





Augu vīrusu molekulārās tehnoloģijas




***Andris Zeltiņš, Dr biol
Latvijas Biomedicīnas pētījumu
un studiju centrs
25. 09. 2014***





Families and Genera of Viruses Infecting Plants

DNA

dsDNA (RT)
Caulimoviridae

 Caulimovirus
 CsVMV-like
 PVCV-like
 SbCMV-like

 Badnavirus
 RTBV-like

ssDNA

Geminiviridae

 Mastrevirus

 Curtovirus

 Begomovirus

Nanovirus





RNA

dsRNA

Reoviridae

 Fijivirus
 Phytoreovirus
 Oryzavirus

Partitiviridae

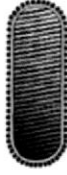

 Alphacryptovirus
 Betacryptovirus


Varicosavirus





100 nm


ssRNA (-)

Rhabdoviridae

 Cytorhabdovirus
 Nucleorhabdovirus


Bunyaviridae

 Tospovirus


Tenuivirus

 Ophiovirus







ssRNA (RT)





Pseudoviridae



ssRNA (+)


Comoviridae

 Idaeovirus


Sequiviridae

 Tombusviridae
 Luteoviridae
 Marafivirus
 Sobemovirus
 Tymovirus (Umbravirus)


Bromoviridae


 Cucumovirus
 Bromovirus


 Ilarvirus


 Alfavirus


Ourmiavirus






Tobamovirus



Tobravirus



Hordeivirus



Furovirus



Peculovirus



Pomovirus


Benyvirus


Allexivirus, Carlavirus, Foveavirus, Potexvirus


Capillovirus, Trichovirus, Vitivirus


Potyviridae


Closteroviridae


8th report of International Committee on Taxonomy of Viruses:

≈ 6000 zināmi vīrusi
 ≈ 2000 - augu vīrusi
 vairums no tiem - **ss(+)RNS** vīrusi

77% no zināmajiem augu vīrusiem – kultūraugu vīrusi

Cik dabā ir vispār?

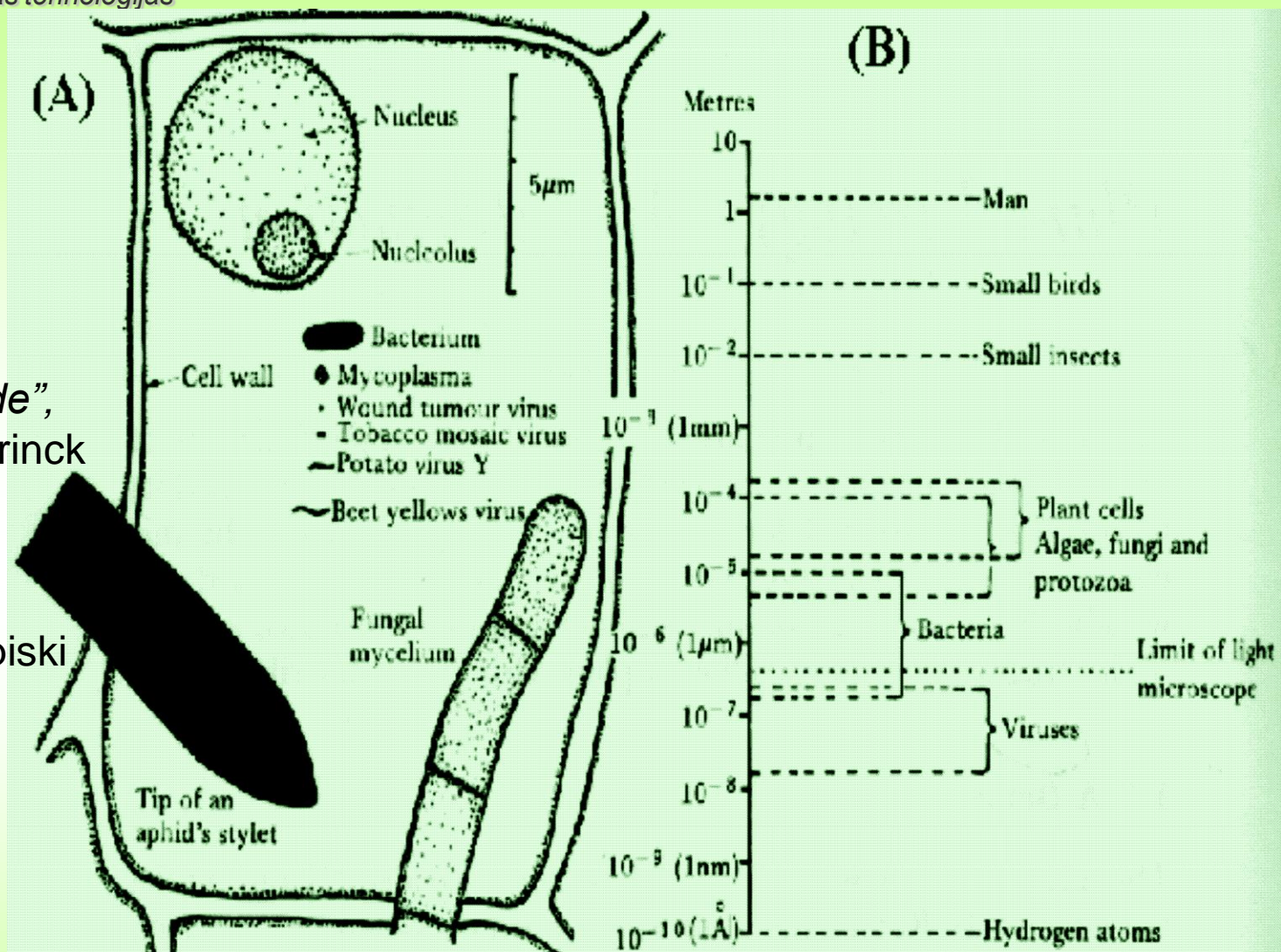
Metagenomiskie dati: aprakstīti tikai aptuveni 1% (Mokili et al., 2012)

IEVADS.

Vīrusi :

-lat. “*virus – inde*”,
Martinus Beijerinck
ieviests
termins, 1898

-ultramikroskopiski
parazīti,
kas inficē
organismu
šūnas



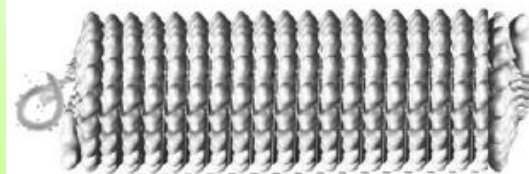
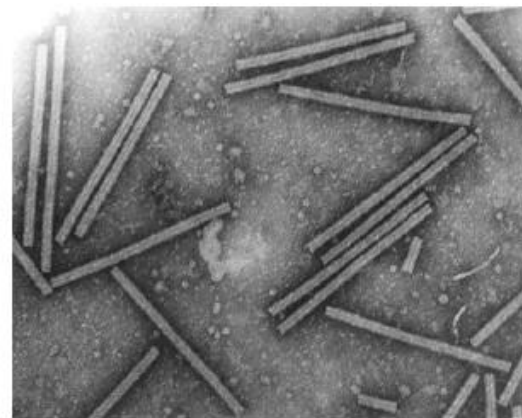
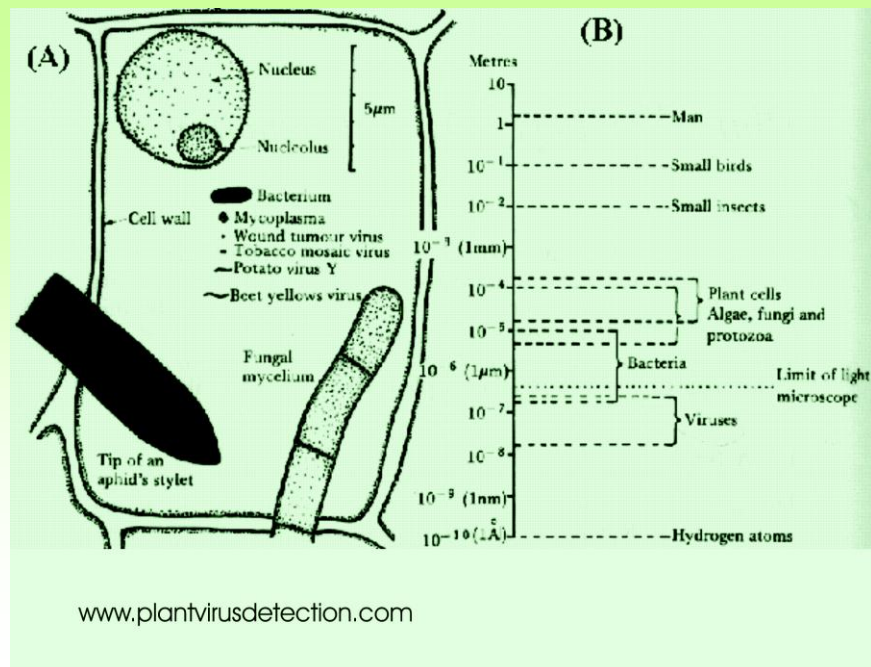
www.plantvirusdetection.com

Dažādu augu kaitēkļu un patogēnu izmēru salīdzinājums

IEVADS.

Vīrusi :

- obligāti intracelulāri parazitā,
- satur nukleīnskābi (RNS vai DNS),
- apvalks – proteīns(i), dažkārt lipīdi, glikoproteīni.



Tabakas mozaīkas vīruss (TMV)

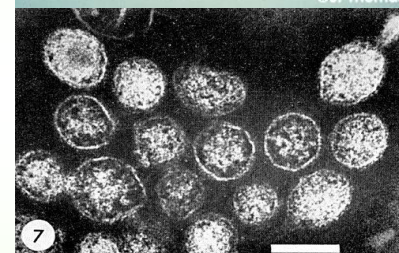
IEVADS.

Vīrusu nozīme lauksaimniecībā:

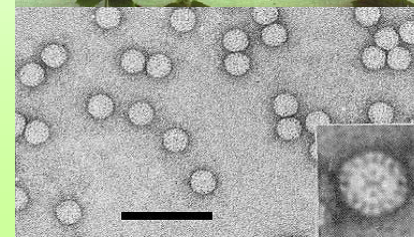
izraisa ievērojamus ražas zudumus –

- kopā 60×10^9 \$/gadā (?);
- TSWV radītie zaudējumi līdz 1×10^9 \$/gadā

Tomato spotted wilt virus (TSWV):
plašs saimnieku spektrs – tomāti, kartupeļi, tabaka, ziedaugi etc. (> 600 sugas)



Cucumber mosaic virus (CMV):
(> 1200 (!) sugas)

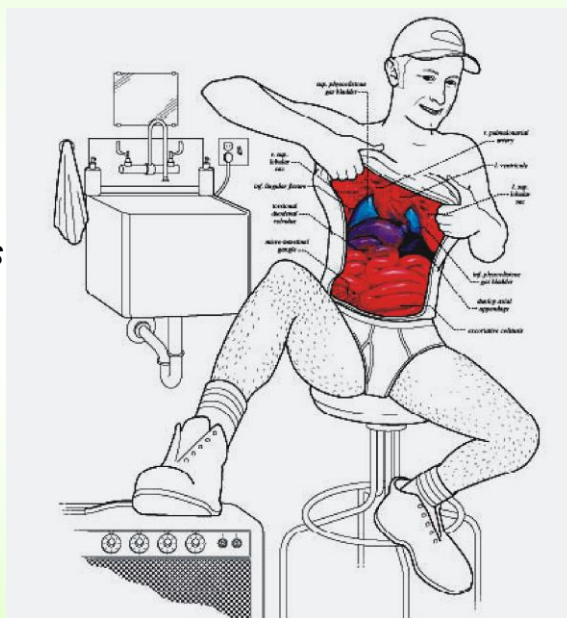


IEVADS.

Augu vīrusi un zīdītāju organismi

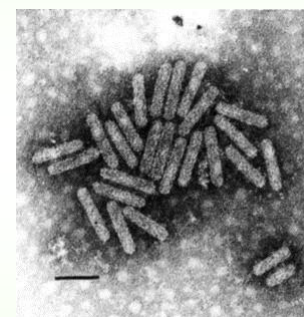


Ar Pepper mild mottle virus (PMMV) inficēta paprika



Tom Giesler zīmējums

No cilvēka zarnu trakta izolēta
34 augu vīrusu RNS, PMMV infekcioza



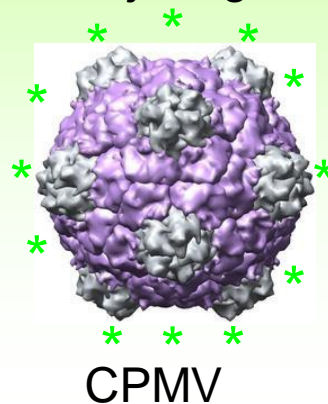
**Augu vīrusi neizraisa infekciju zīdītāju organismos.
Zīdītāji, arī cilvēki – augu vīrusu pārnēsātāji?**

IEVADS.

Augu vīrusi un zīdītāju organismi



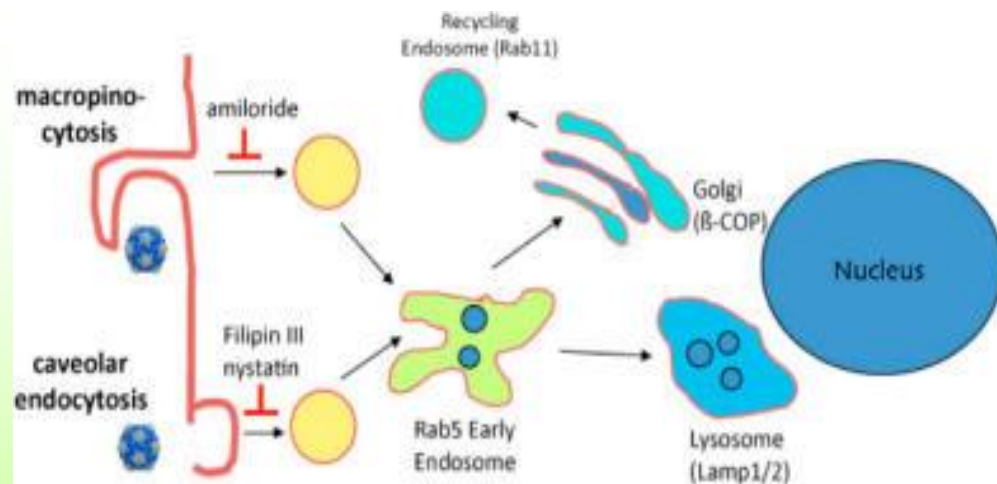
Peles viegli pacieš pat 100 mg/kg CPMV injekcijas



CPMV

Fluorescenti iezīmēts CPMV, iedarots pelēm vai intravenozi injicēts ir atrodams neatkarīgi no ievadīšanas veida (Rae et al., 2005):

- liesā;
- plaušās;
- aknās;
- kaulu smadzenēs;
- kuņģī;
- citos orgānos

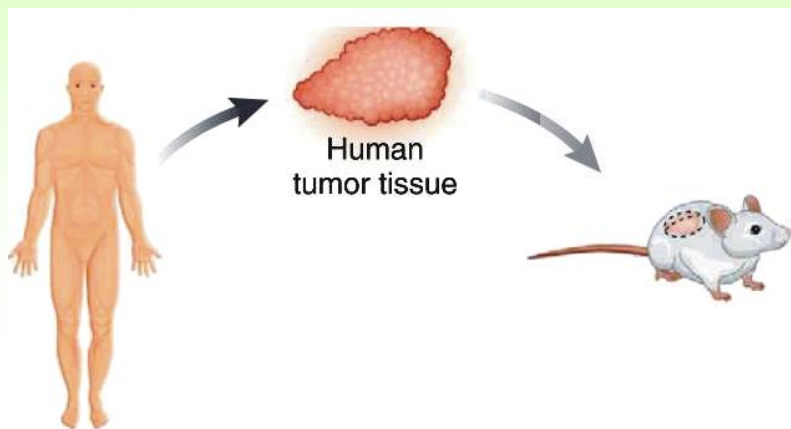


Plummer, Manchester, 2012

Augu vīrusi – relatīvi stabili un netoksiski zīdītāju organismiem

IEVADS.

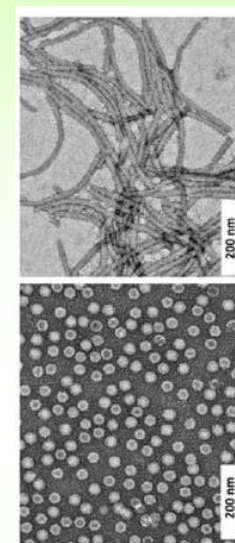
Augu vīrusi un zīdītāju organismi



Shukla et al., 2012

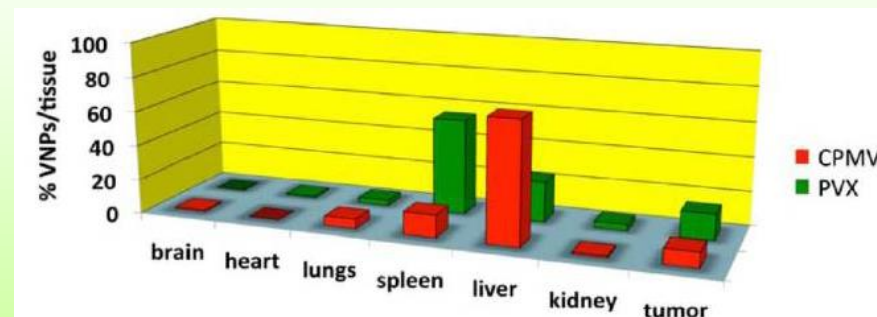
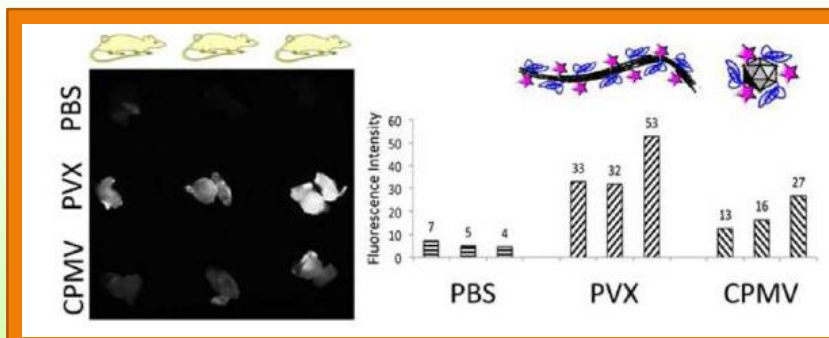


(Alexa Fluor-; PEG-) VLPs



PVX

CPMV



Augu vīrusi – izejmateriāls pretvēža aģentu konstruēšanai

AUGU VĪRUSU TEHNOLOĢIJAS

Annu. Rev. Phytopathol. 2002. 40:45–74

doi: 10.1146/annurev.phyto.40.021102.150133

Copyright © 2002 by Annual Reviews. All rights reserved

MAKING AN ALLY FROM AN ENEMY:

Plant Virology and the New Agriculture

Gregory P. Pogue, John A. Lindbo, Stephen J. Garger, and
Wayne P. Fitzmaurice

Large Scale Biology Corporation, 3333 Vaca Valley Pkwy, Vacaville, CA 95688;

e-mail: greg.pogue@lsbc.com, john.lindbo@lsbc.com, steve.garger@lsbc.com,

wayne.fitzmaurice@lsbc.com

AUGU VĪRUSU TEHNOLOĢIJAS

Ar augu vīrusiem inficētas tulpes –
tirgus prece Holandē XVII gs.



Tulip breaking virus (Potyviridae)

	Guilders
Eight fat pigs	240
Four fat oxen	480
Twelve fat sheep	120
Twenty-four tons of wheat	448
Forty-eight tons of rye	558
Two hogsheads of wine	70
Four barrels of eight-guilder beer	32
Two tons of butter	192
A thousand pounds of cheese	120
A silver drinking cup	60
A pack of clothes	80
A bed with mattress and bedding	100
A ship	500
TOTAL	3,000

Fig. 2. Value of goods equal to the price of the rare broken tulip *Semper Augustus*, as recorded in a pamphlet written in 1636.

AUGU VĪRUSU TEHNOLOĢIJAS



Augu vīrusu tehnoloģijām nozīmīgi vēstures notikumi :

1956 - Gierer & Schramm parāda, ka **attīrīta TMV RNS ir infekcioza augiem**

1984 – Ahlquist *et al.* parāda, ka no klonētas vīrusa cDNS kopijas *in vitro* sintezēta BMV RNS ir arī infekcioza

Ahlquist P. *et al.* (1984)

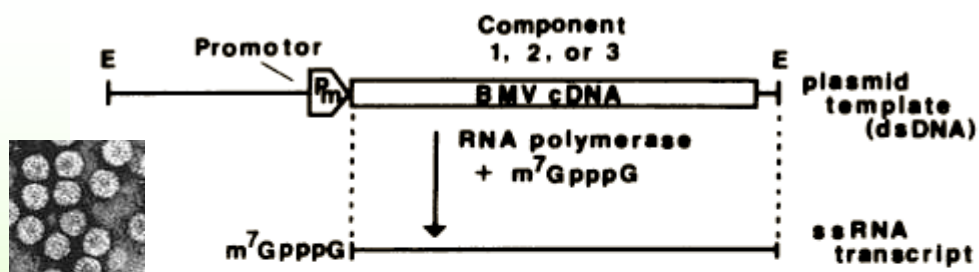
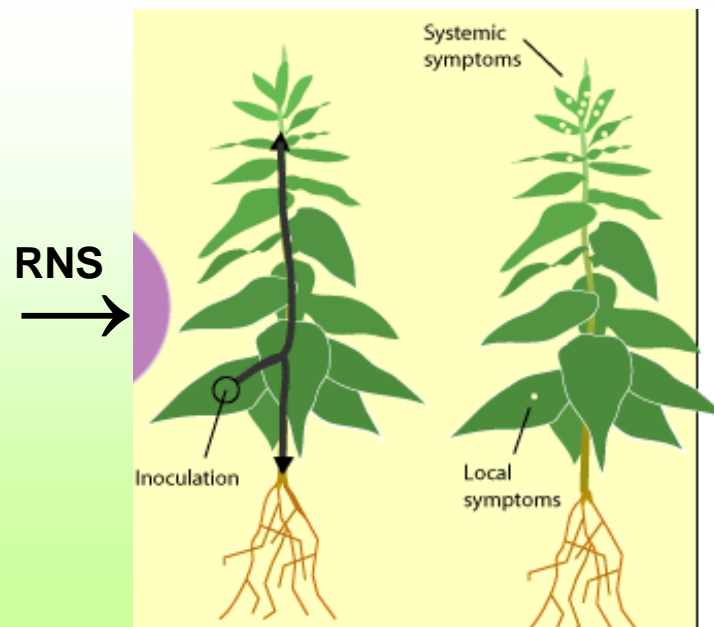


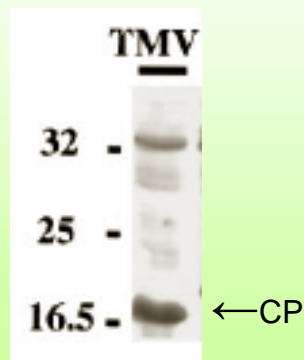
FIG. 1. Schematic representation of a template BMV cDNA clone in transcription vector pPM1 after linearization at the unique *EcoRI* site (E) and the capped runoff RNA transcript generated by RNA polymerase in the presence of m^7GpppG cap analog. Three such plasmids, each containing cDNA to one of the three BMV components, are needed for transcription of the total genome of BMV. The modified λ P_R promoter (P_M) allows RNA synthesis to initiate exactly at the 5' terminus of each BMV sequence, and transcription continues to the end of the DNA template. ds, Double-stranded; ss, single-stranded.



AUGU VĪRUSU TEHNOLOĢIJAS

Augu vīrusa izvēle:

- vīrusa raksturojuma nozīme
- - sekvence un genoma organizācija (mono-, multipartīti genomi, sg-RNS, gēnu raksturojumi); **vīrusa cDNS kopija**
- - dati par vīrusa infekcijas ciklu augu saimnieka šūnās
- - vīrusa 3D struktūras dati
- vīrusa infekcijas efektivitāte (piem., TMV līdz 60 mg/g biomasas)



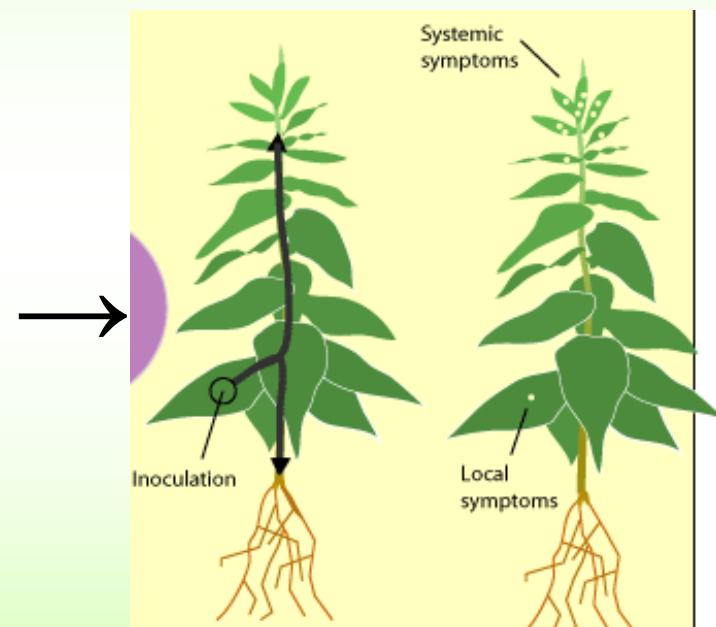
AUGU VĪRUSU TEHNOLOĢIJAS

Augu vīrusu gēnu vektoru veidošana Vīrusa nukleīnskābes ievadīšanas metodes augu šūnās

- Mehāniska inokulācija – nukleīnskābe + abrazīvs materiāls (bentonīts, carborunds, u.c.);
- agrobaktēriju inokulācija (T-DNS vektoriem);
- protoplastu elektroporācija;
- ballistiska inokulācija.



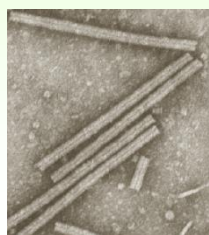
Fig. 1. Bombarding brch with the Helios Gene Gun system.



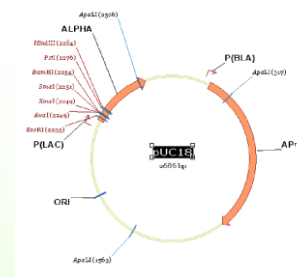
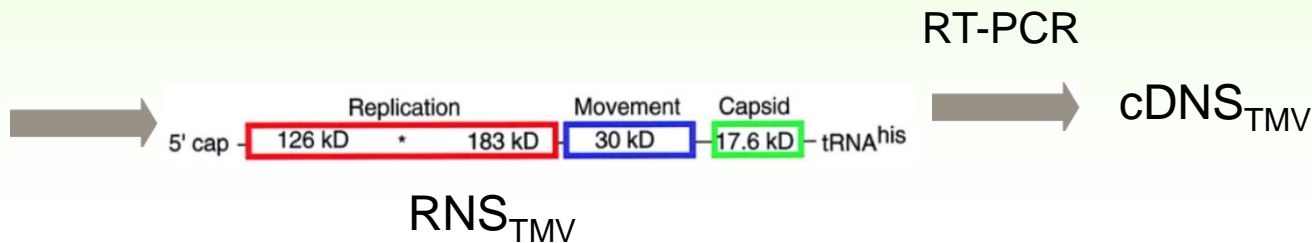
Ballistiska inokulācija

AUGU VĪRUSU TEHNOLOĢIJAS

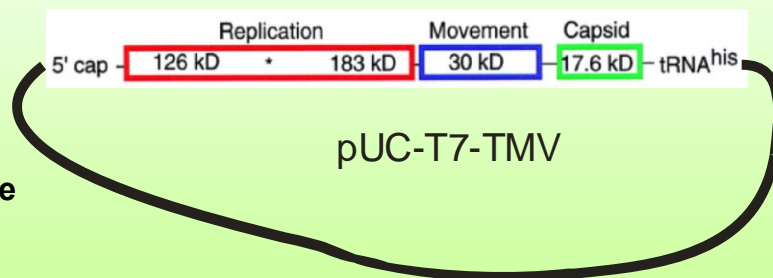
Augu vīrusu gēnu vektoru veidošana
Vīrusa nukleīnskābei jābūt infekciozai - RNS



TMV



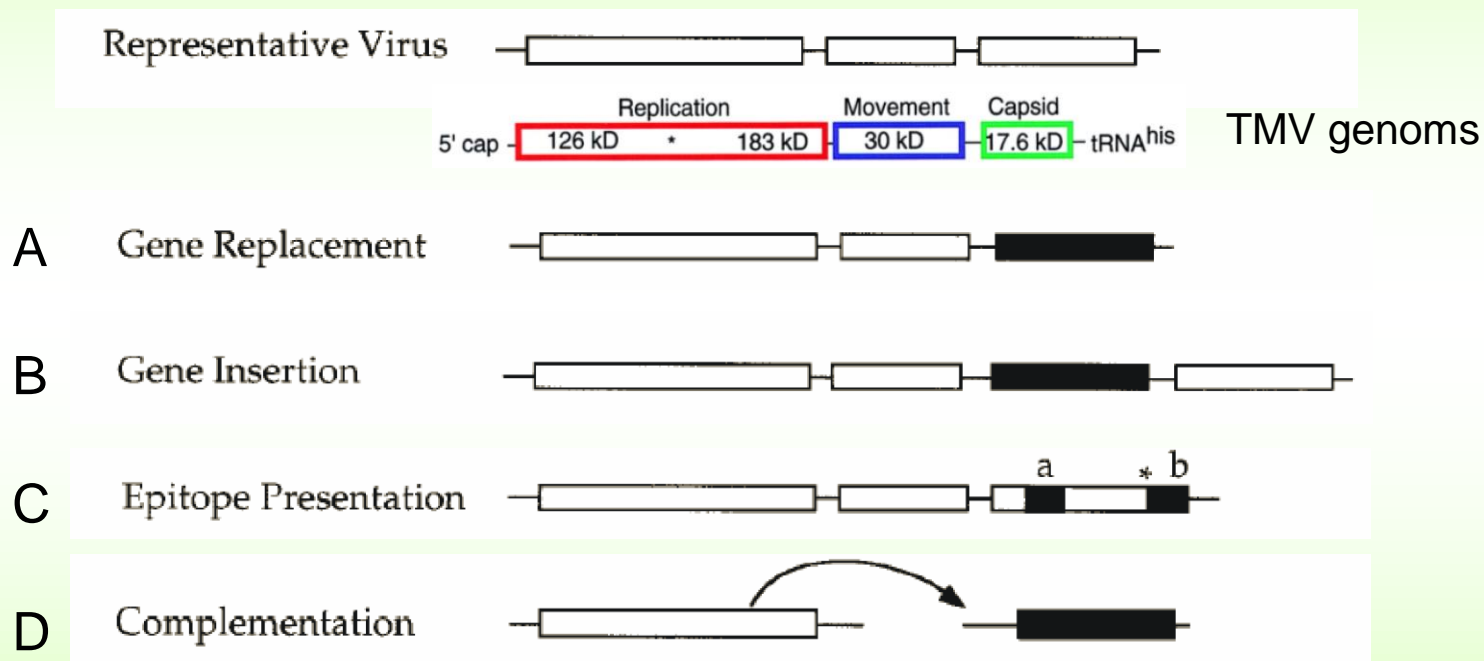
T7 polimerāze



AUGU VĪRUSU TEHNOLOĢIJAS

Augu vīrusu gēnu vektoru veidošana

Rekombinantie gēnu vektori - stratēģijas :



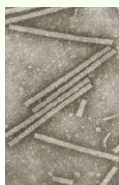
SCHOLTHOF, SCHOLTHOF & JACKSON, 1996

* - translational readthrough of amber stop codon

AUGU VĪRUSU TEHNOLOĢIJAS

Augu vīrusu gēnu vektoru veidošana

Rekombinantie gēnu vektori - stratēģijas :



Piemērs: TMV vektors / CAT



Takamatsu *et al.* (1987); Dawson *et al.* (1988)



→ Laba CAT ekspresija inficētajās tabakas lapās

→ Nav CAT produkcijas visās augs daļās, jo CP nepieciešams vīrusa sistēmiskam transportam

AUGU VĪRUSU TEHNOLOĢIJAS

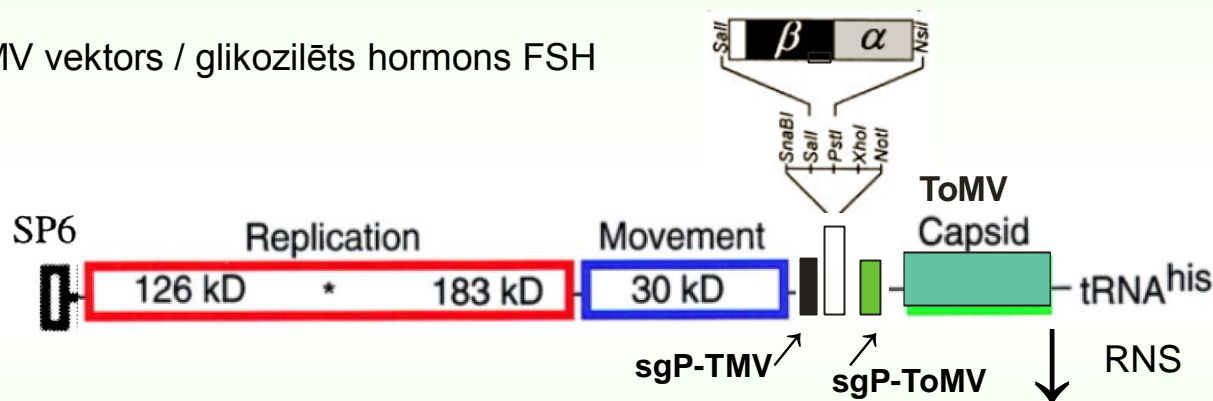
Augu vīrusu gēnu vektoru veidošana

Rekombinantie gēnu vektori - stratēģijas :

B Gene Insertion



Piemērs: TMV vektors / glikozilēts hormons FSH



TMV vektors nodrošina relatīvi augstu FSH iznākumu (3% no šķīstošajiem proteīniem) ←

Adekvāta glikozilēšanas pakāpe *in vitro* un *in vivo* testos ←

FSH inserts stabils TMV vektorā, jo ievietots starp heteroloģiem sg promotoriem ←

Dirnberger et al. (2001)



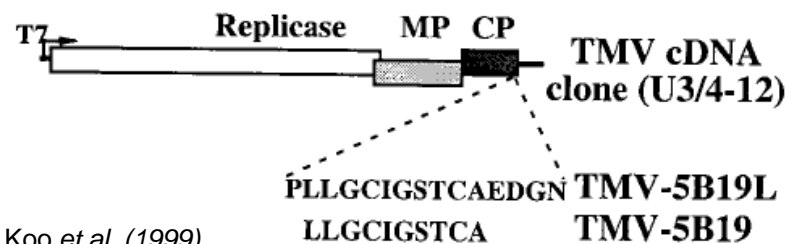
AUGU VĪRUSU TEHNOLOĢIJAS

Augu vīrusu gēnu vektoru veidošana

Rekombinantie gēnu vektori - stratēģijas :

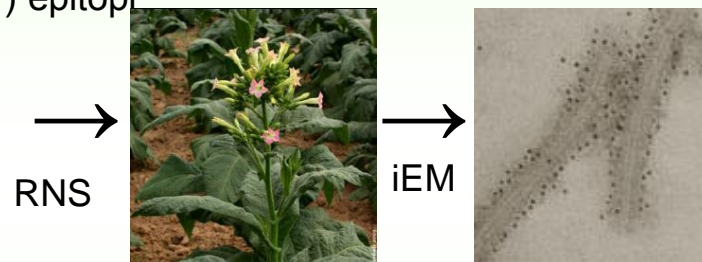


Piemērs: TMV vektors / murine hepatitis virus (MHV) epitopi

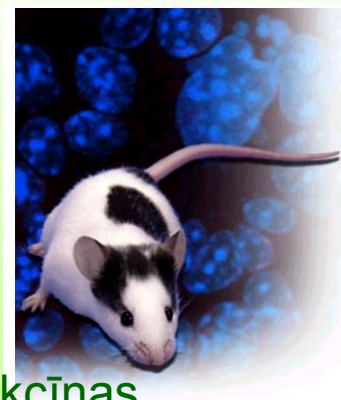


Koo *et al.* (1999)

FIG. 1. Map of hybrid TMV cDNA clones. The position of the 5B19 and 5B19L peptides between Ser-154 and Gly-155 of the TMV coat protein (CP) is indicated. The T7 promoter was used to produce viral RNA in *in vitro* transcription reactions. MP, Movement protein.



- TMV vektors ar CP C-gala epitopu (starp S154/G155) – stabils, iztur vairākas pasāžas;
- strukturāli neatšķiras no TMV, epitopi atrodas uz daļiņu virsmas;
- imunizētas peles izturēja letālu MHV dozu injekcijas.



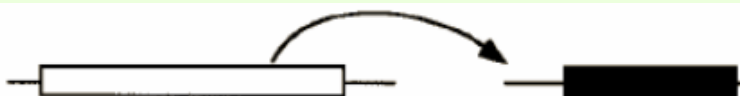
Augu vīrusi ar slimību izraisītāju epitopiem var kalpot kā vakcīnas

AUGU VĪRUSU TEHNOLOĢIJAS

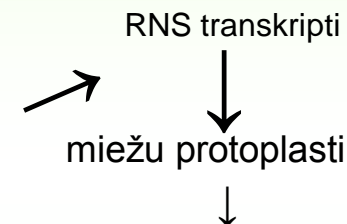
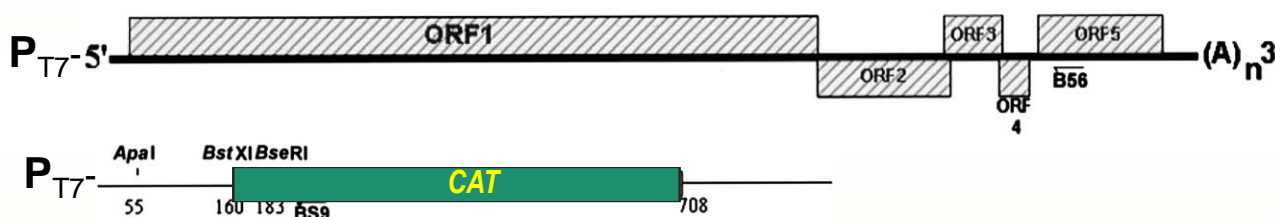
Augu vīrusu gēnu vektoru veidošana

Rekombinantie gēnu vektori - stratēģijas :

D Complementation



Piemērs: BaMV / satBaMV vektors



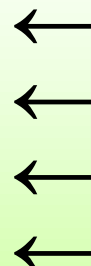
Chenopodium quinoa

Gēnu nomainīa (p20/CAT) neietekmē satBaMV replikāciju;

Produkcija - 2μg / g inficētu lapu biomasas;

Sistēmiska heterologā proteīna ekspresija tikai 1/100 no lokālās;

P20 proteīns nodrošina satBaMV sistēmisku transportu?



ELISA testi

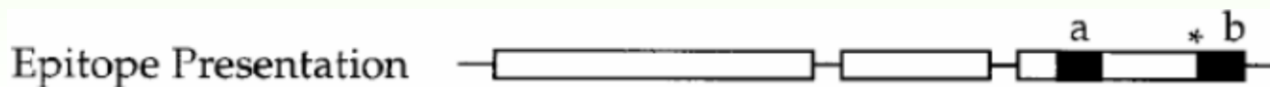
AUGU VĪRUSU TEHNOLOĢIJAS

Tehnoloģiskie aspekti

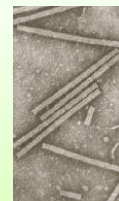
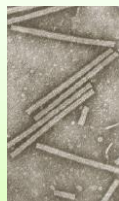
Large Scale Biology Corporation pieredze



Potenciālās malārijas VLP vakcīnas ražošana no augu biomasas (TMV vektora platforma)



RNS transkripts



AUGU VĪRUSU TEHNOLOĢIJAS

Tehnoloģiskie aspekti

Large Scale Biology Corporation pieredze



Potenciālās malārijas vakcīnas ražošana no augu biomasas (TMV vektora platforma)

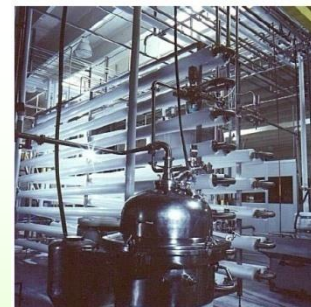
30 d



Biomass Homogenization



Extract Clarification



AUGU VĪRUSU TEHNOLOĢIJAS

Tehnoloģiskie aspekti

Large Scale Biology Corporation pieredze



Potenciālās malārijas vakcīnas ražošana no augu biomasas (TMV vektora platforma)

Chromatography/Ultrafiltration



Finish and Fill



AUGU VĪRUSU TEHNOLOĢIJAS

Tehnoloģiskie aspekti

Large Scale Biology Corporation pieredze



Potenciālās malārijas vakcīnas ražošana no augu biomasas (TMV vektora platforma)

TABLE 4 Large-scale manufacture of antimalarial TMV291 coat fusion and product analysis

Tobacco variety	A	B	C
Biomass and expression			
Acres harvested	0.25	0.25	0.4
kg Biomass harvested	2106	1957	2709
kg Biomass/acre	8424	7828	6773
mg TMV291/kg biomass	123	104	97
g TMV291/acre	1036	814	656

~ 2.5 kg vakcīnas kandidāta no 1 ha!

AUGU VĪRUSU TEHNOLOĢIJAS

Tehnoloģiskie aspekti

Large Scale Biology Corporation pieredze



- Vektoram jānodrošina heterologo gēnu stabilitāte uz vairākām pasāžām; inokulātu savairošanu siltumnīcu / lauka produkcijas vajadzībām;
- Jo garāki inserti, jo lēnāk veidojas vRNS un lēnāk tā tiek transportēta no šūnas uz šūnu, rezultāts – selekcijas spiediens (delēciju uzkrāšanas līdz inserta pilnīgam zudumam – nepieciešami RT-PCR stabilitātes testi (!));
- jākonstruē speciāla augstspiediena iekārta, ar kuras palīdzību inficē augus lauka apstākļos ar vīrusu / abrazīva materiāla suspensiju (efektivitāte >95%; ar aprīkotu traktoru 1 ha var inficēt apm. 1,5 h).



AUGU VĪRUSU TEHNOLOĢIJAS

Tehnoloģiskie aspekti

Large Scale Biology Corporation pieredze

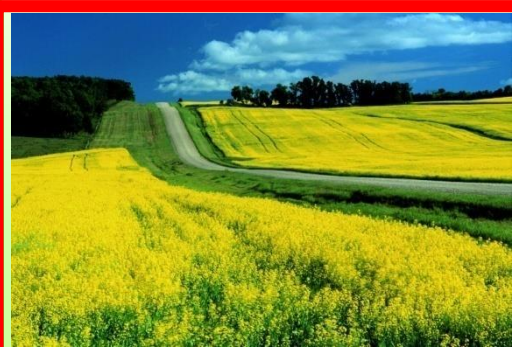


- augu vīrusi un to vektori nav infekciozi cilvēkiem un dzīvniekiem;
- augu vīrusu vektori ir uzskatāmi par augu kaitēkļiem !
- jāsaņem atļauja darbam ierobežotos siltumnīcu / lauka apstākļos;
- jāsniedz detalizētas atskaites par izmēģinājumiem;

Secinājumi no lauka izmēģinājumiem:

- - konstruējot vektorus izmantošanai brīvā dabā var būt nepieciešams ievadīt mutācijas, kas izslēdz vektoru izplatīšanās iespējas ar insektu, sēņu vai nematožu starpniecību,
- - jākonstruē vektori, kuri var kalpot par marķieriem lauka izmēģinājumos (piem., ar GFP marķiergēnu),
- - jānovērtē vīrusu gēnu vektoros ievadīto heterologo gēnu stabilitāte,
- - atkarībā no eksperimentu rezultātiem jāpieņem lēmums par ierobežotu izmantošanu siltumnīcas apstākļos / brīvā dabā.

Pogue *et al.* (2002)



AUGU VĪRUSU TEHNOLOĢIJAS

Augu vīrusu gēnu vektoru veidošana

Agrobacterium tumefaciens

kā gēnu vektors



Photographer: Edward L. Barnard,
Florida Department of Agriculture and
Consumer Services

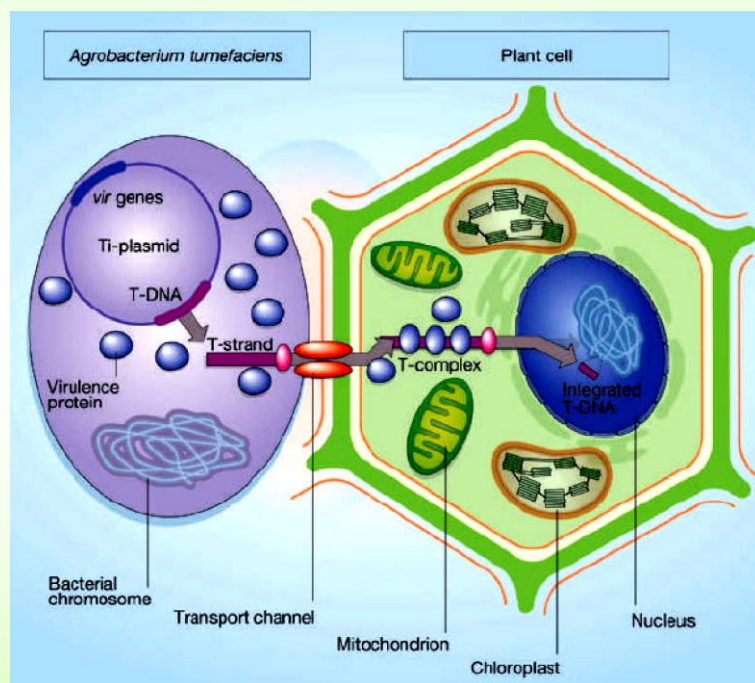


Agrobacterium tumefaciens attached to a plant cell.
Image by Martha Hawes

> 90 augu sugas jūtīgas pret *A. tumefaciens*,
pārsvarā divdīgļlapji

AUGU VĪRUSU TEHNOLOĢIJAS

Augu vīrusu gēnu vektoru veidošana
Agrobacterium tumefaciens rekombinanti
kā vīrusu infekcijas izraisītāji



S. B. Gelvin, *Nature* 433, 583-584 (2005)

- **T DNA** (transferred DNA), kas atrodas Ti-plazmīdā, kodē proteīnus, kas nodrošina audzēju veidošanos;
- T-DNA tiek ievadīta augu šūnās caur audu bojājumiem;
- nonākot kodolā, tā var tikt integrēta genomā; bet var arī tikt ekspresēta bez integrācijas;
- T-DNA var tikt nomainīta ar rekombinanta proteīna DNS

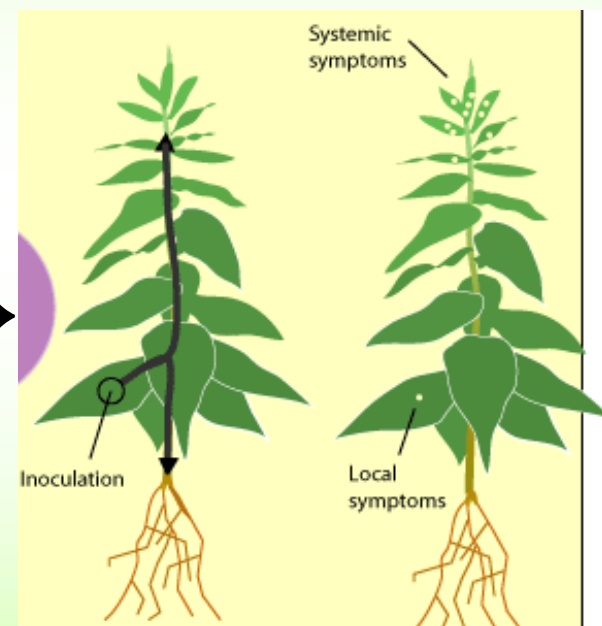
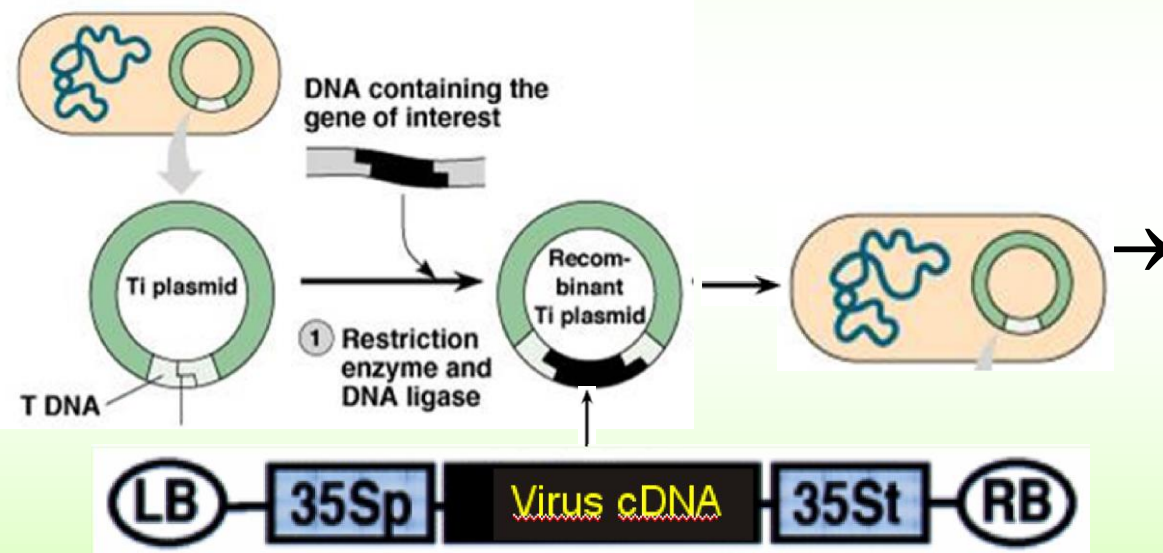
AUGU VĪRUSU TEHNOLOĢIJAS

Augu vīrusu gēnu vektoru veidošana

Agrobacterium tumefaciens

rekombinanti kā vīrusu infekcijas izraisītāji

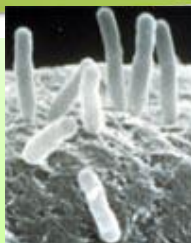
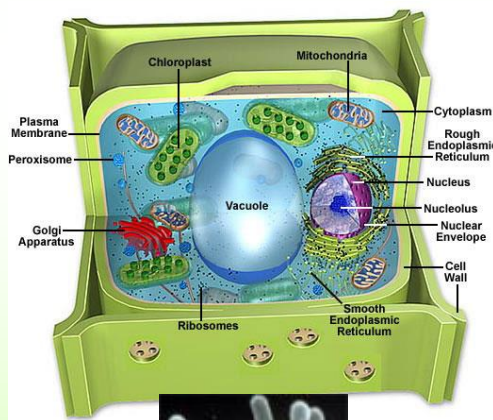
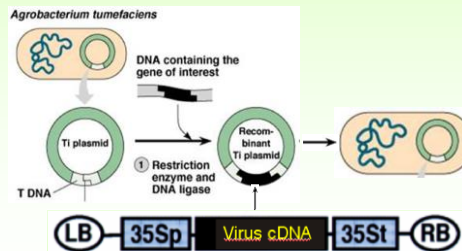
Agrobacterium tumefaciens





AUGU VĪRUSU TEHNOLOĢIJAS

Tehnoloģiskie aspekti *Icon Genetics* pieredze



- 5 agrobaktērijas var inficēt vienu augu šūnu –
tātad var ievadīt 5 dažādas cDNS (moduļus)
vienā šūnā;

- vīrusa pilnā cDNS kodē augu šūnai neraksturīgi
garu RNS, transkripcija kodolā mazefektīva
(degradācija);

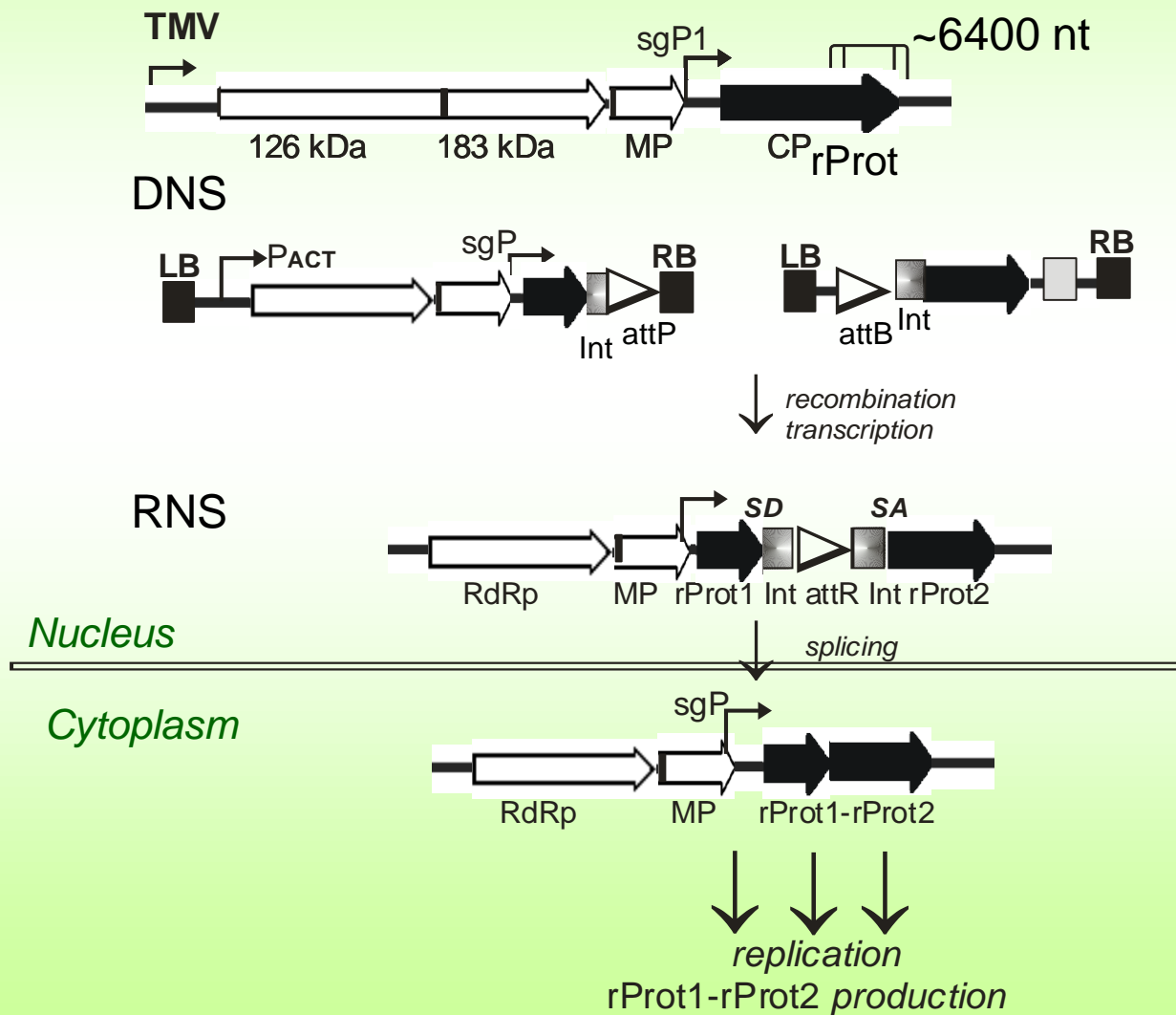
- vīrusa genomam pievieno intronu sekvenses,
sadala genomu vairākās daļās (moduļos);

- pievieno ekspresiju veicinošus cDNS moduļus
(piem., pēctranskripcijas «klusēšanas»
supresorproteīnu gēnus)



Tehnoloģiskie aspekti

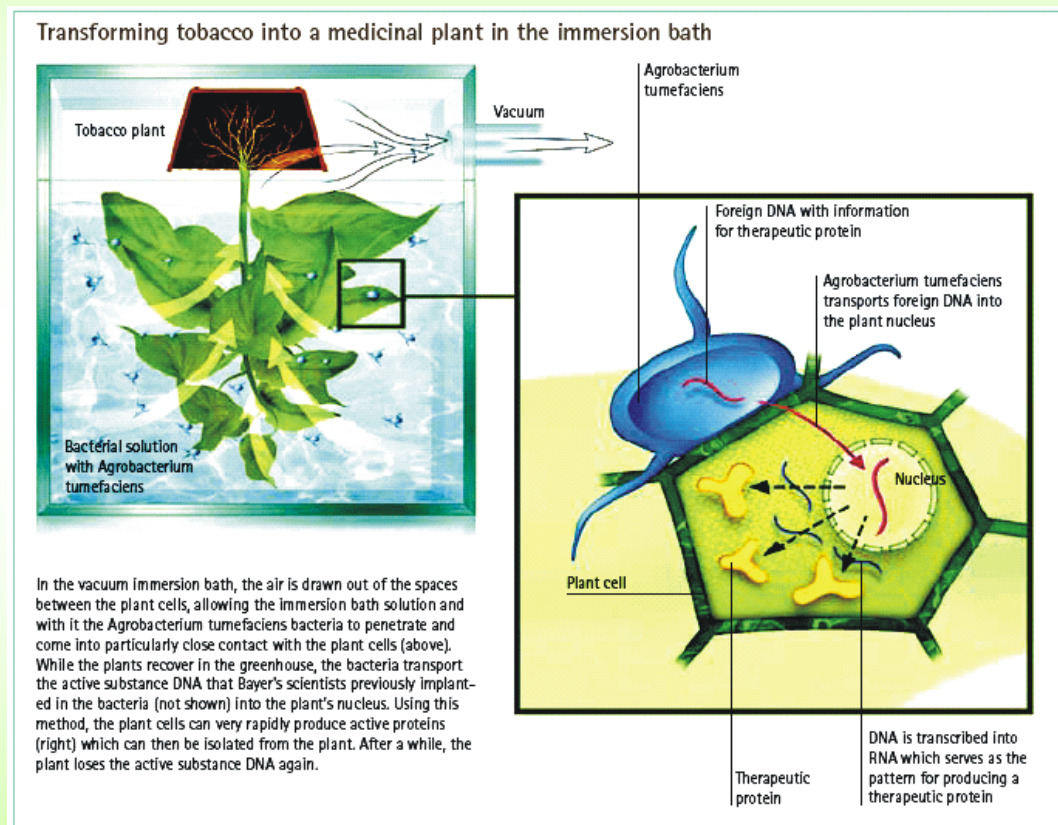
Icon Genetics pieredze: *MAGNIFECTION* sistēma





Tehnoloģiskie aspekti

Icon Genetics pieredze – vakuuma infiltrācija

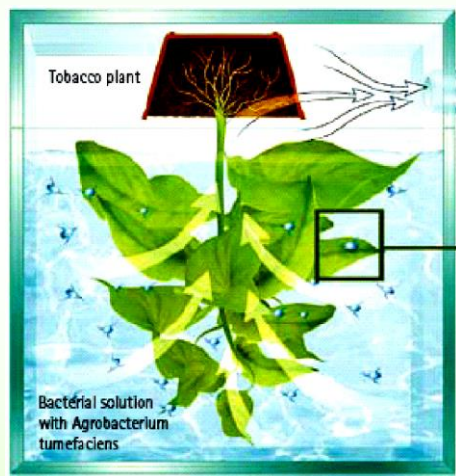


Nodrošina līdz 5 dažādu cDNS moduļu
ievadīšanu vienā šūnā; iespējami tehnoloģiski
risinājumi industriālām vajadzībām



Tehnoloģiskie aspekti

Icon Genetics pieredze – vakuuma infiltrācija



3-4 dienas



Fig. 3. Magnified *Nicotiana benthamiana* plants expressing recombinant protein (GFP), 7 days after infiltration, UV light.

Nodrošina līdz 100% šūnu inficēšanu un efektīvu rekombinantā proteīna sintēzi



Tehnoloģiskie aspekti

Icon Genetics pieredze – platformas validācija

Green fluorescent protein (GFP) - 5000 mg/kg (80% TSP)
Yersinia pestis antigen - 2000 mg/kg
Hepatitis B virus antigēns - 240 mg/kg
Protein A-Tobamovirus VLP's - 3000 mg/kg

Salīdzinājumam:

TMV pilna garuma vektors (GFP) - ~600 mg/kg (10% TSP)

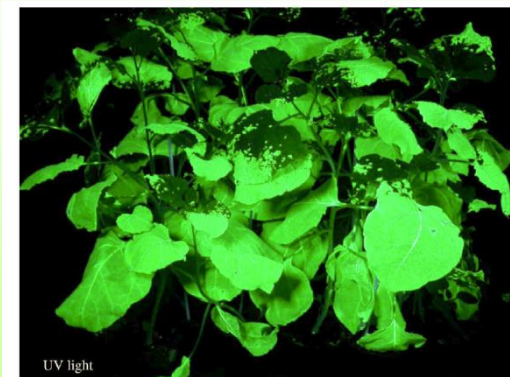
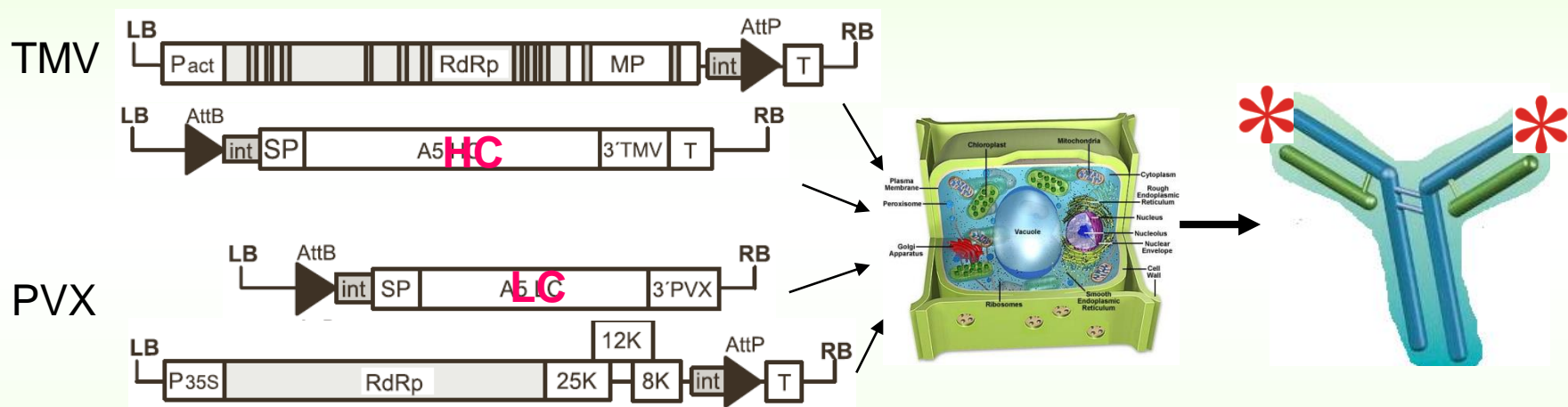


Fig. 3. Magnified *Nicotiana benthamiana* plants expressing recombinant protein (GFP), 7 days after infiltration, UV light



Tehnoloģiskie aspekti

Icon Genetics pieredze – mAb's produkcija



500 mg/kg !

Tehnoloģiskie aspekti Biotehnoloģisko platformu salīdzinājums

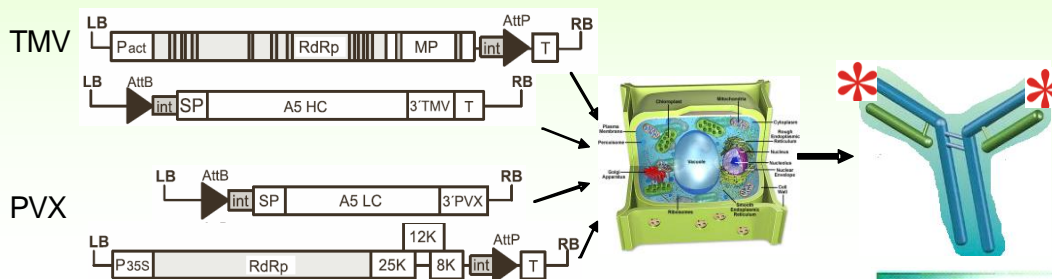
Modificēts pēc Ma, J.K., Drake, P.M. and Christou P., *Nature Rev. Genet.*, 4, 794-805, 2003.

Table 1 | **Comparison of production systems for recombinant human pharmaceutical proteins**

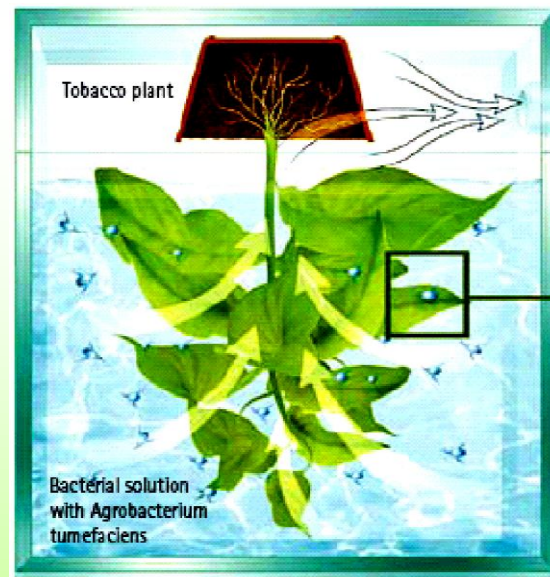
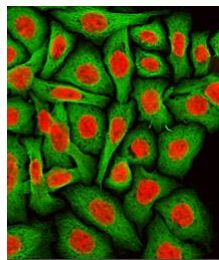
System	Overall cost	Production timescale	Scale-up capacity	Product quality	Glycosylation	Contamination risks	Storage cost
Bacteria	Low	Short	High	Low	None	Endotoxins	Moderate
Yeast	Medium	Medium	High	Medium	Incorrect	Low risk	Moderate
Mammalian cell culture	High	Long	Very low	Very high	Correct	Viruses, prions and oncogenic DNA	Expensive
Transgenic animals	High	Very long	Low	Very high	Correct	Viruses, prions and oncogenic DNA	Expensive
Plant cell cultures	Medium	Medium	Medium	High	Minor differences	Low risk	Moderate
Transgenic plants	Very low	Long	Very high	High	Minor differences	Low risk	Inexpensive
Plant Virus Platform	LOW	MEDIUM	HIGH	HIGH	MINOR DIFFERENCES	LOW RISC	INEXPENSIVE

Tehnoloģiskie aspekti

Ir perspektīva tehnoloģija – kāpēc netiek plaši pielietota?



mAB's iegūšana:



~20 mg mAb's no vienas peles ascīta

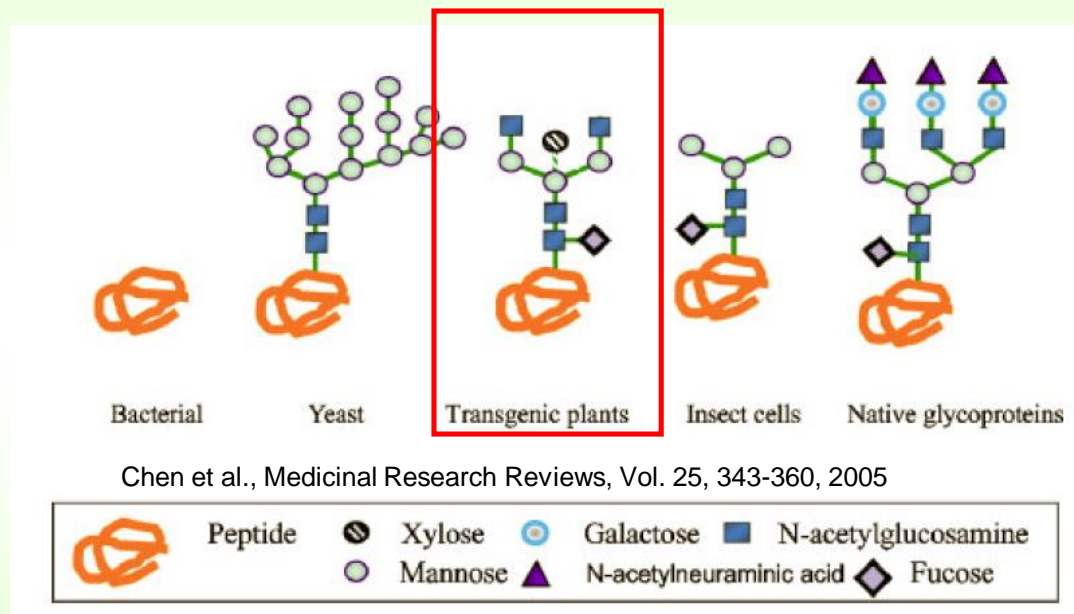
10 - 100 mg/l
Zīdītāju šūnu līnijas
10 dienās iznākums max 500 mg

500 mg/kg
3-4 dienās

Tehnoloģiskie aspekti

Ir perspektīva tehnoloģija – kāpēc netiek plaši pielietota?

1. Proteīnu glikozilēšana



Vajadzīgi papildus klīniskie pētījumi:

- 1) farmacetiskajiem proteīniem jābūt stabiliem cilvēka organismā;
- 2) tie nedrīkst izraisīt alerģijas

Tehnoloģiskie aspekti

Ir perspektīva tehnoloģija – kāpēc netiek plaši pielietota?

2. Birokrātiskas grūtības

Pašlaik farmaceitisko preparātu biotehnoloģisku iegūšanu no augiem kontrolē gan medicīnas, gan lauksaimniecības uzraudzības iestādes, kas sarežģī atļauju saņemšanu.

«Growing” medicines in plants requires new regulations: Just one farm growing 25 square miles of safflower could meet the world’s total demand for insulin. But potential cost savings are eliminated under current regulations, set up for GM agricultural crops not pharmaceuticals.» Sparrow, John Innes Centre, UK, 2013



Viltus safrāns *Carthamus tinctorius*

Vajadzīgas likumdošanas izmaiņas, kas regulē tieši farmaceitisko produktu ražošanu no augiem biotehnoloģiskā ceļā

Tehnoloģiskie aspekti

Ir perspektīva tehnoloģija – kāpēc netiek plaši pielietota?

3. *Agrobacterium* – potenciāli bīstama cilvēkiem?

Nav viennozīmīgu datu. Pastāv aizdomas, ka *Agrobacterium* ir saistīta ar ādas saslimšanu (Morgellons Disease) un spēj transformēt zīdītāju šūnas:

- 1) J. Cummins, Magnifaction, Safe Pharming or Doomsday Device? ISIS Report, 2005/03/09
- 2) Kunik *et al.*, Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. PNAS USA, 2001, 98, 1871-87.
- 3) Petrunia *et al.*, *Agrobacterium tumefaciens*-Induced Bacteraemia Does Not Lead to Reporter Gene Expression in Mouse Organs. PLoS ONE. 2008, 3(6): e2352

Ražošanā jāievēro

GMP (good manufacturing practice) prasības attiecībā uz produktiem un drošas ražošanas prasības attiecībā uz apkārtējo vidi un personālu

Tehnoloģiskie aspekti

Ir perspektīva tehnoloģija – kāpēc netiek plaši pielietota?

4. Izmaksas.

Tehnoloģiju ieviešana ļoti dārga – cilvēka papilomas vīrusa vakcīnas (Gardasil/Silgard) izstrādei (raugu ekspresijas platforma), pārbaudēm un ieviešanai firma *MERCK* ieguldījusi

1000 000 000 \$



Ieguldot līdzekļus tehnoloģijās, farmācijas firmas vēlas būt pārliecinātas par tās efektivitāti, stabilitāti un ilgstošu atdevi, jābūt pozitīvai pieredzei.

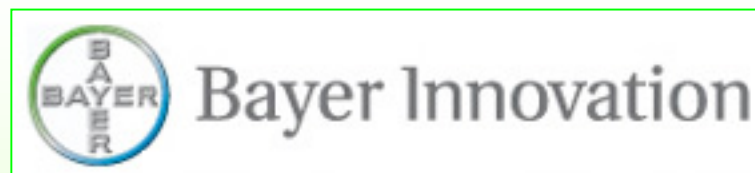
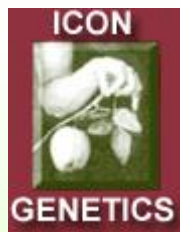
Kādam ir jāuzņemas iniciatīva!

Tehnoloģiskie aspekti

Iniciatīvas:



Newcastle virus veterinārā
vakcīna – pirmā licenzēta
augu izcelsmes vakcīna,
kas sekmīgi izgājusi II
klīniskās fāzes pētījumus

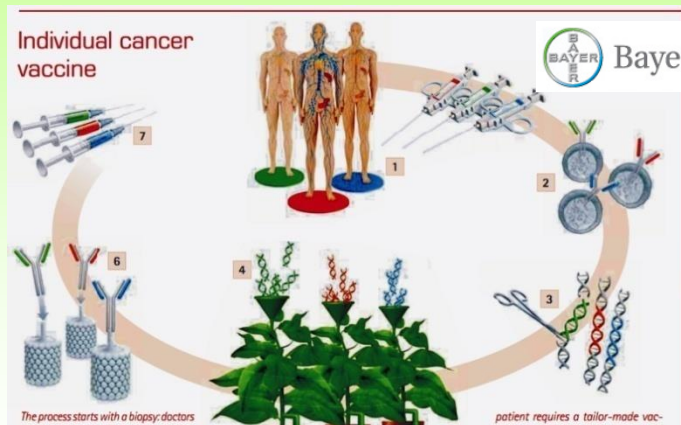


Pretvēža mAb's



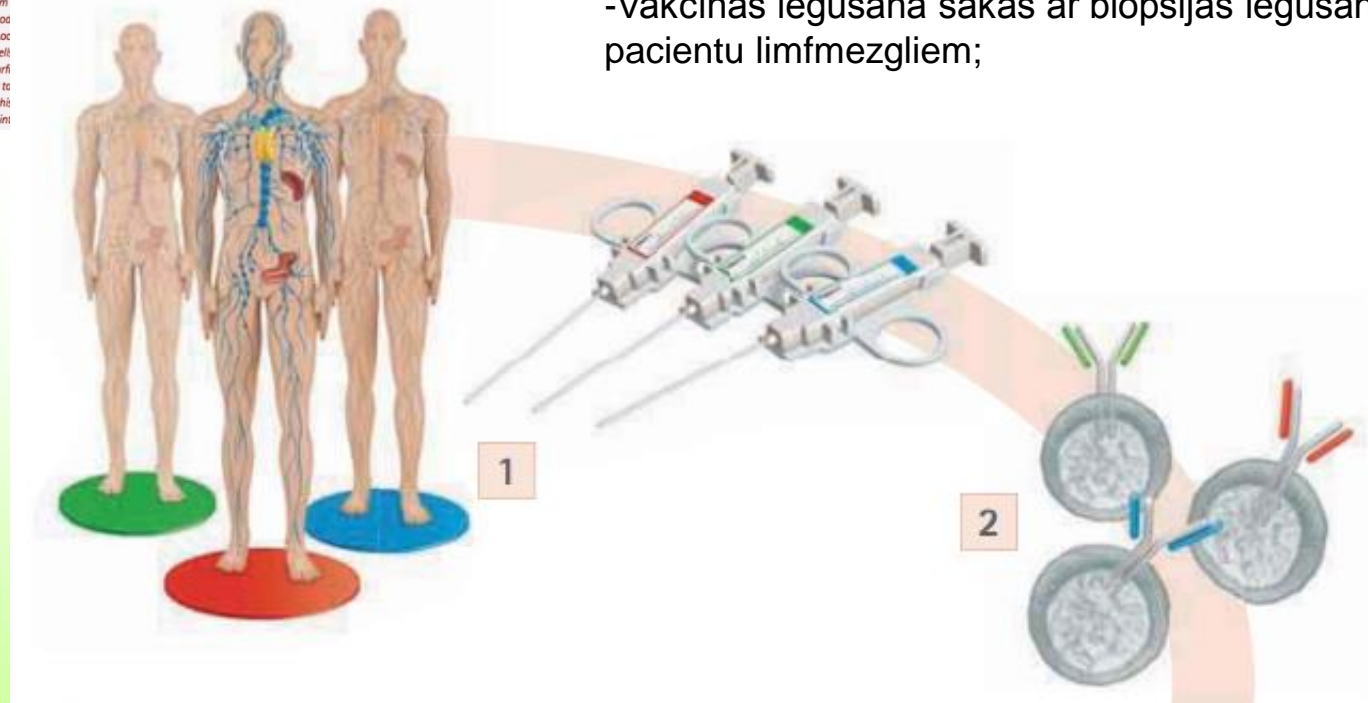
**Idiotype vaccination in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma:
clinical Phase I study with personalized vaccine from
tobacco plants**

Tehnoloģiskie aspekti

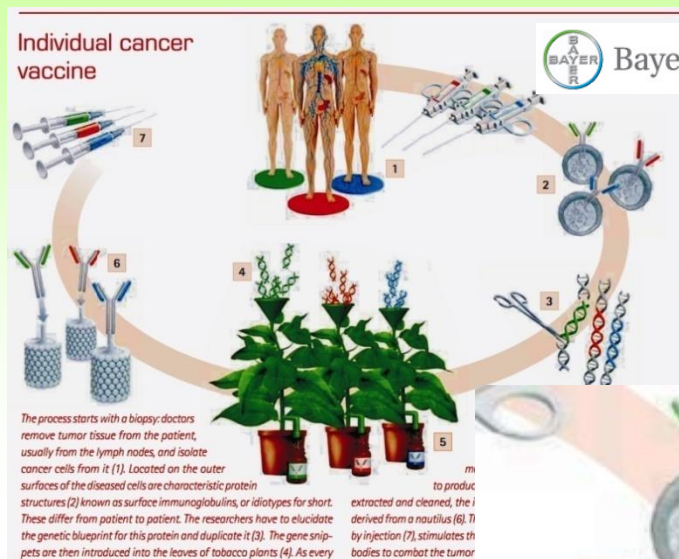


ne-Hodžkina limfomas individuālās vakcīnas iegūšana

- Nehodžkina limfoma – ļaundabīga asins šūnu saslimšana (66000 pacientu katru gadu ASV);
- Ļaundabīgās B šūnas producē unikālus šūnu virsmas imunoglobulīnus (idiotipus), kas kalpo kā marķieri; tie atšķiras individuāliem pacientiem.
- Vakcīnas iegūšana sākas ar biopsijas iegūšanu no pacientu limfmezgliem;

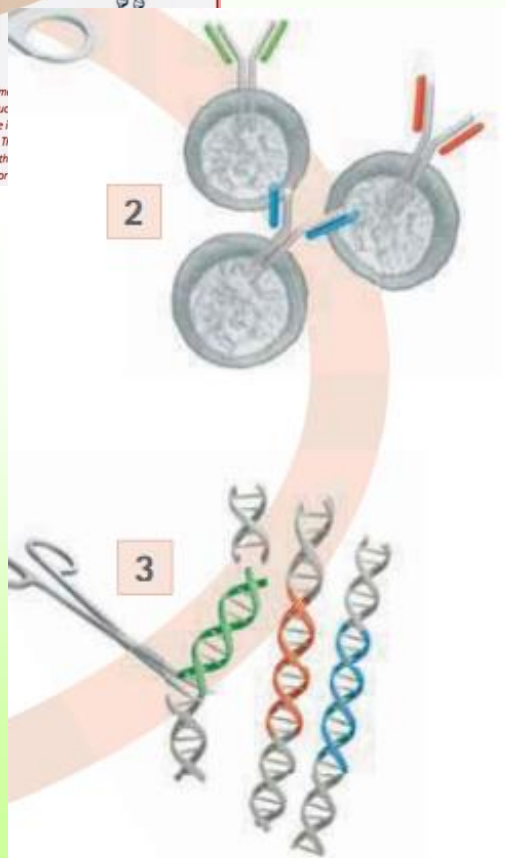


Tehnoloģiskie aspekti

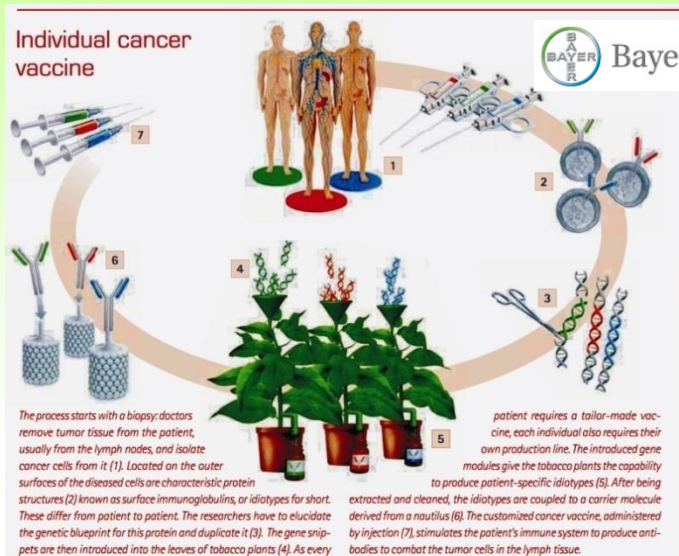


ne-Hodžkina limfomas
individuālās vakcīnas iegūšana

-No biopsiju materiāla ar RT-PCR palīdzību tiek amplificēts attiecīgā individuālā idiotipa proteīnu sekvenču kDNS;



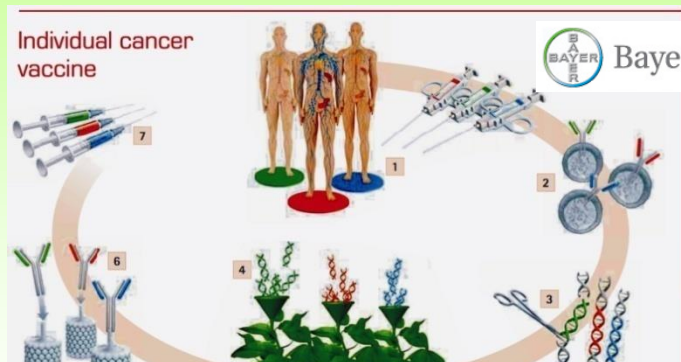
Tehnoloģiskie aspekti



-Pēc atlasē no klonu bibliotēkas individuālā kDNS tiek subklonēta *MAGNIFECTION* vektoru sistēmā un ar *Agrobacterium* palīdzību ievadīts augos



Tehnoloģiskie aspekti



Bayer Innovation

ne-Hodžkina limfomas
individuālās vakcīnas iegūšana

Pēc ekstrakcijas no lapām idiotipu molekulas tiek ķīmiski "piešūtas" pie imunoloģiski aktīvas nesējmolekulas KLH (keyhole limpet hemocyanin – subvienības 350/390 kDa, agregāti līdz 13 MDa)



Tehnoloģiskie aspekti

Individual cancer vaccine



The process starts with a biopsy: doctors remove tumor tissue from the patient, usually from the lymph nodes, and isolate cancer cells from it (1). Located on the surfaces of the diseased cells are characteristic structures (2) known as surface immunogens. These differ from patient to patient. The genetic blueprint for this protein and peptide are then introduced into the leaves



Bayer Innovation

ne-Hodžkina limfomas
individuālās vakcīnas iegūšana



7

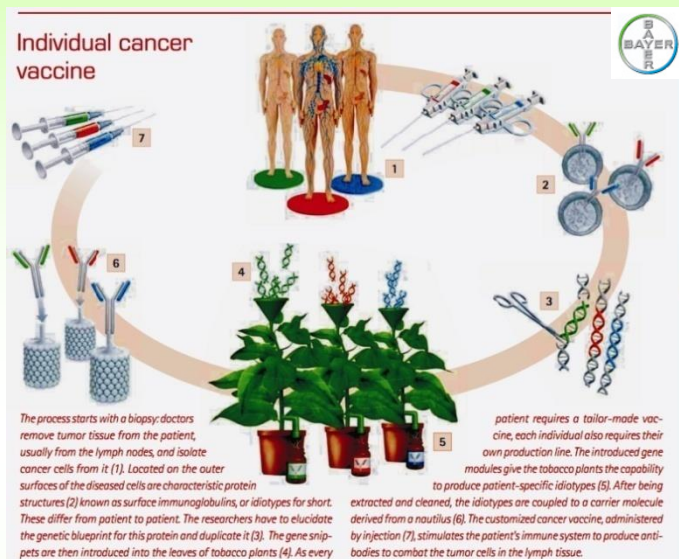


6



- Individualizētā vakcīna tiek injicēta un stimulē pacienta imūnsistēmu, lai ar izveidoto antivielu palīdzību iznīcinātu ļaundabīgās B šūnās

Tehnoloģiskie aspekti



- vakcīnas ražošanas process relatīvi vienkāršs: No biopsijas līdz gatavai vakcīnai <12 nedēļas, no kurām antigēna ekspresijai un attīrīšanai vajadzīgas tikai 2 nedēļas;
- Sistēma pielietojama vakcīnu un monoklonālo antivielu ražošanai ar iznākumu, kas 50 – 1000 reizu pārsniedz citu ar augiem saistīto tehnoloģiju efektivitāti;
- pretvēža monoklonālās antivielas (dozas – 2-4 mg/kg), **tātad 1 cilvēkam (~70 kg) 2 – 4 terapeitiskās dozas no 1 kg tabakas lapu!**

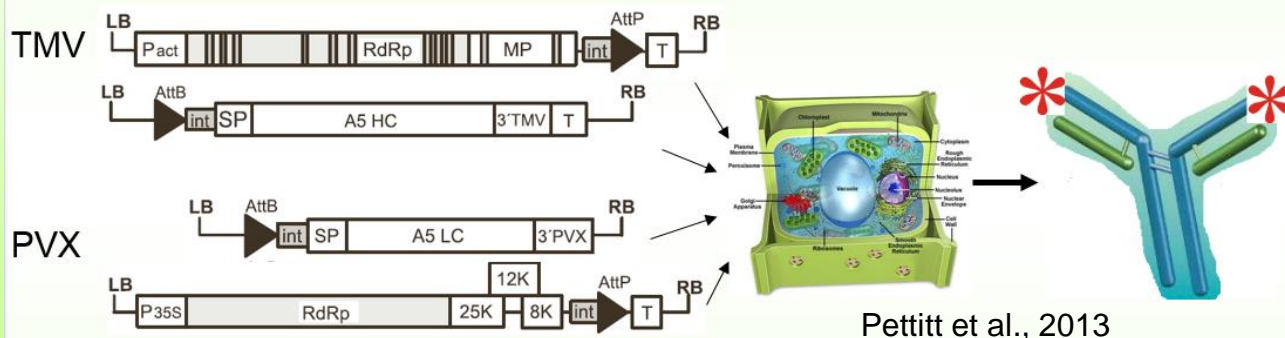
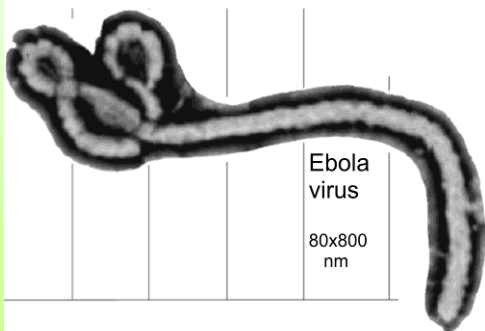
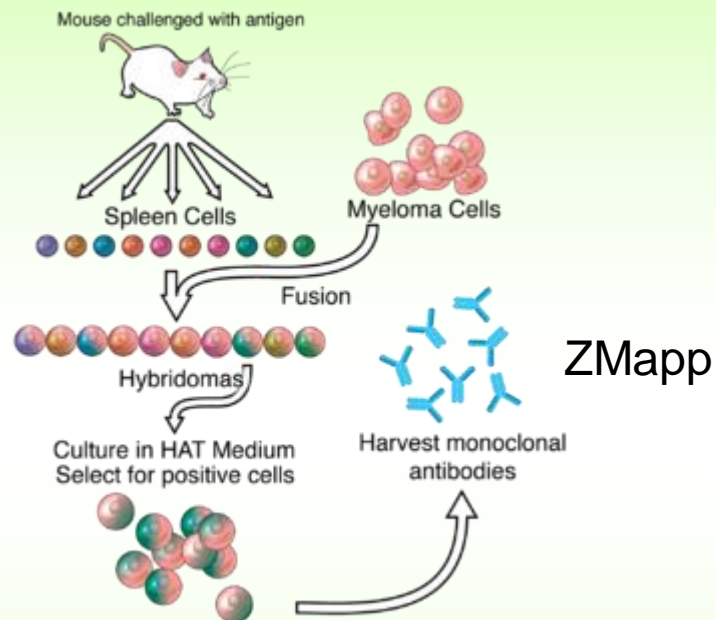
“ ...successful marketing approvals by regulatory agencies are only a matter of time...”

Mccormick (2011) Human Vaccines 7:3, 305-312.

Jauna tehnoloģija, individuālās terapijas princips

Tehnoloģiskie aspekti

MAGNIFECTION sistēma Ebola vīrusa mAb's producēšanai



Vīrusiem līdzīgās daļiņas

Augu vīrusiem līdzīgās daļiņas no rekombinantiem mikroorganismiem

ApMV
E.coli

RBDV
E.coli

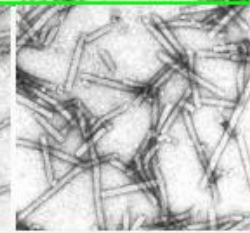
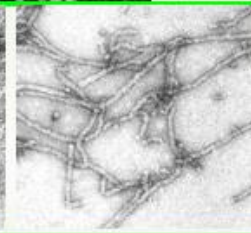
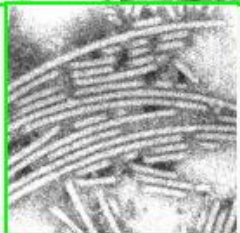
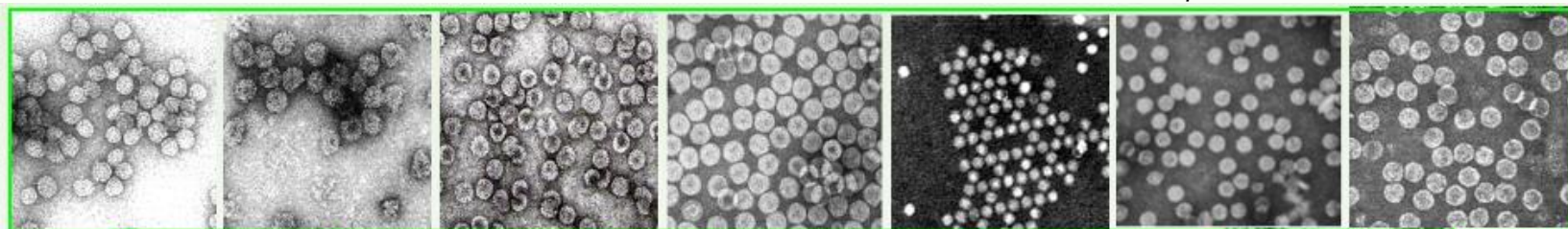
CCMV
E.coli

RYMV (T3)
E.coli

RYMV(T1)
E.coli

RGMoV
P. pastoris

CfMV
E.coli



ACLSV
E.coli

ASPV
E.coli

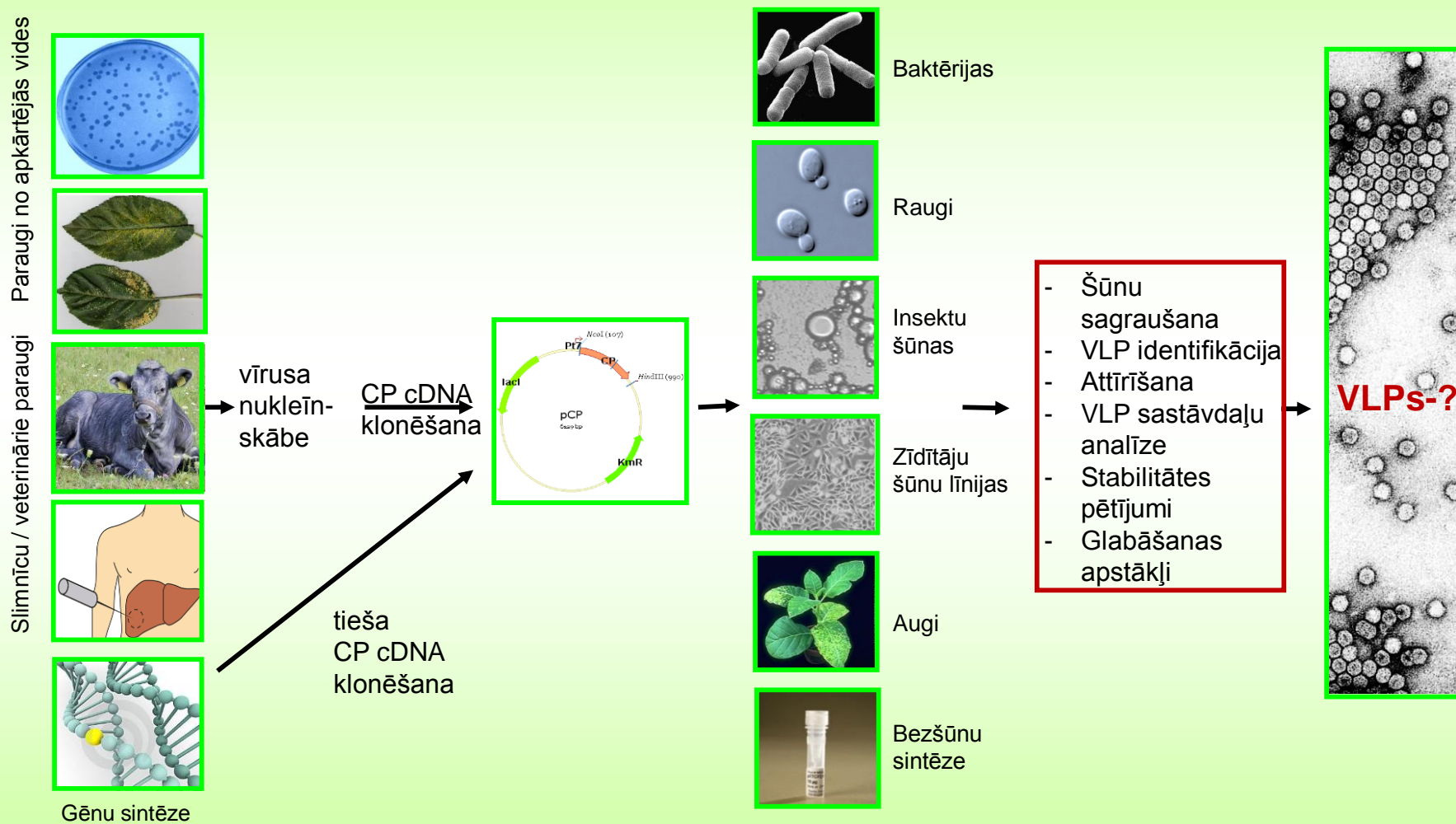
ASGV
E. coli

PVX
E.coli

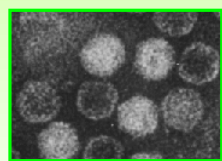
PVY
E.coli

PVM
E.coli

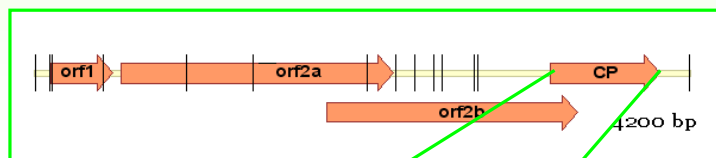
Vīrusiem līdzīgu daļiņu iegūšanas principiālā shēma



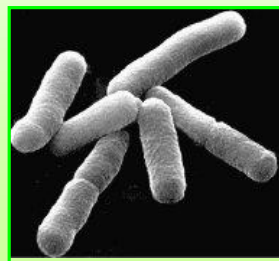
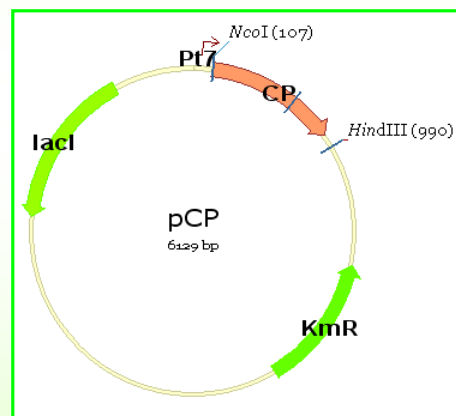
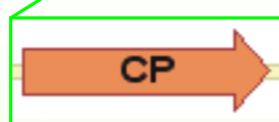
Vīrusiem līdzīgu daļiņu iegūšana no mikroorganismu šūnām



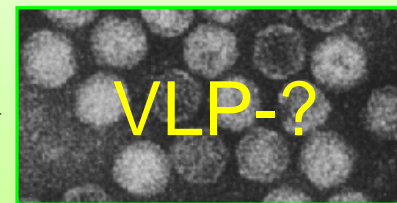
Viens strukturālais gēns



RT-PCR



E.coli

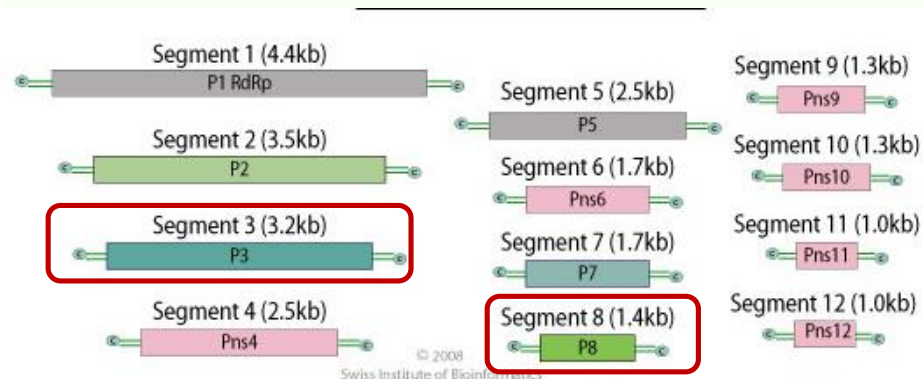
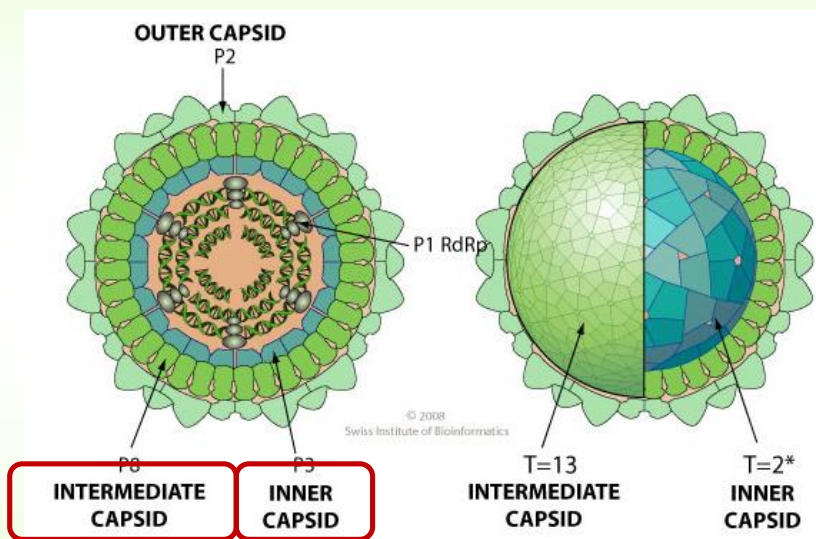


EM

Vīrusiem līdzīgo daļiņu iegūšana no insektu šūnām



Rice dwarf virus (*Reoviridae*)



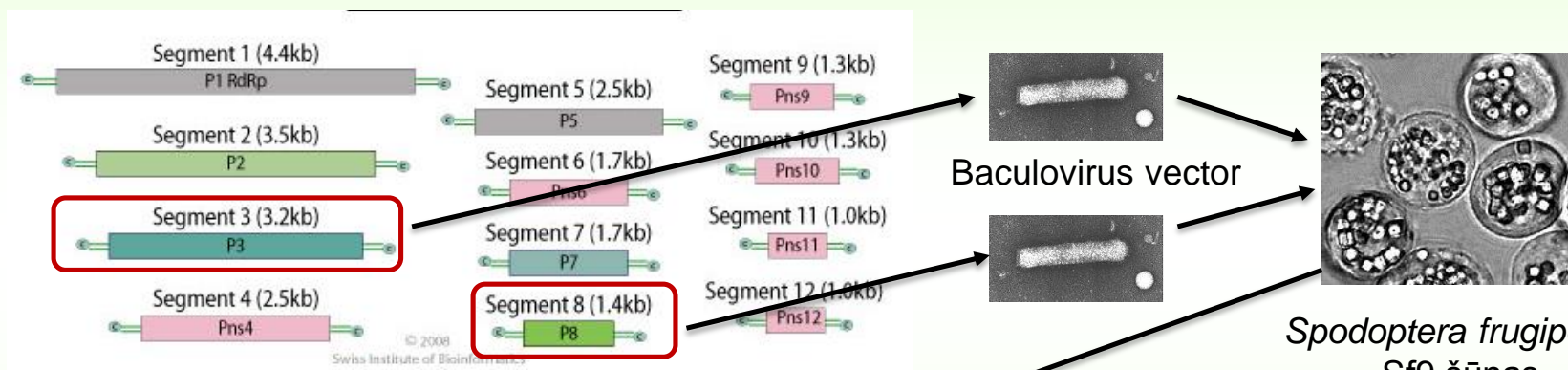
Segmentēts lineāru dsRNA genoms, satur 12 segmentus, kas kodē 15 proteīnus

Vairāki strukturālie gēni

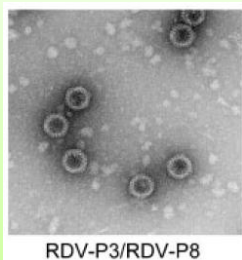
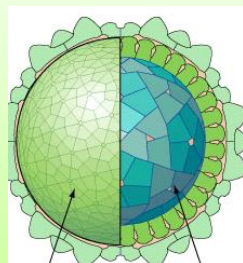
Vīrusiem līdzīgo daļiņu iegūšana no insektu šūnām



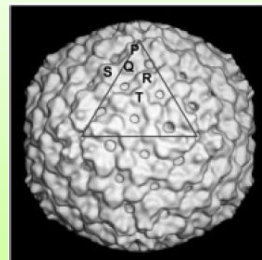
Rice dwarf virus (*Reoviridae*)



Miyazaki, 2010



EM



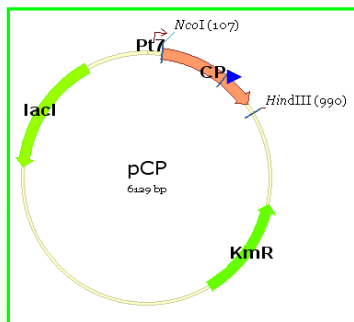
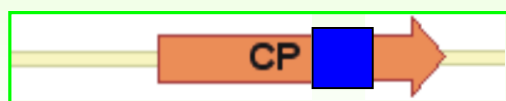
Cryo-EM

Spodoptera frugiperda
Sf9 šūnas

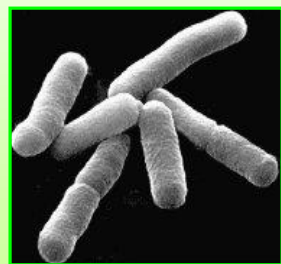
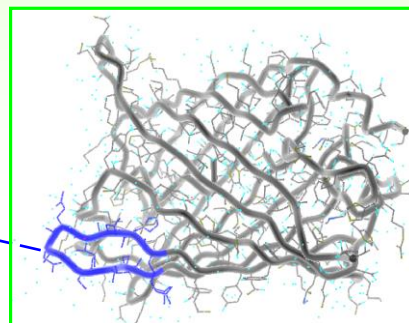
Augu vīrusiem līdzīgās daļiņas

Pielietojumi:

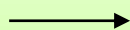
1) Imunoloģiski aktīvi nesēji



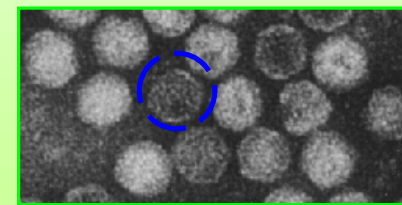
peptīda cDNS



E.coli



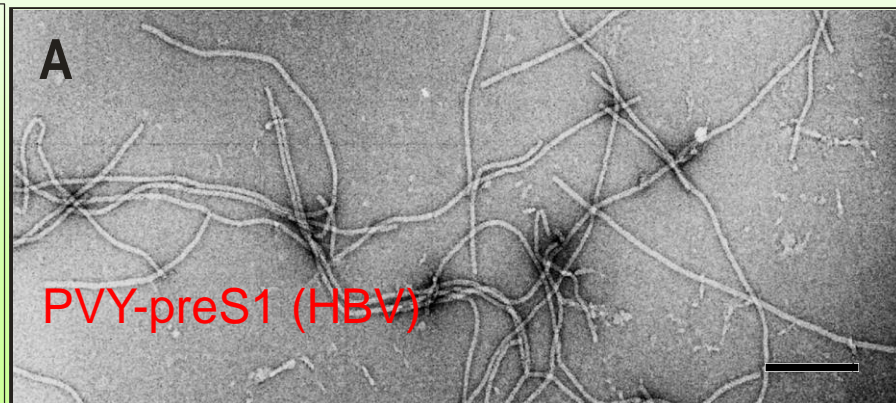
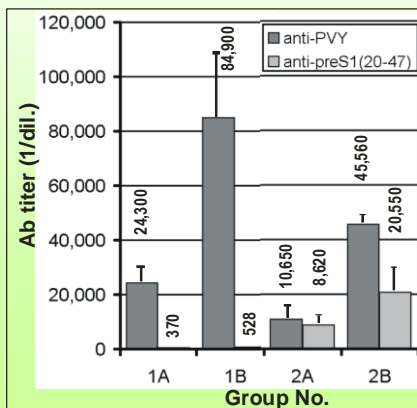
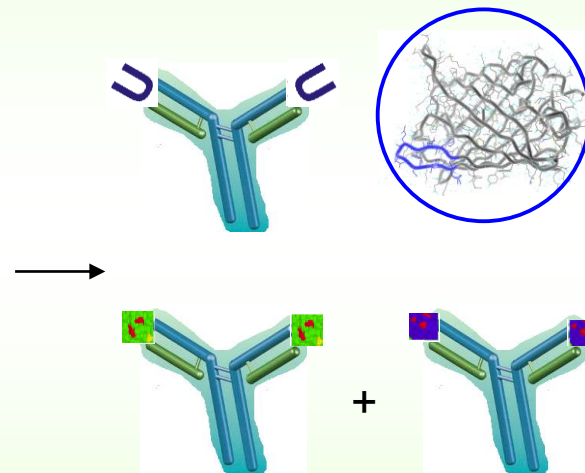
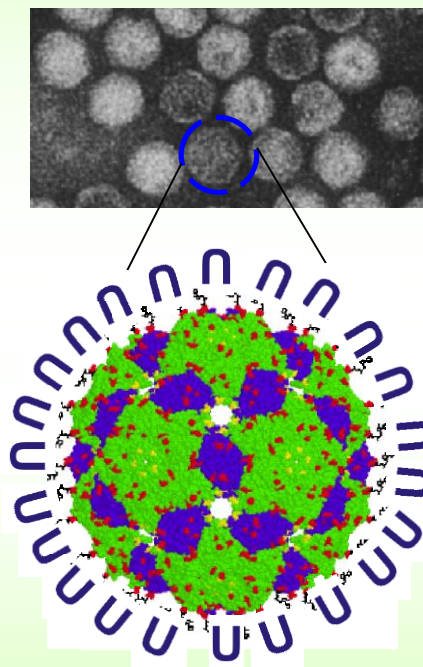
VLPs



Augu vīrusiem līdzīgās daļiņas

Pielietojumi:

1) Imunoloģiski aktīvi nesēji

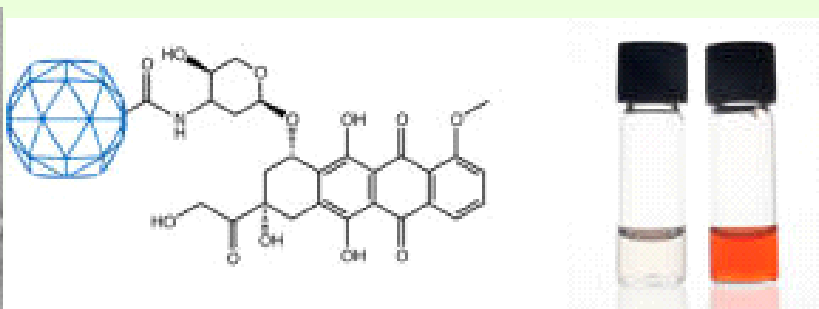
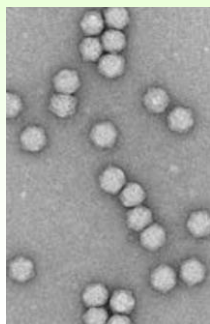


Kalnciema et al., 2012

Augu vīrusiem līdzīgās daļiņas

Pielietojumi:

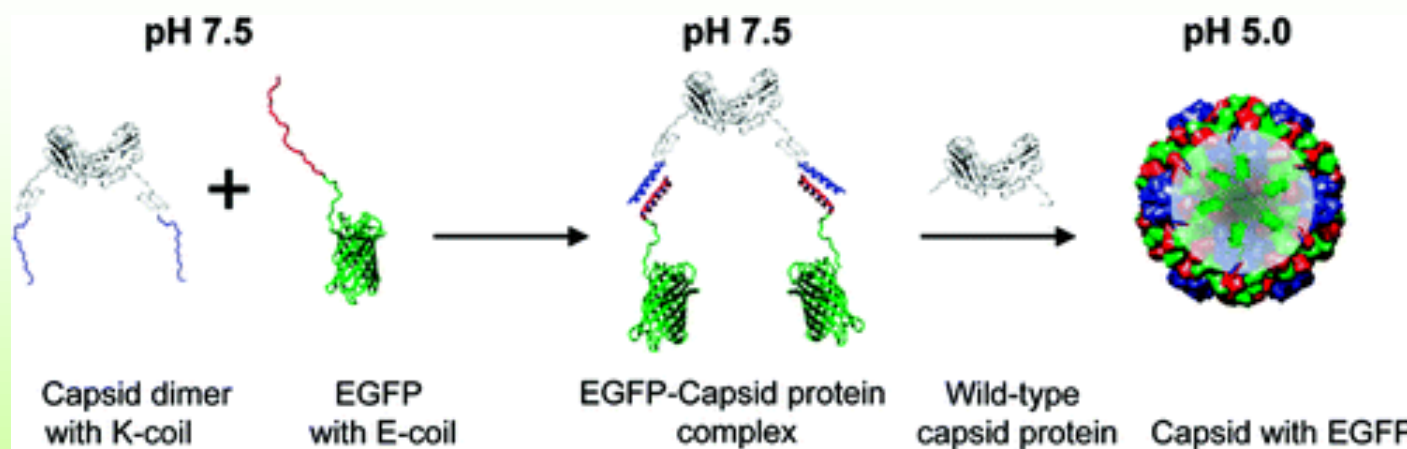
2) Terapeitiski nanomateriāli



Cowpea mosaic virus (CPMV) – vēža ķīmijterapijas preparāta doksorubicīna (DOX) nesējs.

Pie CPMV VLP virsmas ķīmiski piesaista 80 DOX molekulas, kas palielina preparāta efektivitāti pie zemām dozām.

Aljabali, Lomonosoff, 2012



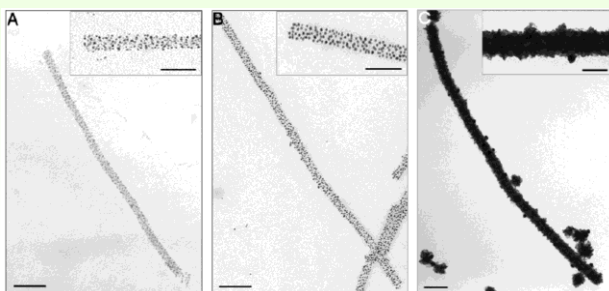
Cowpea chlorotic mottle virus (CCMV) virsmas proteīns ar K-coil motīvu (KIAALKE) spēj stabili piesaistīt dažādus proteīnus ar E-coil motīvu (EIAALEK). VLP veidošanās procesā var tikt iepakotas līdz 14 terapeitiska proteīna molekulām.

Minten, Cornelissen, 2009

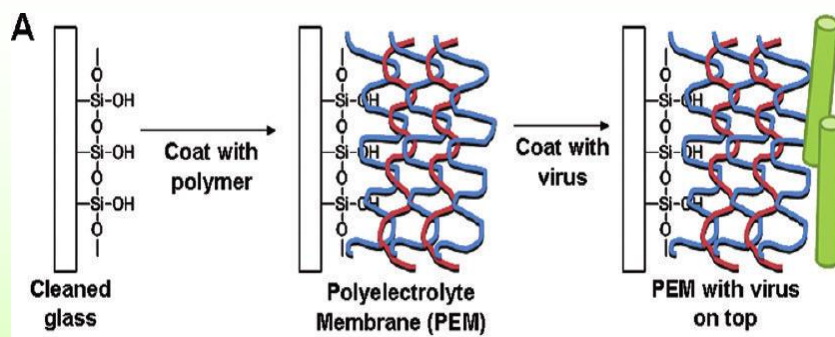
Augu vīrusiem līdzīgās daļiņas

Pielietojumi:

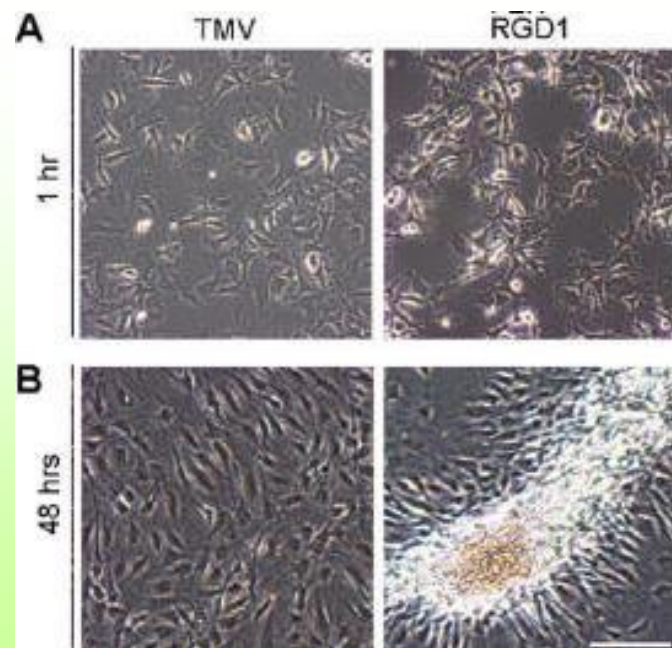
3) Dažādi nanomateriāli ar jaunām īpašībām



Tobacco mosaic virus ar C-terminālu His-tag (-HHHHHH) piesaista zelta nanodaļiņas. No šādām Au-VLP termiskas apstrādes ceļā var iegūt nanometru izmēra elektriskus vadus. Wnek, Stockley, 2013



Tobacco mosaic virus ar C-terminālu peptīdu (**GRGDSPG**) piesaista cilmes šūnas un veicina to diferenciāciju līdz kaulu smadzeņu šūnām. Lee, 2012



KOPSAVILKUMS

Augu vīrusu vektoriem ir liels potenciāls augu kā dabisko bioreaktoru izmantošanā medicīniski nozīmīgu proteīnu ražošanai.

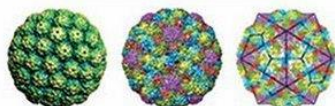
Plant-based biologics and vaccines in clinical development.

(Williams SCP (2012). Nature Medicine, 18, 5)

Drug	Indication	Company	Platform	Phase	
Uplyso (taliglucerase alfa)	Gaucher's disease	Protalix and Pfizer	Carrot	3	GMO
Locteron (interferon alpha)	Hepatitis C	Biolex Therapeutics	Duckweed	3	GMO
SBS -1000 (insulin)	Diabetes	SemBioSys	Safflower	2	GMO
H5N1 vaccine	Influenza	Medicago	Tobacco	2	<i>Agrobacterium</i> vektors, , VLPs
CaroRx antibody	Tooth decay	Planet Biotechnology	Tobacco	2	GMO
H1N1 vaccine	Influenza	Medicago, Fraunhofer	Tobacco	1	<i>Agrobacterium</i> vektors, , VLPs
PRX -105 (acetylcholinesterase)	Biodefense	Protalix	Carrot	1	GMO
P2G12 antibody	HIV	Pharma-Planta	Tobacco	1	GMO
Lymphoma vaccine	Non -Hodgkin's lymphoma	Bayer	Tobacco	1	Augu vīrusu vektors

Ir perspektīvas uz augu vīrusiem balstītas tehnoloģijas – industrija ir gatava to izmantot!

MEDICINAL PROTEIN ENGINEERING



EDITED BY
YURY E. KHUDYAKOV



19 Plant Virus Biotechnology Platforms for Expression of Medicinal Proteins

Andris Zeltins

CONTENTS

19.1	Introduction	481
19.2	Plant Viruses: Short Overview	482
19.3	Plant Viruses and Mammalian Organisms	484
19.4	Biotechnology Platforms: Introduction.....	484

Mol Biotechnol
DOI 10.1007/s12033-012-9598-4

REVIEW

Construction and Characterization of Virus-Like Particles: A Review

Andris Zeltins

© Springer Science+Business Media, LLC 2012

Abstract Over the last three decades, virus-like particles (VLPs) have evolved to become a widely accepted technology, especially in the field of vaccinology. In fact, some VLP-based vaccines are currently used as commercial medical products, and other VLP-based products are at different stages of clinical study. Several remarkable

Introduction

Virus-like particles (VLPs) are multisubunit self-assembly-competent protein structures with identical or highly related overall structure to their corresponding native viruses [1]. The term “VLP” has been used to describe a number