



Biotechnologia leków u progu XXI wieku

Aleksander Chmiel
Akademia Medyczna, Łódź

Biotechnology of drugs on the verge of 21st century

Summary

At present the most classical pharmaceutical technologies have reached a high level of industrial perfection. The best example of those achievements is the biotechnology of penicillins. Biosynthetic penicillin production using highly productive strains of *Penicillium chrysogenum* is followed by enzymatic hydrolysis of the product using microbial penicillin acylase, the best sources of which are recombinant strains of *Escherichia coli*. The resulting 6-aminopenicillanic acid is the starting material for chemical synthesis of a large number of semisynthetic penicillins. Research and development of the biotechnology of antibiotics gave solid foundations to other biotechnological processes in the pharmaceutical industry, i.e. production of amino acids, organic acids, enzymes and enzyme inhibitors, vitamins, alkaloids, dextran, steroid drugs and others.

In addition to the continuous improvement of the classical technology, completely new bioprocesses were introduced to the pharmaceutical industry in the recent years as a result of unprecedented progress in genetic engineering, hybridoma techniques and cell cultures *in vitro*. The new group of polypeptide/protein biopharmaceuticals includes peptide hormones (e.g. insulin, growth hormones, gonadotropins), growth factors (e.g. insulin-like growth factors, epidermal growth factors), haematopoietic growth factors (e.g. erythropoietin, colony stimulating factors), blood proteins (e.g. clotting factors VIII, IX, XII and XIII, tissue plasminogen activator, streptokinase), cytokines (e.g. interferons, interleukines and tumor necrosis factor) and monoclonal antibodies. Another new area of genetic engineering and biotechnology is the production of nucleic acid drugs, which are proposed for both gene and antisense therapy.

Adres do korespondencji

Aleksander Chmiel,
Samodzielna Pracownia
Biosyntezy Środków
Leczniczych,
Akademia Medyczna,
ul. Muszyńskiego 1,
90-151 Łódź.

biotechnologia

3 (50) 118-140 2000

Key words:

pharmaceutical biotechnology, traditional drugs, new biopharmaceuticals, animal and plant biotechnology, biorisk, biosafety, bioethics.

1. Wprowadzenie: zakres i perspektywy biotechnologii farmaceutycznej

Biotechnologia leków została zainicjowana w czasach II wojny światowej bardzo spektakularnym sukcesem – opracowaniem wielkoprzemysłowej produkcji penicyliny, co dało początek biotechnologii antybiotyków. Dzisiaj wiemy, że sukces biotechnologii antybiotyków i antybiotykoterapii jest połowiczny, a na skutek szybko narastającej i rozprzestrzeniającej się oporności bakterii na wprowadzane do lecznictwa antybiotyki, problem chorób zakaźnych nie może być ostatecznie rozwiązany.

Badania i wdrożenia przemysłowe w zakresie biotechnologii antybiotyków stworzyły solidny fundament pod rozwój innych biotechnologii przemysłu farmaceutycznego; dały również początek nowej dyscyplinie – inżynierii biochemicznej (bioprocusowej). Dalszymi bioproduktami wprowadzanymi do lecznictwa były aminokwasy, kwasy organiczne, enzymy, inhibitory enzymów, witaminy, alkaloidy, dekstran, leki steroidowe (tab. 1). Istotny postęp w rozwoju technologii tych ostatnich dokonał się w latach 50. i 60. przez wprowadzenie do technologii chemicznej etapów biologicznych – przeprowadzanych przy udziale drobnoustrojów lub wyizolowanych enzymów. Procesy biotransformacji (biokatalizy enzymatycznej) znalazły zastosowanie w wielu innych złożonych technologiach, np. w produkcji półsyntetycznych antybiotyków β -laktamowych oraz zostały wykorzystane do opracowania całkowicie nowych technologii w innych gałęziach przemysłu, np. biotransformacji skrobi do cyklodekstryny lub kilkusetapowego enzymatycznego procesu produkcji syropu wysokofruktozowego – również ze skrobi.

Nowy rozdział w biotechnologii leków został otwarty w latach osiemdziesiątych dzięki szybkim postępom inżynierii genetycznej. Techniki biologii molekularnej od początku były traktowane jako wyjątkowo korzystna droga do opracowania nowych technologii wytwarzania biofarmaceutyków – leków o budowie polipeptydowej/białkowej (1). Leki, takie jak insulina (w leczeniu cukrzycy), hormon wzrostu (korekta wzrostu), interferony i interleukiny (nowotwory, infekcje), czynnik VIII krzepnięcia krwi (hemofilia), tkankowy aktywator plazminogenu (degradacja zakrzepów krwi) czy erytropoetyna (anemia, uszkodzenia nerek, wspomaganie transfuzji krwi), stały się głównymi tematami badawczymi w wielu zespołach naukowych oraz nowo powstających firmach biotechnologicznych. Dzięki inżynierii genetycznej zaistniała możliwość biotechnologicznej produkcji leków drogich i trudno dostępnych, na które istnieje duże zapotrzebowanie.

Realizacja przemysłowa najważniejszych projektów badawczych nastąpiła bardzo szybko (rys. 1): pierwsze leki wytwarzane metodami rekombinowanego DNA pojawiły się w latach osiemdziesiątych; początek dała insulina w roku 1982 (2). Od tego czasu zrealizowano tysiące projektów badawczych i wdrożono do produkcji kilkadziesiąt biofarmaceutyków. W początkowym etapie rozwoju inżynierii genetycznej i nowego kierunku biotechnologii oczekiwano, że przyniesie on szybko znacznie więcej rozwiązań przemysłowych. Problemy techniczne, biolo-

Produkty biotechnologiczne dla ochrony zdrowia

Technologie	Grupy produktów	Przykłady produktów
mikrobiologiczne	szczipionki przeciwbakteryjne produkty metabolizmu drobnoustrojów produkty biotransformacji (biokatalizy) biofarmaceutyki – białkowe produkty technologii mikrobiologicznych z użyciem rDNA	szczipionki przeciw gruźlicy, durowi brzuszemu, cholercze, krztuścowi antybiotyki, aminokwasy, witaminy, dekstran, enzymy, inhibitory enzymów, immunomodulatory, kwasy organiczne leki steroidowe, kwasy organiczne, półprodukty do syntezy witaminy C insulina, hormony wzrostu, interferony, interleukiny, tPA, czynniki krzepnięcia krwi, czynniki trombolityczne, nowe generacje szczipionek
enzymowe	różne	leki steroidowe, kwasy organiczne, kwas 6-aminopenicylanowy
z użyciem kultur zwierzęcych <i>in vitro</i>	szczipionki przeciwwirusowe produkty białkowe	szczipionki przeciw chorobie Heinego-Medina, odrze, różyczce, śwince przeciwciała monoklonalne, białka krwi, interferony, enzymy
z użyciem kultur roślinnych <i>in vitro</i>	biologicznie aktywne metabolity wtórne	ginsenozydy, kwas rozmarynowy, 6-metylodigoksyna, paklitaksel, szikonina

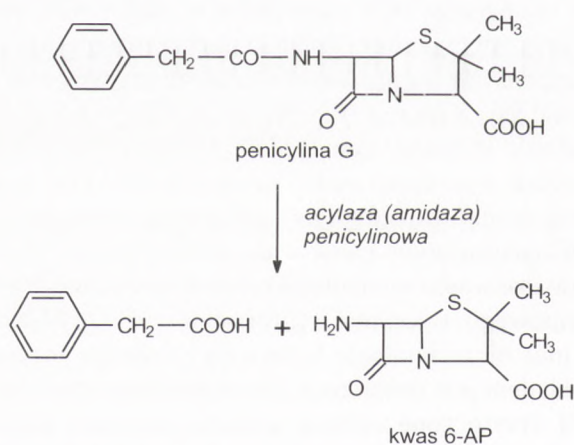
giczne i medyczne sprawiły, że ten ważny dział biotechnologii rozwija się nieco wolniej niż zakładano, niemniej jest on obecnie najbardziej dynamiczny. Obok dotychczasowych osiągnięć opracowywane są nowe bioprodukty i nowe koncepcje leczenia.

W tym opracowaniu dokonano podsumowania najbardziej spektakularnych osiągnięć współczesnej biotechnologii wdrożonych do przemysłu farmaceutycznego i praktyki medycznej. Skrótoowo zasygnalizowane zostały również nowe horyzonty rozwoju biotechnologii farmaceutycznej.

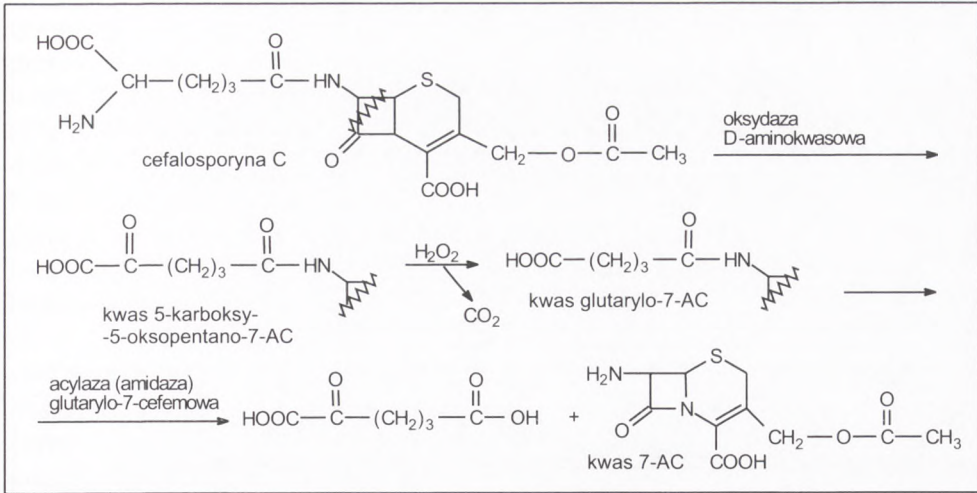
2.1. Biotechnologia antybiotyków

Największe osiągnięcia w doskonaleniu procesów i produktów ma technologia antybiotyków β -laktamowych. Dużym postępowaniem było wprowadzenie w latach sześćdziesiątych enzymatycznej deacylacji (rys. 2) penicyliny do kwasu 6-aminopenicylanowego (kwas 6-AP). Produkt ten jest wykorzystywany do chemicznej syntezy penicylin półsyntetycznych (6). Reakcję enzymatyczną prowadzi się z użyciem amidohydrolazy (acylazy, amidazy) penicylinowej, która jest dość powszechnie wytwarzana przez bakterie i grzyby, a jej najbardziej wydajnymi producentami są zrekombinowane bakterie *Escherichia coli*. Hydrolizę penicyliny można prowadzić z użyciem immobilizowanych komórek, jednak korzystniejszym rozwiązaniem jest użycie immobilizowanego enzymu. Reakcja jest odwracalna; w środowisku alkalicznym (pH 7,5-8,5) zachodzi hydroliza, natomiast w środowisku kwaśnym (pH ok. 6) – synteza penicyliny. Niedostateczna wydajność reakcji syntezy sprawiła, że acylazy używane do wytwarzania kwasu 6-AP z penicyliny biosyntetycznej nie mogły być wykorzystane do syntezy penicylin modyfikowanych. Do produkcji półsyntetycznych penicylin (ampicyliny i amoksycyliny) zaproponowano inne, bardziej wydajne enzymy, np. acylazę z *Pseudomonas melanogenes* i hydrolazę estrów aminokwasowych z *Xantomonas citri* (7).

Dużym postępowaniem w biotechnologii antybiotyków było również opracowanie mikrobiologicznych metod wytwarzania produktów pośrednich do syntezy półsyntetycznych cefalosporyn. Chemiczna hydroliza biosyntetycznej cefalosporyny C do kwasu 7-aminocefalosporanowego (kwas 7-AC) jest uciążliwa, a enzymatyczna nie jest możliwa z powodu braku odpowiedniego enzymu. Opracowano jednak, i wdrożono do skali przemysłowej (8), kilkuetapową technologię enzymatyczną (rys. 3)



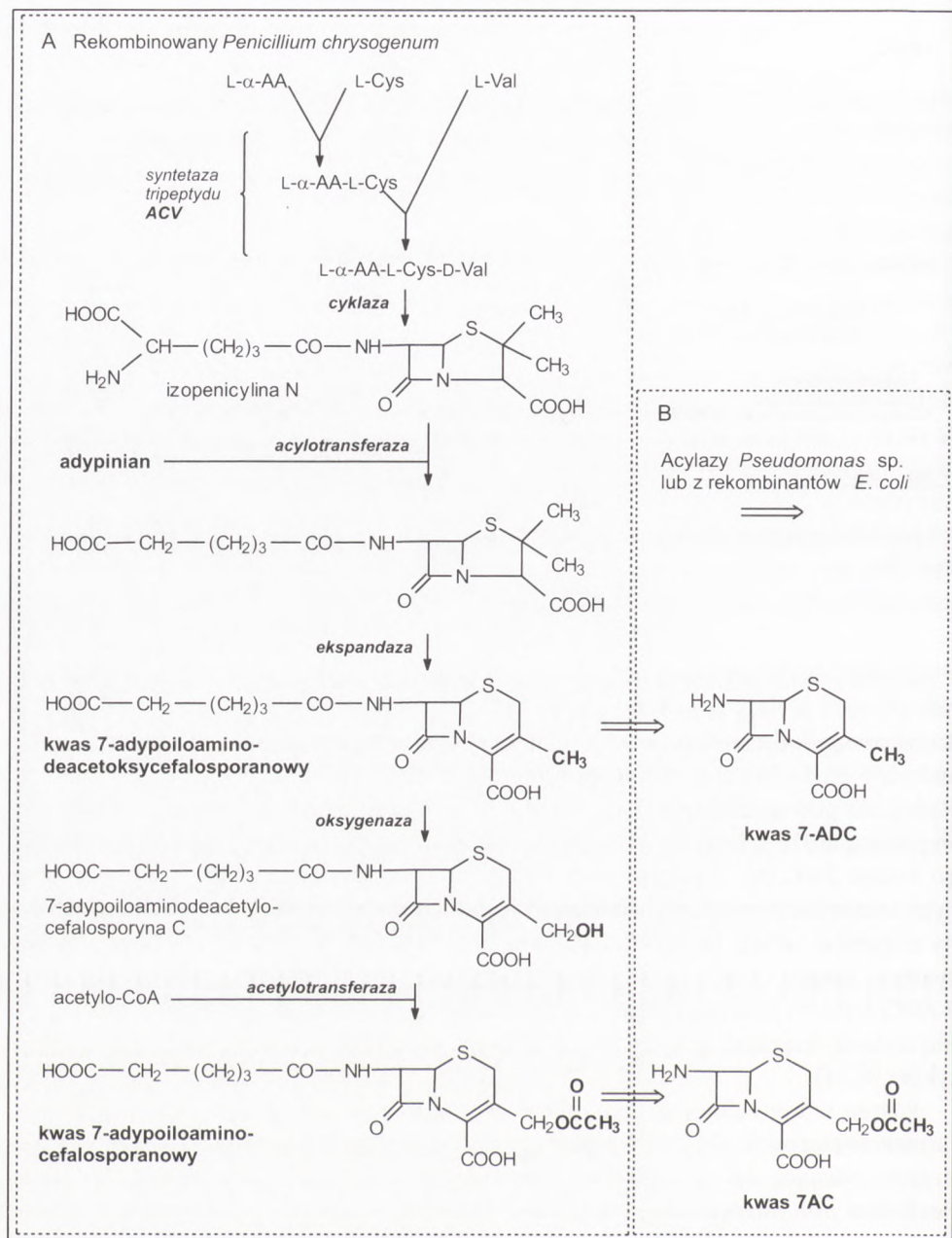
Rys. 2. Enzymatyczna hydroliza penicyliny do kwasu 6-aminopenicylanowego.



Rys. 3. Przemiana cefalosporyny C do kwasu 7-aminocefalosporanowego z udziałem reakcji enzymatycznych.

z udziałem oksydazy D-aminokwasowej z drożdży *Trigonopsis variabilis* lub *Rhodotula gracilis* i acylazy (amidazy) glutarylo-7-cefemowej z bakterii *Arthrobacter* sp., *Comamonas* sp. lub *Pseudomonas* sp. W pierwszym etapie zachodzi deaminacja reszty aminoadypionoilowej w cefalosporynie do reszty 5-karboxy-5-oksopentanoilowej. Następnie pod działaniem H₂O₂ następuje jej dekarboksylacja do reszty glutaryloilowej, która może już być łatwo odszczepiona enzymatycznie z wytworzeniem wolnego kwasu 7-AC (9). Niewątpliwym sukcesem było skonstruowanie zrekombinowanych szczepów *Penicillium chrysogenum* (producenta penicyliny), wzbogaconych o geny enzymów szlaku biosyntezy cefalosporyn (10), zdolnych do bezpośredniej biosyntezy kwasu 7-AC oraz kwasu 7-aminodeacetoksycefalosporanowego (kwas 7-ADC) (rys. 4). Postęp technologiczny dzięki rozwojowi enzymologii i wykorzystaniu technik inżynierii genetycznej obserwuje się również w innych grupach antybiotyków (6,11).

Postęp w biotechnologii antybiotyków ma na celu poprawienie ich właściwości farmakologicznych, ale jest wymuszany przede wszystkim szybko powstającą i rozprzestrzeniającą się opornością drobnoustrojów na te leki. Wprowadza się nowe pochodne półsyntetyczne, a także nadal pozyskuje się nowe produkty pochodzenia drobnoustrojowego (12,13) – antybiotyki (np. karbapenemy) i inhibitory enzymów inaktywujących antybiotyki (np. kwas klawulanowy). Nowych produktów antybiotycznych poszukuje się nie tylko w świecie drobnoustrojów, ale także w organizmach wyższych; jednymi z pierwszych odkrytych substancji tego typu były defensyny – polipeptydowe czynniki układu immunologicznego biorące udział w niszczeniu komórek bakteryjnych w procesie fagocytozy (14). Metabolity peptydowe o ak-



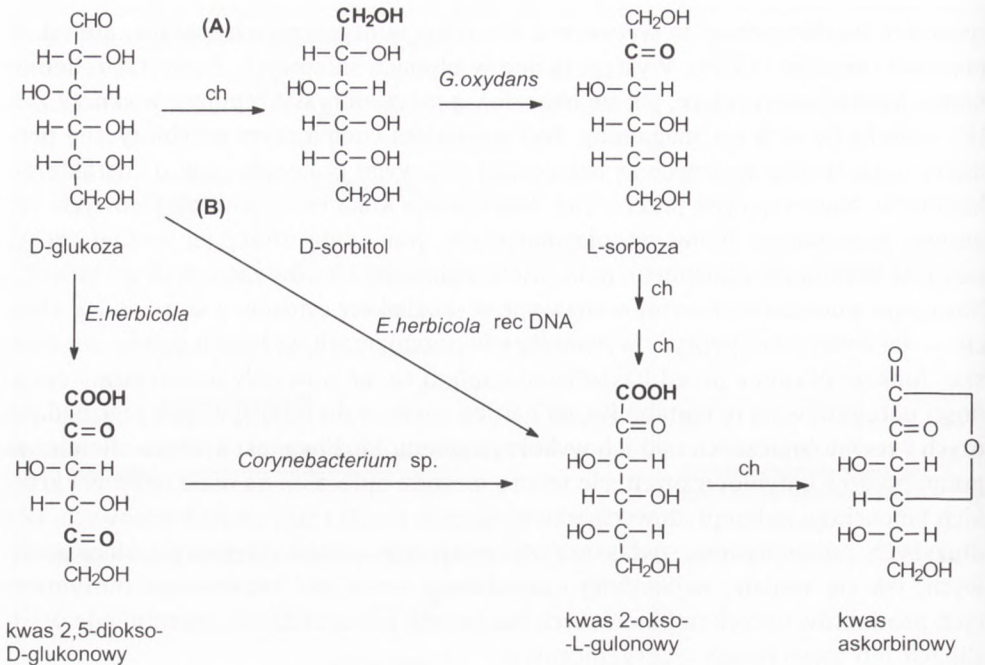
Rys. 4. Wytwarzanie półproduktów do syntezy cefalosporyn półsyntetycznych.

tywności antybiotyecznej są wytwarzane nie tylko w organizmach ssaków, ale także płazów i owadów (15,16). Występują one w błonach śluzowych, fagocytach, hemolimfie. Bardzo interesujące, jak się okazało, są metabolity występujące w skórze żab (17); należą do nich np. magaininy. Pod względem chemicznym antybiotyeczne produkty organizmów wyższych są najczęściej liniowymi polipeptydami o charakterze kationów, zawierającymi przeciętnie dwadzieścia kilka reszt aminokwasowych. Ingerując w strukturę błony cytoplazmatycznej, powodują utratę jej ważnej cechy, jaką jest bariera dla transportu, m.in. wielu związków i jonów zawartych w cytosolu. Następuje wówczas niekontrolowany wypływ składników cytosolu z komórki i w efekcie – jej śmierć. Polipeptydy wytwarzane w organizmach wyższych pełnią „od zawsze” funkcje obronne przed bakteriami, a mimo to nie powstały mechanizmy oporności patogenów na te metabolity, co bardzo zachęca do intensywnych prac badawczych i technologicznych nad ich wykorzystaniem. Możliwa jest synteza chemiczna polipeptydów antybiotyecznych, ale jest to metoda opłacalna na razie tylko dla krótkich łańcuchów polipeptydowych, zawierających do 20 reszt aminokwasowych. Dla dłuższych polipeptydów, zwłaszcza zawierających ponad 30 reszt aminokwasowych, jak się wydaje, najbardziej uzasadniona może być technologia biosyntezy tych produktów w zrekombinowanych bakteriach lub drożdżach, ewentualnie w roślinach lub zwierzętach transgenicznym.

2.2. Inne biotechnologie tradycyjne

Inne działy klasycznych biotechnologii przemysłu farmaceutycznego rozwijają się mniej dynamicznie. Przykładem postępu jest nowa technologia produkcji kwasu askorbinowego przy użyciu zrekombinowanych szczepów *Erwinia herbicola* ze sklonowanym genem reduktazy 2,5-dioksoglukonianowej z *Brevibacterium* sp. (5,18). W jednym procesie mikrobiologicznym przekształcają one glukozę do kwasu 2-okso-glulonowego – bezpośredniego prekursora witaminy C, przez co eliminuje się kilka etapów chemicznych (rys. 5).

W biosyntezie L-lizyny użycie zrekombinowanych klonów *Corynebacterium glutamicum* ze zwiększoną ilością aspartokinazy (pierwszy enzym szlaku) niewrażliwej (w wyniku mutagenyzy) na hamowanie lizyną i zwiększoną ilością syntazy dihydrodipikolinianowej (pierwszy enzym odgałęzienia szlaku w kierunku lizyny) umożliwiło uzyskanie nagromadzenia tego produktu w ilości 120 g/l (3,4,18). Połączenie tradycyjnej mutagenyzy i selekcji z technikami inżynierii genetycznej pozwoliło również na zwiększenie efektywności produkcji do poziomu 100 g/l innych aminokwasów, np. L-argininy, L-proliny, L-treoniny (18). Przez wiele lat do przemysłowej produkcji kwasu l-asparaginowego wykorzystywano mutanty *E. coli* o zwiększonej (nie podlegającej represji) syntezie aspartazy. Prace genetyczne polegały na sklonowaniu genu kodującego aspartazę w celu zwiększenia liczby jego kopii w komórkach bakterii. W projekcie zrealizowanym w Polsce (19) zaprojektowano (na podsta-



Rys. 5. Synteza witaminy C metodą klasyczną (A) oraz zastosowaniem zrekombinowanego szczepu *E. herbicola* (B); ch – reakcja chemiczna.

wie znajomości sekwencji nukleotydujowej genu aspartazy) i zsyntetyzowano startery (primery), które umożliwiły pozyskanie genu aspartazy z genomu wysoko produktywnego mutanta *E. coli* w wyniku polimerazowej reakcji łańcuchowej. Uzyskany produkt PCR sklonowano, a następnie wbudowano do wektora ekspresyjnego z silnym promotorem T7 umożliwiającym wydajną ekspresję genu znajdującego się pod jego kontrolą. Klony *E. coli* z tym wektorem wyróżniały się kilkakrotnym wzrostem szybkości reakcji przekształcenia fumaranu w kwas asparaginowy.

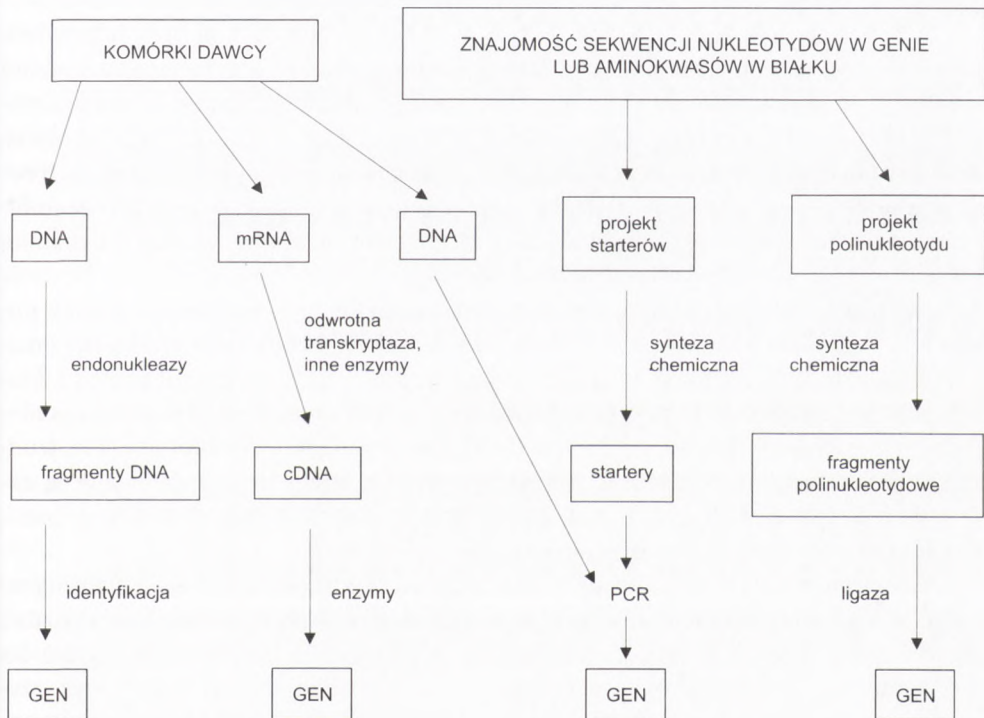
3. Nowe produkty technologii reombinowanego DNA

Głównym nurtem zastosowań nowoczesnych technik genetycznych w biotechnologii leków jest konstruowanie transgenicznych drobnoustrojów i linii komórkowych, zdolnych do wydajnej biosyntezy leczniczych białek ludzkich (1). Niektóre z leków tej grupy były pozyskiwane wcześniej od ludzi lub zwierząt. Otrzymywanie tego typu bioproduktów od ludzi ma bardzo ograniczone możliwości, natomiast produkty zwierzęce czasami różnią się od ludzkich, np. insulina świńska różni się od ludzkiej jedną resztą aminokwasową, co powoduje określone problemy farmako-

logiczne. Produkcja insuliny przy użyciu zrekombinowanych bakterii lub drożdży zapewnia identyczność produktu przemysłowego z hormonem ludzkim. Jeżeli końcowy produkt dla uzyskania pełnej aktywności podlega modyfikacji potranslacyjnej, np. glikozylacji, wówczas najlepszym rozwiązaniem może być użycie zrekombinowanych linii komórek eukariotycznych, np. linii CHO (*Chinese Hamster Ovary*).

3.1. Podstawy sukcesów

Rozwój nowych kierunków współczesnej biotechnologii leków stał się możliwy dzięki stworzeniu, na przestrzeni ostatniego ćwierćwiecza, warsztatu laboratoryjnego obejmującego nowoczesne techniki biologii molekularnej, które umożliwiają przeprowadzanie manipulacji materiałem genetycznym poza komórką. Punktem wyjścia do opracowania nowej technologii z wykorzystaniem rDNA jest gen przeznaczony do klonowania. Na przestrzeni ostatniego ćwierćwiecza opracowano wiele sposobów pozyskiwania DNA do tego celu (rys. 6). Dzięki rozwojowi techniki sekwencjonowania zasad azotowych w DNA (w uproszczeniu sekwencjonowanie DNA)



Rys. 6. Pozyskiwanie genów do klonowania.

i aminokwasów w białkach (sekwencjonowanie białek) poznano strukturę bardzo wielu genów i ich produktów białkowych, które interesują biotechnologów. Stało się to podstawą do upowszechnienia metody syntezy chemicznej krótkich polinukleotydów i enzymatycznego łączenia ich w syntetyczny gen. Tak przygotowano informację genetyczną dotyczącą struktury obu łańcuchów insuliny, pierwszego ludzkiego hormonu polipeptydowego wyprodukowanego w hodowli bakteryjnej.

Szybkim i stosunkowo prostym sposobem pozyskiwania genów do klonowania z organizmów eukariotycznych jest enzymatyczna synteza, za pomocą odwrotnej transkryptazy, komplementarnego DNA (cDNA) na matrycy mRNA izolowanego z tkanek wyspecjalizowanych w biosyntezie określonego białka. Postępy genomiki i znajomość sekwencji nukleotydowych dużych fragmentów genomów wielu organizmów żywych doprowadziły do sytuacji, w której wygodną metodą pozyskiwania genów do klonowania z organizmów prokariotycznych jest użycie techniki PCR. Wykorzystuje się w tym zakresie powszechną dostępność i łatwość syntezy starterowych (primerowych) sekwencji oligonukleotydowych komplementarnych do charakterystycznych, np. końcowych fragmentów poszukiwanego genu. Doskonalenie i rozwój zastosowań polimerazowej reakcji łańcuchowej sprawiły, że metoda ta stała się jedną z głównych technik inżynierii genetycznej, wykorzystywaną zarówno w pracach biotechnologicznych, jak i w badaniach podstawowych biologii molekularnej (20,21).

Pozyskany materiał genetyczny musi być wprowadzony do komórek odpowiedniego biorcy. Wybór *Escherichia coli* jako głównego obiektu inżynierii genetycznej wynikał z dobrej znajomości genetyki, biochemii i biologii tych bakterii, dużej szybkości ich rozmnażania się oraz powszechnego wykorzystywania w pracach laboratoryjnych, a także sprawdzenie przydatności do procesów wielkoprzemysłowych (produkcja acylazy penicylinowej czy kwasu asparaginowego). Dla *E. coli* opracowano olbrzymią liczbę wektorów do klonowania i ekspresyjnych, z możliwością uruchamiania ekspresji genu w określonej fazie hodowli.

Bakterie *E. coli* mają jednak ograniczenia i wady technologiczne, ponieważ pozbawione są dobrze rozwiniętych mechanizmów sekrecji białka poza komórkę i najczęściej gromadzą produkty białkowe w jej wnętrzu w postaci granul (ciałek inkluzyjnych) lub w przestrzeni peryplazmatycznej. Produkt biosyntezy jest wówczas niejednorodny (tworzy dimery, trimery, itd.), najczęściej nieaktywny biologicznie, trudny do oczyszczenia z enterotoksyn bakteryjnych. Od wielu lat proponowane są zatem inne bakterie, zwłaszcza z rodzajów: *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces*.

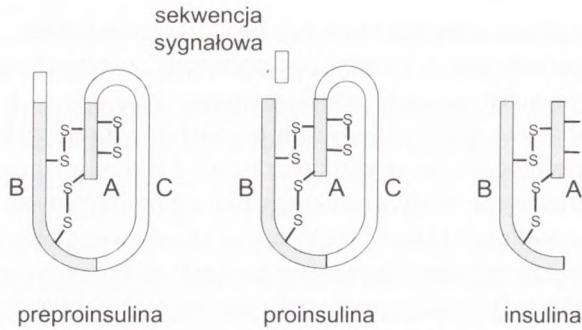
Zwrócono także uwagę na komórki grzybów – drobnoustrojów eukariotycznych. Najwcześniej w manipulacjach genetycznych znalazły zastosowanie drożdże *Saccharomyces cerevisiae*. Jako drobnoustroje eukariotyczne, a przy tym zdolne do wydzielania produktów białkowych poza komórkę, bardzo szybko zostały wykorzystane w nowoczesnych procesach biotechnologicznych przemysłu farmaceutycznego (np. w produkcji szczepionki antygenowej przeciwko wirusowemu zapaleniu

wątroby typu B, insuliny, interferonów). Nie bez znaczenia był fakt, że gatunek *S. cerevisiae* był od najdawniejszych czasów „udomowiony” i wykorzystywany na olbrzymią skalę w tradycyjnych przemysłach fermentacyjnych; jest to jeden z najdogodniejszych modeli badawczych i najlepszych organizmów przemysłowych, dla którego operacje technologiczne zostały już wcześniej doskonale opracowane. Gatunek *S. cerevisiae* został użyty w wielu projektach biotechnologicznych w skali laboratoryjnej do biosyntezy innych białek ludzkich (np. tkankowego aktywatora plazminogenu), a także zwierzęcych (np. chymozyny cielęcej), roślinnych (np. α -amylazy), wirusowych (np. białka IgD wirusa opryszczki), jak również bakteryjnych (np. celulazy, glukooamylazy, czy β -laktamazy). Spośród innych drożdży na szczególną uwagę zasługuje szybko rosnący i dobrze poznany gatunek *Hansenula polymorpha*, a także *Kluyveromyces lactis* i *Pichia pastoris*, a spośród grzybów strzępkowych – rodzaj *Aspergillus* (np. *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. niger*). Z reguły heterologiczne białka syntetyzowane w komórkach grzybów są prawidłowo zwinięte i biologicznie aktywne, a ponadto wydzielane poza komórkę. Wadą może być niewłaściwa glikozylacja produktów biosyntezy.

Perspektywicznym kierunkiem rozwoju nowoczesnej biotechnologii jest wykorzystanie hodowli komórkowych do manipulacji genetycznych i produkcji białek leczniczych (1,20,21). Są one najlepszym środowiskiem do ekspresji genów eukariotycznych, prowadzą właściwe modyfikacje potranslacyjne dając prawidłowy, biologicznie aktywny produkt. Ograniczeniem rozwoju tego kierunku jest jeszcze stosunkowo mała wydajność wytwarzania produktów oraz trudna i droga technologia (zwłaszcza duży koszt podłoża hodowlanego). W nielicznych technologiach (np. produkcji szczepionek wirusowych) wykorzystuje się hodowle komórek ssaków i wektory wirusowe. Sprawiają one jednak pewne trudności technologiczne i, jak dotychczas, istnieje zbyt mało opracowanych efektywnych systemów ekspresji tego rodzaju. Pewne nadzieje wiąże się z opracowaniem systemów opartych na komórkach owadzych i bakulowirusach (22).

3.2. Biofarmaceutyki – nowe leki polipeptydowe

Dzięki rozwojowi inżynierii genetycznej możliwa stała się przemysłowa produkcja wielu cennych leków polipeptydowych/białkowych (20,21), takich jak: hormony (np. insulina, hormony wzrostu, gonadotropiny), cytokiny (np. interferony, interleukiny, czynnik nekrozy nowotworów), czynniki wzrostu (np. insulinopodobny czynnik wzrostu, czynnik wzrostu skóry, erytropoetyna), białka hemostazy (czynniki krzepnięcia VIII, IX, XII i XIII), czynniki trombolityczne (np. tkankowy aktywator plazminogenu, streptokinaza, stafylokinaza, α -1-antytrypsyna). Klasycznym przykładem nowych technologii, dobrze opisanym w piśmiennictwie biotechnologicznym (dlatego pominiemy tutaj szczegóły dotyczące klonowania i procesu biosyntezy), jest biosynteza ludzkiej insuliny. W organizmie człowieka powstaje preproinsulina, która



Rys. 7. Potranslacyjna modyfikacja insuliny w komórkach ludzkich.

ulega następnie degradacji do aktywnego hormonu, składającego się z dwóch łańcuchów A i B (rys. 7). W utworzonej specjalnie w tym celu biotechnologicznej firmie Genentech opracowano pierwszą mikrobiologiczną biosyntezę insuliny, wdrożoną do produkcji przemysłowej przez farmaceutyczną firmę Eli Lilly & Co. w roku 1982 (2). W zrekombinowanych komórkach *E. coli* możliwa jest produkcja proinsuliny lub oddzielnie łańcuchów A i B. W celu uzyskania właściwego połączenia łańcuchów A i B insuliny przeprowadza się je najpierw w pochodne S-sulfonowe, a następnie chemicznie (tioliza i utlenienie) łączy je w aktywny hormon. W technologii, w której produktem biosyntezy jest proinsulina, a właściwie białko fuzyjne zawierające proinsulinę, normalnie otrzymuje się hormon o złej konfiguracji. Zastosowanie wstępnej tlenowej sulfotiolizy mostków disiarczkowych umożliwi prawidłowe połałdowanie się półproduktu, po czym odtwarza się te mostki, otrzymując produkt o właściwej konfiguracji. Z wytworzonej proinsuliny usuwa się enzymatycznie (proteoliza przy udziale trypsyny i karboksypeptydazy) łańcuch C. Obok amerykańskiej biotechnologii z udziałem bakterii *E. coli*, w Europie (Novo Nordisk, Dania) opracowano proces biosyntezy insuliny w oparciu na zrekombinowanych drożdżach *S. cerevisiae* (1).

Biotechnologia tkankowego aktywatora plazminogenu (tPA) – czynnika przekształcającego plazminogen w plazminę i zapoczątkowującego w ten sposób proces degradacji fibryny w zakrzepach krwi, została oparta na użyciu zrekombinowanych linii komórkowych CHO (*Chinese Hamster Ovary*), w których sklonowano gen tego białka pozyskany z linii komórkowej czerniaka (1). Biosynteza, opracowana i opatentowana w roku 1987 przez Genentech, przebiega w bioreaktorze o pojemności 10 m³. Komórki wydzielają produkt biosyntezy do podłoża, skąd tPA jest wyodrębniany chromatograficznie z czystością ponad 99% (23).

Alternatywna metoda produkcji tPA polega na użyciu zrekombinowanych bakterii *E. coli* (1, 23). Otrzymuje się zmodyfikowany tPA, zawierający zamiast 527 tylko 355 reszt aminokwasowych i pozbawiony podstawników glikozylowych, który w pełni zachowuje aktywność inicjującą fibryrolizę. Bakterie gromadzą produkt w postaci ciałek inkluzyjnych wewnątrz komórek; wydzielenie go wymaga zatem ich rozerwa-

nia. Po rozpuszczeniu ciał inkluzyjnych i renaturacji produktu oczyszcza się go stosując chromatografię powinowactwa i jonowymienną, zateża metodą ultrafiltracji i usuwa zanieczyszczenia drobnocząsteczkowe poprzez dializę (1).

3.3. Zrekombinowane wirusy i bakterie – postęp w biotechnologii szczepionek

Tradycyjne technologie szczepionek polegają na namnożeniu patogenów (zjadliwych lub atenuowanych) w zwierzętach (najstarsze szczepionki przeciwwirusowe), w kulturach komórek zwierzęcych (druga generacja szczepionek przeciwwirusowych) i w hodowlach bakteryjnych (szczepionki przeciwbakteryjne). Produkcja szczepionek przy wykorzystaniu zwierząt budzi zastrzeżenia natury etycznej, a poza tym jest niebezpieczna. Niebezpieczne są również technologie z namnażaniem patogenów w bioreaktorach. Nowe bezpieczne technologie szczepionek, zwłaszcza przeciwwirusowych, opracowywane są przy wykorzystaniu technologii rekombinowanego DNA (1,20,21,24-27). Możliwe jest wytwarzanie osłabionych szczepów wirusów, które utraciły swoją zjadliwość w wyniku delecji w określonych miejscach genomu. Prowadzi się mikrobiologiczną biosyntezę białek antygenowych w komórkach bezpiecznych bakterii lub drożdży. W roku 1986 wprowadzono rekombinowaną szczepionkę przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B, wyprodukowaną przy użyciu drożdży (1). Gen antygeny powierzchniowego, HBsAg, sklonowano w bakteriiach *E. coli*, drożdżach *S. cerevisiae* oraz w różnych liniach komórkowych ssaków. Ostatecznie opracowano biotechnologię z użyciem drożdży, uzyskując dobrą ekspresję genu oraz prawidłową strukturę cząsteczki antygeny, co warunkuje powstanie odpowiedzi immunologicznej.

Opracowano także technologię konstruowania zrekombinowanych wirusów, których genom wirusa niechorobotwórczego zostaje uzupełniony fragmentem DNA wirusa chorobotwórczego, kodującym jego białko o pożądanym właściwościach antygenowych. Szczególnie interesujące jest użycie zmodyfikowanego wirusa krowianki (28,29) namnażanego w hodowli komórek zwierzęcych. Wybór wirusa krowianki jako biorcy obcego DNA był podyktowany wieloma przesłankami, takimi jak: brak cechy chorobotwórczości dla człowieka, łatwe namnażanie w organizmie człowieka oraz w hodowlach komórkowych *in vitro*, a także zaprzestanie stosowania tego wirusa do uodporniania ludzi przeciwko ospie. Również w stosunku do chorób bakteryjnych proponowane są rekombinowane szczepionki bezpiecznych bakterii, np. odzjadliwionych szczepów *Salmonella typhimurium* lub *S. typhi*, zawierających heterologiczne antygeny bakterii chorobotwórczych (29,30).

Kolejną propozycją jest immunizacja genetyczna (31,32), która polega na bezpośrednim wprowadzeniu DNA do organizmu pacjenta (np. metodą pistoletu genowego lub iniekcji). W jednej szczepionce mogą być podane geny różnych antygenów. Mechanizm działania szczepionki DNA przypomina infekcję wirusową, gdyż do wytworzenia obcego białka immunogenu wykorzystywany jest potencjał metaboliczny

pacjenta. Dobrą ekspresję informacji genetycznej można uzyskać przy użyciu silnych promotorów wirusowych. Szczepionki genetyczne są bardzo stabilne, łatwe do wytworzenia i tanie. Prowadzone są prace nad szczepionkami DNA m.in. wirusów zapalenia wątroby typu B i C, grypy, wścieklizny, AIDS, prątków gruźlicy.

4. Biotechnologie z użyciem kultur komórkowych *in vitro*

Równolegle z postępowaniem inżynierii genetycznej rozwijał się inny dział współczesnej biotechnologii, oparty na hodowli *in vitro* komórek organizmów wyższych. Znaczne sukcesy odniosła biotechnologia komórek i tkanek ssaków (1,21,33). Początkowo wykorzystywane były tylko kultury pierwotne, każdorazowo izolowane z tkanek organizmów żywych. Rozwój technik *in vitro* i badania z zakresu biologii komórki doprowadziły do wdrożeń technologicznych z użyciem hodowli wtórnych oraz ustabilizowanych i transformowanych linii komórkowych, w tym także linii komórek nowotworowych. Perspektywnym kierunkiem jest użycie zrekombinowanych linii komórkowych, w których klonowane są określone geny odpowiedzialne za syntezę pożądanego produktu polipeptydowego/białkowego (34).

Dwa najważniejsze dotychczasowe osiągnięcia biotechnologii komórek zwierzęcych to: klasyczna już produkcja szczepionek przeciwwirusowych w bioreaktorowych hodowlach komórek ludzkich i zwierzęcych oraz produkcja przeciwciał monoklonalnych w hybrydowych kulturach międzygatunkowych. Do produkcji szczepionek wykorzystuje się ustalone linie komórkowe (często wyprowadzone z tkanek nowotworowych lub otrzymane w wyniku transformacji normalnych komórek w hodowli *in vitro*). Produkcja przeciwciał możliwa jest zarówno w zwierzętach jak i w hodowlach komórkowych *in vitro*. W obu przypadkach opiera się ona na wytworzeniu komórek mieszańcowych (hybrydoma), powstających w wyniku fuzji komórek nowotworowych z komórkami plazmatycznymi syntetyzującymi określone przeciwciała. Komórki mieszańcowe w celach produkcyjnych można wszczepiać zwierzętom lub namnażać je w bioreaktorach. Względy etyczne przemawiają za tym drugim rozwiązaniem.

Przeciwciała monoklonalne – używane w pracach badawczych (analitycznych, preparatywnych) oraz w medycynie – do celów diagnostycznych, proponowane są również jako leki (1,35) w chorobach nowotworowych, infekcyjnych, autoimmunologicznych, w rozpuszczaniu zakrzepów krwi, a także w transplantologii. Przykładem tego ostatniego zastosowania (w USA od roku 1986) jest przeciwciało Orthoclone OKT-3 (1). Wprowadzone dożylnie do organizmu pacjenta wiąże się z antygenem CD-3 na powierzchni limfocytów T i blokuje ich normalne funkcjonowanie (a także prowadzi do ich eliminacji) w układzie komórkowej obrony immunologicznej, polegające w tym przypadku na obronie organizmu przed obcą tkanką czy organem, co prowadzi do odrzuceniu przeszczepu. Preparat Orthoclone OKT-3 stosowany jest przede wszystkim przy transplantacji nerek. W badaniach klinicznych znajdują się

bispecyficzne przeciwciała wykazujące powinowactwo równocześnie do leku i do antygenów występujących, np. na komórkach nowotworowych lub do domen antygenowych zakrzepów (1). W ten sposób do tkanki nowotworowej można skierować nie tylko cytotoksyczny lek, ale także białkowe i komórkowe składniki układu obrony immunologicznej organizmu pacjenta.

Do biosyntezy innych biofarmaceutyków kultury komórkowe ssaków były i są wykorzystywane w mniejszym stopniu. Rozwój tego działu biotechnologii związany jest z wykorzystaniem technik rDNA do konstruowania produkcyjnych linii komórkowych. Użycie zwierzęcych kultur *in vitro* do biosyntezy biofarmaceutyków jest uzasadnione prawidłową strukturą i wysoką aktywnością biologiczną tak otrzymanych produktów, zwłaszcza, jeżeli jest konieczna ich modyfikacja potranslacyjna, np. glikozylacja. Problemem są trudności technologiczne (większe niż w innych biotechnologiach) oraz stosunkowo mała wydajność produktów.

Atrakcyjnym modelem technologicznym do biosyntezy farmakologicznie aktywnych metabolitów wtórnych oraz do specyficznych biotransformacji enzymatycznych są kultury roślinne *in vitro* (36). Najszerzej wykorzystywane są kultury zawiesinowe, ale w ostatnim czasie duże zainteresowanie wzbudzają także kultury organów, a zwłaszcza korzeni transformowanych z użyciem bakterii glebowych *Agrobacterium tumefaciens*. Istnieje pewna liczba projektów badawczych, które zakończyły się opracowaniem technologii w skali produkcyjnej, jednakże wdrożeń przemysłowych jest tu jeszcze niewiele. Problem tkwi w dużych kosztach inwestycyjnych i produkcyjnych biotechnologii, przewyższających koszty pozyskiwania substancji farmakologicznie czynnych z materiału roślinnego. Zastosowanie metod biotechnologicznych jest uzasadnione tylko w przypadku bardzo drogich substancji o zasadniczym znaczeniu dla lecznictwa, na które istnieje bardzo duże zapotrzebowanie. Do takich należą m.in. cenne leki przeciwnowotworowe – winblastyna i winkrystyna – alkaloidy barwinka (*Catharanthus roseus*) oraz taksany – paklitaksel (*Taxol*) i jego pochodne pozyskiwane z cisa (*Taxus brevifolia*, *T. baccata*). Tych pierwszych nie udało się niestety syntetyzować w kulturach *in vitro*, natomiast możliwa jest biotechnologia związków diterpenoidowych z grupy taksanów.

Najstarszą technologią przemysłową z wykorzystaniem kultur komórek roślinnych jest biosynteza szikoniny (37) – czerwonego barwnika o właściwościach antyseptycznych, stosowanego w produktach kosmetycznych. W kulturach *in vitro* produkowana jest również biomasa żeńszeniowa (*Panax ginseng*) zawierająca aktywne farmakologicznie saponiny (38). Uważa się, że opłacalność biotechnologii z użyciem komórek roślinnych wymaga końcowego stężenia produktu w hodowli powyżej 1 g/l i co najmniej kilku % jego zawartości w suchej masie. Do najbardziej wydajnych procesów, w których te wartości są osiągnięte, a nawet znacznie przekraczane, należą m.in. biosynteza kwasu rozmarynowego z użyciem kultur zawiesinowych *Coleus blumei* (39) i *Salvia officinalis* (40) oraz korzeni transformowanych *Hyssopus officinalis* (41). Poza wieloetapowymi procesami biosyntezy w kulturach roślinnych możliwe są również jednoetapowe biotransformacje produktów naturalnych lub ksenobioty-

ków. Proces biokatalizy z użyciem komórek *Digitalis lanata* umożliwia, np. przekształcenie (hydroksylację) bardzo toksycznej metyldigitoksyny do metyldigoksyny (42) – cennego leku nasercowego.

5. Dokąd zmierza biotechnologia leków?

Ostatnie dziesięciolecie charakteryzuje się dynamicznym rozwojem bioinformatyki, genomiki i farmakogenomiki (43,44); tworzone są komputerowe bazy danych dotyczące genomów różnych organizmów (45). Do najważniejszych realizowanych obecnie programów badawczych należy poznanie genomu człowieka oraz występujących w tym zakresie subtelnych różnic molekularnych (różnic w pojedynczych nukleotydach). Oczekuje się, że na bazie biologii molekularnej będzie zachodził dalszy postęp w technologii biofarmaceutyków na początku XXI w. Technika komputerowa umożliwia gromadzenie, przetwarzanie i technologiczne wykorzystywanie olbrzymiego zasobu wiedzy o molekularnych podstawach procesów biologicznych, chorobowych oraz leczeniu chorób. Dotyczy to zwłaszcza analizy funkcjonowania genów i ich produktów białkowych, identyfikacji molekularnych mechanizmów procesu chorobowego i mechanizmów działania leków, poznanie struktury miejsc receptorowych (miejsc działania leków) i projektowania nowych leków z wykorzystaniem techniki molekularnego modelowania komputerowego.

Poszukiwanie i analiza subtelnych różnic genetycznych (polimorfizmu pojedynczych nukleotydów w określonych genach) ludzi, będące przedmiotem farmakogenomiki, służą określeniu osobniczej podatności na choroby, różnic w metabolizmie leków u poszczególnych pacjentów oraz efektywności procesu leczenia. Określenie profilu genetycznego pacjenta może być w nadchodzącym wieku podstawą do indywidualnego postępowania leczniczego (*personalized medicine*) (46), wyboru optymalnego leku i proponowania najbardziej właściwych jego dawek. Badania te prowadzą również do koncepcji tworzenia leków dla konkretnych pacjentów (grup pacjentów). Konsekwencją rozwoju farmakogenomiki są prace nad budową układów analitycznych zawierających sondy genetyczne (*DNA-chipy*, (47)), czyli zestawy sekwencji oligonukleotydowych, komplementarnych do różnych wariantów wybranych fragmentów DNA pacjentów. Już obecnie umożliwia to szybką i bardzo precyzyjną diagnostykę molekularną niektórych chorób o podłożu genetycznym oraz nowotworowym (48). Przewiduje się, że dzięki rozwojowi genomiki i bioelektroniki, diagnostyka medyczna oraz technologia (w tym biotechnologia) leków otrzymają w nadchodzącym wieku potężne narzędzie w postaci genetycznego mikroprocesora zawierającego *DNA-chipy*.

Poszerzeniu ulega asortyment leków możliwych do wytworzenia metodami biotechnologicznymi. Nazwę „biofarmaceutyki” zaproponowano pierwotnie w odniesieniu do leków o budowie polipeptydowej (białkowej). W ostatnim dziesięcioleciu prowadzone są również intensywne badania nad biofarmaceutykami o charakterze

kwasów nukleinowych (1). Wśród produktów tej grupy, obok wytwarzanych i stosowanych już wcześniej w medycynie sond genetycznych oraz odczynników do testów immunologicznych, proponowane są nowe szczepionki DNA i RNA oraz preparaty do terapii genowej chorób genetycznych, nowotworowych i infekcyjnych (21,49,50). Pierwsze próby kliniczne terapii genowej miały miejsce w roku 1990; w ciągu ostatnich dziesięciu lat opracowano około 300 protokołów postępowania leczniczego i poddano terapii ponad 3500 pacjentów, głównie w badaniach klinicznych I i II fazy (50). W odniesieniu do chorób o podłożu genetycznym terapia genowa umożliwia wprowadzenie do organizmu pacjenta prawidłowej kopii uszkodzonego genu, kodującej pożądaną informację genetyczną. Głównym dotychczas kierunkiem klinicznych zastosowań terapii genowej są choroby nowotworowe. Proponuje się wprowadzanie *in vivo* genów podnoszących efektywność obrony immunologicznej pacjentów (np. gen interleukiny 2), powodujących apoptozę (np. gen supresorowy P53) czy lizę komórek nowotworowych – wirusową (np. geny adenowirusowe) lub enzymatyczną (np. gen kinazy tymidynowej) (50). W odniesieniu do chorób o podłożu genetycznym terapia genowa umożliwia wprowadzenie do organizmu pacjenta prawidłowej kopii uszkodzonego genu, kodującej pożądaną informację genetyczną. Nową koncepcję leczenia poprzez ingerencję w ekspresję informacji genetycznej jest wykorzystanie technologii antysensu. Wprowadzenie do organizmu pacjenta chemicznie syntezowanych specyficznych oligonukleotydów antysensowych (analogów naturalnych sekwencji antysensowych) zapobiega ekspresji (transkrypcji lub translacji) określonych genów. W ten sposób proponuje się m.in. zahamowanie replikacji cząstek wirusowych, np. w HIV (51), czy ekspresji niektórych onkogenów w chorobach nowotworowych (52).

Nowe możliwości rozwoju biologicznych sposobów wytwarzania leków (biofarmaceutyków) otwierają dokonane już udane próby konstruowania transgenicznych organizmów wyższych. Dzięki ekspresji egzogennej informacji genetycznej mogą one syntetyzować określone produkty białkowe dla lecznictwa lub innych celów (np. spożywczych). W nowy wiek wchodzimy zatem z koncepcją nowej generacji „bioreaktorów” – transgenicznych roślin i zwierząt. W ten sposób możliwa jest, jak się wydaje, wydajna, kontrolowana i bezpieczna produkcja wielu białek leczniczych. Ważna jest przy tym identyczność produktów pozyskiwanych od zwierząt i roślin transgenicznych z białkami ludzkimi, ich prawidłowa modyfikacja potranslacyjna, struktura przestrzenna i aktywność biologiczna.

Biomasa roślinna (np. bulwy ziemniaka, liście tytoniu czy sałaty), wzbogacona nowym produktem polipeptydowym może być źródłem leku lub szczepionki uodporniającej na choroby zakaźne. Zależnie od rośliny, rodzaju produktu i jego przeznaczenia, można biofarmaceutyk wyizolować w stanie czystym lub bezpośrednio spożywać, np. jako jadalną szczepionkę przeciwwirusową. W badaniach na zwierzętach stwierdzono, że tego typu szczepionka wyprodukowana w pomidorach, podana drogą pokarmową, wywołuje odporność przeciw wścieklicznie (54). Badania na ludziach (ochotnikach) pozwoliły ustalić, że jadalna szczepionka (transgeniczny ziem-

niak) zawierająca enterotoksynę *Escherichia coli* (55) oraz transgeniczna sałata zawierająca powierzchniowy antygen wirusa zapalenia wątroby typu B (56) powodują pojawienie się specyficznych przeciwciał we krwi. Ta ostatnia propozycja pochodzi z polskich pracowni biotechnologicznych.

Produkcję białka wirusowego można uzyskać nie tylko w roślinach transgenicznych konstruowanych technikami inżynierii genetycznej *in vitro*; podobny efekt można osiągnąć w normalnych roślinach zainfekowanych odpowiednim wirusem. Poza antygenami wirusowymi możliwa jest biosynteza w roślinach całego szeregu produktów białkowych, w tym również przeciwciał. Oczekuje się, że produkcja biofarmaceutyków w roślinach może okazać się w przyszłości technologicznie i ekonomicznie najbardziej uzasadniona.

W ostatnim dwudziestolecu faktem stało się otrzymywanie zwierząt transgenicznych (57-59). Pomimo początkowych trudności wynikających z małej efektywności transgenezy (integracja transgeny z genomem gospodarza zachodzi z niewielką częstością, słaba jest również zazwyczaj ekspresja obcego genu), intensywne prace w wielu laboratoriach zaowocowały pozytywnymi wynikami. Dobór właściwych silnych promotorów (np. promotorów białek mleka) i prawidłowa konstrukcja klonowanego DNA umożliwia późniejszą lokalizację syntezy i gromadzenia dużej ilości pożądanego produktu w określonych tkankach dojrzałego zwierzęcia, np. w gruczole mlecznym (60). Konstrukty genetyczne mogą być wprowadzane za pomocą mikroiniekcji *in vitro* do zapłodnionych oocytów (zygot) lub embrionów i w tym układzie umieszczane w organizmie matki – biorcy. U transgenicznego potomstwa takiej matki dochodzi do ekspresji heterologicznego genu i produkcji obcego białka. W procesach transgenezy celowe jest również użycie linii komórkowych, np. niezróżnicowanych komórek embrioidalnych lub fibroblastowych komórek płodowych.

Wytworzenie transgenicznego zwierzęcia kosztuje od kilkadziesiąt tysięcy do kilkuset tysięcy USD. Biorąc pod uwagę duże zyski z produkcji farmaceutycznej, nie są to zbyt wysokie koszty. Zachęca to do rozwijania podstawowych badań w zakresie genetyki zwierząt hodowlanych (60) oraz oceniana jest ich biotechnologiczna przydatność (57,59,61,62). Jedna krowa może wyprodukować rocznie kilka tysięcy litrów mleka zawierającego kilkadziesiąt kilogramów ludzkiego białka, ale osiągnięcie dojrzałości płciowej następuje dopiero po piętnastu miesiącach, a ciąża trwa aż 9 miesięcy. Znacznie mniejsza (kilka kilogramów od jednej samicy), ale szybsza i tańsza może być produkcja z użyciem kóz i owiec. Bardzo ekonomiczne mogą być również technologie z użyciem świni domowej (dojrzałość płciowa po 6 miesiącach, ciąża 4 miesiące, biosynteza około 1,5 kg produktu rocznie). Najszybsze efekty osiąga się w pracy z królikami, gdyż dojrzałość płciową osiągają one po 6 miesiącach, a ciąża u nich trwa tylko miesiąc. Jedna samica tego gatunku może dawać jednak tylko 100 ml mleka dziennie i rocznie może wyprodukować zaledwie około 20 g pożądanego białka (57).

Możliwa jest transgeniczna biosynteza bardzo małych peptydów, np. kalcytoniny (w białku fuzyjnym z albuminą mleka), jak również bardzo dużych złożonych he-

teropolimerów białkowych, np. czynnika VIII krzepnięcia krwi. Zróznicowany jest jednak poziom ekspresji heterologicznych genów poszczególnych białek w różnych zwierzętach: u królików w 1 ml mleka uzyskano zaledwie 0,5 μg interleukiny, 2,5 μg erytropoetyny i 1 mg insulinopodobnego czynnika wzrostu 1. W mleku kozy uzyskano jednak już 20 mg/ml antytrypsyny $\alpha 1$, a w mleku owcy 35 mg/l tego inhibitora proteiny $\alpha 1$ (59). Szacuje się, że roczne zapotrzebowanie w USA na czynnik IX (4 kg) może być pokryte przez produkcję z użyciem 1 krowy, 7 kóz, 10 świń, 18 owiec lub 714 królików (62,63). Pierwszym proponowanym dla lecznictwa produktem, który trafił do badań klinicznych, jest antytrombina III syntetyzowana w organizmie kozy; dwa kolejne to: inhibitor proteiny – antytrypsyna $\alpha 1$ (od owcy) oraz enzym α -glukozydaza (od królika) (59).

Biosynteza i gromadzenie obcych białek może zachodzić również w innych, niż gruczoł mleczny, tkankach i organach. Prowadzone są, np. próby biosyntezy ludzkiej hemoglobiny we krwi zwierząt transgenicznych. Już w roku 1994 udało się uzyskać w organizmie świni (transgenicznej lochy) produkcję hemoglobiny ludzkiej (zawierającej obie globiny ludzkie α i β), która stanowiła blisko 25% hemoglobiny znajdującej się w krwiobiegu zwierząt transgenicznych, a 30% stanowiła hybrydowa hemoglobina „ludzko-świńska” (składająca się z ludzkiej globiny α i świńskiej globiny β) (64). Nie zaobserwowano negatywnych skutków zdrowotnych transgenezy u badanej lochy, a ponadto okazało się, że w drugim pokoleniu 5 prosiąt odziedziczyło cechę syntezy ludzkich globin. Zachowanie cechy produkcji w kolejnych pokoleniach jest bardzo ważne. Skraca to czas badań i uruchamiania potencjalnej produkcji biofarmaceutyków oraz umożliwia szybkie uzyskanie dużych ilości produktu.

6. Zamiast podsumowania: biobezpieczeństwo i bioetyka

Rozwój nowych strategii biotechnologicznych oraz zaistniałe dokonania w zakresie inżynierii genetycznej, które spowodowały przekroczenie naturalnych barier genetycznych, zrodziły nowe problemy – nie tylko natury biologicznej i technicznej, ale także etycznej (65,66) i dotyczącej biobezpieczeństwa (67,68). Można stwierdzić, że społeczeństwo akceptuje doświadczenia genetyczne z drobnoustrojami, przy założeniu, że cel badań nie jest skierowany przeciwko człowiekowi i środowisku przyrodniczemu. Dotychczas nie odnotowano niekorzystnych skutków takich badań i wdrożeń. Niestety wiadomo, że poza działaniami na rzecz ochrony zdrowia, produkcji żywności czy innych działów gospodarki, przedmiotem prac genetycznych jest również broń biologiczna. Od dziesięcioleci były opracowywane preparaty wirusowe i bakteryjne masowego rażenia, a postęp biologii molekularnej i nowoczesne techniki inżynierii genetycznej wniosły nowe możliwości w zakresie doskonalenia broni biologicznej (69). To tutaj właśnie należy widzieć olbrzymie zagrożenie. Analizę biozagrożenia i biobezpieczeństwa, jak się wydaje, należy rozpatrywać nie na płaszczyźnie rozwoju nauki i technologii, ale kontroli celów i sposobów wykorzystania nowych możliwości.

Obok manipulacji genetycznych na drobnoustrojach, w licznych laboratoriach prowadzone są tego typu prace z organizmami wyższymi. Opinia społeczna stosunkowo łatwo godzi się na modyfikacje genetyczne roślin, chociaż nie jest w tym zakresie całkowicie jednoznaczna; istnieje duże zróżnicowanie w tej kwestii w poszczególnych krajach. Można oczekiwać akceptacji użycia transgenicznych roślin do produkcji leków, ale duże obawy lub niechęć budzi żywność produkowana w oparciu na roślinach transgenicznych. Powszechną akceptację mogą uzyskać zwierzęta transgeniczne jako bioreaktory do produkcji leków. Obawy natomiast dotyczą perspektywicznych skutków klonowania zwierząt oraz tworzenia zwierząt transgenicznych, gdyż od opracowania technik, np. klonowania innych ssaków jest bardzo blisko do wykorzystania ich do klonowania człowieka. Problem etyczny polega na wyznaczeniu granic, do których człowiekowi wolno się posunąć w swoich badaniach. Największy, i słuszny, sprzeciw budzi koncepcja klonowania ludzi, nawet w celu selekcjonowania najlepszych cech ludzkich. Granicy akceptowalności należy szukać w obszarze ingerencji w ludzkie komórki rozrodcze. Akceptację natomiast znajduje użycie technik molekularnych do analiz diagnostycznych i naprawy wad genetycznych. Jednak i tutaj pojawiają się wątpliwości i niepokoje, np. dotyczące dostępności wyników analiz genetycznych ludzi i wykorzystywania ich przez pracodawców, firmy ubezpieczeniowe i inne.

W analizie kierunków rozwoju biologii molekularnej i biotechnologii wykazuje się, że są one tymi dziedzinami nauki i przemysłu, które mają do spełnienia w nadchodzącym wieku wiele społecznych oczekiwań, zwłaszcza w zakresie doskonalenia szeroko rozumianej ochrony zdrowia i ratowania życia ludzkiego oraz poprawy jego jakości. Największe dokonania końca mijającego wieku w tej dziedzinie dotyczą diagnostyki molekularnej i produkcji farmaceutycznej. Dokonania te, a także możliwości wykorzystania wielu osiągnięć budzą jednak określone wątpliwości i niepokoje. Ocena rozwoju prac genetycznych i biotechnologicznych oraz skutków różnorodnych możliwości wykorzystania ich wyników wykracza poza gremia ekspertów naukowych; biorą w niej udział również autorytety polityczne, moralne i religijne; ponadto prowadzone są sondaże społeczne i referenda. Dyskusja jest niezbędna, a jeszcze bardziej potrzebna jest powszechna edukacja w tym zakresie.

Literatura

1. Walsh G., (1998), *Biopharmaceuticals: biochemistry and biotechnology*, John Wiley and Sons Ltd., Chichester.
2. Johnson I., (1983), *Science*, 219, 632-637.
3. Jetten M. S., Sinskey A. J., (1995), *Crit. Rev. Biotechnol.*, 15, 73-103.
4. Sahn H., (1995), *FEMS Microbiol. Rev.*, 16, 243-252.
5. Anderson S., Marks C. A., Lazarus R., Miller J., Stafford K., Seymour J., Light D., Rastetter W., Estel D., (1985), *Science*, 230, 144-149.
6. Chmiel A., Grudziński S., (1998), *Biotechnologia i chemia antybiotyków*, PWN, Warszawa.
7. Bruggink A., Ross E.c., de Vroom E., (1998), *Organic Proc. Res. & Develop.*, 2(2), 128-133.

8. ASAHI Chemical Industry, Co. (Japan).
9. Parmar A., Kumar H., Marwaha S. S., Kennedy J. F., (1998), *Crit. Rev. Biotechnol.*, 18(1), 1-12.
10. Diez B., Mellando E., Rodríguez M., Fouces R., Barredo J.-L., (1997), *Biotechnol. Bioeng.*, 55, 216-226.
11. *Biotechnology of antibiotics*, Second edition. Series: *Drugs and the pharmaceutical sciences*, (1997), Ed. Strohl W., Marcel Dekker, New York.
12. *The search for bioactive compounds from microorganisms*, (1992), Ed. Omura S., Springer-Verlag, New York.
13. *New drugs from natural sources*, (1992), Ed. Coombes J. D., IBC Technical Services Ltd.
14. Elsbach P., (1990) *TIBTECH*, 8, 26-29.
15. *Antimicrobial peptides*, (1994), Ed. Boman H., Ciba Foundation Symposium 186, John Wiley and Sons Ltd., Chichester.
16. Kelly K. J., (1996), *Nature Biotechnol.*, 14, May, 587-590.
17. Barra D., Simmaco M., (1995), *TIBTECH*, 13, 205-209.
18. Demain A., (2000), *TIBTECH*, 18, 26-31.
19. Gadomska G., Plucienniczak A., Chmiel A., (1999), Poster na I Krajowym Kongresie Biotechnologii, Wrocław 20-25.09.1999. Streszczenie w materiałach zjazdowych, s. 229.
20. Meyers R. A., (1995), *Molecular biology and biotechnology*, VCH, Weinheim.
21. Glick B. G., Pasternak J. J., (1998), *Molecular biotechnology principles and applications of recombinant DNA*, ASM Press, Washington.
22. King L. A., Possee R. D., (1992), *The baculovirus expression system – a laboratory guide*, Chapman and Hall, London.
23. Datar R., Cartwright T., Rosen C-G., (1993), *Bio/Technology*, 11, 349-357.
24. *Approved biotechnology drugs and vaccines*, (1998), Pharmaceutical Research and Manufacturers of America, Washington, DC. 1998 (za 22).
25. Sandau J. S., (1994), *Crit. Rev. Microbiol.*, 14 (1), 1-27.
26. Brown F., (1994), *Recombinant vectors in vaccine development*, *Dev. Biol. Stand.*, vol. 82. Karger, Basel.
27. *Modern vaccinology*, (1994), Ed. Kurstak E., Plenum Medical Book Company, New York.
28. Miner J. N., Hruby D. E., (1990), *TIBTECH*, 8, 20-25.
29. Burnette W. N., (1991), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2, 882-892.
30. *Recombinant DNA vaccines: rationale and strategy*, (1992), Ed. Isaacson R. B., Marcel Dekker, New York.
31. Donnelly J., (1997), *Annu. Rev. Immunol.*, 15, 617-648.
32. Tuteja R., (1999), *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 74, 1-24.
33. Freshney R. I., (1994), *Culture of Animal Cells*, Wiley-Liss, New York.
34. *Mammalian cell biotechnology in protein production*, (1997), Eds. Hauser H., Wagner R., Walter de Gruyter, New York.
35. Burine J. P., Matthews R. C., (1998), *J. Antimicrob. Chemotherapy*, 41, 319-322.
36. Endress R., (1995), *Plant cell biotechnology*, Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg.
37. Fujita Y., Hara Y., Ogino T., Suga C., (1991), *Plant Cell Rep.*, 1, 61-63.
38. Wu J., Zhong J.-J., (1999), *J. Biotechnol.*, 68, 89-99.
39. Zenk M. H., El-Shagi H., Ulbrich B., (1977), *Naturwissenschaften*, 64, 585-586
40. Hypolyte I., Marin B., Baccou J. C., Jonard R., (1992), *Plant Cell Rep.*, 11, 109-112.
41. Kochan E., Wysiokińska H., Chmiel A., Grabias B., (1999), *Zeitschrift für Naturforschung, Section C.*, 54, 11-16.
42. Reinhard A., Kreis W., Barthlen U., Helmbold U., (1989), *Biotechnol. Bioeng.*, 34, 502-508.
43. *TIBTECH* 14, No. 8, special issue *Bioinformatics in the biopharmaceutical industry*.
44. Baxevanis A. D., Quelette B. F. F., (1998), *Bioinformatics: a practical guide to the analysis of genes and proteins*, John Wiley and Sons, Chichester.
45. *Nucleic Acids Research* 26, No.1, January 1998, zeszyt poświęcony bankom genów i innym bazom danych biologicznych.
46. Cantor C. R. C., (2000), *TIBTECH*, 18, 6-13.

47. Marshall A., Hodgson J., (1998), *Nature Biotechnol.*, 16, 27-31.
48. Persidis A., (1998), *Nature Biotechnol.*, 16, 791-792.
49. *Trends in Genetics*, (1994), 10, 5, zeszyt poświęcony terapii genowej.
50. Mountain A., (2000), *TIBTECH* 18, 119-126,.
51. Hatta T. et al., (1996), *Biotechnologia*, 4(35), 116-131.
52. Skórski T., Nieborowska-Skórska M., Szczylik C., Calabretta B., (1996), *Biotechnologia*, 4(35), 108-115.
53. Kapusta J., (1999), *Biotechnologia*, 3(46), 94-105.
54. Modzelewska A., Dietzschold B., Sleysh N., Fu Z. F., Steplewski K., Hooper D. C., Koprowski H., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 2481-2485.
55. Tacket C. O., Mason H. S., Losonsky G., Clements J. D., Levine M. M., Arntzen C. J., (1988), *Nat. Med.*, 4, 607-609.
56. Kapusta J., Modelska A., Figlerowicz M., Pniewski T., Letellier M., Lisowa O., Yusibov V., Koprowski H., Plucienniczak A., Legocki A. B., (1999), *FASEB J.*, 13, 1796-1799.
57. Houdebine L.-M., (1994), *J. Biotechnol.*, 34, 269-287.
58. Rosochacki S. J., Zwierzchowski L., (1999), *Biotechnologia*, 2(45), 7-24.
59. Rudolph N., (1999), *TIBTECH*, 17, 367-374.
60. Bulfield G., (2000), *TIBTECH*, 18, 10-13.
61. Wall R. J., (1997), *Nature Biotechnol.*, 15, 416-417.
62. Zwierzchowski L., (1998), *Biotechnologia*, 2(41), 33-56.
63. Wall R. J., Kerr R. K., Bondioli K. R., (1997), *J. Dairy Sci.*, 80, 2213-2224.
64. Sharma A., Martin M. J., Okabe J. F., Truglio R. A., Dhanjal N. K., Logan J. S., Kumar R., (1994), *Biotechnology*, 12, 32-34.
65. *Biotechnology*, (1994), Ed. Brauer D., vol. 12: *Legal, economic and ethical dimensions*, VCH, Weinheim.
66. Polkinghorne J. C., (2000), *TIBTECH*, 18, 8-13.
67. Collins C. H., Beale A. J., (1992), *Safety in industrial microbiology and biotechnology*, Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford.
68. Chmiel A., (1993), *Biotechnologia*, 4(23), 71-81.
69. *Critical Rev. Microbiol.*, (1998), Ed. Atlas R. M., 24, special issue (3), *Biological weapons*.