

# Molekulární farmaření

David Honys

Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.



## Molekulární farmaření ...

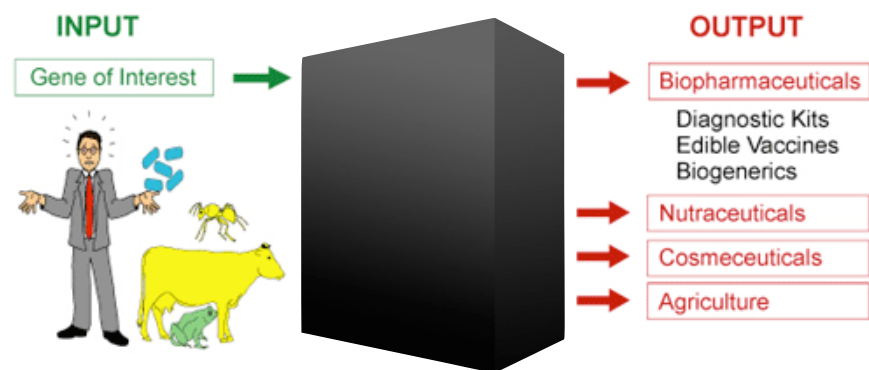
“Transgenic non-food GM plant farming or biopharming”

... metoda integrace cizorodých genů do rostlinných organismů

... termín pro nové použití transgenních rostlin (nikoli živočichů) k produkci komerčně zajímavých bílkovin (nesouvisejících s obživou)

... **medicínské** a **ostatní** (technické, nemedicínské)

## Molekulární farmaření

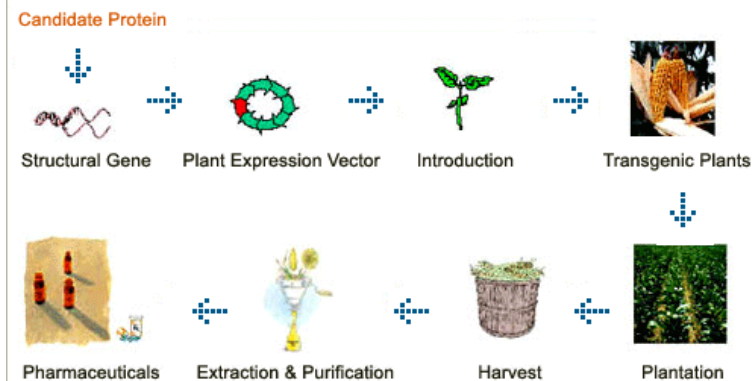


## Molekulární farmaření



## Produkcce farmaceutických bílkovin

### Molecular Farming 1

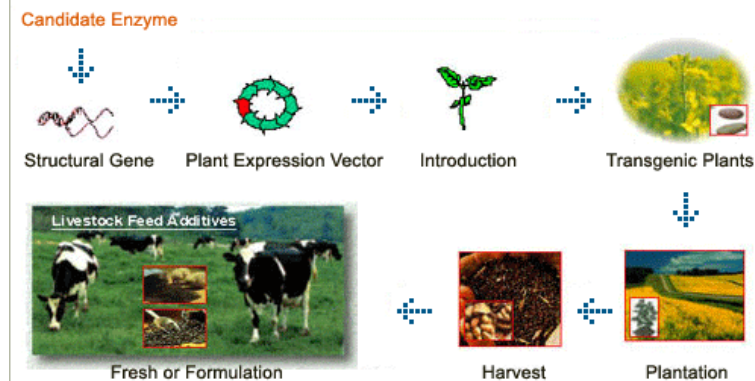


**NEXGEN**<sup>®</sup>  
THE SCIENCE

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honys

## Technické/průmyslové enzymy

### Molecular Farming 2

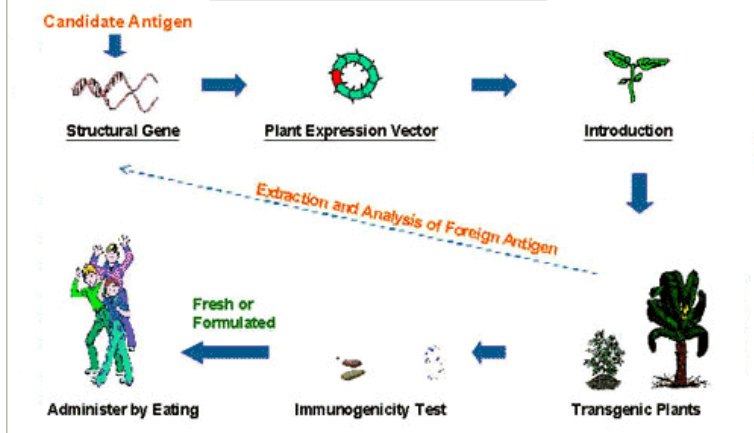


**NEXGEN**<sup>®</sup>  
THE SCIENCE

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honys

## Jedlé vakcíny

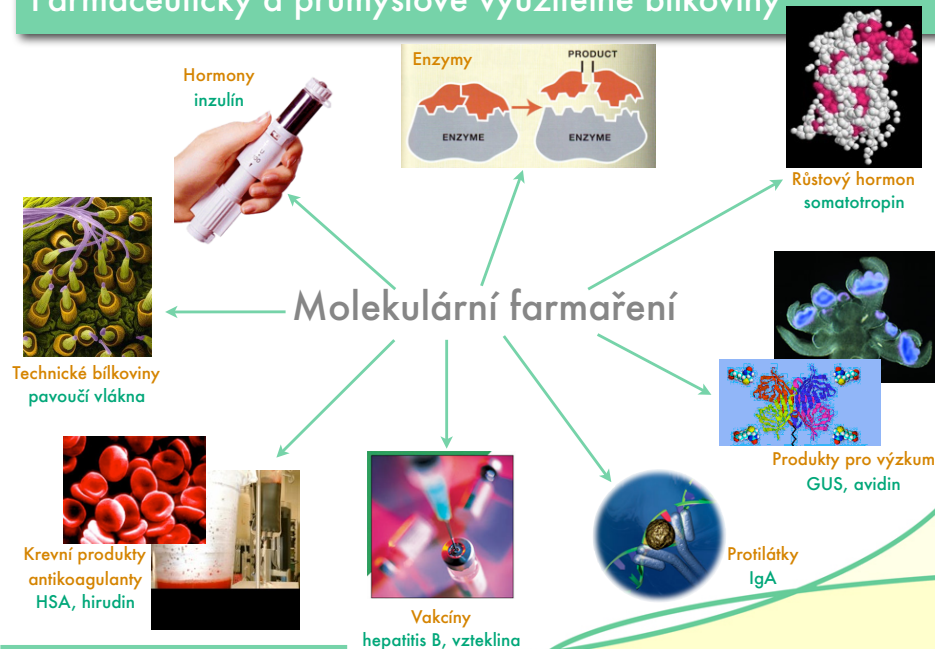
### Molecular Farming 3



**NEXGEN**<sup>®</sup>  
THE SCIENCE

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honys

## Farmaceuticky a průmyslově využitelné bílkoviny



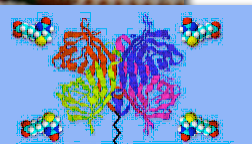
Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honys

## Produkce avidinu

1 tuna slepičích vajec



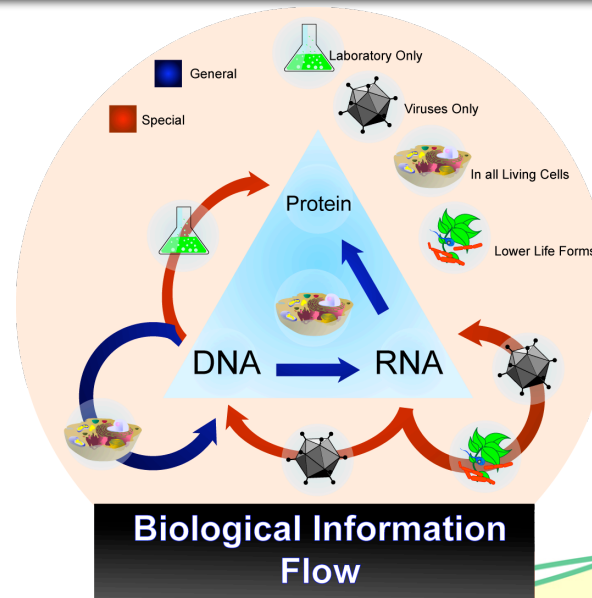
99.5 % snížení nákladů



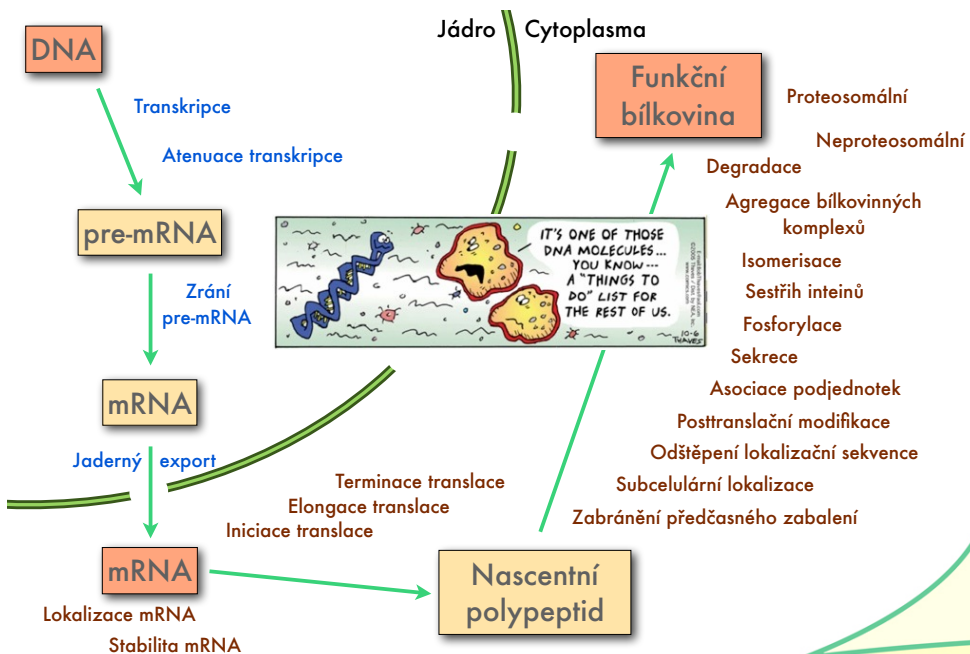
35 l obilěk kukuřice

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honys

## Centrální dogma molekulární biologie



Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honys



11

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honys

## Systémy pro produkci bílkovin

- **Nebuněčné (*in vitro*) systémy**
  - *in vitro* transkripce/translace
  - Chemická syntéza bílkovin
- **Buněčné systémy**
  - Buněčné kultury
    - Bakteriální, kvasinkové, savčí, hmyzí, rostlinné
  - Celé organismy
    - Transgenní živočichové
    - Transgenní rostliny

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honys

## Ideální hostitelský expresní systém - ???



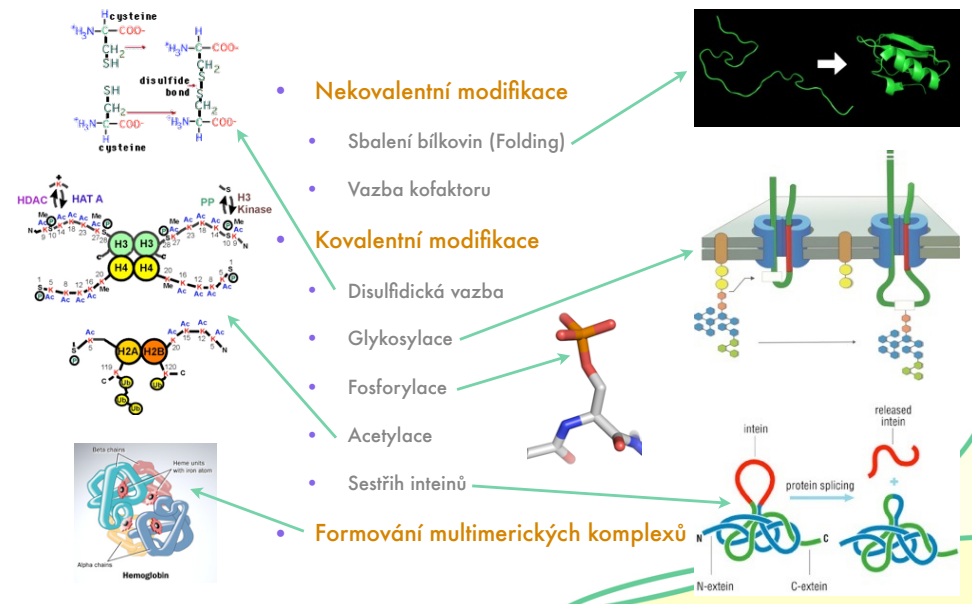
- Rychlost
- Provozní náklady
- Kapitálové náklady
- Biologická aktivita produktů
- Posttranslační modifikace
- Bezpečnost (GRAS status)
- Rozšiřitelnost, míra/flexibilita produkce



## Homologní x heterologní

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honyš

## Biologická aktivita bílkovin: posttranslační modifikace



Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honyš

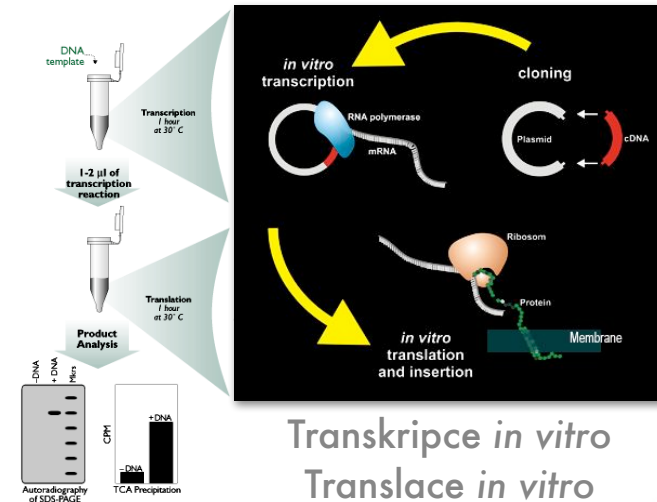
## Systémy pro produkci bílkovin

- **Nebuněčné (*in vitro*) systémy**
- *in vitro* transkripce/translace
- Chemická syntéza bílkovin
- **Buněčné systémy**
- Buněčné kultury
  - Bakteriální, kvasinkové, savčí, hmyzí, rostlinné
- Celé organismy
  - Transgenní živočichové
  - Transgenní rostliny



Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honyš

## Nebuněčná syntéza bílkovin



Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honyš

## Nevýhody *in vitro* systémů

- Vysoké náklady
- Malá výtěžnost (ug-mg)
- Obtížná syntéza velkých bílkovin
- Řada bílkovin postrádá biologickou aktivitu

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honyš

## Systémy pro produkci bílkovin

### • Nebuněčné (*in vitro*) systémy

- *in vitro* transkripce/translace
- Chemická syntéza bílkovin



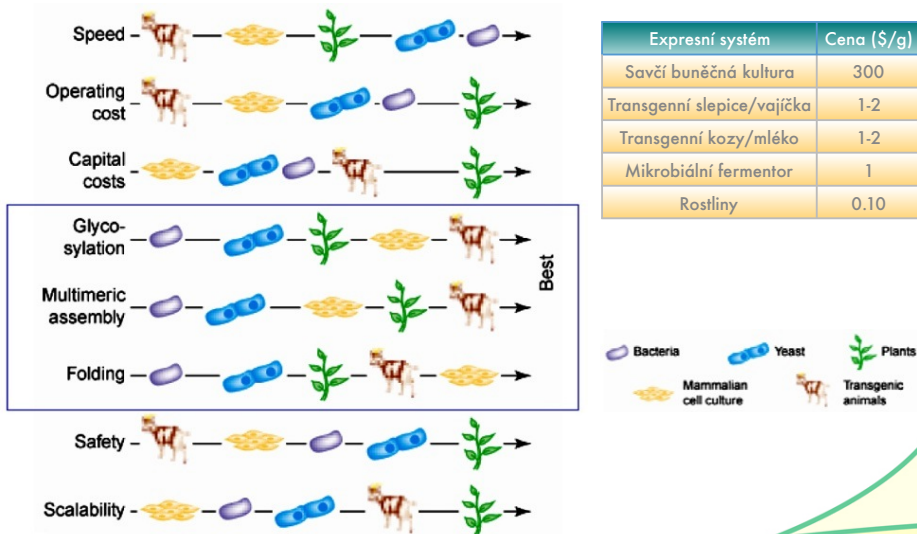
### • Buněčné systémy

- Buněčné kultury
  - Bakteriální, kvasinkové, savčí, hmyzí, rostlinné
- Celé organismy
  - Transgenní živočichové
  - Transgenní rostliny



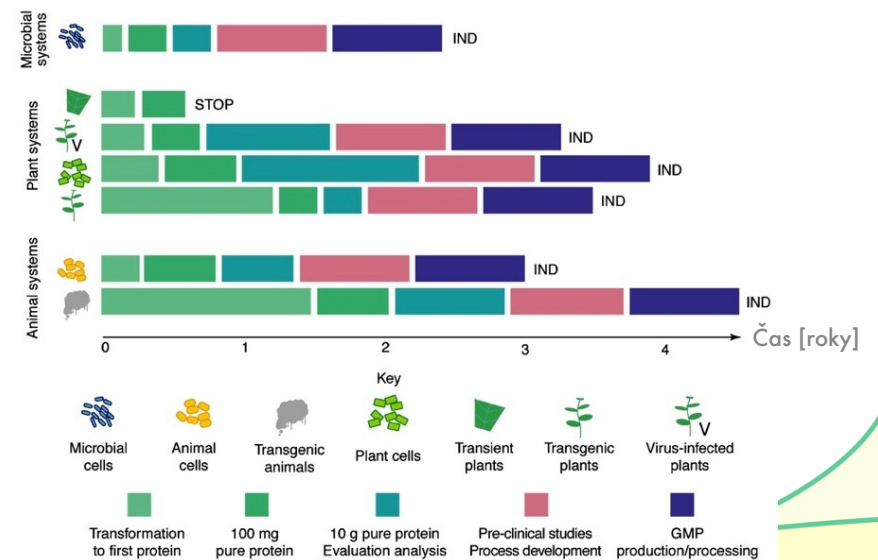
Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honyš

## Porovnání expresních systémů - produkce lidských bílkovin



Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honyš

## Porovnání expresních systémů - časové nároky



Twyman et al., 2003

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honyš

## Neexistuje ideální produkční systém

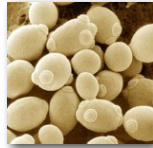


### Prokaryota

Nejlépe charakterizovaný systém  
Rychlá, vysoká produkce (100-1500 mg/l)  
Absence eukaryotických modifikací bílkovin  
Menší, jednoduché bílkoviny  
Častá agregace produktu - často nutná renaturace  
Eliminace bakteriálních toxinů

### Kvasinky (*S. cerevisiae*)

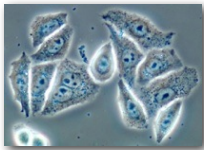
Posttranslační modifikace bílkovin  
Glykosylace odlišná od savců  
Celkem vysoká produkce (100-200 mg/l)  
Ztráty - degradace produktu v médiu



### Kvasinky (*Pichia pastoris*)

Posttranslační modifikace bílkovin  
Glykosylace odlišná od savců  
Vysoká produkce (až 6.4 g/l)  
Minimalizace degradace produktu v médiu

>40% produkce  
v bakteriích a kvasinkách



### Savčí buněčné kultury

Posttranslační modifikace bílkovin, savčí glykosylace  
Standardní produkce 1-3 g/l  
Riziko virové či onkogenní kontaminace  
Vysoká cena (\$ 300-10 000/g)



### Transgenní živočichové

Posttranslační modifikace bílkovin,  
Standardní produkce  
Riziko kontaminací (oběma směry)  
Nepružný, rigidní systém  
Vysoká cena

>50% produkce  
v savčích buněčných kulturách

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honys

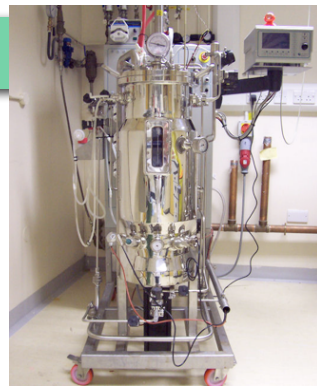
## Molekulární farmaření - rostliny



## Produktivita rostlin

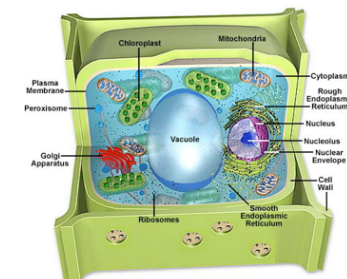
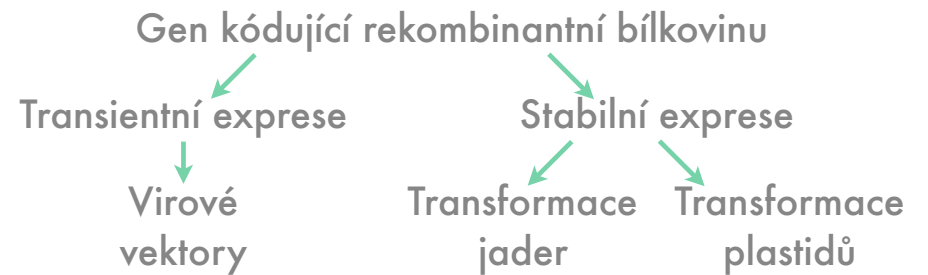


1 rostlina tabáku  
vyprodukuje více  
rekombinantních  
bílkovin než 300  
fermentor *E. coli*



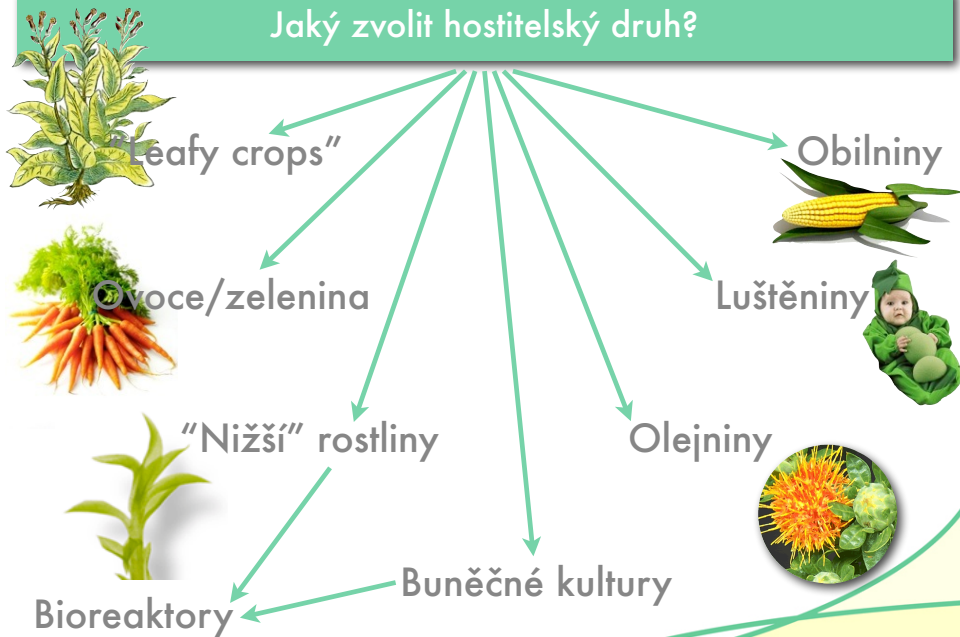
Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honys

## Jak exprimovat geny v rostlinách?



Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honys

## Jaký zvolit hostitelský druh?



Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honys

## Proč zvolit dvouděložné rostliny?



### GRAS status

"Generally regarded as safe"

### Jedlé vakcíny

Plody, kořeny, listy

### Transplastomika

Transformace plastidů

### Míra produkce

Regulace produkce  
Výtěžnost

### Transientní exprese

Flexibilita, výtěžnost, bezpečnost

### Obrovská variabilita systémů

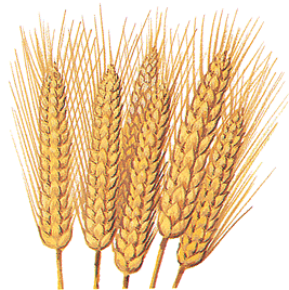
Rostliny, buněčné kultury  
Targeting produktu  
Downstream aplikace na míru

### Transformace

Velice dobře zvládnutá

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honys

## Proč zvolit jednoděložné rostliny - obilniny?



### GRAS status

"Generally regarded as safe"

### Fungující infrastruktura

Produkce i zpracování

### Míra produkce

Vyjímečně snadná regulace produkce

### Skladování

Stabilita produktů

### Výtěžnost

Vysoká míra akumulace rekombinantních bílkovin

### Targetting produktu

#### Semeno

Endosperm, embryo, aleuronová vrstva  
Specifické skladovací kompartmenty - proteinová tělíska (protein bodies), zásobní vakuoly (storage vacuoles)

### Transformace

... celkem fungující

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honys

## Příklady rekombinantních bílkovin a produkčních systémů

Systém	Kompartment	Bílkovina	Aplikace	Hostitel	Exprese	Společnost
Celá rostlina	Cytosol	HBsAg	hepatitida B	brambor	0.007% TSP	AltaGen
		kolagen		tabák	1 mg/g sušiny	CropTech, Medicago Inc., Meristem Therapeutics
		scFv, hepatitida B	hepatitida B	neuveдено	0.032% TSP	PlantGenix
	Vakuola	slgA/G	imunologie	neuveдено	neuveдено	
	ER	scFv, kutinasa			1% TSP	Novoplant
		scFv, ABA	imunologie	tabák	6.8% TSP	
Apoplast	IgG1			1.3% ISP	EpicYTE Pharmaceutical	
	IgG1, Fab	imunologie	tabák	13% ISP		
Specifický orgán	Semeno	avidin	výzkum, diagnostika	kukuřice	6% TSP	ProdiGene
		hirudin	antikoagulant	řepka	1% FW	SemBioSys, Meristem Therapeutics
	Hlíza	scFv, oxalozon	imunologie	brambor	2% TSP	Meristem Therapeutics
	Kořen	IgM, RKN	imunologie		0.003% TSP	
	Plod	RSV-F protein	bronchiolitida	neuveдено	neuveдено	

## Několik rekordů ...

Bílkovina	Hostitel	Rok	Komentář
<b>Lidské farmaceutické bílkoviny</b>			
Růstový hormon	tabák, slunečnice	1986, 2000	1. lidská bílkovina exprimovaná v rostlině (fúze s nos genem Agrobacteria), později 1. lidská bílkovina exprimovaná v chloroplastu (7% TSP)
Lidský sérový albumin	tabák, brambor	1990, 2003	1. velká lidská bílkovina exprimovaná v rostlině, nízká jaderná exprese (0.1% TSP), vysoká v chloroplastech (11% TSP)
α-interferon	rýže, tuřín	1994	1. lidská farmaceutická bílkovina produkovaná v rýži
erythropoietin	tabák	1995	1. lidská bílkovina produkovaná v buněčné suspenzi tabáku
Lidská sekretovaná alkalická fosfatasa (SEAP)	tabák	1999, 2000	1. bílkovina produkovaná sekrecí z kořenů a listů
α1-antitrypsin	rýže	1999	1. použití rýžové suspenzní kultury pro molekulární farmažení
kolagen	tabák	2000	1. lidského polymeru strukturálního proteinu v rostlině, správná modifikace díky kotransformaci a následné koexpresi modifikujícího enzymu
aprotinin	kukuřice	2002	1. lidská farmaceutická bílkovina produkovaná v kukuřici
<b>Rekombinantní protilátky</b>			
IgG1	tabák	1989	1. protilátka produkovaná v rostlině, křížení linií exprimujících těžký a lehký řetězec
IgG (HSV)	sója	1998	1. lidská farmaceutická bílkovina produkovaná v sóji
LSC (HSV)	Chlamydomonas	2003	1. příklad molekulárního farmažení v řasách
<b>Rekombinantní vakcíny</b>			
Plášťový protein viru hepatitidy B	tabák	1992	1. potenciální vakcína produkovaná v rostlině, třetí rostlinná vakcína v klinických testech
Glykoprotein viru vztekliny	rajče	1995	1. příklad jedlé vakcíny produkované v jedlém rostlinném pletivu
Tepelně labilní enterotoxin z E. coli	tabák, brambor	1998	1. rostlinná vakcína v klinických testech
Diabetes autoantigen	tabák, brambor	1997	1. rostlinná vakcína proti autoimunitní chorobě
Cholera toxin, podj. B	tabák, brambor	2001	1. potenciální vakcína exprimovaná v chloroplastech

Ma 2003

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honys

## Příklady rostlinných druhů a je využívajících firem



Company	Production systems										Expression			
	Cell culture	Nicotiana	Alfalfa	Lemma	Peas	Moss	Corn	Safflower	Barley	Arabidopsis	Rice	Nuclear	Viral	Chloroplast
Dow AgroSciences														
Protalix Biotherapeutics														
Planet Biotech														
Bayer														
Chlorogen														
Medicago, Inc.														
Biolex														
Novoplant														
Greenovation														
Meristem Therapeutics														
SemBioSys														
ORF Genetics														
Cobento														
Ventia														

Sourouille 2009

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honys

## Expresní jednotka

### DNA konstrukt -> design



#### Promotor

Rozpoznatelný hostitelským systémem (CaMV 35S)  
Konstitutivní či tkáňově specifický  
Silný promotor -> vysoká míra exprese

#### Kódující sekvence (ORF)

cDNA či genomová DNA  
Optimalizace kodonů

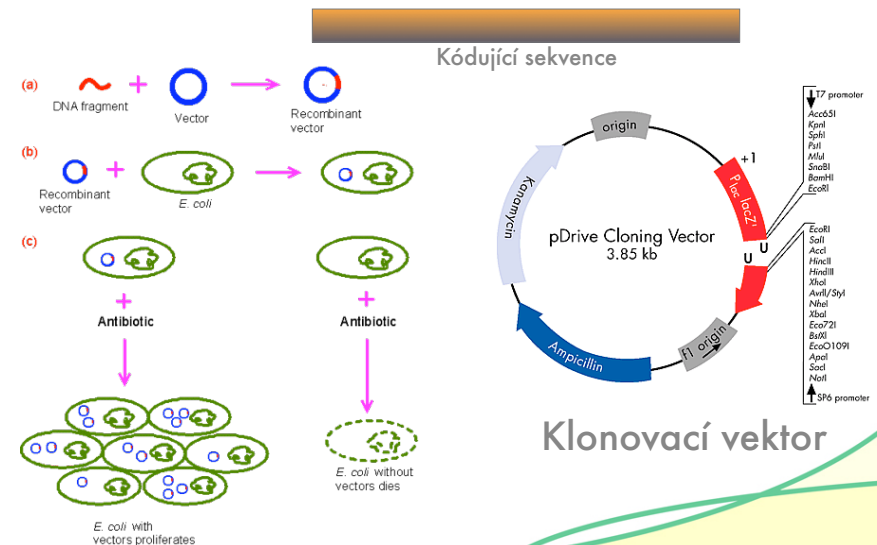
#### Terminátor

Rozpoznatelný hostitelským systémem

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honys

## Klonování

### DNA konstrukt

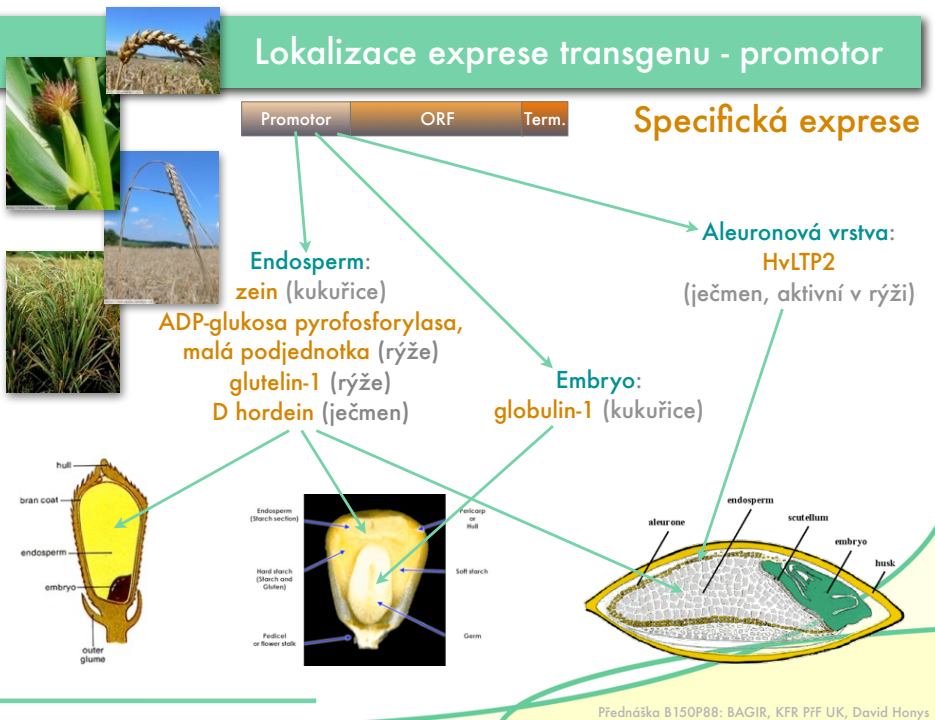


Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honys

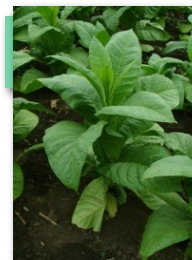




## Lokalizace exprese transgenu - promotor



## Tabák (*Nicotiana tabacum*)



Modelová rostlina, historicky první  
 Vyřešená transformace, regenerace  
 Velká biomasa (100 tun listů / ha / rok)  
 Není potravina

Vysoký obsah alkaloidů - prodražuje purifikaci  
 Heterogenní glykosylace

## Tabák (*Nicotiana benthamiana*)



Transientní exprese

Podporuje systémovou replikaci řady virů:

- 1) Transientní exprese virových vektorů (**TMV, PVX**)
- 2) Produkce protilátek proti rostlinným virům

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honys

## Kukuřice (*Zea mays*)



První a dlouho jediná komerčně využívaná obilnina  
 Vysoký podíl endospermu (82%)  
 Vysoký obsah bílkovin v obilkách (10%)  
 Vysoký výnos zrn (8,3 tun / ha / rok)  
 Nejvyšší výnos rekombinantních bílkovin na hektar  
 Vyřešená transformace

Vysoká stabilita aktivních bílkovin (3 měsíce v -29 až +10 °C)

GRAS status, absence toxických látek - jedlé vakcíny, humánní i veterinární

Větroprašná plodina - problém se šířením transgenů prostřednictvím pylu

Diagnostické bílkoviny - **avidin** a **GUS**

Farmaceutické, technické bílkoviny - **protilátky, vakcíny, enzymy**

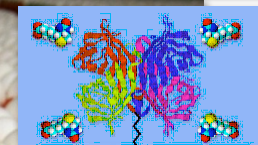
Veterinární farmaka - **TGEV** (Transmissible gastroenteritis virus) **spike protein**



Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honys

## Výnosnost jednoděložných systémů - příklad avidinu

1 tuna slepičích vajec



25% TSP, 2 g/kg obilek  
 Promotor *Ubi1*, targeting do sekreční dráhy,  
 akumulace v mezibuněčném prostoru  
**99.5 % snížení nákladů**



35 l obilek kukuřice

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honys

## Rýže (*Oryza sativa*)

Vysoký podíl endospermu (90%)

Nižší, ale stále vysoký výnos zrn (6,6 tun / ha / rok)

Nižší, ale stále vysoký obsah bílkovin v obilkách (8%)

Vyšší výnosy na jednotku biomasy i než tabák

Samosprašná plodina - redukce problému šíření transgenů prostřednictvím pylu

Osekvenovaný genom, vyřešená transformace, GRAS status



## Ječmen (*Hordeum vulgare*)

Vysoký obsah bílkovin v obilkách (13%)

Nízké náklady

Slibná exprese transgenů (celuláza - 1.5% TSP)

Samosprašná plodina - redukce problému šíření transgenů prostřednictvím pylu



Farmaceutické bílkoviny - **protilátky,  $\alpha$ -interferon, laktoferrin, lysozym, cedrový pylový alergen**

Mírně dražší produkce

Aktuální problém - exprese transgenů (hGM-CSF) aktivuje ubiquitin/26S proteasomovou dráhu degradace bílkovin (Luo et al. 2009)

VENTRIA BIOSCIENCE

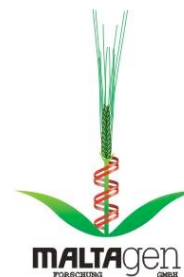


Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honys

Enzymy: **glukanáza, xylanáza, celuláza**

Farmaka: **laktoferrin, lysozym**

Složitější transformace



VENTRIA BIOSCIENCE



Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honys

## Pšenice (*Triticum aestivum*)

Vysoký obsah bílkovin v obilkách (12%)

Nízké náklady

Složitější transformace, slabé expresní kazety

Slabá exprese transgenů

Nižší výnos zrn (2,8 tun / ha / rok)

Zásobní bílkoviny: **legumin**



Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honys

## Klíčící semena jako producent

Promotor ORF Term.

**rbcS**

**GUS, HSA**

**Rubisco**

8xSSU (*rbcS*) + 8xLSU (*rbcL*)  
30-50% bílkovin syntetizovaných de novo v klíčících semenech řepky

**Uspořádání reaktoru**

10l reaktor - 400-800 g semen  
Klíčící médium - voda  
Probublávání vzduchu  
Kultivace 48-96 hodin, tj. 90 dávek/rok

**Výtěžnost**

max. **5% celkových bílkovin**  
0.5-1.5 g / 1 kg semen  
Upscaling: 90 dávek/rok  
1000-2000l reaktor - 9 tun semen  
**405-1215 kg / reaktor / rok**

**Řepka**



**Optimalizace podmínek**

Trvalé světlo  
Mírně zvýšení teploty (25-30°C)  
Fytohormony - auxiny, cytokiny  
Snížení endogenní exprese: represe exprese chloroplastového genomu (antibiotika)  
Snížení exprese Rubisca: antisense *rbcS* mRNA

**UniCrop (Helsinky)**

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honys



## Řepka (*Brassica napus*) Rapeseed/Canola

Vysoký obsah bílkovin v semenech (25%)

Olejová tělíska - targeting produktů, fúze s oleosinem

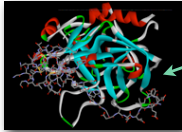
Nízké náklady na purifikaci

Klíčení semen v bioreaktorech - UniCrop (Helsinky)

Produkty - **hirudin** z pijavic *Hirudo medicinalis* (1%TSP), **xylanáza**, **fytáza**

Absence glykosylace zásobních bílkovin

Nížší výnos semen (1 tuna / ha / rok)



Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honyš

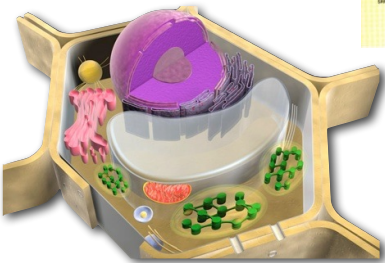
## Sekreční dráha - akumulace v ER

### Akumulace v ER

Interakce s mol. chaperonem BiP

Zabalení bílkoviny

Posttranslační modifikace



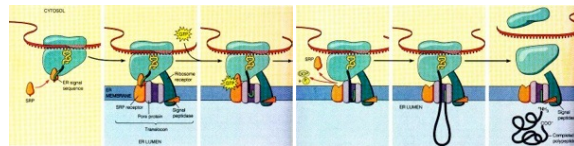
Akumulace ve vakuole

### Lokalizace v ER

N-terminální **signální peptid**

(15-30 hydrofóbních AA)

Kotranslační lokalizace, **SRP**



### Retence v ER

C-terminální signál (**H/KDEL**)

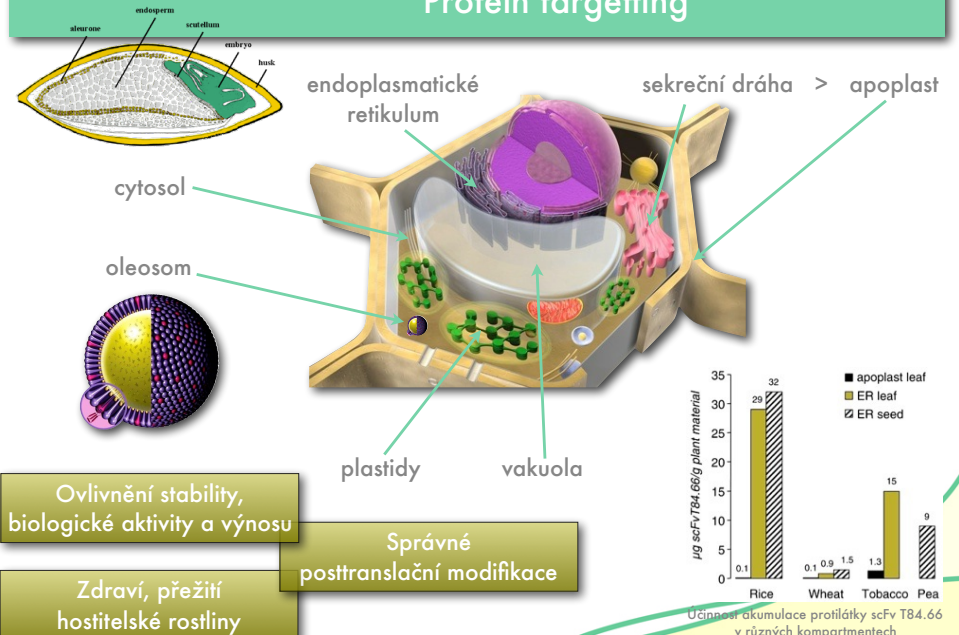
Další 2-10 x zvýšení akumulace

Sekrece produktu do média

Sekrece produktu do apoplastu

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honyš

## Protein targeting



Ovlivnění stability, biologické aktivity a výnosu

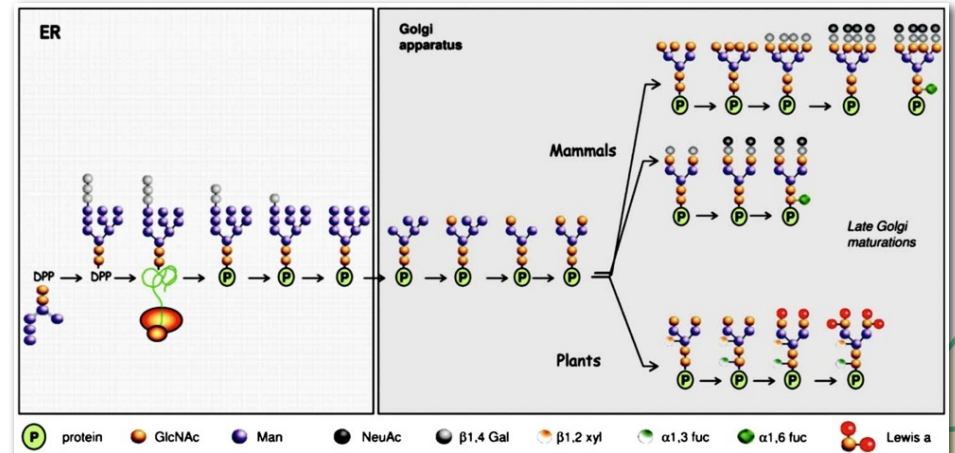
Zdraví, přežití hostitelské rostliny

Správné posttranslační modifikace

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honyš

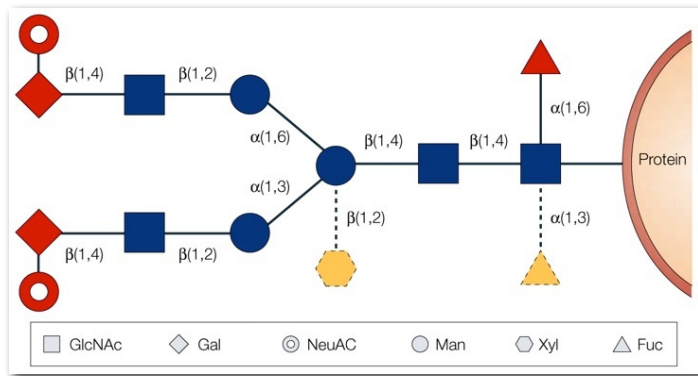
## Glykosylace

... = N-glykosylace ...



Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honyš

## "Humanisace" glykanové struktury



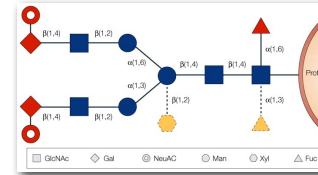
... chybí  
α(1,6)-fucosa  
galaktosa  
kyselina sialová

U rostlin ...

... je navíc  
α(1,3)-fucosa  
β(1,2)-xylosa

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honys

## "Humanisace" glykanové struktury - způsoby



**Prevence N-glykosylace**  
Mutace Asn či Ser/Thr AA  
ALE: řada protilátek potřebuje glykanovou složku pro správnou aktivitu *in vivo*

Cíl: produkce glykosylovaných terapeutických bílkovin nesoucích neimunogenní N-glykany

**Retence bílkovin v ER (H/KDEL)**  
syntéza (nekompletních) neimunogenních N-glykanů mannosového typu

**Inhibice specificky rostlinných glykosyltransferas v Golgi**  
α(1,3)-fukosyltransferasa, β(1,2)-xylosyltransferasa  
inzerční mutagenese (*Arabidopsis*)  
RNAi (*Lemna minor*, *Medicago sativa*)  
homologní rekombinace (*Physcomitrella patens*)

"Humanisace" rostlinných N-glykanů  
exprese savčích glykosyltransferas v rostlinných buňkách  
ALE: targeting do Golgi cisteren

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honys

## "Humanisace" glykanové struktury

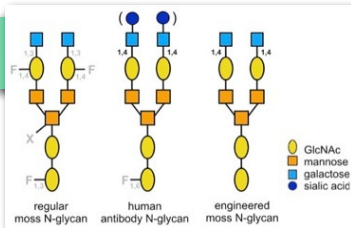
α(1,3)-fukosyltransferasa, β(1,2)-xylosyltransferasa

... inhibice/delete

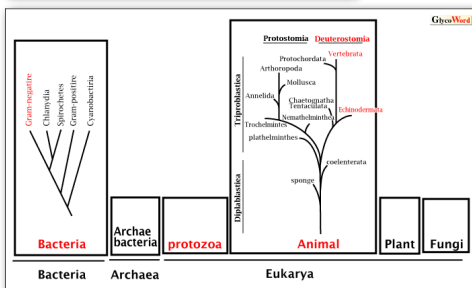
inzerční mutagenese (*Arabidopsis*)  
RNAi (*Lemna minor*, *Medicago sativa*)  
homologní rekombinace (*Physcomitrella patens*)

β(1,4)-galaktosyltransferasa ... inserce

inzerční mutagenese (*Arabidopsis*)  
homologní rekombinace (*Physcomitrella patens*)



Problém: kyselina sialová  
(kys. N-acetylneuraminová, NANA)



Stav: simultánní exprese všech enzymů v jednom expresním systému ...  
GoldenBraid - CRISPR/Cas9

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honys

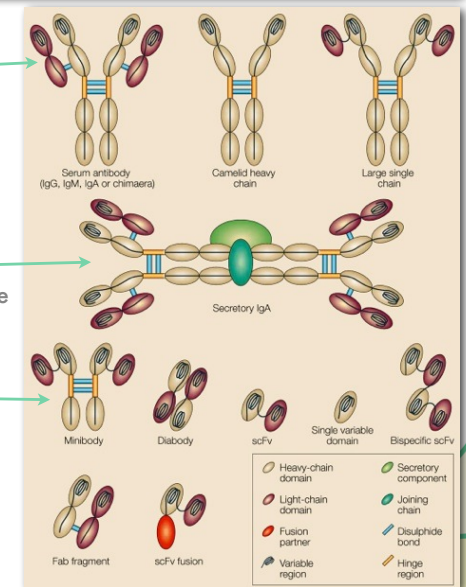
## Expres protilátek

**Protilátky - specifické problémy**

**Sérová protilátka:**  
Tetramer, 2x těžký + 2x lehký řetězec  
Nutné správné zabalení  
Nutná glykosylace

**Sekretovaná protilátka:**  
Sérová protilátka + dva polypeptidové řetězce

**Deriváty protilátek**  
Protilátky vážící se k antigenu univalentně:  
scFv, single variable domain  
Spontánní dimery: Minibody, diabody  
Komplexní deriváty: Bispecific scFv, Fab fragment, ScFv fusion



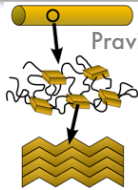
Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honys



## Umělá pavoučí vlákna



Materiál	Mez napětí (N/m <sup>2</sup> )	Elastičita (%)	Tuhost (J/kg)
Závěsné vlákno	4 × 10 <sup>9</sup>	35	1 × 10 <sup>5</sup>
Kokonové vlákno	1 × 10 <sup>9</sup>	> 200	1 × 10 <sup>5</sup>
Kevlar	4 × 10 <sup>9</sup>	5	3 × 10 <sup>4</sup>
Guma	1 × 10 <sup>6</sup>	600	8 × 10 <sup>4</sup>
Šlacha	1 × 10 <sup>9</sup>	5	5 × 10 <sup>3</sup>
Nylon	4 × 10 <sup>7</sup>	200	6 × 10 <sup>4</sup>



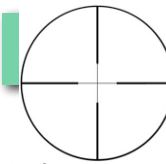
Pravidelné střídání krystalických a amorfních oblastí

### Syntetické geny

Pravidelné repetice základních motivů - celkem až 4 kb mRNA  
Někdy ve fúzi s elastinem - zvýšení elasticity

Vlákno	Použití	Snovací žlázy	Bílkovina	Konsensus sekvence
Závěsné vlákno	Pavučina	Posteriorní	Spidroin MaSp1	GGAGQGGYGLGGQGAGRGLGGQ(GA) <sub>2</sub> A <sub>5</sub>
			Spidroin MaSp11	(GPGGYGPGQQ) <sub>2</sub> GPSGPGSA <sub>8</sub>
Lapací vlákno	Balení kořisti	Anteriorní	Flag	(GPGGX) <sub>43-63</sub> (GGX) <sub>12</sub>

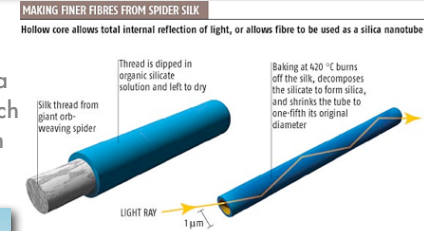
Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honyš



## Produkce a využití (umělých) pavoučích vláken

Nitkové kříže

Výroba optických vláken



Transgenní živočišné Bourec morušový, koza



cíl: 2-15 g/l mléka

Transgenní brambory a tabák  
Promotor CaMV 35S  
Akumulace v ER, až 2% TSP  
Po fúzi s elastinem až 4% TSP

Purifikace  
"Inverse temperature transition"

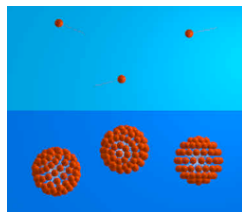


Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honyš

## Pokroky v purifikaci rekombinantních bílkovin

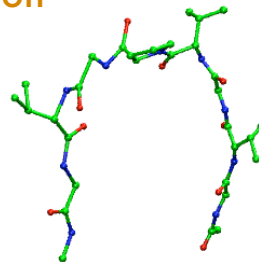
Syntetický polypeptid (GVGVP)<sub>121</sub>

"Inverse temperature transition"



25°C - rozpustný ve vodě

32°C - agregace za vzniku koacervátů



Fúzní protein: Inzulín:(GVGVP)<sub>40</sub>

Purifikace postupným zvyšováním teploty

4°C > 42°C

Relaxovaná molekula

β-spirála

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honyš

## Světlice barviřská (*Carthamus tinctorius*)

Safflower

Vysoký obsah bílkovin v semenech

Olejevá tělíska - targeting produktů, fúze s oleosinem

Nízké náklady na purifikaci

Bezpečný hostitel

Minimální dormance semen, v Kanadě žádný blízký příbuzný

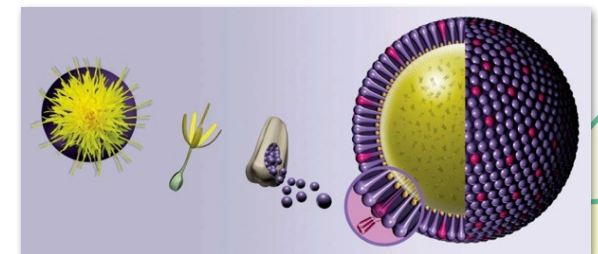
Komerční platforma - semena - SemBioSys (Calgary)



Produkty - insulin, Apo A1



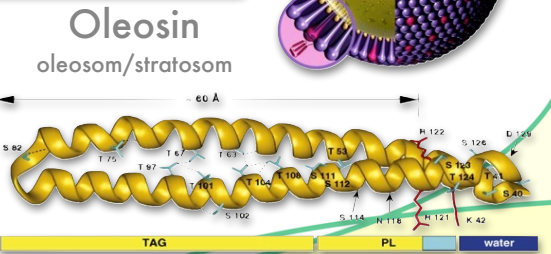
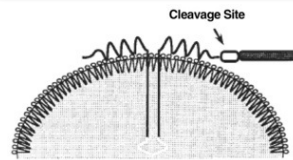
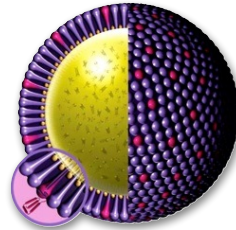
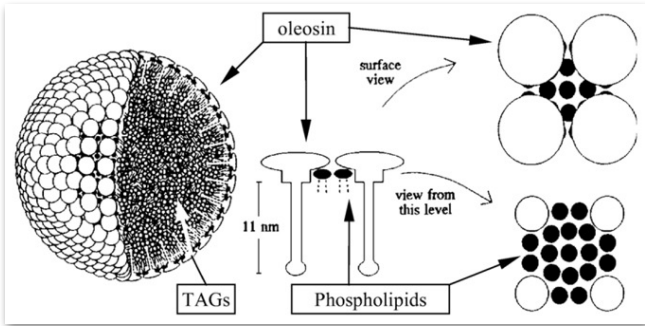
sembiosys



Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honyš

# Světlice barviřská (*Carthamus tinctorius*)

Safflower

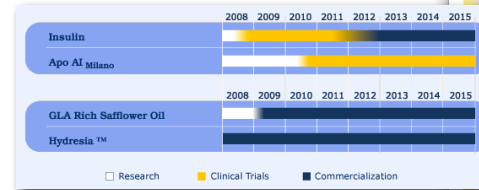


sembiosys

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honyš



sembiosys

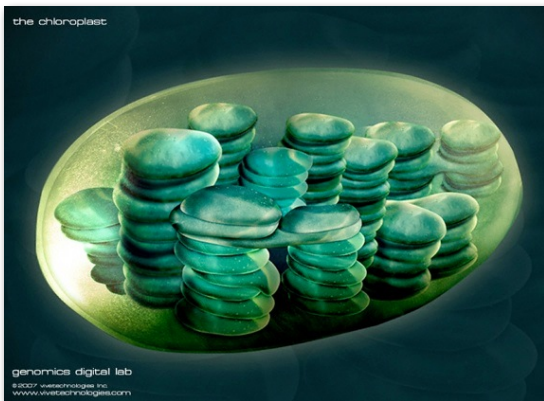


Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honyš

## Expres transgenů v plastidech

Zásadní objev (de Cosa et al. 2001):  
Akumulace bílkoviny Cry2Aa2 (*Bacillus thuringiensis*) v chloroplastech

**46.1 % TSP**



Proč?

polyploidie plastidového genomu  
(10-100 / chloroplast)

10-100 chloroplastů / buňku

Max. 10 000 transgenů / buňku

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honyš

## (Ne)výhody plastidových transgenických systémů

Vysoká míra **expres** (do 47% TSP)

**Maternální dědičnost** chloroplastové DNA

Homologní rekombinace

Místně **specifická integrace** transgenů do spacerových oblastí

**Absence** transkripčního **silencingu**

Expres **operonů** či multigenových kazet

**Cena** - 5% produkce v savčích buněčných kulturách

**Posttranslační modifikace:**

ANO: sbalení bílkovin,  
formování disulfidických můstků  
NE: glykosylace

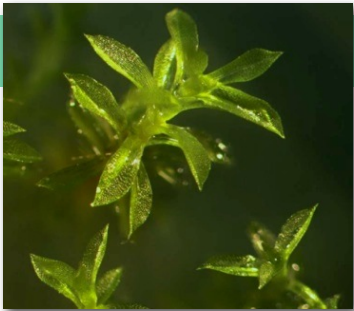
**Drahá purifikace produktů**



Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honyš

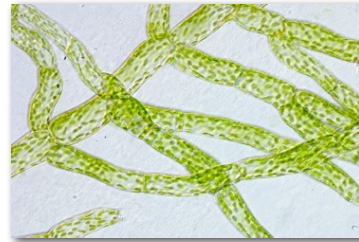
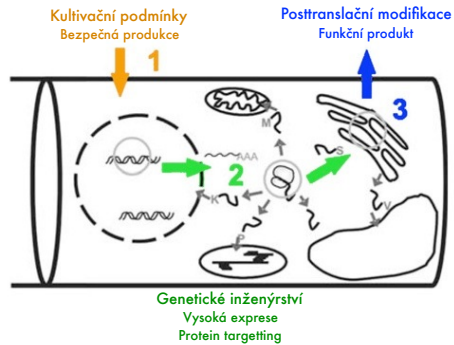




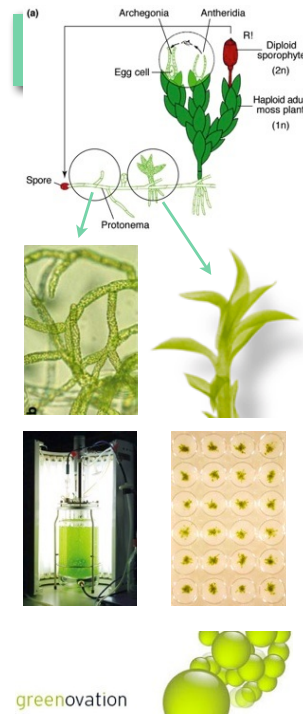


## Physcomitrella patens

- Osekvenovaný genom
- Homologní rekombinace
- Částečně humanizovaná glykosylační dráha
- Produkty - **monoklonální protilátky**
- Transientní expresní systém



Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honyš



## Buněčné kultury Physcomitrella patens

Vegetativní kultury odvozené od protonematu



- Jednoduché médium
- Nízké nároky na světlo
- Rychlá transformace
- Genetická stabilita transformantů

greenovation

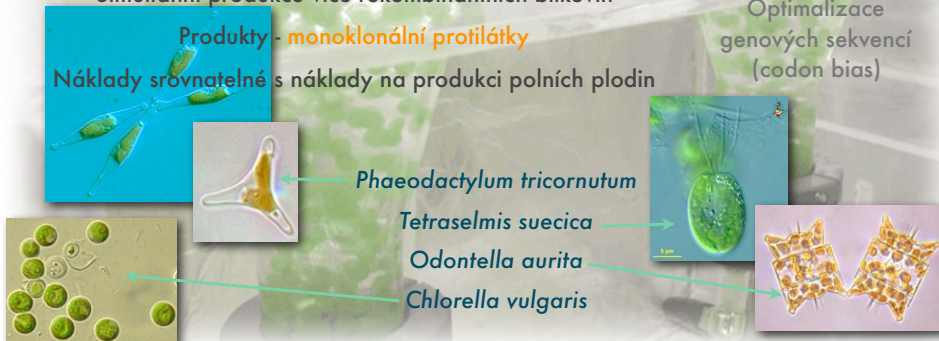
Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honyš

## Chlamydomonas reinhardtii

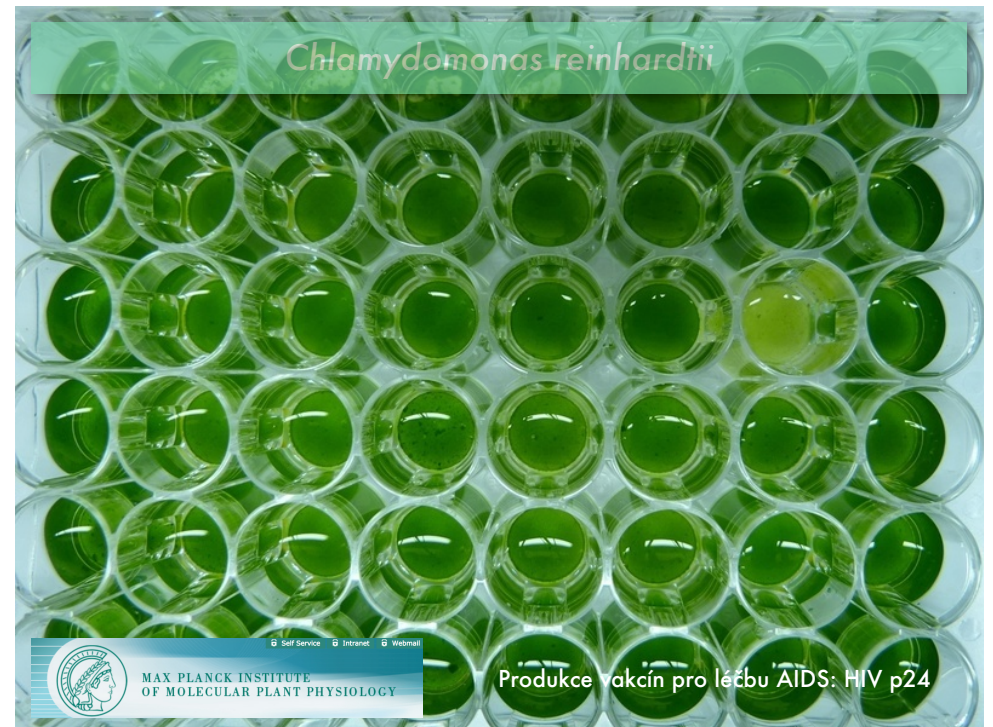
- Model - fotosyntéza, regulace genové exprese světlem
- Levné médium, rychlá transformace
- "Scalability" - desítky ml až 500 000 l
- Rychlý růst, rychlá produkce  
zvojnásobení biomasy za 8 hodin
- Jaderný i chloroplastový expresní systém  
Chloroplast: 200 kb genom, 80 kopií
- Simultánní produkce více rekombinantních bílkovin
- Produkty - **monoklonální protilátky**
- Náklady srovnatelné s náklady na produkci polních plodin



- Absence glykosylace v chloroplastech
- Optimalizace genových sekvencí (codon bias)



## Chlamydomonas reinhardtii



## Okřehek menší (*Lemna minor*) Duckweed

Levné médium  
Variabilní systém, "scalability"  
Rychlý růst  
zvojnásobení biomasy za 24 - 48 hodin



Snadná transformace - *Agrobacterium*, biolistika,  
Částečně humanizovaná glykosylace  
Vysoký obsah bílkovin (30% sušiny)

Produkty - **růstový hormon, interferon- $\alpha$ ,  
monoklonální protilátky, enzymy**

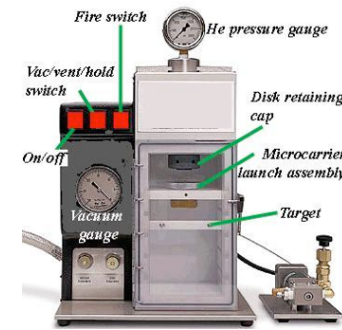


**LEMNA**  
TECHNOLOGIES, INC.  
Čištění odpadních vod

**BIOLEX**  
THERAPEUTICS

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honyš

## Transientní exprese transgenu - virové expresní systémy



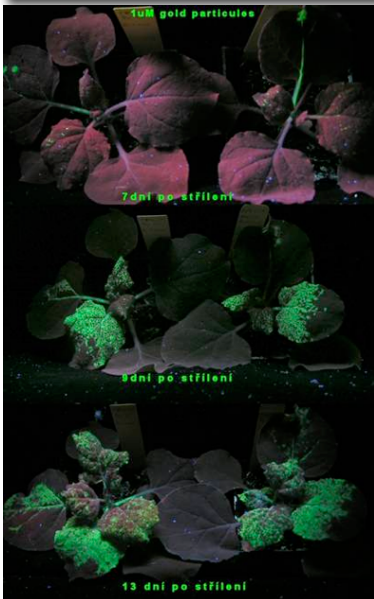
Časová úspora  
Vyšší míra exprese transgenu  
Flexibilita při výběru systému  
Snadná modifikace produktu  
"Scaling"

Fúze s plášťovými proteiny viru  
či jejich nahrazení

Tobacco mosaic virus (TMV)  
Potato virus X (PVX)  
Zucchini yellow mosaic virus  
Plum pox virus  
Cowpea mosaic virus  
Alfalfa mosaic virus (AIMV)  
Tomato bushy stunt virus

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honyš

## Transientní exprese transgenu - virové expresní systémy



Časová úspora  
Vyšší míra exprese transgenu  
Flexibilita při výběru systému  
Snadná modifikace produktu  
"Scaling"

Fúze s plášťovými proteiny viru  
či jejich nahrazení

Tobacco mosaic virus (TMV)  
Potato virus X (PVX)  
Zucchini yellow mosaic virus  
Plum pox virus  
Cowpea mosaic virus  
Alfalfa mosaic virus (AIMV)  
Tomato bushy stunt virus

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honyš

## Purifikace rekombinantních bílkovin

### Jedlé vakcíny

Problém: dávkování



### Protilátky pro pasivní imunizaci

Pasty - zevní aplikace, minimální purifikace

### Technické a zemědělské enzymy

Expese v cílových rostlinách  
(endoglukanáza - brambor, fytáza - včejška, sója)

### Farmaceutické bílkoviny - purifikace



Vysoká akumulace

Sekrece do apoplastu/média



Chromatografie



Specifické zacílení, tagging

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honyš

# Molekulární farmaření

## PRO

- Produkční náklady
- Regulace množství produkce
- Výnosy
- Dostupnost pro spotřebitele
- Bezpečnost

## PROTI

- Produkce funkčních bílkovin - posttranslační modifikace
- Zpracování, purifikace rekombinantních bílkovin
- Přijímání veřejností, politika
- Bezpečnost

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honyš

Product	Application	Plant host(s)	Status *	Company or academic group
<b>Plant-made pharmaceuticals and vaccines - human use</b>				
AB	AB cancer vaccine	Tobacco	Phase II clinical trials	Large Scale Biology, USA *
B subunit of heat labile Escherichia coli toxin LT-B	Oral vaccine against traveller's diarrhoea	Potato, maize	Phase I completed (potato: 1998) *	[89]
Capsid protein Norwalk virus	Vaccine	Potato	Phase I completed (2000) *	[90]
CaroRx™	AB carries prophylaxis	Tobacco	Phase II clinical trials, approved as medical device in the EU in 2003	Planet Biotechnology
DoxoRx™ antibody	Side-effects of cancer therapy	Tobacco	Phase I completed	Planet Biotechnology, USA [88]
Fusion protein, including epitopes from rabies	Vaccine against rabies	Spinach (virus-infected)	Phase I completed *	
Gastric lipase	Cystic fibrosis	Maize	Phase II clinical trials, commercialisation expected for 2009/2010	Meristem Therapeutics, France
Hepatitis antigen	Oral vaccine against hepatitis B	Potato	Phase II clinical trials	Arizona BioIndustry Association
Human glucocerebrosidase (pGCD)	Treatment of Gaucher's disease	Carrot suspension cells	Received FDA approval for Phase II clinical trial of pGCD; marketing expected in early 2008	PROTALIX Biotherapeutics
Insulin	Diabetes	Safflower	Path for clinical trials accepted by FDA, commercialisation expected for 2010	sembiosys
Lactoferrin™ (α interferon)	Hepatitis C	Lemna	Phase II	BIOLEX Therapeutics, USA
RhinoRx™	Common cold caused by rhinoviruses	Tobacco	Phase I/II planned for 2005 *	Planet Biotechnology
<b>Plant-made pharmaceuticals and vaccines - animal use</b>				
Antigen	Vaccine against feline parvovirus	Tobacco	Advanced	Large Scale Biology, USA *
Antigen	Vaccines against papilloma virus	Tobacco	Early	Large Scale Biology, USA *
HN protein of Newcastle disease virus	Poultry vaccine	Tobacco suspension cells	Approved by USDA	Dow AgroSciences
<b>Plant-made pharmaceuticals applied as nutraceuticals</b>				
Human intrinsic factor	Food supplement; vitamin B12 deficiency	Arabidopsis	Approval from Danish authorities for commercial production in greenhouse; market authorisation in Poland	COBENTO
Human lactoferrin	Developed as food supplement: anti-infection, anti-inflammatory and iron-binding properties	Rice	Advanced	Ventria, USA
Human lysozyme	Developed as food supplement: anti-infection, anti-inflammatory and iron-binding properties	Rice	Advanced †	Ventria, USA
Immunosphere™	Carp somatotropin to be used as feed additive for shrimps	Safflower	Only import permits required for USA, Canada or the EU; commercialisation expected for 2008	sembiosys

volný prostor

skleník

zcela uzavřená produkce (buněčné kultury, bioreaktory)

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honyš

## Souhrn polních pokusů s transgenními rostlinami nesoucími geny pro rekombinantní bílkoviny

Rok	USA	Kanada	Evropa	Argentina
1990	0	0	0	0
1991	1	0	0	0
1992	1	0	0	0
1993	2	0	0	0
1994	4	1	0	0
1995	18	2	0	0
1996	19	11	1	0
1997	7	5	0	0
1998	22	2	1	1
1999	20	8	2	0
2000	32	6	0	1
2001	35	3	3	0
2002	12	6	1	0
2003	2	16	1	0
<b>Celkem</b>	<b>175</b>	<b>60</b>	<b>9</b>	<b>2</b>

Přednáška B150P88: BAGIR, KFR PFF UK, David Honyš

## Děkuji za pozornost

