



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Tina MODRIJAN

**PROIZVODNJA FARMACEVTSKIH UČINKOVIN V
TOBAKU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2019

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Tina MODRIJAN

PROIZVODNJA FARMACEVTSKIH UČINKOVIN V TOBAKU

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij - 1. stopnja

PRODUCTION OF PHARMACEUTICALS IN TOBACCO

B. SC. THESIS
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2019

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študijskega programa prve stopnje Biotehnologija.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje študija biotehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala izr. prof. dr. Natašo Štajner.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednik: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootheniko

Član: izr. prof. dr. Nataša ŠTAJNER
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum predavitve: 8.7.2019

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
- DK UDK 606:61:601.4:577.21:582.930.3(043.2)
- KG tobak, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana*, rekombinantni protein, virusom podobni delci, cepiva
- AV MODRIJAN, Tina
- SA ŠTAJNER, Nataša (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Univerzitetni študijski program prve stopnje Biotehnologija
- LI 2019
- IN PROIZVODNJA FARMACEVTSKIH UČINKOVIN V TOBAKU
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
- OP VIII, 21 str., 2 sl., 58 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Proizvodnja farmacevtskih učinkovin v rastlinah je čedalje pogostejša. »Zeleni bioreaktorji« ponujajo kar nekaj prednosti pred obstoječimi proizvodnimi sistemi: sinteza zelenih učinkovin je hitrejša, cenejša, bolj prilagodljiva in izločuje tveganje za okužbo z različnimi živalskimi patogeni. Prvi eksperimenti z rastlinskimi tkivnimi kulturami so večinoma temeljili na celicah rastlin tobaka. Posledično je bila *Nicotiana tabacum* tudi prva rastlina, ki so jo uspešno regenerirali *in vitro*. Danes tobak predstavlja glavni rastlinski model za proizvodnjo rekombinantnih proteinov. Molekularno kmetovanje je relativno nova tehnologija, ki je prišla v uporabo z namenom proizvodnje cenejših ter lažje dostopnih zdravil v rastlinah. Slednje je posebej pomembno pri še kako potrebnem oskrbovanju razvijajočih se držav z zdravilnimi učinkovinami. Proizvodnja rekombinantnih proteinov v rastlinah lahko poteka s spreminjanjem jedrnega ali plastidnega genoma; mogoča je stabilna ali pa prehodna ekspresija zelenega proteina. Prehodna ekspresija omogoča izredno hitro pridobivanje rekombinantnih proteinov, kar je posebej pomembno za pravočasno ukrepanje ob nenadnih izbruhih epidemij. Konstantno izboljševanje in razvoj novih tehnik za transformacijo rastlin je v tobaku omogočilo sintezo številnih pomembnih rekombinantnih proteinov, protiteles ter drugih molekul, ki se uporabljajo v industriji in medicini.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du1

DC UDC 606:61:601.4:577.21:582.930.3(043.2)

CX tobacco, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana*, recombinant protein, virus-like particles, vaccines

AU MODRIJAN Tina

AA ŠTAJNER, Nataša (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology

PY 2019

TI PRODUCTION OF PHARMACEUTICALS IN TOBACCO

DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)

NO VIII, 21 p., 2 fig., 58 ref.

LA sl

AL sl/en

AB The production of active pharmaceutical ingredients in plants is slowly progressing. »Green bioreactors« offer several advantages over other existing production systems: the synthesis of desired molecules is faster, cheaper, more adaptive, and eliminates the risk of infection with animal pathogens. The first experiments with plant tissue cultures were mainly based on tobacco cells, therefore *Nicotiana tabacum* was also the first plant to be successfully regenerated *in vitro*. Today, tobacco remains the main plant model for the production of many different recombinant proteins. Plant molecular farming is a relatively new technology that has come to use in order to obtain more affordable and more widely available medicine. The latter is especially important when it comes to providing medicine for developing countries. The production of recombinant proteins in plants is carried out by successfully changing the genome of the transformant's nucleus or plastid; the expression of the desired protein can be stable or transient. Transient expression allows for an extremely fast production of the required protein, which can play a crucial role in the event of a sudden epidemic outbreak. Continuous improvement and constant development of new plant transformation methods have made the production of many important recombinant proteins, antibodies, and other molecules in tobacco possible.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VII
1 UVOD	1
2 TOBAK	1
3 MOLEKULARNO KMETOVANJE	3
4 EKSPRESIJSKI SISTEMI V TOBAKU	3
4.1 JEDRO	4
4.2 KLOROPLASTI	5
4.3 PREHODNA EKSPRESIJA	5
5 PRIMERI SINTEZE FARMACEVTSKIH UČINKOVIN V TOBAKU	7
5.1 ZMAPP	7
5.2 GRIFFITHSIN	9
5.3 ARTEMIZININ	10
5.4 VIRUSOM PODOBNI DELCI	12
5.4.1 Sinteza VLP	12
5.4.2 Protivirusna VLP cepiva	14
5.4.2.1 Virus influenza	14
5.4.2.2 Hepatitis B	14
5.4.2.3 Humani papiloma virus	15
6 ZAKLJUČEK	16
7 VIRI	16

KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Postopek agroinfiltracije rastlinskega tkiva (Pawar in sod., 2016).	6
Slika 2: ZMapp je mešanica treh mAb (c13C6 iz MB-003 in dveh himernih mAb, c2G4 ter c4G7, ki izvirata iz ZMab), ki so bila z metodo magnifekcije proizvedena v tobaku. Infiltracija tobaka se izvaja v vakuumu ob prisotnosti delcev živega srebra. Listi rastline se namakajo v mediju, ki vsebuje z virusnimi vektorji transformirane kulture <i>Agrobacterium</i> . Po sedmih dneh infiltracije se listi rastline zmeljejo v ekstrakcijskem pufri. Sledijo postopki čiščenja protiteles (filtracija, kromatografija, ultrafiltracija), ki se nato shranjujejo v steklenih vialah na -80°C (Chen in sod., 2016; Budzianowski, 2015).	9

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CaMV	Virus mozaika cvetače (angl. Cauliflower mosaic virus)
CTB	Podenota B toksina kolere (angl. Cholera toxin B)
DNK	Deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
ER	Endoplazemski retikulum (angl. endoplasmic reticulum)
RNK	Ribonukleinska kislina (angl. ribonucleic acid)
TMV	Virus mozaika tobaka (angl. Tobacco mosaic virus)
AMV	Virus mozaika lucerne (angl. Alfalfa mosaic virus)
PVX	Virus X krompirja (angl. Potato virus X)
Ti-plazmid	Tumor inducirajoči plazmid (angl. tumor inducing plasmid)
T-DNK	Prenašalna DNK (angl. transfer-DNA)
HIV	Humani imunodeficientni virus (angl. Human immunodeficiency virus)
VLP	Virusom podobni delci (angl. virus-like particles)
HPV	Humani papiloma virus (angl. Human papillomavirus)
HBV	Virus hepatitisa B (angl. Hepatitis B virus)
EBOV	Virus ebola (angl. Ebola virus)
rVSV-ZEBOV	Rekombinantno cepivo proti Zaire vrsti virusa ebola (angl. Recombinant vesicular stomatitis virus-Zaire Ebola virus)
mAb	Monoklonsko protitelo (angl. monoclonal antibody)
IgG	Imunoglobulin G (angl. immunoglobulin G)
GP	Glikoprotein (angl. glycoprotein)
LD ₅₀	Povprečni smrtni odmerek (angl. median lethal dose)
c13C6	Monoklonsko protitelo, ki sestavlja ZMapp (angl. monoclonal antibody comprising ZMapp)
c2G4	Monoklonsko protitelo, ki sestavlja ZMapp (angl. monoclonal antibody comprising ZMapp)
c4G7	Monoklonsko protitelo, ki sestavlja ZMapp (angl. monoclonal antibody comprising ZMapp)
AIDS	Sindrom pridobljene imunske pomanjkljivosti (angl. acquired immune deficiency syndrome)
GRFT	Griffithsin
cDNK	Komplementarna DNK (angl. complementary DNA)
ACT	Kombinatorne terapije, ki temeljijo na artemizininu (angl. artemisinin based combination therapy)

<i>kelch13</i>	Gen, na katerem se razvije odpornost na antimalarike (angl. gene responsible for the development of resistance to antimalarials)
COSTREL	Kombinatorna supertransformacija transplastomskih recipientnih linij (angl. combinatorial supertransformation of transplastomic recipient lines)
ALDH1	Aldehid dehidrogenaza 1 (angl. aldehyde dehydrogenase 1)
DXR	1-deoksi-D-ksiluloza-5-fosfat reduktoizomeraza (angl. 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase)
BeYDV	Virus rumenja in pritlikavosti fižola (angl. Bean yellow dwarf virus)
HA	Hemaglutinin (angl. hemagglutinin)
NA	Neuraminidaza (angl. neuraminidase)
H5N1	Subtip virusa influence A (angl. Influenza A virus subtype)
HBsAg	Površinski antigen virusa hepatitisa B (angl. Hepatitis B surface antigen)
HBcAg	Antigen virusne sredice hepatitisa B (angl. Hepatitis B core antigen)
<i>nptII</i>	Gen za selekcijski marker (angl. selection marker gene)
L1 proteini	Sestavni proteini kapside humanega papilomskega virusa (angl. Human papillomavirus major capsid protein)
CsCl	Cezijev klorid (angl. cesium chloride)

1 UVOD

Svetovna potreba po rekombinantnih proteinih se iz leta v leto veča. Le-ta obsega pomembne farmacevtske proteine (npr. protitelesa, cepiva) ter tudi različne industrijske encime in sekundarne metabolite. Tradicionalni rekombinantni proizvodni sistemi temeljijo na bakterijskih in živalskih celičnih kulturah, katerih uporaba je omejena predvsem pri proizvodnji v večjem merilu, prav tako pa je velik tudi sam strošek proizvodnje (dragi fermentacijski bioreaktorji in »downstream« procesiranje) (Tremblay in sod., 2010).

Potrebni pogoji za gojenje rastlin, v primerjavi s tradicionalnimi sistemi celičnih kultur, niso zahtevni ali dragi, kar dovoljuje relativno poceni in skoraj neomejeno večanje proizvodnje rekombinantnih molekul (Tremblay in sod., 2010). Rastline uspešno izvajajo večino post-translacijskih modifikacij, ki so pomembne za učinkovito delovanje evkariontskih proteinov. Poleg tega pa omogočajo tudi veliko fleksibilnost v sami bioproizvodnji proteinov, ki zahteva konstantno prilagajanje količine proizvoda, cene, varnosti in regulatornih ukrepov. S pomočjo »zelenih bioreaktorjev« je mogoče pridobiti tudi več kilogramov rekombinantnih proteinov za relativno ugodno ceno (Xu in sod., 2012). Ker rastline niso dovzetne za humane in živalske patogene, je tako proizvodnja varnejša tudi za končne prejemnike učinkovine (Xu in sod., 2011).

Za vzpostavitev »zelenih bioreaktorjev« bi lahko zbirali med številnimi rastlinskimi vrstami, kjer ima vsaka svoje prednosti in slabosti. Vsekakor rastline iz rodu tobak (*Nicotiana*), kot sta *Nicotiana tabacum* in njena bližnja sorodnica *Nicotiana benthamiana*, predstavljajo ključne rastlinske modele za proizvodnjo rekombinantnih proteinov in razvoj transformacijskih tehnologij v rastlinah (Tremblay in sod., 2010; Rao in sod., 2009).

Molekularno kmetovanje predstavlja relativno novo vejo rastlinske biotehnologije, kjer se rastline izkorišča za množično proizvodnjo rekombinantnih farmacevtskih ter industrijskih proteinov (Obeme in sod., 2011). Tehnologija se zanaša na enake metode, ki se uporabljajo tudi za proizvodnjo gensko spremenjenih organizmov, torej gre za umetno vnašanje genov v rastlino. Veliko cepiv, protiteles in drugih terapevtskih molekul, ki so bili sintetizirani s pomočjo rastlin, kot so tobak, koruza, krompir in korenje, se že pojavlja na trgu, oziroma so v zadnji fazi kliničnih študij (Eisenach, 2011).

2 TOBAK

Tobak (*Nicotiana tabacum*) je naravni alotetraploid ($2n=48$), ki naj bi nastal s hibridizacijo dveh diploidnih prednikov *N. sylvestris* in *N. tomentosiformis*, pred približno 6 milijoni let (Okumara in Goldberg, 1985). Generacijski čas rastline, v katerem lahko proizvede tudi do milijon semen, znaša približno tri mesece (Ganapathi in sod., 2004). Poznanih je veliko kultivarjev tobaka, vendar je bilo do danes največ preizkusov narejenih na manjšem,

laboratorijskem SR1 kultivarju. Večji kultivarji tobaka so primernejši za komercialno proizvodnjo, saj so žlahtnjeni z namenom večje produkcije biomase, hitre prilagoditve na spreminjajoče se okolje ter odpornosti na škodljivce (Rymerson in sod., 2002).

Tobak nekateri poimenujejo tudi »bela miš« rastlinskega sveta, saj je, zaradi svoje visoke dovzetnosti za genetske spremembe, v zadnjih treh desetletjih postal ena izmed najbolj uporabljenih rastlin za proizvodnjo rekombinantnih proteinov (Tremblay in sod., 2010). Tobak predstavlja ključen rastlinski model za razvoj transformacijskih tehnologij ter za proučevanje stabilnosti transgenov (Rao in sod., 2009). *In vitro* študije s tkivnimi kulturami *N. tabacum*, ki so bile izpostavljene različnim fizikalnim in kemijskim faktorjem, so omogočile znanstvenikom vpogled v rast in diferenciacijo rastlin. Indukcija haploidov ter selekcija mutiranih celičnih linij, sta na račun poskusov na tej vrsti tobaka, postali zelo uporabni metodi. Prav tako so bili z uporabo tobačnih tkivnih kultur prvič uspešno izvedeni poskusi somatske hibridizacije ter študije izolacije, gojenja in regeneracije rastlin iz protoplastov. Vsi prvi eksperimenti, ki so temeljili na transformaciji rastlin, ekspresiji in stabilnosti genov, so bili izvedeni na tobaku. Trenutno pa se rastlina uporablja predvsem za proizvodnjo številnih rekombinantnih proteinov, protiteles in drugih molekul, ki se uporabljajo v medicini in industriji (Ganapathi in sod., 2004).

Veliko razširjenost uporabe tobaka bi lahko pripisali dejstvu, da je bila *N. tabacum* prva rastlinska vrsta, ki so jo uspešno regenerirali *in vitro*, prav tako pa je bila uporabljena za razvoj prvega standardiziranega gojišča za delo z rastlinskimi tkivnimi kulturami (Rao in sod., 2009). Uporaba tobaka v eksperimentalne namene je zelo razširjena tudi zato, ker rastlina ni namenjena za uživanje (Rymerson in sod., 2002).

Bližnja sorodnica *N. tabacum* je *N. benthamiana*. Ta predstavlja enega izmed najpomembnejših rastlinskih modelov na področju rastlinske virologije, saj jo lahko uspešno okuži veliko število različnih virusov ter drugih patogenih agensov (bakterije, oomicete, glive, ipd.). Posledično ima omenjena vrsta ključno vlogo tudi pri proučevanju interakcij med gostiteljem in patogenom (Goodin in sod., 2008).

Čeprav je bila uporaba tobaka primarno namenjena za druge aplikacije, se je rastlina kmalu izkazala za zelo uporabno v proizvodnih sistemih, ki so bili namenjeni produkciji biomase ter ekstrakciji proteinov. Ti sistemi so temeljili na zelo gosti zasaditvi rastlin (100.000 rastlin/ha) ter številnih žetvah, ki so sledile, ko so porezane (požete) rastline ponovno zrastle. Pod takšnimi pogoji je mogoče po 40 dneh od zasaditve rastlin, pridobiti 50.000 kg/ha sveže biomase tobaka (Woodleif in sod., 1981). Woodleif in sod. (1981) v študiji navajajo, da je količina topnih proteinov predstavljala od 2,3 % do 2,8 % celotne biomase tobaka. Ko so bila iz preračuna izključena stebela, so koncentracije dosegale tudi 9,8 %. Količina ekstrahiranih proteinov je bila sicer odvisna od leta proizvodnje ter od časa žetve rastlin, ni pa se bistveno razlikovala med tremi proučevanimi kultivarji tobaka.

3 MOLEKULARNO KMETOVANJE

Molekularno kmetovanje je tehnologija, ki izkorišča rastline za proizvodnjo velikih količin rekombinantnih proteinov. Slednje vključuje tudi sintezo pomembnih farmacevtskih učinkovin in industrijskih proteinov. Proizvodnja takšnih učinkovin v rastlinah je lažja in bolj zanesljiva v primerjavi s konvencionalnimi postopki; stroški povezani z vzdrževanjem, zagotavljanjem varnosti, shranjevanjem in transportiranjem učinkovin, ki so proizvedene v živalskih ali mikrobnih celičnih kulturah, naj bi bili za 80 % večji, kot če so le-te proizvedene v rastlinah (Eisenach, 2011).

Molekularno kmetovanje temelji na dovzetnosti rastlin za genetske spremembe in je bilo prvič demonstrirano v začetku osemdesetih let (Bevan in sod., 1983). Prvi farmacevtski rekombinantni protein (človeški rastni hormon) in prvo rekombinantno protitelo (izraženo v potomcih križanja dveh posameznih transgenih rastlin, ki sta sintetizirali enojno imunoglobulinsko gama ali kapa verigo) sta bila proizvedena v tobaku že leta 1986 oz. 1989 (Barta in sod., 1986; Hiatt in sod., 1989). Prvi rekombinantni protein (avidin), uporabljen za komercialne namene, pa je bil proizveden v transgeni koruzi šele leta 1997 (Hood in sod., 1997). Vsi ti primeri so služili kot dokaz, da se rastline lahko spremeni v bioreaktorje za sintezo rekombinantnih proteinov. Tako se je v rastlinah skozi leta začelo producirati čedalje bolj kompleksne funkcionalne proteine s terapevtsko funkcijo (npr. različni humani serumski proteini, rastni regulatorji, protitelesa, cepiva, hormoni, citokini ter encimi) (Liénard in sod., 2007). Vsi ti dosežki so bili mogoči zato, ker so rastline zmožne opraviti nujne post-translacijske modifikacije, ki so potrebne za pravilno zvitje proteinov ter za posledično uspešno vzdrževanje njihove strukturne in funkcionalne integritete (Obembe in sod., 2011).

Danes se molekularno kmetovanje uporablja tudi z namenom, da bi se zagotovilo cenejša in lažje dostopna zdravila ter cepiva v državah, kjer so le-ta najbolj potrebna. Vsekakor pa se je izkazalo, da je to dokaj težka naloga. Poleg zelo nizkega splošnega odobravanja gensko spremenjenih rastlin, je tudi zanimanje za investiranje v takšno tehnologijo, zelo majhno; farmacevtske združbe bi bile z nadaljnjim razvojem proizvodnje rekombinantnih proteinov v rastlinah primorane popolnoma spremeniti svoje trenutne produkcijske metode. Kljub temu pa tehnologija molekularnega kmetovanja vsekakor počasi napreduje, še posebej v Združenih državah Amerike, in naj bi do leta 2025 dosegla globalno vrednost okoli 80 milijard ameriških dolarjev (Eisenach, 2011).

4 EKSPRESIJSKI SISTEMI V TOBAKU

Ena izmed večjih prednosti sinteze rekombinantnih proteinov v tobaku je raznolikost ekspresijskih strategij, ki se lahko uporabijo za izražanje želenega gena ali genov. Stabilna transformacija jedra lahko zadosti dolgotrajnim potrebam po avtentičnih glikoproteinih, kot so protitelesa. Po drugi strani pa je z ekspresijo, ki je vezana na kloroplaste, mogoče proizvesti

velike količine proteinov, ki zahtevajo minimalno število post-translacijskih modifikacij. Če pa je potrebno produkte hitro spreminjati (cepiva za različne oblike grip), lahko s prehodno ekspresijo dosežemo zadostne količine zelenega proteina v razmeroma kratkem času (Tremblay in sod., 2010).

4.1 JEDRO

Spreminjanje jedrnega genoma v tobaku najpogosteje poteka preko infekcije rastlinskih izsečkov z *Agrobacterium tumefaciens* ali z biolističnim vnosom gena. Stabilna integracija genov v jedrni genom omogoča kontinuirano produkcijo rekombinantnega proteina z relativno malo potrebnega dodatnega dela, kar pomeni olajšano proizvodnjo in znižanje stroškov le-te. Proteini, ki se izrazijo na tak način, so deležni tipičnih evkariontskih post-translacijskih modifikacij in se nato lahko shranjujejo v različnih organelih ali pa se izločajo iz celice (Tremblay in sod., 2010).

Večji problem pri jedrni ekspresiji predstavlja relativno majhna akumulacija rekombinantnih proteinov. Obstaja sicer nekaj postopkov, s katerimi je mogoče izboljšati izražanje genov: uporaba močnih konstitutivnih/tkivno specifičnih promotorjev (npr. 35S promotor cvetačnega mozaičnega virusa (CaMV)), uporaba 5' ojačevalnih sekvenc za izboljšanje translacije ali modifikacija 3' neprevedene regije za izboljšanje stabilnosti prepisanih kopij, itd. Pogosta je tudi uporaba sub-celularnih lokalizacijskih signalnih proteinov, ki omogočajo razvrščanje rekombinantnih proteinov na točno določena sub-celularna mesta, z namenom preprečevanja proteolitičnega razpada (Streatfield, 2007). Najpogosteje se proteine preusmerja v endoplazemski retikulum (ER). Po sekreciji v Golgijev aparat se proteini vrnejo v ER, kjer nizka proteolitična aktivnost ter dodatna kompleksna zvijanja molekul omogočajo večjo akumulacijo proteinov. Še ena izmed metod za akumulacijo rekombinantnih proteinov je uporaba fuzijskih partnerjev, ki lahko izboljšajo stabilnost proteinov ali njihovo odpornost na proteolizo. Eden takšnih je na primer elastinu podoben polipeptid, ki poleg skoraj dvakrat večje akumulacije omogoča tudi lažje »downstream« procesiranje proteinov pri tobaku. Fuzijski partnerji, ki povečajo stabilnost in imunogenost, so posebej učinkoviti v tobaku, ko je željen izolant nestabilen peptidni antigen. Najpogosteje se v takšnih primerih uporablja netoksična podenota B toksina kolere (CTB). CTB okrepi stabilnost vezanih antigenov, tako da povzroči nastanek pentamerne strukture, ki je odporna na proteolizo. Opisana metoda je omogočila proizvodnjo tudi v primeru nestabilnih peptidnih antigenov, ki je bila sicer zaradi majhne velikosti peptidov v tobaku nemogoča (Tremblay in sod., 2010).

Uporaba rastlinskih bioreaktorjev je omejena tudi pri proizvodnji terapevtskih glikoproteinov. Tobak lahko generira kompleksne glikoproteine, vendar ti vsebujejo za rastline specifične glikane. Glavni problem predstavlja adicija α -1,3-fruktoznih in β -1,2-ksiloznih ostankov, ki pri gostitelju lahko povzročijo aktivacijo imunskega sistema. V nekaterih primerih, kjer naj bi protitelesa delovala kot antigeni, pa je to celo koristno. Nezaželena adicija rastlinskih glikanov

lahko povzroči tudi sintezo neefektivnega ali celo škodljivega glikoproteina, vendar pa je razvitih že kar nekaj tehnik, s katerimi se lahko pridobijo bolj avtentični glikoproteini (Tremblay in sod., 2010).

4.2 KLOROPLASTI

Kloroplasti tobaka vsebujejo krožni genom, ki je velik okoli 156 kbp in je v rastlinski celici prisoten v velikem številu kopij (Gao in sod., 2016); okoli 60 kopij kloroplastnega genoma je prisotnih v vsakem plastidu in 50-60 kloroplastov je prisotnih v vsaki listni celici (Bogorad, 2000). Plastidi imajo aktiven homologni rekombinantni sistem, kar olajša natančno integracijo klonirane DNK ter njeno pomnoževanje v genomih plastidov. Katerikoli gen, ki se bo uspešno vključil v kloroplastni genom, bo posledično v posamezni celici prisoten v tisočih kopijah. Slednje omogoča pridobivanje velike količine rekombinantnega proteina (Reymerson in sod., 2002).

Pridobivanje velike količine proteina predstavlja glavno prednost transformacije kloroplastov pred transformacijo jedra. Transplastomska tehnologija pa ima tudi druge prednosti. Izključno maternalno dedovanje kloroplastnih genov onemogoča razširjanje transgenov preko cvetnega prahu in tako olajša zeleno nadzorovano razširjanje rastline. V plastidu se lahko želeni integrirani geni izražajo skupaj ali pa posamezno, kar predstavlja možnost za inženiring veliko novih biokemijskih poti v transgenih rastlinah. Prav tako je lokacija insercije transgenov predvidljiva, ekspresija le-teh pa je tudi enotna v vseh posamezno transformiranih linijah (Reymerson in sod., 2002).

Glavna omejitev produkcije proteinov v kloroplastih je – enako kot pri bakterijah – glikozilacija, ki je nujno potrebna pri proizvodnji večine farmacevtskih proteinov (Tremblay in sod., 2010). Sinteza učinkovitih glikoproteinov je sicer mogoča, saj so glikani prisotni tudi v kloroplastih, vendar je za to potrebno vključiti številne dodatne korake iz glikanske adicijske/modifikacijske poti (Fettke in sod., 2004).

4.3 PREHODNA EKSPRESIJA

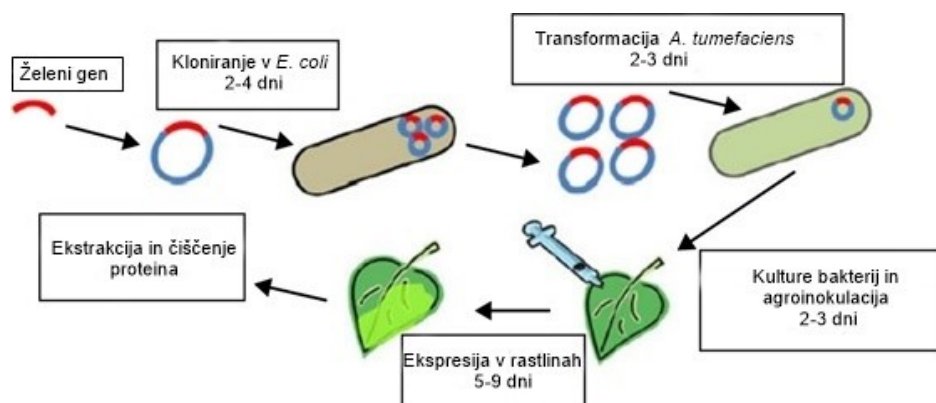
Do prehodne ekspresije heterolognih proteinov pride, ko se vnesen gen v rastlinski celici ne vgradi stabilno v genom. Geni se izražajo le kratek čas, dokler gostiteljska celica ne prepozna tuje DNK in jo uniči (Reymerson in sod., 2002).

Prehodna ekspresija v tobaku omogoča hitro sintezo zelenega proteina, kar je predvsem pomembno pri ustreznem odzivu na nenadne izbruhe bolezni, kot je gripa, ali pri zdravljenju raka, ki je specifično za posameznega pacienta. Samo po nekaj dneh od infekcije rastline, se lahko generira in izolira signifikantna količina rekombinantnega proteina. To omogoča tudi hitro analizo in spreminjanje sintetiziranega proteina, česar pri stabilni transformaciji ni mogoče doseči (Tremblay in sod., 2010). Številne metode, kot so elektroporacija, biolistika,

mikroinjiciranje, magnifekcija, virusni vektorji ter infiltracija z *Agrobacterium* omogočajo indukcijo prehodnega izražanja genov. Zadnje tri naštetih metode se najpogosteje uporabljajo za aplikacije molekularnega kmetovanja (Rymerson in sod., 2002).

Rastlinski RNK virusi, kot so virus mozaika tobaka (TMV), virus mozaika lucerne (AMV) ter virus X krompirja (PVX), se najpogosteje uporabljajo za doseganje ekspresije rekombinantnih proteinov. Želeni gen je v virusni genom lahko vnesen pod nadzorom dodatne kopije subgenomskega promotorja za protein virusnega plašča, a se te sekvence pogosto zelo hitro izbrišejo iz virusa. Pomanjkljivost opisanih vektorjev je v omejeni velikosti gena za želeni protein ter možnost hitre razširitve virusov na mnogo drugih gostiteljev. Glavna prednost prehodne ekspresije genov z virusnimi delci pa je zelo hitra proizvodnja rastlinske biomase, ki izraža rekombinantni protein (dva tedna proti trem ali štirim mesecem pri stabilni transformaciji) ter velike količine proizvedenih proteinov (v obsegu mg/g listnega tkiva). Virusni vektorji se pogosto uporabljajo pri proizvodnji podenotnih cepiv (Rymerson in sod., 2002).

Prehodna transformacija tobaka pogosto poteka tudi z vakuumsko infiltracijo listov rastline z *A. tumefaciens*, ki na tumor inducirajočem (Ti) plazmidu nosi zapis za želen heterologni gen. Takšna tehnika vnosa genov se imenuje agroinfiltracija. Pri postopku agroinokulacije pa inokulacija kultur rastlinskih celic poteka s pomočjo igle (Slika 1) (Canto, 2016). Po infekciji rastlinske celice z bakterijo, se geni na kopijah T-DNK, ki se nahaja na Ti-plazmidu, začnejo prepisovati in prevajati že 24 ur po infiltraciji, kar vodi v hitro akumulacijo rekombinantnih proteinov (Rymerson in sod., 2002). Vaquero in sod. so leta 1999 s postopkom vakuumske infiltracije z *Agrobacterium* poskusili izraziti tumor-specifični antigen v rastlinah tobaka. Celoten antigen jim je uspelo sestaviti s simultano infiltracijo listov tobaka z dvema različnima, neodvisnima vrstama *Agrobacterium*, ki sta vsebovali težko ali lahko verigo protitelesa. Zanimivo je, da se nobena izmed verig sama v rastlini ni uspešno akumulirala, medtem ko se je pri dvojni infiltraciji tobaka popolnoma sestavljeno protiteleso akumuliralo tudi do 1 mg/kg sveže mase listov.



Slika 1: Postopek agroinfiltracije rastlinskega tkiva (Pawar in sod., 2016).

Obetavno tehnologijo za transformacijo rastlin predstavlja tudi magnifekcija, ki omogoča preprosto ter neomejeno ekspresijo rekombinantnih proteinov v rastlinah. Postopek magnifekcije se zanaša na prehodno amplifikacijo virusnih vektorjev, ki so vneseni v različne dele rastline z agrobakterijami. Bakterije poskrbijo za uspešen vnos virusnega vektorja v rastlino, medtem ko sam virusni delec poskrbi za širjenje ter ekspresijo gena za vneseni rekombinantni protein v rastlinskih celicah. Ta eklektična tehnologija združuje prednosti treh bioloških sistemov: sposobnost učinkovitega, systemskega vnosa vektorjev preko *Agrobacterium*, hitrost in visoke ekspresijske sposobnosti virusov ter cenovno ugodno uporabo rastlin in njihovo sposobnost post-translacijskih modifikacij proteinov. Uporaba magnifekcije je cenovno zelo učinkovita, hitra (v 3-4 tednih je mogoče pridobiti tudi do več gramov rekombinantnega proteina) in varna. Metoda omogoča sintezo velike količine rekombinantnih proteinov (do 5 g proteina na kilogram sveže mase listov) ter visok izkoristek (želeni protein lahko predstavlja tudi do 80 % vseh izoliranih topnih proteinov), ki naj bi bil 10-krat večji kot pri tradicionalnih metodah (Gleba in sod., 2005).

Biolistično bombardiranje listov z nukleinskimi kislinami v plazmidu, ki kodirajo tarčne gene ali pa v obliki linearne DNK oziroma RNK, omogoča vnos omenjenih molekul v epidermalne, trihomske ter tudi v mezofilne celice rastline. Tu se nato vstavljeni geni izražajo prehodno. Naprave za bombardiranje vnesejo v rastlino kroglaste delčke iz volframa ali zlata, na katere so nanešene nukleinske kisline, z obstreljevanjem le-te pri povišanem tlaku (okoli 3 bar). Velik problem predstavljajo mehanske poškodbe rastlinskega tkiva, ki jih povzročajo omenjeni delci. Posledično transformacijo preživi le nekaj rastlinskih celic. Obseg poškodbe tkiva in števila celic, ki bodo izražale vstavljene gene je odvisen od parametrov, kot so tip uporabljene pištole za bombardiranje, čvrstost rastlinskih listov, oddaljenost naprave od površine listov, tip kroglastega delčka ter tlak, pod katerim se obstreljuje rastlinsko tkivo (Canto, 2016).

5 PRIMERI SINTEZE FARMACEVTSKIH UČINKOVIN V TOBAKU

Tobak se je v preteklosti izkazal kot zelo učinkovit bioreaktor za proizvodnjo farmacevtsko pomembnih proteinov (Tremblay in sod., 2010). Pomembnejše, že uspešno sintetizirane farmacevtske učinkovine v tobaku predstavljajo himerna monoklonska protitelesa, ki so vodila do razvoja zdravila ZMapp proti virusu ebola, protein griffithsin, ki preprečuje okužbe s humanim imunodeficientnim virusom (HIV), učinkovina artemizinin zoper povzročitelja malarije, virusom podobni delci (VLP) za sintezo cepiv proti humanem papiloma virusu (HPV), hepatitisu B (HBV) in virusu influence.

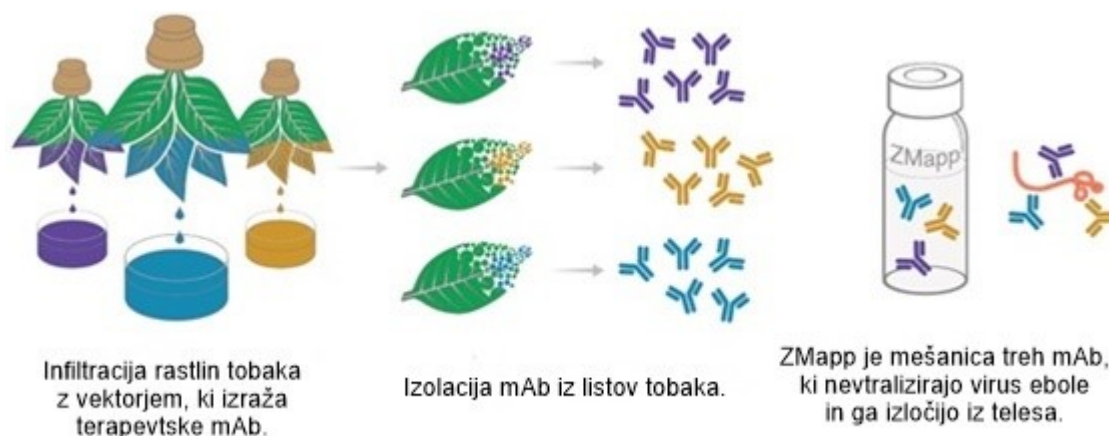
5.1 ZMAPP

Ebola je smrtno nevarna bolezen, ki jo povzroča virus ebola (EBOV). Licenciranih cepiv proti eboli po podatkih WHO na trgu še ni, čeprav se trenutno testira mnogo poskusnih cepiv in potencialno uporabnih terapij. Trenutno ima za namene t.i. »sočutne uporabe« dovoljenje

cepivo rVSV-ZEBOV, ki se je izkazalo za učinkovito in varno proti Zaire vrsti virusa ebola (WHO, 2018).

Med izbruhom ebole v letu 2014, je bila eksperimentalna učinkovina, imenovana ZMapp, administrirana sedmim prostovoljcem, med katerimi je pet oseb ozdravelo. Klinične študije za ZMapp trenutno še potekajo. Gre za mešanico treh himernih monoklonskih protiteles (mAb) razreda IgG, ki so proizvedena v *N. benthamiana* (Slika 2). mAb se vežejo na tri različne epitope glikoproteina (GP) virusa ebola. GP virusu omogoča uspešno integracijo v celico, poleg tega predstavlja tudi glavni antigen virusa in posledično glavno tarčo pri razvoju cepiv ter protiteles (Budzianowski, 2015).

Med izbruhom ebole leta 1995 v Demokratični republiki Kongo, je bila na osmih obolelih osebah opravljena transfuzija krvi, katero je darovalo pet že ozdravljenih oseb. Izmed osmih pacientov je le en izgubil življenje. Opisani dogodek je služil kot glavni povod za začetek uporabe terapije s protitelesi - za zdravljenje ebole tudi po okužbi. Od takrat je bilo sintetiziranih veliko protiteles, ki prepoznavajo različne epitope virusa. Odkrili so, da je za zagotovitev primerne zaščite potrebna mešanica točno treh protiteles. Selekcija protiteles, ki so bila s hibridomsko tehnologijo pridobljena v miših in nato v večjem merilu proizvedena v *N. benthamiana*, je vodila do nastanka dveh protitelesnih mešanic (ZMab in MB-003). Za nadaljnjo izdelavo superiornega terapevtika je bila določena komponenta mešanice MB-003, ki je v morskih prašičkih nudila najboljšo zaščito. Ta je bila nato preizkušena v različnih kombinacijah z dvema ZMab komponentama. Tako nastale kombinacije (ZMapp 1, ZMapp 2 ter ZMapp 3) so bile preizkušene na morskih prašičkih, katerim je bilo dozirano 1000 x LD₅₀ EBOV ter 5 mg preskusih protiteles, ter na opicah vrste *Rhesus*, katerim so bile intramuskularno, na tri dni, injicirane tri doze mešanice s 50 mg/kg učinkovine. Najboljša kombinacija protiteles (ZMapp 1) je po petih dneh od infekcije uspešno zaščitila 100 % opic. Izbrana ZMapp mešanica je bila tekom izbruha ebole leta 2014 izjemoma uporabljena na sedmih okuženih osebah, med katerimi sta na koncu dve umrli. Uporabljeni glikozilacijski mutanti *N. benthamiana* za sintezo protiteles so bili pridobljeni preko tehnologije RNK interference. Mutanti so sintetizirali humanizirane N-glikane s terminalnim N-acetoglukozaminom in ne tipične rastlinske, močno imunogene ksilozne in fukozne epitope (Budzianowski, 2015).



Slika 2: ZMapp je mešanica treh mAb (c13C6 iz MB-003 in dveh himernih mAb, c2G4 ter c4G7, ki izvirata iz ZMab), ki se z metodo magnifekcije proizvajajo v tobaku. Infiltracija tobaka se izvaja v vakuumu ob prisotnosti delcev živega srebra. Listi rastline se namakajo v mediju, ki vsebuje z virusnimi vektorji transformirane kulture *Agrobacterium*. Po sedmih dneh infiltracije se listi rastline zmeljejo v ekstrakcijskem pufru. Sledijo postopki čiščenja protiteles (filtracija, kromatografija, ultrafiltracija), ki se nato shranjujejo v steklenih vialah na -80°C (Chen in sod., 2016; Budzianowski, 2015).

5.2 GRIFFITHSIN

Humani imunodeficientni virus (HIV) pri okuženi osebi lahko povzroči nastanek sindroma pridobljene imunske pomanjkljivosti (AIDS), ki velja za zadnjo ter najnevarnejšo stopnjo okužbe s HIV. HIV napade imunski sistem prizadete osebe, ki je posledično bolj dovzetna tudi za druge oportunistične okužbe in rakava obolenja. Virus uničuje predvsem CD4 T celice, ki imajo pomembno vlogo pri uravnavanju pridobljenega imunskega sistema; med drugim so esencialne tudi pri sintezi protiteles. Ko okužba napreduje v AIDS, število CD4 celic pade pod 200 celic/mm^3 krvi (osebe z zdravim imunskim sistemom imajo od 500 do $1.600 \text{ CD4 celic/mm}^3$ krvi). Brez zdravljenja se življenjska doba okuženih, ki so napredovali v stopnjo AIDS, skrči na 3 leta, ob nastopu oportunistične okužbe pa na 1 leto. Za zdaj zdravilo za HIV še ni poznano, obstajajo le protiretrovirusne terapije, ki ne uničijo virusa, ampak omogočajo okuženi osebi daljše ter boljše življenje (HIV.gov, 2017).

Najučinkovitejše aktivne komponente mikrobicidov, ki se uporabljajo za preprečevanje okužb s spolno prenosljivim HIV, so protiretrovirusne učinkovine, ki neposredno onemogočajo vstop virusa v celice in tako preprečujejo okužbo mukoznih površin. Najobetavnejše protiretrovirusne učinkovine so biološkega izvora, ki pa so izredno drage za proizvodnjo. Med njih sodi tudi griffithsin (GRFT) (O'Keefe in sod., 2009). GRFT je 121 aminokislinski dolgi lektin, ki je bil prvič identificiran v rdečih algah *Griffithsia* sp. (Mori in sod., 2005).

Lektini prepoznajo manozne glikane glikoproteinov (gp120) na površini ovojnice HIV, se na njih vežejo ter preprečijo virusu vstop v celico. Glikani ščitijo pomembne proteinske domene ovojnice virusa pred nevtralizirajočimi protitelesi, prav tako pa olajšujejo okužbo Langerhansovih ter dendritičnih celic (Hladik in sod., 2007). GRFT velja za najmočnejšo proti

HIV učinkovino; inaktivacija HIV-1 se zgodi skoraj takoj po kontaktu z lektinom. GRFT poleg učinkovitosti odlikuje tudi netoksičnost za mukozne celice, izjemna okoljska stabilnost (odpornost na širok spekter pH in temperatur) ter dokazana stabilnost v cervikovaginalni tekočini makakov. Posledično učinkovina predstavlja idealno aktivno komponento topičnih HIV mikrobicidov (Emau in sod., 2007).

Sinteza GRFT poteka z uporabo rekombinantnih sistemov kot so *E. coli* ter rastline. Ekspresija rekombinantnega proteina z *E. coli* je le delno učinkovita, saj je tudi z optimiziranimi procesi mogoče proizvesti le okoli 500 mg GRFT na liter medija (Giomarelli in sod., 2006). Sinteza GRFT v *N. benthamiana* pa se je po drugi strani izkazala za zelo učinkovito, saj donosi dosegajo tudi 1 g rekombinantnega proteina na kilogram listov rastline, v primeru okužbe rastline s TMV vektorjem (Shivprasad in sod., 1999). O'Keefe in sod. so leta 2009 sintetično cDNK, ki je kodirala 121 aminokislin GRFT, vstavili v TMV vektor, kjer se je rekombinantni protein izražal pod nadzorom podvojenega subgenomskega promotorja za protein plašča virusa. Sadike *N. benthamiana* so bile inokulirane z *in vitro* proizvedenimi infektivnimi RNK prepisi ter rekombinantnim TMV inokulumom, ki je bil pridobljen iz okuženih rastlin. Ta inokulum je služil za infekcijo 9.300 rastlin *N. benthamiana*, ki so bile vzgojene v rastlinjaku. Okužena biomasa listov je bila procesirana za ekstrakcijo GRFT 12 dni po inokulaciji. Glavni kontaminant pridobljenega ekstrakta je bil plašč TMV, ki pa je bil odstranjen s postopkom filtracije preko keramične membrane. GRFT je bil naknadno očiščen s postopkom ionske izmenjevalne kromatografije. S procesiranjem 226,5 kg inficiranega rastlinskega materiala, so pridobili več kot 60 g čistega rekombinantnega GRFT. Pridobljeni rekombinantni lektin je bil tekom prve faze kliničnih testiranj preizkušen na 16 posameznikih, izkazal se je za popolnoma varnega.

5.3 ARTEMIZININ

Malarija je nalezljiva bolezen, ki v Aziji in Afriki letno prizadene več milijonov ljudi. Bolezen povzročajo plazmodiji (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* in *P. ovale*), katerih prenašalni vektorji so komarji iz rodu *Anopheles* (Badshah in sod, 2018). Svetovna zdravstvena organizacija poroča, da se smrtnost obolelih iz leta v leto povečuje. Leta 2017 je bilo zabeleženih 219 milijonov primerov malarije, od tega je bilo 435.000 primerov smrtnih (World malaria report, 2018). Glavne ukrepe pri zatiranju in preprečevanju okužb z malarijo predstavljajo spanje pod mrežami, nanos insekticidnih sredstev na zidove objektov ter uporaba kombinatorskih terapij, ki temeljijo na artemizininu (ACT). Artemizinin je alkaloid rastline *Artemisia annua*, ki je bolj poznana pod imenom enoletni pelin. Alkaloid skupaj s svojimi derivati trenutno predstavlja najučinkovitejšo snov zoper povzročitelja malarije (Badshah in sod., 2018).

Danes se veliko pozornosti posveča razvoju učinkovitejših zdravil proti malariji. Idealno bi zdravila učinkovala na več razvojnih ciklov plazmodija, pomagala pri preprečevanju okužb in

nadaljnemu razširjanju bolezni. Čeprav so ACT, v zadnjih desetih letih uspešno zmanjšale število smrtnih žrtev, so tudi plazmodiji razvili delno odpornost na uporabljene učinkovine. Odpornost naj bi bila povezana z mutacijo na *kelch13* genu. Razširitev odpornosti je tudi močno omejila uporabo številnih antimalarikov, ki so bili včasih množično v uporabi (klorokinov ter sulfadoksin-pirimetaminov). Ključnega pomena tako predstavlja optimizacija doziranja zdravil, ki bi zagotovila maksimalni terapevtski učinek ACT in bi hkrati zmanjšala razširjanje odpornosti (Badshah in sod., 2018).

Letna svetovna potreba po artemizininu obsega okoli 119 metričnih ton, le-te pa se ne more pokriti, saj je sama proizvodnja ACT učinkovin predraga. Povečano proizvodnjo artemizininina so poskušali doseči preko metabolnega inženiringa *A. annua*, *E. coli* ter *S. cerevisiae* (Badshah in sod., 2018). Z gensko spremenjeno kvasovko, ki je izražala gene artemizininske biosintezne poti, so uspeli proizvesti 25 g artemizininina na liter fermentacijske brozge, vendar nadaljnjo povečanje proizvodnje učinkovine omejuje drag medij, izolacija ter tudi čiščenje artemizininina iz uporabljene brozge (Paddon in sod., 2013).

Prvi poskus proizvodnje artemizininina v *N. tabacum* je vodil do sinteze reducirane oblike molekule namesto oksidirane (Zhang in sod., 2011). Kljub temu pa so bili ti rezultati prvi, ki so dokazali, da se lahko rastlino tobaka uporabi tudi za sintezo artemizininina. Farhi in sod. (2011) so z uporabo enega samega vektorja v citosolu ter v mitohondrijih rastlin tobaka, uspešno izrazili gene za artemizininsko ter mevalonatno biosintezno pot. Čeprav je bila produkcija artemizininina zaradi nastanka nezaželenih stranskih produktov zelo majhna, je omenjena raziskava utrla pot nadaljnji uporabi tobaka za proizvodnjo tega esencialnega antimalarika (Badshah in sod., 2018).

Fuentes in sod. (2016) so z uporabo sintetične biologije uspešno izrazili vse encime biosintezne poti artemizininina v kloroplastih rastlin tobaka. Z metodo kombinatorne supertransformacije transplastomskih recipientnih linij (COSTREL), so v kloroplaste tobaka uspešno vstavili vse gene za biosintezo antimalarika. V jedro tobaka so vključili tudi nekaj dodatnih akcesornih genov, katerih funkcija še ni točno poznana, vendar predvidevajo, da imajo esencialno vlogo pri reguliranju artemizininske biosintezne poti. Nadaljnji izboljšani fenotipi so akumulirali okoli 120 ± 42 mg artemizininske kisline na kg sveže mase listov (artemizininska kislina se s spontano oksidacijo v rastlinah pretvarja v artemizinin). Raziskave so pokazale, da imata ključno vlogo pri visoki sintezi artemizininske kisline v izboljšanih fenotipih gena za aldehyd dehidrogenazo (ALDH1), ki katalizira pretvorbo dihidroartemizininskega aldehida v dihidroartemizininsko kislino, ter 1-deoksi-D-ksiluloza-5-fosfat reduktiozomerozo (DXR) iz cianobakterije *Synechocystis*, ki je glavni regulatorni encim ne-mevalonatne poti pri biosintezi izoprenoidov. Prisotnost DXR encima naj bi izboljšala razpoložljivost prekurzorjev, kot sta izopentil pirofosfat in dimetilalil pirofosfat. Večja kot je bila ekspresija ALDH1 ter DXR, več artemizininina so rastline sintetizirale. Toksičnega vpliva na kloroplaste rastline ni bilo

zaznanega, v primerjavi z divjim tipom so opazili le 13 % zmanjšanje biomase pri fenotipu, ki je produciral največje količine artemizininske kisline.

Poleg številnih prednostih, ki jih prinaša sinteza artemizininske kisline v tobaku, predstavlja nadzorovanje škodljivcev eno izmed večjih težav, saj zahteva uporabo dragih pesticidov. Problem je mogoče rešiti s križanjem transgenih linij tobaka z linijami, ki so odporne na številne škodljivce, so visoke rasti in producirajo veliko število listov (Badshah in sod., 2018).

5.4 VIRUSOM PODOBNI DELCI

Virusom podobni delci (VLP) so proteinske strukture virusnih antigenov, ki oponašajo organizacijo nativnih virusov, vendar ne vsebujejo virusnega genoma. Pred pripravo cepiv s celotnimi patogeni ali podenotnimi antigeni imajo v smislu varnosti, imunogenosti ter stabilnosti veliko prednosti, zato se jim v zadnjih časih posveča veliko več pozornosti. Inaktivirani ali mrtvi patogeni v cepivih povzročijo zelo močan imunski odziv in se zato uporabljajo kot primarni vir zaščite za mnogo nalezljivih bolezni. Vendar pa pri uporabi celotnih patogenov veliko skrb predstavlja potencialna reverzija oslabljenih virusov, oziroma njihova nepopolna inaktivacija. Poleg tega obstaja veliko število patogenov, za katere varnih oslabljenih kultur še ni mogoče pridobiti, ali pa ni razpoložljive tkivne kulture, kjer bi se lahko patogeni učinkovito razmnoževali. Razvoj podenotnih cepiv je sicer ponudil alternativo uporabi celotnih patogenov, vendar takšna cepiva le redko predstavljajo virusne epitope v nativni konformaciji in so zato tudi manj učinkovita. Posledično morajo takšna cepiva vsebovati večje doze antigena ter adjuvanse, ki izzovejo ustrezen imunski odziv, prav tako pa mora cepljenje poteci večkrat (Chen in Lai, 2013).

VLP združujejo boljše lastnosti podenotnih cepiv ter cepiv s celotnimi virusnimi delci. Ker VLP ne vsebujejo virusne nukleinske kisline, niso infektivni, torej predstavljajo varnejšo alternativo uporabi oslabljenih ali inaktiviranih virusov. Z uporabo VLP se je prav tako mogoče izogniti nezaželenim, nenačrtovanim spremembam epitopov, do katerih lahko pride pri postopku inaktivacije živih virusov. Če se pri izgradnji cepiva ustrezno odstranijo imunosupresivni virusni proteini, je lahko imunogenost VLP tudi večja, kot pri uporabi celih delcev patogena. Prav tako VLP, ker s svojo strukturo posnemajo infektivne viruse, izzovejo močan celični ter humoralni imunski odziv tudi brez dodatka adjuvansov (Chackerian, 2007).

5.4.1 Sinteza VLP

Komercialni uspeh so zaenkrat dosegla le VLP cepiva proti humanem papiloma virusu in hepatitisu B, vendar se čedalje več VLP cepiv, proti mnogim drugim nevarnim okužbam, izkazuje za zelo obetavna. Komercialni proizvodni sistemi so trenutno omejeni na kvasne, insektne ter živalske celične kulture, ki imajo določne omejitve in jih ni mogoče uporabiti za proizvodnjo mnogih funkcionalnih VLP. Velika proizvodnja virusom podobnih delcev poteka sicer tudi v bakterijskih celicah (npr. *E. coli*), vendar noben VLP bakterijskega izvora še ni bil odobren za uporabo v zdravstvene namene. Razlog je verjetno v tem, da prokarionti niso zmožni

glikozilirati proteinov ter opraviti drugih potrebnih post-translacijskih modifikacij, ki pa so ključnega pomena pri cepivih, ki temeljijo na VLP. Izbira ustreznega ekspresijskega sistema za proizvodnjo VLP je odvisna predvsem od strukture in funkcije končnega produkta ter od končnega stroška proizvodnega procesa (Roldao in sod., 2010).

V proizvodnji VLP so se za najučinkovitejše izkazale živalske celične kulture, saj omogočajo pravilno glikozilacijo ter ostale post-translacijske modifikacije proteinov. Problem predstavljajo veliko večji stroški proizvodnje kot pri ostalih celičnih kulturah, prav tako pa je za izgradnjo ustreznega proizvodnega obrata potreben zajeten začetni investicijski kapital. Vse industrijske proizvodnje, ki temeljijo na celičnih kulturah, za povečanje svojega donosa zahtevajo izgradnjo novih objektov in bioreaktorjev, zato pa so ponovno potrebni veliki finančni vložki. Le-ti skupaj z biologijo določenih produkcijskih sistemov onemogočajo cenejšo ter masivnejšo proizvodnjo VLP (Chen in Lai, 2013).

Rastline predstavljajo dober alternativni sistem za proizvodnjo VLP, saj omogočajo sintezo velike količine rekombinantnih proteinov po nizki ceni (Chen, 2011). Na samem začetku so bili poskusi ekspresije VLP v rastlinah razmeroma obetavni, vendar je bila končna ekspresija VLP majhna. Problem je povzročala tudi glikozilacija proteinov, ki je specifična za rastline, ter neuspeli poskusi proizvodnje VLP, ki jih je sestavljal več kot en protein (Roldao in sod., 2010). Omenjeni izzivi so bili razrešeni z razvojem novih rastlinskih ekspresijskih sistemov in napredovanjem tehnik v rastlinskem glikoinženirstvu; začetna proizvodnja VLP v rastlinah je bila počasna, z zelo majhnimi donosi, saj močni regulatorni elementi za povečano akumulacijo rekombinantnih proteinov še niso bili poznani, prav tako pa je integracija rekombinantne DNK v genom potekala bolj ali manj naključno. Četudi je bila proizvodnja VLP v rastlinah najcenejša, zaradi premajhnega donosa takrat enostavno ni bila smiselna (Chen, 2008).

Razvoj tehnik prehodne ekspresije rekombinantnih proteinov s pomočjo rastlinskih virusov je močno izboljšal hitrost in izkoristek proizvodnje VLP v rastlinskih sistemih. Novejše študije kažejo, da je do visokih donosov VLP s pomočjo tehnik prehodne ekspresije rekombinantnih proteinov, mogoče priti tudi že po dveh tednih od infiltracije vektorja s TMV RNK replikomom ali z DNK replikacijskim sistemom virusa rumenjenja in pritlikavosti fižola (BeYDV) (Lai in Chen, 2012). Izboljšave na področju hitrosti ter donosa VLP v rastlinskih sistemih prav tako omogočajo proizvodnjo mnogih različnih rekombinantnih proteinov proti virusom, ki zelo hitro spreminjajo svoje površinske antigene. Slednje se lahko izkaže kot zelo pomembno v primeru nenadnega izbruha pandemije (npr. influenca tipa A), saj se s hitro proizvodnjo VLP in formulacijo cepiva lahko v kratkem času prepreči širjenje smrtonosne bolezni (Chen in Lai, 2013).

5.4.2 Protivirusna VLP cepiva

5.4.2.1 Virus influenza

Gripa oziroma influenza je nalezljiva bolezen, ki jo povzročajo RNK virusi iz družine Orthomyxoviridae. Danes se okužba preprečuje s cepljenjem. Trenutna cepiva sestavljata površinska glikoproteina virusa: hemaglutinin (HA), ki ob okužbi z virusom povzroči aglutinacijo rdečih krvnih celic, ter nevraminidaza (NA), ki je hidrolitični encim in omogoča širjenje virusa v gostitelju. HA in NA sta zelo variabilna, kar močno otežuje proizvodnjo cepiv širokega spektra. Najširše uporabljena cepiva proti influenci so trenutno inaktivirana cepiva ter živa cepiva z oslavljenim virusom gripe. Obe vrsti cepiva se največkrat proizvajata v oplojenih kokošjih jajcih (proizvodnja traja okoli 6 mesecev). Ker trenutna cepiva inducirajo imunost na antigene, ki se razlikujejo od seva do seva, le-ta niso najbolj učinkovita proti novim oblikam pandemskih virusov. S prizadevanjem iznajdbe univerzalnega cepiva proti gripi, so znanstveniki začeli posvečati več pozornosti tudi cepivom, ki temeljijo na VLP (Nogales in Martínez-Sobrido, 2017).

Pandemska VLP cepiva proti gripi so bila proizvedena tudi v tobaku, ki omogoča sintezo cepiva že po treh tednih od pridobitve informacije o sekvenci virusa (Landry in sod., 2010). Landry in sod. (2010) so v *N. benthamiana* uspešno izrazili HA glikoproteine H5N1 virusa gripe. Rastline so bile vakuumsko infiltrirane z inokulumom agrobakterij, ki so vsebovale H5 ekspresijsko kaseto. Že po šestih dneh od infiltracije so uspešno pridobili ekstrakt HA. H5 VLP cepivu so kot adjuvant dodali alum. Administracija cepiva je uspešno inducirala imunski odziv ter preprečila okužbo z virusom pri dihurjih. Za cepivo je bila izvedena tudi prva faza klinične študije, ki je potekala na zdravih odraslih osebah. Osebam sta bili administrirani dve dozi cepiva, 21 dni narazen, v treh različnih koncentracijah. Cepivo je bilo dobro tolerirano pri vseh treh koncentracijah in je po drugi dozi nudilo ustrezno zaščito. VLP cepiva, ki se lahko sintetizirajo v rastlinah, tako predstavljajo zelo dobro alternativno metodo za sintezo sezonskih in pandemskih cepiv.

5.4.2.2 Hepatitis B

Okužbe z virusom hepatitisa B (HBV) se pojavljajo po celem svetu in so endemične v Afriki, Vzhodni Evropi, Centralni ter Jugovzhodni Aziji in na področju Bližnjega vzhoda ter Amazonije v Južni Ameriki. Virus vsako leto terja več kot milijon smrtnih žrtev ter okuži okoli 350-400 milijonov ljudi po celem svetu. HBV je DNK virus, ki najpogosteje okužuje hepatocite (Narasimhamurthy in sod., 2009). Virus pa se nahaja tudi v krvi, slini, spermi, vaginalnem izločku ter mleku doječe matere. Do okužbe pride ob izpostavljenosti okuženi krvi ali drugim telesnim tekočinam. Najpogosteje se okužba prenaša preko spolnega odnosa. Okužba s HBV se lahko pokaže kot akutno ali kronično vnetje jeter, ciroza ter rak jeter, kar so vse lahko vzroki za smrt. Virus velikokrat ne povzroči akutnega vnetja, posledično lahko okužba celo do konca

življenja poteka brez zdravstvenih težav. Zaščita pred okužbo s HBV poteka s cepljenjem, ki je obvezno za vse otroke pred vstopom v osnovno šolo (NIJZ, 2019a).

Vsak virion sestavlja zunanja lipidna ovojnica, ki predstavlja površinski antigen HBV (HBsAg) ter nukleokapsida, ki vsebuje virusno DNK in predstavlja antigen virusne sredice (HBcAg). Cepiva sestavljajo predvsem HBsAg, čigar ekspresija je uspela tudi že v transgenih rastlinah tobaka, solati, korenju ter krompirju. HBsAg, ki je bil izražen v transgenem tobaku (*N. tabacum*), je bil fiziološko, biokemijsko ter imunološko podoben rekombinantnemu HBsAg, ki ga proizvajajo kvasne celice (Thanavala in sod., 1995). Prav tako so tudi Narasimhamurthy in sod. (2009) uspešno izrazili HBsAg protein v *N. tabacum*. Transformacija rastlin je potekala preko bakterij *A. tumefaciens*, v katere je bil vnesen rastlinski binarni vektor z zapisom za celoten, nespremenjen površinski antigen HBV. Gen se je izražal pod promotorjem 35S CaMV. V plazmid je bil vključen tudi gen *nptII*, ki se služil kot selekcijski marker. Izolacija HBsAg iz listov tobaka je bila uspešna, prav tako pa so dokazali, da dedovanje gena, ki kodira HBsAg, poteka v skladu z Mendlovim zakonom (3:1). Mason in sod. (1992) so zabeležili uspešno ekstrakcijo HBsAg iz rekombinantne rastline *N. tabacum* tudi v količinah, ki so dosegale 66 ng/mg listov rastline.

5.4.2.3 Humani papiloma virus

Različni genotipi humanega papiloma virusa (HPV) naj bi bili krivi za nastanek 95 % vseh primerov raka materničnega vratu, ki je drugi najpogostejši rak pri ženskah. Letno je zabeleženih kar pol milijona novih primerov raka materničnega vratu. Le-ta je odgovoren tudi za 250.000 smrtnih primerov na leto. 75 % HPV induciranih rakavih obolenj materničnega vratu je posledica okužbe z visokorizičnima HPV-16 ter HPV-18 genotipoma (Zahin in sod., 2016). Okužba s HPV se prenaša s tesnimi stiki s kožo ali sluznico okužene osebe, najpogosteje pri spolnih odnosih. Okužbe s HPV so najpogostejše pri adolescentih in mlajših odraslih, starih od 15 do 25 let. Okužbe pri večini žensk (90 %) minejo spontano po 8 do 12 mesecih, pri nekaterih (10 %) pa se lahko razvije trajna okužba; pri teh je tveganje za razvoj hujših predrakavih sprememb ter raka materničnega vratu večje (NIJZ, 2019b).

Najpogosteje uporabljeni rekombinantni cepivi, Gardasil (proti štirim oziroma devetim genotipom HPV) in Cervarix (proti dvema genotipoma HPV), sta sestavljeni iz glavnih proteinov ovojnice HPV, ki nato tvorijo visoko imunogene VLP. Čeprav so trenutna komercialna cepiva visoko imunogena, varna, učinkovita in ne povzročajo hudih stranskih učinkov, so v razvijajočih se državah, zaradi velikih stroškov proizvodnje in distribucije, težko dosegljiva. Trenutno na trgu še ni cenovno ugodnega HPV cepiva, ki bi bilo varno in učinkovito (Zahin in sod., 2016).

Raziskave potencialne sinteze HPV cepiv v rastlinah potekajo v mnogih laboratorijih. L1 proteini, ki so sestavni deli kapside virusa, so bili v rastlinah že uspešno izraženi, vendar je bila

njihova ekspresija na začetku raziskav zelo nizka (<1 % vseh topnih proteinov) (Biemelt in sod., 2003). Maclean in sod. (2007) pa so uspešno zabeležili 11 % akumulacijo L1 proteina, ko so nanj vezali signalni peptid za izražanje v kloroplastih. Od takrat so v kloroplastih uspešno izrazili tudi HPV-16 L1 VLP, ki je predstavljal 24 % vseh topnih proteinov (Fernández-San Milán in sod., 2008). VLP sintetizirani v kloroplastih, so bili v miškah uspešno imunogeni in so nudili učinkovito zaščito, vendar je bil izkoristek proizvodnje, zaradi pomanjkljivih protokolov čiščenja VLP, zelo nizek (Hefferon in sod., 2013). Zahin in sod. (2016) so izvedli študijo, v kateri so poskušali izboljšati izkoristek ter procese čiščenja HPV-16 L1 proteina, ki so ga izrazili v *N. benthamiana*. Uporabili so visokoefektivni binarni vektorski sistem, s signalno sekvenco za kloroplasti. Transformacija rastlin je potekala s postopkom agroinfiltracije. Ekstrakcija HPV-16 L1 iz listov rastlin je bila najučinkovitejša pri uporabi fosfatnega pufra z majhno koncentracijo soli (pH 7,0). Za čiščenje VLP od ostalih rastlinskih proteinov, se je kot najbolj učinkovita izkazala uporaba kombinacije metod CsCl gradientne centrifugacije ter gelske izključitvene kromatografije. Po postopkih čiščenja so bili izolirani VLP v miših močno imunogeni. Za stabilizacijo in zaščito HPV-16 L1 VLP pa se je kot najučinkovitejši izkazal polisorbit 20. S pridobljenimi rezultati so uspešno dokazali, da bi se za izražanje VLP lahko uporabili tudi kloroplasti rastlin, saj je tako koncentracija sintetiziranih transgenih proteinov mnogo večja, kot je le-ta v jedru. Prav tako pa so, z opisom novih metod čiščenja VLP iz kloroplastov tobaka omogočili možnost razvoja hitrejše, cenejše ter enostavnejše industrijske sinteze HPV-16 VLP cepiv.

6 ZAKLJUČEK

Rastline so zelo učinkoviti in cenovno ugodni bioreaktorji; omogočajo proizvodnjo številnih dragocenih ter farmacevtsko pomembnih rekombinantnih proteinov. Tobak s svojo visoko dovzetnostjo za genske spremembe, hitro rastjo, veliko akumulacijo biomase ter enostavnim večanjem proizvodnje omogoča sintezo velikih količin zelenih proteinov v zelo kratkem času, kar bi v prihodnosti lahko imelo pomembno vlogo pri učinkovitem preprečevanju širjenja nenadnih izbruhov bolezni. Z izredno hitrim tehnološkim napredkom ter razvojem rastlinske biotehnologije, se večja tudi raznolikost produktov, ki jih je mogoče pridobiti v tobaku. Posledično ta rastlina zagotovo predstavlja enega izmed ključnih dejavnikov, ki bi lahko v prihodnosti doprinesli k bistvenemu izboljšanju kakovosti našega življenja.

7 VIRI

- Badshah S. L., Ullah A., Ahmad N., Almarhoon Z. M., Mabkhot Y. 2018. Increasing the strength and production of artemisinin and its derivatives. *Molecules*, 23, 1: e100, doi: 10.3390/molecules23010100: 17 str.
- Barta A., Sommengruber K., Thompson D., Hartmuth K., Matzke M. A., Matzke A. J. 1986. The expression of a napoline synthase - human growth hormone chimeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Molecular Biology*, 6, 5: 347-357

- Bevan M. W., Flavell R. B., Chilton M. D. 1983. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature*, 304, 5922: 184-187
- Biemelt S., Sonnewald U., Galmbacher P., Willmitzer L., Muller M. 2003. Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants. *Journal of Virology*, 77, 17: 9211-9220
- Bogorad, L. 2000. Engineering chloroplasts: an alternative site for foreign genes, proteins, reactions and products. *Trends in Biotechnology*, 18, 6: 257-263
- Budzianowski J. 2015. Tobacco against Ebola virus disease. *Przegląd lekarski*, 71, 10: 567-571
- Canto T. 2016. Transient Expression System in Plants: Potentialities and Constraints. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 896: 287-301
- Chackerian B. 2007. Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, 6, 3: 381-90
- Chen Q. 2008. Expression and Purification of Pharmaceutical Proteins in Plants. *Biological Engineering Transactions*, 1, 4: 291-321
- Chen Q. 2011. Expression and manufacture of pharmaceutical proteins in genetically engineered horticultural plants. V: *Transgenic Horticultural Crops: Challenges and Opportunities - Essays by Experts*. Scorza R., Mou B. (ur.). Milton Park, Taylor & Francis: 86-126
- Chen Q., Lai H. 2013. Plant-derived virus-like particles as vaccines. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 9, 1: 26-49
- Chen Q., Davis K. R. 2016. The potential of plants as a system for the development and production of human biologics. *F1000Research*, 5, doi: 10.12688/f1000research.8010.1: 8 str.
- Eisenach C. 2011. Molecular farming – How plants produce the vaccines of tomorrow. *The Glasgow Insight into Science and Technology*. University of Glasgow.
<https://the-gist.org/2011/03/molecular-farming-%E2%80%93-how-plants-produce-the-vaccines-of-tomorrow/#easy-footnote-10-318> (26. maj 2019)
- Emau P., Tian B., O'Keefe B. R., Mori T., McMahon J. B., Palmer K. E., Jiang Y., Bekele G., Tsai C. C. 2007. Griffithsin, a potent HIV entry inhibitor, is an excellent candidate for anti-HIV microbicide. *Journal of Medical Primatology*, 36, 4-5: 244-253
- Farhi M., Marhevka E., Ben-Ari J., Algamas-Dimantov A., Liang Z., Zeevi V., Edelbaum O., Spitzer-Rimon B., Abeliovich H., Schwartz B., Tzfira T., Vainstein A. 2011. Generation of the potent anti-malarial drug artemisinin in tobacco. *Nature Biotechnology*, 29, 12: 1072-1074
- Fernandez-San Millan A., Ortigosa S. M., Hervas-Stubbs S., Corral-Martinez P., Segui-Simarro J. M., Gaetan J., Coursaget P., Veramendi J. 2008. Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Plant Biotechnol Journal*, 6, 5: 427-441

- Fettke J., Eckermann N., Poeste S., Pauly M., Steup M. 2004. The glycan substrate of the cytosolic (Pho 2) phosphorylase isozyme from *Pisum sativum* L.: identification, linkage analysis and subcellular localization. *The Plant Journal*, 39, 6: 933-946
- Fuentes P., Zhou F., Erban A., Karcher D., Kopka J., Bock R. 2016. A new synthetic biology approach allows transfer of an entire metabolic pathway from a medicinal plant to a biomass crop. *eLife*, 5: e13664, doi: 0.7554/eLife.13664: 26 str.
- Ganapathi R. T., Suprasanna P., Rao S. T., Bapat A. V. 2004. Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) – A model system for tissue culture interventions and genetic engineering. *Indian Journal of Biotechnology*, 3, 2: 171-184
- Gao H., Zhang Y., Zhao Y., Qiu C., Liu J., Yang J., Hua Y., Yang S., Liu J., Liu Z., Hou Y. 2016. Complete chloroplast genome sequence of *Nicotiana tabacum* TN90 (Solanaceae). *Mitochondrial DNA Part B*, 1, 1: 867-868
- Giomarelli B., Schumacher K. M., Taylor T. E., Sowder, R. C. 2nd, Hartley J. L., McMahon J. B., Mori T. 2006. Recombinant production of anti-HIV protein, griffithsin, by auto-induction in a fermentor culture. *Protein Expression and Purification*, 47, 1: 194-202
- Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. 2005. Magniflection – a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine*, 23, 17-18: 2042-1048
- Goodin M. M., Zaitlin D., Naidu R. A., Lommel S. A. 2008. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21, 8: 1015-1026
- Hefferon K. 2013. Plant-derived pharmaceuticals for the developing world. *Biotechnology Journal*, 8, 10: 1193-1202
- Hiatt A., Cafferkey R., Bowdish K. 1989. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, 342, 6245: 76-78
- HIV.gov. 2017. What are HIV and AIDS?. Washington, D. C., United States of America. United States Department of Health and Human Services. <https://www.hiv.gov/hiv-basics/overview/about-hiv-and-aids/what-are-hiv-and-aids> (26. maj 2019)
- Hladik F., Sakchalathorn P., Ballweber L., Lentz G., Fialkow M., Eschenbach D., McElrath M. J. 2007. Initial events in establishing vaginal entry and infection by human immunodeficiency virus type-1. *Immunity*, 26, 2: 257-270
- Hood E. E., Witcher D. R., Maddock S., Meyer T., Baszczyński C., Bailey M., Flynn P., Register J., Marshall L., Bond D., Kulisek E., Kusnadi A., Evangelista R., Nikolov Z., Wooge C. 1997. Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. *Molecular Breeding*, 3, 4: 291-306
- Lai H., Chen Q. 2012. Bioprocessing of plant-derived viruslike particles of Norwalk virus capsid protein under current Good Manufacture Practice regulations. *Plant Cell Reports*, 31, 3: 573-584

- Landry N., Ward B. J., Trépanier S., Montomoli E., Dargis M., Lapini G., Vézina L. P. 2010. Preclinical and clinical development of plant-made virus-like particle vaccine against avian H5N1 influenza. *PLoS One*, 5, 12: e15559, doi: 10.1371/journal.pone.0015559: 12 str.
- Liénard D., Sourrouille C., Gomord V., Faye L. 2007. Pharming and transgenic plants. *Biotechnology Annual Review*, 13: 115-147
- Maclean J., Koekemoer M., Olivier A. J., Stewart D., Hitzeroth I. I., Rademacher T., Fischer R., Williamson A. L., Rybicki E. P. 2007. Optimization of human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 expression in plants: comparison of the suitability of different HPV-16 L1 gene variants and different cell-compartment localization. *The Journal of General Virology*, 88, 5: 1460-1469
- Mason H. S., Lam D. M. K., Arntzen C. J. 1992. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 89, 24: 11745-11749
- Mori T., O'Keefe B. R., Sowder R. C. 2nd, Bringans S., Gardella R., Berg S., Cochran P., Turpin J. A., Buckheit R. W. Jr., McMahon J.B., Boyd M.R. 2005. Isolation and characterization of griffithsin, a novel HIV inactivating protein, from the red alga *Griffithsia* sp. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 10: 9345-9353
- Narasimhamurthy K. Y., Gowda R. H. P., Swamidatta H. S., Raghavendra G., Nair V. A., Malatheshaiah T. N., Nanjappa D. 2009. Production and Characterization of Hepatitis B Recombinant Vaccine in Tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. 'Kanchun'). *Transgenic Plant Journal*, 3, 1: 97-101
- NIJZ. 2019a. Hepatitis B (Virusni hepatitis B). Ljubljana, Slovenija. Nacionalni inštitut za javno zdravje.
<https://www.nijz.si/sl/hepatitis-b-virusni-hepatitis-b> (26. maj 2019)
- NIJZ. 2019b. Najpogostejša vprašanja in odgovori o okužbi s HPV, raku materničnega vratu in cepljenju proti HPV. Ljubljana, Slovenija. Nacionalni inštitut za javno zdravje.
<https://www.nijz.si/sl/najpogostejsa-vprasanja-in-odgovori-o-okuzbi-s-hpv-raku-maternicnega-vratu-in-cepljenju-proti-hpv-1> (26. maj 2019)
- Nogales A., Martínez-Sobrido L. 2017. Reverse genetics approaches for the development of influenza vaccines. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1: 1-26
- Obeme O. O., Popoola J. O., Leelavathi S., Reddy S. V. 2011. Advances in plant molecular farming. *Biotechnology Advances*, 29, 2: 210-222
- O'Keefe B. R., Vojdani F., Buffa V., Shattock R. J., Montefiori D. C., Bakke J., Mirsalis J., d'Andrea A. L., Hume S. D., Bratcher B., Saucedo C. J., McMahon J. B., Pogue G. P., Palmer K. E. 2009. Scaleable manufacture of HIV-1 entry inhibitor griffithsin and validation of its safety and efficacy as a topical microbicide component. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 15: 6099-6104
- Okumara J. K., Goldberg R. G. 1985. Tobacco single-copy DNA is highly homologous to sequences present in genomes of its diploid progenitors. *Molecular and General Genetics*, 198, 2: 290-298

- Paddon C. J., Westfall P. J., Pitera D. J., Benjamin K., Fisher K., McPhee D., Leavell M. D., Tai A., Main A., Eng D., Polichuk D. R., Teoh K. H., Reed D.W., Treynor T., Lenihan J., Fleck M., Bajad S., Dang G., Dengrove D., Diola D., Dorin G., Ellens K. W., Fickes S., Galazzo J., Gaucher S. P., Geistlinger T., Henry R., Hepp M., Horning T., Iqbal T., Jiang H., Kizer L., Lieu B., Melis D., Moss N., Regentin R., Secrest S., Tsuruta H., Vazquez R., Westblade L. F., Xu L., Yu M., Zhang Y., Zhao L., Lievens J., Covello P. S., Keasling J. D., Reiling K. K., Renninger N. S., Newman J. D. 2013. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*, 496, 7446: 528-532
- Pawar K. R. 2016. Agroinfiltration – Effective method of gene transfer. *Biotech Articles*. <https://www.biotecharticles.com/Biotech-Research-Article/Agroinfiltration-Effective-Method-of-Gene-Transfer-3735.html> (26. maj 2019)
- Rao A. Q., Bakhsh A., Kiani S., Shahzad K., Shahid A. A., Husnain T., Riazuddin S. 2009. The myth of plant transformation. *Biotechnology Advances*, 27, 6: 753-763
- Roldão A., Mellado M. C., Castilho L. R., Carrondo M. J., Alves P. M. 2010. Virus-like particles in vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, 9, 10: 1149-1176
- Rymerson T. R., Menassa R., Brandle E. J. 2002. Tobacco, a platform for the production of recombinant proteins. V: *Molecular farming of plants and animals for human and veterinary medicine*. Erickson L., Yu W. J., Brandle J., Rymerson R. (ur.). Dordrecht, Springer: 1-31
- Shivprasad S, Pogue G. P., Lewandowski D. J., Hidalgo J., Donson J., Grill L. K., Dawson W. O. 1999. Heterologous sequences greatly affect foreign gene expression in tobacco mosaic virus-based vectors. *Virology*, 255, 2: 312-323
- Streatfield S. J. 2007. Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 5, 1: 2-15
- Thanavala Y., Yang Y. F., Lyons P., Mason H. S., Arntzen C. J. 1995. Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92, 8: 3358-3361
- Tremblay R., Wang D., Jevnikar A. M., Ma S. 2010. Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. *Biotechnology Advances*, 28, 2: 214-221
- Vaquero, C., Sack M, Chandler J., Drossard J., Schuster F., Monecke M., Schillberg S., Fischer R. 1999. Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 20: 11128-11133
- WHO. 2018. Ebola virus disease, frequently asked questions. Geneva, Switzerland. World Health Organization. <https://www.who.int/ebola/drc-2018/faq-vaccine/en/> (26. maj 2019)
- World malaria report. 2018. Geneva, Switzerland. World Health Organization: 210 str. <https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/report/en/> (26. maj 2019)

- Woodleif W. G., Chaplin J. F., Campbell C. R., DeJong D. W. 1981. Effect of variety and harvest treatments on protein yield of close-grown tobacco. *Tobacco Science*, 25: 83-86
- Xu J., Dolan M. C., Medrano G., Cramer C. L., Weathers P. J. 2012. Green factory: Plants as bioproduction platforms for recombinant proteins. *Biotechnology Advances*, 30, 5: 1171-1184
- Xu J., Ge X., Dolan M. C. 2011. Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures. *Biotechnology Advances*, 29, 3: 278-299
- Zahin M., Joh J., Khanal S., Husk A., Mason H., Warzecha H., Ghim S. J., Miller D. M., Matoba N., Jenson A. B. 2016. Scalable production of HPV16 L1 protein and VLPs from tobacco leaves. *PloS One*, 11, 18: e0160995, doi: 10.1371/journal.pone.0160995: 16 str.
- Zhang Y., Nowak G., Reed D. W., Covello P. S. 2011. The production of artemisinin precursors in tobacco. *Plant Biotechnology Journal*, 9, 4: 445-454