

Molecular Farming-Produktion von therapeutischen Eiweißen in Pflanzen

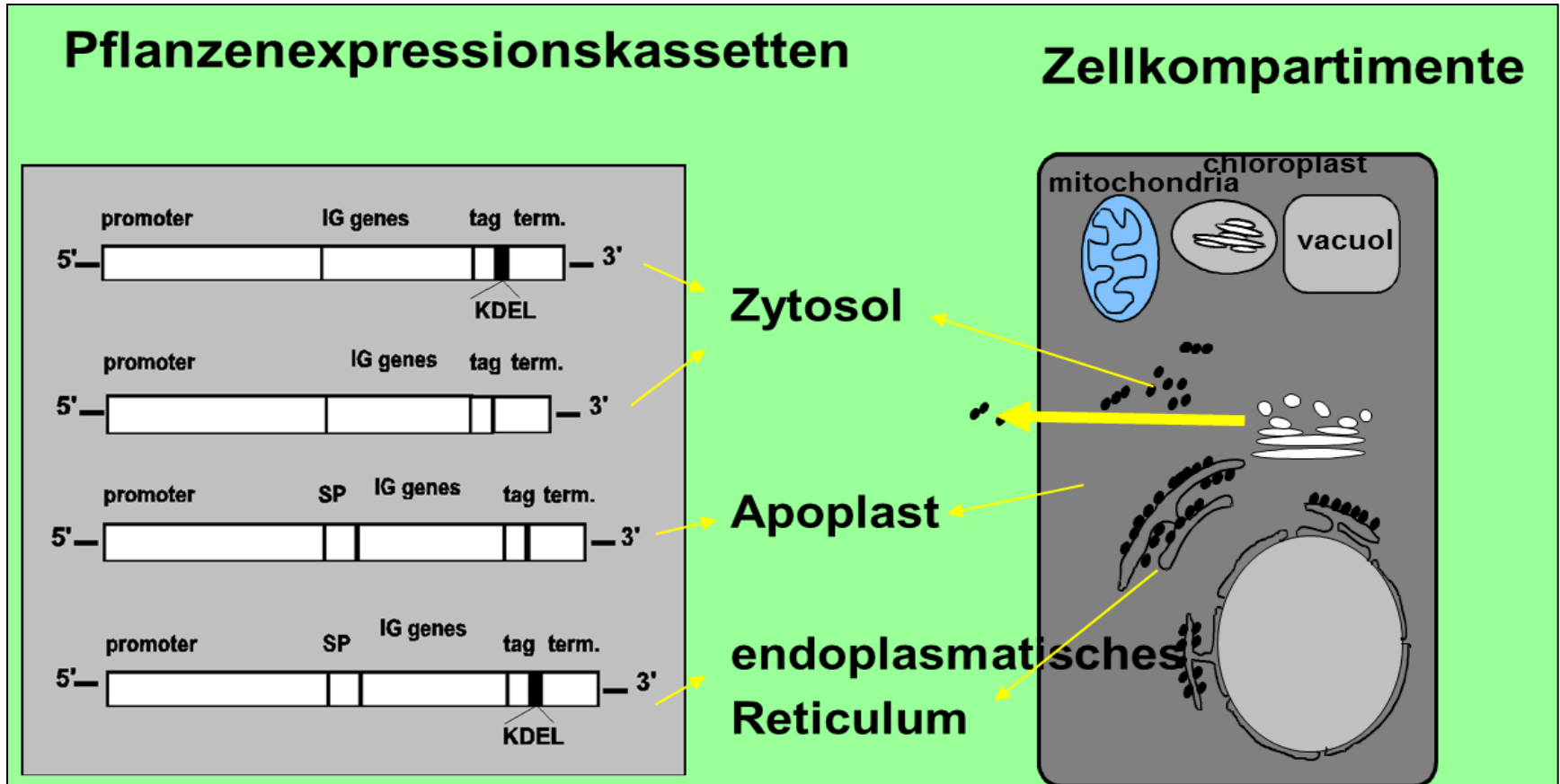
- Zellbiologische und methodische Grundlagen
- Spinnenseidenproteine aus Pflanzen
- Vogelgrippevakzine aus Pflanzen
- Therapeutische antibakterielle Antikörper aus Pflanzen – Ersatz von Antibiotika

Zellbiologische und methodische Grundlagen

- **Gensynthese, klassische Klonierung und PCR-basierte Synthesen sind die Basis für schnelles und sicheres „Genetic Engineering“.**
- **Auf diese Weise werden nicht nur die kodierenden Sequenzen zusammengebaut, sondern auch Steuerelemente (Transcriptionsoptimierung, Translationsoptimierung, Proteinfaltung, Kompartimentierung) hinzugefügt.**
- **Fortschreitende Kenntnisse über Proteinstruktur- und –funktionen ermöglichen in Zukunft das Design völlig neuer Proteine mit neuen Funktionen.**
→ synthetische Biologie

Zellbiologische und methodische Grundlagen

Kompartimentspezifische Expression



Zellbiologische und methodische Grundlagen

Organspezifische Expression

samenspezifische Expression

USP-Promotor

Legumin-Promotor

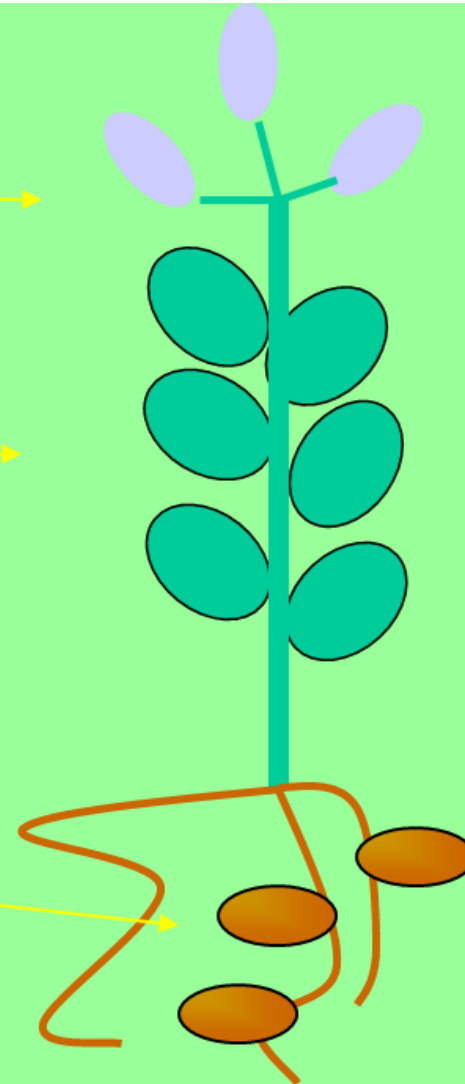
ubiquitäre Expression

CaMV35S-Promotor

Expression in Knollen

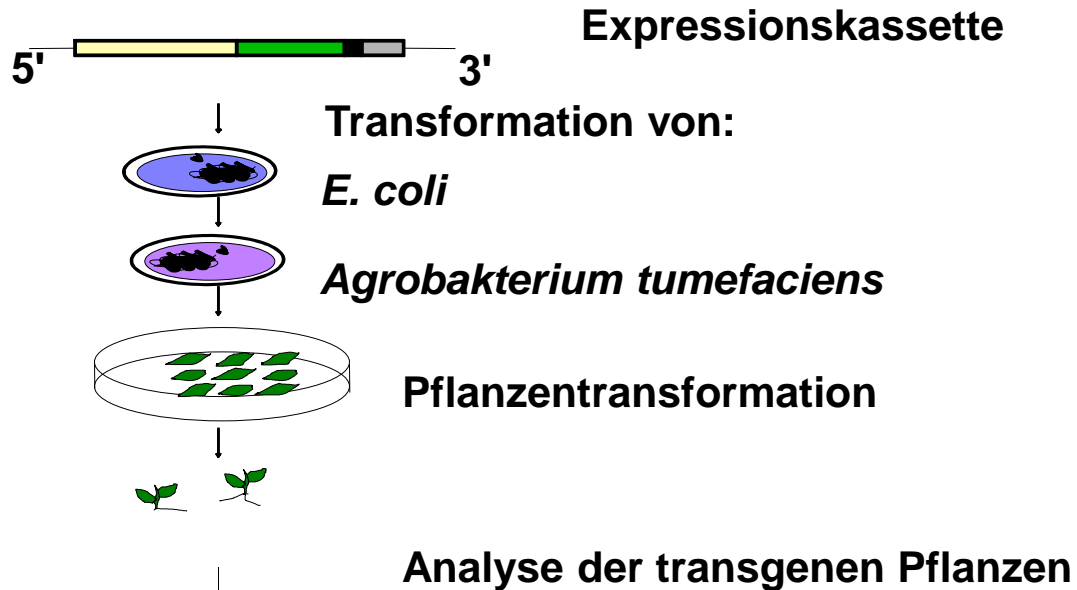
Patatin-Promotor, CaMV

35S-Promotor



Zellbiologische und methodische Grundlagen

Erzeugung transgener Pflanzen



Genomische DNA

Proteinanalyse

Physiologische Untersuchungen

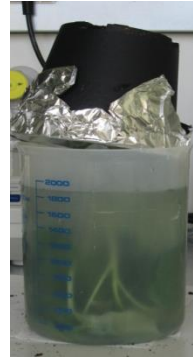
Zellbiologische und methodische Grundlagen

Transiente Expression in *Nicotiana benthamiana*

N.benthamiana

Ganze Pflanzen in Agrobakterienkultur

Vakuum

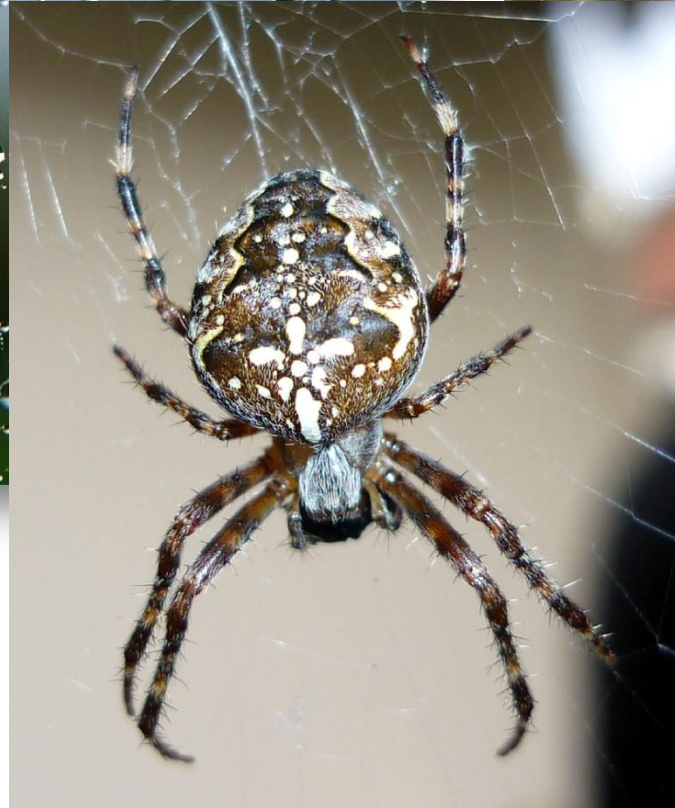


- **Ökonomie**
- **Sicherheit**
- **leichtes *scale-up***

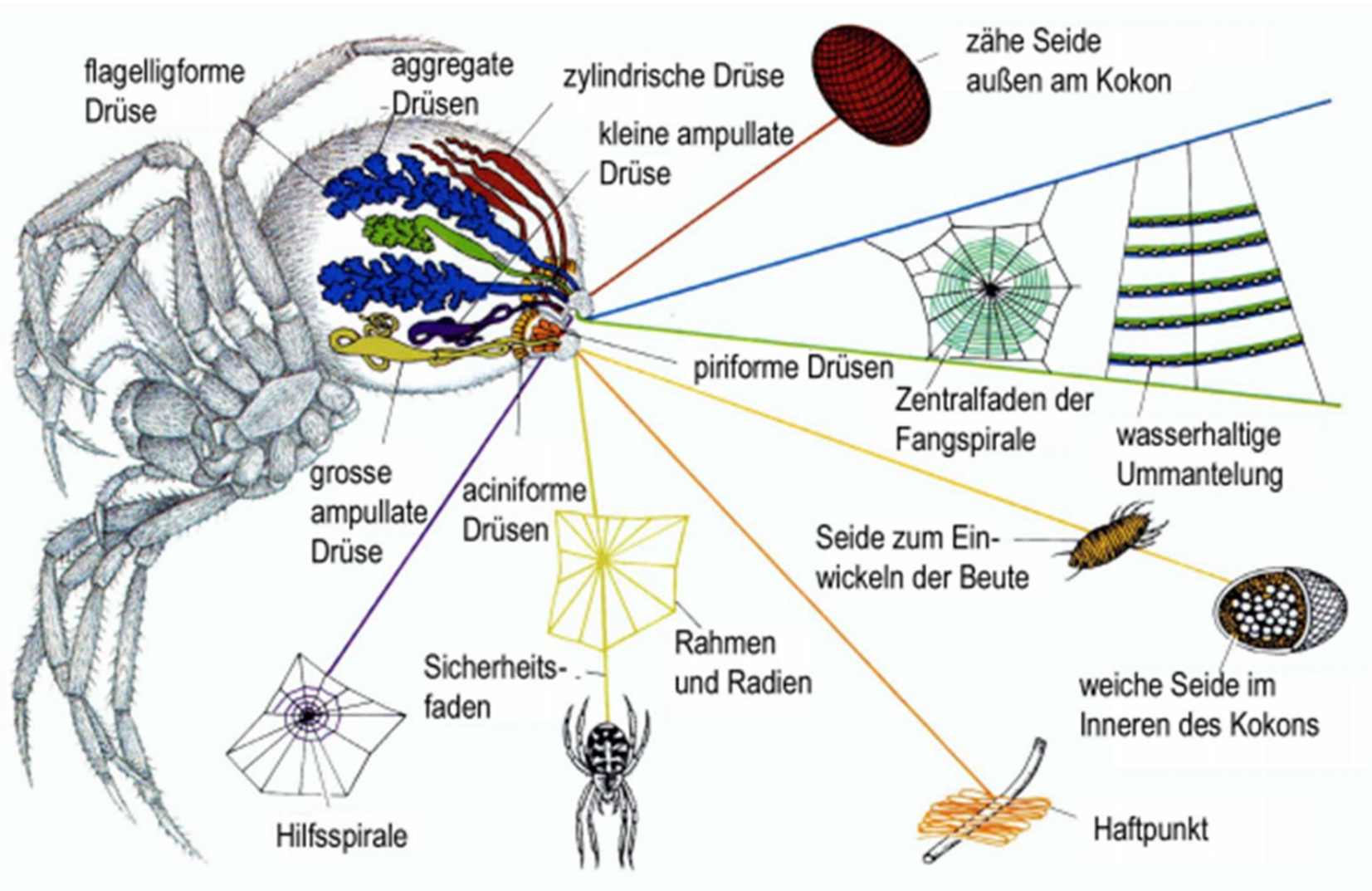


Pflanzen im Gewächshaus, 4-
5 Tage ⁶

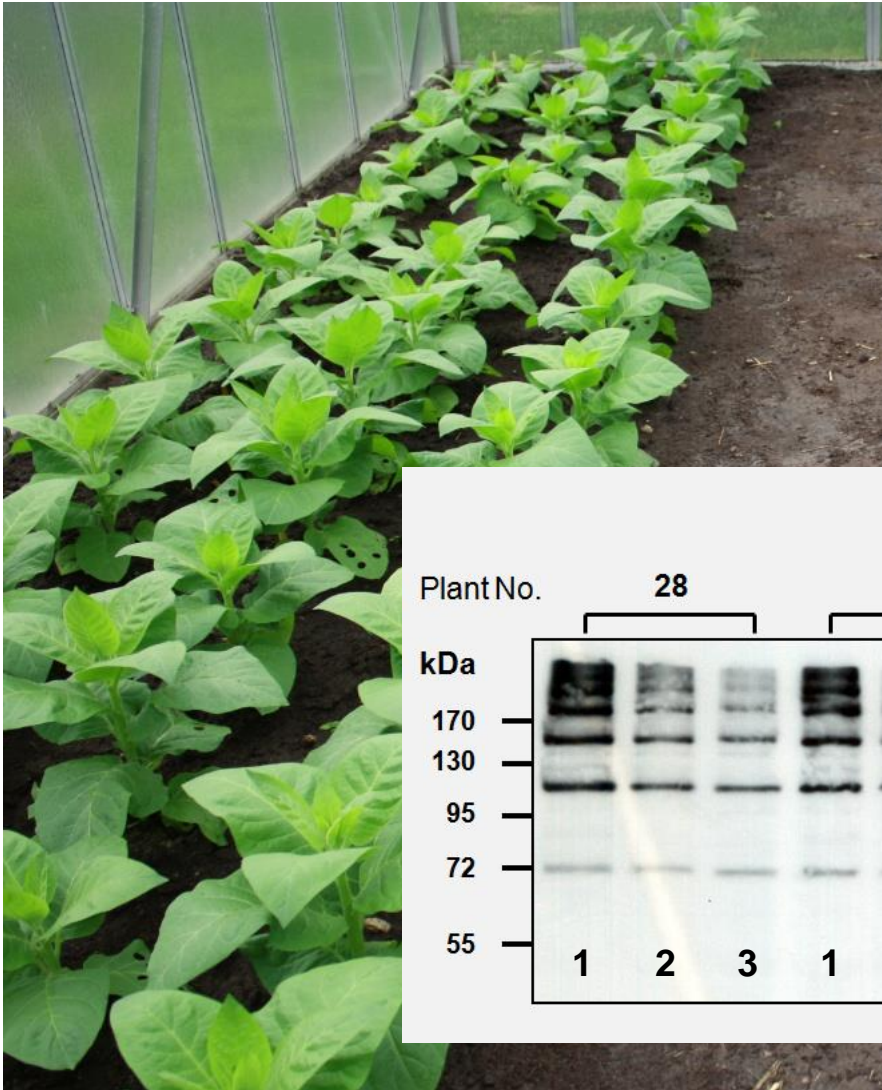
Spinnenseidenproteine aus Pflanzen



Radnetzspinnen können bis zu sechs verschiedene Seiden und einen seidenähnlichen Klebstoff in spezialisierten Drüsen produzieren. Jede dieser maßgeschneiderten Seiden erfüllt bestimmte Aufgaben.



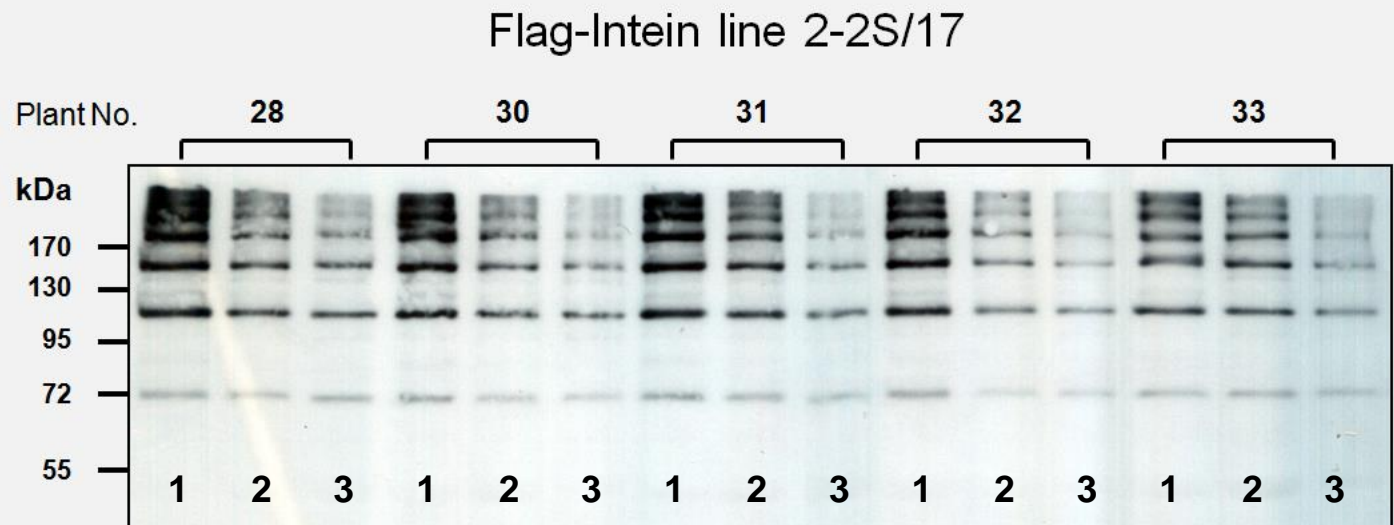
Stabile Expression von Spinnenseidenproteinmultimeren in Tabak



Erntezeitpunkte:

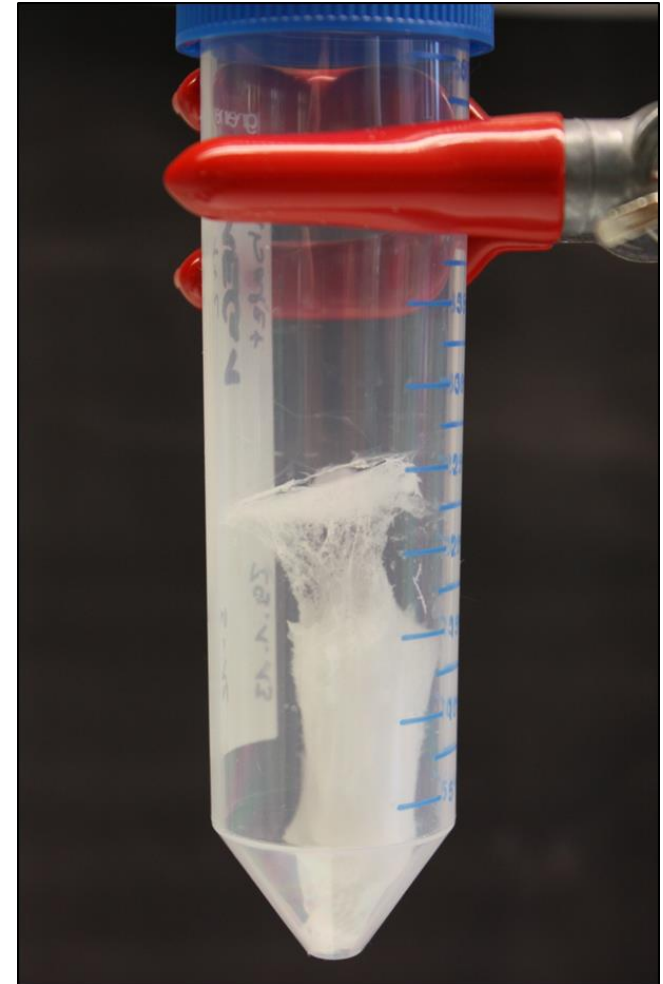
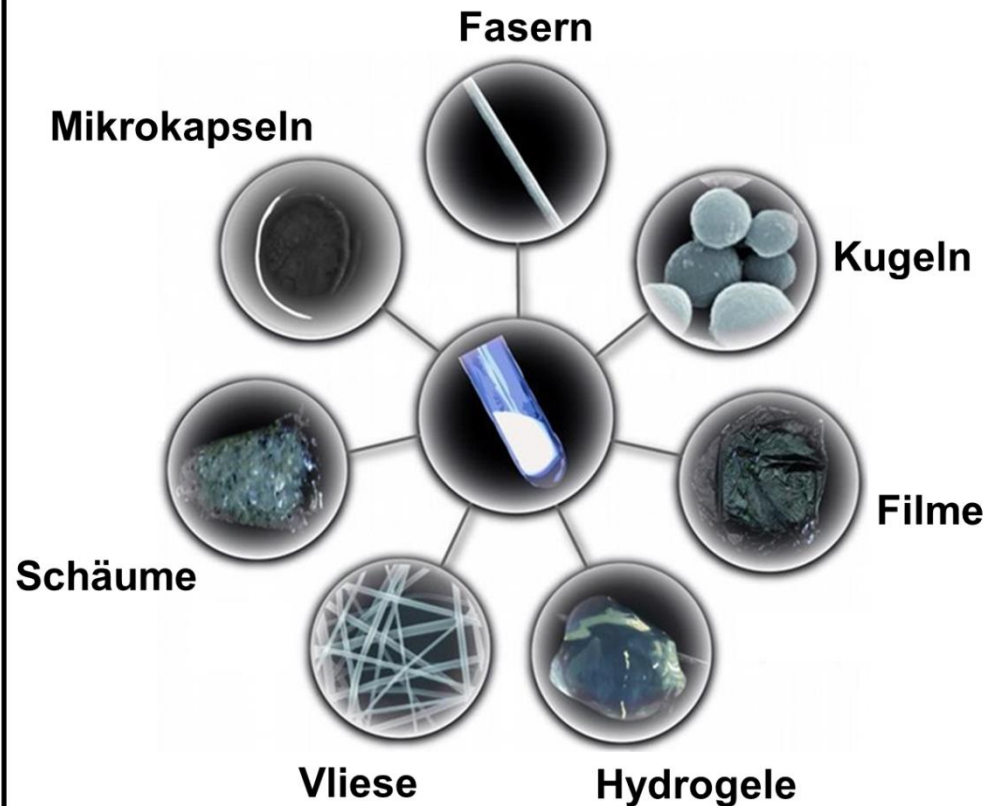
1: 8 Wochen; 2: 9 Wochen; 3: 10 Wochen

Immunochemische Produktionsanalyse



Spinnenseidenproteine aus Pflanzen

Das Rohmaterial „Spinnenseide“ ist Ausgangsstoff für mehr als nur Fäden:



Gefriergetrocknete Spinnenseidenproteine aus Tabakblättern

Spinnenseidenproteine aus Pflanzen

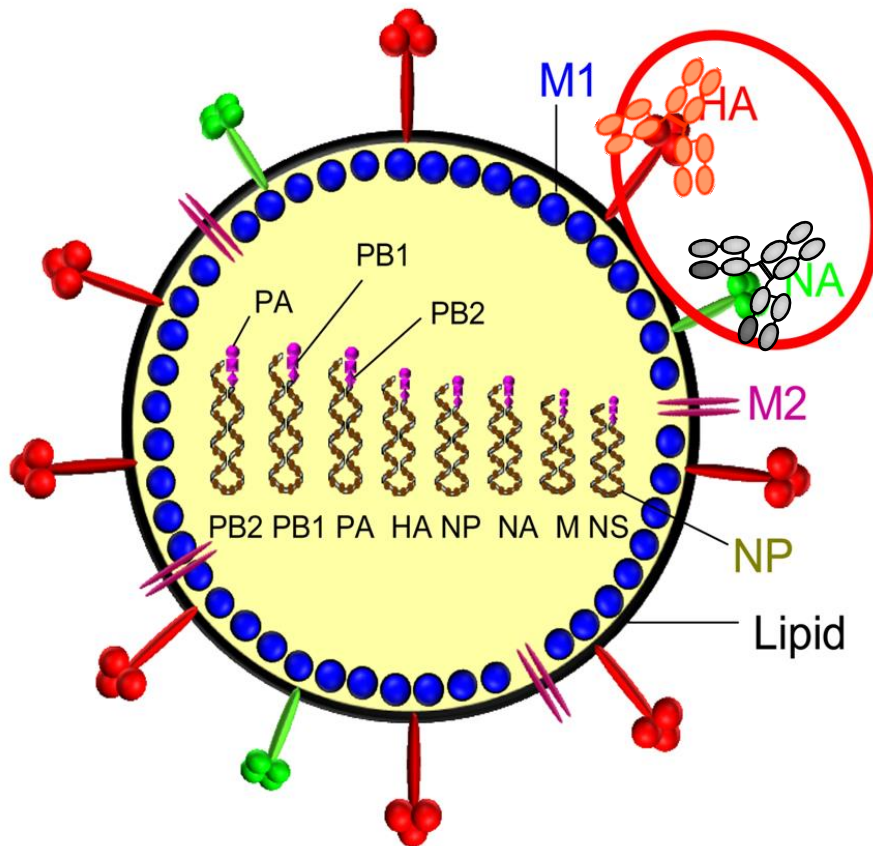
- **Spinnenseidenproteinmultimere aus Pflanzen weisen gute mechanische Eigenschaften auf.**
- **Spinnenseidenproteine aus Pflanzen sind nicht immunogen.**
- **Spinnenseidenproteine aus Pflanzen wirken nicht zytotoxisch und nicht hämolytisch auf humane Zellen.**
- **Das ermöglicht die Entwicklung neuer medizinischer Produkte, wie z. B. Wundverbände (auch Gefäßverbände), Pflaster, entsprechende “Klebstoffe” und extrem dünnes Nahtmaterial für die Augen- und Neurochirurgie. Kapseln aus Spinnenseide ermöglichen eine gezielte Medikamentenaufnahme.**

Vogelgrippevakzine aus Pflanzen:

Chancen für uns und für die Entwicklungsländer

- **Seit 2003 haben Vogelgrippeviren (HP H5N1) wiederholt weltweit Ausbrüche bei Geflügel verursacht.**
- **Dabei wurden die Viren auch auf Menschen übertragen, die direkt mit infiziertem Geflügel in Kontakt kamen. Die Mortalitätsraten beim Menschen waren hoch (59%, 386 Tote in 650 Fällen).**
- **Das Wirtsspektrum des Vogelgrippevirus hat sich ausgeweitet: Katzen, Tiger, Leoparden, Hunde und Menschen wurden befallen.**
- **Diese Situation nährt die Befürchtung, dass HP H5N1 in Zukunft eine weltweite Pandemie verursachen könnte**

Das Vogelgrippevirus H5N1



HA: Hämagglutinin

NA: Neuraminidase

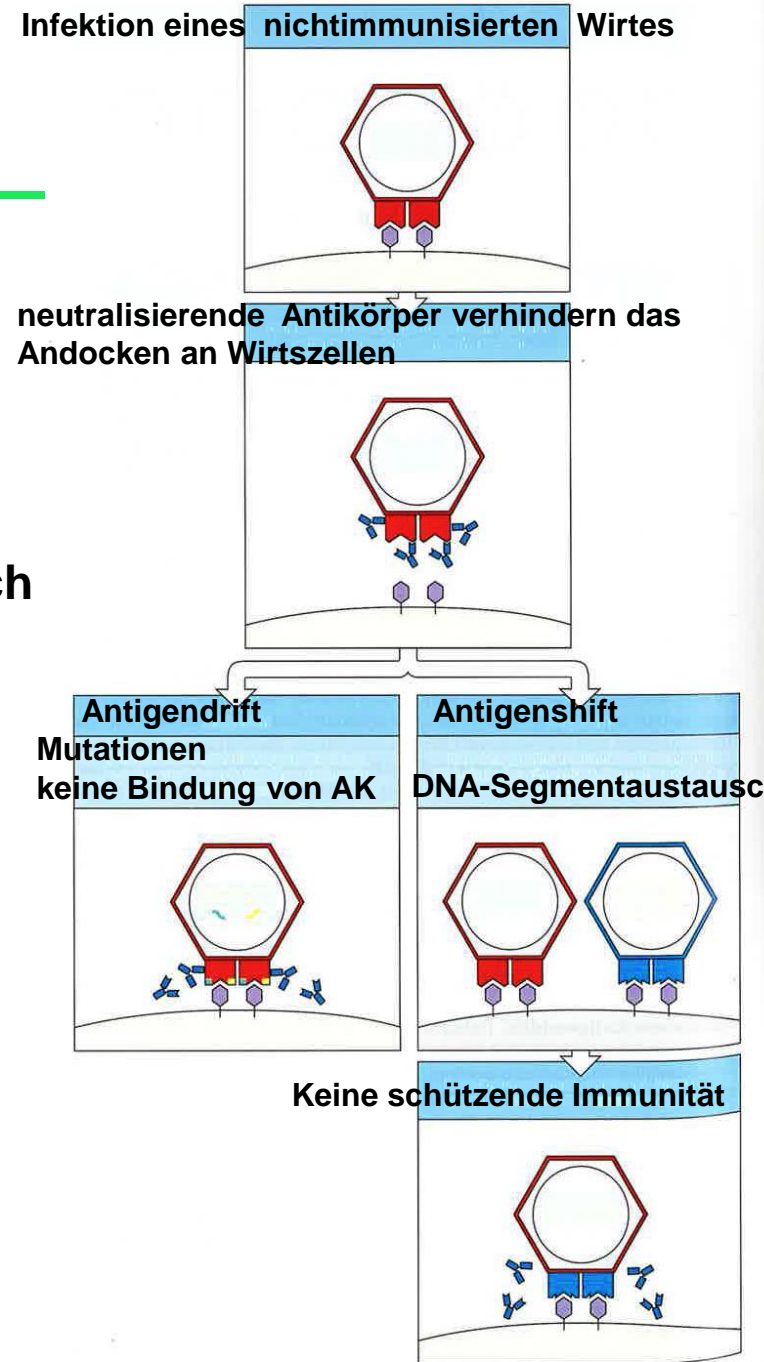
M1-2; P; PA; PB1-2; NS1-2:

andere virale Proteine

Hämagglutinin und Neuraminidase sind für die Entwicklung einer effizienten Influenzavakzine sehr wichtig!

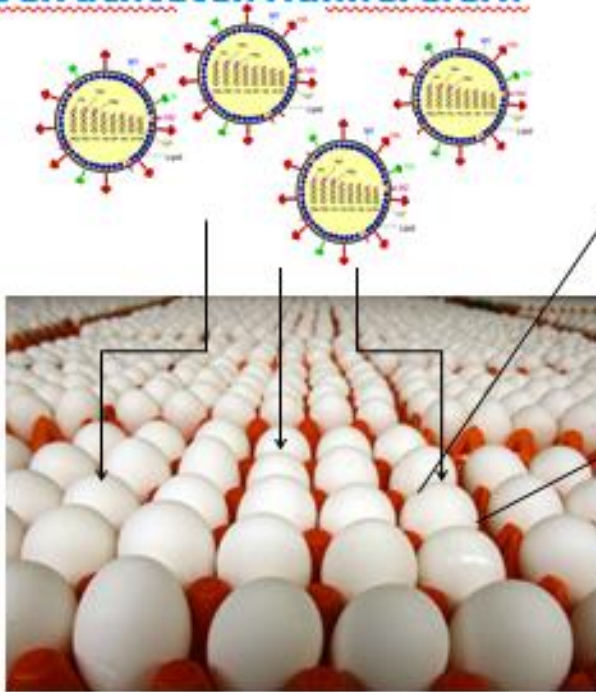
Antigene Variation bei Grippeviren

- hohe Mutationsraten (keine Reparatur)
- Neukombination von Hämagglutinin- und Neuraminidasevarianten, Segmentaustausch



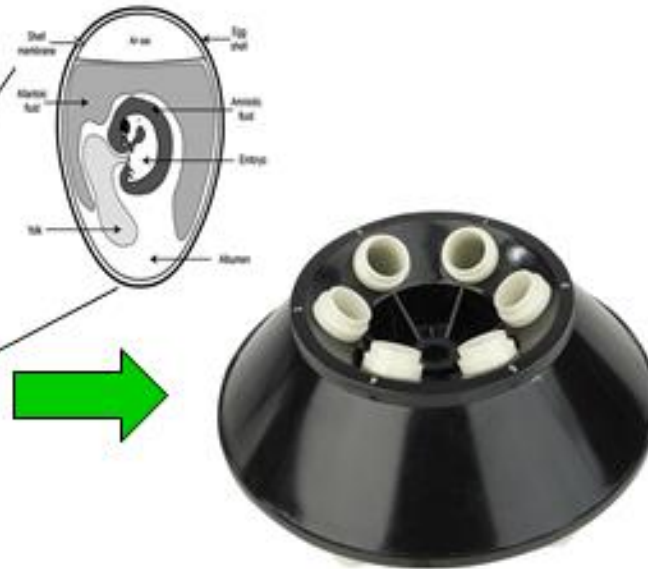
Der Prozess zur Herstellung von Influenzavakzinen in befruchteten Hühnereiern

Anzucht von Saatviren in befruchteten Hühnereiern



Saatviruspools werden vermehrt und große Mengen an befruchteten Hühnereiern werden damit beimpft.

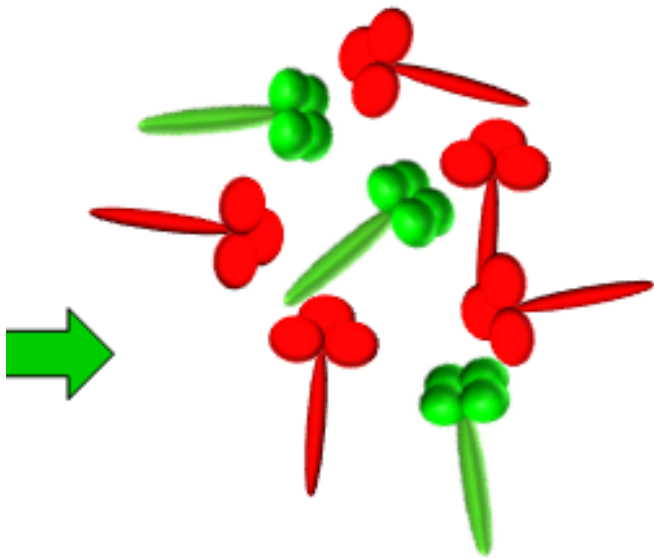
Ernte und Reinigung der Virionen



Konzentration der Virionen durch Zentrifugation.

Der Prozess zur Herstellung von Influenzavakzinen in befruchteten Hühnereiern

Antigenreinigungsprozess



Virionen werden chemisch inaktiviert und durch Detergentien aufgelöst. HA- und NA-Antigene werden gereinigt.

Formulierung, Abfüllung und Endkontrolle



Gereinigte Antigene werden mit Adjuvantien (Immunverstärker) formuliert.

Der Prozess zur Herstellung von Influenzavakzinen in befruchteten Hühnereiern

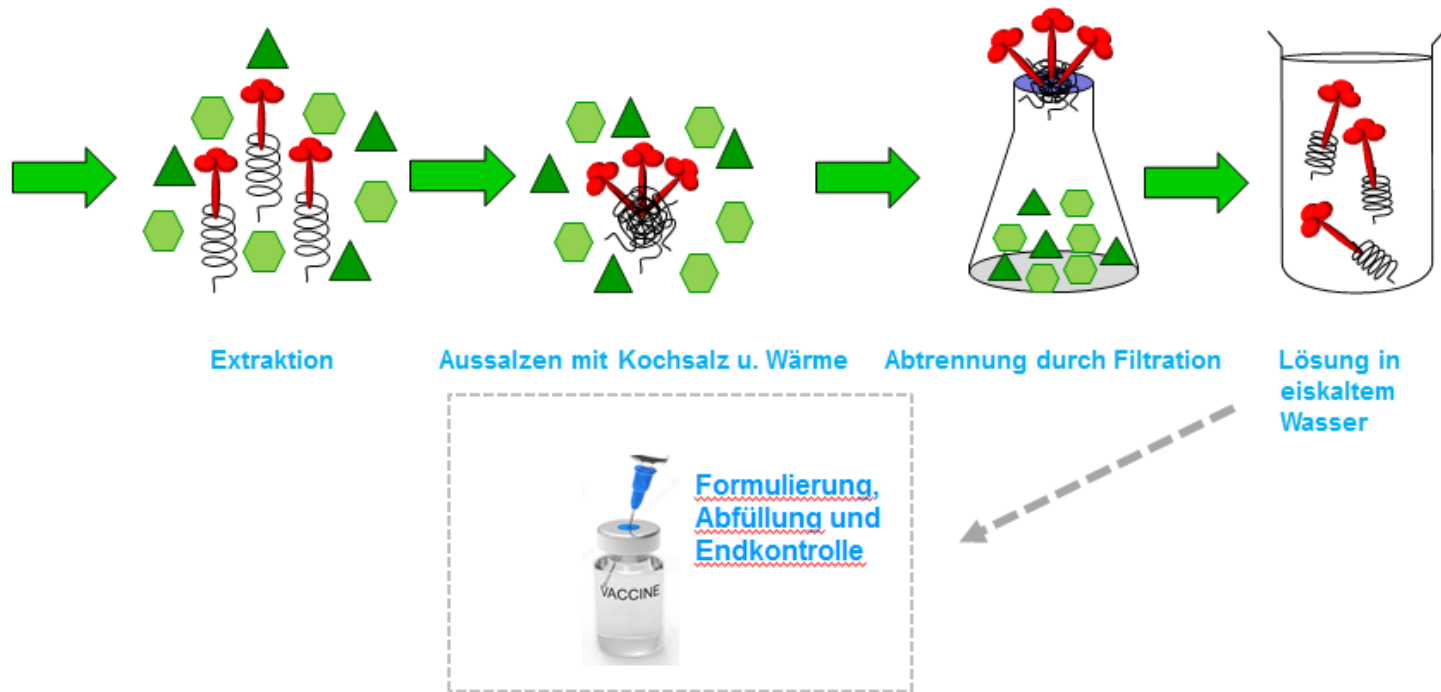
● Nachteile:

- langer und komplexer Produktionsprozess
- begrenzte Kapazität (900 Millionen Dosen für saisonale Vakzine pro Jahr, bei einer Pandemie ????)
- “seasonal vaccine”(Produktionsverzögerung 4-6- Monate)

● Forschungsziele:

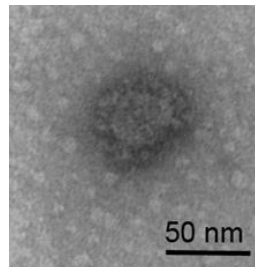
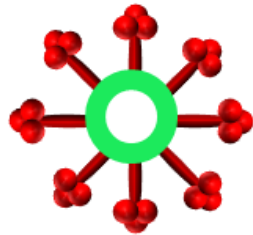
- Nutzung von Pflanzen als Wirtssystem für eine effiziente Antigenproduktion
- Entwicklung eines preiswerten und schnellen Reinigungssystems

Der Prozess zur Herstellung von Influenzavakzinen in Pflanzen



Vorteile pflanzlicher Produktionssysteme

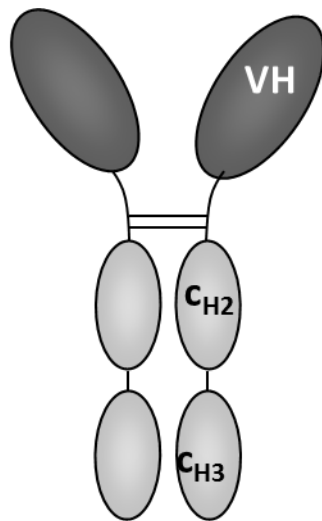
- **Schnelle Verfahren durch transiente Expression**
- **Kontrollierte Anzucht im Gewächshaus**
- **Herstellung von hochimmunogenen Trimeren (Trimere, Virus-artige Partikel, Nanopartikel)**
- **Effiziente Reinigung durch Fusion mit anderen Eiweißen und Aussalzungsverfahren**



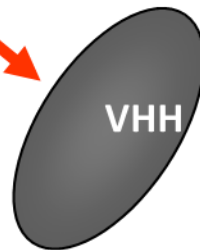
Therapeutische antibakterielle Antikörper aus Pflanzen – Ersatz von Antibiotika: das „Edible Antibody Concept“

Voraussetzungen:

1. Antikörperfragmente und ihre Gewinnung



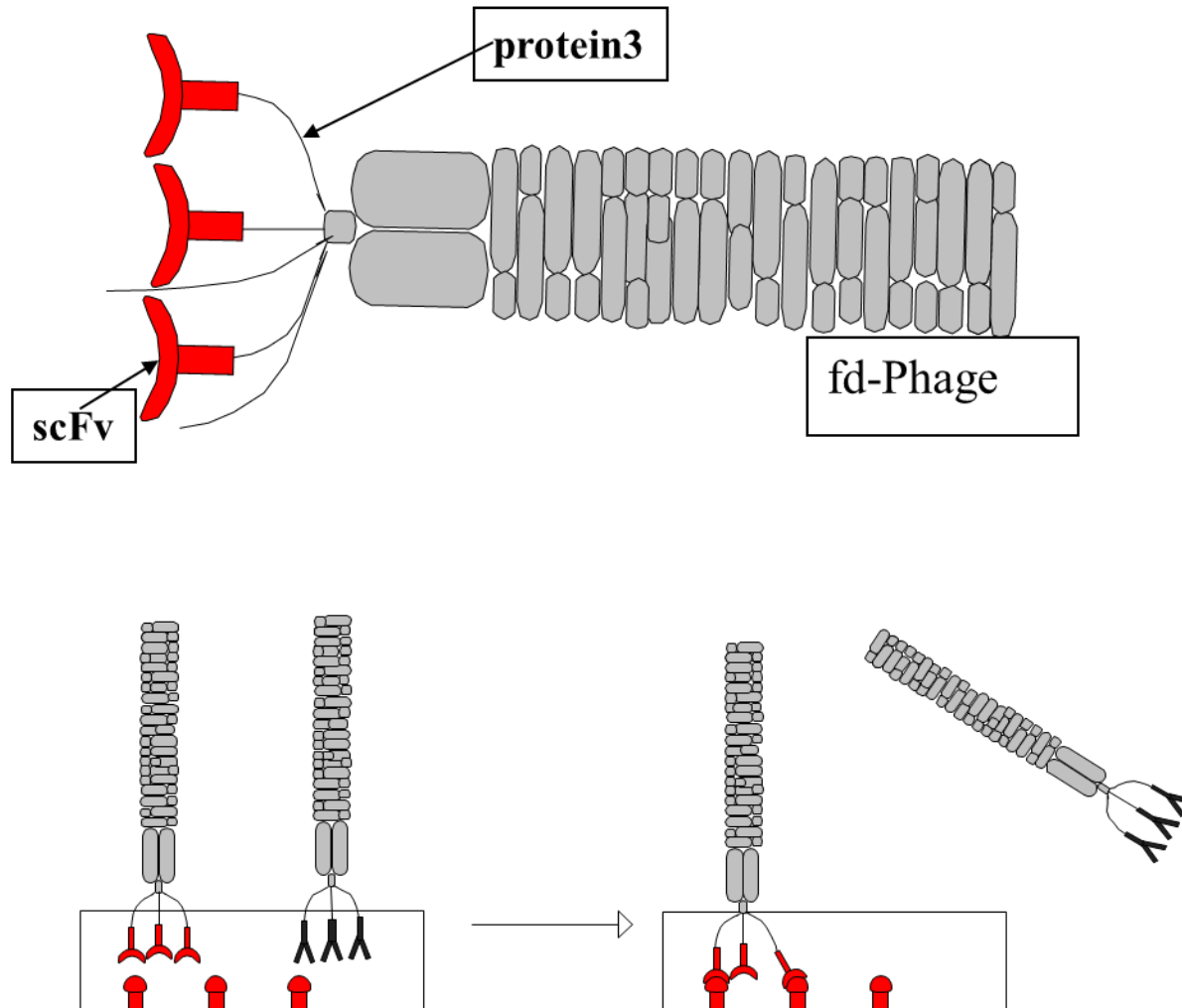
camelid heavy chain antibody (~110 kDa)



Nanobody



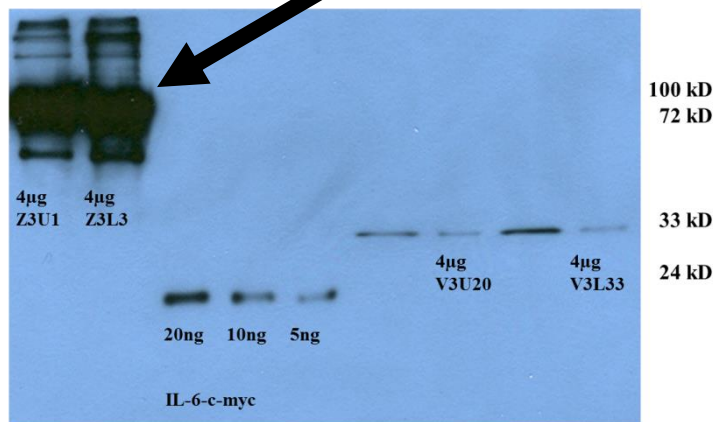
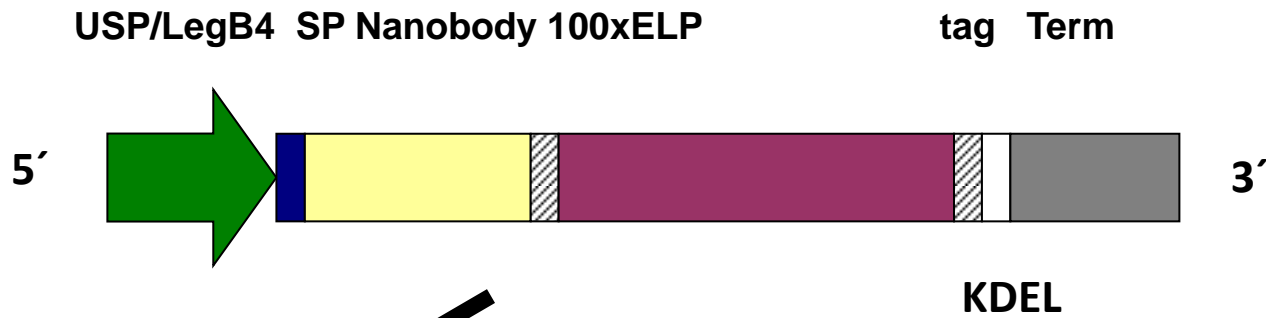
Selektion spezifischer Antikörperfragmente durch Phage Display



Das „Edible Antibody Concept“

Voraussetzungen:

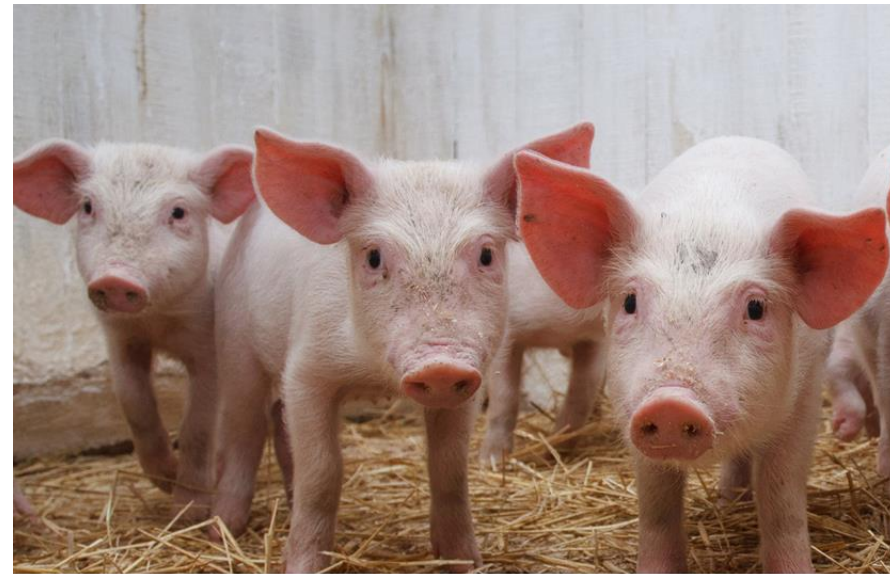
2. Samenspezifische Expression



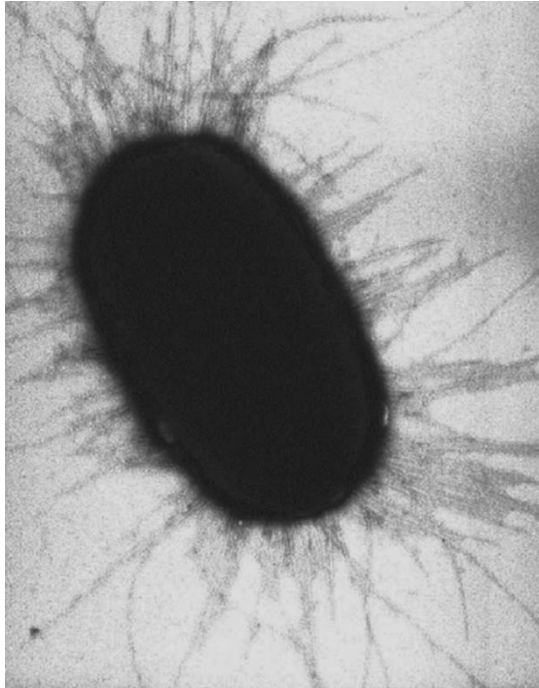
Das „Edible Antibody Concept“

Beispiel: Therapeutische Antikörper gegen enterotoxische *Escherichia coli* (ETEC) Stämme assoziiert mit Infektionen in Schweinen

- nach dem Absetzen verschwindet der Immunschutz durch Muttermilch
- “piglet postweaning diarrhea” (PWD) durch enterotoxische *Escherichia coli* (ETEC) ist ein globales Problem
- große ökonomische Bedeutung



Das „Edible Antibody Concept“



Escherichia coli (ETEC) Stämme tragen F4 Fimbrien als Target für therapeutische Antikörper

Orally fed seeds producing designer IgAs protect weaned piglets against enterotoxigenic *Escherichia coli* infection

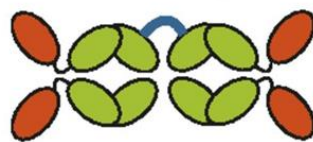
Vikram Viridi^{a,b,1}, Annelies Coddens^c, Sylvie De Buck^{a,b}, Sam Millet^d, Bruno Maria Goddeeris^c, Eric Cox^{c,1}, Henri De Greve^{e,f,1}, and Ann Depicker^{a,b,1}

Das „Edible Antibody Concept“

mVHH-IgA



dVHH-IgA



sVHH-IgA



- Samenspezifische Expression von VHH-IgA-Formaten
- Verfütterung an Ferkel

Virdi V et al. PNAS 2013;110:11809-11814