

Metody biotechnologiczne w otrzymywaniu taksolu – cytostatycznego diterpenu cisów (*Taxus*)



mgr farm. ŁUKASZ SZOKA
Zakład Chemii i Analizy Leków
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Kierownik Zakładu:
prof. dr hab. Jerzy A. Pałka

Streszczenie:

Taksol jest wtórnym metabolitem, wytwarzanym w niewielkich ilościach przez wszystkie gatunki cisów. Leki zawierające taksol są jednymi z najbardziej skutecznych leków przeciwnowotworowych. Niewielka początkowo produkcja, metodą ekstrakcji kory *T. brevifolia*, wpłynęła na wysoką cenę i ograniczoną dostępność terapii. Problem ten częściowo rozwiązano poprzez opracowanie półsyntetycznych metod produkcji taksolu z naturalnych prekursorów. Alternatywnym sposobem, niewymagającym ingerencji w środowisko naturalne, jest zastosowanie kultur komórkowych i kultur korzeni włóśniakowatych.

Słowa kluczowe: taksol, cis, kultury komórkowe, biotechnologia

Summary:

Taxol is secondary metabolite, produced in a little amount by every yew species. Medicines, which contain taxol are one of the most efficient anticancer drugs. The insufficient extraction method of taxol from *T. brevifolia* bark contributed to high prices and limited accessibility of this therapy. This problem was partly solved by compilation of semisynthetic method of taxol's production from precursors, isolated from needles. The alternative way, which does not affect natural environment, is biotechnology employing cell cultures and hairy root cultures.

Key words: taxol, yew, cell cultures, biotechnology

W Polsce występuje cis pospolity (*T. baccata*) w 4 odmianach. Niektóre klasyfikacje uznają istnienie wyłącznie tego gatunku.

Leki zawierające taksol są cenionymi cytostatykami, z roczną sprzedażą o wartości ok. 3 mld USD. Pierwszy lek zawierający tę substancję czynną został dopuszczony do sprzedaży przez FDA w roku 1992. Stosowany jest jako jeden z leków podstawowych w terapii zaawansowanego raka jajnika i niedrobnokomórkowego raka płuc, a pomocniczo w raku piersi. Jest też lekiem drugiego rzutu w mięsaku Kaposiego u chorych na AIDS, choć wykazuje, tak jak inne cytostatyki, toksyczność i działania niepożądane. Mechanizm działania opisany w 1979 r. polega na wiązaniu się taksolu w organizmie z β -tubuliną i w konsekwencji zakłóceniu funkcji mikrotubul. Proces dzielenia się komórek zostaje zahamowany w wyniku zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G_2/M , co prowadzi do fosforylacji bcl-2, skutkującej apoptozą. Przy wyższych stężeniach taksolu stabilizacja mikrotubul jest niezależna od fazy cyklu komórkowego, co prowadzi do nekrozy.

Wspólną cechą taksoidów obecnych w cisach jest występowanie trójpierścieniowego szkieletu taksadienu czyli pentametylo [9.3.1.0]^{3,8} tricyklopentadekanu.

Taksol stanowi w roślinie tylko niewielką część kompleksu taksoidów. Występuje w większych ilościach u osobników męskich, niż żeńskich. Jego zawartość w roślinach waha się w trakcie trwania okresu wegetacyjnego. W 1994 r. został otrzymany w wyniku 25-etapowej syntezy chemicznej, ale z powodu wysokich kosztów i niskiej wydajności metoda ta nie znalazła praktycznego zastosowania. Igły cisu, w przeciwieństwie do kory, są surowcem odnawialnym. Racjonalne ich

pozyskiwanie nie przynosi szkody roślinom i może być prowadzone przez długi czas. Igły wszystkich gatunków zawierają taksol w ilości od 26 $\mu\text{g/g}$ u *T. celebica* do 516 $\mu\text{g/g}$ u występującego na ograniczonym obszarze *T. floridiana*. Jednak większe zainteresowanie przemysłu skupiło się na obecności zaawansowanych prekursorów: 10-deacetylobakkatyny III (10-DAB III) i bakkatyny III (tabela). Związki te w stosunkowo prosty sposób można przekształcić w taksol, co jest obecnie ważnym źródłem pozyskiwania tej substancji. Z powodu dużego rozpowszechnienia *T. baccata* stał się głównym źródłem 10-DAB III.

Ostatnie lata cechował duży postęp w identyfikacji enzymów uczestniczących

Gatunek	Zawartość taksoidów w $\mu\text{g/g}$ suchych igieł		
	taksol	bakkatyna III	10-deacetylobakkatyna III
<i>T. baccata</i>	63	10	468
<i>T. brevifolia</i>	130	296	41
<i>T. canadensis</i>	285	224	2665
<i>T. celebica</i>	26	0	70
<i>T. cuspidata</i>	136	15	116
<i>T. floridiana</i>	516	0	1689
<i>T. globosa</i>	433	168	1395
<i>T. x hunnewelliana</i>	41	0	63
<i>T. x media</i>	211	36	230
<i>T. wallichiana</i>	272	0	1092

Tabela. Zawartość taksoidów w igłach cisów.

w biosyntezie taksolu. Jednak szlak metaboliczny jest poznany tylko częściowo (schemat).

Nie jest znana rola fizjologiczna taksolu w roślinie, ale nie można wykluczyć jego przynależności do fitoaleksyn. Udowodniono, że ma właściwości przeciwgrzybicze względem *Oomycetes* i *Basidiomycetes*. Jednak działanie względem patogennych grzybów roślin jest znacznie słabsze, niż występującej w większej niż taksol ilości taksyniny. W korze i drewnie cisów nie żerują larwy owadów, a igły są pożywieniem tylko nielicznych gatunków. Wykazano że taksoidy, zwłaszcza bakkatyny III i V, mogą działać jako repelenty.

Taksol (paklitaksel) to diterpen, wyizolowany po raz pierwszy w 1971r. z kory cisu zachodniego (*Taxus brevifolia*), w której stanowi ok. 0,01 proc. suchej masy. Jest substancją czynną leków przeciwnowotworowych, początkowo otrzymywaną wyłącznie przez ekstrakcję kory cisów. Wciąż wysoka cena i ograniczona dostępność surowca doprowadziła do opracowania nowych sposobów otrzymywania taksolu, z których duże nadzieje budzą metody biotechnologiczne.

Cisy to długowieczne, wolno rosnące, dwupienne drzewa lub krzewy. Rodzaj *Taxus* składa się z około 8 gatunków, w większości występujących na półkuli północnej.

Cisy rosnące nawet na stosunkowo małym obszarze mogą znacząco różnić się zawartością taksoidów, a u wielu przedstawicieli *T. baccata* nie wykryto taksolu. Próbuje się prowadzić selekcję osobników o dużej zdolności syntezy taksoidów, a następnie ich powielanie metodą klonowania *in vitro* (mikrorozmnażania). Metoda polega na pobraniu pąków lub gałązek zawierających węzły i umieszczeniu ich w pożywce. Po pewnym czasie zachodzi wzrost nowych pędów, które się odcina i przenosi do innego medium zawierającego auksyny, indukujące tworzenie korzeni. Tak powstałe sadzonki przenosi się na podłoże.

Kultury komórkowe

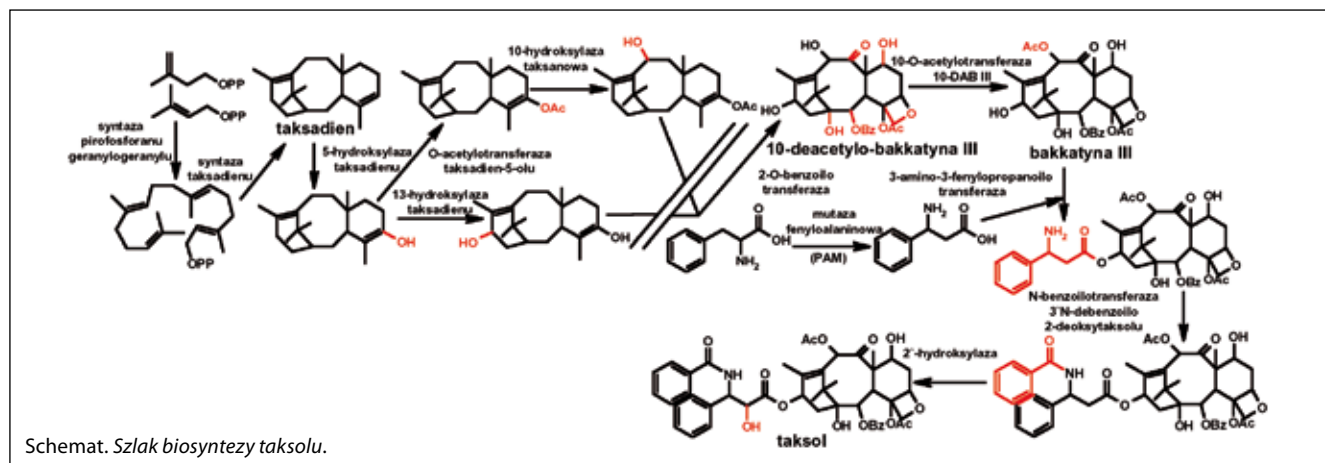
Istnieją liczne opracowania dotyczące zastosowania kultur komórkowych do otrzymywania taksolu. Procesy izolacji

oraz igły cisów. Powstałe komórki mogą się dzielić i przejawiają tendencję do wzrostu w koloniach. Wiele wtórnych metabolitów, których produkcja jest ściśle powiązana ze zróżnicowaniem komórek, nie jest wytwarzanych przez kalus. Jednak możliwe jest ponowne zróżnicowanie komórek poprzez zadziaływanie auksynami, co prowadzi do powstania korzeni, lub cytokininami sprzyjającymi tworzeniu pędów. Powstała hodowla składa się z wielu linii komórkowych, które mogą znacznie różnić się wydajnością biosyntezy. W związku z tym przeprowadza się selekcję szczególnie wydajnych linii w celu założenia kultur roboczych. W jednej z metod selekcji trawi się enzymatycznie ścianę komórkową kalusa, co uwalnia niepołączone ze sobą protoplasty. Po kilku dniach odtwarzają one ścianę i dzieląc się tworzą kolonie złożone z pojedynczych linii, które cechują się

W tym czasie dominuje metabolizm podstawowy, a głównym produktem jest biomasa. Wystąpienie niedoboru któregoś ze składników medium skutkuje spowolnieniem wzrostu. Zatrzymanie podziałów cechuje fazę stacjonarną. Wówczas komórki korzystają z nagromadzonych substancji zapasowych i zachodzą zmiany w metabolizmie prowadzące do wytwarzania metabolitów wtórnych. Gdy wyczerpaniu ulegną także substancje zapasowe dochodzi do stopniowego wymierania komórek.

Metody poprawiania wydajności

Skład pożywek wpływa znacząco zarówno na szybkość wzrostu komórek jak i na wydajność biosyntezy. Stosowane są media modyfikowane w celu poprawienia wzrostu, które po osiągnięciu odpowiedniej ilości biomasy zamienia się na



Schemat. Szlak biosyntezy taksolu.

z surowców roślinnych i oczyszczenia produktów są kosztowne i pracochłonne, natomiast w hodowlach *in vitro* możliwe jest nasilenie produkcji taksolu z ograniczeniem syntezy innych taksoidów. W przemyśle farmaceutycznym duże znaczenie mają kultury drobnoustrojów pomocnych w otrzymywaniu wielu substancji czynnych. Uzyskuje się w ten sposób niektóre antybiotyki, immunosupresanty, leki przeciwwgrzybicze, i przeciwnowotworowe. Ograniczeniem dla stosowania kultur roślinnych jest brak zdolności podziału większości komórek tworzących organy rośliny. Niezbędne jest odróżnicowanie tych komórek poprzez zadziaływanie mieszaniną auksyn, np. kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego, i cytokininy, np. kinetyny, co prowadzi do utworzenia kalusa (tkanka przyranna). Może być on indukowany z każdej części rośliny, ale ze względu na produktywność, jako źródło kalusa preferowane są komórki merystematycz-

nie oraz igły cisów. Powstałe komórki mogą się dzielić i przejawiają tendencję do wzrostu w koloniach. Wiele wtórnych metabolitów, których produkcja jest ściśle powiązana ze zróżnicowaniem komórek, nie jest wytwarzanych przez kalus. Jednak możliwe jest ponowne zróżnicowanie komórek poprzez zadziaływanie auksynami, co prowadzi do powstania korzeni, lub cytokininami sprzyjającymi tworzeniu pędów. Powstała hodowla składa się z wielu linii komórkowych, które mogą znacznie różnić się wydajnością biosyntezy. W związku z tym przeprowadza się selekcję szczególnie wydajnych linii w celu założenia kultur roboczych. W jednej z metod selekcji trawi się enzymatycznie ścianę komórkową kalusa, co uwalnia niepołączone ze sobą protoplasty. Po kilku dniach odtwarzają one ścianę i dzieląc się tworzą kolonie złożone z pojedynczych linii, które cechują się

stabilnością produkcji żądanych metabolitów. Wykazano, że hodowla zmieszanych linii komórkowych znacznie różniących się produktywnością prowadzi do otrzymania większej ilości taksolu, niż przy hodowli tych linii osobno. Sugeruje to zdolność pobudzania przez wysokowydajne linie nadprodukcji w innych komórkach. Kultury komórkowe zapewniają nieograniczoną i ciągłą podaż produktu niezależną od nieprzewidywalnych trudności w dostawie oraz różnic w jakości surowca roślinnego. Zmiany sposobu prowadzenia hodowli umożliwiają także zwiększone pozyskiwanie innych taksoidów w tym bakkatyny III i 10-DAB III. Procesy zachodzące podczas hodowli można podzielić na kilka etapów. Komórki po zawieszeniu w podłożu zawierającym wszystkie niezbędne składniki przystosowują szlaki metaboliczne i przemiany energetyczne do nowego środowiska. Następnie zaczyna ją dzielić się w postępie geometrycznym.

pożywki zoptymalizowane dla produkcji metabolitów. O wpływie medium może świadczyć fakt, że dla standardowego podłoża suplementowanego jednym z 2 rodzajów cukrów i jedną z 3 cytokin i auksyn, zawartość taksolu zawierała się w zakresie 0,03-1,68 mg/g suchej masy.

Elicytory

Znaczącym postępowaniem umożliwiającym wielokrotne zwiększenie wydajności produkcji wtórnych metabolitów było zastosowanie elicytacji. Elicytory to biotyczne lub abiotyczne związki stymulujące odpowiedź odpornościową roślin. Częścią odpowiedzi na patogeny wywołaną przez elicytory jest akumulacja wtórnych metabolitów, w tym także fitoaleksyn. Podwyższona jest ekspresja genów enzymów biorących udział w metabolizmie wtórnym, natomiast metabolizm podstawowy ulega hamowaniu. Najbardziej efektywnymi elicytorami w hodowlach komórek cisów

są kwas jasmonowy i jego ester metylo-
wy (MJA). Oprócz nasilania metabolizmu
wtórnego zauważalnie hamują one pod-
ziały komórek. Stawiane są hipotezy od-
nośnie istnienia receptora MJA złożonego
z fragmentów aktywnych i nieaktywnych,
przy czym MJA ma mieć powinowactwo
do obu tych struktur. MJA nie tylko pobu-
dza biosyntezę taksolu ale wpływa na ki-
netykę tego procesu przyspieszając osią-
gnięcie wartości maksymalnych. Taksol
wytwarzany jest po osiągnięciu fazy stacjo-
narnej i pożądane jest przedłużenie czasu
jej trwania. Osiągane jest to dzięki prowa-
dzeniu kultury ciągłej, w której część uży-
tej pożywki jest usuwana i zamieniana na
świeżą. Wymiana medium nasila o 25-95
proc. biosyntezę taksolu w kulturze *T. chi-
nensis*. Zwiększa też poziom frakcji ze-
wnątrzkomórkowej. W systemie hodowli
ciągłej najczęściej wykorzystywane są
mechanizmy niedopuszczające do utra-
ty komórek, prowadzące do akumulacji
biomasy. W tym celu stosuje się membra-
ny lub unieruchamia komórki na nośni-
kach. Imobilizacja sprawia, że komórki
rosną w zagęszczeniu, co imituje warunki
panujące w tkankach roślinnych i korzyst-
nie wpływa na biosyntezę, a także zmniej-
sza wrażliwość komórek na uszkodzenia
mechaniczne. Na wydajność biosyntezy
wtórnych metabolitów wpływa nie tylko
aktywność enzymów ale także dostęp-
ność prekursorów. Jedynymi większymi
cząsteczkami dołączanymi do rdzenia tak-
sadienu są reszty benzoilowe i acetylowe
oraz β -fenyloalanina. Zarówno fenyloala-
nina, jak i kwas p-aminobenzoesowy do-
dane do kultury kalusa *T. cuspidata* powo-
dują kilkukrotny wzrost zawartości taksolu.
Zmniejszenie żywotności komórek w cza-
sie hodowli związane jest z wyczerpaniem
składników odżywczych oraz kumulacją
toksycznych metabolitów. Zaobserwo-
wano istnienie związku między często-
ścią apoptozy w kulturach *T. chinensis var.
mairei*, a ogólną zawartością produkowa-
nego przez nie taksolu. Wykazano też, że
wprowadzenie taksolu do hodowli zna-
cząco i w sposób zależny od dawki wywo-
luje apoptozę komórek *T. cuspidata*. Z tego
powodu pożądane jest usuwanie taksolu
w czasie trwania procesu produkcyjnego,
co umożliwi przedłużenie czasu hodowli.
Najprostszą metodą jest wymiana me-
dium (prowadzenie hodowli ciągłej), jed-
nak frakcja zewnątrzkomórkowa związku
w wielu liniach kalusa stanowi tylko 7-10
proc. ilości całkowitej. Taksol jest lipofilny
i występuje głównie w ścianie komórko-

wej lub przestrzeni między ścianą a błoną
komórkową. Wykorzystując enzymy roz-
kładające komponenty ściany wykazano,
że w komórkach *T. canadensis* w ten spo-
sób zmagazynowane jest 60 proc. taksolu.
Opracowanie metod zwiększających
poziom frakcji zewnątrzkomórkowej stało
się obecnie głównym celem również z in-
nych powodów. Izolacja taksolu z podłoża
to proces znacznie łatwiejszy niż ekstrak-
cja z biomasy. Prawdopodobnie istnieje
także ujemne sprzężenie zwrotne między
jego poziomem w komórce, a biosyntezą.
Poza stosowaniem hodowli ciągłej efek-
tywne okazało się także wykorzystanie
procesu dwufazowego. Polega on na do-
daniu do zawiesiny komórkowej lipofilo-
wego rozpuszczalnika, do którego prze-
nika taksol z fazy wodnej. Rozpuszczalnik
ulega sukcesywnej wymianie w miarę
gromadzenia się w nim produktu. Dział-
aniem komplementarnym do tej metody
jest stosowanie czynników, które zwięk-
szają przepuszczalność błony komórko-
wej. Umiarkowany efekt dało zastosowanie
ultradźwięków o niskiej energii.

Kultury korzeni włośnikowatych

Kultury mogą być zakładane nie tylko
z nieróżnicowanych komórek, ale także
z organów roślinnych, które mają zdolność
wzrostu dzięki obecności komórek mery-
stematycznych. Wśród nich szczególnego
znaczenia jako źródło wtórnych metaboli-
tów nabrały korzenie włośnikowate. Otrzy-
mywane są w wyniku transformacji tkanek
przez *Agrobacterium rhizogenes*. Zawarty
w tej bakterii plazmid Ri po wbudowaniu
w genom komórki indukuje, prawdopo-
dobnie wskutek zmiany wrażliwości na au-
ksyny, tworzenie cienkich rozgałęzionych
korzeni. Po odcięciu są one dezynfekowa-
ne i używane jako „inokulum” do kultur
prowadzonych w kolbach wytrząsanych
lub bioreaktorach. Wyróżnia się dwie głów-
ne metody prowadzenia hodowli w biore-
aktorach. Kultura hydroponiczna, w któ-
rej korzenie są zanurzone w pożywce, jest
częściej stosowana niż kultura aeroponicz-
na, w której korzenie są zawieszane na siat-
kach w atmosferze powietrza i zraszane
pożywką. Wzrost korzeni jest co najmniej
tak samo szybki jak komórek *in vitro*, ale ko-
rzenie nie wymagają obecności fitohor-
monów w medium. Wydajność biosyntezy
jest nie mniejsza, niż w roślinach macierzy-
stych, a przy tym korzenie włośnikowa-
te wykazują dużą stabilność genetyczną.
Wykazano także akumulację metabolitów,

które w warunkach naturalnych występują
wyłącznie w organach nadziemnych. Tak-
że elicytory mają zastosowanie w tych kul-
turach: MJA zwiększył produkcję taksolu
3-krotnie w kulturze korzeni *T. media* do
210 $\mu\text{g/g}$ suchej masy surowca. Należy za-
uważyć, że powstały taksol znajduje się
w biomacie, co utrudnia izolację.

Metody opracowane już w latach 90.
XX w. umożliwiają uzyskanie znacznej
wydajności otrzymywania taksolu. Opty-
malizacja procesu umożliwiła uzyskanie
902 mg/l z kultury *T. chinensis*. Biorąc pod
uwagę, że pojemność bioreaktorów sto-
sowanych do hodowli komórek roślin-
nych osiąga już nawet kilkadziesiąt tysię-
cy litrów, można przypuszczać że taksol
z źródeł biotechnologicznych będzie
miał w przyszłości znaczny udział w cał-
kowitej produkcji.

mgr farm. ŁUKASZ SZOKA
e-mail: lukasz.szoka@umwb.edu.pl

Wykaz piśmiennictwa u autora

Słowniczek:

Auksyny – roślinne hormony wzrostowe
stymulujące wzrost wydłużeniowy komó-
rek, powstawanie korzeni bocznych, owo-
ców oraz wyginanie łodyg i korzeni.

Cytokiny – hormony roślinne stymulujące
podziały komórkowe.

Fitoaleksyny – metabolity mające zdolność
hamowania wzrostu patogenów, wytwarza-
ne przez roślinę w odpowiedzi na zakażenie.

Mikrotubule – rurkowe elementy cyto-
szkieletu, polimery białka – tubuliny, mają-
ce zdolność zmiany swojej długości w wy-
niku polimeryzacji/depolimeryzacji, tworzą
wrzeciono kariokinetyczne rozdzielające
chromosomy podczas podziału komórki.

Pytania testowe

(Zaznacz jedną prawidłową odpowiedź)

1. Taksol uzyskano po raz pierwszy z:

- a) kory *T. baccata*
- b) kory *T. brevifolia*
- c) igieł *T. baccata*
- d) kory *T. grandifolia*

2. Taksol należy do:

- a) monoterpenów
- b) seskwiterpenów
- c) diterpenów
- d) triterpenów

3. Efektywnym elicytorem stosowa-
nym w kulturach komórkowych ci-
sów jest:

- a) kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy
- b) kwas masłowy
- c) ester metyloowy kwasu jasmonowego
- d) β -fenyloalanina

(Odpowiedzi szukaj w numerze)