

# **Kereskedelmi forgalomban lévő rekombináns gyógyszerkészítmények**

Írta: Barta Zsolt

Biomérnök hallgató

2007

# Tartalomjegyzék

1	Rekombináns inzulin [1] .....	3
2	A humán növekedési hormon rekombináns módon történő előállításának két útja [1] .....	5
2.1	Intracelluláris termék.....	5
2.2	Extracelluláris termék .....	5
3	Erősebben kötődő növekedési hormon variánsok szelekciója fág bemutatással (phage display) [1] .....	7
4	A hepatitis B elleni vakcina [1].....	9
5	Komplex humán fehérjék ipari léptékű termelése emlős szövettenyészetekben [1].....	11
6	Az eritropoetin (EPO) [1].....	13
7	Egyéb <i>E. coliba</i> vagy élesztőbe klónozott humán gének [3].....	15
8	Irodalom .....	15

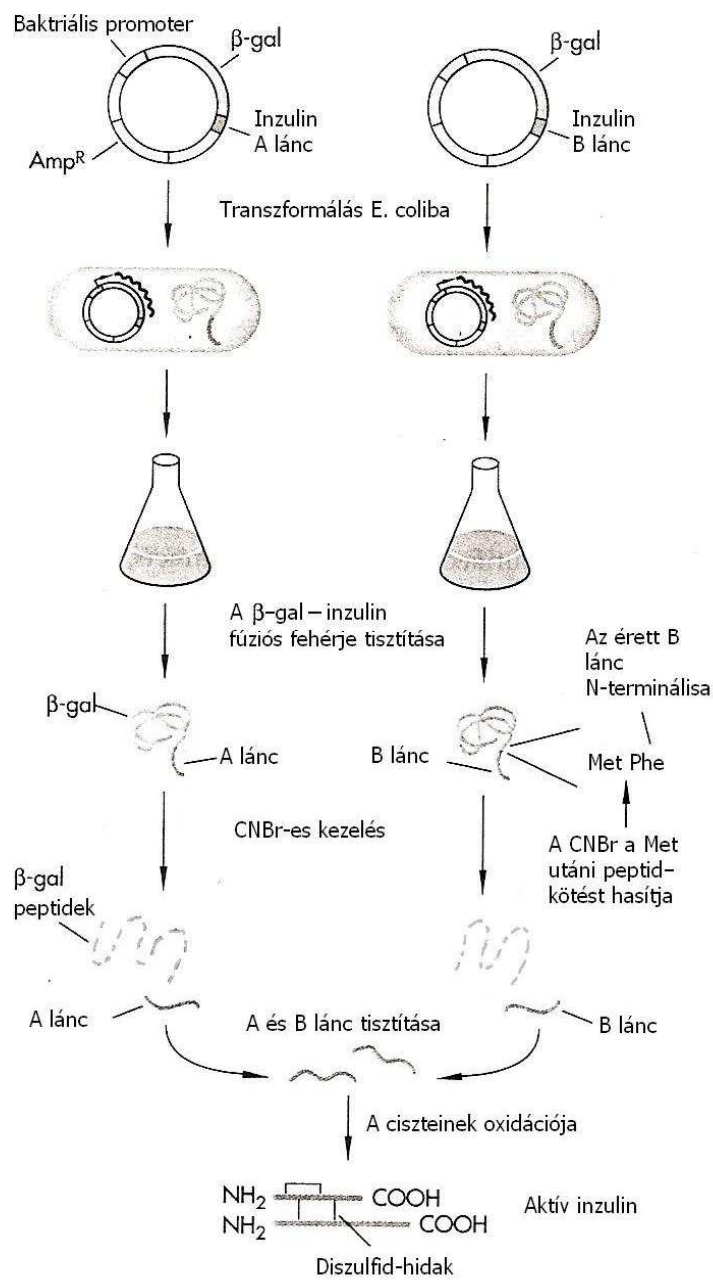
# 1 Rekombináns inzulin [1]

Az első engedélyezett rekombináns humán gyógyszerkészítmény az inzulin volt. Az inzulin a szénhidrát metabolizmusban résztvevő hormon, mely a hasnyálmirigyben termelődik, ahonnan aztán a vérbe kerül. Ha a hasnyálmirigy nem képes inzulin termelésre, az cukorbetegséget eredményez, mely inzulin adagolással orvosolható. A rekombináns úton történő termelés előtt a hormont disznók és tehének hasnyálmirigyéből nyerték. Bár ezen állatok inzulinja biológiailag aktív az emberben, aminosav sorrendje nem azonos az emberiével. Ez néhány betegben antitest termelődést váltott ki, mely akár súlyos immunreakcióhoz is vezethetett. Mivel a rekombináns inzulin azonos a nem cukorbeteg emberben termelődővel, az immunreakciót nem vált ki.

Emlősökben az inzulin *prepro-hormonként* termelődik, mely a plazmamembránon át kerül kiválasztásra. A *prepro* forma olyan aminosavakat is tartalmaz, melyek nincsenek jelen az érett hormonban. A *pre* szekvencia az N-terminális végen található, és a fehérje kiválasztásában van szerepe, míg a *pro* szakasz a fehérje közepén helyezkedik el, és a polipeptid lánc végső szerkezetének kialakításához, azaz a megfelelő csomagoláshoz szükséges. A kiválasztás és csomagolás alatt a *prepro* formából érett hormon lesz, létrejön a diszulfid-hidakkal kapcsolt szerkezet, mely egy A és egy B láncot tartalmaz. A polipeptid lánc darabolását proteázok végzik. A rekombináns inzulintermelés megvalósításának fő problémája ennek az érett formának a kialakítása volt. Az első megközelítésben olyan DNS szakaszokat szintetizáltak, melyek külön tartalmazták az A illetve a B lánc oligonukleotidjait (a komplementer szálakat is megszintetizálták). Ezeket külön-külön expressziós vektorokba ligálták, úgy, hogy az inzulin szakasz a  $\beta$ -galaktozidáz ( $\beta$ -gal) enzim génjéhez kapcsolódott és közöttük egy metionin kód volt (1. ábra). Az expressziós vektorokat *Escherichia coli*-ba transzformálták, melyek intracellulárisan választották ki a  $\beta$ -gal – inzulin fehérjét. Mivel az inzulin nem glükoprotein, az *E. coli* képes a megfelelően működő molekula termelésére (az *E. Colival* előállított hormon márkaneve a Humulin, míg az élesztő eredetűé Novolin). A sejteket feltárták, majd a fehérjéket tisztították, majd CNBr-os kezelésnek vetették alá, mely a metioninok után hasít, így az inzulin lehasadt a  $\beta$ -galaktozidázzal. Mivel az inzulin nem tartalmaz metionint, így nem darabolódott föl, ellentétben a  $\beta$ -galaktozidázzal, mely több darabra esett szét. A kapott A és B láncokat tovább tisztították, majd összekeverték, és oxidációval kialakították a diszulfid-hidakat tartalmazó biológiailag aktív vegyületet. A

módszert finomították, azzal, hogy egy fúziós fehérje tartalmazta mind a két láncot és a  $\beta$ -galaktozidázt is, melyből hasítással egyből az érett hormon nyerték. Ma az utóbbihoz hasonló módon állítják a kereskedelmi forgalomban lévő rekombináns inzulint.

A rekombináns DNS technológia lehetővé tette a természetestől kissé eltérő humán inzulin gyártását. A Humalog® és NovoLog® gyorsabban, a Lantus® lassabban dolgozik, mint a természetes hormon.



1. ábra Rekombináns humán inzulin termelése *E. Coliban*

## 2 A humán növekedési hormon rekombináns módon történő előállításának két útja [1]

A 191 aminosavat tartalmazó humán növekedési hormont (hGH – human growth hormon) az agyalapi mirigy (hipofízis) választja ki, és a növekedést valamint a fejlődést szabályozza. Azok a gyerekek, akik növekedési hormon elégtelenségben szenvedtek, nem fejlődtek rendesen. Rendszeresen adott injekciókkal ezen gyerekek azonban közel normális fejlődést mutatnak. Sajnos az inzulinnal ellentétben az állati növekedési hormonok hatástalanok az emberben, így a hormont sokáig halottak agyalapi mirigyéből vonták ki, mely gyakran fertőzéssel járt. A rekombináns technikának köszönhetően a hormon biztonságosan, elegendő mennyiségben áll rendelkezésre.

A hGH-termelésre két utat dolgoztak ki (2. ábra). Az egyiknél intracelluláris terméket kapnak (a), mely soklépéses tisztítást igényel, a másiknál extracellulárisat (b), mely jóval könnyebben tisztítható. A két termék egymástól eltérő, ugyanis első esetben a polipeptid lánc N-terminálisán egy extra metionin található, míg a másodikban ez hiányzik (Met nélküli hGH). A természetes hGH szekvencia az utóbbival egyező.

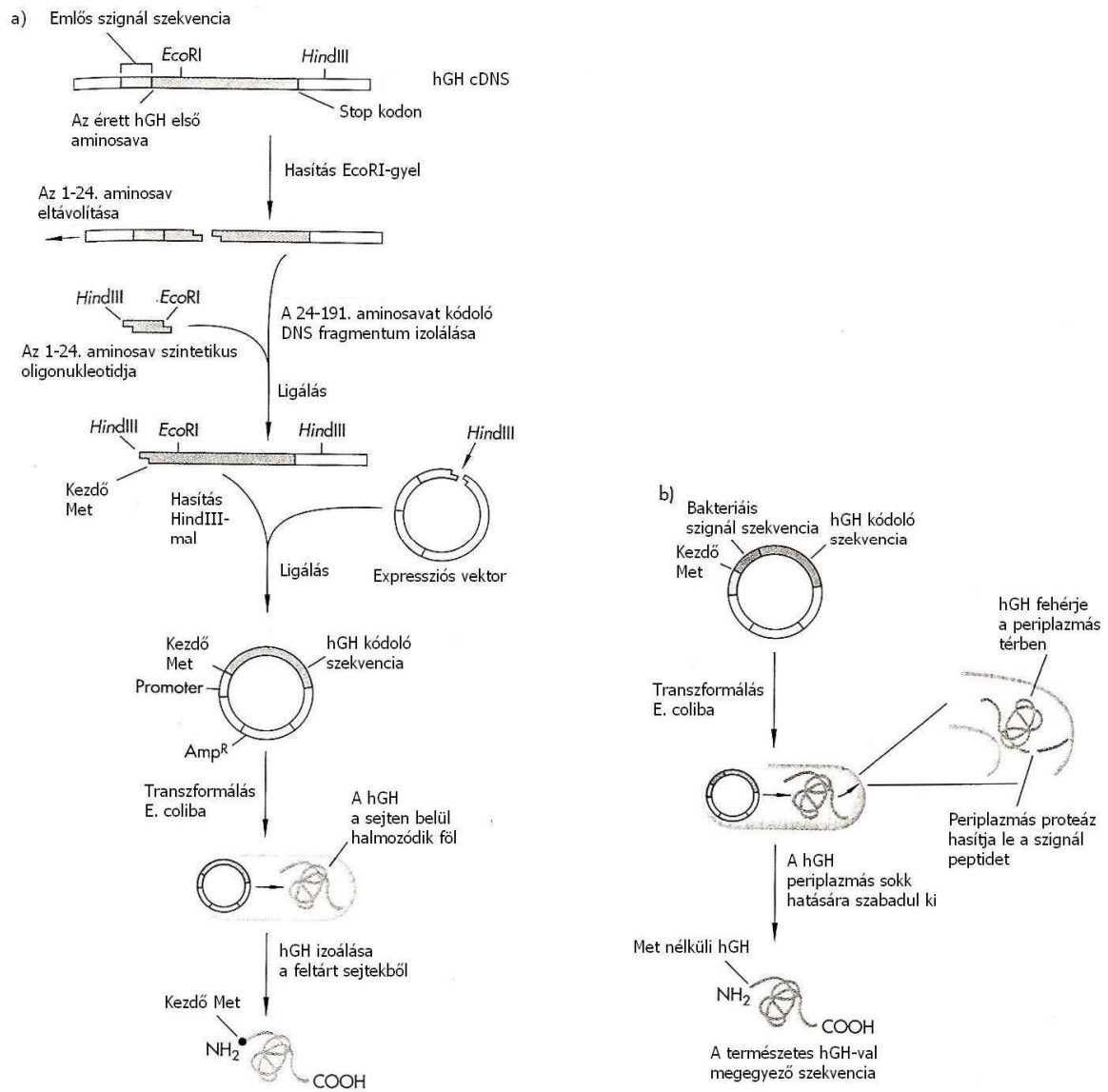
### 2.1 Intracelluláris termék

Az expressziós vektort úgy készítették, hogy a hGH cDNS-éből olyan DNS szakaszt izoláltak, mely 24-től 191-ig tartalmazza az aminosav kódokat. Ehhez egy szintetikusán előállított oligonukleotidot illesztettek, mely az 1-24. aminosavat kódolja, és a kapott *pre-hormont* együtt ligálták a vektorba. Erre azért volt szükség, mert a cDNS az érett hGH 1. aminosavjának kódja előtt humán szignál szekvenciát tartalmaz, melyet a bakteriális kiválasztó rendszer nem ismer föl, így azt el kellett távolítani.

### 2.2 Extracelluláris termék

Ahhoz, hogy a terméket a baktériumsejt kiválassza, bakteriális szignál szekvenciával kell rendelkeznie a fehérjének. Mivel a szignál szekvencia a kezdő metionin és a hGH közé kerül, a termék a szignál szakasz lehasítása után nem fogja tartalmazni a kezdő metionint. Miután a fehérje a periplazmális térbe (külső és a belső membrán közötti tér) került, a szignál szekvenciát egy periplazmális proteáz vágja le. Mivel a hormon a külső membránon nem képes

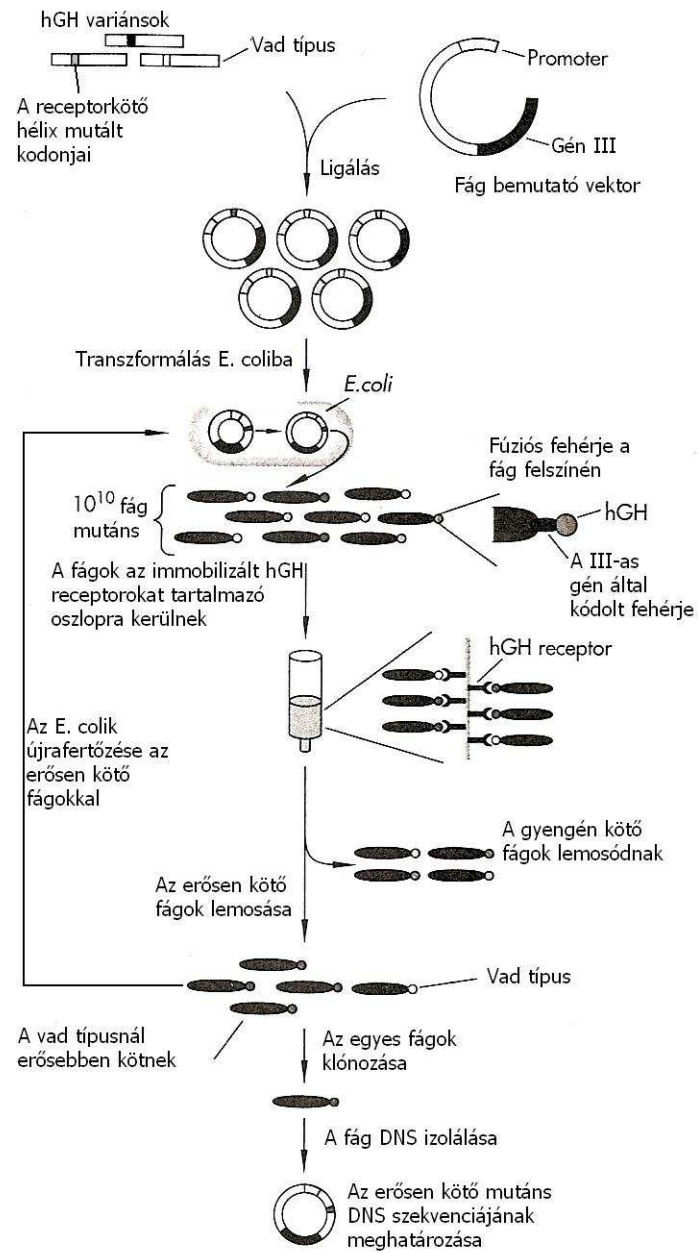
átjutni, a periplazmás térben feldúsul, ahonnan a külső membrán hipotóniás roncsolásával nyerhető ki.



**2. ábra** Rekombináns humán növekedési hormon (hGH) termelése *E. coliban*

### 3 Erősebben kötődő növekedési hormon variánsok szelekciója fág bemutatással (phage display) [1]

A hGH szerkezeti vizsgálataiból ismert volt a szekvencia azon része, mely a receptorhoz való kötődésben szerepet játszik. Degenerált oligonukleotidokat szintetizáltak, melyek kódolják az összes lehetséges aminosav sorrendet a kérdéses szakaszon (3. ábra). Ezeket az oligonukleotidokat a természetes szakasz helyébe ligálták, mellyel hGH variánsokat nyertek. A random módon mutált hGH cDNS könyvtárat M13-alapú fágmid vektorokba ligálták úgy, hogy a hGH variánsokat a promoter és az M13 III-as génje közé illesztették. A fágmid vektor emellett bakteriális origót, M13 origó/pakoló szignált, szelekciós markereket és multiklónozó helyet is tartalmaz. A III-as gén a fág burokfehérjéjének C-terminális domainjét kódolja. Az N-terminális hGH variáns fehérjék és a C-terminális domain együtt egy fúziós fehérjét alkot, mely a fág felszínén található, és a III-as gén fehérjeje mintegy prezentálja a hGH variánsokat. A fágmid könyvtárat *E. coli*-ba transzformálták, és az ampicillin rezisztencia alapján szelektáltak (mivel a fágmid ampicillin szelekciós markert tartalmazott, csak a fágmidot tartalmazó baktériumok tudtak növekedni ampicillin jelenlétében). Mivel a fág kétféle módon viselkedhet attól függően, hogy van-e jelen helper fág – helper fág nélkül kétszálú plazmidként szaporodik, illetve M13 helper fággal felülfertőzve a fágmid egyszálú DNS-e burokfehérjébe pakolva „álruhában”, fertőzőképes fágként lép ki a sejtből –, ezért ahhoz, hogy utóbbi valósuljon meg a transzformánsokat felülfertőzték. Azonban a fágok 1-10%-a tartalmazta a fúziós fehérjét, és ezek mindössze egy fúziós molekulát prezentáltak fágokként. A fágokat olyan oszlopra vitték, melynek töltete kovalensen kötött hGH receptorokat tartalmazott, így el tudták választani a nem és gyengén kötő fágokat az erősen kötőektől. Az erősen kötődő fágokkal az *E. coli*-kat újra megfertőzték. A folyamatot hatszor ismételték meg, és így kivételesen nagy affinitást mutató hGH variánsokat kaptak, melyeket aztán klónoztak, közvetlenül mérték az affinitásukat, és meghatározták a cDNS szekvenciájukat. Ezek között az egyik 10-szer nagyobb affinitást mutatott mint a természetes. Miután egy másik, szintén megnövekedett kötődést mutató variáns – melynek a módosított aminosav helyei különböztek – alapján átszabták a szekvenciát, az így kapott variáns már 50-szeres növekedést mutatott.



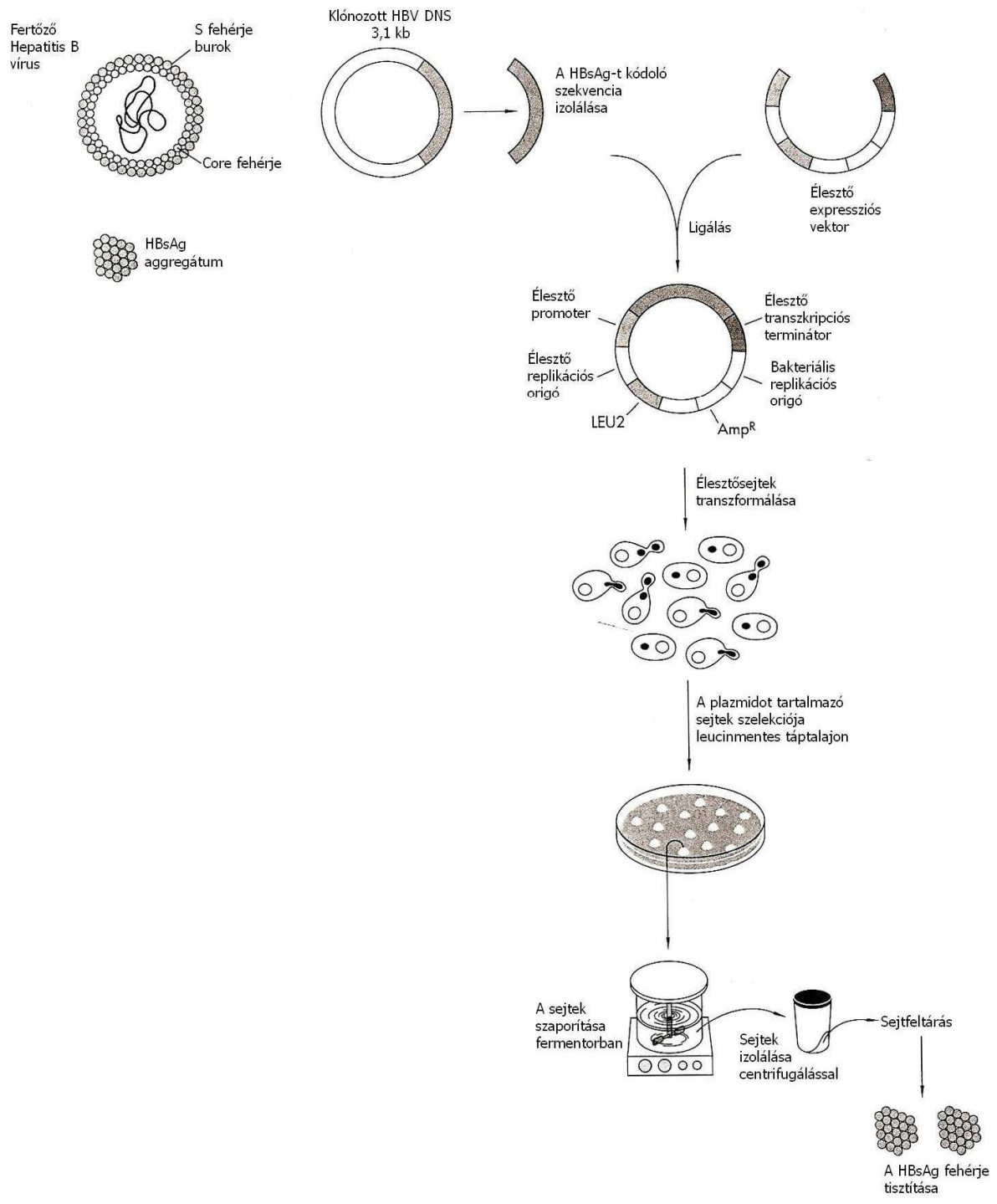
3. ábra Peptidok és fehérjék expressziója fonal fág felszínén



## 4 A hepatitis B elleni vakcina [1]

A modern orvostudomány egyik nagy vívmánya a fertőző betegségek elleni vakcinák használata. A rekombináns DNS technológia kifejlesztése előtt a vakcináknak két típusát alkalmazták: inaktivált és attenuált vakcinákat. Az előbbiek az elölt kórokozó származékait tartalmazzák, utóbbiak olyan élő mikroorganizmusokat, melyek az eredetiétől annyiban különböznek, hogy fertőzni már nem képesek. Mindkettő antigént – felszíni fehérjét – prezentál a T- és B-limfocitáknak. Nagy hátrányuk, hogy néha a fertőző mikroorganizmus is jelen van bennük. A rekombináns úton előállított alegység vakcinák csak az antigént tartalmazzák, így teljesen kockázatmentesek.

Az első alegység vakcina a hepatitis B vírus (HBV) elleni vakcina volt. A HBV a májat károsítja, és néhány esetben rákot okoz. A vírus fehérjeburkát a szervezet felszíni antigénként ismeri föl (HBsAg). Ez a fehérje a fertőzöttek vérében kétféle formában van jelen: aggregátumokban, és a vírus burkaként. Korábbi kísérletek azt mutatták, hogy vakcinaként ezeket az aggregátumokat lehetne használni, azonban gondot jelentett a nagy mennyiségben történő előállítás, mivel a HBV *in vitro* nehezen szaporítható. A problémát a HBsAg gén expressziós vektorba történő klónozásával oldották meg (a gént az alkohol-dehidrogenáz enzim génjének erős promotere és a transzkripció terminátor szekvencia közé ligálták, a vektor ezen kívül tartalmazott még bakteriális valamint élesztő replikációs origókat és markereket) (4. ábra). Ehhez először izolálták a gént a 3,2 kb méretű genomból. Az expressziós vektort *Saccharomyces cerevisiae*-be transzformálták, mivel *E. coli*-t nem találtak megfelelőnek a HBsAg termelésére. A transzformált élesztők nagy mennyiségben termelik a HBsAg-t, ipari léptékű fermentorokban szaporítva őket 50-100 mg fehérjét termelnek kultúra literenként (a HBsAg az élesztőfehérjék 1-2%-át teszi ki). A tisztítás után kapott fehérje 20 nanométer átmérőjű aggregátumokat képez, mely hasonló a fertőzöttek vérében jelen lévőkhöz.



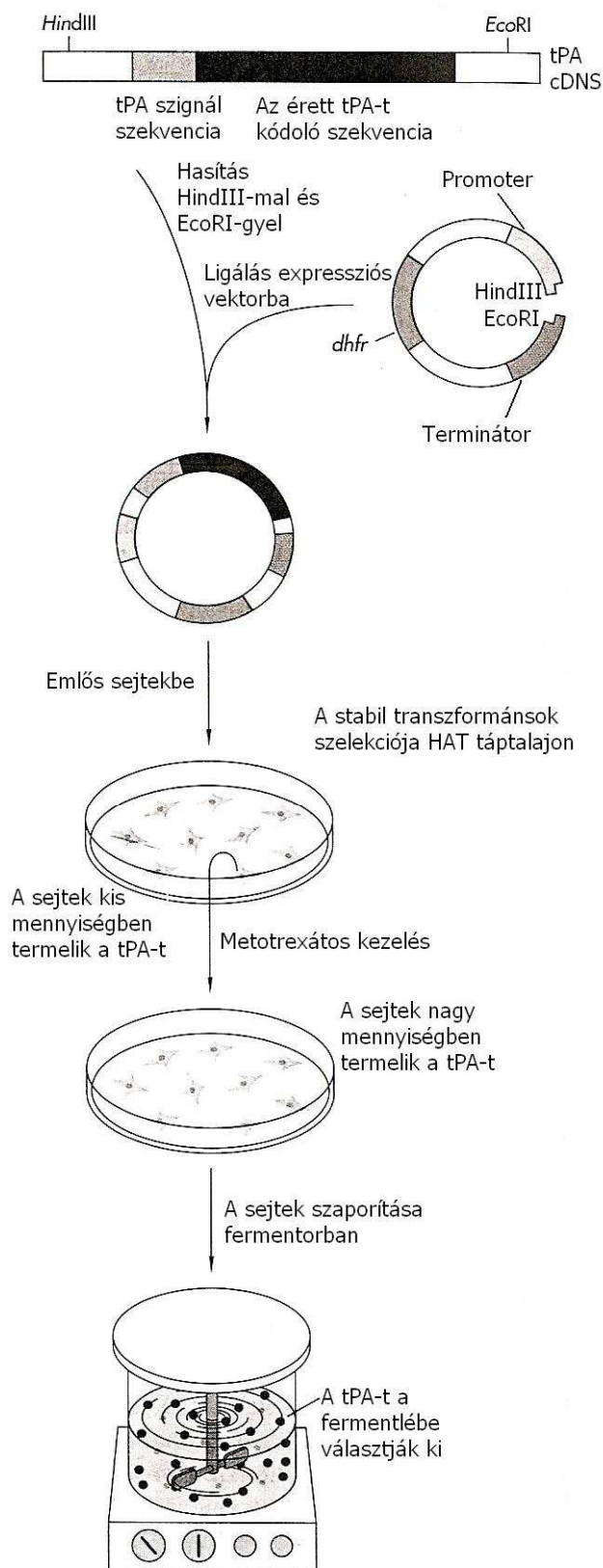
**4. ábra** Hepatitis B elleni alegység vakcina termelése

## 5 Komplex humán fehérjék ipari léptékű termelése emlős szövettenyészetekben [1]

Baktériumokban és élesztőkben csak kis méretű és egyszerű fehérjék termelhetők. A bonyolultabb szerkezetű biológiailag aktív fehérjék termelése emlős szövettenyészetekben folyik, annak ellenére, hogy az emlős sejtek ipari léptékű fermentorokban történő szaporítása nehéz és költséges.

Az első kereskedelmi gyógyszerkészítmény, melyet emlős szövettenyészetben állítottak elő, a szöveti plazminogén aktivátor (tPA – tissue plasminogen activator) volt. A tPA olyan proteáz, mely az inaktív plazminogént – a plazmin prekursorát – hasítja és ezzel aktív plazmint képez, amely a véralvadást okozó fibrin proteáza, azaz oldja a fibrinszálakat. Infarktus után azonnal adva a vérrögképződés megelőzhető. A vérrögök a szívbe kerülve a szívizmot károsítják, amely halálos lehet. A tPA cDNS-ét egy erős promotert tartalmazó vektorba klónozták, melyet emlős sejtvonalba juttattak be, és azt HAT (Hipoxantin Aminopterin Timidin) táptalajon szaporították (5. ábra). Mivel a kezdeti transzformánsok csak kis mennyiségben termelték a fehérjét, azokat metotrexátos kezelésnek vetették alá, melynek következtében csak a multikópiás sejtek maradtak életben (a vektor a *dhfr* gént is tartalmazta, amely szelekciós marker metotrexát esetén), így ezzel föl tudták erősíteni a tPA termelést.

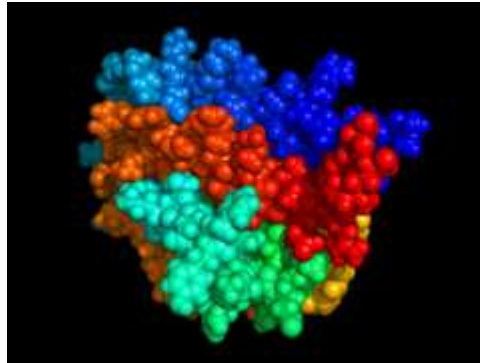
Emlős szövetek termelik a véralvadásban kulcsszereppel bíró VIII-as faktort is. Hiánya vérzékenységet (A típusú hemofíliát) okoz. A VIII-as faktort sokáig az emberi vérből tisztították, azonban a HIV vírusát nem tudták eltávolítani a tisztítás során, így sokan megfertőződtek, és AIDS-ben meghaltak. Amikor ezt felismerték, a VIII-as faktor cDNS-e már létezett, amelyet aztán expressziós vektorban emlős sejtvonalba klónoztak.



**5. ábra** Szöveti plazminogén aktivátor (tPA) termelése emlős szövettenyésztésben

## 6 Az eritropoetin (EPO) [1]

Az eritropoetin olyan glükoprotein (6. ábra), ami a vesében termelődik, és a vérképzésre hat. Ennek a molekulának a hatására indul be az őssejtek differenciálódása vörösvérsejteké. A molekula 165 aminosavból álló a polipeptid lánc, amelyhez 4 helyen szénhidrát láncok kapcsolódnak.



**6. ábra** Az eritropoetin háromdimenziós képe [2]

A vérszegénység és a vér vörösvérsejt mennyisége közötti összefüggés már az 1970-es évek óta ismert. Ebben a bonyolult visszacsatolásokkal teli rendszerben fő faktor az eritropoetin. A vesebetegek vérszegénységének leggyakoribb oka az eritropoetin hiánya. A vörösvérsejt képződéséhez a szervezet vasat használ fel. Emiatt nem ritka, hogy a vérképzést eredményesen javító eritropoetin vashiányt okoz. Az EPO és a vas együttes adása ezért a betegek többségénél indokolt. Az eritropoetin eredményes kezelése következtében minden szerv vérellátása javul, így azoknál a vesebeteg fiatal nőknél, akik a vérszegénységük miatt nem tudtak teherbe esni, visszatérhet a menstruáció, és a megfogant magzat méhen belüli elhalásának a veszélye is sokkal kisebb.

Az eritropoetint alkalmazzák műtéteknél is. Ennek egyik változatában a vértermelés fokozása által próbálják elérni, hogy beavatkozás során minél kevesebb vért kelljen adni a betegnek. A másik esetben a műtét előtt fokozzák a vértermelést, és a betegtől vért vesznek le, melyet a beavatkozás során transzfúzióval juttatnak vissza. Nagyobb vérigény esetén – szintén több héttel a műtét előtt elkezdve – hetenként egyszer, minden alkalommal egy egységgel több vért vesznek le, és a korábban levett vörösvértest-koncentrátumból egy egységgel kevesebbet adnak vissza. A vérgyűjtés idejére gondoskodni kell megfelelő

mennyiségű vas- és vitaminpótlásról. Humán rekombináns eritropoetin adásával a levett vérmennyiség megnövelhető.

Az eritropoetin az anabolikus szteroidok közé tartozik, így doppingszernek is tekinthető. Mivel megnöveli a vérben a vörösvérsejtek arányát, így fokozza a vér oxigénszállító képességét, ezáltal a sportolók sokkal nagyobb teljesítményre képesek mind edzés, mind verseny közben. Edzés közben az izom nagyobb mértékű fejlődését segíti elő. Használata főleg az aerob sportágakban terjedt el (futás, kerékpár, sífutás). A vizeletből gyakorlatilag lehetetlen kimutatni, ami azért jelent problémát, mert a doppingteszteket a WADA (World Anti Doping Assotiation) javaslata alapján vizeletből, tömegspektrométerrel detektált gázkromatográfiával végzik, így az EPO esetében csak bomlástermékeket tudnak kimutatni. Vérből történő kimutatása is nehézkes, mivel a felezési ideje rövid (20 óra körül van), és 2 héttel a használat után már lehetetlen kimutatni. Használata megnöveli a vér viszkozitását, növeli a szívkoszorúér és az agyi erek eltömődésének a veszélyét, magas vérnyomáshoz vezet, és trombózisveszéllyel jár. A vér megnövekedett viszkozitása miatt károsodhatnak a hajszálerek, így a teljes keringés is.

A humán eritropoetin génjét már több helyen is sikerrel klónozták. Az eritropoetin előállításának jelentőségét már régen fölfedezték, de az akkori technológiák mellett erre nem volt lehetőség. További nehézséget okozott, hogy a molekula szénhidrát láncait nehéz volt olyanra alakítani, hogy ez a hormon működését ne akadályozza. Az 1970-es években a Chicagói Egyetemen nagyon kis mennyiségben sikerült kinyerni az eritropoetin molekulát egy vesebeteg ember vizeletéből. Később ebből meg tudták határozni a polipeptid lánc szekvenciáját. Ennek az információnak a tudatában felírták a lehetséges bázissorrendeket, és előállították a DNS fragmentumokat. Azt várták, hogy valamelyik meg fog egyezni az emberi eritropoetin szintéziséért felelős génnel. A humán genom darabjainak baktériumokba történő klónozása után autoradiográfiásan összepároztatták az oligonukleotidokat és a klónozott humán genom darabokat. Ezzel a módszerrel sikerült izolálni az eritropoetint kódoló génszakaszt. A készítmény 1985-ben került kereskedelmi forgalomba. Átlátszó fiziológias oldatban kapható, beadása intravénásan történik.

## 7 Egyéb *E. coli*ba vagy élesztőbe klónozott humán gének [3]

A **IX-es véralvadási faktor**, mely a B típusú hemofiliában szenvedők számára esszenciális.

Három féle interferon és néhány interleukin. Ezek az immunrendszer szabályozásában szerepet játszó fehérjék.

**GM-CSF** (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), mely csontvelő stimuláló fehérje. Csontvelő átültetés után alkalmazzák.

**G-CSF** (granulocyte colony-stimulating factor) a neutrofil granulociták termelését stimuláló fehérje, kemoterápián átesett betegeknél alkalmazzák.

**ADA** (adenosine deaminase), melyet az SCID (severe combined immunodeficiency – a súlyos kombinált immunhiányos állapot) kezelésére használnak.

**Angiostatin** és **endostatin**, melyek sejtszaporodás-gátló szerek, így rákellenes terápiákban alkalmazzák őket.

**Paratiroid hormon**, mely pajzsmirigyhormon. A pajzsmirigy sérülése vagy a gén örökletes hibája esetén alkalmazzák.

**Leptin**, mely egy 167 aminosavból álló fehérje. Zsírsejtek szintetizálják. A leptin a hipotalamusz receptorokhoz kötődik, ahol leköti az étvágygerjesztő molekulákat, elősegíti bizonyos étvágycsökkentő szabályozó molekulák termelődését, ezáltal csökkenti az éhségérzetet.

**C1 inhibitor** (C1INH), melyet a HANE (hereditary angioneurotic edema) örökletes betegség kezelésére használnak.

## 8 Irodalom

- [1] Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. Recombinant DNA, Second Edition, Scientific American Books, New York. Chapter 23: 453-468.
- [2] <http://en.wikipedia.org/wiki/Erythropoietin>. 2007-06-04.
- [3] <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/R/RecombinantDNA.html>. 2007-06-04.