

Biološki lekovi: tri decenije razvoja

Miroslav M. Savić

Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za farmakologiju,
Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

Kratak sadržaj

Svaki lek čija je aktivna supstanca nastala u živom organizmu ili je izvedena iz živog organizma može da se smatra biološkim lekom. Vakcine, derivati i proizvodi od krvi ili hormoni izolovani iz tkiva životinja ili čoveka proizvode se tradicionalnim biotehnološkim postupcima i imaju dugu tradiciju primene kao biološki lekovi. Sa uvođenjem rekombinantnog humanog insulina, 1982. godine, započela je era „visoko-tehnoloških” bioloških lekova, koji se često označavaju terminom biofarmaceutici. Većinu biofarmaceutika čine rekombinantni proteini, koji se dobijaju tehnologijom rekombinantne DNK, i monoklonska antitela, čiji se razvoj bazirao na hibridima tehnologiji. Sa regulatornog aspekta, ključna osobina bioloških lekova jeste neophodnost primene bioloških metoda za njihovu punu karakterizaciju, što je posledica kompleksnosti i heterogenosti njihove strukture. Otuda je klasifikacija nekog proizvoda kao biološkog leka podložna promenama. Na primer, danas se antibiotici ne smatraju biološkim lekovima, s obzirom na to da se u potpunosti mogu okarakterisati fizičkim i hemijskim metodama. Paradoksalno, moguće je i da se lek koji se dobija sintezom smatra biološkim lekom i takav je slučaj sa pegaptanibom, pegilovanim modifikovanim oligonukleotidom, koji se klasifikuje kao biofarmaceutik. Otuda, uočava se potreba da se u klasifikaciju uvede i kategorija graničnih proizvoda, koji pored osobina bioloških lekova imaju i osobine konvencionalnih hemijskih lekova.

Ključne reči: biofarmaceutici; biotehnološki lekovi; biološki metodi

Savremena regulativa u oblasti lekova razlikuje dve kategorije ovih proizvoda: „hemijske” i „biološke” lekove. Dok pojam hemijskog leka ukazuje na hemijsku sintezu kao izvor aktivne supstance, kao biološki lek mogao bi se posmatrati svaki proizvod čija je aktivna supstanca nastala u živom organizmu ili je izvedena iz živog organizma. Danas, većina bioloških lekova dobija se savremenim metodama biotehnologije, a pre svega tehnikom rekombinantne DNK (1-3).

Dosledna primena podele zasnovane na poreklu svrstala bi većinu antibiotika u biološke lekove, što se danas regulatorno ne smatra ispravnim. Naime, pored potrebe da aktivna supstanca bude proizvedena ili izvedena iz biološkog izvora, definicija biološkog leka u užem smislu reči uključuje i drugi uslov, koji podrazumeva da su za karakterizaciju i kontrolu kvaliteta neophodna i biološka, pored fizičko-hemijskih ispitivanja (2, 4).

Biološka ispitivanja bioloških lekova

Biološka ispitivanja koriste biološke eseje, koji prate biološki odgovor koji ispitivani lek izaziva na životinjama, organima ili ćelijama. Istorijski primer takvog ispitivanja jeste izražavanje potentnosti preparata digitalisa u tzv. žabljim jedinicama, kao količini preparata potrebnoj da se, nominalno, ubije 1 g žabe (odnosno, žaba čija je masa „normalizovana” na 1 g). Jasno je da ovakva nestandardizovana ispitivanja odlikuje nepouzdanost dobijenih rezultata (4).

Savremeni biološki eseji kvantifikuju efekat u poređenju sa intenzitetom efekta eksternog standarda i na taj način se izbegava korišćenje „žabljih” ili drugih izrazito varijabilnih jedinica. U praksi, određuje se potentnost biološkog leka kao odnos aktivnosti testirane šarže i odgovarajućeg standarda, koji se označava kao međunarodni standard. Na taj način se postiže „biološka standardizacija” biološkog leka, koju fizičko-hemijska ispitivanja ne mogu da obezbede. Aktivnost biološkog leka izražava se u međunarodnim jedinicama, a ne u apsolutnim jedinicama mase ili količine materije međunarodnog sistema jedinica. Svetska zdravstvena organizacija utvrđuje listu ustanova koje pripremaju i širom sveta distribuiraju međunarodne standarde. Za više od 95% svih međunarodnih standarda odgovoran je britanski Nacionalni institut za biološke standarde i kontrolu (2).

Strukturna kompleksnost i heterogenost bioloških lekova

Dva su razloga zbog kojih biološki lekovi ne mogu u potpunosti da se karakterišu metodama fizičko-hemijskih ispitivanja: njihova strukturna kompleksnost s jedne, i heterogenost s druge strane. **Strukturna kompleksnost** bioloških lekova je posledica njihove hemijske prirode. Sa aspekta prirode aktivne supstance, ovi lekovi se mogu sastojati od celih mikroorganizama ili sisarskih ćelija ili od nukleinsko-kiselinskih, proteinskih ili polisaharidnih komponenti poreklom iz mikrobiološkog, životinjskog,

humanog ili biljnog izvora. Ogromna većina postojećih bioloških lekova ima proteinsku prirodu, sa raznovrsnim biološkim ulogama hormona, citokina, enzima, antitela i drugih regulatornih molekula. Stoga, dok su hemijski lekovi najčešće relativno male molekulske mase, reda veličine nekoliko stotina do oko hiljadu daltona, biološki lekovi imaju mnogostruko veće molekulske mase. Kao primer, faktor koagulacije VIII, korišćen u tretmanu hemofilije, ima primarnu strukturu koju formira 2361 aminokiselina, sa ukupnom molekulskom masom od 268000. Brojni drugi terapijski važni proteini imaju sličan stepen kompleksnosti, tako da je molekulska masa monoklonskih antitela oko 150000 (3-5).

Napredak u oblasti tehnologija fizičko-hemijske analitike sve više savladava izazove strukturne kompleksnosti bioloških lekova. Tako **rekombinantni humani insulin**, sa 51 aminokiselinom i molekulskom masom od 5800, kao i **rekombinantni humani hormon rasta**, sa 191 aminokiselinom i molekulskom masom od 22000, danas dolaze u promet bez potrebe prethodnog sprovođenja bioloških eseja. Zato se sa regulatornog aspekta u nekim zemljama (npr. SAD) insulin i hormon rasta tretiraju kao hemijski, a ne biološki lekovi (2, 4).

S druge strane, **heterogenost** brojnih bioloških lekova predstavlja izazov koji je još uvek često nerešiv. Nekada je heterogenost terapijski neophodna i stoga namerna, kao što je slučaj kod primene složenih mešavina mikrobnih antigena, koji treba da oponašaju infekciju patogenim organizmom i izazovu zaštitni imunski odgovor širokog spektra. U drugim slučajevima, heterogenost je povezana sa prirodom biosinteze, koja rezultuje formiranjem više srodnih, ali hemijski različitih molekulskih struktura. Najčešće pominjani i istraživani izvor molekulske heterogenosti bioloških lekova jeste glikozilacija, kao oblik post-translacijske modifikacije. Glikozilacija je proces u kome se odvija vezivanje ugljenohidratnih grupa za specifična mesta proteina i, za razliku od sinteze proteina, ne zavisi od genskog obrasca (2, 4).

Kod eritropoetina na primer, glikozilacija dovodi do formiranja bi-, tri- i tetra-antenarnih struktura i u zavisnosti od broja terminalnih rezidua sijalinske kiseline gel-izoelektrično fokusiranje eritropoetina može da otkrije prisustvo do šest glavnih izoformi. Humani eritropoetin sastoji se od 165 aminokiselina, sa jednim mestom O-glikozilacije na serinu 126 i tri mesta N-glikozilacije na asparaginu 24, 38 i 83. Teorijska masa proteina iznosi 18240 Da, a stvarna masa dobijena elektroforezom iznosi 34 do 36 kDa, što ukazuje da je prosečan ugljenohidratni sadržaj eritropoetina približno 40%. Iako je u ovakvim slučajevima često tehnički ostvarljivo da se kvantifikuje bazična proteinska struktura, takav pristup nije optimalan. Kod eritropoetina na primer, pokazano je da biološka aktivnost *in vivo* u znatnoj meri zavisi od glikozilacije, što znači da proizvod koji sadrži eritropoetin ne može da bude biološki relevantno kvantifikovan merenjem količine proteina koji sadrži. Usled razlika u glikozilaciji, danas postoji pet bioloških lekova dobijenih rekombinantnom

tehnologijom koji imaju istovetnu primarnu strukturu eritropoetina, a označavaju se kao **epoetin alfa**, **epoetin beta**, **epoetin kapa**, **epoetin teta** i **epoetin zeta**; dodatno, postoji oblik u kome je izvršena izmena četiri aminokiseline prirodnog eritropoetina i koje se označava kao **darbepoetin alfa** (6).

Konačno, ilustrativan je spisak modifikacija kojima mogu da se podvrgnu monoklonska antitela, a koje predstavljaju nepregledan izvor heterogenosti ovih proteina: nekompletno formiranje disulfidnih veza, glikozilacija, piroglutaminska ciklizacija na N-terminalu, obrada lizina na C- terminalu, deamidacija, izomerizacija, oksidacija, amidacija aminokiseline na C- terminalu, modifikacija aminokiseline N-kraja maleuričnom kiselinom, nekovalentno asociranje sa drugim molekulima, konformacijski diverzitet, agregiranje. Zapravo, moguća je koegzistencija desetina hiljada varijanti sa istom primarnom sekvencom (5).

Nomenklatura i klasifikacija bioloških lekova

Često se navodi da era bioloških lekova počinje 1982. godine, kada je uveden rekombinantni humani insulin proizveden u bakteriji *Escherichia coli*. S druge strane, jasno je da lekovi kao što su **heparin** ili **streptokinaza**, uvedeni znatno pre humanog insulina, zadovoljavaju dva osnovna kriterijuma za biološke lekove: potiču iz biološkog izvora, a za njihovu karakterizaciju i kontrolu kvaliteta neophodna su i biološka, pored fizičko-hemijskih ispitivanja. Sa stručnog aspekta, ponekada se za jedan proizvod mogu istovremeno naći čvrsti argumenti i za svrstavanje i za nesvrstavanje u grupu bioloških lekova. Zbog toga je celishodno da se, pored hemijskih i bioloških lekova, uvede i grupa „graničnih proizvoda”, u koje bi spadali peptidi, polinukleozidi, proizvodi fermentacije, semisintetski proizvodi; ova lista se ne može smatrati potpunom (1, 2, 4).

Primer grupe lekova koja se regulatorno neujednačeno tretira jesu niskomolekularni heparini. Oni se dobijaju depolimerizacijom visoko prečišćenog nefrakcionisanog heparina, čija je molekulska masa oko 16000 Da. Vezivanjem za antitrombin ubrzavaju inaktivaciju faktora Xa i IIa, što dovodi do inhibicije kaskade koagulacije, s time da ispoljavaju veću inhibitornu aktivnost na faktor Xa nego na faktor IIa; za heparin, ovaj odnos je jediničan. U kliničkoj primeni u svetu nalazi se osam originalnih predstavnika ove grupe (molekulske mase su navedene u zagradi): **enoksaparin** (4500), **dalteparin** (6000), **tinzaparin** (6500), **certoparin** (5400), **parnaparin** (5000), **nadroparin** (4300), **reviparin** (4400), **bemiparin** (3600). Što se tiče farmakodinamskog profila, heterogenost ovih lekova mogu da ilustruju odnosi anti-Xa: anti-IIa aktivnosti, koji, prema nalazima dva posebna eksperimenta, za enoksaparin iznose 3,8 i 3,9; za dalteparin 2,7 i 2,5; za tinzaparin, 2,2 i 1,6; za certoparin, 3,2 i 2,4; za nadroparin, 3,6 i 3,3; za reviparin, 4,1 i 4,2. Regulatorno, u Evropskoj uniji je odlučeno da se predstavnici ove grupe tretiraju kao biološki lekovi i proizvodi koji se razvijaju po isteku patentne zaštite originalnih proizvoda treba da zadovolje kriterijume

biološki sličnih lekova. S druge strane, u SAD se takvi niskomolekularni heparini tretiraju kao generički lekovi i tako je 2010. i 2011. odobren po jedan generički enoksaparin. Za potvrdu tvrdnje da generički enoksaprin sadrži isti aktivni princip kao originator, primenjeni su kriterijumi ekvivalentnosti u 1. izvoru heparina i načinu depolimerizacije; 2. fizičko-hemijskim osobinama; 3. disaharidnim gradivnim blokovima, mapiranju fragmenata i sekvenci oligosaharidnih vrsta; 4. biološkim i biohemijskim testovima; 5. *in vivo* farmakodinamskom profilu kod zdravih dobrovoljaca. Iz ovoga se može zaključiti da kriterijumi koji se postavljaju pred generičke niskomolekularne heparine u SAD daleko prevazilaze zahteve koji se odnose na standardne generičke lekove i da u tom smislu formalno drugačija regulatorna rešenja ne znače nužno da su i kriterijumi suštinski manje zahtevni (7).

Drugi primer leka koji se može smatrati graničnim proizvodom jeste **pegaptanib**. U pitanju je sintetski pegilovani modifikovani oligonukleotid i za sada jedini klinički primenjeni predstavnik tzv. aptamera. Naziv ovog terapijskog koncepta potiče od latinskog *aptus*, „uklapati se”. U biološkoj sredini, lanac nukleotida kao aptamera stupa u intramolekulske interakcije koje savijaju molekul u kompleksan trodimenzionalni oblik. Nastali oblik aptamera omogućuje čvrsto vezivanje za površinu ciljnog molekula, koji se nalazi ekstracelularno, što znači da ovi lekovi, iako oligonukleotidne prirode, ne stupaju u interakciju sa genetskim materijalom. Aptameri imaju veliku moć razlikovanja srodnih struktura, odnosno, poseduju velike afinitete za endogene molekule za čije prepoznavanje su razvijeni, a relativno male za strukturno slične molekule. Pegaptanib se sa velikim afinitetom i izuzetnom selektivnošću veže za vaskularni faktor rasta endotela i indikovao je u tretmanu neovaskularne (vlažne) senilne degeneracije makule, na svakih 6 nedelja intravitrealno (9 injekcija godišnje). Pored neuobičajene strukture, karakteristika ovog leka je sintetski put dobijanja, što čini paradoksalnim njegovo svrstavanje u biološke lekove; ipak, hemijska priroda leka i složenost njegove karakterizacije opravdavaju, velikim delom, ovakav pristup (8, 9).

Biotehnoški lekovi i biofarmaceutici

Termin *biotehnoški lek*, kada se koristi, odnosi se na ogromnu većinu bioloških lekova koji se proizvode korišćenjem metoda biotehnologije. Kada se govori o biotehnoškim lekovima, od praktične je koristi da se razlikuju, uslovno rečeno, „nisko-tehnoški” i „visoko-tehnoški” proizvodi. „Nisko-tehnoški” proizvodi se pripremaju tradicionalnim biotehnoškim postupcima, kao što su izolovanje i ekstrakcija, a među njima dugu tradiciju proizvodnje i primene imaju vakcine, proizvodi krvi, toksini, antiserumi; lista ni ovoga puta nije potpuna. S druge strane, „visoko-tehnoški” proizvodi predstavljaju onu grupu lekova (čiji je rodonačelnik humani insulin), koji se dobijaju modernim biotehnoškim postupcima, a koji imaju tri decenije razvoja iza sebe (1).

„Visoko-tehnološki” proizvodi izvedeni iz savremenih biotehnoloških postupaka predstavljaju najveći deo *biofarmaceutika*. Pod pojmom biofarmaceutika podrazumevaju se svi proizvodi koji sadrže proteine ili nukleinske kiseline, a koji su proizvedeni svim onim tehnikama koje isključuju direktnu ekstrakciju iz nativnog biološkog izvora. Tu su obuhvaćene sofisticirane metode biotehnologije, kao što su tehnologija rekombinantne DNK, hibridoma tehnologija za monoklonska antitela ili blokada nukleotida i antisens tehnologija, ali tu spadaju i hemijska sinteza (primer pegaptaniba), kao i procedure genske terapije, somatske ćelijske terapije ili bioinženjeringa tkiva, od kojih se očekuje da u budućnosti obezbede lekove za naprednu terapiju. Ova terapija, još uvek u domenu neizvesnih velikih očekivanja, treba da bude zasnovana na tehnologiji transfera gena i trajne biološke modifikacije – reprogramiranja – somatskih ćelija, što znači da bi pojam leka doživeo suštinsku transformaciju (1, 3).

Savremeni biofarmaceutici najčešće uključuju tehnologiju rekombinantne DNK. U pitanju je postupak genetskog inženjeringa odgovarajuće ćelijske linije kojim se formira DNK molekul koji u datoj ekspresionoj ćeliji ne postoji prirodno. Nastali ekspresioni sistem se amplifikuje u ćelijskoj kulturi, najčešće ćelija sisara ili mikroorganizama, a 2012. godine odobren je za promet i prvi biotehnološki lek koji se proizvodi u biljnim ćelijama. U pitanju je taligluceraza alfa, modifikovani humani enzim β -glukocerebrozidaza, koji se dobija u bioreaktorima sa genetski inženjerizovanim ćelijama šargarepe, a indikovano je kao supstituciona terapija kod Gaucher-ove bolesti (3, 5).

U okviru „visoko-tehnoloških” bioloških lekova proteinske prirode od praktičnog je značaja razdvajanje na biofarmaceutike prve i druge generacije. Prvu generaciju biofarmaceutika čine „jednostavni supstitucionni proteini”, koji predstavljaju molekule istovetne endogenim proteinima, kao što su insulin, hormon rasta, tkivni aktivator plazminogena, tiroidostimulirajući hormon, folikulostimulirajući hormon, luteinizirajući hormon, glukagon, faktor stimulacije kolonije granulocita, α galaktozidaza, interferoni α i β ili faktor koagulacije VIII. U nekim slučajevima, rekombinantni humani molekuli dobijaju novo ime koje predstavlja međunarodni nezaštićeni naziv (INN); tako je **somatropin** naziv za hormon rasta, **alteplaza** označava „visoko-tehnološki” biološki lek koji je strukturno istovetan kao tkivni aktivator plazminogena, **filgrastim** je istovetan faktoru stimulacije kolonije granulocita, a **sargramostim** je istovetan faktoru stimulacije kolonija granulocita i makrofaga (3, 9).

U drugu generaciju biofarmaceutika spadaju lekovi dobijeni „proteinskim inženjeringom”, koji se primenjuje s jednim ili više od sledećih ciljeva: a) dobijanje proizvoda sa bržim ili sporijim nastupom dejstva; b) izmena poluvremena eliminacije proteina; c) izmena imunogenosti proizvoda; d) formiranje novih fuzionisanih (hibridnih) terapijskih proteina. Radi se o tehnikama izmene sekvence aminokiselina, izmene šećerne komponente glikozilovanog proteina, ili kovalentnog vezivanja

hemijskih struktura kao što je polietilenglikol. Najpoznatiji primeri izmene primarne sekvence aminokiselina su insulini druge generacije: **insulin aspart**, **insulin detemir**, **insulin glargin**, **insulin glulizin** i **insulin lispro**. **Pegfilgrastim** je pegilovani oblik filgrastima, a **peginterferon α -2a** pegilovani oblik **interferona α -2a**. Konačno, epoetin alfa, epoetin beta, epoetin kapa, epoetin teta i epoetin zeta predstavljaju proteine iste primarne strukture, sa suptilnim razlikama u šećernim komponentama (5, 9).

Monoklonska antitela: klasa lekova sa najbržim rastom

Konvencionalni antiserumi koji se decenijama dobijaju iz krvi imunizovanih ljudi ili životinja sadrže poliklonska antitela, odnosno, mešavinu antitela koja potiču iz svih klonova plazmatskih ćelija koje su reagovale na određeni antigen. Danas, najveću grupu biofarmaceutika predstavljaju monoklonska antitela, koja su se prvobitno zasnivala na otkriću iz 1975. godine, za koje su Milstein i Köhler dobili Nobelovu nagradu: dobijanja iz imunizovanih miševa imortalizovanog *hibridoma*. U pitanju je linija tumorskih ćelija u koju je fuzionisan određeni klon B-limfocita iz slezine miša, koji *in vitro* proizvodi određeno, *monoklonsko*, antitelo u velikoj količini (10).

Muromonab-CD3, prvi biološki lek iz grupe monoklonskih antitela, dobijen je hibridoma tehnologijom i registrovan je 1986. u SAD za tretman akutnog odbacivanja transplantata. Lek je specifičan za CD3 kompleks na površini T limfocita, koji je uključen u prepoznavanje antigena i stimulaciju ćelija; neposredno nakon primene monoklonskog antitela, CD3 pozitivni limfociti se naglo uklanjaju iz cirkulacije. U pitanju je mišje antitelo, na šta ukazuje i infiks „mo”. S obzirom na to da je pokazano da između 50 i 80% pacijenata koji primaju mišja monoklonska antitela razvije humana antimišja antitela (HAMA) nakon prve aplikacije, vremenom može doći do tahifilaksije i neutralizacije monoklonskog antitela. Posledično, terapijska efikasnost takvih proizvoda često je ograničena na prvu i, eventualno, drugu dozu (5, 10).

Napori da se ovi proteini „humanizuju” doveli su do uvođenja monoklonskih antitela druge generacije: prvo himernih monoklonskih antitela sa 30% mišje sekvence aminokiselina (primer **abciksimab**, infiks „ksi”), zatim humanizovanih antitela sa 5% mišje sekvence (primer **trastuzumab**, infiks „zu”) i konačno, kompletno humanih antitela (primer **adalimumab**, infiks „u”). Kod himernih antitela, konstruišu se himerni geni koji kodiraju varijabilne regione mišjeg i konstantne regione lakih i teških lanaca humanog porekla. Kod humanizovanih antitela, mišjeg porekla su samo hipervarijabilni regioni, koji sadrže mesta vezivanja antigena. Postupci ovakvog inženjerizovanja proteina, a posebno dobijanja potpuno humanih antitela, zahtevaju primenu još sofisticiranijih tehnika u odnosu na početnu hibridoma tehnologiju, kao što su transgeni miševi ili „phage display” tehnologija, koja podrazumeva ispoljavanje delova antitela u bakterijama i njihovo prikazivanje na virusima – bakteriofagima (10).

Prema podacima od marta 2012. godine, u EU ili SAD se u prometu nalazi 28 monoklonskih antitela: abciksimab, rituksimab, baziliksimumab, palivizumab, infliksimumab,

trastuzumab, alemtuzumab, adalimumab, tositumomab-I131, cetuksimab, ibrituksimab tiuksetan, omalizumab, bevacizumab, natalizumab, ranibizumab, panitumumab, eculizumab, certolizumab pegol, golimumab, canakinumab, catumaksomab, ustekinumab, tocilizumab, ofatumumab, denosumab, belimumab, ipilimumab i brentuksimab. Šest predstavnika koji su bili u prometu više nije registrovano: muromonab-CD3, nebacumab, edrekolomab, daklizumab, gemtuzumab ozogamicin i efalizumab. Dodatno, nimotuzumab, humanizovano monoklonsko antitelo usmereno na receptor za epidermalni faktor rasta, registrovan je na Kubi kao domicilnoj zemlji i u još 20-ak država, ali ne i u EU ili SAD (11).

Većina (75%; 21 od 28) ima „kanonsku strukturu” pune dužine antitela. Od sedam „nekanonskih antitela”, tri (abciksimab, ranibizumab, certolizumab pegol) predstavljaju Fab fragmente, od kojih je jedan (certolizumab pegol) pegilovan; dva (tositumomab-J¹³¹, ibrituksimab tiuksetan) nose radioizotope; po jedno su konjugat antitelo-lek (brentuksimab vedotin) i bespecifično antitelo (catumaksomab) (11).

Prema stanju iz 2010. godine (5), svetski promet monoklonskih antitela iznosi 52 milijarde dolara, što je gotovo polovina ukupnog prometa proteinskih bioloških lekova od 108 milijardi dolara. Među deset bioloških lekova sa najvećim prometom, šest su monoklonska antitela: bevacizumab, rituksimab, adalimumab, infliksimab, trastuzumab i ranibizumab. Pored njih, među najkorišćenijim lekovima je i jedan predstavnik fuzionih proteina sa delimičnom strukturom antitela, etanercept. Preostala tri biološka leka na ovoj listi su insulin glargin, epoetin alfa i pegfilgrastim (Tabela I).

Fuzioni proteini

Proteinsko inženjerstvo omogućilo je stvaranje nove klase tzv. „fuzionih” ili „hibridnih” biofarmaceutika. Takvi proizvodi sastoje se od dva ili potencijalno više prirodnih proteina/polipeptida (ili, češće, njihovih fragmenata), koji su povezani bilo direktno, bilo preko kratke vezne sekvence aminokiselina. Uopšteno, jedan deo fuzionog proizvoda ima funkciju molekulskog prepoznavanja, dok drugi segment ima efektornu funkciju (12).

Postoje dve osnovne grupe fuzionih proteina. U prvoj grupi, efektorni molekuli su fuzionisani sa Fc domenima antitela, albuminom ili transferinom, pre svega u cilju produženja poluvremena eliminacije fuzionog proizvoda. Najpoznatiji predstavnik je **etanercept**, koji se sastoji od ekstracelularnog, ligand-vezujućeg dela receptora za humani faktor nekroze tumora (TNF), povezanog sa Fc regionom humanog IgG antitela. Fuzioni proizvod je eksprimiran u ćelijskoj liniji ovarijalnih ćelija kineskog hrčka. U drugoj grupi se nalaze fuzioni proteini koji ispoljavaju toksični efekat nakon specifičnog vezivanja za ciljno mesto. Primer je **denileukin difitoks**, koji se sastoji od aminokiselinskih ostataka 1-386 i 484-485 toksina difterije i rezidua 2-133 interleukina 2. Indikovano je kod kožnog limfoma T ćelija, čije maligne ćelije na površini

ekspimiraju CD25 komponentu receptora za interleukin-2 i zbog toga pojačano vezuju toksični fuzioni protein (9).

Specifičnosti bezbednosnog profila bioloških lekova

Iako generalizacije sa tako velikom i heterogenom grupom lekova nisu poželjne, može se očekivati da biološki lekovi, koji obično imaju jasno izdvojeno ciljno mesto vezivanja i fokusiran profil farmakoloških dejstava, ispoljavaju sužen spektar neželjenih dejstava u poređenju sa hemijskim lekovima. Ipak, sa aspekta bezbednosti, opšta je preporuka pri primeni bioloških lekova da je potrebna spremnost na neočekivane događaje, posebno u ranim fazama kliničkih ispitivanja (13).

U poređenju sa konvencionalnim hemijskim lekovima, biološki lekovi mogu da nose karakteristične rizike primene koji su povezani sa specifičnim delovanjem na važne regulatorne mehanizme i puteve. Tako je sa inhibitorima faktora nekroze tumora α , kao što je infliksimab, zapažena povećana učestalost tuberkuloze, dok je sa jednom formulacijom rekombinantnog humanog eritropoetina utvrđeno dramatično povećanje javljanja čiste aplazije eritrocita. U istoriji bezbednosnih pitanja bioloških lekova ostao je kao posebno dramatičan slučaj iz 2006. godine, kada je šest zdravih dobrovoljaca primilo pojedinačnu dozu monoklonskog antitela TGN1412, za koje su prethodna ispitivanja pokazala da predstavljaju tzv. superagonistu CD28 receptora na T ćelijama. Primljena doza je bila 500 puta manja od one koja se pokazala bezbednom u ispitivanju na majmunima. Uprkos svim procenama, monoklonsko antitelo je precipitalo tzv. „citokinsku oluju” kod svih ispitanika, sa zakazivanjem više organa, a najteži ishodi su sprečeni samo zahvaljujući brzom i energičnom tretmanu. U ovom slučaju je samo potvrđeno da prediktibilnost rezultata prekliničkih ispitivanja potencijalnih bioloških lekova nije dovoljno pouzdana. Dva su osnovna razloga za takav zaključak: postojanje specijes-specifičnih farmakoloških dejstava, kao i imunogenost humanih proteina – koji predstavljaju većinu bioloških lekova – kod životinja (5, 13).

Neželjena imunogenost prepoznata je i od strane razvojnih kompanija i od strane regulatornih ustanova kao centralno zajedničko istraživačko pitanje bioloških lekova. Imunološki odgovor, najčešće u obliku stvaranja antitela na biološki lek, može da bude praćen različitim ishodima, kao što su anafilaksa, reakcija na infuziju, ukrštena reaktivnost na endogene proteine, blaže neželjene reakcije, izmenjena farmakokinetika, gubitak efikasnosti, a moguće je i da očekivani klinički efekat izostane. Iako regulatorne ustanove čine napore da se na nivou vodiča utvrde opšte smernice za procenu imunogenosti bioloških lekova, oni ne predstavljaju standardne molekule koji se mogu staviti u fiksirane i čvrste smernice. Istovremeno, ovo nalaže od zdravstvenih radnika da budu stalno spremni na neočekivane događaje, kako u istraživanju, tako i u postmarketinškom praćenju bioloških lekova (13).

Tabela I Biološki lekovi sa najvećim prometom u svetu u toku 2010. godine. Promet je izražen u milijardama USD. Modifikovano prema referenci 5.

| | Nezaštićeno ime | Cilj/mehanizam | Tip | Kompanija | Indikacije (glavne) | Promet |
|----|------------------------|---|--|---------------------------------------|--|---------------|
| 1 | etanercept | TNF α (faktor nekroze tumora α) | fuzija Fc i receptora za TNF | Amgen Wyeth | reumatoidni artritis; juvenilni idiopatski artritis; psorijatički artritis; ankilozirajući spondilitis | 7,287 |
| 2 | bevacizumab | VEGF (vaskularni faktor rasta endotela) | humanizovan i IgG | Genentech Roche Chugai | metastatski karcinom kolona ili rektuma; metastatski kancer dojke; neoperabilan ne-sitnoćelijski kancer pluća | 6,973 |
| 3 | rituksimab | CD20 | himerni IgG | Genentech Biogen-IDEc Roche | non-Hodgkin-ov limfom; hronična limfocitna leukemija; reumatoidni artritis | 6,859 |
| 4 | adalimumab | TNF α | humani IgG | Abbott Eisai | reumatoidni artritis; poliartikularni juvenilni idiopatski artritis; ankilozirajući spondilitis; psorijatički artritis; psorijaza; Crohn-ova bolest; ulcerativni kolitis | 6,548 |
| 5 | infliksimab | TNF α | himerni IgG | Centocor (J&J) Schering-Plough | reumatoidni artritis; Crohn-ova bolest kod odraslih i dece; ankilozirajući spondilitis, psorijatički artritis; psorijaza | 6,520 |
| 6 | trastuzumab | Her2 receptor | humanizovan i IgG | Genentech Chugai Roche | metastatski kancer dojke, rani kancer dojke; metastatski kancer želuca | 5,859 |
| 7 | insulin glargin | receptor za insulin | modifikovani insulin | Sanofi-Aventis | dijabetes melitus kod odraslih, adolescenata i dece starije od 2 godine | 4,834 |
| 8 | epoetin alfa | receptor za eritropoetin | humani rekombinantn i eritropoetin | Amgen Ortho Biotech Kyowa Hakko Kirin | simptomatska anemija povezana sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom; tretman anemije i smanjenje zahteva za transfuzijom kod odraslih pacijenata koji primaju hemoterapiju | 4,590 |
| 9 | pegfilgrastim | receptor za G-CSF (faktor stimulacije kolonija granulocita) | pegilovani rekombinantn i humani G-CSF | Amgen | smanjenje trajanja neutropenije i učestalosti febrilne neutropenije kod pacijenata sa malignitetom lečenim citotoksičnom hemoterapijom | 3,558 |
| 10 | ranibizumab | VEGF | humanizovan i Fab | Genentech Novartis | neovaskularna (vlažna) senilna degeneracija makule; oštećenje vida usled dijabetičkog edema makule; oštećenje vida usled edema makule uzrokovanog okluzijom vene mrežnjače | 3,106 |

Literatura

1. Walsh G. Biopharmaceuticals and biotechnology medicines: an issue of nomenclature. *Eur J Pharm Sci* 2002; 15: 135-8.
2. Longstaff C, Whitton CM, Stebbings R, Gray E. How do we assure the quality of biological medicines? *Drug Discov Today* 2009; 14: 50-5.
3. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nat Biotechnol* 2010; 28: 917-24.
4. Bristow AF. Assignment of quantities to biological medicines: an old problem re-discovered. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci*. 2011; 369: 4004-13.
5. Dimitrov DS. Therapeutic proteins. *Methods Mol Biol* 2012; 899: 1-26.
6. Lee JS, Ha TK, Lee SJ, Lee GM. Current state and perspectives on erythropoietin production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012; 95: 1405-16.
7. Ofosu FA. A review of the two major regulatory pathways for non-proprietary low-molecular-weight heparins. *Thromb Haemost* 2012; 107: 201-14.
8. Chong V. Biological, preclinical and clinical characteristics of inhibitors of vascular endothelial growth factors. *Ophthalmologica* 2012; 227 Suppl 1: 2-10.
9. Walsh G. Second-generation biopharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 58: 185-96.
10. Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 767-74.
11. Reichert JM. Marketed therapeutic antibodies compendium. *MAbs* 2012; 4: 413-415.
12. Schmidt SR. Fusion-proteins as biopharmaceuticals--applications and challenges. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2009; 12: 284-95.
13. Giezen TJ, Mantel-Teeuwisse AK, Leufkens HG. Pharmacovigilance of biopharmaceuticals: challenges remain. *Drug Saf* 2009; 32: 811-7.

Biological medicines: three decades of progress

Miroslav M. Savić

University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology,
Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

Summary

Any medicine whose active substance is present in living organisms, or derived from living organisms, may be considered as a biological product. Vaccines, blood derivatives and products, or hormones isolated from animal or human tissues are produced by traditional biotechnological means and have a long history of use as biologics. With introduction of the recombinant human insulin in 1982, there started an era of 'high-tech' biological medicines, also known as biopharmaceuticals. Recombinant proteins, produced by recombinant DNA technology, and monoclonal antibodies, whose development was based on hybridoma technology, comprise the majority of biopharmaceuticals. The necessity of using biological methods for full characterization is considered by the drug regulation authorities as the key property of biologics, related to complexity and heterogeneity of their structure. Hence, classification of a product as a biological can change over time. For example, the full characterization of antibiotics by physical and chemical methods is feasible nowadays, and hence these drugs are not regarded as biologics any more. Paradoxically, it is possible that a synthetic product be regarded as a biological medicine, and this is the case with pegaptanib, a pegylated modified oligonucleotide, classified into biopharmaceuticals. Hence, the need of introducing a category of borderline products into classification of medicines is noticeable; these products possess some properties of conventional chemical medicines, in addition to those of biologics.

Keywords: biopharmaceuticals; biotechnological medicines; biological methods
