

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Интегрисане академске студије фармације

Г06 – Фармацеутска биотехнологија

## **УВОД У ФАРМАЦЕУТСКУ БИОТЕХНОЛОГИЈУ. РЕКОМБИНАНТНА ДНК ТЕХНОЛОГИЈА**

1. НЕДЕЉА НАСТАВЕ

Летњи семестар 2022/2023. године

Крагујевац

## Увод у фармацеутску биотехнологију

- **Биотехнологија** је интедисциплинарна наука која обједињује знања из области биохемије, микробиологије, генетике и инжењерских наука.
- Биотехнологија подразумева употребу живих организама (биљака, животиња и микроорганизама) или њихових делова (ензима, органела) за добијање производа корисних у различитим животним сферама, тј. представља примену биолошких процеса за добијање производа.

## Увод у фармацеутску биотехнологију

- У зависности од области примене, у најширем смислу постоји десет типова биотехнологије:
- **Црвена биотехнологија** – биомедицинска, тј. биотехнологија у здравству – примењује се у истраживању и производњи медицинских производа за дијагностику, превенцију или лечење болести. Ова област биотехнологије се бави производњом биофармацеутика, генском терапијом, секвенционирањем генома и ткивним инжењерингом. Црвена биотехнологија уједно представља главно подручје примене биотехнологије, а уједно и област која је фокус овог уџбеника.

## Увод у фармацеутску биотехнологију

- **Зелена биотехнологија** – агrobiотехнологија, тј. биотехнологија у пољопривреди – примењује се за повећање приноса усева, у борби против штеточина, заштити усева од микрорганизама и екстремних временских прилика (суша, мраз), побољшању изгледа, укуса, нутритивне вредности биљака. Подразумева добијање нових, генетски модификованих биљних врста са побољшаним особинама.
- **Бела биотехнологија** – биотехнологија у хемијској индустрији – примењује се за добијање биогорива, биопластике, органских растварача, аминокиселина, витамина, ензима, као и побољшање различитих производних процеса (побољшање ефикасности, смањење штетности по животну средину, мањи утрошак ресурса у производњи).

## Увод у фармацеутску биотехнологију

- **Жута биотехнологија** – биотехнологија у прехранбеној индустрији – представља најстарију грану биотехнологије и дели се на традиционалну и нову. Традиционална жута биотехнологије подразумева производњу хране и пића (нпр. сира, вина, пива, квасца), док нова жута биотехнологија подразумева примену генетичког инжењеринга у добијању хране са побољшаним нутритивним и технолошким својствима (нпр. смањење процента засићених масних киселина у уљима за кување).
- **Плава биотехнологија** – биотехнологија водених ресурса – користи морске и слатководне ресурсе за добијање козметике, производа за здравствену заштиту, биогорива, прехранбених производа.

## Увод у фармацеутску биотехнологију

- **Сива биотехнологија** – биотехнологија у екологији - бави се очувањем и обнављањем загађених природних екосистема кроз процес биоремедијације. Биоремедијација подразумева употребу микроорганизама или њихових ензима у циљу деградације или трансформације опасних органских загађивача у безопасне производе.
- **Златна биотехнологија** – биотехнологија у биоинформатици и нанобиотехнологији – одговорна је за добро чување и анализу биолошких информација, нарочито ДНК и аминокиселина.
- **Розе биотехнологија** – бави се патентима, проналасцима, публикацијама и интелектуалном својином у биотехнологији.

## Увод у фармацеутску биотехнологију

- **Браон биотехнологија** – биотехнологија сушних подручја и пустиња – бави се развојем нових пољопривредних технологија и генетички модификованих усева који су отпорни на болести, сушу и велики проценат соли у тлу, који ће успевати у сушним подручјима и пустињама и тако омогућити смањење глади и болести становништва у овом подручју.
- **Црна биотехнологија** – биотехнологија оружја (биотероризам) – бави се развојем биолошких агенаса који могу проузроковати болест или смрт код људи, животиња или биљака. Коришћењем генетичког инжењеринга може се повећати патогеност вируса, бактерија, токсина и других штетних агенаса који се могу користити као биолошко оружје.

## Развој фармацеутске биотехнологије и биофармацеутика

- Развој фармацеутске биотехнологије инициран је развојем генетике и метода генске манипулације, 1970-их година. Открићем молекулских механизма укључених у настанак бројних патолошких стања издвојени су различити терапијски значајни протеини. Међутим, њихова терапијска примена била је незнатна због малих количина које се могу изоловати из хуманих извора.
- Овај проблем је превазиђен открићем рекомбинантне ДНК технологије и технологије хибридома (технологије за добијање моноклонских антитела и тиме је започета нова ера фармацеутске науке.



## Развој фармацеутске биотехнологије и биофармацеутика

- Највећи потенцијал фармацеутске биотехнологије представљају генска терапија и генетички инжењеринг. Генетички инжењеринг је омогућио пренос гена између ћелија различитих врста и добијање генетички модификованих ћелија које су способне да производе многе терапијски значајне протеине у довољним количинама.
- Највећи број биофармацеутика су протеини добијени генетичким инжењерингом, али се овај термин користи и за лекове нуклеинске киселине (ДНК, РНК, антисенс олигонуклеотиди) и целе ћелије.
- Термини „биолошки лекови“, „биофармацеутици“ или „биотехнолошки лекови“ прихваћени су као део фармацеутске литературе и означавају производе фармацеутске биотехнологије.

## Биофармацеутици

- Биофармацеутици су протеини (укључујући и антитела) или нуклеинске киселине (ДНК, РНК и антисенс олигонуклеотиди) који се користе у терапији или *in vivo* дијагностичким процедурама, а производе се на начине који не подразумевају директну екстракцију из нативног биолошког извора.
- Ови лекови се производе биотехнолошким процесима и по својој структури су слични ендогеним молекулима. С обзиром да делују на молекуларне механизме у ћелији, имају потенцијал да излече различита обољења, а не само њихове симптоме, а због своје високе специфичности имају мање нежељених ефеката.

## Биофармацеутици vs. конвенционални хемијски лекови

- Биофармацеутици се у великој мери разликују од конвенционалних хемијских лекова:
  - Биофармацеутици су сложени макромолекули, који су преко 100 пута већи (нпр. интерферон бета 19000 Da, док моноклонска антитела имају молекулску масу и до 150000 Da) од хемијски синтетисаних лекова који су мали молекули (до 500 Da, нпр. ацетилсалицилна киселина има молекулску масу 180 Da).
  - Биофармацеутици имају комплексне хетерогене структуре, док хемијски лекови имају тачно дефинисану структуру.

## Биофармацеутици vs. конвенционални хемијски лекови

- Биофармацеутици се производе коришћењем биолошких извора, док се конвенционални лекови производе хемијским синтезама.
- Биофармацеутици су нестабилни и осетљиви на спољашње утицаје, за разлику од конвенционалних који су стабилни.
- Биофармацеутици су имуногени, а конвенционални лекови најчешће нису имуногени.
- Биофармацеутици изазивају мањи број нежељених ефеката и остварују снажнији ефекат на циљне ћелије у односу на конвенционалне лекове.

## Биофармацеутици прве и друге генерације

- Биофармацеутици се у зависности од технологије добијања класификују у две генерације. У прву генерацију се убрајају неинжењерисана мишја моноклонска антитела и протеини који имају идентичну аминокиселинску секвенцу као нативни хумани протеин (копије ендогених протеина/антитела добијена рекомбинантном ДНК технологијом или технологијом моноклонских антитела).
- Другој генерацији биофармацеутика припадају инжењерисани биофармацеутици, добијени генетичким инжењерингом (протеини/антитела са "побољшаним" физичко-хемијским и фармакокинетичким особинама уз очување фармакодинамике ендогеног молекула).

## Биофармацеутици прве и друге генерације

- Биофармацеутици друге генерације се добијају генетичким инжењерингом који подразумева: промену аминокиселинске секвенце, промену угљенохидратне компоненте гликопротеина или ковалентно везивање хемијских група или молекула (нпр. полиетилен гликол) за протеински молекул.
- Генетички инжењеринг се примењује у циљу промене имунолошког или фармакокинетичког профила протеина, или у циљу стварања нових фузионисаних производа.

## Категорије биофармацеутика

- Биофармацеутици се могу сврстати у различите категорије:
  - (1) цитокини,
  - (2) ензими,
  - (3) хормони,
  - (4) фактори коагулације,
  - (5) вакцине,
  - (6) моноклонска антитела,
  - (7) ћелијска терапија,
  - (8) антисенс лекови и
  - (9) пептиди.

## Категорије биофармацеутика

- **Цитокини** су молекули слични хормонима који могу да контролишу реакције између ћелија. Они активирају ћелије имуног система тј. лимфоците и макрофаге. У цитокине се убрајају:
  - интерферони (гликопротеини који делују на вирусе и неконтролисану пролиферацију ћелија) (нпр. бетаферон, тј. инжењерисани интерферон  $\beta$ ),
  - интерлеукини (функционишу као гласници у имунским реакцијама) (нпр. алдеслеукин, тј. инжењерисани интерлеукин 2) и
  - фактори раста (стимулишу ћелијски раст, пролиферацију и диференцијацију ћелија) (нпр. филграстим, тј. инжењерисани фактор стимулације колоније гранулоцита).



## Категорије биофармацеутика

- **Ензими** су сложени протеини који узрокују одређену хемијску промену у другим молекулима, а да при томе остају непромењени (нпр. пегаспаргаза, тј. инжењерисана L-аспарагиназа).
- **Хормони** су молекули који преносе информације између ћелија (нпр. лиспро, тј. инжењерисани инсулин).
- **Фактори коагулације** су сви фактори неопходни за коагулацију крви (нпр. рекомбинат тј. инжењерисани фактор коагулације VIII).
- **Вакцине** су микроорганизми или делови микроорганизама који се могу користити за подстицање отпорности организма на одређене болести као и за подстицање имунолошког одговора (нпр. енгерикс Б, тј. антигенска вакцина против хепатитиса Б).

## Категорије биофармацеутика

- **Моноклонска антитела** су моноспецифична антитела, која представљају секреторни производ идентичних имунских ћелија (клонова једне ћелије родитеља) (нпр. абциксимаб, тј. химерно моноклонско антитело).
- **Ћелијска терапија** подразумева процес увођења нових ћелија у ткива ради лечења болести (нпр. терапија матичним ћелијама).
- **Антисенс лекови** садрже део не кодирајућег ланца информационе РНК (иРНК). Лекови из ове групе функционишу на генском нивоу, како би прекинули процес стварања протеина који узрокују неку болест (нпр. фомивирсен).
- **Пептидна терапија** представља нову класу терапијских средстава. Тренутно су одобрени само катјонски антимикубни пептиди и то само за локалну примену.

## Биолошки лекови

- **Биолошки лек** је лек чију активну супстанцу чини биолошка супстанца под којом се подразумева супстанца произведена или екстрахована из биолошког извора за чију су категоризацију и контролу квалитета неопходна физичко-хемијско-биолошка испитивања, као и детаљан опис и контрола производног процеса.
- У биолошке лекове се убрајају:
  - имунолошки лекови,
  - лекови из хумане крви и плазме,
  - лекови за напредну терапију.

## Имунолошки лекови

- Имунолошки лекови намењени за примену у хуманој медицини су *вакцине, токсини, серуми и алергени*.
- **Вакцине** су агенси који се користе за стварање активног имунитета.
  - Примери: вакцина против тетануса, вакцина против дифтерије и тетануса, вакцина против дифтерије, тетануса и великог кашља, вакцина против колере, BCG, вакцина против дечје парализе, вакцина против грипа, вакцина против великих богиња, вакцина против тифуса и др.
- **Токсини** су агенси који се користе за дијагностиковање стања имунитета.
  - Примери: туберкулин и туберкулин PPD, токсини за Шиков тест и Диков тест, бруцелин и др.

## Имунолошки лекови

- **Серуми** су агенси који се користе за стварање пасивног имунитета.
  - Примери: антитоксин дифтерије, антитоксин против змијског отрова, антирабични серум, глобулин против великих богиња, антилимфоцитни глобулин и др.
- **Алерген** је лек намењен да идентификује или изазове специфичну стечену измену имунолошког одговора на агенс који изазива алергијску реакцију.
  - Примери: алергени полена траве и дрвећа, алергени кућне гриње и други.

## Лекови из хумане крви и плазме

- Лекови из хумане крви и плазме су лекови произведени из крви и крвне плазме хуманог или животињског порекла.
- У ове лекове се убрајају албумин, фактори коагулације и имуноглобулини хуманог порекла.
- Крв и компоненте крви намењене за трансфузију, не сматрају се леком према закону о лековима и медицинским средствима.

## Лекови за напредну терапију

- Лекови за напредну терапију су:
  - (1) лекови за генску терапију;
  - (2) лекови за соматску ћелијску терапију и
  - (3) лекови добијени из ткива биоинжењерингом.
- Лековима за напредну терапију сматрају се биомолекули добијени технологијом трансфера гена или употребом биолошки модификованих ћелија, а који имају улогу активне супстанце или делова активне супстанце.

# **РЕКОМБИНАНТНА ДНК ТЕХНОЛОГИЈА У ПРОИЗВОДЊИ БИОФАРМАЦЕУТИКА**



## Рекомбинантна ДНК технологија у производњи биофармацеутика

- Рекомбинантни ДНК молекул (химерна ДНК) је молекул ДНК који настаје вештачким удруживањем два молекула ДНК из нехомологих извора. Рекомбинантна ДНК се разликује од природног ДНК рекомбинанта који настаје услед укрштања хомологих хромозома код еукариота и прокариота.
- **Производи рекомбинантне ДНК технологије** су производи добијени генетичким модификацијама. ДНК кодирана за дати производ се уводи посредством бактеријског плаزمида или вирусног вектора у погодан микроорганизам/ћелијску линију у којем потом долази до експресије кодиране ДНК и транслације у жељени протеин. Затим следе сложени поступци екстракције и пречишћавања, при чему се протеин издваја у облику који се може користити за формулацију/добијање финалног биофармацеутика.

## Принцип рекомбинантне ДНК технологије

- Организам који се користити за донирање ДНК назива се **донором**, а ДНК изолована из ових организама назива се донорском ДНК.
- ДНК, тј. гени који се клонирају, односно преносе из једне ћелије у другу, могу се добити на више начина:
  - изоловањем и пречишћавањем из донорских ћелија;
  - синтезом комплементарне ДНК (кДНК);
  - *in vitro* синтезом специфичног сегмента ДНК коришћењем ланчане реакције полимеризације (PCR).

## Принцип рекомбинантне ДНК технологије

- Прво се идентификују и изолују гени или кДНК који кодирају настанак жељеног протеина. Тако добијени фрагменти се потом инсертују у мале отворене циркуларне молекуле ДНК, који имају способност самосталне репликације (нпр. бактеријски плазмиди). Ови мали циркуларни молекули ДНК представљају векторе за фрагменте ДНК.
- Вектор са инсертованим генима назива се рекомбинантна ДНК, јер се састоји од ДНК из доноског генома (пореклом из било ког организма) и векторске ДНК из потпуно другог извора (нпр. бактеријски плазмид или вирус).

## Принцип рекомбинантне ДНК технологије

- Тако добијена рекомбинантна ДНК се затим користи за трансформацију ћелија (нпр. рекомбинантни векторски молекули доспевају у бактеријске ћелије).
- Трансформисане ћелије се потом култивишу и праве колоније, чиме се омогућава стварање довољне количине протеина од интереса – биофармацеутика.
- Потребно је проналажење најпогоднијег система за експресију одређених гена који кодирају синтезу циљних протеина.

## Изолација донорске ДНК

- Да би се омогућила манипулација молекулом ДНК *in vitro*, неопходно је најпре изоловати, а потом и пречистити довољне количине ДНК или РНК из ћелија коришћењем различитих протокола.
- Код еукариота донорска ДНК је нуклеарна геномска ДНК, док је код прокариота то главна геномска ДНК. Да би се изоловале нуклеинске киселине, неопходно је разложити ћелију (ензимски или механички) и омогућити да се ћелијски садржај укључујући и нуклеинске киселине ослободи, затим одвојити ДНК од интрацелуларних компоненти и уклонити РНК и плазмидску ДНК.

## Изолација донорске ДНК

- За сваки организам или ткиво постоје мале варијације у поступку изолације ДНК:
  - Код ћелијских линија прокидање заштитне мембране је једноставно, јер оне немају ћелијске зидове или друге структуре изван ћелијске мембране. Довољан је додатак детерџента који ће нарушити ћелијску мембрану и ослободити унутарћелијске компоненте.
  - Код бактерија за прокидање заштитне мембране неопходан је ензим лизозим који разлаже пептидогликан, главну компоненту ћелијског зида бактерија, а након тога се додаје детерџент натријум додецил сулфат (енгл. *Sodium Dodecyl Sulfate* – SDS) који лизира ћелијске мембране нарушавајући липидни двослој.
  - Када се изолује донорска ДНК животиња или биљака онда се као извори користе ткива, тако да је поступак екстракције комплекснији.

## Изолација донорске ДНК

- Након прокидања мембрана ћелија домаћина, ослобођене интрацелуларне компоненте се одвајају од нерастворљивих остатака (ћелијске мембране, протеини) центрифугирањем или хемијском екстракцијом.
  - *Центрифугирањем* се раздвајају компоненте према величини (већи молекули таложе се брже од мањих молекула, нпр. након што је ћелијски зид лизиран, његови фрагменти су мањи од великих молекула ДНК). Додатно, компоненте нерастворљиве у течной фази брже формирају агрегате који се таложе на дну бочице (центрифугирањем ДНК формира пелет, док растворљиви фрагменти ћелијског зида остају у раствору) .

## Изолација донорске ДНК

- *Хемијска екстракција* подразумева коришћење фенола за уклањање протеина из воденог раствора у коме се уз протеине налази и молекул ДНК од интереса. Након додатка фенола у овај раствор, протеини се растварају у фенолу, а ДНК остаје у води. Две фазе се потом одвајају центрифугирањем, протеини се таложе у фенолној фази, док се ДНК налази у супернатанту у воденој фази.
- Када се протеини уклоне, узорак поред ДНК садржи и РНК, јер ни РНК није растворна у фенолу. За уклањање РНК из раствора користи се ензим рибонуклеаза (РНКаза) који селективно лизира РНК до рибонуклеотида. Након деловања рибонуклеазе у раствору остаје интактна ДНК, кратки фрагменти РНК и рибонуклеотиди.



## Изолација донорске ДНК

- Додавањем једнаке запремине алкохола, мањи рибонуклеотиди остају у воденом раствору, док се молекул ДНК издваја из водене фазе и потом изолује центрифугирањем. Након тога, пречишћена донорска ДНК је спремна за даљу употребу.
- Када се ДНК изолује из бактерија, осим геномске ДНК може бити присутна и плазмидска ДНК. За раздвајање плазмидске и геномске ДНК користи се етидијум бромид ( $C_{21}H_{20}BrN_3$ ) или цезијум хлорид ( $CsCl$ ), јер се плазмидска ДНК везује за ова једињења, па се након центрифугирања таложи и једноставно издваја.

## Изолација донорске иРНК, тј. кДНК

- Када се за добијање рекомбинатне ДНК користи кДНК неопходно је изоловати информациону РНК (иРНК). Један од начина подразумева коришћење вишеструких (олиго) колоне за афинитетно пречишћавање.
- Издвојена иРНК се таложи додавањем етанола и центрифугирањем. Невезани материјал се испира из колоне, а десорпција иРНК са колоне се спроводи пропуштањем пуфера са ниским садржајем соли кроз колону (елуацијом).
- Након што се иРНК издвоји са колоне узорак се центрифугира и тако се таложи пречишћена иРНК.

## Изолација донорске иРНК, тј. кДНК

- Алтернативно пречишћавање подразумева додавање олиго dT (*deoxythymidine*) - магнетних перлица директно у ћелијски лизат и накнадно „извлачење“ иРНК магнетом. Наиме, иРНК поседује *polyA* реп, тј. полиаденилатни реп за који се специфично везује додати олиго dT. Након њиховог везивања у раствор се додаје магнет за који ће се везати магнетне олиго dT перлице које су везале иРНК.
- Метода је брза, а време контакта иРНК са деградационим рибонуклеазама, које су природно присутне у цитоплазми, своди се на минимум.

## Исецање доворске и векторске ДНК

- Након што је ДНК од интереса изолована, потребно је исећи само ген од интереса и инкорпорирати га у одговарајући вектор у циљу добијања рекомбинантне ДНК. Рекомбинантна ДНК технологија не би била могућа без открића **рестрикционих ензима**.
- Рестрикциони ензими или ендонуклеазе су ензими који хидролизују ДНК на одређеним циљним секвенцама, што их чини погодним за коришћење у рекомбинантној ДНК технологији. Било који молекул ДНК (нпр. вирусни, хумани) садржи циљна места за рестрикционе ензиме и због тога се може исецати на фрагменте дефинисане величине, погодне за клонирање.

## Исецање доворске и векторске ДНК

- Рестрикционе ензиме иначе производе бактерије ради њихове одбране од вируса. Рестрикциони ензими присутни у ћелијама разграђују страну ДНК, а како не би дошло до разградње сопствене ДНК, ћелије метилују пуринске и пиримидинске базе и тако обележавају и разликују своју ДНК од стране ДНК.
- Рестрикциони ензими се називају још и „молекуларне маказе“, а име добијају по врсти бактерије из које потичу, па тако нпр. рестрикциони ензим *EcoRI* (изолован из *E. coli*) препознаје секвенцу од шест нуклеотида у ДНК молекулу било ког организма. Оваква секвенца назива се ДНК палиндром, што значи да обе секвенце имају исту нуклеотидну секвенцу, али у антипаралелној оријентацији. Ензим *EcoRI* исеца ДНК молекул унутар ове секвенце и то између G и A нуклеотида.

## Исецање доворске и векторске ДНК

- Након деловања рестрикционих ензима настају идентични једноланчани, углавном „лепљиви крајеви“ (називају се лепљивим, јер се водоничним везама могу повезивати - лепити при чему настаје комплементарни низ). Захваљујући деловању ензима отвара се и циркуларни плазмид те настаје линеарни молекул који има два лепљива краја. Производња ових лепљивих крајева је још једна особина рестрикционих ензима која их чини погодним за технологију рекомбинантне ДНК.
- Принцип је једноставан, ако се два различита молекула ДНК пресеку истим рестрикционим ензимом, оба ће имати фрагменте са комплементарним лепљивим крајевима, што омогућава стварање химерне ДНК. Стога, ако се и векторска и доворска ДНК пресеку помоћу *EcoRI*, а потом и помешају, лепљиви крајеви вектора могу се везати за лепљиве крајеве фрагмента доворске ДНК.

## Исецање доворске и векторске ДНК

- Две особине рестрикционих ензима су искоришћене у рекомбинантној ДНК технологији:
  - исецају ДНК на фрагменте који имају величину погодну за клонирање,
  - многи рестрикциони ензими праве степенасте резове, при чему настају једноланчани лепљиви крајеви погодни за добијање рекомбинантног ДНК молекула.
- До сада је идентификовано на десетине рестрикционих ензима различите специфичности за секвенце. Неки ензими, попут *EcoRI*, праве степеничасти рез, док други то чине у равни. Чак и да је ДНК исечена у равни и нема лепљиве крајеве, може се користити за стварање рекомбинантне ДНК. Такође, ДНК се може исећи и механички, нпр. мешање ДНК у хомогенизатору ће разбити дугачку хромозомску ДНК на мање сегменте који се могу користити за клонирање.

# Вектори

- У рекомбинантној ДНК технологији појам вектор је синоним за "преносилац генског материјала". Вектори за клонирање су најчешће специјализовани плазмиди у које се имплементира фрагмент стране (донорске) ДНК за даљу манипулацију или проучавања. Да би се ДНК која носи одређене гене инсертовала у геном домаћина, репликовала и експримирала, неопходан је вектор, јер би унос ДНК у ћелију без вектора резултовао њеном разградњом.
- Број и врсте плазида који се користе за клонирање стално расту, а уз плазмиде се као вектори користе и вируси и вештачки хромозоми. Једном када се фрагмент донорске ДНК (инсерт) клонира и инсертује у одговарајући вектор, могу се произвести велике количине донорске ДНК, које се потом могу експримирати у другим организмима.



# Вектори

- Када се одабере одговарајући вектор за ген од интереса или фрагмент донорске ДНК, два дела се повезују у једну конструкцију. Израз конструкт се користи за било који молекул рекомбинантне ДНК који је састављен генетичким инжењерингом. Ако су вектор и инсерт исечени истим рестрикционим ензимом, два дела имају комплементарне крајеве и потребна им је само ДНК лигаза да их повеже. Уколико крајеви нису компатибилни понекад се синтетишу кратки олигонуклеотиди и додају на крајеве инсерта како би постали компатибилни са вектором.
- Ови кратки олигонуклеотиди називају се линкери и додају једно или неколико нових места за рестрикционе ензиме на крајевима ДНК фрагмента.

## Удруживање ДНК (клонирање)

- Клонирање представља инсертовање гена од интереса (инсерта) на одговарајућу локацију у вектору, а да би се то омогућило кључно је направити комплементарне једноланчане ДНК крајеве вектора и инсерта, за шта постоји низ метода:
  1. Клонирање рестрикционим ензимима
  2. Клонирање ланчаном реакцијом полимеразе - ТА клонирање
  3. Клонирање рекомбиновањем
  4. Изотермно (Гибсоново) склапање ДНК молекула

## Клонирање рестрикционим ензимима

- Клонирање рестрикционим ензимима подразумева исецање инсерта и вектора истим рестрикционим ензимом, стога имају комплементарне једноланчане крајеве. Када се помешају фрагменти ДНК и вектори долази до њиховог повезивања, јер се између њихових лепљивих крајева формирају двоструке везе. У раствору има много отворених векторских молекула и много фрагмената донорске ДНК.
- Фрагменти се могу ујединити на следеће начине:
  - донорски фрагмент и донорски фрагмент;
  - векторски фрагмент и векторски фрагмент;
  - векторски фрагмент и донорски фрагмент.

## Клонирање рестрикционим ензимима

- Рекомбинантни ДНК молекули се спонтано формирају на горе наведени начин, али ови молекули нису стабилни, јер, иако су се лепљиви крајеви упарили да би створили популацију химерних молекула, скелет формиран од фосфатних група и шећера још увек није комплетан на два положаја, тј. на спојевима, и ДНК молекул није “запечаћен”. Међутим, то се превазилази додатком ензима ДНК лигазе.
- ДНК лигазе стварају фосфодиестарске везе на спојевима, формирајући континуирану и стабилну двоструку спиралу. Одређене ДНК лигазе су чак способне да спајају фрагменте ДНК тупо исечених крајева. Најчешћа употребљена лигаза је заправо из Т4 бактериофага. ДНК лигаза катализује стварање везе између 3'-ОН једног ланца и 5'-PO<sub>4</sub> другог ланца ДНК. ДНК лигазе су много ефикасније када су присутни лепљиви крајеви, док доста спорије повезују тупе крајеве.

## Клонирање ланчаном реакцијом полимеразе - ТА клонирање

- Клонирање ланчаном реакцијом полимеразе (PCR), заснива се на стварању комплементарних једноланчаних крајева између инсерта и вектора коришћавањем секундарног ензимског својства *Tag* полимеразе. Наиме, *Tag* полимераза има способност да на 3'-крај дволанчане ДНК дода деоксиаденозин (dA). Када *Tag* полимераза амплификује део ДНК током PCR-а, она се понаша као терминална трансфераза и додаје један (dA) на 3'-крајеве дволанчане ДНК, тј. инсерт.
- Затим се производи PCR-а помешају са комплементарним вектором (са тимидином на крају) и дода ДНК лигаза ради повезивања вектора и инсерта. Овај вид клонирања се може користити за било који део PCR амплификоване ДНК и погодан је када нису доступна погодна рестрикциона места на вектору.

## Клонирање рекомбиновањем

- Генетички инжењеринг који користи хомологну рекомбинацију назива се рекомбиновање. У технологији рекомбиновања два молекула ДНК прецизно размењују своје сегменте, користећи регионе идентичних секвенци.
- Код ове методе клонирања празан вектор (плазмид, ВАС, козмид и др.) и линеаран инсерт се уносе у цитоплазму бактерије (нпр. *E. coli*), температура медијума се повећава на 42 °C. Услед повећања температуре бактерија синтетише ламбда фаг интеграционе ензиме (назван црвени ензим), који препознају крајеве линеарних ДНК инсерата и интегришу их у хомологно место на вектору. Затим се бактерије враћају на ниску температуру како би се зауставила производња црвеног ензима.

## Клонирање рекомбиновањем

- Рекомбиновани вектори се потом изолују из домаћина и размножавају у *E. Coli* без гена за црвени ензим, чиме се спречава било каква случајна рекомбинација.
- Рекомбиновање има многе предности у односу на традиционалне методе клонирања гена:
  - Црвеним ензимима је потребан само мали регион хомологије (45 bp) да би интегрисали страни део ДНК молекула у вектор.
  - Лабораторијска процедура је брза и једноставна.
  - Могу се користити кратки једноланчани олигонуклеотиди за стварање мањих делеција, инсертовање или промену појединачних нуклеотида у било ком гену, чак иако се налазе у геному организма домаћина.

## Изотермно (Гибсоново) склапање ДНК молекула

- И код ове методе клонирања гена се стварају комплементарне једноланчане секвенце између инсерта и вектора, али се за то користи ензим 5'-егзонуклеаза.
- Реакција Гибсоновог склапања се одвија у епрувети на температури од 50° C, због чега се назива још и изотермно склапање ДНК и одвија се спонтано.
- Предности методе су једноставност и брзина. Наиме, метода траје краће од једног сата и овом методом се може састављати и већи број фрагмената, чак и великих фрагмената од 10 bp или више.
- Да би се успешно комбиновали ти појединачни фрагменти потребно је да сваки фрагмент има регион од 20-30 bp који има идентичну секвенцу као суседни ДНК и тај део се назива регион преклапања. Уколико региони преклапања нису присутни у неком од фрагмената, они се могу додати коришћењем PCR прајмера током амплификације фрагмента.



## Изотермно (Гибсоново) склапање ДНК молекула

- Затим се смеши фрагмената додају ензими ДНК егзонуклеаза, ДНК полимераза и ДНК лигаза.
- Егзонуклеаза уклања нуклеотиде са 5` краја фрагмента како би настао идентични 3` једноланчани део на сваком фрагменту. Пошто сада крајеви сваког фрагмента имају секвенцу која се преклапа са следећом, ови делови су комплементарни и спајају се спонтано на ниским температурама.
- Сходно томе да егзонуклеаза уклања нуклеотиде са 5'-крајева, настају једноланчани делови (рупе) које потом попуњава ДНК полимераза.
- ДНК лигаза служи да “запечати” крајеве тако спојених фрагмената у један континуирани циркуларни молекул ДНК.

## Клонирање иРНК

- Алтернатива клонирању геномске ДНК је клонирање информационе РНК. Ова техника се нарочито користи када се спроводи клонирање еукариотских гена. Укупна иРНК из еукариотских ћелија се изолује захваљујући разликама у афинитету. иРНК добијена на овај начин садржи само гене за полипептиде који су током екстракције експримирани у ћелијама. Инкубацијом иРНК и ензима реверзне транскриптазе се једноланчана иРНК преводи у дволанчану ДНК познату као комплементарна – кДНК.
- Фрагменти кДНК се могу клонирати и формирати већи број различитих кДНК. кДНК „библиотеке” су мање од оних које настају код геномске ДНК, јер су оне састављене само од експримираних гена. Некодирајући региони у геному нису присутни у „библиотеци“, стога је лакше радити са кДНК, али само под претпоставком да је ген од интереса експримиран.

## Трансформација ћелија домаћина

- Вектор који садржи гене од интереса се уноси у ћелију домаћина и инкорпорира у њу тако да се може даље умножавати и потом експримирати ген од интереса. Вектори су велики молекули који не пролазе лако ћелијску мембрану, тако да је неопходно учинити је пропустљивом за вектор. То је могуће учинити на више начина, а одабир методе зависи од врсте ћелија домаћина:
  - топлотним шоком - ћелије се коинкубирају са вектором у раствору калцијум хлорида на  $0^{\circ}\text{C}$ , при чему се температура постепено повећава до  $42^{\circ}\text{C}$ . Овај температурни шок потпомаже улазак вектора у анималне и бактеријске ћелије;

## Трансформација ћелија домаћина

- електропорацијом - која је и најефикаснији метод убацивања гена у бактеријску ћелију. Ћелије се подвргавају високом наизменичном напону, који нарушава мембрану и омогућава улазак вектора у ћелију. Током овог процеса, вектор и ћелије домаћини се мешају заједно у кивети која има електроде са обе стране, које су удаљене свега 1 до 2 mm. Кроз кивету се пропушта струја, што накратко отвара ћелије омогућавајући да вектор уђе у цитоплазму. Електропорација се такође користи и за убацивање вектора у хумане и мишје ћелијске линије, као и ћелијске линије инсеката;

## Трансформација ћелија домаћина

- трансдукција посредством вируса или бактериофага. Гени од интереса се најпре инкорпорирају у вирус који потом инфицира ћелије. Треба нагласити да се пренос гена у бактеријске ћелије одвија доминантно помоћу плаزمида или бактериофага, док се пренос гена у анималне ћелије најчешће одвија посредством аденовируса и ретровируса;
- метода помоћу липозома је посебно корисна за трансфер ДНК у ћелију *in vivo*, тј. користи се у генској терапији. Принцип методе је заснован на фосфолипидном двослоју липозома који се спаја са ћелијском мембраном и ослобађа ДНК унутар ћелије.

## Умножавање рекомбинантног ДНК молекула

- Најчешће само један вектор (рекомбинантни молекул) улази у бактеријску ћелију. Након што се нађе у бактеријској ћелији рекомбинантни молекул ДНК се репликује као и било који други молекул плазмидске ДНК.
- Даље, када се бактеријска ћелија подели, све ћерке ћелије добијају вектор, који се поново репликује у свакој ћерки ћелији.
- Сходно томе да је секвенца доворске ДНК део вектора, доворска ДНК се аутоматски репликује заједно са вектором. Тако добијена колонија бактерија садржи милијарде копија доворске ДНК.
- Смеша трансформисаних бактеријских ћелија се засејава на медијум за раст у Петријевој посуди, ћелије расту и деле се, формирајући видљиве колоније.

## Банке ћелијских система

- Ћелијске линије за производњу рекомбинантних биофармацеутика добијене рекомбинантном ДНК технологијом садрже ген који кодира биосинтезу протеина од интереса. Након култивисања, добијена ћелијска линија се чува у криовајлицама потопљеним у течни азот (-196 °C). У свим криовајлицама налази се идентични садржај и на овај начин се ћелије чувају на неодређено време.
- Како би се спречило оштећење ћелијске мембране, услед формирања кристала леда у ћелијску културу се додају криопротектанти. Као криопротектант у ћелијски медијум се додаје: 5% DMSO (диметилсулфоксид); 10% глицерол; фетални говеђи серум (енгл. *Fetal Bovine Serum* - FBS) са 5% DMSO - код осетљивих ћелија.

## Банке ћелијских система

- Препоручује се споро смрзавање и брзо одмрзавање како би се одржала вијабилност ћелија. Криовајлице са овим ћелијским линијама чине систем банке ћелија. За сваку даљу производњу довољно је да се одмрзне по једна криовајлица са ћелијама. На овај начин се могу добити биофармацеутици из прокариотских и еукариотских ћелијских линија.
- Свака ћелијска банка састоји се из два дела: “*master cell bank*” односно главна банка ћелија и “*working cell bank*” односно радна банка ћелија.
- Главна банка ћелија се добија директно из културе новонасталих ћелијских линија и састоји се од неколико стотина појединачно сачуваних криовајлица. Оне се не користе директно за производњу, већ се из њих стварају радне банке ћелија које се даље користе у процесима производње.



## Банке ћелијских система

- На пример, ако постоји једностепени систем банки ћелија, при чему тај систем има 100 ампула, а за потребе производње се троши 10 ампула годишње, након 10 година ће се извор за добијање производа у потпуности потрошити. Са друге стране, ако се ради о двостепеном систему где се једна главна банка ћелија потроши за добијање 100 ампула радних банки ћелија, овакав систем ће трајати наредних 1000 година.
- Стварање радне банке ћелија подразумева одмрзавање једне криовајлице главне банке ћелија, култивацију ових ћелија, њихово распоређивање у већи број криовајлица и криопрезервирање.
- Када се у процесима производње потроше све криовајлице радних банки ћелија добијене из прве главне банке ћелија, отвара се друга главна банка из које се добија нова серија радних банки ћелија, што осигурава неопходно снабдевање изворно развијеним ћелијама за потребе производње.

## Производња рекомбинантних протеина

- Приликом производње рекомбинантних протеина важно је одабрати најпогоднији експресиони систем и одговарајући вектор. Колоније ћелија које садрже рекомбинантну ДНК од интереса се потом узгајају у већим количинама у одговарајућим условима (процесима ферментације - *upstream* процеси).
- Бактерије или неки други експресиони системи се претварају у „фабрике“ за синтезу страних (хетерологих) протеина. Ћелије се након ферментације сакупљају, лизирају и вектори се „опорављају“ стандардним микробиолошким техникама, док се протеини од интереса изолују употребом одређених техника за пречишћавање.
- Напредни приступ у производњи протеина помоћу технологије рекомбинантне ДНК је увођење жељеног гена у геном животиње, направљен тако да се протеин излучује у млеко животиње, олакшавајући њихово изоловање.

## Употреба рекомбинантних протеина

- Данас се велики број рекомбинантних протеина користи као терапијско средство. Већина њих су хуманог порекла, али постоје и протеини анималног порекла. Од њих, скоро половину чине моноклонска антитела, док преостали терапијски протеини могу имати различите функције:
  - 1) да замене протеине који недостају или су неисправни,
  - 2) повећање количине већ присутних протеина,
  - 3) инхибиција инфективних микроорганизама (бактерија или вируса),
  - 4) носачи за друге молекуле (још увек у развоју).
- Ове категорије нису стриктне, нпр. интерферони поседују две функције - 2) и 3).

## Предности рекомбинантне ДНК технологије

- Рекомбинантном ДНК технологијом се превазилази проблем доступности терапијских протеина. Наиме, многи протеини се у организму стварају у јако малим количинама (нпр. интерферони, интерлеукини, фактори стимулације колонија), а употребом рекомбинантне ДНК технологије може се било који терапијски протеин произвести у потребној количини.
- Превазилази се проблем сигурности производа. Коришћењем производа добијеног директном екстракцијом из природног извора може се пренети и нека болест (нпр. Кројцфелд-Жакова болест услед примене хуманог фактора раста) или патоген (хепатитис В, С или вирус HIV).
- Омогућава се заобилажење екстракције производа из неадекватног или опасног биолошког материјала

## Предности рекомбинантне ДНК технологије

- Пример за то је FSH (фоликулостимулирајући хормон) који се раније екстраховао из урина жена у постменопаузи или hCG (хумани хорионски гонадотропин) који се изоловао из урина трудница. Иако се урин не сматра пожељним извором за добијање фармацеутских производа, неки од ових производа су и даље на тржишту, али су одобрене и њихове рекомбинантне форме.
- Други пример је анкрод протеин који се може изоловати из отрова змије (поседује антикоагулантну активност), али је безбедније да се добије рекомбинантном технологијом помоћу микроорганизама, као што су *Escherichia coli* и *Saccharomyces cerevisiae*.

## Предности рекомбинантне ДНК технологије

- Омогућено је стварање терапијских протеина који ће имати предности у односу на нативне протеине. На овај начин могуће је извршити одређене минималне (инсертовање, брисање или пак промена одређене аминокиселине) или значајније (промена или брисање целог домена или стварање новог хибридног протеина) промене у секвенцама аминокиселина, којима ће се побољшати особине протеина.

## Недостаци рекомбинантне ДНК технологије

- У одређеним случајевима добијање протеинског производа из природних извора се може показати једнако, или пак и боље од коришћења рекомбинантне ДНК технологије. Са финансијског становишта је много исплативије да се поједини протеини једноставно и у великим количинама екстрахују и пречишћавају из природног извора (нпр. хумани серумски албумин (HSA)).
- Због шире специфичности поједине протеине је боље добијати из природних извора (нпр. изоловањем из крви донора добија се већи број различитих фактора коагулације, па се могу лечити пацијенти са различитим типовима хемофилије, док се рекомбинантном ДНК технологијом добија искључиво један фактор коагулације којим се може лечити само један тип хемофилије).