

Rekombináns hemopoetikus növekedési faktorok

Gyógyszerészeti Biotechnológia előadás

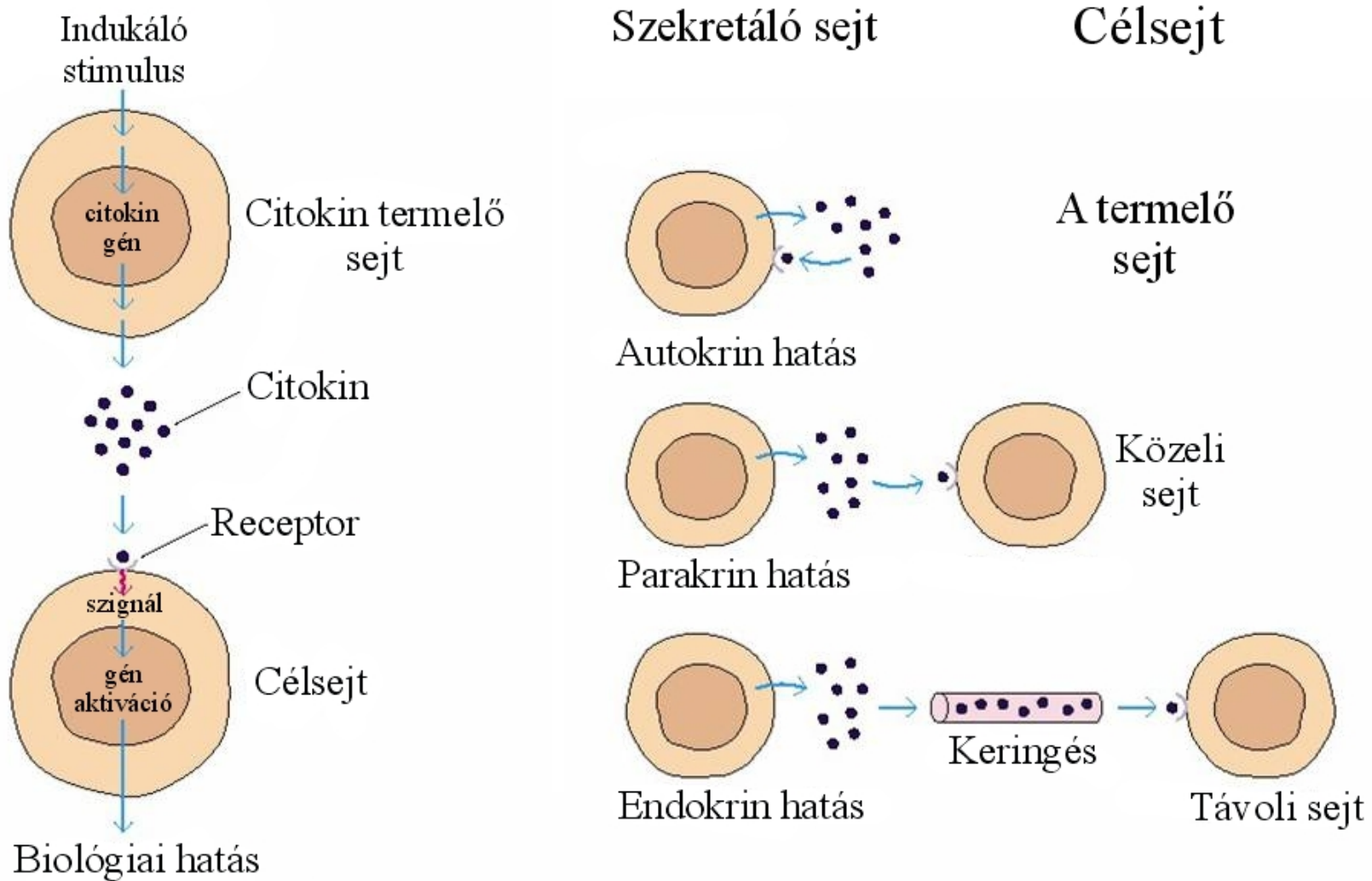
Számonkérés (év végi jegy kialakítása)

- Dolgozat az előadások alatt 2 alkalommal (**11/03** és **12/08**).
- A dolgozatokban a megelőző előadásokból teszünk fel 4 kérdést. Erre tömör “kifejtős” válaszokat várunk (5-10 mondat).
- Értékelés: 1-5 (Minden kérdésre!).
- Összesen 8 jegy, ezeknek az átlaga alapján ajánljuk meg az év végi jegyet.

A citokinek általános jellemzői

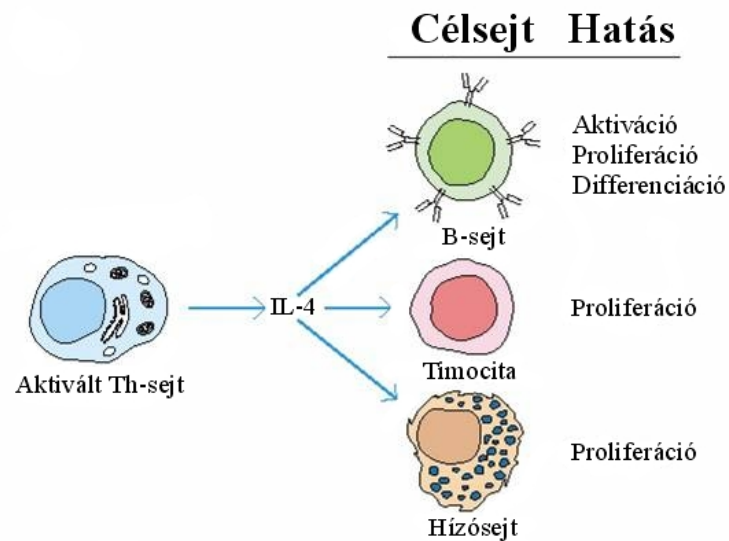
- Kis molekulasúly (10-40 kDa)
- Glikoproteinek
- Izolált sejtek termelik aktiváció hatására
- Sejtek közötti kapcsolatokat közvetítik:
 - információ továbbítás
 - immunválasz szabályozása
- Hatásmód:
 - átmeneti génaktiváció termékei
 - receptorokon keresztül
 - nagy affinitás
 - pikomoláris cc.-ban

A citokinek hatásmódja

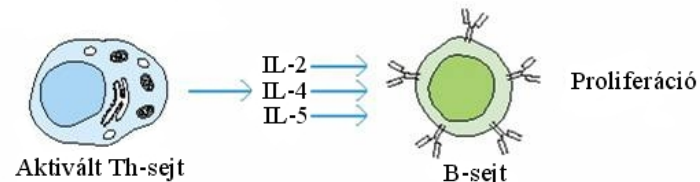


A citokinek hatásmódja

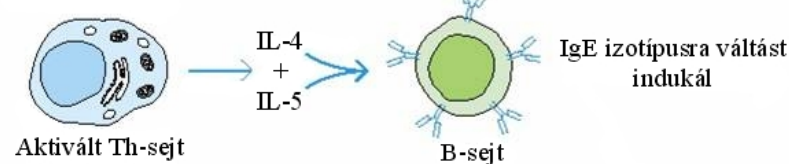
Pleiotropia



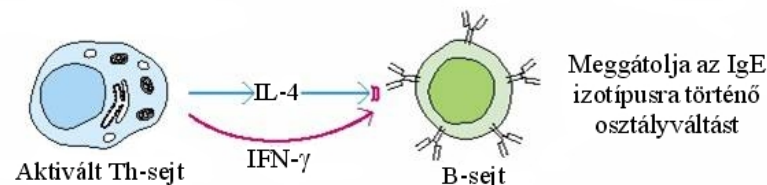
Redundancia



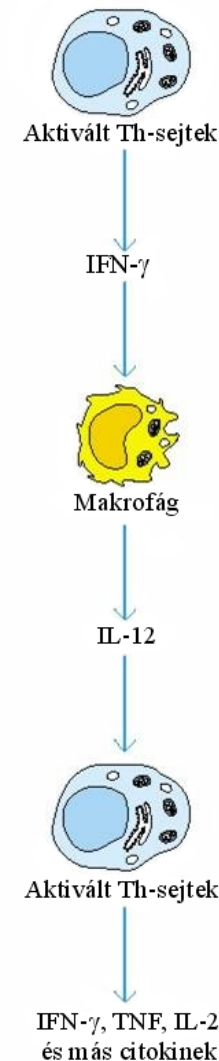
Szinergizmus



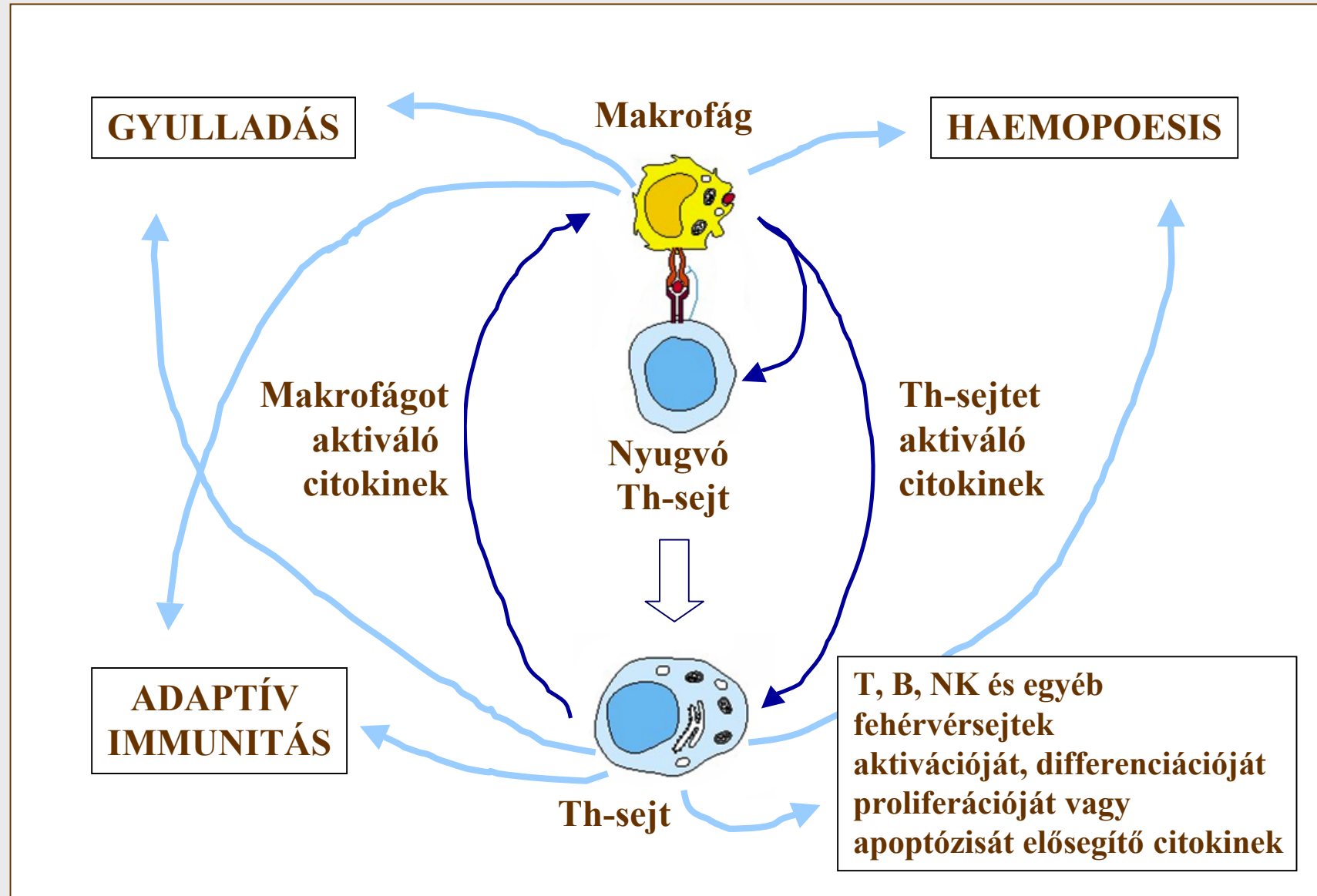
Antagonizmus



**Kaszvád
elindítás**



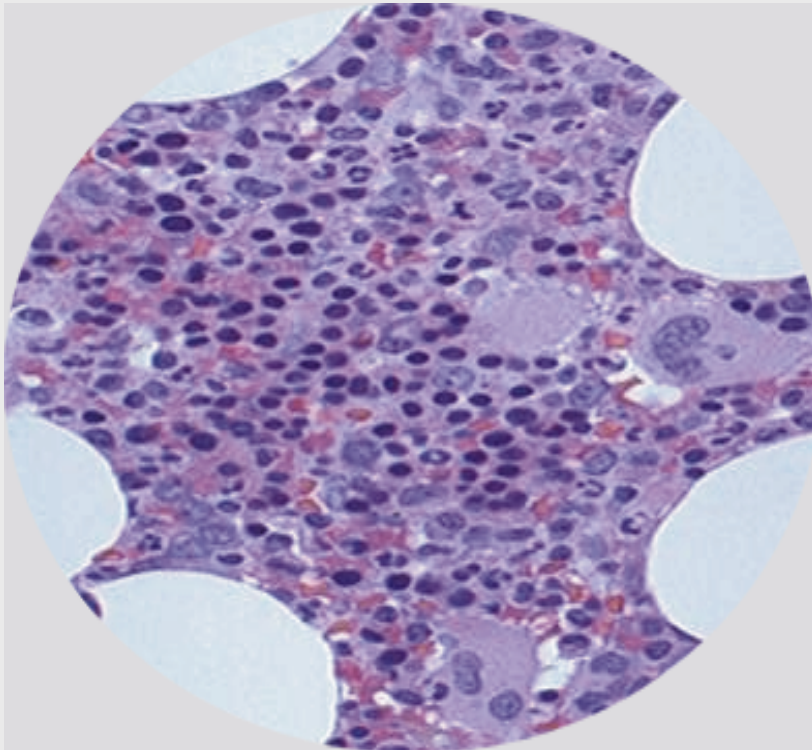
Citokin termelő sejtcsoportok



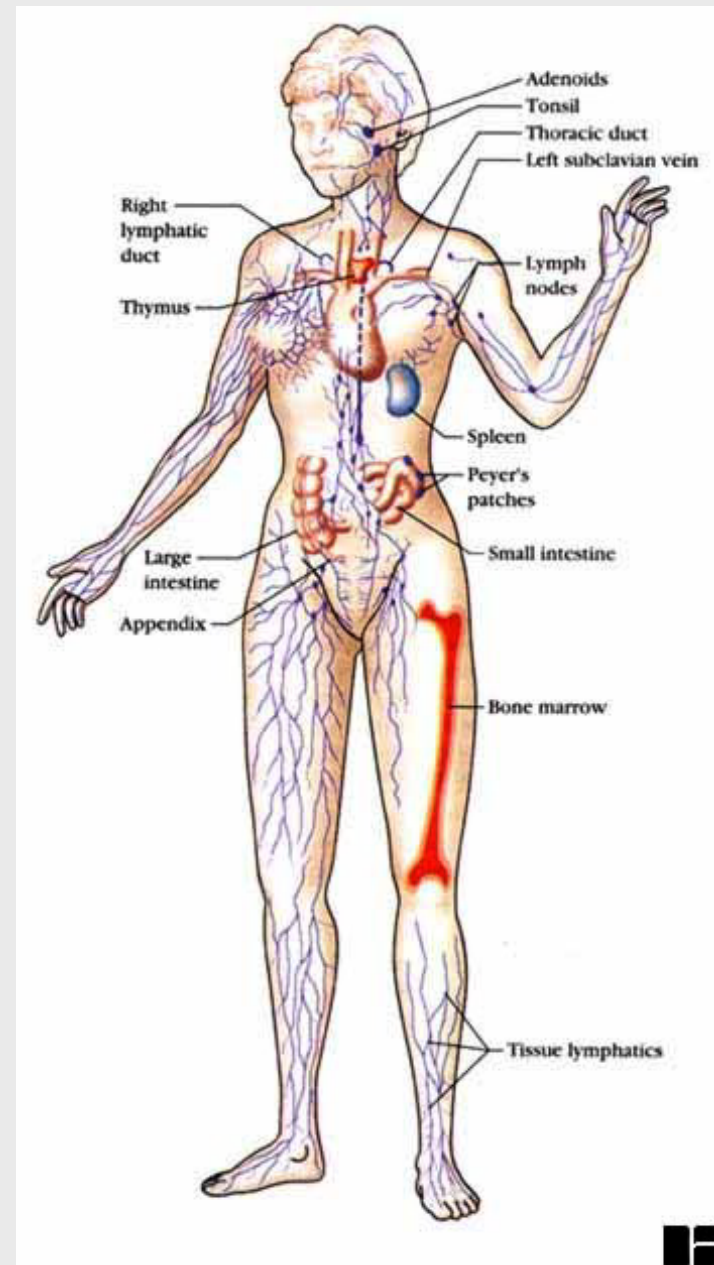
A citokinek funkcionális csoportosítása

<p>I. Természetes immunitásban és gyulladásos folyamatokban résztvevők</p>	<p>IFNα, IFNβ, IFNγ, TNFα, TNFβ, IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12, MIF, kemokinek</p>
<p>II. A limfociták aktivációját és differenciálódását szabályozók</p>	<p>IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IL-15, INFγ, TGFβ</p>
<p>III. Az immunsejtekérésére hatók</p>	<p>IL-3, IL-7, GM-CSF, SCF</p>

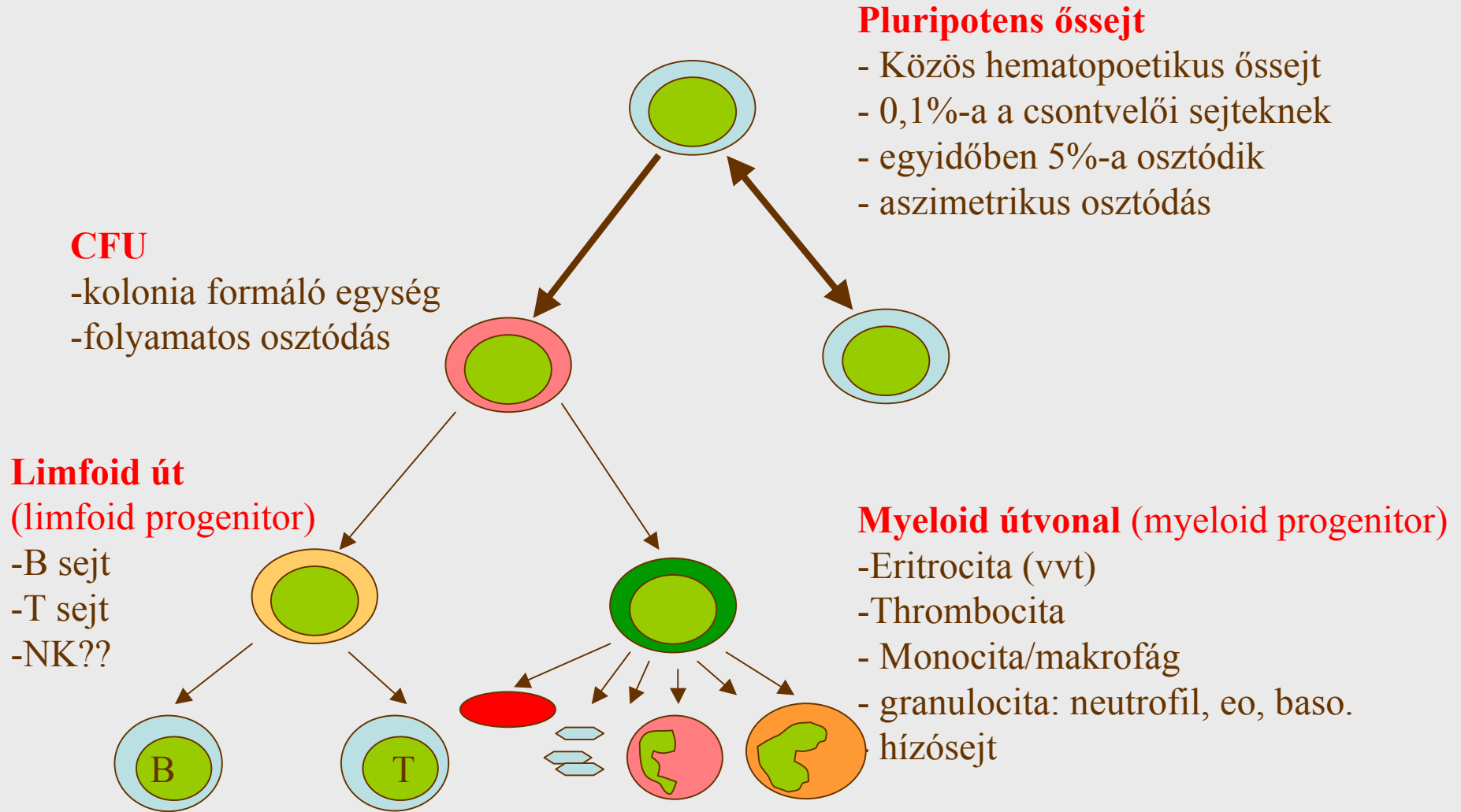
A vérképzés helye a vöröscsontvelő



Csontvelő fénymikroszkópos képe (HE)



A vérképzés fő útvonalai



Immunsejtek érésére ható citokinek = hemopoetikus növekedési faktorok

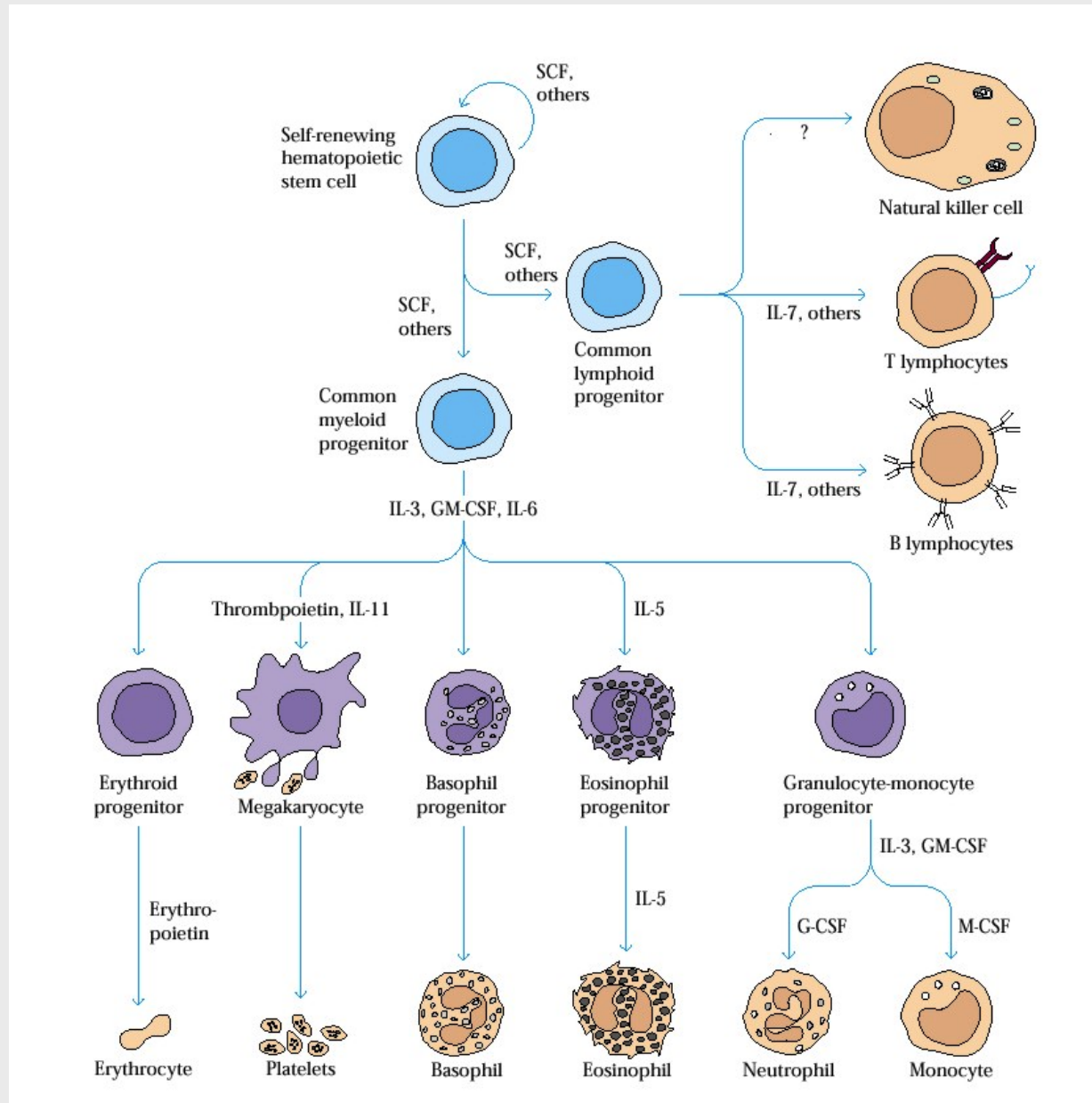
CSF Colony Stimulating Factor - a csontvelő progenitor sejtjeire hatnak

multi-lineage CSF (több-vonalon ható növekedési faktorok) **SCF, GM-CSF, IL-3**

Lineage-specifikus (egy vonalra ható) növekedési faktorok, hasonló szerkezet: monomer 4 α helikális rész **M-CSF, G-CSF, EPO, TPO, IL-5**

T sejt-, B sejt érés **IL-7**

Az immunsejtek érésére ható citokinek



Hematopoetikus növekedési faktorok

- Glycoproteinek
- 14-35 kDA molekulásúly
- Egyláncúak

- **Rekombináns előállítás**
 1. Gén azonosítás
 2. A gén izolálása
 3. A gén plazmidba helyezése
 4. Expresszió: baktériumban, élesztőben vagy emlős sejtben
 5. A termék nem glycosilált, de megtartja biológiai aktivitását

Rekombináns növekedési faktorok

Név:	Gyári név:	Aminosav/glycoziláció	Expresszió:
G-CSF: granulocita kolonia stimuláló faktor	Filgrastim (1991), Lenograstim	174, (Filgrastim: nincs Lenograstim: O-linked)	E. coli CHO sejtek
GM-CSF: granulocita-monocita kolonia stimuláló faktor	Molgramostim (1992) Sargramostim	128, (Molgramostim: nincs, Sargramostim: N- linked)	E. Coli Saccharomyces cervisiae
EPO: erythropoetin	Epoetin alfa (1989) Epoetin beta	165, csak a glycozilált forma hatékony!!	CHO sejtek
SCF: őssejt faktor	Ancestim (1999) (Stemgen)	165, nem glycozilált	E.coli
TPO és MGDF: Thrombopoetinek (Mpl ligandok)	-	-	-
IL-11: interleukin 11	Oprelvekin (1997), Neumega	177, nem glycozilált	E.coli

Farmakológia

Specifikus **sejtfelszíni receptorhoz** kapcsolódnak, majd secunder messengereken keresztül génexpressziót módosítanak.

- **Direkt hatás:** sejt proliferációt, aktivációt vagy differenciációt okoznak.
- **Indirekt hatás:** egy másik citokin vagy hematopoetikus faktor termelődését serkenti, amely más sejteken is hat.

Farmakológia

- *In vitro* aktivitás: csak a direkt hatás érvényesül

- A progenitor sejteken kívül az érett sejtekre is hatnak

- Koncentráció függő hatás: pl. GM-CSF 5-20 pg/ml cc-ban granulocita-monocita stimuláló, míg 20-2000 pg/ml cc-ban eozinofil és trombocita stimulációt okoz.

- *In vivo* aktivitás: eltérhet az *in vitro* tapasztaltaktól az indirekt hatások miatt, a speciesek közti eltérés (ember – állatkísérlet) és az eltérő clearance, farmakokinetika, glykoziláció miatt.

Termelő sejtek és stimuláló hatások

Se. normál szint	Termelő sejt	Termelést stimuláló hatás
G-CSF 9-51 pg/ml	Monocyták, fibroblasztok, endothel, csv. stroma	LPS indukció TNF, IL-1 (monocytákból) Cytokin aktiváció
GM-CSF 0,4-2 pg/ml	T sejtek Monocyták Fibroblasztok, endothel	Antigén, lektin, IL-1 LPS TNF, IL-1 (monocytákból)
EPO 3-7 mIU/ml	Vese (>90%) Máj	Hypoxia
TPO 20-300 pg/ml	Vese máj	Folyamatos expresszió
SCF 1200-1900 pg/ml	Fibroblasztok Csontvelői stromasejtek	Folyamatos expresszió

G-CSF és GM-CSF egymást kiegészítő fiziológias szerepe

- **G-CSF** mérhető a **vérben**
- Normál neutrofil termelést irnyítja (steady-state) és fertőzésnél fokozza a csontvelőben
- Csökkenti a sejtek kiérési idejét: 5 napról 1 napra
- Neutrofil sejtek kidobását okozza a csontvelőből
- Növeli a neutrofil kemotaxist és citotoxikus aktivitást.
- LPS, TNF, IL-1 fokozza a termelését
- Monocita, fibroblast, ér endothel és csv stroma sejtek termelik
- **GM-CSF** helyileg aktiv
- Gyulladást lokalizál és neutrofil sejteket, monocitákat, eozinofil sejtek osztódását és aktivációját okozza
- Nem okoz neutrofil kidobást a csv-ből
- Növeli a neutrofil kemotaxist és citotoxikus aktivitást.
- Dendritikus sejt kiérést okoz
- LPS, lektinek, TNF, IL-1 fokozza a termelődését
- T sejt, monocita, fibroblaszt és ér endothel termeli lokálisan

	rhG-CSF	rhGM-CSF
	Filgrastim / Lenograstim	Molgramostin / Sargramostin
Kromoszóma	17	4
As szám	174 (177 egy másik, kevésbé aktív natív forma)	128 / 127
Glykoziláció	- / O-linked	- / N-linked
Génforrás	Hólyag karcinóma sejtvonal / Hám karcinóma sejtvonal	Humán monocyta sejtvonal / Egér T lymphocyta sejtvonal
Expressziós rendszer	E. coli / rágcsáló ovárium sejtvonal	E. coli / S. cerevisiae
Gyári név (pl.)	Neupogen / Granocyte	Leukomax / Leukine

Alkalmazási területek

- **Chemotherápia okozta neutropenia:** - csökkenti a lázas sokszor tünetmentes fertőzések előfordulását, gyorsítja a neutrofil sejtszám emelkedést, csökkenti az antibiotikum igényt
- **Csontvelő transzplantáció:** autológ, allogén
- **Perifériás vér progenitor sejt mobilizáció:** in vivo és in vitro is!! Myeloszuppresszív chemotherápiát követő autológ progenitor sejt transzplantációhoz. Kevésbé megterhelő, mint a csontvelő vétel. (SFC és G-CSF a leghatásosabb együtt)
- **Súlyos krónikus neutropénia:** veleszületett, ciklikus, vagy idiopátiás --> növekszik a neutrofil sejtszám
- **AIDS:** gyakori az antivirális és myeloszuppresszív kezelés következtében kialakuló neutropénia, thrombocitopénia és anémia, csökkenthető a bakteriális fertőzések gyakorisága

EPO

- Az erythroid progenitor proliferációját és normoblaszttá érését segíti.
- Fokozza a retikulociták kidobását a csontvelőből.
- TPO-nak segíthet a megakaryocita termelődés fokozásában.
- **Hypoxia** fokozza a termelődését, nem infekció.
- Akár százszoros mennyiségű is lehet a konc-ja.
- A **vese** termeli Veseelégtelenség az EPO termelődést is gátolja. (10%-ban a máj is, ez azonban nem elég).

rhEPO

Indikáció:

krónikus veseelégtelenséggel társult anaemia
anaemia kezelése pre-dializises vesebetegeknél
chemoterápia utáni anaemia kezelése
HIV, AIDS betegek Zidovudine kezelés okozta anaemiája
allogén csontvelő transzplantációnál
műtét előtti autológ vér gyűjtés hatékonyságának növelése.

EPO volt az első engedélyezett növekedési faktor készítmény (1989, USA).

Epoetin alfa (Eprex[®], Epogen[®]) steril iv. vagy sc. Injekció

Epoetin béta (NeoRocormon[®]) liofilizált, a.d. pro inj.-vel oldható, beoldás után hűtve tárolandó

SCF

- Hematopoetikus és nem-hematopoetikus őssejtek osztódását serkenti
- *In vitro* csekély a CFU hatása, de fokozza a G-CSF, GM-CSF, EPO, MGDF és IL-2 stimuláló hatását.
- *In vivo* Fibroblasztok és **csv strómasejtek** folyamatosan termelik, a fiziológias hematopoezis egyik alappillére.
- Aránylag nagy koncentrációban található a normál humán **plazmában** (1200-1900 pg/ml).
- rh SCF (ancestim): filgrastimmal (G-CSF) együtt használják csontvelő tx előtt az őssejtek mobilizációjának elősegítésére.

Thrombopoetinek

- **TPO** serkenti a megakariociták és trombociták termelődését
A **máj** termeli és keringésen át jut a csv-be.
- **IL-11**: IL-3-al, TPO-val és SCF-el szinergizmusban segíti a megakariociták és trombociták fejlődését.
TPO termelésen keresztül hat

Indikáció:

rhTPO, rh IL-11 (oprelvekin), rh IL-3 (muplestim)
chemotherápia okozta thrombocytopaenia,
ismételt TCT transzfúziók csökkentése

rh IL-6 (sigosix)
potenciális TCT stimulátor

Farmakológia

- Általában liofilizált formában hozzák forgalomba őket, rekonstrukció után csak néhány óráig stabilak.
- Rendszerint subcutan adagolják
- Eliminációs fél-életidejük rövid: 0,2-3 óra, kivéve rhEPO: 13 óra
- Hatásukat befolyásolja a kiválasztó szervek állapota: daganattherápia, immunszuppresszív kezelés
- 2 hetes folyamatos kezelés hatása 2-3 nap múlva mérhető már
- FDA engedélyezés előtt „kísérleti indikáció” szolgál a kipróbálásukra

CÉL: hosszabb hatású szerek előállítása

PEGfilgastrim:

Kovalnes kötéssel PEG-hez kapcsolták →
hosszúhatású G-CSF, egyetlen injekció

NESP (new erythropoiesis stimulating protein):

5 aminosav csere → 2 új glykozilációs hely,
hosszabb féléletidő

Toxicitás, mellékhatások

Gyakran hasonlítanak a chamotherápiás szerek mellékhatásaihoz

- **rhG-CSF és rh-GM-CSF**: izom-és csontfájdalom, fejfájás, lokális reakció, „capillary-leak syndrome”: csak nagy dózisú i.v. adagolásnál – ritka, tachycardia, hypotónia, dyspnoe **glykoziláció mértéke** csökkenti a mellékhatásokat
- **rhEPO**: nem okoz mellékhatást esetleg vérnyomást emel
- **rhSCF**: anaphylaxia, allergiás reakciók
- **rhIL-11**: folyadék retenció, arrhythmia, anaemia