

Mogućnosti primjene biljaka u proizvodnji cjepiva

**Friščić, Maja; Maleš, Željko; Domijan, Ana-Marija; Vilović, Tihana;
Rudman, Najda**

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2021, 77, 135 - 156**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:985315>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and
Biochemistry University of Zagreb](#)



Mogućnosti primjene biljaka u proizvodnji cjepiva

MAJA FRIŠČIĆ¹, ŽELJAN MALEŠ¹, ANA-MARIJA DOMIJAN¹,
TIHANA VILOVIĆ¹, NAJDA RUDMAN²

¹Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet,
Zavod za farmaceutsku botaniku, Schrottova 39, 10 000 Zagreb

²Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet,
Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju, Ante Kovačića 1,
10 000 Zagreb

Uvod

Cijepljenje, vakcinacija ili imunizacija je postupak koji se provodi kako bi se organizam obranio od zaraznih bolesti. Cijepljenjem ili imunizacijom potiče se imunosni odgovor organizma, a razlikuju se aktivna i pasivna imunizacija. Prilikom aktivne imunizacije u organizam se unose tvari poput živih oslabljenih ili cijelih mrtvih uzročnika bolesti ili njihovih dijelova, koje potiču imunosni sustav organizma da sam proizvodi protutijela, dok se kod pasivne imunizacije u organizam unose specifična protutijela (imunoglobulini) protiv uzročnika, kako bi se organizam privremeno zaštitio od određene bolesti (1).

U razvijenim zemljama, pa tako i u Republici Hrvatskoj, kontinuirano cijepljenje provodi se u svrhu zaštite od zaraznih bolesti poput difterije, tetanusa, rubeole, tuberkuloze i dječje paralize (poliomijelitisa) te se njime smanjuje učestalost navedenih bolesti, kao i posljedična smrtnost, invalidnost i/ili troškovi liječenja (2). U zemljama u razvoju cijepljenje bi trebalo biti najučinkovitija preventivna mjera zaštite od zaraznih bolesti. Nažalost, procijenjeno je da smrtnost od zaraznih bolesti u istima iznosi preko 54 % od ukupne smrtnosti (3). Proizvodnja cjepiva uključuje rad sa živim patogenima, zahtijeva strogi nadzor i provođenje biosigurnosnih mjera, što značajno poskupljuje njihovu proizvodnju te su stoga cjepiva teže dostupna u zemljama u razvoju (3, 4).

Razvojem molekularne biologije i imunologije upotreba mrtvih ili oslabljenih patogena zamijenjena je proizvodnjom cjepiva rekombinantnom DNA tehnologijom. U proizvodnji rekombinantnih cjepiva koriste se genetički modificirane

bakterije, kvasci, stanice kukaca i stanice sisavaca uzgojene u *in vitro* uvjetima, koje za proizvodnju biomase zahtijevaju korištenje velikih volumena medija i dodatne korake pročišćavanja, što može povećati ukupni trošak proizvodnje cjepiva. Obećavajuća alternativa koja bi mogla osigurati proizvodnju cjepiva po niskoj cijeni je primjena biljnih ekspresijskih sustava u kojima se biljke koriste kao bioreaktori za proizvodnju stranih proteina (engl. *molecular farming*) (5).

Mogućnost upotrebe genetički modificiranih viših biljaka u proizvodnji rekombinantnih cjepiva istražuje se zadnjih 30-ak godina. Genetičkim inženjeringom gen odgovoran za sintezu specifičnog antigena (proteina koji će izazvati imunosni odgovor organizma) unosi se u genom više biljke. Tako genetički modificirana biljka sintetizira željeni antigen koji se nakuplja u njenim organima. Antigen se potom može ekstrahirati, primjerice, iz lista biljke i pročititi te kao takav primijeniti u imunizaciji peroralno ili parenteralno (6). Upotreba viših biljaka u proizvodnji cjepiva posebno je privlačna zbog eventualne mogućnosti dobivanja tzv. jestivih cjepiva. Ukoliko je biljni organ koji sadrži rekombinantni antigen jestiv, takvo rekombinantno cjepivo može se unijeti oralnim putem (3). Proizvodnja jestivih cjepiva u usporedbi s današnjim tehnologijama proizvodnje cjepiva je jednostavnija i cjenovno povoljnija, a njome je moguće dobiti veću količinu cjepiva. Iz ovih razloga takva bi cjepiva bilo moguće proizvoditi u zemljama u razvoju, gdje su i najpotrebnija, a osim u humanoj mogla bi se upotrebljavati i u veterinarskoj medicini prilikom zaštite životinja u uzgoju (7, 8).

Prednosti primjene viših biljaka u proizvodnji rekombinantnih cjepiva

Konvencionalnim metodama ne mogu se proizvesti cjepiva za sve zarazne bolesti, dok je uspješnost primjene nekih postojećih cjepiva samo djelomična (7). Nedostaci postojeće tehnologije proizvodnje rekombinantnih cjepiva su visoki troškovi održavanja bioloških sustava za proizvodnju rekombinantnih proteina te pročišćavanja i pohranjivanja dobivenih rekombinantnih proteina. Također, zbog mogućih onečišćenja bakterijskim endotoksinima, virusima i/ili prionima (9), postoji rizik od pojave neželjenog imunosnog odgovora (10). S druge strane, više biljke mogle bi proizvesti cjepiva za zarazne bolesti koja nisu osigurana trenutnom tehnologijom proizvodnje cjepiva, a koja bi bila sigurna za ljude budući da nisu zagađena ljudskim ili životinjskim patogenima (5, 9, 11, 12). Upotreba viših biljaka u proizvodnji cjepiva je ekonomična s obzirom na to da biljke imaju veću biomasu pa je za pretpostaviti da se njihovom primjenom u proizvodnji cjepiva može dobiti i veća količina rekombinantnog cjepiva. Prednost je i to što već postoji tehnologija uzgoja i prerade biljaka na veliko (11). Pored toga, biljke se mogu genetički modificirati kako bi proizvele više različitih antigena te tako

pružiti zaštitu ljudima i životinjama od većeg broja zaraznih bolesti istovremeno (12). Proizvodnja jestivih cjepiva cjenovno bi bila još povoljnija s obzirom na to da takva cjepiva ne treba izdvajati i pročišćavati, a troškovi pohranjivanja i prijevoza značajno su niži jer ne zahtijevaju tzv. hladni lanac (6, 12). S obzirom na oralnu primjenu, razvoj jestivih cjepiva smanjio bi troškove dodatne medicinske opreme potrebne za njihovu intramuskularnu ili subkutanu primjenu, kao i troškove osposobljavanja osoblja koje provodi cijepljenje. Također, njihovom oralnom primjenom izbjegla bi se bol i zaraza koje su moguće kod parenteralne primjene (7, 12).

Tradicionalna primjena cjepiva parenteralnim putem (injekcijom) potiče sustavnu imunost i proizvodnju imunoglobulina G (IgG) i tako pruža zaštitu od patogena koji dovode do opće (sustavne) zaraze (6, 7, 13, 14). Međutim, većina patogena ulazi u organizam preko mukoze (sluznice), a mukozna imunost najbolje se potiče izravnom primjenom cjepiva na površinu sluznice. Primjena cjepiva na površini sluznice potiče proizvodnju imunoglobulina A (IgA), najvažnijeg protutijela u sluzi (6, 7). Oralna primjena jestivih cjepiva potiče i sustavni i mukozni imunosni odgovor (7, 12). Pored toga, jestivo cjepivo koje je proizvela biljka zaštićeno je u biljnoj stanici njenom staničnom stijenkom te se može govoriti o bioenkapsulaciji cjepiva (12). Osim što stanična stijenka štiti rekombinantno cjepivo od kiselog sadržaja želuca, ona osigurava sporo otpuštanje antigena u donjem dijelu probavnog trakta te omogućuje da nakon apsorpcije cjepivo dođe do limfnog tkiva pridruženog sluznici probavnog crijeva i tamo izazove jak i specifičan imunosni odgovor (3, 6, 12, 14). Neke od mogućih prednosti primjene genetički modificiranih viših biljaka u proizvodnji rekombinantnih cjepiva istaknute su u tablici 1.

Počeci istraživanja upotrebe biljaka u proizvodnji rekombinantnih cjepiva

Ljudski hormon rasta bio je prvi farmaceutski važan protein kojeg su sintetizirale više biljke (15). U provedenom istraživanju gen za ljudski hormon rasta unesen je u stanice suncokreta i duhana pomoću bakterije *Agrobacterium tumefaciens*. U njima je nakon toga pronađena funkcionalna prekursorska glasnička RNA (pre-mRNA) za navedeni hormon čime je dokazano da biljke mogu sintetizirati farmaceutski važne proteine. Godine 1992. provedeno je istraživanje na duhanu koji je proizveo površinski antigen virusa hepatitisa B (HBsAg), što mnogi smatraju prvim cjepivom koje su proizvele biljke (16).

Pokazalo se da je HBsAg kojega je sintetizirao duhan sličan onome izdvojenom iz ljudskog seruma, a kada je sintetizirano cjepivo injektirano miševima,

Tablica 1. ► Procijenjene prednosti cjepiva proizvedenih pomoću biljaka (preuzeto i prilagođeno prema 6)

Br.	Prednost	Obilježja
1	Oralni unos	Stanična stijenka biljne stanice štiti antigen od enzima i kiseline u želucu te osigurava njegovo postupno otpuštanje u crijevima
2	Mogućnost primjene u svježem obliku ili u obliku suhog praška	Jestivi biljni organ koji sadrži antigen može se pojesti sirov/osušen ili se antigen može ekstrahirati i pročistiti te primijeniti u kapsuliranom obliku
3	Nije potreban hladni lanac	Biljno tkivo ili biljni ekstrakt može se pohranjivati i prevoziti pri sobnoj temperaturi
4	Mukozni i serumski imunosni odgovor	Jestiva cjepiva prvenstveno bi trebala potaknuti mukozni imunosni sustav (IgA) i spriječiti ulazak patogena na površini sluznice, uz istovremeno poticanje serumskog imunosnog (IgG), a moguće i citotoksičnog odgovora
5	Povoljni troškovi proizvodnje	Proizvodnja u usporedbi s tradicionalnom proizvodnjom cjepiva jeftinija je 100 do 1000 puta
6	Optimiziran sustav proizvodnje proteina	Pehrana antigena u točno određenom dijelu stanice (npr. endoplazmatskom retikulumu, kloroplastima)
7	Jednostavna genetička manipulacija	Molekularni i genetički protokoli već su poznati i dostupni su u zemljama u razvoju
8	Jednostavna proizvodnja i uvećanje proizvodnog procesa (<i>scale-up</i>)	Pehrana sjemenki genetički modificiranih biljaka i mogućnost dobivanja velike količine cjepiva (rekombinantnog proteina) u kratkom vremenu
9	Veća sigurnost od postojećih cjepiva	Smanjeni rizik od zagađenja ljudskim i životinjskim patogenima
10	Pogodna za veterinarsku upotrebu	Cjenovno pristupačna, mogu se dodati u stočnu hranu

IgA – imunoglobulin A, IgG – imunoglobulin G

ono je izazvalo imunosni odgovor usporediv s onime komercijalno dostupnog cjepiva (17). Istraživanje provedeno u ranim 90-ima, u kojem je biljka duhana proizvela površinski antigen A bakterije *Streptococcus mutans*, također se smatra jednim od prvih istraživanja koja potvrđuju da biljke mogu proizvesti cjepiva (18). Uslijedilo je istraživanje koje je pokazalo da rekombinantni protein kojega je proizvela genetički modificirana biljka može spriječiti kolonizaciju bakterijom *S. mutans* u ustima (19) te brojna druga istraživanja koja su potvrdila da biljke mogu uspješno sintetizirati rekombinantna cjepiva (tablica 2.) (9).

Rekombinantna DNA tehnologija

Prije same proizvodnje rekombinantnog cjepiva potrebno je identificirati i izdvojiti antigen uzročnika zarazne bolesti te opisati njegova svojstva, odnosno

Tablica 2. ► Farmaceutski važni proteini proizvedeni u biljkama (preuzeto i prilagođeno prema 9)

Protein	Biljka domaćin	Važnost
Humani lijekovi		
Hormon rasta	Duhan, suncokret	Prvi humani (kimerni) protein proizveden u transgeničnoj biljci; prvi humani protein proizveden u kloroplastima
Humani serumski albumin	Duhan, krumpir	Prvi humani (cjeloviti nativni) protein proizveden u transgeničnoj biljci
Interferon- α	Riža, repa	Prvi humani farmaceutski važan protein proizveden u riži
Eritropoetin	Duhan	Prvi humani protein proizveden u suspenziji stanica duhana
Humana alkalna fosfataza	Duhan	Proizvodnja proteina lučenjem iz korijena i listova
Aprotinin	Kukuruz	Prvi humani farmaceutski važan protein proizveden u kukuruzu
Kolagen	Duhan	Prva proizvodnja humanog strukturnog proteinskog polimera
α 1-Antitripsin	Riža	Prva primjena suspenzije stanica riže u proizvodnji proteina
Rekombinantna protutijela		
IgG1 (fosfonatni ester)	Duhan	Prvo protutijelo proizvedeno u biljkama
IgM (neuropeptidni haptent)	Duhan	Prvo IgM protutijelo proizvedeno u biljkama (proizvodnja u kloroplastima)
sIgA/G (adhezin bakterije <i>Streptococcus mutans</i>)	Duhan	Prvo sekretorno protutijelo proizvedeno u biljkama
scFv-briodin 1 imunotoksin (CD 40)	Duhan	Prvo farmaceutski važno scFv protutijelo proizvedeno u biljkama; prvo protutijelo proizvedeno u staničnoj kulturi
IgG (HSV)	Soja	Prvi farmaceutski važan protein proizveden u soji
LCS (HSV)	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Prva primjena algi u proizvodnji proteina
Rekombinantna cjepiva temeljena na antigenim podjedinicama		
Protein ovojnice virusa hepatitisa B	Duhan	Prvi kandidat za cjepivo proizveden u biljkama; treći kandidat koji je došao do faze kliničkih ispitivanja
Glikoprotein virusa bjesnoće	Rajčica	Prvo proizvedeno jestivo cjepivo
Termolabilni enterotoksin bakterije <i>Escherichia coli</i>	Duhan, krumpir	Prvo biljno cjepivo koje je došlo do faze kliničkih ispitivanja
Protein kapside Norwalk virusa	Krumpir	Drugo biljno cjepivo koje je došlo do faze kliničkih ispitivanja
Autoantigen šećerne bolesti	Duhan, krumpir	Prvo biljno cjepivo za autoimunu bolest

Protein	Biljka domaćin	Važnost
B podjedinica toksina kolere	Duhan, krumpir	Prvi kandidat za cjepivo proizveden u kloroplastima
Spojene B i A2 podjedinice toksina kolere, enterotoksin rotavirusa i fimbrijalni antigen bakterije <i>E. coli</i>	Krumpir	Prvi primjer proizvodnje multivalentnog rekombinantnog antigena u biljci za istovremenu zaštitu od više različitih crijevnih bolesti
Glikoprotein S virusa prijenosnog gastroenteritisa svinja	Duhan, kukuruz	Prvi primjer uspješne oralne primjene cjepiva kod životinja

HSV – Herpes simplex virus, IgG – imunoglobulin G, IgM – imunoglobulin M, LSC – dugi jednostruki lanac (engl. *long single chain*), scFv – jednolančani fragment Fv monoklonskog protutijela (engl. *single chain Fv fragment*), sIgA – sekretorni imunoglobulin A

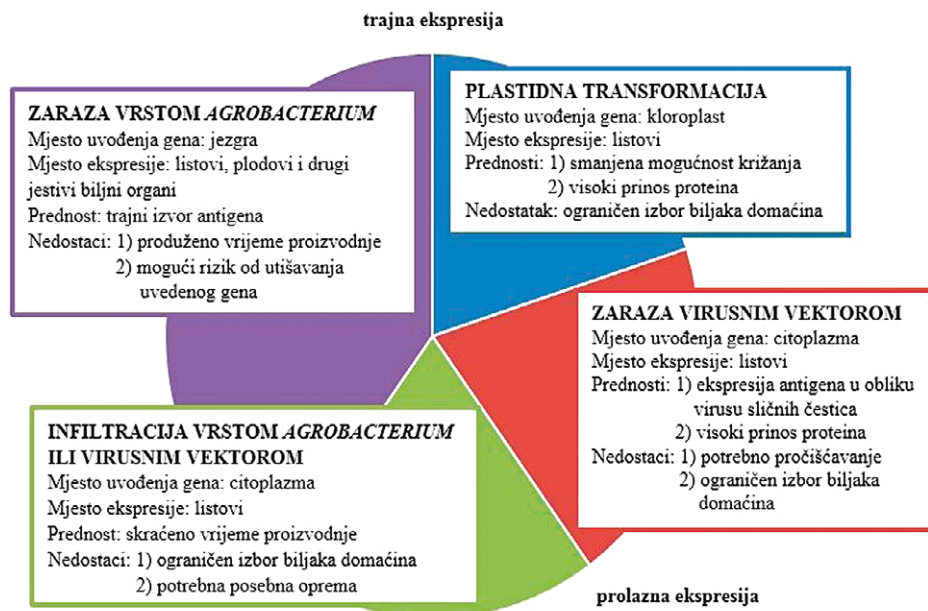
identificirati gen koji kodira za navedeni antigen (3, 7). Proizvodnja cjepiva u biljkama može se planirati tek kada je poznat slijed nukleotida gena koji kodira za ciljni antigen. Gen za taj antigen potom se genetičkim inženjeringom unosi u biljnu stanicu. Za unošenje gena u biljnu stanicu koriste se bakterije te tehnike mikrobombardiranja, elektroporacije, ultrazvučne obrade (sonikacije), transformacija posredovana polietilen glikolom ili pak zaraza virusnim vektorima (9, 10, 14). Genetički se može modificirati jezgrina i kloroplastna DNA pa se u tim slučajevima govori o nuklearnoj i plastidnoj transformaciji, koje su tzv. stabilne transformacije iz razloga što je strani gen trajno ugrađen u genom jezgre ili kloroplasta biljne stanice (6, 7, 10). U obje se DNA može unijeti više gena pa se time teoretski može pružiti zaštita od više zaraznih bolesti istovremeno (6).

Za unos gena u biljnu stanicu najčešće se primjenjuje genetički modificirana bakterija *A. tumefaciens* (6, 12), gram-negativna bakterija tla koja prirodno može zaraziti biljke i unijeti svoj genetički materijal u jezgrinu DNA biljke (10). *A. tumefaciens* mora se genetički modificirati kako bi nosila gen za sintezu željenog antigena, nakon čega se navedeni gen ugrađuje u jezgrinu DNA na nasumičnom položaju, što dovodi do trajne genske ekspresije (slika 1.), odnosno sinteze željenog proteina u biljci (6, 12). Jednom kada je uspostavljena stabilna linija (modificirani genom se stabilno nasljeđuje iz generacije u generaciju), ona se može koristiti kao stalni izvor cjepiva (3, 5, 14). Istraživanje provedeno na genetički modificiranom krumpiru koji je sintetizirao protein VP7 ljudskog rotavirusa pokazalo je da je navedena transformacija bila stabilna preko 50 generacija i u tom periodu biljka je zadržala svoju imunogenost (20). Nedostatak ove metode je što bakterija *A. tumefaciens* ne može zaraziti neke agronomski važne biljne vrste poput soje i većine žitarica, a postupak je skup i dugotrajan (3). Ipak, zbog stabilne ugradnje gena, ovo je metoda koja se najčešće koristi (6).

Drugi način stabilne transformacije DNA je biolistička metoda (bombardiranje mikroprojektilima), koja se još naziva i metoda »genske puške« ili »genski pištolj«, a koja kao mikronosače DNA koristi zlato ili volfram (10). Mikronosač se omata s DNA antigena koja pod utjecajem visokog tlaka helija postiže veliku brzinu pri kojoj ulazi u biljnu stanicu te se ugrađuje u DNA biljke. Ta se metoda može koristiti za unošenje strane DNA u različite vrste biljaka (3, 10), ali je skupa i može dovesti do oštećenja biljnog tkiva. Ovom metodom željeni gen može se ugraditi ne samo u jezgrinu (10) već i u kloroplastnu DNA (3, 6, 12). Osim biolistike, za unos stranih gena u kloroplastnu DNA obično se primjenjuje i transformacija protoplasta posredovana polietilen glikolom (14). Ugradnja na točno određeno mjesto u kloroplastnom genomu uklanja varijabilnost genske ekspresije koja se može javiti kod ugradnje u jezgrin genom kao posljedica utišavanja gena (6). Jedna od prednosti transformacije kloroplastne DNA je i veći broj kloroplasta koje pojedina stanica može imati. Ovo dovodi do veće ekspresije željenog rekombinantnog antigena, odnosno do većeg nakupljanja rekombinantnog cjepiva (3, 14), prvenstveno u listovima (14), a koje samo po sebi značajno ne ometa proces fotosinteze (6). Također, kloroplastna DNA nasljeđuje se preko majke (majčinsko nasljeđivanje) pa nema opasnosti od prenošenja gena na okolne divlje srodnike putem peludi (3, 5). S druge strane, kloroplasti nisu prikladni za ekspresiju glikoproteina (12). Transformacija kloroplastne DNA dosad je uspješno provedena na duhanu i drugim lisnatim biljkama, ali i jestivim kulturama poput krumpira, mrkve i rajčice. Navedene jestive biljne vrste zbog smanjene razine ekspresije transgena u kloroplastima (fotosintetskim neaktivnim plastidima), nažalost, nisu primjerene za proizvodnju rekombinantnih cjepiva (12, 14). Plastidnom transformacijom proizvedena su cjepiva protiv kolere, Lajmske bolesti, kuge, antraksa i tetanusa te rotavirusa i psećeg parvovirusa (10).

Kao vektor za unos željenog gena u biljnu stanicu mogu se upotrebljavati i biljni virusi. Biljni virus genetički se modificira kako bi nosio DNA slijed koji kodira za željeni antigen. Nakon što se biljka njime zarazi, virus se umnožava neovisno o biljnom genomu (3) i to vrlo brzo te dolazi do sinteze velike količine proteina (14). Ovo je robusna metoda, koja ne zahtijeva puno vremena, jednostavna je i njome se brže dolazi do rekombinantnog cjepiva. Također, moguća je i primjena velikog broja biljnih vrsta kao domaćina. No, DNA antigena nije ugrađena u biljni genom te stoga do njegove ekspresije dolazi samo u toj generaciji u kojoj je biljna stanica zaražena (prolazna ekspresija), odnosno proizvodnja antigena ne prenosi se na drugu generaciju pa ovaj postupak treba stalno ponavljati (slika 1.) (6). Također, problem je sinteza složenih proteina kao i sigurnost zbog mogućnosti širenja zaraze na druge biljke. Zarazu je moguće izbjeći korištenjem

virusima sličnih čestica (engl. *virus-like particles*, VLPs) koje ne sadrže virusnu DNA te se ne mogu umnožavati. Virusi koji su do sada korišteni su virusi mozaičnih bolesti duhana, krumpira, lucerne, bambusa i drugi. Ovom tehnologijom proizvedena su, primjerice, cjepiva za humani papiloma virus, virus gripe ili norovirus (14).



Slika 1. ► Tehnologije dobivanja transgeničnih biljaka i njihove prednosti i nedostaci (preuzeto i prilagođeno prema 14)

Biljne vrste pogodne za proizvodnju rekombinantnih cjepiva

U proizvodnji rekombinantnih cjepiva koriste se brojni biljni modeli. To su, primjerice, duhan, krumpir, rajčica, banana, zelena salata, vrsta *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., vodena leća, špinat, grašak, soja, jagoda, jabuka, mrkva, lucerna (alfalfa) i jednostanične alge, a ekspresija rekombinantnog cjepiva usmjerena je u njihove listove, stabljiku, korijen ili plodove. Rekombinantna cjepiva proizvedena su i u sjemenkama odnosno zrnima kukuruza, riže, kvinoje, graha i duhana (3, 8, 12).

Najpogodnije su one biljne vrste koje daju veliku količinu biomase i jednostavno se uzgajaju. U istraživanjima se najčešće primjenjuje duhan budući da je genom duhana poznat, jednostavno se transformira i vrlo brzo se postiže ekspresija željenog antigena. Ukoliko biljna vrsta nije jestiva, kao što je to slučaj kod

duhana, rekombinantno cjepivo mora se ekstrahirati i dodatno pročišćavati, što poskupljuje njegovu proizvodnju (6, 7). Za proizvodnju jestivih cjepiva potrebno je odabrati one biljne vrste koje su sigurne za ljude i životinje te se mogu jesti sirove kako bi se proizvedeno rekombinantno cjepivo moglo primijeniti bez ikakve dorade (6), budući da bi svako zagrijavanje ili primjena povišenog tlaka mogli dovesti do njegove ubrzane razgradnje (7).

Industrijska istraživanja usmjerena su na sjemenke iz nekoliko razloga (7). Sjemenke predstavljaju dobar način dugoročne pohrane rekombinantnog cjepiva jer se u osušenom obliku mogu na duže vrijeme pohraniti na sobnoj temperaturi, a da se pri tome cjepivo ne raspadne i ne izgubi aktivnost (9, 14). Istraživanja pokazuju da je ekspresija rekombinantnog cjepiva stabilnija te da se ono u sjemenkama nakuplja u većoj količini, dok je njegovo pročišćavanje jednostavnije (8). Za dugoročnu pohranu rekombinantnog cjepiva prikladnima su se pokazale sjemenke bogate proteinima kao što su, primjerice, sjemenke soje. Također, obećavajućima u proizvodnji i pohrani rekombinantnih cjepiva smatraju se i sjemenke kukuruza zbog njihove brojnosti i jeftinog skladištenja (5).

Proizvodnja cjepiva pomoću algi također izgleda obećavajuće, što zbog njihove brze stope rasta i mogućnosti primjene cijelih biljaka kao sirovog materijala u proizvodnji jestivih cjepiva, što zbog mogućnosti jednostavnog uzgoja bez potrebe za uporabom gnojiva (marikultura ili uzgoj u bioreaktorima u cilju dodatno pospešene proizvodnje) ili rizika od unakrsne kontaminacije drugim biljnim kulturama (3). Kao modelni organizam koristi se jednostanična zelena alga *Chlamydomonas reinhardtii* P.A.Dang, koja sadrži samo jedan kloroplast, a što pridonosi stabilnosti linija koje proizvode željene antigene (3).

Proizvodnja rekombinantnih proteina pomoću viših biljaka danas

Biljke mogu proizvesti farmaceutski važne humane proteine, rekombinantna protutijela i cjepiva temeljena na antigenim podjedinicama (9), od čega su trenutno komercijalno dostupni neki reagensi te enzimi, primjerice, humani kolagen tipa I kojeg sintetizira duhan i goveđi tripsin kojeg sintetizira kukuruz (TrypZean®). TrypZean, proizvođača Sigma-Aldrich, komercijalno je dostupan od 2002. godine te se koristi prilikom uzgoja životinjskih stanica, a prednost mu je što ne sadrži onečišćenja životinjskog podrijetla. Riža se koristi za sintezu ljudskog lizozima i laktoferina. Izraelska tvrtka Protalix u suradnji s tvrtkom Pfizer proizvodi taliglucerazu alfa za Gaucherovu bolest u stanicama mrkve i duhana, a za što od 2012. godine imaju odobrenje američke Agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) (14). Pomoću genetički modificiranih biljaka dobivaju se i drugi lijekovi poput inzulina u šafrancima i čimbenika rasta u ječmu (10).

U kliničkoj fazi ispitivanja su i brojna rekombinantna cjepiva protiv bakterijskih i virusnih patogena koja su proizvele biljke (14). Najčešće su to vrste roda *Nicotiana* L. (duhan) transformirane pomoću bakterije *Agrobacterium tumefaciens* ili primjenom agroinfiltracije (tablica 3.) (10). Istražuju se i cjepiva proizvedena u jestivim biljkama poput krumpira (enterotoksigena *Escherichia coli*, norovirus i virus hepatitisa B), kukuruza (enterotoksigena *E. coli*), zelene salate (virus hepatitisa B), špinata (virus bjesnoće) i riže (*Vibrio cholerae*) (14).

Tablica 3. ► Tehnologija proizvodnje biljnih cjepiva protiv zaraznih bolesti ljudi i životinja (preuzeto i prilagođeno prema 10)

Bolest	Uzročnik/antigen	Biljka	Metoda transformacije
Dijarealna bolest	Norwalk virus	<i>Nicotiana benthamiana</i>	<i>A. tumefaciens</i>
Dijarealna bolest	Enterotoksigena <i>Escherichia coli</i>	Kukuruz	
Tuberkuloza	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Agrobacterium</i>
Ptičja gripa podtip H5N1	Površinski antigen hemaglutinin podtip 5 virusa ptičje gripe	<i>Nicotiana benthamiana</i>	<i>Agrobacterium</i>
Denga groznica	Domena III površinskog E glikoproteina (EIII) denga virusa tipa 2	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. MD609	<i>A. tumefaciens</i>
Bjesnoća	Virus bjesnoće	<i>Nicotiana benthamiana</i> , rajčica	Agroinfiltracija
Hepatitis B	Površinski antigen virusa hepatitisa B (HBsAg)	Rajčica	<i>A. tumefaciens</i>
Bolest šaka, stopala i usta	Virus uzročnik bolesti šaka, stopala i usta	<i>Stylosanthes guianensis</i> cv. Reyan II	
Humana imunodeficijencija	Virus humane imunodeficijencije (HIV)	Duhan	Agroinfiltracija
Bolest plavog jezika	Virus bolesti plavog jezika	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Agroinfiltracija
Ebola	Virus ebrole	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Agroinfiltracija

Do sada je licencirano rekombinantno HBV cjepivo (scFv monoklonsko protutijelo) proizvedeno u transgeničnom duhanu (8, 14) i cjepivo za Newcastle-sku bolest peradi koje se proizvodi u stanicama duhana uzgojenim u uvjetima *in vitro*, a čiju je upotrebu 2006. godine odobrilo Ministarstvo poljoprivrede Sjedinjenih Američkih Država (engl. *United States Department of Agriculture*, USDA). Nadalje, u duhanu (*Nicotiana tabacum* L.) se proizvode i protutijela na HIV (tvrtka Fraunhofer IME), dok se u njemu srodnoj vrsti *Nicotiana benthamiana*

Domin proizvode protutijela na virus ebole (lijek ZMapp® tvrtke Kentucky Bio-Processing LLC (KBP)). Također, u istim se vrstama proizvode i cjepiva protiv sezonske, ptičje i svinjske gripe koja kao antigen sadrže virusni glikoprotein hemaglutinin (Caliber Biotherapeutics LLC, Fraunhofer CMB USA) ili virusima slične čestice s hemaglutininom na svojoj površini (Medicago Inc.) (10, 14).

Izazovi proizvodnje rekombinantnih cjepiva u biljkama

Razvoj cjepiva pomoću genetički modificiranih biljaka, a posebno jestivih cjepiva prate medicinski, zakonski, etički i okolišni problemi. Jedan od glavnih problema je proizvodnja cjepiva u tzv. stalnoj dozi, koju je u prirodi nemoguće postići (3). Prilikom proizvodnje cjepiva pomoću transgeničnih biljaka, na njegovu količinu i kvalitetu utječu vanjski (okolišni) čimbenici poput temperature, svjetlosti, vlage te prisutnosti hranjivih tvari i patogena (5). Količina proizvedenog rekombinantnog antigena može varirati od biljke do biljke, od ploda do ploda iste biljke i od generacije do generacije, ovisno o veličini i zrelosti same biljke ili njezinih organa (10). Također, promjene u mikrookolišu mogu utjecati na zarazu patogenima, što pak može posljedično utjecati na količinu biomase, ekspresiju transgena i kvalitetu dobivenog antigena. Stoga se genetički modificirane biljke koje proizvode cjepivo moraju uzgajati u staklenicima ili drugim zatvorenim prostorima u kontroliranim mikrookolišnim uvjetima (5). To, naravno, poskupljuje proizvodnju navedenih cjepiva. Kako bi se dobila stalna koncentracija antigena u biljnome tkivu, ispituju se rekombinantne tehnike koje u kratkom vremenu od svega nekoliko dana do nekoliko tjedana mogu dovesti do prolazne ekspresije gena za željeni protein, poput infiltracije vrstom *Agrobacterium* u međustanični prostor listova (agroinfiltracije) i primjene virusnih vektora (3, 10, 14), a koje su primjenjive kod lisnatih biljaka (14). S druge strane, prednost razvoja transgeničnih biljaka je da domaćini ne moraju biti isključivo lisnate biljke (14), iako sam razvoj cjepiva može trajati mjesecima te se na ovaj način dobiva manja količina cjepiva (3).

Također, kao što je već prethodno navedeno, u slučaju kada cjepivo nije jestivo, treba ga pročistiti, što dodatno poskupljuje proizvodnju (8, 12). Pored toga, teško je odrediti odgovarajuću dozu koja je potrebna određenoj osobi, posebno kod jestivih cjepiva, kako ne bi došlo do prevelike stimulacije imunskog sustava i posljedičnog alergijskog odgovora s jedne strane ili pak do oralne tolerancije s druge strane. Naravno, tu su i rizici povezani s upotrebom genetički modificiranih biljaka (GM biljaka) i s njihovim mogućim utjecajem na okoliš i bioraznost. Pri uzgoju na otvorenom, postoji mogućnost da pelud GM biljke opraš srodnu biljku iz okoliša, što je posebno opasno u slučaju biljaka namijenjenih

ljudskoj ili životinjskoj prehrani. Taj problem može se izbjeći genetičkom modifikacijom kloroplastnog genoma (14).

Unatoč navedenim izazovima, imajući na umu ekonomsku isplativost biljaka i mogućnost brze proizvodnje velike količine ciljnih molekula te sigurnost njihove primjene s obzirom na izostanak ljudskih patogena (11, 12), proizvodnja cjepiva pomoću biljaka zanimljiva je posebno u slučaju onih zaraznih bolesti koje zbog svoje težine ili visokog infektivnog potencijala zahtijevaju brzu proizvodnju cjepiva koja bi u konačnici trebala biti svima dostupna, uključujući i socijalno najugroženije.

Zarazne bolesti za koje je potrebno razvijati nova cjepiva

Danas je u svijetu odobrena primjena cjepiva za niz zaraznih bolesti, uključujući bjesnoću, denga groznicu, difteriju, dječju paralizu, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis E, *Haemophilus influenzae* tipa b (Hib), hripavac, humani papiloma virus (HPV), japanski encefalitis, koleru, krpeljni meningoencefalitis, meningokokni meningitis, pneumokoknu bolest, ospice, rotavirus, rubeolu, tetanus, trbušni tifus, tuberkulozu, vodene kozice, zaušnjake (mumps) i žutu groznicu, zahvaljujući čemu je smanjen mortalitet i/ili morbiditet od ovih bolesti (21). Ipak, za brojne zarazne bolesti još uvijek nema odobrenih cjepiva ili se ona i dalje istražuju, odnosno razvijaju. To su, primjerice, cjepivo protiv *Campylobacter jejuni*, Chagasove bolesti, chikungunye, denga groznice, enterotoksigene *E. coli*, enterovirusa 71 (EV71), streptokoka grupe B, Herpes simplex virusa, HIV-1, uzročnika ankilostomijaze, lišmanijaze, malarije, virusa Nipah, netifusne salmoneloze, norovirusa, paratifusa, respiratornog sincicijskog virusa (RSV), šistosomijaze, šigeloze, bakterija *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* i *S. pyrogenes*, tuberkuloze, kao i univerzalno cjepivo protiv gripe (21). Ovdje se odnedavno ubraja i COVID-19, potencijalno smrtonosna i izrazito zarazna bolest koju uzrokuje koronavirus teškog akutnog respiratornog sindroma tipa 2 (engl. *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*, SARS-CoV-2). Prvi slučajevi ove bolesti zabilježeni su početkom prosinca 2019. u gradu Wuhanu (pokrajina Hubei, Kina) (22), otkud se bolest u kratkom vremenu proširila cijelim svijetom (23) te tako postala međunarodni javnozdravstveni problem (22) s ozbiljnim posljedicama na ljudsko zdravlje i svjetsku ekonomiju (24).

Budući da trenutno¹ ne postoji specifičan lijek za liječenje bolesti COVID-19 kao ni cjepivo protiv virusa SARS-CoV-2 (24), potrebna su dodatna sredstva

¹ Autori napominju da naznačena tvrdnja u trenutku objave ovog rada više nije važeća. Do dana 3. ožujka 2021. na području Europske unije, uključujući Republiku Hrvatsku, za liječenje bolesti COVID-19 odobren je lijek Veklury (remdesivir) te su odobrena tri

za ubrzavanje razvoja, proizvodnje i primjene sigurnog i učinkovitog cjepiva protiv ove bolesti, a kako bi se postiglo trajno rješenje za postojeću pandemiju (25). Za očekivati je da bi ovakva nastojanja mogla rezultirati bržim pronalaskom cjepiva, kao što se to pokazalo u slučaju ebole. Ebola je ozbiljna, a često i smrtonosna endemska zarazna bolest (smrtnost veća od 60 %), čije su dvije dosad najveće epidemije zadesile područje zapadne i središnje Afrike u periodu 2014.–2016. i 2018.– danas (26, 27). Cjepivo protiv ebole po prvi je put odobreno u prosincu 2019. godine (28), a sadrži živi oslabljeni (atenuirani) virus vezikularnog stomatitisa koji je genetički modificiran na način da na svojoj površini nosi glikoprotein virusa ebole (29). Za njegov razvoj trebalo je pet godina, što je relativno brzo u usporedbi s deset i više godina koje su uobičajeno potrebne za razvoj novog cjepiva (30). Globalni naponi koji su kao odgovor na pandemiju COVID-19 uloženi u istraživanje i razvoj cjepiva dosad su neviđeni u pogledu njihovog opsega i brzine. O tome svjedoči i podatak da je, primjerice, dana 8. travnja 2020. istraživanjima bilo obuhvaćeno čak 115 potencijalnih kandidata za cjepivo od čega je njih pet već bilo u prvoj fazi kliničkih ispitivanja (30). Prema zadnjim podacima², koje je 15. srpnja 2020. objavila Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO), u kliničkim ispitivanjima bila su 23 potencijalna kandidata, od čega tri u fazi III, te njih 140 u

cjepiva protiv bolesti COVID-19: Comirnaty i COVID-19 Vaccine Moderna (jednolančana glasnička RNA (mRNA) s kapom na 5'-kraju, koja kodira protein šiljka (S) virusa SARS-CoV-2, dobivena pomoću in vitro transkripcije iz odgovarajućih predložaka DNA, bez korištenja stanica) te COVID-19 Vaccine AstraZeneca (adenovirus čimpanze koji kodira glikoprotein šiljka virusa SARS-CoV-2 (ChAdOx1-S)).
<https://www.halmed.hr/COVID-19/Pregled-statusa-ocjene-i-odobravanja-lijekova-i-cjepiva/>, datum pristupa: 3.3.2021.

<https://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Comirnaty/16018/>, datum pristupa: 3.3.2021.

<https://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/COVID-19-Vaccine-Moderna/16019/>, datum pristupa: 3.3.2021.

<https://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/COVID-19-Vaccine-AstraZeneca/16065/>, datum pristupa: 3.3.2021.

² Autori napominju da se naznačena tvrdnja odnosila na trenutak slanja rada u časopis (18. srpnja 2020.). Dana 2. ožujka 2021. u kliničkim ispitivanjima bilo je 76 cjepiva, od čega pet u fazi II/III, dvanaest u fazi III i četiri u fazi IV, dok je njih 182 bilo u pretkliničkim ispitivanjima.

<https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>, datum pristupa: 3.3.2021.

pretkliničkim ispitivanjima (31). Između ostalih, istražuju se cjepiva temeljena na inaktiviranim (mrtvim) i živim oslabljenim virusima SARS-CoV-2, replicirajućim i ne-replicirajućim virusnim vektorima te virusima sličnim česticama, kao i RNA, DNA te proteinska cjepiva. Za dobivanje troje od potencijalnih kandidata za cjepivo, koji su trenutno u pretkliničkoj fazi odnosno u fazi I kliničkih ispitivanja, potrebne su biljke (31). Dapače, kao odgovor na postojeću epidemiju bolesti COVID-19 istražuje se moguća primjena biljaka kao ekspresijskog sustava ne samo za dobivanje cjepiva, već i dijagnostičkih (npr. virusni antigeni i protutijela specifična za SARS-CoV-2) te antivirusnih proteina (npr. lektini koji inaktiviraju viruse vežući se na glikanske strukture na njihovoj površini) (32).

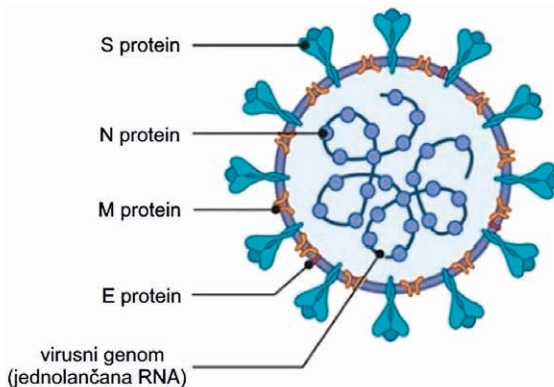
Potencijal primjene biljaka u razvoju cjepiva protiv SARS-CoV-2

Pokazalo se da su cjepiva koja se temelje na proteinskim podjedinicama odnosno na pojedinačnim virusnim antigenima ili virusima sličnim česticama, a koja se između ostalog mogu proizvesti i pomoću biljaka, sigurnija u usporedbi s konvencionalnim cjepivima koja sadrže inaktivirane ili atenuirane viruse kod čije primjene postoji rizik od ponovno stečene virulencije. Prednost im je i ta da ih je moguće dobiti u relativno kratkom vremenu (32).

SARS-CoV-2 je pozitivni jednolančani RNA virus koji u svojoj strukturi ima najmanje četiri glavne vrste proteina. To su nukleokapsidni ili N proteini, koji su uključeni u pakiranje RNA genoma i igraju važnu ulogu u patogenezi bolesti kao inhibitori interferona, membranski ili M proteini, odgovorni za oblikovanje viriona, proteini ovojnice ili E proteini (od engl. *envelope*), odgovorni za sklapanje i otpuštanje viriona, te površinski, S proteini (od engl. *spike*) ili S glikoproteini ovojnice, odgovorni za prepoznavanje angiotenzin konvertirajući enzim 2 (ACE2) receptora stanica domaćina odnosno za vezanje na ciljne stanice i ulazak u njih (slika 2.) (33). Iako sva četiri strukturna proteina mogu potaknuti stvaranje neutralizirajućih protutijela i odgovor CD4+/CD8+ T stanica, pokazalo se da protein N ne potiče zaštitni imunitet, dok M i E to čine samo u manjoj mjeri (33).

Primarnom metom za neutralizaciju virusa SARS-CoV-2 trenutno se smatra njegov S protein (34), te se pretpostavlja da bi se zaustavljanjem ulaska virusa u stanice zaraza mogla uspješno kontrolirati (32). S protein sastoji se od dvije proteinske podjedinice, od kojih je S1 odgovorna za vezanje na ciljne stanice, a S2 za ulazak virusa u stanicu (33). Pri tome je posljednja visoko konzervirana unutar obitelji koronavirusa (99 %), dok je 70 % strukture S1 podjedinice S proteina virusa SARS-CoV-2 identično strukturi drugih koronavirusa. Strukturne razlike najvećim su dijelom prisutne u domeni koja se veže na receptore (engl. *receptor-binding domain*, RBD) (32).

Slika 2. ► Struktura viriona SARS-CoV-2 (preuzeto i prilagođeno prema 33)



Trenutno³ su u pretkliničkim ispitivanjima dva cjepiva za SARS-CoV-2 koja se temelje na proteinskim podjedinicama proizvedenim u biljkama (31), najvjerojatnije na S1 podjedinici ili njezinom RBD dijelu (33), a razvijaju ih iBio/CC-Pharming i Baiya Phytopharm/Chula Vaccine Research Center (31). Pomoću biljaka su dosad već uspješno proizvedena neka druga cjepiva koja se temelje na proteinskim podjedinicama, uključujući ona protiv sezonske i pandemijske gripe. Pri tome je korištena prolazna ekspresija u duhanu pomoću razgrađenih vektora temeljenih na virusu mozaične bolesti duhana koji su uneseni u biljku agroinfiltracijom pomoću bakterije *A. tumefaciens* (32). Prolazna ekspresija može dati potrebne antigene i protutijela u kraćem vremenu (unutar tjedan dana) u usporedbi sa stabilnom transformacijom (nekoliko mjeseci), zbog čega je ona metoda izbora za brz odgovor na pandemiju. Ipak, oralna (jestiva) cjepiva protiv SARS-CoV-2 proizvedena putem stabilne ekspresije u genetički modificiranim biljkama (nuklearnom ili plastidnom transformacijom) mogla bi naći potencijalnu primjenu kod eventualno potrebnog docjepljivanja u razdoblju nakon pandemije (34) u svrhu postizanja dugotrajn(ij)e zaštite. Ova cjepiva privlačna su zbog jeftinije proizvodnje, jednostavnije primjene i mogućnosti poticanja mukozne imunosti. Pri tome

³ Autori napominju da se naznačena tvrdnja odnosila na trenutak slanja rada u časopis (18. srpnja 2020.). Dana 2. ožujka 2021. u pretkliničkim ispitivanjima bila su najmanje četiri cjepiva čija proizvodnja uključuje biljke. Uz dva navedena, riječ je o cjepivu temeljenom na S1, S2 i nukleokapsidnoj podjedinici koje razvija Akdeniz University, Department of Agricultural Biotechnology, Antalya, Turkey te cjepivu temeljenom na virusima sličnim česticama koje razvija Shiraz University.
<https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>, datum pristupa: 3.3.2021.

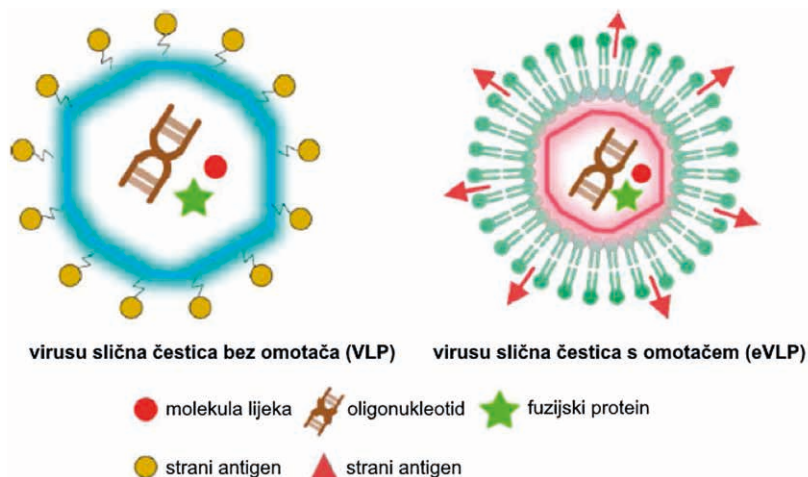
bi prednost nuklearne transformacije pred plastidnom bila mogućnost složenih post-translacijskih modifikacija proteina, dok su njezini nedostaci, koje je moguće izbjeći primjenom plastidne transformacije, umetanje transgena na nespecifično mjesto, mogućnost horizontalnog prijenosa gena između nesrodnih vrsta i utjecaj mjesta vezanja transgena na njegovu ekspresiju (35).

Prethodno se pokazalo da rekombinantni antigen dobiven u transgeničnim staničnim linijama vrste *A. thaliana* ekspresijom S1 ektodomene S proteina prijenosnog gastroenteritisa svinje uzrokovanog koronavirusima može izazvati stvaranje specifičnih protutijela. Navedeno ukazuje na moguću imunogenost odabranog proteina, no još uvijek nije poznato hoće li i na koji način na učinkovitost cjepiva protiv SARS-CoV-2 utjecati razlika u glikozilaciji kod ljudi i biljaka (32), imajući na umu da biljne stanice nemaju sposobnost provođenja glikozilacije karakteristične za stanice sisavaca. Pretpostavka je da bi ove razlike mogle povećati imunogeni potencijal i učinkovitost cjepiva (35). S1 podjedinica S proteina SARS-CoV ekspimirana u transgeničnoj rajčici i duhanu s transformiranim jezgrom potaknula je mukoznu (IgA) odnosno sistemska imunost (IgG) kod miševa nakon njihove oralne odnosno parenteralne primjene (35). Istovremeno, prema rezultatima nedavnih istraživanja, mišja poliklonska protutijela na S protein SARS-CoV mogu izazvati jaku inhibiciju ulaska SARS-CoV-2 u stanice domaćina, koji je posredovan S proteinom, što ukazuje na važnost konzerviranih S epitopa za uspješnu imunizaciju (35).

U prvoj fazi kliničkih ispitivanja odnedavno⁴ je cjepivo proizvedeno u biljkama koje se temelji na virusima sličnim česticama tvrtke Medicago Inc. (31). Ove multimerne nanočestice sastavljene su od virusnih strukturnih proteina i morfološki sliče izvornom virusu, ali ne sadrže njegov genetski materijal (slika 3.), zbog čega nisu patogene ili zarazne (36, 37).

Prednost pred cjepivima s virusnim podjedinicama je da su ovakva cjepiva u pravilu stabilnija te dovode do jakog imunosnog odgovora zahvaljujući optimalnoj veličini čestica (20-200 nm) zbog koje ih lako prepoznaju dendritičke i antigen-prezentirajuće stanice (37). Također, virusima slične čestice uz antigena svojstva istovremeno imaju i svojstva adjuvansa (pomoćnih tvari) (36) te omogućuju

⁴ Autori napominju da se naznačena tvrdnja odnosila na trenutak slanja rada u časopis (18. srpnja 2020.). Dana 2. ožujka 2021. cjepivo tvrtke Medicago Inc. temeljeno na virusima sličnim česticama bilo je u fazi II/III kliničkih ispitivanja, dok je cjepivo tvrtke Kentucky Bioprocessing Inc. temeljeno na RBD dijelu S1 podjedinice bilo u fazi I/II. <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>, datum pristupa: 3.3.2021.



Slika 3. ► Struktura virusu slične čestice bez omotača (VLP) i s omotačem (eVLP) s prikazanim mogućnostima uklapanja molekula lijeka, oligonukleotida i fuzijskih proteina u njihovoj šupljini i prezentacije stranih antigena (proteina) koji mogu biti kovalentno vezani ili uklopljeni na njihovoj površini (preuzeto i prilagođeno prema 37)

dostavu antigena na ciljno mjesto i učinkoviti ulazak u stanicu, a uz to su biokompatibilne i biorazgradive (37). One se ne mogu umnožavati u čovjeku, ali u biljkama se mogu proizvesti u velikoj količini (produksijski kapacitet i preko 10 milijuna doza cjepiva mjesečno (34, 38)).

Primjeri licenciranih cjepiva temeljenih na virusima sličnim česticama su cjepivo protiv virusa hepatitisa B (Engerix-B®) proizvedeno u stanicama kvasca i cjepivo protiv HPV (Gardasil®, Cervarix®) proizvedeno u stanicama kvasca odnosno kukaca te cjepivo protiv virusa hepatitisa E (Hecolin®) proizvedeno u bakteriji *E. coli* (36). Licencirano je i cjepivo protiv hepatitisa B proizvedeno u stanicama ovarija kineskog hrčka (CHO stanicama), dok su cjepiva koja kao ekspresijski sustav za proizvodnju antigena koriste biljke u različitim fazama kliničkih ispitivanja (37). Prolazna ekspresija u biljkama trebala bi biti brža od tradicionalnih platformi temeljenih na mikroorganizmima i stanicama sisavaca budući da za dobivanje konačnog proizvoda pomoću biljaka nije potrebno uspostaviti stabilne stanične linije. Istovremeno je povećanje količine željenog cjepiva moguće relativno jednostavno postići uzgojem većeg broja biljaka pri jednakim uvjetima (32). Ono što ohrabruje je podatak da je nakon uspješno provedenih kliničkih ispitivanja na više od 25 000 ispitanika, trenutno na procjeni pri Health Canada rekombinantno kvadrivalentno cjepivo protiv sezonske gripe, temeljeno na virusima sličnim česticama, dobiveno prolaznom ekspresijom u biljnoj vrsti

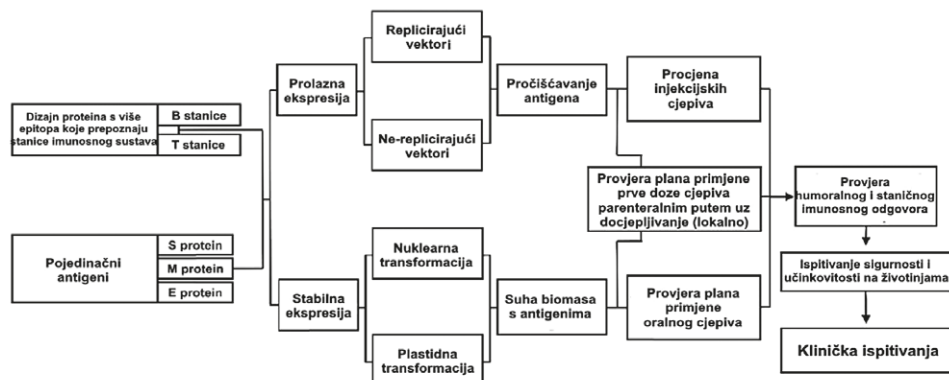
N. benthamiana, tvrtke Medicago Inc. Navedena tvrtka također razvija i cjepivo protiv SARS-CoV-2 (38).

Pretpostavka je da bi rekombinantna cjepiva koja sadrže virusima slične čestice s višestrukim kopijama antigena SARS-CoV-2 na svojoj površini trebala omogućiti izazivanje imunosnog odgovora u slučaju dodira s divljim tipom virusa (32). Prethodno su primjenom bakulovirusa uz pojedinačnu ili istovremenu ekspresiju S, E i M proteina SARS-CoV u stanicama kukaca uspješno pripremljene virusima slične čestice. Navedene čestice morfološki odgovaraju virionima SARS-CoV te je dokazana njihova sposobnost poticanja humoralne (imunosti posredovane protutijelima koja luče B stanice) i stanične imunosti (imunosti posredovane T stanicama koje luče različite citokine, pr. interferon- γ i interleukin-4) (35). Pri tome, umjesto pojedinačnih virusnih proteina ili njihovih dijelova, kao antigeni mogu biti korišteni i kimerni proteini (kimerne virusima slične čestice) s više epitopa koje prepoznaju različite stanice imunosnog sustava (B i T stanice). Prednost kimernih proteina mogla bi biti i mogućnost istovremene imunizacije protiv različitih sojeva virusa u slučaju njegove ubrzane mutacije. Pri tome valja imati na umu da odabrani epitopi koji bi trebali izazvati specifičan imunosni odgovor zbog nedovoljne složenosti zahtijevaju istovremenu primjenu adjuvansa koji će pojačati mukozni i sustavni imunosni odgovor, primjerice B podjedinice toksina kolere ili termolabilnog enterotoksina bakterije *E. coli* (35). Jedno od cjepiva protiv SARS-CoV-2 dobivenih pomoću biljaka, a koje je trenutno u fazi pretkliničkih ispitivanja, sadrži takav kimerni protein kod kojeg je RBD dio S1 podjedinice S proteina virusa vezan s Fc regijom ljudskog IgG te nepoznati adjuvans (31).

Antigeni poput pojedinačnih S, M ili E proteina SARS-CoV-2 ili kimernih proteina mogu biti dobiveni prolaznom ekspresijom uz naknadno pročišćavanje ostataka agrobakterija i otrovnih sastavnica biljke domaćina za proizvodnju injekcijskih cjepiva. Istovremeno, u idealnom slučaju, moguća je i stabilna ekspresija uz teoretsku mogućnost proizvodnje oralnih cjepiva bez potrebe za pročišćavanjem liofilizirane biomase prilikom korištenja jestivih biljaka (slika 4.).

Ipak, valja imati na umu čimbenike koji bi mogli otežati razvoj jestivih cjepiva poput nepoznate stabilnosti i bioraspoloživosti antigena, kao i mogućnosti reproducibilnog dobivanja jednake doze antigena (35).

Također, jedna od mogućnosti za dobivanje visoko imunogenog cjepiva mogli bi biti i imuni kompleksi proizvedeni u biljkama. Imuni kompleksi su makromolekularne strukture sastavljene od antigena i protutijela koja se na njih vežu, a koje učinkovito prepoznaju antigen-prezentirajuće stanice. Primjer imunog kompleksa koji je pokazao visoku imunogenost u miševima bez korištenja adjuvansa je onaj dobiven spajanjem fragmenta C toksina tetanusa i odgovarajućeg monoklonskog protutijela proizvedenog u transgeničnom duhanu (35).



Slika 4. ► Mogući putevi i faze razvoja cjepiva protiv SARS-CoV-2 pomoću biljaka (preuzeto i prilagođeno prema 35)

S druge strane, rekombinantna bi protutijela (pasivna imunizacija) mogla usporiti zarazu i omogućiti organizmu da proizvede vlastita protutijela prije nego što osoba podlegne bolesti (32) te tako poslužiti kao jeftiniji i sigurniji oblik intravenskog liječenja u usporedbi s primjenom plazme pacijenata oporavljenih od COVID-19 (35). Slično je uočeno i kod primjene lijeka za ebolu, ZMapp®, koji sadrži visoku dozu tri neutralizirajuća protutijela, a koja su proizvedena pomoću biljaka, budući da primjena biljaka omogućuje proizvodnju potrebnih protutijela u dostatnoj količini. Uz proizvodnju protutijela koja omogućuju izravnu neutralizaciju virusa, biljke bi mogle proizvoditi i terapijska protutijela koja inhibiraju 'citokin-sku oluju' koja u teškim i fatalnim slučajevima često prati zarazu SARS-CoV-2. Trenutno se klinički ispituju protutijela sarilumab i tocilizumab, koja se koriste u liječenju reumatoidnog artritisa, a koja se vežu na receptor za interleukin-6 (32).

Zaključak

Cijeli je niz zaraznih bolesti za koje nema odobrenih cjepiva, pri čemu se trenutno⁵ posebno ističe pandemija bolesti COVID-19 uzrokovana virusom SARS-CoV-2 koja se proširila svijetom tijekom prve polovine 2020.

⁵ Autori napominju da se naznačena tvrdnja odnosila na trenutak slanja rada u časopis (18. srpnja 2020.). Do dana 3. ožujka 2021. na području Europske unije, uključujući Republiku Hrvatsku, odobrena su tri cjepiva protiv bolesti COVID-19: Comirnaty, COVID-19 Vaccine Moderna i COVID-19 Vaccine AstraZeneca.
<https://www.halmed.hr/COVID-19/Informacije-o-odobrenim-cjepivima/>, datum pristupa: 3.3.2021.

godine. Do današnjeg dana⁶ od ove je bolesti oboljelo više od 14 milijuna ljudi, a umrlo preko 600 000 ljudi (39). Kako bi se povećala vjerojatnost što bržeg dobivanja sigurnog i učinkovitog cjepiva u potrebnim količinama, potrebno je razvijati različite načine njegovog dobivanja, pa tako i proizvodnju cjepiva pomoću biljaka. S obzirom na relativno niske troškove proizvodnje, jednostavnu primjenu te generalnu sigurnost i učinkovitost, biljna cjepiva, usprkos svim svojim izazovima, predstavljaju obećavajuće sredstvo u borbi protiv zaraznih bolesti, uključujući i aktualnu pandemiju, posebice ako se uzme u obzir potreba za brzom proizvodnjom dostatnih količina cjepiva koja bi bila globalno dostupna.

3-4
2021

The possibilities of plant utilization in vaccine production

M. Friščić, Ž. Maleš, A-M. Domijan, T. Vilović, N. Rudman

Abstract The present paper gives basic data on vaccination and vaccine production using recombinant DNA technology with emphasis put on the possibilities, advantages and expected challenges of recombinant vaccine production in higher plants. The history and present situation considering utilization of plants in recombinant protein production, as well as its future perspectives, including the potential of plants in the development of vaccines against SARS-CoV-2, are also considered.

⁶ Autori napominju da se naznačena tvrdnja odnosila na trenutak slanja rada u časopis (18. srpnja 2020.). Do dana 3. ožujka 2021. zabilježeno je više od 115 milijuna slučajeva zaraze virusom SARS-CoV-2 te više od 2,5 milijuna smrtnih slučajeva povezanih s bolešću COVID-19.

<https://www.worldometers.info/coronavirus/>, datum pristupa: 3.3.2021.

1. Plotkin S. History of vaccination. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111:12283–12287.
2. Bralić I. Cijepljenje: Najuspješniji preventivni program. *Paediatr Croat*. 2016; 60:152–159.
3. Concha C, Cañas R, Macuer J, Torres MJ, Herrada AA, Jamett F, Ibáñez C. Disease prevention: An opportunity to expand edible plant-based vaccines? *Vaccines*. 2017; 5:14.
4. Plotkin S, Robinson JM, Cunningham G, Iqbal R, Larsen S. The complexity and cost of vaccine manufacturing – an overview. *Vaccine*. 2017; 35:4064–4071.

5. Lee JH, Ko K. Production of recombinant anti-cancer vaccines in plants. *Biomol Ther* (Seoul). 2017; 25:345–353.
6. Sala F, Rigano MM, Barbante A, Basso B, Walmsley AM, Castiglione S. Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. *Vaccine*. 2003; 21:803–808.
7. Streatfield SJ. Plant-based vaccines for animal health. *Rev Sci Tech*. 2005; 24:189–199.
8. Rybicki EP. Plant-produced vaccines: promise and reality. *Drug Discov Today*. 2009; 14:16–24.
9. Ma JKC, Drake PMW, Christou P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet*. 2003; 4:794–805.
10. Laere E, Kiong Ling AP, Wong YP, Koh RY, Lila MAM, Hussein S. Plant-based vaccines: production and challenges. *J Bot*. 2016; DOI: 10.1155/2016/4928637.
11. Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci*. 2001; 6:219–226.
12. Chan HT, Daniell H. Plant-made oral vaccines against human infectious disease – are we there yet? *Plant Biotechnol J*. 2015; 13:1056–1070.
13. Shil PK, Kwon KC, Zhu P, Verma A, Daniell H, Li Q. Oral delivery of ACE2/Ang-(1-7) bioencapsulated in plant cells protects against experimental uveitis and autoimmune uveoretinitis. *Mol Ther*. 2014; 22:2069–2082.
14. Takeyama N, Kiyono H, Yuki Y. Plant-based vaccines for animals and humans: recent advances in technology and clinical trials. *Ther Adv Vaccines*. 2015; 3:139–154.
15. Barta A, Sommergruber K, Thompson D, Hartmuth K, Matzke MA, Matzke AJM. The expression of a nopaline synthase - human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Mol Biol*. 1986; 6:347–357.
16. Mason HS, Lam DM, Arntzen CJ. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89:11745–11749.
17. Thanavala Y, Yang YF, Lyons P, Mason HS, Arntzen CJ. Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92:3358–3361.
18. Curtiss III R, Cardineau GA. Oral immunisation by transgenic plants. United States patent US 5,679,880. 1997 Oct 21.
19. Ma JK. The caries vaccine: a growing prospect. *Dent Update*. 1999; 26:374–380.
20. Li JT, Fei L, Mou ZR, Wei J, Tang Y, He HY, Wang L, Wu YZ. Immunogenicity of a plant-derived edible rotavirus subunit vaccine transformed over fifty generations. *Virology*. 2006; 356:171–178.
21. <https://www.who.int/immunization/diseases/en>, datum pristupa: 18.7.2020.
22. Harapan H, Itoh N, Yufika A, Winardi W, Keam S, Te H, Megawati D, Hayati Z, Wagner AL, Mudatsir M. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): A literature review. *J Infect Public Health*. 2020; 13:667–673.

23. <https://www.worldometers.info/coronavirus/worldwide-graphs>, datum pristupa: 18.7.2020.
24. Pascarella G, Strumia A, Piliengo C, Bruno F, Del Buono R, Costa F, Scarlata S, Agrò FE. COVID-19 diagnosis and management: a comprehensive review. *J Intern Med*. 2020; DOI: 10.1111/joim.13091.
25. https://ec.europa.eu/info/live-work-travel-eu/health/coronavirus-response/public-health_hr, datum pristupa: 18.7.2020.
26. Rugarabamu S, Mboera L, Rweyemamu M, Mwanyika G, Lutwama J, Paweska J, Misinzo J. Forty-two years of responding to Ebola virus outbreaks in Sub-Saharan Africa: a review. *BMJ Global Health*. 2020; 5:e001955, DOI: 10.1136/bmjgh-2019-001955.
27. <https://www.who.int/emergencies/diseases/ebola/drc-2019>, datum pristupa: 18.7.2020.
28. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/first-fda-approved-vaccine-prevention-ebola-virus-disease-marking-critical-milestone-public-health>, datum pristupa: 18.7.2020.
29. Ollmann Saphire E. A vaccine against ebola virus. *Cell*. 2020; 181:6, DOI: 10.1016/j.cell.2020.03.011.
30. Thanh Le T, Andreadakis Z, Kumar A, Gómez Román R, Tollefsen S, Saville M, Mayhew S. The COVID-19 vaccine development landscape. *Nat Rev Drug Discov*. 2020; 19:305–306.
31. <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>, datum pristupa: 18.7.2020.
32. Capell T, Twyman RM, Armario-Najera V, Ma JKC, Schillberg S, Christou P. Potential applications of plant biotechnology against SARS-CoV-2. *Trends Plant Sci*. 2020; 25:635–643.
33. Alanagreh L, Alzoughool F, Atoum M. The human coronavirus disease COVID-19: Its origin, characteristics, and insights into potential drugs and its mechanisms. *Pathogens*. 2020; 9:331, DOI: 10.3390/pathogens9050331.
34. Rosales-Mendoza S. Will plant-made biopharmaceuticals play a role in the fight against COVID-19? *Expert Opin Biol Ther*. 2020; 20:545–548.
35. Rosales-Mendoza S, Márquez-Escobar VA, González-Ortega O, Nieto-Gómez R, Arévalo-Villalobos JI. What does plant-based vaccine technology offer to the fight against COVID-19? *Vaccines*. 2020; 8:183, DOI: 10.3390/vaccines8020183.
36. Dai S, Wang H, Deng F. Advances and challenges in enveloped virus-like particles (VLP)-based vaccines. *J Immunol Sci*. 2018; 2:36–41.
37. Qian C, Liu X, Xu Q, Wang Z, Chen J, Li T, Zheng Q, Yu H, Gu Y, Li S, Xia N. Recent progress on the versatility of virus-like particles. *Vaccines* 2020; 8:139, DOI: 10.3390/vaccines8010139.
38. <https://www.medicago.com/en/newsroom/medicago-announces-positive-results-in-animal-trials-for-its-vaccine-candidate-against-covid-19/>, datum pristupa: 18.7.2020.
39. <https://www.worldometers.info/coronavirus/>, datum pristupa: 18.7.2020.

Primljeno 18. srpnja 2020.