

Биофармацевтика, занятие 5  
Гемопоэтические факторы  
роста – Г-КСФ, ГМ-КСФ,  
эритропоэтины, тромбопоэтин

**Иван И. Воробьев, к.х.н.**  
[ptichman@gmail.com](mailto:ptichman@gmail.com)

МГУ, ФФМ  
16.04.13

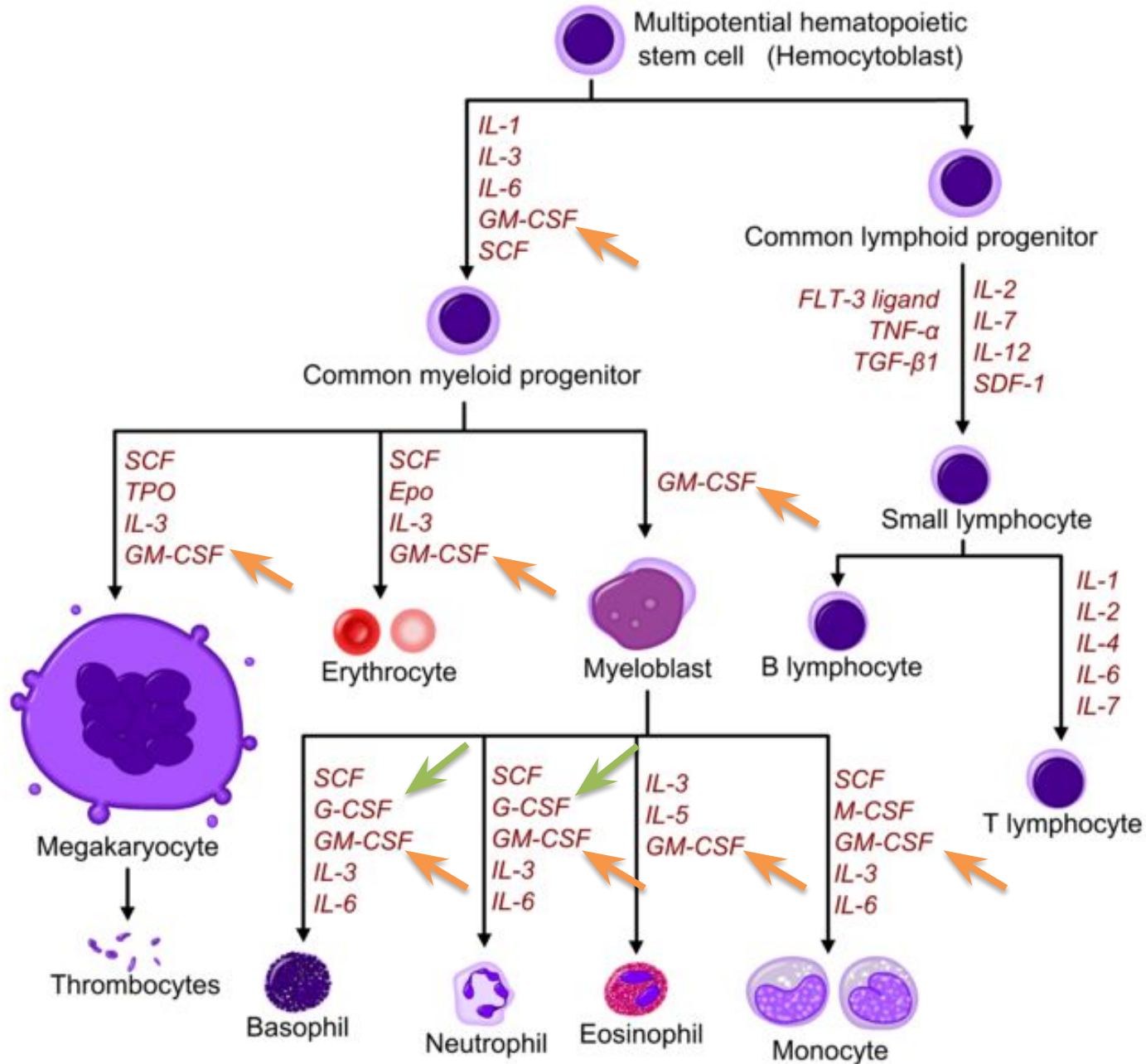
# Ростовые факторы

- Ростовые факторы – это белки, которые модулируют рост, деление и дифференцировку эукариотических клеток.
- Часть ростовых факторов относится к цитокинам (Г-КСФ, TGF- $\beta$ ), большинство – не цитокины.
- Каждый ростовой фактор является митогеном для большей или меньшей группы типов клеток.

# Лекарственные препараты ростовых факторов

Торговое название	МНН	Научное название	Показания	Производитель
Нейпоген	Филграстим	Г-КСФ	Нейтропения, вызванная химиотерапией и трансплантацией костного мозга	Amgen Inc.
Лейкин	Сарграмостим	ГМ-КСФ	Аутологичная траснплантация костного мозга, восстановление уровня нейтрофилов после трансплантации костного мозга	Berlex Labs
Неуластим	ПЭГ-филграстим	Г-КСФ	Нейтропения	Amgen
Erogen, Procrit	Эпоэтин альфа	ЭПО	Анемия	Amgen, Ortho Biotech
Рекормон	Эпоэтин бета	ЭПО	Анемия	Boehringer-Mannheim
Аранесп, Nespo	Дарбэпоэтин альфа	Аналог ЭПО	Анемия	Amgen, Dompe Biotec
Romiplostim	Romiplostim	ТПО-Fc	Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура	Amgen

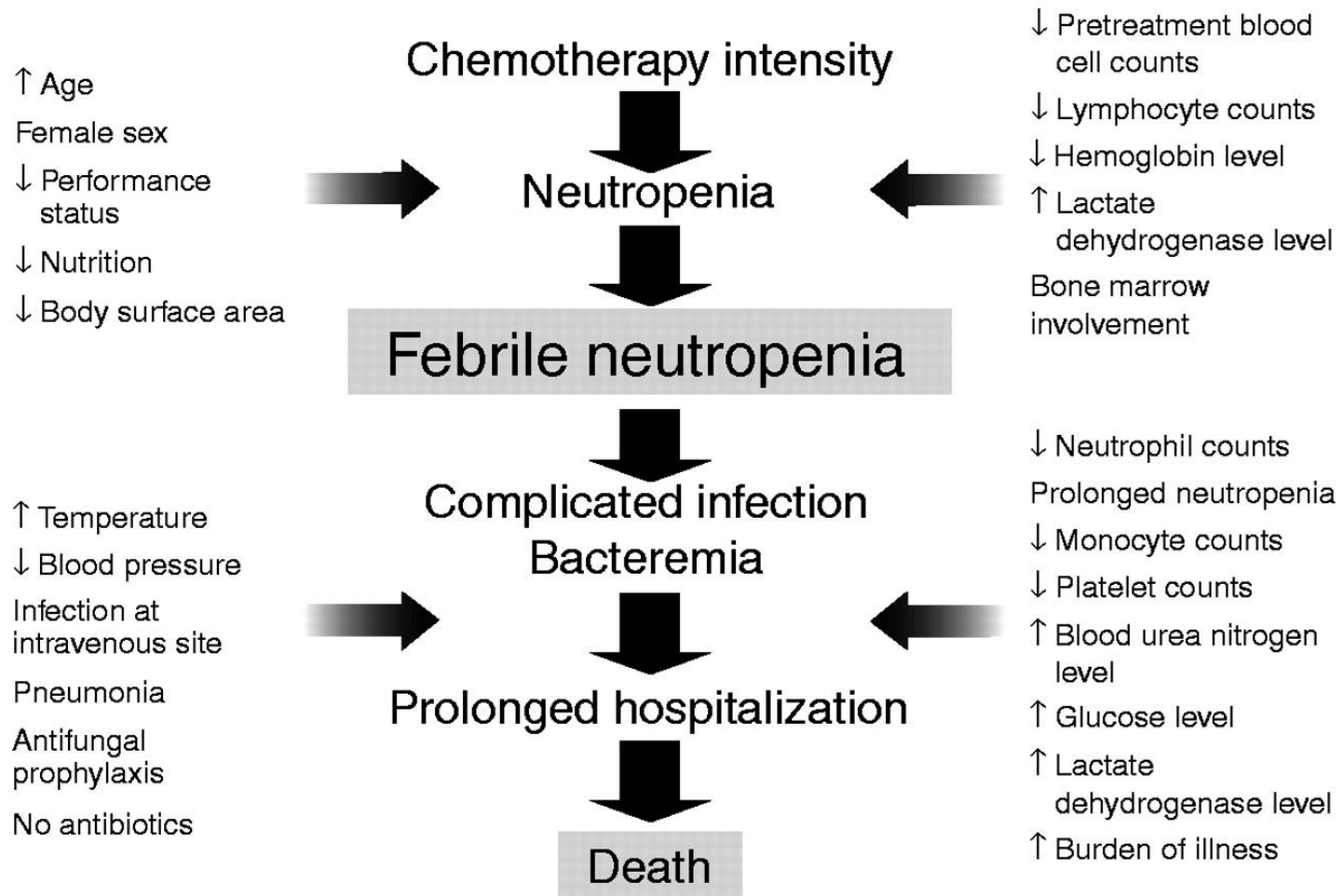
# Система кроветворения



# Нейтропения при химиотерапии

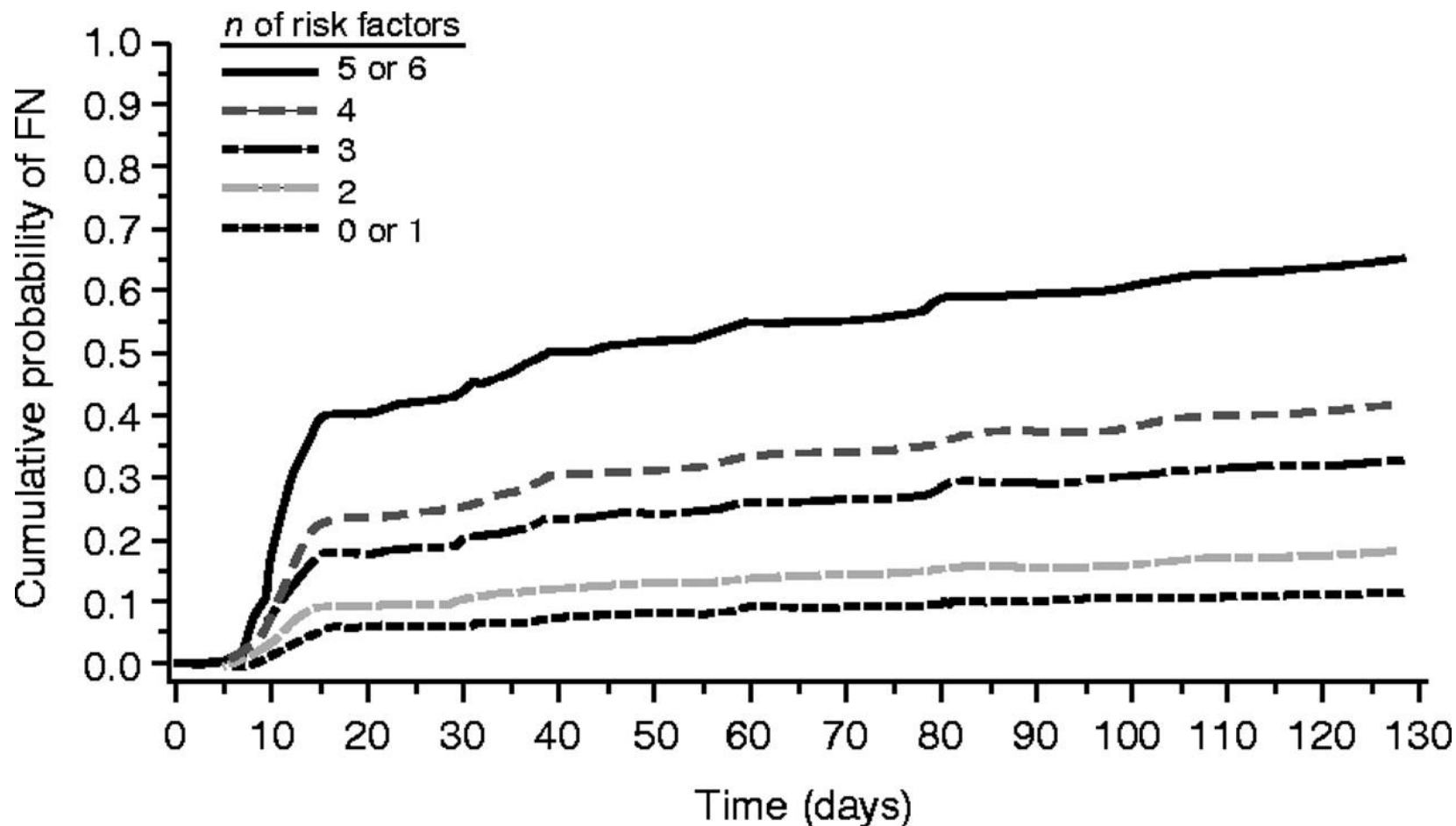
# Risk factors for chemotherapy-induced neutropenia and its complications identified from published clinical prediction models.

## The course of neutropenia and its complications



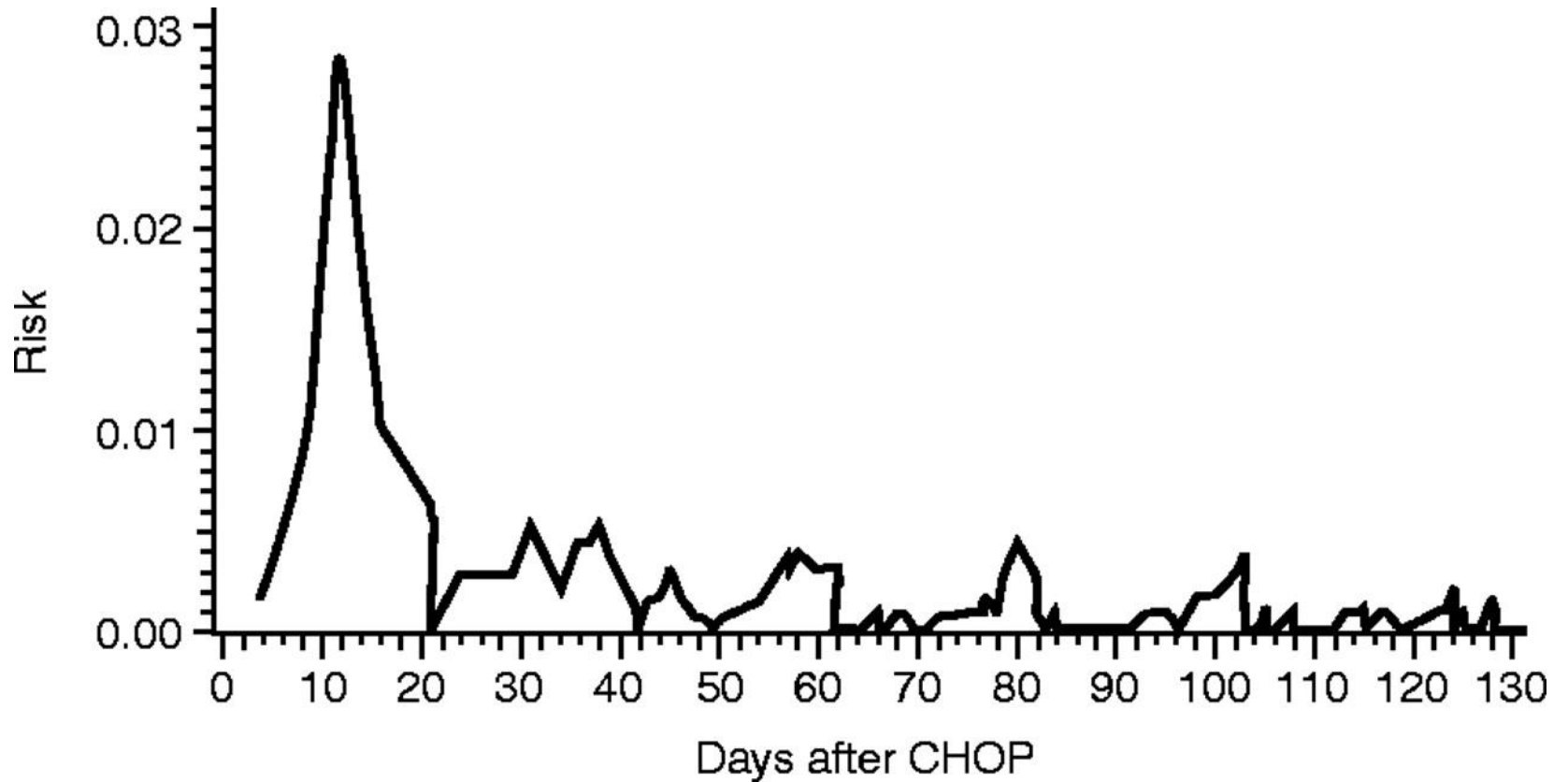
Lyman G H et al. *The Oncologist* 2005;10:427-437

# Cumulative probability of febrile neutropenia, by number of risk factors.



Lyman G H et al. The Oncologist 2005;10:427-437

# Risk of first episode of febrile neutropenia in patients with non-Hodgkin's lymphoma treated with CHOP chemotherapy.



Lyman G H et al. The Oncologist 2005;10:427-437



# Колониестимулирующие факторы

	Г-КСФ	М-КСФ	ГМ-КСФ
<b>Молекулярная масса (кДа)</b>	21	45–90	22
<b>Продуцирующие клетки</b>	Стромальные клетки КМ, Макрофаги, Фибробласты	Лимфоциты, Миобласты, Остеобласты, Моноциты, Фибробласты, Эндотелиальные клетки	Макрофаги, Т-лимфоциты, Фибробласты, Эндотелиальные клетки
<b>Регулируемые клетки</b>	Нейтрофилы, эндотелиальные клетки	Макрофаги и их предшественники	Гематopoэтические клетки- предшественники, гранулоциты, моноциты, эндотелиальные клетки, мегакариоциты, Т- лимфоциты, эритроидные клетки

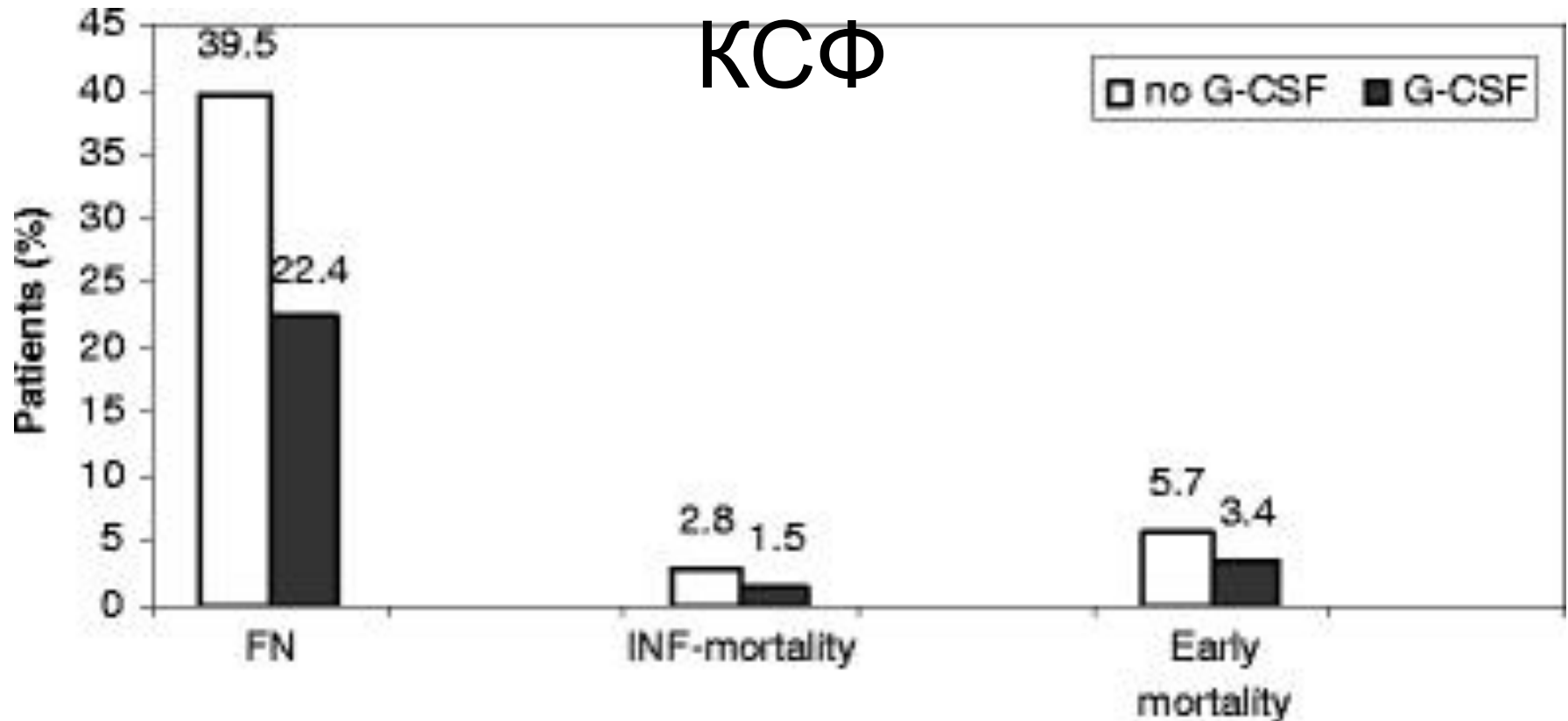
# Г-КСФ

- Синонимы – плюрипоэтин, CSF-β.
- 177 ак, 1 сайт O-гликозилирования, 2 дисульфидные связи, 1 свободный остаток Cys.
- Оригинальное лекарственное средство Г-КСФ, Нейпоген, получают в E.coli с дополнительным остатком Met[-1] в форме телец включения.
- Экстракция и очистка предположительно (патент США 5,849,883) включает в себя стадии солюбилизацию Г-КСФ детергентом саркозилем, окисление дисульфидных связей в присутствии CuSO<sub>4</sub>, удаление детергента хроматографией, очистку Г-КСФ катионообменной хроматографией и финишную диафильтрацию

# Лекформы и применение Г-КСФ

- Лиофилизат – 300 или 480 мкг Г-КСФ, 10 мМ ацетата натрия, 5% маннитола, 0,004% Твин-80. pH после растворения 4,0.
- Предзаполненные шприцы - 300 или 480 мкг Г-КСФ (600 мкг/мл). Для 300 мкг Г-КСФ 0,295 мг/мл ацетата; 0,0175 мг натрия; 25 мг сорбитола; 0.004% Твин-80.
- При введении п/к в дозе 5 мкг/кг  $C_{max}$ =2-8 ч,  $t_{1/2}$ =2-5 ч
- Типичный режим введения – ежедневно до достижения эффекта. Используется либо профилактически – для предотвращения развития нейтропении, либо для уменьшения продолжительности нейтропении

# Клиническая эффективность Г-КСФ



Efficacy of primary prophylactic granulocyte colony-stimulating factor (*G-CSF*; pegfilgrastim, filgrastim or lenograstim) versus placebo or no treatment in preventing febrile neutropenia (*FN*), infection-related mortality (*INF* mortality) and early mortality (all-cause, during chemotherapy) in 3,493 patients treated with chemotherapy for solid tumours or lymphoma. Results of a meta-analysis of 17 studies

# Фармацевтические препараты ГМ-КСФ

- Синонимы – плюрипоэтин- $\alpha$ , CSF- $\alpha$ .
- 127 ак, 1 сайт O-гликозилирования.
- Оригинальное лекарственное средство ГМ-КСФ, Лейкин, получают в *S.cerevisiae*, содержит замену Leu23Arg и лидерный пептид альфа-фактора дрожжей.
- Продукт секретируется в культуральную среду, выделение и очистка при помощи микрофльтрации, ультрафльтрации, ОФ-ВЭЖХ и ионообменной хроматографии
- Другие препараты ГМ-КСФ получают аналогично Г-КСФ

# Лекформы и применение Лейкин (ГМ-КСФ)

- Флаконы со стерильным раствором – 500 мкг/мл ГМ-КСФ, 40 мг/мл маннитол; 10 мг/мл сахароза; 1,2 мг/мл Трис, 11 мг/мл бензиловый спирт.
- При введении в/в в дозе 250 мкг/м<sup>2</sup>  $t_{1/2}=1$  ч
- Типичный режим введения – ежедневно до достижения эффекта. Используется при химиотерапии острого миелолейкоза и проведении трансплантации костного мозга

# Клиническая эффективность Лейкина (ГМ-КСФ)

Table 1			
Hematological Recovery (in Days): Induction			
Dataset	sargramostim n=52* Median (25%, 75%)	Placebo n=47 Median (25%,75%)	p-value†
ANC>500/mm3‡	13 (11, 16)	17 (13, 25)	0.009
ANC>1000/mm3§	14 (12, 18)	21 (13, 34)	0.003
PLT>20,000/mm3¶	11 (7, 14)	12 (9, >42)	0.10
RBC#	12 (9, 24)	14 (9, 42)	0.53

\* Patients with missing data censored.

† p=Generalized Wilcoxon

‡ 2 patients on sargramostim and 4 patients on placebo had missing values.

§ 2 patients on sargramostim and 3 patients on placebo had missing values.

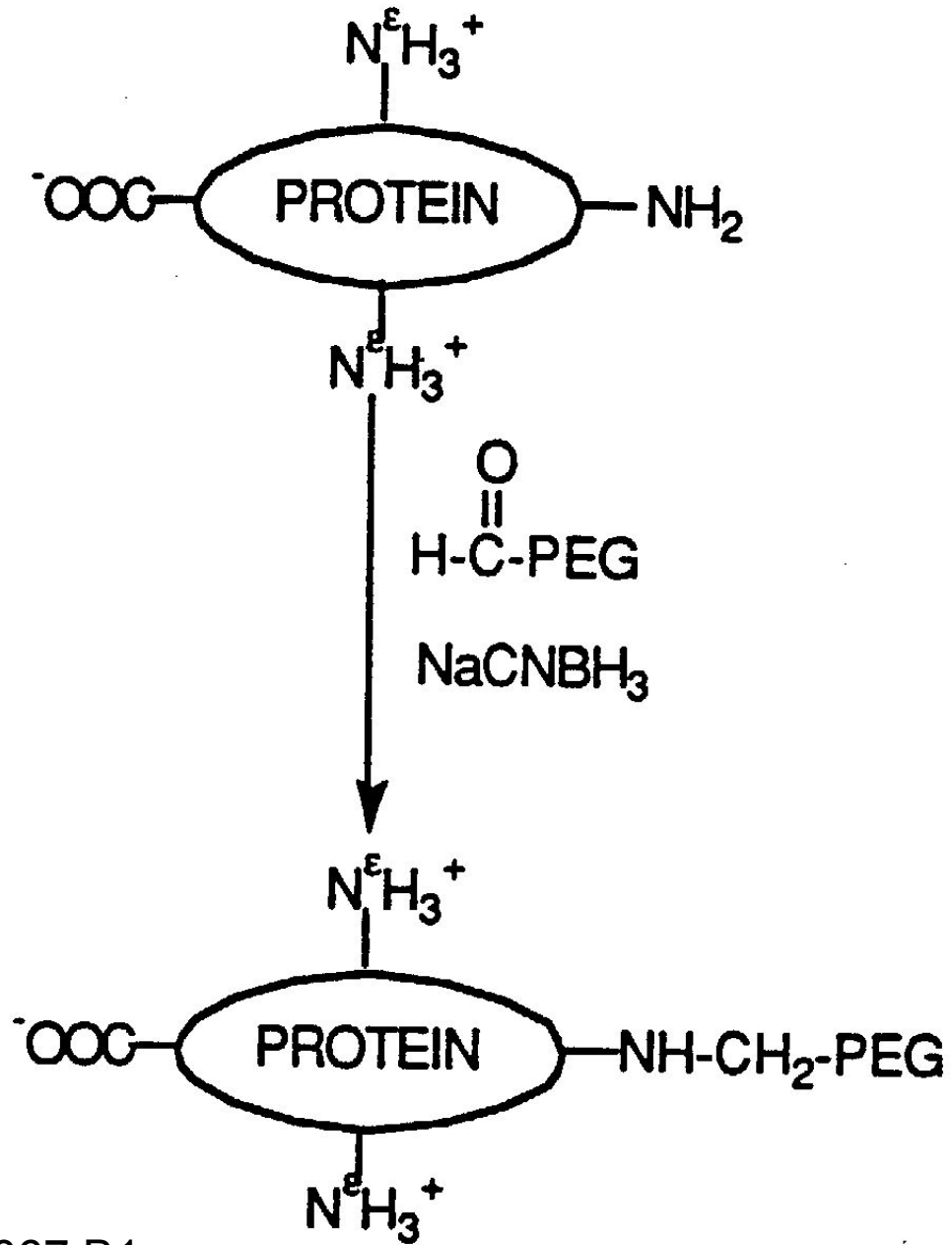
¶ 4 patients on placebo had missing values.

# 3 patients on sargramostim and 4 patients on placebo had missing values

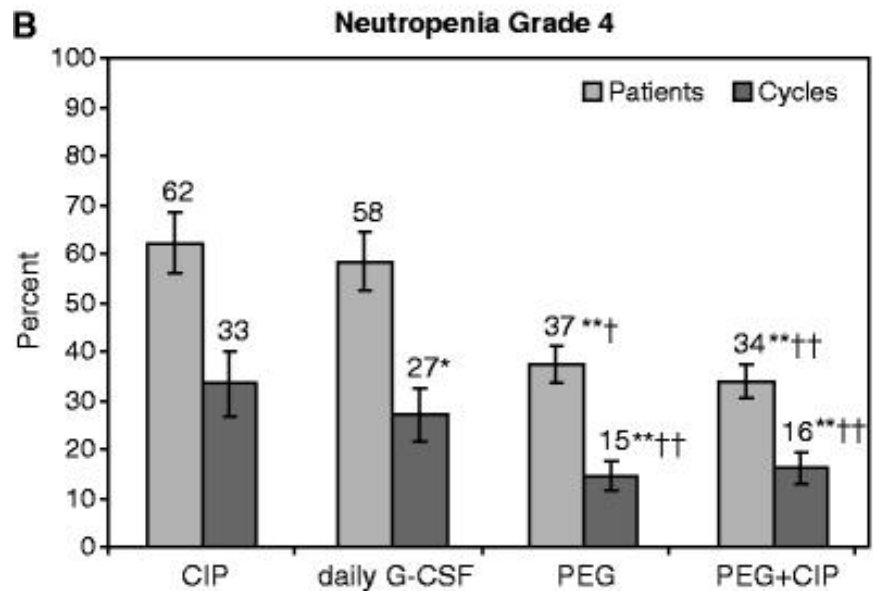
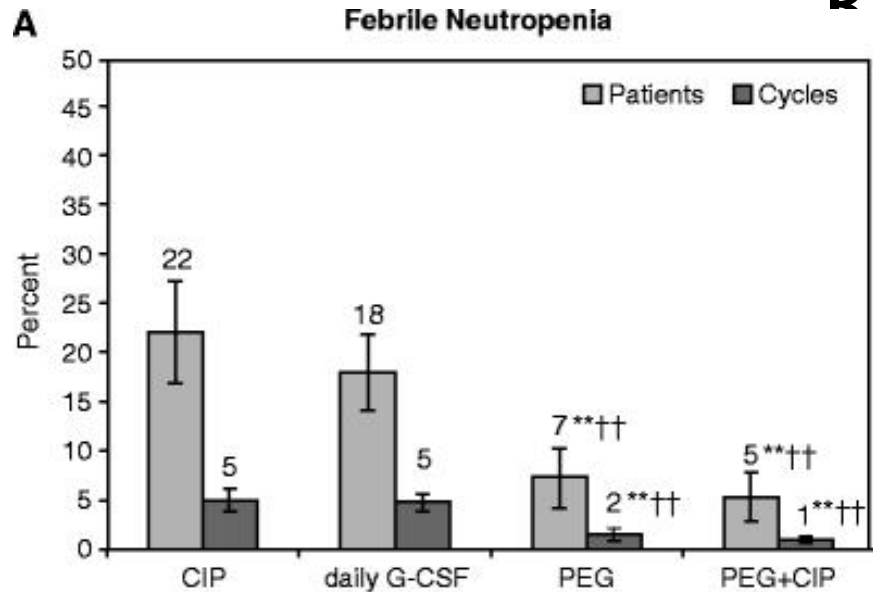
# Конъюгаты Г-КСФ с полиэтиленгликолем

- Получают конъюгацией Г-КСФ и линейного ПЭГ-альдегида 20 кДа, специфическое присоединение к N-концу белка.
- При введении п/к  $T_{1/2}=15-80$  ч.
- Специфически удалется из циркуляции при захвате и интернализации нейтрофилами.
- Применение – 1 доза 6 мг п/к на один цикл химиотерапии.





# Клиническая эффективность | Э | - | - КСФ

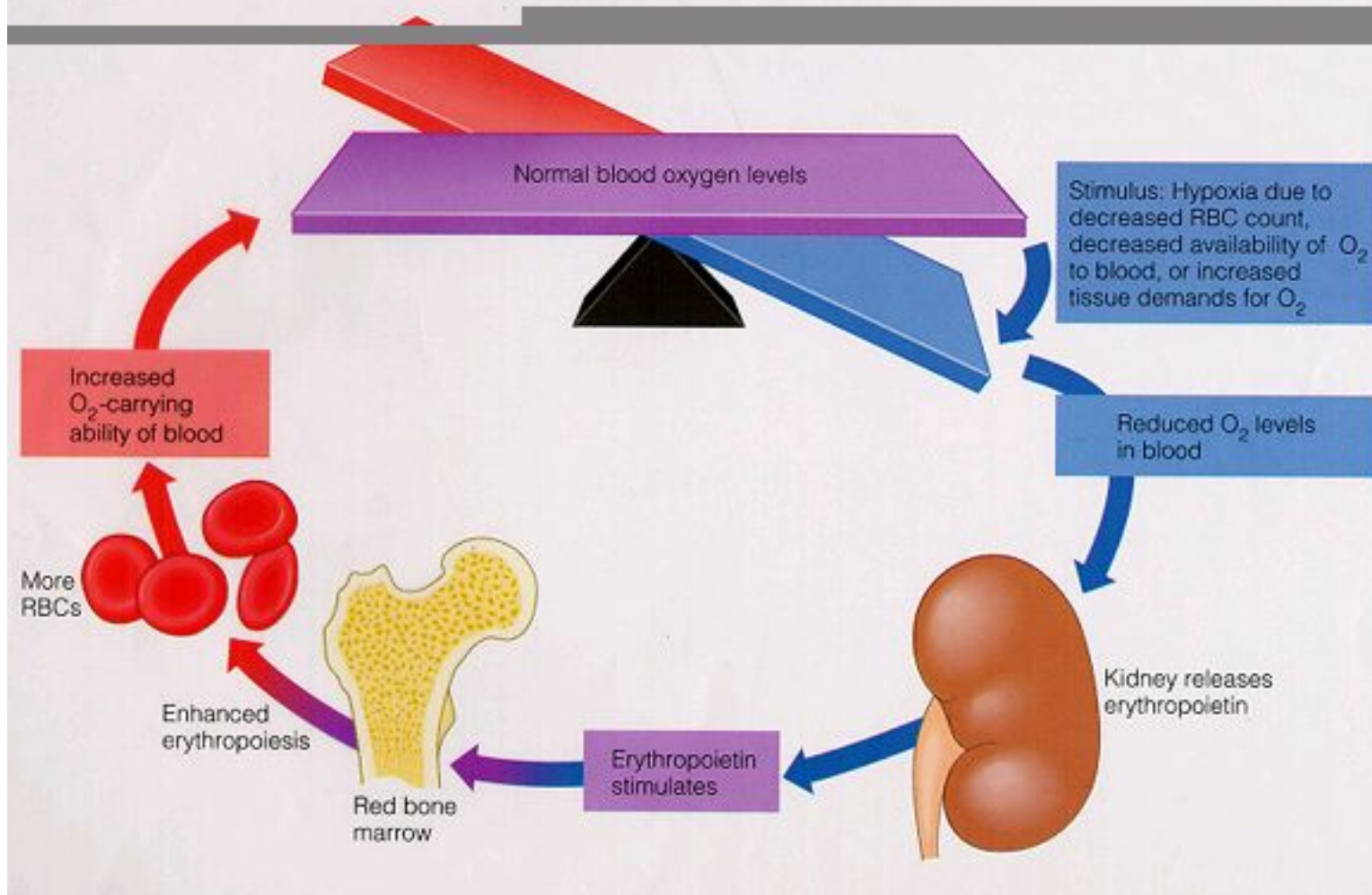


Comparison of febrile neutropenia and grade 4 neutropenia incidence per patient and per cycle in patients receiving TAC chemotherapy for early breast cancer, supported by different primary prophylactic regimens: ciprofloxacin 500 mg orally twice daily on days 5–14 ( $n = 253$  patients), daily granulocyte colony-stimulating factor (*G-CSF*; filgrastim 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  per day or lenograstim 150  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  per day) on days 5–10 ( $n = 374$ ), pegfilgrastim (*PEG*) 6 mg on day 2 ( $n = 303$ ) or pegfilgrastim plus ciprofloxacin (*PEG + CIP*;  $n = 314$ ) [33].  $*p < 0.01$ ,  $**p < 0.001$  versus CIP;  $\dagger p < 0.01$ ,  $\dagger\dagger p < 0.001$  versus daily G-CSF.

Minckwitz G et al. Pegfilgrastim +/- ciprofloxacin for primary prophylaxis with TAC (docetaxel/doxorubicin/cyclophosphamide) chemotherapy for breast cancer. Results from the GEPARTRIO study. *Ann Oncol.* 2008;19:292–298.

# Анемия при хронической почечной недостаточности

Erythropoietin mechanism for regulating the rate of erythropoiesis (Figure 18.6)



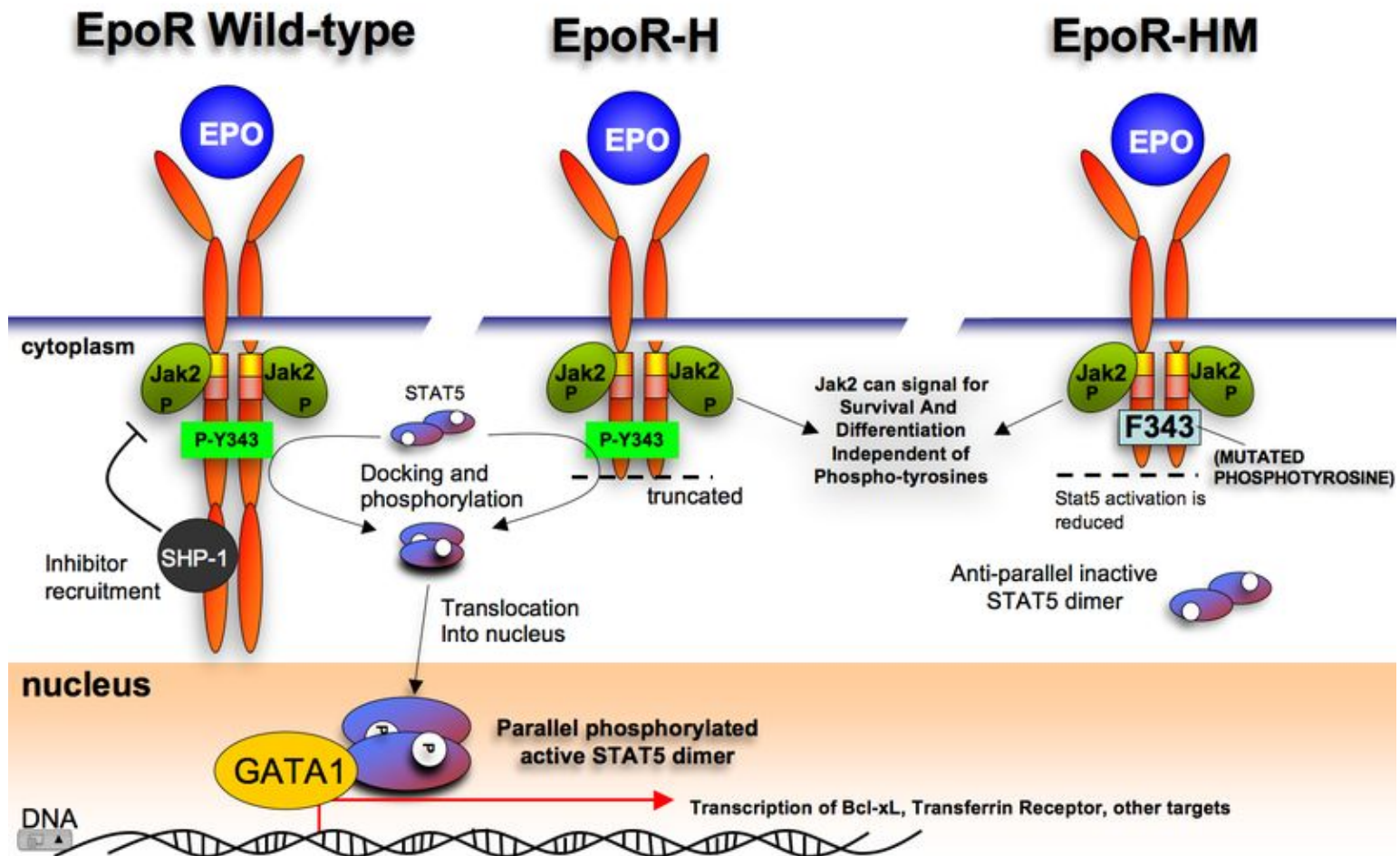
# Эритропоэтин



- Четырехспиральный цитокин, является полноценным гормоном, действует эндокринно.
- 165 а.к., 36 кДа, 3 сайта N-гликозилирования.
- T<sub>1/2</sub> для природного ЭПО 4-6 ч.
- Негликозилированный ЭПО неактивен *in vivo*, но полностью активен *in vitro*.
- При удалении остатков сиаловых кислот t<sub>1/2</sub>=2 мин за счет связывания с

# ЭПО - взаимодействие с рецептором и передача сигнала

## Truncated Epo Receptors



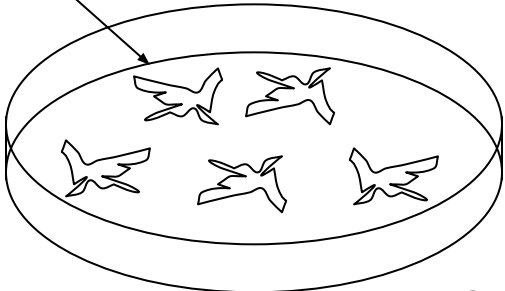
# Методы получения линий- продуцентов рекомбинантного эритропоэтина

# Methotrexate (MTX) Selection

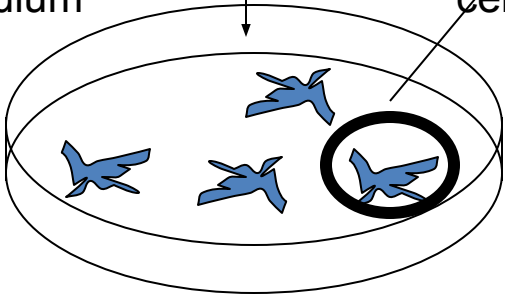
Gene of interest DHFR



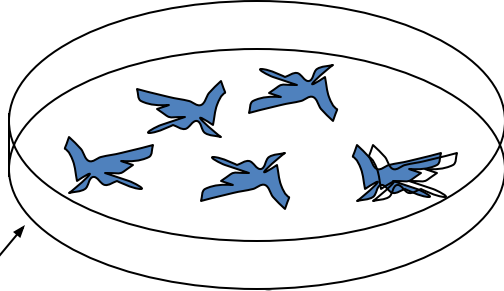
Transfect  
dfhr<sup>-</sup> cells



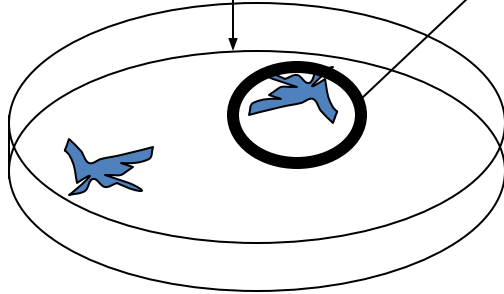
Grow in  
Nucleoside  
Free medium



Culture a  
Colony of  
cells

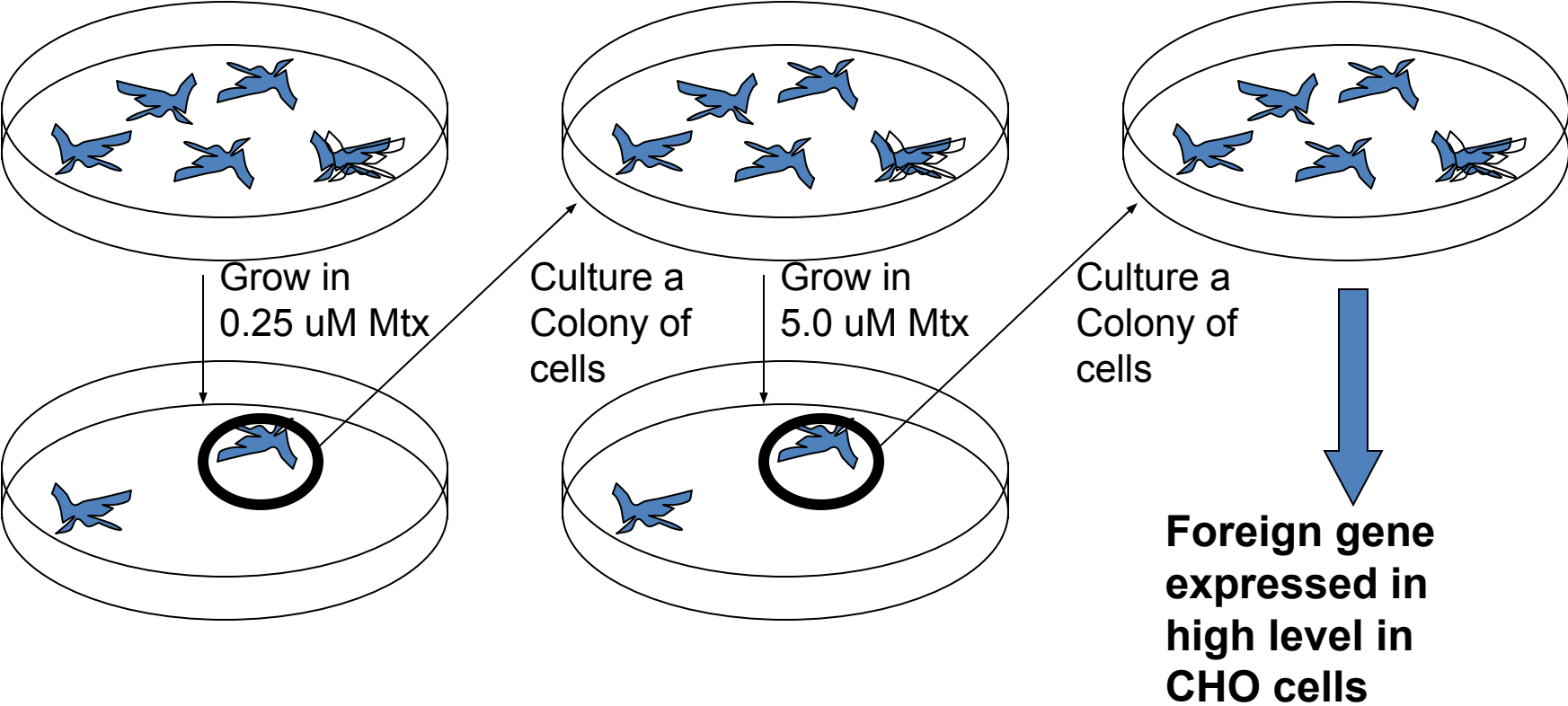


Grow in  
0.05  $\mu$ M Mtx



Culture a  
Colony of  
cells

# Methotrexate (MTX) Selection

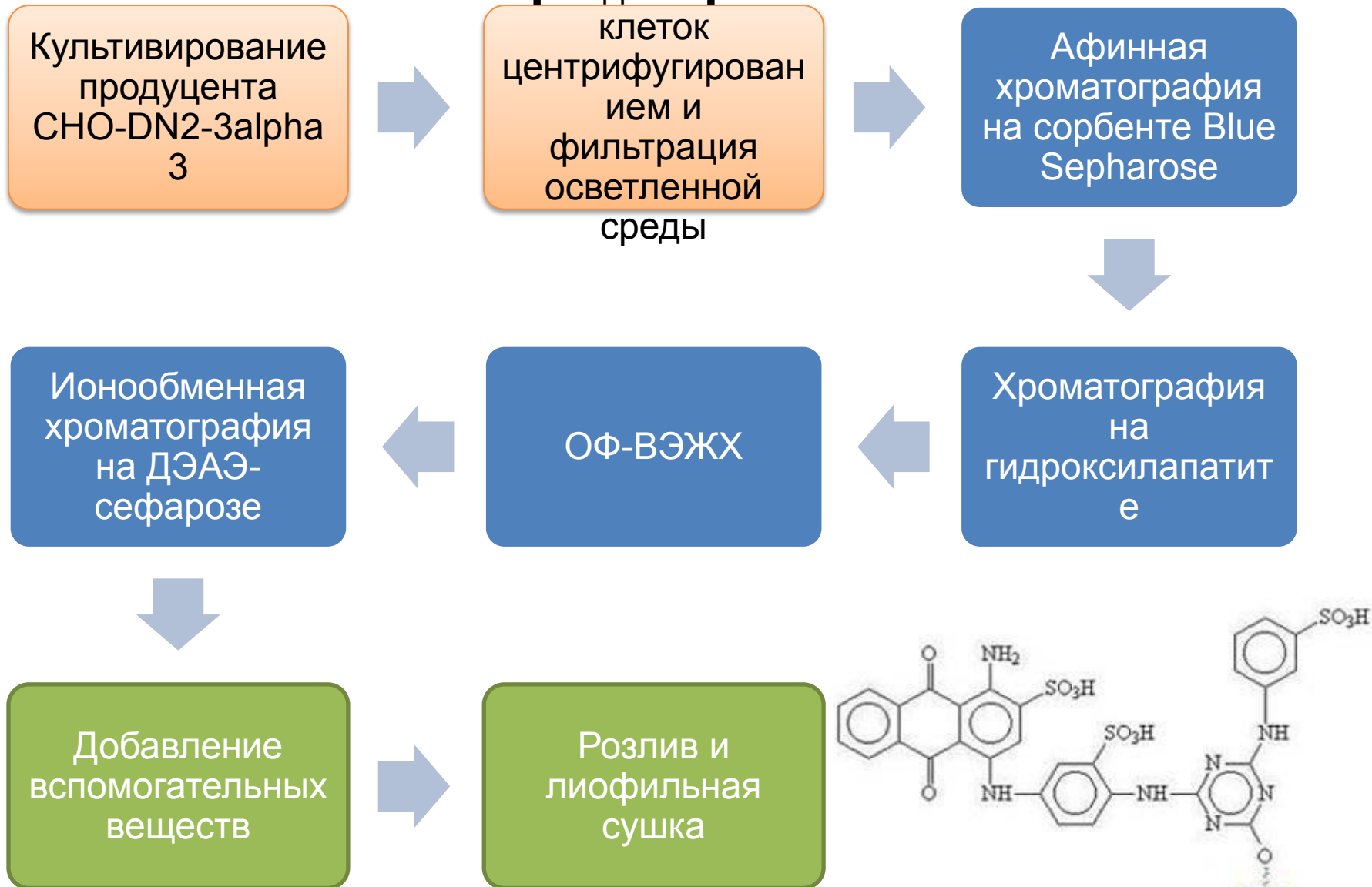




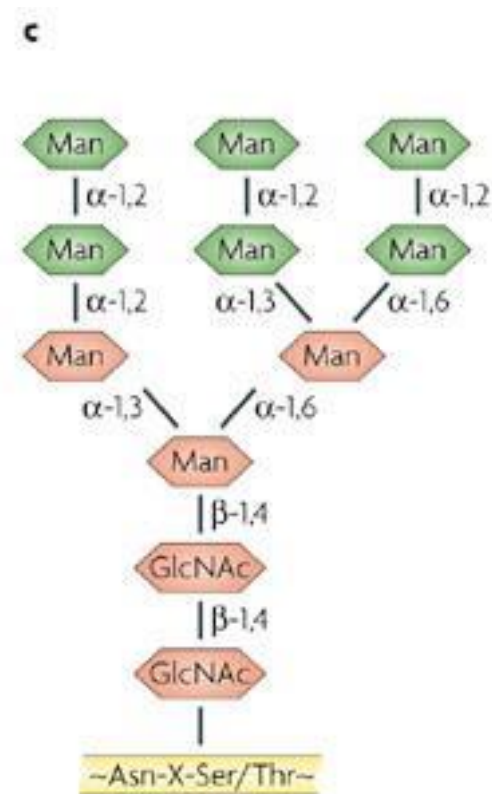
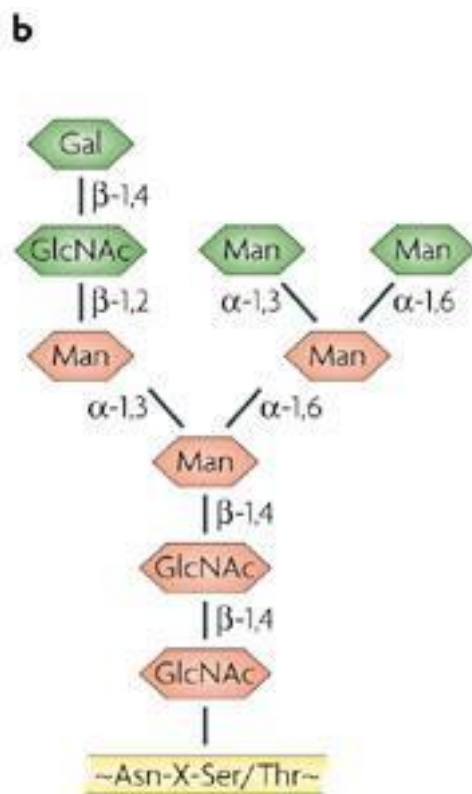
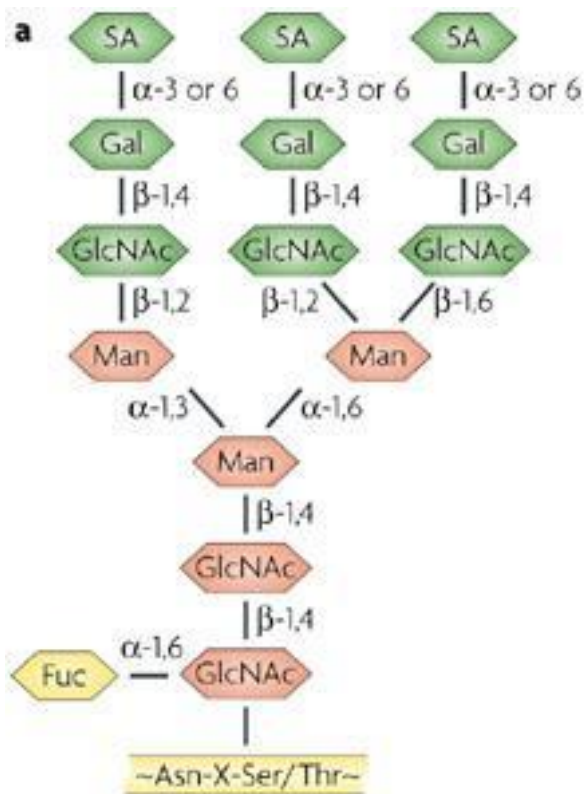
# Неорекормон – эпоэтин бета

- Неорекормон – рекомбинантный эритропоэтин, впервые одобрен в ЕС в 1997 г. для терапии анемии, вызванной хронической почечной недостаточностью и химиотерапией онкологических заболеваний.
- Лекарственные формы – лиофилизат в дозах 500–10 000 МЕ, вспомогательные вещества – фосфат натрия, хлорид натрия, хлорид кальция, мочевины, Твин-20, аминокислоты.
- При в/в введении  $t_{1/2} = 4–12$  ч, при п/к введении  $t_{1/2} = 8–22$  ч
- 1-3 инъекции в неделю
- Побочные эффекты – увеличение АД, инфекции дыхательных путей и увеличение числа тромбоцитов

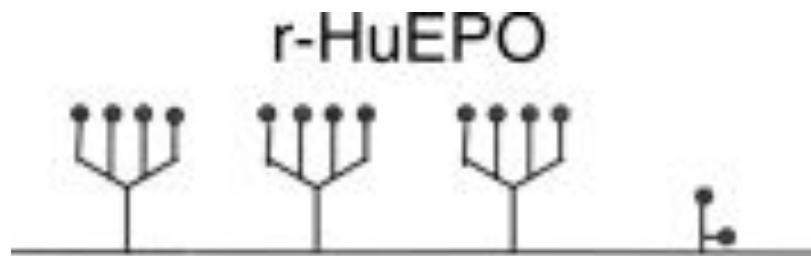
# Процесс производства Неорекормон



# Взаимосвязь структуры гликанов и фармакокинетики ЭПО

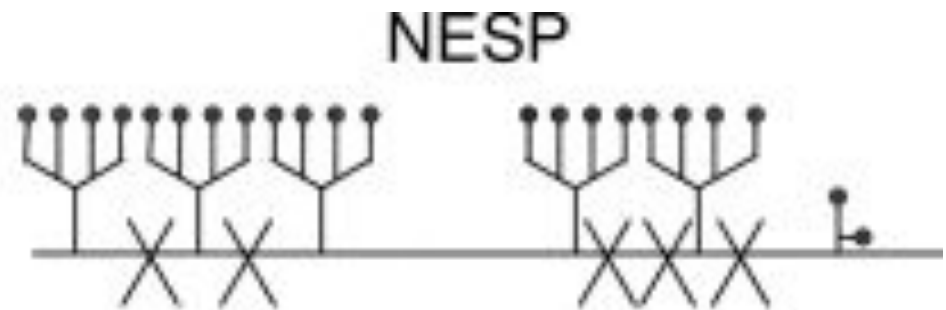


# Дарбэпоэтин альфа



- 3 N-linked CHO chains
- $\leq 14$  sialic acid residues
- 30,400 daltons
- 40% carbohydrate

$t_{1/2} = 8-22$  ч



- 5 N-linked CHO chains
- $\leq 22$  sialic acid residues
- 38,500 daltons
- 52% carbohydrate

$t_{1/2} = 74$  ч

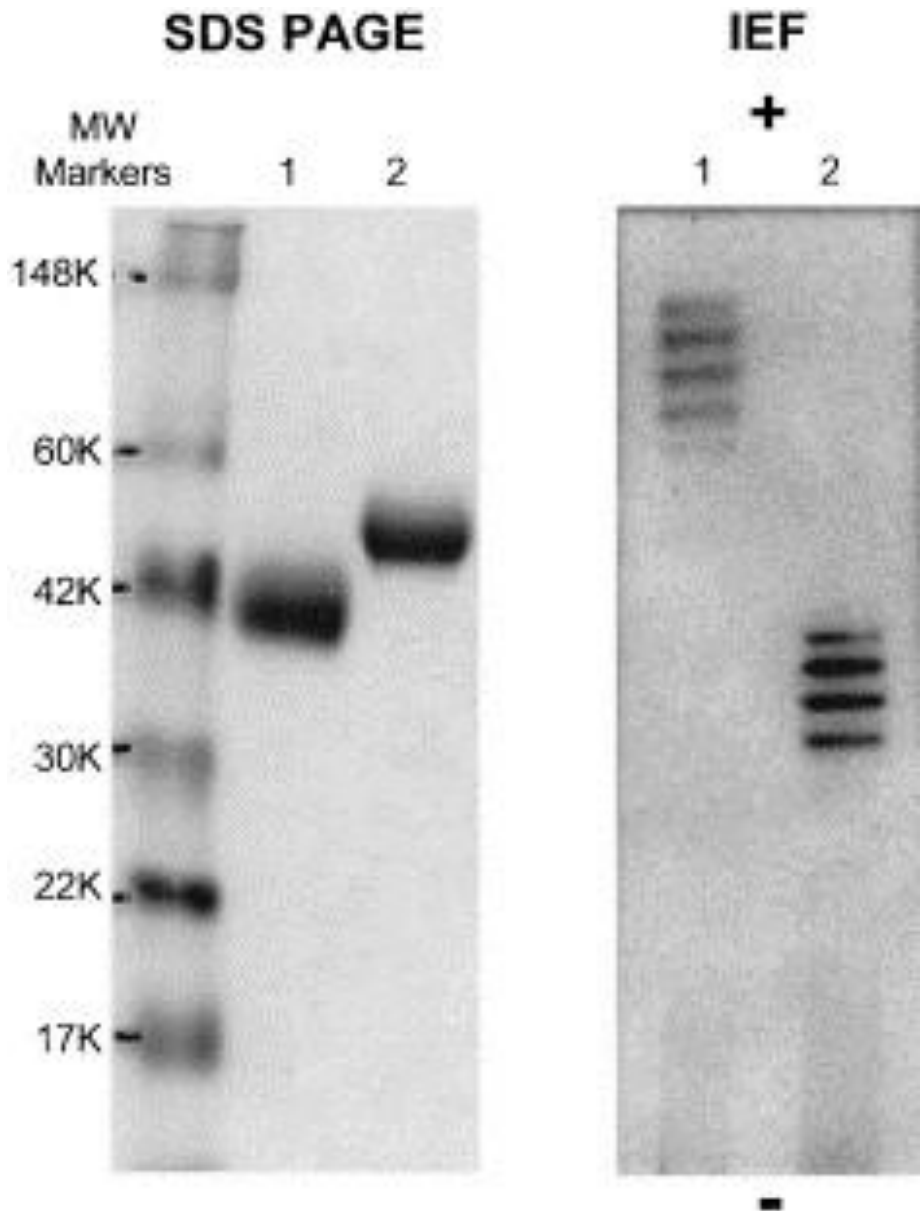


Figure 1. Comparison of darbepoetin alfa and rHuEPO by SDS-PAGE and IEF. SDS-PAGE analysis of 1  $\mu$ g each of rHuEPO (Lane 1) and darbepoetin alfa (Lane 2) was performed on a 14% polyacrylamide gel under reducing conditions. The proteins were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue. IEF analysis over the pH range of 2 to 10 was performed on a thin-layer 7.5% polyacrylamide gel in the presence of urea. The IEF gel was run with  $1.5 \times 10^6$  cpm each of  $^{125}$ I-darbepoetin alfa (Lane 1) and  $^{125}$ I-rHuEPO (Lane 2) and the proteins were visualized by autoradiography. The cathode (+) is at the top of the gel.

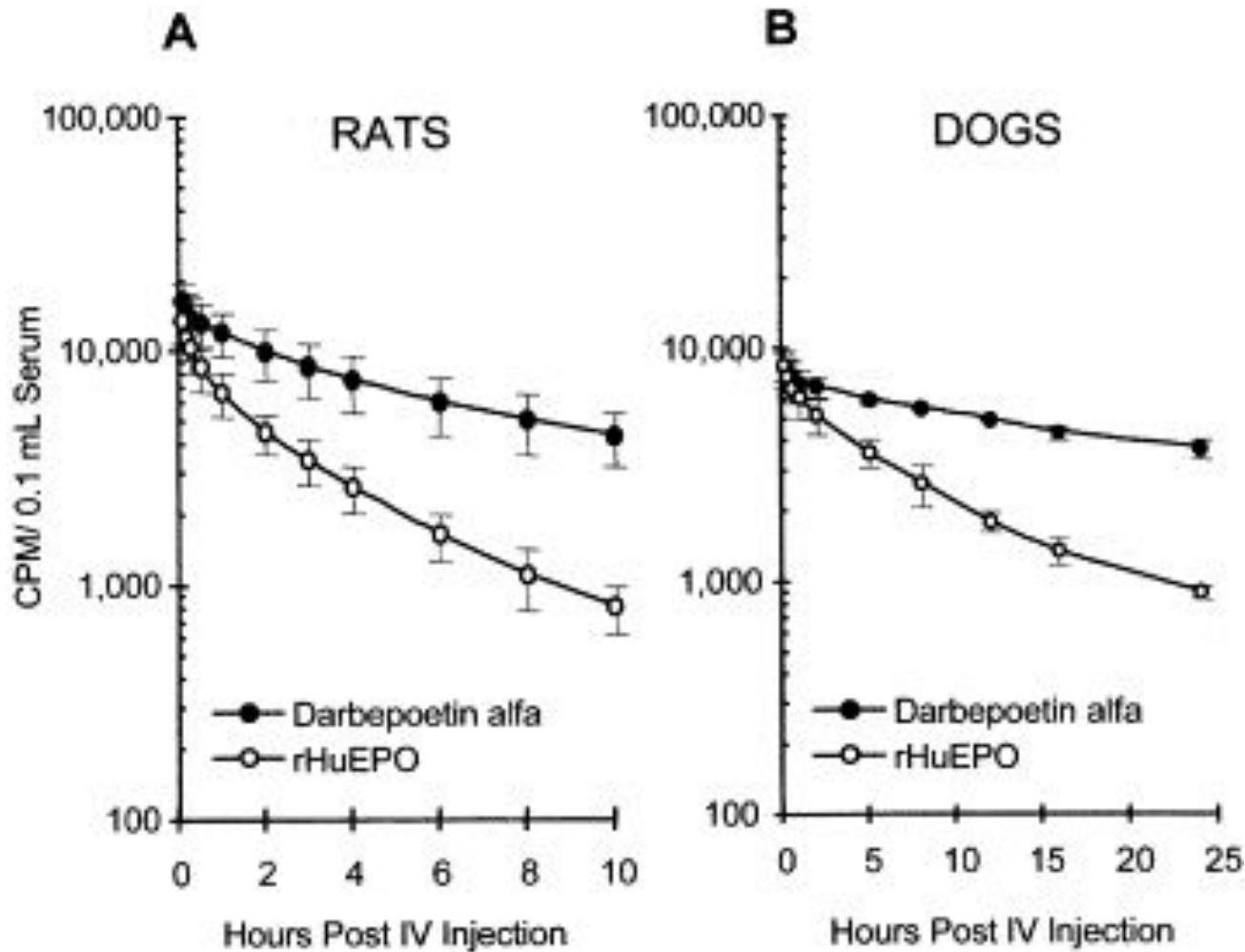


Figure 2. Comparative IV pharmacokinetics of darbepoetin alfa and rHuEPO in rats **(A)** and dogs **(B)**. Iodinated darbepoetin alfa and rHuEPO (~3.3  $\mu\text{Ci}/\text{kg}$ ; ~0.05  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of each test compound) were each injected by IV bolus into cannulated rats (5 and 6 rats/group for darbepoetin alfa and rHuEPO, respectively) or dogs (2 dogs/group) and the amount of ethanol-precipitable test material in 0.1 mL of serum was determined at the indicated time points. Results are expressed as the group mean ( $\pm$  SD).

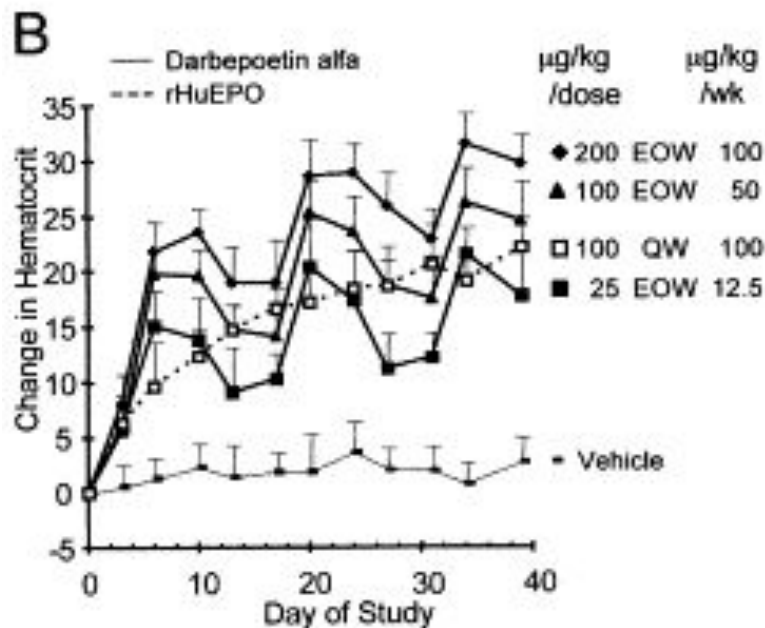
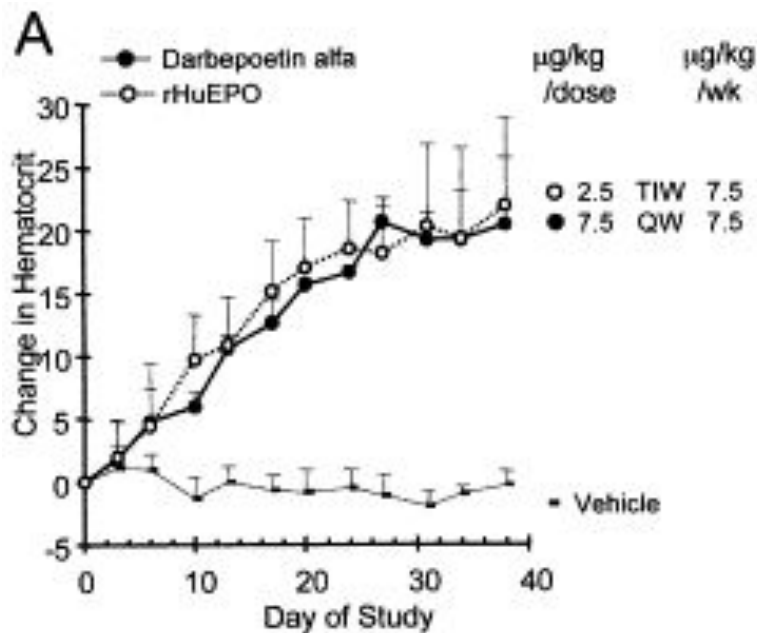
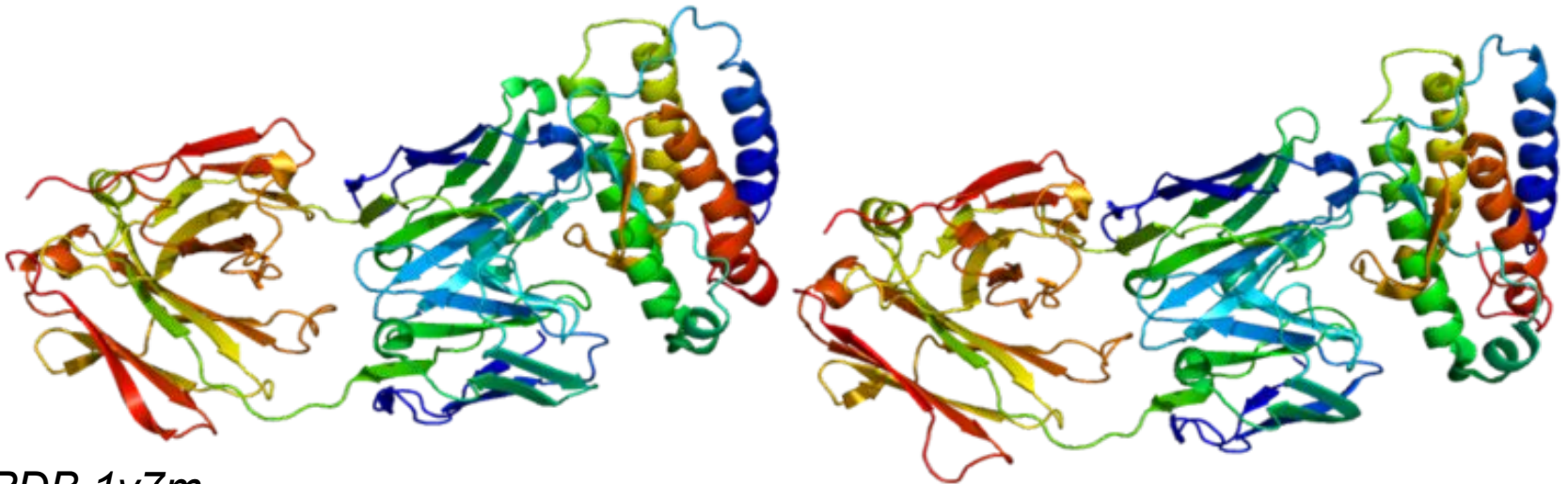


Figure 6. Darbepoetin alfa can be administered less frequently than rHuEPO. **(A)** Groups of CD-1 mice were injected IP with 7.5  $\mu\text{g}$  of peptide/kg/dose of darbepoetin alfa QW [один раз в неделю], 2.5  $\mu\text{g}$  of peptide/kg/dose of rHuEPO TIW [3 раза в неделю], or vehicle control TIW, for 38 days. There were 8 mice/group for darbepoetin alfa, 10 mice/group for rHuEPO, and 6 mice/group for the vehicle control. **(B)** Groups of CD-1 mice were injected IV with varying dose levels of darbepoetin alfa once every other week (EOW), or with 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of rHuEPO QW or vehicle control QW for 39 days. Dose levels ( $\mu\text{g}$  of peptide/kg) are indicated both as the dose per administration and as the equivalent dose per week. There were 10 mice in each group. For both A and B, hematocrit determinations were performed at baseline and twice weekly thereafter. Data are from a representative experiment and are the group mean change in hematocrit ( $\pm$  SD).

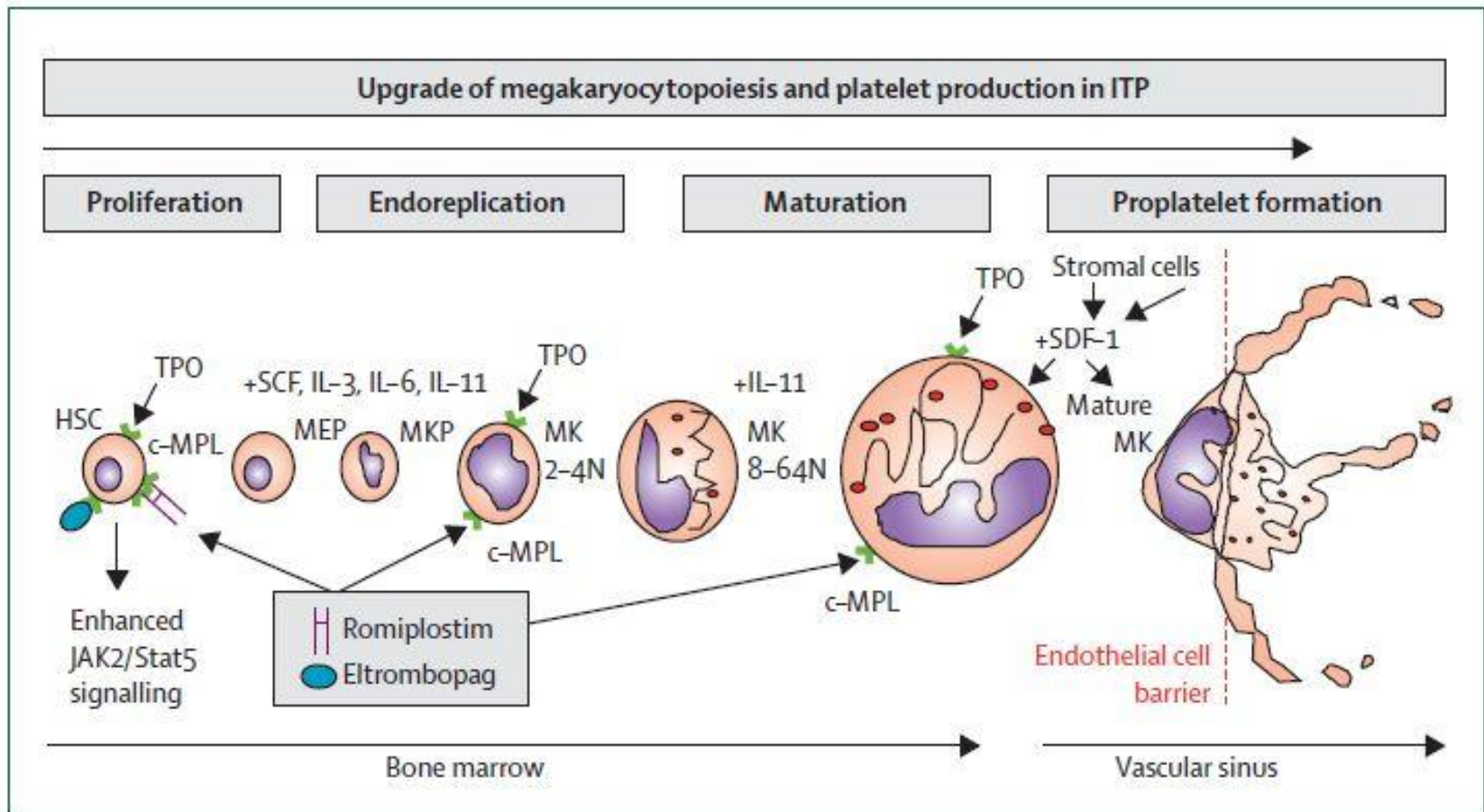
# Тромбопоэтин

- Тромбопоэтин человека (ТПО) - 332 а.к., 60 кДа, 6 сайтов N-гликозилирования в C-концевой области.
- N-концевой домен схож с ЭПО и отвечает за взаимодействие с рецептором.
- ТПО – основной регулятор дифференцировки мегакариоцитов в тромбоциты.



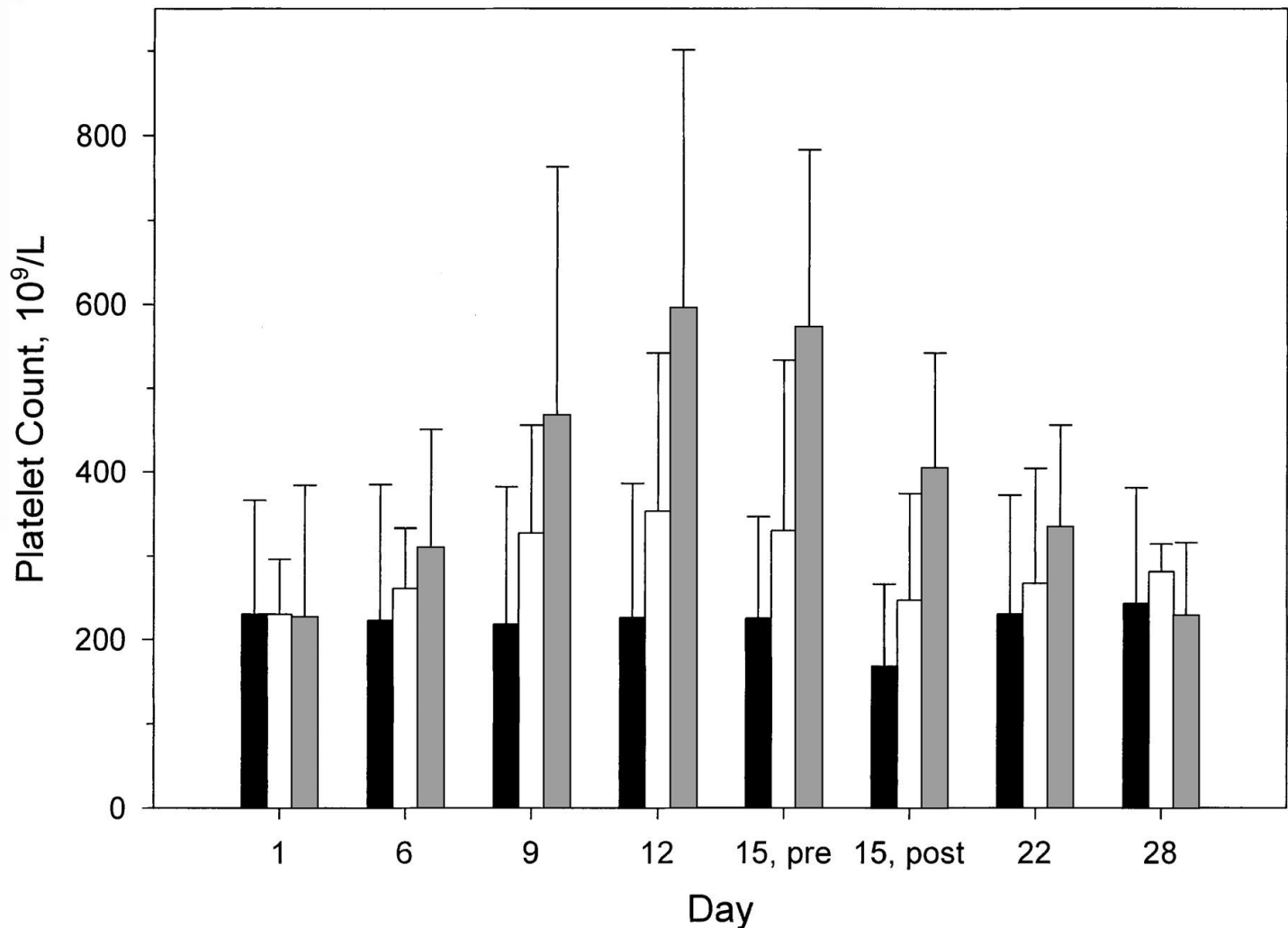
*PDB 1v7m*





**Figure:** Scheme of megakaryocytopoiesis and platelet production in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) Haemopoietic stem cells (HSC) are mobilised and megakaryocyte (MK) and erythroid progenitors (MEP) accumulate with MK-committed progenitors (MKP) giving rise to mature MKs under control of thrombopoietin (TPO) working with chemokines, cytokines, and growth factors including stem-cell factor (SCF) and interleukin (IL)-3, IL-6, and IL-11. Endoreplication results in ploidy changes in MKs and increased chromosome number (up to 64N). Mature MKs migrate to the endothelial cell barrier delimiting the vascular sinus and, under the influence of stromal-derived factor-1 (SDF-1), give rise to proplatelets that protrude into the circulation and produce large numbers of platelets under haemodynamic determinants. Therapeutically given romiplostim and eltrombopag enter the marrow and join with TPO to stimulate megakaryocytopoiesis and platelet production.

The platelet count rises in a dose-dependent manner following the administration of PEG-rHuMGDF to apheresis donors. The response of the donor median platelet count (+ SD) to placebo (□), 1 µg/kg PEG-rHuMGDF (■), or 3 µg/kg PEG-rHuMGDF (▨) administration.



Kuter D J et al. Blood 2001;98:1339-1345

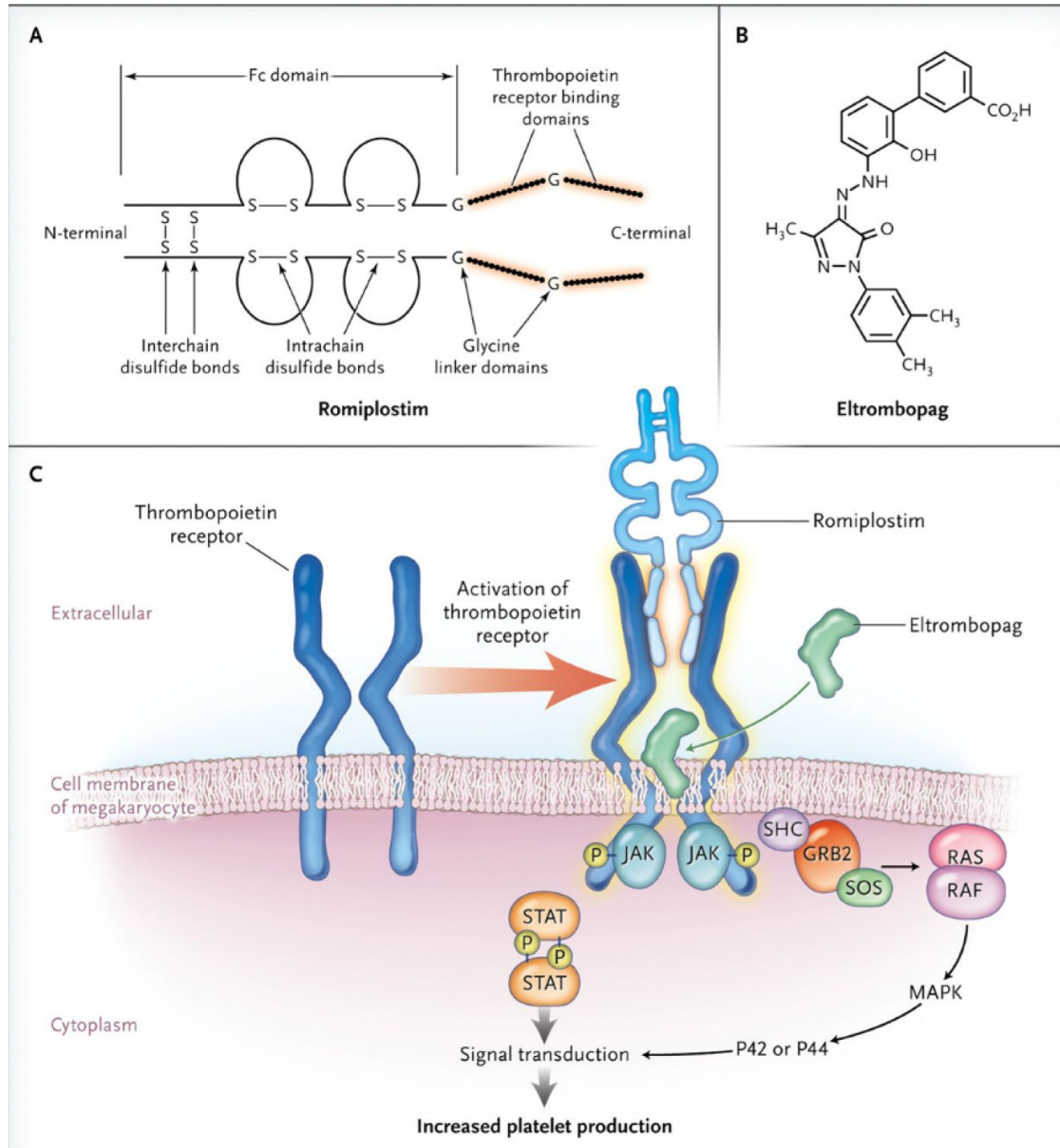
**MGDF = megakaryocyte growth and development factor**

# Аналоги ТПО

L-methionyl[human immunoglobulin heavy constant gamma 1-(227 C-terminal residues)-peptide (Fc fragment)] fusion protein with 41 amino acids peptide, (7-7':10,10')-bisdisulfide dimer

## Romiplostim

Вводят п/к 1 раз в неделю, цель >50 тыс Тц/мкл  
Показания - Идиопатическая  
тромбоцитопеническая пурпура. Д69.3



3'-{(2Z)-2-[1-(3,4-dimethylphenyl)-3-methyl-5-oxo-1,5-dihydro-4H-pyrazol-4-ylidene]hydrazino}-2'-hydroxy-3-biphenylcarboxylic acid

## Eltrombopag

## Следующее занятие 6

# Факторы роста – ЭФР, тромбоцитарный фактор роста, ФРФ, ТРФ, нейротрофные ростовые факторы

- Эпидермальный фактор роста, рецептор ЭФР
- Тромбоцитарный фактор роста, рецептор ТцФР и путь передачи сигнала, ТцФР при заживлении ран, лекарственные формы ТцФР и канцерогенез.
- Семейство факторов роста фибробластов. Палифермин (ФГФ-7) и его рецептор.
- Трансформирующие ростовые факторы.
- Нейротрофные ростовые факторы, рецепторы, роль при нейродегенеративных заболеваниях