

## Produktion af rekombinante membranproteiner til rationelt lægemiddeldesign

### **Bioneer A/S – Bacterial Protein Production**

*Head of Department Søren M. Madsen, tlf. 45 16 04 44, e-mail: sma@bioneer.dk*

#### **Sammenfatning**

Membranproteiner udgør portene til vores celler: næringsstoffer, ioner, affaldstoffer m.m. optages og udskilles ved hjælp af sådanne proteiner. En række sygdomme, f.eks. hjertekarlidelser og cancer er blandt andet forårsaget af dysfunktionelle membranproteiner, hvorfor disse proteiner også er oplagte "drug targets" i rationel lægemiddeludvikling. En bedre forståelse af membranproteiners struktur/opbygning samt adgang til disse proteiner i større mængder vil bidrage til, at virksomheder og forskningsinstitutioner bliver i stand til at designe bedre og nye lægemidler til behandling af en lang række livstruende sygdomme. Udviklingsaktiviteten bidrager til, at der udvikles rekombinante produktionsorganismer, oprensningsteknikker og analytiske metoder til at håndtere rekombinant fremstillede membranproteiner til rationelt lægemiddeldesign.

#### **Markeds- og samfundsbehov**

Celler og såkaldte organeller er omsluttet af membraner, der sikrer, at cellens molekyler forbliver i cellen. Membranerne er opbygget af et dobbelt lipidlag, hvori der er inkorporeret en række forskellige membranproteiner. Membranproteiner medvirker i transportprocesser af salte og molekyler, i celle signalering og i energiproduktion mm. Membranproteiner er derfor helt vitale for cellers funktion, og det er derfor ikke overraskende, at ca. 60% af alle mål (targets) for de nuværende markedsførte lægemidler er membranproteiner. Velkendte midler er f. eks.  $\beta$ -blokkere mod hjertesygdomme og psykofarmaka mod visse psykiske lidelser.

En række ældre og nye lægemidler, herunder antistoffer og lavmolekylære lægemidler er rettet mod membranproteiner, som er særdeles vanskelige at håndtere fremstillingsmæssigt. Det er derfor kun få virksomheder, der har den fornødne knowhow og kapacitet i området. Forskningsinstitutioner, der arbejder med karakterisering af molekyler, der binder til membranproteiner har også behov for denne specialviden, idet det kræver en vis produktionsmæssig kapacitet at få adgang til rimelige mængder af de pågældende membranproteiner.

Det er ikke trivielt at fremstille membranproteiner, det kræver bl.a. en række forskelligartede proteinproduktionssystemer, herunder mikrobielle og mammale for at øge sandsynligheden for succesfuld fremstilling. Endvidere kræver det adgang til specielle oprensningsteknikker som er markant forskellige fra metoder, der anvendes til opløselige proteiner.

Virksomheder og institutioner/hospitaler, der arbejder med lægemidler rettet mod denne type af proteiner har derfor i de tidlige udviklingsfaser behov for:

- Adgang til fremstilling og oprensning af membranproteiner eller dele af membranproteiner i mængder, der sætter dem i stand til at udføre karakteriseringsarbejde, udvikle screeningsmodeller/assays og finde lægemiddelkandidatstoffer, der kan binde til disse specielle targets.
- Adgang til større mængder af membranproteiner i de senere faser i forbindelse med større screeningsprocesser.

Udviklingshorisonten er 3 år og er rettet mod biofarmaceutiske- og farmavirksomheder, samt forskningsinstitutioner. Det skønnes, at der er en lang række danske virksomheder i målgruppen, som udgøres af både store farmaselskaber som f.eks. Lundbeck og Novo Nordisk, men også af mindre

biotekselskaber med et stort potentialle som f.eks Aquaporin, Nuevolution, Pcovery, Saniona AB, Vipergen m.fl.

## Ny teknologisk service, kompetence og teknologi

Bioneer opbygger kompetencer inden for fremstilling af membranproteiner. Bioneer udvikler DNA-vektor systemer, hvormed mikrobielle eller mammale produktionsceller bringes i stand til at syntetisere de ønskede membranproteiner via fermenteringsprocesser i bioreaktor. Bioneer vil endvidere udvikle oprensingsprocesser således, at de fremstillede membranproteiner kan opnås i ren form. Der findes i dag ikke et lignende dansk udbud til det danske markedssegment, som via lokal adgang til knowhow vil få stærkt forbedrede muligheder for udvikling af lægemidler.

Bioneers services forventes at omfatte:

- Fremstilling af expressions-kloner, der udtrykker membranproteiner efter kundens ønske. For at opnå høj succesrate mht fremstilling af membranproteiner skal der udvikles både mikrobielle og mammale produktionssystemer.
- Udvikling af fermenteringsprocesser, hvor udvalgte produktionsorganismer testes parallelt for fremstilling af udvalgte membranproteiner (drug targets).
- Udvikling af oprensingsprocesser, herunder detergentbaseret screening og stabilisering af de fremstillede membranproteiner.
- Fremstilling af membranproteiner i levende celler eller vesikler til screeningsformål.

## Centrale aktiviteter

Bioneer planlægger følgende tre-årige aktivitetsplan, hvis resultater vil føre til udbud af de første services primo 2018:

1. Udvikling af værtsspecifikke ekspressionsvektorer, der muliggør, at membranprotein gener kan afprøves parallelt i mikrobielle og mammale ekspressionssystemer. Vektorerne skal forsynes med passende fusions-tag (Green Fluorescent Protein), som tillader fusion af membranproteinet til et rapportergenprodukt, der gør det nemt at følge lokalisering og funktionalitet af et givet protein. For at simplificere oprensingsprocesser vil der også blive indbygget et såkaldt his-tag til affinitetsoprensning.
2. Expression af en række kendte membranproteiner (f.eks transportører, ionpumper, receptorer) som tidligere er udtrykt i andre systemer, mhp. validering af de ny-udviklede membranprotein produktionssystemer. Afprøvningerne vil også blive benyttet til opsætning af nye analytiske metoder som f.eks in-gel fluorescens til detektion af korrekt foldet membranprotein ved SDS-PAGE, samt til opsætning af fluorescensbaseret størrelseskromatografi til forudsigelse af membranproteinets kvalitet og integritet efter ekstraktion fra værtscellens membran vha. forskellige detergenter.
3. Efter produktion og udtryk af membranprotein i værtscellens membran vil det til visse screeningsformål være ønskeligt at fremstille membranproteinet i ren form uden at destabilisere det. Detergenter vil blive anvendt som led i denne proces for at holde membranproteinerne i en opløselig/funktionel form efter frigørelse fra cellemembranen, hvorfor det ofte er nødvendigt at benytte et forudgående screeningsprogram for at finde den optimale detergentsammensætning.

## Mulige samarbejdspartnere

Københavns Universitet, Danmarks Tekniske Universitet, Syddansk Universitet (<http://www.memphys.dk/>)