

*Растение как
«биореактор» для
производства
лекарственных
препаратов*

Татьяна Валерьевна Комарова, д.б.н.

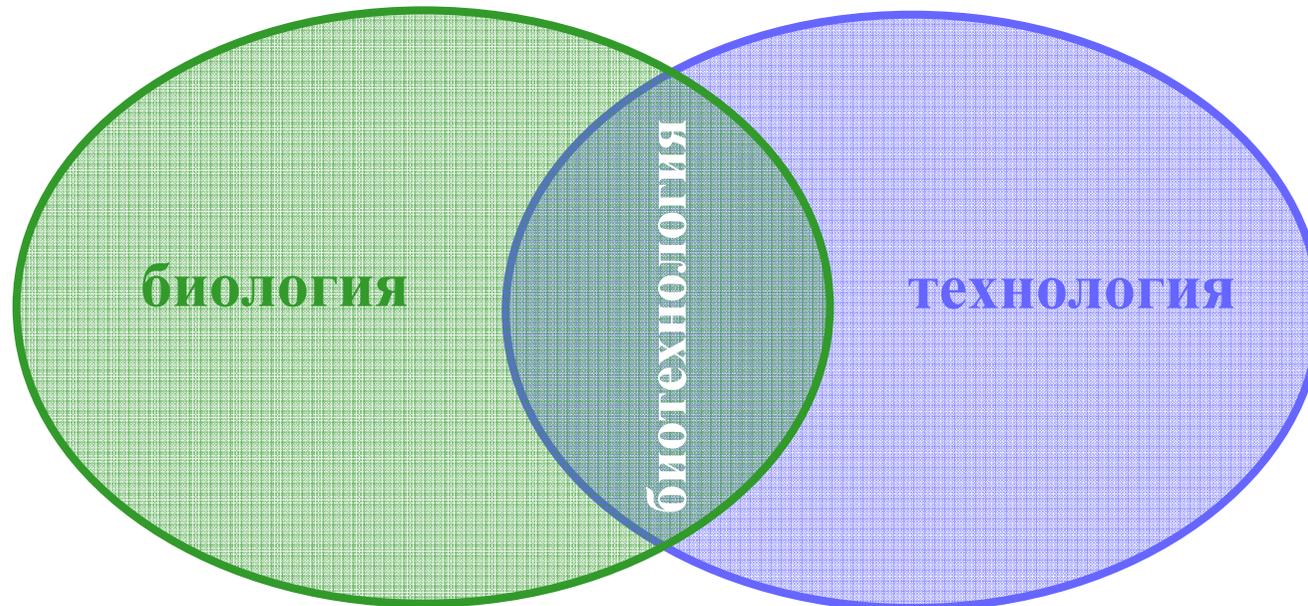
О чем пойдет речь



- что такое биотехнология?
- генная инженерия и молекулярное клонирование
- генетический код, ген и выражение гена
- растение и человек
- "стволовые клетки" растений – тотипотентность
- создание первых трансгенных растений
- способы введения новых генов в растение
- растения как природные источники лекарственных веществ
- растения как "биореакторы"



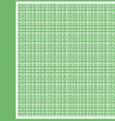
Что такое биотехнология?



**ТЕХНОЛОГИЯ, основанная на
БИОЛОГИИ**



Что такое биотехнология?



- человечество использовало микроорганизмы в течение более чем 6000 лет, чтобы сделать такие пищевые продукты, такие как хлеб и сыр



...а также пиво и вино



Что такое биотехнология?



- использование биологических процессов, организмов, клеток или клеточных компонентов для разработки новых технологий
- биотехнология также дает возможность создания живых организмов с необходимыми свойствами
- области применения:
 - хлебопечение,
 - виноделие,
 - пивоварение,
 - приготовление кисломолочных продуктов
 - получение ацетона, бутанола и др.,
 - синтез антибиотиков, витаминов, кормового белка,
 - производство биотоплива



ГМО

...и другие





Генетическая инженерия и
молекулярное клонирование –
это основа современной
биотехнологии

Основные методы биотехнологии



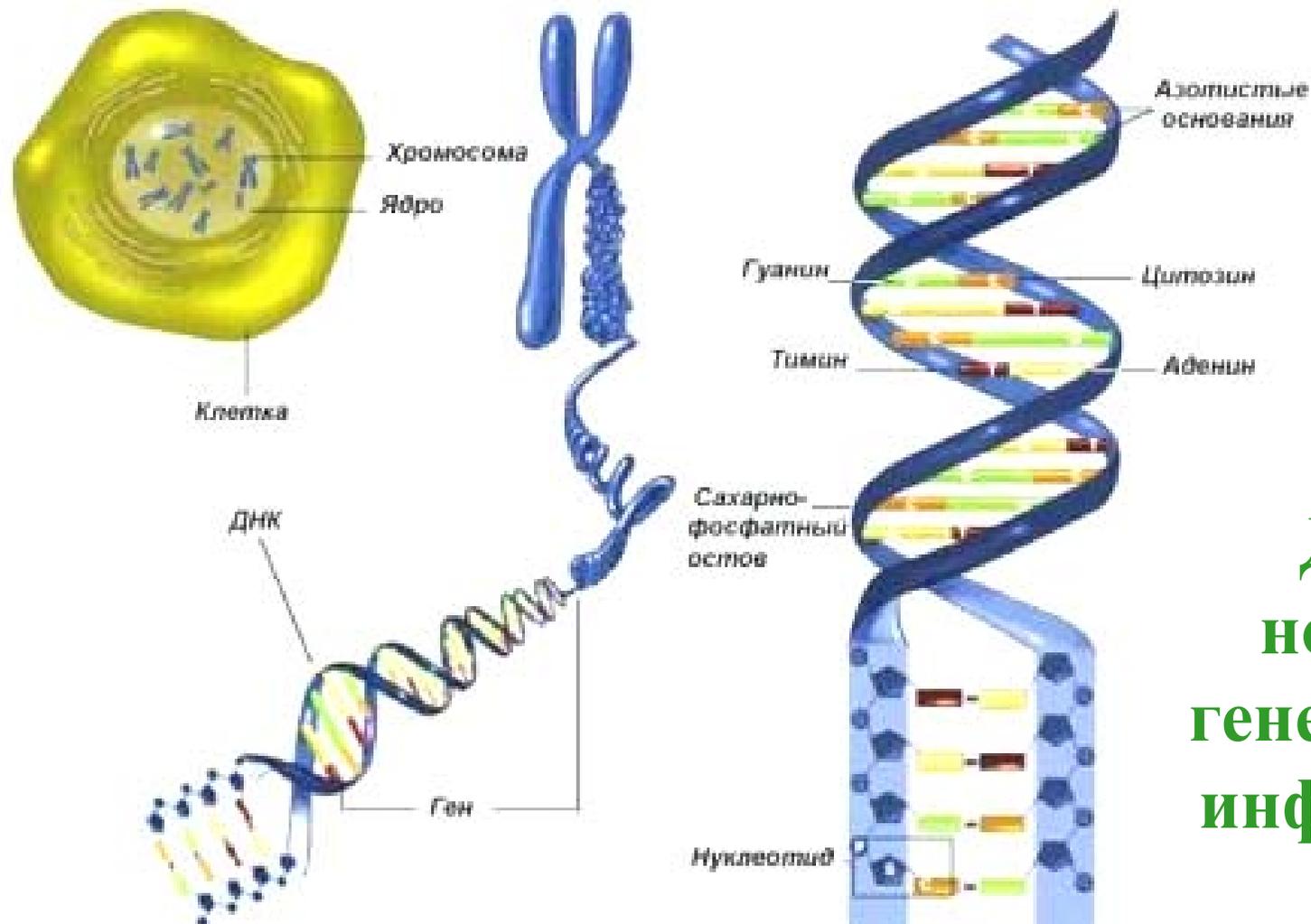
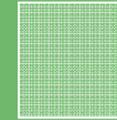
- **Генетическая инженерия**

совокупность приёмов, методов и технологий получения рекомбинантных РНК и ДНК, выделения генов из организма (клеток), осуществления манипуляций с генами и введения их в другие организмы

- **Молекулярное клонирование**

воспроизведение молекул ДНК, т.е. наработка большого количества идентичных ДНК-молекул с использованием живых организмов

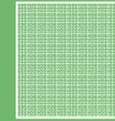
ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота



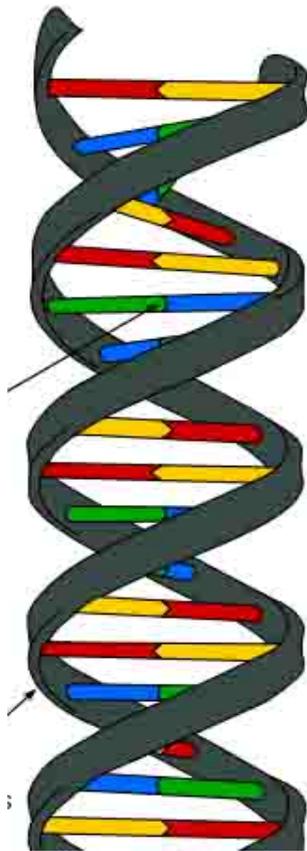
**ДНК –
носитель
генетической
информации**



ДНК – РНК



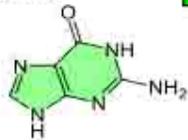
ДНК



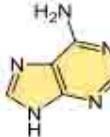
Cytosine **C**



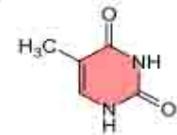
Guanine **G**



Adenine **A**

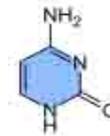


Thymine **T**

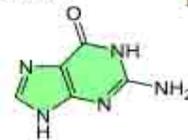


РНК

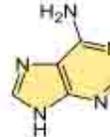
Cytosine **C**



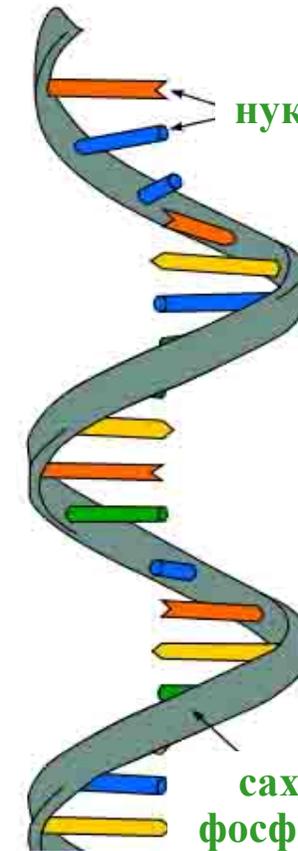
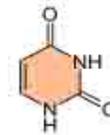
Guanine **G**



Adenine **A**



Uracil **U**



нуклеотиды

сахаро-фосфатный остов

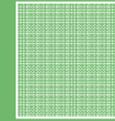
Генетический код



- способ записи и хранения информации о первичной структуре белков через последовательность нуклеотидов ДНК и РНК
- генетический код универсален для всех организмов на Земле



Что делают белки в клетке?



почти **ВСЁ!**

В билете на экзамене по биологии абитуриенту попался вопрос: «Что делают белки в клетке?»



Его ответ был таков: «Белки в клетке пьют воду из поилки, едят орешки, крутятся в колесе».

- Белки – это стройматериал, из которого состоит цитоскелет – «каркас» живой клетки
- Белки – это двигатели организма
- Белки – ферменты-катализаторы, управляющие многочисленными химическими реакциями
- Белки – отвечают за транспорт, который переносит молекулы разных веществ через мембрану клетки и доставляет их в нужное место.
- Белки – это защита
- Синтез ДНК и РНК, а также белка обеспечивается еще десятком специализированных белков
-и так далее.



Использованы материалы сайта polit.ru

ДНК – РНК - белок

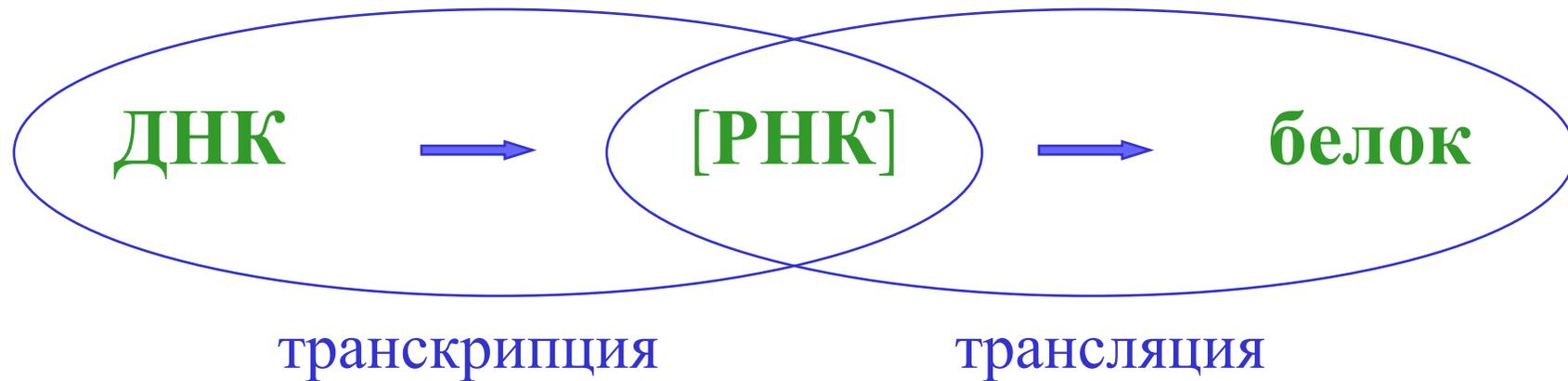


information → [Infə meɪʃən] → информация

слово

транскрипция

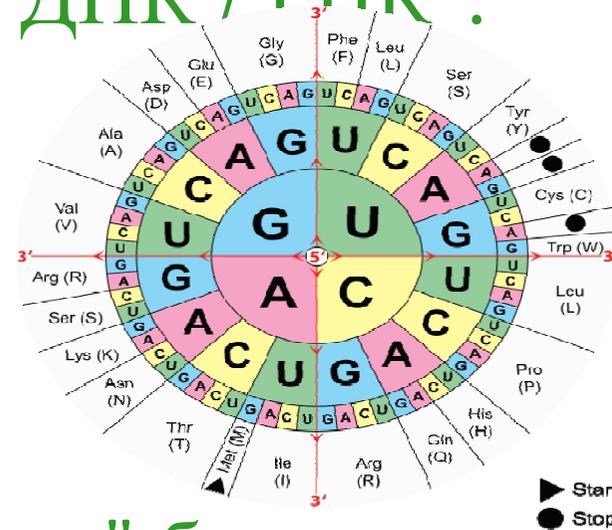
перевод



Генетический код



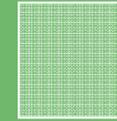
- 4 основания – "алфавит" ДНК / РНК*:
 - аденин
 - гуанин
 - цитозин
 - тимин / урацил*
- 20 аминокислот – "алфавит" белков
- соответствие дает триплетный код



«Aminoacids table» Moua;
Общественное достояние
Викисклада



Генетический код



Георгий
Антонович
Гамов



Роберт
Холли



Хар Гобинд
Корана



Маршалл
Ниренберг

- предположил триплетный код (1954 г.)
- получили Нобелевскую премию за расшифровку генетического кода (1968 г.)



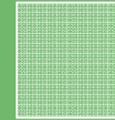
ИТАК:



- все живые организмы используют универсальный генетический код: алфавит из 4 нуклеотидов и 20 аминокислот
- можно брать ДНК из разных организмов и комбинировать ее!
- возможность создания живых организмов с необходимыми свойствами

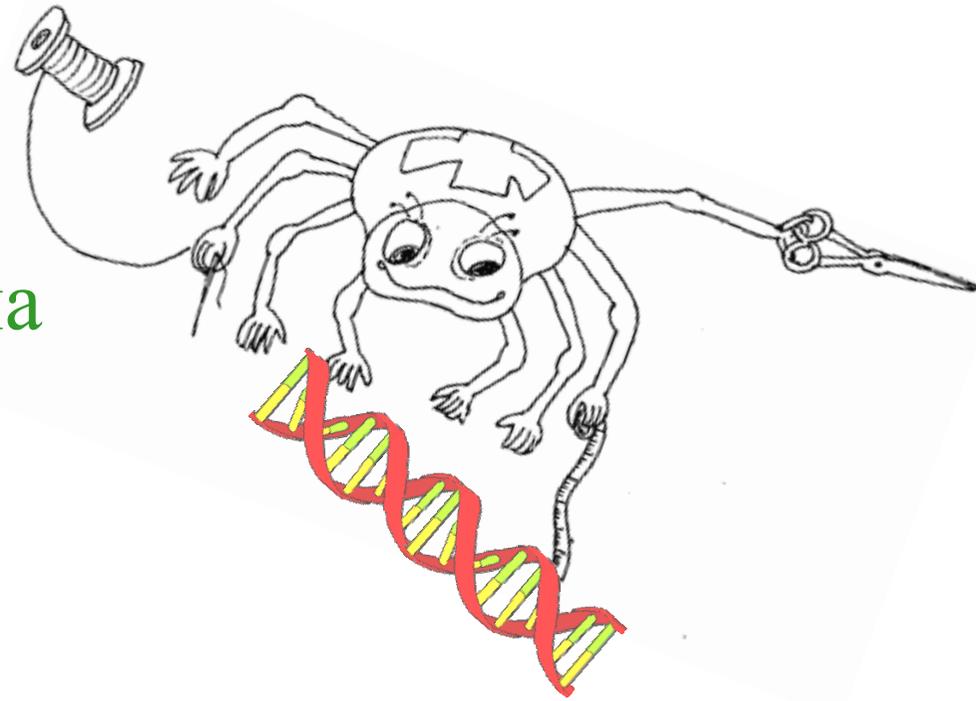


Как же "препарируют" ДНК?

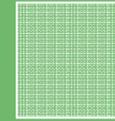


ДНК можно:

- извлечь из организма
- "размножить"
- "разрезать"
- "сшить"
- поместить обратно в нужный организм



Генная инженерия: Вt-кукуруза



Огневка кукурузная

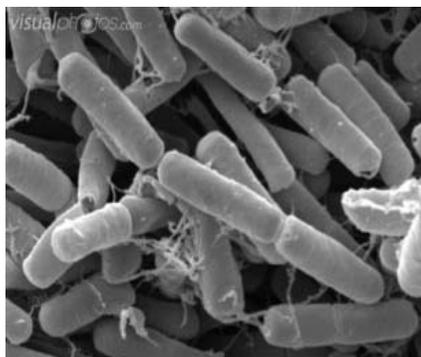


США и Канада:

ущерб более 1 млн \$
в год + расходы на
профилактику



Генная инженерия: Bt-кукуруза



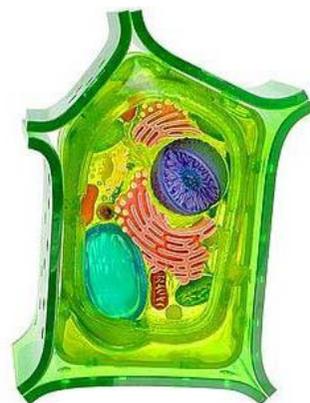
Bacillus thuringiensis



ген *Cry*
кодирует
ТОКСИН



кукуруза

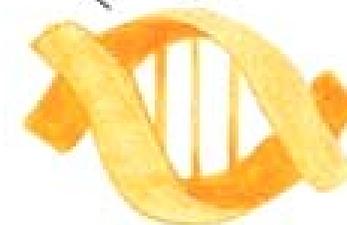


ДНК *B.thuringiensis*



Bt *Cry* ген

ферменты



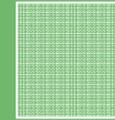
Bt ген

ДНК

кукурузы



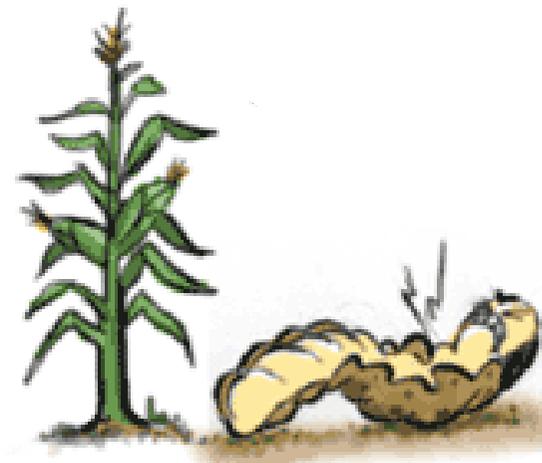
Генная инженерия: Bt-кукуруза



ИТАК:



гусеница
съедает
трансгенную
Bt-кукурузу...



...и это последняя
трапеза в ее жизни



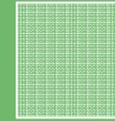
"Золотой" рис



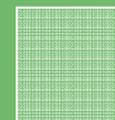
- Дефицит витамина А вызывает 500000 случаев слепоты и до 2 миллионов смертей каждый год в странах, где рис является основным продуктом питания
- "Золотой" рис создан с целью восполнить недостаток витамина А в рационе
- С помощью генной инженерии создан рис с повышенным содержанием бета-каротина (предшественника витамина А)



"Золотой" рис



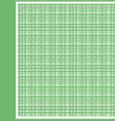
Растения и человек



- пища
- строительные материалы
- ВОЛОКНО
- ТОПЛИВО
- КОРМ ЖИВОТНЫМ
- лекарственные препараты



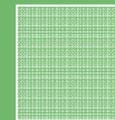
Лекарственные растения



- китайские медицинские источники, описывающие лекарственные растения, относят к XXVI в. до н. э.
- письменные упоминания лечения растениями содержатся в египетских папирусах, которые датированы XVI в. до н. э.
- Гиппократ (V в. до н. э.), "отец медицины" предпринял попытку не только описать свойства лекарственных растений (более 200), но и объяснить их целительное действие



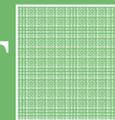
Лекарственные растения



- по данным ВОЗ, в 73 странах мира для лечебных целей применяют около 10 000 видов лекарственных растений
- в «Перечень наиболее широко используемых во всем мире видов лекарственных растений», составленный ВОЗ, вошли 235 наименований
- в России применяют примерно 170 видов растений



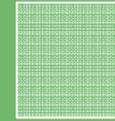
Аспирин: растения вдохновляют



- 2500–3500 лет назад, в древнем Египте и Риме, были известны целебные свойства **ивовой коры**, естественного источника **салицилатов**, как жаропонижающего и болеутоляющего средства. Гиппократ в своих наставлениях рекомендовал использовать ивовую кору в виде отвара при лихорадке
- в 1828 г. профессор химии Мюнхенского университета Йоган Бюхнер выделил из коры ивы активную субстанцию — горький на вкус гликозид, названный им **салицин** (от лат. *Salix* — ива)
- В 1853 г. французский химик Шарль Фредерик Жерар в ходе опытов нашел способ ацетилирования салициловой кислоты, но не завершил работу.
- В 1897 г. Феликс Хоффман продолжил исследования Ш.Ф. Жерара: он разработал новый метод получения ацетилированной формы салициловой кислоты — **ацетилсалициловую кислоту**.
- 1900 г. — на рынок выпущена первая в мире таблетированная форма препарата **Аспирин®**, содержащая 500 мг ацетилсалициловой кислоты.



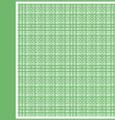
Биотехнология растений



МОЖНО ЛИ ИСПОЛЬЗОВАТЬ РАСТЕНИЕ
как **биореактор** – нарабатывать в
нем различные вещества и выделять
их потом из него?



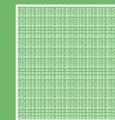
Начало биотехнологии растений



- в 1939 г. ученые обнаружили, что растительная ткань может неограниченно расти "в пробирке"
- регенерация одной клетки до целого растения продемонстрирована в 1965 г.
- возможность получать из растительной клетки целый организм
- обусловлена **тотипотентностью** растительных клеток: способностью одной клетки делиться и образовывать в конечном итоге целое растение



Регенерация



В.М.Верба



В.М.Верба



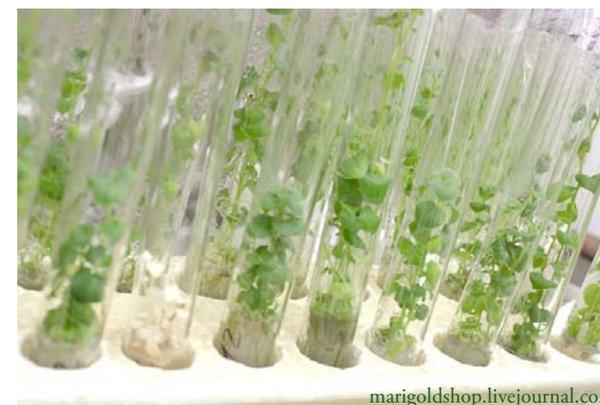
© Пушников И.А., Желтухин



marigoldshop.livejournal.com



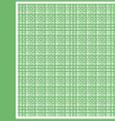
marigoldshop.livejournal.com



marigoldshop.livejournal.com



Начало эры трансгенных растений



Robb T. Fraley

В 1983 г. на Зимнем Симпозиуме в Майами представили данные по генетической трансформации, которая привела к получению нормального, фертильного трансгенного растения, *Nicotiana plumbagenifolia*.



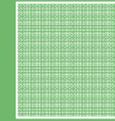
Mari-Dell
Chilton



Marc van Montagu & Jeff Schell



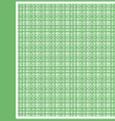
Как же изменяют геном клетки?



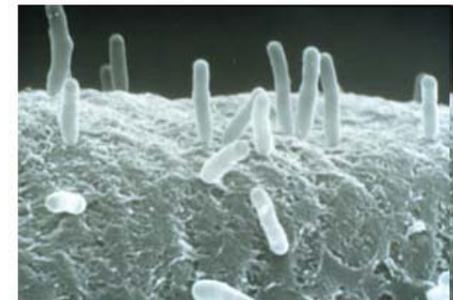
- использование *Agrobacterium tumefaciens* как инструмента для переноса ДНК в растительную клетку
- прямое введение ДНК в **протопласты** под действием электрического поля или осмотического шока
- биолистическая трансформация с помощью "**генной пушки**": прямая доставка ДНК в **клетки**



Agrobacterium tumefaciens



- изучение корончатых галл – опухолей на растении – началось еще в 17 веке
- в начале 20 века была выделена бактерия, которая вызывала подобные опухоли
- в 40-х годах 20 века заговорили о некоем "активном начале", которое отвечает за преобразование клеток растения, tumor inducing principle (TIP) (Brown & Mandle, 1948)
- в галлах были обнаружены новые метаболиты – производные аминокислот – октопин и нопалин

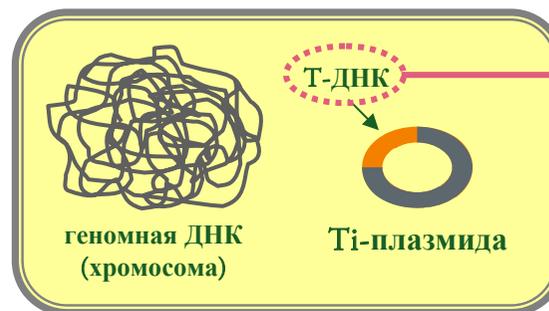


Agrobacterium tumefaciens



- в 1964 г. выдвинута гипотеза, что бактериальный геном становится частью растительной клетки
- в 1974 г. была обнаружена кольцевая ДНК, не являющаяся частью хромосомы, ей дали название **Ti-плазмида (tumor inducing)**

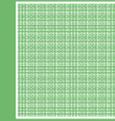
Agrobacterium tumefaciens



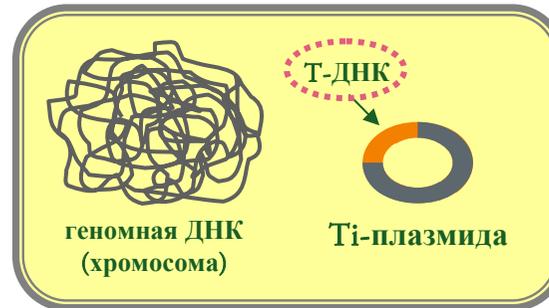
переносится в ядро растительной клетки



Agrobacterium tumefaciens



Agrobacterium tumefaciens



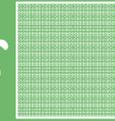
- ученые "разоружили" Тi-плазмиду, чтобы она не вызывала опухоли растения
- добавили в нее необходимые исследователю в работе элементы



инструмент для получения трансгенных растений готов!



Использование *A. tumefaciens*



- получение штамма *A. tumefaciens*, содержащего необходимый трансген
- выращивание *A. tumefaciens* в питательной жидкой среде (до 1 млн клеток в 1 мл суспензии)



- инкубация цветков, семян или фрагментов листьев в суспензии агробактерий
- инкубация протопластов с суспензией агробактерий
- инфильтрация листьев суспензией агробактерий



Использование *A. tumefaciens*

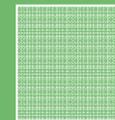


Инкубация цветков, фрагментов листьев или протопластов в суспензии агробактерий.....

.... а затем регенерация, получение каллусов и целого растения



Агроинфильтрация



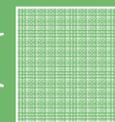
- суспензия агробактерии смешивается со специальным раствором и при помощи шприца без иглы вводится в лист растения
- через 2-3 дня можно увидеть синтез белка



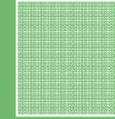
в УФ свете



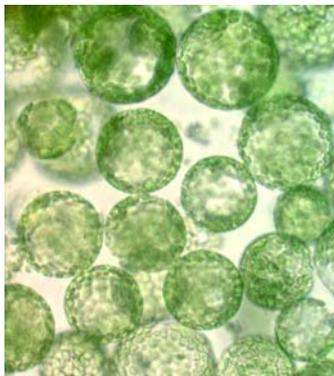
Вакуумная инфльтрация



Трансформация протопластов



клетки

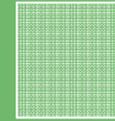


протопласты

- протопласт – клетка растения без клеточной стенки
- протопласт тотипотентен
- ДНК (или РНК) вводят в протопласты под действием электрического поля или осмотического шока
- протопласт синтезирует клеточную стенку и образует каллус
- каллус может регенерировать до целого растения



"Генная пушка"



«Genegun». Под лицензией Общественное достояние с сайта Викисклада - <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Genegun.jpg#/media/File:Genegun.jpg>

- ДНК, нанесенная на мельчайшие частички вольфрама, платины или золота выбрасываются с большой скоростью из пушки и входят в цитоплазму и ядра клеток, не разрушая их



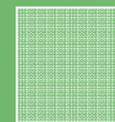
ИТАК:



- научились выращивать целое растение из одной клетки
- научились вводить чужеродную генетическую информацию в клетку
- появилась возможность создавать трансгенные растения
 - ... и не только трансгенные
(временная экспрессия)
 - и не только растения
(суспензионная культура)



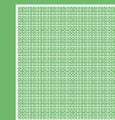
Сельское хозяйство и ГМО



- основные трансгенные культуры: соя, кукуруза, хлопок, рапс, подсолнечник и др.
- основные страны-производители: США, Канада, Аргентина, Бразилия, Китай, Япония
- В России трансгенные растения "производятся" только в лабораториях, но тем не менее, до 70% от всего растительного сырья, поставляемого в Россию, представляют собой трансгенные растения и их производные



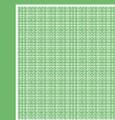
Сельское хозяйство и ГМО



- трансгенные растения, используемые в сельском хозяйстве, как правило, несут в себе гены:
 - устойчивости к пестицидам
 - устойчивости к насекомым-вредителям
 - морозостойкости
 - засухоустойчивости
- т.е. введенный ген (трансген) повышает жизнеспособность подобных растений



Биотехнология растений



МОЖНО ЛИ ИСПОЛЬЗОВАТЬ РАСТЕНИЕ
как **биореактор** – продуцировать в
нем различные (ненужные
растению) белки и выделять их
ПОТОМ ИЗ НЕГО?



Из чего делают лекарства?



- минеральное сырье
- продукты сухой перегонки каменного угля, дерева, горючих сланцев, а также различные фракции нефти
- продукты химического синтеза
- продукты микробиологического синтеза (аминокислоты, витамины, провитамины, коферменты, ферменты и др.)
- **более 40% лекарств, используемых в медицине, имеют растительное происхождение**
 - растительное сырье — листья, цветки, семена, плоды, корни растений — само по себе может представлять лекарственные средства
 - растения являются источником получения природных биологически активных веществ: алкалоидов, терпенов, гликозидов, витаминов
 - использование культуры тканей / клеток растений для производства природных лекарственных веществ (например, морфиновых алкалоидов – в культуре тканей мака снотворного)
- рекомбинантные белки, производимые клетками бактерий, дрожжей, животных, насекомых и, наконец, растений



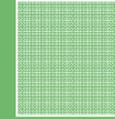


- Итак, есть масса вариантов производства лекарств. Среди наиболее свежих достижений – генноинженерные рекомбинантные белки.

- Обычно это белки человека, например, всем известный инсулин, потребность в котором огромна.



Системы продукции



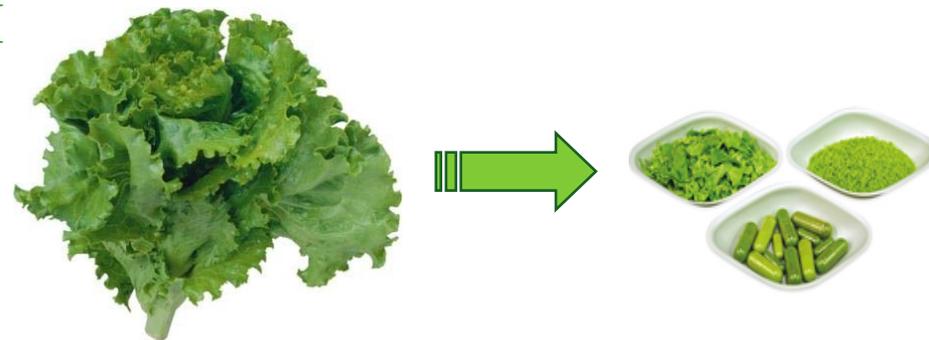
- бактерии
- дрожжи
- млекопитающие
- культура клеток млекопитающих
- культура клеток насекомых
- растения
- культура клеток растений



Растения как "биореактор"



- МОЖНО ИСПОЛЬЗОВАТЬ РАСТЕНИЕ ЦЕЛИКОМ ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ "СЪЕДОБНЫХ" ПРЕПАРАТОВ, В ТОМ ЧИСЛЕ ВАКЦИН



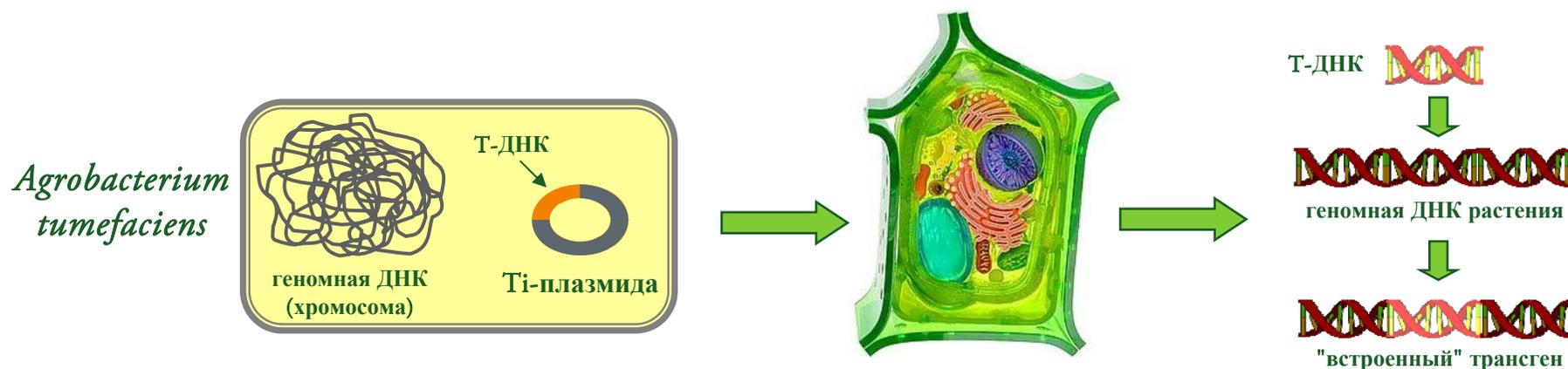
- МОЖНО ВЫДЕЛЯТЬ ИЗ РАСТЕНИЯ НУЖНЫЙ БЕЛОК, ГЕН КОТОРОГО БЫЛ ПРЕДВАРИТЕЛЬНО ВВЕДЕН В РАСТЕНИЕ



Варианты



- трансгенное растение



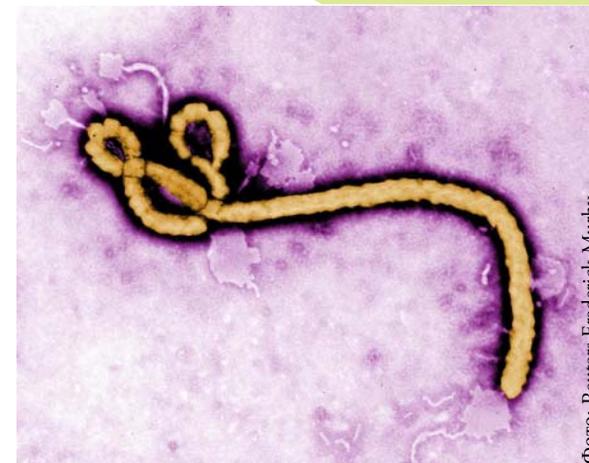
- транзientная экспрессия (растение "временно трансгенно")
- суспензионная культура клеток растения



ZMapp против Эболы



- Недавно мир узнал о препарате ZMapp, дающем шанс на выздоровление больным, зараженным смертельно-опасным вирусом Эбола
- В основе лекарства ZMapp три антитела, синтезированных в растении
- Эта свежая история является примером огромных возможностей растения как фабрики продукции человеческих антител



Технические возможности



Мобильная платформа для выращивания растений



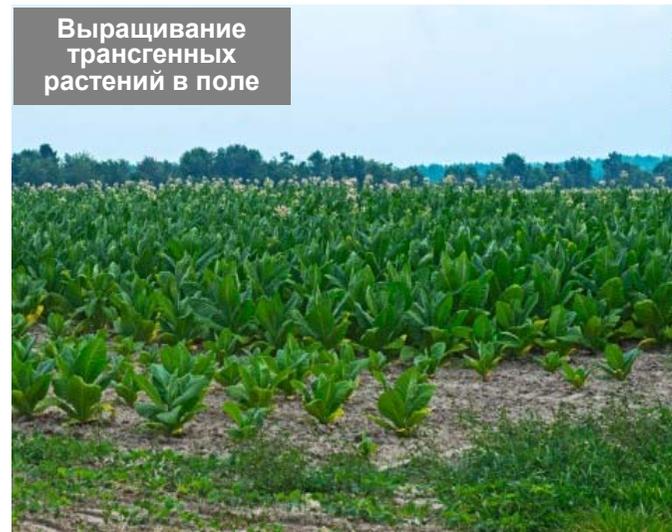
Введение ДНК для продукции антител в растения



Выделение и очистка



Выращивание трансгенных растений в теплице



Выращивание трансгенных растений в поле

COURTESY UNIVERSITY OF LOUISVILLE

В случае повторной эпидемии можно в течение 1 недели приготовить 2,5 млн доз вакцины



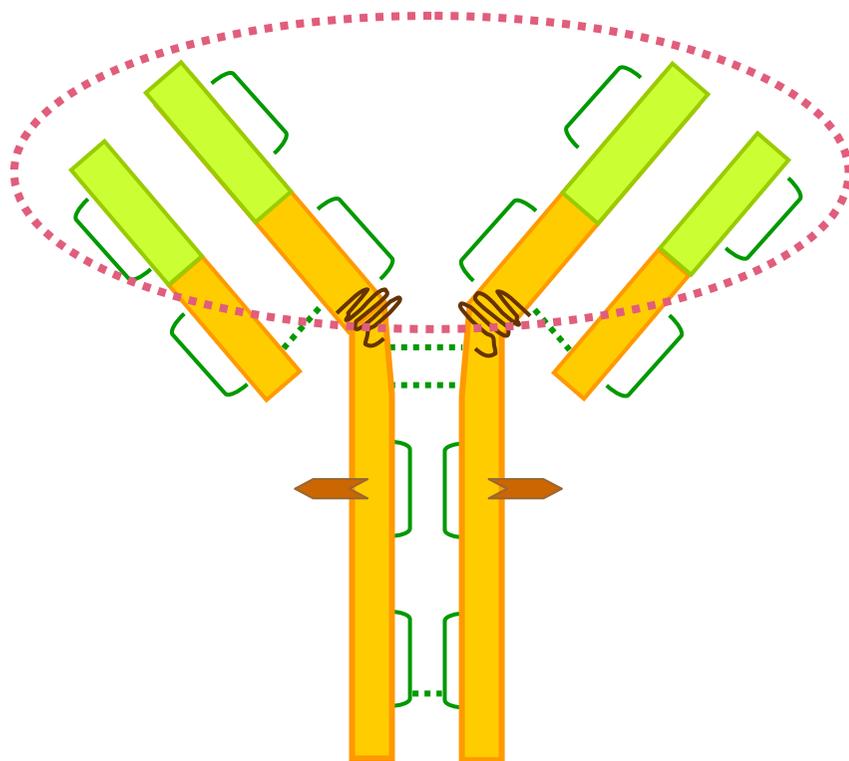
В настоящее время одобрены:



- вакцина против вируса Ньюкасла кур (культура клеток табака) proof of concept
- талиглуцераза альфа (Elelyso™, заместительная терапия, культура клеток моркови)
- антитела против вируса Эбола (ZMapp™, продукция антител в табаке) – клинические испытания



Итак, антитела...



...или иммуноглобулины
класса G (IgG)

- специальные белки – инструменты иммунной системы, которые помогают побороть инфекцию
- антитело безошибочно и очень избирательно узнает чужеродную молекулу – **антиген** (часть бактерии, бактериальный токсин, белок оболочки вируса и т.д.), попавшую в организм
- связанные с антителами чужеродные молекулы и их владельцы-патогены обезвреживаются и уничтожаются иммунными клетками
- можно искусственно создать антитела, которые будут узнавать "**больные**" клетки организма – **раковые клетки**



Для чего используются антитела



- научные исследования:
 - для очистки различных белков – аффинная очистка
 - для детекции различных белков как в экстрактах, так и на поверхности (или внутри) клеток
 - для количественного определения содержания того или иного белка в растворе

.....и много другое

- диагностика в медицине и сельском хозяйстве
- пассивная иммунизация
- антираковая терапия



Антираковые антитела



- терапевтические антираковые антитела в сочетании с химиотерапией вводятся пациентам с некоторыми типами злокачественных опухолей
- эти антитела специфически узнают раковые клетки и блокируют рост опухоли
- имеющиеся на фармацевтическом рынке антираковые антитела производятся в культуре клеток животных и стоят очень дорого

- Стоимость курса лечения Герцептином:
1 200 000 руб.
- Стоимость курса лечения Герцептином с Перьетой
2 500 000 руб



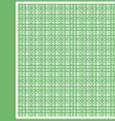
препараты против одного из типов рака молочной железы

нужны альтернативные источники антител!!!



Плюсы растительной системы

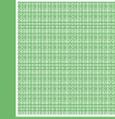
по сравнению с культурой клеток животных



- **снижение себестоимости продукции**
 - не нужны дорогостоящие среды для культивирования, только солнце, воздух и вода ☺
 - нет необходимости в соблюдении стерильных условий при выращивании растений, только солнце воздух и вода ☺
 - высокая эффективность синтеза
- **повышение биобезопасности конечного продукта**
 - отсутствие продуктов животного происхождения при производстве
 - исключение возможности загрязнения вирусами животных, прионами
- **скорость: можно оперативно подготовить необходимые генноинженерные конструкции, ввести их в растения и достаточно быстро получить целевой белок**



PhytoMab / Plantibody



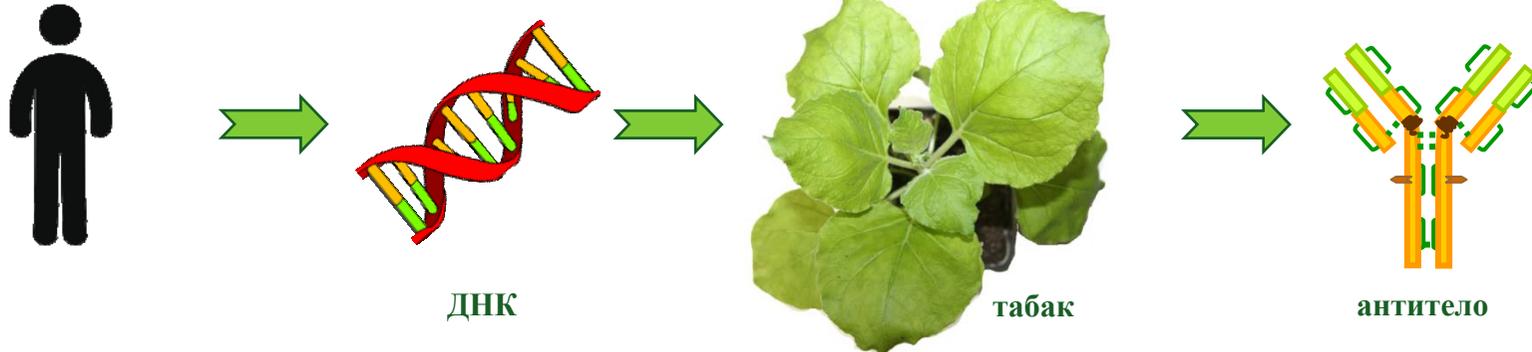
- **PhytoMab = Phyto + Monoclonal antibody (Mab)**



- **Plantibody = Plant + Antibody**



PhytoMab / Plantibody



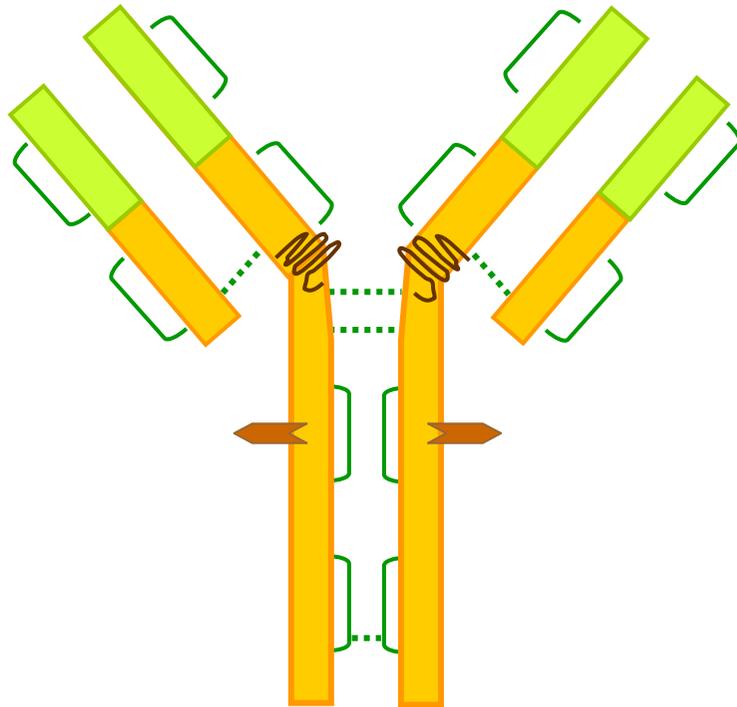
- определенные гены, кодирующих антитела человека,
- вводятся в клетки растения путем агроинфильтрации,
- в течение 10-14 дней синтезируются терапевтические антитела,
- которые затем выделяют из растительного материала



терапевтические
антитела



Как собрать антитело в растении?



ИММУНОГЛОБУЛИН G (IgG)
СОСТОИТ ИЗ:

ДВУХ ТЯЖЕЛЫХ ЦЕПЕЙ
ДВУХ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ



НАДО ВВОДИТЬ В ОДНУ И
ТУ ЖЕ КЛЕТКУ ДВА ГЕНА:
ОДИН ДЛЯ КОДИРОВАНИЯ
ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ, ДРУГОЙ –
ДЛЯ ЛЕГКОЙ



Как собрать антитело в растении?



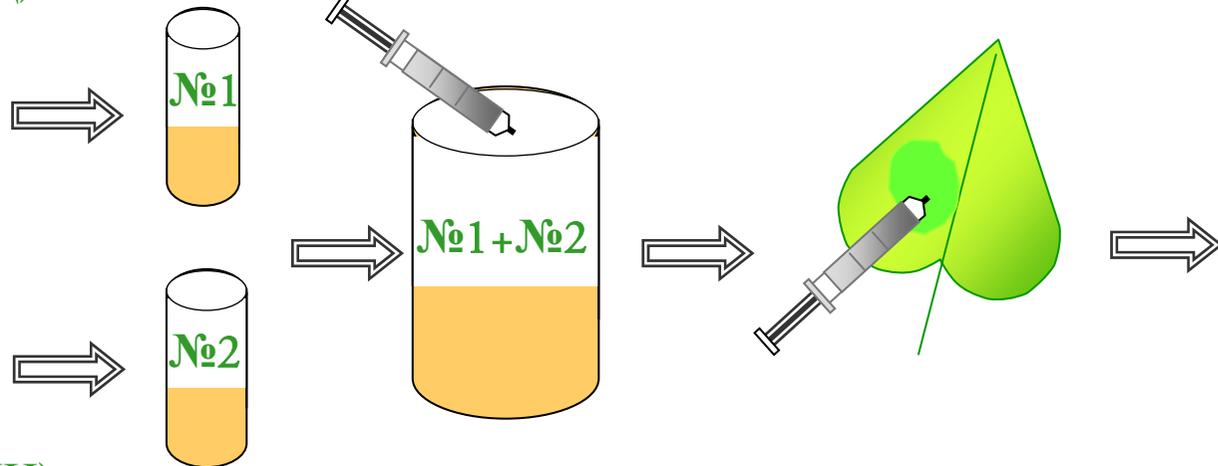
- инфильтрация *Agrobacterium tumefaciens* позволяет доставлять нужную ДНК практически в 99% клеток
- использование двух вариантов *A. tumefaciens* – один содержит ген тяжелой цепи антитела, другой – легкой, – позволяет получить одновременный синтез обеих цепей антитела в одной и той же клетке



Продукция антител в растениях



A. tumefaciens №1 (ген ТЦ)



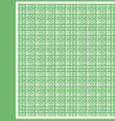
A. tumefaciens №2 (ген ЛЦ)



**ВЫДЕЛЕНИЕ И
ОЧИСТКА
АНТИТЕЛ**



Наиболее перспективно производство в растениях:



- антител
- индивидуальных вакцин
- вакцин в случае эпидемий
- "съедобных" вакцины для людей и животных
- микробицидов
- белков человека, получаемых в многотонных количествах – альбумин и инсулин
- лекарств для небольшой группы людей (орфанные заболевания)



Растение как фабрика



- ✓ **основное преимущество растительной системы продукции – биобезопасность**
- ✓ **получение моноклональных антител в растении – многообещающее направление (мощная система продукции + относительно простая очистка)**
- ✓ **себестоимость белка, полученного в растениях ниже, чем в системе ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК**
- ✓ **одобрены первые фармацевтические рекомбинантные белки, продуцируемые в растениях**



По следам вышесказанного



- ❖ **биотехнология** – технология с использованием биологических объектов
- ❖ инструменты биотехнологии - **генная инженерия** и **молекулярное клонирование**
- ❖ **универсальность генетического кода** позволяет переносить гены из одних организмов в другие
- ❖ **тотипотентность** клеток растений позволяет выращивать целое растение из одной клетки
- ❖ способы **введения новых генов** в растение: агробактерия, доставка ДНК в протопласты, "генная пушка"
- ❖ растения как "**биореакторы**" для продукции антител и других фармацевтических белков: значительный потенциал



