

Biološka zdravila pri raku

Biological drugs

Janko Kos

Povzetek: Biološka zdravila predstavljajo vedno večji delež med novoregistriranimi zdravili. Za razliko od klasičnih zdravil, ki so majhne molekule, so biološka zdravila v večini primerov proteini ali nukleinske kisline, njihova bistvena značilnost pa je tarčno delovanje. V terapiji raka se največ uporabljajo monoklonska protitelesa, ki so po izvoru lahko glodalska, himerna, humanizirana ali popolnoma humana. Uporabljajo se tudi rekombinantni hematopoetski dejavniki, interlevkini in interferoni, ter različni vektorji in fragmenti DNA in RNA kot deli genske terapije. Predstavljena so najpomembnejša biološka zdravila, ki so registrirana za zdravljenje različnih vrst malignih obolenj.

Ključne besede: *biološko zdravilo, protein, nukleinska kislina, rak, monoklonsko protitelo*

Abstract: Biological drugs represent an increasing segment among new registered drugs. Opposite to classical drugs, which are small molecules, the biological drugs are in most cases proteins or nucleic acids and their advantage over classical drugs is their targeted action. In cancer therapy the monoclonal antibodies are the most frequently used biological drugs. With regard to their origin they can be rodent, himeric human-rodent, humanized or completely human. Besides monoclonal antibodies, recombinant hematopoietic factors, interleukins, interferons and various vectors and DNA/RNA fragments as parts of gene therapy are also used. In the paper the most important biological drugs, registered for the therapy of malignant diseases, are presented.

Key Words: *Biological drug, protein, nucleic acid, cancer, monoclonal antibody*

1 Uvod

Biotehnologija je v zadnjih desetletjih eno najhitreje razvijajočih se področij novih tehnologij. Njeni dosežki postajajo nepogrešljivi na področju pridelave hrane, živilske industrije, mikrobne biotehnologije, največji razcvet pa je dosegla sodobna biotehnologija na področju bioloških zdravil. Danes je na tržišču preko 180 bioloških zdravil za humano uporabo, pričakuje se, da bo njihovo število v naslednjih letih še močno poraslo, saj je v tem času v različnih fazah kliničnega preizkušanja vsaj 1600 novih bioloških zdravil.

Biološka zdravila lahko razdelimo na tradicionalna biološka zdravila, pridobljena s klasičnimi biotehnološkimi postopki ali izolirana iz rastlin, živali ali človeške krvi, ter na sodobna biotehnološka zdravila, pridobljena z metodami rekombinantne DNA, moderne celične biologije in usmerjene kemijske sinteze. S temi metodami lahko pripravimo učinkovine proteinskega izvora, ki jih zaradi omejenih naravnih virov ni mogoče pridobiti v zadostnih količinah, ali pa je njihovo pridobivanje etično sporno. Rekombinantna zdravila so na začetku izražali in proizvajali predvsem v bakteriji *Escherichia coli*, danes pa se vse bolj uporabljajo različne celične linije sesalcev, ki omogočajo pridobivanje tudi bolj kompleksnih bioloških učinkovin. Na tržišču se že pojavljajo biološka zdravila druge in tretje generacije z izboljšanimi farmakokinetičnimi in farmakodinamičnimi lastnostmi, pojavila pa so se tudi biološko primerljiva zdravila, ki bodo nedvomno v prihodnosti znižala ceno zdravljenja, ki je danes ena glavnih slabosti pri uporabi bioloških zdravil (1).

Bistvena prednost bioloških zdravil je njihova specifičnost delovanja, saj so bolj kot majhne molekule usmerjena proti terapevtski tarči. To je

še posebej pomembno pri zdravljenju malignih bolezni, kjer so stranski učinki kemoterapije lahko zelo hud problem. Ni naključje, da prav monoklonska protitelesa predstavljajo najštevilčnejšo skupino bioloških zdravil pri raku, saj so znana po svoji specifičnosti. V terapiji raka se uporabljajo tudi rekombinantni hematopoetski dejavniki, interlevkini in interferoni, pa tudi različni vektorji in fragmenti DNA in RNA kot deli genske terapije. V nadaljevanju so predstavljena najpomembnejša biološka zdravila, ki so že registrirana za zdravljenje različnih vrst rakavih obolenj.

2 Protitelesa za zdravljenje raka

Protitelesa ali imunoglobulini (*Ig*) so del humoralnega imunskega sistema sesalcev. So glikozilirani globularni proteini iz naddružine imunoglobulinov z molekulsko maso večjo od 150 kDa. Prisotna so v krvi, tkivnih tekočinah in telesnih izločkih kot so sluz, solze, slina, urin ali mleko doječe matere. Molekule protiteles se razlikujejo po zgradbi, lastnostih in zaščitni vlogi pri obrambi organizma. Protitelesa izločajo diferencirani limfociti B, proti tujku (antigenu) se aktivira več različnih limfocitov B, ki proizvajajo različna protitelesa. Tak poliklonski imunski odziv zagotavlja uspešen odgovor organizma na vdor mikroorganizmov, za uporabo v diagnostične namene in terapevtske namene pa so bolj primerna protitelesa, pridobljena iz enega samega klona limfocitov B - **monoklonska protitelesa**. Njihova bistvena prednost je v definirani specifičnosti in možnosti pridobivanja v neomejenih količinah *in vitro* (2).

Prva registrirana monoklonska protitelesa za terapevtske namene so bila mišjega izvora. Njihovo pridobivanje je omogočil razvoj postopka

priprave hibridomskih celičnih linij, ki *in vitro* proizvajajo protitelesa in se uporabljajo kot neomejen vir za pridobivanje specifičnih monoklonskih protiteles. Tehniko priprave hibridomskih celic sta prva razvila Georges Köhler in Cesar Milstein leta 1975. Vendar so mišja monoklonska protitelesa kazala številne pomanjkljivosti, med njimi je najpomembnejša imunogenost zaradi razlike v aminokislinski sestavi med mišjimi in človeškimi protitelesi. Pri večkratnih odmerkih terapije, najpogosteje pri kroničnih boleznih, lahko organizem odreagira z nastankom humanih protiteles proti mišjim imunoglobulinom, ta odziv pa je znan kot HAMA (angl. izraz. *human anti-mouse antibody*) imunski odziv. Pri naslednji generaciji, to je himernih in humaniziranih protitelesih, je mišjega izvora le še variabilni del oziroma CDR regija, kar močno zmanjša imunogenost in poveča terapevtsko uporabnost. Rešitev problema imunogenosti pa predstavljajo popolnoma humana monoklonska protitelesa. Ta se v zadnjem času pridobivajo z metodami bakteriofagnega prikaza z uporabo fagnih predstavitev knjižnic, ki vsebujejo gene za človeške imunoglobuline in pa s pripravo v transgenih živalih (3).

Protitumorsko delovanje monoklonskih protiteles poteka preko različnih mehanizmov. Kot tarče za delovanje monoklonskih protiteles v protitumorski terapiji so najprimernejši antigeni, specifični za tumorske celice. Vendar antigeni, ki bi bili popolnoma tumorsko specifični, ne obstajajo, zato je vedno nekaj molekul prisotnih tudi na netumorskih celicah. Tudi porazdelitev antigenov, specifičnih za tumorske celice, je na tumorskih celicah lahko zelo heterogena. Prav tako je zelo različna tudi gostota molekul, kar lahko vpliva na učinkovitost zdravljenja z monoklonskimi protitelesi. Prisotnost topnih oblik molekul antigena v krvi dodatno zmanjšuje njihovo terapevtsko učinkovitost.

Protitelesa z vezavo na receptorje za rastne dejavnike blokirajo celično rast in diferenciacijo tumorskih celic in s tem zaustavijo rast tumorja. Primera takega tarčnega antigena so receptorji za epidermalne rastne dejavnike, predvsem HER-1 in HER-2, ki sta pri nekaterih vrstah raka pogosteje prisotna na tumorskih celicah kot na zdravih celicah. Aktivirana receptorja izkazujeta kinazno aktivnost, ki privede do avtofosforilacije tirozinskih preostankov in posledično do transkripcije genov in celične proliferacije. HER receptorji lahko aktivirajo tudi ostale tumorigene procese, kot je angiogeneza, metastaziranje, invazija in apoptoza. Monoklonska protitelesa lahko zavirajo tudi rast tumorskega ožilja in s tem posredno onemogočajo rast tumorjev in metastaziranje. V tem primeru so učinkovita protitelesa, ki inaktivirajo angiogene rastne dejavnike, na primer vaskularni endotelijski rastni dejavnik VEGF. Naslednjo skupino predstavljajo protitelesa, ki so usmerjena proti označevalcem na površini limfocitov in so primerna za zdravljenje levkemij. Ta protitelesa po vezavi na antigen z aktivacijo obrambnih celic in/ali komplementa inducirajo lizo tumorskih celic. Taki označevalci so CD20, CD32 in CD52. Za terapijo se uporabljajo tudi konjugati teh protiteles s toksinom ali radionuklidi. Protitelesa, vezana na tarčne antigene, izkazujejo tudi od protiteles odvisno celično citotoksičnost (ADCC), ki lahko povzroči eliminacijo tumorja s strani različnih imunskih celic (4).

2.1 Terapevtska monoklonska protitelesa proti tirozin kinaznim receptorjem (receptorjem epidermalnega ravnega dejavnika HER-1 in HER-2/neu)

Trastuzumab (Herceptin®)

Trastuzumab je himerno monoklonsko protitelo razreda IgG1, ki prepozna humani epidermalni rastni dejavnik 2 (HER-2). Pridobivajo ga z ekspresijo v ovarijskih celicah kitajskega hrčka (CHO).

Pri preobrazbi normalne v rakasto celico se zaradi spremembe HER-2 gena poveča število receptorskih molekul na površini celic, kar pomeni slabšo prognozo in večjo agresivnost tumorja. Le bolnice, ki imajo omenjeni receptor prekomerno izražen, so primerne za zdravljenje s trastuzumabom. Le ta se veže na ektodomeno receptorjev in tako preprečuje nadaljni razvoj tumorja in njegovo rast. Po vezavi na receptor in njegovi blokadi protitelo sproži od Fc dela odvisno aktivacijo komplementa in celično citotoksičnost. Testiranje bolnic za HER-2 se opravi na odvzetem vzorcu tkiva (med operacijo ali ob biopsiji) z uporabo dveh metod. Prva je imunohistokemijska analiza, kjer se določi proteinsko koncentracijo HER-2 receptorjev na celicah in izrazi s stopnjami 1+, 2+ ali 3+. V primeru, da so dobljene vrednosti 0 ali 1+, je rezultat HER-2 negativen, kar pomeni, da bolnica ni primerna za zdravljenje s trastuzumabom. Če je končna vrednost te analize 2+ ali 3+, se opravi test še z drugo metodo fluorescenčne in situ hibridizacije (FISH), ki dokončno pokaže primernost za zdravljenje s trastuzumabom.

Herceptin se uporablja za zdravljenje bolnikov z metastatsko obliko raka dojke, katerih tumorji imajo čezmerno izražen HER2 receptor:

- kot monoterapija za zdravljenje tistih bolnikov, ki so predhodno za svojo metastatsko bolezen že prejeli kemoterapijo
- v kombinaciji s paklitakselom za zdravljenje tistih bolnikov, ki še niso prejeli kemoterapije za metastatsko bolezen in za katere antraciklini niso primerni.
- v kombinaciji z docetakselom za zdravljenje tistih bolnikov, ki še niso prejeli kemoterapije za metastatsko bolezen.

Cetuximab (Erbix®)

Cetuximab, je himerno monoklonsko protitelo IgG1, ki se specifično veže na receptor epidermalnega ravnega dejavnika 1 (HER-1). S tem blokira njegovo delovanje, posledično se inaktivirajo vse stopnje signalne kaskade, ki jih HER-1 aktivira z vezavo na receptor. Pridobiva se z izražanjem v kulturi ovarijskih celic kitajskega hrčka (CHO). Delovanje cetuximaba je podobno kot pri trastuzumabu, saj vezava z visoko afiniteto na HER-1 receptor povzroči inhibicijo celične proliferacije, saj se zaustavi G1 faza celičnega cikla.

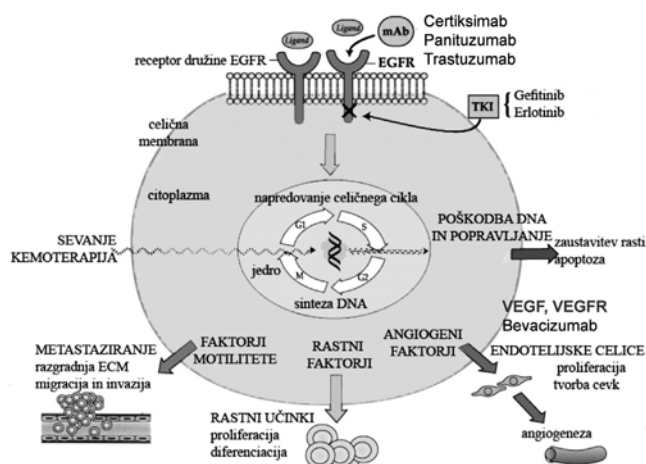
Cetuximab je v kombinirani terapiji z irinotekanom indiciran za zdravljenje bolnikov z metastatskim rakom debelega črevesa in danke z izražanjem HER-1 po neuspešni citotoksični terapiji, ki je vključevala tudi irinotekan.

Cetuximab je v kombinaciji z radioterapijo indiciran tudi za zdravljenje bolnikov z lokalno napredovanim rakom skvamoznih celic glave in vratu.

Panituzumab (Vectibix®)

Panitumumab je humano rekombinantno monoklonsko protitelo, ki se specifično veže na receptor epidermalnega ravnega dejavnika 1 (HER-1). Princip njegovega delovanja je podoben kot pri cetuksimabu. Bistvena razlika pa je ta, da je panituzumab glede na primarno strukturo popolnoma humano protitelo. Pridobljeno je bilo s pomočjo transgenih živali, proizvaja pa se v CHO celicah.

Panituzumab se uporablja za zdravljenje napredovanega metastatskega raka debelega črevesa in danke ali po neuspešni kemoterapiji z fluoropirimidinom, oksiplatinom in irinotekanom.



Slika 1: Mehanizem delovanja terapevtskih protiteles proti receptorjem epidermalnega ravnega dejavnika. Povzeto po (1, 5).

Figure 1: Mechanism of action of monoclonal antibodies against receptors for epidermal growth factor. Adopted from (1, 5).

2.2 Terapevtska monoklonska protitelesa proti limfocitnim označevalcem CD20, CD32 in CD52

Rituksimab (Rituxan®, MabThera®)

Rituximab je himerno monoklonsko protitelo IgG1, usmerjeno proti CD20 antigenu. Pridobivajo ga z izražanjem v kulturi ovarijskih celic kitajskega hrčka (CHO).

Rituksimab se specifično veže na CD20 antigen, transmembranski protein z molekulsko maso 35 kDa, lokaliziran na limfocitih B. Do ekspresije antigena pride na več kot 90% limfocitov B pri ne-Hodgkinovem limfomu (NHL). CD20 regulira procese inicializacije in diferenciacije celičnega cikla. Po vezavi protitelesa na CD20 se kompleks ne odstani s celične površine in se tudi ne privzame v celico. Prav tako se prostega CD20 antigena ne najde v krvnem obtoku. Mehanizem delovanja je povezan z od komplementa in od protiteles odvisno celično citotoksičnostjo. Vezava rituksimaba na antigen CD20 na limfocitih B povzroči celično smrt z apoptozo.

Rituksimab je indiciran za zdravljenje bolnikov s III. in IV. stadijem folikularnih limfomov, ki so neodzivni na kemoterapijo in pri katerih se je bolezen po kemoterapiji drugič ali že večkrat ponovila.

Indiciran je tudi za zdravljenje predhodno nezdravljenih bolnikov s III. in IV. stadijem folikularnih limfomov v kombinaciji s kemoterapijo CVP.

Vzdrževalno zdravljenje z rituksimabom je indicirano za bolnike s folikularnimi limfomi, odzivnimi na indukcijsko zdravljenje s kemoterapijo po tem, ko se na prejšnje zdravljenje niso odzvali ali se je pri njih bolezen ponovila.

Rituksimab je indiciran za zdravljenje bolnikov s CD20 pozitivnim difuznim velikoceličnim B ne-Hodgkinovim limfomom v kombinaciji s kemoterapijo CHOP.

Ibritumomab-tiuksetan (Zevalin®)

Ibritumomab tiuksetan je mišje rekombinantno monoklonsko protitelo, ki je specifično za B-celični antigen CD20 in označeno z izotopom itrij-90 ali indijem -111. Izotopa sta vezana na protitelo preko kelatorske skupine tiuksetana [N-[2-bis(karboksimetil)amino]-3-(p-izotiocianatofenil)-propil]-[N-[2-bis(karboksimetil)amino]-2-(metil)-etil]glicin z uporabo bifunkcionalnega reagenta DTPA (cikloheksil dietilentriaminpentaocetna kislina). Protitelo pridobivajo ga z izražanjem v kulturi ovarijskih celic kitajskega hrčka (CHO).

Uporablja se po predhodnem zdravljenju z rituksimabom.

Mehanizem vezave protitelesa na antigen je enak kot pri rituksimabu.. Izotopa itrij-90 in indij -111 sta sevaleca žarkov β oziroma γ , zato ima ibritumomab-tiuksetan sposobnost uničiti tako ciljne kot tudi sosednje celice. Uporaba ibritumomab-tiuksetana povzroči zmanjšanje števila CD20 pozitivnih limfocitov B.

Z ^{90}Y ali ^{111}In označeni ibritumomab-tiuksetan je indiciran za zdravljenje odraslih bolnikov z ne-Hodgkinovim limfomom (NHL) folikularnih celic B CD20+, ki je po zdravljenju z rituksimabom recidiviral ali je zanj neodziven.

Tositumomab (Bexxar®)

Tositumomab je mišji analog rituksimaba, usmerjen proti B celičnemu antigenu CD20 in označen z izotopom jod 131. Uporablja se za zdravljenje ne-Hodgkinovega limfoma po predhodnem zdravljenju z rituksimabom ali v kombinaciji z njim. Pridobiva se iz celične kulture hibridomskih celic.

Indiciran je za zdravljenje bolnikov z ne-Hodgkinovim limfomom, ki so bili neodzivni na terapijo z rituksimabom.

Gentuzumab ozogamicin (Mylotarg®)

Gemtuzumab ozogamicin je kemoterapevtik, ki ga sestavlja humanizirano monoklonsko protitelo IgG4, usmerjeno proti CD33 in pa citotoksični antibiotik calicheamicin, ki sta med seboj delno kovalentno povezana, del molekul calicheamicina pa je prostih. Protitelo pridobivajo z izražanjem v sesalčki mielomski celični liniji NS-1. Gemtuzumab se specifično veže na CD33 antigen, ki se nahaja na površini levkemičnih mieloblastov in nezrelih celic mielomonocitne vrste. Ta antigen se nahaja na površini levkemičnih celic pri več kot 80% bolnikov z akutno mieloično levkemijo (AML). Pri vezavi protitelesa na antigen se tvori kompleks, ki se internalizira. V lizosomih mieloidne celice se nato sprosti calicheamicin, ki preide v jedro in se veže na DNA. Posledica vezave je prekinitev dvojne vijačnice in smrt celice.

Gentuzumab ozogamicin se uporablja za zdravljenje CD33 pozitivne akutne mieloične levkemije pri ponovnem pojavu bolezni za bolnike, ki so stari nad 60 let in pri katerih se ne da uporabiti citotoksične kemoterapije.

Alemtuzumab (Campath®)

Alemtuzumab je rekombinantno humanizirano monoklonsko protitelo tipa IgG1, ki je usmerjeno proti celičnemu površinskemu antigenu CD52, ki se nahaja na normalnih in malignih B in T limfocitih, monocitih, makrofagih in celicah moškega reproduktivnega sistema. Po vezavi na CD52 antigen se sproži od Fc dela pogojena vezava komplementa in celična citotoksičnost. Posledica je odstranitev malignih limfocitov iz krvi, kostnega mozga in ostalih organov. Pridobivajo ga z izražanjem v kulturi ovarijskih celic kitajskega hrčka (CHO).

Alemtuzumab je indiciran za zdravljenje B-celične kronične limfocitne levkemije (B-CLL) pri bolnikih, ki se zdravijo z alkilanti in ki se ne odzivajo na terapijo s fludarabinom.

2.3 Protitelesa proti vaskularnem endotelijskem rastnem dejavniku

Bevacizumab (Avastin®)

Bevacizumab je rekombinantno humanizirano monoklonsko protitelo, pridobljeno s tehnologijo rekombinantne DNA, ki se veže na vaskularni endotelijski rastni dejavnik (VEGF) in s tem zavira vezavo VEGF na njegova receptorja VEGFR-1 in VEGFR-2 na površini endotelijskih celic. S tem zavira rast tumorskega žilja in posredno zmanjša hitrost rasti tumorja in nevarnost metastaziranja. Povečano izražanje VEGF sproži pomanjkljiva oskrba tkiva s kisikom, sprememba pH, sprememba tlaka, različni rastni dejavniki, interlevkin-1. Po vezavi VEGF se receptor transavtofosforilira in sproži signalno kaskado, ki poveča rast, preživetje in delitev endotelijskih žilnih celic. VEGF poveča tudi permeabilnost žil in tvorbo ekstravaskularnega gela iz fibrina, ki predstavlja primerno okolje za rast endotelijskih celic. Bevacizumab pridobivajo z izražanjem v kulturi ovarijskih celic kitajskega hrčka (CHO).

Bevacizumab je v kombinaciji z intravenskim 5-fluorouracilom/folinsko kislino ali intravenskim 5-fluorouracilom/folinsko kislino/irinotekanom indiciran za prvo linijo zdravljenja metastatskega raka debelega črevesa ali danke.

2.4 Terapevtska monoklonska protitelesa proti prostاتnem specifičnem membranskem antigenu (PSMA)

Capromab pendetide (ProstaScint®)

Capromab pendetide je mišje monoklonsko protitelo, na katerega je preko kelatorskega tripeptida (glicil-tirosil- (N,N-dietilentriamin-pentaocetna kislina)-lizin hidroklorid vezan izotop indij 111. Protitelo specifično prepozna prostatici specifični membranski antigen (PSMA), ki ga izražajo epiteljske celice v normalnem in hipertrofiranim tkivu prostate. Je specifičen za tkivo prostate, označuje tudi metastaze tumorjev prostate, ne prepozna pa rakavih celic katerekoli druge vrste tumorjev. Pridobiva se s celične kulture hibridomskih celic.

¹¹¹In-capromab pendetide se uporablja za radiodiagnostično označevanje tumorjev prostate. Primeren je za lokalizacijo tumorja pri novodiagnosticiranih bolnikih, pri katerih je bil rak prostate dokazan z biopsijo in ki so rizični glede metastaziranja v okoliške bezgavke.

3 Hematopoezni dejavniki

3.1 Eritropoetin

Eritropoetin je najpomembnejši hematopoetski rastni dejavnik. Zrela oblika ima sialoglikoproteinsko strukturo in je sestavljena iz 165 aminokislin (30,4 kDa). Nastaja predvsem v ledvicah, v manjši meri tudi v jetrih. Eritropoetin deluje na eritroidne izvorne celice in na prekursorje eritrocitov v kostnem mozgu in nadzira njihovo proliferacijo, diferenciacijo in zorenje. Nastajanje eritropoetina se v ledvicah močno poveča pri pomanjkanju kisika (hipoksija), premajhno nastajanje pa je vzrok za anemije. Šele priprava rekombinantnega humanega eritropoetina konec 80. let prejšnjega stoletja je omogočila uspešno zdravljenje anemij kot posledic kronične in akutne odpovedi ledvic, presaditve organov in tkiv, kemoterapije in radioterapije pri raku, delovanja nekaterih tumorjev, virusov, itd. (6).

Rekombinantni eritropoetini, ki so na tržišču, se razlikujejo glede zgradbe sladkornih verig, načina priprave in farmakokinetičnih in farmakodinamičnih lastnosti. Tako imamo alfa, beta in delta eritropoetine. Na tržišču se pojavljajo tudi že eritropoetini druge in tretje generacije. Tak je na darbepoetin, ki ima dodatni glikozilacijski mesti in s tem daljšo biološko razpoložljivost. Drugi pristopi za podaljšanje biološke razpoložljivosti so na primer pegiliranje in mikrokapsuliranje.

Za zdravljenje rakavih bolnikov se uporabljajo alfa, beta in darbepoetini. Indicirani so za zdravljenje anemije po kemoterapiji, predvsem bolnikov z limfomi ali multiplimi mielomi.

3.2 Granulocitne kolonije stimulirajoči dejavnik (G-CSF)

Granulocitne kolonije stimulirajoči dejavnik (G-CSF) je glikoprotein, ki nastaja monocitih, makrofagih, fibroblastih in endotelijskih celicah. G-CSF stimulira proliferacijo izvornih celic v kostnem mozgu in njihovo diferenciacijo v granulocitne nevtrofilce, ki so pomembni del imunskega sistema v obrambi pred patogenimi mikroorganizmi. G-CSF poveča število nevtrofilcev v obtoku in pojača njihovo delovanje.

Na trgu je več oblik G-CSF, ki se razlikujejo glede stopnje glikozilacije, pegilacije in načina pridobivanja (filgrastim, lenograstim, pegfilgrastim). G-CSF je indiciran za zdravljenje nevtropenije kot posledice kemoterapije bolnikov z rakom (7).

3.3 Granulocitne/makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik (GM-CSF)

Granulocitne/makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik (GM-CSF) spodbuja proliferacijo in diferenciacijo predvsem celic granulocitno makrofagne linije. Aktivira pa tudi že zrele granulocite in makrofage. Tudi tu se pri rekombinantnih produktih, ki so na trgu, srečamo z različnimi oblikami, ki se razlikujejo glede aminokislinske sestave, stopnje glikozilacije in načina pridobivanja (sargramostim, molgramostim). GM-CSF je indiciran za zdravljenje nevtropenij pri

bolnikov, ki prejemajo mielosupresivno kemoterapijo in pa pri bolnikih z avtologno ali singeno presaditvijo kostnega mozga, da se pospeši mieloidno okrevanje (8).

4 Interlevkini in interferoni

Interlevkini in interferoni spadajo v širšo skupino citokinov, snovi, ki jih izločajo različne celice in izkazujejo določen učinek na tarčne celice. Njihovo število je zelo veliko, v terapevtske namene se uporabljajo le nekateri, za terapijo rakavih obolenj predvsem interlevkin 2, interlevkin 11 in interferon alfa (9).

4.1 Interlevkin 2

Interlevkin 2 (IL2) je glikoprotein s 133 aminokislin dolgo polipeptidno verigo. Veže se na receptorje, ki so izraženi predvsem na aktiviranih limfocitih T. Vezava IL2 na receptorje povzroči njihovo proliferacijo. Uporablja se za povečevanje imunske odpornosti. Na tržišču so rekombinantne oblike IL2 - aldeslevkin (originalna in biološko primerljiva zdravila) in pa rekombinantni fuzijski protein IL2 in fragmentov toksina davece – denilevkin difitoks. Z IL2 zdravimo bolnike z metastatskim rakom ledvic, melanomom, rakom debelega črevesja in danke in rakom mehurja. Denilevkin difitoks se uporablja za zdravljenje trajnega ali ponavljajočega kožnega limfoma celic T.

4.2 Interlevkin 11

Interlevkin 11 (IL11) izločajo predvsem stromalne celice kostnega mozga in je neposredno vpleten pri hematopoezi, predvsem pri razvoju megakariocitov. Zato se uporablja pri kemoterapijah za preprečevanje trombocitopenije. Rekombinantni IL2 oprelvekin posnema zreli del človeškega IL2, razlikuje pa se v tem da nima N-končnega prolina. Odstarnitev ne vpliva na biološko aktivnost oprelvektina. Ker je izražen v *E. coli*, tudi za razliko od človeškega IL2 ni glikoziliran. Oprelvekin se uporablja za preprečevanje hude trombocitopenije pri mielosupresivni kemoterapiji pri bolnikih z nemieloidnimi malignimi obolenji.

4.3 Interferon alfa 2

V človeškem genomu imamo genske zapise za 13 različnih proteinov interferona alfa (IFN α) (10). Vsi imajo 166 aminokislin, razen IFN α 2, ki jih ima 165 zaradi delecije na mestu 44. Glede na aminokislinsko zaporedje so si IFN α med seboj podobni, razlikujejo pa se glede na svoje delovanje. Pri nekaterih IFN α obstajajo dodatne razlike v posameznih aminokislinah, pri IFN α 2 tako ločimo IFN α 2a, IFN α 2b in IFN α 2c. V terapevtske namene se uporabljata IFN α 2a in IFN α 2b. Oba izkazujeta protivirusne, mieloproliferativne in imunomodulatorne učinke. Poleg osnovnih rekombinantnih oblik, pridobljenih v *E. coli*, na tržišču obstajajo tudi njune pegilirane oblike. Zaradi protivirusnega delovanja se IFN α 2a uporablja za zdravljenje hepatitisa, v protitumorski terapiji pa za zdravljenje dlakastocelične levkemije, Kaposijevega sarcoma in kronične mieloidne levkemije, dodatno tudi pri malignem melanoma, zdravljenju genitalnih bradavic, nastalih zaradi človeškega papiloma virusa ter pri folikularnem limfomu.

5 Gensko zdravljenje raka

Rak je bolezen genov, zato so novejši pristopi zdravljenja usmerjeni bodisi k dodajanju funkcionalnih genov ali nadomestitvi okvarjenih

genov, kar naj bi privedlo do vzpostavitve normalnega celičnega fenotipa. Lahko pa z genskim zdravljenjem vzpodbudimo procese, ki vodijo do propada tumorskih celic, kot je na primer apoptoza ali protitumorski imunski odziv ali pa inhibiramo tiste, ki napredovanje raka pospešujejo, na primer angiogenezo (utišanje VEGF, bFGF, TGF). (1) Za spreminjanje genov lahko uporabimo različne pristope, tako utišanje z metodo kratke interferenčne RNA, protismiselne DNA/RNA, vnos genov z virusi ali z nevirusnimi sistemi, kot so elektroporacija ali kompleksiranje DNA z lipidi, itd. V vseh teh primerih imamo opravka z biološkimi makromolekulami, zato lahko rečemo, da tudi ti načini zdravljenja vključujejo biološka zdravila.

Geni, ki so povezani z apoptozo tumorskih celic, so pogosto tarča pri genskem zdravljenju raka. Tak je TNFerade adenovirusni vektor, ki v tumorsko tkivo, kamor ga vbrizgamo, vnese gen za dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF- α). TNF α je protein z močnim protitumorskim učinkom, ki pa je preveč toksičen za sistemsko uporabo. Sam vnos vektorja ne omogoča zadostne selektivnosti, saj se gen vključi tudi v mnoge celice okolišnega tkiva. Dodatno selektivnost so dosegli z uporabo na sevanje občutljivega promotorja, v tem primeru se TNF α izrazi le v tumorskih celicah, ki jih obsevamo. Drugi proapoptotični geni, ki so bili testirani v genski terapiji raka, so p53, p16/p27, FasL, kaspaze, Bax, Bak in apoptin. (Glej prvi prispevek). V rakave celice lahko vnesemo tudi samomorilske gene kot so timidin-kinaza virusa herpesa simpleksa in citozin-deaminaza.

Vnos genov v tumorske celice, ki usmerijo in povečajo protitumorski imunski odziv, je naslednji obetaven pristop. Tako na primer inducirano izražanje GM-CFS ali IL24 v tumorskih celicah vzpodbudi protitumorski imunski odgovor. Taki geni so lahko tudi različni citokini, na primer IL-1, IL-12 ali IFN- α . Naslednje pomembno področje predstavlja izražanje in predstavitev s tumorji povezanih antigenov (TAA) in uporaba dendritičnih celic pri razvoju protitumorskega imunskega odziva. Gene s tumorji povezanih antigenov lahko vnesemo tudi v viruse (TRICOM in ANVAC-VF), te vnesemo v imunske celice in jih usmerimo proti tumorskim celicam.

Žal uspehi genskega zdravljenja raka še niso primerljivi z ostalimi biološkimi zdravili.

6 Literatura

- Štrukelj, B., Kos, J., Biološka zdravila: Od gena do učinkovine. Slovensko farmacevtsko društvo, 2007.
- Glennie, M. J., Van den Winkel, J.G.J. Renaissance of cancer therapeutic antibodies. *Drug Discov Today* 2003, 8: 503-510
- Gilliland, L.K., Walsh, L.A., Frewin, M.R., Wise, M., Ton, e M., Hale, G., Kioussis, D., Waldmann, H. Elimination of the immunogenicity of therapeutic antibodies. *J Immunol* 1999, 162: 3663-3671
- Burton DR. Antibodies, viruses and vaccines. *Nature Rev Immunol* 2002, 2: 706-71.
- Harrari, H.M., Huang, S.M. Searching of reliable epidermal growth factor receptor response predictors. *Clin. Cancer Res.* 2004, 10:691-700.
- Marsden, J.T. Erythropoietin-measurement and clinical applications. *Ann. Clin. Biochem.* 2006, 43:97-104.

7. Touw, I.P., in sod. Granulocyte colony-stimulating factor: key (f)actor or innocent bystander in the development of secondary myeloid malignancy. J. Natl. Cancer Inst. 2007, 99: 184-6.
8. Shi, Y. in sod. Granulocyte macrophage colony stimulating factor and T cell responses: what we do and do not know. Cell Res. 2006, 16:126-33.
9. Taniguchi, T., Minami, Y. The IL-2/IL2 receptor system: a current overview. Cell 1993, 73_ 5-8.
10. Pestka, S., Krause, C.D., Walter, M.R. Interferons, interferon like cytokines, and their receptors. Immunol. Rev. 2004, 202: 8-32.