

PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19) ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **27.09.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **01.10.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/19947290**

(33) Země priority: **DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.07.2002**
(Věstník č. 7/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/DE00/03374**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/25456**

(21) Číslo dokumentu:

2002 - 1061

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/82

C 12 P 21/02

A 01 H 5/00

//(C 07 K 14/52)

(71) Přihlašovatel:
**GREENOVATION BIOTECH GMBH, Freiburg im
Breisgau, DE;**

(72) Původce:
**Reski Ralf, Oberried, DE;
Gorr Gilbert, Freiburg im Breisgau, DE;**

(74) Zástupce:
Vandělíková Jana Ing., Petrská 12, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
Způsob výroby bílkovinných látek

(57) Anotace:

Řešení se týká nového způsobu výroby heterologních bílkovinných látek z rostlinného materiálu. Zejména se týká způsobu, při němž se vybrané rostliny měchů kultivují a požadované sílové látky se získávají z kultivačního média, v podstatě bez porušení tkáně a buněk. Tento způsob umožňuje cenově efektivní výrobu všech druhů heterologních bílkovin v jejich aktivní formě za standardních podmínek.

22.04.00

- 1 -

PV 2002-1061

30662

Způsob výroby bílkovinných látek

Oblast techniky

Předložený vynález se obecně týká oblasti výroby bílkovinných látek v rostlinném materiálu. Vynález se týká zvláště nového způsobu výroby požadovaných bílkovinných látek v mechách.

Dosavadní stav techniky

Využívání biotechnologických metod k výrobním účelům je pro lidstvo důležitou možností výroby látek, které nemohou být vyráběny ekonomicky jinými způsoby – pokud vůbec mohou být vyráběny – například chemickou syntézou, a které jsou jako suroviny dostupné z přirozených zdrojů v nedostatečném množství. I když je známo přes 10000 sekundárních metabolitů rostlinných látek, v průmyslovém měřítku se vyrábí pomocí rostlinných buněčných kultur pouze několik těchto sloučenin. Tyto látky jsou převážně farmaceuticky účinnými sekundárními metabolity. Mezi příklady, které lze zmínit náleží a) berberin (výroba v měřítku 4000 l), který má bakteriostatické a fungicidní účinky (Fujita, Y. a Tabata, M. in: Plant tissue and cell culture, Plant science, 3, 169; Green, C. E., et al., (Ed.), A. R. Liss Inc., New York, 1987), b) shikonin (v měřítku 750 l), který má antibiotické a protizánětlivé účinky (Tabata, M. a Fujita, Y., in: Biotechnology in plant science, 207 – 218, Day, P., et al., (Ed.), Academic Press, Orlando, 1985), a c) paclitaxel (v měřítku 75000 l) známý lépe pod názvem taxol, který má protinádorové účinky (Jaziri, M., et al., Taxus sp. cell, tissue and organ cultures as alternative sources for taxoids production: a literature survey, Plant Cel Tiss. Org. Cult., 46, 59 – 75, 1996).

Další důležitou biotechnologickou metodou, ve které se využívají rostlinné buněčné kultury, je biotransformace digitoxinu na digoxin – léčivo na srdce a krevní oběh. Tato stereospecifická hydroxylační reakce se úspěšně provádí v bioreaktoru s kulturami

Digitalis lanata (Reinhard, E. a Kreis, W., Kultivierung von pflanzlichen Zellen im Bioreaktor [Kultivace rostlinných buněk v bioreaktoru]; Bio. Engin., 5, 135 – 136, 1989) s vysokým výtěžky. Dosavadní a rozsáhlou rešerši využití rostlinných buněčných kultur v biotechnologii lze nalézt v Mühlbach, H.-P., Use of plant cell cultures in biotechnology, Biotechnol. Annu. Rev., 4, 113 – 176, 1998).

Vývoj metod genetické transformace u vyšších rostlin na počátku devadesátých let umožnil významně zvýšit produktivitu specifických sekundárních složek rostlinami transformací genů specifickými klíčovými enzymy odpovídajícími metabolickými cestami. Byly využity nejen transgenní intaktní rostliny, ale také rostlinné buněčné kultury. Jako příklady lze zmínit změny exprese bakteriální lysindekarboxylázy v transgenních kulturách kořenových vláken *Nicotiana tabacum*, které zvýšily výtěžek biogenních aminů kadaverinu a anabasinu až 14 krát (Berlin, J., et al., Genetic modification of plant secondary metabolism: Alternation of product levels by overexpression of amino acid decarboxylases, in: Advances in Plant Biology, Studies in Plant Science, 4, 57 – 81, Ryu, D. D. Y. a Furasaki, S. (Ed.), Elsevier, Amsterdam, 1994).

Možnost transferu DNK do rostlin nejenže otevřela kvantitativní a kvalitativní změny součástí rostlin, ale rostliny a rostlinné buněčné kultury se navíc staly zajímavější pro výrobu heterologních proteinů (Moffat, A. S., High-Tech plants promise a bumper crop of new products, Science, 256, 770 – 771, 1992) a k tomu byly zvoleny dva principiálně odlišné přístupy.

Jeden přístup spočívá ve výrobě heterologních proteinů v transgenních intaktních rostlinách. Vedle výroby protilátek v transgenních tabákových rostlinách (Ma, J. K.-C., et al., Generation and assembly of secretory antibodies in plants, Science, 268, 716 – 719, 1995), byla popsána exprese a regulované zpracování lidského

serumalbuminu jak v transgenních tabákových rostlinách, tak v transgenních rostlinách brambor (Sijmons, P. C., et al., Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants, *Bio/Techn.*, 8, 217 – 221, 1990). Lidský epidermální růstový faktor (hEGF) byl v transgenních tabákových rostlinách expresován také (Salmanian, A.-H., et al., Synthesis and expression of the gene for human epidermal growth factor in transgenic potato plants, *Biotechnol. Lett.*, 18, 1095 – 1098, 1996). Byly však využity i jiné rostliny. Leu-encefalin byl úspěšně vyroben s použitím *Arabidopsis thaliana* a *Brassica napus* (Krebbbers, E. a Vandekerckhove, J., Production of peptides in plant seeds, *Tibtech*, 8, 1 – 3, 1990). Dále byly k expresi chimerických virových částic, které působí jako vakcíny, využity transgenní rostliny *Vigna unguiculata* (Dalsgaard, K., et al., Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease, *Nat. Biotech.*, 15, 248 – 252, 1997).

Principiální nevýhodou používání intaktních rostlin jako jsou rostliny uvedené výše jako příklady, je nutnost jejich růstu, který je časově náročný a nákladný a při výrobě v průmyslovém měřítku vyžadují velkou kultivační plochu. Izolace požadovaných cílových látek z intaktních rostlin vyžaduje navíc obvykle složité výrobní postupy, zvláště pokud musí složení a jakost výrobku splňovat vysoké požadavky, jako je tomu v případě látek, které se mají používat pro farmaceutické nebo potravinářské účely.

Druhý přístup spočívá ve využití transgenních tabákových buněčných kultur k výrobě protilátek. Popsány jsou například exprese protilátek a jejich vylučování do media (Magnuson, N. S., et al., Enhanced recovery of a secreted mammalian protein from suspension culture of genetically modified tobacco cells, *Prot. Expr. Pur.*, 7, 220 – 228, 1996). Protože čištění heterologních proteinů z buněk je navíc složité, poskytuje vylučování cílového proteinu do media významné zlepšení. Výroba rekombinantů farmaceuticky vyhovujících proteinů v buněčných kulturách je také zajímavá z bezpečnostního hlediska, protože transgenní rostlinné buňky mohou růst výsadně

v bioreaktorech a nemusejí se vypouštět. Nezbytnou kultivační hmotu bylo umožněno vyrobit při vývoji bioreaktorů pro rostlinné heterotropní buněčné kultury ve větším měřítku (například Shuler, M. L., et al., Bioreactor engineering as an enabling technology to tap biodiversity: The case of taxol., Ann. N. Y. Acad. Sci., 745, 455 – 461, 1994).

Základní nevýhodou tohoto druhého přístupu, ve kterém se používají suspenze rostlinných kultur je malá rychlost růstu, poměrně pomalá tvorba sekundárních metabolitů, inhibice vytváření produktu při vysokých hustotách buněk, a z toho vyplývající nízká objemová produktivita, tvorba agregátů a složek buněčných stěn a zvýšená citlivost buněk na smykové napětí. Také je nutno vzít v potaz, že se při používání heterotropních buněčných kultur musejí opatřovat komplexní media s mnohými složkami, z nichž některé jsou drahé. Nejzávažnější nevýhodou, kterou je však nutno zmínit, je výskyt somaklonálních změn v rostlinných buněčných kulturách in vitro, které sebou při výrobě heterologních proteinů přinášejí kvantitativní a kvalitativní změny (viz například Jones, M. G. K. a Lindsey, K., Plant biotechnology, in: Molecular biology and biotechnology; Walker, J. M. a Gingold, E. W. (Eds.), 2. vyd., Royal Soc. of Chem., Burlington House, London, 1988). Heterogenita vytvořených produktů a jejich funkční vlastnosti nelze akceptovat, zvláště ve spojení s výrobou farmaceutických a dalších požadovaných látek, jejichž úřední schválení vyžaduje zajištění spolehlivé jakosti a normalizovaný výrobní postup.

Podstata vynálezu

Předmětem předloženého vynálezu je tedy zajištění způsobu normalizované výroby heterologních bílkovinných látek v rostlinných materiálech, které nezbytně eliminují nejen výše popisované nevýhody používání intaktních rostlin, ale také nevýhody používání systémů buněčných kultur.

Tohoto předmětu je podle vynálezu dosaženo zavedením nového způsobu výroby heterologních bílkovinných látek v rostlinném materiálu, ve kterém se plně diferencované rostliny mechu ponechávají růst za normalizovaných podmínek a vytvořené bílkovinné látky se získávají z kultivačního media bez porušení produkčních tkání či buněk.

Termín „bílkovinná látka“ tak, jak se zde používá, představuje peptidy, polypeptidy a proteiny a také jejich fragmenty, které jsou vhodné zvláště k diagnostickým, klinickým, farmaceutickým a potravinářským účelům. Zahrnuje také molekuly, které mají peptidovou vazbu a jejichž informace je rostlinným materiálem přenášena.

U řešení, kterému se podle předloženého vynálezu dává přednost, se požadované heterologní bílkovinné látky uvolňují do kultivačního media v biologicky aktivní formě.

Termínem „biologicky aktivní“ tak, jak se používá v předloženém popisu, se míní to, že cílové látky vybavené tímto atributem mají funkční vlastnosti požadované či vyžadované pro odpovídající účel. Pokud je například vyžadováno vyrobit protilátky, je vyrobený protein nebo jeho funkční fragment biologicky aktivní pokud je schopen vyvolat předpokládanou specifickou vazbu s antigenem. Zkušeným pracovníkům je jasné, že se ne vždy pro takový účel požaduje úplný protein, ale že je možné vyhledávat epitopy či nízkomolekulární struktury, které zajistí požadovanou biologickou aktivitu nebo funkci. Enzym je například biologicky aktivní, pokud je schopen konvertovat svůj cílový substrát.

V dalším řešení podle vynálezu, kterému se dává přednost, se ponechává rostlinný materiál růst ve formě intaktních rostlin mechů v kultivačním mediu, které je nutně prosté cukrů, vitaminů a fytohormonů či jejich funkčních fragmentů.

Způsob podle vynálezu umožňuje růst intaktních a plně diferencovaných rostlin za fotoautotropních podmínek, které lze normalizovat, tj. bez požadavků na přidavku cukrů, vitaminů a fytohormonů a podobných tak, jako tomu bylo u předchozích systémů využívajících heterotropní suspenze buněčných kultur. Jelikož je využíváno laciné a jednoduché kultivační medium, dociluje se jednotlivými stupni získávání a čištění požadovaných cílových látek ve významném množství.

Rostlinným materiálem, který se podle způsobu tohoto vynálezu používá, je přednostně intaktní mechová rostlina vybíraná ze skupiny mechů zahrnující druhy ledviníků rodu *Physcomitrella*, *Funaria*, *Sphagnum* a *Ceratodon* a také *Marchantia* a *Sphaerocarpos*, kterým se dává zvláště přednost. Způsob podle vynálezu se nejlépe provádí s využitím mechu *Physcomitrella patens*.

V dalším řešení, kterému se dává přednost, se skelet kyseliny nukleové používá k transformačnímu kódování nejen požadovaných bílkovinných látek, ale také k převodu peptidů k vylučování látky z hostitelské buňky do kultivačního media. Jak je odborníkům zřejmé, podle tohoto vynálezu může být použita jakákoliv autologní a heterologní sekvence kyseliny nukleové, která se může použít k vytvoření expresní kazety k transformování pracovní tkáně. K transportu endoplasmického retikula či buněk se dává přednost zvláště využívání signálních peptidů.

Práce provedené v předloženém vynálezu potvrzují, že výše popsany problém somaklonální variace, se kterým se počítá v buněčných kulturách, neexistuje ve fotoautotrofických kapalných kulturách mechů. Mechy použité podle vynálezu mají dále před jinými systémy jasnou sekvenci přesně definovaných diferenciačních stupňů (chloronema, caulonema, očko, gametofory), které mohou být ovlivněny přidávkou hormonů (kyselina indol-3-octová vyvolává vznik caulonemy, isopentenyladenin vyvolává vznik oček (viz například Ashton, N. W., et al., Analysis of gametophytic development in the moss, *Physcomitrella patens*, using auxin and cytokinin resistant mutants, *Planta*, 144, 427 – 435, 1979). V kultivačních bioreaktorech je tedy možná směrovaná diferenciačně-specifická exprese heterologních proteinů a synchronně dělená, čistá, a tím homogenní kultura chloronema je podle vynálezu zvláště vhodná pro svoji kontrolovatelnou a rovnoměrnou produkci proteinu v bioreaktoru a pro svoji vhodnost využití na hormonech závislých či diferenciačně specifických promotorů.

Vedle takových expresních systémů lze také podle vynálezu použít systém indukovatelných promotorů, zvláště k výrobě proteinů s krátkým poločasem rozpadu, nebo cytotoxických, kde se přednostně používá 1' -promotor *Agrobacterium tumefaciens*.

Kultivace mechů navržená podle vynálezu k výrobě heterologních proteinů za ekonomických podmínek může být realizována například při použití *Physcomitrelly* v objemech od 20 ml přes 6 l až do 10 l a výše v míchaných kulturách nebo v provzdušňovaných skleněných nádržích (viz například Reski, R., Zell- und molekularbiologische Untersuchungen der cytokinin-induzierbaren Gewebedifferenzierung und Chloroplastenteilung bei *Physcomitrella patens* (Hedw.) B. S. G., [Buněčné a molekulárně-biologické studie diferenciace cytokininem indukovatelných tkání a dělení chloroplastů ve *Physcomitrella patens* (Hedw.) B. S.

G.] doktorská disertace, Universita Hamburg, 1990). Jelikož to je kultura diferencovaných fotoautotropních rostlin, nevyžaduje medium ani dodávání rostlinných hormonů, ani vitaminů či cukrů. V porovnání s požadavky na komplexní media, například zvířecí buněčné kultury, je cena nižší až stokrát. Podle vynálezu se ukazuje, že výtěžek biologicky aktivního heterologního proteinu lze v kultivačním mediu zvýšit v přítomnosti PVP až 35 krát, a proto se podle vynálezu dává přednost PVP v kultivačním mediu.

Podrobné informace o kultivaci dalších mechů v bioreaktorech, které jsou podle vynálezu vhodné, jako například *Leptobryum pyriforme* a *Sphagnum magellanicum*, jsou popsány v předešlých pracích (viz například Wilbert, E., *Biotechnologische Studien zur Massenkultur von Moosen unter besonderer Berücksichtigung des Arachidonsäurestoffwechsels* [Biotechnologické studie týkající se kultur mechů se zvláštním ohledem na metabolismus kyseliny arachidonové], doktorská disertace, Universita v Mainzu, 1991; Rudolph, H. a Rasmussen, S., *Studies on secondary metabolism of Sphagnum cultivated in bioreactors*, *Crypt. Bot.*, 3, 67 – 73, 1992). Pro účely předloženého vynálezu se dává zvláště přednost použití *Physcomitrelly*, a to zvláště proto, že u tohoto organismu jsou již prozkoumány všechny obvyklé molekulárně-biologické technologie (rešerše viz Reski, R., *Development, genetics and molecular biology of mosses*, *Bot. Acta*, 111, 1 – 15, 1998).

Pro biotechnologické využívání *Physcomitrelly* byly pro výrobu heterologních proteinů vyvinuty vhodné transformační systémy. Úspěšné transformace byly například provedeny přímým přenosem DNK do tkáně *protonema* s použitím nastřelování částic. Úspěšný byl též transfer DNK do mechových protoplastů zprostředkovaný PEG. Tato transformační metoda byla opakovaně popsána u *Physcomitrelly* a vedla jak k přechodovým, tak stabilním transformantům (viz například Reutter, K. a Reski, R., *Production of a heterologous protein in bioreactor*

cultures of fully differentiated moss plants, Pl. Tissue culture, Biotech., 2, 142 – 147, 1996).

I když je předložený vynález principiálně vhodný k výrobě jakékoliv bílkovinné látky, bude zde ukázána výroba odpovídajícího farmaceutického proteinu se zvláštním zřetelem na lidský vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF).

VEGF byl poprvé izolován Ferrarem, N. a Henzelem, W. J. (Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., 161, 851 – 858, 1989) a charakterizovaný jako regulační faktor pro řízenou angiogenezi a endoteliální dělení buněk za běžných fyziologických podmínek (Ferrara, N., et al., The vascular endothelial growth factor family of polypeptides, J. Cell. Biochem., 47, 211 – 218, 1991). Autoři také uvádějí, že tento růstový faktor působí vysoce specificky na vaskulární endoteliální buňky a je inaktivní vzhledem k jiným buněčným typům. VEGF je homodimerický glykoprotein vázaný disulfidovými můstky. Známý jsou čtyři formy lidského VEGF. Čtyři isomerní formy jsou aminokyseliny dlouhé 121, 165, 189 a 206 a jsou tvořené alternativně provázanými VEGF RNK. VEGF₂₀₆ byl zjištěn pouze ve fetální jaterní cDNK, zatímco VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ a VEGF₁₈₉ byly zjištěny ve velkém počtu nádorových buněk a nádorových tkání. Všechny isomerní formy VEGF měly naváděcí sekvence k sekreci, avšak účinně jsou vylučovány pouze dvě nejmenší formy (viz například Martiny – Baron, G. a Marmé, D., VEGF-mediated tumor angiogenesis: A new target for cancer therapy, Curr. Opin. Biotechnol., 6, 675 – 680, 1995).

Podstatné množství VEGF bylo a je stále požadováno jak pro vývoj a zdokonalování současných požadavků při terapii nádorů a k charakterizaci VEGF. V časných stádiích práce na s předloženém vynálezu vše, co bylo do této doby popsáno, byla výroba rekombinantu VEGF v buňkách hmyzu expresí systému baculoviru (například Fiebich, B. L., et al., Synthesis and assembly of functionally active human vascular endothelial growth factor homodimers in insect cells, Eur. J. Biochem., 211, 19 – 26, 1993). Následovaly *Saccharomyces cerevisiae* (Kondo, S., et al., The shortest isoform of human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF₁₃₁) produced by *Saccharomyces cerevisiae* promotes both angiogenesis and vascular permeability, Biochim. Biophys. Acta, 1243, 195 – 202, 1995), kvasinky *Pichia pastoris* (Mohanraj, D., et al., Expression of biologically active vascular endothelial growth factor in Yeast, Growth factors, 12, 17 – 27, 1995) a *Escherichia coli* (Siemeister, G., et al., Expression of biologically active isoforms of the tumor angiogenesis factor VEGF in *Escherichia coli*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 222, 249 – 255, 1996) jako další produkční organismy. Biologicky aktivní VEGF byl vyroben všemi těmito rekombinačními systémy. Expresní systém *E. coli* je však komplikovaný co se týká čištění a rekonstituce proteinu, protože se uzavírá do tělních dutin.

Příklady

Shrnutí

Zavedení kontrolovatelných masových kultur *Physcomitrella patens* (Reuter a Reski, loc. cit.) a způsoby transferu DNK do mechu *Physcomitrella patens* (Reutter, K., Expression heterologer Gene in *Physcomitrella patens* (Hedw.) B. S. G. [Expresse

heterologních genů po *Physcomitrella patens* (Hedw.) B. S. G.], doktorská disertace na Universitě v Hamburgu, 1994) vytvořil základní předpoklad k biotechnologickému využívání této rostliny.

Práce provedené na počátku prokázaly dlouhodobou stabilitu integrace při použití transgenních linií *Physcomitrelly* původem od *Reuterra* (loc. cit., 1994). Expres heterologních genů *npt II* a *gus*, které byly jako příklad použity pro tento účel byla ještě detekovatelná po čtyřech letech.

Byla optimalizována bioreaktorová kultivace *Physcomitrelly*. Bylo vyvinuto míchadlo, které provádělo rozměňování protonemat a tím zajišťovalo požadovanou homogenitu kultury při trvalých otáčkách 300 až 500 1.min^{-1} . Bylo tak umožněno normalizované vzorkování. Současně přiváděný vzduch byl v kapalně kultuře distribuován rovnoměrněji. Za těchto podmínek bylo prokázáno, že se vývoj biomasy a proteinu probíhá bez vnější regulace pH stejným způsobem jako při regulaci pH; je překvapivé, že regulace pH není tudíž nutná. V poloprovozním měřítku se týdně vyprodukovala 500 mg sušiny biomasy nebo 22 mg celkového proteinu na litr. To znamená pětinasobný nárůst produkce biomasy v kultuře v 5 l skleněné baňce. Snížení koncentrace sole v Knopově mediu na desetinu vedlo k podobným hodnotám, a tím ke snížení nákladů.

Přídavek 5 mM vlnanu amonného urychlilo vývoj biomasy zkrácením lag fáze. Přídavek vlnanu amonného vydal souběžně kultury, které virtuálně sestávaly výhradně z buněk chloronema. Pomocí průtokové cytometrie bylo prokázáno, že virtuálně sto procent buněk těchto kultur bylo ve fázi G2/M buněčného cyklu. Tento výsledek byl potvrzen dalšími fyziologickými studiemi s auxinem a studiemi s diferenčially-specifickými mutanty *cal112* a *cal113* a bylo zjištěno, že buňky

caulonema jsou ve fázi G1/G0 většinu času, zatímco buňky chloronema jsou převážně ve fázi G2/M.

Promotor byl studován na možnou indukovatelnost do mechu za použití agrobakteriálního 1'-promotoru. Jako markerový gen byl použit gen β -glukuronidasy (gus). V přechodně transformovaných mechových protoplastech (transformační rychlost = $3 \cdot 10^{-4}$) byla po indukci 5 μ M kyselinou indol-3-octovou pozorována exprese genu gus. V kontrolních vzorcích nebyla pozorována žádná exprese.

Gen pro „sestřiženou“ formu lidského vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF₁₂₁) aminokyseliny 121 byl převeden do Physcomitrelly transformační rychlostí $0,5 \cdot 10^{-5}$ a $3,3 \cdot 10^{-6}$. Až potud byl gen klonován z konstitutivního promotoru 35S a do transformačního vektoru pRT99, který je pro rostliny vhodný. U druhého přístupu bylo sekvenční kódování odpovídajícího lidského tranzitního peptidu ER dodatečně klonováno. Analýzou Southern byla potvrzena integrace heterologní DNK a popsán typ integrace získaných stabilních transformantů. Jiná analýza (Northern analysis) v těchto transformantech potvrdila existenci npt II a dvou VEGF transskriptů. Exprese VEGF₁₂₁ v buňkách mechu byla prokázána nepřímou imunofluorescencí. Protein byl nepochybně lokalizován v buňkách pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu. Tyto studie odhalily na transformantech bez tranzitních peptidů, že protein je lokalizován zvláště v cytoplazmě. U transformantů, které navíc obsahovaly tranzitní peptid ER bylo možno zjistit protein v oblasti jádra a v apikálních oblastech apikálních buněk oblasti s velmi vysokým obsahem ER. Biologická aktivita heterologních proteinů produkovaných podle vynálezu byla ověřena provedením zkoušky ELISA a dvou funkčních zkoušek s proteinem VEGF získaných z kultivačního media.

Materiály a metody

Pokud není v dalším textu uvedeno jinak, byly použité chemikálie analytické čistoty a byly získány od firmy Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) a Sigma (Deisenhofen).

Roztoky byly připraveny z přečištěné apyrogenní vody, dále označované H₂O získané z přístroje Milli-Q water purification systém (Milipore, Eschborn).

Restrikční endonukleázy, enzymy modifikující DNK a soupravy pro molekulární biologii byly získány od AGS (Heidelberg), Amersham (Braunschweig), Applied Biosystems (Weiterstadt), Biometra (Göttingen), Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim), Genomed (Bad Oeynhausen), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), Novagen (Madison, Wisconsin, USA), Pharmacia (Freiburg), Qiagen (Hilden) a Stratagene (Heidelberg). Pokud není jinak uvedeno, byly použity v souladu s pokyny výrobce.

Vektory a struktury

Plasmid pCYTEXP-VEGF₁₂₁ je derivátem pCYTEXP1 (Belev, T. N., et al., A fully modular vector systém for the optimization of gene expression in Escherichia coli, Plasmid, 26, 147 – 150, 1991), ve kterém je integrovaná cDNK lidské VEGF₁₂₁ pro expresi do E. coli. VEGF₁₂₁ cDNK je excizován z pCYTEXP-VEGF₁₂₁ za použití restrikční endonukleazy Nde I a Sal I, přečištěn, zatupen a klonován do štěpné Sma I polohy pRT101 (Töpfer, R., et al., A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions, Nucleic Acids Res., 15, 5890, 1987) mezi promotor 35S a polyadenylační sekvenci CaMV. Za použití Hin dIII je takto získaná kazeta opět

excizována a klonována do restrikční štěpné polohy *Hin* dIII transformačního vektoru pRT99. pRT99 obsahuje nejen vícečetná klonovací místa, ale také gen neomycinové fosfotransferázy za řízení promotorem 35S a odpovídající polyadenylační sekvenci CaMV (Töpfer, R., et al., Versatile cloning vectors for transient gene expression and direct gene transfer in plant cells, *Nucleic Acids Res.*, 16, 8725, 1988). Tento gen propůjčuje antibiotiku G418 ve stabilních transformovaných rostlinách odolnost. Plasmidy byly replikovány na kmeni DH5 α *Escherichia coli* (Sambrook, J., et al., *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989).

Za použití restrikčního enzymu *Bam* HI a *Bgl* II je cDNK excizována z vektoru pVE-121, který byl původně připraven pro expresi VEGF₁₂₁ v buňkách hmyzu, a který navíc vedle sekvence VEGF₁₂₁ obsahuje kódování DNK přirozeného tranzitního peptidu, který v systémech zvířecích buněk zprostředkuje sekreci do media přes endoplasmové retikulum (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) a za použití pRT101 je klonován na pRT99 a verifikován.

Plasmid pNA201 je derivátem binárního vektoru pBI101 (Jefferson, A. R., et al., Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system, *Plant Mol. Rep.*, 5, 387 – 405, 1987). Jako marker pro rostliny obsahuje gen *nptII* v nopalín synthasovém promotoru. Gen *gus*, který je také přítomen, je regulován 1'-promotorem z *Agrobacterium tumefaciens*. pNA201 je vhodný pro přímou transformaci *Physcomitrella patens*.

Protilátky

Proti proteinu VEGF se používají dvě různé protilátky. První protilátkou je králičí anti-VEGF protilátka a je směřována proti syntetickému peptidu, který odpovídá aminokyselinám 1 až 20 VEGF lidského původu (Fiebich, et al., loc. cit., 1993). Druhou protilátkou je monoklonální myší protilátka směřovaná proti lidskému proteinu VEGF₁₂₁ (R&D Systems, Wiesbaden).

Rostlinný materiál

Použity jsou divoké kmeny mechu *Physcomitrella patens* (Hedw.) B. S. G., které pocházejí ze sbírky genetické skupiny katedry obecné botaniky university v Hamburgu. Původní kmen 16/14 byl sebrán H. L. K. Whitehouse v Gransden Wood, Huntingdonshire (Anglie) a dále kultivován ze spor.

Divoký kmen roste buď v kapalné kultuře s Kropovým médiem (Reski, R. a Abel, W. O., Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine, *Planta*, 165, 354 – 358, 1985) nebo na pevném Knopově médiu s 1 % agarem Oxoid (Unipath, Basingstroke, Anglie). S kapalnými kulturami se zacházelo podle popisu Reskiho (loc. cit., 1990).

Kultivace v bioreaktoru

Pro masovou kultivaci byl materiál zaveden do 7 l bioreaktoru realizovaného skleněnou baňkou s kulatým dnem vybavenou dvojitým pláštěm (Applikon Biotek, Knüllwald). Do tohoto systému bioreaktoru byl shora otvory ve víku do kultivačního prostoru zaveden vzduchový chladič, trubice k provzdušňování, pH elektroda (Conducta, Gerlingen), teplotní čidlo, míchací zařízení, vzorkovací trubička a vstupy pro kyselinu, bázi a medium. Kultury byly ponechány při 25 °C a tato teplota byla

regulována vhodně nastavenou vodní lázní připojenou na dvojitý plášť. Při pokusech prováděných za řízeného pH bylo pH pomocí titrační jednotky udržováno na hodnotě 5,8. Teplotní měření a regulace pH byla prováděna zařízením Biocontroller ADI 1030 (Applikon Biotek, Knüllwald). Rychlost míchadla lze měnit regulátorem motoru ADI 1012 (Applikon Biotek, Knüllwald). Kultivační medium se provzdušňuje konstantním tlakem vzduchu 1 bar porézním vstřikovacím prvkem. K zajištění sterility kultivační nádoby jsou všechna přívodní a odtahová potrubí vybavena filtračními sterilizačními jednotkami (Midisart, 0,2 μm ; Sartorius, Göttingen). Kultivace v bioreaktoru se provozuje v prostoru s řízeným prostředím s bočním osvětlením (bílé světlo; Osram L 40 W/20; max. 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$). Kultury se za sterilních podmínek inokulují 0,5 až 1 g nesusušeného rostlinného materiálu na litr bioreaktorové kultury. Vzorkovací trubice je umístěna ve stejné úrovni jako míchadlo a tak zajišťuje rovnoměrné vzorkování při míchání. Malé vzorky (<100 ml) se odebírají přes Luerovu zámkovou přípojku stříkačkou, zatímco velkoobjemové vzorky se odebírají například peristaltickým čerpadlem typu 302/3A vybaveným hlavou 501 RI (Sartorius, Göttingen).

Kultury chloronemy divokého typu se vyvíjejí dodáváním Knopova media s 5 mM vápnem amonným.

Výtěžek biologicky aktivního heterologního proteinu, který se vylučuje, lze značně zvýšit v přítomnosti stabilizátoru polyvinylpyrrolidonu (PVP) v kultivačním mediu.

Diferenciaci caulonemy, která nastává během vývoje fotonemy, je možno vyvolat a zvýšit exogenním přídatkem fyziologického množství auxinu vhodné koncentrace jako například 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kyseliny indol-3-octové (IAA).

K provozování kapalně kultury transformantů pod tlakem se ke Knopovu mediu přidává 50 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ antibiotika G418 (Calbiochem, Bad Soden). Nakonec se kultury odvádějí filtrací přes sterilní 100 μm síta (Wilson Sieves, Nottingham, Anglie)

každých deset dnů těsně před rozměňováním a převedou se do Erlenmeyerovy baňky naplněné vybraným médiem.

K pokusům s nutričními prvky se Knopovo medium ředí 1 : 10 vodou.

Transformace

Zvoleným způsobem transformace je přímý transfer DNK do protoplastů zprostředkovaný PEG, jak to popisuje Reutter a Reski (loc. cit., 1996). Pro každou transformaci se na $3 \cdot 10^5$ protoplastů použije 50 μ g plasmidu DNK. Regenerace protoplastů a výběr stabilních transformantů se provádí podle popisu Reutera a Reskiho (loc. cit., 1996), pokud není uvedeno jinak.

Nepřímá imunofluorescence

Ústojný roztok: MSB: 100 mM PIPES; 5 – 10 mM EGTA, 5 mM MgSO_4 , pH 6,8

F-MSB: MSB + 5 % DMSO

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

W-MSB: MSB zředěný H_2O 1 : 2 (promývací ústojný roztok)

Roztok enzymu: 1 % celulóza, 1 % pektináza, 2 % driseláza v MSB, pH 5,6 (všechny od Sigmy, Deisenhofen).

Mechová fotonemata se fixují v 1,25 % glutaraldehydu v F-MSB (obj/obj) inkubací ne delší než 10 minut a krátce se promyjí ve W-MSB. Potom se fotonemata inkubují se 2 % paraformaldehydem v MSB (obj/obj) po dobu 40 minut a 3x promyjí W-MSB (1x vypláchnutí; 2x promývání po dobu 5 minut).

Volné aldehydy, které se nemohou odstranit promýváním se zredukují přidavkem MSB a pevným hydridem boru v množství na špičku nože při inkubační době 10 minut. Hydrid boru se odstraní trojím promytím W-MSB.

V dalším stupni se buněčné stěny zpropustní přidavkem roztoku enzymu na dobu 10 minut. Enzymatická reakce se zastaví změnou pH (MSB, pH 6,8). Směs se opět 3x promyje W-MSB.

Chlorofyly se extrahují inkubací s roztokem detergentu po dobu 120 minut. Potom se roztok odstraní trojím promytím W-MSB.

Po této přípravě se mechová fotonemata mohou inkubovat s primární protilátkou (anti-VEGF; ředění 1 : 50). To se provádí při 37 °C po dobu 45 minut. Po třech promytích W-MSB se na 45 minut při 37 °C přidá značená sekundární protilátka (králíčí nebo myší; ředění 1 : 30; značená fluorescein isothiokyanátem (FITC) (Molecular Probes, Leiden, Nizozemí)). Vedle třech výše uvedených promývacích stupňů se směs ještě jednou promyje W-MSB + 0,1 % Tritonu. Fotonemata se následně dají do W-MSB a uloží se při 4 °C alespoň přes noc.

Materiál se vyhodnotí pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu (CLSM) typ TCS 4D (Leica Lasertechnik, Heidelberg) a softwaru Scanware 5.0 (Leica Lasertechnik, Heidelberg).

Pro analýzu vzorků CLSM se tyto umístí na sklíčko do montážního roztoku (Dabco, Sigma, Deisenhofen). Excitace vazby fluorescenčního barviva FITC se sekundární protilátkou se provede pomocí argon – kryptonového laseru při vlnové délce 488 nm. FITC emituje záření o vlnové délce 528 nm.

Zkouška ELISA

Protein VEGF v kultivačním mediu, který se vytvoří ve vhodně transformovaných mechových rostlinách se kvalitativně určí a kvantitativně stanoví běžnými způsoby za použití zkoušek ELISA a výše popsaných protilátek. Na zkoušku ELISA se použije přímo kultivační medium v množství 200 μ l.

Funkční zkoušky

Biologická aktivita rekombinačně vytvořeného VEGF získaného z kultivačního media se zkontroluje mitogenní zkouškou (Miyazono, et al., Purification and properties of an endothelial cell growth factor from human platelets, J. Biol. Chem., 262, 4098 – 4103, 1987) a „13 denní chorioallanto-membránovou angiogenní zkouškou“ (Wilting, et al., A morphological study of rabbit corneal assay, Anat. Embryol., 183, 1167 – 1174, 1991). Před tím se kultivační medium podrobí ultrafiltraci, potom lyofilizaci a následně se resuspenduje v ústojném roztoku. Pokud se to vyžaduje, může se použít ještě další stupeň čištění na katexové koloně.

Indukovatelnost 1'-promotoru

Indukovatelnost 1'-promotoru auxinem se zkouší 5 μ mol.l⁻¹ kyselinou indol-3-octovou (IAA). Pět dnů po transformaci se převedou 100 μ l alikvotní protoplastové podíly transformační reakce s pNA201 do jamek 96 místné mikrotitrační destičky (Nunc, Wiesbaden). Suspenze protoplastů se inkubuje po dobu pěti hodin s IAA (výsledná koncentrace = 5 μ M). Indukční pokusy se vyhodnotí přímo po inkubační periodě pomocí kvalitativní zkoušky s β -glukuronidasou.

Kvalitativní zkouška s β -glukuronidasou

Aktivita β -glukuronidasy se určuje kvalitativní zkouškou (Jefferson, A. R., Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion systém, Plant Mol. Rep., 5, 387 – 405, 1987).

Substrátový ústojný roztok: 50 mM K₃Fe(CN)₆

50 mM Na₂HPO₄

50 mM $K_4Fe(CN)_6$	1 % Triton X-100 (obj/obj)
50 mM NaH_2PO_4	10 mM EDTA, pH 7,0
4 mg.ml ⁻¹ PVP (m. hm. 10000)	

Barvicí roztok: 12,5 mg kyseliny 5-brom-4-chlor-3-indolylglukuronové (Biomol, Hamburg) se rozpustí ve 250 μ l N,N-dimethylformamidu s 50 ml substrátového ústojného roztoku.

Mechová fotonemata a mechové protoplasty v Kopově nebo regeneračním mediu se inkubují po dobu 72 hodin při 37 °C ve stejném objemu barvicího roztoku a ihned se mikroskopicky vyhodnotí.

Výsledky

Homogenita kultury v bioreaktoru; vzorkování

Pouze homogenní kultury zajistí, aby se mohlo vzorkování buněčných kultur znormalizovat. Při prodloužené kultivaci vede často růst fotonemy do dlouhých vláken k agregátům buněk a tím k nehomogennímu rozdělení rostlinného materiálu v kapalných kulturách. K zabránění takových agregací se fotonemata v určitých časových intervalech rozměňují, a to v bioreaktoru každý den následující po 10. dni a v míchaných kulturách každý 12. den pomocí vysokootáčkových míchadel – homogenizátorů. Aby bylo možno v bioreaktoru dodržovat plynule podmínky při současném normalizovaném vzorkování i po prodlouženou kultivační dobu, doporučuje se upravit turbinové míchadlo třemi míchacími noži zabroušením hran míchacích ramen a tím je převést na stříhací ramena. Konstantní „míchání“ při 300 až 500 1.min⁻¹ umožní udržovat v bioreaktoru homogenní kultury.

Vývoj biomasy (v DW [mg.l^{-1}]) po dobu 35 dnů (840 hod) při 500 l.min^{-1} v kontrolních kulturách s turbinovým míchadlem je stejný jako u kultur v bioreaktoru míchaném míchadlem s nůžkovými rameny.

Homogenita kultury se zkouší porovnáváním vždy šesti souběžných vzorků. Sušina rostlinného materiálu ze vzorkovacího objemu 100 ml se stanoví jako poměrná hodnota. Při použití neupraveného míchadla se současně se zvyšováním koncentrace biomasy zvyšuje standardní odchylka. Jako důsledek míchání míchadlem se stříhovými rameny zůstává standardní odchylka odebíraných vzorků nízká. To umožňuje učinit závěr, že s upraveným míchadlem je možno během 35 dnů získat rovnoměrnou homogenní kulturu.

Studie indukovatelnosti 1'-promotoru

V plasmidu pNA201 je 1'-promotor umístěn nad genem gus a působí jako regulační prvek. Při indukčních pokusech s mechem je známá β -glukuronidasová zkouška vhodná jako detekční zkouška. Pokusy s transgenním tabákem ukazují, že 1'-promotor vede k expresi β -glukuronidasy v tkáni s vysokým obsahem auxinu a lze tudíž usoudit, že tento promotor je závislý na auxinu. Indukovatelnost 1'-promotoru auxinem ve *Physcomitrella patens* se studuje v tranzitně transformovaných protoplastech.

Transformační reakce jsou podrobeny β -glukuronidasové zkoušce s 5 hodinovou inkubací a bez ní s $5 \mu\text{M}$ kyselinou indol-3-octovou (IAA). U kontrolních zkoušek bez přídavku IAA se nezjistily při hodnocení pod mikroskopem žádné modré protoplasty u žádné reakce. Naproti tomu hodnocené protoplasty inkubované s auxinem potvrzují expresi genu gus. Na základě hodnocení modrých protoplastů se docílilo transformační rychlosti $3 \cdot 10^{-4}$. To je jasným znamením, že 1'-promotor je v transitně transformovaných mechových protoplastech indukovatelný rostlinným hormonem auxinem.

Generace vektorů pro transformaci VEGF

Pro transformaci cDNK proteinu VEGF₁₂₁ bez vodící sekvence zde nazývané dále VEGFC a cDNK proteinu VEGF₁₂₁ s vodící sekvencí zde dále nazývanou VEGFP do *Physcomitrella* je nutné sekvence klonovat mezi jednotky promotoru a terminátoru, což je pro rostliny vhodné. K tomuto účelu se zvolil promotor 35S CaMV a odpovídající polyadenylační signál. Vhodně připravené sekvence VEGF cDNK se klonují na restrikční štěpnou polohu Sma I násobně klonovaných poloh vektoru pRT101.

Výsledné vektory (pRT101VEGFC 3 a VEGFP 21) se sekvencují primerem odvozeným od terminální oblasti promotoru 35S a ověřuje se správná integrace mezi promotorem a polyadenylační polohou.

Výsledné kazety se excizují restrikčním enzymem Hin dIII a klonují na aktuální transformační vektor pRT99 do štěpné polohy Hin dIII (pRT99VEGFC 3 a VEGFP 21). Orientace kazet vzhledem ke kazetě NPTII může být stanovena restrikcí se Sma I a Hinc II. V případě orientace promotoru k polyadenylační orientaci signálu se získá fragment 5250 (VEGFC) a 5380 bp (VEGFP), zatímco opačná orientace poskytne fragment 1100 (VEGFC)/1230 (VEGFP) a 4150 bp (VEGFC a P). Restrikční analýza poskytne pouze fragment 5250/5380 bp a kazety VEGFC/P tak mohou být inkorporovány do srovnatelné orientace promotoru ku orientaci polyadenylačního signálu s nptII genu pRT99.

Transformace VEGFC do *Physcomitrelly*

Absolutní rychlost transformace při transformaci struktury VEGFC u protoplastů divokého typu po opakovaných přechodech z Knopova media do vybraného media je $0,5 \cdot 10^{-5}$ při trvalé stabilitě transformantů.

Potvrzení integrace transformovaných plasmidů

Úspěšná integrace do rostlinných genomů se potvrdila hybridizací Southern.

Použité vzorky jsou jednak fragmentem Nco I genu npt II z pRT99 a jednak fragmentem Nde I/Sal I VEGFC z pCYTEXP-VEGF₁₂₁.

Signály detekované v celé nerozštěpené DNK transformantů potvrzují úspěšnou integraci plasmidu DNK do rostlinného genomu. Zda se získá celá kazeta 35S VEGFC PolyA i po integraci se zkouší restrikcí s Hin dIII. Pokud zůstává kazeta při integraci intaktní, excizuje tento restrikční enzym fragment 1100 bp z úplné DNK.

Hybridizační šablona se vzorkem VEGFC prozrazuje fragment 1100 bp u všech transformantů. Byla tak prokázána integrace úplné expresní jednotky VEGFC, která je předurčující pro správnou transkripci a expresi VEGF₁₂₁ do mechu.

Prokazování transkripcie heterologních genů

Transkripcie heterologních genů VEGFC a NPTII transformantů se určuje neradioaktivním detekčním systémem DIG za použití vzorků VEGF a NPTII. S nukleotidy 760 pro transkripci VEGFC a nukleotidů 1100 pro transkripci NPTII se na fluorogramu zjišťovala míra transkripcie řádově v mezích očekávaných pro každý případ. Jak se očekávalo, u kontrolní WT nebyla detekována žádná ze dvou heterologních transkripcí.

Analýza transformantů s lidským tranzitním peptidem

Transfer DNK zprostředkovaný PEG 50 µg pRT99P 21 plasmidu DNK pro jednu transformační reakci vytvoří transformanty, které jsou na vybraném mediu trvale stabilní. Výsledná rychlost stabilní transformace je $3,3 \cdot 10^{-6}$.

Prokazování integrace transformovaného plasmidu

Integrace výše popisovaných transformantů s tranzitním peptidem se prokazuje, jak bylo popsáno výše, hybridizací Southern za použití popisovaných vzorků a hybridizace celé DNK rozštěpené *Hin* dIII se vzorkem VEGF prozrazuje fragment 1230 bp: průkaz kompletnosti integrované kazety 35S VEGFP PolyA.

Prokázání transkripce heterologních genů

Způsobem uvedeným výše lze detekovat jak NPTII, tak VEGFP transkripce

Detekce lidské VEGF₁₂₁ v buňkách transgeních mechů za použití konfokálního laserového skenovacího mikroskopu

Tímto způsobem se zkoušený protein označí přímo ve složených buňkách. Vyhodnocení se provádí pod konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem, který má v porovnání s běžným světelným mikroskopem zlepšenou rozlišovací schopnost.

Rekombinant VEGF₁₂₁ protein – pokud je v mechových buňkách detekovatelný – musí být akumulován v cytoplasmě v transformantech VEGFC. Ve VEGFP transformantech musí být detekovatelný v ER systému, pokud tranzitní peptid v mechu funguje jako signální.

Exprese lidského VEGF¹²¹ v transgenních buňkách mechu byla úspěšně prokázána nepřímou imunofluorescenční metodou a počítačovým vyhodnocením konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem. Navíc bylo prokázáno, že v transgenním mechu se VEGF₁₂₁ úspěšně transportuje do endoplasmického retikula v přítomnosti odpovídajícího lidského tranzitního peptidu.

Zkouška na přítomnost VEGF v kultivačním mediu

200 μ l alikvotní podíl kultivačního media v přítomnosti PVP se zkouší zkouškou ELISA a ukazuje, že mechové rostliny transformované expresní kazetou včetně tranzitního peptidu kódující sekvence jsou schopné uvolňovat VEGF do média. Pozitivní výsledky umožňují vyjádřit závěr, že je přítomen protein VEGF.

Zkouška biologické aktivity

Zkoušky provedené k verifikaci biologické aktivity proteinu VEGF uvolněného do kultivačního media dávají jak pozitivní výsledky, tak potvrzují, že VEGF vytvořený podle vynálezu lze z kultivačního media získat s požadovanou biologickou aktivitou.

22.04.02

PV 2012-1061

- 26 -

20682

Patentové nároky

1. Způsob výroby heterologních bílkovinných látek v rostlinném materiálu vyznačující se tím, že jako rostlinného materiálu využije fotonemické tkáně mechu a že se vyrobené bílkovinné látky získají z kultivačního media bez porušení produkční tkáně nebo buněk.
2. Způsob podle nároku 1 vyznačující se tím, že bílkovinná látka uvolněná do kultivačního media je biologicky aktivní.
3. Způsob podle nároku 1 nebo 2 vyznačující se tím, že se použije kultivační medium, které je prosté cukrů, vitaminů a fytohormonů či jejich funkčních fragmentů.
4. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 vyznačující se tím, že tkáň mechu se vybírá ze skupiny mechů zahrnující ledviníky.
5. Způsob podle nároku 4 vyznačující se tím, že tkáň mechu se vybírá z mechů skupiny obsahující Physcomitrella, Funaria, Sphagnum a Ceratodon.
6. Způsob podle nároku 4 vyznačující se tím, že tkáň mechu se vybírá ze skupiny ledviníků, do níž patří Marchantia a Sphaerocarpos.