

БИОТЕХНОЛОГИЯ

Лекарство из мха

Биореакторы для производства
лекарственных препаратов

Профессор Ральф Рески,
Кафедра биотехнологии растений,
Университет Альберта-Людвига, Фрайбург

Для лечения нарушения обмена веществ у больных диабетом используют инсулин, произведенный бактериями. Все большее применение в медицине находят и другие белки, ферменты и антитела, полученные с использованием генно-инженерных технологий. Такие рекомбинантные белки, называемые также комплексными биофармацевтическими препаратами, применяют как для диагностики, так и для лечения различных заболеваний.

Сейчас уже сложно представить, что в прошлом инсулин получали из отходов скотобоен, после чего очищали и разливали в ампулы. Очевидно, что это было связано с риском загрязнения, и, следовательно, потенциальной опасностью для пациентов. Сегодня большинство комплексных биофармацевтических препаратов получают с помощью с помощью генной инженерии, т.е. технологии рекомбинантных ДНК, что позволяет заметно повысить качество продукции. Кроме того, с помощью с помощью генно-инженерных технологий можно производить белки, не встречающиеся в природе и в то же время имеющие гораздо больший лечебный эффект.

Простые и сложные белки

Простые белки, такие как инсулин, производят с помощью бактерий и грибов с небольшими затратами. Для производства сложных белков, в молекулы которых входят остатки сахаров, необходимо использование более сложных организмов. В настоящее время промышленность в основном производит такие гликопротеины в биореакторах для культивирования генетически модифицированных клеток животных. Но поскольку такие клетки очень требовательны к условиям выращивания и могут содержать скрытых возбудителей заболеваний, во всем мире ведутся исследования способов модификации растений с целью получения рекомбинантных биофармацевтических препаратов.

Это начиналось как узкоспециализированное исследование

Когда более 20 лет назад мы начали работать с маленьким мхом-фискомитреллой (*Physcomitrella patens*) с помощью молекулярно-биологических методов, это было в значительной степени узкоспециализированным исследованием. До возможного биотехнологического применения было очень далеко. Мы научились культивировать мох в простых жидких средах в биореакторах и генетически его модифицировать. Ученые из Лозаннского университета обнаружили, что этот мох, подобно дрожжам, способен очень точно встраивать в свой геном молекулы ДНК. Мы использовали эту эффективную гомологичную рекомбинацию для целенаправленного «выключения» или изменения генов мха. Полученный в результате выключения гена «нокаутный» мох теряет кодируемое им свойство и отличается от первоначального, так называемого дикого типа. Кроме того, нам удалось показать, что при «пересадке» человеческого гена в геном мха последний начинает эффективно производить человеческий белок. Таким образом, все основные составляющие сегодняшнего биореактора на основе мха были под рукой. Большинство последующих работ мы провели в



Биореактор с растущей культурой мха *Physcomitrella patens*

The new sense of flaming
schuett phoenix II: Tomorrows Bunsen Burner Generation

*I speak your language. I guarantee highest safety.
I make you fast and flexible.*

schuett-biotec.de



schuett-biotec GmbH
Rudolf-Wissell-Straße 13
D-37079 Göttingen, Germany
Fon +49 (0) 551/5 04 10-0
info@schuett-biotec.de



Вот уже более 20 лет Ральф Рески из Фрайбургского университета занимается исследованиями маленького мха, *Physcomitrella patens*.

Ральф Рески изучал биологию, химию и педагогику в университетах Гиссена и Гамбурга. В 1990 г. в Гамбурге он защитил диссертацию в области генетики и там же в 1994 г. защитил докторскую диссертацию в области общей ботаники. С 1996 по 1999 гг. Рески был стипендиатом программы Гейзенберга Немецкого фонда научных исследований. В 1999 г. его пригласили во Фрайбургский университет на должность профессора и заведующего кафедрой, где он возглавил только что созданную Кафедру биотехнологии растений. С 2004 г. он также преподает в Высшей биотехнологической школе в Страсбурге (ESBS). Также Рески руководит научными исследованиями в двух организациях, финансируемых по линии программы поддержки лучших научных центров Германии (Exzellenzinitiative): Высшей школы биологии и медицины Шпемана (SGBM) и Центра группы поддержки исследований передачи биологического сигнала (BIOSS).

рамках совместных проектов, получивших щедрую поддержку со стороны Министерства образования и науки Германии.

Гуманизированные белки мха

Немного растений можно культивировать в биореакторе. В то же время, в теплице и, тем более, на поле, невозможно контролировать условия в соответствии с GMP – правилами организации и контроля производства лекарств. Кроме того, хотя белки растений и «украшены» теми же углеводными цепями, что и наши человеческие белки, в растительных гликопротеинах встречаются два типа сахаров, отсутствующие у человека. Эти специфичные для растений остатки сахаров, помимо прочего, вызывают сенную лихорадку – аллергическую реакцию, недопустимую при приеме биофармацевтических препаратов. Мы идентифицировали отвечающие за это гены мха и целенаправленно их выключили. Совместно с коллегами из Венского университета мы показали, что все гликопротеины мха теперь «гуманизированы».



Фотография: Др. Михаэла Азар-Ариф

Изображение мха, полученное с помощью сканирующей электронной микроскопии.

Удивительным оказалось то, что полученный таким образом нокаутный мох рос в биореакторе так же хорошо, как и мох дикого типа, и так же хорошо вырабатывал рекомбинантный белок. Это наблюдалось и после того, как мы дополнительно внедрили в мох гены человека, отвечающие за синтез специ-



Фотография: Инерид Хехер

Выращивание аксенической (чистой) культуры *Physcomitrella patens in-vitro* на чашке Петри с агаром.

фичных для человека сахаров. С помощью такого «гликодизайна» к вырабатываемым мхом белкам были направленно присоединены сахара с различной структурой, что увеличило их сохранность и биологическую эффективность.

Эффективные антитела

Биотехнологической фирме «Greenovation» («Гриновация») из Фрайбурга удалось получить в биореакторе на основе мха моноклональные антитела, оказавшиеся при тестировании в сорок раз активнее аналогичных антител, полученных в культуре животных клеток. Разумеется, такое радикальное улучшение является важнейшим преимуществом с коммерческой точки зрения. Кроме того, по сравнению с биореакторами на основе культур клеток животных у биореактора на основе мха есть еще одно преимущество: мы обнаружили, что мох выделяет белки в среду для выращивания, если перед последовательностью, кодирующей этот белок, вставить короткую сигнальную последовательность. Совместно с коллегами из Центра анализа биосистем (ZBSA) г. Фрайбурга нам удалось показать, что при переносе белка из клетки мха в среду происходит отщепление этого сигнального пептида, и в среде накапливается полноценный и биологически активный белок. Продукт может быть очищен от среды относительно просто и с небольшими затратами, не разрушая вырабатывающие его клетки мха. Такая сравнительно недорогая технология производства и выделения конечного продукта – еще одно коммерческое преимущество биореактора на основе мха.

Непрерывное производство биопродукции

Мхи – очень неприхотливые растения. Для выработки ценных белков, помимо недорогих неорганических веществ и воды, им требуется только свет и парниковый газ CO₂. Кроме того, в природе мхи произрастают в разнообразных условиях, что позволяет менять условия выращивания в биореакторе в самых широких пределах, оптимизируя их для получения каждого конкретного белка. Даже человек, далекий от науки, заметит еще два преимущества такого производства: В биореакторе на основе мха не образуется пены и отсутствует неприятный запах. Этого нельзя сказать о биореакторах с культурами клеток животных. Исследователи фирм Greenovation и Sartorius Stedium Biotech (Сарториус Стедиум Биотех) из Гёттингена совместно с Технологическим институтом г. Карлсруэ (KIT) уже сконструировали фотобиореактор, рассчитанный на объем культуры мха 100 л, производящий биофармацевтическую продукцию с соблюдением условий GMP.

Системная и синтетическая биология

В настоящее время мы используем методы системной биологии, чтобы моделировать рост и производительность мха в биореакторе, целенаправленно их изменяя и таким образом оптимизируя. Совместно с коллегами из Швейцарской высшей технической школы (ETH) Цюриха мы обнаружили, что *Physcomitrella* может эффективно использовать регуляторные элементы генома вирусов и млекопитающих для регуляции собственных генов. Оказалось, что эффективны даже полностью синтетические регуляторные элементы. Так, вместе с коллегами из Института биологии развития Макса Планка в Тюбингене мы сконструировали синтетические молекулы микроРНК, позволяющие целенаправленно и дозированно модулировать экспрессию генов мха.

Недавно нам удалось наладить производство рекомбинантного белка, играющего важную роль в иммунном ответе человека и до настоящего времени недоступного в качестве лекарства. Поэтому

он получил от ЕС статус лекарства для лечения редких заболеваний. Совместно с коллегами из Института Ханса Кнёлля в Йене мы показали, что этот белок, так называемый фактор комплемента Н, полученный посредством биотехнологии в биореакторе с использованием мха, полностью функционален.

Таким образом, с помощью методов синтетической биологии была подготовлена почва для еще большего повышения эффективности маленького мха-фискомитреллы как производителя лекарственных препаратов на благо человека.

→ ralf.reski@biologie.uni-freiburg.de

Литература:

Büttner-Mainik, A., J. Parsons, H. Jérôme, A. Hartmann, S. Lamer, A. Schaaf, A. Schlosser, P.F. Zipfel, R. Reski, E.L. Decker (2010): Production of biologically active recombinant human Factor H in *Physcomitrella*. *Plant Biotechnology Journal*, doi: 10.1111/j.1467-7652.2010.00552.x
Decker, E.L., R. Reski (2007): Moss bioreactors producing improved biopharmaceuticals. *Current Opinion in Biotechnology* 18, 393-398.



Не тратьте время на медленную фильтрацию.

Новые вакуумные насосы ME 1 и ME 1C



Фильтрация является наиболее частым применением вакуума в лабораториях. Отличительной особенностью новых мембранных насосов ME 1 и ME 1C является: высокая производительность, компактный дизайн и удобство в работе. Это идеальные помощники для одно- и многоступенчатой фильтрации и аспирации. Насос ME 1C, кроме всего, имеет высокую химическую стойкость.



VACUUBRAND GMBH + CO KG
Alfred-Zippe-Straße 4 · 97877 Wertheim · Germany
Тел.: +49 9342 808-0 · Факс: +49 9342 808-450
info@vacuubrand.de · www.vacuubrand.com

Технология вакуумных систем