

Molekularna biotehnologija: rekombinantna zdravila

Proteinska zdravila

Pred razvojem tehnologije rekombinantne DNA je bilo proteinskih zdravil zelo malo, bila so slabo okarakterizirana in draga. Danes proizvajamo rekombinantna protitelesa, cepiva, signalne molekule, inhibitorje, encime,... Pri pripravi rekombinantnih učinkovin običajno izhajamo iz cDNA. Zdravila lahko pripravijo s pomočjo rekombinantnih mikroorganizmov oziroma celičnih kultur ali pa v transgenskih organizmih (ocena stroškov: 5x cenejše kot celice v kulturi).

Table 10.1 Some recombinant proteins that have been approved for human use in either the United States or the European Union

Compound	Company	Disorder
Factor VIII	Baxter Healthcare, Genetics Institute, Centeon, Bayer	Hemophilia A
Factor VIIa	Novo Nordisk	Some forms of hemophilia
Factor IX	Genetics Institute	Hemophilia B
Hirudin	Ciba Novartis, Europharm, Hoechst Marion Roussel	Venous thrombosis, heparin-associated thrombocytopenia
Tissue plasminogen activator	Genentech	Acute myocardial infarction
Truncated tissue plasminogen activator	Galenus Mannheim, Boehringer Mannheim/Centocor	Acute myocardial infarction
Insulin	Eli Lilly, Novo Nordisk, Hoechst AG	Diabetes mellitus
Insulin analogues	Eli Lilly, Novo Nordisk, Aventis	Diabetes mellitus
Human growth hormone	Eli Lilly, Genentech, Biotechnology General, Pharmacia, Upjohn, Novo Nordisk, Serono Laboratories	Growth hormone deficiency in children
Human growth hormone analogue	Genentech	Growth hormone deficiency in children
Human growth hormone	Serono Laboratories	AIDS-associated catabolism and wasting
Glucagon	Novo Nordisk	Hypoglycemia
Thyrotrophin- α	Genzyme	Thyroid cancer
Follicle-stimulating hormone	Ares-Serono, Organon	Anovulation and superovulation
Erythropoietin	Amgen, Ortho Biotech, Boehringer-Mannheim	Anemia
Platelet-derived growth factor	Ortho-McNeil Pharmaceuticals, Janssen-Cilag	Lower-extremity diabetic neuropathic ulcers
DNase I	Genentech	Cystic fibrosis
β -Glucocerebrosidase analogue	Genzyme	Gaucher disease
IFN- α_{2a}	Hoffmann-La Roche, Schering-Plough	Hairy cell leukemia, hepatitis B and C
Synthetic type 1 IFN- α	Amgen, Yamanouchi Europe	Chronic hepatitis C
IFN- α_{2b}	Schering-Plough	Hairy cell leukemia, genital warts, hepatitis B and C
IFN- β_{1b} analogues	Schering AG, Berlex Laboratories, Chiron	Multiple sclerosis
IFN- β_{1a}	Biogen, Ares-Serono	Relapsing multiple sclerosis
IFN- γ_{1b}	Genentech	Chronic granulomatous disease
IL-2 analogue	Chiron	Renal cell carcinoma
IL-11 analogue	Genetics Institute	Prevention of chemotherapy-induced thrombocytopenia

Abbreviations: IFN, interferon; IL, interleukin.

Prodaja rekombinantnih zdravil v svetu: 1997-2004

Product	Protein	Effects/therapeutic use	Marketed by	Worldwide sales 2004 in US\$m	Worldwide sales 2003 in US\$m	Worldwide sales 2002 in US\$m	Worldwide sales 2001 in US\$m	Worldwide sales 2000 in US\$m	Worldwide sales 1999 in US\$m	Worldwide sales 1998 in US\$m	Worldwide sales 1997 in US\$m
Epogen	Erythropoietin*	stimulation of the production of erythrocytes	Amgen	2601	2400	2300	2200	1960	1760	1380	1161
Procrit/ Eprex	Erythropoietin alfa *	stimulation of the production of erythrocytes	J&J/ Ortho Biotech	3589	3984	4283	3430	2709	1505	1460	1000
NeoRecormon/ Epogin	Erythropoietin beta *	stimulation of the production of erythrocytes	Genentech/ Roche/ Chugai	1842	1527	1192	443	-	-	-	-
Aranesp	Darbepoietin alfa *	stimulation of the production of erythrocytes	Amgen	2473	1500	400	42	-	-	-	-
Peg-Intron (Intron-A)	PEGylated alpha-interferon + ribavirin	anti Hepatitis C	Schering-Plough	1851	1851	2700	1447	1361	650	-	598
Pegasys	PEGylated interferon alpha-2a + copegus (ribavirin)	anti Hepatitis C	Roche	1382	762	-	-	-	-	-	-
Avonex	Interferon beta-1a	multiple sclerosis	Biogen Idec	1417	1168	1034	972	761	621	394.9	240
Rebif	Interferon-beta-1a	multiple sclerosis	Serono	1091	819	548,8	379.6	254	143	44	19
Betaseron/ Betaferon	Interferon beta-1b	multiple sclerosis	Schering AG	1057	929	830	592	546	395	321	297
Neupogen	G-CSF	stimulation of the production of granulocytes	Amgen	1200	1300	1400	1300	1220	1260	1120	1056
Neulasta	G-CSF PEG conjugate	stimulation of the production of granulocytes	Amgen	1700	1300	-	-	-	-	-	-
Leukine	GM-CSF	stimulation of leukocytes	Schering AG	80	77	n.a.	108.4	88.3	69.1	63.8	53
Proleukin	Interleukin	cancer	Chiron	129	115	114	93	113	112	93	71
Humulin	Insulin	diabetes	Eli Lilly	998	1060	1004	1060.6	1114.5	1087.5	959.2	936
Humalog	Insulin	diabetes	Eli Lilly	1102	1021	1004	627.8	350.2	-	-	-
Rituxan (in EU: Mabthera)	rituximab, humanised MAb	leukemia and lymphomas	Genentech/ Roche	2989	2243	1163	818.7	444.1	279.4	162.6	-
Herceptin	trastuzumab, humanised anti-HER-2 MAb	breast cancer	Genentech/ Roche	1270	952	385	346.6	275.9	188.4	30.5	-
Campath	alemtuzumab, humanised MAb against CD52	B-cell chronic lymphoma	Genzyme	77	72	-	-	-	-	-	-
Mylotarg	gemtuzumab ozogamicin, humanised anti-CD33 MAb	relapsed acute myeloid leukemia	Wyeth	20	20	-	-	-	-	-	-
Enbrel	etanercept (fusion protein of antibody-Fc and p75-TNF receptor protein)	rheumatoid arthritis	Amgen	2580	1300	802	761.9	652.4	366.9	-	-
Remicade	Infliximab, chimaeric MAb	rheumatoid arthritis, morbus Crohn	J&J	2891	1729	1297	721	116	-	-	-
Humira	Adalimumab	rheumatoid arthritis	Abbott	852	280	-	-	-	-	-	-
Humatrope	human growth hormone (HGH) Somatotropin	dwarfism	Eli Lilly	430	371	329	312.7	301	300	268	260
Protropin/Nutropin	human growth hormone (HGH) Somatotropin	dwarfism	Genentech	396	322	297	250	226.6	221.2	214	224
Serostim	human growth hormone (HGH)	dwarfism	Serono	86.8	88.8	95.1	125.3	137.1	137.4	88.2	38.8
Saizen	human growth hormone (HGH)	dwarfism	Serono	182.1	151.5	124	107.3	90.0	-	-	-
Cerezyme/	Glucocerebrosidase	Gaucher's disease	Genzyme	839	734	619	570	537	479	411	333

Rekombinantna zdravila

Ameriška FDA je že do leta 2000 odobrila za uporabo nad 90 biotehnološko pridobljenih zdravil, od teh jih je približno pol dobjenih s tehnologijo rekombinantne DNA. Okrog 50 % teh rekombinantnih preparatov je bilo pridobljenih v *E. coli*.

V enem samem letu (1999) se je prodaja 9 takih preparatov povečala za 52 % glede na leto pred tem in presegla 5 mrd USD. Sredi leta 2000 je bilo na ameriškem tržišču od skupaj skoraj 400 različnih biofarmaceutskih izdelkov 84 rekombinantnih preparatov (40 osnovnih substanc).

V primerjavo z ZDA je v Evropi zakonodaja strožja, zato so v Nemčiji npr. v začetku leta 2000 tržili samo 5 vrst rekombinantnega somatropina, od tega 4 preparate iz *E. coli*, 1 pa iz gojenih mišjih celic. Imeti je moral povsem identične lastnosti kot človeški, vključno s specifično aktivnostjo (3 IU/mg). V drugih evropskih državah je zakonodaja nekoliko manj stroga, zato je tam bilo mogoče kupiti ~20 različnih rekombinantnih zdravil.

Na slovenskem trgu je bilo že decembra 2001 skupaj 77 zdravil, ki so vsebovala 18 učinkovin, pridobljenih s tehnikami rekombinantne DNA. Prevladovali so interferoni, epoetin in inzulin, kot pomembne pa navajajo še eptakog (FVIIa), dornazo (DNaza), folitropin (folikel-stimulirajoči hormon), imiglucerazo (β -glukocerebrozidaza), moroktokog (F VIII) in somatropin. (Vir: Urad RS za zdravila)

Prva rekombinantna veterinarska zdravila, odobrena za uporabo v EU

recombinant veterinary products			
drug	main indication	applicant	first approval in EUD
Porcilis Porcoli (vaccine; E. coli F4ab, F4ac, F5 and F6 adhesin)	passive immunisation of piglets, active immunisation of sows and gilts to reduce neonatale enterotoxigenosis caused by E.coli strains	Intervet International B.V.	02/1996 (09/2000)
Fevaxyn Pentofel (vaccine; component feline leukaemia virus antigen 61E strain)	active immunisation of cats against various feline pathogens	Fort Dodge Laboratories	02/1997
Neocolipor (vaccine; E. coli strain F4 and F5 and field strains F6 and F41)	reduction of neonatale enterotoxigenosis of piglets caused by E. coli strains	Merial	04/1998
Ibraxion (inactivated gene deleted gE-marker IBR vaccine virus)	active immunisation of cattle against infectious bovine rhinotracheitis	Merial	03/2000
Eurifel FELV (vaccine; canarypox virus gag, env gene, feline leukaemia virus partial pol gene)	active immunisation of cats against feline leukaemia	Merial	04/2000
Porcilis pesti (vaccine; Classical Swine Fever Virus E2 subunit antigen)	active immunisation of pigs against classical swine fever	Intervet International B.V.	05/2000
Porcilis AR-T DF (vaccine; Protein dO, nontoxic derivative pasteurilla multocida dermonecrotic toxin)	(vaccine; reduction of clinical signs of progressive atrophic rhinitis by passive orale immunisation)	Intervet International B.V.	11/2000
Bayovac CSF E2 (vaccine; Classical Swine Fever Virus E2 subunit antigen)	active immunisation of pigs against classical swine fever virus	Bayer AG	02/2001
Vibragen Omega (feline omega interferon)	reduction of clinical signs of parvovirus in dogs	Virbac	11/2001
Eurifel RCPFEVL (vaccine; canarypox virus gag, env gene, feline leukaemia virus partial pol gene)	(vaccine; active immunisation of cats against feline infectious rhinotracheitis and calicivirus infection)	Merial	03/2002
Gallivac HVT IBD (live vaccine, engineered HTV expressing gene for VP2 antigen of IBDV)	active immunisation of chicken against infectious bursal disease	Merial	08/2002

Biofarmacevtiki

Biofarmacevtska sredstva so biotehnološko pridobljena zdravila. Zajema tri skupine učinkovin: rekombinantne proteine, monoklonska protitelesa in izolirane naravne proteine. Glede uporabe za zdravljenje jih razvrščajo v več skupin: faktorje strjevanja krvi, trombolitike, hematopoezne rastne dejavnike, interferone in cepiva.

V ZDA proizvedejo ~50 % vseh biofarmacevtikov. Leta 2012 je bilo tržišče biofarmacevtikov v ZDA ocenjeno na 90 mrd USD in letna rast za naslednje petletno obdobje 11 %. Rast si obetajo zaradi zanimivih novih zdravil, ki jih podjetja najavljajo, zaradi starajočega se prebivalstva ter zaradi razširitve spektra bolezni, ki jih je dovoljeno zdraviti z obstoječimi biofarmacevtiki.

Največja ovira za večjo rast proizvodnje in prodaje so visoki stroški in s tem cena. Problem pa predstavljajo tudi stranski učinki, o katerih so poročali pri uporabi biofarmacevtskih sredstev. Zaradi obojega so biofarmacevtski izdelki danes zdravila, ki jih ne predpisujejo kot prva za zdravljenje neke bolezni.

Največjo priložnost za biofarmacevtsko industrijo predstavljajo možnosti razvoja zdravil proti boleznim, ki so za zdaj neozdravljive.

Transparency Market Research: US Biopharmaceutical Market - Global Industry Size, Market Share, Smart Trends, Analysis And Forecast 2012 – 2018 (4795 USD)

Svetovno tržišče za biofarmacevtike je bilo leta 2013 ocenjeno na 199,7 mrd USD, leta 2020 pa naj bi doseglo 497,9 mrd USD, kar za obdobje 2010-2013 predstavlja 13,5-odstotno povprečno letno rast.

Največji segment prodaje predstavljajo mAb (25,6 % oz. 51,1 mrd USD v letu 2013). Najbolj razširjene so aplikacije s področja nevrologije (28,2 % oz. 56,3 mrd USD v letu 2013; v letu 2020 naj bi dosegle 144,5 mrd USD).

Proizvodnja generičnih zdravil / biofarmaceutikov

Prvi generacija bioloških zdravil so večinoma potekli patenti, zato se je povečal interes farmacevtske industrije za proizvodnjo teh zdravil.

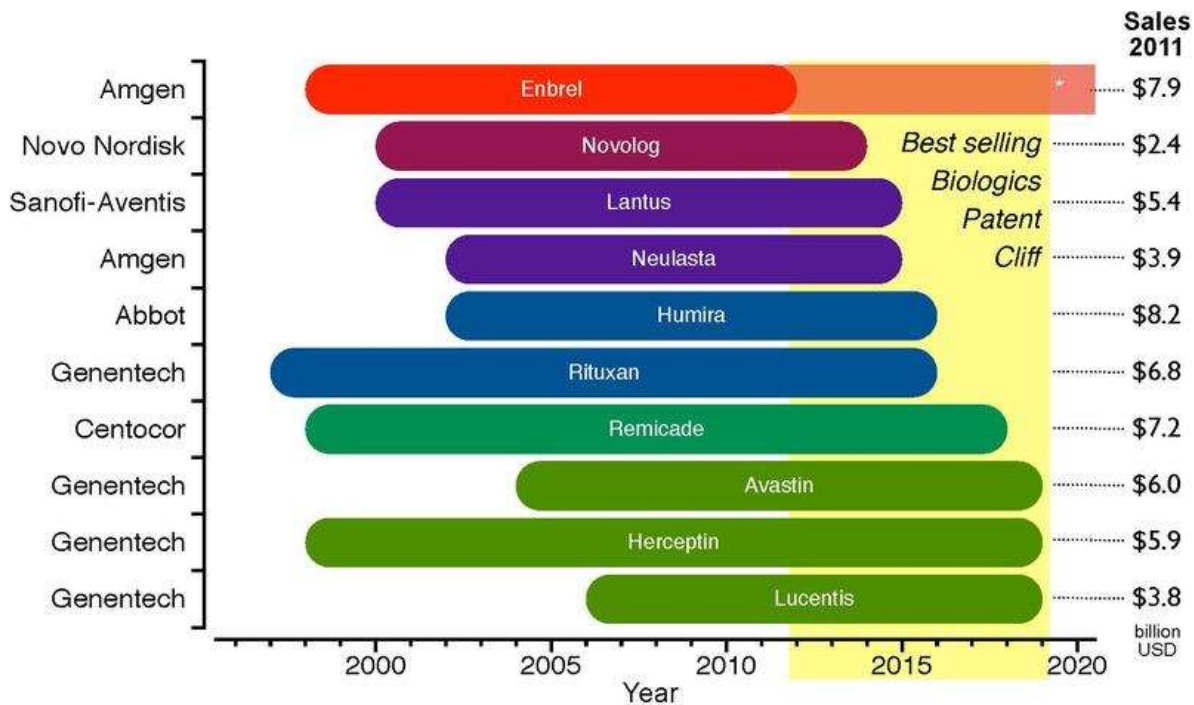
Generična zdravila – generiki – so kopije zdravil, ki so jim poteki patenti. Pomembno je, da podjetja proizvedejo učinkovine, ki so bioekvivalentne (imajo podobne biološke lastnosti) originalnim zdravilom.

Podobna biološka zdravila (biosimilars) so uradno odobreni nasledniki bioloških zdravil, pri čemer je ključno za odobritev sklicevanje na lastnosti originalnih bioloških zdravil.

Proizvajalci podobnih bioloških zdravil so razvili svoje konstrukte in celične klone za proizvodnjo pod svojimi optimiziranimi pogoji gojenja in izolacije.

Posledica tega je lahko drugačna vsebnost nečistoč ali razpadnih produktov učinkovine, to pa lahko pomeni drugačno delovanje.

Odobritev za uporabo je pri podobnih bioloških zdravilih enostavnejša kot pri originalnih – postopek izvajajo po drugih pravilih.



Entrel (etanercept) – inhibitor TNF, za zdravljenje avtoimunskih bolezni

Novolog (inzulin aspart) – analog inzulina

Lantus (inzulin glargin) – analog inzulina

Neulasta (pegfilgrastim) – pegiliran spodbujevalni faktor rasti granulocitnih kolonij, za povečevanje števila nevtrofilcev

Humira (adalimumab) – mAb proti TNFalfa, za zdravljenje avtoimunskih bolezni

Rituxan (rituksimab) – himerno mAb proti CD20, za zmanjševanje števila celic B

Remicade (infliksimab) – himerno mAb proti TNFalfa, za zdravljenje avtoimunskih bolezni

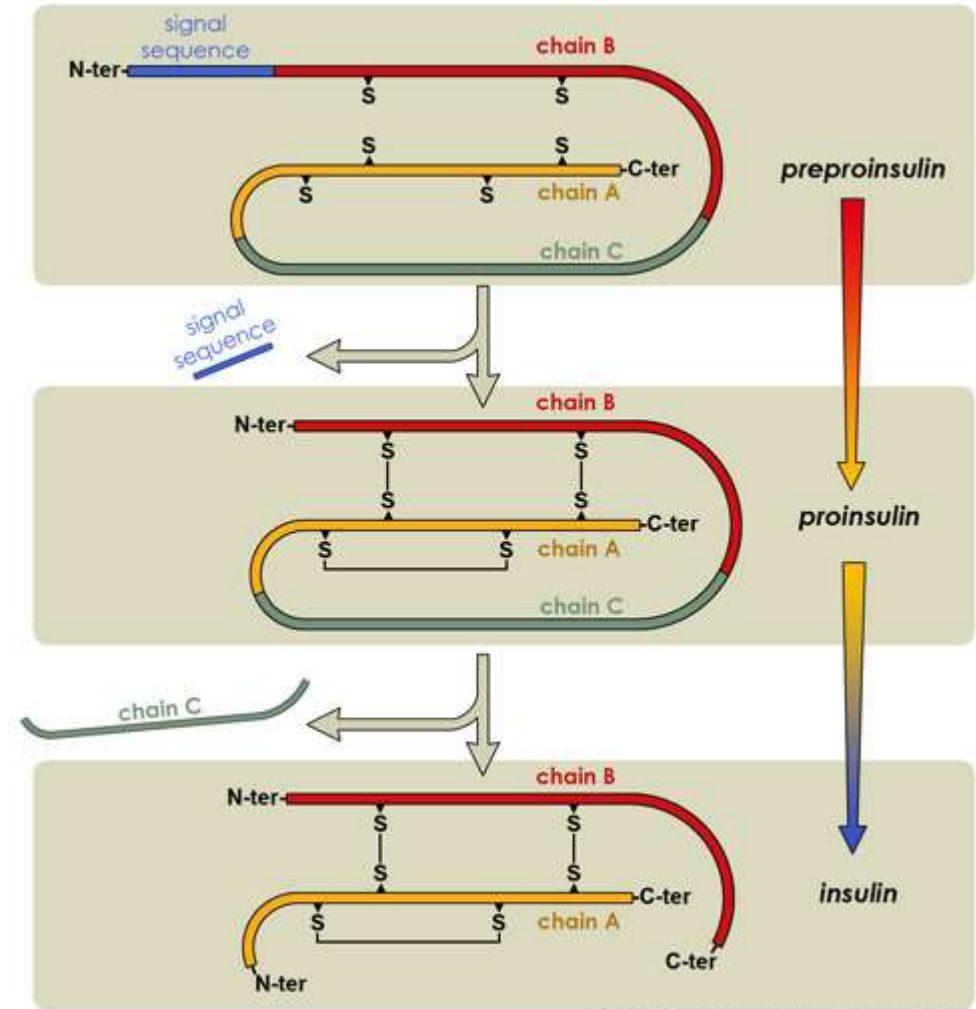
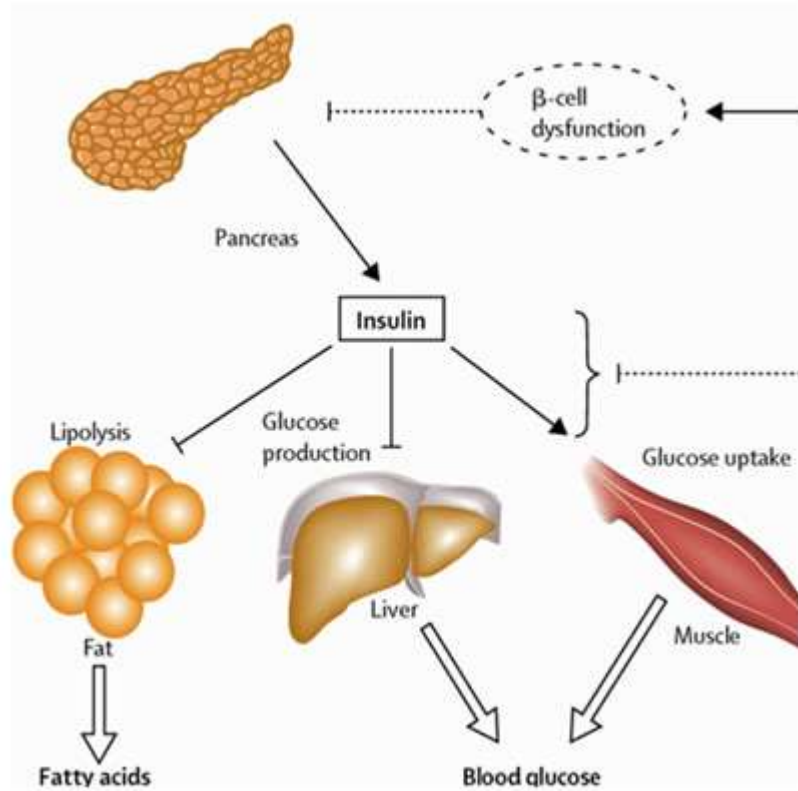
Avastin (bevacizumab) – humanizirano mAb proti vaskularnemu endotelijskemu rastnemu faktorju A, zavira rast novih žil

Herceptin (trastuzumab) – mAb proti receptorju HER/neu, za zdravljenje raka dojke

Lucentis (ranibizumab) – Fab iz istega mAb kot bevacizumab (Avastin), optimiziran preko afinitetnega zorenja; zavira rast novih žil

Rekombinantna zdravila, odobrena za uporabo v EU

recombinant enzymes, hormones and cytokines				
drug	main indication	incidences in D	applicant	first approval in EU/D
Insulin, human	diabetes mellitus type 1	400,000	Lilly Deutschland GmbH Lilly Industries Novo Nordisk Hoechst	12/1987
Interleukin-2, IL-2 (Aldesleukin)	hypernephrom (for T-cell activation)	kidney tumors in 9 of 100,000	Chiron GmbH	12/1989
Somatotropin (human growth hormone)	dwarfism	100,000	Lilly Deutschland GmbH Pharmacia GmbH Serono Pharma GmbH Novo Nordisk Ferring GmbH	02/1991
Glucagon	hypoglycemic reaction	see Insulin	Novo Nordisk	03/1992
Erythropoietin beta (Epoetin beta)	renal anemia	60,000 patients with kidney failure	Boehringer Mannheim	05/1992
Interferon gamma 1b	chronic granulomatosis	-	Dr. Karl Thomae (now Boehringer Ingelheim)	1992
Interferon alfa-2b	hairy cell leukemia, carcinomas, Papilloma induced genital warts	~240,000 new lymphomas and leukemias	Essex Pharma GmbH	03/1993 02/2000
Erythropoietin alpha (Epoetin alpha)	renal anemia	60,000 patients with kidney failure	Janssen-Cilag	04/1993
GM-CSF (Molgramostim)	neutropenia (e.g. after chemotherapies with cytostatics)	330,000	Essex Pharma GmbH Sandoz AG	04/1993
Interferon alpha-2a	hairy cell leukemia, carcinomas, Papilloma induced genital warts	~240,000 new lymphomas and leukemias	Hoffmann-La Roche AG kohl pharma GmbH*	04/1993
Faktor VIII	hemophilia A	8,000	Bayer AG Baxter Deutschl. GmbH Armour Pharma GmbH	07/1993
G-CSF, glycosylated (Lenograstim)	neutropenia (e.g. after chemotherapies with cytostatics)	330,000	Rhône-Poulenc Rorer GmbH Chugai Rhône-Poulenc	10/1993
tissue plasminogen activator, t-PA (Alteplase)	coronary thrombosis, thrombosis	130,000	Dr. Karl Thomae GmbH	04/1994
Glucocerebrosidase (Imiglucerase)	morbus Gaucher	100 (17.99 worldwide)	Genzyme B.V.	06/1994
G-CSF (Filgrastim)	neutropenia (e.g. after chemotherapies with cytostatics)	330,000	Hoffmann-La Roche AG kohl pharma GmbH*	08/1994
hum. DNase (Dornase alfa)	mucoviscidosis	6,000-8,000	Hoffmann-La Roche AG	09/1994
Follitropin alpha	ovaries stimulation, IVF	every 10th couple	Serono Laboratories UK	10/1995



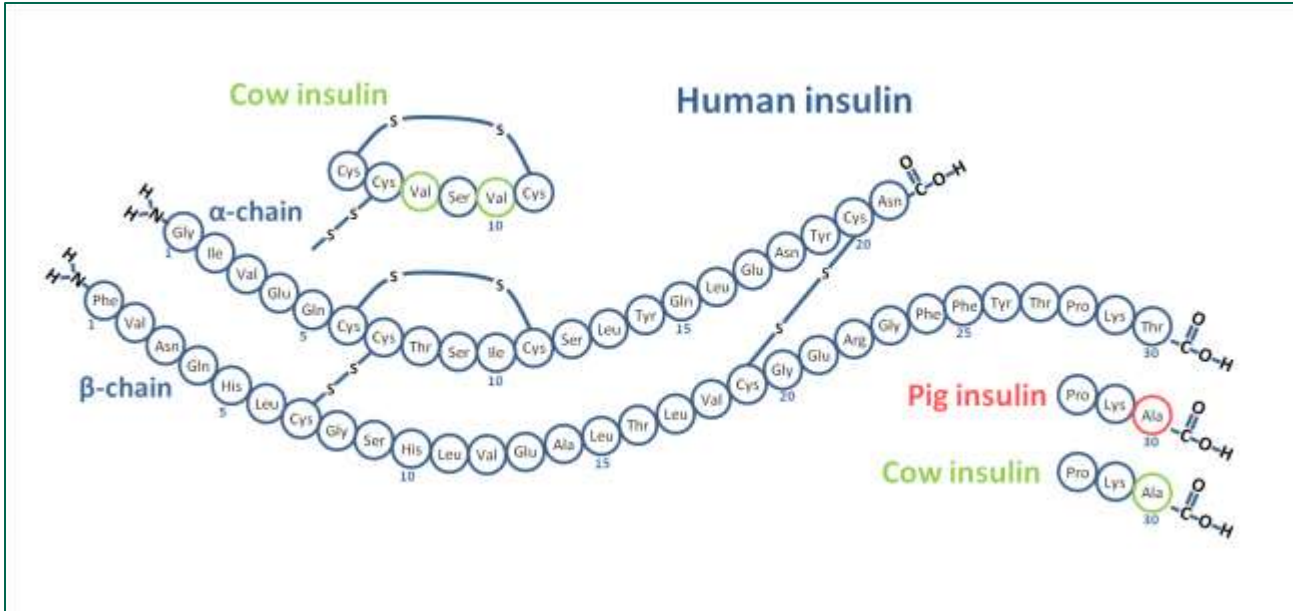
©2004 Beta Cell Biology Consortium

Inzulin in analogi

Rekombinantni inzulin v EU od leta 1987, pred tem so uporabljali svinjski in goveji inzulin, ki se enako dobro vežeta na človeški receptor (razlikujeta se v 1 oz. 3 ak). Izolirali so ju iz trebušnih slinavk. Na Japonskem so uporabljali inzulin iz morskih psov. Pri nekaterih pacientih, ki so dobivali živalske analoge, je prišlo do alergijskih reakcij, za katere so bile delno krive nečistoče v preparatih.

Svinjski inzulin je bilo mogoče kemično modificirati v človeškega. C-končni Ala so odcepili, nato pa dodali Thr → semisintezni inzulin (Novo Nordisk).

Z dostopnostjo rekombinantnega človeškega insulina redko pride do razvoja protiteles proti inzulinu; verjetno k razvoju protiteles prispevajo konzervansi, ki jih uporabljajo v preparatih.



Inzulinski analogi

Kemijske spremembe uvajajo tudi zato, da izboljšajo ADME (absorption, distribution, metabolism, and excretion): absorpcijo, porazdelitev, metabolizem in izločanje. Problem človeškega in svinjskega inzulina je, da se v prisotnosti cinkovih ionov v krvi kompleksira v heksamer, ki ni več sposoben vezave na receptor. Postopno se sicer ustvarja ravnotežne med heksamernim in monomernim inzulinom. Zato je zdravilo, ki že vsebuje cink, namenjeno dolgotrajnemu vzdrževanju ravni inzulina. Po drugi strani pa obstajajo tudi trenutne višje potrebe po inulinu, ko zaužijemo obrok.

Neheksamerni analogi

Prvi rekombinantni inzulin je bil namenjen predvsem zagotavljanju osnovne ravni inzulina. Prvi hitro delujoči inzulin so v ZDA začeli tržiti 1996 (inzulin lispro oz. Humalog). Pripravili so ga tako, da so na ravni DNA zamenjali kodona za zadnji 2 ak v verigi beta (LysPro). S tem se interakcija z receptorjem ne spremeni, bistveno pa se zmanjša raven dimerizacije in heksamerizacije.

Alternativni pristop (inzulin aspart oz. NovoLog/NovoRapid) je z zamenjavo Pro→Asp na mestu B28, kar povzroči odboj med naboji dveh monomerov. Spremenjen zapis so vstavili v genom kvasovke in izrazili. Zdravilo je dovoljeno za uporabo od leta 2000. Delovati začne po 15 minutah, doseže vrh po 45-90 min. in deluje 3-5 h.

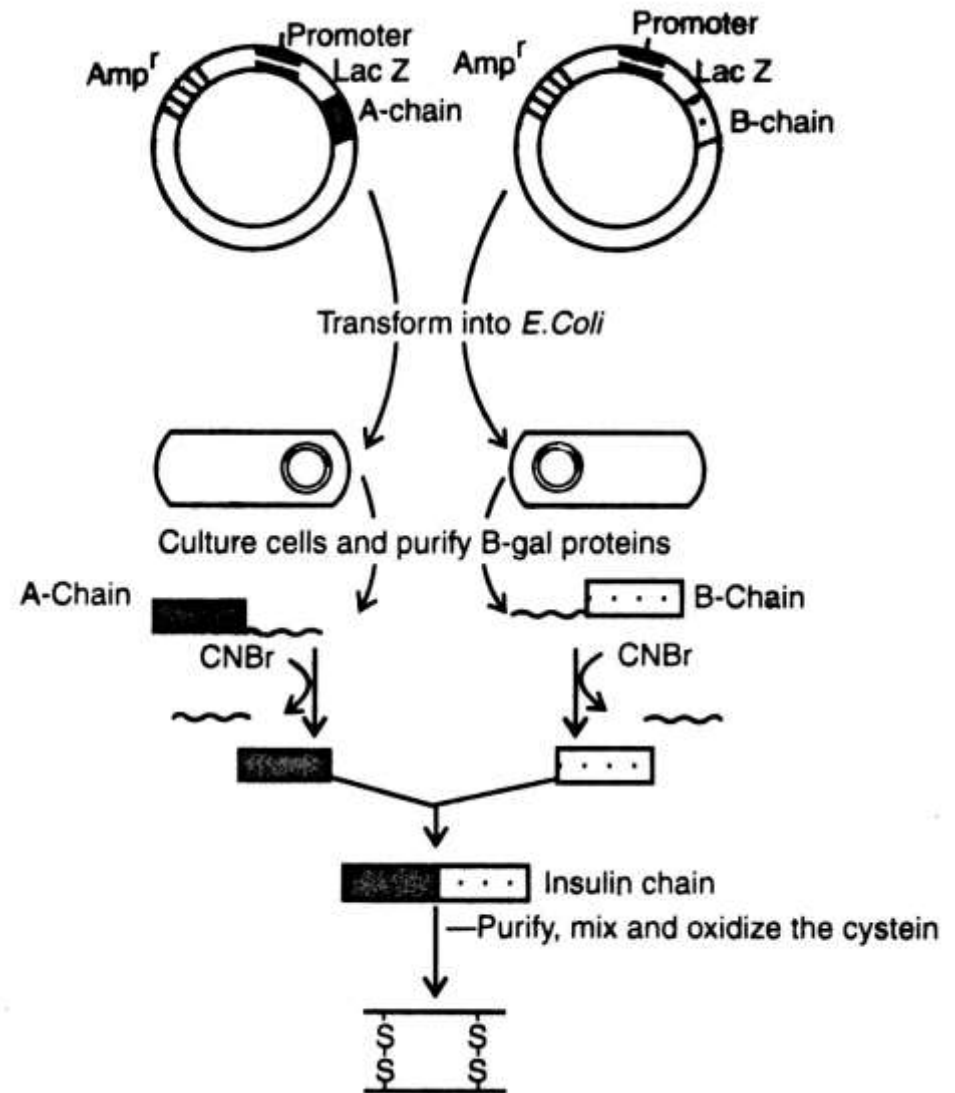
Inzulini s spremenjeno pl

Naravni inzulin je optimalno topen pri serumskem pH. S tem, ko inulinu spremenijo pl, se ga večina obori, iz oborine pa se počasi sprošča. Zato ena doza zadošča za vzdrževanje osnovne ravni hormona za do 24 h. *In vivo* se inzulin lahko veže na lipide, nekatere novejšje formulacije pa na albumin, s čimer se poveča obstojnost v organizmu (detemir inzulin / Levemir).

Preparat glargin inzulin (Lantus) je inzulin s spremenjenimi 3 ak: G21N (Gly je občutljiv za deamidizacijo v kislem) + 2 Arg na C-koncu verige β. Zato se pl s 5,4 dvigne na 6,7; zdravilo je namenjeno za injiciranje v podkožje.

Najdaljši čas obstojnosti ima preparat inzulin degludec (Tresiba), do 40 h. Ima deletirano 1 ak, preko Lys B29 pa je nanj vezan L-glutamatni distančnik in nanj konjugirana heksadekandiojska kislina.

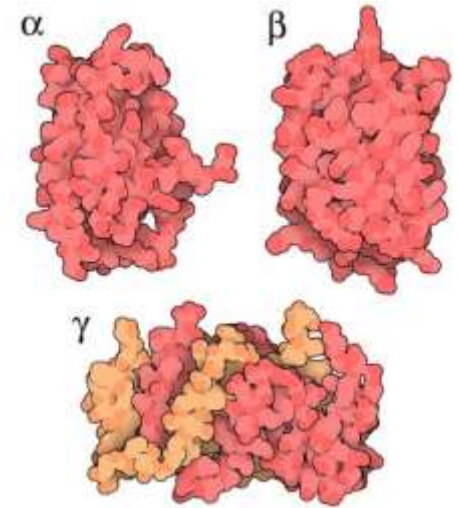
Humulin: cDNA v *E. coli* – neproblematicen vir mRNA
(Langerhansovi otočki: 70 % mRNA je za preproinzulin)



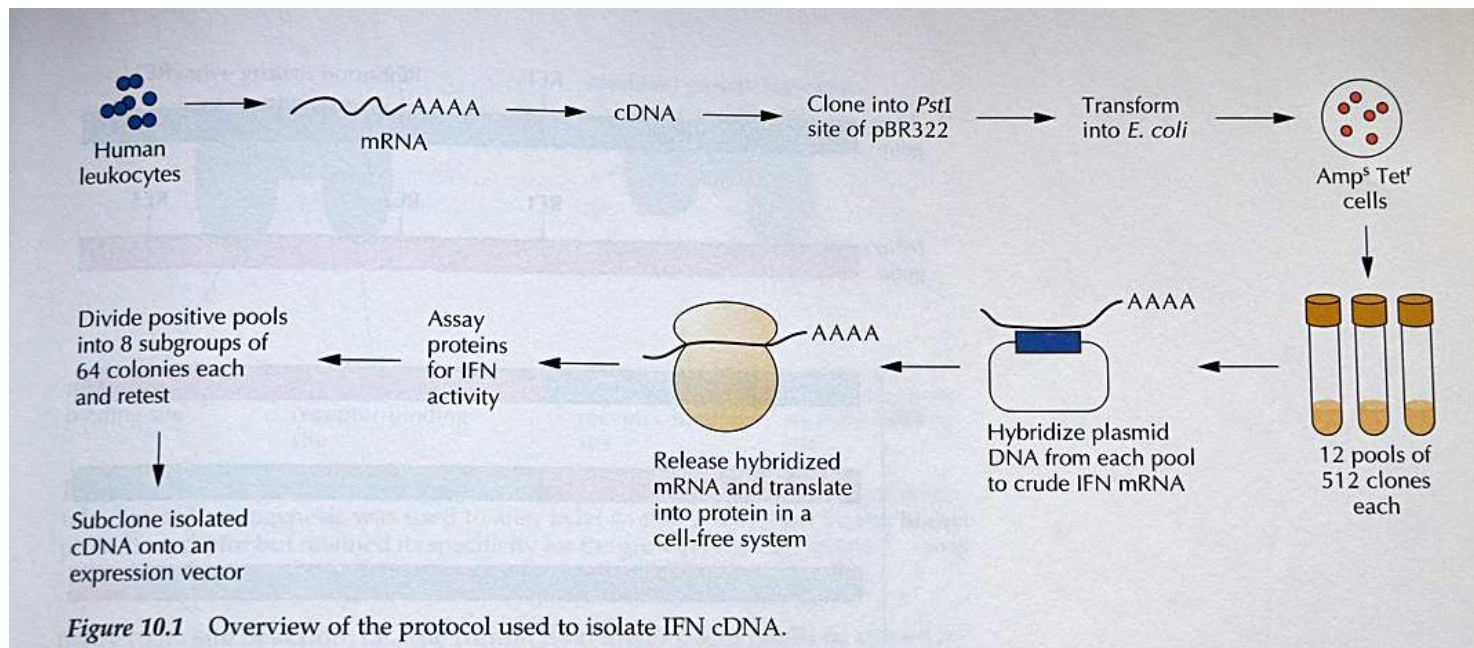
Rekombinantni interferon

Interferon (IFN) je prisoten v človeških celicah v majhnih količinah in v več oblikah, ki imajo različne učinke. Sprva so mislili, da obstaja en sam interferon, kar je otežilo kloniranje, razen tega pa je mRNA zanj prisotna v zelo majhni koncentraciji. Zato so morali iskanje zapisa prilagoditi:

- iz levkocitov so izolirali mRNA in jo ločili po velikosti ter obratno prepisali v cDNA
- iz induciranih levkocitov so izolirali mRNA in jo obratno prepisali v cDNA
- cDNA so vstavili v klonirni vektor pBR322 in po transformaciji *E. coli* dobili ~6000 klonov
- klone so razdelili v skupine po 512 (12x) in izvedli hibridizacijo z izolirano levkocitno mRNA, **obogateno z zapisom za IFN, pod ostrimi pogoji**
- iz hibrida so sprostil mRNA in izvedli translacijo *in vitro*
- preverili so, ali translacijski produkti kažejo protivirusno aktivnost
- skupine, ki so kazale aktivnost, so razdelili na podskupine s po 64 kloni in ponovili test (itd.)



<http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=128>

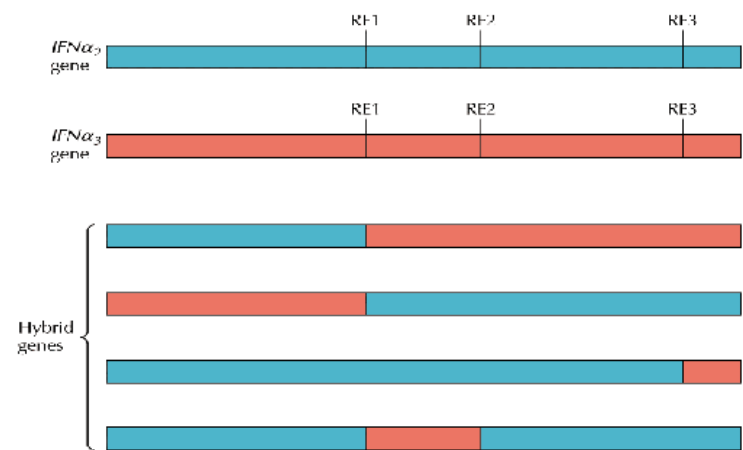


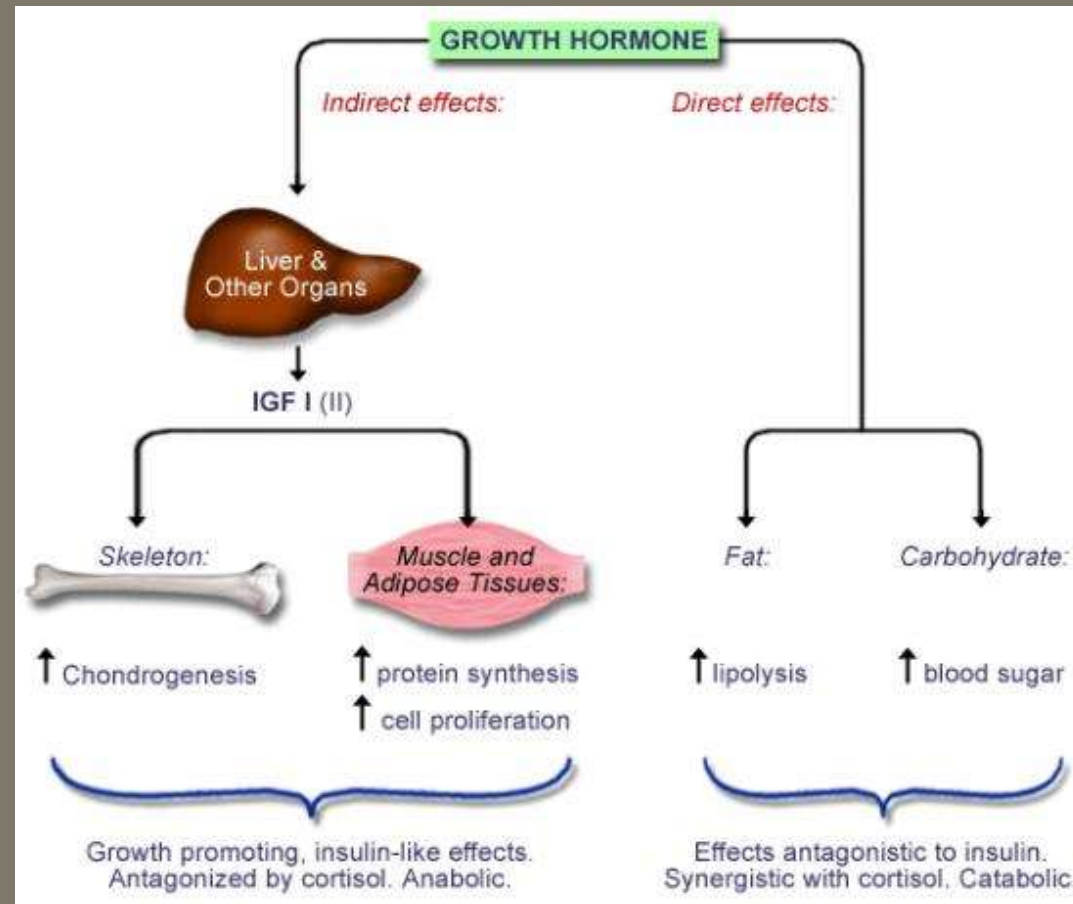
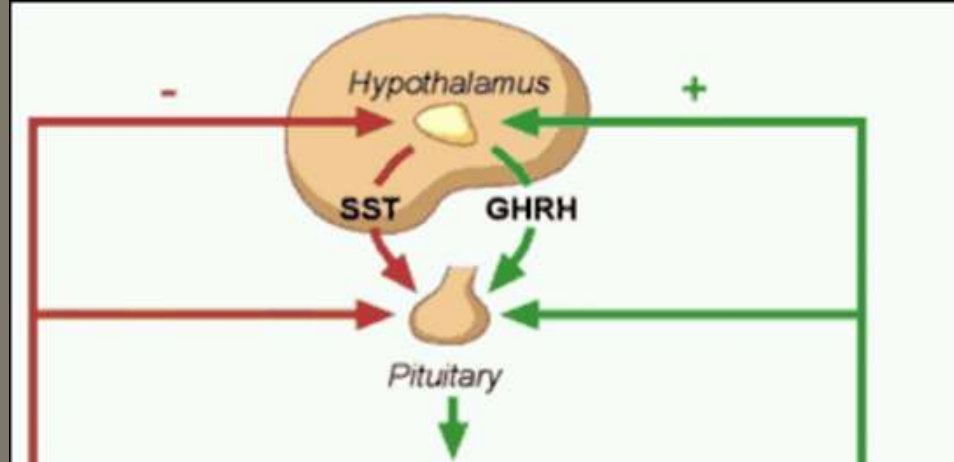
Rekombinantni človeški interferon

IFN- α in IFN- β se sintetizirata v celicah, ki so bile okužene z virusi ali inducirane z virusno RNA, IFN- γ pa po dodatku rastnih dejavnikov.

IFN- α zapisuje vsaj 15 genov; translacijski produkti imajo različne specifičnosti in so različno aktivni (zelo velike razlike tudi pri testiranju različnih okuženih celičnih linij). Poskusili so pripraviti IFN- α , ki bi vključeval protivirusne lastnosti več posameznih podtipov. Izvedli so preprost poskus z zamenjavo posameznih fragmentov gena (med obstoječimi restrikcijskimi mesti) in dobili nekatere hibridne proteine z razširjenim spektrom delovanja – na različne viruse, drugi konstrukti so zavirali rast rakavih celic.

Interferon	Disorder
α_{2a}	Hepatitis C, hairy cell leukemia
α_{2b}	Bladder cancer, head and neck cancer, malignant melanoma, multiple myeloma, non-Hodgkin's lymphoma, renal cell carcinoma, Crohn disease, HIV infection
α_{n3}	AIDS, cervical dysplasia, papillomavirus infections, chronic hepatitis C infection, genital warts
β_{1a}	Multiple sclerosis
β_{1b}	Chronic progressive multiple sclerosis
γ_{1b}	Renal cell carcinoma, chronic granulomatous disease

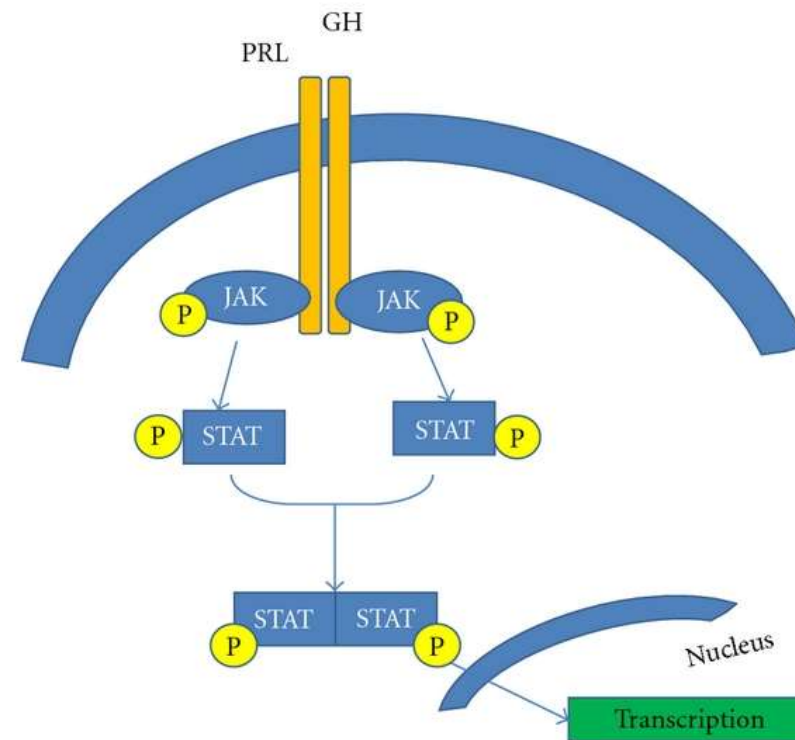




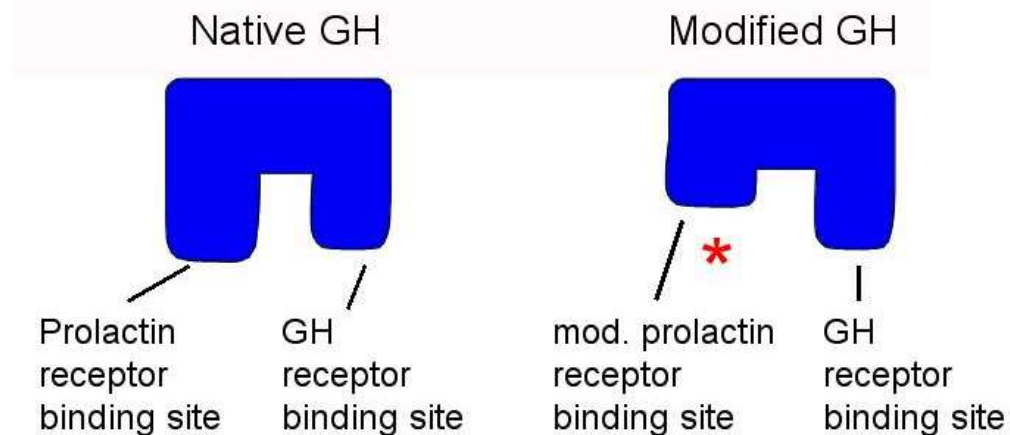
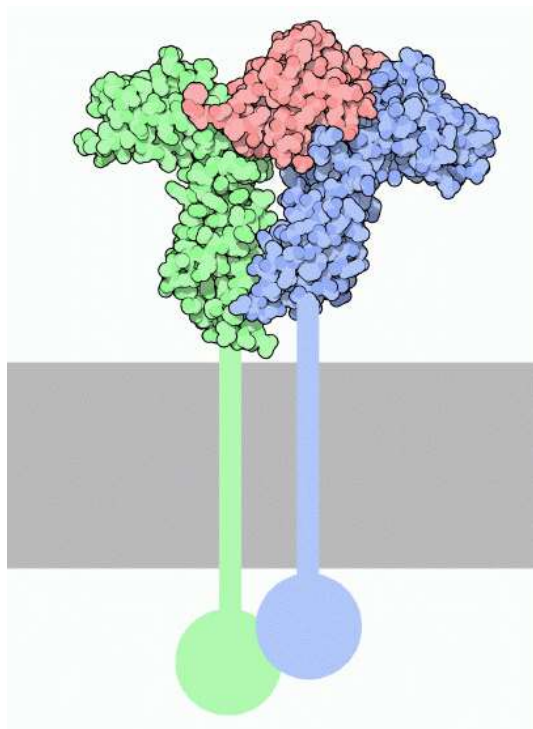
Rekombinantni rastni hormon

Človeški rastni hormon (191 aa, 22 kDa) se sintetizira v hipofizi. Rekombinantnega (iz *E. coli*) uporabljajo za zdravljenje pritlikavosti in pri pacientih z nekaterimi ledvičnimi boleznimi. Stimulira rast različnih tkiv (npr. kosti), sintezo proteinov, zmanjšuje shranjevanje maščob. Naravni protein se veže na lastni receptor, pa tudi na receptor za prolaktin na površini različnih celic. S pristopi rDNA so pripravili mutanta, ki se ne veže več na prolaktinski receptor in s tem izboljšali specifičnost rekombinantnega zdravila.

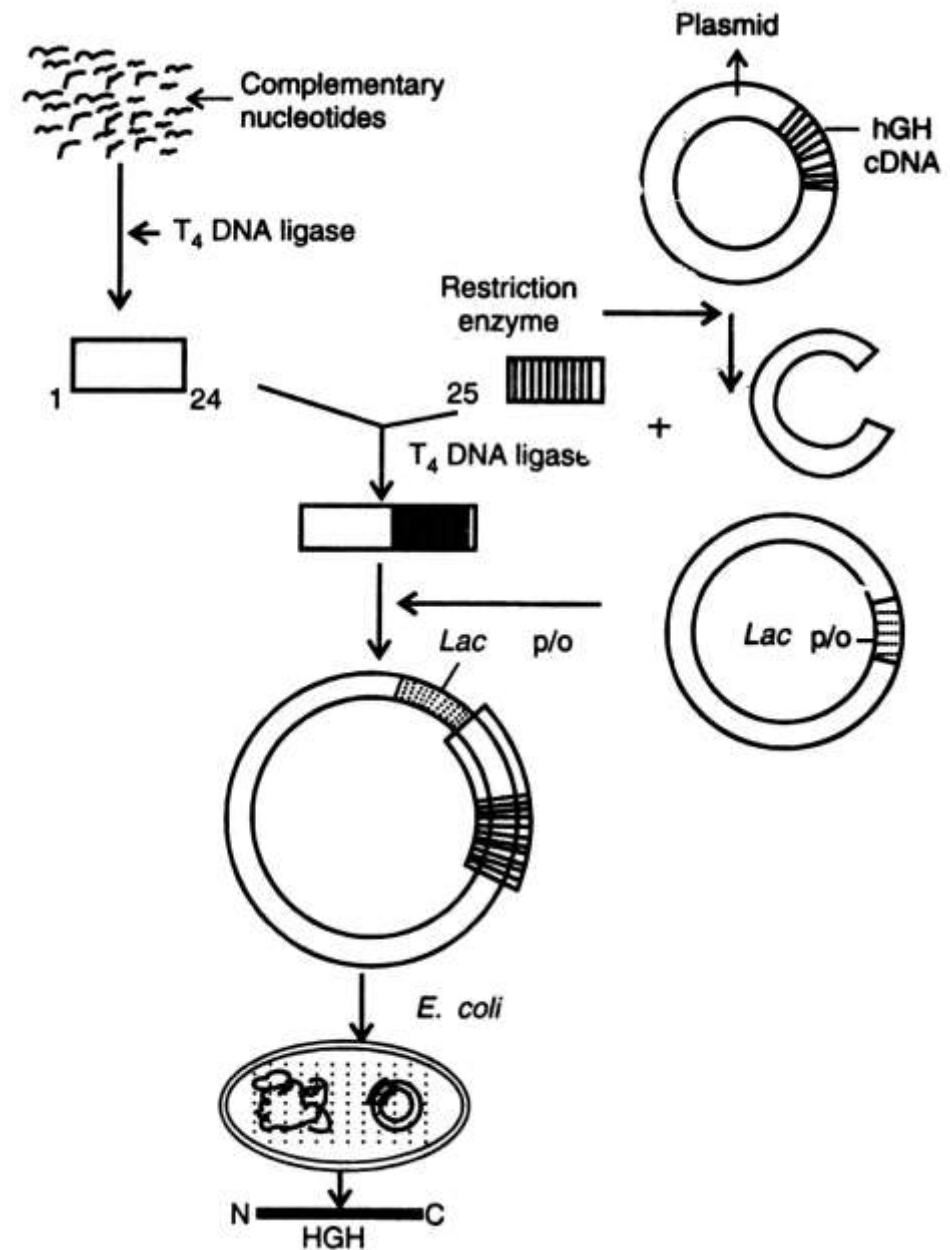
Mutacije so izvedli mestno-specifično in zamenjali nekatere aminokislinske ostanke, ki sodelujejo pri vezavi Zn^{2+} (His18, His21, Glu174), ki je nujno potreben za učinkovito vezavo na prolaktinski receptor, ne pa za vezavo na receptor za rastni hormon.



<http://www.hindawi.com/journals/ije/2012/516718/fig3/>



cDNA za prekurzor somatotropina so vstavili v *E. coli* in dobili procesiran rekombinantni somatotropin, ki pa ni bil aktiven. Ko so poskusili izraziti samo del, ki zapisuje za zrelo obliko, se protein ni izrazil. Zato so z restriktazo iz zapisa za prekurzor odcepili del, ki zapisuje za N-konec prekurzorja, tako da je ostal samo del od 25. ak naprej. Manjkajoči segment so sestavili na ravni DNA iz prekrivajočih se oligonukleotidov in ga dodali na klonirani preostanek v vektorju. Izražanje je potekalo pod kontrolo promotorja *lac* po dodatku IPTG. Raven izražanja je bila 100.00 molekul na celico (Newmark, 1979).

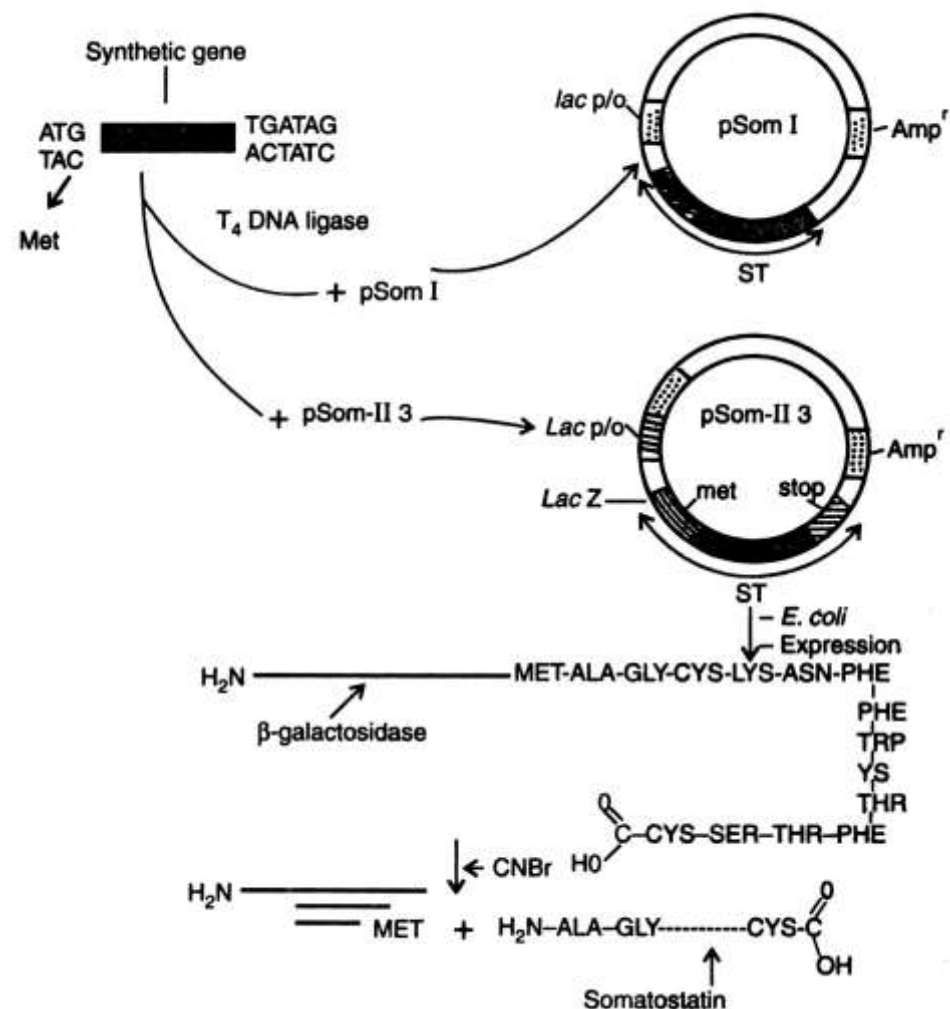


Rekombinantni somatostatin

Sproščanje rastnega hormona iz hipofize nadzorujeta dva hormona, somatotropin in GHRH. Somatotropin je 14 ak dolg peptid. Za njegovo proizvodnjo so prvič uporabili pristop s fuzijo (Itakura et al, 1977). Kot fuzijski partner je delovala betagalaktozidaza.

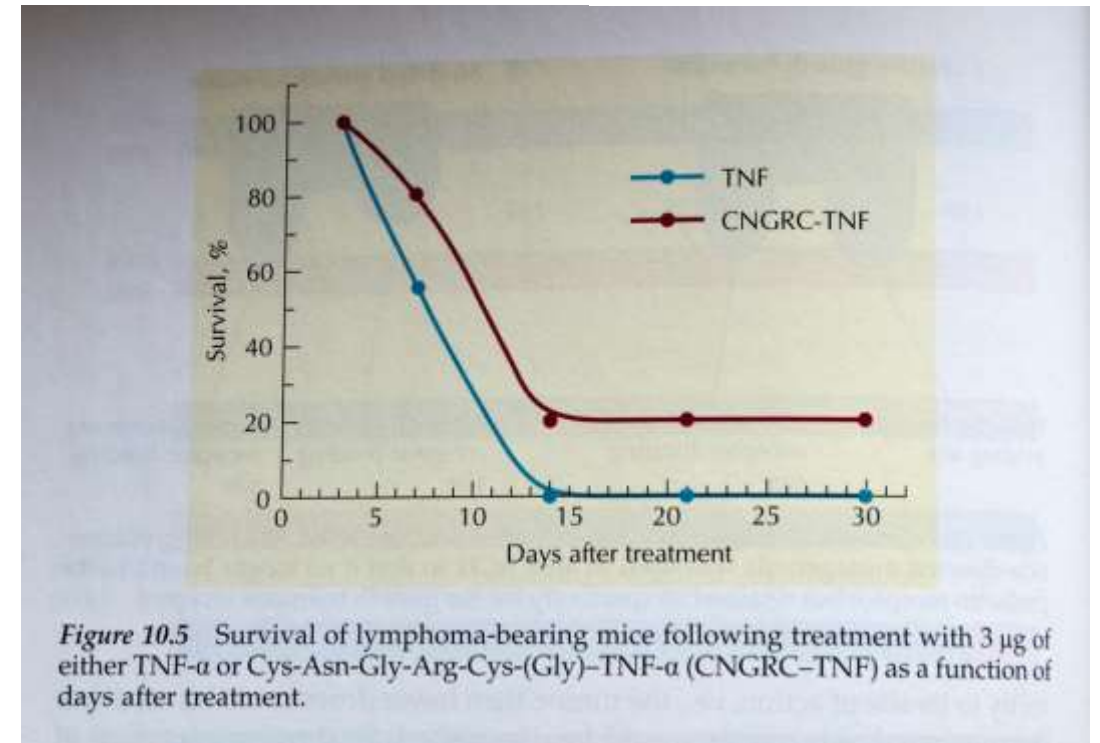
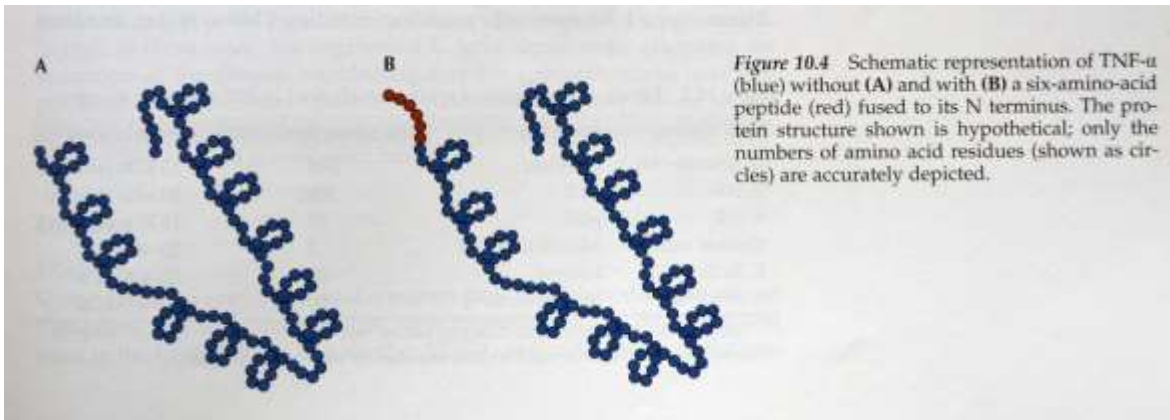
Zapis za peptid so sestavili iz 8 oligonukleotidov, ki so se medsebojno prekrivali, konca pa sta vsebovala prepoznavno mesto za *EcoRI*. Zapis za peptid se je končal z dvojnim stop kodonom, začel pa se je z dodatnim kodonom za Met.

Pripravili so dva konstrukta. Kot N-končna fuzija (za 7. ak β -gal) izražanja niso opazili, ko pa so zapis vstavili proti 3'-koncu zapisa za β -gal, pa je nastal rekombinantni fuzijski protein, ki so ga izolirali in cepili s CNBr.



Dejavnik tumorske nekroze (TNF)

Čeprav ima TNF-a močno protitumorsko aktivnost, je zaradi močne toksičnosti v naravni obliki neuporaben za sistemsko zdravljenje, ki zahteva velike doze. Z dodatkom 6 ak na N-konec (CNGRCG) se citotoksičnost ni spremenila, inhibicija rasti rakavih celic pa je bila 15x močnejša, zato so lahko bile doze manjše. Protein se je kljub podaljšku pravilno zvil in trimeriziral. Pri poskusnih miših so dosegli boljše rezultate zdravljenja, razen tega pa so preživele miši prestale tudi dve dodatni injiciranji limfomskih celic.



Optimiziranje ravni izražanja

Pri biotehnološki proizvodnji ni pomembno samo pridobiti čimveč produkta, pač pa je treba paziti tudi na avtentičnost in homogenost zaradi možnih težav pri registriranju zdravila. Smiselno je preveriti več ekspresijskih sistemov in različne konstrukte. Pri pripravi interleukina 3 so izbrali ekspresijski sistem v *B. licheniformis*, ker je bil rekombinantni protein homogen in nefuziran, čeprav ni bil glikoziliran (kot naravni), niti ravni izražanja niso bile najvišje.

Table 10.2 Levels of interleukin-3 synthesis achieved in different host systems

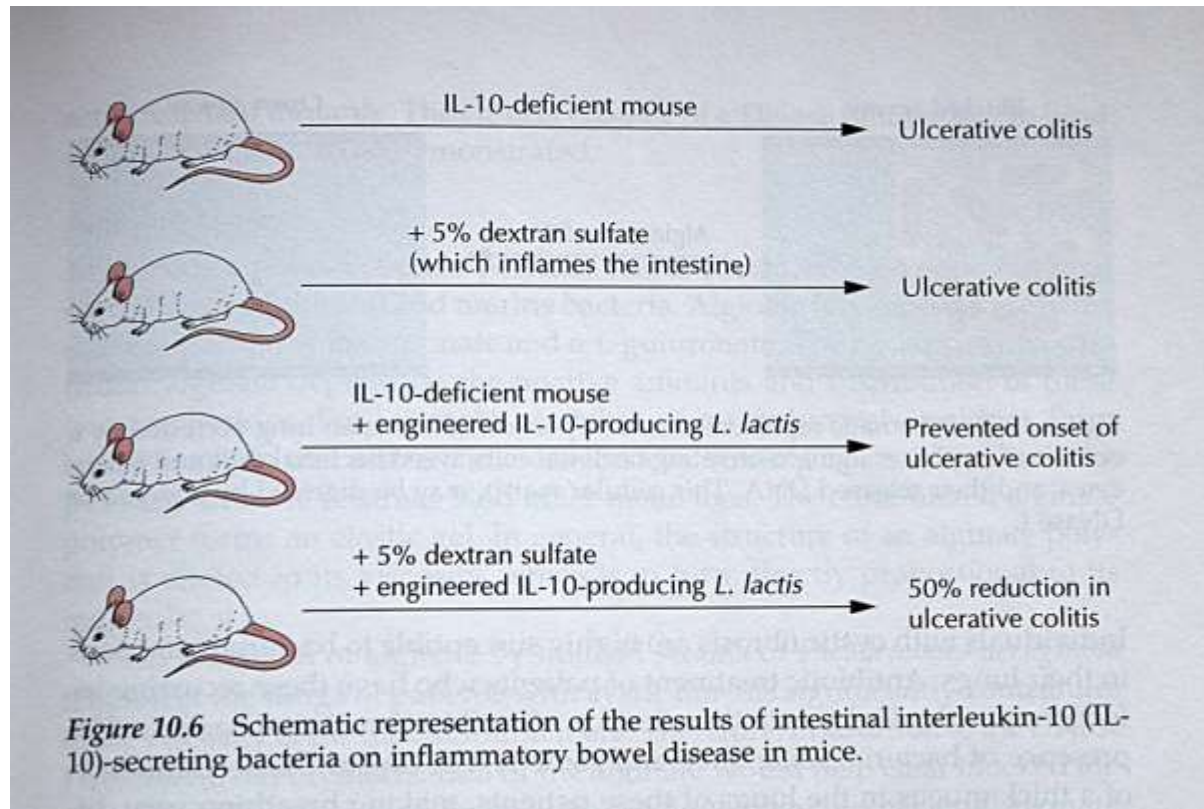
Host system	Promoter	Expression level (units)	Protein form
<i>B. licheniformis</i>	Amylase	300	15 kDa (mature)
<i>E. coli</i>	<i>lacZ</i>	500	20 kDa (fusion)
<i>E. coli</i>	<i>lacZ</i>	20	15 kDa (mature)
Human cells	Metallothionein	2	20–40 kDa
<i>K. lactis</i>	Lactase	20	20–100 kDa
<i>S. cerevisiae</i>	Mating factor α	20	20–100 kDa

Adapted from van Leen et al., *Bio/Technology* 9:47–52, 1991.

In each case, one of the strongest available promoters for that system was used.

Terapevtiki, ki jih proizvajajo črevesne bakterije

Ulcerativni kolitis in Chronova bolezen prizadana ~0,2 % ljudi v razvitem svetu. Gre za prekomerno izražanje nekaterih citokinov (interlevkini, $TNF-\alpha$, $IFN\alpha$). Njihovo koncentracijo lahko poskusimo zaustaviti s protitelesi, ali pa z izražanjem IL-10 (modulira T-celični odgovor na vnetja zaradi prebavnih antigenov) pri pacientih s Chronovo boleznijo. Problem z IL-10 je, da ga je treba injicirati zelo pogosto ali pa uvajati s klistiranjem. Kot alternativo so razvili bakterije *Lactococcus lactis*, ki izločajo rekombinantni IL-10. *L. lactis* je neinvazivna nepatogena bakterija za proizvodnjo mlečnih izdelkov in ne kolonizira črevesja. Je gramnegativna probiotična bakterija. Uporabnost za zdravljenje kronične vnetne črevesne bolezni so preverili pri miših z inducirano boleznijo in modelnih miših brez gena za IL-10. Rezultati so bili vzpodbudni.

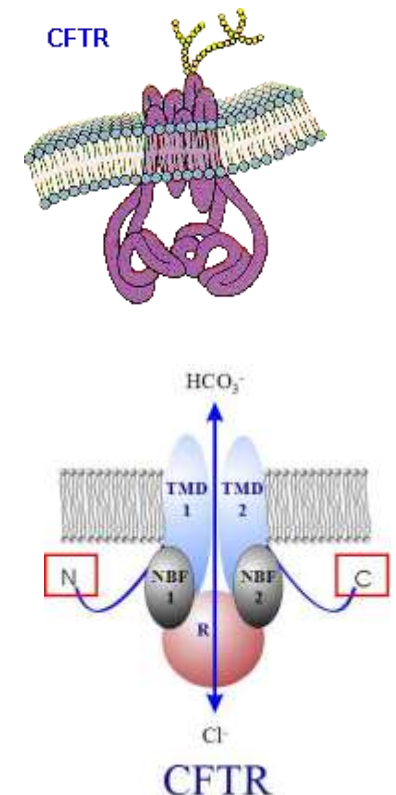
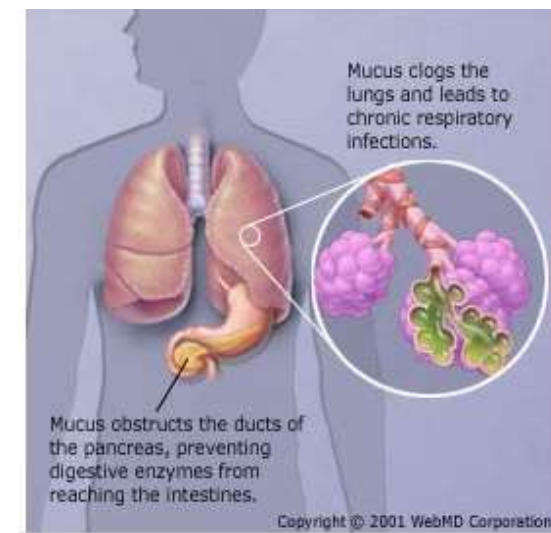
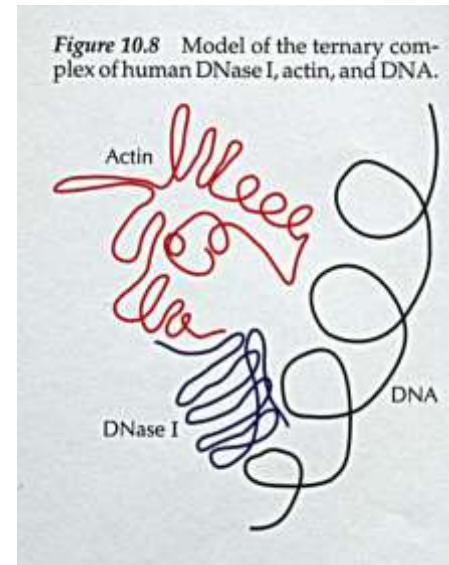
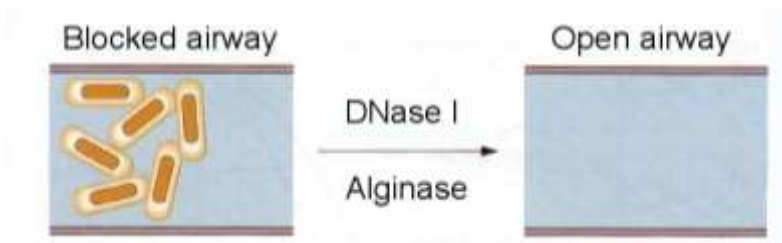


Rekombinantni preparati pri cistični fibrozi

Pri cistični fibrozi (avtosomni dedni bolezn, 1/5000 novorojenih) prihaja do pogostih pljučnih bakterijskih okužb. Zdravimo jih z antibiotiki, kar pogosto privede do razvoja odpornosti.

Dihala so prekrita s sluzjo, v njej se nabirajo bakterije in levkociti, kar otežuje dihanje. K debelini oblog prispeva tudi velika količina dolgih molekul bakterijske in levkocitne DNA, ki se je sprostila iz odmrlih celic. Kot sredstvo za lajšanje težav pri dihanju so v celicah CHO pripravili **DNazo I**, ki jo bolniki vdihavajo kot aerosol. Prodaja tega sredstva v ZDA presega 130 mio USD letno.

Patogene bakterije, ki okužijo dihala in se ujamejo v sluzi, izločajo ne le DNA, pač pa tudi aktin, ki se zelo močno veže na DNazo I ($K_i = 1 \text{ nM}$). Modeli, ki so temeljili na kristalnih strukturah goveje DNaze so pokazali, da zaradi vezave aktina na DNazo pride do zmanjšane vezave na DNA. Identificirali so ostanke, ki so odgovorni za vezavo na aktin, in ugotovili, da zamenjava Ala144Arg ali Tyr65Arg zmanjša vezavo aktina 10.000x, hkrati pa se aktivnost poveča za do 50x.



Rekombinantni preparati pri cistični fibrozi /2

Alginat je polisaharidni polimer, ki ga izločajo mnoge bakterije in s tem ustvarijo sluzast ovoj okrog sebe. Pri pacientih s cistično fibrozo pride pogosto do okužbe z bakterijo *Pseudomonas aeruginosa* in njen alginatni izloček oži dihalne poti. Razen DNaze bi za lajšanje težav pri dihanju lahko uporabili tudi **alginat liazo**, ki depolimerizira alginat.

Gen za alginat liazo so izolirali iz talne bakterije *Flavobacterium* po presejanju ekspresijske knjižnice, pripravljene v *E. coli*.

Kolonije, ki so vsebovale funkcionalen zapis za alginat liazo, so razgrajevale substrat v gojišču. Analizirali so DNA iz pozitivnih klonov in ugotovili, da zapisujejo za protein velikosti ~69 kDa.

Ker je samo ena od domen (40 kDa) potrebna za cepitev bakterijskega alginata, so s PCR pomnožili le zapis za ta del, in ga vstavili v vektor za *B. subtilis*, kjer so ga izrazili kot fuzijo s signalnim peptidom α -amilaze pod kontrolo penicilaznega promotorja. Rekombinantni encim se je izločal iz celic in je bil biološko aktiven.

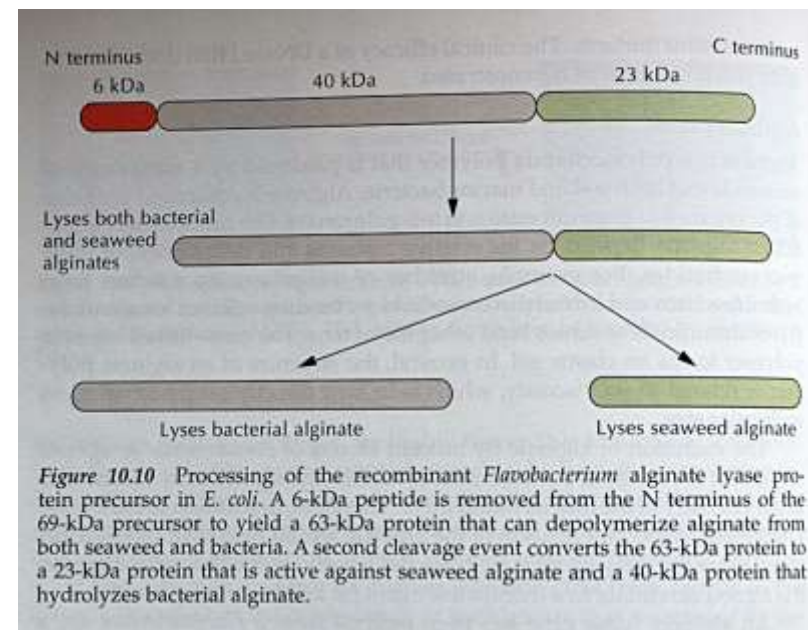
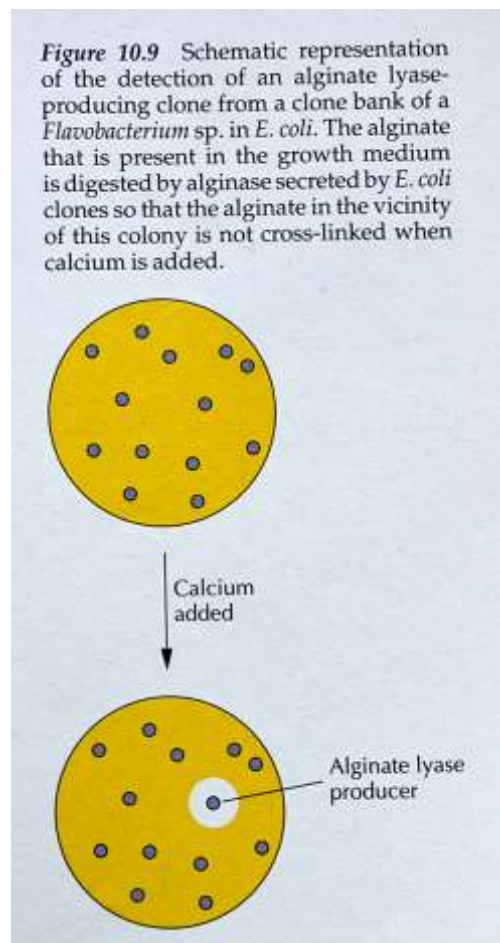
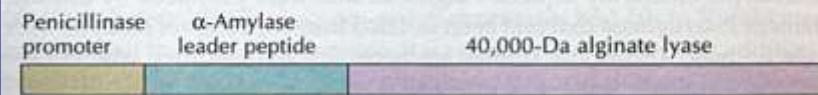


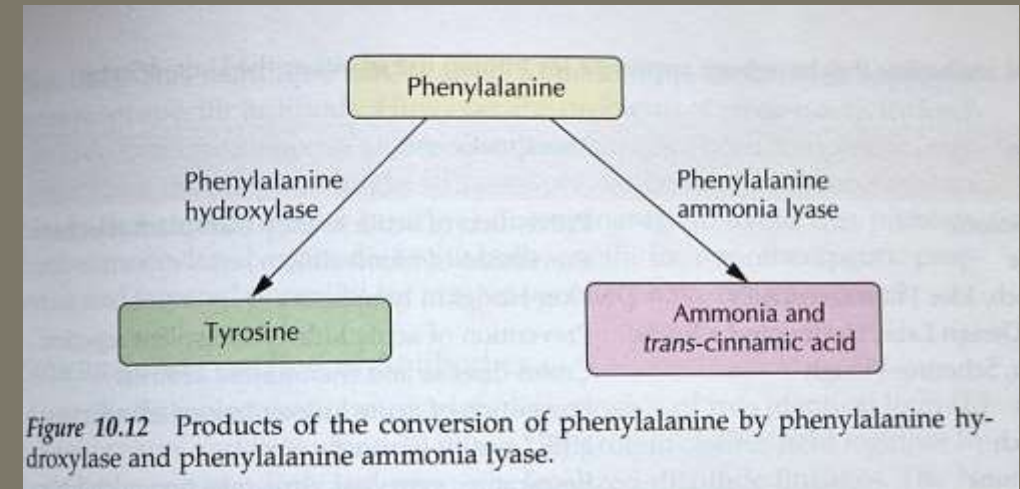
Figure 10.11 DNA construct encoding the 40,000-Da alginate lyase. The leader peptide from a *B. subtilis* α -amylase gene is fused to the N terminus of the alginate lyase coding sequence. The construct is under the transcriptional control of a *B. subtilis* penicillinase gene expression system.



Fenilketonurija

Zaradi nedelovanja fenilalanin hidrosilaze ne nastaja Tyr, kar vodi do zaostajanja umskega razvoja. Potrebno je izrazito zmanjšanje zaužitja Phe. Alternativa bi bilo zdravilo, ki bi predstavljalo aktiven encim, a ta je izrazito nestabilen multiencimski kompleks in potrebuje kofaktor.

Ugotovili so, da ima fenilalanin amonliaza sposobnost razgradnje Phe. Ta encim je stabilen in neodvisen od kofaktorja. Gen za Phe amonliazo so izolirali iz kvasovke *Rhodospiridium toruloides*, rekombinantni encim pa so pripravili v *E. coli*. Pri miših je bil encim aktiven po injiciranju in celo po zaužitju enkapsulirane obilke.



Inhibicija prekurzorjev

Številne patogene bakterije in virusi sintetizirajo rekurzorske proteine, ki se morajo procesirati do aktivne oblike ob delovanju človeških proteaz. Pogosto je cepitveno mesto za zaporedjem Arg-X-Lys/Arg-Arg.

Pripravili so rekombinantno obliko inhibitorja α 1-antitripsina. V poskusih na tkivnih kulturah je inhibitor preprečil procesiranje glikoproteina gp160 virusa HIV in proteina F_0 virusa ošpic, tako da niso mogli nastajati novi virusni delci. Prav tako je varianta inhibitorja preprečevala razmnoževanje citomegalovirusa.

Zdravila v rastlinah

Pri proizvodnji učinkovin za zdravljenje v rastlinah je treba paziti na razlike v glikozilaciji, ki lahko spremenijo lastnosti rekombinantnega proteina.

Table 1. Plant-derived pharmaceutical proteins for potential medical use that have reached clinical development

Product	Medical condition treated by the drug	Source	Status	Refs
Vaccines				
<i>E. coli</i> heat labile toxin	Diarrhea	Maize, potato	Two independent phase I trials	[28,29]
HBsAg	Hepatitis B	Lettuce, potato	Two independent phase I trials	[30,31]
Norwalk virus capsid protein	Sickness and diarrhea	Potato	Phase I trials	[32]
Rabies glycoprotein	Rabies	Viral vectors in spinach	Phase I trials	[33]
Antibodies				
LSBC scFVs	Non-Hodgkin's lymphoma	Viral vectors in tobacco	At least 12 personalized antibodies submitted for phase I trials	Original study [34] ^a
Avicidin	Colorectal cancer	Transgenic maize	Withdrawn from phase II trials in 1998	
CaroRX	Dental caries	Transgenic tobacco	Phase II trials	[35]
Other products				
Gastric lipase	Cystic fibrosis, pancreatitis	Transgenic maize	Phase II trials	^b
Human intrinsic factor	Vitamin B12 deficiency	Transgenic <i>Arabidopsis</i>	Phase II trials	^c
Lactoferrin	Gastrointestinal infections	Transgenic maize	Phase I trials	^b

^aSee also <http://www.lsbc.com>

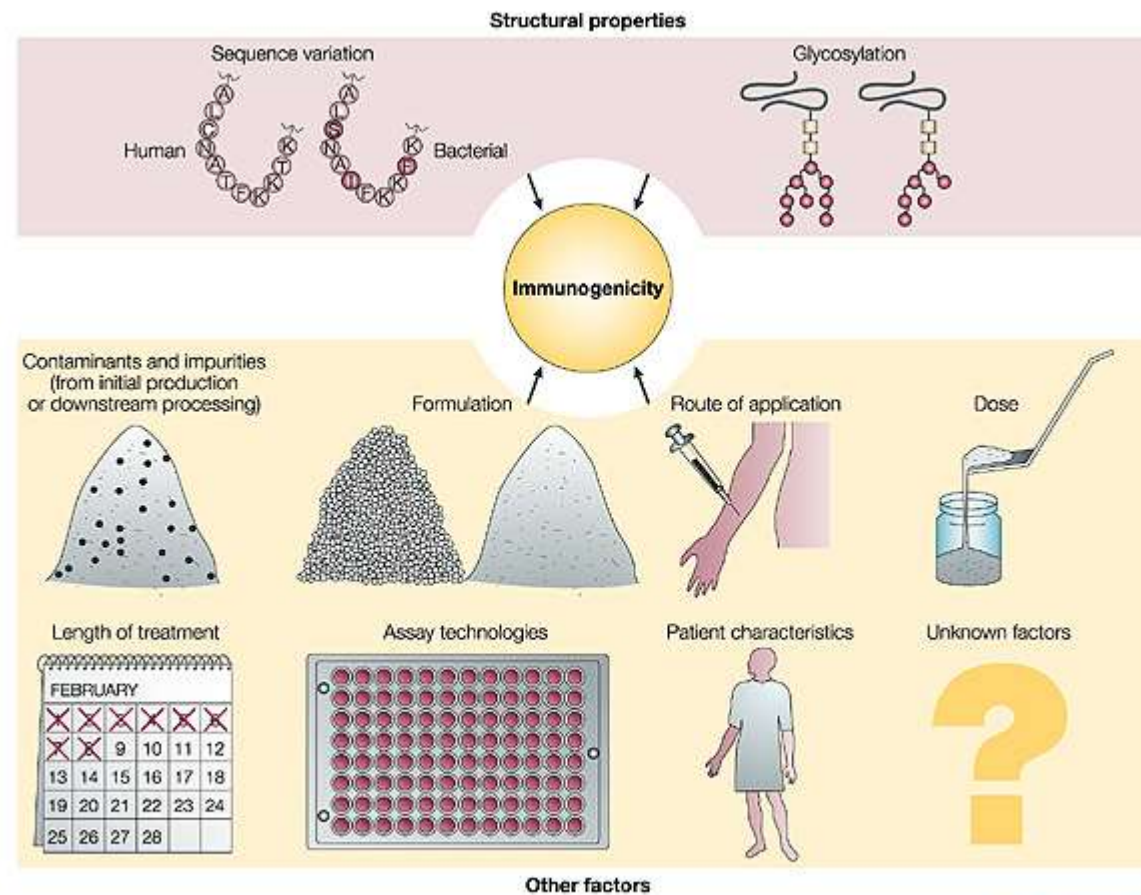
^b<http://www.meristem.com>

^c<http://www.cobento.com>

Problemi pri uporabi biofarmacevtikov

Problem imunogenosti – razlogi so:

- razlike v aminokislinskem zaporedju
- razlike v glikozilacijskem vzorcu
- nečistoče v končnem izdelku
- neprimerna formulacija izdelka
- napačna doza ali način vnosa
- značilnosti pacienta
- dolžina zdravljenja



Nature Reviews | Drug Discovery

Nature Reviews Drug Discovery 1, 457-462 (June 2002)