

**Autoreferat**

**Tomasz Pniewski**

**Instytut Genetyki Roślin  
Polskiej Akademii Nauk**

**Poznań 2013**

### **Uzyskanie stopnia magistra**

Magister biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań, 4.07.1996, Dyplom nr 791.

Praca magisterska pt. "Transformacja łubinu żółtego *Lupinus luteus* L. cv Ventus za pomocą *Agrobacterium tumefaciens*".

### **Uzyskanie stopnia doktora**

Doktor biochemii, Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, Poznań, 28.02.2002.

Rozprawa doktorska z wyróżnieniem, pt. "Ekspresja w roślinach antygenów wirusowych o potencjalnym znaczeniu aplikacyjnym".

### **Zatrudnienie**

- 1) Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, Poznań, 04.1999 – 06.2001, asystent.
- 2) Thomas Jefferson University, Department of Microbiology and Immunology, Filadelfia, Stany Zjednoczone, 03.2002 – 05.2003, Post-doctoral fellowship.
- 3) Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, Poznań, 06.2003 – nadal, adiunkt.

**Główne osiągnięcie naukowo - badawcze**

**Doustna szczepionka  
pochodzenia roślinnego  
przeciwko HBV**

Prezentowane osiągnięcie naukowo-badawcze jest zawarte w następujących publikacjach:

- I. **Pniewski T\***, Kapusta J\*, Płucienniczak A (2006) “*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of yellow lupin to generate callus tissue producing surface antigen of HBV in a long-term culture. *J Appl Genet* 47: 309-318.  
\* - jednakowy wkład do publikacji [20 pkt MNiSW, 12 cytowań wg WoS]
  
- II. Kostrzak A, Cervantes Gonzalez M, Guetard D, Nagaraju DB, Wain-Hobson S, Tepfer D, **Pniewski T**, Sala M (2009) Oral administration of low doses of plant-based HBsAg induced antigen-specific IgAs and IgGs in mice, without increasing levels of regulatory T cells. *Vaccine* 27: 4798-4807.  
[IF<sub>2009</sub> 3,616, 35 pkt MNiSW, 19 cytowań wg WoS]
  
- III. Kapusta J\*, **Pniewski T\***, Wojciechowicz J\*, Bociąg P, Płucienniczak A (2010) Nanogram doses of alum-adsorbed HBs antigen induces humoral immune response in mice when orally administered. *Arch Immunol Ther Exp* 58: 143–151.  
\* - jednakowy wkład do publikacji [IF<sub>2010</sub> 2,385, 20 pkt MNiSW, 7 cytowań wg WoS]
  
- IV. **Pniewski T\***, Kapusta J\*, Bociąg P, Wojciechowicz J, Kostrzak A, Gdula M, Fedorowicz-Strońska O, Wójcik P, Otta H, Samardakiewicz S, Wolko B, Płucienniczak A (2011) Low-dose oral immunization with lyophilized tissue of herbicide-resistant lettuce expressing hepatitis B surface antigen for prototype plant-derived vaccine tablet formulation. *J Appl Genet* 52: 125-136.  
\* - jednakowy wkład do publikacji [IF<sub>2011</sub> 1,664, 20 pkt MNiSW, 9 cytowań wg WoS]
  
- V. **Pniewski T**, Kapusta J, Bociąg P, Kostrzak A, Fedorowicz-Strońska O, Czyż M, Gdula M, Krajewski P, Wolko B, Płucienniczak A (2012) Plant expression, lyophilisation and storage of HBV medium and large surface antigens for a prototype oral vaccine formulation. *Plant Cell Rep* 31: 585-595.  
[IF<sub>2011</sub> 2,274, 35 pkt MNiSW, 6 cytowań wg WoS]
  
- VI. **Pniewski T** (2012) Is an oral plant-based vaccine against Hepatitis B Virus possible? *Curr Pharm Biotechnol* 13: 2692-2704. [IF<sub>2011</sub> 2,805, 30 pkt MNiSW, 1 cytowanie wg WoS]

Niniejsze opracowanie ma charakter łącznika dla wyżej wymienionych publikacji i stanowi komentarz do wyników prac (w załączeniu odbitki publikacji).

## **Rozdział 1. Wprowadzenie.**

Do niedawna biotechnologię roślin utożsamiano z tzw. zieloną biotechnologią, związaną z wykorzystaniem w rolnictwie GMO (Genetically Modified Organisms) czyli roślin modyfikowanych genetycznie. Obecnie coraz częściej opracowywane są bioproceny luźno bądź wcale nie związane z rolnictwem. Część nowych biotechnologii wykorzystuje naturalny potencjał roślin w bioenergetyce, fitoremediacji czy do otrzymywania naturalnych substancji leczniczych na skalę przemysłową. Natomiast kategorię biotechnologii roślin o największym stopniu wykorzystania inżynierii genetycznej i jednocześnie technologii bioprosesowych, stanowi tzw. biofarming czyli zastosowanie roślinnych układów ekspresyjnych jako bioreaktorów produkujących zupełnie nowe dla „natury” roślin substancje heterologiczne, przede wszystkim biofarmaceutyki.

Biofarmaceutyki to najczęściej białka, rzadko inne związki, o znaczeniu medycznym, w tym terapeutycznym, profilaktycznym i diagnostycznym. Rośliny transgeniczne i/lub pochodne kultury tkankowe oraz rośliny-gospodarze dla zrekombinowanych wirusów mogą wytwarzać m. in. niektóre składniki krwi, hormony, immunomodulatory, w tym cytokiny i limfokiny, anty- i koagulanty, nutraceutyki i inne. Jednak najważniejszymi, a zarazem najczęściej otrzymywanymi i badanymi biofarmaceutykami pozostają przeciwciała i szczepionki przeciwko chorobom człowieka i zwierząt. Do tej pory wytworzono ponad sto różnych białek antygenowych o znaczeniu szczepionkowym w około stu różnych roślinnych układach ekspresyjnych, co opisano w kilkuset publikacjach naukowych (Daniell i in. 2009, Tiwari i in. 2011, Kwon i in. 2012).

Rozwój badań nad wykorzystaniem roślin do produkcji szczepionek wynikał z kilku postulatów. Rośliny mogą wydajnie syntetyzować różne białka heterologiczne, porównywalnie z innymi systemami ekspresyjnymi. Białka te występują w formie natywnej i aktywnej biologicznie, co często było i jest problematyczne w przypadku bakterii i innych mikroorganizmów. Szczepionki ‘roślinne’ powinny być też naturalnie bezpieczne, gdyż rośliny nie zawierają toksyn bakteryjnych i nie przenoszą ludzkich i zwierzęcych czynników infekcyjnych. Najważniejszym jednakże założeniem otrzymywania szczepionek w roślinach była możliwość immunizacji drogą doustną, a początkowo rośliny wytwarzające białka antygenowe miały być wręcz stosowane jako ‘szczepionki jadalne’. Doustna droga podania antygeny implikowała ograniczenie lub nawet eliminację obróbki materiału roślinnego, przede wszystkim oczyszczania białek. Ponadto prosta i bezbolesna metoda szczepienia wykluczała użycie dodatkowego sprzętu jak strzykawki, rękawiczki itp. oraz stwarzała możliwość ograniczenia obsługi medycznej. Postulowano również, że szczepionki w

roślinach będą trwałe, a zatem przechowywane i rozprowadzane w warunkach temperatury otoczenia. Miało to skutkować eliminacją konieczności dystrybucji w warunkach chłodniczych czyli tzw. zimnego łańcucha (cold chain) i dalszym ograniczeniem kosztów. Dodatkowym ważnym argumentem za podjęciem około 20 lat temu badań nad ‘szczepionkami jadalnymi’, były niewystarczające wówczas wyniki tradycyjnych szczepień poprzez iniekcję parenteralną, tj. domięśniową, podskórną lub dootrzewnową. Typowym przykładem programów szczepień o niepełnej skuteczności było i pozostaje nadal zapobieganie wirusowemu zapaleniu wątroby typu B (wzw B, hepatitis B).

Otrzymanie szczepionki przeciwko wzw B, opartej na inaktywowanym wirusie z krwi nosicieli, było przełomem w walce z tą chorobą (Krugman 1982). Wkrótce potem, wprowadzenie wysoce efektywnej szczepionki podjednostkowej zawierającej rekombinowany antygen powierzchniowy wirusa (McAleer i in. 1984) zrewolucjonizowało profilaktykę tej choroby i umożliwiło powszechne szczepienia. Jednak pomimo 10 lat programów masowych szczepień, wzw B było w latach 90-tych nadal jedną z najbardziej rozpowszechnionych i groźnych chorób (Hollinger 1996, Engler i in. 2001), gdyż cena szczepionki, a przede wszystkim stworzenie odpowiedniej infrastruktury medycznej okazało się być barierą dla wielu krajów rozwijających się. Stąd, potencjalnie tanie i ogólnodostępne szczepionki pochodzenia roślinnego mogły być istotną alternatywą dla tradycyjnych szczepionek iniekcyjnych, szczególnie w ubogich regionach. Jednakże, pomimo wielu lat badań nie udało się jeszcze wdrożyć żadnej szczepionki pochodzenia roślinnego do praktyki klinicznej. Z drugiej strony, prace są ciągle prowadzone i zaowocowały rozwojem badań podstawowych i aplikacyjnych nad wytwarzaniem różnych białek w roślinnych bioreaktorach, otrzymywaniem szczepionek z materiału roślinnego oraz mechanizmami immunizacji doustnej. Klasycznym przykładem ewolucji poglądów odnośnie ‘szczepionek roślinnych’ jest właśnie szczepionka przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu B (Hepatitis B Virus, HBV).

Idea wytwarzania szczepionek w roślinach pojawiła się na początku lat 90-tych XX wieku. Badania w tym kierunku zostały zainicjowane w Polsce przez prof. Andrzeja Płucienniczaka, w ramach projektu „Ekspresja antygeny powierzchniowego (HBsAg) wirusa żółtaczki zakaźnej typu B w komórkach roślin.” (KBN, Nr 4 4379 91 02, 1992-95), którego celem było otrzymanie szczepionki przeciwko HBV. Jednak pierwsze wyniki dotyczące wytwarzania w roślinach podstawowego dla szczepień białka wirusa, tj. małego antygeny powierzchniowego (S-HBsAg, Small Hepatitis B surface Antigen), zostały opublikowane przez naukowców amerykańskich (Mason i in. 1992, Lam i Arntzen 1996). Szczepionka

przeciwko HBV szybko stała się sztandarowym przykładem ‘szczepionek roślinnych’, mimo że początkowo ‘roślinny’ S-HBsAg był po wstępnym oczyszczeniu aplikowany poprzez iniekcję (Thanavala i in. 1995), a więc był tylko potencjalnym zamiennikiem powszechnie stosowanych szczepionek otrzymywanych z drożdży i komórek ssaczych, np. Engerix B, Euvax, HB-Vax, Twinrix itp. (Brocke i in. 2005).

Wkrótce jednak wypracowano koncepcję użycia roślin jako tzw. ‘szczepionek jadalnych’. Początkowo do szczepienia poprzez spożycie surowych tkanek wykorzystywano rośliny zawierające białka o właściwościach silnych adiuwantów śluzówkowych (Holmgren i in. 1994), pochodzące z patogenów atakujących jelito, jak Lt-B (heat-labile enterotoxin subunit B) z *Escherichia coli*, czy CTB (cholera toxin subunit B) z *Vibrio cholerae* (Haq i in. 1995, Arakawa i in. 1998, Mason i in. 1998). Natomiast wraz z doktorem Józefem Kapustą i innymi współpracownikami, w Pracowni Biologii Molekularnej Roślin kierowanej przez prof. Andrzeja Legockiego w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, wykazano po raz pierwszy, że ‘szczepionki jadalne’ mogą być efektywne także przeciwko chorobom przenoszonym przez krew, jak m. in. hepatitis B. Kontynuując badania prof. Płucienniczaka i wnosząc swój wkład do prac nad ‘szczepionką roślinną’ przeciwko HBV, jako nośnik szczepionki zaproponowano i otrzymano sałatę siewną (*Lactuca sativa* L.), a także kalus łubinu (*Lupinus luteus* L.) wytwarzające S-HBsAg. Po zjedzeniu kalusa bądź liści, odpowiednio przez myszy lub ochotników, obserwowano we krwi obecność specyficznych przeciwciał anti-HBs (Kapusta i in. 1999). Tym wynikiem udowodniono, że możliwe jest wywołanie ogólnoustrojowej humoralnej odpowiedzi immunologicznej wyłącznie przez kontakt antygeny bezpośrednio z błoną śluzową jelita, a ściślej z komórkami układu immunologicznego związanego z przewodem pokarmowym (GALT, Gut Associated Lymphoid Tissue).

Sukces, chociaż przełomowy, był jednak częściowy. Poziom odpowiedzi immunologicznej był niski, osiągając miano przeciwciał anti-HBs w surowicy krwi tylko kilkanaście mIU/ml (International Units), podczas gdy za minimalny poziom ochronny przyjmuje się 10 mIU/ml (International Group 1988), a za przyjęty w praktyce klinicznej realnie skuteczny 100 mIU/ml (Hollinger 1996). Jedną z przyczyn niskiej odpowiedzi immunologicznej mogła być niewielka zawartość S-HBsAg w sałacie bądź kalusie łubinu, odpowiednio tylko do 35 lub 140 ng/ g św. masy. Jakkolwiek udało się ustalić wpływ schematu immunizacji, tj. dawkowania i odstępów czasowych między podaniami antygeny, na odpowiedź immunologiczną, szczepienie poprzez spożywanie tkanki roślinnej zawierającej S-HBsAg okazało się zabiegiem o niewielkim stopniu powtarzalności (Kapusta i in. 2001).

Główną przyczyną był najprawdopodobniej długi czas ekspozycji antygeny wobec komórek GALT, wynikający w naturalny sposób ze spożywania pokarmu roślinnego. Ujawniły się również inne negatywne aspekty 'jadalnej szczepionki'. Niski poziom ekspresji antygeny w roślinach powodował konieczność aplikowania stosunkowo dużej biomasy tkanki, co dodatkowo wymuszało jej przedłużone spożywanie przez ochotników. Taki sposób immunizacji 'pokarmowej' był nie tylko skrajnie niedogodny, ale przede wszystkim był najbardziej prawdopodobną przyczyną niskiej odpowiedzi immunologicznej. Nietrwałość surowej tkanki i praktycznie niemożliwe określenie dawki antygeny w aplikowanej ilości materiału skutkowało brakiem kontroli procedury immunizacji. W konsekwencji 'szczepionki jadalne' cechowały się bardzo niską efektywnością oraz stwarzały poważne ryzyko nabycia tolerancji pokarmowej na podawany antygen.

Ujawnione problemy wymusiły rewizję pierwotnych poglądów odnośnie 'szczepionek jadalnych', w tym szczepionki przeciwko HBV. Dalsze badania, podjęte wg nowo zdefiniowanych założeń, miały doprowadzić do otrzymania efektywnej i możliwej do stosowania w praktyce szczepionki doustnej pochodzenia roślinnego przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu B.

## **Rozdział 2. Cel prowadzonych badań.**

Celem prac, których wyniki stały się podstawą publikacji składających się na rozprawę habilitacyjną, było:

1. Otrzymanie roślin wydajnie wytwarzających białka powierzchniowe HBV, głównie podstawowe dla szczepień białko S-HBsAg, tj. mały antygen powierzchniowy HBV oraz pozostałe: średni i duży antygen powierzchniowy, tj. M-HBsAg i L-HBsAg (publikacje I, IV i V),
2. Opracowanie formy efektywnej i praktycznej w użyciu szczepionki doustnej pochodzenia roślinnego przeciwko HBV (publikacje IV, V i VI),
3. Rozpoznanie warunków indukcji efektywnej odpowiedzi immunologicznej na drodze jelitowo-słuzówkowej i opracowanie odpowiedniej metodologii immunizacji doustnej (publikacje II, III, IV, VI).

Powyższe zagadnienia ściśle łączą się ze sobą. Stąd badania nad nimi cechowały się wielotorowością i prowadzono je najczęściej równolegle. Poniżej omówiono ogólnie uwarunkowania, założenia i rezultaty badań własnych na tle prac innych autorów. Szczegółowe wyniki i prowadzone dyskusje są przedmiotem publikacji naukowych, składowych niniejszej rozprawy.



### **Rozdział 3. Wytwarzanie antygenów powierzchniowych HBV w roślinach.**

Wyniki badań własnych nad otrzymywaniem roślin produkujących antygeny powierzchniowe HBV dla potrzeb szczepionki doustnej przeciwko HBV przedstawiono w publikacjach I, IV i V, będących podstawą niniejszej rozprawy. Tło badań podejmowanych w wielu ośrodkach na świecie oraz wyniki innych autorów zebrano i przedstawiono szczegółowo w publikacji przeglądowej „Is an oral plant-based vaccine against Hepatitis B Virus possible?” *Curr Pharm Biotechnol* 2012, 13: 2692-2704, również składającej się na niniejszą rozprawę (publikacja VI). Poniżej przedstawiono ogólnie najważniejsze tezy lub wyniki opisane w wymienionych publikacjach.

Wiriony HBV zbudowane są z otoczki oraz nukleokapsydu, złożonego z kapsydu i ukrytego wewnątrz DNA razem z wirusową polimerazą DNA. Kapsyd HBV zbudowany jest z tzw. białka rdzeniowego C, będącego antygenem o właściwościach silnego immunogenu (Hepatitis B core Antigen, HBcAg). HBcAg jest jednak zarazem wskaźnikiem późnej fazy zakażenia HBV. Stąd może być rozpatrywany wyłącznie jako tzw. szczepionka terapeutyczna dla chronicznych nosicieli HBV (Böcher i in. 2001) lub nośnik dla epitopów innych antygenów (Chen i in. 2004, Sominskaya i in. 2010). Natomiast szczepionki profilaktyczne przeciwko HBV oparte są na antygenie powierzchniowym wirusa.

Antygen powierzchniowy HBV (Hepatitis B surface Antigen, HBsAg) składa się z trzech białek podjednostkowych, traktowanych często jak odrębne antygeny: mały (small, S-HBsAg), średni (medium, M-HBsAg) i duży (large, L-HBsAg). Antygeny te stanowią odpowiednio 80-95%, 5-15% i 1-2% białek otoczki i jako jej składniki są w pierwszej kolejności rozpoznawane przez komórki układu immunologicznego. Kolejnym czynnikiem determinującym silną antygenowość i immunogenność białek powierzchniowych HBV jest ich zdolność do samoorganizacji w cząstki subwiralne (Bruss 2007). Cząstki takie (SubViral Particles, SVPs), są strukturami wielkości kilkunastu - kilkudziesięciu nm, w których immunogenne epitopy wirusa są znacznie zwielokrotnione. Najczęstszymi typami SVPs są cząstki wirusopodobne (Virus-Like Particles, VLPs), tworzone przez białka powierzchniowe oraz cząstki kapsydopodobne (Capsid-Like Particles, CLPs) formowane przez białka kapsydu. Czasem, jak w przypadku HBV, tworzenie cząstek subwiralnych jest częścią naturalnego cyklu życiowego. Jednak generalnie SVPs są strukturami tworzonymi samoczynnie przez białka strukturalne wirusa, niezależnie od tworzenia wirionów potomnych. Z tego powodu SVPs mogą być wytwarzane w różnych układach ekspresyjnych, włączając rośliny. SVPs jako struktury nie zawierające materiału genetycznego, są nieinfekcyjne. Natomiast z powodu

trwałości, wielkości i struktury przypominającej natywne wiriony, są one silnymi immunogenami. Stąd od pierwszych prób ich wykorzystania (Boisgerault i in. 2002), SVPs różnych wirusów zyskują na znaczeniu jako samodzielne szczepionki lub nośniki dla różnych epitopów lub całych antygenów (Sominskaya i in. 2010, Chen i Lai 2013, Zeltins 2013).

S-HBsAg samodzielnie formuje się w cząstki wirusopodobne o średnicy ok. 22 nm i zawierające ok. 100 cząsteczek białka, zarówno podczas infekcji HBV jak i w sztucznych układach ekspresyjnych. Rekombinowane drożdże są głównym producentem VLPs złożonych z antygeny S-HBsAg, podstawowego składnika powszechnie stosowanych iniekcyjnych szczepionek przeciwko HBV. W warunkach naturalnych, u zakażonych pacjentów, VLPs zawierają często także M-HBsAg, a niekiedy L-HBsAg. Same białka M- i L-HBsAg w naturalnych warunkach nie tworzą rzeczywistych cząstek wirusopodobnych, ale w sztucznych układach ekspresyjnych łączą się w kilku- lub kilkunastocząsteczkowe agregaty, a niekiedy cząstki (Imamura i in. 1987, Yamada i in. 2001, Bruss 2007). Najprawdopodobniejszą przyczyną ograniczonego formowania cząstek subwiralnych przez średni i duży antygen powierzchniowy HBV jest wielkość cząsteczek i wynikające stąd przeszkody przestrzenne. Wszystkie białka powierzchniowe HBV zawierają domenę S o wielkości 226 aminokwasów (aa). Podczas gdy S-HBsAg jest zbudowany wyłącznie z tej domeny, M-HBsAg zawiera dodatkowo N-końcową domenę preS2 o wielkości 55 aa, a L-HBsAg poza preS2 jeszcze preS1 złożoną ze 108-124 aa, w zależności od szczepu HBV. Dodatkowe domeny, chociaż utrudniają tworzenie VLPs, decydują zarazem o zwiększonej antygenowości M- i L-HBsAg (Blanchet i Sureau 2007). Szczepionki zawierające oprócz S-HBsAg także jeden lub dwa pozostałe białka powierzchniowe HBV są bardziej immunogenne od klasycznych, opartych tylko na S-HBsAg. Nowe szczepionki III generacji są coraz szerzej wdrażane do profilaktyki, szczególnie w sytuacjach zwiększonego ryzyka lub braku reakcji pacjentów na tradycyjne szczepionki (Young i in. 2001, Madaliński i in. 2002, Rendi-Wagner i in. 2006). Ponadto antygeny powierzchniowe wirusa, przede wszystkim M- i L-HBsAg, wspólnie z antygenem rdzeniowym HBcAg są stosowane w pilotażowych badaniach nad terapią chronicznej postaci wzwb B (Yuen i in. 2001, Chen i in. 2004, Sominskaya i in. 2010).

Oprócz wymogów sterycznych, do tworzenia stabilnych cząstek subwiralnych przez antygeny powierzchniowe HBV konieczna jest dostępność lipidów błon retikulum endoplazmatycznego komórki gospodarza i możliwość kumulacji bądź wydzielania uformowanych cząstek. Właściwości białek i warunki tworzenia przez nie struktur wyższego rzędu decydują o możliwości i skali syntezy w układach ekspresyjnych. O ile S-HBsAg może być wytwarzany przez drożdże, głównym źródłem pozostałych antygenów powierzchniowych

HBV są linie komórek ssaczych, np. CHO (Chinese Hamster Ovary), (Brocke i in. 2005). Natomiast rośliny są zdolne do syntezy wszystkich antygenów powierzchniowych HBV, ale poziom ekspresji poszczególnych białek może wykazywać znaczne zróżnicowanie.

Wytwarzanie antygenów powierzchniowych HBV, było procesem najintensywniej badanym w przypadku podstawowego antygeny o znaczeniu szczepionkowym, tj. S-HBsAg. Oprócz znaczenia medycznego, białko to poprzez swoją właściwość tworzenia trwałych cząstek wirusopodobnych, jest zarówno doskonałym obiektem badawczym, jak i wydaje się być predestynowane do wydajnej produkcji w roślinach, podobnie jak w innych układach ekspresyjnych. Pierwsze wyniki tych prac były jednak niesatysfakcjonujące. Zawartość S-HBsAg w roślinach transgenicznym wynosiła od zaledwie kilkudziesięciu ng (Kapusta i in. 1999) do maks. 2 - 3  $\mu\text{g/g}$  św. masy tkanki (Mason i in. 1992). Zwiększenie akumulacji S-HBsAg próbowano osiągnąć różnymi sposobami, wśród których można wyróżnić kierunek „fizjologiczny” i „molekularny”. Do pierwszego można zaliczyć próby doboru odpowiedniego gatunku-gospodarza oraz rodzaju układu ekspresyjnego, tj. kompletnych roślin, kultur tkankowych lub zawiesinowych, a także optymalizacji ich warunków wzrostu. Drugi kierunek obejmuje wszelkie modyfikacje przenoszonych do roślin za pośrednictwem *Agrobacterium* sp. kaset ekspresyjnych zawierających sekwencję kodującą S-HBsAg. Poziom ekspresji S-HBsAg próbowano zwiększyć poprzez zastosowanie m. in. i/ wysoce aktywnych promotorów konstytutywnych z dodatkowymi enhancerami lub promotorów organo- bądź fizjologicznie specyficznych, ii/ oryginalnych bądź pochodzących z wirusów roślinnych sekwencji UTR wzmacniających transkrypcję, iii/ sekwencji sygnałowych np. kierujących do retikulum endoplazmatycznego lub wakuoli, czy wreszcie iv/ optymalizację sekwencji kodującej antygen pod kątem użycia kodonów (codon usage) właściwego dla roślin. Pełen przegląd i omówienie wyników zarysowanych działań, podejmowanych przez różnych autorów i opisanych w kilkudziesięciu pracach, stanowi część publikacji przeglądowej, składającej się na niniejszą rozprawę (publikacja VI).

W pracach własnych prowadzono badania wpisujące się w obydwie ww. kierunki działań zmierzających do zwiększenia wydajności produkcji S-HBsAg. Dzięki optymalizacji warunków wzrostu kalusa poprzez modyfikację składu pożywek, częstości pasażu itp., udało się uzyskać wzrost akumulacji antygeny do ok. 6  $\mu\text{g/g}$  św. masy (publikacja I). Była to wartość porównywalna, a często wyższa od wyników innych autorów, opisywanych dla kultur tkankowych i zawiesinowych, a niekiedy całych roślin. Tylko w nielicznych przypadkach, w ustabilizowanych kulturach zawiesinowych tytoniu lub soi uzyskiwano kilku- lub

kilkunastokrotnie wyższe wyniki (Smith i in. 2002, Sojikul i in. 2003, Sunil Kumar i in. 2005), jednakże w tych przypadkach stosowano również modyfikowane kasety ekspresyjne (por. wyżej). Otrzymany kalus stosunkowo wydajnie wytwarzający S-HBsAg mógł być zastosowany w pilotażowych badaniach na zwierzętach nad immunizacją doustną. Niezależnie jednak od osiągniętego postępu uznano, że w bliskiej perspektywie konieczna jest zmiana roślinnego producenta-nośnika antygeny, który nie wymagałby kultur *in vitro* w fazie ustabilizowanego wzrostu i umożliwiałby otrzymywanie prostej w stosowaniu i skutecznej szczepionki.

Odpowiednie badania rozpoczęto w projekcie pt. „Ekspresja antygenów HBV w roślinach transgenicznym dla potrzeb rekombinowanej szczepionki nowej generacji przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B.” (MNI, Nr 2 P04B 001 27, 2004-07). Podjęte prace zmierzały do otrzymania roślin transgenicznym wydajnie produkujących wszystkie białka antygenowe HBV, tj. antygeny powierzchniowe S-, M- i L-HBsAg oraz antygen rdzeniowy HBcAg. Ekspresja ostatniego z wymienionych antygenów jako nośnika epitopów i potencjalnego składnika szczepionki wyłącznie terapeutycznej, jest zagadnieniem odrębnym i nie wchodzi w zakres niniejszej rozprawy.

Wg założeń ww. projektu, głównym nośnikiem szczepionki pozostała sałata, ale do wytwarzania S-HBsAg zastosowano ulepszoną kasetę ekspresyjną. W porównaniu do innych autorów przyjęto jednak całkowicie odmienne podejście do tego problemu. Analiza danych literaturowych wskazywała bowiem, że wyposażanie kaset ekspresyjnych w dodatkowe elementy często nie gwarantowało wydajnej ekspresji. Można było nawet założyć, że stosowanie wysoce aktywnych promotorów czy dodatkowych wirusowych sekwencji UTR itp., teoretycznie zwiększających intensywność transkrypcji, najprawdopodobniej skutkowało wyciszaniem wprowadzonych transgenów (gene silencing). Skonstruowano zatem możliwie najprostszą kasetę ekspresyjną, gdzie sekwencję S-HBsAg, ograniczoną ściśle do części kodującej, połączono bezpośrednio z krótką sekwencją 5'-UTR konstytutywnego promotora 35S z pojedynczym enhancerem oraz terminatorem NOS (publikacja IV). Było to podejście jeszcze bardziej restrykcyjne niż poprzednio zastosowana kasetę (publikacja I), gdzie sekwencja S-HBsAg posiadała naturalne sekwencje 5'- i 3'-UTR, pochodzące z wirusa HBV.

Przyjęte założenie okazało się słuszne. S-HBsAg był wydajnie akumulowany w liściach sałaty – średnio do 20, a maks. do 60  $\mu\text{g/g}$  św. masy i poziom ten utrzymywał się w pierwotnym i potomnym pokoleniu transformantów. Były to wartości porównywalne, a często kilkukrotnie wyższe od dotychczas uzyskiwanych wyników (por. publikacja IV i zestawienie w publikacji VI). Ponadto, jak wykazały analizy immunoenzymatyczne, S-HBsAg był

syntetyzowany w formie natywnej i składał się w cząstki wirusopodobne, obserwowane bezpośrednio w mikroskopie transmisyjnym. Podobne wyniki zostały opublikowane dopiero w ostatnim czasie. Poziom S-HBsAg osiągający do 71  $\mu\text{g/g}$  masy uzyskano w nasionach kukurydzy po zastosowaniu kilkakrotnie zmultiplikowanego promotora globuliny, jednego z białek zapasowych (Hayden i in. 2012a, 2012b). Należy również podkreślić, że omawiane wyniki są jak dotąd najwyższymi uzyskanymi dla roślin transgenicznych. Kilkrotnie wyższą wydajność produkcji S-HBsAg - do 295  $\mu\text{g/g}$  św. masy (Huang i in. 2008), uzyskano bowiem wyłącznie w układzie ekspresji przejściowej wykorzystującej system MagnICON<sup>®</sup>, częściowo wykorzystujący wektory wirusowe i ich zdolność do masowej propagacji (Gleba i in. 2005). Jednak w tym przypadku, rośliny wykorzystano jedynie jako bioreaktor produkujący S-HBsAg w formie VLPs do późniejszego oczyszczania i stosowania jako szczepionki iniekcyjnej, a nie doustnej. Ponadto, wspomniane niewątpliwie osiągnięcie pozostało odosobnionym przypadkiem, gdyż metody ekspresji przejściowej w odniesieniu do S-HBsAg jak dotąd nie udało się zastosować na szeroką skalę.

W odróżnieniu od małego antygeny powierzchniowego S-HBsAg, ekspresja w roślinach pozostałych antygenów otoczki HBV – średniego i dużego – M- i L-HBsAg, była badana w znacznie mniejszym zakresie (por. zestawienie w publikacji VI). Przyczynami mniejszego natężenia prac nad wytwarzaniem ww. białek mogło być to, że pomimo swojego znaczenia medycznego, są one rzadziej wykorzystywane w prewencji wzw B niż S-HBsAg, który pozostaje podstawowym składnikiem szczepionek. Ponadto antygeny M- i L-HBsAg tylko w ograniczonym stopniu łączą się w cząstki wirusopodobne, tworząc raczej agregaty (Imamura i in. 1987, Bruss 2007). Niemniej, w badaniach prowadzonych przez różnych autorów podejmowano próby zwiększenia wydajności wytwarzania M/L-HBsAg z wykorzystaniem podobnych rozwiązań z zakresu inżynierii genetycznej, jak dla S-HBsAg (por. wyżej). Natomiast we własnych badaniach zastosowano konsekwentnie „minimalistyczny” schemat konstrukcji kasety ekspresyjnej, tj. bezpośrednie połączenie ściśle kodującej sekwencji M- lub L-HBsAg z promotorem 35S i terminatorem NOS (publikacja V). Podobnie, uzyskano stosunkowo wysoką, tj. do 17  $\mu\text{g/g}$  św. masy, akumulację antygenów w liściach sałaty oraz tytoniu, kilkakrotnie lub kilkunastokrotnie wyższą od dotychczasowych wyników innych autorów (por. publikacja V i zestawienie w publikacji VI). W sposób pośredni, za pomocą odpowiednio opracowanych testów immunoenzymatycznych, wykazano obecność agregatów i/lub cząstek VLPs, formowanych przez M- lub L-HBsAg o natywnej strukturze.

Reasumując, osiągnięte rezultaty własnych prac plasują się w czołówce wyników badań nad wydajnym wytwarzaniem w roślinach poszczególnych antygenów powierzchniowych HBV. Otrzymane rośliny sałaty stanowiły odpowiedni punkt wyjścia do dalszych etapów prac badawczych nad przygotowaniem doustnej szczepionki pochodzenia roślinnego przeciwko wzv B. Jednakże do osiągnięcia powyższego celu konieczne było opracowanie odpowiedniej formy szczepionki i metodologii efektywnej immunizacji doustnej.

#### **Rozdział 4. Liofilizowana tkanka roślinna jako podstawowy składnik efektywnej i praktycznej szczepionki doustnej pochodzenia roślinnego przeciwko HBV.**

Wyniki badań własnych nad formą szczepionki doustnej pochodzenia roślinnego przeciwko HBV przedstawiono w publikacjach IV i V, będących podstawą niniejszej rozprawy. Relację badań własnych do prac innych autorów przedstawiono szczegółowo w publikacji VI, pracy przeglądowej „Is an oral plant-based vaccine against Hepatitis B Virus possible?” (Curr Pharm Biotechnol 2012, 13: 2692-2704). Poniżej przedstawiono ogólnie najważniejsze tezy lub wyniki opisane ww. publikacjach.

Szczepienie poprzez spożycie tkanki roślinnej zawierającej określony antygen było pierwotną koncepcją wykorzystania roślin jako nośników szczepionek, także w przypadku szczepionki przeciwko wzv B. Ten sposób immunizacji był przez długie lata praktykowany i dominował w literaturze, przede wszystkim za sprawą zespołu Charlesa Arntzen’a z Arizona State University w Stanach Zjednoczonych (Richter i in. 2000, Kong i in. 2001, Thanavala i in. 2005). Jednak pomimo pewnej efektywności, powyższą procedurę można uznać za problematyczną albo wprost niepraktyczną z powodu użycia jako szczepionki surowych bulw ziemniaka z dodatkiem podjednostki B toksyny cholery.

W badaniach prowadzonych w Polsce, w grupie dr Józefa Kapusty, zaproponowano sałatę siewną jako gatunek rośliny produkującej białka HBV dla potrzeb szczepionki przeciwko wzv B. Wybór ten, oprócz możliwości łatwego uzyskiwania roślin transgenicznych, wynikał z założenia, że nośnikiem szczepionki powinna być roślina, w całości lub części spożywana na surowo, nie zawierająca żadnych substancji antyżywnościowych i przez to nie budząca kontrowersji. Jednak, pomimo że pierwsze próby ‘immunizacji pokarmowej’ były częściowo pomyślne, dość szybko zdecydowano, że taki sposób szczepienia jest niemożliwy do zastosowania w praktyce, przynajmniej w odniesieniu do ludzi. Oprócz niskiej efektywności ‘szczepionki jadalnej’ (por. rozdz. 1 i 5), głównym problemem była nietrwałość tkanki i związany z tym brak kontroli dawki antygeny i całej

procedury. Nie bez znaczenia była również skrajna niewygodność stosowania wynikająca z konieczności spożycia dużej ilości tkanki.

W kolejnych projektach zainicjowano zatem i rozwijano prace nad przetwarzaniem biomasy do odpowiedniej formy szczepionki doustnej. Podstawowym założeniem tych badań była znaczna redukcja objętości przy zachowaniu natywnych antygenów HBsAg ustrukturalizowanych w immunogenne cząstki VLPs. Taka forma szczepionki zapewniłaby łatwą i kontrolowaną aplikację antygenów, w tym dawkowanie oraz krótszy czas przechodzenia przez jelito, co jest niezmiernie ważne dla efektywności immunizacji (por. rozdz. 5). Przyjęto, że procesem umożliwiającym odpowiednią konwersję tkanki będzie liofilizacja, tym bardziej, że równoległe przeprowadzone próby suszenia tkanki nie dały pozytywnego efektu. Warto jednocześnie podkreślić, że badania nad liofilizacją tkanek roślinnych zawierających antygeny HBsAg, jak i w ogóle ustrukturalizowanych w VLPs miały w dużej mierze charakter pionierski, gdyż jak dotąd spośród roślin wytwarzających antygeny, liofilizowano te zawierające białka mono- lub co najwyżej oligomeryczne, jak np. Lt-B (Rosales-Mendoza i in. 2009) czy hemaglutynina wirusa odry (Webster i in. 2006).

Wstępne badania nad przetworzeniem tkanki roślinnej zawierającej S-HBsAg i otrzymaniem prototypu szczepionki przyniosły obiecujące rezultaty (publikacja IV). Przetestowano kilka profili liofilizacji tj. kombinacji temperatury, czasu i ciśnienia. Sałata ponownie okazała się właściwym wyborem, gdyż usunięcie wody z liści poprzez liofilizację okazało się nieskomplikowane i powodowało ok. 20-krotne zmniejszenie ich masy. Po zmieleniu i sproszkowaniu, objętość preparatu wynosiła zaledwie 1/50 pierwotnej objętości liści. Natomiast zasadniczym problemem, który się ujawnił i będzie wymagał rozwiązania w dalszych badaniach, był znaczny stopień degradacji cząstek VLPs. Około 90% cząstek ulegało dezintegracji, jakkolwiek antygen S-HBsAg zachowywał się niemal w całości, prawdopodobnie w formie dimerów, które są podstawową jednostką budulcową VLPs. Mimo rozpadu większości cząstek, zawartość VLPs osiągnęła ok. 10 µg/g masy liofilizatu, która pozostawała trwała w temperaturze pokojowej przez wiele miesięcy. Liofilizat o powyższych właściwościach mógł zatem służyć do doświadczeń nad immunizacją doustną, a także być wykorzystany jako półprodukt do otrzymywania różnych postaci szczepionki przeznaczonej dla ludzi.

Niewielki objętościowo, sproszkowany liofilizat mógł być łatwo podawany *per os* w postaci zawiesiny zwierzętom doświadczalnym np. myszom, zarówno w próbach immunizacji na drodze wyłącznie śluzówkowej (publikacje II i IV) lub jako komponent doustny w immunizacji parenteralno-śluzówkowej (publikacja VI). W zależności od procedury, liofilizat

zawierający S-HBsAg indukował lokalną i/lub ogólnoustrojową humoralną odpowiedź immunologiczną o różnej intensywności, zawsze jednak przekraczającą minimalne miano przeciwciał anti-HBs 10 mIU/ml (por. rozdz. 5). Natomiast po dodaniu różnych lepiszczy, substancji wypełniających, powlekających itp. mógł być formowany w upostaciowane preparaty, np. saszetki, granulaty, kapsułki czy tabletki (por. zestawienie w publikacji VI).

W wyniku realizowanych zadań, we współpracy z Instytutem Roślin i Przetworów Zielarskich (obecnie Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich) opracowano i wykonano prototyp szczepionki doustnej przeciwko wzv B w postaci tabletki (publikacja IV). Pierwsze tabletki były standardowe - charakteryzowały się soczewkowatym kształtem i wymiarami 10 mm × 3 mm. Jedna tabletką zawierała 2,3 µg S-HBsAg w formie VLPs, co stanowi ponad 1/10 dawki antygeny w standardowej szczepionce dla osoby dorosłej (20 µg). Jakkolwiek otrzymane tabletki charakteryzowały się 'podstawową formułą', taka postać szczepionki doustnej zapewnia również plastyczność w zakresie kompozycji składu. Oprócz tkanki roślinnej – nośnika szczepionki i substancji umożliwiających techniczną formulację, skład tabletki można bowiem poszerzać o np. protektanty, adiuwanty, immunomodulatory itp., co omówiono w załączonych publikacjach IV i VI. Należy również dodać, że w przeciwieństwie do dotychczasowych rozwiązań, sałata wykorzystana do otrzymania doustnej szczepionki nie zawierała genów markerowych determinujących oporność na antybiotyki (*npt II* lub *hpt*), ale gen oporności na herbicydy fosfotricynowe (*bar*). W konsekwencji, doustne stosowanie wyjściowych roślin i pochodnych preparatów nie niosło ryzyka antybiotykooporności komensali jelitowych wskutek horyzontalnego transferu genów. Otrzymane tabletki stanowiły zatem rzeczywisty prototyp szczepionki doustnej przeciwko wzv B i mogły być potencjalnie wykorzystane do immunizacji ochotników. Wykorzystanie sałaty jako producenta białek szczepionkowych i otrzymanie z liofilizatu tabletki jako pochodnej formy szczepionki wskazywało, wpisywało się i wzmacniało również kierunek badań nad preparatami doustnymi przeciwko innym chorobom, czego przykładem jest proponowana forma szczepionki przeciwko gruźlicy w formie kapsułki (Lakshmi i in. 2013).

Podobnie jak dla S-HBsAg, prowadzono również wstępne badania nad liofilizacją sałaty wytwarzającej M- i L-HBsAg (publikacja V). Z powodu obecności dodatkowych ekspozowanych domen preS, szczególnie dużych w przypadku L-HBsAg, a przez to ograniczonej zdolności formowania cząstek subwiralnych (por. rozdz. 3), białka te generalnie okazały się bardziej wrażliwe na przemiany fizykochemiczne zachodzące podczas liofilizacji. Ponadto poszczególne domeny (S, preS) i formy białka (mono- i dimery vs. agregaty i VLPs)



były w odmiennym stopniu podatne na zmiany temperatury, wilgotności, ciśnienia itp. W trakcie liofilizacji miała miejsce znaczna dezintegracja cząstek VLPs i częściowa degradacja budujących je cząsteczek białek. Procesy te postępowały, chociaż z mniejszym natężeniem, podczas przechowywania preparatów i podobnie jak w trakcie liofilizacji, były zależne od wyjściowej zawartości M/L-HBsAg w komórkach roślinnych. Pomimo niekorzystnych zjawisk, w wybranych wariantach doświadczalnych udało się otrzymać preparaty o zadowalających charakterystykach. Lepsze wyniki uzyskano w przypadku M-HBsAg, gdyż po przechowywaniu przez 3 miesiące w temp. pokojowej zawartość antygeny z zachowaną domeną preS2 i w formie VLPs wynosiła ok. 2 µg/g masy liofilizatu. Natomiast dla L-HBsAg, wartości dla antygeny z preS1/preS2 i formy VLPs najczęściej nie korelowały. Stosunkowo najkorzystniejszym wariantem okazało się przechowywanie w 4°C, gdzie ilość antygeny z preS i formy VLPs oscylowała wokół 1 µg/g liofilizatu. Znaczenie badań nad liofilizacją tkanek zawierających M/L-HBsAg polega przede wszystkim na rozpoznaniu niektórych z warunków wpływających na wydajność otrzymywania preparatów zawierających immunogenne formy M- i L-HBsAg, jak np. materiał wyjściowy, parametry liofilizacji, znaczenie wilgotności dla trwałości preparatu. Wiedza ta stanowi zatem podstawę do podjęcia prac optymalizacyjnych. Wydaje się również, że nawet na obecnym etapie, charakterystyki liofilizatów z M/L-HBsAg są wystarczające do pilotażowych badań immunizacyjnych.

Doświadczenia na zwierzętach prowadzono z wykorzystaniem liofilizatu z S-HBsAg, jako preparatu o zdecydowanie najlepszych właściwościach i podstawowego znaczenia tego antygeny dla szczepionki przeciwko HBV. Immunizacja doustna jest jednak niezwykle złożonym zagadnieniem i prace nad nią ciągle jeszcze mają w dużej mierze charakter badań podstawowych.

### **Rozdział 5. Immunizacja doustna jako element szczepienia przeciwko HBV.**

Powstanie koncepcji doustnej szczepionki pochodzenia roślinnego przeciwko HBV, rys historyczny, ewolucję poglądów i podejścia badawcze, najważniejsze wyniki, a także relację badań własnych do prac innych autorów przedstawiono szczegółowo w publikacji VI - pracy przeglądowej „Is an oral plant-based vaccine against Hepatitis B Virus possible?” (Curr Pharm Biotechnol 2012, 13: 2692-2704). Badania własne nad immunizacją doustną opublikowano w pracach II, III, IV i VI. Poniżej przedstawiono ogólnie najważniejsze wyniki lub tezy opisane ww. publikacjach.

Idea 'szczepionek jadalnych', która pojawia się w latach 90-tych XX wieku, szybko wywołała spore zainteresowanie i entuzjazm wielu naukowców. Możliwość szczepienia poprzez śluzówkę jelita fascynowała, tym bardziej, że wydawała się stanowić panaceum w walce z wieloma chorobami, w tym wzw B. Ideę tą mocno wspierały nieudane próby immunizacji doustnej, w pierwszym rzędzie sukces szczepionki przeciwko polio, opracowanej przez profesora Hilarego Koprowskiego (Koprowski i in. 1952). Jakkolwiek szczepionkę tą stanowił oczyszczony i atenuowany kompletny wirus, zakładano, że równie skuteczne będą szczepionki podjednostkowe. Opierając się na znanych wówczas faktach o funkcjonowaniu jelitowego układu immunologicznego - GALT (Peng i in. 1989), postulowano prosty i skuteczny mechanizm immunizacji poprzez śluzówkę jelita (Langridge 2000). Uznano, że taki sposób immunizacji będzie efektywny szczególnie w przypadku struktur rozpoznawanych jako 'niebezpieczne', czyli np. imitujących wirusy cząstek subwiralnych (Matzinger 1994), formowanych m. in. przez antygeny wirusów hepatotropowych (Li i in. 2001). Niektóre dane z kolei sugerowały, że szczepionki śluzówkowe, w tym jelitowe – inaczej doustne, mogą być skuteczne nie tylko przeciwko chorobom wywoływanym przez patogeny zasiedlające błony śluzowe jak np. cholera czy biegunka, ale również przenoszonym z krwią, włączając HBV (Moss i in. 1984, Lubeck i in. 1989). Ponieważ wiadomo już było, że antygen powierzchniowy HBV może być wytwarzany w roślinach (Mason i in. 1992), istniały solidne przesłanki podjęcia badań nad roślinną szczepionką doustną, czy początkowo 'jadalną', przeciwko wzw B.

Droga podania szczepionki poprzez przewód pokarmowy rodziła jednak oczywiste pytania o jej skuteczność. Obawiano się, że antygen zostanie strawiony zanim wejdzie w kontakt z komórkami M w kępkach Peyera i wywoła lokalną reakcję GALT, a tym bardziej ogólnoustrojową odpowiedź immunologiczną. Prawdopodobnie z tej przyczyny powstało przekonanie o konieczności aplikowania doustnie dużych dawek antygenów. W przypadku HBsAg pogląd ten przyjął się i utrwalił (Streatfield 2005) za sprawą wyników grupy Charlesa Arntzena (Richter i in. 2000, Kong i in. 2001, Thanavala i in. 2005). W badaniach tego zespołu, stosowano dawki S-HBsAg wynoszące nawet kilkadziesiąt  $\mu\text{g}$ /mysz lub kilkaset  $\mu\text{g}$ /osobę, aplikowane w krótkich, cotygodniowych odstępach czasu. Wywoływana odpowiedź immunologiczna była wysoka, miano przeciwciał anti-HBs w surowicy osiągało miano 700–5000 mIU/ml. Oparta na aplikowaniu dużych dawek antygeny procedura immunizacji była również z podobnym skutkiem zastosowana w przypadku M-HBsAg (Youm i in. 2007) czy ostatnio dla S-HBsAg ekstrahowanego z nasion kukurydzy i zgrubnie oczyszczonego (Hayden i in. 2012a). Należy jednak wyraźnie podkreślić, że 'immunizacja

pokarmowa' była tutaj tylko jednym z etapów całego procesu szczepienia, który obejmował również jedną lub więcej iniekcji domięśniowych klasyczną szczepionką przeciwko HBV. Ponadto warunkiem niezbędnym efektywnej immunizacji doustnej okazał się dodatek silnego adiuwanta śluzówkowego, przede wszystkim CTB lub Lt-B. Gdy do 'mieszanej' immunizacji iniekcyjno-pokarmowej użyto materiał roślinny bez CTB, miano przeciwciał osiągnęło zaledwie 40 mIU/ml (Kong i in. 2001). Podsumowując, mimo niezaprzeczalnej efektywności i wynikającej stąd dominującej pozycji w literaturze przedmiotu, ww. opisana procedura immunizacji nie mogła zostać wdrożona do praktyki ze względu na formę i rodzaj materiału roślinnego – najczęściej surowych bulw ziemniaka oraz użytego adiuwanta – pochodną toksyny bakteryjnej i wynikających z tego możliwych kontrowersji (Williamson i in. 1999).

Współuczestnicząc w pracach grupy dr Kapusty, a później w badaniach własnych przyjęto i rozwijano odmienne koncepcje. Według pierwotnych założeń, potencjalna 'szczepionka jadalna' nie powinna wymagać dodatkowych iniekcji ani adiuwantów, w szczególności typu Lt-B czy CTB. W pierwszej próbie udało się wywołać ponad minimalną (10 mIU/ml) ogólnoustrojową odpowiedź humoralną u ludzi – do ok. 18 mIU/ml, za pomocą surowych liści sałaty zawierających stosunkowo niskie dawki antygeny S-HBsAg, tj. ok. 1 µg/osobę i podawanych w dłuższych odstępach czasu – co 4 tygodnie (Kapusta i in. 1999). Kolejne doświadczenia wykazały istotność interwałów czasowych pomiędzy kolejnymi podaniami antygeny. Gdy S-HBsAg był podany dwukrotnie w ciągu tygodnia, odpowiedź immunologiczna nie osiągnęła wymaganego minimum (Kapusta i in. 2001).

Wyniki te wpisywały się w ówczesny stan wiedzy o funkcjonowaniu GALT. Początkowo w reakcji na antygen podawany dojelitowo pojawiają się specyficzne wydzielnicze przeciwciała klasy IgA czyli S-IgA (Brandtzaeg 2003). Jednak w dalszej kolejności, w zależności od dawkowania i ekspozycji antygeny, reakcja GALT może prowadzić do czynnej humoralnej odpowiedzi ogólnoustrojowej lub rozwoju tolerancji pokarmowej (Swarbrick i in. 1979, Garside i Mowat 2001, Strobel 2001, Mowat 2003). Wiele z mechanizmów i procesów związanych z tolerancją pokarmową czeka jeszcze na całkowite poznanie. Wiadomo jednak, że tolerancja rozwija się wobec rozpuszczalnych białek (Richman i in. 1978), a także wywołuje ją częsty lub przedłużony kontakt komórek M układu GALT z danym białkiem-antygenem i/lub jego obecność w dużych ilościach (Friedman i Weiner 1994, Heath i Carbone 2001). Ryzyko tolerancji w odpowiedzi na antygen obecny w 'szczepionce jadalnej' podnoszono zresztą co najmniej kilkakrotnie w pracach przeglądowych (Kirk i in. 2005, Mestecky i in. 2007, Wang i Coppel 2008). Także dla szczepionki przeciwko

wzw B, mimo że w odróżnieniu od wielu innych białek S-HBsAg jako ustrukturalizowany w VLPs mógł być immunogeny wobec śluzówki jelita (Matzinger 1994), aplikowanie 'szczepionki jadalnej' najprawdopodobniej sprzyjało indukcji tolerancji. Dawka antygeny w surowym materiale roślinnym pozostawała jedynie szacunkowa, a w rzeczywistości nieustalona, ze względu na niemożność dokładnych oznaczeń w dużej ilości biomasy. Ponadto, ze względu na spożywanie 'szczepionki jadalnej' początkowa dawka antygeny ulegała rozbiciu na nieokreślone mniejsze, przez długi czas ekspozowane wobec GALT.

Opierając się na powyższych faktach, prowadzono badania w dwóch uzupełniających się kierunkach – opracowania formy szczepionki na bazie liofilizatu oraz ustalenia odpowiedniej procedury immunizacji doustnej z jego użyciem. Liofilizacja materiału roślinnego opisana w poprzednim rozdziale była zatem, oprócz znaczenia praktycznego, kluczowa przede wszystkim ze względu na kontrolę aplikowania antygeny oraz potencjalne zwiększenie jego immunogenności wobec komórek GALT z jednoczesnym ograniczeniem działania jako induktora tolerancji. W badaniach nad ustaleniem warunków efektywnej immunizacji doustnej i zjawisk towarzyszących, opierając się na danych literaturowych i wcześniej uzyskanych wynikach, jako podstawowe założenie przyjęto 'niskodawkowy' (low-dose) reżim immunizacji tj. aplikowanie niewielkich dawek S-HBsAg w stosunkowo długich, kilkutygodniowych odstępach.

W pierwszych doświadczeniach (publikacja II), wykonywanych we współpracy z Instytutem Pasteur'a w Paryżu, wykazano jednoznacznie, że doustne podanie antygeny związanego z tkanką roślinną, stymuluje wzrost populacji limfocytów regulatorowych - Treg, które są podstawowym mediatorem w supresji odpowiedzi immunologicznej i rozwoju tolerancji pokarmowej (Taams i in. 1998). Co więcej, wzrost populacji limfocytów Treg był skorelowany ze zwiększeniem dawki antygeny oraz masy towarzyszącej tkanki roślinnej. Pewną stymulację limfocytów Treg wywoływała nawet tkanka kontrolna nie zawierająca S-HBsAg. Mogło to oznaczać, że tolerancja wywołana przez naturalne substancje roślinne w bliżej nieznanym sposobie rozszerza się na np. towarzyszące heterologiczne białka, jak w tym przypadku S-HBsAg. Obserwowano również, że stymulacji Treg towarzyszyła skorelowana produkcja S-IgA wydzielanych przez śluzówkę jelita, co *de facto* podważało dotychczasowy pogląd, że doustna immunizacja może rozszerzyć barierę ochronną przed infekcją HBV. Generalnie, uzyskane wyniki potwierdzały hipotezę, że efektywna immunizacja doustna wymaga niskiego dawkowania antygeny w możliwie minimalnej ilości tkanki roślinnej.

Właściwe badania nad określeniem zakresu efektywnego dawkowania S-HBsAg rozpoczęto od doświadczeń nad immunizacją doustną za pomocą klasycznej szczepionki,

zawierającej antygen oczyszczony i zaadsorbowany na drobinach wodorotlenku glinu pełniącego jednocześnie rolę adiuwanta (publikacja III). Jakkolwiek udało się wywołać istotną statystycznie odpowiedź immunologiczną, produkcji przeciwciał we krwi towarzyszyło pozytywnie skorelowane wydzielanie przeciwciał S-IgA przez śluzówkę jelita. Mimo tego najprawdopodobniej niekorzystnego zjawiska, udowodniono, że poziom produkcji specyficznych przeciwciał w odpowiedzi na antygen był odwrotnie proporcjonalny do dawki antygeny i korelował z długością okresu pomiędzy immunizacjami. Najwyższe miano przeciwciał w surowicy – do 30 mIU/ml, obserwowano po podaniu tylko 5 - 10 ng S-HBsAg aplikowanego *per os* nawet co 8 tygodni.

Wyniki doświadczeń z użyciem oczyszczonego i adiuwantowanego antygeny wykorzystano w próbach immunizacji myszy za pomocą zawiesiny liofilizatu sałaty zawierającego 100 ng S-HBsAg i podawanego dożołądkowo przez tubkę gastryczną, co imituje połykanie tabletek przez ludzi (publikacja IV). Ze względu na zamknięcie S-HBsAg wewnątrz liofilizowanych komórek, jego dawka została zwiększona, aby niejako zrównoważyć zmniejszoną dostępność antygeny dla komórek M układu GALT. Niemniej ogólna wielkość dawki mieściła się w niskim zakresie, szczególnie w porównaniu z kilkudziesięcioma mikrogramami stosowanymi przez innych autorów (Richter i in. 2000, Kong i in. 2001, Thanavala i in. 2005, Youm i in. 2007, Hayden i in. 2012a). W omawianym doświadczeniu wykazano, że podany doustnie liofilizat zawierający S-HBsAg wywoływał odpowiedź ogólnoustrojową na poziomie do 20 mIU przeciwciał anti-HBs/ml surowicy, nawet nieco wyższą od identycznej dawki oczyszczonego antygeny, a ponadto intensywność reakcji korelowała z wydłużeniem odstępu czasowego pomiędzy immunizacjami. Jednak, mimo że miano przeciwciał przekraczało minimum ochronne, poziom odpowiedzi można było uznać za zbyt niski dla potrzeb praktycznych. Ponadto odpowiedź śluzówkowa przewyższała ogólnoustrojową, co wg wcześniejszych wyników sugerowało zainicjowanie procesów związanych z tolerancją pokarmową.

Próby poprawienia efektywności immunizacji doustnej z użyciem liofilizatu zawierającego S-HBsAg podjęto w projekcie badawczym „Immunizacja śluzówkowo-jelitowa myszy jako zwierząt modelowych za pomocą preparowanego materiału roślinnego zawierającego S-HBsAg dla potrzeb szczepionki doustnej przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B.” (MNiSW, Nr N302 157837, 2009-12). Większość uzyskanych wyników czeka na pełną analizę statystyczną, stąd opublikowano jedynie podstawową część osiągniętych wyników (publikacja VI). Jednakże zasadnicze ustalenia ww. zrealizowanego projektu wymagają przedstawienia w niniejszej rozprawie.

Doświadczenia zaplanowane w projekcie miały na celu dokładne ustalenie reżimu efektywnej immunizacji doustnej czyli podawania preparowanego materiału roślinnego zawierającego S-HBsAg w formie VLPs. Jednak w szeregu doświadczeń osiągnięto wyniki podobne do poprzednich. Po podaniu liofilizatu, a także ekstraktu roślinnego, wg różnych schematów czasowych, tj. z odstępami co 2 - 6 tygodni oraz jednolitego lub zróżnicowanego dawkowania z zakresu 10 – 500 ng, a także z użyciem adiuwantów, obserwowano odpowiedź ogólnoustrojową przeciwciał jedynie na poziomie oscylującym wokół minimalnego miana ochronnego 10 mIU/ml, niekiedy dochodzącą do 20 mIU/ml. Jednocześnie obserwowano intensywną odpowiedź śluzówkową, wyrażającą się w indukcji wydzielniczych przeciwciał S-IgA na średnim poziomie do 80, a maks. 150 mIU/ml. Uznano zatem ostatecznie, że odpowiedź śluzówkowa jest niekorzystnym procesem, konkurencyjnym w stosunku do odpowiedzi ogólnoustrojowej. Niezależnie od ewentualnego związku z tolerancją, pojawiające się podczas odpowiedzi śluzówkowej przeciwciała S-IgA po pierwotnym podaniu antygeny (priming), mogły przy podaniu wtórnym czyli przypominającym (boosting) wiązać S-HBsAg, uniemożliwiając w ten sposób interakcję antygeny z komórkami GALT i dalej intensywniejszą odpowiedź ogólnoustrojową.

Niska efektywność wyłącznie doustnej immunizacji spowodowała zasadniczą zmianę zastosowania szczepionki pochodzenia roślinnego. Zdecydowano, że szczepionka ta będzie użyta na jednym z etapów całej procedury immunizacji parenteralno-śluzówkowej czyli iniekcyjno-doustnej. Przyjęta metodologia szczepienia jest praktycznie unifikacją dotychczasowych podejść badawczych tj. połączenia iniekcji i doustnego podania materiału szczepionkowego stosowaną przez innych autorów oraz opracowywanej wcześniej 'niskodawkowej' immunizacji za pomocą preparatu (liofilizatu lub ekstraktu) roślinnego z S-HBsAg. Kombinowana, tj. iniekcyjno-doustna procedura szczepienia, jak również 'niskodawkowy' reżim doustnego podawania antygeny, okazały się w pełni efektywne. Po primingu na drodze domięśniowej iniekcji S-HBsAg adsorbowanego na uwodnionym wodorotlenku glinu i boostingu - kolejnych dwóch doustnych podaniach liofilizatu lub ekstraktu zawierającego S-HBsAg, średnia ogólnoustrojowa odpowiedź immunologiczna kształtowała się na poziomie od 500 do 1000 mIU/ml przeciwciał w surowicy myszy doświadczalnych. Obserwowano zatem wyraźny wzrost produkcji przeciwciał po doustnych dawkach antygeny, ze 160 mIU/ml po primingu. Końcowa odpowiedź po immunizacji iniekcyjno-doustnej osiągnęła poziom jak po immunizacji wyłącznie iniekcyjnej z użyciem komercyjnej szczepionki. W przeprowadzonych doświadczeniach potwierdzono korzystny wpływ na odpowiedź immunologiczną niskich dawek (min. 5 ng) i długich interwałów

pomiędzy kolejnymi podaniami antygeny (min. 6 tyg.). Dotychczasowe wyniki wskazują także, że adiuwanty śluzówkowe typu CTB lub saponiny nie zwiększają istotnie immunogenności podawanego doustnie S-HBsAg. Jakkolwiek elementy odpowiedzi humoralnej i komórkowej (podklasy przeciwciał, populacje i subpopulacje limfocytów B, CD8+, CD4+, Th1, Th2, supresorowych Treg, produkcja cytokin itp.) są jeszcze analizowane, można jednoznacznie stwierdzić, że immunizacja parenteralno-śluzówkowa nie powodowała mierzalnej śluzówkowej odpowiedzi humoralnej, konkurencyjnej dla odpowiedzi ogólnoustrojowej i sygnalizującej ryzyko wystąpienia tolerancji pokarmowej na antygen. Porównując wyniki immunizacji kombinowanej i wyłącznie doustnej można stwierdzić, że parenteralny priming jest konieczny, gdyż w obecnie nieznanym sposobie uczuła GALT na S-HBsAg docierający do komórek M w błonie śluzowej jelita. W konsekwencji działa on jak właściwy immunogen i wywołuje reakcję ogólnoustrojową, a nie stymuluje tolerancji lub odpowiedzi śluzówkowej. Podsumowując badania realizowane w ostatnim projekcie należy stwierdzić, że zaproponowany schemat immunizacji iniekcyjno-doustnej był efektywny, a uzyskane wyniki stanowią solidną podstawę do badań przedklinicznych i ewentualnie klinicznych.

W świetle dostępnych danych można też stwierdzić, że potencjalną przyszłością roślinnych szczepionek doustnych przeciwko HBV jest stosowanie ich jako szczepionek przypominających. Jest możliwe, że iniekcyjny komponent szczepionki lub samodzielna szczepionka iniekcyjna przeciwko wzv B mogłaby również pochodzić z roślin. Jak wielokrotnie wykazano, antygeny HBsAg mogą być stosunkowo wydajnie oczyszczane i aplikowane w formie zastrzyku, będąc równie immunogennymi jak komercyjne szczepionki otrzymywane z drożdży i komórek ssaczy (Thanavala i in. 1995, Sojikul i in. 2003, Huang i in. 2005, Huang i in. 2008). W tym rozumieniu rośliny w dalszym ciągu mogą służyć jako źródło szczepionek: i/ iniekcyjnych skierowanych przeciwko różnym patogenom i uzyskiwanych poprzez oczyszczanie antygenów produkowanych stale lub przejściowo przez rośliny, ii/ kombinowanych iniekcyjno-doustnych uzyskiwanych wg sposobów opisanych powyżej i o podobnym przeznaczeniu jak szczepionki iniekcyjne lub iii/ szczepionek wyłącznie doustnych skierowanych wobec patogenów wnikających przez błony śluzowe układu pokarmowego, jak np. szczepionka przeciwko cholercie (Hamorsky i in. 2013). Część wyników ostatniego projektu, jak i zarysowane powyżej tezy przedstawiono szczegółowo w publikacji VI, będącej zwieńczeniem dotychczasowych badań i podstawą niniejszej rozprawy.

## Rozdział 6. Podsumowanie.

Badania nad szczepionką pochodzenia roślinnego przeciwko wzw B prowadziłem od ich samego początku, będąc jednym ze współtwórców i realizatorów tego projektu naukowego. Badania własne, przedstawione w rozprawie i załączonych publikacjach, zapoczątkowane zostały zmianą pierwotnej koncepcji szczepionek jadalnych na rzecz szczepionek doustnych. Do najbardziej znaczących osiągnięć, otrzymanych samodzielnie i we współpracy z naukowcami z krajowych i zagranicznych ośrodków naukowych, można zaliczyć:

- Otrzymanie panelu roślin sałaty jako materiału wyjściowego dla potencjalnych szczepionek doustnych przeciwko wzw B, tj. zawierających gen oporności na herbicydy fosfotricynowe i charakteryzujących się jedną z najwyższych wydajności wytwarzania antygenów powierzchniowych HBV - od kilkunastu  $\mu\text{g/g}$  św. masy dla M/L-HBsAg do kilkudziesięciu  $\mu\text{g/g}$  św. masy dla S-HBsAg.
- Koncepcję formy szczepionki doustnej przeciwko wzw B na bazie liofilizatu roślinnego wraz z otrzymaniem preparatów o znaczącej zawartości ( $\mu\text{g/g}$  preparatu) natywnych białek HBsAg w immunogennej formie cząstek wirusopodobnych VLPs lub agregatów.
- Zaproponowanie ustrukturalizowanej postaci szczepionki doustnej, umożliwiającej kontrolę procedury szczepienia poprzez zdefiniowaną ilość czynnika szczepionkowego i ewentualnie substancji pomocniczych oraz prostą w stosowaniu formę, jak również wykonanie prototypu szczepionki doustnej przeciwko HBV w formie tabletki.
- Doświadczalne potwierdzenie zasadniczej roli tolerancji pokarmowej jako bariery dla szczepionek doustnych, szczególnie przeciwko patogenom przenoszonym przez krew, jak m. in. HBV.
- Opracowanie 'niskodawkowego' schematu immunizacji doustnej zmniejszającego ryzyko tolerancji pokarmowej, opartego na aplikacji niewielkich dawek antygeny w długich odstępach czasu i w niewielkiej objętości liofilizatu roślinnego.
- Opracowanie skutecznej metody immunizacji parenteralno-śluzówkowej, polegającej na pierwotnym szczepieniu przez iniekcję i wtórnym szczepieniu doustnym wg opracowanego wcześniej schematu 'niskodawkowego'.

Wiele z przedstawionych wyżej rezultatów, zamykając pewien etap badań, otwiera zarazem pole do dalszych prac. W szczególności konieczne byłoby opracowanie rutynowej metody otrzymywania iniekcyjnego komponentu szczepionki z roślin wytwarzających antygeny HBsAg w technologii ekspresji przejściowej, gdyż jak dotąd udało się tylko



jednokrotnie otrzymać S-HBsAg wg tej metody (Huang i in. 2008). Poprawienie efektywności jest nieodzowne w przypadku liofilizacji i trwałości przechowywanych preparatów. Optymalizacja immunizacji iniekcyjno-doustnej np. przez zastosowanie szeregu adiuwantów śluzówkowych opartych na innych substancjach niż toksyny bakteryjne, np. ISCOMATRIX (Wee i in. 2008) jest pożądana. Natomiast szczegółowa analiza odpowiedzi immunologicznej, bezpieczeństwo i biorównoważność iniekcyjno-doustnej metody szczepienia, jest nieodzowna. Prezentowane osiągnięcie, tj. prototyp doustnej przypominającej szczepionki pochodzenia roślinnego przeciwko HBV, można jednak uznać za zasadnicze i wyjściowe dla zarysowanych wyżej przyszłych badań.

W toku prowadzonych badań poddano rewizji wcześniejsze założenia, zaproponowano i zrealizowano szereg nowych koncepcji oraz otrzymano wyniki zasadnicze dla dalszych prac. Rezultaty przedstawionych badań własnych przyczyniły się do ewolucji poglądów na możliwości szczepionek roślinnych i wywarły zauważalny wpływ na badania nad biofarmaceutykami, a w szczególności szczepionkami doustnymi i immunizacją śluzówkową przeciwko HBV oraz innym patogenom (Madalinski 2008, Azizi i in. 2010, Paul i Ma 2010, Rybicki 2010, Buonaguro i in. 2011, Penney i in. 2011, Tiwari i Vyas 2011, Clemente i Corigliano 2012, Hendrickx i in. 2012, Chen i Lai 2013, Lakshmi i in. 2013, Scotti i Rybicki 2013 i in.; razem 54 cytowania wg Web of Science). Jakkolwiek do zrobienia jest jeszcze wiele, uzyskane wyniki własne i innych autorów stanowią realne naukowe podstawy otrzymania na bazie roślinnej komponentu doustnego w immunizacji parenteralno-śluzówkowej lub szczepionki przypominającej przeciwko HBV. Przedstawione badania stanowią własną część wysiłków biotechnologów w walce z wzv B i innymi chorobami.



**Tomasz Pniewski**

## Literatura uzupełniająca

- Arakawa T, Chong DK, Langridge WH (1998) Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nat Biotechnol* 16: 292-297, Erratum: *Nat Biotechnol* 16: 478.
- Azizi A, Kumar A, Diaz-Mitoma F, Mestecky J (2010) Enhancing oral vaccine potency by targeting intestinal M cells. *PLoS Pathog* 6: Article No. 1001147.
- Blanchet M, Sureau C (2007) Infectivity determinants of the Hepatitis B Virus pre-S domain are confined to the N-Terminal 75 amino acid residues. *J Virol* 81: 5841–5849.
- Böcher WO, Dekel B, Schwerin W, Geissler M, Hoffmann S, Rohwer A, Arditti F, Cooper A, Bernhard H, Berrebi A, Rose-John S, Shaul Y, Galle PR, Lohr HF, Reisner Y (2001) Induction of strong hepatitis B virus (HBV) specific T helper cell and cytotoxic T lymphocyte responses by therapeutic vaccination in the trimera mouse model of chronic HBV infection. *Eur J Immunol* 31: 2071-2079.
- Boisgerault F, Moron G, Leclerc C (2002) Virus-like particles: a new family of delivery systems. *Expert Rev Vaccines* 1: 101-109.
- Brandtzaeg P (2003) Role of secretory antibodies in the defence against infections. *Int J Med Microbiol* 293: 3–15.
- Brocke P, Schaefer S, Melber K, Jenzelewski V, Müller F, Dahlems U, Bartelsen O, Park K-N, Janowicz ZA, Gellissen G (2005) Recombinant Hepatitis B vaccines: disease characterization and vaccine production. In: *Production of Recombinant Proteins. Novel Microbial and Eukaryotic Systems*, Ed. Gellissen G, Wiley – VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim, pp. 319-359.
- Bruss V (2007) Hepatitis B virus morphogenesis. *World J Gastroenterol* 13: 65-73.
- Buonaguro L, Tagliamonte M, Tornesello ML, Buonaguro FM (2011) Developments in virus-like particle-based vaccines for infectious diseases and cancer. *Expert Rev Vaccines* 10: 1569-1583.
- Chen Q, Lai H (2013) Plant-derived virus-like particles as vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 9: 26-49.
- Chen X, Li M, Le X, Ma W, Zhou B (2004) Recombinant hepatitis B core antigen carrying preS1 epitopes induce immune response against chronic HBV infection. *Vaccine* 22: 439-446.
- Clemente M, Corigliano MG (2012) Overview of plant-made vaccine antigens against malaria. *J Biomed Biotechnol* 2012, Article No. 206918.
- Daniell H, Singh ND, Mason H, Streatfield SJ (2009) Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends Plant Sci* 14: 669-679.
- Engler OB, Dai WJ, Sette A, Hunziker IP, Reichen J, Pichler WJ, Cerny A (2001) Peptide vaccines against hepatitis B virus: from animal model to human studies. *Mol Immunol* 38: 457-465.
- Friedman A, Weiner HL (1994) Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6688-6692.
- Garside P, Mowat AM (2001) Oral tolerance. *Semin Immunol* 13: 177–185.
- Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S (2005) Magniflection—A new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine* 23: 2042–2048.

- Hamorsky KT, Kouokam JC, Bennett LJ, Baldauf KJ, Kajiura H, Fujiyama K, Matoba N (2013) Rapid and scalable plant-based production of a Cholera Toxin B subunit variant to aid in mass vaccination against cholera outbreaks. *PLoS Negl Trop Dis* 7(3): e2046. doi: 10.1371/journal.pntd.0002046. Epub 2013 Mar 7.
- Haq TA, Mason HS, Clements JD, Arntzen CJ (1995) Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 268: 714-716.
- Hayden CA, Streatfield SJ, Lamphear BJ, Fake GM, Keener TK, Walker JH, Clements JD, Turner DD, Tizard IR, Howard JA (2012a) Bioencapsulation of the hepatitis B surface antigen and its use as an effective oral immunogen. *Vaccine* 30: 2937-2942.
- Hayden CA, Egelkroun EM, Moscoso AM, Enrique C, Keener TK, Jimenez-Flores R, Wong JC, Howard JA (2012b) Production of highly concentrated, heat-stable hepatitis B surface antigen in maize. *Plant Biotechnol J* 10: 979-984.
- Heath WR, Carbone FR (2001) Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 19: 47-64.
- Hendrickx G, Vorsters A, Van Damme P (2012) Advances in hepatitis immunization (A, B, E): Public health policy and novel vaccine delivery. *Current Opinion Infect Dis* 25: 578-583.
- Hollinger FB (1996) Hepatitis B Virus. In: *Fields Virology*, Eds.: Fields BN, Knipe DM, Howley PM et al., Lippincott – Raven Publishers: Philadelphia 1996, pp. 2739-2806.
- Holmgren J, Czerkinsky C, Lycke N, Svennerholm AM (1994) Strategies for the induction of immune responses at mucosal surfaces making use of cholera toxin B subunit as immunogen, carrier, and adjuvant. *Am J Trop Med Hyg* 50: 42-54.
- Huang Z, Elkin G, Maloney BJ, Buehner N, Arntzen CJ, Thanavala Y, Mason HS (2005) Virus-like particles expression and assembly in plants: hepatitis B and Norwalk viruses. *Vaccine* 23:1851-1858.
- Huang Z, LePore K, Elkin G, Thanavala Y, Mason HS (2008) High-yield rapid production of hepatitis B surface antigen in plant leaf by a viral expression system. *Plant Biotechnol J* 6: 202-209.
- Imamura T, Araki M, Miyanojara A, Nakao J, Yonemura H, Ohtomo N, Matsubara K (1987) Expression of hepatitis B virus middle and large surface antigen genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Virol* 61: 3543-3549.
- International Group (1988) Immunisation against hepatitis B. *Lancet* 331: 875-876.
- Kapusta J, Modelska A, Figlerowicz M, Pniewski T, Letellier M, Lisowa O, Yusibov V, Koprowski H, Plucienniczak A, Legocki AB (1999) A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. *FASEB J* 13: 1796-1799.
- Kapusta J, Modelska A, Pniewski T, Figlerowicz M, Jankowski K, Lisowa O, Plucienniczak A, Koprowski H, Legocki AB (2001) Oral immunization of human with transgenic lettuce expressing hepatitis B surface antigen. *Adv Exp Med Biol* 495: 299-303.
- Kirk DD, McIntosh K, Walmsley AM, Peterson RKA (2005) Risk analysis for plant-made vaccines. *Transgenic Res* 14: 449-462.
- Koprowski H, Jarvis GA, Norton TW (1952) Immune responses in human volunteers upon oral administration of a rodent-adapted strain of poliomyelitis virus. *Am J Hyg* 55: 108-126.

- Krugman S (1982) The newly licensed hepatitis B vaccine. Characteristics and indications for use. *JAMA* 247: 2012-2015.
- Kwon K-C, Verma D, Singh ND, Herzog R, Daniell H (2012) Oral delivery of human biopharmaceuticals, autoantigens and vaccine antigens bioencapsulated in plant cells. *Adv Drug Deliv Rev*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.005>.
- Lakshmi PS, Verma D, Yang X, Lloyd B, Daniell H (2013) Low cost tuberculosis vaccine antigens in capsules: Expression in chloroplasts, bio-encapsulation, stability and functional evaluation *in vitro*. *PLoS ONE* 8(1): e54708. doi:10.1371/journal.pone.0054708
- Lam D M-K, Arntzen CJ (1996) Vaccines produced and administered through edible plants. US Patent 5484719, Jan 16, 1996.
- Langridge WH (2000) Edible vaccines. *Sci Am* 283: 66–71.
- Li T, Takeda N, Miyamura T (2001) Oral administration of hepatitis E virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *Vaccine* 19: 3476-3484.
- Lubeck MD, Davis AR, Chengalvala M, Natuk RJ, Morin JE, Molnar-Kimber K, Mason BB, Bhat BM, Mizutani S, Hung PP, Purcell RH (1989) Immunogenicity and efficacy testing in chimpanzees of an oral hepatitis B vaccine based on live recombinant adenovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6763-6767.
- Madalinski K (2008) Recent advances in hepatitis B vaccination. *Hepatitis B Annual* 5: 51-65.
- Madaliński K, Sylvan SP, Hellstrom U, Mikołajewicz J, Zembrzuska-Sadkowska E, Piontek E (2002) Antibody responses to preS components after immunization of children with low doses of BioHepB. *Vaccine* 20: 92-97.
- Mason HS, Haq TA, Clements JD, Arntzen CJ (1998) Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine* 16: 1336-1343.
- Mason HS, Lam DM-K, Arntzen CJ (1992) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11745-11749.
- Matzinger P (1994) Tolerance, danger and extended family. *Annu Rev Immunol* 12: 991–1045.
- McAleer WJ, Buynak EB, Maigetter RZ (1984) Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* 307: 178-180.
- Mestecky J, Russell MW, Elson CO (2007) Perspectives on mucosal vaccines: is mucosal tolerance a barrier? *J Immunol* 179: 5633–5638.
- Moss B, Smith GL, Gerin JL, Purcell RH (1984) Live recombinant vaccinia virus protects chimpanzees against hepatitis B. *Nature* 311: 67-69.
- Mowat AM (2003) Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev* 3: 331–341.
- Paul M, Ma JK-C (2010) Plant-made immunogens and effective delivery strategies. *Expert Rev Vaccines* 9: 821-833.
- Peng HJ, Turner MW, Strobel S (1989) The kinetics of oral hyposensitization to a protein antigen are determined by immune status and the timing, dose and frequency of antigen administration. *Immunology* 67: 425–430.

- Penney CA, Thomas DR, Deen SS, Walmsley AM (2011) Plant-made vaccines in support of the Millennium Development Goals. *Plant Cell Rep* 30: 789-798.
- Rendi-Wagner P, Shouval D, Genton B, Lurie Y, Rümke H, Boland G, Cerny A, Heim M, Bach D, Schroeder M, Kollaritsch H (2006) Comparative immunogenicity of a PreS/S hepatitis B vaccine in non- and low responders to conventional vaccine. *Vaccine* 24: 2781-2789.
- Richman LK, Chiller JM, Brown WR, Hanson DG, Vaz NM (1978) Enterically induced immunologic tolerance. I. Induction of suppressor T lymphocytes by intragastric administration of soluble proteins. *J Immunol* 121: 2429-2434.
- Rosales-Mendoza S, Alpuche-Solís AG, Soria-Guerra RE, Moreno-Fierros L, Martínez-González L, Herrera-Díaz A, Korban SS (2009) Expression of an *Escherichia coli* antigenic fusion protein comprising the heat labile toxin B subunit and the heat stable toxin, and its assembly as a functional oligomer in transplastomic tobacco plants. *Plant J* 57:45-54.
- Rybicki EP (2010) Plant-made vaccines for humans and animals. *Plant Biotechnol J* 8: 620-637.
- Scotti N, Rybicki EP (2013) Virus-like particles produced in plants as potential vaccines. *Expert Rev Vaccines* 12: 211-224.
- Smith ML, Mason HS, Shuler ML (2003) Hepatitis B surface antigen (HBsAg) expression in plant cell culture: kinetics of antigen accumulation in batch culture and its intracellular form. *Biotechnol Bioeng* 80: 812-822.
- Sojikul P, Buehner N, Mason HS (2003) A plant signal peptide-hepatitis B surface antigen fusion protein with enhanced stability and immunogenicity expressed in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2209-2214.
- Sominskaya I, Skrastina D, Dislers A, Vasiljev D, Mihailova M, Ose V, Dreilina D, Pumpens P (2010) Construction and immunological evaluation of multivalent hepatitis B virus (HBV) core virus-like particles carrying HBV and HCV epitopes. *Clin Vaccine Immunol* 17:1027-1033.
- Streatfield S (2005) Oral hepatitis B vaccine candidates produced and delivered in plant material. *Immunol Cell Biol* 83: 257-262.
- Strobel S (2001) Immunity induced after a feed of antigen during early life: oral tolerance v. sensitization. *Proc Nutr Soc* 60: 437-442.
- Sunil Kumar GB, Ganapathi TR, Srinivas L, Revathi CJ, Bapat VA (2005) Secretion of hepatitis B surface antigen in transformed tobacco cell suspension cultures. *Biotechnol. Lett* 27: 927-932.
- Swarbrick ET, Stokes CR, Soothill JF (1979) Absorption of antigens after oral immunisation and the simultaneous induction of specific systemic tolerance. *Gut* 20: 121-125.
- Taams LS, van Rensen AJ, Poelen MC, van Els CA, Besseling AC, Wagenaar JP, van Eden W, Wauben MH (1998) Anergic T cells actively suppress T cell responses via the antigen-presenting cell. *Eur J Immunol* 28: 2902-2912.
- Thanavala Y, Yang Y-F, Lyons P, Mason HS, Arntzen CJ (1995) Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3358-3361.
- Tiwari S, Verma PC, Singh PK, Tuli R (2011) Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. *Biotechnol Adv* 27: 449-467.

- Tiwari S, Vyas SP (2011) Novel approaches to oral immunization for hepatitis B. *Curr Infect Dis Rep* 13: 4-12.
- Wang L, Coppel RL (2008) Oral vaccine delivery: can it protect against non-mucosal pathogens? *Expert Rev Vaccines* 7:729-738
- Webster DE, Smith SD, Pickering RJ, Strugnell RA, Dry IB, Wesselingh SL (2006) Measles virus hemagglutinin protein expressed in transgenic lettuce induces neutralising antibodies in mice following mucosal vaccination. *Vaccine* 24:3538-3544.
- Wee JL, Scheerlinck JP, Snibson KJ, Edwards S, Pearse M, Quinn C, Sutton P. (2008) Pulmonary delivery of ISCOMATRIX influenza vaccine induces both systemic and mucosal immunity with antigen dose sparing. *Mucosal Immunol* 1: 489-496
- Williamson E, Westrich GM, Viney JL (1999) Modulating dendritic cells to optimize mucosal immunization protocols. *J Immunol* 163: 3668-3675.
- Yamada T, Iwabuki H, Kanno T, Tanaka H, Tomoji K, Fukuda H, Kondo A, Seno M, Tanizawa K, Kuroda S (2001) Physicochemical and immunological characterization of hepatitis B virus envelope particles exclusively consisting of the entire L (pre-S1 + pre-S2 + S) protein. *Vaccine* 19: 3154-3163.
- Youm J-W, Won Y-S, Jeon JH, Ryu CJ, Choi Y-K, Kim H-C, Kim B-D, Joung H, Kim HS (2007) Oral immunogenicity of potato-derived HBsAg middle protein in BALB/c mice. *Vaccine* 25: 577-584.
- Young MD, Rosenthal MH, Dickson B, Du W, Maddrey WC (2001) A multi-center controlled study of rapid hepatitis B vaccination using a novel triple antigen recombinant vaccine. *Vaccine* 19: 3437-3443.
- Yuen MF, Lai CL (2001) Treatment of chronic hepatitis B. *Lancet Infect Dis* 1: 232-241.
- Zeltins A (2013) Construction and characterization of virus-like particles: a review. *Mol Biotechnol* 53:92-107.

## Pozostałe osiągnięcia naukowo – badawcze

Otrzymanie prototypu doustnej szczepionki pochodzenia roślinnego przeciwko HBV było podstawą prezentowanej pracy naukowej. Oprócz tej dominującej działalności podejmowano również prace nie związane z biofarmingiem, jakkolwiek również mieszczące się w obszarze biotechnologii roślin. Należą tutaj badania nad opracowaniem metodyki transformacji genetycznej grochu i rzepaku.

Groch siewny (*Pisum sativum* L.) jest jedną z najważniejszych uprawnych roślin motylkowatych (bobowate, *Fabaceae*), użytkowaną na pożywienie i paszę, przede wszystkim w krajach o umiarkowanym klimacie. Kierunki hodowli twórczej grochu koncentrują się na poprawieniu jakości i zawartości białka, zwiększeniu oporności na choroby i szkodniki oraz polepszeniu cech uprawowych. Podobnie jak w wielu innych przypadkach, postęp hodowlany grochu próbowano poszerzyć o metody biotechnologiczne, w tym transformację genetyczną. Groch jednak, podobnie jak inne tzw. grubonasienne gatunki z rodziny *Fabaceae*, pomimo wielu badań należy do obiektów w niewielkim stopniu podatnych na manipulacje w kulturach *in vitro*.

Pierwotną przyczyną podjęcia własnych badań nad regeneracją i transformacją grochu była koncepcja wykorzystania tego gatunku do wytwarzania białek antygenowych akumulowanych w nasionach. Badania nad tym zagadnieniem rozpoczęto w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN i kontynuowano po uzyskaniu stopnia doktora w Instytucie Genetyki Roślin PAN. Wstępem do prac nad transformacją było opracowanie wydajnej metody regeneracji. W doświadczeniach wykorzystano 9 polskich odmian grochu o różnym przeznaczeniu: jadalnych na świeżo (zielono) i sucho oraz paszowych. Jakkolwiek w badaniach opierano się na danych literaturowych, opracowana procedura regeneracji cechowała się istotnym stopniem oryginalności, głównie w aspekcie składu i kolejności pożywek oraz przebiegu regeneracji na późniejszych etapach, tj. po stadium organogenezy. Wykazano znaczne zróżnicowanie odmian w zakresie podatności na tworzenie kalusa, organogenezę, ukorzenianie lub szczepienie oraz przeżywalność w warunkach *ex vitro*. Regeneracja wg opracowanego schematu charakteryzowała się znaczną efektywnością, tj. w stosunku do liczby wyjściowych eksplantatów – od 16 do ponad 100% w zależności od odmiany, a opracowana metodyka mikropropagacji *in vitro* umożliwiła dalsze zwiększenie liczby regenerantów. Wyselekcjonowano również odmiany o najwyższym całkowitym potencjale regeneracyjnym, które miały stanowić główne obiekty badawcze w dalszych pracach.

Opracowaną procedurę regeneracji wykorzystano w doświadczeniach nad transformacją grochu za pomocą *Agrobacterium* sp. W transformacji „opornych” gatunków roślin kluczowe znaczenie ma dobór szczepów *Agrobacterium*, często także odmiany danego gatunku rośliny. W badaniach nad transformacją grochu wykorzystano hiperwirulentne szczepy *A. tumefaciens*: AgL0, AgL1 i EHA105. Wykazano natomiast, że wysoki potencjał regeneracyjny danej odmiany często nie korelował z podatnością na transformację. Wydajność transformacji wynosiła w najbardziej efektywnych przypadkach 1,5 - 4%, co było wartością porównywalną lub dwukrotnie wyższą od ówczesnych danych literaturowych. Wyniki badań nad regeneracją i transformacją, opublikowane w artykułach „Organogenesis and long-term micropropagation of Polish pea cultivars.” (2003) *Acta Soc Bot Pol* 72: 295-302 oraz “Transformation efficiency of Polish cultivars of pea (*Pisum sativum* L.) varying in regeneration capability using hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strains.” (2005) *J Appl Genet* 46: 139-147, zostały zauważone, a niekiedy wykorzystane przez innych badaczy (dotychczas 8 cytowań razem). Jakkolwiek otrzymany wg opracowanej procedury transgeniczny groch wytwarzał białka antygenowe na bardzo niskim poziomie (dane niepublikowane), ww. metoda transformacji okazała się użyteczna. Została wykorzystana m. in. w pracy doktorskiej pt. „Aptitude à la régénération *in vitro* et à la transformation génétique chez le pois (*Pisum sativum*) et le pois chiche (*Cicer arietinum*). Etude de l’effet de l’expression du gène *WUSCHEL* sur la régénération *in vitro*.” Aline Kadri z Institut Supérieur d’Agriculture de Beauvais (ISAB) w Beauvais we Francji, wykonującej część doświadczeń w IGR PAN. Ponadto skonstruowany wówczas modelowy wektor pKGIB, zawierający reporterowy gen GUS z intronem pod kontrolą konstytutywnego promotora 35S oraz markerowy gen *bar* determinujący oporność na niektóre herbicydy, jak również metodyka przygotowania *Agrobacterium*, były później wykorzystane w pracach innych badaczy i własnych, w tym do transformacji rzepaku ozimego.

Rzepak (*Brassica napus* L.) jest pod względem znaczenia trzecią rośliną oleistą na świecie. Metody biotechnologiczne były zatem stosunkowo wcześniej zaangażowane w ulepszanie rzepaku, podobnie jak w przypadku soi czy kukurydzy. Transgeniczny rzepak, głównie odporny na herbicydy, zajmuje obecnie ok. 20% całkowitego arealu tej rośliny. Jednakże powyższe dane dotyczą zasadniczo rzepaku jarego. Natomiast rzepak ozimy, którego uprawa dominuje w Polsce i Europie, długie lata pozostawał odporny na próby transformacji genetycznej, w tym z użyciem *Agrobacterium* sp.



Badania nad transformacją rzepaku ozimego prowadzono we współpracy z zespołem kierowanym przez dr hab. Teresę Cegielską-Taras z Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Poznaniu. Zasadniczym rezultatem badań jest opracowana procedura transformacji o efektywności do 4,5% w pokoleniu T<sub>0</sub>, kilkakrotnie wyższa od wcześniejszych prób dla rzepaku jarego. Umożliwia to otrzymanie z pojedynczego eksperymentu kilku linii transgenicznych. Osiągnięciem o jeszcze większym znaczeniu była transformacja z wykorzystaniem jako eksplantatów haploidalnych zarodków somatycznych, rozwijających się w kulturze *in vitro* z komórek pyłku. Otrzymane transgeniczne rośliny rzepaku po diploidyzacji były zatem transgenicznymi homozygotami, a nie hemizygotami, jakie są uzyskiwane po rutynowej transformacji diplo- lub poliploidalnych komórek. W konsekwencji wszystkie rośliny potomne były transgeniczne – nie obserwowano typowej dla transgenicznych hemizygot eliminacji transgeny u części potomstwa. Przedstawione wyniki zostały opublikowane w pracy „Transformation of microspore-derived embryos of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*.” (2008) J Appl Genet 49: 343-347 (5 cytowań ogółem) oraz w rozdziale „The use of herbicides in biotech oilseed rape cultivation and in generation of transgenic homozygous plants of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.)” monografii pt. “Herbicides/Book 2” red. Hasaneen MN, InTech d.o.o., Rijeka 2011, ISBN 978-953-307-744-4; ch. 7, pp. 125-136 (1500 pobrań). Jakkolwiek określenie aktywności i/lub wyciszania transgeny w kolejnych pokoleniach transformantów wymaga dalszych analiz, otrzymane wyniki stanowią podstawy takich badań. W przypadku potwierdzenia stabilności transgeny, opracowana metoda otrzymywania transgenicznego i jednocześnie homozygotycznego rzepaku ozimego, może przynieść istotne korzyści gospodarcze.



**Tomasz Pniewski**