



## Nowe leki otrzymywane przy udziale technologii rekombinowanego DNA

Katarzyna Kieć-Kononowicz

Katedra Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych,  
Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

### New drugs based on recombinant DNA technology

#### Summary

Over the last 20 years, some 100 biopharmaceuticals have gained marketing authorization in Europe, USA and other world regions. All biopharmaceutical products currently approved within the EU are protein-based. The majority of the first generation products were either unmodified monoclonal antibodies or proteins used clinically to either replace or augment levels of native human proteins. With the recent advances in genomics, proteomics, pharmaceutical target validation, and lead compound identification new perspectives of biopharmaceutical products development emerged. Protein engineering has recently facilitated the rational development of a number of proteins displaying an altered pharmacokinetics, biodistribution and therapeutic properties. New strategies and challenges in biopharmaceuticals developments yielded the second generation of protein drugs.

#### Key words:

biopharmaceuticals, drugs of recombinant DNA technology, protein drugs, protein engineering, second generation of protein drugs.

#### Adres do korespondencji

Katarzyna  
Kieć-Kononowicz,  
Katedra Technologii  
i Biotechnologii Środków  
Leczniczych,  
Collegium Medicum,  
Uniwersytet Jagielloński,  
ul. Medyczna 9,  
30-688 Kraków.

### 1. Wstęp

Produkcja leków o strukturze białkowej była pierwszym przemysłowym zastosowaniem technologii rekombinowanego DNA. Od lat osiemdziesiątych XX w. różnorodne białka terapeutyczne otrzymane przy udziale tej technologii zostały dopuszczone do obrotu w Europie, Stanach Zjednoczonych i innych częściach świata (1). Tworzą one grupę tzw. biofarmaceutyków, definiowanych pierwotnie jako farmaceutyki otrzymywane z za-

stosowaniem technologii rekombinowanego DNA lub technologii przeciwciał monoklonalnych (2). Pod względem budowy biofarmaceutyki mogą być strukturami:

- o budowie peptydowej,
- wyprowadzonymi ze struktury kwasów nukleinowych.

Druga grupa biofarmaceutyków może znaleźć zastosowanie w terapii genowej oraz technologii antysensowej (obecnie nie ma na rynku farmaceutycznym leków o budowie polinukleotydowej; wyjątkiem jest Vitravene (Fomivirsen) – lek o antysensowym mechanizmie działania, wprowadzony do obrotu w USA w 1998 r., rok później w UE, został jednak wycofany z rynku europejskiego).

Biofarmaceutykami o budowie peptydowej (tab. 1) są czynniki krzepnięcia krwi, hormony, hematopoetyczne czynniki wzrostu, leki trombolityczne, cytokiny, przeciwciała monoklonalne, szczepionki itp. (1,2).

Tabela

## Wybrane przykłady biofarmaceutyków dopuszczonych do obrotu w USA lub w UE

Biofarmaceutyk	Firma (kraj)	Zastosowanie terapeutyczne	Rok
1	2	3	4
<b>Czynniki krzepnięcia krwi</b>			
Benefix (rh cz. IX, CHO)	Genetics Institute (USA)	hemofilia B	1997
NovoSeven (rh cz. VIIa, BHK)	NovoNordisk (DK)	hemofilia	1996
ReFacto (rh cz. VIII, CHO)	Pharmacia & Upjohn (S)	hemofilia A	1999
Kogenate (rh cz. VIII, BHK)	Bayer (USA)	hemofilia A	2000
Helixate NexGen (rh cz. VIII, BHK)	Bayer (USA)	hemofilia A	2000
<b>Trombolityki</b>			
Activase (Alteplase) (rtPA, CHO)	Genentech	ostry zawał mięśnia sercowego	1987
Ecokinase (Reteplase) (rtPA, <i>E. coli</i> )	Boehringer Mannheim (D)	ostry zawał mięśnia sercowego	1996
Rapilysin (Reteplase) (rtPA, <i>E. coli</i> )	Boehringer Mannheim (D)	ostry zawał mięśnia sercowego	1996
TNKase (Tenecteplase) (mod. rtPA, CHO)	Genentech/ScheringPlough	ostry zawał mięśnia sercowego	2001
<b>Hormony</b>			
Humulin (rh insulin, <i>E. coli</i> )	Genentech (USA)	cukrzyca	1982
Insuman (rh insulin, <i>E. coli</i> )	Hoechst (D)	cukrzyca	1997
Humalog (Insulin lispro, <i>E. coli</i> )	Eli Lilly (USA)	cukrzyca	1996
Gensulin	Bioton (PL)	cukrzyca	05. 2000
NovoRapid (Insulin aspart)	Novo Nordisk	cukrzyca	1999
Lantus (Insulin glargine, <i>E. coli</i> )	Aventis Pharmaceuticals	cukrzyca	2000
Genotropin	Genentech	zaburzenia wzrostu	1985
Gonal-F (rh FSH, CHO)	Serono (CH)	niepłodność	1995
Puregon (rh FSH, CHO)	Diosynth (IRL)	niepłodność	1996
Ruvelis (Lutropin a, rh LH, CHO)	Serono	niepłodność	2000

1	2	3	4
<b>Cytokiny</b>			
Epogen (rh EPO, CHO)	Amgen	anemia	1989
Neorecormon (rh EPO, CHO)	Roche (D)	anemia	1997
Aranesp (Darbepoetin alfa, CHO)	Amgen	anemia	2001
Intron A (r IFN- $\alpha$ -2b, <i>E. coli</i> )	ScheringPlough (IRL)	przeciwwirusowe przeciwnowotworowe	2000
PEG-Intron (PEG IFN- $\alpha$ )	Enzon/ScheringPlough	WZWC	2001
Pegasys (PEG-rozgał. IFN- $\alpha$ )	Shearwater/Roche	WZWC	2002
Betaferon (r IFN- $\beta$ -1b, <i>E. coli</i> )	Schering (USA)	multiple sclerosis	1995
Avonex (rh IFN- $\beta$ -1a, CHO)	Biogen (USA)	multiple sclerosis	1997
Avonex (PEG-IFN- $\beta$ , CHO)	Biogen	multiple sclerosis	
Beromun (rh TNF- $\alpha$ , <i>E. coli</i> )	Boehringer-Ingelheim	wspomagający terapię prze- ciwnowotworową	1999
<b>Enzymy terapeutyczne</b>			
Oncospar (Asparaginaza)	Enzon (USA)	cytostatyk	1994
Oncospar (PEGyłowana L-asparaginaza)	Enzon (USA)	białaczka limfoblastyczna	
Adagen (PEGyłowana deaminaza adenozynowa)	Enzon (USA)	niedobór deaminazy adeno- zynowej	
Pulmozyme (DNase)	Genentech (USA)	mukowiscydoza	1993
Cerezyme (r $\beta$ – glukocerebrozydaza, <i>E. coli</i> )	Genzyme (USA)	choroba Gauchera	1997
Fabrazyme (rh $\alpha$ -galaktozydaza, CHO)	Genzyme	choroba Fabry'ego	2001
Fasturtec (Rasburicase) ( <i>S. cerevisiae</i> )	Sanofi-Synthelabo	hiperurykemia	2001
Revasc (r hirudyna, <i>S. cerevisiae</i> )	Novartis (CH)	przeciwzakrzepowe	1997
Refludan (r hirudyna, <i>S. cerevisiae</i> )	Hoechst	przeciwzakrzepowe	1997
<b>Szczepionki</b>			
Tritanrix – HB (rHBsAg, <i>S. cerevisiae</i> )	Smith Kline Beecham	WZWB	1996
Infanrix – HepB	Smith Kline Beecham	WZWB	1997
Infanrix – Xexa	Smith Kline Beecham	WZWB	2000
Infanrix – Penta	Smith Kline Beecham	WZWB	2000
Ambirix	Glaxo Smith Kline	WZWB, A	2002
<b>Przeciwciała monoklonalne</b>			
Orthclone OKT3	Ortho Biotech (USA)	immunosupresant	1986
Prosta Scint	Cytogen Corp. (USA)	diagnostyka raka prostaty	1996
Onco Scint	Cytogen (USA)	diagnostyka raka jajnika	1992
CEA-SCAN	Immunomedics Inc. (USA)	diagnostyka raka jelita grubego	1996
Myo Scint	Centocor B.V. (USA)	schorzenia mięśnia sercowego	1996
Indimacis-125	CIS Bio (UE)	diagnostyka raka jajnika	1996

Ze względu na nowe możliwości inżynierii genetycznej rozszerzono pojęcie leku i w *Farmakopei Europejskiej* (3) z 1998 r., w monografii *Produkty otrzymywane*

z użyciem technologii rekombinowanego DNA zdefiniowano je oddzielnie następująco:

*Produkty otrzymywane z użyciem technologii rekombinowanego DNA wytwarzane są z wykorzystaniem modyfikacji genetycznej, przy której kodujące DNA pożądanego produktu jest wprowadzane – zwykle za pomocą plazmidu lub wektora wirusowego – do odpowiedniego mikroorganizmu lub linii komórkowej, gdzie to DNA podlega ekspresji i translacji. Pożyczony produkt jest następnie pozyskiwany na drodze ekstrakcji i oczyszczania.*

*Komórka lub mikroorganizm przed zasiedleniem wektora jest określana jako **komórka gospodarza**; trwałe połączenie tych dwóch elementów, używane w procesie wytwarzania definiowane jest jako **układ gospodarz – wektor**.*

Proces wytwarzania i stosowania biofarmaceutyków peptydowych przynosi szczególne problemy, związane z odpowiednią czystością produktów (możliwość zanieczyszczenia obcymi białkami lub DNA), ich analizą oraz sposobem podania. Podano wytyczne (4,5), dotyczące określenia równoważności otrzymywanych biofarmaceutyków peptydowych. Wytyczne uwzględniają określenie:

- struktury pierwszorzędowej (skład aminokwasów; całkowita masa cząsteczki i masa produktu po deglikozylacji – MALDI-TOF; mapy peptydowe – ESI-MS; sekwencje N- i C-terminalne; izoformy – IEF),
- struktury fragmentów glikanowych (rodzaj, rozmieszczenie, reszty sjałowe; określenie masy cząsteczkowej enzymatycznie odszczepionych węglowodarów – analiza chromatograficzna MS),
- struktury drugorzędowej (mostki disulfidowe – MS; dichroizm kołowy, spektrometria fluorescencyjna),
- aktywności (zawartość i stężenie; testy komórkowe; FACS – stałe wiązania),
- czystości (elektroforeza – SDS-PAGE, IEF; chromatografia – RP-HPLC, IEC, SEC; analiza agregacji, utlenienia, deamidacji; zanieczyszczenia związane z procesem hodowli komórkowych i oczyszczania).

Wytyczne obejmują także metody, które mogą być w tym zakresie stosowane.

W dziedzinie farmaceutyków białkowych zanotowano dwie rewolucje. Pierwsza zaczęła się w latach siedemdziesiątych XX w. wraz z jednoczesnym rozwojem technologii rekombinowanego DNA i technologii przeciwciał monoklonalnych. Druga rozpoczęła się wraz z rozwojem genomiki, sekwencjonowaniem ludzkiego genomu oraz utworzeniem setek firm biotechnologicznych. Genomika, jak się wydaje, wywrze ogromny wpływ na rodzaj leków wprowadzanych na rynek, ale ten proces może wymagać upływu dłuższego czasu. Wraz z wygaśnięciem ochrony patentowej pierwszych biofarmaceutyków, wiele firm biotechnologicznych wprowadza drugą generację leków białkowych. Biorąc pod uwagę analogię z II generacją leków o małych cząsteczkach, ten sposób może nieść mniej czynników ryzyka oraz wiązać się z łatwiejszym do przewidzenia niezbędnym okresem niż metody związane z zastosowaniem genomiki w poszukiwaniu nowych leków (6-9).

Pierwsze leki białkowe wytwarzane metodami inżynierii genetycznej miały na celu zastąpienie lub uzupełnienie niedoboru natywnych białek ludzkich. Przykładami są tkankowy aktywator plazminogenu – Activase (Genentech), erytropoetyna – Epo-gen (Amgen) czy interferon- $\alpha$  – Intron A (Schering Plough) (2,6-8). U podstaw rozwoju tych leków leżała chęć rozwiązania problemów związanych z dostępnością odpowiednich surowców (minimalne ilości wytwarzanych fizjologicznie cytokin uniemożliwiają ich produkcję na dużą skalę za pomocą bezpośredniej ekstrakcji ze źródeł naturalnych) oraz względy bezpieczeństwa – aby zapobiec ryzyku przypadkowego przeniesienia patogenów z produktów pozyskiwanych z zainfekowanych surowców. Wraz z rozwojem inżynierii białkowej możliwe są ponadto zmiany w składzie aminokwasów, co otwiera nowe, ogromne możliwości. Zmiany te mogą dotyczyć zmiany (substytucji) niektórych aminokwasów, insercję/delecję jednego aminokwasu lub łańcucha aminokwasów, lub fuzję dwu lub więcej polipeptydów. W dalszej przyszłości dyscyplina ta może prowadzić do projektowania *de novo* białek. Obecnie w dziedzinie rozwoju biofarmaceutyków inżynieria białkowa była wykorzystywana by:

- zmieniać biologiczny okres półtrwania leków białkowych,
- otrzymywać krótko/długo działające leki,
- zmieniać immunogenność leków,
- otrzymywać nowe/fuzyjne białka terapeutyczne.

## 2. Inżynieria trombolityków

Tkankowy aktywator plazminogenu (tPA), należący do pierwszych biofarmaceutyków, był jako jeden z pierwszych poddany modyfikacjom na drodze inżynierii białkowej (6). Naturalny htPA jest proteazą serynową zbudowaną z 527 aminokwasów, wytwarzaną przez śródbłonek naczyń krwionośnych, katalizuje reakcję przekształcenia plazminogenu w plazminę, która z kolei katalizuje przejście fibryny w produkty rozpuszczalne. W niezmodyfikowanym tPA wyróżnić można 5 domen strukturalnych, z których każda spełnia specyficzną funkcję (domena F – odpowiedzialna za wysokie powinowactwo do fibryny; domena P – za specyficzną aktywność proteolityczną plazminogenu; domena EGF – wiązanie z receptorami wątrobowymi, uruchamiające klirens wątrobowy; domena K<sub>1</sub> – wiązanie z receptorem; domena K<sub>2</sub> – pozwala na stymulację przez fibrynę aktywności proteolitycznej). Natywne białko jest glikozylowane, fragmenty cukrowe ułatwiają wątrobowy wychwyt tPA i klirens z surowicy krwi. Jest to glikoproteina nieczynna w prawidłowych procesach życiowych (fizjologicznych). Przekształcenie w postać czynną następuje dopiero po połączeniu z fibryną; tPA jest stosowany w leczeniu fibrynolitycznym ostrego zawału mięśnia sercowego. Pierwsza forma otrzymana przy udziale technologii rekombinowanego DNA wprowadzona do lecznictwa to Activase (Alteplase, Genentech, 1987 r., wytwarzany w linii komórkowej CHO). Reteplase (Rapilysin) jest produktem inżynierii tPA dopuszczonym na rynek UE w 1996 r. Cząsteczka składa się tylko z 2 naturalnych domen tPA, domeny katalitycznej (P) i do-

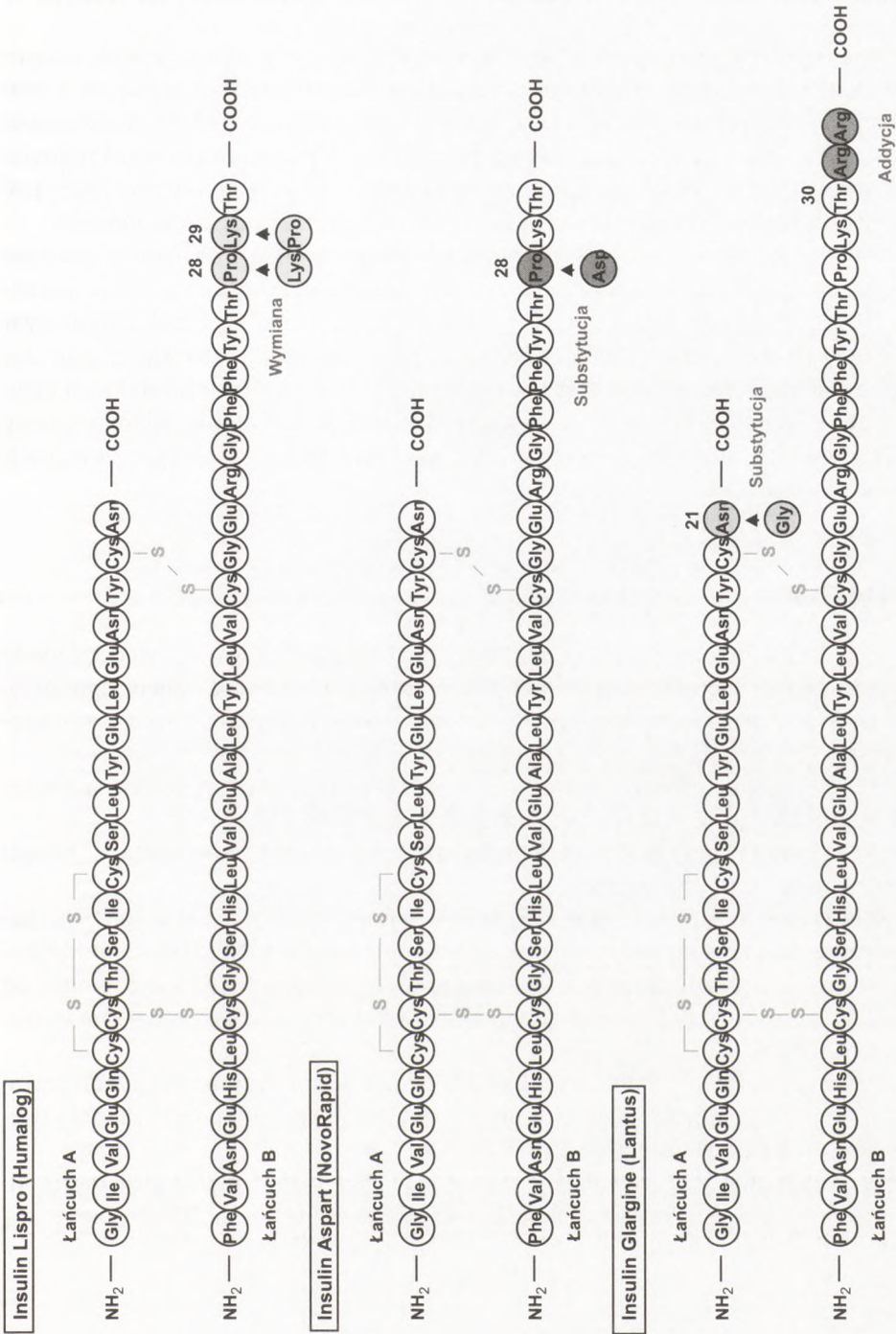
meny  $K_2$ . Wytwarzana jest w *E. coli*, nie jest zatem glikozylowana. Brak glikozylacji, a także brak domen EGF i  $K_1$  powoduje, że Reteplase posiada znacznie wydłużony biologiczny okres półtrwania, pozwalający na stosowanie preparatu w pojedynczych iniekcjach dożylnych. Natywny tPA ma 3 min okres półtrwania, tak zatem musi być podawany w infuzjach przez ok. 90 min. Brak domeny  $F_1$  redukuje powinowactwo do fibryny, pozwalając na dyfuzję zmodyfikowanego aktywatora plazminogenu do wnętrza skrzepu, co prawdopodobnie ułatwia szybszy rozpad skrzepu.

TNKase (Tenecteplase, Genentech, 2001, CHO) jest innym przykładem zmodyfikowanego tPA wykazującego przedłużony okres półtrwania (10). Wytwarzany w linii komórkowej CHO, TNKase różni się od naturalnego tPA zastąpieniem aminokwasów w trzech pozycjach. W wyniku tego stwierdzono zwiększenie specyficzności wiązania z fibryną, w efekcie – zmniejszenie klirensu z osocza krwi, oraz zwiększenie odporności na działanie PAI-1 (naturalnego inhibitora tPA) (11).

### 3. Inżynieria insuliny

Insulina była pierwszym biofarmaceutykiem dopuszczonym do leczenia (Humulin, Eli Lilly, 1982) (2,6). Częsteczki naturalnej insuliny, przechowywanej w stężeniach stosowanych w terapii wykazują tendencję do asocjacji, tworząc dimery, heksamery. Po podaniu (podskórnym, lub domięśniowym) wytwarzają się złogi insuliny, z których muszą oddysocjować pojedyncze cząsteczki, by móc przeniknąć do układu krążenia. Wskutek tego, maksymalne stężenie insuliny stwierdzane jest we krwi dopiero po 90-120 min po iniekcji. Wymaga to podawania insuliny pacjentom na godzinę (lub więcej) przed posiłkiem, w konsekwencji pacjenci muszą zachować pewien reżim czasu posiłków.

Za asocjację cząsteczek insuliny odpowiedzialny jest głównie C końcowy fragment łańcucha B cząsteczki (rys. 1). Wykazano doświadczalnie, że modyfikacje aminokwasów w tym fragmencie cząsteczki mogą redukować zdolność cząsteczek insuliny do asocjacji. Tak zmodyfikowana insulina (szybko działająca) osiąga krążenie szybciej po podaniu drogą iniekcji, umożliwiając podawanie leku bezpośrednio przed posiłkiem. Przykładami tego typu leków są Humalog (Insulin lispro, 1996, *E. coli*) – prolina i lizyna w pozycjach 28 i 29 łańcucha B uległy zamianie, Liprolog (Bio Lysprol, 1997, *E. coli*) i NovoRapid (Insulin aspart, 1999) – wymiana aminokwasu prolina na kwas asparaginowy. Lantus (Insulin glargine, 2000, *E. coli*) – w łańcuchu A w pozycji 21 glicyna zastępuje asparaginę oraz zostają dołączone dwie cząsteczki argininy do C końca łańcucha B, jest przykładem dopuszczonej do obrotu insuliny modyfikowanej, wykazującej przedłużone działanie (insulina długo działająca). Wprowadzone modyfikacje powodują przesunięcie punktu izoelektrycznego cząsteczki w kierunku wartości obojętnych. W konsekwencji insulina jest słabiej rozpuszczalna w fizjologicznym pH. Po podaniu, produkt tworzy w miejscu iniekcji mikrozłogi, z których poszczególne cząsteczki insuliny są powoli uwalniane do krwi (12).



Rys. 1. Inżynieria insuliny, zmiany w natywnej cząsteczce insuliny ludzkiej.

#### 4. Wydłużanie biologicznego okresu półtrwania białek terapeutycznych

Wiele leków ulega szybkiemu procesowi wydalania z organizmu. Białka o masie cząsteczkowej mniejszej niż 50 000 Da usuwane są przez nerki i wydalane z moczem. Jeśli cząsteczki o małej masie, takie jak interleukina-2 (IL-2), interferon- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) i interferon- $\beta$  (INF- $\beta$ ) zostaną podane dożylnie, ich biologiczny okres półtrwania w surowicy krwi wynosi ok. 5 lub mniej godzin. Białka terapeutyczne mogą być także degradowane przez proteazy przed lub po internalizacji do komórek.

Modyfikacje chemiczne za pomocą dużych obojętnych ugrupowań lub połączenie z drugą cząsteczką białka to dwie metody służące otrzymaniu leków o przedłużonym okresie półtrwania. Otrzymywane są cząsteczki o znacznie zmienionym ciężarze cząsteczkowym białka terapeutycznego – powyżej 50 000 Da, tj. powyżej progu zdolności usuwania cząsteczek przez nerki. W niektórych produktach inżynierii genetycznej – białkach fuzyjnych, dołączony fragment nie tylko w prosty sposób zwiększa masę cząsteczkową leku, ale także może zapobiegać degradacji cząsteczek przez proteazy (9).

#### 5. PEGylacja

Sprawdzoną metodą wydłużania okresu półtrwania białek jest PEGylacja. Glikole polietylenowe są niereaktywnymi polimerami, które mogą być kowalencyjnie przyłączane do białek terapeutycznych. Przykładami leków modyfikowanych w ten sposób są:

- PEGylowana deaminaza adenozykowa (Adagen; firma Enzon), stosowana w terapii genetycznego niedoboru deaminazy adenozykowej;

- PEGylowana L-asparaginaza (Oncospar; firma Enzon), stosowana w terapii ostrej białaczki limfoblastycznej;

- PEG-Intron (Pegintron, wprowadzony na rynek farmaceutyczny w 2001 r.), charakteryzuje się okresem półtrwania ok. 5 razy dłuższym niż INF- $\alpha$ -2b niemodyfikowany – w ten sposób może być stosowany raz w tygodniu (w odróżnieniu od INF- $\alpha$ -2b, stosowanego 3 razy w tygodniu) w terapii chronicznego zapalenia wątroby typu C (WZW C);

- Pegasys (wprowadzony na rynek w 2002 r.), o podobnym jak Pegintron zastosowaniu terapeutycznym, to lek, w którym rozgałęziona pochodna glikolu polietylenowego została przyłączona do INF- $\alpha$ -2a (13).

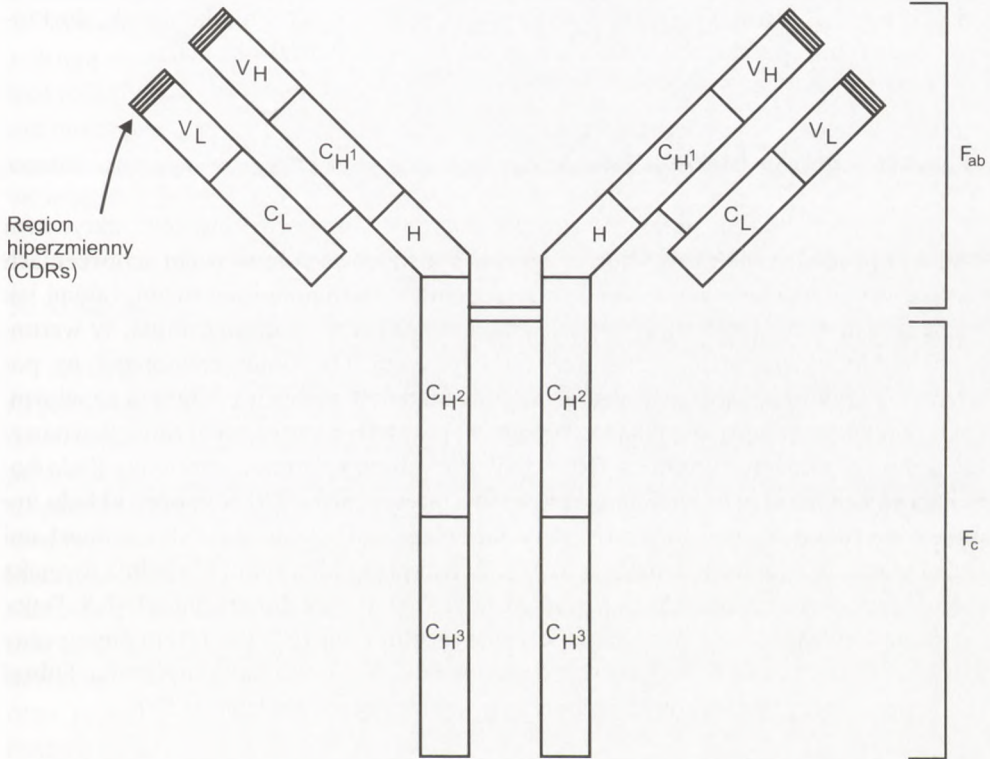
Pegasys (Roche) jest stosowany w kombinacji z lekiem przeciwwirusowym Ribavirin. Firma Biogen prowadzi badania nad PEGylowaną formą INF- $\beta$  (7).



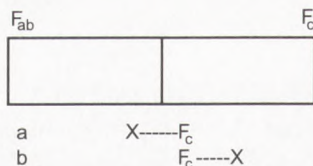
## 6. Białka fuzyjne

Alternatywną wobec PEGylacji metodą jest otrzymywanie białek fuzyjnych zawierających białko terapeutyczne i białkowy fragment dodatkowy, w celu zwiększenia masy cząsteczkowej leku powyżej progu nerkowego (9). Tego typu strategię stosowano, wykorzystując jako fragment dodatkowy albuminy krwi lub region  $F_c$  immunoglobuliny G (rys. 2).

Albuferon (wynik połączenia albuminy i IFN- $\alpha$ ), Albutropin (długo działająca forma ludzkiego hormonu wzrostu), Albulin (wynik fuzji insuliny z albuminą) – to raczej przykłady ulepszonych wersji leków o uznanej aktywności niż przykłady nowych leków (14,15).



Rys. 2. Schemat budowy immunoglobuliny G (IgG). Cząsteczka składa się z czterech łańcuchów polipeptydowych. Dwa identyczne łańcuchy lekkie (L) i dwa identyczne łańcuchy ciężkie (H) ułożone są w kształcie litery Y; fragment  $F_{ab}$ , składający się z łańcucha lekkiego i fragmentu łańcucha ciężkiego; fragment  $F_c$ , składający się z dwóch fragmentów łańcucha ciężkiego. W łańcuchach lekkich i ciężkich immunoglobuliny wyróżnia się części zmienne (V) oraz części stałe (C). W części zmiennej łańcuchów lekkich i ciężkich występują domeny. Domeny posiadają odpowiednią strukturę drugo- oraz trzeciorzędową i są odpowiedzialne za wiązanie swoistych antygenów.



Rys. 3. Schemat łączenia białka X z fragmentami immunoglobuliny.

Łączenie białek terapeutycznych z fragmentami/lub całymi przeciwciałami jest stosowane w celu konstruowania białek fuzyjnych o ulepszonych właściwościach. Otrzymuje się konstrukty typu  $X-F_c$ , w których białko terapeutyczne „X” zastępuje fragment  $F_{ab}$  przeciwciała; możliwe jest także otrzymywanie białek fuzyjnych typu  $F_c-X$  (rys. 3). Obydwie klasy białek fuzyjnych wykazują wydłużony okres półtrwania, ale różnią się innymi właściwościami – na przykład białka typu  $X-F_c$  mają właściwości przeciwciał, które mogą być wykorzystane w celu niszczenia komórek, do których X zostanie przyłączone; białka  $F_c-X$  takich właściwości nie mają.

## 7. Enbrel: białko fuzyjne typu $X-F_c$

TNF (*tumor necrosis factor*) – czynnik martwicy nowotworów jest aktywnym białkiem procesu zapalnego, które odgrywa podstawową rolę w wielu schorzeniach związanych ze stanami zapalnymi i schorzeniami autoimmunologicznymi, takimi jak reumatoidalne zapalenie stawów (*rheumatoid arthritis*) czy choroba Crohna. W warunkach fizjologicznych TNF, łącząc się z receptorami TNF umiejscowionymi na powierzchni komórek, zapoczątkowuje kaskadę zmian związanych ze stanem zapalnym. Lek Enbrel (Etanercept) jest białkiem fuzyjnym powstałym przez połączenie zewnątrzkomórkowej domeny receptora TNF (sTNF) z rejonem  $F_c$  immunoglobuliny (linia komórkowa CHO). Lek uzupełnia ilość naturalnych receptorów TNF komórek układu immunologicznego. Wychwytyjąc TNF, lek zapobiega połączeniu się TNF z komórkami ciała i wyzwoleniu reakcji zapalnej (16-18). W tym przypadku rejon  $F_c$  spełnia dwojaką rolę – przedłuża biologiczny okres półtrwania sTNF-R oraz dimeryzuje sTNF-R. Fizjologicznie TNF wiąże się z co najmniej dwoma receptorami TNF; tak zatem dimeryczny sTNF-R, obecny w leku Enbrel ma wyższą aktywność niż forma monomeryczna. Enbrel jest lekiem stosowanym w terapii schorzeń przebiegających z udziałem TNF.

## 8. Recykling albumin i fragmentu $F_c$ przeciwciał

Albuminy i fragment  $F_c$  IgG charakteryzują się następującą właściwością: są rozpoznawane przez specyficzne systemy recyklingu białek, które aktywnie transportują białka z komórek. System ten jest użyteczny, ponieważ głównym miejscem de-

gradacji białek jest wewnątrz komórek. Na przykład, jeżeli białka sygnalizacyjne typu IFN- $\alpha$ , INF- $\beta$ , erytropoetyna, interleukina-2 przyłączą się do ich receptorów znajdujących się na powierzchni komórek, ulegają internalizacji do wnętrza komórek, a następnie degradacji. Degradacja ta może być głównym szlakiem eliminacji białek terapeutycznych. Jeśli jednak takie białka zostaną przyłączone do albuminy lub fragmentu F<sub>c</sub> immunoglobuliny, to powstałe w ten sposób białka fuzyjne mają znaczną szansę być usunięte z komórek w formie nie zmienionej. Proces taki jednak wydłuża farmakokinetyczny okres półtrwania białek fuzyjnych z albuminami lub F<sub>c</sub> poza zakres jedynie efektu zwiększonej masy cząsteczkowej (9).

Wychwyty albumin, przeciwciał i białek terapeutycznych to przykłady „endocytozy kontrolowanej receptorowo”. W takim procesie białka internalizowane są przekazywane do kompartmentu podjednostki komórkowej zwanego endosomem. Jeśli nie zostanie włączony system recyklingu kontrolowany receptorowo, białka z endosomu są przekazywane do lizosomu i degradowane.

Kompleksy antygen–przeciwciało tworzą się, wtedy gdy przeciwciało połączy się z drugą cząsteczką (antygenem). Kompleksy takie są pobierane przez komórki, np. makrofagi, które trawią antygen, ale prowadzą recykling przeciwciała, które następnie może ponownie spełnić swoją rolę. Proces recyklingu jest uruchamiany przez receptor „protekcynny” F<sub>c</sub> (F<sub>c</sub>Rp). Receptor ten specyficznie identyfikuje przeciwciała wewnątrz komórki i transportuje je na zewnątrz komórek.

## 9. Aranesp (Darbepoetin alfa)

Erytropoetyna II generacji firmy Amgen (zaaprobowana przez FDA w lipcu 2002 r.) jest stosowana jako lek wspomagający u pacjentów z anemią, poddawanych chemioterapii. Preparat Aranesp został otrzymany jako lek o przedłużonym okresie półtrwania, uzyskany w bardzo ciekawy sposób (9). Główna droga eliminacji erytropoetyny (EPO) z organizmu rozpoczyna się od połączenia się z receptorami EPO, znajdującymi się na licznych komórkach prekursorów krwinek czerwonych szpiku kostnego. Aranesp jest derywatyzowaną EPO o zmniejszonym powinowactwie do receptora EPO. Aranesp jest bardziej aktywny *in vivo*. Wiąże się wolniej z receptorem EPO, usuwany jest wolniej i dzięki temu ma ulepszone właściwości farmakokinetyczne. Erytropoetyna jest glikoproteiną posiadającą trzy miejsca N-glikozytacji oraz jedno O-glikozytacji. Cząsteczki cukrów połączone N-glikozydowo to duże, rozgałęzione struktury cukrowe, na końcu posiadające negatywnie naładowane cząsteczki kwasu sjałowego. Asocjacja EPO z jej receptorem jest częściowo wywoływana przez oddziaływanie pozytywnie naładowanych aminokwasów z części wiążącej się z receptorem cząsteczki EPO z negatywnie naładowanym fragmentem receptora. Ujemnie naładowane cząsteczki kwasu sjałowego wytwarzają ujemnie naładowane pole wokół cząsteczki EPO, redukując szybkość wiązania z receptorem, z uwagi na odpychanie elektrostatyczne obydwu struktur. Aranesp jest produktem inżynierii

białkowej, w którym cząsteczka EPO została zaopatrzona w dwa dodatkowe miejsca N-glikozylacji. W porównaniu z naturalną EPO, zmodyfikowana cząsteczka EPO ma większy ładunek ujemny, w efekcie wolniej wiąże się z receptorem, ma dłuższy okres półtrwania. Aranesp może być podawany raz na dwa tygodnie, zamiast trzykrotnie w tygodniu, jak w przypadku EPO, zwiększając komfort życia pacjentów (9,19-21).

## 10. Kontrola dystrybucji białek zmodyfikowanych

Dystrybucja małych cząsteczek jest na ogół dziełem przypadku, podczas gdy białka modyfikowane mogą być kierowane do specyficznych tkanek poprzez fuzję ze zmiennymi domenami przeciwciał lub przez fuzję z białkiem specyficznym dla danej tkanki. Przeciwciała charakterystyczne dla danego nowotworu zostały użyte jako nośniki środków przeciwnowotworowych, takich jak atomy radioaktywne, toksyny bakteryjne (*Pseudomonas exotoxin*), RNaza i cytokiny. Aktywność i działania uboczne – to podstawowe warunki doboru cząsteczek dostarczanych do tkanki nowotworowej. Całkowita liczba miejsc wiążących przeciwciała na powierzchni komórek nowotworowych nie jest wystarczająca, by dostarczyć niezbędną ilość typowego chemioterapeutyku, dlatego ostatnio skupiono się na dostarczaniu ekstremalnie aktywnych cząsteczek, które w innego typu terapii nie byłyby akceptowane, ze względu na znaczne efekty uboczne (9).

## 11. Radioaktywne koniugaty przeciwciał

Rituxan (22) jest przeciwciałem monoklonalnym, stosowanym w terapii białaczki limfatycznej. Preparaty Zevalin (Ibritumomab Tiuxetan – 2002 r.) (23,24) i Bexxar (Iodine-131 Tositumomab) (25) są podobne do Rituxanu, ale zostały zmodyfikowane tak, aby zawierały odpowiednio 131 I i 90 Y. W momencie ich połączenia się z komórkami nowotworu, otaczające komórki są specyficznym napromieniowywane i niszczone w następstwie tzw. efektu sąsiedztwa. Dołączone izotopy w idealnym przypadku mają krótki okres połowicznego rozpadu, porównywalny z czasem pozostawania przeciwciała w okolicy nowotworu, tak zatem napromieniowanie ogranicza się głównie do nowotworu.

## 12. Przeciwciała połączone z proteinami cytotoksycznymi

Ze względu na „efekt sąsiedztwa”, białka są cząsteczkami bardziej aktywnymi niż małe cząsteczki. Na przykład endotoksyna *Pseudomonas* (*Pseudomonas exotoxin*, PE) katalitycznie modyfikuje i inaktywuje rybosomy eukariotów. Niewiele internali-

zowanych cząsteczek PE może zniszczyć komórkę ssaka. Enzym RNaza trawi RNA, tak zatem niewielka ilość RNazy w cytoplazmie komórki może być dla niej zabójcza. Obydwa te białka mogą niszczyć zarówno komórki nowotworów, jak i normalne komórki; mogą mieć znaczenie terapeutyczne, gdy zostaną specyficznym dostarczone do celu terapeutycznego. Wchodząca w skład białka fuzyjnego toksyna PE jest przyłączana do pojedynczego łańcucha  $F_v$ , który składa się z domeny zmiennej łańcucha ciężkiego i lekkiego przeciwciała, połączonych sztucznym linkerem peptydowym. Podobnie, połączenie RNazy z częścią  $F_{ab}$  specyficznego przeciwciała nowotworu mogą znaleźć zastosowanie w terapii nowotworów.

### 13. Fuzja przeciwciała/endotoksyna – cytokina

Cytokiny to aktywne białka, które mogą skierowywać odpowiedź immunologiczną organizmu przeciw nowotworowi. Cytokiny – interleukina-2 (IL-2) i interferon- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) zostały zaakceptowane jako leki w pewnych przypadkach rzadko spotykanych nowotworów, ale wywołują wiele poważnych działań ubocznych. IL-2 wywołuje na przykład gorączkę i ogólne objawy zwalczania infekcji. Stosowanie IL-2 ograniczone jest także jej efektami ubocznymi.

Wiele grup badawczych konstruowało rozmaite wersje IL-2 (w wyniku fuzji całych przeciwciał z IL-2 lub fuzji łańcuchów  $F_v$  z IL-2), skierowywane do naczyń krwionośnych nowotworu lub do martwiczej tkanki sąsiadującej z nowotworem.

Cytokiny są szczególnie atrakcyjnymi potencjalnymi lekami przeciwnowotworowymi. Ich wielką zaletą jest to, że z natury działają lokalnie, a mogą być wprowadzane do organizmu na drodze skierowywania. W warunkach fizjologicznych cytokiny są wytwarzane w miejscu infekcji jako odpowiedź na „wołanie o pomoc”, które skierowuje komórki układu immunologicznego w obszar zagrożenia. Białka fuzyjne, które skierowują cytokiny do komórek nowotworowych, ograniczają działania uboczne cytokin.

Główna zaleta omawianej terapii polega na tym, że przy jej stosowaniu możemy działać na komórki sąsiednie. Poważnym jednak problemem terapii przeciwnowotworowej jest fakt, że komórki nowotworowe ulegają szybkim mutacjom i w odpowiedzi na terapię szybko ewoluują. Leczenie nowotworu przeciwciałem połączonym z *Pseudomonas exotoxin* lub RNazą będzie skierowane na komórki nowotworowe, w których już nie podlega ekspresji gen specyficznego dla nowotworu białka docelowego. Jednakże pierwiastek promieniotwórczy o krótkim okresie półtrwania zniszczy komórki sąsiednie, nawet jeśli nie będą już miały na powierzchni markerów specyficznych dla danego nowotworu. Podobnie cytokiny, wiążąc się z jedną komórką nowotworową, stymulują układ immunologiczny do ataku na wszystkie komórki nowotworowe znajdujące się w sąsiedztwie (9).

Przykładem leku, którego mechanizm działania oparty jest na podanych zasadach jest Ontak (Seragen), białko fuzyjne, złożone z rIL-2 i *Diphtheria toxin* (1999)

(26), skierowywane do komórek wytwarzających powierzchniowy receptor IL-2. On-tak jest stosowany w terapii *Cutaneous T-cell lymphoma*.

## 14. Perspektywy dalszego ulepszania leków białkowych

Jedną z metod doskonalenia leków białkowych jest ich racjonalne projektowanie, podczas którego pożądana właściwość może być dodana do białka terapeutycznego za pomocą fuzji z innym białkiem. Ten sposób postępowania jest wykorzystywany w celu poprawy farmakokinetyki i biodystrybucji leków; może być jednak także wykorzystywany w celu rozwiązania podstawowego problemu leków białkowych – konieczności podawania ich drogą iniekcji. Jest wiele systemów transportu w przewodzie pokarmowym, które w przyszłości mogą być wykorzystane. Inną ważną drogą jest biosynteza białek terapeutycznych w roślinach, co umożliwi zmniejszenie kosztów wytwarzania przeciwciał i zmniejszenie ich immunogenności.

### Literatura

1. [http://www.nature.com/nbt/journal/v18/n8/fig\\_tab/nbt0800\\_831\\_T1.html](http://www.nature.com/nbt/journal/v18/n8/fig_tab/nbt0800_831_T1.html)
2. Walsh G., (1999), *Biopharmaceuticals. Biochemistry and Biotechnology*, John Wiley & Sons, Chichester.
3. *British Pharmacopoea*, (1998), 1095.
4. Woppmann A., (2001), *New Drugs*, 1, 62.
5. <http://www.eudra.org/document.htm>
6. Walsh G., (2002), *New Drugs*, 2, 26.
7. Walsh G., (2003), *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 55, 3.
8. Walsh G., (2001), *New Drugs*, 1, 58.
9. Way J. C., (2002), *Drug Discovery World*, 3, 62.
10. Hellwig B., (2001), *Deutsche Apotheker Zeitung, Neue Arzneimittel*, 48, 23.
11. Hellwig B., (2001), *Deutsche Apotheker Zeitung, Neue Arzneimittel*, 48, 86.
12. Tan M. H., Malone J. K., Mattoo V., (2003), *New Drugs*, 3, 34.
13. Morck H., (2003), *Pharmazeutische Zeitung, Neue Arzneistoffe*, 148, 13.
14. [http://jjanis7hepc.com/august\\_2002\\_news.htm](http://jjanis7hepc.com/august_2002_news.htm)
15. [http://www.hgsi.com/news/press/03-01-06\\_progress.html](http://www.hgsi.com/news/press/03-01-06_progress.html)
16. <http://www.m-ww.de/pharmakologie/arzneimittel/rheuma/etanercept.htm>
17. <http://www.enbrel.com/aae/aae04.jsp?fvar=0>
18. <http://www.i-s-b.org/wissen/broschuere/produkt/etanerce.htm>
19. <http://www.fda.gov/cber/label/darbaemg071902LB.pdf>
20. [www.amgen.com](http://www.amgen.com)
21. [http://www.aranesp.com/professional/about\\_aranesp.jsp?printable=yes](http://www.aranesp.com/professional/about_aranesp.jsp?printable=yes)
22. <http://www.morbus-hodgkin.de/infoserv/rituxan.htm>
23. <http://www.idecpharm.com/site/science/zevalin.htm>
24. <http://www.usadrug.net/gb/fdanew/Zevalin.htm>
25. <http://cstl-cst.semo.edu/swatzell/BI404/Cancer/bexxar>
26. Gaudillière B., Berna P., (2000), *Annu. Rep. Med. Chem.*, 35, 338.