Κεφάλαιο 8

Η ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ

## Η Συμβολή στην Ιατρική

* **Έγκαιρη διάγνωση**, πριν εμφανιστούν τα συμπτώματα:
* Ανίχνευση μολύνσεων από παθογόνα μικρόβια
* Ταυτοποίηση γενετικών ασθενειών
* **Πρόληψη, με χρήση εμβολίων**
* Πιο εξελιγμένα, ασφαλή και οικονομικά εμβόλια για σοβαρές ασθένειες, όπως ηπατίτιδα Β, πολιομυελίτιδα, φυματίωση
* Ανάπτυξη νέων εμβολίων για το AIDS, tη μηνιγγίτιδα τον καρκίνο, κ.λπ.
* **Αποτελεσματική θεραπεία**
* Κατανόηση βιοχημείας και γενετικής της ασθένειας
* Κατάλληλη θεραπεία με:
* Φαρμακευτική αγωγή
* Γενετική διόρθωση

## Μέθοδοι και Εφαρμογές

* Η ιατρική βιοτεχνολογία κάνει χρήση των τεχνικών:
* Ανασυνδυασμένου DNA
* PCR
* Ανιχνευτών μορίων DNA
* Οι τεχνικές αυτές χρησιμοποιούνται για:
* Βελτίωση και ευρεία παραγωγή:
* Διαγνωστικών ουσιών π.χ. μονοκλωνικά αντισώματα
* Εμβολίων
* Φαρμακευτικών προϊόντων
* Μελλοντικά γονιδιακή θεραπεία:
* π.χ. κυστικής ίνωσης, AIDS, καρκίνου

# Φαρμακευτικές Πρωτεΐνες

* Φαρμακευτικές πρωτεΐνες είναι οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών, όπως, π.χ. η ινσουλίνη, οι ιντερφερόνες, η αυξητική ορμόνη, κ.λπ.
* Στο παρελθόν
* Η παραγωγή ήταν εφικτή σε **μικρές ποσότητες** και **ακριβή**
* Η βιολογική δράση τους δεν ήταν πλήρως κατανοητή
* Μη την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA
* Έχουν κλωνοποιηθεί τα γονίδια >300 πρωτεϊνών
* Είναι δυνατή η παραγωγή τους σε μεγάλες ποσότητες για:
* Αποτελεσματικό έλεγχο της δράσης τους
* Ευρεία κατανάλωση

## Οι Ιντερφερόνες

### Στο σώμα

* Είναι αντιιικές πρωτεΐνες:
* Παράγονται και εκκρίνονται από κύτταρα μολυσμένα από ιούς
* Συνδέονται με υποδοχείς γειτονικών υγειών κυττάρων
* Επάγουν την παραγωγή άλλων πρωτεϊνών που εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των ιών
* Παράγονται σε ελάχιστες ποσότητες
* Χωρίζονται σε α, β και γ ανάλογα με τη χημική δομή και τη βιολογική δράση

### Φαρμακευτικά

* Έχουν κλωνοποιηθεί ορισμένα από τα γονίδιά τους
* Είναι δυνατή η παραγωγή τους σε μεγάλες ποσότητες
* Μέθοδος παραγωγής παρόμοια με της ινσουλίνης (δες παρακάτω)
* Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως **αντιιικά** και **αντικαρκινικά** φάρμακα

## Ινσουλίνη

* Η ινσουλίνη είναι μια παγκρεατική ορμόνη
* Ρόλος
* Ρυθμίζει το μεταβολισμό των υδατανθράκων
* Καθορίζει το ποσό της γλυκόζης στο αίμα
* Έλλειψη ή μείωσή της προκαλεί το διαβήτη, που πλήττει 60εκ. άτομα
* Δομή
* Η ινσουλίνη αποτελείται από δύο πεπτίδια (Α & Β) που:
* Συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς
* Αποτελούνται από 51 αμινοξέα συνολικά
* Σύνθεση στον οργανισμό
* Το γονίδιο της ινσουλίνης κωδικοποιεί το πρόδρομο ολιγοπεπτίδιο προ-ινσουλίνη, που περιλαμβάνει και τις δύο αλυσίδες (Α & Β).
* Η προ-ινσουλίνη μετατρέπεται σε ινσουλίνη ενζυμικά

### Φαρμακευτική Ινσουλίνη

* Χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του διαβήτη
* Στο παρελθόν παραγόταν από χοίρους και βοοειδή:
* Υψηλό κόστος, λόγω πολύπλοκης διαδικασία εκχύλισης ιστών
* Αλλεργικές αντιδράσεις, λόγω διαφοράς από την ανθρώπινη
* Σήμερα παράγεται από μετασχηματισμένα βακτήρια:
* Απομόνωση συνολικού mRNA παγκρέατος
* Κατασκευή δίκλωνου cDNA
* Ενσωμάτωση σε πλασμίδια
* Μετασχηματισμός βακτηρίων
* Καλλιέργεια μετασχηματισμένων βακτηρίων
* Επιλογή κλώνου που περιλαμβάνει το γονίδιο της ινσουλίνης
* Καλλιέργεια του κλώνου σε βιοαντιδραστήρα
* Συλλογή και καθαρισμός προ-ινσουλίνης
* Ενζυμική μετατροπή σε ινσουλίνη

## Μονοκλωνικά Αντισώματα

### Αντισώματα

Τα αντισώματα είναι πρωτεΐνες που παράγονται από τα β-λεμφοκύτταρα όταν ένα «αντιγόνο» εισέλθει στον οργανισμό μας.

* Το αντιγόνο μπορεί να είναι ένας παθογόνος μικροοργανισμός (βακτήριο, ιός, κ.λπ.) ή μια οποιαδήποτε ξένη ουσία
* Το κάθε αντίσωμα είναι ειδικό για το αντιγόνο που προκάλεσε την παραγωγή του: Ο οργανισμός μπορεί να παράγει αντισώματα εναντίον κάθε αντιγόνου
* Το αντίσωμα αντιδρά με το αντιγόνο και το εξουδετερώνει
* Τα αντισώματα είναι «ιδανικά φάρμακα» (Ehrlich):
Εξουδετερώνουν τις μολύνσεις χωρίς παρενέργειες για τον οργανισμό.

### Μονοκλωνικά Αντισώματα

* Συχνά ως αντιγόνο λειτουργεί μόνο μια περιοχή της ξένης ουσίας, που ονομάζεται **αντιγονικός καθοριστής**
* Ένα μεγάλο αντιγόνο μπορεί να έχει πολλούς αντιγονικούς καθοριστές
* Αντιγόνα με πολλούς αντιγονικούς καθοριστές προκαλούν την παραγωγή πολλών ειδών αντισωμάτων
* Κάθε είδος αντισώματος παράγεται από μια ομάδα ίδιων
β-λεμφοκυττάρων (κλώνος)
* Τα αντισώματα που παράγονται από ένα κλώνο λεμφοκυττάρων λέγονται **μονοκλωνικά**
* Το αντίσωμα αναγνωρίζει και συνδέεται με ειδικό τρόπο με τον αντιγονικό καθοριστή

### Παραγωγή Μονοκλωνικών Αντισωμάτων

* Το πρόβλημα:
* Η εργαστηριακή παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων σε μεγάλες ποσότητες είναι δύσκολη γιατί τα β-λεμφοκύτταρα δεν επιβιώνουν για πολύ έξω από το σώμα και δεν μπορούν να διατηρηθούν σε κυτταροκαλλιέργειες.
* Η λύση:
* Σύντηξη λεμφοκυττάρου με καρκινικό κύτταρο δημιουργεί ένα **υβρίδωμα** που μπορεί να καλλιεργηθεί και να παράγει ένα μονοκλωνικό αντίσωμα.
* Η διαδικασία (αναπτύχθηκε το 1975):
* Το επιλεγμένο αντιγόνο χορηγείται με ένεση σε ποντίκι
* Εξειδίκευση β-λεμφοκυττάρων για παραγωγή αντισωμάτων για το αντιγόνο
* Αφαίρεση του σπλήνα του ποντικιού ύστερα από 2 εβδομάδες
* Απομόνωση β-λεμφοκυττάρων
* Σύντηξη β-λεμφοκυττάρων με καρκινικά (παραγωγή υβριδωμάτων)
* Αποθήκευση υβριδωμάτων στην κατάψυξη (-80°C) για μεγάλο διάστημα
* Απόψυξη και παραγωγή αντισωμάτων σε μεγάλες ποσότητες

### Χρήσεις Μονοκλωνικών Αντισωμάτων

* Διάγνωση
* Λόγω της ικανότητας τους να αναγνωρίζουν ειδικά ένα αντιγονικό καθοριστή, τα αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση:
* Παθογόνων μικροοργανισμών
* Αντιγόνων ομάδων αίματος
* Διαφόρων ορμονών (π.χ. ορμόνες κύησης για τεστ εγκυμοσύνης)
* Της συγκέντρωσης διαφόρων προϊόντων του μεταβολισμού που μπορεί να είναι ενδεικτική κάποιας ασθένειας
* Η ανίχνευση με αντισώματα είναι:
* Γρήγορη
* Απλή
* Ευαίσθητη
* Ακριβής
* Έγκαιρη (δυνατή πριν την εμφάνιση συμπτωμάτων)
* Θεραπεία
* Χρήση ως εξειδικευμένα φάρμακα εναντίων παθογόνων
* Χρήση ως αντικαρκινικά φάρμακα
* Δυνατότητα αναγνώρισης καρκινικών κυττάρων μέσω «καρκινικών αντιγόνων» που δεν υπάρχουν σε φυσιολογικά κύτταρα»
* Σύνδεση αντισωμάτων με αντικαρκινικά φάρμακα επιτρέπει τη χρήση τους ως μεταφορείς που στοχεύουν με μεγάλη ειδικότητα τα καρκινικά κύτταρα.
* «Χειρουργική» ακρίβεια χωρίς χειρουργείο.
* Χημειοθεραπεία χωρίς πολλές από τις παρενέργειες
* Επιλογή συμβατών οργάνων για μεταμόσχευση
* Δυνατότητα παραγωγής μονοκλωνικών αντισωμάτων για ειδικά «αντιγόνα επιφάνειας» των οργάνων, τα οποία διαφέρουν από άτομο σε άτομο.
* Ελέγχοντας εργαστηριακά αν τα όργανα των δωρητών ταιριάζουν ανοσολογικά με τα αντίστοιχα των ασθενών, αποφεύγουμε τις απορρίψεις.

# Γονιδιακή Θεραπεία

## Γενετικές Ασθένειες

* Πάνω από 4000 ασθένειες οφείλονται σε γονιδιακές μεταλλάξεις
* Όλες σχεδόν προκαλούν δυσμορφίες
* Το 80% προκαλούν διανοητική καθυστέρηση
* Πολλές εμφανίζονται σε μεγάλη ηλικία
* Το 20% προκαλούν θάνατο στην παιδική ηλικία
* Οι ασθένειες από γονιδιακές μεταλλάξεις μπορεί να οφείλονται:
* Σε μετάλλαξη ενός μόνο γονιδίου
* Σε αλληλεπίδραση 2 ή περισσότερων γονιδίων
* Σε συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων (ακτινοβολίες, χημικές ουσίες, κ.λπ.)

## Γονιδιακή Θεραπεία

* Η γονιδιακή θεραπεία είναι η διόρθωση των γενετικών βλαβών με ενσωμάτωση του φυσιολογικού αλληλόμορφου σε συγκεκριμένα σωματικά κύτταρα:
* Η επιδιόρθωση δεν είναι κληρονομήσιμη
* Το μεταλλαγμένο γονίδιο δεν αντικαθίσταται.
* Προϋποθέσεις:
* Προσδιορισμός των κυττάρων που επηρεάζονται από τη μετάλλαξη
* Χαρτογράφηση (εντοπισμός θέσης στο χρωμόσωμα) και κλωνοποίηση των αντίστοιχων γονιδίων.
* Η χαρτογράφηση γίνεται με συνδυασμό μεθόδων κλασσικής γενετικής (γενεαλογικά δένδρα) και της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA
* Ως σήμερα έχουν χαρτογραφηθεί και κλωνοποιηθεί τα υπεύθυνα γονίδια για πολλές ασθένειες, όπως:
κυστική ίνωση, χορεία του Huntington, μυϊκή δυστροφία Duchenne.

## Ex Vivo Γονιδιακή Θεραπεία

Στην **ex vivo** γονιδιακή θεραπεία, κύτταρα που επηρεάζονται από την ασθένεια αφαιρούνται από τον οργανισμό, τροποποιούνται **έξω** από αυτόν, και επανα-εισάγονται.

* Η ex vivo μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί μόνο στην περίπτωση ασθενειών που πλήττουν κύτταρα του αίματος (κύτταρα του αιμοποιητικού και ανοσοποιητικού συστήματος), π.χ.:

Αυτοσωμική υπολειπόμενη μετάλλαξη του γονιδίου ADA

* Έλλειψη του ενζύμου απαμινάση της αδενοσίνης
* Πρόβλημα μεταβολισμού πουρινών στα κύτταρα του μυελού των οστών
* Ανεπάρκεια του ανοσοποιητικού συστήματος\*
* Προδιάθεση για καρκίνο σε μικρή ηλικία
* Χρόνιες μολύνσεις
* Θάνατος συνήθως σε ηλικία λίγων μηνών
* Περίπτωση επιβίωσης αγοριού για 9 χρόνια σε πλαστικό θάλαμο

### Ex Vivo Γονιδιακή Θεραπεία της έλλειψης ADA

* Εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1990 σε κορίτσι 4 ετών

**Διαδικασία:**

* Λήψη λεμφοκυττάρων ασθενούς και καλλιέργειά τους (κυτταροκαλλιέργεια)
* Ενσωμάτωση φυσιολογικού γονιδίου ADA σε φορέα (ιός που έχει καταστεί αβλαβής) με τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA
* Εισαγωγή ιού στα λεμφοκύτταρα
* Ένεση γενετικά τροποποιημένων λεμφοκυττάρων στον ασθενή σε τακτικά χρονικά διαστήματα
* Τα ενιέμενα κύτταρα δε ζουν για πάντα
* Ο ασθενείς μπορεί να ζήσει φυσιολογικά με τακτική θεραπεία

## In Vivo Γονιδιακή Θεραπεία

* Στην **in vivo** γονιδιακή θεραπεία, κύτταρα που επηρεάζονται από την ασθένεια, τροποποιούνται **μέσα** στον οργανισμό
* Ο τύπος αυτός γονιδιακής θεραπείας εφαρμόζεται για όλες τις ασθένειες που πλήττουν όργανα που δεν μπορούν να αφαιρεθούν από το σώμα για τροποποίηση
* Τα κύτταρα του προσβεβλημένου ιστού στοχεύονται:
* Με τη βοήθεια «έξυπνων» φορέων, π.χ. ιών (αδενοϊοί, ρετροϊοί) που προσβάλουν μόνο τα κύτταρα-στόχους
* Με απ’ ευθείας ένεση στο όργανο στόχο με τη μορφή λιποσώματος (DNA με περίβλημα λιπιδικής μεμβράνης) ή γυμνού DNA

### In Vivo Γονιδιακή Θεραπεία Κυστικής Ίνωσης

* Η κυστική ίνωση οφείλεται σε υπολειπόμενη αυτοσωμική μετάλλαξη του γονιδίου ενός μεμβρανικού καναλιού Cl- (CFTR).
* Πρόβλημα στη λειτουργία των επιθηλιακών κυττάρων πνευμόνων & άλλων ιστών (παραγωγή ιδιαίτερα παχύρευστης βλέννας)
	+ Πρόβλημα στη λειτουργία των πνευμόνων, παγκρέατος κ.λπ.
	+ Πρόωρος θάνατος
* Διαδικασία γονιδιακής θεραπείας (πρώτη εφαρμογή 1993)
* Ενσωμάτωση φυσιολογικού γονιδίου σε αδενοϊό
* Ψεκασμός του ιού στο αναπνευστικό σύστημα με βρογχοσκόπιο
* Μόλυνση κυττάρων αναπνευστικού συστήματος
* Ενσωμάτωση φυσιολογικού γονιδίου στο DNA των κυττάρων
* Παραγωγή φυσιολογικού καναλιού CFTR

## Ρεαλιστικότητα Γονιδιακής Θεραπείας

* Η επιτυχία των μεθόδων γονιδιακής θεραπείας είναι περιορισμένη:
* Ορισμένες τεχνικές έχουν δείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε πειραματικό επίπεδο (π.χ. θεραπεία ανεπάρκειας ADA), αλλά δεν είναι (ακόμα;) εφαρμόσιμες σε ευρύτερη κλίμακα
* Ορισμένες τεχνικές είναι αναποτελεσματικές, είτε λόγω χαμηλής ενσωμάτωσης του ξένου DNA, είτε λόγω μικρής διάρκειας δράσης (π.χ. θεραπεία κυστικής ίνωσης)
* Ορισμένες τεχνικές έχουν αποδειχτεί επικίνδυνες, κυρίως λόγω προβλημάτων από τη χρήση ιικών φορέων (παρενέργειες, καρκίνος)
* Προοπτικές για το μέλλον:
* Ο προσδιορισμός της θέσης και της αλληλουχίας πολλών γονιδίων υπεύθυνων για γενετικές ασθένειες δίνει ελπίδες για τη μελλοντική γονιδιακή τους θεραπεία
* Η ανάπτυξη νέων, ασφαλέστερων φορέων είναι η πιο άμεση προτεραιότητα

# Το Πρόγραμμα του Ανθρώπινου Γονιδιώματος

* Το ανθρώπινο γονιδίωμα αποτελείται από 3x109 ζεύγη βάσεων (απλοειδές σετ).
* Η χαρτογράφηση και εύρεση της πλήρους αλληλουχίας του ελπίζουμε να μας βοηθήσει στην κατανόηση της δομής και λειτουργίας του ανθρώπου οργανισμού.
* Σημαντικές χρονολογίες:
* **1986**: Δημιουργείται διεθνής συνεργασία για το σκοπό αυτό
* **1990**: Το πρόγραμμα λαμβάνει χρηματοδότηση και ξεκινάει υπό την αιγίδα του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας (NIH) και του Τμήματος Ατομικής Ενέργειας (DoE) των ΗΠΑ, με αναμενόμενη διάρκεια **15** ετών
* **2001**: Ταυτόχρονη δημοσίευση των αποτελεσμάτων και των 2 ομάδων

## Μελλοντικές Εφαρμογές

Η ανάλυση του ανθρώπινου γονιδιώματος ελπίζεται να συμβάλει:

* Στη μελέτη της οργάνωσης και λειτουργίας του. Με την ολοκλήρωση του προγράμματος προσδιορίστηκαν:
* Όλα τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (~40.000 αντί για τα 100.000 συνολικά γονίδια που αναμένονταν)
* Οι ρυθμιστικές περιοχές όλων των γονιδίων
* Διάφορες περιοχές με άγνωστη λειτουργιά
* Στην ανάπτυξη νέων μεθόδων διάγνωσης και θεραπείας
* Με τον προσδιορισμό της θέσης και της αλληλουχίας των γονιδίων που σχετίζονται με διάφορες ασθένειες
* Μελλοντικές Εφαρμογές (συνέχεια)
* Στη μελέτη της εξέλιξης του ανθρώπινου γονιδιώματος
* Σύγκριση του γονιδιώματος με αυτό άλλων οργανισμών, των οποίων η χαρτογράφηση έχει ξεκινήσει ή ήδη ολοκληρωθεί:
* Νεάντερνταλ, χιμπατζής, μακάκος
* Πρόβατο, αγελάδα
* Σκύλος, γάτα
* Έντομα, σκώληκες (π.χ. γαιοσκώληκας)
* Μικροοργανισμοί
* Ρύζι, καλαμπόκι, ντομάτα, πατάτα
* Στη μαζική παραγωγή προϊόντων βιοτεχνολογίας
* Λόγω της απομόνωσης γονιδίων χρήσιμων στην:
* Φαρμακοποιία
* Βιομηχανία
* Γεωργία και κτηνοτροφία