

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 transgenih bakterija	6
3.2. Upotreba transgenih gljiva	6
3.3. Upotreba transgenih životinja	8
3.4. Upotreba transgenih 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 unaprijeđivali 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, često se unište prilikom procesa ekstrakcije. Prvi protein koji se koristio u terapijske svrhe bio je inzulin iz gušterače svinje 20-ih godina prošlog stoljeća (Houdebine, 2009). Desetljećima 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 ograničavajući, 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 metodama 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 učinkoviti 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 inu u organizmu druge vrste. To se može posti i korištenjem specifi ne restrikijske endonukleaze, enzima koji prepoznaje odre enu nukleotidnu sekvencu (restrikijsko mjesto) te cijepa dvostranu DNA na tom mjestu. Izrezana DNA se zatim ugra uje u vektorsku DNA pomo u enzima ligaze i ubacuje u stanicu domaćina gdje se umnožava stvarajući i mnogobrojne kopije strane DNA. Za opisivanje takvih aktivnosti esto se rabe izrazi poput „geneti ka manipulacija“, „geneti ka modifikacija“, „geneti ko inženjerstvo“ ili „biotehnologija“. Zahvaljuju i rekombinantnoj DNA tehnologiji, posljednjih nekoliko desetljeća svjedo imo velikom napretku medicine, agronomije te prehrambene i farmaceutske industrije. Ako malo pomnije razmislimo o postupcima manipulacije gena koji uključuju njihovo izrezivanje iz genoma domaćina te prijenos i ugradnju u drugi genom, to su procesi koji se normalno događaju u prirodi. Proces koji se svakodnevno događaju u prirodi i time povećavaju geneti ku varijabilnost uključuju „crossing-over“ (lomljenje i zamjena pojedinih dijelova homolognih kromosoma), rekombinaciju i mutacije. Tako er, kada spomenemo „manipulaciju gena“, pomislimo na naprednu tehnologiju 20.-og stoljeća, ali uvijek 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 geneti ki 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 recipijenta te se ugra uje 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 počinje ugradnjom željenog gena u Ti (tumor inducirajući) 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 slučaju DNA biljne stanice, a taj se dio zove T-DNA („transfer DNA“). Rekombinantni Ti plazmid (plazmid s ugrađenim stranim genom) pažljivo se unese 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). Budući da je jako mala vjerojatnost da će stanica spontano uzeti stranu DNA, potrebno je to postići kemijskom ili fizičkom 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 fizičke manipulacije gdje stanicu tretiramo kratkotrajnim električnim impulsima visokog napona. Posljedica ovakvog djelovanja je stvaranje pora na membrani kroz koje željena DNA ulazi u stanicu. Pore na membrani možemo stvoriti i pomoću lasera. DNA možemo direktno unijeti i korištenjem mikroprojektila. DNA se pomiješa sa sićušnim metalnim česticama i ispaljuje u organizam ili stanicu ne kulture. Proces je jako jednostavan, ali često nastaju štete kao posljedica ispaljivanja. Još jedna jednostavna i direktna metoda transformacije je mikroinjektiranje DNA pomoću staklenih mikropipeta.

3. PROIZVODNJA LIJEKOVA

Proces proizvodnje lijekova sastoji se od nekoliko koraka. Prije početka istraživanja samih supstanci za liječenje potrebno je istražiti gdje i kako dolazi do bolesti. To možemo postići pronalaskom gena odgovornih za razvoj bolesti ili promatrajući ekspresiju gena u zdravom i bolesnom tkivu. Nakon toga istražujemo tisuće, ponekad milijune različitih spojeva kako bi pronašli one koji djeluju na željeni način. Zatim kemičari modificiraju te spojeve kako bi im povećali efikasnost, sigurnost te ih detaljnije specijalizirali. Taj korak podrazumijeva testiranje u okruženju koje mora biti što bliže ljudskom (npr. stanične kulture, životinjski modeli: sisavci ili transgeni sisavci) kako bi što detaljnije definirali učinkovitost, djelovanje lijeka na ostale fiziološke procese te „metabolizam“ samog lijeka. Nakon što smo se uvjerali u sigurnost i efikasnost lijeka, može započeti testiranje na ljudima. U fazi I lijek se daje nekolicini zdravih volontera, zatim u fazi II nekolicini pacijenata te u završnoj fazi III velikom broju pacijenata (Snaith i Törnell, 2002).

Danas se za liječenje često koriste rekombinantni proteini koji su dobiveni metodama rekombinantne DNA tehnologije. Za dobivanje takvih proteina koristimo različite transgenne organizme (Tablica 1). Prvi rekombinantni protein proizveden je uz pomoć bakterija. Unatoč brojnim prednostima, bakterije imaju velik nedostatak, a to je da teško sintetiziraju proteine sa složenom strukturom (Houdebine, 2009). Od kvasaca se očekivao veliki pomak u odnosu na bakterije budući da su kvasci eukarioti. No i kvasci su pokazali određene probleme u proizvodnji primjerice monoklonskih antitijela, zbog nemogućnosti glikozilacije proteina. Ti su problemi riješeni ubacivanjem gena za proizvodnju enzima koji je zaslužan za glikozilaciju te se u kvasce kao jednostanične 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 šećera koji se nalaze u ljudskom organizmu te propadanje stanica kao posljedica infekcije virusom (Houdebine, 2009). Stanične 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). Transgenne biljke imaju mnogo prednosti, ali također imaju svojih nedostataka (Thomas i sur. 2002). Rekombinantni proteini se akumuliraju u lišću ili u

sjemenu 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 niji 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 razli itih 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	+++++	+++++	+++	+	+++++	+++++
Prakti ni nivo proizvodnje	++(+)	++(+)	+	+	++	++++
Cijena investicija	+++++	+++++	++	+	++++	+++
Cijena proizvodnje	+++++	+++++	++	++	+++++	++++
Fleksibilnost	+++++	+++++	++	+	+++++	++++
Konzerviranost	+++++	+++++	+++	+++	+++++	+++++
Stabilnost	+++++	+++++	++++	+++	+++++	+++++
Odgoda do prve proizvodnje	+++++	+++++	+++	+++++	++++	+++(+)
Skaliranje	+++++	+++++	++	+	+++++	++++
Kolekcija	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	++++
Utjecaj na organizam	+++(+)	+++(+)	+++(+)	+++(+)	+++(+)	+++
Posttranslacijska modifikacija	+	++	+++	++++	+++	++++
Glikozilacija	+	++	+++	++++	++	++++
Stabilnost proizvoda	+++++	+++++	+++	+++	++++	++++
Pro iš avanje	+++	+++	+++	++++	+++	+++
Patogeni	+++++	+++++	+++++	++++	+++++	++++
Intelektualno vlasništvo	++++	+++	+++	++	+++	+++
Proizvodi na tržištu	++++	+++	+++	+++++	+	+++

3.1. UPOTREBA TRANSGENI NIH BAKTERIJA

Bakterije se često koriste u rekombinantnoj tehnologiji. Razlozi su mnogobrojni, od njihove mogućnosti da u kratkom periodu proizvedu znatne količine proteina, jednostavne i uspješne manipulacije, dobrog poznavanja genetike i fiziologije do lakog uzgajanja i jednostavnog održavanja. *Escherichia coli* je najčešći i modelni organizam među prokariotima. Osim te vrste u farmaceutskoj proizvodnji uspješnima su se pokazale i bakterije iz roda *Bacillus*. Najznačajniji nedostatak bakterija je nemogućnost 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 količini da počinju stvarati agregate iz kojih ih je teško izolirati bez da ih se ne denaturira (Houdebine, 2009). Dakle, bakterije su odličan izbor za proizvodnju proteina koji u nativnom obliku nisu glikozilirani, poput inzulina i somatotropina, te onih koji su funkcionalni bez glikozilacije, unatoč 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 biotehnologiji najčešće 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 izolirati proteine. Vrste kvasaca koje se najčešće 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 genetički opisan eukariotski organizam te se stoga najčešće koristi u farmaceutskoj industriji. *P. pastoris* je također često upotrebljavani kvasac jer omogućava proizvodnju i sekreciju velikih količina rekombinantnih proteina. Unatoč velikom potencijalu

za efikasnu sekreciju proteina, *S. cerevisiae* ga iz nekog razloga ne ostvaruje. Naime kvascu *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 liječenja bolesti zbog kojih godišnje umiru milijuni ljudi. Rak, Alzheimerova bolest, Huntingtonova bolest, cistična fibroza, samo su neke od takvih bolesti. Razvojem rekombinantne DNA tehnologije stvoren je prvi životinjski 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 toksičnosti 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, mliječni 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 zečevi, svinje, ovce, koze i krave. Zečevi imaju veliku prednost zbog kratkog međugeneracijskog intervala, izrazite plodnosti, lako ih je uzgajati, imaju relativno visoku produkciju mlijeka te nisu osjetljivi na prionske bolesti. Zečevi mogu proizvesti nekoliko kilograma proteina godišnje. Za velike količine proteina potrebne su velike životinje. Svinje su se pokazale kao bolja, ali i skuplja alternativa zečevima. Preživci (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 zečeva (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 zaštititi 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).

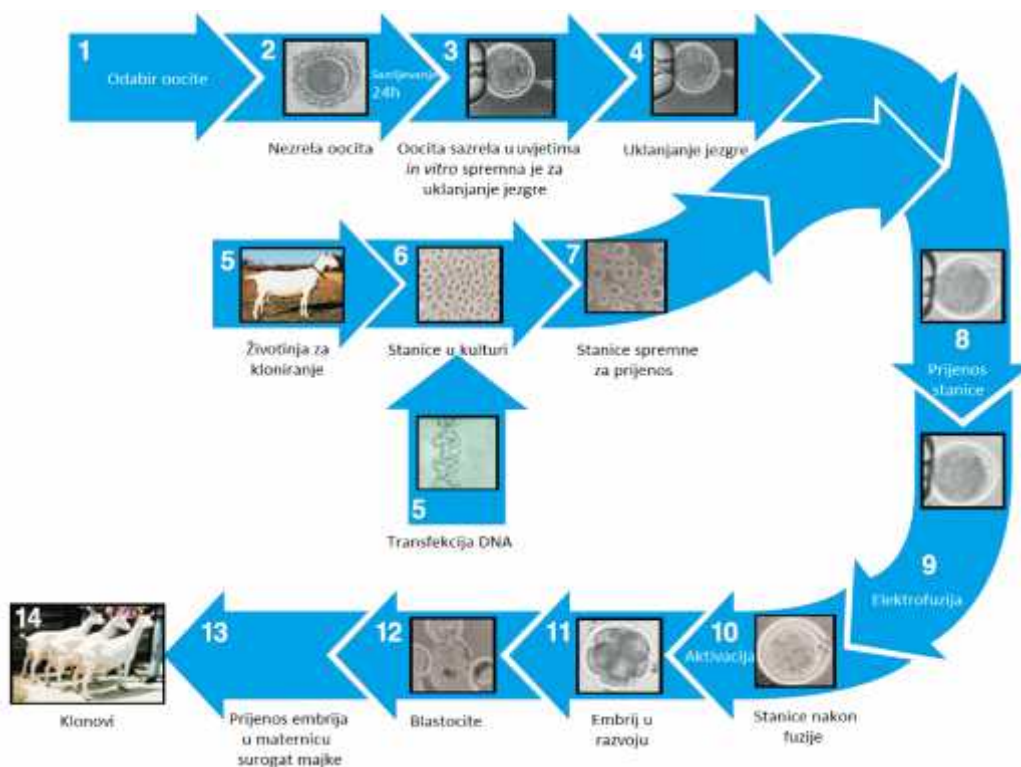
	Krv	Mlijeko	Bjelanjak	Plazma	Mokraća
Teoretski nivo proizvodnje	+++++	+++++	+++++	+++	++
Praktični nivo proizvodnje	++	++++	+++ (+)	+	+
Cijena investicija	+++	+++	+++	+	+
Cijena proizvodnje	++++	++++	++++	++	+
Fleksibilnost	+++++	+++++	+++++	++	+
Konzerviranost	+++++	++++	+++++	+++++	+++++
Stabilnost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

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

Metoda pronuklearnog mikroinjektiranja podrazumijeva direktno injektiranje kopija željenih gena u jedan ili oba pronukleusa tek oplojene oocite. Ako se geni uspješno ugrade u genom u ovoj fazi, sve stanice odrasle jedinke sadržavat će željeni gen. Najčešće se geni ugrade 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. Unato svim tim potencijalnim problemima, pronuklearno injektiranje je uspješna metoda za dobivanje rekombinantnih proteina naročito u koza i ovaca. Ovom metodom dobiven je i antitrombin III iz mlijeka koze (CAST, 2007).

SCNT metoda pokazala se uspješnijom i jeftinijom od pronuklearnog injektiranja. Prvi korak metode je ubacivanje DNA u jezgru somatske stanice (najčešće fibroblasta) elektroporacijom te odvajanje transgeničnih 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 čini kompliciranim, 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 surogat 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 mliječni protein recipijenta. Unatoč 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 čest su problem. Optimalna količina proteina je 1 mg/mL mlijeka ili manje (Houdebine, 2009). Veća količina dovodi do prezasićenosti u stanicama te nastaju nezreli i nepropisno glikozilirani proteini.

Tehnike koje su isprva dizajnirane za proizvodnju proteina koji se koriste u farmaceutске svrhe mogu imati i druge primjene: može se povećati nutritivna vrijednost mlijeka, moguće je sinteza antibakterijskih proteina poput laktoferina i lizozima u mlijeku preživaca koji bi tada pružali zaštitu od infekcija - samom mlijeku, mliječnoj žlijezdi pa i konzumentima. Također je moguće proizvesti mlijeko sa manjom količinom laktoze za ljude osjetljive na laktozu.

Upotreba transgenih životinja za proizvodnju proteina postavlja mnoga etička pitanja. činjenica da životinje ne pate stvaraju i proteine u mlijeku ili jajetu izrazito je zadovoljavajuća. No, to na žalost ne vrijedi za sve proteine. Na primjer, eritropoetin koji se izlučuje u mlijeku zadržava 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 činjenice 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 geneti ki 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 na in daju ve i prinos, otpornije su na herbicide, šteto ine, nisku temperaturu, sušu itd. Osim unapre enja same proizvodnje, GMO biljke izazvale su lavinu reakcija: od eti kih 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 odre enih 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 proizveden 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 prikazuje Tablica 4.

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

Potencijalna primjena ili ljudski protein	Biljka doma in	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
Lije enje 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, raj ica	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 učiniti transformacijom u kojoj se gola strana sekvenca molekule DNA ukomponira 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 u biljka razmnožavanjem prenijeti na svoje potomstvo pa se može lako dobiti veliki broj biljaka sa željenim svojstvom. Upotreba promotora i signalnih sekvenci 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 izvanstanični prostor ili sjeme olakšava proces pročišćavanja, odnosno omogućava dobivanje proteina u čistom 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 organela (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 u biljke danas služe i u proizvodnji cjepiva. Neka od tako dobivenih cjepiva su cjepivo protiv kolere, hepatitisa B, bjesnoće, Norwalk virusa, rotavirusa, citomegalovirusa (CMV) i drugih. Zanimljivo je spomenuti da se u pokušaju 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 ovakvom sustavu ne bi bilo moguće. Također, 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 mogle 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 različite veličine bi sadržavale različitu količinu cjepiva
Biljke uglavnom ne sadrže ljudske patogene, pa takva cjepiva ne predstavljaju opasnost za ljude	Ako bi modificirane biljke slobodno rasle na poljima i drveću, 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 stanih kultura. Oko 50% troškova takve proizvodnje otpada na ekstrakciju i pročišćavanje proteina. Također 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 životinjske 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 mogućnost proizvodnje kompleksnih proteina 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. Moguća 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 (sprečavanje protoka gena; korištenje muških sterilnih biljaka ili korištenje biljaka koje se ne koriste u prehrani-npr. duhan).

4. ZAKLJUČAK

Tek što je uvijek shvatio što su geni i čemu služe, što je DNA, tek što je uspio dešifrirati kodove koji život znače, 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 načine liječenja te direktno utjecala na ljudsko zdravlje koje je najvažnije u životu svake osobe. Tom su 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 građevnim jedinicama organizma kojima je moguće direktno „popravlјati štetu“. Primjena rekombinantne DNA tehnologije koja se isključivo odnosi na poboljšanje ljudskog zdravlja, zanemaruje mnoga pitanja o ispravnosti takve tehnologije. Ako izuzmemo činjenicu 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 čudo 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 stanične 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 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 životinje 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 uvijek 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 čudo 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.