

BIOLOŠKA ZDRAVILA

Spletni učbenik za študente farmacije

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



BIOLOŠKA ZDRAVILA

Spletni učbenik za študente farmacije

Urednici: Nina Kočevar Glavač in Alenka Zvonar

Recenzenta: prof. dr. Samo Kreft, mag. farm., in doc. dr. Mojca Lunder, mag. farm.

Avtorji: Borut Štrukelj, Janko Kos, Matjaž Jeras, Petra Kocbek, Tomaž Bratkovič, Alenka Premuš Marušič, Tomislav Laptoš

Izdala: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Kraj in leto izida: Ljubljana, 2015

CIP - Kataložni zapis o publikaciji
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

615.32(075.8)(0.034.2)

BIOLOŠKA zdravila [Elektronski vir] : spletni učbenik za študente farmacije / avtorji Borut Štrukelj ... [et al.] ; urednici Nina Kočevar Glavač in Alenka Zvonar. - El. knjiga. - Ljubljana : Fakulteta za farmacijo, 2015

ISBN 978-961-6378-66-6 (pdf)

1. Štrukelj, Borut 2. Kočevar Glavač, Nina
280339456

Uvodne besede

Zgodovina razvoja sodobne biotehnologije beleži svoje zgodne začetke v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja. Prvi velik uspeh, s katerim so se okronala biološka zdravila, je prišel z letom 1982, ko so ameriške regulatorne oblasti za zdravljenje sladkorne bolezni odobrile rekombinantni človeški inzulin. Biološka zdravila so doživela v naslednjih tridesetih letih skoraj neslutene razsežnosti. Svetovni trg bioloških zdravil za humano uporabo tako danes šteje več kot 180 bioloških zdravil, v kliničnih raziskavah pa jih proučujejo še veliko več.

Ker se zavedamo, kako pomembno je graditi in širiti obzorja strokovnega znanja, smo predstavitel sodobnih bioloških zdravil zasnovali tako z vidika aktualnosti kot tudi uporabnosti za zaposlene v širši farmacevtski stroki. Obravnavali jih bomo v povezavi z rakom in vnetnimi procesi, ki sta dve najvidnejši področji njihove uporabe. V sklopu kliničnega dela se bomo dotaknili še učinkovin za zdravljenje endokrinoloških bolezni, epoetinov in nizkomolekularnih heparinov. Pomembne vsebine bomo izpostavili tudi z vidika dostavnih sistemov in stabilnosti farmacevtskih oblik z biološkimi zdravili.

Doc. dr. Alenka Zvonar, mag. farm., in doc. dr. Nina Kočevar Glavač, mag. farm.

Ljubljana, junij 2014

Kazalo

30 let bioloških zdravil: pregled in perspektive	7
<i>Prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.</i>	
Biološka zdravila in rak	15
<i>Prof. dr. Janko Kos, univ. dipl. kem.</i>	
Biološka zdravila in celični terapevtski pripravki za modulacijo vnetnih procesov	31
<i>Izr. prof. dr. Matjaž Jeras, mag. farm.</i>	
Od klasičnih do sodobnih dostavnih sistemov za biofarmacevtike	51
<i>Doc. dr. Petra Kocbek, mag. farm.</i>	
Biološka zdravila za zdravljenje endokrinoloških bolezni	65
<i>Doc. dr. Tomaž Bratkovič, mag. farm.</i>	
Klinični vidik uporabe epoetinov in nizkomolekularnih heparinov	75
<i>Asist. Alenka Premuš Marušič, mag. farm., spec. klin. farm.</i>	
Fizikalno-kemijska stabilnost farmacevtskih oblik z biološkimi zdravili v praksi	81
<i>Tomislav Laptoš, mag. farm.</i>	

30 let bioloških zdravil: pregled in perspektive

Prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.
Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani

Povzetek

V zadnjih tridesetih letih se je razvila nova veja zdravil in zdravljenja s sodobnimi biološkimi zdravili, med katerimi je poleg hormonov in citokinov največ monoklonskih protiteles, usmerjenih proti različnim indikacijskim področjem. Od leta 2006, s potekom patentnih pravic, se v Evropski uniji uveljavlja nova alternativna oblika bioloških zdravil, ki jih imenujemo biološko podobna zdravila. Tako za biološka zdravila kot tudi za biološko podobna zdravila je potrebno izpeljati rigorozne klinične raziskave, s katerimi dokazujemo varnost, učinkovitost in kakovost, kar je pogoj za pridobitev dovoljenja za promet, ki se izvaja po centraliziranem postopku. V letu 2012 so predstavljala biološka in biološko podobna zdravila glede na tržni delež skoraj polovico med dvajsetimi najbolj prodajanimi zdravili na globalni ravni. Tudi biološka zdravila izkazujejo neželene učinke, od katerih je najresnejši pojav imunogene reakcije.

Vsebina

1 UVOD

2 SKUPINE BIOLOŠKIH ZDRAVIL

2.1 Rekombinantne biološke učinkovine

2.2 Peptidi kot biološke učinkovine

2.3 Genske učinkovine in gensko zdravljenje

3 BIOLOŠKA ZDRAVILA DRUGE IN TRETJE GENERACIJE

3.1 Rekombinantni inzulini druge generacije

3.2 Rekombinantni eritropoetini druge in tretje generacije

3.3 Rekombinantni filgrastimi in interferoni druge generacije

3.4 Rekombinantna monoklonska protitelesa druge in tretje generacije

4 BIOLOŠKO PODOBNA ZDRAVILA

5 VARNOST (IMUNOGENOST), KAKOVOST IN UČINKOVITOST BIOLOŠKIH ZDRAVIL

6 SKLEP

7 LITERATURA

1 UVOD

Več kot trideset let je minilo od pridobitve prvega dovoljenja za promet z biološkim zdravilom, ki ga je leta 1982 izdala Ameriška agencija za zdravila in hrano FDA za rekombinantni inzulin, ki mu je kmalu zatem sledil rekombinantni rastni hormon. S tem se je začela plodna doba uvajanja sodobnih bioloških zdravil, ki predstavljajo izjemen napredek farmacevtskih in medicinskih ved in znanosti.

Silen razvoj, ki smo mu sedaj priča, se je začel z uvedbo tehnologije rekombinantne DNA, ki se še dalje razvija. Zaradi zahtev po izboljšavi farmakokinetičnih in farmakodinamskih lastnosti bioloških zdravil, ki so kompleksne proteinske ali genske molekule, kakor tudi zaradi potencialne imunogenosti, še nadalje razvijamo nove pristope k načrtovanju in proizvodnji človeku prijaznejših oblik bioloških zdravil. Najhitreje se razvija skupina rekombinantnih monoklonskih protiteles, zlasti popolnoma humanih monoklonskih protiteles, ki izkazujejo najnižjo stopnjo imunogenosti, prav tako smo priča novim rekombinantnim učinkovinam druge generacije. Od leta 2007 se na tržišču pojavljajo biološko podobna zdravila, ki predstavljajo alternativo inovativnim biološkim zdravilom, vplivajo pa na zniževanje cen sodobnih zdravil biološkega izvora (1).

Razvoj je nekoliko upočasnen pri genskih zdravilnih učinkovinah, od katerih smo si veliko obetali, a se je zaradi nedovršene tehnologije vnosa genov in potencialne nevarnosti sprememb v aktivnosti delovanja humanega genoma ta del bioloških zdravil razvijal počasneje od pričakovanj. Z odkritjem novih oblik regulacije genov z molekulami mikroRNA pa si tudi od genskih učinkovin v razvoju obetamo večji delež tistih, ki bodo prešle zahtevne registracijske postopke in bodo na tržišču v naslednjih desetih letih.

Z intenziviranjem razvoja in registracij je trenutno delež sodobnih bioloških učinkovin glede na tržno vrednost med vsemi učinkovinami izjemno narasel. Tako zasledimo v letu 2012 kar osem najbolje prodajanih bioloških zdravil med dvajsetimi najbolje prodajanimi zdravili vseh kategorij. Če pa seštejemo absolutne vrednosti v ameriških dolarjih, smo v svetovnem merilu za prvih dvajset zdravil porabili približno 115 milijard (to je približno 84 milijard evrov), od tega za biološka zdravila skoraj 50 % (približno 56 milijard dolarjev) (preglednica 1) (2).

Preglednica 1: Dvajset najbolje prodajanih zdravilnih učinkovin v letu 2012 na svetovni ravni. Biološka zdravila so napisana v poševnem tisku.

Učinkovina	Indikacija (delovanje)	Prodaja (milijarde am. dolarjev)
<i>Adalimumab</i>	Kronične vnetne bolezni	9,27
<i>Infliximab</i>	Kronične vnetne bolezni	8,22
<i>Etanercept</i>	Kronične vnetne bolezni	7,96
Flutikazon/salmeterol	Astma in kronična obstruktivna pljučna bolezen	7,90
<i>Rituximab</i>	Limfomi, levkemije, avtoimunske bolezni	7,29
<i>Inzulin glargin</i>	Sladkorna bolezen	6,65
<i>Trastuzumab</i>	Rak dojke	6,40
Rosuvastatin	Antiholesterolemik	6,25
<i>Bevacizumab</i>	Različne oblike raka	6,22
Aripiprazol	Antidepresiv	5,38
Klopidogrel	Antitrombotik	5,32
Duloksetin	Anksiolitik	4,99
Imatinib	Različne oblike raka	4,72

Preglednica 1 (nadaljevanje)

Učinkovina	Indikacija (delovanje)	Prodaja (milijarde am. dolarjev)
Tiotropinijev bromid	Kronična obstruktivna pljučna bolezen	4,49
Pregabalin	Protibolečinsko sredstvo	4,16
Pegfilgrastim	Aktivator nevtrofilcev	4,09
Sitagliptin	Sladkorna bolezen	4,09
Atorvastatin	Antiholesterolemik	3,95
Ezomeprazol	Erozivni ezofagitis	3,94
Montelukast	Astma	3,85

2 SKUPINE BIOLOŠKIH ZDRAVIL

Na osnovi razdelitve Evropske agencije za zdravila (EMA) delimo biološka zdravila v pet osnovnih skupin (3). Tako imamo med tradicionalnimi biološkimi zdravili taka, ki jih pridobimo z izolacijo iz rastlin, živali ali človeka, nato sledi skupina zdravil, pridobljenih s pomočjo klasične fermentorske tehnologije, daleč največji del pa tvorijo rekombinantne biološke učinkovine, peptidi, pridobljeni s sintezo ter majhna skupina genskih zdravilnih učinkovin.

2.1 Rekombinantne biološke učinkovine

V letu 2014 imamo na globalnem farmacevtskem trgu več kot 140 različnih rekombinantnih zdravilnih učinkovin. Osnovna tehnologija proizvodnje sestoji z vnosom gena, ki kodira za želeno učinkovino, v primerno gostiteljsko celico. V to skupino uvrščamo rekombinantne hormone, kot so inzulin, glukagon, rastni hormon, paratiroidni hormon, gonadotropini, prolaktin, eritropoetin, in nekatere ostale hormone. Za zdravljenje določenih genskih malformacij uporabljamo rekombinantne encime, kot so alfa in beta agalidaza, alfa dornaza, imigluceraza, superoksid-dismutaza, fenilalanin- amoniak-liaza, alfa glukozidaza, urikaza, pegilirana arginin-deaminaza, sulfataza, porfobilinogen-deaminaza in nekatere druge. Večina rekombinantnih encimov ima status zdravil sirot, saj jih uporabljamo za zdravljenje relativno redkih genskih bolezni (4). Prav tako je registriranih več rekombinantnih dejavnikov strjevanja krvi, ki jih uporabljamo pri zdravljenju različnih tipov hemofilij. V preteklih osmih letih je bilo registriranih nekaj sodobnih rekombinantnih cepiv, kot so (5): cepivo proti hepatitisu B, difteriji, *H. influenzae* in rekombinantno cepivo proti lymfski bolezni.

V podskupini rekombinantnih citokinov najdemo interferon alfa v več različicah, dve vrsti osnovnih interferonov beta, interferon gama, prav tako v dveh različicah, ter interleukin IL-2 in IL-11 (6). Daleč največjo skupino pa predstavljajo rekombinantna monoklonska protitelesa, ki zavzemajo trenutno več kot 40 % vseh rekombinantnih zdravil v sodobni materiji medicini.

2.1.1. Monoklonska protitelesa

Prvo monoklonsko protitelo so naredili s hibridomsko tehnologijo. Na ta način lahko pridobimo le mišja monoklonska protitelesa. Kmalu pa so kliniki opazili, da pride po vnosu mišjih monoklonskih protiteles v organizem do imunskega odziva, nastanejo človeška protitelesa proti mišjemu proteinu.

Zato so s pomočjo tehnologije rekombinantne DNA kmalu začeli izdelovati protitelesa, ki imajo konstantno regijo, sestavljeno iz človeškega aminokislinskega zaporedja, variabilno pa iz mišjega. To so himerna monoklonska protitelesa. Še večjo izboljšavo so dosegli z dodatnim zmanjšanjem mišjih zaporedij v protitelesih. Tako so pridobili humanizirana monoklonska protitelesa, kjer je le še okoli 15 % mišjega zaporedja (7). Šele z uvedbo tehnologije bakteriofagnega prikaza oziroma transgenih miši pa so uspeli pridobiti popolnoma humana protitelesa, ki izkazujejo najmanjšo stopnjo imunogenosti. Najpogosteje uporabljena monoklonska protitelesa in indikacijska področja njihove uporabe predstavljamo v preglednici 2 (8).

Preglednica 2: Rekombinantna monoklonska protitelesa

Monoklonsko protitelo	Glavna indikacija	Monoklonsko protitelo	Glavna indikacija
Abciximab	Preprečitev strdkov	Efalizumab	Luskavica
Rituximab	Ne-hodgkinov limfom	Cetuximab	Kolorektni rak
Baziliximab	Imunosupresija	Bevacizumab	Kolorektni rak
Daclizumab	Imunosupresija	Natalizumab	Multipla skleroza
Palivizumab	Preprečitev virusnih okužb	Ranibizumab	Makularna deg.
Infliximab	Kronične vnetne bolezni	Panitumumab	Kolorektni rak
Trastuzumab	Rak dojke	Ecilizumab	Hemoglobinurija
Gemtuzumab ozogamicin	Akutna mieloidna levkemija	Ibritumomab tiuxetan	Ne-hodgkinov limfom
Alemtuzumab	Kronična mieloična levkemija	Canakinumab	Muckle-wells sindrom
Adalimumab	Kronične vnetne bolezni	Catumaxomab	Maligni ascites
Tositumomab	Ne-hodgkinov limfom	Ustekinumab	Kronična vnetja
Certolizumab pegol	Kronične vnetne bolezni	Tocilizumab	Kronična vnetja
Golimumab	Kronične vnetne bolezni	Ofatumumab	Kronična levkemija
Belimumab	Sistemiški lupus	Denosumab	Osteopenija
Raxibacumab	Okužba z antraksom	Brentuxumab vedotin	Hodgkinov limfom
Ipilimumab	Metastatski melanom		

Čeprav fuzijski proteini niso monoklonska protitelesa, pa jih zaradi podobnosti delovanja in indikacijskih področij uvrščamo v skupino monoklonskih protiteles. Običajno so sestavljeni iz dela konstantne regije monoklonskega protitelesa in dela receptorja za ciljni protein, proti kateremu so usmerjeni. V to podskupino spadajo etanercept, alefacept, abatacept, rilonacept, romiplostim in belatacept (9).

2.2 Peptidi kot biološke učinkovine

Peptidi so manjši proteini, sestavljeni iz manj kot 50 aminokislin. Glede na to, da gre za manjše, enostavne peptidne molekule, jih lahko pridobimo na dva načina: s pomočjo tehnologije rekombinantne DNA ali s pomočjo sinteze na trdnih nosilcih. Slednjo metodo bistveno pogosteje uporabljamo pri manjših peptidih velikosti do 40 aminokislin, saj je bolj ekonomična, pri proteinih velikosti nad 50 aminokislin pa se ekonomika prevesi v prid rekombinantnim proteinom, saj cena sinteze z večanjem števila aminokislin izrazito raste. Za to skupino velja paradoks: čeprav jih pridobivamo sintezno, jih zaradi peptidne narave in načina delovanja uvrščamo med biološka zdravila. Med peptidi so najpomembnejši: kalcitonin, vazopresini, oksitocini, goserelin, buserelin, somatostatini, enfuvirtid, bivalirudin in glatiramer (10).

2.3. Genske učinkovine in gensko zdravljenje

Med biološka zdravila spadajo tudi genske učinkovine. Za razliko od rekombinantnih proteinov ali peptidov v tem primeru v telo vnesemo genski segment, ki lahko deluje kot osnova za biosintezo želenega proteina ali pa vpliva na regulacijo genskega izražanja. Pri tem lahko pride do aktivacije ali utišanja humanih genov, kar vodi do preprečitve transkripcije in translacije. Od genskih učinkovin smo si veliko obetali, a je trenutna tehnologija vnosa genov še vedno na začetnem razvoju.

Največkrat se odločimo za vnos genov s pomočjo virusnih vektorjev, razvijajo pa tudi alternativne poti vnosa z nanodelci, liposomi, kationskimi lipidi, iontoferozo ter s plazmidno DNA, nanoseno na trdnih delcih velike gostote (11). Kljub številnim kliničnim raziskavam v fazi I in II, je le nekaj zdravil prešlo registracijski postopek in jih tržijo kot genska zdravila. To sta dve genski učinkovini iz skupine protismiselnih oligonukleotidov: ApoB-100 in alicaforsen, ki je usmerjen proti ICAM-1 molekuli, iz prodaje pa so zaradi ekonomskih vzrokov že pred leti umaknili vitravene, ki je bil usmerjen proti genomu citomegalovirusa. V letu 2012 je EMA odobrila tudi prvo gensko učinkovino, alipogene tiparvovec, ki vnesena v telo povzroči sintezo lipoprotein lipaze. Genski konstrukt tako nadomesti okvarjen gen pri bolnikih z lipoprotein lipazno deficienco (12).

3 BIOLOŠKA ZDRAVILA DRUGE IN TRETJE GENERACIJE

Biološke zdravilne učinkovine so kot proteini, peptidi ali genski segmenti relativno neoptimalna zdravila, saj so občutljivi na delovanje različnih encimov v telesu, hitro denaturirajo pri povišanih temperaturah, v prisotnosti topil ali nizke vrednosti pH, zato jih razen nekaj izjem ne moremo aplicirati peroralno. Veliko večino bioloških zdravil tako dajemo parenteralno, vendar tudi po tej poti hitro zapadejo metabolnim procesom. Z namenom izboljšati farmakokinetične in farmakodinamične lastnosti se proizvajalci trudijo pripraviti izboljšane različice osnovnih bioloških zdravil, ki naj bi bila taka, kot jih izdeluje človeški organizem. Take učinkovine, ki imajo identično strukturo kot naravni človeški proteini, imenujemo biološke učinkovine prve generacije. Nekaj primerov: rekombinantni inzulin, eritropoetin, filgrastim, interferon alfa in interferon beta. Če pa osnovno molekulo nekoliko spremenimo, kar lahko naredimo na genskem nivoju (dodamo ali odvzamemo nukleotide, ki kodirajo za nove aminokisljine) ali posttranslacijsko (na protein priprnemo maščobne verige ali polietilenglikol), dobimo biološka zdravila druge ali celo že tretje generacije (13).

3.1 Rekombinantni inzulini druge generacije

Sladkorna bolezen (predvsem tipa 2) se širi s pandemično razsežnostjo, poleg tega pa običajno bolnik prejema inzulin doživljenjsko. Zato so že nekaj let po uvedbi rekombinantnega inzulina pričeli z izboljšavami na osnovni molekuli. Tako imamo celo vrsto rekombinantnih inzulinov druge generacije, ki se razlikujejo po času delovanja. Hitro delujoči inzulin je inzulin LisPro, ki so ga pridobili z zamenjavo nukleotidov, ki kodirajo za lizin in prolin v genu za inzulin, ali pa inzulin aspart. Dolgodelujoči inzulin detemir ima na protinski del pripeto maščobno miristinsko kislino. Kot lipoprotein se veže na serumski albumin in se počasneje sprošča, zato deluje dolgočasno. Še večji prodajni uspeh so dosegli z gensko modifikacijo pri inzulinu glargin, kjer so kot glavno spremembo

uvedli dva tripleta nukleotidov, ki kodirajo za arginin. S tem so dosegli, da je molekula pridobila bazični del in pri fiziološkem pH slabše disociira v monomerno obliko, zato deluje kot dolgodelujoči inzulin. V fazi razvoja so lipo-PEG-inzulinske različice.

3.2 Rekombinantni eritropoetini druge in tretje generacije

Tudi na področju eritropoetinov so raziskovalci poskušali povečati biološko delovanje, zato so v gen za osnovni rekombinantni eritropoetin vnesli dva tripleta nukleotidov, ki kodirata za asparagin. Na ta način so dobili dve dodatni glikozilacijski mesti in delež sladkornih verig, vezanih na rekombinantnem eritropoetinu se je povečal za dodatnih 20 %, kar vodi do dolgega razpolovnega časa in s tem večje biološke uporabnosti. Eritropoetin tretje generacije pa je metoksi pegilirani (PEG) eritropoetin, ki je v Evropski uniji registriran od julija 2007.

3.3 Rekombinantni filgrastimi in interferoni druge generacije

Metoda pripetja hidrofilne polietilenglikolne verige na proteinsko molekulo se je izkazala kot izjemno sprejemljiva. Čeprav se je *in vitro* delovanje proteina zmanjšalo, je bilo delovanje *in vivo* bistveno daljše. Vzroki temu so sterično oviranje proteaz, večja molekulska masa in s tem manjša glomerularna filtracija, obenem pa je manjša tudi verjetnost imunogenosti. Poleg PEG-filgrastima je kot predstavnik druge generacije trenutno na tržišču še inovativni PEG-interferon alfa.

3.4 Rekombinantna monoklonska protitelesa druge in tretje generacije

Tudi znotraj velike skupine monoklonskih protiteles se razvijajo posamezne molekule, ki jih uvrščamo v drugo in celo tretjo generacijo. Znotraj druge generacije zasledimo predvsem fuzijske proteine, pegilirane različice in fuzijska protitelesa z antibiotikom ali radioaktivnim izotopom, tretja generacija pa predstavlja le fragmente FAB, *affibody* molekule in humana protitelesa, narejena s pomočjo bakteriofagnega prikaza (14).

4 BIOLOŠKO PODOBNA ZDRAVILA

Pridobitev dovoljenja za promet za biološko zdravilo v Evropski uniji poteka po centraliziranem postopku v strogo določenem časovnem okvirju 210 dni, s prekinitvami do največ 300 dni, nato pa komisija izda mnenje v največ 90 dneh od prejetja mnenja odbora CHMP (EMA, London). Po poteku patentnih pravic inovativnim biološkim zdravilom se lahko na trgu, po uspešnem registracijskem postopku, pojavijo biološko podobna zdravila, ki pa morajo preiti skrajšane klinične raziskave in obširne komparativne raziskave, kar na primer za generike v primeru sinteznih zdravil ni potrebno. Biološke zdravilne učinkovine namreč izdelujemo s pomočjo živih organizmov (prokariotskih ali evkariotskih celic), zato se lahko predvsem kompleksni proteini razlikujejo po strukturi. Že minimalno drugačen biološki postopek lahko vodi do različne strukture.

Definicija generikov narekuje, da je generična učinkovina strukturno enaka referenčni, zato na področju bioloških zdravil generikov ni. Namesto tega je EMA uvedla izraz »biološko podobna zdravila« (BPZ), ki jim pravimo tudi »podobna biološka zdravila« ali na kratko biosimilarji. Tako

imamo od leta 2006 na tržišču Evropske unije registriranih že nekaj biološko podobnih zdravil iz skupine eritropoetinov in filgrastimov, v letu 2013 pa so registrirali že prvo monoklonsko protitelo, ki se uvršča med biološko podobna zdravila. Seveda pa gre tudi na tem področju razvoj dalje, zato se uveljavljajo že tudi biološko podobna zdravila druge generacije, ki jim pravimo trivialno tudi *biobetters*. Prvi predstavnik te skupine je pegfilgrastim. Res pa je, da gre za mejno področje, ko se regulatorni organi odločijo, ali so izboljšave oziroma spremembe na osnovni biomolekuli tako različne, da zahtevajo registracijski postopek za novo zdravilo. Tudi vsi registracijski postopki za biološko podobna zdravila potekajo po centraliziranem postopku na EMA v Londonu (15).

5 VARNOST (IMUNOGENOST), KAKOVOST IN UČINKOVITOST BIOLOŠKIH ZDRAVIL

V prvih nekaj letih po začetku uporabe sodobnih bioloških zdravil smo bili navdušeni nad delovanjem, saj gre za zdravila, ki so ciljano usmerjena proti različnim tarčam (proteinom, receptorjem, ligandom, substratom). Kmalu pa se je izkazalo, da tudi biološka zdravila lahko povzročijo neželene učinke, ki jih razdelimo na a) interakcije z želenimi tarčami in b) interakcije z neželenimi tarčami. V prvo skupino uvrščamo vsa monoklonska protitelesa, ki jih uporabljamo za lajšanje težav pri kroničnih vnetnih stanjih in so usmerjena proti dejavniku tumorske nekroze alfa (TNF- α). Zmanjševanje koncentracije TNF- α namreč vodi do pojava oportunističnih okužb, predvsem tuberkuloze, lahko pa se pojavijo tudi neoplazme (16). Primer predstavnika druge skupine je trastuzumab, ki se sicer uspešno veže na rastne receptorje HER2 na površini rakavih celic, a se lahko veže tudi na srčno mišico in povzroči kardiotoksične neželene učinke.

Prav pri bioloških zdravilih pa smo se spoznali z novim specifičnim neželenim učinkom, ki se dotika tako varnosti kot učinkovitosti, povezan pa je lahko tudi s kakovostjo. To je imunogenost. Majhne sintezne in naravne molekule običajno niso imunogene. Proteini so po svoji naravi imunogeni, če niso človeškega izvora, lahko pa postanejo imunogeni, čeprav za njihovo izdelavo uporabimo popolnoma humano nukleotidno oziroma aminokislinsko zaporedje, vendar pa je pri izdelavi, formulaciji, transportu ali shranjevanju prišlo do porušitve nativne oblike proteina. Tako se izpostavijo hidrofobne aminokisliline, ki so pri proteinu običajno v notranjosti proteina, in povzročijo nastanek imunogene reakcije. Nastajati začinjajo specifična protitelesa, ki izničijo delovanje eksogeno vnesenega biološkega zdravila ali celo endogenega proteina, ki je vitalnega pomena za pravilno delovanje organizma (17).

Poleg učinkovitosti in varnosti regulatorni organi natančno proučijo tudi kakovost, preden biološko ali biološko podobno zdravilo pridobi dovoljenje za promet. Prav zaradi visoke kakovosti je velika večina bioloških zdravil še vedno proizvedena v Evropski uniji ali Združenih državah Amerike, čeprav lahko v naslednjih nekaj letih pričakujemo tudi kakovostna, učinkovita in varna biološko podobna zdravila iz azijskih dežel, predvsem Južne Koreje in Japonske (18).

6 SKLEP

Biološka zdravila so na razvitem farmacevtskem tržišču prisotna že dobrih trideset let, kljub temu pa se je šele v zadnjih nekaj letih njihov delež med vsemi uporabljanimi zdravili znatno povečal. Vzrok temu so nove tehnologije, zaradi izteka patentnih pravic inovativnim biološkim zdravilom pa tudi pojav biološko podobnih zdravilnih učinkovin. Med vsemi skupinami se trenutno trži največ monoklonskih protiteles prve, druge in tretje generacije, pričakujemo pa, da se bo v naslednjih desetih letih močno razvil delež genskih zdravil, ki so trenutno še v začetni fazi razvoja.

7 LITERATURA

1. Štrukelj B. Razvoj, delitev in vloga bioloških zdravil. V: Štrukelj B, Kos J. Biološka zdravila: od gena do učinkovine. Slovensko farmacevtsko društvo, 2007; 4–24.
2. Carroll JD. Top 20 Best-Selling drugs of 2012. <http://www.fiercepharma.com/special-reports>. Datum dostopa: 4. 4. 2014.
3. Development Pharmaceuticals for Biotechnological and Biological Products-Annex to Note for Guidance on Development Pharmaceuticals. CPMP/BWP/328/99; 2000.
4. Carter PJ. Introduction to current and future protein therapeutics: a protein engineering perspective. *Exp Cell Res* 2011; 317: 1261–1269.
5. Walsh G. Biopharmaceutical Benchmarks. *Nat Biotechnology* 2010; 28: 917–924.
6. Laurence A, O'Shea JJ, Watford WT. Interleukin-22: a sheep in wolf's clothing. *Nat Medicine* 2008; 14: 247–249.
7. Dimitrov DS, Marks JD. Therapeutic antibodies: current state and future trends-is a paradigm change coming soon? *Methods Mol Biol* 2009; 525: 1–27.
8. Dimitrov DS. Therapeutic antibodies, vaccines and antybodyomes. *mAbs* 2010; 2: 347–356.
9. Beck A, Reichert JM. Therapeutic Fc-fusion proteins and peptides as successful alternatives to antibodies. *mAbs* 2011; 3: 415–416.
10. Thamilarasan M. Glatiramer acetate treatment effects on gene expression in monocytes of multiple sclerosis patients. *J Neuroinflamm* 2013; 10: 126–133.
11. Misra S. Human Gene Therapy: a Brief Overview of a Genetic Revolution. *JAPI* 2013; 61: 41–57.
12. Wiersbicki AS. Alipogene tiparvovec: gene therapy for lipoprotein lipase deficiency. *Expert Opin Biol Ther* 2013; 13: 7–10.
13. Jefferis R. Glycosilation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8: 226–234.
14. Skerra A. Alternative non-antibody scaffolds for molecular recognition. *Curr Opin Biotechnol* 2007; 18: 295–304.
15. Beck A. Biosimilar, biobetter and next generation therapeutic antibodies. *mAbs* 2011; 3: 107–110.
16. Emi AN, de Carvalho JF, Artur Almeida SC, Bonfa E. Anti-TNF alpha agents in autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* 2010; 38: 82–89.
17. Descotes J, Gouraud A. Clinical immunotoxicity of therapeutic proteins. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008; 4: 1537–1549.

Biološka zdravila in rak

Prof. dr. Janko Kos, univ. dipl. kem.
Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani

Povzetek

Biološka zdravila predstavljajo vedno večji delež med novoregistriranimi zdravili, ki jih uporabljamo za zdravljenje malignih bolezni. Za razliko od klasičnih zdravil, ki so majhne molekule, so biološka zdravila v večini primerov proteini ali nukleinske kisline, njihova bistvena značilnost pa je ciljano delovanje. V večini primerov so indicirana za zdravljenje napredovanih oblik raka. Najbolj številčna so monoklonska protitelesa, ki so po izvoru lahko glodalska, himerna, humanizirana ali popolnoma humana. Število novih protiteles, ki vstopajo v klinična preizkušanja, se povečuje, zato lahko pričakujemo, da se bo v prihodnje povečal tudi njihov delež v klinični uporabi. Poleg protiteles so pri zdravljenju raka pomembni tudi rekombinantni hematopoezni dejavniki, interlevkini in interferoni, ter različni vektorji in fragmenti DNA in RNA v genskem zdravljenju in tumorske vaccine. V prispevku so predstavljena najpomembnejša biološka zdravila, ki so registrirana za zdravljenje različnih vrst malignih bolezni.

Vsebina

1 UVOD

2 PROTITELESA ZA ZDRAVLJENJE RAKA

- 2.1 Terapevtska monoklonska protitelesa proti tirozin kinaznim receptorjem HER-1 in HER-2/neu in signalni molekuli RANKL
- 2.2 Monoklonska protitelesa, ki zavirajo rast tumorskega ožilja
- 2.3 Terapevtska monoklonska protitelesa proti limfocitnim označevalcem CD20, CD33, CD52 in CD152
- 2.4 Bispecifična monoklonska protitelesa
- 2.5 Imunokonjugati
- 2.6 Monoklonska protitelesa v kliničnem preizkušanju

3 HEMATOPOEZNI DEJAVNIKI

- 3.1 Eritropoetin
- 3.2 Granulocitne kolonije stimulirajoči dejavnik (G-CSF)
- 3.3 Granulocitne/makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik (GM-CSF)

4 INTERLEVKINI IN INTERFERONI

- 4.1 Interlevkin 2
- 4.2 Interlevkin 11
- 4.3 Interferon alfa 2

5 GENSKO ZDRAVLJENJE RAKA

6 TUMORSKE VAKCINE

7 SKLEP

8 LITERATURA

1 UVOD

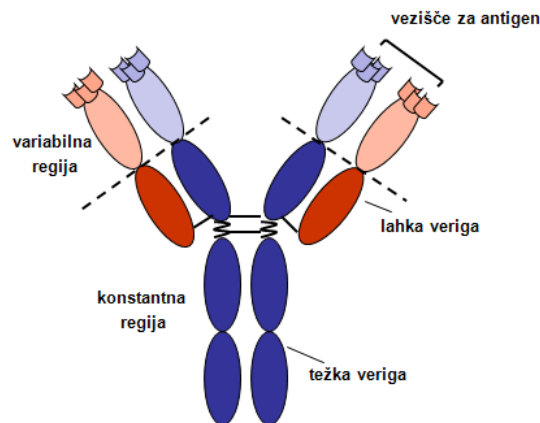
Sodobna biološka zdravila so vključena v vedno več terapevtskih pristopov zdravljenja raka. Metode rekombinantne DNA, moderne celične biologije in usmerjene kemijske sinteze omogočajo pripravo zadostnih učinkovin proteinskega izvora, ki jih iz naravnih virov ni mogoče izolirati. Rekombinantna zdravila so na začetku izražali in proizvajali predvsem v bakteriji *Escherichia coli*, danes pa se vse bolj uporabljajo različne celične linije sesalcev. Na tržišče vstopajo tudi biološka zdravila druge in tretje generacije z izboljšanimi farmakokinetičnimi in farmakodinamičnimi lastnostmi, pojavila pa so se tudi biološko primerljiva zdravila, ki bodo v prihodnosti znižala ceno zdravljenja (1).

Bistvena prednost bioloških zdravil je njihova specifičnost delovanja, saj so bolj kot majhne molekule usmerjena proti terapevtski tarči. Dejstvo je, da lahko večje molekule bolje zavzamejo strukture, ki so kompatibilne ciljnim mestom in z vzpostavitvijo množice nekovalentnih vezi ojačajo vezavo. Specifičnost delovanja je še posebej pomembna 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 zdravljenju raka uporabljamo tudi rekombinantne hematopoetske dejavnike, interlevkine in interferone, različne vektorje in fragmente DNA in RNA kot dele genskega zdravljenja in pa tumorske vakcine kot del imunskega zdravljenja raka. 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. Sestavljeni so iz štirih polipeptidnih verig, dveh težkih in dveh lahkih, ki so med seboj kovalentno povezane z disulfidnimi vezmi. Obe težki in lahki verigi sta med seboj identični, vsaka veriga pa je sestavljena iz konstantne in variabilne regije. Glede na konstantne regije protitelesa razvrščamo v več razredov: IgA, IgD, IgE, IgG in IgM. Vezavno mesto za antigen tvorijo variabilni deli, še posebej tako imenovane hipervariabilne zanke (regije CDR), ki se na mestu vezave razlikujejo v aminokislinskih ostankih (slika 1). Na vsaki molekuli protitelesa sta dve taki mesti, protitelesa, ki so sestavljena iz več podenot (IgA, IgM) pa imajo več vezavnih mest. Heterogenost vezavnih mest omogoča prepoznavanje velikega števila antigenov - naše telo naj bi bilo sposobno sintetizirati do 10 milijard različnih protiteles. Protitelesa izločajo diferencirani limfociti B, vsak klon aktiviranega limfocita B pa proizvaja le eno vrsto protiteles. Po vnosu tujka (antigena) 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 in terapevtske namene pa so bolj primerna monoklonska protitelesa, pridobljena iz enega samega klona limfocitov B.

Njihova bistvena prednost je v definirani specifičnosti in možnosti pridobivanja v neomejenih količinah *in vitro* (2).



Slika 1: Shematski prikaz protitelesa tipa IgG

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 jih uporabljamo kot neomejen vir za pridobivanje specifičnih monoklonskih protiteles. Tehniko priprave hibridomskih celic sta prva razvila nemški biolog Georges Köhler in argentinski biokemik Cesar Milstein leta 1975 (3). 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 terapevtika, najpogosteje pri kroničnih boleznih, lahko organizem odreagira z nastankom humanih protiteles proti mišjim imunoglobulinom – ta odziv poznamo pod imenom odziv HAMA (*human anti-mouse antibody*). Pri naslednji generaciji, to je himernih in humaniziranih protitelesih, je mišjega izvora le še variabilni del oziroma regija CDR, kar močno zmanjša imunogenost in poveča terapevtsko uporabnost. Rešitev problema imunogenosti pa predstavljajo popolnoma humana monoklonska protitelesa. Ta pridobivamo na različne načine, tako z metodami bakteriofagnega prikaza z uporabo fagnih predstavitev knjižnic, ki vsebujejo gene za človeške imunoglobuline, in pa z uporabo transgenih živali (4).

Protitumorsko delovanje monoklonskih protiteles poteka preko različnih mehanizmov. Lahko imajo neposreden učinek, tako da inaktivirajo delovanje molekulske tarče, proti kateri so usmerjeni. Posredni učinki so povezani z delovanjem citotoksičnih celic preko fragmenta Fc. Na ta način spodbujena celična smrt se imenuje od protiteles odvisna celična citotoksičnost (ADCC). Protitelesa lahko spodbudijo tudi celično fagocitozo (ADCP) ali pa vežejo molekule komplementa, kar vodi do od komplementa odvisne citotoksičnosti (CDC). Kot tarče za delovanje monoklonskih protiteles v protitumorskem zdravljenju so izbrani antigeni, ki jih specifično izražajo tumorske celice. Žal popolnoma specifičnih tumorskih antigenov ni, vedno je del teh antigenov prisoten tudi na netumorskih celicah. Zaradi heterogenosti tumorskih celic je tudi porazdelitev tumorskih antigenov na posameznih celicah lahko zelo različna. Razlike so lahko zelo velike tudi med posameznimi

bolniki, zato je pri uporabi monoklonskih protiteles v zdravljenju raka zelo dobrodošla uporaba tumorskih kazalcev, ki lahko napovejo učinkovitost zdravljenja. Prisotnost topnih oblik molekul antigena v krvi dodatno zmanjšuje njihovo terapevtsko učinkovitost (5).

Prvo monoklonsko protitelo, ki so ga vpeljali v zdravljenje raka, je bil rituksimab, ki se je začel uporabljati leta 1997 pri zdravljenju ne-Hodgkinovega limfoma. Za njim so do danes odobrili še 15 drugih protiteles za zdravljenje različnih oblik raka. Glede na njihovo funkcionalnost jih razdelimo v šest različnih skupin:

1. Protitelesa z vezavo na receptorje za rastne dejavnike in signalne molekule, ki blokirajo celično rast in diferenciacijo tumorskih celic in s tem zaustavijo rast tumorja. Primeri takih tarčnih antigenov so receptorji za epidermalne rastne dejavnike HER-1 in HER-2 in ligand receptor aktivatorja za jedrni dejavnik kappa B (RANKL). HER-1 in HER-2 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. Receptorji HER lahko aktivirajo tudi ostale tumorogene procese, kot so angiogeneza, metastaziranje, invazija in apoptoza.
2. Monoklonska protitelesa, ki 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.
3. 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, CD33, CD52 in CD152.
4. Bispecifična monoklonska protitelesa, ki lahko povezujejo dva različna antigena, enega na tumorskih celicah in drugega na citotoksičnih celicah, hkrati pa ohranjajo sposobnost aktivacije imunskih efektorskih funkcij preko dela Fc.
5. Imunokonjugati, ki vključujejo protitelesa, ki so specifično usmerjena proti tumorskim antigenom, ter toksine ali radionuklide. Poleg citotoksičnega delovanja toksinov in radionuklidov tudi protitelesa izkazujejo od protiteles odvisno citotoksičnost, ki lahko povzroči eliminacijo tumorja s strani različnih imunskih celic (4).

2.1 Terapevtska monoklonska protitelesa proti tirozin kinaznim receptorjem HER-1 in HER-2/neu in signalni molekuli RANKL

2.1.1 Trastuzumab

Trastuzumab je himerno monoklonsko protitelo razreda IgG1, ki prepoznava humani epidermalni rastni dejavnik 2 (HER-2). Pri preobrazbi normalne v rakasto celico se zaradi spremembe gena HER-2 poveča število receptorskih molekul na površini celic, kar pomeni slabšo prognozo in večjo agresivnost tumorja. Le bolniki, ki imajo omenjeni receptor čezmerno izražen, so primerni za zdravljenje s trastuzumabom. Le-ta se veže na ektodomeno receptorjev in tako prepreči nadaljnji razvoj tumorja in njegovo rast. Po vezavi na receptor in njegovi blokadi protitelo sproži od dela Fc odvisno aktivacijo komplementa in citotoksičnost.

Trastuzumab uporabljamo za zdravljenje bolnikov z metastatsko obliko raka dojk, katerih tumorji imajo čezmerno izražen receptor HER-2:

- kot monoterapija za zdravljenje tistih bolnic, ki so se za svojo metastatsko bolezen predhodno že zdravile s 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 bolnikov, ki še niso prejeli kemoterapije za metastatsko bolezen.

Vsebnost HER-2 služi kot napovedni dejavnik odziva na zdravljenje raka dojke. Analizo vzorca tkiva opravimo z uporabo dveh metod. Prva je imunohistokemijska analiza, kjer se proteinska koncentracija HER-2 na celicah 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+, opravimo test še z metodo fluorescenčne *in situ* hibridizacije (FISH), ki dokončno pokaže primernost za zdravljenje s trastuzumabom. Trastuzumab uporabljamo tudi za zdravljenje raka želodca in požiralnika.

2.1.2 Cetuksimab

Cetuksimab je himerno monoklonsko protitelo IgG1, ki se specifično veže na receptor epidermalnega rastnega 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. Delovanje cetuksimaba je podobno kot pri trastuzumabu, saj vezava na HER-1 povzroči inhibicijo celične proliferacije in zaustavi se faza G1 celičnega cikla.

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

2.1.3 Panituzumab

Panituzumab je humano rekombinantno monoklonsko protitelo, ki se specifično veže na receptor epidermalnega rastnega 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 s pomočjo transgenih živali.

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

2.1.4 Pertuzumab

Pertuzumab je humanizirano monoklonsko protitelo, ki je prav tako kot trastuzumab usmerjeno proti receptorju HER-2. Njegova vezava na HER-2 prepreči dimerizacijo receptorjev, kar zmanjša rast in napredovanje tumorjev. Pertuzumab uporabljamo za zdravljenje metastatskega raka dojke v kombinaciji s trastuzumabom in z docetakselom.

2.1.5 Denosumab

Denosumab je humano monoklonsko protitelo IgG2, ki specifično veže ligand receptor aktivatorja za jedrni dejavnik kappa-B (RANKL), proteina, ki posreduje primarni signal pri razgradnji kosti. Registriran je za zdravljenje osteoporoze, pa tudi za zdravljenje kostnega velikoceličnega raka, za povečanje kostne mase pri bolnikih, ki so rizični za zlome z rakom prostate ali dojke, kot tudi pri bolnikih z metastazami v kosteh.

2.2 Monoklonska protitelesa, ki zavirajo rast tumorskega ožilja

2.2.1 Bevacizumab

Bevacizumab je rekombinantno humanizirano monoklonsko protitelo, ki se veže na vaskularni endotelijski rastni faktor (VEGF) in s tem zavira vezavo VEGF na njegova receptorja VEGFR-1 in VEGFR-2 na površini endotelijskih celic. S tem zavira razrast tumorskega žilja in posredno zmanjša hitrost rasti tumorja in nevarnost metastaziranja. Po vezavi VEGF se receptor transavtofosforilira in sproži signalno kaskado, ki poveča rast, preživetje in delitev endotelijskih žilnih celic. VEGF poveča tudi prepustnost žil in tvorbo ekstravaskularnega gela iz fibrina, ki predstavlja primerno okolje za rast endotelijskih celic. Bevacizumab je bil 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. Kasneje so registrirali tudi uporabo za zdravljenje napredovanega neskvamoznega nedrobnoceličnega pljučnega raka v kombinaciji s karboplatinom in paklitakselom. Odobrili so tudi zdravljenje metastatskega raka ledvic in ponovljenega glioblastoma multiforme. FDA pa je leta 2010 umaknila registracijo bevacizumaba za zdravljenje raka dojke.

2.3 Terapevtska monoklonska protitelesa proti limfocitnim označevalcem CD20, CD33, CD52 in CD152

2.3.1 Rituksimab

Rituksimab je himerno monoklonsko protitelo IgG1, usmerjeno proti antigenu CD20. Specifično se veže na ta antigen, ki je transmembranski protein z molekulsko maso 35 kDa, lokaliziran na limfocitih B. Do izražanja 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 odstrani s celične površine in se tudi ne privzame v celico. Prav tako prostega antigena CD20 ne najdemo v krvnem obtoku. Mehanizem delovanja je povezan z od komplemента 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. stopnjo 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. stopnjo folikularnih limfomov v kombinaciji s ciklofosamidom, vinkristinom in prednizolonom (t. i. kemoterapija 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 tudi za zdravljenje bolnikov s CD20 pozitivnim difuznim velikoceličnim B ne-Hodgkinovim limfomom v kombinaciji s ciklofosfamidom, doksorubicinom, vinkristinom in prednizolonom (t. i. kemoterapija CHOP).

2.3.2 Ofatumumab

Ofatumumab je humano monoklonsko protitelo tipa IgG1, ki je podobno kot rituksimab usmerjeno proti antigenu CD20, prepozna pa drugačen epitop kot rituksimab. Za razliko od rituksimaba je ofatumumab popolnoma humano protitelo, pridobljeno z uporabo transgenih živali. Do sedaj odobrena indikacija je kronična limfocitna levkemija, pri kateri ostale vrste zdravljenja niso bile učinkovite.

2.3.3 Alemtuzumab

Alemtuzumab je humanizirano monoklonsko protitelo tipa IgG1, ki je usmerjeno proti celičnemu površinskemu antigenu CD52, ki se nahaja na normalnih in malignih limfocitih B in T, monocitih, makrofagih in celicah moškega reproduktivnega sistema. Po vezavi na antigen CD52 se sprožita od Fc dela pogojena vezava komplemента in celična citotoksičnost. Posledica je odstranitev malignih limfocitov iz krvi, kostnega mozga in ostalih organov.

Alemtuzumab je bil indiciran za zdravljenje B-celične kronične limfocitne levkemije (B-CLL) pri bolnikih, ki se zdravijo z alkilirajočimi citostatiki in ki se ne odzivajo na zdravljenje s fludarabinom. Njegova uporaba pri zdravljenju raka je bila prekinjena, ponovno naj bi bil registriran za zdravljenje multiple skleroze.

2.3.4 Ipilimumab

Ipilimumab je humano monoklonsko protitelo tipa IgG1, ki je usmerjeno proti antigenu CTLA 4 (CD152), ki se nahaja predvsem na limfocitih T. CTLA4 je receptor, ki zavira delovanje T-celične imunosti, vezava ipilimumaba na receptor pa poveča citotoksičnost napram tumorskim celicam. Registriran je za zdravljenje melanoma, ki ga ne moremo kirurško odstraniti.

2.4 Bispecifična monoklonska protitelesa

2.4.1 Catumaksomab

Catumaksomab je himerno mišje-podganje protitelo, ki ima eno vezišče usmerjeno proti antigenu CD3, ki se nahaja na limfocitih T, drugo vezišče pa proti EpCAM (epitelijski celični adhezijski molekuli), ki je prisotna na tumorskih celicah. EpCAM je transmembranski glikoprotein, ki ureja od Ca²⁺ neodvisno adhezijo epitelijskih celic, pomembno vlogo pa ima tudi v celičnem signaliziranju. Zamreženje obeh antigenov približa citotoksične limfocite T in tumorske celice, del Fc pa omogoči še od komplemента in protiteles odvisno citotoksičnost. Catumaksomab je indiciran za zdravljenje malignega ascitesa, ki se pojavi pri bolnikih z metastatskim rakom.

2.5 Imunokonjugati

2.5.1 Ibritumomab-tiuksetan

Ibritumomab-tiuksetan je miše monoklonsko protitelo, ki je specifično za B-celični antigen CD20 in označeno z izotopom itrija ^{90}Y ali indija ^{111}In . 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]glicina z uporabo bifunkcionalnega reagenta DTPA (cikloheksil dietilentriaminopentaocetna kislina).

Mehanizem vezave protitelesa na antigen je enak kot pri rituksimabu. Izotopa ^{90}Y in ^{111}In sta sevalca 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 bolnikov z ne-Hodgkinovim limfomom, ki so bili neodzivni na rituksimab.

2.5.2 Tositumomab

Tositumomab je mišji analog rituksimaba, usmerjen proti B celičnemu antigenu CD20 in označen z izotopom joda ^{131}I . Tudi tositumomab je indiciran za zdravljenje bolnikov z ne-Hodgkinovim limfomom, ki so bili neodzivni na zdravljenje z rituksimabom. Predvidevajo, da ga bodo v letu 2014 umaknili s tržišča.

2.5.3 Gentuzumab ozogamicin

Gentuzumab ozogamicin sestavlja humanizirano monoklonsko protitelo IgG4, usmerjeno proti CD33, in pa citotoksični antibiotik kaliheamicin, ki sta med seboj delno kovalentno povezana, del molekul kaliheamicina pa je prostih. Gentuzumab se specifično veže na antigen CD33, 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. Pri vezavi protitelesa na antigen se tvori kompleks, ki se internalizira. V lizosomih mieloidne celice se nato sprosti kaliheamicin, ki preide v jedro in se veže na DNA. Posledica vezave je prekinitev dvojne vijačnice in smrt celice.

Gentuzumab ozogamicin uporabljamo za zdravljenje CD33 pozitivne akutne mieloične levkemije pri ponovnem pojavu bolezni pri bolnikih, ki so stari nad 60 let in pri katerih ne moremo uporabiti citotoksične kemoterapije.

2.5.4 Brentuksimab vedotin

Brentuksimab vedotin je himerno monoklonsko protitelo tipa IgG1, konjugirano z antimitotično spojino monometil avristatin. Protitelo prepozna antigen CD30 na tumorskih celicah, po vezavi se kompleks internalizira. V lizosomih katepsin B razgradi povezovalni peptid med protitelesom in monometil avristatinom. Sproščeni monometil avristatin nato deluje protitumorno. Indiciran je za

zdravljenje Hodgkinovega limfoma po neuspešni avtotransplantaciji matičnih celic ali po neuspešnih drugih vrstah zdravljenja bolnikov, ki niso kandidati za avtologno transplantacijo matičnih celic. Indiciran je tudi za zdravljenje sistemskega anaplastičnega velikoceličnega limfoma po neuspešni predhodni kemoterapiji.

2.5.5 Trastuzumab emtansine

Trastuzumab emtansine je sestavljen iz humaniziranega monoklonskega protitelesa trastuzumaba, ki prepoznava receptor HER-2 in citotoksične spojine mertansina. Po vezavi na receptor HER-2 mertansin vstopi v tumorsko celico in z vezavo na tubulin prepreči njeno delitev. Trastuzumab emtansine je indiciran za zdravljenje bolnikov z metastatskim rakom dojke, ki so že bili zdravljeni s trastuzumabom in taksanom.

2.5.6 Capromab pendetide

Capromab pendetide je mišje monoklonsko protitelo, na katerega je preko kelatorskega tripeptida (glicil-tirozil-(N,N-dietilentriaminopentaocetna kislina)-lizin hidroklorid vezan izotop indija ¹¹¹In. Protitelo specifično prepoznava prostaticni 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 prepoznava pa rakavih celic katere koli druge vrste tumorjev.

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

V preglednici 1 so zbrana opisana monoklonska protitelesa, ki jih uporabljamo v zdravljenju raka.

Preglednica 1: Monoklonska protitelesa v zdravljenju raka

Ime	Vrsta	Tarča	Indikacija	Leto odobritve FDA/EMA
PROTITELESA				
Alemtuzumab	Humanizirano IgG1	CD52	Kronična limfocitna levkemija	2001
Bevacizumab (Avastin)	Humanizirano IgG1	VEGF	Kolorektalni, pljučni, ledvični rak, glioblastoma multifforme	2004
Catumaksomab	Mišje-podganje, hibrid	CD3 EPCAM	Maligni ascites	2009
Cetuximab	Himerno IgG1	EGFR	Kolorektalni rak, rak glave in vratu	2004
Denosumab	Humano IgG2	RANKL	Rak dojke in prostate	2011
Ipilimumab	Humano IgG1	CTLA-4	Melanom	2011
Ofatumumab	Humano IgG1	CD20	Kronična limfocitna levkemija	2009
Panitumumab	Humano IgG2	EGFR	Kolorektalni karcinom	2006
Rituximab	Himerno IgG1	CD20	Kronična limfocitna levkemija, ne-Hodgkinov limfom	1997

Preglednica 1 (nadaljevanje)

Ime	Vrsta	Tarča	Indikacija	Leto odobritve FDA/EMA
Trastuzumab	Humanizirano IgG1	HER2	Rak dojke, rak na želodcu	1998
Pertuzumab	Humanizirano IgG1	HER2	Rak dojke	2012
KONJUGATI				
Brentuksimab vedotin	Himerno IgG1, konjugirano z monometil avristatinom	CD30	Hodgkinov in anaplastični velikocelični limfom	2011
Gemtuzumab	Humanizirano IgG4, vezano na kaliheamicin	CD33	Akutna mieloična levkemija	2000
Ibritumomab tiuksetan	Z ⁹⁰ Y ali ¹¹¹ In označeno mišje IgG1	CD20	Ne-Hodgkinov limfom	2002
Tositumomab	Golo ali z ¹³¹ I označeno mišje IgG1	CD20	Ne-Hodgkinov limfom	2003
Trastuzumab emtansine	Humanizirano IgG1, konjugirano z mertansinom	HER2	Rak dojke	2013
Capromab pendetide	Mišje IgG, označeno z ¹¹¹ In	PSMA	Rak prostate	1996

2.6 Monoklonska protitelesa v kliničnem preizkušanju

Obstoječa monoklonska protitelesa, bodisi sama ali v kombinaciji z že obstoječimi protitumorskimi učinkovinami, preizkušamo v mnogih kliničnih raziskavah z namenom proučiti njihovi varnost in učinkovitost tudi pri drugih vrstah raka. Zelo intenzivna so tudi preizkušanja novih protiteles. Po poročanju Vacchelli in sod. (6, 7) je v letu 2013 potekalo 33 kliničnih preizkušanj novih protiteles kot možnih terapevtikov pri raku. Pri tem so upoštevana protitelesa, ki neposredno vežejo s tumorji povezane antigene ali vplivajo na signaliziranje tumorskih celic. Njihov seznam povzemamo v preglednici 2. Nekatera od teh protiteles so usmerjena na tarče, ki jih že poznamo (CD3, CD20, CD33, IGFR, TRAILR2), pojavlja pa se tudi vrsta novih, kot na primer receptor za inzulinu podobni rastni faktor 1 (IGF1R), kemokin CCL2, angiopoetin (ANGPT), fibronektin 1 (FN1), folatni receptor 1 (FOLR1), glikoprotein A33 (GPA33), glipikan 3 (GPC3), hepatocitni rastni faktor (HGF), receptor IL2 (IL2RB), integrinska receptorja $\alpha 5$ in $\beta 1$ (ITGA5, ITGB1), mucin 1 (MUC1), antigen prostatnih matičnih celic (PSCA), receptor vaskularnega endotelijskega rastnega faktorja 2 (VEGFR2). Pričakovati je, da se bodo nekatera nova protitelesa izkazala kot varna in učinkovita, zato se bo število monoklonskih protiteles v zdravljenju raka v naslednjih letih še povečalo.

Preglednica 2: Izbrana monoklonska protitelesa, ki so uspešno zaključila klinično fazo II

Ime	Tarča	Indikacija	Status
AGS-1C4D4	PSCA	Rak pankreasa	Z gemcitabinom
Blinatumomab (MEDI-538)	CD3, CD19	Akutna limfoblastna levkemija	Samostojen
Carlumab (CNTO888)	CCL2	Rak prostate	Samostojen
Ciksutumumab	IGF1R	Kostni sarkom	S temsirolimusom
Conatumumab	TRAILR2	Kolorektalni rak, pljučni rak, rak pankreasa	Kombinacija z različnimi kemoterapevtiki
Farletuzumab	FOLR1	Ovarijski karcinom	Samostojen ali z platino in taksani

Preglednica 2 (nadaljevanje)

Ime	Tarča	Indikacija	Status
Ganitumab (AMG 479)	IGF1R	Rak dojke, rak pankreasa	S conatumumabom in gemcitabinom
Inotuzumab ozogamicin	CD22	Ne-Hodgkinov limfom	Z rituksimabom
Intetumumab	ITGA5	Rak prostate	Z docetakselom in prednisonom
Lintuzumab	CD33	Akutna mieloidna levkemija	S citarabinom
Rilotumumab (AMG 102)	HGF	Rak prostate	Z mitoksantronom in prednisonom
Ramucirumab	VEGFR2	Hepatocelični karcinom Rak požiralnika pljučni rak	Samostojen Samostojen Z docetakselom
Volociksimab (M200)	TGA5, ITGB1	Nedrobnocelični pljučni rak	S karboplatinom in paklitakselom

3 HEMATOPOEZNI DEJAVNIKI

3.1 Eritropoetin

Eritropoetin je najpomembnejši hematopoezni rastni dejavnik, ki ga uporabljamo tudi v zdravljenju raka. 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 ter nadzira njihovo proliferacijo, diferenciacijo in zorenje. Nastajanje eritropoetina se v ledvicah močno poveča pri pomanjkanju kisika (hipoksiji), premajhno nastajanje pa je vzrok za anemije. Šele priprava rekombinantnega humanega eritropoetina konec osemdesetih 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. (8).

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

Pri raku so eritropoetini indicirani 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 v monocitih, makrofagih, fibroblastih in endotelijskih celicah. G-CSF spodbuja proliferacijo matičnih 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 (9).

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 izdelkih, 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 bolnikih, ki prejemajo mielosupresivno kemoterapijo, in pa pri bolnikih z avtologno ali s singeno presaditvijo kostnega mozga, da se pospeši mieloidno okrevanje (10).

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 uporabljamo le nekatere, za zdravljenje rakavih obolenj predvsem interlevkin 2, interlevkin 11 in interferon alfa (11).

4.1 Interlevkin 2

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

4.2 Interlevkin 11

Interlevkin 11 (IL-11) izločajo predvsem stromalne celice kostnega mozga in je neposredno vpleten pri hematopoezi, predvsem pri razvoju megakariocitov. Zato ga uporabljamo pri kemoterapijah za preprečevanje trombocitopenije. Rekombinantni IL-11 oprelvekin posnema zreli del človeškega IL-11, razlikuje pa se v tem, da nima N-končnega prolina. Odstranitev slednjega ne vpliva na biološko aktivnost oprelvektina. Ker je izražen v *E. coli*, tudi za razliko od človeškega IL-11 tudi ni glikoziliran. Oprelvekin uporabljamo 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) (12). 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. V terapevtske namene uporabljamo 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. V protitumorskem zdravljenju IFN- α 2 uporabljamo za zdravljenje dlakastocelične levkemije, Kaposijevega sarkoma in kronične mieloične levkemije, dodatno tudi pri malignem melanomu, 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 k utišanju genov, k dodajanju funkcionalnih genov ali nadomestitvi okvarjenih genov, kar naj bi privedlo do vzpostavitve normalnega celičnega fenotipa (1). Lahko pa z genskim zdravljenjem spodbudimo 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). 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. Drugi proapoptotični geni, ki so jih preizkušali v genskem zdravljenju raka, so p53, p16/p27, FasL, kaspaze, Bax, Bak in apoptin. 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-CSF ali IL-24 v tumorskih celicah spodbudi protitumorski imunski odgovor. Taki geni so lahko tudi različni citokini, na primer IL-1, IL-12 ali IFN- α .

6 TUMORSKE VAKCINE

Tumorske vakcine predstavljajo obliko biološkega zdravljenja, s katerim skušamo sprožiti učinkovit sistemski imunski odziv proti tumorskim celicam (13). Pri tem ločimo klasične tumorske vakcine, ki vključujejo obsevane avtologne ali alogene tumorske celice, njihove lizate in nespecifične imunomodulatorje, in pa rekombinantne in gensko spremenjene tumorske vakcine. Rekombinantne vakcine vsebujejo antigene peptide, ki posnemajo tumorske antigene in ki se predstavijo z molekulami MHC I in MHC II. To so lahko fuzijski proteini teh peptidov z določenimi citokini ali pa antiidiotipska protitelesa, ki posnemajo antigenske determinante na tumorskih antigenih. Gensko spremenjene tumorske vakcine vključujejo vnos genov za različne citokine, imunogene peptide in kostimulatorne molekule ali pa aktivirane ali gensko spremenjene dendritične celice in hibridome dendritičnih in tumorskih celic.

Primer klasičnih tumorskih vakcin, ki ga uporabljamo v klinični praksi, je OncoVAX, ki vključuje tretiranje tumorskih celic z BSA in ga uporabljamo za zdravljenje raka črevesja. Rekombinantni tumorski vakcini sta Oncophage, ki vključuje očiščene komplekse proteina toplotnega stresa gp96 in tumorskih antigenov in ga uporabljamo za zdravljenje raka ledvic, melanoma in možganskih tumorjev, in pa Stimuvax, ki sproži imunski odziv na celice, ki izražajo mucin 1, uporabljamo pa ga za zdravljenje pljučnega raka in raka dojke. Provenage je prva tumorska vakcina na osnovi denritičnih celic, ki je registrirana za zdravljenje raka prostate.

Poleg tumorskih vakcin za zdravljenje raka so registrirane tudi vakcine, namenjene preventivi raka. Preprečujejo rakava obolenja, povzročena z virusi papiloma, hepatitisa A in hepatitisa B.

7 SKLEP

Biolška zdravila so v zadnjih petnajstih letih omogočila zdravljenje vrste malignih obolenj, za katere prej ni bilo učinkovitega zdravljenja. Njihova glavna značilnost je ciljano delovanje, kar zelo zmanjša interakcije z drugimi molekulami in s tem vrsto neželenih učinkov. Tem pa se le ne moremo popolnoma izogniti. Vzroki za to so različni, povezani so z velikostjo molekul in njihovo biološko uporabnostjo, imunogenostjo, heterogeno porazdelitvijo tarčnih molekul med tumorskimi in netumorskimi celicami, pojavom rezistence itd. Kljub temu je razvoj novih bioloških zdravil za zdravljenje raka zelo izrazit, pri tem prevladujejo nova monoklonska protitelesa, usmerjena proti novim tarčam, ki so pomembne za razvoj in napredovanje tumorjev. Veliko novih monoklonskih protiteles je humanega izvora, kar bo povečalo varnost njihove uporabe. Pomemben je tudi napredek pri imunskem zdravljenju raka, še posebej na področju tumorskih vakcin.

8 LITERATURA

1. Štrukelj B, Kos J, Biolška zdravila: Od gena do učinkovine. Slovensko farmacevtsko društvo, 2007.
2. Glennie MJ, Van den Winkel JGJ. Renaissance of cancer therapeutic antibodies. Drug Discov Today 2003; 8: 503–510.

3. Koehler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 495–497.
4. Burton DR. Antibodies, viruses and vaccines. *Nature Rev Immunol* 2002, 2: 706–771.
5. Bai JPF. Monoclonal antibodies: from benchtop to bedside. *Therapeutic delivery* 2011; 2 (3): 329–331.
6. Vacchelli E, Eggermont A, Galon J, Sautès-Fridman C, Zitvogel L, Kroemer G, Galluzzi L. Monoclonal antibodies in cancer therapy. *OncoImmunology* 2013; 2: e22789.
7. Vacchelli E, Aranda F, Eggermont A, Galon J, Sautès-Fridman C, Zitvogel L, Kroemer G, Galluzzi L. Tumor-targeting monoclonal antibodies in cancer therapy. *OncoImmunology* 2014; 3: e27048.
8. Marsden JT. Erythropoietin-measurement and clinical applications. *Ann Clin Biochem* 2006; 43: 97–104.
9. Touw IP, Bontenbal M. Granulocyte colony-stimulating factor: key (f)actor or innocent bystander in the development of secondary myeloid malignancy. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 184–186.
10. Liu CH, Roberts AI, Das J, Xu G, Ren G, Zhang Y, Zhang L, Yuan ZR, Tan HS, Das G, Devadas S. Granulocyte macrophage colony stimulating factor and T cell responses: what we do and do not know. *Cell Res* 2006; 16: 126–133.
11. Taniguchi T, Minami Y. The IL-2/IL2 receptor system: a current overview. *Cell* 1993; 73: 5–8.
12. Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 2004; 202: 8–32.
13. Herman A, Jeras M. Zdravljenje raka z imunskimi celicami. *Farm Vestnik* 2011; 62: 123–130.

Biološka zdravila in celični terapevtski pripravki za modulacijo vnetnih procesov

Izr. prof. dr. Matjaž Jeras, mag. farm.
Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani

Povzetek

V preglednem prispevku predstavljamo vrste in mehanizme delovanja v klinični praksi najpogosteje uporabljenih bioloških zdravil s protivnetnim učinkom. Dodali smo tudi pregled načinov delovanja in potencialne uporabe različnih vrst celičnih terapevtskih pripravkov za negativno modulacijo vnetnih imunskih reakcij, ki bodo v prihodnosti nedvomno predstavljali pomemben način vzročnega zdravljenja avtoimunskih in drugih vnetnih bolezni ter preprečevanja neželenih zapletov po presaditvah alogenskih tkiv in organov.

Vsebina

1 UVOD

- 1.1 Akutno vnetje kot normalna obrambna reakcija organizma
- 1.2 Patološki kronični vnetni procesi
- 1.3 Citokini in vnetje
- 1.4 Biološka zdravila in celični pripravki s protivnetnim delovanjem

2 BIOLOŠKA ZDRAVILA Z ZAVIRALNIM UČINKOM NA VNETNE PROCESE

- 2.1 Preprečevanje delovanja TNF- α
- 2.2 Preprečevanje delovanja IL-1
- 2.3 Preprečevanje delovanja IL-6
- 2.4 Preprečevanje delovanja IL-12 in IL-23
- 2.5 Preprečitev aktivacije limfocitov T z blokado kostimulatorne signalizacije
- 2.6 Blokada celičnih adhezijskih molekul α 4-integrinov
- 2.7 Blokada molekule CD20 na limfocitih B

3 CELIČNI PRIPRAVKI ZA NEGATIVNO MODULACIJO VNETNIH IMUNSKIH ODZIVOV

- 3.1 Tolerogene dendritične celice (tDC)
- 3.2 Naravni (nTreg) in inducirani (iTreg) regulacijski limfociti T
- 3.3 Mezenhimske matične celice (MSC)

4 SKLEP

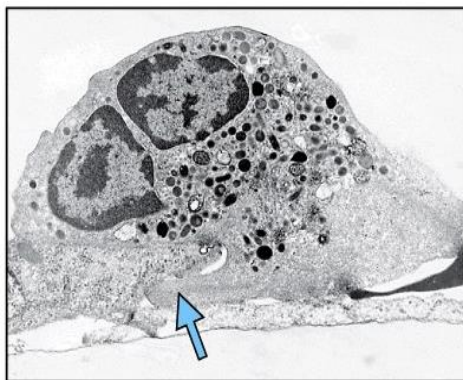
5 LITERATURA

1 UVOD

1.1 Akutno vnetje kot normalna obrambna reakcija organizma

Osnovna naloga imunskega sistema je prepoznavanje in toleriranje lastnega ter zaznavanje in odstranjevanje tujega/nevarnega. Najprej se v odzivu na nevarnost (na primer okužbo, poškodbo) aktivira prirojena ali naravna imunost, in sicer z akutnim vnetjem. Na mestu porajajočega se vnetnega procesa so prvi nevtrofilci, tem pa sledijo monociti, ki v vnetišču dozore v makrofage. Antigensko specifični efektorski limfociti se v proces odstranjevanja organizmu tujih patogenov vključijo šele kasneje, potem ko jih aktivirajo antigene predstavljajoče celice (APC), med katerimi so še posebej učinkovite dendritične celice (DC). Te morajo najprej privzeti antigene, prisotne v vnetem tkivu, in jih predelati v peptide, ki se nato vežejo na molekule poglobitnega kompleksa tkivne skladnosti (MHC, *major histocompatibility complex*) razredov I in II, izražene na njihovih površinah. Med procesi privzema antigenov, njihove predelave in vezave na molekule MHC v obliki peptidov DC dozore in pridobe sposobnost pomika iz vnetišča v najbližje bezgavke, kjer zelo učinkovito aktivirajo ustrezne klone limfocitov T CD4⁺ in CD8⁺. Aktivirane celice T nato po krvi potujejo do mesta, kjer poteka vnetje in vanj vstopajo iz lokalnih žil. Pri tem antigensko specifični kloni celic T pomagalk (limfociti T CD4⁺) nudijo pomoč aktiviranim limfocitom B za njihovo pretvorbo v plazmatke, ki proizvajajo protitelesa, aktivirajo lokalne makrofage ter pospešujejo dozorevanje citotoksičnih limfocitov T CD8⁺ (1).

Vnetne procese sprožijo različni citokini in kemokini, ki jih proizvajajo nevtrofilci in makrofagi, poleg tega pa tudi lokalno aktivirani sistem komplementa. Omenjeni topni vnetni dejavniki vplivajo na lokalno žilje in povzročajo vazodilatacijo, povečan pretok krvi, povečano permeabilnost žil in posledično izstopanje tekočine v tkivo → *calor* (toplota), *rubor* (rdečica), *tumor* (otekanje). Citokini in posamezne komponente komplementa spremenijo tudi adhezijske lastnosti žilnega endotelija, zato se lahko levkociti pritrdijo na žilno steno in z diapedezo med endotelnimi celicami vstopajo v vnetišče, kamor jih privlačijo kemokini → *dolor* (bolečina). V normalnih razmerah, v odsotnosti vnetja, nenehno potekajo šibke interakcije med vezavnimi mesti za ogljikove hidrate selektinov, izraženih na žilnem endoteliju, in njihovimi sladkornimi ligandi (sialil-Lewis^x), ki so prisotni na površinah nevtrofilcev (1). To omogoča počasnejše pomikanje oziroma kotaljenje nevtrofilcev skozi žile, ne pa tudi njihovega sidranja. Do močnejše vezave omenjenih celic na endotelij pride šele potem, ko se lokalno pojavi kemokin CXCL8 oziroma interleven 8 (IL-8), ki ga na začetku vnetnega procesa proizvajajo tkivni makrofagi, pa tudi žilne endotelijske celice. Z vezavo na specifične receptorje, izražene na nevtrofilcih, CXCL8 sproži aktivacijo adhezijskih integrinskih molekul (LFA-1, *lymphocyte function-associated antigen 1*, in CR3 ali Mac-1). Da se na površini žilnega endotelija izrazijo molekule ICAM-1 in ICAM-2 (*inter-cellular adhesion molecule*), ki so njihovi ligandi, pa je potreben citokin TNF- α (dejavnik tumorske nekroze alfa) (1). Močne povezave med ICAM-1 in LFA-1 omogočajo sidranje in nato migracijo (diapedezo) nevtrofilcev preko endotelija (slika 1), kamor jih privlačijo kemokini. Prehod nevtrofilcev, monocitov in drugih imunskih celic skozi bazalno membrano pa olajšujejo tudi aktivirane tkivne metaloproteinaze (1).



Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Slika 1: Neutrofilec med diapedezo. Puščica označuje pseudopod (izrastek), ki ga vriva med žilni endotelijski celici; povečava: x 5500 (1).

Nevtrofilci in aktivirani makrofagi fagocitirajo tujke in odpadne produkte, v vnetišču pa proizvajajo tudi prostaglandine in številne citokine, ki močno spodbujajo vnetje, zlasti IL-1, IL-6 in TNF- α , ter reaktivne kisikove spojine (superoksidne in hidroksilne radikale, hipokloritne anione ter dušikov oksid), ki povzročajo poškodbe patogenov in z njimi okuženih celic, žal pa tudi zdravega tkiva (1, 2). Po dokončni odstranitvi vzroka vnetja, kar je naloga zelo učinkovitih mehanizmov pridobljene imunosti, ki jih izvajajo aktivirani kloni limfocitov T in B, se vnetni procesi ustavijo. Nato sledi regeneracija poškodovanega tkiva.

1.2 Patološki kronični vnetni procesi

Akutno vnetje je torej povsem naraven mehanizem obrambe našega organizma. Kadar pa so njegovi povzročitelji prisotni daljši čas, govorimo o kroničnem vnetju. Vzrok zanj so lahko virusi, bakterije, antigeni iz okolja (na primer različni alergeni), avtoantigeni (avtoimunske bolezni) ali vztrajajoča aktivacija provnetnih molekul. Kronično vnetje vzdržujejo predvsem dolgoživi tkivni makrofagi in monociti, ki vstopajo iz krvnih žil v vnetišče, kjer dozore v makrofage. Posledice perzistentnega vnetja so precej obsežne tkivne poškodbe, ki jih organizem sicer skuša popravljati, a je pri tem neuspešen. Za takšno stanje je značilna tudi angiogeneza oziroma nastajanje novih žil, in sicer zaradi prisotnosti topnega dejavnika VEGF (*vascular endothelial growth factor*), ki spodbuja rast žilnega endotelija (3).

Kronično vnetje torej izčrpava imunski sistem in povzroča poškodbe tkiv ter je značilno za vrsto različnih bolezenskih stanj, pogosto z avtoimunsko etiologijo, kot so astma, revmatoidni artritis, Chronova bolezen, celiakija, vnetna bolezen črevesja, revmatična polimialgija, gingivitis, gastritis itd. Kronično vnetje pa je tudi sestavni del patologije različnih kroničnih bolezni, na primer ateroskleroze, debelosti in sladkorne bolezni (metaboličnih bolezni), določenih oblik raka, Parkinsonove in morda Alzheimerjeve bolezni, kolitisa, nefritisa, hepatitisa, dermatitisa itd. (2).

1.3 Citokini in vnetje

Citokini so majhni biološko aktivni polipeptidi. Proizvajajo jih tako celice prirojene kot pridobljene imunosti. So prenašalci informacij med celicami, pospešujejo njihovo aktivacijo, diferenciacijo in proliferacijo, pomembno vplivajo na njihove funkcijske lastnosti in določajo tip lokalnega imunskega odziva (provneten vrste Th1, protivneten vrste Th2, celični ali protitelesni).

V akutnem vnetnem odzivu so pomembni predvsem IL-1, TNF- α , IL-6, IL-11, IL-8 (kemokin, ki privlači nevtrofilce, bazofilce in limfocite T), poleg njih pa tudi številni kemokini (kemotaktični dejavniki za različne imunske celice) ter rastna dejavnika, granulocitne kolonije stimulirajoči G-CSF ter granulocitne in makrofagne kolonije stimulirajoči GM-CSF. Pri kroničnem vnetju lahko citokine razdelimo na tiste, ki igrajo pomembne vloge v protitelesnem oziroma humoralnem imunskem odzivu, in tiste, ki spodbujajo celične imunske odzive. Med prve sodijo interleukini IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-13 ter transformirajoči rastni dejavnik β (TGF- β). V drugo skupino pa uvrščamo interleukine IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12, IL-18, IL-23, TGF- β , interferone (IFN), dejavnik, ki inducira IFN- γ (IGIF), ter dejavnika tumorske nekroze TNF- α in TNF- β .

Med naštetimi citokini so tako izrazito provnetni, na primer IL-1, TNF- α , IL-2, IFN- γ in IL-12, kot tudi izrazito protivnetni, na primer IL-4, IL-10, IL-13 in TGF- β . Očitno gre torej za natančno uravnavano razmerje med temi nasprotno učinkujočimi topnimi dejavniki, ki odloča o tem, ali bo vnetje kratko- ali pa dolgotrajno. Še več, z različnimi raziskavami so dokazali, da je nagnjenost v prid ene ali druge skrajnosti genetsko pogojena (4).

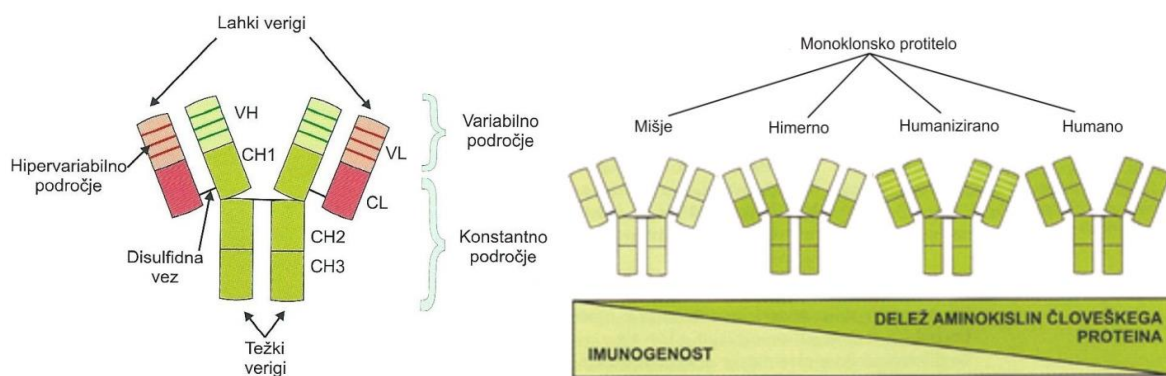
Citokina IL-1 (α in β) in TNF- α nastajata v vnetišču in sinergistično spodbujata vnetne procese. Prvi, bodisi sam ali pa v kombinaciji z drugim, stimulira tudi nastajanje prostaglandina PGE₂, s čimer znižuje prag bolečine (4).

Učinki citokinov so pogosto pleiotropni, kar pomeni, da imajo posamezni med njimi različne, lahko celo nasprotujoče si učinke. Zanje je značilno tudi to, da lahko različni citokini funkcijsko učinkujejo povsem enako. Pogosto delujejo tako, da sprožijo točno določeno zaporedje nastajanja in izločanja ostalih citokinov, pri čemer lahko nato učinkujejo antagonistično, aditivno ali sinergistično. Učinki citokinov so lahko bodisi lokalni, in sicer avtokrini ali parakrini, glede na celice, ki jih proizvajajo, ali pa sistemski (endokrini, toksični), ki so posledica njihove preobsežne proizvodnje.

Citokini učinkujejo šele po tem, ko se z visoko afiniteto ($K_d \approx 10^{-11}$ – 10^{-12}) vežejo na specifične receptorje, izražene na površinah tarčnih celic. Zaradi njihovih izjemno pomembnih funkcijskih lastnosti in vpletenosti v patološke mehanizme številnih bolezni so tako sami kot tudi njihovi receptorji pomembne terapevtske tarče.

1.4 Biološka zdravila in celični pripravki s protivnetnim delovanjem

Biološka zdravila, ki delujejo protivnetno, so monoklonska protitelesa ali fuzijski proteini (slika 2), pripravljene s postopki genskega inženirstva. Delujejo tako, da neposredno ali posredno preprečujejo učinke različnih vnetnih dejavnikov (5). Uporabo prvega tovrstnega zdravila, infliksimaba, ki prepoznava in blokira TNF- α , je FDA odobrila leta 1998. Ostale pomembne tarče protivnetnih bioloških zdravil pa so poleg TNF- α še: njegov receptor; IL-1 in njegov receptor; interleukina IL12/IL23; s citotoksičnimi limfociti T povezan antigen CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*); receptor za IL-6; receptor CD20, izražen na limfocitih B; ter podenota $\alpha 4$ adhezijskih molekul, integrinov $\alpha 4\beta 1$ in $\alpha 4\beta 7$.



Slika 2: *Levo – Zgradba človeškega protitelesa vrste IgG; hipervariabilna področja, kamor se veže antigen, označujemo tudi s kratico CDR (complementarity-determining regions) (5). Desno– Shematski prikaz strukture in imunogenosti različnih terapevtsko uporabnih monoklonskih protiteles (5).*

Ko so dodobra proučili načine priprave ter raziskali lastnosti in mehanizme delovanja tolerogenih dendritičnih celic (APC) kot tudi imunosupresivno delujočih naravnih (Treg) in induciranih (Tr1, Th3) regulatornih limfocitov T, so se odprle možnosti njihove uporabe za ciljano, antigensko specifično protivnetno delovanje. To je še posebej dobrodošlo pri zdravljenju avtoimunskih bolezni in preprečevanju zavrnitvenih reakcij ter akutne bolezni presadka zoper gostitelja (aGvHD - *acute graft-versus-host disease*), po presaditvah alogenskih organov in krvotvornih matičnih celic.

V zadnjem času pa postaja vse bolj perspektivna tudi uporaba mezenhimskih matičnih celic (MMC), izoliranih iz različnih tkiv odraslega človeka in iz popkovnične krvi oziroma same popkovnice (Whartonova žolica). Tovrstne celice imajo poleg razmeroma velike plastičnosti (zmožnosti diferenciranja v različne celice, predvsem vezivnih tkiv in mišic) in posledičnih regenerativnih sposobnosti tudi izrazito protivnetno delovanje.

2 BIOLOŠKA ZDRAVILA Z ZAVIRALNIM UČINKOM NA VNETNE PROCESE

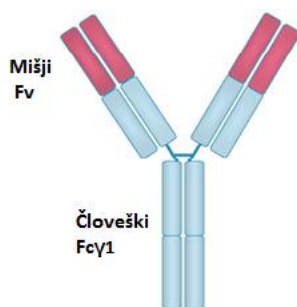
2.1 Preprečevanje delovanja TNF- α

Dejavnik tumorske nekroze TNF- α sodi v veliko naddružino TNF, v katero glede na njihovo sekvenčno homologijo s TNF- α uvrščamo še 18 drugih molekul. Vse so vpletene v vnetne procese (6). Glavni celični viri TNF- α so aktivirani mononuklearni fagociti, predvsem makrofagi, pa tudi dendritične celice. Proizvajajo ga z antigeni stimulirani limfociti T, naravne celice ubijalke NK (*natural killer cells*) in mastociti. TNF- α se veže na specifična receptorja TNF-R1 in TNF-R2 in s tem preko znotrajcelične signalne kaskade aktivira bodisi kaspaze (z vezavo na TNF-R1) ali jedrni transkripcijski dejavnik NF- κ B (z vezavo na TNF-R2) (6). Aktivacija kaspaz (endoproteaze) povzroči programirano celično smrt ali apoptozo, aktivacija NF- κ B pa njegov pomik v celično jedro in s tem sproženje različnih genov, ki so pomembni za nastanek in vzdrževanje vnetja.

Poglavitni lokalni učinek TNF- α je aktivacija žilnih endotelijskih celic, ki posledično začnejo proizvajati kemokine in pospešeno izražati adhezijske molekule, poveča pa se tudi vaskularna permeabilnost. Zaradi tega v tkivo vstopajo protitelesa, sestavine komplemента in imunske celice, iz tkiva pa se v povečanem obsegu drenira tekočina v bezgavke. Pod vplivom TNF- α začnejo aktivirani makrofagi proizvajati sinergistično delujoči IL-1 in skupaj z nevtrofilci pridobijo povečano mikrobicidno aktivnost.

2.1.1 Infliksimab (Remicade)

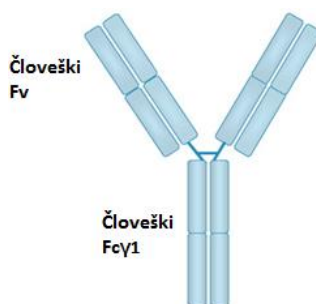
Infliksimab (slika 3) je mišje-človeško himerno monoklonsko protitelo, ki se z visoko afiniteto veže tako na topni (monomer 17 kDa in trimer 51 kDa) kot na membransko vezani TNF- α . Sestavljeno je iz približno 25 % mišjih in približno 75 % človeških aminokislinskih zaporedij (IgG1). Uporabljamo ga za zdravljenje revmatoidnega (RA) in psoriatičnega artritisa (PA), ankilozirajočega spondilitisa (AS), luskavice, amiotrofne lateralne skleroze (ALS), ulcerativnega kolitisa in Chronove bolezni (6, 8).



Slika 3: Struktura infliksimaba. Variabilni del teške (V_H) in lahke (V_L) verige, ki tvori paratop oziroma vezavno mesto za TNF- α , je mišji (Fv), konstantni deli obeh verig monoklonskega protitelesa (C_H1 in $Fc\gamma1$) pa so človeški (7).

2.1.2 Adalimumab (Humira) in golimumab (Simponi)

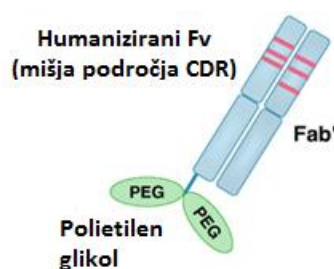
Adalimumab in golimumab (slika 4) sta človeški monoklonski protitelesi vrste IgG1, ki se vežeta na topne in membransko vezane oblike TNF- α . Tako kot infliksimab fiksirata komplement in se vežeta na ustrezne receptorje Fc za konstantne dele (Fab) protiteles, izražene na fagocitnih celicah in na celicah NK (7). Adalimumab uporabljamo za zdravljenje RA, PA, luskavice, ALS, juvenilnega RA in Chronove bolezni, golimumab pa za zdravljenje RA, PA in AS (6, 8).



Slika 4: Struktura adalimumaba in golimumaba, človeških monoklonskih protiteles vrste IgG1, proti TNF- α (7)

2.1.3 Certolizumab pegol (Cimzia)

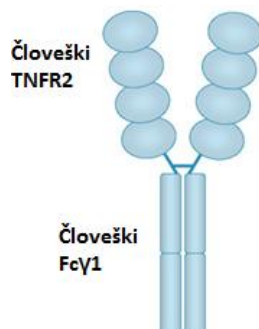
Certolizumab (slika 5) je humaniziran protein, ki vsebuje aminokislinska zaporedja variabilnih področij CDR (*complementarity-determining regions*) mišjega monoklonskega protitelesa proti TNF- α , vstavljena v variabilne dele težke (V_H) in lahke (V_L) verige človeške molekule IgG1, pri čemer je fragment Fab' kovalentno povezan z dvema navzkrižno povezanima verigama (po 20 kDa) polietilenglikola, kar poveča njegovo topnost in razpolovni čas *in vivo* (7). Nima efektorske funkcije, saj ne vsebuje strukturnega področja Fc. Certolizumab se približno trikrat slabše veže na membransko obliko TNF- α kot infliksimab in adalimumab, kar pa ni posledica njegove manjše afinitete, pač pa najverjetneje stehiometričnih razlik (7). S certolizumab pegolom zdravimo RA, PA in Chronovo bolezen (6, 8).



Slika 5: Struktura certolizumab pegola, pegiliranega fragmenta Fab' humaniziranega monoklonskega protitelesa vrste IgG1, antagonista TNF- α (7)

2.1.4 Etanercept (Enbrel)

Etanercept (slika 6) je fuzijski protein, izdelan s postopski genskega inženirstva. Je dimer, zgrajen iz dveh zunajceličnih delov receptorja TNFR2 (p75), spojenih s strukturnim elementom Fc človeške molekule IgG1 (7). Ima bistveno krajši razpolovni čas *in vivo* kot sama molekula IgG1 in monoklonski protitelesi infliksimab in adalimumab, kar pomeni, da je dostopnost njegove strukturne enote Fc za vezavo na receptor Fc γ R, izražen na endotelijskih celicah, drugačna kot v primeru omenjenih protiteles (7). Poleg tega bivalentni protitelesi infliksimab in adalimumab lahko vežeta po dve topni trimerni obliki TNF- α , etanercept pa le eno. Vemo tudi, da se infliksimab lahko veže na do tri molekule membransko izraženega TNF- α , etanercept pa običajno na eno (7). Etanercept uporabljamo za zdravljenje RA, PA, juvenilnega RA, ALS in luskavice (6, 8).



Slika 6: Etanercept je fuzijski protein, sestavljen iz dveh zunajceličnih delov receptorja TNFR2 (p75) za TNF- α ter strukturnega in efektorskega področja Fc človeške molekule IgG (7).

2.2 Preprečevanje delovanja IL-1

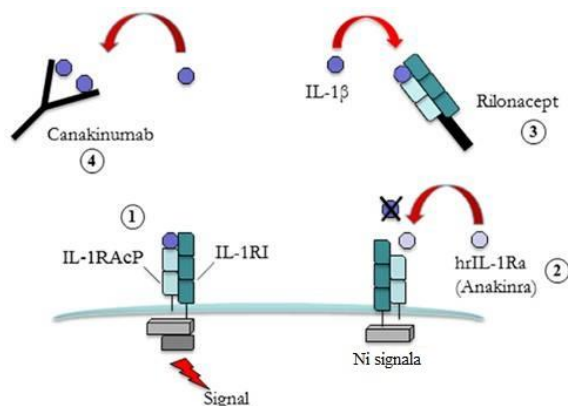
Interlevkin 1 (IL-1) proizvajajo predvsem makrofagi in keratinociti. Pri nizkih koncentracijah spodbuja lokalne vnetne procese, saj, kot smo že omenili, deluje sinergistično s TNF- α . Aktivira endotelij krvnih žil, pri čemer poveča izražanje adhezijskih molekul na endotelijskih celicah in na ta način pospeši dostop efektorskih celic v vneto tkivo. Poleg tega aktivira limfocite in povzroča tkivne poškodbe (4). V visokih koncentracijah deluje sistemsko (endokrino), in sicer izzove vročino (povečana proizvodnja PGE₂), poveča obseg proizvodnje IL-6 in proteinov akutne faze vnetja (na primer CRP) ter povzroča kaheksijo, to je izgubo telesne mase zaradi kroničnega delovanja vnetnih dejavnikov. IL-1 v različnih vrstah celic spodbudi tudi tvorbo levkotrienov (4).

2.2.1 Anakinra (Kineret)

Anakinra je z rekombinantno tehnologijo, v ekspresijskem sistemu *E. coli*, izdelan neglikoziliran antagonist človeškega receptorja za IL-1 (IL-1Ra). Od naravnega receptorja tipa 1 (IL-1R1) se razlikuje v dodatnem metioninskem ostanku na N-končnem delu molekule, tako da vsebuje 153 aminokislinskih ostankov. Anakinra se kompetitivno veže na naravni IL-1R1 in zavira delovanje zvišanih koncentracij IL-1, s čimer na primer preprečuje poškodbe hrustanca in povečano resorpcijo kostnine (slika 7) (9). Anakinro ponekod uporabljajo za blaženje znakov in simptomov RA, in sicer bodisi samo ali pa v kombinaciji z metotreksatom. Ne smemo je aplicirati skupaj z biološkimi zdravili, ki zavirajo delovanje TNF- α .

2.2.2 IL-1 Trap (Rilonacept)

Rilonacept ali IL-1 Trap je inhibitor IL-1, narejen v obliki dimernega fuzijskega proteina iz zunajceličnih delov človeškega receptorja IL-1R1 in pomožnega adapterskega receptorskega proteina IL1RacP (omogoča prenos signala v celično jedro), povezanih s fragmentom Fc čoveškega protitelesa vrste IgG1 (slika 7). V Združenih državah Amerike ima status zdravila sirote za zdravljenje s kriopirinom povezanih občasnih avtoinflamatornih sindromov (CAPS, *cryopyrin-associated periodic syndromes*) (9). Gre za skupino redkih podedovanih vnetnih bolezni. Kriopirin je regulator akutne imunske reakcije.



Slika 7: Različni načini blokade delovanja IL-1: 2 – Specifični antagonist receptorja za IL-1 tipa 1 (IL-1R1), Anakinra, tekmuje s prostim IL- β za vezavo nanj; 3 – Rilonacept, ki je fuzijski protein, sestavljen iz zunajceličnih domen IL-1R1 in adapterskega proteina IL-1RACp, vezanih na fragment Fc čoveškega IgG1, veže krožeči IL- β ; 4 – Prosti IL- β specifično veže tudi človeško monoklonsko protiteleso canakinumab (10).

2.2.3 Canakinumab (Ilaris)

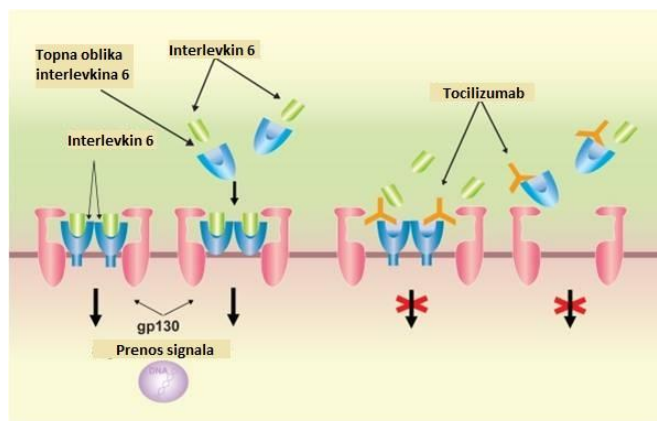
Canakinumab je človeško monoklonsko protitelo, specifično izključno za IL- β , ki ima v Združenih državah Amerike tako kot Rilonacept status zdravila sirote za terapijo CAPS (slika 7). V ta namen se lahko uporablja tudi v Evropski uniji, saj je njegovo uporabo konec leta 2009 dovolila tudi Evropska agencija za zdravila (EMA) (9). Delovanje Rilonacepta in Canakinumaba preizkušajo tudi na bolnikih z RA in sistemskim juvenilnim idiopatskim artritisom.

2.3 Preprečevanje delovanja IL-6

Interlevkin 6 (IL-6), ki je izrazito pleiotropen citokin, proizvajajo predvsem makrofagi in dendritične celice, v sklepih bolnikov z RA pa tudi sinoviociti. Deluje na limfocite, pri čemer spodbuja njihove imunske odzive in tvorbo protiteles. V jetrih inducira nastajanje in izločanje proteinov akutne faze (C-reaktivnega proteina in serumskega amiloida A). Vpliva na metabolizem kostnine in hematopoezo. Skupaj s TNF- α in z IL-1 pa pospešuje tudi angiogenezo, ki je posledica povečanega nastajanja VEGF (11). IL-6, TGF- β in IL-23 inducirajo nastanek limfocitov Th17, ki proizvajajo IL-17 in so pomembni mediatorji vnetja, prisotni pri različnih boleznih. Specifični transmembranski receptor za IL-6 (IL-6R) po vezavi IL-6 sam ne more sprožiti signala proti celičnemu jedru, zato tvori kompleks z adaptorsko molekulo gp130, prav tako izraženo na celični membrani, pri čemer nastane vzdražljiv homodimer (slika 8). Še več, IL-6R obstaja tudi v topni obliki in se po vezavi IL-6 nanj prav tako lahko poveže z membranskimi molekulami gp130 ter sproži signalizacijo (11).

2.3.1 Tocilizumab (Actemra)

Tocilizumab (slika 8) je rekombinantno humanizirano monoklonsko protitelo, ki vsebuje področja CDR mišjega protitelesa proti človeškemu IL-6R, vgrajena v molekulo humanega IgG1. Delovanje IL-6 inhibira tako, da prepreči njegovo vezavo tako na membransko izražene kot na topne receptorje IL-6 (11). Poleg tega lahko povzroči tudi disociacijo že nastalih kompleksov IL-6/IL-6 R. Tocilizumab tudi zelo učinkovito znižuje ravni serumskega amiloida A (SAA), zato bi lahko bil zelo primerno zdravilo za zdravljenje amiloidoze amiloida A, ki se pojavi kot sekundarna težava pri revmatskih obolenjih (11).



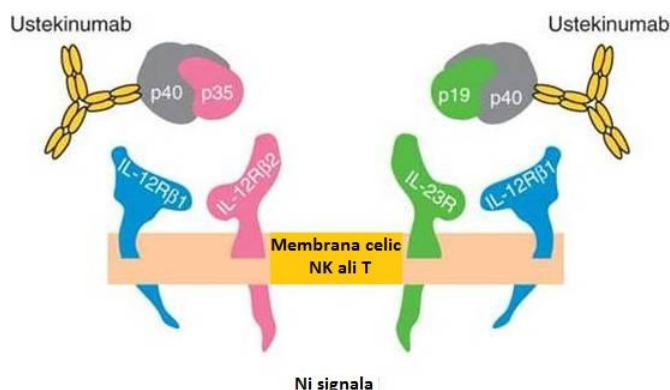
Slika 8: Shematska predstavitev vezave IL-6 bodisi na transmembranske ali topne receptorje IL-6R in nastanek kompleksa z vzdražljivo adaptorsko molekulo gp130, ki omogoča prenos aktivacijskega signala v celično jedro. Prikazani so tudi mehanizmi blokade nastanka signala s tocilizumabom (11).

2.4 Preprečevanje delovanja IL-12 in IL-23

Interlevkin 12 (IL-12) proizvajajo aktivirani mononuklearni fagociti (makrofagi) in dendritične celice (DC). Je pomemben posrednik v zgodnjih procesih prirojene imunosti in eden od poglavitnih dejavnikov za vzpostavitev pridobljene, celično posredovane imunosti. Stimulira proizvodnjo IFN- γ v aktiviranih limfocitih T in celicah NK. Usmerja in spodbuja diferenciacijo celic T pomagalk CD4⁺ v provnetni tip Th1, ki nato aktivirajo fagocite (makrofage). Ojača tudi citotoksično delovanje CD8⁺ limfocitov T in celic NK. Medtem ko IL-12 inducira nastanek limfocitov vrste Th1, pa IL-23, skupaj z IL-1 β , v prisotnosti TGF- β spodbuja nastajanje in vzdrževanje limfocitov tipa Th17 (12, 13).

2.4.1 Ustekinumab (Stelara)

Ustekinumab je človeško monoklonsko protitelo, ki so ga izdelali za specifično vezavo na podenoto p40 (β 2) L-12 (12). Gre za heterodimer, sestavljen iz omenjene podenote in podenote p35 (slika 9). Šele po izdelavi ustekinumaba so odkrili IL-23 ter ugotovili, da se veže tudi nanj, in sicer zato, ker ta poleg zanj specifične podenote p19 vsebuje tudi podenoto p40 (β 2) (13). Ustekinumab uporabljamo za zdravljenje težkih oblik luskavice (plaki), učinkovit pa je tudi pri PA in Chronovi bolezni (13).



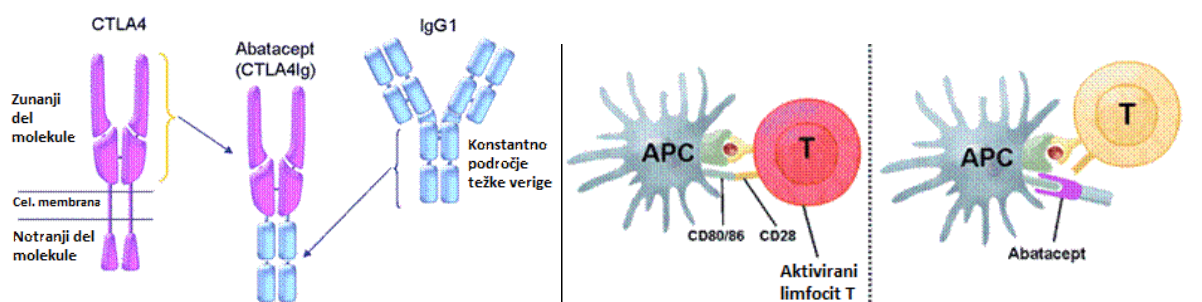
Slika 9: Vezava ustekinumaba na podenote p40 citokinov IL-12 in IL-23 prepreči njuno vezavo na specifične receptorje, izražene na površinah limfocitov T in celic NK, s čimer blokira njihovo aktivacijo in posledično proizvodnjo citokinov (13).

2.5 Blokada aktivacije limfocitov T s preprečitvijo kostimulatorne signalizacije

Za učinkovito antigensko aktivacijo limfocitov T je poleg interakcije med specifičnim antigenim receptorjem TCR, izraženim na limfocitih T, in kompleksom molekul MHC/antigeni peptid na površini antigene predstavljajočih celic (APC), ključen tudi drugi, t. i. kostimulatorni signal. Zagotavlja ga interakcija med molekulami CD80 (B.71) in CD86 (B7.2), izraženimi na aktiviranih APC (predvsem DC), in molekulami CD28, prisotnimi na površini limfocitov T (14, 15). Ko aktivacija limfocitov T ni več potrebna, ti začnejo na svojih površinah izražati molekule CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*), ki imajo bistveno večjo avidnost kot molekule CD28 za vezavo na CD80/CD86, pri čemer pa tovrstne interakcije generirajo negativne aktivacijske signale (14, 15).

2.5.1 Abatacept (Orencia)

Abatacept (slika 10) je fuzijski protein, sestavljen iz strukturne enote Fc, to je konstantnega predela težke verige človeške molekule IgG1 in nanjo pripetega zunajceličnega dela molekule CTLA-4. Z večjo avidnostjo se veže na molekulo CD80 (B7-1) kot na CD86 (B7-2). S preprečevanjem vezave CD28 na CD80 in CD86 onemogoča aktivacijo limfocitov T. Ugotovili so tudi, da lahko vezava abatacepta na molekule CD80/CD86 v APC inducira indolaminsko 2,3-dioksigenazo, encim, ki razgrajuje triptofan (14). To pa še dodatno zavre aktivacijo limfocitov T, ki so izjemno občutljivi na nivoje omenjene aminokisliline. Abatacept uporabljamo za zdravljenje RA pri tistih bolnikih, ki se ne odzivajo na terapijo anti-TNF- α . Običajno ga apliciramo skupaj z metotreksatom, da bi preprečili morebiten nastanek imunskih reakcij na ta nenaravni fuzijski protein (15).



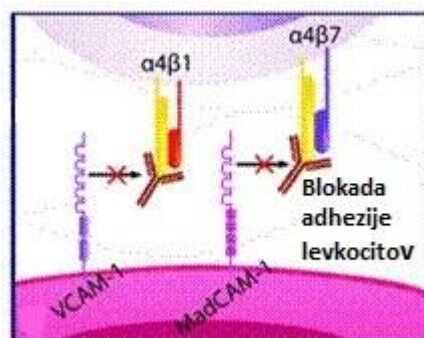
Slika 10: Shematski prikaz sestavnih delov in strukture abatacepta (levo) ter princip njegovega delovanja (15)

2.6 Blokada celičnih adhezijskih molekul α 4-integrinov

Alfa4-integrin je podenota levkocitnih adhezijskih molekul α 4 β 1 (VLA-4, *very late antigen 4*) in α 4 β 7. Prva reagira z molekulo VCAM-1 (*vascular endothelial adhesion molecule 1*), ligand druge pa je MAdCAM-1 (*mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1*). Obe molekuli sta izraženi na žilnem endoteliju in omogočata trdno sidranje levkocitov, kar je nujen predpogoj za njihov vstop iz krvi v vneto tkivo (16).

2.6.1 Natalizumab (Tysabri)

Natalizumab (slika 11) je humanizirano monoklonsko protitelo tipa IgG4 κ . Je selektivni inhibitor α 4-integrinskih komponent adhezijskih molekul α 4 β 1 in α 4 β 7, izraženih na levkocitih. S specifično vezavo nanje preprečuje interakcije z njihovimi ligandi VCAM-1 (α 4 β 1) in MAdCAM-1 (α 4 β 7), kar onemogoči migracijo levkocitov (tudi avtoreaktivnih) iz krvnih žil v tarčne organe oziroma tkiva, s tem pa zavira lokalne vnetne procese.



Slika 11: Shematski prikaz protivnetnega delovanja natalizumaba po vezavi na $\alpha 4$ -integrinske podenote adhezijskih molekul: $\alpha 4\beta 1$ in $\alpha 4\beta 7$ sta integrinski molekuli, izraženi na levkocitih, VCAM-1 in MAdCAM-1 pa njuna liganda, ki se nahajata na površinah endotelijskih celic (16).

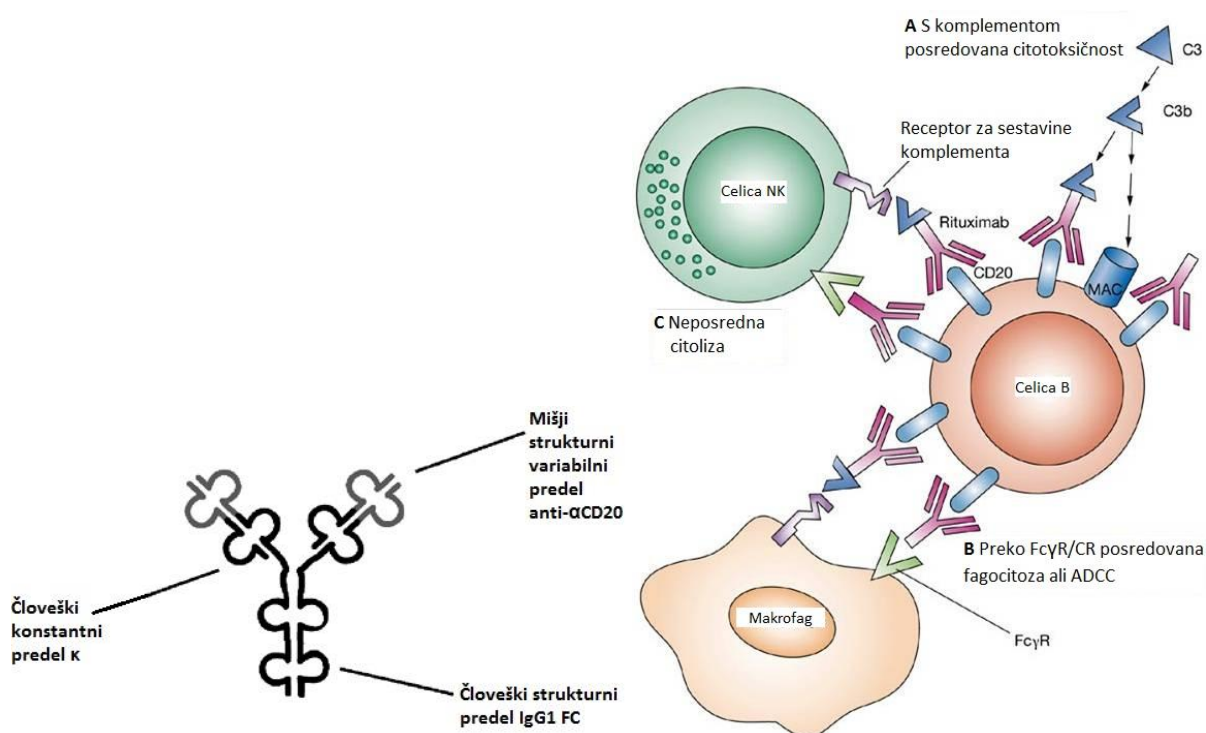
Natalizumab uporabljamo za zdravljenje multiple skleroze (MS) in hudih oblik Chronove bolezni. Preprečuje namreč prehod levkocitov preko hematoencefalne bariere in s tem zbiranje imunskih vnetnih celic v centralnem živčnem sistemu. Ker so molekule VCAM-1 izražene na površinah vnetih žilnih endotelijskih celic v možganih, je torej pri njegovi uporabi za terapijo MS poglavitna tarča molekula $\alpha 4\beta 1$. Poleg tega obstajajo tudi druga biološka zdravila za zdravljenje MS, in sicer rekombinantni človeški interferon β (IFN- β ; Rebif, Avonex, Betaseron) in glatiramer acetat (Copaxone). Prvi ima protivirusne učinke, poleg tega pa deluje tako, da uravnoteži pro- in protivnetne dejavnike v možganih in zmanjša število vnetnih celic, ki prehajajo hematoencefalno bariero, saj deluje antiproliferativno (17). Glatiramer acetat je naključni polimer štirih aminokislin, ki jih najdemo v osnovnem mielinskem proteinu, in sicer *L*-glutaminske kisline (Q), *L*-alanina (A), *L*-tirozina (Y) in *L*-lizina (K), s povprečno maso 5 do 9 kDa. Njegovo delovanje je še v veliki meri nepojasnjeno, vemo pa, da spremeni razmerje med provnetnimi (Th1) in protivnetnimi (Th2) limfociti T, in sicer v korist slednjih, s čimer zavre vnetne procese (17). Zaradi svoje podobnosti z mielinom naj bi deloval tudi kot vaba za odvrčanje napada avtoimunskih celic, poleg tega pa naj bi bil sposoben aktivirati nastanek avtoantigeno specifičnih regulatornih limfocitov T. Pri Chronovi bolezni pa so na črevesnem endoteliju v povečanem obsegu izražene tako molekule VCAM-1 kot MAdCAM-1. Zato je v tem primeru uspešnost natalizumaba posledica učinkovite blokade obeh levkocitnih adhezijskih molekul, $\alpha 4\beta 1$ in $\alpha 4\beta 7$ (16). Bolnike, ki prejemajo to zdravilo, morajo redno spremljati zaradi možnega nastanka jetrnih poškodb.

2.7 Blokada molekule CD20 na limfocitih B

B-limfocitni antigen CD20 je protein, izražen na površinah limfocitov B, za katerega ni znanih ligandov. Ugotovili so, da sodeluje pri zagotavljanju optimalnega B-celičnega imunskega odziva, še posebej zoper tiste antigene, ki niso odvisni od pomoči limfocitov T (18). Njegovi oligomeri naj bi tvorili kalcijeve kanalčke v celični membrani.

2.7.1 Rituksimab (MabThera, Rituxan)

Rituksimab (slika 12) je himerno monoklonsko protitelo, ki vsebuje vezavna mesta oziroma variabilna področja težkih in lahkih verig mišjega protitelesa zoper človeško molekulo CD20, pripeta na konstantne strukturne predele težke in lahke verige κ človeške molekule IgG1. Efektorski strukturni del Fc človeške molekule IgG1 so izbrali zato, ker omogoča fiksiranje komplemента in aktivacijo od vezave protiteles odvisne celično posredovane citotoksičnosti ADCC (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*). Tako rituksimab izzove uničenje celic, na katere se je vezal preko molekul CD20, zato ga uporabljamo za zdravljenje tistih bolezni, pri katerih opažamo preveliko število, pretirano reaktivnost ali pa funkcijsko neustreznost limfocitov B (limfomi, levkemije, reakcije zavračanja presajenih alogenskih organov in tkiv ter avtoimunske bolezni) (19).



Slika 12: *Levo - Struktura rituksimaba (19). Desno - A: Po vezavi na CD20 rituksimab aktivira komplement po klasični poti, kar vodi v nastanek končnega kompleksa (MAC), ki napade membrano limfocita B in vanjo naredi ireverzibilne pore (s komplementom povzročena citotoksičnost). B: Po aktivaciji komplemента se njegove komponente C3b/iC3b vežejo na površino limfocita B (opsonizacija), kjer jih prepoznajo in se nanje vežejo tako Fc del rituksimaba kot tudi receptorja za sestavine komplemента CR1 in CR3, izražena na površini makrofaga in celice NK, kar pospeši fagocitozo opsoniziranega limfocita B in sproži potek od vezave protiteles odvisne celično posredovane citotoksičnosti (ADCC). C: Vezava rituksimaba na molekule CD20 omogoča tudi neposredno interakcijo med predelom Fc in njegovim receptorjem FcRIII, izraženim na celicah NK, kar sproži ADCC (20).*

Kot smo že omenili, rituksimab uporabljamo za zdravljenje določenih oblik raka (limfomov, levkemij), poleg tega pa tudi za zdravljenje zmerno do izrazito aktivne oblike RA, v tem primeru običajno v kombinaciji z metotreksatom, in sicer večinoma pri tistih bolnikih, ki se niso ustrezno odzvali na biološka zdravila proti TNF- α .

3 CELIČNI TERAPEVTSKI PRIPRAVKI ZA NEGATIVNO MODULACIJO VNETNIH IMUNSKIH ODZIVOV

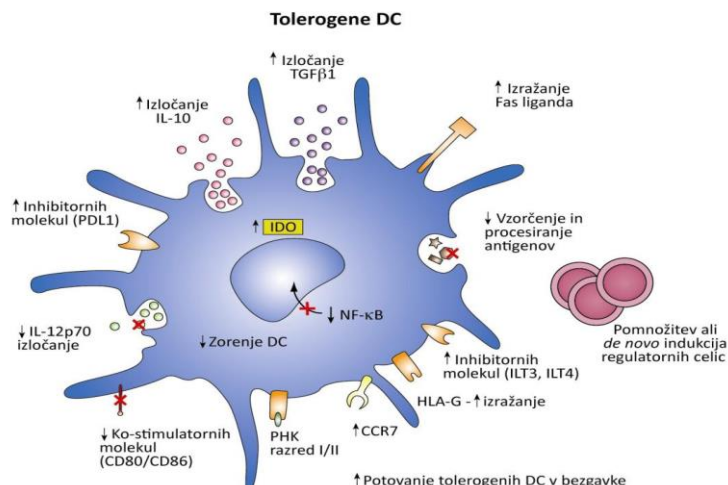
V organizmu obstaja vrsta celic in topnih dejavnikov, ki delujejo izrazito protivnetno oziroma zavirajo imunske odzive. Z vse boljšim poznavanjem mehanizmov imunske tolerance, predvsem pa z napredkom na področjih izolacije želenih vrst celic ter njihove diferenciacije in ekspanzije *ex vivo*, pa se odpirajo možnosti skorajšnje klinične uporabe raznovrstnih avtoloških in morda celo alogenskih protivnetnih celičnih pripravkov.

3.1 Tolerogene dendritične celice (tDC)

Dendritične celice (DC) so tako imenovane profesionalne antigene predstavljajoče celice (APC), ki se nahajajo v različnih tkivih ter primarnih in sekundarnih limfatičnih organih. Sposobne so učinkovito antigensko specifično, pozitivno ali negativno aktivirati različne vrste limfocitov T. Zanje je značilna precejšnja plastičnost, kar pomeni, da lahko obstajajo v različnih diferenciacijskih stanjih, odvisnih od načina in stopnje njihove aktivacije. Tako poznamo nezrele, alternativno oziroma nepopolno aktivirane in zrele DC. V omenjenih diskretnih stanjih se med seboj pomembno razlikujejo, in sicer tako v fenotipskih kot tudi funkcijskih lastnostih. Poleg zaznavanja nevarnosti in vzorčenja mikrookolja ter s tem podajanja in prenašanja antigenskih informacij so pomembni dejavniki nastanka in vzdrževanja osrednje in periferne tolerance na lastne antigene ter homeostaze in regulacije imunskega sistema (21).

Danes imamo na voljo različne protokole, s katerimi lahko, tudi v pogojih dobre proizvodne prakse (GMP), pripravimo veliko število različno aktiviranih DC iz človeških monocitov *in vitro*. S tem so dane možnosti za pripravo terapevtsko uporabnih celičnih zdravil za spodbujanje ali zaviranje antigensko specifičnih odzivov pridobljene imunosti.

Tolerogene DC, za katere so značilne izrazite imunosupresivne značilnosti, aktivirajo proliferacijo in delovanje naravno prisotnih (nTreg) ter omogočajo nastanek induciranih regulacijskih limfocitov T (iTreg), poleg tega pa lahko povzročajo tudi neodzivnost (anergijo) in apoptozo efektorskih celic T. Pripravimo jih lahko iz človeških monocitov, izoliranih iz periferne krvi. Te najprej gojimo v petdnevni celični kulturi, v prisotnosti rekombinantnega človeškega granulocitne in monocitne kolonije spodbujajočega dejavnika (GM-CSF) in IL-4, s čimer dosežemo njihovo diferenciacijo v nezrele DC. V tej fazi celicam najprej dodamo antigene, zoper katere želimo spodbuditi imunsko toleranco, nato pa jih izpostavimo različnim tolerogenim dejavnikom, na primer protivnetnim citokinom, kot sta IL-10 in TGF- β , aktivni obliki vitamina D ($1\alpha,25$ -dihidroksi vitamin D₃), kortikosteroidom (deksametazon) in drugim protivnetno delujočim spojinam. Nastale, alternativno aktivirane tDC imajo specifične lastnosti (slika 13) in so odporne na dejavnike, ki povzročajo zorenje DC, kot je na primer bakterijski lipopolisaharid (LPS). Izražajo majhno število kostimulacijskih molekul CD80 in CD86 ter proizvajajo majhne količine protivnetnih (IL-12) in povečane količine protivnetnih citokinov (IL-10, TGF- β). Njihova pomembna značilnost je tudi ta, da na svojih membranah izražajo različne inhibicijske molekule, elemente aktivne tolerance, na primer ILT3 in ILT4 (*immunoglobulin-like transcript 3 in 4*), ligand as, PDL-1 (*program-mediated death ligand 1*) in druge, ki ob interakciji z njihovimi ligandi, izraženimi na efektorskih klonih limfocitov T, v le-teh izzovejo nastanek negativnih signalov, s tem pa njihovo anergijo ali celo apoptozo.



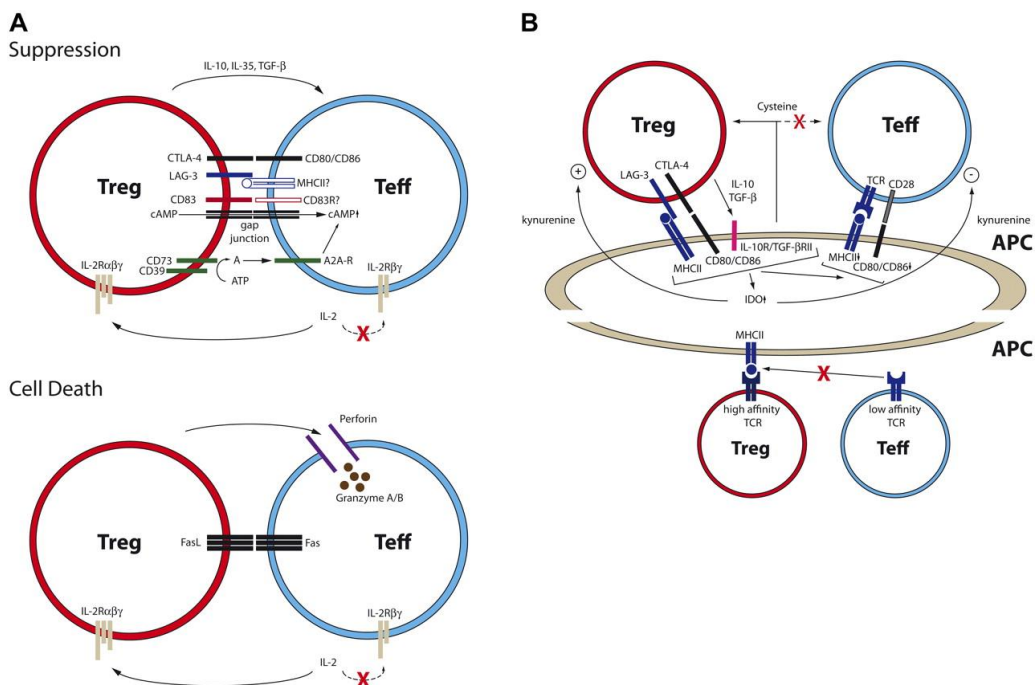
Slika 13: Fenotipske in funkcijske lastnosti tolerogenih dendritičnih celic (tDC)

Klinična uporaba avtolognih tDC za zdravljenje avtoimunskih in kroničnih vnetnih bolezni pri ljudeh, ki temelji na številnih, razmeroma uspešnih predkliničnih raziskavah na glodalcih, je trenutno šele v razvoju. Šele pred kratkim so namreč opravili prve klinične raziskave faz I in II na bolnikih s sladkorno boleznijo tipa I, z RA in s Chronovo boleznijo, s katerimi so dokazali njihovo varnost in netoksičnost (22).

3.2 Naravni (nTreg) in inducirani (iTreg) regulacijski limfociti T

Naravno prisotni CD4⁺ regulacijski limfociti nTreg nastanejo v priželjcu iz dozorevajočih timocitov, v periferno kri pa preidejo šele po preverjanju ustreznosti in jakosti vezave njihovih klonskih antigenskih receptorjev TCR na avtoantigene, predstavljene v okviru lastnih molekul poglavitnega kompleksa tkivne skladnosti MHC. Zanje je značilno, da na svojih površinah močno izražajo molekule CD25 (visokoafinitetni receptor za IL-2), v svoji notranjosti pa transkripcijski dejavnik FOXP3 (*forkhead box P3*). Zdravi ljudje naj bi imeli od 5 do 10 %, po nekaterih strožjih kriterijih pa le 1 do 2 % nTreg, med vsemi limfociti T CD4⁺ (23, 24). Celice nTreg na periferiji skrbijo za vzdrževanje specifične tolerance na posamezne, telesu lastne antigene, s čimer preprečujejo avtoimunske celične odzive. Mehanizmi njihovega delovanja so sicer različni, vsi pa temeljijo na tesnih medceličnih interakcijah z drugimi vrstami imunskih celic (slika 14). Imunosupresivno delujejo tako, da na svojih površinah konstitutivno izražajo molekule CTLA-4, ki po vezavi na kostimulatorne molekule CD80 in CD86, prisotne na APC, v slednjih povečajo aktivnost indolaminske-2,3-dioksigenaze (IDO). Kot smo že omenili, ta encim razgrajuje triptofan, nujno potreben za normalno delovanje efektorskih limfocitov T. Poleg tega nTreg proizvajajo protivnetna citokina IL-10 in TGF-β (topna in membransko vezana oblika), ki nasprotujeta delovanju provnetnih citokinov, nastajajočih v aktiviranih APC (TNF-α, IL-1, IL-12 in IFN-γ). Naravno prisotne regulacijske celice nTreg s posredovanjem inhibitornih signalov efektorским limfocitom, s katerimi so v tesnem stiku, povzročijo zvišanje njihovih znotrajceličnih ravni cikličnega adenozin monofosfata (cAMP), s tem pa preprečijo njihovo optimalno aktivacijo. nTreg lahko na efektorske limfocite T delujejo tudi citotoksično, in sicer z izločanjem grancima B in perforina, molekul, ki ju za uničevanje tarčnih celic uporabljajo aktivirani citotoksični limfociti T CD8⁺ in celice NK (23, 24).

Čprav jih je v krvnem obtoku razmeroma malo, pa nTreg lahko izoliramo in v definiranih pogojih *ex vivo* ekspanziramo do količin, ki bi zadoščale za celično zdravljenje vnetnih in avtoimunskih bolezni ter za preprečevanje reakcij zavračanja alogenskih presadkov (24, 25).



*Slika 14: Shematski prikaz mehanizmov imunosupresivnega delovanja nTreg. **A** - Neposredno supresivno in citotoksično delovanje na efektorske limfocite T. **B** - Negativna modulacija imunskih odzivov efektorskih limfocitov T preko sočasne vezave na APC (23).*

Prav načini imunosupresivnega delovanja so tisti, na osnovi katerih lahko razlikujemo med nTreg in induciranimi regulacijskimi limfociti T (iTreg), ki lahko nastanejo iz naivnih CD4⁺ in CD8⁺ limfocitov T na periferiji le pod določenimi pogoji. Eden od teh je, da morajo priti naivni limfociti T v stik z nezrelimi ali še boljše s tolerogenimi DC (tDC) oziroma z drugimi vrstami imunosupresivnih APC (23, 24, 25). Pri tem je pomembno tudi neposredno mikrookolje, v katerem do takšnih interakcij prihaja. Za celice iTreg je značilno, da, za razliko od nTreg, za imunosupresivno delovanje ne potrebujejo tesnih medceličnih interakcij. Mehanizmi njihovih zaviralnih učinkov na imunsko odzive so vezani na njihovo sposobnost, da po antigensko specifični aktivaciji proizvajajo in v svoje mikrookolje sproščajo velike količine protivnetnih citokinov IL-10 in TGF-β (v topni in membransko vezani obliki). Poglavitne razlike med nTreg in različnimi vrstami iTreg obstajajo tudi na nivoju njihovih antigenskih specifičnosti. Prve namreč lahko specifično prepoznajo le tiste avtoantigene, s katerimi so bile v stiku med svojim razvojem v timusu, medtem ko se druge lahko specifično odzivajo tako na lastne kot na tuje antigene, prisotne v sekundarnih limfatičnih tkivih. Nastanek antigensko specifičnih iTreg v pogojih *in vitro* lahko izzovemo z že omenjeno uporabo tDC, v prisotnosti IL-10 ali na primer aktivne oblike vitamina D. Nekteri v ta namen uporabljajo tudi rapamicin ali pa njihovo indukcijo izvedejo s tehnikami genskega inženirstva (24).

Celične terapije z nTreg namnoženimi *in vitro* ter iTreg pripravljenimi *ex vivo* so še v fazi razvoja, zaradi svoje potencialne klinične uporabnosti pa predstavljajo upanje predvsem za številne bolnike z

avtoimunskimi in drugimi vnetnimi boleznimi ter tiste, ki bodo v prihodnosti prejemniki alogenskih presadkov (24, 25).

3.3 Mezenhimske matične celice (MSC)

Mezenhimske matične celice (MSC, *mesenchymal stem cells*) so znane predvsem po svoji plastičnosti, to je sposobnosti, da pod ustreznimi pogoji v celičnih kulturah *in vitro* diferencirajo v različne vrste tkiv, na primer v kost, hrustanec, kite, mišice in adipozo (preglednica 1). Še bolj kot to pa so zanimive njihove trofične, parakrine in imunomodulatorne sposobnosti, ki bi lahko imele velik terapevtski pomen *in vivo*. Delovanje MSC uravnavajo pogoji v njihovem neposrednem mikrookolju, ki odločajo o tem, kakšne topne dejavnike oziroma signale bodo proizvajale ter kakšna bodo njihova razmerja in koncentracije. Pri tem so protivnetne in imunomodulatorne sposobnosti MSC morda celo njihove najpomembnejše lastnosti, ki omogočajo vzpostavitev lokaliziranih ali sistemskih pogojev za normalno celjenje in/ali regeneracijo poškodovanih tkiv (26).

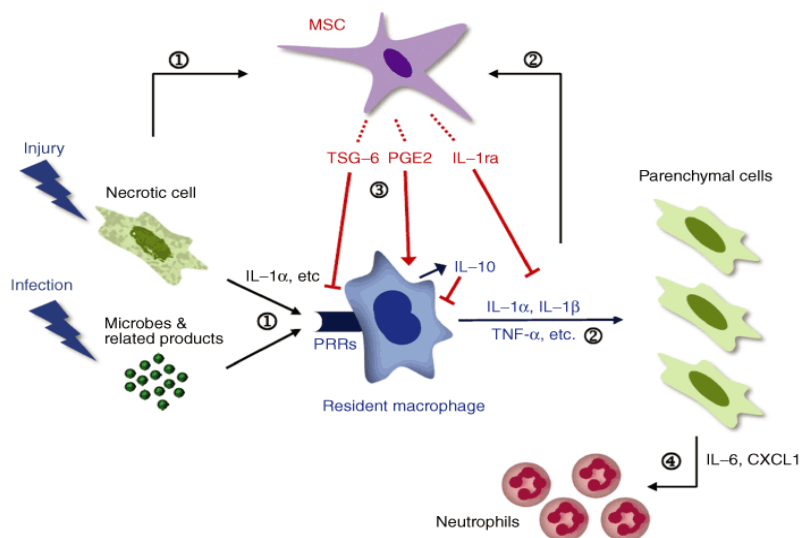
Preglednica 1: Koncentracije in frekvence MSC ter kolonije formirajočih celic (CFU-F), izoliranih iz različnih človeških tkiv (25). CFU-F → klonalna sposobnost MSC ali sposobnost tvorbe celičnih kolonij; x → vrednost, določena na podlagi upoštevanja povprečja 8×10^6 celic z jedrom/ml aspirata kostnega mozga; y → za pojav CFU-F v periferni krvi je potrebna predhodna mobilizacija s sistemsko aplikacijo granulocitne kolonije spodbujajočega dejavnika G-CSF.

Človeško tkivo kot vir MSC	Naravni interval konc. MSC (CFU-F/ml vzorca tkiva)	Razpon frekvenc MSC (CFU-F/ 10^6 celic z jedrom)
Aspirat kostnega mozga	109–664 ^x	10–83
Lipoaspirat adipoznega tkiva	2.058–9.650	205–51.000
Dermis	Ni podatka	74.000–157.000
Popkovnična kri	0,06	0–0,02
Periferna kri	0	0–2 ^y
Sinovijska tekočina	4–14	2–250
Amnijska tekočina	3	9,2

V zadnjem času se je utrdilo mnenje, da so prav mezenhimske matične/stromalne celice (MSC) tiste, ki nas branijo pred pretiranimi vnetnimi odzivi. Ugotovili so, da delujejo protivnetno na različne načine, in sicer tako, da:

- po aktivaciji začnejo izražati antagonist receptorja za IL-1 (IL-1ra, slika 15);
- ustvarijo negativno povratno zanko, znotraj katere jih aktivirajo TNF- α in drugi provnetni citokini, ki jih proizvajajo rezidenčni tkivni makrofagi, tako da izločajo večfunkcijski protivnetni protein TSG-6 (*TNF- α stimulated gene/protein 6*); TSG-6 močno zmanjša signalizacijo preko jedrnega transkripcijskega dejavnika NF κ B v omenjenih makrofagih, s tem pa spremeni kaskado in obseg nastajanja provnetnih citokinov;
- vzpostavijo še eno negativno povratno zanko, v kateri jih lipopolisaharidi, TNF- α , dušikov oksid (NO) in morda tudi drugi, s tkivno poškodbo povezani molekularni vzorci (DAMPs, *damage-associated molecular patterns*) iz ranjenih tkiv ter tkivni makrofagi, aktivirajo na način, da proizvajajo in izločajo prostaglandin E₂ (PGE₂); slednji spremeni fenotip makrofagov iz provnetnega v protivnetni (proizvodnja IL-10).
- naj bi po določeni vrsti aktivacije začele izražati staniokalcin-1, protein, ki deluje proti reaktivnim kisikovim spojinam (27).

Nekaj mehanizmov imunosupresivnega delovanja MSC prikazuje tudi slika 15.



Slika 15: Prikaz nekaterih mehanizmov imunosupresivnega delovanja MSC. 1 - S tkivnimi poškodbami povezani molekularni vzorci (DAMPs, damage-associated molecular patterns), IL-1a (sterilna poškodba) ali s patogeni povezani molekularni vzorci (PAMPs, pathogen-associated molecular patterns) aktivirajo rezidenčne makrofage z vezavo na njihove različne površinske receptorje PRR (pattern recognition receptors). 2 - Aktivirani makrofagi proizvajajo proinflammatory citokine (IL-1a, IL-1β, TNF-α) in s tem sprožijo vnetni proces. 3 - Proinflammatory citokini in najverjetneje tudi različni signali iz poškodovanih celic aktivirajo MSC, ki začno proizvajati in izločati protivnetne dejavnike, kot so TSG-6, PGE₂ in IL-1ra, ter s tem bodisi spremenijo funkcijske lastnosti makrofagov ali pa zmanjšajo vplive proinflammatory citokinov. 4 - Končni cilj je zmanjšanje proinflammatory signalov, ki jih s proizvodnjem IL-6, kemokina CXCL1 in sorodnih dejavnikov generirajo parenhimske celice, s tem pa preprečitev vstopanja nevtrofilcev v vnetišče (26).

Mezenhimske matične celice so že preizkušali v različnih raziskavah, in sicer za zdravljenje RA, Chronove bolezni, sistemskega lupusa eritematozusa (SLE) in številnih drugih avtoimunskih oziroma vnetnih bolezni (25). Ugotovili so, da je uporaba MSC varna in da lahko vzpostavi ugodnejše razmerje Th1/Th2 v organizmu ter poveča število regulatornih limfocitov T. Na splošno so bili rezultati vseh raziskav, ki pa so bile vse po vrsti majhne, glede na število vključenih bolnikov, zelo obetavni. Podobno uspešne rezultate so zabeležili tudi v primeru uporabe MSC za preprečevanje oziroma zdravljenje bolezni presadka zoper gostitelja (GvHD, *graft versus host disease*) po presaditvah alogenskih krvotvornih matičnih celic (26, 28).

4 SKLEP

Z uporabo bioloških zdravil lahko danes številnim bolnikom omilimo hude težave, ki so posledice kroničnih vnetnih bolezni. Zavedati se moramo, da z njimi pomembno posegamo tudi v ostale naravne imunske mehanizme, s tem pa negativno vplivamo na homeostazo. Tako lahko na primer biološka zdravila, ki delujejo proti TNF-α, močno povečajo tveganje za razvoj življenjsko ogrožajočih okužb, zlasti tuberkuloze, ter za nastanek limfomov in drugih oblik raka. Poleg tega jih ne smejo prejemati bolniki z resnimi kongestivnimi srčnimi obolenji. Zato je izjemno pomembno, da prihaja

do pomembnih premikov na področju razvoja imunosupresivnih celičnih terapij, ki imajo izjemen potencial, saj bi lahko z njimi vzročno zdravili predvsem avtoimunske bolezni in tako učinkovito nadomestili sedanje, pretežno simptomatsko zdravljenje. Na tej osnovi potekajo predvsem intenzivna prizadevanja za čim prejšnjo uvedbo naprednega zdravljenja z regulatornimi limfociti T, in sicer zlasti tistih avtoimunskih bolezni, pri katerih poznamo vsaj nekaj specifičnih avtoantigenov, vpletenih v njihovo patogenezo, ter tudi za preprečevanja zavrnitvenih reakcij po alogenskih presaditvah tkiv in organov. Izvedli so že tudi posamezne klinične raziskave, v katerih so uspešno preizkusili predvsem varnost in uporabnost omenjenih celičnih terapevtskih pripravkov.

5 LITERATURA

1. The induced responses of innate immunity. V: Kenneth P. Murphy. Janeway's immunobiology. Garland Science, Taylor and Francis Group, 2012: 75–125.
2. Libby P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev* 2007; 65 (12 Pt 2): S140–146.
3. Bian XW, Chen JH, Jiang XF, Bai JS, Wang QL, Zhang X. Angiogenesis as an immunopharmacologic target in inflammation and cancer. *Int Immunopharmacol* 2004; 4 (12): 1537–1547.
4. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000; 118: 503–508.
5. Obermajer N, Premzl A, Kos J. Terapevtska monoklonska protitelesa. V: Štrukelj B, Kos J. Biološka zdravila: od gena do učinkovine. Slovensko farmacevtsko društvo, 2007; 531–578.
6. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* 2014; 119 (3): 651–665.
7. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, et al. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacology & Therapeutics* 2008; 117: 244–297.
8. Rotar Ž. Uporaba bioloških zdravil v revmatologiji. *Farm Vestn* 2013; 64: 293–298.
9. Dubois EA, Rissmann R, Cohen AF. Rilonacept and canakinumab. *Br J Clin Pharmacol* 2011; 71 (5): 639–641.
10. Federici S, Martini A, Gattorno M. The central role of anti-IL-1 blockade in the treatment of monogenic and multifactorial autoinflammatory diseases. *Front Immunol* 2013 doi: 10.3389/fimmu.2013.00351.
11. Okuda Y. Review of tocilizumab in the treatment of rheumatoid arthritis. *Biologics* 2008; 2 (1): 75–82.
12. Steinman L. Mixed Results with modulation of human TH 17 cells in human autoimmune diseases. *Nature Immunology* 2010; 11: 41–44.
13. Benson JM, Sachs CW, Treacy G, et al. Therapeutic targeting of the IL-12/23 pathways: generation and characterization of ustekinumab. *Nature Biotechnology* 2011; 29: 615–624.
14. Ruderman EM, Pope RM. Drug insight: abatacept for the treatment of rheumatoid arthritis. *Nature Clinical Practice Rheumatology* 2006; 2: 654–660.
15. http://www.medscape.org/viewarticle/496108_12. Datum dostopa: 16. 5. 2014.
16. Selewski DT, Shah GV, Segal BM, et al. Natalizumab (Tysabri). *AJNR* 2010; 31: 1588–1590.
17. Zhang J, Hutton G, Zang Y. A comparison of the mechanisms of action of interferon beta and glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis. *Clin Ther* 2002; 24 (12): 1998–2021.
18. Cragg MS, Walshe CA, Ivanov AO, Glennie MJ. The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Current Directions in Autoimmunity* 2005; 8: 140–174.
19. Smith MR. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Ocogene* 2003; 22: 7359–7368.
20. Taylor RP, Lindorfer MA. Drug Insight: the mechanism of action of rituximab in autoimmune disease – the immune complex decoy hypothesis. *Nature Clinical Practice Rheumatology* 2007; 3: 86–95.
21. Švajger U, Jeras M. Celično zdravljenje s tolerogenimi dendritičnimi celicami – vzročno zdravljenje avtoimunskih bolezni. *Zdrav Vestn* 2013; 82: 47–54.
22. Cabezón R, Benítez-Ribas D. Therapeutic potential of tolerogenic dendritic cells in IBD: From animal models to clinical application. *Clinical and Developmental Immunology* 2013; Article ID 789814.
23. Jeras M, Švajger U. Imunska toleranca. *Zdrav Vestn* 2011; 80: 944–956.

24. Schmetterer KG, Neunkirchner A, Pickl WE. Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. *The FASEB Journal* 2012; 26: 2253–2276.
25. Švajger U, Jeras M. Celična terapija z regulatornimi limfociti T – celice kot zdravila. *Farm Vestn* 2009; 60: 143–149.
26. Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Experimental & Molecular Medicine* 2013; 45, e45; doi:10.1038/emm.2013.94.
27. Prockop DJ, Oh JY. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): Role as guardians of inflammation. *Molecular Therapy* 2012; 20: 14–20.
28. Martinuč M, Jeras M. Imunoregulacijsko delovanje matičnih celic iz kostnega mozga in njihova možna uporaba pri transplantaciji organov. *Zdrav Vestn* 2010; 79: 354–361

Od klasičnih do sodobnih dostavnih sistemov za biofarmacevtike

Doc. dr. Petra Kocbek, mag. farm.
Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani

Povzetek

Kljub več kot tridesetim letom razvoja je danes večina bioloških zdravil (terapevtskih peptidov, proteinov, oligonukleotidov) v klinični uporabi klasičnih parenteralnih farmacevtskih oblik. Razlog je nizka biološka uporabnost po neparenteralnem vnosu, ki je posledica intrinzičnih lastnosti bioloških učinkovin, kot so velika molekulska masa, fizikalna in kemična nestabilnost, omejena permeabilnost skozi biološke membrane. Poleg tega je za doseganje terapevtskega učinka potrebno tudi pogosto odmerjanje, kar vodi v slabo complianco bolnikov in pojav sistemskih neželenih učinkov. To so razlogi za intenziven razvoj sodobnih dostavnih sistemov za neparenteralni vnos biofarmacevtikov, s katerimi bi lahko popolnoma izkoristili velik terapevtski potencial, ki ga prinašajo biološke zdravilne učinkovine. Največ raziskav poteka na področju peroralnih, pulmonalnih, nazalnih in transdermalnih dostavnih sistemov za biofarmacevtike.

Vsebina

- 1 UVOD
- 2 FARMACEVTSKE OBLIKE ZA BIOFARMACEVTIKE DANES IN JUTRI
- 3 BIOFARMACEVTIKI NA OSNOVI PEPTIDOV IN PROTEINOV
- 4 BIOFARMACEVTIKI NA OSNOVI RNA
 - 2.1 Značilnosti RNA in farmacevtskih oblik biofarmacevtikov na osnovi RNA
- 5 KAKO SE IZOGNITI PARENTERALNEMU VNOSU?
 - 5.1 Peroralno dajanje
 - 5.2 Pulmonalno dajanje
 - 5.3 Nazalno dajanje
 - 5.4 Transdermalno dajanje
- 6 BIOLOŠKI (BIOMIMETIČNI) DOSTAVNI SISTEMI
- 7 SKLEP
- 8 LITERATURA

1 UVOD

Sodobna molekulska orodja in biotehnološki pristopi dandanes omogočajo načrtovanje in pripravo specifičnih biomakromolekul, ki se vežejo na tarčne molekule (receptorje, encime, RNA, DNA) in v biološkem okolju sprožijo specifične odzive. Tak pristop teoretično omogoča načrtovanje zdravil za zdravljenje katerekoli bolezni, če le poznamo tarčno mesto oziroma prijemališče delovanja. Na modelnih *in vitro* sistemih so takšne biološke makromolekule dokazano visokoučinkovite, medtem ko *in vivo* raziskave pogosto ne potrdijo njihovega velikega terapevtskega potenciala. Intrinzične lastnosti teh makromolekul (velika molekulska masa, hidrofilnost, kratek razpolovni čas in nestabilnost v *in vivo* okolju) so vzrok, da *in vivo* ne dosežejo tarčnega mesta v biološko aktivni obliki ali pa je njihova koncentracija na tarčnem mestu premajhna ali je njihov čas zadrževanja na tarčnem mestu prekratek, da bi nastopil terapevtski učinek (1, 2). Šele razvoj ustreznih formulacij in dostavnih sistemov za *in vitro* obetavne biomakromolekule lahko le-te spremeni v terapevtsko visokoučinkovita biološka zdravila.

2 FARMACEVTSKE OBLIKE ZA BIOFARMACEVTIKE DANES IN JUTRI

Farmacevtska oblika igra ključno vlogo pri farmakološki učinkovitosti zdravila. Kljub temu, da so biološke makromolekule zelo specifične in visokoučinkovite, lahko tak učinek dosežemo le, če jih vgradimo v ustrezno farmacevtsko obliko. Tehnološki postopki in dejavniki pri izdelavi morajo zagotavljati nespremenjeno biološko aktivnost biološke učinkovine med izdelavo in shranjevanjem zdravila, poleg tega pa mora biti farmacevtska oblika takšna, da omogoči dostavo biomakromolekule na ciljno mesto v organizmu.

Razvoj farmacevtskih oblik z biofarmacevtiki se razlikuje od razvoja farmacevtskih oblik s klasičnimi nizkomolekularnih zdravilnimi učinkovinami, saj so biofarmacevtiki bolj občutljive molekule (peptidi, proteini, nukleinske kisline), ki zahtevajo specifične pogoje rokovanja in oblikovanja. Občutljive so na ostre tehnološke pogoje pri izdelavi, ki lahko zmanjšajo njihovo biološko aktivnost ali jo celo spremenijo, kar lahko vodi v pojav neželenih učinkov (na primer imunskih reakcij) (3). Razvoj učinkovite končne oblike je tako kompleksen proces, ki zahteva natančno poznavanje lastnosti same biološke učinkovine kot tudi njenega obnašanja po vnosu v organizem (farmakokinetika in farmakodinamika). Največji izziv razvoja sodobnih, naprednih zdravil z biofarmacevtiki je njihov transport od mesta vnosa do mesta delovanja v organizmu. Ker je biološka uporabnost biofarmacevtikov običajno zelo majhna, tudi danes, kljub več kot tridesetim letom razvoja, na tržišču prevladujejo parenteralne farmacevtske oblike. Enako velja tudi za biološka zdravila, ki jim je Evropska agencija za zdravila (EMA) podelila dovoljenje za promet v obdobju zadnjih petih let (2010–2014) (preglednica I) (4). Natančneje, to so raztopine in suspenzije biofarmacevtikov, ki jih vnašamo v telo z injiciranjem ali infundiranjem.

Preglednica 1: Biološka zdravila, ki jim je EMA podelila dovoljenje za promet v zadnjih petih letih (2010–2014) (4)

Zdravilo	Učinkovina; farmacevtska oblika	Vnos	Pomožne snovi	Promet
Adcetris	Brentuksimab vedotin; prašek za koncentrat za raztopino za infundiranje	iv	Citronska kislina monohidrat, natrijev citrat dihidrat, α,α -trehaloza dihidrat, polisorbitat 80	2012
Aflunov	Prepandemsko cepivo proti gripi (H5N1) (s površinskimi antigeni, inaktivirano, z adjuvansom); suspenzija za injiciranje	im	Natrijev klorid, kalijev klorid, kalijev dihidrogenfosfat, dinatrijev hidrogenfosfat, magnezijev klorid heksahidrat, kalcijev klorid dihidrat, natrijev citrat, citronska kislina, voda za injekcije, adjuvans (MF59C.1)	2010
Atosiban SUN	Atosiban; raztopina za injiciranje	iv	Manitol, klorovodikova kislina, voda za injekcije	2013
Arzerra	Ofatumumab; koncentrat za raztopino za infundiranje	iv	Arginin, natrijev acetat, natrijev klorid, polisorbitat 80, dinatrijev edetat, klorovodikova kislina, voda za injekcije	2010
Benlysta	Belimumab; prašek za koncentrat za raztopino za infundiranje	iv	Citronska kislina monohidrat, natrijev citrat, saharoza, polisorbitat 80	2011
Bexsero	Cepivo proti meningokokom skupine B (rekombinantno, komponentno, adsorbirano); suspenzija za injiciranje	im	Natrijev klorid, histidin, saharoza, voda za injekcije	2013
Bydureon	Ekstenatid; prašek in topilo za suspenzijo s podaljšanim sproščanjem za injiciranje	sc	<u>Prašek</u> : poli (<i>D,L</i> -laktid koglikolid), saharoza; <u>topilo</u> : natrijev karmelozat, natrijev klorid, polisorbitat 20, natrijev hidrogenfosfat monohidrat, natrijev dihidrogenfosfat heptahidrat, voda za injekcije	2011
Cinryze	Zaviralec C1 (humani); prašek in vehikel za raztopino za injiciranje	iv	<u>Prašek</u> : natrijev klorid, saharoza, natrijev citrat, <i>L</i> -valin, <i>L</i> -alanin, <i>L</i> -treonin; <u>vehikel</u> : voda za injekcije	2011
Constella	Linaklotide; trda kapsula	po	<u>Vsebina kapsule</u> : hipromeloza, kalcijev klorid dihidrat, levcin, titanov dioksid; <u>ovojnica kapsule</u> : želatina, rdeči železov oksid, rumeni železov oksid, šelak; <u>črnilo kapsule</u> : propilenglikol, koncentrirana raztopina amoniaka, kalijev hidroksid, titanov dioksid, črni železov oksid	2012
Defitelio	Defibrotid; koncentrat za raztopino za infundiranje (sterilni koncentrat)	iv	Natrijev citrat dihidrat, klorovodikova kislina, natrijev hidroksid, voda za injekcije	2013
Elonva	Korifolitropin alfa; raztopina za injiciranje	sc	Natrijev citrat, saharoza, polisorbitat 20, metionin, natrijev hidroksid, klorovodikova kislina, voda za injekcije	2010
Eperzan	Albiglutid; prašek in vehikel za raztopino za injiciranje	sc	<u>Prašek za raztopino za injiciranje</u> : natrijev dihidrogenfosfat monohidrat, brezvodni natrijev hidrogenfosfat, trehaloza dihidrat, manitol, polisorbitat 80, brezvodna trehaloza dihidrat, manitol, polisorbitat 80; <u>vehikel</u> : voda za injekcije	2014

Evarrest	Humani fibrinogen/humani trombin; matriks z lepilom za tkiva	Epilezijsko	Kompozitni matriks (poliglaktin 910 in oksidirana regenerirana celuloza), argininijev klorid, glicin, natrijev klorid, natrijev citrat, kalcijev klorid, humani albumin, manitol, natrijev acetat	2013
Eylea	Aflibercept; raztopina za injiciranje	Intravitrealno	Polisorbat 20, natrijev dihidrogenfosfat monohidrat, dinatrijev hidrogenfosfat heptahidrat, natrijev klorid, saharoza, voda za injicije	2012
Fluenz	Cepivo proti gripi (z živimi oslavljenimi virusi, nosno); pršilo za nos, suspenzija	Nazalno	Saharoza, kalijev hidrogenfosfat, kalijev dihidrogenfosfat, želatina (svinjska, tip A), argininijev klorid, natrijev glutamat monohidrat, voda za injicije	2011
Fluenz Tetra	Cepivo proti gripi (z živimi oslavljenimi virusi); pršilo za nos, suspenzija	Nazalno	Saharoza, kalijev hidrogenfosfat, kalijev dihidrogenfosfat, želatina (svinjska, tip A), argininijev klorid, natrijev glutamat monohidrat, voda za injicije	2013
Glybera	Alipogentiparvovek; raztopina za injiciranje	im	Kalcijev klorid dihidrat, brezvodni dinatrijev fosfat, magnezijev klorid heksahidrat, kalijev klorid, kalijev dihidrogenfosfat, natrijev klorid, saharoza, voda za injicije	2012
Grastofil	Filgrastim; raztopina za injiciranje ali infundiranje	sc in iv	Ledocetna kislina, natrijev hidroksid, sorbitol, polisorbat 80, voda za injicije	2013
Hexacima	Mešano cepivo proti davici, tetanusu, oslovskemu kašlju (acelularno, komponentno), hepatitisu B (rekombinantno), otroški paralizi (inaktivirano) in hemofilusu influence tipa b (konjugirano), adsorbirano; suspenzija za injiciranje	im	Dinatrijev hidrogenfosfat, kalijev dihidrogenfosfat, trometamol, saharoza, esencialne aminokislina, vključno z L-fenilalaninom, voda za injiciranje	2013
Hexyon	Mešano cepivo proti davici, tetanusu, oslovskemu kašlju (acelularno, komponentno), hepatitisu B (rekombinantno), otroški paralizi (inaktivirano) in hemofilusu influence tipa b (konjugirano), adsorbirano; suspenzija za injiciranje	im	Dinatrijev hidrogenfosfat, kalijev dihidrogen fosfat, trometamol, saharoza, esencialne aminokislina, vključno z L-fenilalaninom, voda za injiciranje	2013
Hizentra	Humani polispecifični imunoglobulin (s.c.Ig); Raztopina za injiciranje	sc	L-prolin, polisorbat 80, voda za injicije	2011
HyQvia	Humani polispecifični imunoglobulin, rekombinantna humana hialuronidaza; raztopina za infundiranje	sc	<u>Viala humanega polispecifičnega imunoglobulina (IG 10 %):</u> glicin, voda za injicije; <u>viala rekombinantne humane hialuronidaze (rHuPH20):</u> natrijev klorid, dinatrijev fosfat, humani albumin, dinatrijev edetat, kalcijev klorid, natrijev hidroksid, klorovodikova kislina, voda za injicije	2013

IDflu	Cepivo proti gripi z delci virionov, inaktivirano; suspenzija za injiciranje	intradermalno	Natrijev klorid, kalijev klorid, natrijev hidrogenfosfat dihidrat, kalijev dihidrogenfosfat, voda za injekcije	2009
Imvanex	Cepivo proti črnim kozam (živ modificiran virus vakcinija Ankara); suspenzija za injiciranje	sc	Trometamol, natrijev klorid, voda za injekcije	2013
Inflectra	Infliksimab; prašek za koncentrat za raztopino za infundiranje	iv	Saharoza, polisorbit 80, natrijev dihidrogenfosfat monohidrat, natrijev hidrogenfosfat dihidrat	2013
Jetrea	Okriplazmin; koncentrat za raztopino za injiciranje	Intravitrealno	Manitol, citronska kislina, natrijev hidroksid, voda za injekcije	2013
Kadcyla	Trastuzumab emtanzin; prašek za koncentrat za raztopino za infundiranje	iv	Sukcinska kislina, natrijev hidroksid, saharoza, polisorbit 20	2013
Krystexxa	Peglotikaza; koncentrat za pripravo raztopine za infundiranje	iv	Dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat, natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, natrijev klorid, voda za injekcije	2013
Lemtrada	Alemtuzumab; koncentrat za raztopino za infundiranje	iv	Dinatrijev fosfat dihidrat, dinatrijev edetat dihidrat, kalijev klorid, kalijev dihidrogenfosfat, polisorbit 80, natrijev klorid, voda za injekcije	2013
Lonquex	Lipegfilgrastim; raztopina za injiciranje	sc	Ledocet, natrijev hidroksid, sorbitol, polisorbit 20, voda za injekcije	2013
Lyxumia	Liksisenatid; raztopina za injiciranje	sc	85-odstotni glicerol, natrijev acetat trihidrat, metionin, metakrezol, klorovodikova kislina, natrijev hidroksid, voda za injekcije	2013
Maci	na matriks naneseeni karakterizirani avtologni gojeni hondrociti; matriks za vsaditev	Vsaditev	Eaglov medij, modificiran po Dulbecco (DMEM), natrijeva sol 4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etansulfonske kisline (HEPES), klorovodikova kislina, natrijev hidroksid, natrijev klorid	2013
Menveo	Konjugirano cepivo proti meningokokom skupin A, C, W135 in Y; prašek in raztopina za raztopino za injiciranje	im	<u>Prašek</u> : saharoza, kalijev dihidrogenfosfat; <u>raztopina</u> : natrijev dihidrogenfosfat monohidrat, natrijev hidrogenfosfat dihidrat, natrijev klorid, voda za injekcije	2010
NexoBrid	Proteolitični encimi so mešanica encimov iz stebila rastline <i>Ananas comosus</i> (ananas); prašek in gel za gel	Dermalno	<u>NexoBrid prašek</u> : amonijev sulfat, očetna kislina; <u>gel</u> : karbomer 980, brezvodni natrijev hidrogenfosfat, natrijev hidroksid, voda za injekcije	2012
Nimenrix	cepivo proti meningokokom skupin A, C, W-135 in Y, konjugirano; prašek in vehikel za raztopino za injiciranje	im	<u>Prašek</u> : saharoza, trometamol; <u>vehikel</u> : natrijev klorid, voda za injekcije	2012
Nivestim	Filgrastim; raztopina za injiciranje/infundiranje	sc ali iv	Koncentrirana očetna kislina, natrijev hidroksid, sorbitol (E420), polisorbit 80, voda za injekcije	2010
NovoEight	Turoktokog alfa; prašek in vehikel za raztopino za injiciranje	iv	<u>Prašek</u> : natrijev klorid, L-histidin, saharoza, polisorbit 80, L-metionin, kalcijev klorid dihidrat, natrijev hidroksid, klorovodikova kislina; <u>vehikel</u> : natrijev klorid, voda za injekcije	2013

NovoThirteen	katridekakog; prašek in vehikel za raztopino za injiciranje	iv	<u>Prašek</u> : natrijev klorid, saharoza, polisorbitat 20, L-histidin, klorovodikova kislina (za prilagoditev pH), natrijev hidroksid (za prilagoditev pH), <u>vehikel</u> : voda za injekcije	2012
Perjeta	Pertuzumab; koncentrat za raztopino za infundiranje	iv	Koncentrirana oetna kislina, L-histidin, saharoza, polisorbitat 20, voda za injekcije	2013
Prepandemic influenza vaccine (H5N1)	prepandemsko cepivo proti gripi (H5N1) (s površinskimi antigeni, inaktivirano, z adjuvansom); suspenzija za injiciranje	im	natrijev klorid, kalijev klorid, kalijev dihidrogenfosfat, dinatrijev hidrogenfosfat, magnezijev klorid heksahidrat, kalcijev klorid dihidrat, natrijev citrate, citronska kislina, voda za injekcije	2010
Prolia	Denosumab; raztopina za injiciranje	sc	Ledocet, natrijev hidroksid, sorbitol (E420), polisorbitat 20, voda za injekcije	2010
Provenge	Avtologne mononuklearne celice iz periferne krvi, aktivirane s prostatičnim kislim, granulocitne in makrofagne kolonije stimulirajočim faktorjem (PAP-GM-CSF); disperzija za infundiranje	iv	Natrijev klorid, natrijev laktat, kalijev klorid, kalcijev klorid	2013
Pumarix	Cepivo proti pandemski gripi (H5N1) z delci virionov, inaktivirano (z adjuvansom); suspenzija in emulzija za emulzijo za injiciranje	im	<u>Viala s suspenzijo</u> : tiomersal, natrijev klorid, natrijev hidrogenfosfat, kalijev dihidrogenfosfat, kalijev klorid, voda za injekcije; <u>viala z emulzijo</u> : natrijev klorid, natrijev hidrogenfosfat, kalijev dihidrogenfosfat, kalijev klorid, voda za injekcije, Adjuvans AS03	2011
Remsima	Infliksimumab; prašek za koncentrat za raztopino za infundiranje	iv	Saharoz, polisorbitat 80, natrijev dihidrogenfosfat monohidrat, natrijev hidrogenfosfat dihidrat	2013
Ruconest	Konestat alfa; prašek za pripravo raztopine za injiciranje	iv	Saharoz, natrijev citrat, citronska kislina	2010
Revestive	Teduglutid; prašek in vehikel za raztopino za injiciranje	sc	<u>Prašek</u> : L-histidin, manitol, natrijev fosfat monohidrat, natrijev hidrogenfosfat heptahidrat, natrijev hidroksid, klorovodikova kislina; <u>vehikel</u> : voda za injekcije	2012
Scintimun	Besilesomab; komplet za pripravo radiofarmaka	iv	<u>Scintimun</u> : brezvodni natrijev dihidrogenfosfat, brezvodni natrijev hidrogenfosfat, sorbitol E420v v dušikovi atmosferi; <u>vehikel za zdravilo Scintimun</u> : 1,1,3,3-propantetrafosfonska kislina, tetranatrijeva sol, dihidrat (PTP), kositrov klorid dihidrat, natrijev hidroksid/klorovodikova kislina (za uravnanje pH), dušik	2010
Signifor	Pasireotid (v obliki pasireotidijevega diaspartat); raztopina za injiciranje	sc	Manitol, vinska kislina, natrijev hidroksid, voda za injekcije	2012

Somatropin Biopartners	Somatropin; prašek in vehikel za suspenzijo za injiciranje s podaljšanim sproščanjem	sc	<u>Prašek</u> : natrijev hialuronat, jajčni fosfolipidi, brezvodni natrijev dihidrogenfosfat, brezvodni dinatrijev fosfat; <u>vehikel</u> : srednjeveržni trigliceridi	2013
Tresiba	Inzulin degludek; raztopina za injiciranje	sc	Glicerol, metakrezol, fenol, cinkov acetat, klorovodikova kislina, natrijev hidroksid, voda za injekcije	2013
Vepacel	Cepivo proti prepandemski gripi (H5N1) (s celimi virioni, inaktivirano, pripravljeno v celični kulturi); suspenzija za injiciranje	im	Trometamol, natrijev klorid, voda za injekcije, polisorbitat 80	2012
Vibativ	Telavancin; prašek za raztopino za infundiranje	iv	Hidroksipropilbetadeks, manitol, natrijev hidroksid, klorovodikova kislina	2011
Xgeva	Denosumab; raztopina za injiciranje	sc	Ledocet, natrijev hidroksid, sorbitol, voda za injekcije	2011
Xiapex	Formulacija dveh encimov kolagenaz, ki se izražata skupaj in ju pridelajo z anaerobno fermentacijo fenotipsko izbranega seva bakterije <i>Clostridium histolyticum</i> ; prašek in vehikel za raztopino za injiciranje	Intralezijsko	<u>Prašek</u> : saharoza, trometamol, klorovodikova kislina 2,4 % (w/w); <u>vehikel</u> : kalcijev klorid dihidrat, natrijev klorid, voda za injekcije	2011
Yervoy	Ipilimumab; koncentrat za raztopino za infundiranje	iv	Tris v obliki klorida (2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolijev klorid), natrijev klorid, manitol, pentetska kislina (dietilentriaminopentaocetna kislina), polisorbitat 80, natrijev hidroksid klorovodikova kislina, voda za injekcije	2011
Zaltrap	Aflibercept; koncentrat za raztopino za infundiranje	iv	Saharoz, natrijev klorid, natrijev citrat dihidrat, citronska kislina monohidrat, polisorbitat 20, natrijev hidrogenfosfat heptahidrat, natrijev dihidrogenfosfat monohidrat, natrijev hidroksid in/ali klorovodikova kislina (za prilagoditev pH), voda za injekcije	2013

V nasprotju z dokaj enoličnim stanjem na tržišču je dogajanje na področju razvoja zelo pestro, saj potekajo intenzivne raziskave množice sodobnih dostavnih sistemov za vnos biofarmaceutikov. Naloga dostavnega sistema je, da štiti biofarmaceutik na poti od mesta aplikacije do mesta delovanja in mu omogoči premagovanje bioloških barier na poti do ciljnega mesta. Cilj razvoja so tako dostavni sistemi z nadzorovanim sproščanjem, ki bi omogočili manj pogosto odmerjanje in s tem boljšo complianco bolnikov, hkrati pa bi bili bolniku prijazni (neparenteralne farmacevtske oblike). Biološka zdravila na osnovi takšnih sodobnih dostavnih sistemov so zdravila prihodnosti. Prihod na tržišče ovirata tudi stroga regulativa in kompleksnost zdravil z biološkimi makromolekulami. Že priprava in analitika biomakromolekul sta zahtevna procesa, njihovo vgrajevanje v sodobne dostavne sisteme pa kompleksnost končne farmacevtske oblike in posledično njenega vrednotenja le še poveča, razvoj samega zdravila pa podaljša.

3 BIOFARMACEVTIKI NA OSNOVI PEPTIDOV IN PROTEINOV

Številni peptidi in proteini so od konca dvajsetega stoletja do danes uspešno prestali faze predkliničnih in kliničnih raziskav, tako da so danes na voljo za uporabo v klinični praksi (2). Ta skupina bioloških makromolekul je najštevilčnejša tako po številu bioloških zdravil na tržišču kot v razvoju. Proteini so relativno velike molekule s kompleksno zgradbo, za katero je značilna poleg primarne še sekundarna, terciarna in v nekateri primerih celo kvartarna struktura. Spremembe v prostorski strukturi ali v stranskih verigah lahko pomenijo izgubo biološkega učinka ali so vzrok imunogenosti proteina (5). Terapevtski proteini so med proizvodnjo, shranjevanjem ali po vnosu v organizem podvrženi fizikalnim in kemičnim spremembam, zato je ključnega pomena, da v procesu razvoja farmacevtskih oblik karseda zmanjšamo verjetnost takšnih sprememb. To pomeni uporabo ustreznih pomožnih snovi, ki stabilizirajo strukturo proteina, in tehnoloških postopkov, ki ne vplivajo na biološko aktivnost proteina (6). Stabilizatorji so lahko zelo različne snovi, ki vključujejo proteine, sladkorje, poliole, aminokislino, kelatorje kovinskih ionov in anorganske soli. Te pomožne snovi stabilizirajo proteine v raztopini in/ali v procesih zamrzovanja in sušenja. Kot stabilizatorji proteinov v suhih oblikah so znani sladkorji (trehaloza, saharoza, maltoza). Določene površinsko aktivne snovi (na primer polisorbati 20) prav tako delujejo kot stabilizatorji za proteine.

Pri razvoju formulacij s proteini naletimo na omejitve in težave, ki so skupne vsem biološkim makromolekulam: velika molekulska masa, kratek plazemski razpolovni čas, fizikalna in kemična nestabilnost (na primer agregiranje, adsorpcija, deaminiranje, oksidacija), encimska razgradnja in imunogenost (6, 7). Te težave lahko premostimo bodisi s spremembami same biomakromolekule (na primer mutacije v proteinu, kovalentna vezava polimerov in priprava polimernih terapevtikov) ali z vgrajevanjem le-te v ustrezen dostavni sistem (npr. mikro/nanodelce, liposome, hidrogel). Pri kovalentni modifikaciji terapevtskih proteinov je najbolj znan pristop pripenjanje verig polietilenglikola (PEG). PEG-iliranje, ki upočasni izločanje skozi ledvice, zmanjša imunogenost, zmanjša agregiranje proteinov in izboljša njihovo termično stabilnost. Nekatera biološka zdravila s PEG-iliranimi biološkimi učinkovinami so danes že v klinični uporabi; številna pa so še v različnih fazah raziskav (8).

Razvoj bioloških zdravil poteka bolj ali manj empirično, od primera do primera, saj ni recepta, kako oblikovati terapevtsko učinkovito formulacijo. Splošno pa velja, da PEG-iliranje uporabimo, če je

protein majhen in se skozi ledvice hitro izloča iz telesa; v nasprotnem primeru – če je protein velik in zelo labilen – je priporočljivo vgrajevanje v nano/mikrodostavne sisteme, saj lahko na tak način zagotovimo stabilnost biomakromolekule in dosežemo njeno nadzorovano sproščanje (2).

4 BIOFARMACEVTIKI NA OSNOVI RNA

Z odkritjem molekul RNA s katalitskim delovanjem v začetku osemdesetih let in odkritjem interferenčne RNA v poznih devetdesetih letih prejšnjega stoletja je postala biološka vloga RNA precej bolj raziskana. Od prej poznane vloge posrednika med genskim zapisom (DNA) in izražanjem proteinov je razvoj prinesel spoznanje, da je RNA dinamična, vsestranska molekula, ki regulira funkcije genov in celic v vseh živih organizmih (9). Napredek je vodil v razmah številnih potencialnih terapevtikov na osnovi RNA. S tem se je razširil nabor do tedaj poznanih terapevtskih molekul in hkrati se je povečalo število potencialnih terapevtskih tarč v organizmu, s tem pa tudi možnosti zdravljenja nekaterih bolezni, za katere prej zdravil nismo poznali. Danes je v kliničnih raziskavah že več kot 50 biofarmaceutikov na osnovi RNA za zdravljenje različnih bolezni, kot so genske bolezni, okužbe z virusom HIV in različne vrste raka (9, 10). Zdravila na osnovi RNA lahko glede na mehanizem njihovega delovanja razdelimo na inhibitorje translacije mRNA (protismiselna RNA), interferenčne RNA (RNAi), molekule RNA s katalitsko aktivnostjo (ribocimi) in molekule RNA, ki se vežejo na proteine in druge molekulske ligande (aptameri) (9). Če bo tehnologija RNAi sledila podobnemu trendu kot tehnologija monoklonskih protiteles in biotehnološko pridobljenih proteinskih učinkovin, lahko v naslednjih letih pričakujemo prihod prvih komercialnih zdravil na osnovi RNAi v klinično uporabo; v naslednjem desetletju pa razvoj tehnološke platforme za proizvodnjo tovrstnih biofarmaceutikov (10).

2.1 Značilnosti RNA in farmacevtskih oblik biofarmaceutikov na osnovi RNA

RNA je močno negativno nabita makromolekula, ki je občutljiva na encimsko razgradnjo. V serumu in celicah najdemo celo vrsto ribonukleaz, ki RNA razgrajujejo, zato je le-ta v *in vivo* okolju nestabilna (9). Po sistemskem vnosu hitro nastopi razgradnja, zato je plazemski razpolovni čas RNA le nekaj minut, privzem v ciljne organe in celice pa posledično majhen. Dokazali so, da je tak način vnosa kljub temu učinkovit za zdravljenje nekaterih bolezni jeter. V večini kliničnih raziskav z biofarmaceutiki na osnovi RNA so zaradi težav s stabilnostjo farmacevtske oblike aplicirali lokalno (na primer intravitrealno, intranazalno, neposredno v kožne lezije), da bi karseda zmanjšali možnost prezgodnje razgradnje terapevtske molekule (11). Glavni izzivi v razvoju formulacij so dandanes povezani z učinkovito dostavo na ciljno mesto, specifičnostjo, stabilnostjo in imunogenostjo. Težavam z nestabilnostjo biofarmaceutikov na osnovi RNA se lahko izognemo s kemičnimi modifikacijami ali z vgrajevanjem v ustrezne nosilne sisteme, saj tako vplivamo na njihove farmakokinetične in farmakodinamične lastnosti ter zmanjšamo potencialno imunogenost (12). Prijemališče delovanja male interferenčne RNA (siRNA) se nahaja znotraj celic, zato je pomembno, da makromolekula preide bariero, ki jo predstavlja celična membrana, in vstopi v znotrajcelični prostor. V citoplazmi ciljnih celic se nahajajo ciljne informacijske RNA (mRNA), ki so prijemališče njenega delovanja. Prehod terapevtske RNA od mesta vnosa do ciljnega mesta lahko dosežemo z razvojem ustreznih dostavnih sistemov.

Za vnos siRNA poznamo virusne in nevirusne vektorje. Uporaba virusnih je povezana z določenim tveganjem za pojav potencialnih toksičnih učinkov, zato so vse bolj aktualni nevirusni vektorji. Le-ti temeljijo na kompleksiranju siRNA s pozitivno nabitimi molekulami (na primer kationskimi peptidi, ki prehajajo skozi celično membrano (CPP), kationskimi polimeri in dendrimeri ter lipidi), konjugatih siRNA z majhnimi molekulami (na primer holesterolom, žolčnimi kislinami, lipidi), polimeri, protitelesi ali RNA ter vgrajevanju siRNA v nanometriške dostavne sisteme (na primer liposome, micelle, mikroemulzije, trdne lipidne nanodelce) (12–14). Pri izbiri ustrezne farmacevtske oblike oziroma dostavnega sistema za vnos siRNA v organizem moramo upoštevati naslednje dejavnike: (i) lastnosti siRNA, (ii) vrsto ciljnih celic in (iii) pot vnosa v organizem (13).

5 KAKO SE IZOGNITI PARENTERALNEMU VNOSU?

Intrinzične lastnosti biofarmacevtikov so razlog, da je parentralni vnos biofarmacevtikov najbolj razširjen način aplikacije, a z vidika bolnika neprijeten, saj je invaziven. To je razlog, da potekajo številne raziskave, kako se izogniti parenteralnemu dajanju in vnesti biofarmacevtik po alternativni poti v terapevtski koncentraciji v organizem. Najbolj aktualne neparenteralne poti vnosa so peroralno, nazalno, pulmonalno in transdermalno dajanje (15).

5.1 Peroralno dajanje

Peroralno dajanje zdravil je z vidika bolnika najbolj sprejemljiv in zaželen način vnosa zdravil v organizem. V primeru biofarmacevtikov je tak način vnosa le omejeno uporaben, saj so biomakromolekule v gastrointestinalnem traktu običajno nestabilne, obseg absorpcije pa je zaradi velike molekulske mase majhen (16). Kljub temu potekajo intenzivne raziskave na področju razvoja bolnikom prijaznih peroralnih dostavnih sistemov za vnos biofarmacevtikov, zlasti proteinov. Cilj razvoja je povečati biološko uporabnost proteinskih učinkovin po peroralnem vnosu z 1 % na 30–50 % (17). Tehnološki pristopi, ki so danes aktualni za peroralni vnos proteinskih učinkovin, vključujejo kemične modifikacije proteinskih molekul, uporabo nosilnih sistemov, proteaznih inhibitorjev, pospeševalcev absorpcije in mukoadhezivnih polimerov. Med sodobnimi dostavnimi sistemi so aktualni nanometrski dostavni sistemi, ki omogočajo prehajanje bioloških barrier, zaščito vgrajene učinkovine, dostavo na želeno mesto v organizmu in nadzorovano sproščanje (16, 17). Potrebno pa je poudariti, da tudi z uporabo nanometrskih dostavnih sistemov do danes še niso uspeli razviti farmacevtske oblike, s katero bi se približali ciljni biološki uporabnosti.

5.2 Pulmonalno dajanje

Med neparenteralnimi načini vnosa biofarmacevtikov v organizem lahko največjo biološko uporabnost dosežemo prav s pulmonalnim vnosem, ki je aktualen tako za lokalno zdravljenje pljučnih bolezni (na primer astme) kot tudi za sistemsko zdravljenje številnih drugih bolezni, kjer predstavlja alternativo parenteralnemu dajanju biofarmacevtikov (1, 5). Biološka uporabnost peptidov in proteinov, ki jih vnesemo s pulmonalnim dajanjem, je 10- do 200-krat večja v primerjavi z ostalimi neparenteralnimi načini aplikacije (1). S pulmonalno dostavo biofarmacevtikov lahko lokalno dostavimo visoke odmerke ob hkrati zmanjšani verjetnosti za pojav sistemskih neželenih učinkov. Velika površina pljuč, tanek alveolarni epitelij in dobra prekrvitev so dejavniki, ki jih

izkoriščamo pri sistemskem vnosu biofarmaceutikov. Le-ti se lahko iz pljuč hitro absorbirajo v sistemski krvni obtok, hkrati pa se s takšnim vnosom izognemo razgradnji v prebavnem traktu ter učinku prvega prehoda, ki spremljata peroralni vnos biofarmaceutikov.

Temeljni izzivi dostave v pljuča so: (i) razvoj ustreznih formulacij, ki zagotavljajo ohranjeno biološko aktivnost biofarmaceutika in omogočajo dostavo v spodnji dihalni trakt, (ii) premagovanje mehanizmov, ki skrbijo za naravno odstranjevanje eksogenih snovi iz pljuč, in (iii) premostitev alveolarnega epitelija v primeru sistema vnosa biofarmaceutikov (5).

Pri razvoju formulacij za inhaliranje je bistvenega pomena, da zagotovimo ustrezno velikosti delcev oziroma kapljic (1–5 μm), saj le tako formulacija doseže spodnje dihalne poti (5). Zaradi velikih kohezivskih sil med mikrometrskimi delci so le-ti nagnjeni k združevanju. Z ustrezno sestavo farmacevtske oblike moramo karseda zmanjšati verjetnost ireverzibilnega združevanja delcev. Izogniti se moramo tudi tehnološkemu dejavniku, ki vodi v fizikalno-kemijsko nestabilnost biofarmaceutikov, kar ima za posledico zmanjšanje biološkega učinka in/ali težave z varnostjo. Dalj časa stabilne farmacevtske oblike biofarmaceutikov lahko izdelamo z uporabo ustreznih pomožnih snovi in s pretvorbo v suho obliko. Najpogostejša tehnološka postopka sušenja biofarmaceutikov sta liofilizacija in sušenje z razprševanjem, ki je metoda izbora za sušenje proteinov za pulmonalno dajanje. Danes se uveljavlja tudi metoda sušenja z uporabo superkritičnih tekočin. Zelo pomembna je tudi izbira pomožnih snovi, ki stabilizirajo strukturo biofarmaceutika, ko je le-ta izpostavljen različnim stresnim dejavnikom. Glavna vrsta pomožnih snovi v farmacevtskih oblikah za inhaliranje so sladkorji in poliol (laktoza, manitol, glukoza) (19). Ostale pomožne snovi, ki so prisotne v manjših koncentracijah, so snovi za uravnavanje pH (NaCl, HCl, natrijev citrat, citronska kislina, vinska kislina, natrijev fosfat, trometamol), površinsko aktivne snovi (estri sorbitana, polisorbitati, sojin lecitin) in konzervansi (benzalkonijev klorid, EDTA, parabeni) (5).

Odstranjevanje formulacije z mukociliarnim transportom, makrofagi in proteazami v alveolih zmanjša lokalno koncentracijo terapevtske biomakromolekule. Prehitremu odstranjevanju iz pljuč z mukociliarnim transportom in makrofagi se lahko izognemo z uporabo nanodostavnih sistemov, zlasti liposomov. Le-te vnašamo v pljuča običajno v obliki koloidnih disperzij z nebuliranjem, raziskujejo pa tudi pripravo trdnih farmacevtskih oblik, kjer nanodostavni sistem vključimo v mikrodolgec iz ustreznega nosilnega materiala (na primer laktoze) in le-te z inhaliranjem vnesemo v pljuča (1). Delovanje encimov (peptidaz, proteaz) na dostavljene biofarmaceutike lahko zmanjšamo ali preprečimo z vključevanjem proteaznih inhibitorjev, kar pa je lahko povezano z nastopom neželenih učinkov zaradi porušanja naravnega ravnovesja med proteazami in njihovimi inhibitorji v pljučih (5).

Za uspešen sistemski vnos skozi pljuča morajo biofarmaceutiki preiti bariero, ki jo predstavlja alveolarni epitelij. Absorpcijskih mehanizmov, ki omogočajo transport biofarmaceutikov v krvni obtok, danes še ne poznamo popolnoma. Absorpcijo lahko izboljšamo z uporabo pospeševalcev absorpcije, katerih mehanizem delovanja temelji na ireverzibilni spremembi prepustnosti alveolarnega epitelija, kar lahko vodi v pojav okužb, absorpcijo alergenov in večjih delcev v centralni krvni obtok, zato je varnost uporabe vprašljiva. Glavni razredi pospeševalcev absorpcije so površinsko aktivne snovi (žolčne kisline in njihove soli), liposomi, ciklodekstrini in hitosan. Absorpcijo biofarmaceutikov lahko izboljšamo tudi s pripravo fuzijskih proteinov (s proteini, za

katere so izraženi receptorji na celicah alveolarnega epitelija). Povečanje privzema v krvni obtok je tako posledica receptorske endocitoze. Po vstopu v krvni obtok moramo zagotoviti ustrezen razpolovni čas biofarmacevtika, saj lahko le tako nastopi terapevtski učinek. Podobno kot v primeru parenteralnih farmacevtskih oblik so tudi pri pulmonalnih aktualni tehnološki pristopi, kot so PEG-iliranje, hiperglikozilacija, aciliranje in priprava fuzijskih derivatov proteinov z Fc regijo protiteles (5).

Pulmonalna dostava je danes aktualno področje raziskav zlasti za vnos inzulina in antigenov za pulmonalno vakcinacijo. Prvi inzulin za pulmonalno dajanje (Exubera[®]) so leta 2008 umaknili s tržišča zaradi pojava neželenih učinkov. Trenutno je v zadnji fazi kliničnih raziskav zdravilo Afrezza[®], ki prav tako vsebuje inzulin za pulmonalno dajanje. Če bo to zdravilo dobilo dovoljenje za promet, lahko v naslednjih letih pričakujemo tudi prihod zdravil za pulmonalni vnos drugih proteinov (na primer kalcitonina, humanega rastnega hormona, eritropoetina) (5).

5.3 Nazalno dajanje

Prednosti sluznice nosne votline kot mesta vnosa zdravilnih učinkovin so dobra prekrvljenost, dobra prepustnost in visoka absorpcijska kapaciteta, odsotnost metabolizma prvega prehoda in izražen potencial za dostavo učinkovin v centralni živčni sistem. Kljub tem prednostim je običajno biološka uporabnost biofarmacevtikov po nazalni aplikaciji majhna (< 1 %). Prisotnost bogatega limfatičnega tkiva v nosni votlini je razlog, da je tak način aplikacije primeren za vnos vakcin. Potreben odmerek, da izzovemo imunski odziv, pa je manjši kot v primeru peroralnih vakcin. Za dostavo biofarmacevtikov skozi respiratorni epitelij so se izkazali kot obetavni nanodostavni sistemi z mukoadhezivnimi lastnostmi ali s povečano sposobnostjo prehajanja skozi epitelij v nosni votlini (15, 20).

Razvoj formulacij in dostavnih sistemov za nazalno dajanje je aktualno področje raziskav za potencialne biofarmacevtike za zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni, saj z demografskimi spremembami družbe pojavnost nevrodegenerativnih bolezni narašča. Prav pojav novih bioloških makromolekul obeta bolj učinkovito zdravljenje teh bolezni. Njihova dostava do mesta delovanja, ki se nahaja v centralnem živčnem sistemu, je velik izziv farmacevtske tehnologije – da bi dosegli terapevtske učinke, potrebujemo učinkovite dostavne sisteme, ki bodo dostavili učinkovine na mesto njihovega delovanja. Biofarmacevtiki na tem področju prinašajo nove izzive in priložnost za učinkovitejše zdravljenje bolezni centralnega živčnega sistema. Zelo aktualen je razvoj nanodostavnih sistemov, ki omogočijo prenos biomakromolekul skozi krvno-možgansko bariero (20).

5.4 Transdermalno dajanje

Glede na sprejemljivost za bolnike sledi peroralnemu vnosu transdermalna aplikacija zdravil. Poleg tega je prednost tudi manjša encimska aktivnost. Kljub temu je na tržišču malo zdravil za transdermalno dajanje. Razlog je zelo učinkovita bariera za dostavo, ki jo predstavlja rožena plast kože. Njena molekularna sestava in zgradba omogočata pasivno prehajanje le majhnim, lipofilnim molekulam. Torej je vnos biofarmacevtikov v in skozi kožo brez dodatne gonilne sile ali poškodb rožene plasti nemogoč. Tako poteka intenziven razvoj tehnologij za transdermalno dostavo

hidrofilnih učinkovin in biomakromolekul. Pristopi, ki omogočajo transdermalni vnos biofarmaceutikov, so: uporaba kemičnih pospeševalcev absorpcije, iontoforeza, uporaba mikroigel, sonoforeza, laserska ablacija, termična ablacija, radiofrekvenčna ablacija, elektroporacija in jet injektorji (21, 22). Kemični pospeševalci absorpcije spremenijo strukturo lipidov v roženi plasti in tako povečajo permeabilnost kože za biomakromolekule. Iontoforeza in elektroporacija temeljita na uporabi električnega toka, kar poveča dostavo učinkovin skozi kožo (23). Uporaba mikroigel je fizikalna metoda, ki predstavlja most med klasično podkožno aplikacijo in pasivnim vnosom z uporabo transdermalnih obližev. Tehnološki pristop, ki ga uporabimo, mora le reverzibilno spremeniti barierne lastnosti rožene plasti, uporaba mora biti neboleča, kar zmanjša verjetnost pojava draženja in infekcij (primerno za kronično zdravljenje) (5).

6 BIOLOŠKI (BIOMIMETIČNI) DOSTAVNI SISTEMI

V naravi najdemo različne »biološke delce«, ki so visokospecializirani za opravljanje določene funkcije *in vivo* in imajo lastnosti, ki so zaželeni pri nosilcih zdravilnih učinkovin, zato so v farmaciji zanimivi kot potencialni dostavni sistemi, zlasti za biološke makromolekule, ki so z vidika dostave zahtevnejše kot klasične sintezne nizkomolekularne učinkovine. Glede na naravo so ali posnemajo mikroorganizme ali sesalske celice in omogočajo vnos terapevtskih molekul v organizem, saj imajo razvite lastne transportne mehanizme. Le-ti omogočajo prenos terapevtskih molekul do ciljnega mesta. Ta skupina potencialnih dostavnih sistemov je heterogena in vključuje različne vrste virusov, bakterij in sesalskih celic. Patogeni, kot so virusi in bakterije, so razvili edinstvene mehanizme, da se izognejo imunskemu sistemu gostitelja in vstopijo v ciljne celice, prav te mehanizme lahko izkoriščamo za vnos terapevtskih biomakromolekul. V razvoju sodobnih dostavnih sistemov posnemajo ali modificirajo naravne »biološke delce« s ciljem izdelati učinkovit dostavni sistem za terapevtske biomakromolekule (DNA, vaccine, peptide, proteine). Med biološke dostavne sisteme uvrščamo dostavne sisteme na osnovi:

- bakterij: rekombinantne bakterije, bakterije, ki ciljajo tumorje, bakterije kot nosilci nanodelcev, nežive bakterije (na primer »bakterijski duhovi«),
- virusov: virusni genski vektorji, virusom podobni delci, virosomi in
- celic: rdeče krvne celice, makrofagi, limfociti.

Nekateri od teh dostavnih sistemov so že v fazah kliničnih testiranj, večina pa je v začetnih fazah razvoja (24).

7 SKLEP

Nabor bioloških molekul s potencialnim terapevtskim delovanjem se je z napredkom sodobnih molekularnih orodij zelo povečal, zato tudi število biofarmaceutikov na tržišču iz leta v leto narašča. Med farmacevtskimi oblikami bioloških zdravil, ki so danes na tržišču, prevladujejo injekcije in infuzije, kljub intenzivnemu razvoju, ki poteka na področju sodobnih dostavnih sistemov. Šele uporaba bioloških zdravil na osnovi sodobnih dostavnih sistemov bo omogočila popolno izkoriščenje potenciala teh bioloških makromolekul *in vivo*, tj. velike učinkovitosti in selektivnosti delovanja. Glede na dosedanje rezultate raziskav in razvoja lahko v prihodnje utemeljeno

pričakujemo razmah bolniku prijaznih sodobnih dostavnih sistemov za neparenteralni vnos biofarmacevikov.

8 LITERATURA

1. Wan F, Horn Moller E, Yang M, Jorgensen L. Formulation technologies to overcome unfavorable properties of peptides and proteins for pulmonary delivery. *Drug Discov Today Technol* 2012; 9 (2): e141–e146.
2. Pisal DS, Kosloski MP, Balu-Iyer SV. Delivery of therapeutic proteins. *J Pharm Sci* 2010; 99 (6): 2557–2575.
3. He H, Dong W, Gong J, Wang J, Yang VC. Developing macromolecular therapeutics: the future drug-of-choice. *Front Chem Eng China* 2010; 4(1): 10–17.
4. European Medicines Agency. European public assessment reports. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/epar_search.jsp&mid=WC0b01ac058001d124. Datum dostopa: 13. 05. 2014.
5. Depreter F, Pilcer G, Amighi K. Inhaled proteins: Challenges and perspectives. *Int J Pharm* 2013; 447 (1–2): 251–280.
6. Kamerzell TJ, Esfandiary R, Joshi SB, Middaugh CR, Volkin DB. Protein-excipient interactions: Mechanisms and biophysical characterization applied to protein formulation development. *Adv Drug Del Rev* 2011; 63: 1118–1159.
7. Fjokjaer S, Otzen DE. Protein drug stability: A formulation challenge. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 298–306.
8. Pasut G, Veronese FM. State of the art in PEGylation: The great versatility achieved after forty years of research. *J Control Release* 2012; 161: 461–472.
9. Burnett JC, Rossi JJ. RNA-based therapeutics: Current progress and future prospects. *Chem Biol* 2012; 19 (1): 60–71.
10. Tracy MA. RNA interference-based therapeutics and diagnostics. *Drug Deliv Transl Res* 2014; 4: 3.
11. Kole R, Krainer AR, Altman S. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11: 125–140.
12. Wan C, Allen TM, Cullis PR. Lipid nanoparticle delivery systems for siRNA-based therapeutics. *Drug Deliv Transl Res* 2014; 4: 74–83.
13. Wang J, Lu Z, Wientjes G, Au JLS. Delivery of siRNA therapeutics: Barriers and carriers. *AAPS J* 2010; 12 (4): 492–503.
14. Zhou Y, Zhang C, Liang W. Development of RNAi technology for targeted therapy – A track of siRNA based agents to RNAi therapeutics. *J Control Release* 2014; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.044>.
15. Kiparissides C, Kammona O. Nanoscale carriers for targeted delivery of drugs and therapeutic biomolecules. *Can J Chem Eng* 2013; 91: 638–651.
16. Singh R, Singh S, Lillard JW. Past, present, and future technologies for oral delivery of therapeutic proteins. *J Pharm Sci* 2008; 97 (7): 2497–2523.
17. Yun Y, Cho YW, Park K. Nanoparticles for oral delivery: Targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery. *Adv Drug Del Rev* 2013; 65 (6): 822–832.
18. Pilcer G, Amighi K. Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery. *Int J Pharm* 2010; 392: 1–19.
19. Pilcer G, Amighi K. Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery. *Int J Pharm* 2010; 392: 1–19.
20. Shah L, Yadav S, Amiji M. Nanotechnology for CNS delivery of bio-therapeutic agents. *Drug Deliv Transl Res* 2013; 3: 336–351.
21. Kalluri H, Banga AK. Transdermal delivery of proteins. *AAPS PharmSciTech* 2011; 12 (1): 431–441.
22. Gratieri T, Alberti I, Lapteva M, Kalia YN. Next generation intra- and transdermal therapeutic systems: Using non- and minimally-invasive technologies to increase drug delivery into and across the skin. *Eur J Pharm Sci* 2013; 50: 609–622.
23. Kalia YN, Naik A, Garrison J, Guy RH. Iontophoretic drug delivery. *Adv Drug Del Rev* 2004; 56: 619–658.
24. Yoo JW, Irvine DJ, Discher DE, Mitragotri S. Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers. *Nat Rev Drug Discov* 2011; 10: 521–535.

Biološka zdravila za zdravljenje endokrinoloških bolezni

Doc. dr. Tomaž Bratkovič, mag. farm.
Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani

Povzetek

Endokrinološke bolezni, kot so sladkorna bolezen, *diabetes insipidus*, zaostajanje v telesnem razvoju zaradi pomanjkanja endogenega ravnega hormona in neplodnost zaradi neodzivnosti na endogeni gonadoliberin, že desetletja zdravimo na enak način kot danes. Nadomestno zdravljenje s peptidnimi in proteinskimi hormoni pogosto ostaja osrednji način spopadanja z boleznimi. Pomemben napredek smo v zadnjih 40 letih dosegli na področjih varnosti in dostopnosti zdravil, saj so hormone, ki so jih pred tem pridobivali z izolacijo iz živalskih ali človeških tkiv, zamenjale sintezne ali rekombinantne učinkovine. Kemijska sinteza in gensko inženirstvo dopuščata tudi vnašanje strukturnih sprememb v humane hormone, s čimer lahko izboljšamo farmakokinetične in farmakodinamične lastnosti učinkovin s končnim ciljem optimalnega nadzora bolezni in izboljšanja kakovosti bolnikovega življenja.

Vsebina

- 1 UVOD
- 2 BIOLOŠKA ZDRAVILA ZA ZDRAVLJENJE SLADKORNE BOLEZNI
 - 2.1 Inzulini
 - 2.2 Agonisti receptorja za glukagonu podoben peptid-1
 - 2.3 Pramlintid
 - 2.4 Glukagon
- 3 BIOLOŠKA ZDRAVILA ZA ZDRAVLJENJE OSTEOPOROZE
 - 3.1 Kalcitonini
 - 3.2 Teriparatid
 - 3.3 Denosumab
- 4 BIOLOŠKA ZDRAVILA ZA ZDRAVLJENJE MOTENJ V RASTI
 - 4.1 Somatropin
 - 4.2 Mekasermin
- 5 BIOLOŠKA ZDRAVILA ZA ZDRAVLJENJE NEPLODNOSTI
 - 5.1 Analogi gonadoliberina
 - 5.2 Gonadotropini
- 6 BIOLOŠKA ZDRAVILA ZA ZDRAVLJENJE AKROMEGALIJE
 - 6.1 Analogi somatostatina
 - 6.2 Pegvisomant
- 7 OSTALE SKUPINE
 - 7.1 Analogi vazopresina
 - 7.2 Oksitocin in atosiban

8 SKLEP

9 LITERATURA

1 UVOD

Številne rekombinantne in sintezne biološke učinkovine so identične endogenim peptidnim hormonom ali predstavljajo njihove analoge z izboljšanimi lastnostmi, kot sta podaljšana biološka razpolovna doba (na račun metabolične stabilnosti, večjega hidrodinamskega volumna ali vezave na plazemske proteine) in višja jakost. V nekaterih primerih je mogoče s strukturnimi spremembami agoniste pretvoriti v antagoniste ustreznih receptorjev. V prispevku so predstavljene učinkovine za zdravljenje bolezni, ki so posledica kroničnega pomanjkanja (npr. sladkorna bolezen, nizka rast, hipogonadotropni hipogonadizem in *diabetes insipidus*) ali čezmernega nastajanja in sproščanja endogenih hormonov (npr. akromegalija). Z drugimi želimo sprožiti ali zavreti specifične fiziološke procese za doseg ugodnega terapijskega izida, čeprav bolezensko stanje ni neposredna posledica napak v signalizaciji endogenega hormona (npr. osteoporoza).

2 BIOLOŠKA ZDRAVILA ZA ZDRAVLJENJE SLADKORNE BOLEZNI

Sladkorna bolezen (*diabetes mellitus*) je stanje kronične hiperglikemije kot posledice pomanjkanja anabolnega hormona inzulina (tip 1) ali zmanjšane odzivnosti tkiv na inzulini (tip 2). Značilni simptomi so poliurija, polidipsija in polifagija. Nezmožnost nadzora koncentracije glukoze v krvi s časom vodi do poškodb žilnih sten in zapletov, ki prizadenejo kakovost bolnikovega življenja ali ga celo resno ogrožajo, zato je zgodnji začetek zdravljenja bistvenega pomena (1). Zlasti pri sladkorni bolezni tipa 1 so mogoči tudi hudi akutni zapleti. Že devet desetletij predstavlja nadomestno zdravljenje z inzulinom osrednji farmakološki terapijski pristop, v novejšem času pa so bolnikom s sladkorno boleznijo tipa 2 na voljo tudi druga biološka in sintezna zdravila.

2.1 Inzulini

Kmalu po odkritju inzulina v zgodnjih dvajsetih letih prejšnjega stoletja so doumeli tudi njegov terapijski potencial. Inzulin velja za prvo proteinsko učinkovino: pred razmahom genskega inženirstva so ga pridobivali z izolacijo iz govejih in prašičjih trebušnih slinavk. Zaradi majhne velikosti inzulini z mesta aplikacije hitro prehaja v krvni obtok, od koder se z glomerulno filtracijo tudi hitro odstranjuje in učinki so razmeroma kratkotrajni. Z ustrešno formulacijo (kristalizacijo s cinkovimi ioni in/ali bazičnim proteinom protaminom) so uspeli pripraviti oblike z zadržanim sproščanjem (inzulini NPH, lente in ultralente), ki so v rabi še danes. Seveda v teh oblikah danes uporabljamo izključno rekombinantni humani inzulini, izraženi v bakteriji *Escherichia coli* ali kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*. S tehnologijo rekombinantne DNA so pripravili tudi analoge humanega inzulina z izboljšanimi farmakokinetičnimi lastnostmi. Inzulini injiciramo v podkožno tkivo, stegno, nadlaket ali sprednji del pasu.

Pri inzulinskem zdravljenju stremimo k posnemanju plazemskih nivojev endogenega hormona, ki je odziven na ogljikove hidrate, zaužite s hrano. Sladkorni bolniki tako potrebujejo odmerek inzulina z zadržanim sproščanjem za vzdrževanje bazalnega nivoja med obroki in bolusni odmerek inzulina s hitrim sproščanjem ob obroku (preglednica 1).

Preglednica 1: Skupine inzulinskih zdravil (povzeto po (2))

Vrsta inzulina	Čas do nastopa učinka	Čas dosega maksimalnega učinka	Trajanje učinka	Opomba
Hitro delujoči	5–15 min	30–60 min	2–5 h	Injiciranje tik pred obrokom
Kratko delujoči (humani inzulin)	30 min	1–3 h	4–8 h	Injiciranje 15–30 min pred obrokom
Srednjedolgo delujoči	1–2 h (NPH, lente) 2–3 h (ultralente)	4–8 h 4–8 h	8–12 h 8–24 h	Za nadzor plazemske glukoze med obroki; možno kombiniranje s kratko delujočimi inzulinimi
Dolgo delujoči	30–60 min	/	16–24 h	Injiciranje enkrat dnevno

Analogi humanega inzulina glulizin, lispro in aspart izkazujejo manjšo težnjo po združevanju v heksamere v primerjavi z nativnim hormonom in se zato hitreje absorbirajo z mesta aplikacije. Namenjeni so urejanju prandialne glikemije. Dolgo delujoči rekombinantni analogi humanega inzulina (t. i. bazalni inzulinimi) so detemir, degludek in glargin. Detemir in degludek sta kemijsko spremenjena: konjugirana sta z maščobno kislino. Detemir se v plazmi veže na albumin, kar podaljša njegovo razpolovno dobo. Molekule degludeka se povezujejo v multiheksamerne strukture, od koder se biološko aktivni monomeri počasi sproščajo. Glargin je zaradi sprememb v aminokislinski sestavi bolj bazičen kot nativni hormon. Formuliran je v obliki kisle raztopine, ob injiciranju v podkožje pri fiziološki vrednosti pH pa tvori mikrokristale, od koder se le počasi sprošča.

2.2 Agonisti receptorja za glukagonu podoben peptid 1

Glukagonu podoben peptid 1 (*glucagon-like peptide-1*, GLP-1) sodi med inkretine, peptidne hormone, ki nastajajo v prebavnem traktu in urejajo delovanje trebušne slinavke. GLP-1 spodbuja proliferacijo celic beta in izločanje inzulina, zavira izločanje glukagona, upočasnjuje praznjenje želodca in znižuje apetit (3). Biološka razpolovna doba GLP-1 znaša zaradi nizke molekulske mase in metabolične nestabilnosti vsega dve minuti, zato je terapevtsko neuporaben. Trenutno so v EU registrirani trije sintezni analogi GLP-1 (eksenatid, liksisenatid in liraglutid) z izboljšanimi farmakokinetičnimi lastnostmi. Indicirani so za doseganje urejenosti glikemije pri odraslih s sladkorno boleznijo tipa 2 v kombinaciji s peroralnimi antidiabetiki (bigvanidi ali sulfonilsečninami) ali bazalnim inzulinom, če zelenih rezultatov ne dosežemo zgolj z navedenimi zdravili in s telesno aktivnostjo ter primerno prehrano. Apliciramo jih subkutano, eksenatid in liksisenatid enkrat, liraglutid pa dvakrat dnevno. Učinkovito znižajo plazemsko koncentracijo glukoze, pomagajo pri vzdrževanju telesne mase in ne izzovejo hipoglikemije (4).

2.3 Pramlintid

Pramlintid je sintezni analog amilina, nevroendokrinega peptidnega hormona, ki ga skupaj z inzulinom izločajo celice beta trebušne slinavke. Zavira praznjenje želodca in sproščanje glukagona ter izzove občutek sitosti. V ZDA ga uporabljajo za podporno zdravljenje sladkorne bolezni tipov 1 in 2, če s prandialnim inzulinom ne uspejo zagotoviti ustrezne glikemije (5). V EU nima dovoljenja za uporabo. Apliciramo ga subkutano tik pred obrokom.

2.4 Glukagon

Glukagon je katabolni peptidni hormon, ki ga izločajo alfa celice trebušne slinavke. Je fiziološki antagonist inzulina in primarno deluje na jetra, kjer izzove glikogenolizo in sproščanje glukoze v krvni obtok. Rekombinantni glukagon uporabljamo ob hipoglikemičnih reakcijah, do katerih pride zaradi predoziranja z insulinom ali s peroralnimi antidiabetiki, a le, če imajo jetra zadostno zalogo glikogena. Apliciramo ga intramuskularno ali subkutano, redkeje intravensko (6).

3 BIOLOŠKA ZDRAVILA ZA ZDRAVLJENJE OSTEOPOROZE

Osteoporoza je napredujoča bolezen kosti, za katero so značilni zmanjšanje mineralne kostne gostote, spremenjena struktura kostnine in nagnjenost k zlomom. Nastopi kot posledica porušenega ravnovesja med izgradnjo in razgradnjo kostnine (t. i. remodelacija kostnine), čemur lahko botrujejo številni vzroki, npr. hormonske in starostne spremembe, genetski ter okoljski dejavniki. Kostne celice, ki razgrajujejo kostnino, imenujemo osteoklasti, gradijo pa jo osteoblasti. Farmakološki načini zdravljenja slonijo pretežno na omejevanju resorpcije kostnine, tj. zaviranju aktivnosti osteoklastov, le teriparatid ob ustreznem terapevtskem režimu izkazuje anaboličen učinek na kosti.

3.1 Kalcitonini

Kalcitonin je ščitnični hormon, ki se sprošča v kri kot odziv na zvišano plazemsko koncentracijo kalcijevih ionov. Zavira zorenje osteoklastov in njihovo aktivnost, spodbuja izločanje kalcijevih ionov v ledvicah ter zavira njihovo absorpcijo v prebavnem traktu. Pri zdravljenju osteoporoze izkoriščamo delovanje kalcitonina na kosti, pri preprečevanju hiperkalcemij (zlasti pri rakavih obolenjih) so zanimivi tudi ostali fiziološki učinki.

Terapevtsko uporabljamo predvsem lososov kalcitonin, ki v primerjavi s humanim izkazuje daljše delovanje in večjo jakost. Če se bolnikov imunski sistem na lososov kalcitonin odzove s tvorbo protiteles, ga zamenjamo s humanim. Kalcitonine izdelujemo sintezno ali jih izražamo v bakteriji *E. coli* kot rekombinantne peptide. Apliciramo jih intramuskularno, subkutano ali v obliki nosnega pršila, v razvoju pa je tudi peroralni kalcitonin za zdravljenje in preprečevanje osteoporoze. Kalcitonin izkazuje tudi analgetični učinek, ki ga izkoriščamo pri obvladovanju bolečin zaradi zlomov hrbteničnih vretenc (7).

3.2 Teriparatid

Teriparatid je rekombinantni N-končni fragment humanega paratiroidnega hormona. Slednji je fiziološki antagonist kalcitonina, v kri se sprošča iz občitnične žleze kot odziv na znižano plazemsko koncentracijo kalcijevih ionov. V kosteh posredno spodbuja nastajanje osteoklastov ter okrepi absorpcijo kalcijevih ionov v prebavnem traktu in ledvičnih tubulih.

Ugotovili so, da z intermitentno subkutano aplikacijo teriparatida bolj spodbujamo osteoblaste kot osteoklaste. Tako je pri enkrat dnevnem prejemanju teriparatida neto učinek na kosti anabolen (7). Indiciran je za zdravljenje osteoporoze pri ženskah v postmenopavzalnem obdobju, ki imajo povečano tveganje za zlome, in bolnikih, ki so neodzivni na ali ne prenašajo ostalih načinov zdravljenja.

3.3 Denosumab

Denosumab je humano monoklonsko protitelo, usmerjeno proti RANKL (*receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*). RANKL z vezavo na RANK, receptor na preosteoklastih, spodbudi diferenciacijo prekuzorskih celic o osteoklastov. Denosumab zavira zorenje in aktivacijo osteoklastov in upočasnjuje napredovanje osteoporoze (7). Zdravilo apliciramo subkutano v polletnih intervalih. Indicirano je za zdravljenje osteoporoze pri ženskah v postmenopavzi ter moških, ki so zaradi antiandrogenega zdravljenja raka prostate v povečani nevarnosti zlomov hrbteničnih vretenc.

4 BIOLOŠKA ZDRAVILA ZA ZDRAVLJENJE MOTENJ V RASTI

Pomanjkanje endogenega rastnega hormona vodi v motnje rasti pri otrocih in mladostnikih. Vse od šestdesetih let dvajsetega stoletja tovrstne razvojne motnje blažimo z nadomestnim zdravljenjem. Sprva so rastni hormon izolirali iz hipofize umrlih, a je takšno pridobivanje neekonomično, ne zadosti potrebam po zdravilu, predvsem pa je sporno z vidika varnosti, saj so dokumentirali primere prenosa Creutzfeldt-Jakobove bolezni na prejemnike zdravila. Od sredine osemdesetih let prejšnjega stoletja zato terapevtsko uporabljamo izključno rekombinantni rastni hormon, imenovan somatropin (8).

4.1 Somatropin

Rastni hormon (hGH) je mitogen, saj spodbuja proliferacijo celic, a tudi njihovo rast in regeneracijo tkiv. Uravnava številne metabolne procese (okrepi lipolizo in sintezo proteinov). Na večino tkiv deluje anabolno posredno, preko spodbujanja izločanja (jetrnih) rastnih dejavnikov, imenovanih somatomedini. Rekombinantni rastni hormon (somatropin) uporabljamo pri pomanjkanju endogenega hGH, zlasti pri otrocih, ki izkazujejo nizko postavbo za svojo starost, in pri kronični ledvični insuficienci. Druge indikacije so še Turnerjev in Prader-Willijev sindrom ter idiopatska nizka rast (8, 9). Somatropin injiciramo subkutano enkrat dnevno, pred spanjem.

Zdravila s somatropinom so bila prva podobna biološka zdravila z dovoljenjem za promet v Evropski uniji, njihov vstop na tržišče sega v leto 2006. Omeniti velja še pogosto zlorabo somatropina v doping in za pomlajevanje (10).

4.2 Mekasermin

Inzulinu podoben rastni dejavnik 1 (*insulin-like growth factor 1*, IGF-1) je najpomembnejši somatomedin. Rekombinantni IGF-1 imenujemo mekasermin in ima v Evropski uniji status zdravila sirote. Formuliran je v obliki kompleksa z IGFBP-3 (*insulin-like growth factor binding protein 3*), kar omogoča podaljšanje biološke razpolovne dobe. Osnovna indikacija je pomanjkanje endogenega IGF-1, običajno zaradi mutacije v samem genu za IGF-1, redkeje zaradi neodzivnosti na endogeni rastni hormon (npr. zaradi mutacije v receptorju za hGH (Laronov sindrom) ali zaradi pojava nevtralizacijskih protiteles proti hGH pri bolnikih, ki so jih prvotno zdravili s somatropinom) (9, 11). Apliciramo ga subkutano dvakrat dnevno.

5 BIOLOŠKA ZDRAVILA ZA ZDRAVLJENJE NEPLODNOSTI

Hormonsko neravnovesje na ravni gonadoliberina ali gonadotropnih hormonov je pogost vzrok neplodnosti. Gonadoliberin, nevrohormon hipotalamusa, spodbuja sproščanje gonadotropinov (folikle spodbujajočega hormona (FSH)) in luteinizirajočega hormona (LH; pri moških: intersticijske celice spodbujajočega hormona (ICSH)) iz hipofize, ti pa delujejo na spolne žleze, kjer uravnavajo nastajanje in sproščanje steroidnih spolnih hormonov (estrogenov ali testosterona). Neodzivnost na endogeni gonadoliberin imenujemo hipogonadotropni hipogonadizem, neodzivnost spolnih žlez na

gonadotropine pa hipergonadotropni hipogonadizem. Vzroki obeh stanj so lahko prirojeni ali pridobljeni. Ne glede na vrsto hipogonadizma so simptomi podobni: do pojava sekundarnih spolnih znakov in spolne zrelosti pride relativno pozno, če hipogonadizem nastopi pri odraslih osebah, se med drugim zrcali kot neplodnost in upad libida. Zdravljenje običajno poteka v obliki nadomestne terapije s spolnimi hormoni ali z modulatorji estrogenskih receptorjev, kot je klomifen, neplodnost zaradi hipogonadotropnega hipogonadizma pa je moč zdraviti tudi z gonadotropini.

5.1 Analogi gonadoliberina

Gonadoliberin je peptidni nevrohormon. Kot učinkovine uporabljamo njegove sintezne analoge, ki so metabolično bolj stabilni in delujejo kot agonisti (npr. buserelin, goserelin in levprorelin) ali antagonisti gonadoliberinskega receptorja (npr. abareliks, cetoreliks in ganireliks). Zanimivo tako antagonisti kot agonisti (v primeru kontinuirane aplikacije) izkazujejo enak učinek, tj. zavirajo sproščanje gonadotropinov in posledično nastajanje steroidnih spolnih hormonov. Tako so v obliki subkutanih ali intramuskularnih injekcij, subkutanih implantatov ali nosnih pršil indicirani za zdravljenje vseh tistih bolezenskih stanj, ki jih povezujemo s previsokimi plazemskimi koncentracijami steroidnih spolnih hormonov (za paliativno zdravljenje raka prostate, odzivnega na testosteron, in raka dojke, odzivnega na estrogene, za zdravljenje endometrioz in preprečevanje prezgodnje pubertete). V kontekstu oploditve z biomedicinsko pomočjo jih uporabljamo za doseganje selektivne kemične hipofizektomije (neodzivnosti hipofize na endogeni gonadoliberin), kar je pogoj za kasnejše spodbujanje zorenja več jajčnih foliklov hkrati in superovulacijo z rekombinantnimi ali izoliranimi gonadotropnimi hormoni (glejte podpoglavje 5.2) (5).

5.2 Gonadotropini

Z gonadotropnimi hormoni zdravimo stanja hipogonadotropnega hipogonadizma, ki se zrcalijo kot nedozorevanje jajčec oz. semenčic, anovulacija ter številne vedenjske in metabolne spremembe. V to skupino učinkovin sodijo folitropin alfa in beta (rekombinantni obliki FSH), urofolitropin (FSH, izoliran iz urina nosečnic), horionski gonadotropin (hCH, izoliran iz urina nosečnic), korifolitropin (rekombinantni FSH s C-končnim peptidnim zaporedjem podenote beta hCG) ter lutropin (rekombinantni LH). S folitropini je mogoče ob predhodni desenzibilizaciji hipofize na endogeni gonadoliberin spodbuditi zorenje več jajčnih foliklov hkrati. Aplikacija hCG ali lutropina izzove t. i. superovulacijo. Na ta način z enkratnim posegom zberemo več jajčnih celic, ki jih po oploditvi v pogojih *in vitro* vsadimo prejemnici v maternično sluznico ali zamrznemo za kasnejše poskuse oploditve.

6 BIOLOŠKA ZDRAVILA ZA ZDRAVLJENJE AKROMEHALIJE

Čezmerno sproščanje ravnega hormona iz hipofize, običajno kot posledica adenoma (tj. benignega tumorja žleznega epitelija), vodi v bolezenski stanji, znani pod imenom gigantizem (pri mladostnikih) ali akromegalija (pri odraslih). Za bolezen so značilne telesne spremembe, zlasti grobe obrazne poteze, povečane dlani in stopala ter hipertofija mehkih tkiv. Če bolnik zboli še v obdobju rasti, lahko doseže izjemno telesno višino. Nezdravljena bolezen prizadene večino organskih sistemov, poglaviti vzroki smrti so miokardni infarkt, možganska kap in rakava obolenja. Terapevtski pristopi zajemajo kirurško odstranitev adenoma, radioterapijo in farmakološko zdravljenje, vse s končnim ciljem normalizacije ravni ravnega hormona in IGF-1.

6.1 Analogi somatostatina

Somatostatin je parakrino delujoč signalni peptid, izražen v številnih tkivih, le v hipofiznem portalnem obtoku nastopa v vlogi nevrohormona. Sprošča se iz hipotalamusa in ureja delovanje hipofize. Ime nosi po sposobnosti zaviranja izločanja ravnega hormona. Zaradi izrazite pleiotropnosti in neprimernih farmakokinetičnih parametrov ima sam omejeno terapevtsko vrednost. Pri zdravljenju akromegalije in gigantizma uporabljamo njegova sintezna analoga lanreotid in oktreotid, ki izkazujeta nekoliko daljšo razpolovno dobo in bolj selektivno delovanje. Novejši farmacevtski obliki s podaljšanim sproščanjem za subkutano ali intramuskularno injiciranje omogočata aplikacijo na štiri do šest tednov, a je terapevtski režim vselej potrebno prilagoditi individualnim potrebam bolnika (12). V razvoju je tudi farmacevtska oblika z oktreotidom za peroralno aplikacijo. Zaradi nizke pojavnosti akromegalije in gigantizma imata oktreotid in lanreotid status zdravila sirote.

6.2 Pegvisomant

Pegvisomant je rekombinantni analog humanega ravnega hormona, ki ima glede na endogeni hormon zamenjanih devet aminokislin in je povprečno konjugiran s štirimi do šestimi verigami polietilenglikola (potencialnih PEG-ilacijskih mest v molekuli je devet). Deluje kot selektivni antagonist receptorja za humani rasti hormon. V obliki subkutane injekcije je kot zdravilo sirota indiciran za zdravljenje akromegalije in gigantizma pri bolnikih, ki se niso odzvali na poskuse kirurškega zdravljenja, radioterapijo ali farmakološko zdravljenje z analogoma somatostatina.

7 OSTALE SKUPINE

7.1 Analogi vazopresina

Endogeni vazopresin je hipotalamusni peptidni hormon, ki se sprošča v kri v primeru povišanega osmotskega tlaka v plazmi ali ob padcu arterijskega tlaka (hipovolemični šok). Izzove številne učinke, med katerimi sta najpomembnejša vazokonstrikcija ter pasivna resorpcija vode v distalnem nefronu (od tod njegovo alternativno ime: antidiuretični hormon). Pri suprafizioloških plazemskih

koncentracijah spodbudi sproščanje von Willebrandovega dejavnika (vWF) iz žilnih endotelijskih celic.

Pomanjkanje endogenega vazopresina (pri motnjah delovanja hipofize) se kaže kot *diabetes insipidus*, stanje poliurije in polidipsije. Ker ima vazopresin številne resne neželene učinke (npr. angiozno bolečino in nevarnost miokardnega infarkta) in neprimerne farmakokinetične lastnosti, njegovo terapevtsko uporabo opuščamo in ga nadomeščamo s sinteznimi analogi, ki izkazujejo selektivni antidiuretični učinek. Najpomembnejši predstavnik te skupine učinkovin je dezmozopresin. Mogoče ga je aplicirati tudi intranazalno ali celo peroralno, uporabljamo ga za zdravljenje *diabetesa insipidusa*, druge indikacije so nočna enureza pri otrocih in blažji obliki von Willebrandove bolezni (pomanjkanje vWF) ter hemofilije A (pomanjkanje dejavnika koagulacije VIII) (5).

7.2 Oksitocin in atosiban

Oksitocin je peptidni nevrohormon, strukturno zelo soroden vazopresinu, zaradi česar lahko izkazujeta hormona navzkrižno delovanje. Oksitocin se sprošča v kri iz hipofize pod vplivom dveh dejavnikov: ob draženju prsnih bradavic pri dojenju ter ob raztezanju materničnega vratu v poznem stadiju poroda. V prvem primeru je njegova funkcija spodbuditi krčenje gladkih mišic, ki obdajajo mlečne alveole, in tako potisniti mleko v mlečne vode. V času poroda spodbudi krčenje gladkih mišic v steni maternice, kar je pogoj za iztis plodu in posteljice skozi porodni kanal.

V obliki nosnega pršila oksitocin predpisujemo za spodbujanje dojenja in preprečevanje mastitisa, a je učinek kratkotrajen. Kot intravenska infuzija, zlasti v kombinaciji z mizoprostolom, je oksitocin indiciran za spodbujanje umetnih popadkov, če do spontanih ne pride, in za omejevanje krvavitev po carskem rezu, ko je maternica atonična (5).

Atosiban je sintezni analog oksitocina, ki deluje tokolitično kot antagonist oksitocinskih receptorjev. V obliki intravenske infuzije ga uporabljamo za preprečevanje prezgodnjega poroda (tj. pred 33. tednom nosečnosti) (5).

8 SKLEP

Z napredkom tehnologije rekombinantne DNA, kemijske sinteze peptidov in razvojem učinkovitih metod čiščenja danes izdelujemo učinkovine peptidne narave, ki so jih nekoč pridobivali z izolacijo iz živalskih ali človeških tkiv, bistveno bolj ekonomično. Sodobna zdravila so tudi varnejša: verjetnost prenosa patogenov na bolnika z rekombinantno učinkovino je minimalna, humana narava terapevtskih peptidnih hormonov pa je osnova za sprejemljiv imunogeni profil. Dodatna prednost (bio)sintezne izdelave peptidnih hormonov je v možnostih uvajanja strukturnih sprememb, s čimer prirojam farmakokinetične ali farmakodinamične lastnosti učinkovine.

9 LITERATURA

1. Pratley RE. The early treatment of type 2 diabetes. *Am J Medicine* 2013; 126 (9 Suppl 1): S2–9.
2. Owens DR. Insulin preparations with prolonged effect. *Diabetes Technol Ther* 2011; 13 Suppl 1: S5–14.
3. Cohen ND, Audehm R, Pretorius E, Kaye J, Chapman LH, Colagiuri S. The rationale for combining GLP-1 receptor agonists with basal insulin. *Med J Aust* 2013; 199 (4): 246–249.
4. Cho YM, Wideman RD, Kieffer TJ. Clinical Application of Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Agonists for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocrinol Metab (Seoul)* 2013; 28 (4): 262–274.
5. Bratkovič T. Sintezne peptidne učinkovine. V: Štrukelj B, Kos J. *Biolška zdravila: od gena do učinkovine*. Slovensko farmacevtsko društvo, 2007; 475–529.
6. Kočevár N. Ostale rekombinantne učinkovine. V: Štrukelj B, Kos J. *Biolška zdravila: od gena do učinkovine*. Slovensko farmacevtsko društvo, 2007; 429–474.
7. Eriksen EF, Halse J, Moen MH. New developments in the treatment of osteoporosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2013; 92 (6): 620–636.
8. Richmond E, Rogol AD. Current indications for growth hormone therapy for children and adolescents. *Endocr Dev* 2010; 18: 92–108.
9. Ali O, Wyatt D. Therapy of growth disorders. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2011; 18 (1): 3–8.
10. Duntas LH, Popovic V. Hormones as doping in sports. *Endocrine* 2013; 43 (2): 303–313.
11. Fintini D, Brufani C, Cappa M. Profile of mecaseimerin for the long-term treatment of growth failure in children and adolescents with severe primary IGF-1 deficiency. *Ther Clin Risk Manag* 2009; 5 (3): 553–559.
12. Wang JW, Li Y, Mao ZG, Hu B, Jiang XB, Song BB, Wang X, Zhu YH, Wang HJ. Clinical applications of somatostatin analogs for growth hormone-secreting pituitary adenomas. *Patient Prefer Adherence* 2014; 8: 43–51.

Klinični vidik uporabe epoetinov in nizkomolekularnih heparinov

Asist. Alenka Premuš Marušič, mag. farm., spec. klin. farm.
Splošna bolnišnica Murska Sobota

Povzetek

Epoetine in nizkomolekularne heparine uvrščamo med biološka zdravila. Zaradi obširne uporabe je klinični vidik uporabe teh dveh skupin vse bolj pomemben, tako iz strokovnega kot tudi stroškovnega vidika. Epoetine v največjem obsegu predpisujemo dializnim in predializnim bolnikom za zdravljenje anemije. Nizkomolekularne heparine pa v največji meri uporabljamo za preprečevanje in zdravljenje venskih trombembolij. Ker so to tudi stroškovno pomembna zdravila za bolnišnice, se na javnih razpisih poskuša vzpostavljati konkurenčnost znotraj terapevtske skupine epoetinov ali nizkomolekularnih heparinov, in sicer v smislu uvajanja terapevtske zamenjave. Protokoli odmerjanja pri uporabi epoetinov in nizkomolekularnih heparinov zmanjšajo možnosti za neustrezno uporabo in odmerjanje ter poenotijo predpisovanje in dajanje teh zdravil bolnikom. Klinični farmacevti so na oddelkih bolnišnic pri spremljanju zdravljenja bolnikov z biološkimi zdravili lahko v veliko pomoč pri natančnem spremljanju preklapljanja med temi zdravili in pri spremljanju in poročanju o neželenih učinkih.

Vsebina

1 UVOD

2 EPOETINI

2.1 Kratkodelujoči in dolgodelujoči epoetini

2.2 Klinični in stroškovni vidik pri uporabi epoetinov

3 NIZKOMOLEKULARNI HEPARINI (NMH)

3.1 NMH – razlike in indikacije

3.2. Klinični in stroškovni vidik pri uporabi nizkomolekularnih heparinov

4 SKLEP

5 LITERATURA

1 UVOD

Med prvimi desetimi zdravili, za katera smo v letu 2012 namenili največ finančnih sredstev na globalni ravni, jih je kar polovica bioloških (1). Tradicionalna biološka zdravila obstajajo že dalj časa, pridobljena so z izolacijo iz rastlin, živali, človeške krvi ali pa s klasično biotehnologijo (na primer antibiotiki, steroidi). Med biološka zdravila uvrščamo izolirane človeške in živalske hormone, učinkovine iz rastlin ter kri in krvne pripravke (2). Med biološka zdravila uvrščamo tudi nizkomolekularne heparine (NMH) in epoetine. Zaradi njihove obširne uporabe je klinični vidik vse bolj pomemben, tako iz strokovnega kot tudi stroškovnega vidika.

2 EPOETINI

Med sodobna biološka zdravila, pridobljena s pomočjo tehnologije rekombinantne DNA, spada tudi eritropoetin. Endogeni eritropoetin je večinoma ledvičnega izvora, v manjši meri pa nastaja tudi v jetrih (2). Preden je bil rekombinantni eritropoetin na voljo za zdravljenje, je približno četrtnina bolnikov s kronično ledvično boleznijo redno prejemala transfuzijo eritrocitov (3). Leta 1989 je FDA odobrila prvi humani rekombinantni eritropoetin za zdravljenje ledvične anemije (4). Humani eritropoetin je glikoprotein, sestavljen iz 165 aminokislin. Eritropoetine za klinično uporabo pridobivamo s tehnologijo rekombinantne DNA, kjer ekspresijski sistem predstavljajo sesalske celice (na primer ovarijske celice kitajskega hrčka) (5).

2.1 Kratkodelujoči in dolgodelujoči epoetini

V Sloveniji je registriranih več epoetinov, med njimi tudi biološko podobna zdravila (preglednica 1). Vsi epoetini imajo podobno aminokislinsko zaporedje kot endogeni eritropoetin, se pa razlikujejo v glikozilaciji. Glikozilacija vpliva na farmakokinetiko in ima potencialni vpliv na učinkovitost, varnost in s tem imunogenost. Rekombinantni eritropoetini so indicirani za zdravljenje anemije pri bolnikih s kronično ledvično odpovedjo, onkoloških bolnikih z anemijo zaradi kemoterapije in za povečano eritropoezo pri večjih kirurških operacijah. Mehanizem delovanja je v vseh primerih enak, odmerek pa je praviloma najvišji pri onkoloških bolnikih. Aplicira se intravenozno ali subkutano. Subkutana aplikacija bolje spodbudi eritropoezo, saj se eritropoetin sprošča postopoma. Čeprav se eritropoetin hitro veže na receptorje na prekuzorskih celicah, traja nekaj tednov, da se vzpostavi normalna koncentracija eritrocitov in zato ni primeren za zdravljenje pri akutnih stanjih (5).

Preglednica 1: Epoetini, trenutno registrirani v Sloveniji (6)

Lastniško ime		Učinkovina
Dolgodelujoči epoetini	Aranesp®	Darbepoetin alfa
	Mircera®	Metoksipolietilenglikol epoetin beta
Kratkodelujoči epoetini	Abseamed®*	Epoetin alfa
	Eprex®	Epoetin alfa
	Binocrit®*	Epoetin alfa
	NeoRecormon®	Epoetin beta
	Retacrit®*	Epoetin zeta
	Eporatio®*	Epoetin theta

*biološko podobno zdravilo

2.2 Klinični in stroškovni vidik pri uporabi epoetinov

Epoetini se v največjem obsegu predpisujejo dializnim in predializnim bolnikom. Ker pa so to tudi stroškovno pomembna zdravila za bolnišnice, se na javnih razpisih poskuša vzpostaviti konkurenco med registriranimi epoetini pri uporabi za isto indikacijo. Temu nasprotujejo proizvajalci originatorskih epoetinov, predvsem z argumentom, da je »zamenjevanje« oziroma »preklapljanje« iz enega epoetina na drugega pri bolnikih škodljivo s stališča večje nevarnosti za pojav neželenih učinkov imunogenosti, kot je na primer čista aplazija rdečih krvnih celic (PRCA, *pure red cell aplasia*), čeprav neposredne povezave med zamenjevanjem epoetinov pri bolniku in PRCA nikoli niso dokazali. PRCA naj bi bila pogosto lahko posledica izražene imunogenosti na stabilizatorje v pripravkih z epoetini, ti stabilizatorji pa se med različnimi proizvajalci razlikujejo (7). Zato je pri prehodih z enega epoetina na drugega potrebno spremljanje in natančno vodenje farmakovigilance, da se ob pojavu PRCA lahko napove, pri katerem preparatu se je to zgodilo. Do PRCA je prihajalo tako pri uporabi originatorskih preparatov z epoetini kot tudi pri biološko podobnih zdravilih. Zamenjevanje oziroma prehodi z enega epoetina na drugega se dogajajo v vsakdanji praksi, saj bolniki prehajajo s kratkodelujočih epoetinov na dolgodelujoče.

Glede na to, da so primerjalni odmerki različnih epoetinov znani in da nikjer ni strogo zavedeno, da je zamenjevanje pri bolnikih prepovedano, je to odločitev vsakega zdravnika posebej. Ustrezno zdravljenje bolnika vključuje poleg strokovnosti tudi farmakoekonomske vidike zdravljenja, saj je to edino etično za vzdržnost zdravstvenega sistema in omogoča tudi dostopnost do novejših zdravil.

3 NIZKOMOLEKULARNI HEPARINI (NMH)

Prvo randomizirano raziskavo za zdravljenje venske trombembolije so izvedli leta 1960 (8). Sledile so raziskave, ki so optimizirale zdravljenje s heparinom in z varfarinom, nakar je do pravega preboja prišlo šele s pojavom NMH (9, 10, 11). Pri NMH gre za derivate nefrakcioniranega heparina (heparin). Heparin je kombinacija različnih oligosaharadnih verig, ki skupaj merijo okrog 15 kD. Največkrat ga pridobivamo iz črevesnih celic prašičev, zaradi česar ga uvrščamo med biološka zdravila. S posebnim postopkom depolimerizacije iz heparina pridobivamo NMH (12).

3.1 NMH - razlike in indikacije

Na tržišču obstaja več različnih NMH, ki se razlikujejo po načinu pridobivanja, molekularni strukturi ter biokemičnem in farmakokinetičnem profilu (13). V Sloveniji so trenutno na tržišču štiri NMH, in sicer enoksaparin, dalteparin, nadroparin in fondaparinuks. Registrirani so večinoma za naslednje indikacije (nekaterih specifičnih ne omenjamo) (6):

- Preprečevanje trombembolij venskega izvora pri operacijah z zmernim ali velikim tveganjem.
- Preprečevanje venske trombembolije pri nekirurških bolnikih, priklenjenih na posteljo zaradi akutne bolezni, vključno s srčnim popuščanjem (III. ali IV. razred po NYHA), akutno respiratorno insuficienco in epizodami akutne okužbe ali akutne revmatične bolezni oziroma akutnega poslabšanja kronične revmatične bolezni v povezavi z vsaj enim dodatnim dejavnikom tveganja za vensko trombembolijo.

- Zdravljenje venske trombembolije, ki se kaže z globoko vensko trombozo, s pljučno embolijo ali z obema.
- Zdravljenje nestabilne angine pectoris in miokardnega infarkta brez zobca Q v kombinaciji z acetilsalicilno kislino.
- Preprečevanje nastanka trombov v zunajtelesnem krvnem obtoku med hemodializo.
- Zdravljenje akutnega miokardnega infarkta z dvigom spojnice ST (STEMI), vključno z bolniki, ki bodo zdravljeni konzervativno, ali s poznejšo perkutano koronarno intervencijo (PKI) – velja le za enoksaparin.
- Podaljšano zdravljenje simptomatske venske trombembolije (proksimalna globoka venska tromboza in/ali pljučna embolija) in dolgotrajno preprečevanje njene ponovitve pri bolnikih z rakom – velja le za dalteparin.

Izvedli so le malo raziskav, v katerih so primerjali različne NMH med seboj. Kljub temu NMH niso nujno med seboj zamenljivi in tudi primerljivi odmerki so določeni empirično (13, 14). Lahko se uporabljajo vsi za indikacije, za katere so registrirani in tudi smernice za zdravljenje bolezni večinoma ne izpostavljajo določene učinkovine iz terapevtske skupine NMH, ampak dopuščajo uporabo različnih NMH pri določeni bolezni, seveda v primerljivih odmerkih. Vsi NMH imajo visoko biološko uporabnost po subkutanem dajanju, daljši razpolovni čas kot heparin in manj intraindividualne variabilnosti v antikoagulantnem delovanju glede na odmerke (15). Zato je laboratorijsko spremljanje anti-Xa aktivnosti prej izjema kot pravilo pri zdravljenju z NMH. Kljub temu je spremljanje lahko smiselno pri nosečnicah, bolnikih z morbidno debelostjo ali ledvično odpovedjo (16).

Preglednica 2: Nizkomolekularni heparini, trenutno registrirani v Sloveniji

Lastniško ime	Učinkovina
Clexane®	Enoksaparin
Fraxiparin®	Nadroparin
Fragmin®	Dalteparin
Arixtra®	Fondaparinuks

Kljub velikemu napredku pri preventivi in zdravljenju venske trombembolije (VT), ostaja pljučna embolija (PE) glavni vzrok smrti v bolnišnici, ki ga lahko preprečimo (17, 18). Pojavnost venske trombembolije v Evropi je glede na raziskave v južni Franciji in na Švedskem nekje med 160 do 180 na 100.000 oseb na leto oziroma smrti, povezanih z vensko trombembolijo, je med 10 % (Združeno Kraljestvo) do 14 % (Italija) (19, 20, 21). Zato je ustrezna uporaba NMH, ki je glede na smernice še vedno prva izbira pri preventivnem zdravljenju za preprečevanje venske trombembolije, ključnega pomena. NMH glede na indikacije v največjem obsegu uporabljamo kot preventivno zdravljenje po kirurškem posegu. Tipično je tromboprofilaksa obvezna pri posegih pri abdominalnih, torakalnih, ortopedskih posegih kolka in kolena, travmatoloških poškodbah kolka, možganski kapi, poškodbi hrbtenjače, ob imobilizaciji spodnjih udov in nepokretnosti pri kritično bolnih. Za preprečevanje venske trombembolije uporabljamo običajno nižje odmerke kot pa za zdravljenje. Pri tem velja izpostaviti izjemo, ki velja za rizične bolnike na predhodni terapiji z antagonistom vitamina K, pri katerih tudi za profilaktične namene uporabljamo terapevtske odmerke za tromboprofilakso. V tem primeru govorimo o tako imenovanem »bridgingu«. Za ustrezen odmerek je v večini primerov potrebno upoštevati tudi maso bolnika, ledvično funkcijo in tveganje pri operativnem posegu (6, 22).

3.2 Klinični in stroškovni vidik pri uporabi nizkomolekularnih heparinov

V številnih bolnišnicah, tudi v Sloveniji, imajo na bolnišnični listi zdravil le enega izmed NMH, kar pomeni eno učinkovino v vseh različnih odmerkih. V Povzetkih glavnih značilnosti zdravil pa je za razliko od epoetinov pri nekaterih NMH zapisano, da jih med zdravljenjem »ne smemo zamenjevati« (23). Zamenjevanje tudi ni potrebno, saj se bolniku večinoma uvaja NMH v bolnišnici (predoperativno ali postoperativno ali na internističnih oddelkih) in je na voljo enak NMH tudi na recept, če bolnik zdravljenje potrebuje tudi po odpustu. Če bolnik pride v bolnišnico z že vpeljanim NMH, pa zamenjevanje ni priporočeno, čeprav je v klinični praksi zanemarljivo malo poročil o neželenih učinkih zaradi prehajanja z enega NMH na drugega, saj so tudi raziskave na tem področju redke (24). Za natančnejše vrednotenje imunogenosti pri zdravilih, ki vsebujejo nizkomolekularne heparine, in pri preklapljanju le teh, so potrebne nadaljnje raziskave (24).

Zakaj prihaja do prehoda z enega na drugi NMH, ko bolnik odhaja iz bolnišničnega okolja v domače okolje, ni povsem jasno oziroma je težko definirati in posledično razumeti razloge zdravnikov, da se tako odločijo. V bolnišnicah je bolnikom, ki so imeli doma že vpeljan NMH, na voljo nadaljevanje zdravljenja z enakim zdravilom (takih terapij je ocenjeno 10 %), kar ne vpliva bistveno na rezultate znižanja cene pri javnih razpisih, če je to okno vnaprej določeno in je izdaja zdravila, ki ni izbrano v večjem obsegu na javnem razpisu, tudi preverjena in mora biti za to izpolnjen poseben protokol.

4 SKLEP

Epoetini in nizkomolekularni heparini sta dve skupini bioloških zdravil, katerih uporaba je v vsakdanjem bolnišničnem okolju pogosta. V splošnih bolnišnicah sta to najpogosteje predpisani biološki zdravili po dnevni definirani odmerkih. Za ustrezno odmerjanje, prilagajanje odmernega intervala in spremljanje bolnikov je potrebno poznati razlike med posameznimi epoetini in razlike med posameznimi nizkomolekularnimi heparini. Razlike so v načinih pridobivanja, molekularni strukturi, biokemičnem in farmakokinetičnem profilu ipd.

Pri prehajanju z enega epoetina na drugega ali z enega NMH na drugega je potrebna posebna pozornost zaradi pojava imunogenosti pri uporabi bioloških učinkovin. Ob natančnem zapisu prehoda z ene učinkovine na drugo oziroma pri preklapljanjih je tudi farmakovigilanca možna, če pride do izraženega neželenega učinka.

Protokoli odmerjanja pri uporabi epoetinov in nizkomolekularnih heparinov zmanjšajo možnosti za neustrezno uporabo in odmerjanje, poenotijo predpisovanje in dajanje teh zdravil bolnikom in preprečujejo nenamensko (*off label*) uporabo teh zdravil.

Klinični farmacevti so na oddelkih bolnišnic pri spremljanju zdravljenja bolnikov z biološkimi zdravili lahko v veliko pomoč pri natančnem spremljanju preklapljanja med temi zdravili in pri spremljanju in poročanju o neželenih učinkih teh zdravil.

5 LITERATURA

1. Lindsley CW. The Top Prescription Drugs of 2012 Globally: Biologics Dominate, But Small Molecule CNS Drugs Hold on to Top Spots. *ACS Chem Neurosci* 2013; 4: 905–907.
2. Štrukelj B., Kos J. *Biološka zdravila: Od gena do učinkovine*. Slovensko farmacevtsko društvo. 2007.
3. Jelkmann W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *European Journal of Haematology*, 2006.
4. Adamson J. W. The story of erythropoietin. 50 years in hematology Research that revolutionized patient care. *American society of hematology*, 2011.
5. Wiecek A., Mikhail A. European regulatory guidelines for biosimilars. *Nephrol Dial Transplant*; 2006: 21, suppl 5: v17–v20.
6. MZ, JAZMP, ZZZS, NIJZ. Centralna baza zdravil. [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search/\\$searchForm?SearchView](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search/$searchForm?SearchView). Datum dostopa: 24. 4. 2014.
7. Haselbeck A. Epoetins: differences and their relevance to immunogenicity. *Curr Med Res Opin* 2003; 19 (5): 430–432.
8. Barritt DW, Jordan SC. Anticoagulant drugs in the treatment of pulmonary embolism: a controlled trial. *Lancet* 1960; 1: 1309–1312.
9. Hirsh J, Dalen JE, Anderson DR, Poller L, Bussey H, Ansell J, Deykin D, Brandt JT. Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. *Chest* 1998; 114: 445S–469S.
10. Hirsh J, Warkentin TE, Raschke R, Granger C, Ohman EM, Dalen JE. Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing considerations, monitoring, efficacy, and safety. *Chest* 1998; 114: 489S–510S.
11. Weitz JI. Low-molecular-weight heparins. *N Engl J Med* 1997; 337: 688–698.
12. De Lissovoy G, Subedi P. Economic evaluation of enoxaparin as prophylaxis against venous thromboembolism in seriously ill medical patients: A US perspective. *Am J Manag Care* 2002; 8: 1082–1088.
13. White RH, Ginsberg JS. Low-molecular-weight heparins: are they all the same? *Br J Haematol* 2003; 121 (1): 12.
14. Wells PS, Anderson DR, Rodger MA, et al. A randomized trial comparing 2 low-molecular-weight heparins for the outpatient treatment of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. *Arch Intern Med* 2005; 165 (7): 733.
15. Green D, Hirsh J, Heit J, Prins M, Davidson B, Lensing AW. Low molecular weight heparin: a critical analysis of clinical trials. *Pharmacol Rev* 1994; 46 (1): 89–109.
16. Hirsh J, Bauer KA, Donati MB, et al. Parenteral anticoagulants: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest*. 2008; 133 (6 Suppl): 141S.
17. White RH, Zhou H, Romano PS. Incidence of symptomatic venous thromboembolism after different elective or urgent surgical procedures. *Thromb Haemost* 2003; 90 (3): 446.
18. Martino MA, Borges E, Williamson E, et al. Pulmonary embolism after major abdominal surgery in gynecologic oncology. *Obstet Gynecol* 2006; 107 (3): 666.
19. Nordstrom M, Lindblad B, Bergqvist D, et al. A prospective study of the incidence of deep-vein thrombosis within a defined urban population. *J Intern Med* 1992; 232: 155–160.
20. Oger E. Incidence of venous thromboembolism: a community-based study in Western France. EPI-GETBO Study Group. *Groupe d'Etude de la Thrombose de Bretagne Occidentale. Thromb Haemost* 2000; 83: 657–660.
21. Cohen AT, Agnelli G, Anderson FA, et al. Venous thromboembolism (VTE) in Europe: The number of VTE events and associated morbidity and mortality. *Thromb Haemost* 2007; 98: 756–764.
22. Guyatt GH, Akl EA, Crowther M, et al. Executive summary: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2012; 141; 7S–47S.
23. Povzetek glavnih značilnosti zdravila. Fraxiparine. Centralna baza zdravil. [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/733C54D36C209BCDC12579C2003F4B01/\\$File/s-013215.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/733C54D36C209BCDC12579C2003F4B01/$File/s-013215.pdf). Datum dostopa: 24.4.2014.
24. Geno J, Merli, James B. Groce. Pharmacological and Clinical Differences Between Low-Molecular-Weight Heparins: Implications for Prescribing Practice and Therapeutic Interchange. *P T*. 2010; 35 (2): 95–105.

Fizikalno-kemijska stabilnost farmacevtskih oblik z biološkimi zdravili v praksi

Tomislav Laptoš, mag. farm.

Lekarna Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana

Povzetek

Biološka zdravila, predvsem tista, ki kot zdravilno učinkovino vsebujejo monoklonska protitelesa, postajajo vedno pomembnejši del klinične prakse. Zaradi svoje kompleksne strukture so proteinske molekule dovzetne za fizikalne in kemijske spremembe okolja, njihova visoka cena pa zahteva še posebej veliko pozornost pri celotnem procesu od biosinteze do uporabe v terapevtske namene. Kumulativni učinki vplivajo na spremembe monoklonskega protitelesa, ki lahko vodijo v neučinkovitost pripravka, v najslabšem primeru pa tudi do imunskega odziva in tvorbe nevtralizacijskih protiteles v organizmu bolnika. Zagotavljanje stabilnosti terapevtskih monoklonskih protiteles tekom celotnega procesa terja ustrezno izobraževanje in rokovanje vseh vključenih na celotni poti proteina, od proizvajalca do bolnika.

Vsebina

1 UVOD

2 STABILNOST MONOKLONSKIH PROTITELES

2.1 Kemijska nestabilnost

2.2 Fizikalna nestabilnost

2.3 Povišana temperatura

2.4 Cikli zamrzovanja in odtajanja

3 ROKOVANJE

3.1 Strokovna javnost

3.2 Laična javnost

4 MONOKLONSKA PROTITELESA V KLINIČNI UPORABI

5 SKLEP

6 LITERATURA

1 UVOD

Monoklonska protitelesa predstavljajo v sodobni klinični praksi pomemben način zdravljenja in diagnostike zaradi svoje visoke specifičnosti in dobro definiranega delovanja na ciljne sisteme. Glavna področja uporabe zajemajo rakave in avtoimunske bolezni kot tudi obvladovanje preobčutljivostnih reakcij in astme, osteoporoze in kostnih zasevkov trdnih tumorjev, s starostjo povezane vlažne degeneracije makule in ostalih. V poznih fazah kliničnih raziskav so trenutno med drugimi tudi monoklonska protitelesa za zdravljenje Alzheimerjeve bolezni in stafilokoknih ter enterokoknih okužb, hiperlipidemij in diabetesa tipa 1 (1–3).

Od leta 1986, ko se je na tržišču pojavilo prvo monoklonsko protitelo, muromonab-CD3 (4), sta se spremenila tudi načina njegove uporabe in aplikacije. Če so bili prvi pripravki (in velika večina je še vedno) namenjeni pripravi in aplikaciji s strani zdravstvenega osebja v nadzorovanih razmerah, je uvedba predvsem inhibitorjev dejavnika tumorske nekroze alfa (TNF- α) v prednapolnjenih farmacevtskih oblikah (peresnikih, brizgah) v zadnjih slabih desetih letih povzročila (5), da zdravilo zapušča okvire predpisane in nadzorovane hladne verige in da odgovornost za njegovo stabilnost prevzema tudi bolnik.

2 STABILNOST MONOKLONSKIH PROTITELES

Stabilnost proteinov, predvsem večjih, med katere spadajo tudi monoklonska protitelesa, je odvisna od njihove strukture, okolja, v katerem se nahajajo, in zunanjih dejavnikov, ki so jim izpostavljeni. Fiziološko so protitelesa ali imunoglobulini (Ig) glikozilirani globularni proteini iz naddružine imunoglobulinov z molekularno maso približno 150 kDa s simetrično strukturo, ki tridimenzionalno spominja na obliko črke Y. Sestavljena so iz dveh enakih težkih polipeptidnih verig (označimo jih z grškimi črkami γ , μ , α , δ , ϵ) ter dveh enakih lahkih polipeptidnih verig κ ali λ , povezanih z disulfidnimi vezmi. Lahko in težko verigo sestavljajo konstantna in variabilna območja, kjer imajo konstantna območja podobno aminokislinsko sestavo znotraj protiteles iste vrste. Večje razlike se nahajajo v variabilnem območju protiteles na N-končnem delu lahke in težke polipeptidne verige, ki določa specifičnost vezave protitelesa z antigenom (6).

Terapevtska monoklonska protitelesa se od fizioloških (nativnih) v osnovni strukturi ne razlikujejo. Večina jih pripada razredu IgG1 κ z molekularno maso okoli 150 kDa (1), čeprav med njih uvrščamo tudi certolizumab pegol, ki je 48 kDa velik pegiliran Fab' fragment humaniziranega monoklonskega protitelesa proti TNF- α (7), možni pa so tudi drugi konjugati z radioaktivnimi izotopi (8).

Spremembe, ki vplivajo na stabilnost proteinov, v grobem delimo na kemijske in fizikalne. Med kemijske spremembe proteinov uvrščamo oksidacijo, deamidacijo, hidrolizo, Maillardovo reakcijo, prekinitev disulfidnih vezi, nesulfidno premreženje in izomerizacijo, med fizikalne pa agregacijo in fragmentacijo.

Dejavniki, ki vplivajo na omenjene procese, so odvisni od strukturnih lastnosti molekule, temperature, raztopine, v kateri se protein nahaja, učinkov medfaz (na primer tekoče-plinasto,

tekoče-tekoče in tekoče-trdno) ter snovi, ki se izločajo iz stične ovojnine ali so prisotne v reagentih med postopkom izolacije in čiščenja. Tako fizikalne kot kemijske spremembe proteinov imajo navadno za posledico izgubo nativne sekundarne ali terciarne strukture (9, 10), saj so nativni proteini v fizioloških pogojih slabo stabilni (11, 12).

2.1 Kemijska nestabilnost

Za kemijske spremembe proteinov štejemo vse tiste kemijske reakcije, ki imajo za posledico spremembo dela proteina (9). Kemijska nestabilnost tako obsega vse procese, ki vodijo do nastanka ali cepitve kovalentnih vezi in pomenijo nastanek nove kemijske entitete (11). Določitev razgradnih in ostalih produktov kemijskih sprememb proteinov je lahko problematična, saj lahko znotraj ene molekule proteina istočasno poteče več različnih tipov reakcij (12). Za doseganje čim večje stabilnosti je potrebno prepoznati najbolj nestabilne aminokislino in določiti njihovo reaktivnost, predvsem tistih na površini proteina. Nestabilne aminokislino v notranjosti proteina so namreč slabo hidratirane, omejena je tudi njihova mobilnost (11). Kemijske reakcije aminokislino v proteinu zahtevajo lokalno molekulsko gibljivost, zato je hitrost razgradnje večja pri denaturiranih proteinih. Za preprečevanje kemijske razgradnje je potrebno ohraniti oziroma stabilizirati nativno konformacijo proteina (12).

2.1.1 Oksidacija

Oksidacija predstavlja glavni mehanizem kemijske spremembe proteina, ki ima lahko za posledico kovalentno spremembo aminokislinskih preostankov primarne strukture. Proces lahko sprožijo peroksidi, raztopljen kisik, kovinski ioni, svetloba in prosti radikali. Kovinski ioni, ki katalizirajo reakcije oksidacije, izvirajo predvsem iz kontaminiranih pufrov (9, 13), možni viri pa so tudi gumijasti zamaški ter steklo vial in prednapolnjenih brizg (14).

Oksidacija IgG lahko poveča njihovo antigenost in dovzetnost za cepitev s proteazami. Klinični učinek oksidacije v variabilni regiji še ni povsem znan, rezultati raziskav pa kažejo, da lahko na primer elektro-oksidirani IgG z vezavo na endotelijske celice povzročijo sproščanje prosvetnih dejavnikov (15).

2.1.2 Deamidacija

Deamidacija je najpogostejša oblika razgradnje biološko aktivnih proteinov. Največkrat poteka na aminokislinskem zaporedju, ki vsebuje par asparagin-glicin ali asparagin-serin, možna pa je tudi pri paru asparagin-treonin in glutaminu. Pri protitelesih je možna tako v lahki kot težki verigi. Lokacija, hitrost in mehanizem reakcije so odvisni od pH. Deamidacija asparagina tako poteka predvsem v bazičnih in nevtralnih razmerah, zato je pri razvoju farmacevtskih oblik zaželeno, da je pH raztopine proteina, ki ima izpostavljen te aminokislino, med 2,0 in 5,0.

2.1.3 Hidroliza

Amidne vezi med aminokislino kot sestavnimi deli protiteles so podvržene tako kisli kot bazični hidrolizi. Za večino peptidnih vezi sklepamo, da so stabilne, razen tistih v zaporedju X-Asp-Y, kjer je

vez Asp-Y v razredčeni kislini vsaj stokrat bolj nestabilna od ostalih vezi. Hidroliza pogosto poteče, ko pride do deamidacije asparagina, vendar je v primerjavi z deamidacijo počasnejši in redkejši proces (11, 12). Ker vpliva na primarno strukturo, pomeni popolno izgubo funkcije in oblike proteina, vendar ob predpisanih pogojih rokovanja in shranjevanja zdravila navadno ne poteče (9).

2.1.4 Maillardova reakcija

Pogosta uporaba sladkorjev kot stabilizatorjev proteinov v trdnih in tekočih farmacevtskih oblikah predstavlja določen dejavnik tveganja za nastanek kemično spremenjenih protiteles. Reducirajoči sladkorji lahko zlasti pri visokih temperaturah reagirajo z aminoskupinami proteina in tvorijo karbohidratne adukte. Kompleksna reakcija vodi do nastanka obarvanih produktov.

2.2 Fizikalna nestabilnost

Fizikalna nestabilnost je posledica spremenjene strukture proteina zaradi fizikalne spremembe. Vključuje spremembo sekundarne, terciarne in kvartarne strukture in se lahko odrazi kot denaturacija, agregacija, obarjanje ali adsorpcija proteinov na stične površine. Ker pomeni izgubo učinkovitosti terapevtskih proteinov in posledično njihovo neprimernost za klinično uporabo ter spremenjeno imunogenost, je ključnega pomena, da z ustreznimi postopki dela preprečimo ali zmanjšamo dejavnike, ki nestabilnost povzročajo (12, 16).

2.2.1 Denaturacija in agregacija

Agregacija predstavlja glavni mehanizem fizikalne nestabilnosti proteinov, ki ima za posledico v terapevtske namene neuporaben protein (9–11). V primerjavi z majhnimi molekulami proteini agregirajo v različnih razmerah, ki jih v grobem delimo na intrinzične (primarna, sekundarna, terciarna in kvartarna struktura molekule) in ekstrinzične (okolje, v katerem je protein prisoten, način rokovanja) (17). Ločimo koncentracijsko inducirano agregacijo, agregacijo, ki je posledica konformacijske spremembe, agregacijo, ki je posledica kemijske reakcije, od nukleacijskih jeder odvisno agregacijo in površinsko inducirano agregacijo (9, 17, 18). V primeru monoklonskih protiteles agregacija primarno poteka preko delno denaturiranih stanj (9). Domnevajo, da se agregati pojavijo zaradi specifičnih interakcij med določenimi konformacijami proteinskih intermediatov (11, 12). Zaradi kompleksne strukture z več domenami lahko pri monoklonskih protitelesih pride do denaturacije in posledično agregacije neodvisno na različnih domenah. Gonilna sila agregacije je zmanjšanje termodinamsko neugodnih interakcij med topilom in izpostavljenimi hidrofobnimi deli proteina. Hidrofobne interakcije, ki vplivajo na zvijanje proteinov, so tudi glavne sile, ki vodijo do nastanka agregatov. Agregacijo lahko pospešijo tudi fizikalni dejavniki, kot so temperatura, ionska moč in stresanje, ki izpostavijo hidrofobno površino proteina (11, 12). Proces agregacije je lahko reverzibilen ali ireverzibilen, pri čemer reverzibilnost smatramo kot sposobnost ponovne disociacije agregatov, ko odpravimo pogoje oziroma dejavnike, ki so agregacijo sprožili. V primeru raztopin so to pH, temperatura, sprememba površinske napetosti, prisotnost organskih topil ali koncentracija pomožnih snovi, na primer soli. Agregacija, ki je posledica spremembe temperature, je pogosto ireverzibilna (17).

Problem agregacije je večji pri farmacevtskih oblikah za subkutano in intramuskularno aplikacijo, ki si jih bolniki aplicirajo sami. Ker je pri teh oblikah zaradi boljše prenosljivosti zdravila zaželen nižji volumen raztopine, lahko koncentracija proteina v brizgi doseže 125 mg/ml, medtem ko je večina koncentratov za pripravo infuzijskih raztopin v območju med 1 in 25 mg/ml. Zaradi visoke koncentracije in ob pojavu agregacije postanejo raztopine zelo viskozne in težko prehajajo skozi iglo prednapolnjene brizge (19).

2.3 Povišana temperatura

Stabilnost monoklonskih protiteles v farmacevtskih pripravkih je odvisna tudi od temperature. Daljša izpostavitve zmerno povišani temperaturi pospeši predvsem kemijsko nestabilnost. Tako so za monoklonsko protitelo, ki je bilo šest mesecev izpostavljeno temperaturi 40 °C, dokazali, da je podvrženo predvsem deamidaciji in hidrolizi (20). Ko monoklonska protitelesa izpostavimo temperaturam blizu temperature razvitja (temperatura, ko je polovica molekul proteina razvita), ki za večino protiteles znaša približno 75 °C, pa razvitje povzroči pospešeno agregacijo molekul (9, 12).

2.4 Cikli zamrzovanja in odtajanja

Mehanizmi nestabilnosti ob zamrzovanju in odtajanju so predvsem posledica agregacije proteinskih molekul zaradi izpostavljenosti povišanim koncentracijam pomožnih snovi v nevodni fazi, ki ne zamrzne (21), spremembe pH (17), adsorpcije na medfazi led-tekočina, stenah posode (9, 22) in medfazah zrak-tekočina, kar je posledica ujetja zraka v tekočo fazo med prehitrim ohlajanjem (23). Pri nizkih temperaturah je zmanjšan tudi stabilizacijskih vpliv vodikovih vezi (9). Učinki ciklov so kumulativni, pri čemer velja, da hitro zamrzovanje v primerjavi s počasnim do 11-krat bolj denaturira proteine (24).

3 ROKOVANJE

Biološka zdravila z monoklonskimi protitelesi so na poti od proizvajalca do končnega uporabnika izpostavljena več dejavnikom, ki vplivajo na njihovo stabilnost. Kritične faze se pojavljajo pri transportu, shranjevanju in pripravi končnih pripravkov za aplikacijo bolniku, v primeru pripravkov za samoaplikacijo pa tudi pri rokovanju s strani bolnika, torej v času, ko zdravilo zapusti nadzorovane pogoje.

3.1 Strokovna javnost

Ker je za razmere med transportom do prevzema v zdravstveni ustanovi odgovorna veledrogerija in ker ima naročnik ob nepopolni dokumentaciji pravico sprejem zavrniti, bomo predstavili samo postopke, ki jim biološko zdravilo sledi od prevzema v zdravstveni ustanovi do aplikacije bolniku. V nadaljevanju opisujemo nekaj kritičnih postopkov, ukrepov in primerov dobrih praks, ki ta tveganja zmanjšajo.

Že Breckenridgeovo poročilo iz leta 1976 (25) je imelo za posledico priporočilo, da naj bi v bolnišničnem okolju parenteralne raztopine za aplikacijo bolnikom zaradi varnosti in zagotavljanja

sterilnosti centralno izdelovala bolnišnična lekarna. Smernice *National Health Service* (NHS) iz leta 2008 (26), *South Australian Health Service* (27) in *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) (28) iz leta 2012 so na seznam zdravil za onkološko uporabo, ki naj bi jih pripravljala bolnišnična lekarna, uvrstile monoklonska protitelesa. V določenih pogojih, ko centralizirana priprava ni možna ali smiselna, lahko pripravo zdravil za aplikacijo izvaja tudi posebej usposobljena medicinska sestra, vendar je nabor učinkovin, primernih za pripravo na oddelku omejen. Na njem najdemo recimo infliksimab in trastuzumab (29).

Pripravo končnega parenteralnega pripravka praktično izvaja farmacevtski tehnik. V primeru volumetričnega odmerjanja mora vsako dodajanje zdravila v nosilno raztopino potrditi odgovorni magister farmacije, v primeru vedno bolj uveljavljenega gravimetričnega načina odmerjanja pa delavca na vsakem koraku vodi računalniški program, ki tudi s tehtanjem potrdi ustreznost pripravka. Računalniško podprta priprava zaradi uporabe črtnih kod, definiranih gostot raztopin in tolerančnih nivojev zagotavlja večjo varnost in boljše upravljanje z ostanki zdravil (30). Ne glede na način dela mora biti farmacevtski kader ustrezno usposobljen tako za aseptično delo kot rokovanje z monoklonskimi protitelesi. V praksi velja načelo, da je za samostojno delo potrebno usposabljanje od pol do enega leta.

3.1.1 Povišana temperatura

Vse trenutno dostopne pripravke z monoklonskimi protitelesi je potrebno pred pripravo končne oblike shranjevati na temperaturi od 2 do 8 °C (31). Kot vsa ostala zdravila iz hladne verige imajo tudi pripravki z monoklonskimi protitelesi prednost pri prenosu iz vsebnikov veledrogerij ali transportne službe v hladilne omare.

Verjetnost, da bo zdravilo z monoklonskim protitelesom od prevzema do priprave končnega pripravka v lekarni izpostavljeno temperaturi, ki bi negativno vplivala na njegovo stabilnost, je majhna. Največji dejavnik tveganja predstavlja odpoved delovanja hladilnih omar, zato je priporočljivo, da so le-te opremljene s sistemom stalnega nadzora temperature, ki omogoča opozarjanje in ukrepanje tudi v času odsotnosti kadra.

3.1.2 Cikli zamrzovanja in odtajanja

Pripravkov z monoklonskimi protitelesi v obliki raztopin po pripravi končne farmacevtske oblike ne smemo izpostavljati razmeram, v katerih bi raztopina lahko zamrznila. Kljub temu lahko pride med transportom ali shranjevanjem do popolnega ali delnega zamrzovanja raztopine, na primer zaradi uporabe hladilnih omar, ki ne delujejo po principu vpihovanja hladnega zraka, ampak se ta ohlaja na eni od sten omare). Zaradi tega je smiselno, da je farmacevtski obliki dodan krioprotektant (21).

3.1.3 Redispwergiranje liofilizatov

Liofiliziranim oblikam monoklonskih protiteles moramo vodo dodajati počasi, saj le tako preprečimo penjenje nastale raztopine in zagotovimo prisotnost ustrezne konformacije proteinske molekule. Protitelesa lahko namreč med procesom liofilizacije zavzamejo določene nenativne oblike zaradi interakcij z molekulami, ki nadomeščajo vodo (19). V praksi je običajno potrebno curek topila

za rekonstitucijo (t. j. voda za injekcije) usmeriti v steno vial in ne neposredno v liofilizat (32). Rekonstitucijo je možno pospešiti z obračanjem vial okoli njene osi, pri novejših pripravkih pa so navedeni tudi parametri za uporabo mehanskih naprav za pripravo (33). Uporaba pripravkov z liofiliziranimi oblikami protiteles je tehnično zahtevnejša in časovno potratnejša.

3.1.4 Vpliv medfaz in adsorpcija

Raztopine proteinov so med proizvodnjo, transportom in pripravo končnih farmacevtskih oblik pogosto izpostavljene stresanju in strižnim silam. Oba stresna dejavnika lahko sprožita agregacijo proteinov, katere obseg je odvisen od intenzitete in trajanja stresa (17).

Stresanje raztopin proteinov ustvarja medfazo zrak-voda. Ker je glede na vodo zrak relativno lipofilen, se hidrofobni deli molekul proteinov razporedijo v zračno fazo, kar poruši nativno konformacijo proteina in sproži agregacijo. Strižne sile nastopijo, ko ima raztopina ob steni vsebnika drugačno hitrost kot preostanek raztopine (*bulk* faza). Predlagani mehanizem nestabilnosti proteinov zaradi strižnih sil predvideva, da hidrodinamski tok molekulo proteina prinese do stacionarne površine, kjer se ta adsorbira in razvije. Površinsko aktivne snovi zmanjšajo agregacijo proteinov na medfazah, saj s slednjimi tekmujejo za vezavo na hidrofobne površine in medfaze, vezavo na hidrofobne dele proteinov samih in povečanjem viskoznosti raztopine, kar zmanjša strižne sile (17). Dokazali so, da dodatek polisorbata 80 raztopini monoklonskega protitelesa zavre s stresanjem povzročeno agregacijo (34). Tako polisorbit 80 kot polisorbit 20 sta pogosti pomožni snovi trenutno registriranih farmacevtskih oblik z monoklonskimi protitelesi.

Priprava končnih farmacevtskih oblik je zaradi destabilizirajočega vpliva medfaz zahteven proces, ki terja usposobljenega izvajalca. Proizvajalci v navodilih za uporabo zdravil z monoklonskimi protitelesi izrecno navajajo, da je prepovedano stresanje vial s koncentratu za pripravo infuzijskih raztopin in infuzijskih raztopin samih. Kot metodo zagotavljanja enakomerne porazdelitve koncentracije v plastenki ali vrečki nosilne raztopine priporočajo previdno obračanje le-te.

Raztopina monoklonskega protitelesa je lahko izpostavljena medfazi zrak-tekoče tudi med odvzemom iz vial in med dodajanjem v nosilno raztopino. Pri delu z navadno injekcijsko iglo, ki ne omogoča izenačevanja tlaka med notranjostjo in zunanostjo vial, je potrebno odvzeti volumen raztopine nadomestiti z enakim volumnom zraka. V praksi se vedno pogosteje uporabljajo polimerne prebodne igle, ki imajo ločena kanala za odvzem raztopine in izenačevanje tlaka in so običajno opremljene z zračnim filtrom. Pri njihovi izbiri moramo biti pozorni na svetlino (lumen) kanala za odvzem raztopine, ki je s strani proizvajalca zdravila predpisan za večino pripravkov. Zaželeno je tudi, da ponudniki prebodnih igel izvedejo testiranja adsorpcije za vsako protitelo posebej.

Pred pričetkom dela oziroma po redispergiranju moramo vsako vialo z raztopino protitelesa pregledati na motnost in lebdeče delce, ki so pokazatelji agregacije.

3.2 Laična javnost

Poraba monoklonskih protiteles za samoaplikacijo v Sloveniji narašča od njihove uvedbe v klinično prakso. V letu 2011 so tako v breme ZZZS predpisali 5.565 receptov v vrednosti preko 12 milijonov evrov, v letu 2012 pa že 11.881 receptov v vrednosti preko 16 milijonov evrov. Porast v zadnjem letu

je predvsem posledica uvedbe denozumaba za zdravljenje osteoporoze (35). Povečano število na recept izdanih monoklonskih protiteles prav tako pomeni, da se večja število bolnikov oziroma njihovih svojcev, ki zdravila prevzamejo in ki morajo biti seznanjeni s konceptom zagotavljanja hladne verige in upoštevati priporočila proizvajalca in strokovne javnosti.

Proizvajalci oziroma imetniki dovoljenj za promet za novo uvedene bolnike običajno pripravijo komplete, ki poleg potrebne dokumentacije o varnosti zdravila in določenih praktičnih vidikih vsebujejo tudi hladilno torbo in hladilni vložek. Pričakujemo, da naj bi bolnik ob dvigu zdravila v lekarni s sabo prinesel ustrezen ohlajen vložek v hladilni torbi, vendar praktične izkušnje kažejo drugače. Določen del bolnikov hladilno torbo pozabi doma, nekateri so celo prepričani, da jim zaradi cene zdravila ob vsakem dvigu pripada nova. Problem je posebej pereč v poletnih mesecih, saj je s strokovnega vidika nesprejemljivo izdati zdravilo, za katero domnevamo, da bo transportirano v nasprotju s predpisanimi pogoji.

Razmere, ko je monoklonsko protitelo izpostavljeno previsoki temperaturi, nastopijo pri transportu v toplejših mesecih. Glede na literaturne podatke lahko temperature v vozilih, ki so bila izpostavljena soncu, ne glede na barvo vozila, dosežejo 90 °C v poletni mesecih in 60 °C spomladi in jeseni (36, 37). Podatki veljajo za sončne dni, vendar je poleti tudi ob oblačnem vremenu temperatura le okoli 10 °C nižja (37). Bolnika moramo opozoriti, da naj bo čas transporta po prevzemu čim krajši, predvsem pa naj zdravila ne pušča v vozilu, če to ni nujno potrebno.

Še večji dejavnik tveganja predstavljajo hladilniki, v katerih bolniki zdravila shranjujejo doma. Nerealno je pričakovati, da bodo za potrebe shranjevanja zagotovili medicinski hladilnik, zato se večina zdravil po izdaji hrani v gospodinjskih hladilnikih. Pri teh največjo težavo predstavlja porazdelitev temperature, saj lahko le-ta ob steni, kjer so nameščeni izmenjevalci toplote, dosega -5 °C (38), v mrtvih kotih pa tudi 15 °C (39). Zdravilo je lahko zato ob nepravilnem delovanju izpostavljeno ciklom zamrzovanja in odtajanja. Bolnikom priporočamo, da zdravila shranjujejo v osrednjem delu hladilne omare, kjer je temperatura najbližje prednastavljeni (38) in da slednjo redno spremljajo.

4 MONOKLONSKA PROTITELESA V KLINIČNI UPORABI

V Sloveniji je trenutno registriranih 29 zdravil z monoklonskimi protitelesi z 28 različnimi učinkovinami. Glede na pot uporabe je večina (18) namenjenih intravenski, 8 subkutani, po eno pa intramuskularni, intraperitonealni in intravitrealni uporabi. Glede na farmacevtsko obliko je 21 zdravil v obliki raztopine, 7 v obliki praška za pripravo raztopine in en komplet za pripravo radiofarmaka. Pregled pripravkov prikazujemo v preglednici 1.

Preglednica 1: Zdravila z monoklonskimi protitelesi z dovoljenjem za promet v Republiki Sloveniji glede na pot aplikacije in farmacevtsko obliko (31)

Pot uporabe	Nelastniško ime	Lastniško ime	Farmacevtska oblika
Intramuskularna	Palivizumab	Synagis®	Prašek in vehikel za raztopino za injiciranje
Intraperitonealna	Katumaksomab	Removab®	Koncentrat za raztopino za infundiranje
Intravenska	⁹⁰ Y ibritumomab tiuksetan	Zevalin®	Komplet za pripravo radiofarmaka
	Abciksimumab	ReoPro®	Raztopina za injiciranje ali infundiranje
	Alemtuzumab	MabCampath®	Koncentrat za raztopino za infundiranje
	Baziliksimumab	Simulect®	Prašek in vehikel za raztopino za injiciranje
	Belimumab	Benylsta®	Prašek za koncentrat za raztopino za infundiranje
	Bevacizumab	Avastin®	Koncentrat za raztopino za infundiranje
	Brentuksimumab vedotin	Adcetris®	Prašek za koncentrat za raztopino za infundiranje
	Cetuksimumab	Erbix®	Raztopina za infundiranje
	Ekulizumab	Soliris®	Koncentrat za raztopino za infundiranje
	Infliksimumab	Remicade®	Prašek za koncentrat za raztopino za infundiranje
	Ipilimumab	Yervoy®	Koncentrat za raztopino za infundiranje
	Natalizumab	Tysabri®	Koncentrat za raztopino za infundiranje
	Ofatumumab	Arzerra®	Koncentrat za raztopino za infundiranje
	Panitumumab	Vectibix®	Koncentrat za raztopino za infundiranje
	Pertuzumab	Perjeta®	Koncentrat za raztopino za infundiranje
	Rituksimumab	MabThera®	Koncentrat za raztopino za infundiranje
	Tocilizumab	RoActemra®	Koncentrat za raztopino za infundiranje
Trastuzumab	Herceptin®	Prašek za koncentrat za raztopino za infundiranje	
Intravitrealna	Ranibizumab	Lucentis®	Raztopina za injiciranje
Subkutana	Adalimumab	Humira®	Raztopina za injiciranje
	Canakinumab	Ilaris®	Prašek in vehikel za raztopino za injiciranje
	Certolizumab pegol	Cimzia®	Raztopina za injiciranje
	Denozumab	Prolia®	Raztopina za injiciranje
	Denozumab	Xgeva®	Raztopina za injiciranje
	Golimimumab	Simponi®	Raztopina za injiciranje
	Omalizumab	Xolair®	Raztopina za injiciranje
	Ustekinumab	Stelara®	Raztopina za injiciranje

Predpisovanje zdravil z monoklonskimi protitelesi, ki jih izdajamo na recept v breme ZZZS, je z izjemo denozumaba, kjer je omejitev indikacijska, omejeno na specialiste kliničnih oddelkov ali od njih pooblaščen zdravnike (31). Omejitev je še strožja za zdravila, ki jih apliciramo po intravenski poti, saj je omejena na posamezne indikacije, bolnikova stanja in izvajalce (klinične oddelke in inštitute) in se določi vsako leto posebej s Splošnim dogovorom, ki ga sprejmejo Ministrstvo za zdravje, ZZZS in združenja in zbornice izvajalcev. Ti pripravki spadajo med t. i. draga bolnišnična zdravila, za katere se poraba od 1. 1. 2011 vodi za vsakega bolnika posebej (40).

5 SKLEP

Monoklonska protitelesa predstavljajo v sodobni klinični praksi pomemben in že uveljavljen način zdravljenja predvsem onkoloških in avtoimunskih bolezni. Trenutno je v Sloveniji registriranih 29, na svetu pa v različnih fazah kliničnega preizkušanja več sto novih monoklonskih protiteles. Njihova klinična učinkovitost je odvisna od ohranitve native strukture proteina od biosinteze do aplikacije bolniku. Zaradi kompleksne strukture lahko na njihovo stabilnost v pripravkih vplivajo tako fizikalni kot kemijski dejavniki znotraj samega pripravka ter njegove okolice. Med glavne načine kemijske nestabilnosti sodita oksidacija in deamidacija, medtem ko je glavni mehanizem fizikalne nestabilnosti agregacija. Stabilnost pripravkov lahko v procesu razvoja farmacevtske oblike povečamo z dodatkom pomožnih snovi ali odtegnitvijo vode, predvsem z liofilizacijo.

Trenutne smernice priporočajo, da zaradi zahtevnosti dela, zagotavljanja aseptičnih pogojev in možnih prihrankov priprava končnih farmacevtskih oblik za aplikacijo bolniku v bolnišničnem okolju poteka centralizirano v bolnišnični lekarni s strani posebej usposobljenega kadra. Takšna priprava omogoča tudi večjo sledljivost porabe, saj trendi narekujejo, da bo v prihodnosti potrebno serije zdravil, ki jih bo bolnik prejel intravensko, zabeležiti v njegovo dokumentacijo.

Narašča tudi število farmacevtskih oblik za samoaplikacijo, ki jo bolnik izvede v domačem okolju. Ker zdravilo v tem primeru zapusti nadzorovane razmere shranjevanja, morajo zdravstveni delavci poseben poudarek nameniti izobraževanju bolnika, predvsem o razmerah shranjevanja in načinu aplikacije. Samo na ta način lahko zagotovimo, da bo imela uporaba zdravil z monoklonskimi protitelesi optimalne klinične, humanistične kot tudi ekonomske učinke zdravljenja.

6 LITERATURA

1. Elvin JG, Couston RG, et al. Therapeutic antibodies: market considerations, disease targets and bioprocessing. *Int J Pharm* 2013; 440 (1): 83–98.
2. U.S. National Institutes of Health. Clinical Trials. U.S. National Institutes of Health. Datum dostopa: 10. 8. 2013.
3. La Merie Publishing. <http://www.pipelinereview.com>. Datum dostopa: 10. 8. 2013.
4. Smith SL. Ten years of Orthoclone OKT3 (muromonab-CD3): a review. *J Transpl Coord* 1996; 6 (3): 109–119.
5. Shukla D, Schneider CP, et al. Molecular level insight into intra-solvent interaction effects on protein stability and aggregation. *Adv Drug Deliv Rev* 2011; 63 (13): 1074–1085.
6. Štrukelj B, Kos J. Terapevtska monoklonska protitelesa. V: *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*. Slovensko farmacevtsko društvo; 2007: 532–579.
7. European Medicines Agency. Povzetek temeljnih značilnosti zdravila Cimzia. <http://www.ema.europa.eu/ema/>. Datum dostopa: 11. 8. 2013.
8. European Medicines Agency. Povzetek temeljnih značilnosti zdravila Zevalin. <http://www.ema.europa.eu/ema/>. Datum dostopa: 25. 8. 2013.
9. Berrill A, Biddlecombe J, et al. Chapter 13 - Product Quality During Manufacture and Supply. In: Chris Van Der W, editor. *Peptide and Protein Delivery*. Academic Press; 2011: 313–339.
10. Ye H. Simultaneous determination of protein aggregation, degradation, and absolute molecular weight by size exclusion chromatography-multiangle laser light scattering. *Anal Biochem* 2006; 356 (1): 76–85.
11. Štrukelj B, Kos J. Razvoj farmacevtskih oblik. V: *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*. Slovensko farmacevtsko društvo; 2007: 186–279.
12. Wang W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm* 1999; 185 (2): 129–188.

13. Kamerzell TJ, Esfandiary R, et al. Protein-excipient interactions: Mechanisms and biophysical characterization applied to protein formulation development. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2011; 63 (13): 1118–1159.
14. Bee JS, Nelson SA, et al. Precipitation of a monoclonal antibody by soluble tungsten. *J Pharm Sci* 2009; 98 (9): 3290–3301.
15. Omersel J, Jurgec I, et al. Autoimmune and proinflammatory activity of oxidized immunoglobulins. *Autoimmunity Reviews* 2008; 7 (7): 523–529.
16. Parkins DA, Lashmar UT. The formulation of biopharmaceutical products. *Pharm Sci Technolo Today* 2000; 3 (4): 129–137.
17. Wang W, Nema S, et al. Protein aggregation--pathways and influencing factors. *Int J Pharm.* 2010; 390 (2): 89–99.
18. Lee HJ, McAuley A, et al. Molecular origins of surfactant-mediated stabilization of protein drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 2011; 63 (13): 1160–1171.
19. Daugherty AL, Mrsny RJ. Formulation and delivery issues for monoclonal antibody therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58 (5–6): 686–706.
20. Liu H, Gaza-Bulseco G, et al. Characterization of the stability of a fully human monoclonal IgG after prolonged incubation at elevated temperature. *Journal of Chromatography B* 2006; 837 (1): 35–43.
21. Arakawa T, Prestrelski SJ, et al. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 46 (1–3): 307–326.
22. Hawe A, Kasper JC, et al. Structural properties of monoclonal antibody aggregates induced by freeze-thawing and thermal stress. *Eur J Pharm Sci* 2009; 38 (2): 79–87.
23. Wang W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm* 2000; 203 (1–2): 1–60.
24. Chang BS, Kendrick BS, et al. Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1996; 85 (12): 1325–1330.
25. Department of Health and Social Security. Addition of drugs to intravenous infusion fluids - HC(76)9. http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20130107105354/http://www.dh.gov.uk/prod_consum_dh/groups/dh_digitalassets/@dh/@en/documents/digitalasset/dh_4068896.pdf. Datum dostopa: 19. 8. 2013.
26. NHS. Guideline for the Preparation or Manipulation of Monoclonal Antibodies (MABs) and related compounds such as Fusion Proteins, used in the Treatment of Cancer. http://www.birminghamcancer.nhs.uk/uploads/document_file/document/500fde6c358e98058500005c/Guideline_for_the_Preparation_or_Manipulation_of_Monoclonal_Antibodies_-_version_2.0.pdf. Datum dostopa: 19. 8. 2013.
27. South Australian Health Services. Safe Handling of Cytotoxic Drugs and Related Wastes: Guidelines for South Australian Health Services 2012. <http://www.sahealth.sa.gov.au/wps/wcm/connect/f8aa68004b3f6cf6a340afe79043faf0/SafeHandlingOfCytotoxicDrugsRelatedWastesGuideline-PHCS-120515.pdf?MOD=AJPERES>. Datum dostopa: 19. 8. 2013.
28. American Society of Clinical Oncology. The American Society of Clinical Oncology (ASCO) and the Oncology Nursing Society (ONS) Chemotherapy Administration Safety Standards. http://www.asco.org/sites/www.asco.org/files/asco_ons_chemotherapysafetystandards_v3-formatted.pdf. Datum dostopa: 19. 8. 2013.
29. Langford S, Fradgley S, et al. Assessing the risk of handling monoclonal antibodies. *Hospital Pharmacist* 2008; 15: 60–64.
30. Chemocato Software solutions. <http://www.chemocato.com/>. Datum dostopa: 19. 8. 2013.
31. Centralna baza zdravil. <http://www.cbz.si/>. Datum dostopa: 1. 5. 2014.
32. European Medicines Agency. Povzetek temeljnih značilnosti zdravila Remicade. <http://www.ema.europa.eu/ema/>. Datum dostopa: 22. 8. 2013.
33. European Medicines Agency. Povzetek temeljnih značilnosti zdravila Benlysta. <http://www.ema.europa.eu/ema/>. Datum dostopa: 22. 8. 2013.
34. Mahler HC, Muller R, et al. Induction and analysis of aggregates in a liquid IgG1-antibody formulation. *Eur J Pharm Biopharm* 2005; 59 (3): 407–417.
35. Zavod za zdravstveno zavarovanje Slovenije. Zdravila OZZ 2001 - 2012. <http://www.zzs.si/zzs/internet/zzs.nsf/o/CEECE65B19F25E4FC1257552002BEC54>. Datum dostopa: 9. 8. 2013.
36. Marty W, Sigrist T, et al. Temperature variations in automobiles in various weather conditions. An experimental contribution to the determination of time of death. *Am J Forensic Med Pathol* 2001; 22 (3): 215–219.
37. Grundstein A, Meentemeyer V, et al. Maximum vehicle cabin temperatures under different meteorological conditions. *Int J Biometeorol* 2009; 53 (3): 255–261.

38. Laguerre O, Flick D. Temperature prediction in domestic refrigerators: Deterministic and stochastic approaches. *International Journal of Refrigeration* 2010; 33 (1): 41–51.
39. James S, Evans J, et al. A review of the performance of domestic refrigerators. *Journal of Food Engineering* 2008; 87 (1): 2–10.
40. Zavod za zdravstveno zavarovanje Slovenije. Aneks št. 2 k Splošnemu dogovoru za pogodbeno leto 2010. <http://www.zzzs.si/ZZZS/info/egradiva.nsf/o/FF709F5DFC514F38C12578140028C543?OpenDocument>. Datum dostopa: 20. 8. 2013.

