

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Интегрисане академске студије фармације

Г06 – Фармацеутска биотехнологија

## **АНТИСЕНС ТЕРАПИЈА**

15. НЕДЕЉА НАСТАВЕ

Летњи семестар 2022/2023. године

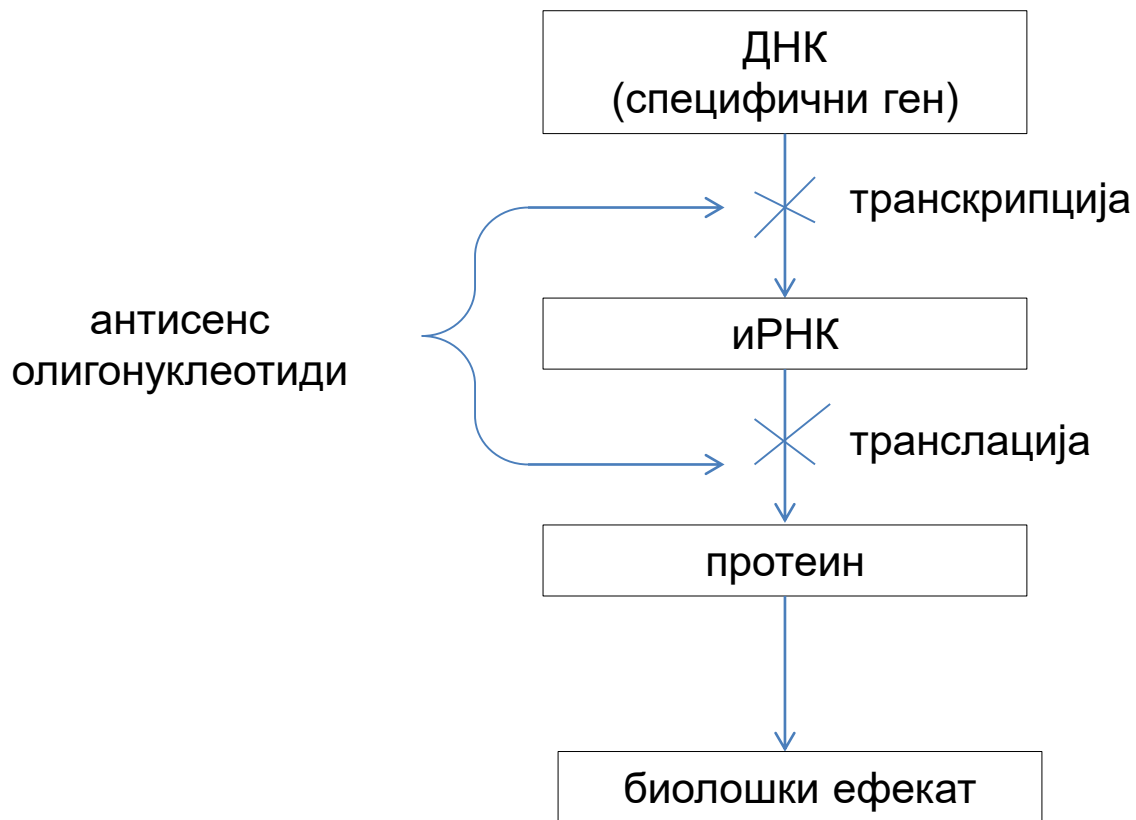
Крагујевац

## Антисенс терапија

- Поједина патолошка стања настају услед неадекватне/прекомерне продукције генских производа:
  - експресија онкогена која резултује настанком трансформисаних ћелија;
  - прекомерна експресија цитокина која резултује погоршањем симптома болести;
  - прекомерна производња ангиотензиногена која изазива хипертензију;
  - транскрипција и транслација вирусних гена током вирусне репликације у ћелији.
- Патолошка стања изазвана неадекватном експресијом гена могла би се спречити или лечити модификацијом експресије. За постизање овог циља користи се приступ заснован на нуклеинским киселинама који се назива „антисенс терапија“.

## Антисенс технологија

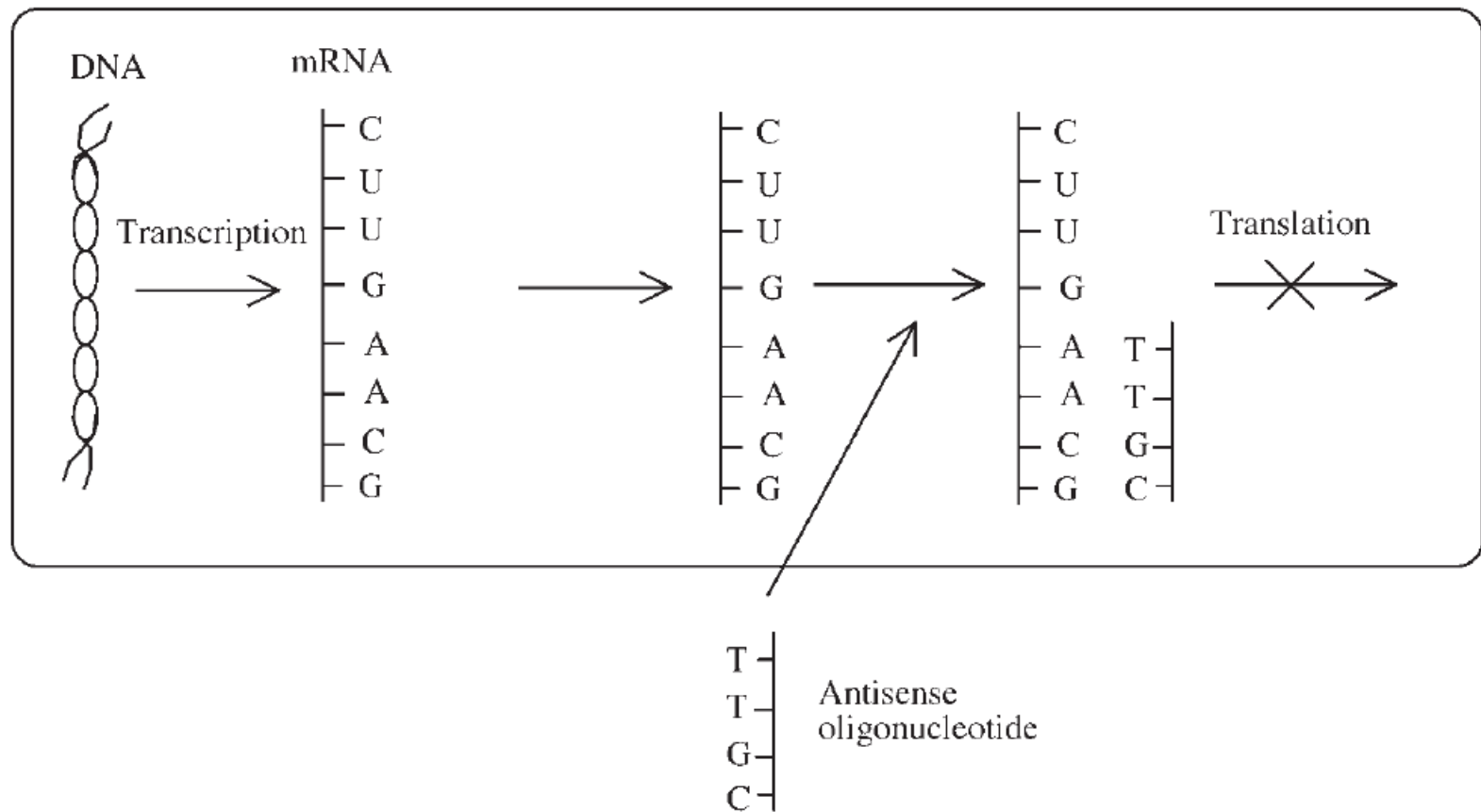
- Антисенс технологија се заснива на синтези антисенс олигонуклеотида. То су кратке, једноланчане секвенце нуклеинских киселина (засноване на ДНК или РНК) које представљају специфичну нуклеотидну секвенцу.
- Олигонуклеотиди се везују за ДНК (на специфичним позицијама на генима) или, чешће, за иРНК добијену из специфичних гена. У већини случајева, везивање се одвија по принципу комплементарних базних парова. Везивање олигонуклеотида за нуклеинске киселине спречава настанак генског производа блокирањем процеса транскрипције или транслације.



Концепт антисенс терапије: циљ је спречавање настанка генског производа (протеина) блокирањем транскрипције или транслације тог гена

## Механизам дејства антисенс олигонуклеотида

- иРНК диктира аминокиселинску секвенцу протеина, те се за њу каже да представља "смисао" (од енгл. *sense*). иРНК је комплементарна „антисенс“ ланцу ДНК.
- Како би се хемијски синтетисали олигонуклеотиди (дезоксирибо- или рибонуклеотида) неопходно је да бар део циљне нуклеотидне секвенце иРНК буде познат. Када овај олигонуклеотид доспе у ћелију, захваљујући комплементарности секвенци са иРНК долази до њихове хибридизације.



Схематски приказ механизма дејства антисенс олигонуклеотида

## Механизам дејства антисенс олигонуклеотида

- Антисенс олигонуклеотид је најчешће састављен од 17 или више нуклеотида. Везивање антисенс олигонуклеотида се најчешће дешава у једру, а успешност зависи од комплементарности база, као и од секундарне и терцијарне структуре диктиране РНК молекулом.
- Механизам његовог дејства подразумева блокирање транслације чиме се спречава синтеза генског производа.
- Интрамолекулским комплементарним упаривањем база стварају се кратке, двоструке секвенце одвојене петљама. Овај виши ниво структуре је функционално важан, јер служи за препознавање протеина и додатних нуклеинских киселина и помаже у стабилизацији РНК.

## Идентификација секвенце олигонуклеотида

- Региони који су одговорни за интрамолекулско упаривање база нису добра мета за антисенс олигонуклеотиде. Стога је пожељно синтетисати нуклеотид чија је секвенца комплементарна доступној секвенци унутар скелета иРНК. За идентификацију таквих секвенци (при чему је целокупна секвенца иРНК позната) користе се различити приступи.
- "Слепи" или "насумични" приступ подразумева синтетисање великог броја олигонуклеотида намењених различитим деловима иРНК, који се често преклапају. Способност сваког олигонуклеотида да блокира транслацију иРНК се процењује *in vitro* помоћу медијума без ћелија.



## Идентификација секвенце олигонуклеотида

- Други приступ подразумева употребу различитих компјутерских програма за испитивање секвенце иРНК са циљем предвиђања вишег нивоа њене структуре и идентификације доступне секвенце.
- Често су погодни делови секвенце почетна места за транслацију иРНК, јер су од пресудног значаја за овај процес, и најчешће су без секундарне структуре. Међутим, хомологе секвенце могу постојати унутар тих секвенци и у другим генима. То смањује специфичност блокирања и може довести до клинички значајних нежељених ефеката.

## Идентификација секвенце олигонуклеотида

- Везивање изазива блокаду транслације иРНК и, према томе, спречава синтезу зрелих генских производа, тј. протеина. Антисенс олигонуклеотиди спречавају транслацију иРНК стварањем двоструких хеликса следећим механизмима:
  - (а) олигонуклеотиди се понашају као стерни блокатори, тј. спречавају протеине укључене у транслацију или друге процесе иРНК, да се вежу за одговарајуће секвенце у иРНК;
  - (б) стварање двоструких хеликса вероватно омогућава и циљање унутарћелијским РНКазама, као што је РНКазаХ. Овај ензим је способан да се веже за двоструки хеликс РНК-ДНК и разгради РНК део (већина синтетских антисенс олигонуклеотида је заснована на ДНК молекулу).

## Примена олигонуклеотида

- Антисенс олигонуклеотиди („олигос“) се испитују у претклиничким и клиничким студијама као терапијска средства за лечење карцинома и бројних вирусних обољења (нпр. инфекције ХИВ, хепатитис Б, херпес и папилома вирусима). Такође имају потенцијалну примену у лечењу других болести код којих би спречавање експресије гена могло имати користан ефекат, нпр. код рестенозе, реуматоидног артритиса и алергија.

## Примена олигонуклеотида

- Олигонуклеотиди су најчешће индиковани за терапију карцинома. Механизам дејства подразумева циљање гена чија је прекомерна експресија окидач за настанак тумора (нпр. производи Bcl-2, сурвивин и кластерин гена).
- Производи Bcl-2 онкогена инхибирају апоптозу и тако подстичу прогресију неоплазми.
- Сурвивин се углавном не експримира у здравом ткиву, али је зато у високом проценту присутан код карцинома, укључујући карцином плућа, дебелог црева, дојке и простате. Има важну улогу у стимулацији ћелијске деобе и у инхибицији апоптозе.
- Кластерин ген кодира цитопротективни протеин шаперон, чија је повећана производња повезана са различитим врстама карцинома код људи.

## Предности олигонуклеотида

- Као потенцијални лекови, антисенс олигонуклеотиди имају бројне предности:
- Специфичност

Вероватноћа да је било која базна секвенца са више од 17 база присутна више пута у нуклеинским киселинама хуманих ћелија је мала. Самим тим мало је вероватно да ће се олигонуклеотид са  $\geq 17$  нуклеотидних јединица, који је дизајниран да се успешно веже за циљну иРНК, везати за било коју другу иРНК. Стога се већина синтетских олигонуклеотида састоји од 17 нуклеотидних јединица. Они имају готово апсолутну специфичност за циљну секвенцу.

## Предности олигонуклеотида

- Релативно мала токсичност  
Вероватно захваљујући прецизном везивању олигонуклеотида за иРНК и чињеници да су они "природни" биомолекули. Међутим, токсичност може бити изазвана неспецифичним везивањем за протеине и већина антисенс лекова подстиче проинфламаторне ефекте уколико се примењују у високим дозама.
- Присутни у ћелији у ниским нивоима  
Најчешће у наномолским концентрацијама, као што је случај и са циљном иРНК.
- Релативно једноставна производња помоћу аутоматизованих уређаја за синтезу.

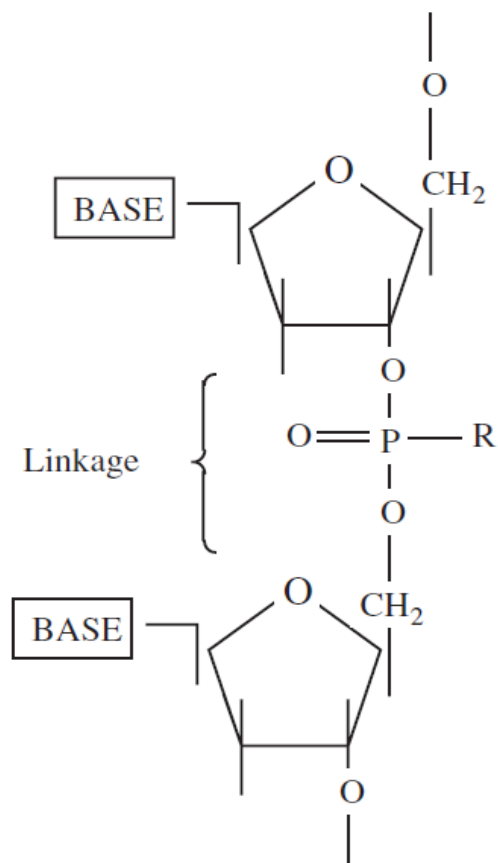
## Недостаци олигонуклеотида

- Међутим, нативни антисенс олигонуклеотиди имају и недостатке, који су одговорни за бројне разочаравајуће резултате истраживања.
- Недостаци олигонуклеотида:
  - осетљивост на деградацију под дејством нуклеаза;
  - врло кратак полуживот у серуму;
  - слабо ћелијско преузимање;
  - неактивни након пероралне примене.

## Превазилажење недостатака олигонуклеотида

- Међутим, постигнут је одређени напредак у превазилажењу ових недостатака, па се очекује да наредна генерација олигонуклеотида има већу терапијску ефикасност.
- Нативни олигонуклеотиди у скелету имају 3' – 5' фосфодиестарску везу и осетљиви су на многе нуклеазе присутне у организму. Полуживот нативних олигонуклеотида у серуму износи свега 15 минута, а олигорибонуклеотиди су мање стабилни од олигодезоксинуклеотида. Селективна измена нативне фосфодиестарске везе може производ учинити отпорним на деградацију нуклеазама.





Линкер	Супституент (R)
фосфотиоат	-S-
метилфосфонат	-CH <sub>3</sub>
метилфосфотриестар	-O-CH <sub>3</sub>
етилфосфотриестар	-O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>
алкилфосфоамидат	-NH-CH <sub>3</sub>

Измене на фосфодиестарској вези олигонуклеотида повећавају стабилност или побољшавају функционалне карактеристике. Нативна фосфодиестарска веза је приказана лево.

## Превазилажење недостатака олигонуклеотида

- Модификација најчешће подразумева замену једног од слободних атома кисеоника из фосфодиестарске везе алтернативним атомом или хемијском групом.
- Најчешће се кисеоник мења атомом сумпора и настали фосфотиоати показују охрабрујуће резултате у клиничким истраживањима. Олигонуклеотиди на бази фосфотиоата, „S-олигонуклеотиди“, су отпорнији на деловање нуклеаза, док притом остају растворљиви у води. Такође, лако се хемијски синтетишу и имају биолошки полуживот од неколико сати.
- Тренутно се у клиничким испитивањима највише истражују „S-олигонуклеотиди“ (фомивирсен).
- Додатне модификације олигонуклеотида могу значајно побољшати фармакокинетичка и фармакодинамичка својства препарата.

## Фармакокинетичке особине олигонуклеотида

- У клиничким студијама испитивана је примена олигонуклеотида *i.v.* инфузијом током неколико сати, као и супкутана и интрадермална примена.
- Олигонуклеотиди се везују за различите протеине у серуму, укључујући албумин, па није могуће циљати специфичне ћелије огољеним олигонуклеотидима. Након примене, олигонуклеотиди се брзо дистрибуирају до многих ткива, при чему се највише нагомилавају у јетри, бубрезима, костној сржи, скелетним мишићима и кожи, али не пролазе кроз крвно-мождану баријеру. Везивање за серумске протеине омогућава им стварање депоа и спречава брзо излучивање путем бубрега.

## Фармакокинетичке особине олигонуклеотида

- Тачан механизам уласка олигонуклеотида у ћелије није у потпуности разјашњен.
- Већина олигонуклеотида су наелектрисани молекули, молекулске масе и до 12 kDa. Наелектрисани олигонуклеотиди (фосфотиоати) најчешће улазе у ћелију ендоцитозом посредованом рецептором.
- Претпоставља се да је фосфотиоатни рецептор површински протеин, повезан са мањим мембранским протеином. Међутим, сматра се да овај механизам уласка у ћелију није ефикасан, јер само мали проценат примењеног лека пролази кроз плазма мембрану.
- Ненаелектрисани олигонуклеотиди примарно улазе у ћелију пасивном дифузијом, ређе ендоцитозом. С обзиром на то да су ненаелектрисани и релативно хидрофобни, постоји проблем везан за синтезу и испоруку ових лекова.

## Приступи за побољшање испоруке антисенс олигонуклеотида

- За побољшање уласка олигонуклеотида у ћелију употребљавају се носачи, као што су липозоми и полимерни носачи (нпр. на бази полилизина).
- Алтернативни систем, који ефикасно уводи антисенс олигонуклеотиде у ћелију, подразумева примену генске терапије. Наиме, ген који кодира (антисенс) иРНК одговарајуће нуклеотидне секвенце, уводи се у ћелију помоћу ретровируса или другог одговарајућег вектора. Овај приступ у лечењу карцинома и АИДС-а је већ испитиван у многим студијама.

## Приступи за побољшање испоруке антисенс олигонуклеотида

- Олигонуклеотиди, укључујући и модификоване облике, се метаболишу деловањем нуклеаза, посебно 3'-екзонуклеаза. Метаболички производи се затим углавном излучују преко урина.
- Чак и фосфотиоатни олигонуклеотиди имају полуживот у серуму и ткивима краћи од једног дана, па се примењују континуираним или честим *i.v.* инфузијама.
- Фосфотиоатни олигонуклеотиди друге генерације имају побољшане фармакокинетичке карактеристике. Највећа пажња усмерена је ка развоју производа са модификованом рибозом која се налази у структури понављајућих нуклеотида. Присуство метил или метоксиетил групе у положају 2' повећава стабилност производа, као и његову потентност (повећањем афинитета везивања за РНК).
- Међутим, ове промене смањују способност производа да активира РНКазуX, примарни механизам индукције антисенс ефекта. Ово се може превазићи развојем химерног фосфотиоатног олигонуклеотида, у коме су нуклеотиди са модификованом рибозом у позицији 2' смештени само на крајевима молекула, остављајући део који је компатибилан са нуклеазом у средини.

## Производња олигонуклеотида

- За разлику од других биофармацеутика (рекомбинантни протеини и производи генске терапије), антисенс олигонуклеотиди се производе директном хемијском синтезом. С обзиром на то да се олигонуклеотиди широко користе као реагенси у молекуларној биологији, развијене су оптималне методе за њихову синтезу.
- Олигонуклеотиди се користе као прајмери, пробе и за потребе циљне мутагенезе. Нуклеотиди (модификовани или немодификовани) најпре реагују са заштитном хемијском групом. Сваки "заштићени" нуклеотид се затим спаја са растућим крајем ланца нуклеотида, који је везан за чврсту фазу.

## Производња олигонуклеотида

- Након спајања, заштитна група се уклања и, када је синтеза ланца завршена, веза која причвршћује олигонуклеотид за чврсту фазу хидролизује, ослобађајући слободни олигонуклеотид. Затим следи пречишћавање помоћу HPLC.
- Најчешће коришћена метода синтезе олигонуклеотида је фосфоамидитна метода која користи диметокситритил заштитну групу и тетразол као средство за спајање (везивање). Аутоматизовани уређаји за синтезу затим могу у кратком временском интервалу синтетисати олигонуклеотиде од стотине тренутно доступних нуклеотида.



## Фомивирсен

- Фомивирсен (*Vitravene*®) је први антисенс производ одобрен за медицинску употребу од стране ФДА 1998. године. Производ се састоји од 21 фосфотиоатског нуклеотида са следећом секвенцом:

5'-G-C-G-T-T-T-G-C-T-C-T-T-C-T-T-C-T-T-G-C-G-3'

- Фомивирсен се користи за лечење цитомегаловирусног (CMV) ретинитиса код пацијената са АИДС-ом. Формулише се у облику стерилног воденог раствора (6,6 mg активне супстанце/ml), уз додатак бикарбонатног пуфера за постизање коначне рН вредности препарата 8,7.

## Фомивирсен

- Инхибира репликацију хуманог CMV-а антисенс механизмом. Нуклеотидна секвенца фомивирсена је комплементарна иРНК за IE2 регију (од енгл. *Immediate early region*) хуманог CMV-а. Ове иРНК кодирају неколико есенцијалних вирусних протеина и блокирањем њихове синтезе ефикасно се инхибира репликација вируса.
- Примењује се директним убризгавањем 0,05 ml препарата у око (интравитреална инјекција), иницијално једна инјекција сваке 2 недеље, а затим једном у 4 недеље. У анималним студијама је утврђено да се препарат елиминише из ока за 7 – 10 дана, метаболизмом посредованим нуклеазама, који уједно представља и примарни пут елиминације лека. Најчешће нежељено дејство је инфламација ока.

## Мипомерсен

- Мипомерсен (*Kynamro*®) је антисенс лек који је 2013. године одобрен у САД за лечење породичне хомозиготне хиперхолестеролемије. То је антисенс олигонуклеотид који инхибира синтезу *apo B-100*, главне компоненте липопротеина VLDL и LDL. Садржи кратке, једноланчане синтетске молекуле ДНК за циљање иРНК одговорне за кодирање *apo B-100*. Хибридни молекул мипомерсена и иРНК активира РНК-азу X (ензим који катализује цепање РНК), а инхибира транслацију протеина чиме се смањује концентрација *apo B*. Крајњи исход је смањена производња атерогених липопротеина.

## Етеплирсен

- Етеплирсен (*ExonDys51*®) је одобрен 2016. године у САД за лечење пацијената са *Duchenne*-овом мишићном дистрофијом код којих су присутне мутације на гену за протеин дистрофин, који је важан за одржавање ћелијске мембране мишићних влакана.
- Етеплирсен коригује мутације на гену за дистрофин прескакањем егзона 51 на том гену како би настали краћи, функционални облици дистрофина.

## Дефибротид натријум

- Дефибротид натријум (*Defitelio*®) представља смешу једноланчаних олигонуклеотида добијених из ДНК свињске слузокоже или говеђих плућа.
- Користи се за лечење тешке хепатичне вено-оклузивне болести код одраслих и деце која су била подвргнута хемиотерапији и трансплантацији хематопоеетских матичних ћелија.
- Дефибротид натријум делује тако што повећава разградњу угрушака у крви, смањујући активност ендотелних ћелија променом експресије фактора коагулације:
  - Повећава активност ткивног активатора плазминогена који претвара плазминоген у плазмин
  - Повећава активност тромбомодулина, антикоагулантног кофактора
  - Смањује активност фон Вилебрандовог фактора који стимулише агрегацију тромбоцита
  - Смањује активност инхибитора активатора плазминогена 1 који смањује фибринолизу
- Поред тромболитичког дејства, има и антиинфламаторна и антиисхемијска дејства.

## Нусинерсен

- Нусинерсен (*Spinraza*®) је 2016. године одобрен у САД за терапију спиналне мишићне дистрофије повезане са мутацијом на SMN1 гену (енгл. *survival motor neuron 1*). То је уједно и једини антисенс лек регистрован у нашој земљи.
- Нусинерсен омогућава алтернативно спајање гена SMN2, претварајући га у функционални ген SMN1, чиме се повећава ниво SMN протеина у ЦНС-у.
- Нусинерсен се примењује директно у ЦНС интратекалном инјекцијом. Код више од 60% деце са овом болешћу лек доводи до побољшања моторне функције.

## **Додатни антигенски агенси: РНК интерференција и рибозими**

- РНК интерференција (РНКи) и рибозими представљају два додатна приступа за утишавање/смањивање производње гена са терапијским потенцијалом.
- РНКи је урођени ћелијски процес утишавања одабраних гена антисенс механизмом. Има много особина сличних антисенс приступу, али и неке битне разлике, нпр. механизам којим се постиже антисенс ефекат.
- РНКи се првобитно развила у примитивним организмима како би заштитила свој геном од вируса, транспозона и других генетских елемената који се могу инсертовати, а такође и за регулисање експресије гена. РНКи је најпре откривена у биљкама, али сада се зна да функционише код већине, ако не и код свих еукариота.

## Додатни антигенски агенси

### - РНК интерференција

- РНКи представља посттранслациону инхибицију експресије гена, индуковану дволанчаном РНК, која је произведена природним путем или синтетисана *in vitro* и уведена у ћелију. Улазак дволанчане РНК изазива њено цепање на кратке секвенце (21 – 23 нуклеотида) које се називају кратке интерферирајуће РНК (од енгл. *short interfering RNA*, siRNA).
- siRNA је инкорпорирана у РНК-индуковани комплекс за утишавање (од енгл. *RNAinduced silencing complex*, RISC), који садржи и неколико ензима за обраду нуклеинских киселина (хеликаза, ендонуклеаза и егзонуклеаза). Дволанчана siRNA се затим одмотава (процес стимулисан активношћу хеликазе), док се "сенси" ланац дволанчане РНК одбацује. Преостали „антисенси“ ланац siRNA олакшава комплементарно везивање RISC за специфичну иРНК, која се затим разграђује деловањем RISC нуклеазе.



## Додатни антигенски агенси

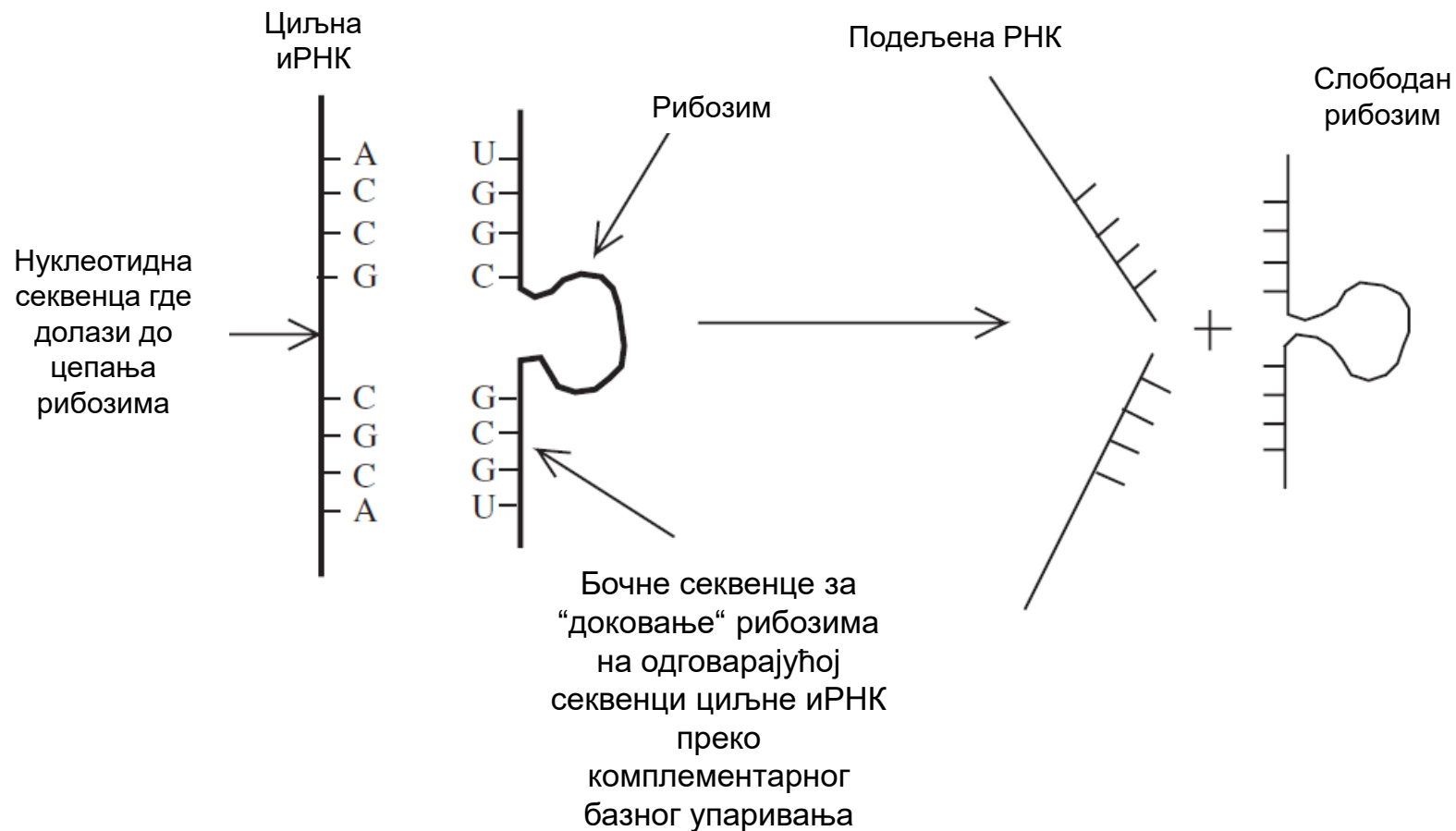
### - РНК интерференција

- Терапијски циљеви РНКи су третман вирусних инфекција, неуролошких обољења и карцинома.
- Синтеза дволанчане РНК са жељеним нуклеотидним секвенцама је једноставна. Међутим, постоје одређени недостаци тако синтетисаних препарата. На пример, због деградације од стране серумских нуклеаза немодификоване siRNA имају полуживот у серуму краћи од једног минута.
- Побољшање фармакокинетичког профила РНКи постиже се хемијском модификацијом нуклеотидног скелета, чиме се постиже отпорност на дејство нуклеаза. Такође, могуће је и коришћење вирусних или невирусних вектора ради постизања испоруке препарата до ћелија.

## Додатни антигенски агенси

### *- рибозими*

- Одређене РНК секвенце могу функционисати као катализатори. Рибозими делују као катализатори раскидања веза на специфичним секвенцама у циљној иРНК. Многи рибозими цепају циљне иРНК тамо где постоји нуклеотидна секвенца G – U – C. У већини иРНК постоји барем једна оваква секвенца.
- Рибозими се могу усмерити ка циљној иРНК увођењем кратких бочних комплементарних олигонуклеотида. Услед цепања циљне иРНК спречава се транслација.
- Потенцијална предност рибозима је могућност да један молекул уништи хиљаде копија циљне иРНК. Такав лек би из тог разлога требало бити веома потентан.
- Међутим, недостатак рибозима је проблем њиховог развоја као биофармацеутика, тако да се у скорије време не очекује да ће такви производи добити одобрење за употребу.



Принцип спречавања транслације специфичне иРНК и синтезе специфичног цільног протеина технологијом рибозима

# Аптамери

- Аптамери су молекули базирани на секвенцама једноланчане ДНК или РНК, савијени у јединствену тродимензионалну структуру, што им омогућава везивање за специфични циљни молекул.
- Везивање је високо специфично и постоје аптамери који могу разликовати сродне изоформе или различите конформације истог протеина. Такође, афинитет везивања је висок, што је слично као и код антиген-антитело интеракција.

# Аптамери

- Технологија аптамера је развијена 1990. године и подразумева стварање велике библиотеке аптамера, са накнадном идентификацијом појединачних аптамера који везују циљни лиганд.
- Библиотеке ДНК аптамера се најчешће стварају директном хемијском синтезом, а умножавају помоћу PCR методе, док РНК библиотеке настају *in vitro* транскрипцијом синтетских ДНК библиотека.
- Идентификација специфичног везивања аптамера за циљни молекул се најлакше спроводи аутоматским приступом *in vitro* одабира, који је познат као *SELEX* (од енгл. *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*). *SELEX* приступ подразумева одабир лиганада нуклеинских киселина који на жељен начин интерагују са циљном метом. Већина библиотека садржи до  $10^{15}$  врста.

## Аптамери

- Због њихове високе специфичности и афинитета везивања, аптамери се користе (као и антитела) за пречишћавање засновано на афинитету, идентификацију и откривање лекова, као и дијагностику и терапију. Поједини аптамери се тренутно клинички испитују за лечење инфективних болести, карцинома и хемофилије.
- Аптамери имају ниску имуногеност, али када се примене системски брзо се излучују путем бубрега. Како би се спречило излучивање преко бубрега, аптамери се могу коњуговати са ПЕГ. Такође, пегиловање помаже и у заштити од разградње серумским нуклеазама. Нативни аптамери су иначе подложни нападу нуклеаза, али се њихов полуживот може продужити хемијским модификацијама.

# Аптамери

## - пегаптаниб натријум

- Пегаптаниб натријум (*Masigen*®) је први и до сада једини аптамер одобрен за клиничку употребу 2004. године. Производ је синтетски пегировани олигонуклеотид који се специфично везује за васкуларни ендотелни фактор раста (VEGF).
- Индикуван је за лечење неоваскуларне ("мокре") сенилне дегенерације макуле. Аптамер заснован на РНК молекулу састоји се од 28 нуклеотида унапред дефинисане секвенце, који је хемијски модификован у циљу заштите од нуклеаза. Два ПЕГ молекула су ковалентно везана на једном крају нуклеотида. Препарат се формулише као стерилни раствор који садржи натријум хлорид и натријум фосфат као адјувансе.

# Аптамери

## *- пегаптаниб натријум*

- Сенилна неоваскуларна дегенерација макуле или мокра дегенерација макуле је резултат пролиферације абнормалних крвних судова у оку, што доводи до оштећења ретине и губитка вида. Процес васкуларизације (ангиогенезе) покреће VEGF.
- Пегаптаниб натријум има тродимензионалну конформацију која му омогућава да специфично интерагује са VEGF-ом инхибирајући његову активност.
- Препарат се примењује локално интравитреалном инјекцијом. Апсорпција из ока у системску циркулацију је спора, тако да се примењује једном у 6 недеља. Метаболише се деловањем нуклеаза. Најчешћа потенцијално озбиљна нежељена дејства су ендофталмитис, аблација ретине, инфламација/иритација ока и замагљен вид, мада се ретко може јавити и анафилакса.



## Терапија на бази ћелија и ткива

- Недавни напредак у идентификацији, изолацији и манипулацији матичним ћелијама довео је до великог интереса за ову врсту ћелија. Матичне ћелије имају велики медицински потенцијал, али тренутно се рутински користе потпуно диференциране ћелије или групе ћелија (органи и ткива). Такви производи укључују ћелије или ткива која се користе у трансплантацији, као и мали број инжењерисаних производа заснованих на ћелијама.

## Терапија на бази ћелија и ткива

- Трансплантација подразумева преношење живих ћелија/ткива /органа са донора на примаоца. У неким случајевима (нпр. многи поступци пресађивања коже), донор и прималац су заправо исти појединац, и то се назива **аутологна трансплантација**. Међутим, давалац и прималац су најчешће различите јединке, и то се назива **алогена трансплантација**.
- Уобичајени облици трансплантације подразумевају трансфузију пуне крви, трансплантацију костне сржи, коже и органа (нпр. бубрега, јетре, панкреаса, плућа и срца). Напредак у хируршким техникама трансплантације, заједно са доступношћу ефикасних имуносупресивних лекова (укључујући моноклонска антитела), учиниле су да је стопа успеха за већину трансплантираних органа 75 – 95%.

## Терапија на бази ћелија и ткива

- Ткива/органи намењени за трансплантацију се углавном не сматрају фармацеутским производима. Материјал за трансплантацију се прикупља директно током хируршких захвата или на други одговарајући начин, и потом се обавља трансплантација без значајне *in vitro* обраде.
- „Инжењерисана ткива или ћелије“ представљају малу, али значајну подгрупу производа заснованих на ћелијама. Такви производи се састоје од потпуно диференцираних ћелија, али пре медицинске употребе подлежу неким модификацијама или се формулишу *in vitro* (нпр. *CarticeL*<sup>®</sup> и *Apligraf*<sup>®</sup>).
- *Apligraf*<sup>®</sup> се користи као замена за кожу и састављен је од кератиноцита и фибробласта добијених из хуманог неонаталног ткива препуцијума и говеђег колагена, а користи се за лечење улцера.

## Терапија на бази ћелија и ткива

### - имплантација аутологних хондроцита

- *CarticeI*<sup>®</sup> (познат и као ACI, од енгл. *Autologous Chondrocyte Implantation*) је препарат аутологних култивисаних хондроцита који се користи у лечењу оштећења хрскавице феморалног кондила (заобљена избочина на куку), проузрокованог акутном или понављајућом траумом, код пацијената код којих се хируршка интервенција није показала адекватном. Препарат је одобрен за клиничку употребу 1997. године. Свака бочица за једнократну употребу садржи око 12 милиона ћелија, у финалној запремини од 0,4 ml стерилног, пуферизованог медијума ћелијске културе (*Dulbессо модификовани Eagle's медијум*).

# Терапија на бази ћелија и ткива

## - имплантација аутологних хондроцита

- Хондроцити се примарно прикупљају из организма пацијента и подвргавају *in vitro* расту у медијуму са феталним говеђим серумом. Бочице се асептично пуне ћелијама и тестирају на вијабилност и микробиолошку стерилност.
- Ћелије се потом имплантирају у оштећено подручје зглоба инјекцијом, применом катетера. На овај начин се у зглоб уноси 1 - 2 милиона ћелија.
- Способност култивисаних хондроцита да подстакну обнављање хрскавице показана је у претклиничким испитивањима на кунџима, козама, псима и коњима, као и у клиничким испитивањима на људима.
- Међутим, значајан број пацијената лечених овим препаратом захтевало је каснију хируршку интервенцију због блокаде, кликтања или болних зглобова за које се верује да настају због претераног раста графта.

## Терапија на бази ћелија и ткива

### *- трансфузија пуне крви*

- Пуна крв се добија од донора и садржи антикоагуланс (хепарин или супстанце на бази цитрата и декстрозе). Крв се чува на температури од 1 - 8 °C, и има кратак рок трајања (48 сати након прикупљања ако се хепарин користи као антикоагуланс, или до 35 дана ако се користи цитрат-фосфат-декстроза са аденином).
- Крв се загрева на 37 °C непосредно пре трансфузије. Пуна крв се углавном користи за надокнаду изгубљене крви због повреде или током хируршких интервенција. Број јединица (једна јединица  $\approx$  510 ml) који се примењује зависи од општег здравља и старости примаоца, као и од терапијске индикације.

# Терапија на бази ћелија и ткива

## - трансфузија пуне крви

- Примена пуне крви се може користити за надокнаду одређених компоненти крви (нпр. фактора коагулације, имуноглобулина, тромбоцита или еритроцита). Међутим, овај вид примене је сведен на минимум, јер је погодније применити само специфичну компоненту крви која недостаје. Након примене крви или њених производа постоји ризик од случајног преношења инфективних узročника, као што су вируси хепатитиса или ХИВ-а. Спречавање случајне трансмисије патогена зависи од:
  - пажљивог скрининга давалаца крви;
  - увођења метода елиминације/инактивације патогена током обраде препарата;
  - контроле готових производа.

# Терапија на бази ћелија и ткива

## *- трансфузија пуне крви*

- Потребно је забележити идентитет сваког даваоца крви и све јединице крви пажљиво означити, јер је то од суштинског значаја у случају да се накнадно установи да је крв контаминирана патогенима. Ризик од контаминације крви током прикупљања/обrade је смањен коришћењем затворених система и стриктних асептичних техника.
- Пре него што се изда или обради крв донора, она се тестира на потенцијално присуство различитих патогена. Користе се имуноесеји који могу да открију:
  - површински антиген хепатитиса Б (HBsAg);
  - антитела против ХИВ-а;
  - антитела против вируса хепатитиса Ц;
  - антитела против сифилиса.



## Терапија на бази ћелија и ткива

### *- трансфузија пуне крви*

- Међутим, ниједан имунолошки тест није 100% прецизан и сви могу дати лажно негативне и лажно позитивне резултате. Сматра се да 1/42 000 крвних јединица за коју је тестом утврђено да је негативна на ХИВ-антитело, заправо садржи овај вирус.
- Технике које могу инактивирати вирусне или друге патогене (нпр. топлотне или хемијске технике) не смеју се применити на пуну крв и већину производа добијених из крви. Дакле, ефикасан скрининг донорске крви се ослања искључиво на спречавање преношења патогена.

# Терапија на бази ћелија и ткива

## *- трансфузија пуне крви*

- Многе технике које се користе за добијање крвних производа из пуне крви (нпр. таложење, али посебно хроматографско пречишћавање) могу бити ефикасне у одвајању вирусних или других патогена из финалног производа.
- Фракционисани производи имају мању вероватноћу да садрже недетектоване патогене.
- Поред скрининга на патогене, такође се одређују крвна група АБО система и Rh фактор.

## Матичне ћелије

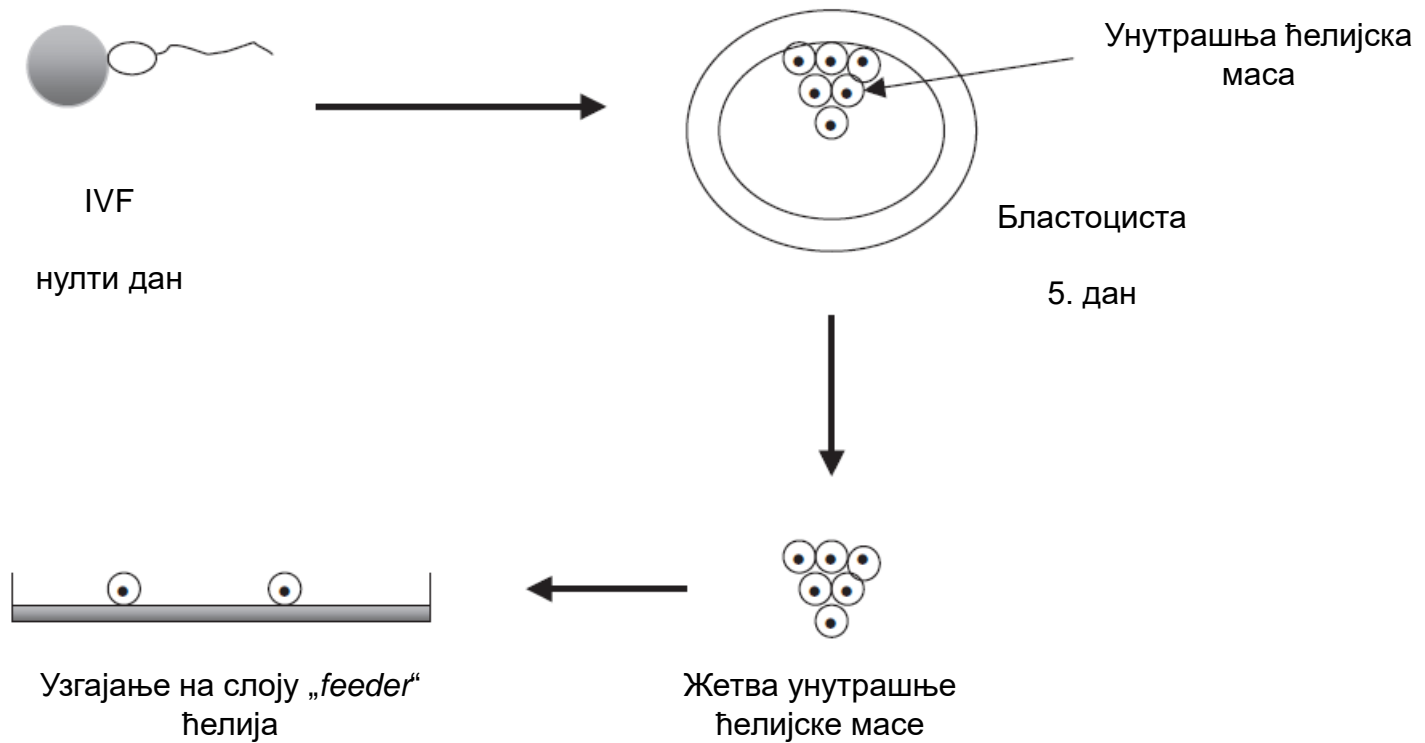
- Потенцијална терапијска примена матичних ћелија је дуго у фокусу медицинских наука, међутим недавна открића и технолошки напредак учинили су да примена матичних ћелија у терапијске сврхе буде могућа. Матичне ћелије представљају недиференциране ћелије способне за самообнављање које се могу диференцирати у више од једне врсте специјализованих ћелија.
- На основу извора из кога потичу класификују се на ембрионалне и одрасле матичне ћелије. Ембрионалне матичне ћелије потичу из раног ембриона, док су одрасле матичне ћелије присутне у различитим ткивима одраслих јединки. Велики део ранијих истраживања ембрионалних матичних ћелија спроводио се применом мишјих ембриона.

## Матичне ћелије

- Истраживања одраслих матичних ћелија трају око пола века, а започета су открићем хематопоеетских матичних ћелија костне сржи током 1960-их година. Хумане ембрионалне матичне ћелије првобитно су изоловане и узгајане у лабораторијама 1998. године. Данас су у фокусу интензивних истраживања прецизна дистрибуција, улога и способност манипулације одраслих матичних ћелија (посебно оних ван костне сржи).
- Ембрионалне матичне ћелије потичу од хуманих ембриона пре фазе имплантације, најчешће у фази бластоциста (бластоциста је танка шупља структура која садржи велики број ћелија, позната као унутрашња ћелијска маса, из које се развија ембрион). У почетку су се ови ембриони добијали током процедуре *in vitro* оплодње (IVF). То су заправо они ембриони који се нису могли користити за вантелесну оплодњу, било због лошег квалитета или због тога што су сувишни.

## Матичне ћелије

- Култивисање хуманих ембрионалних матичних ћелија започиње жетвом унутрашње ћелијске масе бластоцисте. Поступак жетве тих ћелија назива се „имунохирургија“.
- Процес подразумева иницијално третирање бластоциста проназом (коктел протеолитичких ензима), који ефикасно разграђује спољашњу заштитну мембрану познату као "*zona pellucida*". Бластоцисте се затим третирају антихуманим серумским антителом и комплементом заморца који изазива лизу спољашњих ћелијских слојева бластоциста (трофобласт), чиме се омогућава жетва унутрашње ћелијске масе. Ове ћелије се потом узгајају под дефинисаним условима како би им се омогућило да се умножавају, при чему остају недиференциране.



Стварање и култивисање хуманих ембрионалних матичних ћелија

## Матичне ћелије

- Посуде са ћелијском културом, поред медијума, садрже и слој ћелија које је исхрањују (енгл. *feeder cells*) (нпр. мишји фибробласти). *Feeder* ћелије се излажу зрачењу како би се спречио њихов раст и деоба и имају две улоге:
  - (а) обезбеђују одговарајући супстрат са којим ембрионалне матичне ћелије могу интераговати, што помаже у њиховом расту и деоби;
  - (б) ослобађају хранљиве састојке у медијум чиме је омогућен поновни раст матичних ћелија.
- Присуство *feeder* ћелија може бити проблем током *downstream* процеса припреме матичних ћелија за терапијску употребу, јер представљају потенцијални извор патогених контаминаната.

## Матичне ћелије

- У новије време су развијени системи култура у којима је слој *feeder* ћелија замењен фибронектином (гликопротеин присутан на ћелијској површини) или матригелом (мембрански екстракт богат протеинима из ћелијске линије мишјег саркома). Истраживања су и даље у току како би се идентификовао оптимални састав медијума за ћелијску културу, који ће олакшати раст недиференцираних ћелија.
- Основни медијум анималних ћелијских култура додатно садржи серум као извор хранљивих материја. Познато је да додатак цитокина LIF може одржати мишје ембрионалне матичне ћелије у недиференцираном стању, док то није у стању да постигне код хуманих ембрионалних матичних ћелија. Истраживања се због тога настављају са циљем побољшања састава медијума културе за хумане ћелијске линије.

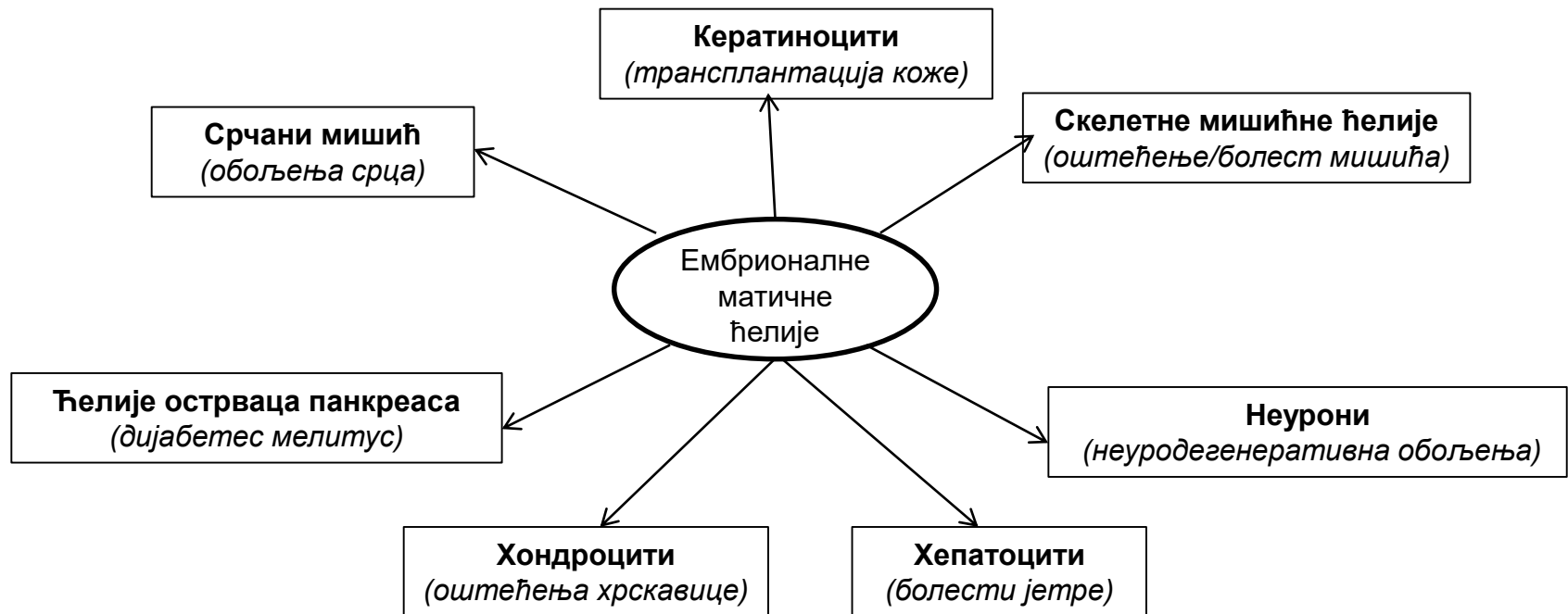


## Матичне ћелије

- Током култивисања хуманих ембрионалних матичних ћелија неопходно је одржати ћелије у недиференцираном стању, док је код примене таквих ћелија у регенеративној медицини потребно обезбедити њихову контролисану диференцијацију за стварање жељеног типа ћелија (нпр. специфичан тип неурона за лечење одређене неуродегенеративне болести). Процес којим се матичне ћелије природно диференцирају до специфичних ћелија је врло сложен и само делимично разјашњен.
- Диференцијација зависи од неколико усклађених сигнала из ефекторских молекула, као што су цитокини. Дакле, главни изазов је потпуније разумевање начина на који се дешава и контролише диференцијација.

## Матичне ћелије

- Иако је тек у развоју, уочен је извештајан напредак у откривању одређених путева диференцијације, најпре мишјих, а потом и хуманих ембрионалних матичних ћелија. Овај напредак је у великој мери резултат емпиријских студија и постиже се на један или више начина:
  - (а) променом састава медијума у култури;
  - (б) променом површинских карактеристика матрикса на којима расту ћелије (нпр. адхезивне „*feeder*“ ћелије или специфични матрикси на бази протеина);
  - (в) увођењем специфичних регулаторних гена у матичне ћелије.



Неке врсте ћелија које се производе *in vitro* усмереном диференцијацијом из мишјих или хуманих ембрионалних матичних ћелија и њихова потенцијална примена

## Одрасле матичне ћелије

- Последњих неколико деценија главни фокус истраживања матичних ћелија био је усмерен на ембрионалне матичне ћелије. Међутим, данас је дат акценат на истраживање и разумевање различитих популација одраслих матичних ћелија.
- Одрасле матичне ћелије су недиференциране ћелије које се налазе међу диференцираним ћелијама у ткиву или органу. Ове ћелије се могу обнављати и диференцирати у главне врсте ћелија карактеристичне за ткиво у којем се налазе.
- Главна физиолошка улога им је одржавање и репарација (бар у одређеној мери) ткива у којима се налазе.

## Одрасле матичне ћелије

- Дуго година се веровало да је популација одраслих матичних ћелија присутна само у ограниченом броју ткива и да се оне могу диференцирати само у ћелије карактеристичне за ткиво у којем се налазе. Међутим, скорашње истраживање оспорило је ове тврдње.
- Наиме, одрасле матичне ћелије се откривају у све већем броју ткива, укључујући костну срж, периферну крв и крвне судове, мозак и кичмену мождину, скелетне мишиће, кожу, јетру, панкреас, дигестивни тракт, рожњачу (корнеу) и мрежњачу (ретину).

## Одрасле матичне ћелије

- Идентификација и проучавање таквих ћелија може бити отежано због ниских нивоа у којима су присутне, присуства додатних типова ћелија и потешкоћа у њиховом узгајању.
- Потребно је спровести бројна истраживања да би се одговорило на основна питања у вези са одраслим матичним ћелијама, укључујући следећа:
  - Колико врста постоји и где се налазе?
  - Који је њихов извор?
  - Који ниво пластичности показују?
  - Који фактори подстичу њихову миграцију и диференцијацију на месту оштећења ткива?

## Одрасле матичне ћелије

- За разлику од ембрионалних, употреба одраслих матичних ћелија у регенеративној медицини има значајне предности.
- Ове врсте ћелија би могле превазићи етичке проблеме повезане са деструкцијом бластоциста. Такође, омогућавају аутологну трансплантацију ћелија при чему се одрасле матичне ћелије прикупљају од пацијента, узгајају и диференцирају *in vitro*, а затим поново враћају у организам пацијента. Ово би превазишло потенцијалне имунолошке компликације и примену имunosупресивних лекова.

## Одрасле матичне ћелије

- Међутим, проблеми овог приступа се не односе само на изолацију и успешно култивисање ових ћелија, већ и на утврђивање нивоа пластичности одраслих матичних ћелија. То се односи најпре на широк спектар потпуно диференцираних типова ћелија који се могу произвести из популације одраслих матичних ћелија, и таква истраживања представљају веома активно подручје тренутних испитивања матичних ћелија.



## Закључак

- Генска терапија потенцијално може учинити да већина тренутно доступних биофармацеутских производа постане застарела.
- Регенеративна медицина, иако још у развоју, има велики потенцијал за примену у будућности. Од свих биофармацеутика сматра се да лекови на бази нуклеинских киселина и ћелија могу имати најјачи утицај на будућност молекуларне медицине.

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Хвала на пажњи