

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Интегрисане академске студије фармације

Г06 – Фармацеутска биотехнологија

## **Терапијски цитокини: интерферони и интерлеукини**

7. НЕДЕЉА НАСТАВЕ

Летњи семестар 2022/2023. године

Крагујевац

## Цитокини

- У покушају да се систематизују бројни регулаторни протеини које лuche хематопoетске и соматске ћелије, 1974. године први пут је уведен термин - цитокини.
- Цитокини су солубилни мултифункционални протеини/гликопротеини које поред ћелија имунског система производе и друге здраве, али и туморске ћелије.
- Цитокини имају кључну улогу у расту, диференцијацији и репарацији ћелија, док у модулацији урођеног и стеченог имунитета представљају медијаторе инфламаторних реакција.
- У организму се производе у наномолским и пикомолским концентрацијама, а након везивања за рецепторе подстичу комуникацију између леукоцита или између леукоцита и других ћелија.

# Цитокини

## *-типови*

У цитокине се сврставају:

а) Интерферони (IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , - $\tau$ , - $\omega$ ):

Протеини које производе еукариотске ћелије у одговору на вирусне инфекције, туморе и друге биолошке индукторе.

б) Интерлеукини (IL-1-33):

Група цитокина коју углавном луче леукоцити и који првенствено утичу на раст и диференцијацију хематопоеетских и имуних ћелија. Такође су производ здравих и малигних ћелија и од великог су значаја у регулисању хематопоезе, имунитета, инфламације, ремоделовања ткива и развоја ембриона.

# Цитокини

## *-типови*

### в) Фактори раста:

Протеини који активирају ћелијску пролиферацију и/или диференцијацију. Многи фактори раста стимулишу ћелијску поделу различитих типова ћелија, док су поједини специфични за одређени тип ћелије. У ову групу се сврставају:

1. Фактори стимулације колонија (CSF) (гранулоцита (G-CSF), макрофага (M-CSF), гранулоцита и макрофага (GM-CSF));
2. Неуротрофини (фактор раста неурона (NGF), неуротрофни мождани фактор (BDNF), неуротрофин (NT-3, NT-4/5));
3. Цилијарни неуротрофни фактор (CNTF);
4. Глијални неуротрофни фактор (GDNF);
5. Епидермални фактор раста (EGF);
6. Еритропоетин (EPO);
7. Фактор раста фибробласта (FGF);

# Цитокини

## *-типови*

- 8. Фактор инхибиције леукемије (LIF);
- 9. Макрофагни инфламаторни протеини (MIP-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ , -2);
- 10. Тромбоцитни фактор раста (PDGF);
- 11. Трансформишући фактори раста (TGF- $\alpha$ , - $\beta$ );
- 12. Тромбопоетин (TPO).

### г) Хемокини (хемотактички цитокини):

Велика породица структурно сродних протеина мале молекулске масе која има хемотактичку активност и потентно активира леукоците.

### д) Фактори некрозе тумора (TNF- $\alpha$ и - $\beta$ ).

TNF- $\alpha$  (кахектин) и TNF- $\beta$  (лимфотоксин) су плејотропни цитокини (делује на различите типове ћелија) који учествују у патогенези различитих болести и регулацији стеченог имунског одговора.

# Цитокини

## -особине

- Цитокини делују тако што се везују за специфичне трансмембранске рецепторе који садрже две главне компоненте: домен за везивање лиганда ниског афинитета (одговоран за специфично везивање лиганда) и домен за везивање лиганда високог афинитета (активира промотере циљног гена преко интрацелуларног сигналног пута).
- Продукција цитокина може бити конститутивна или индуцибилна. Највећи број цитокина лучи се као одговор на одређене стимулусе или индукујуће сигнале, нпр. продукција IFN- $\alpha$  може бити индукована вирусном инфекцијом, па такву продукцију цитокина можемо назвати индуцибилном, док се пак неки други производе константно у организму попут EPO и CSF, тј. конститутивно.

# Цитокини

## -особине

- Након што се цитокини вежу за циљне ћелије, стимулишу их да синтетишу и ослобађају додатне количине истог цитокина, али и друге цитокине. Стога, постоје три типа активације:
  - аутокрина - када цитокин делује на ћелију која га лучи;
  - паракрина - када је деловање ограничено на непосредну близину секреције цитокина;
  - ендокрина - када цитокини дифундују до удаљених региона путем циркулације и утичу на различита ткива у организму.

# Цитокини

## -особине

- Производња већине цитокина је индуцибилна и секретију их ћелије које их производе, међутим то није увек случај.
- Поједини цитокини индукују циљну ћелију да синтетише и ослобођа друге цитокине (*нпр. када се IL-1 веже за свој рецептор на површини T-лимфоцита, T-лимфоцити синтетишу и ослобађају IL-2*).
- Неки од њих се складиште у цитоплазматским гранулама и брзо се ослобађају као одговор на стимулусе (PDGF и TGF- $\beta$ ) док су неки везани за екстрацелуларни матрикс у везивном ткиву, костима и кожи (TGF- $\beta$ , FGF и IL-1).



# Цитокини

## -особине

- Поједине ћелије (макрофаги, Т-лимфоцити), као одговор на инфективне агенсе, повреде ткива и токсичне стимулусе, луче цитокине који посредују у многим реакцијама урођене имуности.
- Већину цитокина продукују различите врсте ћелија
  - нпр. IL-1 продукују леукоцити, моноцити, макрофаги, NK-ћелије, В- и Т-лимфоцити, глатке мишићне ћелије, васкуларне ендотелне ћелије, фибробласти, астроцити и хондроцити.
- Многе ћелије продукују више од једног цитокина
  - нпр. лимфоцити продукују различите интерлеукине, CSF, TNF, IFN- $\alpha$  и - $\gamma$ , а фибробласти IL-1, -6, -8 и -11, CSF, TNF и IFN - $\beta$ ).

# Цитокини

## -особине

- Већина цитокина је плејотропна, при чему ефекти које остварују на различите ћелије могу бити исти или супротни:
  - *IL-1* индукује грозницу, хипотензију и инфламацију;
  - *G-CSF* стимулише раст неутрофила и хематопоеетских ћелија, а такође може да стимулише и миграцију ендотелних ћелија;
  - *IFN- $\gamma$*  стимулише активацију и раст *T*- и *B*-лимфоцита, макрофага, *NK* ћелија, фибробласта и ендотелних ћелија, а делује и антипролиферативно на поједине типове ћелија.
- Различити цитокини могу изазвати сличан биолошки ефекат:
  - *TNF- $\alpha$*  и *- $\beta$*  се везују за исти рецептор и индукују сличне/исте биолошке одговоре, а *IFN- $\alpha$*  и *- $\beta$*  иако се везују за исти рецептор, не индукују исте биолошке ефекте.

# Цитокини

## -особине

- Поред улоге у процесима имуности и инфламације, многи цитокини значајни су и у процесима, попут раста, развоја, еритропоезе, функционисања нервног система и других.

*-Неуротрофни фактори (NGF и BDNF) регулишу раст, развој и одржавање различитих врста неурона у централном и периферном нервном систему;*

*-Еритропоетин (EPO) стимулише производњу еритроцита из прекурсора у костној сржи.*

# Цитокински рецептори

## -врсте

- На основу хомологије аминокиселинских секвенци, цитокински рецептори се класификују у 6 суперфамилија.

Суперфамилија рецептора	Ендогени лиганди
Хематопоетски рецептори (citoкински рецептори тип 1)	IL-2, 7, 9, 12, G-CSF, GM-CSF, EPO, LIF, CNTF, GH
Рецептори за интерфероне (citoкински рецептори тип 2)	IFN- $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , IL-10
Рецептори тирозин киназе	EGG, IGF-1, инсулини
Рецептори за факторе раста неурона	NGF, TGF
Трансмембрански рецептори	хемокини (укључујући IL-8 и MIP)
Протеини који контролишу систем комплемента	IL-2 ( $\alpha$ -ланац)

## Цитокински рецептори

### *-особине*

- Чланови једне рецепторске суперфамилије имају хомологију од 20 до 50%. Већина рецептора има више различитих домена, па поједини домени могу бити заједнички за две или више суперфамилија.
- Цитокински рецептори могу да се састоје од:
  - трансмембранског полипептида (рецептори за IL-8, -9 и -10);
  - две полипептидне компоненте (рецептори за IL-3, -4 и -5);
  - три или више полипептидних компоненти (рецептор за IL-2 - три полипептидна ланца).

## Цитокински рецептори

### -особине

- Рецептори су састављени од већег броја полипептида. Полипептид који је јединствен за тај рецептор директно интерагује са одређеним цитокином, а додатни полипептид(и), који може бити заједнички за већи број рецептора, је одговоран за иницирање сигналне трансдукције.
- Код неких рецептора за цитокине, везивање цитокина може директно да иницира сигналну трансдукцију.
- Поједини цитокини иницирају сигналну трансдукцију везивањем за два или више различитих рецептора
  - нпр. *IL-1* има два различита рецептора, тип I и II.

# Интерферони

- Интерферони су прва откривена фамилија цитокина. До данас је познато да људски организам производи најмање три различите класе интерферона :  $-\alpha$ ,  $-\beta$ , и  $-\gamma$ .
- IFN- $\alpha$  и  $-\beta$  који се једним именом називају интерферони **тип I** или киселински стабилни интерферони: показују значајну међусобну хомологију (сличност аминокиселинских секвенци 30%), везују се за исти рецептор и индукују сличне биолошке активности.
- IFN- $\gamma$  се разликује од осталих интерферона, јер се везује се за другачији рецептор и индукује различите биолошке активности, па се убраја у интерфероне **тип II**, а назива се и имуни интерферон.

# Интерферон-α

## *-особине и биохемија*

- IFN-α производе леукоцити. За сада је познато да постоји 26 хуманих гена/псеудогена за IFN-α и да они производе најмање 16 различитих зрелих, али блиско повезаних IFN-α.

### **- код људи -**

24 гена/псеудогена који кодирају производњу најмање 16 различитих зрелих IFN-α

**15 врста IFN-α тип I**

**1 врста IFN-α тип II**

садрже 166 АК  
(једна садржи 165)

садржи 172 АК



# Интерферон- $\alpha$

## *-особине и биохемија*

- Сваки члан фамилије IFN- $\alpha$  има назив који се додељује додавањем слова, броја или слова и броја након " $\alpha$ " (IFN- $\alpha$ A, IFN- $\alpha$ B, IFN- $\alpha$ 7, IFN- $\alpha$ 8, IFN- $\alpha$ 2b)
- На основу аминокиселинске анализе, молекулска маса свих IFN- $\alpha$  је 19 - 20 kDa. Хомологост секвенци различитих IFN- $\alpha$  износи >70%, најзаступљеније а.к. Су леуцин и глутаминска киселина, цистеин (најчешће на положајима 1, 29, 99 и 139), који у зрелом молекулу формирају две дисулфидне везе.
- Њихове терцијарне структуре су сличне, садрже неколико  $\alpha$  хеликса, али немају  $\beta$ -набране структуре. Хетерогеност IFN- $\alpha$  може бити последица О-гликозилације појединих IFN- $\alpha$  (иако неколико IFN- $\alpha$  није гликозилирано) и структурних разлика између подтипова IFN- $\alpha$ .

# Интерферон- $\beta$

## *-особине и биохемија*

- IFN- $\beta$  производе фибробласти.
- Људски организам синтетише само једну врсту молекула IFN- $\beta$ , који се састоји од 166 АК.
- Зрели молекул (преко 20 kDa) је гликопротеин, са једном дисулфидном везом код кога је угљенохидратни бочни ланац преко N-гликозидне везе везан за аспарагин на положају 80.
- У терцијарној структури IFN- $\beta$  доминира пет  $\alpha$ -хеликса, од којих су три паралелна, док су преостала два антипаралелна.

# Интерферон- $\gamma$

## *-особине и биохемија*

- IFN- $\gamma$  претежно производе лимфоцити, али његова производња може бити индукована и IL-2 и -12. Постоји један ген за IFN- $\gamma$ , који се налази на хуманом хромозому број 12.
- Зрели IFN- $\gamma$  садржи 143 АК, а SDS-PAGE анализом откривено је да због разлика у гликозилацији постоје три различите молекулске масе IFN- $\gamma$ :
  - 17 kDa - IFN- $\gamma$
  - 20 kDa - IFN- $\gamma$  гликозилиран на аспарагину у положају 97,
  - 25 kDa - IFN- $\gamma$  гликозилиран на аспарагинима у положају 25 и 97.
- Терцијарна структура молекула састоји се од шест  $\alpha$ -хеликса повезаних петљама. IFN- $\gamma$  постоји као димер и мултимер, а његов биолошки активан облик је хомодимер у коме су две подјединице антипаралелно повезане.

# Медицински значај и развој технологије добијања интерферона

- Узимајући у обзир да интерферони имају широк спектар биолошких ефеката, могу да се примењују у различите терапијске сврхе:
  - као антивиротици, антипаразитици и антибиотици јер индукују ћелијску резистенцију на вирусе, протозое и бактерије, односно појачавају имунски одговор на инфективне агенсе;
  - за лечење појединих аутоимуних стања јер регулишу већину аспеката имунске функције и мењају имунски и инфламаторни одговор;
  - за лечење појединих карцинома јер регулишу раст и диференцијацију многих типова ћелија, односно показују антипролиферативну активност.

## Медицински значај и развој технологије добијања интерферона

- Наведене ефекте интерферони остварују везивањем за специфични рецептор који се налази на цитоплазматској мембрани осетљивих ћелија, међутим, треба имати у виду да ниједан од интерферона не испољава све наведене биолошке ефекте.
- С обзиром на медицински значај интерферона, као и чињеницу да се у организму производе у малим количинама, унапређивање технологије добијања интерферона је од великог значаја.
- IFN- $\alpha$  је био први производ добијен из туморских ћелијских линија који је одобрен за терапију код људи. Првенствено су добијани у малим количинама директно из хуманих леукоцита изолованих из трансфузионих залиха крви.

## Медицински значај и развој технологије добијања интерферона

- Препарати добијени на овај начин су се састојали од мешавине различитих IFN- $\alpha$ , присутних у различитим количинама. Захваљујући напретку технологије и проналаску ћелија способних да производе интерфероне у већим концентрацијама седамдесетих година XX века почела је производња IFN- $\alpha$  у неопходним количинама.
- Наиме, откривено је да поједине ћелијске линије карцинома излучују интерфероне у већим количинама, а због своје трансформисане природе подложне су прилагођавању за раст у културама ћелија и то у већим запреминама.

## Медицински значај и развој технологије добијања интерферона

- У клиничким студијама је доказан терапијски потенцијал тако добијених препарата IFN- $\alpha$  на регресију тумора код пацијената са карциномом дојке, лимфомима и мултиплим мијеломом, као и на раст рекурентног тумора након операције код пацијената са остеогеним саркомом.
- Намалва (енгл. *Namalwa*) ћелијска линија (специфични сој хуманих лимфобластних ћелија) постала је главни индустријски извор интерферона.
- Овакав начин производње подразумевао је да се ћелије размножавају у великим ферментаторима (до 8000 L) при чему се накнадно додаје индуцибилни вирус (најчешће *Sendai*), што омогућава производњу значајних количина интерферона (из леукоцита).

## Медицински значај и развој технологије добијања интерферона

- На овај начин добија се мешавина од најмање осам различитих подтипова IFN- $\alpha$ . Један од првих производа добијен на овај начин је IFN- $\alpha$ -n1 (*Wellferon*<sup>®</sup>) који садржи девет подтипова IFN- $\alpha$ . За његову производњу коришћене су лимфобластне ћелије сисара, а сирови препарат се пречишћава хроматографијом која подразумева два имуноафинитетна корака.
- Са друге стране, IFN- $\gamma$  првобитно је добијен пречишћавањем хуманих лимфоцита.
- Осамдесетих година XX века са развојем генског инжењеринга отпочело је клонирање и експресија већине гена за интерфероне у различитим експресионим системима. На овај начин омогућено је добијање **чистог интерферона**, односно интерферона који садржи један (под)тип у довољним количинама.



## Медицински значај и развој технологије добијања интерферона

- Први рекомбинантни интерферон који се 80-их година испитивао у клиничким студијама за лечење једног подтипа хроничне лимфоцитне леукемије је **IFN- $\alpha$ 2a**, а недуго након тога за исту индикацију испитиван је и IFN- $\alpha$ 2b. За производњу ових интерферона се као експресиони систем користи *E. coli*.
- Данас се већина рекомбинантних хуманих (rh) интерферона производи у *E. coli*, али се могу производити и у другим експресионим системима (*S. cerevisiae*, CHO и BHK).
- Производњом негликозилираних IFN (поједини - $\alpha$ ) у *E. coli* добија се одговарајући негликозилиран дериват IFN, док се производњом гликозилираних IFN (- $\beta$ , - $\gamma$ ) у *E. coli* такође добија негликозилиран дериват, јер *E. coli* не може да спроведе посттранслационе модификације.

## Медицински значај и развој технологије добијања интерферона

- Међутим, то не представља проблем јер добијени негликозилирани дериват има биолошку активност сличну нативном, хуманом IFN који је гликозилиран.
- С обзиром да се интерферони производе у рекомбинантним микробиолошким системима, нечистоће у финалном производу су микробиолошке природе. Да би финални производ интерферона имао чистоћу 99%, неопходна су хроматографска пречишћавања која подразумевају:
  - стандардне технике - гел-филтрација и јоноизмењивачка хроматографија;
  - технике засноване на разликама у афинитету - имуноафинитетна хроматографија, хроматографије засноване на афинитету према бојама, металима, лецитину (за гликозилиране интерфероне), хидрофобним интеракцијама.

## Производња и медицинска примена интерферона- $\alpha$ -rhIFN- $\alpha$ 2B

- За добијање rhIFN- $\alpha$ 2B (*Intron A*<sup>®</sup>) експресиони систем је *E. coli* који садржи експресиони вектор са геном за интерферон који се експримира интрацелуларно.
- *Upstream* и *downstream* процеси:
  - Ферментација се обавља у посебно пројектованим биореакторима од нерђајућег челика, запремине 42 000 L.
  - Након изоловања из ћелија, производ се пречишћава хроматографијом.
  - Коначни корак пречишћавања је кристализација IFN- $\alpha$ 2B.
  - Кристални производ се поново раствара у фосфатном пуферу, који садржи глицин и хумани албумин као ексципијенсе.
  - Након асептичног пуњења, производ се лиофилизује.

## Производња и медицинска примена интерферона- $\alpha$ *-rhIFN- $\alpha$ 2B*

- rhIFN- $\alpha$ 2B први пут је одобрен у САД 1986. године за лечење хроничне лимфоцитне леукемије, а данас је у више од 50 земаља одобрен за бројне индикације од којих су најважније:
  - хронични хепатитиси (Б, Ц, Д),
  - карциноми (хронична лимфоцитна леукемија, хронична мијелоидна леукемија, не-Хоџкинов лимфом, мултипли мијелом...),
  - обољења изазвана хуманим папилома вирусом (полно преносиви кондиломи, ларингеална папиломатоза, цервикална интраепителна неоплазма...).

## Производња и медицинска примена интерферона- $\alpha$ *-rhIFN- $\alpha$ 2B*

- Примењује се *i.m.*, *s.c.*, интралезијски, или у виду *i.v.* Инфузије (30 min). Максималне концентрације у плазми се брже постижу након *i.m.*, него након *s.c.* примене (4 h vs. 7,5 h). Време полуетиминације износи 2,5 - 3,5 h.
- Најчешћи нежељени ефекти који се јављају након примене овог лека су: симптоми слични грипу, главобоља, умор, мучнина, дијареја, губитак апетита, проређивање косе, и оток, бол или пецкање на месту примене инјекције, док су озбиљнија нежељена дејства попут неуропсихијатријских, аутоимунских, исхемијских и инфективних поремећаја знатно ређа.

## Производња и медицинска употреба интерферона- $\alpha$ *-модификовани рекомбинантни интерферони*

- Бројни модификовани рекомбинантни интерферони су такође одобрени за клиничку употребу:
  - пегировани - *PEG Intron A*<sup>®</sup> и *Viraferon Peg*<sup>®</sup>;
  - синтетски - *Infergen*<sup>®</sup> (интерферон алфакон-1 или консензус интерферон).

# Производња и медицинска употреба интерферона- $\alpha$

## -пегировани *IFN- $\alpha$*

- Пегировани  $\text{IFN}\alpha\text{-2B}$  се од хуманог  $\text{IFN}\alpha\text{-2B}$  разликују само по ковалентно везаном ПЕГ.
- Такође се производи рекомбинантном ДНК технологијом у инжењерисаној ћелијској линији *E. coli* у коју је инсертован ген за хумани  $\text{IFN}\alpha\text{-2B}$ . Након ферментације, интерферон се пречишћава из бактеријске културе кристализацијом и вишеструким хроматографским корацима.
- Процес пегилације се спроводи као део *downstream* процеса. Наиме, интерферон се инкубира хемијски активираним метоксиполиетиленгликолом (мПЕГ), који формира ковалентне везе са слободним аминок групама на молекулу интерферона.

## Производња и медицинска употреба интерферона- $\alpha$ *-пегировани IFN- $\alpha$*

- Анализом молекулске масе пегированих интерферона утврђено је да се већина одобрених пегированих производа састоји претежно од монопегированих молекула интерферона, али су присутне и мале количине слободних и дипегированих врста, које такође настају током овог процеса. Монопегировањем се избегава стварање интерпротеинских (олигомеризација) или интрапротеинских мостова.
- Пегировани облик IFN- $\alpha$ 2b је лиофилизат који као ексципијенсе садржи натријум фосфат, сахарозу и полисорбат.



# Производња и медицинска употреба интерферона- $\alpha$

## *-пегировани IFN- $\alpha$*

- Коњуговање протеинских лекова са полиетиленгликолом (ПЕГ) тј. пегировање, има за циљ да спречи препознавање протеина од стране имунског система, као и да смањи његову елиминацију гломеруларном филтрацијом или посредством протеолитичких ензима и на тај начин продужи релативно кратак полуживот у плазми.
- Биолошка активност пегированих и непегированих интерферона је иста, али услед спорије елиминације из организма и спорије апсорпције са места инјектовања пегировани производ има продужен полуживот у плазми.

## Производња и медицинска употреба интерферона- $\alpha$ -синтетски интерферон

- **Интерферон алфакон-1** или **консензус интерферон** (*Infergen*<sup>®</sup>) је синтетски инжењерисани интерферон. Иницијални развој овог интерферона подразумевао је поређења аминокиселинских секвенци различитих нативних подтипова IFN- $\alpha$ .
- На основу најчешћих аминокиселинских остатака у одговарајућим положајима, синтетисана је аминокиселинска секвенца консензус интерферона која се састоји од 166 аминокиселина.
- Показује око 85% хомологије са IFN- $\alpha$ 2B и преко 30% хомологије са IFN- $\beta$ . У процесу производње овог интерферона користи се *E. coli*, која рекомбинантни производ акумулира интрацелуларно у виду инклузионих телашаца.

## Производња и медицинска употреба интерферона- $\alpha$ *-синтетски интерферон*

- Производња консензус интерферона подразумева ферментацију и жетву, након којих се ћелије *E. coli* хомогенизују и центрифугирањем се изолују инклузиона телашца. После растварања и поновног савијања протеинског молекула из инклузионих телашца, интерферон се до хомогености пречишћава комбинацијом хроматографских корака.
- Коначни производ се формулише у облику раствора уз додатак фосфатног пуфера и натријум хлорида. Пакује се у стаклене бочице има рок трајања 2 године када се чува у фрижидеру (2 – 8 °C).
- Консензус интерферон је одобрен за лечење хроничног хепатитиса Ц код пацијената старијих од 18 година, самостално или у комбинацији са антивиротцима (рибавирин).

# Интерферон- $\beta$

## *-производња и медицинска примена*

- За добијање rhIFN- $\beta$  експресиони системи могу бити:
  - рекомбинантне ћелије *E. coli*, при чему се добија rhIFN- $\beta$ -1b (*Betaferon*<sup>®</sup>, *Betaseron*<sup>®</sup>),
  - CHO ћелијске линије, при чему се добија rhIFN- $\beta$ -1a (*Avonex*<sup>®</sup> и *Rebif*<sup>®</sup>).
- rhIFN- $\beta$ -1b добијен употребом *E. coli* се од нативног хуманог IFN- $\beta$  разликује по томе што је негликозилиран, а цистеин на положају 17 је замењен серином.
- Ферментација *E. coli* постиже се употребом простог медијума, при чему се производ акумулира интрацелуларно (инклузиона телашац). Током даље обраде, инклузиона телашца се растварају у бутанолу, а да би се омогућило поновно савијање производа бутанол се уклања. После две узастопне гел-филтрације додају се помоћне материје, производ се пакује у стаклене бочице и лиофилизира.

# Интерферон- $\beta$

## *-производња и медицинска примена*

- Примењује се *s.c.* сваког другог дана, а након једне инјекције (500  $\mu\text{g}$ ) максимална концентрација у серуму се постиже за 8 h. Рок употребе је 18 месеци, када се чува на 2 – 8<sup>0</sup> C.
- **rhIFN- $\beta$ -1a** се производи рекомбинантном ДНК технологијом у CHO ћелијским линијама, гликозилиран је и има идентичну аминокиселинску секвенцу као и нативни хумани IFN- $\beta$ .
- Након добијања у култури ћелија, пречишћава се низом хроматографских техника, а као ексципијенсе садржи манитол, HSA, натријум ацетат, сирћетну киселину и натријум хидроксид. Формулише се као стерилни раствор у шприцевима спремним за употребу. Примењује се *s.c.* или *i.m.* три пута недељно, а након једне инјекције максимална концентрација у серуму се постиже за 16 h, а полувреме елиминације износи 70 h.

# Интерферон- $\beta$

## *-производња и медицинска примена*

- rhIFN- $\beta$  (1a и 1b) се користе за лечење релапсно-ремисионе мултипле склерозе (МС) јер смањују учесталост рецидива за око 30% (смањује акумулацију можданих лезија).
- IFN- $\beta$  индукује терапијски ефекат сложеним молекулским механизмима. Наиме, код пацијената са МС специфични Т-лимфоцити подстичу стварање проинфламаторних цитокина (IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-2 и TNF- $\alpha$ ) који уз друге елементе имунитета (нпр. антитела и активација комплемента) уништавају мијелин који окружује неуронске аксоне и онемогућавају им да преносе импулсе до мозга. IFN- $\beta$  инхибицијом производње IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  делимично спречава ове аутоимуне ефекте и на тај начин доприноси смањењу проинфламаторног одговора.

# Интерферон- $\gamma$

## *-производња и медицинска примена*

- rhIFN- $\gamma$ 1b (*Actimmune*<sup>®</sup>) је једноланчани полипептид од 140 аминокиселина који се производи у инжењерисаној *E. coli*.
- Има идентичну биолошку активност као нативни хумани IFN- $\gamma$ , иако је негликозилиран. Пречишћавање производа постиже се конвенционалном хроматографијом на колони.
- Формулише се као стерилни раствор који се састоји из нековалентно везаних хомодимера. Примењује се s.c. три пута недељно.
- IFN- $\gamma$  се користи за лечење хроничне грануломатозне болести. Такође, индикуван је за успоравање прогресије болести код пацијената са малигном узнатредовалом остеопорозом.

# Интерферон- $\gamma$

## *-производња и медицинска примена*

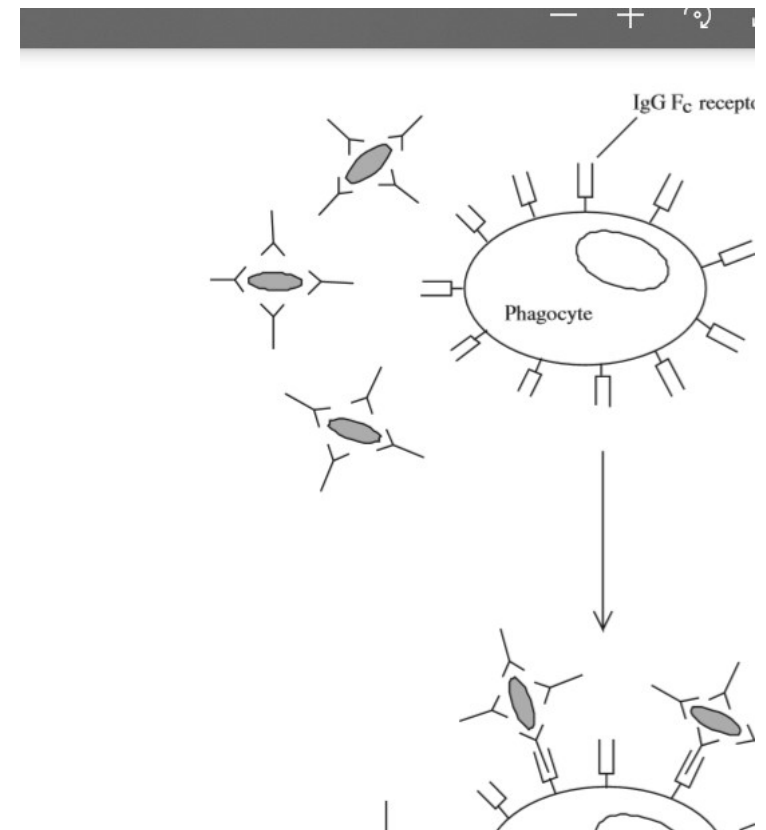
- У физиолошким условима, преко NADPH оксидазног система фагоцити производе високо реактивне кисеоничне врсте (водоник пероксид, хипохлорна киселина), које убијају патогене.
- Међутим, код хроничне грануломатозне болести постоји генетски дефект у NADPH систему, па он не функционише исправно. Наиме, фагоцити пацијената оболелих од овог поремећаја имају смањену способност за ингестију/уништавање инфективних агенаса, па последично може доћи до инфекција различитих органа опасних по живот.
- IFN- $\gamma$  као снажан активатор фагоцита, појачава флуks кроз NADPH оксидазни систем и потенцира његову способност да ствара токсичне кисеоничне врсте неопходне за убијање инфективних агенаса.



# Интерферон- $\gamma$

## *-производња и медицинска примена*

- IFN- $\gamma$  стимулише ћелијски и хуморални имунитет (нпр. преко Т- и В-лимфоцита), као и активност НК ћелија.
- Такође, IFN- $\gamma$  повећава експресију Fc рецептора за IgG на површини фагоцита. Имуноглобулини G препознају инфективне агенсе, везују их својим Fab фрагментима, а потом се Fc фрагментима везују за своје рецепторе на фагоцитима. Тако опсонизовани инфективни агенси се накнадно фагоцитују.



# Интерферон-γ

## *-производња и медицинска примена*

- Поред рекурентних инфекција, код оболелих од хроничне грануломатозне болести присутне су и инфламаторне реакције, које подразумевају формирање гранулома који могу довести до опструкције канала у уринарном и дигестивном тракту.
- Третман овог обољења првобитно је подразумевао профилактичку примену антибиотика, али се дуготрајна примена IFN-γ показала ефикаснијом у лечењу/ублажавању симптома ове болести.
- Ефикасност IFN-γ се испитује и за лечење:
  - лајшманијазе (узрочник - протозоа рода *Leishmania* која карактеристично инфицира макрофаге) јер IFN-γ стимулише инфицирани макрофаг да производи азотмоноксид, који је токсичан за паразите;
  - разних врста карцинома, АИДС и лепроматозне губе, јер IFN-γ стимулише активност фагоцита.

## Нежељени ефекти и токсичност интерферона

- Код многих пацијената током 8 h од примене интерферона (као и многих других цитокина) јављају се **благе реакције на месту примене и симптоми слични грипу** који се ублажавају применом парацетамола.
- Толеранција на примену интерферона се развија у првих неколико недеља од почетка лечења и у том периоду ови симптоми престају.
- У неким случајевима јављају се и **озбиљни нежељени ефекти**: инсуфицијенција јетре, реакције преосетљивости, анорексија, менструални поремећаји, несаница, анксиозност и емоционална лабилност, депресија, која у ретким случајевима може изазвати суицидалне мисли...

## Нежељени ефекти и токсичност интерферона

- У ретким случајевима, код примене високих доза, може доћи до срчане инсуфицијенције, компликација на нивоу ЦНС-а (дезоријентисаност, симптоми слични паркинсонизму), метаболичких компликација (хипергликемија) и разних других симптома, који захтевају хитан прекид лечења.
- Нажалост, у неким случајевима озбиљност нежељених ефеката може ограничити примену препоручене терапијске дозе, већ се примењују ниже дозе које немају максимални терапијски ефекат.
- Иако је тешко предвидети учесталост и тежину нежељених ефеката након примене препарата интерферона, праћењем пацијената у раним фазама лечења, најбоље се открива почетак нежељених ефеката, који би могли захтевати прекид терапије.

# Интерферони

*-регистровани за примену у Р. Србији*

Генерички назив	Заштићен назив	Експресиони систем	Индикација	Формулација
интерферон бета-1а, хумани рекомбинантни	<i>Avo-nex Rebif</i>	CHO	мултипла склероза	раствор за инј. у шприцу/пену
интерферон бета-1б, хумани рекомбинантни	<i>Beta-fe-ron</i>	<i>E. coli</i>	мултипла склероза	лиофилизат
пегировани интерферон алфа-2а	<i>Pegasys</i>	<i>E. coli</i>	лимфоми, хронични хепатитис В	раствор за инјекцију у шприцу

\*- подаци потичу из 2022. године, подложни су променама током времена.

# Интерлеукини

## *-особине и биохемија*

- **Интерлеукини (IL)** су полипептидни регулаторни фактори који чине другу велику фамилију цитокина и до сада је окарактерисано 33 (1 - 33).
- У већини случајева интерлеукини:
  - имају угљенохидратну компоненту (осим IL-1);
  - имају молекулску масу 15 - 30 kDa (поједини имају већу молекулску масу нпр. веома гликозилиран IL-9, молекулска маса 40 kDa);
  - делују паракрино тј. циљне ћелије су у непосредној близини ћелија произвођача (мада неки делују аутокрينو нпр. IL-2 може стимулирати раст и диференцијацију ћелија које га производе; а поједини имају ендокрине ефекте нпр. неки од ефеката IL-1);
  - већину интерлеукина производе различити типови ћелија (више од 17 типова ћелија производи IL-1; IL-8 производи најмање 10 различитих типова ћелија; IL-2, -9 и -13 производе само Т-лимфоцити);

# Интерлеукини

## *-особине и биохемија*

- Већина ћелија способних за синтезу интерлеукина заправо синтетише неколико њих, а многи значајни “произвођачи” интерлеукина нису ћелије имунског система.

Произвођачке ћелије	Интерлеукин
Васкуларне ендотелне ћелије	IL-1, IL-6, IL-8
Фибробласти	IL-1, IL-6, IL-8, IL-11
Кератиноцити	IL-1, IL-6, IL-8, IL-10
Макрофаги	IL-1, IL-6, IL-10, IL-12
Еозинофили	IL-3, IL-5

# Интерлеукини

## *-особине и биохемија*

- Регулација синтезе интерлеукина је комплексна и само делимично објашњена. У већини случајева, индукција или инхибиција било ког интерлеукина потиче од бројних регулатора (углавном додатних цитокина).
  - IL-1 повећава синтезу и ослобађање IL-2 из активираних Т-лимфоцита.
- Ћелије које синтетишу већи број интерлеукина не могу их истовремено синтетисати у великим концентрацијама.
- Скоро сви интерлеукини су слободни молекули, сем једног облика IL-1 који је везан за ћелије.



# Интерлеукини

## *-особине и биохемија*

- Интерлеукини индукују биолошки одговор након везивања за специфичне рецепторе на површини циљних ћелија, користећи један од наведених механизма сигналне трансдукције:
  - фосфорилација интрацелуларног тирозина;
  - фосфорилација интрацелуларног серина и треонина;
  - алтернативна сигнална трансдукција, укључујући:
    - повећање интрацелуларне концентрације калцијума или
    - хидролизу фосфатидилетаноламина уз ослобађање диацилглицерола.
- Биолошки одговори изазвани интерлеукинима су бројни, разнолики и изузетно сложени. Интерлеукини регулишу различита физиолошка и патолошка стања, укључујући:
  - раст ћелија;
  - имунски одговор;
  - инфламацију.

# Интерлеукини

## -особине и биохемија

- Клинички су значајни интерлеукини који утичу на раст трансформисаних ћелија, као и они који делују имностимулаторно.
- Појава рекомбинантне ДНК технологије олакшала је производњу ових молекула у количинама довољним за медицинске потребе, а до сада су само два интерлеукина одобрена за клиничку употребу (IL-2 - алдеслеукин, *Proleukin*® и IL-11 - опрелвекин *Neumega*®).
- Поред ова два интерлеукина клинички су значајни и антагонисти рецептора за IL-1.

# Интерлеукин-2

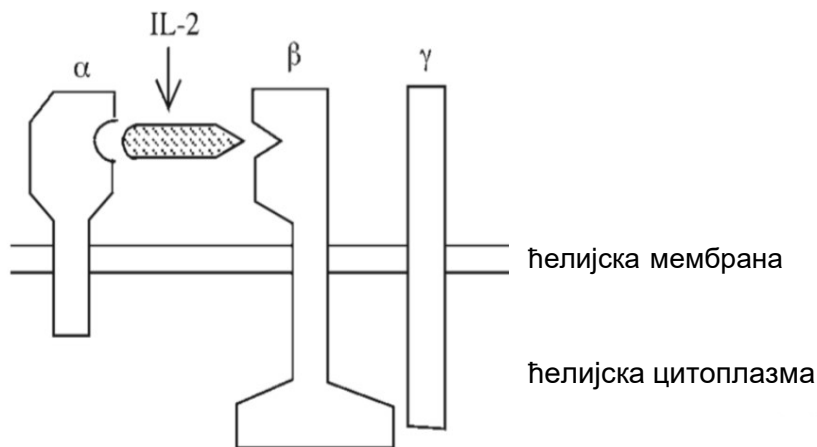
## *-особине и биохемија*

- **IL-2** или **фактор раста Т-лимфоцита**, је највише проучаван члан фамилије интерлеукина. То је први идентификован фактор раста Т-лимфоцита који има централну улогу у имунском одговору. Производе га искључиво Т-лимфоцити (посебно CD4+ Т-помоћничке ћелије), као одговор на активацију антигенима и митогенима.
- Хумани IL-2 је једноланчани гликопротеин од 133 АК, а у зависности од степена гликозилације има молекулску масу 15 - 20 kDa. Његова угљенохидратна компонента је повезана О-гликозидном везом за треонин у положају 3, али она није неопходна за биолошку активност.
- Састоји се од четири  $\alpha$ -хеликса повезаних петљама. Нема ниједну  $\beta$ -набрану структуру и садржи једну дисулфидну везу која повезује цистеине на положајима 58 и 105.

# Интерлеукин-2

## -рецептор

- IL-2 своје ефекте остварује везујући се за специфичне рецепторе који су присутни на бројним типовима ћелија, углавном оним које учествују у имунском одговору (Т- и В-лимфоцити, НК-ћелије, моноцити, олигодендроцити, макрофаги, LAK ћелије (лимфокинима активирани ћелије)).
- Везивањем за рецепторе, IL-2 индукује раст и диференцијацију ових ћелија. Стога се овај цитокин понаша као „главни прекидач“, активирајући већину аспеката имунског одговора.



Рецептор за IL-2 је састављен од три мембранска полипептидна ланца ( $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ )

# Интерлеукин-2

## -рецептор

- IL-2 се малим афинитетом везује за  $\alpha$  ланац рецептора, уз високу стопу асоцијације-дисоцијације. IL-2 не интерагује директно са  $\gamma$  ланцем који се понекад назива и  $\gamma_c$  (*c - common*), јер је често конституент и рецептора за друге интерлеукине -4, -7, -9, -13 и -15.
- IL-2 се средњим афинитетом везује за хетеродимерне комплексе  $\alpha\gamma$  или  $\beta\gamma$ .
- Хетеротримерни  $\alpha\beta\gamma$  комплекс представља прави цитокински рецептор за који IL-2 има највећи афинитет.

# Интерлеукин-2

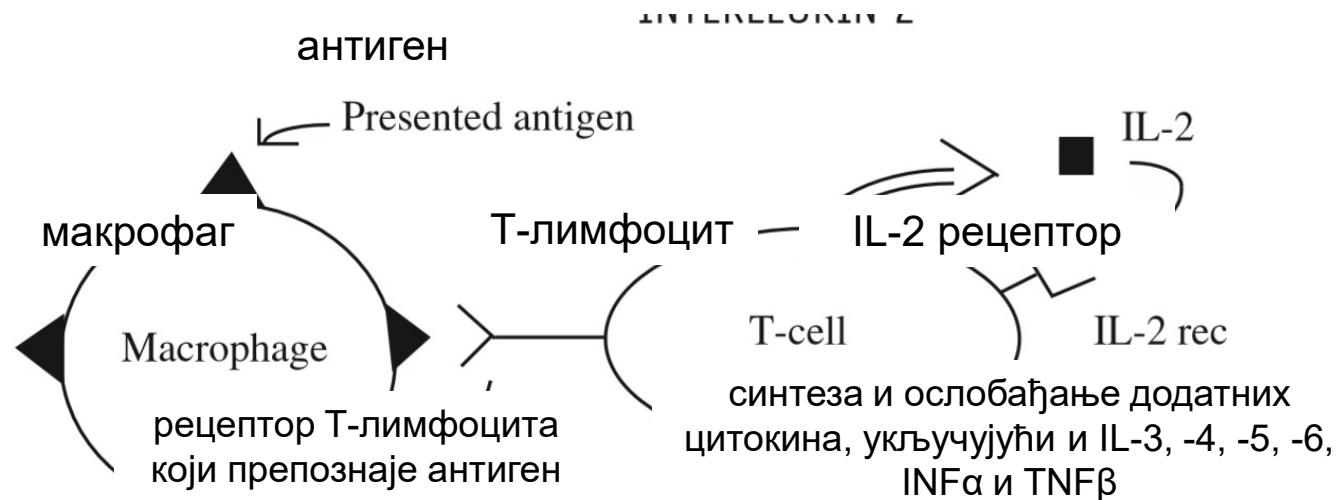
## *-рецептор*

- Тачан механизам интрацелуларне сигналне трансдукције након везивања IL-2 за рецептор није у потпуности разјашњен.
- $\alpha$  ланац рецептора поседује цитоплазматски домен који садржи само 9 АК и претпоставља се да нема улогу у интрацелуларној сигнализацији.
- Интрацелуларни домен  $\beta$  ланца састављен је од 286 АК и садржи најмање два региона (подручје богато серином и кисело подручје) неопходна за сигналну трансдукцију.  $\beta$  ланац се фосфорилише на специфичном тирозинском остатку после везивања IL-2, асоцијацијом протеина тирозин киназе неопходне за настанак интрацелуларних сигнала.
- Директна улога  $\gamma$  ланца није довољно разјашњена

# Интерлеукин-2

## -биолошка улога

- Након везивања Т-лимфоцита за антигене на макрофагима, долази до њихове активације и производње IL-2, који делује аутокринно и стимулише даљи раст и диференцијацију Т-лимфоцита.
- IL-2 је главни регулаторни молекул одговоран за стимулацију целуларног имунитета и има пролиферативну улогу као главни фактор раста Т- и В-лимфоцита.



# Интерлеукин-2

## -биолошка улога

- Ово доводи до индукције експресије гена чији су производи важни у стимулацији имунитета. То су:
  - Неколико цитоплазматских протеина способних да индукују раст Т-лимфоцита (тј. неколико ћелијских протоонкогена, укључујући *C-fos* и *C-myc*);
  - Разни цитокини, нарочито IL-2;
  - Цитокински рецептори, а нарочито подјединица  $\alpha$  рецептора за IL-2. (Т-лимфоцити конститутивно експримирају  $\beta$  и  $\gamma$  подјединице рецептора за IL-2. Индукцијом гена за  $\alpha$  субјединицу формира се комплекс  $\alpha\beta\gamma$  рецептора високог афинитета, чиме активиран Т-лимфоцит постаје осетљив на IL-2.)



# Интерлеукин-2

## *-биолошка улога*

- IL-2 делује имуностимулаторно тако што:
  - стимулише продукцију и секрецију антитела, што ефикасно потенцира хуморални имунски одговор;
  - стимулише раст и даљу диференцијацију NK ћелија, при чему се формирају LAK ћелије, које имају повећану способност да директно убијају туморске или вирусом инфициране ћелије. NK ћелије експримирају само  $\beta$  и  $\gamma$  IL-2 рецепторске субјединице, па су за њихову стимулацију неопходне повишене концентрације IL-2, због нижег афинитета везивања у односу на  $\alpha\beta\gamma$  комплекс. Такође, NK ћелије се активирају и низом других цитокина, као што су интерферони и TNF.

# Интерлеукин-2

## *-производња и медицинска примена*

- Главни значај IL-2 за клиничку примену се огледа у његовим имуностимулаторним ефектима. Примена егзогеног IL-2 појачава имунски одговор у бројним клиничким стањима, као што су карциноми, инфективне болести, дефицит Т-лимфоцита и други облици имунодефицијенције.
- Клиничка употреба IL-2 је у почетку била непрактична због малих количина у којима се физиолошки производи, али је употребом рекомбинатне ДНК технологије овај проблем превазиђен.
- Међутим, с обзиром да поједине трансформисане ћелијске линије, нарочито ћелијска линија Јуркат леукемије (леукемија Т-лимфоцита), производи IL-2 у повећаним количинама, за почетну карактеризацију коришћен је IL-2 пореклом из овог извора.

# Интерлеукин-2

## -производња и медицинска примена

- Иако се ген за IL-2 или комплементарна ДНК могу експримирати у великом броју домаћина, као експресиони систем најчешће се користи *E. coli* јер одсуство гликозилације не утиче на биолошку активност.
- **Алдеслеукин** (*Proleukin*®) је рекомбинантни IL-2 одобрен за лечење одређених врста карцинома (метастатски карцином бубрега и метатстатски меланом).
- Производи се у инжењерисаној *E. coli* и разликује се од нативног хуманог IL-2 јер није гликозилиран, нема аланин на N-терминусу, а цистеин у положају 125 је замењен серином.
- Производни процес укључује ферментацију у дефинисаном медијуму који садржи тетрациклин хидрохлорид, који се накнадно уклања из производа. Након екстракције и хроматографског пречишћавања, производ се формулише у фосфатном пуферу који садржи манитол и ниске концентрације SDS детерџента.

# Интерлеукин-2

## *-производња и медицинска примена*

- Алдеслеукин се везује за IL-2 рецептор што доводи до хетеродимеризације цитоплазматских домена  $\beta$  и  $\gamma$  ланаца IL-2R, активације тирозин киназе Јак3 и фосфорилације остатака тирозина на  $\beta$  ланцу.
- То резултује стварањем активираног рецепторског комплекса, у који су укључени различити цитоплазматски сигнални молекули који постају супстрати за регулаторне ензиме (тирозин киназе) повезане са рецептором. Ови догађаји последично доводе до стимулације раста и диференцијације Т-лимфоцита.
- Алдеслеукин поседује типичне биолошке активности IL-2:
  - побољшава митогенезу и цитотоксичност лимфоцита
  - индукује активацију LAK/NK ћелија
  - индукује производњу IFN- $\gamma$ .

# Интерлеукин-2

## *-производња и медицинска примена*

- Ови ефекти могу бити индуковани не само директно IL-2, већ и другим цитокинима, попут IL-3, -4, -5 и -6, као и TNF и IFN- $\gamma$ , чија је синтеза повећана услед примене IL-2.
- Примена IL-2 може изазвати дозно-зависне нежељене ефекте, али и озбиљна нежељена дејства, као што су кардиоваскуларне, хепатичке или пулмоналне компликације, које најчешће захтевају прекид терапије.

## Инхибиција активности IL-2

- Различита медицинска стања су узрокована/погоршана индукцијом/активацијом имунског система и углавном се лече применом имуносупресива као што су аутоимунске болести и спречавање одбацивања графта.
- Селективна имуносупресија која настаје код појединаца оболелих од ових стања се најбоље постиже спречавањем синтезе или функционисања IL-2.
- Циклоспорин А је један од најважнијих имуносупресивних лекова који се тренутно користи, а делује тако што инхибира синтезу IL-2.

## Инхибиција активности IL-2

- Међутим данас се бројни алтернативни приступи инхибиције IL-2 тестирају у клиничким студијама.
  - Примена солубилних рецептора за IL-2 уз истовремену примену нативних рецептора за везивање IL-2 (на површини ћелије);
  - Примена моноклонских антитела за рецептор IL-2 (моноклонско антитело које не иницира сигналну трансдукцију након везивања за рецептор);
  - Примена IL-2 у облику који задржава способност везивања за рецептор, али који не успева да покрене сигналну трансдукцију;
  - Примена IL-2 везаног за бактеријске или друге токсине, јер везивање IL-2 за његов рецептор доводи токсин у близак контакт са антиген-активираним Т-лимфоцитима (и другим ћелијама, укључујући активирание В-лимфоците) и уништава их. Ово доводи до селективне имунотолеранције на било који специфични антиген који активира В/Т лимфоците (нпр. денилеукин дифитокс)

# Инхибиција активности IL-2

## -денилеукин дифитокс

- **Денилеукин дифитокс** (*Ontak*<sup>®</sup>) је инжењерисани цитотоксични фузионисани протеин произведен рекомбинантном ДНК технологијом у *E. coli*.
- Одобрен је за клиничку употребу у САД 1999. године за лечење пацијената са кожним Т-ћелијским (лимфоцитним) лимфомом (енгл. *cutaneous T cell lymphoma* - CTCL).
- Фузионисани производ, молекулске масе 58 kDa састоји се од фрагмената дифтеријског токсина А и Б који су директно повезани са IL-2.
- Пречишћава се хроматографијом реверзне фазе и дијафилтрацијом.



# Инхибиција активности IL-2

## *-денилеукин дифитокс*

- Производ се формулише као стерилан смрзнути раствор који садржи лимунску киселину, EDTA и полисорбат као ексципијенсе. Пакује се у бочице за једнократну употребу и примењује *i.v.* инфузијом једном дневно, током пет узастопних дана, сваке три недеље.
- Механизам дејства овог лека подразумева да фузионисани протеин олакшава интеракцију производа са ћелијама које експримирају рецепторе за IL-2 на површини ћелија. Ове ћелије су у високом проценту присутне код леукемија и ћелија лимфома, укључујући CTCL ћелије. Фузионисање изазива интернализацију комплекса рецептор-фузионисани протеин. Довољне количине омогућавају инхибицију синтезе ћелијских протеина посредством дифтеријског токсина, при чему ћелијска смрт најчешће настаје за неколико сати.

# Инхибиција активности IL-2

## *-денилеукин дифитокс*

- Денилеукин дифитокс има двофазну елиминацију, иницијалну фазу елиминације тј. дистрибуције (полуживот 2 - 5 минута) и терминалну фазу елиминације (полуживот 70 - 80 минута).
- Развој антитела на производ значајно утиче на клиренс лека. Код 30% пацијената забележен је позитиван одговор тумора на терапију денилеукин дифитоксом.
- Озбиљне нежељене реакције на овај лек су: реакције преосетљивости (акутни тип), синдром повећане васкуларне пропустљивости и оштећење вида. Додатна нежељена дејства су симптоми слични грипу, главобоља, хипер- или хипотензија, као и дигестивне сметње.

# Интерлеукин-1

## *-особине и биохемија*

- IL-1, познат и као фактор активације лимфоцита (LAF), ендогени пироген и катаболин. Поседује широк спектар биолошких активности.
- Постоје два различита облика IL-1 $\alpha$  и IL-1 $\beta$  који показују само 20% хомологије аминокиселинских секвенци.
- Производи су различитих гена који се налазе на хромозому број 2 и имају сличну молекулску структуру. Међутим, упркос разликама везују се за исти рецептор и индукују сличне биолошке одговоре.

# Интерлеукин-1

## *-особине и биохемија*

IL-1 $\alpha$  и -1 $\beta$  су негликозилирани, велики прекурсорски молекули (30 kDa) из којих се зрели полипептиди ослобађају протеолитичком деградацијом. Секреторни сигнални пептиди и молекулски механизми којим напуштају ћелију нису довољно истражени.

### **IL-1 $\alpha$**

иницијално се синтетише као прекурсор од 271 АК

зрела форма садржи 159 АК  
(17,5 kDa)

Претпоставља се да овај молекул остаје повезан са екстрацелуларном површином ћелијске мембране.

### **IL-1 $\beta$**

иницијално се синтетише и ослобађа из ћелије као прекурсор од 269 АК

зрела форма садржи 153 аминокиселине (17,3 kDa)

# Интерлеукин-1

## *-особине и биохемија*

- Рендген кристалографија показала је да су тродимензионалне структуре IL-1 $\alpha$  и - $\beta$  сличне. Оба облика су глобуларни протеини, састављени од шест антипаралелних  $\beta$  ланаца.
- Велики број ћелија производи IL-1: Т- и В-лимфоцити, моноцити/макрофаги, NK-ћелије, велики грануларни лимфоцити, кератиноцити, хондроцити, васкуларне ендотелне ћелије, фибробласти, астроцити, дендритске ћелије, микроглије, ћелије глиома.
- Ове ћелије производе различите облике IL-1, у различитим односима (нпр. у фибробластима и ендотелним ћелијама, оба се производе у сличним односима, док се у моноцитима IL-1 $\beta$  производи у већим количинама од IL-1 $\alpha$ ). Активирани макрофаги представљају главни извор IL-1.

# Интерлеукин-1

## *-рецептор*

- IL-1 изазивају биолошке одговоре везивањем за специфичне рецепторе на површини осетљивих ћелија. Идентификована су два различита рецептора, тип I и II, за које се везују IL-1 $\alpha$  и -1 $\beta$ .
- Тип I рецептор је трансмембрански гликопротеин молекулске масе 80 kDa, члан је суперфамилије IgG. Експримира се претежно на фибробластима, кератиноцитима, хепатоцитима и ендотелним ћелијама.
- IL-1 свој биолошки одговор индукују највероватније само након везивања за рецептор тип I.

# Интерлеукин-1

- IL-1 поседује широк спектар биолошких активности:
  - као проинфламаторни цитокин индукује синтезу разних супстанци као што су еикосаноиди, протеазе и други ензими који су укључени у стварање инфламаторних медијатора (сматра се да је то његова главна биолошка функција);
  - има улогу у активирању В-лимфоцита, заједно са додатним цитокинима, и може бити значајан за активацију Т-лимфоцита;
  - заједно са IL-6 индукује синтезу протеина акутне фазе у хепатоцитима;
  - делује као костимулатор раста/диференцијације хематопоеетских ћелија.

# Интерлеукин-1

- Биолошка активност у великој мери зависи од произведене количине IL-1:
  - У ниским концентрацијама делује *паракрино* (нпр. индукција локалне инфламације).
  - У повишеним концентрацијама делује *ендокрино*: изазива системске ефекте (синтеза протеина акутне фазе у хепатоцитима); индукује грозницу (отуда и име, ендогени пироген); индукује кахексију (општи губитак телесне масе, што је повезано са неким врстама карцинома).
- Поред IL-1 $\alpha$  и -1 $\beta$ , идентификован је и трећи протеин сличан IL-1, назван антагониста рецептора за IL-1 (IL-1R $\alpha$ ). Овај молекул се везује за рецепторе IL-1 без изазивања интрацелуларног одговора.



# Интерлеукин-1

## *-производња и медицинска примена*

- Захваљујући бројним имуностимулаторним ефектима; способности заштите/обнављања хематопоезе током или након хемиотерапије или радиотерапије; антипролиферативним ефектима на различите хумане туморске ћелијске линије (*in vitro*) IL-1 је предмет многих претклиничких и клиничких истраживања.

# Интерлеукин-1

## *-производња и медицинска примена*

- Након примене IL-1 већина ових ефеката је посредована управо IL-1, али и другим цитокинима (укључујући IL-2). Уочени ефекти довели су до даљих клиничких испитивања која су процењивала ефикасност IL-1 у лечењу супресије костне сржи индуковане хемио/радиотерапијом и неких врста карцинома.
- Због посредовања у акутној/хроничној инфламацији, смањење нивоа IL-1 може бити ефикасно у побољшању клиничке слике код ових стања. Неколико приступа може бити корисно, укључујући примену:
  - анти-IL-1 антитела;
  - солубилне форме IL-1 рецептора;
  - природних антагониста рецептора за IL-1.

# Интерлеукин-1

## -анакинра

- **Анакинра** (*Kineret*<sup>®</sup>) је рекомбинантна форма компетитивног антагонисте рецептора за IL-1 одобрена 2001. године у САД-у за лечење реуматоидног артритиса, а данас је званично индикуван и за лечење CAPS синдрома (периодични синдром повезан са криопирином одликује се мутацијом гена за криопирин или NLRP3 који има важну улогу у контроли инфламације).
- Поред тога, анакинра може бити корисна као имуносупресив у терапији одређених пацијената са COVID-19, посебно код оних са умереном или тешком пнеумонијом праћеном повећаним инфламаторним одговором. Децембра 2021. године Европска медицинска агенција је одобрила проширење листе индикација анакинре и на лечење COVID-19.

# Интерлеукин-1

## -анакинра

- Производ је молекулске масе 17,3 kDa, садржи 153 аминокиселине, произведен је рекомбинантном ДНК технологијом у инжењерисаној *E. coli* и разликује се од нативног хуманог молекула по томе што је негликозилиран и садржи додатни N-терминални остатак метионина (последица његове експресије у прокариотском систему).
- Производни процес подразумева ферментацију, жетву ћелија, након чега следи разарање ћелија. Пречишћавање анакинре се постиже низом хроматографских корака и филтрације. Тако пречишћени производ је формулисан у облику раствора, а као ексципијенсе садржи натријум цитрат, EDTA, натријум хлорид и *polysorbate 80*.

# Интерлеукин-1

## **-анакинра**

- Примењује се једном дневно (s.c.) у дози од 100 mg, код пацијената са реуматоидним артритисом (висок ниво IL-1 у синовијалној течности захваћених зглобова).
- Показао се ефикасним и за лечење идиопатског јувенилног артритиса, Стилове болести и синдрома активације макрофага (*off label* употреба).
- Честа нежељена дејства су: главобоља, артралгије, дигестивне сметње, локалне реакције на кожи, симптоми слични грипу и повећан ризик од бактеријских инфекција.

# Интерлеукин-1

## *-инхибитори протеолитичких ензима*

- Додатни приступ за смањење нивоа IL-1 је развој инхибитора протеолитичких ензима који ослобађају активни интерлеукин из његовог неактивног прекурсора. Такви инхибитори би се узимали перорално и били погодни за лечење хроничне инфламације (претходно поменуте алтернативе би се примењивале парентерално).
- Идентификован је и детаљно проучен ензим који ослобађа активни IL-1 $\beta$  из његовог прекурсора. То је IL-1 $\beta$  конвертујући ензим (**ICE или каспаза-1**), серинска протеаза, чији је једини познати физиолошки супстрат управо инактивни IL-1 $\beta$  прекурсор.
- ICE раскида везу између Asp 116 и Ala 117 и ослобађа активни IL-1 $\beta$ , који делује проинфламаторно.

# Интерлеукин-1

## *-инхибитори протеолитичких ензима*

- ICE је олигомерни ензим (активни облик може бити тетрамер), који садржи две различите полипептидне подјединице, p10 (10 kDa) и p20 (20 kDa).
- p10 и p20 су просторно веома блиске и настају протеолизом прекурсорског протеина од 45 kDa. Активно место ICE је састављено од аминокиселинских остатака p10 и p20.
- ***Pralnacasan*** је ICE-инхибитор, једини представник овог приступа, који је доспео до друге фазе клиничког истраживања индикуван за лечење реуматоидног артритиса и остеоартритиса .

# Интерлеукин-1

## *-рилонацепт*

- Још један инхибитор интерлеукина 1 одобрен од стране FDA 2008. године који се примењује s.c. јесте **рилонацепт** (*Arcalyst*<sup>®</sup>).
- Рилонацепт је димерни фузионисани протеин који се састоји од делова IL-1R и помоћног протеина IL-1R повезаног са Fc фрагментом имуноглобулина G1.
- Користи се у лечењу CAPS синдрома, као и анакинра, и у лечењу фамилијарног хладног аутоинфламаторног синдрома (FCAS) и *Muckle-Wells* синдрома (MWS), код одраслих и деце старије од 12 година. Од 2021. индикације су проширене и на рекурентни перикардитис.



# Интерлеукин-1

## *-рилонацепт*

- Делује тако што блокира IL-1 $\beta$  сигнализацију делујући као солубилни рецептор који везује IL-1 $\beta$  и тако спречава његову интеракцију са рецепторима на површини ћелије.
- Рилонацепт такође везује IL-1 $\alpha$  и антагонисту рецептора за IL-1 (IL-1ra) смањеним афинитетом.
- Везивањем IL-1, спречава се активација IL-1 рецептора, и последични инфламаторни одговор.

# Интерлеукин-11

## *-особине и биохемија*

- IL-11 је негликозилирани полипептид састављен од 178 аминокиселина, молекулске масе 23 kDa.
- IL-11 у великој мери производе фибробласти и стромалне ћелије костне сржи активирани IL-1.
- IL-11 делује као хематопоеетски фактор раста и стимулише тромбоцитозу, заједно са IL3 и TPO. Стимулише диференцијацију и пролиферацију мегакариоцита, прекурсора тромбоцита, и на тај начин повећава број тромбоцита.

# Интерлеукин-11

## *-рецептор*

- Његов рецептор је једноланчани трансмембрански протеин молекулске масе 150 kDa.
- Везивањем IL-11 за алфа субјединицу свог рецептора (IL11R) долази до фосфорилације аминокиселине тирозин у неколико интрацелуларних протеина, што доводи до биолошке активности IL-11.

# Интерлеукин-11

## *-производња и медицинска примена*

- IL-11 се испитује као потенцијално терапијско средство због индукције синтезе тромбоцита.
- **Опрелвекин** (*Neumega*®) је рекомбинантни хумани IL-11, одобрен за превенцију хемиотерапијом индуковане тромбоцитопеније код пацијената са немијелоидним малигнитетима.
- Производи се рекомбинантном ДНК технологијом у инжењерисаним ћелијама *E. coli* и разликује се од хуманог IL-11 само по одсуству пролина на N-терминусу (177 АК). Међутим, упркос овој структурној разлици, биолошка активност је иста као и код нативног IL-11.

# Интерлеукин-11

## *-производња и медицинска примена*

- Примењује се s.c. у дози 50  $\mu\text{g/kg}$ /дан једном дневно 10-21 дан, најчешће 6-24h по завршетку хемиотерапије.
- Формулисан је као лиофилизат, уз додатак фосфатног пуфера и глицина. Реконституише се водом за инјекције, непосредно пре s.c. примене, до концентрације 5 mg/ml, pH 7.
- Најчешћа нежељена дејства су: замор, едем, главобоља, палпитације, тахикардија, атријална фибрилација, диспнеја.