

Die Patente der Polymerase-Kettenreaktion:

## EINFÜHRUNG

Die Geschichte der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) setzt sich fort. Die Grundlagenpatente für diese Schlüsseltechnologie sind im März 2005 in den USA ausgelaufen und in Europa im März 2006.

Was ist Polymerase-Kettenreaktion? Die Genetik beeinflusst alle Lebewesen. Es ist das, was uns unterscheidet, nicht nur auf einer oberflächlichen physischen Ebene, sondern auch auf eine Weise, die unser Leben dramatisch beeinflusst. Die Polymerase-Kettenreaktion ist die fast allgegenwärtig bevorzugte Methode zur Erleichterung einer solchen genetischen Analyse; sie kann nicht nur zur Diagnose einer Krankheit eingesetzt werden, sondern auch, um uns zu sagen, an welchen Krankheiten wir im späteren Leben eher leiden werden und wie wir unseren Lebensstil entsprechend anpassen können. Es kann uns sogar sagen, wie wir auf Therapeutika reagieren werden, so dass wir Nebenwirkungen vermeiden können, indem wir die Dosierung anpassen oder gegebenenfalls alternative Therapien auswählen. In solchen Bereichen haben sich die analytische Leistungsfähigkeit und das Potenzial der Polymerase-Kettenreaktion für die genetische Analyse in den letzten zwei Jahrzehnten immer wieder bewährt. Obwohl der Erfolg der Polymerase-Kettenreaktion durch erhebliche finanzielle und technologische Investitionen unterstützt wurde, würden einige argumentieren, dass sie auch durch eine starke Patentposition eingeschränkt wurde, so dass die Ausbeutung auf einige wenige große Akteure mit ausreichender Finanzkraft für den Eintritt in diesen Markt beschränkt war.

## DIE TECHNISCHE HERAUSFORDERUNG

Da eine genetische Analyse wünschenswert ist, besteht die Herausforderung darin, die relevanten Sequenzinformationen, auf denen man einen solchen Test durchführen kann, gezielt zu erfassen. Das menschliche Genom ist riesig und umfasst etwa 3,2 Milliarden Basenpaare von Informationen, die in 23 Chromosomenpaaren organisiert sind. Innerhalb des Gesamtgenoms gibt es schätzungsweise >30 000 Gene, die oft unterteilt und durch nicht-kodierende und intervenierende Regionen sowie regulatorische Sequenzen durchdrungen sind. So ist für jede spezifische menschliche Erkrankung nur ein winziger Prozentsatz einer

DNA-Probe von Bedeutung. Die genetische Analyse muss sich daher auf einen kleinen Bereich von DNA-Sequenzinformationen konzentrieren und dann nach Mutationen oder Polymorphismen in ihr suchen. Daher ist eine Technik erforderlich, die nicht nur genügend DNA der Region von Interesse erzeugt, sondern auch die genetische Sequenz innerhalb dieser Region analysiert. Das ist die Vielseitigkeit der Polymerase-Kettenreaktion.

## DIE POLYMERASE-KETTENREAKTION

Wie kann man eine bestimmte genetische Region für weitere Analysen angreifen? Es gibt mehrere Wege, dies zu erreichen, aber von diesen ist die Polymerase-Kettenreaktion wohl die bekannteste und erfolgreichste. Kary Mullis erhielt 1993 den Nobelpreis für Chemie für die Erfindung der Polymerase-Kettenreaktion nach seiner frühen Arbeit bei der Cetus Corporation in den 1980er Jahren. Die Idee soll 1983 von Mullis auf einer nächtlichen Fahrt durch die kalifornischen Berge entwickelt worden sein.

1975 entwickelte Sanger eine in vitro Methode zum Kopieren von DNA-Sequenzen, bei der kurze Oligonukleotide verwendet wurden, um die DNA-Synthese von einer bestimmten Stelle aus zu initiieren oder zu starten. Diese "Primer" würden so konzipiert sein, dass sie eindeutig an die DNA binden, die an die interessierende Sequenz angrenzt. Mullis' Idee war es, ein zweites Oligonukleotid zu verwenden, um eine weitere Runde der DNA-Synthese zu beginnen, die entlang des ersten Produkts zurückkehrt. Dieser Prozess könnte dann mit Hilfe von Temperaturzyklen mehrmals wiederholt werden, um den Prozess des Primens, Verlängerns und der Strangtrennung voranzutreiben. Auf diese Weise würde die durch die Position der Primer definierte Sequenz in einem Prozess, der mit der genetischen Fotokopie verglichen wurde, mehrfach kopiert werden.

Obwohl die ersten Experimente einfach konzipiert waren, mussten bei jedem Zyklus frische DNA-Polymerase (das Enzym, das die DNA ausgehend vom Primer kopiert hat) hinzugefügt werden, da der Schritt der Strangtrennung oder Denaturierung mit einer Erwärmung auf 95°C verbunden war, um eine Wiederholung der Grundierung und Synthese zu ermöglichen. Diese hohe Temperatur führte zur Inaktivierung der DNA-Polymerase. Zusätzlich musste die Reaktion manuell zwischen den Wasserbädern bei geeigneten Temperaturen

bewegt werden. Allerdings wurden inzwischen hitzebeständige DNA-Polymerasen, wie die Taq-Polymerase aus dem Mikroorganismus *Thermus aquaticus*, und gentechnisch veränderte Formen eingeführt, die den Einsatz automatisierter Thermocycler erleichtern und den Prozess stark vereinfachen und verbessern.

Der Polymerase-Kettenreaktionsverstärkungsprozess wird durch wiederholte Runden der Denaturierung, des Glühens und der Verlängerung gesteuert.

(1) Denaturierung: Doppelsträngige DNA-Moleküle werden bei hoher Temperatur (~95°C) geschmolzen oder denaturiert, um einzelsträngige Ziele für die Vervielfältigung zu erhalten. (2) Glühen: Die Temperatur wird auf eine geeignete Glühtemperatur gesenkt (~50°C). Kurze synthetische DNA-Stücke oder Primer werden an die einzelsträngigen Zielsequenzen und die Prime-DNA-Synthese durch Taq-Polymerase gebunden. (3) Erweiterung: Die Temperatur wird auf die optimale Temperatur für Taq-Polymerase (~72°C) angehoben. Ein Amplifikationszyklus ist abgeschlossen und der Prozess kann wiederholt werden, wodurch die Produktmenge mit jedem Zyklus theoretisch exponentiell verdoppelt wird, bis ein maximales Niveau oder Plateau erreicht ist.

Es gibt viele Variationen zum Thema Polymerase-Kettenreaktion. Der Vorteil dieser genetischen Amplifikationstechnik besteht jedoch in vielen Fällen darin, dass für die Einleitung des Prozesses nur sehr wenig DNA benötigt wird und relativ große Mengen an spezifischer Sequenz erzeugt werden, so dass das Produkt für viele nachfolgende analytische Zwecke als rein angesehen werden kann. Daher ist es möglich, solche Produkte einfach zu analysieren, z.B. durch Sequenzlänge, sequenzspezifischen enzymatischen Abbau oder durch eine Vielzahl von DNA-Sondensystemen wie homogene oder Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion.

#### DIE GELEGENHEIT NACH DEM PATENT

Mit dem Untergang des frühen Prozesses oder der "grundlegenden" Patente für die Polymerase-Kettenreaktion in den USA und in Europa im März 2006, gab es erhebliche Spekulationen über die möglichen Auswirkungen auf die molekulardiagnostische Industrie, die nicht mehr durch Lizenzgebühren und Lizenzgebühren begrenzt sein ist.

Die Anwendungen und Varianten der Polymerase-Kettenreaktion sind über alle Erwartungen hinausgewachsen, seit der Veröffentlichung des ersten Papiers von

Saiki et al. 1985, in dem die Amplifikation des Beta Globin-Gens und sein möglicher Einsatz für das Screening auf Sichelzellenanämie beschrieben wurde.

Die Chancen für die molekulare Diagnostik entwickelten sich weiter und der Markt wurde für 2010 auf 12 Milliarden US-Dollar und 2015 auf 35 Milliarden US-Dollar geschätzt. Bei so großen Chancen ist es nicht verwunderlich, dass erhebliche Investitionen in technologische Verbesserungen und Entwicklungen, wie beispielsweise bei thermisch stabilen Enzymen und Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktionen, getätigt wurden und dass ein weiterer Patentschutz angestrebt wurde, der die Lebensdauer, wenn auch vielleicht nicht die Dominanz, des Polymerase-Kettenreaktionsprozesses effektiv verlängert. Während weitere Patente auf die Polymerase-Kettenreaktion für die kommenden Jahre in der Pipeline sind, bedeutet die Tatsache, dass diejenigen, die den Kernprozess abdecken, abgelaufen sind, dass Techniken, die die Polymerase-Kettenreaktionsbasierte Amplifikation nutzen, ohne Lizenz verwendet werden können. Während die Zugänglichkeit des Basisprozesses mit dem Untergang dieser frühen Patente zunahm und es vorhergesagt wurde, dass die Kosten für Enzyme und Geräte sinken, konnten Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktionsmethoden, wie der 5' Exonuclease-Assay, zweifellos populär bleiben und noch für die kommenden Jahre erhebliche Einnahmen generieren. So liefen beispielsweise Patente, die für thermisch stabile DNA-Polymerasen relevant sind, in Europa erst 2007 und 2009 aus, während andere, die für die Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion relevant sind, bis 2010 und darüber hinaus reichten.

Während die Senkung der Lizenz- und Lizenzgebühren im Zusammenhang mit den Basispatenten als Meilenstein für diejenigen im Bereich der Molekulardiagnostik angesehen wurde, die die Polymerase-Kettenreaktion nutzen wollen, setzen sich die finanziellen Auswirkungen der damit verbundenen Lizenzen für thermisch stabile Polymerasen, Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion und andere fort. Darüber hinaus wirken sich regulatorische Hürden im Zusammenhang mit der Food and Drug Administration in den USA und der In-Vitro-Diagnostik-Richtlinie in Europa erheblich auf Finanzinvestitionen und die Markteinführungszeit für diejenigen aus, die in den Markt der Molekulardiagnostik einsteigen wollen. Es bleibt daher abzuwarten, ob es zu einer Zunahme der Anzahl von Tests auf Basis der Polymerase-Kettenreaktion in der Diagnostik kommen wird oder ob regulatorische Hürden und andere Patente im Zusammenhang mit dem

Polymerase-Kettenreaktionsprozess die Entwicklung in diesem Bereich weiterhin behindern werden.

Was können wir von der Zukunft erwarten? Generell können wir uns vorstellen, dass sich unser Verständnis von Genetik weiter entwickeln wird. Dieses Wissen und der Wunsch nach Nutzung werden die technologische Entwicklung weiter vorantreiben, damit Tests immer einfacher, schneller und kostengünstiger durchgeführt werden können. Kurzfristig ist zu erwarten, dass die Analyse einiger der einfachen Genstörungen in einem Point-of-Care-Umfeld zugänglich wird. Ebenso ist zu erwarten, dass die Prüfung komplexerer Genstörungen zunehmend in spezialisierten Analysezentren durchgeführt wird. Die Polymerase-Kettenreaktion wird zweifellos weiterhin eine sehr wichtige Rolle bei der Erbringung dieser Dienstleistungen spielen. Wir können aber auch mit einem zunehmenden Wettbewerb durch andere Technologien rechnen, die den inzwischen abgelaufenen Kernprozess nutzen und versuchen, die finanziellen Auswirkungen anderer, noch gültiger Patente zu minimieren oder ganz zu vermeiden. Der zunehmende Wettbewerb auf dem Markt wird zweifellos die Testkapazität erhöhen, die Analysekosten senken und den Wettbewerb mit Anbietern aus dem privaten Sektor verstärken. Wie diese Kosten getragen werden, ist noch ungewiss. Die Anforderungen des immer besser informierten Patienten mit Internetzugang werden jedoch zweifellos den Druck auf solche Gesundheitsdienste weiter erhöhen, sobald die Bedenken über mögliche negative Auswirkungen auf die Beschäftigung und die Krankenversicherung ausgeräumt sind. Die Polymerase-Kettenreaktion wird uns zweifellos noch viele Jahre begleiten.

## Referenzen

1. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatische Amplifikation von Beta-globin-Genomsequenzen und Restriktionsstellenanalyse zur Diagnose von Sichelzellanämie. *Wissenschaft* 1985;230: 1350-4 [PubMed] [Google Scholar]
2. Sanger F, Coulson AR. Schnelles Verfahren zum Bestimmen von Sequenzen in DNA durch primierte Synthese mit DNA-Polymerase. *J Molec Biol* 1975;94: 441-8 [PubMed] [Google Scholar]