

## NOWE PROJEKTY NAUKOWE

# Projekt „ANALIZA TECHNO-EKONOMICZNA WYBRANYCH SYSTEMÓW EKSPRESJI BIAŁEK REKOMBINOWANYCH”

Lek. Mateusz Kawka – doktorant w Katedrze i Zakładzie Biologii Farmaceutycznej, kierownik projektu

**K**omórkowe systemy ekspresji stanowią obecnie metodę z wyboru produkcji białek rekombinowanych stanowiących składniki aktywne leków biologicznych, kosmetyków oraz odczynników o przeznaczeniu badawczym, diagnostycznym i przemysłowym. W samej tylko medycynie, rekombinowane białka terapeutyczne pozwoliły na przełomową poprawę efektów leczenia i jakości życia pacjentów, poprzez wprowadzenie do praktyki klinicznej produktów leczniczych w postaci rekombinowanych przeciwciał monoklonalnych, czynników wzrostu, enzymów do terapii substytucyjnej, hormonów peptydowych czy szczepionek. Tak szeroka aplikacyjność wynika z wielkocząsteczkowej struktury białek, powstającej dzięki molekularnym mechanizmom biosyntezy występującym wyłącznie w komórkach organizmów żywych. Ta unikalna zdolność decyduje o ich wykorzystaniu przez przemysł, który z uwagi na konieczność standaryzacji procedur, bazuje głównie na niewielkiej liczbie wybranych szczepów bakterii, czy linii komórek ssaczych. Dzięki dostępnym i stale rozwijanim technikom biologii molekularnej pozwalającym na wprowadzanie precyzyjnych modyfikacji genetycznych do organizmów modelowych, możliwe staje się racjonalne projektowanie funkcjonalnych systemów ekspresji. Ponieważ żadna z dostępnych metod nie jest doskonała, wciąż rozwijane są alternatywne rozwiązania wykorzystujące między innymi komórki roślinne. W ich przypadku, przeszkodą trudną do pokonania na drodze do komercjalizacji jest pragmatyzm kierujący przemysłem, a motywowany niedostatecznie udokumentowanymi sukcesami komercyjnymi w wytwarzaniu białek rekombinowanych, niewystarczającą ekonomią procesu oraz



Na zdjęciu studenci Wydziału Farmaceutycznego od lewej Aleksandra Oźga, Wiktoria Kuczmierczyk, Michał Markowski, Zuzanna Czarnomska, Jakub Kornatowski, Antonina Kawka

brakiem odpowiednich wytycznych nakładanych przez agencje regulatorowe. Jedną z potencjalnych możliwości uzupełnienia tej luki jest wsparcie badań typu proof-of-concept o modelowanie techno-ekonomiczne.

Prowadzony przez nasz zespół projekt ma na celu opracowanie systemów ekspresji białek rekombinowanych na bazie wybranych organizmów modelowych, celem ich szczegółowego porównania pod kątem wydajności produkcji w skali laboratoryjnej i pilotażowej. W naszym przypadku skupiamy się na systemach opartych o bakterie *Escherichia coli*, komórki ssacze CHO oraz HEK-293, a także dwa systemy roślinne, tj. zawiesinę komórek BY-2 oraz rośliny *Nicotiana benthamiana*. Dane zbierane przez nas w ramach realizowanych prac stanowią podstawę do budowy modelu techno-ekonomicznego, mającego pomóc w odpowiedzi na kluczowe pytania dotyczące wykonalności oraz opłacalności technologii dla określonych rodzajów rekombinowanych białek o różnej funkcji

i budowie (czynników wzrostu, antygenów szczepionkowych, enzymów, przeciwciał oraz peptydów).

Techniczny aspekt naszych badań, jak również opracowywanego modelu, to ścieżka technologiczna prowadząca do uzyskania zmodyfikowanego genetycznie organizmu wytwarzającego pożądaną białko rekombinowane. Co ciekawe, niezależnie od rozpatrywanego systemu ekspresji ma ona uniwersalny przebieg. Za początek można uznać syntezę genu kodującego docelowe białko, wraz z sekwencjami regulatorowymi stanowiącymi swoiste instrukcje dla komórek do wydajnej biosyntezy funkcjonalnego produktu. Opracowane konstrukty wprowadzamy do odpowiednich plazmidowych wektorów zawierających zwykle dodatkowe sekwencje odpowiedzialne między innymi za ich replikację oraz ewentualne wbudowanie syntetycznego fragmentu do genomowego DNA. Ponieważ finalne wektory często stanowią dość złożony układ genetyczny, nieocenioną pomocą

## NOWE PROJEKTY NAUKOWE

jest dla nas możliwość projektowania *in silico* z użyciem specjalistycznego oprogramowania. Kolejnym krokiem jest wprowadzenie ostatecznego wektora do docelowego organizmu. Dostępność metod i ich skuteczność różni się zależnie od rozpatrywanego systemu ekspresji, ale efekt końcowy to heterogenna mieszanina milionów komórek pomyślnie zmodyfikowanych, z tymi które nie poddały się temu procesowi. Dlatego też w przypadku systemów komórkowych i ekspresji ciągłej konieczna jest selekcja klonów wysokoprodukcyjnych, stanowiąca najbardziej czasochłonny etap, jednak warunkujący wydajność całego bioprocesu. W następnym kroku przenosimy hodowlę z małej skali laboratoryjnej do pilotażowych bioreaktorów pozwalających na zautomatyzowaną hodowlę biomasy produkującej požądane białko ze ścisłym monitorowaniem

parametrów bioprocesu takich jak moc mieszania, intensywność napowietrzania, pH oraz skład medium hodowlanego.

Jedną z rozwijanych przez nas platform jest również system ekspresji przejściowej oparty o wspomniane rośliny *Nicotiana benthamiana*. Od tradycyjnych systemów komórkowych różni się ona wykorzystaniem sekwencji pochodzących od wirusów roślinnych, których zadaniem jest przeciwdziałanie wyciszaniu post-transkrypcyjnemu genów, zjawiska będącego jedną z przyczyn niskiej wydajności biosyntezy rekombinowanych białek w roślinach. Co ciekawe, transformowana jest cała biomasa liści dojrzałej rośliny, co znacząco skraca czas bioprocesu (pominięcie etapu selekcji) i rewolucjonizuje koncepcję wytwarzania białek rekombinowanych pozwalając traktować każdą z roślin jako „jednorazowy bioreaktor”.

Projekt realizujemy głównie dzięki zaangażowaniu studentów kierunku farmacja w ramach Studenckiego Koła Naukowego Herba działającego przy Katedrze i Zakładzie Biologii Farmaceutycznej. Zespół tworzą Zuzanna Czarnomska (V rok), Michał Markowski (V rok), Antonina Kawka (III rok), Aleksandra Oźga (III rok), Wiktoria Kuczmierczyk (III rok) oraz Jakub Kornatowski (III rok). Rozwijanie tak interdyscyplinarnego projektu wymaga intensywnego rozwijania umiejętności i konsolidacji wiedzy z wielu różnych dziedzin, jak biologia molekularna, biotechnologia czy inżynieria bioreaktorów. Dlatego też, dużym wsparciem dla nas, szczególnie na etapie pilotażu, jest możliwość współpracy z inżynierami z Wydziału Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej. ■