

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Интегрисане академске студије фармације

Г06 – Фармацеутска биотехнологија

Фактори некрозе тумора и терапијски фактори раста

8. НЕДЕЉА НАСТАВЕ

Летњи семестар 2022/2023. године

Крагујевац

Фактори некрозе тумора

- Фактори некрозе тумора (TNF) су цитокини у које се убрајају два повезана регулаторна фактора:
 - TNF- α (кахектин) и
 - TNF- β (лимфотоксин).
- Гени за хумане TNF- α и - β лоцирани су један поред другог на хромозому број 6.
- TNF- α (кахектин, цитотоксични фактор макрофага, цитотоксин макрофага, некрозин) више је проучаван од TNF- β .
- Многе имунске и неимунске ћелије могу синтетисати TNF- α :
 - **макрофаги**, NK-ћелије, еозинофили, Купферове ћелије, гломеруларне мезенгијалне ћелије, фибробласти, Т- и В-лимфоцити, полиморфонуклеарни леукоцити, астроцити, Лангерхансове ћелије, микроглијалне ћелије, као и различите измењене ћелијске линије.

Фактор некрозе тумора алфа

-особине и биохемија

- Ћелије које производе TNF- α га не складиште, већ га *de novo* синтетишу након активације.
- Да би се TNF- α синтетисао, неопходна је стимулација агенсима инфективне и/или инфламаторне природе, попут:
 - **LPS**, микобактерије, гљивице, вируси, паразити, различити цитокини (IL-1), TNF- α (аутокрина активност).
- Синтеза TNF- α регулисана је позитивном и негативном повратном спрегом:
 - Повећање синтезе појединих цитокина (IL-1, IL-2, INF- γ) подстиче продукцију TNF- α .
 - TNF индукцијом синтезе IL-10, простагландина и кортикостероида инхибира сопствену синтезу.

Фактор некрозе тумора алфа

-особине и биохемија

- TNF- α се синтетише као прекурсор од 212 АК који представља **стабилну, хомотримерну трансмембранску форму (tmTNF- α)**. Деловањем специфичне екстрацелуларне металопротеазе, прекурсор се протеолитички деградира између 76-Ala и 77-Val и издваја се зрели (солубилни) полипептид TNF- α са 157 АК који не поседује угљенохидратну компоненту и садржи једну дисулфидну везу. Полимеризацијом три полипептидна ланца настаје **циркулишућа хомотримерна солубилна форма (sTNF- α)**.
- Обе хомотримерне форме (tmTNF- α и sTNF- α) су биолошки активне, док је TNF у облику мономера биолошки неактиван.

Фактор некрозе тумора алфа

-особине и биохемија

- Биолошки ефекти индуковани TNF- α зависе од бројних фактора, али пре свега делује плејотропно:
 - индукује/регулише инфламацију;
 - активира одређене елементе неспецифичног и специфичног имунитета, посебно као одговор на Грам-негативне бактерије;
 - селективно цитотоксично;
 - посредује у различитим патолошким стањима (септички шок, кахексија и анорексија).
- Наиме, као главна физиолошка улога TNF- α издваја се индукција/регулација инфламације преко:
 - активације неутрофила, еозинофила и других леукоцита;
 - експресије различитих адхезионих молекула на површини васкуларних ендотелних ћелија, који олакшавају акумулацију неутрофила, моноцита и лимфоцита на месту инфламације;

Фактор некрозе тумора алфа

-особине и биохемија

- индукције хемотаксе моноцита и полиморфонуклеара;
 - побољшања васкуларне пропустљивости;
 - синтезе липидних медијатора (простагландина и фактора активације тромбоцита, макрофага и других ћелија);
 - синтезе проинфламаторних цитокина (IL-1 и IL-8).
- Поред тога, на имунитет утиче индиректно, стимулишући синтезу и ослобађање других цитокина:
 - IFN, IL-1, IL-6, IL-8 и фактора стимулације колонија (CSF).

Фактор некрозе тумора алфа

-особине и биохемија

- Заправо, како ће TNF- α деловати зависи директно од концентрације:
 - при ниским концентрацијама делује локално (паракрино и аутокрينو) и регулише имунитет и инфламацију.
 - у високим концентрацијама улази у крвоток, делује ендокрино и индукује системске ефекте.
 - хронично повишени нивои у системској циркулацији могу индуковати додатне метаболичке ефекте (попут инсулинске резистенције, атеросклеротских промена и др.)

Фактор некрозе тумора алфа

-особине и биохемија

Болест	Здравствени поремећаји изазвани TNF- α
Карцином	кахексија, стимулација раста неких тумора
Септични шок	васкуларна оштећења, некроза ткива, хипотензија, коагулација крви
Реуматоидни артритис	инфламација ткива, оштећење зглобова
Мултипла склероза	инфламација
Дијабетес	уништавање ћелија панкреаса уз изазивање инсулинске резистенције

Фактор некрозе тумора алфа

-рецептори

- чланови суперфамилије фактора раста неурона (NGF)
- у екстрацелуларном домену имају четири понављајуће, цистеином богате јединице (28% хомологије),
- интрацелуларни домени немају хомологију (што указује на различите сигналне механизме посредоване овим рецепторима)

Тип I
(TNF-R55, TNFR1, CD120 α)
55 kDa

- експримирају га скоро све ћелије
- конститутивна експресија
- индукује цитотоксичност и синтезу различитих цитокина и простагландина

Тип II
(TNF-R75, TNFR2, CD120 β)
75 kDa

- експримиран на површини само одређених ћелија
- индуцибилна експресија
- индукује синтезу Т-лимфоцита

Фактори некрозе тумора

-рецептори

- TNF-R55 је значајнији, јер биолошке активности посредоване TNF-R75 могу бити чак и при нижим концентрацијама посредоване и TNF-R55. TNF-R75 има споредну улогу у побољшању ефеката посредованих TNF-R55.
- Везивањем TNF- α за рецепторе (TNF-R55 и -R75) долази до њихове олигомеризације, која је праћена фосфорилацијом деловањем киназа које се везују за интрацелуларни домен рецептора. У већини случајева, везивањем TNF- α за TNF-R55 индукује се брза интернализација комплекса лиганд-рецептор, након чега следи лизозомска деградација.
- Насупрот томе, везивање TNF- α за TNF-R75 не индукује интернализацију рецептора, али у појединим случајевима, долази до селективног одвајања екстрацелуларног домена и ослобађања солубилног TNF-R75.

Фактори некрозе тумора

-рецептори

- Осим киназа које се везују за интрацелуларни домен рецептора, постоји и неколико фосфопротеина који могу да се вежу за ове домене TNF рецептора.
- Након олигомеризације TNF рецептора, везани фосфопротеини се активирају и сложеним механизмима посредују у:
 - фосфорилацији,
 - активацији различитих фосфолипаза, што доводи до настанка секундарних гласника:
 - диацилглицерола,
 - инозитол фосфата и
 - арахидонске киселине.

Фактор некрозе тумора алфа

-производња и медицинска примена

- **Тасонермин** (*Beromun*[®]) је хумани TNF- α -1а произведен рекомбинантном ДНК технологијом у *E. coli*. Рекомбинантни производ је идентичан нативном хуманом протеину, са три полипептида молекулске масе 17,3 kDa и 157 АК.
- Након ферментације ћелија *E. coli* и екстракције производа, сирови препарат се вишеструко хроматографски пречишћава (јоноизмењивачка хроматографија, хроматографија заснована на хидрофобним интеракцијама и гел-филтрација).
- Пречишћени производ се формулише као лиофилизат и пакује у бочице за једнократну употребу, а као ексципијенси се користе фосфатни пуфер, натријум хлорид и серумски албумин.
- 1999. године је одобрен за лечење саркома меког ткива у екстремитетима, у циљу спречавања/одлагања ампутације. Најчешће се користи у комбинацији са мелфаланом.

Фактор некрозе тумора алфа

-производња и медицинска примена

- Реконституише се у стерилном физиолошком раствору и примењује изолованом перфузијом екстремитета:
 - 3 - 4 mg тасонермина се током 90 минута перфундује кроз екстремитет одвојено од системске циркулације.
- Након поновног успостављања циркулације у изолованом екстремитету долази до системске апсорпције.
- Системски примењен TNF има релативно кратак полуживот (20 - 30 min).
- Нежељена дејства повезана са применом тасонермина су:
 - Локална (у екстремитету): едем, повреда нерава и инфекције...
 - Системска: мучнина, хематолошке промене (анемије, повећање хематокрита, повећање/смањење леукоцита и тромбоцита), хипер/хипотензија, аритмије, нефротоксичност и хепатотоксичност...

Фактор некрозе тумора алфа

-инхибиција ефеката TNF

- **Етанерцепт** (*Enbrel*[®]) је компетитивни инхибитор TNF- α који се експримира у CHO ћелијској линији, где настаје као димерни солубилни протеин молекулске масе приближно 150 kDa и 934 АК.
- Састоји се од екстрацелуларног домена TNF-R75 који је директно фузионисан са F_c фрагментом хуманог IgG1. Присуство F_c фрагмента петоструко повећава полуживот у серуму, у односу на солубилни TNF рецептор.
- После пречишћавања и додавања ексципијенса (манитол, сахароза и трометамол) формулише се као лиофилизат.
- Етанерцепт је индикуван за лечење реуматоидног артритиса (најчешће у комбинацији са метотрексатом), псоријазног артритиса, аксијалног спондилоартритиса, анкилозирајућег спондилитиса и псоријазе.

Фактор некрозе тумора алфа

-инхибиција ефеката TNF

- Примењује се s.c. једном или два пута недељно.
- Најчешће изазива нежељене реакције на месту примене, попут бола, отока, свраба, црвенила и крварења на месту примене, као и различитих инфекција, алергијских реакција, свраба и грознице.

Фактор некрозе тумора алфа

-регистрован за примену у Р. Србији

Генерички назив	Заштићен назив	Експресиони систем	Индикације	Формулација
етанерцепт	<i>Enbrel</i>	СНО	Реуматоидни артритис, псоријазни артритис, анкилозирајући спондилитис	лиофилизат, шприц за једнократну употребу, пен

Фактори раста

- Различити фактори могу утицати на диференцијацију, раст и деобу еукариотских ћелија, међутим као најважнији издвајају се **фактори раста**.
- Фактори раста су полипептиди и у ову групу се убрајају бројни молекули који се групишу у фамилије на основу :
 - хомологије секвенци аминокиселина или
 - типа ћелија на које делују.
- Већину фактора раста производи више од једне врсте ћелија, а на циљне ћелије могу деловати:
 - ендокрино,
 - паракрино или
 - аутокрينو.

Фактори раста

-подела

Фактор раста	Главне циљне ћелије
Интерлеукини	различите ћелије, углавном оне које су укључене у регулацију имунитета и инфламације
IFN- γ	лимфоцити и друге ћелије које су укључене у регулацију имунитета (и инфламације)
CSF	хематопоеетске ћелије
EPO	еритроидне прекурсорске ћелије
TPO	мегакариоцити, већински
Неуротрофни фактори	нервне ћелије, већински
Инсулин	различите ћелије
IGF	различите ћелије
EGF	епителне, ендотелне ћелије и фибробласти
PDGF	фибробласти, глија ћелије и ћелије глатких мишића
FGF	фибробласти, остеобласти и васкуларне ендотелне ћелије
TGF- α	различите ћелије
LIF	хематопоеетске ћелије

Хематопоетски фактори раста

-процес хематопоезе

- Крв се састоји од еритроцита и леукоцита који су заједно са тромбоцитима, суспендовани у плазми. Ћелије периферне крви настају из матичних ћелија (плурипотентних, хематопоетских матичних ћелија) које се налазе у костној сржи.
- Плурипотентне матичне ћелије имају способност:
 - продуженог самообнављања,
 - диференцијације,
 - чиме се постиже разноликост ћелија у крви (неутрофили, Т- и В-лимфоцити, еозинофили, еритроцити, базофили, моноцити, мегакариоцити, остеокласти).
- **Хематопоеза** је процес којим се део матичних ћелија константно усмерава ка диференцијацији и производњи нових крвних ћелија у циљу њиховог обнављања.

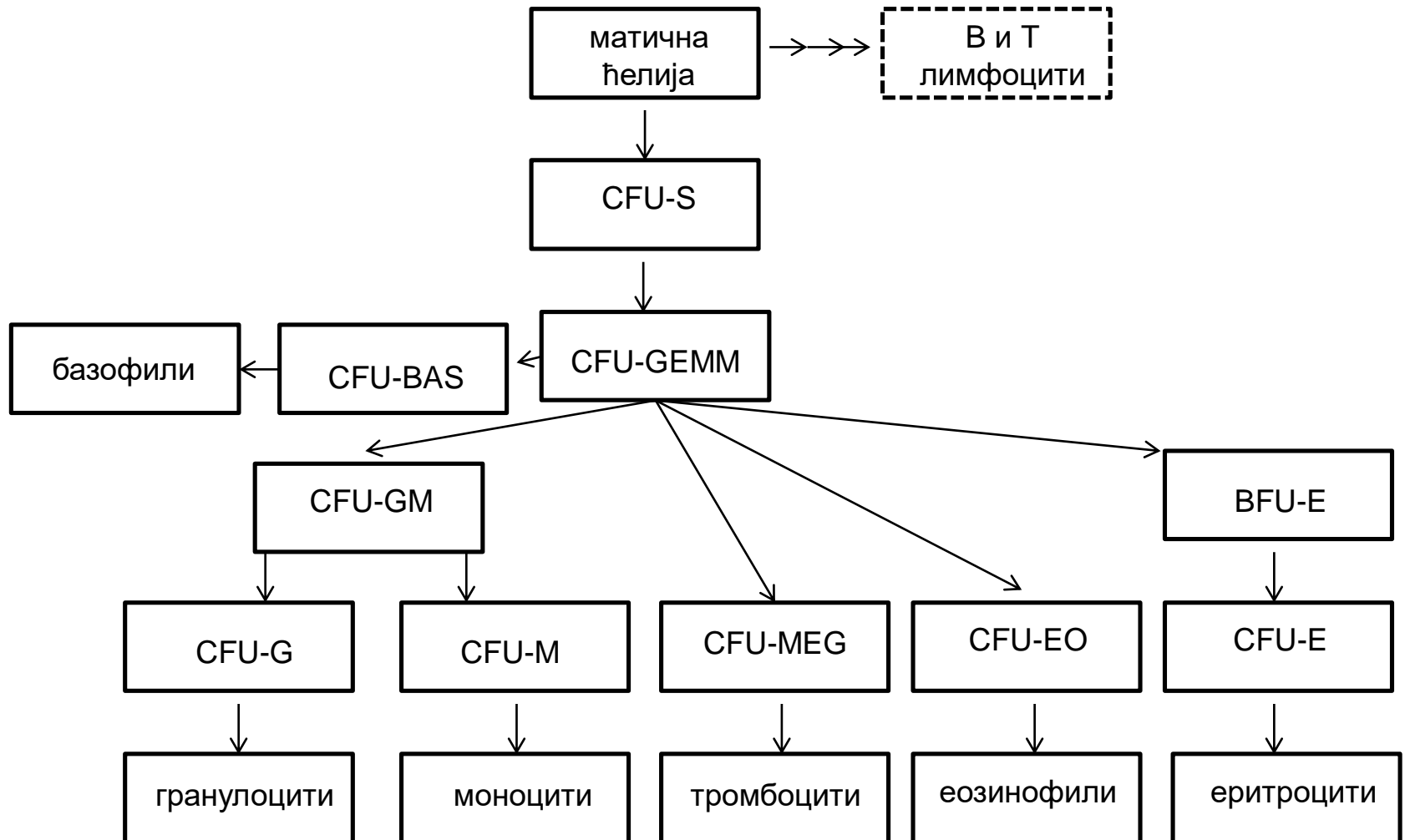
Хематопоетски фактори раста

-процес хематопоезе

- Током процеса хематопоезе, матичне ћелије се диференцирају и настају ћелије са суженим избором даље диференцијације.
- Производња многих зрелих крвних ћелија почиње када се део матичних ћелија диференцира, формирајући плурипотентне матичне ћелије специфичне за крвне ћелије (CFU-S) које се даље диференцирају до CFU-GEMM ћелија (мијелоидне прогениторске ћелије).
- CFU-GEMM ћелије могу да се диференцирају у различите типове зрелих крвних ћелија:
 - гранулоците, моноците, еритроците, тромбоците, еозинофиле и базофиле.
- Лимфоцити нису изведени из CFU-GEMM пута, већ се од матичних ћелија диференцирају алтернативним путем.

Хематопоетски фактори раста

-схематски приказ хематопоезе



Хематопоеетски фактори раста

-процес хематопоезе

- Током процеса хематопоезе, мали део матичних ћелија се диференцира, док се остале самообнављају.
- Равнотежа између обнављања и диференцијације матичних ћелија зависи од присуства и концентрације различитих фактора раста.
- Велики број цитокина утиче на хематопоезу:
 - IL-3 утиче на континуирану пролиферацију измењених матичних ћелија, такође рецептор за IL-3 се налази на бројним прогениторским хематопоеетским ћелијама и стимулише CFU-GEMM и прекурсорске ћелије базофила, еозинофила и тромбоцита;
 - IL-11 стимулише тромбопоезу и раст/диференцијацију ћелија костне сржи.

Хематопоетски фактори раста

-процес хематопоезе

- Кључне компоненте у одржавању хематопоезе су хематопоетски фактори раста:
 - неколико интерлеукина, који првенствено утичу на производњу и диференцијацију лимфоцита;
 - CSF, који имају главну улогу у диференцијацији ћелија изведених из матичних ћелија у неутрофиле, макрофаге, мегакариоците (од којих су изведени тромбоцити), еозинофиле и базофиле;
 - EPO, неопходан за еритропоезу;
 - TPO, неопходан за тромбопоезу.
- Хематопоетски фактори раста су најчешће гликопротеини молекулске масе 14 - 24 kDa.
- Већину хематопоетских фактора раста производе различити типови ћелија, а оне ћелије које на својој површини имају рецепторе за неколико фактора, могу стимулисати пролиферацију било које линије хематопоетских ћелија.

Фактори стимулације колонија гранулоцита и/или макрофага

	G-CSF	M-CSF	GM-CSF
Молекулска маса (kDa)	21	45-90	22
Главне произвођачке ћелије	Стромалне ћелије костне сржи Макрофаги Фибробласти	Лимфоцити Миобласти Остеобласти Моноцити Фибробласти Ендотелне ћелије	Макрофаги Т-лимфоцити Фибробласти Ендотелне ћелије
Главне циљне ћелије	Неутрофили и друге хематопоетске прогениторске ћелије и ендотелне ћелије	Макрофаги и њихове прекурсорске ћелије	Хематопоетске прогениторске ћелије Гранулоцити Моноцити Ендотелне ћелије Мегакариоцити Т-лимфоцити Еритроидне ћелије

Фактор стимулације гранулоцитних колонија

- Фактор стимулације гранулоцитних колонија (G-CSF, CSF- β , плурипоетин- β) је фактор раста, диференцијације и активације гранулоцитних колонија чија је улога да:
 - активира зреле неутрофиле;
 - стимулише раст и диференцијацију неутрофила и њихових прекурсорских ћелија;
 - стимулише раст и диференцијацију различитих хематопоеетских прогениторских ћелија;
 - стимулише пролиферацију и миграцију ендотелних ћелија.
- G-CSF је полипептид састављен од 174 или 177 АК, при чему је краћи полипептид заступљенији и има значајно већу биолошку активност. Овај гликопротеин молекулске масе 21 kDa има једно место за О-гликозилацију.

Фактор стимулације макрофагних колонија

- Фактор стимулације макрофагних колонија (M-CSF, CSF-1) је фактор раста, диференцијације и активације макрофага и њихових прекурсорских ћелија. Сврстава се у цитокине.
- Зрела форма (45 - 90 kDa) је гликопротеин који садржи три потенцијална места за N-гликозилацију. Постоје три слична облика хуманог M-CSF (522 АК, 406 АК, 224 АК), при чему су сви производи истог гена и деле заједничке С- и N- терминусе.
- Биолошки активан облик M-CSF је хомодимер (две идентичне подјединице) и може бити:
 - интегрални протеин на површини ћелије или
 - солубилни цитокин који је добијен протеолизом из ћелије која га производи.

Фактор стимулације колонија гранулоцита и макрофага

- Фактор стимулације колонија гранулоцита и макрофага (GM-CSF, CSF- α , плурипоетин- α) је фактор стимулације колонија гранулоцита и макрофага:
 - Стимулише хематопоезу - пролиферацију/диференцијацију хематопоетских прогениторских ћелија, посебно оних из којих настају неутрофили (различити гранулоцити) и макрофаги, али и еозинофили, еритроцити и мегакариоцити.
 - Активира зреле крвне ћелије, што повећава:
 - фагоцитну активност;
 - микробицидну активност;
 - антитуморску активност;
 - хемотаксу леукоцита.
- GM-CSF је једноланчани, гликозилирани полипептид састављен од 127 АК, молекулске масе 22 kDa.

Фактори стимулације колонија гранулоцита и/или макрофага

-рецептор

- Рецептор за GM-CSF (150 kDa) је једноланчан, гликозилиран, трансмембрански полипептид, локализован на површини неутрофила, различитих хематопоетских прекурсорских ћелија, тромбоцита, ендотелних ћелија и ћелија мијелоидне леукемије.
- Интактни рецептор за GM-CSF је хетеродимер састављен од α -и β -ланца.
- α -ланац (80 kDa) је гликопротеин са кратким интрацелуларним доменом. β -ланац (130 kDa) има дужи интрацелуларни домен. Сигнална трансдукција подразумева фосфорилацију тирозина код одређеног броја цитоплазматских протеина.



Фактори стимулације колонија гранулоцита и/или макрофага

-производња и медицинска примена

- Неколико CSF препарата је одобрено за клиничку примену:
 - **G-CSF** и **GM-CSF** за лечење неутропеније и након алогене или аутологне трансплантације костне сржи јер убрзавају опоравак неутрофила;
 - **Сва три типа CSF** за лечење инфективних болести, неких облика карцинома и код трансплантације костне сржи, јер стимулишу диференцијацију/активацију леукоцита.

Фактори стимулације колонија гранулоцита

-производња и медицинска примена

- **Филграстим** (*Neupogen*[®], рекомбинантни хумани G-CSF) произведен у *E. coli* је 1991. године одобрен за лечење неутропеније изазване хемиотерапијом, а данас је индикуван за профилаксу и лечење неутропеније у различитим медицинским стањима.
- Састоји се од 175 АК, молекулске масе 18,8 kDa. Као последица експресије у *E. Coli*, разликује се од природног хуманог G-CSF само по:
 - додатном метионинском остатку на N-терминусу;
 - одсуству гликозилације.
- Производња подразумева стандардне кораке: раст и жетву ћелија, екстракцију производа и пречишћавање хроматографијом и ултрафилтрацијом.

Фактори стимулације колонија гранулоцита

-производња и медицинска примена

- Формулише се као стерилни раствор у бочицама за једнократну употребу или у напуњеним шприцевима, а као помоћне супстанце садржи ацетатни пуфер, сорбитол и *Tween 80*.
- Примењује се једном дневно *s.c.* или *i.v.* инфузијом, неколико дана у дози 5 - 10 $\mu\text{g/kg/дан}$. Дужина и начин примене зависе од индикације.
- Максималне концентрације у плазми се постижу након 2 - 8 h од *s.c.* примене, а полувреме елиминације износи 2 - 5 h.
- Нежељена дејства повезана са применом филграстима су:
 - честа - мијалгија, артралгија;
 - ретка, озбиљна - руптура слезине и респираторни дистрес синдром.

Фактори стимулације колонија гранулоцита

-производња и медицинска примена

- **Пегировани облик филграстима (Neulasta®)** одобрен је за клиничку примену 2002. године. Производ се добија ковалентним везивањем активираног монометокси-ПЕГ за бочни ланац метионина на N-терминусу филграстима.
- Пегировањем се продужава време полуелиминације лека, чиме се смањује учесталост примене, а самим тим и нежељена дејства.
- За формулацију производа користе се ексципијенси: ацетатни пуфер, сорбитол и полисорбат.
- Након формулисања производ се пакује у шприцеве за s.c. примену.

Еритропоетин

-особине и биохемија

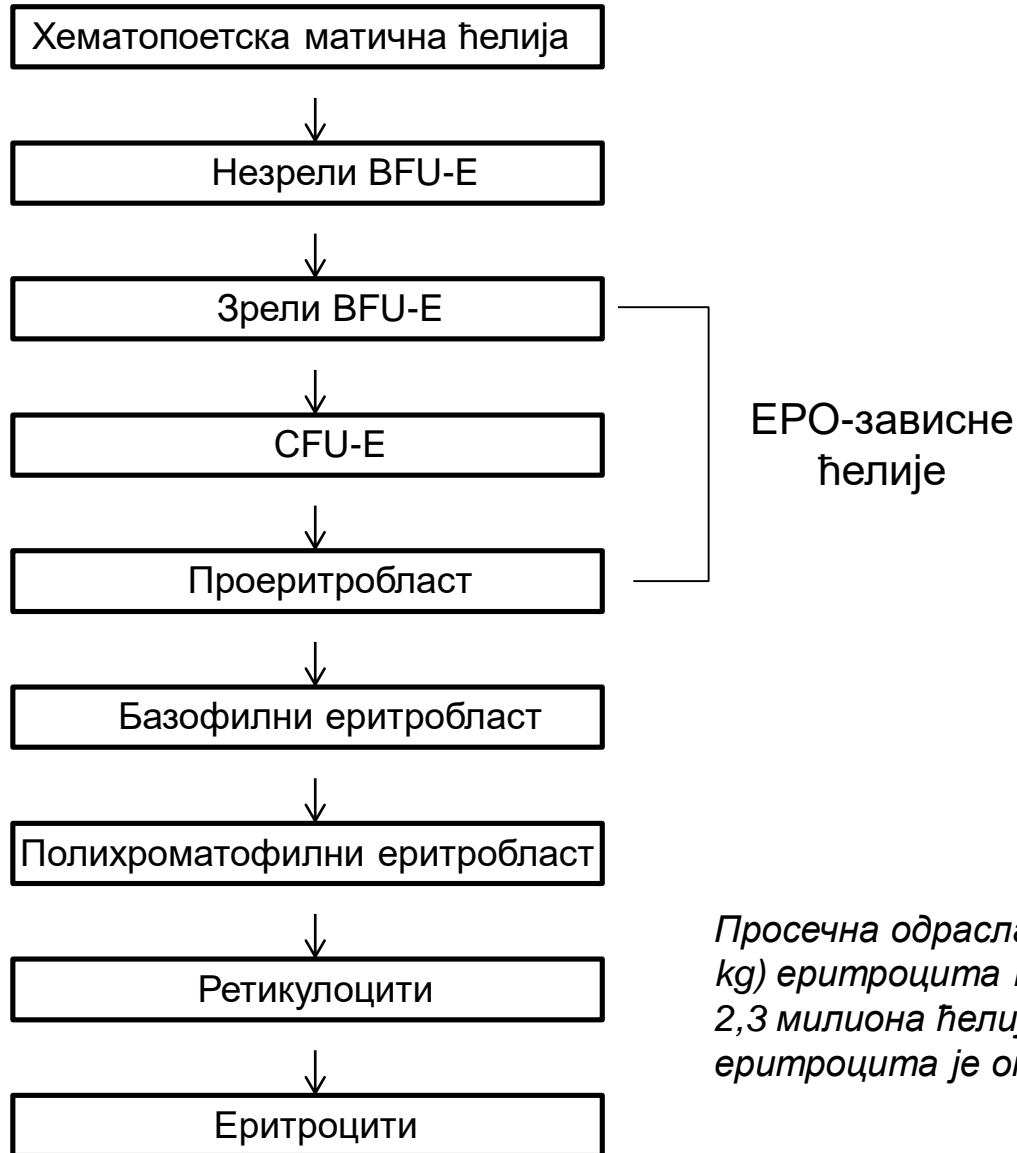
- ЕРО је хематопоетски фактор раста чија је главна функција стимулација и регулација еритропоезе (Еритропоеза је процес стварања зрих еритроцита из њихових матичних ћелија који се одвија у костној сржи)
- ЕРО стимулише еритропоезу:
 - повећањем броја ћелија способних за диференцијацију у еритроците;
 - повећањем брзине диференцијације прекурсора;
 - повећањем брзине синтезе хемоглобина у ћелијама у развоју.
- Прекурсорске еритроидне ћелије, BFU-E (енгл. *Burst Forming Unit Erythroid*) на својој површини имају ЕРО рецепторе, а за раст и диференцијацију ових ћелија у CFU-E (енгл. *Colony Forming Unit Erythroid*) неопходно је присуство ЕРО, IL-3 и/или GM-CSF.

Еритропоетин

-особине и биохемија

- CFU-E ћелије имају највећи број рецептора за ЕРО на својој површини и највећи биолошки одговор на ЕРО, док их еритроцити не поседују.
- Након везивања ЕРО за његов рецептор на CFU-E ћелијама, стимулише се диференцијација CFU-E ћелија у проеритробласте.
- Иако је главна физиолошка улога ЕРО стимулација еритропоезе, иРНК за ЕРО је такође откривена у макрофагима костне сржи и у појединим плурипотентним матичним ћелијама. Тај ЕРО има локалну паракрину (или аутокрину) улогу у стимулацији еритроидне диференцијације.

Фазе у процесу еритропоезе



Просечна одрасла особа садржи око $2,3 \times 10^{13}$ (око 3 kg) еритроцита који се синтетишу брзином од око 2,3 милиона ћелија у секунди. Животни век еритроцита је око 120 дана.

Еритропоетин

-особине и биохемија

- ЕРО је атипични цитокин, јер делује као прави (ендокрини) хормон и не синтетишу га леукоцити.
- Кодиран је једним геном, који се налази на хуманом хромозому број 7. Зрели ЕРО садржи 165 АК, молекулске масе 36 kDa.
- ЕРО је гликопротеин, угљенохидратни део чини скоро 40% молекула. Присутна су три места за N-гликозилацију и једно за O-гликозилацију.
- O-угљенохидратна група нема значајну улогу у биолошкој активности ЕРО, али уклањањем N-везаних угљених хидрата спречава се његова *in vivo* активност.

Еритропоетин

-особине и биохемија

- Некомплетна N-гликозилација доводи до бржег клиренса ЕРО путем јетре, а самим тим и смањења *in vivo* активности.
- Ензимским уклањањем остатака сијалинске киселине са олигосахарида на крајевима, откривају се иначе скривени остаци галактозе. Ови слободни остаци се везују за специфичне хепатичне лектине који стимулишу уклањање ЕРО из плазме.
 - Полувреме елиминације за природни ЕРО је 4 - 6 h, док је за ЕРО без сијалинске киселине 2 min.

Еритропоетин

-рецептор

- Рецептор за ЕРО припада суперфамилији хематопоеетских цитокинских рецептора. Његов интрацелуларни домен нема каталитичку активност, али се директно везује за ЈАК2 киназу која стимулише пренос ЕРО сигнала.
- Постоје и додатни сигнални механизми, који подразумевају учешће G протеина, протеин киназе C и Ca^{2+} . Тачни молекулски механизми укључени у трансдукцију ЕРО сигнала и даље нису детаљно разјашњени.

Еритропоетин

-производња и медицинска примена

- ЕРО се код одраслог човека синтетише:
 - примарно у специјализованим ћелијама бубрега,
 - у мањим количинама у јетри (код фетуса примарно у јетри).
- ЕРО је присутан у серуму, али се у малим количинама може изоловати и из урина пацијената оболелих од анемије:
 - први пут изолован 1971. године из плазме анемичних оваца;
 - 1977. године изолован је из урина сакупљеног од анемичних пацијената.
- Ген за хумани ЕРО је из геномске ДНК изолован 1985. године, након чега је олакшана његова трансфекција у СНО ћелије. Ово је омогућило комерцијалну производњу рекомбинантног хуманог производа (rhЕРО), који сада има широку медицинску примену.

Еритропоетин

-производња и медицинска примена

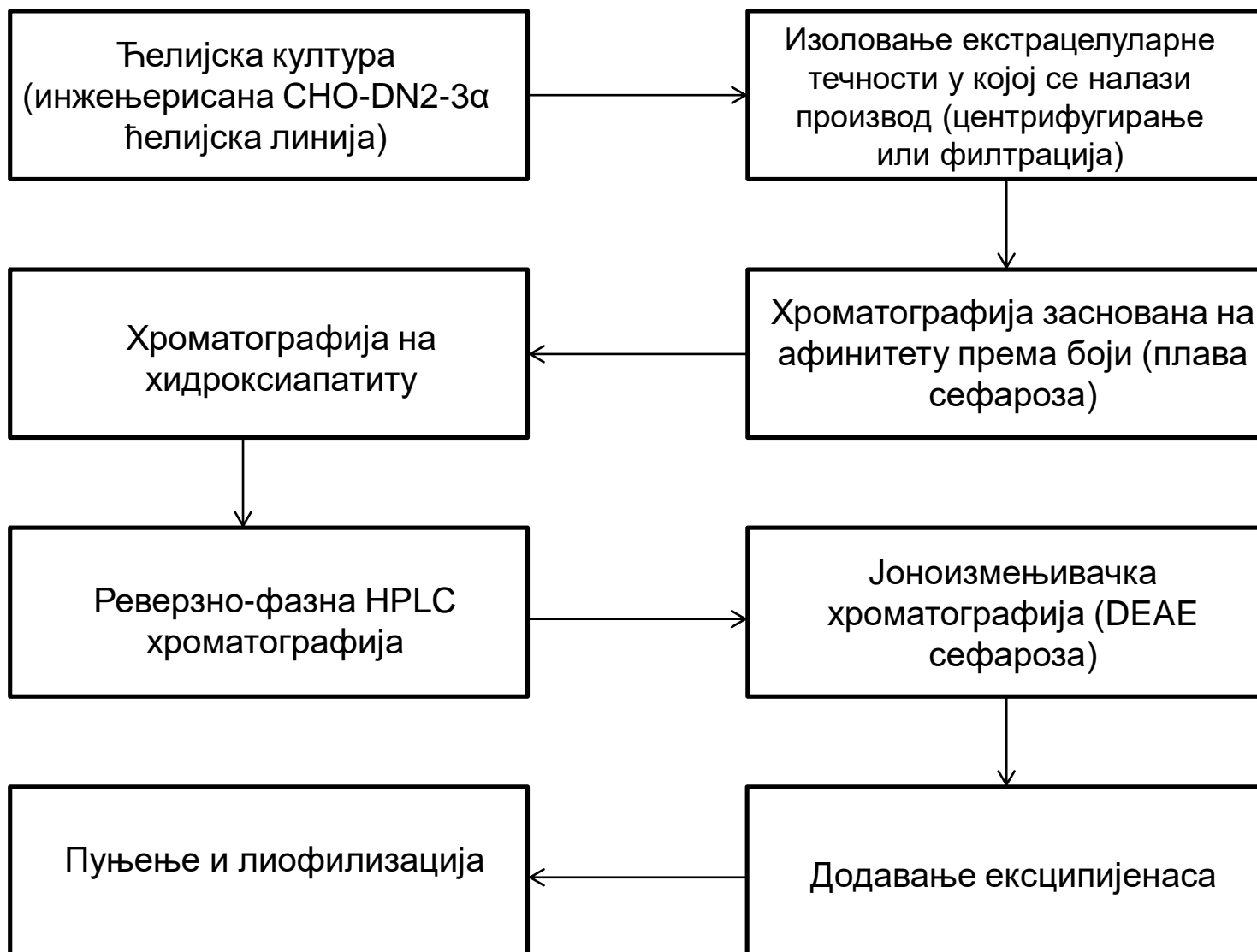
- ЕРО је одобрен за:
 - лечење анемија изазваних хроничним болестима, туморима, хемиотерапијом, превременим порођајем;
 - превенцију анемија након трансплантације костне сржи;
 - примену током преоперативне аутологе трансфузије;
 - смањење потребе за трансфузијама након операције.
- Предности примене егзогеног ЕРО су:
 - смањење/елиминација потреба за трансфузијом крви,
 - смањење ризика од случајног преноса инфективних агенаса и трансфузионих нежељених реакција.
- Примена егзогеног ЕРО оправдана је код пацијената са ниском стопом еритропоезе (бубрежна инсуфицијенција, реуматоидни артритис, карциноми, AIDS, инфекције), а такође побољшава толеранцију на вежбање (аеробни капацитет), као и субјективни осећај пацијента.

Еритропоетин

-производња и медицинска примена

- **Епоетин бета** (*Neorecormon*[®]) је rhEPO који се производи у СНО ћелијским линијама. Одобрен је 1997. године за лечење анемије код пацијената са хроничном инсуфицијенцијом бубрега и код пацијената на хемиотерапији.
- Формулише се као лиофилизат (500-10 000 IU/бочици), а као ексципијенсе садржи фосфатни пуфер, натријум хлорид, калцијум хлорид, уреу, полисорбат и разне аминокиселине.
- Након *i.v.* администрације $t_{1/2}$ је 4 - 12 h, а након *s.c.* 8 - 22 h.
- Примена EPO у дози 50 - 150 IU/kg три пута недељно је довољна да повећа вредности хематокрита до жељених 32 - 35%.
- Најчешћи нежељени ефекти су хипертензија, тромбоцитоза и повећан ризик за настанак респираторних инфекција, а ретко се јављају и кардиоваскуларне компликације.

Схематски приказ производње епоетина бета



Еритропоетин

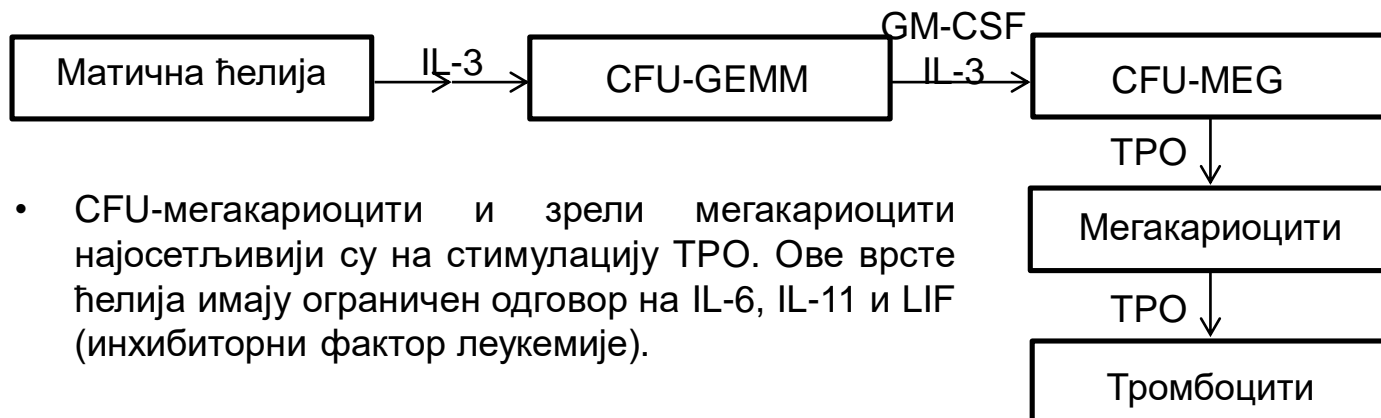
-производња и медицинска примена

- **Дарбепоетин-алфа** (*Aranesp[®]* и *Nespo[®]*) је инжењерисани облик ЕРО одобрен за клиничку примену.
- Добијен је изменом секвенци хуманог ЕРО, при чему су уведена два нова места за N-гликозилацију (са три на пет).
- Увођењем два додатна угљенохидратна ланца продужава се полуживот у серуму (око 21 h vs. 4-6 h).

Тромбопоетин

- ТРО је хематопоеетски фактор раста и представља примарни физиолошки регулатор тромбопоезе.
 - Тромбоцити су честице у облику диска (пречника 1 - 2 μm) које настају диференцијацијом матичних ћелија специфичних за крвне лозе. На самом крају овог процеса настају „мегакариоцити“ са чије површине се одвајају тромбоцити који улазе у циркулацију.
 - Тромбоцити у физиолошкој концентрацији од око $250 \times 10^9/\text{L}$ имају неколико функција у организму, а све се односе на заустављање крварења.

Схематски приказ поједностављене тромбопоезе



- CFU-мегакариоцити и зрели мегакариоцити најосетљивији су на стимулацију ТРО. Ове врсте ћелија имају ограничен одговор на IL-6, IL-11 и LIF (инхибиторни фактор леукемије).

Тромбопоетин

- Хумани ТРО је гликопротеин састављен од 332 АК, молекулске масе 60 kDa, са шест потенцијалних места за N- гликозилацију. N-терминус има висок степен хомологије аминокиселина са ЕРО и представља биолошки активни домен молекула.
- Узимајући у обзир његову физиолошку улогу, ТРО би се потенцијално могао користити за лечење тромбоцитопеније индуковане хемио/радиотерапијом.
- Ромиплостим је рекомбинантни агониста ТРО рецептора одобрен 2008. године од стране FDA. Овај димерни фузионисани протеин се састоји из две идентичне једноланчане подјединице (свака има по 269 АК) повезане дисулфидним везама. Свака подјединица састоји се од IgG1 Fc пептида ковалентно везаног за полипептидну секвенцу састављену од два везујућа домена (по 14 АК) која омогућавају интеракцију са ТРО рецепторима на мегакариоцитима (с-Mpl) и даљу индукцију тромбопозе.

Фактори раста и зарастање рана

- Процес зарастања рана је сложен и још увек непотпуно разјашњен, а обухвата хемостазу, инфламацију, пролиферацију и сазревање.
- На месту ране секретују се различити фактори (најчешће FGF, TGF, PDGF, IGF-1 и EGF) који стимулишу раст и активирају различите типове ћелија које убрзавају зарастање индукујући гранулацију (раст везивног ткива и малих крвних судова на површини ране) и последичну епителизацију.

У зависности од дужине трајања разликују се:

АКУТНЕ РАНЕ

- брзо самостално зарастају
- висока концентрација фактора раста
- низак ниво протеолитичке активности

ХРОНИЧНЕ РАНЕ

- зацељују споро, захтевају лечење
- ниска концентрација фактора раста
- висок ниво протеолитичке активности (200x већи)

Фактори раста и зарастање рана

- Иако је директна (локална) примена фактора раста убрзала зарастање рана код животиња, у клиничким истраживањима није дала значајне ефекте. Ово може делом бити последица брзе протеолитичке разградње и/или деградације рецептора фактора раста присутних на површини осетљивих ћелија.
- Тренутне студије усмерене су на:
 - Идентификацију одговарајућих инхибитора протеаза и њиховој примени у комбинацији са факторима раста.
 - Примени комбинације фактора раста уместо примене једног фактора.

Фактори раста слични инсулину

- У IGF (соматомедини) се убрајају два мала полипептида: IGF-I и IGF-II. Ови фактори раста су структурно слични инсулину, тачније проинсулину. IGF имају плурипотентну активност, регулишу раст, активацију, диференцијацију (и одржавање диференцираног стања) многих ћелија и ткива. Стимулишу:
 - напредовање ћелијског циклуса код већине типова ћелија;
 - раст и диференцијацију феталних ћелија и органогенезу (фетални развој);
 - раст и повећање телесне тежине;
 - функционисање мушког и женског репродуктивног система;
 - раст и диференцијацију нервног ткива.

Фактори раста слични инсулину

- Примарно се синтетишу у јетри, а потом прелазе у крвоток и делују ендокрино. У мањим количинама се синтетишу на другим местима у организму и делују аутокрино или паракрино.
- IGF стимулишу ћелијски циклус (они су једини митогени потребни за фазе напредовања (G1b фаза ћелијског циклуса)).
- Још једна од активности IGF је утицај на неконтролисан раст ћелија карцинома. Многе измењене ћелије имају висок ниво IGF рецептора, а раст ових ћелија се инхибира *in vitro* додавањем антитела која блокирају везивање за IGF рецепторе.
- Постоје два типа IGF рецептора који се експримирају на готово свим ћелијама.

Биолошки ефекти IGF

- Имају кључну улогу у обнављању ткива (нпр. зарастању рана) и ремоделовању костију (тј. реапсорпцији и поновној изградњи, што помаже у одржавању костију чврстим и доприноси хомеостази калцијума у целом организму) код одраслих. Реапсорпцију калцификоване кости спроводе остеокласти, ћелије хематопоетског порекла чији је настанак стимулисан IGF. Према томе, ови митогени могу утицати на развој остеопорозе.
- Регулишу функцију бубрега јер су и локализовани у бубрезима, стимулишу гломеруларну филтрацију, проток плазме кроз бурега и раст бубрега.
- Заједно са инсулином имају низ важних улога у нервном систему. Подстичу раст и развој различитих популација неурона, као и неуротрофичне ефекте, што може бити од користи у лечењу различитих неуродегенеративних болести.

Биолошки ефекти IGF

- Терапија различитих поремећаја раста (изазваних дисфункцијом неких елемената у осовини GH-IGF). IGF-I посредује у већини ефеката хормона раста (GH).
- Примена IGF-I:
 - смањује концентрацију инсулина и глюкагона,
 - повећава преузимање глукозе у ткиво и
 - инхибира транспорт глукозе из јетре.

Фактори раста слични инсулину

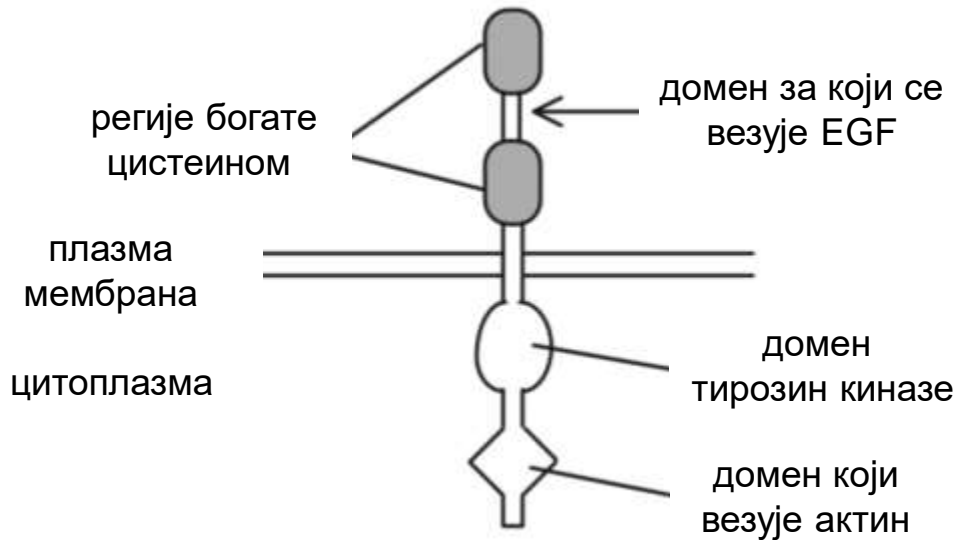
-производња и медицинска примена

- **Мекасермин** (Increlex®) представља рекомбинантни хумани IGF-I произведен у *E. coli*. Овај једноланчани полипептид се састоји се од 70 АК и има молекулску масу од око 7600 Da.
- Дејство остварује везивањем за IGF рецепторе тип 1, након чега се путем интрацелуларних сигнала стимулише раст.
- Индикуван је за лечење примарне IGF-I дефицијенције и код делеције гена за хормон раста код деце (неутралишућа антитела на хормон раста).
- Формулише се у облику стерилног раствора за s.c. примену и у облику фластера за топикалну примену. Најчешћа нежељена дејства повезана са применом мекасермина су главобоља, хипогликемија повраћање, отитис и хипертрофија на месту примене.

Епидермални фактор раста

- EGF је негликозилирани пептид, молекулске масе 6 kDa, састављен од 53 АК и један је од првих откривених фактора раста.
- EGF има снажан митогени ефекат на многе типове ћелија, док се његов рецептор експримира на површини већине ћелија. Делује на фибробласте, ендотелне и епителне ћелије, при чему је кожа главни физиолошки циљ јер стимулише раст епидермалног слоја. Заједно са неколико других фактора раста, EGF има улогу у процесу зарастања рана, што омогућава његову потенцијалну медицинску примену.
- С обзиром да је нестабилан и да се протеолитички разграђује на површини ћелија хроничне ране, још увек није регистрован рекомбинантни препарат EGF. Тренутна истраживања су усмерена ка развоју нових система испоруке EGF који би стабилизовали и заштитили протеин.

Епидермални фактор раста



EGF рецептор

EGF остварује ефекат везујући се за EGF рецептор. N-терминални , ванћелијски регион EGF рецептора садржи 622 АК. Има две регије богате цистеином, између којих се налази домен за који се везује лиганд. Хидрофобни (трансмембрански) домен је састављен од 23 АК и пролази кроз плазма мембрану. Цитоплазматска (унутарћелијска) регија рецептора садржи око 542 АК. Поседује домен тирозин киназе, који има неколико места за аутофосфорилацију тирозина и домен који везује актин и олакшава интеракцију са ћелијским цитоскелетом.

Тромбоцитни фактор раста

- PDGF је фактор раста, ког примарно синтетишу тромбоцити, али и други типови ћелија (фибробласти, глатке мишићне ћелије, ендотелне ћелије, мегакариоцити, макрофаги, астроцити, миобласти, епителне ћелије бубрега, многе трансформисане ћелије).
- PDGF има бројне биолошке активности, а превасходно делује као митоген за фибробласте, глатке мишићне ћелије, трансформисане и глија ћелије и као хемоатрактант за фибробласте, глатке мишићне ћелије, моноците и неутрофиле.
- PDGF има важну улогу у процесу зарастања рана. На месту повреде ткива активирани тромбоцити производе PDGF који делује као митоген/хемоатрактант за многе ћелије одговорне за започињање обнављања ткива. Стога има тенденцију да превасходно делује паракрино, али представља аутокрини/паракрини фактор раста различитих малигних ћелија.

Тромбоцитни фактор раста

- Активни PDGF је димер са два конститутивна полипептида (А и Б), постоје три активне PDGF изоформе: АА, ББ и АБ. Поред наведених идентификоване су ЦЦ и ДД изоформе, које се секретују као латентни фактори који захтевају активацију од стране екстрацелуларних протеаза.
- Код људи постоје две различите изоформе PDGF А полипептида, краћи А облик садржи 110 АК, а дужи А облик 125 АК. Оба имају једно потенцијално место гликозилације и три дисулфидне везе унутар једног ланца.
- PDGF је ефикасан у третману рана, посебно хроничних (дијабетски улцер). Све три изоформе PDGF могу се синтетисати употребом експресионих система, а најпотентније су АБ или ББ димерне изоформе PDGF.

Тромбоцитни фактор раста

-рецептор

- PDGF рецептор садржи две подјединице. Обе су трансмембрански гликопротеини чији цитоплазматски домени имају активност тирозин киназе након активирања.
- Здрава кожа не садржи PDGF рецепторе. Међутим, доказано је да се брза експресија α и β рецепторских подјединица индукује након повреде (нпр. хируршки рез). Експресија рецептора поново престаје након епителизације и потпуног зарастања ране.
- Свакодневна локална примена PDGF (ББ изоформа):
 - стимулише зарастање хроничних рана, мада је забележено побољшање скромно.
 - поспешује зацељивање хроничних дијабетских улцера.

Тромбоцитни фактор раста

-производња и медицинска примена

- **Бекаплермин** (*Regranex*[®]) је одобрен за клиничку примену крајем '90-их година. Производи се у инжењерисаном соју *S. cerevisiae* који садржи ген за Б ланац PDGF. Бекаплермин је хомодимер који се састоји од два идентична полипептидна ланца међусобно повезана дисулфидним везама, молекулске масе око 25 kDa.
- Индикуван је за лечење улцера доњих екстремитета који настају као компликација дијабетесне неуропатије, када постоји адекватан доток крви у то подручје. Контраиндикувана је примена бекаплермина на местима захваћеним инфективним улцером или карциномом коже.

Тромбоцитни фактор раста

-производња и медицинска примена

- Формулише се као нестерилни гел, намењен за локалну примену, и у већини случајева доводи до побољшања након 8-10 недеља третмана. Финални производ као конзервансе садржи метилпарабен, пропилпарабен и *m*-крезол. Рок трајања препарата износи 1 годину уколико се чува на 2-8 °C, а након отварања стабилан је 6 недеља.
- Такође, као и у случају EGF, и PDGF антагонисти могу бити значајни у лечењу неких врста карцинома код којих претерана производња митогених сигнала изазваних PDGF доводи до измењеног стања.

Фактори раста фибробласта

- FGF представљају фамилију од око 20 протеина (FGF 1 - 20), молекулске масе 18 - 28 kDa. Они индукују низ митогених, хемотактичких и ангиогених одговора.
- Класификација FGF заснива се на структурној сличности. Сви имају средишње језгро од 140 АК које је изразито хомолого међу члановима фамилије.
- Сви FGF чврсто везују хепарин и хепарину сличне гликозаминогликане који се налазе у ванћелијском матриксу, што је омогућило пречишћавање неколико FGF коришћењем хепарин-афинитетне хроматографије.
- Иако многи изворни чланови ове фамилије стимулишу раст/развој фибробласта (отуда и назив), неколико новијих чланова показује мало/нимало ефеката на фибробласте.

Фактори раста кератиноцита

- **Палифермин** (*Kerivance*®) је фактор раста кератиноцита (FGF-7) произведен рекомбинантном технологијом у *E. coli*. Одобрен је за примену 2004. године и за сада је једини члан фамилије FGF-7 одобрен за клиничку примену.
- Фактор раста кератиноцита састоји се од 140 АК, молекулске масе 16,3 kDa. Од нативног фактора раста кератиноцита се разликује по томе што нема прве 23 аминокиселине на N-терминусу, па му је стабилност побољшана.
- Рецептор за фактор раста кератиноцита присутан је у великом броју ткива: језик; букална слузница; једњак; јетри; бубрези; бешика. Када се веже за рецептор, покреће се пролиферација, диференцијација и миграција епителних ћелија. Терапијске ефекте палифермин остварује превасходно везивањем за FGF2 рецептор (активност тирозин киназе).

Фактор раста кератиноцита

- Након раста ћелија, производ се изолује и пречишћава вишестепеним хроматографским корацима. Формулише се као лиофилизат и пакује у бочице за једнократну употребу, а као ексципијенсе садржи манитол, сахарозу, *Polysorbate 20* и хистидин.
- Смањује учесталост и трајање тешког оралног мукозитиса код пацијената са хематолошким малигнитетима на мијелотоксичној терапији која захтева примену хематопоеетских матичних ћелија (орални мукозитис, за који су карактеристичне улцерозне лезије уста, чест је нежељени ефекат примене високих доза хемиотерапије или радиотерапије).
- Примењује се свакодневно *i.v.*, најчешће током неколико дана. Уочена нежељена дејства су: осип, еритем, задебљање и промена боје језика и промена укуса.

Трансформишући фактори раста

- TGF представљају још једну фамилију полипептидних митогена. Чланови ове фамилије су TGF- α , као и неколико врста TGF- β .
- TGF- α се најпре синтетише као интегрални протеин мембране, а потом се протеолитичком деградацијом ослобађа солубилни фактор раста (полипептид од 50 АК). Овај фактор раста има висок ниво хомологије аминокиселина са EGF и индукује биолошке ефекте везивањем за EGF рецептор.
- Синтетишу га различита ткива, моноцити и кератиноцити, али и многе врсте туморских ћелија на које може да делује као аутокрини фактор раста.

Трансформишући фактори раста

- TGF- β је први описани фактор раста који индукује трансформацију више ћелијских линија фибробласта и састоји се од три одвојена фактора раста: TGF- β 1, - β 2 и - β 3.
- Иако су производи различитих гена, сви имају висок степен хомологије. У зрелом облику постоје као хомодимери, а свака подјединица садржи 112 АК. Већина ћелија синтетише TGF- β , појединачно или у комбинацији.
- Делују преко TGF- β фамилије рецептора (TGF β R1, TGF β R2, и TGF β R3).
- TGF- β су плејотропни цитокини, способни да инхибирају ћелијски циклус, а према томе и ћелијски раст неколико типова ћелија, од којих су најбитније епителне и хематопоеетске.

Трансформишући фактори раста

- Међутим, ови фактори стимулишу и раст неких типова ћелија, од којих су најбитније ћелије које стварају везивно ткиво, хрскавицу и кости. Они индукују синтезу протеина ванћелијског матрикса и модификују експресију матриксних протеаза. Служе и као моћан хемоатрактант за моноците и фибробласте.
- TGF- β има главни физиолошки утицај на:
 - ремоделовање ткива;
 - зацељивање рана;
 - хематопоезу.
- Такве активности их чине потенцијално корисним терапијским средствима, па се поједини препарати испитују за употребу у медицинске сврхе.

Фактори раста

-регистровани за клиничку примену у Р. Србији

Генерички назив	Заштићен назив	Експресиони систем	Индикације	Формулација
филграстим	<i>Nivestim Zarzio Accofil</i>	<i>E. coli</i>	Неутропенија, смањење учесталости компликација неутропеније код хемиотерапије, малигних обољења, трансплантације костне сржи	шприц за једнократну употребу
пегфилграстим	<i>Ziextenzo</i>	<i>E. coli</i>	Неутропенија код пацијената на хемиотерапији	шприц за једнократну употребу
епоетин α + хумани рекомбинантни еритропоетин	<i>Binocrit Eprex</i>	CHO	Анемија са дефицитом еритропоетина код пацијената са хроничном бубрежном инсуфицијенцијом, на дијализи и на хемиотерапији	шприц за једнократну употребу
епоетин β + хумани рекомбинантни еритропоетин	<i>Recormon</i>	CHO	Анемија са дефицитом еритропоетина код пацијената са хроничном бубрежном инсуфицијенцијом, на дијализи и на хемиотерапији	шприц за једнократну употребу

Фактори раста

-регистровани за клиничку примену у Р. Србији

епоетин зета	<i>Eqralys</i>	CHO	Анемија са дефицитом еритропоетина код пацијената са хроничном бубрежном инсуфицијенцијом, на дијализи и на хемиотерапији	шприц за једнократну употребу
дарбепоетин α	<i>Aranesp</i>	CHO	Анемија са дефицитом еритропоетина код пацијената са хроничном бубрежном инсуфицијенцијом, на дијализи и на хемиотерапији	шприц за једнократну употребу
метоксиполиетил енгликол-епоетин β	<i>Mircera</i>	CHO	Анемија са дефицитом еритропоетина код пацијената са хроничном бубрежном инсуфицијенцијом, на дијализи и на хемиотерапији	шприц за једнократну употребу
ромиплостим	<i>Nplate</i>	E. coli	Рефрактерна хронична имунолошка тромцитопенијска пурпура код пацијената код којих је извршена спленектомија или је контраиндикована, или су резистентни на лекове 1. и 2. терапијске линије	прашак за раствор за инјекцију

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Хвала на пажњи