

Transgenične životinje u proizvodnji terapeutskih proteina

Tomašić, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:478502>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-26**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

TRANSGENIČNE ŽIVOTINJE U PROIZVODNJI
TERAPEUTSKIH PROTEINA

TRANSGENIC ANIMALS FOR PRODUCTION OF
THERAPEUTIC PROTEINS

SEMINARSKI RAD

Ana Tomašić

Preddiplomski studij
biologije

(Undergraduate study of biology)

Mentor: doc. dr. sc. Nenad Malenica

Zagreb, 2018.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. GENETIČKI MODIFICIRANE I TRANSGENIČNE ŽIVOTINJE	2
2.1. METODE DOBIVANJA TRANSGENIČNIH ŽIVOTINJA	4
2.2. SUSTAVI PROIZVODNJE TERAPEUTSKIH PROTEINA U ŽIVOTINJAMA.	6
3. ATryn	7
3.1. ANTITROMBIN.....	8
3.2. PRIMJENA ATITROMBINA U KLINIČKE SVRHE.....	8
3.3. KONSTRUIRANJE, UGRADNJA I EKSPRESIJA VEKTORA.....	9
3.4. PROČIŠĆAVANJE rhAT.....	9
3.5. STRUKTURA rhAT.....	10
3.6. POKUSI <i>in vivo</i>	10
3.7. KLINIČKA ISPITIVANJA.....	11
4. SEBELIPASE ALFA – KANUMA	11
4.1. LIZOSOMALNA KISELINSKA LIPAZA I NEDOSTATAK LAL-A	12
4.2 KLINIČKA PRIMJENA.....	12
4.3. FARMAKODINAMIKA	12
4.4. FARMAKOKINETIKA	13
4.5. KLINIČKA ISPITIVANJA	13
5. ANTI CD-20 MONOKLONALNO ANTITIJELO	13
5.1. PRODUKCIJA U TRANSGENIČNIM KOKOŠIMA	14
5.2. KONSTRUKCIJA I PRIJENOS VEKTORA	14
5.3. DOBIVANJE HOMOZIGOTA	15
5.4. DETEKCIJA I PROČIŠĆAVANJE	16
5.5. KARAKTERIZACIJA REKOMBINANTNOG ANTITIJELA	17
6. ZAKLJUČAK	18
7. LITERATURA	19
8. SAŽETAK	20
9. SUMMARY	21

1. UVOD

Još od davnih dana, ljudi su upotrebom raznih metoda pokušavali doskočiti liječenju različitih bolesti. Napretkom znanosti iz polja biologije i kemije te medicine, mnoge bolesti postale su izlječive, dok su neke praktički nestale. Ipak, i danas postoji velik broj bolesti koje istražuju znanstvenici diljem svijeta s ciljem pronalaska novih vrsta lijekova. Dio takvih bolesti može se tretirati proizvodnjom terapijskih rekombinantnih proteina. Iako su se isprva dobivali kao ekstrakti iz različitih organizama, ti proteini često nisu bili biološki aktivni. Prvi protein koji se koristio u terapijske svrhe bio je inzulin, dobiven iz gušterače svinja 20-ih godina prošlog stoljeća (Houdebine, 2009). Iako je inzulin iz svinja strukturno najbliži ljudskom, i dalje nije bio visoke učinkovitosti te su se često javljale popratne alergijske reakcije. Razvojem rekombinantne DNA tehnologije 1973. godine, Herbert Boyer i Stanley Cohen proizvode prvi genetički modificiran organizam (GMO), a već 1974. Rudolf Jaenisch prvu transgeničnu životinju, miša. Time se dogodila prekretnica koja je već 1982. omogućila godine proizvodnju rekombinantnog ljudskog inzulina u bakteriji *Escherichia coli*. Osim transgeničnih prokariota i životinja, stvorene su i mnogobrojne transgenične biljke, čija je najveća primjena je u poljoprivredi, a danas već i u proizvodnji terapijskih proteina. Razvoj novih transgeničnih poljoprivrednih kultura brzo je prihvaćen u Sjevernoj Americi, dok je Europa puno skeptičnija glede prihvatanja GMO usjeva. Međutim, primjenu transgeničnih životinja u svrhu medicinskih i kliničkih istraživanja Europa je prihvatila puno lakše. (Salter i sur. 2012). Genetičko inženjerstvo je od kraja prošlog stoljeća uvelike promijenilo i unaprijedilo razvoj proizvodnje terapijskih proteina. Ubrzo su počela eksperimentiranja u svrhu korištenja transgeničnih životinja za farmaceutsku primjenu i komercijalnu proizvodnju. ATryn, lijek dobiven iz mlijeka koza, bio je prvi takav protein koji je 2009. godine odobren od strane FDA (The US Food and Drug Administration) (Salter i sur. 2012). Uslijedio je brz razvoj mnogih biotehnoških kompanija i utrka u otkrivanju što efikasnijeg, bržeg i jeftinijeg načina sinteze pojedinih terapijskih proteina i njihovog plasmana na tržište. Tako proizvedeni proteini, dobiveni od genetički modificiranih životinja, mogu se koristiti kao vrlo učinkoviti lijekovi u obliku antitijela, cjepiva, hormona, faktora zgrušavanja, faktora rasta i dr.

2. GENETIČKI MODIFICIRANE ŽIVOTINJE

Genetički modificirane životinje dobivene su mijenjanjem genoma organizma od interesa različitim tehnikama genetičkog inženjstva. Transgenične životinje nastaju uvođenjem stranog gena tzv. transgena u genom organizma od interesa, pri čemu se transgen eksprimira i prenosi na potomstvo. Ekspresija transgena u organizmu od interesa, moguća je zahvaljujući prilagođenom genetičkom kodu transgena, na način da se on može efikasno translirati u proizvodnom organizmu (*codon usage*). Genetički kod sastavljen je od kodona, čiji je broj proporcionalan udjelu pojedinih tRNA za odabranu vrstu. Takvim je sustavom osigurano da se svaka odabrana sekvenca (sekvencija) DNA optimalno translira u različitim organizmima. Nadalje, mogući tehnički problem su posttranslacijske modifikacije (npr. nepravilna glikolizacija) što igra bitnu ulogu u odabiru organizma u koji će transgen biti unesen. Iz tog razloga ljudski proteini se ne proizvode u prokariotima, već eukariotima sa sličnijim uzorkom glikolizacije. Genetički modificirane (GM) životinje imaju raznoliku primjenu čiji se spektar svakim danom proširuje. Dva su glavna područja primjene GM životinja, to su zelena i crvena biotehnologija. Zelena biotehnologija odnosi se na upotrebu GM životinja za hranu, dok crvena biotehnologija podrazumijeva farmaceutsku primjenu GM životinja (Salter i sur. 2012). Najveći broj GM životinja otpada na glodavce (miševe, štakore, zečeve) te služi za fundamentalno proučavanja genskih mehanizama, funkcije i interakcije gena kao i kontrolu i regulaciju ekspresije gena (Tab. 1.).

Tablica 1: Neke od stvorenih transgeničnih životinja

Miš (<i>Mus musculus</i>)	Gordon i suradnici (1980), Joyner i Sedivy (2000)
Štakor (<i>Rattus rattus</i>)	Hamra i suradnici (2002), Kato i sur. (2004), Hirabayashi i sur. (2005), Agca i sur. (2008)
Zec (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	Fan i Watanabe (2003)
Ovca (<i>Ovis aries</i>)	McCreath i sur. (2000), Denning i Priddle (2003), Wheeler (2003)
Svinja (<i>Sus domestica</i>)	Lai i sur. (2002), Houdbine (2009), Kragh i sur. (2009)
Govedo (<i>Bos taurus</i>)	Donovan i sur. (2005), Richt i sur. (2007), Houdebine (2009)
Koza (<i>Capra hircus</i>)	Wheeler (2003), Houdebine (2009)
Pas (<i>Canis familiaris</i>)	Hong i sur. (2009)
Marmozet (<i>Callithrix jacchus</i>)	Sasaki i sur. (2009)

Također, znanstvenici vrše eksperimentalni uzgoj životinja s uspješnijom rezistencijom na bolesti, većom mišićnom masom te poboljšanom kvalitetom danih produkata (npr. mlijeko u krava i koza). Konačan cilj je da takve životinje nađu primjenu u ljudskoj prehrani. Pokrenuta je i proizvodnja transgeničnih životinja kao ljubimaca (npr. ribica *Danio rerio*-zebrica s genom za fluorescenciju). U novije vrijeme istražuju se moderne tehnike usavršavanja ksenotransplantacije, ali veliki broj transgeničnih životinja koristi se i u obliku bioreaktora (Salter i sur. 2012). Takve životinje proizvode rekombinantne farmaceutske proteine (Tab. 2.) u mlijeku (koze, krave i ovce) ili u bjelanjku jajeta (kokoši). Na ovaj način transgenične životinje igraju sve bitniju ulogu u modernoj medicini. Ti proteini se kasnije pročišćavaju brojnim metodama, a rezultat su velike količine biološki aktivnih proteina koji se koriste u liječenju raznih oboljenja.

Tablica 2: Lista nekih rekombinantnih proteina dobivenih iz transgeničnih životinja

Protein	Izvor	Primjena
antitrombin III	koza	tromboza
aktivator tkivnog plazmogenog	ovca, svinja	tromboza
α -antitripsin	ovca	emfizem
faktor VIII, IX	ovca, svinja, krava	hemofilija
α -glukozidaza	zec	Pompeova bolest
fibrinogen	ovca, krava	zacjeljivanje rana
dekarboksilaza glutamične kiseline	koza	dijabetes tip 1
ljudski serumski albumin	krava, ovca	održavanje volumena krvi
ljudski protein C	koza	tromboza
monoklonalna antitijela	kokoš, krava, ovca	proizvodnja cjepiva
Pro542	koza	HIV
laktoferin	krava	gastrointestinalne infekcije, infektivni artritis

2.1. METODE DOBIVANJA TRANSGENIČNIH ŽIVOTINJA

Stvaranje farme transgeničnih životinja ovisi o pojedinoj vrsti, njenim specifičnostima i metodama koje su učinkovite kod jedne, no ne i kod druge vrste. Pronuklearno mikroinjektiranje, SCNT (*Somatic Cell Nuclear Transfer*), ICSI (*Intracytoplasmic Sperm Injection*) te korištenje embrionalnih matičnih stanica glavne su metode za modifikaciju

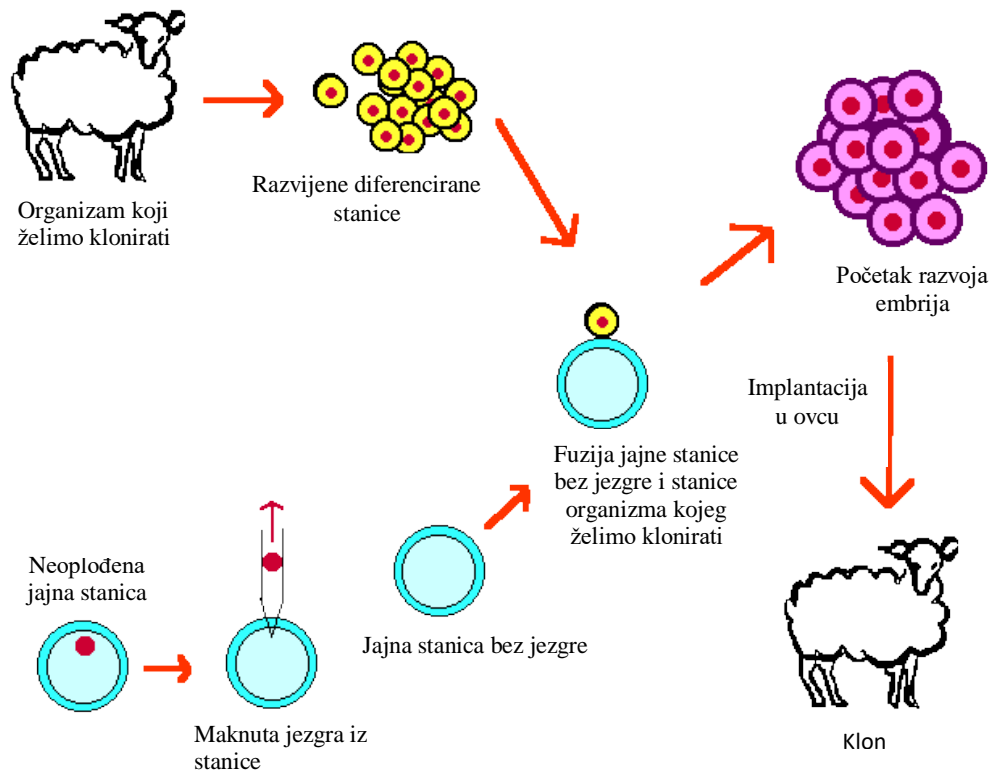
životinja. Izravno mikroinjektiranje strane DNA u pronukleus zygote (Sl. 1.) daje dobre rezultate s miševima, štakorima, zečevima, ribama te pticama. Nažalost, ova tehnika vrlo je neefikasna u svinja, koza i ostalih preživača (Houdebine 2009.). U tim slučajevima transgen se prenosi letivirnim vektorom u pronukleus kako bi se povećala stopa njegove integracije. Cilj mikroinjektiranja je ugradnja gena ilegalnom rekombinacijom u fazi tek oplodene oocite, čime će sve stanice odrasle jedine sadržavati željeni gen. Ipak, geni se najčešće ugrade nakon nekoliko dioba zigote što rezultira genetičkim mozaicizmom (kimerizmom/himerizmom). Takve životinje sastoje se od stanica različitog genotipa: onih s ugrađenim transgenom i stanica divljeg tipa (bez ugrađenog transgena). Također, zbog nasumične inaktivacije pojedinih transgena poznati su slučajevi gdje nije došlo do ekspresije gena, iako je došlo do integracije u genom.



Slika 1: Mikroinjektiranje nukleinske kiseline u pronukleus.

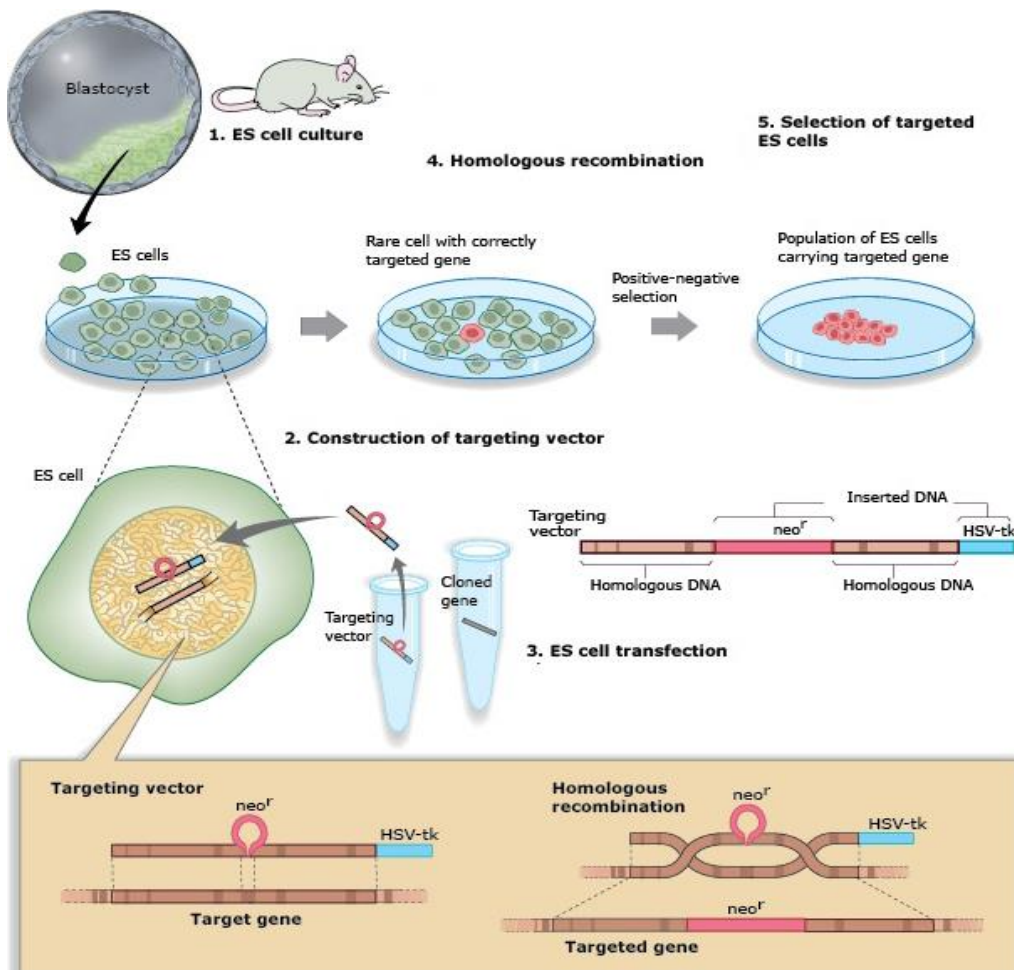
Intracitoplazmatsko injektiranje spermarnih stanica (ICSI) oblik je *in vitro* oplodnje gdje se izolirani spermij sa transgenom injektira u citoplazmu jajne stanice. Ovom tehnikom dobiveni embriji se potom implantira u maternicu surogat majke. Prijenos transgena spermarnim stanicama razvijen je kod svinja i miševa.

Metodom transfera jezgre somatske stanice (SCNT) dobivamo vijabilne embrije nastale ubacivanjem jezgre transgenične somatske stanice iz kulture u oocitu s prethodno uklonjenom jezgrom (Sl. 2.). Takvim načinom omogućeno je uvođenje ciljanih mutacija homolognom rekombinacijom (Cozzi i sur. 2010). Jajna stanica se zatim potiče na diobu dodatkom spermarnih stanica kao induktora diobe, kemijskom aktivacijom ili elektrošokom. Ova tehnika koristi se u kloniranju životinja.



Slika 2: Metoda kloniranja prijenosom transgenične somatske stanice iz kulture u oocitu bez jezgre

Transfer gena u pluripotentne embrionalne matične stanice embrija (Sl. 3.) koristio se do nedavno samo u miševa, posebice za dobivanje *knockout* sojeva. Prije nekoliko godina znanstvenici su otkrili tehniku uspješne izolacije pluripotentne stanične linije čime je konačno savladana prepreka uzgoja transgeničnih ptica (najčešće kokoši) kao kandidata za produkciju rekombinantnih proteina u bjelanjku (Houdebine 2009). U ovoj metodi moguća je ciljena ugradnja gena tj. homologna rekombinacija.



Slika 3: Transfer ciljanog gena u embrionalne matične stanice (ES) s homolognom rekombinacijom. 1.Kultura matičnih stanica, 2. Konstrukcija ciljanog vektora, 3. Transfer ES stanica, 4. Homologna rekombinacija, 5. Selekcija ciljanih ES stanica

2.2. SUSTAVI PROIZVODNJE TERAPEUTSKIH PROTEINA U ŽIVOTINJAMA

Najčešća su dva sustava u proizvodnji rekombinantnih proteina pomoću transgeničnih životinja. To su mlijeko i bjelanjak jajeta. Osim njih moguće je i korištenje životinjske krvi i urina te svilenih žlijezda pauka. Krv ne može skladištiti velike količine terapijskih proteina zbog nestabilnosti te utjecaja rekombinantnih proteina (biološki aktivnih) na zdravlje životinje. Iz tog razloga danas se koristi mlijeko kao puno bolji medij za dobivanje terapijskih proteina. U ovoj metodi koriste se zečevi, svinje, koze i krave. Zečevi imaju niz povoljnih karakteristika kao što je lak i jeftin uzgoj, kratko generacijsko vrijeme, izrazita plodnost, neosjetljivost na prionske bolesti te relativno visoka produkcija mlijeka. Ipak zbog svoje male veličine, ukupna

godišnja produkcija proteina iz zečeva dosta je niska pa se često zamjenjuju većim životinjama s većom produkcijom mlijeka. Svinje proizvode veće količine naspram zečeva, a preživači još više od svinja. Time su preživači potencijalno najprikladniji za proizvodnju velikih količina proteina, iako imaju i neke nedostatke: relativno dugo generacijsko vrijeme (spora reprodukcija), glikolizacija proteina nije toliko slična ljudskoj kao kod svinja i zečeva, a k tome su preživači osjetljivi i na prionske bolesti (Houdebine 2009). Prionski gen PrP potreban je za nastanak prionske bolesti. U svojoj normalnoj staničnoj formi sudjeluje u signalizacijskim procesima, no promjenom forme izaziva scarpie bolest u ovaca tj. u kravljjoj spongioformnoj encefalopatiji. Pošto se prioni ne izlučuju u mlijeko (već u živčani sustav) infektivnost mlijeka vrlo je slaba, ali i dokazana u par slučajeva. (Jung, Lavtar 2008). Rizik prionskih bolesti za čovjeka riješen je izbacivanjem PrP gena iz genoma „knock out“ metodom. (Houdebine 2009). Ekspresija transgena u mlijeku osigurana je korištenjem specifičnog promotora za gene koji kodiraju proteine mlijeka.

Bjelanjak jajeta, nešto je noviji sustav za produkciju proteina koji je postao moguć savladavanjem poteškoća genetičke modifikacije ptica. Kokoši su time postale jedan od najučinkovitijih bioreaktora sa kratkim generacijskim vremenom, velikim reproduktivnim kapacitetom i dnevnim nešenjem jaja iz kojeg se pročišćavanjem dobivaju rekombinantni proteini. Ekspresija transgena isključivo u bjelanjku jajeta omogućena je korištenjem promotora za ovalbumin. Međutim, postoji problem s pravilnom glikozilacijom: npr. nakon izolacije rekombinantna monoklonska antitijela ne sadrže sialinsku kiselinu što često smanjuje vrijeme poluživota tog antitijela u krvotoku pacijenta. Kako bi se takav problem izbjegao, a glikolizacija optimizirala, provodi se ko-transfer gena koji kodiraju za odgovarajuće glikolizil-transferaze. S druge strane dokazano je da monoklonska antitijela koja ne sadrže fruktozu i sialinsku kiselinu imaju pojačan citotoksični efekt i reduciraju upalne reakcije. Takva antitijela su izrazito prigodna za uništavanje tumorskih stanica i predstavljaju moćan alat u borbi protiv tumora. Iz navedenih razloga važno je odabrati organizam s prihvatljivom glikolizacijom sukladno svrhi proteina kojeg želimo prizvesti.

3. ATryn

ATryn komercijalni je naziv za rekombinantni ljudski (antitrombin) AT dobiven iz mlijeka transgeničnih koza. To je prvi takav protein koji je zadovoljio sve tri faze kliničkih testiranja i odobren od strane EMA (European Medicines Agency) i FDA (Lavine G. 2009).

3.1. ANTITROMBIN

Antitrombin je glikoprotein sintetiziran u jetri i jedan je od glavnih regulatora aktivacije kaskade zgrušavanja krvi. U krvnoj plazmi dolazi u dvije forme: α -Antitrombin i β -antitrombin. Prvi je dominantni oblik koji čini oko 85% ukupnog AT. Predstavlja potpuno glikoliziran oblik antitrombina s glikolizacijom na sva četiri asparaginska (Asn) ostatka, no s nešto slabijim afinitetom za heparin. Drugi, β -oblik antitrombina čini tek 15% njegove ukupne količine, nedostaje mu i jedna glikolizacija na Asn135, no odlikuje se i do 10 puta većim afinitetom za heparin. AT je serin proteazni inhibitor koji ima ključnu ulogu u prevenciji zgrušavanja. Inaktivira trombin i faktore zgrušavanja IXa, Xa, nešto slabijim intenzitetom faktore VIIa, XIa i XIIa te proteaze tripsin, plazmin i kalikrein. Inhibicijska aktivnost AT se uz prisutnost heparina povećava 300 puta za faktor Xa, a čak do 1000 puta za trombin zbog promjene u alosteričkoj konformaciji (Yann E. i sur. 2005). Interakcijom trombina i AT nastaje ireverzibilni TAT kompleks, čime su obje molekule onesposobljene (inaktivirane) te se brzo gubi iz cirkulacije. Također, AT ima protuupalno djelovanje. Potiče oslobađanje prostaciklina iz stanica endotela, smanjuje ishemiju (nedovoljan protok krvi) uzrokovanu ekstravazacijom leukocita, utječe na migraciju neutrofila signalizacijom s površinskim heparin-sulfatnim proteoglikanima.

3.2. PRIMJENA AT U KLINIČKE SVRHE

Koncentrirani AT iz ljudske krvne plazme (hpAT) koristi se kod pacijenata s nasljednim nedostatkom AT od ranih 80-ih prošlog stoljeća. Nasljedni nedostatak AT povezan je s većim rizikom od venske i pulmonalne tromboembolije, te smanjenom aktivnosti AT. Kod takvih pacijenata, hpAT se koristi kao prevencija u visokorizičnim situacijama poput operacija, porođaja, opekotina, bolestima jetre i slično. Provedeno je ispitivanje utjecaja hpAT na mortalitet pacijenata s DIC-om (*Disseminated intravascular coagulation*) koje, nažalost nije pokazalo razliku u stopi mortaliteta kod pacijenata tretiranih s hpAT i onih s placebo (Yann E. i sur. 2005). Takav rezultat bio je razočaravajući, no primijećena je smanjena stopa smrtnosti u pacijenata tretiranih s AT bez prisutnosti heparina, te pacijenata kojima je davan placebo bez heparina. To upućuje potrebu za daljnja istraživanja kako bi se ustvrdio točan učinak AT. Kako se klasični (nerekombinantni) hpAT dobiva koncentriranjem AT iz uzoraka krvi, potrebne su velike količine krvne plazme za taj postupak, koje nekad nisu ni dostupne. Također, pročišćavanjem proteina iz krvi uvijek ostaje opasnost od kontaminacije uzorka i zaraze s

bolesti koje se prenose krvlju (HIV, hepatitis). Zbog toga bi rekombinantni ljudski AT dobiven u obilnim količinama iz transgeničene životinje bio idealna zamjena do sada korištenom hpAT.

3.3. KONSTRUIRANJE, UGRADNJA I EKSPRESIJA VEKTORA

Kako bi u konačnici dobili rekombinantni produkt u mlijeku potrebno je prvo konstruirati specifični vektor i ubaciti ga u zigotu. Za rezanje molekule DNA na specifičnim mjestima koriste se restrikcijski enzimi. Prvo su cDNA ljudskog antitrombina i kozji gen za β -kazein klonirani svaki u svoj vector, a potom su rezani restrikcijskim enzimima. Konačni je konstrukt dobiven ligacijom cDNA antitrombina s promotorom za kozji β -kazein (Yann E. i sur. 2005). Na taj je način kodirajuća regija za β -kazein zamijenjena genom za ljudski AT, dok je promotor ostao isti. β -kazein dominantni je protein u mlijeku koza te se stoga upravo on modificira u želji da se protein luči u mlijeko. Slijedi izrezivanje transgena iz plazmida pomoću NotI i Sall restrikcijskih enzima. U konačnici je dobiven lineariziran transgen koji se pročišćuje elektroforezom na agaroznom gelu. Za provjeru ekspresije transgena korišteni su miševi, a kasnije se metoda primijenila i na koze. Transgen je ubačen metodom mikroinjektiranja mikropipetom u pronukleus zigote koje su se potom vraćale u jajovod ženki. Nedostak ove metode je nasumična integracija DNA fragmenta koja se može odviti i nakon diobe zigote što rezultira mozaicizmom. Također, transgen se može ugraditi na više mjesta u genomu. Mikroinjektiranje se vršilo na 139 embrija, od čega je rođeno 70 potomaka, a samo pet je identificirano kao transgenične životinje. Određivanje nosi li životinja transgen vrši se iz uzorka tkiva uha i krvi, nakon čega se provodi PCR i hibridizacija po Southern-u. Od dobivenih pet transgeničnih životinja samo je jedan mužjak davao zadovoljavajuću količinu produkta transgena te se koristio kao osnivač transgene populacije. Osnivač se pario sa 14 ženki, te je samo 5 mladih nosilo transgen (manje od 50%) što je sugeriralo da je mužjak kimera/himera (Yann E. i sur. 2005). Nužno je bilo identificirati kozlića sa samo jednim, ekspresijski aktivnim mjestom integracije. To je bilo mjesto na kromosomu pet (C5) koji je nosio četiri kopije transgena što je ustanovljeno FISH metodom (Fluorescence insitu hibridization).

3.4. PROČIŠĆAVANJE rhAT

Mlijeko sa rhAT prvo se tretira EDTA-om i pročišćuje kroz filter tangencijalnog protoka (TFF), slijedi afinitetna kromatografija na heparinskoj koloni (Heparin-Hyper D kolona) koja veže AT, a propušta vitamine, ostale proteine mlijeka, DNA i hormone. Cijeli taj sustav spojen je u zatvorenu petlju tako da isti volumen mlijeka više puta kruži sve dok se ne

sakupi više od 90% antitrombina iz danog volumena. Sakupljeni eluat filtrira se potom kroz antivirusni filter. Zatim se vrši diafiltracija i propuštanje kroz više kolona. Konačno, radi se završna diafiltracija do koncentracije od 25 mg/mL. Takvim postupkom pročišćavanja 375 L mlijeka koje sadrži 600g antitrombina dobiveno je 300 g pročišćenog antitrombina (oko 50% od ukupne količine). Što se tiče prijenosa virusnih bolesti, vjerojatnost je izrazito mala zbog visokog stupnja kontrole i izolacijskog uzgoja u zatvorenim, izoliranim farmama. Dodatno, vrši se testiranje mlijeka prije pročišćavanja na tri stanične linije, a potom i serološko testiranje virusa (Yann E. i sur. 2005). Serološko testiranje temelji se na vezanju protutijela na odgovarajući epitop antigena. Zbog osjetljivosti koza na prionske bolesti važno je vršiti testiranja na scarpie (“grebež ovaca”) - bolest uzrokovana promjenom forme priona.

3.5. STRUKTURA rhAT

Brojnim analizama utvrđena je potpuna podudarnost u strukturi između hpAT i rhAT osim u glikolizaciji. Provjere su se radile tekućinskom kromatografijom i masenom spektrofotometrijom (LC/MS), analizom N-terminalnog kraja, mapiranjem peptida, te osvjetljavanjem -UV spektrom.

Oboje sadrže 4 ista N-glikolizacijska mjesta, no razlika je primijećena u posttranslacijskoj modifikaciji peptida. Kod rhAT uočena je prisutnost fruktoze, viša razina manoze, a niža galaktoze i sijalinske kiseline, te supstitucija N-acetilneuraminske kiseline za N-glikolilneuraminsku. Utvrđeno je da navedene razlike ne utječu na biološku aktivnost AT, već na afinitet prema heparinu koji je kod rhAT veći četiri puta.

3.6. POKUSI *in vivo*

Učinkovitost rhAT prvo se provjeravala na različitim modelima životinjama s nedostatkom AT pri induciranoj sepsi i ksenotransplataciji. U štakora, babuna i ovaca sa sepsom dokazana je veća stopa preživljavanja, te se pokazao učinkovitim pretretmanom kod DIC-a (*Disseminated intravascular coagulation*) zbog antikoagulativnih i antiinflamatorinih svojstava. Tretman je održavao AT u plazmi u granici normalne, kao i broj trombocita, a sve tretirane jedinke bile su negativne na degradaciju fibrina. Pokusom ksenotransplatacije, svinjskog bubrega humane ekspresije u neimunosupresirane babune, nije došlo do

trombocitopenije, krvarenja, ni koagulopatije u prvih pet dana, što je dvostruko više naspram netretiranih životinja.

3.7. KLINIČKA ISPITIVANJA

Ukupno je provedeno 8 kliničkih ispitivanja sa naglaskom na pacijente rezistentne na heparin, te prevenciju tromboze. Važno je napomenuti da su sva ispitivanja utvrdila sigurnost lijeka. Ispitivanja su izvršena u tri faze. Faza 1 odnosila se na procjenu farmakokinetike AT i njegovog utjecaja na kliničku sliku pacijenata. Parametri zgrušavanja, hematologija i biokemija, te vitalni znakovi i elektrokardiogram bili su u granicama normale kod ispitivanih dobrovoljaca. Faza 2 proučavala je farmakodinamiku i optimalno doziranje rhAT tijekom operacija ugradnje prenosnice (*cardiopulmonary bypass* i *coronary artery bypass grafting*). Prilikom kardioloških operacija često se razina AT-a u plazmi snizi zbog predtretmana heparinom, pa je važan njegov nadomjestak. Nitko od tretiranih pacijenata nije razvio antitijela na rhAT, a opažena je bolja inhibicija trombina, fibrina i trombocitnog poremećaja. Cilj faze 3 bio je ustanoviti optimalnu dozu i ona je ustanovljena na 75 U/kg rhAT. Ni u jednom ispitivanju nije zabilježen slučaj imunološke reakcije (Yann E. i sur. 2005).

4. SEBELIPAZA ALFA – KANUMA

Kanuma je rekombinantna ljudska lizosomalno kiselinska lipaza (LAL) proizvedena iz bjelanjaka jajeta transgeničnih kokoši. Rekombinanti protein sadrži isti aminokiselinski slijed kao nativni. Ova metoda odabrana je primarno zbog glikolizacijskog uzorka dobivenog proteina (Nature Biotech). Tako LAL sadrži N-vezujuće glikane s terminalnim N-acetilglukozaminom, te manoznim i manoz-6-fosfatnim ostacima. Osim načina glikolizacije, produkcija željenog proteina u bjelanjku izrazito je povoljna zbog sadržaja inhibitora proteinaza, kao i manjka samih proteinaza. Kanuma je prihvaćen kao dugotrajna enzimatska zamjenska terapija u EU i Americi za liječenje ljudi s nedostatkom LAL enzima (Sherdian 2016).

4.1. LIZOSOMALNA KISELINSKA LIPAZA I NEDOSTATAK LAL-A

LAL je enzim koji katalizira lizosomalnu hidrolizu kolesterol estera i triglicerida do kolesterola, glicerola i slobodnih masnih kiselina.

Nedostatak LAL-a je rijetka recesivna autosomalna bolest uzorkovana mutacijom u LIPA genu koji kodira spomenuti enzim. Sinteza nefunkcionalnog enzima očituje se nagomilavanjem lizosoma, kolesteril estera i triglicerida (Shirley M. 2015). U dojenčadi je u svojoj najagresivnijoj formi, pa je često uočljiva hepatospelnomegalija, malapsorpcija i disfunkcija jetre. U takvom stadiju pacijenti prežive najviše do 6 mjeseci života. Pojava bolesti u djece i odraslih sporije je progresije. Neke od posljedica su povišena razina transaminaza u serumu, dislipidemija, hepatomegalija, bolesti jetre, srteroskleroza i preuranjena smrt.

4.2. KLINIČKA PRIMJENA

Do nedavno, jedini način borbe protiv nedostatka LAL-a bio je snižavanje razine lipida u tijelu, čiji su učinci bili mali do nikakvi. Enzimska zamjena dugo je smatrana potencijalnim rješenjem, sve do konačne proizvodnje Kanume. Rekombinantni enzim zamjenjuje funkciju pacijentovog nefunkcionalnog enzima, reducira nagomilavanje lizosomalnih lipida i tako smanjuje rizik od dislipidemije, abnormalnosti jetre i ostalih posljedica bolesti (Shirley M. 2015). Lijek se daje intravenozno jednom tjedno ili jednom u dva tjedna pacijentima starijim od osam mjeseci.

4.3. FARMAKODINAMIKA

U *in vitro* uvjetima fluorescentno obilježena sebelipaza α unešena je u makrofage i fibroblaste pomoću receptora za manozu i maoza-6-fosfat. Primijećen je transport u lizosome.

U *in vivo* pokusima na mišu tretiranim sebelipazom α primijećena je redukcija kolesterol estera i triglicerida u tkivima, bolja vrijednost transaminaza i patologija jetre.

U fazi I/II kliničkog ispitivanja zabilježen je značajan pad vrijednosti amino i aspartat aminotrasferaze, a srednja plazmatska vrijednost kolesterola, triglicerida i LDL-a (low density protein) povećala se 70%, 69% i 87%, kao posljedica mobilizacije (Shirley M. 2015). Danjim unosom lijeka, srednje plazmatske vrijednosti vratile su se u normalu (niži LDL, kolesterol i trigliceridi, a viši HDL – high density protein).

4.4. FARMAKOKINETIKA

Analizom je ustvrđeno da je farmakokinetika nelinearna te bez akumulacije u pacijenata koji su primali 1-3 mg/kg jednom tjedno. Vrijeme poluraspada iznosi 0.1 sat za sve skupine (dojenčad, djeca i odrasli). Također je utvrđeno da dob, težina i spol nemaju utjecaj na klirens. Pošto se razgrađuje putem peptidne hidrolize, može se uzimati i s drugim lijekovima bez međusobne interakcije.

4.5. KLINIČKA ISPITIVANJA

Faza III bilo je slijepo ispitivanje sa nasumično odabranim pacijentima (n=36) koji će primati sebelipazu α , odnosno placebo kroz 20 tjedana. Prije testiranja pacijenti su imali povećane vrijednosti ALT-a i LDL-a. Kod 32 pacijenata utvrđena je fibroza jetre, a dijelu pacijenata i ciroza jetre. ALT normalizacija postignuta je kod 31% ispitanika, dok je kod svih uočen pad vrijednosti spomenutih factora. Zabilježena je redukcija vrijednosti LDL-a (28%), triglicerida (26%) i masnoće jetre (32%). Daljnjim uzimanjem lijeka vrijednosti su se nastavile vraćati u normalu.

Faza II/III bilo je ispitivanje na novorođenčati, sa teškim posljedicama nedostatka enzima. Šest od devet (67%) doživjelo je primarni cilj tj. 12 mjeseci života, što je do tada bio nikad zabilježen slučaj (Shirley M. 2015).

5. ANTI-CD20 MONOKLONALNO ANTITIJELO

Rekombinantna monoklonalna protutijela (mAb) koriste se u terapiji upalnih bolesti te u liječenju tumora. Anti-CD20 mAb (cCD20 mAb) veže se na epitope CD20 antigena koji se nalazi na površini B stanica. Povišene vrijednosti CD20 antigena, koji se koristi kao marker, upućuju na non-Hodgkinov limfom, kroničnu limfocitičnu leukemiju (CLL) te reumatski artritis (Young i sur. 2018). Kao terapija koristi se lijek Rituximab (rekombinantno anti-CD20 mAb). Mehanizam djelovanja temelji se na induciranoj apoptozi, citotoksičnosti ovisnoj o komplementu (CDC) te citotoksičnosti ovisnoj o protutijelima (ADCC). Zbog njegovog skromnog kliničkog učinka stvorila se potreba za poboljšanjem efikasnosti lijeka. U tu svrhu,

korištene su transgenične kokoši zbog mogućnosti modulacije N- glikolizacijskog profila i poboljšanja Fc efektonih funkcija.

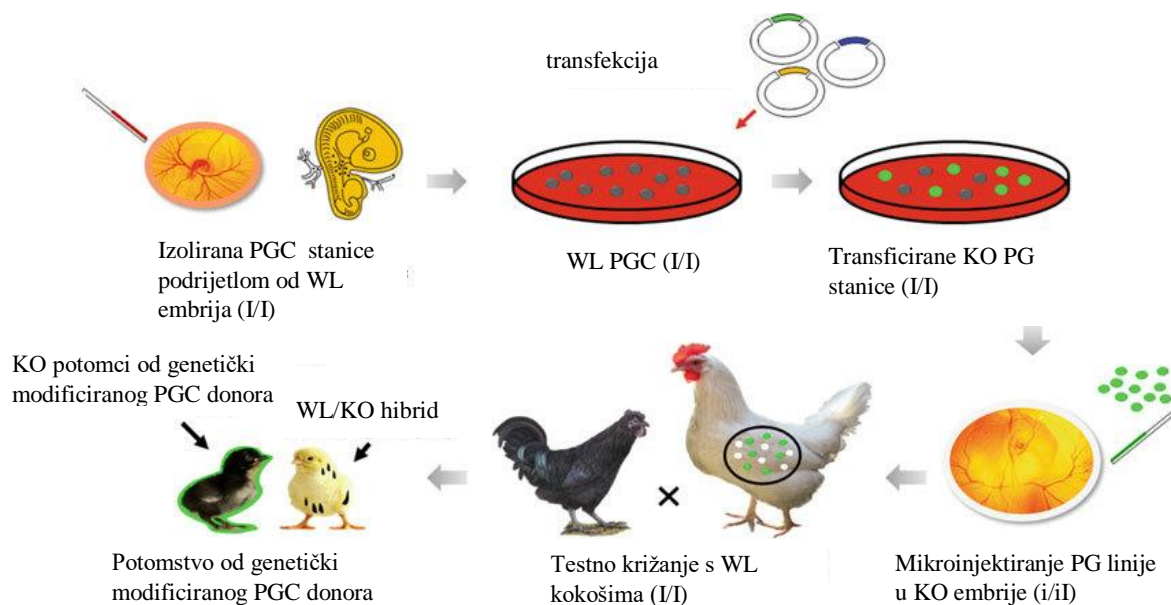
5.1. PRODUKCIJA U TRANSGENIČNIM KOKOŠIMA

Kokoši su jedan od najučinkovitijih bioreaktora zbog kratkog generacijskog vremena, velikog reproduktivnog kapaciteta, genetičke stabilnosti kroz generacije, dnevne produkcije protutijela u bjelanjku, a pogodne su i kao model za ljudske bolesti. U bjelanjku jednog jajata nalazi se 6.5 g proteina, većina monogenske ekspresije (npr. ovalbumin) što ga čini prikladnim za masovnu produkciju ekzogenih proteina. N-glikolizacija mAb u bjelanjku specifična je po velikom udjelu manoze koja olakšava transport terapeutskog proteina do ciljane stanice, a time i njegovu efikasnost. Primijećeno je da je N-glikolizacija CH2 domene važan faktor u stabilizaciji Fc regije (posreduje u komunikaciji protutijela i imunološkog sustava, te aktivira efektore), aktivaciji ADCC-a i CDC-a. Stoga, ako je prisutan manji udio fruktoze, odnosno veći udio manoze ADCC vrijednost će biti veća (Young i sur. 2018). Povećan udio terminalne galaktoze uzrokuje veću CDC vrijednost. Time se očekivalo da bi antitijelo proizvedeno u transgeničnoj kokoši također trebalo pokazivati visoku ADCC i CDC aktivnost.

5.2. EKSPRESIJSKI VEKTOR

Kodonski optimiziran anti-CD20 mAb gen sastavljen od: VL + hlg kappa regije, VH hlgG regije i unutrašnjeg ribosomskog ulaznog mjesta (IRES) ugrađen je u "piggyBack" transpozon s promotorom za ovalbumin (OV), 3' netranslatirajuću regiju i sekvencu za poli A rep.

Primordijalna zametna stanična linija (PGC) uspostavljena je iz embrionalnih gonada bijele kokoši (WL), a proliferacija je inducirana fibroblasnim faktorom rasta. Transfekcija cCD20 mAb vektora u PGC liniju izvršena je lipofekcijom (Young i sur. 2018). Konačno, u embrije crnih kokoši (KO) mikroinjektiraju se transformirane stanice PGC linije. Učinjeno je testno križanje i otkrivanje transgeničnih WL kokoši s dominantnim pigmentacijskim inhibitor genom (I/I) i crnih KO kokoši s recesivnim pigmentacijskim inhibitor genom (i/i). Analizom testnog križanja oplodnjom ženish KO kokoši identificirane su kimere među njihovim potocima.

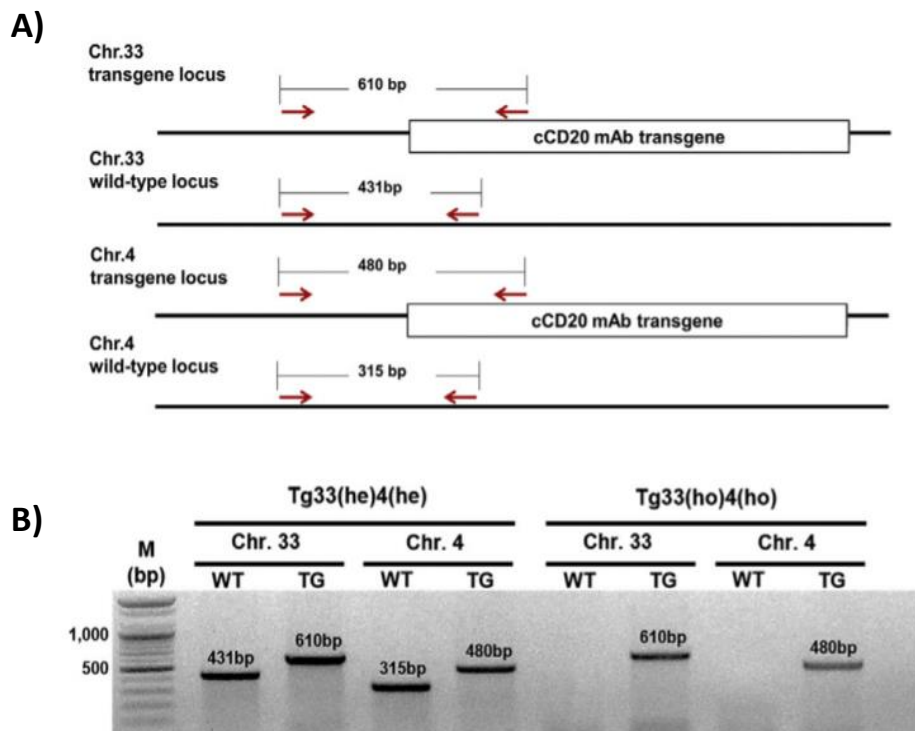


Slika 4. Dobivanje transgeničnih kokoši i test križanje WL kokoši divljeg tima (I/I) s KO homozigotnim transgeničnim kokošima (i/i).

Mjesta insercije transgena identificirana su *DNA walking* metodom. Odgovarajući PCR produkti su pročišćeni i klonirani u pGEM-T vektor, a potom sekvencirani i analizirani BLAST-om (*Basic Local Alignment Search Tool*) za identifikaciju mjesta insercije.

5.3. DOBIVANJE HOMOZIGOTA ZA TRANSGEN

Za osnivače populacije odabrani su pijetlovi s jednom kopijom transgena na kromosomu: Tg33 na kromosomu 33, a Tg4 na kromosomu 4. Pijetlovi su križani s netransgeničnim kokošima. U prvoj generaciji identificirani su heterozigoti za jedan kromosom: pijetao Tg4(he) te kokoš Tg33(he) koji su međusobno pareni. U drugoj generaciji dobiveni su heterozigoti za oba kromosoma (dihibridi): pijetao Tg33(he)4(he) i kokoš Tg33(he)4(he), a njihovim parenjem homozigoti Tg33(ho)Tg4(ho) koji su sadržavali po 2 kopije transgena na svakom kromosomu. Kako bi razlikovali transgenične jedinke od „divljeg tipa“ korištena je PCR analiza. Zaključeno je da su transgenični lokusi na kromosomu 33, odnosno 4 duži od lokusa divljeg tipa. Rezlutati su bili vidljivi i na gel elektroforezi (Sl. 5).

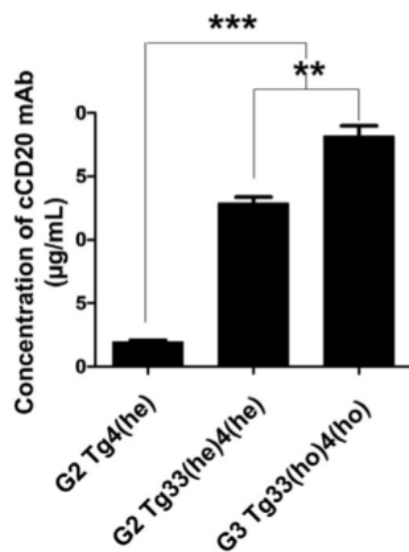


Slika 5: A) Razlika u dužini PCR fragmenta transgeničnog lokusa i lokusa divljeg tipa; B) Gel elektroforeza PCR produkata heterozigota Tg33(he)Tg4(he) (svaki kromosom sadrži transgeničan lokus ali i lokus divljeg tipa) i homozigota Tg33(ho)Tg4(ho) (sadrži samo transgeničan lokus).

5.4. DETEKCIJA I PROČIŠĆAVANJE cCD20 mAb

Kako bi se ustvrdila ekspresija cCD20 gena rađen je reverzni PCR raznih tkiva kokoši (slezena, mozak, mišići, spolni sustav). Najveća količina eksprimiranog transgena bila je u tkivu jajovoda, mjestu proizvodnje bjelanjka.

Bjelanjak je homogeniziran te centrifugiran čime se uklonila većina proteina bjelanjka. Supernatant je filtriran, a ljudski IgG je pročišćen afinitetnom kromatografijom na koloni s proteinom A kao ligandom. Vezani IgG je eluiran puferom. Kvantifikacija izoliranog cCD20 mAb mjerena je ELISA testom (*Enzyme linked immunosorbent assay*) pri čemju je koncentracija antitijela bila proporcionalna optičkoj gustoći nakon reakcije s kromogenim supstratom. Vršena je i usporedba koncentracije antitijela u heterozigota s transgenom na samo jednom kromosomu Tg4(he), na oba kromosoma Tg33(he)Tg4(he) i homozigota Tg33(ho)Tg4(ho). Koncentracija cCD20 mAb značajno je rasla s brojem kopija transgena u organizmu (Sl. 6.).



Slika 6. Ovisnost prinosa antitijela o broju kopija transgena u genomu.

5.5. KARAKTERIZACIJA REKOMBINANTNOG ANTITIJELA

Analiza pročišćenog antitijela pokazala je da cCD20 mAb obiluje galaktozom na N-terminalnom kraju, da sadrži visok udio manoznih, te izrazito nizak udio fruktoznih ostataka.

Procjena stabilnog vezanja antitijela na antigen bitan je pokazatelj kvalitete i stabilnosti antitijela. Raji stanice s CD20 antigenom tretirane su cCD20 mAb kako bi odredili afinitet vezanja antitijela. Provjera se vršila protočnom citometrijom i ustvrdila stabilno vezanje, slično onom od rituximaba. Afinitet vezanja antitijela izrazito je važan u staničnoj apoptozi. Postotak apoptoze u kulturi stanica tretiranih cCD20 mAb bio je višji za oko 12% nasprem stanica tretiranih Rituximabom (Young i sur. 2018).

6. ZAKLJUČAK

Transgenične životinje proizvode se sve od otkrivanja načina transfera (prenošenje iz i u maternicu surogat majke) i manipulacije embrijima (uvođenje transgena) pa do danas, kada se rutinski koriste kao modeli u biomedicinskim istraživanjima ljudskih bolesti i funkcija gena. Prepoznati su i kao bioreaktori u kojima je moguća proizvodnja većih količina terapijskih proteina. Takvi su proteini proizvedeni najčešće u mlijeku ili bjelanjku jajeta, te spadaju u noviju vrstu lijekova odobrenih od strane FDA i EMA. Glavna prednost terapijskih proteina je što nisu sastavljeni od sintetskih kemikalija već se sastoje od identičnog slijeda aminokiselina, slične tercijarne strukture i uzorka glikolizacije kao i nativni proteini čovjeka. Zbog toga im je fiziološko djelovanje izrazito uspješno. Naravno, primjena transgeničnih životinja u medicinske svrhe i danas zna povlačiti kontroverzna razmišljanja i neka etička pitanja, kao što su dobrobit same transgenične životinje ili pak ljudi kao završnih konzumenata njihovih produkata. Usprkos tome, možemo sa sigurnošću zaključiti kako je primjena transgeničnih životinja u proizvodnji terapijskih proteina bitno doprinijela poboljšanju sveukupne kvalitete ljudskog života i liječenju bolesti.

7. LITERATURA

1. Cormac Sheridan, FDA approves 'farmaceutical' drug from transgenic chickens, *Nature Biotechnology*, svezak 34, broj 2, Veljača 2016.
2. Brian Salter, Núria Vázquez-Salat, Greet Smets, Louis-Marie Houdebine, The current state of GMO governance: Are we ready for GM animals, *Biotechnology Advances* 30, 1336–1343 str., 15. veljače 2012.
3. Greg Lavine, FDA approves first biological product derived from transgenic animal, *Am J Health-Syst Pharm*, 66 svezak, 15. ožujak 2009.
4. Matt Shirley, Sebelipase Alfa: First Global Approval, *Springer International Publishing*, 2015.
5. Young Min Kim, Jin Se Park, Sang Kyung Kim, Kyung Min Jung, Young Sun Hwang, Mookyoung Han, Hong Jo Lee, Hee Won Seo, Jeong-Yong Suh, Beom Ku Han, Jae Yong Han, The transgenic chicken derived anti-CD20 monoclonal antibodies exhibits greater anti-cancer therapeutic potential with enhanced Fc effector functions, *Biomaterials* 167 58e68, 2018.
6. Louis-Marie Houdebine, Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 32, 107–121, 2009.
7. Yann Echelard, Harry M. Meade, Carol A. Ziomek, *Modern Biopharmaceuticals*. U: The first biopharmaceutical from transgenic animals: ATryn, Ed. J. Knablein, WILEY-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp. 995-1020, 2005.
8. Mirko Jung, Polona Lavtar, Bovina spongiformna encefalopatija i mlijeko, *Infektološki glasnik* 28:3, 153–156, 2008.
9. Jean Cozzi, Eryao Wang, Christelle Jacquet, Alexandre Fraichard, Yacine Cherifi, Qi Zhou, Procedures for Somatic Cell Nuclear Transfer in the Rat, *Rat Genomics*, pp 137-150, 2009.

8. SAŽETAK

Proizvodnja terapijskih proteina pomoću transgeničnih životinja započela je još 80-ih godina prošlog stoljeća, a vrlo je popularna i korištena tehnika i dan danas. Od transgeničnih životinja u tu svrhu najčešće se koriste miševi, koze i kokoši. Životinje se drže na izoliranim farmama ili u laboratoriju kako bi određeni faktori poput bolesti i infekcija bili visoko kontrolirani. Postupak dobivanja transgeničnih životinja izrazito je delikatan i osjetljiv proces umetanja željenog transgena u genom životinje, kontroliranih križanja u svrhu dobivanja homozigotnih transgeničnih jedinki kao i proces pročišćavanja dobivenog proteina. Popularna je proizvodnja proteina (antitijela i enzima) u mlijeku tj. bjelanjku jajeta zbog dobivanja velikih količina proteina, te modulacije posttranslacijskih modifikacija. Pročišćavanje proteina se kroz više koraka filtracija i afinitetne kromatografije, praćenih imunološkim mikrobiološkim i virusnim analizama. Konačna svrha proizvedenog terapijskog proteina je primjena u medicinskoj praksi. Stoga svaki rekombinantni protein mora proći klinička ispitivanja i evaluaciju. Danas je proizvodnja terapijskih proteina i dalje vrlo skup proces, što predstavlja prepreku u bržem napredovanju kliničkih i ranijih faza razvoja proteina. Lijekove koji su na koncu uspjeli doći na tržište (Atryn, Kanuma) možemo smatrati pionirima koji će stvoriti utaban put za nova istraživanja i poboljšanja u polju proizvodnje terapijskih proteina pomoću transgeničnih životinja.

9. SUMMARY

The production of therapeutic proteins in transgenic animals started in the 1980s and it is a very popular and widely used technique until today. Mouse, goats and chickens are mostly used as transgenic animals. These animals are kept in isolated farms or laboratories so that disease and infection could be controlled and minimised. The procedure of getting transgenic animals is a very delicate and sensitive process of implanting a desired transgene in the animal's genom, as well as the process of purification of that produced protein. A popular method of protein production (mostly antibodies and enzymes) is by directing its synthesis in the milk or the albumen (egg-white) of the egg of the transgenic animal. In that way large amounts of recombinant protein can be produced including the posttranslational modifications. The purification of the protein is done by many filtration steps and affinity chromatography paralleled with immunologic, microbiological and virus analysis. The final purpose of the produced therapeutic proteins is the use in the clinic. To achieve that, the protein has to pass clinical testing and evaluation. Even today, the production of a protein is an expensive process, which still presents an obstacle for faster development of new candidate proteins. Medication that have reached the market so far (e.g. Atryn, Kanuma) are considered pioneers which will pave the path for new research and improvement of the field of therapeutic protein production in transgenic animals.