

# 6.1 Fehérjék: Hormonok, enzimek és monoklonális antitestek- bevezetés, háttérismeretek

Wayne Materi, Zoltán Gombos és David S. Wishart

*National Institute for Nanotechnology, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada*

## Tartalom

- 6.1.1 Bevezetés
- 6.1.2 Fehérjealapú gyógyszerek
- 6.1.3 Peptid- és fehérjehormon gyógyszerek
  - 6.1.1.3.1 Példák hormon alapú bio-gyógyszerkészítményekre
  - 6.1.1.3.2 A hormon alapú bio-gyógyszerkészítmények jövője
- 6.1.4 Antitest alapú gyógyszerek
  - 6.1.4.1 Példák antitest alapú gyógyszerekre
  - 6.1.4.3 Az antitest alapú bio-gyógyszerkészítmények jövője
- 6.1.5 Az enzimalapú gyógyszerek
  - 6.1.5.1 Példák enzimalapú gyógyszerekre
  - 6.1.5.2 Az enzim alapú bio-gyógyszerkészítmények jövője

## 6.1.1 Bevezetés

Az emberi test hasznos fehérjealapú gyógyszerek igazi tárháza. „pharmacopiája”. Ha jobban belegondolunk, testünk saját, endogén úton előállított enzimeinek, hormonjainak és antitestjeinek egész gyűjteményével rendelkezik, amelyek felelősek a homeosztázis fenntartásáért, a sebgyógyulásért, a fertőzések elleni küzdelemért, a méreganyagok semlegesítéséért, a rákos sejtek megfékezéséért, vagyis általánosságban azért, hogy életben tartsanak minket. Természetes gyógyító fehérjéink csak az abban az esetben szorulnak külső kiegészítésre, ha testünk valamilyen súlyos traumával küzd (mint például vérvesztés, agyvérzés, súlyos fertőzés vagy rákos betegség). Már az ősi kínaiak, „moche” indiánok, maszajok, szkíták, egyiptomiak és a korai keresztények is felismerték, hogy testünk és testnedveink csodálatos, gyógyító erejű anyagokat tartalmaznak, ezért a harcba induló katonákkal, a betegekkel és a bűnösökkel vért vagy vizeletet itattak, hogy ez által eltöltsék őket erővel és egészséggel. Ezeknek a kezdetleges fehérjekoktélokknak a sikertelensége azonban mind a betegek, mind orvosaik számára a középkorra már feltehetőleg nyilvánvalóvá vált. Mivel szájon át adva ezek a fehérjék teljesen hatástalannak bizonyultak, az 1400-as évek elején itáliai orvosok új megközelítésként elkezdtek kísérletezni a fehérjék intravénás adagolásával, vérátömlesztés útján. Az első ismert példa a transzfúzió terápiás alkalmazására az 1492-ben agyvérzés okozta kómába esett VIII. Ince pápa esete volt [1]. Ugyan ez a próbálkozás végül sikertelen maradt, további 300 éven át folytak kísérletek abból a célból, hogy a sebek és különböző betegségek kezelésére alkalmassabbá tegyék, illetve finomítsák az állatokból emberekbe történő, vagy az emberek közötti transzfúziót. Az első sikeres transzfúziós kezelést James Blundell valósította meg Angliában, és ezzel valószínűleg ő volt az első, aki sikeresen alkalmazott fehérjéket gyógyszerként, egy szülési vérzésben szenvedő nő esetében (jóllehet ez még csak tisztítatlan albumin használatát jelentette). [2] 1844-ben Blundell és kollégája, Samuel Armstrong Lane voltak az elsők, akik egy genetikai betegség, a hemofília kezelésére vért (vagyis VIII-as faktort) használtak. [3] Az 1800-as években és az 1900-as évek elején a transzfúziós módszerek sokat finomodtak (a vércsoportok elkülönítése és az aseptikus körülmények alkalmazása révén), így a vér lett az a fehérjéket tartalmazó gyógyszer, amelynek segítségével sebeket ápoltak (albuminok), fertőzé-

seket gyógyítottak (antitestek, antiglobulinok), illetve egyéb, genetikai betegségeket is kezeltek.

Természetesen nem a vér a fehérje alapú gyógyszerek egyetlen forrása. Már nagyon régen, 1796-ban kezdték felismerni a fehérjegyógyszerek egyéb forrásait. Edward Jenner munkássága, melynek során sikerült kifejlesztenie a himlő elleni oltást [4], az első példának tekinthető a fehérjegyógyszerek betegségmegelőzési célt szolgáló használatára. A testnedvek orvosi célú használatának ősi módszerénél maradva, Jenner tehének himlős keléseiből vett mintákat használt fehérje alapú gyógyszeréhez. (tehénhimlő vírus burkának fehérjéit.) 1870-ben Pasteur, Jenner ötletét kiterjesztve, legyengített baktériumsejteket, illetve szárított idegszöveteket használt lépfene és veszettség elleni oltóanyag kifejlesztésére. Pasteur a száraz bakteriális- vagy vírusfehérjéket vakcinaként adható oldattá dolgozta fel. Ebben a tekintetben tehát Pasteur volt az első, aki bevezette a „szintetikus”, vagy *ex vivo* biológiai készítmények, mint lehetséges gyógyszerek használatát.

Ennek ellenére csak hosszú évek után született meg a tisztított, aktív biológiai anyagok felhasználásának gondolata. A Jenner által feltalált és Pasteur által finomított oltások ötletét az 1800-as évek végén kiterjesztették a terápiás vakcinákra, vagyis a méregellenes anyagokra. Ezeket a mérgeket hatástalanító anyagokat egy olyan módszerrel készítették, amit Albert Calmette fejlesztett ki 1895-ben kobramarás áldozatainak kezelésére. Az ellenanyagot úgy nyerték, hogy a méregből kis mennyiséget állatokba, például lóba, birkába vagy nyúlba injektáltak. Ennek eredményeképpen az állatok különféle antitesteket termeltek a mérreg ellen. Az antitesteket ezután az állatok véréből összegyűjtötték és az adott mérreg ellenszereként használták.

Az 1800-as évek közepéig nem ismerték a vér gyógyító erejének pontos okát, vagy a himlőhólyagok és bakteriális kivonatok betegségmegelőző erejét. 1838-ban Jons Jakob Berzelius bevezette a fehérje fogalmát. [5] Berzelius állítása szerint a vérben és a baktériumokban található fehérjék (a „protein” kifejezés is tőle származik) különleges szerves anyagok, amelyek kémiai vegyületekként viselkednek, illetve működnek. Ebből kiindulva azt is felfedezték, hogy a vérben és egyéb biológiai szövetekben sokféle fehérje található, amelyek elválaszthatók és tiszta anyagokként kezelhetők, akár csak az egyéb vegyszerek vagy kismolekulájú gyógyszerek. Azonban egészen 1922-ig nem hasznosították a gyógyászatilag értékes fehérjék tisztításának technológiáját. Az inzulin főként négy kanadai tudós, Banting, Best, Collip és MacLeod munkájának köszönhetően vált az első olyan „tiszta” fehérjévé, amit sikeresen használtak egy betegség, név szerint a diabetes kezelésére. 1922 előtt az I. típusú diabetes majdnem minden esetben hosszas és fájdalmas leépülésre, majd halálra ítélte a beteget. Ez azért is volt különösen kétségbeejtő, mert a betegség gyakran érintette a serdülőkorú gyerekeket. Bár a diabetes okát 1910-re már részlegesen ismerték, a tisztítatlan hasnyálmirigy-kivonatok használatára tett erőfeszítések sikertelenek voltak és gyakran heveny allergiás reakciókkal jártak együtt. A tisztított inzulin használata viszont hihetetlenül eredményesnek bizonyult. Nehéz túlbecsülni akár a látványos felépülések jelentőségét, akár azt a hatást, amit az inzulin, mint gyógyszer gyakorolt a nyilvánosságra és az orvosi-gyógyszerészi közösségre. Az „inzulin jelenség” valóban nem csak cukorbeteg millióit mentette meg, hanem lényegében megteremtette a „tiszta” fehérjealapú gyógyszerek fogalmát és lefektette a modern biotechnológiai ipar alapjait.

A mai fehérjealapú gyógyszerek öt általános osztályba sorolhatók: (1) hormonok, (2) vakcinák, (3) antibiotikumok, (4) antitestek és (5) enzimek. Ezek közül az osztályok közül hármát, a hormonokat, az antitesteket és az enzimeket elsősorban nem fertőző, vagy endogén betegségek kezelésére használják (pl. genetikai-, vagy az öregedés során fellépő betegségek), míg a másik két osztályt, a vakcinákat és az antibiotikumokat fertőző, vagy exogén betegségek (bakteriális vagy vírusfertőzés) kezelésére alkalmazzák. Érdekes módon mind az öt kate-

góriát csak az utóbbi 80 évben állapították meg. Az inzulin hormon volt az első tisztított fehérjealapú gyógyszer, ami megjelent a piacon (1922-ben). Röviddel ezután, 1923-ban, megjelent a tisztított diftéria (torokgyík) toxoid, (egy 58 kD molekulatömegű fehérje) amely ezáltal az első tisztított oltóanyagává vált. Az első tiszta peptid-antibiotikum, a Gramicidin S, 1943-ban jelent meg Oroszországban, mint felületi sebkezelésre alkalmas gyógyszer. Az első tisztított méregellenes anyagokat, vagy antitoxin-antitesteket az 1950-es években vezették be, és az első monoklonális antitest gyógyszert, az OKT3-at (másnéven muronomab vagy Orthoclone) 1986-ban jegyezték be [7]. Az Activase, az első tisztított enzim, amelyet humán gyógyszerként bejegyeztettek, 1987-ben került a piacra. Érdekes módon az első emberi rekomináns fehérje, amit betegség kezelésére használtak, szintén inzulin volt (Humulin néven), ezt az Eli Lilly vezette be 1982-ben.

1982-ig az összes peptid- és fehérjegyógyszert „természetes” forrásokból izolálták, vagyis állati (vagy emberi) testnedvekből és szövetekből nyerték ki őket. Ezekkel a természetes forrásokkal rendkívül nehéz és drága dolgozni, ráadásul közben észrevétlenül maradt fertőző anyagok (vírusok, baktériumok, prionok) adódhatnak át a betegeknek. Mivel a gyógyászatban értékes fehérjék viszonylag ritkák, egy pár milligramm tiszta hatóanyag kinyeréséhez gyakran több tíz, vagy akár több száz kilogramm folyadék vagy szövet feldolgozására volt szükség. Például ahhoz, hogy elég növekedési hormont (szomatotropint) tudjanak előállítani egy arányos törpeségben szenvedő beteg kezeléséhez, az 1980-as évekig több, holttestből származó emberi agy eltávolítására és homogenizálására volt szükség. [6]

A nagyobb mennyiségben jelen levő fehérjék, mint pl. az albumin, kb. 35 g/l koncentrációban található a megfelelő szövetekben vagy testnedvekben [9]. Ezeknek az izolálása és tisztítása viszonylag egyszerű. Azonban sok fontos fehérje csak 1-2 pg/l koncentrációban fordul elő a szervezetben. Ilyen alacsony koncentrációnál majdnem lehetetlen elválasztani ezeket az anyagokat a testben található egyéb fehérjék ezreitől. Ráadásul ha ezekből a termékekből kereskedelmi mennyiséget akarnánk előállítani, akkor fel kéne használnunk a Föld teljes marha, disznó vagy éppen ember „készletét”. Ma a legtöbb fehérjegyógyszert rekombináns módszerekkel gyártják, beleértve az inzulint, a növekedési hormont és a legtöbb monoklonális antitestet is. Ez a megoldás lehetővé teszi, hogy szigorúan ellenőrzött körülmények között akár a legritkább fehérjét is nagy mennyiségben tudják előállítani, annak a veszélye nélkül, hogy a termék vírusokkal (HIV, HCV), toxinokkal vagy prionokkal (a Creutzfeldt–Jakob betegség vagy a kergemarhakór okozóival) fertőződjön. Habár a legtöbb fehérjegyógyszert bioszintetikus úton gyártják (sejtkultúrák segítségével), egy részüket (a 20-nál kevesebb aminosavból állókat) automatizált peptidszintézis segítségével állítják elő. Ez utóbbiak között található például a leuprotid (Leugard), az oxitocin (Oxitocyn), a kalcitonin (Miacalcin) és az abarelix (Plenaxis). A továbbra is természetes forrásból előállított peptidok és fehérjék közé tartozik például a Menotropin (Repronex) és a Hyaluronidase (Vitraxe).

Az inzulin 1922-ben történt bevezetése óta több, mint 110 féle különböző fehérje- vagy peptidalapú gyógyszert jegyzett be a Szövetségi Élelmiszer és Gyógyszerügyi Hatóság (FDA) humán gyógyászati céllal [10]: ezek közül 50 hormon, 2 vakcina, 2 peptid-antibiotikum, 26 antitest, illetve antitestek keveréke, és 17 enzim (lásd a 6.1-1 – 6.1-3 táblázatokat). Ezek a peptid-, illetve fehérjegyógyszerek méretüket tekintve lehetnek 10 aminosavnál rövidebbek, de akár 1000-nél hosszabbak is, és különféle kovalens módosításokat tartalmazhatnak, mint pl. szénhidrát-láncokat, D-aminosavakat, vagy szokatlan oldalláncú aminosavakat. Részletesebb adatok a fehérjealapú gyógyszerek nagy részének szerkezetéről és összetételéről ezen könyv következő fejezeteiben (6.5-6.7), valamint a DrugBank adatbázisában, a biotechnológiai gyógyszerek között található. [10] A Biotechnológiai Ipari Szervezet (Biotechnology Industry Organization – [www.bio.org](http://www.bio.org)) szerint jelenleg több, mint 300 peptid- és fehérjegyógyszer van klinikai kipróbálás vagy felülvizsgálat alatt. Az FDA által már bejegyzett fehérjegyógyszerekhez hasonlóan ezek nagy része is az endogén vagy emberi eredetű fehérjék

három nagy osztályába tartozik: (1) a hormonok, (2) az antibiotikumok, és (3) az enzimek közé. A gyógyszeripar számára fontos fehérjék közül ez a három csoport alkotja ennek a fejezetnek a fő témáját.

A történeti áttekintésen túl ennek a fejezetnek az a célja, hogy ellássa az olvasót a gyógyszerészeti szempontból fontos hormonok, antitestek és enzimek általános jellemzőivel és tulajdonságaival kapcsolatos információkkal. A fehérjealapú terápia ezen három osztálya alkotja a bejegyzett biotechnológiai úton gyártott gyógyszerek háromnegyedét, és ezek eladásainak több, mint 90%-át. Ebben a fejezetben amellett, hogy általánosságban tárgyaljuk, mit jelent a hormon, az enzim és az antitest fogalma, részletes ismertetést is adunk a ma is használatos, történeti vagy egyéb szempontból fontos hormonokról, enzimekről és antitestekről. A fejezet öt szakaszra tagolódik, egy történeti bevezetőre, a fehérje- és peptid-alapú gyógyszerek előnyeinek és hátrányainak általános tárgyalására, majd a hormonok, az enzimek és az antitestek részletes ismertetésére. Minden, hormonokkal, enzimekkel, illetve antitestekkel foglalkozó fejezet tartalmazza az adott fehérje/peptid termékcsalád leírását, ill. definícióját, kiszárlásuk és a szervezetbe való bejuttatásuk sajátosságos szempontjainak általános áttekintését, példákat az FDA által bejegyzett hormon, enzim és antitest készítményekre, és az új, klinikai tesztelés alatt álló termékek rövid ismertetőjét. A hormonok, enzimek és antitestek teljeskörű tárgyalása messze túlmutat ennek a fejezetnek a határain. Amennyiben az Olvasó többet szeretne megtudni ezekről, érdemes elolvasni néhány kitűnő könyvet a témában [11-13].

### **6.1.2. Fehérjealapú gyógyszerek**

Ahhoz, hogy egy peptid vagy egy fehérje hasznos gyógyszerre váljon, általában vízoldhatónak és viszonylag stabilnak kell lennie, nem lehet immunogén (tehát azonosnak, vagy majdnem azonosnak kell lennie a megfelelő humán fehérjével), általában monomer, és megelőző tulajdonságú egy betegségre nézve. Nem minden polipeptid felel meg ezeknek az elvárásoknak, tehát nem minden polipeptid alkalmas gyógyszerészeti célra. Általában ezek a (még) nem hasznos fehérjék magas polimerizációs fokú, rendezett stuktúrájú fehérjék, mint pl. a tubulin, az aktin vagy a miozin. Hasonlóképpen nem praktikus vagy legalább is valószínűtlen a membránkötött receptorfehérjék (G-fehérje-kapcsolt receptorok, lamininek, stb.) felhasználása. Ezek a fehérjeosztályok, melyek az emberi fehérjeállomány kb. 60%-át teszik ki, általában nem gyógyszerek, hanem a gyógyszerek célpontjai. Bizonyos fehérjék, mint pl. a polimerázok, a hisztonok és a riboszomális fehérjék, olyan létfontosságú funkciókat töltenek be, melyek a szervezet számára nélkülözhetetlenek, és így általában gyógyszerként nem alkalmazhatóak, bár pl. a DNáz I (Pulmozyme) egy figyelemreméltó kivétel. Ezeket az egyszerű kritériumokat használva, vagyis meghatározva, hogy milyen feltételeknek kell eleget tennie egy lehetséges gyógyszernek egy lehetséges célponttal szemben, meg lehet vizsgálni az emberi fehérjeállományt, és meg lehet állapítani, hogy melyek azok a fehérjeosztályok, melyek elméletileg gyógyszerészeti felhasználásra alkalmasak. Az elemzés elvégzése után jellemzően a peptidokat, ill. a fehérjék három nagy csoportját kapjuk, ezek (1) a hormonok, (2) az enzimek és (3) az immunmolekulák (antitestek).

A peptid- és fehérjegyógyszerek különböznek a kismolekulájú gyógyszerektől. Először is, a polipeptid gyógyszerek általában sokkal nagyobbak, molekulatömegük 1000 és 200 000 Dalton között változhat, míg a kismolekulájúaké 600 Dalton alatt van. Egy másik különbség, hogy a fehérjék nem-kovalens vagy háromdimenziós (negyedleges) szerkezete elengedhetetlen a megfelelő működésükhöz. Ebből a szempontból éles ellentétben állnak a kismolekulájú gyógyszerekkel, melyeknek kovalens, vagy elsőrendű szerkezete egyértelműen meghatározza a funkcióját. A kisebb polipeptidok csak ritkán rendeződnek negyedleges szerkezetbe, vagy egy jelentősebb ilyen típusú elrendeződés csak akkor jön létre, mikor a fehérje a célreceptorhoz kapcsolódik. A nagyobb (40 egységnél nagyobb) polipeptidok általában stabil, jól defini-

ált negyedleges szerkezettel rendelkeznek. Általánosságban a kevesebb, mint 40 aminosavból álló polipeptideket peptideknek, míg a 40 egységnél hosszabbakat fehérjéknek nevezzük. A legtöbb hormon peptid (40 aminosavegységnél rövidebb), bár néhány hormon, mint pl. a szomatotropin (növekedési hormon), akár 200 egység hosszúságú is lehet. A legtöbb peptidhormon tulajdonképpen egy nagyobb prekursor fehérjének vagy pro-proteinnek egy kis részlete. Míg a legtöbb hormon viszonylag kisméretű polipeptid, addig az enzimek és antitestek általában sokkal nagyobbak. Általános szabályként azt mondhatjuk, hogy az enzimek 200 és 800 aminosavegység hosszúságúak, míg az antitestek jellemzően 1200 egységből állnak, bár a kisebb antitest fragmentumok (egyszálú antitestek) is használhatók fehérjealapú gyógyszerként.

A peptid és fehérjealapú gyógyszerek talán leginkább lenyűgöző és tetszetős tulajdonsága teljes szelektivitásuk és specificitásuk. A bioaktív fehérjék egy cirkulórakéta pontosságával célozzák meg a receptoraikat vagy kötik meg kismolekulájú ligandumaikat. A legtöbb ismert hormon, enzim és antitest esetén szinte semennyi kereszt-kötődést nem tapasztaltak más receptorokhoz vagy ligandumokhoz. Emellett a legtöbb fehérjegyógyszer előnyös farmakokinetikával és kiváló biológiai hozzáférhetőséggel rendelkezik. Ezek a kedvező tulajdonságok nem teljesen váratlanok. Valóban, több százmillió éves természetes kiválasztódás során fejlődtek ki az olyan bioaktív fehérjék, mint a hormonok, az enzimek és az antitestek, amelyek az élőlény egészsége és életképessége szempontjából optimális módon képesek betölteni a feladatukat. Az ún. nagy molekulájú (peptid és fehérje) gyógyszerekéhez hasonló szelektivitást vagy érzékenységet szinte semmilyen ismert kis molekulájú gyógyszer sem képes kifejteni. Talán csak azok a kismolekulájú gyógyszerek képeznek kivételt, amelyek pontosan megegyeznek a szervezetben előforduló megfelelő molekulákkal (pl. ösztrogén, tesztoszteron, tiroxin, adrenalin.) Valószínűleg ezek a molekulák az evolúció során a receptorfehérjékkel együtt alakultak ki.

A polipeptidekbe nagy méretüknél fogva sokkal több megfelelő működésükkel kapcsolatos, funkcionális kémiai információ kódolható, mint a kisebb molekulákba. Másként úgy fogalmazhatnánk, hogy a fehérjevázon sokkal több lehetőség van funkciós csoportok hozzáadására, elvételére vagy cseréjére, ezáltal az adott fehérje specificitásának, biológiai hozzáférhetőségének, kinetikájának, vagy funkciójának módosítására. Ez a kémiai rugalmasság lehetővé teszi a fehérjemérnökök számára, hogy egy ígéretesnek tűnő fehérje alapján egy jobban használható terméket tervezzenek. Ma a piacon kapható peptid-, ill. fehérjealapú gyógyszerek nagy része irányított mutagenezissel vagy kémiai módosítással kezelt, és ezáltal megnövelt stabilitással, szelektivitással vagy nagyobb hatásokkal rendelkezik. Például az Infergen nevű citokin hormon egy egyéb emlősökben található, bioaktív interferonok konszenzusos alfaszekvenciái alapján tervezett interferon. Úgy találták, hogy ez a mesterségesen tervezett molekula nagyobb bioaktivitást ad az eredeti fehérjének. Másik példa a PEGademáz, az adenzindeamináz enzim PEG-gel kapcsolt formája. [14] Ebben a fehérjében a lizin-oldalláncokhoz poli(etilén-glikol) (PEG) alegységek kapcsolódnak kovalens kötéssel. Ez a kovalens módosítás tízszeresére, vagy még nagyobbra növeli a fehérje in vivo felezési idejét. Még egy további példa a fehérjemérnökség módszereivel előállított fehérjékre a LisPro inzulin hormon, az inzulin egy olyan módosítása, melyben a 28-as helyen található lizint és a 29-es helyen található prolint kicserélték. [15] Úgy találták, hogy ez a csere a természetes inzulinéhoz képest megnövekedett aktivitást és élettartamot eredményezett. A módosított hormonok és enzimek ezen példáin túl találhatunk még sok olyan kimérés murin - humán antitestet, mint pl. az Infliximab, Rituximab és az Abciximab, amiket úgy terveztek, hogy a változó régiójukban murin egységeket tartalmazzanak, míg az állandó régiójuk azonos legyen a humán megfelelőjükkel. Ezek a kimérés tulajdonságok csökkentik a monoklonális murin-antitestek antigenitását, ezáltal nagyban megnövelve a felezési idejüket és a szervezet velük szembeni toleranciáját.

A fehérjegyógyszerek szelektivitása, specificitása és „programozhatósága” teszi ezeket a termékeket kifejezetten vonzóvá a mai gyógyszer-és biotechnológiai iparban. Ennek eredmé-

nyeképpen mostanában hatalmas erőfeszítéseket tesznek több tucat fehérjegyógyszer felfedezése, gyártása és FDA-engedélyeztetése érdekében. 2005-ben az Amerikai Egyesült Államokban a biotechnológiai ipar összes piaci tőkéjét kb. 311 millárd dollárra becsülték. 2004-ben az FDA 40 új fehérjegyógyszert (gyógyszertípust, javallatot vagy készítményt) jegyzett be, többet, mint bármelyik megelőző évben. A Humán Genom Project befejezésével és a nagyszabású fehérjemérnöki erőfeszítések [16,17] hatására úgy tűnik, hogy egyre szélesebb lehetőségek nyílnak meg újabb, a gyógyszeriparban használható hormonok, enzimek és antitestek felfedezésére. Meddig folytatódhat ez a növekedés? Az endogén fehérjék „univerzumának” mérete az emberi fehérjekészlet és ennek eddig megismert változatos funkciói alapján becsülhető. Az emberi szervezetben azonosított kb. 25000 gén nagyjából 40000 különböző fehérjét kódol, (izozimet vagy splicing variánst), és kb. 1000 000 különböző poszttranszlációs módosításon átesett variánst, beleértve a kémiai módosított vagy hasított fehérjéket is. [18] A legújabb szakirodalmi utalások szerint kb. 3000 különböző enzim és több, mint 150 különféle hormon létezik. Az azon hormonok és enzimek száma alapján, melyek használhatóak lennének a hormon-, ill. enzimpótlást igénylő terápiákban, úgy tűnik, hogy ezeknek kb. 3500 antitest lehet célpontja (amelyek pedig esetleg hasznosak lehetnek bizonyos enzimek vagy hormonok hatásának gátlására). Ha ehhez hozzávesszük az olyan ismert receptorok számát, melyekhez antitestek kötődhetnek, (ezt kb. 4000-re becsülik) a gyógyszerészetileg fontos antitestek száma inkább a 8000-et közelíti. Jelenleg a piacon kevesebb, mint 400 fehérjealapú gyógyszer van forgalomban vagy fejlesztési fázisban, tehát ennek az egyszerűsített számításnak alapján úgy tűnik, még hosszú út áll előttünk, mielőtt ki tudnánk méríteni az endogén fehérjegyógyszerek tárházát.

Bár a fehérjealapú gyógyszerek jövőjét illetően sok minden adhat okot az optimizmusra, sok egyedi probléma adódhat fejlesztésük, gyártásuk és beadásuk során. A fehérjegyógyszerekkel kapcsolatos egyik legnyilvánvalóbb nehézség, hogy sokkal érzékenyebbek, mint a kis molekulájú gyógyszerek. Az olyan fehérjéket, mint pl. a hormonok, antitestek, vagy enzimek, általában nem lehet tablettákba keverni vagy préselni, emulzióba vinni, vagy koncentrált tinktúráként forgalomba hozni. Ezek a konvencionális gyártási és formulázási módszerek megszüntetnék a legtöbb fehérjegyógyszer aktivitását. Ugyanígy, a legtöbb peptid hormon, antitest és enzim nem tartható el korlátlan ideig szobahőmérsékleten, nem steril tárolókban, hanem még hűvös, sötét, steril vizes közegben is csak néhány hétig tárolhatók. Ezek a formulázási problémák jelentős kihívás elé állítják a gyógyszervegyészeket. A lehetséges megoldásokat ennek a könyvnek a 4. fejezetében tárgyaljuk.

Másik fontos szempont a peptid- és fehérjegyógyszerekkel való munka és a gyártási folyamat során fellépő kiadások. A kismolekulájú gyógyszerekkel összehasonlítva a peptid- és fehérjegyógyszerek gyártási költsége hatalmas, ennek megfelelően az áruk is a kismolekulájú gyógyszerek árának több tíz, vagy akár ezerszerese is lehet. (a milligramonkénti árat összehasonlítva.) Ennek a nagy árkülönbségnek az oka, hogy a legtöbb polipeptid-gyógyszert nem lehet klasszikus szerves szintézis segítségével előállítani- egyszerűen túl nagy és bonyolult vegyületek a mai technológia számára. Ma ez egyetlen költséghatékony megoldás a polipeptid hormonok, antitestek és enzimek gyártására a génexpresszió bakteriális vagy emlős sejt kultúrában. Ez egy időigényes, alacsony kitermelésű (100 mg- 10 g/l) eljárás, melynek során nagy fermentor rendszereket használnak, és gondosan ellenőrzött körülményekre, valamint többszörös tisztítási lépésekre van szükség.

A gyártás és tárolás egyértelmű problémái mellett a fehérjegyógyszerek gyártása során fellépő, talán legelkeserítőbb probléma, hogy az emberi test nagyon nem szívesen fogadja az idegen fehérjéket. És valóban, a testünk különféle módszerek egész arsenálját alakította ki, hogy minél gyorsabban és hatékonyabban megszabadulhasson a lenyelt, beinjektált vagy más- képp bevitt idegen fehérjéktől. Például, a lenyelt fehérjéket a szájban azonnal megtámadják az amilázok [19], amelyeket arra „terveztek”, hogy eltávolítsák a legtöbb fehérjét borító védő

szénhidrátokat. A nyelőcsőben lefelé haladva ezeket a „lemeztelített” fehérjéket a nyálkahártya sejtei a felületükön adszorbeálják és inaktíválják. Amint a „túlélő” fehérjék elérik a gyomrot és a vékonybelet, extrém savas körülményeknek vannak kitéve (ami azonnal denaturálja a fehérjéket) és az itt található saválló proteázok rövid, inaktív peptidekké emésztik a denaturált fehérjéket. Hasonlóképpen, ha a fehérjét a véráramba juttatjuk, antitestek vagy T-sejtek támadhatják meg és szabdalhatják darabokra. Emellett albuminok vagy lipoproteinek is adszorbeálhatják, majd véglegesen eltávolíthatják ezeket a fehérjéket a keringésből. Még ha esetleg egy keringésbe injektált fehérje túl is élné ezeket a támadásokat, a plazmafehérjék még mindig megtámadhatják és felszabdalthatják. Az idegen fehérjéket azért kezeljük ilyen „barátságtalanul”, mert a testünk úgy van felépítve, hogy a fehérjéket táplálékforrásként használja fel (amennyiben lenyeljük őket), vagy patogénekként ismeri fel (mint pl. baktériumok, vírusok, paraziták), melyek megtámadták a keringési rendszerünket. Ez a legtöbb fehérjét „el-lenségge” teszi, melyeket legjobb minden adandó alkalommal azonnal megemészteni vagy eltávolítani. A test még a saját „barátságos” fehérjéinek pár naponkénti eltávolítására vagy cseréjére is kifejlesztett különböző mechanizmusokat. Ez a rendszeres csere megvédi a szervezetet az öreg, rosszul működő fehérjéktől és szoros kontrollt gyakorol a regulációs fehérjék fölött, melyekre csak pár percig vagy óráig van szükség. Ezek a finom mechanizmusok, melyek az elmúlt kétmilliárd évben alakultak ki, nagyban megnehezítik a gyógyszergyárak dolgát, mikor fehérjeinjekciókat vagy szájon át adható készítményeket akarnak gyártani.

### 6.1.3. Peptid- és fehérjehormon gyógyszerek

A hormon klasszikus definíciója: a hormon egy olyan kémiai üzenetközvetítő anyag, mely lehet kis- vagy nagy molekulájú, egy mirigy vagy egy szövet szintetizálja és szekretálja a véráramba, ahol azokra a szervekre hat, amelyek rendelkeznek a megfelelő receptorokkal. A hormonhatások közé tartozik a növekedés stimulálása vagy leállítása, a programozott sejthalál (apoptózis) indukciója vagy szupressziója, az immunrendszer modulációja, a metabolizmus regulációja és a szervezet valamely új feladatra (pl. harc, menekülés, párzás), vagy életfázisra (pl. pubertás, gyermekszülés, menopauza) való felkészítése. Sok esetben egy hormon más hormonok termelését és szekrécióját szabályozza. Sok hormon úgy írható le, mint egy, az adott szerv vagy szövet anyagcseréjét szabályozó hírközlő anyag. Szinte minden többsejtű szervezet szaporodási ciklusát is hormonok szabályozzák.

Az állati hormonok alapvetően négy kategóriába sorolhatók: (1) aminoszármazék típusú hormonok, (2) peptid/fehérje hormonok, (3) szteroid hormonok, (4) lipid vagy foszfolipid hormonok. Az aminoszármazék típusú hormonok, mint a katecholaminok és a tiroxin, a tirozin és a triptofán aminosavak származékai. A peptid hormonok, köztük az inzulin, a szomatotropin (GH) és a vasopressin 5-200 aminosav-egység hosszúságú polipeptidek. A szteroid-hormonok, mint pl. az ösztrogén és a tesztoszteron, a koleszterin származékai. Ezeknek a hormonoknak az elsődleges forrása a mellékvesekéreg és a gonádok (ivarmirigyek). A lipid és foszfolipid hormonok lipidek, pl. a linolénsav, illetve foszfolipidek, mint pl. az arachidonsav származékai. Ebben a fejezetben elsősorban a fehérjehormonokkal fogunk foglalkozni.

A peptid- ill. fehérjehormonok rendkívül sokféle funkcióval rendelkezhetnek. Ezeknek a hormonoknak annyiféle osztálya képzelhető el, amennyi hormonálisan szabályozott biológiai funkció létezik. Amennyiben ezekhez hozzávesszük még ezeknek a hormonoknak a lehetséges antagonistáit is (amelyek kompetitív vagy nem-kompetitív módon kötődhetnek a hormonreceptorhoz), a kapott osztályok számát akár meg is duplázhathatnánk. Ezeket az alosztályokat viszont lehet úgy csoportosítani, hogy a gyógyszeripari szempontból fontos hormonok a következő szélesebb kategóriák valamelyikébe essenek:

1. A homeosztázis regulátor hormonok alapvető fiziológiai jellemzőket szabályoznak, mint pl. a vércukorszint (inzulin), vízvisszatartás (vasopressin, desmopressin) vagy a méh simaizomzatának összehúzódnása (oxitocin)

2. A termékenységet szabályozó hormonok a fogamzóképeséget tudják elősegíteni vagy gátolni. A luteinizáló hormont (LH) és a tüszőérést serkentő hormont (FSH) indirekt módon lehet úgy szabályozni a szteroid hormonok (az ösztrogén és a progeszteron) szintjének beállításával, hogy elnyomják a termékenységet, a peptidhormonok közvetlen adagolását viszont arra használják, hogy több petesejt egyidejű érését érjék el.

3. A növekedést/osztódást szabályozó hormonok között találunk olyanokat, melyek a teljes szervezet növekedését serkentik elő (GH) és olyanokat, melyek egy bizonyos szövettípusra hatnak (pl. az eritropoietin a vérképzésnél, palifermin a nyálkahártyáknál vagy aldesleukin a limfocitáknál.) Több termékenységi hormon, mint pl. a leuprolid, közvetetten hathat általános vagy specifikus növekedésserkentőként.

4. Az immunomodulátor hormonok a normál immunválaszt és a gyulladáshoz vezető folyamatokat szabályozzák. Ebben a csoportban előfordulnak olyan hormonok, melyek serkentik az immunrendszer működését (pl. interferonok), vagy éppen elnyomják azt (ciklosporinok).

Amennyiben a hormon definícióját kiterjesztenénk a helyhez kötött szekretált vagy sejtfelszíni szignálmolekulákat, az előző listát még egyéb típusú regulátoranyaggal egészíthetnénk ki, beleértve az olyan molekulákat is, melyek a fejlődő szövetek specifikációját és differenciálódását szabályozzák (pl. netrinek, szemaforinok, morfogének). Mivel ezeknek az anyagoknak a hatása erőteljesen lokalizált, terápiás szerként csak akkor lennének hatásosak, ha a szervezetbe juttatásukat az eddig, szisztémás adagolási módszerek helyett sikerülni valamilyen precízebb megoldást kifejleszteni. A 6.1-1-es táblázat bemutatja az összes, az FDA által bejegyzett peptid-, illetve fehérjealapú hormonkészítményt. Lejjebb ezek közül néhányról részletesebb információt is találhatunk.

### 6.1.3.1 Példák hormon alapú bio-gyógykészítményekre

Homeosztázis hormonok. Az inzulint a hasnyálmirigyben elszórtan elhelyezkedő Langerhans-szigeteinek  $\beta$ -sejtjei termelik. A szigetsejtek a teljes hasnyálmirigy szövetnek összesen mintegy 1%-át alkotják. Minden sziget kb. 3000 endokrin sejtet tartalmaz; a sziget közepét a b-sejt alkotja, ezt egyéb endokrin sejtek veszik körül, mint pl. a glükagon-szekretáló a-sejtek, a szomatostatin-szekretáló d-sejtek, és a pankreász-polipeptideket szekretáló PP-sejtek. A b-sejtek először egy 109 aminosavból álló pre-proinzulint termelnek, amely ezután a 86 aminosavból álló proinzulinná alakul. Az A- és a B-láncokat a C-peptidlánc és két diszulfid-híd köti össze. A proinzulint a Golgi-készülék a szekréció előtt még lehasítja a 35-aminosav hosszúságú C-peptidet az összesen 51 aminosavegységből álló A- és B-láncokól. Az inzulint a b-sejtek a véráramba ürítik, ahonnan az eljut a fő célszervekhez: a májhoz, a zsírsejtekhez és az izmokhoz. Az inzulin a célsejtek plazmamembránjában található inzulin-receptorhoz, a tirozinkinázhoz kötődik, ami a receptor autofoszforilációjához és a jelátviteli kaszkád beindításához vezet, ami több, mint 100 downstream gén regulációjáért felelős.

Banting, Best, Collip és MacLeod 1921-ben izolálták először az inzulint, és 1922-ben mutatták be, hogy szerepe lehet az I-es típusú cukorbetegség (diabetes mellitus) kezelésében [20]. Az inzulint a rekombináns formák kifejlesztése előtt szarvasmarha vagy disznó hasnyálmirigyéből nyerték. A rekombináns humán inzulint genetikailag módosított *Escherichia coli* baktérium, vagy *Saccharomyces cerevisiae* élesztő törzsekkel termeltetik. Az aktív inzulint két peptidláncból áll (A és B), melyeket diszulfid-hidak kötnek össze (6.1-1-es ábra). Az A lánc



21, a B lánc 30 aminosav hosszúságú. Az *E. coli* nem rendelkezik a proinzulin hasításához szükséges proteázzal, ezért az A és B láncokat vagy külön sejtekkel termeltetik, kinyerik, tisztítják és utólag kémiai oxidációval hozzák létre köztük a diszulfid kötések, vagy a termelt proinzulint utólag, in vitro körülmények között hasítják a megfelelő proteolitikus reakcióval. (erről részletesebb információt a 21-es hivatkozásban olvashatunk.) A *S. cerevisiae* genomját úgy módosítják, hogy az általa termelt inzulin A és B láncait egy rövid, szintetikus peptid-szekvencia köti össze. Ezt a terméket vizes-szerves oldószeres közegben, főlős treonin-észter jelenlétében végbemenő transzpeptidációs reakció segítségével alakítják humán inzulinná. Az inzulin volt az első olyan állati eredetű fehérje, melyet baktériumok segítségével az eredetivel teljesen megegyező formában tudtak előállítani. Az eredeti rekombináns inzulint a később többféleképpen módosították: a Lispro inzulinban két aminosav pozícióját felcserélték, a Glargine és az Aspart nevű termékekben pedig bizonyos aminosavakat másokkal helyettesítettek, vagy éppen eltávolítottak az eredeti szekvenciából. Ezeknek a modifikációknak az volt a célja, hogy a gyógyszerhatás kinetikáját, vagy hatóidejét javítsák.

Az inzulint általában parenterálisan (szubkután injekció formájában) adják, de sok kutató és gyógyszerceg dolgozik egyéb beadási módok kidolgozásán (szájon át, nyelv alatti tablettaként ( Oral-lyn) , vagy légúton keresztül (Exubera) [10]. A nyelv alatti vagy a légúti beadás esetén a dózist jelentősen meg kell növelni, vagy a szájon át adott készítmények esetében adalékanyagokat kell alkalmazni, hogy a megfelelő felszívódást elősegítsék. (ezek közé tartozik a kapszulázás, a permeabilizálás, vagy kémiai stabilizátorok adagolása). Máig még egyetlen orális inzulin készítmény hatékonyságát sem sikerült bizonyítani, így nincs ilyen, FDA által bejegyzett gyógyszer.

A homeosztázis fenntartását szolgáló, fontos szabályozó hormonok másik csoportját alkotja a vasopressin és az oxitocin. Ez a két hormon stuktúráisan hasonló 9 aminosavból álló oligopeptid, melyek a hipotalamuszban termelődnek, és axonok közvetítésével jutnak el a hipotalamusz hátsó lebenyébe és a szekréciójukig ott raktározódnak. Az oxitocin és a vasopressin a 3-as és a 8-as aminosavat kivéve teljesen egyforma szekveciával és szerkezettel rendelkeznek, a fiziológiás hatásuk mégis eltérő. Az oxitocin az anyatej elválasztást és a méhnyálkahártya simaizomzatának összehúzódását stimulálja, és valószínűleg szerepe van a szülés megindításában. A vasopressin, vagy más néven antidiuretikus hormon (ADH) érösszehúzó hatású és csökkenti a vizelet mennyiségét azáltal, hogy a vesetubulusok vízvisszaszívását növeli. Hasonló szerkezetükből adódóan mégis van némi átfedés a két hormon által kiváltott fiziológiás reakcióban. Az oxitocin a vasopressin antidiuretikus hatásának kb. 1%-ával, míg a vasopressin az oxitocin tejelválasztást serkentő hatásának kb. 15%-ával rendelkezik. Mindkét peptid ciklikus szerkezetű, valamint az 1-es és 6-os pozícióban mindkettő ciszteineket tartalmaz, melyeket diszulfid híd köt össze, ezzel egy olyan hattagú gyűrűs szerkezetet hozva létre, amihez egy flexibilis 3 tagú, amidált, C-terminális „farok” tartozik. Mindkét hormon specifikus receptorokhoz kötődik, amelyek G-fehérje szignál transzdukciós útvonalakhoz kapcsolódnak. A G-fehérjék aktiválása az inozitol-trifoszfát és a diacil-glicerol aktivációjához vezet, ami sejten belüli  $Ca^{2+}$  kibocsátást és egy MAP-kináz kaskád elindulását okozza. Ennek a reakciósornak a végén a miozin könnyű láncú egységei foszforilálódnak, ami a simaizom összehúzódásához vezet. Az oxitocin-receptorok az emlőszövet mioepiteliális sejtjeiben és a méhnyálkahártya simaizom sejtjeiben találhatóak, míg a vasopressin receptorai a vesekéreg érgomolyagjainak falában és a vesevelő simaizom sejtjeiben fordulnak elő. Az érfal sejtjeinek összehúzása mellett a vasopressin az akvaporin vízátvezető fehérjecsatornák áthelyeződését okozza a vesetubulusok belseje felé eső felére. A hipotalamuszt ért metastatikus vagy traumatikus károsodások, vagy ritka örökletes betegségek okozhatják a vasopressin hiányát, ami egy másik fajta cukorbetegség, a diabetes insipidus kifejlődéséhez vezet [11]. Az ebben a betegségben szenvedők nagy mennyiségű, híg vizeletet ürítenek, ezért rengeteg vizet kell inniük, hogy pótolni tudják az elvesztett folyadékot.

A vasopressint parenterálisan adják, de szintetikus analógja, a desmopressin-acetát, a diabetes insipidus kezelésére orron át, vagy tablettaként is bevehető [10]. Az oxitocint és a vasopressint szilárd fázisú szintézissel gyártják [22, 23]. Az antidiuretikus hatású gyógyszereket 2002 - 2003-ban az USA-ban az orvoshoz forduló betegek 15%-ának írták fel, míg 7 évvel ezelőtt ez az arány csak 10% volt [24]. Az oxitocint a szülés megindítására használják parenterálisan (intravénás vagy szubkután injekció formájában) adva, vagy orrcseppként szoptatós édesanyák tejelválasztásának növelésére. 2003-ban az USA-ban az összes szülés 20%-ánál alkalmaztak oxitocint[24].

Termékenységi hormonok. Az LH és a z FSH erőteljesen N-glikozilált glikoprotein dimerrek, melyek egy közös, 92 aminosav-egységből álló a-láncot és és egy-egy, különböző b-láncot tartalmaznak (a LH-nál 121, a FSH-nál 111 aminosav egység hosszúságú). Az LH hormon a szteroid nemi hormonok termeléséért, az LH és az FSH együttesen a gametogenezisért felelős férfiakban és nőkben egyaránt. A hipofízis gonadotrop sejtjei ezeket a hormonokat egy meghatározott időciklus szerint termelik. Férfiakban például egy állandó nagyságú LH impulzus jön létre kb. 90 percenként, míg nőkben az LH impulzusok nagysága és gyakorisága a menstruációs ciklus során változik. [11]. Az LH aktivál egy G-fehérrével kapcsolt transzmembrán receptort, ami főleg a herék Leydig-sejtjeiben, illetve a petefészekben található tüsző sejtjeiben található. Az FSH hasonló receptorai kizárólag a herék Sertoli-sejtjeiben, illetve a tüsző granulosa sejtjeiben találhatók. Férfiakban az LH tesztoszteron képződését indukálja a célsejtben, míg az FSH az androgének termelődését segíti elő. Nőkben az LH és az FSH receptorok komplex kooperatív aktivációja szabályozza az elsődleges szteroid nemi hormonok, a progeszteron és az ösztadiol szintjét. Az LH és az FSH posztmenopauzális korú nők vizeletéből gyűjthető, vagy transzgén-expresszió segítségével kínai hörcsög petefészek (CHO) sejtvonalakban állítható elő. Az LH-t és az FSH-t általában együtt adják a női terméketlenség kezelésére, az ovuláció és a sárgatest képződés elősegítésére. Az LH-t és az FSH-t parenterálisan adják (Lutropin-LH, vagy Repronex- LH és FSH kombinált készítmény). 1995-ben az USA-ban kb. 6,7 millióra becsülték a termékenységi problémákkal küzdő nők számát, 35 százalékukat kezelték is valamilyen termékenységet stimuláló gyógyszerrel[25].

Növekedést szabályozó hormonok. A növekedési hormont (GH, más néven szomatotropin vagy szomatropin) először 1944-ben izolálták [11]. A GH egy anabolikus hormon, mely felelős a sejtosztódás indukálásért és az adott egyén magasságának kialakításáért. A GH növeli a kalcium visszatartást is, erősíti és ásványi anyagokban dúsabbá teszi a csontot, segít az izomtömeg növekedésében, indukálja a fehérjeszintézist és az immunrendszert is stimulálja. Az érett növekedési hormon egy egyszálú, nem glikozilált, 191 aminosavegységből álló polipeptid, a hipofízis elülső lebenyében termelődik. Egy nagyobb prohormonból származtatható, amiből a GH éréskor lehasad egy szekréciós szignálpeptid. A GH-t a hipofízis mellett sokkal kisebb mértékben egyéb szövetek is termelik, pl. a központi idegrendszer, az emlőszövet mirigyei, mindkét nem ivarmirigyei, valamint a vérképző (hematopoietikus)- és immunsejtek. A GH receptora volt az elsőként felismert citokin receptor, egy kb. 620 tagú transzmembránfehérje, mely erőteljesen glikozilált és ubikvitinezett. A receptor proteolitikus alegysége, a GH-kötő fehérje folyamatosan kering a vérben és megnöveli a hormon felezési idejét azáltal, hogy csökkent a degradációjának mértékét. A GH receptort a test olyan különböző szöveteiben találták meg, mint az emésztőrendszer, a csont-és izomrendszer, a légzési és keringési rendszer, a vérképző és immunrendszer, a központi idegrendszer, a vese és vizeletürítési rendszer és az endokrin mirigyek. Előfordul a növekedő magzat minden sejtípusában is. Felnöttekben legnagyobb mennyiségben a májban van jelen. Egy GH hormon egyszerre két receptorhoz kapcsolódik, így ezek dimerizációját okozza. A létrejött trimernek nincs saját kináz funkciója, így

a Janus tirozin kináz család egy tagját (JAK2) használja a STAT-mediált génextpresszió aktiválásához, miközben aktiválja a Ras-Raf-MEK-et, a foszfatil-inozitol 3-kinázt (PI 3-kináz) és a protein-kináz C típusú reakcióútját [26,27]. Ahogy ezt várhatjuk is, ennek a bonyolult aktiválási folyamatnak sokféle kiterjedt hatása van a fiziológiára és a morfológiára. Fő hatása a chondrociták (porcsejtek) és osteoblast sejtek proliferációjának elősegítése, ami a csontok hosszirányú növekedéséhez vezet. Emellett az izomszövet tömegének növekedésének is kedvez, növeli a zsírsejtek lipolitikus aktivitását, így az összes testzsír mennyiségét csökkenti. A GH a központi idegrendszer differenciálódását is befolyásolja, aminek olyan kognitív hatásai lehetnek, mint a hosszútávú memória, a tanulási képesség és a REM alvás fejlődése (bár ez csak akkor következik be, ha a fiziológiánál nagyobb mennyiségben adagoljuk.)

A GH hormon termelés visszaesése vagy megszűnése egy autoszomális recesszív genetikai betegség, ami olyan nyilvánvaló tünetekhez vezet, mint az arányos törpenövés kialakulása (akár már 6 hónapos korban). A Laron-szindróma a GH receptor hibás szerkezete miatt jön létre, szintén erőteljesen csökkent testméret kialakulásához vezet, de a GH külső adagolására rezisztens [29]. Másfelől, a GH krónikus túltermelése akromegáliához (a fej vagy a végtagok csontjainak beteges megnagyobbodásához) vezethet, ami néha halálos kimenetelű kardiovaszkuláris, agyi, légzési és metabolikus rendellenességekhez vezethet.

A rekombináns GH-t *E. coli*-ban termeltetik, és injekcióként adják be. A végső termék megegyezik a humán növekedési hormonnal, bár eredetileg egy szignálpeptiddel együtt történik a translációja, de ezt a peptidet a sejt a periplazmába történő transzport után lehasítja. A GH termelését semorelin acetát adagolásával is lehet segíteni. A semorelin acetát egy szintetikus, 29 aminosavból álló amidált peptid acetátsója, amely a GRH (GH releasing hormon) aminoterminális végéhez tud kapcsolódni [11]. Az akromegáliához vezető GH túltermelés a GH PEG-észterezett változatával, a Pegvisomant nevű gyógyszerrel kezelhető [30]. A GH-nak ez az inaktív, kémiai módon módosított analógja kompetitív gátlást jelent a GH számára a receptorokhoz való kapcsolódásnál.

A GH másik szabályozóhormonja, az eritropoietin (EPO) egy 166 tagú citokin, melyet elsősorban a vesetubulusok mellett található intersticiális sejtek termelik. Az EPO stimulálja az eritropoiezist, a vörösvérsejtek képződését. A hormont részlegesen először Goldwasser és munkatársai tisztították vérszegénységben szenvedő betegek vizeletéből, 1977-ben, a cDNS-t Lin és társai, valamint Jacobs és társai klónozták 1985-ben [31,32]. Az EPO fehérje erősen N- és O-glikozilált, tömegének kb. 40%-a szénhidrát. Minden glikozilált lánc végén szialsav található, de a lánc belsejében is előfordulhat a szialsavazottság mértéke kihat a hormon receptorokhoz való kötődésére és a szérumbeli felezési idejére (ez utóbbi fontosabb az EPO bioaktivitásának szempontjából). A vese képes a hematokrit szintet (a vörösvérsejtek arányát a vérben) a normál, 45%-os értékre beállítani úgy, hogy a vörösvérsejtek mennyiségét az EPO termelésén és a víz, illetve só ürítésén keresztül (a plazmatérfogat beállításával) szabályozza [11, 33]. A vérbe kerülő EPO eljut a csontvelő sejtjeihez és a sejt felszíni receptorokhoz kötődik, így stimulálja a vörösvérsejtek termelését. A rokon citokin, a GH kötődéséhez hasonlóan az EPO receptorhoz való kötődése is dimerizációt és a JAK2 tirozin kináz jelátviteli út aktiválását eredményezi, ezáltal elősegítve az eritrociták proliferációját és differenciálódását. Az EPO-t engedélyezték krónikus veseelégtelenségben szenvedő anémiások és kemoterápiás kezelés alatt álló rákos betegek számára, valamint műtéti vérvesztés esetén. Az EPO adása a HIV kezelésére használt Zidovudine mellett adagolva is jótékony hatású. Mivel a fehérje megfelelő működéséhez fontos a megfelelő poszttranszlációs glikozilálás, ezért olyan rekombináns CHO sejtekkel állítják elő, melyekben kifejeződik a az EPO prekursor fehérjéje, a 27 aminosavból álló szignálfehérjével együtt. Létezik egy olyan variáns forma (a darbepoietin alfa), melyben két aminosavat kicseréltek, ezáltal kettővel több N-glikozilációs helyet hoztak létre.

Immunmodulációs hormonok. Az interferonok gerinceseknél egy olyan fajspecifikus fehérjecsaládot alkotnak (emberben I-es típus: IFN-a, IFN-b, IFN-e, IFN-k, IFN-o, és II-es típus: IFN-g), amely a szervezet számára egy általános védettséget ad sok vírusos fertőzés ellen, befolyásolja a sejtproliferációt, és modulálja az immunválaszt [34]. Az interferonokat először Isaacs és Lindenmann írták le, mint olyan vízoldható fehérjéket, amelyek csirke sejtekben antivirális aktivitást fejtenek ki. Az IFN-b-nak és az IFN-o-nak csak 1-1 funkcionális változata létezik, míg IFN-a –t 13 különböző allél kódolhat, 12 funkcióképes izoformát eredményezve. A különféle IFN-a-k mindegyike más-más antivirális, antiproliferatív és immunostimuláns hatással rendelkezik, az interferon terápiás gyógyszerek nagy részét mégis az IFNA2 gén variánsai adják (IFN-a2a, IFN-a2b és IFN-a2c). Az I-es típusú interferonok különböző celluláris reakciókat váltanak ki, mégis közös a dimer receptoruk, az IFNAR, mely kis mennyiségben minden sejt típus plazmamembránján megtalálható. Minden IFNAR alegység egy egyszeres transzmembrán fehérjéből és a JAK tirozin-kináz család egy tagjából áll (TYK2 az IFNAR-1, és JAK1 az IFNAR-2c esetén). Mikor az interferon a receptorhoz kötődik, a receptor dimerizálódik, és kereszt-autofoszforilálja a citoplazma receptorok végeit a TYK2-vel és a JAK1-el együtt. Ez elindítja a sejt magban a STAT szignálkomplex transzlokációját és a gén-specifikus transzkripciót [36]. Még nem ismert, hogy lehetséges az, hogy a sok különféle IFN-a különböző celluláris válaszreakciót vált ki, miközben ugyanazon a receptoron keresztül hatnak, bár vannak arra utaló adatok, hogy a különböző ligandumoknak kissé különböző kötőhelyei lehetnek, és esetleg bevonhatnak egyéb receptorokat az aktivált komplexbe.

A természetes és rekombináns interferonokat a hajassejtes leukémia, a malignus melanóma, az AIDS-hez kapcsolódó Kaposi-szarkóma, és többféle vírusos betegség kezelésére engedélyezte az FDA. Az I-es típusú IFN-ek sokféle biológiai funkciót látnak el, mint antivirális és antiproliferációs hatások és az MHC I-es antigén prezentációs sejtek és az NK-sejtek aktiválása. Ez sok súlyos betegség kezelésében ideális gyógyszerré teszi őket, de nemkívánatos mellékhatásaik is lehetnek, különösen az általában alkalmazott nagy dózisokban. Klinikai tesztelés alatt vannak szájon át adható, alacsony dózisú készítmények is, de ezeket még nem engedélyezték általános használatra. Az IFN- $\alpha$ -t az FDA 1991. február 25-én engedélyezte hepatitis C kezelésére [37,38]. 2001 januárjában az FDA a PEG-ilált IFN-a-t is bejegyezte. A PEG-észterezett formát hetente egyszer elég injekcióban beadni, míg a hagyományos IFN- $\alpha$ -t hetente háromszor szükséges beadni.

### 6.1.3.2 A hormonalapú bio-gyógyszerkészítmények jövője

Az új peptidhormon alapú gyógyszerek kutatása több vonalon is folytatódik. A legaktívabban kutatott terület az alternatív adagolás: a szájon át, orron át, nyelv alatti tablettaként, transzdermális tapaszként vagy inhalálható készítmények kutatása. Mindezen módszerek legnagyobb nehézsége a hatóanyag átjutattása az akadályt jelentő nyálkahártyán vagy epidermális sejteken, a fehérje stabilitásának megőrzése, a kiürülés sebessége és a biológiai hozzáférhetőség.

Az epitheliális nyálkahártya, amely az emésztőrendszer, a szájüreg, az orr és a tüdő falát borítja, ami a peptid és fehérjehormonok számára jelentős nehézséget jelent a keringési rendszer elérése szempontjából. A terápiás fehérjék nyálkahártyához való kötődését növelve azt érzük el, hogy a fehérje hosszabb ideig kötődik a megfelelő adszorpciós helyekhez. Ennek érdekében a fehérjét a nyálkahártyához jól tapadó mikro-vagy nanorészecskébe csomagolják [39, 40]. A nyálkahártyában tartózkodva viszont a fehérje megnövekedett extracelluláris proteolitikus aktivitásnak van kitéve. Ezért a fehérjegyógyszereket úgy kell kémiailag módosítani, hogy csökkentsék a proteolitikus aktivitással szembeni érzékenységüket (pl. a bélben). Például a szájon át adható desmopressin acetát a C-terminális aminosav amidálásával, az L-Arg

D-Arg-al történt szubsztitúciójával, és az N-terminális aminosav merkaptó-propionsavra történt cseréjével részlegesen védetté vált a proteolitikus degradáció ellen [41].

A nyálkahártya mellett az epitheliális sejtek is jelentős akadályt képeznek a terápiás fehérjék felszívódásakor. Sokféle próbálkozás történt ennek a problémának az áthidalására, ezek közül legsikeresebbnek az a megoldás bizonyult, mikor a fehérje hidrofilitását lipofil láncok kovalens addíciójával megváltoztatták. Például, a szájon át adható hexil-inzulin monokonjugát 2 (HIM2) 7-9 PEG egységet és egy hexil-alkil láncot tartalmaz a Lys 29-hez kötve, ezáltal biztonságosnak és az I-es és II-es fázisú klinikai kísérletek során valamelyest hatékonynak bizonyult a hiperglikémia kezelésére a az 1-es típusú diabetes mellitusban szenvedő betegeknél [42]. Újabb kutatások eredményeként az epitheliális permeációt elősegítő anyagokat fejlesztettek ki, mint pl. hidrophil poliszacharidok kationos vagy polimer származékait, ezek az inzulin és a calcitonin szájon át vagy [43] orron át történő [44], illetve inhalációs [39] adagolásának hatékonyságát kísérleti körülmények között bizonyítottan megerősítették. Ezeknek a permeációt elősegítő szereknek a hatásmechanizmusa nem teljesen ismert, de a kutatók úgy gondolják, hogy (legalábbis a béltraktus esetén) a sejtek és az epitheliális állomány közötti szűk átjárható utak módosítása elengedhetetlen [40].

Az új beviteli módszerek mellett több új terápiás hatású peptidhormont is felfedeztek. A Ghrelin egy 28 tagú, poszttranszlációsán módosított peptid, melyet főként a gyomor sejtjei szekretálnak, és úgy tűnik, hogy hatása van a táplálkozási szokásokra [11]. Bizonyított tény, hogy az orexigenális (étvágyat gerjesztő) aktivitást részben az Y peptid nevű hipotalamusz-hormon szabályozza. A Ghrelin a GH receptor endogén liganduma, stimulálja a GH hormon termelődését a hipofízisben az GRH hipotalamusz hormontól függetlenül. A Ghrelin ismételt beadása a sorvadásos, krónikus szív- vagy tüdőelégtelenségben [45] szenvedő betegekben az izomtömeg növekedését, és a funkcionális kapacitások növekedését okozta, és rágszálókban enyhítette a kemoterápia okozta emésztési zavarokat [46]. A Leptin egy zsírszövetből származó citokin hormon, mely valószínűleg növeli a zsírsavoxidáció sebességét és növeli az inzulinreceptorok érzékenységét az AMP-aktivált protein kináz felé, ezáltal csökkentve a szabadon keringő zsírsavak és trigliceridek mennyiségét [47].

#### 6.1.1-es táblázat Az FDA által engedélyezett fehérje, illetve peptid alapú gyógyszerek

Generikus név	Kémiai név	Márkanév	Leírás	Indikáció
Abarelix	acetil-D-b-naftil Ala-d-4-kloroPhe-D-3-piridil Ala-L-Ser-L-Leu-L-N-metilTyr-D-Asp-L-Leu-L-N-izopropil-Lys-L-Pro-D-Ala	Plenaxis	Anti-tesztoszteron, antineoplasztikum. A GnRH (gonadotropin releasing hormon) szintetikus decapeptid antagonistája	Előrehaladott prosztatarákot csillapító szer.
Aldesleukin	módosított humán IL-2	Proleukin	Antineoplasztikum. Rekombináns E.coliban termeltetik. Nem glikozilált. Az N-terminális Ala hiányzik. Cys-125-Ser szubsztitúció	Metastatikus vesesejt-rákban szenvedő felnőtt betegek számára.

Anakinra	humán IL-1 receptor-antagonista fehérje	Kineret	Antireumatikus, immunmodulátor. Rekombináns humán IL-1receptor antagonist. <i>E. coli</i> -ban termeltetik. 153 tagú peptid.	Rheumatoid arthritis felnőttekben.
Becaplermin	humán növekedési faktor	Regranex	Topikus fekélyellenes anyag. A rekombináns fehérjét a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> élesztővel termeltetik. Homodimer.	Cukorbetegség okozta bőrfekélyek kezelésére
Calcitonin, lazac	lazac calcitonin	Miacalcin	Antihipokalcémiás, csontritkulást megakadályozó gyógyszer. Szintetikus, 32 tagú peptid, orrspray formájában forgalmazzák.	osteoporosis (csontritkulás)
Cetrorelix	acetyl-D-3-(2'-naftil)-Ala-D-4-kloroPhe-D-3-(3'-piridil)-Ala-L-Ser-L-Tyr-D-citrulin-L-Leu-L-Arg-L-Pro-L-Ala-amid	Cetrorelix, Cetrolexium, Cetrotide	Terméketlenség elleni gyógyszer. A szintetikus hormon megakadályozza az idő előtti ovulációt a GnRh stimulált LH termelés gátlásával.	Peteérést stimuláló kezelés alatt álló nőkben a túl korai LH hatás gátlására
Choriogonadotropin-a	humán chorion gonadotropin	Novarel, Ovidrel, Pregnil, Profasil	Termékenységet javító gyógyszer. 2 alegysége van, az a egység 92, a b egység 145 tagú, mindkettőhöz N-és O- szénhidrát kapcsolódik.	női terméketlenség
Darbepetin a	humán eritropoietin	Aranesp	Antianémiás gyógyszer. Humán EPO 2 a-a-szubsztitúcióval a glikoziláció elősegítésére. Rekombináns CHO sejtekben termelik.	vérszegénység (vesetranszplantáció vagy bizonyos HIV-kezelés által okozott esetben)
Denileukin diftitox	diftéria-toxin- IL-2 fúziós fehérje	Ontak	Antineoplasztikum. Rekombináns diftéria toxin A és B alegységei IL-2-vel fuzionáltatva. <i>E. coli</i> -ban termeltetik.	kután T-sejt limfoma

Desmopressin	1-dezamino-8-D-Arg-vasopressin	Concentraid, DDAVP, Stimate	A vesére ható gyógyszer, a vasopressin szintetikus módosított változata. Dezaminált, a 8-as Arg L helyett D konfigurációjú.	diabetes insipidus, átmeneti túlzott vizeletürítés és polidipsia ellen.
Desmopressin acetát	desmopressin acetát	Stimane	Antidiuretikus szer. A 8-Arg-vasopressin (ADH) hipofízis hormon szintetikus analógja. Az N-terminális Cys-t 3-merkaptopropionsavval és a Arg-t D-Arg-al helyettesítették.	diabetes insipidus, polidipsia megakadályozása, túlzott vizeletürítés és dehidratáció ellen.
Epoetin a	humán EPO	Epogen, Epogin, Epomax, Eprex, NeoRecormon	Antianémiás gyógyszer. Rekombináns CHO sejtekben termelik.	Vérszegénység (vesetranszplantáció vagy bizonyos HIV-kezelés által okozott esetben)
Eptifibatide	N 6-(aminoiminometil)-N 2-(3-merkaptó-1-oxo-Pro-L-Lys-L-Gly-L-AspL-Try-L-Pro-L-Cys	Integrilin	Antikoaguláns, thrombocytá gátló. Szintetikus ciklikus hexapeptid, a thrombocytareceptor glikoproteinhez kötődik és megakadályozza a thrombocyták aggregációját.	miokardiális infarktus, akut koronáriás szindrómák.
Felypressin	2-(L-Phe)-8-L-Lys-vasopressin	Felipresin, Felipressina, Felypressin, Felypressinum	Vesére ható anyag, érösszehúzó hatású. Hemostatikus, a Lysipressin (Lys-vasopressin) szintetikus analógja, érösszehúzó hatása erősebb az antidiuretikus hatásánál.	altatók lokalizálószere.
Filgrastim	humán granulocita kolónia stimuláló faktor	Neupogen	Fehérvérűség ellenes, Fertőzés gátló, immunmodulátor. 175 tagú, <i>E. coli</i> -ban termeltetik.	Növeli a leukociták termelését. Nem mielómás rákos betegség, fehérvérűség, csontvelőátültetés esetén.

Follitropin a/b	humán FSH	Gonal-F	Termékenységet javító gyógyszer. 2, nem-kovalensen kötött, nem egyforma glikoprotein kapcsolódik, 92, ill. 111 aminosavból állnak.	női terméketlenség
Follitropin b	humán FSH	Follistin	Termékenységet javító gyógyszer. 2, nem-kovalensen kötött, nem egyforma glikoprotein kapcsolódik, 92, ill. 111 aminosavból állnak.	női terméketlenség
Glükagon rekombináns	humán glükagon	GlucaGen, Glucagon	Antihipoglikémiás szer. 29 tagú peptidhormon, E coliban termeltetik	súlyos hipoglikémia
Goserelin	piro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Bu)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH <sub>2</sub> acetát	Zoladex	Antineoplasztikus anyag. Szintetikus hormon. Férfiakban leállítja a tesztoszteron termelését, nőkben csökkenti az ösztadiol termelését.	mellrák, prosztaták, endometriózis
Inzulin Glargin rekombináns	rekombináns humán inzulin	Lantus	Hipoglikémiás szer. E.coli-ban termeltetik. Abban különbözik a humán inzulintól, hogy a 21-es Asn-t Gly-vel helyettesítik és B szál C-terminálisára két Arg-t kapcsolnak.	diabetes (I-es és II-es típus)
Inzulin Lyspro rekombináns	humán inzulin	Humalog, Insulin Lyspro	Hipoglikémiás szer. A szokásos hexamer inzulin monomer formája, gyorsabban felszívódik, mint a természetes inzulin. A B-láncban a Lys28 és a Pro29 fel van cserélve.	diabetes (I-es és II-es típus)
Inzulin rekombináns	humán inzulin	Novolin R	Hipoglikémiás szer. 51 tagú, az E. coli külön termeli a 2 láncát, ezeket in vitro kapcsolják össze.	diabetes (I-es és II-es típus)
Disznó inzulin	disznó inzulin	Iletin II	Hipoglikémiás szer, disznó hasnyálmirigyéből izolálják.	diabetes (I-es és II-es típus)



Interferon a-2a	humán IL-1 a-2a	Roferon A	Antineoplasztikus, antivirális szer. 165 tagú fehérje. Rekombináns E. coli-val termeltetik.	krónikus Hepatitis C, hajassejtes leukémia, AIDS-okozta Kaposi-szarkóma, krónikus mielogén leukémia
Interferon alfacon-1	humán IL-a	Infergen	Antineoplasztikus, antivirális, immunomodulátor. Konszenzus szekvenciája az IL-a-ból származtatható, a humán IL-a-val 88 %-ban azonos. (20 as-ban különbözik.)	hajassejtes leukémia, AIDS-okozta Kaposi-szarkóma, malignus mieloma
Interferon a-n1	humán IL-a	Wellferon	Antivirális, immunomodulátor. 166 tagú tisztított, természetesen glikozilált fehérje.	HPV vírus okozta genitális daganatok
Interferon b-1a	humán IL b	Alferon	Antineoplasztikus, antivirális, immunomodulátor. Tisztított, természetes humán IL a fehérjék (2a, 2b, 2c)	hajassejtes leukémia, AIDS-okozta Kaposi-szarkóma, malignus mieloma, gyerekekben gége-papillomatosis, Hepatitis bizonyos változatai
Interferon b-1b	humán IL b	Avonex	Antivirális, immunomodulátor. 166 tagú tisztított, glikozilált fehérje. Rekombináns CHO sejtekkel termeltetik. Az elsődleges szekvenciája a humán IL b-ével azonos.	Sclerosis multiplex
Interferon c-1b	humán IL b	Betaseron	Antivirális, immunomodulátor. 165 tagú fehérje, a Cys 17 Ser-el szubsztituált. E coliban termeltetik, nem glikozilált.	Sclerosis multiplex
Interferon g-1b	humán IL g-1b	Actimmune	Antivirális, immunomodulátor. 166 tagú tisztított, glikozilált fehérje. Rekombináns E coliban termeltetik. Tisztítása oszlopkromatográfiával.	krónikus granulóma, csontritkulás

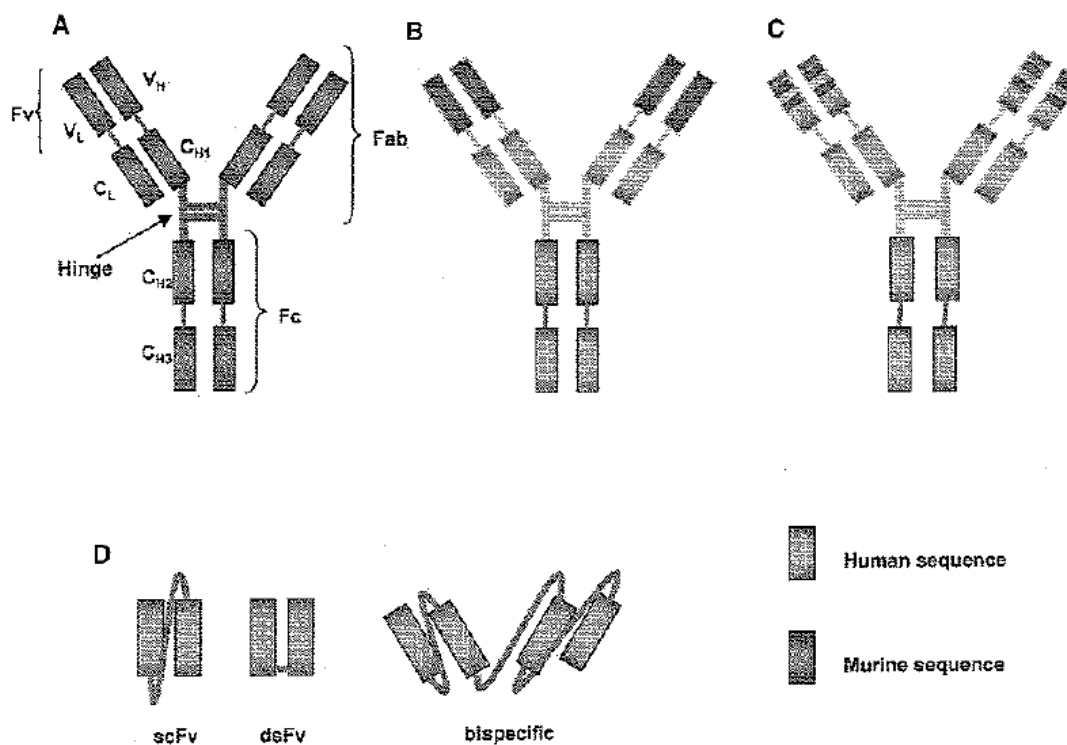
Leupirudin	Hirudo medicinalis hirudin (1-es variáns)	Refludan	Antikoaguláns, thrombocytá gátló. Megegyezik az emberi hirudinnal, azaz a különbséggel, hogy a N-terminális Ile Leu-ra van cserélve, és egy szulfátcsoport hiányzik a Tyr163-as csoportról.	heparin okozta thromocitátúltengés
Leuprolide	5-oxo-Pro-His-Ser-Tyr-Leu-Leu-Arg-N-etil-Pro	Eligard	Antineoplasztikum, a GnRH analógja	prosztatarák, endometriózis, méh fibridizáció, túl korai pubertás
Lutropin a	humán LH	Luveris	Termékenyséjavító szer. A rekombináns LH-t élesztőben termeltetik, 2 alegysége van: a: 92, b: 121 as. egység	női terméketlenség
menotropinok	LH és FSH kombinációja	Gengraf, Neoral, Restasis, Sandimmune,	Immunomodulátor. Posztmenopauzális korú nők vizeletéből tisztítják.	transzplant kilökődés, rheumatoid arthritis, súlyos psoriasis, akromegália és kemoterápia mellékhatásai
Octreotide acetát	Octreotide acetát	Sandostatin LAR	Anabolikus, hormonpótló. Egy ciklikus oktapeptid acetátsója, hatása a Somatostatinéhoz hasonló.	transzplant kilökődés, rheumatoid arthritis, súlyos psoriasis, akromegália és kemoterápia mellékhatásai
Oprelvekin	humán IL-11	Neumega	Koaguláns, trombocitaserkentő	megnöveli a kemoterápia során lecsökkent trombocitaszintet
Szájon át adható IL-a	humán IL-a	Veldona	Fertőzésellenes, antineoplasztikum, IL-a, 165 aminosavból áll.	HIV okozta szájdaganatok
Oxitocyn	oxitocin	Oxytocin, Pitocin, Syntocinon	Szintetikus 9 tagú peptid, azért gyárják szintetikus úton, hogy elkerüljék a vasopressinel történő esetleges szennyezést	szülésindítás, méhösszehúzóadás kiváltása

Palifermin	humán keratinocita növekedést sekentő faktor	Kepivance	Szájkişebesedés ellenes gyógyszer. 140 aminosav egység hosszú, E. coliban termeltetik. Az első 23 aminosavat a stabilitás növelése érdekében eltávolítják	mucositis (szájkişebesedés)
Pegfilgastrim	PEGilált humán granulocita kolónia stimuláló faktor	Neulasta	Fertőzéscellenes, fehérvérűség-ellenes gyógyszer. Immunomodulátor. 165 as-ból áll. E. coliban termeltetik.	nem-mielómás rák, fehérvérűség, csontvelőátültetés, hajassejtes leukémia, AIDS-okozta Kaposi-szarkóma, malignus mieloma
Peginterferon a-2a	PEGilált humán IL a-2a	Pegasys	Antineoplasztikus, antivirális, immunomodulátor. A rekombináns IL-a-2a kovalens konjugátuma egy PEG szállal. E. coli-ban termeltetik, 165 as.	nem-mielómás rák, fehérvérűség, csontvelőátültetés, hajassejtes leukémia, AIDS-okozta Kaposi-szarkóma, malignus mieloma
Peginterferon a-2b	PEGilált humán IL a-2b	PEG-intron	Antineoplasztikus, antivirális, immunomodulátor. 165 as. Egy aminosav szubsztitúciót tartalmaz (Lys23Arg)	hajassejtes leukémia, AIDS-okozta Kaposi-szarkóma, malignus mieloma
Pegvisomant	PEGilált GH	Somavert	Anabolikus, hormonhelyettesítő. Szelektíven kötődik a GH receptorokhoz és blokkolja az endogén GH-t.	akromegália
Sargramostim	humán granulocita makrofág kolónia stimuláló faktor	Leucomax, Leucine	Antineoplasztikus, fertőzéscellenes szer. A rekombináns GM-CSF-et élesztőben expresszáltatják. 127 as-at tartalmazó glikoprotein.	rák és csontvelőátültetés
szintetikus Secretin	humán szekretin	Secremax, SecreFlo	Diagnosztikum. A vékonybél S-sejtjei termelik a helyi alacsony pH hatására. A máj és a hasnyálmirigy bikarbonát-termelését stimulálja.	gasztrinóma és hasnyálmirigy exokrin működésbeli elváltozás diagnózisa

Sermorelin	GRH alegység	Geref	Anabolikus hormonpótlás, az amidált szintetikus, 29 as egységből álló peptid acetát sója, mely a természetes GRH N-terminális végének felel meg.	arányos törpeség, akromegália, HIV-okozta súlyvesztés megakadályozása
Somatropin rekombináns	GH	BioTropin, Genotropin, Humatropin, Norditropin, Nutropin, Nutropin AQ, Protropin, Saizen, Serostim, Tev-Tropin	Anabolikus hormonpótlás, 191 egységből álló fehérje, rekombináns E coliban termeltetik	arányos törpeség, akromegália, HIV-okozta súlyvesztés megakadályozása
Thyrotropin a	humán a thiotropin	Thyrogen	Diagnosztikum. Heteromer glikoprotein, 2 nemkovalensen kötött alegységet tartalmaz, megegyezik a humán hipofízis- TSH-val.	pajzsmirigyrák diagnózisa
Urofollitropin	humán FSH	Fertinex, Metrodin	Termékenységgjavító szer. Posztmenopauzális korú nők vizeletéből tisztítják.	női terméketlenség
Vasopressin	Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH <sub>2</sub> (A Cys-eket S-S híd köti össze)	Pitressin, Pressin	Antidiuretikus és érösszehúzó hatású szer. A hipofízis hátsó lebenye által szekretált 9 as-ból áll. A vesetubulusok receptoraihoz kötődik és segíti a vízvisszaszívást.	diabetes insipidus, túlzott vizeletürítés, polydipsia

## 6.1.4 ANTITEST ALAPÚ GYÓGYSZEREK

Az antitestek, ellenanyagok vagy immunglobulinok a szervezet által különféle betegségek ellen alkalmazható fehérjék egy csoportja, melyeket a nyirokrendszerben vagy a csontvelőben található B-sejtek termelnek. Az antitestek az immunrendszert stimuláló specifikus fehérjékhez kötődnek. Jelentőségük abban rejlik, hogy rendkívül szelektívek, valamint hogy a nagy- és kismolekulájú szubsztrátok szinte végtelen széles skáláját képesek felismerni és kötődni hozzájuk. A kötődés után az antigént az immunrendszer más sejtjei, elsősorban makrofágok emésztik meg és pusztítják el. Minden antitest négy polipeptid láncból áll: a két nehéz- és két könnyűláncot diszulfid hidak tartják össze az úgynevezett hinge vagy kapocs régióban, így alakul ki az Y alakú molekula (6.1-2a ábra) Az ipszilon elágazó szárai az antigénkötő helyek vagy antigénkötő fragmentumok, röviden Fab-k az angol antigen binding fragment kifejezésből. Az Fab fragmentumon, a könnyű- és a nehézlánc kapcsolódásánál egy variábilis és egy konstans domén található. Mindegyik könnyűlánc egy konstans és egy variábilis domént tartalmaz. Mind a könnyű-, mind a nehézlánc variábilis doménjét egyaránt variábilis fragmentumnak (Fv-nek) hívjuk. Minden Fv hipervariábilis régiókat tartalmaz, melyeket az angol complementary-determining region kifejezés alapján CDR régióknak nevezünk.



**6.1-2. ábra** IgG antitestek és fragmentumok (A) Egér IgG antitest variábilis (Fv), antigénkötő (Fab) és konstans régiója (Fc). A nehézláncokat az angol heavy chain alapján H-val, a könnyűláncokat L-lel (light chain) jelöljük. (B) Kimérás IgG és egér Fv és humán konstans régió (C<sub>L</sub>, C<sub>H</sub> és Fc) fúziójából (C) Humanizált IgG fuzionált egér CDR-rel az Fv régióban. (D) Antitest fragmentumok scFv – egyszálú Fv (single chain); dsFv – diszulfid híddal stabilizált Fv; bispecific/bispecifikus – két összekapcsolt scFv különböző antigén felismeréssel

Elsősorban ezek a CDR régiók felelősek az antigén-felismerésért. Az Y alakú molekula alsó részét, amelyet főleg a nehézláncok alkotnak, konstans régióknak nevezzük. A konstans régió határozza meg, hogy milyen mechanizmus játszik szerepet az antigén megsemmisítésében. Az emberi immunglobulinok (antitestek) öt osztályba sorolhatók: IgM, IgG, IgE, IgA és IgD. A legtöbb biogyógyszer IgG alapú.

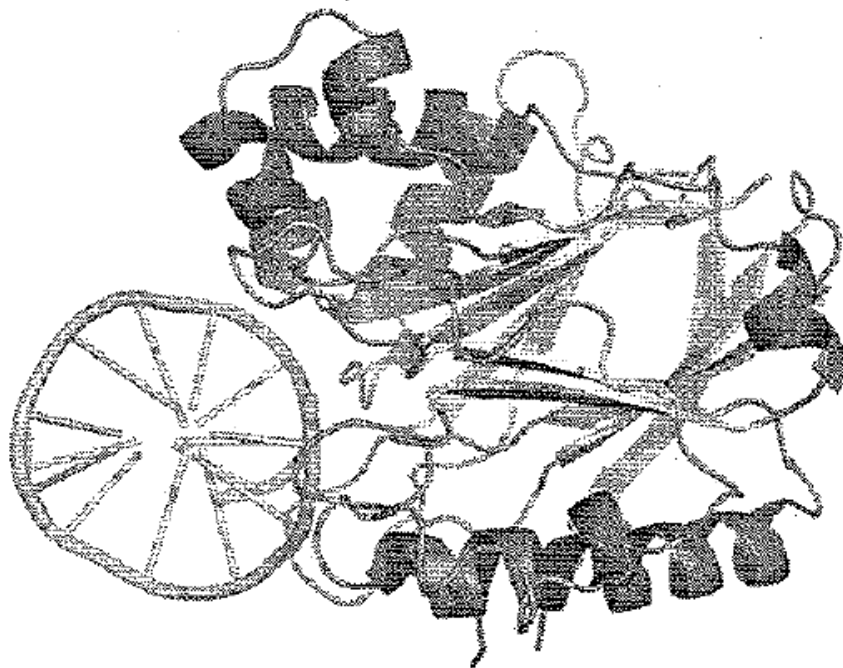
Az ellenanyagok nemcsak felismerik és megkötik az antigént, hanem irányítják az antigén-eltávolító és –megsemmisítő folyamatokat is. Ezt hívjuk effektor funkciónak. A nehézlánc alsó része, vagyis a konstans fragmentum (Fc) fajspecifikus és többek között olyan effektor funkciókat közvetít, mint az ellenanyagfüggő, sejtközvetített citotoxikus reakció (Antibody-dependent cellular cytotoxicity ADCC) vagy a komplementfüggő citotoxikus reakció (complement-dependent cytotoxicity, CDC). Az ADCC esetén az antitestek a természetes ölősejtek (NK sejtek) vagy a makrofágok felületén kötődnek az Fc receptorokhoz és a célsejt fagocitózist vagy lízist váltják ki. A CDC-nél az ellenanyagok úgy ölik meg a célsejtet, hogy a sejt felületén komplement kaszkádot idéznek elő. Mivel az IgG indukálja leghatékonyabban az ADCC-t és a CDC-t is, ezért ez a antitest a legalkalmasabb gyógyászati célokra.

Az első 1986-ban, a humán gyógyászatban tesztelt monoklonális antitest (mAb) egy egér eredetű antitest volt, a Muromonab (OKT3) [6]. Az mAb terápiával szemben támasztott nagyfokú elvárások ellenére az OKT3 nem bizonyult megfelelőnek a szervátültetések utáni kilökődés kezelésére. A sikertelenség oka elsősorban a kezelt betegeknél az egér génnel szemben fellépő erős immunválasz volt. A második humángyógyászati használatra piacra került monoklonális antitest az Abciximab (ReoPro) fejlesztéséhez közel kilenc év kellett. A kimérás ellenanyagának egér és humán Fc régiója volt [48]. Azóta több, mint huszonhét rekombináns ellenanyag-készítményt ismert el az amerikai FDA (Food and Drug Administration). Ez az összes engedélyezett fehérje- illetve peptid alapú gyógyszerkészítmény 24%-át teszi ki (6.1-2 táblázat). A monoklonális ellenanyagok mai rendszere a szerkezeti különbségeken alapul (6.1-2b-d ábra).

- 1) A standard mAb-k úgy készülnek, hogy tenyésztett egér melanóma sejteket fúzionáltatnak izolált, immunreaktív (immunválaszt adó) lép sejtekkel, így hoznak létre hibridóma sejteket. A hibridómák reaktivitását egy választott antigénre in vitro tesztelik, majd egy-egy reagáló sejt klónjait visszainjekciózzák egerekbe, ahol a klónok tovább növekednek. Így egy adott egerből származó minden reaktív sejt egyetlen reaktív klónból ered, ezért az innen származó antitesteket monoklonálisnak nevezzük.
- 2) Génsebészeti módszerekkel állítják elő az Fc-humanizált monoklonális antitesteket, ahol az egér Fc-t humán Fc-vel helyettesítik a melanóma sejtvonalakban [49].
- 3) A humanizált Ab termelés egyik alternatív módszere, hogy az egér eredetű CDR régiókat és a nehézlánc néhány szerkezeti maradványát humán IgG nehézláncba ültetik át [50]. A CDR átültetést a hibridóma sejtek által termelt normál egér könnyűláncsal ötvözve fejlesztették ki 1997-re a Daclizimab (Zenapax) nevű készítményt. CDR régiókat nem csak a teljes állati szervezetben történő antigén-immunizálással lehet előállítani. Ehelyett szelektálhatunk CDR régiókat úgy is, hogy rekombináns Fab-ekkel pásztázunk végig kombinatórikus fágkönyvtárakat. Az Adalimumab (Humira) volt az első gyógyászatban használatos ellenanyag, amelyet ezzel a módszerrel fejlesztettek ki 2002-ben. A humanizált antitest termelés egy másik lehetősége az olyan transzgénikus egerek immunizálása, melyekben a génmanipuláció következtében egy adott antigén elleni humán IgG gének expresszálódnak. [52, 53]. Több transzgénikus, „humanizált” egerből származó mAb gyógyszerkészítmény a klinikai próbák végső stádiumaiban

van. Ezek közül az egyik a Panitumumab, egy anti-EGFR ellenanyag, amelyet az előrehaladott, metastabil vastag- és végbélrák kezelésében kívánnak használni.

- 4) A rekombináns bakteriális technikák, valamint az a felismerés, hogy a teljes ellenanyag-molekula nem minden esetben nélkülözhetetlen, vezetett a számos, gyógyászatban alkalmazható ellenanyag-készítmény kifejlesztéséhez. A teljes IgG molekulák körülbelül 150 kDaltonosak, ezért lassan szívódnak fel a szövetekben és lassan is ürülnek ki a szervezetből. E tulajdonságok miatt rosszul használhatók a diagnosztikai képalkotásban vagy a radioterápiás módszereknél. Az Fv régió az a legkisebb része az antitestnek, amelyik még megtartja az antigén specificitását, emellett elég kicsi ahhoz, hogy könnyen expresszálható legyen *E. coliban*. Az egyszálú Fv-k (scFv-k) olyan fuzionált fehérjék, amelyekben a nehéz- és könnyűlánc variábilis régióit rövid fehérje kar (linker) köti össze. A diszulfid-stabilizált Fv-kben (dsFv-k) a két variábilis régiót mesterségesen létrehozott cisztein diszulfid hidak kötik össze. A diabodyk (diabody-k) olyan rövid peptid karral összekötött scFv homodimerek, ahol a V domének mindenképpen molekulán belüli komplexeket alkotnak. A bispecifikus Fv-k két teljes Fv régió fúziójából származnak, ahol az egyes Fv-k különböző antigén specificitásúak. A előzőek olyan variációi is előfordulnak, ahol a konstans régió egy része is jelen van a molekulában.



**6.1-3. ábra** A DNáz röntgenes kristályszerkezete a palindróm d(GCGATCGC) DNS szekvencia jelenlétében, 2.0 Å felbontásban (PDB ID: 2DNJ)

**6.1-2-es TÁBLÁZAT. Az FDA által elismert antitest alapú gyógyszerek**

Generikus név	Kémiai név	Márkanév	Gyógyszer kategória	Alkalmazás, javaslat
Abciximab	Kimérés humán-egér (anti CD41) antitest	ReoPro	Alvadásgátló, vérlemezke-képződés gátló. A kimérés humán-egér monoklonális antitest Fab fragmentuma a humán vérlemezkék IIb/IIIa glikoprotein receptorához kapcsolódik és megakadályozza az aggregációt.	Miokardiális infarktus, kiegészítő kezelés a perkután koronáriás intervenciónál, nem stabil anginánál
Adalimumab	Humanizált anti-TNF ellenanyag	Humira	Antireumatikus, immunszabályozó. Fág display technológia alkalmazásával készült. A nehéz- és könnyűláncok variábilis régiói humán származékok, a konstans régiók tisztán humán szekvenciák. Rekombináns DNS technikával készült emlőssejtes rendszerben.	Reumatoid artritisz kezelésére
Alefacept	Humán LFA-3/IgG1 fúziós fehérje	Amevive	Immunszabályozó, immunszupresszáns. A leukocita funkciójú 3-as antigén extracelluláris CD2-kötő részének fuzionált dimerje kapcsolódik a humán IgG1 Fc részéhez (kapocsrégió, CH2 és CH3 domének). Rekombináns CHO sejtekkel termeltetik.	A mérsékelttől egészen a súlyos krónikus plakk pszoriázisig
Alemtuzumab	Humanizált anti-CD52-es ellenanyag	Campath	Antineoplasztikum. Limfocita antigénre (a CD52-es sejtfelszíni glikoproteinre) specifikus humanizált mAb. IgG1 humán változó szerkezeti elemekkel és konstans régióval, valamint egér CDR-ekkel. CHO sejtekkel termelik.	B-sejtes krónikus limfocitás leukémia



Antitimocita globulin (Antithymocyte globulin)	Nyúl antitimocita globulin	Atgam, Thymoglobulin	Immunszabályzó. A poliklonális antitest eliminálja a szervkilökődésért felelős T-sejteket a transzplantált betegeknél.	Veseátültetés utáni szervkilökődés ellen
Arcitumomab	AntiCEA ellenanyag	CEA-Scan	Diagnosztikai, képalkotó reagens. Az egér eredetű IgG1 mAb IMMU-4-et [amelyet NP-4-nek is hívnak és specifikus a CEA (carcinoembryonic antigen) antigénre] kovalensen jelölik Technícium 99-el.	Vastag- és végbéltumorok diagnosztizálására
Basiliximab	Kimérás egér-humán anti-CD25 antitest	Simulect	Immunszabályzó, immunszuppresszáns. Az aktivált T-sejtekben az IL-2R alfa receptort blokkolja. Egér mielóma sejtekkel termeltetik. Humán nehéz- és könnyűlánc konstans régiókat és egér nehéz- és könnyűlánc variábilis régiókat tartalmaz.	Vese-transzplantáció utáni kilökődés ellen
Bevacizumab	Humanizált anti-VEGF ellenanyag	Avastin	Érszűkület elleni szer, neoplasztikum. Humán szerkezeti elemeket és egér eredetű antiVEGF CDR-eket tartalmaz. Rekombináns CHO sejtekkel termelik.	Metastabil vastag- és végbélrák kezelésére
Capromab	Egér anti-7E11 ellenanyag	ProstaScint	Képalkotó reagens. Egér monoklonális antitest egy kelát peptid csoporthoz kötve, amely az indium jelzést tartalmazza.	Prosztata rák diagnosztizálásához, medencén belüli áttétek felismerésére
Cetuximab	Humanizált anti-EGFR ellenanyag	Erbitux	Antineoplasztikum. Felhám növekedési faktor receptorhoz kötő Fab. Egér EGFR mAb variábilis régiók a humán EGFR N-terminális része helyett, humán IgG1 nehéz- és kappa könnyűlánc konstans szerkezeti régiókkal.	Metastabil vastag- és végbélrák kezelésére

Daclizumab	Humanizált anti-CD25 ellenanyag	Zenapax	Immunszabályzó, immunszupresszáns. Humanizált IgG1 Mab humán IL-2R (anti-CD25)-höz kötve. 90% humán (IgG1 konstans régiók és az Eu mielóma antitest variábilis szerkezeti régiói) és 10% egér eredetű antitest szekvencia (CDR) komplexe.	Veseátültetés utáni szervkilökődés ellen
Digibind	Anti-digoxin ellenanyag fragmentum	Digibind	Digoxinre specifikus birka antitest Fab fragmentuma	Digotoxin túladagolás vagy digitális glikozid toxicitás
Efalizumab	Humanizált anti-CD11a ellenanyag	Raptiva	Immunszabályzó, immunszupresszáns. Humanizált IgG1 anti-CD11a antitest	Pszoriázis (pikkelysömör)
Etanercept	Humán tumor nekrozis faktor receptor fúziós fehérje	Enbrel	Reuma ellenes szer, immunszabályzó. Dimer fúziós fehérje, amelyben a humán p75 TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) extracelluláris ligand-kötő része egy CH1 domén nélküli IgG1 Fc részhez van kötve. Rekombináns DNS technikával termelik CHO sejtekben.	Súlyos felnőtt és ifjúkori reumatoid artritisz
Gemtuzumab ozogamicin	Humanizált kimérés anti-CD33-as ellenanyag	Mylotarg	Antineoplasztikum. Rekombináns, humanizált IgG4 kalikeamicin (calicheamicin)-hez kapcsolva, amely egy citotoxikus tumorelles antibiotikum. Emlőszejtes tenyészetben termelik	Akut mieloid leukémia
Ibritumomab	Egér anti-CD20-as ellenanyag	Zevalin	Antineoplasztikum. Indiumhoz kapcsolt egér eredetű IgG1 anti-CD20-as mAb. A CD20-as antigén a normál és a rosszindulatú B-sejtek felületén található. Rekombináns CHO sejtekkel termelik.	Non-Hodgkin limfóma

Immun globulin (Immune globulin)	Humán antitestek	Flebogamma, Gamunex	Fertőzés elleni szer, immunszabályzó. IgG1 és más humán plazma ellenanyag származékok elegye. Ezeket Cohn-frakcionálással állítják elő. Összetétel: 70,3% IgG1; 24,7% IgG2; 3,1% IgG3; 1,9% IgG4	Immunhiány betegségek, thrombocytopeniás purpura, Kawasaki kór, gammablobulinémia, csontátültetés
Infliximab	Kimérés egér/humán anti-TNF-alfa ellenanyag	Remicade	Immunszabályzó, immunszuppresszáns. TNF-alfa-kötő ellenanyag. Humán konstans és egér variábilis régiókból álló kimérés antitest. Folyamatos áramoltatásos (continuous perfusion) technikával, rekombináns sejttenyészetben termelik.	Crohn-kór, pikkelysömör, reumatoid arthritisz, ízületi csigolyagyulladás
Muromonab	Egér anti-CD3-as ellenanyag	Orthoclone OKT3	Immunszabályzó, immunszuppresszáns. Tisztított egér eredetű mAb, amely a T-sejtek felületén található CD3 (T3) receptor ellen hat. Egér ascites-ből tenyésztik. 93% monomer IgG2a.	Szervkilökődés megelőzésére
Natalizumab	Humanizált anti-a4 integrin ellenanyag	Tysabri, Antegren	Immunszabályzó. Egér mielóma sejtekben termelt humanizált IgG4 mAb. Humán szerkezeti részeket és egér anti-a4 integrin CDR régiókat tartalmaz.	Szklerózis multiplex
Omalizumab	Humanizált anti-IgE ellenanyag	Xolair	Asztmaellenes szer, immunszabályzó. Humanizált, rekombináns IgG1 monoklonális ellenanyag humán IgE-hez kötve. Rekombináns CHO sejtekkel termelik.	Allergia okozta asztma

Palivizumab	Humanizált anti-RSV ellenanyag	Synagis	Antivirális szer. Az RSV (respiratory syncytial virus) vírus F fehérjéjének A antigén helyének epitópja (antigéndeterminánsa) elleni humanizált mAb (5% egér eredetű szekvenciával). Stabil egér mielóma sejtvonallal termeltetik.	RSV vírus által okozott légzőszervi megbetegedések
Rituximab	Kimérés egér/humán monoklonális anti-CD20-as ellenanyag	Rituxan	Egér eredetű könnyű- és nehézlánc variábilis régió-szekvenciákat valamint humán konstans régiók szekvenciáit tartalmazza. A C20 a normál és rosszindulatú B-limfociták felületén található.	B-sejtes (CD20 pozitív) non-Hodgkin limfóma
Satumomab Pendetide	Indium 111-el jelölt egér anti-TAG72-es ellenanyag	OncoScint	Képzőanyag reagens. Tumorhoz kapcsolódó glikoprotein mAb, amelynek Indium-111-el való jelölése vastagbélrák radioizotópos diagnosztizálásra tesz alkalmassá.	Roszzindulatú, extra-hepatikus tumorok diagnosztizálásához
Tositumomab	Egér anti-CD20-as ellenanyag	Bexxar	Antineoplasztikum. Egér eredetű IgG2 anti-CD20-as monoklonális ellenanyag. Emlősejtes tenyészetben termelik. Radioaktív jód-131 izotóphoz kovalensen köthető.	Non-Hodgkin limfóma
Trastuzumab	Humanizált anti-HER2-es ellenanyag	Herceptin	Antineoplasztikum. Humán EGFR extracelluláris doménjéhez kapcsolt humanizált, rekombináns mAb. CHO sejtekkel termelik.	HER2-pozitív metastabil mellrák

#### 6.1.4.1 Példák antitest alapú gyógyszerekre

A Muromonab (Orthoclone OKT3) egy a T-sejtek (T-limfociták) felületén lévő CD3 receptorra specifikus egér monoklonális ellenanyag. Szervátültetéseknél megelőző kezelésként, parenterálisan adják be a pácienseknek. A szer hatékonynak bizonyult a kortikoszteroid-rezisztens heveny kilökődés ellen a vese-, máj- és szívatültetéseknél. A Muromonab a T-sejt receptorhoz kapcsolt CD3 felületi glikoprotein epszilon-alegységéhez kötődik. Valószínűleg úgy öli meg a CD3-pozitív sejteket, hogy Fc-mediált apoptózist, antitest-közvetített citotoxikus reakciót és komplementfüggő citotoxikus reakciót generál. Közvetlenül a szer beadása után a CD3-pozitív T-limfociták eltűnnek a vérkeringésből. Erre a legvalószínűbb magyarázat a T-sejtek ellen irányuló NK-sejtek által közvetített citotoxikus reakció vagy az indukált T-sejt apoptózis. Az alloreaktív T-limfociták mennyiségének OKT-3-függő csökkenése erősen csökkenti a szervkilökődés esélyét. Viszont, mivel az OKT3 egér Fc régiókat tartalmaz, használata sajnos több olyan nem kívánt mellékhatáshoz vezetett, mint az akut citokin túlstimuláció, az influenzához hasonló tünetek, valamint néhány ritka esetben tüdőödéma, a központi idegrendszer rendellenességei vagy az egér eredetű Fc által kiváltott anafilaktikus reakció.

Az Abciximab (ReoPro) volt az első gyógyászati célra engedélyezett részlegesen humanizált ellenanyag. Olyan transzgenikus egér melanóma sejtekkel termelték, amelyek humán nehézlánc géneket tartalmaztak. Az így keletkező Fab fragmentum humán és egér antitest fragmentum kimérája. Az Abciximab a glikoprotein IIb/IIIa receptorhoz köt és kompetitíven gátolja a fibrinogén-mediált vérlemezke-aggregálódást és vérrögképződést [57]. (A glikoprotein IIb/IIIa receptor az adhéziós receptorok integrin családjába tartozik és a vérlemezke aggregálódás legfontosabb vérlemezke felszíni receptora.) E tulajdonsága miatt a miokardiális infarktus és a nem stabil angina kezelésében használják, valamint kiegészítő kezelésként a perkután koronária intervencióknál is. Mivel a Fab fragmentum konstans régiói humán gének termékei, így az olyan mellékhatások, amelyeket például a Muromonabnál figyeltek meg, csak nagyon gyengén jelentkeznek. Ugyanakkor néhány ritka esetben előfordulhat akut, mély trombocitopénia az Abciximab beadása után, ezért ajánlatos folyamatosan ellenőrizni a páciensek vérlemezke-számát a kezelést követő 11-21 órában [58].

A Daclizumab egy humanizált monoklonális antitest, mely a humán IL-2 receptorhoz (anti-CD25-höz) kapcsolódik. 90% emberi és 10% egér eredetű ellenanyag szekvenciából áll. A humán szekvenciák a humán IgG1 konstans régióiból és az Eu mielóma antitest variábilis szerkezeti régióiból származnak [59]. Az egér szekvenciák az egér eredetű anti-CD25 antitest CDR régióinak származékai [50]. A Daclizumab kompetitíven gátolja a citokin IL-2-öt. A gátlás következtében az IL-2 nem tud a CD25 receptorához kötni és az IL-2R béta és gamma láncai nem foszforilálódnak. Ennek következménye a downstream STAT aktivátor gének inhibíciója, valamint az így kialakuló immunszuppresszív hatás [60]. A Daclizumab klinikai hatékonyságára vonatkozó kezdeti becslések ígéretesek: az OKT3-hoz képest kisebb/kevesebb mellékhatással lehet számolni.

Az Adalimumab (Humira) egy a reumatoid arthritis kezelésében alkalmazott anti-TNF ellenanyag. A reumatoid artritistól szenvedő betegek szinoviális folyadékának magas TNF szintje fontos szerepet játszik mind a kóros gyulladás kialakulásában, mind az ízület sorvadásában, melyek e betegség jellemzői. Az Adalimumab specifikusan kötődik a TNF-alfához és úgy blokkolja az általános citokin hatását, hogy kölcsönhatásba kerül a p55-el és a p75-el, így csökkenti a TNF által kiváltott gyulladást és az ízület sorvadását. Ezenkívül az Adalimumab komplement jelenlétében in vitro lizálja a felületi TNF-et expresszáló sejteket. Ez volt az első FDA által elismert gyógyászati célú antitest készítmény, amelyet fág display technológiával állítottak elő [48]. A létrehozott ellenanyag humán-származék nehéz- és könnyűlánc variábilis régiók és humán IgG konstans régiók ötvöze. Az Adalimumabot

rekombináns DNS technikával, emlőssejtes tenyészetben termelik. Az így készült ellenanyagot tisztítás után szubkután injekcióval adják be a betegeknek. Mint más TNF-blokkoló gyógyszereknél, az Adalimumab használatával is együtt jár az olyan korábbi fertőzések újbóli megjelenése, mint a tuberkulózis, a szepszis (vérmérgezés) vagy a gombás fertőzések. Fertőzött betegeket nem ajánlatos Adalimumabbal kezelni.

#### 6.1.4.3. Az antitest alapú bio-gyógyszerkészítmények jövője

A gyógyászati célú antitestek fejlesztésének három fő irányvonala van: (1) az ellenanyagok további humanizálása a nemkívánatos Fc-alapú immunválaszok csökkentésére; (2) új, adott targetek elleni CDR-ek létrehozása valamint (3) új, terápiás antitestek kiválasztása. A monoklonális antitestek humanizálásával már máshol átfogóan foglalkoztak [61, 62]. Legújabban a transzgenikus egerek használata került az érdeklődés középpontjába: ezeket az egereket különböző hagyományos transzgenés technikák, a YAC technológia (YAC-yeast artificial chromosome) és a mikrosejt-mediált kromoszóma transzfer ötvözésével hozták létre. E technikák alkalmazása az immunglobulin génklaszterek nagy száma miatt indokolt. A humán nehéz-,  $\lambda$ -könnyű és  $\kappa$ -könnyűláncok lokuszainak (a 14-es, 22-es illetve a 2-es kromoszómán található) mindegyike körülbelül egy megabázist tesz ki. Ezenkívül ezeknél az erősen módosított genetikai állományú egereknél az eredeti egér könnyű- és nehézlánc-kódoló régiókat kivágták, így csökkentették az egér eredetű ellenanyag termelést. Több, ilyen egerekkel termelt monoklonális ellenanyag áll jelenleg fejlesztés alatt, többek közt a Zanolimumab (kután és perifériás T-sejtes limfóma kezelésére használatos anti-CD4 [63]), a Panitumumab (előrehaladott stádiumban lévő, metastabil vastag-, végbél- és egyéb rák kezelésére használatos anti-epidermális növekedési faktor receptor [64]) és a Denosumab (a sejtmagfaktor kappa B-ligand [RANKL], amely a csontmegújulás reszorptív fázisának egyik kulcseleme; csonttritkulás, reumatoid artritisz és gerincáttételes rák kezelésére használják [65]).

Eddig olyan kombinatórikus fágkönyvtárakat használó technikákat tárgyaltunk, melyek segítségével terápiás targetekre reagáló CDR régiókra szelektálhatunk. Az új CDR-könyvtárak *E.coli* vagy *S. cerevisiae* felületén is expresszálhatók vagy *in vitro* előállíthatók riboszóma display-jel (riboszóma bemutatással) illetve félig vagy teljesen szintetikus antitest könyvtárakkal is (Ref. 48-ban tárgyalva). Ezen könyvtárak alapját beoltott vagy naiv egyedek CDR régiói képezik és IgG vagy IgM régiók variábilis doménjeit tartalmazzák. A variábilis doméneket PCR-rel (polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció) nyerik ki az IgG illetve IgM régiókból, majd expressziós vektorokba (például fágba vagy *E. coliba*) klónozzák őket. Bár a naiv könyvtárak (nem immunizált egyedekből származó könyvtárak) összetettebbek, mint azok, melyeket beoltott (immunizált) egyedekből hoztak létre, általában *E. coliban* mégis rosszabb expresszió és magasabb toxicitás jellemző rájuk. *In vitro* technikákkal meg lehet kerülni ezt a problémát és szigorúbb szelekciós körülményeket lehet létrehozni, így nagyobb affinitású ellenanyagokat lehet előállítani. A fág display az egyetlen olyan technológia, amelyet megfelelő szintre fejlesztettek ahhoz, hogy piacra kerülő termékeket gyártsanak vele. Több, ezzel a technikával gyártott gyógyászati célú antitest van a fejlesztés különböző stádiumaiban. Ilyen például a Mapatumumab, egy agonista mAb, amely a TNF receptor által indukált ligandot, a TRAIL-R1-et aktiválja, így különféle rákos sejten indukál apoptózist. Egyéb példák a Metelimumab, egy a szkleroderma kezelésére használt anti-TGF- $\beta$ 1 valamint az AbThrax, egy anti-*Bacillus anthracis* Védő Antigen (Protective Antigen), amely nem engedi, hogy az anthrax (lépfene) toxin-mediált sejthalált okozzon.

Bár továbbra is rutinszerűen fedeznek fel új terápiás targeteket, mostanáig a hagyományos sejtfelületi és extracelluláris antigének voltak az ellenanyag-fejlesztés középpontjában. Különböző tudományágak területén tett felfedezések befolyásolják az új,

lehetséges terápiás targetek fejlesztését. Ilyen területek a sejtbiológia, a rákbiológia, a mikrobiológia és a fejlődésgenetika. Nemrégiben kerültek a figyelem középpontjába az intratest nevű antitest származékok, amelyek célpontjai a sejten belül találhatóak [66]. A sejten belüli redukáló közeg miatt a legtöbb ellenanyag nem képes a molekula stabilitásához nélkülözhetetlen diszulfid-hidakat létrehozni. Az intratestek olyan természetben előforduló immunglobulin szerkezetekből állnak, melyek egy sor antigénkötő szerkezetet tartanak fenn ebben a redukáló közegben. Intratestek felfedezésére több alternatív módszer kínálkozik, többek között az scFv-k screeningje, az élesztő felületi display, a fág display, az intracelluláris antitest befogás és az Fc régió irányított módosítása, amely a molekula stabilitását növeli a sejten. Nemrégiben fejlesztettek ki scFv-kből olyan kísérleti intratesteket, amelyek a H-RAS-hoz kötődnek és blokkolják a NIH 3T3 sejtek rákos elváltozását. Az anti-angiogén adenovírusos által szállított scFv-eket szintén scFv-kből fejlesztettek ki.

### 6.1.5. AZ ENZIMALAPÚ GYÓGYSZEREK

Az enzimeket élő szervezetek termelik és biológiai katalizátorként működnek specifikus biokémiai reakciókban. Az enzimek általában úgy gyorsítják a reakciókat, hogy aktív helyükön (a reakció végbemenetelének helyén) stabilizálják a reakció egy reaktív köztitermékét (intermedierjét). Az enzimek kémiai megváltozhatnak a reakció során, de a végén mindig visszaalakulnak eredeti állapotukba. A legtöbb sejtrendszer működéséhez elengedhetetlenek az enzimek. Ennek az az oka, hogy a legtöbb alapvető metabolikus (anyagcsere) vagy katabolikus (lebontó) reakció túl lassan menne végbe, vagy eltérő termék keletkezéséhez vezetne enzimek nélkül. Jelentőségük miatt egyetlen kritikus enzim mutációja, túltermelése, alultermelése vagy hiánya súlyos betegséghez vezethet. A VI-os típusú mukopoliszaharidózis (vagy Maroteaux-Lamy szindróma) például akkor alakul ki, amikor a beteg nem rendelkezik az N-acetilgalaktózamin-4-szulfatáz (galszulfáz) nevű enzimmel és ennek következtében nem képes megfelelően lebontani a glükózaminoglükánokat. Ezek a vegyületek különböző szövetekben halmozódnak fel. Ez állandó, folyamatos sejtkárosodást eredményez és hatással van az egyén kinézetére, fizikai képességeire, a szervek és szervrendszerek működésére és legtöbb esetben a szellemi fejlődésre is [69].

Több, mint háromezer humán enzimet azonosítottak és neveztek el. Jellemzően az „-áz” végződés kapcsolódik a szubsztrát nevéhez (például a laktáz enzim végzi a laktóz lebontását) vagy a reakció típus nevéhez (például a DNS polimeráz katalizálja a DNS szintézist). Ez azonban nem minden esetben van így, különösképpen, ha az enzim több szubsztrátot módosít. Ezért az IUB (International Union of Biotechnology) Nevezéktani Bizottságának ajánlása alapján hivatalosan nevezik el és sorolják osztályokba az enzimeket. Ez a szervezet rendel hozzá egy EC (Enzyme Commission, Nemzetközi Enzim Bizottság) számot és egy hivatalos nevet minden egyes enzimhez. Az enzimeket hat fő osztályba sorolják: az oxidoreduktázok (EC1), a transzferázok (EC2), a hidrolázok (EC3), a liázok (EC4), az izomerázok (EC5) és a ligázok (EC6) osztályába. A legtöbb ma használatos enzimalapú gyógyszer a hidrolázok osztályába tartozik, mint például a galszulfáz és az agalidáz is. Ezek az enzimek különböző kötések hidrolízisében (hasításában) játszanak szerepet. Emellett vannak az oxidoreduktázok osztályába tartozó enzimgyógyszerek is, ilyen például a raszburikáz. Egyes enzimek erősen specifikusak bizonyos szubsztrátokra (például az adozin dezamináz), ezek jó eséllyel használhatók majd gyógyszerként. Másfelől a széles spektrumú illetve specificitású enzimek, mint az A vitamin észteráz kevésbé alkalmasak gyógyászati célokra.

Már több évtizede megállapították, hogy az enzimek potenciálisan gyógyszerként is használhatók. Azóta majdnem két tucat enzimet fejlesztettek ki különféle betegségek

kezelésére. Majdnem minden eddig kifejlesztett enzimterápiát valamilyen funkcióvesztés kezelésére alkalmaznak. (A funkcióvesztés oka valamilyen mutáció, amely aktivitáscsökkenést, alultermelést vagy egy enzim teljes hiányát okozza.) Ezért a legtöbb enzimgyógyszert enzimpótló terápiaként, ERT-ként (Enzyme Replacement Therapy) alkalmazzák viszonylag ritka veleszületett metabolizmus defektusoknál, IEM-eknél (Inborn Error of Metabolism). Következésképpen sok enzimgyógyszer tartozik az FDA Orphan Drug Designation („Árva Gyógyszer”) kategóriába. Néhány enzimterápiát viszont olyan, jóval gyakoribb betegségek kezelésére lehet alkalmazni, mint a rák, a szívinfarktus vagy a stroke (szélütés). Az Egyesült Államokban az első, FDA által jóváhagyott enzim egy altepláz nevű szöveti plazminogén aktivátor (tPA, tissue plasminogen activator) volt. Ezt a manapság stroke kezelésében alkalmazott fehérjét 1987-ben hozták forgalomba Activase néven. Azóta legalább másik tizenhat enzimgyógyszert hoztak forgalomba. Ezek közül néhányat részletesebben a 6.1.3-as táblázatban ismertetünk.



**6.1-3-as TÁBLÁZAT. Az FDA által elismert enzimalapú gyógyszerek**

Generikus név	Márkanév	Alkalmazás	Leírás
Agalsidáz béta (Agalsidase)	Fabrazyme	Fabry-kór	Rekombináns humán $\alpha$ -galaktozidáz A. Az érett fehérje két 398 aa alegységből áll. A fehérjét glikozilálják és CHO sejtekkel termeltetik
Algluceráz Imigluceráz  (Alglucerase Imiglucerase)	Ceredase Cerezyme	Gaucher-kór	Humán $\beta$ -glükocerebrozidáz vagy $\beta$ -D-glükozil-N-acilszfingozin glükohidroláz. Az Alglucerase-t a humán $\beta$ -glükocerebrozidáz oligoszaharid láncának módosításával állítják elő. A glikoprotein oligoszaharid láncainak nemredukáló végein a cukorrészt úgy módosítják, hogy ezek a végek főleg mannózból épüljenek fel.
Altepláz (Alteplase)	Activase	Akut miokardiális infarktus, akut ischémias stroke és akut tüdőembólia	Tisztított, glikozilált humán plazminogén aktivátor. CHO sejtekből tisztított 527 aa.
Anisztelpláz (Anistepase)	Eminase	Akut tüdőembólia, intrakoronáriás embólia és miokardiális infarktus	Tisztított, glikozilált humán szöveti plazminogén aktivátor. Az 527-es maradékokat CHO sejtekből tisztítják. Az Eminase az anisztrelpláz egy liofilezett formája. Az anisztrelpláz az elsődleges Lys-plazminogén-sztreptokináz aktivátor komplex p-anizol származéka. A p-anizol csoport kémiai kötéssel kapcsolódik a bakteriális eredetű sztreptokináz és a humán plazma eredetű Lys-plazminogén fehérjék komplexéhez.
Aszparagináz (Asparaginase)	Elspar	Akut limfocitás leukémia és non-Hodgkin limfóma	<i>Escherichia coli</i> ből származó L-aszparagináz amidohidroláz.
Kollagenáz (Collagenase)	Santyl	Krónikus bőrfekély esetén és súlyosan megégett bőrre alkalmazzák	A kollagenáz enzim <i>Clostridium histolyticum</i> fermentációjából származik.

Dornáz alfa DNáz (Dornase alfa DNase)	Dilor Lufyllin Neothylline Pulmozyme	Cisztás fibrózis	Rekombináns humán dezoxiribonukleáz I. Aeroszolként alkalmazzák. A fehérjét olyan genetikailag módosított CHO sejtekkel termelik, amelyek az eredeti humán fehérjét, a DNáz I. 260 aa-t kódoló DNS darabot tartalmazzák.
Hialuronidáz (Hyaluronidase)	Vitraxe	Más, injekcióval beadott gyógyszerek felszívódásának és eloszlásának javítására, rehidratálásra és diabetikus retinopátia kezelésére	Nagy tisztaságú birka hialuronidáz, amelyet a szem üvegtest üregébe fecskendeznek.
Laronidáz (Laronidase)	Aldurazyme	Mukopoliszaharidózis	Rekombináns DNS technológiával, CHO sejtekkel termelt humán rekombináns $\alpha$ -L-iduronidáz 628 aa (érett alakja). A laronidáz egy 83 kDaltonos glikoprotein. A nukleotid része azonos az emberi $\alpha$ -L-iduronidáz polimorf alakjával. 6-N-hez kötött oligoszaharid modifikációs helyet tartalmaz.
Pankrelipáz (Pancrelipase)	Cotazym Pancrease Ultrase Zymase	Cisztás fibrózis, krónikus pankreatitisz és hasnyálmirigy-vezeték elzáródás	Sertés és szarvasmarha hasnyálmirigyből izolált fehérje-elegy, amelyet pankreatinnek is neveznek. Három enzimet tartalmaz: amilázt, lipázt és proteázt (kimotripsint).
Pegademáz (Pegademase)	Adagen	SCID súlyos kombinált immunhiányos betegség	Szarvasmarha bélből származó adenzin dezamináz, melyet a hosszabb féléletidő elérése érdekében PEGilálnak
Pegaszpargáz (Pegaspargase)	Oncaspar	Akut limfoblasztikus leukémia	<i>Escherichia coliból</i> származó PEGilált L-aszparagin amidohidroláz. A PEGilálás lényegesen (körülbelül négyszeresére) növeli a fehérje féléletidejét.
Raszburikáz (Rasburicase)	Elitek	Hiperuricémia	A raszburikáz (egy 34,1 kDaltonos fehérje) a kemoterápiát követő tumor lízis miatt a vérplazmában kialakuló magas húgysavszintet csökkenti. A húgysavnak az allantoinná, egy inaktív, vízoldható metabolittá történő oxidációját katalizálja.

Retapláz (Retaplase)	Retavase	Akut tüdőembólia, intrakoronáriás embólia és miokardiális infarktus	CHO sejtekből tisztított, glikozilált, 355 aa-s humán szöveti plazminogén aktivátor. A Retavase-t harmadik generációs trombolitikus szernek tekintik: az eredeti humán tPA-ból úgy hozták létre, hogy egyes szakaszokat meghagytak, másokat kivágtak belőle. Az endogén humán tPA-ban megtalálható különböző aa-k kivágásával jött létre a Retavase. A szer az eredeti humán 527 aa-ból 355-öt tartalmaz (az 1-3 és a 176-527 közöttieket) és meghagyták benne a humán tPA aktivitásért felelős kringle-2 domént és a szerinproteáz domént is. Három domén hiányzik a Retavase-ből: a kringle-1, a finger (ujj) és az EGF domén.
Sztreptokináz (Streptokinase)	Streptase	Akut miokardiális infarktus, tüdőembólia, mélyvénás trombózis, arteriális trombózis vagy embólia és érelzáródás	C csoportbeli ( $\beta$ )-hemolitikus <i>Streptococcus</i> ok bakteriális fehérjéjéből előállított, tisztított készítmény.
Tenektepláz (Tenecteplase)	TNKase	Miokardiális infarktus, intrakoronáriás embólia	A tenektepláz egy 527 aa glikoprotein, amelynek fejlesztésénél a következő módosításokat eszközölték a cDNS-ben: Thr <sub>103</sub> cseréje Asp <sub>103</sub> -ra, Asp <sub>117</sub> cseréje Gln <sub>117</sub> -re (mindkettő a kringle-1 doménon belül) és egy tetra-Ala szubsztitúció a 296-299 aa-ban a proteáz doménban. Így természetes humán tPA-t kaptak.
Urokináz (Urokinase)	Abbokinase	Tüdőembólia, szívkoszorúér trombózis, és IV-es katéter clearance	A humán urokináz kis molekulású alakja, amely egy 2kDaltonos A láncból és egy hozzá SH hídon keresztül kapcsolódó 30,4 kDaltonos B láncból áll. Rekombináns urokináz plazminogén aktivátor.

### 6.1.5.1. Példák enzimalapú gyógyszerekre

A dornáz alfa (DNáz I, EC 3.1.21.1) több, mint egy évtizede jelent meg a gyógyszerpiacon, mint a cisztás fibrózis (CF) egyik alternatív gyógyszere. A cisztás fibrózis egy autoszómás, recesszíven öröklődő betegség, amely a tüdőt, a verejtékmirigyeket és az emésztőrendszert támadja meg és krónikus légzési és emésztési problémákat okoz. A betegséget egy a CFTR (Cisztás Fibrózis Transzmembrán Konduktancia Regulátor) nevű fehérjében kialakuló mutáció okozza; ez a rendellenesség a legelterjedtebb halálos autoszómás betegség a kaukázusi típusú emberek körében. Körülbelül minden huszonötödik európai származású ember hordozza a CF mutációt. A dornáz úgy bontja le a tüdőben képződött sputumot (felköhögött váladékot), hogy megemésztí a felhalmozódott extracelluláris DNS-t. Ez a DNS a tüdő helyi gyulladása során összegyűlt lebomlott neutrofilekből származik [70]. A gyógyszer rövid hatóideje miatt folyamatos napi inhalációs adagolást igényel, melyhez egy porlasztós vagy kompresszoros rendszert használnak. Ez a kezelés a betegek 40%-nál hatásos. A gyógyszer általában nem okoz különösebb mellékhatásokat, bár néhány esetben mellkásfájdalomról és bőrküütésről számoltak be [71]. A DNáz I háromdimenziós szerkezete, egy rövid DNS darab jelenlétében a 6.1-3 ábrán látható.

A galszulfáz (Aryplase) vagy N-acetilgalaktózamin-4-szulfatáz (ARSB; EC 3.1.6.12) egy hidroláz enzim-gyógyszerkészítmény, amelyet egy lizoszómás rendellenesség (lysosomal storage disease, LSD), a IV-es típusú mukopoliszaharidózis (MPS) (vagy Maroteaux-Lamy szindróma), kezelésénél alkalmaznak. A mukopoliszaharidózis egy halálos kimenetelű betegség, amely nem megfelelő galszulfáz expresszióval jár. Ez gátolja a glükózaminoglükánok bomlását, így azok különböző szövetekben halmozódnak fel [69]. A galszulfáz kezelés jól tolerálható, bár néhány páciensnél antitestképződést tapasztaltak az enzimmel szemben. Ezeknek az enzimspecifikus ellenanyagoknak a szintje azonban általában a kezelést követő másfél év után jelentősen lecsökken [72]. 2003 óta egy másik I-es típusú MPS kezelésére alkalmas gyógyszer is kapható. A betegség oka az alfa-L-iduronidáz (Iaronidáz; Aldurazyme EC 3.2.1.76) deficienciája [73]. Az I-es típusú MPS enyhébb formájára a Iaronidáz kezelés biztonságosnak, jól tolerálhatónak és hatékonyan bizonyult. Ennek az enzimgyógyszernek a beadása semmilyen lényeges mellékhatással nem hozható összefüggésbe, bár a legtöbb páciensnél az enzimmel szemben ellenanyag képződés jelentkezik; idővel azonban az antitestek titer lecsökken [74]. A Iaronidáz injekciókat heti rendszerességgel kell beadni [73].

Az Agalzidázt (Fabrazyme) a Fabry kór kezelésében használják. Ez egy halálos kimenetelű, örökletes anyagcserezavar, amely a lizoszómás hidroláz  $\alpha$ -galaktózidáz A ( $\alpha$ GalA; EC 3.2.1.22) enzim hiányával jár. Ez az enzim a glikoszfinbolipidek lebontásában játszik szerepet, így hiánya esetén az  $\alpha$ -galaktóz felhalmozódik a szövetekben és a plazmában [75]. A felgyülemlett  $\alpha$ -galaktóz bőrbántalmat, lázat és a végtagokban égető érzést okozhat. A korai felnőttkorban bekövetkező halál oka általában veseelégtelenség, amelyet a proteinuria (fehérjevizelés) által kiváltott magas vérnyomás okoz. A kéthavonta beadott agalzidáz- $\alpha$  (Replagal) vagy agalzidáz- $\beta$  (Fabrazyme) csillapítja a betegséggel járó erős fájdalmat. E gyógyszerek költsége meghaladhatja az évi 170 000 dollárt.

A pegademáz (adenozin dezamináz; EC 3.5.4.4) nevű PEGilált enzimet az adenozin dezamináz (ADA) hiánybetegség valamint a SCID egyik formájának kezelésére használják. A SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency syndrome – súlyos kombinált immunhiányos betegség) körülbelül minden ötvenzredik születésnél fordul elő. Az SCID-s betegeknek olyan súlyosan sérült az immunrendszerük, hogy képtelenek felépülni a legenyhébb bakteriális vagy vírusos fertőzéstől is. Az SCID-ben szenvedő betegek kezelés hiányában egy éven belül meghalnak az olyan folyamatosan visszatérő fertőzések miatt, mint a krónikus hasmenés, a fülfertőzések, a visszatérő tüdőgyulladás vagy az erős orális kandidiázis. Az

ADA deficiencia purin metabolitok felhalmozódásával jár: elsősorban a dGTP gyülemlik fel, ez pedig mérgező a limfoid őssejtek számára. A normál ADA szint visszaállításával a dGTP eltűnik, így a limfoid őssejtek szaporodhatnak. A pegademázt intravénásan adják be, 4°C-on tárolják, nem szabad fagyasztani [77].

Az imiglucirázt (alglucirázt) az I-es típusú Gaucher-kór (Gaucher disease, GD) kezelésében használják. Ez a lizoszómás betegség a glükocerebrozidáz (EC 3.2.1.45) enzim rendellenessége miatt alakul ki és glükozilceramidok felhalmozódásával jár a sejteken belül [78]. Az imiglucirázt az utóbbi tíz évben a Gaucher-kór kezelésére használták és intravénásan szokták beadni. Használatával jelentősen javulnak a betegség klinikai tünetei [79]. A gyógyszer azonban nem képes a Gaucher-kór minden következményét, így a rost- és idegszövetek károsodását sem visszafordítani [80]. A gyógyszer jól tolerálható és kevés mellékhatása van. Leggyakoribb mellékhatása az antitestképződés a glucirázzal szemben [81]. Mivel imigluciráz rendkívül biztonságos szer, a betegek saját maguknak adhatják be, valamint használatával elkerülhető a betegséggel járó kóros állapot.

Bár a legtöbb enzimterápiát viszonylag ritka anyagcsere zavarak vagy genetikai rendellenességek kezelésére használják, néhány enzimmel olyan gyakori egészségügyi problémákat is lehet kezelni, mint a szívinfarktus vagy a stroke (szélütés). A szöveti plazminogén aktivátorok (tPA-k; EC 3.4.21.68) olyan intravénásan beadott fibrinolitikus szerek, amelyeket perfúzióánál, akut ischémiás stroke kezelésében alkalmaznak [82]. Bebizonyították, hogy az olyan tPA-k használatával, mint a retepláz (Retavase), a tenektepláz (TNKase), az altepláz (Activase) vagy az anisztrepláz (Eminase) a stroke utáni három órán belül legalább egy nagyságrenddel jobb hatékonyság érhető el, mint az aszpirinnal, amely az egyetlen másik hatékony gyógyszer e betegség kezelésében. Az intravénás fibrinolitikus szerrel kezelt páciensek körülbelül egyharmadánál tapasztaltak stroke utáni javulást [83]. A tPA-kat ezenkívül akut miokardiális infarktus kezelésére is használják [84]. A tenektepláznak hosszú féléletideje van, így egyetlen bólus (nagy mennyiségű hatóanyagot tartalmazó) injekció is elég a kezelésre [85]. A retepláz féléletideje még hosszabb, beadása dupla bólus injekcióval történik. Úgy tűnik azonban, hogy ennek a hosszú féléletidőnek egyetlen haszna, hogy csökkenteni lehet az injekciók számát, más egészségügyi haszonnal nem jár a betegek számára [86]. A sztreptokináz (Streptase; EC 3.4.99.0) szintén egy trombolitikus szer, amely egyes esetekben hatásosabbnak bizonyult, mint a tPA-k [87]. Az urokináz (Abbakinase; EC 3.4.21.73) egy másik típusú trombolitikus szer, amely a plazminogén aktiválást egy más mechanizmuson keresztül végzi és amelyet a tüdőembólia kezelésében használnak.

Különböző enzimterápiákat rákkezelésben is alkalmaznak. A raszburikázt például a TLS (tumor lysis syndrome – tumor lízis szindróma) következtében kialakuló hiperuricémia kezelésére használják. Ez a betegség akár halálos kimenetelű is lehet és olyan gyorsan növekvő tumorokkal jár együtt, amelyek a limfóma és a leukémia esetében is tapasztalhatók a kemoterápiával kezelt betegeknél. Ezeknél a pácienseknél a hiperuricémia gyakorisága közel 20% [88]. Az urikáz azért egy érdekes enzim, mert a legtöbb emlősben megtalálható, viszont az embereknél az enzimet kódoló gén egy nonsense mutációt tartalmaz [89]. A raszburikáz jól tolerálható, gyorsan hat és napi egyszer, intravénásan adják be. Az enzimet azonban nem lehet alkalmazni olyan betegeknél, akiknél glükóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim hiányzik [90]. Az urikáz PEGilált formája kevésbé vált ki immun ellenreakciót és hosszabb féléletideje van, mint a „csupasz” formának [89].

Az aszparagináz (EC 3.5.1.1) egy másik példa az enzimalapú rákellenes terápiákra. Az *E. coliból* nyert aszparaginázt gyakran használják az akut limfoblasztikus leukémia kezelésére [91]. Az aszparagináz úgy működik, hogy a leukémiás sejtektől elvonja az L-aszparagint. Az aszparagináz az L-aszparagin aminosavat L-aszpartám savvá és ammóniává hidrolizálja. A legtöbb emberi szövetnek nincs szüksége L-aszparagindra, mivel azt az aszparagin szintáz (AS) segítségével elő tudja állítani L-glutaminból. Az akut limfoblasztikus leukémiás

sejtekben viszont általában nagyon alacsony az AS szint és az L-aszparagin hiánya esetén a sejtek nem képesek az AS gént nagyobb mennyiségű enzim előállítására serkenteni. Az aszparagináz egy hatékony módja annak, hogy a test aszparagin készletét kimerítse. Ennek az a következménye, hogy azok a sejtek (és csak azok), melyek nem képesek szintetizálni az L-aszparagint elpusztulnak. Ez szelekciót tesz lehetővé a leukémiás és nem leukémiás sejtek között. Az aszparagináznak viszonylag rövid féléletideje van (10-20 óra). A PEGilált aszparagináznak viszont 10-szer, 15-ször is hosszabb a féléletideje. A PEGilált aszparagináz (Pegaspargase) az 1970-es 1980-as években fejlesztették ki. A gyógyszert széleskörű tesztelésnek vetették alá. Ez alapján úgy tűnik, megtartja a leukémia elleni hatékonyságát, emellett kevésbé gyakori gyógyszerbeadást tesz lehetővé, mint az eredeti vegyület. A Pegaspargáz valós költsége a pácienseknek nagyobb, mint a többszöri injekciózás más aszparagináz készítmény esetén. Ennek ellenére, mivel kevesebb orvosi vizit szükséges és a terápia mellékhatásainak kezelésére is kevesebbet kell szánni, a teljes terápia számottevően kevesebbe kerülhet, mint a hagyományos aszparagináz kezelések.

Néhány gyógyszerkészítmény egynél több enzimet is tartalmaz. Ilyen például a pankrelipáz vagy Zymase, amely amilázt (a keményítőlebontáshoz), lipázt (a zsírok lebontásához) és kimotripsint (egy proteázt) tartalmaz különböző összetételben. Ezt a fehérjekeveréket sertés és szarvasmarha hasnyálmirigyből izolálják és néha pankreatinnak hívják. Ez a fehérjekoktél arra szolgál, hogy elősegítse az emésztést olyan embereknél, akiknél saját emésztőenzimjeik nem termelődnek megfelelő mennyiségben. Ilyen állapot jöhet létre pankreatitisz, cisztás fibrózis vagy hasnyálmirigyrák okozta hasnyálmirigy zavaroknál.

#### **6.1.5.2. Az enzim alapú bio-gyógyszerkészítmények jövője**

Az enzimterápia tudományterületén állandó a változás. Folyamatosan új enzimeket fejlesztenek ki és tesztelnek különféle betegségek kezelésére. A legintenzívebb munkák egy része a lizoszómás rendellenességek (LSD) területén készül. Néhány enzim biogén gyógyszer már a tesztek második illetve harmadik fázisában kerül. Ezeket a gyógyszereket cukor anyagcserével és cukorlebontással kapcsolatos halálos vagy teljes legyengüléssel járó szindrómák kezelésére kívánják használni. Erre egy példa a sav-maltáz, amely egy ritka és halálos betegséggel, a Pompe-kórral hozható összefüggésbe. A Pompe kór, más néven 2-es típusú, gyermekkori glikogén raktározási rendellenesség (glycogen storage disease type 2, GSD II), vagy sav-maltáz hiánybetegség az enzimet kódoló gén mutációja miatt alakul ki. A géntermék, a sav-maltáz enzim rendes körülmények között a glikogént, a sejtekben tárolt cukrot bontja le. A sav-maltáz hiánya esetén a glikogén toxikus mértékben halmozódik fel a szív- és vázizmokban, ez pedig az izmok elsorvadásához vezet. A Pompe-kóros újszülötteken végzett korai sav-maltáz kísérletek sikeresnek bizonyultak, főleg azoknál, akinél még tapasztalható volt valamilyen kis mértékű, maradék sav-maltáz aktivitás [92]. Más lizoszómás rendellenességnél, például a Hurler-kórnál és a Maroteaux-Lamy szindrómánál is vizsgálták az enzimpótlás eredményességét. A Hurler-kór jellemzője a nem megfelelő  $\alpha$ -iduronidáz aktivitás, amely a dermatán-szulfát és a heparin-szulfát felhalmozódásával jár a betegek szervezetében. A felhalmozódás következtében kialakuló tünetek a merev ízületek, a korlátozott mozgás, a tüdőbaj, az alvás közbeni légzésszünetek (apnoé), valamint a szemet, májat, ízületeket és a gerincet érintő egyéb zavarok. Az  $\alpha$ -iduronidáz enzimpótlási terápiával végzett legújabb klinikai próbák egyes betegeknél jelentős javulást idéztek elő, főleg ami a többirányú mozgást, a rugalmasságot és az apnoét illeti (Ref. 93-nál részletesebben kifejtve). A Maroteaux-Lamy szindrómát az N-acetilgalaktózamin-4-szulfatáz (arilszulfatáz B) hiánya következtében fellépő nagy mennyiségű dermatán-szulfát felhalmozódása okozza. Nemrégiben egy arilszulfatáz B-vel végzett ERT-kísérletet folytattak le, ahol az enzimet heti

rendszerességgel adták be a pácienseknek. A kísérlet eredményeként a vizeletben a glükózaminglükánok mennyisége lecsökkent, a páciensek járása és vállmozgása könnyebbé vált valamint az ízületi fájdalmaik enyhültek [72]. Azonban számos kedvezőtlen hatásról is beszámoltak és valamennyi páciensnél ellenanyag-termelődést tapasztaltak az arilszulfatázzal szemben.

Valószínűleg nem minden enzimterápia lesz sikeres, legalábbis addig biztosan nem, amíg nem találnak jobb módszereket arra, hogy milyen formában és hogyan juttassák be az enzimeket a működési helyükre. Majdnem az összes ERT terápiánál a legnagyobb feladat annak a megoldása, hogy a fehérjék a megfelelő szövetekbe kerüljenek. Például a lizoszómás rendellenességek kezelésében olyan fejlesztésekre van szükség, amelyekkel megoldható, hogy a terápiás enzimek eredményesen eljussanak a szívizomba és a vesébe a Fabry-szindróma esetén, a vázizmokba a Pompe-kór esetén, valamint az ízületekbe a Hurler-kóros és a Maroteaux-Lamy szindrómától szenvedő betegeknél. A jobb szövet-targeting kétségtelenül más enzimterápiáknál is előnyös lenne, például egyes rák, szívinfarktus és stroke kezeléseknél.

Az ERT-vel kapcsolatos másik probléma a rendkívül magas költségek, valamint az, hogy néha megkérdőjelezhető a terápia haszna vagy a kis mértékű a javulás a páciens életminőségében. Néhány IEM esetében (Inborn Error of Metabolism) a betegség annyira ritka, hogy az előállítási költségek mindig magasak fognak maradni. A Gaucher-kórnál, amely kezelésében az ERT bizonyult a leghatékonyabbnak, az ERT éves költsége betegenként 40 000 és 320 000 dollár közé esik. A Fabry-kórnál alkalmazott ERT évente körülbelül 160 000 dollárba kerül. Még az olyan gyakori zavaroknál, mint a rák, a szívinfarktus vagy a stroke, az enzim alapú gyógyszerkészítmények ára néha túl magasnak bizonyul. Hasonló ár-haszon vitát kavart a szélütés tPA versus aszpirin és heparin kezelése több, mint tizenöt éven keresztül [15]. Néhány esetben az enzim alapú gyógyszerkészítmény nagyon költséghatékonyak bizonyul, más esetekben viszont nem. Minden bizonnyal ahogy néhány enzimterápia piaca nő, a költségek szükségszerűen csökkennek. Hasonlóképpen ahogy tökéletesednek a gyógyszer kiképzésének és bejuttatásának módszerei, úgy lesz egyre valószínűbb, hogy az ár-haszon mérleg határozottan változni fog.

## ÖSSZEGZÉS

A természetes és rekombináns fehérje alapú gyógyszerek gyógyászati jelentősége mára már igazolt. Akár hormon- vagy enzimpótló terápiaként, akár úgy, hogy más fehérje szignálokat blokkolnak vagy inhibeálnak, a fehérje gyógyszerkészítmények kitűnő szelektivitással és specificitással rendelkeznek targetjeik felé. Megjelenésük óta több, mint száz fehérjét hagyott jóvá az amerikai Food and Drug Administration és még több van jelenleg a fejlesztés különböző fázisaiban. Hatékonyságuk ellenére több tényező gátolja a fehérjegyógyszerek széleskörű elterjedését. A fehérjék előállításához speciális, drága technikák alkalmazására van szükség: általában rekombináns technikákkal előállított sejtek tenyésztését hosszú és költséges tisztítási folyamat követi. A kész fehérjéket speciális körülmények közt kell tárolni és szállítani, mivel hajlamosak a denaturálódásra és a proteolitikus bomlásra. A fehérjegyógyszerek szájon át történő beadása és hozzáférhetősége akadályokba ütközik, mivel a testnek sok természetes védekező-mechanizmusa van az exogén fehérjékkel szemben. Mindamelllett, bár sok akadályt kell még legyőzni, a fehérje alapú gyógyszerkészítmények minden bizonnyal továbbra is gyors fejlődésnek néznek elébe, mivel más gyógyszerekkel szemben összehasonlíthatatlanul specifikusabb és hatásosabb terápiás megközelítést tesznek lehetővé.