



Zwierzęta jako bioreaktory – przyszłość przemysłu farmaceutycznego?

Agata Tyczewska, Kamilla Bąkowska-Żywicka
Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

Animals as bioreactors – the future of pharmaceutical industry?

Summary

Biotechnology products and its application raise many controversies. Discussions are carried out where the supporters of GMO are underlining the qualities of genetically modified organisms, and sceptics are pointing the dangers that, in their perspective, are exceeding the benefits. In this article, we intend to show the qualities resulting from the use of transgenic animals to produce cheaper drugs, as biotechnology and genetic engineering methods gave the possibility to use animals as bioreactors.

Key words:

transgenic animals, bioreactors, drugs.

1. Zwierzęta jako bioreaktory

Produkcja leków wymaga znacznych nakładów finansowych i czasowych. Od dawna w leczeniu wielu chorób jako terapeutyki stosuje się białka pochodzące od człowieka (np. z krwi), jednak ich ilość (a zatem również i cena) jest limitowana dostępnością ludzkich tkanek. Dlatego też powstała idea, aby wytwarzać je w żywych organizmach, początkowo w drożdżach czy bakteriach. Jednak w przypadku wielu białek pomysł ten się nie sprawdził, ponieważ w mikroorganizmach nie występuje zjawisko modyfikacji potranslacyjnej białek, niezbędnej dla ich aktywności i stabilności w wyższych organizmach (1). Problem ten może zostać ominięty przy produkcji białek w kulturach komórek ssaczy,

Adres do korespondencji

Agata Tyczewska,
Instytut Chemii
Bioorganicznej,
Polska Akademia Nauk,
ul. Noskowskiego 12/14,
61-704 Poznań;
e-mail:
agatat@ibch.poznan.pl

biotechnologia

3 (82) 64–70 2008

jednak w skali komercyjnej system ten jest niezwykle kosztowny i technicznie wymagający. Biotechnologia i inżynieria genetyczna wykształciły zatem możliwość wykorzystywania zwierząt jako „bioreaktorów”. Zmodyfikowane zwierzęta, z wprowadzonym obcym genem, mogą produkować cenne farmakologicznie preparaty, które dzisiaj pozyskiwane są na przykład z ludzkiej krwi. Istnieje jednak kwestia łatwego i taniego odzyskania znacznych ilości wytworzonego przez zwierzęcy bioreaktor terapeutycznego, bez konieczności zabijania zwierzęcia. Dlatego produkcji poddawane są białka wydzielane wraz z mlekiem lub moczem. Zaletą mleka jest fakt, że obecność dużych ilości obcych białek nie wpływa niekorzystnie na zdrowie zwierzęcia podczas laktacji. W niektórych przypadkach zaobserwowano wręcz odwrotne efekty, dla przykładu w transgenicznym królikach produkujących erytropoetynę (2), czy w myszach produkujących ludzki hormon wzrostu (3). Zaletą produkcji terapeutycznych białek w mleku zwierząt transgenicznych jest również łatwość oczyszczania produktu (4). Mleko zawiera kilka głównych składników białkowych (np. kazeiny), które mogą być usunięte przy użyciu nieskomplikowanych technik. Jeśli jednak rekombinowane białko wykazuje znaczne podobieństwo do prawidłowego białka mleka, wówczas kwestia jego odzyskania może okazać się kłopotliwa. Ponadto, dla uzyskania produktu komercyjnego, który ma być aplikowany ludziom, niezbędna jest wysoka czystość, w tym brak zanieczyszczeń wirusowych czy prionowych. Procedury takiego oczyszczania zwykle obejmują kombinację kilku etapów i metod, takich jak filtracje, precypitacje, inaktywacje wirusów czy chromatografie.

Do produkcji cennych białek wydzielanych wraz z mlekiem wykorzystywane są przede wszystkim króliki, owce, krowy oraz kozy, ze względu na dużą ilość produkowanych białek, długi okres produkcji oraz niskie koszty utrzymania (4). Najmniejsze, a zarazem najłatwiejsze w hodowli (tylko 6 miesięcy aby uzyskać laktujące zwierzę) są króliki, dające około 1 litra mleka w ciągu jednej laktacji, przy czym laktacja występuje u nich 8-10 razy w roku. Króliki są idealnym modelem laboratoryjnym, ale mogą być również z powodzeniem stosowane jako bioreaktory (5), jeśli ilość poddawanego ekspresji białka nie musi być wyższa niż kilka kilogramów (tak jest w przypadku czynników krzepliwości krwi).

Krowy wymagają najdłuższego czasu hodowli (minimum 2,5 roku) i największych nakładów finansowych, jednak można z nich uzyskać nawet 10 000 l mleka w ciągu życia. Są zatem najbardziej ekonomicznym rozwiązaniem, jeśli celem jest produkcja bardzo dużych ilości rekombinowanego białka. W 2006 r. naukowcy sklonowali krowę produkującą mleko zawierające ludzki hormon wzrostu (hGH, ang. *human growth hormone*) (6). Do tej pory hGH wytwarzany był bardzo powoli na bazie skomplikowanych hodowli bakterii, podczas gdy transgeniczna krowa dostarcza 5 g hormonu na 1 litr mleka. W ciągu roku stanowi to czterokrotnie więcej niż osiąga się dotychczas z hodowli bakterii. Oszacowano, że 15 takich zwierząt byłoby w stanie pokryć obecne światowe zapotrzebowanie na ten hormon.

Z owiec i kóz z każdej laktacji można uzyskać kilkaset litrów mleka, a czas hodowli od narodzin do pierwszej laktacji wynosi około 1,5 roku. W przypadku owiec, istnieje

wysokie ryzyko zachorowania na chorobę zwaną trzęsawką lub kołowacizną (ang. *scrapie*) wywołaną przez priony. Dlatego też wybiera się zwierzęta z krajów, w których ryzyko wystąpienia tej choroby jest znikome, np. Nowa Zelandia. W 2006 r. Europejska Agencja ds. Leków jako pierwsza na świecie zezwoliła na stosowanie środka otrzymanego z mleka genetycznie zmodyfikowanych kóz. Preparat ATryn jest przeznaczony dla pacjentów z wrodzonym niedoborem antytrombiny (naturalnego antykoagulanta hamującego wraz z heparyną proces krzepnięcia krwi), poddawanych zabiegom chirurgicznym. Jedna koza może zastąpić 90 000 ludzkich dawców krwi.

Nowe cechy uzyskane na drodze transgenezy mogą być dziedziczone. W roku 2008 opisano badania, w których modyfikacjom genetycznym poddano ssacze samcze komórki zarodkowe. Wykorzystano w tym celu wektory adenowirusowe (ang. *Adeno-associated virus*) i wykazano, że dochodzi do wydajnej transdukcji i przekazywania nowych cech na drodze dziedziczenia. Na skutek krzyżowania komórek rozrodczych pochodzących od transgenicznych samców z dzikim typem samic powstaje tylko około 10% transgenicznego potomstwa (F1). Krzyżowanie transgenicznych heterozygot pokolenia F1 prowadzi do uzyskania 33% transgenicznego potomstwa (7). Jest to pierwsze doniesienie dotyczące dziedziczenia nowych transgenicznych cech u ssaków wyższych. Istnieje zatem realna szansa na skrócenie czasu powstawania zwierząt transgenicznych. Ponadto wprowadzanie modyfikacji genetycznych przed mejozą powoduje, że może dochodzić do rekombinacji, co pozwala na przesiewanie i uzyskiwanie potomstwa o najbardziej pożądanym genotypie.

2. Przykłady białek produkowanych przez zwierzęta transgeniczne

2.1. Hormon wzrostu

Jest to bardzo cenny terapeutyk stosowany w leczeniu chorób związanych z jego niedoborem. Od piętnastu lat próbuje się wykorzystać transgeniczne zwierzęta hodowlane do produkcji hormonu wzrostu jako alternatywę do uzyskiwanego do tej pory w komórkach *E. coli*. Jedną z pierwszych metod transdukcji zastosowaną do produkcji dużych ilości transgenicznego hormonu wzrostu było wprowadzanie genu tego białka w wektorach retrowirusowych do gruczołów sutkowych kóz (8). Kolejno otrzymywano transgeniczne króliki i krowy (6,9,10), w mleku tych ostatnich produkowane jest 5 g hormonu wzrostu w litrze mleka.

2.2. Laktoferryna

Białko to pomaga zapobiegać i zwalczać infekcje i stany zapalne, a także wzmacniać system odpornościowy. Laktoferryna jest obecna w dużych ilościach w płynach

ustrojowych i wydzielinach takich jak łzy. Wykazano, że zwalczą bakterie wywołujące stany zapalne oczu i płuc (4). Firma Pharming jest producentem laktoferryiny jako leku i suplementu diety. Cykl produkcyjny obejmuje hodowlę transgenicznych krów, pozyskiwanie białka z mleka i jego oczyszczanie. W porównaniu z białkiem natywnym jego rekombinowany odpowiednik ma nieznacznie zmienioną masę spowodowaną różnicami w procesie potranslacyjnej modyfikacji – N-glikozytacji (11). Nie wpływają one jednak na dwie najistotniejsze funkcje tego białka – wiązanie żelaza i aktywność przeciwbakteryjną. Ludzka laktoferryina jest też wytwarzana przez transgeniczne kozy, ilość białka w litrze mleka to 2,6 mg/ml (12).

2.3. Erytropoetyna (hEPO)

Jest to hormon regulujący produkcję czerwonych krwinek. Wytwarzany jest głównie przez nerki, prawdopodobnie także przez makrofagi w szpiku kostnym. Obecnie do celów farmaceutycznych (leczenie anemii spowodowanej chroniczną niewydolnością nerek czy chemioterapią) erytropoetynę uzyskuje się z szczepów kultur komórkowych. W celu uzyskania dużych ilości tego białka wytworzono transgeniczne króliki (13), świny (14), a także wykorzystano nietransgeniczne kozy (15). W przypadku transgenicznych świń poziom ekspresji erytropoetyny wynosił 900 IU/ml (u ludzi waha się między 10 a 30 IU/ml). Wysoki poziom (2 mg/ml) hEPO uzyskuje się z mleka nietransgenicznych kóz.

2.4. Insulinopodobny czynnik wzrostu (hIGF-1)

Insulinopodobne czynniki wzrostu są częścią złożonego systemu wykorzystywanego przez komórki do komunikacji ze środowiskiem fizjologicznym. Składa się on z dwóch receptorów powierzchniowych (IGF-1R, IGF-2R), dwóch ligandów (IGF-1 lub somatomedyny C, IGF-2 lub somatomedyny A), rodziny sześciu białek wiążących IGF (IGFBP 1-6) i enzymów degradujących związanych z IGFBP. hIGF-1 jest wydzielane przez wątrobę na skutek stymulacji przez hGH, uczestniczy w regulacji normalnych stanów fizjologicznych, jak i wielu stanów patologicznych organizmu, np. nowotworowych. Terapeutyczne próby wykorzystania hIGF-1 obejmują zaburzenia wzrostu, cukrzycę typu 1 i 2, chorobę Lou Gheriga, poważne oparzenia i dystrofię miotoniczną. Komercyjnie dostępny hIGF-1 produkowany jest w komórkach *E. coli*. W roku 1994 opublikowano udaną próbę wykorzystania transgenicznych królików do produkcji hIGF-1 w ilości 1 mg/mL mleka (16). W roku 2005 FDA zaaprobowała lek o nazwie Increlex (firmy Tercica, www.tercica.com) stosowany w terapiach zastępczych chorób spowodowanych niedoborem IGF-1. Podobnie IPLEX (kompleks IGF-1/IGFBP-3) wyprodukowany przez firmę Insmad (www.insmad.com) zaaprobowano w 2005 r. Dostarczanie tego leku w kompleksie

z białkiem IGFBP-3 zapewnia jego wysoką skuteczność przy zmniejszonej ilości efektów ubocznych.

2.5. Antytrombina III (hAT-III)

Jest to białko surowicy o właściwościach antykoagulacyjnych i przeciwzapalnych. Pełni rolę regulatora trombiny, białka krwi uczestniczącego w tworzeniu skrzepów. U osób z chorobą HAD (ang. *Hereditary Antithrombin Deficiency*) mogą występować skrzepy, dochodzić do uszkodzenia organów, a nawet śmierci. Firma GTC Biotherapeutic produkuje lek na HAD o nazwie ATryn[®], uzyskiwany z mleka transgenicznych kóz (20 mg/mL) (17). Właściwości transgenicznej formy tego białka są bardzo zbliżone do natywnej antytrombiny, transgeniczna wykazuje jedynie czterokrotnie większe powinowactwo do heparyny. W roku 2006 ATryn[®] został zaaprobowany jako lek w Unii Europejskiej.

2.6. C1 Inhibitor (hC1INH)

Jest to inhibitor proteazy serynowej i występuje we krwi. Jest wykorzystywany do leczenia w chorobie zwanej HAE, dziedzicznym obrzękiem naczynioruchowym (ang. *Hereditary Angioedema*) występującej z częstością 1 na 30 000 urodzeń. Choroba ta poważnie wpływa na obniżenie jakości życia pacjentów, a w końcowych przypadkach może nawet prowadzić do śmierci. Rekombinowana wersja hC1INH uzyskiwana jest z mleka transgenicznych królików w ilości 12 mg/mL (18,19). hC1INH jest obecnie w trzeciej fazie testów klinicznych.

2.7. Lizozym

Jest to białko znajdujące się we łzach, ślinie i mleku wszystkich ssaków. Jest czynnikiem antybakteryjnym niszczącym ściany komórkowe bakterii. Lizozym jest uważany za jeden z głównych czynników ograniczających wzrost bakterii jelitowych u dzieci karmionych piersią. W badaniach przeprowadzonych na prosiętach karmionych mlekiem wzbogaconym w lizozym, który jest produkowany przez transgeniczne kozy, wykazano skuteczne obniżenie poziomu bakterii jelitowych (pałeczkowych) w jelicie cienkim w porównaniu z grupą kontrolną (20). Wysoki poziom rekombinowanego lizozymu uzyskano również z mleka transgenicznych myszy (21).

2.8. Czynn timer wzrostu nerwu β (hNGF- β)

Jest to białko z rodziny neurotrofin, będące czynn timer krytycznym dla funkcjonowania pierwszorzędowych neuronów czuciowych, neuronów współczulnych, cholinergiczych i podstawy przodomózgowie. Na podstawie wyników badań pośmiertnych mózgow zaproponowano, że wydzielanie pro-hNGF- β w stanach patologicznych może prowadzić do śmierci neuronów (np. w chorobie Alzheimer). Rekombinowany hNGF- β może być wykorzystywany do leczenia zaburzeń centralnego i obwodowego układu nerwowego, a także w neuropatii związanej z infekcją wirusem HIV-1. W ostatnich piętnastu latach w dużej skali hNGF- β produkowano w ssaczych kulturach komórkowych. Obecne technologie transgeniczne umożliwiają produkcję 250 $\mu\text{g/mL}$ tego białka w mleku królików, ponadto taka transgeniczna wersja białka jest w pełni aktywna (22).

2.9. Kolagen (hCOL)

Jest to podstawowe białko tkanki łącznej u zwierząt, występuje m.in. w ścięgach, skórze, rogówce oka, kościach (stanowi 25% całkowitej zawartości białka). Posiada bardzo wysoką odporność na rozciąganie. Kolagen jest częściowo odpowiedzialny za elastyczność skóry, wzmacnia naczynia krwionośne. Ubytek kolagenu ze skóry powoduje powstawanie zmarszczek, w trakcie jej starzenia. Kolagen stosuje się do pokrywania implantów (ortopedycznych i naczyniowych, zębowych), do tworzenia sztucznej skóry, opatrunków, a także jako wypełniacz w chirurgii kosmetycznej, np. do wypełniania ust. Prowadzone obecnie badania zmierzają do poszerzenia możliwych zastosowań kolagenu (inżynierowanie chrząstek, tworzenie sztucznych ścięgien, naczyń krwionośnych, dostarczanie leków). Kolagen jest także powszechnie stosowany w kosmetykach, zwłaszcza w kremach i maściach przeciwzmarszczkowych. Firmy Pharming i Cohesion Technologies (<http://www.cohesioneotech.com>) wykorzystują transgeniczne kozy do produkcji dużych ilości kolagenu typu II. Oczyszczony białko jest obecnie przedmiotem testów w fazie przedklinicznej.

3. Podsumowanie

Do tej pory w leczeniu wielu chorób jako terapeutyki stosuje się białka pochodzące od człowieka lub wytwarzane są w drożdżach czy bakteriach. Jednakże na drodze transgenezy można zmieniać nie tylko tempo wzrostu, jakość mleka i mięsa, ale także wykorzystywać zwierzęta hodowlane jako „żywe bioreaktory” do produkcji biofarmaceutyków. Biorąc pod uwagę koszty oraz czas niezbędny do uzyskania leków metodami „tradycyjnymi”, wydaje się, że uzyskiwane zwierzęta zmodyfikowane genetycznie pozwalają, mimo wysokich kosztów początkowych, na całłościowe zmniejszenie nakładów finansowych niezbędnych do wytworzenia nowych, cennych leków.

Zwierzę wykorzystywane jako bioreaktor wytwarza produkt, który występuje naturalnie w przyrodzie, nie powinien być on zatem niebezpieczny dla konsumenta. Podobnie, prawdopodobieństwo rozpowszechnienia się transgenicznych genów w środowisku naturalnym jest niskie, głównie z powodu hodowlanego ograniczenia przestrzennego, dlatego też zwierzęta takie są w zasadzie bezpieczne dla otoczenia.

Literatura

1. Swartz J. R., (2001), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12, 195-201.
2. Massoud M., Attal J., Thepot D., Pointu H., Stinnakre M. G., Theron M. C., Lopez C., Houdebine L. M., (1996), *Reprod. Nutr. Dev.*, 36, 555-563.
3. Devinoy E., Thepot D., Stinnakre M. G., Fontaine M. L., Grabowski H., Puissant C., Pavirani A., Houdebine L. M., (1994), *Transgenic Res.*, 3, 79-89.
4. Bosze Z., Baranyi M., Whitelaw C. B., (2008), *Adv. Exp. Med. Biol.*, 606, 357-393.
5. Brem M. B. U., Castro F. O., Muller M., (1998), *Therapeutic protein production*, Eds. Janne J., Castro F. O., Springer, Berlin, 107-142.
6. Salamone D., Baranao L., Santos C., Busmann L., Artuso J., Werning C., Prync A., Carbonetto C., Dabsys S., Munar C., Salaberry R., Berra G., Berra I., Fernandez N., Papouchado M., Foti M., Judewicz N., Mujica I., Munoz L., Alvarez S. F., Gonzalez E., Zimmermann J., Criscuolo M., Melo C., (2006), *J. Biotechnol.*, 124, 469-472.
7. Honaramooz A., Megee S., Zeng W., Destrempe M. M., Overton S. A., Luo J., Galantino-Homer H., Modelski M., Chen F., Blash S., Melican D. T., Gavin W. G., Ayres S., Yang F., Wang P. J., Echelard Y., Dobrinski I., (2008), *FASEB J.*, 22(2), 374-382.
8. Archer J. S., Kennan W. S., Gold M. N., Bremel R. D., (1994), *PNAS, USA*, 91, 6840-6844.
9. Limonta J. M., Castro F. O., Martínez R., Puentes P., Ramos B., Aguilar A., Leonart R. L., de la Fuente J., (1995), *J. Biotechnol.*, 15, 40(1), 49-58.
10. Lipiński D., Jura J., Kalak R., Pławski A., Kala M., Szalata M., Jarmuz M., Korcz A., Słomska K., Jura J., Groniek P., Smoraż Z., Pieńkowski M., Słomski R., (2003), *J. Appl. Genet.*, 44(2), 165-174.
11. van Berkel P. H., Welling M. M., Geerts M., van Veen H. A., Ravensbergen B., Salaheddine M., Pauwels E. K., Pieper F., Nuijens J. H., Nibbering P. H., (2002), *Nat. Biotechnol.*, 20(5), 484-487.
12. Han Z. S., Li Q. W., Zhang Z. Y., Xiao B., Gao D. W., Wu S. Y., Li J., Zhao H. W., Jiang Z. L., Hu J. H., (2007), *Protein Expr. Purif.*, 53(1), 225-231.
13. Korhonen V. P., Tolvanen M., Hyttinen J. M., Uusi-Oukari M., Sinervirta R., Alhonen L., Jauhainen M., Jänne O. A., Jänne J., (1997), *Eur. J. Biochem.*, 245(2), 482-489.
14. Park J. K., Lee Y. K., Lee P., Chung H. J., Kim S., Lee H. G., Seo M. K., Han J. H., Park C. G., Kim H. T., Kim Y. K., Min K. S., Kim J. H., Lee H. T., Chang W. K., (2006), *J. Biotechnol.*, 122(3), 362-371.
15. Toledo J. R., Sanchez O., Segui R. M., Garcia G., Montanez M., Zamora P. A., Rodriguez M. P., Cremata J. A., (2006), *J. Biotechnol.*, 123, 225-235.
16. Brem G., Hartl P., Besenfelder U., Wolf E., Zinovieva N., Pfaller R., (1994), *Gene*, 149(2), 351-355.
17. Edmunds T., van Patten S. M., Pollock J., Hanson E., Bernasconi R., Higgins E., Manavalan P., Zioemek C., Meade H., McPherson J. M., Cole E. S., (1998), *Blood*, 91(12), 4561-4571.
18. Koles K., van Berkel P. H., Mannesse M. L., Zoetemelk R., Vliegthart J. F., Kamerling J. P., (2004), *Glycobiology*, 14(11), 979-986.
19. Koles K., van Berkel P. H., Pieper F. R., Nuijens J. H., Mannesse M. L., Vliegthart J. F., Kamerling J. P., (2004), *Glycobiology*, 14, 51-64.
20. Maga E. A., Walker R. L., Anderson G. B., Murray J. D., (2006), *Transgenic Res.*, 15(4), 515-519.
21. Yu Z., Meng Q., Yu H., Fan B., Yu S., Fei J., Wang L., Dai Y., Li N., (2006), *J. Dairy Sci.*, 89(8), 2911-2918.
22. Coulibaly S., Besenfelder U., Miller I., Zinovieva N., Lassnig C., Kotler T., Jameson J. L., Gemeiner M., Müller M., Brem G., (2002), *Mol. Reprod. Dev.*, 63(3), 300-308.