



Gyógyszerészi Biotechnológia

Rekombináns hormonok

.



Rekombináns hormonok

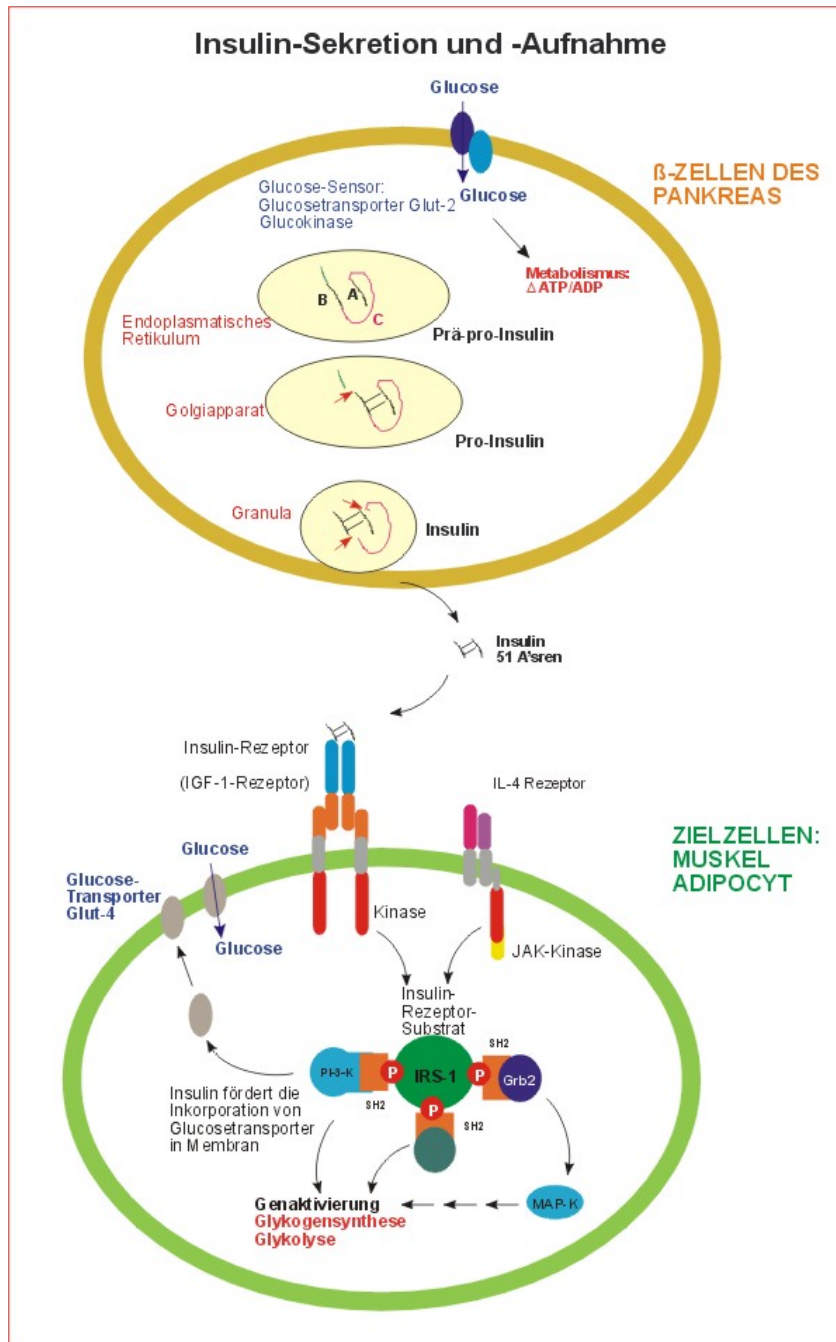
- Insulin
- Növekedési hormon (hGH)
- Follikulus stimuláló hormon (FSH)
- Luteinizáló hormon (LH)
- Humán choriogonadotropin (hCG)



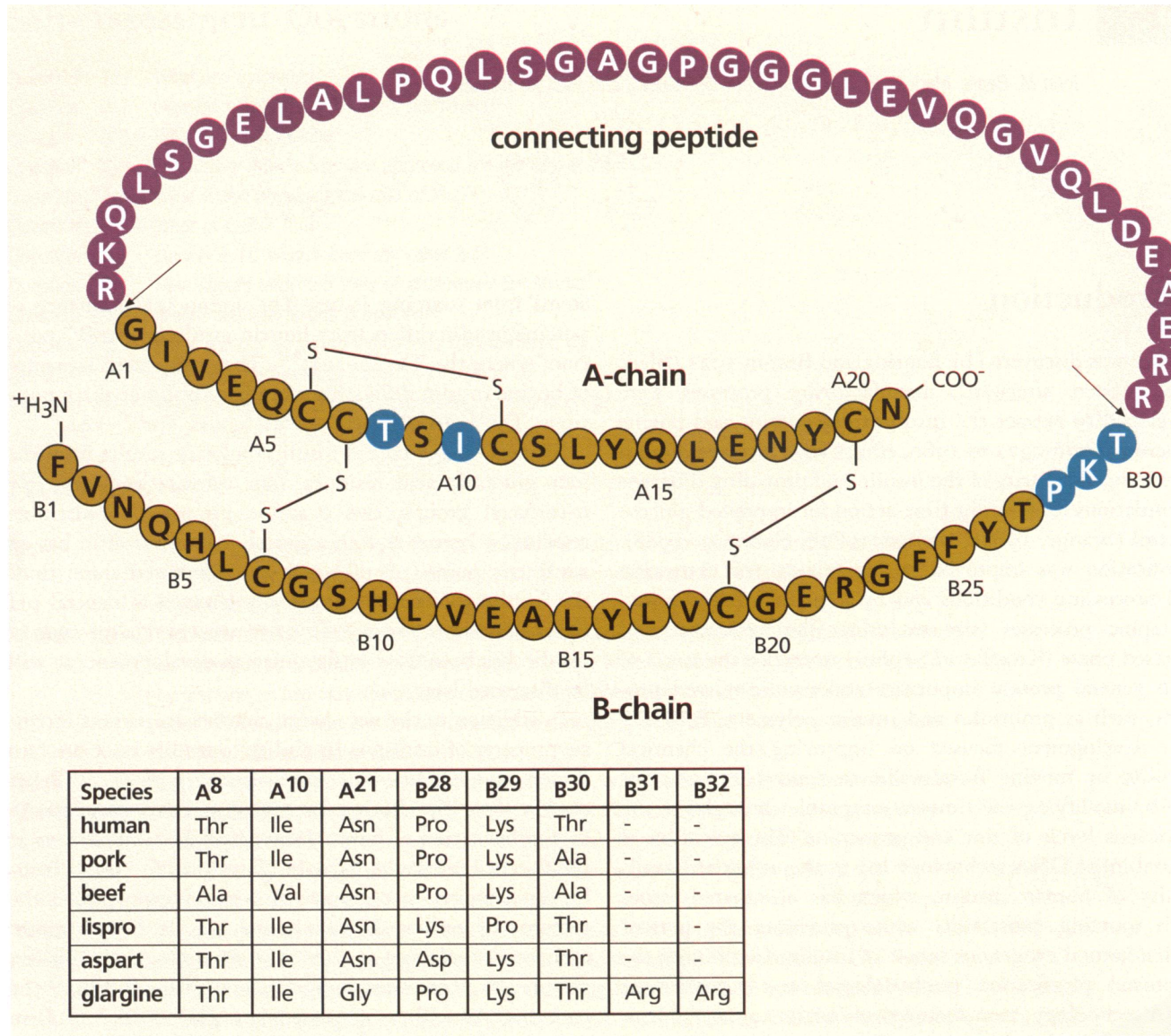
Insulin előállítás története:

- 1921. Banting és Best felfedezi az insulint
- 1921-1980. sertés és bovin pancreasból állítják elő - folyamatos változtatás:
 - - tisztasági fok növelése (proinsulin, insulin polymer ne legyen benne)
 - - stabilitás növelése (savas →neutrális)
 - - hatás időtartam növelése → cink és protamin hozzáadása
- Rekombináns előállítás + bevált tisztítási módszer → ma a humán insulin tisztasági foka > 98%

Insulin-Sekretion und -Aufnahme

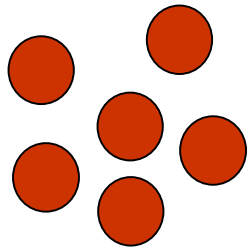


A humán proinzulin elsődleges szerkezete

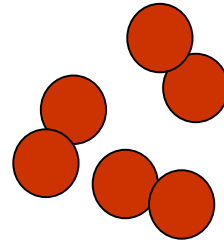


Humán insulin kémiai leírása:

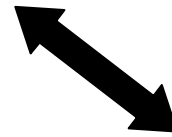
- 51 aminosavból áll, pancreas β -sejtek termelik, mint proinzulin \rightarrow C-peptid lehasad \rightarrow A (21 aa.) és B (30 aa.) lánc 2 S-S hídval kapcsolódik (A⁷-B⁷ és A²⁰-B¹⁹) és egy belső S-S híd az A láncban (A⁶-A¹¹)
- Sertés insulin a B³⁰ aa-ban különbözik (Thr \rightarrow Ala)
- Szarvasmarha insulin 3 helyen tér el
- Isoelektromos pontja - pH 5.3 \rightarrow neutrális pH-n negatív töltésű.
- Hajlamos dimert és nagy molekulású aggregátumokat alkotni –hydrofób interakcióval
- Bivalens fémionok (pl. cink) jelenlétében **hexamert** alkot (pancreasban is)
- **Deamidáció**: jellemző az Asn⁸³ aszparagin gyors hidrolitikus átalakulása aszparagin-savvá savi pH-n ami lassú neutrális pH-n \rightarrow inzulin bomlását okozza
- A készítmény fenol származékot mint antimicrobiális ágenst is tartalmaz, mely szintén növeli stabilitását: kinyújtott állapotból (T) \rightarrow α -helix állapot (R) (T \rightarrow R)
- Modern készítmények tartalmaznak még glicerolt vagy NaCl-ot és fiziológiás puffert (PBS) a pH stabilizálására



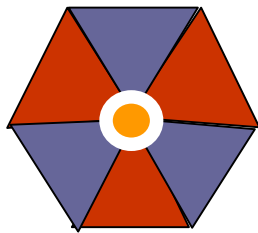
Inulin monomer



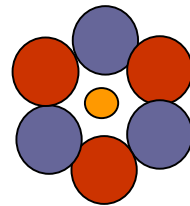
Inulin dimer



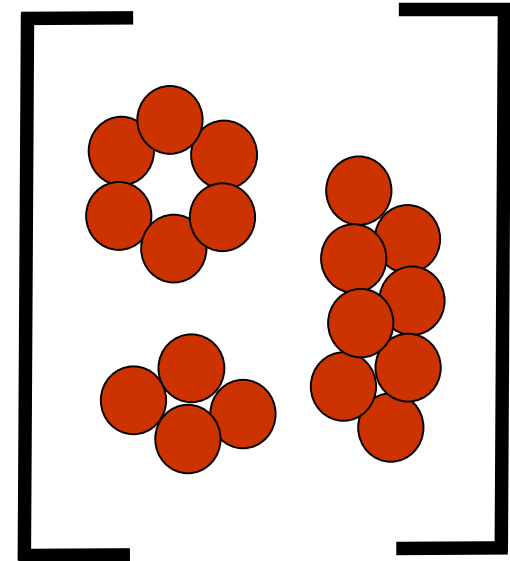
Fenol
tartósító



Inulin Hexamer (R6)



Inulin Hexamer (T6)



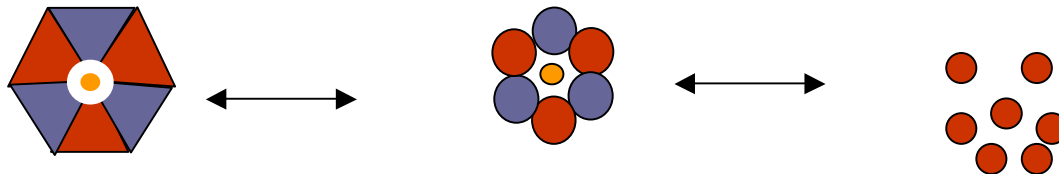
Inulin



Zn^{2+}

Farmakológia, formulációk

- Normál insulin szekréció formái:
 - **bazális** vagy háttér: 5-15 $\mu\text{U/ml}$,
 - étkezéssel **indukált**: 60 $\mu\text{U/ml}$ → a készítményeknek meg kell felelnie ezen két követelménynek.
- Reguláris és gyors-hatású készítmények hatása függ: **dózis, beadás helye, hőmérséklet, fizikai aktivitás.**
 - **Neutrális-reguláris formuláció**:- cink → **hexamer** szerkezet → 6 fenol molekulát köt (pl. m-cresol) → stabil hexamer szerkezet, nem alakul ki Asn^{A121} deamidáció és polimer kialakulás, ami csökkenti az aktivitást. A hexamer disszociációja felszívódó monomerré időt igényel → **késleltetett aktivitás**: 2-3 óra csúcs és 6-8 óra
 - **Gyors** hatású készítmények → **monomer** szerkezet: asszociáció gátlás: Lys^{B28} - Pro^{B29} csere: Humalog v. Liprolog, vagy Asp^{B28} : NovoRapid



Intermedier-hatású készítmények

- Szükséges a kristályos vagy precipitált forma feloldódása. Elnyújtott disszociáció a hexamer formából.
- **NPH**: Neutral Protamine Hagedorn (1936.). Neutrális. protaminnal kristályosított forma. Protamin: 30 aa. Hal spermából előállított, 65-70% arginine tartalmú molekula. Tetragonális kristályokat képeznek. 1-2 óra múlva kezd hatni, csúcs-aktivitása 6-12 óra múlva, 18-24 órán át.
- **Keverék** formák:
 - **Reguláris + NPH** - 50-50%: egyedül ez alkalmas hosszú távú tárolásra, előre összekeverhető.
 - Gyors hatású **lispro + NPH**: a feloldás után azonnal be kell adni, mert a szolubilis és szuszpenzióban levő (kristályos) forma kicserélődésének veszélye nagy → megszűnik a rapid hatás.
 - Megoldás: lispro készítmény protamin-kristályos formájának előállítása: Neutral protamin Lispro (NPL): homogén bifázisos keverék állítható elő: **lispro + NPL**
Ugyanígy előállították a gyors aspart protamin kristályos formáját is.
- **Lente** insulin: 70% kristályos, extra cinkkel stabilizált Ultralente + 30% amorf Insulin. 1-3 óra múlva kezd hatni, 6-12 órás csúccsal, 18-24 órán át.



Hosszú-hatású készítmények: **Ultralente,** **Lantus**

- Normál pancreas basal szekréciója 1 U/óra → szabályozza a máj glukóz kidobását, agyi energiatermeléshez szükséges.
- Elv: lassú, állandó feloldódása a partikulumoknak a subcutan szövetből. Ezt követi a hexamer disszociációja és a felszívódás.
- **Ultralente** = NPH másképp kritályosítva: pH:5,5!! protamin nincs, helyette cink feleslegben és methylparaben tartósítószer.
Hatás: 4-6 óra múlva kezdődik, 8-20 órás csúccsal, 24-48 órán át.
- **Lantus**: + 3 arginin hozzáadása: isoelektromos pont pH 5,4-ről 6,7-re változik → savanyú pH-n (pH: 4) is szolubilis, neutrális pH-n kevésbé szolubilis, ezért lassabban szívódik fel. Napi 1 adag biztosítja a bazális insulin szükségletet. Nem kell hígítani, keverni.



Inzulin-készítmények fizikai stabilitása:

1. Aggregátum-képződés megakadályozása:
 - 25°C-fölött nő az aggregáció veszélye. Szuszpenzióban lassúbb.
 - mechanikai rázás is okozhatja
2. Stabil hexamer forma fenntartása fenol jelenlétében → csökken az Asn⁸³ deamidáció veszélye
3. 2-8 °C között, fénytől védve tárolandó, fagyasztás után elveszti aktivitását.
4. Pen – cartridge formuláció biztosabb adagolást enged meg,



Humán növekedési hormon (hGH) alkalmazás története:

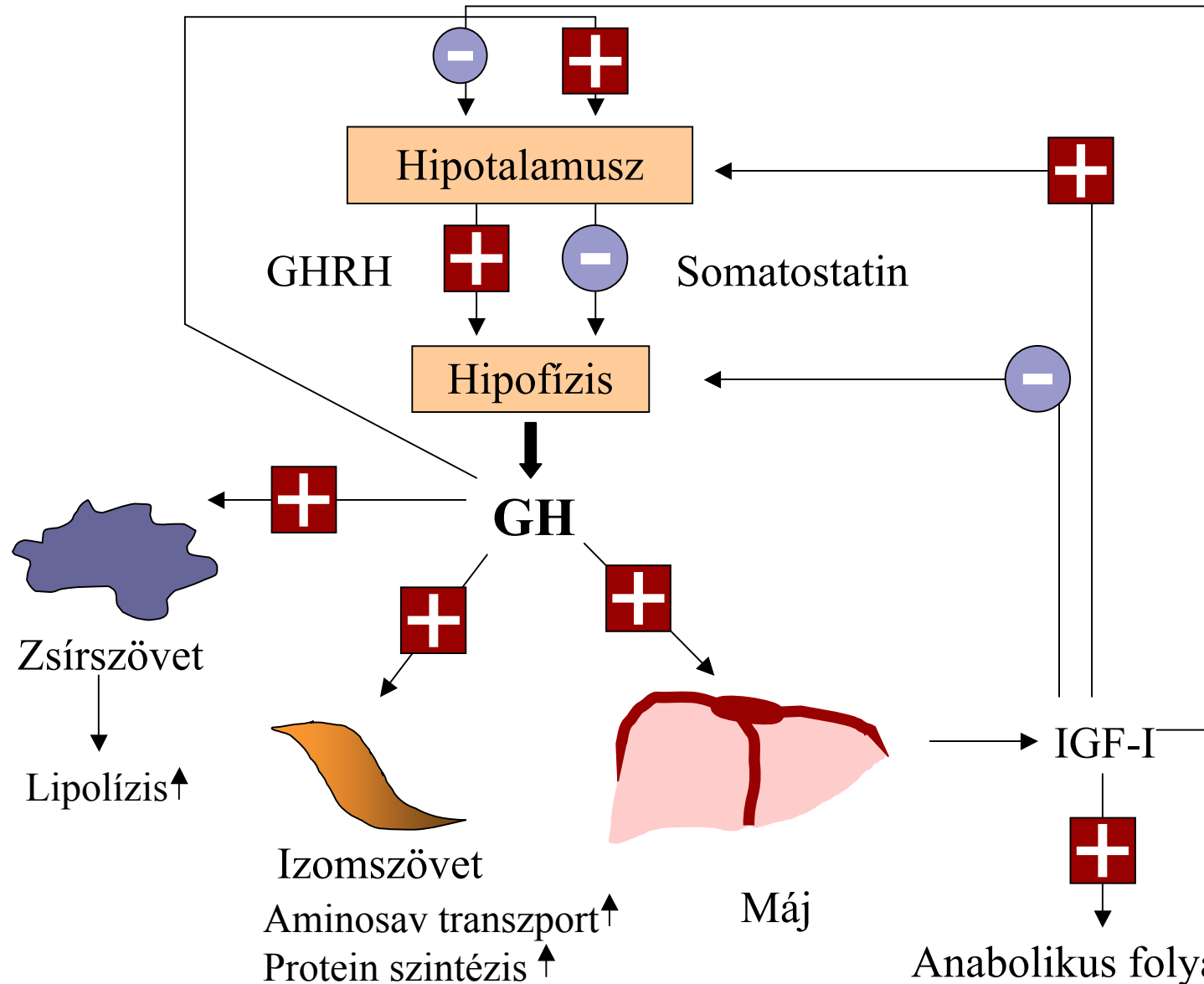
- 1957. első klinikai felhasználása a hypophysisből izolált hGH-nak.
- 1979. hGH klónozása, 1982. rhGH klinikai alkalmazása.
- 1985. a hypophysisből izolált preparátumok kivonása a forgalomból, mert gyakran prionnal szennyezettek → Creutzfeld-Jakob sy.



hGH szerkezete, isohormonok:

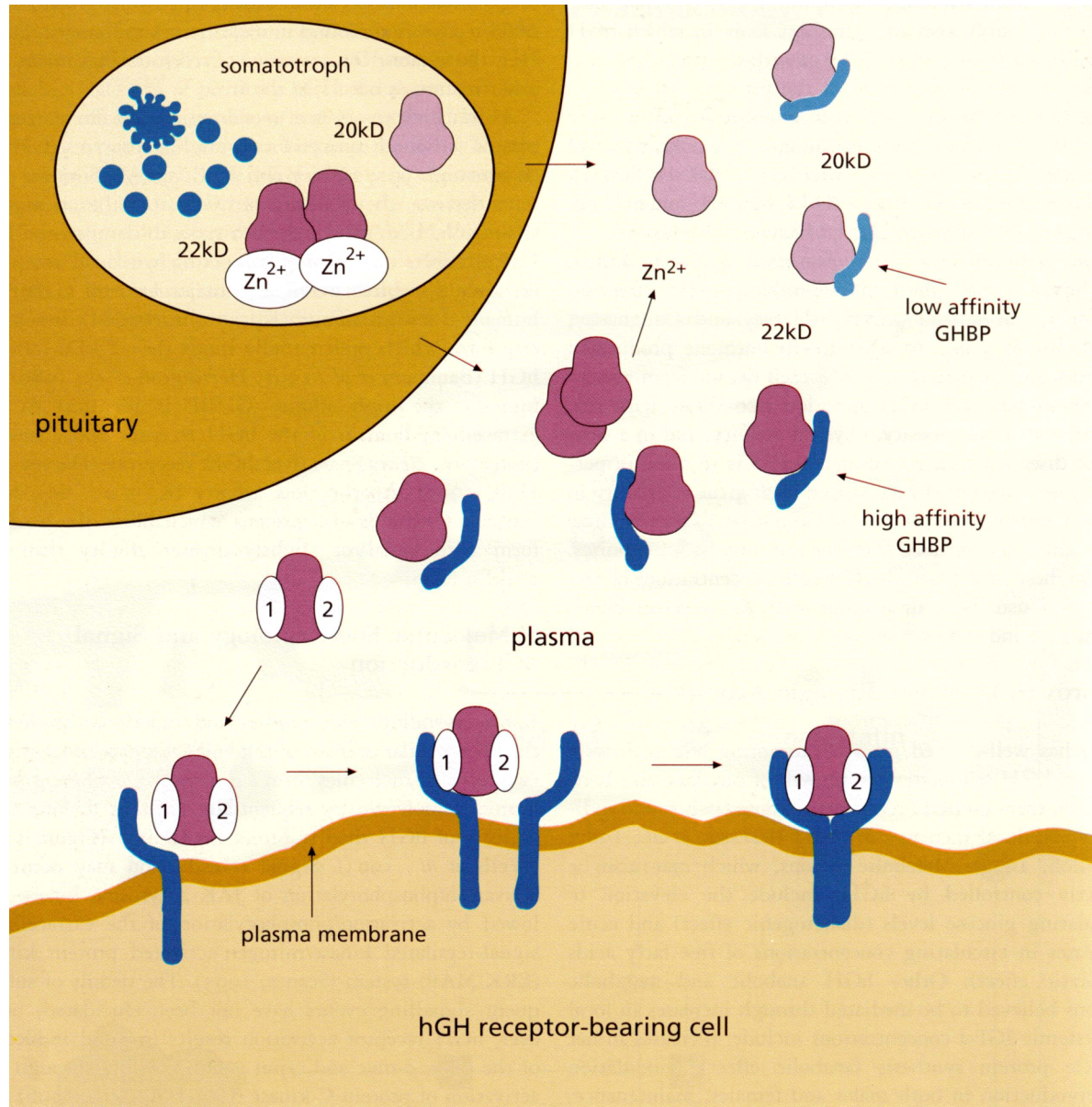
- Nem-glykozilált, 22kDA protein, 191 asav., 2 S-S híd, 4 alpha-helix: 1.4. tartalmazza a receptor kötő régiót.
- Fiziológiás összetétel: 85% a 22kDA monomer, 5-10% 20kDA monomer, 5% dimer – oka: alternatív splicing
- hGH-N gén: hypophysis első lebenyben, hGH-V gén: placentában.

hGH szekréció szabályozása:



Szekréció függ:
tápláltság, nem,
elhízás, fizikai
aktivitás.
Napi ritmus: 10-30
ng/ml csúcs
éjszaka

hGH receptor, kötő fehérjék:





rhGH és biológiai hatásai:

- Porc-és csont növekedés
- Metabolikus hatások: növeli a vércukrot, a keringő szabad zsírsav cc-t, anabolikus hatás (izom fehérje szintézist növeli).
- Ozmoreguláció: vesén átfolyó plazma mennyiség nő.
- Hat az insulin, glucagon és T3, T4 felszabadulásra és metabolizmusra.

- **rhGH:** E.coli-ban vagy emlős sejtben állítják elő.
1994. óta a WHO standard: 3.0 IU/mg.
- **Dózis:** hGH deficienciában: 0,05-0,1 mg/kg i.m. 3x hetente, vagy s.c. naponta este.

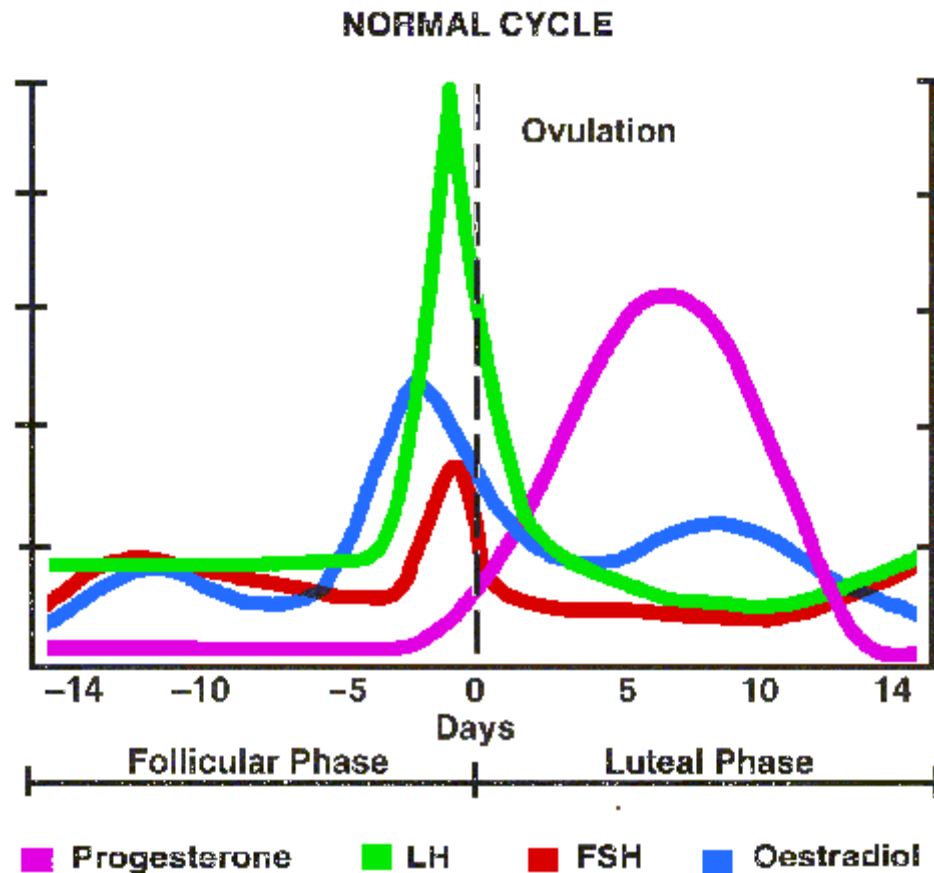
Hosszú hatású készítmény: **Nutropin Depot:** 1-2x havonta – biokompatibilis, biodegradábilis polylactide-coglycolide (PLGA) mikropartikulumokba zárva, elhúzódó bomlás, felszívódás.

Metabolizmus: vesén keresztül filtráció, visszaszívás, katabolizmus

Klinikai alkalmazás:

- Idiopathiás alacsony növés – növekedési hormon deficiencia (**GHD**): → hosszú távú hormonpótlás: Nutropin Depot sc. 1x havonta
- **Turner-szindróma**: - egyik x-kromoszóma hiánya → alacsony növés, zavart a másodlagos szexuális jelek kialakulása: rhGH + oxandrolon-nal kombinálva
- **Prader-Willi szindróma**: apai 15. kr. hiánya → alacsony növés, elhízás, hypotónia, hypogonadizmus, viselkedési zavarok. hGH javít az állapoton.
- **Gyerekkori krónikus veseelégtelenség**: gyermekeknél a metabolikus zavarok miatt (IGF-hGH vonal zavart) → lelassult fejlődés
- **Felnőttkori hGH deficiencia**:
 - a.: gyerekkori GHD folytatódik,
 - b.: tumor miatti hypophysectomia után.
 - c.: 60 év felett csökken a hGH termelés.
- **AIDS-hez asszociált fogyás**: anabolikus hatás kihasználása
- Kipróbálás alatt: - osteoporosisban, Crohn betegségben.

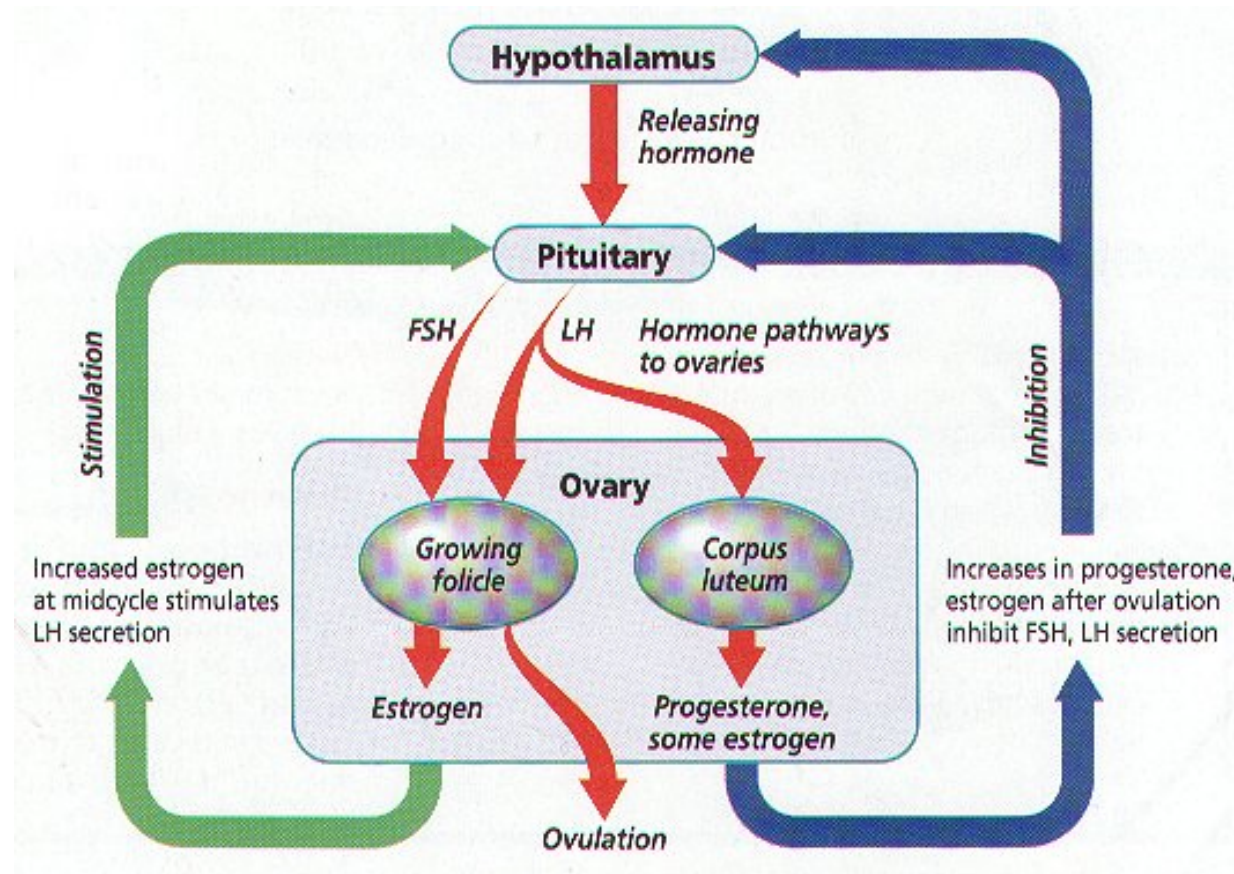
A női reprodukciós (menstruációs) ciklus



- FSH stimulálja a folliculus növekedést → ösztadiol

- 12. napon LH kilökés → ovuláció
→ folliculus progesteront termel

Visszacsatolási mechanizmusok:





Folliculus-stimuláló hormon (FSH)

- Régebbi gonadotropin preparátumok postmenopauzális vizeletből készültek: 5% tisztasági fok (LH-t is tartalmaztak)
- 1990. **rhFSH** → 2 subunit transzfekciója CHO sejtekbe → follitropin α (Gonal F) és follitropin β (Puregon/Follistim)
- **Termelőds helye**: hypophysis első lebeny
- **Hatása**: az oocytát körülvevő granulosa sejtek FSH receptorához kötődik → szaporodásukat serkenti

Kémiai szerkezet:

- Struktúrában azonos glycoproteinek **hormon család tagja**: FSH, LH, hCG, TSH
- **Dimer** szerkezet: α subunit azonos, β subunit eltér, specifikus mindegyik hormonra
- **CH oldalláncok**: α subuniton Asn-52, Asn-78, a β subuniton Asn-7 és Asn-24-hez csatlakoznak: mannóz, fukóz, N-acetyl-glukózamin, galaktóz, és szialinsav
- **Biológiai aktivitáshoz** szükséges a megfelelő dimer szerkezet és a CH oldalláncok:
 1. Receptor kötődéshez,
 2. Jelátvitel elindításához
 3. Plazma féléletidőt befolyásolja
- **Tisztítás**: 5 lépés kromatográfia, köztük egy egér anti-FSH monoklonális antitestet immunoaffinitás kromatográfia.
- **Izo-hormonok**: a terminális szialinsav tartalmában különböznek → meghatározza a molekula biológiai aktivitását.



Klinikai alkalmazás: indikáció

- **Anovuláció**/beleértve a polycisztás ovárium – 50 IU naponta 7-14 napig
- **Kontrollált ovárium hyperstimuláció**: in vitro fertilizáció, embryo transzfer céljára – előzetesen GnRH-val elnyomják az endogén gonadotropin képzést, majd 100-200IU rhFSH
- **Férfiaknak** hypogonadotróp hypogonadozmusban a spermatogenezis stimulálására.
- Minden esetben hatékonyabb, mint a vizeletből izolált forma.



The **GONAL-f® (FbM)** Prefilled Pen is easy for the patient to administer as it does not need reconstitution and cartridge assembly into the injection device, thereby reducing the number of steps before injection and assuring the patients that they are injecting an accurate and correct dose.

It is available in three multidose presentations (300, 450 and 900 IU) allowing individualised dosing of **r-hFSH** to individual patient needs in both OI (**Ovulation Induction**) and ART (**Assisted Reproductive Techniques**).



OVIDREL®
choriogonadotropin alfa



Ovitrelle®
choriogonadotropin alfa

Ovidrel/Ovitrelle

Ovidrel®/Ovitrelle®**1** (choriogonadotropin alfa) is the world's **first recombinant chorionic gonadotropin (r-hCG)** for the treatment of **anovulation**, the most common cause of infertility in women. Anovulation is brought about by irregularities in the hormones needed to produce and release healthy eggs.

Ovidrel®/Ovitrelle® is administered after the stimulation of the growth of follicles (or eggs) by another hormone (follicle stimulating hormone). It is used to trigger ovulation in women with anovulation and to promote final maturation of eggs in the ovaries of women undergoing assisted reproductive technologies (ART), such as **in-vitro fertilization**.



Luveris

Luveris® (lutropin alfa) is the world's first pure luteinizing hormone (**recombinant human LH**) for the treatment of female infertility.

It is indicated for use **in combination with human follicle-stimulating hormone (hFSH)**, like GONAL-f®, for the stimulation of follicles in the ovaries of women with severe LH and FSH deficiency.

Luveris® is the only pure LH presentation, allowing physicians to precisely tailor LH administration to individual patient needs, offering greater treatment flexibility.