

Box 7.14 Expertenmeinung: Moos wirkt Wunder

Die meisten **rekombinanten Biopharmazeutika** sind komplexe menschliche Glykoproteine, die normalerweise in Säugerzellen produziert werden, so z. B. in CHO (Chinese Hamster Ovary)-Zellen.

Pflanzen sind auf den ersten Blick keine geeigneten Produzenten für menschliche Glykoproteine, und doch werden sie zunehmend als **alternative Produktionssysteme** genutzt. Hier sind einige der Gründe:

- Sie sind einfacher zu kultivieren.
- Sie sind billiger.
- Es gibt kein Risiko der Verunreinigung mit Humanpathogenen.
- Die Aufreinigung, das sogenannte downstream processing, und Sicherheitstests sind direkter und kostengünstiger.

Einige in Pflanzen hergestellte Biopharmazeutika sind in klinischen Studien. Das erste Produkt, Taliglycerase alfa, ein Enzym zur Behandlung von Morbus Gaucher, wurde 2012 von Pfizer/Protalix auf den Markt gebracht.

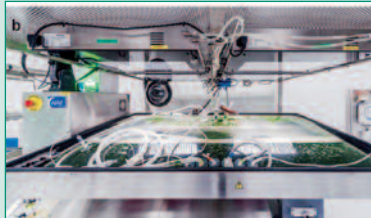
Große Herausforderungen für Pflanzen

Drei große Herausforderungen gilt es zu meistern, bevor Pflanzen auf breiter Front als alternative Produktionssysteme genutzt werden können:

- Die Ausbeute an rekombinanten Produkten muss erhöht werden.
- Obwohl die Grundstruktur der Zucker auf **Glykoproteinen** zwischen Menschen und Pflanzen gleich ist, gibt es spezifische Unterschiede, die die Stabilität, die Effizienz und die Toleranz durch das Immunsystem der Patienten beeinflussen können.
- Um offiziell als Biopharmazeutikum zugelassen zu werden, muss das Produkt nach den Richtlinien des **good manufacturing practice (GMP)** hergestellt werden, und diese schreiben auch die Produktion in geschlossenen Systemen vor.

Moos: Millionen Jahre älter als Spermaphyten (Samenpflanzen)

Unser Team in Freiburg nutzt das Kleine Blasenmützenmoos *Physcomitrella patens* als Produktionssystem für Glykoproteine. Seit den 1980er Jahren habe ich mich auf die Erforschung dieses Moooses konzentriert,



Großtechnische GMP-konforme Einmal-Wave-Reaktoren für die Produktion von Biopharmazeutika im Moos *Physcomitrella patens*. (A) Ein Raum bestückt mit mehreren Wave-Reaktoren. (B) Ein genauerer Blick auf einen Wave-Reaktor und sein Beleuchtungssystem. Die Abbildungen wurden mit Erlaubnis der Veröffentlichung Reski, Parsons und Decker (2015): *Moss-made pharmaceuticals: from bench to bedside. Plant Biotechnology Journal* 13, 1191-1198 entnommen.

zu einer Zeit in der die meisten anderen Forscher begannen, die Acker-Schmalwand *Arabidopsis thaliana* als Modellsystem zu nutzen. Obwohl Moose nie wirklich als Modellsysteme in Mode waren, hat sich viel Wissen über die Jahrhunderte angesammelt. Von Beginn an fühlte ich mich zu den Moosen hingezogen; wegen ihrer geringen Größe, ihrer Fähigkeit, auf reinem Mineralmedium in Petrischalen zu wachsen, und nicht zuletzt wegen der Tatsache, dass sie die meiste Zeit ihrer Entwicklung haploid sind.

Auf dem evolutionären Baum finden sich Moose ungefähr in der Mitte zwischen den einzelligen Algen und den komplexen Samenpflanzen, deren letzter gemeinsamer Vorfahre vor ungefähr **einer Milliarde Jahre** lebte. Moose haben ihre Gestalt in den letzten 400 Millionen Jahren kaum verändert. Es gab sie schon, als die Dinosaurier entstanden und sie sahen auch deren Verschwinden. Obwohl sie niemals wirklich im Rampenlicht standen, waren und sind sie doch **wahre Überlebenskünstler**.

Enabling-Technologien

Über die Jahre konnten wir unbeeindruckt von verschiedenen kurzlebigen Wissenschafts- und Technologietrends unser Moos zu einem **Flaggschiff-Modellorganismus**

entwickeln. Unsere Moose wachsen nicht nur in Petrischalen und Erlenmeyerkolben, sondern auch in großtechnischen Bioreaktoren in reinen Mineralmedien. Sie benötigen keine organischen Zusätze wie Antibiotika, Kohlenstoffquellen oder Wachstumsregulatoren und keine extrem kontrollierten Bedingungen. *P. patens* wurde zuerst transformiert, in dem man Antibiotikaresistenz in das Wildtyp-Moos brachte und die Transformanten so leicht identifizieren konnte.

Das Moos ist aber auch besonders geeignet für das **Gen-Targeting (GT)**. Weil die haploide Wachstumsphase vorherrschend ist, wird GT oft benutzt, um interessante Gene zu zerstören und die Genfunktion von diesen Knock-out-Moosen abzuleiten.

Diese Anwendung war **das erste Beispiel für ein präzises Genom-Engineering bei Pflanzen**, und das schon im Jahre 1998.

Die hohe GT-Rate ist ein klarer Vorteil für ein Glyko-Engineering von Moos gegenüber ähnlichen Verfahren bei Samenpflanzen. Überraschenderweise kann *P. patens* eine Vielzahl von Komponenten der Transkriptions-, Translations- und Sekretions-Maschinerien nutzen, die ursprünglich für die rekombinante Produktion in CHO-Zellen entwickelt und optimiert wurden – eine wirkliche evolutionäre Überraschung!

Das *Physcomitrella* Genom besteht aus ca. 500 Megabasenpaaren. Es wurde vollständig sequenziert – als drittes Pflanzen genom nach *A. thaliana* und *Populus*, der Pappel. Die komplette Genomsequenz ist frei verfügbar über www.cosmoss.org.

Eine Lebens- und Produktionsumgebung für Moose

Wie Pflanzenzellkulturen und Wurzelkulturen können auch Moose in Fotobioreaktoren vermehrt werden, was das Containment in kontrollierter Umgebung vereinfacht. GMP-Richtlinien sind unter solchen Bedingungen einfacher einzuhalten. Die ersten Kulturen wurden in 2 L Folienreaktoren gezogen. Danach folgten Kulturen in 5, 10 und 20 L gerührten Glasreaktoren, die immer noch die Arbeitspferde im Labor sind. Für die kommerzielle Produktion unter GMP-Bedingungen werden zurzeit 100 und 500 L Wave-Reaktoren als Einwegartikel verwendet.

Rekombinante Proteine aus Moos

Verschiedene Proteine wurden bereits in Moos produziert.

Bakterielle beta-Glucuronidase (GUS), bakterielle alpha-Amylase (AMY) und die humane plazenta-sekretierte alkalische Phosphatase (SEAP) wurden als quantifizierbare Reporterproteine eingesetzt. Als Produkt, aber auch als Stabilisator für sekretierte Biopharmazeutika wurde **humanes Serumalbumin (HSA)** im Produktionsprozess koexprimiert.

Weitere in Moos produzierte humane Proteine sind gegen Tumore gerichtete **monoklonale Antikörper** mit erhöhter **antikörperabhängiger zellvermittelter Zytotoxizität (ADCC)**, **vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF)**, **Komplementfaktor H (FH)**, Keratinozyten-Wachstumsfaktor (FGF7/KGF), **epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)**, **Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF)**, **asialo-Erythropoietin (asialo-EPO)**, **alpha-Galaktosidase (aGal)** und **beta-Glucocerebrosidase (GBA)**.

Darüber hinaus wurde ein von mehreren Epitopen der Virushülle abgeleitetes **HIV-Protein** als **möglicher Impfstoff** in Moos produziert.

Sekundärmetabolite

Moose haben wesentlich mehr Gene für den Sekundärstoffwechsel als Samenpflanzen.

Einige Metabolite besitzen bekannte gesundheitsfördernde Eigenschaften. Deshalb ist ein Seitenaspekt der Biotechnologie mit Moosen das *metabolic engineering*, um die Produktion von wirtschaftlich wichtigen Sekundärmetaboliten zu steigern. Ein Durchbruch war in diesem Zusammenhang die Expression der Taxadien-Synthase von *Taxus brevifolia*, einem Enzym, das verantwortlich für die Synthese einer Vorstufe von Paclitaxel ist, eines weit verbreiteten Krebsmedikamentes.

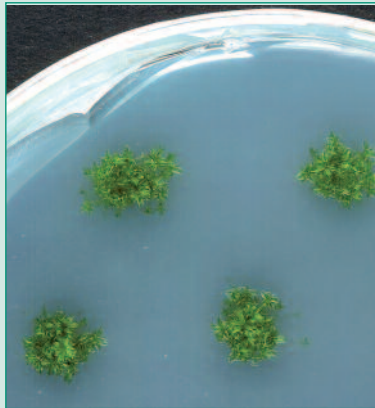
Ein weiterer bedeutender Markt für genveränderte Moose ist die Parfümindustrie. In diesem Zusammenhang wurden eine Patchoulool-Synthase und eine alpha/beta-Santalol-Synthase in Moos exprimiert. Patchoulool und alpha/beta-Santalol sind zwei Sesquiterpenoide, die in Parfüms Anwendung finden.

In Moos produzierter humaner Komplementfaktor und Impfstoffe

Der **humane Komplementfaktor H (FH)** ist ein zentraler Regulator des alternativen Weges der Komplementaktivierung und schützt vor oxidativem Stress. Weil es ein grosses Protein ist (155 kDa) und 40 Disul-



Ralf Reski vor einem Moosbioreaktor.



Bildtext ???

fidbrücken enthält, ist es ein **schwer zu exprimierendes Protein**. Deshalb werden Versuche unternommen, kürzere Versionen, die aber dennoch biologisch aktiv sind, in Insektenzellen zu produzieren.

Das FH-Protein konnte in voller Länge in Moos produziert werden und zeigte sowohl *in vitro* als auch in präklinischen Versuchen an FH-defizienten Knockout-Mäusen *in vivo* volle biologische Aktivität. Rekombinantes FH könnte essentiell sein bei der Behandlung von Nierenerkrankungen wie dem atypischen hämolytisch-urämisches Syndrom (aHUS) und der C3 Glomerulopathie (C3G), sowie für die altersbedingte Makuladegeneration (AMD).

FH aus Moos könnte eine kostengünstigere und verträglichere **Alternative zum monoklonalen Antikörper Eculizumab** sein,

der nur zur Behandlung von aHUS eingesetzt werden darf und erhebliche Nebenwirkungen hat. **Eculizumab ist das weltweit teuerste Biopharmazeutikum mit Behandlungskosten von ca. 400.000 Euro pro Patient und Jahr.**

Verschiedene humane Wachstumsfaktoren wie EGF und HGF, die in Säugerzellkulturen verwendet werden, wurden im Moosystem produziert. FGF7/KGF (Keranozyten-Wachstumsfaktor) ist das erste kommerziell erhältliche humane Protein aus Moos und kann *in vitro* verwendet werden (www.greenovation.com).

Ausgehend von diesen Erfahrungen wurde Moos als **möglicher Produzent von Impfstoffen** vorgeschlagen. Da keine nachteiligen Effekte eines Verzehrs von Moosen bekannt sind, könnten Impfstoff-produzierende Moose direkt oral eingenommen werden. Damit könnte man eine teure Proteinaufreinigung vermeiden, was die Impfstoffe preiswerter machte.

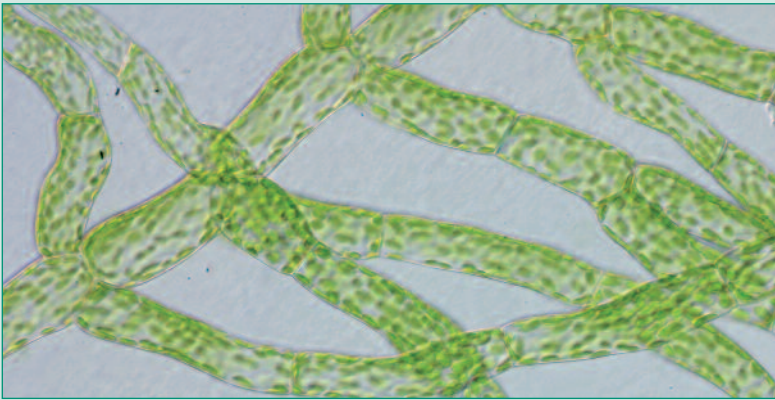
Biobetters aus Moos

Pflanzen werden als alternative Produktionssysteme immer beliebter, weil sie eine kostengünstigere Produktion bei gleichzeitig erhöhter Sicherheit ermöglichen. Humane Proteine können in ihnen ähnlich wie in CHO-Zellen produziert werden. Für die Produktion solcher Biosimilars muss aber umfassendes Glykoengineering betrieben werden.

Die inhärenten Unterschiede zwischen Pflanzen und Säugetieren könnten aber Pflanzen als Produktionsorganismen bevorzugen. Zumindes in einigen Fällen produzieren sie Biopharmazeutika von überlegener Qualität, sogenannte Biobetters. Hier sind einige Beispiele: ein glyko-optimierter Antikörper, der entwickelt wurde, um Tumor-assoziierte Glykosylierungsmuster zu erkennen, wurde in Moos produziert. Er induzierte **vierzigmal effektiver** in drei verschiedenen Tumorzelllinien eine Lyse als der gleiche Antikörper aus CHO-Produktion.

Morbus Gaucher und **Morbus Fabry** sind zwei seltene Erkrankungen, bei denen eine Enzymersatztherapie angezeigt ist.

Beide humanen Enzyme, **alpha-Galaktosidase (aGal)** für Fabry und **beta-Glucocerebrosidase (GBA)** für Gaucher, werden in Moos hergestellt. Eine detaillierte Analyse der Glykanstrukturen aus verschiedenen Batches ergab eine höhere Homogenität und



Bildtext ???

eine **signifikant erhöhte Batch-zu-Batch Stabilität** im Vergleich zu kommerziell erhältlichen, in Säugerzellen hergestellten vergleichbaren Medikamenten. Deshalb ist Moos in der Lage, **Biopharmazeutika von überlegener Qualität** zu produzieren. In Moos produzierte aGal hat erfolgreich alle vorgeschriebenen Toxizitätstests durchlaufen. Es ist **das erste in Moos produzierte Pharmazeutikum in klinischen Versuchen**. Somit wurde das Etappenziel „Vom Moos in den Menschen“ schon erreicht.

Asialo-EPO, ein nützliches und sicheres EPO

Erythropoietin (EPO) ist ein Hormon (Zytokin), das an der Reifung der roten Blutkörperchen (Erythrozyten) im Knochenmark beteiligt ist. Darüber hinaus hat es noch eine Reihe anderer Effekte; u. a. in der Nierenfunktion, beim Wachstum der Blutgefäße (Angiogenese) und bei der Bildung von Nervenzellen (Neurogenese).

Ferner wurde gezeigt, dass es die Immunabwehr steigert und den programmierten Zelltod (Apoptose) verhindert – um nicht nur den illegalen Gebrauch in verschiedenen Sportarten zu erwähnen. Funktionelles EPO wurde in Moos produziert.

Das resultierende **asialo-EPO** war von außerordentlich hoher Homogenität. Diese Glykoform des EPO kann die Reifung der Erythrozyten nicht stimulieren und deswegen nicht für Doping missbraucht werden. Aber es hat neuroprotektive und anti-apoptische Funktionen.

Deshalb könnte in Moos produziertes asialo-EPO ein sicheres Biobetter für verschiedene Indikationen sein (siehe Cartoon am Ende dieses Kapitels).

Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten wurde das Moos *Physcomitrella patens* von Grund auf zu einem Flaggschiff-Modellorganismus für die Grundlagenforschung und für die Biotechnologie entwickelt. Einige zentrale Eigenschaften des Moossystems sind ein vollständig sequenziertes Genom, herausragende Möglichkeiten für gezielte Genomveränderungen (*genome engineering*), die zertifizierte GMP-konforme Produktion in Bioreaktoren, das erfolgreiche Upscaling in großtechnische 500 L Wave-Reaktoren, die herausragende Homogenität hinsichtlich Proteinglykosylierung und Batch-zu-Batch Stabilität und eine sichere Kryokonservierung von Produktionszelllinien (*master cell banks*).

Ralf Reski

(Jahrgang 1958) studierte Biologie, Chemie und Pädagogik im Lehramt. Er war Heisenberg-Stipendiat der Deutschen Forschungsgemeinschaft DFG und wurde 1999 zum ordentlichen Universitätsprofessor und Ordinarius für Pflanzenbiotechnologie an die Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau berufen. Im selben Jahr war er einer der Gründer der Firma Greenovation Biotechnologie GmbH. Im Jahr 2011 wurde er als *Senior Fellow* an das *Freiburg Institute for Advanced Studies* (FRIAS) und als ordentliches Mitglied der Heidelberger Akademie der Wissenschaften berufen. Im Jahr 2013 wurde er als *Senior Fellow* an das *Institute for Advanced Study* der Universität Strasbourg, Frankreich (USIAS) berufen.



Literatur:

- Büttner-Mainik, A., J. Parsons, H. Jérôme, A. Hartmann, S. Lamer, A. Schaaf, A. Schlosser, P.F. Zipfel, R. Reski und E.L. Decker (2011): Production of biologically active recombinant human factor H in *Physcomitrella*. *Plant Biotechnol. J.* **9**, 373–383.
- Decker, E.L. und R. Reski (2004): The moss bioreactor. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 166–170.
- Häffner, K., J. Parsons, L.L. Bohlender, S. Hoernstein, H. Niederkrüger, B. Fode, A. Busch, N. Krieghoff, J. Koch, A. Schaaf, T. Frischmuth, P.F. Zipfel, M. Pohl, R. Reski, E.L. Decker und S. Michelfelder (2017): Treatment of experimental C3 Glomerulopathy by human complement factor H produced in glycosylation-optimized *Physcomitrella patens*. *Molecular Immunology*. **89**, 120. DOI: 10.1016/j.molimm.2017.06.050.
- Koprivova, A., C. Stemmer, F. Altmann, A. Hoffmann, S. Kopriva, G. Gorr, R. Reski und E.L. Decker (2004): Targeted knockouts of *Physcomitrella lacking* plantspecific immunogenic N-glycans. *Plant Biotechnol. J.* **2**, 517–523.
- Michelfelder, S., J. Parsons, L.L. Bohlender, S.N.W. Hoernstein, H. Niederkrüger, A. Busch, N. Krieghoff, J. Koch, B. Fode, A. Schaaf, T. Frischmuth, M. Pohl, P.F. Zipfel, R. Reski, E.L. Decker und K. Häffner (2016): Moss-produced, glycosylation-optimized human factor H for therapeutic application in complement disorders. *J. Americ. Soc. Nephrol.* **28**, 1462–1474.
- Parsons, J., F. Altmann, C.K. Arrenberg, A. Koprivova, A.K. Beike, C. Stemmer, G. Gorr, R. Reski und E.L. Decker (2012): Moss-based production of asialo-erythropoietin devoid of Lewis A and other plant-typical carbohydrate determinants. *Plant Biotechnol. J.* **10**, 851–861.
- Reski, R. (1998): Development, genetics and molecular biology of mosses. *Bot. Acta* **111**, 1–15.
- Reski, R. (1998): *Physcomitrella* and *Arabidopsis*: the David and Goliath of reverse genetics. *Trends Plant Sci.* **3**, 209–210.
- Reski, R. und W. Frank (2005): Moss (*Physcomitrella patens*) functional genomics - Gene discovery and tool development, with implications for crop plants and human health. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* **4**, 48–57.
- Reski, R., J. Parsons und E.L. Decker (2015): Moss-made pharmaceuticals: from bench to bedside. *Plant Biotechnol. J.* **13**, 1191–1198.