

# Hematopoetski rastni faktorji

Prof.dr. Borut Štrukelj

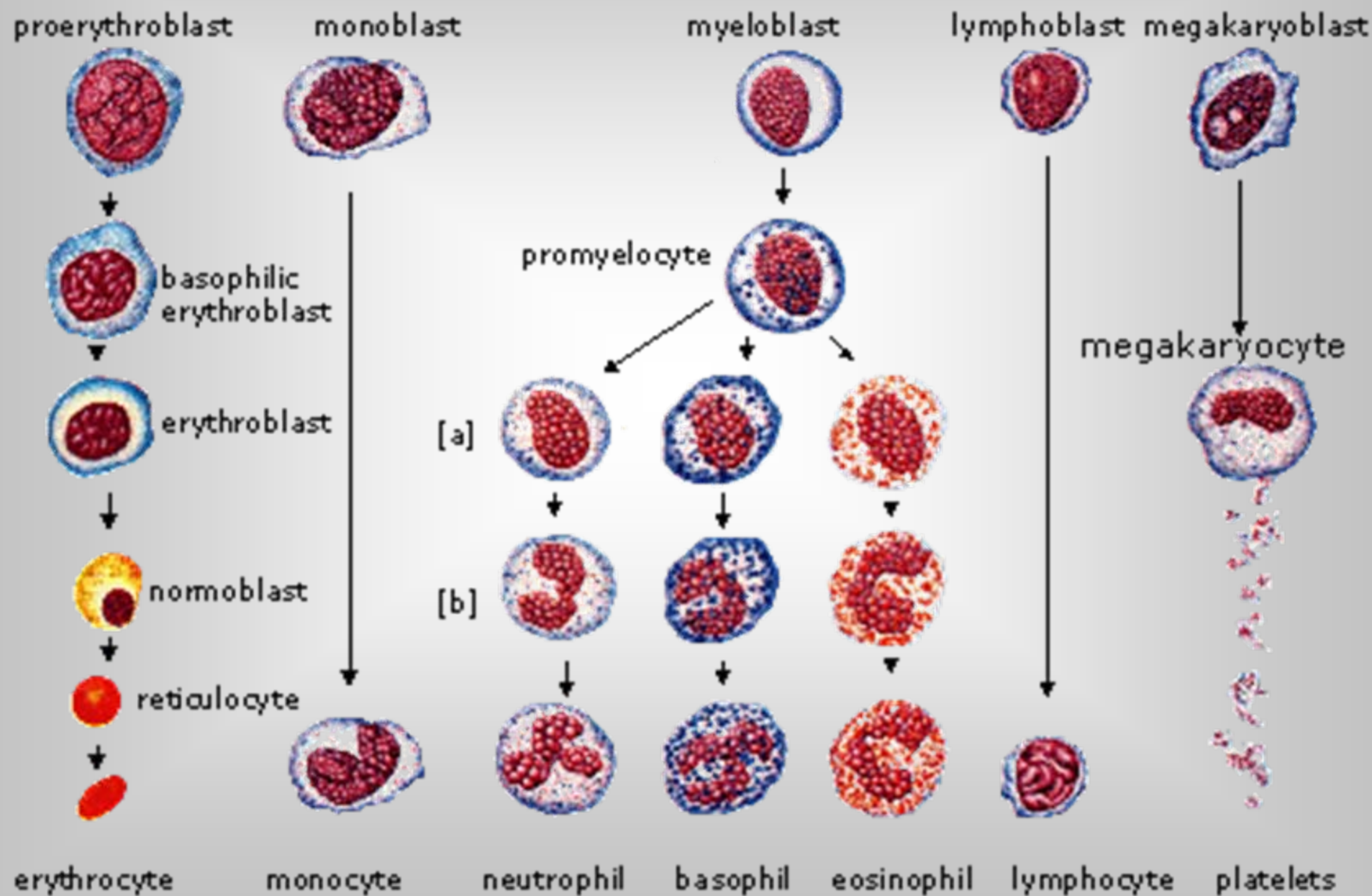
## Osnovne funkcije krvnih celic:

- Prenos kisika
- Skrb za imunski sistem
- Skrb za strjevanje krvi

Kratka življenska doba krvnih elic zahteva kontinuirano nadomeščanje-hematopoeza (anemije, infekcije, trombocitopenije)



Uncommitted stem cell gives rise to committed cells



# Poglavitni hematopoetski rastni faktorji

- Faktor, ki spodbuja razvoj granulocitov (G-CSF)
- Faktor, ki spodbuja razvoj granulocitov in monocitov (GM-CSF)
- Eritropoetin (EPO)
- Levkemija-inhibitorni faktor (LIF)
- Faktor, ki spodbuja razvoj makrofagov (M-CSF)
- Trombopoetin (TPO)
- Faktor, ki vzpodbuja razvoj matične celice (SCF)
- Razni interlevkini

**GM-CSF, SCF, interleukini ter interferoni delujejo na zgodnjo stopnjo diferenciacije matične celice, G-CSF, EPO. TPO in M-CSF pa na pozno stopnjo diferenciacije matične celice.**

- Hematopoetski rastni faktorji se sproščajo iz limfociov T, monocitov, makrofagov, fibroblastov in endoteljskih celic.**

<b>Celična vrsta</b>	<b>GM-CSF</b>	<b>IL-3</b>	<b>G-CSF</b>	<b>M-CSF</b>	<b>EPO</b>
<b>nevtrofilci</b>	+	+	+		
<b>monociti</b>	+	+		+	
<b>bazofilci</b>		+			
<b>eozinofilci</b>	+	+			
<b>eritrociti</b>		+			+
<b>trombociti</b>	+				

## G-CSF in GM-CSF

- Z rekombinantno DNA tehnologijo pridobljena rastna faktorja: filgrastim in lenograstim (G-CSF) in molgramostim in sargramostim (GM-CSF)

	filgrastim	lenograstim	molgramostim	sargramostim
Št aminokislin	175	174	128	127
MW	18,6kD	18,5 kD	14,7 kD	14,6 kD
glikozilacija	ne	O-glik	ne	N-glik
Genski vir	ca	ca	monociti	Limfociti T
Ekspresijski sistem	E. coli	CHO	E.coli	Aspergillus

## A Summary of Results: What three major studies discovered about Pegfilgrastim compared with Filgrastim

**Table 1**

	Filgrastim	Pegfilgrastim
Incidence of Grade 4 Neutropenia after cycle	179%	77%
Incidence of Grade 4 Neutropenia after cycles 2-4	55-60%	37-45%
Duration of Grade 4 Neutropenia after cycle 1	1.8 days	1.7 days
Duration of Grade 4 Neutropenia after cycles 2-4	1.1-1.3	0.6-0.9*
Incidence of Febrile Neutropenia after all cycles	18%	9%*
Time to ANC>2K after nadir	9.7 days	9.3 days

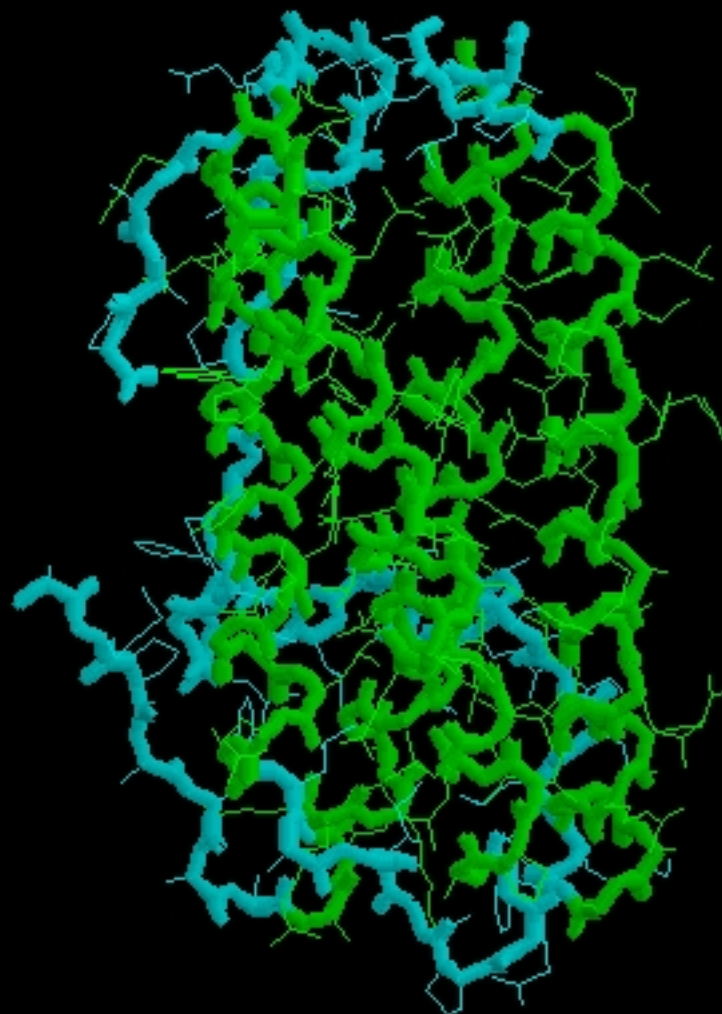
(\* indicated statistical significance).

**Table 2**

	Filgrastim	Pegfilgrastim
Duration of Severe Neutropenia	1.6 days	1.8 days
Incidence of Febrile Neutropenia after all cycles	20%	13%

**Table 3**

	Filgrastim	Pegfilgrastim
Incidence of Grade 4 Neutropenia	68%	69%
Duration of severe neutropenia after cycle 1	2.4 days	2.8 days
Incidence of Febrile Neutropenia after cycles 1 & 2	19%	21%
Time to ANC>2K after cycle 1	15 days	16 days



**G-CSF**

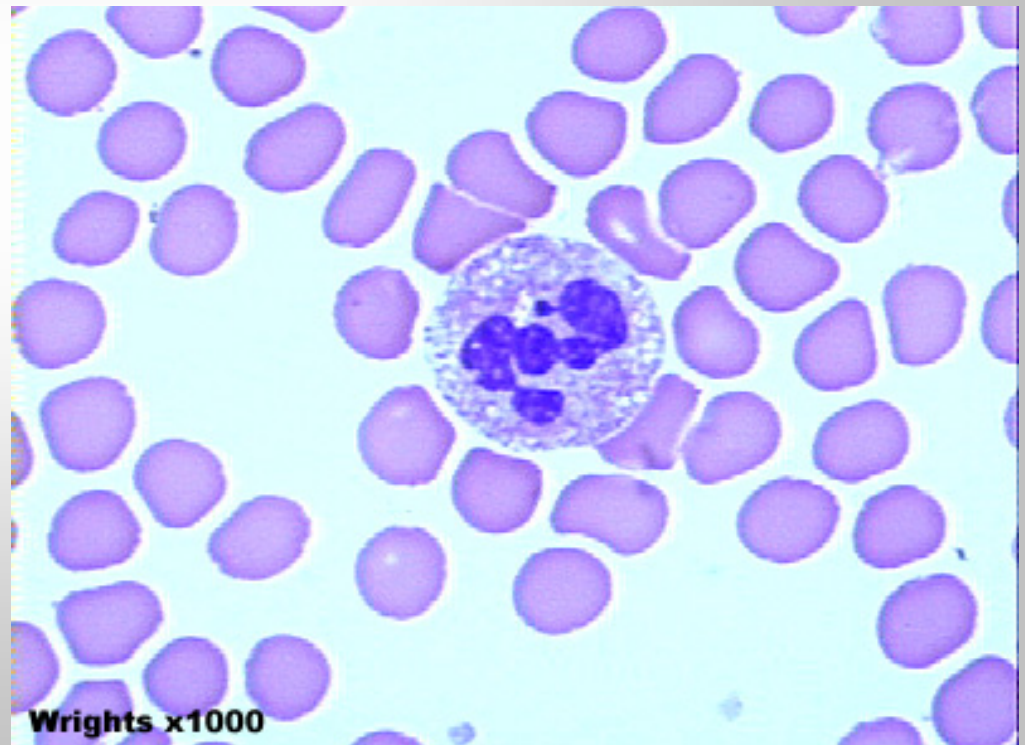
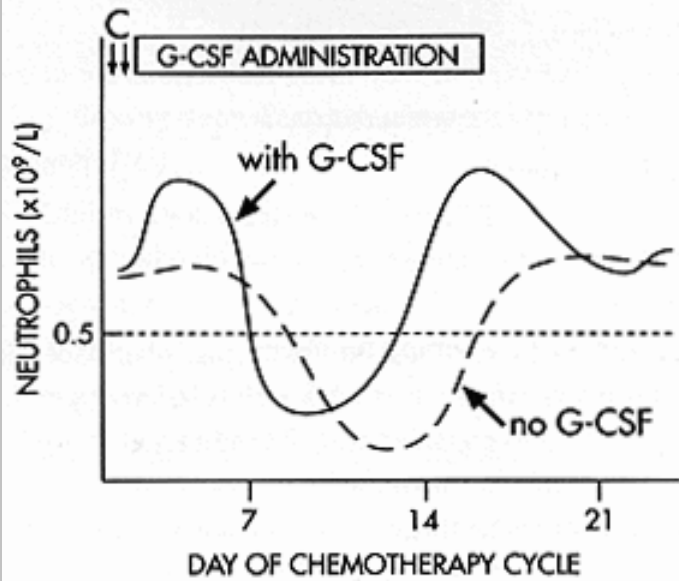


**Fig. 1**

Schematic diagram of the effects of G-CSF on neutrophil counts during a chemotherapy cycle.

C = chemotherapy administration

(Adapted with permission from Lieschke GJ. Topics on Supportive Care in Oncology, 1992;4:4-6.)

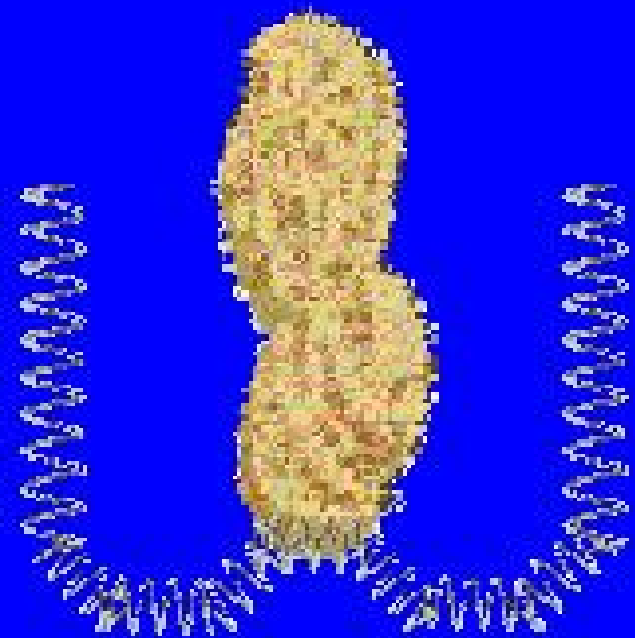


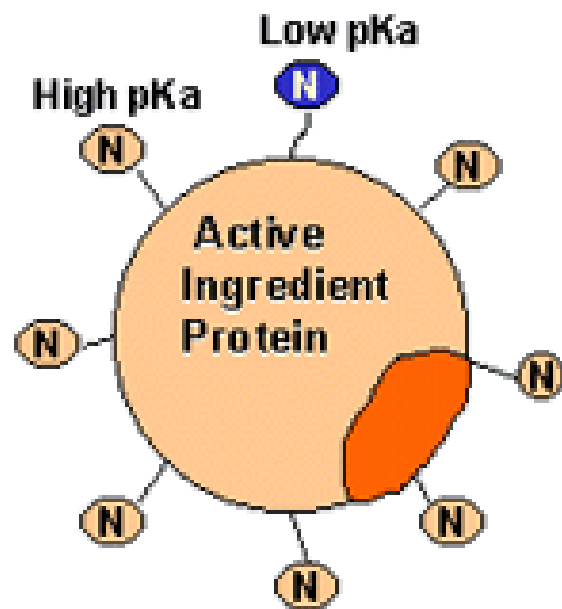
- **Indikacije:** nevtropenija (pri kemoterapiji, febrilnih stanjih, trasplantaciji organov, obsevanju, AIDS, kirurška profilaksa, pljučnice,
- **Neželjeni stranski učinki:**
  - **A) filgrastim:** bolečine v kosteh, slabost
  - **B) molgramostim:** slabost, dispnėja, diareja, rigor, bruhanje, anoreksija, aritmija, hipotenzija, perikarditis, pljučni edem, sindrom kapilarne permeabilnosti
- **Odmerki:** 1-5 ug/kg/dan



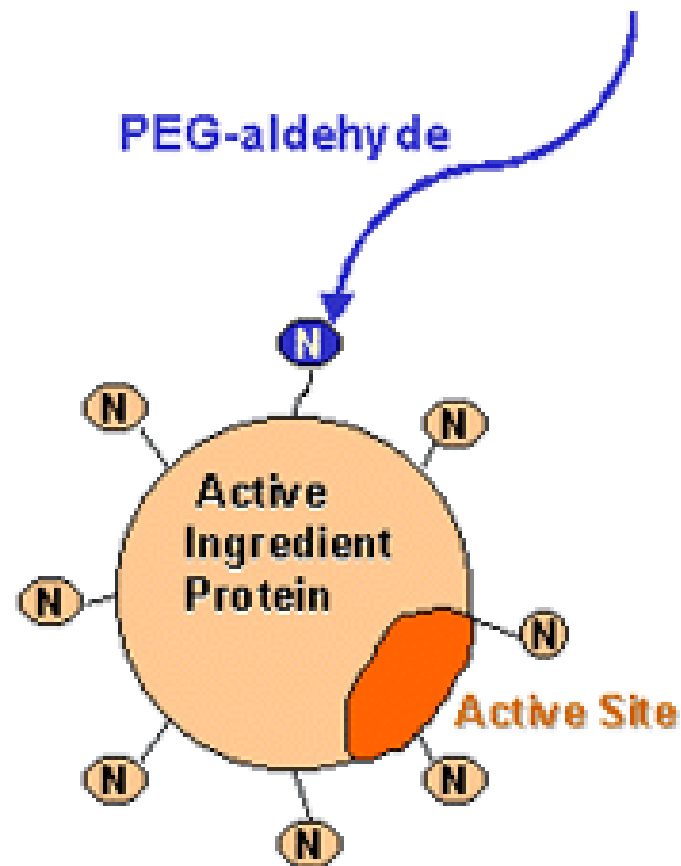
# Pegylation of proteins

- Enhanced solubility
- Decreased proteolysis
- Decreased immunogenicity
- Reduced rate of kidney clearance
- Increase in half life
- Altered distribution and absorption
- Nontoxic PEG readily cleared from body
- Enhanced storage stability





-  N Terminal Amine Group
-  Free Amine Group



N Terminal Amine Specific  
Pegylation at Acidic pH

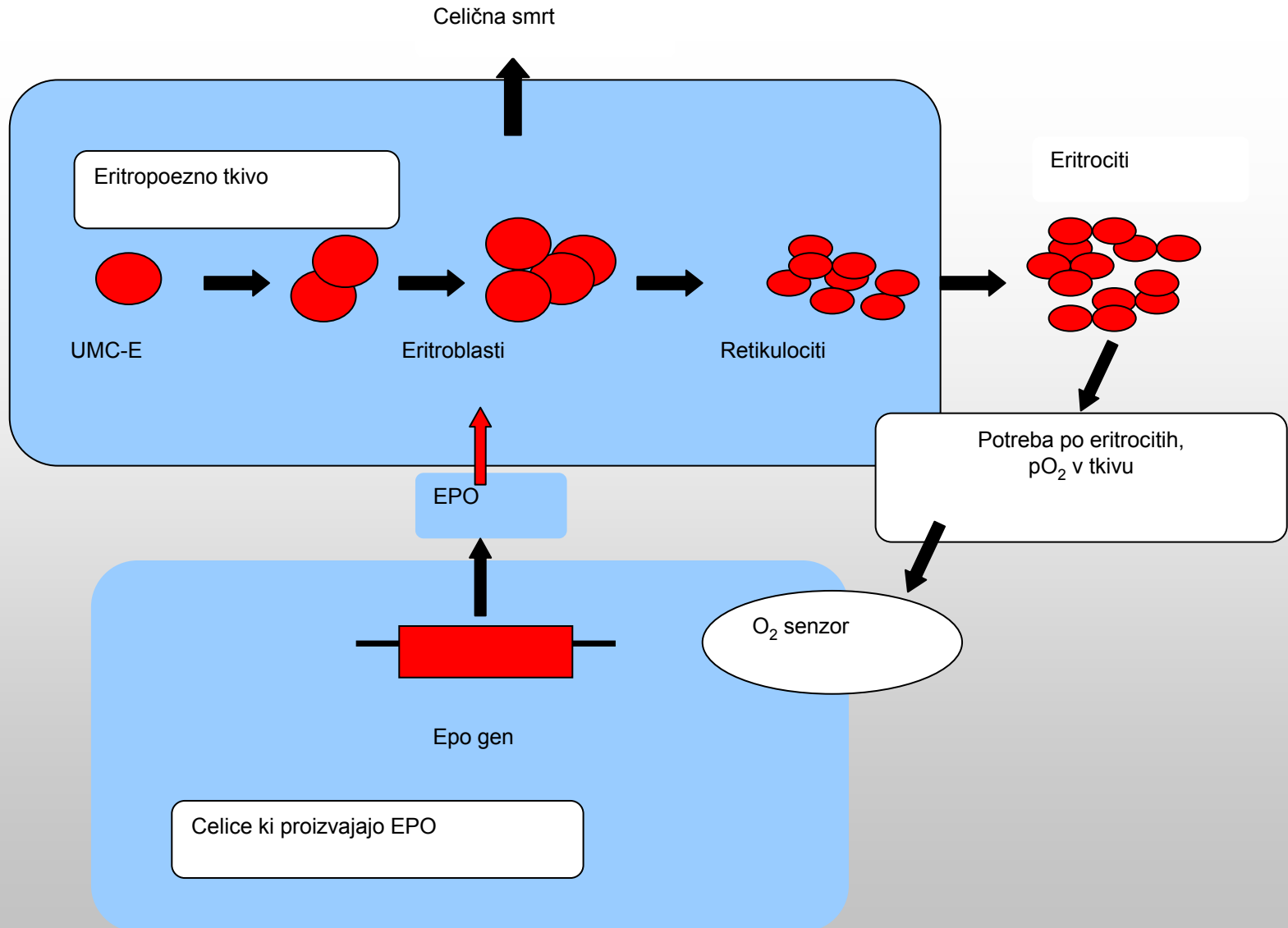
# Eritropoetin

**Fiziologija, biokemija, pridobivanje, zloraba**

# Fiziologija

- 1% eritrocitov se obnovi vsak dan. Anemije vodijo v tkivno hipoksijo. Vsak dan se naredi  $2-3 \times 10^{11}$  novih eritrocitov. Po izgubi večje količine krvi pa narastev produkcija eritrocitov še za 5-8 X!
- Eritropoetin je hormon (nepravi citokin)
- Regulira nastajanje in zorenje eritrocitov
- Tvorba: m RNA za eritropoein nastaja v ledvicah (peritubularne intersticijske celice korteksa in zgornjega dela medule ledvice)-94% in v jetrih (6%). Nekaj malega mRNA za EPO je še v pljučih, vranici in možganih. Glavni stimulus aktivacije transkripcije je tkivna (ledvična) hipoksija.
- Regulacija tvorbe (hipoksija) primik na višjo nadmorsko višino, izguba velike količine krvi, pri zmanjšanem pretoku krvi skozi ledvica, zmanjšani afiniteti hemoglobina do kisika, pri kronični obstruktivski pljučni bolezni in pri nekaterih oblikah srčnih bolezni

# Mehanizem delovanja



# Nastanek eritrocitov in vpliv EPO na celice:

Figure 2

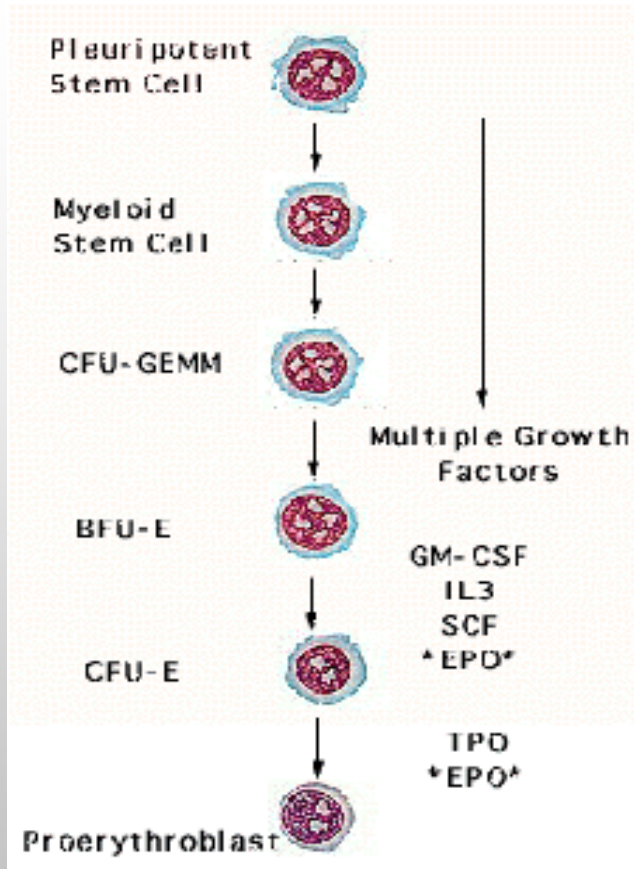
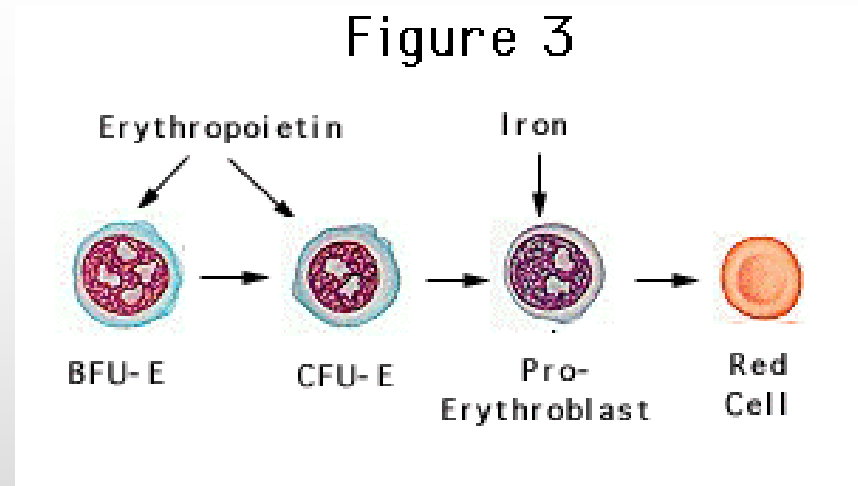


Figure 3





# Pato-fiziologija

- **A) Preveliko izločanje EPO**

- kronična višinska bolezen
- kronična respiratorna hipoventilacija
- ledvične ciste
- stenoza ledvične arterije
- tumor ledvičnega korteksa

- **B) Premajhno izločanje EPO**

- kronična ledvična insuficienca
- akutne in kronične infekcije
- avtoimune bolezni
- AIDS
- kemoterapija
- opekline

# Terapevtska uporaba

- Kronična odpoved ledvic,
- Zdravljanje anemije, ki nastane pri terapiji rakavih obolenj s kemoterapijo,
- Zdravljenje anemije pri nekaterih kroničnih boleznih (revmatoidni artritis),
- Zdravljenje anemije pri bolnikih z AIDS-om,
- Zdravljenje anemije pri nedonošenčkih,
- Po avtologni transfuziji pred operacij ali za zmanjšanje transfuzije po operaciji,
- Preventiva anemije po presaditvi kostnega mozga.

Običajna doza je 50 -150 I.U. EPO/kg telesne teže 2-3x tedensko.

To zadostuje za vzdrževanje hematokrita na vrednosti 32-35%



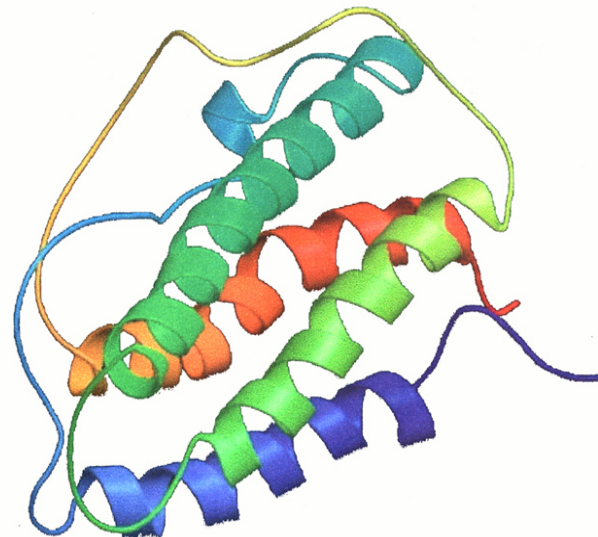
# Biokemija

## Gen

- Gen za EPO se pri človeku nahaja na 7 kromosomu (7q11-q22),
- 4kb (vsebuje promotor, 5 eksonov in 4 introne in pospeševalec pod vplivom hipoksije (hypoxia-inducible enhancer)).

## Peptidna struktura

- 165 aminokislin dolga polipeptidna veriga z izračunano molsko maso 18.3 kDa,
- 2 disulfidni vezi: Cys7-Cys161 in Cys29-Cys33,
- Visoka homologija med človeškim in mišjim EPO,
- 3D struktura: 4 alfa-vijačne strukture, ki jih povezujejo različno dolge zanke.

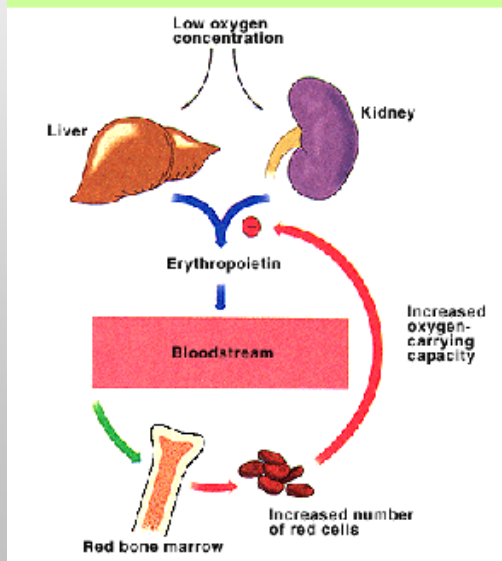


# Izolacija EPO in bioprodukcija rEPO

Iz 2550 litrov urina je leta 1977 Miyake s sodelavci izoliral 10 mg čistega EPO. Uspeli so narediti N-terminalno zaporedje, s tem so dobili osnovo za iskanje Po cDNA knjižnici. Izolirali so cDNA , ki kodira za preproeritropoetin ([ledvični faktor eritropoeze](#)).

## RBC PRODUCTION

•KIDNEYS WILL



- PRODUCE ERYTHROPOIETIN IN RESPONSE TO HYPOXEMIA
- ERYTHROPOIETIN STIMULATES BONE MARROW TO INCREASE RBC PRODUCTION

# Glikozilacija

4 glikozilacijska mesta, 14 izoform

N-glikozilacija (Asn24, Asn38 in Asn83)

O-glikozilacija (Ser126)

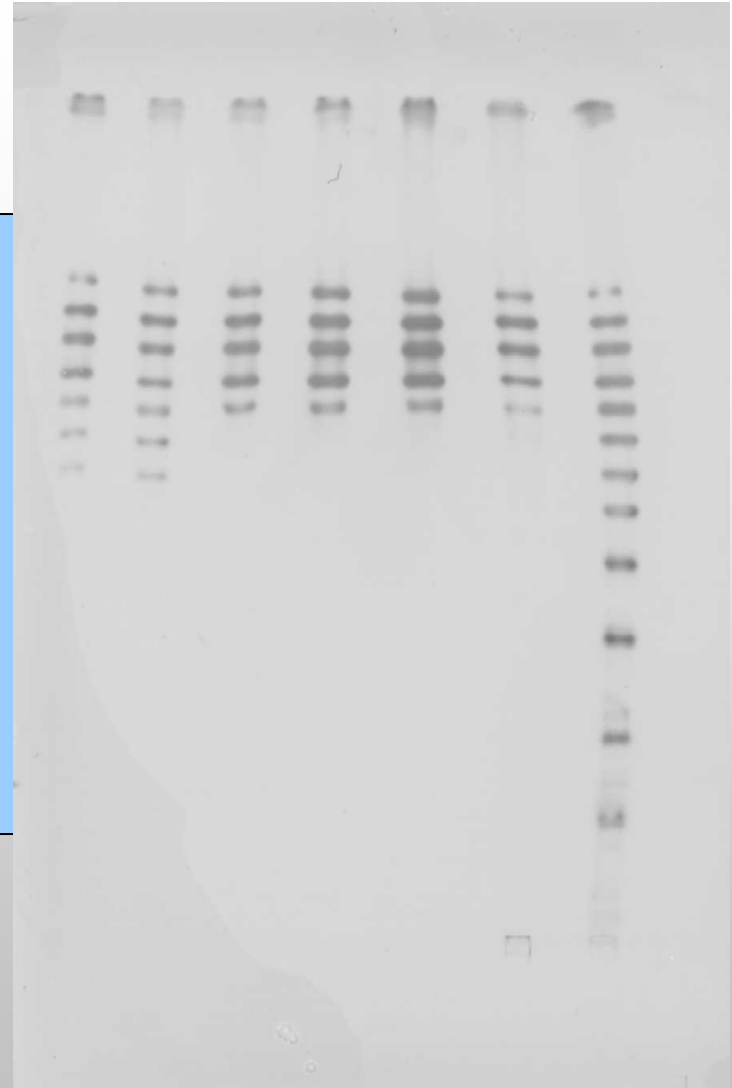
(Sialična k.) Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-6)  
Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-2)- Man( $\alpha$ 1-6) Fuc( $\alpha$ 1-6)  
Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)- Man( $\alpha$ 1-3)- Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc-**Asn**  
Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-2)

N-glikozilacijska struktura

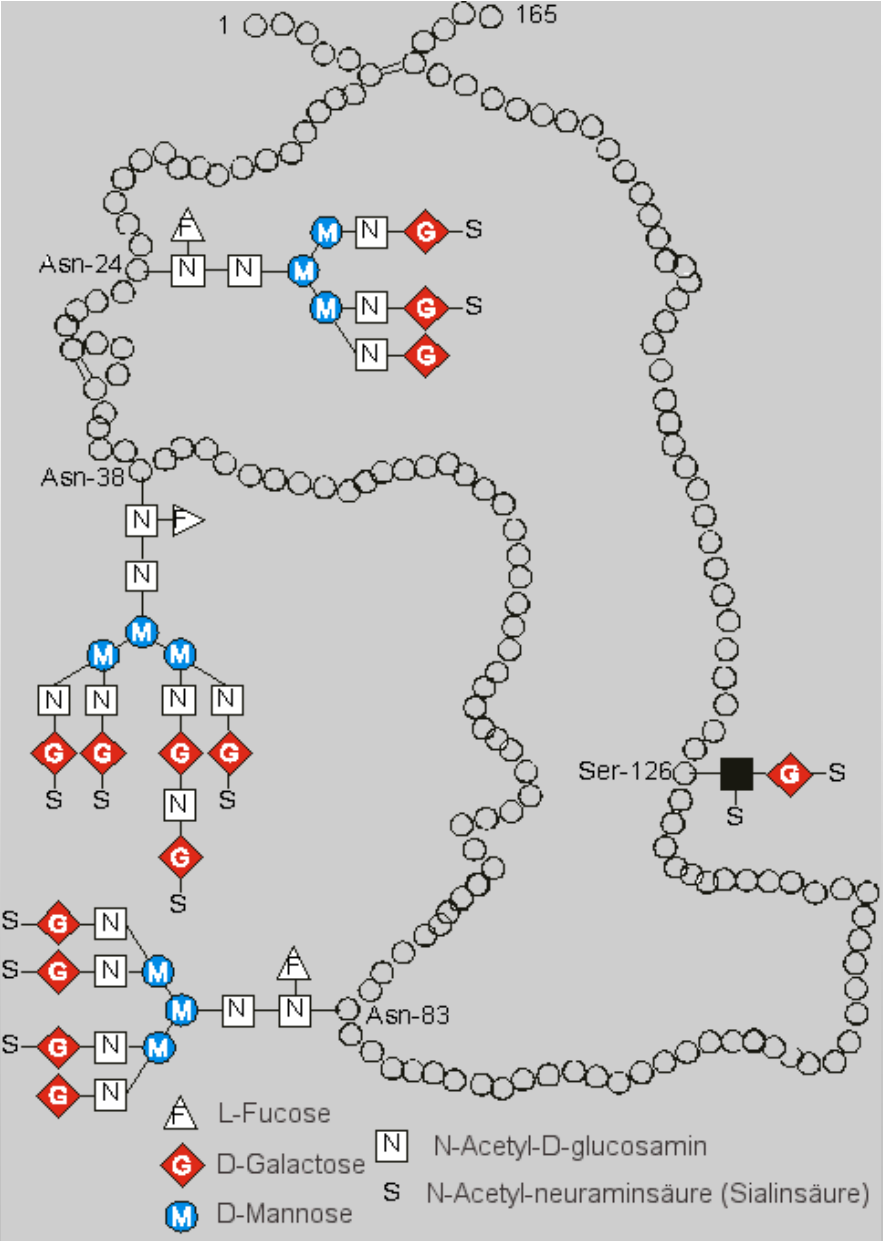
(Sialična k.)  
|

(Sialična k.)-Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAc-**Ser**

O-glikozilacijska struktura



# Shematski prikaz glikoziliranega EPO



# Pridobivanje

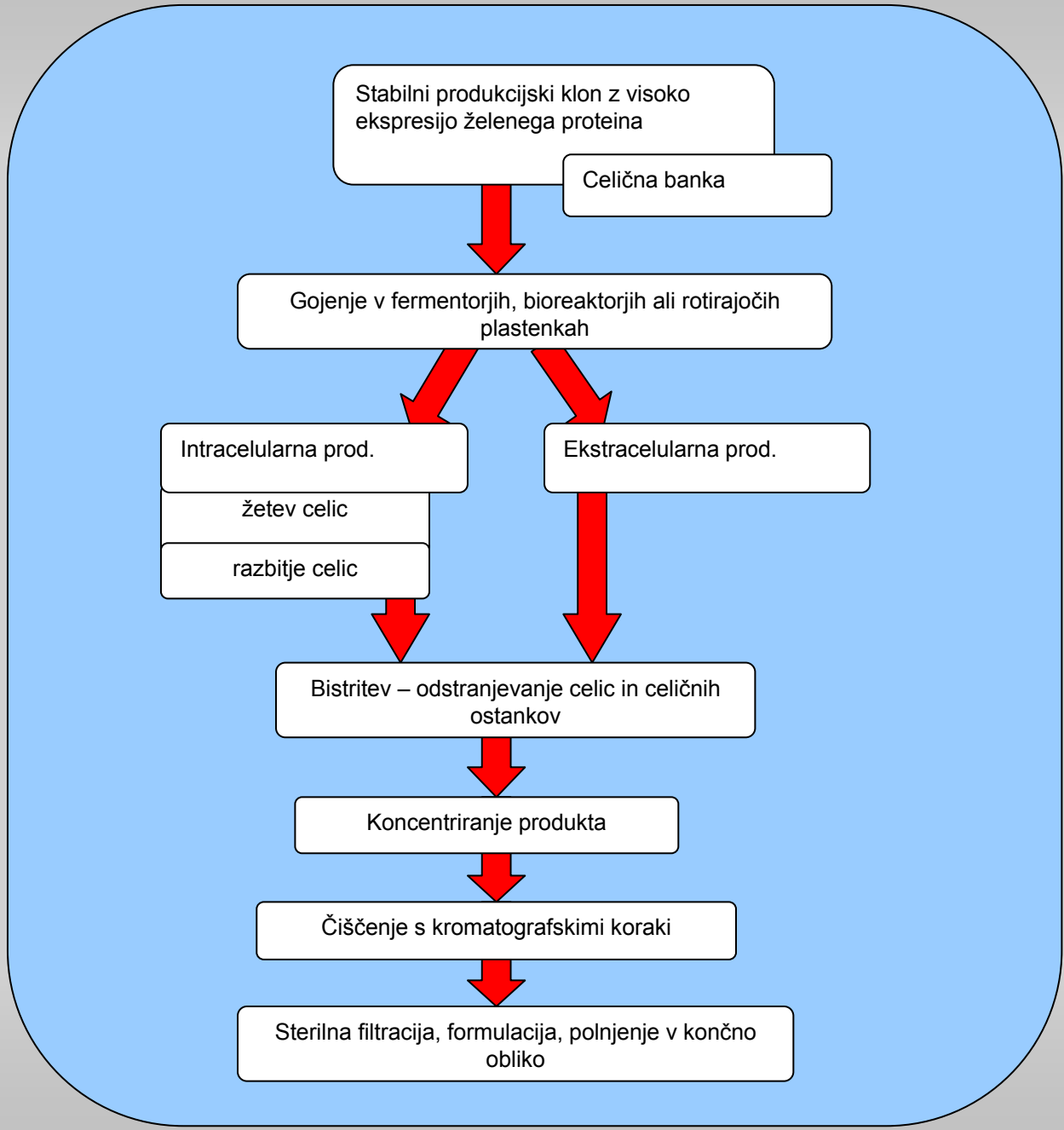
1. Določitev AK zaporedja (EPO iz urina),
2. Screening genomske knjižnice celic fetalnih jeter,
3. Izolirani gen vstavijo v vektor,
4. Vnos v gostiteljsko celico (CHO, BHK).

## CHO - Chinese Hamster Ovary celice (1957)

- Visoka stopnja pomnoževanja in izražanja rekombinantnih genov in proteinov,
- sposobnost sinteze proteinov s podobnim vzorcem glikozilacije kot nativni humani proteini,
- možnost gojenja v velikih bioreaktorjih.

## BHK - Baby Hamster Kidney (BHK) celice (1961 )

- Podobne CHO,
- zelo hitro sprejmejo viruse in se pogosto uporabljajo za proizvodnjo vakcin.



Stabilni produkcijski klon z visoko ekspresijo želenega proteina

Celična banka

Gojenje v fermentorjih, bioreaktorjih ali rotirajočih plastenkah

Intracelularna prod.

Ekstracelularna prod.

žetev celic

razbitje celic

Bistritev – odstranjevanje celic in celičnih ostankov

Koncentriranje produkta

Čiščenje s kromatografskimi koraki

Sterilna filtracija, formulacija, polnjenje v končno obliko



# Kakovostne zahteve rekombinantnih proteinov za terapevtske namene

Nečistote	Metoda določanja	Zahteve
Nečistote iz medija in procesa (dodatki v mediju, serumu, izlužene snovi, čistila)	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Spec. metode za določanje barvil, detergentov itd.</li> </ul>	10 ppm
Proteinske nečistote (sestavine medija, gostitelji proteini, nečistote iz izdelka)	<ul style="list-style-type: none"> <li>•HPLC</li> <li>•IEF</li> <li>•SDS-PAGE</li> <li>•ELISA</li> </ul>	100ppm
Endotoksini	<ul style="list-style-type: none"> <li>•LAL (Limulus Amebocyte Lysate)</li> </ul>	Apirogenost
Pirogeni	<ul style="list-style-type: none"> <li>•<i>In vivo</i> test na pirogene na kuncih (Edina metoda, jo ki dovoljuje Ph. Eur. Za določanje pirogenov v končnih paraneralnih produktih).</li> <li>•Humani lavkocitni test na pirogene</li> </ul>	Apirogenost
Mikrobiološke kontaminante (bakterije, glive, mikoplazme)	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Test sterilnosti</li> </ul>	Sterilnost (za paraneralne pripravke)
Virusi in virusom podobni delci	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Obremenilni test z modelnimi virusi in validacija odstranjevanja virusov (viral clearance studies).</li> <li>•Virusno specifično DNA testiranje.</li> </ul>	V primeru da dodamo $10^{10}$ virusnih delcev mora biti log redukcije od 4 do 6.
Nukleinske kisline	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Fluorometrija (barvanje NK z barvilom picogreen)</li> <li>•DNK hibridizacija.</li> <li>•Inkubacija celične linije z radioaktivno označenimi nukleotidi in nato merjenje radioaktivnosti v končnem produktu.</li> </ul>	100 pg/enkratni terapevtski odmerek

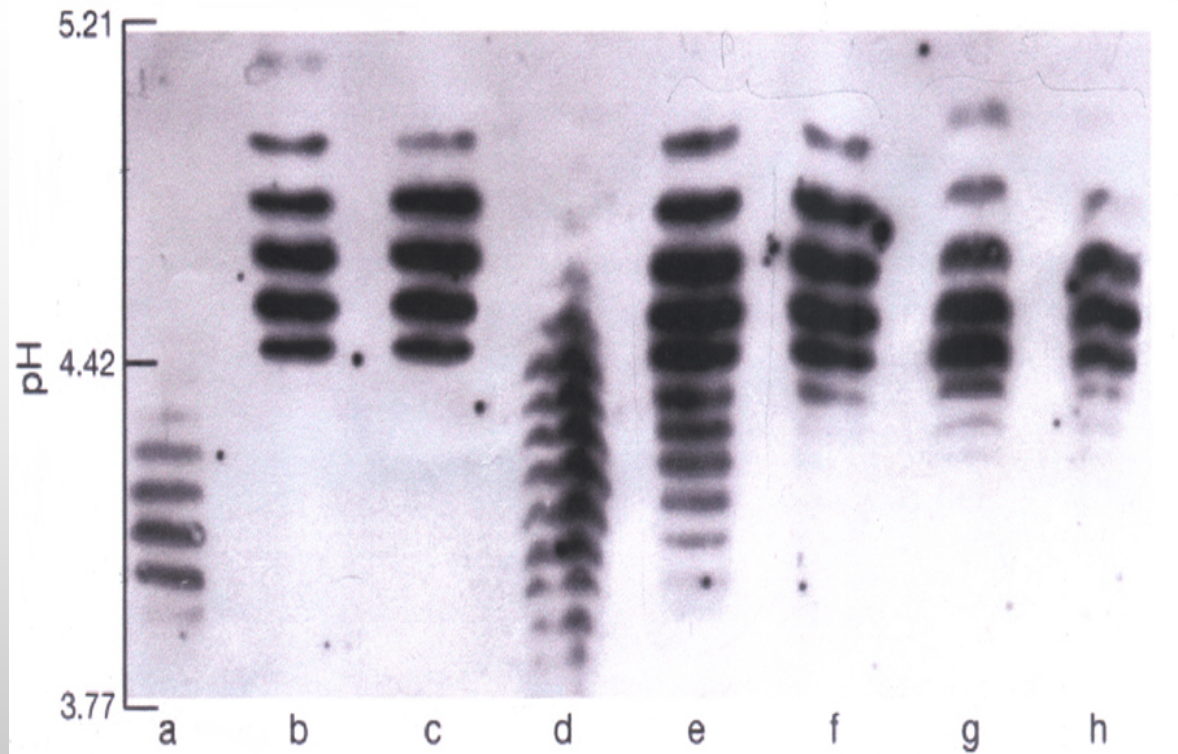
# Zloraba EPO

- EPO zveča oksiforno kapaciteto krvi,
- Tritedensko jemanje rekombinantnega EPO (1x / 2 dni) poveča totalno koncentracijo hemoglobina 7-12% in s tem poveča dostavo kisika tkivom za 6-7%.
- Zloraba v športnih disciplinah, kjer je pomembna aerobna poraba energije (plavanja, tek na smučeh, kolesarjenje in tek na daljših razdaljah).



# Detekcija rekombinantnega EPO pri športnikih

- **Indirektno** (pretočna citometrija) mejna vrednost hematokrita je 50%,
- **Direktno** (IEF) določanje rekombinantnega EPO v urinu,
- **Kombinirana metoda** (pretočna citometrija in ELISA) hematokrit retikulocitov, serumsko koncentracijo EPO, topni receptor za transferin, hematokrit in delež makrocitov.



Slika: IEF analiza EPO gliko-izoform; a: komercialni naravni EPO (urinski), b: Neorecormon, c: Eprex, d: urin kontrolne osebe, e,f: urin pacienti na th. z Neorecorminom, g,h: urin kolesarjev.

# Patentna zaščita in nove eritropoezno-stimulirajoče molekule

Potek osnovnega patenta: 2004!

Novi analogi EPO: **darbepoetin-alfa (Aranesp)**: uvedba 2 novih Asn: dve novi mesti glikozilacije, kar poveča  $t_{1/2}$  na 20h! Običajni EPO: 5-6 ur, EPO brez sialičnih kislin: 2 min!

Razvoj dimer in trimer (prof. Sitkowsky)

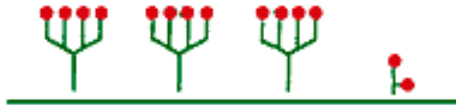
Razvoj s pomočjo **phage displaya** in razvoj peptidomimetikov

# Darbepoetin-alfa



## Schematischer Strukturvergleich

r-HuEPO



- 4 Kohlenhydrat-Ketten
- bis zu 14 Sialinsäurereste
- 40 % Kohlenhydratanteil

»Darbepoetin alfa«



- 6 Kohlenhydrat-Ketten
- bis zu 22 Sialinsäurereste
- 51 % Kohlenhydratanteil

• symbolisiert die glykosidischen Sialinsäurereste, die an N- (4 Sialinreste) bzw. O-Atomen (2 Sialinreste) binden

Abb. 1

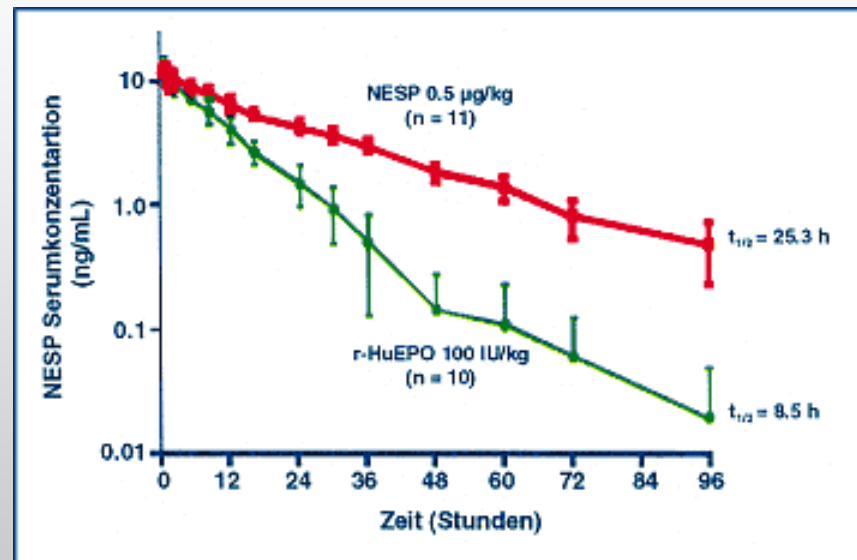


Abb. 2: Kinetikvergleich nach i. v.-Einzelgabe bei Dialysepatienten