

Productie van farmaceutische eiwitmoleculen in paddestoelen.

Kansen voor de de Nederlandse paddestoelensector?

Dr. J.J.P. Baars & Dr. A.S.M. Sonnenberg

Vertrouwelijk

© 2005 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

PPO Publicatienr. 2005-22.



Projectnummer PPO: 620207
PT nummer: 11960

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Sector Paddestoelen

Adres : Peelheideweg 1, 5966 PJ, Horst
: Postbus 6042, 5960 AA Horst
Tel. : 077 - 464 75 75
Fax : 077 - 464 15 67
E-mail : info.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

1	SAMENVATTING.....	7
2	BEGRIPPENLIJST	10
3	INLEIDING	12
3.1	Productie van eiwitten m.b.v. genetisch gemodificeerde organismen.	12
3.2	Welke farmaceutische eiwitten kunnen m.b.v. genetisch gemodificeerde organismen geproduceerd worden?	14
3.3	Ontwikkeling van de markt voor farmaceutische eiwitten.	16
3.4	Problemen die bij het bedienen van de markt verwacht worden.	16
3.4.1	Voorspelling van tekorten in productie capaciteit.	16
3.4.2	Te hoge prijzen.....	17
3.5	Het ideale systeem voor de productie van farmaceutische eiwitten?.....	17
3.5.1	Productie van farmaceutische eiwitten in planten.	18
3.5.2	Productie van farmaceutische eiwitten in paddestoelen.	18
4	ETHISCHE EN MAATSCHAPPELIJKE ASPECTEN VAN DE TEELT VAN FARMACEUTISCHE GEWASSEN.	21
5	VAN TOEPASSING ZIJNDE REGELGEVING	24
5.1	Regelgeving m.b.t. de teelt van recombinante gewassen.	24
5.1.1	Ingeperkt gebruik.....	24
5.2	Regelgeving m.b.t. registratie van medicijnen.	24
6	BESCHRIJVING VAN EEN MOGELIJKE PRODUCTIE-KETEN VOOR FARMACEUTISCHE EIWITTEN UIT PADDESTOELEN.....	26
6.1	Overzicht van de betrokken partijen.	26
6.2	De farmaceutische industrie.	27
6.3	Broedproducent.....	28
6.4	Substraatproducent.	29
6.5	Teeltbedrijf.....	29
6.5.1	Inrichtingseisen.....	29
6.5.2	Werkvoorschriften.....	30
6.5.3	Personeel.....	31
6.5.4	Documentatie	31
7	PATENTSITUATIE	32
8	TOEKOMST VERKENNING; WANNEER KAN MUSHFARMING OPERATIONEEL ZIJN EN WAT PRODUCEERT HET?.....	33
8.1	Wanneer kan het operationeel zijn?.....	33
8.2	Wat kan het produceren?	33
8.2.1	Eiwitten als basis van een geneesmiddel.....	33
8.2.2	Eiwitten voor niet-medicinaal gebruik.	35
9	VOORSPELLING VAN BENODIGDE PRODUCTIECAPACITEIT	36
9.1	Bij gebruik van champignon als productieplatform:	36
9.2	Bij gebruik van oesterzwam als productieplatform	37

10	GEBRUIKTE LITERATUUR	38
	BIJLAGE 1. ONTWIKKELING VAN EEN GENETISCH GEMODIFICEERDE STAMMEN VAN PADDESTOELPRODUCERENDE SCHIMMELS	42
	ONTWIKKELING VAN DE TECHNIEK.	42

1 Samenvatting

Gedurende de laatste jaren wordt een nieuwe klasse geneesmiddelen ontwikkeld; medicijnen op basis van eiwitmoleculen. Naar verwachting zullen in de nabije toekomst 300 tot 500 nieuwe medicijnen op eiwitbasis (bijvoorbeeld tegen kanker en hart- en vaatziekten) een toelating verkrijgen. De eiwitmoleculen voor deze medicijnen worden op dit moment geproduceerd door zoogdier celculturen of door genetisch gemodificeerde organismen in fermentoren. Aangezien van deze medicijnen vaak relatief grote hoeveelheden nodig zijn (veel per patiënt of voor grote groepen patiënten), verwacht men dat de productiecapaciteit in fermentoren in de toekomst niet toereikend zal zijn. Naast de momenteel vrij dure productiemethode zal een tekort aan productiecapaciteit de ontwikkeling van nieuwe medicijnen remmen. Een potentieel grote markt komt daarmee in gevaar. Naar schatting kan deze markt in 2010 een omzet van 10 miljard dollar bedragen. Er is dringend behoefte aan nieuw productieplatform dat een aantal eigenschappen moet hebben: veilig, ingeperkt gebruik, geen gebruik van dierlijke componenten, flexibel, snel op te schalen tot grote hoeveelheden en af te stemmen op "time-to-market".

Momenteel worden een aantal alternatieven ontwikkeld voor de productie van medicijnen op basis van eiwitmoleculen. Voorbeelden van dergelijke alternatieven zijn de ontwikkeling van genetisch gemodificeerde zoogdieren die in hun melk medicinale eiwitten produceren en de ontwikkeling van genetisch gemodificeerde planten die medicinale eiwitten produceren in hun zaden of bladeren. Er kleven echter nadelen aan het gebruik van deze alternatieven. Aan het gebruik van genetisch gemodificeerde zoogdieren kleven ethische bezwaren. Daarnaast bestaat altijd een kans dat een dergelijk systeem ongewenste componenten overbrengen (virussen, prionen). Aan de teelt van genetisch gemodificeerde planten op akkers kleeft het risico van uitkruising (ongewilde verspreiding van de genen die coderen voor geneesmiddelen naar de natuurlijke populatie) en een gebrek aan draagvlak onder de bevolking. Teelt van genetisch gemodificeerde planten in kassen (ingeperkt gebruik) zou aan deze bezwaren tegemoet kunnen komen. Echter, in vergelijking met teelt van genetisch gemodificeerde planten in kassen, biedt het gebruik van genetisch gemodificeerde paddestoelen voor de productie van medicinale eiwitten een aantal extra voordelen.

- *Inperking.* Paddestoelen worden gedurende het gehele jaar in een gesloten systeem geteeld. Een gesloten systeem is ideaal omdat dan voorkomen wordt dat genetisch gemodificeerde organismen in het milieu kunnen worden geïntroduceerd. Hierdoor is het enerzijds waarschijnlijk gemakkelijker om een vergunning te krijgen en zijn anderzijds de productieomstandigheden heel goed in de hand te houden.
- *Productie-efficiëntie.* Paddestoelen, en in het bijzonder de champignon, zijn in staat in een relatief korte tijd een enorme hoeveelheid biomassa te produceren, meer dan met planten mogelijk is. Opschaling is dus relatief makkelijk en *time-to-market* is kort. Een aantal paddestoel soorten kunnen in principe op een gedefinieerd en steriel substraat geproduceerd worden (zie verderop in dit rapport). Dat voorkomt een enorme toename veroorzaakt door eisen van substraatcetrificering.
- *Uitgangsmateriaal.* Het uitgangsmateriaal (ent-materiaal) voor de paddestoelproductie wordt vegetatief vermeerderd. Ten opzichte van planten heeft dit het voordeel dat het niet nodig is om eerst zaad te produceren voordat een grootschalige teelt kan worden uitgevoerd. Mycelium van genetisch gemodificeerde paddestoelen kan lang in vloeibare stikstof worden opgeslagen en naar behoefte worden ontdooid.
- *Productiesnelheid.* Ook de snelle productiecycclus van paddestoelen is een pluspunt. Er kunnen tot 7 teelten per jaar worden uitgevoerd. Hierdoor is er een gelijkmatiger productie jaarrond te realiseren en kan, indien nodig, tussentijds sneller op verandering in de marktbehoefte worden ingespeeld.
- *Genetisch modifieren.* Er zijn relatief efficiënte methoden beschikbaar voor het maken van genetisch gemodificeerd mycelium van paddestoelen. Hierdoor is het in principe mogelijk om in relatief korte tijd een genetisch gemodificeerd mycelium voor de productie van medicinale eiwitten te construeren. Het productieniveau van medicinale eiwitten door genetisch gemodificeerde schimmels is momenteel nog te laag voor industriële toepassing. Dit onderzoeksgebied is echter

nog relatief nieuw en verbeteringen zijn in de loop van de tijd te verwachten.

- *Onderscheidend van gewassen bedoeld voor voedselketen.* De Europese wetgeving geeft duidelijk de voorkeur aan het gebruik van transgene gewassen die niet voor de voedselketen worden gebruikt of gewassen die duidelijk zijn te onderscheiden van voedingsgewassen. In principe kunnen paddestoelsoorten gebruikt worden die niet gegeten worden maar wel in de huidige productiesystemen te produceren zijn. Het is zelfs mogelijk om het beoogde eiwit/medicijn alleen te winnen uit het doorgroeide substraat. In dit geval is menging met de voedselketen zelfs onmogelijk.

Welk productiesysteem door de industrie als alternatief gebruikt kan/zal worden zal afhangen van een aantal factoren. In de procedure voor toelating van een medicinaal eiwit als geneesmiddel wordt de toelating verleend op de combinatie van geproduceerd eiwit en het producerende organisme. Aangezien de toelatingsprocedure voor medicijnen lang en kostbaar is, is de keuze van de meest optimale combinatie van medicinaal eiwit en producerend organisme van groot strategisch belang. Indien voor de productie een ander producerend organisme wordt gekozen, moet een nieuwe (kostbare en tijdrovende) toelating worden aangevraagd. Gezien het feit dat momenteel nog geen enkel recombinant eiwit door paddestoelvormende schimmels wordt geproduceerd, zal het naar verwachting ruwweg 2 decennia duren voordat grootschalige productie van medicinale eiwitten in genetisch gemodificeerde paddestoelen op teeltbedrijven aan de orde is.

Indien een farmaceutisch bedrijf er voor kiest om medicinale eiwitten in genetisch gemodificeerde paddestoelen te produceren, moet er een productieketen worden georganiseerd. Het ligt voor de hand dat een dergelijk productiesysteem een volledig geïntegreerd systeem wordt (van substraat/broed productie/teelt tot winning van het medicijn in één bedrijf en volledig afgesloten van de productieketen voor consumptie paddestoelen).

Een keten voor productie van medicinale eiwitten heeft met meerdere systemen van regelgeving te maken. Een deel van de regelgeving hangt samen met het specifieke eindproduct van de productieketen; een medicijn. De eisen die aan het productieproces van medicinale eiwitten uit genetisch gemodificeerde gewassen worden gesteld, worden voor een groot deel bepaald door instanties als de European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA), de United States Department of Agriculture (USDA), de Food and Drug Administration (FDA) en het College ter Beoordeling van Geneesmiddelen (CBG). Het Committee on herbal medicinal products van het EMA werkt aan een voorstel voor een systeem van Good Agricultural Practice regels die ook van toepassing kunnen zijn voor productie van medicinale eiwitten uit paddestoelen. Als er gewerkt wordt met genetisch gemodificeerde organismen is ook de regelgeving uit het Besluit genetisch gemodificeerde organismen Wet milieugevaarlijke stoffen van toepassing. Hierin worden werkvoorschriften en inrichtingseisen voor gebouwen in een dergelijke keten beschreven. Deze zijn primair gericht op het voorkomen van ongewilde introductie van genetisch gemodificeerde paddestoelen in het milieu. Daarnaast moet rekening worden gehouden met de eisen die farmaceutische industrie stelt aan de kwaliteit van de geleverde paddestoelen. Deze eisen zijn gericht op het garanderen van een zo constant mogelijk product dat als basis dient voor de extractie en zuivering van medicinale eiwitten. Boven alles staat de kwaliteit van het medicinale eiwit dat uit paddestoelen gehaald kan worden en daarna de opbrengst per kilogram paddestoelen.

Als medicijnen met paddestoelen geproduceerd gaan worden zal een beperkt aantal bedrijven nodig zijn voor de productie van één eiwit. Dit aantal kan oplopen tot enkele tientallen bedrijven als er een grote vraag naar het medicinale eiwit bestaat. Als er meerdere verschillende medicinale eiwitten in paddestoelen geproduceerd gaan worden, zal in de toekomst een aanzienlijk aantal bedrijven betrokken zijn bij de productie. Deze schattingen zijn echter gebaseerd op productieniveau's zoals die momenteel op commercieel opererende teeltbedrijven worden behaald.

Men verwacht dat de markt voor farmaceutische eiwitten zich in de komende jaren flink zal uitbreiden en voorspelt wordt dat voor 2010 een omzet is bereikt van 125 miljard dollar met een jaarlijkse groei van 15-20%.

Genetisch gemodificeerde paddestoelen kunnen ook gebruikt worden voor de productie van eiwitten die geen medische toepassing hebben (eiwitten voor diagnostische testen, enzymen met een industriële toepassing e.d). De ontwikkeling en marktintroductie van dergelijke niet-farmaceutisch eiwitten zal waarschijnlijk minder tijd in beslag nemen. Voor niet-medische toepassingen zal mogelijk over een tiental jaren grootschalige productie een realiteit kunnen zijn.

Het moge duidelijk zijn dat als paddestoelen als productieplatform gebruikt gaan worden voor de productie van medicinale eiwitten, dit een ander teeltsysteem vereist dan het huidige. De initiatieven en ideeën met betrekking tot systeeminnovatie in de paddestoelteelt sluiten hierop al voor een gedeelte aan. Een voor een groot gedeelte geautomatiseerd teeltsysteem op alternatieve, goed te standaardiseren, substraten past goed in het type bedrijf dat nodig is voor de productie van medicinale eiwitten uit paddestoelen. Daar zal een sector niet op korte termijn al profijt van hebben maar, indien uitontwikkeld en beschermd, biedt dit voor de Nederlands paddestoelen sector mogelijk een lucratief alternatief om een technisch vooraanstaand productiesysteem in te zetten voor producten met een enorme toegevoegde waarde. Zodra blijkt dat paddestoelen de potentie hebben om een goed productieplatform te worden voor farmaceutische eiwitten is het aan te bevelen om in een vroegtijdig stadium een alliantie aan te gaan met R&D bedrijven die geneesmiddelen ontwikkelen. Op deze manier wordt voorkomen dat een bedrijf alleen een rol gaat spelen bij de “productie in opdracht van”, wat een minder profijtelijke *business* is.

2 Begrippenlijst

Antilichaam	Antilichamen (antistoffen) zijn eiwitten die door de mens en andere gewervelde dieren worden geproduceerd als antwoord op het binnendringen van een lichaamsvreemde stof of lichaamsvreemde cellen, antigenen. Ze vormen een belangrijk onderdeel van het immuunsysteem en specifiek gericht op één type antigen. Antilichamen komen voor in het bloed en in de extracellulaire vloeistof in weefsels voor.
Antigen	Een antigen is een (macro)molecuul dat in staat is een immunrespons op te wekken waarbij antistoffen worden aangemaakt. Hiervoor geldt dat een antigen molecuul of zelf voldoende groot moet zijn of, als het klein is, door een ander molecuul, b.v. een eiwit, moet worden gebonden waardoor de combinatie groot genoeg wordt om een antistofreactie op te wekken. Voor een optimale werking zijn vaak combinaties nodig met "hulpstoffen" die het aangeboren immuunsysteem ook stimuleren. Cellen in het dierlijk lichaam bevatten een groot aantal stoffen en uitstekende molecuul-uiteinden op de buitenkant van hun membraan die als antigenen kunnen fungeren. Bekende zijn o.a. de bloedgroepantigenen, maar er zijn er vele andere. Deze antigenen zijn er de oorzaak van dat transplantaties niet tussen iedere donor en ontvanger mogelijk zijn: als geen bijzondere voorzorgen worden getroffen zal een nieuwe cel van een ander vrijwel altijd worden herkend als lichaamsvreemd.
Biopharming	Planten kunnen tegenwoordig zodanig genetisch worden gemodificeerd dat zij farmaceutische middelen produceren zoals vaccins, antilichamen en andere biofarmaceutica. Deze productiewijze, biopharming genaamd, wordt door velen beschouwd als een aantrekkelijke manier om geneesmiddelen te produceren waarvan grote groepen mensen, ook in de Derde Wereld, kunnen profiteren.
Cellijn	Een cellijn bestaat uit een verzameling genetisch gelijke cellen en kan bijna net zo gemakkelijk gekweekt en gehanteerd worden als een bacteriecultuur. Het is dus minder bewerkelijk en kostbaar dan het werken met dieren. Zo is bijvoorbeeld een cellijn ontwikkeld uit ovariumcellen van de Chinese hamster (de CHO cellijn).
COGEM	Commissie Genetische Modificatie (COGEM). De COGEM is een organisatie die de regering adviseert over mogelijke risico's van productie en handelingen met genetische gemodificeerde organismen (ggo's) voor mens en milieu. Tevens informeert de COGEM betrokken ministers over ethisch-maatschappelijke aspecten verbonden aan genetische modificatie. De taken van de COGEM zijn vastgelegd in de Wet Milieubeheer. Het werkveld van de COGEM omvat alle gebieden in de biotechnologie, van landbouw tot medische toepassingen en van laboratoria tot commerciële introductie. Echter de COGEM adviseert niet over voedsel- of veevoederveiligheidsvraagstukken of over mogelijke risico's voor behandelde patiënten bij medische toepassingen.
GMO-status	Genetisch gemodificeerde organismen (genetically modified organisms) worden ingedeeld in risicoklassen. Belangrijke overwegingen daarbij zijn pathogeniciteit voor mensen, besmettelijkheid en mogelijkheid tot behandeling van ziekten. Er wordt bij voorkeur gewerkt met organismen die een zo laag mogelijk risico met zich meebrengen.
Hybridoma cellijnen	Een hybridoma is een cel die ontstaat door celfusie tussen een antilichaam producerende B-lymfocyt en een kankercel (myeloma). Hierdoor ontstaat een cellijn waarvan de cellen allen identiek zijn en waarvan de cellen zich blijven delen.
Recombinant	Recombinant-DNA-techniek is een biotechnologische methode om DNA-fragmenten te wijzigen door inlassing van een vreemd stukje DNA (bijv een menselijke gen) waardoor een nieuwe combinatie (= re-combinatie) ontstaat van met oorspronkelijke DNA. Als een stukje recombinant DNA in cellen van een organisme

Transgeen	<p>wordt binnengebracht ontstaat een recombinant organisme, ook wel genetisch gemodificeerd organisme genoemd.</p> <p>Het DNA van planten, dieren en micro-organismen kan met behulp van transformatietechnieken worden veranderd met lichaamsvreemd (transgeen) DNA. Er kunnen genen worden uitgeschakeld, veranderd, aangeschakeld of toegevoegd. Wanneer een organisme op een dergelijke manier genetisch is veranderd noemen we dat een transgeen organisme.</p>
Vaccin	<p>Een vaccin is een middel dat bij de patiënt een immuunrespons opwekt zonder hem ziek te maken. Hierdoor is de gevaccineerde beter tegen de ziekteverwekker bestand waar het vaccin voor bedoeld is dan zonder de behandeling.</p> <p>Er bestaan verschillende soorten vaccins:</p> <ul style="list-style-type: none"> • vaccins die levende verzwakte organismen bevatten (bv sommige poliovaccins)en • vaccins bestaand uit (delen van) gedode organismen; de laatste kunnen dan weer <ul style="list-style-type: none"> ○ uit de echte ziekteverwekker bereid zijn (bijvoorbeeld difterie) of ○ door middel van genetische manipulatie synthetisch zijn bereid (bijvoorbeeld eetbare vaccins). <p>Vaccins worden in het algemeen intramusculair of subcutaan als een injectie toegediend; sommige levende vaccins kunnen worden geslikt of in een krasje op de huid worden gewreven. Bij de meeste vaccinaties is na een maand een tweede dosis nodig (boosterdosis), soms na nog enige maanden een derde</p>

3 Inleiding

Het is al tientallen jaren mogelijk om met behulp van recombinant DNA technieken organismen lichaamsvreemde moleculen te laten produceren. Een bekend voorbeeld is de productie van menselijk insuline door bacteriën. Het menselijk gen (stukje DNA) voor insuline is hiervoor in een bacterie geplaatst. Door deze genetisch gemodificeerde bacteriën in groter fermentoren te kweken kan op grote schaal en dus goedkoop menselijk insuline worden geproduceerd. In vergelijking met het oude product, gemodificeerd varkensinsuline, veroorzaakt deze insuline geen bijwerkingen.

Het is inmiddels mogelijk om via recombinant DNA technieken lichaamsvreemde eiwitten te laten produceren door een groot aantal verschillende organismen. Voor productie van dergelijke eiwitten worden vaak micro-organismen (bacteriën, schimmels of gisten) gebruikt. Er wordt echter ook gewerkt aan alternatieven voor micro-organismen.

Stier "Herman" van het Leidse biotechnologie bedrijf Pharming is een bekend voorbeeld. Het erfelijk materiaal van deze stier bevat een menselijk gen dat codeert voor lactoferrine. Lactoferrine is een infectie-remmend eiwit. Het lactoferrine gen is ingebracht in de cellen van het embryo dat uitgroeide tot Herman. Dit werd gedaan in de hoop dat vrouwelijke nakomelingen van Herman deze stof in aanzienlijke hoeveelheden in hun melk zouden hebben. De bedoeling was dan om lactoferrine uit de melk te winnen en als geneesmiddel op de markt te brengen voor mensen met een verzwakt immuunsysteem (zoals HIV-patiënten).

Met aanzienlijk meer inspanning wordt sinds de jaren 80 van de vorige eeuw gewerkt aan de mogelijkheden om planten zodanig genetisch te modificeren dat zij farmaceutische middelen produceren zoals vaccins, antilichamen en biofarmaceutica. Deze productiewijze wordt biopharming genaamd.

Het doel van voorliggende studie is het in kaart brengen van de randvoorwaarden om paddestoelen te gebruiken als productieplatform voor farmaceutische eiwitten. We zullen ons daarbij eerst richten op technische aspecten van een dergelijke productiemethode. Daarna willen we kijken naar de markt en de economische haalbaarheid voor een dergelijke productiemethode. Vervolgens willen we de maatschappelijke en juridische voorwaarden voor een dergelijke productiemethode in kaart brengen: hoe kijkt de maatschappij aan tegen een dergelijk productiesysteem en wat is de relevante wetgeving op dit gebied. Tot slot willen we inzichtelijk maken in hoeverre de productie van genetisch gemodificeerde paddestoelen voor de farmaceutische industrie afwijkt van de productie van paddestoelen voor menselijke consumptie.

3.1 Productie van eiwitten m.b.v. genetisch gemodificeerde organismen.

Om een goed inzicht te kunnen geven in de mogelijkheden en beperkingen die verbonden zijn aan de productie van eiwitten door genetisch gemodificeerde organismen, is het noodzakelijk om in grote lijnen te bespreken hoe eiwitten door organismen gemaakt worden. Aangezien we eiwitten willen produceren voor gebruik in het zoogdier "mens", is het daarbij verstandig om te kijken hoe eiwitten in zoogdiercellen wordt geproduceerd.

Eiwitmoleculen bestaan uit een snoer van met elkaar verbonden aminozuur-moleculen. Er zijn twintig verschillende aminozuren beschikbaar voor het maken van eiwitten. De volgorde waarin de aminozuren op het snoer wordt geregen, is vastgelegd in het erfelijk materiaal (het DNA) dat in de kern van de cel ligt opgeslagen. Het DNA vormt dus een bouwtekening voor het maken van eiwitten.

De snoer van aminozuren (ofwel het eiwitmolecuul) wordt in de cel aaneengeregen en opgevouwen tot de juiste ruimtelijke structuur. Om dit vouwingsproces te begeleiden en te vergemakkelijken maakt een zoogdiercel gebruik van een aantal gespecialiseerde "vouw-eiwitten" (chaperones).

Naast het correct vouwen van een eiwitmolecuul kunnen er nog een aantal andere bewerkingen van het oppervlak van het eiwitmolecuul plaatsvinden. Een van de belangrijkste daarvan is de glycosylering van een eiwit. Glycosylering houdt in dat er suikerstructuren aan het eiwit worden gekoppeld. Deze suikerstructuren kunnen grote effecten hebben op de biologische functie van het eiwit. De suikerketens kunnen bijvoorbeeld effecten hebben op het correct vouwen van het eiwitmolecuul, op de mogelijkheid van het eiwit om te

binden aan andere eiwitten, op de stabiliteit van het eiwitmolecuul, op de snelheid waarmee het eiwit uit de bloedbaan wordt verwijderd of op het transport van het eiwit naar specifieke weefsels in het lichaam. Verschillende eiwitten worden verschillend geglycosyleerd. Sommige eiwitten (zoals insuline) worden niet geglycosyleerd.

Om een organisme een speciaal door ons gewenst eiwit te laten produceren, moet het genetisch gemodificeerd worden. Dat wil zeggen dat er een stukje DNA, de bouwtekening voor het eiwit, ingebouwd moet worden dat codeert voor het betreffende eiwit. De cellen van het organisme moeten vervolgens aan het werk om een eiwit te produceren. Deze techniek werkt nu al voor bacteriën, gisten, losse zoogdiercellen, dieren (insecten, koeien, schapen, konijnen), losse plantecellen en hele planten. Er blijken echter verschillen te bestaan in de manier waarop deze verschillende groepen organismen met de bouwtekening omgaan. Bacteriën zijn bijvoorbeeld niet in staat om een glycosylering uit te voeren. Gisten kunnen wel glycosyleren, maar maken andere (en daardoor onbruikbare) suikerstructuren. Zoogdieren kunnen wel de glycosylering uitvoeren die voor menselijke toepassingen nodig is. Omdat niet elk genetisch gemodificeerd organisme is in staat om eiwitten correct te vouwen of om de juiste suikers aan het eiwit te hangen hebben de geproduceerde eiwitten een mindere kwaliteit of zijn zelfs niet werkzaam.

Welk organisme gekozen wordt om een productiesysteem te ontwikkelen is dus erg belangrijk. Niet alleen hangt de kwaliteit van het product hiervan af maar ook andere factoren zijn belangrijk als een eiwit op commerciële schaal geproduceerd moet worden. Dit zijn productiekosten, de aanlooptijd die nodig is om de productie op te kunnen starten, de mogelijkheid om productieomvang op te schalen en het risico dat het product verontreinigd raakt met ziektenverwekkers.

Tabel 1 geeft een overzicht van de verschillen tussen de diverse productiesystemen die gebruikt kunnen worden voor de aanmaak van recombinante eiwitten. Ieder productiesysteem blijkt zijn voor- en tegens te kennen. Zoogdiercellijnen, gisten en bacteriën worden momenteel op industriële schaal gebruikt voor de

Stelsel	Productiekosten	Productieduur	Mogelijkheid tot opschaling	Product kwaliteit	Glycosylering	Risico op besmetting	Kosten bewaarderbaarheid
Bacteriën	Laag	Kort	Groot	Laag	Geen	Endotoxinen	Gemiddeld
Gist	Middelmatig	Middelmatig	Groot	Middelmatig	Incorrect	Laag risico	Gemiddeld
Zoogdiercellijn	Hoog	Lang	Erg klein	Erg hoog	Correct	Virussen, prionen en oncogene DNA	Duur
Transgene dieren	Hoog	Erg lang	Klein	Erg hoog	Correct	Virussen, prionen en oncogene DNA	Duur
Plantcellijn	Middelmatig	Middelmatig	Middelmatig	Hoog	Kleine verschillen	Laag risico	Gemiddeld
Transgene planten	Erg laag	Lang	Erg hoog	Hoog	Kleine verschillen	Laag risico	Goedkoop

Tabel 1. Vergelijking van productiesystemen voor recombinante eiwitten voor gebruik als geneesmiddel (aangepast naar Ma *et al.*, 2003).

productie van recombinante eiwitten. Transgene dieren, plantencellijnen en transgene planten worden bestudeerd als alternatieve productiesystemen. Vooral een productiesysteem van transgene planten kent een zeer veelbelovende combinatie van eigenschappen. De kansen die de teelt van transgene planten t.b.v. de productie van recombinante eiwitten kunnen bieden voor de Nederlandse Tuinbouwsector werden al in 2002 geïnventariseerd (Creemers-Molenaar *et al.*, 2002). Over de mogelijkheden en voorwaarden waaronder transgene planten door de Canadese agro-industrie zouden kunnen worden geteeld verscheen in 2004 een overzichtsrapport (Arcand & Arnison, 2004).

3.2 Welke farmaceutische eiwitten kunnen m.b.v. genetisch gemodificeerde organismen geproduceerd worden?

In principe kan een heel breed scala aan verschillende eiwitten m.b.v. genetisch gemodificeerde organismen worden geproduceerd. De meeste interesse bestaat echter voor de productie van antilichamen (Biotechnology Industry Organization, geciteerd in Food & Drug Letter (2003) 668 p.2). Antilichamen zijn eiwitten die door cellen van het immuunsysteem worden geproduceerd. Deze eiwitten zijn in staat om ziekteverwekkers zoals virussen en bacteriën te herkennen en er aan te binden. Hierdoor worden de ziekteverwekkers als het ware “gelabeld”. Aan het label kunnen andere cellen van het immuunsysteem zien welke cellen/deeltjes opgeruimd moeten worden. Ook kankercellen kunnen door antilichamen worden herkend en door het immuunsysteem worden opgeruimd.

Het vermogen om ziekteverwekkende deeltjes en zieke cellen te herkennen kan op tweeërlei wijze in de geneeskunde worden gebruikt. Enerzijds kun je van antilichamen gebruik maken om te proberen iemand te genezen, bijvoorbeeld door injectie van antilichamen tegen kanker (therapeutische toepassing). Anderzijds kun je van antilichamen gebruik maken om er achter te komen wat iemand mankeert. Antilichamen kunnen zodanig ontworpen worden dat ze bijvoorbeeld maar één type virus herkennen. In een diagnostische test kun je van een dergelijk antilichaam gebruik maken om te kijken met welk virus iemand is geïnfecteerd (diagnostische toepassing).

Antilichamen worden momenteel geproduceerd door genetisch gemodificeerde hybridoma-cellijnen (die bijvoorbeeld afkomstig kunnen zijn van de Chinese hamster) te kweken in enorme fermentoren. Daarnaast wordt een nieuwe techniek gebruikt (faag display) waarin met behulp van bacterievirussen specifieke antilichamen worden gemaakt (voor een begrijpelijke uitleg van deze fascinerende techniek zie: <http://www.kennislink.nl/web/show?id=120036>).

Naast de antilichamen bestaat nog een hele reeks aan andere eiwitten met medische toepassingen. Daarbij moet men denken aan groeihormoon, interferon (voor behandeling van hepatitis B en C), bloedstollingsremmers, EPO (erythropoëetine, bij bloedarmoede, stimuleert vorming rode bloedcellen), en vele anderen. Traditioneel worden dergelijke farmaceutische eiwitten geproduceerd via extractie uit dierlijke of humane weefsels. Momenteel wordt verreweg de grootste gewichtshoeveelheid aan farmaceutische eiwitten (ca. 99% van de jaarlijkse totaalproductie van ruim 1 miljoen kg eiwit) gewonnen uit natuurlijke bronnen. Daarvan wordt een groot deel, voornamelijk albumine en gammaglobuline gezuiverd uit menselijk bloed, een klein deel (met name pancreatine) uit dierlijke bron en een verwaarloosbaar deel uit plantaardig weefsel. In 1999 ging het om een totaal van 38 verschillende eiwitten, waarvan er 18 uit menselijk bloed en urine, 18 uit dierlijk weefsel en 2 uit planten komen (Creemers-Molenaar *et al.*, 2002). De extractie en zuivering van deze eiwitten uit hun natuurlijke bronnen (zoals bloed of organen) kan echter moeilijk en duur zijn. Daarnaast zijn er risico's verbonden aan het gebruik van eiwitten uit deze bronnen als geneesmiddel. Veel mensen hebben bijvoorbeeld onbedoeld een ziekte opgelopen door het gebruik van virus besmette bloedproducten of hormonen.

Een totaal andere mogelijkheid is de productie van vaccins. Zoals hierboven al is opgemerkt kan het immuunsysteem via antilichamen een reeks aan bacteriën en virussen herkennen. Het antilichaam bindt daarbij aan eiwitten die door de bacterie of het virus worden geproduceerd en die “uniek” zijn voor dat organisme. Vaccinatie wordt al decennia lang toegepast en het meest bekende voorbeeld is dat waarin een verzwakte vorm van de ziekteverwekker wordt geïnjecteerd. Het immuunsysteem herkent de ziekteverwekker en bouwt een afweerreactie op. Als de afweerreactie voorbij is blijven enkele cellen met een “immunologisch geheugen” achter. Deze cellen zorgen er voor dat bij een hernieuwde infectie met de ziekteverwekker het immuunsysteem sneller en effectiever kan reageren.

Door eiwitfragmenten van een ziekteverwekker te laten produceren door een genetisch gemodificeerd organisme, kan men grote hoeveelheden antigenen verkrijgen. Deze stimuleren de afweer maar zijn zelf onschadelijk.

Indien men het antigen door een genetisch gemodificeerd voedselgewas zou laten produceren bestaat in principe de mogelijkheid om eetbare vaccins te maken. Dergelijke vaccins kunnen grote voordelen bieden ten opzichte van de traditionele vaccins. Eetbare vaccins kunnen waarschijnlijk veel goedkoper geproduceerd worden. Voor traditionele vaccins is een dure kweek van de ziekteverwekker in een fermentor nodig, gevolgd door een zuivering. Voor eetbare vaccins is alleen teelt van het transgene gewas nodig.

De traditionele vaccins moeten vanaf moment van productie tot moment van toediening voortdurend koel bewaard worden. Vooral in ontwikkelingslanden waar vaccinaties in het binnenland moeten worden uitgevoerd kan dat een groot probleem vormen. Een eetbare vaccin kan bij omgevingstemperatuur worden opgeslagen en vervoerd. Een derde voordeel is het gemak waarmee een eetbaar vaccin kan worden toegediend. Het feit dat niet geïnjecteerd hoeft te worden maakt voor de patient een groot verschil. De ontwikkeling van farmaceutische eiwitten in diverse productiesystemen is momenteel in volle gang.

Product	Bedrijf	Gebruikt organisme
Bloedstollingsfactoren VII, VIII en IX	Novo-Nordisk/Bayer/Centeon	BHK cellen
	Genetics Baxter/Centeon/Wyeth	CHO cellen
Calcitonine	Unigene	E. coli (bacterie)/CHO cellen
DNase (cystic fibrosis)	Roche	CHO cellen
Erythropoietine (EPO)	Janssen-Cilag/Amgen/Boehringer	CHO cellen
Darbepoietine	Amgen	CHO cellen
Follikel stimulerend hormone (FSH)	Serono/Organon	CHO cellen
Luteïniserend hormoon (LH)	Serono	CHO cellen
Gonadotropine	Serono	CHO cellen
Glucagon	Novo-Nordisk	S. cerevisiae (bakkersgist)
Glucocerebrosidase (ziekte van Gaucher)	Genzyme	CHO cellen
Groeihormonen (somatotropines)	Pharmacia & Upjohn/Lilly/Novo-Nordisk/Ferring/Genentech	E. coli (bacterie)
	Serono/Bio-Technology General Corp	CHO cellen
	Serono	Muizencellijn
Eutropine (groeihormoon derivaat)	LG Chemical	S. cerevisiae (bakkersgist)
Groefactoren (GCSF, GMCSF)	Novartis/Essex/Amgen/Roche	E. coli (bacterie)
	Chugai Pharmaceuticals	CHO cellen
Platelet derived growth factor (PDGF)	Janssen-Cilag	S. cerevisiae (bakkersgist)
PDGF-antagonist	ZymoGenetics	S. cerevisiae (bakkersgist)
Hepatitis B vaccin	GlaxoSmithKline	S. cerevisiae (bakkersgist)
	Rhein-Biotech	H. polymorpha (gist-soort)
Hirudin (stollingsremmer)	Aventis/Novartis	S. cerevisiae (bakkersgist)
Insuline	Bio-Technology General Corp	E. coli (bacterie)
	Novo-Nordisk	S. cerevisiae (bakkersgist)
Interferon-alfa	Roche/Essex/Yamanouchi	E. coli (bacterie)
Interferon-beta	Schering	E. coli (bacterie)
	Biogen/Serono	CHO cellen
Interferon-gamma	Amgen/Boehringer	E. coli (bacterie)
Oprelvekin (interleukine 11 antagonist)	Wyeth	Humane cellijn ROMI 8866
OP-1 (osteogenic, neuroprotective factor)	Curis/Striker	E. coli (bacterie)
Plasminogeen activator	Genentech/Roche/Boehringer	CHO cellen
Stam cel factor	Amgen	CHO cellen
Tumor necrose factor	Boehringer	E. coli (bacterie)

Tabel 2. Overzicht van in 2004 commercieel beschikbare farmaceutische eiwitten en de genetisch gemodificeerde organismen waarmee ze geproduceerd worden (overgenomen van Schmidt, 2004). De farmaceutica zijn min of meer geordend naar toepassingsgebied. Antilichamen (in de meeste gevallen geproduceerd met hybridoma-cellijnen) zijn niet opgenomen in de lijst. BHK staat voor cellen die oorspronkelijk uit baby hamster kidney (nier) zijn geïsoleerd. CHO staat voor cellen die oorspronkelijk uit de baarmoeder van Chinese hamster werden geïsoleerd.

Diverse auteurs hebben in de wetenschappelijke literatuur overzichten gepubliceerd van in ontwikkeling zijnde geneesmiddelen. Tabel 2 geeft een overzicht van momenteel commercieel beschikbare farmaceutische eiwitten die m.b.v. genetisch gemodificeerde organismen worden geproduceerd. Walsh (2003) heeft in 2003 het aantal farmaceutische eiwitten geïnventariseerd die een toelating voor gebruik als geneesmiddel in de Europese Unie hadden en kwam op een totaal aantal van 88 verschillende producten. Hiervan waren 6 producten bedoeld voor gebruik als diergeneesmiddel. Al deze farmaceutische eiwitten worden geproduceerd in fermentoren. Verreweg de meeste van deze eiwitten werden

geproduceerd door transgene *Escherichia coli* (een darmbacterie), *Saccharomyces cerevisiae* (bakkersgist) en zoogdiercellijnen (oorspronkelijk afkomstig uit hamsters).

3.3 Ontwikkeling van de markt voor farmaceutische eiwitten.

Men verwacht dat de markt voor farmaceutische eiwitten zich in de komende jaren flink zal uitbreiden (Arcand & Arnison, 2004). Men voorspelt voor 2010 een omzet van 125 miljard dollar met een jaarlijkse groei van 15-20%. Vele nieuwe producten zijn in ontwikkeling. Afhankelijk van de bron zijn 300 tot 500 nieuwe producten op basis van recombinante eiwitten in een vergevorderd stadium van ontwikkeling (Steiner, 2005; Walsh, 2000, 2003). Volgens de Biotechnology Industry Organization (BIO, geciteerd in Food & Drug Letter (2003) 668 p.2) zijn er zelfs meer dan 1000 op eiwit gebaseerd geneesmiddelen in ontwikkeling. Het merendeel van deze eiwitten zijn monoklonale antilichamen. Van deze monoklonale antilichamen is het merendeel geschikt voor kankertherapie, gevolgd door antilichamen met ontstekingsremmende werking en antilichamen ter bestrijding van infecties.

Men voorspelt dat de vraag naar monoklonale antilichamen ter bestrijding van kanker het hoogst zal zijn. Er zijn naar schatting 2.6 miljoen kankerpatiënten in de G7 landen. Men gaat uit dat 82% van deze patiënten met monoklonale antilichamen behandeld kunnen worden. Naar schatting is daar per patiënt 6.5 gram per jaar voor nodig. Uitgaande van deze gegevens kan berekend worden dat er een vraag naar 14000 kg aan verschillende monoklonale antilichamen per jaar bestaat voor de bestrijding van kanker. Gerekend aan de huidige prijs van ongeveer \$6000 per gram betreft het een markt van \$84 miljard.

Voor de behandeling van kanker zijn momenteel 8 monoklonale antilichamen op de markt. Een aantal van 68 monoklonale antilichamen zit momenteel in de klinische testfase. Uitgaande dat 40% van deze antilichamen deze testfase met succes afsluit, kunnen in de komende jaren nog 27 extra monoklonale antilichamen verwacht worden. Een aantal van 75 monoklonale antilichamen bevindt zich nog in de experimentele en preklinische test fase. Uitgaande van een succespercentage van 10% zijn hier nog 8 aanvullende monoklonale antilichamen van te verwachten. In de toekomst zullen dus waarschijnlijk voor de behandeling van kanker 43 verschillende monoklonale antilichamen beschikbaar zijn. Uitgaande van een behoefte van 14000 kg per jaar (zie boven) is er in de toekomst gemiddeld een jaarlijkse behoefte aan ongeveer 325 kg per monoklonaal antilichaam (Steiner 2005).

Echter, de vraag naar antilichamen is product specifiek en erg variabel (Steiner 2005). De vraag naar de monoklonale antilichamen Enbrel (ter behandeling van reumatoïde artritis), Rituxan (ter behandeling van Non-Hodgkinlymfomen) en Remicade (tegen ziekte van Crohn) is het hoogst (300-500 kg/jaar). De totale omzet aan monoklonale antilichamen in 2004 bedroeg 1800 kg/jaar met een waarde van \$13 miljard.

(Het ligt in de lijn der verwachting dat naarmate de productietechnieken verbeteren de prijs per gram zal dalen. Bij een productieschaal van 1000 kg per jaar ligt de prijs op ongeveer \$1500 per gram).

3.4 Problemen die bij het bedienen van de markt verwacht worden.

De productie van recombinante eiwitten krijgt naar alle verwachting in de toekomst te maken met een tweetal problemen die te maken hebben met de gebruikte productiesystemen; een gebrek aan productiecapaciteit en de hoge prijzen van de producten (Arcand & Arnison, 2004).

3.4.1 Voorspelling van tekorten in productie capaciteit.

Momenteel wordt het grootste deel van alle recombinante eiwitten (waaronder monoklonale antilichamen) geproduceerd in zoogdiercellen die in grote fermentoren worden gekweekt (Walsh, 2003; Wurm, 2004). De zoogdiercellen worden genetisch gemodificeerd met het gen dat codeert voor het te maken product. Deze cellen scheiden het recombinant eiwit uit in de kweekvloeistof tot een concentratie die in uitzonderlijke gevallen op kan lopen tot 4.7 g/L (Wurm, 2004). Voor monoklonale antilichamen ligt het gemiddelde productieniveau op 600 mg/L (Arcand & Arnison, 2004).

In hoeverre de huidige fermentorsystemen een tekort aan productie capaciteit gaan vertonen hangt van een aantal factoren af. Allereerst heeft het aantal verschillende antilichamen dat in de toekomst voor

therapeutisch gebruik geproduceerd gaat worden een invloed. Als veel producten tegelijkertijd een toelating verkrijgen kan een tekort aan productiecapaciteit ontstaan. Een andere factor die invloed heeft is de productie capaciteit van de gebruikte cellijnen. Wurm (2004) stelt dat er nog voldoende mogelijkheden zijn om de productiviteit van zoogdiercellen te verbeteren. Hierdoor zal het gebrek aan productie capaciteit minder groot zijn. Daarnaast hebben een aantal bedrijven het voornemen om hun productiecapaciteit uit te breiden met meerdere fermentoren (Arcand & Arnison, 2004).

Velen zijn echter van mening dat de toename van de productiecapaciteit erg laag zal zijn en dat de bestaande infrastructuur niet toereikend zal zijn om aan de toekomstige vraag te voldoen. Arcand & Arnison (2004) citeren de website van BIO (<http://www.bio.org/healthcare/old/pharmaceutical/pmp/factsheet3.asp>) met Enbrel als voorbeeld van een recombinant eiwit met een hogere vraag dan aanbod.

Enbrel werd eind 1998 geïntroduceerd door Immunex Corporation (in juli 2002 overgenomen door Amgen) en werd een van de meest succesvolle uit biotechnologie voortgekomen behandelingen. Enbrel was ontworpen voor de behandeling van patiënten met middelmatige tot zware reumatoïde artritis, een pijnlijke ontsteking van gewrichten met alleen al in de VS meer dan twee miljoen patiënten. In 2002 werd Enbrel door 82000 patiënten in the VS gebruikt voor de behandeling van reumatoïde artritis.

Enbrel is een genetische kopie van enkele ontstekingsremmende eiwitten. Deze eiwitten worden geproduceerd in bioreactoren met hamster cellen. De resultaten van een behandeling met Enbrel waren zo goed dat de vraag naar het product explosief steeg, ondanks de kosten voor de patiënten (\$1,000 tot \$1,200 per maand). Er ontstond een productietekort in het begin van 2001 en rond maart 2002 was inmiddels een wachtlijst van 13000 patiënten ontstaan.

Het bleek heel moeilijk om het productietekort te voorkomen. Enerzijds had men de enorme toename van de vraag niet zien aankomen. Anderzijds gaat er veel geld en tijd zitten in het bouwen van een productiefaciliteit (naar schatting \$450 miljoen en 4-7 jaar voor een productiefaciliteit van 500 kg per jaar (Teli & Timko, 2004)). Een dergelijk financieel risico gaat men niet aan als de vraag nog niet duidelijk is. Analisten voorspellen dan ook dat dergelijke tekorten aan biotech geneesmiddelen vaker voor kunnen komen.

3.4.2 Te hoge prijzen.

Het tweede probleem betreft de hoge prijzen van de recombinante eiwitten. Een belangrijke component in de totstandkoming van de prijs zijn de productiekosten. Bij productie van farmaceutische eiwitten in dierlijke cellijnen variëren de productiekosten van \$300 tot \$1000 per gram ongezuiverd bulkproduct. Dit betekent dat voor de farmaceutische eiwitten de productiekosten ongeveer 15% van de verkoopprijs bedragen. Ter vergelijking; voor geneesmiddelen uit de fijnchemische industrie is dat 3 tot 5%.

Door deze hoge verkoopprijzen valt te verwachten dat voor de meeste landen zal gelden dat de regeringen en ziektenkosten verzekeringsmaatschappijen niet de financiële middelen zullen hebben om tegen de huidige prijzen op grote schaal recombinante eiwitten als geneesmiddelen aan te schaffen. Omschakelen naar goedkopere productiesystemen is een mogelijkheid om de prijs te verlagen. Een voorbeeld is de productie van eiwitten in recombinante planten (zie ook Tabel 1). Niet elk eiwit kan zomaar in een ander productiesysteem gemaakt worden. Dat komt doordat niet elk organisme in staat is om een eiwit correct te vouwen of er de juiste suikers aan te hangen. Daardoor kunnen onverwachte en ongewenste effecten ontstaan, zoals antigene activiteit. Om die reden wordt een eiwit, gemaakt in een nieuwe productiesysteem, beschouwd als een nieuw geneesmiddel en moet dus het preklinische en klinische onderzoek opnieuw worden uitgevoerd. Dat houdt in dat kostbaar onderzoek over een periode van ongeveer 10 jaar herhaald moet worden.

3.5 Het ideale systeem voor de productie van farmaceutische eiwitten?

Zoals in paragraaf 3.4 duidelijk is geworden, dient dus al bij het ontwikkelen van het farmaceutische eiwit rekening gehouden te worden met het toekomstige productiesysteem. Dat productiesysteem moet goedkoop zijn, moet zich naar behoefte gemakkelijk en zonder exorbitante kosten snel laten opschalen en moet veilige eiwitten van een hoge kwaliteit kunnen produceren.

Uit de vergelijking van productiesystemen zoals die is weergegeven in Tabel 1, blijkt dat productie van

farmaceutische eiwitten in planten de meeste gunstige eigenschappen in zich verenigt. Er bestaat dus een redelijke kans dat farmaceutische industrie voor de ontwikkeling van toekomstige producten gebruik zal maken van planten als productie-organismen. Op dit moment bevinden zich 3 vaccins die in planten zijn geproduceerd in de klinische testfasen.

3.5.1 Productie van farmaceutische eiwitten in planten.

Vooraf het gebruik van transgene landbouwgewassen biedt voordelen met betrekking tot de praktische uitvoering, de kosten en de kwaliteit en risico's van het geleverde product. Wat men als het grote voordeel van de productie van farmaceutische eiwitten in planten ziet, is de gemakkelijke en snelle opschaling van de productie als de vraag in korte tijd explosief toeneemt (Enbrell). Het is vrij simpel en zonder exorbitante kosten te regelen dat meer hectaren landbouwgrond met transgene planten worden ingezaaid.

Ter vergelijking, het duurt vier tot zeven jaar en kost omstreeks \$450 miljoen om een faciliteit te bouwen voor een jaarlijkse productie van 500 kg antilichamen in dierlijke cellen (volgens een woordvoerder van BIO (geciteerd in the Food & Drug Letter (2003) 668 p. 2) zelfs \$500 tot \$700 miljoen). Dezelfde hoeveelheid product zou geproduceerd kunnen worden in mais op ongeveer 200 hectare landbouwgrond en gezuiverd in een fabriek van \$80 miljoen die in 3 tot 5 jaar operationeel zou kunnen zijn. Afhankelijk van de productieschaal zouden de kosten van monoklonale antilichamen kunnen dalen van \$350-\$1200 (dierlijke cellen) naar \$80-\$250 (mais) (Teli & Timko, 2004).

Een ander groot voordeel van expressie van recombinante eiwitten in transgene planten is de veiligheid van het geproduceerde product. Bij gebruik van planten is er geen risico van de aanwezigheid van prionen, virussen of endotoxinen in het eindproduct.

De aantrekkelijkheid van transgene planten als productiesysteem van transgene eiwitten (Plant derived Pharmaceuticals) komt ook tot uiting in het aantal recent verschenen overzichtsartikelen in de wetenschappelijke pers over dit onderwerp (Fisher *et al.*, 2004; Horn *et al.*, 2004; Howard & Hood, 2005; Ma *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2005; Schmidt 2004; Teli & Timko, 2004, Twyman *et al.*, 2003). Het gebruik van transgene planten (en dieren) voor de productie van recombinante eiwitten wordt in deze artikelen vaak aangeduid als "molecular farming", "biopharming" of "pharming". De met transgene planten verbonden industrie staat nog in de kinderschoenen en omvat een beperkt aantal bedrijven. De belangrijkste bedrijven die zich bezighouden met ofwel ontwikkeling ofwel het uitbaten van molecular farming staan weergegeven in Tabel 3.

Arcand & Arnison (2004) berekenen dat als de totale wereldproductie van recombinante eiwitten in planten in Canada zou plaatsvinden, daarvoor in 2013 in totaal 16000 hectare landbouwgrond voor nodig zou zijn. Deze schatting hebben zij bewust gebaseerd op heel optimistische uitgangspunten om de grootst mogelijke omvang in te schatten. Aangezien Canada een landbouwareaal van 67.5 miljoen hectare heeft, zou dus 0.02% van het landbouwareaal gebruikt worden voor de productie van farmaceutische eiwitten. Vergeleken met het areaal dat gebruikt wordt voor de teelt van transgene gewassen voor gebruik in voedingsstoffen en/of als veevoer gaat het dus om een zéér beperkt areaal.

Er kleven echter ook bezwaren aan het gebruik van transgene landbouwgewassen voor de productie van geneesmiddelen. Een uitgebreide afweging van de voor- en nadelen van de productie van farmaceutische eiwitten in transgene planten vindt U in hoofdstuk 4. Het voornaamste bezwaar van de productie van farmaceutische eiwitten in landbouwgewassen is het risico op besmetting van de voedselketen. Dit kan enerzijds gebeuren door het vermengen van "farmaceutisch" gewas met "voeding" gewas. Anderzijds kunnen de "lichaamsvreemde genen" door uitkruising ontsnappen uit het "farmaceutisch" gewas. Een manier om dit te voorkomen is een strikte scheiding tussen de voedselproductieketen en de productieketen voor het farmaceutisch eiwit. Daarnaast kan teelt in een afgesloten ruimte (fysieke inperking) voorkomen dat erfelijk materiaal in de natuur vermengd raakt met "lichaamsvreemde genen".

Zoals de haalbaarheidsstudie van Creemers-Molenaar *et al.* (2002) aan geeft biedt teelt van "farmaceutisch" gewas in plantenkassen in Nederland goede mogelijkheden.

3.5.2 Productie van farmaceutische eiwitten in paddestoelen.

Analoog aan de teelt van transgene planten in kassen, zouden farmaceutische eiwitten ook in paddestoelen kunnen worden geproduceerd. Paddestoelen (champignons in het bijzonder) hebben op het eerste gezicht een aantal pluspunten voor gebruik als organisme waarin farmaceutische eiwitten kunnen worden gemaakt (Romaine, 2005).

Paddestoelen worden gedurende het gehele jaar in een gesloten systeem geteeld. Na de oogst worden kweekcellen met stoom behandeld zodat er geen levend materiaal meer aanwezig is. Een ideaal systeem dus voor de productie van medicijnen via transgene biomassa onder “ingeperkt gebruik” condities. “Ingeperkt gebruik” condities voorkomen dat transgene biomassa in het milieu wordt geïntroduceerd. Om het risico van een onbedoelde introductie van genetisch gemodificeerd materiaal in het milieu verder te beperken zou gebruik kunnen worden gemaakt van sporenloze rassen (zie Figuur 4).

Bedrijf/organisatie	Land van herkomst
Agrenvec	Spanje
Agrisoma Biosciences Inc.	Canada
AltaGen Bioscience	USA
Bayer CropScience, BioScience	
Bevo Farms	Canada
Center for Genetic Engineering and Biotechnology	Cuba
Centocor	USA/Nederland
Chlorogen	USA
Chromatin	USA
Controlled Pharming Ventures LLC	USA
CropTech	Australië
Dow AgroSciences	USA
Dow BioPharma	USA
Epicyte	USA
ERA Plantech	Spanje
Fraunhofer IME	Duitsland
Fraunhofer USA	USA
Geneart	Duitsland
Greenovation Biotech	Duitsland
Icon Genetics	Duitsland
Large Scale Biology Corporation	USA
LevTech	USA
Maltagen	Duitsland
Medicago	Canada
Meristem Therapeutics	Frankrijk
Monsanto Protein Technologies	USA
Nexgen	Korea
ORF Genetics	IJsland
Phytomedics	USA
Planet Biotechnology	USA
Plant Research International	Nederland
Plantigen	Canada
Planton	Duitsland
Prodigene	USA
Saponin Inc.	Canada
SemBioSys	Canada
Syngenta	Zwitserland
Unicrop	Finland

Tabel 3. Bedrijven en organisaties die betrokken zijn bij ontwikkeling ofwel het uitbaten van transgene planten als productiesysteem voor farmaceutische eiwitten. Daarnaast zijn nog tal van universitaire onderzoeksgroepen werkzaam op dit veld.

Een tweede pluspunt van paddestoelen, en in het bijzonder de champignon, is dat ze in staat zijn in een relatief korte tijd een enorme hoeveelheid biomassa te produceren. Zhang *et al.* (2005) schatten dat de biomassa output van champignon 5.5 keer hoger is dan die van tabak.

Een derde voordeel is dat paddestoelen vegetatief worden vermeerderd. Ten opzichte van planten heeft dit het voordeel dat het niet nodig is om eerst zaad te produceren voordat een grootschalige teelt kan worden uitgevoerd. Mycelium van genetisch gemodificeerde paddestoelen kan in principe voor onbeperkte tijd in vloeibare stikstof worden opgeslagen en naar behoefte worden ontdooid.

Een vierde voordeel wordt geboden door de snelle productiecycli van paddestoelen. Er worden tot 7 teelten per jaar uitgevoerd. Dat betekent een gelijkmatiger productie jaarrond en men kan, indien nodig, tussentijds sneller op verandering in de marktbehoefte inspelen. De productiecycli zou eventueel nog verder kunnen worden verkort door de paddestoelen meteen op het broed te laten produceren. Voor een teelt als voedingsgewas is een dergelijke teeltmethode veel te duur, maar voor een teelt van biomassa voor farmaceutische toepassing zou de afweging van kosten en baten anders kunnen uitvallen. Omdat de drager in broed (graan) volledig gesteriliseerd is wordt dit als een extra voordeel gezien. Het is zelfs in principe mogelijk om het doorgegroeide substraat te gebruiken om het beoogde eiwit/medicijn te produceren. Dit heeft uiteraard als voordeel dat vermenging/verwisseling met de voedselketen niet snel zal plaatsvinden. Dit kan ook worden bereikt door paddestoel-soorten te gebruiken die niet gegeten worden maar wel in de huidige productiesystemen te produceren zijn.

Als vijfde voordeel kan genoemd worden dat er relatief efficiënte methoden zijn om genetisch gemodificeerd mycelium te maken. Hierdoor is het in principe mogelijk om in relatief korte tijd een genetisch gemodificeerd mycelium voor de productie van farmaceutische eiwitten te maken. Onderzoek naar deze mogelijkheid is op meer dan één plaats in de wereld lopende (Velcko et al., 2004, Zhang et al., 2004). Samengevat kan worden gezegd dat het gebruik van genetisch gemodificeerde paddestoelen voor de productie van farmaceutische eiwitten naast alle voordelen van plant-gebaseerde systemen een aantal unieke extra voordelen biedt.

Deze toekomstverkenning is uitgevoerd om de aantrekkelijkheid van paddestoelen als productieplatform beter in kaart te brengen.

4 Ethische en maatschappelijke aspecten van de teelt van farmaceutische gewassen.

Op het moment dat dit rapport geschreven wordt bestaat de teelt van farmaceutische gewassen in Nederland alleen nog maar uit een experimentele teelten bij onderzoeksgroepen. Ook in andere Europese landen worden op dit moment geen genetisch gemodificeerde gewassen voor de markt geteeld. Tot eind 2001 was er binnen de EU een moratorium op de milieutoelating van genetisch gemodificeerde organismen. Elders in de wereld staan de ontwikkelingen op dit gebied echter niet stil. In de Verenigde Staten is de ontwikkeling van dergelijke teelten al in volle gang. Nederland zal naar verwachting vroeg of laat met teelt van farmaceutische gewassen of met de producten van deze teelt worden geconfronteerd.

De Commissie Genetisch Modificatie (COGEM).

De COGEM is een organisatie die de regering adviseert over mogelijke risico's van productie en handelingen met genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) voor mens en milieu. Tevens informeert de COGEM betrokken ministers over ethisch-maatschappelijke aspecten verbonden aan genetische modificatie. De taken van de COGEM zijn vastgelegd in de Wet Milieubeheer. Het werkveld van de COGEM omvat alle gebieden in de biotechnologie, van landbouw tot medische toepassingen en van laboratoria tot commerciële introductie. (voor meer informatie zie <http://www.cogem.net/>).

De houding van de Nederlandse samenleving ten opzichte van de teelt van genetisch gemodificeerde gewassen is in het algemeen negatief. Bij sommige groepen binnen de samenleving is er een hoge weerstand die zich uit in het met enige regelmaat vernietigen van proefvelden met genetisch gemodificeerde gewassen. Binnen de andere landen van de Europese Unie bestaat zo mogelijk nog meer weerstand tegen de teelt van genetisch gemodificeerde gewassen (Eurobarometers 52.1 (2000) and 224 (2005)) Daar staat tegenover dat er veel meer waardering bestaat voor het gebruik van genetisch gemodificeerde organismen ten behoeve van onderzoek voor medicinale toepassingen (Eurobarometers 52.1 (2000)). De ontwikkeling van farmaceutische gewassen bevindt zich dus op het snijvlak van twee trends in de toepassing van gen-technologie, op de productie van voedsel en op de productie van geneesmiddelen. De COGEM (Commissie Genetische Modificatie) heeft een advies voor een standpunt over de ontwikkeling van de productie van farmaceutische eiwitten door genetisch gemodificeerde gewassen (biopharming) gegeven aan de Nederlandse regering. In dit advies geeft de COGEM een overzicht van de argumenten die pro en contra gebruikt worden in de discussie omtrent de wenselijkheid van deze ontwikkeling (COGEM, 2004). Een opsomming van de argumenten pro en contra staat weergegeven in Tabel 4. Bij het opstellen van deze tabel heeft de COGEM gebruik gemaakt van de ervaringen met de ontwikkelingen in de Verenigde Staten. In de Verenigde Staten bestaat al langer en op grotere schaal ervaring met biopharming. In de loop van komende tijd zal moeten blijken of de in Tabel 4 genoemde voor- en nadelen wel terecht zijn. Niet alle argumenten zullen even zwaarwegend blijken te zijn. De COGEM verwacht dat veiligheid, economische voordelen en het belang voor de verbeterde gezondheid van mensen, belangrijke factoren zullen zijn in de uiteindelijke afweging over biopharming. De COGEM komt tot de conclusie dat de productie van farmaceutische eiwitten in planten (biopharming) een ontwikkeling is die zowel kansen biedt, als mogelijk belangen schaadt.

Om de gevolgen van de introductie van farmaceutische gewassen te kunnen inschatten, heeft volgens de COGEM een ketenperspectief de voorkeur. De voor- en nadelen van biopharming kunnen zich op allerlei momenten in de keten voordoen. Daarom dienen zaadproductie, teelt, opslag, transport, het productieproces, de afvalverwerking en het eindproduct, zowel in de bespreking van de ethische en maatschappelijke aspecten als in de risico-analyse in beschouwing te worden genomen. Daardoor kunnen ook de verschillende belanghebbenden bij biopharming worden geïdentificeerd; producenten (biotechnologiebedrijven), telers, consumenten en patiënten.

De COGEM concludeert dat biopharming door velen wordt beschouwd als een aantrekkelijke manier om geneesmiddelen te produceren waarvan grote groepen mensen, ook in de Derde Wereld, kunnen profiteren. Biopharming is naar verwachting goedkoper dan conventionele geneesmiddelenproductie, biedt een hogere opbrengst, vergt lagere investeringen en bouwt voort op bestaande agrarische know-how.

Argumenten pro	Argumenten contra
<p>Economische voordelen voor producenten:</p> <ul style="list-style-type: none"> • goedkopere productie • hogere relatieve opbrengst • flexibel productieniveau • kostenreductie bij de verwerking • gunstige opslagvoorwaarden • goede afzetmogelijkheden • lagere investeringen <p>Technologische innovatie:</p> <ul style="list-style-type: none"> • aansluiten bij en uitbouwen van bestaande know-how • aansluiting houden met internationale onderzoekstrends en de eigen positie daarin versterken <p>Voordelen voor patiënten:</p> <ul style="list-style-type: none"> • geneesmiddelen goedkoper • geneesmiddelen sneller op de markt • geneesmiddelen breder beschikbaar, ook voor zeldzame ziekten • geneesmiddelen inherent veiliger <p>Voordelen voor telers:</p> <ul style="list-style-type: none"> • nieuw perspectief • voortbouwen op bestaande expertise <p>Derde Wereld beschikt over goede en goedkope vaccins</p> <p>Geen aantasting van de integriteit van dieren</p>	<p>Economische nadelen door bijv. schadeclaims of boetes na contaminatie van de voedselketen.</p> <p>Productie duurder door veiligheidseisen</p> <p>Maatschappelijke zorg:</p> <ul style="list-style-type: none"> • elke vermenging van voedselketen is ongewenst, ook als er geen risico is voor gezondheid of welzijn van mens en dier. • <p>Onbedoelde negatieve gevolgen voor derden:</p> <ul style="list-style-type: none"> • industrie, boeren, producenten, alternatieve productiemethoden, consumenten, keuzevrijheid, dieren e.d. • <p>Economische afhankelijkheid van teler:</p> <ul style="list-style-type: none"> • geen productie van eigen zaaigoed, • geen “farmers privilege” • <p>Eetbare vaccins blijken risico in Derde Wereld ten gevolge van lokale productiewijze en gebrek aan toezicht en controle</p> <p>Aantasting van de integriteit van planten</p> <p>Aantasting van de culturele waardering van voedselproductie</p> <p>Aantasting van de culturele waardering van voedsel als onbesmet en geloofwaardig product</p> <p>Vervaging van grens tussen voedsel en geneesmiddel</p> <p>Breuk met traditie, verhouding mens-natuur</p>

Tabel 4. Overzicht van door diverse belanghebbenden genoemde argumenten pro en contra de productie van farmaceutische eiwitten in planten. In de loop van de tijd zal moeten blijken of de nu geclaimde voor- en nadelen wel terecht zijn. De opgesomde argumenten zullen niet allen even zwaarwegend blijken te zijn. De COGEM verwacht dat veiligheid, economische voordelen en het belang voor de verbeterde gezondheid van mensen, belangrijke factoren zullen zijn in de uiteindelijke afweging over biopharming (COGEM, 2004).

De belangrijkste risico's van biopharming zijn enerzijds verontreiniging van de menselijke en dierlijke voedselketens met farmaceutische eiwitten en anderzijds uitkruising naar voedings- en voedergewassen. Verontreiniging van zowel de menselijke als dierlijke voedselketens heeft bijvoorbeeld in de Verenigde Staten reeds enkele malen plaatsgevonden (Arcand & Arnison, 2004). In September 2000 werden DNA fragmenten van een recombinant eiwit gevonden in taco-schelpen (deegproduct) in de VS. Deze vondst suggereerde dat genetisch gemodificeerde maïsplanten met een verhoogde resistentie tegen insecten (Starlink) gebruikt waren om de taco-schelpen te produceren. Het gebruik van dit type maïsplanten was wel toegestaan voor gebruik in veevoeder, maar niet in voedsel voor mensen. In Nebraska in de Verenigde Staten werden in najaar 2002 transgene maïsplanten van het bedrijf Prodigene gevonden in een veld met soja dat bestemd was voor menselijke consumptie. De transgene maïs was genetisch gemodificeerd om een vaccin voor varkens te produceren. Deze “besmetting” kon plaatsvinden

doordat achtergebleven zaden uit een proef in het voorgaande jaar ontkiemden. In Iowa werden kort daarvoor de experimentele planten gevonden in een maïsveld, bestemd voor het voederen van dieren. Het vermoeden bestaat dat deze maïs besmet werd doordat stuifmeel van een nabijgelegen proefveld de maïs heeft bestoven. ProdiGene heeft voor de 'ontsnapping' van de experimentele maïs van het Amerikaanse landbouwministerie USDA een boete van 250.000 dollar gekregen. Voor het vernietigen van de besmette maïs en soja moet ProdiGene verder 2,8 miljoen dollar betalen. Tevens verplicht de Amerikaanse overheid het bedrijf om een obligatie-emissie van 1 miljoen dollar uit te brengen, waarmee een veiligheidsprogramma wordt ontwikkeld om toekomstige ongelukken met farmaceutische gentegewassen te voorkomen (Gillis, 2003).

In Canada kwamen 3 genetisch gemodificeerde varkens (zeugen) van het bedrijf TGN Biotech per ongeluk in de menselijke voedselketen terecht. Deze varkens waren genetisch gemodificeerd om een eiwit in het sperma te produceren.

In al deze gevallen was het zeer onwaarschijnlijk dat de volksgezondheid er door in gevaar kwam. Het zijn echter wel gevallen die het consumentenvertrouwen in de voedselveiligheid in gevaar brengen.

Ook van uitkruising zijn voorbeelden te noemen. Bij de teelt van genetisch gemodificeerde gewassen mag er vanuit worden gegaan dat er genetisch materiaal uitkruist naar verwante wilde soorten. Via bijvoorbeeld stuifmeel van de gemodificeerde planten is het niet uit te sluiten dat de genen voor farmaceutische eiwitten op nauw verwante wilde soorten worden overgebracht. In 2004 publiceerde de "Union of Concerned Scientists" (Mellon & Rissler, 2004) een wetenschappelijk onderbouwd rapport waarin aannemelijk wordt gemaakt dat het erfelijk materiaal dat via genetische modificatie in transgene gewassen wordt geïntroduceerd, inmiddels ook in het zaad van normale gewassen is te vinden.

Het risico op uitkruising kan sterk worden verkleind door teelt onder "ingeperkt gebruik condities" in kassen en kweekcellen. De Union of Concerned Scientist (UCS) is een non-profit organisatie van wetenschappers die milieu problemen analyseert en zich inzet voor duurzame landbouw. Zij hebben zaaizaden uit het handelscircuit van traditionele rassen maïs, soja en canola (een variant van koolzaad) ge-analyseerd op de aanwezigheid van het erfelijk materiaal dat gebruikt werd om genetisch gemodificeerde rassen te maken (gericht op resistentie tegen herbicide of insecten). Op basis van hun resultaten schatten ze dat 0.05 tot 1 procent van de zaden "besmet" is met genetisch gemodificeerd materiaal. Hoe de besmetting heeft plaatsgevonden is niet duidelijk. Ook in dit geval is er geen gevaar voor de volksgezondheid ontstaan. In de Europese Unie mag tot 0.9% genetisch gemodificeerd materiaal in voedingsmiddelen aanwezig zijn zonder dat dit op het etiket hoeft te worden vermeld.

Om bovenstaande problemen te voorkomen adviseert de COGEM, wanneer farmaceutische gewassen worden toegelaten in Europa, een strikte ketenregulering c.q. ketenscheiding. In het kader van risicomanagement kunnen daarnaast, in tegenstelling tot de huidige trend in de Verenigde Staten, voedings- of veevoedergewassen beter niet als uitgangspunt gekozen worden voor farmaceutische productie. Uiterlijke herkenbaarheid kan een middel zijn om onbedoelde consumptie te voorkomen.

Om het risico van uitkruising te beperken kan de teelt van farmaceutische gewassen onder "ingeperkt gebruik condities" in kassen en teeltcellen worden uitgevoerd. Onder deze condities wordt voorkomen dat reproductieve delen van het organisme in het milieu terecht komen.

De COGEM signaleert dat contaminatie van de voedselketen, ook als er geen veiligheidsrisico mee is gemoeid, het maatschappelijk draagvlak voor biopharming zal schaden. Ook dit vormt een argument voor het strikt navolgen van ketenscheiding.

5 Van toepassing zijnde regelgeving

5.1 Regelgeving m.b.t. de teelt van recombinante gewassen.

Genetisch gemodificeerde gewassen kunnen geteeld worden onder de regelgeving die is bestudeerd door de Commissie Genetische Modificatie (COGEM). De COGEM constateert in haar advies en signalering over de productie van farmaceutische eiwitten door genetisch gemodificeerde gewassen (biopharming) aan de Staatsecretaris van VROM d.d. 14 december 2004 (COGEM, 2004) dat de huidige wetgeving betreffende de voeder- en voedselveiligheid en de milieuveiligheid van de teelt van genetisch gemodificeerde gewassen afdoende is om de veiligheid van mens en milieu te waarborgen en dat er geen noodzaak is voor nieuwe regelgeving. Farmaceutische gewassen zijn onderdeel van de teelt van genetisch gemodificeerde gewassen. De teelt van farmaceutische gewassen onder veldomstandigheden kan met behulp van de huidige wetgeving gebaseerd op de EU richtlijn 2001/18, beoordeeld en gereguleerd worden. Indien voedselgewassen gebruikt worden als productiemiddel zal ook een beoordeling door de Europese Autoriteit voor Voedselveiligheid (EFSA) in het kader van de voedselveiligheid plaatsvinden op basis van de EU Verordening 1820/2003/EG, ook wanneer deze planten niet voor consumptie bedoeld zijn.

Toelating van kweek van genetisch gemodificeerde planten onder strikt ingeperkte omstandigheden zoals kweekcellen en plantenkassen wordt beoordeeld onder het Besluit genetisch gemodificeerde organismen Wet milieugevaarlijke stoffen. Afspraken en reguleringsmaatregelen die van toepassing worden verklaard op coëxistentie van GGO-teelt, conventionele teelt en biologische teelt zullen eveneens onverkort op farmaceutische gewassen van toepassing zijn.

Informatie over vergunning verlening en betrokken wetgeving zoals onder is weergegeven is te vinden op website <http://www.vrom.nl/ggo-vergunningverlening>.

Veel van de benodigde vergunningen zullen waarschijnlijk geregeld worden door het farmaceutisch bedrijf dat voornemens is om farmaceutische eiwitten in paddestoelen te gaan produceren.

5.1.1 Ingeperkt gebruik

Teelt van farma-paddestoelen onder ingeperkt gebruik condities, kweekcellen, kan waarschijnlijk gemakkelijker plaatsvinden dan teelt op het veld, omdat de veiligheid van mens en milieu onder ingeperkte condities beter gewaarborgd blijft. Afhankelijk van de soort waarin het farmaceutische eiwit tot expressie wordt gebracht zullen er strengere eisen aan de kweekcelvoorschriften worden gesteld. In Appendix C van de regeling genetisch gemodificeerde organismen en richtlijnen van de COGEM bij deze regeling (1998) staan alle soorten beschreven waar in Nederland een vergunning voor is verleend, met de daarbijbehorende inperkingsmaatregelen. Deze maatregelen zorgen ervoor dat het transgen niet kan ontsnappen naar het milieu. Er vindt dus geen uitkruising plaats, noch kan een plant verwilderen. Diepgaande informatie van het transgen is in geval van ingeperkt gebruik ook niet noodzakelijk, m.a.w. de risicoanalyse is onafhankelijk van het type farmaceutisch eiwit. Champignon (*Agaricus bisporus*) en oesterzwam (*Pleurotus ostreatus*) staan in Appendix C vermeld als gastheren die geschikt zijn voor de vervaardiging van genetisch gemodificeerde organismen.

De eisen die worden gesteld aan de kassen (teeltruimten) waarin de genetisch gemodificeerde planten geteeld worden staan beschreven in de door VROM gepubliceerde Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen. De teelt van genetisch gemodificeerde planten en daarmee ook de teelt farmagewassen onder ingeperkt gebruik is geregeld onder het Besluit genetisch gemodificeerde organismen.

5.2 Regelgeving m.b.t. registratie van medicijnen.

Ook registratie van medicijnen die door genetisch gemodificeerde organismen worden geproduceerd, zal door het ontwikkelende farmaceutische bedrijf worden verzorgd. Goedkeuring voor de productie van

medicijnen via genetisch gemodificeerde organismen kan alleen worden verstrekt door de “gecentraliseerde” EU procedure zoals beschreven in EU wet 2309/93. Een uitgebreid dossier moet de aanvraag voor een medicijn afkomstig uit genetisch gemodificeerde organismen ondersteunen. Drie soorten data moeten worden verzameld voor dit dossier: kwaliteitsdata, preklinische data en klinische data (zie ook Figuur 2). De dossieropbouw wordt begeleid door de European Medicine Agency (EMA).

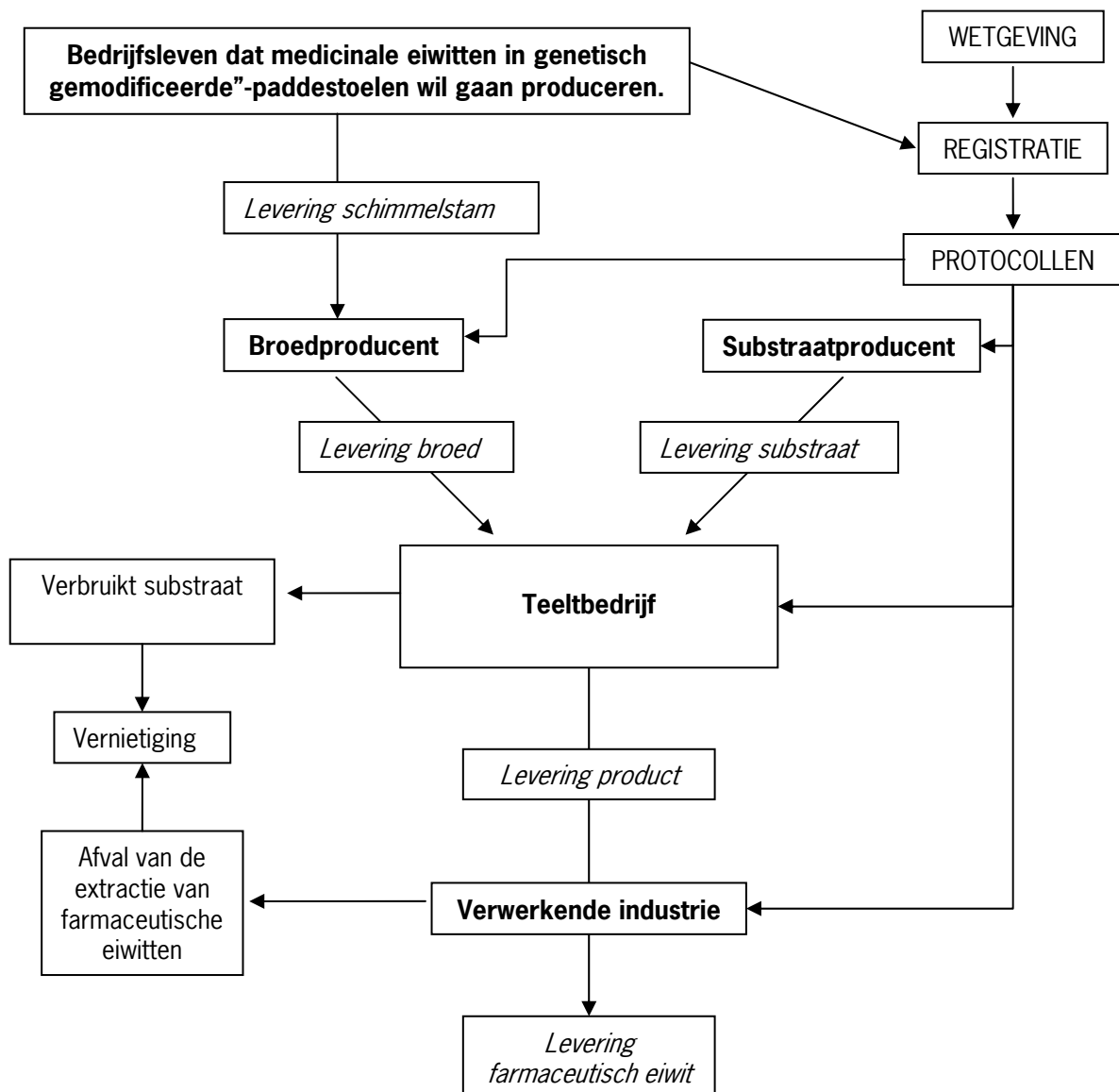
Medicinale producten voor gebruik door mensen worden ingedeeld in twee categorieën via EU wet 92/26; voorgeschreven en niet voorgeschreven medicijnen. Voorgeschreven medicijnen kunnen alleen door apothekers worden verstrekt. De niet voorgeschreven medicijnen kunnen zonder doktersvoorschrift verkregen worden. Verschillende criteria bepalen of een medicijn een “niet voorgeschreven” status krijgt. Daaronder vallen de veiligheid van een medicijn en het vermogen van een patient om zonder of met weinig professionele instructies tot zelfdiagnose en zelfmedicatie te komen.

Ook voor registratie van medicinale producten voor dierlijk gebruik dient een dossier te worden opgebouwd dat vergelijkbaar is met dat voor menselijk gebruik.

6 Beschrijving van een mogelijke productie-keten voor farmaceutische eiwitten uit paddestoelen.

6.1 Overzicht van de betrokken partijen.

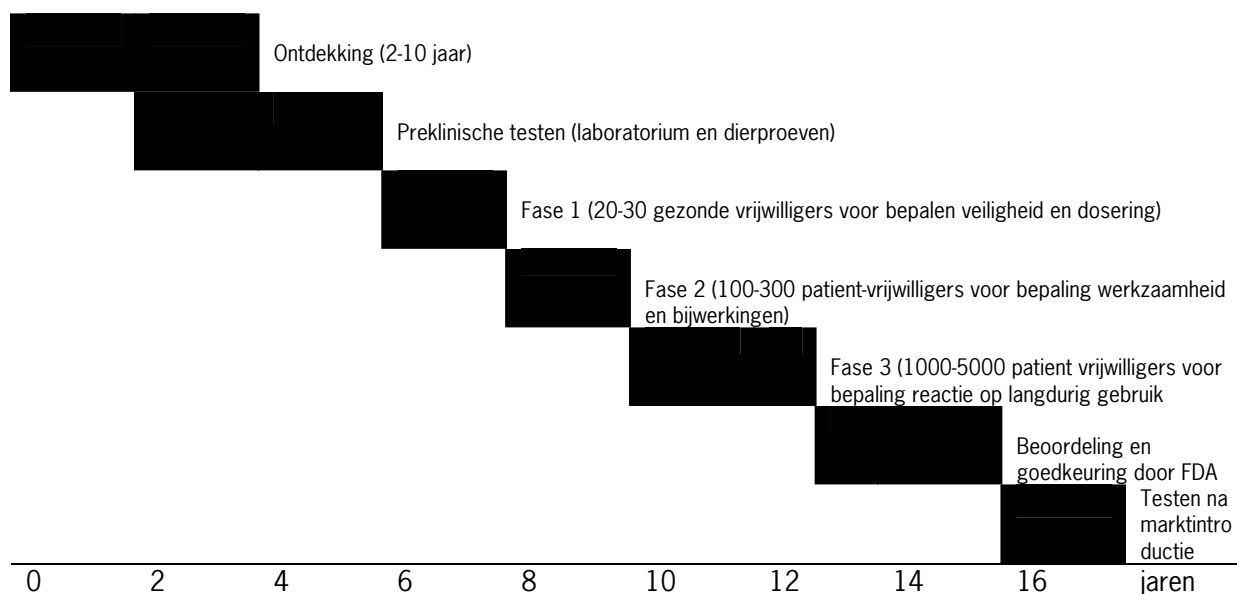
In Figuur 1 wordt een overzicht gegeven van een hypothetische productieketen voor farmaceutische eiwitten uit genetisch gemodificeerde paddestoelen. Aan de hand van deze hypothetische productieketen kunnen we de diverse praktische aspecten van de productie van farmaceutische eiwitten met genetisch gemodificeerde paddestoelen toelichten.



Figuur 1. Organisatie van een denkbeeldige productieketen voor farmaceutisch eiwit uit genetisch gemodificeerde paddestoelen.

6.2 De farmaceutische industrie.

Momenteel worden farmaceutische eiwitten geproduceerd met behulp van genetisch gemodificeerde micro-organismen of cellijnen die in fermentoren worden opgekweekt. Het verwachte tekort aan productiecapaciteit noopt de farmaceutische bedrijven om te kijken naar alternatieve productiemethoden. Er zijn diverse alternatieven in ontwikkeling (zie Tabel 1). Bij de keuze voor een productiesysteem spelen productiekosten een rol, maar ook te verwachten problemen ten gevolge van wet- en regelgeving. Een complicerende factor is dat de wet- en regelgeving voor de productie van medicinale eiwitten in genetisch gemodificeerde organismen nog niet helemaal is uitgekristalliseerd. Dit is te wijten aan het feit dat het een relatief nieuwe techniek is waarbij de risico's nog niet helemaal in kaart zijn gebracht. Zodra een farmaceutisch bedrijf gekozen heeft voor een productiesysteem kan de ontwikkeling van een medicijn op basis van recombinant eiwit van start gaan. Met de ontwikkeling en toelating van farmaceutische eiwitten als medicijn is een grote investering in tijd en financiële middelen gemoeid (Figuur 2). Indien men een vanuit medisch oogpunt interessant eiwit heeft gekozen, moet het in een genetisch gemodificeerd organisme tot ontwikkeling worden gebracht. Het geproduceerde recombinante eiwit kan vervolgens gebruikt worden om preklinische testen te doen. Hiermee start een proces dat ruwweg 14 jaar kan duren.



Figuur 2. Voorbeeld van een tijdschema voor de ontwikkeling en marktintroductie van een geneesmiddel (overgenomen uit Arcand & Arnison, 2004).

Aangezien de farmaceutische industrie op het moment dat dit wordt geschreven nog niet in staat is om een keuze te maken voor een productiesysteem (productie in planten, productie in paddestoelen, productie in zoogdieren), zal het nog meer dan 15 jaar duren voordat grootschalige productie van medicinale eiwitten in paddestoelen realiteit kan zijn. Productie van medicinale eiwitten in paddestoelen wordt op dit moment nog niet als een serieuze optie overwogen. De voornaamste reden daarvoor is dat de ontwikkeling van een teeltbare paddestoelstam die een farmaceutisch eiwit produceert nog niet ver genoeg gevorderd is. In eerste gesprekken met bedrijven uit de farma en bedrijven die grondstoffen maken voor de farmaceutische industrie is door hen wel aangegeven dat zij serieuze interesse hebben voor paddestoelen als productieplatform voor medicinale eiwitten.

Bijlage 1 beschrijft de technische stand van zaken m.b.t. de ontwikkeling van een stam waarmee via paddestoelen farmaceutische eiwitten geproduceerd kunnen worden. Op het moment dat dit rapport

geschreven wordt is de lage productie van recombinant eiwit het voornaamste obstakel in de ontwikkeling. Om genetisch gemodificeerde paddestoelen als serieus alternatief productiesysteem te kunnen presenteren is onderzoek om de productie van recombinant eiwit te verhogen noodzakelijk.

De onderstaande beschrijving van een mogelijke productieketen voor medicinale eiwitten beschrijft dus een situatie zoals die er over een kleine twee decennia uit zou kunnen zien. We gaan er van uit dat de farmaceutische industrie of een conglomeraat van farmaceutische industrie en onderzoeksinstituten zorg hebben gedragen voor de ontwikkeling van een farmaceutisch eiwit producerende paddestoelstam en voor de registratie van het geproduceerde eiwit als medicijn.

Gedurende het in Figuur 2 getoonde ontwikkelingsproces zijn steeds grotere hoeveelheden van het te ontwikkelen geneesmiddel nodig om de benodigde experimenten te doen. Het wordt tijdens dit proces steeds belangrijker om vorm te geven aan een productieproces dat het mogelijk maakt om grootschalig farmaceutische eiwitten te produceren.

De eisen die aan dit productieproces worden gesteld, zullen voor een groot deel ingegeven worden door de regelgeving die door instanties als de European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) en het College ter Beoordeling van Geneesmiddelen (CBG) wordt opgesteld. De werkgroep Herbal Medicinal Products van het EMA heeft in 2005 een werkdocument opgesteld m.b.t. kwaliteitsaspecten van geneesmiddelen die uit genetisch gemodificeerde planten worden geïsoleerd (EMA, 2005). De items die in dit werkdocument worden besproken zijn ook op de productie van farmaceutische eiwitten uit genetisch gemodificeerde paddestoelen van toepassing. Ze kunnen de basis vormen voor de ontwikkeling van Good Manufacturing Practices richtlijnen. De bedoeling van deze richtlijnen is er voor te zorgen dat het uiteindelijke geneesmiddel op een reproduceerbare en goed gedocumenteerde manier wordt geproduceerd. Dit is nodig om de hoogst mogelijke kwaliteit, veiligheid en best mogelijke werkzaamheid te kunnen garanderen. Het is belangrijk dat de opeenvolgende batches van het farmaceutische eiwit betrouwbaar en met de voorspelde medicinale eigenschappen geproduceerd kunnen worden. Als gevolg van die eis moet het hele productieproces in detail worden beschreven, beginnende bij de manier waarop de farmaceutisch eiwitproducerende schimmelstam uit een collectie wordt gehaald en vermeerderd voor gebruik. De eisen beslaan dus de gehele productieketen en vinden hun weerslag in diverse protocollen waarin de bijzonderheden van het gehele productieproces worden vastgelegd.

6.3 Broedproducent.

Nadat de farmaceutisch eiwitproducerende schimmelstam uit een collectie is gehaald, begint het productieproces met de vermeerdering van de stam als startmateriaal (de broedproductie). Productie van broed houdt een vermeerdering in van een genetisch gemodificeerd organisme. EU wet 90/219 richt zich op het gebruik van genetisch gemodificeerde micro-organismen binnen een afgesloten gebied, zoals een fermentor in een fabriek. Het dossier dat moet worden ingediend om een vergunning te verkrijgen moet onder andere moleculaire data over het ingebrachte gen en data over de veiligheid van het organisme bevatten. Aangezien productie van broed een vermeerdering van het transgene organisme met zich meebrengt, moet de broedbereiding onder "ingeperkt gebruik" condities worden uitgevoerd. De aard van het proces leent zich daar overigens uitstekend voor. In principe betreft de broedbereiding een vaste stof fermentatie van vooraf gesteriliseerde zaden.

Naast de bovenbeschreven maatregelen die bedoeld zijn om te voorkomen dat het genetisch gemodificeerde organisme in het milieu terecht komt, zijn er ook maatregelen die moeten voorkomen dat het broed tijdens productie, opslag en vervoer verontreinigd kan raken (bijvoorbeeld door besmetting met andere schimmels). Er zullen procedures moeten worden ontwikkeld om een zo constant mogelijke kwaliteit broed te kunnen leveren. Om een indruk te krijgen van zaken die in deze procedures vastgelegd moeten worden verwijzen we naar paragraaf 5.4.

In verband met de gewenste strikte ketenscheiding zal de organisatie die het transgene broed produceert alleen aan die bedrijven mogen leveren die onderdeel uitmaken van de "transgene keten". Als de broedproducent meerdere transgene paddestoelstammen, ieder gericht op een ander farmaceutische eiwit, beheert, zullen werkprocedures dienen te worden ontwikkeld om verwisseling van stammen te voorkomen. Als het broed geproduceerd is moet het naar het teeltbedrijf worden vervoerd. Om te voorkomen dat genetisch gemodificeerde organismen onbedoeld in het milieu worden geïntroduceerd moeten de auto's

waarmee het transgene broed vervoerd wordt uitsluitend voor dit doel worden gereserveerd. Tevens moeten handelingsprotocollen beschikbaar zijn indien een verpakking beschadigd raakt. Voor het vervoer van genetisch gemodificeerde schimmels geldt bijlage 9 (onder punt 2: vervoer buiten de inrichting) van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen. Volgens deze regels kan broed met genetisch gemodificeerde schimmel vervoerd worden in een gesloten scheurvrije zaaddichte zak die in een breukvaste tweede houder wordt geplaatst. Op de container of in de begeleidende papieren dient te zijn aangegeven dat het vervoer betreft van genetisch gemodificeerde organismen. Daarnaast zijn de bepalingen in de wet vervoer gevaarlijke stoffen van toepassing. Aangezien de omvang van de transgene keten naar verwachting vrij klein zal zijn, is het waarschijnlijk dat een productiebedrijf ook de broedproductie zal doen.

6.4 Substraatproducent.

Welk substraat gebruikt zou kunnen worden voor de teelt van genetisch gemodificeerde paddestoelen is van een aantal factoren afhankelijk. De gebruikte paddestoelensoort bepaalt welk substraat gebruikt kan worden. Voor de substraatproducent zullen de eisen die de uiteindelijke afnemer stelt aan de geproduceerde paddestoelen veel belangrijker zijn. De mogelijkheid bestaat dat de afnemer van de farmaceutische paddestoelen een teelt op steriel substraat wil uitvoeren om meer controle op mogelijke besmetting met "onkruidschimmels" te kunnen uitoefenen. In dat geval bestaat de kans dat men zal trachten de paddestoelen direct op het broed te laten ontwikkelen.

De kwaliteit van het geproduceerde substraat heeft grote invloed op opbrengst en kwaliteit van de paddestoelen. Ook hier zal volgens protocollen gewerkt moeten worden en zal het substraat een constante en goed gedefiniëerde samenstelling moeten hebben. Dat is op dit moment beter te realiseren door paddestoelen op broed te produceren dan op compost. Onderzoek naar alternatieve, beter te reproduceren substraten is wenselijk.

In het geval dat de substraatproducent doorgroeid substraat zal gaan produceren, moeten alle maatregelen die van toepassing zijn op de vermeerdering van genetisch gemodificeerde organismen door de substraatfabrikant moeten worden overgenomen (vergunningen, maatregelen voor ingeperkt gebruik, etc.).

6.5 Teeltbedrijf

Met de keuze voor een klant komen zowel het te produceren recombinant eiwit als de paddestoelsoort waarin geproduceerd gaat worden vast te liggen. Het is de klant die op grond van de in hoofdstuk 3 genoemde factoren een keuze heeft gemaakt voor het eiwitproduct, de expressietechnologie, de toepassing en de daarmee samenhangende bewerkings- en zuiveringstappen. Door de specifieke eisen die de klant aan de geproduceerde paddestoelen stelt, zal hij een grote invloed hebben op de manier van telen en de handelingsvrijheid van de individuele teler.

6.5.1 Inrichtingseisen

De eisen die aan de inrichting van een teeltbedrijf gesteld worden voor productie van genetisch gemodificeerde schimmels hangen af van de GMO status van de geproduceerde paddestoelen en aan de eisen die gesteld worden door het bedrijf dat de paddestoelen tot medicinale producten verwerkt. Om een indruk te krijgen van mogelijke inrichtingseisen is een oriënterend gesprek gevoerd met het Bureau Genetisch Gemodificeerde Organismen (Bureau GGO). Dit bureau verzorgt de vergunningverlening voor werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen. Leidraad voor de inrichtingseisen is de preventie van verspreiding van het organisme. Grootste zorgpunt daarbij is sporenvorming. Als sporenvorming onvermijdelijk is kunnen bij grootschalige teelt problemen optreden (ingerpakt gebruik moeilijker te garanderen). Bureau GGO ziet het liefst een gesloten systeem tussen productiebedrijf en verwerker. Voor een inschatting van het inrichtingsniveau heeft Bureau GGO specifieke biologische kennis nodig. In het adviesgesprek is uitgegaan van sporenloze stammen of gesloten champignons waarbij een beperkte productie of geen productie van sporen plaatsvindt.

Bureau GGO doet de aanbeveling om bij een eventuele aanvraag voor vergunning het inperkingsniveau PC-I

als basis nemen, aangepast voor deze specifieke toepassing.

Om te voldoen aan inperkingsniveau PC-I moet de kweekcel uit een permanente ruimte bestaan, waarvan de werkoppervlakken, vloeren, wanden en deuren zijn afgewerkt met een niet-absorberend materiaal. De werkoppervlakken en wanden moeten bestand zijn tegen water, zuren, basen, oplosmiddelen, desinfectiemiddelen en ontsmettingsreagentia en gemakkelijk schoon te maken. De kweekcel moet afsluitbaar zijn en voorzien van een deur waarop de aanduiding staat dat het om een PC-I kweekcel gaat. Daarnaast moeten de namen en telefoonnummers van ten minste één voor de ruimte verantwoordelijk persoon en van de biologische veiligheidsfunctionaris op de deur vermeld staan.

Een zorgpunt is het mogelijke transport van sporen met medewerkers die teeltruimte in en uitgaan. Om die reden moet in de teeltruimte een wastafel of douche beschikbaar zijn (niet nodig bij sporenloos ras).

Daarnaast moet de teeltruimte in onderdruk worden gehouden om te voorkomen dat bij het openen van deuren sporen buiten de teeltruimte terecht kunnen komen.

Het afvalwater van de teeltruimte moet kunnen worden verzameld in een bezinkput en de in het afvalwater voorkomende organismen moeten kunnen worden afgedood (er moet een voorschrift zijn hoe gevalideerd kan worden dat alles dood is (bijvoorbeeld met chloortabletten)).

De in en uitgaande lucht in de teeltruimte moet worden gefiltreerd om sporen weg te vangen. Sporen van champignon zijn ongeveer 4-7 µm lang en 4-6 µm breed (Phillips, 1981), sporen van oesterzwam zijn 7-10 µm lang en 3-4 µm breed (Hilber, 1982). Een zogeheten Hepa-filter zou daar geschikt voor zijn. HEPA is een filtratie standaard geautoriseerd door US ATOM. HEPA filter medium heeft bewezen meer dan 99,97% van alle deeltjes tot 0,3 micron tegen te houden (de deeltjes grootte van sigarettenrook is ongeveer 0,5 micron) en HEPA is voor meer dan 95% effectief voor deeltjes tot 0,1 micron (= 1/10.000-ste van een millimeter). HEPA staat dus niet voor de naam van het filter. Er dienen protocollen ontwikkeld te worden voor een het verwisselen van de filters en het verwerken van de gebruikte filters. Hieruit blijkt wel dat sporenloze rassen de voorkeur hebben,

Daarnaast is het mogelijk dat het bedrijf dat de geproduceerde paddestoelen verwerkt aanvullende eisen stelt aan de inrichting. Daarbij valt te denken aan de mogelijkheid om het geogste product meteen na oogst in te vriezen (zodat kwaliteit van geproduceerd eiwit niet achteruit gaat t.g.v. naogst processen).

6.5.2 Werkvoorschriften

Niet alleen moet de inrichting van het gebouw er op gericht zijn om ontsnapping van het genetisch gemodificeerde organisme te voorkomen, ook het personeel moet daar naar kunnen handelen. Dat houdt in dat werkprotocollen moeten worden opgesteld om te zorgen dat voldaan wordt aan de eisen die de diverse regelingen en de afnemer van de paddestoelen stelt. Met betrekking tot van toepassing zijnde regelingen valt te denken aan de bepalingen in de hinderwetvergunning, de EU richtlijnen over voedselhygiëne, de Europese Richtlijn over Good Manufacturing Practice (91/356/EEC) en de richtlijnen die door de EMEA (European Medicines Agency) worden voorgesteld.

Dergelijke werkprotocollen dienen alle aspecten van de teelt te beslaan. Teelt handelingen en manier van oogsten moeten in detail beschreven zijn, evenals de procedures voor het bepalen of gewasbeschermingsmaatregelen nodig zijn en het uitvoeren van dergelijke maatregelen. Daarnaast valt het aan te bevelen om methoden te ontwikkelen en toe te passen om de opbrengst van het te produceren eiwit tijdens de teelt te monitoren. Bij de teelt van paddestoelen voor de productie van farmaceutische eiwitten is het eiwitgehalte en de kwaliteit van het geproduceerde eiwit leidend. Dit vergt hoogstwaarschijnlijk een andere manier van telen dan het produceren van zoveel mogelijk biomassa. De criteria voor het tijdstip waarop de oogst kan beginnen moeten goed gedefinieerd zijn en er moet goed beschreven zijn hoe het geogste materiaal verpakt en bewaard moet worden.

Ook voor het behandelen van het verbruikte substraat en de methode van verwerking dienen protocollen ontwikkeld te worden. Na doorgroeiing bevat het substraat immers genetisch gemodificeerde organismen die niet in het milieu mogen worden geïntroduceerd. Na afdoding van alle levende organismen moet bepaald worden hoe het verbruikte substraat verwerkt kan worden. Mogelijk bevat het mycelium/substraat nog geneesmiddelen (farmaceutische eiwitten) waardoor de opties voor verwerking en afzet worden beperkt. Daarnaast moeten protocollen ontwikkeld worden voor de benodigde uitrusting en de manier waarop de uitrusting wordt onderhouden. De uitrusting moet gemakkelijk schoon te maken zijn om het risico op verontreinigingen te verkleinen. Machines om pesticiden toe te dienen moeten regelmatig geijkt worden.

6.5.3 Personeel

Het personeel moet voldoende opgeleid zijn voor de gekwalificeerde taken. Van het personeel moet een hoge mate van persoonlijke hygiëne geëist worden (waartoe ruimtes met wastafels gelegenheid moeten bieden). Personeel dat lijdt aan besmettelijke ziekten die via het voedsel verspreid kunnen worden, zoals griep, of personen die verspreiders zijn van deze ziekten, moeten geweerd worden van de verwerking plaats vindt of moet voldoende beschermende kleding dragen

6.5.4 Documentatie

Alle uitgangsmateriaal en alle verwerkingsstappen inclusief de plaats waar gekweekt wordt moeten gedocumenteerd worden. Het is essentieel om het type genetisch gemodificeerde paddestoel, de hoeveelheid en de oogstdatum te registreren. Ook het gebruik van pesticiden moet gedocumenteerd worden. Alle processen en procedures die een effect kunnen hebben op de kwaliteit van het product moeten opgenomen worden in de batchdocumentatie (i.v.m. traceerbaarheid). Speciale omstandigheden die de chemische samenstelling van de paddestoelen zouden kunnen veranderen, zoals ziekten en plagen, moeten gedocumenteerd worden..

Daarnaast moeten de resultaten van audits worden gedocumenteerd in een Audit Rapport dat minimaal 10 jaar bewaard moet worden.

7 Patentsituatie

Patenten geven aan de eigenaar ervan het exclusieve recht anderen uit te sluiten om de uitvinding te reproduceren, te gebruiken of te verkopen. Het recht van de eigenaar van het patent is alleen geldig in de landen waar het is ingediend. Om een overzicht te verkrijgen over mogelijk van toepassing zijnde patenten is gebruik gemaakt van Espace.net (<http://ep.espacenet.com/>). De resultaten staan weergegeven in Tabel 5. Er is niet uitgezocht in hoeverre ook rechten aan de beschreven patenten kunnen worden ontleend. Een dergelijke zoektocht naar patenten, maakt ook duidelijk welke organisaties en onderzoekers expertise op dit gebied hebben.

Voor de constructie van genetisch gemodificeerde schimmelstammen die farmaceutische eiwitten produceren zijn een groot aantal verschillende technieken nodig. Een aantal van deze technieken zijn zo cruciaal dat ze door de ontwikkelaar van de techniek zijn gepatenteerd.

Met betrekking tot transformatietechnieken die tot doel hebben lichaamsvreemd erfelijk materiaal in schimmels te introduceren en de schimmels vervolgens lichaamsvreemd eiwit te laten produceren zijn patenten bekend van Unilever, Penn State University en van Horticulture Research International.

Zoals beschreven in paragraaf 3.1 is het voor sommige functies van het geproduceerde eiwit belangrijk dat de juiste suikerstructuren op het eiwit worden aangebracht. Met betrekking tot dergelijke glycosyleringsreactie zijn een groot aantal patenten gevonden waaronder enkele van Plant Research International (WUR).

Bedrijf	Uitvinder	Patent nr.	Titel van het patent
Unilever (NL/GB)	Beijersbergen A.G., Bundock P., Gouka R.J., de Groot M.J. A., Hooykaas P.J.	EP0973917	Agrobacterium mediated transformation of moulds, in particular those belonging to the genus <i>Aspergillus</i>
Penn State Res Found (US)	Romaine C.P., Chen X	US2005070007	Methods and compositions for highly efficient transformation of filamentous fungi
Horticulture Res Internat (GB)	Burton K., Challen M., Elliott T., Sreenivasaprasad S., Eastwood D., Malloy S.	EP1563076	Selective expression in filamentous fungi
Plant Res Internat (NL)	Bakker H.A.C., Bosch H.J.	MXPA02004142	Mammalian-type glycosylation in plants
	Wildt S., Miele R.G., Nett J.H., Davidson R.C.	US2005170452	Method to engineer mammalian-type carbohydrate structures
Plant Res Internat (NL)	Bakker H.A.C., Florack D.E.A., Bosch H.J., Rouwendal G.J.A.	EP1485486	Optimizing glycan processing in plants
Flanders Interuniversity Inst (BE)	Contreras R., Callewaert N.L.M., Geysens S.C.J.	WO0200856	Protein glycosylation modification in <i>pichia pastoris</i>
GLYCOFI INC	Gerngross T.U.	WO0200879	Methods for humanizing glycosylation of recombinant glycoproteins expressed in lower eukaryotes
Hamilton S.R.	Hamilton S.R.	WO2004074497	Endomannosidases in the modification of glycoproteins in eukaryotes

Tabel 5. Beschreven patenten met betrekking tot de productie van farmaceutische eiwitten in paddestoelen. De lijst is opgesteld a.h.v. resultaten van zoekacties in de databases van Espace.net (<http://ep.espacenet.com/>). Er is in dit overzicht niet gestreefd naar volledigheid.

8 Toekomst verkenning; wanneer kan mushfarming operationeel zijn en wat produceert het?

De studie van Creemers-Molenaar et al. (2002) naar de haalbaarheid van de productie van farmaceutische eiwitten in planten beschrijft de opties van een dergelijk productiesysteem. Voor de productie van farmaceutische eiwitten in paddestoelen gelden grotendeels dezelfde overwegingen. Om die reden is een groot deel van de onderstaande tekst ontleend aan deze studie en aangepast aan de situatie voor de productie van farmaceutische eiwitten in paddestoelen.

8.1 Wanneer kan het operationeel zijn?

Een belangrijk nadeel van de productie van farmaceutische eiwitten in paddestoelen, is dat er nog geen enkel voorbeeld is van een registratie van een dergelijk product. Dat brengt met zich mee dat zowel bij producent als wetgever er geringe ervaring op dit terrein is. Gevolg daarvan is dat er een risico is op extra kosten van de toch al zeer dure registratie. Het is uitgesloten dat paddestoelsystemen de productie zullen overnemen van “biopharmaceuticals” die op dit moment al geregistreerd zijn als producten van microbiële en dierlijke celcultures (zie paragraaf 3.4.2.). Voor geheel nieuwe biopharmaceuticals zal er een zeer duidelijk voordeel moeten zijn om te kiezen voor de productie middels paddestoelen.

Figuur 2 in paragraaf 6.1 geeft een indruk van de tijd die gemoeid is met de ontwikkeling van een nieuw biopharmaceutical dat geproduceerd wordt m.b.v. paddestoelen. Momenteel wordt nog gewerkt aan het optimaliseren van de productie van eiwitten in genetisch gemodificeerde schimmels. Zelfs indien op dit moment begonnen zou kunnen worden met de ontwikkeling van een biopharmaceutical, duurt het nog minstens 14 jaar voordat productie voor een marktpartij op continue basis tot stand kan komen. Volgens een realistische schatting duurt het nog twee decennia voordat grootschalige productie van geneesmiddelen uit genetisch gemodificeerde paddestoelen een feit zal zijn.

Men kan genetisch gemodificeerde paddestoelen ook gebruiken voor de productie van eiwitten die geen medische toepassing hebben. Hierbij valt te denken aan eiwitten die gebruikt worden in diagnostische tests, enzymen met een industriële toepassing e.d (zie ook volgende paragraaf). De ontwikkeling en marktintroductie van dergelijke niet-farmaceutisch eiwitten zal waarschijnlijk minder tijd in beslag nemen. Voor niet-medische toepassingen zal mogelijk over een tiental jaren grootschalige productie een realiteit kunnen zijn.

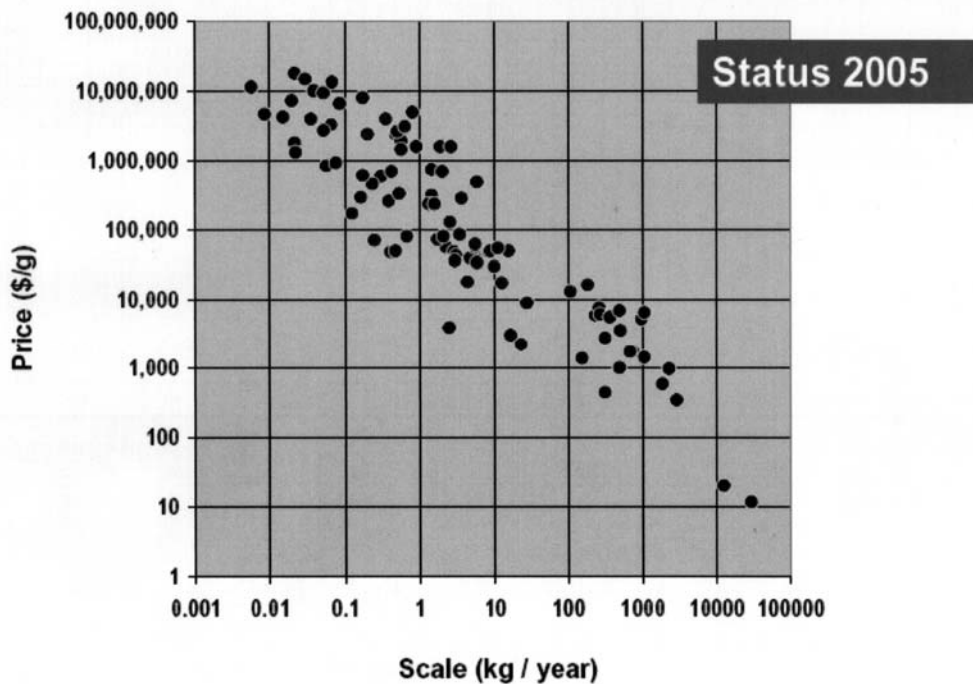
8.2 Wat kan het produceren?

8.2.1 Eiwitten als basis van een geneesmiddel.

Tot nu toe is voornamelijk gesproken over de productie van eiwitten voor gebruik in geneesmiddelen. Een dergelijke toepassing stelt hoge eisen aan kwaliteit en zuiverheid van het geproduceerde eiwit. Of een dergelijke toepassing economisch haalbaar is, is lastig te voorspellen. Op de conferentie gewijd aan “Plant-made Pharmaceuticals” die in 2005 in Montreal werd gehouden presenteerde Dr. Steiner van Bayer CropScience een overzicht van de markt (<http://archives.cmp2005.org/>). In de komende jaren zullen vooral antilichamen tegen kanker, ontstekingsreacties en infecties op de markt worden geïntroduceerd. Echter, de vraag naar deze producten is sterk product specifiek en varieert sterk van product tot product. Steiner geeft aan dat indien in de nabije toekomst 43 antilichamen op de markt worden geïntroduceerd er gemiddeld per antilichaam een behoefte van 325 kg bestaat.

De verkoopprijs van de antilichamen staat in relatie tot de productieschaal (Figuur 3). Bij een productie van 325 kg ligt de verkoopprijs omstreeks \$1500 per gram. In dat geval wordt 325 kg antilichaam verkocht voor een bedrag dat rond \$487,5 miljoen. De productiekosten bedragen naar schatting 15% van de verkoopprijs (paragraaf 3.4.2.) en liggen dan ruwweg rond \$73 miljoen.

Bij wijze van voorbeeld kunnen we uitrekenen wat de productiekosten zouden zijn van recombinant eiwit in een genetisch gemodificeerde champignon. Als we aannemen dat 0.1% van alle eiwit in de champignon uit



Figuur 3. Prijs van medicinale eiwitten die m.b.v. genetisch gemodificeerde organismen zijn geproduceerd en de productieschaal zijn omgekeerd evenredig aan elkaar. Grafiek is aangepast naar een grafiek uit de presentatie van Dr. Steiner op de conferentie gewijd aan “Plant-made Pharmaceuticals” (Montreal, 2005).

recombinant eiwit bestaat en dat de champignon 3,5% eiwit op basis van versgewicht bevat (Abou-Heilah et al. 1987, Beelman & Edwards 1989), dan bevat een kg genetisch gemodificeerde champignons 35 gram eiwit en 35 milligram recombinant eiwit. Voor de productie van een kg recombinant eiwit is dan 28600 kg champignon nodig. Om een jaarproductie van 325 kg recombinant eiwit is dan ruwweg 9.3 miljoen kg champignon nodig ofwel 9.3 duizend ton champignons. Dat is ca. 3.5% van de huidige jaarproductie in Nederland.

In een champignonbedrijf dat machinaal champignons oogst werden in 2002 champignons geoogst aan een kostprijs van 0.90 Euro per kilo (Groot *et al.*, 2003). De productie van 9,3 miljoen kg zou in dat geval omstreeks 8,4 miljoen Euro kosten. Het is echter onwaarschijnlijk dat in de teelt van genetisch gemodificeerde organismen tegen dezelfde prijs kan worden geproduceerd als in de teelt van conservenchampignons. De inrichtingseisen voor het bedrijf en de naleving van regelgeving zullen de kostprijs zeker verhogen. Aangezien de productiekosten (€8.4 miljoen) een klein gedeelte (<2%) zijn van de verkoopwaarde (\$500 miljoen) hoeft dat nog geen *bottle neck* te zijn.

Een tweede onzekere factor is het gehalte aan recombinant eiwit in de champignons. In dit rekenvoorbeeld is uitgegaan van 0,1% van het geproduceerde eiwit. Indien 1% van het geproduceerde eiwit uit recombinant eiwit bestaat wordt 350 mg recombinant eiwit per kg champignons geproduceerd. Voor een jaarproductie van 325 kg recombinant eiwit is dan 930.000 kg champignons nodig (productiekosten <0.2%). De kosten worden dus zeer sterk beïnvloed door het gehalte aan recombinant eiwit in de paddestoelen.

Een derde onzekere factor in de berekening is de opbrengst aan champignons. In een teelt van voedingschampignons worden opbrengsten van 350 kg per ton substraat bereikt. Het is geenszins zeker dat dergelijke top-opbrengsten ook gehaald worden in de teelt van genetisch gemodificeerde paddestoelen. Enerzijds zal de kwaliteit van het geproduceerde recombinante eiwit het oogstmoment bepalen. Dat moment hoeft niet samen te vallen met het moment waarop de meeste kilogrammen paddestoelen geoogst kunnen worden. Anderzijds is het niet zeker dat de teelt op het huidige commercieel verkrijgbare substraat kan worden uitgevoerd. Indien ander substraat gebruikt wordt, kunnen zowel opbrengst als kosten van het substraat wezenlijk anders zijn.

Als de paddestoelen met recombinant eiwit zijn geoogst, zal het recombinant eiwit ge-extraheerd en gezuiverd moeten worden. Een schatting van de kosten van extractie en zuivering van het recombinant eiwit voor medicinaal gebruik is moeilijk te geven. Deze kosten zullen sterk afhankelijk zijn van het gemak waarmee de zuivering kan worden uitgevoerd en de mate van zuiverheid die bereikt moet worden. Eiwitpreparaten voor medicinaal gebruik, vooral diegene die door injectie of via een infuus worden toegediend, moeten volledig ontdaan zijn van de aanwezigheid van virussen, endotoxinen en andere verontreinigingen en het uiteindelijke eiwitpreparaat dient minstens 95-98% zuiver te zijn (Headon & Walsh, 1994). Evangelista *et al.* (1998) hebben een berekening gemaakt van de kosten van het zuiveren van recombinant β -glucuronidase enzym uit genetisch gemodificeerde mais. Zij zijn er in hun berekeningen van uitgegaan dat mais van genetisch gemodificeerde planten tweemaal zoveel kost als normale voedingsmaïs. De genetisch gemodificeerde mais bevatte 132 mg recombinant eiwit per kg. Op jaarbasis kon uit 1,74 miljoen kg genetisch gemodificeerde mais 137 kg recombinant β -glucuronidase van 83% zuiverheid worden geproduceerd. De productiekosten bedroegen \$43000 per kg recombinant β -glucuronidase. De kosten van de gebruikte genetisch gemodificeerde mais bedroegen 6% van de productiekosten (i.e. \$0,20 per kg genetisch gemodificeerde mais).

Uitgaande van bovenstaand voorbeeld kan men concluderen dat de kosten van zuivering en extractie een bijzonder grote invloed hebben op de kostprijs van het uiteindelijk op te leveren eiwitpreparaat. Indien een recombinant eiwit gebruikt zou kunnen worden in een toepassing waarvoor met een minder stringente zuivering nodig is, zou dat de kostprijs sterk kunnen drukken.

Creemers-Molenaar *et al.* (2002) beschrijven in de haalbaarheidstudie die zij opstelden t.b.v. de Glastuinbouw een profiel voor potentiële farmaceutische eiwitten die in principe geschikt zijn voor productie via glastuinbouw. Voor productie van recombinante eiwitten in paddestoelen gelden dezelfde overwegingen. Wanneer de sterke eigenschappen zoveel mogelijk worden uitgebuit en de zwakke kenmerken zoveel mogelijk worden vermeden, gaat het om:

1. Producten waarvan langdurig grote volumes omgezet kunnen worden, zodat grootschalige productie rendabel is, en waarmee niet snel op een kortstondige marktvraag gereageerd hoeft te worden.
2. Producten die direct toepasbaar zijn, of toepasbaar zonder dure extractie en zuiveringen, en waarvoor dus geen registratie nodig is. Hiermee vallen dus ook alle producten met intraveneuze toepassing af. Daarmee zou deels het probleem van schimmel-type glycosylering worden omzeild.
3. Complexe eiwitten die niet geproduceerd kunnen worden door microbiële systemen.

8.2.2 Eiwitten voor niet-medicinaal gebruik.

Indien men de recombinante eiwitten in de genetisch gemodificeerde paddestoelen niet voor medicinaal gebruik produceert kan men waarschijnlijk veel sneller tot een toepassing komen. Daarnaast maakt de minder stringente zuivering dat het eiwitpreparaat goedkoper kan worden geproduceerd. Creemers-Molenaar *et al.* (2002) noemen diverse productgroepen, waaronder niet-farmaceutische eiwitten, die aan dit profiel voldoen. Voorbeelden zijn:

- Antilichamen met toepassingen a) in diagnostiek, b) in crèmes (huidapplicatie en tandpasta, gericht tegen bacteriën en virussen, c) als ligand bij industriële bioaffiniteitszuiveringen.
- Collageen en anti-microbiële eiwitten met toepassing in cosmetica en medicinale zalven.
- Vaccins voor uitsluitend orale vaccinatie
- Digestieve enzymen voor toepassing bij spijsverteringsaandoeningen (bijv. alcoholdehydrogenase, lactase).
- Eiwitten die gebruikt worden voor diagnostische toepassingen, en waarvan relatief grote hoeveelheden nodig zijn en die geringe zuiverheid mogen hebben.
- Enzymen voor industriële toepassingen (bijvoorbeeld bereiding van levensmiddelen, wasmiddelen, polymeerchemie).
- Additieven voor diervoeder (bijvoorbeeld fytase)
- Nutraceuticals.

9 Voorspelling van benodigde productiecapaciteit.

De benodigde productiecapaciteit en daarmee het aantal bedrijven dat betrokken zou kunnen zijn bij de teelt van genetische gemodificeerde paddestoelen voor de productie van farmaceutische eiwitten is moeilijk te voorspellen.

Onzekere factoren in een voorspelling zijn:

- behoefte aan het te produceren eiwit
- gehalte aan recombinant eiwit dat in genetisch gemodificeerde paddestoelen bereikt kan worden
- de paddestoelsoort die gebruikt kan gaan worden
- het teeltsysteem dat gebruikt kan gaan worden.

We hebben twee voorbeelden uitgewerkt waarbij we zijn uitgegaan van champignon en oesterzwam als te gebruiken paddestoelsoorten in de huidige teeltsystemen. Of in de toekomst ook daadwerkelijk recombinante eiwitten in deze soorten geproduceerd gaan worden is niet duidelijk. Het is zelfs niet duidelijk in hoeverre de huidige teeltsystemen voldoen aan de eisen die het afnemende farmaceutische bedrijf stelt. Indien op steriele substraten geteeld moet gaan worden of indien de teelt op granen wordt uitgevoerd, kunnen opbrengsten en aantal teelten dat per jaar kan worden uitgevoerd sterk verschillen.

9.1 Bij gebruik van champignon als productieplatform:

Bij het berekenen van het aantal bedrijven dat mogelijk betrokken kan zijn bij het produceren van recombinante eiwitten in genetisch gemodificeerde champignons zijn we uitgegaan van een teelt waarin machinaal geoogst wordt. In ons rekenmodel worden de bedden gevuld met 85 kg doorgroeid substraat per m². We gaan uit van een champignon-opbrengst van 350 kg/ton substraat. Deze champignons bevatten een eiwitgehalte van 3.5% van het versgewicht (Abou-Heilah et al. 1987, Beelman & Edwards 1989). Op dit denkbeeldige bedrijf worden 7 teelten per jaar uitgevoerd. Aangezien het gehalte aan recombinant eiwit niet bekend is, is uitgegaan van twee hypothetische gehalten aan recombinant eiwit, 0.1% en 1.0% van het totale eiwitgehalte. De behoefte aan teeltruimte wordt weergegeven in Tabel 6.

Gehalte aan recombinant eiwit	Opbrengst aan recombinant eiwit		Benodigde jaarproductie recombinant eiwit	Benodigd teeltoppervlak	Benodigd aantal cellen op bedrijf	
	% van totaal eiwit	kg/m ²	kg/jaar/m ²	Kg	m ²	bij 400 m ² teeltopp./cel
0.1%	0.001	0.0073	2	274	1.0	1.0
			10	1372	4.0	2.0
			200	27440	69.0	28.0
			1000	137198	343.0	138.0
1.0%	0.010	0.0729	2	27	1.0	1.0
			10	137	1.0	1.0
			200	2744	7.0	3.0
			1000	13720	35.0	14.0

Tabel 6. Globale schatting van het aantal bedrijven dat betrokken zou kunnen zijn bij de productie van recombinante eiwitten in genetisch gemodificeerde champignons.

Bij een gehalte aan recombinant eiwit van 0.1% van het totaal eiwit en een behoefte van 200 kg recombinant eiwit per jaar kan met 28 tot 69 cellen in de jaarlijkse behoefte voorzien worden. Snijbedrijven in Nederland variëren in teeltoppervlak tussen 400 en 1000 m² per teeltcel. Er zijn meerdere teeltcellen op

een bedrijf aanwezig, waardoor een vrij constante productie in de tijd kan worden geleverd. Zelfs bij een behoefte aan 200 kg recombinant eiwit per jaar en een gehalte aan recombinant eiwit van 0.1% van het totale eiwit, zouden 4 bedrijven met elk 7 cellen van 1000 m² in de behoefte kunnen voorzien of 10 bedrijven met elk 7 cellen van 400 m². Of bij een teelt waarbij gestuurd wordt op het gehalte aan recombinant eiwit nog steeds opbrengsten van 350 kg per ton substraat gehaald worden is overigens de vraag.

Indien meerdere recombinante eiwitten gelijktijdig geproduceerd moeten worden kan een beperkt aantal bedrijven in de behoefte voorzien.

9.2 Bij gebruik van oesterzwam als productieplatform

Bij het berekenen van het aantal bedrijven dat mogelijk betrokken kan zijn bij het produceren van recombinante eiwitten in genetisch gemodificeerde oesterzwammen zijn we er van uitgegaan dat de oesterzwammen in pakketten van 18 kg gepasteuriseerd stro-substraat geteeld worden en daarna met de hand geoogst worden. In ons rekenmodel gaan we verder uit van een opbrengst van 150 kg per ton substraat en een eiwitgehalte van 1.95% van het versgewicht (Manzi *et al.*, 2001; Mattila *et al.*, 2002; Yildiz *et al.*, 1998). Als gemiddeld bedrijf stellen we ons voor dat 6 teelten per cel per jaar worden uitgevoerd en dat het bedrijf 6 cellen heeft. Een de teeltruimten bevatten in ons rekenvoorbeeld 600 pakketten per cel. De behoefte aan oesterzwamteeltruimte wordt weergegeven in Tabel 7.

Gehalte recombinant eiwit (% van het totaal eiwit)	Productie recombinant eiwit/ton (kg)	Benodigde jaarproductie recombinant eiwit (kg)	Substraat behoefte (ton)	aantal pakketten	aantal cellen (bij 6 teelten per jaar)	aantal bedrijven
0.10%	0.00293	2	684	37987	10.6	2
		10	3419	189934	52.8	9
		200	68376	3798670	1055.2	176
		1000	341880	18993352	5275.9	880
1.00%	0.02925	2	68	3799	1.1	1
		10	342	18993	5.3	1
		200	6838	379867	105.5	18
		1000	34188	1899335	527.6	88

Tabel 7. Globale schatting van het aantal bedrijven dat betrokken zou kunnen zijn bij de productie van recombinante eiwitten in genetisch gemodificeerde oesterzwammen.

Bij gebruik van gepasteuriseerd stro in het in Nederland gebruikelijke teeltsysteem voor oesterzwammen zouden capaciteitsproblemen kunnen optreden. Indien het gehalte aan recombinant eiwit slechts 0.1% van het totaal eiwit in de oesterzwam zou zijn en de behoefte aan recombinant eiwit 200 kg per jaar, dan zouden er alleen al voor de productie van dit ene recombinante eiwit meer bedrijven nodig zijn dan er momenteel in Nederland bestaan.

Wil de oesterzwam een aantrekkelijk productieplatform voor grote hoeveelheden recombinante eiwitten worden, dan moet het gehalte aan recombinant eiwit minstens 1% van het totale eiwit zijn. Daarnaast zal getracht moeten worden om een efficiënter teeltsysteem te ontwikkelen.

10 Gebruikte literatuur

- Abou-Heilah, A.N.; Kassim, M.Y.; Khaliel, A.S. (1987) Chemical composition of the fruiting bodies of "*Agaricus Bisporus*". *Phyton* 47(1987)1/2 p. 63-68.
- Alic M., Clarck E.K., Kornegay J.R. & Gold M.H. (1990) Transformation of *Phanerochaete chrysosporium* and *Neurospora crassa* with adenine biosynthetic genes from *Schizophyllum commune*. *Curr. Genet.* 17, pp 305-311.
- Alves A.M.C.R., Record E., Lomascolo A, Scholtmeijer K., Asther M., Wessels J.G.H. & Wösten H.A.B. (2004) Highly efficient production of laccase by the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarius*. *Appl. Environm. Microbiol* 70(11) pp 6379-6384.
- Arcand F. & Arnison P. (2004) Development of novel protein production systems and economic opportunities & regulatory challenges for Canada. Download van (<http://www.cmpm2005.org/plant-factories.aspx>) .
- Bartholomew K., Dos Santos G., Dumonceaux T., Charles T. & Archibald F. (2001) Genetic transformatrion of *Trametes versicolor* to phleomycin resistance with the dominant selectable marker *shble*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, pp 201-204.
- Beelman R.B. & Edwards C.G. (1989) Variability in the composition and nutritional value of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Mushroom News* (july) pp 17-26.
- Binnering D.M., Skrzynia C., Pukkila P.J. & Casselton L.A. (1987) DNA-mediated transformation of the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *The EMBO Journal* 6(4) pp 835-840.
- Burns C., Gregory K.E., Kirby M., Cheung M.K., Riquelme M., Elliott T.J., Challen M.P., Bailey A. & Foster G.D. (2005) Efficient GFP expression in the mushrooms *Agaricus bisporus* and *Coprinus cinereus* requires introns. *Fungal Genetics & Biology* 42 pp 191-199.
- Burton K.S., Hammond J.B.W. & Minamide T. (1994) Protease activity in *Agaricus bisporus* during periodic fruiting (flushing) and sporophore development. *Curr. Microbiol.* 28, pp 275-278.
- Burton K.S., Partis M.D., Wood D.A. & Thurston C.F. (1997) Accumulation of serine proteinase in senescent sporophores of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Mycol. Res.* 101(2), pp 146-152.
- Chen X., Stone M., Schlaghaufer C. & Romaine C.P. (2000) A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. *Appl. Environm. Microbiol.* 66, pp 4510-4513.
- COGEM (2004) Farmaceutische gewassen. Signalering en Advies. CGM/041214-01/02. <http://www.cogem.net/pdfdb/advies/CGM041214-01.pdf>
- Creemers-Molenaar J., Stevens L.H. & van der Krieken W.M. (2002) Farmaceutische eiwitten in planten; een nieuwe uitdaging. Een haalbaarheidsstudie door Plant Research International in opdracht van Stichting Innovatie Glastuinbouw en InnovatieNetwerk Groene Ruimte en Agrocluster. Rapport nummer 02.2.006, Den Haag, februari 2002. http://www.agro.nl/innovatienetwerk/doc/farmaceutische_eiwitten.pdf
- Daniell H., Streatfield S.J. & Wycoff K. (2001) Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *TRENDS in Plant Science* 6(5), pp 219-226.
- De Groot M.J.A., Bundock P., Hooykaas P.J.J. & Beijersbergen A.G.M. (1998) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology* 16, pp 839-842.
- EMEA (2005) Public Statement on Good Agricultural and Collection Practice for Starting Materials of Herbal Origin [Draft]. London, UK: European Medicines Agency. Doc. Ref. EMEA/HMPC/246816/2005. Download van <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/hmpc/24681605en.pdf>
- Eurobarometer 52.1 (2000) The Europeans and Biotechnology. A report of INRA (Europe)-ECOSA on behalf of Directorate General for Research. Directorate B – Quality of Life and Management of Living Resources Program (<http://europa.eu.int/comm/research/pdf/eurobarometer-en.pdf>).
- Eurobarometer 224 (2005) Europeans, Science and Technology. http://europa.eu.int/comm/public_opinion/archives/ebs/ebs_224_report_en.pdf
- Evangelista R.L., Kusnadi A.R., Howard J.A. & Nikolov Z.L. (1998) Process and economic evaluation

of the extraction and purification of recombinant b-glucuronidase from transgenic corn. *Biotechnol Prog.* 14 pp 607-614.

- FDA (2002) Guidance for Industry: Drugs, Biologics, and Medical Devices Derived from Bioengineered Plants for Use in Humans and Animals [Draft Guidance]. Rickville MD, USA: United States Food and Drug Administration.
- Fisher R., Stoger E., Schillberg S., Christou P. & Twyman R.M. (2004) Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Plant Biology* 7, pp 152-158.
- Gerngross T.U. (2004) Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nature Biotechnology* 22(11) pp 1409-1414.
- Gillis J. (2003) U.S. will subsidize cleanup of altered corn. *Washington Post*, Woensdag 26 Maart 2003.
- Godio R.P., Fouces R., Gudiña E.J. & Martín J.F. (2004) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the antitumor clavarinic acid-producing basidiomycete *Hypholoma sublateritium*. *Curr. Genet.* 46, pp 287-294.
- Granada J.D., Kertesz-Chaloupková K., Aebi M. & Kües U. (1997) Restriction enzyme-mediated DNA integration in *Coprinus cinereus*. *Mol. Gen. Genet.* 256, pp 28-36.
- Groot M.J., Vermeire R., Peppelman G., van Roestel A.J.J., Willensens L.J., Meeder A. & Zhu Y. (2003) Concurrentiekracht verwerkte paddestoelen. PPO Rapport 2003-15.
- Headon D.R. & Walsh G. (1994) The industrial production of enzymes. *Biotechnol. Adv.* 12, pp 635-646.
- Hilber O. (1982) Die Gattung *Pleurotus* (Fr.) Kummer. J. Cramer, Vaduz.
- Hirano T., Sato T., Yaegashi K. & Enei H. (2000) Efficient transformation of the edible basidiomycete *Lentinus edodes* with a vector using a glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase promoter to hygromycin B resistance. *Mol. Gen. Genet.* 263, pp 1047-1052.
- Honda Y., Matsuyama T., Irie T., Watanabe T. & Kuwahara M. (2000) Carboxin resistance transformation of the homobasidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus*. *Curr. Genet.* 37, pp 209-212.
- Horn M.E., Woodard S.L. & Howard J.A. (2004) Plant molecular farming; systems and products. *Plant Cell Rep.* 22 pp 711-720.
- Hossain F., Onyango B., Adelaja A., Schilling B. & Hallman W. (2002) Uncovering factors influencing public perceptions of Food Biotechnology. Food Policy Institute, University of New Jersey. (<http://www.foodpolicyinstitute.org/docs/working/Perception%20of%20Food%20Biotech-WP-0602-003.pdf>)
- Howard J.A. & Hood E. (2005) Bioindustrial and biopharmaceutical products produced in plants. *Advances in Agronomy* 85, pp 91-124.
- Irie T., Honda Y., Watanabe T. & Kuwahara M. (2001a) efficient transformation of filamentous fungus *Pleurotus ostreatus* using single-strand carrier DNA. *Appl Microbiol Biotechnol* 55, pp 563-565.
- Irie T., Honda Y., Hirano T., Sato T., Enei H., Watanabe T. & Kuwahara M. (2001b) Stable transformation of *Pleurotus ostreatus* to hygromycin B resistance using *Lentinus edodes* GPD expression signals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, pp 707-709.
- Jia J.H., Buswell J.A. & Pederby J.F. (1998) Transformation of the edible fungi, *Pleurotus ostreatus* and *Volvariella volvacea*. *Myc. Res.* 102(7), pp 876-880.
- Kajita S., Sugawara S., Miyazaki Y., Nakamura M., Katayama Y., Shishido K. & Imura Y. (2004) Overproduction of recombinant laccase using a homologous expression system in *Coriolus versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66 pp 194-199.
- Kikuchi M., Ogawa K., Yamazaki T., Kajiwara S., Sugio A., Nakamura S. & Shishido K. (1999) Secretory expression of a *Bacillus subtilis* xylanase gene in the Basidiomycete *Coprinus cinereus*. *FEMS Microbiology Letters* 178, pp 277-282.
- Kikuchi M., Kitamoto N. & Shishido K. (2004) Secretory production of *Aspergillus oryzae* xylanase XynF1, xynF1 cDNA product, in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Appl. Microbiol Biotechnol* 63 pp 728-73.
- Kim K., Leem Y., Kim K., Kim K. & Choi H.T. (2002) Transformation of the medicinal basidiomycete *Trametes versicolor* to hygromycin B resistance by restriction enzyme mediated integration. *FEMS*

- Microbiol. Lett 209, pp 273-276.
- Kim B-G., Magae Y., Yoo Y-b. & Kwon S-T (1999) Isolation and transformation of uracil auxotrophs of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. FEMS Microbiol. Lett 181(2) pp 225-228.
 - Kingsnorth C.S., Eastwood D.C. & Burton K.S. (2001) Cloning and post-harvest expression of serine proteinase transcripts in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. Fungal Genetics and Biology 32 pp 135-144.
 - Kuo C-Y., Chou S-Y. & Huang C-T. (2004) Cloning of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and use of the *gpd* promoter for transformation on *Flammulina velutipes*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 65, pp 593-599.
 - Leem Y-e., Kim S-j., Ross I.K. & Choi H.T. (1999) Transformation and laccase mutant isolation in *Coprinus congregatus* by restriction enzyme-mediated integration. FEMS Microbiol. Lett. 172(1), pp 35-40.
 - Li D., Youngs H. & Gold M.H. (2001) Heterologous expression of a thermostable Manganese peroxidase from *Dichomitus squalens* in *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys. 385(2) pp 348-356.
 - Ma B., Mayfield M.B. & Gold M.H. (2003) Homologous expression of *Phanerochaete chrysosporium* manganese peroxidase, using bialaphos resistance as a dominant selectable marker. Curr Genet. 43 pp 407-414.
 - Ma J. K-C., Drake P.M.W. & Christou P. (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. Nature Reviews Genetics 4, pp 794-805.
 - Ma J. K-C., Barros E., Bock R., Christou P., Dale P.J., Dix P.J., Fisher R., Irwin J., Mahoney R., Pezzotti M., Schillberg S., Sparrow P., Stoger E. & Twyman R.M. (2005) Molecular farming for new drugs and vaccines. EMBO reports 6(7), pp 593-599.
 - Manzi P., Aguzzi A. & Pizzoferrato L. (2001) Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. Food Chem 73(3) pp 321-325.
 - Mattila P, Salo-Vaananen P, Konko K (2002) Basic composition and amino acid contents of mushrooms cultivated in Finland J. Agric. Food Chem. 50 (22) pp 6419-6422
 - Mellon M & Rissler J (2004) Gone to Seed. Rapport uitgegeven door UCS Publications. Download van http://www.ucsusa.org/food_and_environment/genetic_engineering/gone-to-seed.html
 - Mikosch T.S., Lavrijssen B., Sonnenberg A.S.M. & Van Griensven L.J.L.D. (2001) Transformation of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) using T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens*. Curr. Genet. 39, pp 35-39.
 - Mooibroek H., Kuipers A.G.J., Sietsma J.H., Punt P.J. & Wessels J.G.H. (1990) Introduction of hygromycin B resistance into *Schizophyllum commune*: preferential methylation of donor DNA. Mol. Gen. Genet. 222, pp 41-48.
 - Munoz-Rivas A., Specht C.A., Drummond B.J., Froeliger E., Novotny C.P. & Ullrich R.C. (1986) Transformation of the basidiomyceten, *Schizophyllum commune*. Mol. Gen. Genet. 205, pp 103-106.
 - Murata H. & Miyazaki Y. (2004) δ_{marY1} , the LTR of the gypsy-type retroelement *marY1* from the basidiomyceten *Tricholoma matsutake*, allows multicopy DNA integration in *Lentinula edodes*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 68(1) pp 218-221.
 - Noël T., Simoneau P. & Labarère J (1995) Heterologous transformation of *Agrocybe aegerita* with a bacterial neomycin-resistance gene fused to a fungal promoter-like DNA sequence. Theor. Appl. Genet. 90, pp 1019-1027.
 - Ogawa K., Yamazaki T., Hasebe T., Kajiwara S., Watanabe A., Asada Y. & Shishido K. (1998) Molecular breeding of the basidiomyceten *Coprinus cinereus* strains with high lignin-decolorization and – degradation activities using novel heterologous protein expression vectors. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49, pp 285-289.
 - Phillips R. (1981) Paddestoelen en schimmels van West-Europa. Spectrum, Utrecht.
 - Romaine C.P. (2005) Transgenic breeding of *Agaricus bisporus*: the next frontier. Acta Edulis Fungi vol. 12 Supplement pp 174-184.
 - Sato T., Yaegashi K., Ishii S., Hirano T., Kajiwara S., Shishido K. & Enei H. (1998) Transformation of the edible basidiomycete *Lentinus edodes* by Restriction Enzyme – Mediated Integration of plasmid DNA. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62 (12) pp 2346-2350.

- Schmidt F.R. (2004) Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, pp 363-372.
- Scholtmeijer K., Wösten H.A.B., Springer J. & Wessels J.G.H. (2001) Effect of introns and AT-rich sequences on expression of the bacterial hygromycin B resistance gene in the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Appl. Environm. Microbiol.* 67(1), pp 481-483.
- Schuren F.H.J. & Wessels J.G.H. (1994) Highly- efficient transformation of the homobasidiomycete *Schizophyllum commune* to phleomycin resistance. *Curr. Genet.* 26, pp 179-183.
- Schuren F.H.J. & Wessels J.G.H. (1998) Expression of heterologous genes in *Schizophyllum commune* is often hampered by the formation of truncated transcripts. *Curr. Genet.* 33, pp 151-156.
- Specht C.A., Munoz-Rivas A., Novotny C.P. & Ullrich R.C. (1988) Transformation of *Schizophyllum commune*: an analysis of parameters for improving transformation frequencies. *Experimental Mycology* 12, pp 357-366.
- Steiner U. (2005) State of the Biologics Market. Lecture held at Conference on Plant-made Pharmaceuticals. Montréal, Québec, Canada - January 30 to February 2, 2005.
- Sun L., Cai H-Q., Xu W-H., Hu Y-L. & Lin Z-P. (2002) CaMV 35S promoter directs beta-glucuronidase expression in *Ganoderma lucidum* and *Pleurotus citrinopileatus*. *Molecular Biotechnology* 20(3), pp 239-244.
- Sunagawa M. & Magae Y. (2002) Transformation of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* by particle bombardment. *FEMS Microbiol Lett* 211, pp 143-146.
- Teli N.P. & Timko M.P. (2004) Recent developments in the use of transgenic plants for the production of human therapeutics and biopharmaceuticals. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79, pp 125-145.
- Trendanalysis Biotechnology (2004). Trends in biotechnology and their possible significance for society. (http://www.cogem.net/pdfdb/rapport/Trend_analysis_biotechnology.pdf)
- Tsukamoto A., Kojima Y., Kita Y. & Sugiura J. (2003) Transformation of the white-rot basidiomyceten *Coriolus hirsutus* using the ornithine carbamoyltransferase gene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67(10) pp 2075-2082.
- Twyman R.M., Stoger E., Schillberg S., Christou P. & Fisher R. (2003) Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology* 21 (12) pp 570-578.
- Velcko A.J., Kerrigan R.W., MacDonald L.A., Wach M.P., Schlagnhauser C. & Romaine C.P. (2004) Expression of novel genes in *Agaricus bisporus* using an *Agrobacterium*-mediated transformation technique. In: *Science and Cultivation of Edible and Medicinal Fungi*. Romaine, Keil, Rinker & Royse (eds.), The Pennsylvania State University, pp 591-597.
- Walsh G. (2000) Biopharmaceutical benchmarks. *Nature Biotechnology* 18 (August). Pp 831-833.
- Walsh G. (2003) Pharmaceutical biotechnology products approved within the European Union. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 55, pp 3-10.
- Wurm FM (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology* 22 (11) pp 1393-1398.
- Yanai K., Yonekura K., Usami H., Hirayama M., Kajiwara S., Yamazaki T., Shishido K. & Adachi T. (1996) The integrative transformation of *Pleurotus ostreatus* using Bialaphos resistance as a dominant selectable marker. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60(3) pp 472-475.
- Yildiz A., Karakaplan M. & Aydin F. (1998) Studies on *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kum. var. *salignus* (Pers. ex Fr.) Konr. et Maubl.: cultivation, proximate composition, organic and mineral composition of carpophores. *Food Chem* 61 (1-2) pp 127-130
- Zhang C., Odon V., Kim H.K., Challen M., Burton K.S., Hartley D. & Elliott T. (2004) Mushrooms for Molecular Pharming. . In: *Science and Cultivation of Edible and Medicinal Fungi*. Romaine, Keil, Rinker & Royse (eds.), The Pennsylvania State University, pp 611-617.

Bijlage 1. Ontwikkeling van een genetisch gemodificeerde stammen van paddestoelproducerende schimmels

Om farmaceutische eiwitten in paddestoelen te kunnen produceren moet aan een aantal randvoorwaarden zijn voldaan:

- Er moet een systeem zijn ontwikkeld waarmee functionele farmaceutische eiwitten in basidiomyceten tot een niveau van minimaal 100 mg/kg versgewicht tot expressie kunnen worden gebracht.
- Er moet een farmaceutisch bedrijf zijn dat interesse toont in de ontwikkeling van geneesmiddelen uit farma-paddestoelen
- Er moet een teeltsysteem zijn ontwikkeld waarin de farma-paddestoelen met hoge opbrengst en lage kosten geproduceerd kunnen worden.
- Er moet een gespecialiseerd broedbedrijf ontwikkeld worden (ofwel zelfstandig ofwel als onderdeel van het farmaceutisch bedrijf dat de paddestoelen verwerkt)
- Er moeten voldoende teeltbedrijven zijn. Deze moeten zodanig zijn aangepast dat teelt van farma-paddestoelen mogelijk wordt (gelet op de bestaande wetgeving, gelet op de eisen die het farmaceutische bedrijf stelt aan het product).

Ontwikkeling van de techniek.

Een systeem waarmee functionele farmaceutische eiwitten in basidiomyceten tot expressie kunnen worden gebracht.

De afgelopen twee decennia is onderzoek verricht naar de mogelijkheid om specifieke eiwitten in grote hoeveelheden door paddestoelvormende schimmels (basidiomyceten) te laten produceren. Hierbij heeft men geprobeerd stukken DNA die coderen voor het gewenste eiwit in te bouwen in de chromosomen van de schimmels. Hierbij zijn ruwweg twee benaderingen gevolgd; introductie van een gen dat al in de schimmel aanwezig is en introductie van soort-vreemd DNA.

Bij introductie van een gen dat al in de schimmel aanwezig was het de bedoeling om meerdere kopieën van het gen in het erfelijk materiaal te introduceren. Met de introductie van meerdere kopieën hoopte men een hogere productie van het gewenste eiwit te verkrijgen.

Met de introductie van soort-vreemd DNA probeerde men om de schimmel eiwitten te laten produceren, die hij van nature niet kan produceren. Deze benadering is nodig als met functionele farmaceutische eiwitten door schimmels wil laten produceren.

Een overzicht van de gerapporteerde succesvolle pogingen om paddestoelsoorten genetisch te transformeren, wordt gegeven in Tabel Voor een groot gedeelte van deze paddestoelsoorten bestaat de mogelijkheid om ze om commerciële basis te telen (champignon (*Agaricus bisporus*), oesterzwam (*Pleurotus ostreatus*), shii-take (*Lentinula edodes*), fluweelpootje (*Flammulina velutipes*), rijststropaddestoel (*Volvariella volvacea*), inktzwam (*Coprinus cinereus*), populierenleemhoed (*Agrocybe aegerita*)).

Het onderzoek naar de genetische transformatie van paddestoelen vindt slechts plaats in een paar landen. Onderzoek naar genetische transformatie van champignon vindt bijna uitsluitend plaats in Nederland, Engeland en de Verenigde Staten. Genetische transformatie van shii-take vindt vrijwel alleen plaats bij diverse onderzoeksgroepen in Japan, terwijl genetische transformatie van oesterzwam plaats vindt bij onderzoeksgroepen in Japan, China en Zuid-Korea.

Hoewel genetische transformatie van paddestoelvormende schimmels bijkans de vele publicaties mogelijk is, worden echter geen hoge niveau's van eiwitproductie gehaald. Nadat het "lichaamsvreemde" DNA in de schimmelcellen is geïntroduceerd, wordt het blijkbaar niet bijzonder effectief door de cel gebruikt om het gewenste eiwit te produceren. Daar kunnen verschillende redenen voor zijn. Soms herkent de schimmelcel het lichaamsvreemde DNA niet als een stukje DNA waar eiwit van gemaakt moet worden (slechte promotor, Godio et al., 2004, Schuren & Wessels, 1994). Soms heeft de schimmelcel moeite om het lichaams-

Soort	Transformatie-methode	Efficiëntie (transformanten per µg vector)	Referentie
<i>Coprinus cinereus</i>	PEG/EDTA-transformatie van tryptofaan-auxotrofe protoplasten		Ogawa et al., 1998 Kikuchi et al., 1999 Kikuchi et al., 2004 Burns et al., 2005
	Lithium acetaat/PEG transformatie van tryptofaan-auxotrofe protoplasten	300	Binnering et al., 1987
	REMI-mediated PEG-transformatie van para-aminobenzoëzuur-auxotrofe protoplasten	100-800	Granado et al., 1997
<i>Schizophyllum commune</i>	PEG-transformatie van tryptofaan-auxotrofe protoplasten	2 tot 30	Munoz-Rivas et al., 1986
	PEG-cotransformatie van tryptofaan-auxotrofe protoplasten met hygromycine		Mooibroek et al., 1990
	PEG/Ca ⁺⁺ -transformatie van tryptofaan-protoplasten	10000	Schuren & Wessels, 1994
	PEG/Ca ⁺⁺ -transformatie van tryptofaan-protoplasten	2000	Specht et al. 1988
<i>Agaricus bisporus</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> transformatie met hygromycine resistentie als selectiemarker		De Groot et al., 1998, Chen et al., 2000 Mikosch et al., 2001 Burns et al., 2005
	PEG transformatie met hygromycine resistentie als selectiemarker		
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	PEG-transformatie van uracil-of adenine-auxotrofe protoplasten	30	Li et al., 2001 Alic et al., 1990
	PEG-transformatie van protoplasten met bialaphos resistentie als selectiemarker (bialaphos = glyfosinaat = fosfonithricine)		Ma et al., 2003
<i>Pleurotus ostreatus</i>	PEG/EDTA-transformatie van protoplasten met carboxine resistentie als selectiemarker	1-5 200 (ssDNA-carrier) 0.1 (no REMI)-0.8 (REMI)	Honda et al., 2000 Irie et al., 2001a Irie et al., 2001b
	Particle bombardment van uracil auxotroof mycelium	1	Sunagawa & Magae, 2002
	PEG/Ca ⁺⁺ -transformatie van protoplasten met bialaphos resistentie als selectiemarker	2	Yanai et al., 1996
	PEG/Ca ⁺⁺ -transformatie van protoplasten met 5-fluoroindole resistentie als selectiemarker	5	Jia et al., 1998
	PEG/Ca ⁺⁺ -transformatie van uracil-auxotrofe protoplasten	30	Kim et al., 1999

Tabel 8. Overzicht van paddestoelvormende schimmels waarbij in de afgelopen twee decennia succesvol genetische transformaties zijn uitgevoerd.

<i>Agrocybe aegerita</i>	Electroporatie van protoplasten met neomycine resistentie als selectiemarker	1-3	Noël et al., 1995
<i>Lentinula edodes</i>	REMI mediated PEG transformatie van protoplasten met hygromycine resistentie als selectiemarker.	6 1-16	Sato et al., 1998 Hirano et al., 2000
	PEG transformatie van protoplasten met hygromycine resistentie als selectiemarker	1	Murata & Miyazaki, 2004
<i>Volvariella volvacea</i>	PEG/Ca ⁺⁺ -transformatie van protoplasten met 5-fluoroindole resistentie als selectiemarker	4	Jia et al., 1998
<i>Coriolus (Trametes) versicolor</i>	PEG-transformatie van protoplasten met hygromycine resistentie als selectiemarker	13	Kajita et al. 2004
	REMI mediated PEG transformatie van protoplasten met hygromycine resistentie als selectiemarker.	25-50	Kim et al., 2002
	PEG-transformatie van protoplasten met phleomycine resistentie als selectiemarker	4-7	Bartholomew et al 2001
<i>Flammulina velutipes</i>	Electroporatie van protoplasten met hygromycine resistentie als selectiemarker	5-60	Kuo et al., 2004
<i>Ganoderma lucidum</i>	REMI mediated PEG transformatie van protoplasten met geneticine resistentie als selectiemarker.	4-17	Kim et al., 2004
	Electroporatie van protoplasten met hygromycine resistentie als selectiemarker	15	Sun et al., 2002
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	Electroporatie van protoplasten met hygromycine resistentie als selectiemarker	120	Sun et al., 2002
<i>Coprinus congregatus</i>	REMI mediated PEG transformatie van protoplasten met phosphinothricine resistentie als selectiemarker	550	Leem et al., 1999
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	PEG-transformatie van protoplasten met phleomycine of hygromycine resistentie als selectiemarker	6-10	Alves et al., 2004
<i>Coriolus hirsutus</i>	PEG/Ca ⁺⁺ -transformatie van arginine-auxotrofe protoplasten	1000-10000	Tsakamoto et al., 2003

Tabel 8 (vervolg) Overzicht van paddestoelvormende schimmels waarbij in de afgelopen twee decennia succesvol genetische transformaties zijn uitgevoerd.

vreemde DNA af te lezen omdat de codering van de aminozuren in het DNA te sterk verschilt van de eigen codering (AT rijk DNA, Scholtmeijer et al., 2001, Schuren & Wessels, 1998). In sommige gevallen bleken speciale DNA-fragmentjes (intronen) in het lichaamsvreemde DNA belangrijke signalen te bevatten voor de verdere verwerking van de in het DNA opgeslagen informatie voor de bouw van een lichaamsvreemd eiwit (Lugones et al., 1999; Scholtmeijer et al., 2001, Burns et al., 2005).



Figuur 4. Paddestoelproductie op steriel substraat (Sorhum broed). A: *Pleurotus eryngii*; B: Een sporenloze oesterzwam (*P. ostreatus*); C: Een sporenloze, niet eetbare, inktzwam (*Coprinus cinereus*).

Samenvattend kan men zeggen dat de verschillende onderzoeksgroepen wel in staat zijn om het DNA dat nodig is voor de productie van farmaceutische eiwitten in schimmelcellen te introduceren, maar dat het laten lezen van het DNA en het tot hoge concentraties produceren van eiwit nog niet lukt. Op dit punt is nog veel onderzoek nodig.

Er bestaan twee typen farmaceutische eiwitten; geglycosyleerde eiwitten en niet-geglycosyleerde eiwitten. Glycosylering houdt in dat als het eiwit gemaakt is, er in de cel "antennes" op gemaakt worden. Deze antennes bestaan uit ketens van suikermolekulen. Deze antennes zijn heel belangrijk voor een correcte fysiologische werking. Sommige eiwitten zoals bepaalde hormonen hebben deze antennes nodig. Zonder deze antennes zijn kan het lichaam het hormoon niet herkennen.

Er zijn echter verschillen in de manier waarop verschillende organismen deze antennes bouwen. Bacteriën bouwen helemaal geen antennes aan hun eiwitten. Schimmels maken wel suikerantennes op eiwitten, gebruiken iets andere suikers dan zoogdieren. Dat heeft tot gevolg dat een eiwit van humane oorsprong dat in een schimmel gemaakt wordt, niet dezelfde fysiologische werking hoeft te hebben als hetzelfde eiwit dat in een menselijke cel gemaakt wordt. Een andere mogelijkheid is dat "afwijkend geglycosyleerd" eiwit sneller uit de bloedbaan wordt verwijderd en dus minder lang werkzaam is.

Niet geglycosyleerde eiwitten omvatten momenteel ongeveer 40% van de markt voor farmaceutische eiwitten en deze markt groeit jaarlijks ong. 12%. (Insuline is een voorbeeld van een niet-geglycosyleerd farmaceutisch eiwit). Geglycosyleerde eiwitten omvatten 60% van de markt en kennen een jaarlijkse groei van ong. 26% (Gerngross, 2004)

Om de hele markt aan farmaceutische eiwitten te kunnen bedienen is het belangrijk om onderzoek te verrichten naar de mogelijkheden om de correcte suiker-antennes aan de farmaceutische eiwitten te bouwen.

Een niveau van minimaal 100 mg farmaceutisch eiwit/kg versgewicht is nodig wil een industriële toepassing aantrekkelijk worden (Evangelista et al., 1998). Daarnaast is de kwaliteit van het eindproduct in termen van

functionaliteit en homogeniteit heel belangrijk. De farmaceutische eiwitten moeten functioneel, homogeen, stabiel, non-immunogeen en vrij van verontreinigingen zijn.

Als een eiwit eenmaal gemaakt is door de schimmelcel, moet zoveel mogelijk vermeden worden dat het eiwit beschadigd raakt doordat het door proteases wordt afgebroken. Eiwitafbraak is niet alleen belangrijk voor de hoeveelheid eindproduct, maar ook voor de kwaliteit aangezien inactieve eiwitmoleculen in de zuiveringsprocedure moeilijk te scheiden zijn van intacte antilichamen.

Eenzijds kan men eiwitafbraak proberen te beperken door de geproduceerde eiwitmoleculen in celcompartimenten van de schimmelcel op te laten slaan, buiten bereik van proteases. Daarnaast is het belangrijk om de paddestoelen van een schimmel op het juiste moment te oogsten. Naarmate de paddestoelen langer blijven staan, neemt de activiteit van proteasen toe. Ook als paddestoelen na de oogst te lang blijven liggen neemt de protease activiteit toe (Burton et al., 1994; 1997; Kingsnorth et al., 2001). Het farmaceutisch eiwit moet bij voorkeur alleen in de paddestoelen worden geproduceerd en niet in het vegetatieve mycelium. Als het farmaceutisch eiwit niet in het vegetatieve mycelium wordt geproduceerd, kan voorkomen worden dat het farmaceutisch eiwit in hoge concentratie in het substraat aanwezig is. Dat kan veel verschil maken voor de manier waarop het substraat na de teelt verwerkt dient te worden.

Transformatie door PPO

PPO heeft de techniek van transformatie van paddestoelvormende schimmels in huis. Het *Agrobacterium* systeem is gebruikt om met succes champignon mycelium te transformeren. De PEG-transformatie van protoplasten van de oesterzwam is nu geoptimaliseerd en kan routinematig worden uitgevoerd. Ook is getest dat het transgene gen dat in het mycelium is gezet ook nog steeds werkt in de paddestoelen. Naast het onderhavige project is samengewerkt met PRI en een onderzoeksgroep aan de Universiteit van Utrecht in een ander verwant project. Daaruit is gebleken dat basidiomycete schimmels in staat zijn om vaccins te produceren (niet geglycosyleerde eiwitten) na transformatie met het betreffende gen.

PPO heeft in dit project getest of een aantal paddestoelsoorten geproduceerd kunnen worden op gesteriliseerde substraten. Sporenloze oesterzwamrassen (*Pleurotus ostreatus*) blijken erg geschikt te zijn:

- er is een transformatiesysteem voor oesterzwammen
- we beschikken over sporenloze rassen waardoor een inperking tijdens de teelt goed te handhaven is
- met de sporenloze rassen kunnen we paddestoelen produceren op steriel substraat (broed, zie Figuur 4.)

Wanneer dit soort rassen in een gesloten systeem gebruikt worden (productie en winning binnen één gesloten bedrijf) dan kan dit tot een productieplatform ontwikkeld worden.

Aangezien de overheid aanbeveelt om gewassen te gebruiken die niet in de voedselketen zitten is ook gekeken naar de inktzwam *Coprinus cinereus*. Deze soort wordt niet geteeld en geconsumeerd. De soort wordt veel in laboratoria gebruikt om de vorming van paddestoelen te onderzoeken. Er is een sporenloos ras van deze soort voorhanden (ATCC collectie) en PPO heeft deze lijn in huis. Uit een recente test hebben we kunnen concluderen dat dit ras ook paddestoelen produceert op steriel substraat. Bovendien is er een efficiënt transformatiesysteem voorhanden van deze soort.

Tot slot blijkt de kruisdistel oesterzwam ook uitstekend op steriel substraat geteeld te kunnen worden.