

Podstawowe zagadnienia z obszaru biotechnologii farmaceutycznej

pod redakcją
Ilony Bednarek

ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH

Recenzent

Prof. dr hab. Katarzyna Kieć-Kononowicz

Redakcja

Teresa Pawlok

Alicja Prochas

© Copyright by Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice 2007
Wszelkie prawa zastrzeżone

Dzieło może być wykorzystane tylko na użytek własny,
do celów naukowych, dydaktycznych lub edukacyjnych.
Zabroniona jest niezgodna z prawem autorskim reprodukcja,
redystrybucja lub odsprzedaż.

Wydanie I

ISBN 978-83-7509-051-2

Skład komputerowy i łamanie

Wydawnictwo ŚUM

40-752 Katowice, ul. Medyków 12

SPIS TREŚCI

1. Produkcja biomasy roślin (<i>Grzegorz Machnik</i>)	7
2. Zakładanie hodowli in vitro (<i>Sabina Gałka</i>)	12
3. Uwalnianie roślin od patogenów (<i>Sabina Gałka</i>)	15
4. Produkcja probiotyków (<i>Daniel Sypniewski, Ilona Bednarek</i>)	19
5. Nadprodukcja metaboliczna jako źródło aminokwasów (<i>Grzegorz Machnik</i>).	22
6. Fermentacja etanolowa (<i>Grzegorz Machnik</i>)	24
7. Produkcja kwasów organicznych (<i>Grzegorz Machnik</i>)	29
8. Witaminy i sterydy otrzymywane w bioprocessach (<i>Daniel Sypniewski, Agnieszka Klama-Baryła</i>)	35
9. Biotechnologia antybiotyków (<i>Daniel Sypniewski</i>)	42
10. Surowce, szczepionki i adiuwanty jako produkty biotechnologiczne (<i>Ilona Bednarek, Daniel Sypniewski</i>)	65
11. Przeciwciała monoklonalne (<i>Ilona Bednarek</i>)	73
12. Peptydomimetyki i rekombinanty białkowe – leki nowej generacji (<i>Ilona Bednarek, Krzysztof Cholewa</i>)	84
13. Insulina i jej analogi (<i>Daniel Sypniewski</i>)	94
14. Otrzymywanie cytokin jako przykład nowoczesnej produkcji biotechnologicznej (<i>Daniel Sypniewski, Ilona Bednarek</i>)	100
15. Rośliny transgeniczne źródłem surowców farmaceutycznych (<i>Sabina Gałka</i>) .	110

Wprowadzenie

Zredagowana przeze mnie i przedstawiona pozycja pt.: *Podstawowe zagadnienia z obszaru biotechnologii farmaceutycznej* ma służyć zebraniu zasadniczych informacji niezbędnych w nauczaniu głównych zagadnień z obszaru biotechnologii farmaceutycznej. W chwili obecnej brak jest na rynku skompensowanego polskojęzycznego materiału źródłowego do nauki wspomnianego przedmiotu. Dostępne są wysoko cenione pozycje, jak np. *Wybrane zagadnienia z metod poszukiwania i otrzymywania środków leczniczych* pod red. Katarzyny Kieć-Kononowicz; czy pozycje autorów: A. Chmiel: *Biotechnologia, podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne*; A. Chmiel: *Biotechnologia Antybiotyków*, oraz Kayser, Muller: *Biotechnologia farmaceutyczna*. Niestety, żadna z nich nie obejmuje całościowo zagadnień wymaganych od studentów w aspekcie tematycznym obszaru biotechnologii farmaceutycznej. Wiedza z tego obszaru, obok zagadnień podstawowych, tak zwanej biotechnologii ogólnej i technologii biochemicznych, obejmuje najnowsze zagadnienia dotyczące osiągnięć nauki w projektowaniu, biosyntezie, modyfikacjach i testowaniu leków oraz środków leczniczo-badawczych. Obok klasycznej już biosyntezy antybiotyków, produkcji witamin czy sterydów, nowoczesna biotechnologia zajmuje się produkcją takich biofarmaceutyków, jak peptydomimetyki, cytokiny i czynniki wzrostowe, hormony, przeciwciała monoklonalne, a w produkcji każdego z nich sięga się po najnowsze techniki molekularne, dające produkt o różnym stopniu rekombinacji genetycznej i modyfikacji potranslacyjnej.

Autorzy przedstawionego skryptu mają na celu stworzenie skomasowanej pozycji literaturowej do nauki biotechnologii farmaceutycznej, adresowanej oprócz studentów farmacji, także do magistrów tego kierunku, lekarzy i diagnostów laboratoryjnych, którzy zamierzają doskonalić swoją wiedzę i swoje umiejętności w ramach szkolenia podyplomowego. Książka może być również wykorzystywana w nauczaniu wybranych zagadnień studentów innych kierunków, jak na przykład biotechnologia, czy kosmetologia.

W rozwijającej się dziedzinie biotechnologii nieustannie pojawiają się nowe odkrycia i osiągnięcia. Zdając sobie sprawę z powyższego faktu, oddaję tę niedoskonałą ciągle pozycję do wnikliwej oceny czytelnika, a w perspektywie liczę na jej stosowne uaktualnienia.

Ilona Bednarek

1. Produkcja biomasy

Grzegorz Machnik

Stosowanie drobnoustrojów do celów żywieniowych jest znane od czasów prehistorycznych. W początkowym okresie miało ono charakter przypadkowy, lecz stopniowe poznanie i zrozumienie podstawowych cech mikroorganizmów pozwoliło na ich świadome użycie do przetwarzania żywności. Przelomowych odkryć w dziedzinie mikrobiologii dokonał Ludwik Pasteur, który w połowie XIX wieku po raz pierwszy szczegółowo scharakteryzował procesy fizjologiczne bakterii i drożdży, wprowadził pojęcie aseptyki, pożywki minimalnej oraz zdefiniował wymagania odżywcze i tlenowe wielu mikroorganizmów. Kolejnym, bardzo istotnym krokiem w kierunku ich przemysłowego zastosowania były dokonania Jacques'a Monoda, który opisał model wzrostu drobnoustrojów, charakteryzując takie pojęcia, jak szybkość wzrostu, właściwa szybkość wzrostu oraz stężenie substratów limitujących ich wzrost. Zrozumienie fizjologii podstawowych grup drobnoustrojów oraz poznanie charakteru wzrostu ich populacji umożliwiło dalszy rozwój metod przemysłowej hodowli mikrobiologicznej (zasada chemostatu, Monod i wsp. 1950) [2].

Obecnie, obok tradycyjnych procesów wykorzystujących potencjał mikroorganizmów (winiarstwo, browarnictwo, serowarstwo, piekarnictwo itp.), stosuje się je w przemyśle farmaceutycznym (synteza witamin, antybiotyków itp.) oraz do wytwarzania różnorodnych metabolitów (enzymy, aminokwasy itp.). Prowadzi się również wiele prac mających na celu selekcję mikroorganizmów wykorzystujących materię organiczną jako źródło węgla i energii oraz takich, które mogłyby wiązać azot nieorganiczny i zużywać go do syntezy wysokowartościowego białka. Takie drobnoustroje można by wykorzystać do celów żywieniowych człowieka lub do skarmiania zwierząt hodowlanych, częściowo zastępując tradycyjne źródła uzyskiwania pokarmu. Uważa się, że mikroorganizmy, takie jak algi, bakterie, drożdże oraz grzyby mogą być z powodzeniem stosowane jako źródło wysokowartościowego białka. Pierwsze kultury drobnoustrojów o znaczeniu odżywczym wprowadzono pod koniec I wojny światowej. Dalszy rozwój produkcji o tym charakterze nastąpił w Niemczech w latach międzywojennych i był kontynuowany po II wojnie światowej również w Stanach Zjednoczonych oraz Wielkiej Brytanii. Jako źródło węgla i energii wykorzystywano pentozy z ługów posiarczynowych, melasę oraz pulpę z kawy lub nasion palmowych. Intensywne prace nad zastosowaniem mikroorganizmów jako źródła żywności bądź do celów paszowych były prowadzone po roku 1950 i osiągnęły szczytowy poziom w roku 1977. W trakcie tych badań wprowadzono pojęcie *single cell protein* (SCP, białko jednokomórkowców) i opublikowano wiele artykułów naukowych na ten temat. Najważniejsze wyniki prac nad SCP obejmują: różnorodność wykorzystywanych substratów i opis ich przemian (w tym substraty odnawialne), dogłębne poznanie procesów życiowych wielu mikroorganizmów o potencjalnym znaczeniu użytkowym.

Jak wspomniano wyżej, do produkcji biomasy wykorzystuje się mikroorganizmy bakteryjne, drożdże, grzyby, glony oraz rośliny. Wybór konkretnej grupy zależy od różno-

rodnych czynników, z których najważniejsze kryterium stanowi rodzaj dostępnego substratu (najczęściej produktu odpadowego przemysłu) [4]. Inne kryteria to: wartość odżywcza mikroorganizmu (wartość energetyczna, zawartość białka, udział poszczególnych aminokwasów), parametry technologiczne (charakter hodowli, wymagania pokarmowe, łatwość separacji), parametry toksykologiczne. Idealny mikroorganizm wykorzystywany do produkcji biomasy powinien posiadać następujące cechy:

- wysoką szybkość wzrostu (μ) oraz wydajność biomasy,
- wysokie powinowactwo do substratu,
- niskie wymagania pokarmowe, np. brak konieczności dodawania czynników wzrostowych,
- zdolność do metabolizowania złożonych substratów,
- zdolność do uzyskiwania wysokiej gęstości komórek,
- stabilność cech w procesie rozmnażania,
- podatność na modyfikacje genetyczne,
- wysoki zakres tolerancji na zmiany pH i temperatury.

Dodatkowo, mikroorganizm powinien mieć odpowiedni skład białek i lipidów, niską zawartość kwasów nukleinowych, być łatwo strawny oraz nietoksyczny [3].

Drożdże

Drożdże jako pierwsze znalazły zastosowanie do produkcji biomasy. Ta grupa mikroorganizmów jest powszechnie akceptowana przez konsumentów. Rzadko są toksyczne lub patogenne, mogą być zatem wykorzystywane w żywieniu ludzi. Mimo że zawartość białka ogólnego jest stosunkowo niska (zwykle nie przekracza 60%), to jego skład aminokwasowy jest odpowiedni, zwłaszcza pod względem ilości niezbędnych aminokwasów – lizyny (6–9%), tryptofanu i treoniny. Drożdże zawierają niewiele aminokwasów siarkowych – metioniny i cysteiny, ale są bogate w witaminy (szczególnie z grupy B). Zawartość kwasów nukleinowych waha się w granicach 4–10%. Drożdże są organizmami większymi niż bakterie, co znacznie ułatwia procesy separacji. Właściwa szybkość wzrostu jest stosunkowo niska, czas generacji wynosi 2–5 godzin.

Bakterie

Bakterie posiadają najwyższą właściwą szybkość wzrostu spośród wszystkich mikroorganizmów stosowanych do produkcji biomasy. Całkowita zawartość białka może sięgać nawet 80%, a jego skład aminokwasowy jest zbilansowany. Odpowiednio wysoki jest też udział aminokwasów siarkowych oraz lizyny. W odróżnieniu od drożdży, bakterie posiadają nieco więcej kwasów nukleinowych (10–16%). Niestety, stosunkowo niewiele bakterii może być stosowanych jako środek żywieniowy, ze względu na potencjalną patogenność. Komórki bakteryjne trudniej też odseparować, ponieważ mają niewielkie rozmiary.

Grzyby

Zastosowanie grzybów do produkcji biomasy drobnoustrojów jest zagadnieniem stosunkowo nowym. Na ogół tę grupę mikroorganizmów tradycyjnie wykorzystuje się do syntezy enzymów, kwasów organicznych oraz antybiotyków. Czas generacji grzybów jest znacząco dłuższy niż bakterii oraz drożdży i wynosi od 5 do 12 godzin, a ponadto trudno

go sprecyzować, ponieważ wzrost *mycelium* nie wykazuje typowego dla mikroorganizmów wzrostu logarytmicznego. Zawartość białka ogólnego u grzybów (50%) jest często niższa niż u bakterii i drożdży. Białko jest ubogie w aminokwasy zawierające siarkę. Dodatkowym problemem w przypadku grzybów może być też obecność trudnych do strawienia ścian komórkowych. Korzystny jest niski udział kwasów nukleinowych (około 3%) i łatwość separacji, ze względu na duże rozmiary komórek. Podstawową zaletę wykorzystania grzybów w syntezie biomasy stanowi ogromna różnorodność metabolizowanych substratów, w tym również związków złożonych, takich jak celuloza i skrobia.

Tabela I. Mikroorganizmy produkujące biomasę i ich potencjalne źródła węgla [wg Atkinson B. i wsp., zmodyfikowana]

Potencjalne źródło węgla	Mikroorganizmy produkujące biomasę
Dwutlenek węgla	Glony: <i>Chlorella pyrenoidosa</i> , <i>C. regularis</i> , <i>C. sorokiniana</i> , <i>Oocystis polymorpha</i> , <i>Scenedesmus quadricaula</i> , <i>Spirulina maxima</i> , <i>Spirulina platensis</i> , <i>Dunaliella bardawil</i>
<i>n</i> -Alkany	Bakterie i Promieniowce: <i>Acinetobacter cerificans</i> , <i>Achromobacter delvacuate</i> , <i>Mycobacterium phlei</i> sp., <i>Nocardia</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp.
<i>n</i> -Alkany, <i>n</i> -parafiny	Drożdże: <i>Candida lipolytica</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. maltosa</i> , <i>C. paraffinica</i> , <i>C. oleophila</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>
Metan	Bakterie i Promieniowce: <i>Corynebacterium hydrocarbonoclastus</i> , <i>Nocardia paraffinica</i> , <i>Acinetobacter</i> sp., <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Hyphomicrobium</i> sp., <i>Methylomonas methanica</i> , <i>Methylococcus capsulatus</i>
Metanol	Bakterie i Promieniowce: <i>Methylomonas methylavora</i> , <i>M. clara</i> , <i>M. methanolica</i> , <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Methylophilus methylotrophus</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Streptomyces</i> sp., <i>Xantomonas</i> sp. Drożdże: <i>Candida utilis</i> , <i>Hanseniaspora</i> sp., <i>Pichia pastoris</i> , <i>Hansenula</i> sp., <i>Kloeckera</i> sp.
Etanol	Bakterie i Promieniowce: <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Drożdże: <i>Candida enthanothermophilum</i> , <i>C. utilis</i> , <i>C. kruzei</i>
Celuloza i odpady celulozy	Bakterie i Promieniowce: <i>Thermomonospora fusca</i> Drożdże: <i>Candida utilis</i> Pleśnie i grzyby: <i>Chaetomium cellulolyticum</i> , <i>Trichoderma viride</i>
Ługi siarczynowe	Bakterie i Promieniowce: <i>Pseudomonas denitrificans</i> Drożdże: <i>Candida utilis</i> , <i>C. tropicalis</i> Pleśnie i grzyby: <i>Paecilomyces variotii</i>
Pszenica	Drożdże: <i>Kluyveromyces fragilis</i> , <i>Candida intermedia</i>
Melasa (trzciniowa, buraczana)	Drożdże: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Pleśnie i grzyby: <i>Agaricus campestris</i>
Skrobia	Drożdże: <i>Schwanniomyces alluvius</i> , <i>Lipomyces kononenkoae</i> Pleśnie i grzyby: <i>Aspergillus niger</i> , <i>Fusarium graminearum</i>
Lipidy	Drożdże: <i>Candida rugosa</i> , <i>C. utilis</i> , <i>C. lipolytica</i> , <i>C. blankii</i> , <i>C. curvata</i> , <i>C. deformans</i> , <i>C. parapsilosis</i>
Glukoza	Pleśnie i grzyby: <i>Agaricus blazei</i> , <i>A. campestris</i>
Odpady przemysłu browarniczego	Pleśnie i grzyby: <i>Calvatia gigantea</i>

Glony

Produkcja biomasy z wykorzystaniem glonów zachodzi w naturalnych zbiornikach wodnych, np. w stawach, jeziorach i lagunach. Potencjalną zaletą tych organizmów jest

zdolność do wykorzystywania dwutlenku węgla jako jedyne źródła węgla i energii. Niektóre grupy glonów są także zdolne do wiązania azotu atmosferycznego (*Cyanophyta*). Stanowią także tradycyjny element pożywienia wielu populacji ludzi na świecie, np. w Meksyku (*Spirulina platensis*), Republice Czad (*Spirulina maxima*). Charakteryzuje je niska zawartość aminokwasów siarkowych. Udział kwasów nukleinowych zawiera się w przedziale od 4 do 6%. Glony można łatwo oddzielać na drodze filtracji, jednak ze względu na konieczność utrzymania sztucznych zbiorników wodnych, wykorzystanie tej grupy organizmów w produkcji biomasy jest jak dotąd mało opłacalne [6].

Rośliny

Badania naukowe związane z produkcją biomasy roślin mają na celu stworzenie nowych odmian gatunków roślin uprawnych o ulepszonych parametrach przemysłowych, takich jak: produktywność biomasy, odporność na herbicydy, zwiększona rezystancja wobec chorób i szkodników roślinnych. Istotnym zagadnieniem jest również zwiększenie intensywności fotosyntezy poprzez wprowadzoną zdolność do wiązania azotu atmosferycznego.

W hodowlach tkankowych roślin wykorzystuje się zdolność do odtwarzania (reprodukcji) *in vitro* całego organizmu z niewielkiego fragmentu tkanki. Biotechnologiczna reprodukcja rośliny następuje na drodze somatycznej embriogenezy – zjawiska występującego powszechnie w świecie roślin. Polega ono na różnicowaniu komórek i wytwarzaniu zarodków z pominięciem zapłodnienia i wytwarzania zygoty, przy czym dotyczy zarówno komórek haploidalnych, jak i diploidalnych. Proces somatycznej embriogenezy nie tylko znacznie przyspiesza rozmnażanie, lecz także umożliwia uzyskiwanie roślin identycznych pod względem genetycznym, co jest bardzo istotne w przypadku biotechnologii i nadawania roślinom nowych cech.

Rozmnażanie wegetatywne i hodowlę biomasy roślin rozpoczyna się od uzyskania protoplastów, tj. komórek pozbawionych ścian komórkowych. Protoplasty umieszczone w odpowiedniej pożywce hodowlanej tworzą kalusy. Z kalusa natomiast regeneruje się cały organizm, który z założenia powinien być klonem – identycznym pod względem genetycznym z rośliną, od której pobrano protoplasty – zauważono jednak, że komórki somatyczne w obrębie określonej tkanki różnią się nieco między sobą, stąd przy preparowaniu protoplastów i wyprowadzaniu nowych roślin uzyskuje się organizmy o zróżnicowanych cechach, w tym również użytkowych. Dlatego somatyczną embriogenezę i produkcję biomasy *in vitro* wykorzystuje się do poszukiwania i wyprowadzania nowych odmian, np. o zwiększonej odporności na choroby, polepszonych walorach przemysłowych, takich jak odporność pszenicy na niskie temperatury, zwiększona tolerancja ryżu na zasolenie gleb, modyfikacje składu aminokwasowego nasion kukurydzy. Należy jednak mieć na uwadze, że pojawienie się korzystnej cechy w komórkach hodowli *in vitro* nie zawsze oznacza, że wystąpi ona w całej regenerowanej roślinie.

Oprócz hodowli płytkowych, stosowanych powszechnie przy produkcji biomasy roślin, prowadzone są również hodowle w bioreaktorach. Zrozumiałe jest, że dynamika wzrostu komórek roślinnych w hodowlach *in vitro* jest daleko niższa niż dynamika wzrostu drobnoustrojów. Wśród komórek roślinnych szybko namnażają się komórki *Nicotiana tabacum*, dla których czas generacji wynosi ok. 15 h. W komórkach roślin bardzo wysoki jest z kolei współczynnik konwersji źródła węgla i energii na masę komórkową, wynoszą-

cy ok. 0,65–0,85. W przypadku hodowli wglębnych komórek roślinnych w bioreaktorze można zaobserwować podobną charakterystykę wzrostu, jak w przypadku hodowli drobnooustrojów. Przyrost liczby komórek w czasie może mieć formę liniową bądź logarytmiczną. Duże nadzieje pokłada się w hodowli immobilizowanych (unieruchamianych) komórek roślinnych. Wykazano, że osadzenie komórek na stałym nośniku wpływa istotnie na produkcję metabolitów w porównaniu z komórkami niezwiązanymi [5].

W przypadku roślin produkcja biomasy *in vitro* ma zdecydowanie inny charakter niż u pozostałych organizmów. Szczególnie istotne zagadnienia dotyczą prowadzenia kultur hodowlanych oraz uwalniania roślin od patogenów wirusowych, co można osiągnąć dzięki technice *in vitro*. Oba tematy zostały szerzej omówione w oddzielnych rozdziałach.

PIŚMIENNICTWO

1. *Atkinson B., Mavituna F.*: Biochemical engineering and biotechnology handbook. Nature Press, New York 1983.
2. *Boże H., Moulin G., Galzy P.*: Production of Microbial Biomass. [In:] *Reed G., Nagodawithana T.*: Biotechnology, vol. 9: Enzymes, Biomass, Food and Feed. Wiley-VCH 1999–2000, 170.
3. *Boże H., Moulin G., Galzy P.*: Production of Microbial Biomass. [In:] *Reed G., Nagodawithana T.*: Biotechnology, vol. 9: Enzymes, Biomass, Food and Feed. Wiley-VCH 1999–2000, 171.
4. *Dabod S.K.*: Raw material selection and medium development for industrial fermentation processes. [In:] *Demain A.L.*: Davies Manual Of Industrial Microbiology And Biotechnology. Second Edition, ASM Press, Washington 1999, 213.
5. *Reps A.*: Biotechnologia składników żywności. [W:] *Bednarski W., Reps A.*: Biotechnologia żywności. Wydawnictwa Naukowo Techniczne, Warszawa 2001, 240–245.
6. *Szewczyk K.W.*: Technologia biochemiczna. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1997, 121.

2. Zakładanie hodowli roślin *in vitro*

Sabina Gałka

W odróżnieniu od komórek ludzkich czy zwierzęcych, w stosunkowo łatwy sposób można otrzymywać hodowlę tkanek czy pojedynczych komórek roślinnych *in vitro*. Rośliny są organizmami o znacznie mniejszym stopniu skoordynowania różnych organów i tkanek, cechującymi się nieograniczoną zdolnością do dzielenia się i odtwarzania (regeneracji) całego organizmu (teoria totipotencji Haberlandta). Fakt ten oznacza, że nie tylko zygota może dać początek nowej roślinie. Każda żywa komórka, nawet zróżnicowana, zawiera pełną informację genetyczną, dlatego też w odpowiednich warunkach blokada genotypu może ulec zniesieniu i doprowadzić do regeneracji poszczególnych organów bądź całej rośliny. Pozbawienie komórki korelacyjnego wpływu organizmu macierzystego oraz wpływ regulatorów wzrostu wyzwala ją totipotencję genetyczną i rozwojową. Dochodzi wówczas do ekspresji genów (realizacji informacji zawartej w DNA) odpowiedzialnych za podziały komórkowe, które są podstawą dalszych procesów rozwojowych. Nie wszystkie komórki roślinne w jednakowym stopniu reagują na próby regulacji czy sterowania ich procesami rozwojowymi. W zależności m.in. od: przynależności taksonomicznej, rodzaju tkanki, pozycji w tkance, z której pochodzą, wieku, ogólnego stanu fizjologicznego rośliny macierzystej i stopnia zróżnicowania, komórki cechuje odmienna kompetencja, czyli zdolność do odbioru sygnałów i reagowania na nie za pomocą odpowiednich receptorów. Najłatwiej manipulować rozwojem komórek merystematycznych (wierzchołki pędu, kłącza, oraz zawiązki pąków bocznych) czy mięksiszowych roślin dwuliściennych. Znacznie trudniej manipulować rozwojem komórek pochodzących z roślin nagozalążkowych czy traw. Należy również podkreślić, że im komórki są bardziej zróżnicowane strukturalnie czy bardziej wyspecjalizowane fizjologicznie, tym trudniej im reagować na sygnały z zewnątrz bądź w ogóle brak jest takiej reakcji. Przykładem mogą być komórki szparkowe, wydzielnicze czy przewodzące. Jednak u każdego gatunku można wybrać fragment rośliny, organ lub tkankę dobrze regenerujące się w kulturach *in vitro*.

Materiałem zapoczątkowującym hodowlę jest eksplant, czyli kawałek tkanki roślinnej otrzymany z żywej rośliny matecznej. Materiał roślinny przeznaczony do kultur musi być odpowiednio wybrany i może pochodzić z pola, szklarni, pomieszczenia vegetacyjnego oraz z komór lub szaf fitotronowych. Rośliny mateczne powinny być utrzymane w pełnej zdrowotności przez zastosowanie właściwych zabiegów agrotechnicznych i niezbędnej ochrony chemicznej. Wiek rośliny matecznej odgrywa istotną rolę, zaobserwowano bowiem łatwiejszą regenerację z roślin młodych, w początkowych fazach rozwoju, zdrowych i intensywnie rosnących. Z roślin usuwa się części zeschnięte i niepotrzebne, resztki ziemi i inne zanieczyszczenia, płucze się pod bieżącą wodą z detergentem i poddaje sterylizacji w etanolu, podchlorynie sodu lub wapnia bądź chloraminie. W przypadku systemicznego zakażenia przez patogeny (bakterie, grzyby) kontynuuje się dezynfekcję w hodowli wstępnej (prekultury), eliminując patogeny poprzez wyłożenie hodowli na pożywkę zawierającą

antybiotyki lub fungicydy. Uwalnianie roślin od wirusów przeprowadza się, prowadząc kulturę merystemów, termoterapię czy chemioterapię [3].

Hodowla *in vitro* komórek roślinnych przebiega w pożywce z odpowiednimi substancjami odżywczymi i czynnikami wzrostowymi, z dostępem światła lub w ciemności, w odpowiedniej temperaturze i wilgotności. Tkanka rozpoczyna wzrost w postaci kalusa, który może być hodowany na stałym podłożu lub wykorzystany do otrzymania zawiesiny komórek.

Izolacja linii komórkowych z hodowli *in vitro* kalusa zachodzi poprzez podzielenie go na małe fragmenty, z których wyprowadza się nowe kalusy. Proces ten powtarza się wielokrotnie, aż ich pojedyncze fragmenty będą składać się z jednej linii komórkowej. W ten sposób wyizolowano np. szczepy komórkowe, wytwarzające większe ilości szikoniiny lub alkaniny. Innym sposobem wyizolowania roślinnych linii komórkowych jest regeneracja kolonii komórek z protoplastów, będących komórkami pozbawionymi ściany komórkowej, a zatem niepołączonymi ze sobą. Poprzez regenerację ściany komórkowej z protoplastów powstają pojedyncze, oddzielone od siebie komórki, z których można regenerować linie komórkowe. Takim przykładem są linie bardzo aktywnie hydroksylujące digitoksynę w pozycji 12 β lub produkujące szikoninę.

Miejscem hodowli najczęściej są bioreaktory. Wyróżniamy dwa rodzaje kultur bioreaktorowych: niezróżnicowane (kultura zawiesinowa) i zróżnicowane (kultury między innymi korzeni włośnikowatych). Dzięki hodowli w zawiesinie następuje szybszy przyrost komórek. Choć techniki stosowane do hodowli komórek roślinnych w zawiesinie są zbliżone do metod hodowli drobnoustrojów, to jednak występują tu zasadnicze różnice. Otóż komórki roślinne w porównaniu z komórkami mikroorganizmów są znacznie większe, ich objętość przekracza 10 mikrometrów sześciennych. W przypadku drobnoustrojów wartość ta wynosi ok. 2 mikrometry sześciennie. Komórki roślinne cechują się znacznie większą czułością na bodźce mechaniczne i zawierają też znacznie więcej wody (ok. 90%). Są natomiast odporne na rozciąganie. Komórki roślinne rosną bardzo wolno, czas generacji wynosi 20–40 godzin, i mają mniejsze zapotrzebowanie w tlen. Ze względu na to, że bioprodukt w hodowli roślinnej są głównie metabolity wtórne, często hodowla przebiega dwustopniowo. Najpierw namnaża się komórki, po czym przenosi do bioreaktora z odpowiednim medium promującym wytwarzanie danego metabolitu. Coraz częściej prowadzi się prace nad unieruchomieniem komórek roślinnych, co zapobiega agregacji komórek, zwiększa ich odporność na uszkodzenia mechaniczne, umożliwia pokrywanie się stadium wzrostu ze stadium produkowania metabolitów oraz daje możliwość łatwego przenoszenia komórek do świeżej pożywki [4]. Przykładem wykorzystania kultur bioreaktorowych są hodowle *Lithospermum erythrorhizon* wytwarzające barwnik szikoninę, który ma działanie bakteriobójcze. Naturalne występowanie *Lithospermum erythrorhizon* w Japonii jest ograniczone a jej uprawa zbyt kosztowna. Dzięki procesom fermentacyjnym, przy użyciu bardzo wydajnych szczepów, prowadzi się jej hodowlę w dużych bioreaktorach, co pokrywa zapotrzebowanie na tę substancję.

Drugi typ kultur bioreaktorowych – kultury korzeni włośnikowatych – ma duże znaczenie w produkcji metabolitów komórkowych. Biosynteza większości metabolitów wtórnych włączona jest w programy specjalizacji, które nie mogą być uruchomione w komórkach niewyspecjalizowanych. Dlatego też w kulturach *in vitro* uruchamia się program specjalizacji prowadzący do wykształcenia się organów, w których tworzą się w wyjściowej

roślinie pożądane substancje. Zakłada się kultury samych korzeni, które uzyskuje się, stosując duże stężenia auksyn w podłożu odżywczym albo przez transformację za pomocą *Agrobacterium rhizogenes*. Opisano również produkcję metabolitów wtórnych z użyciem zarodków somatycznych – glikozydy naparstnicy [2]. W niektórych przypadkach metabolity wtórne są wytwarzane in vitro także w kulturach, które powstają z komórek parenchymatycznych niewyspecjalizowanych. Wówczas ich biosynteza nie jest związana z programem specjalizacji. Może ona mieć związek z mutacją, która dość często spontanicznie powstaje w kulturach in vitro kalusa (zmienność somaklonalna). W celu zwiększenia genetycznej zmienności, np. u *Digitalis lanata*, indukuje się również mutacje, stosując napromieniowanie rentgenowskie oraz traktowanie mutagenami chemicznymi [1].

PIŚMIENNICTWO

1. Diettrich B.: Techniki in vitro z użyciem roślin leczniczych do produkcji metabolitów wtórnych. [W:] Kayser O., Müller R.H.: Biotechnologia farmaceutyczna. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2003, 164–175.
2. Kapusta J.: Produkcja substancji biologicznie i farmakologicznie czynnych, na potrzeby medycyny i weterynarii. [W:] Malepszy S.: Biotechnologia roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004, 341–432.
3. Stefaniak B.: Regeneracja i rozmnażanie roślin w kulturach in vitro. [W:] Woźny A., Przybył K.: Komórki roślinne w warunkach stresu. Tom II. Komórki in vitro. Wydawnictwo Naukowe, Poznań 2004, 29–39.
4. Viesturs U.E, Szmite I.A., Žilevič A.W.: Biotechnologia. Substancje biologicznie czynne, technologia, aparatura. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 1992, 69–73.

3. Uwalnianie roślin od patogenów

Sabina Gałka

Wirusy a tkanki twórcze roślin

Badania nad występowaniem i stężeniem wirusów w zainfekowanej roślinie wykazały, że w obrębie organizmu znajdują się komórki, grupy komórek, a nawet tkanki, w których dostępnymi metodami nie można wykryć obecności patogenu. W jednym z pierwszych doniesień z lat 50. dowiedziono, że w merystemach wierzchołkowych *Nicotiana tabacum* nie występuje wirus mozaiki tytoniu (TMV). Wyniki tych badań wpłynęły na rozpowszechnienie hodowli tkanek merystematycznych *in vitro*, których celem było otrzymanie roślin wolnych od wirusów. Eksperymentalnie stwierdzono samoistne uwalnianie się tkanek od wirusów. Wykorzystano do tego ustabilizowane kultury kalusa *Nicotiana tabacum*, które zainokulowano TMV, a po kilku pasażach wykonano analizy na obecność wirusa. Rośliny regenerujące z wielokrotnie pasażowanego kalusa były wolne od infekcji. Inne doniesienia wskazują na możliwość wykorzystania kultur pylników izolowanych np. z zakażonych wirusem pelargonii oraz kultur zawiesiny komórkowej i protoplastów jako źródła roślin wolnych od wirusów. Informacje te wpłynęły na zapoczątkowanie dyskusji nad wieloma hipotezami wyjaśniającymi przyczyny uwalniania tkanek roślinnych od wirusów.

Hipotezy wyjaśniające brak wirusów w tkankach twórczych

- Wysokie stężenie endogennych substancji wzrostowych w wierzchołkach pędów jest inhibitorem replikacji wirusa.
- Przemieszczanie się wirusa jest zbyt wolne, by móc opanować szybko dzielące się i wydłużające komórki merystemu.
- Wirusy nie mogą przemieszczać się przez plasmodesmy, a więc ich penetracja do wnętrza merystemu jest bardzo utrudniona.
- Inaktywacja wirusa jest spowodowana działaniem składnika obecnego w pożywce.
- W momencie izolacji merystemu zachodzi w jego komórkach przejściowa dezorganizacja procesów wzrostowych, w czasie której nie są wytwarzane enzymy nieodzowne do replikacji wirusów [1].

Metody eliminowania wirusów

1. Zwalczanie wektorów wirusów (np. owadów, nicieni, roztoczy) poprzez opryskiwanie roślin preparatami chemicznymi o działaniu lokalnym lub systemicznym. Prewencyjnie powinno odizolować się rośliny od owadów poprzez uprawę w szklarniach klimatyzowanych czy namiotach z siatki nylonowej.
2. Najpopularniejszą metodą jest kultura *in vitro* merystemów wierzchołkowych. W trakcie jej trwania wirusy ulegają dezaktywacji. Powinno się wykorzystywać merystemy nie większe niż 0,1–0,3 mm bez zawiązków liści, uprzednio zdezynfekowane. Możliwość

uwolnienia od wirusów gatunków, które od dziesiątków lat były rozmnażane wegetatywnie, zapoczątkowała intensywny rozwój kultury merystemów.

3. Chemioterapia stosowana przed (*in vivo*) lub po (*in vitro*) izolacji merystemów. W chemioterapii stosuje się antymetabolity należące do związków o wysokiej aktywności przeciwwirusowej. Są to substancje włączające się w metabolizm wirusów i wywołujące zmiany w kodzie genetycznym wirusowego RNA, hamujące ich namnażanie się (analogi pirymidyn: uracyl, tiouracyl, bromouracyl; analogi puryn: siarczan 2,6-diaminopuryny, 8-azaguanina, chloramfenikol; fenyloalanina, bromek etydyny). Często stosuje się również rybawirynę, która przeciwdziała replikacji, uniemożliwia przemieszczanie się wirusów z komórki do komórki. W chemioterapii *in vivo* rośliny podlewa się i opryskuje, natomiast w chemioterapii *in vitro* antymetabolity dodaje się do pożywek.
4. Termoterapia – *in vivo* lub *in vitro*

Termoterapia in vivo – inaktywacja termolabilnych wirusów następuje pod wpływem długotrwałego działania podwyższoną temperaturą 26–45°C w czasie od 4 tygodni do 3 miesięcy (w termostacie lub w klimatyzowanej komorze szklarniowej). Zaleca się stosowanie temperatur zmiennych (23°C – noc, i 40°C – dzień). Termoterapii poddaje się całe rośliny lub tylko poszczególne organy: pędy, kłącza, bulwy, cebule. Mechanizm terapeutyczny tego procesu nie został do końca poznany. Przypuszcza się, że dochodzi do dezaktywacji wirusa lub całkowitej jego eliminacji. Z roślin po termoterapii izoluje się małe merystemy (nie większe niż 0,1–0,3 mm) bez zawiązków liści i przenosi na pożywkę regeneracyjną. Skuteczność uwalniania roślin od wirusów zależy głównie od czasu trwania termoterapii oraz dokładności izolacji merystemu.

Termoterapia in vitro – traktowanie eksplantatów wyłożonych na pożywkę podwyższoną temperaturą (36°C – dzień, 30°C – noc, przez 4–8 tygodni) eliminuje wiele wirusów, a nawet niektóre bakterie. Warunki terapeutyczne dobiera się eksperymentalnie dla konkretnego gatunku rośliny i rodzaju wirusa.

Krioterapia (schładzanie, zamrażanie) – niewielka grupa termolabilnych wirusów i wiroidów roślinnych może być eliminowana przez mrożenie. Krioterapia jest wysoce efektywną metodą eliminacji wiroidów, np. w czasie przechowywania materiału rozmnożeniowego drzew owocowych w temp. (1–5°C) i przy niedostatku światła. Metoda krioprezervacji znajduje również zastosowanie m.in. do przechowywania materiału wolnego od wirusów w warunkach całkowitego zabezpieczenia przed infekcją. Merystemy izoluje się po termoterapii, a następnie odwadnia w sacharozie i otoczkuje w alginianie wapnia. W zależności od indywidualnej wrażliwości gatunkowej merystemy poddawane są tzw. wolnemu schładzaniu; witrifikacji lub bezpośredniemu zanurzeniu w ciekłym azocie. W stanie zamrożenia mogą być transportowane i przechowywane przez długi czas.

5. Metody kombinowane polegające na łączeniu kilku metod, np. wyeliminowano wirus szarki śliwy (PPV) poprzez izolację małych merystemów wierzchołkowych pędów i krioterapię. Izolowane merystemy *Prunus* wyłożono na pożywkę zawierającą DMSO oraz prolinę i schłodzono do 4°C. Następnie pasażowano do mieszaniny krioprotektantów i poddano powolnemu schładzaniu (1°C/min) do temperatury -40°C, po czym zanurzano je w ciekłym azocie (-196°C). Kolejnym krokiem było odmrożenie mery-

stemów i wyłożenie ich na pożywkę MS oraz testowanie roślin na obecność wirusa [2,3].

Testowanie roślin uwolnionych od wirusów

Do badania zdrowotności roślin uzyskanych z eksplantatów „odwirusowywanych” metodą kultur *in vitro* w połączeniu z chemio- lub termoterapią stosuje się:

1. Testy biologiczne na roślinach wskaźnikowych. Na liściach tych roślin, po inokulacji sokiem wyciśniętym z liści badanych roślin, w określonym czasie i miejscu występują charakterystyczne objawy świadczące o obecności wirusa. Główną zaletą jest wysoka czułość testu, możliwość identyfikacji wirusa z dokładnością do rodziny i rodzaju oraz możliwość rozdzielenia i identyfikacji infekcji mieszanych. Wadę stanowią trudności związane z uprawą dużych partii roślin testowych oraz z kosztami ich utrzymania w stanie sterylnym.
2. Testy serologiczne – opierające się na reakcji płaszczka wirusa (antygeny) z przeciwciałami obecnymi w surowicy. Ich zaletą jest szybkie uzyskanie wyników, mniejsza pracochłonność, natomiast wadą – niższa czułość oraz konieczność przygotowania dużych ilości surowicy. Najczęściej stosuje się:
 - Test mikroprecypitacji na szalkach Petriego, który polega na bezpośrednim łączeniu się przeciwciał zawartych w surowicy z cząsteczkami wirusa obecnego w kropli soku badanej rośliny. Po około 2 godzinach (temp. 37°C) wyniki testu odczytujemy pod binokulem na ciemnym tle. Jeżeli w kropli wytrąca się gruzelkowaty, białawy osad, uważamy reakcję za dodatnią.
 - Test podwójnej dyfuzji w żelu agarowym jest bardziej pracochłonny, lecz o wiele dokładniejszy. Polega na wylaniu agaru na szalkach Petriego, następnie wycina się otworek przeznaczony na surowicę i sześć otworków wokół niego na sok badanych roślin. Po 10 godzinach odczytuje się wynik: w miejscu zetknięcia się dyfundujących przeciwciał z dyfundującymi w agarze wirusami ujawnia się reakcja precypitacji w postaci mlecznobiałego, lukowatego pasma.
3. Wykrywanie z zastosowaniem mikroskopu elektronowego. Metoda stosowana głównie do celów badawczych, zwłaszcza gdy zachodzi potrzeba określenia wymiarów i kształtu cząstek oraz struktury wirusa. Polega na zanurzeniu skrawków chorych liści w kropli barwnika i obserwowaniu preparatów w mikroskopie elektronowym przy powiększeniu 30 000–40 000 x.
4. Wykrywanie wirusów przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. Metoda ta stosowana jest głównie do celów badawczych, w celu wykrycia niskich stężeń wirusa czy określenia zasięgu jego występowania w badanej tkance.
5. Test immunoenzymatyczny ELISA umożliwia identyfikację oraz wykrywanie wirusa w bardzo małym stężeniu. Opiera się na specyficznej reakcji antygen-przeciwciało. Zadsorbowana do powierzchni polistyrenu globulina wiąże ilościowo wirusa, który następnie wiąże cząsteczkę globuliny połączonej z enzymem (fosfatazą). Kompleks wykrywany jest po dodaniu wywoływacza fosfatazy, z którym reaguje enzym z kompleksu, dając nitrofenol o żółtym zabarwieniu. Podczas reakcji negatywnej (brak wirusa) kompleks nie powstaje i wywoływacz pozostaje bezbarwny. Zaletą metody jest jej prostota i niski koszt przy masowym stosowaniu [1].

6. Metody molekularne: elektroforeza na żelach poliakrylamidowych, techniki hybrydyzacji z użyciem sond molekularnych oraz łańcuchowa reakcja polimerazy – PCR. Są to techniki odznaczające się najwyższą czułością; około 100–1000 razy większą niż test ELISA [2,3].

PIŚMIENNICTWO

1. *Zenktele E.*: Uwalnianie roślin od wirusów metodą hodowli wierzchołków pędów. [W:] *Zenktele M.*: Hodowla komórek i tkanek roślinnych. PWN, Warszawa 1984, 156–208.
2. *Zenktele E.*: Kultura merystemów i uwalnianie roślin od wirusów. [W:] *Malepszy S.*: Biotechnologia roślin. PWN, Warszawa 2004, 33–42.
3. *Adamus A.*: Uwalnianie roślin od patogenów [W:] *Michalik B.*: Zastosowanie metod biotechnologicznych w hodowli roślin. Wydawnictwo Drukrol s.c., Kraków 1996, 20–22.

4. Produkcja probiotyków

Daniel Sypniewski, Ilona Bednarek

Grupą bakterii o dużym znaczeniu biotechnologicznym są bakterie kwasu mlekowego. Jednostka ta została wyróżniona z uwagi na wspólne cechy fizjologiczne tworzących ją organizmów. Zaliczane są tu głównie ziarniaki z rodzajów *Streptococcus sp.*, *Lactococcus sp.*, *Pediococcus sp.*, *Leuconostoc sp.* oraz pałeczki z rodzaju *Lactobacillus sp.* Są to bakterie Gram-dodatnie, beztlenowe (niektóre są anaerobami fakultatywnymi), niewytwarzające zarodników. Naturalnym środowiskiem dla nich jest przewód pokarmowy oraz błony śluzowe ssaków, mleko, a także rośliny i ich szczątki. Bakterie te nie występują natomiast ani w wodzie, ani w glebie. Wymagania wzrostowe bakterii kwasu mlekowego są dość wysokie – niezbędny jest dodatek do podłoża większości aminokwasów i witamin z grupy B. Często stosowanym dodatkiem do medium hodowlanego jest sok pomidorowy. Z uwagi na ich mezofilny charakter bakterie te wzrastają w temperaturze zbliżonej do 37°C (optimum temperaturowe różni się w zależności od szczepu i mieści się zwykle w zakresie 26–50°C). Znaczenie bakterii kwasu mlekowego wynika z ich zdolności do beztlenowego metabolizowania cukrów (fermentacji). Bezpośrednim produktem tej fermentacji jest kwas mlekowy (homofermentacja) lub mieszanina kwasu mlekowego i innych produktów – kwasu octowego, etanolu i dwutlenku węgla (heterofermentacja).

Wykorzystanie bakterii kwasu mlekowego obejmuje rolnictwo (kiszonki paszowe) i przemysł spożywczy (kiszonki warzywne – ogórki, kapusta, buraki; przetwory mleczne – kefir, jogurt, maślanka, sery; fermentowane przyprawy i używki – herbata, kawa, tytoń, kakao, sos sojowy; fermentowane produkty mięsne – salami, marynaty). Szczepy stosowane na skalę przemysłową w mleczarstwie to głównie *Lactococcus lactis*, *L. diacetylactis*, *L. cremoris*, *L. thermophilus*, *Leuconostoc citrovorum*, *L. mesenteroides*, *Lactobacillus delbrückii sp. bulgaricus*, *L. brevis*, *L. helveticus*, *L. plantarum*. Ponadto bakterie fermentacji mlekowej znalazły zastosowanie w produkcji dekstranu (*Leuconostoc mesenteroides*) oraz antybiotyku polipeptydowego – nizyny – i innych substancji o charakterze antybiotycznym (laktobrenina, laktolina, bulgarikan, acidofilina), których używa się jako konserwantów żywności. Bakterie te mają ogromne znaczenie także w przemyśle farmaceutycznym, z uwagi na rosnące zainteresowanie preparatami probiotycznymi, tj. takimi, które zawierają żywe lub będące w stanie anabiozy kultury bakterii kwasu mlekowego, a także niektóre grzyby (*Aspergillus sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Candida sp.*) zdolne do kolonizowania organizmu. Badania nad leczniczymi właściwościami bakterii probiotycznych zapoczątkowało odkrycie w latach 20. XX wieku zjawiska kolonizacji przewodu pokarmowego człowieka przez bakterie obecne w kefirze.

Wśród właściwości szczepów saprofitycznych bakterii kwasu mlekowego zasiedlających przewód pokarmowy można wskazać na ich aktywność antybiotyczną (hamowanie rozwoju bakterii patogennych – zwłaszcza *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, a także *Helicobacter pylorii*, *Campylobacter jejuni* oraz grzybów pleśniowych), dzięki której zapobiegają biegunkom bakteryjnym oraz rozwojowi wrzodów żołądka i dwunastnicy. W przypadku szczepu *Lac-*

tobacillus rhamnosus GG podkreśla się jego właściwości antagonistyczne w stosunku do bakterii wywołujących próchnicę zębów. Probiotyki mają także korzystny wpływ na funkcjonowanie układu pokarmowego – eliminują wzdęcia, niestrawność, zaparcia czy zwiększają produkcję śluzu przez komórki nabłonka jelit. Stwierdzono wpływ nawet na obniżanie poziomu cholesterolu w surowicy przez bakterie probiotyczne. Szczególnie wskazane jest stosowanie preparatów probiotycznych (lub probiotyczno-prebiotycznych) w stanach zaburzenia równowagi mikrobiologicznej po antybiotykoterapii. Cały organizm człowieka zasiedla w warunkach normalnych około 400–500 szczepów różnych drobnoustrojów, w tym aż miliard bakterii na mililitr występuje w samym jelicie grubym. Bakterie probiotyczne mają dodatkowo zdolność do niespecyficznego aktywowania układu immunologicznego oraz pobudzania ogólnej syntezy przeciwciał przez limfocyty B. Ponadto syntetyzują znaczne ilości witamin B i K. Pozytywny wpływ probiotyków dotyczy także zwierząt gospodarskich – probiotyki są naturalnymi stymulatorami wzrostu, poprawiają trawienie i przyswajanie paszy oraz wzmacniają odporność zwierząt. Stosowane są w hodowli świń, drobiu i przeżuwaczy.

Tabela II. Dostępne na rynku preparaty probiotyków

Nazwa handlowa preparatu	Postać	Skład
Lacid	Ampułki zawierające liofilizat do sporządzenia zawiesiny doustnej	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
Lacidophil	Kapsułki doustne	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i>
Lactovaginal	Kapsułki dopochwowe	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Symbiotic	Kapsułki doustne	<i>Lactobacillus casei rhamnosus</i> , inulina (prebiotyk)
Beneflora	Saszetki do sporządzenia zawiesiny doustnej	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , oligofruktoza, maltodekstryna, błonnik grochu (prebiotyki)
Fisioflor	Kapsułki doustne	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>B. longum</i> , <i>L. sporogenes</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , korzeń cykorii (prebiotyk)
Lacium	Kapsułki doustne	<i>Lactobacillus plantarum</i> , inulina (prebiotyk)
LaciBios	Kapsułki doustne	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>Bifidobacterium animalis</i>
Lactivup	Kapsułki doustne	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , inulina (prebiotyk)
ProBacti4	Kapsułki doustne	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i>
Nutriplant	Kapsułki doustne	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Trilac	Kapsułki doustne	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> , <i>L. bifidus</i>
Probiotic Sense (DAX Cosmetics)	Odżywczy krem na dzień	biolizat bakterii mlekowych <i>Lactococcus lactis</i>

Korzystne z biotechnologicznego punktu widzenia parametry szczepów stosowanych w preparatach probiotycznych obejmują przede wszystkim: zdolność do zasiedlania przewodu pokarmowego, oporność na niskie pH i działanie żółci, antagonizm i zdolność do usuwania bakterii patogennych oraz zapobieganie ponownej kolonizacji przewodu pokarmowego przez te bakterie. Szczepy probiotyczne nie powinny jednak wywoływać reakcji alergicznych lub wytwarzać szkodliwych dla organizmu metabolitów. Podstawowe wymagania technologiczne stawiane szczepom probiotycznym to stabilność genetyczna i fenotypowa (utrzymywana także w okresie przechowywania szczepu) oraz wysokie zdolności wzrostowe zwłaszcza na niedrogich podłożach hodowlanych.

Preparaty probiotyków zawierają wymienione wyżej szczepy bakterii w postaci liofilizowanej. Często stosowanym dodatkiem w takich preparatach są substancje określane jako prebiotyki, będące pożywką dla szczepów. Są to substancje odporne na trawienie w przewodzie pokarmowym, pobudzające selektywnie wzrost bakterii probiotycznych. Preparaty stanowiące połączenie probiotyków z prebiotykami są nazywane symbiotykami. Oprócz preparatów farmaceutycznych, które spełniać muszą wszystkie wymagania stawiane lekom, szczepy probiotyczne służą także jako dodatek do fermentowanych produktów mlecznych podnosząc ich wartość. W technologii otrzymywania takich produktów przeprowadza się najpierw ukwaszanie mleka przy użyciu kultur bakteryjnych, a następnie dodawane są w odpowiedniej ilości szczepy probiotyczne namnożone oddzielnie w mleku.

PIŚMIENNICTWO

1. *Długoński J.*: Biotechnologia mikrobiologiczna. Ćwiczenia i pracownie specjalistyczne. Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź 1997.
2. *Łabużek S., Necklen D., Radziejewska-Lebrecht J.*: Biotechnologia mikroorganizmów. Wybrane zagadnienia. Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego, Katowice 2002.
3. *Bednarski W., Reps A.*: Biotechnologia żywności. Wydanie II. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2003.
4. *Chmiel A.*: Biotechnologia. Podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne. PWN, Warszawa 1994.
5. *Felley C., Michetti P.*: Probiotics and *Helicobacter pylori*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003, 17 (5), 785–791.
6. *O'Sullivan G.C., Kelly P., O'Halloran S.* et al.: Probiotics: an emerging therapy. *Curr Pharm Des* 2005, 11 (1), 3–10.
7. *Podlenski J.K., Chwalibogowska-Podlenska A.*: Leki współczesnej terapii. Wydanie XV. Split Trading, Warszawa 2001.
8. *Taniguchi M., Tanaka T.*: Clarification of interactions among microorganisms and development of co-culture system for production of useful substances. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2004, 90, 35–62.
9. *Twomey D., Ross R.P., Ryan M., Meaney B., Hill C.*: Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002, 82, 165–185.
10. *von Wright A.*: Regulating the safety of probiotics – the European approach. *Curr Pharm Des* 2005, 11 (1), 17–23.

5. Nadprodukcja metaboliczna jako źródło aminokwasów

Grzegorz Machnik

Aminokwasy są podstawowymi elementami budulcowymi białek, ich kolejność w białku decyduje o jego strukturze I-rzędowej. Spośród ponad 20 znanych aminokwasów wyróżnia się aminokwasy endo- i egzogenne, przy czym te ostatnie nie są wytwarzane przez organizm człowieka i muszą być dostarczone wraz z pokarmem [2]. Synteza tych związków pozwala na uzupełnienie ich niedoborów w żywieniu, jednak obecnie stosuje się na szeroką skalę również syntezę innych aminokwasów, które wykorzystuje się nie tylko w przemyśle spożywczym, lecz także farmaceutycznym i kosmetycznym oraz w produkcji rolnej jako dodatek do pasz. Nie wszystkie aminokwasy są syntetyzowane na drodze biochemicznej, część powstaje na skutek syntezy chemicznej (metionina, fenyloalania, tryptofan), inne są ekstrahowane z surowców naturalnych. Spośród aminokwasów syntetyzowanych na skalę przemysłową obecnie na świecie produkuje się najwięcej lizyny oraz kwasu glutaminowego [4].

Kwas glutaminowy, a ściślej jego sól sodowa – glutaminian sodu – jest powszechnie wykorzystywany w przemyśle spożywczym. Ma zastosowanie jako dodatek polepszający smak i zapach potraw; szczególnie chętnie wykorzystywany w kuchniach Dalekiego Wschodu [2]. Kwas glutaminowy jest syntetyzowany przez kilka rodzajów bakterii, wśród których największe znaczenie praktyczne mają wyselekcjonowane szczepy *Corynebacterium glutamicum* oraz *Brevibacterium flavum*. Bakterie te posiadają szczególne predyspozycje metaboliczne do nadprodukcji kwasu glutaminowego. Dodatkowo, opracowano system regulacji syntezy glutaminianu i wyselekcjonowano szczepy, które są podatne na niedobór jednej z witamin – biotyny i przy jej braku odpowiadają znacznie zwiększoną syntezą kwasu glutaminowego. Uwarunkowania metaboliczne wynikają z wysokiej aktywności enzymu – dehydrogenazy glutaminianowej, dzięki której na skutek dużego nagromadzenia NADPH (formy zredukowanej) zachodzi intensywny proces redukcyjnej aminacji 2-oksoglutaranu do L-glutaminianu. Drugim elementem wpływającym na zwiększoną syntezę glutaminianu jest bardzo niska aktywność innego enzymu – dehydrogenazy 2-oksoglutaranowej, która współzawodniczy o ten sam substrat z enzymem wspomnianym wcześniej (dehydrogenazą glutaminianową). W związku z tym 2-oksoglutaran jest preferencyjnie przekształcany do L-glutaminianu zamiast ulegać utlenieniu w cyklu Krebsa. Oprócz szczególnych predyspozycji metabolicznych bakterii kwasu glutaminowego, dodatkowo opracowano system regulacji wydzielania tego związku do podłoża. Nadmierne nagromadzenie glutaminianu we wnętrzu komórek wpływa hamująco na jego dalszą biosyntezę, mimo omówionych wcześniej uwarunkowań metabolicznych. Poprzez niedobór biotyny w pożywce hodowlanej można uzyskać przepuszczalność błon komórkowych i wypływ nadmiaru glutaminianu poza komórki, co usuwa czynnik hamujący i w efekcie pozwala na nadprodukcję tego aminokwasu do ilości 2300 mg/g suchej masy. Inne związki, takie jak detergenty i niektóre antybiotyki, mogą być stosowane alternatywnie do biotyny w celu zwiększenia przepuszczalności błon komórkowych. Umożliwia to wówczas wykorzystanie w pożywce ta-

nich, nieoczyszczonych surowców, np. melasy, która naturalnie zawiera biotynę. Dla uzyskania wysokiej produkcji L-glutaminianu, oprócz stosowania ścisłego stężenia biotyny w pożywce (optymalnie 2,5 µg/l), istotne jest zachowanie innych parametrów hodowli; jako źródło węgla stosuje się glukozę, sacharozę, octan, etanol lub n-alkany. Optymalne pH wynosi 7–8, temperatura 30–35°C, konieczny jest również odpowiedni poziom natlenienia – 3–5 mmol O₂/ml hodowli [1].

Lizyna należy do grupy aminokwasów egzogennych, jest produkowana na skalę przemysłową i stosowana jako dodatek do pasz oraz produktów spożywczych. Do syntezy L-lizyny wykorzystuje się bakterie z rodzaju *Corynebacterium* i *Brevibacterium*. Są to mutanty bakterii kwasu glutaminowego. Jako źródło węgla mogą być stosowane: glukoza, kwas octowy, etanol, melasy czy *n*-parafiny [3]. Bezpośrednim prekursorem L-lizyny jest kwas L-asparaginowy powstający w wyniku transaminacji szczawiooctanu (intermediat cyklu Krebsa). Oprócz lizyny, kwas asparaginowy jest prekursorem innych aminokwasów, tj. L-metioniny, L-treoniny oraz L-izoleucyny. Kluczowymi enzymami wpływającymi na wydajność produkcji L-lizyny przez bakterie kwasu glutaminowego są: kinaza asparaginianowa (katalizująca przekształcanie asparaginianu w lizynę) oraz dehydrogenaza homoserynowa (kluczowy enzym odgałęzienia prowadzącego do przekształcania asparaginianu w metioninę, treoninę i izoleucynę). Aktywność obu enzymów podlega u bakterii kwasu glutaminowego niezależnej regulacji. W skali przemysłowej wykorzystywane są mutanty auksotroficzne homoserynozależne (brak aktywnej dehydrogenazy homoserynowej) lub metioninowo-treoninowe (brak aktywności enzymów szlaków prowadzących do biosyntezy obu aminokwasów). Szczepy takie wykazują znaczącą nadprodukcję L-lizyny, gdyż aktywność kinazy asparaginianowej nie jest hamowana przez końcowe produkty biosyntezy metioniny, treoniny i izoleucyny, a więc produktów szlaku konkurencyjnego dla lizyny. Ponadto, nadprodukcja lizyny wymaga wysokiej aktywności enzymu warunkującego syntezę asparaginianu ze szczawiooctanu – aminotransferazy glutaminianowej. Dodatkowym czynnikiem zwiększającym nadprodukcję jest także mutacja blokująca przemianę fosfoenolopirogronianu do pirogronianu w glikolizie. Fosfoenolopirogronian jest u takich mutantów wydajnie przekształcany w większości w szczawiooctan (karboksylacja katalizowana przez karboksylazę fosfoenolopirogronianową), podczas gdy w normalnych warunkach ulega przekształceniu w pirogronian włączany dalej do cyklu Krebsa. Podobny efekt uzyskiwany jest przez mutacje prowadzące do obniżenia aktywności dehydrogenazy pirogronianowej (katalizującej przekształcanie pirogronianu w acetylo-CoA) lub syntazy cytrynianowej (katalizującej kondensację szczawiooctanu z acetylo-CoA). Ograniczenie tempa tych reakcji prowadzi do zmniejszenia zużycia szczawiooctanu w cyklu Krebsa, a tym samym zwiększenia jego puli w syntezie asparaginianu i dalej lizyny [1].

PIŚMIENNICTWO

1. *Chmiel A.*: Biotechnologia. Podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne. PWN, Warszawa 1994, 163–167.
2. *Koolman J., Rohm K.H.*: Biochemia. Ilustrowany przewodnik. PZWL, Warszawa 2005, 58–62.
3. *Reps A.*: Biotechnologia składników żywności. [W:] *Bednarski W., Reps A.*: Biotechnologia żywności, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2001, 259–260.
4. *Szcwarczyk K.W.*: Technologia biochemiczna. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1997, 235–238.

6. Fermentacja etanolowa

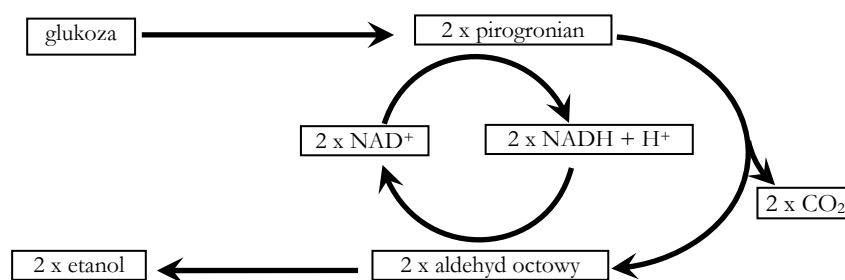
Grzegorz Machnik

Podstawy biochemiczne fermentacji etanolowej

Wiele różnorodnych drobnoustrojów jest zdolnych do prowadzenia procesu fermentacji cukrów i wytwarzania etanolu. Najwięcej produkują go grzyby, zwłaszcza drożdże z gatunku *Saccharomyces cerevisiae*. Podobnie jak większość grzybów, drożdże w obecności tlenu oddychają tlenowo, natomiast w warunkach beztlenowych energię uzyskują w wyniku fermentacji węglowodanów do etanolu i dwutlenku węgla. Oprócz drożdży, również wiele bakterii tlenowych i względnie tlenowych jest zdolnych do produkcji etanolu jako głównego lub ubocznego produktu fermentacji pentoz bądź heksoz [4]. Podstawowy wzór obrazujący przemianę glukozy do alkoholu etylowego został wyprowadzony na początku XIX w przez Gay-Lussaca i ma postać:



Drożdże fermentują glukozę do etanolu i dwutlenku węgla w szlaku fruktozobisfosforanowym. Konwersja pirogronianu w alkohol etylowy zachodzi dwuetapowo. Na pierwszym etapie pirogronian ulega dekarboksylacji do aldehydu octowego przy udziale enzymu – dekarboksylazy pirogronianowej i pirofosforanu tiaminy (witamina B₁). Na drugim etapie aldehyd octowy ulega redukcji do alkoholu etylowego (etanolu). Poniższy schemat przedstawia omawiane cykle przemian. W reakcji redukcji aldehydu octowego do etanolu rolę donora elektronów pełni NADH₂.



Ryc. 1. Drożdżowa fermentacja glukozy do etanolu (zmodyfikowano wg [4]).

Jak wspomniano, drożdże prowadzą proces fermentacji w warunkach beztlenowych, niemal nie wykazując wówczas wzrostu. Gdy w środowisku pojawi się tlen, intensywność fermentacji zostaje zahamowana (w przypadku niektórych gatunków drożdży ustaje całkowicie). Zjawisko to nosi nazwę efektu Pasteura i dotyczy również innych komórek o charakterze względnie tlenowym. Proces oddychania jest dla komórek drożdży znacznie korzystniejszy energetycznie – z jednego mola glukozy uzyskują one aż 38 moli ATP;

w procesie fermentacji: 1 mol glukozy \rightarrow 2 mole ATP. Ze względu na różną wydajność fermentacji, wyselekcjonowano wiele gatunków, szczepów i odmian drożdży na potrzeby różnych gałęzi przemysłu. Wyróżnia się np. silnie fermentujące drożdże o słabej intensywności oddechowej, tzw. drożdże denne (in. drożdże fermentacji dolnej), używane przede wszystkim w piwowarstwie. Z kolei drożdże fermentacji górnej używane są do wyrobu etanolu i wina, a także do wytwarzania niektórych gatunków piwa. Do tej grupy należą również drożdże piekarnicze, w przypadku których podstawową zaletą jest wytwarzanie dwutlenku węgla spulchniającego ciasto. Równowaga między wytwarzaniem etanolu/dwutlenku węgla a wzrostem komórek jest utrzymywana dzięki regulowanemu dostarczaniu cukru i powietrza [4].

Wykorzystanie drożdżowej fermentacji etanolowej

Browarnictwo

Do wytwarzania piwa stosuje się głównie tzw. drożdże fermentacji dolnej, rzadziej górnej (np. do wyrobu piwa jasnego typu Berliner). Surowcem używanym do prowadzenia fermentacji jest najczęściej jęczmień (specjalne, selekcjonowane odmiany o dużej zawartości cukru i niewielkiej ilości białek) oraz pszenica. Do hydrolizy skrobi do dwucukrów i cukrów prostych wykorzystuje się słód zawierający naturalne enzymy amylolityczne z kielkujących nasion jęczmienia, który przygotowuje się przez namaczanie i skielkowanie nasion jęczmienia. Następnie powstający słód suszy się, rozciera i ponownie zawieszają w wodzie. Zawarta w nasionach skrobia jest hydrolizowana do maltozy, a powstała w ten sposób brzezka zostaje po kilku dalszych etapach (dodatek chmielu, podgrzewanie, schłodzenie), poddana procesowi fermentacji, która zachodzi w kadziach (tankach) fermentacyjnych.

Wyrób etanolu przemysłowego

Do wyrobu alkoholu etylowego przeznaczonego do celów spożywczych wykorzystuje się wysokoskrobiowe surowce rolne, które są uprawiane na danym obszarze geograficznym. W Europie Środkowej najczęściej stosuje się ziarna zbóż (żyto, pszenica, jęczmień) oraz ziemniaki. Inną grupę stanowią surowce cukrowe, zawierające dużą ilość sacharozy, takie jak buraki cukrowe, trzcina cukrowa, różne owoce oraz melasa (produkt uboczny przemysłu cukrowniczego, zawierający dużą ilość sacharozy). Trzecim źródłem surowców dla przemysłu spirytusowego są odpady przemysłowe zawierające cukry proste lub złożone, np. odpady przemysłu młynarskiego, z przemysłu owocowo-warzywnego, odpady z produkcji krochmalu, odpady zawierające celulozę, np. drzewne, ługi siarczynowe (z przemysłu papierniczego). W przypadku surowców celulozowych przed właściwą fermentacją należy przeprowadzić hydrolizę polimerów celulozowych na drodze chemicznej z zastosowaniem kwasów. W innych regionach geograficznych surowcem do wyrobu etanolu mogą być różnorodne, lokalnie dostępne produkty rolne, np. kukurydza, sorgo, tapioka, ryż itp. Niezależnie od rodzaju, każdy surowiec przeznaczony do fermentowania musi zostać oczyszczony i odpowiednio rozdrobniony. Surowce miękkie, np. owoce, nie muszą być mielone, natomiast niezbędne jest ich odpowiednie rozdrobnienie, co uzyskuje się przez ucieranie, zgniatanie itp. Ziemniaki są szatkowane na wiórki. W przypadku ziaren zbóż (surowiec najczęściej stosowany w Polsce) do rozdrabniania używa się młynów udarowych. W efekcie mielenia uzyskuje się śrutę, dzięki temu skrobia

może być poddana dalszej obróbce. Kolejnym etapem jest jej upłynnienie, co ma miejsce w wysokiej temperaturze (150–170°C) i pod zwiększonym ciśnieniem (0,4–0,6 MPa). Wówczas dochodzi do kleikowania skrobi, która staje się podatna na działanie enzymów amylolitycznych. Obecnie stosuje się przede wszystkim mikrobiologiczne preparaty enzymów amylolitycznych, dawniej natomiast wykorzystywano w tym celu słoń. Proces hydrolyzy skrobi jest pierwszym etapem procesu produkcji etanolu i nosi nazwę zacierania. Zacier gorzelniczy zawiera mono- i disacharydy oraz dekstryny. Są to związki stanowiące źródło węgla dla fermentujących drobnoustrojów (drożdży). Stosunek ilościowy maltozy i dekstryn może być różny, zależy np. od gęstości przygotowanego zacieru. Drożdże stosowane do produkcji spirytusu (drożdże gorzelnicze) powinny spełniać następujące cechy:

- szybkie tempo prowadzonej fermentacji (zwłaszcza w gorzelniach przemysłowych),
- odporność na wysokie stężenia etanolu (do 14%),
- odporność na wysoką gęstość brzezki melasowej (gorzelnie przemysłowe),
- odporność na działanie kwasów organicznych,
- zdolność do fermentowania wielu cukrów: glukozy, fruktozy, maltozy, sacharozy, niektóre również częściowo mannozy, laktozy, rafinozy.

W nowoczesnym systemie produkcji alkoholu etylowego stosuje się preparaty drożdży: mrożonych, suszonych lub liofilizowanych. Dodaje się je bezpośrednio do zbiornika z zacierem lub biomasę drożdży wstępnie namnaża się i dodaje do zacieru w postaci tzw. matki drożdżowej.

Fermentacja polega na przemianie cukrów znajdujących się w zacierze w alkohol etylowy, a mikroorganizmami prowadzącymi proces są drożdże (*Saccharomyces cerevisiae*). Fermentację można podzielić na trzy etapy, co przedstawia tabela III.

Po procesie fermentacji zacier gorzelniczy poddawany jest procesowi destylacji i rektyfikacji, które mają na celu oddzielenie alkoholu etylowego z odfermentowanego zacieru na zasadzie różnicy lotności poszczególnych jego składników. Wskutek destylacji/rektyfikacji oprócz właściwego produktu – alkoholu – uzyskuje się produkt uboczny – wywar. Zawiera on do 30% nieprzefermentowanej suchej masy oraz liczne związki, jak glicerynę, kwasy organiczne, wyższe alkohole (tzw. fuzle), aldehydy i estry. Wywar może być wykorzystany np. jako wartościowa pasza dla bydła lub jako nawóz [1]. Dalsze etapy obróbki destylatu/rektyfikatu zależą od przeznaczenia produkowanego etanolu.

Tabela III. Etapy fermentacji etanolowej (zmodyfikowano wg [1])

Zafermentowanie	Początkowy etap procesu fermentacji. Zacier zawiera wówczas dużo cukrów oraz powietrza. Następuje namnażanie biomasy drożdży, w mniejszym stopniu wytwarzanie alkoholu. Powstający CO ₂ nasycza zacier, a następnie wydostaje się na powierzchnię, powodując tworzenie piany. Zafermentowanie to zjawisko egzotermiczne; przy nadmiernym wzroście temperatury konieczne jest chłodzenie zbiornika do ok. 16–18°C. Pod koniec etapu proces nabiera charakteru beztlenowego – zwiększa się produkcja etanolu i CO ₂ . Czas trwania: ok. 6–18 godz.
Fermentacja główna	Proces wytwarzania etanolu zachodzi bardzo intensywnie. Wydziela się dużo CO ₂ , jednocześnie wzrasta temperatura (nawet do ponad 30°C) a zacier silnie się „burzy”. Istotne jest chłodzenie zacieru do temperatury optymalnej dla danego szczepu drożdży. Stopniowe zużywanie substratów (cukrów) i wzrost stężenia alkoholu do ponad 5% (v/v) powoduje zahamowanie metabolizmu drożdży i spadek intensywności fermentacji. Zakończenie fermentacji głównej można poznać po zmniejszeniu burzliwości i zaniku piany na skutek mniejszej ilości wydzielanego CO ₂ i niższej lepkości zacieru. Czas trwania tego etapu to ok. 12–18 godz.
Dofermentowanie	Następuje dofermentowanie resztek sacharydów przez drożdże. Proces przebiega powoli na skutek niskiego stężenia substratów pokarmowych. Na tym etapie fermentowane są głównie dekstryny. Ponieważ intensywność procesu dofermentowania jest niewielka, zmniejsza się objętość zacieru (mniejsze wysycenie CO ₂); spada temperatura w zbiorniku fermentacyjnym. Dofermentowanie jest najdłuższym etapem fermentacji, trwa około 20–30 godzin. Po zakończeniu fermentacji gęstość zacieru zbożowego lub ziemniaczanego jest znacznie niższa (1,0–1,5° Blg* w stosunku do 17–18° Blg na początku procesu). Zawartość etanolu wynosi 10–12,5% (v/v).

* Blg = stopnie Bellinga, jednostka skali aerometru Bellinga, odpowiadająca zawartości cukru w badanym roztworze.

Inne drobnoustroje prowadzące proces fermentacji etanolowej

Proces fermentacji etanolowej jest prowadzony przez wiele różnych bakterii, przy czym tylko bakteria *Sarcinia ventriculi* wykorzystuje do syntezy etanolu ten sam szlak metaboliczny co drożdże (szlak fruktozobisfosforanowy i dekarboksylaza pirogronianowa).

Bakteria *Zymomonas mobilis*, wyizolowana z fermentującego soku agawy meksykańskiej, syntetyzuje etanol za pomocą innego szlaku metabolicznego – 2-keto-3-deoksy-6-fosfoglukonianowego przy udziale dekarboksylazy pirogronianowej. W tym szlaku pirogronian jest rozkładany do aldehydu octowego i CO₂, a aldehyd octowy polega z kolei redukcji do etanolu. Produktami fermentacji są etanol, dwutlenek węgla i nieco kwasu mlekowego [4].

Etanol powstaje również jako produkt uboczny fermentacji prowadzonych przez niektóre drobnoustroje z grupy *Enterobacteriaceae* oraz *Clostridium*. Prekursor etanolu – aldehyd octowy powstaje na skutek redukcji acetylo-koenzymu A.

Bakterie mlekowe, prowadzące heterofermentację (np. *Leuconostoc mesenteroides*) wytwarzają również alkohol, jednak proces jego tworzenia przebiega w odmienny sposób – z glukozy poprzez pentozofosforan (ksylulozo-5-fosforan), który przy udziale fosfoketolazy jest degradowany do acetylofosforanu. Acetylofosforan z kolei podlega redukcji do etanolu kolejno przez dehydrogenazę aldehydu octowego i dehydrogenazę alkoholową [5].

Prowadzone są intensywne prace nad wykorzystaniem odpadów ligninocelulozowych jako substratów do wytwarzania etanolu. Jak wspomniano wyżej, w przypadku surowców zawierających celulozę niezbędne jest doprowadzenie materiału do formy dostępnej dla fermentujących drobnoustrojów, co pochłania znaczną część kosztów procesu syntezy etanolu. Dlatego prowadzone są próby wykorzystania bakterii fermentujących, które jednocześnie wydzielają do środowiska celulazy – enzymy rozkładające celulozę. Obiecujący gatunek stanowi *Clostridium thermocellum*, który z 1 mola celulozy wytwarza ok. 1 mol etanolu w temperaturze 55–60°C oraz grzyby strzępkowe – *Monilia sp.*, *Neurospora crassa*, *Paecilomyces sp.*, *Fusarium oxysporum*, predysponowane do etanolowej fermentacji heksoz i pentoz. Ponadto wykorzystuje się techniki inżynierii genetycznej do uzyskiwania szczepów bakterii fermentujących o pożądanej wydajności i dobrych parametrach technologicznych. W ten sposób powstały genetycznie modyfikowane *Zymomonas mobilis*, *Klebsiela oxytoca*, *Clostridium thermocellum* oraz drożdże *Saccharomyces cerevisiae* [3].

Ze względu na światowy wzrost cen ropy naftowej oraz stopniowe zużywanie surowców energetycznych, prowadzone są próby wykorzystania etanolu (produkowanego na drodze mikrobiologicznej) jako alternatywnego źródła energii. Rządowy program datujący jego produkcję jako paliwa do samochodów, prowadzony jest od 1975 roku w Brazylii, a jego skutki są obiecujące również ze względu na ochronę środowiska. Także w Stanach Zjednoczonych wprowadzane są pilotażowe programy mające na celu stopniowe zastępowanie pochodnych ropy naftowej paliwami o pochodzeniu biotechnologicznym [2].

PIŚMIENNICTWO

1. Babuchowski A.: Technologie fermentacyjne. [W:] Reps A.: Biotechnologia składników żywności. [W:] Bednarski W., Reps A.: Biotechnologia żywności. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2001, 356–360.
2. Dien B.S., Cotta M.A., Jeffries T.W.: Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. Appl Microbiol Biotechnol 2003, 63, 258–266.
3. Ng T.K., Ben-Bassat A., Zeikus J.G.: Ethanol Production by Thermophilic Bacteria: Fermentation of Cellulosic Substrates by Cocultures of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermoautotrophicum*. Appl Environ Microbiol 1981, 41(6), 1337–1343.
4. Schlegel H.S.: Mikrobiologia ogólna. PWN, Warszawa 2004, 337–344.
5. Szcwżyk K.W.: Technologia biochemiczna. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1997, 121.

7. Produkcja kwasów organicznych

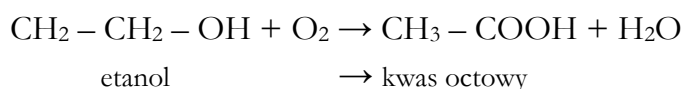
Grzegorz Machnik

Fermentacja octowa

Synteza kwasu octowego przez drobnoustroje następuje w wyniku tzw. fermentacji oksydatywnej (in. utleniania częściowego), co oznacza, że przebiega w obecności tlenu. Oprócz kwasu octowego, do produktów końcowych fermentacji oksydacyjnych należą kwasy: glukonowy, fumarowy, cytrynowy, glutaminowy, mlekowy a także keto- i oksykwas-y. Mikrobiologiczna synteza produktów powstających dzięki drobnoustrojom tlenowym zajmuje istotne miejsce we współczesnej biotechnologii. Dodatkowo, na potrzeby przemysłu wprowadzane są drobnoustroje modyfikowane genetycznie, zdolne do syntezy nowych metabolitów, produktów wtórnych oraz białek obcych gatunkowo (takich jak insulina, liczne enzymy) [4].

Bakterie fermentacji octowej posiadają zdolność do syntezy kwasów poprzez częściowe utlenianie cukru lub alkoholi. Kwas octowy jest niewykorzystanym produktem końcowym, przejściowo lub stale wydzielanym do podłoża. Do grupy bakterii syntetyzujących kwas octowy należą gramujemne *Acetobacter* (słabo ruchliwe, wkołorzese) lub *Gluconobacter* (biegunowo urzęsione). Charakteryzują się one dużą tolerancją na kwasowość, niską ruchliwością, brakiem pigmentów oraz niską aktywnością peptolityczną. Naturalnie występują w roślinach, a także wraz z drożdżami wszędzie tam, gdzie obecne są wydzieliny lub soki zawierające cukier. *Gluconobacter oxydans* jest przedstawicielem grupy *suboxidans*, natomiast *Acetobacter aceti* oraz *A. pasteurianum* należą do *peroxidans*. Obie grupy drobnoustrojów różnią się zdolnością (*peroxidans*) bądź jej brakiem (*suboxidans*) do dalszego metabolizowania kwasu octowego [4].

Reakcja utleniania alkoholi do odpowiadających im kwasów organicznych przebiega zgodnie z poniższym schematem reakcji:



W przemianach alkoholi do kwasów organicznych biorą udział enzymy – dehydrogenazy alkoholowe – znajdujące się na zewnętrznej powierzchni bakteryjnych błon cytoplazmatycznych [4].

Technologia produkcji octu

Podstawowym parametrem niezbędnym do prawidłowego przebiegu fermentacji octowej jest dostarczenie odpowiedniej ilości powietrza. Zarówno tradycyjne, jak i współczesne technologie produkcji octu muszą zapewniać ścisły kontakt bakterii i pożywki z tlenem atmosferycznym.

Najstarsza metoda produkcji octu z wina – metoda powierzchniowa – polega na pozostawieniu wina w kadzi fermentacyjnej lub płaskim naczyniu. Bakterie fermentacji octowej (*Acetobacter*) dostają się do naczynia za pośrednictwem muszki owocowej (*Drosophila*).

Proces przemiany wina w ocet przebiega bardzo powoli a drobnoustroje nie są związane z żadnym nośnikiem. Z czasem metoda powierzchniowa uległa modyfikacjom poprzez wprowadzenie odpowiednich nośników, na których bytują drobnoustroje. Rola taką pełniły wytłoki winogron lub lodygi winorośli; proces przyspieszano przez wytrząsanie naczyń, co zapewniało silniejsze napowietrzenie pożywki.

Klasyczna metoda produkcji octu, tzw. technika stojakowa, polega na wykorzystaniu wiórów drzewnych, najczęściej bukowych, jako miejsca bytowania bakterii. Wióry umieszcza się w wysokich kadziach o podwójnym dnie; drewnianych o wysokości do 3 metrów lub kamionkowych o wysokości do 5 metrów. Pożywkę dla bakterii stanowi surowiec (wino), w którym ilość alkoholu wynosi ok. 4%. Niezbędny jest również dodatek składników odżywczych, takich jak sole amonowe i fosforowe, niekiedy stosuje się pożywkę organiczną, np. ekstrakt słodowy, suszone drożdże lub ekstrakt drożdżowy. Surowiec doprowadza się do kadzi od góry, skąd – spływając grawitacyjnie przez złożę wiórów i bytujących na nich bakterii – ulega stopniowej konwersji w ocet. Jednocześnie do złoża od dołu doprowadzane jest powietrze, które migruje w górę kadzi, przeciwprądowo w stosunku pożywki.

Procedura powtarzana jest kilkakrotnie aż do całkowitego utlenienia alkoholu i uzyskania odpowiedniego stężenia kwasu octowego. Kadzie, na których prowadzi się syntezę octu, mogą być wykorzystywane przez wiele lat.

Obecnie tradycyjną technikę produkcji octu zastępuje się metodami zanurzeniowymi (wglębnymi), z zastosowaniem fermentorów. Utlenianie alkoholu przebiega w ściśle kontrolowanych i sterowanych warunkach. Surowcem do wyrobu octu jest roztwór zawierający ok. 5% alkoholu i 7–10% kwasu octowego. Proces prowadzi się w sposób półciągły, tzn. przebiega on do momentu spadku stężenia alkoholu do 0,3%, kiedy część octu zostaje odprowadzana, a dostarczana jest nowa porcja pożywki, zapewniająca zachowanie optymalnych stężeń substratów odżywczych. Zakończenie cyklu produkcyjnego prowadzi się w taki sposób, aby nie następował spadek wydajności procesu, tj. zachowując optymalne parametry środowiska bytowania bakterii. Stężenie kwasu octowego w produkcie końcowym wynosi do 15% objętości, przy czym istnieją technologie pozwalające uzyskać ocet o stężeniu 18–20% przy jednoczesnym użyciu odpornych szczepów bakterii octowych. Uzyskany w wyniku fermentacji produkt – ocet surowy – jest następnie filtrowany w celu usunięcia zanieczyszczeń, zwłaszcza białek powodujących jego mętnienie [4,6].

Produkcja kwasu cytrynowego

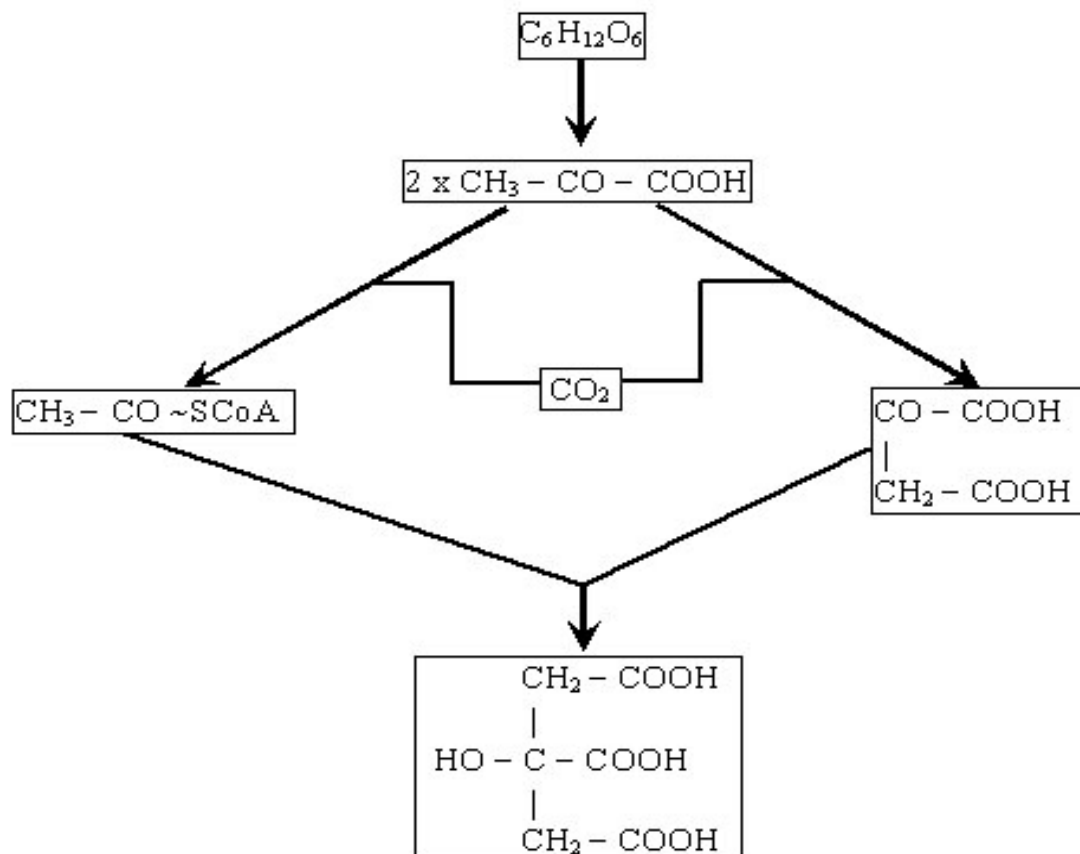
Wytwarzanie kwasu cytrynowego (wzór sumaryczny $C_6H_8O_7$) na skalę przemysłową realizuje się najczęściej dzięki hodowli grzyba *Aspergillus niger*. Prowadzone są też hodowle drożdży zdolnych do syntezy kwasu cytrynowego [7]. W przeciwieństwie do bakterii, grzyby są dużo bardziej podatne na separację przez filtrowanie, co usprawnia technologię procesu i nie wymaga dużych nakładów energii. Grzyby syntetyzują kwasy organiczne w warunkach tlenowych a tendencja do nadmiernego wydzielania pośrednich produktów metabolizmu (np. kwasu cytrynowego) jest często wynikiem braku pewnych pierwiastków

śladowych w podłożu hodowlanym. Możliwość celowej regulacji metabolizmu grzybów w kierunku nadprodukcji i wydzielania określonego produktu jest bardzo korzystną cechą z punktu widzenia ich przemysłowego zastosowania. W wielu przypadkach wykluczenie pojedynczego pierwiastka z podłoża wzrostowego grzyba indukuje akumulację jakiegoś produktu pośredniego. Niedobór np. żelaza, manganu, miedzi, magnezu, potasu, wapnia wywołuje często akumulację pośrednich produktów metabolizmu, co jest wykorzystywane w produkcji tych związków na skalę przemysłową. Ustalono, że najkorzystniej hodować *Aspergillus niger* przy zachowaniu niskiego pH na początku procesu (pH = 2,5 – 3,5), to bowiem warunkuje powstawanie czystego kwasu cytrynowego (bez syntezy innych produktów), a jednocześnie chroni hodowlę przed zakażeniami bakteryjnymi. Dodatkowo zostały zdefiniowane szczegółowe warunki prowadzonej hodowli, w tym wpływ poszczególnych pierwiastków na proces wzrostu mycelium oraz wydajność syntezy kwasu cytrynowego. Ustalono, że siarczan magnezu ani azotan amonu nie wpływają na wydajność syntezy cytrynianu, natomiast są istotne dla wzrostu mycelium. Z kolei stężenie żelaza, cynku i fosforanu ma wpływ na ilość uzyskiwanego kwasu cytrynowego, przy czym szczególnie wysoką wydajność uzyskuje się, gdy żelazo i cynk występują w stężeniach ograniczających.

W syntezie kwasu cytrynowego (oraz innych kwasów organicznych) przez grzyby podstawową rolę odgrywają enzymy cyklu kwasów trójkarboksylowych (cyklu Krebsa) a powstające związki są efektem metabolizowania glukozy jako substratu. Uważa się, że fumaran, jabłczan, bursztynian i cytrynian są wydzielane do podłoża jako produkty pośrednie powstające w cyklu Krebsa. Wydajność kwasu cytrynowego w hodowli jest jednak znacząco wyższa, niż wynikałoby to z przemian acetylo-CoA (teoretycznie ze 100 g glukozy powinno powstać 71,1 g cytrynianu). W rzeczywistości uzyskuje się wydajność rzędu 75–78 g/100 g glukozy. Okazuje się, że do syntezy cytrynianu jest również wykorzystywany dwutlenek węgla. Należy jeszcze raz podkreślić, że akumulacja i wydzielanie do pożywki produktów pośrednich cyklu kwasów trójkarboksylowych (w tym kwasu cytrynowego) przez kultury grzybowe jest wynikiem niezrównoważonego metabolizmu tych organizmów. W normalnych warunkach, dzięki szczepom grzyba przeprowadzają całkowite utlenienie i asymilację substratów. Przemianę glukozy do kwasu cytrynowego, jaka zachodzi w hodowlach *A. niger*, przedstawiono na rycinie 2.

Pierwotnie kwas cytrynowy uzyskiwano z owoców cytryn, gdzie występuje on w ilości ok. 8% i jest możliwa jego precypitacja solami, np. wapnia. Ten sposób pozyskiwania został na początku XX w. zastąpiony technologiami fermentacyjnymi z wykorzystaniem zdolności *A. niger* do syntezy cytrynianu. Wczesna technologia produkcji tego kwasu za pomocą metod mikrobiologicznych polegała na hodowli grzyba w otwartych, aluminiowych naczyniach, bez zachowania warunków sterylnych (niskie pH środowiska monokultury zapewniało dostateczną ochronę przed zakażeniami). Pożywką do hodowli grzybów był roztwór melasy, proces produkcyjny trwał około 9–11 dni w temperaturze 30°C. Po tym czasie usuwano zużytą pożywkę (produkt syntezy), pozostawiając na miejscu kultury grzyba, do którego następnie dodawano świeży roztwór melasy. Współcześnie mikrobiologiczna produkcja kwasu cytrynowego przebiega w sterylnych fermentorach o pojemności kilkuset tysięcy litrów [5]. Stosuje się różne rozwiązania technologiczne, np. obok konwencjonalnych bioreaktorów wyposażonych w mieszadło wykorzystuje się reaktory typu airlift lub fermentory kolumnowe. Źródło węgla i energii dla mikroorganizmów

stanowią cukry, których stężenie w pożywce wynosi na ogół 18–22%. Źródłem cukrów może być roztwór melasy, syropy glukozowe lub fruktozowe. Konieczne jest zapewnienie wysokiej kwasowości pożywki ($\text{pH} = 2,2 - 2,6$) oraz usunięcie z podłoża hodowlanego soli metali (żelaza, manganu, cynku i in.), dotyczy to zwłaszcza surowców nieoczyszczonych, takich jak melasa. Czas hodowli (prowadzonej w sposób okresowy) wynosi 10–12 dni, przy czym dla wydajności procesu krytyczne są pierwsze 2–3 dni. Modyfikacja metody okresowej i ciągle dodawanie pożywki przy jednoczesnej kontroli stężenia cukru w pożywce pozwala na skrócenie czasu fermentacji do 5–6 dni.



Ryc. 2. Metabolizm glukozy do kwasu cytrynowego. Zmodyfikowano wg [5].

Kwasu cytrynowego używa się powszechnie w przemyśle spożywczym, głównie jako regulatora kwasowości (napoje, dżemy, galaretki, słodczyce). Cytrynian ma również działanie konserwujące, wybielające i przeciwutleniające, co wykorzystuje się w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym, a także w produkcji środków piorących.

Fermentacja mlekowa

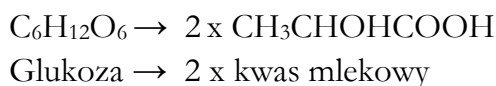
Bakterie fermentacji mlekowej, tworzące szeroką grupę mikroorganizmów, są gram-dodatnimi, nieruchliwymi laseczkami lub ziarniakami, które nie wytwarzają przetrwalników. Podstawową cechą tych bakterii jest zdolność do syntezy kwasu mlekowego – głównego produktu końcowego metabolizmu węglowodanów. Bakterie mlekowe pełnią bardzo istotną rolę w wielu dziedzinach działalności człowieka, zwłaszcza w przetwórstwie żywności, gdzie są wykorzystywane (świadomie lub nie) od najdawniejszych czasów.

Głównymi przedstawicielami znanych od dawna bakterii mlekowych są m.in. *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* i *Streptococcus*. Obecnie poznano znacznie więcej gatunków bakterii mlekowych, lecz ich znaczenie gospodarcze jest mniejsze niż w przypadku wyżej wymienionych [1].

Reakcja konwersji węglowodanów do kwasu mlekowego i dwutlenku węgla oraz innych kwasów organicznych jest prowadzona przez bakterie mlekowe w warunkach niemal beztlenowych (wymagają bardzo niewielkiej ilości tlenu – bakterie mikroaerofilne). Ma to istotne znaczenie praktyczne, gdyż dzięki temu pożywienie fermentowane przez bakterie mlekowe nie ulega drastycznym przemianom organoleptycznym i smakowym. Ponadto, zasiedlenie produktu spożywczego przez bakterie mlekowe i wydzielanie do podłoża kwasu mlekowego powoduje obniżenie pH i inhibicję wzrostu innych grup drobnoustrojów.

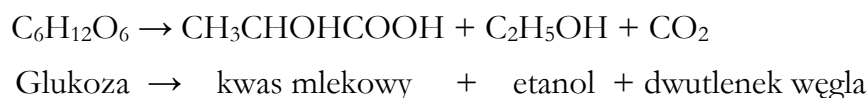
Do grupy bakterii mlekowych należą zarówno bakterie wydzielające wyłącznie kwas mlekowy (homofermentujące), jak i takie, które oprócz kwasu mlekowego wydzielają nieco innych składników (kwas octowy, CO₂) oraz niewielką ilość alkoholu etylowego (bakterie heterofermentujące) [2]. Poniższy schemat przedstawia różnicę pomiędzy homo- i heterofermentacją prowadzoną przez bakterie kwasu mlekowego:

Fermentacja homomleczanowa (szlak fruktozobisfosforanowy):



Metabolizm 1 mola glukozy daje w efekcie 2 mole kwasu mlekowego.

Fermentacja heteromleczanowa (brak enzymów szlaku fruktozobisfosforanowego):



Metabolizm 1 mola glukozy daje 1 mol kwasu mlekowego, etanol oraz dwutlenek węgla.

Bakterie fermentacji mlekowej są bardzo wymagające pod względem składu podłoża. Nie wykazują wzrostu na pożywce mineralnej z glukozą i solami amonowymi, bowiem większość z nich wymaga do wzrostu obecności wielu witamin, aminokwasów oraz zasad azotowych. Zatem w hodowli stosuje się podłoża wzbogacane np. ekstraktem drożdżowym, koncentratem pomidorowym lub krwią. W świetle dotychczasowych badań uważa się, że bakterie z rodzaju *Lactobacteriaceae* zatraciły wtórnie zdolność syntezy niektórych metabolitów ze względu na ich naturalne występowanie w podłożach bogatych we wszystkie składniki niezbędne do wzrostu, np. w mleku. Bakterie mlekowe posiadają również rzadko spotykaną w świecie bakteryjnym zdolność do metabolizowania cukru mlecznego – laktozy. Jest to możliwe dzięki obecności enzymu – β-galaktozydazy, który hydrolizuje dwucukier – laktozę do D-glukozy i D-galaktozy, które z kolei mogą zostać włączone do szlaku katabolicznego heksoz.

Przykładami bakterii mlekowych wykorzystywanych w przemyśle spożywczym są *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. caret*, *L. pentoaceticus*, *L. brevis* oraz *L. thermophilus*. Szczególne znaczenie w przemyśle ma bakteria *Leuconostoc mesenteroides*, ponieważ jest wyjątkowo odporna na wysokie stężenie soli i cukrów w pożywce (toleruje do

50% cukru w podłożu). *Leuconostoc mesenteroides* szybko zasiedla środowisko w szerokim zakresie temperatur i wydziela duże ilości kwasu mlekowego oraz CO₂; jest głównym drobnoustrojem obecnym w kwaszonej kapuście i ogórkach; należy do grupy bakterii heterofermentujących [6].

Bakterie fermentacji mlekowej, ze względu na duże wymagania odżywcze, nie występują w wodzie i glebie. Ich naturalne środowisko życia stanowią mleko i przetwory mleczne, rośliny oraz układ pokarmowy i błony śluzowe zwierząt oraz człowieka, przy czym bakterie te nie są pasożytami. Obszerne zagadnienie mikroflory błon śluzowych i jelit oraz związane z nimi pojęcie preparatów probiotycznych dotyczy pozytywnego wpływu bakterii mlekowych na organizm człowieka i jest tematem oddzielnego rozdziału.

Bakterie mlekowe znajdują bardzo szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym, zarówno na skalę przemysłową, jak i na użytek domowy. Podstawową zaletą tych drobnoustrojów jest wspomniana wcześniej zdolność do zdominowania całego środowiska i uniemożliwienie rozwoju innym mikroorganizmom. Bakterie fermentacji mlekowej są odpowiedzialne za powstawanie wszelkich fermentowanych przetworów mlecznych, kwaszonych warzyw (kapusta, ogórki, buraki itp.), fermentowanych wędlin (np. salami), a także pozwalają na produkcję kiszonek dla zwierząt. Czysty kwas mlekowy jest wykorzystywany jako dodatek smakowy w niektórych produktach spożywczych, przy czym jego synteza może zachodzić na drodze mikrobiologicznej lub syntetycznej.

PIŚMIENNICTWO

1. Klingberg T.D., Axelsson L., Naterstad K., Elsser D., Budde B.B.: Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented Sausages. *Int J Food Microbiol* 2005, 105, 419–431.
2. Salminen S., von Wright Atte: *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. 2nd ed. Marcel Dekker, New York 1998.
3. Schlegel H.S.: *Mikrobiologia ogólna*. PWN, Warszawa 2004, 344–346.
4. Schlegel H.S.: *Mikrobiologia ogólna*. PWN, Warszawa 2004, 406–407.
5. Schlegel H.S.: *Mikrobiologia ogólna*. PWN, Warszawa 2004, 412–415.
6. Szcwżyk K.W.: *Technologia biochemiczna*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1997, 160–168.
7. Wojtatowicz M.: *Studia nad biosyntezą kwasów cytrynowych przez szczep drożdży Y. lipolytica A-101 i jego mutanty*. Wydawnictwo Akademii Rolniczej we Wrocławiu, Wrocław 1991.

8. Witaminy i sterydy otrzymywane w bioprocessach

Daniel Sypniewski, Agnieszka Klama-Baryła

Witaminy

Pierwszą witaminę odkrył w 1912 roku polski chemik Kazimierz Funk. Była nią tiamina (witamina B₁). Funk współtworzył także nazwę „witamina” – *amina necessaria ad vitam* (amina niezbędna do życia). Mimo iż wszystkie witaminy to substancje o naturalnym pochodzeniu, większość z nich obecnie produkuje się metodą syntezy chemicznej. Metody biotechnologiczne są opłacalne tylko w przypadku otrzymywania witamin B₂ i B₁₂, witaminy C oraz prowitamin A (β -karotenu) i D (ergosterolu). Niewielkie znaczenie przemysłowe ma mikrobiologiczna produkcja witaminy H (biotyny), Q (koenzymu Q) oraz koenzymu A. Opracowywane są jednak metody otrzymywania semisyntetycznych witamin, czyli syntezy witamin z prekursorów uzyskiwanych na drodze biotechnologicznej bądź czysto chemicznej.

Otrzymywanie witaminy C

Witamina C (kwas askorbowy) jest przeznaczona tylko dla człowieka, wyższych naczelnych oraz świnki morskiej. Technologię jej otrzymywania opracowano w latach trzydziestych XX wieku, a obecnie roczna produkcja wynosi kilkadziesiąt tysięcy ton. Na skalę przemysłową jest uzyskiwana na drodze chemiczno-biotechnologicznej. Substrat wyjściowy stanowi glukoza. Na pierwszym etapie następuje chemiczna redukcja D-glukozy do D-sorbitolu, w warunkach 120–140°C, w obecności niklu jako katalizatora. Nikiel jest niestety inhibitorem drugiego etapu syntezy – biotransformacji D-sorbitolu do L-sorbozy – dlatego konieczne trzeba dokonać oczyszczenia produktu reakcji np. na kolumnach dejonizujących. Konwersja D-sorbitolu do L-sorbozy to etap utleniania mikrobiologicznego warunkowanego obecnością enzymu zależnego od NAD⁺: dehydrogenazy sorbitolowej, prowadzony w hodowli bakterii *Acetobacter suboxidans* (syn. *Gluconobacter oxidans*). Bioprocess przebiega w warunkach intensywnego natleniania, w temperaturze 28–30°C i trwa 14–40 godzin przy stężeniu sorbitolu 10–29%. W skład podłoża produkcyjnego wchodzi ekstrakt drożdżowy, a ponadto fosforany, siarczan amonu i siarczan magnezu. Po zakończeniu bioprocessu oddziela się biomasę, a sorbozę zagęszcza się do około 90% i poddaje krystalizacji. Ostatni etap syntezy polega na przekształceniu L-sorbozy do witaminy C. Reakcję przeprowadza się z użyciem nadmanganianu potasu. Produktem pośrednim jest kwas 2-ketogulonowy, który ulega następnie enolizacji i laktonizacji, tworząc witaminę C.

Witamina B₁₂

Witamina B₁₂ (cyjanokobalamina) została odkryta w roku 1948. W jej budowie chemicznej wyróżnić można cztery pierścienie pirolowe koordynujące centralnie położony jon kobaltowy. Znaczenie biologiczne tej witaminy wynika z udziału w szlakach biosyntezy puryn i pirymidyn. Produkty roślinne są wyjątkowo ubogie w tę witaminę, natomiast

ważnym źródłem cyjanokobalaminy jest wątroba zwierząt. Stąd też pewne ilości są pozyskiwane właśnie z tego źródła. Dzielne zapotrzebowanie człowieka na tę witaminę wynosi około 5 µg i w większości pokrywa je produkcja przez saprofityczne bakterie jelitowe. Wchłanianie witaminy B₁₂ w jelicie wymaga obecności specjalnego czynnika białkowego (apoerytreina, czynnik wewnętrzny Castle'a) wytwarzanego przez komórki nabłonkowe.

Na skalę przemysłową cyjanokobalaminy otrzymuje się obecnie poprzez bezpośrednią biosyntezę przeprowadzaną przez następujące szczepy bakterii właściwych: *Propionibacterium shermanii*, *Bacillus coagulans*, *Pseudomonas denitrificans*, *Rhodospseudomonas protamicus*. Znaczne ilości cyjanokobalaminy produkują także promieniowce: *Streptomyces griseus*, *S. olivaceus*, *S. aureofaciens*, *Nocardia rugosa*. Prekursorami witaminy B₁₂ są sukcyńlo-CoA oraz aminokwasy glicyna, treonina, metionina. Konieczne jest oczywiście zapewnienie odpowiedniego stężenia jonów kobaltu w medium hodowlanym, jednak zbyt duża ich ilość wpływa hamująco na biosyntezę kobalaminy. W przypadku bakterii z rodzaju *Pseudomonas sp.* pierwszy etap produkcji przebiega w warunkach beztlenowych (2–3 doby), a następnie w warunkach umiarkowanego napowietrzania bioreaktora (2–3 doby). Podłoża wzrostowe zawierają zwykle glukozę, wyciąg kukurydziany jako podstawowe źródła węgla, a także wyciąg drożdżowy i melasę. Źródłem azotu mogą być sole amonu lub hydrolizaty kazeiny oraz pepton. Mniejszą wydajność biosyntezy osiąga się w hodowlach promieniowców. Bioprocess przebiega w tym przypadku w warunkach tlenowych (3–4 doby, temperatura 28°C), jednak natlenianie powinno być umiarkowane, aby nie stymulować zbyt intensywnego wzrostu szczepu. Podłoża produkcyjne zawierają glukozę i melasę, hydrolizaty białkowe oraz węglan wapnia i sole mineralne. Znaczna część cyjanokobalaminy pochodząca z produkcji nie jest wydzielana do medium, lecz pozostaje wewnątrz komórek, stąd wysuszona biomasa może służyć jako dodatek do pasz dla zwierząt.

Witamina B₂

Witamina B₂, czyli ryboflawina, jest składnikiem koenzymów FMN (mononukleotyd flawinowy) i FAD (dinukleotyd flawinoadeninowy) związanych z przemianami oksydoredukcyjnymi. Zapotrzebowanie człowieka na tę witaminę wynosi 2–3 µg dziennie. Obfitującymi w witaminę B₂ produktami naturalnymi są głównie przetwory zbożowe oraz mięsne i mleczne. Roczna produkcja ryboflawiny na świecie wynosi około 1300 ton. Na skalę przemysłową otrzymywana jest trzema sposobami. Pełna synteza chemiczna stanowi około 20% i stosuje się ją głównie do otrzymywania ryboflawiny do preparatów farmaceutycznych. Jako substrat wykorzystywana jest glukoza. 50% produkcji powstaje dzięki metodzie mieszanej chemiczno-biotechnologicznej, gdzie ryboflawinę produkuje się chemicznie z D-rybozy, pochodzącej z hodowli bakterii *Bacillus subtilis* lub *Bacillus pumilus*. 30% zapotrzebowania pokrywa bezpośrednia biosynteza ryboflawiny z D-rybozy i 3,4-dimetyloaniliny przez następujące szczepy drobnoustrojów: *Clostridium acetobutylicum* (bakterie z rodziny *Bacillaceae*), *Candida flareri* (drożdżaki), grzyby *Eremothecium ashbyii* i *Ashbya gossypii* (patogeny roślin wyższych). Znaczące ilości tej witaminy wytwarzają także niektóre glony oraz bakterie *Escherichia coli*. Największą wydajność biosyntezy ryboflawiny posiadają jednak wymienione szczepy grzybów *Eremothecium ashbyii* i *Ashbya gossypii* (odpowiednio 2480 i 6420 mg z 1 litra hodowli w porównaniu z 97 mg/l w przypadku *Clostridium acetobutylicum*). Wykazują one naturalną zdolność do nadprodukcji ryboflawiny na poziomie przekraczającym 10 000 razy ich zapotrzebowanie, co stanowi około 30% całej biomasy.

Synteza ryboflawiny przebiega w warunkach umiarkowanego natlenienia, w temperaturze 26–28°C. Podłoża hodowlane zawierają glukozę, fruktozę lub sacharozę oraz oleje roślinne, aminokwasy, biotynę i inne czynniki wzrostowe. Bioprocjs ma charakter okresowy, trwa 5–6 dni. Bezpośrednim prekursorem ryboflawiny jest GTP – niezbędny w syntezie kwasów nukleinowych. Stąd też w komórkach grzybów zachodzi naturalna regulacja procesów biosyntezy ryboflawiny, nadprodukowanej w fazie stacjonarnej, natomiast wcześniej większość GTP jest kierowana w szlaki syntezy DNA. Znaczna część witaminy B₂ pozostaje wewnątrz komórek, dlatego wysuszona biomasa stanowi cenny dodatek do pasz zwierzęcych.

Biotechnologia hormonów steroidowych

Budowa, biogeneza i biotransformacje sterydów

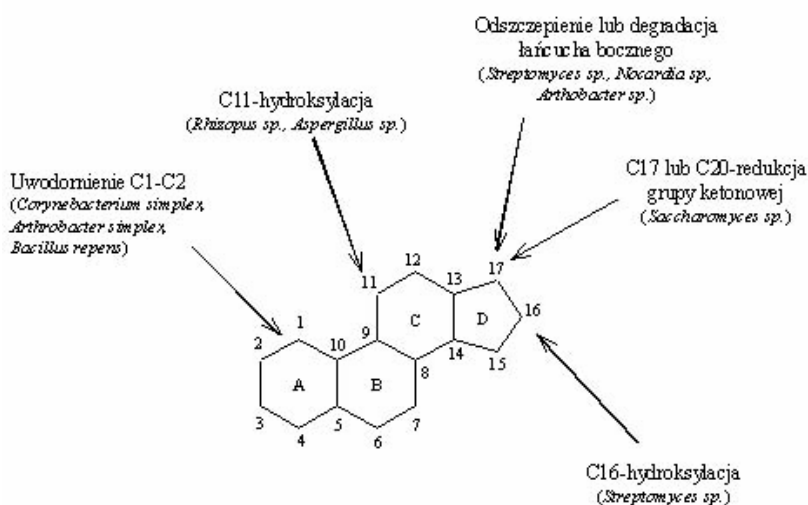
Budowa wszystkich związków steroidowych oparta jest na izoprenie – pięciowęglowym nienasyconym węglowodorze. Do izoprenoidów zalicza się liczne substancje o charakterze metabolitów wtórnych, rozpowszechnione głównie w świecie roślin (składniki olejków eterycznych, terpeny, karotenoidy, kauczuk, saponiny terpenowe). Do związków o budowie steroidowej zaliczamy zarówno metabolity roślin (niektóre saponiny, alkaloidy, fitosterole i glikozydy nasercowe), jak i zwierząt (cholesterol, kwasy żółciowe, witaminę D, hormony kory nadnerczy i gonad). W budowie steroidów zawsze występuje układ steranu, czyli cyklopentanoperhydrofenantrenu. Jest to układ przestrzenny. We wszystkich naturalnych steroidach układ pierścieni w cząsteczce steranu ma charakter trans.

Hormony o budowie steroidowej stanowią ważną gałąź przemysłu biotechnologicznego z uwagi na ich duże znaczenie lecznicze. Pierwotnie wszystkie naturalne sterydy otrzymywano ze źródeł natywnych poprzez ekstrakcję z moczu lub gruczołów dokrewnych produkujących dany hormon. Opracowanie odpowiednich technologii sprawiło, iż większość struktur sterydowych można uzyskać dzięki syntezie chemicznej. Ich otrzymywanie metodą pełnej syntezy chemicznej jest jednak obecnie nieopłacalne z powodu wysokich kosztów. Uzyskanie sterydu na drodze chemicznej jest możliwe, ale bardzo trudne, gdyż związki te wykazują skomplikowaną strukturę przestrzenną, a ich aktywność biologiczna często zależy od wysokiej stereospecyficzności prowadzonych reakcji. Stosuje się mieszaną metodę wykorzystującą zarówno przemiany typu biotransformacji substratów wyjściowych przez wyselekcjonowane szczepy drobnoustrojów, jak i modyfikacje chemiczne otrzymanych produktów (pólproduktów). Ta mieszaną chemiczno-mikrobiologiczną technologią pozwala na ograniczenie liczby koniecznych do przeprowadzenia reakcji. Zdolność do biotransformacji steroidów przez mikroorganizmy jest dość zaskakującym zjawiskiem, gdyż są to dla nich w większości związki o charakterze ksenobiotyków. Obecność układów enzymatycznych zdolnych do przeprowadzania biotransformacji sterydów stanowi prawdopodobnie mechanizm obronny wykorzystujący detoksycację szkodliwych ksenobiotyków.

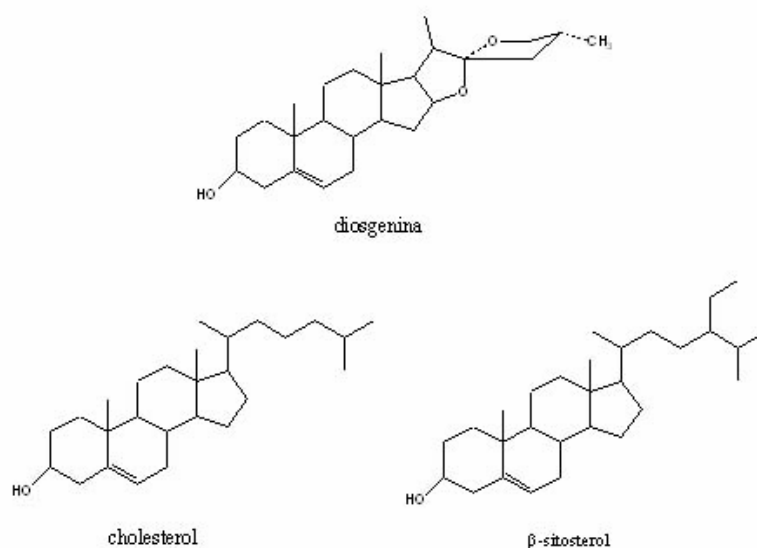
Jako substraty wyjściowe stosuje się w skali przemysłowej kwasy żółciowe (kwas cholowy, kwas deoksycholowy), fitosterole (sitosterole, stigmasterol), cholesterol, alkaloidy steroidowe (solasodyna, tomatodyna), a przede wszystkim diosgeninę – saponinę izolowaną z korzeni rośliny *Dioscorea villosa*. Cholesterol otrzymywany jest najczęściej z wełny owiec. Źródłem fitosteroli są oleje roślinne np. olej sojowy. Wykorzystanie drobnoustrojów w produkcji sterydów opiera się na zastosowaniu reakcji biotransformacji naturalnych

prekursorów przeprowadzanych przy udziale odpowiednich układów enzymatycznych. Zapewnia to możliwość odpowiednich przekształceń cząsteczki nawet w miejscach mało reaktywnych z zachowaniem reguł regio- i stereoselektywności. Praktyczne znaczenie przemysłowe uzyskały zarówno reakcje zachodzące w obrębie pierścienia steranowego, jak i w bocznym łańcuchu (w pozycji C17). Do reakcji tych zalicza się przede wszystkim:

- Hydroksylowanie w pozycjach C11 α , C11 β , C16 α , C17 α , C19 i C21 (*Rhizopus nigricans*, *Aspergillus olivaceus*, *Curvularia lunata*, *Streptomyces fradiae*, *Cunninghamella blakeslesana*, *Trichoderma viridae* i inne).
- Utlenianie grupy hydroksylowej do ketonowej w pozycji C3 (z równoczesną izomeryzacją wiązania nienasyconego). Wykorzystywane szczepy: *Aspergillus sp.*, *Streptomyces sp.* itp.
- Uwodornienie grupy ketonowej w pozycji C17.
- Odwodornienie pierścienia A w pozycji C1-C2 (*Bacillus repens*, *Arthrobacter simplex*, *Mycobacterium flavum*).
- Degradację łańcucha bocznego z wprowadzeniem grupy ketonowej (laktonizacja pierścienia D): ma duże znaczenie w przekształcaniu substratów wyjściowych (cholesterolu lub fitosteroli). Wykorzystywane drobnoustroje: *Nocardia sp.*, *Streptomyces sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Mycobacterium sp.*, *Corynebacterium sp.*



Ryc. 3. Główne kierunki modyfikacji struktury związków steroidowych przez wybrane grupy drobnoustrojów wykorzystywanych w skali przemysłowej.

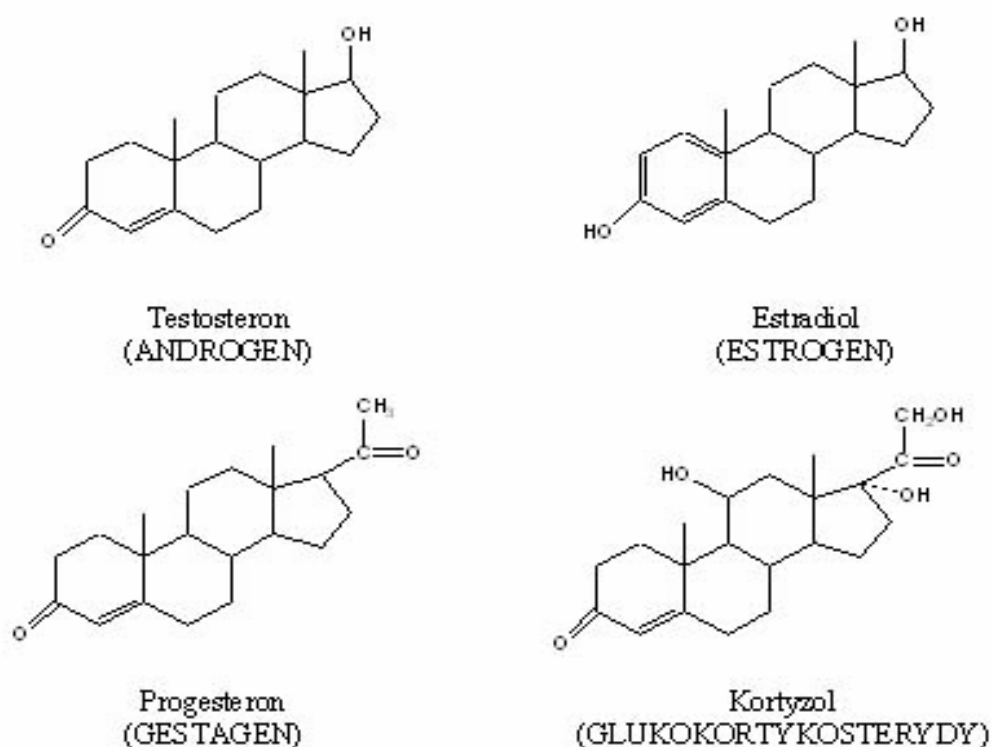


Ryc. 4. Budowa wybranych związków wyjściowych stosowanych w produkcji hormonów sterydowych.

Produkcja glukokortykosterydów

Substrat wyjściowy – zwykle diosgeninę – przekształca się na drodze chemicznej do octanu 16-dehydro-pregnenolonu-3 (za pomocą bezwodnika octowego i kwasu chromowego w obecności AlCl_3). Jest to dwuetapowa reakcja oksydacyjnej degradacji bocznego łańcucha przy pierścieniu D. Kolejnym, także chemicznym etapem transformacji jest utworzenie pregnenolonu poprzez selektywne uwodornienie, a następnie hydrolizę alkaliczną. Pregnenolon ulega przekształceniu w ważny półprodukt procesu – progesteron. Reakcja ta polega na utlenieniu grupy hydroksylowej w pierścieniu A oraz równoczesnej izomeryzacji cząsteczki (wiązanie nienasycone) metodą Oppenauera. Wymaga to zastosowania nadmiaru odczynnika utleniającego (aceton, cykloheksanon) i obecność bezwodnego środowiska. Alternatywnie można dokonać tej przemiany metodą mikrobiologiczną z udziałem szczepów *Aspergillus sp.* lub *Streptomyces sp.* Progesteron jest jednocześnie produktem – żeńskim gestagenem stosowanym w zaburzeniach hormonalnych u kobiet – a także bardzo ważnym półproduktem wykorzystywanym w kolejnych etapach produkcji glukokortykosterydów. Etap kolejny przeprowadza się z wykorzystaniem pleśni chlebowej (*Rhizopus nigricans*); stanowi typową reakcję biotransformacji prowadzącą do powstania 11α -hydroksy-progesteronu. Dalsze etapy prowadzą do otrzymania dwóch podstawowych glukokortykosterydów: kortyzonu i hydrokortyzonu. Polegają na wprowadzeniu grupy hydroksylowej w pozycji $\text{C}17\alpha$ metodą chemiczną bądź mikrobiologiczną (*Trichothecium roseum*). Produkcja glukokortykosterydów może być także prowadzona z innych niż diosgenina substratów (np. fitosteroli), jednak stosowana jest rzadko, z uwagi na konieczność włączenia dodatkowych etapów. Kortyzon i hydrokortyzon są naturalnymi glukokortykosterydami, na bazie których otrzymano cały szereg modyfikowanych pochodnych (glukokortykoidy półsyntetyczne) metodami chemicznymi lub mikrobiologicznymi. Półsyntetyczne glukokortykosterydy mają większą aktywność przeciwzapalną niż hormony naturalne. Ich produkcja opiera się na następujących przekształceniach:

- Odwodornienie w pozycji C1-2: prednizon (encorton), prednizolon (encortolon); metoda chemiczna lub biooksydacja z udziałem *Bacillus repens*, *Arthrobacter simplex* lub *Mycobacterium flavum*.
- Fluorowanie w pozycji C9 α : triamcinolon (Polcortolon) – z udziałem szczepów *Streptomyces roseochromogenes*.
- Fluorowanie w pozycjach C9 α i C6 α : acetonid fluocinolonu (Flucinar).
- Metylacja lub hydroksylacja w pozycji C16 α : deksametazon (Dexapolcort), betametazon.
- 11 β -hydroksylacja (z progesteronu): kortyzol (11-hydrokortyzon) – przekształcenie z udziałem szczepów *Curvularia lunata*.



Ryc. 5. Budowa podstawowych grup hormonów sterydowych na wybranych przykładach.

Produkcja hormonów płciowych

Do hormonów płciowych zalicza się następujące grupy związków o budowie steroidowej: androgeny (męskie hormony płciowe – pochodne androstanu), estrogeny (żeńskie hormony płciowe – pochodne estranu), gestageny (hormony ciała żółtego – pochodne pregnanu). Synteza estrogenów przebiega z androstenolonu (otrzymywanego w wyniku przekształcenia chemicznego fitosteroli). W pierwszej, kilkietapowej fazie syntezy następuje redukcja wiązania pomiędzy 5 a 6 węglem oraz utlenienie grupy hydroksylowej w pozycji C3 i utworzenie dwóch wiązań nienasyconych (C1-2 i C4-5). Następnie związek poddawany jest aromatyzacji pierścienia A z jednoczesnym odszczepieniem grupy metylowej (C10) w temperaturze ok. 600°C. W wyniku przeprowadzonych przemian powstaje

półprodukt – estron – przekształcany w estradiol (redukcja grupy ketonowej w pozycji C17) lub etinyloestradiol (wprowadzenie grupy etylenowej w pozycji C17).

Głównym gestagenem jest progesteron, który stanowi półprodukt w syntezie kortyzonu i hydrokortyzonu, stąd też obecnie otrzymuje się go wyłącznie tą metodą. Wcześniej otrzymywano progesteron oraz estrogeny poprzez izolację z moczu kobiet. Jednak jest to sposób zupełnie nieopłacalny, z uwagi na niską wydajność. Produkcja progesteronu odbywa się obecnie syntetycznie bądź metodą chemiczno-mikrobiologiczną (patrz: produkcja kortyzonu) z wyjściowych surowców – diosgeniny lub fitosteroli.

Męski hormon płciowy, testosteron, pozyskuje się na drodze chemiczno-mikrobiologicznej. Jest to jedna z najstarszych biotechnologii przemysłowych – została opracowana już w 1937 roku (Mamoli i Varcellone). Polega na utlenianiu wyjściowego prekursora – dehydroepiandrosteronu (DHEA) – do androstendionu przez drobnoustroje z rodzaju *Corynebacterium sp.* Następnie przeprowadzana jest redukcja androstendionu do testosteronu z udziałem drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Testosteron można również otrzymywać metodą chemiczną.

PIŚMIENNICTWO

1. *Ajjawi I., Shintani D.*: Engineered plants with elevated vitamin E: a nutraceutical success story. Trends Biotechnol 2004, 22 (3), 104–107.
2. *Arlt W.*: Androgen therapy in women. Eur J Endocrinol 2006, 154 (1), 1–11.
3. *Bibb M.J.*: Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. Curr Opin Microbiol 2005, 8 (2), 208–215.
4. Biotechnologia mikrobiologiczna. Ćwiczenia i pracownie specjalistyczne, praca zbiorowa pod red. J. Długońskiego. Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź 1997.
5. Biotechnologia mikroorganizmów. Wybrane zagadnienia, praca zbiorowa pod red. S. Łabuźek, D. Necklena i J. Radziejewskiej-Lebrecht. Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego, Katowice 2002.
6. Biotechnologia żywności. Praca zbiorowa pod red. W. Bednarskiego i A. Repsa. Wydanie II. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2003.
7. Chemia leków. Praca zbiorowa pod red. A. Zejca i M. Gorzczy. PZWL, Warszawa 1998.
8. *Chmiel A.*: Biotechnologia. Podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne. PWN, Warszawa 1994.
9. *Chmiel A.*: Biotechnologia środków leczniczych. Akademia Medyczna w Łodzi, Łódź 1985.
10. *Dillon J.S.*: Dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone sulfate and related steroids: their role in inflammatory, allergic and immunological disorders. Curr Drug Targets Inflamm Allergy 2005, 4 (3), 377–385.
11. *Druckmann R., Druckmann M.A.*: Progesterone and the immunology of pregnancy. J Steroid Biochem Mol Biol 2005, 97 (5), 389–396.
12. *Engelberger L., Darnton-Hill I., Covne T., Fitzgerald M.H., Marks G.C.*: Carotenoidrich bananas: a potential food source for alleviating vitamin A deficiency. Food Nutr Bull 2003, 24 (4), 303–318.
13. *Herbers K.*: Vitamin production in transgenic plants. J Plant Physiol 2003, 160 (7), 821–829.
14. *Keliang G., Dongzhi W.*: Asymmetric oxidation by *Gluconobacter oxydans*. Appl Microbiol Biotechnol 2006, 70 (2), 135–139.
15. *Roman R.V., Iluc E., Mustea A., Neacsu A., Asandului V.*: Optimization of medium components in vitamin B12 biosynthesis. Roum Biotechnol Lett 2001, 4, 343–350.
16. *Valentin H.E., Qi Q.G.*: Biotechnological production and application of vitamin E: current state and prospects. Appl Microbiol Biotechnol 2005, 68 (4), 436–444.
17. Wybrane zagadnienia z metod poszukiwania i otrzymywania środków leczniczych. Praca zbiorowa pod red. K. Kieć-Kononowicz; Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2000.

9. Biotechnologia antybiotyków

Daniel Sypniewski

Biotechnologia antybiotyków stanowi największy dział współczesnego przemysłu biotechnologicznego i jedną z najważniejszych gałęzi przemysłu farmaceutycznego. Antybiotyki znalazły zastosowanie w medycynie i weterynarii jako leki przeznaczone do zwalczania infekcji bakteryjnych, w rolnictwie jako dodatki do pasz lub środki ochrony roślin oraz w przemyśle spożywczym jako dodatki o charakterze konserwantów żywności. Roczna produkcja antybiotyków do celów leczniczych wynosi około 25 000 ton (w większości są to penicyliny i cefalosporyny). Zapotrzebowanie na antybiotyki do celów niemedycznych sięga natomiast 40 000 ton rocznie (25 000 ton w ochronie upraw roślinnych, 10 000 ton jako konserwanty żywności i 5000 ton jako dodatki do pasz dla zwierząt).

Zjawisko antybiozy zostało opisane w 1928 r przez Aleksandra Fleminga w hodowli gronkowców zainfekowanych pleśnią *Penicillium notatum*, choć znane było znacznie wcześniej. Obecna definicja antybiotyków określa je jako związki naturalne wydzielane przez dane szczepy mikroorganizmów, ich półsyntetyczne pochodne bądź syntetyczne analogi, które działając wybiórczo, w niewielkich stężeniach, na wybrane procesy lub struktury innego mikroorganizmu powodują jego śmierć lub zahamowanie namnażania.

Substancje o charakterze antybiotyków produkowane są nie tylko przez drobnoustroje, lecz także przez rośliny, a nawet niektóre gatunki zwierząt. W przyrodzie zidentyfikowano ponad 7000 naturalnych metabolitów o charakterze antybiotyków. Około 2/3 znanych antybiotyków to metabolity promieniowców (najczęściej z rodzaju *Streptomyces sp.*), w tym aż 90% stosowanych w lecznictwie. Wiele antybiotyków naturalnych używanych obecnie w medycynie to metabolity grzybów, natomiast najrzadziej stosowane są te pochodzące od bakterii właściwych (gł. *Bacillus sp.*).

Antybiotyki charakteryzują się bardzo różnorodnymi punktami uchwytu w komórkach. W klasyfikacji opartej na mechanizmach działania wyróżnia się następujące ich grupy:

- antybiotyki hamujące syntezę ściany komórkowej (penicyliny i cefalosporyny);
- antybiotyki uszkodzające błonę komórkową (antybiotyki polienowe);
- antybiotyki hamujące syntezę kwasów nukleinowych (np. mitomycyna, daktynomycyna);
- antybiotyki hamujące syntezę białek (tetracykliny, aminoglikozydy, chloramfenikol);
- antybiotyki wpływające na procesy bioenergetyczne (gramicydyny, oligomycyna).

Ogólny schemat produkcji antybiotyków naturalnych składa się z następujących etapów:

1. Przygotowanie inokulum. Zaszczep hodowlany czystego szczepu przemysłowego prowadzony jest początkowo na niewielką skalę – namnożenie czystej kolonii w kolbach hodowlanych (0,25–2 l) w optymalnej dla wzrostu danego drobnoustroju temperaturze w warunkach wytrząsania. Czas prowadzenia hodowli zależy od szybkości wzrostu kolonii (zwykle wynosi 1–2 doby). Następnie powiększa się stopniowo skalę procesu na-

- mnażania szczepu, przenosząc zaszczep do bioreaktora o niewielkiej pojemności (kilkanaście litrów).
2. Przygotowanie podłoża hodowlanego i materiału posiewowego do bioreaktora. Przygotowane inokulum przenoszone jest w jałowych warunkach do bioreaktora produkcyjnego o odpowiedniej pojemności (do kilkudziesięciu tysięcy litrów) zawierającego przygotowane jałowe podłoże produkcyjne o zoptymalizowanym składzie. Podłoże zawiera zarówno odpowiednie składniki o charakterze odżywczym (źródła węgla, azotu), jak i prekursorzy stosowane w danym bioprociesie oraz substancje buforujące, witaminy i sole mineralne. Należy zapewnić również dodatek substancji zapobiegających powstawaniu piany w czasie prowadzenia procesu biotechnologicznego.
 3. Przeprowadzenie bioprociesu. Proces biotechnologiczny (fermentacja) w przypadku produkcji antybiotyków przebiega zwykle okresowo, w czasie kilku dni. Produkcja antybiotyku zachodzi w idiofazie. Proces zostaje przerwany w optymalnym momencie, kiedy następuje maksymalne nagromadzenie antybiotyku w płynie hodowlanym.
 4. Izolacja antybiotyku z hodowli. Bezpośrednio po zakończeniu fermentacji biomasę odziera się przez filtrowanie od podłoża hodowlanego. Wydzielenie antybiotyku z podłoża może być przeprowadzone różnymi metodami fizykochemicznymi: adsorpcja na kolumnach chromatograficznych (na węglu aktywnym, tlenku glinu, chromatografia jonowymienna), ekstrakcja rozpuszczalnikami organicznymi, precypitacja (np. w postaci soli wapniowych).
 5. Oczyszczenie antybiotyku. Najczęściej stosuje się w skali przemysłowej oczyszczanie poprzez krystalizację produktu.
 6. Przygotowanie odpowiedniej postaci leku. Jest ona ściśle związana ze stabilnością antybiotyku w określonych warunkach. Większość antybiotyków ma postać zwykłych lub powlekanych tabletek, ze względu na największą stabilność tej postaci leku. Większy problem stanowi przygotowanie zawiesin antybiotyków, gdyż wiele z nich jest nietrwałych w postaci roztworów (zwłaszcza w pewnych przedziałach pH) lub nie tworzy dobrze rozpuszczalnych w wodzie związków. W takim przypadku mogą być przygotowane w postaci suchej zawiesiny, którą chory rozpuszcza w odpowiedniej objętości wody bezpośrednio przed użyciem. Antybiotyki w postaci iniekcji muszą odpowiadać wszystkim kryteriom stawianym tej formie (przede wszystkim jałowość i apirogenność) oraz zapewniać maksymalną trwałość leku w postaci roztworu. Alternatywna strategia polega na sporządzaniu suchego proszku z dołączonym gotowym rozpuszczalnikiem do przygotowania bezpośrednio przed użyciem.

Antybiotyki β -laktamowe

Biogeneza penicylin i cefalosporyn

Biosynteza penicylin i cefalosporyn, a także innych β -laktamów przebiega według podobnego szlaku ogólnego. Jest on wspólny dla wszystkich drobnoustrojów mających zdolność syntezy tych antybiotyków.

Zdolność do biosyntezy antybiotyków β -laktamowych wykazują przede wszystkim grzyby pleśniowe (*Aspergillus sp.*, *Cephalosporium sp.*, *Penicillium sp.*) i one też znalazły głównie zastosowanie w biotechnologii tych leków, jednak również niektóre bakterie i promieniowce są zdolne do wytwarzania β -laktamów, np. nokardycyny (grupa odkryta w 1976 r.), będące metabolitami promieniowców z rodzaju *Nocardia sp.* Bezpośrednimi prekursorami penicylin i cefalosporyn są aminokwasy: L-cysteina, L-walina, kwas L-aminoadypinowy.

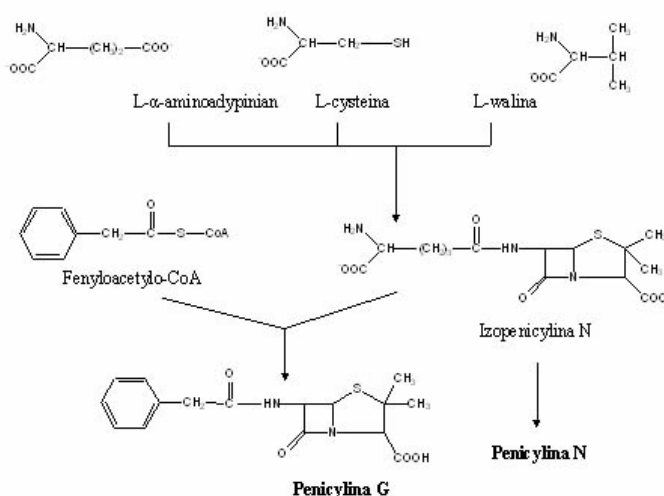
Kwas L-aminoadypinowy wywodzi się bądź z lizyny (u promieniowców), bądź też jest intermediatem w szlaku biosyntezy lizyny – u grzybów. Początkowy etap powstawania penicylin i cefalosporyn stanowi kondensacja aminokwasów do tripeptydu AA-Cys-Val, a następnie cyklizacja układu, w wyniku czego powstaje charakterystyczne ugrupowanie β -laktamowe. Produktem pośrednim tych przemian jest izopenicylina N będąca prekursorem wszystkich penicylin i cefalosporyn. Dalsze przemiany izopenicyliny N zależą od szczepu drobnoustroju. Może ona ulec przekształceniu do naturalnej penicyliny G lub może wejść w szlak syntezy cefalosporyn poprzez izomeryzację w penicylinę N, a następnie przekształcenie w deacetoksycefalosporynę C i dalej utlenianie do deacetylocefalosporyny C. Ostatni z metabolitów ulega u *Cephalosporium* acetylacji z wytworzeniem naturalnej cefalosporyny C. Deacetylosporyna C jest także prekursorem β -laktamów z grupy cefamycyn (u promieniowców).

Ważne z biotechnologicznego punktu widzenia aspekty regulacji biosyntezy antybiotyków β -laktamowych są tylko częściowo wyjaśnione. Niemniej jednak znajomość podstawowych mechanizmów represji biosyntezy tych metabolitów jest na tyle duża, iż przed kilkudziesięcioma laty doskonale opracowano otrzymywanie naturalnych penicylin i cefalosporyn na skalę przemysłową.

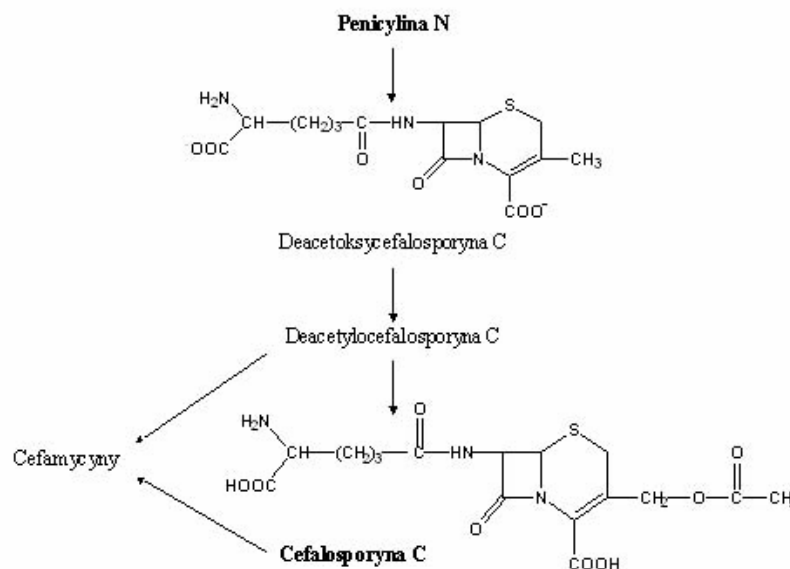
Biosynteza penicyliny benzylowej przez *Penicillium chrysogenum* należy do najwydajniejszych biotechnologii stosowanych w przemyśle. Podstawowym czynnikiem wywołującym represję enzymu(ów) biosyntezy penicylin i cefalosporyn jest nadmiar glukozy bądź fruktozy w podłożu. Dobrze znane są mechanizmy represji w szlakach biosyntezy prekursorów β -laktamów, czyli aminokwasów.

Nadmiar lizyny bądź waliny wywołuje represję biosyntezy tych antybiotyków zarówno bezpośrednio, jak i pośrednio poprzez hamowanie syntezy własnej aminokwasów. Istnieje ponadto mechanizm indukowania i derepresji biosyntezy cefalosporyn w obecności metioniny. Wynika to prawdopodobnie ze zwiększenia ilości metioniny oraz waliny, lizyny i aminoadypinianu w komórkach drobnoustrojów (mechanizm ten dotyczy *Cephalosporium acremonium*).

Oczywiście, występuje także naturalny mechanizm sprzężenia zwrotnego polegający na hamowaniu biosyntezy penicylin przez sam produkt końcowy przemian.



Ryc. 6. Biogeneza antybiotyków β -laktamowych (część I).

Ryc. 7. Biogeneza antybiotyków β -laktamowych (część II).

Mechanizm działania antybiotyków β -laktamowych

Antybiotyki β -laktamowe wykazują działanie bakteriobójcze, które wiąże się z zaburzeniem syntezy ściany komórkowej bakterii. Na pierwszym etapie działania antybiotyk przenika do komórki bakteryjnej, wiążąc się ze swoistymi białkami, tzw. PBP_s (*penicillin-binding proteins*), stanowiącymi receptory dla tych leków. Następnie zachodzi właściwy etap hamowania syntezy składników ściany komórkowej poprzez zablokowanie enzymu transpeptydazy katalizującego odłączanie D-alaniny od pentapeptydu – procesu warunkującego krzyżowe łączenie łańcuchów peptydoglikanu. Upośledzenie funkcjonowania ściany komórkowej zaburza homeostazę w komórce bakterii, prowadząc do uaktywnienia enzymów autolitycznych, a tym samym do lizy komórki. Tak wybiórczy mechanizm działania antybakteryjnego powoduje, że antybiotyki β -laktamowe są stosunkowo mało toksyczne i dobrze tolerowane przez makroorganizm. Wpływ na różne grupy bakterii przez te antybiotyki jest dość szeroki – działają zarówno na bakterie Gram(+), jak i Gram(-), przy czym spektrum działania antybakteryjnego ma zróżnicowany charakter.

Produkcja naturalnej penicyliny

Naturalne penicyliny są grupą złożoną z około dziesięciu związków. Zdolność do ich produkcji jest dość szeroko rozpowszechniona w świecie drobnoustrojów z różnych grup – posiadają ją przede wszystkim metabolity grzybów (*Aspergillus sp.*, *Cephalosporium sp.*, *Penicillium sp.*) oraz promieniowców. Znaczenie lecznicze posiadają praktycznie tylko penicylina benzylowa (penicylina G) oraz jej bezpośrednia modyfikacja – penicylina fenoksymetylowa (penicylina V), otrzymywane z hodowli *Penicillium chrysogenum*. W wyniku produkcji powstaje zawsze mieszanina kilku różnych penicylin naturalnych, stąd stosowane są odpowiednie prekursory reszty benzylowej (fenylooctan lub fenyloalanina) w przypadku uzyskiwania penicyliny G. Penicylina V nie powstaje natomiast w ogóle w normalnych warunkach hodowli – w celu jej otrzymania należy zastosować odpowiedni prekur-

sor. Naturalną penicylinę benzyłową otrzymuje się w wyniku prowadzenia hodowli okresowej w typowych bioreaktorach produkcyjnych. Inokulum przygotowywane jest na podłożu wzbogaconym w cukry (glukoza lub sacharoza) i źródła azotu (np. azotan amonu), co zapewnia szybki przyrost biomasy. Inokulum wzrasta z liofilizowanych zarodników. Podłoże produkcyjne ma optymalny skład do zapewnienia obfitego wzrostu grzybni w pierwszej fazie bioprodukcji, a następnie wydajnej syntezy penicyliny w idiofazie (odpowiedni stosunek glukozy do laktozy). W tym celu można także stosować stałe dozowanie glukozy lub sacharozy, aby uniknąć represji katabolicznej. Jako prekursor reszty benzyłowej w benzylopenicylinie stosowany jest zwykle fenylloctan sodu. Faza logarytmicznego wzrostu kolonii trwa około 1–2 doby.

Następnie rozpoczyna się proces biosyntezy penicyliny przez grzybnię – w tym czasie obniżona zostaje nieznacznie temperatura w bioreaktorze do około 24–25°C. Konieczne jest także intensywne napowietrzanie. Druga faza bioprodukcji rozpoczyna się po wyczerpaniu łatwo przyswajalnej puli węgla, głównie glukozy. Następuje wtedy pełna derepresja enzymów szlaku biosyntezy penicylin. Jako źródło węgla zaczyna być wykorzystywana laktoza. W przypadku stałego dozowania glukozy do bioreaktora, następuje obniżenie się jej stężenia do minimum, dzięki czemu znacznie wydłuża się czas trwania idiofazy i tym samym ilość wyprodukowanej penicyliny. Na ostatnim etapie dochodzi do wyczerpania składników pokarmowych i nagromadzenia produktu biosyntezy, co indukuje autolizę grzybni i zakończenie hodowli. Całą hodowlę prowadzi się przez 7–8 dni. Ważnym czynnikiem decydującym o wydajności bioprodukcji jest moment przzerwania hodowli, gdyż benzylopenicylina jest bardzo niestabilna w środowisku wodnym i równocześnie z jej syntezą ulega łatwo hydrolizie, zwłaszcza w środowisku alkalicznym, charakteryzującym hodowlę w fazie zamierania. Benzylopenicylinę w formie wolnego kwasu izoluje się z medium hodowlanego za pomocą ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi. Jako preparat stosuje się sole sodowe lub potasowe benzylopenicyliny (penicylina krystaliczna), a także formy łatwiej rozpuszczalne – np. sól prokainową.

Ogólna wydajność produkcji penicyliny zależy w dużym stopniu od zastosowanego szczepu – wykorzystywane na skalę przemysłową szczepy są zwykle mutagenizowane – i może wynosić około 30 g produktu z 1 litra podłoża.

Produkcja penicylin półsyntetycznych

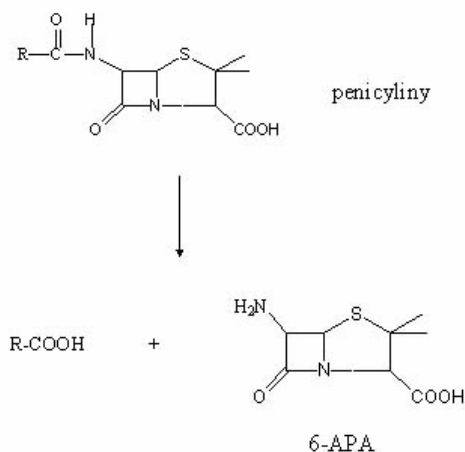
Cechą wyróżniającą produkcję modyfikowanych (półsyntetycznych) penicylin, w porównaniu z modyfikowanymi antybiotykami z innych grup, jest wykorzystanie w tym celu głównie technologii biochemicznych zamiast typowo chemicznych przekształceń, podobnie jak w przypadku otrzymywania półsyntetycznych cefalosporyn. Półproduktem stosowanym do uzyskania penicylin półsyntetycznych jest kwas 6-aminopenicylanowy (6-APA). Prekursor ten można otrzymywać bądź bezpośrednio z odpowiednich szczepów *Penicillium chrysogenum*, bądź poprzez hydrolizę wiązania amidowego w naturalnej penicylinie metodą chemiczną lub enzymatyczną. Najbardziej opłacalna jest metoda hydrolizy enzymatycznej uwarunkowana obecnością enzymu acylazy (amidaza) penicylinowej (syn. amidohydrolaza penicylinowa). Jest to enzym dość szeroko rozpowszechniony wśród drobnoustrojów saprofitycznych, gdyż stanowi podstawowy element warunkujący oporność na penicyliny naturalne. Istnieją trzy izoformy tego enzymu: acylaza penicyliny G (izolowana głównie z *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, *Proteus rettgeri*, *Pseudomonas melanogenes* oraz

drożdży *Kluyvera citrophila*), acylaza penicyliny V (izolowana z grzybów strzępkowych *Bovista plumbea*, *Fusarium sp.* i promieniowców *Actinoplanes sp.*, *Streptomyces lavandulae*) oraz acylaza ampicylinowa. Po raz pierwszy zastosowano acylazę wyizolowaną z szczepów *Bacillus sp.*, jednak obecnie stosuje się zwykle acylazę z *Escherichia coli*. Jest to enzym wewnątrzkomórkowy, stąd można stosować ekstrakty komórkowe lub całe komórki, zamiast konieczności izolowania enzymu. Zwykle stosuje się immobilizację komórek bądź enzymu. Proces hydrolizy penicyliny przeprowadza się w bioreaktorze, stosując formę soli (sodowej lub potasowej) penicyliny G. Hydroliza trwa 4–5 godzin w temperaturze 37–40°C, w środowisku słabo alkalicznym. 6-APA wydziela się z mieszaniny reakcyjnej w postaci siarczanu, zakwaszając środowisko kwasem siarkowym, a następnie poddaje się oczyszczeniu poprzez krystalizację.

Otrzymanie w latach pięćdziesiątych XX wieku przez Anglików (G.N. Rolison i F.R. Batchelor) kwasu 6-aminopenicylanowego w wyniku hydrolizy penicyliny G stało się fundamentalnym osiągnięciem w biotechnologii penicylin i przyczyniło się do ogromnego sukcesu tej grupy antybiotyków w medycynie. Zastosowanie 6-APA jako prekursora w biosyntezie penicylin półsyntetycznych spowodowało uzyskanie wielu tysięcy nowych pochodnych, z których ostateczne badania kliniczne przeszło korzystnie około 30 z nich. Obecnie, wraz z półsyntetycznymi cefalosporynami, są antybiotykami produkowanymi w największej liczbie i najczęściej stosowanymi w różnych typach infekcji bakteryjnych. Opracowanie nowych pochodnych penicylin wiązało się głównie z poszerzeniem ich zakresu działania o nowe szczepy oraz z polepszeniem ich parametrów biofarmaceutycznych – przede wszystkim zwiększenie oporności na β -laktamazy i niskie pH. Pierwszą wprowadzoną na rynek i stosowaną także obecnie półsyntetyczną penicyliną była penicylina V (fenoksymetylopenicylina) otrzymywana w wyniku biosyntezy z użyciem kwasu fenoksyoctowego jako prekursora (1948 r.). W porównaniu z penicyliną G jest ona znacznie trwalsza w kwaśnym środowisku i dobrze wchłania się z przewodu pokarmowego, dzięki czemu można ją podawać doustnie. Uzyskanie tysięcy innych pochodnych pozwoliło w końcu na opracowanie biotechnologii otrzymywania 6-APA. Głównym kierunkiem modyfikacji struktury tego prekursora jest acylacja z użyciem kwasów karboksylowych, chlorków lub bezwodników kwasowych. Pierwszymi penicylinami otrzymanymi za pomocą takiej technologii były metycylina (1960 r.) – obecnie niestosowana w lecznictwie – oksacylina i kloksacylina (1961 r.). W 1962 roku wprowadzono do lecznictwa bardzo ważną penicylinę stosowaną także obecnie na bardzo dużą skalę jako jeden z podstawowych antybiotyków podawanych w infekcjach bakteryjnych. Jest nią ampicylina, która wykazuje wprawdzie wrażliwość na penicylinazy, ale ma szeroki zakres działania antybakteryjnego i jest oporna na niskie pH. Jeszcze częściej stosowana (zwłaszcza w infekcjach górnych i dolnych dróg oddechowych) jest pochodna tego antybiotyku – amoksycylina – wprowadzona na rynek w 1972 roku. Ma ona silniejsze w porównaniu z ampicyliną działanie i lepiej wchłania się z przewodu pokarmowego. Stosowana jest w preparatach jednoskładnikowych lub w połączeniu z inhibitorem β -laktamaz – kwasem klawulanowym – co dodatkowo wydłuża jej działanie.

Penicyliny często łączone są w preparatach z inhibitorami β -laktamaz. Pierwszym związkiem o właściwościach hamujących rozkład penicylin przez te enzymy był kwas klawulanowy odkryty w 1975 roku w hodowli *Streptomyces clavuligerus*. Kwas klawulanowy ma niewielkie właściwości antybiotyczne, jednak jego znaczenie jako inhibitora β -laktamaz zostało szybko docenione i doprowadziło do odkrycia kolejnych związków o podobnych

właściwościach (sulbaktam, tazobaktam, tienamycyna). Ta ostatnia jest metabolitem *Streptomyces cattleya* charakteryzującym się nie tylko właściwościami inhibitorowymi wobec β -laktamaz, ale także niezależnie dość dużą aktywnością bakteriobójczą.



Ryc. 8. Produkcja kwasu 6-aminopenicylanowego.

Tabela IV. Preparaty najważniejszych penicylin naturalnych i modyfikowanych zarejestrowane w Polsce

Skład (substancja czynna)	Nazwa preparatu	Dostępne dawki i postacie leku
Sól potasowa fenoksymetylopenicyliny	Ospen	tabletki doustne (0,5 mln jm., 1 mln jm.; 1,5 mln jm.) zawiesina doustna (0,4 mln jm./5 ml; 0,75 mln jm./5 ml)
Benzylopenicylina	Penicillin G, Penicillinum crystallisatum	ampułki do iniekcji
Benzylopenicylina prokainowa	Penicillinum procainicum	ampułki do iniekcji
Benzylopenicylina benzatynowa	Debecylina	ampułki do iniekcji
Ampicylina	Ampicillin	ampułki do iniekcji dożylnych (250 mg, 500 mg, 1 g)
Amoksycylina	Amotaks, Amotaks Dis, Apo-Amoxi, Duomox, Novamox, Hiconcil, Ospamox	tabletki doustne (250 mg, 500 mg, 1000 mg);
Amoksycylina + kwas klawulanowy	Amoksiklav, Augmentin, Curam, Forcid, Ramoclav, Taromentin	tabletki doustne (875 mg amoksyliny + 125 mg kwasu klawulanowego; 500 mg amoksyliny + 125 mg kwasu klawulanowego; 250 mg amoksyliny + 125 mg kwasu klawulanowego). proszek do sporz. zawiesiny doustnej (125 mg amoksyliny + 31,24 mg kwasu klawulanowego/5 ml; 250 mg amoksyliny i 62,5 mg kwasu klawulanowego/5 ml)
Kloksacylina	Syntarpen	tabletki doustne (500 mg); fiołki do wstrzyknięć (500 mg, 1 g)

Produkcja cefalosporyny C

Naturalna cefalosporyna C jest produkowana przez szczepy *Cephalosporium acremonium* (syn. *Acremonium chrysogenum*). Warunki technologiczne jej biosyntezy są bardzo zbliżone do produkcji penicyliny. Bioprocess przebiega w warunkach tlenowych w temperaturze około 25°C w czasie 4–5 dób i ma charakter dwufazowy: intensywne namnażanie grzybni przez pierwsze 2–3 doby, a następnie biosynteza cefalosporyny w idiofazie. Szczepy *Cephalosporium acremonium* cechują się charakterystycznymi zmianami morfologii grzybni, co ułatwia monitorowanie bioprocessu. Zaszczep produkcyjny stanowią hodowle o nitkowatej grzybni, które na początkowym etapie ulegają intensywnemu wzrostowi i namnażaniu. Wyczerpywanie się glukozy w podłożu produkcyjnym, a także obecność metioniny stymulują fragmentację strzępek grzybni prowadzącą do wytworzenia jednokomórkowych artrospor. Jest to etap najintensywniejszej biosyntezy cefalosporyny C. Bioprodukt izoluje się z podłoża za pomocą chromatografii jonowymiennej, a następnie poddaje oczyszczaniu poprzez krystalizację. Gotowe preparaty stanowią łatwo rozpuszczalną w wodzie postać soli sodowej cefalosporyny C.

Cefalosporyny półsyntetyczne

Naturalna cefalosporyna C ma zbyt niską aktywność antybakteryjną, aby znaleźć jakiegokolwiek szersze zastosowanie w leczeniu. Przełomem w opracowaniu biotechnologii pozyskiwania modyfikowanych cefalosporyn było otrzymanie produktu hydrolizy cefalosporyny C przez enzym acylazę cefalosporynową (wyizolowanego ze szczepów *Bacillus sp.*) do kwasu 7-aminocefalosporynanowego (7-ACA). Zastosowanie 7-ACA jako prekursora umożliwiło syntezę ponad 30 000 pochodnych, z których do leczenia wprowadzono około 30. Ważne było także określenie zależności pomiędzy miejscem modyfikacji cząsteczki i wprowadzenia nowego podstawnika, a zakresem czy też siłą działania lub zmianą właściwości biofarmaceutycznych. Innymi ważnymi prekursorami stosowanymi do otrzymywania półsyntetycznych cefalosporyn są także kwas 7-amino-3-deacetoksycefalosporynowy (7-ADC), otrzymywany z penicylin poprzez chemiczną hydrolizę lub transformację chemiczno-enzymatyczną, oraz cefamycyna C będąca analogiem cefalosporyn. Stosowane obecnie cefalosporyny półsyntetyczne należą do najczęściej, wraz z półsyntetycznymi penicylinami, podawanych w medycynie antybiotyków. W zależności od czasu pojawienia się na rynku można wyróżnić cefalosporyny I generacji (np. cefaleksyna, cefradyna, a zwłaszcza cefaklor) wprowadzone już w latach sześćdziesiątych XX wieku, cefalosporyny II generacji (głównie cefamandol i cefuroksym oraz cefprozyl), cefalosporyny III generacji (np. cefotaksym, ceftriakson) zastosowane w latach siedemdziesiątych oraz cefalosporyny IV generacji (np. cefpirom, cefepim) wprowadzone w latach dziewięćdziesiątych XX wieku.

Tabela V. Preparaty najważniejszych cefalosporyn półsyntetycznych zarejestrowane w Polsce

Skład (substancja czynna)	Nazwa preparatu	Dostępne dawki i postacie leku
Cefuroksym	Biodroxil, Bioracef, Xorimax, Novocef, Zinnat Plixym, Biofuroksym, Zinacef	tabletki doustne (125 mg, 250 mg, 500 mg, 1000 mg); zawiesina doustna (125 i 250 mg/ml) iniekcje (250 mg, 500 mg, 750 mg i 1500 mg)
Cefaclor	Ceclor, Ceclor MR, Vercef, Vercef MR	tabletki doustne (500 mg, 375 mg)
Cefadroxil	Duracef, Biodroxil	tabletki doustne (250 mg, 500 mg, 1000 mg); zawiesina doustna (125 mg/5 ml; 250 mg/5 ml; 500 mg/5 ml)
Cefaleksyna	Keflex, Cefaleksyna	tabletki doustne (250 mg, 500 mg); zawiesina doustna (250 mg/5 ml)
Cefprozyl	Cefzil	tabletki doustne (250 mg, 500 mg); zawiesina doustna (125 mg/5 ml; 250 mg/5 ml)
Cefradyna	Sefril	kapsułki doustne (500 mg); zawiesina doustna (250 mg/5 ml)
Ceftriakson	Biotrakson	iniekcje (0,25; 0,5; 1 i 2 g)

Antybiotyki aminoglikozydowe

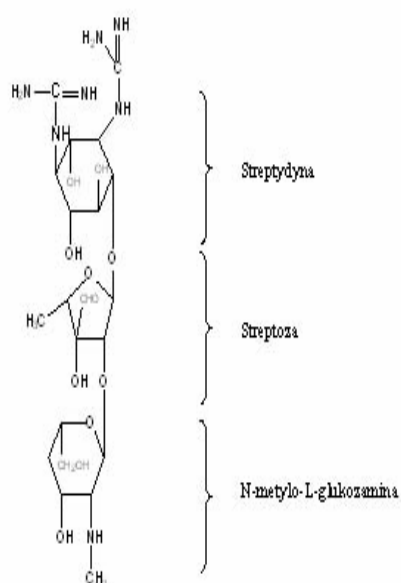
Budowa chemiczna, mechanizm działania i biogeneza

Antybiotyki aminoglikozydowe zbudowane są z części cukrowej, którą stanowi zazwyczaj cząsteczka aminocukru, oraz z aglikonu o budowie cyklicznej. Są zatem zaliczane do bardzo szerokiej grupy metabolitów o budowie glikozydowej. Aglikonem jest zwykle reszta aminocyklitolowa. Najczęściej spotykane struktury zawierają w cząsteczce streptydynę (grupa streptomycyny), dezokystreptaminę (grupa neomycyny) lub dezokystreptaminę z dodatkowymi podstawnikami (grupa kanamycyny).

Mechanizm działania antybiotyków aminoglikozydowych polega na hamowaniu syntezy białek poprzez nieodwracalne wiązanie się z podjednostką mniejszą (30 S) rybosomów bakteryjnych. Wykazują przez to silne działanie bakteriobójcze wobec wielu bakterii chorobotwórczych, włączając prątki gruźlicy (streptomycyna). Niestety, cechują się także wysoką toksycznością, zwłaszcza działaniem ototoksycznym i nefrotoksycznym, dodatkowo nasilanym koniecznością stosowania tych antybiotyków w dużych dawkach ze względu na ich utrudnione przenikanie przez błony biologiczne. Wadą antybiotyków aminoglikozydowych jest także łatwo powstająca oporność – wynika to z ich budowy chemicznej z licznymi miejscami podatnymi na degradację. Największe znaczenie w medycynie zyskały następujące antybiotyki aminoglikozydowe: streptomycyna (produkowana przez *Streptomyces griseus*) – pierwszy antybiotyk z tej grupy odkryty przez A.S. Waksmana i współpracowników w roku 1944, neomycyna (*S. fradiae*) odkryta w 1949 r., gentamycyna (*Micromonospora purpurea*) odkryta w 1963 r., kanamycyna (*S. kanamyceticus*) odkryta w 1957 r., tobramycyna (*S. tenebrarius*) odkryta w 1968 r. oraz sisomycyna (*M. inyoensis*) odkryta

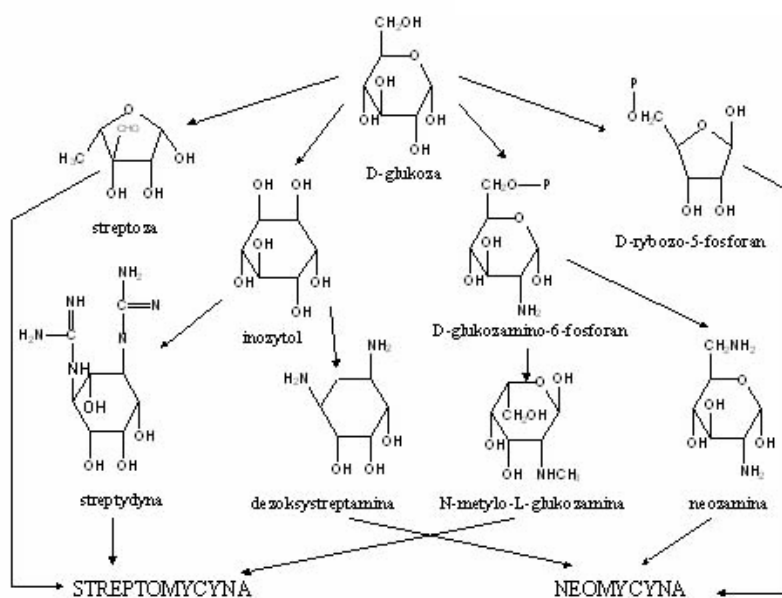
w 1970 r. Aminoglikozydem półsyntetycznym jest popularna amikacyna otrzymana w 1972 roku (pochodna kanamycyny).

Antybiotyki aminoglikozydowe są syntetyzowane przez szczepy promieniowców z rodzaju *Streptomyces sp.* i *Micromonospora sp.* Cechą niekorzystną z punktu widzenia biotechnologii jest wytwarzanie przez wymienione szczepy wieloskładnikowych kompleksów antybiotyków aminoglikozydowych o różnej aktywności biologicznej, co utrudnia otrzymywanie czystych związków. Prekursorem wszystkich składowych cząsteczek aminoglikozydów jest glukoza. Źródło grup aminowych stanowi alanina bądź glutamina. Grupa amidynowa w reszcie streptydyny pochodzi z arginy. Prekursorem części aminocukrowej jest mioinozytol.



Ryc. 9. Budowa antybiotyków aminoglikozydowych na przykładzie streptomycyny.

STREPTOMYCINA



Ryc. 10. Zarys biogenezy antybiotyków aminoglikozydowych.

Produkcja antybiotyków aminoglikozydowych

Ogólna wydajność biosyntezy antybiotyków aminoglikozydowych przez stosowane szczepy przemysłowe nie jest zbyt wysoka (np. produkcja streptomycyny osiąga najwyższą wydajność kilkunastu gramów na litr hodowli). Fermentacja przebiega według typowego dla antybiotyków schematu, gdzie faza produkcyjna przypada na idiofazę. W czasie trofofazy aktywność wszystkich enzymów szlaku biosyntezy tych antybiotyków ulega silnej represji. U szczepów *Streptomyces griseus* odkryto czynnik (tzw. faktor A) odpowiedzialny za regulację wytwarzania streptomycyny oraz przekierowanie całego metabolizmu komórki z fazy wzrostu do fazy sporulacji, w której następuje zużycie prawie całej glukozy do syntezy streptomycyny. Podłoża produkcyjne stosowane w bioreaktorach zawierają glukozę lub inne cukry (poza sacharozą), mąkę sojową, wywar gorzelniany, sole mineralne. Proces produkcji streptomycyny przebiega w pH=6, przy intensywnym natlenianiu i temperaturze około 27–29°C. Konieczne jest także zapewnienie niedoboru fosforanów, co eliminuje powstawanie produktu ubocznego – fosforanu streptomycyny. Streptomycynę izoluje się, a następnie oczyszcza metodą chromatografii kolumnowej lub metodami strącaniowymi (np. acetonem, etanolem, metanolem). Znaczna część antybiotyku pozostaje wewnątrz komórek, dlatego doprowadza się do ich dezintegracji w celu zwiększenia wydajności produkcji. Biomasa (grzybnia) po wysuszeniu nadaje się do wykorzystania jako dodatek do pasz – zawiera znaczne ilości witaminy B₁₂ i białka.

Produkcję neomycyny przeprowadza się na podłożach kompleksowych z dodatkiem węgla wapnia. Antybiotyk ten otrzymywany w wyniku naturalnego bioprocessu jest mieszaniną związków o różnej aktywności biologicznej – przeważa neomycyna B, najbardziej aktywna. Znaczna jej część pozostaje w komórkach, dlatego też dokonuje się mechanicznej dezintegracji ściany komórkowej, ułatwiając uwolnienie antybiotyku. Izolację i oczyszczanie przeprowadza się za pomocą chromatografii jonowymiennej. W przypadku kanamycyny stosowane jest podłoże skrobiowe lub sacharozowe oraz dodatek wodorofosforanu potasu i jonów magnezu. Izolacja i oczyszczanie produktu dokonywane są poprzez chromatografię jonowymienną, ewentualnie poprzez strącanie etanolem w środowisku alkalicznym. Izoluje się głównie kanamycynę A, mniej toksyczną od formy B.

Gentamycynę otrzymuje się ze szczepów *Micromonospora purpurea*, choć zdolność do jej biosyntezy mają także inne gatunki z tego rodzaju. Jest to jeden z najważniejszych antybiotyków, z uwagi na szerokie spektrum aktywności antybakteryjnej. Ze względu na bardzo dużą stabilność w roztworze, często stosuje się go w hodowlach komórkowych in vitro.

Tabela VI. Preparaty ważniejszych antybiotyków aminoglikozydowych zarejestrowane w Polsce

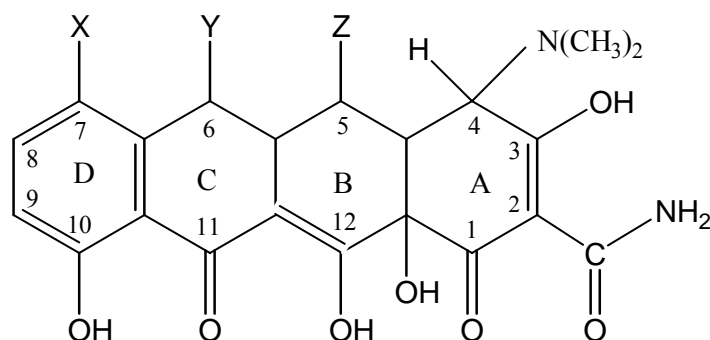
Nazwa preparatu	Skład	Postać leku
Maxitrol	deksametazon, neomycyna, polimyksyna B	maść i krople do oczu
Dicortineff	neomycyna, gramicydyna, fludrokortyzon	zawiesina do oczu i uszu, maść do oczu
Dexamytrex	deksametazon, gentamycyna	maść i krople do oczu
Gentamytrex	gentamycyna	krople do oczu
Gentamicin	gentamycyna	krople do oczu, iniekcje (40 mg, 80 mg)
Garasone Ophthalmic	betametazon, gentamycyna	maść do oczu
Biodacyna, Amikin	amikacyna	iniekcje (250 mg, 500 mg); krople do oczu
Bivacyn	neomycyna, bacytracyna	aerozol, maść do oczu
Tobrex	tobramycyna	krople do oczu
Tobradex	tobramycyna, deksametazon	krople oczne
Neomycinum	neomycyna	aerozol
Dexapolcort N	neomycyna, deksametazon	aerozol
Tribiotic	bacytracyna, neomycyna, polimyksyna B	maść

Tetracykliny

Budowa i właściwości biologiczne

Tetracykliny zostały wyizolowane i wprowadzone do lecznictwa w latach 50. XX wieku. Ich zaletą jest bardzo szerokie spektrum działania antybiotycznego oraz dobra wchłanianie z przewodu pokarmowego (możliwość podania doustnego). Antybiotyki te mają bardzo jednolitą ogólną budowę chemiczną. Cząsteczka tetracykliny składa się z czterech skondensowanych pierścieni cykloheksanu (oktahydronaftalen) zawierających różne podstawniki. Pierścień D ma charakter aromatyczny. Mechanizm działania tetracyklin polega na hamowaniu syntezy białek oraz procesów fosforylacji.

Naturalnymi tetracyklinami stosowanymi w lecznictwie są tetracyklina (1953 r.) i oksytetracyklina (1950 r.), natomiast pierwszego wyizolowanego antybiotyku z tej grupy – chlorotetracykliny (1948 r.) – używa się jako konserwantu w produktach żywnościowych oraz jako środka ochrony upraw roślinnych. Największe znaczenie w antybiotykoterapii mają obecnie tetracykliny modyfikowane: doksycyklina (najszerokie spektrum antybakteryjne i najczęstsze stosowanie) otrzymana w roku 1963, rolitetracyklina (1956 r.), metacyklina (1961 r.) i minocyklina (1967 r.). Działania niepożądane wynikają głównie ze zdolności do tworzenia nierozpuszczalnych kompleksów z jonami wapnia – najmniej toksyczna jest pod tym względem doksycyklina.



Ryc. 11. Budowa tetracyklin. Różnice w budowie poszczególnych związków zaznaczono symbolami X, Y i Z.

Biogeneza

Synteza podstawowego szkieletu cząsteczki tetracyklin jest związana z metabolizmem podstawowym, przemianami cukrowymi, lipogenezą i cyklem Krebsa. W idiofazie następuje zmiana szlaków metabolicznych polegająca na zahamowaniu procesów anabolicznych, niezbędnych do wzrostu i namnażania komórek, a fosfoenolopirogronian, acetylo-CoA i szczawiooctan zaczynają być zużywane głównie do syntezy tetracyklin. Pomędzy procesami tymi ustala się po pewnym czasie równowaga, a decydujący kierunek przemian zależy od warunków metabolicznych danego szczepu oraz warunków środowiska zewnętrznego.

Bezpośrednim prekursorem tetracyklin jest malonylo-CoA powstający ze szczawiooctanu. Osiem jednostek malonylo-CoA ulega kondensacji z jedną jednostką amidomalonylo-CoA, tworząc produkt pośredni: poliketydoamid. Związek ten ulega metylacji i uwodornieniu, po czym zachodzi jego cyklizacja prowadząca do powstania 6-metylopretetroamidu. Kolejne przekształcenia polegają głównie na wprowadzaniu odpowiednich podstawników w określonych położeniach pierścienia.

Produkcja tetracyklin

Zdolność do biosyntezy tetracyklin wykazują promieniowce z rodzaju *Streptomyces sp.* Na skalę przemysłową wykorzystuje się: *Streptomyces aureofaciens* (produkcja tetracykliny i chlorotetracykliny), *S. rimosus* (oksy-tetracyklina), *S. viridifaciens* (tetracyklina i chlorotetracyklina) i *S. psamoticus* (chlorotetracyklina i demetylotetracyklina). Szczepy przemysłowe są odpowiednio wyselekcjonowane lub mutagenizowane, o wysokich zdolnościach produkcyjnych. Do zaszczepiania nowych podłoży wykorzystywane są zarodniki promieniowców w postaci liofilizowanej.

Podłoże sporulacyjne powinno mieć skład zapewniający obfite tworzenie zarodników przy umiarkowanym namnażaniu komórek wegetatywnych. Uaktywnienie i namnażanie spor odbywa się zazwyczaj na skosach agarowych lub skosach ziemniaczanych, w umiarkowanej temperaturze (ok. 26–28°C) przez kilka dni.

Podłoża do wstępnego namnożenia promieniowców zawierają sacharozę bądź skrobię, mąkę sojową, a także wyciąg z drożdży i niektóre sole mineralne (m.in. węglan wapnia). Podobny skład posiadają podłoża produkcyjne stosowane w bioreaktorach, powinny jednak zawierać umiarkowaną liczbę źródeł azotu, gdyż nadmiar tego typu związków obniża wydajność produkcji tetracyklin.

Często wykorzystywanym źródłem węgla, azotu i mikroelementów jest melasa buraczana, będąca jednocześnie bardzo tanim produktem odpadowym z cukrowni. Dodatek węglanu wapnia pomaga utrzymać odpowiednie pH podłoża, powoduje także tworzenie kompleksów z tetracyklinami, podnosząc wydajność produkcji dzięki neutralizującemu wpływowi na toksyczność produkowanych tetracyklin komórek szczepu producenta. Jako środki przeciwpianowe stosowane są oleje roślinne lub tłuszcze zwierzęce. Cały bioprocess przebiega w warunkach intensywnego natleniania, w temperaturze 26–28°C i trwa 5–6 dni.

Tetracykliny są wydzielane do podłoża i ulegają wytrącaniu w postaci soli wapniowych i magnezowych. W celu ich izolacji stosuje się po zakończeniu bioprocessu zakwaszenie, co ułatwia oddzielenie biomasy. Następnie odzyskuje się tetracykliny z podłoża produkcyjnego poprzez ekstrakcję rozpuszczalnikami organicznymi (butanol, octan amylu), chromatografię kolumnową (adsorpcja na złożach węglowych, krzemionkowych albo na jonitach) lub najczęściej, ze względu na niski koszt, poprzez precypitację w postaci soli wapniowych za pomocą chlorku wapnia (w przypadku oksytetracykliny można stosować wytrącanie soli barowo-magnezowej).

Tabela VII. Preparaty najważniejszych tetracyklin naturalnych i modyfikowanych zarejestrowane w Polsce

Skład (substancja czynna)	Nazwa preparatu	Dostępne dawki i postać leku
Doksycyklina	Doxycyclinum, Dotur, Doxyratio M, Unidox Solutab	tabletki doustne (100 mg)
Limecyklina	Tetralysal	kapsułki doustne (150 mg)
Tetracyklina	Tetracyclinum	tabletki doustne (250 mg); maść
Oksytetracyklina, polimyksyna B, hydrokortyzon	Atecortin	maść do oczu
Oksytetracyklina, hydrokortyzon	Oxycort, oxycort A	aerozol, maść, maść do oczu

Antybiotyki makrolidowe

Budowa i właściwości biologiczne makrolidów

Makrolidy, czyli antybiotyki makrocykliczne, są metabolitami wtórnymi o budowie opartej na dużym pierścieniu makrocyklicznym połączonym z resztami cukrowymi lub aminokwasowymi. Wyróżnia się kilka grup makrolidów: makrolidy właściwe, czyli polioksomakrolidy (zawierają pierścień laktonowy i reszty cukrowe bądź aminocukrowe), makrolidy polienowe (zawierają pierścień laktonowy z ugrupowaniem skondensowanych wiązań nienasyconych nadających cząsteczce charakter chromoforowy), makrolidy jonoforowe (zawierają kilka dużych pierścieni laktonowych; są zdolne do transportu jonów metali przez błony biologiczne), ansamycyny (o budowie policyklicznej z częścią aromatyczną oraz alifatyczną) i inne (posiadające nietypową budowę o odmiennym od wyżej wymienionych grup charakterze). Znaczenie medyczne jako związki antybiotyczne mają polioksomakrolidy, polieny oraz ansamycyny. Wszystkie one są metabolitami promieniowców.

Antybiotyki makrolidowe mają 12–16-członowy pierścień laktonowy połączony z kilkoma (zwykle trzema) resztami cukrowymi, a więc należą do grupy glikozydów. Me-

chanizm działania tych antybiotyków polega na hamowaniu syntezy białek poprzez blokowanie translacji peptydylotransferazy dzięki wiązaniu z podjednostką 50 S rybosomów bakteryjnych. W dawkach terapeutycznych działają bakteriostatycznie. Charakteryzują się szerokim zakresem działania, są mało toksyczne i dobrze tolerowane przez organizm. Najważniejszym naturalnym antybiotykiem z grupy makrolidów jest odkryta w 1952 roku erytromycyna oraz jej modyfikowane pochodne półsyntetyczne: klarytromycyna (otrzymana w 1990 r.), roksitromycyna (1987 r.), azytromycyna. Mniejsze znaczenie posiadają oleandomycyna oraz spiramycyna i tylozyna. Pochodne półsyntetyczne otrzymuje się poprzez tworzenie soli z kwasami lub za pomocą estryfikacji. Makrolidy modyfikowane charakteryzują się korzystniejszymi parametrami farmakokinetycznymi (rozpuszczalność w wodzie, wchłanianie i oporność na rozkład w kwaśnym środowisku) w porównaniu z naturalnymi. Pozostałe makrolidy naturalne mają mniejsze znaczenie lecznicze – wykorzystuje się głównie spiramycynę (metabolit *Streptomyces ambofaciens*), a w niewielkim stopniu także oleandomycynę (metabolit *Streptomyces antibioticus*). Makrolidem stosowanym jako dodatek do pasz w hodowli zwierząt gospodarskich oraz konserwant żywności jest tylozyna produkowana przez *Streptomyces fradiae*.

Biogeneza i produkcja makrolidów

Makrolidy powstają w wyniku dwóch szlaków biosyntezy: jeden z nich prowadzi do utworzenia pierścienia makrolidowego (z jednostek octanu, propionianu i metylomalonianu), a drugi do utworzenia 6-dezoksyheksoz (z glukozy). Biosynteza pierścienia laktonowego erytromycyny-erytronolidu zachodzi podobnie do biosyntezy kwasów tłuszczowych. Zamiast octanu i malonianu prekursorami są w tym przypadku propionian oraz metylomalonian. W wyniku polikondensacji reszt propionianu i malonianu powstaje produkt pośredni – oligoketyd – a następnie pierścień erytronolidu. Szczepy zdolne do produkcji erytromycyny (gł. *Streptomyces erythreus*) posiadają podstawowy na tym szlaku enzym, kinazę propionianową, która podlega mechanizmowi regulacji allosterycznej. Odpowiada on za tworzenie propionylo-CoA, z którego może następnie powstać 2-metylomalonilo-CoA w wyniku działania karboksylazy propionylo-CoA. Oba enzymy posiadają wysoką aktywność w idiofazie u szczepów wysoce wydajnych. W fazie wzrostu enzymy te są hamowane, a wysoką aktywność wykazuje inny enzym, dekarboksylaza metylomalonylo-CoA. W fazie tej większość prekursorów służy do biosyntezy kwasów tłuszczowych, a więc typowych metabolitów podstawowych, niezbędnych do prawidłowego wzrostu i namnażania komórek. Końcowy produkt obu szlaków biosyntezy stanowi mieszanina erytromycyn A, B i C w stosunku 50:1:5. Pierwszym produktem glikozylacji (przyłączenie L-mykarozy i D-dezoaminy) jest natomiast erytromycyna D, która nie wchodzi w skład mieszaniny produktów końcowych.

Materiałem posiewowym do produkcji naturalnych makrolidów są wyselekcjonowane szczepy *Streptomyces erythreus* (erytromycyna) i *Streptomyces antibioticus* (oleandomycyna). Namnażanie materiału posiewowego przebiega podobnie jak w przypadku innych promieniowców (zwykle skosy ziemniaczane lub agarowe). Podłoże produkcyjne może zawierać przede wszystkim glukozę, skrobię, mąkę sojową, mąkę kukurydzianą, wyciąg drożdżowy oraz składniki mineralne (siarczan amonu, węglan wapnia i chlorek sodu), a dodatkowo także prekursor biosyntezy: propanol lub kwas propionowy. Ważne jest także zapewnienie odpowiedniej ilości fosforanów, jednak zbyt duże ich stężenie hamuje

produkcję makrolidów. Bioprocess przebiega w warunkach dobrego natlenienia i mieszania w temperaturze 27–28°C, a w przypadku erytromycyny 30–32°C. Czas trwania bioprocessu wynosi 5–6 dni. Makrolidy są wydzielane do podłoża. Hodowlę najpierw alkalizuje się, a następnie oddziela biomasę. Z podłoża ekstrahuje się erytromycynę octanem amylu. Do oczyszczania produktu stosuje się krystalizację. Oleandomycyna ekstrahowana jest zazwyczaj octanem butylu i krystalizowana w postaci chlorowodoru.

Tabela VIII. Preparaty ważniejszych antybiotyków makrolidowych naturalnych i modyfikowanych zarejestrowane w Polsce

Skład (substancja czynna)	Nazwa preparatu	Postać leku i dostępne dawki
Erytromycyna	Erythromycinum, Davercin Cusi-erythromycin Aknemycin, Zineryt	tabletki doustne (200 mg), żel, emulsja (zewn.) 0,5% maść do oczu zawiesiny zewnętrzne
Spiramycyna	Rovamycine	tabletki doustne (150 i 300 mln jm.)
Azitromycyna	Azimycin, Azitrox, Azibiot, Oranex, Sumamed	tabletki doustne 125 mg 250 mg, 500 mg; zawiesina doustna
Klarytromycyna	Klacid, Klacid Uno, Fromilid, Lekoklar, Taclar	tabletki doustne (250 mg, 500 mg); zawiesina doustna
Roksitromycyna	Roxiratio, Xitrocin, Rulid, Rolicyn, Renicin	tabletki doustne

Ryfamycyny

Ryfamycyny zalicza się do antybiotyków o budowie makrolidowej – ansamycyn, które zawierają pierścień aromatyczny o charakterze chromoforu. W cząsteczce ryfamycyn układ ten tworzy pierścień naftalenowy, do którego przyłączony jest łańcuch alifatyczny tworzący zamknięty układ (mostek). Naturalne antybiotyki z tej grupy odkryto w latach 50. XX wieku w hodowlach promieniowców glebowych *Nocardia mediterranea*. W sumie zidentyfikowano ich pięć (A, B, C, D i E), z których najlepiej została scharakteryzowana ryfamycyna B. W kolejnych latach wyizolowano nowe naturalne ryfamycyny (z rodzajów *Streptomyces* i *Micromonospora*), a w sumie poznano ich około 20. Znaczenie praktyczne uzyskały jedynie ryfamycyna B i SV (otrzymywana początkowo przez chemiczną modyfikację ryfamycyny B, a obecnie w wyniku hodowli wyselekcjonowanych mutantów *N. mediterranea*). Mechanizm ich działania polega na hamowaniu transkrypcji poprzez inhibicję polimerazy RNA (działanie bakteriobójcze). Ryfamycyny B i SV posłużyły także do wytworzenia półsyntetycznych ryfamycyn o wyższej aktywności antybakteryjnej i lepszych właściwościach farmakokinetycznych oraz obniżonej toksyczności. Najlepsze właściwości posiada ryfamycyna. Jest to obecnie najsilniejszy lek stosowany w leczeniu gruźlicy i trądu.

Biogeneza ryfamycyn opiera się, podobnie jak w przypadku innych makrolidów, na szlaku poliketydowym. Prekursorami pierścienia są malonylo-CoA (2 cząsteczki) i metylomalonylo-CoA (8 cząsteczek). W wyniku kondensacji powstaje protoryfamycyna I. Dalsze przekształcenia pierścienia prowadzą do powstania poszczególnych ryfamycyn. Produkcja ryfamycyny B przez szczepy *N. mediterranea* prowadzona jest na podłożu mineralnym z laktozą. Bioprocess przebiega w warunkach intensywnego napowietrzania i miesza-

nia w czasie 4–5 dni. Izolację ryfamycyny przeprowadza się za pomocą ekstrakcji octanem etylu lub chloroformem, a następnie poddaje oczyszczaniu przez krystalizację.

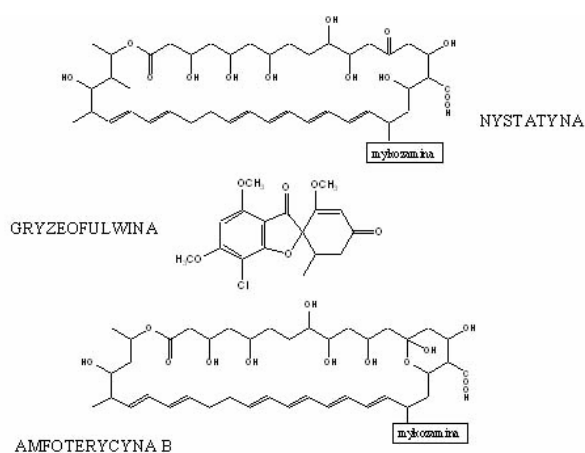
Makrolidy o aktywności przeciwgrzybiczej

Ważnymi antybiotykami stosowanymi w zakażeniach grzybiczych są makrolidy polienowe produkowane przez promieniowce z rodzaju *Streptomyces*. Są to przede wszystkim nystatyna oraz amfoterycyna B. Nystatyna to metabolit otrzymywany z hodowli *S. noursei*, mieszanina trzech składowych: A1, A2 i A3, natomiast amfoterycyna B jest produkowana przez *S. nodosus*. Cząsteczki antybiotyków polienowych mają charakter glikozydów – część cukrową stanowi zwykle aminocukier (mykozamina). Właściwości fizykochemiczne obu antybiotyków są zbliżone. Amfoterycyna posiada natomiast znacznie szersze spektrum działania, jedno z najszerszych spośród leków przeciwgrzybiczych. Mechanizm działania przeciwgrzybiczego antybiotyków polienowych polega na zaburzaniu funkcjonowania błony cytoplazmatycznej poprzez wiązanie się ze sterolami błonowymi. Biogeneza części aglikonowej antybiotyków polienowych łączy się ze szlakiem syntezy kwasów tłuszczowych – wykorzystywane są te same prekursorzy, natomiast w biosyntezie uczestniczą całkiem inne, specyficzne układy enzymatyczne. Bezpośrednimi prekursorami są propionylo-CoA, malonylo-CoA i metylomalonylo-CoA. Czynnikiem regulującym biosyntezę polienów jest poziom NADPH₂. Wysokie stężenie tego związku w fazie wzrostowej hodowli sprzyja syntezie kwasów tłuszczowych, natomiast w idiofazie następuje przewaga formy utlenionej NADP⁺, co stanowi czynnik stymulujący produkcję antybiotyków polienowych.

Odkrycie nystatyny w hodowlach *S. noursei* nastąpiło w 1950 r. Gatunek ten ma także zdolność syntezy innego antybiotyku o aktywności przeciwgrzybiczej – cykloheksimidu. Podłoża wykorzystywane do otrzymywania antybiotyków polienowych zawierają mąkę sojową lub skrobię, glukozę, siarczan amonu oraz węglan wapnia. Glukoza nie może być stosowana w nadmiarze, gdyż wywołuje represję kataboliczną. Bioprocess przebiega w temperaturze 28°C w przypadku nystatyny lub 25°C w przypadku amfoterycyny B. Czas trwania także jest różny: 4 doby dla nystatyny i aż 8 dób dla amfoterycyny. Izolacja produktu w przypadku nystatyny napotyka trudności ze względu na to, iż nie jest wydzielana do podłoża, lecz niemal w całości magazynowana w komórkach. W izolacji antybiotyków polienowych stosuje się metodę ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi, a następnie krystalizację.

Gryzeofulwina jest antybiotykem przeciwgrzybiczym produkowanym przez grzyby pleśniowe *Penicillium sp.* Nie ma typowej budowy makrolidowej ani nie zawiera układu sprzężonych wiązań nienasyconych. W jej budowie wyróżnić można trzy skondensowane pierścienie, w tym jeden aromatyczny. Mechanizm działania gryzeofulwiny polega na hamowaniu replikacji DNA. Biogeneza tego antybiotyku również wiąże się z biosyntezą kwasów tłuszczowych. 14-węglowy układ poliketonowy powstaje przez kondensację 6 cząsteczek malonylo-CoA i 1 cząsteczki acetylo-CoA. Proces ten jest przeprowadzany przez wieloenzymatyczny kompleks. Następne etapy biosyntezy odbiegają znacznie od typowych przemian makrolidów. Następuje wprowadzenie dwóch reszt metylowych, a następnie zachodzi cyklizacja całego łańcucha z wytworzeniem trzech pierścieni – powstaje gryzeofenon B, który zostaje przekształcony w gryzeofulwinę. Do produkcji gryzeofulwiny na skalę przemysłową wykorzystuje się szczepy *Penicillium griseofulvum* (zbadane już

w 1939 r.). Początkowo antybiotyk ten służył jako środek ochrony roślin przed patogenami. Jako antybiotyk przeciwgrzybiczy gryzeofulwina została zastosowana w latach 50. XX wieku. Jej produkcję prowadzi się na podłożu zawierającym siarczan amonu, magnezu oraz diwodorofosforan potasu. Stosuje się stałe dozowanie glukozy do bioreaktora. Jako dodatkowego źródła węgla można użyć sacharozy, laktozy lub skrobi. Bioprocess zachodzi w ciągu 7–10 dni w temperaturze 25°C. Produkt gromadzony jest głównie wewnątrzkomórkowo. Izolację gryzeofulwiny prowadzi się zarówno z grzybni, jak i z podłoża produkcyjnego za pomocą ekstrakcji acetonem, octanem butylu lub chloroformem. Oczyszczanie ekstraktu przeprowadza się na kolumnach chromatograficznych z węglem aktywnym.



Ryc. 12. Budowa najważniejszych antybiotyków przeciwgrzybiczych.

Antybiotyki polipeptydowe

Budowa

Budowa antybiotyków polipeptydowych jest bardzo zróżnicowana. W znacznej większości przypadków charakteryzuje się budową cykliczną. Aminokwasy budujące ich cząsteczki mogą być zarówno enancjomerami L, jak i D. Ponadto wiele z nich ma charakter zmodyfikowany. Oprócz aminokwasów w skład cząsteczek antybiotyków polipeptydowych mogą dodatkowo wchodzić cukry i związki o charakterze amin lub kwasów organicznych (najczęściej hydroksykwasy). Nietypowa, w porównaniu z białkami komórkowymi, struktura nadaje tym antybiotynom wyjątkowo dużą oporność na degradację przez proteazy.

Mechanizm działania i właściwości biologiczne

Antybiotyki polipeptydowe charakteryzuje niejednorodność mechanizmu działania antybakteryjnego. Część z nich wpływa na procesy syntezy ściany komórkowej (bacytracyna, wankomycyny) lub uszkadza funkcje błony cytoplazmatycznej (polimyksyny, gramicydyny, nizyna), inne natomiast hamują procesy replikacji (aktynomycyny) bądź syntezy białek (wiomycyna). Zakres aktywności antybakteryjnej także jest zróżnicowany. Zastosowanie tej grupy antybiotyków w medycynie jest dość ograniczone, ze względu na dość dużą toksyczność oraz bardzo słabą wchłanianiałość z przewodu pokarmowego. Zewnętrznie podaje się głównie bacytracynę, polimyksyny i gramicydyny w postaci maści lub kropli do oczu. Bacyltracyna A jest stosowana jako dodatek do pasz dla zwierząt gospodarskich.

Aktynomycyna D (daktynomycyna) stanowi z kolei bardzo cenny lek przeciwnowotworowy. Produkt metabolizmu bakterii kwasu mlekowego (*Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*) – nizinę – stosuje się jako konserwant żywności.

Biogeneza

Biogeneza antybiotyków o budowie polipeptydowej jest oczywiście związana z aminokwasami. Podobnie do antybiotyków β -laktamowych bezpośrednimi prekursorami tej grupy są aminokwasy. Biosynteza antybiotyków polipeptydowych różni się zasadniczo od syntezy białek komórkowych, gdyż przebiega enzymatycznie i nie biorą w niej udziału rybosomy. Budowa pierwszorzędowa tych związków nie jest zatem zakodowana w DNA, a geny związane z syntezą antybiotyków polipeptydowych kodują odpowiednie białka enzymatyczne szlaków przemian. Enzymy te najczęściej tworzą kompleksy, a cyklizacja cząsteczki jest ostatnim etapem biosyntezy. Produkcja antybiotyków polipeptydowych przez drobnoustroje zachodzi w idiofazie, jednak u szczepów wykorzystywanych w skali przemysłowej może przebiegać już w fazie logarytmicznego wzrostu kolonii.

Drobnoustroje zdolne do syntezy antybiotyków polipeptydowych należą do różnych, często niespokrewnionych grup bakterii oraz promieniowców. Bakterie przetrwalnikujące z rodzaju *Bacillus* produkują polimyksyny (*B. polymyxa*, *B. colistinus*, *B. circulans*), bacytracynę (*B. subtilis*, *B. licheniformis*) oraz gramicydyny (*B. brevis*), ziarniaki saprofityczne z grupy bakterii kwasu mlekowego – nizinę (*Streptococcus lactis*, *S. cremoris*), promieniowce zaś – wankomycyny (*Streptomyces canus*, *S. orientalis*), wiomycynę i kapreomycyny (*S. puniceus*, *S. capreolus*) stosowane w terapii gruźlicy, oraz aktynomycyny (*S. antibioticus*).

Produkcja wybranych antybiotyków polipeptydowych

Antybiotykami z tej grupy, produkowanymi w największej ilości, są bacytracyny (gł. bacytracyna A), polimyksyny (gł. polimyksyna B, czyli kolistyna) oraz gramicydyny, będące metabolitami bakterii z rodzaju *Bacillus sp.* Na skalę przemysłową wykorzystuje się specjalnie wyselekcjonowane szczepy o wysokich zdolnościach produkcyjnych. Proces biosyntezy tych antybiotyków jest kilkuetapowy. Materiał posiewowy stanowią liofilizowane komórki przetrwalnikowe. Po uaktywnieniu spor rozpoczyna się ich kiełkowanie, a po kilkunastogodzinnej hodowli otrzymuje się kolonie w fazie wegetatywnej (faza wzrostu logarytmicznego) służące jako inokulum. Podłoże posiewowe zawiera zazwyczaj mąkę sojową, wyciągi mięsne oraz skrobię z dodatkiem soli mineralnych i aminokwasów. Namnażanie materiału posiewowego przeprowadza się w temperaturze 30–35°C w warunkach intensywnego napowietrzania. Proces fermentacji w bioreaktorze przebiega w temperaturze 25–35°C z intensywnym mieszaniem i napowietrzaniem. Fermentacji towarzyszy gwałtowny wzrost temperatury w bioreaktorze, stąd konieczne jest jego schładzanie. Podłoże produkcyjne zawiera sacharozę lub syrop ziemniaczany (skrobia) z dodatkiem innych składników wzrostowych. Synteza antybiotyków polipeptydowych zachodzi już w czasie intensywnego wzrostu kolonii. Całą fermentację prowadzi się w ciągu zaledwie 1,5–2 dób, co jest jednym z najkrótszych procesów w biosyntezach antybiotyków. Do wydzielania bioproduktu stosuje się ekstrakcję butanolem, propanolem lub chromatografię jonowymienną. Antybiotyki służące jako dodatek do pasz nie są ekstrahowane z bioreaktora – wykorzystuje się wysuszoną hodowlę w całości, wraz z biomasa.

Tabela IX. Preparaty ważniejszych antybiotyków polipeptydowych zarejestrowane w Polsce

Nazwa preparatu	Skład	Postać leku
Maxitrol	deksametazon, neomycyna, polimyksyna B	maść i krople do oczu
Dicortineff	neomycyna, gramicydyna, fludrokortyzon	zawiesina do oczu i uszu, maść do oczu
Atecortin	oksytetracyklina, polimyksyna B, hydrokortyzon	maść do oczu
Bivacyn, Baneocin	neomycyna, bacytracyna	aerozol, maść do oczu
Tribiotic	bacytracyna, neomycyna, polimyksyna B	maść

Linkozamidy

Naturalnym linkozamidem jest linkomycyna (preparat: Linkocin 500) odkryta w 1962 r. w hodowlach promieniowca *Streptomyces lincolnensis*, posiadająca niewielkie znaczenie terapeutyczne. W jej budowie można wyróżnić dwa pierścienie heterocykliczne oraz resztę aminokwasową połączoną wiązaniem amidowym z pochodną cukrową (metylotiolinkozamina). Linkomycyna ma spektrum antybakteryjne zbliżone do erytromycyny. Mechanizm działania tego antybiotyku polega na hamowaniu syntezy białek poprzez blokowanie podjednostki 50 S rybosomów. Jej produkcja przebiega w podłożu kompleksowym zawierającym glukozę, skrobię lub melasę buraczaną, hydrolizaty białkowe oraz sole mineralne, w tym węglan wapnia. Bioprocess trwa 4 dni w temperaturze 28°C. Izolacja produktu zachodzi na kolumnach chromatograficznych z węglem aktywnym lub krzemionką. Następnie przeprowadzana jest ekstrakcja antybiotyku z eluatu za pomocą chloru metylenu.

Ważną pochodną półsyntetyczną linkomycyny jest klindamycyna (preparaty: Dalcin, Clindo, Klimicin), powstająca w wyniku podstawienia grupy hydroksylowej atomem chloru. Modyfikacja ta znacznie zwiększa wchłanianie antybiotyku z przewodu pokarmowego oraz czterokrotnie nasila aktywność antybakteryjną w porównaniu z naturalną linkomycyną.

Antybiotyki o aktywności przeciwnowotworowej

Antybiotyki przeciwnowotworowe wykazują zdolność (częściowo selektywną) do hamowania wzrostu i proliferacji komórek nowotworowych. Pierwsze leki z tej grupy zaczęto wprowadzać w latach 50. XX wieku, kiedy odkryto zjawisko antybiozy produktów metabolizmu promieniowców (*Streptomyces erythrochromogenes*) w stosunku do komórek nowotworowych. Ogółem aż do połowy lat 80. zidentyfikowano około 200 takich antybiotyków. Do leczenia wprowadzono ostatecznie tylko niektóre z nich, np. karcynofilinę (1954 r.), mitomycynę C (1956 r.), chromomycynę A3 (1960 r.), neokarcynostatynę (1965 roku), bleomycynę (1966 r.), aktynomycynę D, rubidomycynę, mitromycynę.

Głównymi mikroorganizmami mającymi zdolność do produkcji antybiotyków przeciwnowotworowych są promieniowce z rodzaju *Streptomyces sp.* oraz *Nocardia sp.* Wiele antybiotyków z tej grupy otrzymano także z hodowli grzybów. Liczne substancje antybiotyczne o charakterze przeciwnowotworowym wykryto również u roślin wyższych, np. al-

kaloidy różanecznika, składniki żywicy stopkowca (podofilotoksyny, np. etopozyd), alkaloidy cisu pospolitego (taksol). Budowa chemiczna antybiotyków przeciwnowotworowych jest bardzo zróżnicowana. Niektóre z nich są pochodnymi aminokwasowymi (np. azaseryna), część z nich to peptydy (np. aktynomycyny), glikopeptydy (np. bleomycyny), a także pochodne antrachinonu (np. rubidomycyna), bądź alkaloidy (np. winblastyna, winkrystyna). Otrzymano także wiele pochodnych modyfikowanych, o silniejszych właściwościach cytostatycznych lub zmniejszonej toksyczności. Pochodne te otrzymuje się zarówno wskutek chemicznej modyfikacji, jak i metodami biotechnologicznymi poprzez hodowlę wyselekcjonowanych szczepów na podłożach zawierających odpowiednie prekursory biosyntezy. Przykładem są modyfikowane bleomycyny (ponad 70 pochodnych).

Mechanizm działania przeciwnowotworowego, a także ich wysokiej toksyczności, polega na hamowaniu replikacji DNA lub transkrypcji. Inne mechanizmy wykazują azaseryna, DON (6-diazo-5-keto-L-norleucyna) – są to analogi glutaminy (antymetabolity), które działają poprzez blokowanie transaminacji rybotydu formyloglicynamidowego – oraz puromycyna będąca inhibitorem syntezy białka poprzez blokowanie elongacji łańcucha polipeptydowego. Antybiotyki przeciwnowotworowe wykazują także działanie antybakteryjne.

Ze względu na bardzo silne działanie antybiotyków antynowotworowych (cytotoksyczne, mutagenne i kardiotoksyczne), opracowano szczegółowe przepisy dla personelu pracującego przy ich produkcji. Poniżej podano wykaz szczepów drobnoustrojów syntetyzujących ważniejsze antybiotyki przeciwnowotworowe:

Aktynomycyna D	<i>Streptomyces antibioticus</i>
Bleomycyna	<i>Streptomyces verticillus</i>
Chromomycyna A3	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> , <i>S. griseus</i>
Daunorubicyna	<i>Streptomyces pauceticus</i> , <i>S. bifurcus</i> , <i>S. griseus</i>
Doksorubicyna (adriamycyna)	<i>Streptomyces pauceticus</i> var. <i>caesioides</i> (mutant)
Karcynofilina	<i>Streptomyces sabachiroi</i>
Mitomycyna C	<i>Streptomyces caespitosus</i>
Mitomycyna	<i>Streptomyces tanashiensis</i>
Neokarcynostatyna	<i>Streptomyces carzinostaticus</i>
Rubidomycyna	<i>Streptomyces pauceticus</i> , <i>S. coeruleorubidus</i>
Streptozotocyna	<i>Streptomyces achromogenes</i>
Streptonigryna	<i>Streptomyces flocculus</i>

PIŚMIENNICTWO

1. Angulo F.J., Baker N.L., Olsen S.J., Anderson A., Barrett T.J.: Antimicrobial use in agriculture: controlling the transfer of antimicrobial resistance to humans. *Semin Pediatr Infect Dis* 2004, 15 (2), 78–85.
2. Aparicio J.F., Mendes M.V., Anton N., Recio E., Martín J.F.: Polyene macrolide antibiotic biosynthesis. *Curr Med Chem* 2004, 11 (12), 1645–1656.
3. Arroyo M., de la Mata I., Acebal C., Castillon M.P.: Biotechnological applications of penicillin acylases: stateofheart. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003, 60 (5), 507–514.
4. Barber M.S., Giesecke U., Reichert A., Minas W.: Industrial enzymatic production of cephalosporinbased beta-lactams. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2004, 88, 179–215.

5. *Bibb M.J.*: Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr Opin Microbiol* 2005, 8 (2), 208–215.
6. *Bijie H., Kulpradist S., Manalaysay M., Soebandrio A.*: In vitro activity, pharmacokinetics, clinical efficacy, safety and pharmacoeconomics of ceftriaxone compared with third and fourth generation cephalosporins: review. *J Chemother* 2005, 17 (1), 3–24.
7. *Biotechnologia mikrobiologiczna. Ćwiczenia i pracownie specjalistyczne. Praca zbiorowa pod red. J. Długońskiego.* Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź 1997.
8. *Biotechnologia mikroorganizmów. Wybrane zagadnienia. Praca zbiorowa pod red. S. Łabużek, D. Necklena i J. Radziejewskiej-Lebrecht.* Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego, Katowice 2002.
9. *Brakbage A.A., Sprote P., Al-Abdallah Q., Gebrke A., Plattner H., Tucher A.*: Regulation of penicillin biosynthesis in filamentous fungi. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2004, 88, 45–90.
10. *Byynak J.D.*: The discovery and development of modified penicillin- and cephalosporin-derived beta-lactamase inhibitors. *Curr Med Chem* 2004, 11 (14), 1951–1964.
11. *Chemia leków. Praca zbiorowa pod red. A. Zejca i M. Gorzczy.* PZWL, Warszawa 1998.
12. *Chmiel A.*: *Biotechnologia. Podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne.* PWN, Warszawa 1994.
13. *Chmiel A.*: *Biotechnologia środków leczniczych.* Akademia Medyczna w Łodzi, Łódź 1985.
14. *Chmiel A., Grudziński S.*: *Biotechnologia i chemia antybiotyków.* PWN, Warszawa 1998.
15. *Coulthurst S.J., Barnard A.M., Salmond G.P.*: Regulation and biosynthesis of carbapenem antibiotics in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2005, 3 (4), 295–306.
16. *Evers M.E., Trip H., van den Berg M.A., Bovenberg R.A., Driessen A.J.*: Compartmentalization and transport in beta-lactam antibiotics biosynthesis. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2004, 88, 111–135.
17. *Florea N.F., Nightingale C.H.*: Review of the pharmacodynamics of antibiotic use in animal food production. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004, 49 (2), 105–108.
18. *Golenser J., Domb A.*: New formulations and derivatives of amphotericin B for treatment of leishmaniasis. *Mini Rev Med Chem* 2006, 6 (2), 153–162.
19. *Groisman E.A., Casadeu J.*: The origin and evolution of human pathogens. *Mol Microbiol* 2005, 56 (1), 1–7.
20. *Koba M.*: Modifications of actinomycin D structure as example of actinomycins structures-activity relationship. *Postepy Hig Med Dośw* 2005, 59, 276–282.
21. *Li S.M., Heide L.*: New aminocoumarin antibiotics from genetically engineered *Streptomyces* strains. *Curr Med Chem* 2005, 12 (4), 419–427.
22. *Markiewicz Z., Kwiatkowski Z.A.*: *Bakterie, antybiotyki, lekooporność.* PWN, Warszawa 2001.
23. *Martin J.F., Demair A.L.*: Unraveling the methionine-cephalosporin puzzle in *Acremonium chrysogenum*. *Trends Biotechnol* 2002, 20 (12), 502–507.
24. *Martin J.F., Ullan R.V., Casqueiro J.*: Novel genes involved in cephalosporin biosynthesis: the three-component isopenicillin N epimerase system. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2004, 88, 91–109.
25. *Nedal A., Zotchev S.B.*: Biosynthesis of deoxyaminosugars in antibiotic-producing bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004, 64 (1), 7–15.
26. *Nizet V.*: Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Curr Issues Mol Biol* 2006, 8 (1), 11–26.
27. *Paterson D.L., Bonomo R.A.*: Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005, 18 (4), 657–686.
28. *Pelaez F.*: The historical delivery of antibiotics from microbial natural products – can history repeat? *Biochem Pharmacol* 2006, 71 (7), 981–990.
29. *Podlewski J.K., Chwalibogowska-Podlowska A.*: *Leki współczesnej terapii.* Wydanie XV. Split Trading, Warszawa 2001.
30. *Ramphal R., Ambrose P.G.*: Extended-spectrum beta-lactamases and clinical outcomes: current data. *Clin Infect Dis* 2006, 42, suppl 4, S164–172.
31. *Schallmay M., Singh A., Ward O.P.*: Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol* 2004, 50 (1), 1–17.

32. *Schneider G.*: Enzymes in the biosynthesis of aromatic polyketide antibiotics. *Curr Opin Struct Biol* 2005, 15 (6), 629–636.
33. *Shah A.A., Hasan F., Ahmed S., Hameed A.*: Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum beta-lactamases. *Res Microbiol* 2004, 155 (6), 409–421.
34. *Schmitt E.K., Hoff B., Kuck U.*: Regulation of cephalosporin biosynthesis. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2004, 88, 1–43.
35. *Siddiqui J.*: Immunomodulatory effects of macrolides: implications for practicing clinicians. *Am J Med* 2004, 117 suppl 9A: 26S–29S.
36. *Tamaoki J., Kadota J., Takizawa H.*: Clinical implications of the immunomodulatory effects of macrolides. *Am J Med* 2004, 117 suppl 9A: 5S–11S.
37. *Tateda K., Standiford T.J., Pechere J.C., Yamaguchi K.*: Regulatory effects of macrolides on bacterial virulence: potential role as quorum-sensing inhibitors. *Curr Pharm Des* 2004, 10 (25), 3055–3065.
38. *Tollnick C., Seidel G., Beyer M., Schugert K.*: Investigations of the production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2004, 86, 1–45.
39. *Thykaer J., Nielsen J.*: Metabolic engineering of beta-lactam production. *Metab Eng* 2003, 5 (1), 56–69.
40. *Wallace R.J.*: Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proc Nutr Soc* 2004, 63 (4), 621–629.
41. *Weber T., Welzel K., Pelzer S., Vente A., Wohlleben W.*: Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes. *J Biotechnol* 2003, 106, 221–232.
42. *Wilke M.S., Lovering A.L., Strynadka N.C.*: Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol* 2005, 8 (5), 525–533.
43. Wybrane zagadnienia z metod poszukiwania i otrzymywania środków leczniczych. Praca zbiorowa pod red. Katarzyny Kieć-Kononowicz, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2000.
44. *Zemke D., Majid A.*: The potential of minocycline for neuroprotection in human neurologic disease. *Clin Neuropharmacol* 2004, 27 (6), 293–298.

10. Surowice, szczepionki i adiuwanty jako produkty biotechnologiczne

Ilona Bednarek, Daniel Sypniewski

Surowice i szczepionki pełnią podstawową rolę w profilaktyce i leczeniu chorób zakaźnych, zwłaszcza infekcji wirusowych. Szczepionki umożliwiają powstanie w organizmie odporności czynnej, która jest długotrwała i skuteczna. Surowice odpornościowe, zawierając gotową paletę czynników odpornościowych, m.in. przeciwciał, nadają natomiast organizmowi odporność bierną, krótkotrwałą, a przez to mniej skuteczną. Ich podanie stanowi najczęściej doraźny sposób poprawienia odpowiedzi organizmu na patogeny lub bezpośredniej eliminacji czynników szkodliwych pochodzenia patogennego.

Produkcja surowic odpornościowych

Surowice odpornościowe są preparatami zawierającymi przeciwciała (immunoglobuliny). Otrzymuje się je z krwi ludzkiej lub zwierzęcej. Surowice zwierzęce pozyskiwane są z krwi osobników różnych gatunków (najczęściej koni, rzadziej bydła, baranów, królików) poddanych uodpornieniu zazwyczaj przeciwko określonej toksynie bakteryjnej lub wirusowi. Pierwszym etapem otrzymywania takich surowic jest hodowla odpowiedniego szczepu bakterii w celu otrzymania materiału do szczepienia. Następnie przeprowadza się szczepienie zwierzęcia drogą dożylną, domięśniową lub dootrzewnową. Po długotrwałym zwykłym cyklu uodparniania, czyli immunizacji, można przystąpić do pobierania krwi zwierzęcia, którą z kolei poddaje się procesowi wykrzepiania w temperaturze pokojowej lub w 37°C. Po oddzieleniu skrzepu krew jest wirowana (ok. 3000 obrotów na minutę, 10 minut). Czasami wykrzepioną krew pozostawia się na noc w temperaturze 4°C. Kolejny etap postępowania stanowi dezaktywacja termiczna białek układu dopełniacza (ogrzewanie w 56°C przez 30 minut). Preparat jest następnie oczyszczany i zagęszczany. Należy pamiętać, że w zależności od sposobu immunizacji (rodzaju wprowadzonego antygeny, jego złożoności) uzyskiwać można surowice poliwalentne lub monowalentne, zawierające odpowiednio wiele bądź jedną frakcję immunoglobulin skierowanych przeciwko wielu lub jednemu epitopowi danego antygeny.

Izolacja immunoglobulin może być prowadzona metodami nieswoistymi (np. tzw. zimna ekstrakcja etanolowa) bądź też stosuje się metody dokładniejsze, specyficzne, umożliwiające izolację nawet konkretnej frakcji immunoglobulin. Metody nieswoiste mogą opierać się na technice frakcjonowania białek przez ich precypitację roztworami soli lub etanolu albo na chromatograficznym frakcjonowaniu białek osocza (chromatografia kolumnowa). W wypadku metod swoistych często prowadzi się izolację wybranej partii immunoglobulin poprzez ich wiązanie ze specyficznym antygenem, którym może być wypełniona odpowiednia kolumna chromatograficzna lub oplaszczone odpowiednie naczynie kolekcjonujące. Immunoglobuliny, będąc białkami, same mogą stać się antygenami. Immunoglobuliny pozyskiwane drogą immunizacji zwierząt, właśnie ze względu na obco-gatunkowy charakter białka i potencjalną immunogenność, częściej wykorzystuje się

w diagnostyce czy badaniach naukowych. Zgodne gatunkowo, czyli ludzkie immunoglobuliny, mogą być pozyskiwane w analogiczny sposób, najczęściej jednak ich źródłem są surowice krwiodawców lub ozdrowieńców. Ten typ pozyskiwania surowic odpornościowych to jednak klasyka współczesnej biotechnologii.

Gdy immunoglobuliny zwierzęce stwarzają ryzyko alergizacji, stosuje się surowice ludzkie, których istnieją dwa rodzaje. Pierwszy stanowią preparaty przygotowywane z osocza dużej liczby dawców (wg WHO powinno się otrzymywać preparat od co najmniej 1000 zdrowych dawców). Substancje takie zawierają całą gamę różnych przeciwciał uodparniających przeciwko wielu różnym patogenom. Wśród tak izolowanych przeciwciał 90% stanowią przeciwciała klasy IgG, resztę głównie przeciwciała IgA i IgM. Preparaty te stosowane są profilaktycznie u pacjentów z obniżoną odpornością (AIDS, białaczki) bądź leczniczo w zakażeniach zagrażających życiu. Przykładem takiego wieloglobulinowego preparatu jest Bioglobulina (firmy Biomed). Drugim rodzajem surowic są takie, które otrzymuje się od rekonwalescentów lub osób świadomie uodpornionych przeciw konkretnemu patogenowi (np. Hepatect – przeciwko WZW typu B, Tetabulin – przeciwko tężcowi). Surowice ludzkie są pozyskiwane najczęściej w stacjach krwiodawstwa. Należy podkreślić, że z pobieranej od pacjentów poddawanej wykrzepianiu krwi, oprócz immunoglobulin, pozyskuje się dodatkowo albuminy i czynniki krzepnięcia krwi. Jeśli miano danego przeciwciała jest niewielkie, można zastosować selektywną adsorpcję surowicy, czyli usuwanie zbędnych przeciwciał reagujących krzyżowo. W tym celu surowica jest mieszana z roztworem antygeny w stosunku 8:1 i inkubowana w temperaturze pokojowej przez godzinę. Następnie wiruje się preparat (ok. 3000 obrotów na minutę, 10 minut), otrzymując swoistą surowicę (nadsącz).

Surowice i preparaty krwiopochodne można także otrzymywać z krwi pełnej pobieranej na antykoagulant (1 jednostka krwi to około 450 ml). Materiałem wyjściowym jest krew pełna konserwowana (KPK). W tym wypadku dodatkowymi produktami krwiopochodnymi są koncentraty: erytrocytów, płytek krwi oraz granulocytarne. Rozdział poszczególnych składników krwi można przeprowadzać metodą aferezy – na specjalnych separatorach (komórkowe, do otrzymywania koncentratów krwinek, oraz osoczowe). Koncentraty krwinek mogą być przechowywane w specjalnych płynach zabezpieczających i zwykle poddawane głębokiemu zamrożeniu. Preparaty osocza są magazynowane nawet ponad 2 lata w temperaturach poniżej -20°C .

Bardzo ważnym zagadnieniem związanym z otrzymywaniem krwi i preparatów krwiopochodnych, w tym surowic, jest czystość mikrobiologiczna. Obecnie standardowymi testami przeprowadzanymi na każdej pobranej porcji krwi są: test kilowy, oznaczenie poziomu przeciwciał anty-HCV, anty-HBV, anty-HIV, antygenów HbsAg (antygen powierzchniowy HBV) oraz testy na obecność materiału genetycznego wirusów HBV, HCV i HIV. Dodatkowo określana jest aktywność transaminazy alaninowej: ALT. Pomieszczenia, w których prowadzi się pobieranie krwi, są naświetlane promieniami UV, aby zmniejszyć ryzyko kontaminacji mikrobiologicznych, a krew zbierana jest wyłącznie do jednorazowych, jałowych pojemników. Surowice odpornościowe są preparatami pozajelitowymi. Wymagania stawiane takim lekom to przede wszystkim jałowość (wyjaławianie przez sączenie) i apirogenność. Przechowywanie dużych partii surowic prowadzi się w zamrażarkach, natomiast małe ilości można przechowywać w lodówce. Wielokrotne zamrażanie i rozmrażanie preparatów prowadzi do dezaktywacji zawartych w nim przeciwciał.

Produkcja tradycyjnych szczepionek

Szczepionki, zgodnie z klasyczną definicją, są odpowiednio przygotowanymi preparatami zawierającymi antygen (antygeny) w formie żywych lub zabitych drobnoustrojów, bądź też produktów ich metabolizmu. Nadają one organizmowi odporność immunologiczną czynną. Pierwszego skutecznego szczepienia dokonał w 1796 roku angielski lekarz Edward Jenner, stosując zarazki ospy bydłowej (krowianki) do wywołania odporności na ospę u ludzi. Opracowanie skutecznych szczepionek przeciwko groźnym chorobom infekcyjnym nastąpiło jednak dopiero w drugiej połowie XIX wieku. W 1881 roku Ludwik Pasteur opracował szczepionkę przeciwko wścieklicznie, a w 1885 roku przeciw węglikowi. Pierwszą szczepionkę anatoksynową stworzył naukowiec francuski Ramon – była to szczepionka przeciwżółciowa (1923 r.). Stosowane szczepionki można podzielić na kilka grup w zależności od typu użytych antygenów:

- Preparaty przygotowane z żywych drobnoustrojów, których własności chorobotwórcze zostały osłabione (szczepionki atenuowane). Przykładami są szczepionki przeciwko gruźlicy, *poliomyelitis*, ospie, żółtej febrze, różyczce, odrze, śwince. Atenuacja polega na selekcji mutantów o znacznie obniżonej zjadliwości w porównaniu ze szczepem dzikim. Mutanty takie uzyskiwane są w wyniku długotrwałych hodowli z wielokrotnym pasażowaniem (np. uzyskanie szczepionki BCG przeciwko prątkom gruźlicy zajęło jej twórcom – Calmette i Guerin – 13 lat, w czasie których przeprowadzili 230 pasaży).
- Preparaty przygotowane z drobnoustrojów zabitych środkami fizycznymi lub chemicznymi (szczepionki inaktywowane). Zawierają całe komórki bakterii lub wiriony bądź ich frakcje. Ich immunogenność jest zwykle niższa w porównaniu ze szczepionkami atenuowanymi lub anatoksynami. Czynniki inaktywujące to: wysoka temperatura, fenol, formalina, etanol, aceton. Przykładem są niektóre szczepionki przeciwko grypie, a także szczepionki przeciwko krztuścowi, durowi brzuszemu, cholercie, dżumie, *poliomyelitis*, wścieklicznie.
- Preparaty przygotowane z przetworzonych produktów metabolizmu bakterii (głównie szczepionki anatoksynowe). Anatoksyny są toksynami bakteryjnymi, które pod wpływem odpowiedniego przygotowania (traktowanie formaliną i wysoką temperaturą) pozbawiono toksyczności, jednak zachowały zdolność do stymulacji odpowiedzi immunologicznej. Umożliwiają zapobieganie chorobom wywołanym działaniem jądów bakteryjnych (egzotoksyn). Przykładami są anatoksyny błonicze, tężcowe, botulinowe, gronkowcowe. Produkcja takich szczepionek polega na hodowli selektywnej szczepu toksynotwórczego, następnie odtoksyczeniu, a potem izolacji i oczyszczeniu anatoksyny (produkcja zbliżona do produkcji preparatów enzymatycznych).
- Preparaty przygotowane z fragmentów komórek lub wirusów (podjednostkowe). Zawierają izolowane białka lub frakcje wirionów bądź komórek bakteryjnych. Przykładem są szczepionki przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu B, zawierające izolowane antygeny powierzchniowe. Szczególnym typem szczepionek podjednostkowych są szczepionki rybosomalne. Ich opracowanie wiąże się z odkrytym w 1965 roku efektem immunologicznym rybosomów bakteryjnych. Ich zaletami są brak toksyczności oraz bardziej wyrazista niż w przypadku typowych szczepionek immunogenność. Produkcja szczepionek rybosomalnych odbywa się podobnie, jak w przypadku innych preparatów wewnątrzkomórkowych. Po przeprowadzeniu hodowli szczepu dokonuje się dezintegracji komórek, wytrącają się substancje balastowe, a potem izolowana jest frakcja rybosomalna. Gotowy izolat podlega oczyszczaniu.

Istnieją także szczepionki monowalentne, zawierające antygeny jednego patogenu (np. szczepionka BCG przeciw gruźlicy), oraz poliwalentne (skojarzone), stanowiące mieszaninę różnych antygenów chroniących przed kilkoma patogenami (np. DiTePer – szczepionka przeciwko błonicy, tężcowi i krztuścowi). Szczepionki można także podzielić na swoiste i nieswoiste. Cechą charakterystyczną szczepionek nieswoistych jest stymulowanie mechanizmów odpornościowych w sposób ogólny, nieswoisty, a nie indukowanie odporności na konkretne zakażenia. Szczepionki te zawierają mieszaninę zabitych bakterii różnych szczepów i produktów ich rozpadu. Pobudzają one układ immunologiczny poprzez stymulację aktywności limfocytów, wzrost zdolności fagocytarnych makrofagów i inne mechanizmy immunostymulacyjne.

Obecnie, tak ze względów bezpieczeństwa, jak i ekonomicznych, otrzymuje się szczepionki rekombinowane (patrz kolejny podrozdział). W tym wypadku, wykorzystując techniki molekularne, konkretne antygeny produkowane są przez transformowane genetycznie komórki bakteryjne, ludzkie, zwierzęce lub komórki owadów. Układ hodowanych zrekombinowanych genetycznie komórek stanowi bioreaktorową produkcję wybranych antygenów na dużą skalę. Wystarczy znajomość zapisu genetycznego dla wybranego antygenu białkowego, by tenże zapis – gen, opierając się na nośnikach informacji genetycznej – wektorach molekularnych, np. plazmidach, wprowadzić do dowolnego typu komórki. Wprowadzenie do komórki wektora zawierającego informację genetyczną na temat struktury danego antygeny to proces transformacji, w wyniku której transformowana komórka nabiera zdolności syntezy nowego białka – naszego wybranego antygeny. W tym systemie produkcji szczepionek rekombinowanych sami kierujemy syntezą wybranych antygenów, otrzymany rekombinowany antygen nie będzie zawierał innych dodatkowych antygenów pochodzących od wyjściowego patogenu i nie będzie również niebezpieczeństwa kontaminacji antygeny cząsteczkami całych patogenów. Zapewnienie odpowiednich warunków hodowli rekombinowanych komórek daje nieograniczone możliwości uzyskiwania bardzo dużej ilości rekombinowanych białek antygenowych. Dalej, posługując się standardową metodą izolacji i oczyszczania białek z hodowli bioreaktorowych, otrzymuje się produkt końcowy: szczepionkę rekombinowaną.

Adiuwanty stosowane w szczepionkach

Preparaty szczepionek zawierają najczęściej dodatek substancji zwiększających w sposób nieswoisty ich immunogenność – tzw. adiuwanty. Jest to substancja, która wzmacnia reakcję immunologiczną przeciw specyficznemu antygenowi. Mechanizmy działania większości adiuwantów polegają na adsorbowaniu antygeny na swojej powierzchni, dzięki czemu ulega on powolniejszemu wchłanianiu. Ich zastosowanie pozwala uzyskać preparat typu „depot” o powolnym uwalnianiu antygeny i długotrwałym jego kontakcie z komórkami układu immunologicznego, co wzmocni oraz zintensyfikuje odpowiedź immunologiczną szczepionego organizmu. W przypadku pewnych antygenów zadaniem adiuwanta nie jest tylko wzmocnienie reakcji immunologicznej organizmu, ale w ogóle jej wywołanie. Najczęściej adiuwanty, wydłużając czas prezentacji antygenów w organizmie, zwiększają odpowiedź immunologiczną, dając organizmowi czas na zlokalizowanie, zidentyfikowanie, „rozpracowanie” i finalnie eliminację antygeny. Najpopularniejszymi adiuwantami są związki glinu (głównie wodorotlenek glinu) i wapnia, w badaniach eksperymentalnych znajduje się wodorotlenek berylu. Cechą charakterystyczną soli glinu, takich

jak wodorotlenek lub fosforan, jest ich koloidalny charakter, co z kolei wpływa na właściwości zwiększenia prezentacji antygeny w organizmie poprzez jego połączenie z koloidalnym roztworem adiuwanta. Ostateczny mechanizm działania związków glinu nie został do chwili obecnej potwierdzony. Udowodniono, że związki te wywołują miejscowy odczyn zapalny i mogą wywierać bezpośredni wpływ na limfocyty, monocyty oraz makrofagi, jak również promować uwalnianie interleukiny 4 (IL-4).

Jako adiuwanty stosuje się również Lipid A i jego pochodne, będące fragmentem lipopolisacharydu bakteryjnego (LPS). Właściwości adiuwanta wykazują również peptydy muramylowe izolowane z bakteryjnych ścian komórkowych oraz saponiny – roślinne glikozydy trójterpenowe. Stosuje się też emulsje olejowe oraz mikrosfery polimleczano-poliglikolanowe. Specyficznego rodzaju adiuwantem jest ciąg nukleotydów CpGp podawanych niezależnie w formie około kilkunastooligonukleotydowych fragmentów lub wbudowywanych sekwencji w struktury wektorów plazmidowych. Sekwencje CpGp, naturalnie występujące w genomie bakteryjnym, wprowadzone do organizmu ludzkiego stymulują w nim produkcję cytokin, a tym samym przyczyniają się do zwiększenia odpowiedzi immunologicznej.

Ten specyficzny typ adiuwanta ma swoje szczególne zastosowanie w przypadku szczepionek typu DNA. Nowszymi adiuwantami są tzw. stałe nanocząstki lipidowe SLN (ang. *solid lipid nanoparticles*). Składają się one z jądra – stałego lipidu – oplaszczoną stabilizującą warstwą środka powierzchniowo czynnego. Ważną ich zaletą jest możliwość podażi doustnej oraz miejscowej. SLN otrzymuje się poprzez homogenizację wysokociśnieniową lub – rzadziej – techniką zimnej homogenizacji. Do produkcji SLN można stosować triglicerydy lub woski (substancje biodegradowalne), bądź też węglowodory. SLN są trwałymi adiuwantami. Można je liofilizować. Odpowiedni dobór tenzydów zapewnia stabilizację cząstek SLN oraz regulację właściwości powierzchniowych wpływających na siłę wiązania antygeny.

Pod względem budowy i pochodzenia adiuwanty dzieli się na następujące grupy:

- a) **adiuwanty typu żeli**; do nich zalicza się wodorotlenek glinu, fosforan glinu czy też fosforan wapnia;
- b) **adiuwanty bakteryjne**; tj. toksyna ciepłochwiejna *E. coli*, toksyna krztuśca, endotoksyny, w tym monofosforylolipid A (MPLTM), ektotoksyny, w tym toksyna cholery oraz motyw nukleotydowy DNA CpGp;
- c) **adiuwanty na bazie olejowej** i na bazie środków emulgujących; należą tu m.in. niekompletny adiuwant Freuda – IFA, adiuwanty oznaczane jako MF59, AS02 czy SAF (*Syntax adjuvant formulation*), które są emulsjami typu olej/woda, zawierającymi skwalen i dodatek detergentów, takich jak trioleinian sorbitanu – Span 85 czy Tween 80.;
- d) **adiuwanty specyficzne**, tutaj należą liposomy, saponiny, cytokiny czy wreszcie kompleksy immunostymulatorowe typu ISCOMs. Saponiny będące roślinnymi glikozydami zawierają steroidowe aglikony; przykładem powszechnie stosowanej saponiny w szczepionkach weterynaryjnych jest saponina izolowana z kory drzew *Quillaja saponaria*, oznaczana symbolem Quil A. Połączenie Quil A z cholesterolem, fosfolipidami i niekowalencyjnie połączonymi cząsteczkami antygeny to adiuwant typu ISCOM;
- e) **adiuwanty syntetyczne**; w tym muramylodipeptydy, polimery, takie jak acetylowana polimannoza, polinukleotydy: Poly rA, Poly rU, β -glukany, sulfolipopolisacharyd polimetylometakrylanu – PUMA czy polifosfazeny.

W technologii szczepionek antywirusowych próbuje się wykorzystać jako adiuwanty liposomy oraz wirosomy. Są to jednocześnie adiuwanty oraz nośniki antygeny. W szczepionkach liposomalnych antygen jest połączony z adiuwantem, co może przebiegać na dwa sposoby: zamaskowanie (zamknięcie) determinanty antygenowej wewnątrz cząstki (w fazie wodnej liposomu) lub jej ekspozycja na powierzchni liposomu. Wiązanie antygeny odbywa się bądź poprzez kowalencyjne związanie antygeny z fosfolipidami, bądź też przez niespecyficzną adsorpcję hydrofobowych antygenów bezpośrednio na powierzchni liposomów. Antygen umieszczony w liposomach zachowywany jest znacznie dłużej w organizmie niż w wypadku użycia innych adiuwantów. Liposomy wzmacniają również prezentację antygenów makrofagom. Dodatkową ich zaletę stanowi fakt, iż prawie wszystkie liposomy wchłaniane są przez komórki układu siateczkowo-śródbłonkowego. Zastosowanie w adiuwantach liposomalnych fosfatydyloetylenoaminy nadaje im zdolność do bezpośredniego stymulowania komórek B.

Pierwszą wprowadzoną na rynek (1999 r.) szczepionką wirosomową jest szczepionka przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu A oparta na cząstkach IRIV, czyli immunostymulującego rekonstruowanego wirosomu grypy (ang. *immunopotentiating reconstituted influenza virosome*). Jest to liposom zawierający na swej powierzchni wbudowane białka wirusa grypy. Błonowa glikoproteina hemaglutyninowa (HA) stanowi białko odpowiedzialne za fuzję wirusa z błoną zakażonej komórki wirusa grypy i jednocześnie jego najważniejszy antygen. Druga glikoproteina wirusa grypy, neuraminidaza (NA), jest białkiem enzymatycznym. Warunkuje zmniejszenie lepkości śluzu wydzielanego przez błony śluzowe, a przez to ułatwia wirusowi grypy dostęp do komórek. IRIV, może być zatem szczególnie cennym nośnikiem w szczepionkach stosowanych drogą wziewną, zwłaszcza donosową. Ogromną zaletą wirosomów oraz innych adiuwantów liposomowych jest także możliwość wpływania na kierunek odpowiedzi immunologicznej bądź ze strony limfocytów B (wiązanie antygeny na powierzchni wirosomu), bądź głównie limfocytów T (umieszczenie antygeny we wnętrzu wirosomu). Ten aspekt działania jest zbieżny z odpowiednią prezentacją antygenów w układzie MHC człowieka – dla antygenów zewnątrzkomórkowych kierowanych na szlak prezentacji powiązany z układem MHC klasy II, a dla antygenów wewnątrzkomórkowych – odpowiednio MHC klasy I. W konsekwencji następuje stymulacja odpowiedzi humoralnej lub komórkowej organizmu. Taką strategię można też przyjąć podczas tworzenia szczepionek przeciwnowotworowych; tutaj – przyjmując wewnątrzkomórkowy charakter nieprawidłowych białek produkowanych przez komórki nowotworowe – można stymulować wysoce aktywną odpowiedź komórkową skierowaną przeciwko tymże antygenowym białkom nowotworowym.

Tabela X. Najważniejsze szczepionki dostępne na rynku

Nazwa preparatu	Skład lub zastosowanie
Polyvaccinum, Bronchovaxom, Ribomunyl, Luivac, IRS-19 (szczepionki nieswoiste)	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphyl. epidermidis</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Diplococcus pneumoniae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Corynebacterium pseudodiphtheriae</i> , <i>Neisseria catarrhalis</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i>
Infanrix Hep B, Tritanrix HB	Szczepionka przeciwko błonicy, tężcowi, krztuścowi i WZW typu B
Infanrix DTPA, Tripacel	Szczepionka przeciwko krztuścowi, tężcowi i błonicy
Infanrix Polio-Hib, Tetracoq	Szczepionka przeciwko błonicy, tężcowi, krztuścowi i poliomyelitis
Act-Hib, Hiberix	Szczepionka przeciwko <i>Haemophilus influenzae</i> typu B
Engerix B, Euvax B, Hepavax-Gene	Szczepionka przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu B
Influvac, Vaxigrip	Szczepionka przeciwko grypie
M-M-R II, Priorix, Trimovax	Szczepionka przeciwko odrze, śwince, różyczce
Pneumovax 23, Pneumo 23	Szczepionka przeciwko pneumokokom (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)
Imovax Polio	Szczepionka przeciwko poliomyelitis
Pseudovac	Szczepionka przeciwko <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Nowoczesne technologie produkcji szczepionek i szczepionki DNA

Techniki inżynierii genetycznej umożliwiły wykorzystanie wektorów DNA do ekspresji izolowanych antygenów wirusowych w komórkach *Escherichia coli*, drożdży, a nawet zwierzęcych i ludzkich. Są to szczepionki oparte na technice rekombinacji DNA. Najpowszechniejszą szczepionką rekombinowaną jest preparat przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu B. Otrzymywane są także rekombinowane szczepionki przeciwko wirusowi grypy, a także wścieklizny. Możliwe jest także jednoczesne otrzymywanie produktów ekspresji kilku genów tego samego lub różnych wirusów w jednej komórce biorcy rekombinowanego DNA. Podstawową zaletą tego typu szczepionek jest eliminacja ryzyka związanego z wprowadzeniem całego wirusa, w tym także jego genomu, do organizmu poddanego szczepieniu. Ponadto możliwe jest uzyskanie wybranych antygenów oraz ich modyfikacja. Wadę szczepionek rekombinowanych stanowi ich obniżona, czasami zupełnie wyciszona, immunogenność.

Inna strategia zakłada zamiast otrzymywania rekombinowanych białek antygenowych tworzenie wirusów fuzyjnych poprzez włączanie do genomu wirusa niepatogenego dla człowieka (np. wirusa krowianki, bakulowirusów) genów wirusów, wobec których chcemy uzyskać immunizację (np. HBV, HIV, grypy, wścieklizny).

Zupełnie inne podejście do zasad szczepienia stosowane jest w szczepionkach DNA. W tym wypadku do organizmu wprowadzane są nie gotowe antygeny, lecz wektory ekspresyjne (plazmidy), które zawierają gen kodujący dane białko antygenowe. Ekspresja antygeny następuje zatem dopiero *in situ*, w tkance gospodarza (najczęściej po podaniu domięśniowym). Szczepionki DNA niosą jednak pewne zagrożenia.

Z jednej strony wbudowanie się wektorowej szczepionki genetycznej w strukturę genomu gospodarza zapewnia długotrwałą ekspresję antygenów w jego ciele, a przez to silniejszą immunizację. Niestety, z drugiej strony, wprowadzenie obcej informacji genetycznej do komórek gospodarza może uczynić je również obiektem eliminacji przez ustrój

i wywołać reakcje autoimmunologiczne. Wszystko to składa się na ryzyko wbudowania transgenu do DNA gospodarza, uaktywnienie ekspresji interferonów itp.

Nietypowymi szczepionkami mogą także być przeciwciała antyidiotypowe. Determinanty idiotypowe określają konformację fragmentu przeciwciała, który reaguje z antygenem. Stanowią one genetycznie utrwalony „negatyw” antygeny.

Przeciwciała antyidiotypowe (przeciwiidiotypowe) zawierają natomiast strukturę będącą „pozytywem” antygeny, a więc jego kopią. Są one zatem autoprzeciwciałami, których struktura naśladuje strukturę antygeny, a właściwie epitopu. Zasada wykorzystania tego typu przeciwciał jako szczepionek opiera się na założeniu uczulania samymi przeciwciałami, a nie antygenami. Zaletą przeciwciał antyidiotypowych jest znaczne zminimalizowanie ryzyka alergizacji oraz możliwość zastosowania w przypadku, gdy nie udało się jeszcze otrzymać szczepionki przeciwko danemu patogenowi lub pacjent reaguje na tradycyjną szczepionkę niedostatecznie.

PIŚMIENNICTWO

1. *Antoniewicz-Papis J.*: Zasady otrzymywania i przechowywania krwi i jej składników. Laboratorium 2005, 3, 48–53.
2. Biotechnologia farmaceutyczna. Praca zbiorowa pod red. O. Kaysera i R.H. Mullera. PZWL, Warszawa 2003.
3. *Dzierżbicka K., Kołodziejczyk A.M.*: Adiuwanty – niezbędne składniki szczepionek nowej generacji. Postępy Biochemii 2006, 52 (2), 204–211.
4. *Kondera-Anaszk Z.*: Immunodiagnostyka. Przewodnik do ćwiczeń. Katowice 1990.
5. *Korban S.S., Krasnyanski S.F., Buetow D.E.*: Foods as production and delivery vehicles for human vaccines. J Am Coll Nutr 2002, 21 suppl 3, 212S–217S.
6. *Krieg A.M.*: The role of CpG motifs In innate immunity. Current Opinion In Immunology 2000, 12, 35–43.
7. *Magliani W., Conti S., Salati A., Arseni S., Ravanetti L., Frazzini R., Polonelli L.*: Biotechnological approaches to the production of idiotypic vaccines and antiidiotypic antibiotics. Curr Pharm Biotechnol 2003, 4 (2), 91–97.
8. *Podlewski J.K., Chwalibogowska-Podlowska A.*: Leki współczesnej terapii. Wydanie XV. Split Trading, Warszawa 2001.
9. *Roitt L., Brostoff J., Male D.*: Immunologia. Wydanie II. PZWL i Wydawnictwo Medyczne Slotwiński Verlag, Warszawa 2000.
10. *Smolewski P., Grzybowska-Izidorczyk O.*: Zastosowanie szczepionek z komórek dendrytycznych w leczeniu chorób nowotworowych. Postępy Biologii Komórki 2005, 3, 571–587.
11. *Sharma A.K., Khuller G.K.*: DNA vaccines: future strategies and relevance to intracellular pathogens. Immunology and Cell Biology 2001, 79, 537–546.
12. *Viesturs U.E., Szymite, I.A., Żilewicz A.W.*: Biotechnologia. Substancje czynne, technologia, aparatura. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 1992.

11. Przeciwciała monoklonalne

Ilona Bednarek

Dostający się do organizmu antygen, w wyniku jednego z licznych możliwych oddziaływań, stymuluje komórki limfocytarne do produkcji przeciwciał, będących białkami o charakterze immunoglobulin. Następujący w tym samym czasie kontakt licznych determinant antygenowych (epitopów) z szeregiem limfocytów B mających zdolność do produkcji przeciwciał, wywołuje więc wiele równoczesnych aktywacji limfocytarnych. Komórki B, dzieląc się i będąc stymulowane różnorodnymi determinantami antygenowymi, ostatecznie wytworzą zróżnicowaną pulę immunoglobulin stanowiących grupę przeciwciał poliklonalnych. Wyodrębnienie pojedynczego limfocyta B, a następnie uzyskanie z wyjściowej komórki szeregu komórek potomnych o identycznym profilu genetycznym prowadzi do otrzymania klonu komórkowego, teoretycznie stanowiącego molekularne odwzorowanie komórki wyjściowej. Tak uzyskany klon komórek B produkuje przeciwciała skierowane wobec tego samego epitopu; immunoglobuliny te stanowią tym samym pulę przeciwciał wywodzących się z pojedynczego klonu, czyli pulę przeciwciał monoklonalnych (mAb, ang. *monoclonal antibody*).

Otrzymanie dużej ilości przeciwciał skierowanych wobec konkretnego epitopu wielokrotnie jest bardzo potrzebne, niestety, utrzymanie przy życiu klonu limfocytów B w warunkach laboratoryjnych staje się zadaniem problematycznym. Główną niedogodnością w warunkach hodowli *in vitro* okazuje się stopniowe zamieranie populacji komórek w miarę postępujących podziałów komórkowych, wynikające z naturalnej limitacji liczby podziałów związanej ze stopniową utratą telomerów w kolejnych cyklach replikacyjnych. Rozwiązaniem problemu może się stać uzyskanie efektu immortalizacji pożądaných komórek. „Uniesmiertelnienie” komórek może się odbywać wieloma drogami, najczęściej wybiera się rodzaj transformacji komórek, w wyniku której w komórce pojawia się białko – produkt ekspresji odpowiedniego genu: ludzkiego, zwierzęcego lub wirusowego – mające zdolność interferencji z normalnym przebiegiem cyklu komórkowego. W efekcie dochodzi do „nieskończonej” liczby podziałów, prowadzących do uzyskania tak zwanej ciągłej linii komórkowej. W przypadku immortalizacji klonów limfocytów B należy pamiętać, aby nie wpłynęła ona na charakter produkowanych przeciwciał, a jedynie nadała limfocytom cechę „niesmiertelności”. Od 1975 roku znana jest metoda immortalizacji limfocytów B opracowana przez Kohler i Milstein, zwana metodą fuzji komórkowej i produkcji hybridom. Metodę tę do dnia dzisiejszego stosuje się w celu otrzymywania przeciwciał monoklonalnych, uzyskiwanych zarówno techniką *in vivo*, jak i *in vitro*. Obie wymienione techniki bazują na początkowym tworzeniu hybridom komórkowych, będących długożyjącymi komórkami wydzielającymi przeciwciała monoklonalne.

W produkcji wspomnianych hybridom komórkowych wyróżnia się następujące etapy:

1. Immunizację odpowiednich zwierząt (na przykład myszy), przy zachowaniu ustalonych zasad drogi podaży antygeny, odpowiednich jego dawek, w tym dawek przypo-

- minających, aż do momentu uzyskania optymalnego miana immunoglobulin we krwi zwierzęcia.
2. Ocenę w warunkach *in vitro* swoistości i aktywności wytworzonych przez zwierzę przeciwciał.
 3. Pobranie od zwierzęcia puli komórek aktywnie produkujących przeciwciała. Można izolować limfocyty B z krwi obwodowej, jednak pula uzyskanych komórek może nie być licznie satysfakcjonująca, dlatego głównie pobiera się cały narząd: śledzionę, homogenizuje ją, izoluje limfocyty, a te następnie poddaje się fuzji z odpowiednio przygotowanymi (warunki podano poniżej) komórkami nowotworowymi – komórkami szpiczaka; o ile pobranie krwi zwierzęcia może zachować je przy życiu, o tyle izolowanie śledziony jest równoznaczne z uśmierceniem immunizowanego zwierzęcia – dawcy.
 4. Hodowlę komórek szpiczaka charakteryzujących się obecnością odpowiedniego bloku enzymatycznego: np. braku fosforybozylotransferazy hipoksantynowej – HGPRT⁻, bloku wynikającego z mutacji genu kodującego enzym: HGPRT. Hodowlę takich komórek prowadzi się przez okres około tygodnia przed przewidywaną fuzją z prawidłowymi limfocytami i utrzymuje w obecności w podłożu hodowlanym czynnika wzrostowego: 8-azaguaniny. Istniejący blok enzymatyczny umożliwia uzależnienie wzrostu komórek od obecności czynnika wzrostowego, czyli substancji, której komórka, wskutek zaistniałego bloku szlaku metabolicznego, nie potrafi zsyntetyzować. Dodatek lub wycofanie z podłoża czynnika wzrostowego pozwala wpływać na wzrost i przeżycie takich komórek.
 5. Fuzję (najczęściej prowadzoną w obecności glikolu polietylenowego) wyizolowanych ze śledziony zwierzęcia produkujących pożądaną immunoglobulinę limfocytów B z komórkami nowotworowymi (komórkami szpiczaka posiadającymi cechę nieśmiertelności oraz równoczesny, wspomniany wcześniej blok enzymatyczny).
 6. Selekcję klonów na tak zwanym podłożu wzrostowym selekcyjnym oraz namnażanie uzyskanych hybrydom techniką granicznych rozcieńczeń klonów. W przypadku bloku enzymatycznego HGPRT⁻, długoterminową hodowlę na podłożu selekcyjnym przeżyją jedynie te hybrydomy, które powstały w wyniku fuzji komórki szpiczaka (nadanie cechy nieśmiertelności) i limfocytu B (dostarczenia hybrydomie komórkowej prawidłowej formy enzymu HGPRT); niepożądane hybrydomy typu: limfocyt B-limfocyt B obumrą po kilkakrotnym pasażowaniu, natomiast te, które powstały na skutek fuzji samych komórek szpiczaka zginą z powodu posiadanego bloku enzymatycznego i braku syntezy puryn przez te komórki.
 7. Ocenę swoistości i aktywności wytworzonych przez hybrydomy przeciwciał. Badania te prowadzi się głównie na podstawie znanych i opisanych reakcji typu: antygen-przeciwciało. Głównym stosowanym testem jest test immunoenzymatyczny typu ELISA, praca ze swoistym antygenem splaszczonym na naczynkach testowych sprawdza zarówno obecność samych wyprodukowanych opisywaną techniką przeciwciał, jak i umożliwia określenie ich ilości, czyli pozwala na równoczesną ocenę jakościowo-ilościową produkowanych immunoglobulin.

Uzyskanie populacji aktywnie dzielących się i produkujących funkcjonalne przeciwciała monoklonalne hybrydom to początkowy, ale i podstawowy etap szlaku syntezy mAb tak na skalę laboratoryjną, jak i przemysłową. Obie mogą opierać się na namnażaniu hybrydom poprzez „hodowle” w układzie *in vivo* lub typowe hodowle *in vitro*. Hodowle *in*

in vitro są bardzo często prowadzone jako pasaż w specjalistycznych naczyniach hodowlanych umożliwiającym wzrost komórek w wysokich gęstościach, przy równoczesnym doprowadzaniu do hodowli świeżego medium wzrostowego, a odprowadzaniu z niego metabolitów, fragmentów komórkowych oraz produkowanych przeciwciał monoklonalnych. Takie specyficzne warunki hodowli można osiągnąć między innymi dzięki stosowaniu systemów membranowych, z membranami półprzepuszczalnymi: jednokrotnymi lub podwójnymi, o tak zwanym niskim punkcie odcięcia rzędu 10 000–30 000 kDa, gdzie wskazana wielkość masy odpowiada zakresowi działania membrany w aspekcie przepuszczalności przez nią cząsteczek, w tym białek immunoglobulinowych (miniPERM®, Unison Technologies, Hopkinton MA czy też CELLLine®, Integraf Bioscience, Ijamsville, MD). Podobne warunki hodowli można utrzymać w przypadku prowadzenia pasażu w bioreaktorach typu *hollow-fiber*.

Ważnym aspektem prowadzonej hodowli komórek hybrydowych jest ich pasaż na specjalnych podłożach wzrostowych, gdzie jako dodatek do podłoża stosuje się minimalne stężenie bydlęcej surowicy płodowej (około 1%), używanej zwykle jako suplement wzrostu w stężeniu około 10%, bądź też hybrydomy hoduje się na tzw. wolnych od surowicy mediach (*serum-free*), tak wzbogaconych, że dodanie surowicy staje się zbędne. Ta ostatnia możliwość jest korzystniejsza, gdyż obniża prawdopodobieństwo kontaminacji pozyskiwanych mAb frakcją bydlęcych immunoglobulin pochodzących z suplementu, czyli dodawanej do podłoża hodowlanego bydlęcej surowicy płodowej. Dodatkowym plusem nowoczesnych podłoży typu *serum free* jest ominięcie kolejnego problemu związanego z faktem, że obecność wyższych stężeń surowicy w podłożu wzrostowym sprzyja proliferacji hybrydom, ale wpływa hamująco na produkcję przez nie przeciwciał.

Wydajność produkcji przeciwciał monoklonalnych z podstawowej hodowli komórkowej jest stosunkowo niska, rzędu poniżej 20 mikrogramów immunoglobulin na mililitr. Większość aplikacji wykorzystujących przeciwciała monoklonalne wymaga stężeń w granicach od 0,1 do 10 miligramów na mililitr. Z tego powodu otrzymywane drogą hodowli podstawowej hybrydom przeciwciała monoklonalne często zagęszcza się, niestety, proces ten może prowadzić do częściowej dezaktywacji przeciwciał i utraty ich właściwości. Dotyczy to szczególnie zagęszczania immunoglobulin klasy M, klasy IgG3, bądź też rozdziału mono-, di- i trimerów immunoglobulin typu IgA [6]. Problem niskiej wydajności produkcji immunoglobulin w warunkach hodowli in vitro może zostać w pewnych granicach rozwiązany poprzez zmianę typu bądź skali hodowli. Stosowanie systemu membranowego podnosi wydajność produkcji do około 100 mg na mililitr, w przypadku zaś hodowli na skalę przemysłową można pozyskiwać odpowiednio od 0,1 aż do 100 gramów przeciwciał monoklonalnych podczas procesu produkcyjnego.

Synteza w systemie in vitro na skalę przemysłową dostarcza przeciwciał monoklonalnych wykorzystywanych głównie w celu zaspokojenia potrzeb diagnostyki, terapii bądź do tzw. badań podstawowych. Spotykanym układem pozyskiwania mAb w szczególnych wypadkach jest produkcja tychże przeciwciał w układzie in vivo. System ten polega na odpowiednim wprowadzeniu do organizmu zwierzęcia hybrydom, które zasiedlając organizm wrastają w guzy nowotworowe produkujące duże ilości immunoglobulin. Wyprodukowane immunoglobuliny najczęściej wydzielane są do płynu puchlinowego, który zbiera się w przestrzeni międzyotrzewnowej. Taki system „produkcji” oparty na inokulacji hybrydom do organizmu zwierzęcia prowadzi się głównie w przypadkach, kiedy:

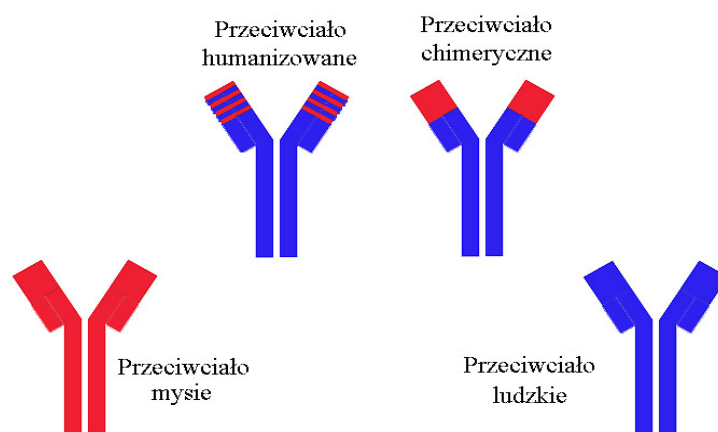
- jest niemożliwa lub bardzo trudna adaptacja uzyskanych hybrydom do warunków hodowlanych *in vitro* prowadzonych przy obniżonym stężeniu surowicy w podłożu wzrostowym;
- procesy oczyszczania przeciwciał monoklonalnych z płynu hodowlanego są niekorzystne dla wybranych frakcji immunoglobulin; mogą powodować denaturację i dezaktywację oczyszczanych mAb (dotyczy to szczególnie oczyszczania przeciwciał monoklonalnych należących do klas IgM, IgG3 i IgA);
- planuje się wykorzystanie mAb w badaniach klinicznych oraz w terapii, gdy równocześnie niezbędne jest przeprowadzenie oznaczenia toksyczności *in vivo* uzyskanych przeciwciał.

Podstawową wadą pozyskiwania mAb z hodowli *in vitro* jest prawdopodobieństwo utraty aktywności przeciwciał podczas procesu ich oczyszczania i zagęszczania (np. utrata zdolności wiązania dopełniacza przez fragmenty Fc oczyszczanych IgM i IgG3) [6]. Natomiast w wypadku produkcji techniką *in vivo* największym problemem jest wysoka śmiertelność zwierząt po inokulacji „produkcyjnych” hybrydom i ich następnej propagacji w organizmie zwierzęcia. Problem ten można zredukować np. poprzez prowadzenie odpowiedniego systemu zbiórki płynu puchlinowego i niedopuszczanie do stanu, w którym masa zgromadzonej wydzieliny przekraczałaby o 20% wartość wyjściowej masy zwierzęcia [6]. Pozytywnym aspektem otrzymywania mAb techniką *in vivo* jest przede wszystkim wysokie stężenie przeciwciał i uniezależnienie ich produkcji od dodatkowych suplementów wzrostowych, takich jak bydłęca surowica płodowa.

Przeciwciała, i to zarówno mono- jak i poliklonalne, są białkami, które w procesach potranslacyjnych poddawane są dodatkowej obróbce, a jeden z jej elementów stanowi proces glikozylacji. Produkowane *in vitro* mAb mogą być tym samym odmiennie glikozylowane. W miejsce reszt kwasu siałowego często pojawiają się cząsteczki mannozy. Prowadzić to może do zmniejszonego powinowactwa przeciwciał do antygeny, co jest równoznaczne ze zmniejszoną ich reaktywnością, a co niebezpieczniejsze, odmienna glikozylacja doprowadzić może do pojawienia się lub wzrostu immunogenności samych przeciwciał. Ten ostatni aspekt okazuje się szczególnie istotny w przypadku przeciwciał monoklonalnych stosowanych w terapii. Przeciwciało produkowane przez komórki zwierzęce już będzie immunogenne, a obecność reszt mannozowych przyczynia się do szybszej eliminacji *in vivo* tak glikozylowanych przeciwciał, głównie z powodu ich wiązania przez odpowiednie receptory o powinowactwie do mannozy [6]. Opisane czynniki stały się przyczyną powstania alternatywnych metod tworzenia przeciwciał monoklonalnych, ustawnie doskonalonych oraz modyfikowanych.

Nowoczesne metody syntezy przeciwciał monoklonalnych są oparte głównie na technikach biologii molekularnej i inżynierii genetycznej. Procesy klonowania, celowanej mutagenyzy oraz transgenyzy stoją u podstaw tworzenia nowych struktur przeciwciał monoklonalnych określanych mianem przeciwciał chimerycznych lub innej odmiany mAb – przeciwciał humanizowanych. Najwyższym osiągnięciem jest stworzenie techniką rekombinacji genetycznej monoklonalnych przeciwciał w pełni „ludzkich”. W odróżnieniu od zwierzęcych (mysich) mAb, otrzymywanych jako produkty syntezy w komórkach mysich hybrydom, w strukturze cząsteczek **przeciwciał chimerycznych** wyróżnić można region zmienny kodowany przez mysie geny immunoglobulin, które są poddane fuzji drogą rekombinacji genetycznej z regionem genów ludzkich kodujących stałe odcinki łańcuchów lekkich i ciężkich immunoglobulin. **Przeciwciała „humanizowane”** otrzymywane

są również dzięki technologiom rekombinacji DNA. Przeciwciała „humanizowane” charakteryzują się obecnością zredukowanych do minimum odcinków regionów zmiennych pochodzenia mysiego strukturalnie zintegrowanych z pozostałością „szkieletu cząsteczki” ludzkiej immunoglobuliny. W przypadku przeciwciał chimerycznych, dużym osiągnięciem jest zredukowanie ich immunogenności, a wynika to z ograniczenia „wielkości” obcogatkowego białka (mysiego) wprowadzanego do organizmu wraz z całą cząsteczką immunoglobuliny. Obecność „mysiego” fragmentu w obrębie regionu zmiennego przeciwciała chimerycznego nadal jednak może prowadzić do syntezy ludzkich immunoglobulin antymysich, które następnie wylapują wprowadzane mAb, pułapując je, tj. obniżając efektywność ich działania. Dalsze zmniejszenie procentowej zawartości „mysich” fragmentów w cząsteczce przeciwciał humanizowanych jeszcze istotniej redukuje ich immunogenność, niestety szereg manipulacji molekularnych podczas tworzenia tych przeciwciał znacząco ogranicza wydajność ich syntezy i może objawiać się zmniejszonym powinowactwem oraz siłą wiązania do antygeny [1]. Typy przeciwciał wykorzystywanych w badaniach klinicznych zilustrowano na rycinie 13.



Ryc. 13. Struktura przeciwciał stosowanych w badaniach klinicznych (na czerwono zaznaczono elementy immunoglobuliny pochodzenia mysiego, na niebiesko – pochodzenia ludzkiego).

Możliwe jest otrzymanie „całkowicie ludzkich” przeciwciał monoklonalnych po uzyskaniu ludzkich hybrydom pomiędzy ludzkimi komórkami B i komórkami szpiczaka ludzkiego. W praktyce monoklonalne przeciwciała „ludzkie” otrzymywane są głównie drogą transgenezy. W tym wypadku proces transferu genów ludzkich immunoglobulin prowadzony może być dwoma sposobami: pierwszy polega na tym, że do zarodków mysich na etapie wczesnej zygoty, do przedjądrza męskiego wprowadzana jest odpowiednia informacja genetyczna dotycząca syntezy ludzkich immunoglobulin. Prowadzi to do uzyskania transgenicznych zygot rozwijających się w transgeniczne zwierzęta. Alternatywną metodą stanowi praca na poziomie mysich blastocyst i wprowadzanie do nich modyfikowanych mysich komórek zarodkowych – *transfektom* (odpowiedniki hybrydom, w których informacja genetyczna kodująca immunoglobulinę jest pochodzenia ludzkiego).

Opisana technika często zwiększa szanse przeżycia modyfikowanych zarodków, oraz pozwala zwiększyć ich liczbę, prowadzi jednak do otrzymania myszy chimerycznych, których dopiero następcza selekcja w kolejnych pokoleniach może doprowadzić do

otrzymania zwierzęcia w pełni transgenicznego, często typu *knock-out*, gdzie odpowiednie geny mysie kodujące immunoglobuliny zostają inaktywowane – wyłączone.

Odmianą, szybszą i prostszą metodą uzyskania ludzkich przeciwciał monoklonalnych jest tzw. technika *phage display*, w której rekombinacji poddaje się genomy bakteriofagów, a te na kolejnym etapie ulegając ekspresji syntetyzują odpowiednie białka fuzyjne. Białka te stanowią połączenie klonowanej immunoglobuliny z odpowiednim białkiem płaszczka fagowego i są eksponowane na zewnątrz cząstki fagowej. Wprowadzając odpowiedni gen taką metodą w strukturę genomu bakteriofaga, można doprowadzić do ekspozycji na powierzchni płaszczka białkowego bakteriofaga dowolnego białka, w tym także białka ludzkiej immunoglobuliny. W celu uzyskania takiej celowanej ekspozycji przeprowadza się rekombinację wektora molekularnego pochodzenia fagowego. Gen ludzkiej immunoglobuliny wklonowuje się w genom bakteriofaga, co w efekcie prowadzi do uzyskania fuzji dwóch genów: ludzkiego kodującego Ig oraz fagowego kodującego jedno z białek płaszczka bakteriofaga. Tak zrekombinowanym bakteriofagiem przeprowadza się następnie transfekcję komórek bakterii *Escherichia coli*. Bakteriofag namnaża się w komórkach bakteryjnych, a każda z powstałych cząstek fagowych eksponuje na swojej powierzchni cząsteczkę ludzkiego przeciwciała.

Namnożone zrekombinowane bakteriofagi można wyizolować, oznaczyć ich miano i wykorzystać jako nośniki zsyntetyzowanych ludzkich immunoglobulin, bądź też po uprzednim enzymatycznym odłączeniu od powierzchni płaszczka białkowego bakteriofagów immunoglobulin i ich następczemu oczyszczeniu, same ludzkie immunoglobuliny można przeznaczyć do badań. Taka technika pozyskiwania mAb zasługuje na uwagę chociażby z tego względu, że zachodzący sam proces powielania się bakteriofagów wewnątrz infekowanych komórek bakteryjnych prowadzi do zwielokrotnienia – amplifikacji – wprowadzonych ludzkich genów immunoglobulin; można więc stwierdzić, że jest to również swoistego rodzaju technika ich klonowania.

Uzyskane opisanymi powyżej metodami przeciwciała monoklonalne stosuje się w różnych dziedzinach, w tym w diagnostyce, terapii i badaniach podstawowych. Najpopularniejszymi metodami wykorzystującymi mAb są:

1. **Techniki jakościowe**, takie jak: immunocytochemia, western blotting, chromatografia immunopowinowactwa, cytometria przepływowa, wykorzystujące przeciwciała monoklonalne i umożliwiające przeprowadzenie analiz typu:

- detekcja i ocena procesu apoptozy,
- immunofenotypowanie komórek,
- badania przebiegu cyklu komórkowego
- określanie efektywności transfekcji komórek i ekspresji transgenów,
- badanie procesów transportu komórkowego,
- badanie procesów wychwytu leków przez komórki,
- badanie budowy i funkcji struktur subkomórkowych,
- badania z zakresu cytotoksyczności,
- określanie aktywności komórek.

2. **Ilościowe**, takie jak techniki immunoenzymatyczne:

- testy immunoenzymatyczne typu EIA (ang. *Enzyme Immune Assays*),

- enzymatyczne testy immunosorpcyjne typu ELISA (ang. *Enzyme Linker Immune Sorbent Assay*),
- testy oparte na zjawisku immunofluorescencji FIA (ang. *Fluorescence Immuno Assay*),
- testy oparte na zjawisku immunoluminescencji LIA (ang. *Luminiscence Immuno Assay*),
- oraz testy radioimmunologiczne RIA (ang. *Radio Immuno Assay*).

Obecnie do znakowania przeciwciał monoklonalnych stosuje się coraz to bardziej swoiste i charakteryzujące się różnymi parametrami spektralnymi znaczniki. Są wśród nich ciągle jeszcze radioizotopy, jednak ze względów bezpieczeństwa wykorzystuje się przede wszystkim fluorochromy. Zalicza się do nich: fluoresceinę (FITC), fikoerytrynę (PE), cyjaninę 5 i 7 (Cy-5, Cy-7), czerwień teksańską (Texas Red, TR) czy też allofikocjaninę (APC). Dobór znacznika fluorescencyjnego zależy głównie od źródła promieniowania, którym jest wzbudzana emisja fluorescencji. Obserwuje się jednak pewne ograniczone możliwości koniugacji przeciwciał z danymi fluorochromami. Większość z fluorochromów stosunkowo łatwo poddaje się koniugacji z przeciwciałami klasy IgG. Trudniejsza do koniugacji jest klasa immunoglobulin M, które słabiej łączą się z fikobiliproteinami, takimi jak fikoerytryna czy allofikocjanina; gorzej również łączą się z czerwiecią teksańską [<http://www.hmds.org.uk/fluorochrome>].

Pula dostępnych analiz z tak wyznakowanymi przeciwciałami monoklonalnymi jest niemalże nieograniczona. Dzięki możliwości zsyntetyzowania odpowiednich mAb istnieje opcja prowadzenia badań typu: analiza struktur komórkowych, detekcja receptorów, ocena aktywności translacyjnej komórek, obecność i poziom wybranych białek: komórkowych, pozakomórkowych, wirusowych czy wreszcie białek prionowych; wszystkie wspomniane struktury mogą być tak wizualizowane, scharakteryzowane, a także oznaczone ilościowo właśnie dzięki możliwości syntezy mAb. Jeżeli tylko znamy lub jesteśmy w stanie przewidzieć sekwencję aminokwasową danego białka czy jego fragmentu, możliwa staje się konstrukcja odpowiedniego wektora molekularnego, kodującego tę sekwencję aminokwasów, a w dalszej kolejności tak stworzony wektor posłuży do rekombinacji genetycznej odpowiedniej „hybrydomy” i ostatecznie doprowadzi do uzyskania pożądanej cząsteczki immunoglobuliny. W takich manipulacjach molekularnych jedynym ograniczeniem wydawać się może problem prowadzenia takich kombinacji na poziomie genetycznym, które nie tylko pozwolą na syntezę określonej sekwencji aminokwasowej, lecz doprowadzą także do uzyskania funkcjonalnej, czyli „aktywnej” przestrzennie konformacji immunoglobuliny.

Nowa technologia produkcji przeciwciał monoklonalnych przynosi bardzo wiele korzyści w terapii chorób. Można tu przytoczyć przykłady leczenia chorób autoimmunologicznych, uzyskania inhibicji procesów angiogenezy, protekcji angioplastów przed restenozą, ale najbardziej obiecujące jest zastosowanie mAb w terapii nowotworów. W przypadku tradycyjnej chemio- czy radioterapii nowotworów nie można mówić o wybiórczym działaniu tych czynników na komórki nowotworowe, można je ukierunkować na komórki szybkodzielące się (a do takich należą komórki nowotworowe), niemniej jednak zdrowe, naturalnie intensywnie dzielące się komórki (np. szpiku kostnego, nabłonka układu pokarmowego, komórki w skórze) również pozostaną pod negatywnym wpływem cytostatyków. Stan taki nie jest więc obojętny dla zdrowia całego organizmu – dawki leków powodują wiele objawów ubocznych. Aby zmniejszyć efekty toksyczne terapii, można spróbować zmniejszyć dawki, schodząc do wartości suboptymalnych, lecz efektem będzie naj-

prawdopodobniej zaprzeczanie pozytywnych skutków leczenia. Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych specyficznym wiążącym się do zmienionych komórek umożliwia przeprowadzenie swoistej i skutecznej terapii, a równocześnie minimalizuje efekty uboczne. Aby jednak uzyskać taki efekt, należy zidentyfikować dowolne białko, które można potraktować jako swoiste dla danego typu komórek białko markera; następnie wykorzystać je jako cząsteczkę antygeny, przeciwko któremu pozyska się odpowiednie przeciwciało monoklonalne. W ten sposób prowadzi się między innymi wyszukiwanie tzw. TAAs, (ang. *Tumor Associated Antigens*), czyli antygenów specyficznych dla nowotworów. Pojawienie się takich antygenów w komórkach może być wynikiem wielu procesów, takich jak zmieniona glikozylacja białek, zmieniona ekspresja białek onkogennych wirusów, nadekspresja onkogenów komórkowych czy wreszcie różnych mutacji w obrębie genomów komórek, np. translokacji chromosomalnych. Pomimo różnorodności procesów związanych z pojawieniem się białek o charakterze TAA, niestety nie jest łatwo odnaleźć, a co ważniejsze przypisać takie specyficzne białko tylko do danego typu nowotworu. Obecnie jako białka markerowe, które jednocześnie mogą stać się miejscem rozpoznawanym przez terapeutyczne przeciwciała monoklonalne, wymienia się: transmembranowe białko charakterystyczne dla epitelialnych komórek prostaty – PSMA (ang. *Prostate Specific Membrane Antigen*); wzrost poziomu tego białka towarzyszy przypadkom gruczolakoraka prostaty. Kolejnymi białkami/antygenami markerowymi/znacznikowymi są epidermalne czynniki wzrostowe i ich receptor, w tym HER-2 i EGF-R. Pierwszy z nich jest silnie nadprodukowany w około 30% inwazyjnego raka piersi, natomiast receptor EGF-R towarzyszy wielu nowotworom i jest skojarzony z ich złośliwością [1]. Najłatwiej zidentyfikować bogatsze w grupę białek markerowych nowotwory pochodzące z układu krwiotwórczego. Antygeny, takie jak: CD20, CD22, CD25, CD33 i CD52, można tutaj łączyć bezpośrednio z komórkami różnicującymi się lub z już zróżnicowanymi komórkami pochodzącymi z całego układu krwiotwórczego. Oprócz znalezienia odpowiedniego białka markerowego – TAA, przypisanego do określonego typu nowotworu, niezwykle istotne jest, aby poziom ekspresji takiego białka nowotworowego okazał się na tyle wysoki, by było możliwe łatwe i skuteczne „wylapywanie” go przez podawane mAb. Jako częściowe rozwiązanie tego kolejnego problemu przyjmuje się strategię dodatkowej podaży wybranych cytokin przed właściwą immunoterapią, wykorzystując fakt, iż interferony alfa lub beta (IFN- α lub IFN- β), przejściowo mogą stymulować zwiększoną ekspresję antygenów na powierzchni komórek nowotworowych [1].

Wyszukanie określonego białka, przeciwko któremu można wytworzyć specyficzne przeciwciało monoklonalne, to dopiero początek skutecznej immunoterapii. Dodatkowo należy rozwiązać takie trudności, jak:

- szybka eliminacja w organizmie mAb, czyli tzw. szybki klirens wprowadzonych mAb, związany z krótkim czasem ich półtrwania (zazwyczaj od 18 do 48 godzin od podaży); to natomiast wynika ze stymulacji odpowiedzi immunologicznej poprzez wprowadzone do organizmu chorego przeciwciała i produkcji ludzkich anty-immunoglobulin [4];
- wysokie pułapowanie wprowadzonych przeciwciał przez pojawiające się duże stężenie wolnego antygeny nowotworowego, który podlega procesowi przypominającemu „nadmierne złuszczenie się” z powierzchni komórek cząstek białek nowotworowych; zachodzi ono w celu protekcji komórek nowotworowych przed działaniem systemu immunologicznego [4].

Pierwszy z wymienionych problemów można wyeliminować w ten sposób, iż w miejsce mysich mAb podaje się pacjentowi otrzymywane technikami inżynierii genetycznej przeciwciała chimeryczne, humanizowane lub w pełni ludzkie. Wówczas uzyskamy efekt zminimalizowania antygenowości wprowadzanego przeciwciała, a to z kolei automatycznie powinno zmniejszyć problem „klirensu immunologicznego”. W drugim z przytoczonych problemów skuteczne może być podanie tzw. dawki „wysycającej” przeciwciał terapeutycznych w pierwszym rzucie; powinno to wychwycić wolno pływające cząsteczki TAA, a ponowne podanie tych samych przeciwciał powinno wiązać już bezpośrednio antygeny zlokalizowane na powierzchni komórek nowotworowych, a nie te „złuszczone” do środowiska płynów ustrojowych.

Dostępność przeciwciał monoklonalnych do antygenów zlokalizowanych na powierzchni komórek krwi jest stosunkowo wysoka, stąd immunoterapia nowotworów dotyczących komórek wywodzących się z układu krwiotwórczego kończy się powodzeniem w dużo większym stopniu. Niestety, dostępność dla wprowadzanych przeciwciał monoklonalnych do komórek guza litego lub dowolnej tkanki nowotworowej zlokalizowanej „pozanaczyniowo” staje się znacząco niższa. Już same komórki endotelium naczyń stanowią dla nich trwałą barierę napotyka na wyraźne trudności; ściśliwość komórek endotelium jest bardzo wysoka, przepuszczalność niska, tym samym wydostanie się cząstek poza światło naczyń. Ponadto większość nowotworów jest pochodzenia nabłonkowego, a komórki nabłonka również charakteryzują się specyfiką silnych połączeń międzykomórkowych „wzmacnianych” oddziaływaniem swoistych białek adhezyjnych z grupy kadheryn.

Istnieje jeszcze trzeci problem związany z istnieniem wysokiego ciśnienia płynu międzytkankowego w obrębie tkanki guza, co wynika z „bogatokomórkowości” guza, jego przepelnienia ciągle dzielącymi się komórkami nowotworowymi; w efekcie „perfuzja” do wnętrza guza staje się prawie niemożliwa [1]. Pokonanie wspomnianych barier przez podane pacjentowi zarówno donaczyniowo, jak i bezpośrednio do guza przeciwciała monoklonalne może się okazać wyjątkowo trudne; istnieją jednak pewne strategie postępowania, które skutecznie zwiększają „penetrację” mAb do wnętrza tkanki nowotworowej. Wykorzystać można między innymi podaż czynników prozapalnych i wazoaktywnych, takich jak: czynnik martwicy nowotworu alfa (TNF- α), histamina, bradykinina, leukotrien B₄, fizalamina czy interleukina 1-beta (IL-1 β). Zwiększają one przepuszczalność ściany naczyń, przez co przyczyniają się do lepszej migracji mAb (metoda ta korzystnie wpływa na wzrost penetracji wszystkich innych substancji, w tym chemioterapeutyków stosowanych oprócz mAb). Podanie bezpośrednio do guza TNF- α dodatkowo wywołuje apoptozę, czyli programowaną śmierć komórek, redukując tym samym liczbę komórek nowotworowych. Ta strategia obarczona jest jednak dużym prawdopodobieństwem pojawienia się wielu efektów ubocznych podażi oraz wymaga dużej kontroli stanu pacjenta i jego odpowiedzi na terapię.

Bezpieczniejsze i „łatwiejsze” jest ukierunkowanie „ataku” na białka adhezyjne – kadheryny, zależne między innymi od jonów wapnia. Podaż czynnika chelatującego, takiego jak EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy), znacznie osłabia oddziaływania międzykomórkowe, a podanie niezależnej puli mAb skierowanych przeciwko swoistym kadherynom może poprzez rozluźnienie połączeń międzykomórkowych ułatwić penetrację tak terapeutycznym przeciwciałom monoklonalnym, jak i innym cząsteczkom, w tym chemioterapeutynom [1]. Mając takie możliwości i perspektywę uzyskania tylko korzyści do tera-

pii wprowadza się coraz więcej przeciwciał monoklonalnych. Przykłady stosowanych na świecie terapeutycznych przeciwciał monoklonalnych zebrano w tabeli XI.

Równie cenna i istotna stała się możliwość koniugacji przeciwciał monoklonalnych z różnymi cząsteczkami. Skutkiem było stworzenie tzw. immunokoniugatów wykorzystywanych w diagnostyce (wspomniane wcześniej połączenia ze znacznikami fluorescencyjnymi), ale co istotniejsze, ten sam mechanizm koniugacji przeciwciała z obcą cząsteczką umożliwił powstanie cząsteczek mAb pełniących rolę nośnikowych przeciwciał monoklonalnych oraz bifunkcyjnych przeciwciał monoklonalnych. W przypadku nośnikowych przeciwciał monoklonalnych połączenie z przeciwciałem takich cząsteczek, jak leki, proleki, cytokiny, radioizotopy czy wreszcie komórki pozwala otrzymywać immunokoniugaty, takie jak: immunotoksyny, immunoliposomy, immunocytokiny, radioimmunokoniugaty czy immunokoniugaty komórkowe. Przeciwciało monoklonalne, docierając do celu, oddziałuje na komórkę lub dociera tam z transportowaną substancją/komórką pomocniczą, wykazując wzmożony efekt terapeutyczny. Immunokoniugaty działają nie tylko silniej na wybrany cel, np. komórkę nowotworową, ale co istotne, wpływ ten jest wysoce specyficzny i ograniczony do konkretnej lokalizacji w naszym organizmie, narządzie, a nawet tkance.

Procedury pozyskiwania przeciwciał monoklonalnych ciągle się rozwijają. Stosuje się już mikroprzeciwciała, które praktycznie zawierają jedynie aktywne domeny immunoglobulin, przez co niosą wyłącznie potrzebną „informację”, nie wywołując ubocznych efektów „wtórnej” immunizacji antyimmunoglobulinowej. Nowoczesne przeciwciała monoklonalne są dobrym, a może najlepszym dostępnym i sprawnym narzędziem diagnostycznym, badawczym, terapeutycznym.

Tabela XI. Wybrane przykłady terapeutycznych przeciwciał monoklonalnych [1–6]

Lp.	Przeciwciało/sposób wytwarzania	Nazwa handlowa	Wskazanie terapeutyczne	Uwagi
1	<i>Ibritumomab</i> tiuksetan, przeciwciało mysie	<i>Zevalin</i>	przeciwnowotworowe	
2	<i>Muromonab CD3</i> , przeciwciało mysie skierowane przeciw powierzchniowemu antygenowi CD3 limfocytów T	<i>Orthoctone OKT3</i>	przeciwdziałanie ostrej reakcji odrzutu przeszczepu narządów	
3	<i>Abciximab</i> , fragmenty Fab z chimerycznego przeciwciała monoklonalnego skierowane przeciw płytkowemu receptorowi powierzchniowemu GPII ^b /IIIa.	<i>ReoPro</i>	działanie przeciwzakrzepowe	
4	<i>Rituximab</i> , przeciwciało chimeryczne skierowane przeciw powierzchniowemu antygenowi CD20 limfocytów B	<i>Rituxan</i>	chłoniak nieziarniczy guzkowy	
5	<i>Daclizumab</i> , humanizowane przeciwciało skierowane przeciw łańcuchowi α receptora IL-2	<i>Zenapax</i>	przeciwdziałanie ostrej reakcji odrzutu po przeszczepie nerki	
6	<i>Basiliximab</i> , chimeryczne przeciwciało skierowane przeciw łańcuchowi α receptora IL-2	<i>Simulect</i>	jak wyżej	
7	<i>Infliximab</i> , chimeryczne przeciwciało skierowane przeciw TNF- α	<i>Remicade</i>	choroba Crohna, reumatoidalne zapalenie stawów	

8	<i>Palivizumab</i> , humanizowane przeciwciało skierowane przeciw epitopowi na powierzchni wielojądrazastego wirusa układu oddechowego	<i>Synagis</i>	zapobieganie chorobie dolnych dróg oddechowych wywołanej wirusem wielojądrazastym u dzieci	
9	<i>Trastuzumab</i> , humanizowane przeciwciało skierowane przeciw HER2, tj. receptorowi 2 naskórkowego czynnika wzrostu	<i>Herceptin</i>	rak piersi z przerzutami	
10	<i>Gemtuzumab</i> , przeciwciało humanizowane	<i>Ozogamicin</i>	przeciwnowotworowe	
11	<i>Alemtuzumab</i> , przeciwciało humanizowane	<i>Campath</i>	przeciwnowotworowe	
12	<i>Cetuximab</i> , przeciwciało chimeryczne, blokuje receptor EGFR	<i>Erbitux</i>	przeciwnowotworowe	
13	<i>Adalimumab</i> , przeciwciało ludzkie	<i>Humira</i>	reumatoidalne zapalenie stawów	
14	<i>Ranibizumab</i> , przeciwciało humanizowane, rhu	<i>Lucentis</i>	okulistyka, zmiany degeneracyjne związane z wiekiem	
15	<i>Natalizumab</i>	<i>Antegren</i>	stwardnienie rozsiane	
16	<i>Omalizumab</i> , wiąże IgE	<i>Xolair</i>	astma	
17	<i>Zevalin</i> , przeciwciało chimeryczne skierowane przeciw powierzchniowemu antygenowi CD20 limfocytów B	<i>Zevalin</i>	przeciwnowotworowe	Występuje w formie koniugatów z radioizotopami: Indem In ¹¹¹ oraz Itrem Y ⁹⁰
18	<i>Tositumomab</i> , przeciwciało chimeryczne skierowane przeciw powierzchniowemu antygenowi CD20 limfocytów B	<i>Bexxar</i>	przeciwnowotworowe	Występuje w formie koniugatów z radioizotopem: Jod J ¹³¹
19	<i>Mylotarg</i> , wiąże receptor CD33	<i>Mylotarg</i>	ostra białaczka szpikowa	Koniugat z kalichemicyną, toksyną uszkadzającą DNA
20	<i>Bevacizumab</i> , wiąże VEGF	<i>Avastin</i>	inhibitor angiogenezy	

PIŚMIENNICTWO

1. *Christiansen J., Rajasekaran A.K.*: Biological impediments to monoclonal antibody-based cancer immunotherapy. *Molecular Cancer Therapeutics* 2004, 3(11), 1493–1501.
2. *Countouriotis A.* et al.: Cell surface antigen and molecular targeting in the treatment of hematologic malignancies. *Stem Cells* 2002, 20, 215–229.
3. *Hainsworth J.D.*: Monoclonal Antibody Therapy in Lymphoid Malignancies. *The Oncologist* 2000, 5, 376–384.
4. *Kieć-Kononowicz K.*: Leki otrzymywane z zastosowaniem technologii rekombinowanego DNA. *Farmacja Polska* 2005, 61, 407–417.
5. *Mullin R.*: Targeted drugs. Contractors score on a new class of cancer therapeutics. *Chemical&Engineering News* 2005, 83(20), 9.
6. *Ward P.A.* et al.: Monoclonal antibody production. National Academy Press. Washington DC 1999.

12. Peptydomimetyki i rekombinanty białkowe – leki nowej generacji

Ilona Bednarek, Krzysztof Cholewa

Biochemia białek i nowa, szeroko rozwinięta proteomika, to dziedziny, dzięki którym możliwe jest między innymi poznanie zarówno struktury, jak i funkcji związków o charakterze białkowym/peptydowym.

Większość aktywnych cząsteczek endogennych, takich jak np. grupa hormonów, neurotransmiterów, enzymów czy innych przekaźników informacji, np. endogennych peptydów opioidowych, to związki o charakterze białkowym. Odrębną grupę stanowią receptory komórkowe, zarówno błonowe, cytoplazmatyczne, jak i jądrowe, które pod względem swojej budowy również są białkami lub peptydami. Znajomość funkcji oraz budowy receptorów stanowi bardzo cenną bazę wyjściową do pracy nad projektowaniem związków o odpowiednim powinowactwie do tychże receptorów.

Tak powstaje wiele nowych farmaceutyków, które mogą między innymi funkcjonować jako agoniści lub antagoniści wybranych receptorów. Patrząc na szeroki zakres funkcji pełnionych przez peptydy/białka w organizmie, należy jednak zdawać sobie sprawę z tego, że projektowane farmaceutyki to nie tylko wspomniane związki o zdolności pobudzania, bądź blokowania wybranych receptorów. To również odpowiednie hormony, enzymy, czynniki wzrostu lub martwicy komórek/tkanek, z których te ostatnie reprezentują szeroką gamę cytokin.

Dla małych cząstek białkowych i peptydów stosuje się klasyczne metody syntezy chemicznej, prowadzonej zarówno w fazie rozpuszczalnej, jak i syntezy z użyciem tak zwanej fazy unieruchomionej/immobilizowanej na odpowiednich nośnikach. Większe białka, ich zmodyfikowane postaci oraz odpowiedniki otrzymywane są najczęściej dzięki wykorzystaniu nowoczesnych technik rekombinacji genetycznej.

Tutaj wykorzystanie technik biologii molekularnej i inżynierii genetycznej pozwala między innymi na uzyskiwanie białek produkowanych przez komórki „bioreaktory” niebędące naturalnym źródłem syntetyzowanych cząsteczek. W tak popularnych w biotechnologii komórkach bakteryjnych *Escherichia coli* czy komórkach drożdży *Saccharomyces* zachodzi produkcja obcych „gatunkowo” białek, np. ludzkich bądź zwierzęcych (np. insuliny czy hormonu wzrostu).

Białka otrzymywane właśnie w ten sposób określane są potocznie mianem białek rekombinowanych, w analogii do rekombinowanych cząsteczek kwasów nukleinowych. Należy jednak podkreślić, iż zalecana, poprawna nazwa brzmi „białka rekombinantowe”. Stanowią one ważną i cenną grupę leków nowej generacji, tzw. biofarmaceutyków.

W celu otrzymania rekombinantów białkowych najczęściej wprowadza się właściwe dla syntetyzowanych białek geny do komórek bakteryjnych lub drożdżowych odpowiednimi technikami transferu genów, np. techniką elektroporacji (z wykorzystaniem impulsów elektrycznych jako czynników przejściowo perforujących błony plazmatyczne i pro-

wadzących w ten sposób do wnikania do komórek cząsteczek wybranych przez nas genów) lub lipotransferu, gdzie liposomy stanowią czynnik transportujący do wnętrza komórek odpowiednie cząsteczki kwasów nukleinowych/genów.

Istnieje wiele szczegółowych opracowań podających specyfikę i pełną charakterystykę metod transferu genów, a odpowiednie procedury uwzględniają charakter komórek, do których ma on być zastosowany, oraz specyfikę, w tym długość odcinka kwasu nukleinowego wprowadzanego do modyfikowanych, rekombinowanych genetycznie komórek.

W przypadku peptydów i białek stosowanych jako farmaceutyki na uwagę zwraca fakt wielu niedogodności wynikających z charakteru chemicznego tych cząsteczek. Podkreśla się, między innymi, ich degradowalność po podaniu doustnym (głównie niszczenie w wyniku silnie kwaśnego pH i obecności peptydaz w soku żołądkowym), słabą przenikalność lub wręcz jej brak w odniesieniu np. do bariery krew/mózg, szybką degradację przez peptydazy pozostałych płynów ustrojowych, a w związku z tym niestabilność, szybki metabolizm i eliminację z ustroju.

Te niedogodności przyczyniły się do kolejnego etapu syntezy białek i peptydów zmodyfikowanych w taki sposób, aby ich szeroko rozumiana trwałość i biodostępność zostały maksymalnie ulepszone.

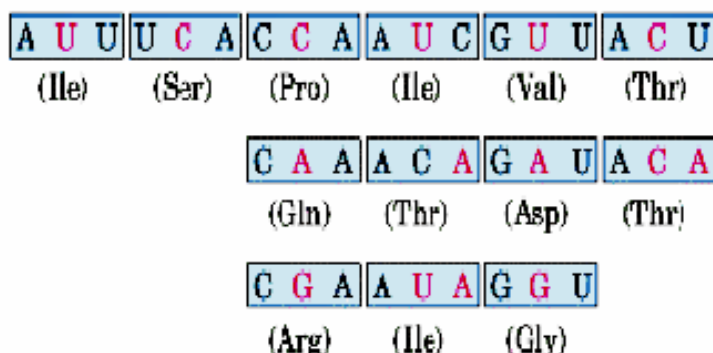
Pojedyncza zamiana aminokwasu w białku czy włączenie dodatkowej sekwencji aminokwasowej może np. zmienić rozpuszczalność, powinowactwo do receptora, aktywność enzymatyczną bądź czas połowicznego rozpadu w organizmie. Techniki, takie jak celowana mutageneza czy tworzenie białek fuzyjnych, odgrywają czołową rolę w syntezie peptydów/białek o zmodyfikowanych właściwościach.

W przypadku celowanej mutagenezy (ang. *site-directed mutagenesis*), na podstawie klasycznego narzędzia, jakim jest kod genetyczny i jego tzw. trójkowy zapis, można w dość łatwy sposób, manipulując sekwencją nukleotydów w kodującym odcinku kwasów nukleinowych, wprowadzić punktową zmianę – celowaną mutację.

Pojedyncza substytucja zasad typu: tranzycja lub transwersja (odpowiednio: zasada purynowa na purynową/pirymidynowa na pirymidynową, bądź w wypadku transwersji: podstawiona zasada purynowa na pirymidynową), prowadząc do zmiany sekwencji nukleotydowych w obrębie kodonu (kodującej aminokwas trójki nukleotydów), może w efekcie końcowym doprowadzić do uzyskania genu zawierającego informację o zupełnie innym aminokwasie w wybranej pozycji białka (*ryc.* 14–16).



Ryc. 14. Zapis kodonów w ramce odczytu.



Ryc. 15. Substytucje pojedynczych nukleotydów w kodonie mogą prowadzić do zmiany informacji genetycznej, zmiana sekwencji aminokwasów w kodonie białka, np. CAA→Gln CGA→Arg. Tranzycja A→G prowadzi do zamiany aminokwasów z Gln na Arg.

		Drugi nukleotyd kodonu					
		U	C	A	G		
Pierwszy nukleotyd kodonu	U	UUU Fenyloalanina	UCU Seryna	UAU Tyrozyna	UGU Cysteina	Trzeci nukleotyd kodonu	U
		UUC Fenyloalanina	UCC Seryna	UAC Tyrozyna	UGC Cysteina		C
		UUA Leucyna	UCA Seryna	UAA STOP	UGA STOP		A
		UUG Leucyna	UCG Seryna	UAG STOP	UGG Tryptofan		G
C	CUU Leucyna	CCU Prolina	CAU Histydyna	CGU Arginina	U		
	CUC Leucyna	CCC Prolina	CAC Histydyna	CGC Arginina	C		
	CUA Leucyna	CCA Prolina	CAA Glutamina	CGA Arginina	A		
	CUG Leucyna	CCG Prolina	CAG Glutamina	CGG Arginina	G		
A	AUU Izoleucyna	ACU Treonina	AAU Asparagina	AGU Seryna	U		
	AUC Izoleucyna	ACC Treonina	AAC Asparagina	AGC Seryna	C		
	AUA Izoleucyna	ACA Treonina	AAA Lizyna	AGA Arginina	A		
	AUG Metionina	ACG Treonina	AAG Lizyna	AGG Arginina	G		
G	GUU Walina	GCU Alanina	GAU Asparaginan	GGU Glicyna	U		
	GUC Walina	GCC Alanina	GAC Asparaginan	GGC Glicyna	C		
	GUA Walina	GCA Alanina	GAA Glutaminian	GGA Glicyna	A		
	GUG Walina	GCG Alanina	GAG Glutaminian	GGG Glicyna	G		

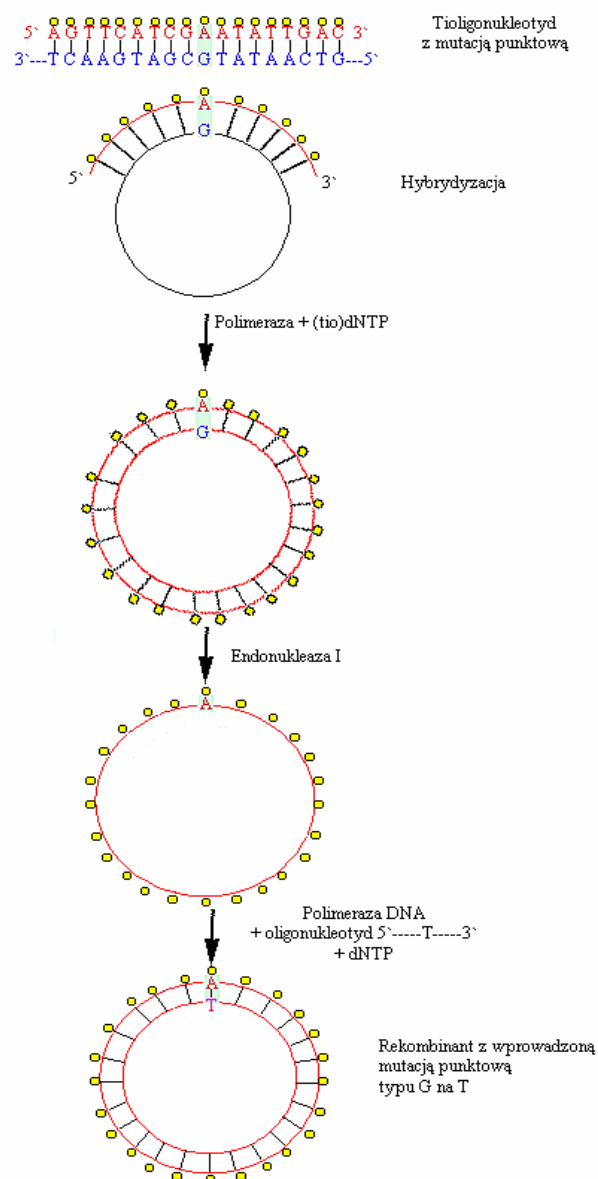
Ryc. 16. Tabela kodu genetycznego.

Pojedyncza zmiana aminokwasu z kolei pociągnie za sobą zmianę właściwości zsyntetyzowanego białka (np. utrata centrum aktywnego, maskowanie miejsc cięcia proteolitycznego itp.). Właśnie taką zmianę jesteśmy w stanie sami odpowiednio zaprogramować i to stało się podstawą celowanej mutagenyzy (ryc. 17).

Celowa mutagenyza

Wobec wybranego genu syntetyzowana jest w warunkach *in vitro* sekwencja oligonukleotydu posiadająca jeden niesparowany nukleotyd, którego dobór zależy od projektowanej wprowadzanej zmiany. Oligonukleotyd przyłącza się komplementarnie do wy-

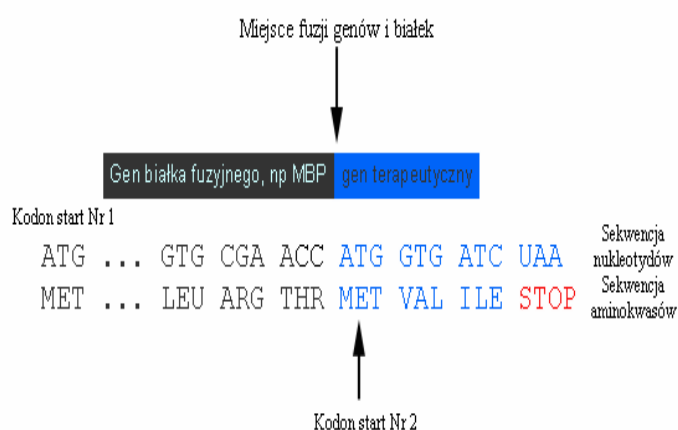
branego fragmentu DNA kodującego dany produkt białkowy, zachowany zostaje jeden niesparowany układ nukleotydów pomiędzy oligonukleotydem a sekwencją DNA poddawaną mutacji celowanej. Do kompleksu dodawane są tiopochodne dNTP oraz polimeraza DNA wydłużająca komplementarnie sekwencję oligonukleotydu wobec zmienianej matrycy. Powstaje hybrydowa dwuniciowa cząsteczka DNA zawierająca jeden niesparowany nukleotyd oraz jedną nić zbudowaną z dNTP, drugą zaś z tiopochodnych dNTP. Hybrydę poddaje się działaniu endonukleazy I, która degraduje nić zbudowaną z niemodyfikowanych nukleotydów (tiopochodne dNTP są „niewrażliwe” na działanie nukleolitycznego enzymu). Następnie nową, jednoniciową matrycę kopiuje się w obecności drugiego oligonukleotydu, zawierającego tym razem nukleotyd odpowiadający komplementarnie (T) pierwszemu niesparowanemu nukleotydowi wprowadzającemu mutację (A).



Ryc. 17. Celowa mutageniza.

W obecności polimerazy DNA odbudowuje się druga nić, dając w efekcie dwuniciową cząsteczkę DNA z prowadzoną punktową mutacją typu G→T.

W przypadku projektowania białek fuzyjnych, również na poziomie genu, następuje bezpośrednie połączenie ze sobą sekwencji kodujących kolejno: badane, np. terapeutyczne białko oraz fragment dodatkowy, np. białko ułatwiające izolację. Połączenie musi również respektować zasady kodu genetycznego, jego trójkowy charakter oraz tzw. bezprzecinkowość i zgodność ramek odczytu. Oznacza to, że sekwencje kolejnych kodonów pierwszego białka muszą być bezpośrednio połączone z kolejną sekwencją kodonów drugiego poddawanego fuzji białka; nie może być między nimi kodonu STOP oraz żadnych zbędnych nukleotydów zaburzających trójkowy układ. Schemat białka fuzyjnego przedstawiono na rycinie 18.



Ryc. 18. Schemat ideowy cząsteczki białka fuzyjnego.

Endonukleaza lub endopeptydaza

Uwaga 1: "stop" translacji genu fuzyjnego musi zostać usunięte, pozostaje jedynie sygnał stop na końcu całej sekwencji kodującej

Uwaga 2: ramka odczytu białka fuzyjnego musi być ciągła, kodony białka MBP „płynnie” przechodzą w kodony białka terapeutycznego

Uwaga 3: Element fuzyjny może być usunięty poprzez odpowiednie trawienie enzymatyczne, tak na poziomie genu (endonukleaza), jak i produktu białkowego (endopeptydaza).

Fuzji podlegać mogą dwa różne białka terapeutyczne, np. białko fuzyjne, tzw. Pixykina, składa się z połączenia cytokin interleukiny 3 oraz GM-CSF (czynnika stymulującego granulocyty i makrofagi), które jest celowane i kieruje specyficznie hematopoezą. Dostępne jest terapeutyczne białko fuzyjne będące połączeniem domeny receptora TNF- α (ang. *Tumor Necrosis Factor*, czynnik martwicy nowotworu) z rejonem Fc immunoglobuliny G1; jest to preparat ENBREL (etanercept) firmy Amgen i Wyeth USA, stosowany w leczeniu aktywnego reumatoidalnego zapalenia stawów oraz w chorobie Crohna.

Fuzja może dotyczyć również białka terapeutycznego połączonego z innym, o właściwościach toksyny – toksyny błoniczej. Połączenie w tym wypadku np. białka odpowiadającego interleukinie 2 (IL-2) z toksyną dyfterii będzie prowadziło do lizy komórek posiadających na swojej powierzchni receptory dla IL-2 na skutek działania połączonej z IL-2

toksyny bakteryjnej. Takim właśnie lekiem fuzyjnym wprowadzonym na rynek jest ONTAK firmy Ligand Pharmaceuticals (USA), który stosuje się w leczeniu skórnych chłoniaków wywodzących się z limfocytów T. Skutecznymi i szeroko wykorzystywanymi w terapii białkami fuzyjnymi są te połączone z tzw. białkiem DAB₃₈₉, które stanowi jedynie odcinek pierwszych 389 aminokwasów białka – toksyny błoniczej. Białko DAB₃₈₉ połączone z IL-4 stosowane jest w terapii mięsaka Kaposiego, a fuzja z epidermalnym czynnikiem wzrostowym – EGF – daje produkt zapobiegający restenozie [6].

Białka fuzyjne, w których dodawany fragment białkowy ma ułatwić izolowanie czy oczyszczanie danego białka terapeutycznego z mieszaniny innych białek, to cząsteczki zawierające jako element fuzyjny między innymi MBP (z ang. *Maltose Binding Protein*; białko wiążące maltozę) bądź transferazę glutationową – GST. W tych przypadkach przyłączony drogą fuzji fragment ma zdolność łączenia się odpowiednio z maltozą lub glutationem. Zastosowanie tych ostatnich jako nośników wypełniających kolumny chromatograficzne w chromatografii powinowactwa umożliwia specyficzne wiązanie do kolumny, a następnie eluowanie z mieszaniny tylko tych białek, które zawierają odpowiedni „reaktywny” fragment MBP lub GST. W przypadku zastosowania jako elementu fuzyjnego odcinka transferazy glutationu, gen kodujący GST izolowany jest z materiału genetycznego przywru *Schistosoma japonicum*. Gen koduje stosunkowo małe białko o wielkości 26 kD. Obecność GST jako fragmentu fuzyjnego umożliwia oczyszczanie klonowanego białka na kolumnach wypełnionych złożem agarozowym z przyłączonym S-glutationem. Następnie zaadsorbowane białko poddaje się elucji buforami zawierającymi glutation. Elementy fuzyjne z genem GST często są jeszcze modyfikowane w ten sposób, że dodatkowo zawierają fragmenty kodujące sekwencje rozpoznawalne przez proteazy, tj. trombinę czy czynnik krzepnięcia krwi Xa. Białko MBP ma masę cząsteczkową 42 kDa, jest kodowane przez *E. coli* jako białko wewnątrzkomórkowe wydzielane do przestrzeni peryplazmatycznej (łatwa izolacja z cytoplazmy komórek). Uzyskane w tym systemie fuzyjnym białka są łatwe do oczyszczenia metodami chromatografii powinowactwa, gdzie jako nośnik wykorzystuje się głównie bardzo tanie podłoże z amylozą.

Białkami fuzyjnymi są wreszcie przeciwciała monoklonalne tzw. chimeryczne lub humanizowane, dzięki którym drogą połączenia (fuzji) fragmentów genów kodujących odpowiednio odcinki immunoglobuliny ludzkiej i mysiej otrzymuje się m.in. terapeutyczne przeciwciała o minimalnej ubocznej właściwości uczulającej, a maksymalnym powinowactwie do antygeny. Przykładami mogą być przeciwciała podane w tabeli XII.

Przeciwciała monoklonalne, opisane w odrębnym rozdziale, stanowią wyjątkowo trafny sposób konstruowania i wykorzystania białek fuzyjnych. Część immunoglobuliny rozpoznająca cel terapii (terapia targetowa – celowana, ukierunkowana), np. swoisty receptor komórkowy, stanowi wehikul dla cząstki terapeutycznej, np. enzymu, toksyny, hormonu, izotopu, które w sposób wybiórczy (tylko do komórek „rozpoznawanych” przez część immunoglobulinową) są „podawane” do wybranej grupy komórek.

Wykorzystanie technik inżynierii genetycznej i biologii molekularnej, stwarzając możliwości manipulacji genami oraz transferu i ekspresji genów w różnych, często odległych filogenetycznie komórkach/organizmach, rozwiązało między innymi problemy ograniczonej ilości odpowiednich surowców białkowych pochodzących z naturalnego źródła (organizmu człowieka). Ponadto, co bardzo istotne, otrzymywanie rekombinantowych białek zredukowało możliwość wystąpienia działań niepożądanych naturalnych bia-

lek czy peptydów terapeutycznych; zmalało niebezpieczeństwo transmisji czynników zakaźnych spotykanych i wywołujących patologie, takie jak choroba Creutzfelda-Jacoba, zapalenie wątroby typu B lub C czy też HIV, a wynikające z przenoszenia „zanieczyszczeń” białek izolowanych z naturalnych źródeł.

Tabela XII. Przeciwciała monoklonalne powstałe na podstawie syntezy białek fuzyjnych stosowanych w terapii [wg 1]

Nazwa handlowa przeciwciała monoklonalnego (nazwa międzynarodowa)	Firma	Typ przeciwciała	Wskazanie terapeutyczne	Rok wprowadzenia na rynek
<i>ReoPro</i> (<i>abciximab</i>)	Centocor/ Eli Lilly	chimeryczne	angioplastyka, niestabilna dławica piersiowa	1994 (USA)
<i>Rituxan</i> / <i>Mabthera</i> (<i>rituximab</i>)	Biogen IDEC/ Roche	chimeryczne	chłoniak nieziarniczy, przewlekła białaczka limfocytarna	1997 (USA) 1998 (EU)
<i>Zenapax</i> (<i>daclizumab</i>)	Protein Sesign Lab./Roche	humanizowane	profilaktyka ostrego odrzucania przeszczepu nerki	1997 (USA) 1999 (EU)
<i>Simulect</i> (<i>basiliximab</i>)	Novartis	chimeryczne	profilaktyka ostrego odrzucania przeszczepu nerki	1998 (USA) 1998 (EU)
<i>Synagis</i> (<i>palivizumab</i>)	Medimmune/ Abbott	humanizowane	zapobieganie zakażeniom wywołanym przez syncytialny wirus oddechowy	1998 (USA) 1999 (EU)
<i>Remicade</i> (<i>infliximab</i>)	Centocor/ Schering- -Plough	chimeryczne	czynne reumatoidalne zapalenie stawów, choroba Crohna	1998 (USA) 1999 (EU)
<i>Herceptin</i> (<i>trastuzumab</i>)	Genentech/ Roche	humanizowane	rak sutka z przerzutami	1998 (USA) 2000 (EU)
<i>Mylotarg</i> (<i>gemtuzumab ozogamicin</i>)	Wyeth	humanizowane	ostra białaczka szpikowa	2000 (USA)
<i>Campath</i> / <i>Mabcampath</i> (<i>alemtuzumab</i>)	Millenium/ ILEX, Schering	humanizowane	przewlekła białaczka limfatyczna i szpikowa, stwardnienie rozsiane	2001 (USA) 2001 (EU)
<i>Humira</i> / <i>Trudexa</i> (<i>adalimumab</i>)	Abbott	ludzkie	czynne reumatoidalne zapalenie stawów	2002 (USA) 2003 (EU)
<i>Xolair</i> (<i>omalizumab</i>)	Genentech	humanizowane	astma	2003 (USA)
<i>Raptiva</i> (<i>efalizumab</i>)	Genentech	humanizowane	łuszczyca	2003 (USA)
<i>Erbitux</i> (<i>cetuximab</i>)	Imclone Systems	chimeryczne	rak odbytnicy i jelita grubego	2004 (USA)
<i>Avastin</i> (<i>bevacizumab</i>)	Genentech	humanizowane	rak odbytnicy i jelita grubego	2004 (USA)

Odrębnym zagadnieniem omawianym wśród terapeutyków nowej generacji, powstałych na drodze odpowiednich modyfikacji molekularnych, są peptydomimetyki inaczej określane jako tzw. pseudopeptydy. Erę mimetyków peptydowych zainicjowały badania

prowadzone nad strukturą endogennych opioidów, enkefalin: leucylowej i metioninowej [2]. Na bazie badań struktury oraz powinowactwa do odpowiednich receptorów rozpoczęto syntezę i poszukiwanie nowych związków, które w sposób analogiczny do naturalnie występujących cząsteczek, tzw. endogennych ligandów, miałyby zdolność odpowiedniej interakcji z wybranymi receptorami, wiążąc się z nimi w sposób odwracalny lub nieodwracalny, pobudzając je bądź jedynie blokując. Ostatecznie peptydomimetyki definiowane są jako struktury chemiczne stanowiące substytuty peptydów, mające zdolność interakcji z receptorami i enzymami [3]. Znane są liczne opracowania poświęcone syntezie i analizie tychże pseudopeptydowych związków, z których jednym jest opracowanie autorów: Nakanishi H. i Kahn M. w całości poświęcone projektowaniu i wykorzystaniu w medycynie peptydomimetyków [4].

Na uwagę zasługuje fakt, że opracowanie/wykrucie jednego pseudomimetyku pociąga za sobą możliwości wprowadzania daleko posuniętych modyfikacji chemicznych, czy stereochemicznych. Ogólnym celem tych działań jest opracowanie takiej struktury związku, która będzie cechowała się pożądanymi przez nas parametrami z zakresu biodostępności czy biostabilności. Klasycznym przykładem może tu być wynalezienie wśród produktów fermentacji mikrobiologicznej peptydomimetyku – asperciliny, która okazała się skutecznym antagonistą cholecystokininy (CCK), a następnie stała się substancją bazową do syntezy związków zawierających jednostkę 1,4-benzodiazepinową, odpowiedzialną za interakcję z neuroreceptorami naturalnie wchodzącymi w reakcję z ligandem peptydowym – CCK. Synteza nowych związków ukierunkowana była w taki sposób, aby otrzymywany analog cechował się większym od naturalnego liganda powinowactwem do receptora, a selektywność wiązania była jak najbardziej zawężona. Syntetycznymi peptydami o przedłużonym czasie działania są m.in. analogi podwzgórzowej gonadoliberyny: gonadorelina, gorselina, leuprorelina, triptorelina, busarelina czy nafarelina. Kolejnym przykładem może być oktreotyd o właściwościach podobnych do naturalnej somatostatyny, tetrakozaktyd o właściwościach podobnych do hormonu adrenokortykotropowego, czy wreszcie dezmpresyna i ornipresyna, syntetyczne analogi wazopresyny [5].

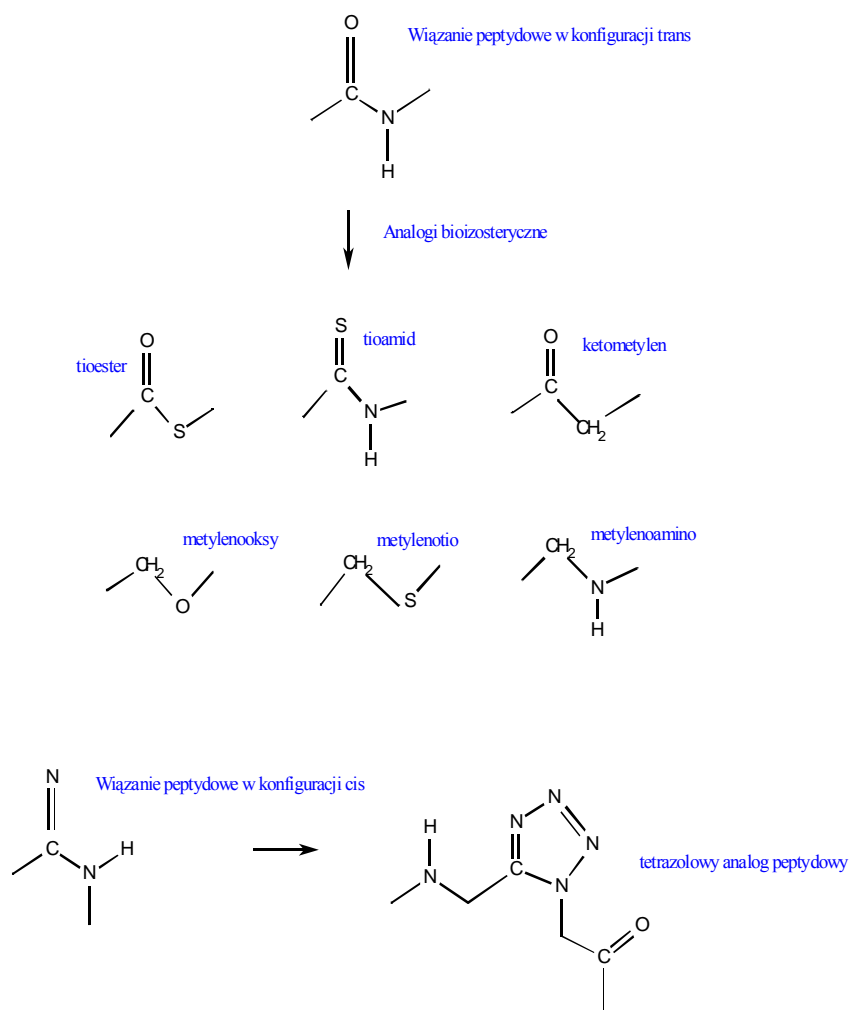
Zwiększenie biostabilności peptydów osiągane jest między innymi przez tworzenie tzw. bioizosterycznych analogów, w strukturze których w miejsce wiązania peptydowego wprowadzane są inne ugrupowania chemiczne lub atomy. W efekcie taka substytucja prowadzi najczęściej do zmian konformacji całego łańcucha polipeptydowego, a to np. pociąga za sobą maskowanie naturalnie występujących miejsc cięć proteolitycznych cząsteczki, a tym samym zwiększa odporność polipeptydu na degradację enzymatyczną w ustroju. Analizując różnicę w odległości pomiędzy atomami węgla C α – C α , w naturalnym wiązaniu *trans*-peptydowym wynoszącą 3.8 Å, natomiast w wiązaniach peptydowych odpowiednio zmodyfikowaną, to odległość ta w przypadku substytucji wiązania peptydowego wiązaniem typu metylenotiopochodnej daje analogiczną odległość równą 4.2 Å, w przypadku zaś pochodnej metylenooksy – odpowiednio 3.7 Å. Równie ciekawe w aspekcie wpływu na strukturę i właściwości peptydomimetyku jest wyprowadzenie tetrazolowych analogów peptydowych, gdzie naturalne wiązanie *trans*-peptydowe ulega modyfikacji przez wprowadzony podstawnik tetrazolowy (pierścień pięcioczłonowy zawierający cztery atomy azotu), co w efekcie prowadzi do zmiany konformacyjnej – zmiany orientacji wiązania *trans*-peptydowego, w wiązanie typu *cis*. Jeżeli w tym momencie przypomnimy sobie zasadę oddziaływań typu enzym-substrat czy receptor-ligand oraz zależ-

ności wynikających zarówno z obecności konkretnych ugrupowań chemicznych w wymienionych cząsteczkach, jak i ich konformacji, to bardzo łatwo zauważyć, że ingerencja w budowę chemiczną na pewno będzie miała wpływ na interakcję cząsteczek, i to zarówno na sam fakt możliwości wytworzenia odpowiednich wiązań, jak i siłę wzajemnych oddziaływań. Wśród modyfikacji w cząsteczkach pseudopeptydów pojawiają się również takie, które wprowadzają nie tylko zmienione konformacje pojedynczych ugrupowań chemicznych, ale dzięki celowemu zmienianiu podstawników tworzą odpowiednio programowane struktury drugorzędowe. Całe zaplecze modelowania molekularnego, oparte go na silnej bazie oprogramowania komputerowego, jest właśnie tym narzędziem, które taką pracę umożliwia. Przykłady stosowanych substytucji w peptydomimetykach, ich ugrupowaniach chemicznych, przedstawiono na rycinie 19.

Warto wspomnieć o niezależnej metodzie umożliwiającej otrzymywanie biofarmaceutyków o przedłużonym okresie działania, a mianowicie o procesie pegylowania. Stosuje się go głównie w odniesieniu do leków będących pod względem budowy chemicznej białkami. Pegylowanie polega na kowalencyjnym połączeniu polietylenoglikolu z cząsteczką białka. Taka modyfikacja, zwiększając ciężar cząsteczkowy białka wydłuża m.in. czas półtrwania leku, zmniejsza jego podatność na proteolizę, zwiększa stabilność termiczną i mechaniczną cząsteczki, może również powodować zmniejszenie antygenowości danego białka terapeutycznego. Pegyłowanymi biofarmaceutykami wprowadzonymi do leczenia są m.in. pegylowane formy interferonu alfa-2a i alfa-2b, oraz hematopoetyczny czynnik wzrostu: filgastrim (Neupogen/Lenogastrim) wprowadzony na rynek amerykański przez firmę Amgen, a na rynek europejski przez firmę Hofmann-La Roche.

Od stosunkowo już długiego czasu znana jest zależność wynikająca z faktu, że zmiana aminokwasu na końcu NH_2 - (aminowym) białka ma wpływ na czas półtrwania całej cząsteczki [6]. Aminokwasy, takie jak metionina, glicyna, alanina, seryna, treonina czy walina, wpływają stabilizująco na cząsteczkę białka, wydłużając jej czas półtrwania powyżej 20 godzin. Destabilizującymi aminokwasami są: izoleucyna, tyrozyna, prolina, fenyloalania czy wreszcie arginina. Odpowiednio dla wymienionego aminokwasu umieszczonego na aminowym końcu tego samego białka czas półtrwania skracał się kolejno do 30 min, 10, 7, 3 i 2 min. O ile pegylacja nie zmienia składu aminokwasowego białka, o tyle substytucje aminokwasów na końcu aminowym mogą w sposób krytyczny wpłynąć na jego aktywność. Stąd też dobór metody umożliwiającej zwiększenie stabilności cząsteczki białka uzależniony jest od funkcji, jakie ma pełnić uzyskane zmodyfikowane białko.

Wszystkie z wymienionych w tekście postaci związków: rekombinanty białkowe, peptydomimetyki i modyfikowane chemicznie białka, stanowią nową generację cząsteczek, których wykorzystanie w medycynie dotyczy zarówno terapii, jak i diagnostyki. To dzięki nim skuteczność leczenia często jest dużo większa, zmniejsza się zakres działań ubocznych stosowanych leków, a czas trwania terapii może być odpowiednio modyfikowany, bez dodatkowych skutków ubocznych dla pacjenta czy efektu terapeutycznego. Wraz z rozpracowaniem zapisu kodu genetycznego człowieka, stopniowym odkrywaniem poszczególnych powiązań między genami, a produktami ich ekspresji rośnie możliwość skutecznej i celowanej terapii, w której bezspornie w wielu przypadkach wiodącą rolę będą odgrywać rekombinanty białkowe czy peptydomimetyki.



Ryc. 19. Substytucje wiązań chemicznych wykorzystywane w tworzeniu peptydomimetyków.

PIŚMIENNICTWO

1. *Borowicz P.*: Produkcja biotechnologiczna leków. [W:] S. Bielecki: Raport perspektywy i kierunki rozwoju biotechnologii w Polsce do 2013 r. Ministerstwo Edukacji i Nauki, Polska Akademia Nauk, Komitet Biotechnologii przy Prezydium PAN, Warszawa 2005, 17–40.
2. *Huges J., Smith T.W., Kostelitz H.W., Fothergill L.A., Morgan B.A., Morris H.R.*: Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 1975, 258, 577–579.
3. *Morgan B.A., Gaynor J.A.*: Approaches to the discovery of non-peptide ligands for peptide receptors and peptidases. *Ann Rep Med Chem* 1989, 24, 243–252.
4. *Nakanishi H., Kahn M.*: Design of peptidomimetics. [in] *Practice of medicinal chemistry*. CG Wermuth Academy Press, London UK 1996, 570–590.
5. *Janiec W.*: Kompendium farmakologii. PZWL, Warszawa 2003.
6. *Pharmaceutical Biotechnology. An introduction for pharmacists and pharmaceutical scientists*. Edited by Crommelin D JA and Sindelar RD. Harwood Academic Publishers. Amsterdam, The Netherlands 1997.

13. Insulina i jej analogi

Daniel Sypniewski

Budowa, rola i wydzielanie insuliny

Poziom glukozy u zdrowego człowieka na czczo jest stały i mieści się w zakresie 65–90 mg/100 ml osocza. W ciągu doby istnieją dość duże wahania jej poziomu, a w okresie spożywania posiłków dochodzi do przejściowego znacznego zwiększenia jej stężenia w osoczu, nigdy jednak nieprzekraczającego tzw. progu nerkowego (160–180 mg/100 ml), powyżej którego glukoza pojawia się w moczu. Ścisła kontrola jej poziomu jest jednym z najważniejszych elementów utrzymywania homeostazy organizmu i warunkowana jest głównie poprzez mechanizmy hormonalne. Bezpośredni wpływ na poziom tego cukru w osoczu mają dwa przeciwstawnie działające hormony – insulina i glukagon – wydzielane do krwi przez komórki α (glukagon) oraz β (insulina) wysp trzustkowych Langerhansa. Ogólne działanie tych hormonów można określić jako kataboliczne w przypadku glukagonu i anaboliczne w przypadku insuliny. Efektem działania insuliny jest spadek poziomu glukozy w osoczu poprzez pobudzenie mechanizmów jej wychwyty przez komórki oraz magazynowanie w wątrobie w postaci glikogenu. Glukagon natomiast powoduje uruchomienie rezerw metabolicznych (hydroliza glikogenu) i wzrost poziomu glukozy w osoczu. Spadek lub wzrost wydzielania obu hormonów jest oczywiście uwarunkowany bieżącym stanem metabolicznym organizmu.

Insulina ludzka jest polipeptydem złożonym z dwóch łańcuchów, łańcucha A zbudowanego z 21 aminokwasów i łańcucha B składającego się z 30 aminokwasów połączonych dwoma mostkami disulfidowymi (tworzonymi przez reszty cystein w pozycjach 7 i 20 w łańcuchu A oraz 7 i 19 w łańcuchu B). W łańcuchu A znajduje się ponadto wewnętrzny mostek disulfidowy pomiędzy resztami cysteinowymi w pozycjach 6 i 11. Insulina jest produkowana w postaci prekursora – proinsuliny – zbudowanego z jednego łańcucha (84 aminokwasy), który z kolei powstaje z bezpośredniego produktu translacji mRNA, preproinsuliny, poprzez proteolityczne odcięcie sekwencji sygnałowej. Proinsulina jest magazynowana w cysternach aparatu Golgiego, gdzie ulega przekształceniu przez peptydazy w aktywny hormon, a następnie wydzielaniu na drodze egzocytozy do krwiobiegu. Proces ten zachodzi stale, jednak w ciągu doby ilość wydzielanej insuliny zmienia się w zależności od potrzeb metabolicznych. Na czczo stężenie insuliny w osoczu wynosi 20–40 $\mu\text{m}/\text{ml}$. Wydzielanie insuliny u zdrowego człowieka odbywa się w dwojaki sposób: w warunkach podstawowych oraz w odpowiedzi na przyjmowany posiłek. Wydzielanie podstawowe w ciągu całej doby wynosi około 0,5–1 $\mu\text{m}/\text{h}$, choć wartość ta zależy od aktualnego stanu organizmu (np. wysiłek fizyczny). Podstawowe wydzielanie tego hormonu zapewnia utrzymanie regulacji homeostazy energetycznej organizmu. Insulina posiłkowa jest wydzielana w dwóch fazach: w fazie pierwszej (2–5 minut) następuje przejściowy wyrzut, po czym zachodzi powolne, narastające uwalnianie polipeptydu (5–25 minut). Podwyższone stężenie insuliny utrzymuje się przez 2–4 godziny po posiłku. Wspomniany hormon jest również stale wychwytywany przez komórki tkanek obwodowych. Proces ten

przebiega bardzo dynamicznie – średni okres półtrwania insuliny w krwiobiegu wynosi 20 minut. Insulina jest wiązana przez specyficzne receptory powierzchniowe. Powstanie aktywnego kompleksu ligand-receptor powoduje transdukcję sygnału do wnętrza komórki, a następnie zachodzi internalizacja kompleksu i rozkład proteolityczny hormonu we wnętrzu komórek.

Konieczność egzogenego podawania insuliny ma miejsce w większości przypadków cukrzycy. Schorzenie to jest poważnym problemem społecznym o stale wzrastającym wskaźniku zachorowań. Obecnie już zalicza się ją do chorób cywilizacyjnych. Wyróżnia się dwa typy cukrzycy: typ I – cukrzyca insulinozależna – będąca następstwem całkowitego lub częściowego zniszczenia komórek produkujących insulinę, oraz typ II – cukrzyca insulinoniezależna – charakteryzująca się względnym niedoborem insuliny. Preparaty insuliny podawane są wszystkim chorym na cukrzycę typu I i większości chorych na cukrzycę typu II, zwłaszcza osobom chorującym od wielu lat, mającym znacznie upośledzoną funkcję komórek β .

Otrzymywanie insulin metodami konwencjonalnymi

Najstarszą metodę otrzymywania insuliny opracowano w 1921 roku (Banting i Best). Polegała na izolacji tego hormonu z trzustek bydłych. Z homogenatu tkankowego insulina ekstrahowana jest za pomocą zakwaszonego kwasem solnym alkoholu etylowego. Kwaśne środowisko ekstrakcji zapewnia dezaktywację enzymów proteolitycznych (gł. trypsyny). Insulinę wysala się z ekstraktu za pomocą siarczanu sodu lub chlorku sodu. Następnie przeprowadzana jest krystalizacja w $\text{pH}=5,3$ (punkt izoelektryczny insuliny) metodą Scotta (bufor fosforanowy, aceton, chlorek cynku i amoniak). W ten sposób z insuliny bezpostaciowej otrzymuje się insulinę krystaliczną. Mianowanie preparatów przeprowadzane jest metodą biologiczną (zdolność do obniżania stężenia glukozy w krwi królika). Aktywność preparatu podaje się w jednostkach Bantina i Besta. 1 jednostka odpowiada $1/3$ ilości insuliny, która w przeliczeniu na 2 kg wagi ciała powoduje spadek poziomu glukozy w osoczu do 0,045% (odpowiada to około $1/22$ mg czystej insuliny krystalicznej). Insulina bydłeca ma wiele wad związanych głównie z ryzykiem alergizacji oraz niedostateczną czystością preparatów. Nowsze technologie polegają na humanizowaniu insuliny bydłeczej poprzez enzymatyczne usunięcie N-końcowego aminokwasu w łańcuchu B (alaniny), a następnie wstawieniu w tym miejscu treoniny. Jest to metoda półsyntetyczna (semisynteza z insuliny wieprzowej). Insuliny humanizowane mają znacznie niższy potencjał alergizacji po podaniu człowiekowi.

Istotnym problemem w leczeniu insuliną jest dopasowanie poziomu podawanego egzogennie do naturalnego rytmu jego wydzielania w organizmie. Od początku insulinoterapii próbowano uzupełniać jej preparaty o odpowiednie substancje wpływające z jednej strony na stabilność biologiczną insuliny (środki konserwujące – krezol, fenol; odpowiednie bufory), a także substancje opóźniające jej wchłanianie w miejscu podania. Substancje przedłużające wchłanianie insuliny po podaniu podskórnym obejmowały początkowo standardowe środki, takie jak cholesterol czy oleje roślinne i lecytyny. W 1936 r. wprowadzono pierwszą insulinę z dodatkiem protamin – zasadowych białek izolowanych zwykle z plemników lososia. Insulina, tworząc kompleks z protaminami wchłania się znacznie wolniej. Stabilizatorem kompleksu są jony cynku. Kryształy insuliny protaminowo-cynkowej mają znacznie wydłużony czas wchłaniania – nawet do 72 godzin. W ten sposób

powstały stosowane również obecnie preparaty insuliny proteinowo-cynkowej, czyli izofanowej (NPH). Skrót NPH oznacza preparat insuliny o odczynie neutralnym (N – *neutral*), protaminowej (P – *protamine*), natomiast H pochodzi od nazwiska twórcy insuliny protaminowo-cynkowej, Hagedorna. Insulina taka może mieć zarówno pochodzenie naturalne (wieprzowa lub wołowa), jak też może być insuliną humanizowaną bądź rekombinowaną. Kryształy insuliny są zbudowane z heksamerów. W przypadku insuliny NPH na jeden heksamer insuliny przypadają dwa jony cynku. Pierwiastek ten pełni rolę stabilizatora heksamerów, hamuje również enzymy rozkładające protaminy, z którymi insulina tworzy kompleksy. Dodatkowym składnikiem preparatów NPH jest glicerol, mający na celu stabilizację zawiesiny. Insuliny izofanowe zalicza się do insulin o średnio długim czasie działania (16–24 godzin). Insuliny cynkowe, będące kompleksami insuliny z jonami cynku bez dodatku protamin, to insuliny „lente” o średnio długim czasie działania, natomiast insulina neutralna (roztwór neutralnej krystalicznej insuliny cynkowej) charakteryzuje się krótkim czasem działania (6–8 godzin). Na rynku jest także dostępna insulina „ultralente”, o czasie działania od 22 do 28 godzin, będąca mieszaniną insuliny amorficznej i krystalicznej, którą zalicza się do insulin o średnio długim czasie działania.

Klasyczne preparaty insuliny o zróżnicowanym okresie działania różnią się szybkością rozpadu heksamerów insulinowych. Po podaniu podskórnym heksamery insuliny ulegają dysocjacji do monomerów, które są następnie wchłaniane do łożyska naczyń włosowatych w tkance podskórnej. Szybkość rozpadu heksamerów jest głównym czynnikiem wpływającym na szybkość wchłaniania, a tym samym czas działania danego typu preparatu. Czas wchłaniania jednak zależy także od czynników miejscowo wpływających na przepływ krwi w tkance podskórnej (np. temperatura otoczenia, palenie papierosów) oraz takich parametrów, jak głębokość wstrzyknięcia czy objętość i stężenie insuliny. Problem stanowi również występowanie szczytu stężenia insuliny – dotyczy to wszystkich typów tego hormonu, a szczególnie ważne jest w przypadku insuliny „ultralente”, która charakteryzuje się zróżnicowanym czasem osiągnięcia szczytu.

Otrzymywanie analogów insuliny

Największym osiągnięciem współczesnej terapii cukrzycy było wprowadzenie na rynek preparatów insulin rekombinowanych, czyli tzw. analogów insuliny. Preparaty takie otrzymywane są technikami inżynierii genetycznej poprzez ekspresję genu ludzkiej insuliny w hodowlach komórkowych organizmu gospodarza (*Escherichia coli* lub drożdże). Teoretycznie możliwe jest także otrzymywanie insuliny ludzkiej metodą pełnej syntezy chemicznej, jednak ze względu na bardzo wysokie koszty nigdy nie została zastosowana praktycznie. Opracowanie wydajnej technologii uzyskiwania rekombinowanej insuliny ludzkiej wyeliminowało ryzyko alergizacji. Co więcej, możliwe jest otrzymywanie licznych modyfikacji naturalnej insuliny, dzięki czemu otrzymuje się obecnie preparaty naśladujące w znacznym stopniu fizjologiczny rytm wydzielania tego hormonu w organizmie zdrowego człowieka.

Obecne preparaty insulin są zazwyczaj mieszaninami o różnym czasie uwalniania i wchłaniania, a co za tym idzie, także działania. Kompozycje takich mieszanin ułatwiają prawidłowe rozłożenie w ciągu doby efektu hipoglikemicznego tego hormonu. Istnieją istotne różnice osobnicze w fizjologicznym uwalnianiu insuliny, a także indywidualne cechy cukrzycy u danego pacjenta oraz zróżnicowany tryb życia. Wszystkie wspomniane

przesłanki należy uwzględnić, opracowując nowe formy insulin. Niefizjologiczny profil ich działania stanowi obecnie największą przeszkodę i wyzwanie insulinoterapii. Ścisła kontrola poziomu glukozy u pacjentów z cukrzycą jest natomiast czynnikiem warunkującym opóźnienie powikłań związanych głównie z rozwojem mikroangiopatii. Wprowadzenie do leczenia cukrzycy analogów insuliny umożliwi opracowanie preparatów o korzystniejszych niż konwencjonalne parametrach biofarmaceutycznych. Analogi insulin stosuje się zarówno jako insuliny podstawowe, jak i posiłkowe.

Spośród ponad 300 przebadanych analogów insuliny jedynie kilka wprowadzono na rynek. Analogi insuliny o bardzo szybkim czasie działania (3–4 godziny) to insulina lispro (Humalog), insulina aspart (NovoRapid) oraz glulizyna. Ich zaletą jest szybsze i krótsze działanie oraz mniejsza podatność na różnice osobnicze w porównaniu z insuliną neutralną. W insulinach lispro i aspart dokonano odpowiednio zamiany pozycji lizyny i proliny w łańcuchu B (lispro) lub zamiany proliny na kwas asparaginowy w pozycji B28 (aspart). Glulizyna jest najnowszym analogiem insuliny (rejestracja w 2005 r.). W jej cząsteczce zmieniono lizynę na asparaginę w pozycji 3 łańcucha B oraz kwasu glutaminowego na lizynę w pozycji 29. Wprowadzenie analogów insuliny bardzo szybko działających ułatwiło kontrolę glikemii w przypadku nieplanowanego przyjmowania posiłków. Dodatkowo są one dostępne zwykle w postaci wstrzykiwaczy, czyli tzw. piór insulinowych (penów). Analogi insulin często wchodzi w skład mieszanin insulin o różnym czasie działania. Mogą to być mieszaniny zawierające zarówno analog, jak i insulinę konwencjonalną. Preparaty z insuliną konwencjonalną najczęściej zawierają 30% insuliny neutralnej oraz 70% izofanowej (Gensulin M30, Mixtard 30, Humulin M3, wstrzykiwacz Humaject M3) lub po 50% obu insulin (Gensulin M50, Humulin M5, Mixtard 50), rzadziej mieszanki obu insulin w innych proporcjach (Gensulin M10, Gensulin M20, Gensulin M40, Mixtard 10, Mixtard 20, Mixtard 40 – wszystkie preparaty Mixtard są dostępne w postaci wstrzykiwaczy NovoLet lub wkładów Penfill). Analogi insulin wchodzi w skład preparatów Humalog Mix zawierających 75% neutralnej protaminowej insuliny lispro (NPL) i 25% insuliny lispro (Humalog Mix 25) lub po 50% obu insulin (Humalog Mix 50) oraz NovoMix 30 Penfill zawierającego 70% protaminowej insuliny aspart i 30% insuliny aspart.

Analogi insuliny podstawowej to wprowadzona niedawno glargina (preparat Lantus) oraz detemir o długim czasie działania (do 30 godzin). Glargina zawiera w pozycji A21 glicynę zamiast asparaginy oraz dodatkowe dwie reszty argininy na końcu C w łańcuchu B. Jest podawana w postaci kwaśnego roztworu (pH=4), który w momencie wstrzyknięcia ulega neutralizacji, przez co insulina tworzy w miejscu wstrzyknięcia mikroprecypitaty. Następuje powolna dysocjacja do heksamerów, potem dimerów, a w końcu powstają monomery insuliny ulegające wchłonięciu. Proces dysocjacji i wchłaniania jest powolny i ma bardzo przewidywalną kinetykę. Działanie glarginy jest w miarę stałe i nie wykazuje szczytu. Jest ono niemal identyczne jak w przypadku stałego wlewu dożylnego insuliny. Insulina detemir jest analogiem insuliny podstawowej o wyjątkowych właściwościach. Po wchłonięciu do krwi ulega silnemu wiązaniu z albuminami osocza. Wynika to z budowy tego preparatu – w pozycji B30 treonina została zastąpiona kwasem mirystynowym, a więc związkiem z grupy kwasów tłuszczowych.

Przechowywanie insuliny

Ważnym problemem jest odpowiednie przechowywanie preparatów insuliny. Należy chronić je przed dostępem światła i przechowywać w temperaturze 2–8°C. Preparat zachowuje wtedy swoje właściwości przez kilka lat, a aktywność biologiczna insuliny spada w tym czasie zaledwie o 2%. Niekorzystne jest zarówno zamrożenie, jak i przechowywanie w temperaturze pokojowej. W przypadku zamrożenia dochodzi do uszkodzenia struktury kryształów insuliny. Dłuższe przechowywanie insuliny w temperaturze powyżej 25°C prowadzi natomiast do powstawania większych agregatów ulegających adhezji do ścianek fiolki, przyspieszenia procesów utleniania (brązowienie) oraz polimeryzacji i dezamidacji insuliny.

Nowe postacie preparatów insuliny

Najnowsze tendencje w insulinoterapii są ukierunkowane na wprowadzanie do leczenia zarówno nowych analogów insuliny o parametrach farmakokinetycznych, lepiej naśladujących fizjologiczny wzór wydzielania endogennej insuliny, jak też nowych lub zmodyfikowanych postaci leku dążących do nieinwazyjnego podawania insuliny egzogennej. Najkorzystniejszą strategią byłoby oczywiście doustne podawanie insuliny, jednak podstawowym ograniczeniem jest tu jej podatność na rozkład przez enzymy proteolityczne przewodu pokarmowego. Opracowywane są analogi insuliny o zwiększonej oporności na enzymy proteolityczne oraz wydłużonym czasie trwania, głównie poprzez wytwarzanie oligomerów pegylowanych (kompleksy z glikolami polietylenowymi) – strategia podobna jak w przypadku pegylowanych interferonów. Oligomery z dodatkiem PEG-ów mają jednak niższą biodostępność związaną z zaburzeniami wiązania z receptorami insuliny. Przykładem preparatu doustnego insuliny jest Oralin (firmy Generex Biotechnology Corporation), będący płynną postacią insuliny dawkowaną w formie aerozolu (technologia RapidMist). Zawarte substancje pomocnicze zwiększają wchłanianie insuliny przez błonę śluzową jamy ustnej. Niestety, podobnie jak w przypadku innych postaci doustnych, biodostępność insuliny taką drogą jest niewielka, a jej wchłanianie ma mało przewidywalną kinetykę. Istnieją także postacie wykorzystujące inhalacje insuliny bezpośrednio do płuc. Zaletą takiej strategii jest nieinwazyjność oraz wykorzystanie bardzo dużej powierzchni wchłaniania. Wadę stanowi konieczność uwzględnienia dużych różnic osobniczych wynikających z takich czynników, jak choroby płuc (astma, śródmiąższowe zapalenie płuc), palenie papierosów, intensywny wysiłek fizyczny. Czynniki te zmniejszają przewidywalność wchłaniania i tym samym czas oraz siłę działania leku. Istnieją dwa scharakteryzowane systemy wziewnego podawania insuliny. Pierwszym z nich jest system Inhale (firmy Inhale Therapeutic Systems), w którym insulinę stosuje się w postaci suchego proszku. W przypadku systemu AERx Diabetes Management System (firmy Aradigm Corporation) insulinę podaje się w postaci płynnej.

PIŚMIENNICTWO

1. *Czyżyk A.*: Patofizjologia i klinika cukrzycy. PWN, Warszawa 1997.
2. Farmakodynamika. Praca zbiorowa pod red. W. Jańca i J. Krupińskiej. PZWL, Warszawa 1995.
3. Farmakologia. Podstawy farmakoterapii. Praca zbiorowa pod red. W. Kostowskiego. PZWL, Warszawa 1998.

-
4. *Oiknine R., Bernbaum M., Mooradian A.D.:* A critical appraisal of the role of insulin analogues in the management of diabetes mellitus. *Drugs* 2005, 65, 325–340.
 5. *Podlewski J.K., Chwalibogowska-Podlowska A.:* Leki współczesnej terapii. Wydanie XV. Split Trading, Warszawa 2001.
 6. Wybrane zagadnienia z metod poszukiwania i otrzymywania środków leczniczych. Praca zbiorowa pod red. Katarzyny Kieć-Kononowicz, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2000.

14. Otrzymywanie cytokin jako przykład nowoczesnej produkcji biotechnologicznej

Daniel Sypniewski i Ilona Bednarek

Zastosowanie cytokin w terapii

Cytokiny są niskocząsteczkowymi białkami bądź peptydami związanymi z układem immunologicznym, które wpływają na funkcjonowanie i wzajemne oddziaływanie komórek. Głównym mechanizmem ich działania jest regulacja wzrostu oraz kontrola procesów różnicowania komórek, jednak efekty działania cytokin na różne typy komórek są niezwykle plejotropowe. Cytokiny przede wszystkim wpływają na komórki związane z odpowiedzią immunologiczną, dzięki czemu łączą funkcjonowanie układu odpornościowego z działaniem innych układów i narządów. Omawiane peptydy tworzą skomplikowaną sieć wzajemnych powiązań i regulacji, przez co efekty ich działania są jeszcze bardziej różnorodne i często trudne do jednoznacznego określenia. Odgrywają także dużą rolę w patogenezie wielu stanów chorobowych, stąd istnieje ogromne zainteresowanie zarówno strategiami cytokinoterapii, jak i wyciszania ich działania, tj. antycytokinoterapii. Podkreśla się takie charakterystyczne cechy cytokin, jak plejotropowość, czyli zdolność oddziaływania jednej cytokiny na wiele różnych komórek, oraz redundacja, czyli właściwość wywoływania takiego samego efektu przez różne cytokiny. Istotną cechą tych białek jest również zdolność do indukowania tak zwanych kaskad sprzężeń zwrotnych, które mogą mieć charakter dodatni lub ujemny. Cytokiny względem siebie mogą działać antagonistycznie bądź synergistycznie. Niektóre z nich, np. czynnik martwicy nowotworów (TNF), wytwarzane są początkowo jako cząsteczki błonowe, które uczestniczą w bezpośredniej aktywacji komórek docelowych. Biorąc pod uwagę „zasięg” działania, grupuje się je w peptydy o działaniu autokrynowym, działają wtedy na te same komórki, przez które są wydzielane; znane są również cytokiny o działaniu parakrynowym (na komórki znajdujące się w najbliższym sąsiedztwie) oraz endokrynowym (wpływające na komórki znajdujące się w innych narządach).

Należy podkreślić, że cytokiny mogą wywierać swoje działanie na komórki jedynie dzięki obecności na komórkach swoistych receptorów. Swoistość dotyczy zarówno struktury, jak i sposobu przekazywania sygnałów po połączeniu się cytokiny z takim receptorem. Część zewnątrzkomórkowa tych receptorów zbudowana jest z reguły z charakterystycznych domen, np. zawierających sekwencje aminokwasów typu: WSXWS, gdzie W to tryptofan, S – seryna, a X – dowolny aminokwas. Zgodnie z klasyfikacją podaną przez Gołąb W. i wsp. [9] można wyróżnić pięć różnych typów receptorów dla cytokin:

- 1) receptory o budowie immunoglobulinopodobnej,
- 2) receptory dla cytokin klasy I – hematopoetyń,
- 3) receptory dla cytokin klasy II – interferonów,
- 4) receptory dla nadrodziny TNF,
- 5) receptory sprzężone z białkami G – receptory dla chemokin.

Połączenie się cytokiny z odpowiednim receptorem w błonie komórkowej jest początkiem aktywacji szlaku przekazywania sygnałów w komórce. Dotyczy ono między innymi szlaku GTPaz, kinaz MAP, szlak białka Ras, kinaz tyrozynowych, w tym kinaz Janus (JAK – *Janus kinases*) i białek STAT (*signal transducers and activators of transcription*).

Otrzymywanie dużych ilości cytokin rekombinowanych umożliwia ich zastosowanie w terapii niektórych chorób. Szczególnie duże znaczenie mają w terapii nowotworów i chorób infekcyjnych. Od wielu lat zarejestrowane są na rynku preparaty interferonów, krwiotwórczych czynników wzrostu oraz niektórych interleukin (zwłaszcza IL-2). Badania kliniczne wykazały także możliwość zastosowania kolejnych rekombinowanych cytokin w medycynie.

Klasyfikacja cytokin nie jest jednoznaczna i opiera się zarówno na ich właściwościach biologicznych, jak i homologii strukturalnej. Tradycyjnie wyróżnia się następujące grupy cytokin:

- interferony (IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- ω),
- interleukiny (od IL-1 do IL-13),
- czynniki martwicy nowotworu (TNF- α , TNF- β),
- krwiotwórcze czynniki wzrostu (G-CSF, M-CSF, GM-CSF, Meg-CSF, EPO, LIF itp.),
- transformujące czynniki wzrostu (TGF- α , TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, inhibina A i B, aktywina A i B),
- inne czynniki wzrostu (VEGF, EGF, PDGF, IGF, NGF itp.),
- czynniki chemotaktyczne (MCP-1, MIP itp.).

Interleukina-1

Istnieją dwie interleukiny-1, IL-1 α oraz IL-1 β , kodowane przez dwa różne geny zlokalizowane w chromosomie 2. Mają one jednak bardzo zbliżone właściwości biologiczne i działają poprzez te same receptory (dwa typy). Dojrzałe białka mają masę ok. 17 kDa. Występują zarówno w formie glikozylowanej, jak i nieglikozylowanej. Homologia sekwencji aminokwasowej wynosi zaledwie ok. 25%. Wytwarzane są głównie przez aktywowane monocyty.

Działanie IL-1 jest bardzo wszechstronne i zróżnicowane. Wpływa między innymi na komórki krwi obwodowej (limfocyty T i B, neutrofile), a także na fibroblasty, komórki wątroby, mięśnie, szpik kostny. Główne działanie IL-1 wiąże się z wpływem na procesy immunologiczne i układ krwiotwórczy. IL-1 uważana jest, poza TNF- α , za główną cytokinę prozapalną (zdolność stymulacji neutrofilii). Ma w związku z tym istotny udział w patogenezie wstrząsu septycznego, reumatoidalnego zapalenia stawów oraz choroby Leśniowskiego-Crohna. Stanowi czynnik aktywujący limfocyty T. W mniejszym stopniu wpływa także na limfocyty B. Działa pośrednio na układ krwiotwórczy poprzez stymulację wytwarzania czynników stymulujących wzrost kolonii (G-CSF i GM-CSF). IL-1 może mieć także udział w patogenezie ostrych i przewlekłych białaczek szpikowych, gdyż stymuluje wzrost i proliferację komórek nowotworowych.

Zastosowanie lecznicze zyskał tzw. antagonist receptoru IL-1 (IL-1Ra). Jest to białko występujące naturalnie w organizmie, które ma wysokie powinowactwo do receptorów IL-1, ale nie posiada aktywności liganda, a więc hamuje aktywację receptorów, dzia-

lając tym samym jako naturalny inhibitor aktywności IL-1. Głównym efektem działania tego białka jest hamowanie stanu zapalnego. Zarejestrowany w 2001 roku preparat Kineret (anakinra), zawierający rekombinowane białko IL-1Ra, stosuje się jako lek w reumatoidalnym zapaleniu stawów.

Interleukina-2

Interleukina-2 (IL-2) została odkryta w 1976 r. Naturalnym źródłem tej cytokiny w organizmie są niektóre subpopulacje limfocytów T pomocniczych. Wydzielanie IL-2 stwierdzono także w przypadku nowotworowych linii komórkowych Jurkat (pochodzenie białaczkowe). IL-2 jest białkiem o budowie kulistej zbudowanym ze 133 aminokwasów (masa 15 kDa) i kodowanym przez jeden gen zlokalizowany u człowieka w chromosomie 4 (4q26 – q27). Receptor błonowy IL-2 jest zbudowany z trzech pojedynczych łańcuchów polipeptydowych (α , β i γ). Istnieją różne formy receptorów – zbudowane bądź z wszystkich trzech łańcuchów (mają największe powinowactwo do ligandu) lub też tylko z jednego bądź dwóch łańcuchów. Podstawowa rola IL-2 w warunkach fizjologicznych wiąże się z wpływem na procesy immunologiczne w organizmie. IL-2 stanowi najsilniejszy czynnik wzrostu dla limfocytów T. Aktywacja tych komórek przez IL-2 jest zależna od stymulacji antygenowej (udział receptorów TCR), natomiast nie wpływa na limfocyty spoczynkowe (brak ekspresji odpowiedniej liczby receptorów IL-2). Wysoką ekspresję receptorów IL-2, niezależnie od warunków, stwierdzono na powierzchni komórek NK. Stymulacja komórek NK przez IL-2 powoduje wydzielanie przez nie do otaczającego środowiska cytokin aktywujących makrofagi (TNF- α , IFN- γ , GM-CSF) oraz substancji cytotoksycznych (perforyna i granzymy). Wspomniana interleukina wykazuje także wpływ na limfocyty B – stymuluje ich proliferację oraz syntezę przeciwciał. Cytokina ta powoduje również wzrost ekspresji i uwalniania IL-6 oraz interferonu- γ . W stanie fizjologicznym IL-2 jest praktycznie niewykrywalna w osoczu.

Rekombinowana IL-2 jest produkowana w komórkach *E. coli* w postaci nieglikozylowanej. W takiej formie zachowuje swoją aktywność biologiczną jako czynnik przeciwnowotworowy (aldesleukina, teceleukina). Zastosowanie terapeutyczne IL-2 obejmuje przede wszystkim raka nerki i czerniaka złośliwego. Prawdopodobnie zostanie zaaprobowana także w leczeniu białaczek, natomiast nie stwierdzono istotnego efektu leczniczego tej cytokiny w raku okrężnicy, jajników oraz pęcherza moczowego. Potencjalnie może zostać również wykorzystana w leczeniu ciężkich chorób zakaźnych – AIDS i trądu. Działanie przeciwnowotworowe IL-2 nie jest bezpośrednie, lecz polega na stymulacji aktywności cytotoksycznej komórek kompetentnych immunologicznie – komórek NK i limfocytów T. Sama IL-2 nie wywiera natomiast wpływu na komórki nowotworowe. Omawianą interleukinę można stosować w terapii nowotworów samodzielnie lub w tzw. immunoterapii adoptywnej, która polega na podawaniu aktywowanych *in vitro* komórek cytotoksycznych – najczęściej komórek LAK (*lymphokine activated killer cells*). Komórki LAK uzyskiwane są poprzez inkubację autologicznych limfocytów z interleukiną-2, charakteryzującą się nieswoistą cytotoksycznością wobec komórek nowotworowych. W immunoterapii adoptywnej można także stosować aktywowane IL-2 komórki TIL (ang. *tumor infiltrating lymphocytes*), które są limfocytami izolowanymi z guza nowotworowego. Istnieją także badania nad terapią genową nowotworów z wykorzystaniem genu kodującego IL-2.

Interleukina-2 podawana jest dożylnie w postaci wlewu (1 mln jm./m² w ciągu 6 h). Biotransformacja leku zachodzi w cewkach nerkowych. W moczu wykrywane są tylko śladowe ilości aktywnej IL-2. Na aktywność przeciwnowotworową rIL-2 ma istotny wpływ skład roztworu stosowanego do wlewu: podanie rIL-2 z albuminami powoduje spadek wahań stężenia tej cytokiny w osoczu oraz nasila stymulację ekspresji TNF- α . Wydłużenie czasu działania można osiągnąć poprzez stosowanie formy pegylowanej rIL-2 (koniugaty z glikolem polietylenowym).

Interleukina-11

Interleukina-11 (IL-11) jest cytokiną o właściwościach podobnych do interleukiny-6, mimo że obie nie wykazują homologii strukturalnej na poziomie genu ani białka. Sekwencję genu kodującego IL-11 opisano w 1992 r. Gen zlokalizowany jest w 19 chromosomie (19q13.3 – 13.4). Nie poznano dotychczas bliżej budowy receptora IL-11. Podstawowe właściwości IL-11 związane są z wpływem na komórki krwiotwórcze. IL-11 stymuluje przechodzenie komórek krwiotwórczych z fazy G₀ (spoczynkowej) do fazy G₁ i tym samym nasila ich proliferację. Wpływ na proliferację komórek krwiotwórczych jest często synergistyczny z innymi cytokinami (np. wpływ na kolonie megakariocytarne wraz z IL-3). Efektem działania IL-11 jest stymulacja erytropoezy, megakariopoezy, kolonii granulocytarno-makrofagowych, a także aktywacja wielu typów dojrzałych komórek krwi (gł. limfocytów T i monocytów). Cytokina ta może także wywierać wpływ na inne typy komórek w organizmie człowieka – stwierdzono m.in. supresję adipogenezy oraz istotny wpływ na rozwój neuronów.

Rekombinowana IL-11 jest zbudowana ze 199 aminokwasów (masa 23 kDa). Nie posiada potencjalnych miejsc glikozylacji. Ogólny wpływ IL-11 na organizm polega na stymulacji procesów hematopoezy, przede wszystkim megakariopoezy, stąd jej główne zastosowanie jako leku łagodzącego objawy trombocytopenii związanej z mielosupresją po chemio- i radioterapii nowotworów. Ponadto wpływa korzystnie na stan uszkodzonego przez chemioterapię nabłonka jelitowego oraz stymuluje wytwarzanie białek ostrej fazy (białko C-reaktywne, fibrynogen, kwaśna glikoproteina- α 1, haptoglobina, hemopeksyna). W badaniach klinicznych rIL-11 podawano podskórnie przez 14 dni przed rozpoczęciem chemioterapii. Stosowana jest także w ciężkiej mielosupresji po leczeniu cyklofosfamidem i doksorubicyną.

Krwiotwórcze czynniki wzrostu

Zbadanie i identyfikacja czynników wzrostu krwinek stało się możliwe głównie dzięki opracowaniu modeli hodowli komórek krwiotwórczych *in vitro*. Dzięki nim udało się także sklonować geny kodujące poszczególne cytokiny z tej grupy i otrzymać rekombinowane białka o zastosowaniu terapeutycznym.

Najwcześniej opracowano metodę hodowli komórek hematopoetycznych szeregu granulocytarno-makrofagowego (CFU-GM ang. *colony forming unit – granulocyte, macrophage*). CFU-GM rosną tylko w obecności GM-CSF. Czynnikiem stymulującym wzrost kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF) jest cytokiną wpływającą zarówno na multipotencjalne komórki macierzyste szpiku kostnego, jak i na ukierunkowane komórki krwiotwórcze szeregu granulocytarno-makrofagowego. Ludzki czynnik GM-CSF jest białkiem zbudowanym ze 127 aminokwasów. Gen kodujący GM-CSF występuje w chromosomie 5 w są-

siedztwie genów IL-3 i IL-5, z którymi wiąże go także zbliżone właściwości biologiczne. Podobną budowę wykazują także receptory GM-CSF oraz receptory interleukin 3 i 5. GM-CSF produkowany jest przez limfocyty T, makrofagi, fibroblasty oraz komórki śródbłonna naczyń.

Rekombinowany GM-CSF (molgramostim, sargramostim, regramostim) stosuje się jako lek. Badania kliniczne potwierdziły skuteczność rGM-CSF w stymulacji hematopoezy u ludzi. Czynniki te wywierają wpływ na proliferację komórek prekursorowych, przede wszystkim jednak na komórki dojrzałe linii granulocytów oraz monocytów. Ponadto wpływa aktywnie na mechanizmy działania przeciwbakteryjnego i przeciwnowotworowego tych komórek (np. wzrost produkcji reaktywnych form tlenu, pobudzenie fagocytozy i chemotaksji, zwiększenie produkcji TNF- α). GM-CSF, podobnie jak inne krwiotwórcze czynniki wzrostu, stymuluje także proliferację komórek białaczkowych, a także komórek innych typów nowotworów (np. rak drobnokomórkowy płuca). Wiele linii komórkowych białaczek wykazuje zdolność do autokrynnego wydzielania GM-CSF. W warunkach fizjologicznych naturalny GM-CSF jest niewykrywalny w surowicy oraz w tkankach. Rekombinowany GM-CSF podawany jest drogą podskórną lub dożylną. Wskazaniami do stosowania rGM-CSF są wrodzona lub nabyta neutropenia (np. zespół Kostmanna), niedokrwistość aplastyczna oraz zespoły mielodysplastyczne. Są to zwykle uboczne skutki działania leków przeciwnowotworowych (chemio- i radioterapia). Lek może być także podawany w celu przyspieszenia regeneracji układu krwiotwórczego po przeszczepie szpiku.

Czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów (G-CSF) ma znacznie mniej uniwersalny wpływ na komórki krwiotwórcze w porównaniu z GM-CSF oraz IL-3. Reguluje proliferację i różnicowanie komórek prekursorowych linii granulocytarnej (CFU-G i CFU-GM). Gen kodujący G-CSF znajduje się w 17 chromosomie (17q11 – 12). Dojrzałe białko ma masę około 20 kDa i wykazuje wysoką homologię do G-CSF mysiego. Produkowany jest przez makrofagi, komórki śródbłonna i fibroblasty. Zidentyfikowano jeden typ receptora tej cytokiny. Mutacja w genie kodującym receptor G-CSF występuje w zespole Kostmanna. Receptor G-CSF obecny jest na powierzchni komórek reagujących na działanie G-CSF, takich jak dojrzałe granulocyty. Stwierdzono także ich obecność na komórkach linii białaczkowych. W warunkach *in vitro* potwierdzono stymulację proliferacji i różnicowania ukierunkowanych komórek prekursorowych szeregu granulocytarnej (CFU-G) pod wpływem G-CSF. Największy wpływ G-CSF widoczny jest w przypadku komórek tworzących neutrofile. Cytokina ta wpływa także aktywnie na mechanizmy obronne warunkowane przez neutrofile (np. stymulacja produkcji reaktywnych form tlenu).

Rekombinowany G-CSF (filgrastim lub lengrastim) jest stosowany jako lek w stanach upośledzenia układu krwiotwórczego. Podawany jest drogą dożylnego wlewu lub podskórną. Preparaty rG-CSF stosowane są w celu pobudzenia granulopoezy u chorych z uszkodzeniem szpiku kostnego pod wpływem radio- lub chemioterapii. Lek przyspiesza także regenerację układu krwiotwórczego po przeszczepach szpiku. Preparaty rG-CSF wykorzystywane są także w zespołach mielodysplastycznych. Są to stany patologiczne charakteryzujące się nieefektywną hematopoezą wywołaną defektem komórek macierzystych szpiku. Inne wskazania do leczenia rG-CSF obejmują także leczenie ostrych białaczek, neutropenii (wrodzonej lub nabytej), niedokrwistości aplastycznej (niedobór komór-

rek krwiotwórczych) i zaburzeń krwiotworzenia w przebiegu AIDS (leukopenia). Szczególne znaczenie rG-CSF wynika z jego zdolności do łagodzenia ciężkiej neutropenii, gdyż jest to jeden z najpoważniejszych i najczęstszych skutków niepożądanych chemioterapii nowotworów, obniżających zdolność układu immunologicznego do zwalczania poważnych, zagrażających życiu infekcji. Zastosowanie rG-CSF w politerapii nowotworów zwiększa tolerancję na wysokie dawki chemioterapeutyków. Działanie takie zaobserwowano między innymi w nowotworach opornych na cytostatyki – rak jajnika, rak drobno-komórkowy płuca, chłoniaki nieziarnicze.

Czynnik stymulujący wzrost kolonii makrofagów (M-CSF) został odkryty już w 1977 roku. Gen kodujący M-CSF jest zlokalizowany w chromosomie 5 (5q31.1). Istnieje kilka form alternatywnego splicingu mRNA tej cytokiny. Powstające białka tworzą homodimery o masie 90 kDa. Receptor M-CSF jest również kodowany przez jeden gen.

Występuje na powierzchni prawidłowych monocytów oraz niektórych komórek nowotworowych. M-CSF ma istotne znaczenie w powstawaniu i funkcjonowaniu monocytów oraz makrofagów. Indukuje proliferację i tworzenie makrofagów przez komórki prekursorowe szpiku (stymuluje późne kolonie CFU-GM do tworzenia kolonii makrofagów). Ma także zdolność do regulowania proliferacji izolowanych makrofagów *in vitro* oraz przedłuża czas przeżycia monocytów i stymuluje ich różnicowanie do makrofagów. Ponadto M-CSF zwiększa cytotoksyczność dojrzałych fagocytów wobec patogenów i komórek nowotworowych. W warunkach fizjologicznych M-CSF jest wykrywalny w osoczu oraz w moczu, a jego stężenie zwiększa się w pod wpływem stymulacji przez niektóre cytokiny. Głównymi źródłami M-CSF są monocyty i makrofagi. M-CSF produkują także fibroblasty, komórki podścieliska szpiku, komórki śródbłonka, limfocyty B i T oraz granulocyty.

Otrzymywanie M-CSF początkowo opierało się na jego ekstrakcji z moczu. Obecnie otrzymuje się rekombinowany M-CSF z hodowli transformowanych komórek *E. coli* bądź ssaczycy linii komórkowych (postać glikozylowana). Zainteresowanie lecznicze rM-CSF wynika głównie z jego zdolności do aktywowania monocytów-makrofagów. Są one ważnym elementem odpowiedzi przeciwnowotworowej organizmu. Obecne wskazania obejmują przede wszystkim zwalczanie ciężkich grzybic narządowych związanych z neutropenią u pacjentów leczonych chemio- i radioterapią.

Interferony

Interferony są grupą cytokin, których wspólną cechą są właściwości antywirusowe. Obecnie wyróżnia się dwie grupy interferonów: typ I tworzony przez IFN- α , IFN- β i mniej znaczący IFN- ω oraz typ II tworzony tylko przez IFN- γ , ze względu na jego odmienne właściwości biologiczne. Cytokiny te biorą udział w mechanizmach obrony przed inwazją patogenów, przede wszystkim wirusów. Ich produkcja jest stymulowana przez obecność wirusów, bakterii, pierwotniaków lub komórek nowotworowych. Interferony wykazują ogólne działanie antyproliferacyjne, co wiąże się z hamowaniem przez nie wzrostu komórek nowotworowych. Posiadają także zdolność do indukowania stanu antywirusowego w komórkach poprzez supresję replikacji wirusów oraz poprzez hamowanie syntezy białek wirusowych. Ponadto zwiększają ekspresję białek głównego układu zgodności tkankowej (MHC), aktywują komórki układu immunologicznego – makrofagi, limfocyty T i komórki NK.

IFN- α , zwany interferonem leukocytarnym, jest wytwarzany głównie przez monocyty, limfocyty B i komórki NK. IFN- β (interferon fibroblastyczny) jest produkowany przez komórki nabłonkowe i fibroblasty. Ekspresja interferonów typu I następuje pod wpływem infekcji wirusowej. Preparaty interferonów należą do najwcześniej zarejestrowanych biofarmaceutyków na rynku. Wskazania do stosowania IFN- α obejmują zarówno choroby infekcyjne, głównie przewlekłe zapalenia wątroby typu B i C, brodawczaki krtani oraz kłykciny kończyste (choroba wywołana przez wirusy *Papilloma*), jak i choroby nowotworowe – białaczkę włochatokomórkową, szpiczaka mnogiego, chłoniaki złośliwe, przewlekłą białaczkę limfatyczną i mięsaka Kaposiego będącego powikłaniem w przebiegu AIDS. W raku nerki i czerniaku złośliwym sięga się także po IFN- α . IFN- β obecnie podaje się jedynie w leczeniu stwardnienia rozsianego (choroba neurodegeneracyjna).

IFN- γ jest wytwarzany przez dojrzałe pomocnicze limfocyty T subpopulacji Th1 oraz komórki NK. Rekombinowany IFN- γ jest produkowany w hodowlach *E. coli*. Wskazania do użycia IFN- γ obejmują przewlekłą chorobę ziarniniakową oraz ciężkie przypadki złośliwej osteopetrozy – choroby kości, której patogenezę wiąże się z upośledzonym metabolizmem tlenowym osteoklastów.

Czynnik martwicy nowotworów – α

Czynnik martwicy nowotworów – α (TNF- α , *tumor necrosis factor- α*), zwany także kachektyną, ze względu na jego związek ze stanem wyniszczenia organizmu w chorobach nowotworowych jest białkiem zbudowanym ze 157 aminokwasów o masie 17 kDa tworzącym dimery lub trimery. Gen kodujący TNF- α znajduje się w chromosomie 6 (6p21.30). Komórkami produkującymi TNF- α są przede wszystkim makrofagi. Może być także uwalniany przez komórki NK, komórki tuczne, adipocyty, komórki mięśni gładkich, komórki nabłonkowe, astrocyty i niektóre linie nowotworowe. TNF- α oddziałuje poprzez dwa typy receptorów powierzchniowych. Czynnikiem ten jest poza IL-1 główną cytokiną prozapalną. Odgrywa także rolę w patogenezie wstrząsu septycznego. Cytokina ta wzbudziła zainteresowanie przede wszystkim ze względu na jej związek z licznymi stanami patologicznymi, z których najważniejszymi są choroby przebiegające ze stanami zapalnymi (zwłaszcza przewlekłymi) oraz gorączką i wstrząsem septycznym. Stany zapalne związane z TNF- α dotyczą między innymi chorób układu nerwowego, przewodu pokarmowego, płuc, nerek. Najważniejszymi jednostkami chorobowymi, z którymi wiąże się badania nad TNF- α są reumatoidalne zapalenie stawów, stwardnienie rozsiane oraz AIDS.

Uniwersalny charakter TNF- α jako cytokiny prozapalnej stanowi dogodny cel farmakoterapii z udziałem przeciwciał monoklonalnych. Infliksimab (Remicade) jest preparatem zawierającym przeciwciała monoklonalne anty-TNF- α zarejestrowanym w leczeniu choroby Leśniowskiego-Crohna. Adalimumab (Humira) stosuje się natomiast w reumatoidalnym zapaleniu stawów. Znaczenie terapeutyczne ma jednak także sam TNF- α dzięki jego właściwościom immunomodulacyjnym.

Niewielkie dawki TNF- α mają działanie korzystne, a stany patologiczne są związane przede wszystkim z rozregulowaniem działania tej cytokiny i charakteryzują się bardzo wysokim wzrostem jej poziomu przekraczającym wartości fizjologiczne. Niewielkie stęże-

nia TNF- α wpływają korzystnie na aktywność fagocytarną neutrofilii, zwiększają ekspresję cząstek adhezyjnych, aktywują limfocyty T oraz stymulują produkcję krwiotwórczych czynników wzrostowych. Kachektyna ma także działanie przeciwnowotworowe, związane z bezpośrednim efektem cytotoksycznym tej cytokiny.

Podanie TNF- α powoduje martwicę krwotoczną guzów nowotworowych. Mechanizm działania wynika prawdopodobnie zarówno z aktywności cytotoksycznej TNF- α , jak i z jego oddziaływania na komórki śródbłonna. Omawiane białko wykazuje synergizm z wieloma lekami cytostatycznymi i cytokinami o aktywności antynowotworowej. Niestety, wiele nowotworów wykazuje oporność na działanie TNF- α . Rekombinowany TNF- α (Beromun) podawany jest dożylnie lub domięśniowo. Lepszy efekt przeciwnowotworowy można uzyskać przez bezpośrednie podanie do guza lub dootrzewnowo. Obecnie rTNF- α stosuje się tylko wspomagająco po operacyjnym usunięciu nowotworu złośliwego.

Tabela XIII. Wybrane preparaty cytokin I i II generacji stosowane w leczeniu [wg 4]

Wybrane preparaty I generacji Rodzaj cytokiny, produkujący rodzaj rekombinowanych genetycznie komórek	Wskazanie terapeutyczne	Firma Rok wprowadzenia
1	2	3
CY TOKINY		
Roferon A (rh-IFN- α -2a, <i>E. coli</i>)	różnego rodzaju nowotwory złośliwe, przewlekłe zapalenie wątroby typu B i C	Hoffman-La Roche 1986 (USA)
Intron A/Alfatronol/Viraferon/Virtron (rIFN- α -2b, <i>E. coli</i>)	różnego rodzaju nowotwory złośliwe; przewlekłe zapalenie wątroby typu B i C	Schering Plough 1986 (USA), 2000 (EU)
Infergen (interferon alfacon-1) (rIFN- α , <i>E. coli</i>)	WZW typu C	Amen (USA) 1997
Rebif (rIFN- β -1a, komórki CHO)	nawrotowo-remisyjna po-stać stwardnienia rozsianego	Ares-Serono 1998 (EU) 2002 (USA)
Avonex (rh-IFN- β -1a, komórki CHO)	nawrotowo-remisyjna postać stwardnienia rozsianego	Biogen 1996 (USA) 1997 (EU)
Betaseron/Betaferon (rh-IFN- β -1b, <i>E. coli</i>)	nawrotowo-remisyjna postać stwardnienia rozsianego	Chiron 1993 (USA) Schering 1995 (EU)
Actimmune (rh-IFN- γ -1b, <i>E. coli</i>)	przewlekła ziarniakowatość	Genentech 1990 (USA)
Beromun (rh-TNF- α , <i>E. coli</i>)	pomocniczo w chirurgii mięsaka tkanki miękkiej	Boehringer-Ingelheim 1999 (EU)
Anakinra (Kineret) (rIL-1Ra, <i>E. coli</i>).	reumatoidalne zapalenie stawów	Amen 2001 (USA)
HEMATOPOETYCZNE CZYNNIKI WZROSTU		
Epogen/Eporex/Procrit (rh-EPO α , komórki CHO, komórki jajnika chomika chińskiego; <i>Chinese hamster ovary cells</i>)	niedokrwistość	Amgen, Cilag, Ortho Biotech 1989, 1990 (USA)

cd. tab. XIII

1	2	3
Neupogen/Lenograstim (filgrastim, rG-CSF, <i>E. coli</i>)	neutropenia	Amgen 1991 (USA) Hoffmann-La Roche 1994 (EU)
Neorecormon (rh-EPO β , komórki CHO)	niedokrwistość	Boehringer-Mannheim, Hoffmann-La Roche 1997 (EU)
Wybrane preparaty II generacji Rodzaj cytokiny, produkujący rodzaj rekombinowanych genetycznie komórek	Wskazanie terapeutyczne	Firma Rok wprowadzenia
CY TOKINY		
Pegasys (pegylowana forma interferonu alfa-2a)	Przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu C	Hoffmann-La Roche 2002 (EU, USA)
Peg-Intron (pegylowana forma interferonu alfa-2b)	Przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu C	Schering Plough 2000 (EU) 2001 (USA)
HEMATOPOETYCZNE CZYNNIKI WZROSTU		
Aranesp/Nespo (darbopoetyna alfa, długo działający analog EPO)	Niedokrwistość	Amgen 2001 (EU, USA) Dompe Biotec 2001 (EU)
Neulasta/Neupogep (pegylowana forma filgrastimu)	Neutropenia u chorych onkologicznych	Amgen 2002 (USA, EU)

Otrzymywane drogą rekombinacji genetycznej cytokiny stanowią bardzo istotną pulę biofarmaceutyków, przy czym należy pamiętać, że droga rekombinacji genetycznej to sposób na syntezę wielu innych związków wykorzystywanych w medycynie i naukach pokrewnych. Związkami rekombinowanymi będą również różnego typu enzymy, hormony białkowe, receptory białkowe dla cytokin, białka układu dopełniacza czy wreszcie cała pula czynników krzepnięcia krwi, tzw. koagulantów *in vitro*, którym poświęcono wiele monografii, w tym monografię Rodneya J.Y., Ho i Milo Gibaldiego: *Biotechnology and Biopharmaceuticals. Transforming proteins and genes into drugs*. Wiley-Liss, Hoboken, N.J. 2003.

PIŚMIENNICTWO

1. *Balducci L., Carreca I.*: The role of myelopoietic growth factors in managing cancer in the elderly. *Drugs* 2002, 62 suppl 1, 47–63.
2. *Basak G., Lasek W.*: Eksperymentalne i kliniczne próby leczenia nowotworów z użyciem genu dla interleukiny 12 (IL-12). *Postępy Biologii Komórki* 2002, 3, 465–487.
3. *Boehm U., Klamp T., Groot M., Howard J.C.*: Cellular responses to interferon- γ . *Ann Rev Immunol* 1997, 15, 749–795.
4. *Borowicz P.*: Produkcja Biotechnologiczna Leków. [W:] Bielecki S.: Raport perspektywy i kierunki rozwoju biotechnologii w Polsce do 2013 r., Ministerstwo Edukacji i Nauki, Polska Akademia Nauk, Komitet Biotechnologii przy Prezydium PAN, Warszawa 2005, 17–40.
5. *Carr R., Modi N., Dore C.*: G-CSF and GM-CSF for treating or preventing neonatal infections. *Cochrane Database Syst Rev* 2003, 3, CD003066.
6. *Clark O.A., Lyman G., Castro A.A., Clark L.G., Djulbegovic B.*: Colony stimulating factors for chemotherapy induced febrile neutropenia. *Cochrane Database Syst Rev* 2003, 3, CD003039.

7. Farmakologia. Podstawy farmakoterapii. Praca zbiorowa pod red. W. Kostowskiego. PZWL, Warszawa 1998.
8. Heuser M., Ganser A.: Colony-stimulating factors in the management of neutropenia and its complications. *Ann Hematol* 2005, 84 (11), 697–708.
9. Immunologia. Praca zbiorowa pod red. J. Gołąb, M. Jakóbisiak i W. Lasek. PWN, Warszawa 2005.
10. Kieć-Kononowicz K.: Leki otrzymywane z zastosowaniem technologii rekombinowanego DNA. *Farmacja Polska* 2005, 9, 407–418.
11. Koj A.: Niektóre cytokiny przeciwzapalne: własności i mechanizm działania. *Postępy Biologii Komórki* 2001, supl. 16, 5–15.
12. Nemeckova S., Sroller V., Hainz P., Krystofova J., Smabel M., Kutinova L.: Experimental therapy of HPV16-induced tumors with IL-12 expressed by recombinant vaccinia virus in mice. *Int J Mol Med* 2003, 12, 788–796.
13. Podlewski J.K., Chwalibogowska-Podlowska A.: Leki współczesnej terapii. Wydanie XV. Split Trading, Warszawa 2001.
14. Pucino F., Harbus F.T., Goldbach-Mansky R.: Use of biologics in rheumatoid arthritis: Where are we going? *Am J Health-Syst Pharm* 2006, 63, S19.
15. Robak T.: Biologia i farmakologia cytokin. PWN, Warszawa-Łódź 1995.
16. Rodney J.Y. Ho; Milo Gibaldi: Biotechnology and Biopharmaceuticals. Transforming proteins and genes into drugs. Wiley-Liss, Hoboken, N.J. 2003.
17. Roitt L., Brostoff J., Male D.: Immunologia. Wydanie II. PZWL i Wydawnictwo Medyczne Slotwiński Verlag, Warszawa 2000.
18. Samuel C.E.: Antiviral actions of interferons. *Clin Microb Rev* 2001, 14, 778–809.
19. Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A.: Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004, 75, 163–189.
20. Sypniewski D., Bednarek I.: Aktywność biologiczna i zastosowanie interferonu- γ w leczeniu. *Annales Academiae Medicae Silesiensis* 2005, 59 (3), 237–246.

15. Rośliny transgeniczne źródłem surowców farmaceutycznych

Sabina Gałka

Metody otrzymywania roślin transgenicznych

Za genetycznie zmodyfikowane uważa się te rośliny, w których materiał genetyczny został zmieniony w sposób niezachodzący w warunkach naturalnych, tj. wskutek krzyżowania lub naturalnej rekombinacji. Wprowadzenie obcego genetycznego materiału do komórek roślinnych wykorzystywanych jako źródło surowców naturalnych może zajść:

- a) w wyniku zastosowania technik rekombinacji DNA z użyciem wektorów, w tym tworzenia materiału genetycznego poprzez wprowadzenie do wirusa plazmidu lub każdego innego wektora cząsteczek DNA wytworzonych poza organizmem i włączenie ich do organizmu biorcy, w którym w warunkach naturalnych nie występują, ale w którym są zdolne do ciągłego powielania,
- b) w wyniku wdrożenia technik stosujących bezpośrednio włączenie materiału dziedzicznego przygotowanego poza organizmem, a w szczególności technik mikroiniekcji, makroiniekcji i mikrokapsułkowania,
- c) jako efekt stosowania metod niewystępujących w przyrodzie w celu połączenia materiału genetycznego co najmniej dwóch różnych komórek, w wyniku czego powstaje nowa komórka zdolna do przekazywania swego materiału genetycznego odmiennego od materiału wyjściowego komórkom potomnym.

Przykładem modyfikacji roślin z zastosowaniem wektora molekularnego jako nośnika informacji genetycznej jest transformacja z użyciem *Agrobacterium*. Procedura ta umożliwia stabilne włączenie w genom biorcy obcego materiału genetycznego. *Agrobacterium tumefaciens* doprowadza do nadmiernej produkcji auksyn i cytokin, co skutkuje tworzeniem się guzowatych narośli. Przy zakażeniu dzikimi szczepami *Agrobacterium rhizogenes* przenoszone są do rośliny jedynie te geny, które kodują produkcję auksyn, i tworzą się tzw. korzenie włośnikowate, wytwarzające np. szikoninę, ginsenozydy, atropinę. Dla *Digitalis lanata* opracowano procedury transformacji, gdzie obce geny połączono z różnego rodzaju promotorami kontrolującymi ekspresję wprowadzanej informacji genetycznej. Dzięki takiej strategii włączone geny mogą ulegać różnego typu ekspresji, np. konstytutywnej lub tkankowo czy też środowiskowo zależnej.

Przykładem bezwektorowego wprowadzania obcego DNA jest bezpośrednie wstrzeliwanie do komórek i tkanek roślinnych cząstek z naniesioną na nie warstwą DNA [1]. Siły balistyczne wykorzystuje się tutaj jako czynnik ułatwiający przeniesienie materiału genetycznego przez bariery błon komórkowych.

Duże korzyści w pozyskiwaniu zmodyfikowanych komórek roślinnych przynosi zastosowanie fuzji protoplastów, tzn. połączenia komórek roślinnych pozbawionych ścian komórkowych. Jest to bardzo efektywna metoda uzyskiwania nowych odmian roślin o po-

żądanych cechach. Protoplasty mają między innymi zdolność do pochłaniania z roztworu cząsteczek zawartego w nim obcego DNA, a sam proces zachodzi na drodze endocytozy.

Transformacja roślin obejmuje następujące etapy:

1. Izolacja genu, który ma być użyty do modyfikacji.
2. Przygotowanie konstrukcji genowej składającej się z:
 - genu kodującego określone, pożądane przez nas białko, które chcemy wprowadzić/uzyskać ze zmodyfikowanej rośliny,
 - dwóch genów regulatorowych – promotora i terminatora,
 - genu markerowego – umożliwiającego selekcję transformantów,
 - genu reporterowego – umożliwiającego np. wizualizację transgenu bądź produktu ekspresji, wprowadzanego do roślin konstrukt molekularnego,
 - wektora zawierającego dwie sekwencje graniczne regionu T-DNA z plazmidu Ti.
3. Wprowadzenie konstrukcji genowej do komórki roślinnej (metody wektorowe lub bezwektorowe).
4. Regeneracja roślin transgenicznych w kulturach *in vitro*.
5. Identyfikacja transgeniczności za pomocą genów reporterowych, markerowych oraz kodujących.
6. Ocena stabilności transformacji w kolejnych pokoleniach [2].

Pierwsze udane doświadczenia z transformacją petunii i tytoniu przeprowadzono już w 1983 roku. Od tego czasu technikę transformacji roślin, zastosowano dla wielu gatunków roślin, takich jak: pomidor, ziemniak, sałata, sorgo, ryż, kukurydza, naparstnica, kapusta, barwinek, nawrot i wielu innych.

Surowce farmaceutyczne otrzymywane z roślin transgenicznych

Spośród nowych produktów biotechnologii roślin otrzymywanych na drodze transgenezy wymienić należy między innymi szczepionki produkowane w roślinach oraz roślinne szczepionki doustne, przeciwciała monoklonalne oraz środki i preparaty o właściwościach leczniczych lub też zwiększających walory żywieniowe czy zdrowotne (witaminy, mikroelementy).

Rośliny wytwarzające więcej witamin i mikroelementów

Naukowcy otrzymali genetycznie zmodyfikowaną odmianę gatunku *Oryza*, tzw. złoty ryż, który produkuje zwiększoną ilość β -karotenu będącego prekursorem witaminy A. Organizm ludzki nie potrafi samodzielnie wyprodukować takiego prekursora, dlatego musi on być dostarczany w pożywieniu, w przeciwnym wypadku człowiek jest narażony na objawy niedoboru witaminy A. Podczas wytwarzania „złotego ryżu” do genomu rośliny macierzystej zostały wprowadzone dwa geny z kukurydzy – jeden gen kodujący syntazę fitoenu (*psy*) oraz drugi kodujący desaturazę karotenu (*crtI*) [3]. Kolejnym osiągnięciem naukowców jest genetycznie modyfikowana kukurydza, która może stać się wydajnym źródłem żelaza. Niedobór tego mikroelementu stanowi poważny problem żywieniowy w krajach rozwijających się. Dieta uboga w żelazo, dotykająca prawie dwa miliardy ludzi, jest przyczyną anemii u dzieci, a także chronicznego zmęczenia u dorosłych. Naukowcy zmodyfikowali kukurydzę poprzez wprowadzenie do jej genomu dodatkowego genu z soi

i grzyba *Aspergillus*. Oba geny, działając wspólnie, odpowiedzialne są za wydajniejsze pobieranie żelaza z gleby oraz udostępnianie go w formie łatwo przyswajalnej dla ludzi. Gen soi produkuje białko – ferrytynę – która wiąże się z żelazem, pomagając w pobieraniu go z gleby przez roślinę. Jednak pomimo zwiększenia zawartości tego pierwiastka w roślinie nadal pozostają trudności w przyswajaniu żelaza z nasion kukurydzy, co wynika z obecności w nich kwasu fitynowego, stanowiącego rodzaj rezerwy fosforu dla zarodka. Problematyczną „obecność” w nasionach kukurydzy kwasu fitynowego rozwiązano dzięki wprowadzeniu drugiego genu izolowanego z grzyba *Aspergillus*, kodującego fytazę – enzymu rozkładającego kwas fitynowy. W ten sposób zniwelowano negatywny wpływ kwasu fitynowego na wchłanianie żelaza gromadzonego w wyższym stężeniu w zmodyfikowanych genetycznie roślinach. Badania *in vitro* wskazały, że komórki ludzkiego jelita wchłonęły trzy razy więcej żelaza z kukurydzy modyfikowanej genetycznie niż analogicznie z odmiany niemodyfikowanej [4].

Afrykańscy naukowcy planują stworzyć genetycznie zmodyfikowane sorgo, aby dzięki zawartości dodatkowych witamin i metali rozwiązać problem niedoboru mikroelementów afrykańskiej ludności, której dieta jest oparta w znacznej mierze na tym zbożu.

Sorgo jest odpornym na warunki środowiskowe ziarnem, dobrze rozwijającym się w półsuchych regionach, które są zbyt trudne dla niemiejsowych odmian w Afryce, np. kukurydzy. Niestety, sorgo nie zawiera wystarczającej ilości substancji odżywczych, dlatego też dorośli i dzieci, dla których jest ono podstawowym składnikiem diety, cierpią na formę głodu zwaną niedożywieniem mikroelementowym. Genetycznie zmodyfikowane sorgo będzie miało wyższy poziom prowitamin A i E, żelaza, cynku oraz podstawowych aminokwasów.

Szczepionki roślinne

Szczepionki roślinne otrzymuje się obecnie dwoma metodami. W jednej z nich wykorzystuje się rośliny transgeniczne, które zawierają transgen (fragment obcego DNA) kodujący odpowiedni antygen i produkują określone białko antygenowe. W drugim przypadku stymuluje się nadprodukcję w roślinie antygeny, którego sekwencja zostaje wprowadzona w odpowiednie miejsce genomu wirusa roślinnego w taki sposób, że w rekombinowanym wirusie białko antygenowe eksponowane jest na jego powierzchni. W zainfekowanej roślinie wirus namnaża się, rozprzestrzenia w organizmie gospodarza i produkuje zwiększoną ilość antygenów przyłączonych do białka otoczki wirusa. Antygeny produkowane w roślinie można następnie wyizolować, oczyścić i podać zwierzętom bądź ludziom jako szczepionki w tradycyjnej formie (iniekcja domięśniowa lub podskórna). Do tworzenia takich wektorów dotychczas wykorzystano między innymi wirusa mozaiki tytoniu (TMV) oraz wirusa mozaiki lucerny (AMV), uzyskując transgeniczny tytoń szlachetny (*Nicotiana tabacum*) z wprowadzonym genem HBV kodującym małą jednostkę antygeny powierzchniowego HBS wirusa żółtaczk. Tak zmodyfikowaną roślinę można wykorzystać jako źródło swoistych antygenów – szczepionkę uczulającą organizm na produkcję swoistych przeciwciał skierowanych w tym wypadku przeciwko jednemu z antygenów HBV, czyli szczepionkę przeciw wirusowemu zapaleniu wątroby typu B. Jednak znacznie większe zainteresowanie budzi wytwarzanie w roślinach uprawnych szczepionek, które – pomijając etap izolacji antygeny – mogą być aplikowane bezpośrednio drogą doustną. Szczepionki jadalne mają wiele zalet, między innymi posiadają zdolność kompletnej im-

munizacji ogólnoustrojowej, a także dają specyficzną „odpowiedź śluzówkową” obejmującą wszystkie błony śluzowe organizmu. Jest to o tyle istotne, że szczepionki podawane drogą iniekcji domięśniowej lub podskórnej zapewniają immunizację systemową, lecz nie wywołują reakcji miejscowej w obrębie błon śluzowych. W przypadku dopracowania wielu roślinnych szczepionek jadalnych nie będzie potrzeby dysponowania złożoną infrastrukturą medyczną w celach immunizacji oraz, co szczególnie ważne jest w profilaktyce szczepień prowadzonej u dzieci, szczepionki jadalne będą bezboleśnie podawane [2]. Prace nad taką formą doprowadziły do powstania transgenicznego ziemniaka zawierającego gen pochodzący od bakterii *E. coli*. Podanie myszom i ludziom zmodyfikowanych, surowych ziemniaków spowodowało wytworzenie przeciwciała w odpowiedzi na ten antygen i powstanie odpowiedzi immunologicznej. Uzyskano również szczepionki jadalne przeciw pałeczce cholery (transgeniczne ziemniaki) i wścieklicznie (transgeniczny pomidor). Aktualnie trwają badania nad otrzymaniem szczepionki z modyfikowanego pomidora przeciwko AIDS i wirusowemu zapaleniu wątroby typu B. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów udowodniono, że system immunologiczny myszy, które jadły transgeniczne pomidory, znacznie się wzmocnił. W kolejnych pracach naukowcy planują stworzenie szczepionek przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu A oraz przeciwko odkleszczowemu zapaleniu mózgu, do czego chcą użyć marchwi i sałaty.

Nieco innym aspektem, ale ciągle pozostającym w ramach modulacji immunologicznej organizmu dzięki wykorzystaniu zmodyfikowanych roślin, są próby otrzymywania ludzkich przeciwciał, które można by zastosować w terapii nowotworów. W ten sposób próbuje się uzyskać swoiste immunoglobuliny poprzez wprowadzenie ludzkiego genu do komórek rozrodczych kukurydzy. Prowadzi się uprawy soi produkującej ludzkie przeciwciała przeciw wirusowi *Herpes simplex 2*, wywołującemu choroby weneryczne, uprawy transgenicznego tytoniu wytwarzającego przeciwciała przeciwdziałające powstawaniu próchnicy czy wytwarzające w swoich liściach enzym glukocerebrozydazę [5].

Polskim akcentem w tego typu badaniach jest otrzymanie zmodyfikowanej sałaty produkującej szczepionkę przeciwko zapaleniu wątroby typu B, która została opracowana przez naukowców z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu pod kierownictwem prof. Legockiego [6].

Szczepionki otrzymywane z transgenicznych roślin mają wiele zalet. Układ ekspresyjny rośliny transgenicznej odznacza się zdolnością przekazywania genu roślinom potomnym. A zatem koszty uprawy roślin raz stabilnie zmodyfikowanych mogą być wielokrotnie niższe niż szczepionki wytwarzanej dotychczasowymi metodami produkcji. Dodatkowym atutem jest także ich wysokie bezpieczeństwo wynikające z tego, iż roślina zawiera pojedyncze białko drobnoustroju chorobotwórczego lub nawet tylko jego fragment. Konwencjonalne szczepionki mogą bowiem zawierać zabite (inaktywowane) lub osłabione (atenuowane) patogeny, co niesie ze sobą niebezpieczeństwo odwrócenia atenuacji i ujawnienia cech patogennych.

Rośliny do produkcji związków biologicznie czynnych i terapeutyków (*bio-farming*)

Jednym z kierunków rozwoju biotechnologii roślin jest produkowanie w roślinach naturalnych substancji biologicznie czynnych, takich jak: wybrane składniki krwi, hormony, immunomodulatory (cytokiny, limfokiny). Wytwarzanie w roślinach powyższych składników zyskuje na znaczeniu zarówno ze względu na niższe koszty otrzymywania, jak

i możliwość uniknięcia potencjalnych zagrożeń wynikających z przetaczania płynów ustrojowych. Jednak produkcja tego rodzaju wymaga wysokiego reżimu technologicznego oraz kontroli jakości otrzymanego produktu, a także specjalnej infrastruktury w zakresie obrotu, przechowywania i dystrybucji. Przykładem roślin wykorzystywanych do uzyskania tych związków może być transformacja *Nicotiana tabacum* genem kodującym ludzki hormon wzrostu oraz otrzymanie transformantów *Brassica napus* produkujących białko hirudynę, które jest cennym antykoagulantem.

Biotransformacja metabolitów wtórnych

Poza wykorzystaniem zdolności komórek do syntezy metabolitów wtórnych podejmuje się również próby zastosowania ich do biotransformacji związków biologicznych. Procesy biotransformacji umożliwiają w warunkach *in vitro* syntezę związków o nowych właściwościach chemicznych i wyższych aktywnościach biologicznych. Prekursorami przemian biotransformacyjnych mogą być związki pochodzenia naturalnego (endogenne występujące w roślinie) lub ksenobiotyki (związki obce dla rośliny). Obecność w roślinach szeregu szlaków enzymatycznych umożliwia przemiany substratów pochodzenia naturalnego oraz syntetycznego. Jednym z najważniejszych obszarów biotransformacji jest produkcja metabolitów wtórnych w warunkach *in vitro*. Główne grupy związków, które otrzymuje się z hodowli komórek roślinnych, to metabolity wtórne czynnie biologicznie, takie jak: alkaloidy, przeciwutleniacze, fitoaleksyny, olejki aromatyczne i inne. Metabolity wtórne charakteryzują się często skomplikowaną strukturą, a ich otrzymywanie na drodze syntezy chemicznej jest bardzo trudne, niemożliwe lub nieopłacalne. Związki te otrzymywane są z odmian roślin leczniczych, lecz w warunkach naturalnych biosynteza przebiega powoli i na ogół z bardzo małą wydajnością. Ponadto dostępność materiału roślinnego może być ograniczona z powodu specyficznych wymagań klimatycznych, ścisłej ochrony niektórych cennych gatunków roślin. Wiele z nich otrzymuje się z roślin tropikalnych, które nie są dostępne w każdym klimacie, a ich synteza chemiczna jest kosztowna i wymaga często drogich półproduktów ekstrahowanych z materiału roślinnego. W świetle tych ograniczeń produkcja metabolitów wtórnych z użyciem kultur komórkowych lub tkankowych na dużą skalę wydaje się bardzo atrakcyjnym rozwiązaniem. Hodowle komórek roślinnych stanowią zatem alternatywną technologię pozyskiwania tych substancji, a technologie ich otrzymywania mogą być rozpatrywane jako metody wytwarzania rzadkich metabolitów roślinnych o znacznej wartości, występujących w surowcach naturalnych w niskich stężeniach. Analizy ekonomiczne wskazują, że wytwarzanie produktów metodą hodowli komórek roślinnych może być opłacalne, jeżeli cena gotowego produktu wyniesie ok. 10 000 \$/kg. Dalszy postęp w tej dziedzinie zależy od prac biologów nad kontrolą syntezy produktów w komórkach roślinnych oraz obniżenia kosztów ich wydzielania i oczyszczania [7]. Przykładem metabolitów wtórnych wykorzystywanych w farmacji są głównie alkaloidy. Dzięki biosyntezie w kulturach zawiesinowych ajmalicyny z *Catharanthus roseus* otrzymano silny i skuteczny lek na nadciśnienie, wykazujący również działanie przeciwnowotworowe. Roślina jest także cennym źródłem innych alkaloidów indolowych działających przeciwnowotworowo, np. windolina, katarantyna. Rośliny z rodzin *Ranunculaceae*, *Menispermaceae* i *Berberidaceae* są źródłem berberyny – alkaloidu izochinolinowego o szerokim zastosowaniu leczniczym. Alkaloidy tropanowe (atropina, skopolamina) to grupa związków należących do parasympatykolytyków wykorzystywanych w chorobach

żołądka i jelit, głównie jako środki przeciwskurczowe. Do ich produkcji stosuje się kultury zawiesinowe i korzenie włośnikowate otrzymane między innymi z *Atropa belladonna* i *Duboisia leichberdtii*. Hodowla roślin w kulturach in vitro jest również źródłem takich substancji, jak kofeina, teobromina (alkaloidy purynowe), sangwinaryna (alkaloid benzofenantrydynowy o działaniu bakterio- i fungistatycznym), mentol, paklitaksel, tridiolod, glikozydy nasercowe (terpenoidy) [8].

Przykładem ekonomicznie opłacalnych procesów jest biotransformacja β -metyldigoksyny w komórkach *Datura*. W ten sposób uzyskuje się produkt o wartości przewyższającej 500-krotnie wartość substratu, a co istotne, produktu tego nie można otrzymać ani metodą chemiczną, ani mikrobiologiczną [9].

PIŚMIENNICTWO

1. Dietrich B.: Techniki in vitro z użyciem roślin leczniczych do produkcji metabolitów wtórnych. [W:] Kayser O., Müller R.H.: Biotechnologia farmaceutyczna, 164–175.
2. Stefaniak B.: Rośliny transgeniczne. [W:] Woźny A., Przybył K.: Komórki roślinne w warunkach stresu. Tom II. Komórki in vitro. Wydawnictwo Naukowe, Poznań 2004, 121–142.
3. Paine J.A., Sipton C.A., Chaggar S., Howells R.M., Kennedy M.J., Vernon G., Wright S.Y., Hinchliffe E., Adams J.L., Silverstone A.L., Drake R.: Improving the nutritional value of Golden Rice through increased provitamin A content. Nature Biotechnology, Nat Biotechnol 2005, 23(4), 429–430.
4. Drakakaki G., Marvel S., Glahn R.P., Lund E.K., Pariagh S., Fischer R., Christou P., Stoger E.: Endosperm-specific co-expression of recombinant soybean ferritin and Aspergillus phytase in maize results in significant increases in the levels of bioavailable iron. Plant Molecular Biology 2005, 59(6), 869–880.
5. Kieć-Kononowicz K., Pękala E.: Transgeniczne rośliny. [W:] Kieć-Kononowicz K.: Wybrane zagadnienia z metod poszukiwania i otrzymywania środków leczniczych. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Wydanie I, Kraków 2000, 202–203.
6. Kapusta J., Modelska A., Figlerowicz M., Pniński T., Letellier M., Lisowa O., Yusibov V., Koprowski H., Płucienniczak A., Legocki A.B.: A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. The FASEB Journal 1999, 13, 1796–1799.
7. Szewczyk K.W.: Hodowle komórek roślinnych. [W:] Szewczyk K.W.: Technologia biochemiczna. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1997, 235–238.
8. Grajek W.: Biosynteza metabolitów wtórnych w kulturach in vitro. [W:] Malepszy S.: Biotechnologia roślin. PWN, Warszawa 2004, 306–341.
9. Viesturs U.E., Szmite I.A., Żilewicz A.W.: Biotechnologia. Substancje biologicznie czynne, technologia, aparatura. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 1992, 69–73.
10. Stefaniak B.: Regeneracja i rozmnażanie roślin w kulturach in vitro. [W:] Woźny A., Przybył K.: Komórki roślinne w warunkach stresu. Tom II. Komórki in vitro. Wydawnictwo Naukowe, Poznań 2004, 29–39.
11. Kapusta J.: Produkcja substancji biologicznie i farmakologicznie czynnych, na potrzeby medycyny i weterynarii. [W:] Malepszy S.: Biotechnologia roślin. PWN, Warszawa 2004, 341–432.