

№28 2004 год

ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ КАК БИОПРОДУЦЕНТЫ БЕЛКОВ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Успехи в области генетической инженерии растений открыли новые возможности для получения рекомбинантных белков. Для этой цели широко используются клетки бактерий, дрожжей, млекопитающих и насекомых. Однако такие системы имеют ряд существенных недостатков. В клетках прокариот не происходят посттрансляционная модификация и правильная укладка (фолдинг) полипептидных цепей многих эукариотических белков. Клетки дрожжей, млекопитающих и насекомых лишены подобных недостатков, но их использование в качестве биопродукторов ограничено высокой себестоимостью выхода рекомбинантных белков (Russel, Clarke, 1999).

По сравнению с вышеупомянутыми системами экспрессии растения имеют ряд особенностей и преимуществ. Прежде всего необходимо отметить, что в клетках высших растений происходят гликозилирование и фолдинг белков, сходные с таковыми в клетках млекопитающих. Культивирование растений не требует дорогостоящего оборудования, а сельскохозяйственные масштабы продукции гарантируют доступность рекомбинантного препарата в количествах, достаточных для клинических испытаний и широкого терапевтического использования. В отличие от животных, растительные клетки не содержат в своём составе патогенные для человека вирусы, а также прионы и, таким образом, могут служить безопасным источником рекомбинантных белков медицинского назначения. Хотя стоимость выделения и очистки целевого белка из растений-продуцентов может быть сопоставима с таковой для других систем, наработка сырого материала обходится значительно дешевле. В ряде случаев, например, при использовании трансгенных растений в качестве «съедобных вакцин» выделение белка в чистом виде не требуется. В дополнение ко всему перенос фрагментов экзогенной ДНК в растительный геном и регенерация у растений происходят значительно проще по сравнению с животными (Daniell *et al.*, 2001).

Известно, что аппарат транскрипции и трансляции у растений является универсальным и может быть адаптирован не только для накопления гомологичных белков, не синтезируемых данным видом растения, но и для синтеза гетерологичных белков как бактериального, так и животного происхождения. С другой стороны, сами растения *in vivo* могут служить благоприятной средой для развития различных организмов — бактерий и вирусов, геном которых может быть модифицирован и адаптирован для синтеза соответствующих гетерологичных белков. Анализируя данные литературы, необходимо отметить, что поиск различных систем для экспрессии чужеродных генов за последние десять лет был связан с развитием трёх основных подходов.

Первым из них был предложен путь использования трансгенных растений, в ядерный геном которых перенесены гены, контролирующие синтез соответствующих гетерологичных белков (De la Riva, 1998). Получение таких растений было основано на природной способности почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens* переносить часть своей собственной ДНК в виде Т-области мегаплазмиды в растительные клетки. Именно эта часть Т-плазмиды была использована учёными для переноса генно-инженерных конструкций, включающих различные целевые гены. В качестве целевых можно было использовать и гены гетерологичных белков медицинского назначения. Необходимо отметить, что использование только агробактериального переноса в значительной степени сужало круг растений-реципиентов и ограничивало его, как правило, до двудольных. Поэтому дальнейшее развитие идеи использования растительного генома для синтеза гетерологичных белков стимулировало поиск новых способов переноса фрагментов экзогенной ДНК в геном растений. Были разработаны методы прямой доставки чужеродных генов в растительный геном, такие, как микроинъекции (Neuhauser *et al.*, 1987), электропорация (Fromm *et al.*, 1985) и методы биобаллистики (Klein *et al.*, 1987). В этом случае для переноса использовалась очищенная плазмидная ДНК, в которой содержались генетические конструкции с целевыми генами.

При переносе в геном растения чужеродные гены, как правило, стабильно интегрируются и передаются по-томкам в последующих поколениях согласно законам Менделя (Horsch *et al.*, 1984; Budar *et al.*, 1986; De-roles, Gardner, 1988; Heberle-Bors *et al.*, 1988).

Хотя идея внедрения экзогенной ДНК в растительный геном для наработки соответствующих продуктов в растении представляется весьма перспективной, этот подход не лишен и некоторых недостатков. Среди них необходимо отметить низкий уровень экспрессии перенесенных генов, даже при использовании очень сильных промоторов. Содержание сывороточного альбумина человека в трансгенных тканях табака составило 0,02 % от суммарного белка (Sijmons *et al.*, 1990). Ещё меньшие значения были получены для эритропоэтина (0,003 %) и β -интерферона (0,001 %) (Edelbaum, 1992; Kusnadi *et al.*, 1997). Одной из причин этого, по-видимому, является увеличение скорости деградации мРНК чужеродного гена, когда её уровень достигает порогового значения. Этот механизм, возможно, служит одним из способов защиты растения от РНК-содержащих вирусов (Matzke *et al.*, 1994; Matzke M., Matzke A., 1995; Vaucheret, 2001). Второй причиной низкого уровня продукции является протеолиз чужеродных белков в цитоплазме растительной клетки. Введение в полипептидную цепь целевого белка сигнальных последовательностей, направляющих его накопление в эндоплазматической сети или секрецию в апопласт, где частота протеолиза значительно ниже, позволяет достичь повышения продуктивности трансгенных растений в 100 раз (Giddings *et al.*, 2000; Menassa *et al.*, 2001). Экспрессия целевых белков в запасной ткани семян, где уровень биodeградации ниже, чем в обводнённых тканях (листья, плоды), способствует повышению продуктивности на 2-3 порядка. Так, содержание химерного энкефалина человека в семенах трансгенного *A. thaliana* составило 2,9 % от суммарного белка. Этого удалось достичь введением в полипептидную цепь энкефалина сигнальной последовательности глютелина (запасного белка риса), направляющей его транспортировку в компартменты накопления запасных белков. Химерный ген находился под контролем промотора гена глютелина, который направлял его тканеспецифичную транскрипцию в клетках запасной ткани семян (Vandekerckhove *et al.*, 1989).

Интеграция чужеродных генов в ядерный геном растения сопряжена и с рядом проблем биобезопасности использования генетически модифицированных организмов. При получении трансгенных растений в сельскохозяйственных масштабах существует опасность утечки трансгена в окружающую среду (выход из-под контроля) в результате переопыления с близкородственными дикорастущими видами. Для повышения уровня биобезопасности рядом исследователей было предложено использовать для трансгенеза стерильные по мужской линии растения (Menassa *et al.* , 2001).

Другой проблемой, возникающей при интеграции гетерологичных генов в ядерный геном растений, является вероятность «замолкания» трансгенов в последующих поколениях (сайленсинг). Вероятность сайленсинга резко возрастает при встраивании множества копий чужеродного гена на геном растения (Finnegan, McElroy, 1994; Matzke *et al.* , 1994; Matzke M., Matzke A., 1995). Поэтому при создании трансгенных растений-биопродукторов рекомбинантных белков среди трансформантов отбирают растения, содержащие только одну вставку чужеродного гена.

В связи с вышеперечисленными проблемами, возникающими при интеграции трансгенов в ядерный геном, весьма привлекательным представляется способ переноса экзогенной ДНК в геном хлоропластов.

Хлоропласты — органеллы растительной клетки, содержащие зеленый пигмент хлорофилл, а также ряд других пигментов, принимающих участие в поглощении световой энергии и осуществлении фотохимических реакций. По форме и размерам хлоропласты высших растений достаточно однородны. Некоторая вариабельность наблюдается в отношении их числа в расчете на одну клетку, которое варьирует от нескольких десятков до сот-ни и более. Каждый отдельный хлоропласт окружен двойной мембраной и имеет сложную внутреннюю структуру. В одной растительной клетке в среднем содержится от 5 до 10 тыс. копий хлоропластной ДНК, за счёт чего уровень экспрессии чужеродных белков достигает значений, сравнимых с уровнем экспрессии в *E. coli* (до 40 % от суммарного белка клетки) (Staub *et al.* , 2000; De Cosa *et al.* , 2001). Однако в литературе встречаются только единичные работы по получению растений с генетически модифицированными хлоропластами. Это связано с чрезвычайной сложностью методов их трансформации и последующего отбора.

Третий путь использования растений для накопления белков гетерологичного происхождения основан на природной способности растительных вирусов проникать в клетки растений и колонизировать растительные ткани (Mushagian, Shepherd, 1995). На этой основе возникает реальная возможность модификации вирусного генома и адаптации его не только в качестве вектора для доставки в растения соответствующих генетических конструкций, но и в качестве матриц для транзиторной экспрессии генов, кодирующих синтез белков, представляющих коммерческий интерес. Для заражения растительных тканей используются рекомбинантные (+)РНК-содержащие вирусы растений, несущие в составе своего генома транскрипт чужеродного гена (Mushagian, Shepherd, 1995). Скорость мультпликации вирусной РНК в растениях чрезвычайно высока, за счёт чего достигается высокая копияность транскриптов чужеродных генов в цитоплазме заражённых клеток. Поэтому продуктивность вирусной системы экспрессии в среднем на 2 порядка выше по сравнению со стабильной трансформацией растений (Giddings *et al.* , 2000).

В настоящее время широко используются два вида вирусов для продукции чужеродных белков в растениях: ви-рус табачной мозаики (ВТМ) и вирус мозаики коровьего гороха (ВМКГ). Вектор на основе РНК ВТМ использовался для получения ингибитора репликации ВИЧ α -трихосантина в *Nicotiana benthamiana* (Kumagai *et al.* , 1993). Для этого целевую последовательность, кодирующую α -трихосантин, поместили под субгеномный промотор белка оболочки ВТМ. Спустя две недели после заражения рекомбинантный α -трихосантин накапливался в листьях *N. Benthamiana* в количестве 2 % от суммарного белка. На основе ВМКГ удалось получить химерные частицы этого вируса с экспонированными на поверхности антигенными детерминантами ВИЧ1 (gp41) (Porta *et al.* , 1996). Для этого последовательность эпитопа gp41 была «сшита» с геном белка оболочки ВМКГ. Такие частицы обладали высокой иммуногенностью и были способны нейтрализовать инфекционные свойства ВИЧ1 *in vivo*.

Сравнивая пути наработки гетерологичных белков в растительных тканях, необходимо отметить, что каждый из них имеет свои преимущества и недостатки. В трансгенных растениях перенесенные гены стабильно встраиваются в геном и сохраняются в последующих поколениях, тогда как при интеграции генов в геном вирусов в зараженных вирусами растениях обеспечивается их временная (транзиторная) экспрессия. Накопление соответствующих белковых продуктов будет определяться периодом вегетации зараженного растения-хозяина. С другой стороны, пре-имуществом вирусного пути накопления белков в растениях является короткий период размножения вирусных частиц, простота инфицирования растений, а также широкий диапазон различных видов растений, которые могли бы быть использованы для этих целей.

Растения-продуценты антител

Цель иммунизации организма вакцинами — индуцировать продукцию антител на патогенный агент. Альтернативой такому подходу является метод пассивной иммунизации, основанный на введении готовых иммуноглобулинов. Широкое применение такого подхода долгое время было ограничено высокой стоимостью антител, получаемых традиционными способами. В 1989 г. была показана возможность сборки функционально активных иммуноглобулинов класса IgG и IgA из лёгкой и тяжёлой цепей в растениях табака (Hiatt *et al.* , 1989). С того момента в нескольких крупных лабораториях мира были получены трансгенные растения-продуценты различных типов антител к эпитопам ряда патогенных агентов. В таблице 1 представлена сводка этих результатов.

Таблица 1

Растения-продуценты антител

Применение и специфичность	Класс антител	Растение-продуцент	Уровень продукции	Лит. ссылка
Зубной кариес; стрептококковый антиген	IgA-IgG	Табак	500 мкг/г сырого веса	Ma <i>et al.</i> 1995, 1998
Вирус простого герпеса 2	IgG	Соя	Нет данных	Zeitlin <i>et al.</i> 1998

Диагностика ряда заболеваний; антитела, специфичные к IgG человека	IgG	Люцерна	1 % суммарного белка	Khoudi <i>et al.</i> 1999
Терапия рака; раковый эмбриональный антиген	ScFv	Пшеница Рис	900 нг/г сырого веса (листья) 1,5 мкг/г сырого веса (семена) 29 мкг/г сырого веса (листья) 32 мкг/г сырого веса (семена)	Stoger <i>et al.</i> 2000; Torres <i>et al.</i> 1999

Как видно из таблицы 1, к настоящему времени получены трансгенные растения табака, люцерны, пшеницы, риса и сои. Среди этих растений выделяются две группы: продуценты иммуноглобулинов к антигенам двух патогенных агентов (стрептококк и вирус простого герпеса второго типа) и антител, специфичных к раковому эмбриональному антигену и к IgG человека.

Анализируя уровень экспрессии перенесённых генов в геноме растений-биопродуцентов антител, можно отметить, что уровень продуктивности иммуноглобулина к поверхностному антигену *Staphylococcus mutants* в растениях табака оказался наиболее высоким и составил 500 мкг/г сырого веса (табл. 1). Такие антитела, выделенные из трансгенных растений табака, предупреждали развитие кариеса у пациентов при непосредственном нанесении их на зубную эмаль и не уступали по своим свойствам аналогичным антителам, получаемым из гибридомы мышей.

Имуноглобулины к раковому эмбриональному антигену были получены в трансгенных растениях риса и пшеницы (табл. 1). Такие антитела используются в иммунотерапии онкологических заболеваний, а также для визуализации опухоли *in vivo*.

Трансгенные растения рассматриваются как потенциальный недорогой источник иммуноглобулинов для медицинских и исследовательских целей. На рисунке представлена динамика стоимости одного грамма чистого IgA, производимого в разных экспрессирующих системах, по оценкам компании «Planet Biotechnology» (Daniell *et al.*, 2001). Из графика видно, что уровень экспрессии значительно влияет на конечную стоимость IgA в случае продукции в культуре клеток млекопитающих и молоке трансгенных животных. В меньшей степени зависимость цены от уровня экспрессии наблюдается при использовании трансгенных растений. Это связано с тем, что конечная цена рекомбинантного белка складывается из стоимости наработки сырого материала и стоимости его выделения. Считается, что стоимость очистки приблизительно одинакова для всех систем, а различие обусловлено затратами при наработке сырого материала, которая в клетках млекопитающих и трансгенных животных гораздо выше.

Растения-продуценты субъединичных вакцин

Трансгенные растения-продуценты эпитопов болезнетворных агентов человека и животных получили название «съедобных вакцин». Механизм иммунизации такими вакцинами основан на антигенпредставляющей способности перитонеальных макрофагов тонкого кишечника млекопитающих. В кишечнике чужеродный белок, обладающий антигенными свойствами, распознается специальными М-клетками, которые широко представлены в толще слизистого эпителия. М-клетки транспортируют захваченный антиген к перитонеальным макрофагам и В-лимфоцитам, находящимся в лимфоидных образованиях тонкого кишечника (пейеровых бляшках). В результате презентации антигена на поверхности антиген-представляющих клеток происходит активация Т-лимфоцитов-хэлперов, которые в сочетании с антигеном активируют В-лимфоциты. Дифференцированные В-клетки выходят из лимфоидных фолликулов слизистой оболочки и поступают через общую циркуляцию в мезентеральные лимфатические узлы, где происходит их созревание и превращение в плазматические клетки, синтезирующие специфические к антигену антитела. Плазматические клетки способны снова мигрировать к слизистым оболочкам дыхательных путей, желудочно-кишечного и мочеполового трактов. Секреторные иммуноглобулины IgA транспортируются на поверхность слизистых оболочек, где они связываются с чужеродными агентами и препятствуют их проникновению в организм. Следует отметить, что мукозная вакцинация стимулирует как иммунный ответ слизистых оболочек —

первого защитного барьера на пути патогенных агентов, так и общий иммунный ответ организма (Walmsley, Arntzen, 2000).

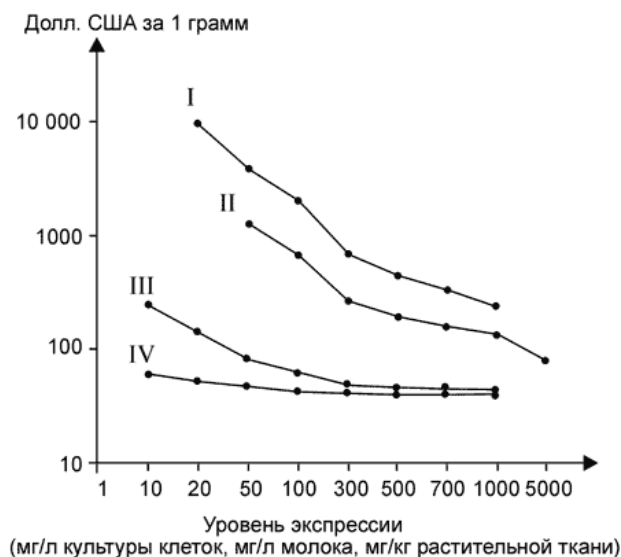


Рис. Динамика цены за 1 грамм рекомбинантного IgA, полученного из разных экспрессирующих систем в зависимости от уровня экспрессии.

I — культура клеток млекопитающих; II — молоко трансгенной козы; III — трансгенные растения (семена); IV — трансгенные растения (зелёная биомасса) (По: Daniell et al., 2001).

Таблица 2

Антигены, экспрессированные в растениях

Патогенный агент или токсин	Растение-производитель	Антиген	Ссылка
Вирус гепатита В	Табак Картофель Люпин Салат	HbsAg	Mason et al., 1992; Thanavala et al., 1995; Richter et al., 2000; Kapusta et al., 1999
Вирус бешенства	Томаты	Гликопротеин вируса бешенства	McGarvey et al., 1995
Энтеропатогенная <i>E. Coli</i>	Табак Картофель Кукуруза	В-субъединица энтеротоксина <i>E. Coli</i>	Haq et al., 1995; Mason et al., 1998; Streatfield et al., 2000
Холерный вибрион	Картофель	В-субъединица токсина <i>V. Cholerae</i>	Arakawa et al., 1997
Вирус ящура	<i>A. thaliana</i> Люцерна	VP1	Carrillo et al., 1998; Wigdorovitz et al., 1999
<i>Streptococcus mutans</i> (зубной кариес)	Табак	<i>S. mutans</i> поверхностный антиген SpaA	Tacket, Mason, 1999
Цитомегаловирус	Табак	Гликопротеин В	Tackaberry et al., 1999
Вирус Норфолк	Табак Картофель	Антиген капсида вируса Норфолк	Mason et al., 1996; Tacket et al., 2000
ВИЧ1	Табак	gp120	Giddings et al., 2000
Вирус трансмиссивного гастроэнтерита свиней	<i>A. thaliana</i> Табак Кукуруза	Гликопротеин S коронавируса	Tuboly et al., 2000; Streatfield et al., 2000

К настоящему времени получены трансгенные растения табака, картофеля, люпина, салата, томатов, кукурузы, *A. thaliana* и люцерны, синтезирующие антигены различных инфекционных патогенов человека и животных (табл. 2).

Первыми «съедобными вакцинами» были трансгенные растения табака и картофеля, экспрессирующие поверхностный антиген вируса гепатита человека HbsAg (Mason et al., 1992). Скармливание клубней картофеля-производителя HbsAg мышам стимулировало развитие мукозного (слизистого) и общего гуморального иммунного ответа (Thanavala et al., 1995).

Токсины, выделяемые энтеропатогенной *E. Coli* и холерным вибрионом, вызывают желудочно-кишечные расстройства у человека и животных и являются сильными оральными иммуногенами. При попадании в кишечник токсины вызывают продукцию

специфических IgG и IgA иммуноглобулинов. Созданы трансгенные растения табака, картофеля и кукурузы, синтезирующие В-субъединицу энтеротоксина *E. Coli* (табл. 2). Была проанализирована степень протективности иммунитета, приобретенного мышами при оральной вакцинации трансгенным картофелем. Иммунизированные мыши обладали устойчивостью к действию орально вводимого токсина по сравнению с контрольной группой, потреблявшей нетрансгенные клубни, хотя уровень устойчивости был ниже, чем у мышей, иммунизированных введением в желудок эквивалентного количества В-субъединицы природного токсина. Полученные на животных моделях результаты по выработке защитного иммунитета против энтеропатогенной *E. coli* были подтверждены в дальнейшем в клинических исследованиях на добровольцах (Tacket *et al.*, 2000). В аналогичной работе (Arakawa *et al.*, 1997) было показано развитие защитного иммунитета у мышей после скармливания клубней трансгенного картофеля, экспрессирующего В-субъединицу токсина *V. cholerae*. Иммунизация сопровождалась выработкой антител классов IgG и IgA.

Не останавливаясь подробно на других антигенах, приведённых в таблице 2, следует отметить, что практически во всех полученных растениях-продуцентах происходила сборка индивидуальных молекул антигена в мульти-мерные комплексы или вирусоподобные частицы, которые стимулировали развитие как мукозного, так и общего гуморального иммунного ответа при скармливании экспериментальным животным. Основные преимущества «съедобных вакцин» — экономичность, безопасность и доступность для широкой иммунопрофилактики населения.

Таблица 3

Фармацевтические белки, полученные в трансгенных растениях

Применение	Растение-продуцент	Фармацевтический белок	Уровень продукции (в % от суммарного растворимого белка)	Ссылка
Анестезия	<i>A. thaliana</i>	Энкефалин	2,9 (семена)	Vandekerckhove <i>et al.</i> , 1989
Цирроз печени, ожоги, хирургия	Табак	Сывороточный альбумин	0,02	Sijmons <i>et al.</i> , 1990
Косметология	Табак	Гомодимер коллагена	0,01	Ruggiero <i>et al.</i> , 1990
Лечение гепатитов С и В	Табак	β-интерферон	0,001	Edelbaum, 1992
Заживление ран	Табак	Эпидермальный фактор роста	0,001	Higo, 1993
Ингибитор тромбина	Рапс	Гирудин	0,3 (семена)	Parmenter <i>et al.</i> , 1995
Анемия	Табак	Эритропоэтин	0,003	Kusnadi <i>et al.</i> , 1997
Заменитель крови	Табак	Гемоглобин α, β	0,05 (семена)	Diercyk <i>et al.</i> , 1997
Заменитель материнского молока	Картофель	Казеин	0,01	Chong <i>et al.</i> , 1997
Фиброзный кистоз, кровотечения	Рис	α-1-антитрипсин	Нет данных	Giddings <i>et al.</i> , 2000
Антикоагулянт	Табак	Белок С	0,01	Cramer <i>et al.</i> , 1999
Ингибитор трипсина	Кукуруза	Апротонин	Нет данных	Zhong <i>et al.</i> , 1999
Гормон роста	Табак	Соматотропин	0,16 (семена)	Leite <i>et al.</i> , 2000
Антимикробное средство	Картофель	Лактоферрин	0,1	Chong <i>et al.</i> , 2000
Синдром Гоше	Табак	Глюкоцереброзидаза	1-10	Giddings <i>et al.</i> , 2000
Воспалительные заболевания кишечника	Табак	Интерлейкин-10	0,0055	Menassa <i>et al.</i> , 2001
Нейропения	Табак	ГМ-КСФ	0,03 (семена)	Sardana <i>et al.</i> , 2002
Иммунотерапия рака	Картофель	Интерлейкин-2	0,06	Park, Cheong, 2002
Болезнь Педжета, остеопороз	Картофель	Кальцитонин	0,02	Ofoghi <i>et al.</i> , 2000

За последние несколько лет в ведущих биотехнологических центрах мира созданы трансгенные растения-продуценты широкого спектра гормонов, цитокинов, факторов роста и ферментов, имеющих потенциальное применение в фармакологии (табл. 3). Все они не уступали по биологической активности аналогам, получаемым из других систем экспрессии.

По закону, принятому Всемирной организацией здравоохранения, любые предлагаемые источники лекарственных препаратов, в частности трансгенные растения, должны быть зарегистрированы и пройти серию клинических испытаний. Первые клинические испытания трансгенных растений риса, синтезирующих активный человеческий α -1-антитрипсин для терапии фиброзного кистоза, были начаты в 1998 г.

Производство рекомбинантных белков для медицинских целей с использованием традиционных систем требует значительных финансовых затрат. Так, например, недостаток лизосомального фермента гликоцереброзидазы в организме вызывает синдром Гоше. Единственным видом терапии этого заболевания является внутри-венное введение гликоцереброзидазы. Долгое время этот белок получали из плаценты человека, на поддержание жизни одного пациента в течение года требовалось 160000\$. Переключение продукции гликоцереброзидазы на культуру клеток млекопитающих снизило стоимость этого препарата, однако не вытеснило его из группы «самых дорогих лекарств в мире». В 1999 г. сотрудниками корпорации CropTech было показано, что трансгенные растения способны синтезировать биологически активную гликоцереброзидазу человека. В дальнейшем были получены высокопродуктивные трансгенные растения табака, в которых содержание гликоцереброзидазы человека варьировало от 1 до 10 % TSP. Ожидается, что получение рекомбинантной гликоцереброзидазы из таких растений позволит значительно снизить её стоимость (Giddings *et al.*, 2000).

В заключение хотелось бы отметить, что несмотря на значительные достижения в области продукции рекомбинантных белков медицинского назначения в растениях, это направление находится лишь на начальном этапе своего развития. Учёные-биотехнологи уверены, что в будущем рекомбинантные препараты, получаемые из генетически модифицированных растений, заменят дорогостоящие бактериальные и животные аналоги на фармацевтическом рынке. «Съедобные вакцины» позволят значительно усовершенствовать программы всеобщей иммунизации, особенно для населения развивающихся стран.

Литература

Arakawa T., Chong D., Merritt J. et al. Expression of cholera and toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants // *Transgenic Res.* 1997. V. 6. P. 403-413.

Budar F., Thia-Toong, Van Montagu M. Agrobacterium-mediated gene transfer results mainly in transgenic plants trans-mitting T-DNA as a single Mendelian factor // *Genetics.* 1986. V. 114. P. 303-313.

Carrillo C., Wigdorovitz A., Oliveros J. et al. Protective immune response to foot-and-mouth disease virus with VP1 ex-pressed in transgenic plants // *J. Virol.* 1998. V. 72. P. 1688-1690.

Chong D., Roberts W., Arakawa T. et al. Expression of human milk protein b-casein in transgenic potato plants // *Trans-genic Res.* 1997. V. 6. P. 289-296.

Chong D., Langridge W. Expression of full length bioactive antimicrobial human lactoferrin in potato plants // *Transgenic Res.* 2000. V. 9. P. 71-78.

Cramer C., Boothe J., Oishi K. Transgenic plants for therapeutic proteins: linking upstream and downstream technolo-gies // *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* 1999. V. 240. P. 95-118.

Daniell H., Streatfield S., Wycoff K. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants // *Trends in Plant Sci.* 2001. V. 6. P. 219-226.

Deroles S.C., Gardner R.C. Analysis of the T-DNA structure in a large number of transgenic petunias generated by Agro-bacterium-mediated transformation // *Plant Mol. Biol.* 1988. V. 11. P. 365-377.

De Cosa B., Moar W., Lee S. et al. Overexpression of Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals // *Nature Biotechnol.* 2001. V. 19. P. 71-74.

De la Riva G., Gonzalez-Cabrera J., Vazquez-Padron R., Ayra-Pardo C. Agrobacterium tumefaciens: a natural tool for plant transformation // *Electronic J. of Biotechnol.* 1998. V. 1, № 3. www.ejb.org.

Dieryck W., Pagnier J., Poyart C. et al. Human haemoglobin from transgenic tobacco // *Nature.* 1997. V. 386. P. 29-30.

Edelbaum O., Stein D., Holland N. et al. Expression of active human interferon-beta in transgenic plants // *J. of Interferon Res.* 1992 V. 12. P. 449-453.

Finnegan J., McElroy D. Transgene inactivation: Plants fight back! // *Bio/Technology.* 1994. V. 12. P. 883-887.

Fromm E.M., Taylor L.P., Walbot V. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1985. V. 82. P. 5824-5825.

Giddings G., Allison G., Brooks D., Carte A. Transgenic plants as factors for biopharmaceuticals // *Nature Biotechnol.* 2000. V. 18. P. 1151-1155.

Haq T., Mason H.S., Clements J. et al. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants // *Science.* 1995. V. 268. P. 714-716.

Heberle-Bors E., Charvat B., Thompson D. et al. Genetic analysis of T-DNA insertion into tobacco genome // *Plant Cell Rep.* 1988. V. 7. P. 571-574.

Hiatt A., Cafferkey R., Bowdish K. Production of antibodies in transgenic plants // *Nature.* 1989. V. 342. P. 76-78.

Higo K., Saito Y., Higo H. Expression of a chemically synthesized gene for human epidermal growth factor under the control of cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic tobacco // *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*. 1993. V. 57. P. 1477-1481.

Horsch R.B., Fraley R.T., Rogers S.G. et al. Inheritance of functional foreign genes in plants // *Science*. 1984. V. 223. P. 496-499.

Kapusta J., Modelska A., Figlerowicz M. et al. A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus // *FASEB J*. 1999. V. 13. P. 1796-1799.

Khoudi H., Laberge S., Ferullo J. et al. Production of diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants // *Bio-technology and Bioengineering*. 1999. V. 64. P. 135-143.

Klein T., Wolf D., Wu R., Sanford J. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells // *Nature*. 1987. V. 327. P. 70-72.

Kumagai M., Turpen T.H., Weinzettl N. et al. High-level expression of biologically active alpha-trichosanthin in trans-fected plants by an RNA viral vector // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1993. V. 90. P. 427-430.

Kusnadi A. Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations // *Biotechnology and Bioengineering*. 1997. V. 56. P. 473-484.

Leite A., Kemper E. Expression of correctly processed human growth hormone in seeds of transgenic tobacco plants // *Molecular Breeding*. 2000. V. 6. P. 47-53.

Ma J., Hiatt A., Hein M. et al. Generation and assembly of secretory antibodies in plants // *Science*. 1995. V. 268. P. 716-719.

Ma J., Hikmat B., Wycoff K. et al. Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans // *Nature Medicine*. 1998. V. 4. P. 601-606.

Mason H., Lam D., Arntzen C. Expression hepatitis B surface antigen in transgenic plants // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1992. V. 89. P. 11745-11749.

Mason H., Ball J., Shi J. et al. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1996. V. 33. P. 5335-5340.

Mason H., Haq T., Clements J. et al. Edible vaccine protect mice against Escherichia coli heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene // *Vaccine*. 1998. V. 16. P. 1336-1343.

Matzke M., Matzke A. How and why do plants inactivate homologous transgenes? // *Plant Physiol*. 1995. V. 107. P. 679-685.

Matzke A., Neuberger F., Park Y. et al. Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: epistatic silencing loci contain multiple copies of methylated transgenes // *Mol. Gen. Genet*. 1994. V. 244. P. 219-229.

McGarvey P., Hammond J., Dienelt M. et al. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes // *Biotechnology*. 1995. V. 13. P. 1484-1487.

Menassa R., Nguyen V., Jevnikar A. et al. A self-contained system for the field production of plant recombinant interleukin-10 // *Mol. Breeding*. 2001. V. 8. P. 177-185.

Mushegian A., Shepherd R. Genetic elements of plant viruses as tools for genetic engineering // *Microbiol. Rev*. 1995. V. 12. P. 548-578.

Neuhaus G., Spandenberg G., Mittelstein O. et al. Transgenic rapeseed plants obtained by the microinjection of DNA into microspore-derived embryoids // *Plant J*. 1987. V. 75. P. 30-36.

Ofoghi H. Cloning and expression of human calcitonin genes in transgenic potato plants // *Biotechnol. Lett*. 2000. V. 22. P. 611-615.

Park Y., Cheong H. Expression and production of recombinant human interleukin-2 in potato plants // *Protein Expression and Purification*. 2002. V. 25. P. 160-165.

Parmenter D., Boothe J.G., van Rooijen G. et al. Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning // *Plant Mol. Biol*. 1995. V. 29. P. 1167-1180.

Porta C., Spall V., Lin T. et al. The development of cowpea mosaic virus as a potential source of novel vaccines // *Intervirology*. 1996. V. 39. P. 79-84.

Richter L., Thanavala Y., Arntzen C. et al. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization // *Nature Biotechnol*. 2000. V. 18. P. 1167-1171.

Ruggiero F., Exposito J., Bournat P. et al. Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants // *FEBS Lett*. 1990. V. 469. P. 132-136.

Russel C., Clarke L. Recombinant proteins for genetic disease // *Clinical Genet*. 1999. V. 55. P. 389-394.

Sardana R., Alli Z., Dudani A. et al. Biological activity of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor is maintained in a fusion with seed glutelin peptide // *Transgenic Res*. 2002. V. 5. P. 521-531.

Sijmons P., Dekker B., Schrammeijer B. et al. Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants // *Bio/Technology*. 1990. V. 8. P. 217-221.

Staub J., Garcia B., Graves J. et al. High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts // *Nature Biotechnol*. 2000. V. 18. P. 333-338.

Stoger E., Vaquero C., Torres E. et al. Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies // *Plant Mol. Biol*. 2000. V. 42. P. 583-590.

- Streatfield S., Jilka J., Hood E. et al. Plant-based vaccines: unique advantages // *Vaccine*. 2000. V. 19. P. 2742-2748.
- Tackaberry E., Dudani A., Prior F. et al. Development of biopharmaceuticals in plant expression systems: cloning, ex-pression and immunological reactivity of human cytomegalovirus glycoprotein B (UL55) in seeds of transgenic to-bacco // *Vaccine*. 1999. V. 17. P. 3020-3029.
- Tacket C., Mason H., Losonsky G. et al. Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in trans-genic potatoes // *J. of Infectious Diseases*. 2000. V. 182. P. 302-305.
- Tacket C., Mason H. A review of oral vaccination with transgenic vegetables // *Microbes and Infection*. 1999. V. 1. P. 777-783.
- Thanavala Y., Yang Y., Lyons P. et al. Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1995. V. 92. P. 3358-3361.
- Torres E., Vaquero C., Nicholson L. et al. Rice cell culture as an alternative production system for functional diagnostic and therapeutic antibodies // *Transgenic Res*. 1999. V. 8. P. 441-449.
- Tuboly T., Yu W., Bailey A. et al. Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein ex-pressed in plants // *Vaccine*. 2000. V. 18. P. 2023-2028.
- Vandekerckhove J. Enkephalines produced in transgenic plants using modified 2S storage proteins // *Bio/Technology*. 1989. V. 7. P. 929-932.
- Vaucheret H., Beclin C., Fagard M. Post-transcrip-tional gene silencing in plants // *J. Cell Sci*. 2001. V. 114. P. 3083-3091.
- Walmsley A., Arntzen C. Plants for delivery of edible vaccines // *Current Opinion in Biotechnol*. 2000. V. 11. P. 126-129.
- Wigdorovitz A., Carrillo C., Dus Santos M. et al. Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1 // *Virology*. 1999. V. 255. P. 347-353.
- Zeitlin L., Olmsted S., Moench T. et al. A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotec-tion of the vagina against genital herpes // *Nature Biotechnol*. 1998. V. 16. P. 1361-1364.
- Zhong G., Peterson, D., Delaney D. et al. Commercial production of aprotinin in transgenic maize seeds // *Mol. Breeding*. 1999. V. 5. P. 345-356.

¹ А.А. Турчинович, аспирант

¹ Е.В. Дейнеко, к.б.н., зам. зав. лабораторией гетерозиса растений

² М.Л. Филипенко, к.б.н., зав. сектором фармакогеномики

² Е.А. Храпов, ст. инженер сектора фармакогеномики

¹ В.К. Шумный, академик

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск