

Construction of the IntF2A fusion domain-based bicistronic vector for simultaneous expression of the polypeptide chains of bevacizumab antibody and investigating its transient expression in tobacco plants

Pari Andaz 

Ph.D. Student. Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran. E-mail address: p.andaz@urmia.ac.ir

Morad Jafari 

*Corresponding author. Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran. E-mail address: m.jafari@urmia.ac.ir

Abstract

Objective

Bevacizumab (trade name Avastin®) is a humanized monoclonal antibody (mAb) that is widely used in the treatment of various cancers. It is one of the most expensive and best-selling cancer drugs in the world. Bevacizumab is produced by recombinant DNA technology in a mammalian expression system, the Chinese hamster ovary. In recent years, plant expression systems have attracted global attention due to their various benefits for producing recombinant pharmaceutical proteins. The successful expression of the mAbs is dependent on the proper folding and assembly of the light chains (LC) and heavy chains (HC). The efficient and controlled co-expression of the peptide chains is an essential consideration in designing antibody expression vectors. This study aimed to construct a plant expression vector for the simultaneous expression of HC and LC peptide chains of bevacizumab mAb using the IntF2A fusion domain.

Materials and methods

In order to construct the recombinant vector, the sequences of genes encoding bevacizumab and IntF2A were codon-optimized and artificially synthesized for expression in tobacco plants. The bicistronic recombinant vector was constructed by the routine restriction digestion-ligation method. Finally, the recombinant construct was used for the transient expression of bevacizumab in tobacco plants through agroinfiltration approach. RT PCR analysis was used to determine the

presence of transgene transcripts. The production and accumulation level of the recombinant antibody was evaluated through western blotting analysis.

Results

Recombinant plasmid construction is verified by colony PCR, restriction digestion, and sequencing analyses. Expression of the transgenes as a single-transcript unit was confirmed by RT-PCR analysis. Western blot analysis showed the production of the full-length heterotetrameric antibody in agroinfiltrated leaves. The level of antibody accumulation was estimated at an average of 67.20 mg of bevacizumab per kg of fresh weight (3.36% TSP).

Conclusions

The results showed that the IntF2A-based bicistronic vector provides an efficient simultaneous expression of genes encoding the polypeptide chains of antibody and high accumulation of the full-length mAb in plant cells. The constructed vector can be used for the possibility of development and manufacturing of bevacizumab antibody in plant expression system.

Keywords: Agroinfiltration, Bevacizumab, Bicistronic vector construction, IntF2A, Tobacco

Paper Type: Research Paper.

Citation: Andaz P, Jafari M (2024) Construction of the IntF2A fusion domain-based bicistronic vector for simultaneous expression of the polypeptide chains of Bevacizumab antibody and investigating its transient expression in tobacco plants. *Agricultural Biotechnology Journal* 16 (1), 45-68.

Agricultural Biotechnology Journal 16 (1), 45-68.

DOI: 10.22103/jab.2023.21398.1477

Received: October 22, 2023.

Received in revised form: December 08, 2023.

Accepted: December 09, 2023.

Published online: February 20, 2024.




Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

ساخت وکتور دوسیسترونی مبتنی بر دومین فیوژن IntF2A برای بیان همزمان زنجیره‌های پلی‌پپتیدی آنتی‌بادی بواسیزوماب و بررسی تظاهر موقت آن در گیاه توتون

پری انداز 

دانشجوی دکتری، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: p.andaz@urmia.ac.ir

مراد جعفری 

*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: m.jafari@urmia.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۳۰ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۰۹/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۱۸

چکیده

هدف: بواسیزوماب (با نام تجاری آوستین) یک آنتی‌بادی مونوکلونال (mAb) انسانی شده است که به‌طور گسترده‌ای در درمان سرطان‌های مختلفی کاربرد دارد. این دارو جزء گرانتیتم‌ترین و پر فروش‌ترین داروهای دنیا است. بواسیزوماب از طریق تکنولوژی DNA نو ترکیب در سیستم بیان پستانداری، تخمدان همستر چینی تولید می‌شود. در سال‌های اخیر، سیستم‌های بیان گیاهی به دلیل مزایای مختلف برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب دارویی، توجه جهانی را به خود جلب کرده‌اند. تولید موفقیت‌آمیز mAbها به تاخیر و گردایش مناسب زنجیره سبک (HC) و زنجیره سنگین (LC) بستگی دارد. بیان همزمان کارآمد و کنترل شده این زنجیره‌های پپتیدی یک ملاحظه مهم در طراحی وکتورهای بیان آنتی‌بادی است. هدف این تحقیق ساخت وکتور دوسیسترونی برای بیان همزمان زنجیره‌های پپتیدی HC و LC آنتی‌بادی بواسیزوماب با استفاده از دومین فیوژن IntF2A و ارزیابی آن از طریق بیان موقت در گیاه توتون است.

مواد و روش‌ها: به منظور ساخت وکتور نو ترکیب، توالی ژن‌های رمز کننده بواسیزوماب و IntF2A از نظر کدونی بهینه‌سازی شد و برای بیان در گیاه توتون به‌طور مصنوعی سنتز شدند. وکتور نو ترکیب دو سیسترونی بواسیزوماب IntF2A با روش معمول هضم آنزیمی-اتصال ساخته شد. در نهایت، سازه نو ترکیب برای بیان گذرا بواسیزوماب در گیاهان توتون از طریق روش آگروفلتراسیون

استفاده گردید. برای تعیین حضور رونوشت تراژن‌ها از آنالیز RT-PCR استفاده شد. تولید و میزان تجمع آنتی‌بادی نوترکیب از طریق آنالیز وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: ساختار مولکولی و کتور نوترکیب ساخته شده از طریق آنالیزهای PCR، هضم آنزیمی و توالی‌یابی تایید شد. آنالیز RT-PCR نشان داد تراژن‌ها به صورت یک رونوشت واحد بیان می‌شوند. آنالیز وسترن بلات تولید آنتی‌بادی هتروترامر کامل در برگ‌های آگرواینفیلتر شده را تأیید نمود. سطح تجمع آنتی‌بادی به طور متوسط ۶۷/۲۰ میلی‌گرم بوا سیزوماب به ازای هر کیلوگرم وزن تر (معادل ۳/۳۶ درصد پروتئین محلول کل) برآورد شد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد وکتور دو سیسترونی مبتنی بر IntF2A بیان همزمان کارآمد ژن‌های رمزکننده زنجیره‌های پپتیدی آنتی‌بادی و تجمع بالای mAb با فرم کامل را در سلول‌های گیاهی فراهم می‌کند. از وکتور ساخته شده می‌توان برای امکان توسعه و ساخت آنتی‌بادی بوا سیزوماب در سیستم بیان گیاهی استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: آگرواینفیلتراسیون، بوا سیزوماب، توتون، ساخت وکتور دو سیسترونی، IntF2A.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: انداز پری، جعفری مراد (۱۴۰۳) ساخت وکتور دو سیسترونی مبتنی بر دومین فیوژن IntF2A برای بیان همزمان زنجیره‌های

پلی‌پپتیدی آنتی‌بادی بوا سیزوماب و بررسی تظاهر موقت آن در گیاه توتون. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۶(۱)، ۴۵-۶۸.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

در دهه‌های اخیر، استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال^۱ برای درمان بسیاری از بیماری‌های انسانی به ویژه سرطان‌ها بسیار مورد توجه بوده است. بازار جهانی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال درمانی در سال ۲۰۱۸ تقریباً معادل ۱۱۵/۲ میلیارد دلار آمریکا تخمین زده شده است و پیش‌بینی می‌شود تا پایان سال ۲۰۲۵ این رقم به ۳۰۰ میلیارد دلار افزایش یابد (Lu et al. 2020). بوا سیزوماب^۲ با نام تجاری Avastin®، در میان ده آنتی‌بادی نوترکیب پرفروش جهان در سال ۲۰۱۸ در رتبه پنجم قرار داشت (Lu et al. 2020) و جزء دهمین داروی ضد سرطان پرفروش دنیا در سال ۲۰۲۲ بود (Taylor 2022). این آنتی‌بادی، آنتی‌ژن فاکتور رشد

¹ Monoclonal antibodies

² Bevacizumab

اندوتلیال عروقی (VEGF)^۱ را که نقش کلیدی در رگ‌زایی^۲ تومورها بازی می‌کند (Lugano et al. 2020) مورد هدف قرار می‌دهد و از رگ‌زایی تومورها جلوگیری می‌کند (Chellappan et al. 2018). این داروی زیستی به‌طور گسترده‌ای در درمان سرطان‌های کولورکتال متاستاتیک (Bang et al. 2021)، گلیوبلاستوما (نوعی تومور بدخیم سیستم عصبی) (Brenner et al. 2021)، سرطان ریه سلول غیرکوچک (Tsai et al. 2021)، کارسینومای پیشرفته کلیه (Dudek et al. 2020; Feldman et al. 2020)، سرطان دهانه رحم پیشرفته (Chu et al. 2021) و سرطان تخمدان (Liu et al. 2021) کاربرد دارد. بوا سیزوماب یک آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی شده (شامل ۹۳ در صد توالی انسانی و ۷ در صد توالی موشی) است که از طریق تکنولوژی DNA نوترکیب و مهندسی ژنتیک در کشت سو سپانسیون تخمدان همستر چینی (CHO)^۳ توسط شرکت Roche تولید می‌شود.

در حال حاضر تقاضا برای داروهای نوترکیب بسیار بیش‌تر از ظرفیت تولید صنعتی آنها است و این نیازمند یک سیستم تولیدی با ظرفیت بالا و هزینه‌ی تولید پایین می‌باشد. طی دهه‌های گذشته استفاده از گیاهان به‌عنوان یک روش کم‌هزینه برای تولید آنتی‌بادی و پروتئین‌های نوترکیب بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Kolotilin et al. 2015). سیستم‌های تولیدی مبتنی بر گیاه در مقایسه با باکتری‌ها و سیستم پستانداری دارای مزایای زیادی است. سیستم‌های گیاهی بسیار انعطاف‌پذیر هستند و مدیریت تولید و مقیاس‌پذیری راحت‌تری دارند. از طرفی گیاهان همانند سلول‌های پستانداری قابلیت تغییرات پس از ترجمه (PTMs)^۴ بر روی پروتئین‌های نوترکیب را دارند (Kolotilin et al. 2015; Sil & Jha 2014; Frenzel et al. 2013). همچنین تولید پروتئین نوترکیب به‌صورت مداوم در درازمدت می‌تواند در بستر گیاهی تحقق یابد، چرا که با تلفیق پایدار تراژن‌ها در ژنوم گیاه، می‌توانند به‌طور پایدار طی نسل‌های متعدد بیان شوند. علاوه بر این پروتئین‌های تولید شده در سیستم‌های گیاهی خطر آلودگی به پاتوژن‌های انسانی، که معمولاً در سیستم‌های تولید پستانداری مورد توجه است، را ندارند (Merlin et al. 2014). به‌دلیل این ویژگی‌ها، هزینه‌ی تولید پروتئین نوترکیب در گیاه به‌شدت کاهش می‌یابد. از طرفی ویژگی منحصر به فرد سیستم‌های تولیدی مبتنی بر گیاه، تنوع گونه‌های گیاهی و سیستم‌های مورد استفاده برای تولید پروتئین است. گونه‌های گیاهی فراوانی از جمله توتون، سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، یونجه، آفتابگردان، هویج، کاهو، توت‌فرنگی، ذرت، گندم، برنج و خزه به‌عنوان سامانه تولید پروتئین نوترکیب^۵ استفاده می‌شود. به‌علاوه می‌توان از کل گیاه و یا کشت اندام‌های گیاهی مانند ریشه موین و کشت سو سپانسیون سلولی استفاده کرد. استراتژی‌های سیستم بیانی نیز می‌تواند بصورت سیستم بیان موقت یا بیان پایدار باشد (Schillberg & Finnern 2021). با توجه به این‌که در سیستم بیان موقت تولید پروتئین‌های نوترکیب به سرعت و در کوتاهترین زمان صورت

¹ Vascular endothelial growth factor

² Angiogenesis

³ Chinese hamster ovary

⁴ Post-translational modifications

⁵ Recombinant protein production platform

می‌گیرد این سیستم بسیار مورد توجه قرار گرفته است، چرا که این امر امکان تولید پروتئین‌های نوترکیب دارویی در مواقع اضطراری را فراهم می‌کند (Jugler et al., 2022). بیان موقت بر اساس آگرواینفیلتراسیون یک تکنیک ساده، سریع و مقیاس پذیر است که با تزریق سو سپان سیون آگروباکتری حاوی سازه بیانی نوترکیب به بافت برگ و انتقال T-DNA به در صد بسیار بالایی از سلول‌ها، منجر به بیان سطح بالایی از پروتئین نوترکیب در یک سامانه گیاهی می‌شود. (Ma et al., 2012). از این رو توسعه این فناوری تحقق سیستم‌های بیان گذرا گیاهی را به عنوان یک سامانه برتر برای تولید تجاری پروتئین‌های نوترکیب دارویی و صنعتی تسهیل می‌کند.

استفاده از گیاهان به‌عنوان بیوراکتورهای زیستی و تولید پروتئین‌های نوترکیب با استفاده از گیاهان تراریخته از دهه ۱۹۸۰ آغاز شده است. در طول چهار دهه اخیر آنتی‌بادی‌های فراوانی با استفاده از سیستم گیاهی تولید شده است که می‌توانند در پیشگیری و درمان بیماری‌های انسانی مورد استفاده قرار گیرند. از آنتی‌بادی‌های مهم درمانی که با استفاده از سیستم گیاهی تولید شده‌اند می‌توان به آنتی‌بادی گلیکوزیله $^1\text{pp-mAb}^{\text{PA}}$ و غیرگلیکوزیله $^2\text{pp-mAb}^{\text{PANG}}$ تولید شده در توتون *Nicotiana benthamiana* برای علیه آنتی‌ژن حفاظتی باکتری عامل بیماری سیاه زخم (Mett et al. 2011) و آنتی‌بادی MB-003 (Petitt et al. 2013) و آنتی‌بادی ZMapp تولید شده در *N. benthamiana* (Qiu et al. 2014) برای مقابله با بیماری ابولا اشاره نمود. تعدادی از پروتئین‌های نوترکیب تولید شده در سیستم گیاهی به بازار فروش راه یافته‌اند که اولین آن، فرم نوترکیب glucocerebrosidase انسانی با نام ژنریک taliglucerase alfa است که با نام تجاری Elelyso، پس از طی آزمایشات بالینی سه‌گانه، در سال ۲۰۱۲ توانست مجوز ورود به بازار را برای درمان بیماری گوشه^۳ از سازمان FDA آمریکا کسب کند (Zimran et al. 2018). برخی محصولات دیگر نیز از جمله pegunigalsidase alfa، فرم نوترکیب globotriaosylceramide (Gb3) انسانی تولید شده در گیاه توتون برای درمان بیماری فابری (van der Veen et al. 2020)، واکسن شبه ویروسی تولید شده در *N. benthamiana* برای آنفلوآنزای فصلی (Ward et al. 2020) و آنتی‌بادی p2G12 برای درمان بیماری ایدز (Ma et al. 2015) و برخی آنتی‌بادی دیگر در حال سپری نمودن مراحل مختلف مطالعات بالینی هستند. در مواجهه با پاندمی‌هایی همچون پاندمی کووید ۱۹ نیز استفاده از سیستم‌های بیانی گیاهی به عنوان یک استراتژی سریع پیشنهاد شد (Schillberg & Finnern 2021). سامانه‌های گیاهی برای تولید واکسن‌های حیوانی نیز مناسب می‌باشند، چراکه حیوانات می‌توانند گیاه را بصورت خام یا تزریق عصاره گیاهی بدون نیاز به خالص‌سازی پروتئین تغذیه کنند و بنابراین هزینه‌ها کاهش می‌یابد (Topp et al. 2016). به عنوان مثال تزریق عصاره خام برگ *N. benthamiana* که تیمر H5 ویروس آنفلوآنزا در آن بیان می‌شد مانع از گسترش ویروس آنفلوآنزای پرندگان (H5N1) در جوجه‌ها گردید (Phan et al.

¹. Plant-produced glycosylated anti-PA (protective antigen) mAb

² Plant-produced non-glycosylated anti-PA (protective antigen) mAb

³. Gaucher disease

(2020). هتروداایمر E1E2^۱ ویروس هپاتیت C تولید شده در کاهو باعث بروز پاسخ ایمنی در موش شد (Clarke et al. 2017). همچنین پروتئین پوششی ویروس Zika تولید شده در گیاهان تراریخته منجر به بروز پاسخ ایمنی در موش شد (Yang et al. 2018).

یکی از اقدامات اساسی در به‌نژادی ملکولی، مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با آن‌ها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Mohammadinejad et al. 2022; Shahsavari et al. 2022). ماده ژنتیکی^۲ یک سلول از تعداد زیادی ژن تشکیل شده است که هیچ‌گاه همه به طور همزمان بیان نمی‌شوند و در هر لحظه فقط تعداد کمی از آن‌ها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Barazandeh et al. 2016). ژن‌های یوکاریوتی بیان شان تحت کنترل موقت و چندبعدی است و در هر یک از انواع بافت‌ها تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم بیان می‌شود (Masoudzadeh et al. 2020). آنتی‌بادی‌های مونوکلونال از دو زنجیره سبک (LC^۳) و دو زنجیره سنگین (HC^۴) تشکیل یافته‌اند. بیان زنجیره‌های LC و HC آنتی‌بادی به صورت هماهنگ در سطوح یکسان برای تشکیل فرم تترامر (H2L2) و اندازه‌ی کامل آنتی‌بادی^۵ یکی از چالش‌های تولید آنتی‌بادی‌ها است (Lin et al. 2018). در مهندسی ژنتیک برای بیان مولتی‌ژن به‌طور هم‌زمان، استراتژی‌های بیانی پلی‌سیسترونی و پلی‌پروتئینی مطرح است (Zhang et al. 2017). توالی‌های جایگاه میانی ورود ریبوزومی (IRES^۶) برای بیان پلی‌سیسترونی استفاده می‌شوند که بیان ناهمگن تراژن‌ها از معایب این سیستم می‌باشد (François et al. 2002). در بیان پلی‌پروتئینی می‌توان از توالی لینکر حاوی جایگاه آنزیم‌های پروتئازی استفاده نمود که این نوع توالی‌های لینکر نیز دارای معایبی مانند بیان پایین پروتئین‌های هم‌جوار لینکر، نیازمندی به آنزیم پروتئازی دورن‌زاد یا برون‌زاد برای برش و جدا شدن پروتئین‌ها از هم و تاشدگی نادرست^۷ بعضی از پروتئین‌های هدف هستند (Marcos and Beachy, 1994). در حال حاضر پرکاربردترین نوع لینکر، پپتید 2A است. توالی رمزکننده‌ی پپتید 2A از ویروس عامل بیماری تب برفکی (FMDV^۸) برای اتصال چند تراژن جهت تولید به صورت پلی‌پروتئین در یوکاریوت‌های مختلف از جمله گیاهان استفاده شده است که با استفاده از مکانیسم خودبرشی پپتید 2A، پروتئین‌های عملکردی به طور جداگانه ساخته می‌شوند (Halpin et al. 1999; Ralley et al. 2004; Luke et al. 2015). با این‌حال از معایب این لینکر نیازمندی به سیستم آنزیم پروتئازی برای برش و حذف 2A از پروتئین‌های هم‌جوار خود و احتمال باقی ماندن بخشی از این توالی بر روی توالی یکی از پروتئین‌های هدف است (François et al. 2002). اخیراً یک دومین پروتئین فیوژن بنام IntF2A از طریق اتصال مینی‌پروتئین اینتین^۹ با پپتید 2A ساخته شده است که قابلیت خودبرشی پس

¹ The hepatitis C virus envelope proteins E1 and E2

² DNA

³ Light chain

⁴ Heavy chain

⁵ Full size antibody

⁶ Internal ribosomal entry site

⁷ Misfolding

⁸ Foot-and-mouth disease virus

⁹ Intein

از ترجمه‌ای 2A را افزایش می‌دهد، بدون اینکه نیازی به حضور جایگاه عمل پروتازها در انتهای N پروتئین‌ها برای برداشتن توالی 2A وجود داشته باشد (Zhang et al., 2017). با استفاده از دومین IntF2A، قابلیت بیان هم‌زمان و هماهنگ چندین پروتئین از جمله آنتی‌بادی‌ها، هدف‌گذاری این پروتئین‌ها و تولید فراورده‌های پیچیده‌ی پروتئینی امکان‌پذیر خواهد بود. برای تولید بهینه آنتی‌بادی‌های نوترکیب در سیستم گیاهی طراحی سازه بیانی کارآمد برای تولید فرم کامل آنتی‌بادی از اهمیت بالایی برخوردار است. لذا در تحقیق حاضر برای اولین بار طراحی و ساخت وکتور بیانی مبتنی بر دومین پروتئین فیوژن IntF2A برای امکان تولید سطح مناسب آنتی‌بادی بوا سیزوماب در سیستم گیاهی گزارش می‌شود. کارایی و عملکرد سازه نوترکیب ساخته شده در گیاه توتون (*Nicotiana tabacum*) با استفاده از روش آگرواینفیلتراسیون^۱ مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

باکتری‌ها و پلاسمیدهای مورد استفاده: باکتری *Escherichia coli* سویه‌ی DH5 α به عنوان میزبان در مراحل هم‌سازگی استفاده گردید. پلاسمیدهای مورد استفاده شامل pGH-HC حاوی ژن رمزکننده زنجیره سنگین بوا سیزوماب (*BHC*)، pGH-LC حاوی ژن رمزکننده زنجیره سبک بوا سیزوماب (*BLC*)، pUC57-IntF2A حاوی ژن رمزکننده پروتئین فیوژن IntF2A بود. پلاسمید باینری pSAR-Ext به عنوان وکتور بیانی مقصد استفاده گردید. پلاسمیدهای pBI121-CYS8 و pBI121-CDI حاوی ژن‌های رمزکننده بازدارنده‌های پروتازهای^۲ *SICYS8* و^۳ *SICDI* به منظور جلوگیری از تخریب احتمالی پروتئین نوترکیب توسط پروتازهای میزبان، همراه با وکتور نوترکیب ساخته شده در ترانسفورماسیون گیاه استفاده شدند. از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه EHA105 برای آگرواینفیلتراسیون گیاهان توتون استفاده شد.

مواد گیاهی: جهت ارزیابی کارایی سازه نوترکیب ساخته شده برای امکان تولید بوا سیزوماب در سیستم گیاهی، از لاین تراریخته NT- Δ FXFT (جعفری و همکاران، ۱۴۰۱) در فرآیند ترانسفورماسیون استفاده شد. در لاین NT- Δ FXFT ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های α -1,2-xylosyltransferase (*XylT*) و β -1,3-fucosyltransferase (*FucT*) از طریق فن‌آوری RNAi جهت حذف باقیمانده‌های گلیکان‌های گیاهی از بدنه گلیکوپروتئین‌های نوترکیب تولید شده در میزبان گیاهی، خاموش شده‌اند. لازم به ذکر است گیاه مادری لاین NT- Δ FXFT توتون رقم Gewone groene حاوی کمترین مقدار نیکوتین است (مرکز تحقیقات توتون تبرناش، مازندران). بذور NT- Δ FXFT ابتدا در سینی نشاء کشت گردید و پس از ۲-۳ هفته، گیاهچه‌ها به گلدان انتقال یافتند. گیاهان ۵-۶ هفته‌ای در ترانسفورماسیون به روش آگرواینفیلتراسیون مورد استفاده قرار گرفتند.

1. Agroinfiltration
2. Tomato cystatin protease inhibitor
3. Tomato cathepsin D inhibitor

ساخت سازه نو ترکیب دوسیسترونی بواسطه دومین IntF2A: برای ساخت سازه نو ترکیب حاوی ژن های *BHC* و *BLC*، توالی اولیه این ژن ها (پایگاه DrugBank با شماره دسترسی DB00112) و توالی دومین پروتئین فیوژن *IntF2A* (Zhang et al. 2017) بر اساس کدون های ترجیحی توتون با استفاده از نرم افزار Entelechon (<http://www.entelechon.com>) بهینه سازی شد. در ابتدا و انتهای توالی ژن *BHC* به ترتیب جایگاه آنزیم های *NheI* و *SalI* و در ابتدا و انتهای ژن *BLC* جایگاه آنزیم های *SalI* و *SacI* قرار گرفت. همچنین در دو طرف ژن *IntF2A* جایگاه آنزیم *SalI* تعبیه شد. توالی های بهینه سازی شده جهت سنتز به شرکت Gen Script (آمریکا) ارسال شد و توالی های سنتتیک همسانه سازی شده در وکتورهای *pGH-LC*، *pGH-HC* و *pUC57-IntF2A* در ساخت سازه ژنی نو ترکیب استفاده گردید. برای ساخت سازه نو ترکیب دوسیسترونی، در مرحله اول ژن *BHC* با استفاده از آنزیم های *NheI* و *SalI* در وکتور *pSAR-Ext* همسانه سازی گردید. بدین منظور پس از هضم آنزیمی هر دو وکتور *pGH-HC* (حاوی اینزرت *BHC*) و *pSAR-Ext* (وکتور بیانی مقصد)، محصول واکنش های هضم روی ژل آگارز ۰/۸ در صد برر سی شد. پس از تأیید نتیجه برش های آنزیمی، قطعات مربوط به ژن *BHC* از وکتور *pGH-HC* و باقیمانده وکتور *pSAR-Ext* از روی ژل برداشته و سپس خالص سازی شدند. واکنش اتصال قطعات مذکور طی واکنش اتصال^۱ با استفاده از آنزیم *T4 DNA Ligase* انجام شد و پس از تراریختی باکتری های مستعد *E. coli*، گزینش کلونی های نو ترکیب در محیط انتخابی حاوی ۱۰۰ میلی گرم در لیتر آمپی سیلین صورت گرفت. سازه ساخته شده، پس از تأیید ساختار مولکولی با هضم آنزیمی، به صورت *pSAR-HC-Ext* نامگذاری شد. در مرحله دوم، ژن *BLC* از وکتور *pGH-LC* با استفاده از آنزیم های *SalI* و *SacI* برداشته شد و در سازه ساخته شده *pSAR-HC-Ext* همسانه سازی گردید و سازه ساخته شده، پس از تأیید ساختار مولکولی آن با هضم آنزیمی، به صورت *pSAR-HC-LC-Ext* نامگذاری شد. در مرحله سوم توالی رمزکننده دومین *IntF2A* با استفاده از آنزیم *SalI*، بین دو ژن *BHC* و *BLC* در سازه *pSAR-HC-LC-Ext* همسانه سازی شد. پلاسمید نو ترکیب حاصل (سازه نهایی) با استفاده از هضم آنزیمی و آنالیز PCR صورت گرفت. واکنش پی سی آر تحت برنامه دمایی یک چرخه ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه جهت واسرشته سازی اولیه، ۴۰ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه جهت اتصال پرایمر، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه و یک چرخه ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه جهت بسط نهایی انجام شد. به این منظور از آغازگرهای اختصاصی *HCInF-F* (5'-GGATGAGCATCAAACCTTGC-3') و *HCInF-R* (5'-TGATGTTTGGGTTACCGGC-3') برای تکثیر قطعه *BHC+IntF2A* و آغازگرهای *InFLC-F* (5'-TCCTACAGAAGCTAATCCAG-3') و *InFLC-R* (5'-GCTTTTCGTAGAGTTAACCG-3') برای تکثیر بخشی از *IntF2A+BLC* استفاده گردید. برای تأیید نهایی ساختار مولکولی سازه ساخته شده، پلاسمید نو ترکیب توسط کیت *GeneJET plasmid miniprep* (Thermofisher، آمریکا)

¹. Ligation

استخراج گردید و جهت توالی‌یابی به صورت دو بار خوانش به شرکت GenScript (آمریکا) از طریق شرکت فزایژوه (تهران) ارسال شد. انطباق و تعیین مشابهت توالی‌های بدست آمده با توالی‌های اولیه مورد استفاده در همسانه‌سازی از طریق پایگاه اطلاعاتی EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa>) انجام گرفت. در نهایت وکتور دوسیسترونی ساخته شده به صورت pSAR-HCIntF2ALC-Ext نامگذاری شد و به روش ذوب-انجماد^۱ (Holsters et al. 1978) به آگروباکتری سویه EHA105 ترانسفورم گردید.

آگرواینفیلتراسیون توتون با سازه نو ترکیب: به منظور ارزیابی کارایی وکتور نو ترکیب ساخته شده، آگرواینفیلتراسیون گیاهان توتون (۶-۵ هفته‌ای) با استفاده از سازه نو ترکیب به شرح زیر انجام گرفت (Sainsbury and Lomonosoff 2008). آگروباکتری سویه EHA105 حاوی سازه نو ترکیب pSAR-HCIntF2ALC-Ext به همراه آگروباکتری‌های حاوی پلاسمیدهای pBI121-CDI و pBI121-CYS8 (دارای ژن‌های رمزکننده بازدارنده‌های پروتئازی *S/CYS8* و *S/CDI*) بطور جداگانه کشت شدند. دو میلی‌لیتر از کشت شبانه باکتری‌ها به مدت ۵ دقیقه و با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل در ۵ میلی‌لیتر بافر القا (۱۰/۵ گرم بر لیتر K_2HPO_4 ، ۴/۵ گرم بر لیتر KH_2PO_4 ، ۱ گرم بر لیتر $(NH_4)_2SO_4$)، ۰/۵ گرم بر لیتر NaCitrate، ۱ گرم بر لیتر گلوکز، ۱ گرم بر لیتر فروکتوز، ۴ گرم بر لیتر گلیسرول، ۱ میلی‌مولار، MES، ۱۰ میلی‌مولار، (pH=۵/۶) همراه با استوسیرینگون ۱۰۰ میکرو مولار، ریفامپیسین ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، آمپی‌سیلین ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر برای آگروباکتری‌های حاوی سازه pSAR-HCIntF2ALC-Ext (و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین برای آگروباکتری‌های حاوی پلاسمیدهای دیگر) حل گردید. محلول باکتری به مدت ۶-۵ ساعت در شیکرانکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۸۰ دور در دقیقه قرار گرفت و سپس سوسپانسیون باکتری‌ها به مدت ۵ دقیقه و با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل در بافر اینفیلتراسیون (۱۰ میلی‌مولار، $MgCl_2$ ، ۱۰ میلی‌مولار، MES، ۱۰ میلی‌مولار، Tween20 ۰/۰۳ در صد حجمی، آسکوربیک اسید ۰/۵ میلی‌مولار) حاوی استوسیرینگون ۲۰۰ میکرو مولار حل گردید. جهت تراریختی گیاهان، سوسپانسیون آگروباکتری‌های فوق با نسبت برابر مخلوط شده و با استفاده از سرنگ بدون سوزن به پشت برگ‌ها تزریق شد. آگروباکتری حاوی سازه غیرنو ترکیب به عنوان شاهد استفاده گردید. با توجه به اینکه تا روز هفتم پس از اینفیلتراسیون، پژمردگی محسوس و علایم زرد شدگی یا نکروتیک ناشی از پاسخ فوق حساسیت^۲ سلولی در برگ‌ها مشاهده نگردید (داده‌ها نشان داده نشدند)، لذا هفت روز پس از اینفیلتراسیون از برگ‌ها برای آنالیزهای بعدی نمونه‌برداری شدند.

آنالیز RT-PCR: برای بررسی بیان ژن‌های رمزکننده آنتی‌بادی تراستوزوماب، RNA کل برگ‌های آگرواینفیلتر شده با پلاسمید نو ترکیب pSAR-HCIntF2ALC-Ext با استفاده از محلول استخراج RNX Plus (سیناکلون، ایران) استخراج شد.

1. Freeze-thaw method
2. Hypersensitive response

حضور رونوشت ژن‌ها به وسیله آنالیز RT-PCR براساس دستورالعمل کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermofisher، آمریکا) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی HCInF-F و InFLC-R (مورد استفاده در آنالیز PCR) انجام شد.

آنالیز وسترن بلات: برای ارزیابی تولید آنتی‌بادی بواسیزوماب در گیاهان ترانسفورم شده از آنالیز وسترن بلات استفاده شد. برگ‌های ترانسفورم شده هفت پس از آگرواینفیلتراسیون جهت استخراج پروتئین کل نمونه‌برداری شدند. برای استخراج پروتئین کل، بر روی ۲۰۰ میلی‌گرم پودر برگ، ۳۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (۲۰ میلی‌مولار، EDTA ۱۰ میلی‌مولار، 2-mercapthoethanol ۵ میلی‌مولار، Protease inhibitor cocktail ۱۰ میلی‌مولار) افزوده شد و پس از مخلوط نمودن کامل، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار گرفتند. سپس عصاره خام سلولی حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و در نهایت رسوب پروتئینی حاصل در همان محلول استخراج حل گردید و غلظت نمونه‌های پروتئینی به روش Bradford (1976) تعیین شد. حدود ۵۰ میکروگرم از محلول پروتئینی هر نمونه برگ همراه با ۵۰ نانوگرم IgG1 انسانی به عنوان استاندارد در ژل SDS-PAGE ۱۰٪ بارگذاری شد و سپس پروتئین‌ها از روی ژل به غشای نیتروسولوزی انتقال یافتند. به منظور تشخیص آنتی‌بادی بواسیزوماب، از مخلوطی از آنتی‌بادی‌های اختصاصی goat Anti-goat Anti-human IgG-Kappa (κ)- و human IgG-Gamma (γ)-specific AP-conjugated antibody chain specific AP-conjugated antibody تحت شرایط SDS-PAGE غیراحیا استفاده گردید. برای سنجش نیمه کمی میزان تولید آنتی‌بادی، شدت باندها روی غشاء حاصل از آنالیز وسترن بوسیله نرم افزار ImageJ 1.53 (Rasband, 2020) پس از نرمال سازی نسبت به نمونه استاندارد به داده‌های کمی چگالی تصحیح شده تبدیل شدند و تجمع آنتی‌بادی به صورت میزان چند برابری^۲ بیان شد. با توجه به اینکه محتوای پروتئین برگ‌های توتون تقریباً دو درصد وزن تر می‌باشد (Stevens *et al.*, 2000)، با در نظر گرفتن غلظت نمونه استاندارد و میزان پروتئین بارگذاری شده در آنالیز وسترن، تجمع آنتی‌بادی به صورت میلی‌گرم در کیلوگرم زیست توده تر و همچنین به صورت درصدی از پروتئین محلول کل (%TSP) محاسبه شد.

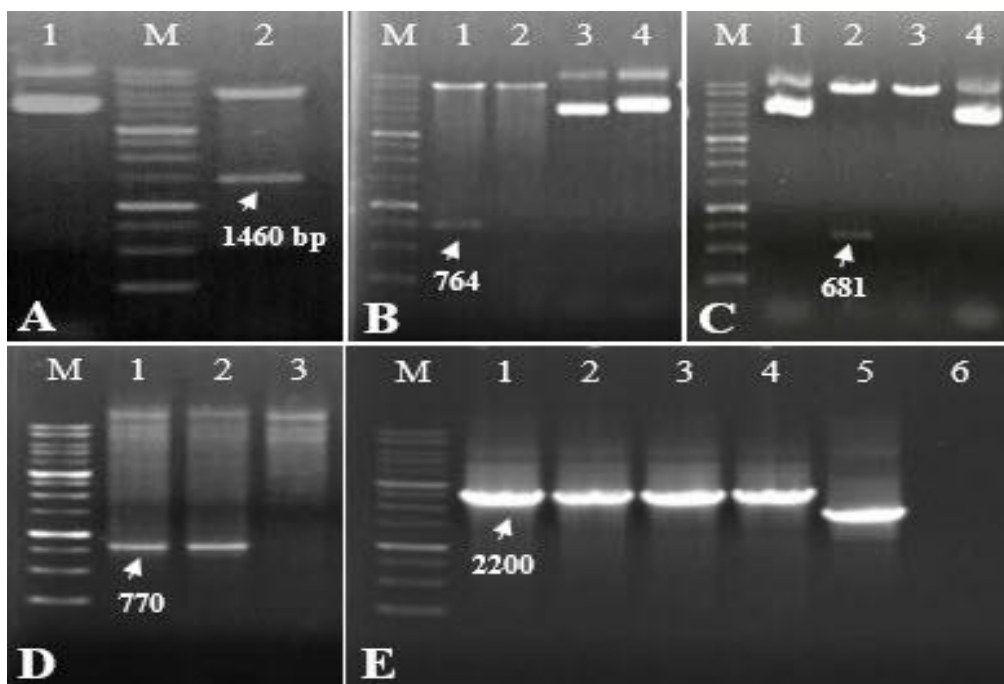
آنالیز آماری: برای سنجش نیمه کمی بیان ژن‌ها و میزان تجمع آنتی‌بادی نوترکیب، آنالیزهای RT-PCR و وسترن بلات در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی (CRD) در سه تکرار انجام گردید و هر آزمایش سه بار تکرار شد. آنالیز آماری داده‌ها و مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) توسط نرم افزار SAS 9.4 و رسم نمودارها توسط نرم افزار 2021 Excel انجام شد.

1. Non-reducing
2. Fold change
3. Total soluble protein

نتایج و بحث

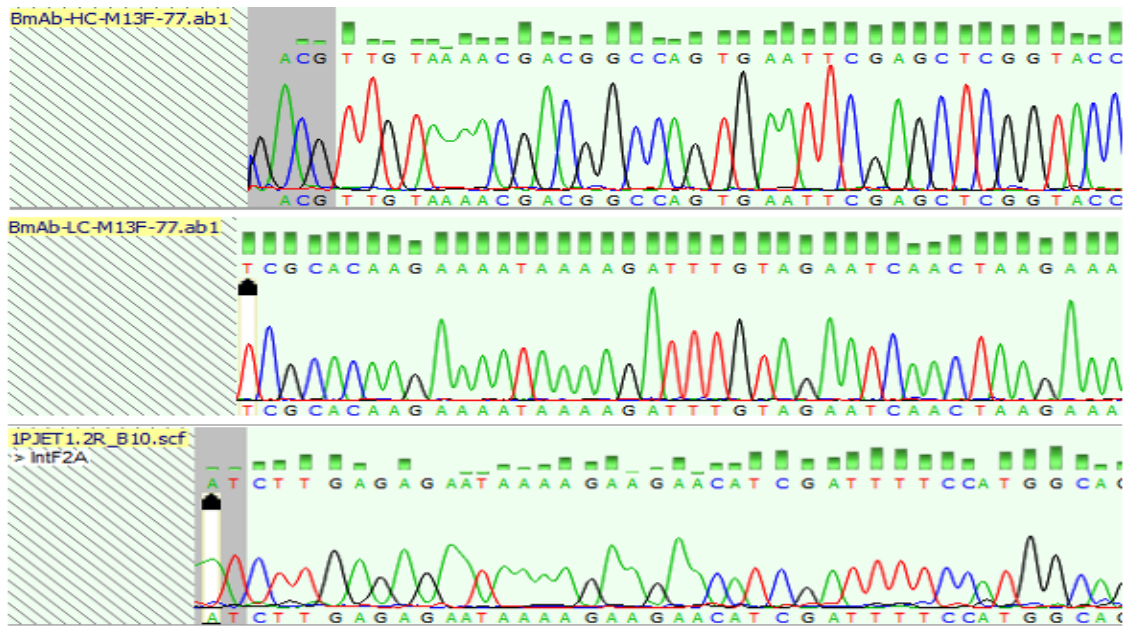
ساخت سازه دو سیسترونی pSAR-HCIntF2ALC-Ext: برای تأیید ساختار مولکولی سازه نو ترکیب ساخته شده pSAR-HCIntF2ALC-Ext آنالیزهای هضم آنزیمی، انجام PCR و همچنین توالی‌یابی قطعات درج شده در سازه نو ترکیب صورت گرفت. با توجه به اینکه در مرحله‌ی اول ساخت سازه، ژن *BHC* (۱۴۶۰ جفت باز) با استفاده از آنزیم‌های *NheI* و *SalI* در وکتور pSAR-Ext درج گردید. با برش پلاسمید نو ترکیب pSAR-HC-Ext با استفاده از آنزیم‌های *NheI* و *SalI*، قطعه‌ای به اندازه ۱۴۶۰ جفت باز برابر با اندازه‌ی مورد انتظار *BHC* حاصل شد که نشان دهنده الحاق ژن رمزکننده زنجیره HC بواسی‌زوماب در وکتور pSAR-HC-Ext بود (شکل A۱). در ساخت سازه مرحله دوم (pSAR-HC-LC-Ext)، ژن *BLC* (۷۶۴ جفت باز) با استفاده از آنزیم‌های *SalI* و *SacI* در سازه نو ترکیب همسانه‌سازی گردید، که صحت ساخت این سازه با استفاده از هضم آنزیمی مربوطه بررسی شد. برش سازه نو ترکیب pSAR-HC-LC-Ext با آنزیم‌های *SalI* و *SacI* منجر به جدا شدن باندی به اندازه ۷۶۴ جفت باز برابر با ژن رمزکننده زنجیره LC بواسی‌زوماب گردید (شکل B۱). باقی‌مانده pSAR-HC-LC-Ext برش یافته نیز برابر با pSAR-HC-Ext خطی شده با آنزیم *SalI* بود که نشان دهنده درج قطعه الحاقی در pSAR-HC-Ext بود. در تأیید ساخت سازه نو ترکیب در مرحله سوم یعنی سازه نهایی pSAR-HC-IntF2A-LC-Ext، توالی رمزکننده دومین *IntF2A* با استفاده از آنزیم *SalI* در سازه pSAR-HC-LC-Ext بین ژن‌های رمزکننده HC و LC الحاق گردید که جهت تأیید حضور این قطعه در سازه نهایی، پلاسمید استخراج شده از کلونی‌های نو ترکیب با استفاده از آنزیم *SalI* هضم شد که در نتیجه قطعه‌ای به اندازه ۶۸۱ جفت باز خارج شد که نشان دهنده درج *IntF2A* در این سازه بود (شکل C۱). باقیمانده پلاسمید نیز برابر با سازه مرحله دوم (pSAR-HC-LC-Ext) خطی شده با آنزیم *SalI* بود.

برای اطمینان بیشتر از صحت سازه نو ترکیب ساخته شده نهایی، آنالیز PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام شد. تکثیر باندی با اندازه تقریبی ۷۷۰ جفت باز برابر با اندازه بخش انتهایی *IntF2A* و طول تمام زنجیره LC بواسی‌زوماب (شکل D۱) و باندی با اندازه تقریبی ۲۲۰۰ جفت باز برابر با مجموع اندازه زنجیره HC بواسی‌زوماب و *IntF2A* است (شکل E۱)، که نشان دهنده حضور قطعات همسانه‌سازی شده در پلاسمید اولیه pSAR-Ext بود. نتایج توالی‌یابی قطعات الحاقی و آنالیز هم‌ردیفی آنها با توالی‌های اولیه مورد استفاده در همسانه‌سازی نشان داد توالی قطعات همسانه‌سازی شده انطباق ۱۰۰ درصد با توالی‌های اولیه دارند و هیچ گونه تفاوت نوکلئوتیدی ندارد (شکل ۲). بدین ترتیب وکتور بیانی pSAR-HCIntF2ALC-Ext حاوی ژن‌های زنجیره سبک و سنگین آنتی‌بادی بواسی‌زوماب و دومین فیوژن *IntF2A* جهت تولید این آنتی‌بادی در گیاه توتون طراحی و ساخته شد. در شکل ۳ شماتیک بخش T-DNA پلاسمید نو ترکیب pSAR-HCIntF2ALC-Ext آورده شده است.



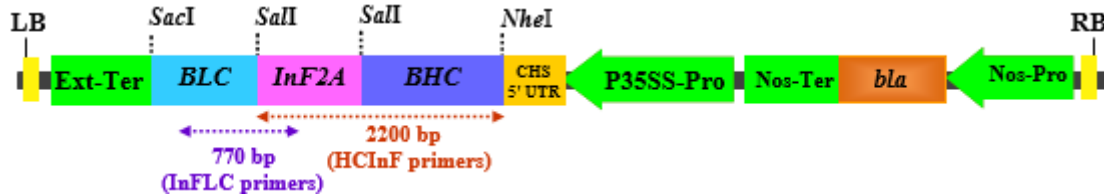
شکل ۱. آنالیز مولکولی سازه‌های نو ترکیب حاوی ژن‌های رمز کننده آنتی‌بادی بواسیزوماب و دومین فیوژن *IntF2A*.
 A) آنالیز هضم *pSAR-HC-Ext* (۱) برش نیافته *M*- نشانگر وزن مولکولی 1kb DNA ladder، ۲- *pSAR-HC-Ext* هضم
 با *NheI* + *SalI* برش یافته و خروج قطعه الحاقی *BHC* (۱۴۶۰ جفت باز). B) آنالیز هضم *pSAR-HC-LC-Ext*
 (۱) برش یافته با *SacI* + *SalI* و خروج قطعه درج الحاقی *BLC* (۷۶۴ جفت باز)، ۲- برش *pSAR-HC-Ext* با *SalI* و خطی شدن آن با اندازه مورد انتظار، ۳) *pSAR-HC-Ext* برش نیافته، ۴) *pSAR-HC-IntF2A-LC-Ext* (۱) آنالیز هضم *pSAR-HC-IntF2A-LC-Ext* (۲) برش یافته، ۳) *pSAR-HC-IntF2A-LC-Ext* با *SalI* و خطی شدن آن با اندازه بزرگ مورد انتظار (حاوی
 قطعات کلون شده) در مقایسه با *pSAR-HC-LC-Ext* خطی شده با *SalI* (۳)، ۴- *pSAR-HC-LC-Ext* برش نیافته.
 D) آنالیز PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر بخشی از *IntF2A* و *BLC* با اندازه مورد انتظار ۷۷۰
 جفت باز، ۱ و ۲- کلونی‌های نو ترکیب حاوی *pSAR-HC-IntF2A-LC-Ext*، ۳- *pSAR-HC-LC-Ext* به عنوان کنترل
 منفی. E) آنالیز PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر طول کامل *BHC+IntF2A* با اندازه مورد انتظار
 ۲۲۰۰ جفت باز، ۱ تا ۴- کلونی‌های نو ترکیب حاوی *pSAR-HC-IntF2A-LC-Ext*، ۵- *pSAR-HC-LC-Ext* (بدون
 قطعه *IntF2A*)، ۶- واکنش PCR بدون DNA الگو به عنوان کنترل منفی

Figure 1. Molecular analysis of recombinant constructs containing the genes encoding the bevacizumab antibody and *IntF2A* peptide domain. A) Digestion analysis of *pSAR-HC-Ext*; 1: Uncut *pSAR-HC-Ext*, M- 1 Kb DNA ladder. 2- Digestion of *pSAR-HC-Ext* with *NheI*+*SalI* released insert fragment of *BHC* (1460 bp); B) Digestion analysis of *pSAR-HC-LC-Ext*: 1- Digestion of *pSAR-HC-LC-Ext* with *SalI*+*SacI* released insert fragment of *BLC* (764 bp), 2- Digestion of *pSAR-HC-Ext* with *SalI* linearized the plasmid with expected size, 3- Uncut *pSAR-HC-Ext*. 4- Uncut *pSAR-HC-LC-Ext*; C) Digestion analysis of *pSAR-HC-IntF2A-LC-Ext*: 1-Uncut *pSAR-HC-IntF2A-LC-Ext*, 2- Digestion of *pSAR-HCIntF2ALC-Ext* with *SalI* linearized the plasmid with expected large size (containing the cloned fragments) compared with *pSAR-HC-LC-Ext* linearized with *SalI*, 4- Uncut *pSAR-HC-LC-Ext*; D,E) Identification of the cloned fragments by PCR analysis. D) PCR analysis using gene-specific primers amplified the portion of *IntF2A+BLC* fragment with expected size of 770 bp, 1&2- Recombinant colonies containing *pSAR-HCIntF2ALC-Ext*, 3- *pSAR-HC-LC-Ext* as a negative control. E) PCR analysis using gene-specific primers amplified the full length of *BHC+IntF2A* fragment with expected size of 2200 bp, 1-4- Recombinant colonies containing *pSAR-HCIntF2ALC-Ext*, 5- *pSAR-HC-LC-Ext* without *IntF2A* as a negative control, 6- Non-template PCR reaction as a negative control



شکل ۲. بخشی از نتایج توالی‌یابی ژن‌های همسانه‌سازی شده در وکتور نو ترکیب pSAR-HC-IntF2A-LC-Ext و هم‌ردیفی نوکلئوتیدی دوگانه با توالی‌های مورد استفاده در ساخت سازه

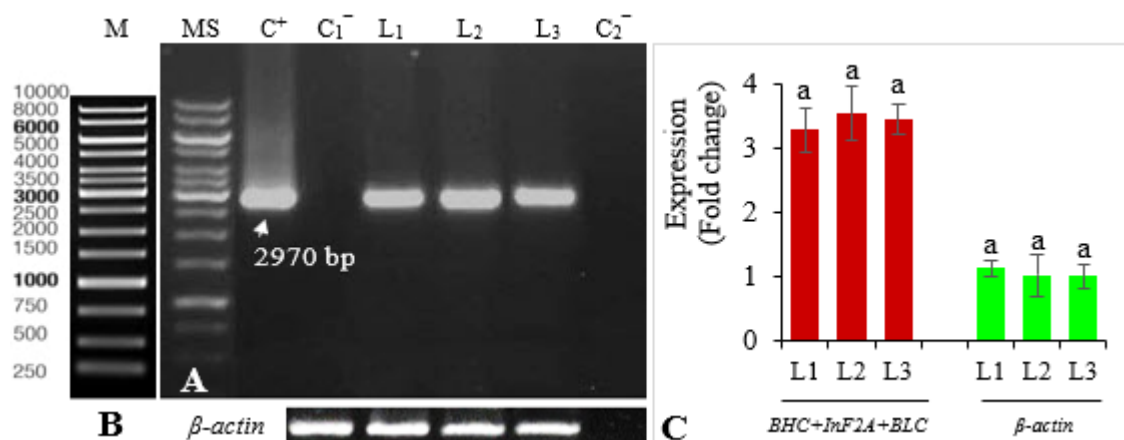
Figure 2. Part of sequencing results of the genes cloned into recombinant vector pSAR-HCIntF2ALC-Ext and pairwise nucleotide alignment with the sequences used in construction



شکل ۳. نمایش شماتیک ناحیه T-DNA پلاسمید نو ترکیب pSAR-HCIntF2ALC-Ext. LB و RB: مرزهای چپ و راست ناحیه T-DNA، *npII*: ژن neomycin phosphotransferase، Ext-Ter: توالی پایان دهنده ژن Extensin توتون، Nos-P و Nos-Ter: به ترتیب راه‌انداز و ناحیه پایان‌دهنده ژن نوپالین سنتاز آگروباکتریوم، P35SS-Pro: راه‌انداز CaMV 35S دارای توالی تقویت‌کننده رونویسی دوبر شده، CHS 5' UTR: ناحیه غیرترجمه شونده 5' ژن چالکون سنتاز (گیاه جعفری)، BHC و BLC: ژن‌های رمزکننده زنجیره سبک و زنجیره سنگین آنتی‌بادی بواسیزوماب، IntF2A: دومین پروتئین فیوژن IntF2A

Figure 3. Schematic representation of the T-DNA region of the recombinant plasmid pSAR-HCIntF2ALC-Ext. LB and RB: the right and left borders of the T-DNA region, *bla*: ampicillin/carbenicillin-resistance *bla* gene, Ext-Ter: Terminator of tobacco extensin gene, Nos-P and Nos-Ter: *Agrobacterium* nopaline synthase gene promoter and terminator, P35SS: CaMV 35S promoter with duplicated transcriptional enhancer, CHS 5' UTR: 5' untranslated region of chalcone synthase gene (*Petroselinum crispum*), BLC and BHC: Genes encoding the light chain and heavy chain of bevacizumab antibody, IntF2A: IntF2A fusion protein domain

بیان همزمان ژن‌ها به صورت تک رونوشت: آنالیز RT-PCR بیان همزمان ژن‌های رمزکننده بواسیزوماب (*BHC*) و (*BLC*) در برگ‌های توتون آگرواینفیلتر شده، نشان داد (شکل ۴A). تکثیر باند به اندازه تقریبی ۲۹۷۰ جفت باز بیانگر حضور رونوشت (mRNA) ژن‌های آنتی‌بادی و دومین *IntF2A* به صورت یک رونوشت واحد^۱ در برگ‌های توتون ترانسفورم شده می‌باشد. عدم تکثیر در نمونه‌های شاهد درستی بیان ژن‌ها و عدم آلودگی در آنالیز RT-PCR را اثبات نمود. با توجه به استفاده مقدار تقریباً یک سان RNA کل و cDNA از نمونه‌های مورد بررسی و میزان بیان سطح ثابتی از ژن مرجع (*β-actin*) در آنالیز RT-PCR (شکل ۴B)، به طور نسبی میزان بیان ژن‌های هدف در نمونه‌های مورد بررسی در سطح یکسانی برآورد شد (شکل ۴C). نتایج آنالیز RT-PCR بیان کاست *BHC+IntF2A+BLC* و کارایی سازه نو ترکیب ساخته شده را تأیید نمود.



شکل ۴. A) آنالیز RT-PCR برای بیان همزمان ژن‌ها رمزکننده آنتی‌بادی بواسیزوماب بواسطه دومین *IntF2A* در برگ‌های توتون آگرواینفیلتر شده با پلاسמיד نو ترکیب *pSAR-HCIntF2ALC-Ext* به عنوان شاهد مثبت، *L1-L3*: نمونه‌های برگ آگرواینفیلتر شده با پلاسמיד نو ترکیب *pSAR-HCIntF2ALC-Ext*؛ *C1-*: برگ آگرواینفیلتر شده با پلاسמיד *pSAR* خالی (شاهد منفی اول)، *C2-*: واکنش RT-PCR بدون RNA الگو (شاهد منفی دوم). B) بیان *β-actin* (ژن مرجع) کمی‌سازی بیان ژن. بیک حاصل از هر باند توسط نرم‌افزار کمی‌شد و بعد از نرمال‌سازی با ژن مرجع به صورت تغییرات چند برابری (Fold change) بیان شد. میانگین‌های با حروف یکسان دارای اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون LSD ($P \leq 0.05$) نیستند

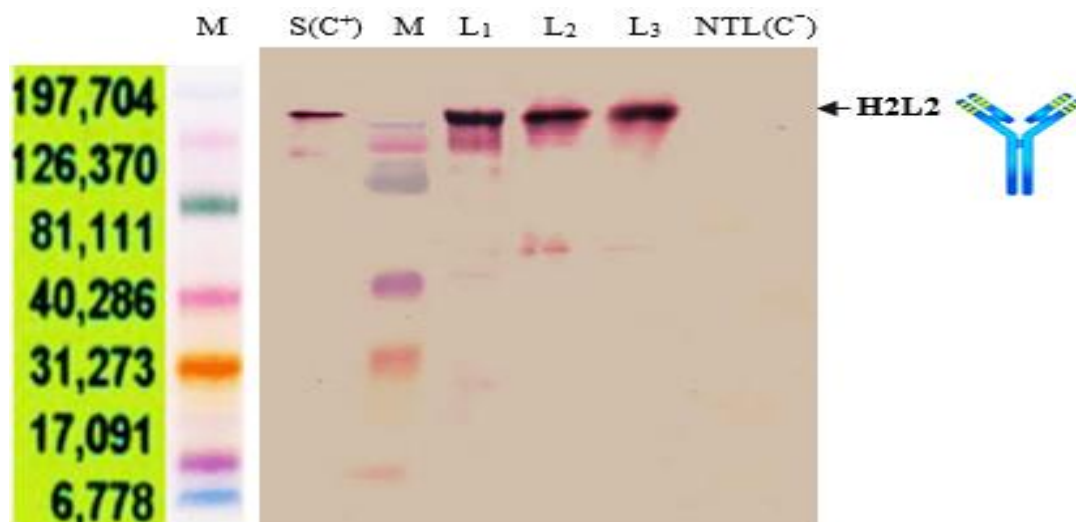
Figure 4. A) RT-PCR analysis of co-expression of the genes encoding bevacizumab antibody by *IntF2A* domain in agroinfiltrated tobacco leaves. C+: the recombinant plasmid *pSAR-HCIntF2ALC-Ext* as positive control, L1-L3: Leaves agroinfiltrated with the recombinant plasmid, C1-: leaves agroinfiltrated with *pSAR* empty plasmid as first negative control, C2-: RT-PCR reaction without RNA template as second negative control. B) Expression of *β-actin* (reference gene). C) Quantification of gene expression. The pick from each band was quantified by ImageJ software and expressed as fold change after normalization with reference gene (*β-actin*). Means with the same letter are not significantly different according to LSD test ($P \leq 0.05$)

¹. Single transcript unit

تولید آنتی‌بادی بواسیزوماب: برای تأیید عملکرد سازه ساخته شده (pSAR-HCIntF2ALC-Ext)، تجمع و تولید آنتی‌بادی بواسیزوماب در برگ گیاهان ترانسفورم شده با استفاده از آنالیز وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس این آنالیز بواسیزوماب در برگ‌های ترانسفورم شده با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی تشخیص داده شد (شکل ۵). در برگ آگرواینفیلتر شده با باکتری حاوی پلاسمید غیرنوترکیب (شاهد منفی) هیچ باندی تشخیص داده نشد که بیانگر درستی آنالیز وسترن است. در نمونه‌های مورد آنالیز فرم کامل تترامریک (H2L2) به عنوان فرم غالب آنتی‌بادی تولید شد، اگرچه به مقدار بسیار ناچیز و قابل اغماض فرم‌های دیگری از آنتی‌بادی نیز مشاهده شد. این الگوی هموزن تشکیل آنتی‌بادی (شامل درصد بالایی از فرم کامل آنتی‌بادی) نشان دهنده بیان برابر زنجیره‌های HC و LC، گردایش^۱ کارآمد و مناسب زنجیره‌ها بر روی هم و همچنین حفاظت آنتی‌بادی تولید شده از تخریب پروتئین‌کافت^۲ توسط آنزیم‌های پروتئازی می‌باشد. الگوی بیان پیچیده شامل فرم‌های مختلف آنتی‌بادی می‌تواند ناشی از بیان و تجمع نابرابر زنجیره‌های LC و HC (Chan et al. 2010; Schlatter et al. 2005) و همچنین به دلیل تخریب فرم کامل آنتی‌بادی در نتیجه پروتئین‌کافت توسط آنزیم‌های پروتئازی باشد (Jutars et al. 2016; Huang et al. 2010). مطالعات قبلی کاهش تخریب پروتئین‌های نوترکیب مختلف و بهبود میزان تجمع آن‌ها را در نتیجه بیان هتروولوگوس ژن‌های مذکور در میزبان گزارش شده است (Jutars et al. 2016; Robert et al. 2013). نتایج در تحقیق حاضر برای کاهش تخریب پروتئینی ناشی از پروتئین‌کافت، در فرایند ترانسفورماسیون از پلاسمیدهای حاوی ژن‌های رمزکننده بازدارنده پروتئازی S/CDI و S/CYS8 استفاده شد. نتایج حاصل نشان داد که سازه نوترکیب ساخته شده تولید آنتی‌بادی بواسیزوماب با الگوی بیان غالب به فرم کامل هتروتترامر در گیاه توتون را فراهم می‌کند. با آنالیز غشاء وسترن به وسیله نرم‌افزار ImageJ و مقایسه شدت باندها مشخص شد که بین نمونه‌های برگ ترانسفورم شده از نظر میزان بیان آنتی‌بادی تفاوت معنی‌دار وجود دارد (شکل ۶). با در نظر داشتن نمونه استاندارد (IgG1 انسانی، ۵۰ نانوگرم)، حداکثر میزان بواسیزوماب تجمع یافته تقریباً ۳/۲۱ برابر نمونه استاندارد بود که این مقدار ۶۷/۲۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم زیست توده تر تقریباً معادل با ۳/۳۶ درصد TSP برآورد شد. در عصر کنونی تولید پروتئین‌های نوترکیب دارویی در گیاهان از اهمیت بالایی برخوردار است. لازمه تولید پروتئین‌های دارویی مهم در گیاهان، طراحی و ساخت سازه‌های بیانی مناسب می‌باشد. عناصر ژنتیکی بالادست و پایین دست که در طراحی یک کاست بیانی استفاده می‌شود نقش بسزایی در سطح بیان و تولید پروتئین نوترکیب دارد. در تحقیق حاضر وکتور نوترکیب حاوی کاست بیانی متشکل از ژن‌های زنجیره سبک و سنگین بواسیزوماب، دومین IntF2A، راه‌انداز ویروس موزاییک کلم تقویت شده، توالی پایان‌دهنده ژن extension توتون، توالی نشانه ترشحی آنتی‌بادی و ناحیه 5' UTR مشتق شده از ژن چالکون سینتاز گیاه جعفری ساخته شد.

1. Assembling

2. Proteolysis

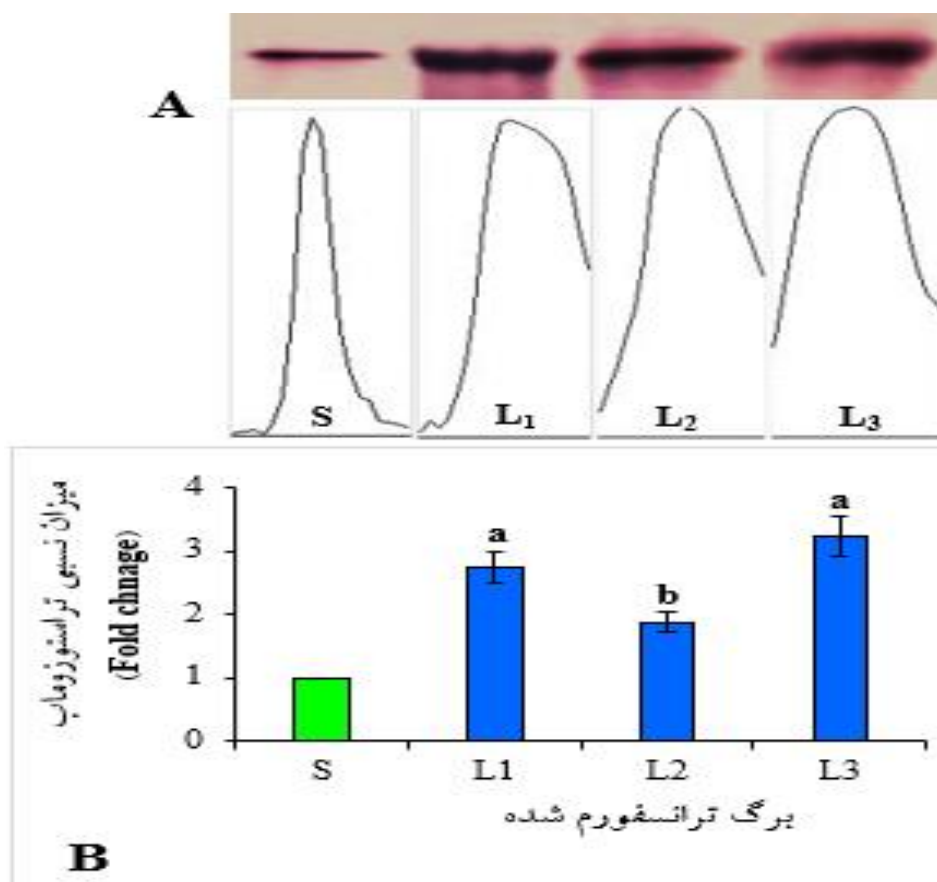


شکل ۵. آنالیز وسترن بلات تحت شرایط احیا نشده برای برگ‌های توتون آگرواینفیلتر شده با سازه نوترکیب S .Kaleidoscope prestained standard (BioRad) :نشانگر پروتئینی M .pSAR-HCIntF2ALC-Ext : عنوان انسانی به عنوان استاندارد (۵۰ نانوگرم) و شاهد مثبت. L₁₋₃: نمونه‌های برگ‌گی از سه گیاه گلدانی مختلف آگرواینفیلتر شده با باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب، NTL(C⁻): برگ آگرواینفیلتر شده با پلاسمید غیرنوترکیب به عنوان شاهد منفی

Figure 5. Western blot analysis under non-reducing conditions for tobacco leaves agroinfiltrated with recombinant plasmid pSAR-HCIntF2ALC-Ext. M: Kaleidoscope™ Prestained Protein marker (BioRad), S (C⁺: Human IgG1 as standard (50 ng) and positive control, L1-3: Leaf samples from three different potted plants agroinfiltrated with recombinant plasmid, NTL (C⁻): leaves agroinfiltrated with native vector as negative control

انتخاب راه‌انداز و توالی پایان‌دهنده مناسب برای تولید کارآمد پروتئین نوترکیب بسیار مهم است. راه‌انداز تقویت‌شده CaMV 35S $\times 2e$ دارای تکرارهای پشت سر هم به اندازه ۲۵۰ جفت باز در بخش بالادست است. این ناحیه تکراری به عنوان یک تقویت‌کننده قوی عمل کرده، منجر به سطوح بالای بیان ژن‌های بیگانه در گیاهان تراریخته می‌شود (Kay *et al.*, 1987). ترمیناتور ژن extension توتون در مقایسه با سایر ترمیناتورهای رایج، به عنوان یک ترمیناتور قوی برای رونویسی کارآمد و تقویت‌کننده بیان تراژن محسوب می‌شود. در مطالعه‌ای، وکتور حاوی توالی پایان‌دهنده extension توتون میزان تولید پروتئین GFP را حدود ۲/۵ برابر و میزان تولید NVCP (Norwalk virus capsid protein) را حدود ۶ برابر افزایش داد (Diamos *et al.* 2016). از استراتژی‌هایی که برای بهبود عملکرد نهایی پروتئین‌های نوترکیب استفاده می‌شود استفاده از نواحی غیرترجمه 5' UTR و 3' UTR برای تثبیت mRNA و همچنین توالی‌های نشانه‌تر شحی برای هدایت پروتئین به بخش‌های زیر سلولی

جهت تاشدگی مناسب پروتئین است. با طراحی نواحی غیرترجمه شونده 5' UTR و 3' UTR سینتتیک، سطح بیان بسیار بالایی از پروتئین نو ترکیب در سیستم بیان موقت گزارش شده است (Peyret et al. 2019).



شکل ۶- کمی سازی نسبی میزان تجمع آنتی بادی بواسیزوماب در برگ های آگرواینفیلتر شده با پلاسمید نو ترکیب pSAR-HCIntF2ALC-Ext (A) پلات پروفیل باندهای بواسیزوماب حاصل از آنالیز وسترن بلات در نرم افزار ImageJ. پیک حاصل از هر باند توسط نرم افزار کمی شد و بعد از نرمال سازی با نمونه استاندارد (S) به صورت تغییرات چند برابری (Fold change) بیان شد (B). میانگین های با حروف یکسان دارای اختلاف معنی دار بر اساس آزمون LSD ($P \leq 0.05$) نیستند

Figure 6- Relative quantification of bevacizumab antibody accumulation in tobacco leaves agroinfiltrated with recombinant plasmid pSAR-HCIntF2ALC-Ext. A) The profile plot of bevacizumab bands obtained from western blot analysis in ImageJ software. The pick from each band was quantified by the software and expressed as fold change after normalization with standard (S). Means with the same letter are not significantly different according to LSD test ($P \leq 0.05$)

در مطالعه‌ای تاثیر دو نوع 5' UTR، CHS (از منشاء گیاه) و Ω TMV (از منشاء ویروس) بر میزان بیان پروتئین نوترکیب scFvT84.66 (اختصاصی آنتی‌ژن CEA موجود در بسیاری از تومورهای انسانی) در کالوس برنج، گزارش شد که 5' CHS UTR به اندازه 5' UTR ویروسی موجب بهبود تولید پروتئین نوترکیب می‌شود (Torres et al. 1999). همچنین استفاده از 5' UTR مربوط به ژن رمزکننده زیرواحد K فتوسیستم گیاه آراییدوپسیس در مقایسه با 5' UTR TMV، موجب افزایش ۲۰ درصدی تولید پروتئین GFP گردید (Diamos et al., 2016). در مطالعه حاضر نیز از 5' UTR CHS از منشاء گیاه جعفری برای امکان بهبود سطح تولید آنتی‌بادی بواسیزوماب استفاده شد. بیان کارآمد زنجیره‌های HC و LC نیاز به یک پپتید سیگنال مناسب برای انتقال پلی‌پپتیدهای زنجیره‌های آنتی‌بادی به شبکه آندوپلاسمی جهت تاشدگی مناسب، گردایش درست زنجیره‌ها بر روی هم و ویرایش پس از ترجمه نیاز دارد. در مطالعه‌ای تأثیر هشت پپتید سیگنال انسانی ویژه HC (H1-H8) و دو پپتید سیگنال انسانی ویژه LC (L1 and L2) در کارایی تولید پنج آنتی‌بادی مهم ارزیابی شد و گزارش گردید که نوع پپتید سیگنال مورد استفاده تأثیر بسزایی در مقدار آنتی‌بادی تولید شده دارد (Haryadi et al. 2015). نتایج این مطالعه نشان داد استفاده از سیگنال پپتید H7 همراه با توالی ترشچی L1 و L2، تأثیر معنی‌داری در افزایش تولید آنتی‌بادی‌های بواسیزوماب، اینفیلیکسی‌ماب، ریتوکسی‌ماب و آدالیموماب دارد و بیشترین تولید بواسیزوماب در ترکیب سیگنال پپتید H7 و L1 بدست آمد. از این رو در تحقیق حاضر نیز برای تاشدگی درست و مناسب و امکان بهبود سطح تولید آنتی‌بادی در سیستم گیاه از سیگنال ترشچی H7 برای زنجیره سنگین (HC) و سیگنال L1 برای زنجیره سبک (LC) آنتی‌بادی استفاده گردید. نتایج حاصل بیان موفق و تولید سطح مناسب بواسیزوماب در گیاهان توتون را نشان داد، اگرچه بین نمونه‌های برگ‌گی مختلف تفاوت در سطح تجمع آنتی‌بادی مشاهده شد. این تنوع می‌تواند ناشی از تفاوت در وضعیت فیزیولوژیکی گیاهان مورد آنالیز، تفاوت در موقعیت نمونه‌برداری در داخل برگ‌ها و همچنین به دلیل موقعیت برگ‌ها در هر گیاه باشد، که با نمونه‌برداری و اندازه‌گیری‌های تکراری در هر برگ و در گیاهان متعدد می‌توان این تنوع در سطح تجمع پروتئین نوترکیب را در بیان موقت از طریق روش آگرواینفیلتراسیون به حداقل رساند (Robert et al. 2013; Bashandy et al. 2015). توتون به عنوان یکی از سامانه‌های مهم و غالب برای بیان و تولید تجاری پروتئین‌های نوترکیب دارویی است (Ma et al., 2015). این گیاه با داشتن برگ‌های پهن و تولید میزان بالای زیست‌توده (بالای ۱۰۰ تن زیست‌توده برگ‌گی در هکتار)، بالاترین میزان پروتئین محلول را در مقایسه با سایر سامانه‌های گیاهی تولید می‌کند و دارای ویژگی‌های قابل توجهی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب است (Tremblay et al. 2010). تاکنون گزارشی مبنی بر تولید آنتی‌بادی بواسیزوماب در سامانه توتون وجود ندارد. تولید بواسیزوماب در سیستم‌های بیانی سلول‌های پستانداری از جمله در CHO صورت می‌گیرد و در سیستم گیاهی برای اولین بار در کالوس واریته‌ای از برنج گزارش شد (Chen et al. 2016). در این مطالعه تولید آنتی‌بادی با استفاده از یک وکتور دوتایی تحت پروموتور یوبی‌کوئیتین ذرت صورت گرفت و برای تعادل در نسبت تولید زنجیره‌های سبک و سنگین و تولید پلی‌پروتئین، از لینکر پپتید 2A استفاده شد. از این لینکر پپتید در تولید آنتی‌بادی مونوکلونال ویروس ابولا (EBOV mAb) در توتون نیز استفاده شده است (Lin et al. 2018)، که نتایج نشان داد گیاهان توتون تراریخته دارای یک رونوشت واحد حاوی HC و LC متصل شده

به‌وسیله 2A، نه تنها سطوح مشابه HC و LC را تولید می‌کنند، بلکه در مقایسه با گیاهانی که HC و LC را در دو واحد مستقل رونویسی بیان می‌کنند، عملکرد تولیدی بالاتری نیز دارند. در مطالعه‌ای دیگر پردازش پلی‌پروتئینی متشکل از سه نوع پروتئین هدف بواسطه استفاده از پروتئین فیوژن IntF2A هم در بیان موقت و هم در بیان پایدار در گیاهان کاهو و توتون *N. benthamiana* گزارش شد (Zhang et al. 2017). دومین پروتئین فیوژن IntF2A در مقایسه با پپتید 2A قابلیت خودبرشی^۱ در دو انتهای اتصالات پروتئینی و بدون باقی گذاشتن هر گونه بقایایی از توالی 2A در انتهای کربوکسیلی پروتئین‌های نوترکیب و هدف‌یابی درست آن به محل مورد نظر در سلول را فراهم می‌کند (François et al., 2002; Zhang et al., 2017). در تحقیق حاضر طراحی و ساخت سازه دوسیسترونی حاوی ژن‌های رمزکننده بواسیزوماب مبتنی بر دومین فیوژن IntF2A انجام و عملکرد سازه با استفاده از آگرواینفیلتراسیون گیاه توتون ارزیابی گردید. آنالیز وسترن بلات نشان داد آنتی‌بادی بواسیزوماب بطور موفقیت‌آمیز به شکل غالب تترامر و در سطح تقریباً بالایی (۶۷/۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم زیست‌توده تر) در گیاهان توتون تولید می‌شود. این نتایج نشان‌دهنده عملکرد درست دومین IntF2A در بیان و انباشت تقریباً برابر و به اندازه کافی زنجیره‌های HC و LC آنتی‌بادی و کارایی بالای سازه ساخته شده در تولید آنتی‌بادی نوترکیب بواسیزوماب است.

نتیجه‌گیری: آنالیزهای مولکولی بیان موفق ژن‌های هدف و تولید آنتی‌بادی بوا سیزوماب به فرم غالب تترامر را در گیاهان توتون آگرواینفیلتر شده تأیید کرد. این امر نشان‌دهنده کارایی لینکر پروتئین فیوژن IntF2A و سایر عناصر ژنتیکی بکار رفته در سازه نوترکیب از جمله توالی‌های نشانه ترشحی زنجیره‌های HC و LC در تولید فرم کامل آنتی‌بادی می‌باشد. از این رو سازه نوترکیب ساخته شده می‌تواند جهت برسی امکان تولید آنتی‌بادی بوا سیزوماب در سامانه گیاهی در مقیاس و وسیع‌تر یا در سطح صنعتی مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری: نویسندگان از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه ارومیه به خاطر حمایت مالی پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌کنند.

منابع

جعفری مراد، دلیرژ نوروز، حبیبی مهدی (۱۴۰۱) تولید آزمایشگاهی ریتوکسی‌ماب، آنتی‌بادی ضد CD20، در گیاه توتون (*Nicotiana tabacum* L). گزارش نهایی طرح تولید محور، دانشگاه ارومیه، ۱۴۲-۱.

References

Bang YH, Kim JE, Lee JS et al. (2021) Bevacizumab plus capecitabine as later-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines. *Sci Rep* 11, 7118.

¹. Self-excision

- Barazandeh A, Mohammadabadi MR, Ghaderi-Zefrehei M, Nezamabadipour H (2016) Genome-wide analysis of CpG islands in some livestock genomes and their relationship with genomic features. *Czech J Anim Sci* 61, e487.
- Bashandy H, Jalkanen S, Teeri TH (2015) Within leaf variation is the largest source of variation in agroinfiltration of *Nicotiana benthamiana*. *Plant Methods* 11, e47.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brenner AJ, Floyd J, Fichtel L et al. (2021) Phase 2 trial of hypoxia activated evofosfamide (TH302) for treatment of recurrent bevacizumab-refractory glioblastoma. *Sci Rep* 11, 2306.
- Chan CE, Lim AP, Chan AH et al. (2010) Optimized expression of full-length IgG1 antibody in a common *E. coli* strain. *PLoS One* 20, e10261.
- Chen L, Yang X, Luo D, Yu W (2016) Efficient production of a bioactive bevacizumab monoclonal antibody using the 2A self-cleavage peptide in transgenic rice callus. *Front Plant Sci* 7, 1156.
- Chellappan DK, Leng KH, Jia LJ et al. (2018) The role of bevacizumab on tumour angiogenesis and in the management of gynaecological cancers: A review. *Biomed Pharmacother* 102, 1127-1144.
- Chu G, Liu X, Yu W et al. (2021) Cisplatin plus paclitaxel chemotherapy with or without bevacizumab in postmenopausal women with previously untreated advanced cervical cancer: a retrospective study. *BMC Cancer* 21, 133.
- Clarke JL, Paruch L, Dobrica MO et al. (2017) Lettuce-produced hepatitis C virus E1E2 heterodimer triggers immune responses in mice and antibody production after oral vaccination. *Plant Biotechnol J* 15, 1611-1621.
- Diamos AG, Rosenthal SH, Mason HS (2016) 5' and 3' untranslated regions strongly enhance performance of geminiviral replicons in *Nicotiana benthamiana* leaves. *Front Plant Sci* 7, e200.
- Dudek AZ, Liu LC, Gupta S et al. (2020) Phase Ib/II clinical trial of pembrolizumab with bevacizumab for metastatic renal cell carcinoma: BTCRC-GU14-003. *J Clin Oncol* 38, 1138-1146.
- Feldman DR, Ged Y, Lee CH et al. (2020) Everolimus plus bevacizumab is an effective first-line treatment for patients with advanced papillary variant renal cell carcinoma: Final results from a phase II trial. *Cancer* 126, 5247-5255.
- François IE, Broekaert WF, Cammue BP (2002) Different approaches for multi-transgene-stacking in plants. *Plant Sci* 163, 281-295.
- Frenzel A, Hust M, Schirrmann T (2013) Expression of recombinant antibodies. *Front Immunol* 4, 217.
- Halpin C, Cooke SE, Barakate A et al. (1999) Self-processing 2A-polypeptides—a system for coordinate expression of multiple proteins in transgenic plants. *Plant J* 17, 453-459.

- Haryadi R, Ho S, Kok YJ et al. (2015) Optimization of heavy chain and light chain signal peptides for high level expression of therapeutic antibodies in CHO cells. *PLoS One* 10, e0116878.
- Holsters M, de Waele D, Depicker A et al. (1978) Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Gen Genet* 163, 181-187.
- Huang Z, Phoolcharoen W, Lai H et al. (2010) High-level rapid production of full-size monoclonal antibodies in plants by a single-vector DNA replicon system. *Biotechnol Bioeng* 106, 9-17.
- Jafari M, Delirez N, Habibi M (2022) Lab-scale production of Rituximab, an anti-CD20 monoclonal antibody, in tobacco plant (*Nicotiana tabacum* L). Final report of project, Urmia University, 1-142 (in Persian).
- Jugler C, Sun H, Nguyen K et al. (2023) A novel plant-made monoclonal antibody enhances the synergetic potency of an antibody cocktail against the SARS-CoV-2 Omicron variant. *Plant Biotechnol J* 21(3), 549-559.
- Jutras PV, Marusic C, Lonoce C et al. (2016) An accessory protease inhibitor to increase the yield and quality of a tumour-targeting mAb in *Nicotiana benthamiana* leaves. *PLoS One* 11, e0167086.
- Kay R, Chan A, Daly M, McPherson J (1987) Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236, 1299-1302.
- Kolotilin I, Topp E, Cox E et al. (2015) Plant-based solutions for veterinary immunotherapeutics and prophylactics. *Vet Res* 45, 117.
- Lin Y, Hung CY, Bhattacharya C et al. (2018) An effective way of producing fully assembled antibody in transgenic tobacco plants by linking heavy and light chains via a self-cleaving 2A peptide. *Front Plant Sci* 9, 1379.
- Liu S, Kasherman L, Fazelzad R et al. (2021) The use of bevacizumab in the modern era of targeted therapy for ovarian cancer: A systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol* 161, 601-612.
- Lu RM, Hwang YC, Liu IJ et al. (2020) Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J Biomed Sci* 27, 1.
- Lugano R., Ramachandran M, Dimberg A. (2020) Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *CMLS* 77, 1745-1770.
- Luke GA, Roulston C, Tilsner J, Ryan MD (2015) Growing uses of 2A in plant biotechnology. In: *Biotechnology* (1st edn). Ekinci D (ed). InTech, Croatia. pp. 165-193.
- Ma JKC, Drossard J, Lewis D et al. (2015) Regulatory approval and a first-in-human phase I clinical trial of a monoclonal antibody produced in transgenic tobacco plants. *Plant Biotechnol J* 13, 1106-1120.
- Ma L, Lukasik E, Gawehns F, Takken FL (2012) The use of agroinfiltration for transient expression of plant resistance and fungal effector proteins in *Nicotiana benthamiana* leaves. *Plant fungal pathogens: Methods Mol Biol*, 835, 61-74.
- Marcos JF, Beachy RN (1994) In vitro characterization of a cassette to accumulate multiple proteins through synthesis of a self-processing polypeptide. *Plant Mol Biol* 24, 495-503.

- Masoudzadeh SH, Mohammadabadi MR, Khezri A et al. (2020) Dlk1 gene expression in different tissues of lamb. *Iran J Appl Anim Sci* 10, 669-677.
- Merlin M, Gecchele E, Capaldi S et al. (2014) Comparative evaluation of recombinant protein production in different biofactories: the green perspective. *Biomed Res Int* 2014, e136419.
- Mett V, Chichester JA, Stewart ML et al. (2011) A non-glycosylated, plant-produced human monoclonal antibody against anthrax protective antigen protects mice and non-human primates from *B. anthracis* spore challenge. *Hum Vaccin* 7, 183-190.
- Mohammadinejad F, Mohammadabadi M, Roudbari Z, Sadkowski T (2022) Identification of key genes and biological pathways associated with skeletal muscle maturation and hypertrophy in *Bos taurus*, *Ovis aries*, and *Sus scrofa*. *Animals* 12(24):3471.
- Pettitt J, Zeitlin L, Kim DH et al. (2013) Therapeutic intervention of Ebola virus infection in rhesus macaques with the MB-003 monoclonal antibody cocktail. *Sci Transl Med* 5(199):199ra113.
- Peyret H, Brown JK, Lomonosoff GP (2019) Improving plant transient expression through the rational design of synthetic 5' and 3' untranslated regions. *Plant Methods* 15, 108.
- Phan HT, Pham VT, Ho TT et al. (2020) Immunization with plant-derived multimeric H5 hemagglutinins protect chicken against highly pathogenic avian influenza virus H5N1. *Vaccines* 8, 593.
- Qiu X, Wong G, Audet J et al. (2014) Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature* 514, 47-53.
- Ralley L, Enfissi EM, Misawa N et al. (2004) Metabolic engineering of ketocarotenoid formation in higher plants. *Plant J* 39, 477-486.
- Rasband, WS (2020) ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>
- Robert S, Khalf M, Goulet MC et al. (2013) Protection of recombinant mammalian antibodies from development-dependent proteolysis in leaves of *Nicotiana benthamiana*. *PLoS One* 8, e70203.
- Sainsbury F, Lomonosoff GP (2008) Extremely high-level and rapid transient protein production in plants without the use of viral replication. *Plant Physiol* 148, 1212-1218.
- Schlatter S, Stansfield SH, Dinnis DM et al. (2005) On the optimal ratio of heavy to light chain genes for efficient recombinant antibody production by CHO cells. *Biotechnol Prog* 21, 122-33.
- Schillberg S, Finnern R (2021) Plant molecular farming for the production of valuable proteins- Critical evaluation of achievements and future challenges. *J Plant Physiol*, 258-259, 153359.
- Shahsavari M, Mohammadabadi M, Khezri A et al. (2022) Effect of Fennel (*Foeniculum Vulgare*) Seed Powder Consumption on Insulin-like Growth Factor 1 Gene Expression in the Liver Tissue of Growing Lambs. *Gene Express* 21 (2), 21-26.
- Sil B, Jha S (2014) Plants: the future pharmaceutical factory. *Am J Plant Sci* 5, 319-327.

- Stevens LH, Stoopen GM, Elbers IJ et al. (2000) Effect of climate conditions and plant developmental stage on the stability of antibodies expressed in transgenic tobacco. *Plant Physiol* 124, 173-182.
- Taylor P (2022) The top 15 best-selling cancer drugs in 2022. www.fiercepharma.com.
- Topp E, Irwin R, McAllister T et al. (2016) The case for plant-made veterinary immunotherapeutics. *Biotechnol Adv* 34, 597-604.
- Torres E, Vaquero C, Nicholson L et al. (1999) Rice cell culture as an alternative production system for functional diagnostic and therapeutic antibodies. *Transgenic Res* 8, 441-449.
- Tremblay R, Wang D, Jevnikar AM, Ma S (2010) Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. *Biotechnol Adv* 28, 214-221.
- Tsai JS, Su PL, Yang SC et al. (2021) EGFR-TKI plus bevacizumab versus EGFR-TKI monotherapy for patients with EGFR mutation-positive advanced non-small cell lung cancer-A propensity score matching analysis. *J Formos Med Assoc* 120, 1729-1739.
- Urwin P, Yi L, Martin H et al. (2000) Functional characterization of the EMCV IRES in plants. *Plant J* 24, 583-589.
- Urwin PE, McPherson MJ, Atkinson HJ (1998) Enhanced transgenic plant resistance to nematodes by dual proteinase inhibitor constructs. *Planta* 204, 472-479.
- van der Veen SJ, Hollak CE, van Kuilenburg AB, Langeveld M (2020) Developments in the treatment of Fabry disease. *J Inher Metab Dis* 43, 908-921.
- Ward BJ, Makarkov A, Séguin A et al. (2020) Efficacy, immunogenicity, and safety of a plant-derived, quadrivalent, virus-like particle influenza vaccine in adults (18–64 years) and older adults (≥ 65 years): Two multicentre, randomised phase 3 trials. *Lancet* 396, 1491-1503.
- Yang M, Sun H, Lai H et al. (2018) Plant-produced Zika virus envelope protein elicits neutralizing immune responses that correlate with protective immunity against Zika virus in mice. *Plant Biotechnol J* 16, 572-580.
- Zhang B, Rapolu M, Kumar S et al. (2017) Coordinated protein co-expression in plants by harnessing the synergy between an intein and a viral 2A peptide. *Plant Biotechnol J* 15, 718-728.
- Zimran A, Gonzalez-Rodriguez DE, Abrahamov A et al. (2018) Long-term safety and efficacy of taliglucerase alfa in pediatric Gaucher disease patients who were treatment-naive or previously treated with imiglucerase. *Blood Cells Mol Dis* 68, 163-172.