

Cytokiny

Obsah

- Definice cytokinu
- Dělení
- Funkční charakteristiky
- Mechanismus působení
- Využití v medicíně
 - Interferony
 - Interleukiny
 - Růstové faktory
 - Další

Definice

- V průběhu posledních 10-20 let se mění pohled
- Menší proteiny 5-20 kDa
- Produkce izolovanými buňkami (ne žlázou)
- Dramatické změny koncentrací (pM – nM)
- Řídí nejen imunitní odpovědi (IF, IL), ale i základní vývojové a růstové procesy (FGF)
- Funkce přes specializované receptory

Dělení

- Funkce
- Struktura
- Receptory
- Produkční buňky

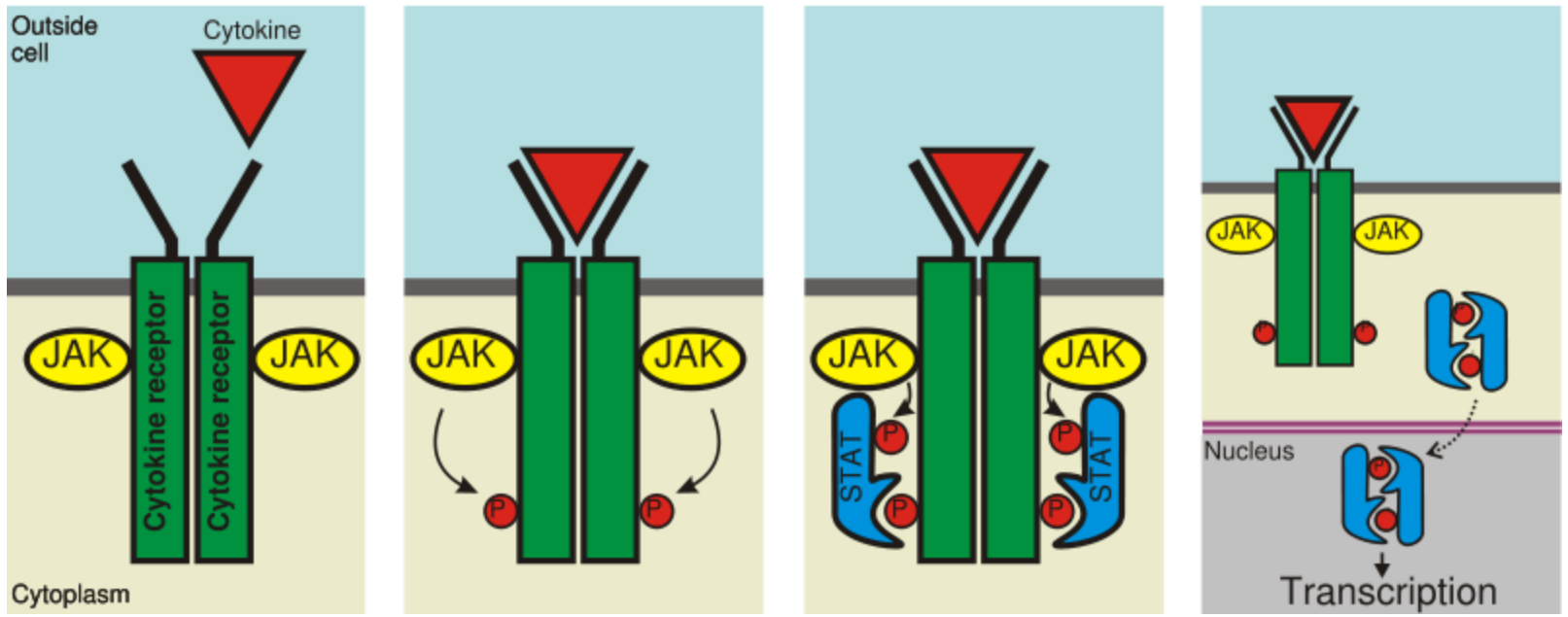
- Jedno z možných :
 - Interleukiny (T-helper cells)
 - Lymphokiny (Lymfocyty)
 - Monokiny (Monocyty)
 - Interferony (antivirální aktivita)
 - Kolonie stimulující faktory (podpora růstu)
 - Chemokiny (chemotaxe)

Český ekvivalent	Angl. název	Mezinár. používaná zkratka
Interleukiny	Interleukins	IL-1 až IL-15
Interferony	Interferons	IFN- α , - β , - γ , - τ , - ω
Faktory stimující kolonie	Colony stimulating factors	G-CSF, M-CSF, GM-CSF
Tumorový nekrotický faktor	Tumor necrosis factor	TNF- α , - β
Neurotropiny	Neurotrophins	NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5
Ciliární neurotropní faktor	Ciliary neurotrophic factor	CNTF
Neurotropní faktor odvozený od gliálních buněk	Glial cell-derived Neurotrophic factor	GDNF
Epidermální růstový faktor	Epidermal growth factor	EGF
Erythropoetin	Erythropoietin	EPO
Růstový faktor fibroblastů	Fibroblast growth factor	FGF
Leukemický inhibující faktor	Leukaemia inhibitory factor	LIF
Makrofágové zánětlivé proteiny	Macrophage inflammatory proteins	MIP-1 α , -1 β , -2
Růstový faktor odvozený od krevních destiček	Platelet-derived growth factor	PDGF
Transformující růstový faktor	Transforming growth factors	TGF- α , - β
Trombopoetin	Thrombopoietin	TPO

G – CSF granulocyte CSF, M-CSF – macrophage CSF, GM – granulocyte-macrophage CSF, NGF – nerve growth factor, BDNF – brain-derived neurotrophic factor, NT – neurotrophic factor.

Mechanismus působení

- INF – JAK-STAT
- IL – JAK-STAT,
- TNF – NFkappaB, MAPK
- EGF – MAPK, Akt, JNK
-



Funkce

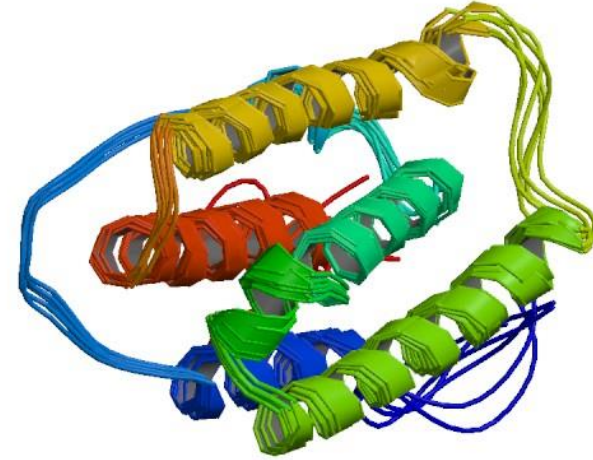
- Uvolněny z různých typů buněk
- Interakce s receptory buněk (auto, para, endo)
- Overstimulation – „cytoniková bouře“ viz testování TGN1412 (protilátka proti CD28 – systemické uvolnění cytokinů, fatální následky, 2006)
- Receptory strukturně z několika tříd
 - Ig superfamily (IL-1)
 - Receptory hemopoetických růstových faktorů (IL-2)
 - Interferon family
 - TNF family
 - 7 transmembránových helixů family – G-proteiny

Hlavní typy interferonů

- Interferon α
- Interferon β
- Interferon γ
- Regulace imunitního systému, antivirální resistance, regulace růstu mnoha buněčných typů, udržení plodu v ranných fázích

Interferon α

- Značná mezidruhová odlišnost – není vhodný zvířecí model pro testování
 - Použití myši s implantovaným lidským nádorem
 - Použití MDCK buněk
- Primární experimenty prokázaly aktivity v oblasti léčby rakoviny a infekčních onemocnění
- Existuje INF α – 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 21 – vysoká homologie

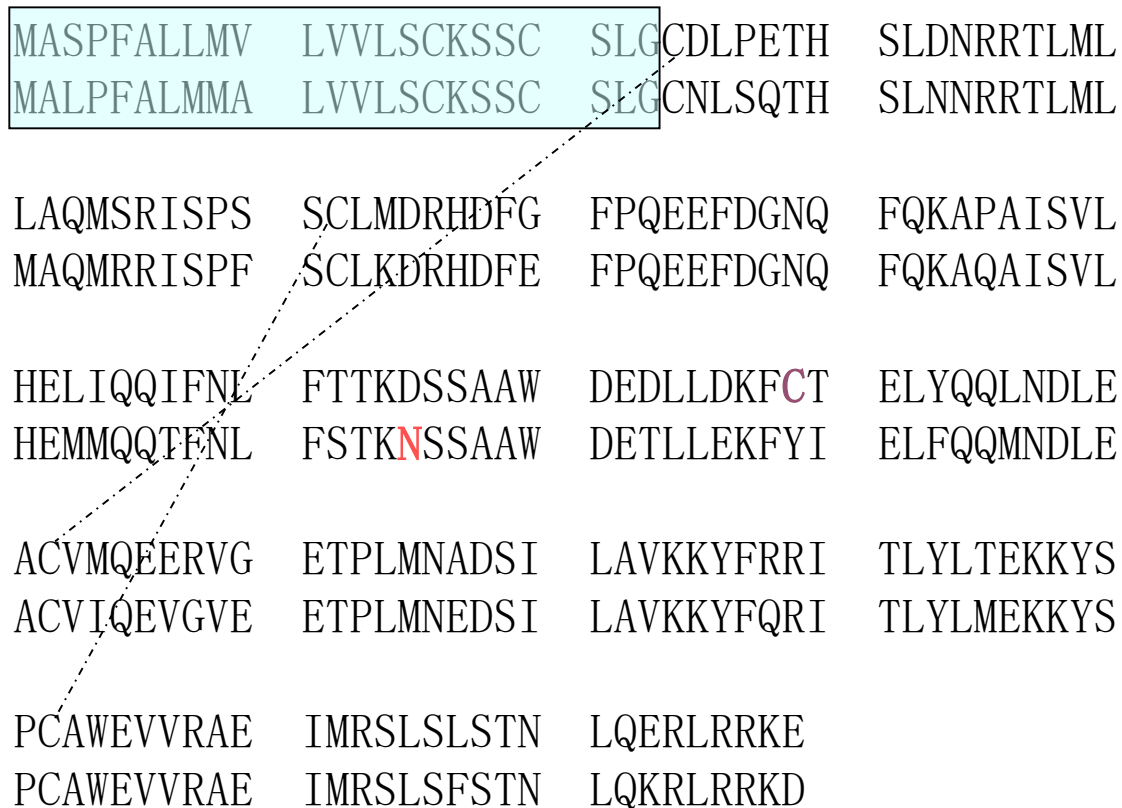


INF α 1

MASPFALLMV LVVLSCKSSC SLGCDLPETH SLDNRRTLML
 LAQMSRISPS SCLMDRHDFG FPQEEFDGNQ FQKAPAI SVL
 HELIQQIFNL FTTKDSSAAW DEDLLDKFCT ELYQQLNDLE
 ACVMQEERVG ETPLMNADSI LAVKKYFRRI TLYLTEKKYS
 PCAWEVVRAE IMRSLSLSTN LQERLRRKE

INF α 14

MALPFALMMA LVVLSCKSSC SLGCNLSQTH SLNNRRTLML
 MAQMRRISPF SCLKDRHDFE FPQEEFDGNQ FQKAQAISVL
 HEMMQQTFNL FSTKNSSAAW DETLLEKFYI ELFQQMNDLE
 ACVIEVGVE ETPLMNEDSI LAVKKYFQRI TLYLMEKKYS
 PCAWEVVRAE IMRSLSFSTN LQKRLRRKD



Některé glykosylace, některé ne, navíc často aminokyselinové přirozené funkční mutace, tedy kromě základních typů ještě mnoho mutant

Variabilita – INF α 2/....

Přirozené variace [46](#) [K → R](#) v α -2B and α -2C.

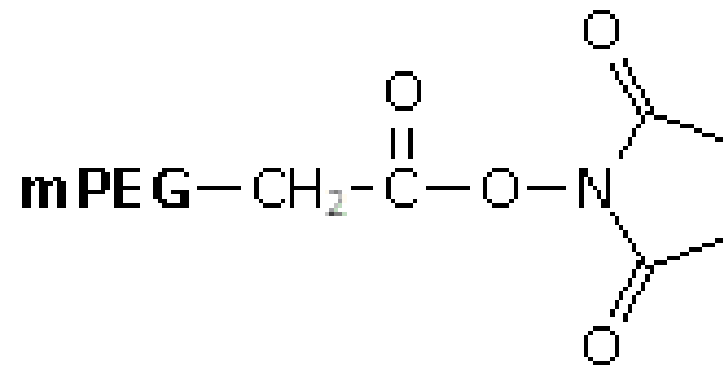
Přirozené variace [57](#) [H → R](#) v α -2C.

Přirozené variace [177](#) [S → L](#) v některých typech rakoviny prsu - somatická mutace.

rIFN α

- **Roferon - A**
- Interferon α -2a (humanní glykosylace)
- Hoffmann La Roche
- Produkce *E.coli* , navíc startovní Met
- Exprese do cytosolu, hlavní izolační krok – imunoafinitní chromatografie
- Indikace : chronická hepatitida typu C, leukémie vlasatých buněk a Kaposiho sarkom u pacientů trpících onemocněním AIDS.

- **Pegasys**
- Interferon α -2a
- Hoffmann La Roche (86)
- Produkce *E.coli*
- Pegylace (MW 40 000) vazbou na Lysin
- PEG – 2. generace, rozvětvený
- Povoleno 2002
- Indikace : chronická Hep. C
- PEGYLACE – snižuje aktivitu *in vitro*, ale dává lepší výsledky *in vivo* – pomalejší odbourávání v játrech, pomalejší proteolytická degradace, delší působení, zvýšená stabilita pH a teplotní.



• Intron A

• Interferon α -2b

• *E.coli*

• Největší podíl na trhu

• Schering-Plough, 86 (2002 PEG-Intron, 15 000)

• Indikace :

- leukémii vlasatých buněk,

- maligní melanom,

- folikulární lymfom,

- **condylomata acuminata**, *Condyloma acuminata jsou všeobecně benigní pseudotumorózní léze lokalizované na genitálu v místě vlhké zapáčky. Typicky růžové papulky se rychle zvětšují v měkké, květákovité nebo hřebínkovité útvary, často stopkaté s šedobílým zmacerovaným, zápachajícím detritem na povrchu. onemocnění je způsobeno lidskými papilomaviry (HPV).*

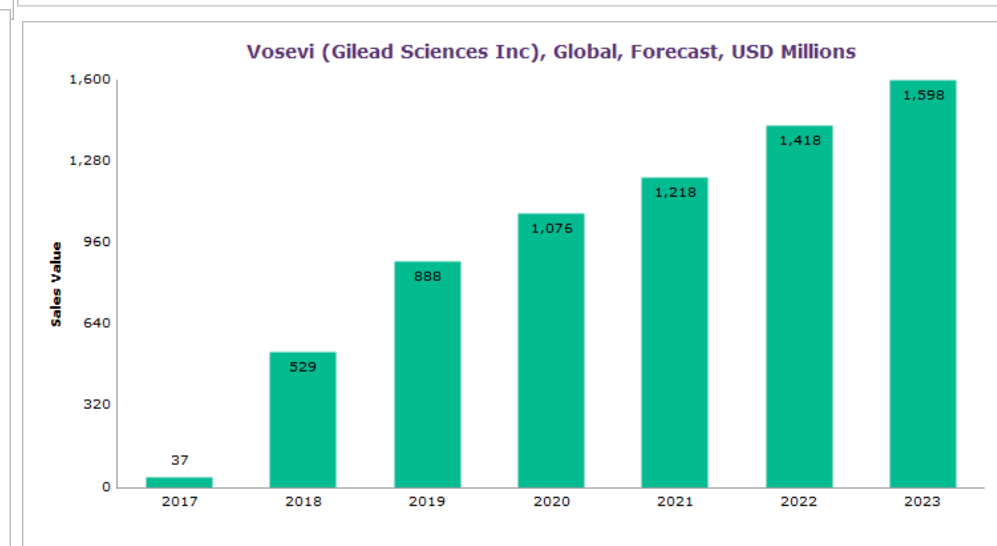
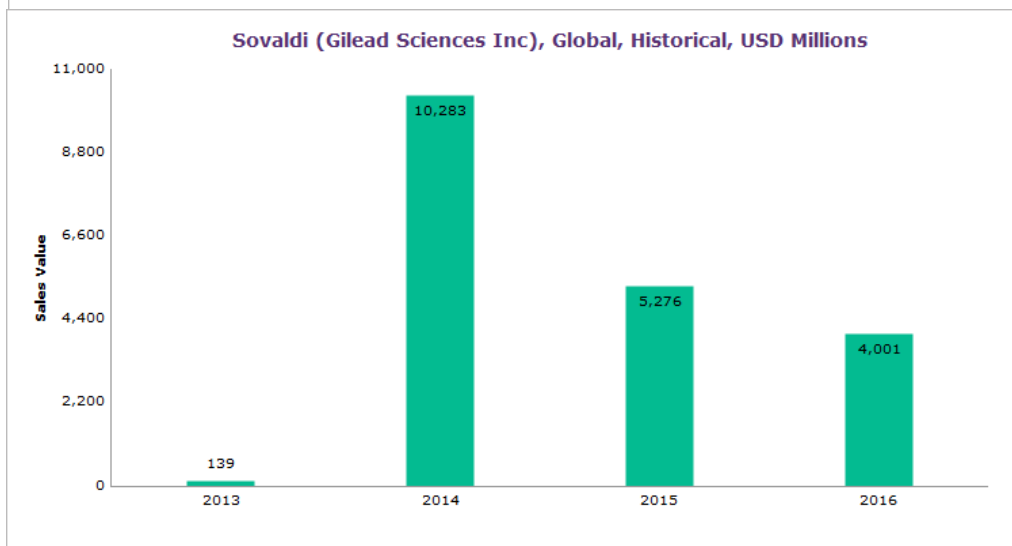
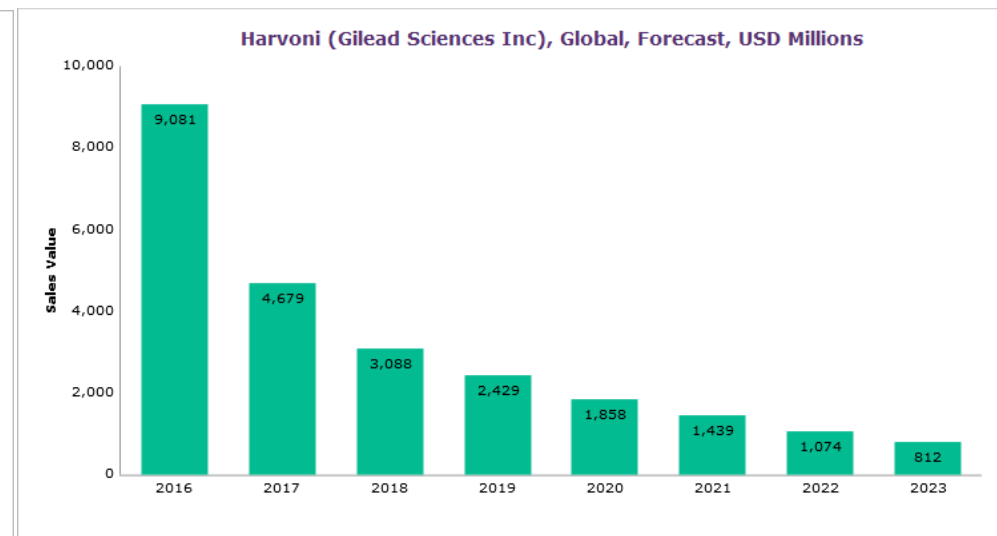
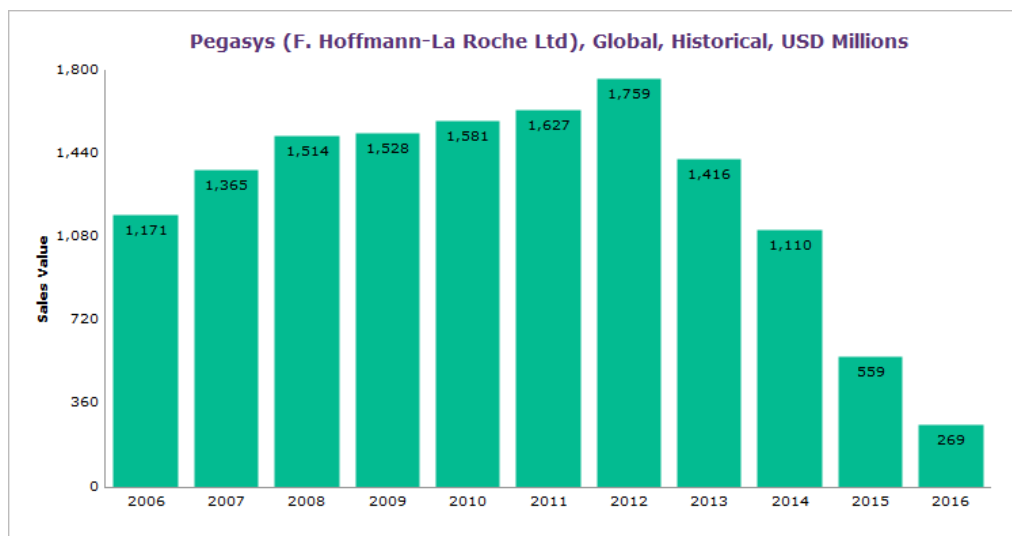
- Kaposiho sarkom u AIDS pacientů,

- chronická hepatitida C a chronická hepatitida B

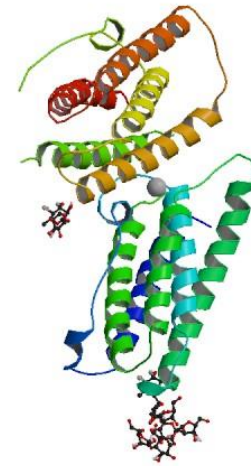
Virální hepatitidy

- HAV Picornavirus, přenos kontaktem, virus do stolice, 4-6 týdnů inkubační doba. – specifické porilátky proti viru (IgM)
- HBV dlouhodobé komplikace, velmi resistantní DNA virus, přenos – kontakt s infikovanou krví nebo kontakt s tělními tekutinami – poranění při odběrech, drogově závislí, intimní kontakty při sexu, z matky na dítě. Inkubace 1 – 6 měsíců
- HDV – nutná ko-infekce HBV, těžké superinfekce, vážný průběh
- HCV – RNA virus, přenos krví, nitrožilní narkomaní, dříve transfuze, chronické infekce – cirhozy, léčba virostatiky a interferonem
- HEV – RNA virus – podobné HAV, Asijská choroba

Léky na HEP-C



IFN β



- Typy –IFN β 1 a IFN β 3
- Není vhodný zvířecí model
- Působí na – hematoencefalickou bariéru, podporuje B lymfocyty, NKC buňky, pomáhá MHC I receptorům, aktivuje protein kinázy, působí antiapoptoticky
- V přírodě IFN β 1 fosforylace serinu 140 (119), glykosylace N 101(80)
- Pro IFN β 3 nejsou dostupná sekvenční data
- IFN β 1 Aplikace především pro léčbu roztroušené sklerozy



nystagmus

RS

- Autoimunitní choroba
- Imunitní systém napadá CNS (mozek, mícha) – demyelizační účinky – odstranění myelinové ochrany (izolace) + zánět
- T buňky procházejí hemato-encefalickou bariérou jako při virálním onemocnění a na padají již tak poškozenou tkáň
- Léčba – akutní atak – kortikosteroidy (methylprednisolon), chronické potíže - interferony

Avonex

- Biogen 1996
- Expres CHO buňky
- Glykosylace i když cukerné složení není identické
- Expres do média
- Produkce v suspenzních kulturách

Rebif

- Serono rok 2002
- CHO buňky
- Kultura s buňkami adherovanými na mikro-nosičích

Betaseron

- Berlex + Shering Plough + Chiron
- Mutein INF β 1 - Cys 17 (nepárový, kromě toho jeden disulfid)- Ser
- Produkce v *E.coli* – není glykosylace
- Podle dosavadních výsledků mutace ani absence glykosylace neovlivňují biol. aktivitu ani nevyvolávají negativní reakce organismu.

Tysabri

- **Tysabri (dříve Antegren) - Natalizumab**
- Natalizumab jsou rekombinantní, humanizované monoklonální protilátky se specifitou pro receptor $\alpha(4)\beta(1)$ a $\alpha(4)\beta(7)$ integrinu na aktivovaných lymfocytech, včetně CD4+ T-buněk. Vazbou na tyto receptory funguje Natalizumab jako antagonist $\alpha(4)$ integrinu. Tento produkt je vyráběn a prodáván firmou Biogen a povolení k distribuci získal v roce 2004.
- Blokování vazby integrinu na příslušné receptory je důležité proto, že je tím zabráněné T-lymfocytům v jejich působení mimo krevní řečiště, především v místech s chronickými zánětlivými procesy, jako je tomu v případě roztroušené sklerózy, Crohnovy choroby a revmatoidní artritidy.

IFN γ

- Mnohočetné funkce podporující imunitní systém
- Produkován T helper cells
- Popisované funkce
 - Antigen processing a presentace
 - Zastavení buněčného cyklu
 - Defenzivní odezva na bakterie a viry
 - Positivní regulace dalších cytokinů
 - syntéza MHC II
 - Aktivace fagocytů a NK buněk
 - Zvýšení oxidativního metabolismu makrofágů
- Dvojitá glykosylace na N
- Přirozené mutanty na dvou pozicích

Actimune

- Genentech/Boehringer/InterMune 1990
- rIFN - γ -1b
- Exprese v *E.coli*
- Sekvence identická s lidským až na počáteční Met (AUG)
- V roztoku stejně jako nativní protein ve formě dimeru s MW 33 000
- Indikace - snižování frekvence a vážnosti infekcí spojených s chronickou granulomatosní chorobou (geneticky dané onemocnění kdy fagocyty jsou nefunkční)
- Indikace – maligní osteopetrosa

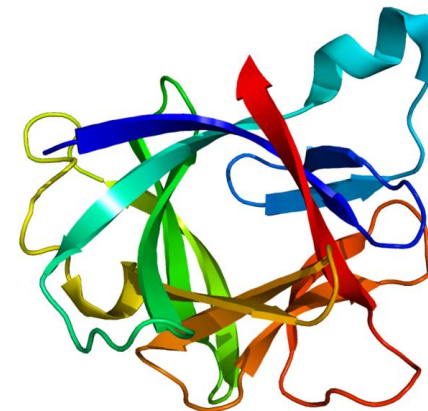
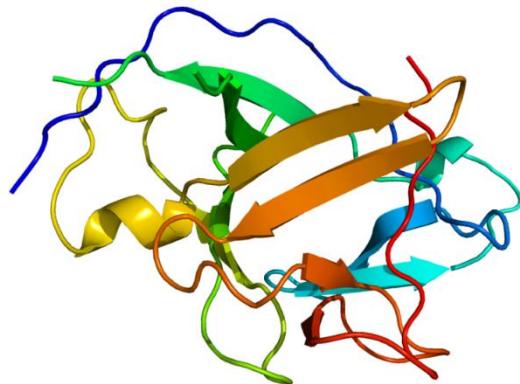
Interleukiny

- IL-1 – IL-25
- Kromě IL1 glykosylace, MW 15-30 000, různé typy buněk

Buněčný typ	Produkované interleukiny
T-lymfocyty	všechny typy IL s výjimkou IL-7 a IL-15
Makrofágy	IL-1, IL-6, IL-10, IL-12
Eosinofily	IL-3, IL-5
Cévní endoteliální buňky	IL-1, IL-6, IL-8
Fibroblasty	IL-1, IL-6, IL-8, IL-11
Keratinocyty	IL-1, IL-6, IL-8, IL-10

- Působení po sekreci (parakrinně, autokrinně, endokrinně) (kromě jednoho subtypu IL-1 – vázán na buňku)

IL-



- IL-1 α a IL-1 β – 20 % sekvenční homologie, stejný receptor a účinek
- Produkce makrofágy, monocyty a dendritickými buňkami a mnoha dalšími typy buněk
- Mimo jiné – aktivace endoteliálních buněk pro pohyb leukocytů, „re-set“ termoregulace v hypotalamu (horečka), aktivace B-lymfocytů, indukce syntézy RAF....indukce zánětlivých faktorů (TNF α) ale podílí se i na postupu revmatoidní artritidy – aktivace cyklooxygenasy a tím prostaglandinů – zvýšení zánětlivých procesů v kloubních tkáních.
- Důležité – homolog, který působí jako antagoista na receptorech pro IL-1 – tzv IL-R α .
- Důležité – při revmatoidní artritidě se také uplatňuje role TNF α

RA

- Artritida je zánět kloubů a revmatoidní artritida je jedním z možných zánětů kloubů.
- chronické onemocnění kloubů, které je charakterizováno na mikroskopické úrovni zánětem synoviální tkáně a postupnou degradací molekulárních komponent chrupavky, kloubního spojení, pouzdra a kostí.
- záněty a eroze tkání v kloubních spojeních mají za následek značné bolesti, otoky a ztrátu funkce.
- App. 1 % populace. Etiologie tohoto onemocnění není zcela přesně známa. Není zřejmé, co způsobí iniciaci celého zánětlivého procesu.
- Jako možní kandidáti se uvádějí :
 - virální infekce, bakteriální infekce, či vlastní antigeny.
- antigen vyvolává tvorbu protilátek, přičemž dochází k tvorbě protilátek i proti vlastním proteinům.
- Jednou takovou autoprotiátkou je tzv. revmatoidní faktor. Tento faktor může přispívat k udržování zánětlivé reakce, jeho přítomnost v krvi pak může napomáhat diagnostice revmatoidní artritidy. Potom se spouští celý mechanismus ve kterém aktivní (a v tomto případě negativní) roli hraje řada cytokinů, například interleukin 1 (IL-1) a tumor necrosis factor α (TNF α), stejně jako autoprotiátky.

Využití IL-R α a TNF α v terapiích

- Především pro léčbu revmatoidní arititidy a to zamezením jeho funkce.
- Tři základní přístupy :
 - Produkce IL-R α
 - Blokace funkce TNF α
 - Blokace produkce TNF α a dalších cytokinů

Kineret

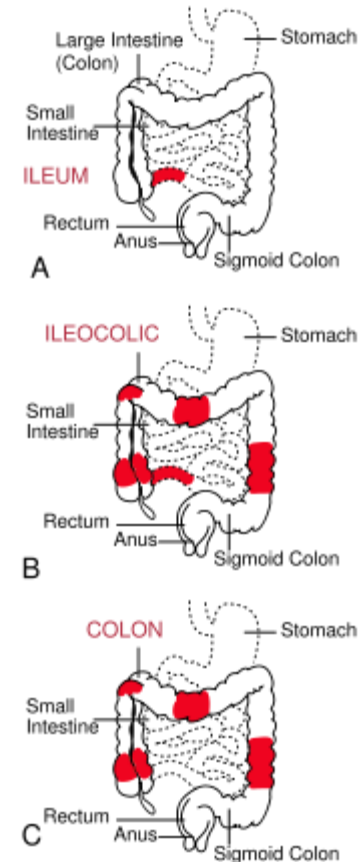
- Amgen 2001
- Rekombinantní IL-R α
- Exprese *E.coli* (+ methionin)
- Blokace funkce IL-1 (relativně snadné testování)
- Používá se intravenosně, poločas v organismu cc 4-6 hodin – léčba artritidy

Remicade

- Centocor (Johnson & Johnson)
- Jeden z nejúspěšnějších léčiv, prodeje 1,5 miliardy USD/rok
- Rekombinantní, chimerická, monoklonální protilátka proti TNF α .
- Produkce – myelomové buňky SP20
- Sekrece do média, afinitní chromatografie na Protein A Sepharose
- Silně váže jak volný, tak membránově vázaný TNF α a tím zabraňuje jeho biol. funkci při zánětlivých onemocněních
- Indikace – RA ale také **Crohnova choroba**

CD

- Zánětlivé onemocnění zažívacího traktu od úst po konečník
- Nejčastěji střevo
- Imunitní systém napadá vlastní tkáň
- Záněty, nekrosa
- Neznámá etiologie, genetické dispozice, druh *Mycobacteria*
- Antibiotika, kortikosteroidy, 5-aminosalicylová, methotrexat, biol. léčiva



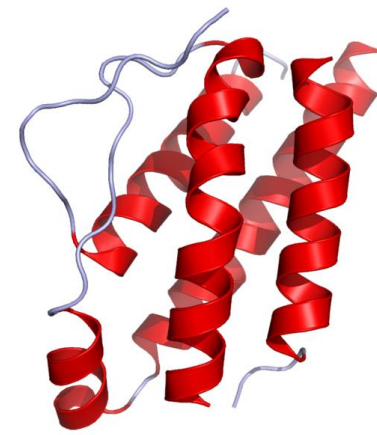
Humira

- Abbot 2003
- Lidská rekombinantní monoklonální protilátka (phage display) proti TNF α

Enbrel

- Amgen + Boehringer
- Rekombinantní chimerický protein – extracelulární část TNF α receptoru a Fc fragment lidské protilátky
- Tvoří dimer jako protilátka s dvěma vazebnými místy pro TNF α
- Produkce v CHO buňkách
- Indikace - RA

IL-2



- Produkován T lymfocyty na podnět mitogenů a antigenů a podporuje jejich růst (autokrinní mitogen)
- MW 15-20 000 – heterogenita způsobena různým stupněm glykosylace (1 místo), cukerná část se zřejmě na biol. aktivitě nepodílí.
- Zároveň aktivuje B-buňky a NKC
- 3 možné aplikace – rakovina (NK), nedostatek T buněk, infekční choroby

Aldesleukin

- Chiron Corp. 1992
- Rekombinantní mutein lidského IL-2 produkovaný v *E.coli*
- Odstraněn konový Ala a záměna Cys 125 za Ser (nepárový Cys, vedle toho jeden disulfid)
- Produkce do inkluzí – nutné rozpouštění v SDS a následně oxidace a redukce disulfidu
- Indikace – dva typy rakoviny, u kterých se ukázala možnost využití imunitní reakce – metastatizující rakovina ledviny a melanom.

Ontak

- Cambrex 1999
- Chimerická molekula spojující IL-2 a část toxinu z viru záškrtu (toxin inhibuje proteosyntézu)
- Produkce v E.coli
- Sekvence :

Met

1-386 sekvence toxinu

2 – 133 sekvence IL-2



- Indikace – T-cell lymphoma, jeden typ Non-Hodgkin lymfoma (onkologické onemocnění lymfocytů ale tvořící pevné nádory lymfatického systému, na rozdíl od leukemií, které postihuje buňky mimo lymfatické uzliny)
- Buňky lymfomu exprimují na svém povrchu receptory pro IL-2 a tak dochází k vazbě, proteolytickému uvolnění a usmrcení buňky

Simulect a Zenapax

- Produkce Novartis (98) respektive Hoffman-LaRoche
- Chimerické protilátky proti receptoru pro IL-2 – zabránění funkce a výrazné snížení imunitní odpovědi.
- Indikace – imunosupresivum po transplantacích

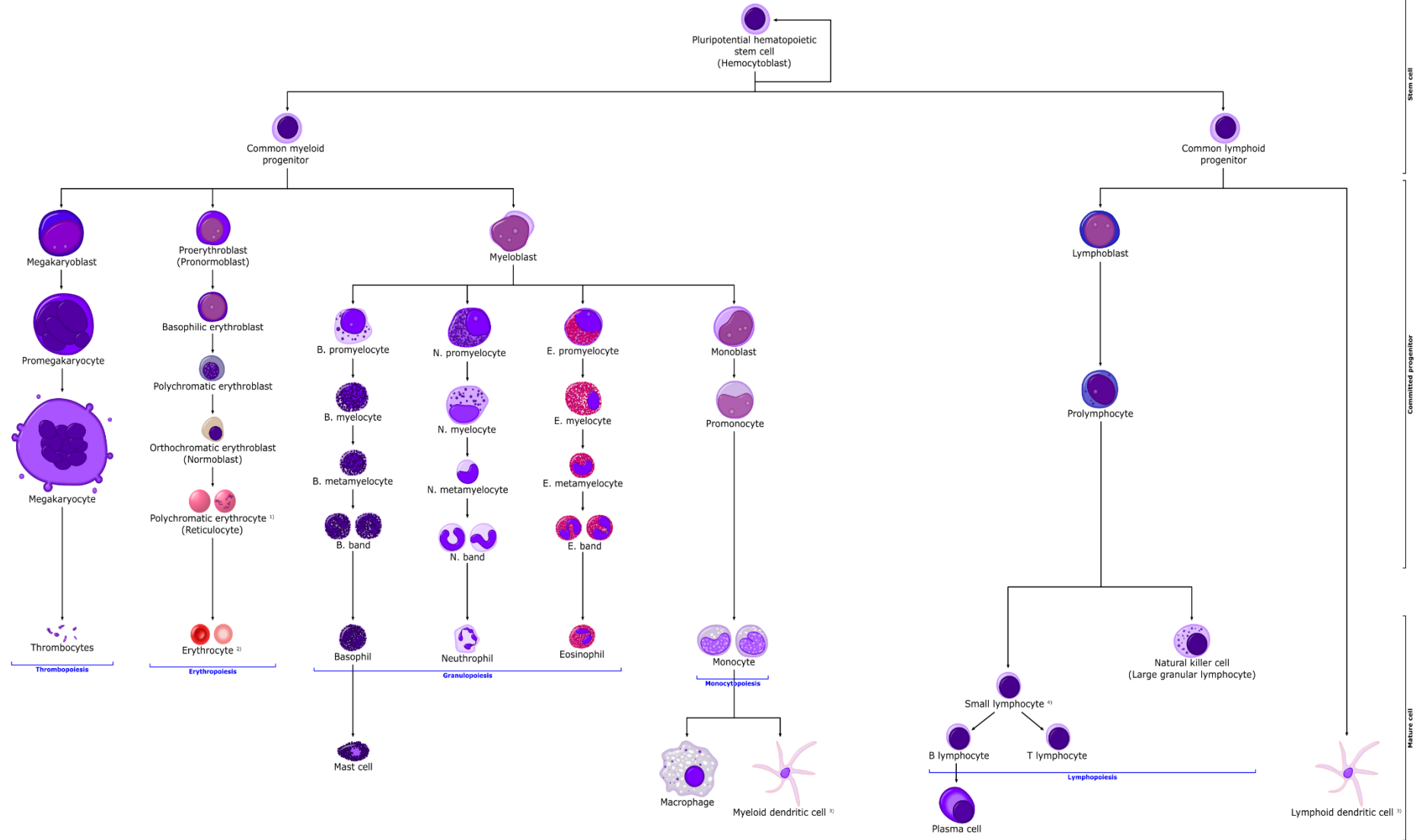
Hematopoiesis in humans

He

Bone marrow

Blood

Tissue



Notes

- Approximate scale information: 10 μm
- The morphological characteristics of the hematopoietic cells are shown as seen in a Wright's stain, May-Giemsa stain or May-Grimwald-Giemsa stain. Alternative names of certain cells are indicated between parentheses.
- Certain cells may have more than one characteristic appearance. In these cases, more than one representation of the same cell has been included.
- Together, the monocytes and the lymphocytes comprise the agranulocytes, as opposed to the granulocytes (basophil, neutrophil and eosinophil) that are produced during granulopoiesis.
- B, N, and E stand for Basophilic, Neutrophilic and Eosinophilic, respectively. As in Basophilic promyelocyte.
- 1) The polychromatic erythrocyte (reticulocyte) at the right shows its characteristic appearance when stained with methylene blue or Azure B.
- 2) The erythrocyte at the right is a more accurate representation of what it looks like in reality when viewed through a microscope.
- 3) Other cells that arise from the monocyte: osteoclast, microglia (central nervous system), Langerhans cell (epidermis), Kupffer cell (liver).
- 4) For clarity, the T and B lymphocyte are split to better indicate that the plasma cell arises from the B-cell. Note that there is no difference in the appearance of B- and T-cells unless specific staining is applied.

Hematopetické růstové faktory

- některé z interleukinů, které především působí na produkci a diferenciaci lymfocytů;
- tak zvané kolonie stimulující faktory („colony stimulating factors“ – CSFs), které hrají hlavní roli v diferenciaci buněk v neutrofilů, makrofágy, megakaryocyty, eosinofily a basofily;
- erythropoetin, který je zásadní pro tvorbu červených krvinek – erytrocytů;
- trombopoetin, který má hlavní úlohu v produkci krevních destiček.

rCSFs

- Neupogen – Amgen + Hoffman - La Roche 1991
- Neulasta – Amgen + Hoffman - La Roche 2002
- Leukin – Berlex 1991

Neupogen

- Rekombinantní Granulocytární CSF
- Exprese *E.coli*, není glykosylován, 2 x disulfid,
- Podpora produkce progenitoru neutrofilů
- Zvýšení fagocytosy a oxidativního vzplanutí
- Indikace – neutropenie po chemoterapii a po transplantaci kostní dřeně a u chronických neutropenií

Neulasta

- Neupogen ale s PEG modifikací

EPO

- Anemie neboli chudokrevnost je syndrom, při kterém je v krvi snížený počet erytrocytů a koncentrace hemoglobinu.
- Pokles ERY a HEMO - do svalů a dalších orgánů dostává méně kyslíku.
- Normálně - na pokles hladiny kyslíku reagují ledviny zvýšením sekrece erytropoetinu.
- Erytropoetin - proteinový hormon, který se přenáší krevním řečištěm do kostní dřeně, kde vydává signál ke zvýšení produkce červených krvinek.
- Anemie je většinou pouze projevem jiného patologického stavu, ale sama o sobě se také projevuje symptomy jako je únava, deprese, poruchy spánku, zhoršené dýchání, zrychlená srdeční frekvence.
- velkou ztrátou krve, nedostatečným přísunem železa pro syntézu hemoglobinu, rozpadem erytrocytů (hemolysa) v důsledku nedostatečné aktivity některých katabolických enzymů, dědičnou abnormalitou některé bílkoviny erytrocytu (např. při srpkovité anemii) a z dalších důvodů.
- Největší počet anemií tvoří tři skupiny pacientů – pacienti s poškozenou funkcí ledvin, pacienti po chemoterapii a pacienti po chirurgických operacích (ztráta krve).
- Léčba těchto pacientů je tedy rozdělena na více směrů – jedna terapie se soustředí na primární příčinu (například rakovina) a druhá terapie na odstranění anemie a zdravotních problémů z ní vyplývajících. Pro odstranění anemie v těchto skupinách pacientů je primárním léčivem erytropoetin.

EPO

- Erythropoetin je kyselý glykoprotein o relativní molekulové hmotnosti 34 000. Přirozený lidský erythropoetin se vyskytuje ve třech isoformách – α , β a asialo. Rozdíly mezi isoformami jsou v cukerné části a neliší se významně svou biologickou aktivitou. Erythropoetin je nutný k tomu, aby prekursori erytrocytů v kostní dřeni přežily, vyvíjely se a diferenciovaly se. Erythropoetin je produkován ledvinami a hladina jeho produkce je regulována koncentrací kyslíku v tkáních. Hypoxie a nedostatek erytrocytů ve zdravém organismu mají za následek zvýšení produkce erythropoetinu. Toto zvýšení exprese může být až stonásobné oproti normálnímu stavu. Za ustáleného stavu je koncentrace erythropoetinu velmi nízká a stačí k tomu, aby se postupně obnovovaly erytrocyty tak, jak přirozeně odumírají.
- Všechny biotechnologicky vyráběné erythropoetiny se používají pro exogenní zvýšení koncentrace erythropoetinu, a tím ke zvýšení produkce erytrocytů v kostní dřeni.

Epogen, Procrit, Eprex - Epoietin α

- Epogen, Procrit a Eprex jsou identické preparáty původně vyvinuté ve firmě Amgen. Ta později část práv prodala firmě Johnson&Johnson. Jedná se o lidský erythropoetin α exprimovaný v CHO buňkách. Aminokyselinová sekvence je totožná s lidským erythropoetinem, molekulová hmotnost je díky rozdílné glykosylaci o něco nižší, cca 30 400. Výroba probíhá v tzv. roller bottles (láhve s médiem a buňkami, rotující v CO₂ inkubátoru) a erythropoetin je pěstovanými buňkami sekretován do růstového média. Medium je potom odebráno a erythropoetin je izolován sekvencí několika chromatografií. Takto připravený produkt je testován na mnoho parametrů, které zahrnují : SDS elektroforézu, Western blott, isoelektrickou fokusaci, N-koncové sekvenování, HPLC, DNA analýzu (pro zachycení případných kontaminací) a imunostanovení. Produkt se testuje na biologickou aktivitu pomocí RIA metody a pomocí biologického *in vivo* testu.
- Celkové prodeje těchto tří léčiv byly v roce 2003 téměř 6, 4 miliardy USD. Odhaduje se, že trh s erythropoetinem bude stále větší, neboť přibývá pacientů, kteří podstupují chemoterapii, složité chirurgické operace a neboť přibývá nemocných, kteří jsou závislí na hemodialýze (roční přírůstek přibližně 7 %).

NeoRecormon - Epoietin b

- Jedná se o výrobek firmy Hoffman-La Roche a je to rekombinantní, lidský erythropoetin β exprimovaný v CHO buňkách. Ačkoliv jde o jinou isoformu než výše zmíněné Epogen, Procrit, Eprex a o zcela jiný expresní konstrukt všechny, preparáty jsou prakticky shodné svou biologickou funkcí a jsou v klinické praxi prakticky zaměnitelné. Nicméně liší svými molekulárními vlastnostmi (glykosylace). NeoRecormon se vyrábí pomocí tzv. „Batch Refeed“ procesu (vsádkové pěstování buněk s opakovanou výměnou média). Erythropoetin je z odebraného média potom izolován pomocí kolonových chromatografií – Blue Sepharosa, hydroxyapatit, HPLC na koloně Vydac C4 a na DEAE Sepharose. Původním výrobcem byla firma Boehringer Mannheim GmbH, která později vstoupila do firmy Hoffman-La Roche. Prodeje v roce 2003 byly téměř 1 miliarda USD.

Dynepo - Epoietin δ

- Na rozdíl od předchozích preparátů je Dynepo exprimováno v lidské buněčné linii a proto jeho glykosylace (4 cukerné řetězce) a ostatní posttranslační modifikace nejvíce odpovídají endogennímu lidskému erythropoetinu. Jeho biologické působení je totožné s endogenním hormonem. Specifikou tohoto preparátu je jeho exprese v buňkách R223, při které je použita speciální genová aktivace. Ta zajišťuje vysokou úroveň transkripce a translace, a tudíž produkce. Kvůli patentovým sporům mezi firmami Amgen, Serono a výrobcem firmou Aventis, není produkt uveden na trhu.

Aransep, Nespo - Darbopoetin α

- Tento preparát se od endogenního erythropoetinu liší v primární sekvenci, tedy je mutovaný, a díky tomu se liší také v úrovni glykosylace. Na druhou stranu, stejně jako ostatní preparáty erythropoetinu od firmy Amgen, je produkován v CHO buňkách. Dvě mutace, které jsou do hormonu zavedeny zajišťují navázání dvou dodatečných cukerných řetězců oproti preparátům Epogen a Procrit. To má za následek jednak zvýšení relativní molekulové hmotnosti na 37 000. Druhým důsledkem, z lékařského hlediska důležitějším, je prodloužení přetrvávání určité hladiny Aransepů v krvi, což umožňuje snížení počtu dávek pacientovi. Podobně jako Epogen a Procrit, také Aransep je produkován konstitutivní expresí a sekrecí buňkami CHO za použití kultivace v rotujících lahvích. Tento preparát je vyráběn firmou Amgen a celkové prodeje v roce 2003 dosáhly 1, 5 miliardy USD.
- V závěru je třeba podtrhnout, že erythropoetin představuje komerčně zatím nejúspěšnější biolécivo, jeho celkové prodeje (ze všech uvedených produktů) v roce 2006 přesáhly 10 miliard USD. Vedle toho existuje nyní řada výrobců, kteří erythropoetin vyrábějí jako generický preparát a dodávají jej na trhy, které nejsou patentově chráněny. Další, neregistrované prodeje, jsou svázány se zneužíváním erythropoetinu sportovci.

Epidermální růstový faktor EGF

- Epidermální růstový faktor je jedním z prvních růstových cytokinů, které byly objeveny.
- významné mitogenní vlastnosti na mnoho buněčných typů a jeho receptor je exprimován téměř všemi buňkami. Vliv EGF na endotheliální buňky, epiteliální buňky a na fibroblasty je nejznámější a kůže se zdá být hlavním místem jeho působení.
- Spolu s dalšími růstovými faktory hraje důležitou úlohu v hojení ran. EGF je syntetizován především monocyty a ektodermálními buňkami, ale také ledvinami. EGF se vyskytuje ve většině tělesných tekutin a zvláště v lidském mléce.
- EGF v organismu interaguje se svým receptorem. Tento receptor je velmi blízce příbuzný receptoru pro transformující růstový faktor (TGF). Vazba EGF na tento receptor v konečném efektu působí mitogenně – urychluje růst a množení buněk.
- V případě řady rakovinných buněk je exprimován mutovaný receptor, který působí jako konstitutivní mitogenní receptor, nebo je EGF receptor exprimován ve zvýšené míře (u 35% rakovin je výrazně zvýšena exprese tohoto receptoru). Zároveň onkogen *V-erbB* také kóduje mutantní formu tohoto receptoru. Proto hlavní aplikace v biofarmacii směřuje k potlačení nežádoucích efektů EGF receptoru.
- Erbitux – v protilátkách

Růstový faktor odvozený z krevních destiček - Platelet derived growth factor (PDGF)

- Tento růstový faktor je sekretován krevními destičkami v místě poranění a působí při hojení ran. Hojení ran má tři základní etapy : a) nejdříve probíhá zánět, při kterém jsou eliminovány bakterie a probíhá přísun potřebných buněk do poškozené tkáně, b) proliferace, při které dochází k pomnožení a prorůstání buněk, které byly do poškozené tkáně přisunuty, vzniká nová tkáň a kapilární zásobení, c) remodelování, při kterém je pozměněna původně vzniklá jizva. Růstový faktor odvozený z krevních destiček hraje ve všech třech procesech důležitou roli. Je dopraven krevními destičkami, pomáhá při signalizaci pro příchod nových buněk, pomáhá jako mitogen při růstu a pohybu buněk.
- **Regranex - Becaplermin**
- Jedná se o rekombinantní PDGF, který vyrábí firma Johnson & Johnson od roku 1997. Expres probíhá v kvasinkách *Sacchariomyces cerevisiae*. Tento preparát se používá ve formě masti a je indikován pro zlepšení hojení ran u pacientů trpících cukrovkou.

Insulinu podobný růstový faktor – 1 (Insulin-like growth factor –1)

- Insulinu podobný růstový faktor – 1 je polypeptid tvořený 70 aminokyselinami s třemi intramolekulárními disulfidickými můstky. Je strukturou podobný insulinu. Hraje důležitou úlohu v dětství a v dospělosti má anabolické efekty. Je produkován primárně v játrech jako endokrinní hormon, ale vzniká také v tkáních a působí tam jak autokrinně, tak parakrinně. Jeho produkce je stimulována růstovým hormonem. Asi 98% tohoto faktoru je vázáno na vazebné proteiny. IGF-1 se váže na specifické receptory, které jsou přítomné na mnoha buněčných typech. IGF-1 aktivuje AKT signalizační dráhu, a tím podporuje růst a množení buněk a naopak je inhibítozem programované buněčné smrti – apoptosy. Jeho nedostatek vyvolává vážné poruchy vývoje.
- **Increlex – mecasermin rinfabate**
- Increlex je rekombinantní lidský insulinu podobný růstový faktor – 1 (IGF-1). Vznikl kooperací firem Tercica a Genentech. Výroba probíhá expresí v *E. coli*. Je indikován k dlouhodobé léčbě nedostatku IGF-1. Povolen byl v roce 2006.

Kostní morfogenní proteiny – bone morphogenic proteins – BMP

- Rodina tak zvaných BMP zahrnuje 20 strukturně příbuzných kostních růstových faktorů označovaných jako BMP-1 až BMP-20. Některé z nich mají schopnost indukovat vznik a růst kostní tkáně včetně regenerace (například BMP-2 a BMP-7). Tyto proteiny jsou příbuzné TNF- β cytokinům a v nativní formě tvoří dimerní molekulu o molekulové hmotnosti 30 000 Da. Jsou glykosylovány a v organismu hrají roli v řadě procesů souvisejících se vznikem a růstem kostí.
- **Dibotermin α – INFUSE Bone graft**
- Jedná se o rekombinantní lidský BMP-2 exprimovaný v CHO buňkách, který je absorbován v kolagenové „houbě“. Samotný rekombinantní protein má stejnou sekvenci jako nativní protein, je glykosylován a je tvořen dimerem, jehož monomery jsou, jako je tomu u nativního proteinu, spojeny disulfidickými můstky. Dibotermin α má v organismu stejné účinky jako nativní protein – tedy napomáhá růstu kostní tkáně. Samotný protein se vyrábí standardními technikami tkáňových kultur a kolagenová houba je připravena z hovězího kolagenu, který je chemicky zesíťován. Tento preparát vyrábí firma Wyeth ve spolupráci s Genetics Institute Inc. Povoleno bylo v roce 2002.
- Indikace je velmi zajímavá. Tento preparát se používá k fixaci/srůstu obratlů v oblasti L4 – S1 při degenerativních chorobách meziobratlových plotének. Houba, která je nasycena proteinem BMP-2, je pomocí speciálních „klecí“ z titanu zafixována do mezibratlového prostoru. BMP-2 indukuje potom rychlé srůstání dvou obratlů k sobě. Dosud používaná technika v tomto případě zahrnovala odebrání kostního štěpu z pánve a jeho vsunutí mezi obratle. Výhodou nového postupu je jednak významné urychlení léčby - zkrácení imobilizace pacienta, a jednak odstranění bolestivých následků odebírání štěpů.
- **Eptotermin α – Osteogenic protein-1**
- V tomto případě se jedná o rekombinantní lidský BMP-7 exprimovaný v CHO buňkách napuštěný do kolagenového nosiče. Eptotermin α je produktem firmy Stryker Biotech a povoleno bylo v roce 2001.
- Indikace je pro použití při zlepšení léčby zlomenin dlouhých kostí.