

BİYOTEK İLAÇLARIN BİLİMSSEL VE TEKNOLOJİK ANALİZİ

Farmasötik Biyoteknolojinin Tarihçesi

Biyoteknoloji, bitki ve hayvan türlerini geliştirmek, özel kullanımlara yönelik yeni mikroorganizmalar ve bu organizmaların üretebildiği farklı yapılarla molekülleri elde etmek amacıyla, canlı organizmalar ya da parçalarının kullanıldığı bir teknik olarak tanımlanabilir. Bu tanıma göre biyoteknolojinin tarihini, insanlığın yerleşik düzene geçtiği on bin yıl öncesine kadar götürmek mümkündür. Yabani bitki ve hayvanların evcilleştirilmesi, bunların melezlerinin oluşturulması ile insanın gereksinimlerin uygun yeni türlerin geliştirilmesi, bugünkü genetik olarak değiştirilmiş bitki ve hayvanların geliştirilmesine örnek olan uygulamalardır. Diğer taraftan, bitkisel ve hayvansal ürünlerin (üzüm, süt, et gibi) fermentasyon gibi tekniklerle şarap, yoğurt, peynir veya pastırmaya dönüştürülmesi de biyoteknolojinin ilk örnekleridir.

Yirminci yüzyıl, geleneksel biyoteknolojinin, modern biyoteknolojiye dönüştüğü ve insanlığı için, yepyeni ufukların açıldığı bir yüzyıl oldu. Farmasötik biyoteknoloji açısından en önemli 2 gelişmenin, rekombinant DNA teknolojisi ile hibridoma teknolojisi olduğu söylenebilir. Bu iki teknik sayesinde, insan ve diğer canlı proteinlerinin tedavi, aşılama ve tanıda kullanmak üzere geniş ölçekli olarak üretilmesi mümkün olmuştur.

Ürün geliştirmede biyolojinin kullanımını, 1866'da başlayan Mendel'in bezelye deneylerine kadar götürmek mümkündür. Mendel'in bu gözlemleri, modern genetiğin temellerini oluşturmuştur. Modern biyoteknoloji ile ilgili belgelerde, bu teknolojinin başlama tarihi olarak 1979 kabul edilse de, rekombinant

protein üretiminde bugün kullanılmakta olan fermentasyon teknolojisi ilk kez 1. Dünya Savaşı'nda, mısır şekeri fermentasyonunda ve patlayıcı amaçlı aseton üretmek için kullanılmıştır. Aynı fermentasyon teknolojisi daha sonra, 2. Dünya Savaşı'nda, antibiyotik üretiminde kullanıldı ve böylece yüz binlerce insanın ölümü engellenebildi.

1869'da Friederich Miescher'in DNA'yı izole etmesi, 1928'de Alexander Flemming'in penisilini bulması, 1953'de James Watson, Francis Crick ve Rosalinda Franklin'in DNA'nın yapısını tanımlamaları, 1961'de Marshall Nirenberg ve Gobind Khorana'nın genetik kodu çözmeleri, modern biyoteknoloji endüstrisine geçişte önemli kilometre taşlarını oluşturmuştur. 1970'lerde, hücre bölünmesi ve protein yapısının anlaşılması, DNA kesici enzimleri ve polimerazları da içeren DNA replikasyon enzimlerinin izolasyonu ile başlayan Walter Gilbert'in ilk rekombinant DNA deneyleri, 1975'de ilk hibridomanın yapılması, 1976'da ilk biyotek firması olan Genentech'in kuruluşu, 1982'de tanı amaçlı ilk monoklonal antikorun üretimi, yine aynı yılda insülinin (Humulin®) ilk insan terapötik proteini olarak üretilmesi, bu yoladaki en önemli gelişmeler olmuştur.

Rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen ve günümüzde kullanılan ürünlerin çoğu, protein ya da peptid yapısındadır. Rekombinant DNA teknolojisiyle yeterince saf ve bol miktarda protein üretmenin ilk aşamasını oluşturan araştırma-geliştirme çalışmalarında sırasıyla yapılması gerekenler; (1) üretilen hedeflenen proteini kodlayan genin izolasyonu için en uygun kaynağın seçilmesi, (2) genin klonlanması, (3), hedef proteinin üretimini sağlayan ekspresyon sisteminin inşa edilmesi, (4) protein

ekspresyonunu artırmak için DNA dizisinin optimize edilmesi, (5) eksprese olan rekombinant proteinin fonksiyonel ve moleküler karakterizasyonu olarak özetlenebilir.

Proteini kodlayan gen kaynağının seçimi için, hedef genin DNA ya da RNA olarak en fazla miktarda bulunduğu doku, hücre, bakteri ya da virüsü bilmek gereklidir. Proteinin en fazla bulunduğu dokudan mesajcı RNA'yı izole etmek en uygun yaklaşımdır. Hedef genin klonlanmasında cDNA klonlama, genomik DNA klonlama ve PCR yolu ile klonlama yöntemleri kullanılır. Günümüzde, uzunluğu 2000 baz çiftini aşmayan gen veya cDNA formları PCR yolu ile çok kısa zaman içinde ve ucuz yoldan klonlanabilmektedir. Pankreas dokusunda çokça bulunan insülin örneğinde olduğu gibi, hedef genin mesajcı RNA'sı bolca elde edilebildiği zaman, ters transkriptaz enzimi kullanılarak, bu mRNA'dan cDNA sentezlenebilir ve bu cDNA bir bakteri ekspresyon vektörünün içine yerleştirilebilir. Hedef proteini kodlayan genin dizisi biliniyor, ancak hedef proteinin hangi dokuda çokça bulunduğu bilinmiyorsa, herhangi bir dokuda az miktarda bulunan mRNA, PCR yöntemi kullanılarak, bu amaç için yeterli olabilir.

Hedef gen ürününün klonlanmasından sonraki aşama, genetik dizinin protein ürününe çevrilmesi için prokaryotik (bakteri ya da faj) ya da ökaryotik (maya, böcek ya da memeli hayvan hücresi) konakların seçimidir. Seçilen genin ürünü oluşturacağı konağa sokulması plazmid adı verilen küçük, çembersi DNA parçaları ile olur. Bu konak-plazmid birlikteliği ekspresyon sistemi olarak da bilinir. Prokaryotik ya da ökaryotik ekspresyon sisteminin seçiminde en önemli kriter, elde edilecek olan proteinin hangi ortamdan aktif olarak üretilebileceğidir. Kendisinden biyolojik bir aktiviteyi gerçekleştirmesi beklenen terapötik proteinler, sentez sırasında gerekli üçbölümlü katlanmayı yapabilmeli, sentez sonrasında ise, eğer gerekli ise, glikolizasyon, asilasyon gibi translasyon sonrası modifikasyonlardan geçebilmektedir. Eğer üretilmesi amaçlanan insan proteinini bakterilerde bu özellikleri kazanabiliyorsa, üretim kolaylığı ve maliyeti açısından bakteri ekspresyon sis-

temini seçmek gerekir. Örneğin, insülin ve interferon-alfa gibi basit yapıda olan terapötik proteinler bakterilerde üretilebilmektedir. Ancak, çoğu insan ya da memeli kaynaklı proteinler, glikozilasyon ve benzeri işlemlerden geçtikleri için, bakterilerde üretilemezler. Bu durumda, daha zor ve pahalı olan memeli ekspresyon sistemlerinin kullanılması kaçınılmaz olur. Örneğin, eritropoietinler ve monoklonal antikorlar sadece memeli hücre kültürü ile üretilebilmektedir.

Kullanılan sistemden bağımsız olarak, araştırma aşamasında kullanılan ekspresyon sistemleri preklinal testler için yeterli miktarda protein üretmek için uygun olmayabilir. Bir sonraki aşamada, bazı optimizasyonların yapılması gerekecektir. Bunlar kısaca, yüksek verimlilikte ve kararlı biçimde protein ekspresyonunun sağlanması, konak hücreden hedef proteinin salgılanmasını sağlayacak sinyal peptid ve diğer DNA dizilerinin plazmid vektöre eklenmesi, ve genin proteine çevrilmesini arttırıcı kodon modifikasyonlarıdır. Bir sonraki aşamada, protein pilot üretimine geçilir ve elde edilen ürünün biyokimyasal ve biyofiziksel özellikleri kontrol edilir. Bunun için ELİZA, western blotlama, immunoçöktürme, akım sitometresi ve çeşitli kromatografik yöntemler kullanılmalıdır. Dolayısı ile, terapötik protein üretiminin önemli aşamalarında konuya hakim araştırmacılarla işbirliği yapmak kaçınılmaz olmaktadır.

Araştırma-geliştirme aşamalarından sonraki aşama ise, üretim öncesi (upstream processing) ve sonrası (downstream processing) kısımlarından oluşan üretim işlemlerinin geliştirilmesi aşamasıdır. Rekombinant geni taşıyan konakçı hücre başına ürün miktarını artırmak ve ürünün verimli olarak saflaştırılması, bu aşamanın temel hedeflerini oluşturur. Çünkü, üretimin bu 2 parametresi, pazarlanacak ürünün maliyetini, kar marjını belirleyecek düzeyde etkin olabilir. Kabul edilebilir bir fiyatla verimli ve güvenilir şekilde proteini üretmede anahtar yol üretim için en uygun konak hücrenin seçilmesidir. Tablo 1-1' de, konakçı hücreler olumlu ve olumsuz yönlerine göre karşılaştırılmaktadır.

Tablo 1-1. Terapötik Protein Üretiminde Kullanılan Konakçı Hücre Türleri

Özellikler	Prokaryot (E. Coli)	Ökaryot Maya (S. cerevisiae vb.)	Ökaryot Memeli H. (CHO, BHK vb.)
DNA Büyüklüğü	4.6 Mbç	12.1 Mbç	2000-3000 Mbç
DNA Biçimi	Çembersi	Kromozomlu	Kromozomlu
Protein Glikozilasyonu	Yok	Mümkün, insan ürünlerinden farklı	Mümkün, insan ürünleriyle aynı
Çoğalma Hızı (döngü/saat)	3.33	0.25	0.02
Kültür Yöntemi	Fermentör	Fermentör	Biyoreaktör, döner şişe
Üretim Maliyeti	Düşük	Orta	1.000 \$/g protein

Proteinin aktif olabilmesi için gerekli translasyon sonrası modifikasyonları yapabilen tek sistem yüksek ökaryotlar, yani memeli hücrelerdir. Burada çoğunlukla kullanılan Chinese hamster ovary (CHO) ve baby hamster kidney (BHK) hücreleridir. Prokaryotik hücrelerse (genellikle E. coli), doğal ve immünolojik özelliklerindeki farklılıkların, güvenilirlik ve verimlilik açısından rekombinant proteini etkilemediği durumlarda, ucuz ve kolaylığı dolayısıyla tercih edilen bir yöntem olabilir.

Günümüzde ilaç olarak kullanılan terapötik proteinlerin neredeyse tamamı, ya memeli hayvan hücresinde, ya E. coli'de ya da S. cerevisiae maya türünde üretilmektedir. Ancak, başka sistemler de, terapötik protein üretimi için denenmektedir. Bunlar arasında, transgenik hayvanlar (örneğin) süte salgılama yolu ile) ve transgenik bitkiler verimlilik açısından en vadedici görünenler olmakla beraber, bu tür yöntemlerle üretilen her hangi bir terapötik protein henüz ruhsatlanmamış olması, bu alandaki araş-

tırmaların kullanıma dönüşünün uzun zaman alacağına işaretidir.

Üretim geliştirme (process development) sırasında, üretilmek istenen proteinin mümkün olduğunca en verimli şekilde elde edilebileceği en iyi büyüme ortamının geliştirilmesi hedeflenir. Böylece optimize edilen yöntemin, terapötik proteinin sadece preklinik ve klinik denemeler için değil, uzun yıllar boyunca pazarlanmasına yetecek miktarda üretim verebilmesi hedeflenir. Yine bu aşama, rekombinant hücrelerin üretilmesi, rekombinant proteinin izolasyonu ve saflaştırılması ve üretim öncesi ve sonrası kalite kontrollerinin yapılması için gerekli besiyeri, solüsyonlar, materyal ve metodların geliştirilmesi, sıvı kromatografi yada bioreaktör gibi aletlerin seçilmesini de içerir.

Ürün geliştirme aşamasının sonuna doğru, ürüne talep olduğu müddetçe tekrar tekrar kullanılabilecek, bir Ana Hücre Bankası (Master Cell Bank) oluş-

turulur. Hücre bankasını meydana getiren hücre stokları, yaklaşık 1 milyon rekombinant hücre 1 ml sıvı besiyerinde olacak şekilde, küçük şişe veya ampüllerde sıvı nitrojen tanklarında saklanır. Böylece, gerektiğinde bu bankadan bir şişe çözülür, ve hücreler çok daha fazla miktarda büyüme ortamlarına transfer edilip, "bulk" halinde üretilebilir. Hücreler daha sonra buradan ayrılır, besin ortamına büyürken salgıladıkları proteinler konsantre edilir ve safılaştırmaya tabi tutulur. Bu işlemler sırasında İyi İmalat Uygulamaları (GMP/Good Manufacturing Practices) kurallarına kesinlikle uyulması zorunluluğu vardır. Bu kurallara uyulmadığı saptandığı durumlarda ürünün ruhsatlanması olanaksızlaşır.

Modern biyoteknolojinin tedavi alanında uygulanabilirliği 1980'lerde kesinlik kazanınca, bundan 20 yıl kadar önce, başlangıcında çoğu ABD'de olmak üzere, "start-up" biofarmasötik şirketleri kurulmaya başladı. Bugün sayıları bir kaç yüzle ifade edilen bu şirketlerin çoğu girişimci moleküler biyologlar tarafından kuruldu. Dolayısı ile, bu küçük firmalar, biyotek arenasında kendilerine avantaj sağlayacak akademik ve teknik deneyime sahip olmalarına rağmen, ilaç üretim tecrübelerinin olmaması gibi önemli bir handikap taşımaktaydılar. Diğer taraftan, önde gelen farmasötik şirketleri ise, bu hızla büyüyen çok önemli teknolojinin yüksek potansiyelini önceleri fark edemeyerek modern biyoteknoloji alanına girmekte yavaş davrandılar. Zamanla, bu ikili sorun, küçük biyoteknoloji firmalarının büyük ilaç firmaları ile kurduğu ittifaklar yoluyla aşıldı. Örneğin, Genentech biyoteknoloji firması rekombinant insan insülinini geliştirdi, Eli Lilly bu ilacı Humulin® marka adı ile piyasaya sürdü. Son zamanlarda ise, başarılı küçük biyoteknoloji firmaları, büyük ilaç firmaları tarafından, çok yüksek fiyatlarla satın alınmaktadır.

Modern biyoteknoloji firmalarının başlattığı bu yeni akım, 20 yıl gibi kısa bir sürede 50'den fazla farklı terapötik proteinin hastaların kullanımına sunulmasını sağlamıştır. 1982'de insan insülini'nin E.coli'de üretilmesinden sonra, sayıları her yıl hızla artan bu ilaçlardan Protropin (1985), Intron A (1986-

1992), Alferon N (1989), Activase (1990), Recombinate (1992), Epogen (1993), Procrit (1993), , Orthoclone (1993), Betaseron (1993), Kogenate (1993), Cerezyme (1994), Nutropin (1994), Neupogen (1994) örnek olarak verilebilir. Toplam ilaç türlerinin binlere ulaştığı bir ilaç endüstrisinde, 50 yeni molekülün anlamının sınırlı olabileceği gibi bir kaniye kapılmadan önce, bu 50 kadar ilacın, kısa bir süre içinde yılda 30 milyar dolarlık bir paya sahip olduklarını hatırlamak gerekir. Tablo 1-2'de terapötik proteinler içinde satış rakamları açısından en önde yer alanların bir listesi sunulmaktadır.

Biyotek İlaç Çeşitleri ve Terapötik Proteinler

Biyoteknoloji, geliştirme veya ürüne dönüştürme aşamasında canlı organizmaların kullanıldığı bir teknoloji alanını ifade ettiği için, bugün geleneksel ilaçlar haline gelmiş olan hayvan kaynaklı (androjenler, östrojenler, kortikosteroidler vb.), bitkisel kaynaklı (atropin, morfin, kardiyak glikosidler, aspirin vb.) ve mikrobiyolojik kaynaklı ilaçlar (antibiyotikler vb.) biyoteknolojik ilaçlar kapsamında tanımlanmaktadır. Ancak, günümüzün biyoteknolojisi, yani modern biyoteknoloji, geleneksel biyoteknolojiden farklı bir konumdadır.

Modern biyoteknolojiye dayanan yeni ilaçlar kısaca "biyofarmasötikler" olarak tanımlanabilir. Biyofarmasötikler ise iki ana sınıfta incelenebilir: küçük moleküllerden oluşan "kimyasal ilaçlar" ve daha büyük moleküllerden oluşan "terapötik proteinler". Bu raporun konusu "terapötik proteinler" ile sınırlandırılmıştır, kimyasal ilaçlara (chemical drugs) değinilmeyecektir. Bunun başlıca nedeni, modern bilimlere dayalı kimyasal ilaçların, kısa bir geçmişe sahip olmaları, ayrıca sayılarının az olmasıdır. Diğer önemli bir husus ise, kimyasal ilaçların, geliştirme aşamasında canlılardan elde edilen bilgiler kullanılmış olsa da, üretim teknolojilerinde genellikle biyoteknolojinin kullanılmayışıdır.

Kimyasal ilaç grubundaki ilaçlara örnek olarak, kronik myeloid lösemilerde aktivitesi artmış olan Bcr-

Tablo 1-2. Biyoteknolojik Yöntemlerle Üretilen ve Dünyada En Çok Satılan 12 Terapötik Protein Türü İlaç

İlacın adı	Üretici firma	Geliştirici firma	Kullanım yeri
Epogen	Amgen	Amgen	Anemi
Procrit	Amgen	Ortho Biotech	Anemi
Neupogen	Amgen	Amgen	Nötropeni
Humulin	Genentech	Eli Lilly	Diyabet
Engerix-B	Genentech	SmithKline Beecham	Hepatit B
Intron A	Biogen	Shering-Plough	Bazı lösemisi ve sarkomalar, Hepatit C
Kogenate	Bayer Biological	Bayer Biological	Hemofili A
Genotropin	Genentech	Pharmacia	Büyüme bozukluğu
Avonex	Biogen	Biogen	Multipl skleroz
Betaseron	Chiron/Berlex	Berlex/Schering AG	Multipl skleroz
ReoPro	Centocor	Eli Lilly, Centocor	Kalp iskemik komplikasyonları
Ceredase/Cerezyme	Genzyme	Genzyme	Gaucher's hastalığı

Kaynak: Biotechnology and Biopharmaceuticals (eds. Ho RJY and Gibaldi M), 2003

Abl kinaz enzim inhibitörü imatinib (Glivec®) gösterilebilir. Bazı lösemi ve barsak stroma tümörlerinin tedavisinde kullanılan bu ilacın geliştirilmesi, tamamı ile, Bcr-Abl enziminin kronik myeloid lösemi-deki önemli rolünün belirlenmesi sayesinde müm-

kün olabilmıştır (Goldman JM and Melo JV. N Engl J Med. 2003).

Terapötik proteinler, tanımsal olarak, tedavi amacı ile kullanılan her türlü proteini kapsar. Modern bi-

yoteknoloji ürünü olan terapötik proteinler ise, doğrudan biyolojik kaynaklardan (örneğin insan kanı veya idrarından) saflaştırılmayan, biyoteknolojik bir yöntem kullanılarak üretilen proteinleri tanımlamaktadır. Biz bu raporda terapötik proteinleri, bu ikinci dar anlamında kullanıyoruz.

Terapötik proteinlerin bir çoğu rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak üretilmektedir. Bir önceki kısımda ayrıntılı olarak anlatıldığı gibi, ilaç olarak kullanılması amaçlanan bir insan proteinini, hücre kültürü yöntemi ile memeli hayvan hücrelerinde veya fermentasyon yöntemi ile maya veya bakteriyel hücrelerinde yüksek miktarlarda üretilmekte, daha sonra bu proteinler üretim ortamından saflaştırılmaktadır. Normal hücreler bu tür proteinleri ya hiç sentezlemezler, ya da sentez miktarı çok düşük olduğu için, ilaç olarak kullanılacak miktarda üretime elverişli değildir. Bu nedenle, insan proteinini üreten insan geninin (daha doğru bir deyişle bu genle aynı protein sentezleyebilen cDNA'nın) hayvan, maya veya bakterilere rekombinant DNA teknolojisi yardımı ile aktarılması ve aktarılan genin yüksek miktarlarda aktif protein sentezleyebilmesini sağlamak gerekmektedir. Monoklonal antikor grubunda yer alan terapötik proteinler ise, sadece memeli hayvan hücrelerinde üretilmektedir. Terapötik amaçlı olarak kullanılan monoklonal antikorlar, genellikle, önce antikorun hedefleyeceği antijenin farelere verilmesi, daha sonra farenin lenfosit hücrelerinin hibridoma hücreleri haline getirilmesi ile elde edilmektedir. Bir çok durumda, fare antikoru doğrudan insan için kullanılmamakta, rekombinant DNA teknolojisi yardımı ile, fare antikoru kodlayan genlerde bazı değişiklikler yapılmakta, böylece sentezlenen antikoru insaninkine benzer hale getirilmesi (humanization) sağlanmaktadır. İster rekombinant ister monoklonal antikor türünde olsun, konak hücrelerin ürettiği etken maddenin, ilaç olarak kullanılabilmesi için bir kaç kromatografi yöntemiyle aşamalı olarak saflaştırılması gerekir.

Aşağıda başlıca terapötik proteinlerle ilgili bilgiler sunulmuştur.

Eritropoietin [EPO]

Eritropoietin (EPO) kırmızı kan hücrelerinin üretimini artıran bir hematopoetik büyüme faktörüdür. Kemik iliğindeki kırmızı kan hücresi oluşturmak üzere programlanmış olan öncül hücrelerin çoğalmasında, farklılaşarak özelleşmesinde ve bu hücrelerde kanda oksijeni taşıyan hemoglobin sentez hızının artmasında başlıca rolü oynayan EPO'nun % 90'ını böbrek üretir. EPO kodlayıcı gen insan 7. kromozomu üzerinde tek kopyası olan, 4 intron ve 5 eksondan oluşan bir gendir. Bu genin sentezlediği protein 166 aminoasit uzunluğunda, 36kD moleküler ağırlığa sahip bir glikoproteindir. Yüzde 40'ı karbonhidrat olan EPO'nun, O-bağlantılı karbonhidrat kısmı biyolojik aktivitesini etkilemektedir. EPO ilk kez 1971'de anemik koyunların plazmalarından ve sonralarda anemili hastalardan toplanan yaklaşık 2500 litre idrardan saflaştırılmıştır. Doğal kaynaklardan elde edilen bu saflaştırmaların geniş kapsamlı ihtiyacı karşılamada hiç de pratik olmaması, EPO'nun rekombinant DNA teknolojisinin uygulamalarında ilklerinden biri olmasını sağlamıştır. İnsan EPO geni 1985'de genomik DNA'dan izole edilmiş, kısa sürede klonlanarak CHO memeli hücrelerinde üretilmiştir. EPO ilaç olarak, ilk kez 1989'da, kronik böbrek yetmezliğine bağlı anemi tedavisinde kullanılmaya başlandı. Böbreğin yeterince endojen EPO üretememesinden kaynaklanan bu anemide, EPO ruhsatlanmadan önce, hastalığın tek tedavi yöntemi kan transfüzyonu idi. Kan transfüzyonu, yeterli donör olmamasının yanında, bu hastalarda zaman için hepatit gibi diğer tehlikeli hastalıkların gelişmesine neden olmuştur. Günümüzde, bu çok riskli yöneme karşılık, bu tür riskleri taşımayan EPO'nun kullanımı yaygınlaşmış durumdadır. EPO yıllar içinde, böbrek yetmezliğinin dışında, dializ sırasında, eklem romatizmasında, kanser hastalarında kullanılan kemoterapi sonrasında, AIDS ve diğer enfeksiyonlarda ve kemik iliği transplantasyonu sonrası oluşan aneminin tedavisinde de, sıklıkla kullanılmaya başlanmış, böylece geniş bir kullanım potansiyeli kazanmıştır.

Son yıllarda başlangıçta üretilen Epogen'e alternatif olarak, Aranesp gibi, yarılanma ömrü 3 kat daha faz-

la olması nedeniyle doktor ve hastaya kullanım kolaylığı sağlayan rekombinant eritropoietinler piyasaya sunulmuştur.

İnsülin

İnsülin diyabette kullanılan en eski tedavi şeklidir ve vücutları kendiliğinden insülin üretemeyen Tip I diyabet hastaları için gereklidir. Birçok Tip II diyabet hastasına da insülin kullanımı, biguanid ya da sulfonilüre tedavisine bütünleştirici olarak tavsiye edilmesi pazarın genişlemesine neden olmaktadır. Günlük insülin kullanımının çok rahat olmaması nedeniyle, özellikle Pfizer firmasının ürettiği deri altına yerleştirilen uzun süreli ilaç salınım sistemleri, piyasaya hakim diğer iki firmanın (Nordisk ve Eli Lilly) rekabetine rağmen hızla kullanımı alanı bulmaktadır. İnsülin üreten pankreas beta hücrelerinin transplantasyonu da, alternatif bir yöntem olarak ABD'de bazı merkezlerde denetlenmektedir. 1921 yılında ilk kez "antidiyabetik faktör" olarak tanımlanan insülinin tüm aminoasit dizisi, ancak 1951 yılında belirlenebilmiştir. İnsülin, son hali dimerik yapıya sahip olmasına rağmen, preproinsülin adında tek zincirli bir polipeptit öncül molekül olarak sentezlenir. 108 amino asit içeren bu polipeptit önce endoplazmik retikulumla sonra golgi cihazına geçip, oradan da 'non-coated secretory vesicle/kaplanmamış salgılayıcı veziküller' olarak pankreasın beta hücrelerinde depolanır. Kandaki glukoz oranı arttığında, ya da diğer uygun sinyaller geldiğinde bu veziküller hücre zarıyla füzyon yaparak, ekzositoz yolu ile hücre dışına, yani kana geçerler. Proinsülin coated secretory granuleler içerisinde, aktif insülin ve 34 amino asitlik bağlantı C peptidini oluşturmak üzere proteaz enzimlerince işlenir. Aktif İnsülin disülfat bağları ile bağlı iki polipeptit zincirinden oluşur. A zinciri 21 aminoasitten, daha geniş olan B zinciri 30 aminoasit uzunluğundadır. Aminoasit dizilerinde farklılıklar olmasına karşın, çeşitli türlerin ürettiği insülinler bu basit yapıya sahiptir. Domuz insülini (5777Da) insan insülininden (5807Da) yalnızca bir, sığır insülininden ise (5733Da) üç aminoasit farklıdır. Çeşitli türler arasında insülin bu kadar benzerlik göstermesine rağmen, proinsülin olduk-

ça farklıdır. Bu nedenle, tedavi amaçlı kullanılan ve hayvanlardan elde edilen insülin preparatlarındaki muhtemel proinsülin kontaminasyonundan dolayı, insanlarda alerji ve bağışık yanıtta direnç mekanizmaları oluşmaktadır. Dolayısıyla bu tür hayvan insülinleri zamanla hasta için kullanılamaz hale gelmektedir. Bu sorunları çözmek amacıyla, 1970'lerde bazı kimyasal ve enzimatik yöntemlerle domuz insülini insan insüline benzer yapıya çevirebildiyse de, bu pahalı, uzun ve zor bir takım işlemler gerektiriyordu. Diğer taraftan, dünyada 60 milyon üzerinde diyabetlinin olması, bu sayının her yıl ortalama %1-2 oranında artış göstermesi, ve bir domuzdan elde dlebilecek insülinin bir hastanın sadece 3 günlük insülin ihtiyacını karşılayabilmesi, bu tür ürünlerin zaman içerisinde ihtiyacı karşılamada yetersiz hale gelmesine yol açmıştır. Bu sorunu gidermek amacıyla, Genentech araştırmacıları ilk uygulamalarında insülin A ve B zincirlerini kodlayan nükleotit dizilerini, ayrı ayrı iki farklı E. coli hücresinde klonlayıp, iki zinciri farklı fermentörlerde üretilip saflaştırdılar. Sonra bu A ve B zincirleri uygun okside edici ortamlarda tutularak, aralarında sülfat bağlarının oluşması sağlandı. Eli Lilly araştırmacıları ise, farklı metodlarında, rekombinant E.coli'de insan proinsülinini kodlayan nükleotit dizisini klonlayıp, eksprese olan proinsülini saflaştırdıktan sonra, C peptidinin proteolitik olarak in vitro ayrılmasını sağladılar. Bu yöntem, tek fermentör kullanıma avantajından dolayı, zamanla tercih edildi. Yine bu yöntemde, son aşamada E.coli' den gelecek impuritelere temizleyecek HPLC kolonlarının geliştirilmesi ile % 99 saflıkta insan insülini elde edilebildi.

İnterferon Alfa ve Beta

İnterferonlar antiviral ve bağışıklık sistemini düzenleyici özelliği olan sitokinlerdir. Bunlar, virüs enfeksiyonlarında hücrel yanıtın oluşmasını, bağışıklık yanıtın çoğu aşamasının kontrolü, birçok hücre tipinin farklılaşması ve çoğalmasının regülasyonu gibi biyolojik etkilere sahiptir. Biyolojik aktivite göstermek için bağlandıkları reseptör çeşidi ve sentezlendikleri hücre tipine göre 3 ana sınıfa ayrılırlar, lökositlerin ürettiği interferon alfa (IFN- α), fibroblastla-

rın ürettiği interferon beta (IFN- β), ve natural killer hücrelerin ürettiği interferon gamma (IFN- γ). Interferon alfa ve beta, hücre yüzeyindeki aynı reseptöre bağlandıkları için Tip I interferon sınıfı olarak da bilinir. Interferon gama ise, tek başına farklı bir yüzey reseptörüne bağlanarak aktivite gösterdiği için Tip II interferonu olarak bilinir. Ve bu interferonun antiviral aktivitesi daha düşük olduğundan bağışıklık sistemi düzenleyici özelliği farklıdır. Daha çok makrofaj aktivasyonu sağlar. Genel olarak, interferonlar, virüs, bakteri, parazit vb. enfeksiyonlara karşı bağışıklık yanıtı hızlandırıcısı olarak, bazı otoimmün hastalıkların ve kanserin tedavisinde kullanılmaktadır. Tablo 1-3'de halen tedavi amaçlı kullanılan insan interferon çeşitleri gösterilmiştir.

İnterferon, ilk kez 1950'lerde kandan izole edilerek tedaviye yönelik olarak kullanılmak istendi. Fakat bu yöntem, interferon eser miktarda üretildiği için yeterli olmadı. Zamanla, geniş çaplı üretimler için, interferon alfa'yı bolca üreten bazı kanser hücre hatları kullanılmaya başlandı. Fakat bu yolla elde edilen interferon en az 8 çeşit alt grup içeriyordu, yani spesifik değildi. 1980'lerde interferonlar farklı

sistemlerde klonlanıp eksprese edilmeye başlandı. Tedaviye yönelik kullanımlar içinse, bakteri ekspresyon sistemi tercih edildi. Bu yolla elde edilen interferonlar, doğal hallerindeki aynı aktiviteyi gösterdiler. Son yıllarda araştırmacılar, Intron-A ve Roferon örneğinde olduğu gibi, E.coli'de üretilen proteine polietilen glikol (PEG) denilen bir yapı eklenerek, tedavide kullanılan interferonun aktivitesini değiştirmeden daha uzun sürede emilimini yani hasta açısından daha rahat kullanımını sağladılar.

Kan Faktörleri

Kan Pıhtılaşma Faktörleri

Hemostasis, damarın yapalandığı kısımlarda, kan pıhtı oluşumun sağlayan bir dizi işlemler bütünüdür. Buradaki en önemli pıhtılaşma faktör kompleksi, proteaz yapısında faktör IX, aktif olan faktör VII-I, kalsiyum, kofaktör olan fosfolipidler ve substrat olan faktör X'u içerir. Faktör VIII, 2351 aminoasitlik tek bir polipeptit zinciri olarak sentezlenir. Sentezden hemen sonra, 19 aminoasitlik sinyal peptidi, bir proteaz tarafından kesilir. Böylece plazmada dolaşan heterodimer yapıdaki faktör VIII oluşur. Bu ya-

Tablo 1-3. Tedavide Kullanılan İnterferon Çeşitleri

İnterferon Çeşidi	Marka adı	Kullanım alanı
IFN-2b	Intron-A (Schering)	Melanoma, Hepatit C, Tüylü hücre lösemisi, Kronik myeloid lösemi, Deri tipi T-hücre lenfoması
IFN-2a	Roferon-A (Roche)	Kronik Hepatit C
IFN-1a	Avonex (biogen); Rebif (Serono)	Multipl skleroz
IFN-1b	Betaseron (Berlex)	Multipl skleroz
IFN- γ 1b	Actimmune (InterMune Lab)	Ciddi osteopetroz malignanslı hastalarda
IFN-con-1	Infergen (Amgen)	Kronik Hepatit C

pının da aktif hale geçebilmesi için trombin yada faktör Xa ile kesilmesi gerekmektedir.

Hemofili, sıklıkla ailesel yolla geçer, halk arasında kanama hastalığı olarak bilinir. Bu hastalık, pıhtılaşma faktörlerindeki anormallikler ile oluşur. Hemofili A faktör VII ve hemofili B faktör IX'ın bu hastalarda eksik olmasından kaynaklanır. 1970- 1980 arasında, hemofili hastalarına özellikle akut kanamalarda koruyucu olarak insan plazmasından saflaştırılarak konsantre edilen pıhtılaşma faktörleri verildi. Ama bunun yıllar içerisinde HCV ve HIV gibi çok ciddi virüs kontaminasyonlarına neden olduğu anlaşıldı. 1984'de faktör VIII'in nükleotit sekansının belirlenmesi üzerine tedaviye yönelik rekombinant faktör VIII üretimine başlandı. Burada çoğunlukla CHO (BeneFix gibi) ya da BKC (Novoseven gibi) hücrelerinde üretilen faktör VIII'i daha stabil hale getirmek için, plazmadan hazırlanan albümin kullanıldı. Albumin nedeniyle, bu ürünler hala virüs kontaminasyon riski taşımakla birlikte, ürünün konsantre olmamasına neden oluyordu. 2000 yılından sonra ise, Refacto ile birlikte, CHO hücreleri kullanılarak, albuminsiz rekombinant faktör VIII üretilmeye başlandı. Buna alternatif olarak üretilen KogenateFS'de ise yeni bir sistemle, son üründe albümin miktarının bin kere azaldı. Böylece, yüksek konsantrasyonda, dolayısı ile kısa sürede etkili ilaçlar oluşturuldu. Günümüzde transkaryotik terapiler (TKT) de olarak da bilinen, gen tedavi yöntemlerinin hemofili A'nın tedavisinde kullanılmaya çalışıldığı bilinmektedir. Klinik aşamada olan bu çalışmaların rekombinant protein kullanımına alternatif olması için çok zaman gerekmektedir. Bunun yanı sıra halen firmalar Avigen örneğinde olduğu gibi, çok yeni geliştirilen virüs vektörleri (AAV) ile, karaciğere yerleştirilebilen ve burada stabil olarak üretilen rekombinant pıhtılaşma faktörleri üreterek klinik denemeler yapmaya başlamışlardır.

Plazminojen Aktivatörü

Plazminojen aktivatörleri, kalp krizi ve beyin kanaması da içeren çeşitli trombotik hastalıklar için önemli enzimlerdir. Bunlar rekombinant enzimlerin

en geniş sınıfını oluşturur ve normalde hastanın kan dolaşımında bulunan miktarı gerektiğinde çoğalmak suretiyle tedavi amaçlı kullanılırlar. Trombotik hastalıkların iyileştirilmesinde enzimlerden dışında, protein olmayan kompetitörlerin kullanıldığı çeşitli tedaviler de uygulanmaktadır. Örneğin; warfarin ve heparin, plazminojen aktivatörünün de yapacağı gibi, kanı seyrelterek pıhtılaşmayı ve dolayısıyla tıkanmayı önler. Bu alternatifler rekombinant yolla üretilcek enzimlere göre çok daha ucuz olmasına rağmen, etkileme hızları ve kullanım alanları daha sınırlıdır. Streptokinaz, Aktivaz, TNKaz, Astilaz,.. ve benzeri birçok enzim günümüzde tedavi amaçlı kullanılmaktadır.

Koloni Uyarıcı Faktörler

Koloni uyarıcı faktörler (colony-stimulating factors), kemik iliği hücresinden kırmızı ve beyaz kan hücreleri ile trombositlerin oluşumunu indükleyen glikoproteinlerdir. Bunlar, kırmızı kan hücrelerinin düşüklüğü (anemi), beyaz kan hücrelerinin düşüklüğü (nötropeni) ve trombosit seviyesinin düşüklüğü (sitopeni) durumlarında kullanılır.

İnterlökinler

İnterlökinler (IL), peptid yapısında normal koşullarda devamlı olarak üretilmeyen sitokinlerdir. Fibroblast, endotel hücreleri, lökosit, lenfosit ve makrofajların aktivasyonu sırasında sentezlenirler. Bugüne kadar 20 çeşit interlökin tanımlanmıştır. Bunlar bağışıklık ve enflamasyon reaksiyonlarını regule ederler ve bu sistemlerde hücre tamiri, hücre farklılaşmaları ve çoğalmalarında rol oynarlar. Proleukin (IL2), İmunace (IL2), Proleukin (IL2) HIV enfekte ve kronik myeloid lösemi hastalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Wyeth firmasının ürettiği, hem interlökin hem koloni stimülasyon faktörü işlevlerini yapacak olan Neumega, klinik deneme aşamasında olan bir rekombinant ilaçtır.

Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanarak, hücrenin çoğalmasını ve

farklaşmasını sağlar. Bunlar, çok düşük miktarda oldukları halde, insan dokusunun tamiri ve büyümesinde önemli role sahiptir. Tablo 1-4'de bazı büyüme faktörleri ve işlevleri bulunmaktadır.

Monoklonal Antikorlar

Monoklonal antikorlar, terapötik proteinler içinde özel bir grubu oluşturmaktadırlar. Antikorlar bağışıklık sisteminin bir parçası olarak B-lenfositleri tarafından üretilen immüno globulinlerdir. Antikorlar

özel bir hedefe (antijene) karşı yönelmiş ve hedef proteine kilitlenerek, onu etkisiz hale getirebilen özelliğe sahip moleküllerdir. Monoklonal antikorlar, bir tek B-hücre klonu tarafından üretilen homojen yapıda antikorlardır. Tedavide kullanılan monoklonal antikorlar genellikle farede geliştirilen antikorlardır. Bunun nedeni, fare antikorlarını üreten fare lenfositlerinin, fare plasmositoması olarak adlandırılan hücre dizileri ile füzyona tabi tutulabilmesi, böylece elde edilen hibridoma hücrelerinin, tek bir monoklonal antikorlu bol miktarda ve sürekli olarak

Tablo 1-4. Büyüme Faktörleri

Sınıfı	İşlevi
Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF)	Hepatosit, böbrek tübuler epitel hücrelerinde, epidermal keratinositlerde ve melanositlerde bölünmeyi indükleyici
Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)	Birçok hücre tipinde mitojen
Eritropoietin	Öncül kırmızı kan hücrelerinin olgunlaşması ve çoğalması
Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)	Mesodermal ve nöroektoderm hücre indükleyicisi; gelişim sırasında da rol oynar
İnstitin benzeri Büyüme Faktörü (IGF)	Kemik kırıklarında önemli olan bağ doku ve yağ hücrelerini çoğaltıcı
İnterlökinler	Beyaz kan hücrelerinin çoğalması, farklılaşması ve aktivasyonu indükleyici
Nöron Büyüme Faktörü (NGF)	Nöronları ölümünden koruyucu ve bir dokuya bağlanmasını sağlayıcı
'Platelet-Derived Growth Factor' (PDGF)	Doku tamirini indükleyici ve fibroblast ve beyaz kan hücreleri için kemotaktik madde
'Transforming Growth Factor' (TGF)	Mikrovasküler endotel hücrelerinin büyümesini indükleyici
Vasküler endotel Büyüme Faktörü (VEGF)	PDGF ailesindendir; vasküler endotelin spesifik indükleyicisi

üretebilmeleridir. Bu şekilde üretilen fare monoklonal antikorları klinik denemelerde hedef moleküllere yeterli etkiyi gösterebilmiş, ancak tedaviye tabi olan hastalar bu fare proteinlerine karşı bağışıklık geliştirdiklerinden kullanımları sınırlı kalmıştır. Bu sorun, fare monoklonal antikorlarının "insanlaştırılmaları" ile giderilebilmiştir. İnsanlaştırılmış (humanized) monoklonal antikorların elde edilmesinde rekombinant DNA teknolojisi kullanılmaktadır. Bu amaçla, önce fare antikorunu kodlayan gen dizileri belirlenmekte, daha sonra bu dizilerde yer alan fare DNA'ları insan immüoglobulin DNA'ları ile değiştirilmektedir. Böylece elde edilen rekombinant monoklonal antikorlar, sadece hedef moleküllü tanıyan kısımları itibarı ile fare kaynaklı olmakta, moleküllerin diğer parçaları insan türünden olmaktadır. Bu şekilde değiştirilmiş olan antikorlar hastalarda daha az bağışıklık uyarısı yaptıklarından, sürekli kullanımı mümkün olmaktadır. Halen kullanımda olan çok miktarda monoklonal antikor ilacı vardır ve bunların sayısının hızla artması beklenmektedir. Özellikle, kanser hücrelerinin yüzeylerinde bolca bulunan antijenlere yönlendirilmiş olan monoklonal antikorların sayısının hızla artacağı tahmin edilmektedir. Halen, bazı meme kanserlerinin tedavisinde kullanılan Herceptin® ile dikkatleri üzerinde toplayan monoklonal antikorlar çeşit olarak artacakları için, terapötik ilaç arenasında önemli bir yer tutacaklardır. Ancak, tek tek bakıldığında, bu tür ilaçların kullanımının, örneğin eritropoetine kıyasla sınırlı kalması beklenir.

Dünyada Halen Kullanımda Olan Ruhsatlandırılmış Terapötik Proteinler

Gelişmiş Ülkeler

Bu ülkelerde kullanıma sunulan terapötik proteinler inovatif ilaçlar olarak ilacı geliştiren firmalarca veya bu tür firmalardan lisans sahibi olan yerel firmalarca üretilip kullanıma sunulmaktadır.

ABD terapötik proteinlerin geliştirilmesi ve kullanımı konularında ilk uygulamaların başladığı ülkedir. Bu nedenle, ABD'de kullanılan ruhsatlandırılmış te-

rapötik proteinler sayıca en yüksektir. 2003 verilerine göre, bu ülkede 1980-2002 arasında toplam 50 farklı protein değişik yapı ve formülasyonlarda ruhsatlandırılmıştır. Bunlardan 40 adedi, rekombinant DNA teknolojisi ile üretilenler, 10 adedi ise, monoklonal antikor türü ilaçlardır (Reichert JM. Nat. Rev. Drug. Discov. 2003). Bu raporda sözü edilen terapötik proteinlerin neredeyse tamamı ilk önce ABD'de ruhsatlandırılmış, daha sonra diğer ülkelerde ruhsatlandırma işlemleri meydana gelmiştir. AB ülkelerinde, 2003 yılına kadar 88 biyoteknoloji ürünü (aynı proteinin farklı formları dahil olmak üzere) ilaç ruhsatlandırılmıştır. Bu rakam, 1995'de yürürlüğe giren AB merkezi ruhsatlandırma sistemi yolu ile verilen toplam ilaç ruhsatlarının % 38'lik gibi yüksek bir oranını temsil etmektedir (G. Walsh. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2003).

AB merkezi ruhsatlandırma sisteminde, ilaç ruhsat başvurularının koordinasyonu ve yöntemi, 1995'ten bu yana, EMEA (European Medicines Evaluation Agency/Avrupa İlaç Değerlendirme Ajansı) tarafından gerçekleştirilmektedir. EMEA kapsamında AB ülkelerinde 1995-2002 döneminde ruhsatlandırılmış olan 56 yeni terapötik proteinin listesi Tablo 1-5'de gösterilmiştir. Ruhsatlandırılan ürünlerin başında hormon ve sitokinler yer almaktadır. Diğer önemli bir grubu ise rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen kan ürünleri (çoğunlukla koagülasyon faktörleri) teşkil etmektedir.

ABD verilerine göre, halen 300'den fazla terapötik protein geliştirme aşamasındadır. Buna göre, AB ülkelerinde, önümüzdeki on yıl içinde her yıl bir düzine yeni terapötik proteinin ruhsatlandırılması beklenmektedir (G. Walsh. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2003). Bu ilaçlar içinde, özellikle kanser alanında yoğunlaşan monoklonal antikorlar önemli bir yer tutacaktır.

Tablo 1-5'de gösterildiği gibi, yeni ruhsatlandırılan ilaçlar başlıca 3 farklı sistem kullanılarak üretilmektedir. Bunlar içinde, memeli hayvan hücre kültürü 28 ilaçla en yaygın yöntem olarak öne çıkmakta, bu-

nu 19 ilaçla bakteri (*E.Coli*) fermentasyonu izlemektedir. Maya (*S.cerevisiae*) fermentasyonu 6 ürünle sonuncu sırada yer almaktadır. Halen ruhsatlı ilaç kapsamına girmeyen, transgenik hayvanla üretim sistemi (hayvan sütü) önümüzdeki yıllarda yeni bir alternatif üretim teknolojisi haline gelebilir. Halen bu yöntemle üretilen bazı rekombinant proteinler (antitripsin, rekombinant antikorlar vb.) klinik denemelerde kullanılmaktadır (G.Walsh. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2003). Bu denemeler olumlu sonuçlar verdiği ve hayvandan insana geçebilen enfeksiyon riskleri kontrol edilebildiği takdirde, transgenik hayvanlarda üretilen terapötik proteinler önümüzdeki on yıl içinde kullanım alanına girebilir. Daha uzun vadede ise, bitkilerde üretilen terapötik proteinlerin kullanımı söz konusu olabilir.

Halen kullanılmakta olan terapötik proteinler parenteral yolla verilmektedir.

İnsülin gibi sık kullanım gerektiren bazı ürünlerin ağız ya da burun yolu ile alınması daha pratik olabilir. Bu amaçla gerçekleştirilen araştırmaların, özellikle burun yolu ile alınabilecek preparatlarda (örneğin insülin) başarılı olabileceği tahmin edilmektedir.

ABD ve AB gibi gelişmiş ülkelerde jenerik terapötik proteinlerin kullanımı henüz söz konusu değildir. Bu konuda tek ciddi engel olarak yasal düzenlemelerin olmayışı görülmektedir (Datamonitor, *Therapeutic Proteins*, 2002). Jenerik terapötik proteinler hakkındaki yasal düzenlemelerin 2006 yılında gerçekleşmesi beklenmektedir. Bu konuda gelişmiş ülkelerde henüz bir gelişmenin olmamasının diğer bir nedeni ise, bir çok terapötik proteinin patent koruma sürelerinin henüz dolmamış olmasıdır. Halen ABD, Kanada, İngiltere, Almanya ve İsrail gibi gelişmiş ülkelerde 10 kadar yerleşik jenerik ürün firması, eritropoetin, insülin, koloni stimulant faktörler, büyüme hormonu, interferon gibi ilaçların jenerik formlarını geliştirme çalışmaları içindedir (ABN-Amro, *Generic Biologics: next frontier*, 2001; Datamonitor, *Therapeutic proteins*, 2002). Bu fir-

malarından bazıları, patent koruması olmayan bazı Asya ve Latin Amerika ülkelerinde yerleşik diğer firmalarla ortak yatırım girişimleri içindedir. Bu tür firmaların, öncelikle, Asya, Güney Amerika, Afrika, Orta-Doğu ve Doğu Avrupa'da yer alan gelişmekte olan ülkelerin pazarlarına, daha sonraki aşamalarda ise sırası ile, AB, Kanada, ve ABD pazarlarına girmeleri söz konusu olabilir (Datamonitor, *Therapeutic proteins*, 2002). Diğer muhtemel bir gelişme ise, uluslararası ilaç firmalarının rakip firmaların patent süresi dolmuş ilaçlarını üretmeye başlamaları olabilir. Ekonomik yönü ağır basan bu tür gelişmeler bir sonraki bölümde ayrıntılı olarak tartışılacaktır. Burada altını çizmek istediğimiz nokta, 2005-2006 yıllarından sonra AB ülkelerinde jenerik terapötik proteinlerin ruhsatlandırılmasının söz konusu olabileceğidir.

Tablo 1-5. AB Ülkelerinde Merkezi Sistemle Ruhsatlandırmış Olan Terapötik Proteinler

Ürün (tanımı, üretim sistemi)	Ruhsat Sahibi	Endikasyon (ilk ruhsat tarihi)
Rekombinant kan faktörü ve benzerleri		
Benefix (rhFactor IX, CHO)	Genetics Institute	Hemofili B (1997)
Kogenate (rhFactor VIII, BHK)	Bayer	Hemofili A (2000)
Helixate NexGen (octocog alfa; rhFactor VIII BHK)	Bayer	Hemofili A (2000)
NovoSeven (rhFactor VIIa, BHK)	Novo-Nordisk	Bazı hemofili formları (1995)
ReFacto (morotocog-alfa, FVIII, CHO)	Genetics Institute	Hemofili A (1999)
Ecokinase (reteplase, rTPA, E. coli)	Galenus Mannheim	Akut miyokard enfarktüsü (1996)
Rapilysin (reteplase, rTPA)	Boehringer Mannheim	Akut miyokard enfarktüsü (1996)
Tenecteplase; Metalyse (TNK-rTPA, CHO)	Boehringer Ingelheim	Miyokard infarktüsü (2001)
Refludan (hirudin, S. cerevisiae)	Behringwerke AG	Heparine bağlı trombositopeni (1997)
Xigris (drotrecogin-a, insan hücre)	Eli Lilly	Ağır sepsis (2002)
Rekombinant Hormonlar		
Humalog (İnsülin lispro, E. coli)	Eli Lilly	Diabetes Mellitus (1996)
Insuman (rh-Insulin, E. coli)	Hoechst AG	Diabetes Mellitus (1997)
Liprolog (Bio Lysprol, analog, E. coli)	Eli Lilly	Diabetes Mellitus (1997)
NovoRapid (İnsülin Aspart, analog)	Novo Nordisk	Diabetes Mellitus (1999)
Novomix 30 (İnsülin Aspart, analog)	Novo Nordisk	Diabetes Mellitus (2000)
Actrapid/Velosulin/Monotard/ Insulatard/Protaphane/Mixtard/ Actraphane/Ultratard (Insulin, S. cerevisiae)	Novo Nordisk	Diabetes Mellitus (2002)
Lantus (İnsülin glargine, analog, E. coli)	Aventis Pharm.	Diabetes Mellitus (2000)
Optisulin (İnsülin glargine, E. coli)	Aventis Pharma	Diabetes Mellitus (2000)
Glucagen (rhGlucagon, S. cerevisiae)	Novo Nordisk	Hipoglisemi
Thyrogen (thyrotrophin-a, CHO)	Genzyme	Tiroid kanseri (2000)
Nutropin AQ (rhGH, E. coli)	Schwartz Pharma AG	Büyüme sorunu, Turners S. (2001)
Gonal F (rhFSH, CHO)	Serono	Anovulasyon, superovulas (1995)
Puregon (rhFSH, CHO)	N.V. Organon	Anovulasyon, superovulas (1996)
Luveris (lutropin alfa; rhLH, CHO)	Ares-Serono	Bazı infertilite formları (2000)
Ovitrelle; Ovidrelle (rhCG CHO)	Serono	Bazı yumurtlama teknikleri (2001)
Forcaltonin (r Salmon calcitonin, E. coli)	Unigene	Paget's hastalığı (1999)
Sitokinler		
Neorecormon (rhEPO, CHO cells)	Boehringer-Mannheim	Anaemi (1997)
Aranesp (darbepoetin alfa; EPO analog, CHO)	Amgen	Anaemi (2001)
Nespo (darbepoetin alfa; rEPO analog, CHO)	Dompe Biotec	Anaemi (2001)
Neulasta; Neupogeg (pegfilgrastim)	Amgen	Nötropeni (2002)

Tablo 1-5. AB Ülkelerinde Merkezi Sistemle Ruhsatlandırmış Olan Terapötik Proteinler

Ürün (tanımı, üretim sistemi)	Ruhsat Sahibi	Endikasyon (ilk ruhsat tarihi)
Intron A (rIFN-a-2b, E. coli)	Schering Plough	Kanser, jenital siğiller, Hepatit (2000)
PegIntron A (PEGylated rIFN-a-2b, E. coli)	Schering Plough	Kronik Hepatit C (2000)
Viraféron (rIFN-a-2b, E. coli)	Schering Plough	Kronik Hepatit B & C (2000)
ViraféronPeg (PEGylated rIFN-a-2b, E. coli)	Schering Plough	Kronik Hepatit C (2000)
Betaferon (rIFN-b-1b, analog E. coli)	Schering AG	Multipl skleroz (1995)
Avonex (rhIFN-b-1a, CHO)	Biogen	Multipl Skleroz (1997)
Infergen (rIFN-a, E. coli)	Yamanouchi Europe	Kronik Hepatit C (1999)
Rebif (rh IFN-b-1a, CHO)	Ares Serono	Multipl Skleroz (1998)
Alfatronol (rhIFN-a-2b, E. coli)	Schering Plough	Hepatit B, C, kanser (2000)
Virtron (rhIFN-a-2b, E. coli)	Schering Plough	Hepatit B & C (2000)
Beromun (rhTNF-a, E. coli)	Boehringer-Ingelheim	Tümör cerrahisi sonrası amputasyona karşı (1999)
Revasc (antikoagulant; hirudin, S. cerevisiae)	Ciba Novartis Europharm	Venöz tromboza karşı (1997)
Enbrel (rTNFR-IgG fuzyon, CHO)	Wyeth Europa	Rhوماتoid artrit (2000)
Regranex (rhPDGF, S. cerevisiae)	Janssen-Cilag	Diyabetic neuropatik ulser (1999)
Monoklonal antikorlar		
Zenapax (Dacizumab, anti-IL-2 reseptör)	Hoffman La Roche	Akut böbrek transplant rejeksiyonu (1999)
Simulect (Basiliximab, anti-IL-2 reseptör)	Novartis	Allojenik böbrek transplantasyon rejeksiyonuna karşı (1998)
Remicade (Infliximab, anti-TNF a)	Centocor	Crohn's hastalığı (1999)
Herceptin (Trastuzumab, anti-HER2)	Roche Registration	HER2(+) Metast. Meme Ka. (2000)
Mabthera (Rituximab, anti-CD20)	Hoffmann La Roche	Non-Hodgkin's Lenfoma (1998)
Mabcampath; Campath (alemtuzumab; anti-CD52)	Millennium & ILEX	Kronik lenfositik lösemi (2001)

Terapötik enzimler ve diğerleri

Cerezyme (rb-glucocerebrosidase, analog, E. coli)	Genzyme	Gaucher's hastalığı (1997)
Fabrazyme (a-galactosidase, CHO cells)	Genzyme	Fabry hastalığı (2001)
Replagal (a-Galactosidase, insan)	TKT Europe	Fabry hastalığı (2001)
Fasturtec (rasburicase; urate oxidase, S. cerevisiae)	Sanofi-Synthelabo	Hipertürisemi (2001)
Osteogenic protein 1 (BMP-7, CHO)	Howmedica (EU)	Tibia hastalığı (2001)
Inductos (dibotermim alfa; BMP-2, CHO)	Genetics Institute	Akut tibia kırıkları (2002)

(Kaynak: G. Walsh. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2003)

Gelişmekte Olan Ülkeler

Gelişmekte olan ülkelerdeki ruhsatlı terapötik protein çeşitleri hakkında sağlıklı verilere ulaşılamamıştır. Ancak, bu ülkelerin çoğunda ruhsatlandırma sisteminin tam çalıştırılmadığı, terapötik proteinler dahil bir çok ilacın yerli olarak üretilmediğini, acil

ihtiyaçların ithalat yolu ile karşılandığını söyleyebiliriz. Diğer taraftan, terapötik proteinler dünyanın en pahalı ilaçları arasında yer aldıklarından, gelişmekte olan bir çok ülke, terapötik proteinleri ithal etmek yerine, jenerik olarak kendi ülkelerinde üretip kullanma yolunu tercih etmiştir. Bu tür ülkeler arasında yüksek nüfusu ile dikkati çeken Çin gibi ülke-

Tablo 1-6. Gelişmekte Olan Ülkelerde Jenerik Terapötik Protein Üretiminde Örnekler

Ülke	Firma	Üretilmiş İlaçlar	Geliştirilen İlaçlar
Hindistan	Bharat Biotech	-	Streptokinaz, VEGF
Hindistan	Dr. Reddy's Labs	G-CSF	Eritropoetin, İnterferon-beta, İnterferon-gama, Büyüme hormonu tPA
Hindistan	Ranbaxi	-	İnterferon-alfa-2b G-CSF Eritropoetin
Hindistan	Shantha		İnterferon-alfa İnsülin GM-CSF Streptokinaz tPA Eritropoetin Büyüme hormonu
Hindistan	Wockhardt	Eritropoetin	İnterferon-alfa-2b İnsülin
Güney Kore	LG Chem	Eritropoetin Büyüme hormonu İnterferon-alfa 2aİnterferon-gama GM-CSF	b.y.
Çin	Sunshine	Eritropoetin İnterferon-alfa 2a İnterlökin-2	Trombopoetin
Arjantin	Bio Sidus	Eritropoetin İnterferon-alfa Filgrastim	b.y.

Kaynaklar: BioCentury, April 2002; Sunshine Pharm., Bio Sedus.,

lerin terapötik protein ihtiyaçlarının yarı yarıya yerel üretilen ilaçlarla karşıladıkları tahmin edilmektedir. Bu ülkelerin ortak özelliği uluslararası patent koruma sisteminin dışında yer almış olmaları, ayrıca ilaç pazarı olarak ekonomik bir önem arz etmiyor olmalarıdır. Yukarıda zikredilen bir çok faktörün bir araya gelmesi ile, Küba, Arjantin, Güney Kore, Hindistan ve Çin'de terapötik protein üretimi yerli firmalar tarafından gerçekleştirilmeye başlanmıştır. Gelişmekte olan ülkelerde jenerik terapötik protein üretimi ile ilgili bazı örnek bilgiler Tablo 1-6'da sunulmuştur.

Türkiye

Türkiye'de terapötik proteinlerin kullanımı diğer gelişmiş ülkelere kıyasla daha geç başlamış ve sınırlı sayıda kalmıştır. Vademacum-2003 bilgilerine göre, halen ülkemizde 25 terapötik protein ilaç olarak satılmaktadır (Tablo 1-7), ancak AB ile uyum çalışmalarının sonucu olarak, bu sayının hızla artması, AB ülkelerinde kullanılan terapötik proteinlerin kısa bir süre içinde ülkemizde de kullanıma sunulması beklenmektedir.

Ülkemizde kullanılan bütün rekombinant proteinler ithalat yolu ile elde edilen, Türkiye'de üretilmeyen ilaçlardır. Ayrıca, şimdiye kadar Türkiye'de ruhsatlandırılmış olan terapötik proteinler, inovatif firma veya bu tür firmaların lisanslarına sahip firmalarca imal edilen ilaçlardır. Türk yasaları 1995 yılına kadar, ilaç ürünleri ve ilaç üretim yöntemlerini patent kapsamı dışında bıraktıkları için, halen Türkiye'de ve diğer ülkelerde kullanımda olan terapötik proteinlerden hiç biri ülkemizde patent koruması altında değildir (bkz. Bölüm 2). Dolayısı ile, yurtdışında patentli olan bu tür ilaçların Türkiye'de üretimi ve kullanımı, ayrıca böylece üretilbilecek olan ürünlerin Türkiye ile benzer yasal düzenlemeleri olan Asya ve Latin Amerika ülkelerinde kullanıma sunulabilmesi yasal olarak mümkündür. Buna rağmen, Türkiye'ye yüksek fiyatlarla ithal edilen rekombinant proteinlerin yerli üretimi gerçekleştirilmemiştir. Ayrıca, bazı Latin Amerika ve Asya ülkelerinde üretilen jenerik terapötik proteinler de henüz

Türkiye'de ruhsatlı kullanıma açılmamışlardır. Bu gruba giren ilaçlardan bazıları için, Sağlık Bakanlığı nezdinde ruhsatlandırma girişimleri 5-6 yıl öncesi-ne kadar geri gitmektedir. Ancak, bu girişimler, çeşitli nedenlerle, şimdiye kadar sonuçsuz kalmıştır. Oysa, diğer jeneriklerde olduğu gibi, jenerik terapötik proteinler de, inovatif ilaçlara göre tüketiciye daha ucuz fiyatlara mal olacak olan ilaçlardır. İlaç giderlerini karşılamada güçlükler yaşayan bir ülke olarak, jenerik terapötik ilaçların hangi gerekçelerle ülkemizde ruhsatlandırılmadıkları bilinmemektedir.

Dünyada Halen Kullanımda Olan Jenerik Terapötik Proteinler

Jenerik olarak üretilmiş olan terapötik proteinler, gelişmekte olan ve patent koruma sistemlerinin dışında kalmış olan Asya ve Güney Amerika ülkelerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, bu ülkelerle ilgili veriler ayrıntılı olarak mevcut değildir.

Bu ülkelerde kullanılan jenerik terapötik proteinlere örnek olarak, Çin, Hindistan, Güney Kore ve Arjantin gibi ülkelerde bu tür ilaçları üreten yerli firmaların listelerinden yararlanılabilir. Bu ülkelerde kullanılan başlıca jenerik terapötik proteinler şunlardır:

- G-CSF (Filgrastim)
- GM-CSF
- Eritropoetin
- Büyüme hormonu
- İnterferon-alfa 2a
- İnterferon-gama
- İnterleukin-2

Tablo 1-7. Türkiye'de Ruhsatlı Terapötik Proteinler

Jenerik Adı	Marka Adı	İmalatçı	Türkiye Ruhsatı	Üretim Sistemi
İnterferonlar				
İnterferon alfa-2a	Roferon-A	Roche	Roche	E. Coli
İnterferon alfa-2b	Intron A	Schering	Schering-Plough	E. Coli
İnterferon beta-1a	Avonex	Biogen	Biogen	CHO
İnterferon beta-1a	Rebif	Serono	Serono	CHO
İnterferon beta-1b	Betaferon	Schering	Schering	
Eritropoietinler				
Epoetin alfa	Epex	Johnson&Johnson	Santa-Farma	CHO
Eritropoetin beta	Neo Recormon	Roche	Roche	
İnsülin ve Analogları				
İnsan insülini	Humulin	Eli Lilly	Eli Lilly	E. Coli
İnsan insülini	Novolin	Novo Nordisk	Novo Nordisk	S. Cerevisiae
İnsülin lispro (analog)	Humalog	Eli Lilly	Eli Lilly	E. Coli
İnsülin aspart (analog)	NovoLog	Novo Nordisk	Novo Nordisk	S. Cerevisiae
Büyüme Hormonları				
Somatropin	Humatrope	Eli Lilly	Eli Lilly	E. Coli
Somatropin	Genotropin	Pharmacia	Pharmacia	E. Coli
Somatropin	Norditropin	Novo Nordisk	Novo Nordisk	E. Coli
Somatropin	Saizen	Serono	Serono	Fare C127
Koloni-stimülant faktörler				
Filgrastim (G-CSF)	Neupogen	Amgen	Roche	E. Coli
Monoklonal Antikorlar				
Muromonab-CD3	Orthoclone OKT3	OrthoBiotech	Santa-Farma	Hibridoma
Daclizumab	Zenapax	Hoffman- Roche	Roche	Hibridoma
İnfliximab	Remicade	Centacor	Schering Plough	Hibridoma
Palivizumab	Synagis	Medimmune	Abbott	M.hayvan hücre
Diğerleri				
Folitropin alfa	Gonal-F	Serono	Serono	CHO
Folitropin beta	Puregon	Organon	Organon	CHO
Glucagon	Glucagen	Novo Nordisk	Novo Nordisk	S. Cerevisiae
Dornase alfa (DNase)	Pulmozyme	Genentech	Roche	CHO
Drotrocogin alfa (prot. C)	Xigris	Eli Lilly	Eli Lilly	İnsan hücre dizisi

(Kaynak: Vademecum-Modern İlaç Rehberi + ATC Index, 2003)