

**G & MB**

**Tome IV**

**Iași, 2003**

## **APLICAȚIILE DE ULTIMĂ ORĂ ÎN TEHNOLOGIA ADN-ULUI RECOMBINANT**

**MIRELA M. CÎMPEANU<sup>1</sup>, CRISTIAN S. CÎMPEANU<sup>2</sup>, SILVICA PĂDUREANU<sup>3</sup>**

### **PROTEINELE MEDICAMENT**

Una dintre aplicațiile comerciale timpurii ale tehnicilor de manipulare genetică a fost producerea de proteine umane de către bacterii, în scopuri terapeutice.

Deloc surprinzător, primele astfel de produse au fost versiunile recombinante ale unor proteine deja utilizate în terapie: *hormonul de creștere uman* și *însulina*. Anterior punerii la punct a metodelor care să permită obținerea acestor compuși cu ajutorul bacteriilor, hormonul uman de creștere era obținut prin extracția sa din glanda pituitară prelevată de la cadavre. Restricțiile acestei metode au apărut nu doar din lipsa materialului uman disponibil, ci mai ales din cauza pericolului contaminării, în unele cazuri cu agenți etiologici ai unor maladii neurodegenerative grave (Creutzfeld-Jakob).

Tehnologia recombinantă a eliminat astfel de probleme, oferind în cantități nelimitate, compuși terapeutici absolut siguri.

Aceste aspecte sunt cu mult mai importante cu cât de exemplu, unii factori de coagulare necesari tratamentului hemofiliei, obținuți din sânge uman, prezintă riscuri, deloc neglijabile, de contaminare cu HIV. Clonarea genelor acestor factori a devenit însă, din ce în ce mai accesibilă, și în același timp mai sofisticată, permițând astăzi creșterea numărului de limfokine și citokine identificate și implicit, producerea lor în scop terapeutic, în cantități nelimitate.

Prima generație de **proteine – medicament** era reprezentată de copii fidele a unor molecule umane, dar astăzi, încep să apară din ce în ce mai multe proteine modificate genetic, cu caracteristici îmbunătățite față de variantele lor naturale, proteine care aparțin deja uneia din cele două generații de proteine medicament.

Cel mai recent exemplu: *receptorul factorului de necroză al tumorilor* (TNF = tumor necrosis factor) cuplat cu regiunea Fc a IgG1, care a primit aprobarea pentru utilizare în tratamentul artritei reumatoide umane (1998).

### **ANIMALE ȘI PLANTE TRANSGENICE UTILIZATE CA BIOREACTOARE. CONCEPTUL DE PHARMING**

#### **ANIMALE TRANSGENICE**

Pharming reprezintă un cuvânt rezultat în urma unei combinații de termeni și care desemnează metodologia de utilizare a plantelor sau animalelor transgenice în scopul producerii de proteine recombinante cu rol terapeutic.

Sinteza de proteine recombinante în celulele animale prezintă o serie de avantaje comparativ cu sistemele de expresie bacteriene, avantaje dintre care cel mai important este reprezentat de modificările post-translaționale care sunt efectuate de către celula animală.

În condițiile în care culturile de celule animale la scară industrială ar fi exorbitant de scumpe, iar un control al condițiilor de cultură aproape imposibil de realizat, cercetătorii și-au îndreptat atenția și asupra altor strategii.

Producerea de *hormon de creștere uman* de către șoarecii transgenici (**Palmiter și colab., 1982**), la nivelul serului sanguin, a reprezentat prima dovadă privind posibilitatea producerii continue, în fluidele corpului unui animal, a unor proteine heterologe (străine).

Ulterior, cinci echipe de cercetători au prezentat rezultatele unor studii privind secreția de proteine recombinante în lapte, la șoareci. În fiecare astfel de caz, gena străină (transgena) a fost cuplată cu un promotor de transcripție specific pentru celulele glandelor mamare, promotor cum ar fi cel al genei responsabile de biosinteza caseinei.

Primele proteine produse pe această cale au fost *lactoglobulina β* de oaie (**Simons și colab., 1987**) și *activatorul plasminogenului tisular uman* (tPA) (**Gordon și colab., 1987**).

Cu toate că aceste proteine pot fi secretate în concentrații ridicate în laptele de șoarece, sistemul nu este ideal, deoarece cantitatea de lapte produsă de șoarece este foarte mică. Din acest motiv și nu numai, alte animale, cum ar fi oile și caprele au fost luate în studiu ca posibile bioreactoare.

Astfel de mamifere nu doar produc lapte în cantități importante, dar și consumatorii sunt, evident, de acord să consume laptele acestor animale.

Un succes în domeniul reprezintă oaia Tracy, o oaie transgenică care a produs cantități mari de *α<sub>1</sub>-antitripsină umană* (AAT) în laptele său (30g/l) (**Wright și colab., 1991**).

*Antitrombina III umană* recombinantă (deci obținută de la alt organism decât cel uman), folosită în scopul împiedicării formării cheagurilor de sânge la pacienții ce urmează a fi supuși unei intervenții pe cord, este prima proteină transgenică umană exprimată în lapte de animale, care a primit aprobarea pentru uz uman și producție comercială, fiind un patent al Corporației Genzyme Transgenics (SUA).

Producerea de proteine străine care să fie secretate în fluidele corpului prezintă avantaje evidente, în special deoarece animalele transgenice pot fi utilizate ca o sursă continuă de proteine dorite.

În afară de secreția în lapte, au fost investigate și alte sisteme de producție: în ser (**Massoud și colab., 1991**), spermă (**Dyck și colab., 1999**) și urină (**Kerr și colab., 1998**).

În fiecare caz, considerentul critic luat în calcul a fost stabilitatea produsului și dacă proteina secretată a avut configurația tridimensională funcțională.

În prezent sunt investigate și alte căi de producere a proteinelor recombinante cu rol terapeutic, cum ar fi în albușul ouălor de găină, sau ca proteine de fuziune cu proteina de mătase din coconii viermilor de mătase (**Tamura și colab., 1999**).

## PLANTE TRANSGENICE

Plantele reprezintă o alternativă utilă în producerea de proteine recombinante, deoarece pot fi cultivate pe suprafețe mari la un preț de cost relativ redus.

Actualmente se manifestă un interes crescut în utilizarea plantelor ca sisteme de producere a unor proteine recombinante sau a altor compuși de interes.

În condițiile în care producerea de molecule terapeutice cu ajutorul sistemelor de expresie animale prezintă chiar și cel mai mic risc de contaminare virală sau de prezență a prionilor, utilizarea în același scop a plantelor poate elimina complet astfel de riscuri.

Mai mult, celulele vegetale efectuează toate modificările post-tranșlaționale care conduc la producerea unei proteine funcționale, ca și celulele animale, cu doar minore diferențe în ceea ce privește pattern-ul glicozilării (**Cabanes – Macheteau și colab., 1999**). Este deci evident faptul că plantele sunt potrivite pentru producerea de proteine recombinante umane, în scopuri terapeutice.

Primele rezultate în această direcție au fost obținute de **Barta și colab. (1986)**, care au exprimat *hormonul de creștere uman* ca proteină de fuziune cu nopalina sintetizată de la *Agrobacterium tumefaciens*, în plante transgenice de tutun și floarea-soarelui.

Deși tutunul a fost planta cel mai frecvent utilizată pentru producerea de proteine recombinante, în prezent alte plante, cum ar fi orezul, au devenit populare în astfel de cercetări, în special datorită faptului că sunt comestibile și astfel, proteinele recombinante pot fi administrate fără purificare, odată cu consumul respectivei plante.

Expresia unor anticorpi umani cu ajutorul plantelor reprezintă cel mai relevant exemplu în acest sens, deoarece consumarea materialului vegetal respectiv, conținând anticorpi recombinanți a asigurat voluntarilor imunitate pasivă față de anumiți patogeni (fără ca sistemul lor imunitar să fi fost stimulat cu antigeni specifici).

Plante producătoare de *IgA umană* recombinantă, direcționată împotriva patogenului oral *Streptococcus mutans* (agentul etiologic al cariilor dentare) au fost obținute de către **Ma și colab.**, în **1998**. Anticorpii produși de aceste plante (care au primit denumirea generică de *planticorpi*) au început să fie comercializați recent, sub denumirea comercială CaroRx, sub patent Planet Biotechnology Inc. (SUA).

## TRANSFERUL DE GENE LA OM – TERAPIA GENICĂ

### SCOPUL TERAPIEI GENICE

Terapia genică reprezintă o cale de tratare a unor maladii, prin modificarea informației genetice (corectarea uneori a acesteia) deținute de celulele pacientului.

În esență, terapia genică reprezintă încercarea de a corecta alterarea genetică și de a reda individului respectiv sănătatea.

Transferul de gene la om poate fi realizat pe multiple căi, cum ar fi culturi de celule prelevate de la pacient (deci, *in vitro*), celule care după ce vor fi modificate genetic vor fi reintroduse în organismul bolnavului; ADN-ul poate fi introdus *in vivo*, în organismul pacientului, fie prin metode directe, fie prin intermediul unor vectori virali.

Calea de transfer *in vitro* poate fi aplicată însă, doar în cazul celulelor aparținând anumitor țesuturi, cum ar fi cele din măduva osoasă, celule care sunt disponibile pentru cultivare.

Terapia genică poate fi utilizată în tratamentul unor maladii provocate de mutații la nivelul ADN-ului pacientului (maladii genetice moștenite, anumite tipuri de cancer), cât și a unor maladii infecțioase. Terapia genică este în mod particular valoroasă în special în situațiile în care nu există un tratament convențional, sau când tratamentul disponibil este extrem de riscant pentru viața pacientului.

Există mai multe strategii puse la punct în domeniul terapiei genetice, fiecare înregistrând deja succese în tratarea unor maladii umane.

### STRATEGII ÎN TERAPIA GENICĂ UMANĂ

#### 1. *Terapia prin amplificarea genică (gene augmentation therapy – GAT)*

Reprezintă modalitatea de terapie prin care ADN-ul aparținând genei normale, funcționale, este adăugat ADN-ului celulelor pacientului, cu scopul ca, prin funcționarea acestei gene să se suplinească lipsa produsului genei mutante sau deteriorate, lipsă ce a produs boala.

#### 2. *Terapia prin înlocuire*

În acest caz gena deteriorată este înlocuită (prin mecanisme de recombinare omoloagă) cu varianta sa normală și funcțională.

#### 3. *Terapia prin inhibarea expresiei genice (gene expression inhibition therapy)*

În această situație se folosesc tehnici bazate pe expresia de ARN antisens sau producerea de anticorpi intracelulari direcționați împotriva produsului genei mutante.

#### 4. *Terapia prin „ajutorarea” medicamentului*

Se bazează pe introducerea în celulele bolnave a unei gene străine, responsabile de apariția unei sensibilități deosebite a acestor celule la acțiunea unor chimioterapice.

Terapia genică în cancer a fost inițial, o extensie a primelor experimente de marcare a genelor. Astfel, leucocitele infiltrante în tumori au fost transformate prin adăugarea genei responsabile de biosinteza factorului de necroză al tumorilor, în scopul de a îmbunătăți eficiența acestor celule în distrugerea celulelor maligne, prin creșterea nivelului de factor de necroză al tumorilor secretat. Remarcabil a fost și faptul că această terapie nu a avut și efecte secundare nedorite, limfocitele acționând foarte specific asupra celulelor tumorale, în condițiile în care factorul de necroză al tumorilor are o toxicitate extremă (chiar la concentrații de 1 μg/kg greutate corporală) (**Hwu și colab., 1993**).

O strategie alternativă constă în transformarea chiar a celulelor tumorale, în sensul creșterii sensibilității acestora la atacul sistemului imunitar al pacientului, ca urmare a exprimării de către celulele maligne a anumitor antigene de suprafață, citokine etc., sintetizate pe baza informației genetice străine introduse în genomul lor.

Există deja, în faza de teste clinice, un număr de terapii genetice în cancer, bazate în majoritate pe „sinuciderea” indusă a celulelor tumorale.

În ultimul deceniu a devenit de asemenea posibil să corectăm secvența nucleotidică a unei gene care declanșează apariția unor forme de cancer.

O terapie de mare viitor în domeniu are la bază strategia de „ajutorare” a activării compusului terapeutic. Această terapie se bazează pe activarea unei enzime particulare, în mod specific, în celulele tumorale, enzimă care va produce conversia unui compus netoxic (promedicamentul) într-unul toxic, care va distruge celula tumorală. Un exemplu este gena timidin kinazei virusului herpetic care poate fi introdusă în genomul celulelor tumorale și exprimată specific doar de acestea, grație utilizării unor elemente de control transcripțional active doar în celulele tumorale (**Su și colab., 1996**). Această genă este responsabilă de biosinteza enzimei care va putea converti ganciclovirul (care aici funcționează ca promedicament) într-un analog nucleosidic care, încorporat în catena ADN în timpul biosintezei acestuia, va bloca replicarea ADN-ului celulei tumorale prin inhibarea enzimei responsabile de replicare – ADN polimeraza. În acest fel, ganciclovirul, ineficient ca agent terapeutic asupra celulelor maligne se poate transforma într-o armă redutabilă de luptă împotriva acestora.

#### BIBLIOGRAFIE

- Barta A., Sommergruber K., Thompson D., 1986**, Plant Mol. Biol. 6:347 - 357  
**Cabanes – Macheteau M., Fichette-Laine A.C., Loutelier-Bourhis C., 1999**,  
Glycobiology 9: 365 - 372  
**Dyck M.K., Gagne D., Oullet M., 1999**, Nature Biotechnol. 17: 1087 - 1090  
**Gordon K., Lee E., Vitale J.A., 1987**, Biotechnology 5: 1183 - 1187  
**Hwu P., Yannelli J., Krieger M., 1993**, Immunol. 150: 4101 - 4115  
**Kerr D.E., Liang F., Bondioli K.R., 1998**, Nature Biotechnol. 16: 75 - 79  
**Ma J.K., Hikmat B.Y., Wykoff K., 1998**, Nature Med. 4: 601 - 606  
**Massoud M., Bischoff R., Dalemans W., 1991**, J. Biotechnol. 18: 193 - 204  
**Palmiter R.D., Chen H.Y., Brinster R.L., 1982**, Cell 29: 701 - 710  
**Simons J.P., McClenaghan M., Clark A.J., 1987**, Nature 328: 530 - 532  
**Su H., Chang J.C., Xu S.M., Kan Y.W., 1996**, Hum. Gene Ther. 7: 463 - 470  
**Tamura T., Thibert C., Royer C., 1999**, Nature Biotechnol. 18: 81 - 84  
**Wright G., Carver A., Cottom D., 1991**, Biotechnology 9: 830 - 834

<sup>1</sup> “Alexandru Ioan Cuza” University, Faculty of Biology, Genetics Department, Bd. Carol I, 20A, Iasi, Romania [my panda64@yahoo.com](mailto:my panda64@yahoo.com)

<sup>2</sup> “Alexandru Ioan Cuza” University, Faculty of Biology, Cell and Molecular Biology Department, Bd. Carol I, 20A, Iasi, Romania [cchris61@yahoo.com](mailto:cchris61@yahoo.com)

<sup>3</sup> “Ion Ionescu de la Brad” Agronomic University, Faculty