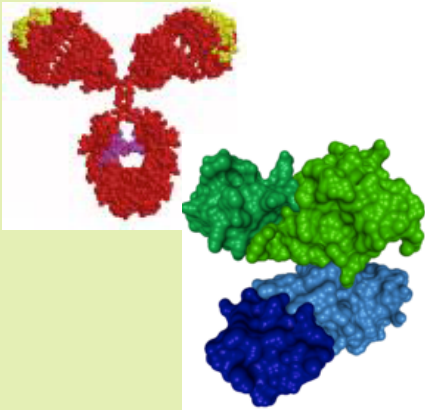
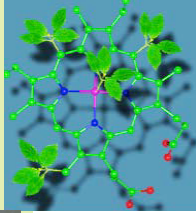


Firenze, 31 Ottobre 2013
Accademia dei Georgofili



*Le piante come biofabbriche di molecole
bioattive di interesse farmaceutico*



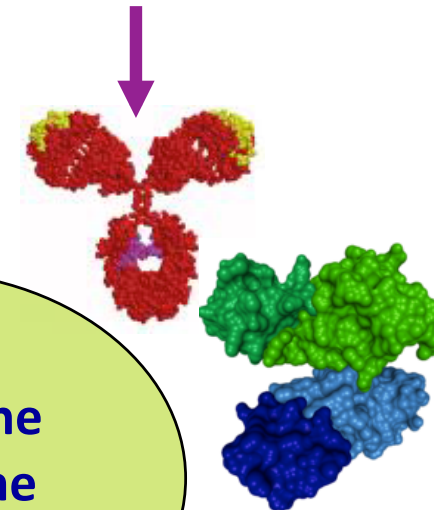
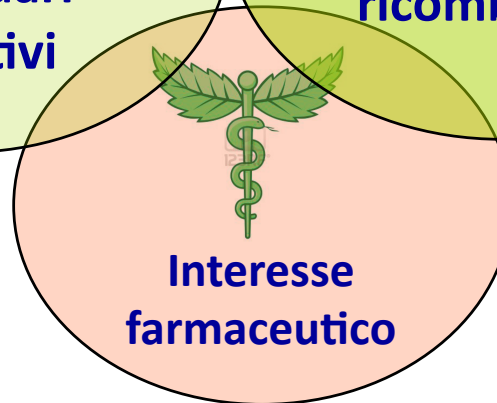
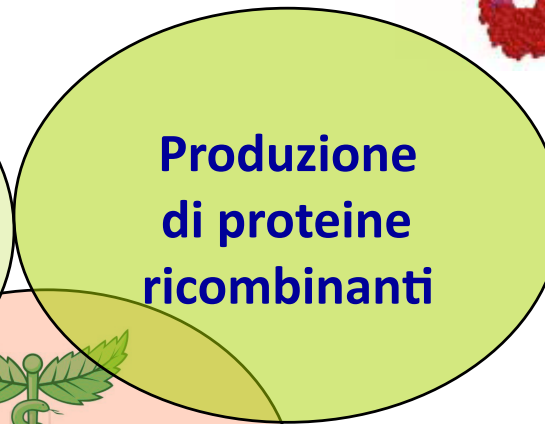
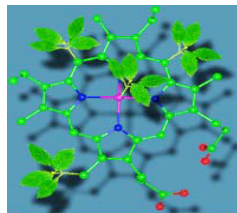
Antonella Leone
Dipartimento di Farmacia
Università di Salerno



Produzione di molecole bioattive in pianta

- Aumento e/o modificazione della sintesi di molecole bioattive già prodotte in pianta

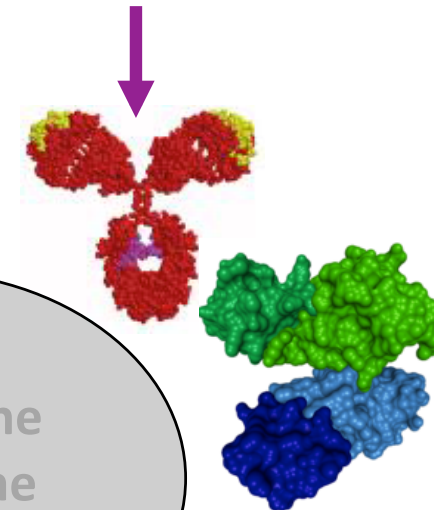
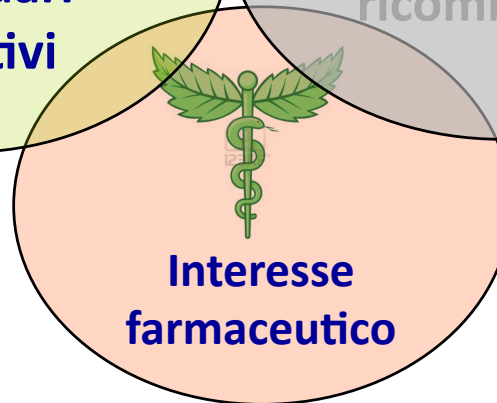
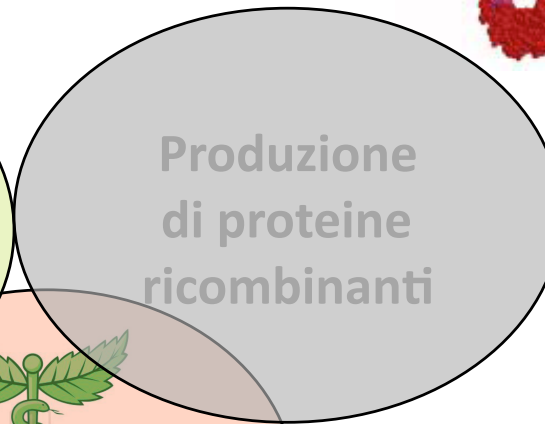
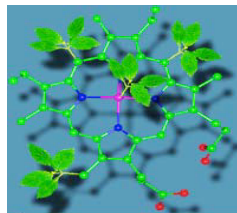
- Nuovi prodotti



Produzione di molecole bioattive in pianta

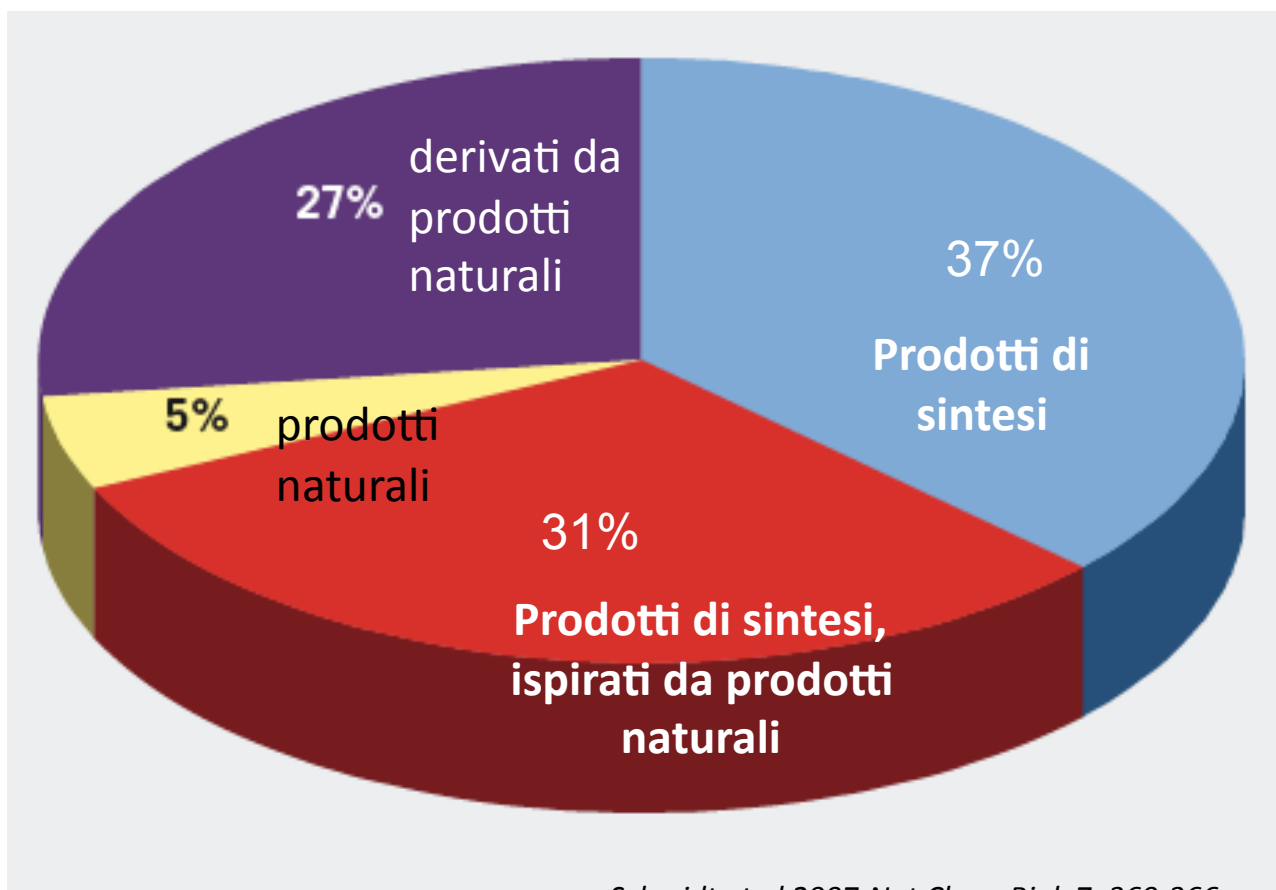
- **Aumento e/o modificazione della sintesi di molecole bioattive già prodotte in pianta**

- **Nuovi prodotti**



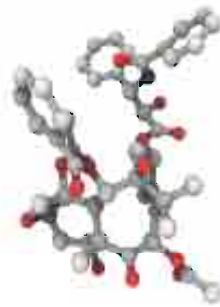


Origine di farmaci basati su piccole molecole

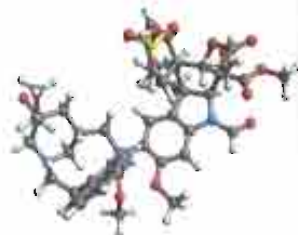


Schmidt et al 2007-Nat Chem Biol 7: 360-366

Molecole vegetali di successo



Il **tassolo** è un diterpene estratto originariamente dalla corteccia di alberi del genere ***Taxus*** spp, una molecola **anti-tumorale** tra le più efficaci in commercio



La **vincristina** è un alcaloide estratto dalle foglie di ***Catharanthus vinca***, anch'esso una molecola **anti-tumorale** di grande efficacia

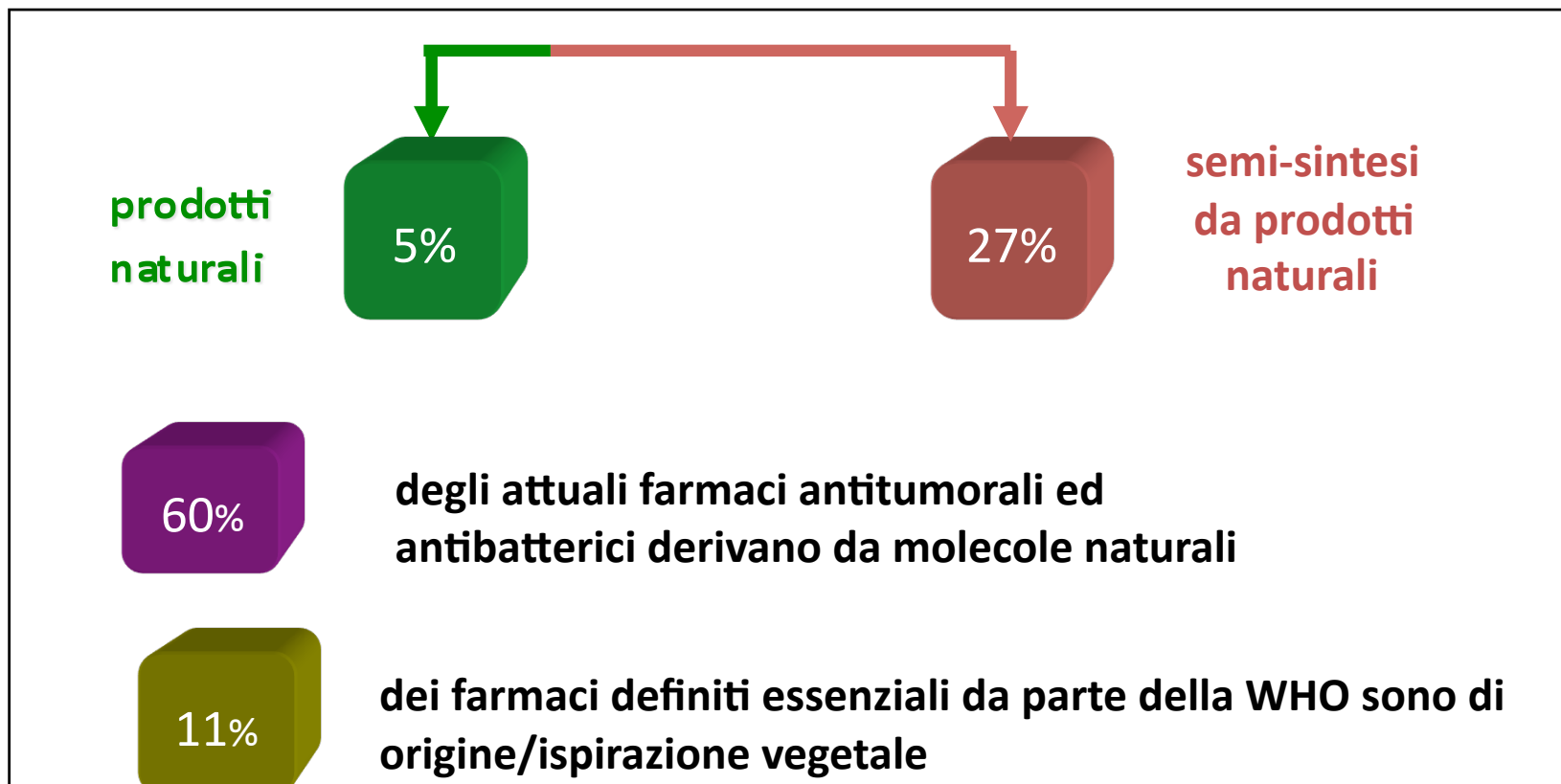


La **artemisinina** è un sesquiterpene estratto dalle foglie **di *Artemisia annua***, l'**anti-malarico** più efficace contro ceppi resistenti di *Plasmodium*.



Farmaci basati su piccole molecole

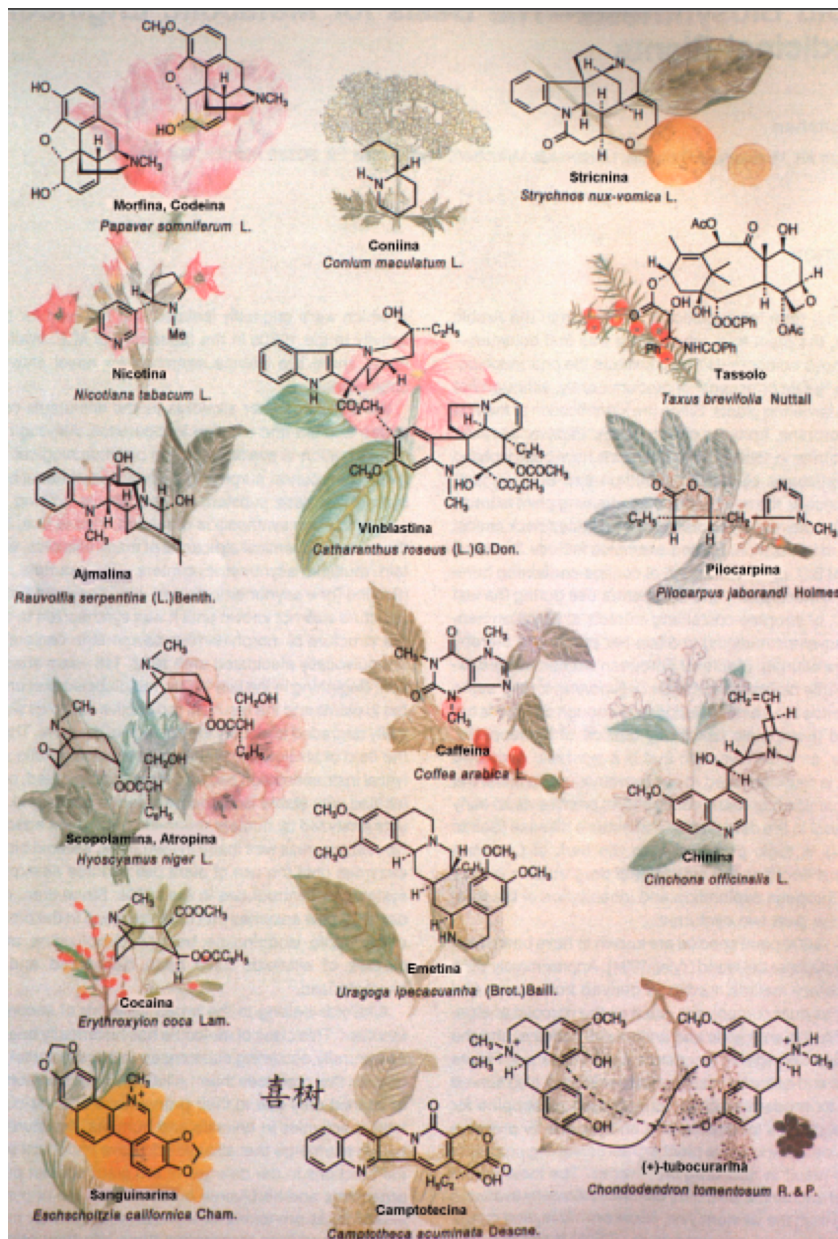
di 847 farmaci attualmente
in commercio basati
su piccole molecole



Newman and Cragg 2011

- ✓ **Questi dati indicano che le molecole di origine naturale (comprese quelle vegetali) hanno strutture fisico-chimiche più appropriate per interagire con target cellulari di interesse farmacologico**
- ✓ **Forte impulso per lo sviluppo di nuovi farmaci basati su molecole naturali da rimedi utilizzati nella medicina tradizionale**

Le piante producono una miriade di molecole bioattive



Una singola pianta produce da 5000-25000 composti diversi

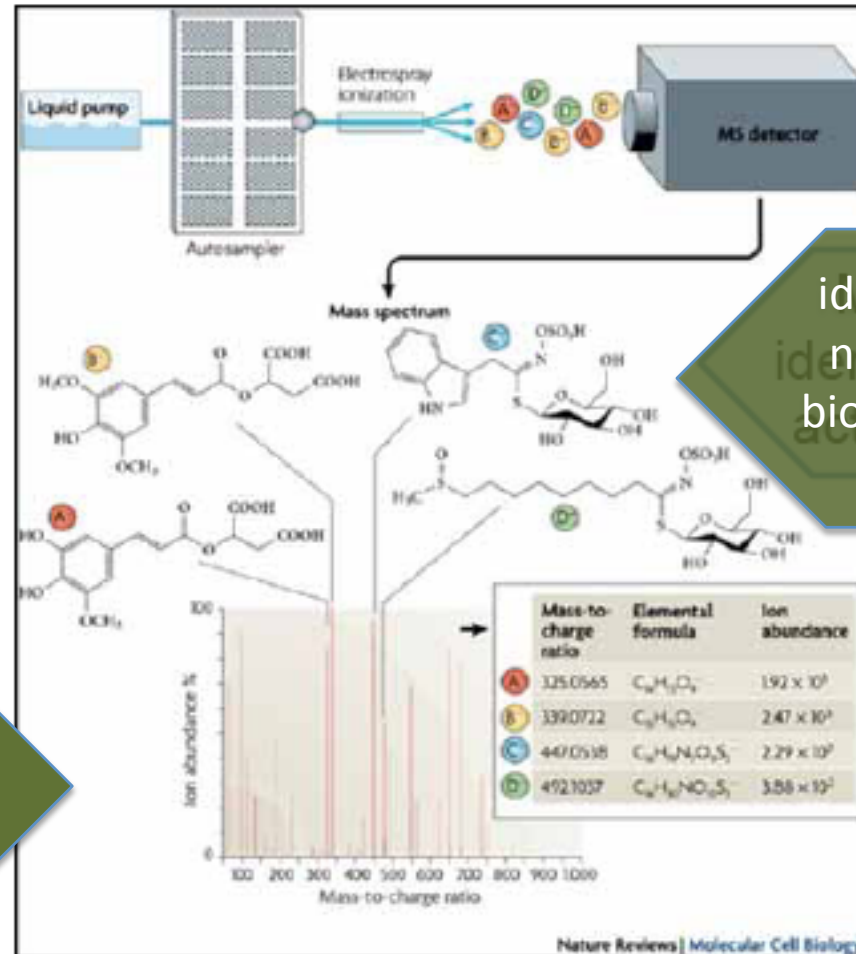
>100 000 composti diversi già descritti



solo il 10% del totale di molecole vegetali

La caratterizzazione chimico-strutturale di questo enorme numero di molecole di origine vegetale con potenziale bioattività e lo sviluppo di tecniche analitiche sensibili è una prima sfida!

Tecnologie ad alta prestazione per identificare composti bioattivi di origine vegetale di interesse farmaceutico

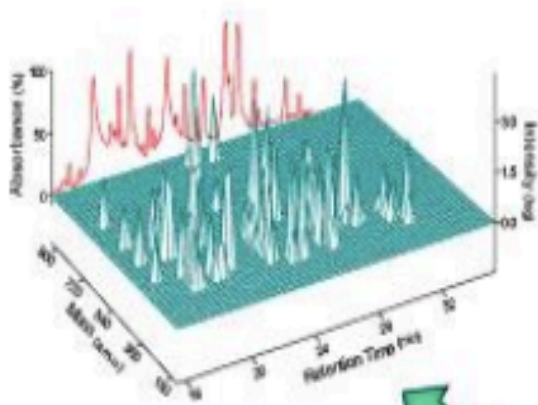


identificazione di sostanze bioattive presenti nei rimedi della medicina tradizionale

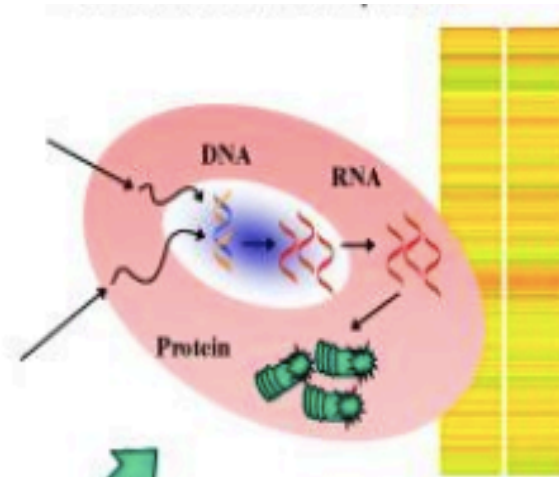
identificazione di nuove molecole bioattive di origine vegetale

Tecnologie di screening efficaci per una rapida caratterizzazione delle proprietà farmacologiche

Analisi fitochimiche
mediante LC/MS



Analisi della risposta dei
prodotti bioattivi di origine vegetale



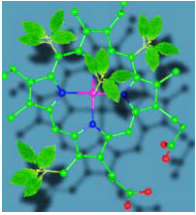
Quali sono le
molecole bioattive?

Qual è il dosaggio
ottimale?

Quali sono i target
cellulari?

Quali effetti
collaterali?

Test *in vitro* e *in vivo*)



Le piante sono i migliori CHIMICI!

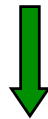
... i metaboliti secondari sono sintetizzati a bassissime concentrazioni ($\leq 1\%$ del peso secco), talvolta insufficienti per la caratterizzazione della loro attività.....

...ma soprattutto alti costi di estrazione e purificazione

Qualche esempio

Vincristina e vinblastina
(*C. roseus*)

500 kg di materiale vegetale
per ottenere 1 g di vincristina
(~13 000 € / g)



Tassolo (*T. brevifolia*)

Un albero di *Taxus* di 200 anni alto 13 metri produce solo mezzo grammo di Paclitaxel

Per il trattamento di un paziente sarebbe necessario tagliare e processare 6 alberi di 100 anni!

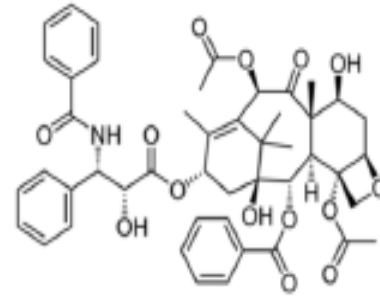
**Necessità di ottimizzare
la produzione per abbassare i costi**

Tassolo: una molecola di origine vegetale di successo



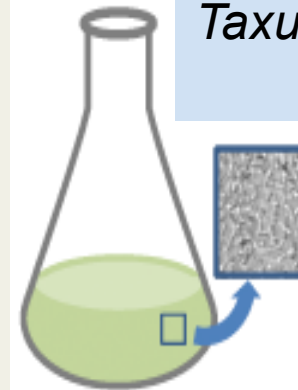
Negli anni '80 migliaia di alberi di tasso del Pacifico (*Taxus brevifolia*) usati per l'estrazione del tassolo

Attualmente il tassolo è prodotto per semisintesi da un precursore 10 deacetil-baccatina estratta dagli aghi del tasso europeo (*Taxus baccata*), senza distruggere gli alberi



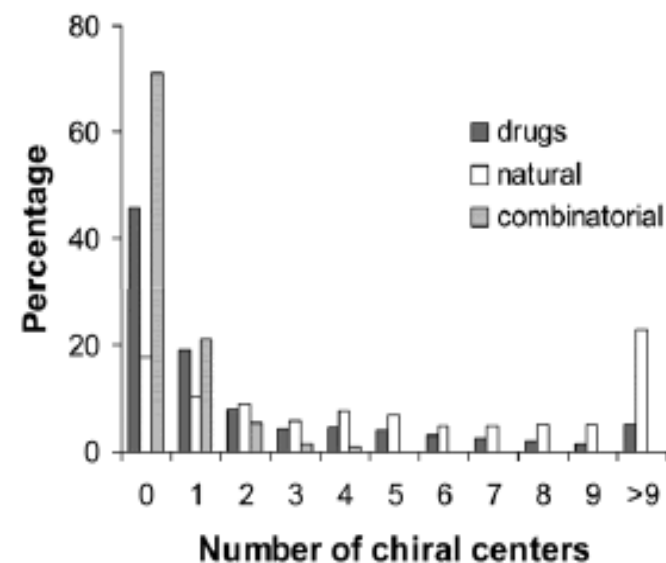
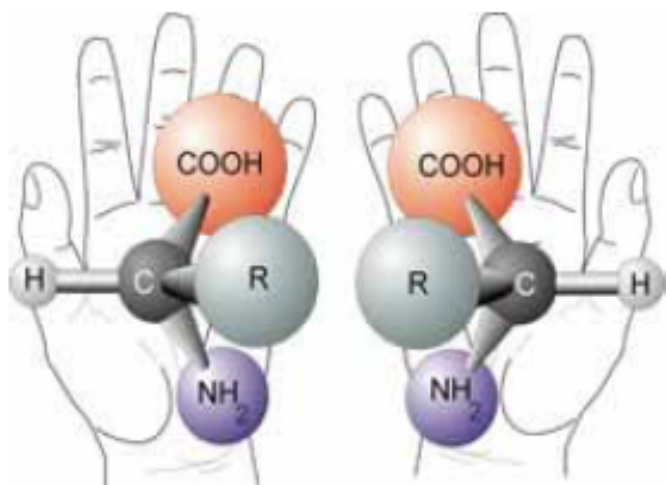
Sintesi chimica del tassolo possibile, ma molto costosa

un altro metodo usa colture cellulari di *Taxus baccata*



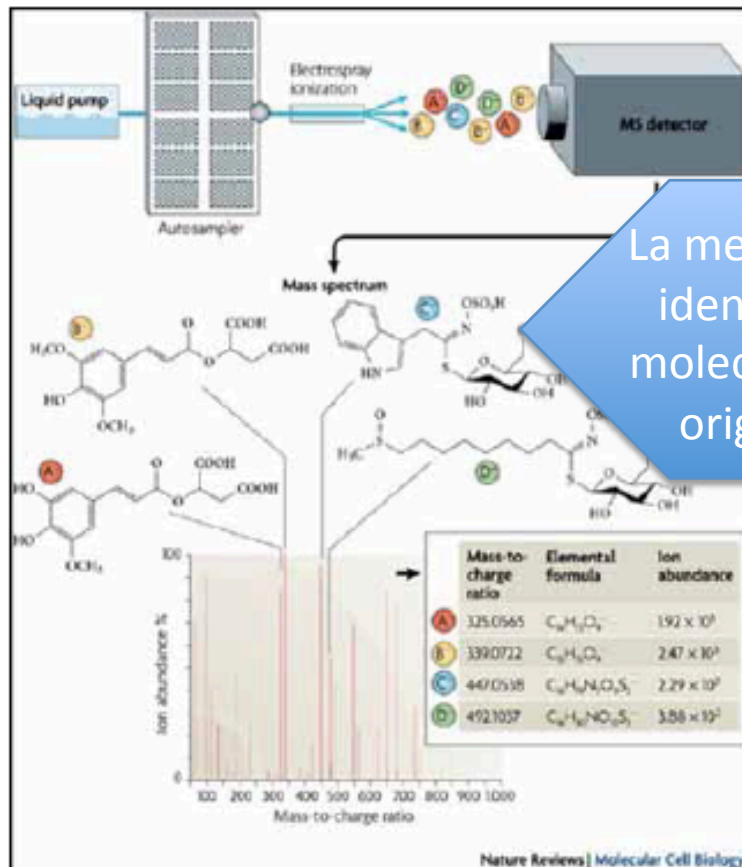
La sintesi chimica di prodotti naturali è complicata dalla loro estensiva chiralità

I prodotti naturali hanno molti centri chiralici che sono difficili da riprodurre mediante sintesi chimica



Ingegneria metabolica per aumentare la produzione e la diversità di composti di origine vegetale

L'ingegneria metabolica per aumentare la produzione e la diversità di composti di origine vegetale

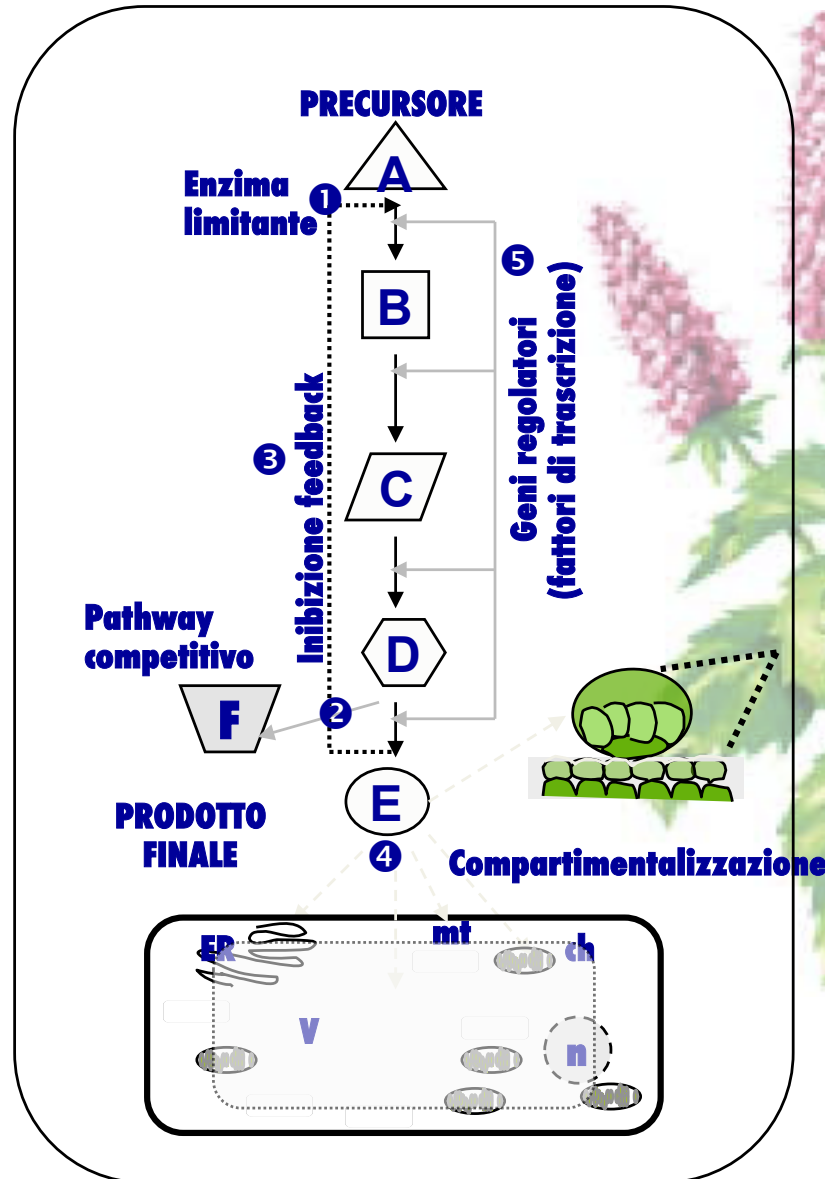


La metabolomica per identificare nuove molecole bioattive di origine vegetale



Nelle ultime due decadi strategie di ingegneria metabolica sono state applicate con successo in piante modello e in piante coltivate e medicinali

Possibili strategie di ingegneria metabolica



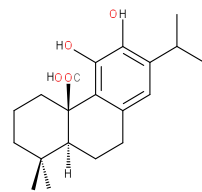
Modificazione del flusso metabolico

- ① Sovra-espressione di un gene/i che regola una reazione limitante (costitutiva, inducibile o tessuto-specifica)
- ② Silenziamento di pathway competitivi (antisense, RNAi)
- ③ Eliminazione di inibizioni da feedback
- ④ Miglioramento compartmentalizzazione/trasporto
- ⑤ Regolazione coordinata di geni biosintetici mediante sovraespressione di geni regolatori

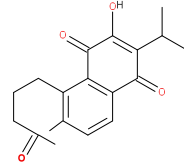
Salvia sclarea (Lamiaceae)

- Pianta medicinale tipica del bacino del Mediterraneo, Europa meridionale e Iran
- Usata principalmente per la produzione e l'isolamento dello sclareolo

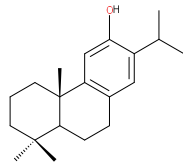
Diterpenoidi abietanici



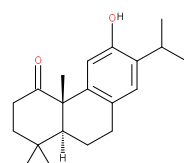
Acido carnosico



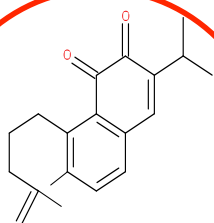
salvipisone



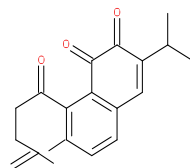
ferruginolo



1-oxo-ferruginolo



etiopinone



1-oxo-etiopinone

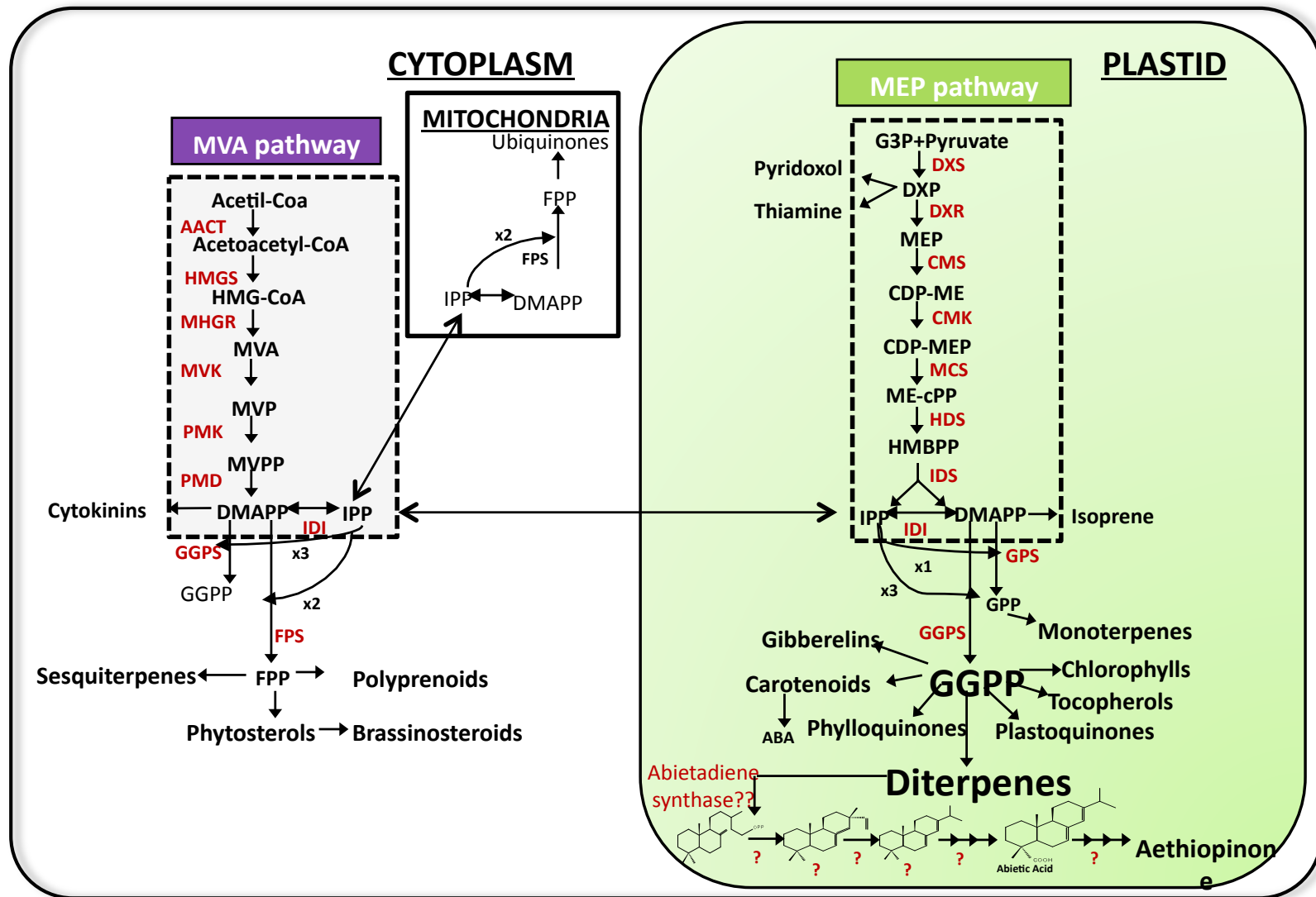


Attività biologica

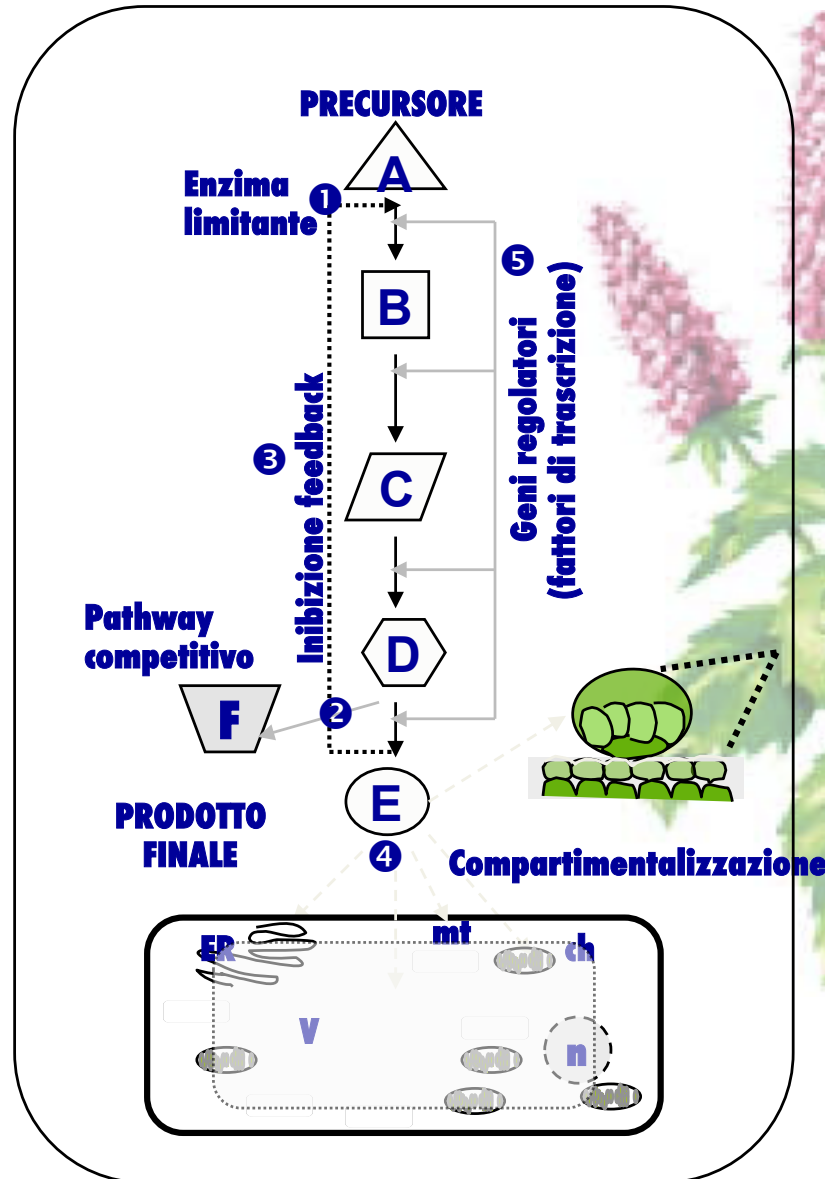
- antimicrobica (*Kuzma et al 2007*)
- antiossidante (*Grzegorzak et al, 2007*)
- anti-infiammatoria (*Benrezzouk et al, 2006*)

Quantità basse sintetizzate nelle radici (< 0.1% peso secco)

Biosintesi di diterpeni bioattivi in *Salvia sclarea*



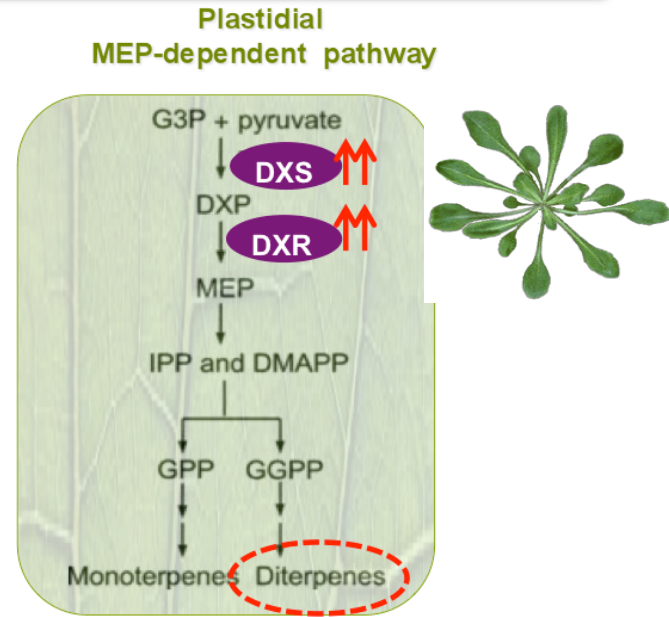
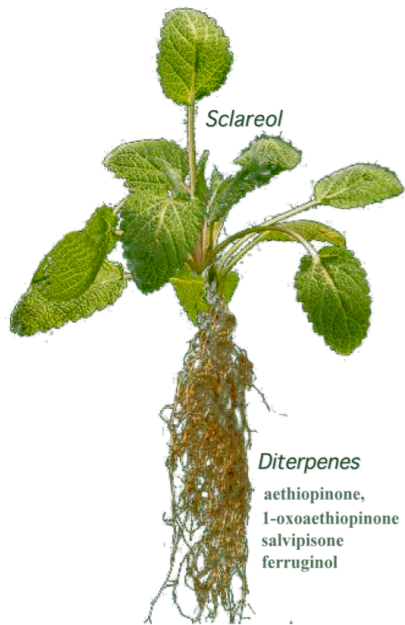
Possibili strategie di ingegneria metabolica



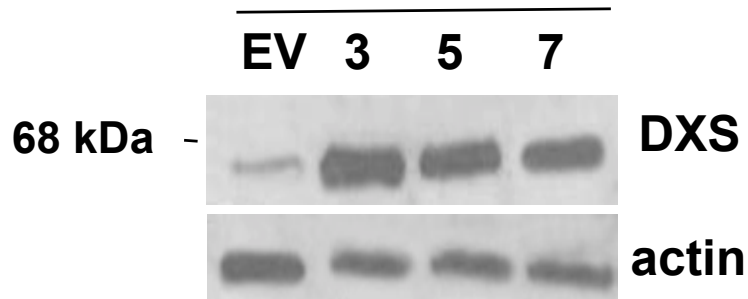
Modificazione del flusso metabolico

- 1 **Sovra-espressione di un gene/i che regola una reazione limitante (costitutiva, inducibile o tessuto-specifica)**
- 2 **Silenziamento di pathway competitivi (antisenso, RNAi)**
- 3 **Eliminazione di inibizioni da feedback**
- 4 **Miglioramento compartimentalizzazione/trasporto**
- 5 **Regolazione coordinata di geni biosintetici mediante sovraespressione di geni regolatori**

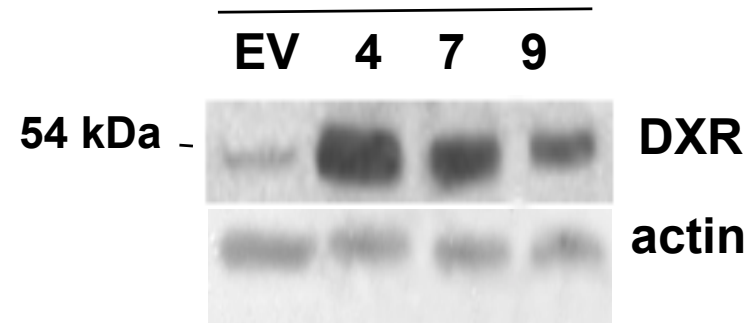
Sovraespressione dei geni *AtDXS* e *AtDXR* in radici avventizie di *S. sclarea*



Linee di radici avventizie



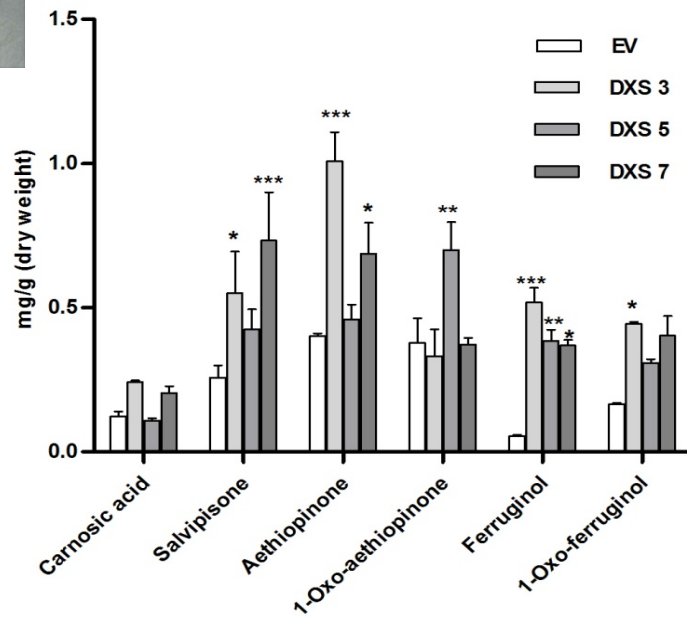
Linee di radici avventizie



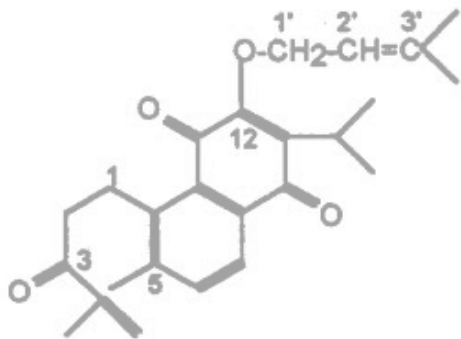
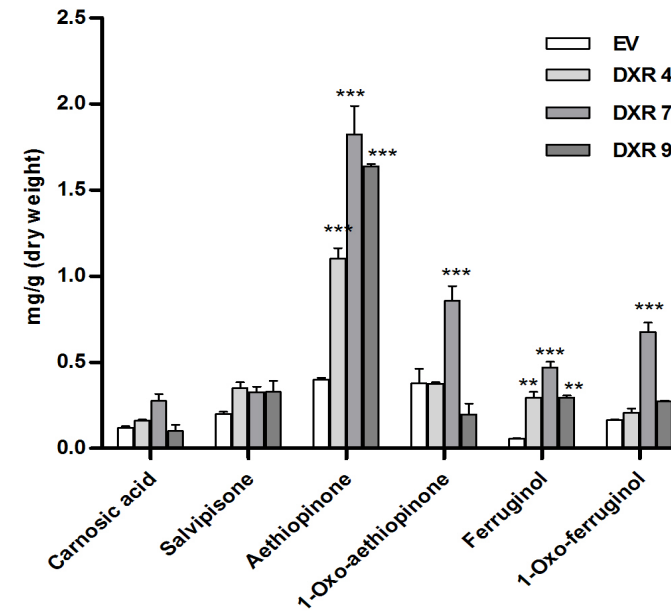
Diterpeni abietanici in radici avventizie di *S. sclarea*



AtDXS

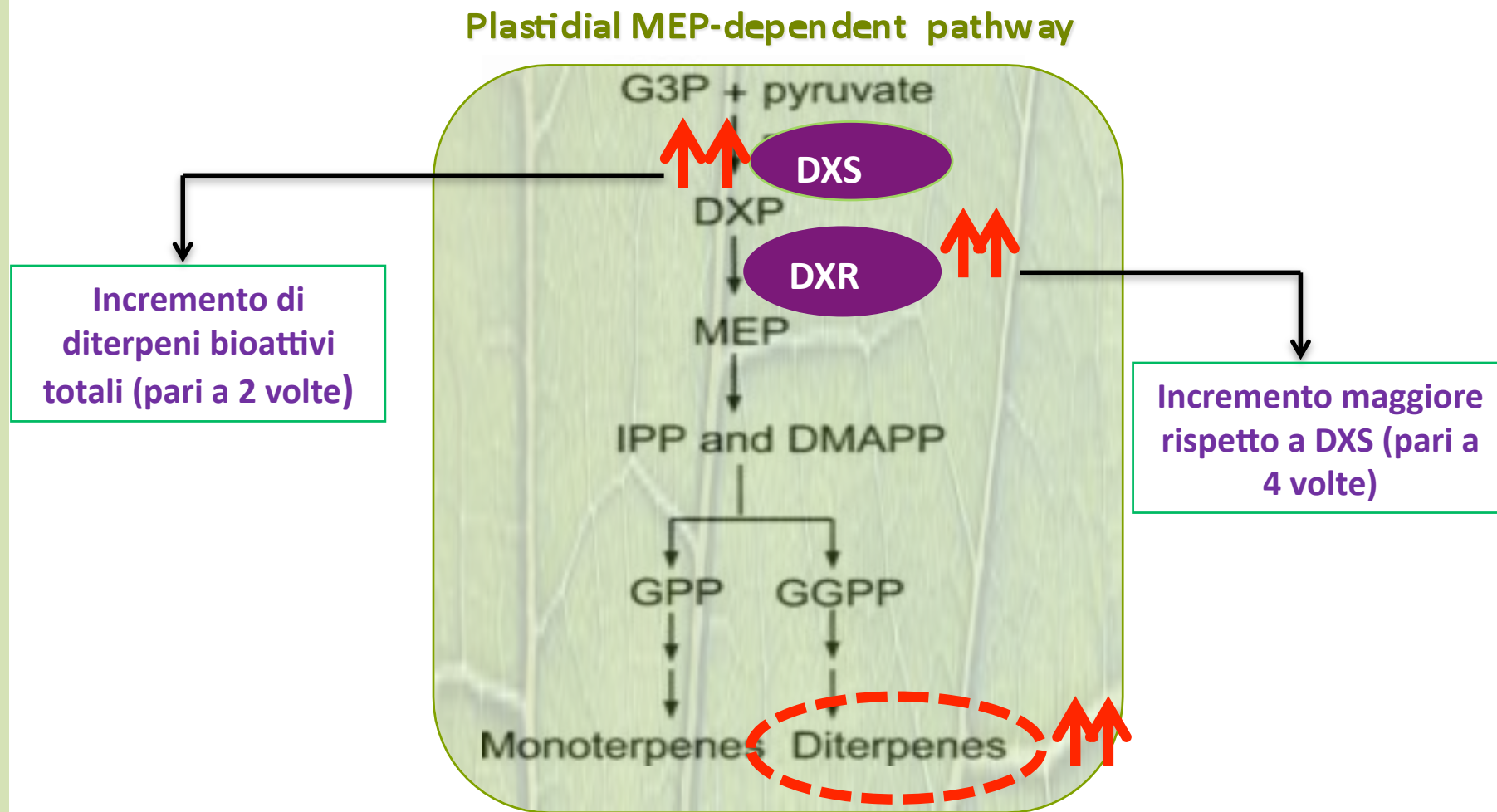


AtDXR



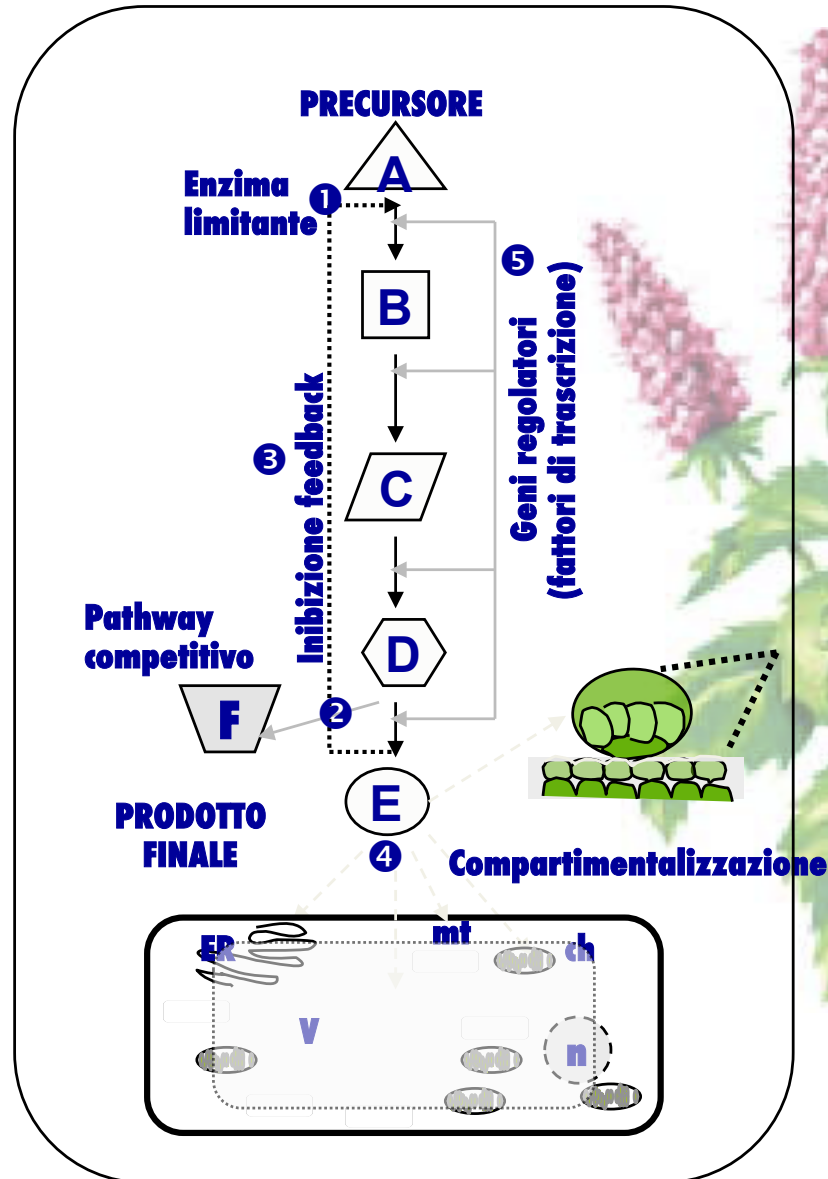
Aumento di 2-4 volte il contenuto in etiopinone

Incremento di diterpeni in seguito a sovra-espressione di DXS e DXR in radici avventizie di *Salvia sclarea*



Si può ulteriormente migliorare la biosintesi di questi composti?

Possibili strategie di ingegneria metabolica

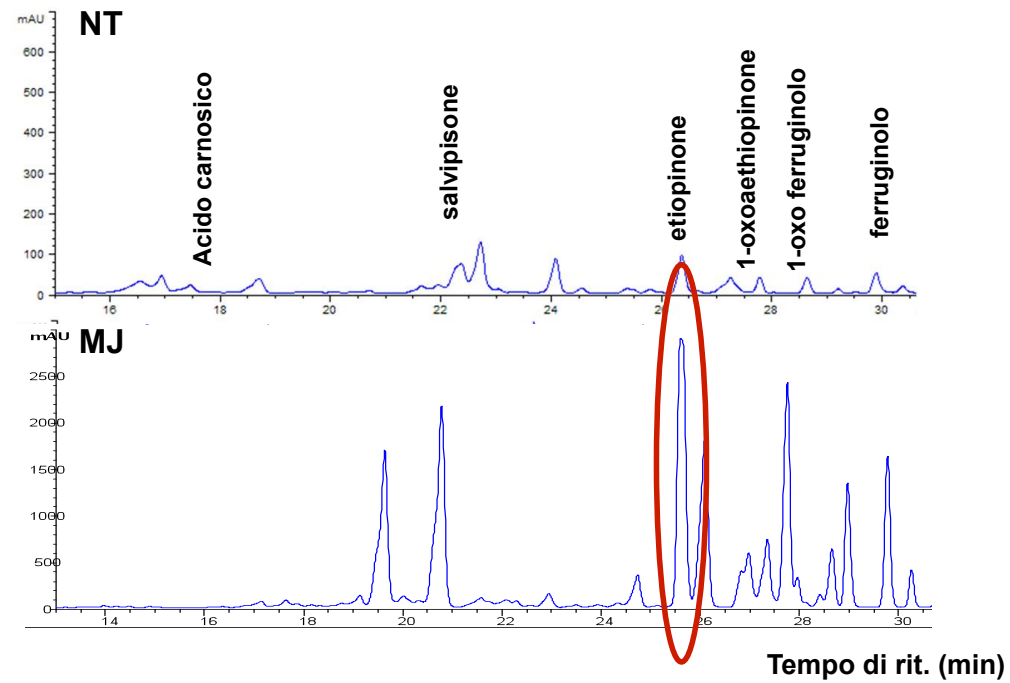


Modificazione del flusso metabolico

- ① Sovra-espressione di un gene/i che regola una reazione limitante (costitutiva, inducibile o tessuto-specifica)
- ② Silenziamento di pathway competitivi (antisenso, RNAi)
- ③ Eliminazione di inibizioni da feedback
- ④ Miglioramento compartimentalizzazione/trasporto
- ⑤ Regolazione coordinata di geni biosintetici mediante sovraespressione di geni regolatori



Il Metil-Jasmonato attiva la sintesi di diterpeni abietanici



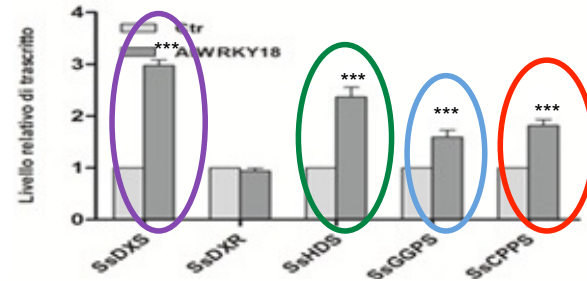
Identificazione di TF con motivi ME-responsive nel promotore

TGACg = tipici elementi responsivi
al Jasmonato

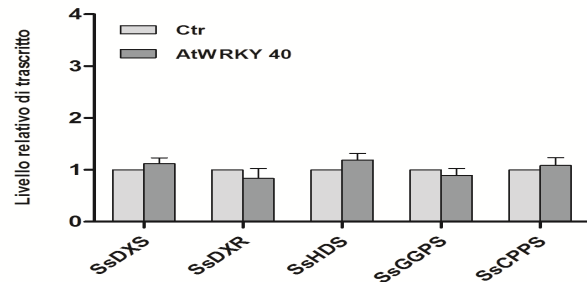
```
-800 + TTCAAGTCTT TGGACGGTAT TTGAGATTTT TTGTAATTTT ACTTGTAATT GTACCACCTA ACAGTGACTA  
- AAGTTCAGAA ACCTGCCATA AACTCTAAAG AACATTAAAG TGAACATTAA CATGGTGGAT TGTCACTGAT pWRKY18  
  
-850 + AATCGTCACG ATGGTATCGT CAATTTGTCT AGTGGATTTT GAAAAGCCGT GTGGGCTTGA CTTTGACCGA  
- TTAGCAGTGC TACCATAGCA GTTAAACAGA TCACCTAAAA CTTTTCGGCA CACCCGAACT GAAACTGGCT pWRKY40  
  
-800 + TTTCTTTCAA ACTTAATGAA CATAAAAAA AGGGAAACGA AATCTTATTT TGCCTAGCTG ACATAATTAA  
- AAAGAAAGTT TGAATTACTT GTATTTTTTTT TCCCTTTGCT TTAGAATAAA ACGGATCGAC TGTATTAATT pWRKY60  
  
-850 + TTTATGCATG GAGGAAAAGA TGCCAAATGA TTTATGTTAT TCACTCATACT TCACCTAATG ACCTAATCCT  
- AAATACGTAC CTCCTTTTCT ACGGTTTACT AAATACAATA AGTGAGTATG AGTGGATTAC TGGATTAGGA pMyc2
```


Analisi dei livelli di espressione di geni della via biosintetica MEP-dipendente nelle linee transgeniche

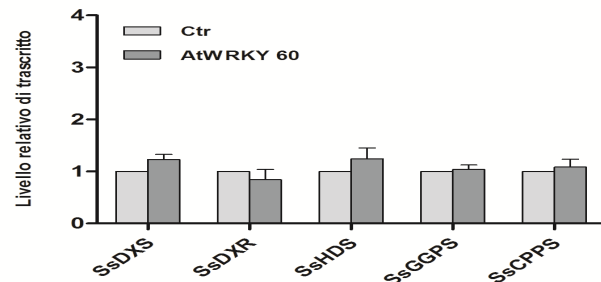
AtWRKY18#10



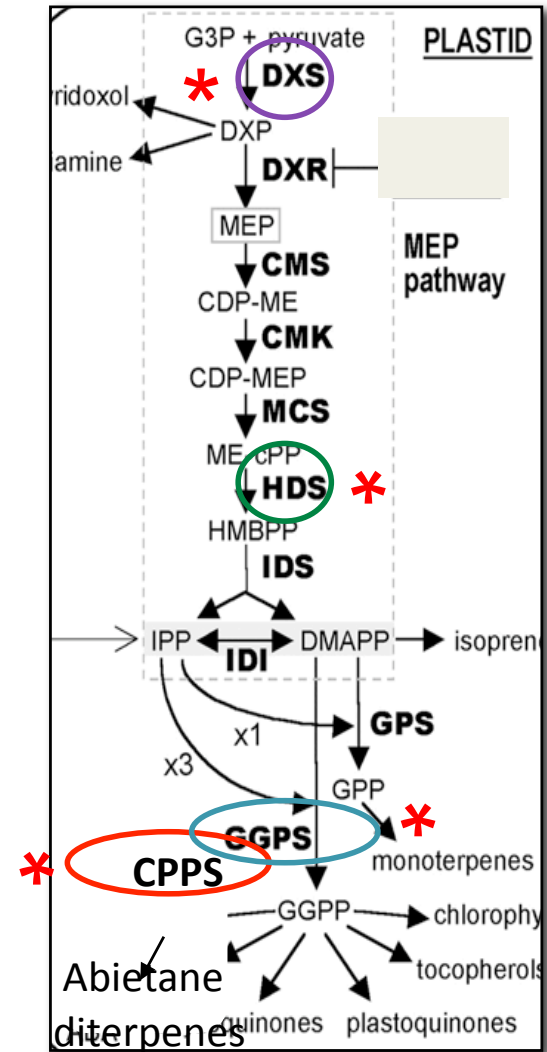
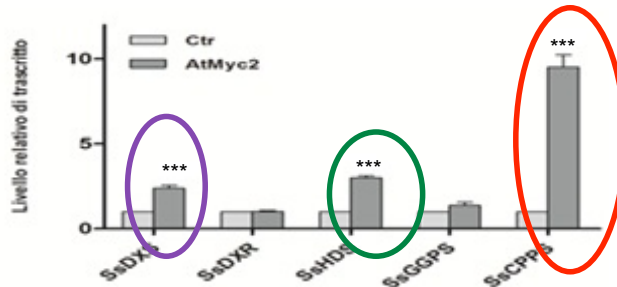
AtWRKY40#7



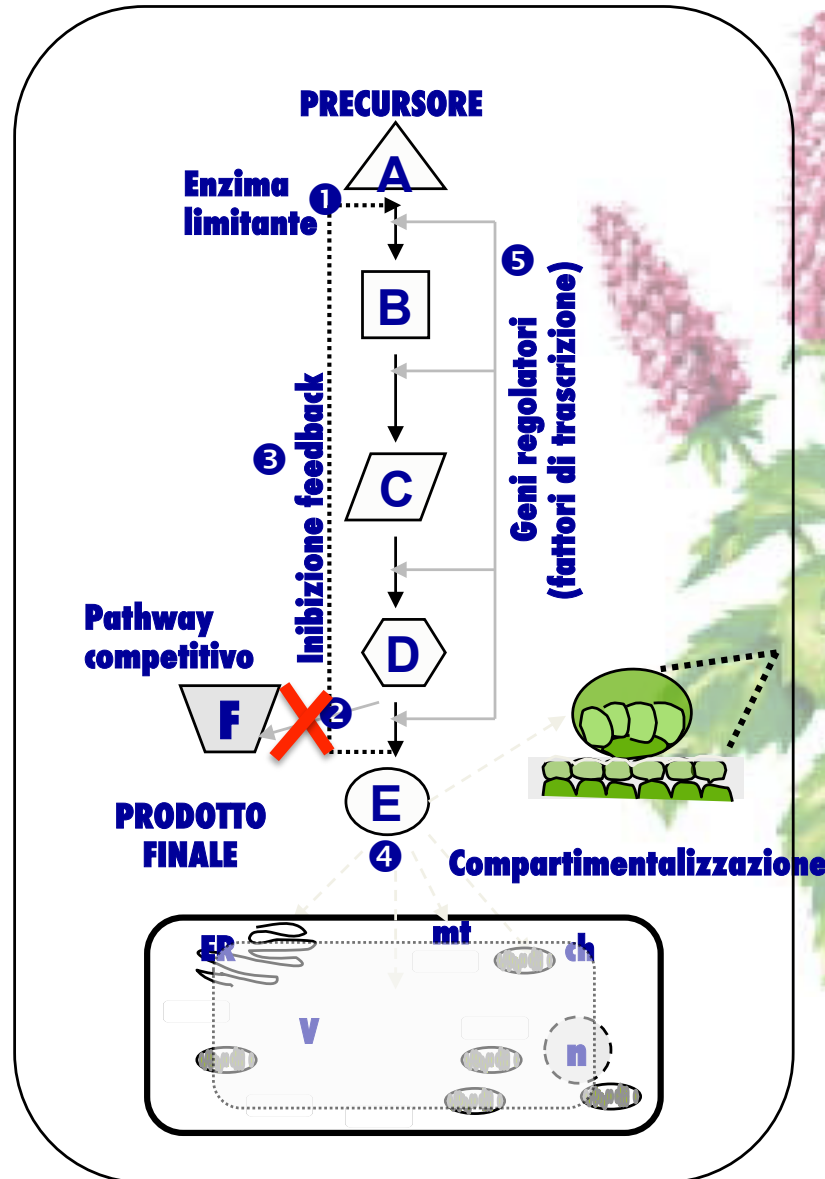
AtWRKY60#9



AtMyc2#2



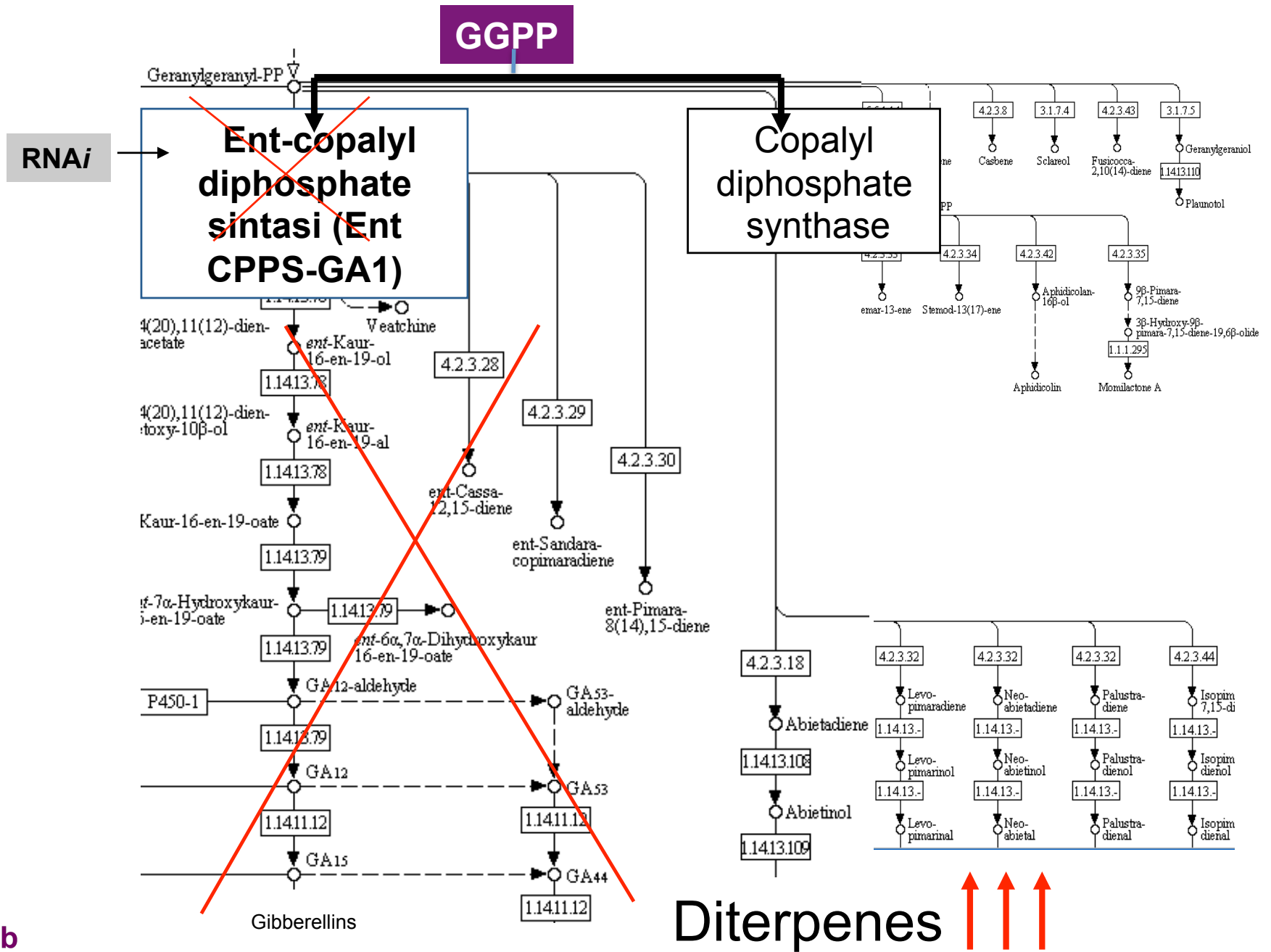
Possibili strategie di ingegneria metabolica

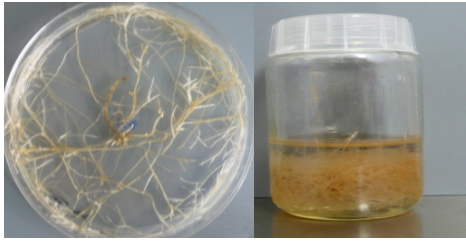


Modificazione del flusso metabolico

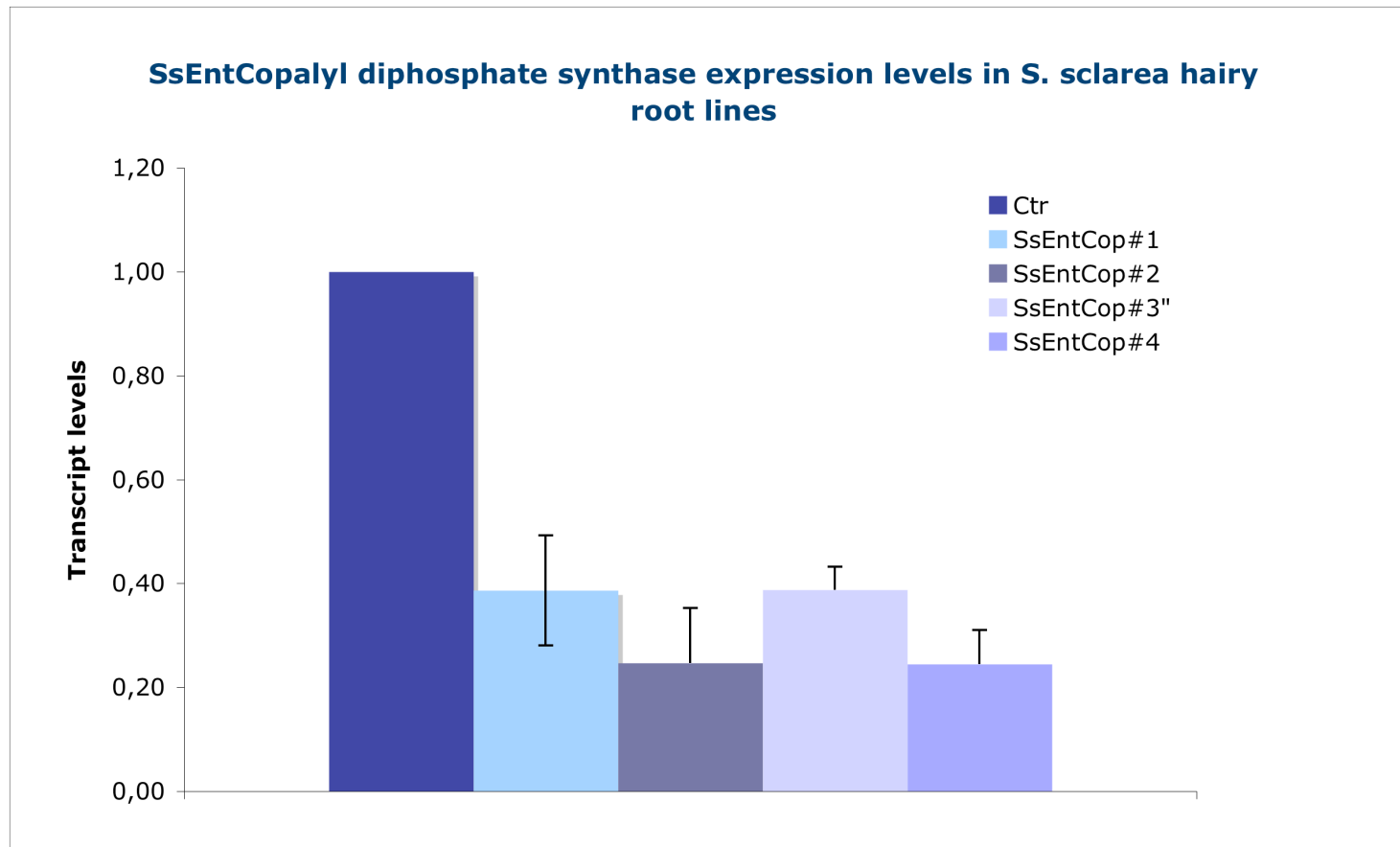
- 1 **Sovra-espressione di un gene/i che regola una reazione limitante (costitutiva, inducibile o tessuto-specifica)**
- 2 **Silenziamento di pathway competitivi (antisense, RNAi)**
- 3 **Eliminazione di inibizioni da feedback**
- 4 **Miglioramento compartimentalizzazione/trasporto**
- 5 **Regolazione coordinata di geni biosintetici mediante sovraespressione di geni regolatori**

Blocco di una via laterale competitiva

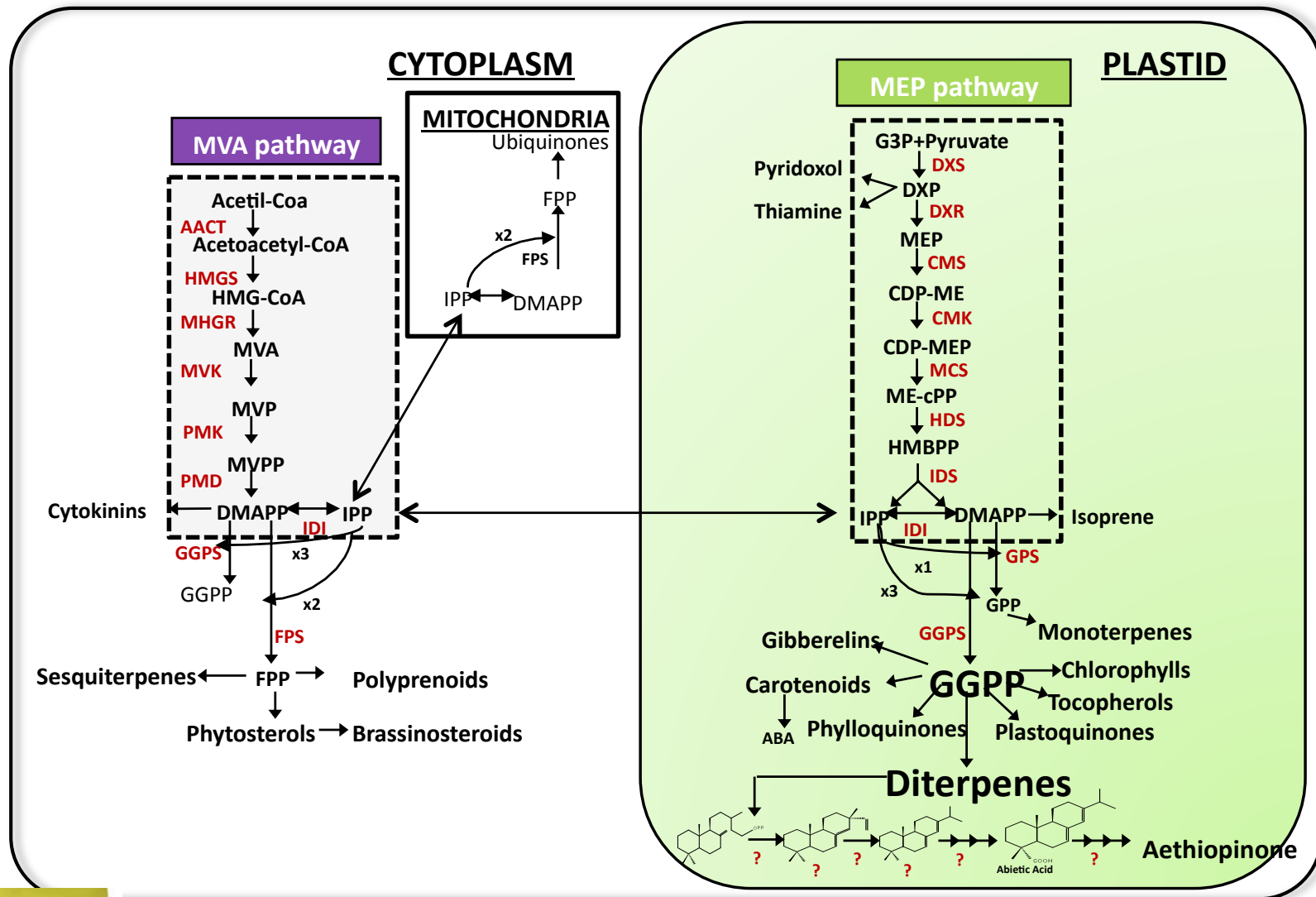




SsCPPS silenced hairy root lines



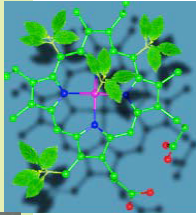
Ottimizzazione della biosintesi di diterpeni bioattivi in radici avventizie di *Salvia sclarea*



Work in Progress

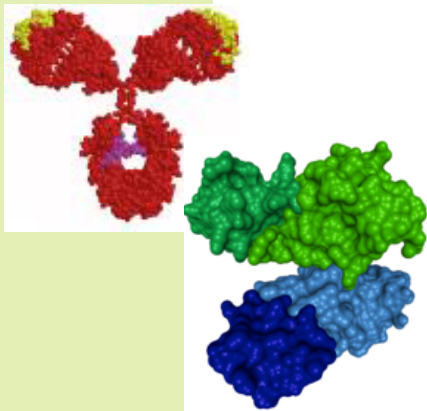
Linee hairy root che sovraesprimono *AtWRKY18* e con il gene *sCPPSS* silenziato

Firenze, 31 Ottobre 2013
Accademia dei Georgofili



Maria Carmela Vaccaro
Maria Evelina Alfieri
Vivi Ocampo Bernal
Rossella Fasano

 **PlantaLab**



Tina De Tommasi
Fabrizio Dal Piaz
Antonio Vassallo
Nicola Malafronte

Laboratorio di Fitochimica
Laboratorio di Proteomica



Antonella Leone
Dipartimento di Farmacia
Università di Salerno

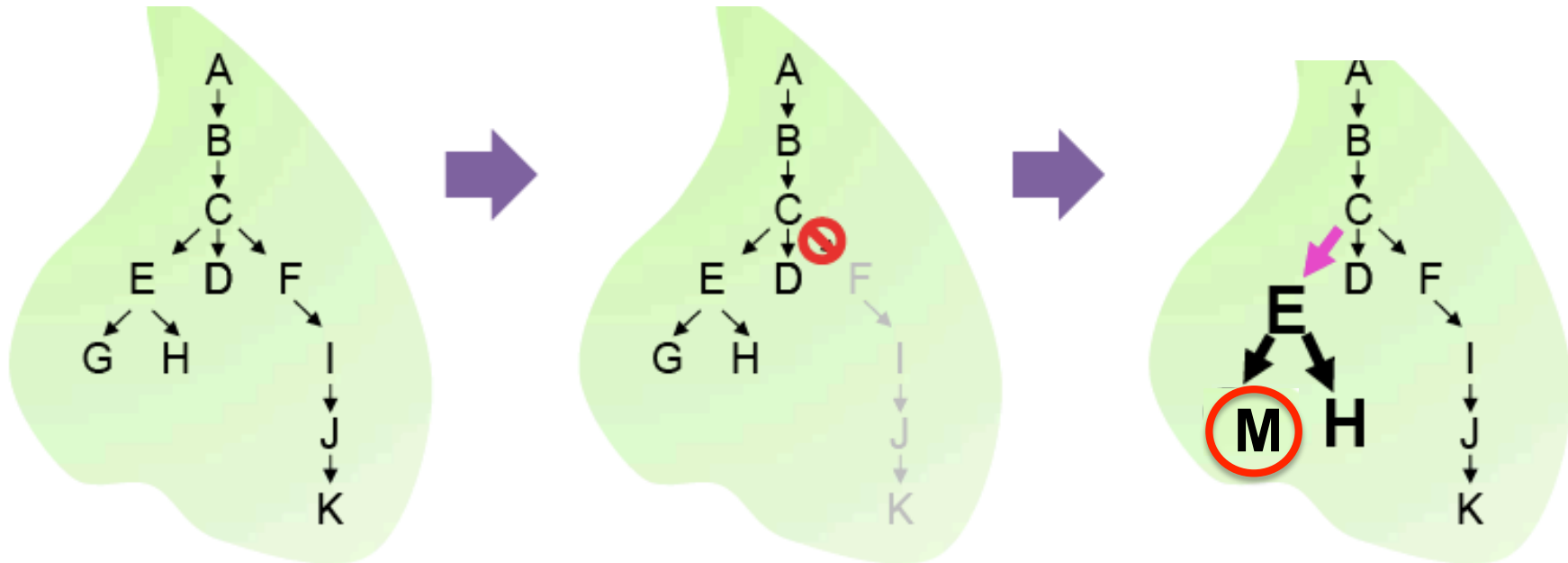
 **PlantaLab**

Ingegneria metabolica: non solo aumento della quantità ma anche nuovi prodotti

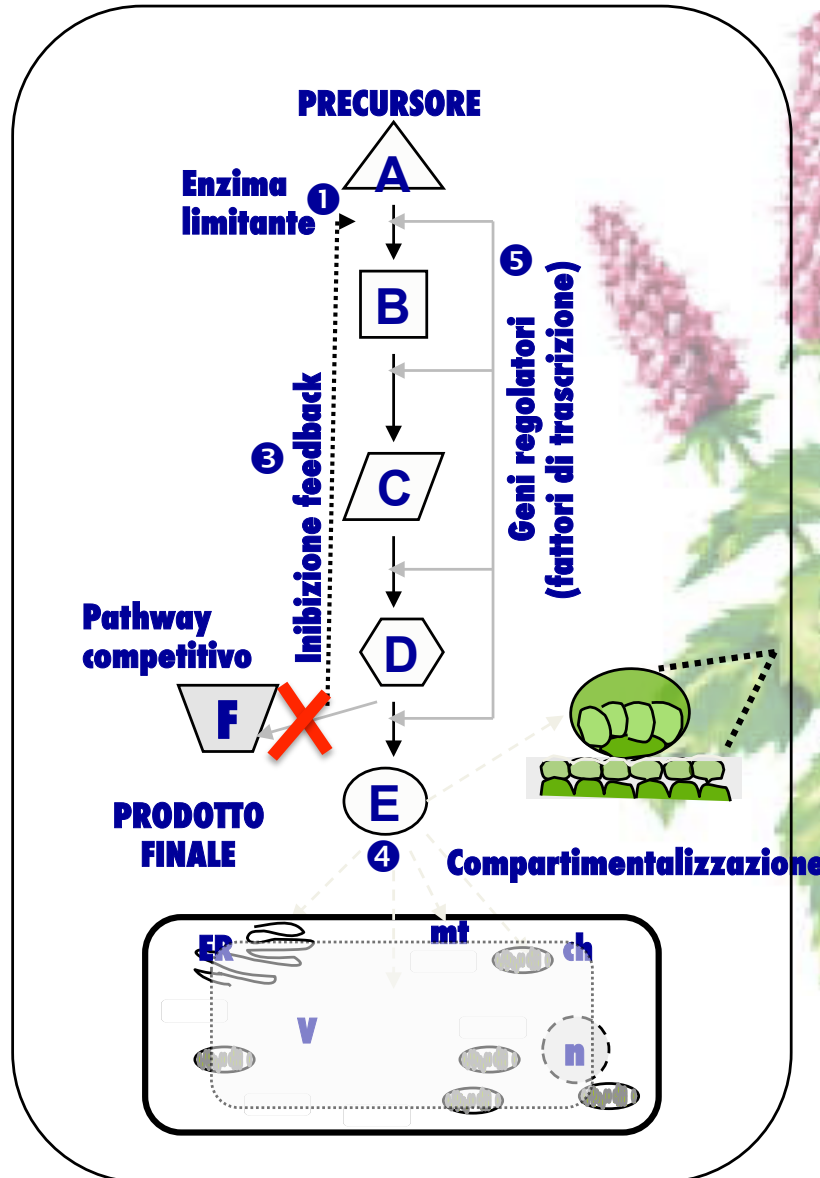
una via metabolica può essere modificata

Geni della via metabolica possono essere silenziati (RNAi mutazioni, VIGS...)

Anche nuove vie metaboliche possono essere introdotte

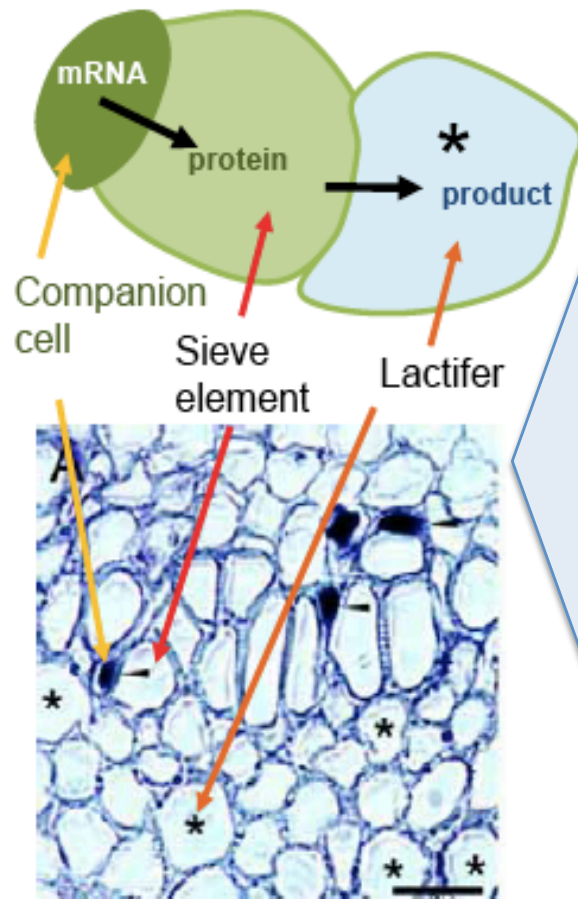


Ingegneria metabolica: sfide future



- ✓ Eliminazione di meccanismi Inibizione da feedback
- ✓ Tessuto specificità e compartimentalizzazione
- ✓ Regolazione post-traduzionale
- ✓ Interattoma: necessari complessi multi-enzimatici (metaboloni) per una biosintesi efficiente
- ✓ *Gene discovery* (RNA seq, genome sequencing di piante medicinali)
- ✓ *Biologia sintetica*

Molti enzimi e metaboliti secondari sono compartimentalizzati

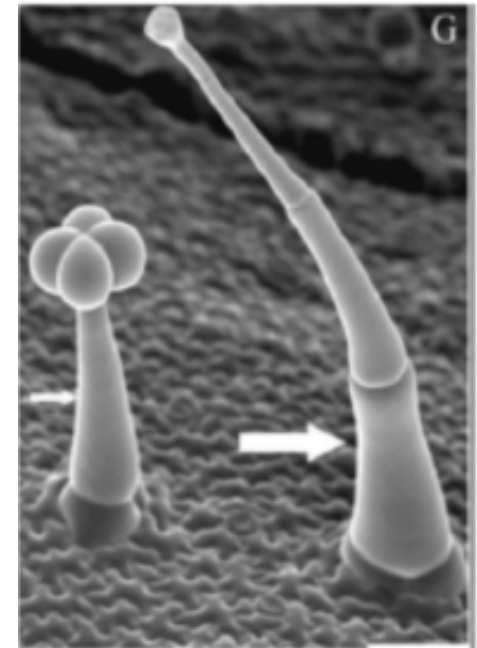


per la biosintesi della morfina geni, proteine e prodotti sono localizzati in diverse cellule specializzate

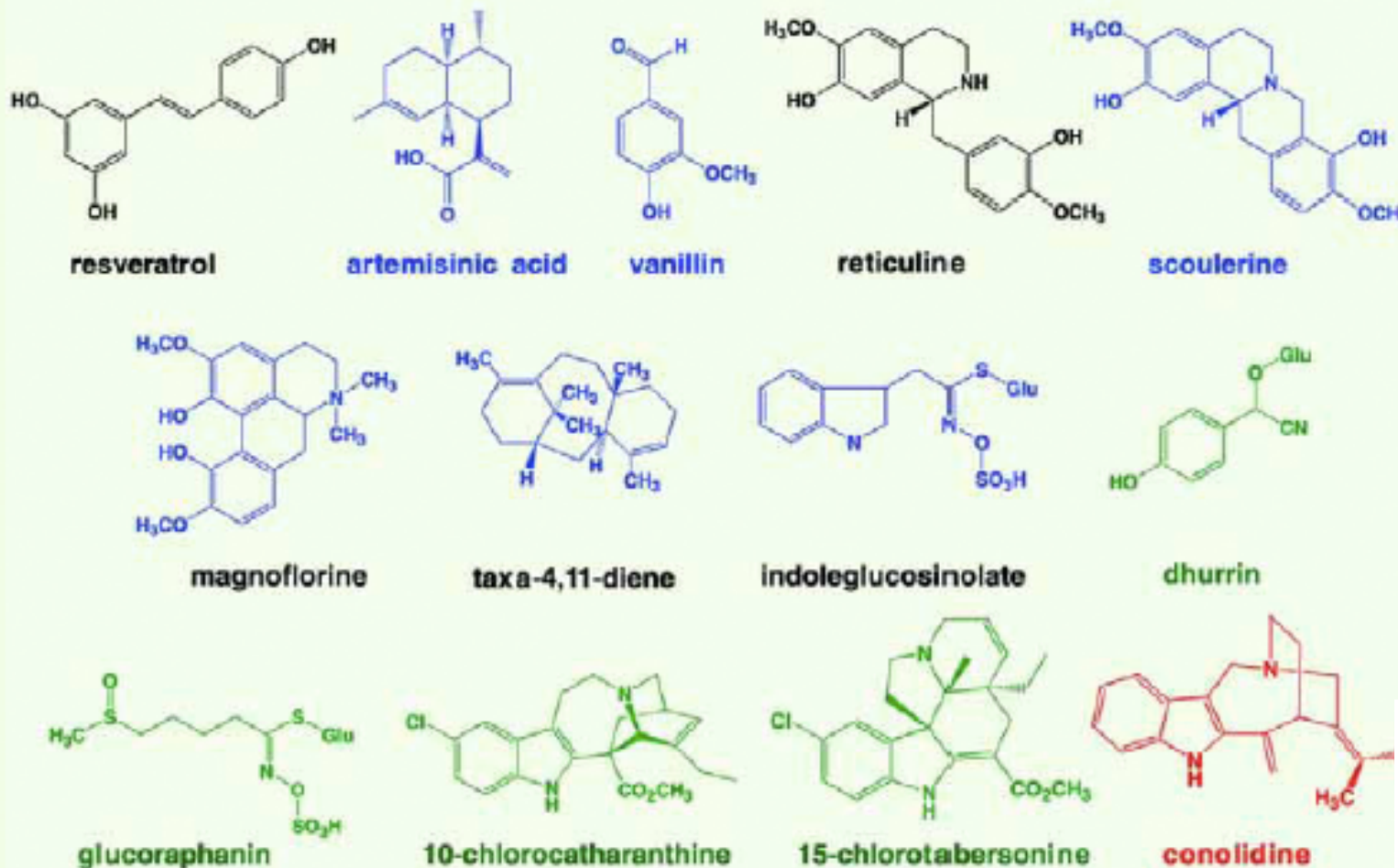
anche gli alcaloidi antitumorali di *Catharanthus roseus* sono compartimentalizzati

Molti metaboliti si accumulano nei tricomi (oli essenziali, artemisinina etc)

Omics database sono stati sviluppati per comprendere meglio queste “micro-factories”



Molti metaboliti secondari di origine vegetale di interesse biomedico sono stati oggetto di strategie di ingegneria metabolica



in batteri e
lievito (nero)



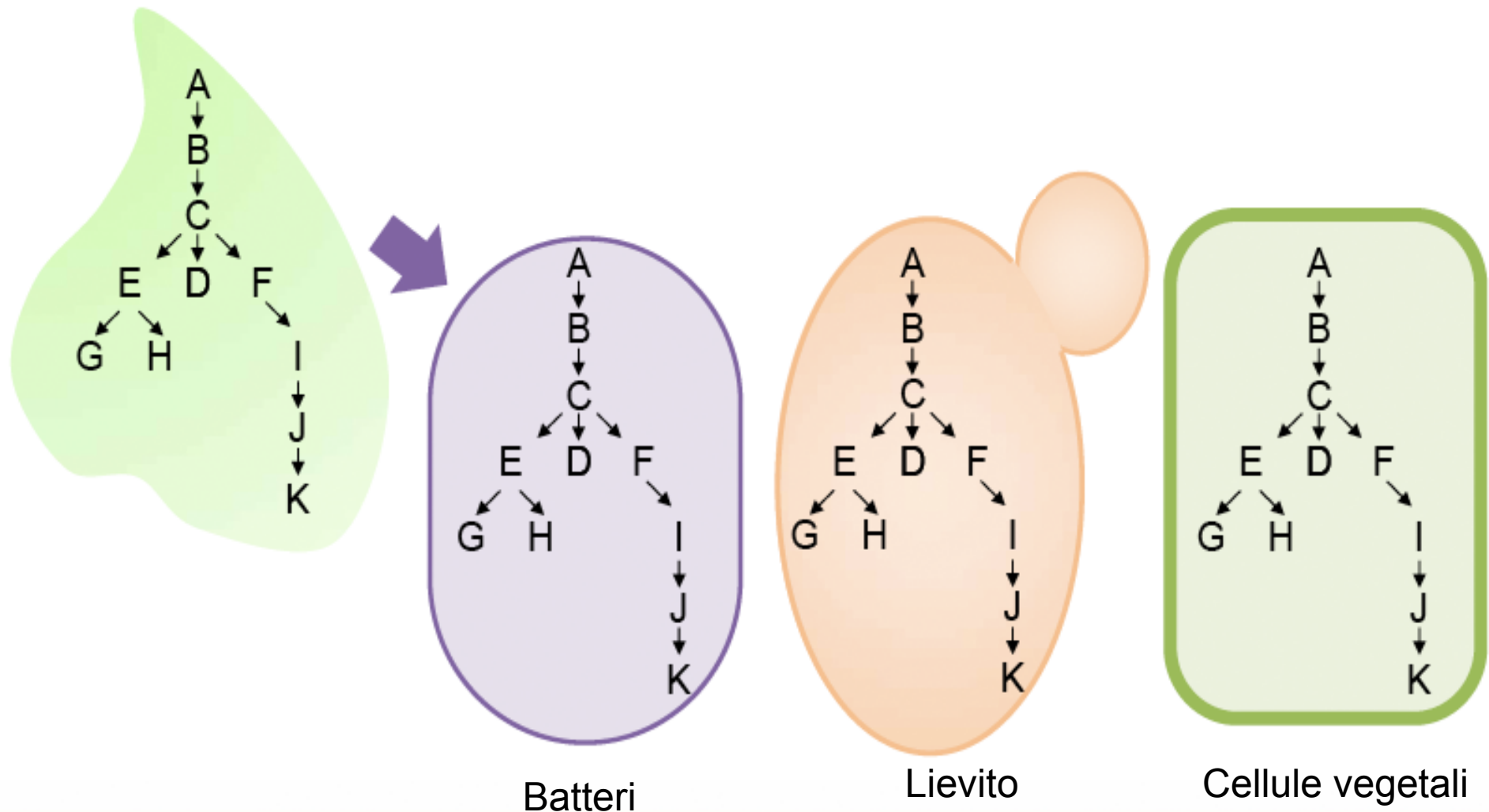
in lievito
(blu)



in piante (verde)

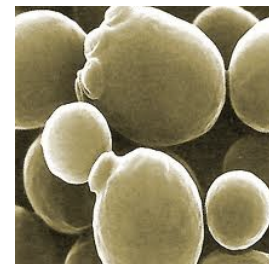
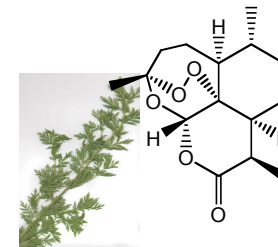
un raro anti-dolorifero
non oppiaceo: un buon
candidato

Vie biosintetiche di composti vegetali possono essere ricostruite in altri organismi



Nuove frontiere: la Biologia sintetica

- E' possibile ricostruire intere vie biosintetiche di metaboliti secondari vegetali in microrganismi (Lievito, batteri)



**Biosintesi
dell'artemisinina in
lievito**

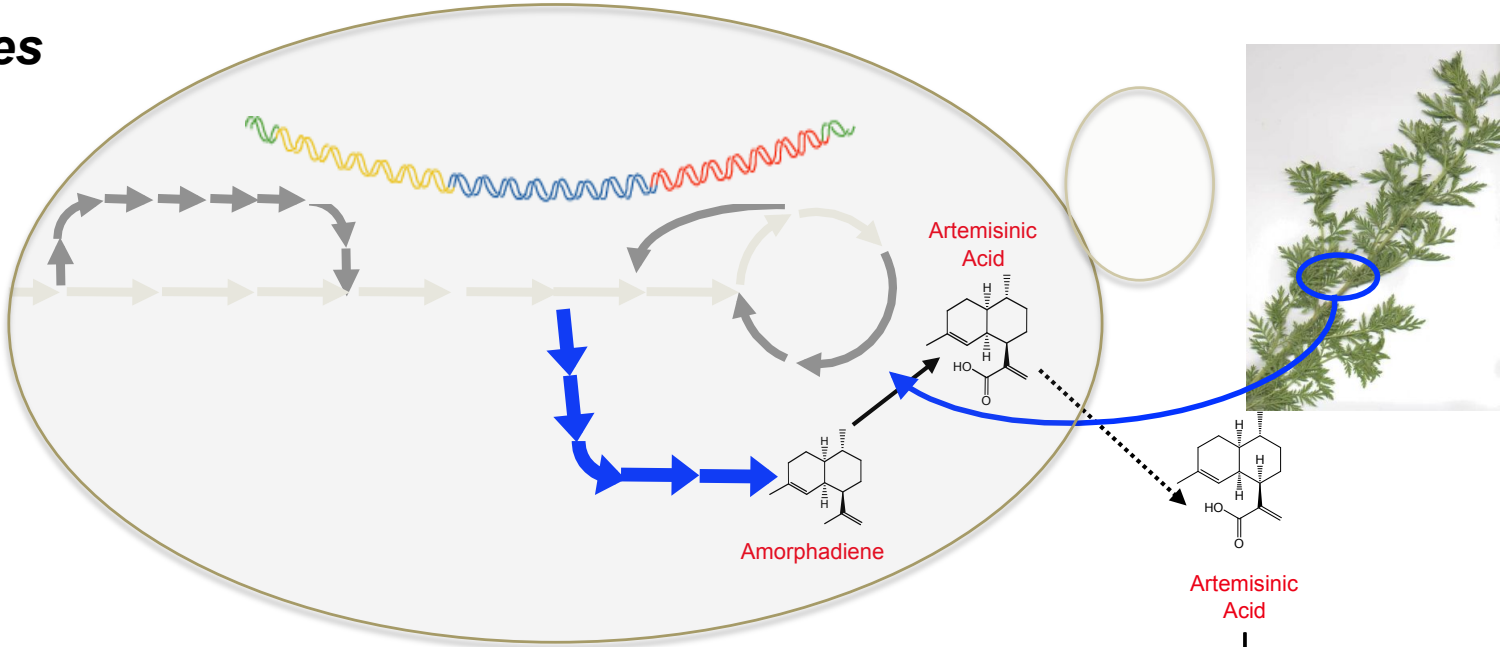


**Biosintesi di
carotenoidi in *E. coli***

Progetto finanziato dalla
Bill & Melinda Gates Foundation

Biologia sintetica: produzione di artemisinina in lievito

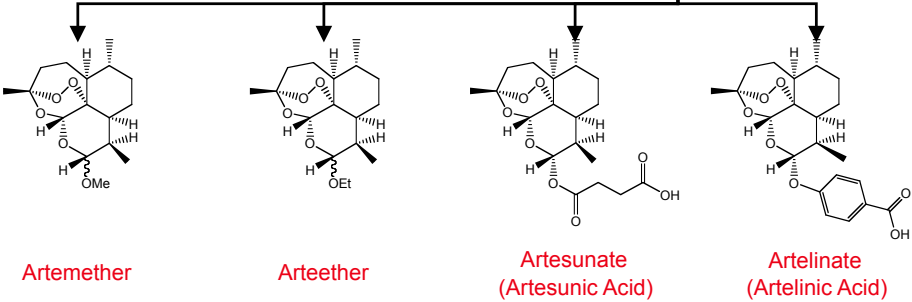
Saccharomyces cerevisiae



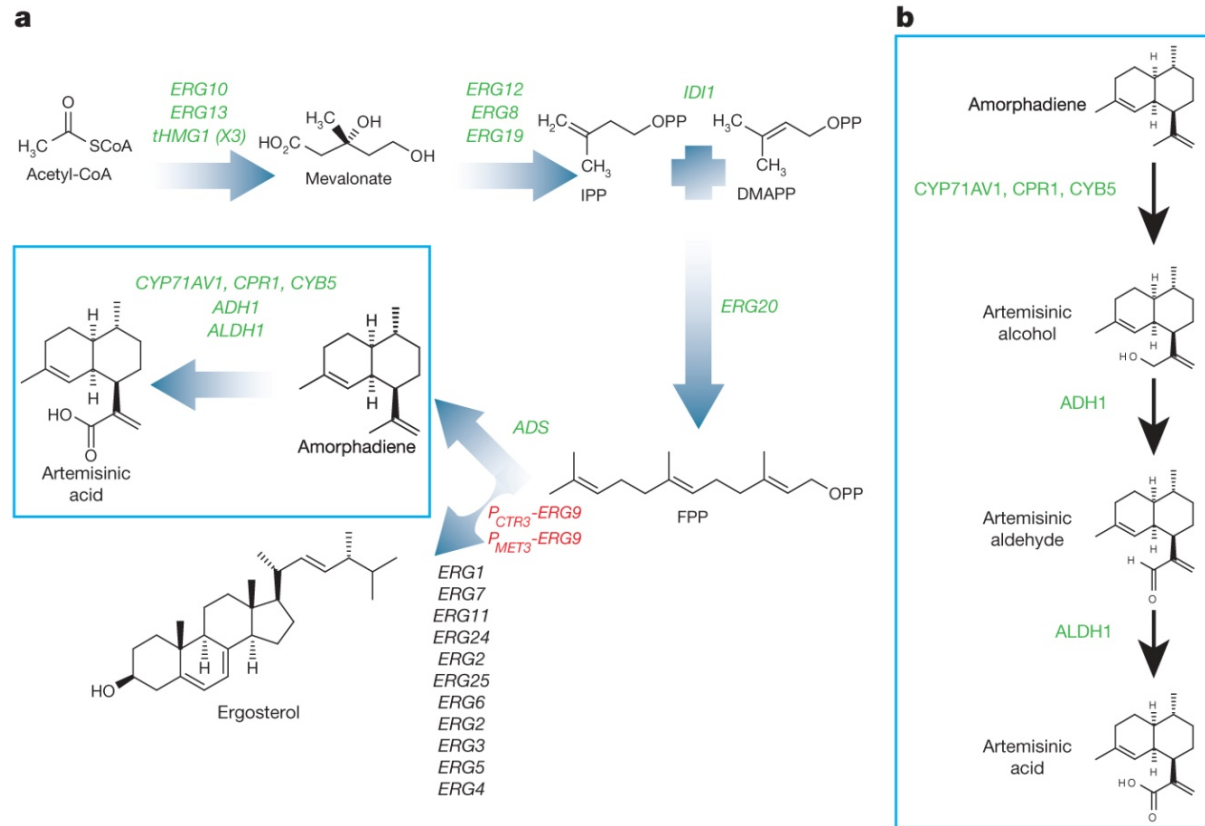
Costo artemisinina

Estratta da pianta
Prodotto in lievito

1\$ grammo
10 cent grammo



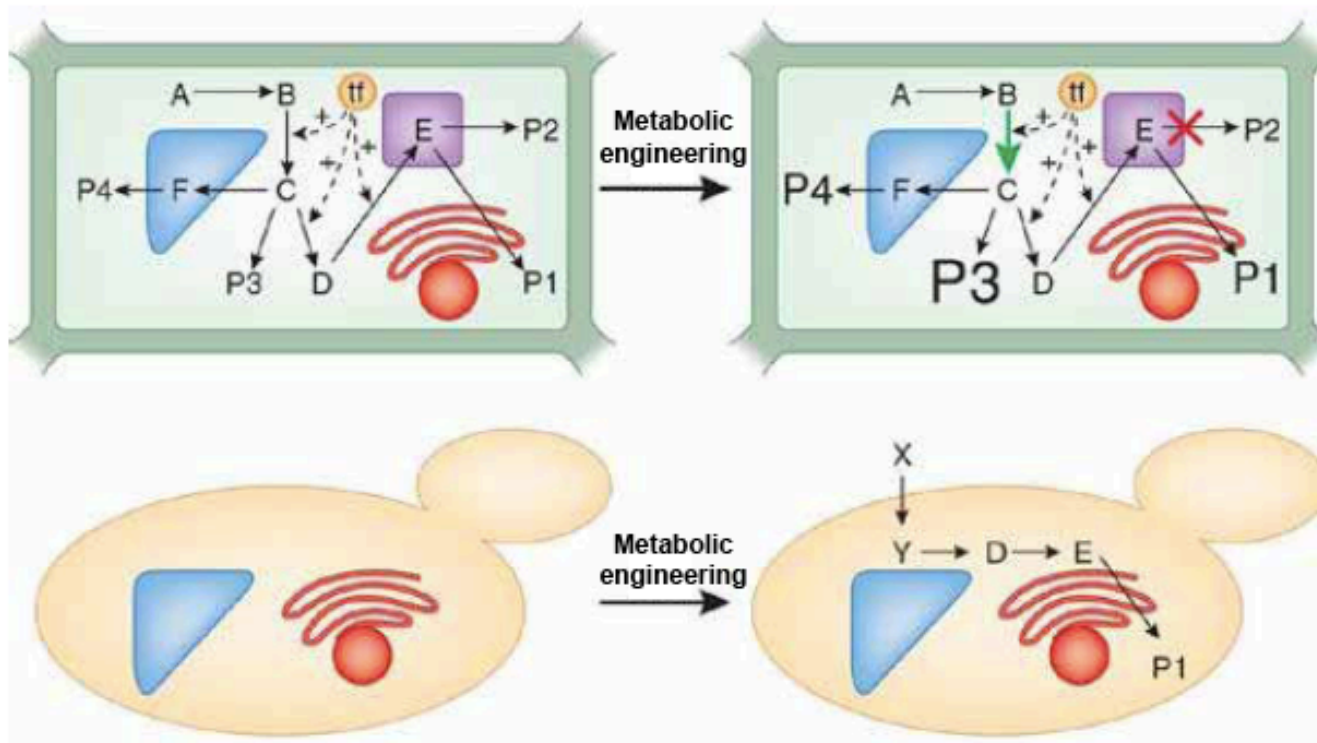
Produzione di acido artemisico in lievito *S. cerevisiae*



CJ Paddon *et al.* *Nature* **000**, 1-5 (2013) doi:10.1038/nature12051

nature

Vantaggi e svantaggi della produzione di molecole vegetali bioattive in cellule vegetali o microbiche



Le piante hanno TF e precursori endogeni
Diversi tipi di organelli
Tempi lunghi di crescita
Effetti collaterali indesiderati su altre vie metaboliche

Facile per uno scale-up
Le aziende Pharma già in possesso delle tecnologie di base

L'intera via biosintetica deve essere ricostruita nel batterio/lievito e modificata per un'efficiente espressione
Aggiunta dei precursori

Conoscenze, strumenti e risorse genomiche sono in rapido progresso anche per piante medicinali



Home	List of Plants	Tools	Downloads	List of Participants	Objectives	Links	Contacts	Sign Up	Metabolomics 
----------------------	--------------------------------	-----------------------	---------------------------	--------------------------------------	----------------------------	-----------------------	--------------------------	-------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Release of the first Metabolomic Dataset

The Medicinal Plant Metabolomics Resource website, the metabolomics partner of the Medicinal Plant Genomics Resource, is available with metabolomics data from *Atropa belladonna* and *Digitalis purpurea*. Metabolite data from the remaining 12 medicinal plant species covered by this project will be made available soon. A [press release](#) is available with complete information about this metabolite resource.

Release of the Final Version of the Transcriptome Data

For more information about the release of the Final Version of the transcriptome data, please see the [press release](#).

Release of Version 1 of the Transcriptome Data

What's New

December 5, 2011

Expression data released for 14 medicinal plants. Expression levels for the representative transcript (the longest transcript isoform) are provided from an array of tissues that were sequenced using RNA-seq for expression abundances. Expression levels are provided in FPKM values (Fragments per kilobase per transcript per million mapped reads). The information can be downloaded from the [MPC FTP site](#).

Conoscenze, strumenti e risorse genomiche sono in rapido progresso anche per le piante medicinali



Home About PhytoMetaSyn Contact Us Search Login

Main Menu

- » Home
- » Project Overview
- » Who We Are
- » Funding
- » SAB
- » GE3LS
- » FAQ
- » News
- » BLAST Our Transcriptomes

Resources

- » Publications
- » Events
- » Web Links

Plants 📄 🖨️ 📧
 Thursday, 12 November 2009 12:34

 **Plants of Interest**
 Approximately seventy-five plant species are being studied in the project. The plant species were selected on the basis of the following criteria:(1) the natural product composition of the species; (2) the commercial importance of the plant and/or the natural products; and (3) the availability of sufficient tissue for RNA and metabolite isolation.

Proposed Plant Species List
 (Table is sortable by clicking on the heading of the column you wish to list by)

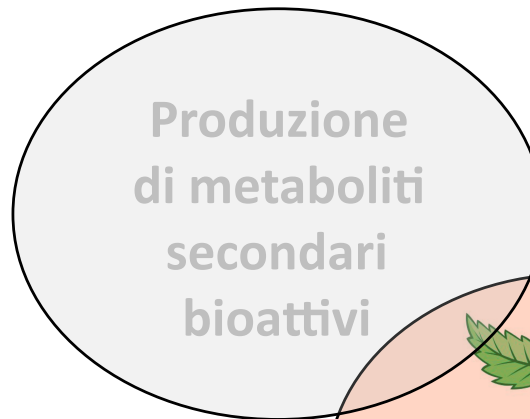
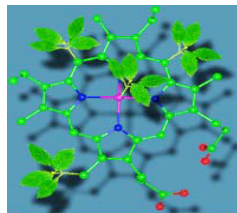
Species Name	Common Name	Author	PI	Family Name	Status
<i>Papaver bracteatum</i>	Persian Poppy	Lindl.	P.Facchini	Papaveraceae	MAGPIE
<i>Sanguinaria canadensis</i>	Bloodroot	L.	P.Facchini	Papaveraceae	MAGPIE
<i>Chelidonium majus</i>	Greater Celandine	L.	P.Facchini	Papaveraceae	MAGPIE
<i>Stylophorum diphyllum</i>	Celandine Poppy	(Michx)Nutt	P.Facchini	Papaveraceae	MAGPIE
<i>Eschscholzia californica</i>	California Poppy	Cham.	P.Facchini	Papaveraceae	MAGPIE
<i>Glaucium flavum</i>	Yellow Hornpoppy	Crantz	P.Facchini	Papaveraceae	MAGPIE
<i>Argemone mexicana</i>	Mexican Prickly Poppy	Linn.	P.Facchini	Papaveraceae	MAGPIE
<i>Thalictrum flavum</i>	Meadow Rue	L.	P.Facchini	Ranunculaceae	MAGPIE
<i>Hydrastis canadensis</i>	Goldenseal	L.	P.Facchini	Ranunculaceae	MAGPIE
<i>Nigella arvensis</i>	Black Cumin	L.	P.Facchini	Ranunculaceae	MAGPIE

75 diverse piante medicinali: trascrittomica e metabolomica

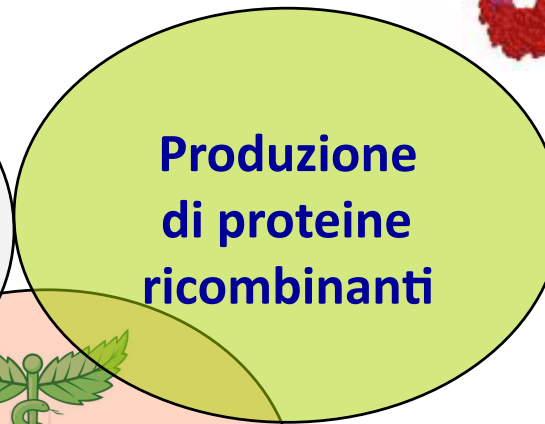
Produzione di molecole bioattive in pianta

- Aumento e/o modificazione della sintesi di molecole bioattive già prodotte in pianta

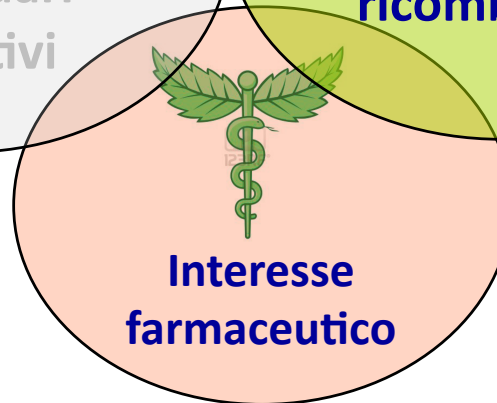
- Nuovi prodotti



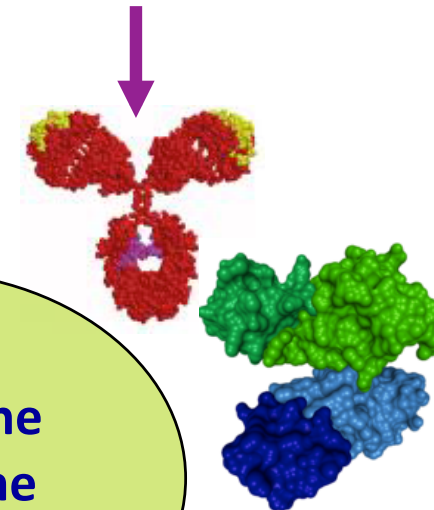
Produzione di metaboliti secondari bioattivi



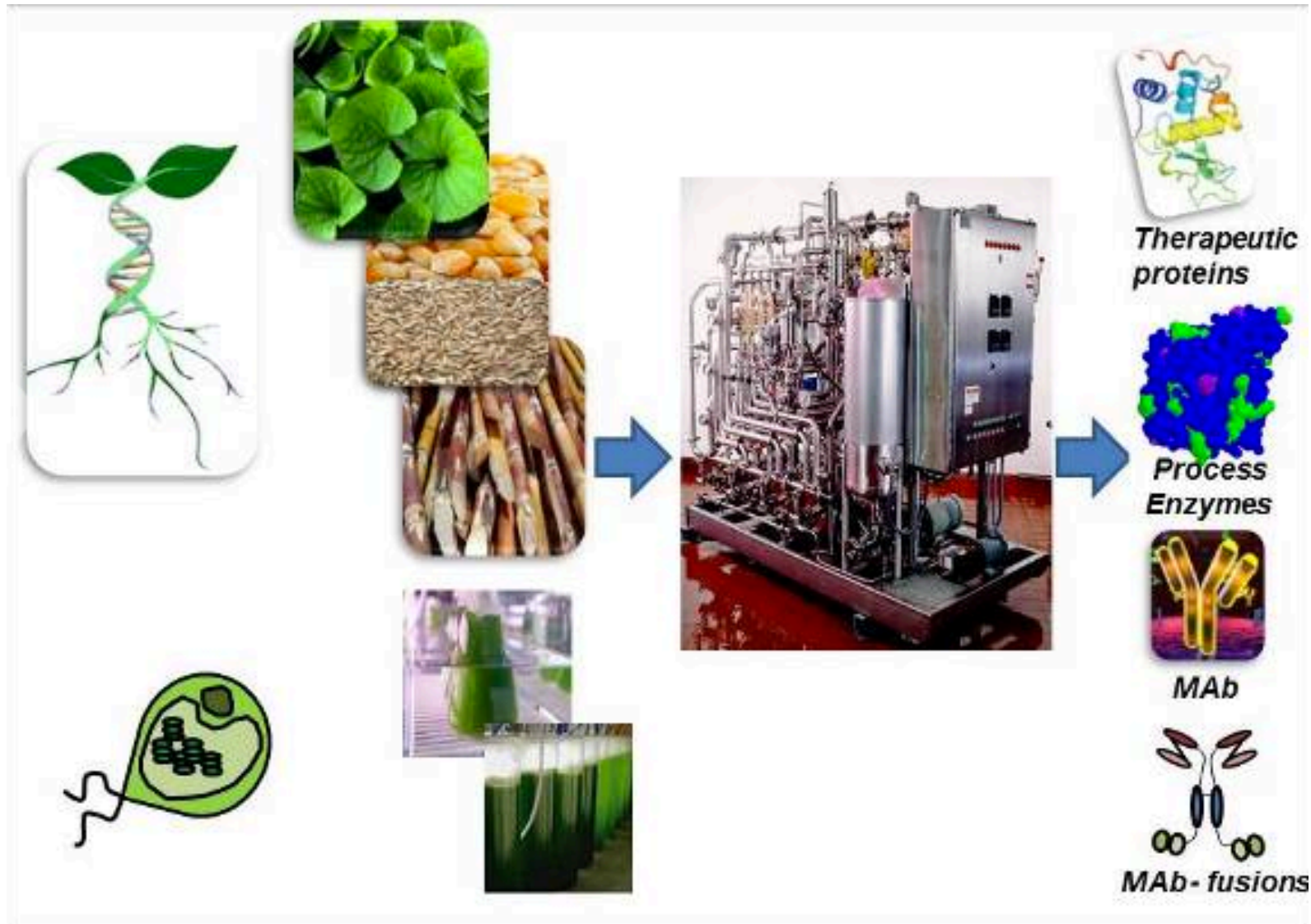
Produzione di proteine ricombinanti



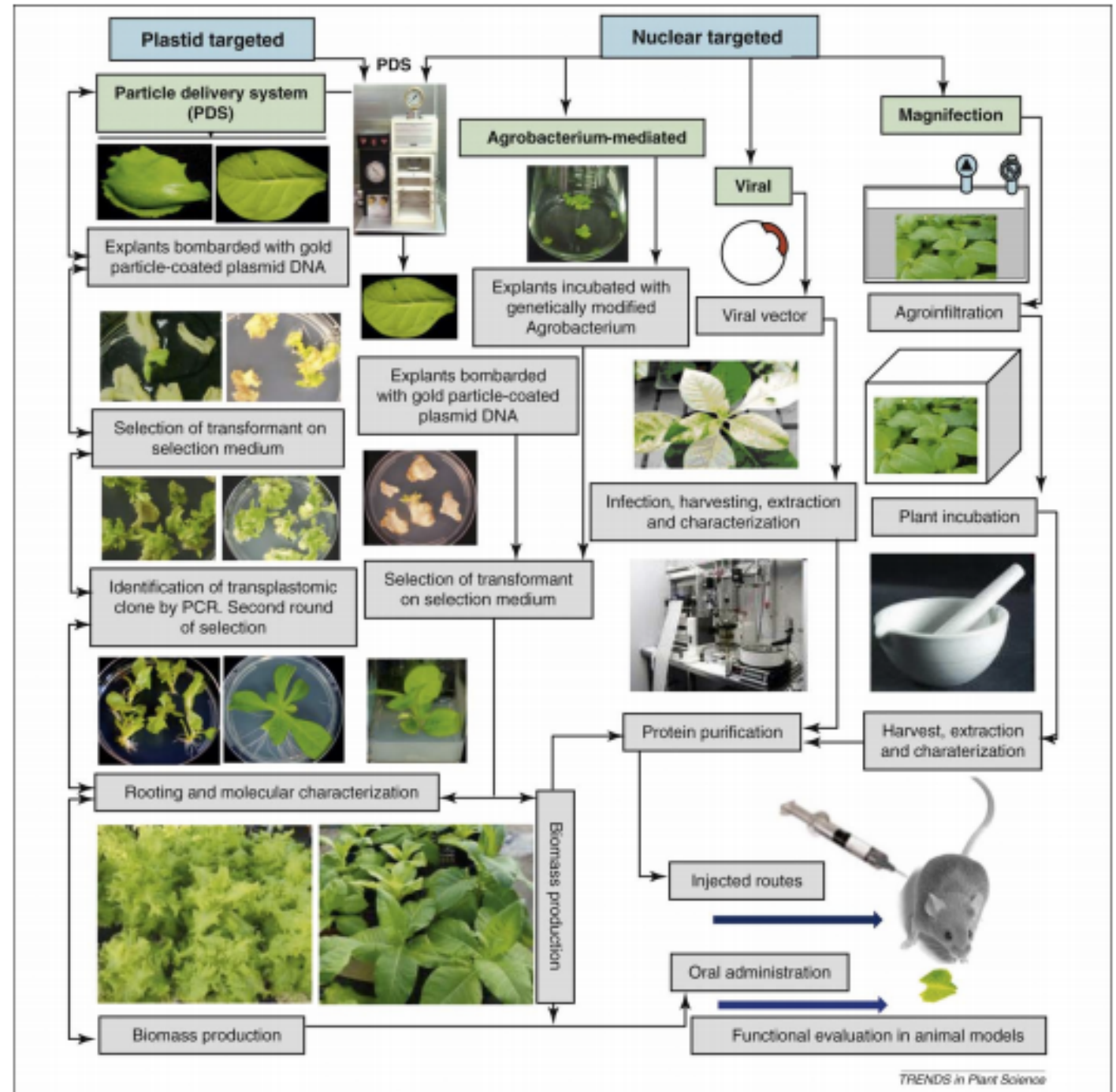
Interesse farmaceutico



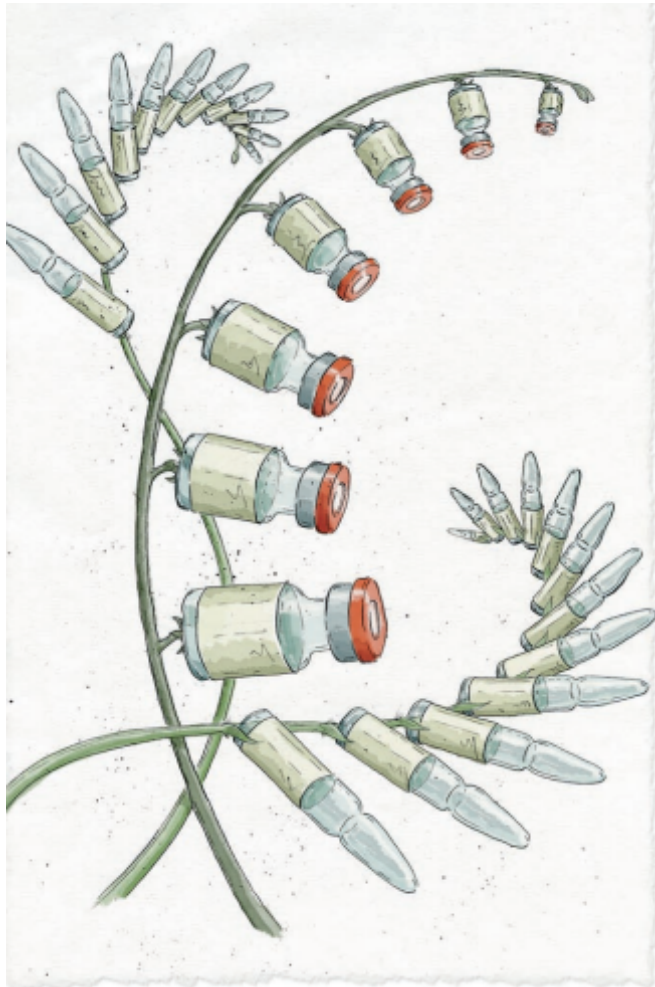
Diversi per sistemi per la produzione di proteine in piante e microalghe



Produzione di proteine ricombinanti in pianta



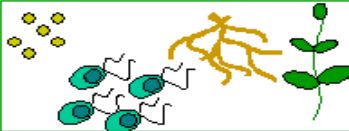
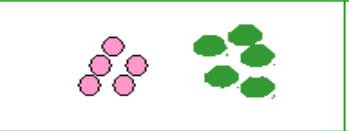
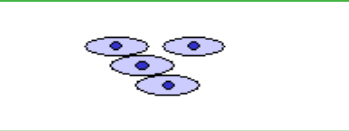

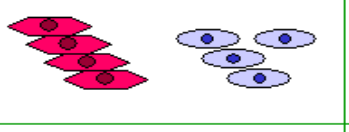
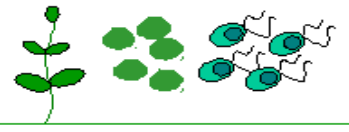

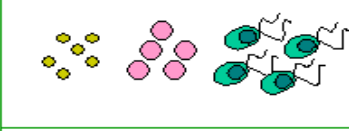

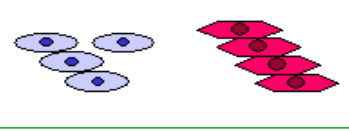


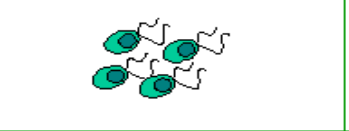


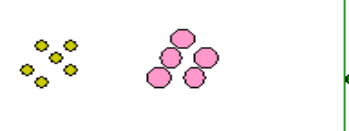
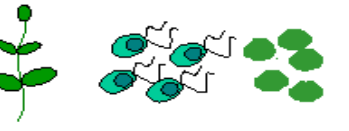

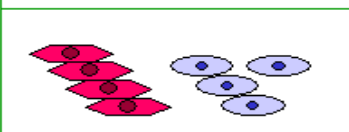
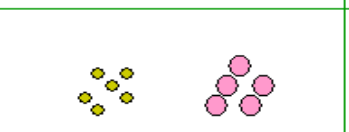
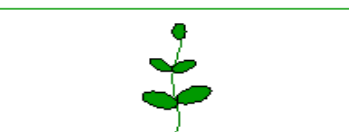


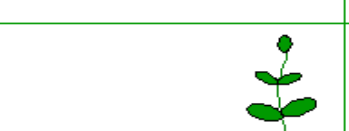


Produzione di proteine ricombinanti di interesse terapeutico in pianta





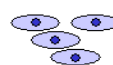

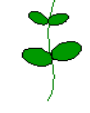



- ✓ Trasformazione stabile vs transiente
- ✓ Trasformazione nucleare vs plastidiale
- ✓ Ottimizzazione del *codon usage*
- ✓ Modifiche post-traduzionali (glicosilazione, altre)
- ✓ Ottimizzazione dei processi di estrazione
- ✓ Sistemi di produzione GMP come per altri farmaci

E' già una realtà: diversi prodotti già immessi sul mercato a costi competitivi con quelli prodotti in cellule umane/batteri/lievito

Confronto tra diversi sistemi di produzione di proteine ricombinanti

	LOW	MEDIUM	HIGH	VERY HIGH
COST				
SCALE-UP				
TIME				
PTM				
GMP				
SAFETY				
MARKET				

							
Bacteria	Yeast	Plant cells	Microalgae	Insect cells	Mammalian cells	Transgenic plant	Hairy root cultures

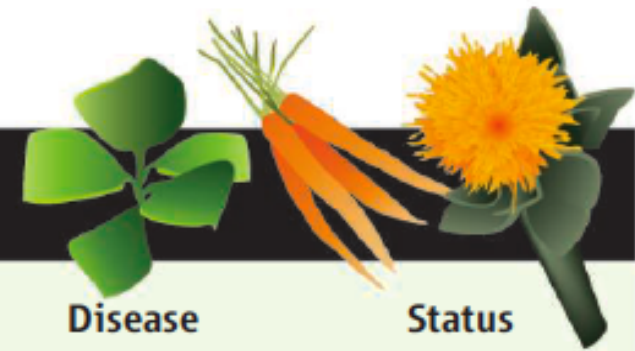
Franconi R., Demurtas OC, Massa S.
Expert Reviews Vaccines 2010

Plant Expression Systems and Recombinant Protein Products

Manufacturer	System	Product	Stage
Protalix	Carrot (root cell suspension)	Elelyso™ (taliglucerase alfa) (Gaucher Disease)	FDA Cleared
InVitria	Rice (seed)	Cell Culture Products (rh-albumin, rh-lysozyme, rh-transferrin, rh-lactoferrin)	Marketed
Medicago	Tobacco (whole plant)	Influenza Vaccines	Phase II
Planet Biotechnology	Tobacco (whole plant)	Dental Caries	Phase II
Ventria Bioscience	Rice (seed)	VEN100 (rh-lactoferrin) VEN200 (rh-albumin)	Phase II Phase I
Synthon	Duckweed (whole plant)	Interferon Alpha (Hepatitis C)	Unknown*

*Synthon acquired intellectual property related to this and other products during the June 2012 liquidation of Biolex Therapeutics. The terms of the acquisition were not published and the status of these products is not currently available.

Plant Genomes



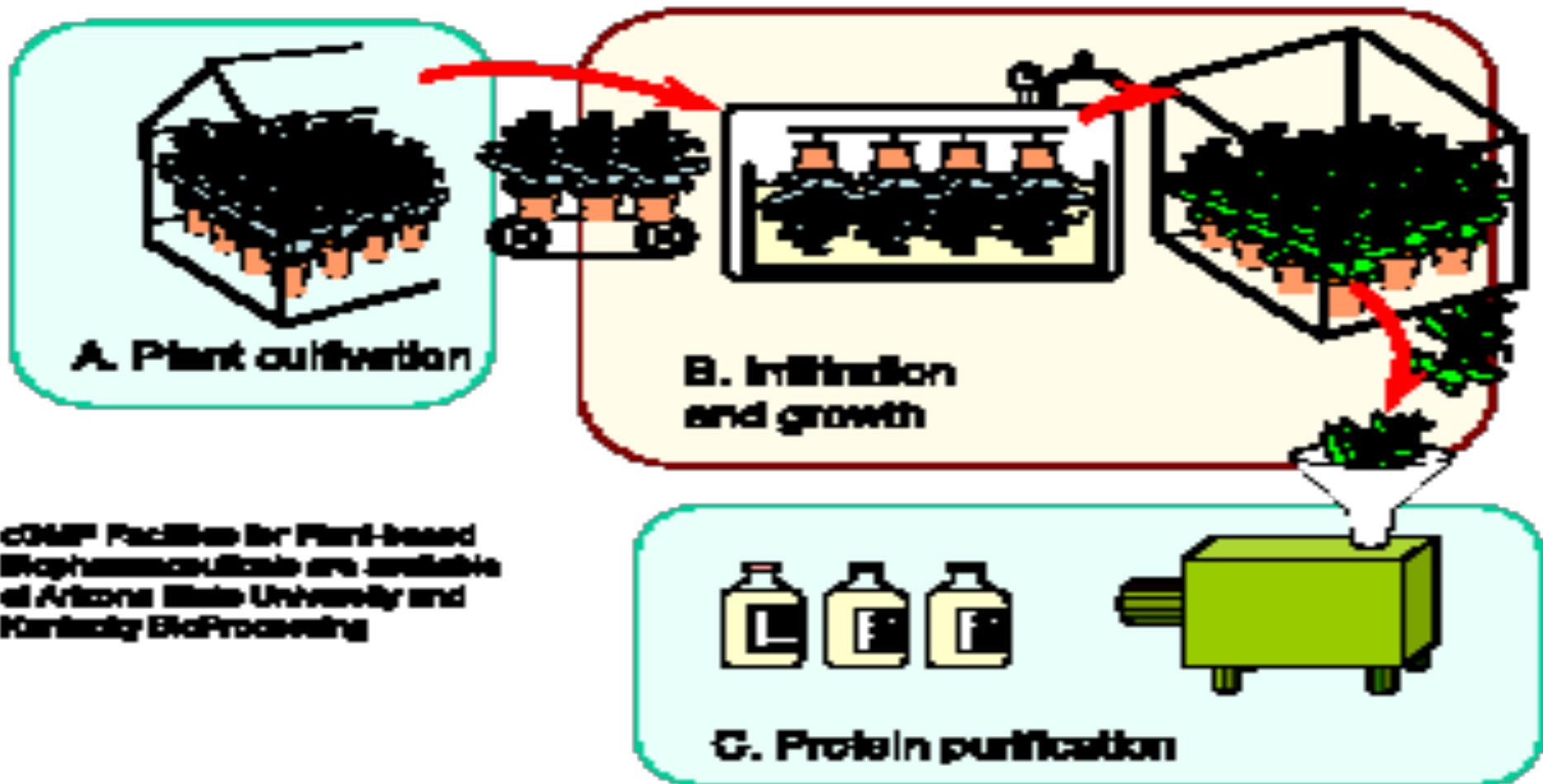
Selected Plant-Made Pharmaceuticals

Company	Plant	Grown in	Drug or product	Disease	Status
Human drugs					
Protalix Biotherapeutics	carrot	cell culture	glucocerebrosidase	Gaucher disease	Phase III trial* [*]
Biolex Therapeutics	duckweed	indoor chambers	alpha interferon	hepatitis C	Phase II trial*
SemBioSys Genetics	safflower	field	insulin	diabetes	Phase I/II trial †
Meristem Therapeutics	corn	field	lipase	cystic fibrosis	Phase III trial †
Other products					
Ventria Bioscience	rice	field	lactoferrin, lysozyme	diarrhea	Efficacy trial ‡
Cobento	<i>Arabidopsis</i>	greenhouse	human intrinsic factor	Vitamin B-12 deficiency	Approved ††
Planet Biotechnology	tobacco	field	secretory antibody vaccine	tooth decay	E.U. approved
Dow AgroSciences	tobacco	cell culture	poultry vaccine	Newcastle disease	USDA approved
CIGB, Cuba	tobacco	greenhouse	vaccine purification antibody	hepatitis B	On market

* Ongoing; † Projected late 2008; ‡ Completed; †† In Ukraine.

Steps along the way. No plant-made human drug has made it through final clinical trials, but several “pharmed” proteins are close to or on the market as supplements, a vaccine reagent, and a medical device.

GMP facilities and automatization for Plant-Made-Pharmaceuticals (PMP)



cGMP Facilities for Plant-based Biopharmaceuticals are available at Arizona State University and Kentucky BioProcessing

Plant-Based Vaccine Production

Fraunhofer Center for Manufacturing Innovation



Fraunhofer CMI, in collaborazione con il *Fraunhofer Center for Molecular Biotechnology* (CMB) e la Boston University, ha sviluppato una facilities altamente automatizzata, per la produzione su larga scala quantità di proteine ricombinanti di interesse bio-farmaceutico con procedure GMP.



Le piante come biofabbriche di molecole bioattive di interesse farmaceutico

Molti successi concreti e molte altre applicazioni ad un passo dal mercato!



A. Leone
PlantaLab