

ОСОБЛИВОСТІ ТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА ТЕРАПЕВТИЧНИХ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ У ЛИСТКАХ ВИЩИХ РОСЛИН

Савченко Т.А., Гринюк І.І.

НТУУ «КПІ ім. Ігоря Сікорського», savchenko.timothy@iik.kpi.ua

Вступ. Виробництво моноклональних антитіл у клітинах ссавців передбачає використання поживних середовищ, що містять дороговартісні компоненти, зокрема інсулін [1], у зв'язку із чим значно зростає вартість кінцевої продукції. Використання рослин у якості біологічного агента для експресії білків має ряд переваг: передбачає скорочення витрат, оскільки вони не потребують специфічних та складних умов культивування, рослини вважаються безпечнішими, порівняно з іншими системами експресії, оскільки не виробляють ендотоксинів і не підтримують ріст вірусів чи пріонів, які інфікують людей [2].

Однак, існує проблема у відмінностях механізму посттрансляційного N-глікозилювання білків у рослинах порівняно з N-глікозилюванням білків у ссавців, що негативно впливає на якість експресованих у рослинних організмах моноклональних антитіл.

Метою роботи є дослідження особливостей використання вищих рослин для виробництва терапевтичних моноклональних антитіл.

Матеріали та методи. Дослідження проводилося шляхом аналізу наукової літератури із використанням міжнародних наукометричних баз даних Scopus, National Center for Biotechnology Information, PubMed.

Результати та обговорення. У якості рослинного біологічного агента для експресії моноклональних антитіл широко використовують *Nicotiana benthamiana*, яка має високу трансформаційну здатність [2].

Особливістю процесу N-глікозилювання у клітинах рослин є активність ензимів α 1,3-фукозил трансферази та β 1,3-ксилозил трансферази, що виконують функцію внесення у N-глікани, відповідно, α 1,3-фукози та β 1,3-ксилози, які відсутні у людських глікопротеїнах. У зв'язку із цим, моноклональні антитіла глікозилювані цими цукрами можуть володіти антигенністю та призводити до імунної відповіді при їх потраплянні в організм людини [3]. Зважаючи на це, для отримання терапевтичних моноклональних антитіл у рослинах повинні бути видалені механізми фукозилювання та ксилозилювання, та включена здатність до галактозилювання, для збереження стабільності [4] глікопротеїнів для їхнього застосування у медицині.

У роботі [5] із використанням сучасного підходу «нокауту» генів за допомогою технології модифікації геному CRISPR/Cas9 отримали лінії *Nicotiana benthamiana*, які позбавлені α 1,3-фукозил трансферазної та β 1,3-ксилозил трансферазної активності та не здійснювали N-глікозилювання. При цьому, такі зміни не вплинули на фенотип модифікованих рослин.

Внесення генів, які відповідають за експресію моноклональних антитіл і β 1,3-ксилозил трансферази здійснюють за допомогою вектору *Agrobacterium tumefaciens* у T-ДНК ділянці плазмиди pEAQ-HT *Nicotiana benthamiana* [2].

Для цього застосовували спільну експресію β 1,4-галактозил трансферази і цільового моноклонального антитіла, оскільки експресія генів β 1,4-галактозил

трансферази під час росту рослин може спричиняти відставання у рості та інші негативні фенотипові зміни [6]. Тому, обробку рослин здійснюють після достатнього вегетативного росту. Для цього стебла разом із листками занурюють у суспензію вектору *Agrobacterium tumefaciens*, досягають вакууму в камері та повертають до атмосферного тиску не виймаючи з суспензії, що дозволяє здійснювати рівномірну обробку великої кількості рослин [7]. У роботі [8] було показано, що після внесення залишків β 1,4-галактози при N-глікозилуванні зростала стабільність антитіл, а здатність до зв'язування була такою ж як в антитіл, які отримані з клітин яєчників китайського хом'яка.

Висновки. Отже, технологія отримання терапевтичних моноклональних антитіл у листках вищих рослин полягає в:

– «нокауті» генів, які відповідають за типове рослинне N-глікозилування протеїнів та накопичення калусу генетично модифікованої *Nicotiana benthamiana*;

– отриманні окремих рослин з калусу обробкою фітогормонами;

– вирощуванні рослин та внесенні генів, що кодують цільове антитіло разом із β 1,4-галактозил трансферазою за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*;

– накопиченні моноклональних антитіл у листках рослин, збиранні листків, гомогенізації біомаси, виділенні та очистці готового продукту методами ультрафільтрації та хроматографії.

Така технологія виробництва терапевтичних моноклональних антитіл у клітинах рослин є перспективною з точки зору підвищення стабільності антитіл та зменшення витрат на таке виробництво.

Список використаної літератури:

1. Ritacco F.V., Wu Y., Khetan A. Cell culture media for recombinant protein expression in Chinese hamster ovary (CHO) cells: History, key components, and optimization strategies // *Biotechnology Progress*. Wiley, 2018. Vol. 34, № 6. P. 1407–1426.

2. Alonso A.D. Transient Gene Expression Seeds Plant-Based Bioproduction Systems // *Genetic Engineering & Biotechnology News*. Mary Ann Liebert Inc, 2019. Vol. 39, № 3. P. 54–56.

3. Jin C. et al. A plant-derived human monoclonal antibody induces an anti-carbohydrate immune response in rabbits // *Glycobiology*. Oxford University Press (OUP), 2007. Vol. 18, № 3. P. 235–241.

4. Zhou Q., Qiu H. The Mechanistic Impact of N-Glycosylation on Stability, Pharmacokinetics, and Immunogenicity of Therapeutic Proteins // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Elsevier BV, 2019. Vol. 108, № 4. P. 1366–1377.

5. Jansing J. et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of six glycosyltransferase genes in *Nicotiana benthamiana* for the production of recombinant proteins lacking β -1,2-xylose and core α -1,3-fucose // *Plant Biotechnology Journal*. Wiley, 2018. Vol. 17, № 2. P. 350–361.

6. Tague B.W., Mantis J. & In Planta *Agrobacterium*-Mediated Transformation by Vacuum Infiltration // *Arabidopsis Protocols*. Humana Press. P. 215–224.

7. Schneider J. et al. Characterization of plants expressing the human β 1,4-galactosyltransferase gene // *Plant Physiology and Biochemistry*. Elsevier BV, 2015. Vol. 92. P. 39–47.

8. Strasser R. et al. Improved Virus Neutralization by Plant-produced Anti-HIV Antibodies with a Homogeneous β 1,4-Galactosylated N-Glycan Profile // *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier BV, 2009. Vol. 284, № 31. P. 20479–20485.