



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Předmět: Biofarmaceutika
4. rok studia

Kurz: Bioléčiva – biofarmaceutika

Terapeutické peptididy a proteiny kromě protilátek, receptorových molekul a enzymů

doc. PharmDr. Oldřich Farsa, Ph.D.

Rozdělení v současnosti používaných terapeutických proteinů a 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 Stimulátory krvetvorby erythropoetinového typu

1.6 Imunomodulátory – faktory stimulující kolonie

1.7 Imunomodulátory - interferony

2. Toxiny

3. Faktory srážení krve a koagulancia

4. Peptidová antibiotika

Jedno- a třípísmenné symboly L- α -aminokyselin

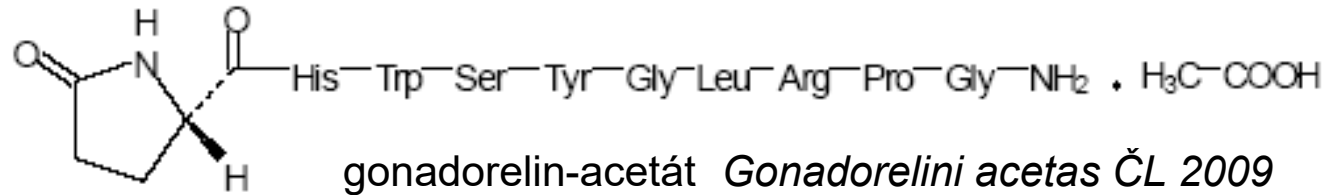
Jednopísmenný	Třípísmenný	
A	Ala	alanin
B	Asx	asparagová kys. nebo asparagin
C	Cys	cystein
D	Asp	asparagová kys.
E	Glu	glutamová kys.
F	Phe	fenylalanin
G	Gly	glycin
H	His	histidin
I	Ile	isoleucine
K	Lys	lysin
L	Leu	leucin
M	Met	methionin
N	Asn	asparagin
P	Pro	prolin
Q	Gln	glutamin
R	Arg	arginin
S	Ser	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

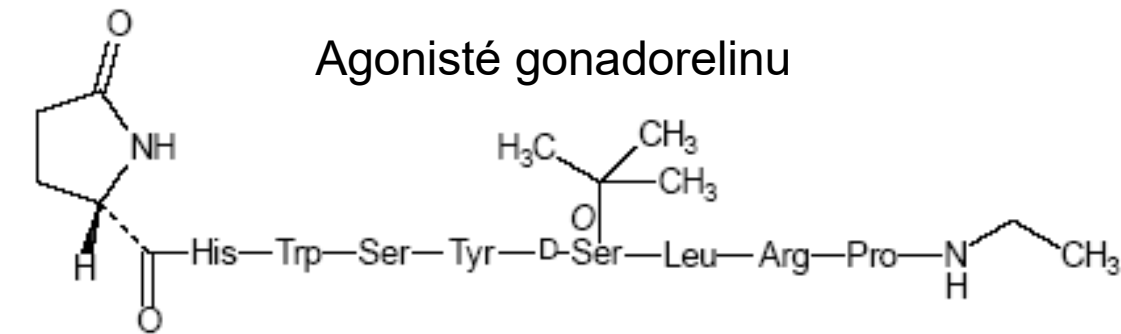
- hormon hypothalamu
- stimuluje uvolňování folikuly stimulujícího hormonu a luteinizačního hormonu z hypofýzy



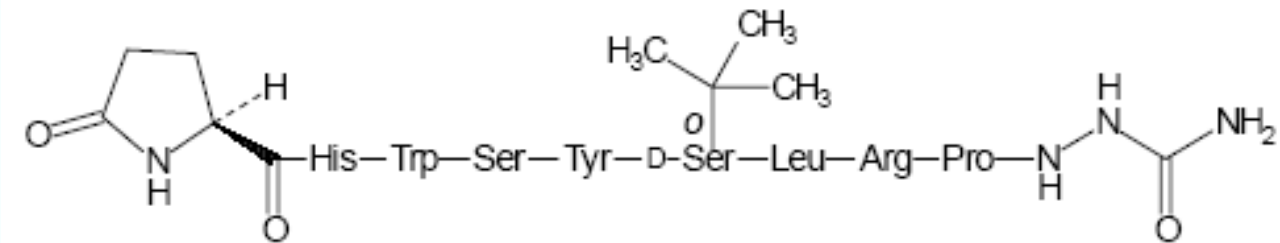
$C_{57}H_{79}N_{17}O_{15}$

M_r 1242,35

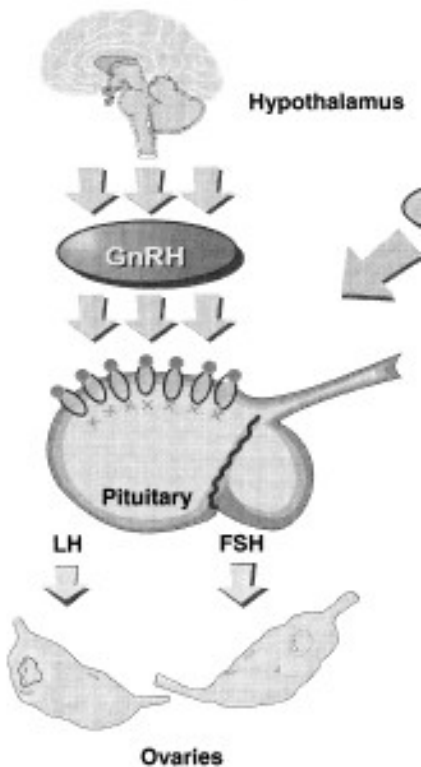
Agonisté gonadorelinu



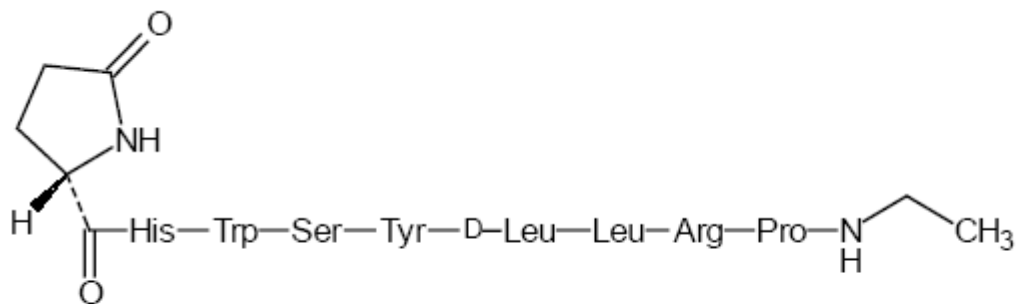
buserelin *Buserelinum* ČL 2009



goserelin *Goserelinum* ČL 2009



Gonadorelin a jeho analogy Agonisté



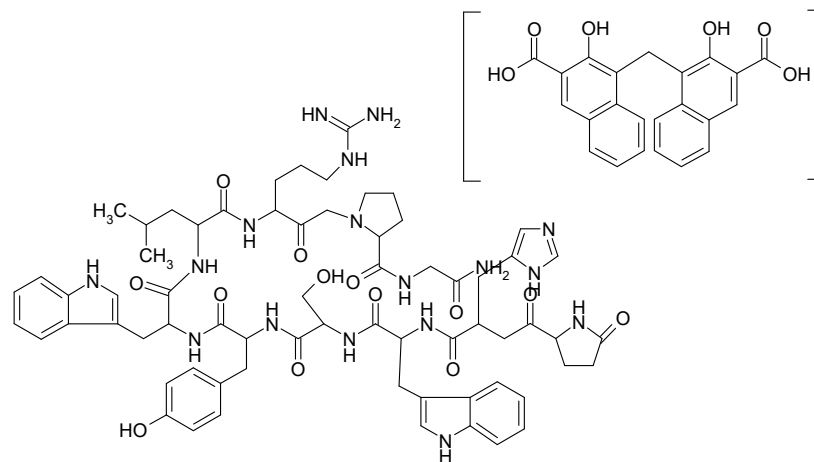
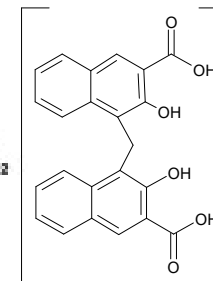
$C_{59}H_{84}N_{15}O_{12}$

M_r 1209,40

CAS 53714-56-0

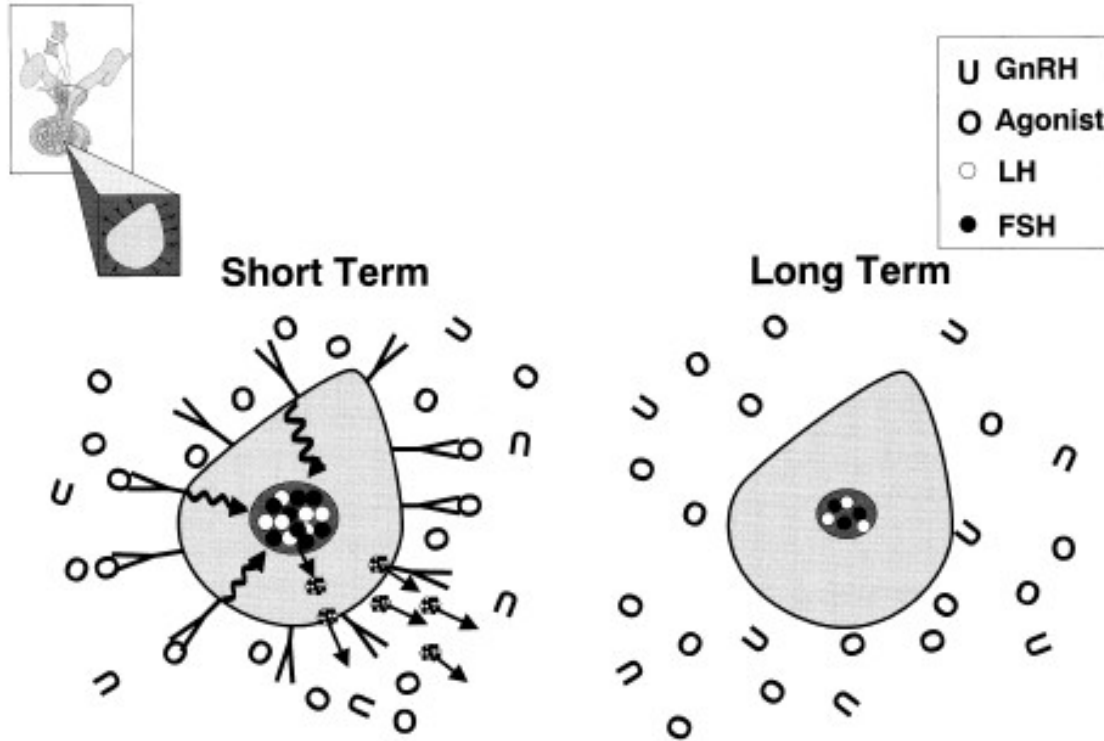
leuprorelin (syn. leuprolid) *Leuprorelinum* ČL2009

Trelstar™ (triptorelin pamoate)



Krátkodobé a dlouhodobé působení agonistů gonadorelinu

Effects of GnRH agonist.



Analoga gonadorelinu Antagonisté gonadorelinu

The GnRH antagonists.

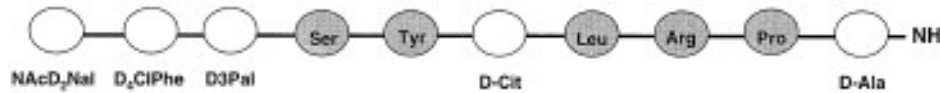
GnRH



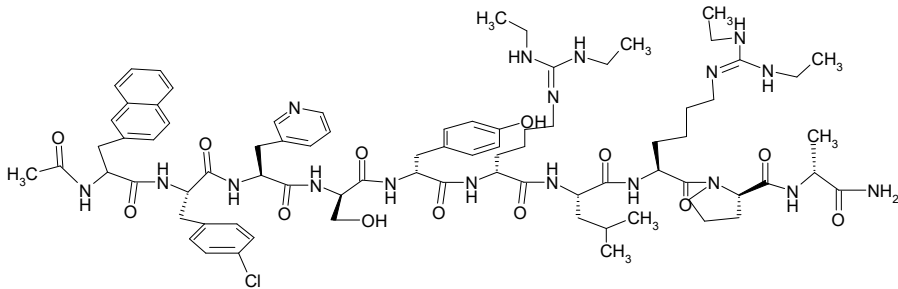
Antagon™ (ganirelix acetate)



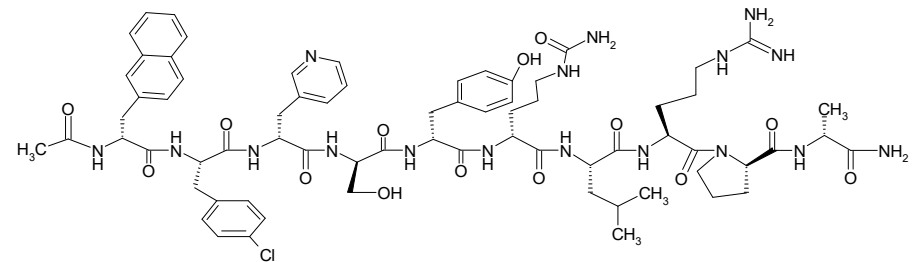
Cetrotide® (cetrorelix acetate)



Amino Acid Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	NAcD ₃ Nal	D ₂ ClPhe	D ₃ Pal	Ser	Tyr	D-Cit	Leu	Arg	Pro	D-Ala



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

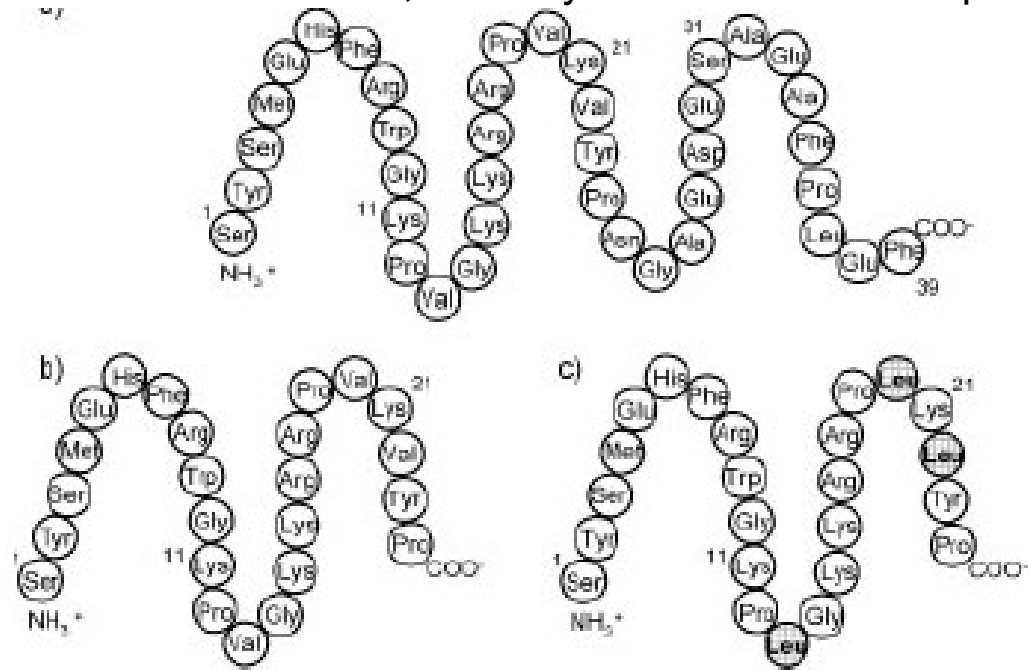
Vztahy mezi strukturou a aktivitou

- 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, važí 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



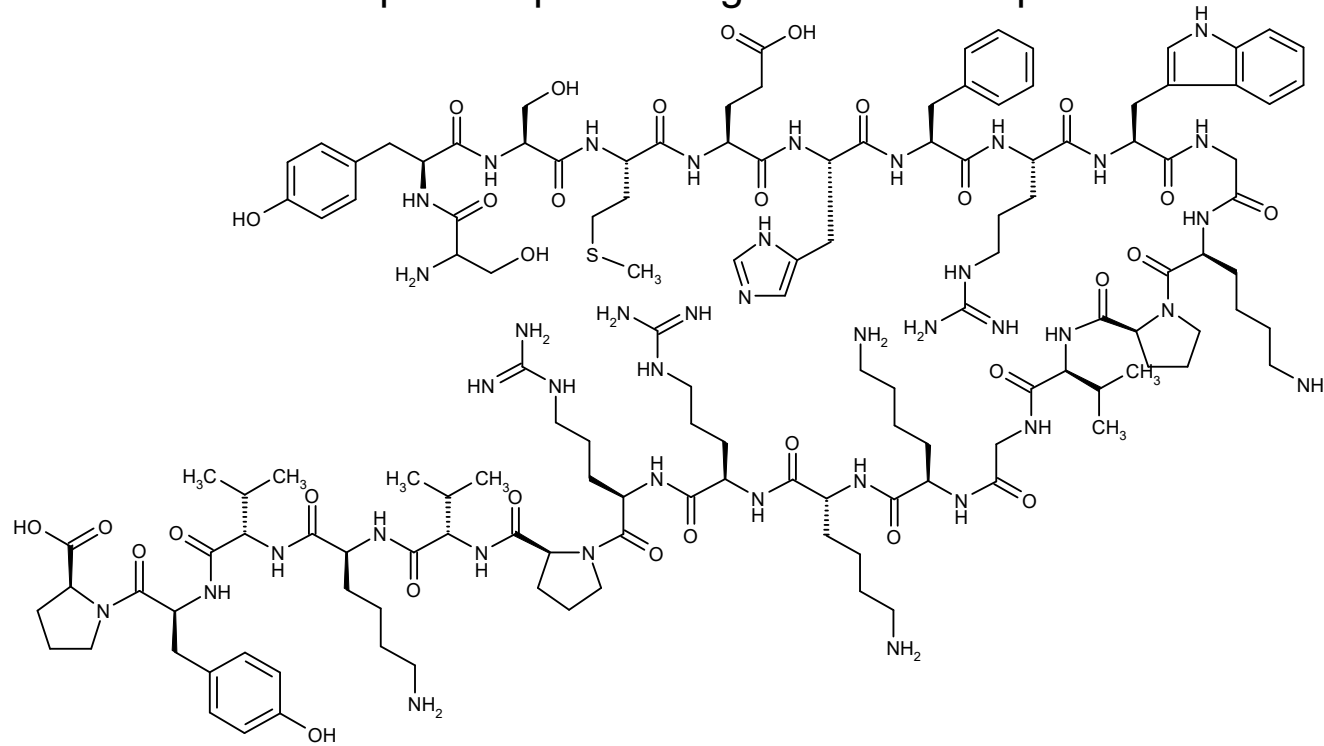
kortikotropin

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

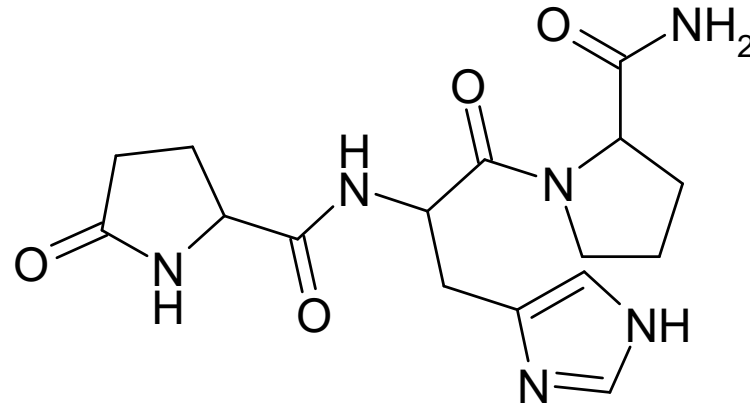


tetrakosaktid

- 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

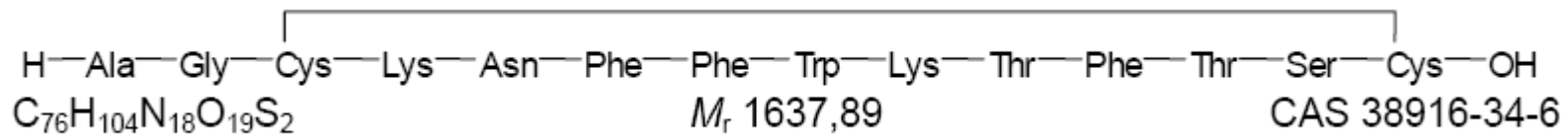
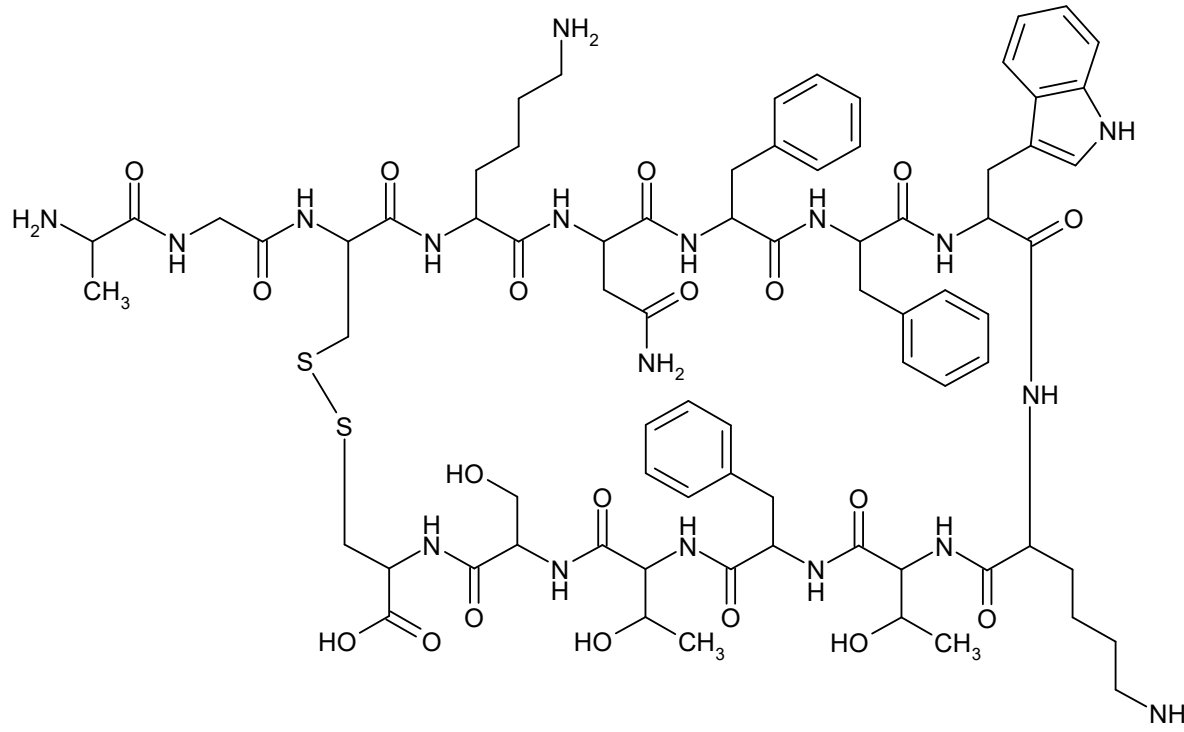
5-oxopropyl-histidyl-prolinamid

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

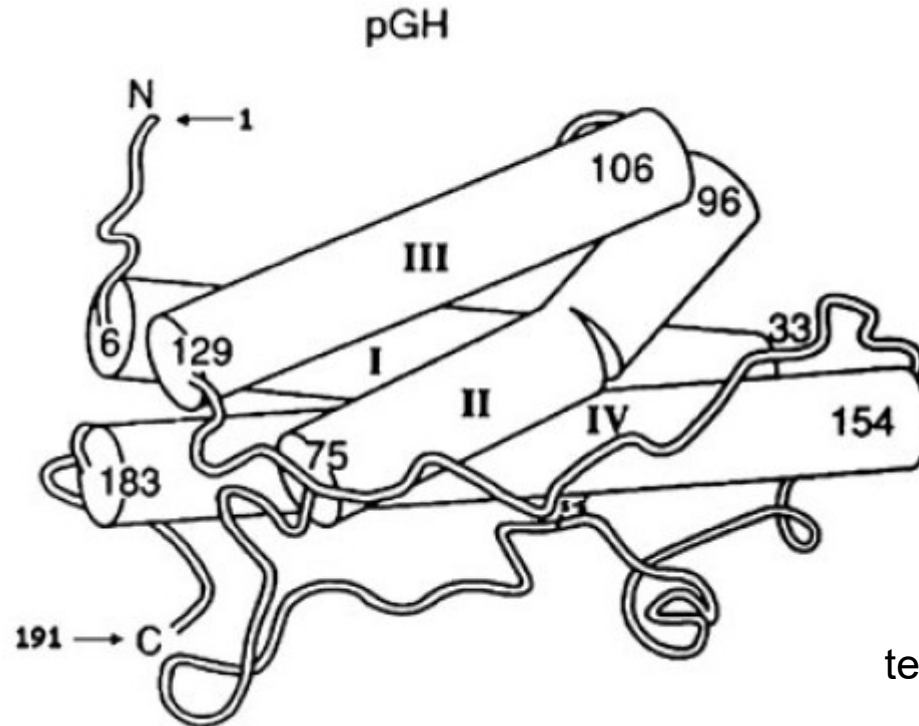
Somatostatin-UCB[®] inf.

- 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



terciární struktura prasečího GH

somatotropin

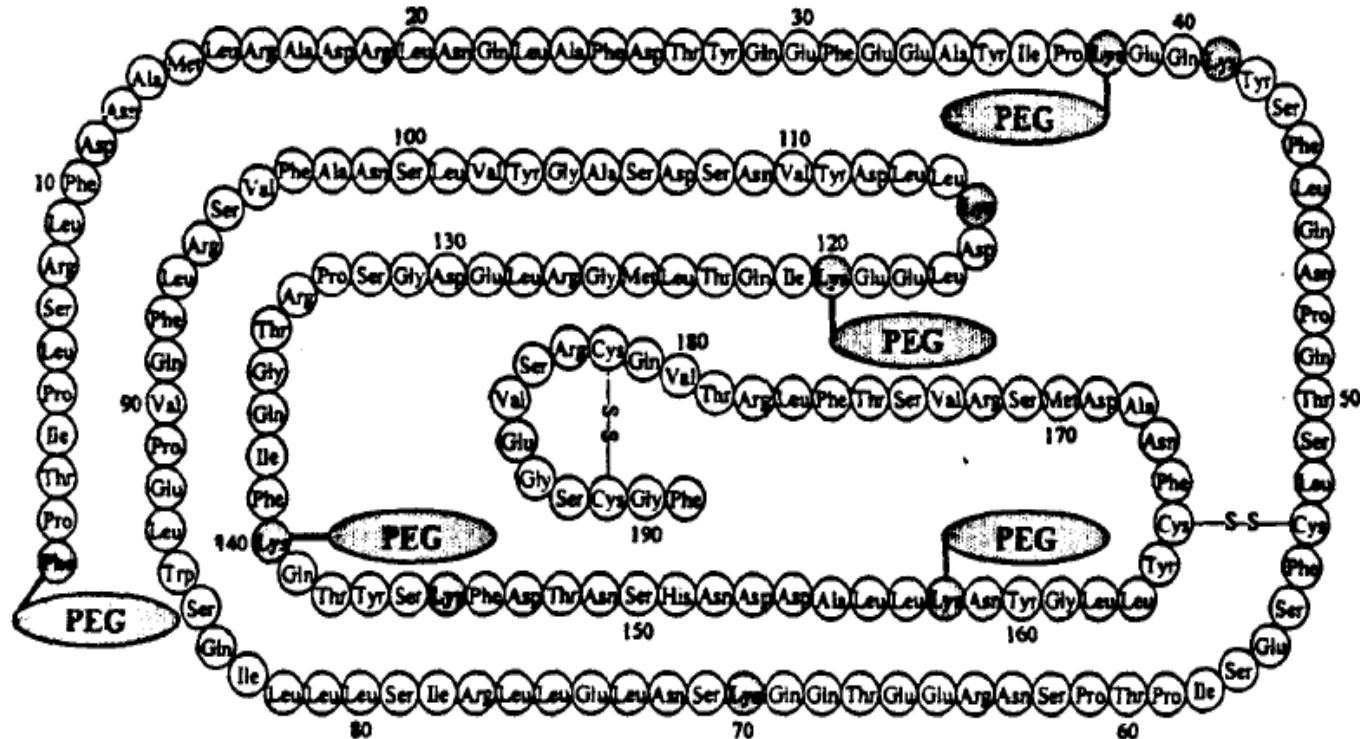
Somatropinum ČL2009

- 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

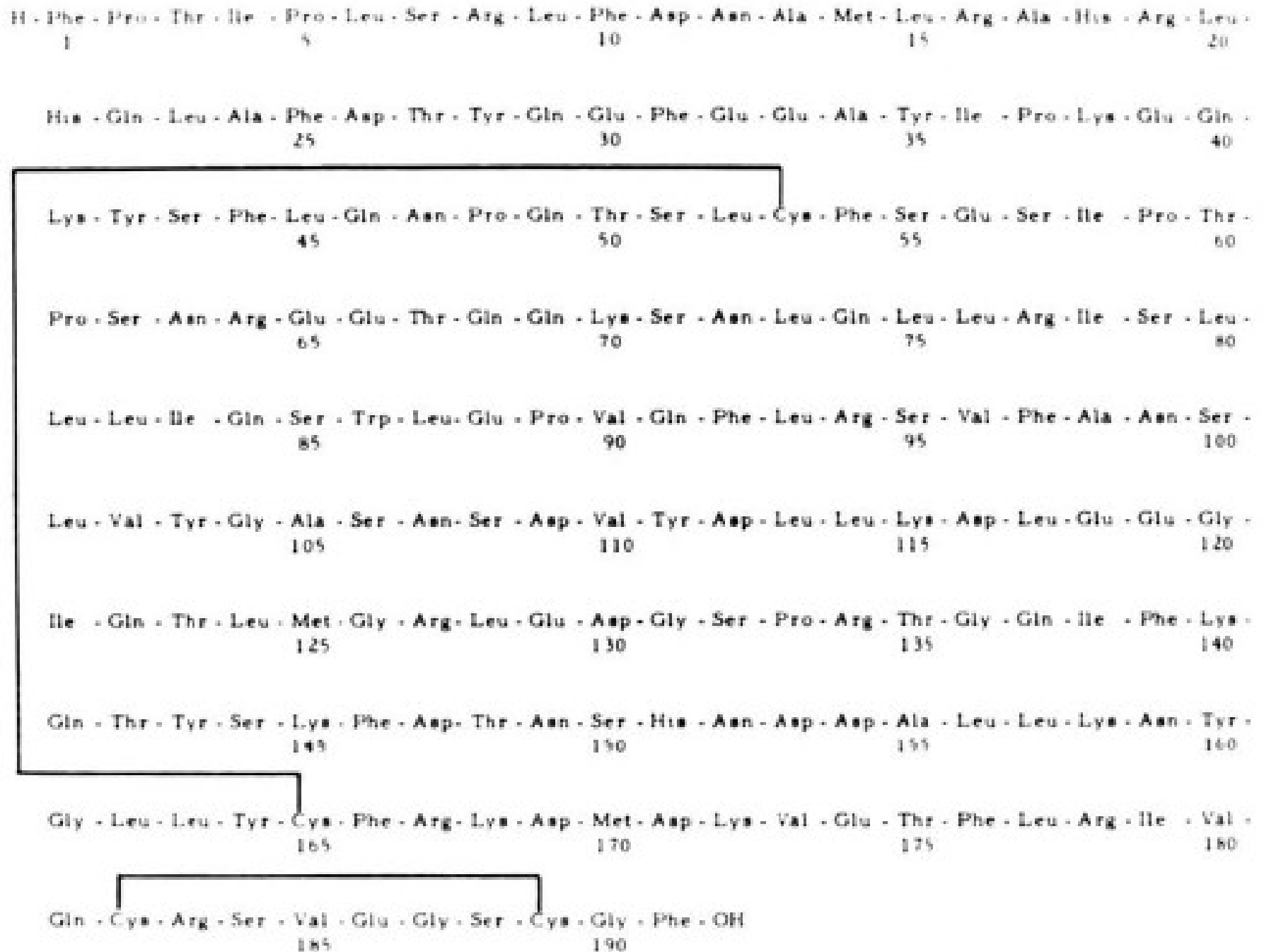


* Stippled residues indicate PEG attachment sites (Phe₁, Lys₃₈, Lys₄₁, Lys₇₀, Lys₁₁₅, Lys₁₂₀, Lys₁₄₀, Lys₁₄₅, Lys₁₅₈)

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

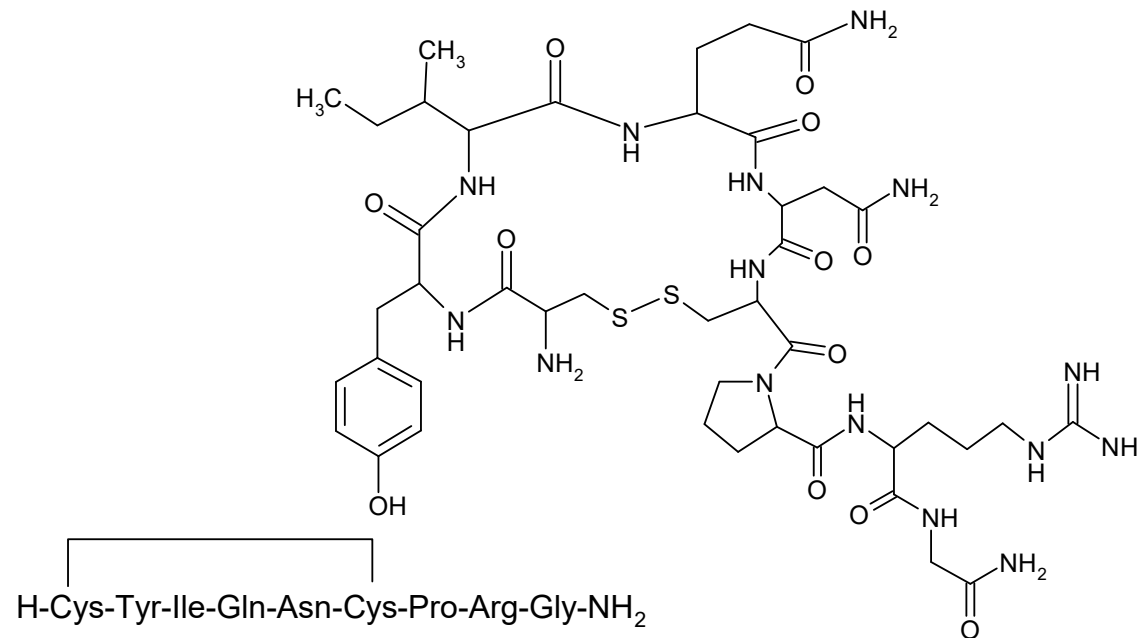
Primární struktura lidského somatotropinu



1.3 Oxytocin, vasopresiny a jejich analogy

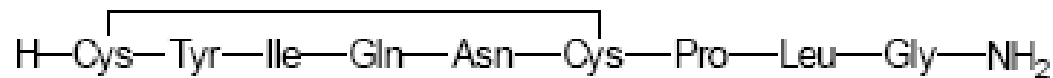
Vasotocin

= fylogenetický prekurzor oxytocinu i vasopresinů u nižších organismů než savců



Oxytocin

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



C₄₃H₆₆N₁₂O₁₂S₂

M_r 1007,19

CAS 50-56-6

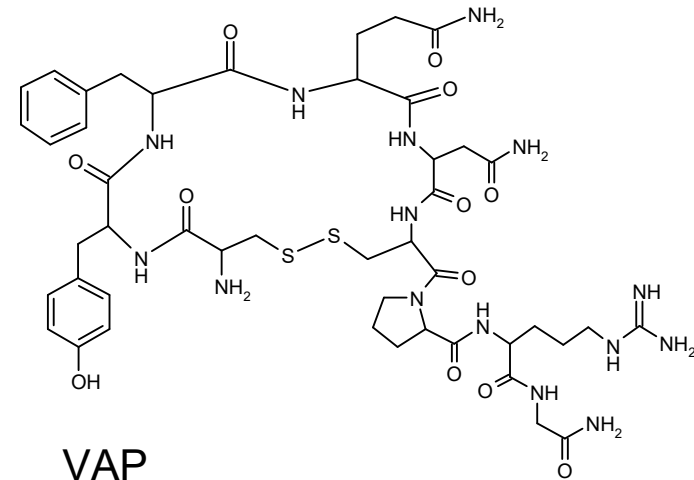
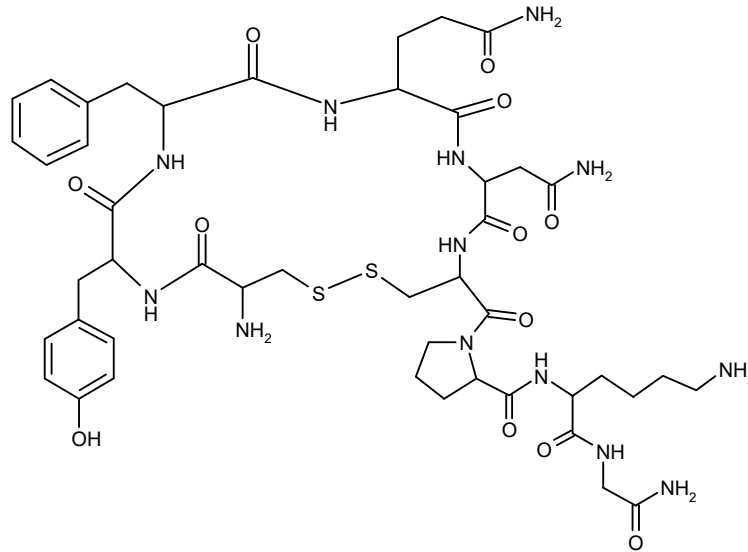
Oxytocinum ČL 2009

- 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

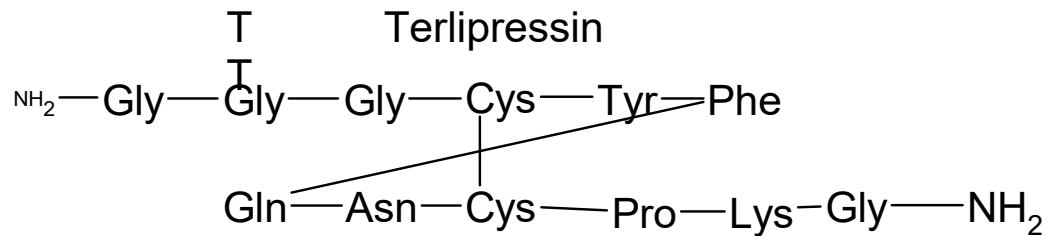


C₄₆H₆₅N₁₃O₁₁S₂

M_r 1040,22

CAS 56-59-7

Felypressinum ČL2009

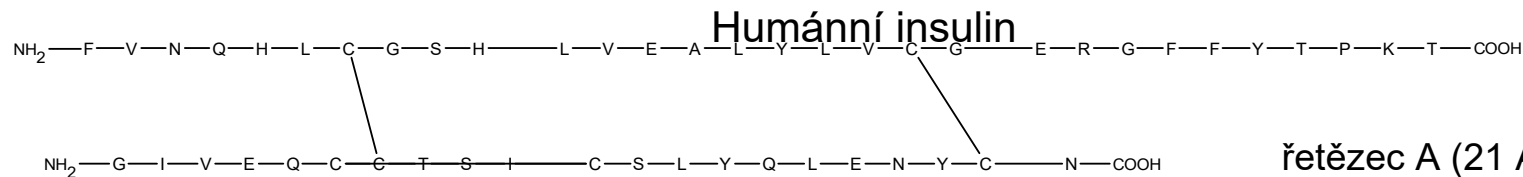


- vazokonstriktor, léčba krvácení z varixů apod., léčba oběhového šoku
Glypressin[®] inj., Remestyp[®] inj.

1.4 Insuliny a glukagon

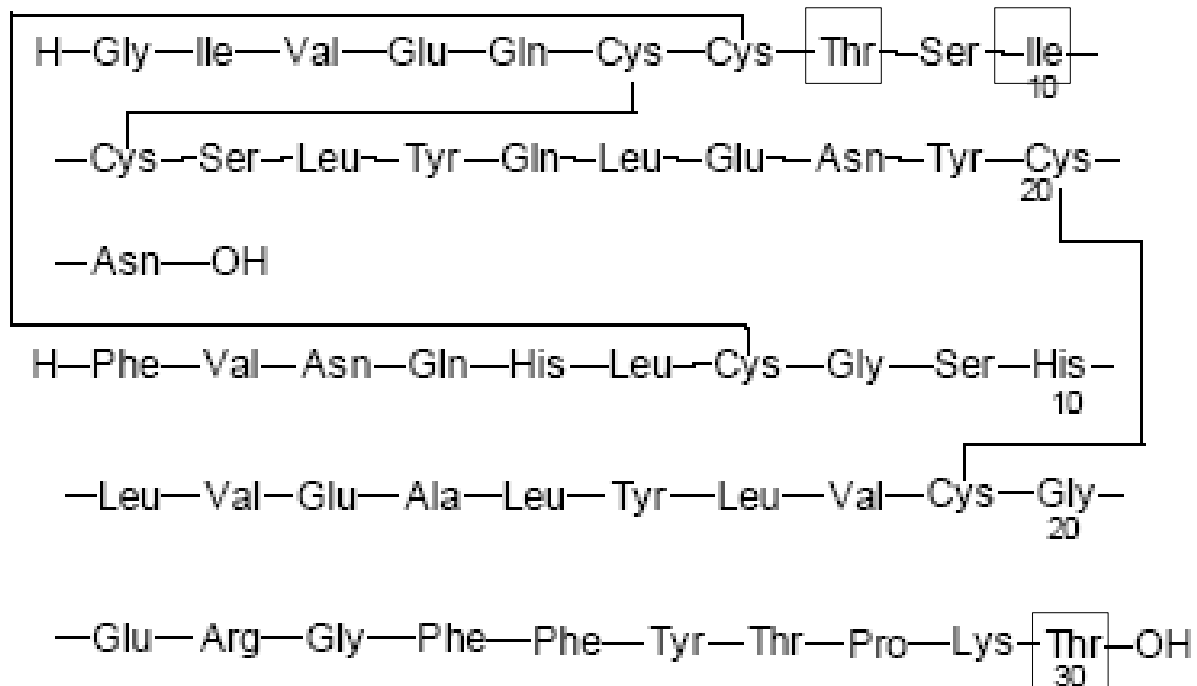
Insulin

- secernován převážně β -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)



C₂₅₇H₃₈₃N₆₅O₇₇S₆

M_r 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

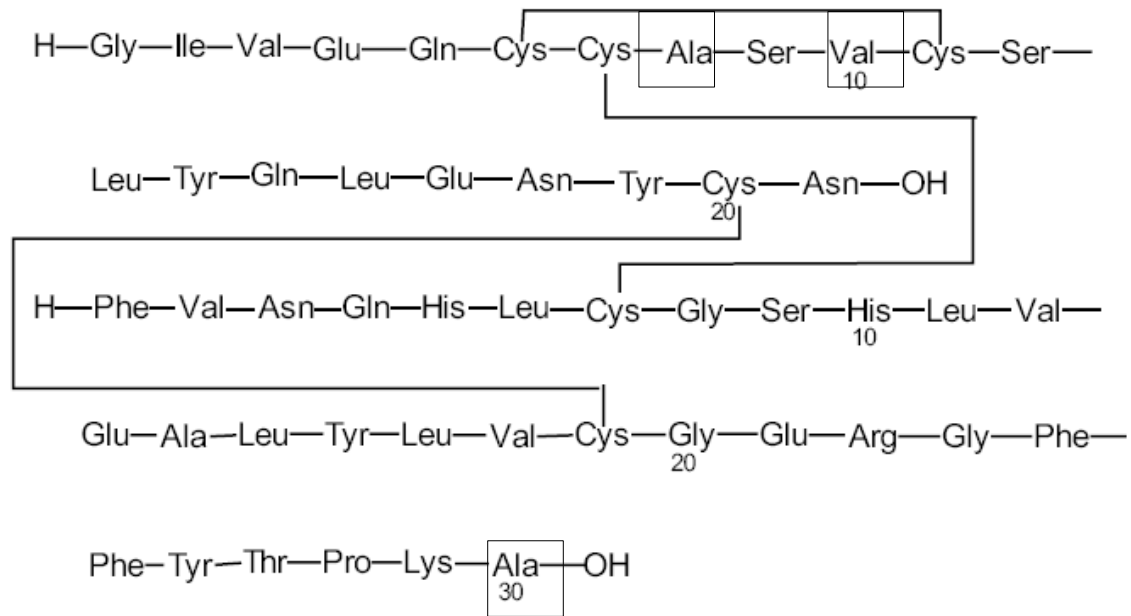
1-24 signální sekvence; 25-54 řetězec B; 57-87 peptid C; 90-110 řetězec A

•dnes získáván rekombinantní technikou nebo semisynteticky z prasečího

Insulinum humanum ČL2009

•syn. humulin

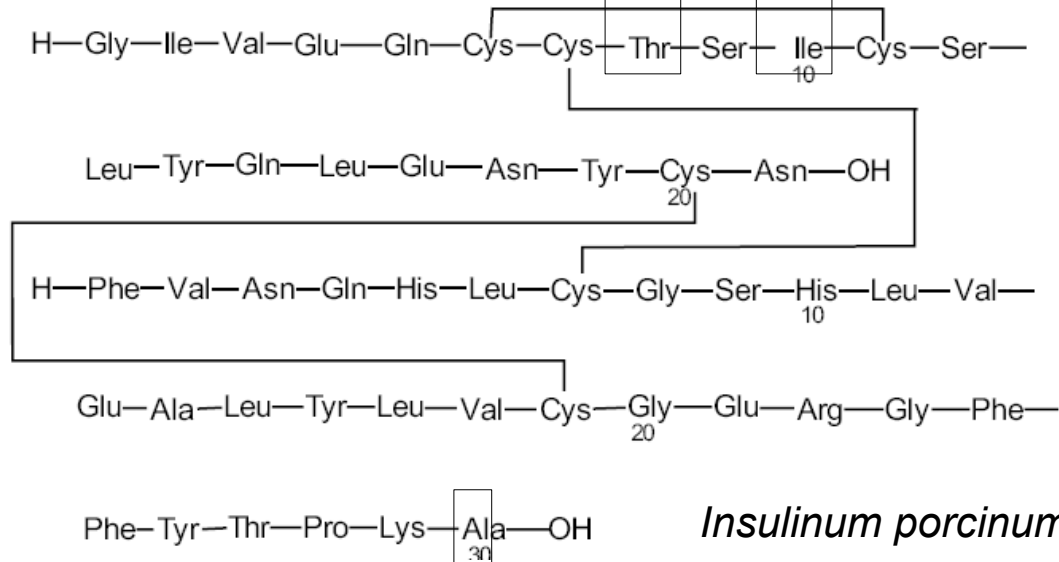
Insulin bovinní (hovězí)



Insulinum bovinum ČL2009

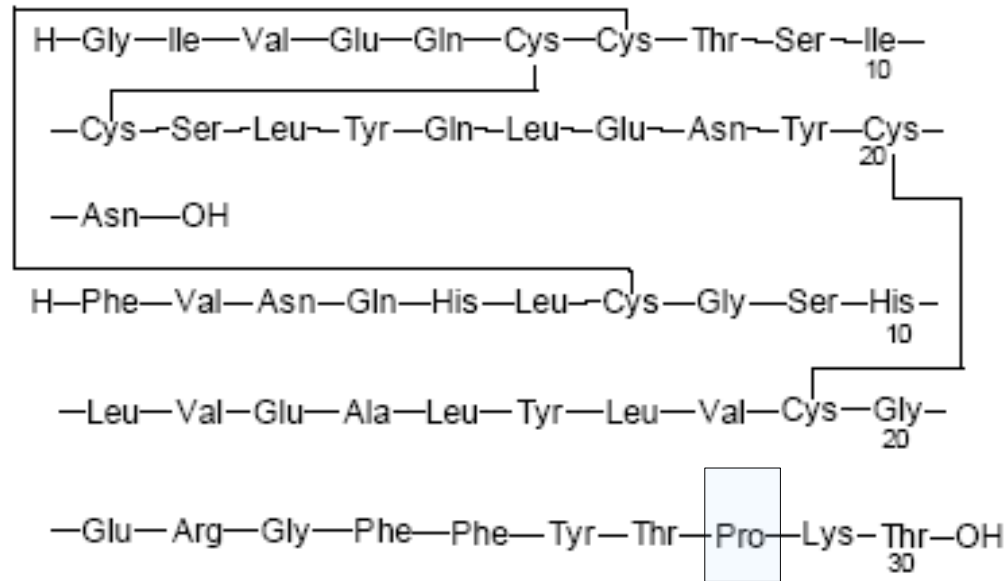
- izolace z hovězích slinivek

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



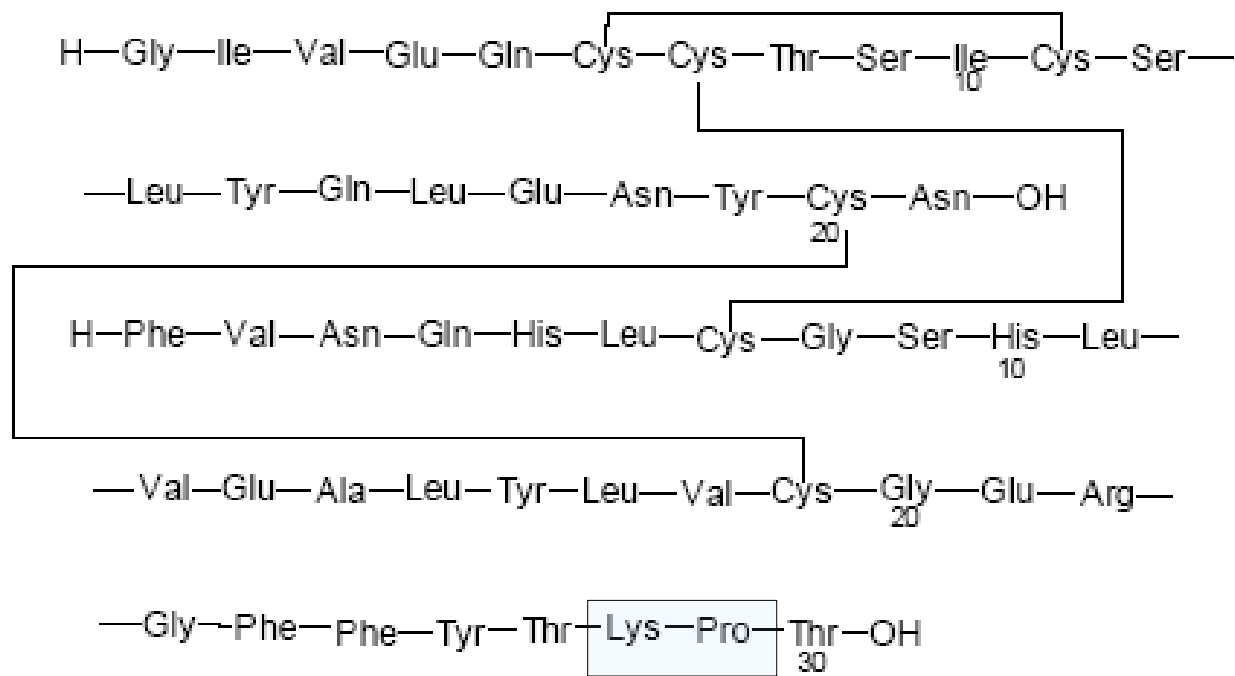
aspart
Insulinum aspartum ČL 2009

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

M_r 5825,58

CAS 116094-23-6

- rekombinantní technika
- krátkodobě působící



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

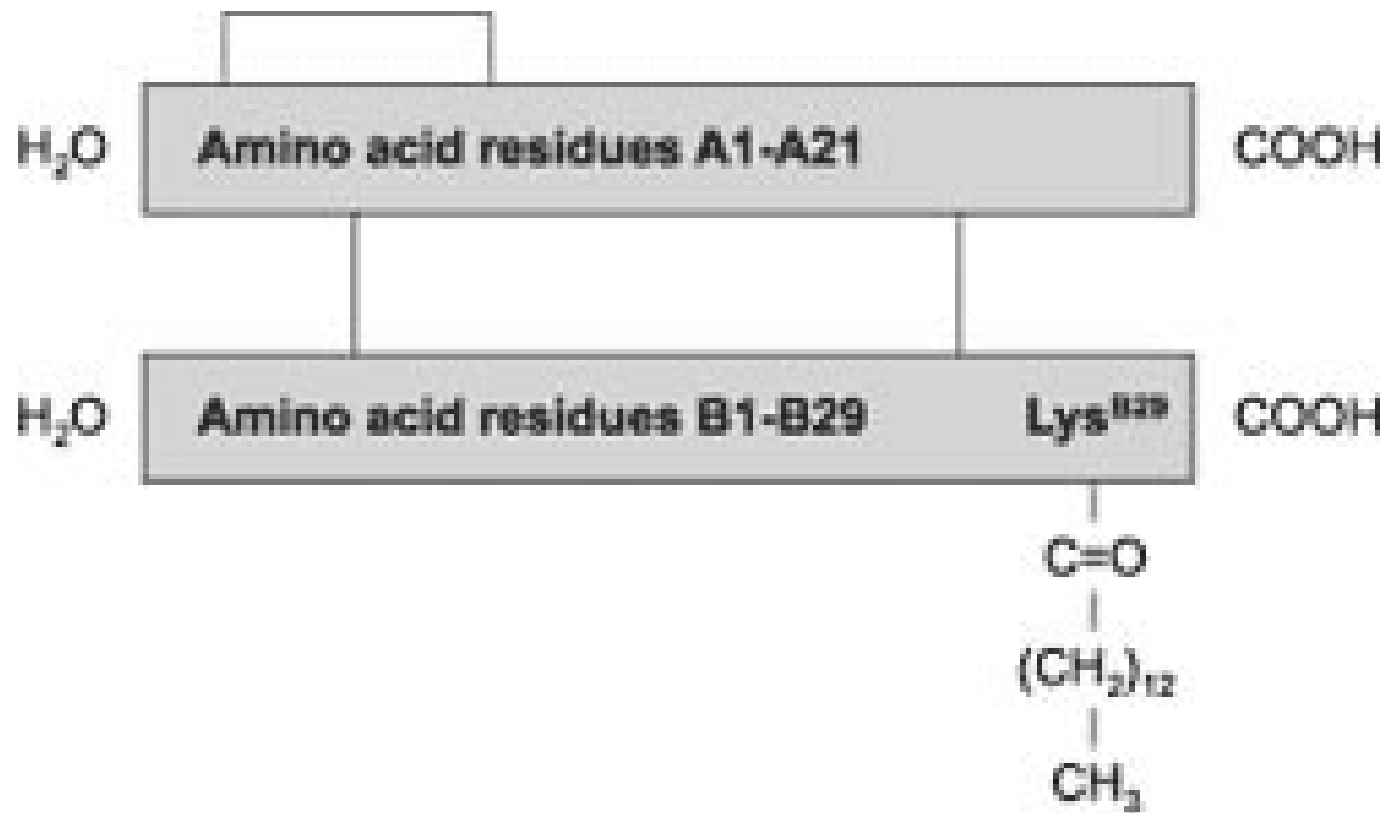
M_r 5807,61

CAS 133107-64-9

insulin-lispro

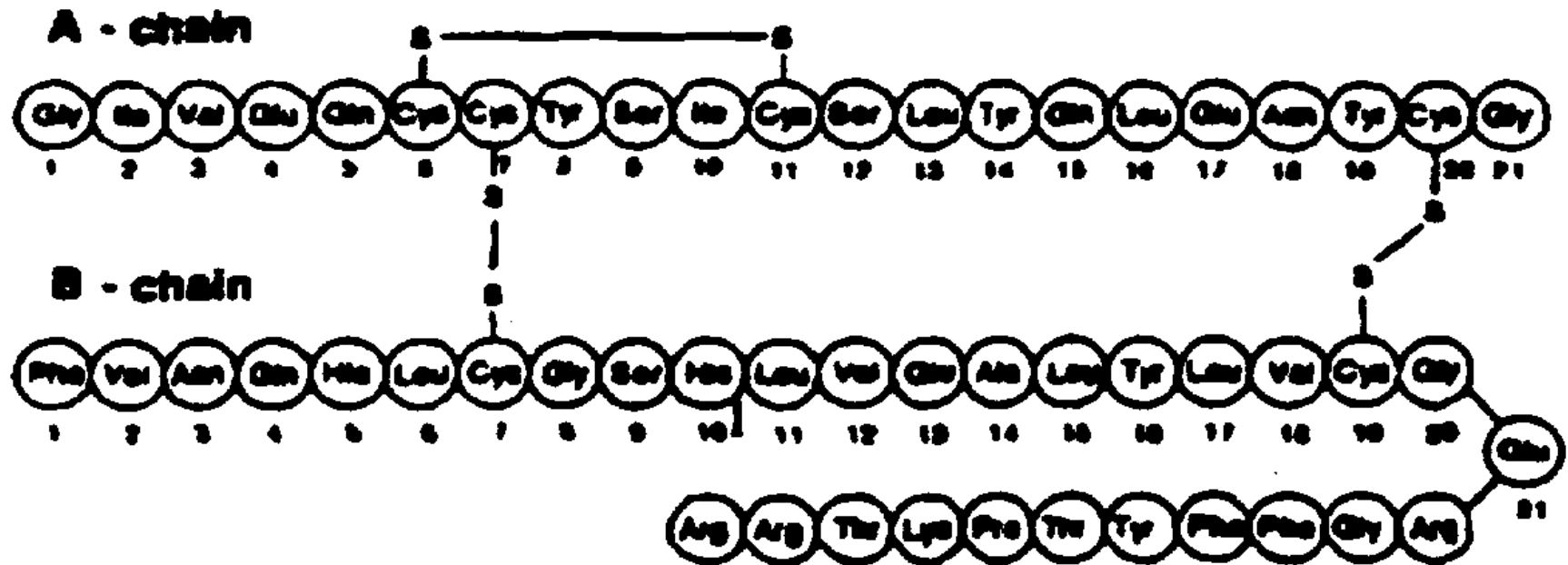
Insulinum lisprum ČL 2009

- rekombinantní
- krátkodobě působící



insulin-detemir

- řetězec B jen 29 AK, na Lys^{B29} tetradekanoyl (myristoyl)
- rekombinantně-polosyntetický

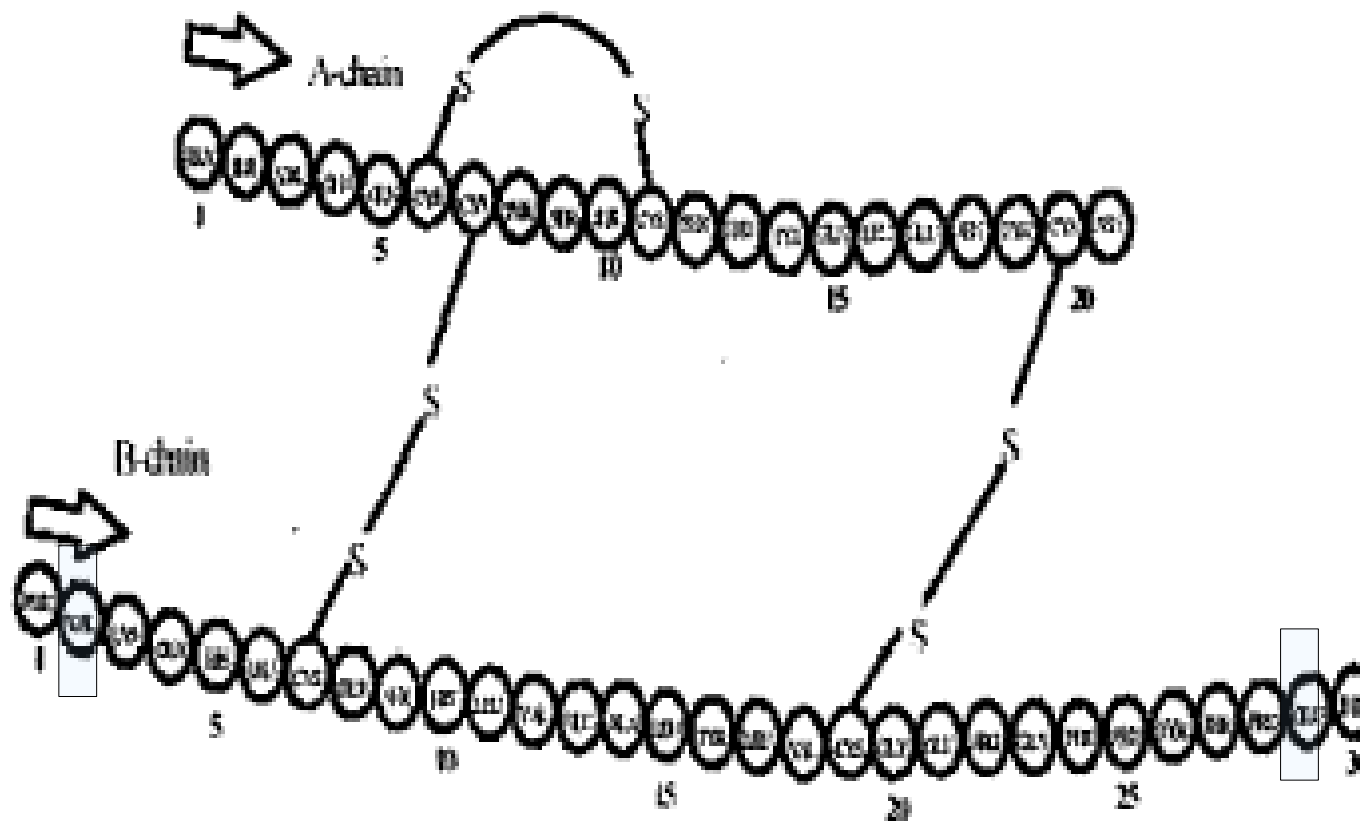


insulin-glargin

Gly^{21A}-L-Arg^{30B}-L-Arg^{31B}-insulin

Lantus[®]

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



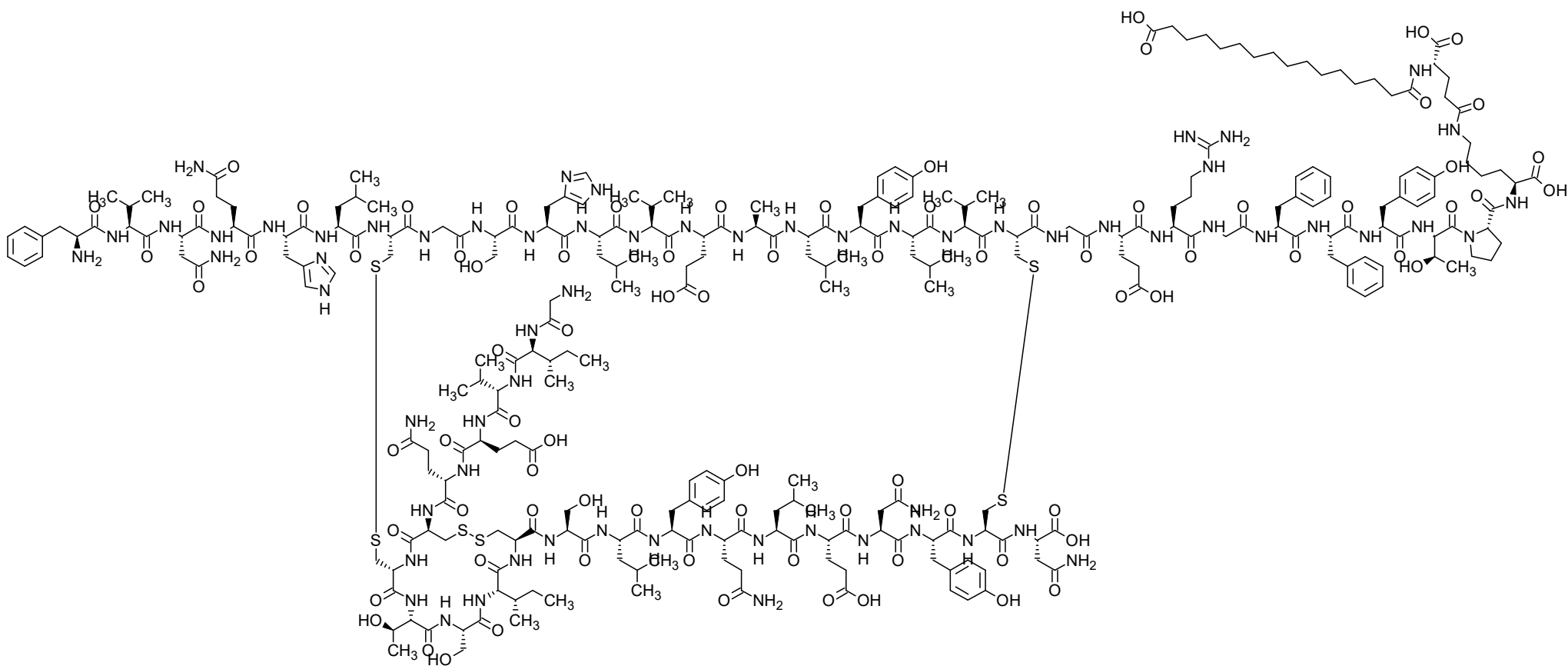
Chemical name: 3βLys-29βGlu-human insulin

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

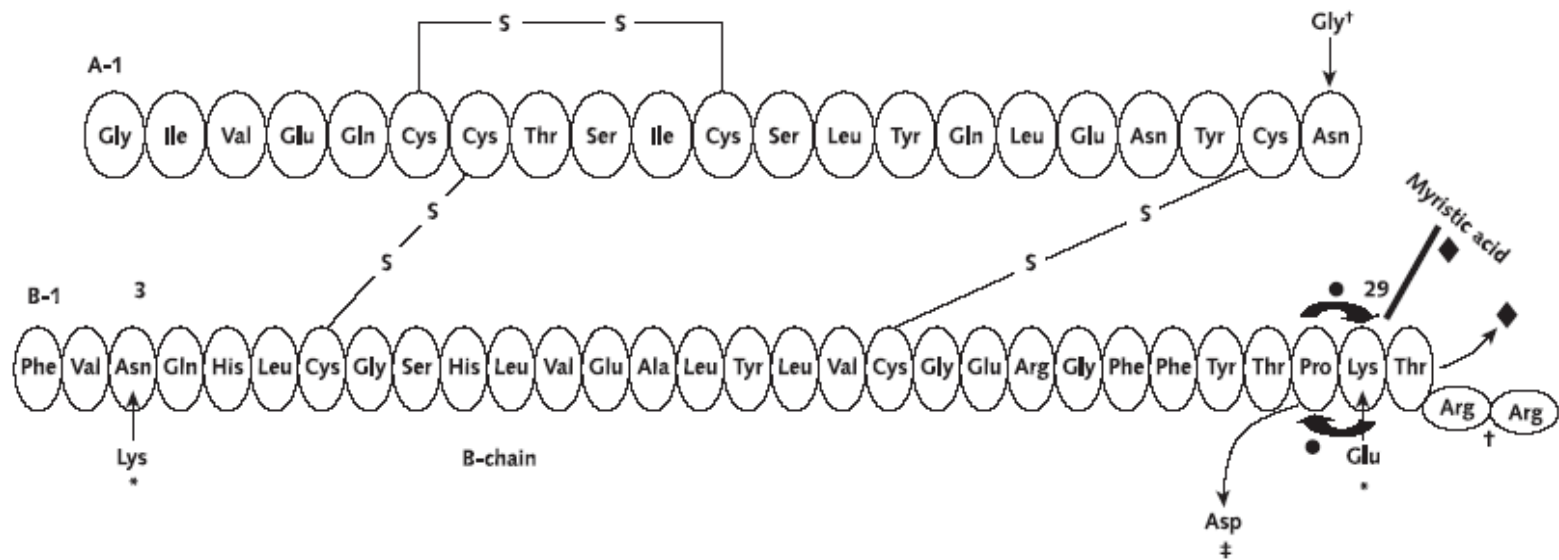


insulin **degludec**

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 β chain.

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

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

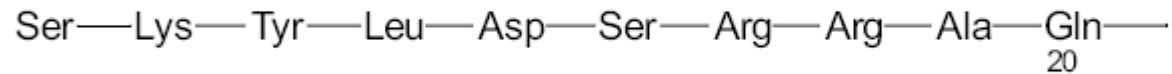
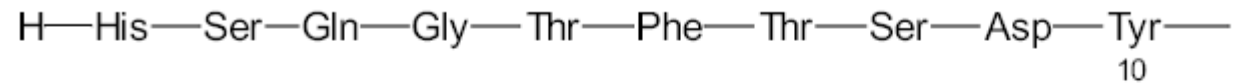
† = Insulin glargine differs from human insulin in that the amino acid asparagine at position A21 is replaced by glycine and 2 arginines are added to the C-terminus of the β chain.

◆ = Insulin detemir is designed to bind albumin in plasma after absorption. Threonine is omitted from position 30 of the insulin β 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

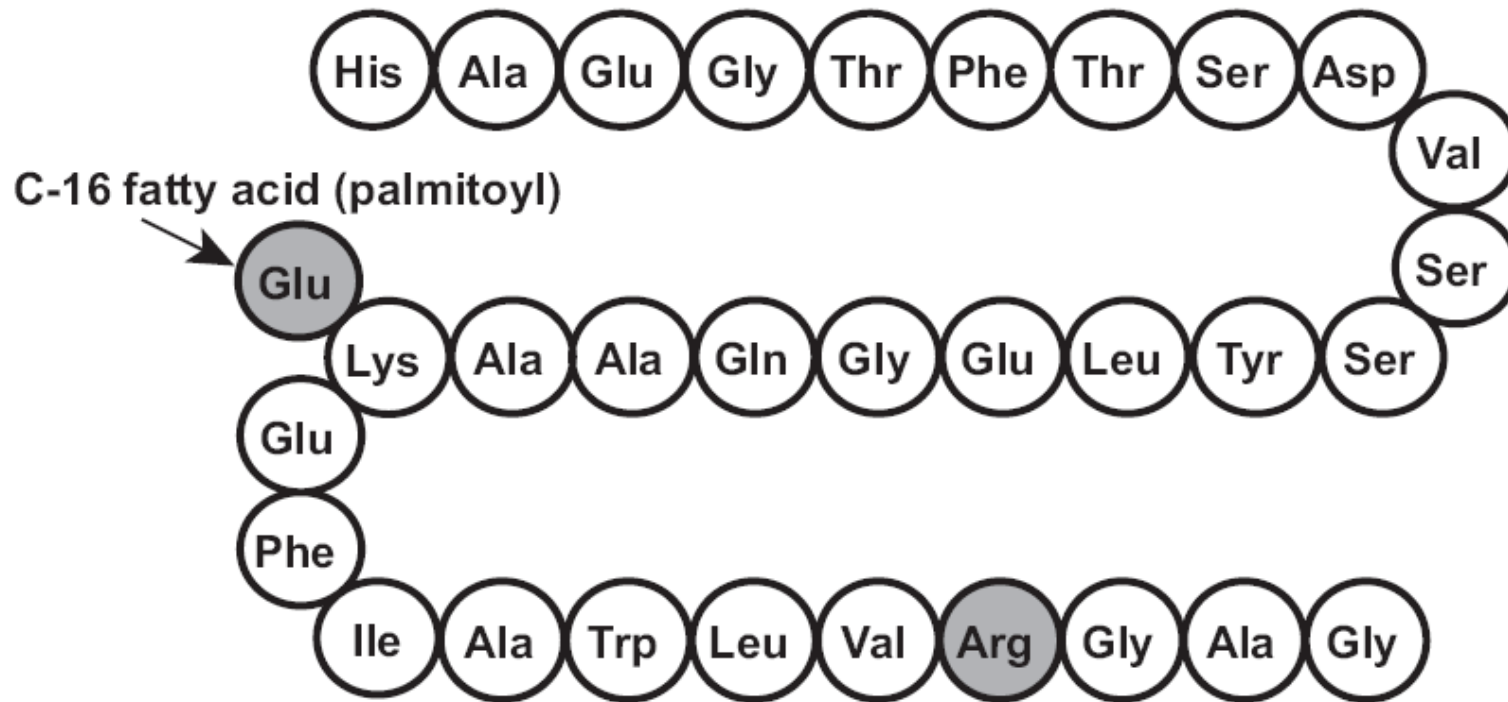
- připravován rekombinantní technikou; sekvence AK totožná
- použití: terapie těžké hypoglykémie, diagnostika GIT radiologicky apod.

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 β -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

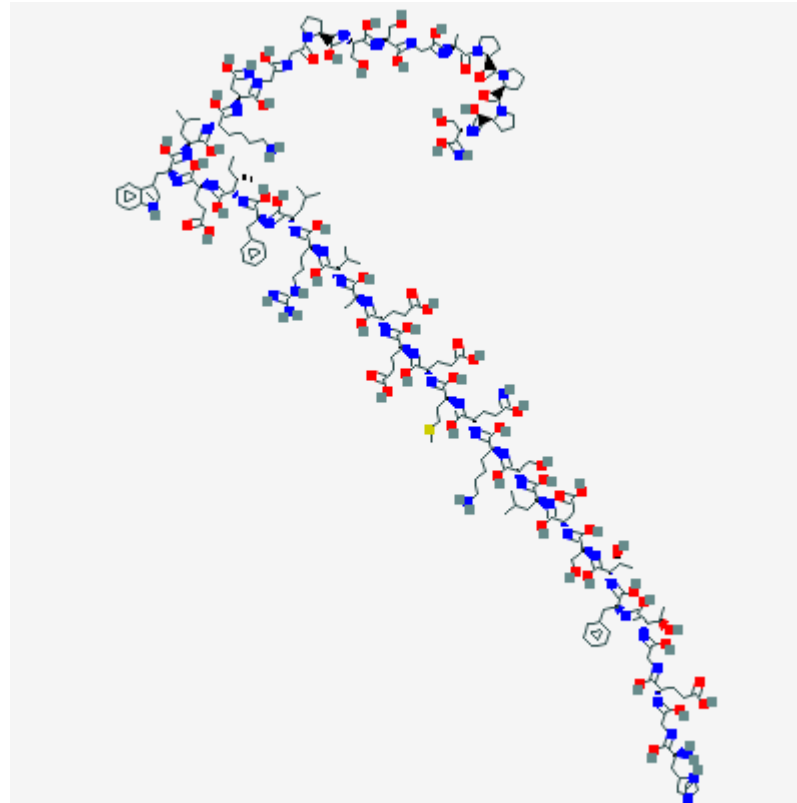


liraglutid

γ -L-glutamoyl(N- α -hexadekanoyl)-Lys,²⁶Arg³⁴-GLP-1(7-37)

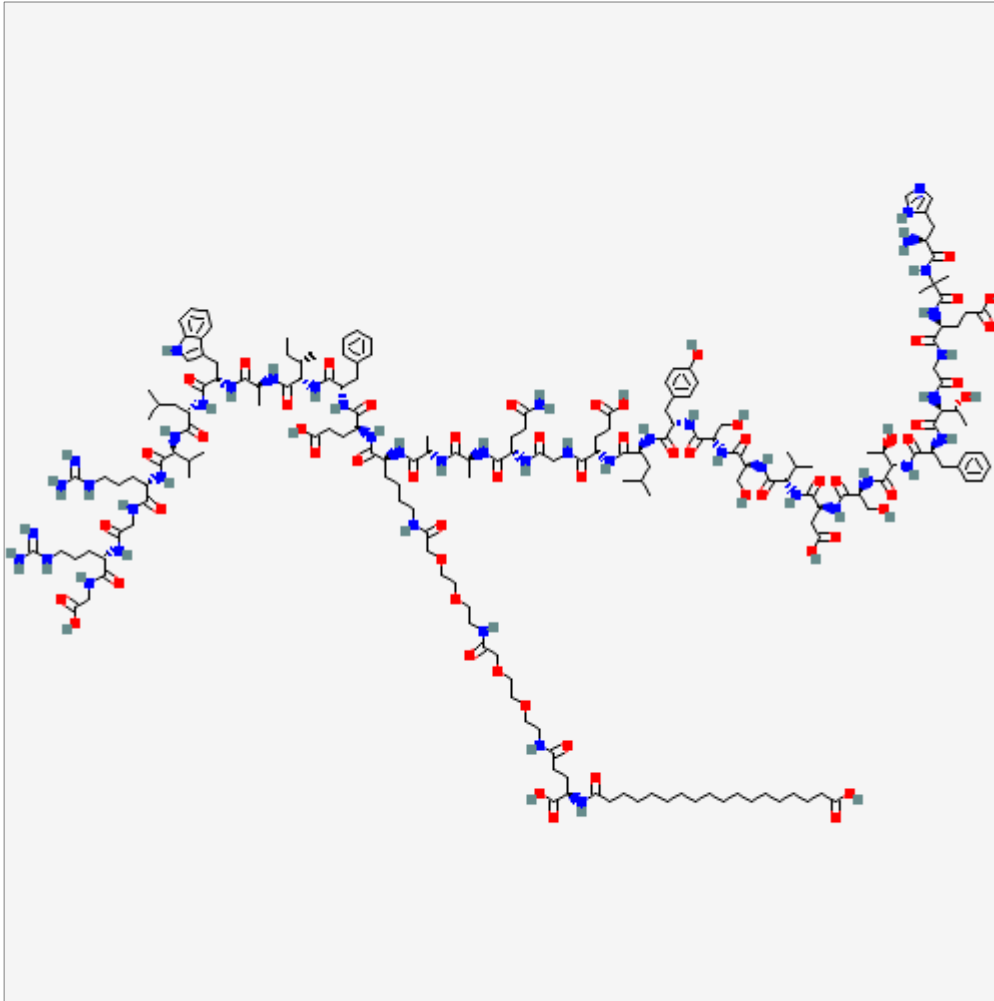
- sekvence AK zbytků z 93 % shodná s fragmentem 7-37 nativního GLP-1
- silná vazba na sérový albumin, vzájemná asociace molekul, nepodléhá glomerulární filtraci $\Rightarrow T_{1/2} = 12,5$ hod po s.c. injekci
- zlepšuje funkci α i β buněk
- Victoza ®

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 ®

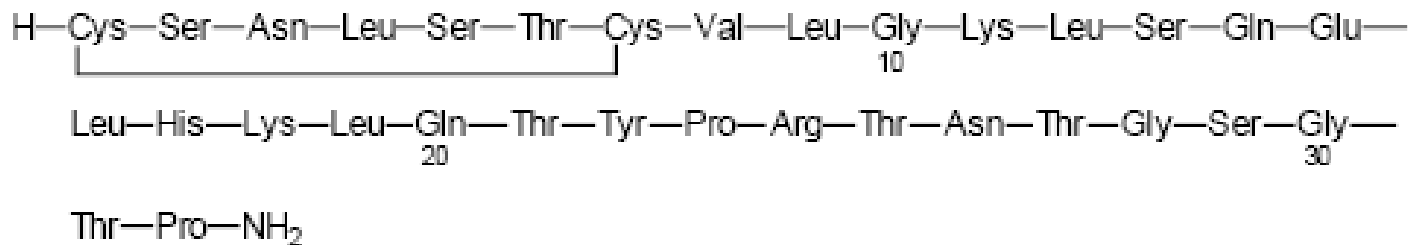
Semaglutid



- Ozempic[®], Wegovy[®], Rybelsus[®]
- podatelny s.c. i p.o.
 - antidiabetikum, anobezikum („adjuvantní“ léčba k dietě a cvičení)

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 Ca^{2+} z kosti (\Rightarrow ↓ kalcémie)
- ↓ tvorbu osteoklastů
- aplikace spolu s Ca^{2+} k léčbě osteoporózy

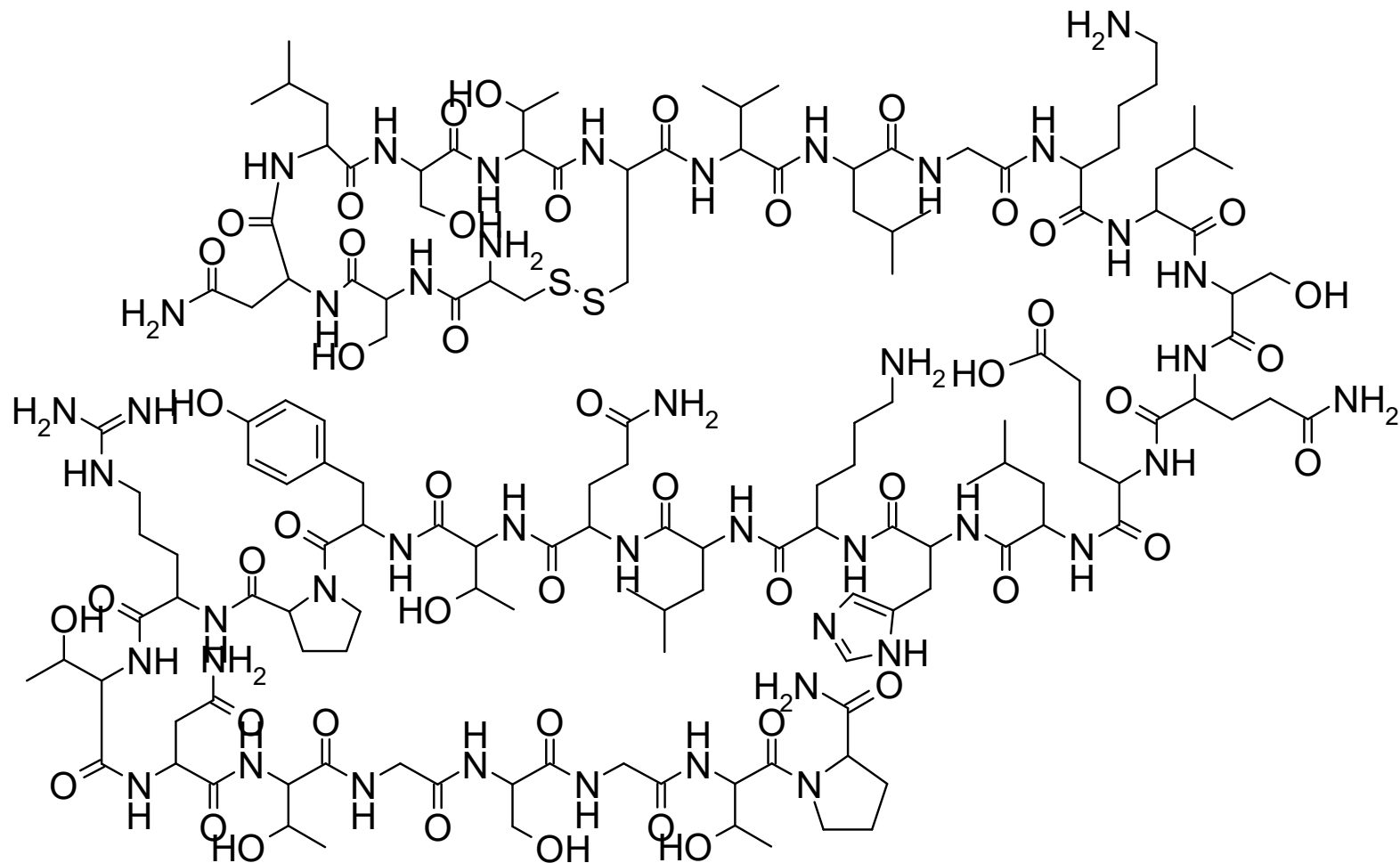


$\text{C}_{145}\text{H}_{240}\text{N}_{44}\text{O}_{48}\text{S}_2$

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	GLRSLTTLLR	ALGAQKEA I S
PPDAASAAPL	RT I TADTFRK	LFRVYSNFLR
GKCLKLYTGEA	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

```

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

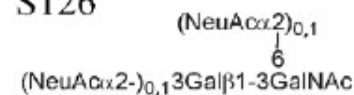
N24, N38, N83 and S126 : glycosylation

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
    
```

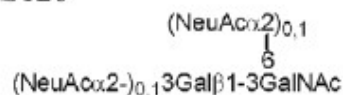
N24, N38, N83 and S126: glycosylation

Carbohydrate moiety (structure of major glycans)

N24, N38 and N83



S126

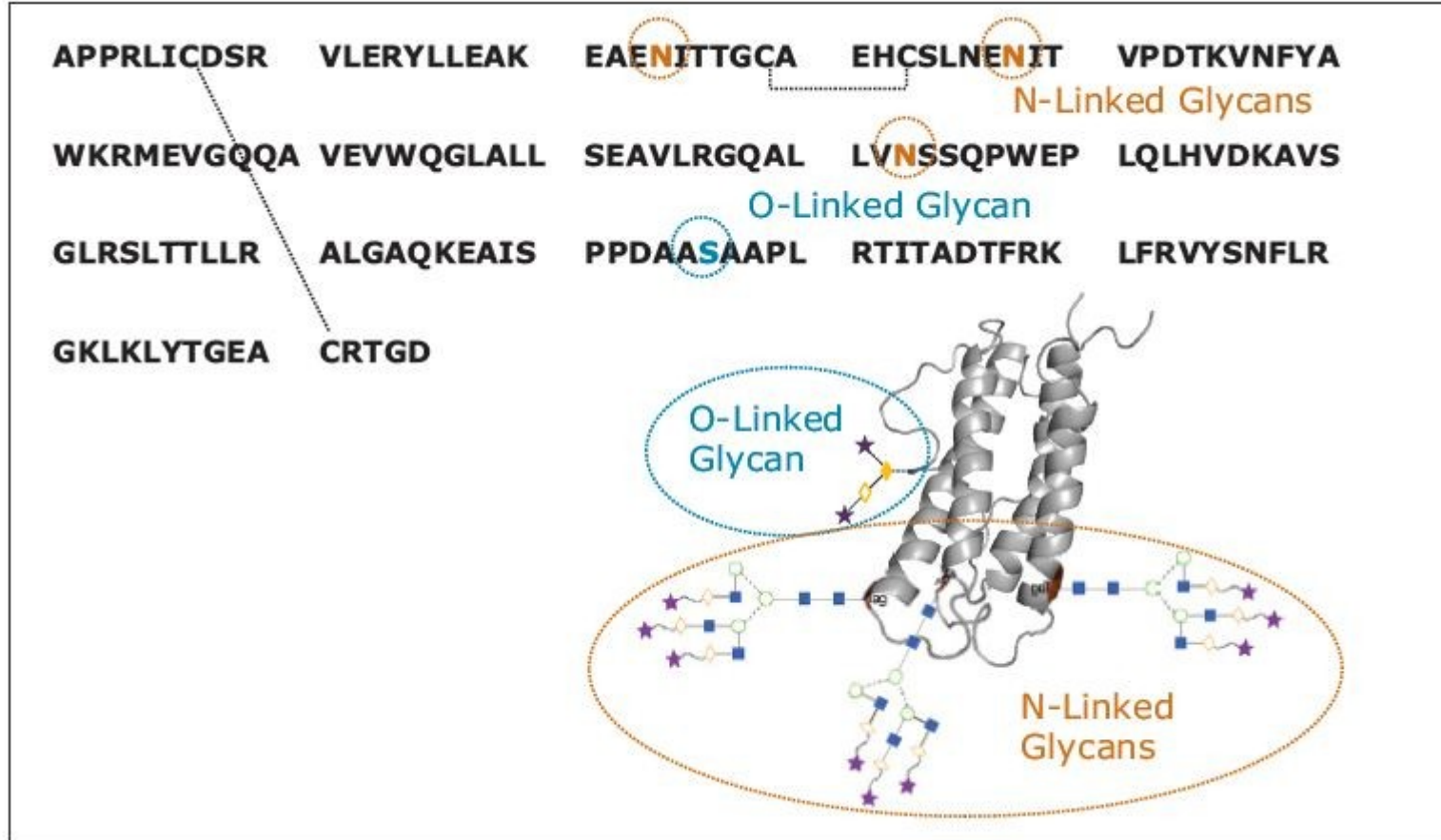


$\text{C}_{809}\text{H}_{1301}\text{N}_{229}\text{O}_{240}\text{S}_5$: 18235.70 (Protein moiety)
[122312-54-3]

Stručný přehled dosud popsaných epoetinů

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

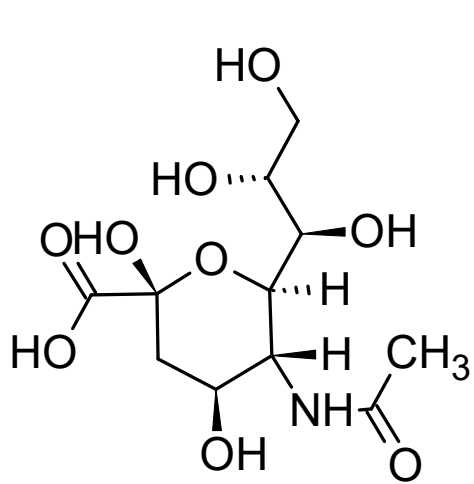
Epoetins' glycosylation



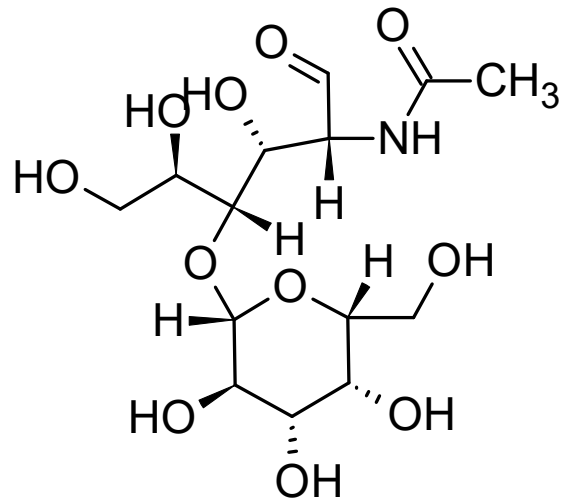
Sites of *N*-glycosylation: Asn24, Asn38, Asn83 (= N24, N38, N83)

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

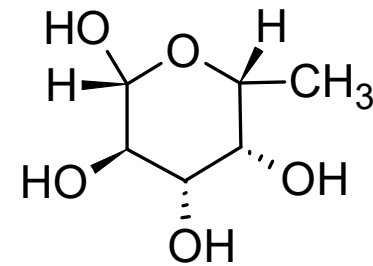
Epoetins' glycosylation: some more specific occurring sugars



N-acetylneuraminic acid (= sialic acid)



N-acetyllactosamine



L-fucose

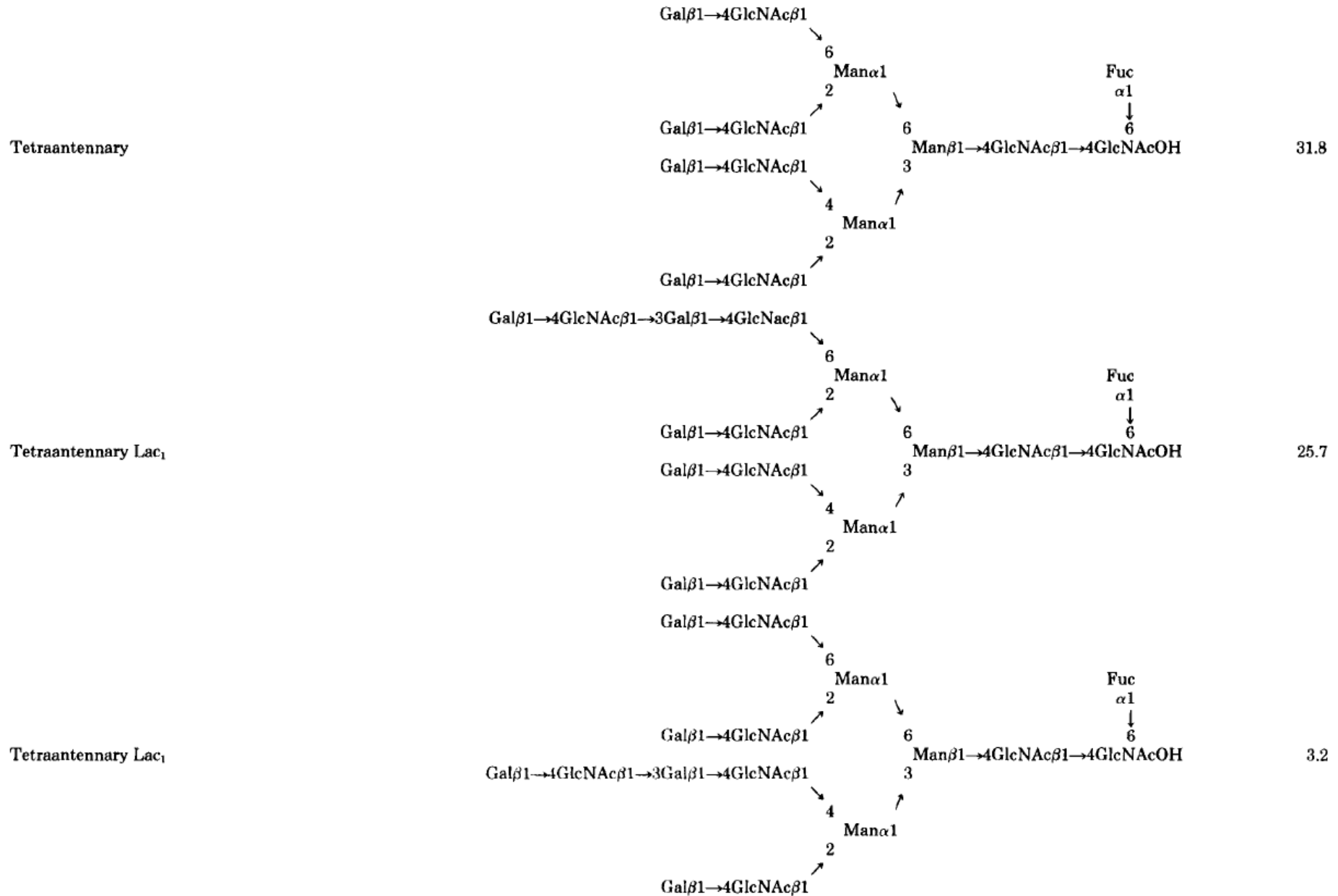
Epoetins' glycosylation: secondary structure of *N*-attached oligosaccharide chains

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

Saccharide	Structure ^a	Relative amount %
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



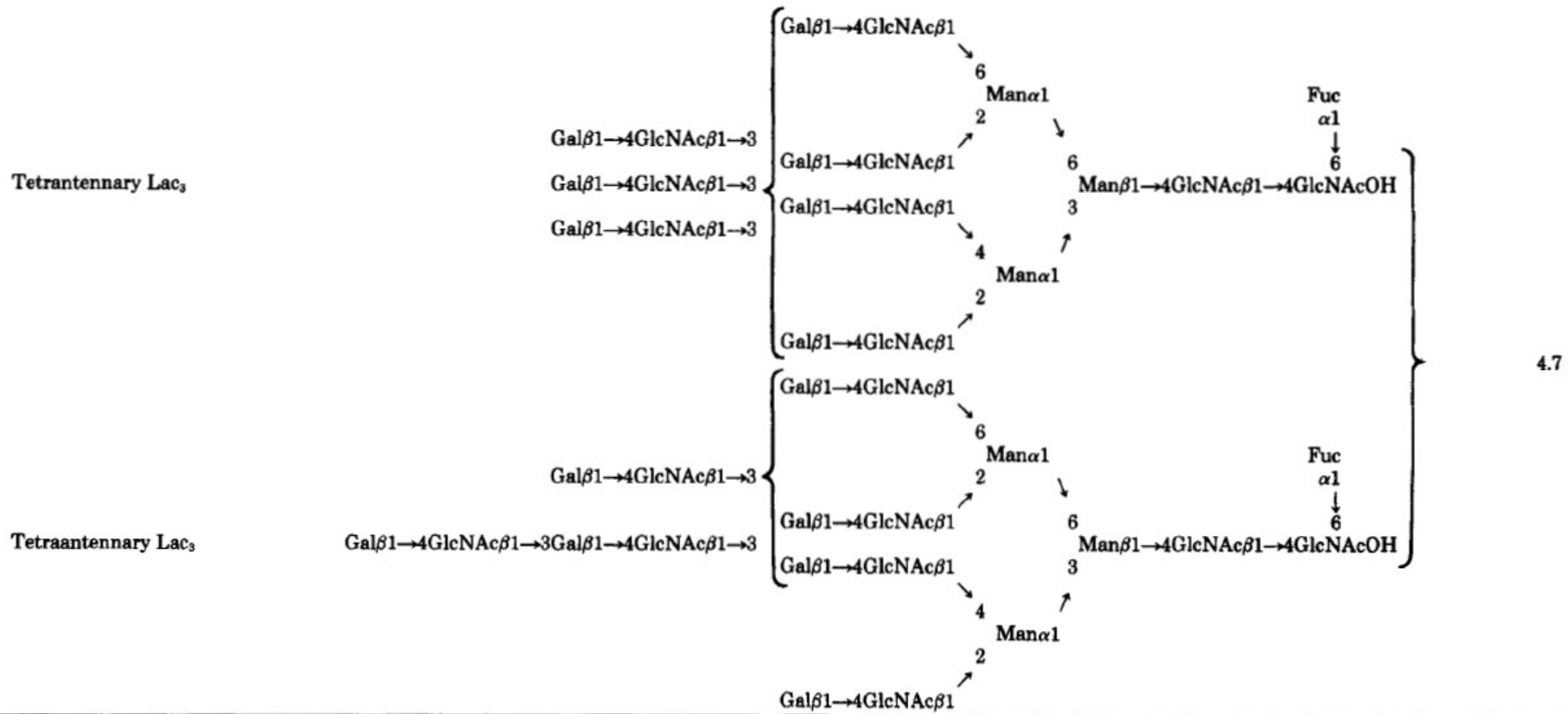
Epoetins' glycosylation: secondary structure of *N*-attached oligosaccharide chains continued

TABLE III-Continued

Saccharide	Structure ^a	Relative amount
		%
Tetraantennary Lac ₁		3.2
Tetraantennary Lac ₂		13.2
Tetraantennary Lac ₂		3.3

Carbohydrate Structure of Human Recombinant Erythropoietin

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

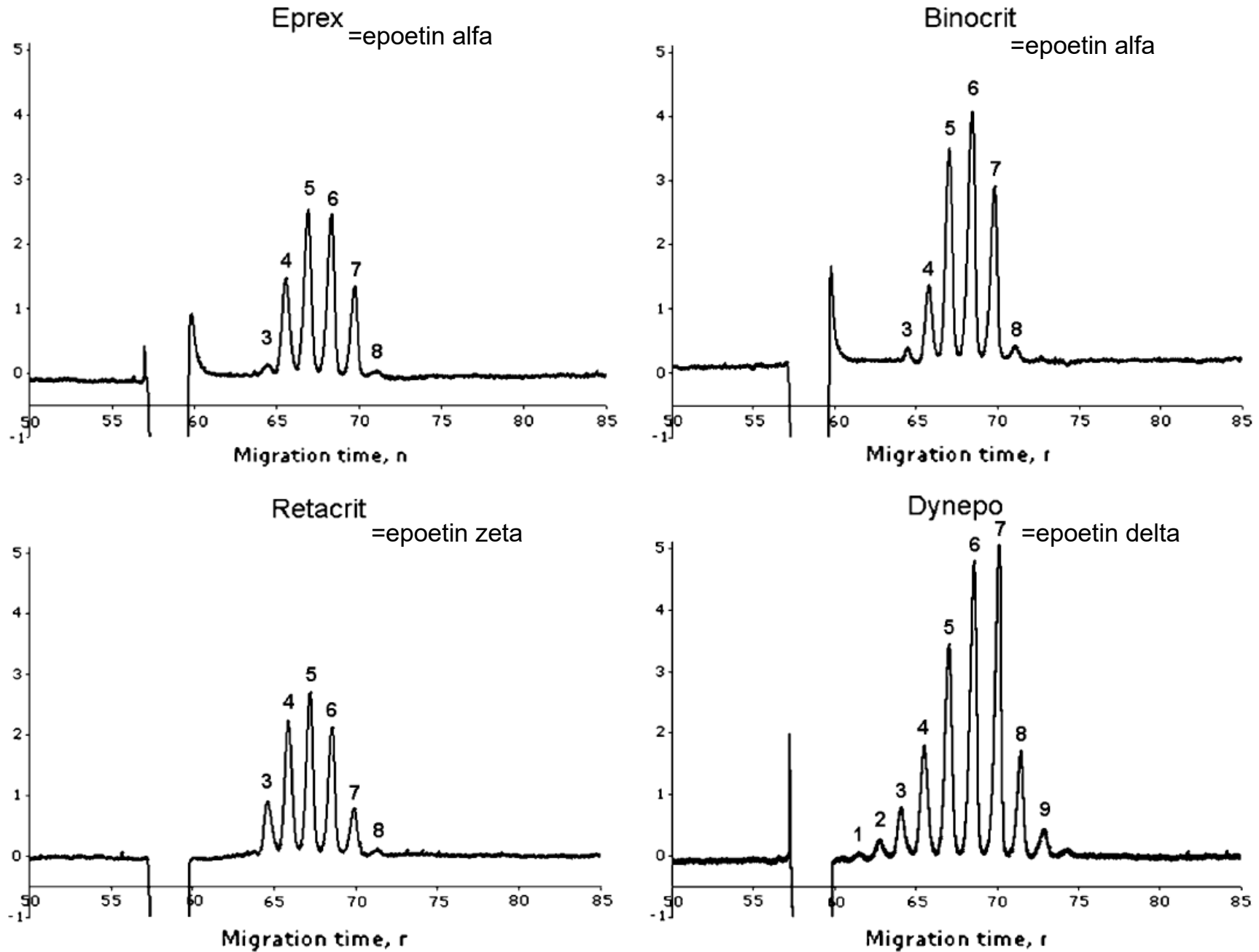
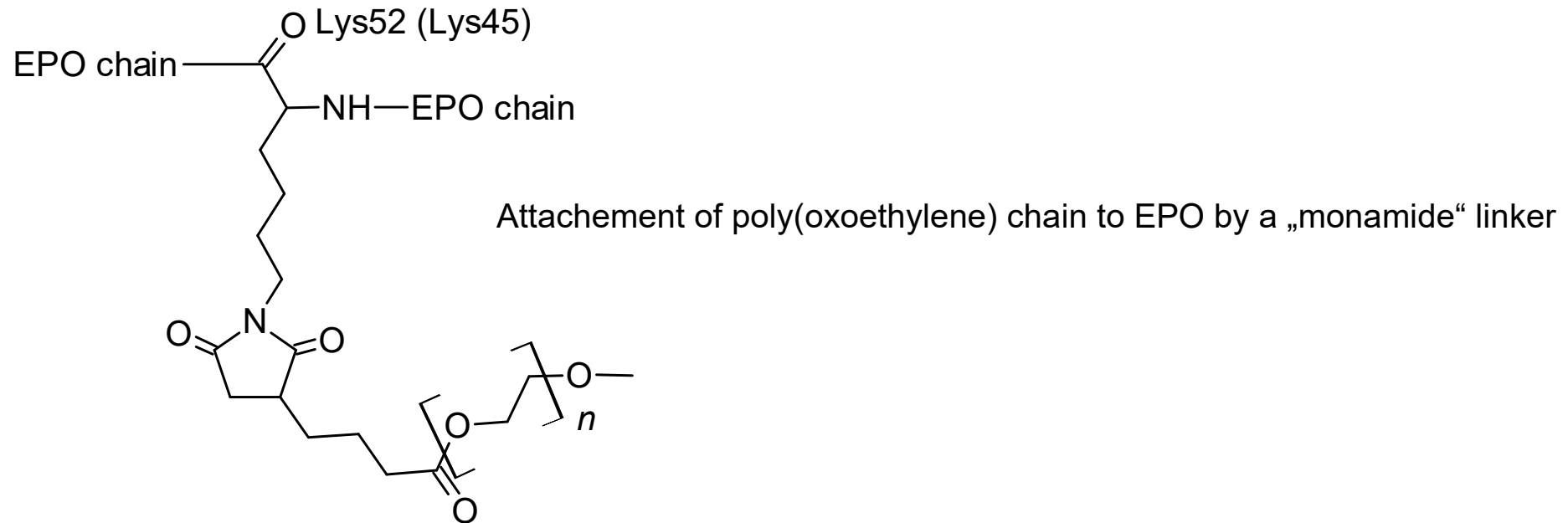


Fig. 3 CE-UV analysis of the four EPO products.

Epoetin conjugates
Methoxy-polythylenglycol-epoetin beta

Total M_r cca 60 000



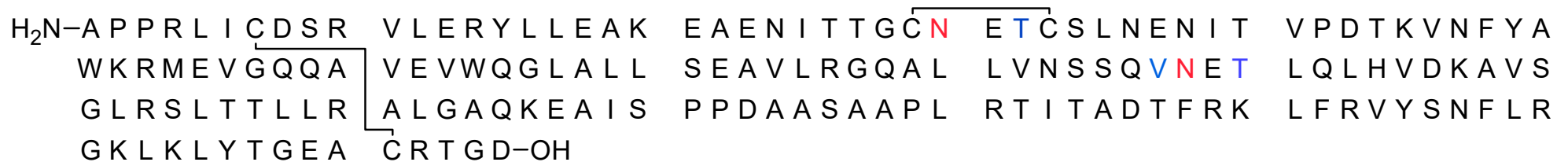
Plasmatic $T_{1/2}$ cca 139 h \Rightarrow „continuous erythropoietin receptor activator“, CERA
Mircera $\text{\textcircled{R}}$ (s.c. or i.v.) for treatment of anemia in chronic renal disease

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)

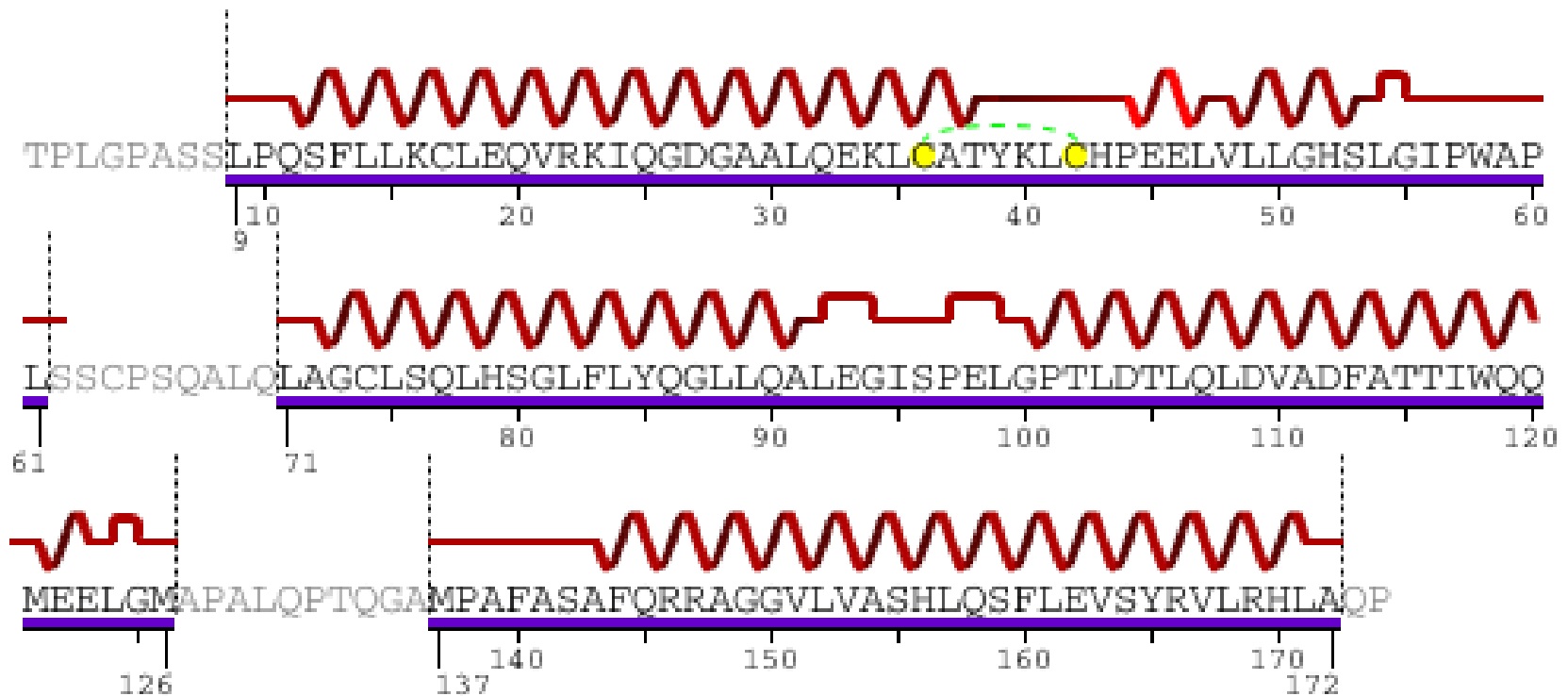
- stimuluje diferenciaci a proliferaci pluripotentních kmenových buněk leukocytů ve zralé granulocyty a makrofágy
- není glykosylovaný
- výroba rekombinantní technikou za použití bakterií jako hostitelských buněk
- léčba leukopenie při chemoterapii nádorů a AIDS (Leucemax®)

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



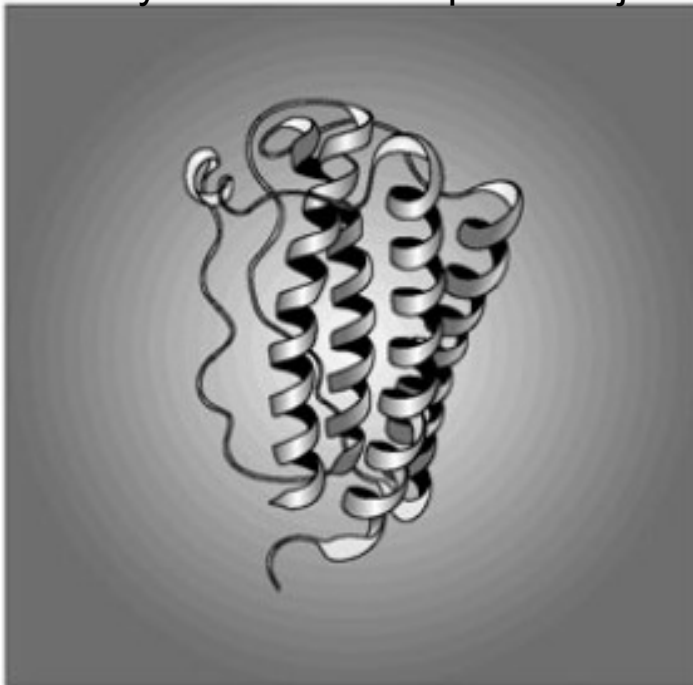
- **filgrastim**: analog G-CSF s přidaným Met na N-konci
- rekombinantně na *E. coli*
- léčba neutropenie při chemoterapii nádorových onemocnění a při AIDS
- s.c., i.v.

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

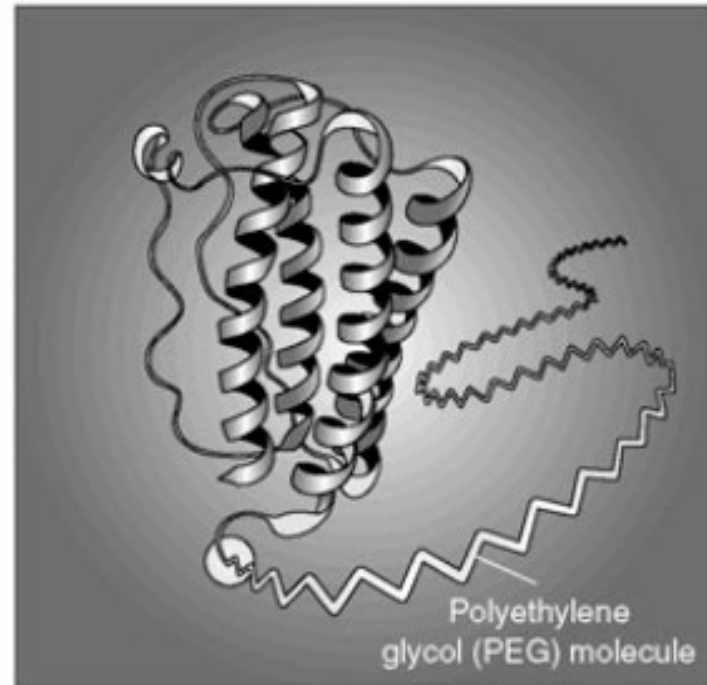
Konjugáty filgrastimu

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- α -galaktopyranosylová jednotka, na ni molekula kys. neuraminové, na její aminoskupinu pak fragment *N*-karboxyglycinu, na který je karbamátovou vazbou konečně napojen polyoxoethylenový řetězec, zakončený CH₃

- glykosylovaný; celková M_r 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_r cca 85 000

- T_{1/2} 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

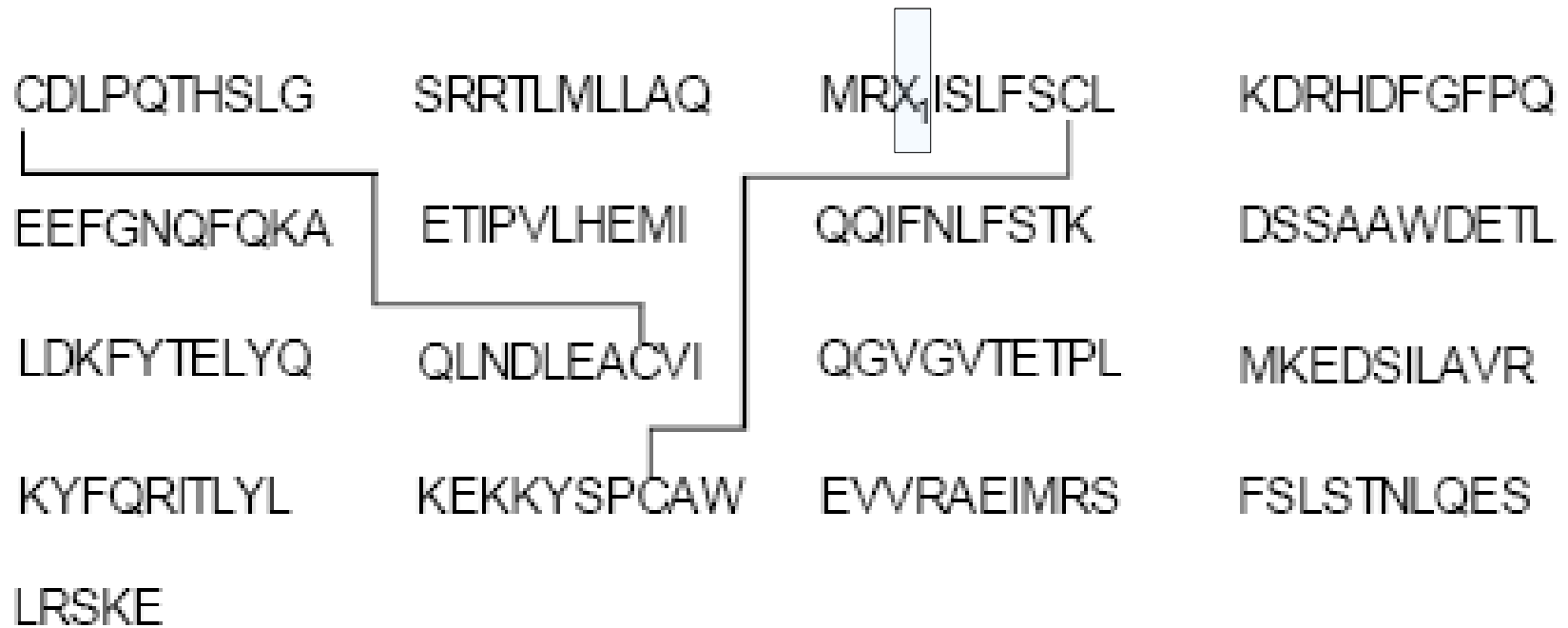
- ligand for the receptor-type protein-tyrosine kinase KIT (\Rightarrow synonym KITLG).
- plays an essential role in the regulation of cell survival and proliferation, hematopoiesis, stem cell maintenance, gametogenesis, mast cell development, migration and function, and in melanogenesis
- KITLG/SCF 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 α_2

Interferoni alfa-2 solutio concentrata ČL 2017

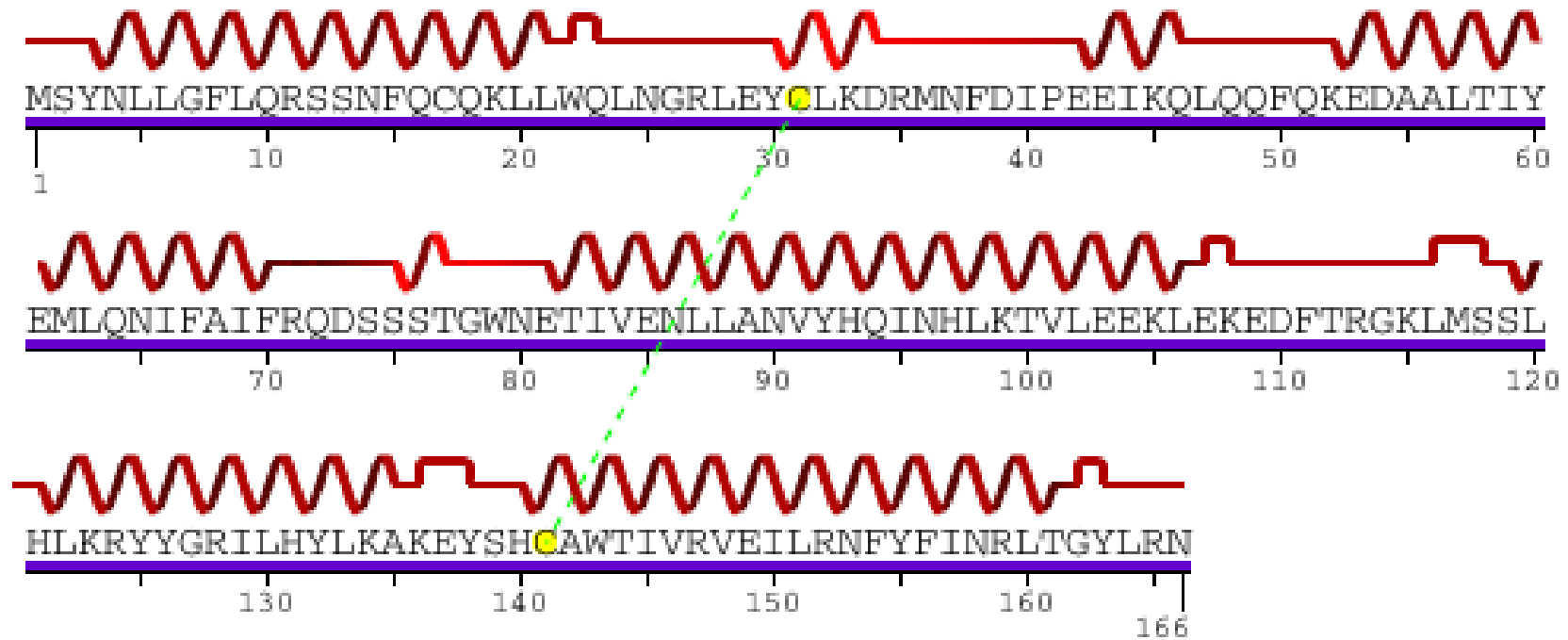
X1 = Lys α_{2a}

X1 = Arg α_{2b}

- protivirová aktivita v průběhu syntézy virové RNA a bílkoviny
- antiproliferační aktivita
- výroba rekombinantní technikou na bakteriích
- Introna ® , Roferon ®
- též pegylovaný: peginterferon alfa-2a (Pegasys ®) - na N-konci N², N⁶-dikarboxy-Lys esterifikovaný PEG-monomethyletherem

interferon β
= peptid ze 166 AK

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



- terapie roztroušené sklerózy
- Avonex[®] , Betaferon[®] , Extavia[®] : i.m. injekce

interferon γ_{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	SFYFKLFFKNF	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 γ , která má na N-konci Met