



ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΣΤ' ΕΞΑΜΗΝΟΥ

Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων
Τ.Ε.Ι. Αθήνας



Μάθημα 6^ο
Ινσουλίνη – Αυξητική ορμόνη

Διδάσκων

Δρ. Ιωάννης Δρίκος

Απόφοιτος Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων (ΠΙ)

Απόφοιτος Βιολογίας, ΑΠΘ

Διδάκτωρ Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ)

Ειδ. Παιδιατρικής

email: johndrikos@yahoo.com, idrikos@teiath.gr



Ανθρώπινη Ινσουλίνη

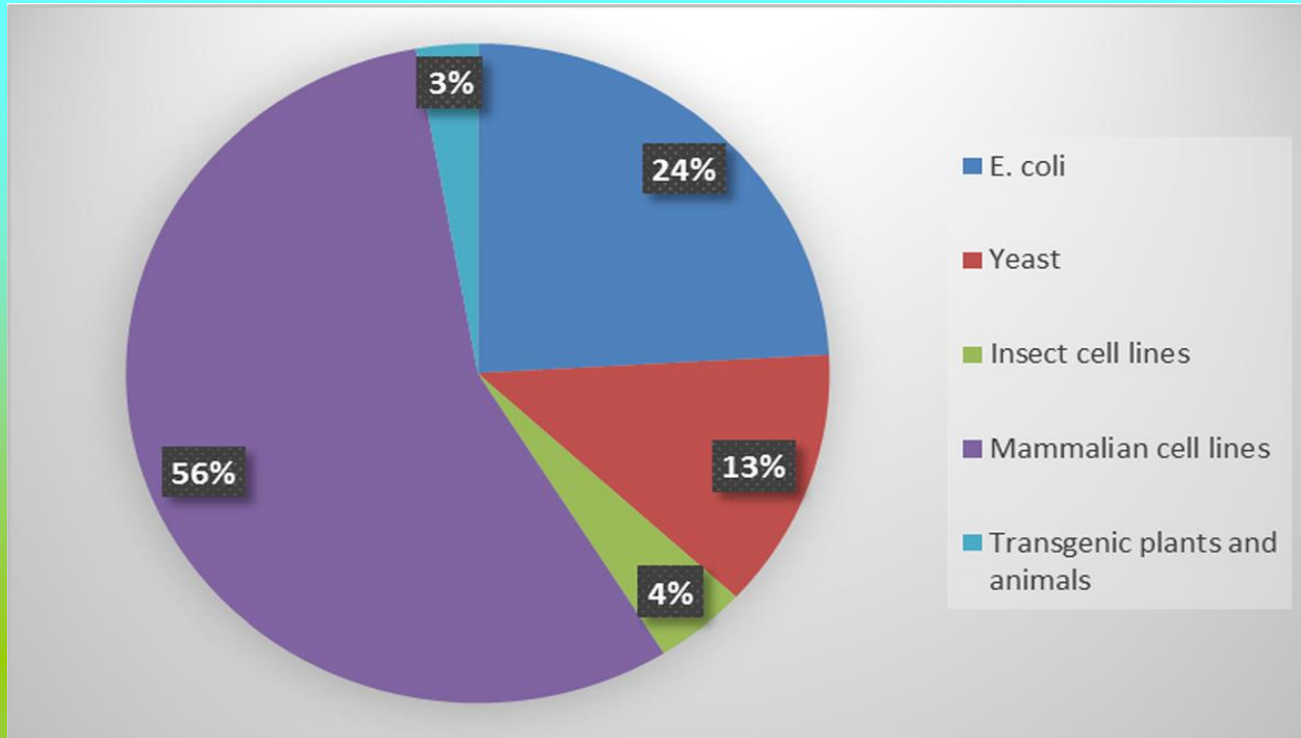
“Εργοστάσια” κυττάρων για την παραγωγή ινσουλίνης

✓Υπάρχουν περισσότερα από 300 είδη φαρμακευτικών προϊόντων που παράγονται με διαδικασίες βιοτεχνολογίας, συμπεριλαμβανομένων των θεραπευτικών πρωτεϊνών και των αντισωμάτων με πωλήσεις άνω των 100 δισ δολαρίων στις ΗΠΑ.

✓Σήμερα η ινσουλίνη παράγεται κατά κύριο λόγο από το μικροοργανισμούς όπως το *E.coli* και ο *Saccharomyces cerevisiae* και έχει καλά αποτελέσματα στην θεραπεία διαβητικών ασθενών.

✓Από τις αρχές της δεκαετίας του 1920, οι διαβητικοί ασθενείς υποβλήθηκαν σε αγωγή με ινσουλίνη, η οποία απομονώθηκε από χοίρους και βοοειδή.

✓Η ανάπτυξη στον τομέα της γενετικής μηχανικής επέτρεψε την παραγωγή της ινσουλίνης από το *E coli* και την ζύμη.



✓ Τα Βιοφαρμακευτικά προϊόντα που έχουν εγκριθεί από τον οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων των ΗΠΑ (Food and Drug Administration - FDA) και τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (EMA) (2004-2013) είναι σε μεγάλο βαθμό προερχόμενα από κύτταρα θηλαστικών (56%), το *E. Coli* (24%) και τον *S. Cerevisiae* (13%).

✓ Σήμερα, η ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ινσουλίνη παράγεται είτε από στελέχη του γένους *E.coli* είτε από τον *Saccharomyces cerevisiae*.

Επιδημιολογία του σακχαρώδους διαβήτη

✓ Η συχνότητα του σακχαρώδους διαβήτη αυξάνεται με ανησυχητικούς ρυθμούς με τον αριθμό των διαβητικών ασθενών να υπολογίζεται σε περίπου 300 εκατομμύρια μέχρι το έτος 2025.

✓ Η απαίτηση για ινσουλίνη θα αυξηθεί σημαντικά (εκτιμώμενη ποσότητα περίπου άνω των 16000 kg / έτος), επομένως η παραγωγικότητα του τρέχοντος συστήματος έκφρασης ινσουλίνης δεν θα είναι επαρκής για να καλύψει τις μελλοντικές ανάγκες της αγοράς.

✓ Η απόδοση των συστημάτων έκφρασης για την παραγωγή ινσουλίνης απαιτεί επίσης την αναζήτηση μιας νέας οδού χορήγησης όπως η στοματική οδός ή μέσω εισπνοής.

Δομή και λειτουργία της ινσουλίνης

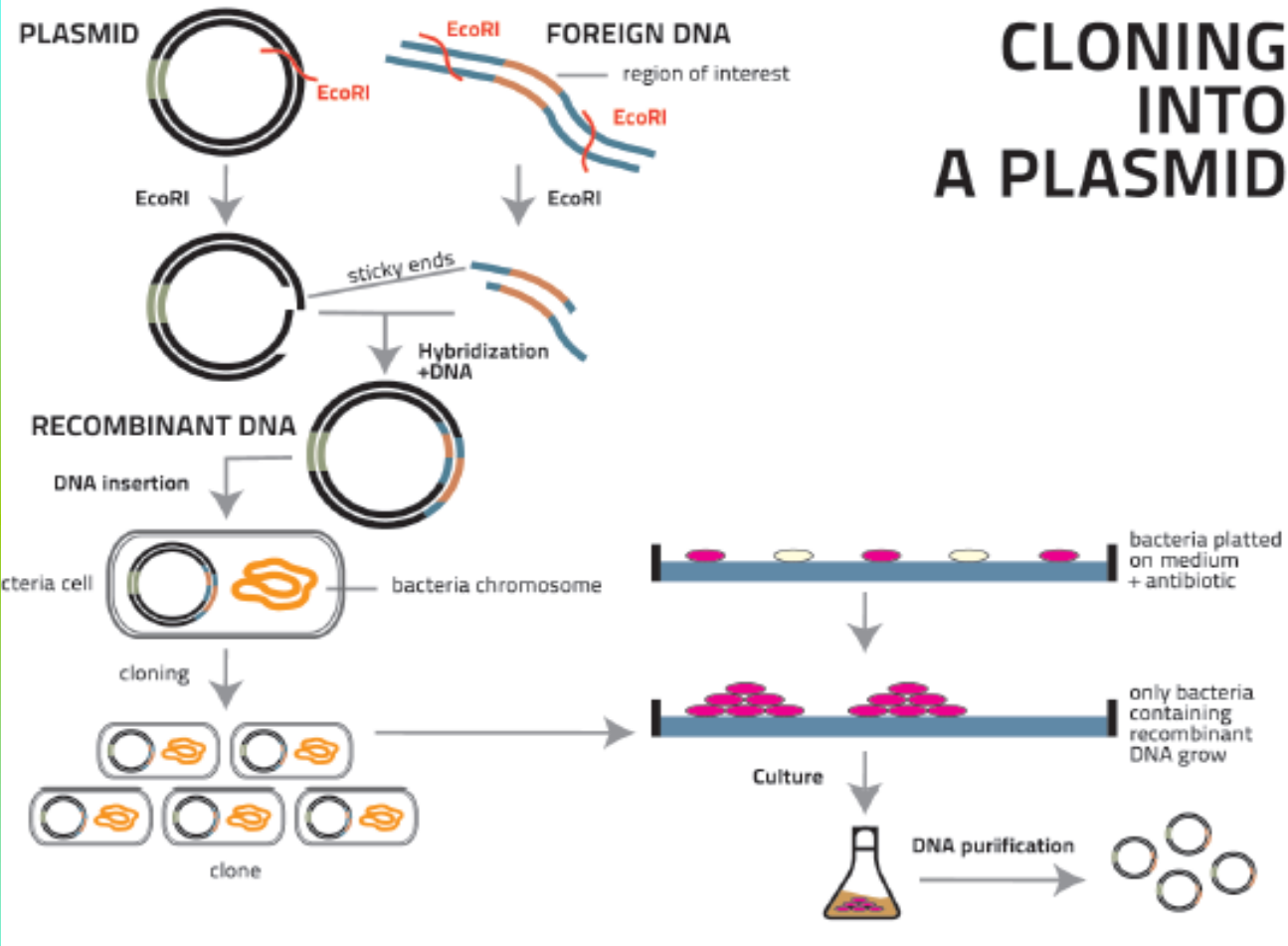
✓ Η ανθρώπινη ινσουλίνη αποτελείται από 51 αμινοξέα και έχει ένα μοριακό βάρος 5808 Da.

✓ Παράγεται από τα βήτα κύτταρα του παγκρέατος και παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού των υδατανθράκων.

✓ Ινσουλίνη συντίθεται ως ένα απλό πολυπεπτίδιο γνωστό ως προ-προϊνσουλίνη στα παγκρεατικά βήτα κύτταρα.

✓ Η ώριμη ινσουλίνη αποτελείται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες την A με 21 αμινοξέα και την B που περιέχει 30 αμινοξέα, με τα δύο πολυπεπτίδια να συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς.

CLONING INTO A PLASMID



Σύστημα έκφρασης E. coli για την παραγωγή της ινσουλίνης (1)

- ✓ Το E. coli είναι ένας μικροοργανισμός που προτιμάται για την παραγωγή μεγάλης κλίμακας ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.
- ✓ Ωστόσο, διάφορα μειονεκτήματα περιορίζουν τη χρήση του για την παραγωγή ανασυνδυασμένων βιοφαρμακευτικών προϊόντων.
- ✓ Διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (PTMs) όπως γλυκοζυλίωση, φωσφορυλίωση, πρωτεολυτική επεξεργασία και ο σχηματισμός των δισουλφιδικών δεσμών οι οποίες είναι πολύ σημαντικές για την βιολογική δραστηριότητα των μορίων, δεν συμβαίνουν στο E.coli.

Σύστημα έκφρασης E. coli για την παραγωγή της ινσουλίνης (2)

✓ Η ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ινσουλίνη παρήχθη για πρώτη φορά από το E. coli από την Genentech το 1978, χρησιμοποιώντας μια τεχνική που στηρίχθηκε στην έκφραση μέσω τεχνικών cDNA βιβλιοθήκης των δύο αλυσίδων A και B της ινσουλίνης χωριστά από το E. Coli.

✓ Μια άλλη προσέγγιση περιλαμβάνει την έκφραση ενός ενιαίου cDNA που κωδικοποιεί την ανθρώπινη προΐνσουλίνη στο E.coli, διαδικασία που ακολουθείται από καθαρισμό και μετέπειτα των εκτομή του C-πεπτιδίου με πρωτεολυτική πέψη.

✓ Η Eli Lilly ακολούθησε αυτή την τεχνολογία για την παραγωγή της Humulin, της πρώτης ανασυνδυασμένης ινσουλίνης που εγκρίθηκε το 1982, για την αντιμετώπιση των διαβητικών ασθενών.

Σύστημα έκφρασης E. coli για την παραγωγή της ινσουλίνης (3)

✓ Ωστόσο, η πρόοδος στον τομέα της γενετικής μηχανικής και η ανάπτυξης της τεχνολογίας του ανασυνδασμένου DNA οδήγησε στην σύνθεση γονιδίων με αλλοιωμένη νουκλεοτιδική ακολουθία, που διευκόλυνε την ανάπτυξη των αναλόγων ινσουλίνης με τροποποιημένη αλληλουχία.

✓ Είχε παρατηρηθεί ότι η μητρική ινσουλίνη σε εμπορικά παρασκευάσματα συνήθως υπάρχει σε ολιγομερή μορφή, αλλά στο αίμα η βιολογικώς δραστική ινσουλίνη είναι σε μονομερή μορφή.

✓ Ως εκ τούτου, τα ολιγομερή θα πρέπει να διαχωριστούν έτσι ώστε η ινσουλίνη να μπορεί να απορροφηθεί από τη θέση της ένεσης εντός του αίματος.

✓ Λόγω αυτού, η υποδορίως ανασυνδυσμένη ινσουλίνη συνήθως έχει μια αργή έναρξη δράσης με μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα μετά από 2 ώρες από την ένεση και διάρκεια δράσης για 6-8 ώρες.

Σύστημα έκφρασης E. coli για την παραγωγή της ινσουλίνης (4)

✓Ως εκ τούτου, προκειμένου να αναπτυχθεί ένα ταχείας δράσης ανάλογο ινσουλίνης, έγινε τροποποίηση στα κατάλοιπα αμινοξέων των οποίων οι πλευρικές αλυσίδες εμπλέκονται στο σχηματισμό διμερών ή ολιγομερών.

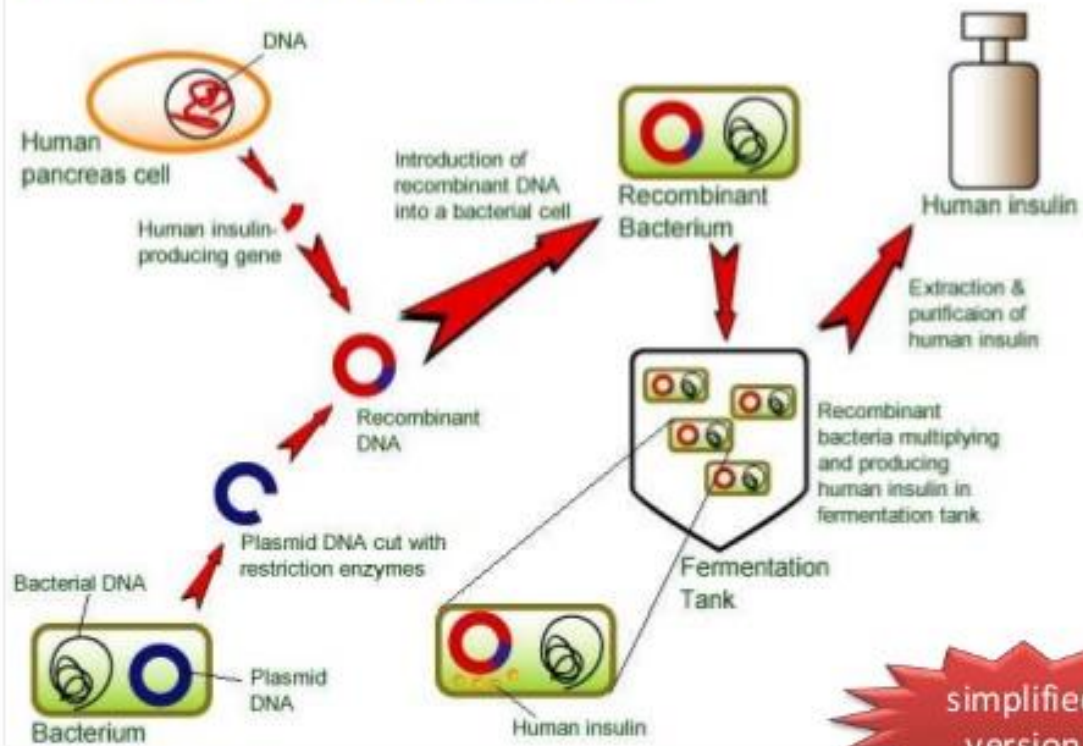
✓Με αυτό τον τρόπο λοιπόν παράχθηκε η ινσουλίνη Lispro, που αναπτύχθηκε από την Eli Lilly, ως το πρώτο ταχείας δράσης ανάλογο ινσουλίνης που έλαβε το 1996 έγκριση για εφαρμογή στην θεραπευτική πρακτική.

✓Για να αποφευχθούν οι πολλαπλές ενέσεις, τα τελευταία χρόνια παρήχθησαν τα μακράς δράσης ανάλογα ινσουλίνης που έχουν παρατεταμένη διάρκεια δράσης.

✓Η ινσουλίνη glargine είναι ένα από αυτά τα μακράς δράσης ανάλογα ινσουλίνης, το οποίο αναπτύχθηκε από την εταιρεία Aventis και κυκλοφόρησε στις ΗΠΑ και την ΕΕ το 2000.

Production of insulin with recombinant DNA technology

Human Insulin Production



Σύστημα έκφρασης ζυμομυκήτων για την παραγωγή ινσουλίνης (1)

✓ Ο ζυμομύκητας είναι ένας προτιμώμενος ξενιστής για την έκφραση των διαφόρων ετερόλογων πρωτεϊνών που απαιτούν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ώστε να εμφανίσουν την βέλτιστη βιολογική τους δράση.

✓ Ο ζυμομύκητας έχει την δυνατότητα να πραγματοποιήσει πολυάριθμες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως φωσφορυλίωσεις κάνοντας τα βιολογικά μόρια δραστικά.

✓ Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες εκφράζονται σε διαλυτή μορφή στον ζυμομύκητα και αναδιπλώνονται σωστά σε λειτουργικά ενεργή μορφή.

Σύστημα έκφρασης ζυμομυκήτων για την παραγωγή ινσουλίνης (2)

- ✓ Ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την παραγωγή ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ινσουλίνης από τις αρχές της δεκαετίας του 1980.
- ✓ Η ασπαρτική ινσουλίνη (*aspart*) είναι μια ινσουλίνη ταχείας δράσης η οποία παρήχθηκε από τον *S. Cerevisiae*, αναπτύχθηκε από την Novo Nordisk και έχει εγκριθεί από τον FDA το 2001 για θεραπευτική χρήση στον άνθρωπο.
- ✓ Η ινσουλίνη *aspart* δημιουργήθηκε με αντικατάσταση στην αλυσίδα Β του αμινοξέος της προλίνης στην θέση 28 με ασπαρτικό οξύ.
- ✓ Αυτή η γενετική τροποποίηση είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του ομοδιμερισμού προκαλώντας έτσι ταχεία εισαγωγή του προϊόντος στην κυκλοφορία του αίματος.

Διαγονιδιακά φυτά ως ξενιστές για την παραγωγή ανθρώπινης ινσουλίνης (1)

✓ Διαγονιδιακά φυτά έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών λόγω του χαμηλού κόστους, της υψηλής ποιότητας στην επεξεργασία των πρωτεϊνών, την απουσία ανθρώπινων παθογόνων, την ευκολία στην παραγωγή και την παρουσία ευκαρυωτικών μηχανισμών για μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις.

✓ Η ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ινσουλίνη έχει επιτυχώς εκφραστεί και παραχθεί σε ελαιούχους σπόρους του φυτού *Arabidopsis thaliana*.

✓ Η τεχνολογία αυτή αφορούσε τη στοχευμένη έκφραση της ινσουλίνης σε υποκυτταρικά οργανίδια γνωστά ως oilbodies που επέτρεψε την έκφραση με υψηλή ποιότητα του προϊόντος με εύκολο καθαρισμό.

Διαγονιδιακά φυτά ως ξενιστές για την παραγωγή ανθρώπινης ινσουλίνης (2)

✓ Σε μία άλλη προσέγγιση, δημιουργήθηκαν διαγονιδιακά φυτά, όπως ο καπνός και το μαρούλι των οποίων οι χλωροπλάστες μετασχηματίστηκαν με την ανθρώπινη προΐνσουλίνη που αποτελείται από τα πεπτίδια A, B και C συζευγμένα με την υπομονάδα της τοξίνης της χολέρας B.

✓ Η προ-ινσουλίνη από τα φύλλα του καπνού εκχυλίζεται με καθαρότητα 98% και διασπάται από την πρωτεάση φουρίνη ώστε να απελευθερώσει τα πεπτίδια της ινσουλίνης.

✓ Η στοματική χορήγηση αυτών των μορίων προΐνσουλίνης παραγμένα σε φυτικά κύτταρα ή μέσω ένεσης σε ποντίκια αποκάλυψε μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα παρόμοιο με τις εμπορικώς διαθέσιμες ινσουλίνες.

Παραγωγή ινσουλίνης και μελλοντικές προοπτικές (1)

✓ Η ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ινσουλίνη παράγεται κυρίως χρησιμοποιώντας τα στελέχη του βακτηρίου *E. coli* και του μύκητα *Saccharomyces cerevisiae*.

✓ Ωστόσο, υπάρχει μια υπέρτατη ανάγκη να αυξηθεί η παραγωγή της βιολογικά ενεργού ινσουλίνης και τα ανάλογά της από το *E. coli* και τους ζυμομύκητες, χρησιμοποιώντας σύγχρονες και αποδοτικές νέες τεχνολογίες.

✓ Επομένως, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί μια άλλη στρατηγική με διαφορετικό ξενιστή έκφρασης εκτός του *E. coli* και του *Saccharomyces cerevisiae*.

Παραγωγή ινσουλίνης και μελλοντικές προοπτικές (2)

✓ Το σύστημα έκφρασης με βάση φυτικούς οργανισμούς δίνει τεράστιες δυνατότητες για παραγωγή ινσουλίνης υψηλής αποδοτικότητας με οικονομικά αποδοτικό τρόπο.

✓ Τα πολύ ψηλά επίπεδα έκφρασης των βιολογικώς δραστικών μορίων προΐνσουλίνης σε σπόρους ή φύλλα που έχουν μακροχρόνια σταθερότητα, προσφέρει μια χαμηλού κόστους τεχνολογία τόσο για τις ενέσιμες όσο και τις στοματικές μορφές της προ-ινσουλίνης.

✓ Επιπλέον, οι διαγονιδιακοί σπόροι μπορούν να δρουν ως αποθήκες αποθηκευμένων μορφών ανασυνδυασμένης ινσουλίνης όποτε απαιτείται.

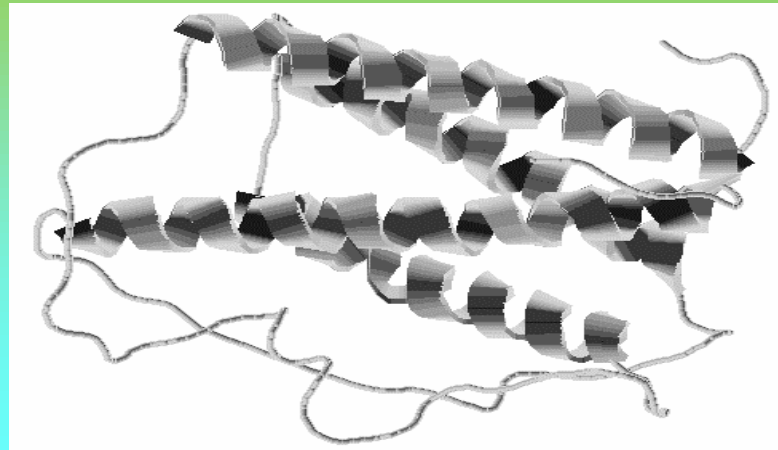
Αυξητική ορμόνη του ανθρώπου

Αναδρομή στην παραγωγή της GH με την τεχνολογία rDNA

- ✓ Στη δεκαετία του 1960 και του 1970, τα παιδιά υποβλήθηκαν σε θεραπεία με αυξητική ορμόνη απομονώθηκε από ανθρώπινα πτώματα.
- ✓ Το 1985 ο FDA απαγόρευσε αυτή την πρακτική, διότι αρκετοί ασθενείς έχασαν τη ζωή τους από μια θανατηφόρα διαταραχή του εγκεφάλου γνωστή ως Creutzfeldt-Jacob (CJD).
- ✓ Η CJD προκλήθηκε έπειτα από μόλυνση με prions στο εκχύλισμα αυξητικής ορμόνης.
- ✓ Το 1985, η Genentech εισήγαγε την προτροπίνη, μια ανασυνδυασμένη GH που παράγεται από βακτήρια.

Δομή των αυξητικών ορμονών

- ✓ **Οι αυξητικές ορμόνες GHs** σε γενικές γραμμές, έχουν ένα μοριακό βάρος περίπου 22.000 Daltons (22 kDa)
- ✓ **Δεν απαιτούν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις** για να γίνουν λειτουργικές.
- ✓ Αυτά **συντίθενται από τα σωματότροφα κύτταρα** της υπόφυσης, έχοντας ως σημαντικό ρόλο στην μεταγεννητική σωματική ανάπτυξη και τη γαλουχία.



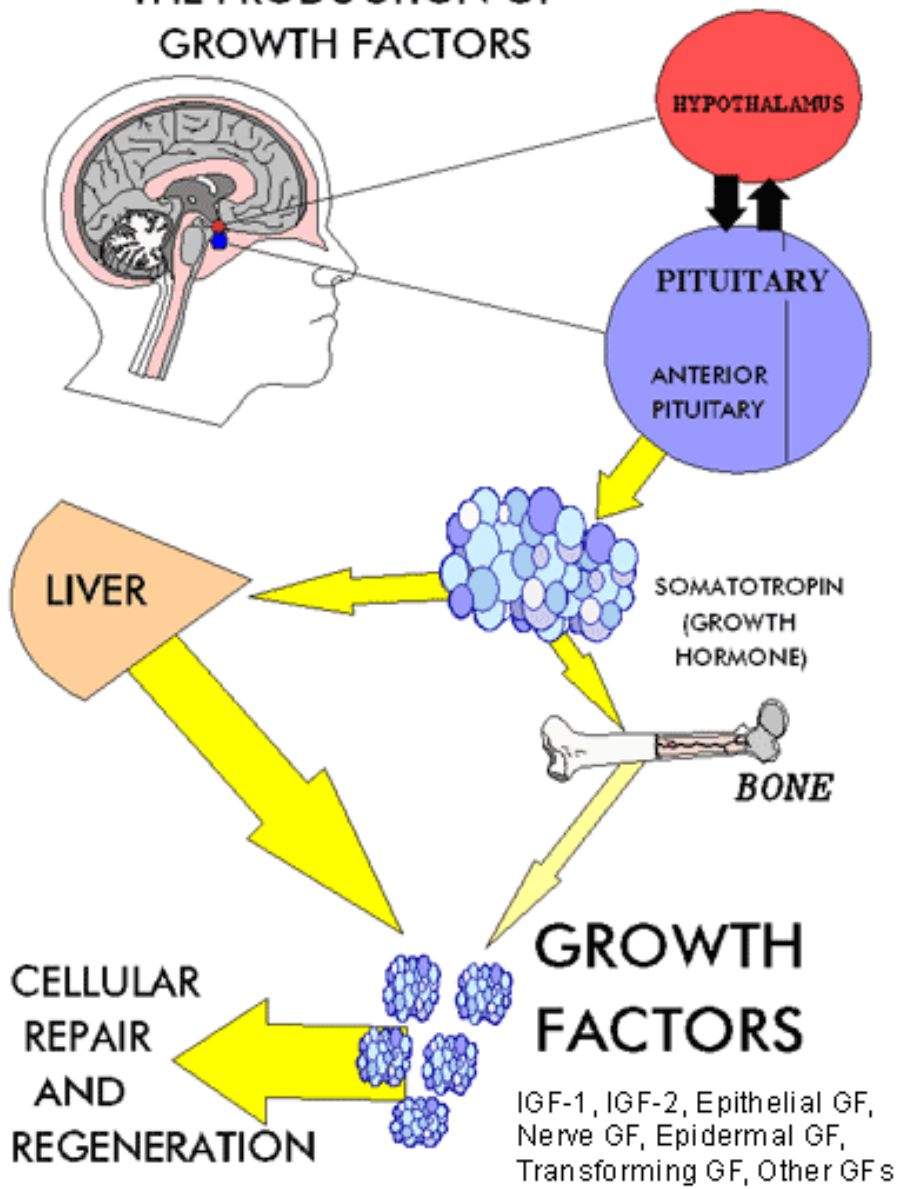
Ο γενετικός τόπος της ανθρώπινης GH

✓ Εκτός από τα δύο γονίδια hGH (κανονικό και μεταβλητό), τρεις HCSS συμπληρώνουν την πολυγονιδιακή οικογένεια των HG στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Αυτά είναι διατεταγμένα με την ακόλουθη σειρά: HGHN, HCS-1, HCS-2, HGH-V y HCS-3.

✓ Τα τελευταία χρόνια έχουν κλωνοποιηθεί τα γονίδια των hGH και έχουν εκφραστεί σε κυτταρική καλλιέργεια, καθώς επίσης έχουν προσδιοριστεί και οι παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης τους.

✓ Αρκετά νέα γονίδια και συμπληρωματικό DNA (cDNA) με το mRNA πολυάριθμων GHs έχουν απομονωθεί στο εργαστήριο κυρίως από θηλαστικά.

THE PRODUCTION OF GROWTH FACTORS



Αυξητικές ορμόνες ανθρώπινης προέλευσης

Immunization and healing <ul style="list-style-type: none">• Resistance to common diseases• Ability to heal• Healing of old lesions• Healing of other lesions• Ulcer treatment	Mental function <ul style="list-style-type: none">• Emotional stability• Memory• General aspect and attitude• Mental energy and clarity
Skin and hair <ul style="list-style-type: none">• Skin elasticity• Skin thickness• Skin texture• Growth of new hair• Disappearance of wrinkles• Skin hydration	Muscle strength and tone <ul style="list-style-type: none">• Increase in energy in general• Increase muscle strength• Promotion of muscle mass gain
Sexual factors <ul style="list-style-type: none">• Duration of an erection• Increase in libido• Potential/frequency of sexual activity• Regulation and control of the menstrual cycle• Positive effects in the reproductive system• Increase in breast-milk volume	Circulatory system <ul style="list-style-type: none">• Improvement in circulation• Stabilization of blood pressure• Improvement in cardiac function
Bone <ul style="list-style-type: none">• As treatment for bone fractures• Osteoporosis treatment• Increases flexibility of the back and joints	Fats <ul style="list-style-type: none">• Increases "good" cholesterol (HDL) levels• Reduces fat

Παραγωγή ανθρώπινης ανασυνδυασμένης GH (1)

- ✓ Μεταξύ των πρώτων cDNAs που κλωνοποιήθηκαν και εκφράστηκαν σε βακτήρια *Escherichia coli* ήταν η GH.
- ✓ Αυτό το σύστημα έκφρασης έχει χρησιμοποιηθεί από το 1985 για την παραγωγή ανασυνδυασμένων GH από την Genentech (προτροπίνης), η οποία αργότερα ακολουθήθηκε από τις Biotech (biotropin), Novo Nordisk (Norditropin), Serono (SEROSTIM).
- ✓ Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που έχει ανακτηθεί από το *E. coli* έχει ανεπιθύμητες τροποποιήσεις.

Παραγωγή ανθρώπινης ανασυνδυασμένης GH (2)

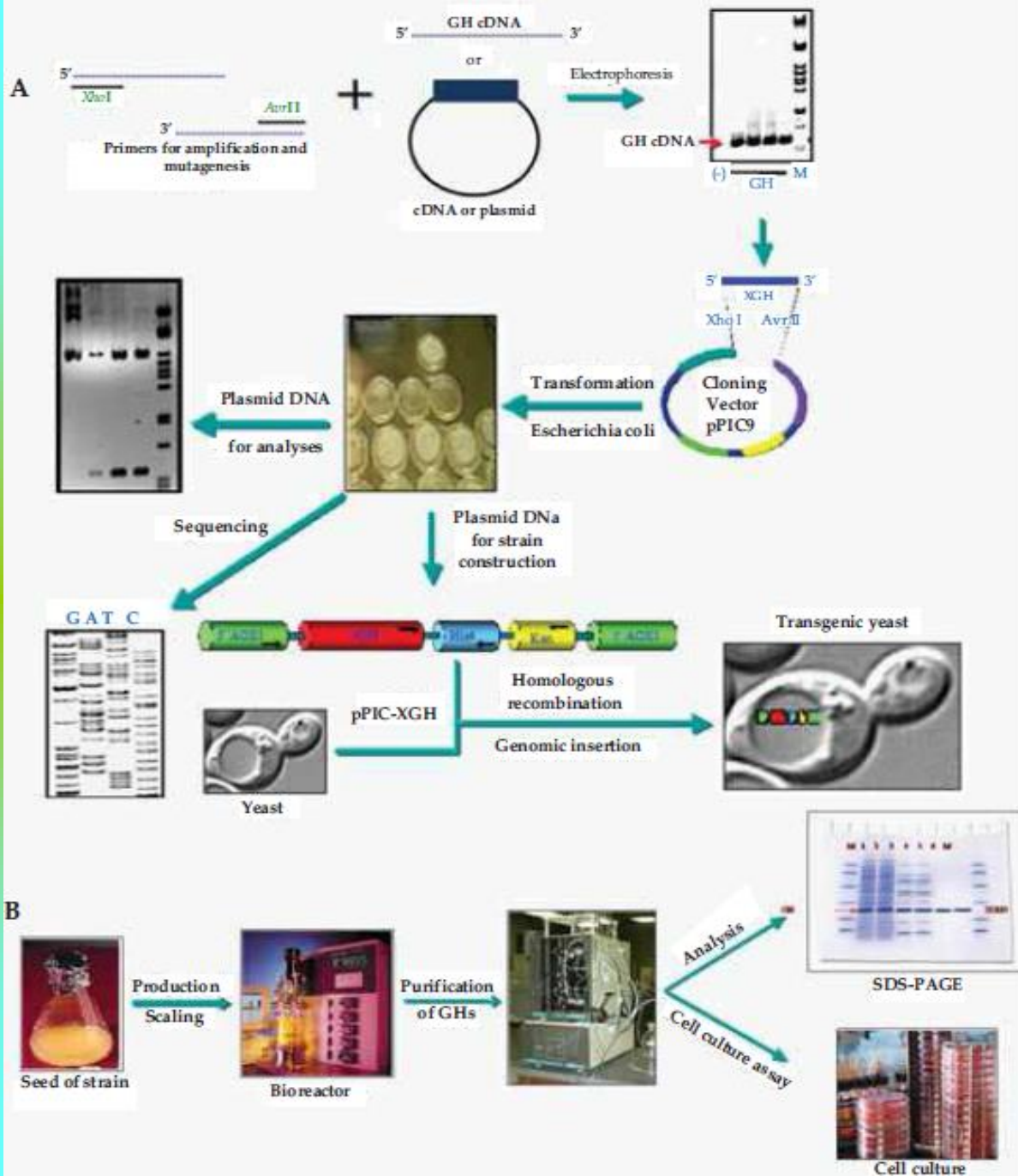
✓Οι προσπάθειες έχουν επικεντρωθεί στην αναζήτηση καλύτερων συστημάτων έκφρασης, όπως ο *Saccharomyces cerevisia*, ο *Bacillus subtilis*, καλλιέργειες σε κύτταρα θηλαστικών, καθώς επίσης και διαγονιδιακά ζώα.

✓Αυτά τα συστήματα έκφρασης δεν προσφέρουν όμως ένα επίπεδο παραγωγής μεγαλύτερο από εκείνο του *E coli* αλλά και καταλληλότερη μορφή προϊόντος.

✓Ο *P. pastoris* είναι ένας μεθυλοτροφικός ζυμομύκητας (ικανός να αναπτύσσεται σε μεθανόλη ως μόνη πηγή άνθρακα πηγή) που προσφέρει μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και παράγει ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη μια ή δύο τάξεις μεγέθους καλύτερες από εκείνες του *Saccharomyces cerevisiae*.

Πώς γίνεται η παραγωγή της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης (HGH) σε βακτηρίδια;

- ✓ Αρχικά γίνεται ανάστροφη μεταγραφή του DNA της hGH με πρότυπο το mRNA.
- ✓ Αυτό το αντίγραφο είναι γνωστό ως συμπληρωματικό DNA ή cDNA.
- ✓ Κλώνος cDNA εισάγεται στο πλασμίδιο.
- ✓ Ακολουθεί η εισαγωγή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου σε βακτήρια (*E. coli*), με τα βακτήρια αυτά να χαρακτηρίζονται ως μετασχηματισμένα.
- ✓ Τέλος γίνεται η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου και ο καθαρισμός HGH.



Η αυξητική ορμόνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως θεραπεία (1)

- ✓ Ανεπάρκεια αυξητικής ορμόνης (GHD) σε παιδιατρικούς ασθενείς.
- ✓ Ανεπαρκή ανάπτυξη σχετιζόμενη με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (CRI) πριν από τη μεταμόσχευση νεφρού.
- ✓ Κοντό ανάστημα που σχετίζεται με το σύνδρομο Turner.
- ✓ Ανεπάρκεια αυξητικής ορμόνης (GHD) σε ενήλικες.

Η αυξητική ορμόνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως θεραπεία (2)

- ✓ Η ανασυνδυασμένη αυξητική ορμόνη συνήθως είναι καλά ανεκτή και σπάνια παρατηρούνται ανεπιθύμητες ενέργειες.
- ✓ Αναστρέψιμες επιπλοκές αποτελούν η καλοήθης ενδοκράνια υπέρταση και η δυσανεξία υδατανθράκων σε συνδυασμό με ήπια αντίσταση στην ινσουλίνη.
- ✓ Η αυξητική ορμόνη επηρεάζει το λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών και υποστηρίζεται ότι η χρήση της μπορεί να αυξήσει παράγοντες κινδύνου για τη δημιουργία αθηροσκλήρωσης.
- ✓ Η αυξητική ορμόνη επίσης δρα θετικά στον οστικό μεταβολισμό αυξάνοντας την οστική πυκνότητα ενώ δεν είναι απόλυτα σαφές τι επίδραση έχει στην οστική ηλικία.