

Eredeti gyógyszerkutatás

ELTE TTK vegyészhallgatók számára

Dr Arányi Péter

2009 április, 7.ea.

Biologikumok

Biológiai gyógyszerek

- Olyan gyógyszerek, melyek hatóanyagai
 - Biológiai forrásból készültek, vagy abból vonták ki
 - Teljes pontossággal nem jellemezhető makromolekulák, főleg fehérjék
 - Gyártásukhoz, minőségük meghatározásához, gyártás-ellenőrzéshez fizikai-kémiai és biológiai módszerek kombinációja szükséges

Biologicals

- Proteins, peptides
 - Replacement therapy (insulin)
 - Antibodies (antiTNF α ...)
 - IL-1Ra (anakinra)
- Oligosacchrides
 - Heparin and derivatives
- RNA
 - Antisense
 - siRNA
- Gene therapy
- Stem cells

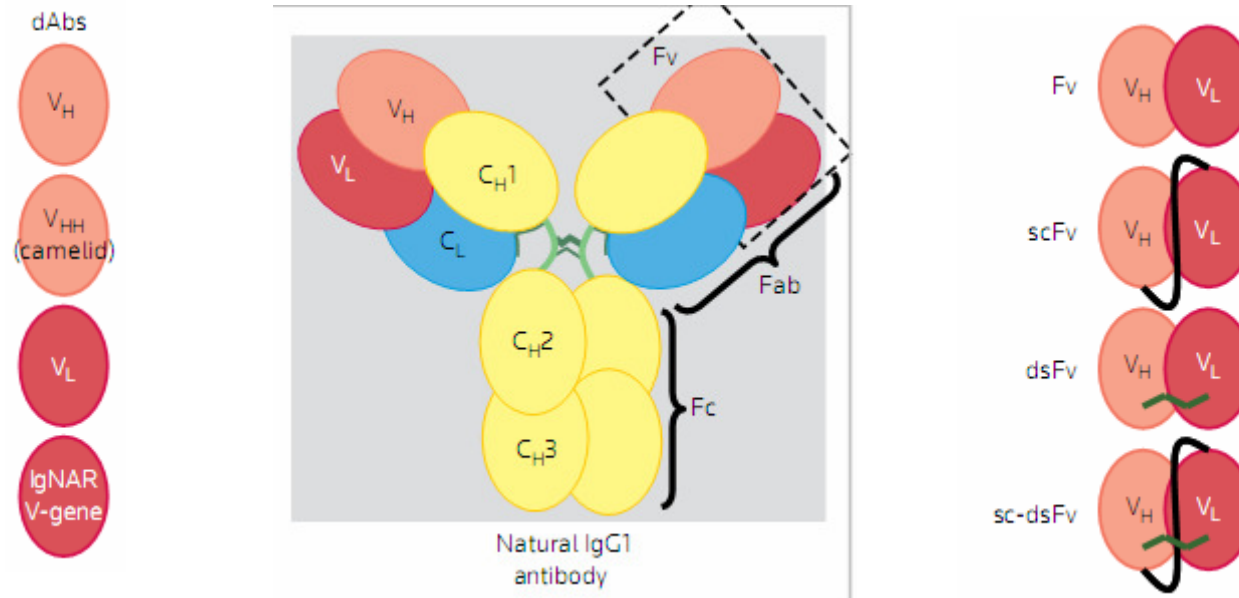
Table 1.1: Sales trends of leading biologics by product category, 2006

Product Class	2006 sales (\$ billion)	% change vs 2005
Erythropoietins	11.94	+6.7%
Major cancer MAbs	10.62	+56.8%
Anti-TNF antibodies	10.28	+24.8%
Insulin & analogs	8.97	+24.4%
Recombinant coagulation factors	4.71	+17.0%
Interferon beta	4.40	+14.4%
G-CSF	4.36	+11.4%
HGH	2.45	+6.9%
Interferon alfa	2.26	+6.9%
Enzyme replacement	1.71	+27.5%

Source: La Merie Business Intelligence (www.lamerie.com)

Business Insights Ltd

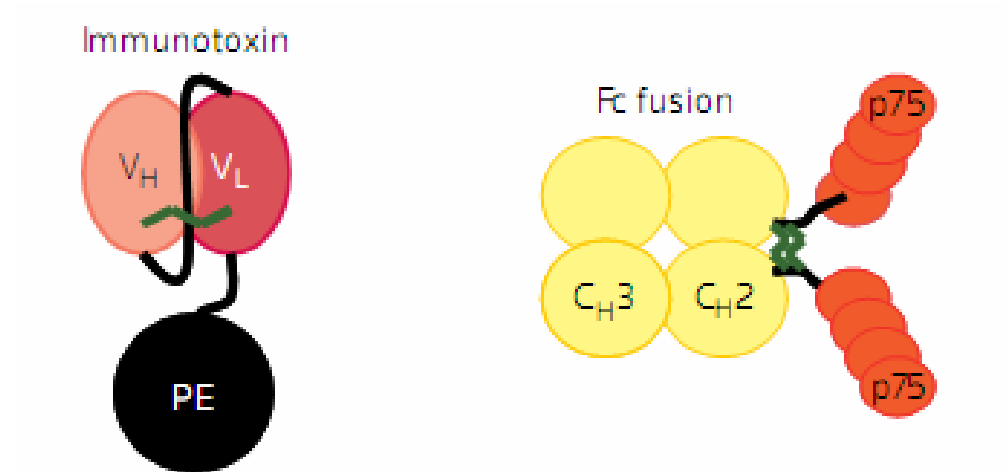
Az IgG1 antitest szerkezete és rokon konstrukciók



H=heavy, L=light, V_{HH}=camelid (tevefélék),
 IgNAR=cápa ag receptor variábilis domain
 ds=disulfid stabilizált

Antibody therapeutics, antibody engineering, and the merits of protein stability
 Stephen J Demarest* & Scott M Glaser (2008)

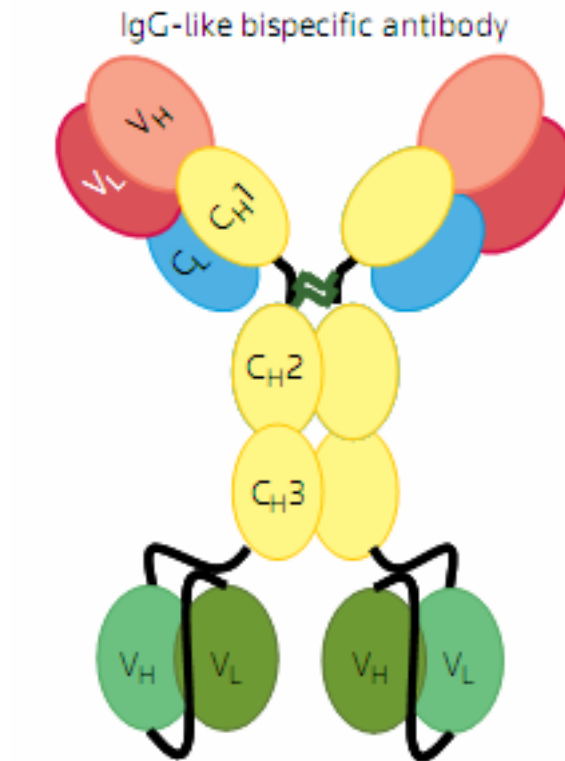
Antitest-szerű fúziós fehérjék



Antibody therapeutics, antibody engineering, and the merits of protein stability

Stephen J Demarest* & Scott M Glaser (2008)

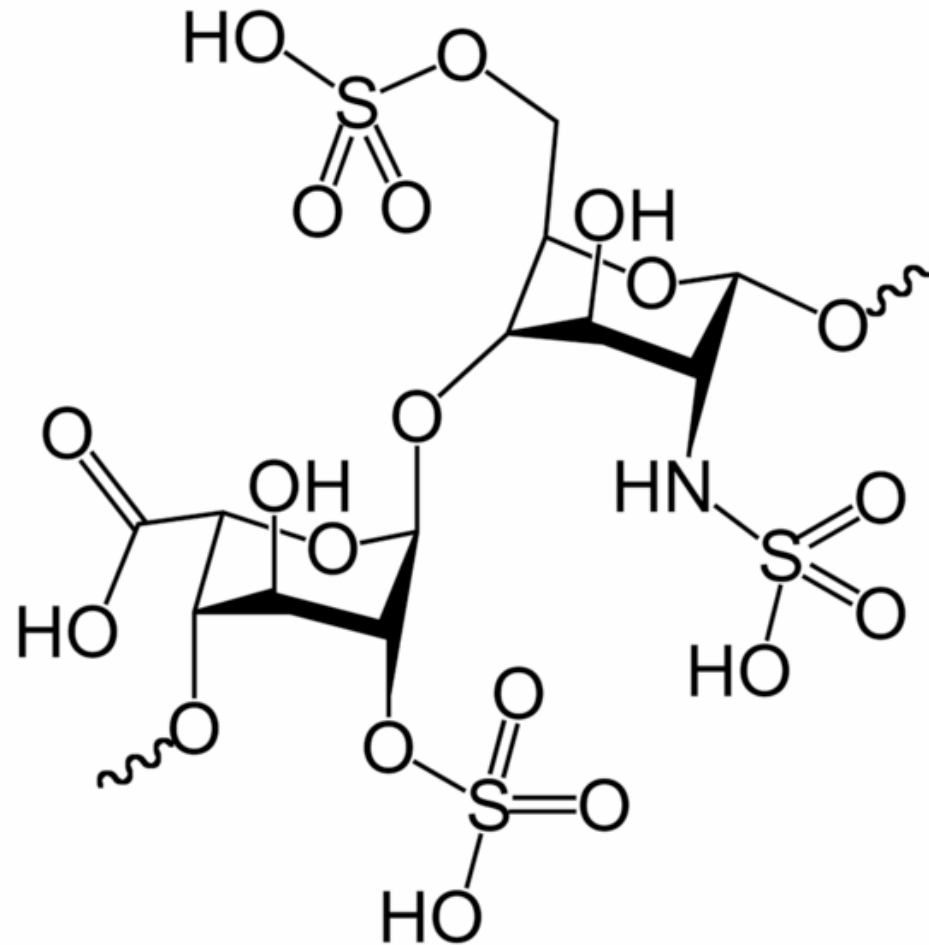
IgG-szerű bispecifikus antitestek



Antibody therapeutics, antibody engineering, and the merits of protein stability

Stephen J Demarest* & Scott M Glaser (2008)

Heparin



MW: ~20kDa, LMWH:~3kDa

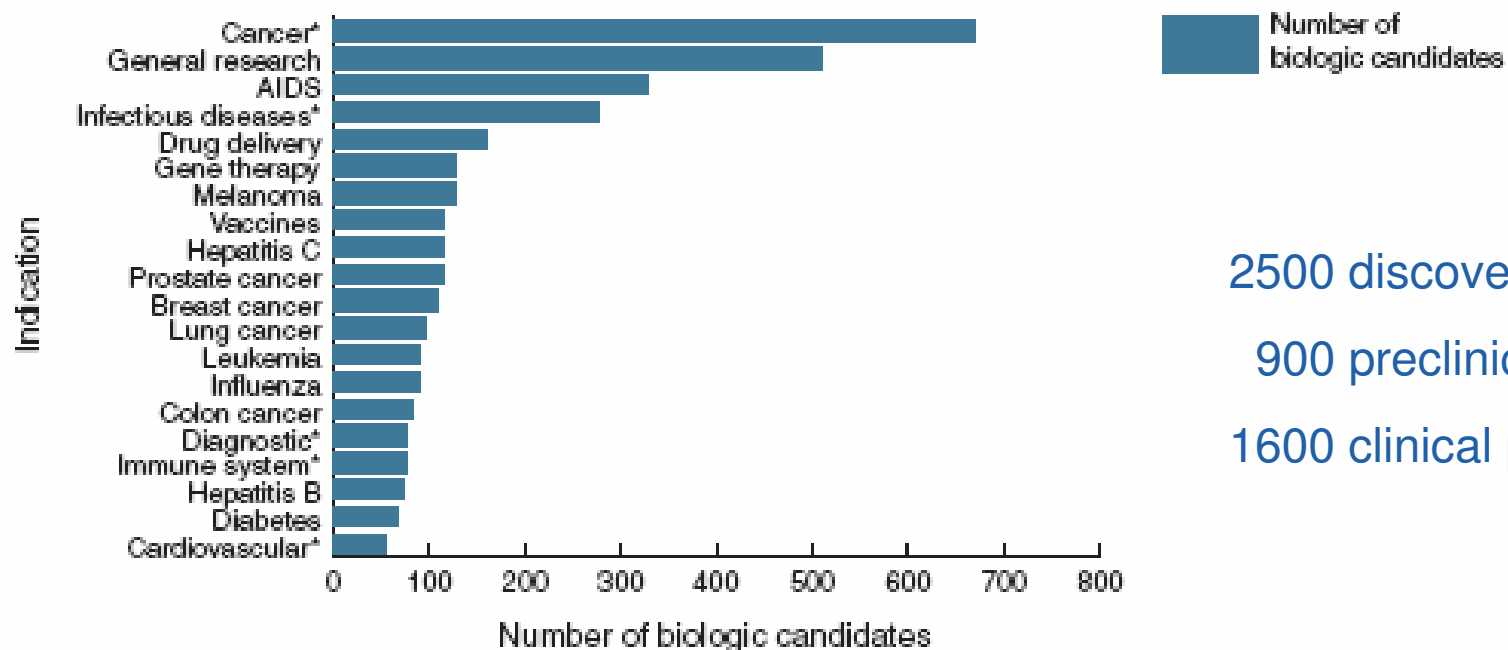
Néhány példa

Természetes fehérje	Humulin	Diabetes
GM fehérje	Lantus	Diabetes
mAbs	Orthoclone	Vese transzplantátum
	OKT3	kilökődés
GM mAbs	Remicade	Crohn betegség
Enzymes	Pulmozyme	Cystic fibrosis
Vaccines	TWINRIX	Hepatitis A +rekombináns hepatitis B
Aptamer	Macugen	AR Macular degeneration

Definition: aptamer

- An aptamer is a nucleic acid macromolecule that binds tightly to a specific molecular target. Like all nucleic acids, a particular aptamer may be described by a linear sequence of nucleotides (A, U, T, C and G), typically 15-40 nucleotides long. In solution, the chain of nucleotides forms intramolecular interactions that fold the molecule into a complex three-dimensional shape. The shape of the aptamer allows it to bind tightly against the surface of its target molecule.

Biopharmaceuticals in the pipeline (2006)



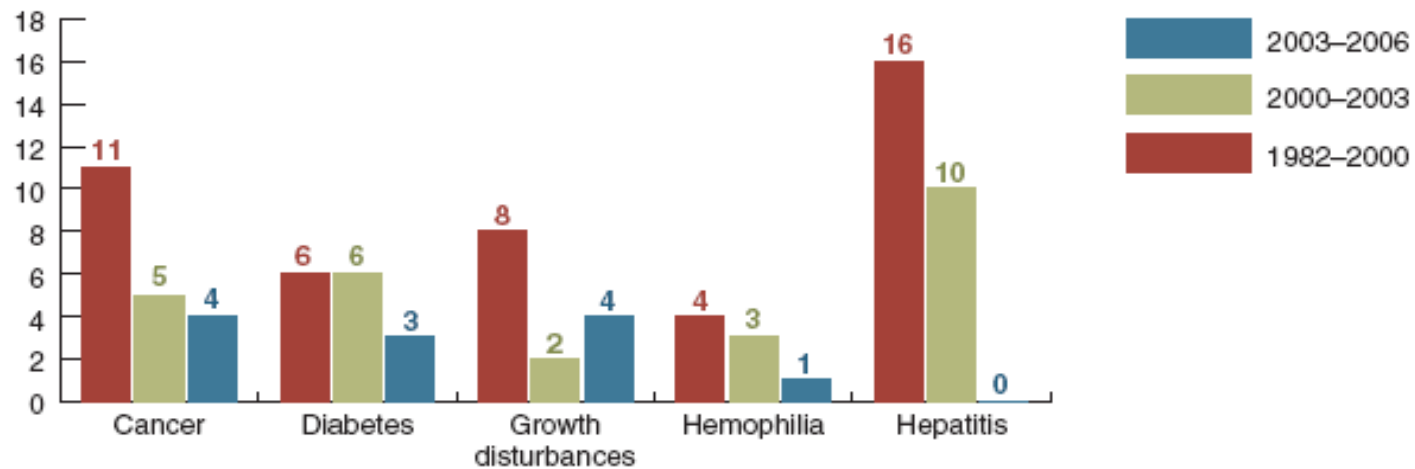
Több száz termék fejlesztésben

A biofarmakonok a jövő ígérete – hosszú ideje

Van valami baj?

- Korlátozott indikációs terület
- Parenterális alkalmazás (csaknem kizárólag)
- Váratlan súlyos mellékhatások
- Termék hatásossága és mellékhatás profilja a gyártási eljárástól függ
- Magas előállítási költségek/ magas ár
- Generikumok helyett hasonló biológiai hatóanyagok „biosimilars” (drága generikus fejlesztés)

Engedélyezett biológiai gyógyszerek



Korlátozott indikációs terület

Adminisztráció

Humulin

Sc injekció

Lantus

SC injekció

Orthoclone OKT3

IV injekció

Remicade

IV infúzió

Pulmozyme

Inhaláció (nebulizer)

TWINRIX

IM injekció

Macugen

Intravitális injekció

Parenterális alkalmazás (csaknem kizárólag)

Aptamer approved

Macugen:

FDA posted a safety alert for Macugen in April this year after rare anaphylactoid reactions were reported, necessitating changes to the product's approved labeling. (2006)

Macugen and Visudyne costs: average. sales **prices** (ASP) for Medicare Part B. (\$1054.70 for **Macugen** 0.3mg, \$1344.30 for. Visudyne 15mg) ...

- **Váratlan súlyos mellékhatások**
- **Magas előállítási költségek/ magas ár**

Natalizumab (Tysabri)

- Humanized monoclonal antibody which binds to the alpha4beta1 integrins of leukocytes, blocks attachment to cerebral endothelial cells, thus reducing inflammation at the blood-brain barrier.
- Two pivotal randomized trials,
 - comparing active treatment to placebo
 - comparing active treatment to placebo in relapsing multiple sclerosis (MS) patients receiving intramuscular interferon beta1alpha (Avonex),
demonstrated significant efficacy for relapse control, decrease in sustained disability, and reduced numbers of new lesions on MRI.

Postapproval adverse effect

Tysabri first came on the market in November 2004. It received accelerated FDA approval on the basis of the substantial therapeutic benefit to MS sufferers revealed by initial trials. At that time, the most serious adverse events noted were infections and temporary hypersensitivity reactions, and approval was contingent upon continuing the trials for an additional year. Marketing and ongoing trials were halted, however, in February 2005 when studies revealed one fatal and one additional case of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) in patients receiving Tysabri in conjunction with Avonex (interferon- β) for two years. Tysabri, however, is making a comeback. Trials recommenced earlier this year, and both the EMEA and FDA have recommended that Tysabri be approved as a single therapy for aggressive forms of MS.

Váratlan súlyos mellékhatások

TGN1412 (Wikipedia)

- **TGN1412** (also known as **CD28-SuperMAB**) - [immunomodulatory](#) drug withdrawn from development, originally intended for the treatment of [B cell chronic lymphocytic leukemia](#) (B-CLL) and [rheumatoid arthritis](#) a [humanised monoclonal antibody](#) that not only binds, but is a strong [agonist](#) for the [CD28](#) receptor of the [immune system's T cells](#)
- In its first human [clinical trials](#), in [March 2006](#), it caused catastrophic systemic failure in the subjects, despite being administered at a supposed sub-clinical dose of 0.1 mg per kg, some 500 times lower than the dose found safe in animals,^[3] resulting in the hospitalization of six volunteers on [13 March 2006](#). At least four of these suffered [multiple organ dysfunction](#), and one trial volunteer is said to be showing signs of developing [cancer](#).
- [TeGenero Immuno Therapeutics](#), entered into [insolvency](#) proceedings later in 2006. Tentative opinions suggest that the problems arose due to "unforeseen biological action in humans", rather than breach of trial protocols The drug, which was designated as an [orphan medical product](#) by the [European Medicines Agency](#) in March 2005, was developed by [TeGenero Immuno Therapeutics](#), tested by [Parexel](#) and manufactured by [Boehringer-Ingelheim](#)

Biosimilars: different side effect profile

WARNINGS

THIS LILLY HUMAN INSULIN PRODUCT DIFFERS FROM ANIMAL-SOURCE INSULINS BECAUSE IT IS STRUCTURALLY IDENTICAL TO THE INSULIN PRODUCED BY YOUR BODY'S PANCREAS AND BECAUSE OF ITS UNIQUE MANUFACTURING PROCESS.

ANY CHANGE OF INSULIN SHOULD BE MADE CAUTIOUSLY AND ONLY UNDER MEDICAL SUPERVISION. CHANGES IN STRENGTH, MANUFACTURER, TYPE (E.G., REGULAR, NPH, ANALOG), SPECIES, OR METHOD OF MANUFACTURE MAY RESULT IN THE NEED FOR A CHANGE IN DOSAGE.

SOME PATIENTS TAKING HUMULIN® (HUMAN INSULIN, rDNA ORIGIN) MAY REQUIRE A CHANGE IN DOSAGE FROM THAT USED WITH OTHER INSULINS. IF AN ADJUSTMENT IS NEEDED, IT MAY OCCUR WITH THE FIRST DOSE OR DURING THE FIRST SEVERAL WEEKS OR MONTHS.

- **Termék hatásossága és mellékhatás profilja a gyártási eljárástól függ**
- **Generikumok helyett hasonló biológiai hatóanyagok „biosimilars” (drága generikus fejlesztés)**

Miért nélkülözhetetlenek a biológiai gyógyszerek?

- Fehérjék, peptidek pótlása
- Kis molekulával nem elérhető szelektivitás
- „non-druggable” biológiai célpontok
- Optimálisnak nem tekinthető meglévő gyógyszerelési lehetőség mellett újszerű megközelítés

Antisense oligonucleotide drugs

Genetic pharmacology

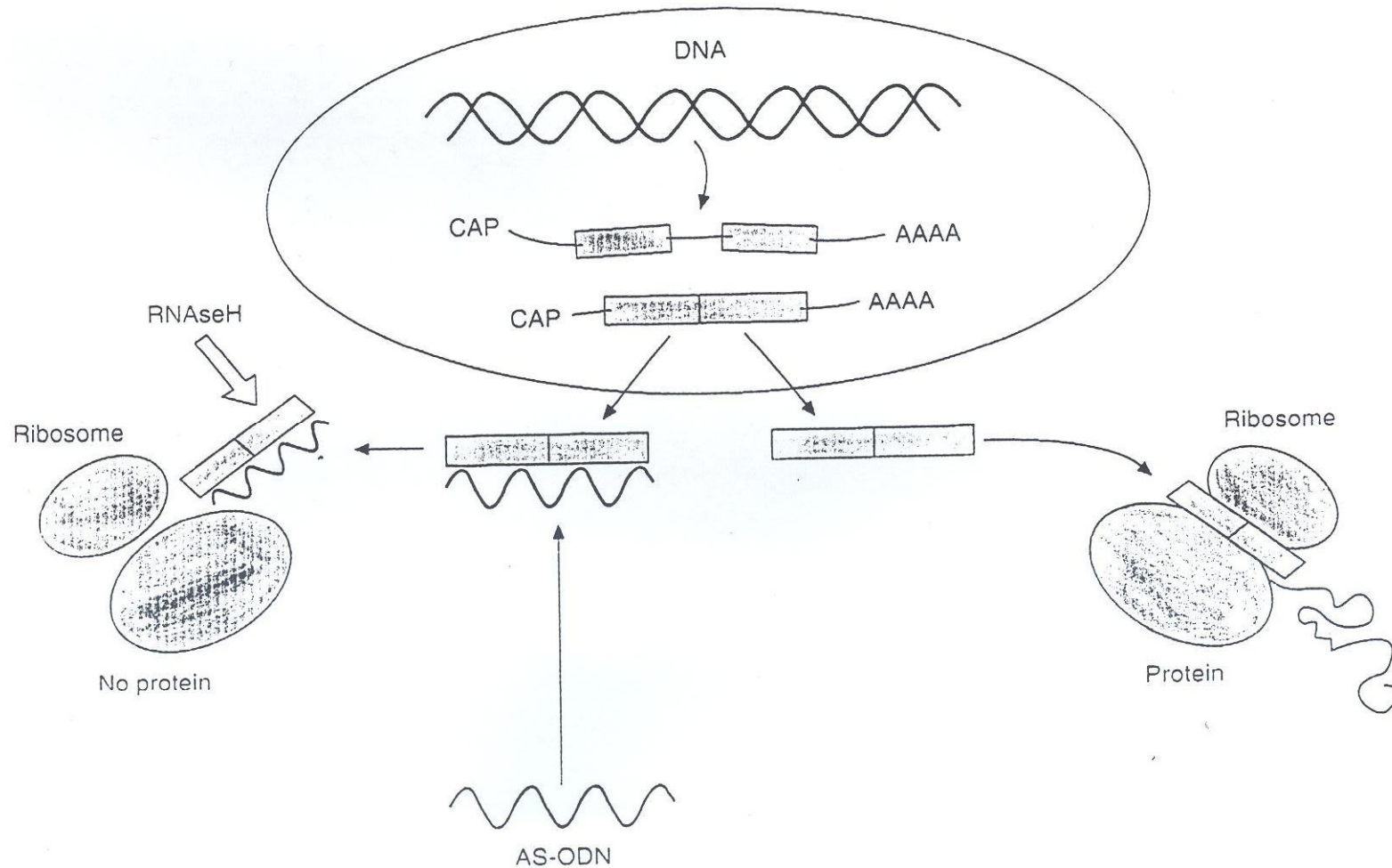
Oligonucleotide length: 10-30 bases

**High affinity ($K_d = 10^{-18}$ M),
selectivity**

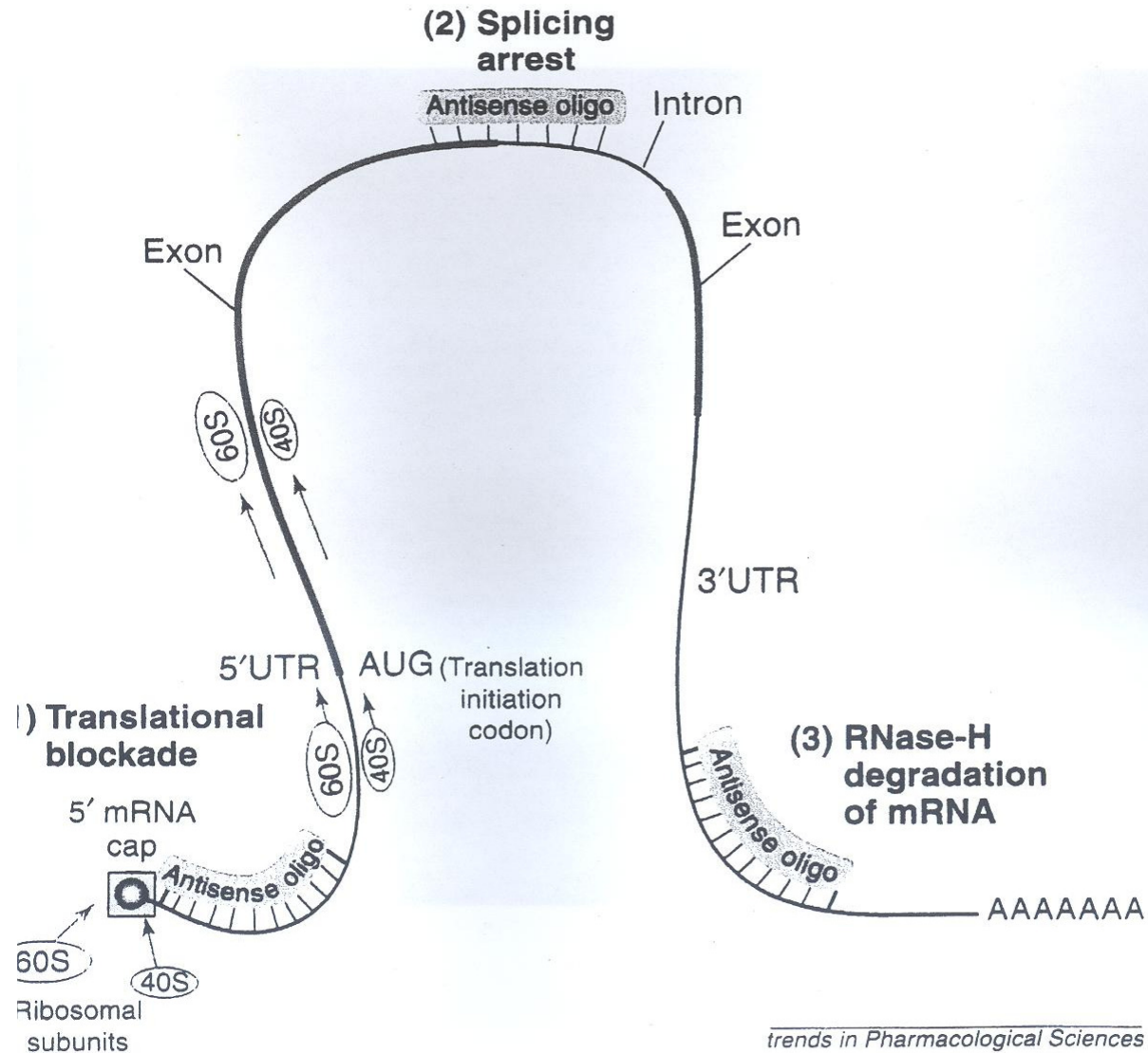
Effect: hybrid arrest (no translation)

**RNase H digestion of
heteroduplex**

Antiszensz RNS transzláció gátló hatása



Antiszensz RNS transzláció gátló hatása



Antisense oligonucleotides in clinical trials or approved in haematology and oncology

Compound	Protein target	Indication	Development phase
Vitravene (Fomivirsen)	CMVIE2	Cytomegalovirus- induced retinitis	Approved
G3139	BCL2	Malignant melanoma, B-cell lymphoma	Phase III Phase II
ISIS 3521	Protein kinase C alpha	Solid cancers	Phase III
ISIS 5132	RAF kinase	Solid cancers	Phase II
ISIS 2503	HRAS	Cancer	Phase II
GEM 231	Protein kinase A	Solid cancers	Phase II
MG 98	DNA methyltransferase	Solid cancers	Phase II

Szerkezet optimalizálás

Structures compatible with hybridization

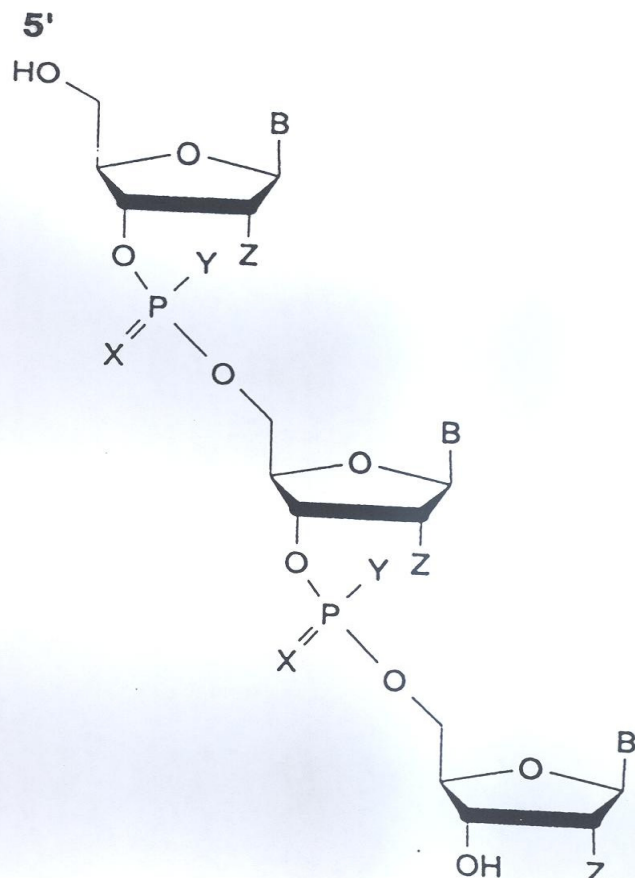
Phosphate: negatively charged

phosphonate: neutral

phosphoramidate: positively charged

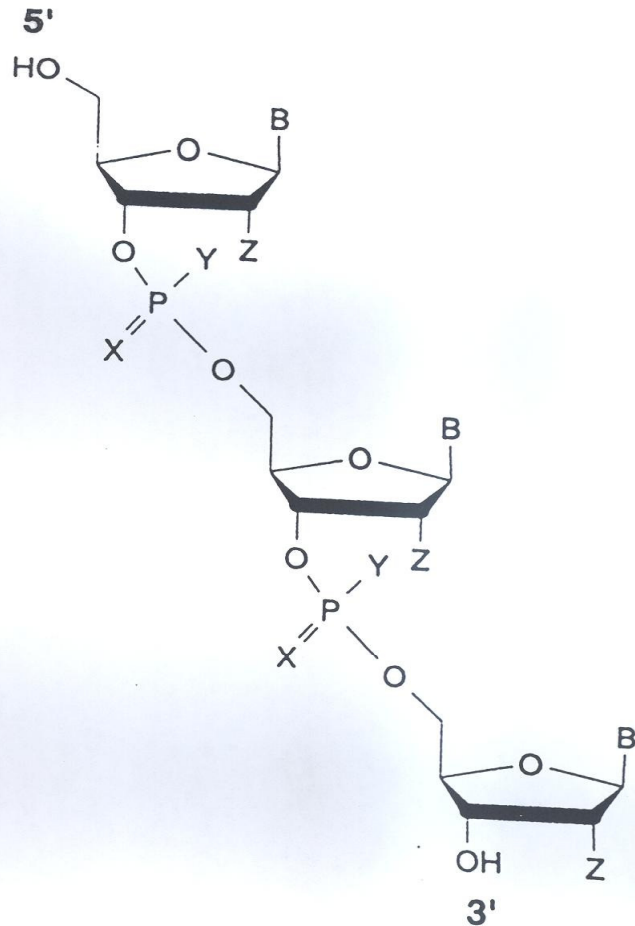
Sugar replacement

Láncmódosítások



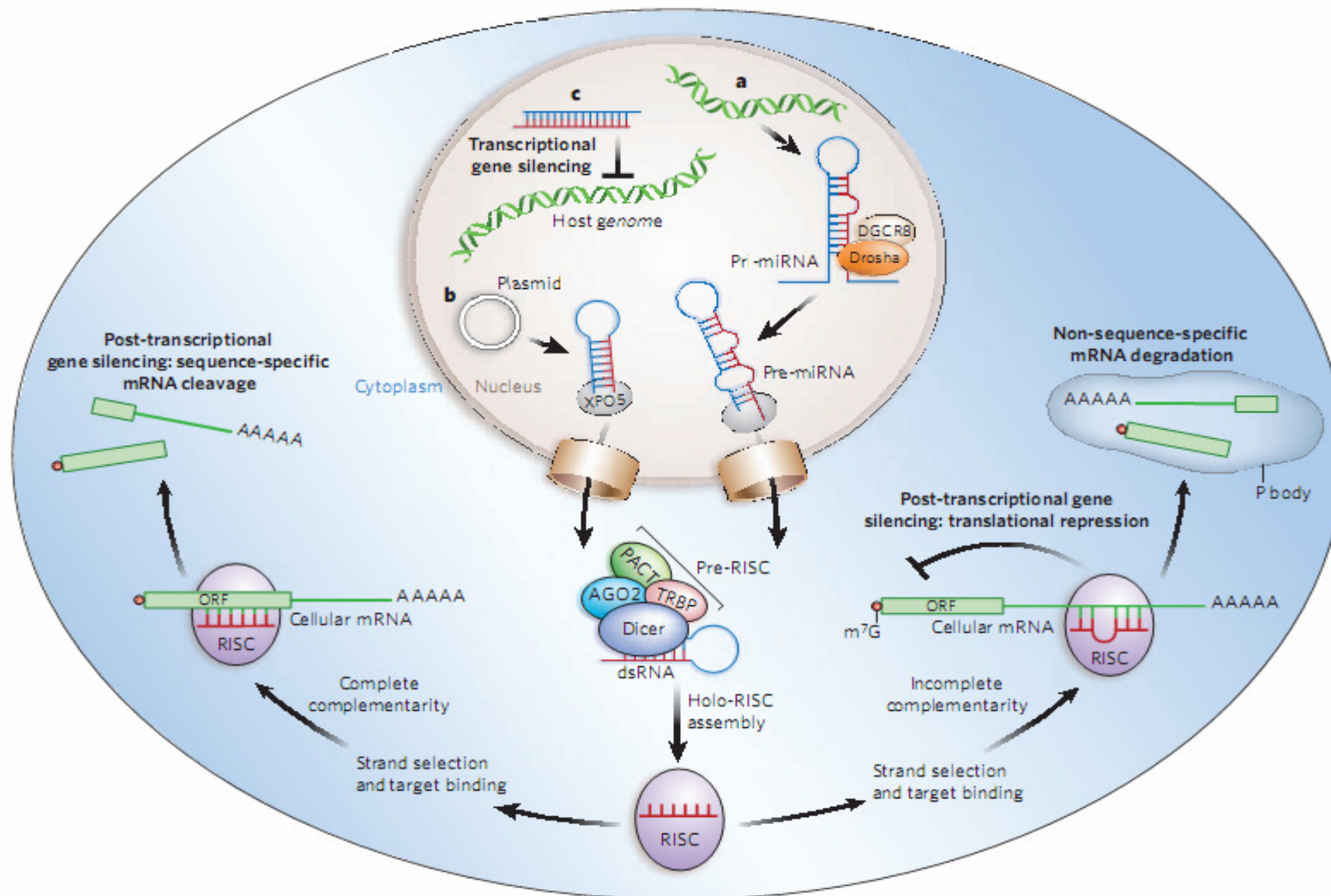
	X	Y	Z
Deoxyoligonucleotides			H
Ribooligonucleotides			OH
2'-O-methyl derivatives			OMe
Unmodified	O	O	
Phosphorothioate	O	S ⁻	
Methylphosphonate	O	CH ₃	
Phosphoramidate	O	NR ¹ R ²	

Láncmódosítások

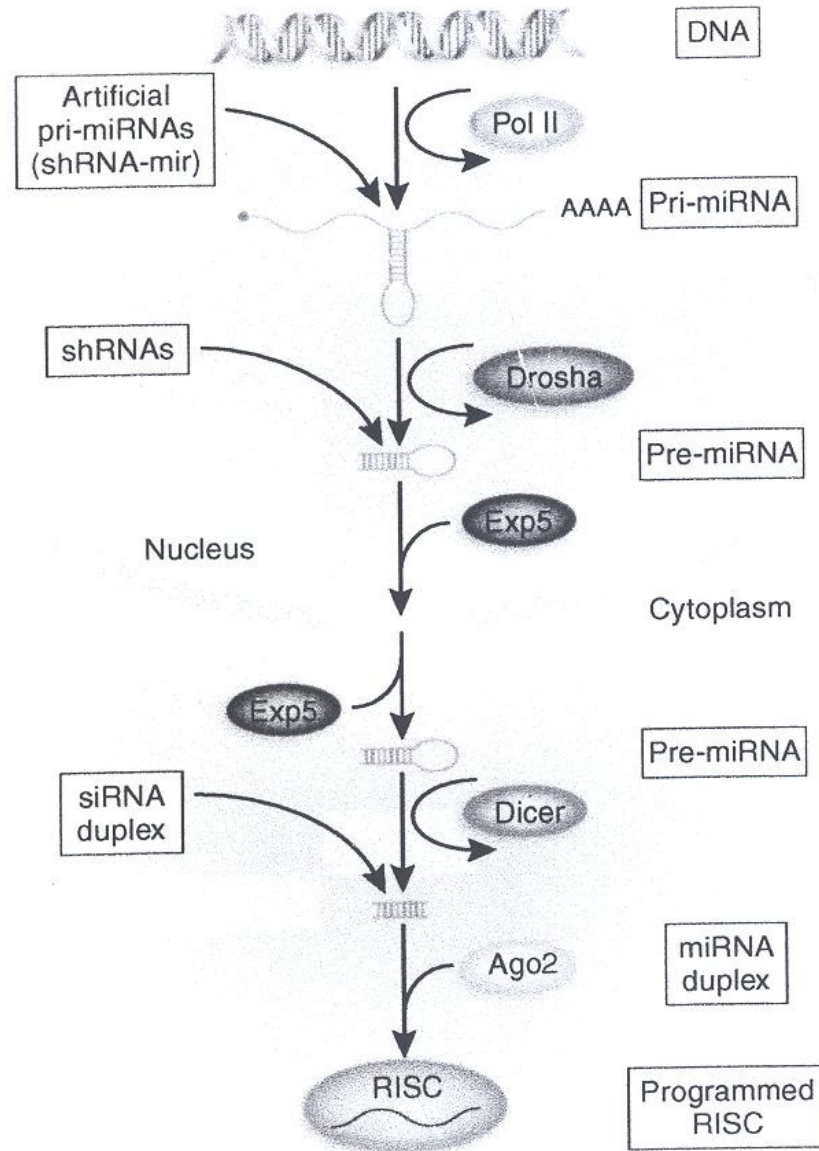


backbone	X	Y	Z
Deoxyoligo-nucleotides			H
Ribooligo-nucleotides			OH
2'-O-methyl-			OMe
unmodified	O	O	
Phosphoro-thioate	O	S ⁻	
Phosphor-amidate	O	NR ¹ R ²	

Mechanism of gene silencing



RNA interference: silencing



GÉN TERÁPIA:

Betegek állapotának javítása annak révén, hogy sejtjeikbe új genetikai anyagot juttatunk.

- **Genetikai betegségek (Adenozin deamináz deficiencia)**
- **Rák (immunterápia, citotoxikus metabolitok)**
- **Komplex genetikai betegségek (genetikai erősítés pl. t-PA⁺ endotél sejtek)**
- **Szerzett genetikai betegségek (vírusinfekció)**

A génterápia alkalmazásai

Örökletes genetikai megbetegedések

Cisztás fibrózis

Súlyos kombinált immunhiány

II típusú hiperkoleszterin kémia

Multifaktoriális betegségek

tumor

szív- és keringési megbetegedések

Vírusfertőzések (szerzett genetikai betegségek)

Megoldandó technikai feladatok

- **Célszövetbe juttatás**
- **Membrán-penetráció**
- **Citoszolbeli degradáció elkerülése**
- **Nukleáris lokalizáció, integrálódás**
- **Expresszió**

Gének célbajuttatása

- Virus vektorok

retrovírus (osztódó sejtek)

adenovírus

HSV (neuron specifikus)

adeno-asszociált vírus

- Liposzóma

- Receptor mediált célbajuttatás

- Plazmid DNS

TABLE I. Characteristics of presently available viral vectors relevant to gene therapy

	Retrovirus	Adeno-associated virus	Adenovirus	Herpes simplex virus
Maximum insert size	Small (6.5 kb)	Small (5 kb)	Intermediate (8 kb)	Large (36 kb)
Maximum attainable titer	Low	Low	High	Low
Viral production	Helper-free	Helper	Helper-free	Helper/helper-free
Infectivity	Dividing cells only	Broad	Broad	Broad
Integration	Chromosomal integration (random)	Chromosomal integration (not random)	Episomal	Episomal
Viral gene persistence in host cells	No	No	Yes	Yes
<i>In vivo</i> risks	Mutagenesis, tumorigenesis	?	Immune response, direct toxicity	Cytopathogenicity
Latency in host cells	No	No	No	Yes
Seriousness of wild-type infection in humans	Low	Low	Low	Low/high

Monogénes veleszületett betegségek

Defective gene	Disease	Reference
Adenosine deaminase	Severe Combined Immunodeficiency	27, 35, 52, 60, 183
α 1-Antitrypsin	Emphysema	23, 42
Arginosuccinate synthetase	Citrullinemia	30
CD-18	Leukocyte Adhesion Deficiency	28
Cystic fibrosis transmembrane regulator	Cystic fibrosis	23, 164
Factor IX	Hemophilia B	26, 29, 44
Factor VIII	Hemophilia A	44
α -L-Fucosidase	Fucosidosis	33
Glucocerebrosidase	Gaucher's Disease	25, 39, 41
β -Glucuronidase	Mucopolysaccharidosis type VII	32
β -Globin	Thalassemia	70, 72, 74
β -Globin	Sickle Cell Anemia	70, 72, 74
α -L-Iduronidase	Mucopolysaccharidosis type I	46
Low-density lipoprotein receptor	Familial Hypercholesterolemia	34, 36, 43, 195
Ornithine transcarbamylase	Hyperammonemia	31
Purine nucleoside phosphorylase	Severe Combined Immunodeficiency	40
Sphingomyelinase	Niemann-Pick Disease	38

ADA Hiánybetegség

Deoxyadenosine ADA Deoxyinosine

Deoxyadenosine a T sejtekre toxikus.

Halálos betegség

Génterápia: keringő limfocitákat in vitro ADA és Neo^R

génnel kezelik (retrovirális vektorban),

majd in vitro szaporítás után visszaadják a

betegnek

Betegek T sejtszáma a normálisra, ADA tartalmuk a normális

25 %-ára emelkedett.

6,5 hónappal a kezelés után a kezelt limfociták és az ADA

aktivitás még közel állandó.

Pozitív in vivo immunreakciók (bőrpróbák)

Rák génterápia

- I. 1. IL-2, vagy TNF_α tartalmú vektorok bevitele a betegből származó tumorsejtekbe.
 2. Módosított sejtek visszaültetése
 3. A módosított tumor helyéről származó TIL és közeli nyirokcsomókból származó limfociták in vitro szaporítása és visszajuttatása.
-
- II. HSV-TK gén injektálása gliomába (patkány kísérlet) majd gancyclovir kezelés.
(Gancyclovirt HSV-TK foszforilálja, így toxikussá válik)