

# Primjena rekombinantne DNA tehnologije u proizvodnji lijekova

---

**Tesla, Blanka**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2010**

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:217:424770>

Rights / Prava: [In copyright/Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEU ILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO - MATEMATI KI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Primjena rekombinantne DNA tehnologije u proizvodnji lijekova  
(-The use of recombinant DNA technology in producing pharmaceuticals-)

### SEMINARSKI RAD

Blanka Tesla  
Preddiplomski studij biologije  
(Undergraduate Study of Biology)  
Mentor: prof. dr. sc Mirjana Pavlica

Zagreb, 2010.

## SADRŽAJ

1. Uvod .....	1
2. Rekombinantna DNA tehnologija .....	2
2.1. Transformacija	
.....	2
2.1.1. Vektorska transformacija .....	3
2.1.2. Direktna transformacija .....	3
3. Proizvodnja lijekova .....	4
3.1. Upotreba transgeni nih bakterija .....	6
3.2. Upotreba transgeni nih gljiva .....	6
3.3. Upotreba transgeni nih životinja .....	8
3.4. Upotreba transgeni nih biljaka .....	12
4. Zaključak .....	15
5. Literatura .....	16
6. Sažetak .....	17
7. Summary .....	18

## **1. UVOD**

Ljudi su oduvijek u prirodi tražili inspiraciju za otkrića kojima su unaprjeđivali svakodnevni život. Tako su u prirodi tražili različite supstance koje bi im pomogle u liječenju bolesti, ublažavanju njihovih simptoma te smanjenju bolova. Iako su koristili različite ekstrakte organizama kao lijekove, ti ekstrakti nisu sadržavali aktivne proteine. Proteini, koji su zbog svoje strukture jako labilni i osjetljivi na povišenu temperaturu,esto se uništaju prilikom procesa ekstrakcije. Prvi protein koji se koristio u terapeutske svrhe bio je inzulin iz guštera e svinje 20.-ih godina prošlog stoljeća (Houdebine, 2009). Desetljeće ima se takav inzulin koristio za liječenje dijabetesa. 1982. godine dogodila se prekretnica koja je uvelike promijenila i unaprijedila farmaceutsku industriju. Proizveden je prvi protein, inzulin, metodom rekombinantne DNA tehnologije iz bakterije *Escherichia coli* (Moschini, 2006). Tako proizveden ljudski inzulin pokazao se puno boljom alternativom konvencionalnom inzulinu i ubrzo ga je u potpunosti zamijenio. Ubrzo nakon toga proizveden je i ljudski hormon rasta istom metodom. Iako se ni inzulin ni hormon rasta ekstrahirani iz animalnih tkiva nisu pokazali ograničenja imaju, ipak je njihova kvaliteta uvelike poboljšana novom metodom proizvodnje. Osim kvalitete, nova tehnologija omogućila je i proizvodnju velikih količina željenih hormona. Danas se za proizvodnju proteina metodom rekombinantne DNA tehnologije, koriste osim bakterija, i kvasci, biljke, životinje te stanične kulture. Tako proizvedeni proteini imaju široku primjenu u farmaceutskoj industriji jer se kao antitijela, hormoni, cjepiva, faktori zgrušavanja, faktori rasta i dr. koriste kao vrlo uinkoviti lijekovi.

## **2. REKOMBINANTNA DNA TEHNOLOGIJA**

Rekombinantna DNA tehnologija podrazumijeva metode kojima se geni prenose iz jednog organizma u drugi. Rezultat tog postupka jest da gen koji stvara protein u organizmu jedne vrste, to sada ini u organizmu druge vrste. To se može postići i korištenjem specifičnih restriktivnih endonukleaze, enzima koji prepoznaje određenu nukleotidnu sekvencu (restriktivno mjesto) te cijepa dvolan danu DNA na tom mjestu. Izrezana DNA se zatim ugrađuje u vektorsku DNA pomoću enzima ligaze i ubacuje u stanicu domaćina gdje se umnožava stvarajući mnogobrojne kopije strane DNA. Za opisivanje takvih aktivnosti postoje razne izrazi poput „genetička manipulacija“, „genetička modifikacija“, „genetičko inženjerstvo“ ili „biotehnologija“. Zahvaljujući rekombinantnoj DNA tehnologiji, posljednjih nekoliko desetljeća svjedočimo velikom napretku medicine, agronomije te prehrambene i farmaceutske industrije. Ako malo pomnićemo razmislimo o postupcima manipulacije genima koji uključuju njihovo izrezivanje iz genoma domaćina te prijenos i ugradnju u drugi genom, to su procesi koji se normalno događaju u prirodi. Procesi koji se svakodnevno događaju u prirodi i time povezuju genetičku varijabilnost uključujući „crossing-over“ (lomljenje i zamjena pojedinih dijelova homolognih kromosoma), rekombinaciju i mutacije. Tako da, kada spomenemo „manipulaciju genima“, pomislimo na naprednu tehnologiju 20.-og stoljeća, ali ovajek zapravo manipulira genima više od 10,000 godina. Križanjima i umjetnom selekcijom dobiveni su mnogobrojni varijeteti životinja i biljaka sa poboljšanim svojstvima, a sve su to oblici manipulacije gena (Sambamurthy i Kar, 2006).

Metode kojima možemo izravno mijenjati genetički materijal, mnogobrojne su. Osnovni postupak sastoji se od identifikacije gena koji stvara polipeptid za koji smo zainteresirani te transfera tog gena iz vrste u kojoj se on prirodno nalazi, u željenu vrstu.

### **2.1. TRANSFORMACIJA**

Transformacija je jedan od mehanizama rekombinacije u bakterija. DNA bakterije donora ulazi u stanicu bakterije recipienta te se ugrađuje u genom. Mehanizam je iskorišten za stvaranje transgenih organizama. Transformacija u biotehnologiji dijeli se na vektorsku i na direktnu (Sambamurthy i Kar, 2006).

### **2.1.1. Vektorska transformacija**

Kao vektor (prijenosnik stranog gena) može nam poslužiti, na primjer, virus ili bakterijski plazmid. U transformaciji posredovanoj agrobakterijom, proces po inje ugradnjom željenog gena u Ti (tumor induciraju i) plazmid koji se prirodno nalazi u bakteriji tla *Agrobacterium tumefaciens*. Ta vrsta bakterije izaziva tumore vrata korijena u jednosupnicama. Samo se jedan dio Ti plazmida integrira u DNA recipijenta, a to je u ovom slu aju DNA biljne stanice, a taj se dio zove T-DNA („transfer DNA“). Rekombinantni Ti plazmid (plazmid s ugra enim stranim genom) pažljivo se uneće u bakteriju *A. tumefaciens* koja se uzgaja u kulturi sa biljnim stanicama. Nakon nekog vremena bakterija će prenijeti rekombinantnu T-DNA u biljnu stanicu, a željeni gen će se ugraditi u biljni genom. Ova metoda relativno je jednostavna i pokazala se jako uspješnom (Sambamurthy i Kar, 2006).

### **2.1.2. Direktna transformacija**

Ova metoda podrazumijeva unos DNA u željenu stanicu bez bioloških posrednika (Sambamurthy i Kar, 2006). Budu i da je jako mala vjerojatnost da će stanica spontano uzeti stranu DNA, potrebno je to postići i kemijskom ili fizi kom manipulacijom.

Polietilenglikol (PEG), polivinil alkohol (PVA) i kalcijev fosfat neki su od kemijskih spojeva koji potiču u stanicu na uzimanje strane DNA. Elektroporacija je primjer fizi ke manipulacije gdje stanicu tretiramo kratkotrajnim elektri nim impulsima visokog napona. Posljedica ovakvog djelovanja je stvaranje pora na membrani kroz koje željena DNA ulazi u stanicu. Pore na membrani možemo stvoriti i pomo u lasera. DNA možemo direktno unijeti i korištenjem mikroprojektila. DNA se pomiješa sa si ušnim metalnim esticama i ispaljuje u organizam ili stani ne kulture. Proces je jako jednostavan, ali esto nastaju štete kao posljedica ispaljivanja. Još jedna jednostavna i direktna metoda transformacije je mikroinjektiranje DNA pomo u staklenih mikropipeta.

### **3. PROIZVODNJA LIJEKOVA**

Proces proizvodnje lijekova sastoji se od nekoliko koraka. Prije po etka istraživanja samih supstanci za lije enje potrebno je istražiti gdje i kako dolazi do bolesti. To možemo posti i pronalaskom gena odgovornih za razvoj bolesti ili promatralju i ekspresiju gena u zdravom i bolesnom tkivu. Nakon toga istražujemo tisu e, ponekad milijune razli itih spojeva kako bi pronašli one koji djeluju na željeni na in. Zatim kemiari modificiraju te spojeve kako bi im pove ali efikasnost, sigurnost te ih detaljnije specijalizirali. Taj korak podrazumijeva testiranje u okruženju koje mora biti što sli nije ljudskom (npr. stani ne kulture, životinjski modeli: sisavci ili transgeni ni sisavci) kako bi što detaljnije definirali u inkovitost, djelovanje lijeka na ostale fiziološke procese te „metabolizam“ samog lijeka. Nakon što smo se uvjerili u sigurnost i efikasnost lijeka, može zapoeti testiranje na ljudima. U fazi I lik se daje nekolicini zdravim volontera, zatim u fazi II nekolicini pacijenata te u završnoj fazi III velikom broju pacijenata (Snaith i Törnell, 2002).

Danas se za lije enje esto koriste rekombinantni proteini koji su dobiveni metodama rekombinantne DNA tehnologije. Za dobivanje takvih proteina koristimo razliite transgeni ne organizme (Tablica 1). Prvi rekombinantni protein proizveden je uz pomoč bakterija. Unato brojnim prednostima, bakterije imaju velik nedostatak, a to je da teško sintetiziraju proteine sa složenom strukturom (Houdebine, 2009). Od kvasaca se otkriva veliki pomak u odnosu na bakterije budu i da su kvasci eukarioti. No i kvasci su pokazali odreene probleme u proizvodnji primjerice monoklonskih antitijela, zbog nemogunosti glikozilacije proteina. Ti su problemi riješeni ubacivanjem gena za proizvodnju enzima koji je zaslužan za glikozilaciju te se u kvasce kao jednostani ne eukariote za proizvodnju rekombinantnih proteina polažu velike nade (Houdebine, 2009). Stanice kukaca zaražene bakulovirusom-Sf9 također imaju široku primjenu u proizvodnji rekombinantnih proteina. Nedostaci ovog sistema su također nemogućnost pravilne posttranslacijske modifikacije kao što je primjerice dodavanje še era koji se nalaze u ljudskom organizmu te propadanje stanica kao posljedica infekcije virusom (Houdebine, 2009). Stani ne linije, naročito linija CHO („Chinese Hamster Ovary“) stanica uspješno se koriste za proizvodnju rekombinantnih proteina već 20 godina (Houdebine, 2009). Najveća njihova prednost je uspješna posttranslacijska modifikacija koja daje vjerodostojnu kopiju proteina. Nedostatak je pak mala količina dobivenih proteina (ne više od nekoliko kilograma na godinu) te visoka cijena proizvodnje (Houdebine, 2009). Transgeni ne biljke imaju mnogo prednosti, ali također imaju svojih nedostataka (Thomas i sur. 2002). Rekombinantni proteini se akumuliraju u lišću ili u

sjemuenu biljaka. Koli ina proizvedenog željenog proteina je gotovo neograni ena, a sam postupak nije skup. Iako biljne stanice mogu uspješno proizvoditi i formirati proteine, za razliku od životinjskih stanica tijekom posttranslacijske modifikacije ne dodaju sijalinsku kiselinu te koriste še er ksilozu koji može izazvati imunološku reakciju kod ljudi. Trenutno se radi na modifikaciji procesa glikozilacije kako bi on bio što sli nji onome u životinjskoj stanici. Transgeni ne životinje nam nude zanimljive na ine za proizvodnju farmaceutskih proteina. Prednosti su visoka kvaliteta proteina te prihvatljiva cijena (Houdebine, 2009).

**Tablica 1.**: Usporedba različitih sustava proizvodnje rekombinantnih proteina u proizvodnji lijekova  
(Izvor: Houdebine 2009).

	Bakterije	Kvasci	Stanice insekata + bakulovirus	Životinjske stanice (CHO stanice)	Transgeni ne biljke	Transgeni ne životinje
Teoretski nivo proizvodnje	+++++	+++++	+++	+	++++	++++
Praktični nivo proizvodnje	++ (+)	++ (+)	+	+	++	+++
Cijena investicija	+++++	+++++	++	+	+++	+++
Cijena proizvodnje	+++++	+++++	++	++	++++	+++
Fleksibilnost	+++++	+++++	++	+	++++	+++
Konzerviranost	+++++	+++++	+++	+++	++++	++++
Stabilnost	+++++	+++++	+++	+++	++++	+++
Odgoda do prve proizvodnje	+++++	+++++	+++	+++++	+++	++ (+)
Skaliranje	+++++	+++++	++	+	++++	+++
Kolekcija	+++++	+++++	++ ++	++ ++	++++	+++
Utjecaj na organizam	++ (+)	++ (+)	++ (+)	++ (+)	++ (+)	++
Posttranslacijska modifikacija	+	++	++	++	++	++
Glikozilacija	+	++	++	++	++	++
Stabilnost proizvoda	+++++	+++++	++	++	++	++
Proizvodnja	++	++	++	++	++	++
Patogeni	+++++	+++++	++ ++	++ ++	++++	+++
Intelektualno vlasništvo	++ +	++	++	++	++	++
Proizvodi na tržištu	++ +	++	++	++ ++	+	++

### **3.1. UPOTREBA TRANSGENI NIH BAKTERIJA**

Bakterije se esto koriste u rekombinantnoj tehnologiji. Razlozi su mnogobrojni, od njihove mogu nosti da u kratkom periodu proizvedu znatne koli ine proteina, jednostavne i uspješne manipulacije, dobrog poznavanja genetike i fiziologije do lakog uzgajanja i jednostavnog održavanja. *Escherichia coli* je naj eš i modelni organizam me u prokariotima. Osim te vrste u farmaceutskoj proizvodnji uspješnima su se pokazale i bakterije iz roda *Bacillus*. Najzna ajniji nedostatak bakterija je nemogu nost posttranslacijskih modifikacija proteina poput smatanja, cijepanja, glikozilacije, -karboksilacije, fosforilacije, sulfatacije i drugih (Houdebine, 2009). Zbog toga ne mogu sintetizirati kompleksne proteine poput monoklonskih antitijela i proteina odgovornih za zgrušavanje krvi jer je za njihovu stabilnost i aktivnost neophodan proces posttranslacijske modifikacije. Osim što teško sintetiziraju proteine sa složenom strukturom, bakterije ponekad proizvedu neke proteine u tolikoj koli ini da po inju stvarati agregate iz kojih ih je teško izolirati bez da ih se ne denaturira (Houdebine, 2009). Dakle, bakterije su odli an izbor za proizvodnju proteina koji u nativnom obliku nisu glikozilirani, poput inzulina i somatotropina, te onih koji su funkcionalni bez glikozilacije, unato njihovom prirodno glikoziliranom stanju, kao na primjer citokina. S druge strane, za proizvodnju proteina koji su funkcionalni samo u glikoziliranom obliku, transgeni ne eukariotske stanice puno su bolji izbor.

### **3.2. UPOTREBA TRANSGENI NIH GLJIVA**

Od gljiva se u biotehnologij naj eš e koriste kvasci. Poput *E. coli* mogu se proizvoditi brzo i jeftino. Za razliku od bakterija stanice kvasca sposobne su za kompleksnu posttranslacijsku modifikaciju, nisu patogene što je velika prednost, te mogu efikasnije izlu ivati proteine. Vrste kvasaca koje se naj eš e koriste u biotehnologiji su *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris* i *Hansenula polymorpha* (Schmidt, 2004). Prednosti i nedostaci pojedinih vrsta u proizvodnji proteina prikazani su u Tablici 2. *S. cerevisiae* je najbolje geneti ki opisan eukariotski organizam te se stoga naj eš e koristi u farmaceutskoj industriji. *P. pastoris* je tako er esto upotrebljavani kvasac jer omogu ava proizvodnju i sekreciju velikih koli ina rekombinantnih proteina. Unato velikom potencijalu

za efikasnu sekreciju proteina, *S. cerevisiae* ga iz nekog razloga ne ostvaruje. Naime kvazu *S. cerevisiae* je potrebno 50 kopija nekog gena da ima istu proizvodnju proteina kao *P. pastoris* sa jednom ili nekoliko kopija gena. Tako er, nedostatak mu je što proteini molekularne mase ve e od 30 kDa zaostaju u citoplazmi, dok primjerice vrsta *H. polymorpha* uspješno izlu uje proteine molekularne mase do 150 kDa (Schmidt, 2004). Razli iti stupanj sekrecije izme u vrsta ovisi i o razli itim proteoliti kim aktivnostima te stupnjevima glikozilacije. Najve i kapacitet za glikozilaciju ima *S. cerevisiae* gdje dolazi do hiperglikozilacije proteina, a posljedica toga je smanjena sekrecija proteina. Efikasnost sekrecije može se pove ati uvo enjem gena zaslužnih za poboljšavanje sekrecije, zaustavljanjem funkcija koje blokiraju sekreciju te smanjenjem proteoliti ke aktivnosti u sekrecijskim vezikulama.

**Tablica 2.:** Prednosti i nedostaci pojedinih vrsta kvasaca u proizvodnji rekombinantnih proteina (Izvor: Schmidt, 2004).

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. pastoris</i>	<i>K. lactis</i>	<i>H. polymorpha</i>
Industrijska primjena	+	+	+	+
Potreba za protu-eksplozivnom opremom	-	+	-	+
Kvaliteta hrane	+	-	+	-
Efikasnost sekrecije	-	+	+	+
Hiperglikozilacija	+	-	-	-
Stabilnost vektora	+	-	+	-
Aktivnost proteaze u sekrecijskim vezikulama	Visoka	Niska	Niska	Niska

Nitaste gljive naprednije su od kvasaca i imaju kompleksniji posttranslacijsko-modifikacijski aparat, sli an onom u sisavaca. Za proizvodnju rekombinantnih proteina koriste se vrste koje ve imaju primjenu u industriji za proizvodnju kiselina, enzima i antibiotika. To su *Aspergillus nidulans*, *A. niger*, *A. awamori*, *Penicillium chrysogenum*, *Acremonium chrysogenum* te razne vrste iz rodova *Fusarium* i *Trichoderma*. Iako je sekrecijski potencijal za neke enzime poput celulaze i amilaze 30-40 g/L nije ge bilo mogu e iskoristiti za proizvodnju rekombinantnih proteina. Proizvodnja ljudskih proteina uglavnom se kre e ispod 1 mg/L (Schmidt, 2004). U današnje vrijeme, nitaste gljive ne mogu se smatrati ozbiljnom alternativom u proizvodnji lijekova (Schmidt, 2004).

### **3.3. UPOTREBA TRANSGENI NIH ŽIVOTINJA**

Transgeni ne životinje imaju važnu ulogu u modernoj medicini. Godinama se na životinjama testiraju lijekovi i pokušavaju riješiti problemi lije enja bolesti zbog kojih godišnje umiru milijuni ljudi. Rak, Alzheimerova bolest, Huntingtonova bolest, cisti na fibroza, samo su neke od takvih bolesti. Razvojem rekombinantne DNA tehnologije stvoren je prvi životinski model, miš, koji je pokazivao simptome teške neurodegenerativne bolesti, do tada poznate samo kod ljudi (Snaith i Törnell, 2002). Danas postoji mnogo takvih modela koji nam pomažu u pronalasku pravog rješenja kojim bismo iskorijenili te teške bolesti. Osim toga transgeni ne životinje mogu nam poslužiti i u istraživanjima toksi nosti supstanci. Primjena transgeni nih životinja u proizvodnji lijekova postala je stvarnost. Do sada su na taj način proizvedeni različiti hormoni, monoklonska antitijela, cjepiva, faktori zgrušavanja, faktori rasta, enzimi, mlijekni proteini, kolagen, fibrinogen i drugi. 2006. godine na tržište je pušten antitrombin III (Atryn), prvi protein dobiven iz mlijeka koze, odobren od strane EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products). Količina ljudskog antitrombina III dobivena rekombinantnom DNA tehnologijom u godini dana jednaka je količini koja se dobije iz 90,000 ljudskih uzoraka krvi (Houdebine, 2009).

Željeni protein možemo dobiti iz krvi, mlijeka, bjelanjka jajeta ili urina transgeni nih životinja (Tablica 3). Krv ne može skladištiti velike količine proteina, a i sami biološki aktivni proteini mogu naštetiti zdravlju životinje. S druge strane mlijeko je puno bolji medij za dobivanje rekombinantnih proteina. Danas se za tu metodu koriste životinje poput evis, svinje, ovce, koze i krave. Životinje evi imaju veliku prednost zbog kratkog međugeneracijskog intervala, izrazite plodnosti, lako ih je uzgajati, imaju relativno visoku produkciju mlijeka te nisu osjetljivi na prionske bolesti. Životinje evi mogu proizvesti nekoliko kilograma proteina godišnje. Za veće količine proteina potrebne su veće životinje. Svinje su se pokazale kao bolja, ali i skuplja alternativa za evime. Preživa i (koze, krave, ovce) su potencijalno najprikladniji za proizvodnju velikih količina proteina, ali imaju i brojne nedostatke. Sama proizvodnja transgeni nih životinja zahtijeva korištenje lentivirusnih vektora za kloniranje, reprodukcija je spora, životinje su osjetljive na prionske bolesti, a niti sami proteini nisu tako uspješno glikozilirani kao kod svinja i životinje eva (Houdebine, 2009). Kod krave je pak uspješno lociran gen PrP, nužan za razvoj prionske bolesti, te se „knock out“ metodom može izrezati i na taj način zaštiti ovjeka od potencijalne zaraze prionom (Houdebine, 2009). Sve do nedavno je bilo teško stvoriti transgeni ne ptice. Veliki uspjeh postignut je korištenjem pluripotentnih

primordijalnih spolnih stanica te lentivirusa. Usavršavanjem te metode, danas je moguće iz bjelanjka jajeta dobiti monoklonska antitijela te proizvesti neka cjepiva (Houdebine, 2009).

**Tablica 3.**: Usporedba proizvodnje rekombinantnih proteina iz različitih animalnih medija  
(Izvor: Houdebine, 2009).

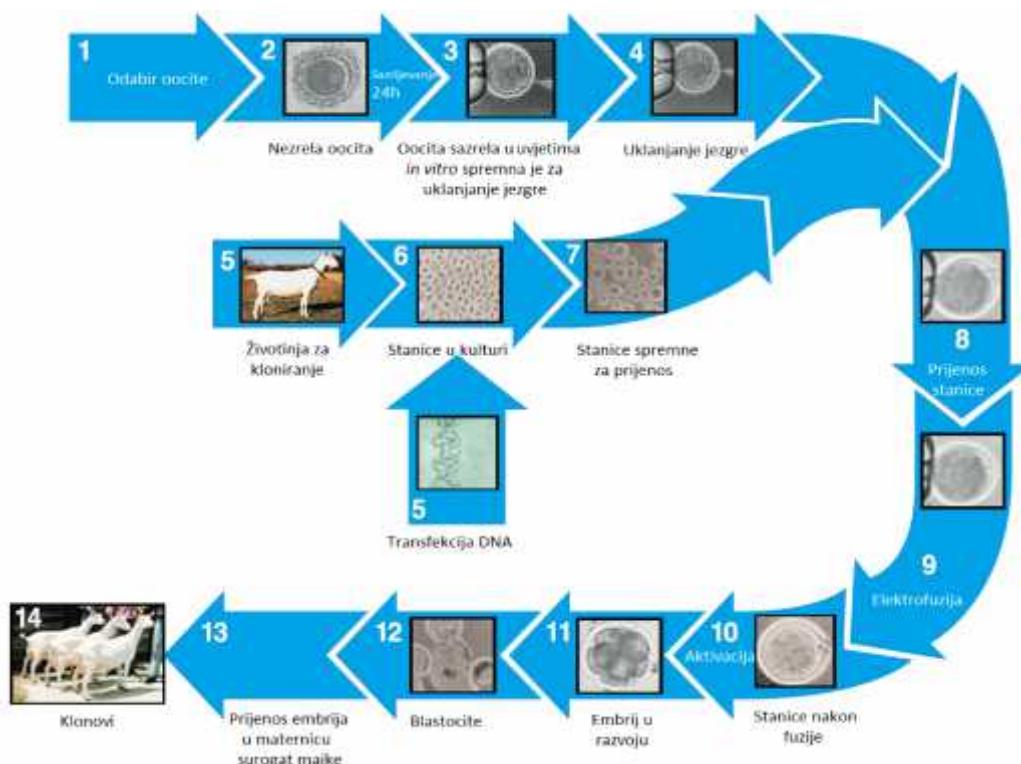
	Krv	Mlijeko	Bjelanjak	Plazma	Mokra a
Teoretski nivo proizvodnje	+++++	+++++	+++++	+++	++
Praktični nivo proizvodnje	++	+++	+++ (+)	+	+
Cijena investicija	+++	+++	+++	+	+
Cijena proizvodnje	++++)	++++)	++++)	++	+
Fleksibilnost	+++++	+++++	+++++	++	+
Konzerviranost	+++++	++++	+++++	+++++	+++++
Stabilnost	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
Odgoda do prve proizvodnje	+++	+++	+++	++	+
Skaliranje	++++)	++++)	++++)	++	+
Kolekcija	++++)	++++)	++++)	+++	+++
Utjecaj na organizam	++	+++	+++ (+)	+++ (+)	+++ (+)
Posttranslacijska modifikacija	++++)	++++)	+++) (+)	+++) (+)	+++) (+)
Glikozilacija	++++) (+)	++++)	+++	+++) (+)	+++) (+)
Stabilnost proizvoda	+++	++++)	++++)	+++) (+)	+++) (+)
Prošavljivanje	++	+++	+++	++ (+)	++ (+)
Patogeni	++	+++	+++	+++	++
Intelektualno vlasništvo	++++)	+++	+++	+++	+++
Proizvodi na tržištu	+	++++)	++	+	

Pronuklearno mikroinjektiranje, SCNT („Somatic Cell Nuclear Transfer“) i korištenje embrionalnih matnih stanica glavne su metode za modificiranje životinja. Korištenje embrionalnih matnih stanica tako je uspješno kod stvaranja nekih sojeva transgenih miševa, ali ta metoda nije se pokazala uspješnom u stvaranju transgenih stoke.

Metoda pronuklearnog mikroinjektiranja podrazumijeva direktno injektiranje kopija željenih gena u jedan ili oba pronukleusa tek oplođene oocite. Ako se geni uspješno upgrade u genom u ovoj fazi, sve stanice odrasle jedinke sadržavat će željeni gen. Najčešće se geni upgrade nakon što se stanica nekoliko puta podijeli, a rezultat toga je mozaicizam, odnosno neke stanice sadrže transgen, a neke ga ne sadrže. I nakon uspješne ugradnje u genom ponekad ne dođe do ekspresije zbog nasumične inaktivacije gena. Također, nema garancije da

e se transgen prenijeti na potomstvo. Unatoč svim tim potencijalnim problemima, pronuklearno injektiranje je uspješna metoda za dobivanje rekombinantnih proteina narođeno u koza i ovaca. Ovom metodom dobiven je i antitrombin III iz mlijeka koze (CAST, 2007).

SCNT metoda pokazala se uspješnjom i jeftinijom od pronuklearnog injektiranja. Prvi korak metode je ubacivanje DNA u jezgru somatske stanice (najčešće fibroblasta) elektroporacijom te odvajanje transgeni nih stanica od ostalih selekcijom. Sljedeći korak je uklanjanje jezgre iz oocite pomoću tanke mikropipete. Zatim je potrebno unijeti jezgru donora (iz somatske stanice) u oocitu bez jezgre. Jezgru je moguće direktno injektirati u citoplazmu ili umetnuti cijelu somatsku stanicu u oocitu (fuzija). Ukoliko je došlo do fuzije, kompleks stanica se ubaci u elektrofuzijsku komoru gdje se uz pomoć električnog impulsa kompleks pretvara u jedinstvenu stanicu sa jezgrom. Iako se proces može komplikiranim, zapravo je jako efikasan i ne utječe na funkcije same stanice. Nakon toga je potrebno aktivirati oocitu, odnosno potaknuti je na dijeljenje, a to se postiže dovođenjem spermija ili kemijskom aktivacijom. Zadnji korak u procesu je umetanje embrija u maternicu surrogat ženke (Slika 1). DNA se u stanicu može ubaciti i preko mikrokromosoma koji se ne ugrađuje u genom već se samostalno prenosi za vrijeme diobe stanica. DNA koja se ugrađuje u genom može sadržavati do 30,000 nukleotida, dok mikrokromosom sadrži više od 10 milijuna nukleotida (CAST, 2007).



**Slika 1.**: Koraci u SCNT procesu (Izvor: CAST, 2007.)

Da bi došlo do ekspresije gena na željenom mjestu, transgeni moraju imati promotor. Na primjer, za ekspresiju nekog proteina u mlijeku potreban je promotor iz gena za mlijekni protein recipijenta. Unato velikom napretku u dizajniranju vektora za ekspresiju transgena u mlijeku ili bjelanjku, ipak se javljaju poteškoće. Ponekad se iz nepoznatih razloga proteini slabo sintetiziraju ili ne odgovaraju u potpunosti željenom proteinu. Proces glikozilacije proteina te druge posttranslacijske modifikacije je su problem. Optimalna količina proteina je 1 mg/mL mlijeka ili manje (Houdebine, 2009). Veća količina dovodi do prezasićenosti u stanici te nastaju nezreli i nepropisno glikozilirani proteini.

Tehnike koje su isprva dizajnirane za proizvodnju proteina koji se koriste u farmaceutske svrhe mogu imati i druge primjene: može se povećati nutritivna vrijednost mlijeka, mogući je sinteza antibakterijskih proteina poput lakoferina i lizozima u mlijeku preživa i koji bi tada pružali zaštitu od infekcija - samom mlijeku, mlijeku nožu žljezdama i konzumentima. Također je moguće proizvesti mlijeko sa manjom količinom laktoze za ljudi osjetljive na laktozu.

Upotreba transgeni nih životinja za proizvodnju proteina postavlja mnoga etička pitanja. Injenice da životinje ne pate stvarajući proteine u mlijeku ili jajetu izrazito je zadovoljavajuće. No, to na žalost ne vrijedi za sve proteine. Na primjer, eritropoetin koji se izlučuje u mlijeku je eva negativno utjecaj na njihovo zdravlje. Osim etičkih pitanja, javljaju se i ona vezana uz sigurnost pripreme takvih preparata. Iako je mogućnost da transgeni ne životinje pobjegnu u prirodu izrazito mala, ona ipak postoji. Što bi se dogodilo da se genetički modificirane životinje nađu u prirodi, možemo samo naslutiti. Vaganje pozitivnih i negativnih strana ovakve tehnologije ovisi o pojedincu, a najvažnije je objektivno iznijeti injenice i dozvoliti svakome da može samostalno donijeti sud. No najvažnija je svakako zadovoljavajuća kontrola takve proizvodnje.

### 3.4. UPOTREBA TRANSGENI NIH BILJAKA

ovjek je oduvijek u biljkama, osim hrane, tražio i druge korisne supstance, pa je tako vrlo rano otkrio i njihova ljekovita svojstva. Supstance ili lijekove dobivene iz transgeni nih, odnosno genetički modificiranih (GMO) biljaka nazivamo „plant-made pharmaceuticals“ odnosno PMP-s. Prva generacija GMO biljaka svoju primjenu je pronašla uglavnom u poljoprivrednoj proizvodnji jer biljke dobivene na taj način daju veći prinos, otpornije su na herbicide, šteto inje, nisku temperaturu, sušu itd. Osim unapređenja same proizvodnje, GMO biljke izazvale su lavinu reakcija: od etičkih i zdravstvenih aspekata tako proizvedene hrane, do zakonodavnih intervencija (posebice u EU). Nove generacije GMO biljaka našle su svoju primjenu kao izvor sirovina u farmaceutskoj industriji. Korištenjem transgeni nih biljaka uvode se i pojmovi kao što su „molecular farming“ koji podrazumijeva uzgoj biljaka i ekstrakciju određenih proteina ili organskih molekula iz njih, te pojma „biopharming“ koji se odnosi na uzgoj takvih biljaka za potrebe farmaceutske industrije. Prvi protein za farmaceutsku industriju dobiven iz biljaka, bio je ljudski hormon rasta proizведен 1986. godine u transgeni nom duhanu, a prvo eksperimentalno cjepivo proizvedeno je 1992. godine („hepatitis B surface antigen“) (Jelaska i sur., 2005). Neke od proteina koji se dobivaju iz transgeni nih biljaka prikazuju Tablica 4.

**Tablica 4:** Proteini i njihova potencijalna primjena u lječenju ljudi (Izvor: Thomas i sur., 2002).

Potencijalna primjena ili ljudski protein	Biljka domaćina	Protein
Antikoagulansi	Duhan	Protein C
Inhibitor trombina	<i>Brassica napus</i>	Hirudin
Neutropenija	Duhan	Faktor stimulacije kolonizacije granulocita/makrofaga
Hormon rasta	Duhan	Somatotropin (kloroplast)
Anemija	Duhan	Eritropoetin
Lječenje rana i kontrola proliferacije stanica	Duhan	EGFR (Epidermal growth factor receptor)
Hepatitis C i B	Riža, repa i duhan	Interferon i
Ciroza jetre, opekline, operacije	Duhan	Albumin
Sastav krvi	Duhan	Hemoglobin ,
Cisti na fibroza, bolesti jetre	Riža	-1-antitripsin
Antimikrobni lijekovi	Krumpir	Laktoferin
Ne-ljudski proteini		
Hipertenizija	Duhan, rajčica	Enzim angiotenzin konvertaza
HIV terapija	Duhan	„-tricosanthin“
Gaucherova bolest	Duhan	Glukocerebrozidaza

Općenito za proces proizvodnje specifičnih proteina u biljkama potrebno je ubaciti DNA koja kodira taj protein. To možemo u inicijskoj transformaciji u kojoj se gola strana sekvenca molekule DNA uklapava u genom biljke. Alternativno, može se koristiti biljni virus za ubacivanje željene DNA u stanicu. Iako postoji više metoda za ubacivanje stranih gena u biljku, transformacija se najčešće izvodi korištenjem agrobakterija ili metodama bombardiranja esticama (Thomas i sur., 2002). U obje metode, DNA sekvenca za protein i pridružen joj promotor, koji omogućava ekspresiju u određenom tkivu ili u određenom razvojnom stadiju, se ubacuju u genom biljke. Na taj način to svojstvo će biljka razmnožavanjem prenijeti na svoje potomstvo pa se može lako dobiti veći broj biljaka sa željenim svojstvom. Upotreba promotora i signalnih sekvenca je bitna da bi se dobio aktivni protein te da bi se omogućila ili spriječila posttranslacijska modifikacija. Nakupljanje proteina u željenim dijelovima stanice ili tkivima te njegova sekrecija u izvanstani ni prostor ili sjeme olakšava proces prirodnog avanja, odnosno omogućava dobivanje proteina u prirodnem obliku (Thomas i sur., 2002). Ovdje postoji mogućnost da se nakon žetve sjeme posuši te na taj način dobijemo jednostavno uskladišteni željeni protein. Postoji i mogućnost unošenja gena u genome organела (kloroplaste i mitohondrije) unutar stanica, a budući da biljke sadrže nekoliko kloroplasta u stanici, transformacija kloroplasta ima visoki potencijal za snažnu ekspresiju i prinos rekombinantnih proteina. Za sada je transformacija kloroplasta bila uspješna kod duhana i krumpira, a prednost je što se geni iz genoma kloroplasta ne prenose peludom pa se smanjuje mogućnost kontaminacije drugih biljaka.

Alternativna metoda podrazumijeva korištenje rekombinantnog biljnog virusa. U tom slučaju DNA za željeni protein se ubacuje u genom biljnog virusa kojem se izlaže željena biljka. Kako se virus širi biljkom, stvara brojne kopije stranog gena i proizvodi velike količine željenog proteina. Ovom metodom se ne ubacuje strana DNA u genom biljke, a pelud ili jajne stanice uglavnom ne sadrže virusne estice pa se strani gen ne prenosi na potomstvo (Thomas i sur., 2002).

Transgeni ne biljke danas služe i u proizvodnji cjepiva. Neka od tako dobivenih cjepiva su cjepivo protiv kolere, hepatitisa B, bjesnjenosti, Norwalk virusa, rotavirusa, citomegalovirusa (CMV) i drugih. Zanimljivo je spomenuti da se u početku pokušalo stvoriti jeftinu oralnu alternativu klasičnom cjepivu koja bi podrazumijevala konzumiranje kompletne biljke kao cjepiva, tzv. „edible vaccine“. Međutim problem je nastao jer cjepiva zahtijevaju standardizirano doziranje aktivne tvari što u ovakovom sustavu ne bi bilo moguće. Tako je, poznato je da se samo jedno cjepivo za ljude daje oralnim putem („Sabin polio vaccine“) jer je teško procijeniti imunološku reakciju na cjepivo koje se uzima na taj način. Detaljniji opis

prednosti i nedostataka takvih cjepiva nalazi se u Tablici 5. Primjerice kod životinja se koristi niz takvih oralnih cjepiva kao što su „Prodigene“ cjepivo za svinje koje se nalazi u kukuruzu kojim se hrane svinje.

**Tablica 5.:** Prednosti i nedostaci jestivih cjepiva (Izvor: Jelaska i sur., 2005).

Prednosti	Nedostatci
Biljke koje proizvode jestiva cjepiva moguće bi se proizvoditi u zemljama trećeg svijeta	Biljke su živi organizmi koji se mijenjaju, pa se ne može osigurati konstantna proizvodnja
Biljke se već koriste u proizvodnji lijekova te postoje protokoli za purifikaciju	Jestiva cjepiva bi se mogla zamijeniti za običnu hranu i konzumirati se u većim dozama od dopuštenog
Uzgoj biljaka je jeftiniji od proizvodnje cjepiva	Doziranje cjepiva bi moglo varirati. Na primjer, banane razlike veličine bi sadržavale razlike količine cjepiva
Biljke uglavnom ne sadrže ljudske patogene, pa takva cjepiva ne predstavljaju opasnost za ljude	Ako bi modificirane biljke slobodno rasle na poljima i druge, sigurnost bi bila velik problem
Poljoprivredni proizvodi mogu se jeftino transportirati diljem svijeta	Glikozilacijski procesi u biljkama se razlikuju od onih u ljudi i to bi moglo utjecati na funkcionalnost cjepiva

Prednosti ovakve proizvodnje su brojne (Tablica 5). Upotreba transgenih biljaka snižava troškove proizvodnje te omogućuje dobivanje većih količina proteina nego npr. upotrebom staničnih kultura. Oko 50% troškova takve proizvodnje otpada na ekstrakciju i preprocesiranje proteina. Tako da takve biljke su sposobne proizvoditi tisuće kilograma proteina godišnje (Thomas i sur. 2002). Kao prednost možemo istaknuti i to da proteini proizvedeni u biljkama ne sadrže ljudske ili životinske patogene. Osim toga kod uzgoja transgenih biljaka i provođenja eksperimenata na njima postavlja se manje etičkih pitanja nego kod primjerice uzgoja transgenih životinja. Osobita prednost je i da mogu nastati proizvodnje kompleksnih proteinova u aktivnom obliku zbog mogućnosti posttranslacijske modifikacije.

Nedostatak proizvodnje ovakvih specijaliziranih biljaka (Tablica 5) je njihova interakcija sa okolišem, odnosno sa biljkama namijenjenima za prehranu, jer postoji opasnost kontaminacije hrane sa supstancama koje su namijenjene za farmaceutsku industriju. Takva kontaminacija hrane s vremenom bi mogla izazvati kod ljudi tolerantnost na određeni aktivni sastojak lijeka ili cjepiva. Modificirani genomi biljaka bi se mogli vrlo lako prenijeti peludom (kukcima, vjetrom) ili pak ljudskim faktorom (loše rukovanje prilikom žetve, skladištenja,

transporta i sl.). Ovi problemi mogu se riješiti strogim zakonskim odredbama i kontrolama u svim fazama proizvodnje. Mogu i rješenja tih problema su: prostorna izolacija (npr. uzgoj biljaka u staklenicima), vremenska izolacija (sadnja u vremenu kada se normalni usjevi ne sade) te biološka izolacija (spre avanje protoka gena; korištenje muških sterilnih biljaka ili korištenje biljaka koje se ne koriste u prehrani-npr. duhan).

#### **4. ZAKLJUČAK**

Tek što je ovjek shvatio što su geni i što su služe, što je DNA, tek što je uspio dešifrirati kodove koji život zna e, odmah je shvatio kako se time može manipulirati. Ideja je naravno munjevitom brzinom zaživjela i dok većina ljudi još uvijek nije u potpunosti shvatila što je to DNA, a što gen, znanstvenici su već „natjerali“ bakteriju da proizvede inzulin. Primjena rekombinantne DNA tehnologije u proizvodnji lijekova otvorila je mnoga vrata i uvelike unaprijedila naše liječenje te direktno utjecala na ljudsko zdravlje koje je najvažnije u životu svake osobe. Tom se tehnologijom uspješno proizvedeni mnogobrojni proteini i što je još važnije u vrlo velikim količinama. Ovdje ne govorimo o lijeku kao o mješavini različitih „kemikalija“, već o proteinima, temeljnim građevinim jedinicama organizma kojima je moguće direktno „popravljati štetu“. Primjena rekombinantne DNA tehnologije koja se isključivo odnosi na poboljšanje ljudskog zdravlja, zanemaruje mnoga pitanja o ispravnosti takve tehnologije. Ako izuzmemos injenicu da je biotehnologija vrlo brzo pronašla svoju primjenu u mnogim područjima iako još uvijek premalo znamo o tome kako će se to u budućnosti odraziti na prirodu, možemo reći da je rekombinantna DNA tehnologija u proizvodnji lijekova, svojevrsno u doba 20.-og stoljeća.

## 5. LITERATURA

Council for Agricultural Science and Technology (CAST). (2007). The Role of Transgenic Livestock in the Treatment of Human Disease, Issue Paper 35. CAST, Ames, Iowa.

Houdebine, L-M. (2009). Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **32**, 107-121.

Jelaska, S., Mihaljevi , S. i Bauer, N. (2005). Production of biopharmaceuticals, antibodies and edible vaccines in transgenic plants. *Current Studies of Biotechnology*, **4** - Immuno-Modulatory Drugs, 121-127.

Moschini, G.C. (2006). Pharmaceutical and Industrial Traits in Genetically Modified Crops: Co-existence with Conventional Agriculture. Center for Agricultural and Rural Development, Iowa State University, Ames, Iowa.

Sambamurthy, K. i Kar, A. (2006). Pharmaceutical Biotechnology. New Age International, New Delhi.

Schmidt, F.R. (2004). Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Applied Microbiology and Biotechnology* **65**, 363-372.

Snaith, M.R. i Törnell, J. (2002). The use of transgenic systems in pharmaceutical research. *Briefings in functional genomics and proteomics* **2** , 119-130.

Thomas, B.R., Van Deynze, A. i Bradford, K.J. (2002). Production of Therapeutic Proteins in Plants. *Agricultural biotechnology in California* series, Publication 8078.

## **6. SAŽETAK**

Rekombinantna DNA tehnologija podrazumijeva metode kojima možemo prenijeti gene iz jednog organizma u drugi. Time se omogućava dobivanje proteina u organizmima u kojima se ti proteini prirodno ne stvaraju. Takva tehnologija danas ima brojne primjene, a jedna od njih je proizvodnja lijekova. Prvi ljudski protein dobiven iz bakterije *E. coli* bio je inzulin, 1982. godine. Danas se za manipulaciju gena u svrhu dobivanja rekombinantnih proteina, osim bakterija, koriste i kvasci, životinje, biljke te stani ne kulture. Svaka metoda proizvodnje ima svoje prednosti i nedostatke. Glavni nedostatak bakterijama je nemogućnost glikozilacije proteina. Kvasci, kao eukarioti, uspješniji su u tom procesu. Transgeni ne životinje mogu izlučivati znatne količine proteina u krv, mlijeko, bjelanjak ili urin. Mogu proizvoditi proteine složenih struktura koji moraju proći proces posttranslacijske modifikacije da bi postali aktivni. Upotreba transgenih životinja postavlja brojna etička pitanja te pitanja vezana uz sigurnost pripreme takvih proteina. Transgeni ne biljke mogu proizvoditi velike količine proteina te stvarati proteine kompleksnih struktura. Također takva je proizvodnja jeftina i nema gotovo nikakvih etičkih problema. Najveći nedostatak genetički modificiranih organizama je interakcija s okolišem. Unatoč tome što još uvek malo znamo o tome kakav bi u inak transgeni organizmi mogli imati na svoj okoliš, možemo reći da je rekombinantna DNA tehnologija u proizvodnji lijekova svojevrsno u do 20.-og stoljeća.

## **7. SUMMARY**

Recombinant DNA technology encompasses various techniques by which we can transfer genes from one organism to another. This way we accomplished production of proteins in organisms for which these proteins are not natural. Such technology has many applications today. One of them is the use in producing pharmaceuticals. Proteins play an important role in the pharmaceutical industry. The first human protein produced in *Escherichia coli* was insulin, in 1982. Today, we use biotechnology in order to obtain recombinant proteins from bacteria, yeasts, animals, plants and cell cultures. Each manufacturing method has its advantages and disadvantages. The major drawback of bacteria is that they are unable to perform the posttranslation modifications such as glycosylation. Yeasts, as eukaryotes, have some advantages over bacteria in this process. Transgenic animals can secrete significant amounts of protein in blood, milk, egg white or urine. They can also produce proteins with complex structure that must undergo a process of posttranslational modifications. The use of transgenic animals faces many ethical issues and issues of environmental impact of such animals. Transgenic plants can produce large amounts of protein and they can also form complex protein structures. This system of production is cheap and avoids some ethical issues. The biggest disadvantage is interaction with the environment. Although we still know little about how transgenic organisms could affect the nature one day, we can say that the recombinant DNA technology in the production of pharmaceuticals is sort of a miracle of the 20th century.