

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) **BG**

(11) **65487 B1**

(51) Int.Cl.

ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

C 12 N 15/82 (2006.01)

C 12 P 21/02 (2006.01)

A 01 H 5/00 (2006.01)

C 07 K 14/52 (2006.01)

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Заявителски № 106547

(22) Заявено на 22.03.2002

(24) Начало на действие
на патента от: 27.09.2000

Приоритетни данни

(31) 19947290.4 (32) 01.10.1999 (33) DE

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 4 на 30.04.2003

(45) Отпечатано на 30.09.2008

(46) Публикувано в бюлетин № 9
на 30.09.2008

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(73) Патентоприитежател(и):

**GREENOVATION BIOTECH GMBH,
D-79111 FREIBURG, BOETZINGER
STRASSE 29 B (DE)**

(72) Изобретател(и):

**Ralf Reski
Oberried
Gilbert Gorr
Freiburg im Breisgau (DE)**

(74) Представител по индустриална
собственост:

**Георги Цветанов Перев, 1124 София,
ул. "Леонардо да Винчи" 3**

(86) № и дата на РСТ заявка:

PCT/DE2000/003374, 27.09.2000

(87) № и дата на РСТ публикация:

WO2001/025456, 12.04.2001

(54) МЕТОД ЗА ПРОИЗВОДСТВО НА ПРОТЕИНОВИ СУБСТАНЦИИ

(57) Методът за производство на хетероложни протеинови субстанции в растителни материали намира приложение за получаването на всякакви хетероложни протеини в съответната им биологично активна форма при оптимални разходи и стандартизирани условия. Съгласно предпочитан вариант на изпълнение се култивират диференцирани пълноценни мъхови растения, като добиването на желаната субстанция от културалната среда се извършва без нарушаване на произвеждащите тъкани и клетки.

6 претенции

BG 65487 B1

(54) МЕТОД ЗА ПРОИЗВОДСТВО НА ПРОТЕИНОВИ СУБСТАНЦИИ

Област на техниката

Настоящото изобретение се отнася общо до областта на производство на протеинови субстанции в растителни материали. В частност изобретението се отнася до нов метод за производство на желани протеинови субстанции в мъхове.

Предшестващо състояние на техниката

Приложението на биотехнологични методи за производствени цели представлява за човека значима възможност да произвежда субстанции, които по друг начин, например чрез химичен синтез, не са производими или не са промишлено производими и не се намират като суровини в природата в достатъчни количества. Въпреки че са известни повече от 10 000 вторични метаболити от растения, само малко от тези съединения се добиват от растителни клетъчни култури в технически мащаб. При тези съединения се отнася на първо място до вторични метаболити с фармацевтични действия. Например, става въпрос за а) Берберин (производство в количество 4000 l) с бактериостатично и фунгицидно действие (Y. Fujita and M. Tabata, in: *Plant tissue and cell culture, plant science*; Vol. 3, 169, C. E. Green et al. (eds), A. R. Liss Inc., New York (1987)), б) Шиконин (количество 750 l) с антибиотично и противовъзпалително действие (M. Tabata and Y. Fujita, in: *Biotechnology in plant science*; 207-208, P. day et al (eds), Academic Press, Orlando (1985)), и с) Паклитаксел (количество 75000 l), по-известен като Таксол, с противотуморно действие (M. Jaziri et al., *Taxus sp. cell, tissue and organ cultures as alternative sources for taxoids production: a literature survey, Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 46, 59-75 (1996)).

Друг важен биотехнологичен метод, при който се използват растителни клетъчни култури, е биотрансформацията на дигитоксин в дигоксин - лекарствено средство за сърдечносъдовата система. Тази стереоспецифична реакция на хидроксилране е възможна при висок добив в биореакторни култури от *Digitalis lanata* (E. Reinhard und W. Kreis, *Kultivierung von*

pflanzlichen Zellen im Bioreaktor, Bio. Eng., 5, 135-136 (1989)). Актуален и обширен преглед на приложението на растителни клетъчни култури в биотехнологията е направен от H.-P. Muhlbach, *Use of plant cell cultures in biotechnology*, *Biotechnol. Annu. Rev.*, 4, 113-176(1998)).

Разработването на генетични методи за трансформация при по-висши растения в началото на 80-те години даде възможност значително да се повиши продуктивността на растенията за определени вторични съставки посредством трансформация на гените за определени ключови ензими от съответните метаболитни пътища. Освен приложението на трансгенни пълноценни растения са прилагани и растителни клетъчни култури. Като пример може да се посочи свръхекспресията на бактериална лизиндекарбоксилаза в трансгенни клетъчни култури от *Nicotiana tabacum*, които са довели до 14-кратно повишаване на добива на биогенните амини кадаверин и анабазин (J. Berlin et al., *Genetic modification of plant secondary metabolism: Alteration of product levels by overexpression of amino acid decarboxylases*, in: *Advances in Plant Biology, Studies in Plant Science*, Vol. 4, 57-81, D. D. Y. Tyu and S. Furasaki (eds), Elsevier, Amsterdam (1994)).

Чрез осъществяване на ДНК-трансфер в растения, обаче, са възможни не само количествени и качествени изменения на растителни съставки. Растенията и растителните клетъчни култури са интересни и при производството на хетероложни протеини (A. S. Moffat, *High-Tech plants promise a bumper crop of new products*, *Science* 256, 770-771 (1992)), където основно се избират два различни способа.

Единият способ включва производството на хетероложни протеини в трансгенни пълноценни растения. Освен производството на анти-тела в трансгенни тютюневи растения (J. K. - C. Ma et al., *Generation and assembly of secretory antibodies in plants*, *Science* 268, 716-719 (1995)) е описана и експресията и правилното процесиране на човешки серумен албумин, както в трансгенни тютюневи, така и в картофени растения (P. C. Sijmons et al., *Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants*, *Bio/Techn.*, 8, 217-221 (1990)). Също в тютюневи растения е експримиран човешкият епидермален растежен фактор (hEGF) (A.-H. Salmanian et al., *Synthesis and expression of the*

gene for human epidermal growth factor in transgenic potato plants, *Biotechnol. Lett.*, 18, 1095-1098 (1996). Прилагат се и други растения. Производството на лев-енкефалин е извършено успешно с *Arabidopsis thaliana* и *Brassica napus* (E. Krebbers and J. Vanderkerckhove, Production of peptides in plant seeds, *Tibtech.*, 8, 1-3, (1990). Освен това се прилагат трансгенни растения на *Vigna unguiculata* за експресия на химерни вирусни частици, които служат като ваксина (K. Dalsgaard et al., Plant-derived vaccine protects target animals against viral disease, *Nat. Biotech.*, 15, 248-252 (1997).

Основният недостатък при приложението на пълноценни растения като горепосочените примери се състои в необходимостта от тяхното изискващо време и средства култивиране, както и в нужните за промишления мащаб на производство големи площи за отглеждане. Освен това, пречистването на желаните субстанции от пълноценни растения изисква по принцип комплексни методологични етапи, особено тогава, когато има високи изисквания към състоянието и качеството на продуктите, както е при фармацевтично приложимите или съобразените с физиологичното хранене субстанции.

При втория способ се използват трансгенни тютюневи растения за производството на антитела. Описана е, например, експресията на антитела и тяхната секреция в средата (N. S. Magnuson et al., Enhanced recovery of a secreted mammalian protein from suspension culture of genetically modified tobacco cells, *Prot. Expr. Pur.*, 7, 220-228 (1996). Тъй като пречистването на хетероложни протеини от клетки изисква много средства, секрецията на желани протеини в средата представлява значително подобрение. Освен това, за производството на рекомбинантни, фармацевтично значими протеини в клетъчни култури от значение са и аспекти на сигурност, тъй като трансгенните растителни клетки могат да бъдат култивирани изключително само в биореактори и не трябва да бъдат освобождавани. Развитието на биореактори за хетеротрофни растителни клетъчни култури в големи мащаби (например M. L. Shuler et al., Bioreactor engineering as an enabling technology to tap biodiversity: The case of taxol., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 745, 455-461 (1994) направи възможна необходимата масова култура.

Основните недостатъци на този втори способ при приложение на растителни суспензионни култури са малката скорост на растеж, относително бавното образуване на вторични метаболити, потискането на образуването на продукта при висока клетъчна плътност с резултат ниска обемна производителност, образуване на агрегати и съставки от клетъчната стена, както и повишена чувствителност на клетките спрямо сили на разкъсване. Освен това следва да се съобразява, че при приложение на хетеротрофни култури винаги трябва да се изготвят комплексни среди с много, отчасти, скъпи съставки. Като най-значителен недостатък, обаче, трябва да се посочи настъпването на соматонални вариации в растителните клетъчни култури *ин витро*, което води до количествени и качествени промени в производството на хетероложни протеини (виж например M. G. K. Jones and K. Lindsey, Plant biotechnology, in: *Molecular biology and biotechnology*, J. M. Walker and E. W. Gingold (eds), 2 ed., Royal Soc. Of Chem., Burlington House, London (1988). Хетерогенността на образуваните продукти и на техните функционални свойства не е приемлива, особено при производството на фармацевтични средства и други желани субстанции, чието разрешение от институциите изисква надеждно осигуряване на качество, както и стандартизиран метод за производство.

Техническа същност на изобретението

Задача на настоящото изобретение е осигуряването на метод за стандартизирано производство на хетероложни протеинови субстанции в растителни материали, с който до голяма степен се отстраняват, както описаните недостатъци при приложението на пълноценни растения, така и недостатъците при приложението на системи от клетъчни култури.

Съгласно изобретението тази задача се решава чрез осигуряване на нов метод за производство на хетероложни протеинови субстанции в растителни материали, при който се култивират напълно диференцирани мъхови растения при стандартни условия и добивът на произвеждани протеинови субстанции се осъществява от културалната среда без нарушаване на произвеждащата тъкан или клетки.

Използваното понятие "протеинова субстанция" обхваща пептиди, полипептиди и протеини, както и техни фрагменти, които са подходящи особено за диагностични, клинични, фармацевтични и съобразени с физиологичното хранене цели. Обхващат се и такива молекули, които имат пептидни връзки и се транслатират от растителен материал.

Съгласно предпочитания вариант на изпълнение на изобретението желаната хетероложна протеинова субстанция се освобождава в културалната среда в нейната биологичноактивна форма.

В рамките на настоящото описание понятието "биологичноактивен" означава, че притежаващите това качество целеви субстанции имат желаните и необходими за съответната цел на приложение качества. Например, ако се цели производството на антитела, то произвежданият протеин, съответно негов функционален фрагмент, е биологичноактивен, когато е в състояние да осъществява желаното специфично свързване към антигена. За специалист в областта е ясно, че за това не винаги се изисква наличието на пълноценен протеин, а може да се търсят епитопи или по-нискомолекулни структури, които осигуряват желаната биологична активност, съответно функционалност. Един ензим, например, е биологичноактивен, когато е в състояние да преобразува своя субстрат.

Съгласно друг предпочитан вариант на изпълнение на изобретението растителният материал се култивира под формата на пълноценни мъхови растения в културална среда, която по същество е свободна от захари, витамини и фитохормони, съответно техни функционални фрагменти.

Методът съгласно изобретението предоставя възможността за култивиране на пълноценни диференцирани растения при стандартизирани фотоаутоτροφни условия, т.е. без изискването за добавяне на захари, витамини, фитохормони и подобни, както се изисква в познатите от състоянието на техниката хетеротрофни суспензионни клетъчно-културални системи. Поради приложението на финансово изгодна и проста културална среда етапите на получаване и пречистване на желаните субстанции значително се опростяват.

Приложимият растителен материал съгласно

но изобретението предпочитано е пълноценно мъхово растение, избрано от групата на листостеблени и чернодробни мъхове, като особено се предпочитат видове от родовете *Physcomitrella*, *Funaria*, *Sphagnum* и *Ceratodon*, съответно *Marchantia* и *Sphaerocarpos*. Най-предпочитано е осъществяването на метода от изобретението при използване на мъха *Physcomitrella patens*.

Съгласно друг предпочитан вариант на изпълнение използваната за трансформацията конструкция от нуклеинови киселини кодира не само желаната протеинова субстанция, но и транзитен пептид за освобождаване на субстанцията от клетката-гостоприемник в културалната среда. Всякакви познати на специалист в областта автоложни и хетероложни последователности от нуклеинови киселини са приложими в изобретението и могат да намерят приложение за създаване на експресионна касета за трансформация на тъканта на продуцента. Особено предпочитано е приложението на сигнални пептиди за ендоплазмения ретикулум (ER) или за клетъчния транспорт.

Извършените работи по изобретението показват, че описаният по-горе проблем на соматоклонална вариация при клетъчни култури не съществува във фотоаутоτροφни течни култури от листостеблени мъхове. Освен това, приложимите съгласно изобретението мъхове имат спрямо други системи предимството от ясна последователност на точно дефинирани етапи на диференциране (хлоронема, каулонема, пъпки, гаметофори), които се повлияват от добавянето на растителни хормони (индол-3-оцетната киселина индуцира образуването на каулонема, изопентенил-аденинът индуцира образуването на пъпки) (виж например N. W. Ashton et al., Analysis of gametophytic development in the moss, *Physcomitrella patens*, using auxin and cytokinin resistant mutants, *Planta*, 1444, 427-435 (1979)). Така става възможна целенасочена диференцирано-специфична експресия на хетероложни протеини в биореакторни култури, като съгласно изобретението особено предпочитано се прилага синхронно деляща се и поради това хомогенна хлоронемна култура, поради нейното контролируемо, равномерно протеиново производство в биореактор, и поради това, че е подходяща за приложение на хормонално-зависими или диференцирано-специфични промотори.

За производството на протеини, които имат кратко време на полуживот или упражняват цитотоксично действие, освен такава експресионна система особено предпочитано приложима съгласно изобретението е и индуцируема промоторна система, като особено предпочитано е приложим 1'-промоторът от *Agrobacterium tumefaciens*.

Предложеното съгласно изобретението култивиране на мъхове за производството на хетероложни протеини от стопанска гледна точка може да бъде осъществено, например, при култивиране на *Physcomitrella* в порядък от 20 ml на 6 l до 10 l обем или повече във вибрационни култури, или в снабдявани с въздух стъклени съдове (виж напр. R. Reski, Zell- und molekularbiologische Untersuchungen der cytokinin-induzierbaren Gewebedifferenzierung und Chloroplastenteilung bei *Physcomitrella patens* (Hedw.) B. S. G., Dissertation, Univesitat Hamburg (1990)). Тъй като в този случай става въпрос за култура от диференцирани фотоавтотрофни растения, към средата не трябва да се добавят нито растителни хормони, нито витамини или захари. В сравнение с комплексните среди, които се използват например за животински хормони, разходите тук са 10 пъти по-малко. Съгласно изобретението е доказано, че добивът от биологичноактивен хетероложен протеин в културална среда с присъствие на PVP може да бъде повишен до 35 пъти, поради което приложението на PVP в културалната среда се предпочита в метода съгласно изобретението.

Подробни данни за култивирането в биореактори на други подходящи съгласно изобретението листостеблени мъхове, като например *Leptobryum pyriforme* и *Sphagnum magellanicum*, са известни от състоянието на техниката (виж напр. E. Wilbert, Biotechnologische Studien zur Massenkultur von Moosen unter besonderer Berücksichtigung des Arachidonsaurestoffwechsels, Dissertation, Universität Mainz (1991); H. Rudolph and S. Rasmussen, Studies on secondary metabolism of *Sphagnum* cultivated in bioreactors, Crypt. Bot., 3, 67-73 (1992)). В рамките на настоящото изобретение много предпочитано е приложението на *Physcomitrella*, особено поради това, че всички действащи молекулярно-биологични техники за този организъм са установени (обзор при R. Reski, Development, genetics and

molecular biology of mosses, Bot. Acta., 111, 1-15 (1998)).

За биотехнологичното използване на *Physcomitrella* за производство на хетероложни протеини са разработени подходящи трансформационни системи. Успешни трансформации са проведени, например, с "particle gun" чрез директен ДНК-трансфер в протонемната тъкан. Успешен е също и PEG-опосредственият ДНК-трансфер в мъхови протопласти. Този трансформационен метод е описван многократно за *Physcomitrella* и води както до преходни, така и до стабилни трансформанти (виж напр. K. Reuter and R. Reski, Production of a heterologous protein in bioreactor cultures of fully differentiated moss plants, Pl. Tissue culture, @ Biotech., 2, 142-147 (1996)).

Въпреки че настоящото изобретение е подходящо по принцип за производство на всякакви протеинови субстанции, по-нататък се представя производството на един фармацевтично значим протеин, използвайки като пример човешкия "съдов ендотелен растежен фактор" (VEGF).

VEGF за пръв път е изолиран от N. Ferrara и W. J. Henzel (Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., 161, 851-858 (1989)) и е характеризан като регулаторен фактор за контролираната ангиогенеза и деленето на ендотелните клетки при нормални физиологични условия (N. Ferrara et al., The vascular endothelial growth factor family of polypeptides, J. Cell. Biochem., 47, 211-218 (1991)). Те са доказали също така, че този растежен фактор действа много специфично върху съдовите ендотелни клетки и е неактивен при други клетъчни типове. VEGF е хомодимерен гликопротеин със свързване посредством дисулфитни мостове. Познати са четири различни форми на човешкия VEGF. Четирите изоформи са с дължина 121, 165, 189 и 206 аминокиселини и възникват чрез алтернативно разцепване на VEGF-РНК. VEGF₂₀₆ е доказан само във фетална чернодробна сДНК, докато транскрипти на VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ и VEGF₁₈₉ са установени в много туморни клетки и тъкани. Всички VEGF-изоформи имат водещи последователности за секрецията, но само двете най-малки форми се секретират ефективно (виж напр. G. Martiny-Baron and D.

Marme, VEGF-mediated tumor angiogenesis: A new target for cancer therapy, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 6, 675-680 (1995)).

Както за разработването и подобряването на съществуващите терапевтични способности при лечението на тумори, така и за характеризирането на VEGF са били и са необходими съответни количества VEGF. Към началото на разработките, довели до настоящото изобретение, е било описано само рекомбинантното производство на VEGF чрез бакуловирусна експресионна система в клетки на насекоми (виж напр. B. L. Fiebich et al., Synthesis and assembly of functionally active human vascular endothelial growth factor homodimers in insect cells, *Eur. J. Biochem.*, 211, 19-26 (1993)). Като други произвеждащи организми се добавят и *Saccharomyces cerevisiae* (S. Kondo et al., The shortest isoform of human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF₁₂₁) produced by *Saccharomyces cerevisiae* promotes both angiogenesis and vascular permeability, *Biochem. Biophys. Acta*, 1243, 195-202 (1995)), дрождите *Pichia pastoris* (D. Mahanraj et al., Expression of biologically active human vascular endothelial growth factor in Yeast, *Growth Factors*, 12, 17-27 (1995)) и *Escherichia coli* (G. Siemeister et al., Expression of biologically active isoforms of the tumor angiogenesis factor VEGF in *Escherichia coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 222, 249-255 (1996)). С всички рекомбинантни системи е бил произвеждан биологичноактивен VEGF. Експресионната система с *E. coli* изисква, обаче, много усилия за пречистването и реконституцията на протеина, тъй като той се съдържа във "включени телца".

Примери за изпълнение на изобретението

Обобщение

С установяването на управляеми масови култури от *Physcomitrella patens* (Reutter и Reski, по-горе), както и на методи за ДНК-трансфер в листостеблениа мъх *Physcomitrella patens* (K. Reutter, Expression heterologer Gene in *Physcomitrella patens* (Hedw.) B. S. G., Dissertation, Univesitat Hamburg (1994)), са създадени основните предпоставки за биотехнологичното използване на това растение.

В първоначално извършени разработки чрез използване на трансгенни *Physcomitrella*

линии, съгласно работата на Reutter (в посочения източник, 1994), е показана дългосрочната стабилност на интегрирането. Експресията на примерно посочените тук хетероложни *npt II*- и *gus*-гени е могла да бъде доказана и четири години по-късно.

Биореакторната култура на *Physcomitrella* е била оптимизирана. Разработена е бъркалка, която осъществява раздробяване на протонемите и така осигурява изискваната хомогенност на културата при постоянни обороти от 300-500/min. По този начин е било възможно стандартизирано вземане на проби. Едновременно е било осъществявано равномерно разпределение на вкарвания въздух в течната култура. При тези условия е могло да бъде показано, че развитието на биомасата и протеините става без регулиране на рН отвън, както и при регулиране на рН; изненадващо, това вече не било необходимо. При полупостоянни условия е било постигнато седмично производство на биомаса от 500 mg сухо тегло, съответно 22 mg общ протеин, на литър. Това означава повишаване на производството на биомаса до 5 пъти спрямо обичайната 5-литрова култура в стъклени колби. Намалването на солната концентрация на Кпор-средата до 1/10 е довела до подобни стойности и поради това - до намаляване на разходите.

Добавянето на 5 mM амониев тартарат е ускорил развитието на биомасата чрез намаляване на lag-фазата. С добавянето на амониев тартарат са получени същевременно култури, които съдържат почти изключително само хлоронемни клетки. С помощта на промивна цитометрия при тези култури е могло да бъде доказано, че клетките се намират почти 100% в G2/M-фазата на клетъчния цикъл. Други физиологични изследвания с ауксин, както и изследвания с диференцирано-специфичните мутанти *sa/112* и *sa/113* са потвърдили този резултат и са довели до заключението, че каулонемните клетки са били през по-голямата част от времето в G1/G0-фазата, а хлоронемните клетки са основно в G2/M-фазата.

С 1'-промотора от агробактерии е проучван промотор за възможна индуцируемост в мъхове. Генът на бета-глюкуронидазата (*gus*) е служел за ген-маркер. В преходно трансформирани мъхови протопласти (дъл на трансформиране = 3×10^{-4}) след индукция с 5 microM

индол-3-оцетна киселина е била наблюдавана експресия на gus-гена. При контролите никога не е наблюдавана експресия.

Генът за разцепената форма на човешкия съдов ендотелен растежен фактор с големина 121 аминокиселини (VEGF_{121}) е трансфериран в *Physcomitrella* при дял на трансформиране от 0.5×10^{-5} и 3.3×10^{-6} . За тази цел генът е клониран след конститутивния 35S-промотор и в подходящия за растения трансформационен вектор pRT99. При втори способ допълнително е клонирана кодиращата последователност за принадлежащия към него човешки транзитен ER-пептид. Чрез Southern-анализи на получените стабилни трансформанти е могло да бъде доказано интегрирането на хетероложната ДНК и да бъде описан видът на интегрирането. Northern-анализи при тези трансформанти са доказали транскрипти на pntII и на двата VEGF_{121} . Доказването на експресията на VEGF в мъховите клетки е било извършено чрез индиректна имунофлуоресценция. С помощта на конфокален лазерно-сканиращ микроскоп протеинът недвусмислено е локализиран в клетките. Изследванията при трансформантите без транзитен пептид са показали, че протеинът е локализиран основно в цитоплазмата. В трансформантите, които съдържат допълнително транзитния пептид за ER, протеинът се открива в ядрената област и във върховите области на апикалните клетки - места с много високо съдържание на ER. Чрез прилагането на ELISA, както и на два функционални теста спрямо получения от културалната среда VEGF-протеин, е могла да бъде доказана биологичната активност на произведения съгласно изобретението хетероложен протеин.

Материали и методи

Използваните химикали, ако не е упоменато по друг начин в текста, са доставени от фирмите Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) и Sigma (Deisenhofen).

Разтворите са изготвяни в предварително подготвена, непирогенна вода, обозначаваща понататък в текста като H_2O , от система за обработване на вода Milli-Q Water System (Millipore, Eschborn).

Рестрикционни ендонуклеази, ДНК-модифициращи ензими и молекулярно-биологични китове са доставени от фирмите AGS (Heidelberg),

Amersham (Braunschweig), Applied Biosystems (Weiterstadt), Biometra (Gottingen), Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim), Genomed (Bad Oeynhausen), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), Novagen (Madison, Wisconsin, USA), Pharmacia (Freiburg), Qiagen (Hilden) и Stratagene (Heidelberg). Ако не е упоменато другояче, те са прилагани съгласно данните от производителя.

Вектори и конструкти

Плазмидът pCYTEXP- VEGF_{121} е дериват на pCYTEXP1 (T. N. Belev et al., A fully modular vector system for the optimization of gene expression in *Escherichia coli*, *Plasmid*, 26, 147-150 (1991)), в който е интегрирана сДНК на човешкия VEGF_{121} за експресията в *E. coli*. сДНК на VEGF_{121} е изрязана от pCYTEXP- VEGF_{121} чрез рестрикционните ендонуклеази Nde I и Sal I, пречистена е и е клонирана "blunt end" в Sma I-мястото на разцепване на pRT101 (R. Topfer et al., A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions, *Nucleic acids Res.*, 15, 5890 (1987)) - между 35S-промотора и полиаденилиращата последователност на CaMV. С Hin dIII така получената касета отново се изрязва и се клонира в рестрикционното място на разкъсване от Hin dIII на трансформационния вектор pRT99. Освен множествено място за клониране pRT99 разполага и с гена за неомицинофосфотрансфераза при регулиране от 35S-промотора и принадлежащата към него полиаденилираща последователност от CaMV (R. Topfer et al., Versatile cloning vectors for transient gene expression and direct gene transfer in plant cells, *Nucleic Acids Res.*, 16, 8725 (1988)). Този ген определя в стабилно трансформирани растения резистентност спрямо антибиотика G418. Размножаването на плазмидите става в *Escherichia coli* щам DH5 α (J. Samrook et al., *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989)).

От вектора pVE-121, първоначално конструиран за експресията на VEGF_{121} в клетки на насекоми, който допълнително към VEGF_{121} -последователността включва и ДНК, кодираща естествения транзитен пептид, определящ в животински клетъчни системи секрецията от ендоплазматичния ретикулум в средата (Fiebich et al., Synthesis and assembly of functionally active human vascular endothelial growth factor homodimers in insect cells, *Eur. J. Biochem.*, 211,

19-26 (1993)), сДНК се изрязва чрез рестрикционните ензими Bam HI и Bgl II и през pRT101 се клонира и изпитва в pRT99.

Плазмидът pNA201 е производно на би-
нарния вектор pBI101 (A. R. Jefferson et al.,
Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene
fusion system, Plant Mol. Rep., 5, 387-405 (1987)).
Той съдържа като селекционен маркер за расте-
ния nptII-гена под нопалинсинтазния промотор.
Наличният също така gus-ген се регулира от 1'-
промотора от *Agrobacterium tumefaciens*. pNA201
е подходящ за директна трансформация на
Physcomitrella patens.

Антитела

Прилагат се две различни антитела срещу
VEGF-протеина. Първото антитяло е анти-VEGF-
антитяло от зайци и е насочено срещу синтети-
чен пептид, който съответства на аминокисели-
ните 1-20 от нативния човешки VEGF (Fiebich et
al., по-горе. (1993)). Второто антитяло е монок-
лонално антитяло от мишки, насочено срещу чо-
вешкия VEGF₁₂₁ (R&D Systems, Wiesbaden).

Растителен материал

Прилага се див шам на листостеблениа мъх
Physcomitrella patens (Hedw.) B. S. G., произли-
заш от сбирката на отдела по генетика към
Института по обща ботаника на Университета в
Хамбург. Произходът е от събрания от H. L. K.
Whitehouse в Gransden Wood, Huntingdonshire
(England) шам 16/14, който е субкултивиран от
спора.

Дивият шам се култивира или в течна кул-
тура с Кнор-среда (R. Reski and W. O. Abel,
Induction of budding on chloronemata and
caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*,
using isopentenyladenin, Planta, 165, 354-358
(1985)) или върху твърда Кнор-среда с 1% ок-
соиден агар (Unipath, Basingstoke, England).
Течната култура се изготвя според описаното от
Reski (в посочения източник, 1990).

Биореакторна култура

За масово отглеждане растителният мате-
риал се култивира в 7-литров, двойностенен,
стъклен реактор тип кръгла колба (Applikon
Boitek, Knullwald). Охладителят на отвеждания
въздух, вентилационната тръба, рН-електродът
(Conducta, Berlingen), температурният датчик,
бъркалката, тръбата за вземане на проби и тръ-
бите за приток на киселина, луга и среда са пос-
тавени чрез отвори в капака, отгоре в културал-

ното пространство. Култивирането се извършва
при 25°C и се регулира чрез съответно нагласе-
на водна баня, свързана с двойния кожух. При
изпитателни пускове, които се извършват с ре-
гулиране на рН, последното се поддържа чрез
титрационното устройство постоянно при
стойност от 5.8. Измерването на температура и
регулирането на рН се осъществяват чрез
Biocontroller ADI 1030 (Applikon Biotek,
Knullwald). Оборотите на бъркалката могат да
се променят от регулатора на мотора ADI 1012
(Applikon Biotek, Knullwald). Културалната сре-
да се вентилира постоянно с въздух при наля-
гане от 1 bar чрез порьозен елемент за вкарване
на въздуха. За осигуряване на свобода на зарод-
ишите в културалния съд всички привеждащи
и отвеждащи въздуха тръби са снабдени със сте-
рилни филтри (Midisart, 0.2 microm; Sartorius,
Gottingen). Биореакторната култура се осъщес-
твява в културален шкаф с осветление отстрани
(бяла светлина; Osram 40W/20; макс. 100
micromol⁻¹m⁻²). Зараждането на културите става
с 0.5 -lg FG растителен материал на литър би-
ореакторна култура при стерилни условия.
Тръбата за вземане на проби се намира на ви-
сочината на бъркалката, чрез което при разбър-
кване се осигурява равномерно вземане на
проби. Малки пробни количества (<100 ml) се
вземат чрез стерилна спринцовка през Luer
Lock-съединение, а за вземане на по-големи
пробни обеми се използва, например, шлаух-
помпа тип 302/3A с глава 501 RI (Sartorius,
Gottingen).

Чрез добавяне на 5 mM амониев тартарат
към Кнор-средата се получават хлоронемни кул-
тури от дивия вид.

В присъствие на стабилизатора поливи-
нилпирилодон (PVP) в културалната среда до-
бивът на свободен биологичноактивен хетеро-
ложен протеин може да бъде повишен
значително.

Осъществяващото се по време на прото-
немното развитие диференциране на каулонемите
може да бъде индуцирано и засилено чрез до-
бавяне отвън на физиологични количества
ауксин, като са подходящи концентрации от око-
ло 5 micromol/l индол-3-оцетна киселина (IAA).

За течната култура от трансформанти под
селекционно налягане към Кнор-средата се до-
бавят 50 mg/l от антибиотика G418 (Calbiochem,

Bad Soden). За тази цел, преди раздробяването културите се филтрират на всеки 10 дни през стерилни 100 microm-сити (Wilson Sieves, Nottingham, England) и се прехвърлят в пълни със селекционна среда ерленмайерови колби.

За проби с подхранваща сол Кнор-средата се разрежда в отношение 1:10 с H₂O.

Трансформация

Като трансформационен метод е избран PEG-опосредственият директен ДНК-трансфер в протопласти съгласно Reutter и Reski (в посочения източник, 1996). При всяка трансформация се прилагат 50 microg плазмидна ДНК на 3 x 10⁵ протопласти. Регенерирането на протопластите и селекцията на стабилни трансформанти се извършва, ако не е посочено другояче, съгласно Reutter и Reski (в посочения източник, 1996).

Индиректна имуофлуоресценция

Буфер: MSB: 100 mM PIPES; 5-10 mM EGTA, 5 mM MgSO₄, pH 6.8

F-MSB: MSB + 5% DMSO

E-MSB: MSB + 5% DMSO + 5% Nonidet

W-MSB: MSB разреден 1:2 с H₂O (проми-
вен буфер)

Ензимен разтвор: 1% целулаза, 1% пекти-
наза, 2% дризепаза в MSB, pH 5.6 (всички са
производство на Sigma, Deisenhofen).

За фиксиране на мъховите протонемии се инкубират в 1.25% глутаралдехид в F-MSB (обем/обем) максимум за 10 min и за кратко се промиват в W-MSB. След това се инкубират с 2% параформалдехид в MSB (обем/обем) за 40 min и 3 пъти се промиват с W-MSB (1 път изплакване; 2 пъти по 5 min промиване).

Редукцията на свободни, неотделими с промиване алдехиди става чрез добавяне на MSB и на твърд борхидрид на върха на шпатулата с време за инкубация 10 min. Борхидридът се отстранява с трикратно промиване с W-MSB.

На следващия етап клетъчните стени се правят пропускливи с добавяне на ензимен разтвор за 10 min. Ензимната реакция се спира с промяна на pH (MSB, pH 6.8). Отново се промива трикратно с W-MSB.

Чрез инкубация с детергентен разтвор за време от 120 min се екстрахират хлорофилите. Разтворът се отстранява отново с трикратно промиване с W-MSB.

След тази подготовка мъховите протонемии могат да бъдат инкубирани с първичните ан-

титела (анти-VEGF; разреждане 1/50). Това става за 45 min при 37°C. След трикратно промиване с W-MSB маркираното вторично антитяло (от заек или от мишка; разреждане 1/30; маркирано с флуоресцинизотиоцианат (FITC) (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)) се добавя за 45 min при 37°C. Допълнително към трите етапа на промиване, както бе посочено по-горе, се промива един път с W-MSB + 0.1% тритон. След това протонемите се вземат в W-MSB и се съхраняват минимум една нощ при 4°C.

Оценката се извършва с помощта на конфокален лазерно-сканиращ микроскоп (CLSM) от типа TCS 4D (Leica Lasertechnik, Heidelberg) и софтуера Scanware 5,0 (Leica Lasertechnik, Heidelberg).

За изследването с CLSM пробите се слагат върху стойка и в "Mounting-solution" (Dabco, Sigma, Deisenhofen). Възбуждането на свързания към вторичните антитела флуоресцентен оцветител FITC става с помощта на аргон-криптон лазер при дължина на вълната от 488 nm. FITC излъчва светлината с дължина на вълната 528 nm.

ELISA-тест

Качественото и количествено определяне на образувания в трансформирания мъхови растения VEGF-протеин в културалната среда става съгласно обичайните методи посредством ELISA-тест при използване на горепосочените антитела. Количество от 200 microl културална среда се добавя директно към ELISA-теста.

Тест за функционалност

Изпитването на биологичната активност на рекомбинантно получения от културалната среда VEGF става с използване на 'Mitogenic Assay' (Miyazono et al., Purification and properties of an endothelial cell growth factor from human platelets, J. Biol. Chem., 262, 4098-4103 (1987)), както и на 'Day-13 chorioallantoic-membrane angiogenesis Assay' (Wilting et al., A morphological study of the rabbit corneal assay, Anat. Embryol., 183, 1167-1174 (1991)). Преди това културалната среда се ултрафилтрира, лиофилизира и след това се ресуспендира в буфер. При желание може да се извърши допълнителен етап на пречистване над катионна колона.

Индукция на I'-промотора

Индуцируемостта на I'-промотора от ауксин се тества с 5 micromol/l индол-3-оцетна ки-

селина (IAA). 100 microl кратно количество протопласти от трансформационна проба с pNA201 се прехвърлят 5 дена след трансформацията в ямките на 96-ямкова микротитърна плочка (Nunc, Wiesbaden). Протопластните суспензии се инкубират 5 h с IAA (крайна концентрация = 5 microM). Оценката на индукционните опити става директно след изтичане на инкубационното време с помощта на качествено доказване на бета-глюкуронидаза.

Качествено доказване на бета-глюкуронидаза

Бета-глюкуронидазната активност се определя с качествен тест (A. R. Jefferson, Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system, Plant Mol. Rep., 5, 387-405 (1987)).

Субстратен буфер: 50 mM $K_3Fe(CN)_6$,
50 mM Na_2HPO_4 ,
50 mM $K_4Fe(CN)_6$, 1% (об/об) Тритон X-100

50 mM Na_2HPO_4 , 10 mM EDTA, pH 7.0
4 mg/ml PVP (MG 10000)

Оцветяващ разтвор: 12.5 mg 5-бромо-4-хлоро-3-иноил-глюкоронова киселина (Biomol, Hamburg), разтворена в 250 microl N,N-диметилформамид/50 ml субстратен буфер

Мъховите протонемии и протопласти в Кнорсреда, съответно в регенерационна среда, се инкубират в същия обем от оцветяващия разтвор при 37°C до 72 h и веднага след това се оценяват с микроскоп.

Резултати

Хомогенност на пробата от биореакторна култура

При клетъчни култури стандартизираното вземане на проби се осигурява само от хомогенни култури. Израстването на протонемите до формиране на дълги клетъчни влакна води след продълъг живот на културите до образуване на клетъчни агрегати и поради това - до нехомогенно разпределение на растителния материал в течните култури. За избягване на това образуване на агрегати през определени интервали от време - в биореактора след 10-ия ден: на всеки два дена, а във вибрационна култура: на всеки 12 дена - се извършва раздробяване на протонемите чрез използване на високооборотни бъркалки/хомогенизатори. За да се постигнат и при продължително отглеждане на културата постоянни условия в биореактора при едновременно стандартизирано

вземане на проби, се препоръчва модификацията на турбинна бъркалка с три бъркащи лопатки посредством префункциониране на ръбовете на бъркащите лопатки чрез заточването им като режещи лопатки. Така, при непрекъснато "бъркане" с 300-500 оборота става възможно постигането на хомогенни биореакторни култури.

Развитието на биомасата (в TG [mg/l]) за време от 35 дни (840 h) при 500 оборота в контролни култури с турбинна бъркалка е същото, както в биореакторни култури, които се разбъркват с бъркалка с режещи лопатки.

Хомогенността на културите се оценява чрез сравняване на по 6 съответни успоредни вземания на проби. Като сравнителен параметър се определя сухото тегло на растителния материал от 100 ml пробен обем. При използване на непроменена турбинна бъркалка стандартното отклонение се увеличава с покачването на концентрацията на биомасата. Разбъркването с бъркалка с режещи лопатки има за резултат факта, че стандартните отклонения на пробите остават еднакво малки. Това води до извода, че с модифицираната бъркалка за време от 35 дена може да се получи равномерно хомогенна култура.

Изследвания за индуцируемостта на 1'-промотора

В плазмиди pNA201 1'-промоторът се намира като контролен елемент преди gus-гена. За опити върху индуцируемостта при мъхове познатият бета-глюкуронидазен тест е подходящ като доказателен за експресия. В опити с трансгенен тютюн се наблюдава, че 1'-промоторът води до експресия на бета-глюкуронидаза в тъкани с високо съдържание на ауксин, поради което за този промотор се предполага зависимост от ауксина. Индуцируемостта на 1'-промотора от ауксин в *Physcomitrella patens* се изследва в преходно трансформирани протопласти.

Трансформационните състави се подлагат със (5 h) и без инкубация с 5 micromol индол-3-оцетна киселина (IAA) на бета-глюкуронидазния тест. В контролите без добавяне на IAA при микроскопската оценка в никой от съставите не се откриват сини протопласти. Оценката на протопластите, инкубирани с ауксин, установява доказателство за експресията на gus-гена. Чрез сините протопласти се отчита дял на трансформация от 3×10^{-4} . Това е явно доказателство за индуцируемостта на 1'-промотора в пре-

ходно трансформирани мъхови протопласти от растителния хормон ауксин.

Получаване на вектори за VEGF-трансформации

За трансформации на сДНК на VEGF₁₂₁ без главна последователност, означава по-натък като VEGFC, и на сДНК на VEGF₁₂₁ с главна последователност, означава като VEGFP, при *Physcomitrella* е необходимо последователностите да се клонират между подходяща за растения промоторна/терминална единица. За това се избират 35S CaMV-промоторът и принадлежащият към него полиаденилизиращ сигнал. Подготвените по съответен начин сДНК-последователности на VEGF се клонират в Sma I-рестрикционното място от множественото място за клониране на вектора pRT101.

С един пример, изведен от крайната област на 35S-промотора, получените вектори (pRT101 VEGFC 3 и VEGFP21) се секвентират и се определя точното интегриране между промотор и полиаденилизиращото място.

Получените касети се отделят с рестрикционния ензим *Hin* dIII и се клонират в същия трансформационен вектор pRT99 на *Hin* dIII-мястото на разкъсване (pRT99 VEGFC 3 и VEGFP 21). Ориентирането на касетите към NPTII-касетата може да се установи чрез рестрикция с Sma I и *Hinc* II. При ориентация промотор към полиаденилизиращ сигнал се получава голям фрагмент 5250 (VEGFC), съответно 5380 bp (VEGFP), при обратна ориентация се получава голям фрагмент 1110 (VEGFC)/1230 (VEGFP), както и един голям фрагмент 4150 bp (VEGFC и P). При рестрикционни анализи се разпознава само един 5250/5380 bp-фрагмент, като така се осъществява включване на VEGFC/P-касетите при ориентация промотор към полиаденилизиращ сигнал спрямо *nptII*-гена на pRT99.

VEGFC-трансформации в *Physcomitrella*

Абсолютният трансформационен дял за трансформация на VEGFC-конструкта в протопласти от дивия вид при постоянна стабилност на трансформантите след многократна смяна на Кпор-средата със селективна среда възлиза на 0.5×10^{-5} .

Доказване на интегрирането на трансформирания плазмид

Доказването на успешно интегриране в растителния геном се осъществява при използ-

ване на Southern-хибридизиране. Като сонди се прилагат, от една страна, един Nco I-фрагмент на *npt II*-гена от pRT99, и от друга страна - един Nde I/Sal I-фрагмент на VEGFC от pCYTEXP-VEGF₁₂₁.

Откритите сигнали в неразцепената цяла ДНК на трансформантите потвърждават успешното интегриране на плазмидната ДНК в растителния геном. Съдържанието на цялата 35S-VEGFC-PolyA-касета се изследва и след интегрирането чрез рестрикцията с *Hin* dIII. Доколкото касетата е останала интактна при интегрирането, с този рестрикционен ензим се отцепва един 1100 bp голям фрагмент от цялата ДНК.

Хибридиращата проба с VEGF-сондата показва при всички трансформанти фрагмент с 1100 bp. С това се доказва интегрирането на пълноценна експресионна VEGFC-единица, което е предпоставка за точната транскрипция и експресия на VEGF₁₂₁ в мъха.

Доказване на транскрипцията на хетероложните гени

Транскриптите на хетероложните гени VEGFC и NPTII от трансформантите се доказват чрез нерадиоактивна детекторна DIG-система при използване на VEGFC- и NPTII-сондите. Големините на откритите във флуорограмата транскрипти са 760 нуклеотида за VEGFC-транскрипта и 1100 нуклеотида за NPTII-транскрипта и поради това са в съответния очакван порядък. В WT-контролата, съответно на очакванията, не се установява никой от двата хетероложни транскрипта.

Анализ на трансформантите с човешки транзитен пептид

Чрез PEG-опосредствания ДНК-трансфер на 50 μ g pRT99 21 плазмидна ДНК за трансформационен състав се получават трансформанти, които са с дългосрочна стабилност в селекционна среда. От тях се получава стабилен трансформационен дял от 3.3×10^{-6} .

Доказване на интегрирането на трансформирания плазмид

Доказването на интегрирането с транзитен пептид при описаните по-горе трансформанти се извършва, както бе представено по-горе, с метода на Southern-хибридизиране при използване на посочените сонди, като хибридирането на разцепената с *Hin* dIII обща ДНК разпознава чрез VEGF-сондата един 1230 bp-

фрагмент: доказателство за пълноценността на интегрираната 35S-VEGFP-PolyA-касета.

Доказване на транскрипцията на хетероложните гени

С по-горе представения метод могат да бъдат доказани както NPTII-, така и VEGFP-транскрипти. 5

Доказване на човешки VEGF в трансгенни мъхови клетки с конфокален лазерно-сканиращ микроскоп 10

При този метод изследваният протеин се маркира директно във фиксираните клетки. Оценката се извършва с конфокален лазерно-сканиращ микроскоп, с който се постига по-добра разделителна способност, отколкото с нормалния светлинен микроскоп. 15

В VEGF-трансформантите рекомбинантният VEGF₁₂₁-протеин, когато е доказуем в мъховите клетки, трябва да акумулира в цитоплазмата. В VEGFP-трансформантите той трябва да бъде установим в ER-системата, ако преходният пептид функционира като сигнал в мъха. 20

Посредством метода на индиректната имунофлуоресценция и компютърния анализ чрез конфокалния лазерно-сканиращ микроскоп се е удало доказването на експресията на човешкия VEGF₁₂₁ в трансгенни мъхови клетки. Освен това се доказва, че с помощта на принадлежащия към него транзитен пептид в трансгенен мъх VEGF₁₂₁ успешно се транспортира в ендоплазмения ретикулум. 25 30

Изследване на наличието на VEGF в културалната среда

Кратно количество от културалната среда в присъствието на PVP с обем от 200 µl се изследва посредством ELISA-тест и показва, че трансформираните с експресионната касета, включваща кодиращата последователност за транзитния пептид, мъхови растения са в състояние да освобождават VEGF в средата. Положителните резултати потвърждават наличи- 35 40

ето на функционален VEGF-протеин.

Изследване на биологичната активност

Двата теста, приложени за проверка на биологичната активност на освободения в културалната среда VEGF-протеин дават положителни резултати и доказват, че произведеният съгласно изобретението VEGF може да бъде добиван от културалната среда с желаната биологична активност.

Патентни претенции

1. Метод за производство на хетероложни протеинови субстанции в растителни материали, характеризиращ се с това, че като растителен материал се използва тъкан от мъх и получаването на произведените протеинови субстанции от културалната среда се осъществява по същество без нарушаване на произвеждащата тъкан или клетки.

2. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че освободената в културалната среда протеинова субстанция е биологично активна.

3. Метод съгласно претенция 1 или 2, характеризиращ се с това, че се използва културална среда, която по същество е свободна от захари, витамини и фитохормони, съответно, техни функционални фрагменти.

4. Метод съгласно една от претенции от 1 до 3, характеризиращ се с това, че мъховата тъкан е избрана от групата на листостеблените и чернодробни мъхове.

5. Метод съгласно претенция 4, характеризиращ се с това, че мъховата тъкан от листостеблени мъхове е избрана от групата, състояща се от *Physcomitrella*, *Funaria*, *Sphagnum* и *Ceratodon*.

6. Метод съгласно претенция 4, характеризиращ се с това, че мъховата тъкан от чернодробни мъхове е избрана от групата, състояща се от *Marchantia* и *Sphaerocarpos*.

Издание на Патентното ведомство на Република България
1797 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: М. Станкова