

Gyógyászati jelentőségű rekombináns DNS termékek előállítása

Géntechnikák 4. rész

Dr. Gruiz Katalin
Dr. Szvoboda György

Gyógyászati jelentőségű rekombináns DNS termékek előállítás

Maximálisan üzleti alapon zajlik a döntés meghozatala. Profitot kell hoznia az eljárásnak, ezért főleg nem a tudomány szépsége vezeti a döntéshozókat. A megfontolandó problémák és teendők az alábbiak:

1. Piaci helyzet felmérése

- betegállomány
- van-e már gyógyszer?
- ha van, akkor mennyivel jobb az rDNS termék, mint a meglévő? mennyi kell belőle?
- mennyibe kerül egy kezelés?

2. Biológiai problémák

- mérhető-e a hatás, az aktivitás (könnyen, in vitro vagy ex vivo rendszerben)
- mi az összefüggés a biológiai aktivitás és a szerkezet között? kiürülés sebessége (TPA!,)

3. Fehérje-kémiai problémák

- mennyire bonyolult a természetes térszerkezet kialakítása (-S-Shidak)?
- glikozilezett-e az anyag?
- érdemes-e fúziós fehérjét csinálni?
 - mennyire bonyolult a kinyerés, tisztítás?
 - egyáltalán: ANALITIKA

4. Genetika

- ismert-e a szekvencia?
- van-e bőséges mRNS forrás?
- a 3. pont alapján miben kell expresszálni?

5. Méretnagyítás GMP előírások!

- Biztonságtechnikai előírások betartása, PR munka

6. Gyógyszerbiztonsági vizsgálatok:

- GLP előírások betartása!

7. Formulázási kísérletek

8. Klinikai kísérletek, engedélyeztetés

Részletezés

1. Piaci helyzet felmérése

- betegállomány:
 - van-e elég sok beteg a világban (orphan státusz) kipróbálható-e gyorsan klinikán?
- van-e már gyógyszer?

szintetikus eredetű, egyéb természetes forrásból származó (sztreptokináz, lazac kalcitonin, oszteochin)

- ha van, akkor mennyivel jobb az rDNS termék, mint a meglevő?
mi az előnye? (specifikusabb hatás, kisebb mellékhatás
nincs fertőzésveszély (növekedési hormon probl.)
- mennyi kell belőle?
lényeges kérdés, hogy milyen mennyiséget kell előállítani (alfa1-antitripszinből
kanállal kellene a betegbe tölteni az anyagot)
- mennyibe kerül egy kezelés?
lényeges kérdés, hogy kifizetik-e a betegbiztosító cégek, lesz-e rá fizetőképesség
kereslet

Ez mind a tudományos orvosi marketing tevékenység témája

2. Biológiai problémák

- mérhető-e a hatás, aktivitás (könnyen, in vitro vagy ex vivo rendszerben)
- mi az összefüggés a biológiai aktivitás és a szerkezet között?
lehet-e változtatni a szerkezeten (gyakorlati célokból, a hatás elvesztése nélkül)
- kiürülés sebessége {TPA!, alfa1-antitripszin}
ez is sorolható a szerkezeti problémákhoz (glikozilezettség és kiürülési sebesség
összefüggése)

3. Fehérje-kémiai problémák

- mennyire bonyolult a természetes térszerkezet kialakítása (-S-S- hidak)?
TPA-nál szinte végtelen lehetőség, ebből csak egy jó
glikozilezett-e az anyag?
ha igen, jó-e az nekünk? (TPA, antitripszin, EPO) a glikozilezést miben lehet
megcsinálni (élesztő, emlős sejtvonalak, egyéb sejtek, pl. rovarvonalak,
baculovírus, tejelő állatok teje, stb.)
- érdemes-e fúziós fehérjét csinálni?
- mennyire bonyolult a kinyerés, tisztítás?
- analitika: van-e megfelelő módszer, érzékenység, szelektivitás, immunanalitika
(immunogén-e?)

4. Genetika

- ismert-e a szekvencia?
- van-e bőséges mRNS forrás?
- a 3. pont alapján miben kell expresszálni?

5. Méretnagyítás

- GMP előírások
- Biztonságtechnikai előírások betartása, PR munka

6. Gyógyszerbiztonsági vizsgálatok

- GLP előírások betartása!

7. Formulázási (gyógyszertechnológiai) kísérletek

- Posztranszlációs módosítások

- Natív forma előállítás
- Glikozilezettség
- Transzgénikus állatok teje

8. Klinikai kísérletek, engedélyeztetés

- Első fázis: kis létszámú (10–20 fő) nem beteg önkéntesen történő kipróbálás. Egyetlen kórházban. Célja: a gyógyszer farmakokinetikájának megismerése
- Második fázis: az első fázis sikeres lezárása után a szer kipróbálása betegeken. Kis létszámú (10–20), egyetlen kórházban, ahol GLP előírásoknak eleget tesznek. Cél: a szer gyógyító hatásának bizonyítása.
- Harmadik fázis: nagylétszámú betegen (100–1000) történő kipróbálás, legalább hat különböző kórházban. Kettős vak: sem a beteg, sem a kutató-orvos nem tudja, hogy ki kap szert és ki kap placebot. Cél: a szer jobb, mint az eddig alkalmazott szerek. Sikeres tesztelés után a szer beadható engedélyeztetésre.
- Negyedik fázis: piacra kerülés utáni vizsgálatok: a dózis pontosítása, mellékhatások összegyűjtése és a nem prognosztizált terápiás hatások.
-

Konkrét rekombináns termékek előállítása

A következő fejezetben három rekombináns termék: TPA, EPO, alfa1-antitripszin klónozásának részleteit ismertetjük szakirodalom alapján. Ezek a fehérjék emlős szervezetek hatóanyaga, génjük szerkezete bonyolult, gyógyszerként alkalmazhatóak.

TPA: humán szöveti plazminogén aktivátor

A fibrinolízis végső lépésében játszik szerepet: fibrin (fibrinrögök) jelenlétében specifikusan aktiválja a plazmint (plazminogén-plazmin átalakulást), ezáltal feloldja a fibrinrögöt. Rendkívül nagy jelentősége van az infarktuszos betegek kezelésében. Léteztek régebben is gyógyszerek erre a célra, de a TPA aktivitása sokkal specifikusabb, mint az urokinázé vagy a sztreptokinázé (pióca, méh). Aktivitása mérhető. Glikoprotein, és ez okozott, okoz problémákat a rekombináns termék tervezésében és előállításában.

Mérete: 527 aminosav, molekulásúlya kb. 70000 Dalton.

A májban termelődik, és a májban vannak olyan receptorok, amelyek pillanatok alatt kiszedik a vérből a bejuttatott TPA-t. Ezért sokat kell bejuttatni a szervezetbe, ennek következtében aspecifikus vérzéseket is okoz (katéteren keresztül kellene a röghez juttatni). A glikozilett formája aktív igazán, de a glikozilezés az okozója annak is, hogy gyorsan kiürül a szervezetből. A glikozilezés miatt emlős sejtvonalban kell előállítani. Olyan mutáns expressziós rendszerek (gazdák) kidolgozásán fáradoznak, amelyekből azok a glikozilezési helyek hiányoznak, amelyekről két feltételt vélnék igaznak: 1/ nem szükséges a biológiai aktivitáshoz; 2/ a májban levő receptorok ennek alapján szűrik ki a véráramból.

A termék előállításánál az is problémát jelent, hogy elég nehezen veszi fel a natív konformációt, a sok kénhidrátiós kombinációs lehetősége miatt. Nehéz tisztítani.

A fenti okok miatt drága egy kezelés (2500 USD körül).

Mivel nagy molekula, ezért nem érdemes fúziós fehérje formájában előállítani. A szekvenciája ma már természetesen ismert. A klinikai vizsgálatokat félbe kellett szakítani, mert maguk a vizsgálatot végző orvosok etikátlannak tartották, hogy a kontroll kezelést kapott betegek között mennyivel nagyobb a halálozási arány.

Alfa-1-antitripszin

Máj eredetű szérumban proteáz inhibitor, a véráramban található. A neutrofil elasztáz nevű enzim gátolja, amely a szerkezeti fehérjét hidralizálja. Alacsony szintje felborítja a tüdőben a proteáz-antiproteáz egyensúlyt, ennek következménye a krónikus tüdőemfizéma, Mérete: 394 aminosav, 53 000 dalton. Glikozilezve van

Gyerekeknél májbetegséget okozhat a rossz gén alfa-1-antitripszin gén. Kisebbségi betegség mint az α_1 -Z α_1 két molekulánál. Ezért az α_1 -Z α_1 gének az úgynevezett orphán drog státuszú folyamatok. Nagyon sok kell belé (2 mg/kg/perc infúzióban).

Elvi lépések

1. Az rDNS technikával feldúsítandó fehérje izolálása természetes forrásból
2. A fehérje egy-két része aminosav szekvenciájának meghatározása
3. Az aminosav szekvencia alapján oligonukleotidok szintézise (degeneráció!)
4. mRNS izolálás (ha lehet, maximálisan dúsítva a kívánt mRNS-ben)
5. Antitest készítés az izolált fehérjével, mérési, kimutatási eljárás kidolgozása
6. Innen több variáció létezik
 - mRNS frakcionálás, karmosbéka pete vizsgálat
 - cDNS klóntár készítés, majd hibridizálás a próbával
 - differenciál-hibridizálás
 - genomális gén izolálása
 - gén izolálása PCR-rel
7. Az izolált gén klónozása a lehető legegyszerűbb, legstabilabb szerkezetű plazmidban (pl. pBR322).
8. Az α_1 -Z α_1 ismeretek alapján kiválasztjuk azt a rendszert, amelyben expresszálni akarunk, majd annak megfelelő expressziós vektort készítünk (szubklónozás).
9. Expressziós kísérletek, ezek alapján a gén esetleges módosítása
10. Előállítás nagy mennyiségben (GMP, rDNS környezetvédelem)
11. Preklinikai vizsgálatok (GLP!) (milyen állatban, milyen módszerrel, mi a hatás véleménye; case by case alapon döntenek még az USA-ban is)
12. Klinikai vizsgálatok, gyógyszerforma kidolgozása

EPO: Eritropoietin

Erythropoietin glikozilezett fehérje, az eritrociták termelését szabályozza. A felnőtt emberek veséjében keletkezik. A veseproblémák miatt fellépő vérszegénység igen gyakran a lecsökkent EPO szint következménye. Nagyjelentős alkalmazási területe a művesekezelést kapott betegek, akiknek a kezelés vérszegénységet okoz. Molekulásúlya 35 000 dalton. Ebből a 166 aminosavból álló polipeptid lánc 18800 dalton. A többi cukorszármazék. Csak a glikozilezett forma aktív, és a felezési ideje is sokkal hosszabb (proteolitikus bomlást megakadályozza), és az sem mindegy, hogy milyen emlős sejtvonalban állítják elő, mert csak az N-glikozilezés helye (Asn-XSer/Thr) állandó, de az nem, hogy erre egyes sejtek milyen cukorszármazékot aggnak. Ez is drága molekula.

ERITROPOIETIN előállítása

1. EPO tisztítás, monoklonális antitest készítés

Vizeletből tisztítottak EPO-t (korlátozott mennyiségben, nem is túl tiszta állapotban), majd megpróbálták immunizálni vele. Gyenge immunogén! Kevés állat reagált rá. Nehezen tudtak hibridóma sejtet készíteni vele, de végül sikerült. Lehet tisztítani, mérni az EPO-t.

2. Klónozás, expresszió

Négy különböző cég (NYU School of Medicine, Amgen, Genetics Institute, Kyoto Egyetem) négy különböző megoldással klónozte a gént.

1. NYU School of Medicine

a/ mRNS izolálás magas EPO tartalmú vesetumorszövetből, *in vitro* transláció nyúl retikulocita lizátumban, immunprecipitáció antitesttel

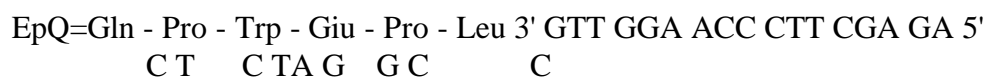
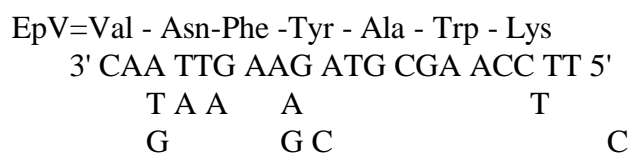
b/ az izolált mRNS-ből cDNS könyvtár készítés (E. coli-ban), hibridizáció az *in vitro* transláció és méret alapján szelektált mRNS frakcióival

c/ gyanús pBR322 b-laktamáz-EPO fúziós fehérje készítés, amit EPO monoklonális antitesttel ki lehetett mutatni

2. Amgen

a/ EPO tisztítás vizeletből, triptikus emésztés, aminosav szekvenálás.

b/ próbakeverék készítés kémiai DNS szintézissel.



Két db 128 tagú oligonukleotid keverék

c/ Humán genomiális DNS-ből lambda fágban készítettek könyvtárat, majd a tarfoltokat (1 500 000) a próbakeverékekkel hibridizálták. Csak 4 tarfolt hibridizált mindkét próbával. Kiválasztották azt, amely a komplett EPO gént tartalmazta.

d/ pDVSL nevű vektorba klónozták az EPO gént (dihidrofolát reduktáz marker), 5V40 későbbi promotor mögé, CHO sejtben expresszálták.

e/ megadták a gén szekvenciáját, szerkezetét.

3. Genetics Institute

a/ EPO tisztítás (10 mg), triptikus emésztés, szekvenálás b/ Másik két oligonukleotid próbakeverék készítés (17 tagú, 32-szeres degeneráltság, 18 tagú, 128-szoros degeneráltság).

c/ genomiális lambda könyvtár készítés, azt a klónt választják, amely mindegyik próbával hibridizál (DNS szekvenálás).

d/ a genomiális klónnal végzett hibridizálással egy kb 1600 bázis méretű mRNS-t izoláltak, illetve cDNS könyvtárból izolálták a megfelelő cDNS-t.

e/ a cDNS-t is expresszálni lehetett COS sejtekben, EPO aktivitás keletkezésével.

f/ a kimutatást monoklonális antitestekkel végezték.

g/ a keletkező termék molekuláris súlyát gélelektroforézissel ellenőrizték, ebből kiderült, hogy glikozilezett termék keletkezett.

4. Kyoto egyetem

Ők már ismerték az elődök munkáját!

a/ Triptikus EPO peptideket készítettek, de csak egyetlen 30 tagú oligóval vizsgálták át egy magzati májból származó lambda klóntárat. Három pozitív tarfoltot kaptak.

b/ a vektor egy long terminal repeat-et tartalmaz transzkripciós promoterként, majd a Tn5 transzpozonból származó Neo gént (G418 rezisztencia alapján lehet a transzformánsokat szelektálni).

c/ BHK és 3T3 sejtekben expresszálták.

d/ immunaffinitás-kromatográfiával tisztították az EPO-t, nagy tisztaságban, jó kinyeréssel.

e/ a két sejtvonalban termelt EPO-nak azonos az aminosav szekvenciája, de más a molekuláris súlya és az aktivitása, jelezve, hogy a glikozilezettségben eltréne. Megállapították, hogy ha csökken a cukorrész szénhidrát tartalma, akkor nő az in vitro mérhető aktivitás.

5. Hogyan csinálnánk ma?

Az ismert szekvencia alapján a gén két végéről oligo szintézis (az oligók restriktációs hasítási helyeket is tartalmaznak a klónozáshoz).

mRNS tisztítás

PCR

Klónozás klónozó vektorba

Szubklónozás expressziós vektorba

Helyspecifikus mutagenézis az expresszió maximalizálására

Expresszió emlős sejtvonalban (egészen 20³-ben)

Tisztítás immunaffinitás vagy biomimetikus kromatográfiával

Preklinikai és klinikai vizsgálatok, regisztráció

Tartalom

Gyógyászati jelentőségű rekombináns DNS termékek előállítása.....	1
Gyógyászati jelentőségű rekombináns DNS termékek előállítása	2
Részletezés	2
1. Piaci helyzet felmérése	2
2. Biológiai problémák.....	3
3. Fehérje-kémiai problémák	3
4. Genetika	3
5. Méretnagyítás	3
6. Gyógyszerbiztonsági vizsgálatok.....	3
7. Formulázási (gyógyszertechnológiai) kísérletek.....	3
8. Klinikai kísérletek, engedélyeztetés	4
Konkrét rekombináns termékek előállítása	4
TPA: humán szöveti plazminogén aktivátor	4
Alfa-1-antitripszin.....	5
EPO: Eritropoietin.....	5
ERITROPOIETIN előállítása.....	6
1. EPO tisztítás, monoklonális antitest készítés	6
2. Klónozás, expresszió	6
1. NYU School of Medicine.....	6
2. Amgen.....	6
3. Genetics Institute.....	6
4. Kyoto egyetem	7
5. Hogyan csinálnánk ma?.....	7