

Neue Analysetechnologie für höchste Effizienz in der Drug Discovery

Anagnostic Bioanalysis GmbH, St. Valentin, Österreich, www.anagnostics.com

Das Hightech-Startup Anagnostics Bioanalysis entwickelt analytische Technologien zur routinemäßigen Anwendung in der Wirkstoff- sowie der medizinischen Forschung. Mit der hochparallelen Affinitätsmessung von Proteinen und der kompakten DNA-Sequenzierung wird der Drug-Discovery-Prozess wesentlich beschleunigt und effizienter. Ziel ist es, Wirkstoffkandidaten und deren Wirkungsweise und Wirkung auf unterschiedliche Patientengruppen in einer frühen Phase möglichst umfassend zu charakterisieren um „späte“ und damit kostspielige Fehlschläge zu vermeiden. Steht nämlich ein potenzielles Medikament kurz vor der Zulassung, sind bereits 200 bis 800 Millionen Euro geflossen.

Technologische Basis: hybcell

Anagnostics entwickelte in den letzten Jahren eine komplett neuartige Microarray-Technologie. Das Microarray ist ein rotierender Zylinder, der in einer speziell entwickelten Kartusche verpackt ist und das Herzstück der Technologie bildet. Durch das Rotationsprinzip ergeben sich wesentliche Vorteile gegenüber den herkömmlichen, flachen Array-Systemen wie Dr. Bernhard Ronacher, Mitbegründer von Anagnostics und Erfinder der hybcell-Technologie ausführte: „Meine Arbeit mit konventionellen Microarrays war mitunter frustrierend: Komplexes Handling wurde mit Ergebnissen belohnt, die von manuellen Prozessen und Umweltbedingungen stark beeinflusst waren. Dazu kamen technologische Beschränkungen, wie zum Beispiel die Endpunktmessung ohne Chance auf kinetische Ergebnisse. Das Ziel unserer Entwicklung war von Anfang an ein System, das neue technologische Wege geht und bei höchster Datenqualität und Robustheit hochproduktiv ist“.

Parallelanalyse bei hoher Probenzahl

Das um die patentierte hybcell gebaute Analysesystem kombiniert die ohnehin schon beeindruckende Parallelanalyse des Arrays mit einer hohen Probenzahl (8 bzw. 96 hybcells). Zudem zeichnet sich das System durch die Vollautomation der Analyseschritte (Mehrfachprobengeber, Hybridisierung, Temperaturzyklen, Detektion, Auswertung) aus. Über intuitive Softwareprogramme können neue Tests sehr einfach aufgesetzt und alle Programmschritte abgearbeitet werden. Die Softwarearchitektur bietet einerseits für die Testentwicklung hohe Flexibilität durch den Zugriff auf alle Geräteparameter, unterstützt andererseits aber auch die Abarbeitung von geschützten Protokollen für den Routinebereich.

Affinitätsmessung von Proteinen auf der hybcell

Der Einsatz von Laserfluoreszenzdetektion ermöglicht hoch empfindliche und selektive Messungen. Durch das zylindrische Design sind auch Verlaufsmessungen umsetzbar. Damit wird zum Beispiel das Bindungsverhalten von Proteinen analysiert. Eine „gute“ Bindung zwischen beispielsweise einem (Impfstoff-)Antikörper mit seinem Antigen resultiert in einer geringen „Off-Rate“, also einer langsamen (bis nicht feststellbaren) Abnahme des Bindungssignals. Diese gute Bindung ist im Falle eines Impfstoffs auch notwendig, denn sie bedeutet, dass der Wirkstoff lang im Körper des Patienten wirksam bleibt. Die hybcell Technologie hilft damit in einer sehr frühen Phase eines Wirkstoffprojektes die „richtigen“ Kandidaten auszuwählen. Im Gegensatz zu Systemen mit konventioneller SPR-Technologie misst die hybcell-Technologie hochparallel (mehr als 100 Kandidaten) und selektiv, was die Produktivität im Labor deutlich steigert (Abbildung 1).

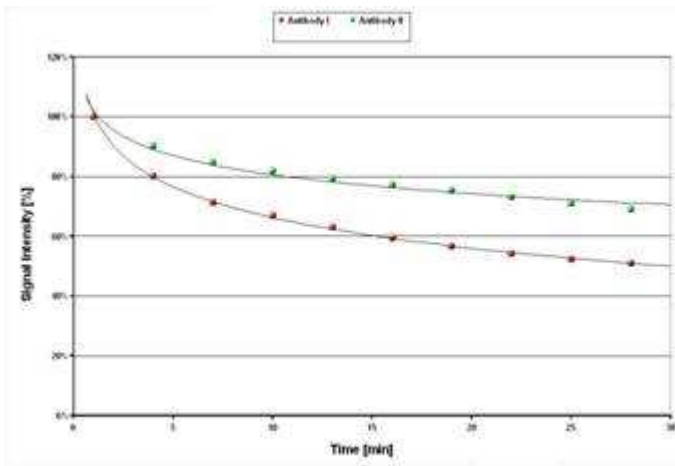


Abbildung 1: Off-Rates zweier Antikörper mit einem Peptid (Drug Candidate).

Patientenstratifizierung durch Microarray-Sequenzierung von bis zu 2.000 DNA-Sequenzen durch On-Spot-Primer-Extension

„Targeted therapy“ und „companion diagnostics“ sind Schlagworte, die einen Trend in der Medikamentenentwicklung beschreiben. Immer weniger Medikamente wirken in allgemein gültiger Weise, das heißt auf alle Patienten gleich. Vielmehr sind Wirkstoffe vermehrt von persönlicher „Prädisposition“ des Patienten abhängig. Eine solche Prädisposition ist beispielsweise die genetische Veranlagung (zum Beispiel Mutationen) des Patienten.

Stand und Problematik der DNA-Mutationsdiagnostik lassen sich am anschaulichsten am Beispiel von KRAS2 – einem menschlichen Gen – verdeutlichen. Mit der Zulassung der therapeutischen Antikörper Erbitux® und Vectibix®, die gegen den Wachstumsrezeptor EGFR gerichtet sind, und die bei der Behandlung von metastasiertem Darmkrebs zum Einsatz kommen, haben die Zulassungsbehörden in Europa und den USA die Behandlung an eine molekular-diagnostische Untersuchung geknüpft. In den klinischen Studien zur Zulassung der beiden therapeutischen

Antikörper hat sich gezeigt, dass eine Behandlung nur dann Aussicht auf Erfolg hat, wenn das KRAS2 Gen nicht mutiert ist.

Darüber hinaus sind eine Reihe weiterer Krebsmedikamente zugelassen (IRESSA®, GLEEVEC®) oder in Entwicklung, deren Wirkung von der An- oder Abwesenheit definierter Mutationen abhängen (beispielsweise PI3K Gen).

Durch die Neuentwicklung weiterer Medikamente einerseits und durch die zu erwartenden Zulassungen zur adjuvanten Therapie wird dieses Marktsegment auch in Zukunft wachsen. Weitere Quellen des Marktwachstums für standardisierte, qualitätsgesicherte und therapiebegleitende DNA-Diagnostik bilden genetische Veränderungen wie Translokationen (Gleevec®) oder epigenetische Veränderungen (DNA-Methylierung).

Mutationsdiagnostik in Form von „Mini-Sequencing“ auf der hybcell

Die komplette und vollautomatische Integration von Thermocycling, Waschschritten, Hybridisierung und Detektion bietet die Möglichkeit der hochparallelen On-Spot-Primer-Extension und damit einen Ansatz eine große Anzahl von DNA-Sequenzen schnell und einfach zu identifizieren.

Die zur gesuchten DNA-Sequenz komplementären Primer (DNA-Oligomere) werden auf die Oberfläche der hybcell (Microarray) kovalent gebunden. Dazu stehen bis zu 2.000 Spots zu Verfügung. Die in 300 µl „Extension Lösung“ gelöste Proben-DNA (Template) wird in die hybcell pipettiert. Alle weiteren Schritte arbeitet das hyborg-System voll automatisiert ab. Die Verlängerung der Primer (Primer Extension) beginnt mit einem Denaturierungsschritt bei 94°C, um die Proben-DNA zu schmelzen und die Polymerase zu aktivieren. Die hybcell besteht aus zwei Zylindern. Durch Rotation des inneren entsteht im äußeren Probenraum eine konstante Temperaturverteilung auf der Microarray-Oberfläche und ein effektiver Kontakt von Probe und Primer.

Im nächsten Schritt bindet die Proben-DNA bei 55°C an die auf dem Microarray immobilisierten Primer, welche dann bei 72°C verlängert werden. Der Temperaturzyklus (94°C – 55°C – 72°C) wird insgesamt vier Mal wiederholt. Die DNA denaturiert bei einem letzten Temperaturschritt bei 94°C und wird durch einen Waschvorgang entfernt, was das „Durchflusszellen Design“ der hybcell ermöglicht.

Hochspezifische Ergebnisse in 45 Minuten

Die erfolgreiche Primer Extension wird über die Hybridisierung fluoreszenzmarkierter Probes (22nt CY5 markiert) erzielt. Das hyborg-System (Abbildung 3) detektiert die Fluoreszenzsignale, welche die gerätespezifische Software hybcon automatisch auswertet. Dadurch ergibt sich innerhalb von nur 45 Minuten die exakte Aussage, ob bestimmte DNA-Sequenzen in der Probe enthalten sind.

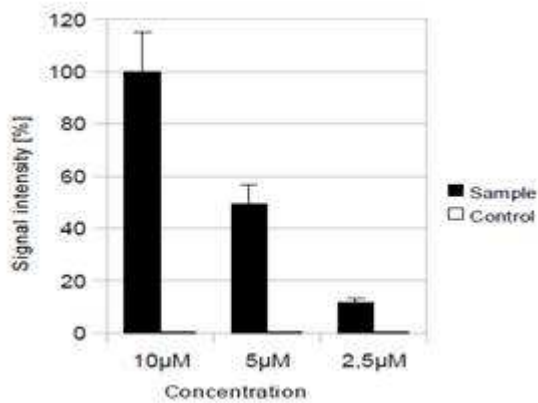


Abbildung 2: Signalintensität in Abhängigkeit der Konzentration an gespottetem Primer

Die Vorteile der hybcell (Abbildung 4) gegenüber herkömmlichen Sequenzierungen liegen vor allem in der hohen Spezifität (eindeutige Zuordnung von DNA-Sequenzen) und der einfachen und schnellen Durchführung durch die vollautomatische, ca. 45 Minuten andauernde Analyse. Dies bedeutet auch eine hohe Effizienz hinsichtlich Kosten, Zeit und Probenmaterial.



Abbildung 3: Analysesystem hyborg.



Abbildung 4: hybcell