



## Biotechnologia farmaceutyczna: dokonania wieku XX i oczekiwania wieku XXI

Aleksander Chmiel

Katedra Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej  
Uniwersytet Medyczny, Łódź

### Pharmaceutical biotechnology: The achievements of 20<sup>th</sup> century and the expectations in 21<sup>th</sup> century

#### Summary

Pharmaceutical biotechnology is 60 years old. Its development one can divide into three essential periods. Two of them have proceeded in past century. The first period started during the Second World War with the industrial production of penicillin and was **microbiology-based** (microbial metabolites as drugs). The second one was **genetic engineering-based** and started in 1982, when human insulin synthesized in recombinant bacteria was introduced by pharmaceutical industry to health care. The third period began in 2001 with the first descriptions of the human genome, and is **genome-based** (also proteome-based). Molecular biology with its new areas – genomics, pharmacogenomics and proteomics, together with bioinformatics and other sophisticated tools developed at the end of XX century and introduced (to the pharmaceutical and medical biotechnology of the XXI century) very new ideas and new approaches to drug discovery and design. Pharmaceutical biotechnology (as well as pharmaceutical industry as a whole and world biotechnology as a whole) is entering upon the third phase of its development, a very integrated and globalized one.

#### Adres do korespondencji

Aleksander Chmiel,  
Katedra Biologii  
i Biotechnologii  
Farmaceutycznej,  
Uniwersytet Medyczny,  
ul. Muszyńskiego 1,  
90-151 Łódź;  
e-mail:  
chmiel@pharm.am.lodz.pl

#### Key words:

bioproducts, biopharmaceuticals, genomics, drug discovery, drug targeting, drug market.

### 1. Wstęp

Biotechnologia farmaceutyczna ma 60 lat; rozpoczęła się od uruchomienia wielkoprzemysłowej produkcji penicyliny podczas II wojny światowej. Pierwsza połowa tego okresu to dominacja

procesów mikrobiologicznej biosyntezy leków będących metabolitami drobnoustrojów. Rozwój wielu klasycznych dyscyplin naukowych (zwłaszcza mikrobiologii, biochemii, chemii i inżynierii biochemicznej), umożliwił doskonalenie szczepów produkcyjnych oraz procesów technologicznych; nastąpił dynamiczny rozwój nowych technik wydzielania i oczyszczania bioproduktów; stworzono podwaliny nowoczesnej biotechnologii, a miejscem gdzie je tworzono były głównie firmy farmaceutyczne w USA, Europie i Japonii.

W tym czasie dojrzała genetyka i biologia molekularna, co zaowocowało na przełomie lat 60. i 70. powstaniem (w USA) koncepcji manipulacji genetycznych poza komórką (inżynieria genetyczna, technologia rekombinowanego DNA). Nowa inżynieria miała rewolucyjny wpływ na zmiany w biotechnologii farmaceutycznej, które dokonały się w jej drugim trzydziestoleciu. Wielu autorów uważało nawet (a niektórzy uważają nadal), że były to narodziny biotechnologii, wręcz utożsamiając ją z inżynierią genetyczną.

Już dziesięć lat od narodzin inżynierii genetycznej pojawił się w lecznictwie jej pierwszy produkt – rekombinowana ludzka insulina wytworzona w komórkach bakterii *Escherichia coli*. Ostatnie dwudziestolecie biotechnologii farmaceutycznej przebiegało pod znakiem produkcji kolejnych biofarmaceutyków\* – leków nowej generacji, które są wytwarzane dzięki rozwojowi technik inżynierii genetycznej i komórkowej. Głównym nurtem zastosowań nowoczesnych technik genetycznych w biotechnologii leków jest konstruowanie transgenicznych drobnoustrojów i linii komórkowych zdolnych do wydajnej biosyntezy ludzkich białek leczniczych. Początkowy etap tych prac mamy już za sobą; zaowocował przemysłową produkcją kilkudziesięciu biofarmaceutyków. Przykładami są: insulina (w leczeniu cukrzycy), hormon wzrostu (korekta wzrostu), interferony (nowotwory, infekcje wirusowe), czynnik VIII krzepnięcia krwi (hemofilia), czynnik nekrozy nowotworów (choroby nowotworowe), tkankowy aktywator plazminogenu (degradacja zakrzepów krwi) czy erytropoetyna (anemia, uszkodzenia nerek, wspomaganie transfuzji krwi). Dokładniejsze omówienie tej tematyki Czytelnik znajdzie we wcześniejszej pracy (1).

W ciągu pierwszych dziesięciu lat od dopuszczenia do stosowania w lecznictwie rekombinowanej insuliny (Lilly & co., 1982) status leków uzyskało 10 produktów rDNA. W ciągu następnych 10 lat (do roku 2001) przemysł farmaceutyczny wdrożył do produkcji i lecznictwa kolejnych ponad 50 biofarmaceutyków. Świadczy to o dużej dynamice rozwoju nowoczesnej biotechnologii farmaceutycznej. Obecnie, uwzględniając wcześniej niedostępne informacje (np. z Chin) i fakt, że ta sama substancja lecznicza pochodzenia rDNA może być zawarta w więcej niż jednym leku można szacować rynek biofarmaceutyków na około 100 produktów. Kilkaset produktów

\* Nazwę „biofarmaceutyki” zaproponowano pierwotnie w odniesieniu do leków o budowie polipeptydowej (białkowej), które były wytwarzane z wykorzystaniem technik inżynierii genetycznej, zrekombinowanych kultur drobnoustrojowych, kultur komórkowych (ludzkich lub zwierzęcych), w tym zwłaszcza komórek mieszańcowych (*hybrydoma*) produkujących przeciwciała. Później w tej grupie leków uwzględniono również produkty o budowie oligo- i polinukleotydowej.



znajduje się w różnych fazach badań klinicznych. Większość z nich jest wytwarzana z użyciem zrekombinowanych bakterii (głównie *Escherichia coli*) i drożdży (głównie *Saccharomyces cerevisiae*), ale wykorzystywane są również inne drobnoustroje oraz zrekombinowane linie komórkowe organizmów wyższych. W dalszej perspektywie proponowane jest przemysłowe wykorzystanie do tego celu transgenicznych roślin i zwierząt. W tym opracowaniu pominięte zostaną zagadnienia technologiczne wynikające z transgenezy organizmów wyższych oraz biotechnologie z użyciem ludzkich i zwierzęcych kultur komórkowych. Były one prezentowane przez autora wcześniej (1,2). Nadmienię tylko, że najważniejszymi dotychczas przemysłowymi osiągnięciami kultur komórek ssaków są klasyczne już biotechnologie szczepionek przeciw-wirusowych z użyciem linii komórek nowotworowych lub ustalonych linii komórek transformowanych oraz produkcja przeciwciał monoklonalnych z wykorzystaniem kultur komórek mieszańcowych (*hybrydoma*).

Dzięki inżynierii genetycznej zaistniała możliwość biotechnologicznej produkcji leków drogich i trudno dostępnych, na które istnieje duże zapotrzebowanie. W początkowym etapie rozwoju nowego kierunku biotechnologii farmaceutycznej oczekiwano, że przyniesie on bardzo szybko znacznie więcej rozwiązań przemysłowych. Problemy techniczne, biologiczne i medyczne sprawiły, że ten ważny dział biotechnologii, pomimo że uważany jest za najbardziej dynamiczny, rozwija się nieco wolniej niż zakładano.

Powodzenie inżynierii genetycznej w biotechnologii farmaceutycznej oraz oczekiwania społeczne w zakresie ochrony zdrowia pobudziły pod koniec XX w. niebywały postęp w naukach biologicznych – dynamiczny rozwój **bioinformatyki** (3,4) i **genomiki** (5,6). Wiek XXI zaczął się pod znakiem poznawania genomu ludzkiego, co jest kolejnym dokonaniem biologów molekularnych, rewolucjonizującym biotechnologię farmaceutyczną. Stoją przed nią duże wyzwania w zakresie opracowywania nowych, doskonalszych leków. Dotyczy to zwłaszcza chorób infekcyjnych i nowotworowych, chorób (wad) genetycznych oraz chorób układu krążenia. Na potrzeby medycyny i przemysłu farmaceutycznego powstała **farmakogenomika** (7), stworzone zostały komputerowe bazy danych dotyczące genomów i białek różnych organizmów, zaproponowano nowe koncepcje poszukiwania i opracowywania nowych substancji leczniczych, wprowadzono wysoko przepustowe (bardzo efektywne) testy skринingowe (*high throughput screening*, HTS) (8), stworzono podstawy komputerowego modelowania struktury chemicznej nowych leków (*computer aided drug design*, CADD; *structure-based drug design*, SBDD; *in silico screening*) (9,10).

Bioinformatyka stała się podstawowym narzędziem biologii molekularnej i warunkuje dalszy rozwój medycyny molekularnej i biotechnologii farmaceutycznej. Szybkość z jaką pod koniec XX w. tworzono biblioteki sekwencji nukleotydowych w DNA oraz aminokwasowych w białkach doprowadziły do sytuacji, w której do efektywnego wykorzystania nagromadzonej wiedzy molekularnej nieodzowne było wspomaganie techniką komputerową. Bez niej sprawne gromadzenie, przesyłanie, szybkie przetwarzanie i ułatwione wykorzystywanie olbrzymiej ilości „surowych” informacji molekularnych, pochodzących z licznych laboratoriów, byłoby praktycznie



niemożliwe. Niezbędne okazały się bardzo szybkie komputery i specjalistyczne oprogramowania. Pozwalają one na tworzenie nowej jakości gromadzonej wiedzy o molekularnych podstawach procesów biologicznych (analiza funkcjonowania genów i ich produktów białkowych), procesów chorobowych (identyfikacja molekularnych mechanizmów procesu chorobowego i poznanie struktury miejsc receptorowych), farmakologii molekularnej (mechanizmy działania leków), a także na jej technologiczne wykorzystywanie w przemyśle biofarmaceutycznym (poszukiwanie struktur wyjściowych\*), a następnie projektowanie nowych leków (technika molekularnego modelowania komputerowego, dopasowywanie struktury substancji leczniczej do struktury miejsca receptorowego).

Na przełomie wieków byliśmy świadkami rodzenia się drugiej generacji biofarmaceutyków. Inżynieria białkowa, wykorzystująca głównie techniki inżynierii genetycznej, umożliwiła opracowanie zmodyfikowanych biofarmaceutyków o strukturach chemicznych odmiennych od polipeptydów i białek naturalnych. Można było w ten sposób poprawić trwałość biologiczną, zmienić (spowolnić lub przyspieszyć działanie leku czy zmniejszyć niekorzystne działania immunogenne oraz wytworzyć hybrydowe (łączone) białka lecznicze. Przykładami są zmodyfikowane enzymy, np. tkankowy aktywator plazminogenu, zmodyfikowane insuliny, inżynierowane przeciwciała oraz inne produkty. Obszerne opracowanie tych zagadnień znajdzie Czytelnik w pracy Walsh (11).

Genomika zrodziła terapię genową chorób genetycznych, nowotworowych i wirusowych. Pierwsze próby kliniczne terapii genowej miały miejsce w USA w roku 1990. Od tego czasu opracowano kilkaset protokołów postępowania leczniczego i poddano terapii kilka tysięcy pacjentów. Głównym dotychczas kierunkiem klinicznych zastosowań terapii genowej są jednak nie wady genetyczne, lecz choroby nowotworowe (12,13).

Nową koncepcją leczenia poprzez ingerencję w ekspresję informacji genetycznej jest wykorzystanie technologii antysensu (12). Wprowadzenie do organizmu pacjenta chemicznie syntetyzowanych specyficznych oligonukleotydów antysensowych (analogów naturalnych sekwencji antysensowych) uniemożliwia ekspresję informacji zawartej w określonych genach. W ten sposób proponuje się m.in. zahamowanie replikacji cząstek wirusowych, np. w HIV, czy ekspresji niektórych onkogenów w chorobach nowotworowych. Inną techniką zmierzająca do tego samego celu jest eliminacja ekspresji informacji genetycznej przepisanej na RNA przez wykorzystanie rybozymów, czyli enzymatycznej aktywności określonych domen występujących w RNA w stosunku do wiązań fosforanowych w łańcuchu polinukleotydowym. Zarówno terapia genowa jak i technologia antysensowa są przedmiotem biotechnologii medycznej (klinicznej) i jako takie nie będą dalej omawiane.

\* Strukturą albo związkiem wyjściowym (*leading compound*) określa się substancję chemiczną aktywną farmakologicznie, która ma podstawowe cechy poszukiwanego leku i może służyć jako materiał wyjściowy do opracowania ostatecznej struktury substancji leczniczej. Substancja taka może być produktem naturalnym lub związkiem zsyntetyzowanym chemicznie.



## 2. Przemysł farmaceutyczny wraca do bioproduktów naturalnych

W pierwszej połowie XX w., kiedy rodził się wielki przemysł farmaceutyczny, podstawowym źródłem leków była przyroda; dominowały leki roślinne. W miarę rozwoju chemii lek roślinny stawał się często pierwowzorem leku syntetycznego. Klasycznym przykładem jest kwas salicylowy występujący w wierzbie i jego syntetyczne analogi – aspiryna (kwas acetylosalicylowy) i ibuprofen.

W roku 1922 miało miejsce pierwsze lecznicze użycie insuliny (w rok po wyizolowaniu z trzustki), która do dzisiaj jest głównym przedstawicielem grupy polipeptydów i białek leczniczych oraz innych preparatów pochodzenia biologicznego (*biologics*) otrzymywanych z tkanek i organów ludzi i zwierząt (w dawnej nomenklaturze tzw. organopreparatów). Przez długie lata insulina i inne produkty tej grupy nie wchodziły w zakres biotechnologii; zmiana nastąpiła dopiero w roku 1982, kiedy to wprowadzono do leczenia ludzką insulinę wyprodukowaną metodą mikrobiologiczną (14). Był to bardzo spektakularny powrót przemysłu farmaceutycznego do produktów naturalnych, dokonany dzięki inżynierii genetycznej. W roku 2000 uruchomiono również w Polsce przemysłową produkcję rekombinowanej insuliny (15). Jest to jeden z kilku zarejestrowanych na świecie preparatów ludzkiej insuliny.

W drugiej połowie XX w. wśród nowych leków pochodzenia naturalnego dominowały jednak produkty metabolizmu drobnoustrojów. Po sukcesach medycznych i rynkowych antybiotyków i bardzo jednostronnym początkowo skryningu metabolitów drobnoustrojowych ukierunkowanemu prawie wyłącznie na aktywność antybiotyczną, okazało się że drobnoustroje mogą być źródłem również innych cennych substancji leczniczych. Przykładami są m.in. cyklosporyna (lek immunosupresyjny chroniący allogeniczne przeszczepy przed odrzuceniem przez układ odpornościowy pacjenta) lowastatyna (lek obniżający poziom cholesterolu w hipercholesterolemii), czy kwas klawulanowy (inhibitor  $\beta$ -laktamaz), przywracający antybiotykom  $\beta$ -laktamowym ich aktywność w stosunku do wielu szczepów opornych (16).

Produkty naturalne – drobnoustrojowe i roślinne, a obecnie również białka ludzkie – były i są chemicznie modyfikowane w celu poprawienia ich właściwości farmakologicznych (np. aktywności, farmakokinetyki), czy też zmniejszenia lub usunięcia ich wad (np. toksyczności, labilności). W ten sposób otrzymano zdecydowaną większość stosowanych obecnie antybiotyków, leki steroidowe, a także jedne z najdroższych leków przeciwnowotworowych – półsyntetyczne pochodne winblastyny i winkrystyny – alkaloidów *Catharanthus roseus*. W XX w. przemysł farmaceutyczny opracował również tanie procesy pełnej syntezy chemicznej struktur identycznych z produktami naturalnymi (chloramfenikol, D-cykloseryna) oraz procesy syntezy doskonalszych analogów metabolitów naturalnych (prokaina – analog kokainy, chlorochina – analog chininy) (17). W roku 1986 w hodowli promieniowca *Streptomyces griseofuscus* wykryto azomycyny. Poznano ich strukturę chemiczną, zsyntetyzowano chemicznie fragmenty składowe i zestawiono z nich cząsteczkę identyczną ze struk-



turą produktu naturalnego, a następnie zsyntetyzowano bardziej trwale i lepiej dostępne farmakologicznie analogi tego bioproduktu (18).

W drugiej połowie XX w. przemysł farmaceutyczny nastawiony był przede wszystkim na całkowicie syntetyczne leki o małych cząsteczkach, które zdominowały medycynę akademicką. Jednak sukcesy inżynierii genetycznej w biotechnologii farmaceutycznej ponownie skierowały uwagę przemysłu na substancje naturalne, tym razem na średnio- i wielkocząsteczkowe polipeptydy i białka pochodzenia ludzkiego. Pełnią one istotną rolę w funkcjonowaniu organizmu jako hormony, czynniki układu odpornościowego czy czynniki krzepnięcia krwi i czynniki trombolityczne, a w stanach zaburzeń metabolicznych i wad genetycznych są proponowane jako najcenniejsze leki.

Chociaż z mniejszym rozgłosem, ale również z dobrymi efektami nadal poszukuje się bioproduktów wytwarzanych przez rośliny. Od nowa badane są metabolity wykryte już wcześniej, czego przykładem jest wprowadzenie do leczenia paklitakselu (*Taksol*) – metabolitu cisa (19). Nowymi badaniami objęto także organizmy badane wcześniej zbyt jednostronnie lub przy użyciu niedostatecznie czułych metod. W uznanych roślinach leczniczych wykrywane są coraz to nowe związki. Od wieków w tradycyjnej medycynie chińskiej ziele bylicy rocznej (*Artemisia annua*) stosowane było w leczeniu malarii. W latach 70. XX w. stwierdzono występowanie w nim artemizyny – laktonu sesquiterpenowego z oryginalnym pierścieniowym układem nadtlenkowym, który decyduje o przeciwmalarycznej aktywności tego związku. Dzisiaj artemizyna (wadą jej jest mała rozpuszczalność) oraz jej aktywniejsze i lepiej rozpuszczalne półsyntetyczne pochodne – *Artemeter* (eter metylowy artemizyny o dobrej rozpuszczalności) i artesanian sodu (rozpuszczalna w wodzie sól sodowa estru chemisukcynylowego artemizyny) są najlepszymi lekami przeciwmalarycznymi, znacznie lepszymi od chininy i chlorochiny; są one aktywne również w stosunku do szczepów *Plasmodium falciparum* opornych na chlorochinę (17).

Wprowadzenie do leczenia (jako wyizolowanych pojedynczych substancji) alkaloidów barwinka czy glikozydów naparstnicy, paklitakselu, artemizyny oraz innych silnie aktywnych farmakologicznie metabolitów roślinnych, a także ich półsyntetycznych pochodnych zaowocowało w ostatnim ćwierćwieczu szybkim rozwojem etnobotaniki i etnofarmakognozji. Jest to racjonalne, uzasadnione osiągnięciami fitochemii, zwrócenie się w kierunku medycyny ludowej różnych regionów geograficznych, długo lekceważonej przez przemysł farmaceutyczny i medycynę akademicką.

Obok starej medycyny chińskiej (której symbolem jest żeń-szeń) i europejskiej (symbolem może być rumianek) zwrócono się w kierunku tradycyjnej medycyny indyjskiej, indochińskiej, afrykańskiej, malgaskiej czy amerykańskiej. Indianie północnoamerykańscy od wieków wykorzystywali lecznicze właściwości żeń-szenia pięciolistnego (*Panax quinquefolium*), który jak się okazało – zawiera podobny skład ginsenozydów jak jego odpowiedniki azjatyckie, np. żeń-szeń właściwy (*Panax ginseng*) (20). „Głośnym” przykładem w ostatnich latach, dzięki działalności polskiego misjonarza o. Szeligi w Peru, jest *Vilcacora* (*Uncaria tomentosa*), zawierająca farmakolo-



gicznie aktywne pentacykliczne alkaloidy oksoindolowe i inne metabolity wtórne (21).

Firmy farmaceutyczne i uniwersyteckie zespoły badawcze, dysponując doskonałymi technikami preparatywnymi i analitycznymi, badają aktywność farmakologiczną tysięcy bioproduktów rocznie. Zakładane są również małe firmy biotechnologiczne o charakterze komercyjnym, które zdobywają środki (zazwyczaj w powiązaniu z dużymi firmami farmaceutycznymi) na badania skринingowe i wdrożeniowe. Przykładami produktów, które mają szansę w ten sposób trafić do leczenia są m.in. magaininy (krótkie polipeptydy o charakterze kationowym występujące w skórze żab i przejawiające silną aktywność przeciwbakteryjną (22)). Metabolity takie występują w organizmach żywych powszechnie (23), np. w hemolimfie owadów, a także w organizmie człowieka (polipeptydy i białka, np. defenzyny czy lizozym) stanowiąc pierwszą linię obrony w zakażeniach drobnoustrojami, zanim jeszcze uruchomiony zostanie układ obrony immunologicznej.

Atrakcyjnym rezerwuarem substancji leczniczych lub ich pierwowzorów są organizmy żyjące w morzach i oceanach. Znane są badania przeciwnowotworowej aktywności metabolitów występujących w organizmach rekinów. U strzykwy morskiej *Ecteinascidia turbinata* wykryto ekteinascydynę (ET743) – alkaloid tetrahydroizochinolonowy o silnej aktywności przeciw wielu typom nowotworów (24). Stwierdzono, że znosi on oporność komórek nowotworowych na wiele leków, jest selektywnym inhibitorem procesu transkrypcyjnego, blokuje cykl komórkowy w fazie S i G2 oraz oddziałuje na tworzenie się komórkowej sieci mikrotubul; ostatecznie zapobiega podziałom komórkowym. Badania kliniczne wskazują, że ET743 może okazać się bardzo cennym lekiem przeciwnowotworowym w leczeniu mięsaków. Proponowane jest podawanie tej substancji skojarzonej z klasycznymi lekami przeciwnowotworowymi – doksorubicyną, taksolem czy związkami platyny; osiąga się wówczas znaczący synergistyczny efekt leczniczy u pacjentów z nowotworami opornymi na leczenie standardowe. Jeżeli fazy badań klinicznych zakończą się powodzeniem, terapia nowotworów otrzyma pierwszy po trzydziestu latach oryginalny lek do walki z mięsakami (24).

### 3. Materiał roślinny w bioreaktorze: inne oblicze biotechnologii

Istnieje wiele przesłanek dla których przemysł farmaceutyczny od wielu lat wykazuje zainteresowanie biotechnologią roślinnych kultur *in vitro* (25). Głównie dotyczy to kultur zawiesinowych, ale ostatnio prowadzone są również intensywne prace z kulturami korzeni transformowanych (transgenicznych, włośnikowatych). Ten kierunek biotechnologii bardzo powoli wkracza do praktyki przemysłowej.

Opracowanie wydajnej technologii przemysłowej wymaga wieloletniej pracy badawczej: selekcji wysoko wydajnych linii komórkowych, optymalizacji podłoża, wyboru właściwego sposobu prowadzenia procesu technologicznego i optymalizacji



jego warunków. Dobrym przykładem efektów jakie można osiągnąć w tym zakresie jest biosynteza kwasu rozmarynowego w kulturze zawieszinowej *Coleus blumei* (26). Roślina zawiera niewiele ponad 1% tego metabolitu; w kulturze wyselekcjonowanej linii komórkowej w fazie wzrostu gromadził się on w ilości 2,9%, a w fazie produkcji aż 15%. Po optymalizacji dwuetapowego procesu technologicznego otrzymano 21% kwasu rozmarynowego w suchej masie kultury. Produktywność z jednostki objętości kultury po zoptymalizowaniu procesu technologicznego wzrosła z  $0,02 \text{ g dm}^{-3}\text{doba}^{-1}$  do  $0,91 \text{ g dm}^{-3}\text{doba}^{-1}$  (26). Wydajność produktu jest wprawdzie bardzo ważna w biotechnologii przemysłowej, ale równie ważna jest stabilność genetyczna i produkcyjna kultur roślinnych. Tutaj niewątpliwie dużym problemem jest zmienność somaklonalna i epigenetyczna kultur zawieszinowych; bardziej stabilne są kultury korzeni transformowanych.

Wiek XX zaowocował opracowaniem ponad 10 przemysłowych biotechnologii produkcji metabolitów roślinnych w bioreaktorach. Nie wszystkie jednak zakończyły się pełnym sukcesem i były dalej realizowane w skali przemysłowej. Na powodzenie technologiczne i ekonomiczne mogą liczyć tylko biotechnologie produktów drożych, na które istnieje duże zapotrzebowanie, a ich dostępność z tradycyjnych źródeł jest ograniczona. Niektóre biotechnologie roślinne, pomimo że zostały opracowane i sprawdzone w dużej skali, nie mogły zatem wejść na stałe do realizacji przemysłowej ze względów ekonomicznych. Przykładem jest biotechnologia produkcji nikotyny w kulturze *Nicotiana tabacum* w bioreaktorze o pojemności  $20 \text{ m}^3$  (25). Pierwszą przemysłową biotechnologią roślinną, uruchomioną w roku 1983, była biosynteza szikoniny. Kilka lat później wdrożono bioreaktorową produkcję biomasy żeńszczenia zawierającej aktywne farmakologicznie saponiny. Obie technologie zostały opracowane w Japonii. Biotechnologię żeńszczenia opracowano później również w ZSRR, Izraelu i Hong Kongu (25).

Największa instalacja przemysłowa dla kultur roślinnych opisana w piśmiennictwie (29) została oddana do użytku w roku 1988 w firmie Diversa Gesellschaft für Bio- und Verfahrenstechnik mbH (Niemcy). Składa się ona z kaskady bioreaktorów mieszadłowych o pojemności: 7,5, 15 i  $75 \text{ m}^3$ . Instalacja ta umożliwia prowadzenie kultur zawieszinowych w warunkach możliwie najbardziej kontrolowanych, sterowanych komputerowo. Specjalna konstrukcja mieszadeł zapobiega niszczeniu wrażliwych komórek roślinnych. Bioreaktor o pojemności  $75 \text{ m}^3$  użyto również do biosyntezy paklitakselu w kulturach *Taxus spp.* w firmie Phyton Gesellschaft für Biotechnik mbH (27). W późniejszych doniesieniach nie ma jednak potwierdzenia informacji o tej technologii.

Na powodzenie biotechnologii wpływa wiele czynników. Opłacalna produkcja biotechnologiczna metabolitu roślinnego wymaga dużej wydajności produktu, jego wysokiej ceny i odpowiednio dużego i stabilnego rynku zbytu. Do najbardziej interesujących przemysłowo produktów roślinnych ważnych dla lecznictwa należą: artemizyna, chinina, digoksyna, efedryna, kodeina, olejek miętowy, paklitaksel (*Taxol*) oraz winblastyna z winkrystyną. Roczna wielkość rynku wynosi dla nich po kilka-



dziesiąt mln USD; maksymalnie do 100 mln USD – dla efedryny, kodeiny i olejku miętowego. Do najdroższych bioproduktów należą (28): winblastyna z winkrystyną – przeciwnowotworowe alkaloidy barwinka; ich cena osiąga 5000 USD za 1 g. Paklitaksel (*Taxol*) – przeciwnowotworowy alkaloid uzyskiwany z cisa kosztuje 500 USD g<sup>-1</sup>, digoksyna – ważny lek nasercowy – tylko 3 USD g<sup>-1</sup>, kodeina – tylko 0,65 USD g<sup>-1</sup>, a chinina – tylko 0,1 USD g<sup>-1</sup>. Teoretycznie najlepszymi kandydatami do przemysłowego wdrożenia biotechnologii ich wytwarzania są zatem bardzo drogie przeciwnowotworowe alkaloidy barwinka i cisa. W przypadku winblastyny i winkrystyny nie udało się jednak w ogóle opracować procesu ich biosyntezy w kulturach *in vitro*. Natomiast paklitaksel i inne taksany występujące w cisie są obecnie przedmiotem intensywnych prac badawczych i wdrożeniowych. Tymczasem biotechnologicznych opracowań wdrożeniowych doczekały się inne, znacznie tańsze produkty roślinne. Przykładem jest szikonina; chociaż jej cena jest stosunkowo niska – poniżej 5 USD za gram; niewielkie jest również jej roczne zapotrzebowanie – rzędu 200 kg, ale za to zoptymalizowany proces biotechnologiczny okazał się niezwykle wydajny – kilka gramów produktu w 1 litrze kultury. Przyjmuje się, że dla opłacalności procesu biotechnologicznego końcowe stężenie produktu powinno przekraczać 1 g dm<sup>-3</sup>.

Stężenie metabolitu na poziomie kilku g dm<sup>-3</sup> kultury można by uznać za duże. W najbardziej jednak wydajnych procesach biotechnologicznych produkcji antybiotyków – wtórnych metabolitów bakterii i grzybów uzyskuje się 10-50 g dm<sup>-3</sup>, a kwasów organicznych i aminokwasów 100 i więcej g dm<sup>-3</sup>. Jeszcze lepsze wyniki osiągnięto w mikrobiologicznej produkcji metabolitów podstawowych, takich jak kwas L-glutaminowy i L-lizyna – 100 g dm<sup>-3</sup>, kwas L-asparaginowy i cytrynowy – 150 g dm<sup>-3</sup>, kwas glukonowy – nawet 300 g dm<sup>-3</sup> (29). Uzyskanie takich wyników było możliwe jednak po kilkudziesięciu latach badań i ulepszania szczepów produkcyjnych oraz doskonalenia technologii. Oceniając współczesny stan wiedzy z zakresu genetyki, metabolizmu i enzymologii (szlaki metaboliczne i ich regulacja) roślin i kultur roślinnych oraz wyniki prac optymalizacyjnych roślinnych kultur *in vitro* w bioreaktorach, należy uznać, że są one jeszcze nadal bardzo skromne.

#### **4. Genomika i bioinformatyka rewolucjonizują biologię molekularną: rodzi się nowa biotechnologia farmaceutyczna**

Komputerowa analiza gromadzonej wiedzy molekularnej w XX w. przyspieszyła w sposób zasadniczy rozszyfrowywanie genetycznego zapisu instrukcji procesów życiowych oraz ustalanie zależności między genotypem, funkcjonowaniem i współzależnością genów. Biologicznie czynnymi produktami genów są białka. Badanie wieloetapowego procesu wytwarzania białek na podstawie zapisu znajdującego się w DNA oraz regulacji tego procesu w zależności od bieżących potrzeb organizmu czy komórki są przedmiotem **transkryptomiki**, a badanie funkcji białek



i ich współdziałania – przedmiotem **proteomiki** (30,31). Są to dyscypliny naukowe, którym początek dała genomika.

Genomika gromadzi wiedzę podstawową; w ostatnim ćwierćwieczu stworzono biblioteki (komputerowe bazy danych) zasobów genetycznych (kompletnych sekwencji nukleotydów w genomie) kilkudziesięciu drobnoustrojów – drożdży i bakterii, a także kilku organizmów wyższych. Zasoby gromadzonej wiedzy molekularnej są dostępne w internetowych bioinformatycznych bazach danych. Dla lepszej ilustracji przytoczono kilka wybranych przykładów internetowych źródeł molekularnych danych biologicznych i biotechnologicznych.

DBcat (biologiczne bazy danych) <[www.infobiogen.fr/services/bdcat](http://www.infobiogen.fr/services/bdcat)>

DDBJ (sekwencje nukleotydowe) <<http://www.ddbj.nig.ac.jp>>

EMBL (sekwencje nukleotydowe) <<http://www.ebi.ac.uk/dbasestopdata.html>>

ETI (taksonomia i informacje dotyczące bioróżnorodności) <<http://www.eti.uva.nl>>

PIR (sekwencje białkowe) <<http://pir.georgetown.edu>>

SWISS-Prot (sekwencje białkowe) <<http://www.expasy.ch/sprot>>

### Genomika człowieka i jej następstwa

Do najważniejszych programów badawczych należy zaliczyć poznawanie genomu człowieka oraz występujących w tym zakresie subtelnych różnic molekularnych (różnic w pojedynczych nukleotydach). W badaniach genomów organizmów żywych dominowały dwa wielkie przedsięwzięcia amerykańskie dotyczące zbadania ludzkiego genomu. Pierwszy był międzynarodowy Projekt Poznania Ludzkiego Genomu (*Human Genome Project*, HGP), którego kierownikiem jest Francis Collins, prowadzony przez Narodowy Instytut Badań nad Ludzkim Genomem (*National Human Genome Research Institute*, Bethesda, USA), przy współudziale laboratoriów w Anglii, Chinach, Francji, Japonii i Niemczech. Wyniki precyzyjnych i pracołłonnych badań są udostępniane społeczności uczonych i firmom farmaceutycznym m.in. na stronie internetowej GenBank <[www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank)>. Inne witryny informujące o projekcie to: <<http://www-hgc.lbl.gov/inf/HGCcenters.html>>, <<http://www.ornl.gov/hgmis>> i <<http://www.gdb.org>>.

W celu poznania ludzkiego genomu powstała komercyjna firma Celera Genomics (Rockville, USA), kierowana przez Creiga Ventera, która pracowała z bardzo dużą wydajnością wykorzystując 300 automatycznych aparatów do sekwencjonowania DNA oraz mająca do dyspozycji olbrzymie moce obliczeniowe komputerów. Firma jest nastawiona na patentowanie\* swoich wyników z przeznaczeniem ich (odpłatnie) głównie dla przemysłu farmaceutycznego.

\* Trwa społeczny spór dotyczący patentowania sekwencji genomów i czerpania z tego korzyści, za czym zdecydowanie opowiadają się prywatne laboratoria genetyczne i niektóre firmy biotechnologiczne. Firmy komercyjne nastawiają się na szukanie rzadkich wariantów (mutacji) ludzkich genów. Zdecydowanie przeciwnie podejście do dostępu do wiedzy molekularnej jest prezentowane przez liczne śro-



W połowie 2000 r. ogłoszono, że ludzki genom został zsekwencjonowany **prawie** w całości. Na początku 2001 r. firma Celera Genomics opublikowała w „Science” <[www.sciencemag.org/content/vol291/issue5507](http://www.sciencemag.org/content/vol291/issue5507)>, że poznano sekwencję nukleotydów 95% genomu pięciu osób z dokładnością 99,96%. W tym samym czasie w „Nature” z 15 lutego 2001 r. opublikowane zostały wyniki prac HGP <[www.nature.com/genomics/human](http://www.nature.com/genomics/human)>. Chociaż obydwie zespoły udostępniają w internecie zbierane przez siebie sekwencje ludzkiego DNA, z danych firmy Celera Genomics można korzystać z dużymi ograniczeniami (dostęp do pełnych danych wymaga podpisania specjalnej umowy), natomiast baza HGP – zgodnie z wcześniejszymi zapewnieniami – jest dostępna bez ograniczeń. Na podstawie badań obydwu grup oceniono, że genom ludzki, szacowany pierwotnie na 60-100 tys. genów (około 2-3 mld par nukleotydów), zawiera tylko około 30-40 tys. genów; kilka miesięcy później oceniono go na około 50 tys. Dla porównania – genom *Escherichia coli* zawiera 4,6 mln par zasad i jest szacowany na około 2800 genów zajmujących 75% DNA tej bakterii.

Zsekwencjonowanie ludzkiego genomu było wielkim dokonaniem naukowym – przede wszystkim poznawczym. Ważnym odkryciem było np. stwierdzenie, że genomy badanych kilku osób obojga płci różnych ras okazały się identyczne w 99,9% oraz, że geny stanowią tylko około 1% (!) ludzkiego genomu. Te wyniki miały dla biologii, medycyny i farmacji znaczenie raczej symboliczne; wciąż nasza wiedza o genach i ich funkcjonowaniu oraz o kodowanych przez nie białkach, funkcjach i interakcjach białek jest jeszcze zbyt skromna i fragmentaryczna, aby można było z niej czerpać na miarę potrzeb. Dotychczasowe wyniki wymagają dalszej weryfikacji i wielokrotnych powtórzeń oraz uzupełnień, gdyż na początku 2001 r. jeszcze około 5% ludzkiego DNA nie zostało zsekwencjonowane. Jednakże pierwszy krok został zrobiony i rozpoczęła się nowa era w rozwoju biologii molekularnej, która będzie miała wielki wpływ na rozwój medycyny oraz biotechnologii farmaceutycznej.

---

dowiska naukowe, medyczne i gremia społeczne: proponowana jest powszechna dostępność do katalogu subtelnych różnic w strukturze genów dla wszystkich badaczy i technologów.

W opinii autora (i nie tylko) patentowanie genów istniejących w przyrodzie, niezależnie od inwencji człowieka, jest nieetyczne i niemoralne. Geny nie są wynalazkiem ani wytworem człowieka, jakim zatem „prawem” człowiek (zespół ludzi) uzurpuje sobie **prawo** do wyłączności na coś co wykrył, ale czego przecież nie wytworzył. Wiedza i jej poznanie nie powinny być przedmiotem patentowania, powinny być dostępne i służyć wszystkim, tymczasem obserwuje się modyfikację („naginanie”) prawa patentowego (pod presją finansowo zainteresowanych wąskich grup społecznych) w celu osiągnięcia korzyści materialnych z tytułu poznania elementów procesów biologicznych. Sekwencja nukleotydów w DNA jest częścią wiedzy o życiu. Nie budzi wątpliwości patentowanie sztucznych analogów naturalnych genów i białek oraz patentowanie nowych leków i procesów ich wytwarzania w oparciu na znajomości molekularnych aspektów procesów życiowych.

Na zakończenie tej dygresji należy dodać, że patentowane są nie tylko geny. Opatentowano niezróżnicowane komórki szpiku kostnego i wszystkie typy komórek krwi pępowinowej, które stanowią niezwykle cenny wyjściowy materiał terapeutyczny. Zastrzeżenia patentowe dotyczą także embrionów i technologii ich wyprowadzania.



Pomimo ostentacyjnego ogłoszenia w 2001 r. wyników dwóch najważniejszych programów genetycznych, nasza wiedza nawet tylko w zakresie poznania lokalizacji genów i sekwencji nukleotydów w całym ludzkim DNA nie jest kompletna. Panuje przekonanie, że ostateczne pełne zsekwencjonowanie ludzkiego DNA wymaga jeszcze kilku lat pracy, wielu powtórzeń i porównań. Chociaż zsekwencjonowano przewidzianą część kodującego ludzkiego DNA, nie zidentyfikowano jednak jeszcze wszystkich genów. Wiele sekwencji nukleotydowych (genów) jest odpowiedzialnych za udział w kodowaniu więcej niż jednego białka (kilku, kilkunastu, a czasem nawet kilkudziesięciu). Upadł jeden z dogmatów wczesnej genetyki: jeden gen – jedno białko.

Nowa wiedza o ludzkim genomie skłania do zrewidowania definicji genu. Jeżeli ten sam fragment DNA koduje różne białka i jest odpowiedzialny za więcej niż jedną cechę fenotypową, dotychczasowe definicje przestają obowiązywać. W procesie ekspresji informacji genetycznej zawartej w tym samym odcinku eukariotycznego DNA powstaje preRNA, z którego po wycięciu zbędnych fragmentów (intronów) mogą powstawać różne układy egzonów RNA (kodujących jednostek RNA). W efekcie końcowym, w wyniku ekspresji tego samego fragmentu DNA (genu), w procesie translacji różnych kodujących jednostek RNA są syntetyzowane różne białka. Odpowiedź na pytanie – jak to się dzieje – jaki jest mechanizm gwarantujący syntezę określonego białka w oparciu na tym samym fragmencie DNA, ma dać transkryptomika.

Poza poznaniem sekwencji genów struktury białek, niezbędna jest identyfikacja w DNA sekwencji regulatorowych oraz odpowiadających im białek sterujących ekspresją genów (w jakiej komórce/tkance, w jakim czasie i ile jakiego białka ma powstać). Przed genomiką stoi jeszcze problem genów, które nie kodują białek, lecz tylko RNA, a co z olbrzymią częścią DNA o nie znanej dotąd funkcji, nie kodującą genów (szacowaną w roku 2000 na 96%, a na początku roku 2001 r. – na ponad 98%)? W żadnym poznanym dotąd genomie innego organizmu nie ma takiego nadmiaru DNA nie kodującego genów. Obecny etap poznania ludzkiego genomu rodzi wiele dalszych pytań, np. jaką funkcję mają liczne wielokrotnie powtarzające się identyczne sekwencje nukleotydów (tzw. genetyczna czkawka), których zawartość szacuje się na ponad 35% całego naszego DNA.

Praktyczne wykorzystanie gromadzonej wiedzy wymaga porównawczej analizy genomów dużej liczby ludzi. Oczekuje się, że rutynowe określanie sekwencji nukleotydów w DNA człowieka stanie się powszechnie dostępne w drugim ćwierćwieczu XXI w. Chociaż uważa się, że nasze geny są identyczne w 99,99%, to istotne znaczenie dla praktycznego wykorzystania w medycynie i przemyśle farmaceutycznym może mieć zaledwie część z 0,01% różniących się elementów ludzkiego genomu (mutacji genowych). Wykryto dotychczas ponad 2 mln indywidualnych różnic w pojedynczych nukleotydach, przy czym okazało się, że różnice te nie przebiegają według podziałów rasowych.

Poznanie ludzkiego genomu (kompletu genów) wprowadza naukę, medycynę i biotechnologię w erę postgenomową (*postgenomic era*), w której nastąpi stopniowe



wykorzystywanie genomiki dzięki rozwojowi innych działów wiedzy biologicznej, takich jak wymienione już: proteomika, transkryptomika, metabolomika i inne. Są to znamiona trzeciego okresu w rozwoju biotechnologii farmaceutycznej. Ważniejsze perspektywiczne kierunki wpływu genomiki na dalszy rozwój biologii i biotechnologii, które są niezbędne do wykorzystania genomiki człowieka koncentrują się na następujących zagadnieniach (32):

1. Poznanie, dlaczego i w jaki sposób możliwe jest powstawanie wielu produktów białkowych z informacji zawartej w pojedynczym genie.

2. Poznanie wzajemnego oddziaływania złożonego systemu białek w organizmie, co umożliwi lepsze zrozumienie molekularnych podstaw stanu zdrowia i choroby.

3. Poznanie genetycznego zróżnicowania populacji ludzkiej, co umożliwi lepsze diagnozowanie chorób i dopasowanie leków dla określonych pacjentów. Tutaj drzemie wielkie niebezpieczeństwo, że firmy farmaceutyczne nie będą ekonomicznie zainteresowane poszukiwaniem i produkcją leków dla małej liczby pacjentów oraz, że znajomość defektów genetycznych może być wykorzystana na szkodę ludzi upośledzonych.

4. Zrozumienie mechanizmów regulujących ekspresją informacji genetycznej kontrolujących rozwój człowieka od zapłodnionego jaja do osoby dojrzałej. Szczególnie interesujące jest pytanie, dlaczego informacja genetyczna jest błędnie czytana, co prowadzi do wielu chorób, np. autoimmunologicznych czy nowotworowych. Celem medycznym jest opracowanie leków – regulatorów informacji genetycznej.

Osiągnięcie tych celów wymaga opracowania i wprowadzenia do badań bardziej nowoczesnych metod i urządzeń analitycznych oraz narzędzi biologii molekularnej niż te, które zostały opracowane do końca minionego wieku. Mówi się o automatycznych maszynach czytających informację zawartą w DNA z szybkością zbliżoną w jakimś stopniu do szybkości odczytu tej informacji w żywej komórce. Potrzebne są narzędzia i aparaty z obszaru nanotechnologii (nanobiotechnologii), które umożliwią molekularne wytwarzanie produktów w skali mierzonej w mikrometrach. Marzeniem biotechnologów są nowe procesy chemiczne oparte na projektowaniu i użyciu sztucznego DNA, nowe biomateriały, biokomputery, samoreprodukujące się układy (obiekty fizyczne).

Poszukiwanie i analiza subtelnych różnic genetycznych (polimorfizmu pojedynczych nukleotydów w określonych genach) ludzi, wchodzące w zakres farmakogenomiki, służą określaniu osobniczej podatności na choroby, różnic w metabolizmie leków u poszczególnych pacjentów oraz efektywności procesu leczenia. Określenie profilu genetycznego pacjenta może być w nadchodzącym wieku podstawą do indywidualnego postępowania leczniczego (*personalized medicine*) (33), wyboru optymalnego leku i proponowania najbardziej właściwych jego dawek. Badania te prowadzą również do koncepcji tworzenia leków dla konkretnych pacjentów (grup pacjentów).

Z jednej strony jest to kierunek bardzo kosztowny, z drugiej jednak istnieją już wcześniejsze dowody, że podział pacjentów chorych, np. na cukrzycę czy hipercho-



lesterolemię (obie choroby mają zróżnicowane podłoża genetyczne i metaboliczne) na subpopulacje jest uzasadniony, ponieważ umożliwia stosowanie zróżnicowanego postępowania leczniczego. Na różnice subpopulacyjne nakładają się oczywiście również różnice indywidualne, tzn. indywidualna reakcja pacjentów na ten sam lek, jego metabolizm, toksyczność i inne niepożądane działania uboczne u poszczególnych pacjentów.

Jak realizowane są nowe koncepcje w przemyśle farmaceutycznym? Pochodną rozwoju genomiki i farmakogenomiki są prace nad budową układów analitycznych zawierających sondy genetyczne (tzw. DNA-chipy), czyli zminiaturyzowane zestawy (mikromacierze) sekwencji oligonukleotydowych, komplementarnych do różnych wariantów wybranych fragmentów DNA pacjentów. W pierwszej kolejności mikromacierze DNA zostały wykorzystane do celów diagnostycznych\*, jednakże niemal równocześnie stały się także podstawą atrakcyjnej drogi poszukiwania nowych leków (*genomics-based drugs*) (34).

## 5. Nowy lek: znaleźć igłę w stogu siana

Szacuje się, że około 10% wprowadzanych obecnie leków jest wynikiem osiągnięć biologii molekularnej (są one określane jako *genome-based drugs*), natomiast 90% nowych substancji leczniczych nadal jest opracowanych metodą klasycznej syntezy chemicznej (leki te są określane jako *chemistry-based drugs*), przy czym najbardziej powszechnym podejściem jest selekcja leczniczych „kandydatów” wśród związków mających strukturę podobną do leków już stosowanych (*drug-like compounds*).

Nowoczesna strategia poszukiwania nowych leków syntetycznych, biosyntetycznych i naturalnych jest rozwijana przez wprowadzanie określonych reguł postępowania oraz kilkietapowej „filtracji” biblioteki struktur chemicznych, uwzględniającej korzystne i niekorzystne kryteria chemiczne (zasadniczy zrąb węglowy cząsteczki, pierścienie, grupy funkcyjne) i fizycznych (masa cząsteczkowa, NMR), w celu jak najwcześniejszej eliminacji możliwie dużej liczby słabo rokujących związków (37). Przykładem zaawansowanego „filtru” jest REOS (*Rapid Elimination of Swill*). Pozwala on na odrzucenie około 60% związków chemicznych już w pierwszym etapie. W kolejnych etapach eliminowanych jest od około 50 do około 90% struktur pozostających po poprzednim etapie do następnego przesiewania. W ten sposób, np. spośród około  $1,2 \times 10^6$  dostępnych komercyjnie związków chemicznych na końcu filtracji może pozostać około  $10^3$  substancji (ponad tysiąckrotna redukcja). Wyróż-

\* Tego typu mikromacierze umożliwiają szybką i bardzo precyzyjną diagnostykę molekularną niektórych chorób o podłożu genetycznym oraz nowotworowym. W podobny sposób możliwa jest również analiza, które odcinki DNA podlegają ekspresji w danym momencie (w czasie wykonywania analizy). Dostępne są już mikromacierze diagnostyczne na płytkach o wymiarach kilku cm<sup>2</sup>, pozwalające identyfikować ekspresję ponad 10 tys. genów równocześnie. Podobna propozycja dotyczy mikromacierzy polipeptydowych, które pozwalają na analizę ludzkiego proteomu.



nia się spośród ich struktur grupy związków o wielu cechach wspólnych lub podobnych. Do laboratoryjnych badań przesiewowych używa się jedynie „środkowych” przedstawicieli (*centroids*) najbardziej reprezentatywnych dla tych grup (35).

Doświadczalne testowanie biologicznej aktywności związków syntetycznych i pochodzenia naturalnego czy też otrzymywanych biotechnologicznie, przeszło pod koniec XX w. poważne przeobrażenie. Postęp technik preparatywnych i analitycznych oraz doskonalenie różnych nowych technologii laboratoryjnych, poznawanie mechanizmów działania leków i proponowanie określonych molekularnych miejsc uchwytu (receptorów) potencjalnych leków doprowadziły do opracowania w latach 90. bardzo szybkich i wydajnych testów przesiewania i testowania badanych związków chemicznych, określanych jako postępowanie HTS (*High Throughput Screening*) (7). Ich znamionami są: możliwość równoczesnego testowania dużej liczby prób, miniaturyzacja, mechanizacja i automatyzacja. Dokonał się zasadniczy przeskok, np. od testowania kolonii drobnoustrojowych (a właściwie wytwarzanych przez nie aktywnych bioproduktów) na płytkach Petriego zawierających kilkanaście ml pożywki do testowania miniaturowych próbek na płytkach plastikowych zawierających standardowo 96 studzienek (a następnie 384 studzienki), w których bada się próbki o objętości rzędu 100  $\mu$ l przy użyciu kilkuset nanomoli (albo kilkunastu czy kilkudziesięciu mg) substancji receptorowej.

Miniaturyzacja testów płytkowych doprowadziła na przełomie wieków do opracowania zagęszczonych mikroplitek zawierających powyżej 1500 mikrostudzienek mieszczących mniej niż 5  $\mu$ l reagentów. Obecnie są już dostępne mikroplátky z kilku tysiącami mikrostudzienek, mieszczącymi nawet mniej niż 1  $\mu$ l reagentów. W przypadku testów z komórkami mikrostudzienki mieszczą od 100 do 1000 komórek każda. Te najnowsze rozwiązania, wyposażone w bardzo precyzyjne zestawy pomiarowe, rozdzielające i pipetujące oraz bardzo czułe układy detekcyjne, są określane jako system uHTS (*ultra-High Throughput Screening*) (37). Pozwalają one na testowanie ponad 100 tys. próbek pikolitrowych dziennie. Całość wymaga dobrego opracowania elektronicznego i informatycznego; tylko wówczas jest bowiem możliwe praktyczne wykorzystanie wyników testów. Ważną sprawą jest również opracowywanie miniaturyzowanych testów do badania dużej liczby próbek w wielu kierunkach aktywności farmakologicznej oraz wybranych parametrów tych aktywności (selektywność, toksyczność czy zależność aktywności od dawki). Dokładne omówienie tych zagadnień i przykłady praktycznego użycia uHTS znajdzie Czytelnik w obszernej pracy Ashtona (38).

Poznanie ludzkiego genomu ma być źródłem leków nowej generacji (*genome-based drugs*). Szacuje się, że na kilkadziesiąt tysięcy genów ludzkich kilka tysięcy może mieć potencjalne powiązania z chorobami, z tego blisko połowa może być brana pod uwagę w poszukiwaniu leków jako miejsca uchwytu. Przewiduje się, że w najbliższym czasie końcowym wynikiem wykorzystania ludzkiego DNA do prac skrininowych (*gene-based drug-targeting*) może być jednak zaledwie kilkanaście, może kilkadziesiąt leków. Nowa strategia poszukiwania leków ma i będzie miała znacznie



szersze podstawy molekularne niż jedynie oparte na genomice; bez wątpienia równie ważną rolę odegra rozwój proteomiki, bowiem miejsca uchwytu mają najczęściej budowę białkową. Obecnie stosowane leki oddziałują terapeutycznie jedynie na około 400-500 białek ludzkich. Oczekuje się istnienia u człowieka 5-10 tys. potencjalnych białkowych miejsc uchwytu (32).

Genomika i proteomika, które pozwalają wykorzystać duże kolekcje informacji o genomie i proteomie człowieka i organizmów chorobotwórczych wyjaśniania kwestii biologicznych i medycznych, stają się dla przemysłu farmaceutycznego źródłem informacji pozwalającym na produkcję najbardziej nowoczesnych leków, a dla lekarzy – na opracowanie całkowicie nowych metod leczenia. Medycyna XX w. wykorzystywała mało- i średniocząsteczkowe związki chemiczne o masie od kilkuset do kilku tysięcy Da, głównie syntetyczne, i w mniejszym stopniu naturalne. Nowoczesne rozwiązania lecznicze są oparte na makrocząsteczkach – polipeptydach, białkach i kwasach nukleinowych (biofarmaceutykach o masie kilkudziesięciu tysięcy Da).

Drugim dynamicznie rozwijającym się kierunkiem współczesnej medycyny, opartym na biologii komórek i biotechnologii kultur komórkowych *in vitro* jest klonowanie komórek do celów farmaceutycznych, wytwarzanie tkanek *ex vivo* i biotechnologiczna medycyna regeneracyjna. Początek dały klasyczne już hormony peptydowe i przeciwciała monoklonalne (produkty przemysłu biofarmaceutycznego) oraz laboratoryjne ekwiwalenty skóry – produkty biotechnologicznych laboratoriów przyklinicznych lub niewielkich wyspecjalizowanych firm biotechnologicznych.

Nowa wiedza oraz nowe techniki molekularne, informatyczne i technologiczne rewolucjonizują medycynę i przemysł farmaceutyczny XXI w. rozszerzając zakres możliwości do wymiarów trudnych obecnie do ogarnięcia. Gdy dodamy do tego jeszcze możliwości jakie niesie ze sobą rozwój **metabolomiki** (biochemia dynamiczna małych cząsteczek w komórkach, całokształt szlaków metabolicznych) oraz **fizjomiiki** (współdziałanie systemu układów wielobiałkowych odpowiedzialnych za metabolizm i całościowe ujęcie procesów metabolicznych w tkankach, organach i organizmie oraz ostateczny efekt fenotypowy) wizja rozwoju medycyny i farmacji ma znamiona *science fiction*. Podejmowane są próby komputerowej symulacji szlaków metabolicznych, całokształtu procesów komórkowych oraz funkcjonowania organów i systemu organów (organizmu) przy użyciu modeli matematycznych. Fizjomiika ma na celu tworzenie ilościowego modelu fizjologii człowieka i opracowanie systemu komputerowej symulacji procesu chorobowego. Wizją tego kierunku biologii medycznej jest testowanie hipotez (hipotetycznych leków) w eksperymentach wirtualnych zanim przystąpi się do badań klinicznych (38).



## 6. Od substancji leczniczej do rejestracji leku; przemysł i rynek farmaceutyczny

W wyniku postępowania skringowego dokonany zostaje wybór substancji kandydującej do miana leku. Droga do stworzenia leku i służące temu procedury badawcze stają się od tego momentu jeszcze bardziej uciążliwe. Badania farmakologiczne i kliniczne jakie należy wykonać w celu uzyskania rejestracji leku mają na celu uzyskanie leku możliwie najwyższej jakości (sprawy te wykraczają poza merytoryczny przedmiot niniejszego opracowania).

Czas, jaki upływa od stwierdzenia aktywności farmakologicznej nowej substancji do rejestracji leku, wydłużył się w ostatnim ćwierćwieczu do ponad 10 lat, a zarazem zmniejszyła się liczba nowo wprowadzanych leków (39,40). Główne giganty przemysłu farmaceutycznego wprowadzają nowy lek nie częściej niż raz na 2-2,5 roku. Wynikiem tego była mała dynamika globalnej rejestracji nowych oryginalnych leków, która w ostatnim dwudziestolecu XX w. miała nawet tendencję spadkową – z około 50. rocznie w latach osiemdziesiątych do około 40. rocznie w latach dziewięćdziesiątych i tylko 30. w 2000 r. Na tym tle dynamika udziału biofarmaceutyków w nowo rejestrowanych lekach, chociaż zmienna, wykazuje wyraźną tendencję wzrostową – od kilku procent w drugiej połowie lat osiemdziesiątych do ponad 25% w roku 1998. Zaskoczeniem był spadek poniżej 10% w roku 2000 (39). Był to jednak spadek okresowy, wynikający m.in. z wydłużania się okresu badań farmakologicznych. W tym czasie w różnych fazach tych badań było jednak już blisko 400 nowych preparatów biotechnologicznych. Na przełomie wieków globalnie dostępnych było około 100 biofarmaceutyków (bez uwzględniania szczepionek); w fazie opracowywania nowych leków biofarmaceutyki stanowiły 11%. Szacuje się, że w obecnym dziesięcioleciu udział biofarmaceutyków w nowo rejestrowanych lekach osiągnie blisko 20%. Według najbardziej optymistycznych prognoz (nie akceptowanych jednak przez wszystkich ekspertów) przyjmuje się, że w przyszłości należy oczekiwać ustalenia się równowagi po 50% między tymi grupami leków (39). Na korzyść nowego podejścia przemawia m.in. bardzo krótki czas, od identyfikacji nowego miejsca uchwytu a rozpoczęciem prób klinicznych, nawet w granicach 6-9 miesięcy, podczas gdy postępowanie konwencjonalne wymaga kilku lat.

W ciągu ostatniego piętnastolecia średni czas wprowadzania (rejestracji) leku syntetycznego do lecznictwa światowego (511 leków) miał tendencję zwykłą z około 10 do około 12 lat. W tym okresie czas wprowadzania biofarmaceutyków do lecznictwa (47 leków) był wprawdzie początkowo znacznie niższy – 6-8 lat, ale pod koniec lat 90. również przekroczył 10 lat. W USA dla leków syntetycznych (290 leków) parametr ten oscyluje na poziomie 14 lat, podczas gdy dla biofarmaceutyków (27 leków), ponad 10 lat (w roku 1996 wyniósł nawet 12 lat). Amerykańskie biuro rejestracyjne FDA podjęło jednak w latach 90. poważne kroki w celu obniżenia czasu oczekiwania na rejestrację (po złożeniu kompletnej dokumentacji) w obu



omawianych grupach leków – uległ on obniżeniu z blisko 3 lat dla leków syntetycznych i nieco ponad 2 lata dla biofarmaceutyków w roku 1991 do niewiele ponad 1 rok w 1999 r. (40).

Interesujące jest porównanie dwóch grup producentów biofarmaceutyków – tradycyjnego (wielkiego) przemysłu farmaceutycznego oraz nowych (małych) firm biotechnologicznych. Pomimo że na opracowanie biofarmaceutyków nastawionych jest kilkaset firm biotechnologicznych, w nich też realizowana jest większość projektów badawczo-rozwojowych i z nich wywodzi się aż 3/4 zarejestrowanych produktów tej grupy, to jednak aż 70% rejestracji dokonały duże firmy farmaceutyczne. Dzieje się tak ponieważ niewiele firm biotechnologicznych dysponuje wystarczającymi zasobami finansowymi do przeprowadzenia badań klinicznych i prowadzenia marketingu bez partnera z przemysłu farmaceutycznego (40). Zmiana tej sytuacji na korzystniejszą dla firm biotechnologicznych zależy od zainteresowania zewnętrznych inwestorów sektorem biotechnologii farmaceutycznej.

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że wśród biofarmaceutyków wprowadzonych do lecznictwa w USA do roku 2000, aż 56% można zaliczyć do grupy leków przeznaczonych do leczenia chorób stosunkowo mało rozpowszechnionych (tzw. rzadkich). Leki tego typu należą do tzw. grupy „orphan” (leki sieroce), bowiem przeznaczone są dla populacji pacjentów liczących mniej niż 200 tys. osób. Kontrastuje z tym niski odsetek (tylko 14%) leków sierocych w grupie leków syntetycznych. Leki typu „orphan” mogą przynosić bardzo duże dochody, czego przykładem jest Cerezym amerykańskiej biotechnologicznej firmy Genzyme, stosowany w rzadkiej chorobie Gauchera typu I, którego światowa wartość sprzedaży w 1999 r. osiągnęła 500 mln USD (41).

Do najlepiej sprzedawanych leków typu „orphan” należał Epogen – erytopoetyna wyprodukowana przez biotechnologiczną firmę Amgen, która początkowo była przeznaczona tylko dla pacjentów z anemią wynikającą z ich dializowania z powodu uszkodzonych nerek, ale następnie została wprowadzona również do leczenia pacjentów z anemią spowodowaną chemioterapią nowotworów. W 1999 r. łączna sprzedaż Epogenu oraz innej erytopoetyny Procrit firmy Johnson and Johnson osiągnęła wartość 3 mld USD (42).

Pod koniec XX w. koszt wprowadzenia na rynek nowego leku wynosił 300-500 mln USD. Obecnie kształtuje się na poziomie od 400 (38) do 600 mln USD (41). W prezentacjach konferencyjnych mówi się już o 800 mln USD (42). Zadziwiający jest fakt, że to wszystko ma miejsce w czasie, kiedy molekularna wiedza o przyczynach chorób, miejscach uchwytu leków i mechanizmach procesów leczenia jest coraz większa, a technologia odkrywania nowych substancji aktywnych farmakologicznie coraz doskonalsza. Okazuje się, że postęp nauki i technologii nie przynosi efektów medycznych oczekiwanych przez społeczeństwo. Co więcej nowe leki są coraz droższe.

Nakłady na badania i rozwój (R&D) w zakresie nowych leków są coraz większe; w ciągu ostatnich dziesięciu lat wydatki globalne na ten cel wzrosły 6-krotnie



i w 2001 r. wyniosły ponad 35 mld USD\* (41). Oczekiwania społeczne są następujące: chcemy nowych, lepszych, bardziej bezpiecznych i tańszych leków. Uzyskiwane wyniki nie spełniają tych oczekiwań: nowe leki przebijają się do lecznictwa z trudem, i chociaż są lepsze, to jednak równocześnie droższe, a przemysł farmaceutyczny nie otrzymuje zysków jakich oczekuje w stosunku do poniesionych kosztów\*\*.

Zastanawiające są dane dotyczące łożenia zbędnych kosztów na badania kliniczne; z uwagi na problemy z rekrutacją ochotników do tych badań i wynikających z tego kłopotów ze spełnieniem wszystkich wymogów stawianych badaniom klinicznym. Szacuje się, że na rekrutację ochotników firmy farmaceutyczne tracą ok. 1 mld USD rocznie; w przeliczeniu na każdy dzień opóźnienia w rejestracji jednego leku 1,3 mln USD (41). Tradycyjnym sposobem rekrutacji ochotników jest ich pozyskiwanie przez lekarzy, a nie przez firmy farmaceutyczne. Proponuje się rekrutację internetową prowadzoną przez firmy, a następnie kierowanie ochotników do lekarzy uczestniczących w badaniach.

Zaledwie około 10% preparatów trafiających do badań klinicznych kończy pozytywnie testy, a następnie postępowanie rejestracyjne o dopuszczenie leku do użycia. 90% niepowodzeń sprawia, że przemysł farmaceutyczny jest zainteresowany wprowadzaniem nowych rozwiązań badawczych, które pozwoliłyby na podejmowanie ważnych decyzji o zarzuceniu lub kontynuacji badań możliwie jak najwcześniej.

## 7. Koncentracja i globalizacja biotechnologii farmaceutycznej

W przemyśle farmaceutycznym główną rolę w XX w. odgrywali potentaci amerykańscy: Abbot Laboratories, American Home Products Corp., Bristol Meyers Squibb Co., Eli Lilly & Co., Johnson & Johnson, Merck & Co., Pfizer Inc.; w Europie były to firmy: Beecham, Boehringer, Ciba-Geigy, Glaxo, Hoechst, Hoffman La Roche, ICI, Sandoz, Schering, Wellcome, Zeneca. Zdecydowanymi liderami w zakresie opraco-

\* Kwota obejmuje tylko dane dostępne oficjalnie.

\*\* Zdaniem autora duże znaczenie w tych relacjach mają trzy czynniki. Po pierwsze, nowa wiedza i nowoczesna technologia kosztują bardzo dużo (taka jest zawsze rynkowa cena nowości). Po drugie, koszty produkcji wzrastają przez konkurencyjne, nadmierne podwyższanie ceny, jaką się płaci za windowanie jakości przez farmaceutyczne giganty w celu całkowicie uzasadnionego, gruntownego przebadania nowych leków i zapewnienia bezpieczeństwa pacjentów, ale przy okazji eliminowania konkurencji mniejszych producentów na rynku leków. Na początku XXI w. pojawiła się opinia, że drugie miejsce w grupie firm wytwarzających określony produkt może okazać się niesatysfakcjonujące; firmy dążą zatem do zdobycia pozycji lidera na rynku. Znane są tego przykłady z innych gałęzi przemysłu, np. w zakresie sprzętu i oprogramowania komputerowego (IBM i MicroSoft) niestety z ujemnymi skutkami, jeżeli chodzi o jakość produktów tych firm. Po trzecie, olbrzymie kwoty pochłania marketing, który niestety został wypaczony. Wynika on z istnienia konkurencji rynkowej, a polega na zachęcającym dotarciu przez producenta do lekarzy i pacjentów. Zdaniem autora marketing leków, stając się walką o rynek, wyparł rzetelną informację o lekach. W roku 2001 globalny koszt marketingu wyniósł około 10 mld USD (41). Zapłacili pacjenci.



wań nowoczesnej biotechnologii farmaceutycznej były również firmy amerykańskie: Amgen Inc., Genentech Inc., Serono SA, Genzyme Corp., Ciron Corp. (44). Dominacja przemysłu farmaceutycznego USA w światowej produkcji biotechnologicznej jest przytłaczająca, a wynika to z wielkiej koncentracji kapitału w sektorze amerykańskiej biotechnologii farmaceutycznej. Europa (Unia Europejska) wytwarza jedynie 1/4 światowej produkcji tego sektora (globalna wartość rynkowa wynosi około 30 mld Euro). W UE dominujące miejsce przypada Wielkiej Brytanii, która ma 48 spośród 105. znaczących firm biofarmaceutycznych i wytwarza produkty o łącznej wartości 2 mld Euro. Obecnie do przejścia pierwszego miejsca w Europie przygotowuje się biotechnologia farmaceutyczna w Niemczech. Bardzo mocną pozycję w biotechnologii farmaceutycznej zajmuje Francja. Największą dynamiką rozwoju w tym zakresie wyróżnia się Irlandia.

Bardzo niekorzystnie kształtuje się porównanie wartości rynkowej (kapitału) firm biotechnologicznych USA i UE; jedna tylko (największa) amerykańska firma biotechnologiczna – Amgen osiągnęła poziom kapitalizacji rynkowej 70 mld Euro, prawie tyle samo co wszystkie firmy biotechnologiczne w UE. Jedynym rozwiązaniem dla europejskich firm biotechnologicznych w przemyśle farmaceutycznym stało się doinwestowanie, integracja i scalanie; niezbędne okazało się tworzenie struktur pan-europejskich, umożliwiających dobrą współpracę. W ostatnich latach XX w. powstały (głównie w Europie) nowe grupy (holdingi) – organizacyjne giganty finansowo-technologiczno-badawcze, takie jak: Aventis S.A. (Hoechst AG + Rhone-Poulenc S.A.), AstraZeneca, Glaxo-Wellcome, Novartis (Ciba-Geigy + Sandoz), Pfizer-Warner Lambert, SmithKline Beecham, Sanofi-Syntelabo, Glaxo-Wellcome. Jeden z największych europejskich holdingów – Aventis S.A. (powstały w 1999 r.) dysponuje olbrzymim potencjałem badawczym i innowacyjnym w tym zakresie. Zatrudnia około 95 tys. pracowników w ponad 120. krajach, a roczna wartość sprzedaży jego produktów przekracza 20 bilionów Euro. Grupa SmithKline Beecham była pod koniec XX w. światowym liderem w zakresie innowacji i patentowania w sektorze biotechnologii farmaceutycznej (ponad 120 patentów w roku 2000). W 2001 r. zaistniała nowa superfuzja gigantów Glaxo Wellcome – SmithKline Beecham.

Obserwuje się jeszcze inną formę współdziałania dużych firm. AstraZeneca PLC i Novartis AG zawarły porozumienie, na bazie którego połączono sektory Zeneca Agrochemicals and Novartis Agribusiness we wspólną firmę Syngenta działającą dla rolnictwa. Obie firmy macierzyste skoncentrowały się natomiast na produkcji farmaceutycznej. W grudniu 1999 r. Monsanto i Pharmacia & Upjohn utworzyły tymczasem wspólne przedsiębiorstwo w obszarze produkcji farmaceutycznej; Monsanto samodzielnie kontynuuje działania w obszarze agrobiznesu. Zmiany te były spowodowane częściowo odmienną oceną społeczną innowacji biotechnologicznych w farmacji i w rolnictwie, a częściowo brakiem oczekiwanego wcześniej wspomagania między tymi dwoma obszarami biotechnologii w jednej firmie.

Do koncentracji potencjału ekonomicznego, badawczego i produkcyjnego w określonym sektorze biotechnologii prowadzi również wykupywanie części działalności



niektórych dużych firm przez inne. Przykładem jest wykupienie przez Du Pont udziałów Mercka w produkcji farmaceutycznej, a przez Dow Chemical udziałów Eli Lilly w zakresie roślin transgenicznych i żywności produkowanej z wykorzystaniem osiągnięć inżynierii genetycznej.

Szczególne miejsce wśród potentatów naukowych i ekonomicznych zajmują firmy biotechnologiczne skoncentrowane na inżynierii genetycznej. Dwie największe to Amgene i Genentech. Liderem w zakresie innowacyjności jest założona w roku 1976 amerykańska firma Genentech Inc.; ma ona ponad 3600 przyznanych patentów (ponad 100 w roku 2000) i ponad 2600 zgłoszeń patentowych w toku. Europejskim liderem patentowania w dziedzinie inżynierii genetycznej jest drugi na światowej liście Instytut Pasteur – ponad 70 patentów z zakresu inżynierii genetycznej w roku 2000. Jego potencjał to 2700 pracowników w tym około 600 naukowców wizytujących z ponad 70. krajów.

W europejskim modelu koncentracji zakłada się ścisłą współpracę regionalną przez tworzenie bioparków czy bioregionów w poszczególnych krajach lub w obrębie państw sąsiadujących (45-47). W Angli utworzono *Golden Triangle* obejmujący potencjał biotechnologiczny, skoncentrowany w Cambridge, London i Oxford. Na szwedzkim obszarze wokół Lund i Malmö oraz w duńskiej strefie wokół Kopenhagi powstała tzw. *Medicon Valley* z zamiarem utworzenia w tym regionie Europy największego zagęszczenia firm biotechnologicznych i farmaceutycznych na świecie. Koncentracja potencjału istnieje również w sferze akademickich badań podstawowych i aplikacyjnych w zakresie biotechnologii. W Holandii przed kilkunastu laty powstało porozumienie *Biotechnological Sciences Delft Leiden* (BSDL) między Delft University of Technology, Leiden University i Wageningen University of Agriculture oraz Duch Organization for Applied Research. Wspólny bioregion ukierunkowany na przyszłe wdrożenia przemysłowe w „Biodolinie Górnego Renu” stworzyły uniwersytety w Bazylei (Szwajcaria), Freiburgu (Niemcy) i Strasburgu (Francja). Powstała również międzynarodowa sieć biotechnologiczna BioCon Valley propagująca współpracę państw regionu bałtyckiego.

Nowe gigafirmy i porozumienia między firmami dysponują tak dużym potencjałem, że decydują bez reszty o zasadniczych kierunkach rozwoju biotechnologii. Powstaje pytanie, czy we wszystkich kierunkach dyktat gigantów przyniesie im spodziewane zyski? Przecież przy nietrafionych decyzjach, niewłaściwej edukacji (lub braku edukacji) społeczeństw czy niedostatecznym potencjale nabywczym ludzi, niektóre produkty tych firm mogą nie zostać zaakceptowane (dopuszczone, kupowane) przez społeczeństwa i rządy państw. W mniejszym stopniu dotyczy to leków, w dużym natomiast rolnictwa i produkcji żywności. Małe i średnie firmy znalazły się pod silną presją gigantów; są od nich w mniejszym lub większym stopniu uzależnione i z trudem mogą realizować własną politykę technologiczną. Małe firmy biotechnologiczne mogą podejmować projekty badawczo-wdrożeniowe z założenia przeznaczone, np. dla gigantów farmaceutycznych lub też realizować własne programy na marginesie zainteresowań potentatów.



## 8. Zamiast zakończenia

Kompleksowość rynku i przemysłu farmaceutycznego (często łączy się produkcję farmaceutyczną z inną produkcją chemiczną, kosmetyczną, agrobiznesem i przemysłem spożywczym, doprowadziła do powstania tak wielkich i wielokierunkowych firm, że napotyka one na zasadnicze trudności organizacyjne. Trudności te rosną do nie spotykanych dotąd wymiarów po fuzji wcześniejszych gigantów, czego przykładem jest połączenie American Home Products i Monsanto w supergigant Filasco. Dotychczasowe metody zarządzania oraz przepływu informacji okazują się często w takich przypadkach niewystarczające. Poszukuje się zatem nowych rozwiązań w zarządzaniu informacją i zarządzaniu firmą. Bardziej praktycznym rozwiązaniem jest, jak się wydaje, tworzenie ponadfirmowych porozumień lub niepełnych fuzji w celu integracji w określonym sektorze rynku. Tak postąpiły Novartis AG i AstraZeneca, wyłączając swoje działy agrobiznesu we wspomniany już jeden wspólny organizm, Syngenta AG, i koncentrując się tylko na własnej produkcji farmaceutycznej. Postęp technologiczny i koncentracja kapitału wyprzedziły rozwój technologii zarządzania. Obserwujemy początek kolejnego etapu reorientacji i rekoncepcji kapitału i zarządzania w utworzonych niedawno supergigantach.

## Literatura

1. Chmiel A., (2000), *Biotechnologia*, 3(50), 118-140.
2. Chmiel A., (2000), *Farmacja Polska*, 56 (11), 515-530.
3. TIBTECH (1996) 14, 8, special issue on „Bioinformatics in the biopharmaceutical industry”.
4. Buehler L. K., (2002), *New Drugs*, 2 (2), 34-38.
5. *Nucleic Acid Research*, (1998), 26 (1), special issue on gene banks.
6. Bailey D., Zanders E., Dean P., (2001), *Nature Biotechnol.*, 19 (3), 207-209.
7. Norton R., (2001), *Drug Discovery Today*, 6 (4), 180-185.
8. *Drug Discovery Today*, (2001), 6 (12), supplement: High-Throughput Screening.
9. Chu A., (2001), *Gen. Engin. News*, 21 (7), 10, 13, 55, 99.
10. Lohmann R., Voss H., (2002), *New Drugs*, 2 (4), 46-48.
11. Walsh G., (2002), *New Drugs*, 2 (2), 26-32.
12. *Biotechnologia*, (1996), special issue dedicated to Japanese-Polish Symposium on Medical Applications of Molecular Biology.
13. Mountain A., (2000), *TIBTECH*, 18, 119-126.
14. Johnson I., (1983), *Science*, 219, 632-637.
15. Borowicz P., Jaromińska M., Karabin L., Płucienniczak A., (2001), *Terapia i Leki*, (3), 52-54.
16. Chmiel A., Grudzinski S., (1998), *Biotechnologia i chemia antybiotyków*, PWN, Warszawa.
17. Robers J. E., Speedie M. K., Tyler V. E., (1996), *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*, Williams and Wilkins, Baltimore.
18. Coleman R. S., (2001), *Angew. Chem.*, 40, 1736-1739.
19. Nicolaou K. C., Dai W.-M., Guy R. K., (1994), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33, 15-44.
20. Li W., Gu C., Zhang H., Awang D. V. C., Fitzloff J. F., Fong H. H. S., Breemen R. B., (2000), *Anal. Chem.*, 72 (21), 5417-5422.
21. Żurawska K. (red.), (2001), *Ziotolecznictwo amazońskie i andyjskie*, Tower press, Gdańsk.
22. Barra D., Simmaco M., (1995), *TIBTECH*, 13, 205-209.



23. Kelly K. J., (1996), *Nature Biotechnol.*, 14 (5), 587-590.
24. Fricker J., (2001), *Drug Discovery Today*, 6 (12) 603-604.
25. Chmiel A., (2002), *Farm. Pol.*, 58 (34), 103-110.
26. Ulbrich B., Wiesner W., Arens H., (1985), in: *Primary and secondary metabolism of plant cell cultures*, Eds. Neoman K. H., Barz W., Reinhard E., Springer-Verlag, Berlin, 293-303.
27. Rittershaus E., Ulrich J., Weiss A., Westphal K., (1988), *BioEngineering*, 2, (1), 8-10.
28. Dörnenburg H., Knorr D., (1995), *Enz. Microbial Technol.*, 17, 674-684.
29. Humphrey A. E., (1994), *Adv. Bioprocess Engin.*, Eds. Galindo E., Ramirez O. T., Kluwer Academic Publishers, 103-107.
30. A Trends Guide to Proteomics. A supplement to TIBTECH, (2001), 19 (10).
31. Smith I., (2001), *New Drugs*, 1 (3), 28-35.
32. Ernst & Yang., (2001), *Convergence. The Biotechnology Industry Report*.
33. Cantor C. R. C., (2000), *TIBTECH*, 18, 6-13.
34. Frost & Sullivan (2001), *New Drugs*, 1 (4), 30-34.
35. Lepre Ch. A., (2001), *Drug Discovery Today*, 6 (3), 133-140.
36. Wölcke J., Ullmann D., (2001), *Drug Discovery Today*, 6 (12), 637-646.
37. Matthews D. J., Kopczynski J., (2001), *Drug Discovery Today*, 6 (3), 141-149.
38. Ashton G., (2001), *Nature Biotechnol.*, 19 (4), 307-311.
39. Jain R. K., (2001), *Drug Discovery Today*, 6 (3), 131-132.
40. Anon., (2000), *Med. Ad. News*, May 2000, 56-60.
41. Drennan K. B., (2001), *Drug Discovery Today*, 6 (12), 597-599.
42. Gralinski M., (2000), *Bioforum III, Biotechnology usiness-science conference*, 20-21 May, Lodz.
43. Jiang Y., Wang Y., (200), *Drug Discovery Today*, 6 (12), 610-612.
44. Anon., (2001), *Ben. Engin. News*, 21 (12), 13.
45. Anon., (2002), *Biotech. International*, 14 (1), 10-13.
46. Anon., (2002), *Biotech. International*, 14 (3), 13-15.
47. Anon., (2002), *Biotech. International*, 14 (4), 22-26.