

ОСОБЛИВОСТІ ВИБОРУ РОСЛИННИХ ПРОДУЦЕНТІВ ДЛЯ СИНТЕЗУ РЕКОМБІНАНТНИХ ТЕРАПЕВТИЧНИХ БІЛКІВ

Удовенко Ю.Р.¹, Овчаренко О.О.^{1,2}

¹КПІ ім. Ігоря Сікорського, udovenko.julia@iit.kpi.ua

²Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

Abstract

Molecular farming is a promising technology for producing recombinant therapeutic proteins in plants in large volumes without the risk of accumulation of animal pathogens. This paper discusses the advantages and disadvantages of different plant species used for molecular farming, identifying optimal species for the production of recombinant proteins by transient expression, stable nuclear, and chloroplast transformation.

Keywords: *plant molecular farming, transgenic plants, recombinant pharmaceutical proteins.*

Вступ. Використання рослин у якості продуцентів рекомбінантних терапевтичних білків є перспективним напрямком сучасної рослинної біотехнології, адже дозволяє отримувати високий вихід фізіологічно-активного цільового продукту з необхідними пост-трансляційними модифікаціями. До основних переваг рослинних продуцентів також відносять невисоку вартість культивування, можливість масштабування та відносно низький ризик контамінації продукту патогенами тваринного походження або бактеріальними токсинами [1].

Відомо про синтез у організмі рослин ряду терапевтичних білків, а саме моноклональних антитіл, вакцинних антигенів, факторів росту, гормонів, ферментів, цитокінів (зокрема, інтерферонів), тощо.

При розробці технології синтезу терапевтичних білків у рослинах важливу роль займає етап підбору методу трансформації та виду-продуцента. Існує декілька методів генетичної трансформації рослин: стабільна ядерна та хлоропластна (вставка в ядерну та хлоропластну ДНК), транз'єнтна (експресія без вставки гену у геном). Методом, що дозволяє найшвидше отримати рекомбінантний білок, є транз'єнтна експресія, проте, в залежності, від мети створення продуцента та особливостей цільового продукту, часто використовують стабільну трансформацію.

Для оптимальної реалізації біосинтезу рослина-продуцент має відповідати наступним критеріям: мати високу ефективність трансформації, синтезувати стабільний цільовий білок у високій концентрації, мати низький вміст інтерферуючих та токсичних сполук, бути стійким до дії несприятливих біотичних та абіотичних факторів, не потребувати значних витрат на етапі культивування [2].

Мета дослідження – визначити основні переваги та недоліки рослинних продуцентів, особливу увагу приділивши їстівним сільськогосподарським культурам, враховуючи їхні генетичні та фізіологічні особливості.

Матеріали та методи. Для визначення переваг і недоліків продуцентів було проаналізовано значну кількість оригінальних експериментальних статей, а також статей-оглядів з висококвартільних журналів (Q1-Q2). Досліджували

переваги та недоліки представників родин *Leguminosae*, *Poaceae*, *Solanaceae*, *Brassicaceae* як потенційних продуцентів фармацевтичних протеїнів.

Результати та обговорення. Перспективними їстівними рослинами-продуцентами є бобові, злакові, овочеві та фруктові сільськогосподарські культури. Серед видів родини *Leguminosae*, як господарів для виробництва рекомбінантного білка використовували сою (*Glycine max*), горох (*Pisum sativum*), люцерну (*Medicago truncatula*), лядвенець японський (*Lotus japonicus*), сочевицю (*Lens culinaris*), представників родів *Vigna*, *Vicia*, *Phaseolus*.

Головна перевага бобових полягає у їхній здатності до утворення симбіотичних зв'язків з азотфіксуючими бактеріями, тому вирощування цих рослин не потребує значного підживлення добривами, що значно економить витрати на культивування продуценту, крім того високий вміст білку у зернобобових культурах також надає їх перевагу як потенційним господарям фармацевтично цінних білків [3-5]. Але разом з тим активне використання бобових для синтезу терапевтичних білків обмежено рядом факторів: низька ефективність трансформації, ризик потрапляння трансгенних рослин у харчовий ланцюг, стабільна трансформація може спричинити погіршення вегетативного росту та розвитку продуценту тощо. Причинами складності отримання трансгенних рослин бобових можуть бути низьке виживання трансформованих експлантів на етапі селекції. Також можливе утворення химер при неякісно проведених селекції [6]. Проте, попри зазначені складнощі були отримані трансгенні рослини низки видів родини бобових. Відносно високу ефективність трансформації виявили соя, лядвенець японський, люцерна [3, 5]. Ці види характеризуються досить високою регенераційною здатністю (особливо люцерна та лядвенець японський), невеликим розміром геному, що пояснює більшу ефективність отримання трансгенних рослин [3, 5, 6]. Найбільш низьку здатність до генетичної трансформації виявляють представники родів *Vigna* та *Vicia* [6]. Останні мають досить великий геном та низьку ефективність регенерації. Горох та маш мають досить високу швидкість росту, але чутливі до дії несприятливих абіотичних та біотичних факторів, що може негативно вплинути на вихід рекомбінантного білка [3, 5].

Найбільш поширеними продуцентами у групі злакових є пшениця (рід *Triticum*), ячмінь (рід *Hordeum*), кукурудза (*Zea mays*), рис (*Oryza sativa*). Використання злакових у якості продуцентів терапевтичних білків також має ряд переваг: в зерні злакових низька концентрація протеаз, знижений вміст води (забезпечує стабільне та довготривале зберігання білку навіть за кімнатної температури), присутні молекулярні шаперони, відсутні феноли, а при використанні насіння специфічних або індукцибельних промоторів можна уникнути негативного впливу стабільної експресії на вегетативний ріст та розвиток рослини [2]. Генетична трансформація злакових ускладнена через поширену поліплоїдність та відносну стійкість однодольних рослин до агробактеріальної трансформації. Поліплоїдність значно ускладнює вірогідність отримання бажаного фенотипу (можливі негативні ефекти дози генів, у ряді випадків необхідно редагування усіх паралогів гену) [7, 8]. Проблема

нечутливості злакових до агробактеріальної трансформації може бути вирішена шляхом використання високовірулентних штамів *Agrobacterium tumefaciens* зі стандартною (LBA4404 (Ach5), C58C1) або з надекспресією *vir*-генів (AGL та сконструйовані штами AGL0, AGL1, що несуть гіпервірулентну плазмиду T1, рTiBo542 з додатковими *vir*-генами). Ефективність трансформації також може бути збільшена при використанні експлантів з високим вмістом клітин, що знаходяться в активній фазі росту (незрілі зародки) [9]. До мінусів використання деяких злакових культур можна віднести наявність глютену, що обмежує ту частину цільових споживачів, які хворіють на целиацію.

Представники родини пасльонових (*Solanaceae*) характеризуються високою ефективністю генетичної трансформації, таким чином деякі з них (*Nicotiana benthamiana*, *N. tabacum*) є модельними продуцентами. *N. tabacum* часто використовується для ядерної та хлоропластної трансформації, водночас *N. benthamiana* є модельним видом для транз'єнтної експресії з використанням вірусних векторів. Головним недоліком продуцентів з родини пасльонових є наявність алкалоїдів, які можуть ускладнювати процес очистки цільового продукту (особливо, якщо молекулярна маса синтезованого продукту є подібною до молекулярної маси алкалоїдів рослини). Проте, останні дослідження запропонували інших продуцентів, зокрема базилік (*Ocimum basilicum*) для синтезу подібних сполук. Ця їстівна рослина характеризується високим рівнем експресії гетерологічних білків при застосуванні вірусних векторів і водночас позбавлена токсичних алкалоїдів, які можуть ускладнити процес очистки терапевтичного білка [14].

Значний інтерес становить біосинтез терапевтичних білків у їстівних рослинах, зокрема фруктах та овочах оскільки є можливе їх вживання у сирому вигляді або з мінімальною термічною обробкою, відсутність токсинів, можливість вирощування у теплицях. Але спільною проблемою даної групи продуцентів є складність точного дозування [4]. З огляду на органолептичні якості та можливість використання рослин у сирому вигляді найкращими продуцентами у цій групі є банан (проте має низький вміст білку), томат (хоча і містить соланін), перець (недолік – вміст капсаїцину), капуста (складність генетичної трансформації) та салат [10, 11]. Рослини останнього були використані для продукції коліцину М – антимікробного білку (активний проти різних штамів *Escherichia coli*) [12]. Використання картоплі має переваги з огляду на стабільність зберігання продукту, але наявність соланіну та потреба термічної обробки перед вживанням, знижують її цінність як продуцента [2, 8].

Крім перерахованих, перспективним продуцентом є представники родини *Lemnaceae* (роди *Lemna*, *Wolffia*, *Spirodela*). Ці рослини швидко накопичують біомасу, здатні рости на дешевих середовищах, придатні для генетичної трансформації, а також їх можна культивувати у асептичних умовах у біореакторах, що важливо для приведення технології синтезу рекомбінантних терапевтичних білків до вимог GMP [13].

Висновки. Підбір рослинних продуцентів на основі генетичних та фізіологічних особливостей визначає ефективність отримання рослин з бажаними ознаками, вихід рекомбінантних терапевтичних білків та їхню

стабільність, а також обумовлює потребу в очистці кінцевого продукту та ступінь її складності, визначає безпечність при використанні людиною. Ключовими труднощами при використанні їстівних сільськогосподарських рослин є низька ефективність генетичної трансформації (злакові, деякі представники бобових), наявність алергенів/токсичних речовин (представники пасльонових, злакових), небезпека потрапляння трансгенів у навколишнє середовище.

Список використаної літератури:

1. Shanmugaraj B., I. Bulaon C. J., Phoolcharoen W. Plant molecular farming: a viable platform for recombinant biopharmaceutical production. *Plants*. 2020. Vol. 9, no. 7. P. 842. URL: <https://doi.org/10.3390/plants9070842>.
2. Exploring recent progress of molecular farming for therapeutic and recombinant molecules in plant systems / J. K. Bharathi et al. *Heliyon*. 2024. Vol. 10, no. 18. P. e37634. URL: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e37634>.
3. Gene-Editing technologies and applications in legumes: progress, evolution, and future prospects / M. C. Baloglu et al. *Frontiers in Genetics*. 2022. Vol. 13. URL: <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.859437>.
4. Burnett M. J. B., Burnett A. C. Therapeutic recombinant protein production in plants: challenges and opportunities. *PLANTS, PEOPLE, PLANET*. 2019. Vol. 2, no. 2. P. 121–132. URL: <https://doi.org/10.1002/ppp3.10073>.
5. Smýkal P., von Wettberg E. J. B., McPhee K. Legume genetics and biology: from mendel's pea to legume genomics. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21, no. 9. P. 3336. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms21093336>.
6. Nivya V. M., Shah J. M. Recalcitrance to transformation, a hindrance for genome editing of legumes. *Frontiers in Genome Editing*. 2023. Vol. 5. URL: <https://doi.org/10.3389/fgeed.2023.1247815>.
7. Genome editing in cereals: approaches, applications and challenges / W. A. Ansari et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21, no. 11. P. 4040. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms21114040>.
8. Buyel J. F. Product safety aspects of plant molecular farming. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2023. Vol. 11. URL: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1238917>.
9. Facts, uncertainties, and opportunities in wheat molecular improvement / F. Rafiei et al. *Heredity*. 2024. URL: <https://doi.org/10.1038/s41437-024-00721-1>.
10. Gerszberg A. Tissue culture and genetic transformation of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*): an overview. *Planta*. 2018. Vol. 248, no. 5. P. 1037–1048. URL: <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2961-3>.
11. Establishment of a stable, effective and universal genetic transformation technique in the diverse species of *Brassica oleracea* / X. Sheng et al. *Frontiers in Plant Science*. 2022. Vol. 13. URL: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1021669>.
12. Accumulation of colicin M protein and its biological activity in transgenic lettuce and mizuna plants / N. Shcherbak et al. *Frontiers in Plant Science*. 2023. Vol. 14. URL: <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1271757>.
13. Robust agrobacterium-mediated transient expression in two duckweed species (*Lemnaceae*) directed by non-replicating, replicating, and cell-to-cell spreading vectors / A. Peterson et al. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021. Vol. 9. URL: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.761073>.
14. Sindarovska Y., Kuchuk M. Viral-based expression cassettes ensure high level production of recombinant green fluorescent protein (GFP) in sweet basil (*Ocimum basilicum*) plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2023. URL: <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02516-4>.