



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Předmět: Biofarmaceutika  
4. rok studia

Kurz: Bioléčiva – biofarmaceutika

## **Peptidická léčiva.**

doc. PharmDr. Oldřich Farsa, Ph.D.

## Rozdělení v současnosti používaných terapeutických peptidů

### **1. Hormony**

#### **1.1 Liberiny a statiny („releasing“ & „inhibiting“)**

#### **1.2. Somatotropin**

#### **1.3 Oxytocin, vasopresin a jejich analogy**

#### **1.4 Insuliny a glukagon**

#### **1.5 Kalcitonin**

#### **1.5 Krevní faktory erythropoetinového typu**

#### **1.6 Imunomodulátory – faktory stimulující kolonie**

#### **1.7 Imunomodulátory - interferony**

### **2. Toxiny**

### **3. Faktory srážení krve a koagulancia**

### **4. Antibiotika**

## Jedno- a třípísmenné symboly L- $\alpha$ -aminokyselin

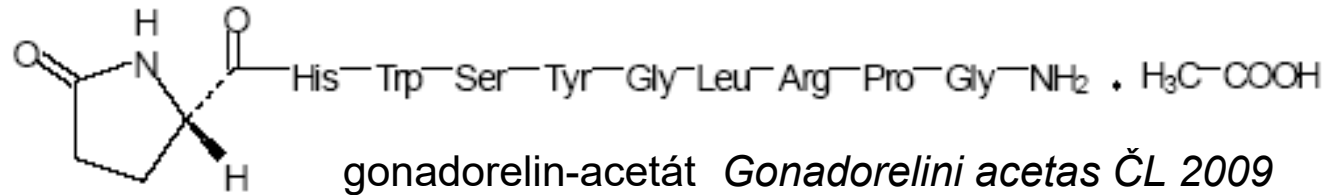
| Jednopísmenný | Třípísmenný |   |
|---------------|-------------|---|
| A             | Ala         | alanin  |
| B             | Asx         | asparagová kys. nebo asparagin  |
| C             | Cys         | cystein   |
| D             | Asp         | asparagová kys.   |
| E             | Glu         | glutamová kys.  |
| F             | Phe         | fenylalanin   |
| G             | Gly         | glycin  |
| H             | His         | histidin  |
| I             | Ile         | isoleucine  |
| K             | Lys         | lysin   |
| L             | Leu         | leucin  |
| M             | Met         | methionin   |
| N             | Asn         | asparagin   |
| P             | Pro         | prolin  |
| Q             | Gln         | glutamin  |
| R             | Arg         | arginin   |
| S             | Ser         | serin   |
| T             | Thr         | threonin  |
| U             | Sec         | selenocystein   |
| V             | Val         | valin   |
| W             | Trp         | tryptofan   |
| X             | Xaa         | neznámá nebo „jiná“ aminokyselina   |
| Y             | Tyr         | tyrosin   |
| Z             | Glx         | glutamová kys. nebo glutamin (nebo látky jako 4-karboxyglutamová kys. nebo 5-oxoprolin) |

# 1. Hormony

## 1.1 Liberiny a statiny („releasing“ & „inhibiting“)

### Gonadorelin a jeho analogy

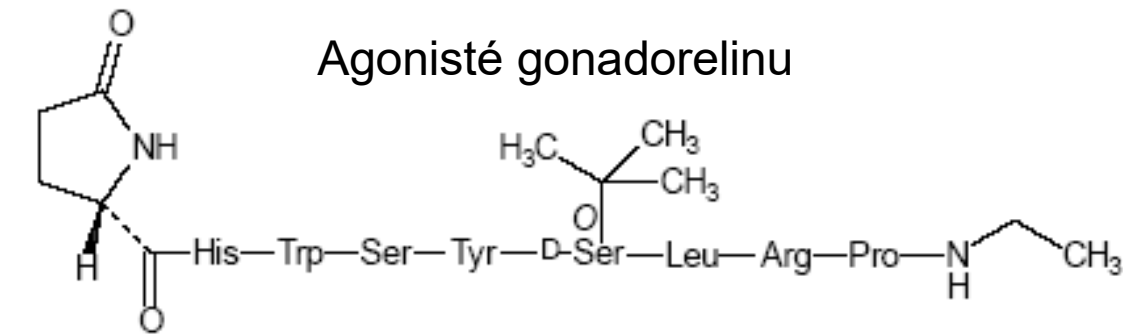
- hormon hypothalamu
- stimuluje uvolňování folikuly stimulujícího hormonu a luteinizačního hormonu z hypofýzy



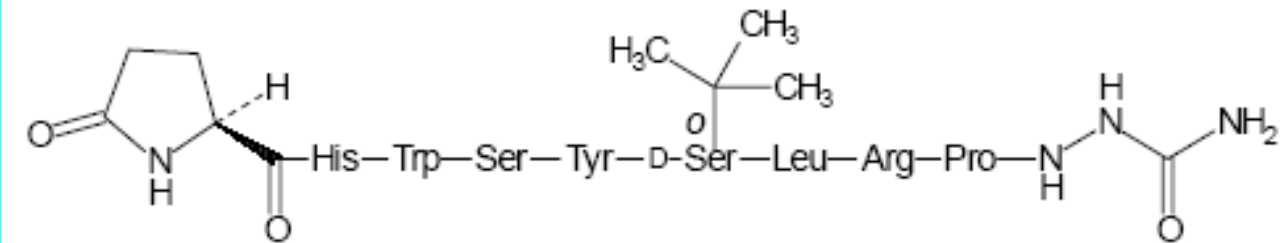
$C_{57}H_{79}N_{17}O_{15}$

$M_r$  1242,35

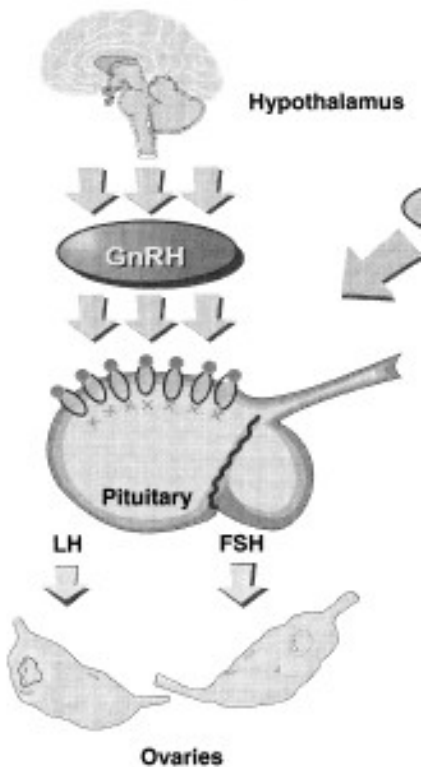
### Agonisté gonadorelinu



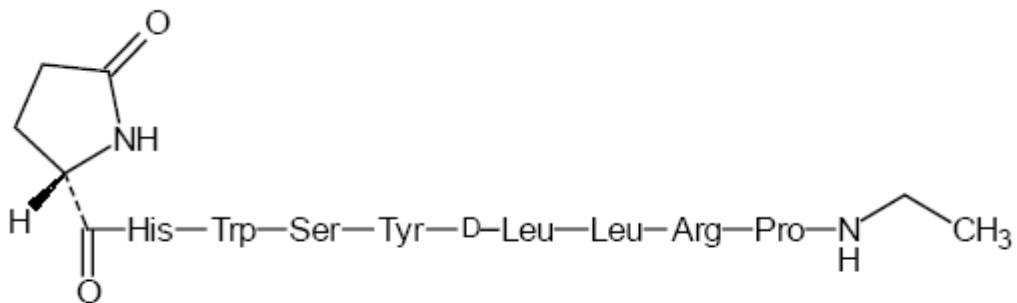
### buserelin *Buserelinum* ČL 2009



### goserelin *Goserelinum* ČL 2009



## Gonadorelin a jeho analogy Agonisté



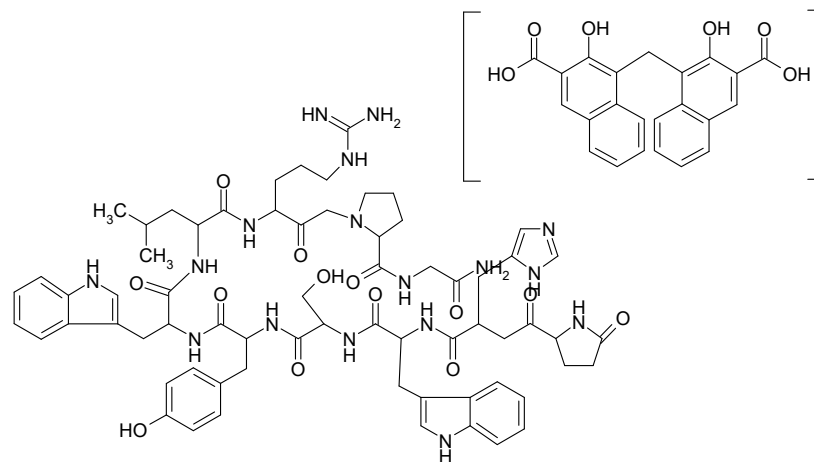
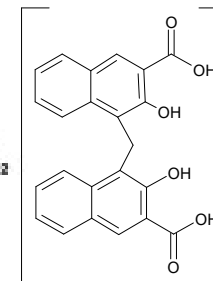
$C_{59}H_{84}N_{15}O_{12}$

$M_r$  1209,40

CAS 53714-56-0

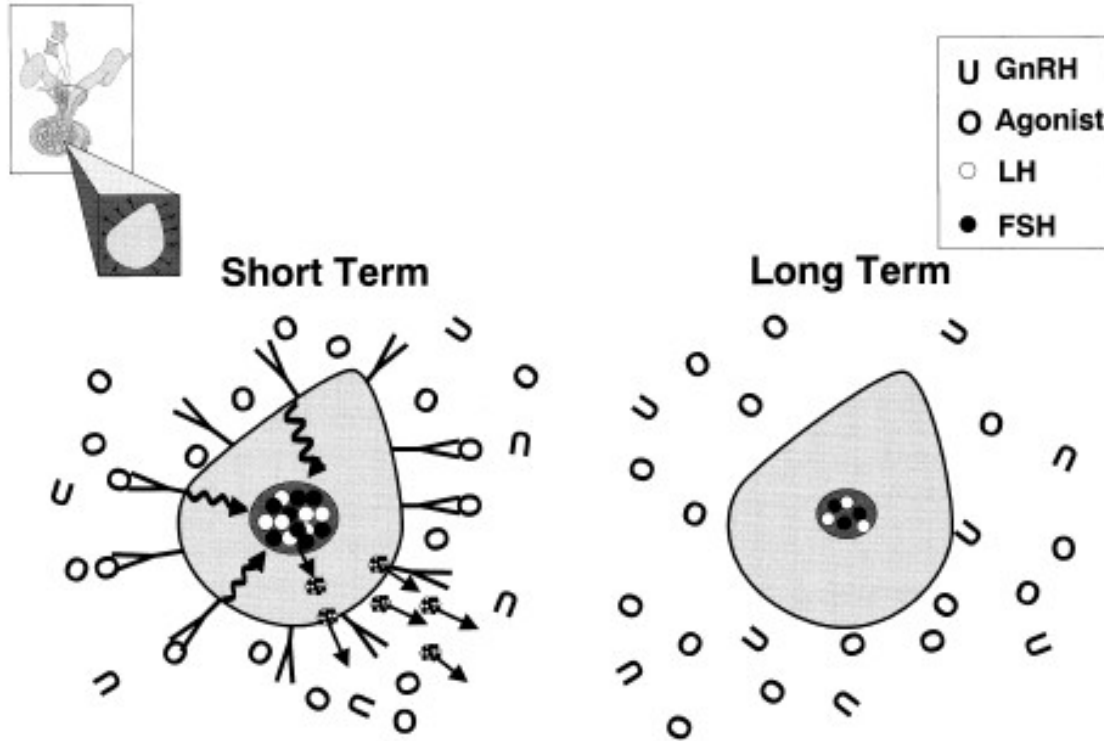
leuprorelin (syn. leuprolid) *Leuprorelinum* ČL2009

Trelstar™ (triptorelin pamoate)



# Krátkodobé a dlouhodobé působení agonistů gonadorelinu

Effects of GnRH agonist.



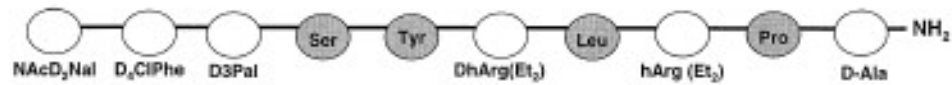
# Analoga gonadorelinu Antagonisté gonadorelinu

The GnRH antagonists.

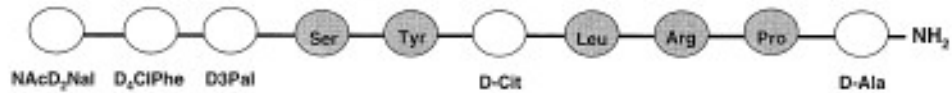
## GnRH



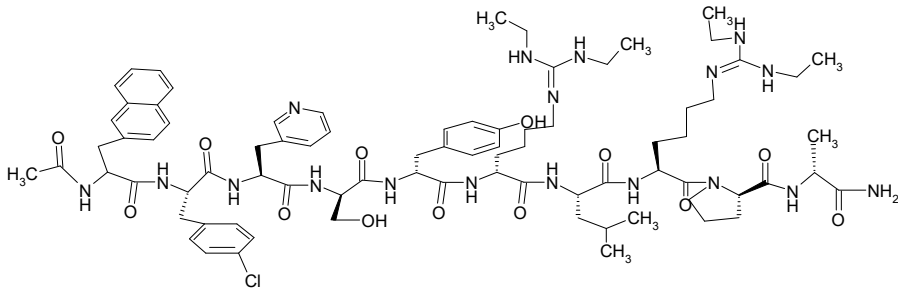
## Antagon™ (ganirelix acetate)



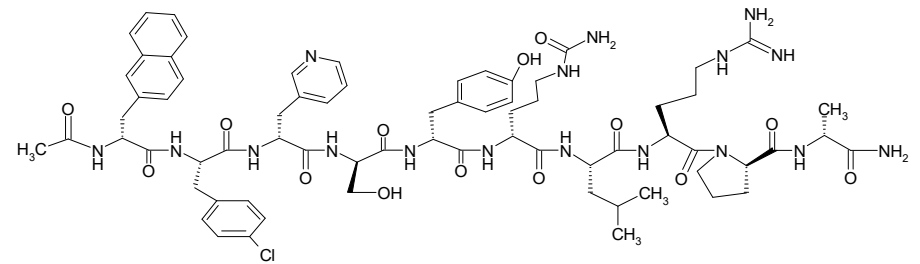
## Cetrotide® (cetrorelix acetate)



| Amino Acid Number | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
|-------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|



ganirelix



cetrorelix

## Gonadorelin a jeho analogy

- příprava: chemická syntéza
- použití: především asistovaná reprodukce
- výhody analogů: podstatně větší stabilita  $\Rightarrow$  delší eliminační poločas  $\Rightarrow$   
 $\Rightarrow$  možnost podávat v podstatně delších intervalech; injekce agonisty nahradí infuzi gonadorelinu

### Vztahy mezi strukturou a aktivitou

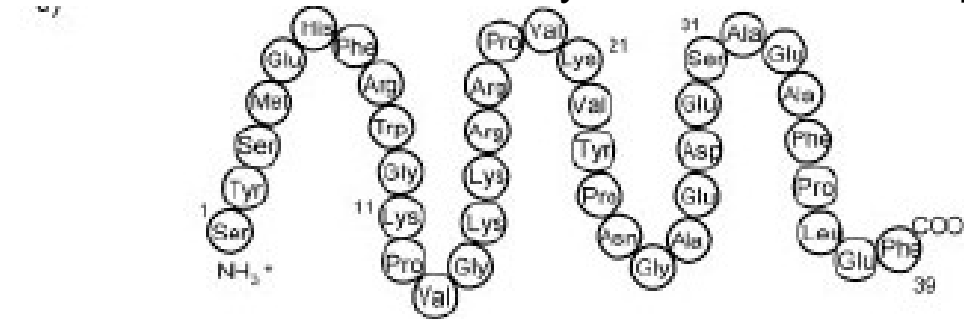
- záměna glycinu v pozici 6 za objemnější AK vede ke zvýšení stability
- sekvence prvních 3 AK nutná pro vazbu na receptor a pro agonistický účinek; u agonistů zachována, antagonisté mají změněnou za 3 nefyziol. AK, váží se na GnRH



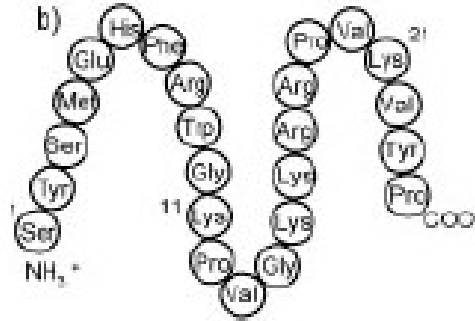
## Kortikotropin a jeho analogy

Kortikotropin = ACTH; hormon hypofýzy stimulující tvorbu gluko- a mineralokortikoidů v kůře nadledvinek a růst těchto žláz

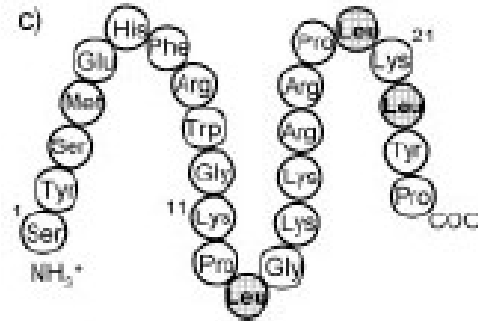
- polypeptid z 39 AK; prvních 24 totožných u všech druhů
- prvních 24 AK odpovídá za biol. aktivitu, koncových 15 AK za imunospécifitu



kortikotropin



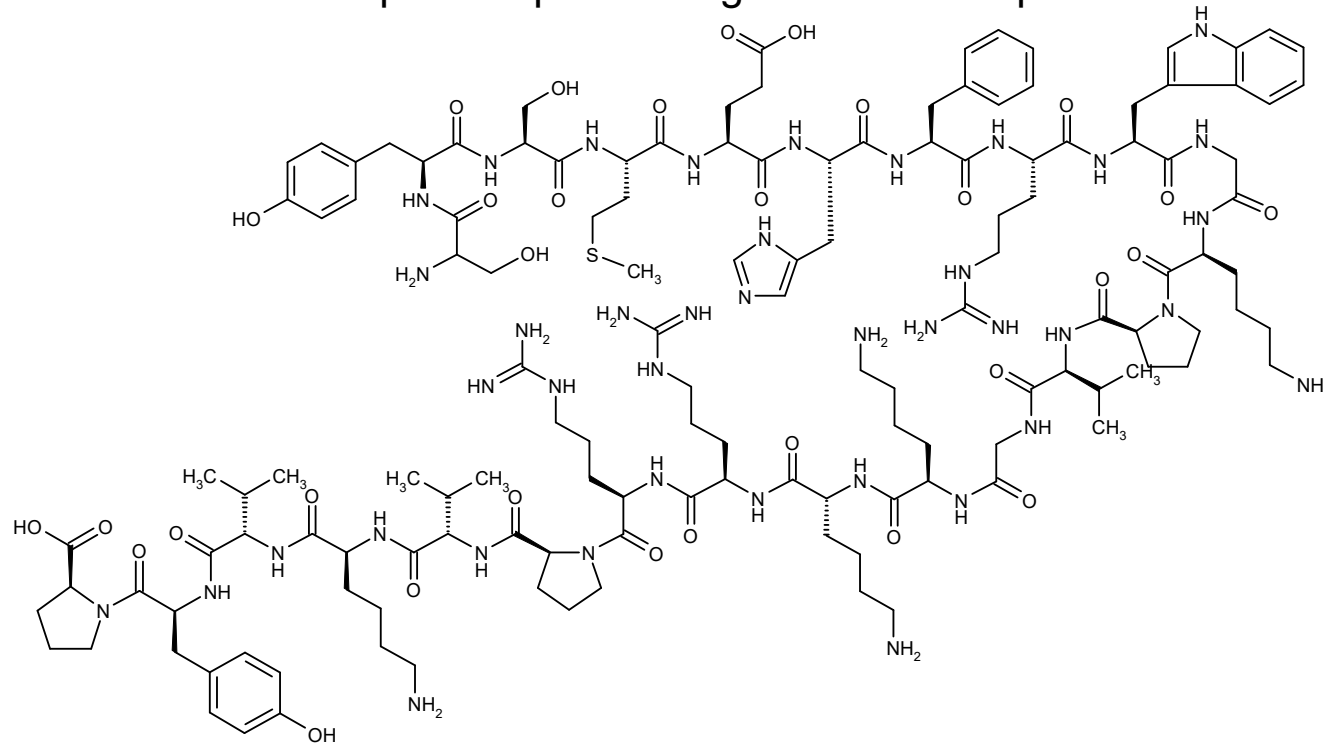
**tetrakosaktid**  
syn. cosyntropin [USAN]  
*Tetracosactidum* ČL 2009  
Synacten®



SynVL  
• látka používaná jako standard  
k  
MS identifikaci tetrakosktidu

## Použití kortikotropinu a tetrakosaktidu

- diagnostika funkce nadledvinek
- substituční terapie při nedostatku glukokortikoidů
- náhrada depotního podávání glukokortikoidů při dlouhodobé terapii

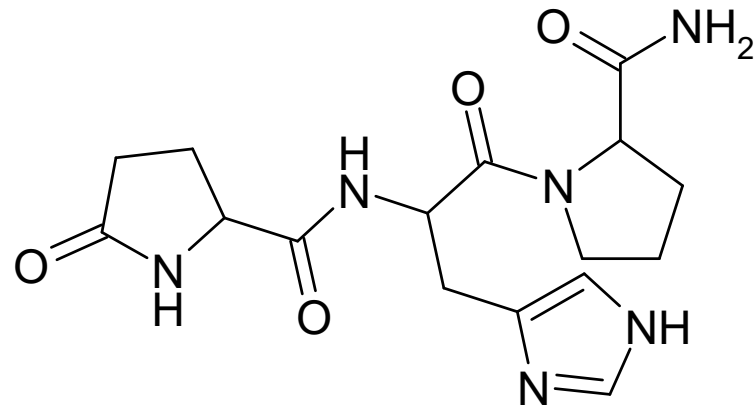


### tetrakosaktid

- používán od r. 1961
- připravován synteticky
- zneužíván sportovci k dopingu

## Protirelin – syntetický thyreotropin-releasing hormone (TRH)

- hormon hypothalamu, stimulující tvorbu thyreotropinu v hypofýze a prolaktinu
- též neurotransmitter v CNS, podílí se na regulaci příjmu potravy, reguluje energetický metabolismus aj,



protirelin

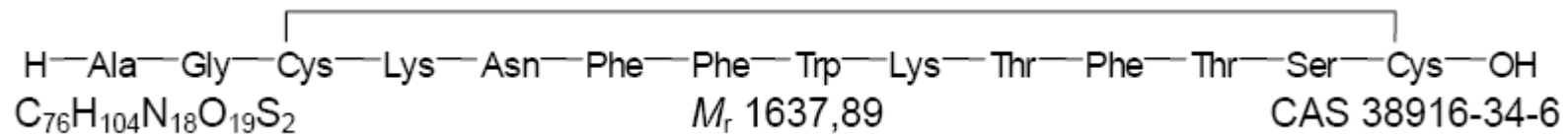
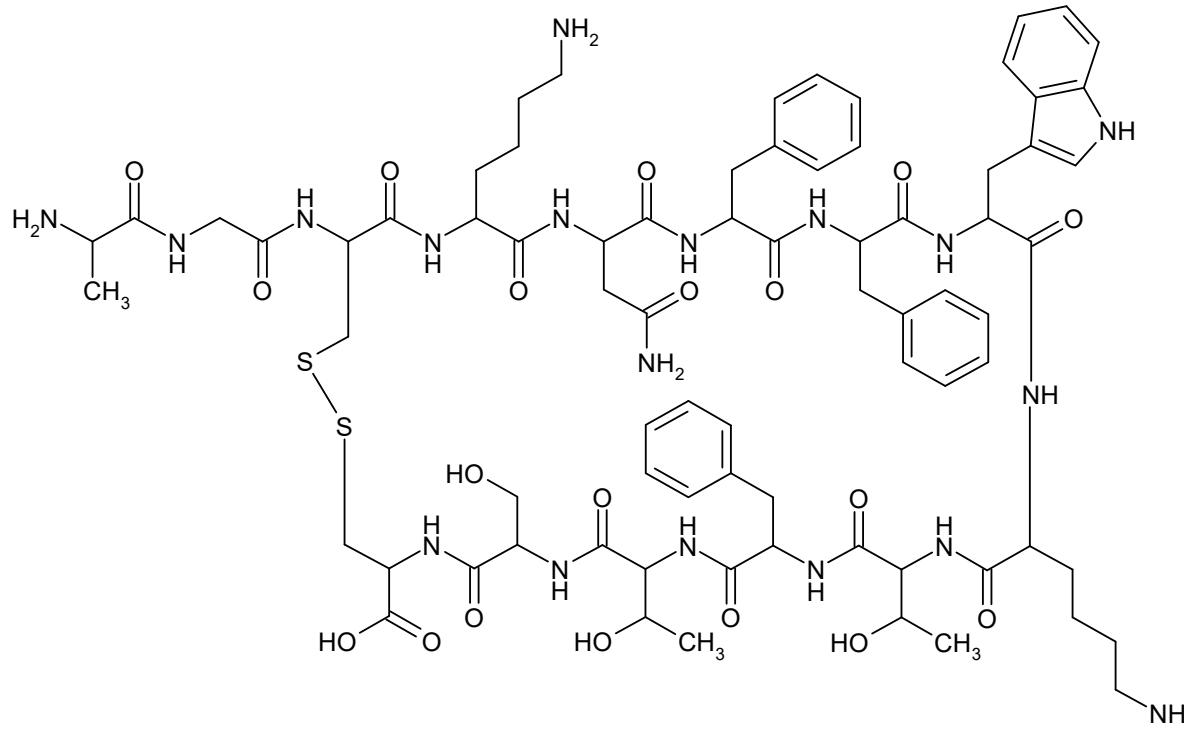
5-oxopropyl-histidyl-prolinamid

*Protirelinum* ČL 2009

- struktura objasněna r. 1969, používán od r. 1976
- podáván p.o.
- používán jako posilovač kognitivních funkcí k terapii následků poškození mozku a míchy a neurodegenerativních onemocnění (Alzheimer, Parkinson, motorická neuronální choroba aj.)

# Somatostatin

- cyklický tetradekapeptid tvořený zejména v hypothalamu
- inhibuje tvorbu růstového hormonu (somatotropinu) v hypofýze
- ovlivňuje funkci ledvin, pankreatu a GITu
- též neurotransmitter v CNS („neuropeptid“)



somatostatin

*Somatostatinum* ČL 2009

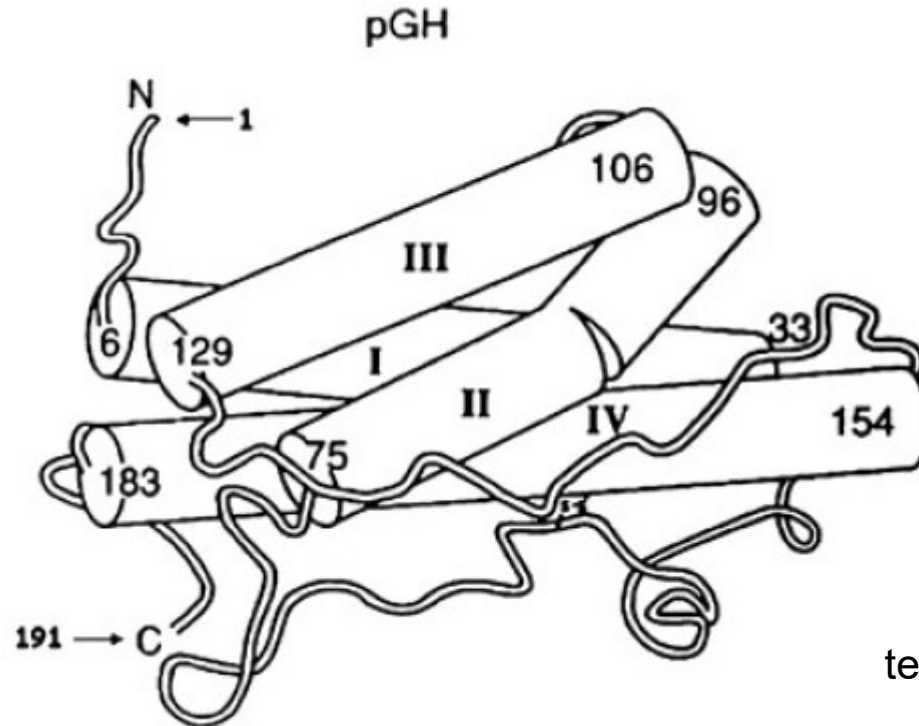
Somatostatin-UCB<sup>®</sup> inf.

- připravován synteticky
- terapie akromegalie

## 1.2 Somatotropin

= růstový hormon (GH)

- peptid ze 191 AK vylučovaný v předním laloku hypofýzy
- stimuluje mitózu, růst buněk a diferenciaci buněk určitých tkání
- ovlivňuje expresi genů a metabolismus
- sekvence AK známá od r. 1972, sekvence nukleotidů kódujícího genu od r. 1977



somatotropin

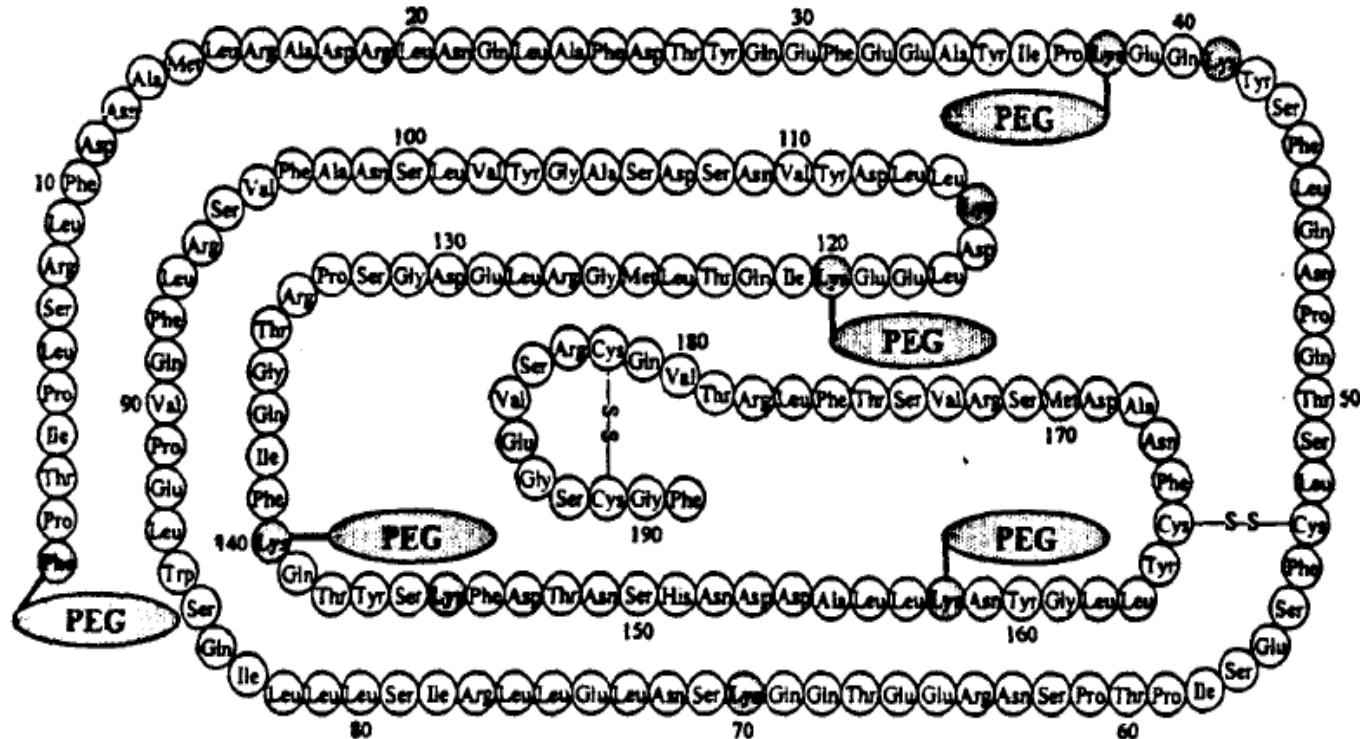
*Somatropinum* ČL2009

- lidský, připravený rekombinantní technikou používán od r. 1985
- substituční terapie při deficitu přirozeného GH

```
1 MATGSRTSLL LAFGLLCLPW LQEGSAFPTI PLSRLFDNAM LRAHRLHQLA FDTYQEFEEA YIPKEQKYSF LQNPQTSLCF SESIPTPSNR EETQQKSNLE 100
101 LLRISLLLIQ SWLEPVQFLR SVFANSLVYG ASDSNVYDLL KDLEEGIQTL MGRLEDGSPR TGQIFKQTYS KFDNTSHNDD ALLKNYGLLY CFRKDMDKVE 200
201 TFLRIVQCRS VEGSCGF
```

## Analoga somatotropinu (růstového hormonu)

### Amino Acid Sequence of Pegvisomant Protein

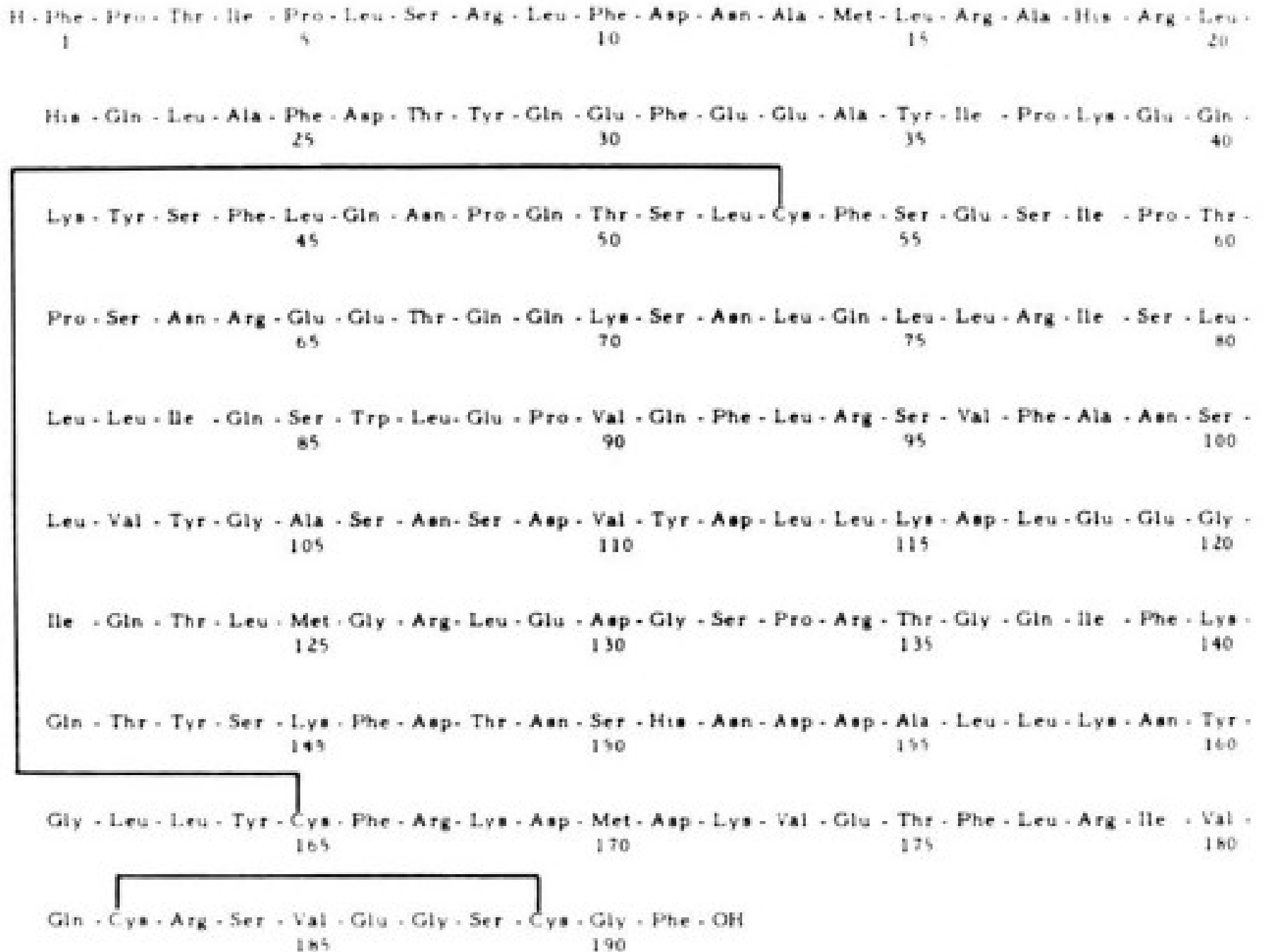


\* Stippled residues indicate PEG attachment sites (Phe<sub>1</sub>, Lys<sub>38</sub>, Lys<sub>41</sub>, Lys<sub>70</sub>, Lys<sub>115</sub>, Lys<sub>120</sub>, Lys<sub>140</sub>, Lys<sub>145</sub>, Lys<sub>158</sub>)

pegvisomant

- analog – antagonist lidského růstového hormonu (GH), v němž je Gly v pozici 120 nahrazen Lys, přidáno 8 AK pro lepší vazbu na receptor a je pegylován na Phe v pol. 1 a na 8 Lys
- připravován rekombinantní technikou a následnou reakcí s oxiranem (polyadice)
- pegylace snižuje antigenicitu a prodlužuje biologický poločas
- použití: léčba akromegalie

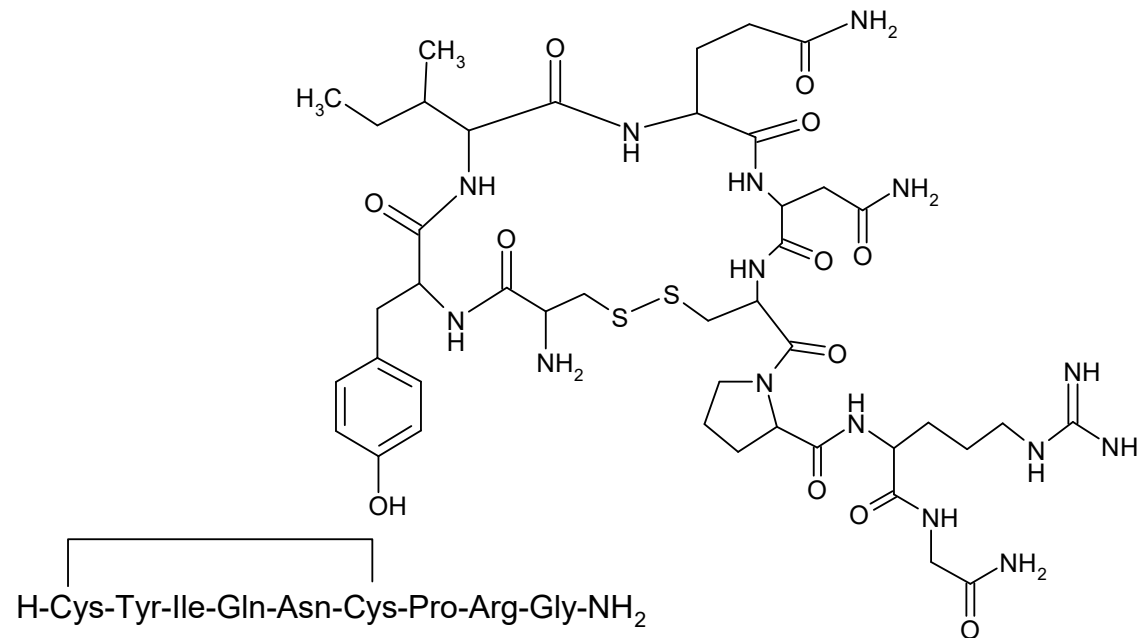
## Primární struktura lidského somatotropinu



### 1.3 Oxytocin, vasopresiny a jejich analogy

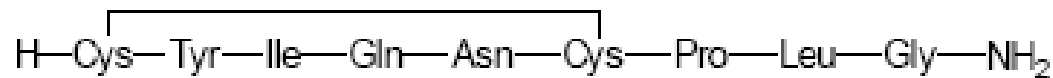
Vasotocin

= fylogenetický prekurzor oxytocinu i vasopressinů u nižších organismů než savců



Oxytocin

- cyklický nonapeptid vylučovaný zadním lalokem hypofýzy
- stimuluje kontrakce dělohy a vylučování mléka u savců



C<sub>43</sub>H<sub>66</sub>N<sub>12</sub>O<sub>12</sub>S<sub>2</sub>

M<sub>r</sub> 1007,19

CAS 50-56-6

*Oxytocinum* ČL 2009

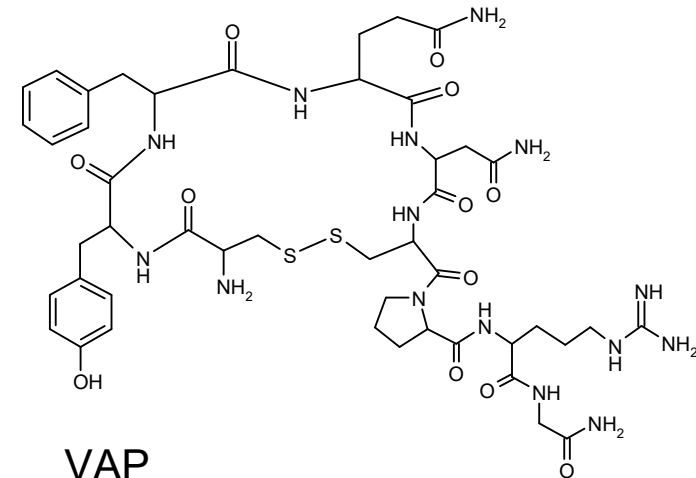
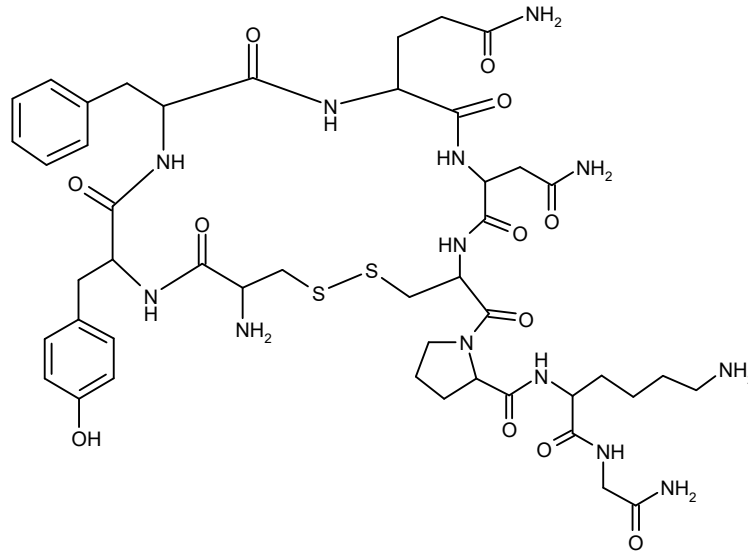
- připravován synteticky
- používán k navození porodu a posílení děložních stahů



# Vasopresin

=antidiuretický hormon (ADH)

- oktapeptidy produkované neurohypofýzou všech obratlovců (prekurzor synt. v hypothalamu)
- sekvence AK se liší dle druhu
- řídí množství vody v těle (regulace ledvin, plic aj.)
- potenciální neurotransmittery
- používány zejména syntetické deriváty



VAP

- savci kromě *Suidae* pouze

## Desmopressin



$C_{46}H_{64}N_{14}O_{12}S_2$

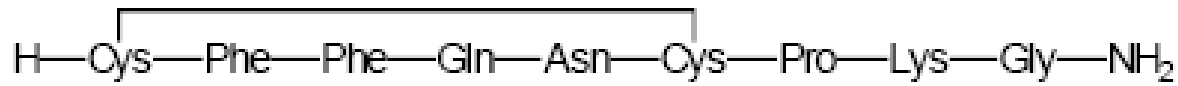
$M_r$  1069,22

CAS 16679-58-6

*Desmopressinum* ČL 2009

- cyklický nonapeptid
- připravován synteticky
- antidiuretikum (enuresis nocturna, ...)

Analoga vasopresinů  
Felypressin

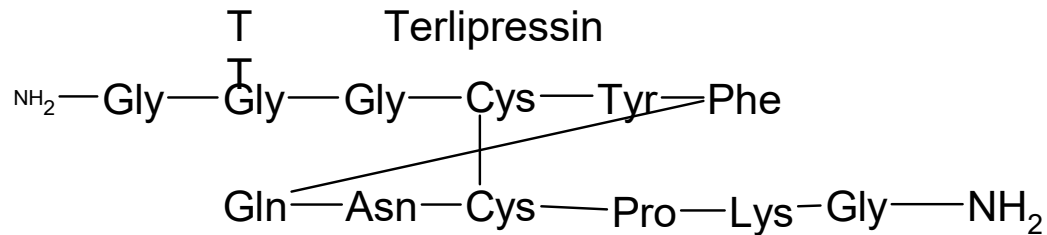


C<sub>46</sub>H<sub>65</sub>N<sub>13</sub>O<sub>11</sub>S<sub>2</sub>

M<sub>r</sub> 1040,22

CAS 56-59-7

*Felypressinum* ČL2009

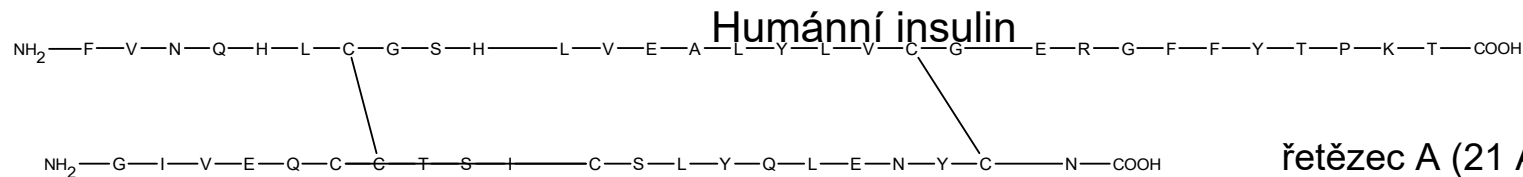


- vazokonstriktor, léčba krvácení z varixů apod., léčba oběhového šoku  
Glypressin<sup>®</sup> inj., Remestyp<sup>®</sup> inj.

## 1.4 Insuliny a glukagon

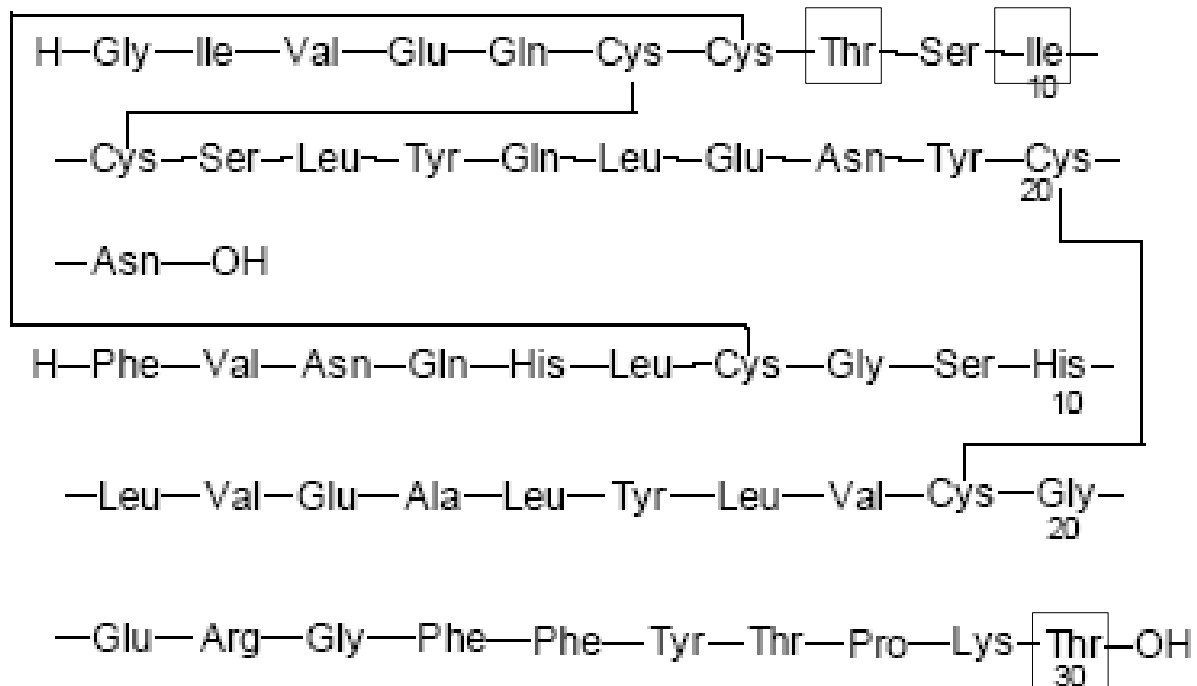
### Insulin

- secernován převážně  $\beta$ -buňkami Langerhansových ostrůvků pankreatu
- umožňuje utilizaci glukosy buňkami organismu
- izolovali Banting a Best r. 1921 z pankreatu psa



řetězec B (30 AK)

řetězec A (21 AK)



C<sub>257</sub>H<sub>383</sub>N<sub>65</sub>O<sub>77</sub>S<sub>6</sub>

M<sub>r</sub> 5807,60

CAS 11061-68-0

•tvoří se z prekursoru – proinsulinu o 110 AK

10 20 30 40 50 60  
MALWMRLLPL LALLALWGPD PAAAFVNQHL CGSHLVEALY LVCGERGFFY TPKTRREAED  
70 80 90 100 110  
LQVGQVELGG GPGAGSLQPL ALEGLQKRG IVEQCCTSIC SLYQLENYCN

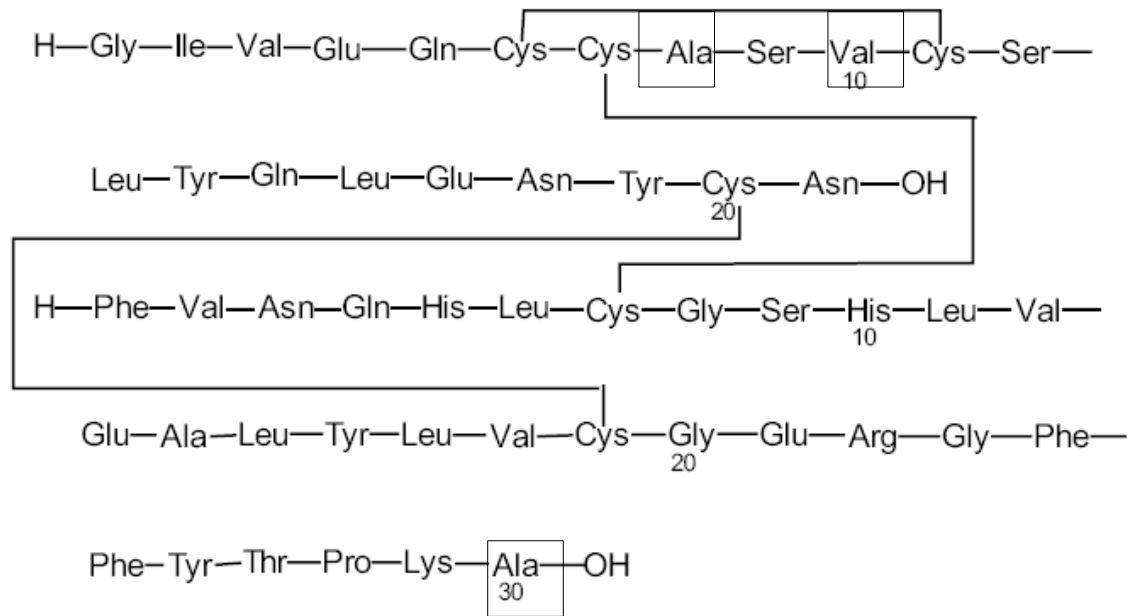
1-24 signální sekvence; 25-54 řetězec B; 57-87 peptid C; 90-110 řetězec A

•dnes získáván rekombinantní technikou nebo semisynteticky z prasečího

*Insulinum humanum* ČL2009

•syn. humulin

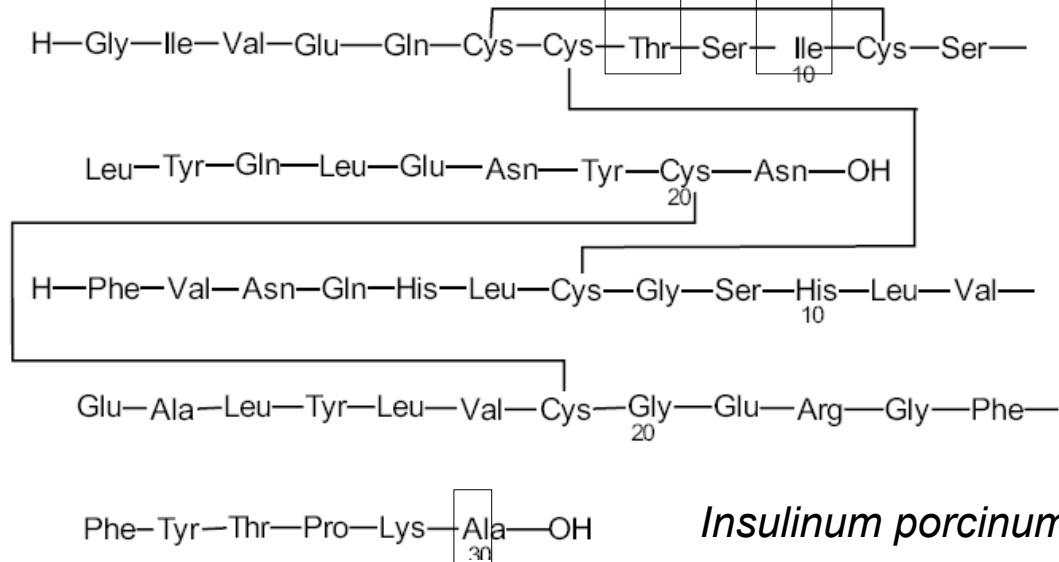
## Insulin bovinní (hovězí)



## *Insulinum bovinum* ČL2009

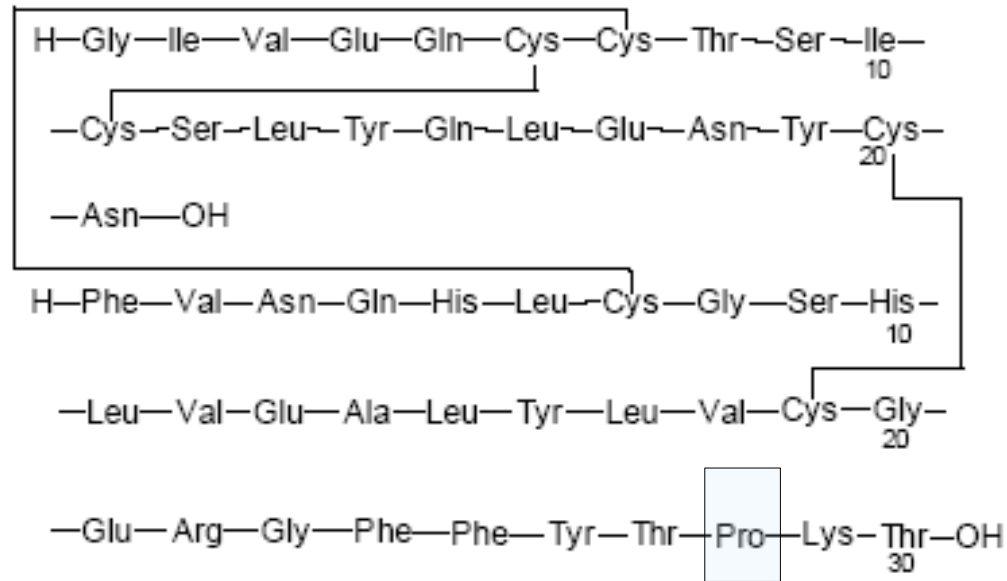
- izolace z hovězích slinivek

## Insulin prasečí



## *Insulinum porcinum* ČL2009

# Analogy insulínu



lidský

$C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$

$M_r$  5807,60

CAS 11061-68-0



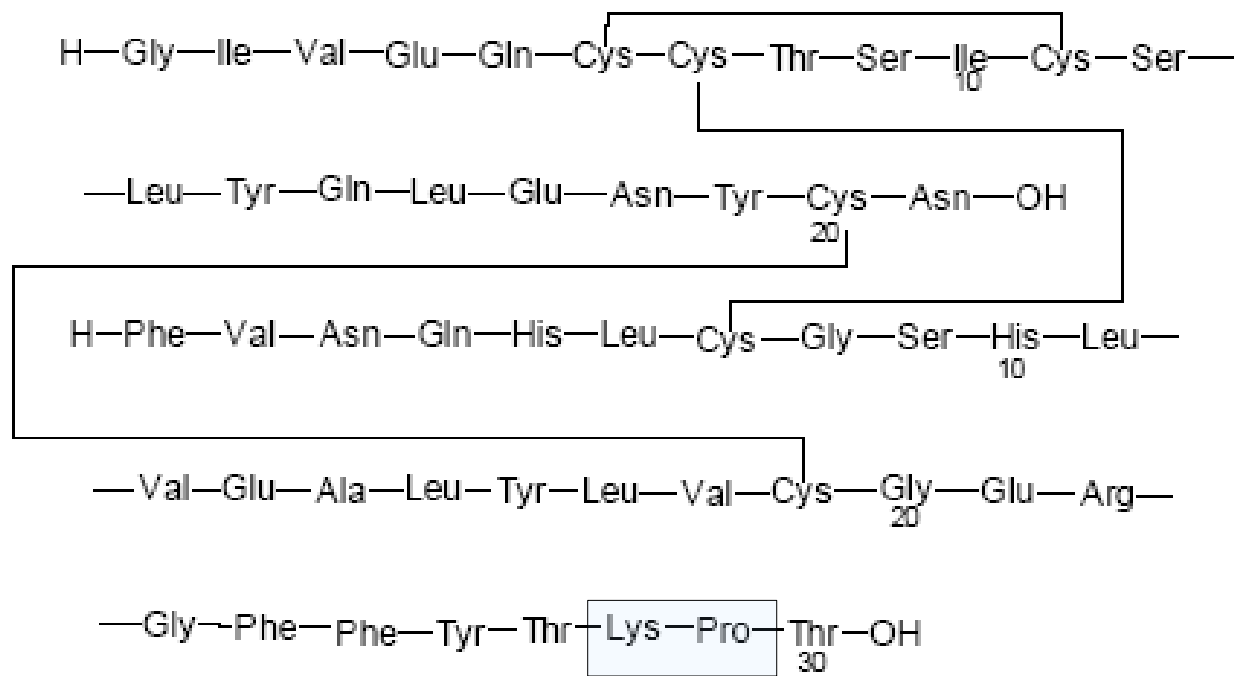
aspart  
*Insulinum aspartum* ČL 2009

$C_{256}H_{381}N_{65}O_{79}S_6$

$M_r$  5825,58

CAS 116094-23-6

- rekombinantní technika
- krátkodobě působící



$C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$

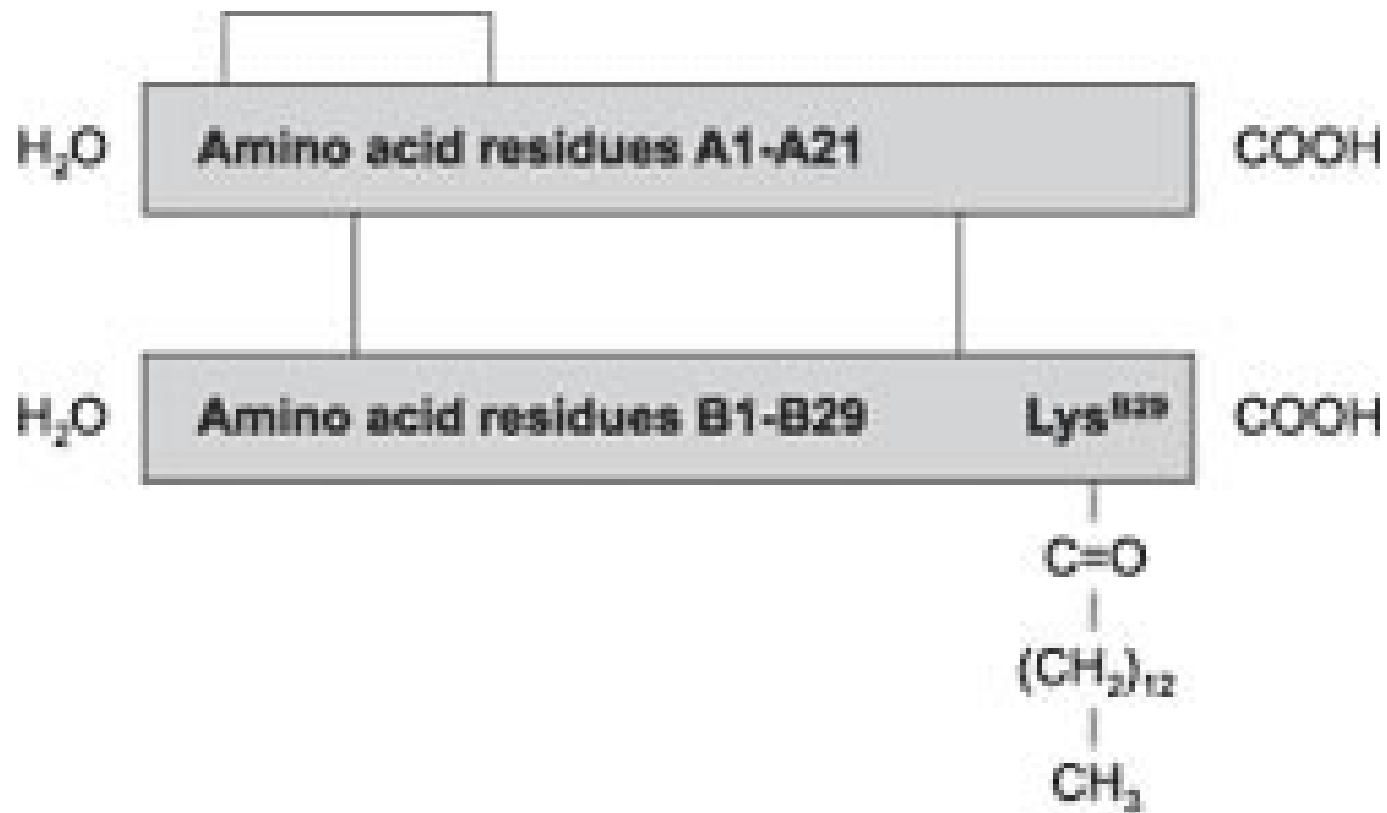
$M_r$  5807,61

CAS 133107-64-9

insulin-lispro

*Insulinum lisprum* ČL 2009

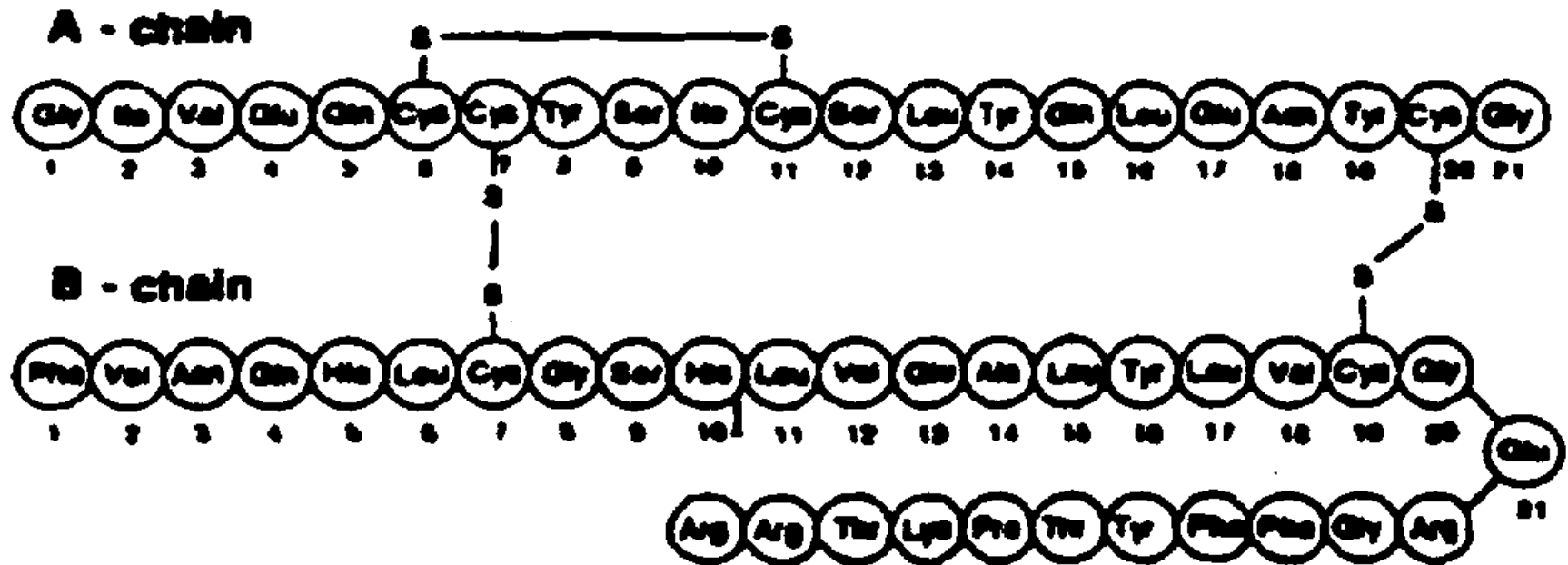
- rekombinantní
- krátkodobě působící



insulin-detemir

- řetězec B jen 29 AK, na Lys<sup>B29</sup> tetradekanoyl (myristoyl)
- rekombinantně-polosyntetický



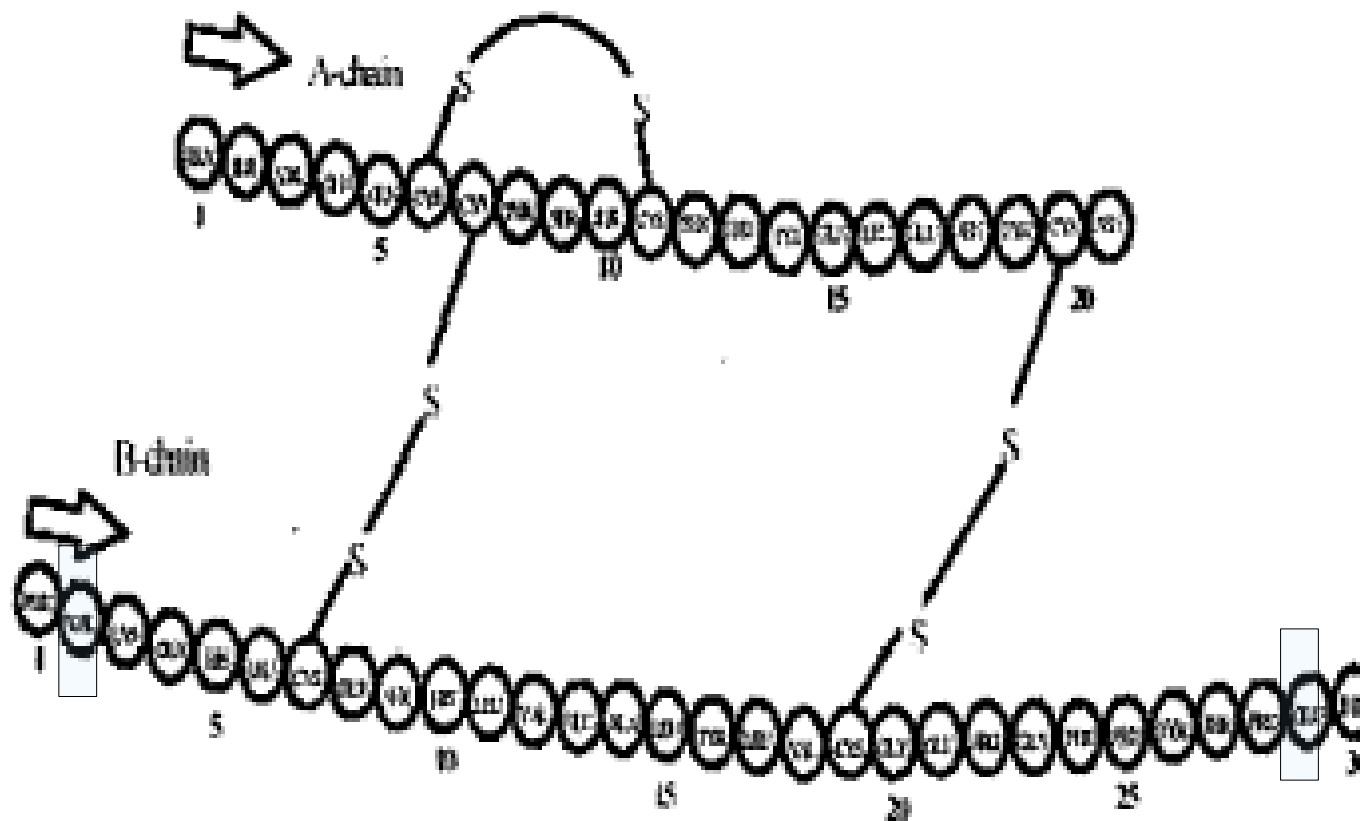


### insulin-glargin

Gly<sup>21A</sup>-L-Arg<sup>30B</sup>-L-Arg<sup>31B</sup>-insulin

Lantus<sup>®</sup>

- inzulin první volby, nestačí-li u diabetu 2. typu perorální antidiabetika
- dlouhý  $T_{1/2}$ , podáván typicky 1x denně s.c. před spaním



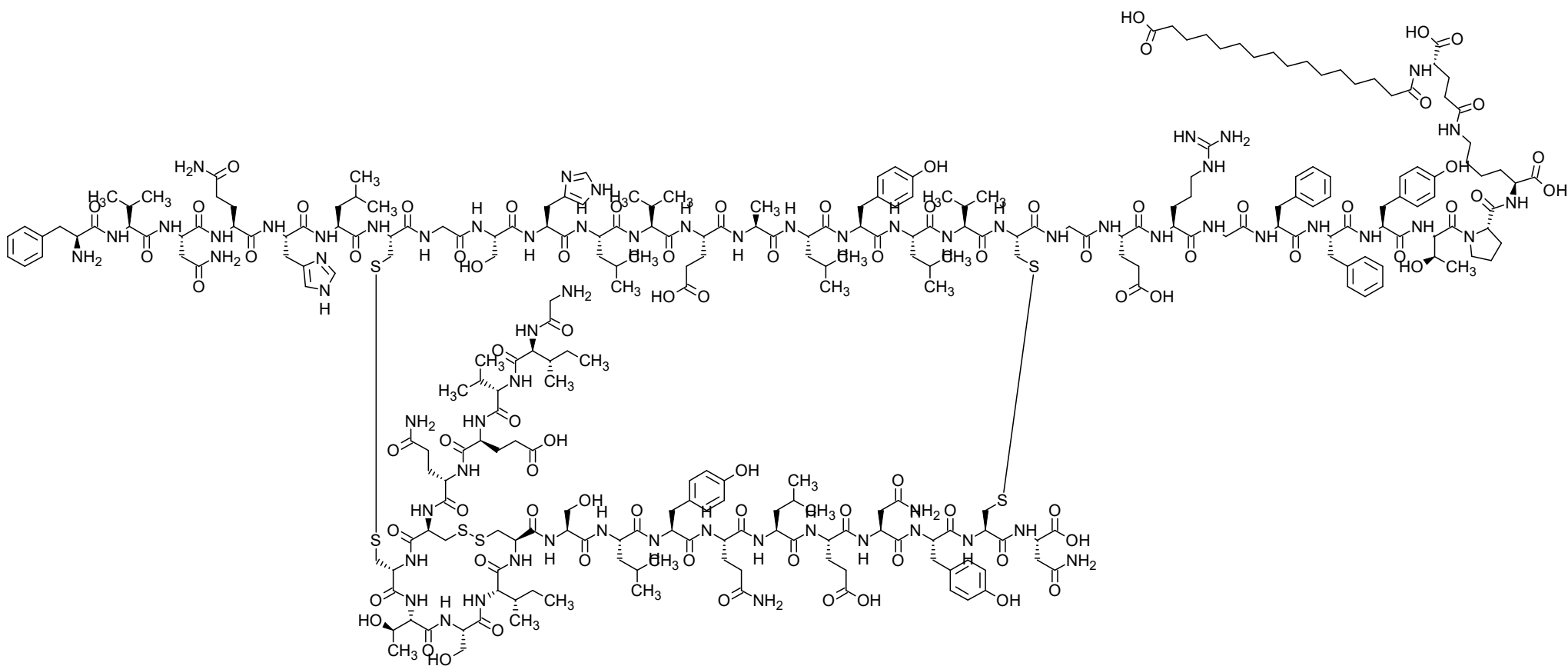
Chemical name: 3βLys-29βGlu-human insulin

CAS registry number: 207748-29-6

Molecular formula/molecular weight:  $C_{258}H_{384}O_{78}N_{64}S_6/5823$

insulin-glulisin

•krátkodobě působící

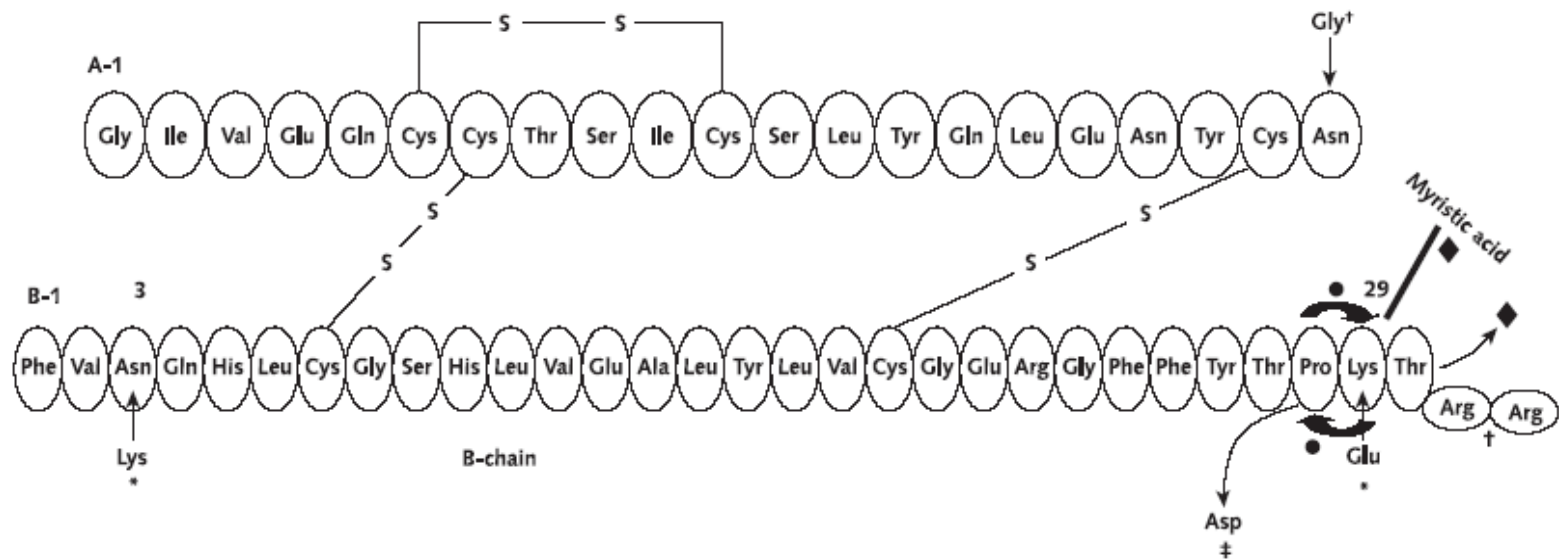


## insulin **degludec**

B29N(epsilon)-omega-karboxypentadekanoyl-gama-L-glutamoyl desB30 humánní insulin

- velmi dlouhá doba působení
- Tresiba ®
- s.c. podání

## Shrnutí používaných obměn insulínu



● = Insulin lispro differs from human insulin by the substitution of proline with lysine at position 28 and the substitution of lysine with proline at position 29 of the insulin  $\beta$  chain.

‡ = Insulin aspart is designed with the single replacement of the amino acid proline by aspartic acid at position 28 of the human insulin  $\beta$  chain.

\* = Insulin glulisine is designed with the substitution of the amino acid lysine with asparagine at position 3 of the human insulin  $\beta$  chain and by substitution of the amino acid lysine at position 29 with glutamine.

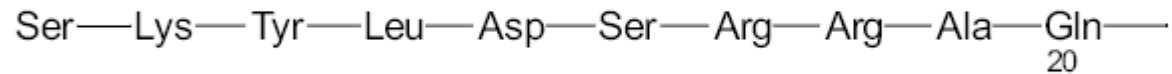
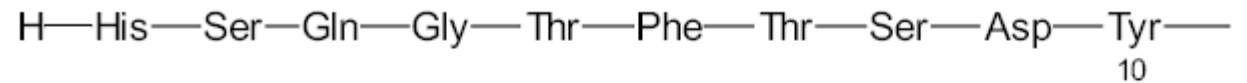
† = Insulin glargine differs from human insulin in that the amino acid asparagine at position A21 is replaced by glycine and 2 arginines are added to the C-terminus of the  $\beta$  chain.

◆ = Insulin detemir is designed to bind albumin in plasma after absorption. Threonine is omitted from position 30 of the insulin  $\beta$  chain and replaced by myristic acid, a C14 fatty acid chain.

Figure reprinted with permission from reference 2: Oiknine R, Bernbaum M, Mooradian AD. A critical appraisal of the role of insulin analogues in the management of diabetes mellitus. *Drugs*. 2005;65:325-40. [PMID: 15669878]

## Glukagon

- peptid o 29 AK z pankreatu podporující štěpení jaterního glykogenu a zvyšující glykémii
- způsobuje relaxaci hladkého svalstva žaludku a střev podobně jako cholinergika



$\text{C}_{153}\text{H}_{225}\text{N}_{43}\text{O}_{49}\text{S}$

$M_r$  3482,78

CAS 16941-32-5

### *Glucagonum* ČL2009

- izolován z vepřových nebo hovězích slinivek

### *Glucagonum humanum* ČL2009

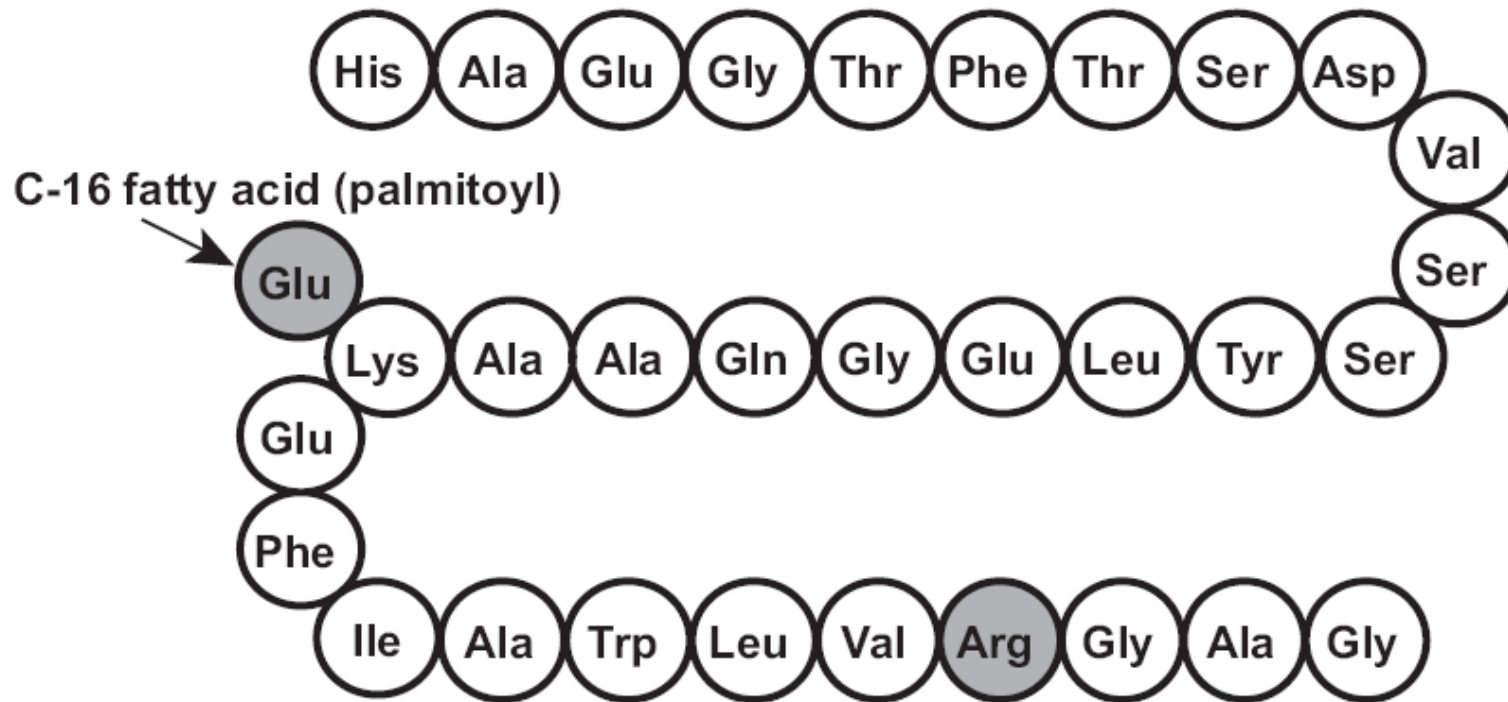
- připravován rekombinantní technikou; sekvence AK totožná
- použití: terapie těžké hypoglykémie, diagnostika GIT radiologicky apod.

## Analoga GLP-1

GLP-1: Glucagon-like peptide 1 = glukagonu podobný peptid 1 = střevní hormon, jenž spolu s glukoso-dependentním inzulinotropním polypeptidem (GIP) potencuje sekreci inzulínu indukovanou jídlem

- potecuje všechny kroky biosyntézy inzulínu, má pozitivní vliv na funkci a přežívání  $\beta$ -buněk
- snižuje nadbytečnou produkci glukosy v játrech, zpomaluje vyprazdňování žaludku, vedoucí k postprandiální hyperglykémii, centrální efekt vede ke snížení chuti k jídlu ( $\Rightarrow$  pokles tělesné hmotnosti), pravděpodobně i pozitivní účinky na kardiovaskulární systém
- nevýhody GLP-1 jako léčiva: nutnost podávání v kontinuální infuzi, extrémně krátký biol. poločas  $T_{1/2} = 2 - 3$  min (rychlý rozklad peptidasami)  $\Rightarrow$  potřeba stabilnějších analogů

## Analoga GLP-1

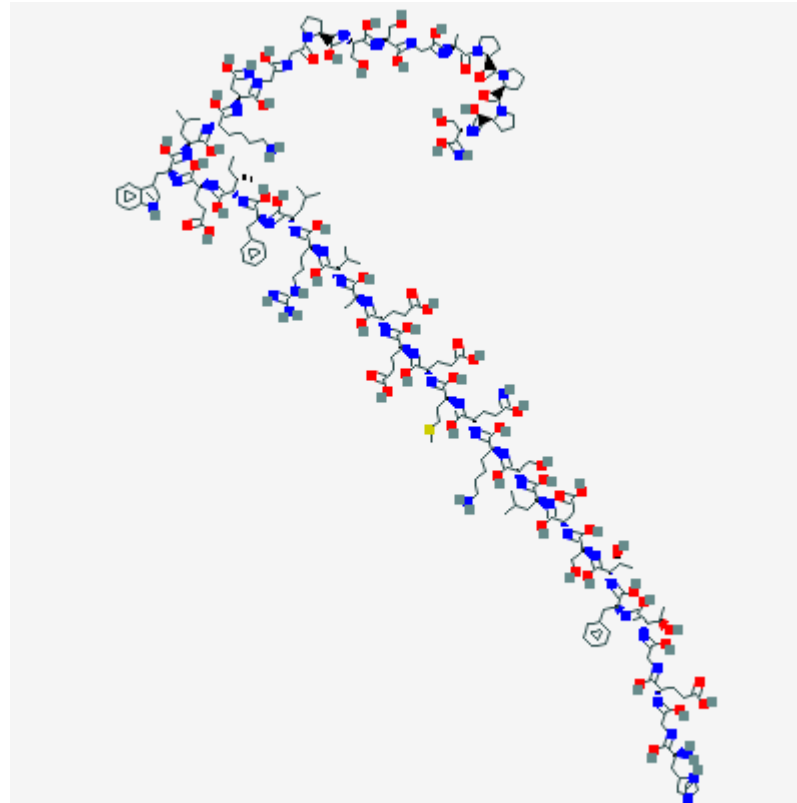


### **liraglutid**

$\gamma$ -L-glutamoyl(N- $\alpha$ -hexadekanoyl)-Lys,<sup>26</sup>Arg<sup>34</sup>-GLP-1(7-37)

- sekvence AK zbytků z 93 % shodná s fragmentem 7-37 nativního GLP-1
- silná vazba na sérový albumin, vzájemná asociace molekul, nepodléhá glomerulární filtraci  $\Rightarrow T_{1/2} = 12,5$  hod po s.c. injekci
- zlepšuje funkci  $\alpha$  i  $\beta$  buněk
- Victoza ®

## Exenatid

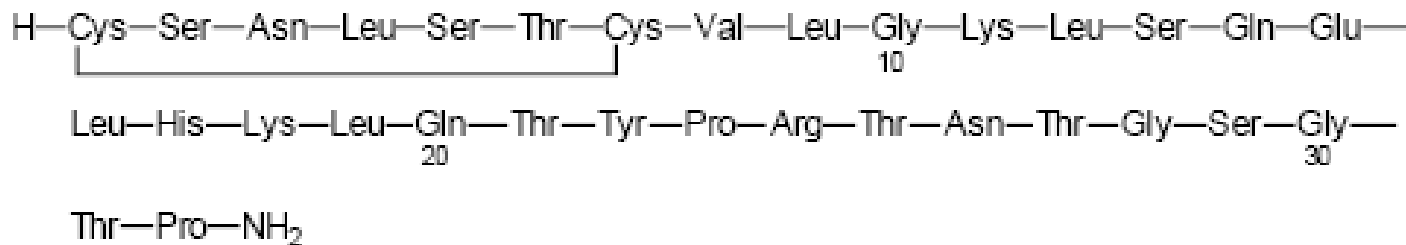


- syn. exendin 4
  - syntetický analog exendinu 3, který byl izolován z ještěrky *Heloderma suspectum*
  - záměna Ser(2)-Asp(3) za Gly(2)-Glu(3)
- Byetta ®, Bydureon ®



## Kalcitonin

- tvořen C-buňkami štítné žlázy ( = parafolikulární bb. – Baber 1876), u nižších obratlovců ultimobranchiálními tělísky, vznikajícími z 5. žaberní štěrbiny
- peptid ze 32 aminokyselin (lososí – *Onchorhynchus kisutch*; humánní 139 AK)
- receptory na osteoklastech (ale též ledviny, mozek)
- ↓ vylučování  $\text{Ca}^{2+}$  z kosti ( $\Rightarrow$  ↓ kalcémie)
- ↓ tvorbu osteoklastů
- aplikace spolu s  $\text{Ca}^{2+}$  k léčbě osteoporózy

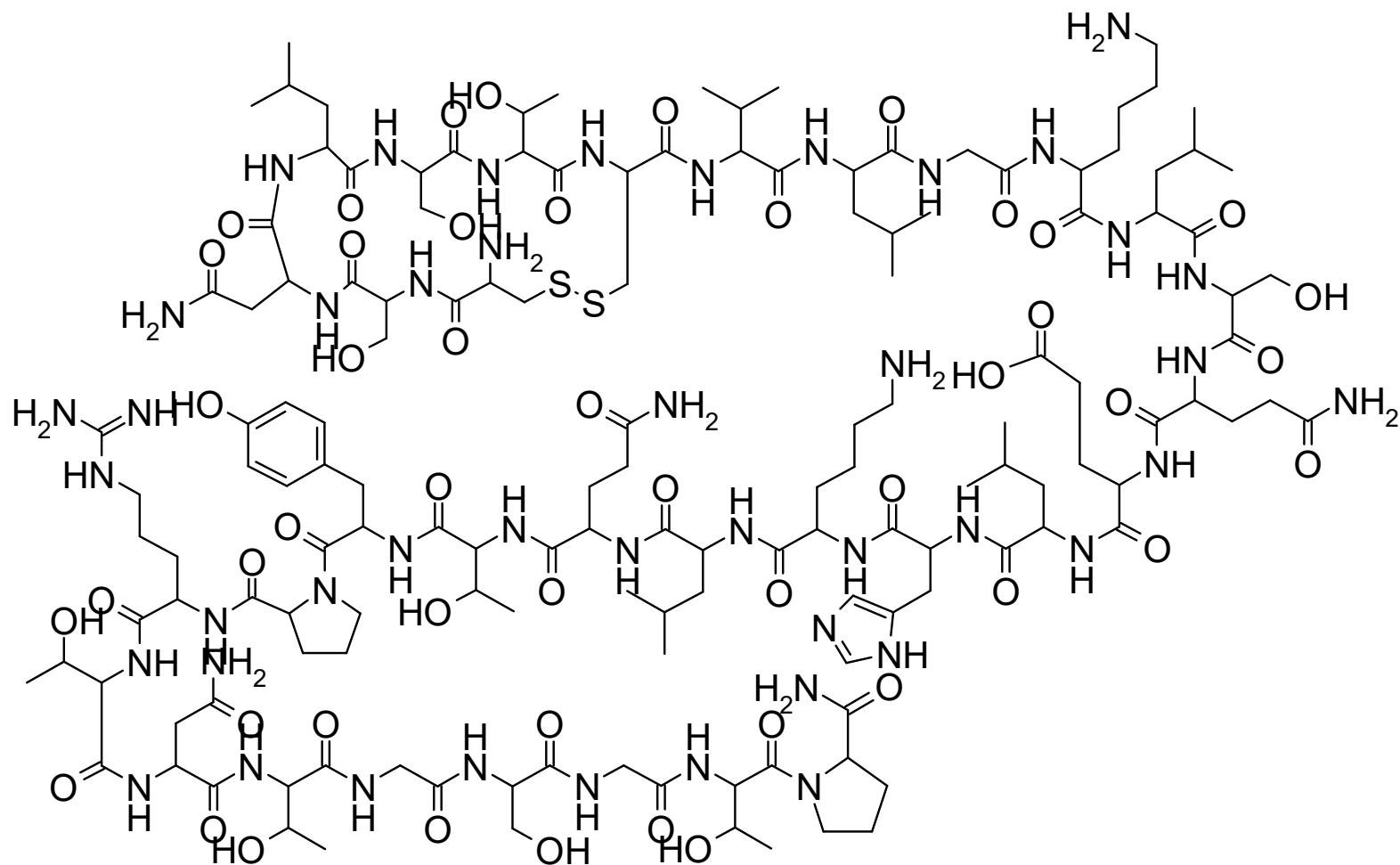


$\text{C}_{145}\text{H}_{240}\text{N}_{44}\text{O}_{48}\text{S}_2$

$M_r$  3431,88

CAS 47931-85-1

## Kalcitonin



*Calcitoninum salmonis* ČL 2009 = **kalcitonin lososí** (syntetický; sekvence AK odpovídá lososímu hormonu)

Miacalcic® inj., nasal; Osteodon®; Tonocalcin®

## 1.5 Krevní faktory erythropoetinového typu

|              |              |              |
|--------------|--------------|--------------|
| APPRL I CDSR | VLERYLLEAK   | EAEN I TTGCA |
| EHCSLNEN I T | VPDTKVN FYA  | WKRMEV GQQA  |
| VEVWQGLALL   | SEAVLRGQAL   | LVNSSQPWEP   |
| LQLHVDKAVS   | GLRSLTLLR    | ALGAQKEA I S |
| PPDAASAAPL   | RT I TADTFRK | LFRVYSNFLR   |
| GKLLKLYTGEA  | CRTGD        |              |

$M_r$  about 30 600

CAS 113427-24-0

### **erythropoietin (EPO)**

= glycosylated protein from 165 AA

$M_r$  of protein aglycon 18235.87

### *Erythropoietini solutio concentrata EP*

= a solution containing a group of closely related glycoproteins, which are not to distinguish from the natural human erythropoietin (human urine erythropoietin, huEPO), from the point of view of 165 amino acids sequence and their average profile of glycosylation

- naturally released from kidneys of adults and in liver of foetus
- stimulates stem cells of bone marrow to proliferation and differentiation
- produced *in vitro* mostly in rodent cell lines by a method based on the recombinant DNA technology
- **INN names: epoetin + greek letter spelt in full** (eg. epoetin beta)
- various epoetins differ in glycosylation, complex branched oligomeric sugar chains are attached
- treatment of anaemia in chronic kidney failure, missused for doping

# Epoetin Alfa (Genetical Recombination)

エポエチン アルファ (遺伝子組換え)

## Protein moiety

```

APPRLICDSR VLERYLLEAK EAENITTGCA EHC SLNENIT VPDTKVN FYA
WKRMEVGQQA VEVWQGLALL SEAVLRGQAL LVNSSQPWEP LQLHV DKA VS
GLRSLTTLR ALGAQKEAIS PPDAASAAPL RTITADTFRK LFRVYSN FLR
GKLKLYTGEA CRTGD
  
```

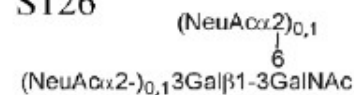
N24, N38, N83 and S126 : glycosylation

## Carbohydrate moiety (structure of major glycans)

N24, N38 and N83



S126



$\text{C}_{809}\text{H}_{1301}\text{N}_{229}\text{O}_{240}\text{S}_5$ : 18235.70 (Protein moiety)  
[113427-24-0]

# Epoetin Beta (Genetical Recombination)

エポエチン ベータ (遺伝子組換え)

Protein moiety

```

APPRLICDSR VLERYLLEAK EAENITTGCA EHCSLNENIT VPDTKVNEYA
WKRMEVGQQA VEVWQGLALL SEAVLRGQAL LVNSSQPWEP LQLHVDKAVS
GLRSLTTLR  ALGAQKEAIS PPDAASAAPL RTITADTERK LFRVYSNELR
GKLKLYTGEA CRTGD
  
```

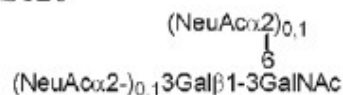
N24, N38, N83 and S126: glycosylation

Carbohydrate moiety (structure of major glycans)

N24, N38 and N83



S126

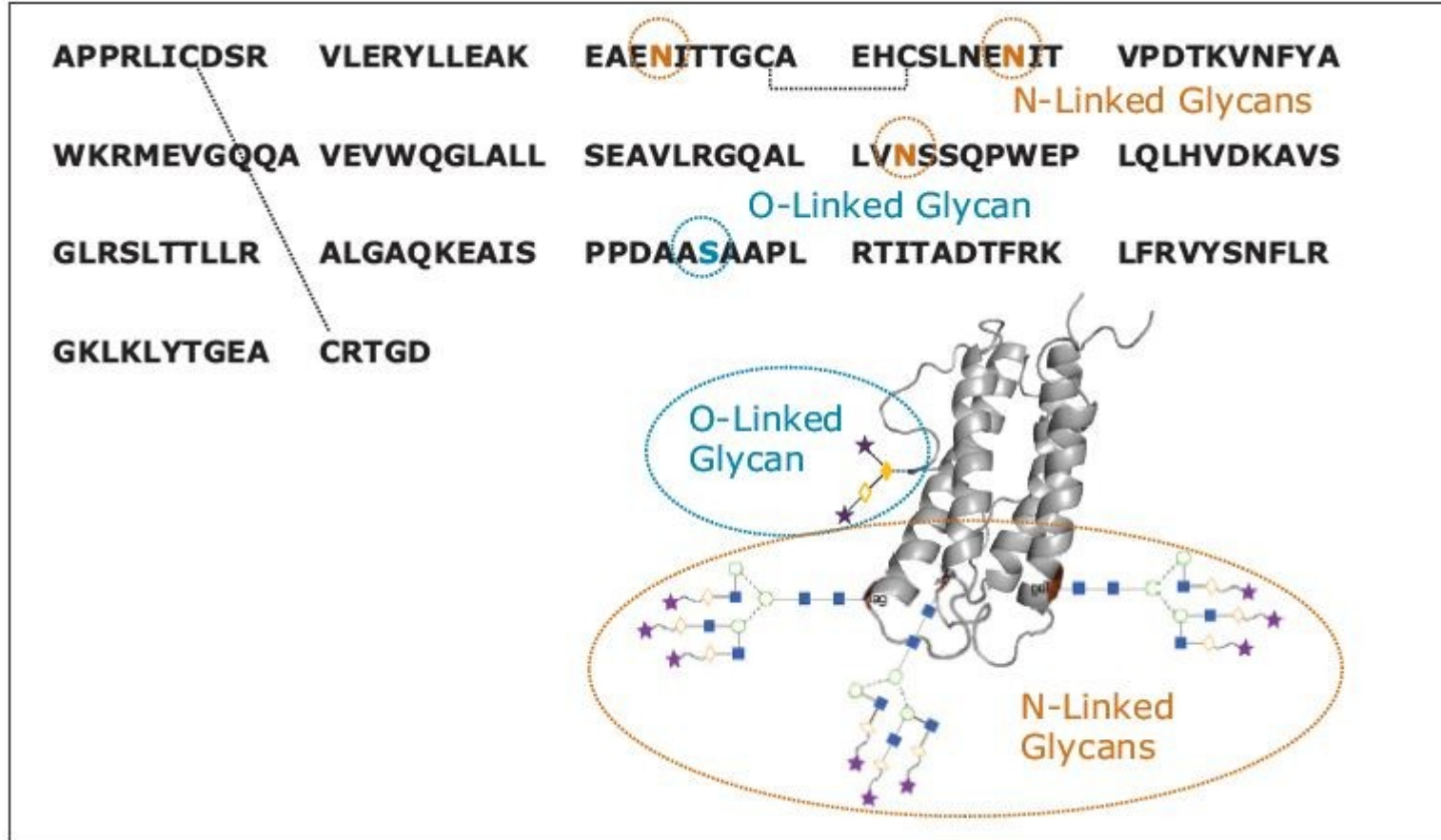


$\text{C}_{809}\text{H}_{1301}\text{N}_{229}\text{O}_{240}\text{S}_5$ : 18235.70 (Protein moiety)  
[122312-54-3]

## Stručný přehled dosud popsaných epoetinů

| INN name:<br>epoetin | Year of<br>discovery/approval | Production<br>organism /<br>tissue                  | M <sub>r</sub><br>CAS           | Glycosylation<br>pattern   | Originator<br>product/biosimilar | Brand<br>names ®,<br>generic<br>codes  |
|----------------------|-------------------------------|---|---------------------------------|--|----------------------------------|--|
| alfa                 | 2000                          | Chinese<br>hamster ovary                            | 113427-24-0                     | similar to<br>uhEPO  | orig/biosim                      | <b>Eprex,</b><br>Binocrit,<br>Abseamed |
| beta                 | 1997                          | Chinese<br>hamster ovary                            | 122312-54-3                     |  | orig                             | Neorecormon                            |
| gama                 | 1990                          | C127 murine cells<br>transfected with<br>huEPO cRNA | 28 000-31<br>000<br>130455-76-4 |  | orig                             | TYB-5220                               |
| delta                | 2002 -<br>2009                | human<br>fibrosarcoma<br>cell line HT-<br>1080      | 261356-80-3                     | less O-<br>acetyls in O-<br>glycan<br>chains;<br>similar to<br>uhEPO | orig                             | Dynepo                                 |
| epsilon              | 1995                          |   | 154725-65-2                     |  | orig                             |  |
| zeta                 | 2007                          | Chinese<br>hamster ovary                            | 32 000-40 000<br>604802-70-2    |  | biosim. of<br>EPO alfa           | Silapo,<br>Retacrit                    |
| theta                | 2009                          | Chinese<br>hamster ovary                            | 762263-14-9                     | sugars<br>represent 40<br>% of total M <sub>r</sub>                  | orig                             | Biopoin,<br>Eporatio                   |
| kappa                | 2010                          | Chinese<br>hamster ovary                            | 11096-26-7                      |  | biosim. of<br>EPO alfa           | Epoetin<br>alfa BS<br>injection        |

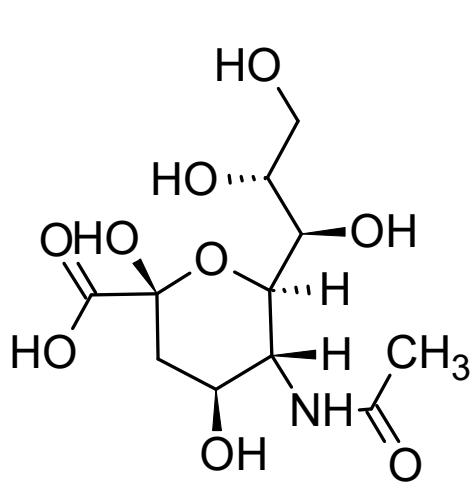
# Epoetins' glycosylation



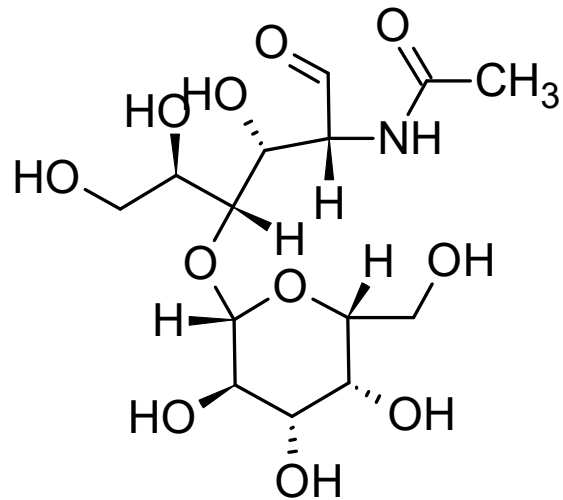
Sites of *N*-glycosylation: Asn24, Asn38, Asn83 (= N24, N38, N83)

Site of *O*-glycosylation: Ser126 (= S126)

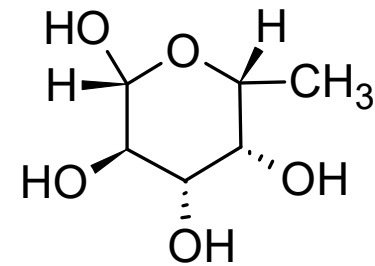
Epoetins' glycosylation: some more specific occurring sugars



*N*-acetylneuraminic acid (= sialic acid)



*N*-acetyllactosamine



L-fucose



# Epoetins' glycosylation: secondary structure of *N*-attached oligosaccharide chains

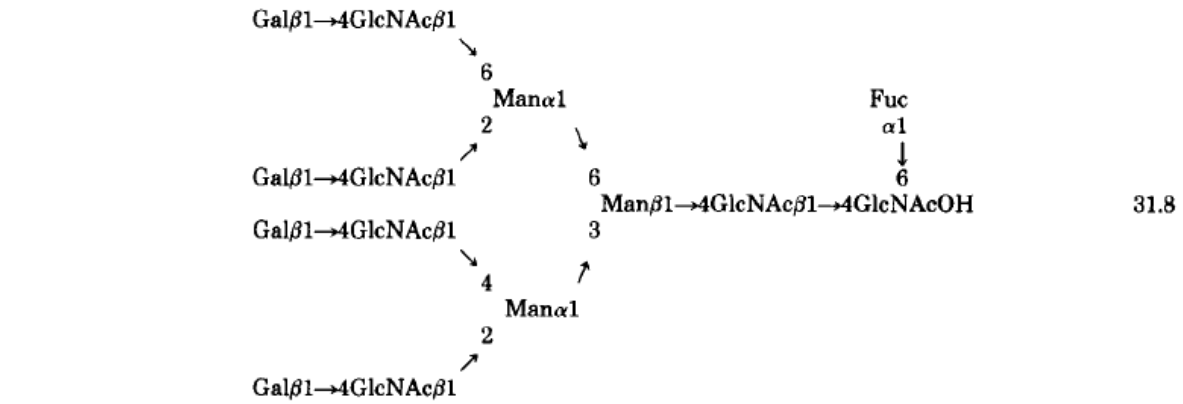
Structures of asialo *N*-linked saccharides obtained from recombinant erythropoietin

| Saccharide   | Structure <sup>a</sup>  | Relative amount<br>% |
|--------------|---|----------------------|
| Biantennary  | $\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \\ \searrow 6 \\ \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAcOH} \\ \nearrow 3 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \end{array}$   | 1.4                  |
|              | $\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \\ \searrow 6 \\ \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAcOH} \\ \nearrow 3 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \\ \searrow 4 \\ \text{Man}\alpha 1 \\ \nearrow 2 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \end{array}$  | 3.5                  |
| Triantennary | $\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \\ \searrow 6 \\ \text{Man}\alpha 1 \\ \searrow 6 \\ \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAcOH} \\ \nearrow 3 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \end{array}$  | 6.5                  |
|              | $\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \\ \searrow 6 \\ \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAcOH} \\ \nearrow 3 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \\ \searrow 4 \\ \text{Man}\alpha 1 \\ \nearrow 2 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \end{array}$ | 3.5                  |

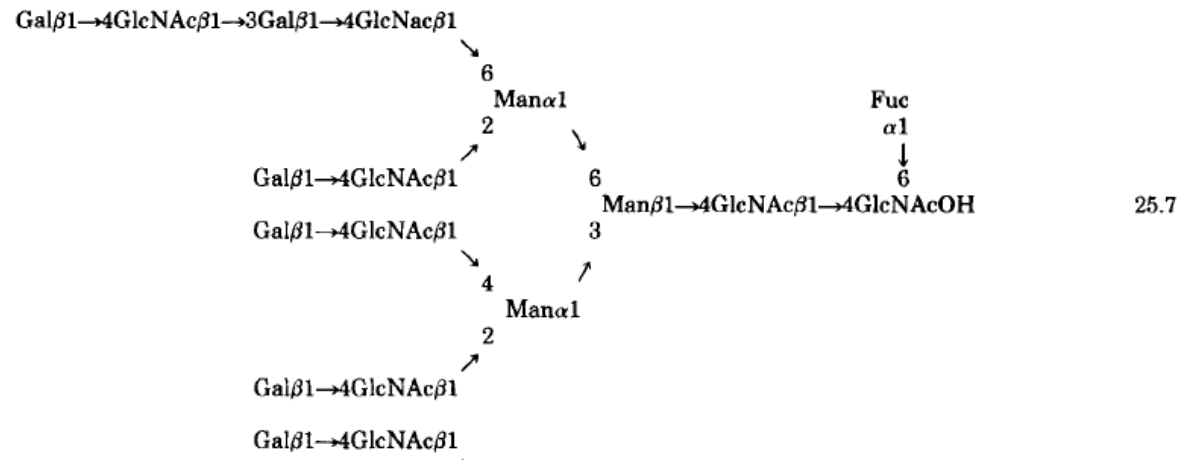
Carbohydrate Structure of Human Recombinant Erythropoietin

# Epoetins' glycosylation: secondary structure of *N*-attached oligosaccharide chains continued

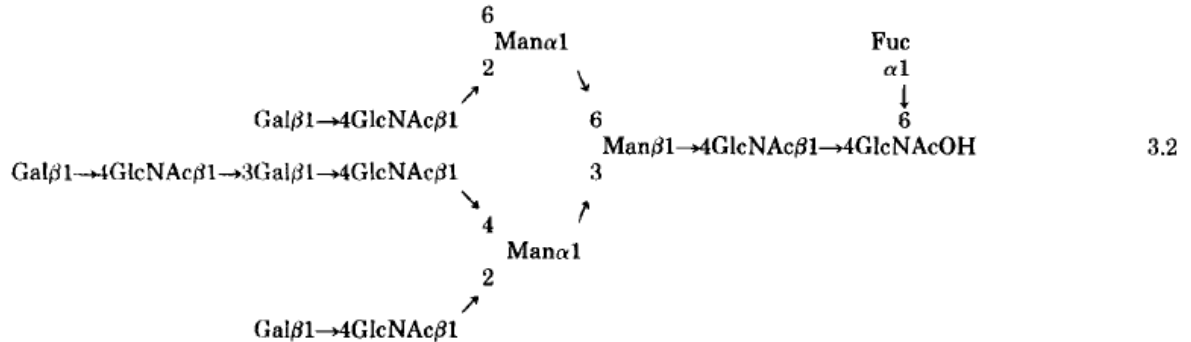
Tetraantennary



Tetraantennary Lac<sub>1</sub>



Tetraantennary Lac<sub>1</sub>

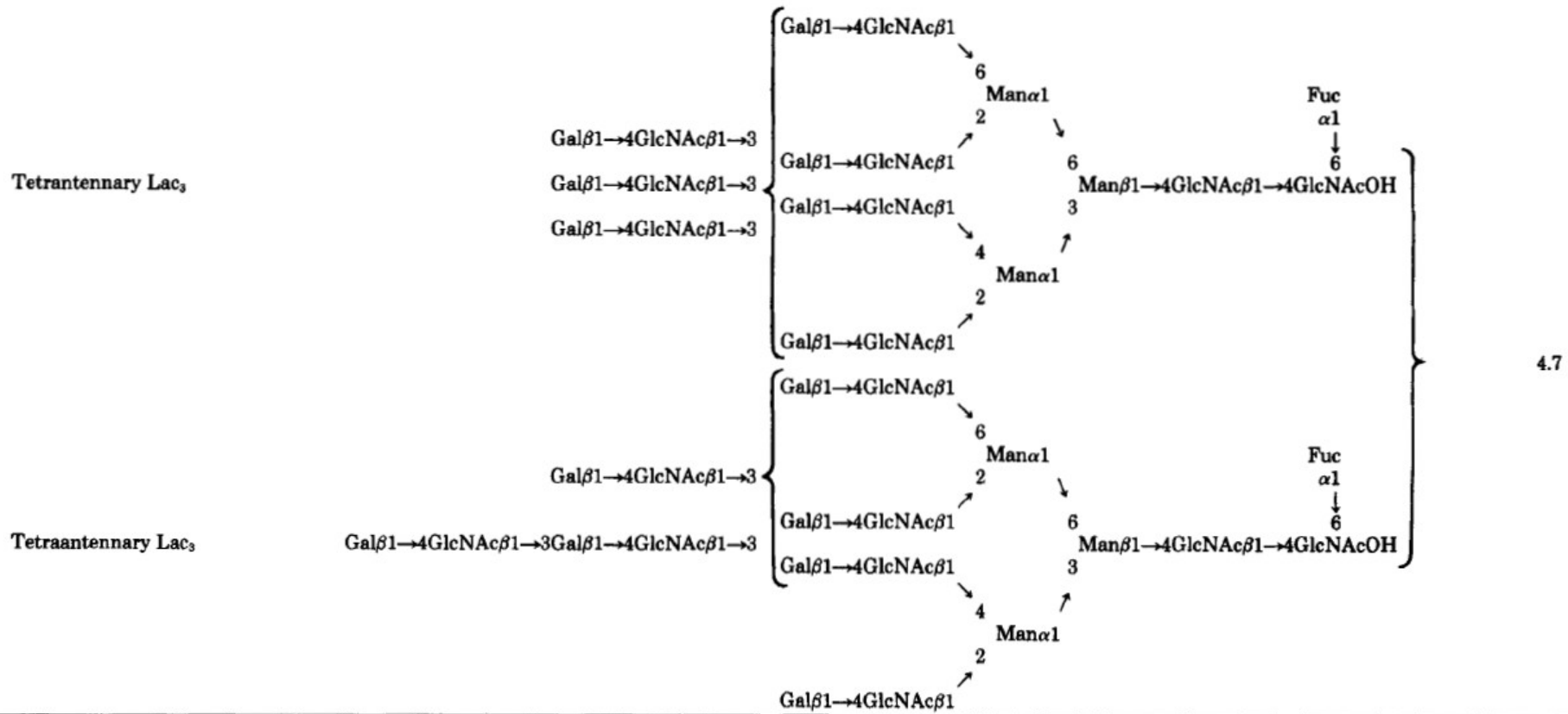


# Epoetins' glycosylation: secondary structure of *N*-attached oligosaccharide chains continued

TABLE III-Continued

| Saccharide                      | Structure <sup>a</sup> | Relative amount<br>% |
|---------------------------------|------------------------|----------------------|
| Tetraantennary Lac <sub>1</sub> |                        | 3.2                  |
| Tetraantennary Lac <sub>2</sub> |                        | 13.2                 |
| Tetraantennary Lac <sub>2</sub> |                        | 3.3                  |

# Epoetins' glycosylation: secondary structure of *N*-attached oligosaccharide chains continued



\* 15% of the saccharides lack fucose attached to the reducing terminal *N*-acetylglucosamine.

# Differences in individual epotins' glycosylation pattern: CZE in accordance with the European Pharmacopoea continued

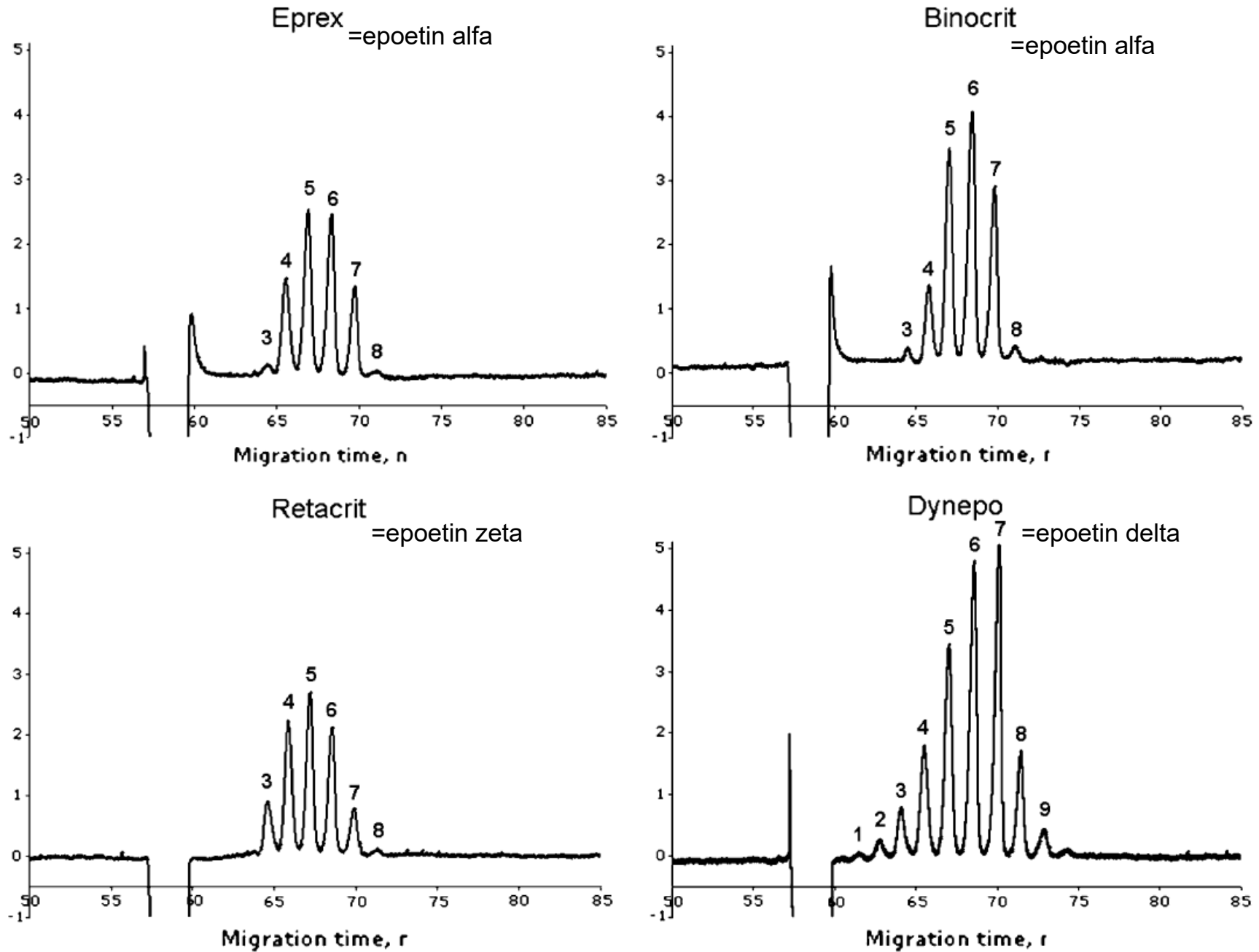
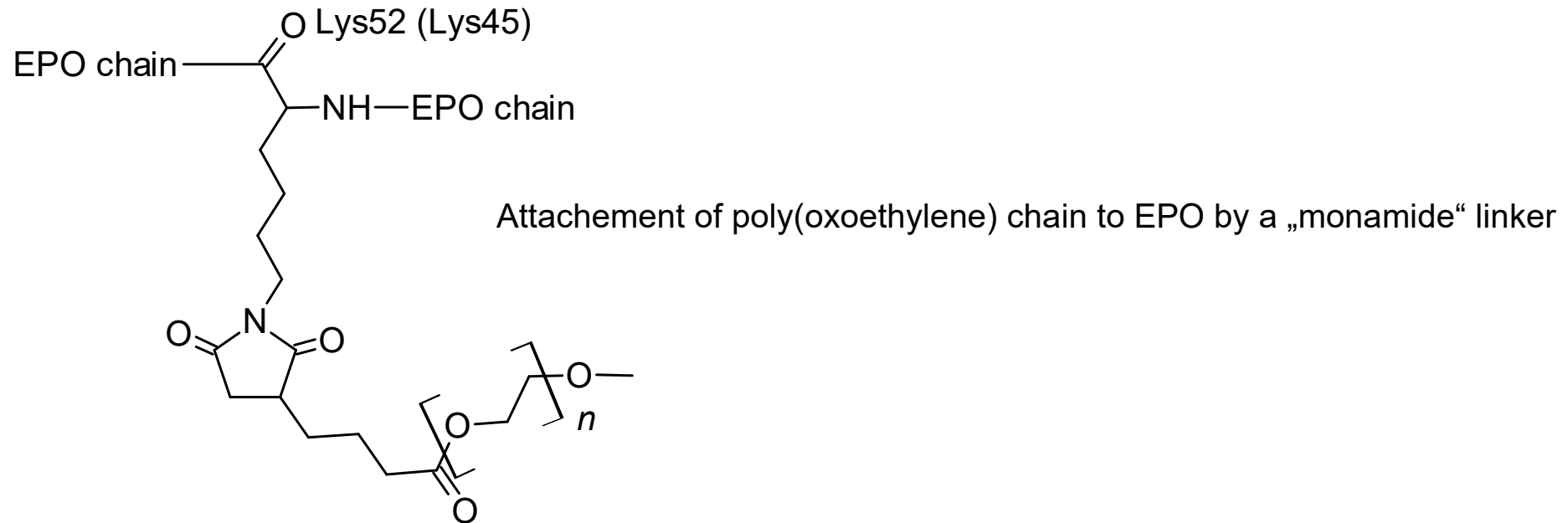


Fig. 3 CE-UV analysis of the four EPO products.

Epoetin conjugates  
**Methoxy-polythylenglycol-epoetin beta**

Total  $M_r$  cca 60 000



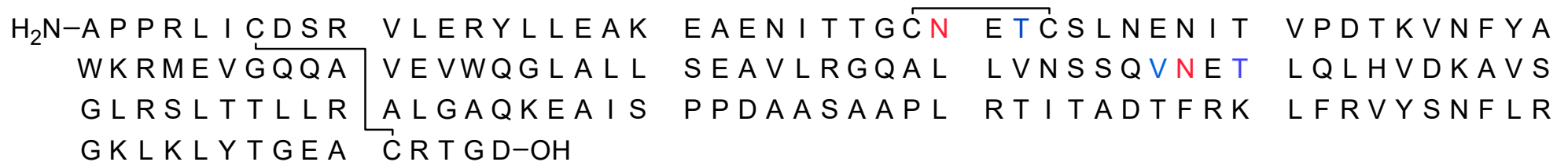
Plasmatic  $T_{1/2}$  cca 139 h  $\Rightarrow$  „continuous erythropoietin receptor activator“, CERA  
Mircera  $\text{\textcircled{R}}$  (s.c. or i.v.) for treatment of anemia in chronic renal disease

# Epoetin analogues with altered protein sequence

## Darbepoetin alfa

- sequence of EPO alfa changed: Asn30, Thr32, Val87, Asn88 and Thr90  $\Rightarrow$  2 new sites of *N*-glycosylation  $\Rightarrow$  5 sites of *N*-glycosylation in total; 2 new oligosaccharide chains attached
- total  $M_r$  30 000 – 37 000
- recombinant
- indicated for treatment of anemia caused by a chemotherapy of non-myeloid cancers or by chronic renal failure

Aranesp® (originator); Nespo® (biosimilar – approved in EU 2001 - 2008)



Primary structure of darbepoetin alfa aglycone. New asparagine residues, to which new carbohydrate chains are attached, are in red, other changed amino acid residues in blue.

## 1.6 Faktory stimulující kolonie (CSF)

= proteins supporting survival and expansion of pluripotent stem cells and stimulate them to differentiation into various types of leukocytes

**GM-CSF:** Granulocyte macrophage colony stimulating factor

```

      10           20           30           40           50
MWLQSLLLLG TVAC SISAPA RSPSPSTQPW EHVNAIQEAR RLLNLSRDTA
      60           70           80           90          100
AEMNETVEVI SEMFDLQEPT CLQTRLELYK QGLRGSLTKL KGPLTMMASH
      110          120          130          140
YKQHCPPTPE TSCATQITF ESFKENLKDF LLVIPFDCWE PVQE
```

signaling peptide  
GM-CSF

Sites of glycosylation: O-: Ser22, Ser24, Ser26, Thr27; N-: Asn44, Asn54



## 1.6 Faktory stimulující kolonie

APARSPSPST    QPWEHVNAIQ    EARRLLNLSR  
DTAAEMNETV    EVISEMFDLQ    EPTCLQTRLE  
LYKQGLRGSL    TKLKGPLTMM    ASHYKQHCPP  
TPETSCATQI    ITFESFKENL    KDFLLVIPFD  
CWEPVQE

$C_{639}H_{1007}N_{171}O_{196}S_8$

$M_r$  14 477,49

CAS 99283-10-0

### **molgramostim**

= rekombinantní forma faktoru stimulujícího kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF)

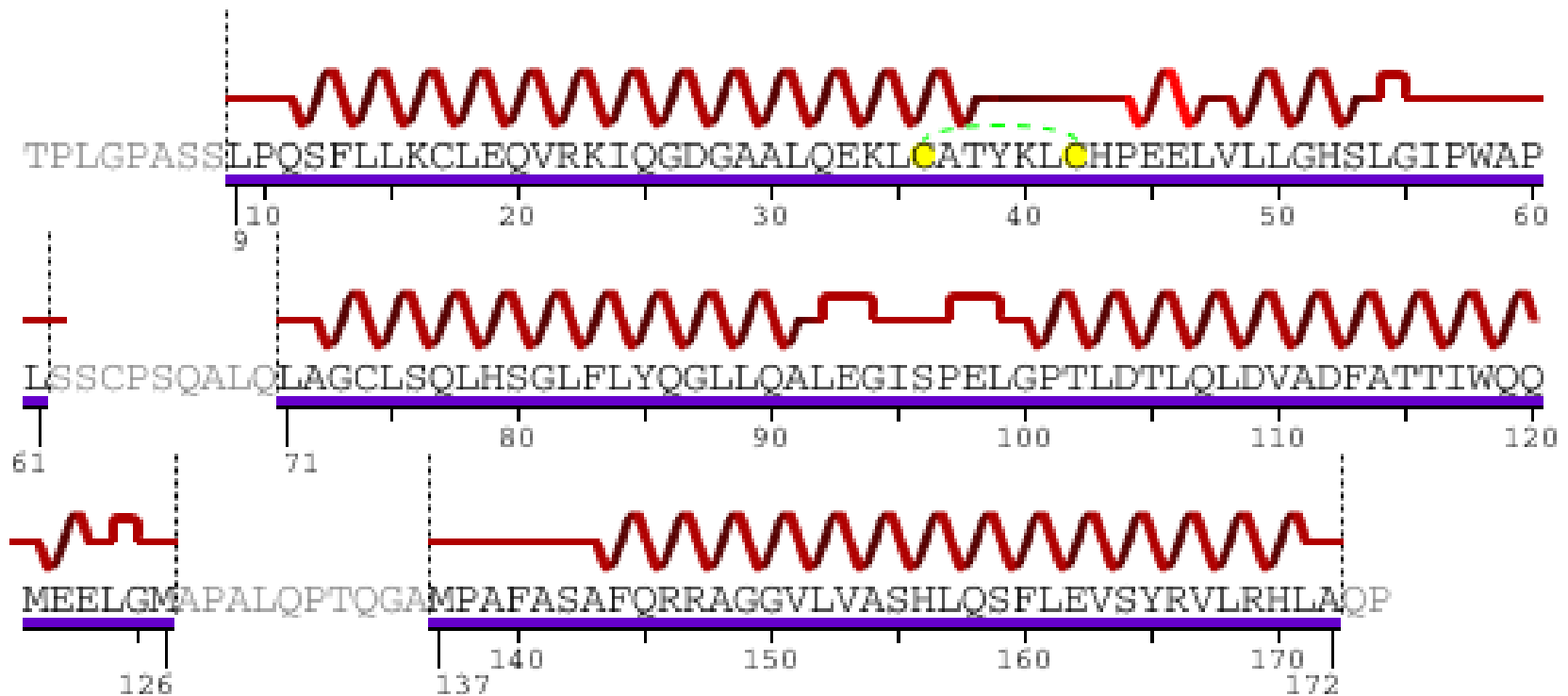
- stimuluje diferenciaci a proliferaci pluripotentních kmenových buněk leukocytů ve zralé granulocyty a makrofágy
- není glykosylovaný
- výroba rekombinantní technikou za použití bakterií jako hostitelských buněk
- léčba leukopenie při chemoterapii nádorů a AIDS (Leucemax®)

### **sargramostim**

- glykosylovaný analog GM-CSF
- Pro23 – Leu23
- 3 hlavní komponenty o  $M_r$  19 500, 16 800 a 15 500
- rekombinantně na *S. cerevisiae*
- při útlumu tvorby leukocytů při chemoterapii; pro mobilizaci leukocytů v periferní krvi před leukaferézou; pro urychlení normalizace počtu leukocytů po transplantaci kostní dřeně
- Leukine® (reg. v USA)

## Filgrastim a pegfilgrastim

G-CSF = humánní faktor stimulující kolonie neutrofilních granulocytů; neglykosylovaný, 174 AK  
Sekvence G-CSF a jeho prekurzoru



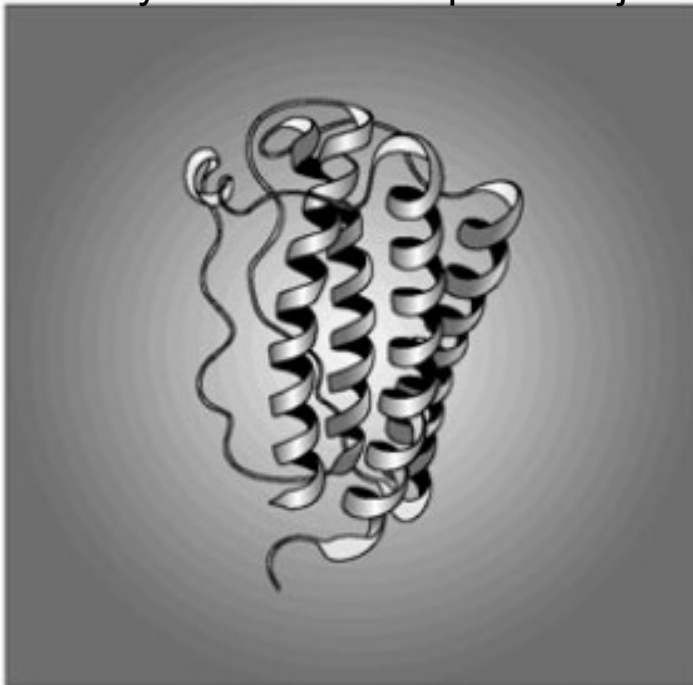
- **filgrastim**: analog G-CSF s přidaným Met na N-konci
- rekombinantně na *E. coli*
- léčba neutropenie při chemoterapii nádorových onemocnění a při AIDS
- s.c., i.v.

Neupogen®, Accofil®, Filgrastim Hexal®, Filgrastim Ratiofarm®, Nivestim®, Tevagrastim®, Zarzio®.

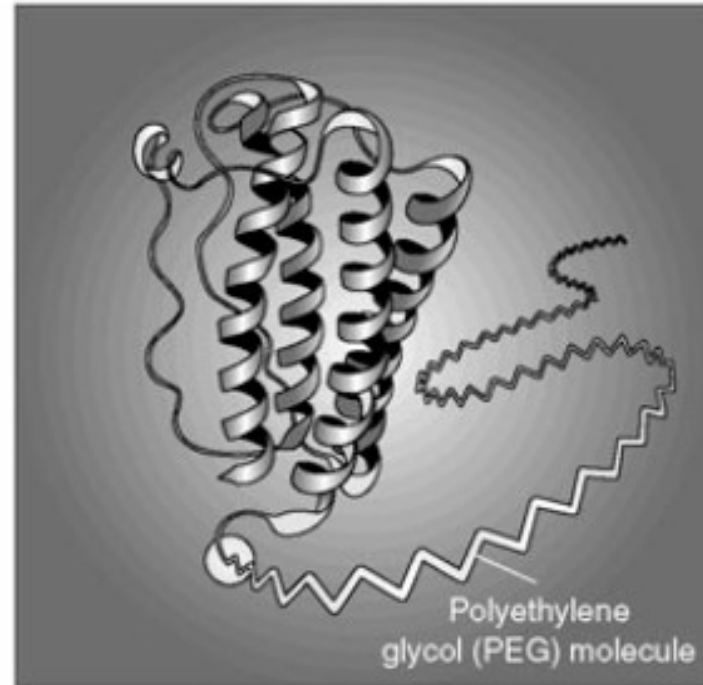
## Konjugáty filgrastimu

**Pegfilgrastim** má kovalentně vázaný PEG řetězec o  $M_r$  cca 20 000 na N-konci

- připojen na aminoskupinu N-konc. Met přes propylovou spojku
- delší eliminační poločas
- výroba rekombinantní a polosyntetická
- Neulasta®
- na 1 cyklus chemoterapie stačí jediná dávka



**Filgrastim**



**Pegfilgrastim**

## Konjugáty filgrastimu

### **lipegfilgrastim** (Longquex ®)

z *N*-Met-G-CSF vypuštěny aminokyseliny 37-39, na OH Thr133 připojena 2-deoxy- $\alpha$ -galaktopyranosylová jednotka, na ni molekula kys. neuraminové, na její aminoskupinu pak fragment *N*-karboxyglycinu, na který je karbamátovou vazbou konečně napojen polyoxoethylenový řetězec, zakončený CH<sub>3</sub>

- glykosylovaný; celková M<sub>r</sub> je asi 39 000

**balugrastim** (CG10639) = konjugát G-CSF, z jehož sekvence byly vypuštěny Ala1, Val37, Ser38 a Glu39, s humánním sérovým albuminem o 585 AK

- celková sekvence 759 AK, M<sub>r</sub> cca 85 000

- T<sub>1/2</sub> cca 19 dní !

- ve studiích 2. a 3. fáze při léčbě nádoru prsu účinnost srovnatelná s pegfilgrastimem

# Human stem cell factor (SCF)

1 MEGICRNRVT NNVKDVTKLV ANLPKDYMIT LKYVPGMDVL PSHCWISEMV  
51 VQLSDSLTDL LDKFSNISEG LSNYSIIDKL VNIVDDLVEC VKENSSKDLK  
101 KSFKSPEPRL FTPEEFFRIF NRSIDAFKDF VVASETSDCV VSSTLSPEKD  
151 SRVSVTKPFM LPPVAA

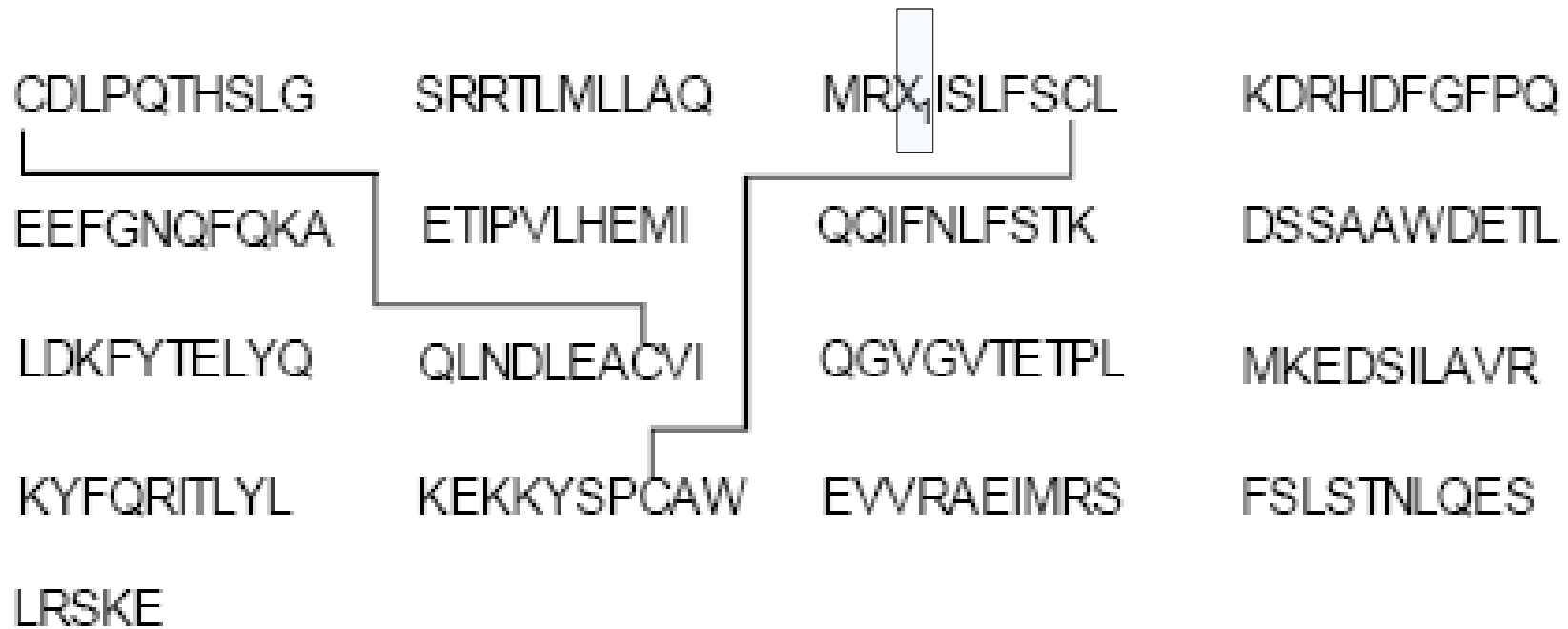
- ligand for the receptor-type protein-tyrosine kinase KIT ( $\Rightarrow$  synonym KITLG).
- plays an essential role in the regulation of cell survival and proliferation, hematopoiesis, stem cell maintenance, gametogenesis, mast cell development, migration and function, and in melanogenesis
- KITLG/SCF binding can activate several signaling pathways
- 166 AA
- two differentially glycosylated forms, LMW-SCF and HMW-SCF
- peripheral blood progenitor cell mobilization

## A recombinant form of SCF: **ancestim** (Stemgen ®)

- dimer
- non-glycosylated
- indicated for the setting of autologous peripheral blood progenitor cell transplantation in patients at risk of poor peripheral blood progenitor cell mobilisation combined with filgrastim
- temporarily approved e.g. in Canada and New Zealand, currently withdrawn
- namísto něj používána malá molekula – **plerixafor** Mozobil ®

<http://www.medsafe.govt.nz/regulatory/ProductDetail.asp?ID=8093>

## 1.7 Imunomodulátory - interferony



interferon  $\alpha_2$

*Interferoni alfa-2 solutio concentrata ČL 2017*

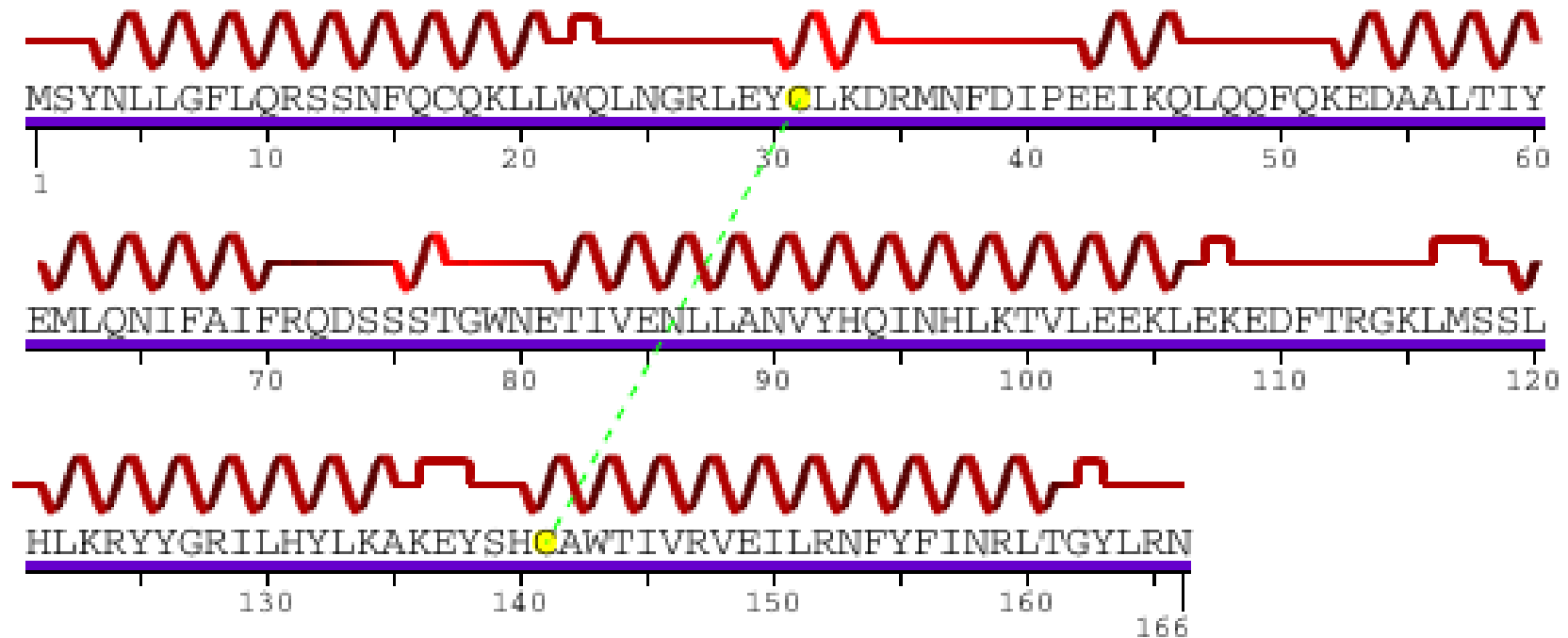
X1 = Lys  $\alpha_{2a}$

X1 = Arg  $\alpha_{2b}$

- protivirová aktivita v průběhu syntézy virové RNA a bílkoviny
- antiproliferační aktivita
- výroba rekombinantní technikou na bakteriích
- Introna<sup>®</sup> , Roferon<sup>®</sup>
- též pegylovaný: peginterferon alfa-2a (Pegasys<sup>®</sup>) - na N-konci N<sup>2</sup>, N<sup>6</sup>-dikarboxy-Lys esterifikovaný PEG-monomethyletherem

interferon  $\beta$   
= peptid ze 166 AK

- produkován fibroblasty jako odpověď na stimulaci živým nebo inaktivovaným virem nebo dvouvláknovou RNA



- terapie roztroušené sklerózy
- Avonex<sup>®</sup> , Betaferon<sup>®</sup> , Extavia<sup>®</sup> : i.m. injekce



interferon  $\gamma_{1b}$

- vylučován lidskými T-lymfocyty jako odpověď na virové infekce a jiná agens
- imunomodulační účinky
- nekovalentní dimer 2 identických monomerů

Sekvence monomeru:

M

QDPYVKEAEN LKKYFNAGHS DVADNGTLFL GILKNWKEES

DRKIMQSQIV SFYFKLFKNF KDDQSIQKSV ETIKEDMNVK

FFNSNKKKRD DFEKLTNYSV TDLNVQRKAI HELIQVMAEL

SPAAKTGKRK RSQMLFRGR  $C_{734}H_{1166}N_{204}O_{216}S_5$   $M_r$  16 464,76

- výroba rekombinantní technikou na bakteriích  
*Interferoni gamma-1b solutio concentrata ČL 2017*
- roztok formy interferonu  $\gamma$ , která má na N-konci Met