

# IMUNOGENOST BIOLOŠKIH ZDRAVIL

## IMMUNOGENICITY OF BIOLOGICAL DRUGS

AVTOR / AUTHOR:

Doc. dr. Tomaž Bratkovič, mag. farm.

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,  
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: tomaz.bratkovic@ffa.uni-lj.si

## 1 UVOD

Sodobna biološka zdravila omogočajo spoprijemanje z boleznimi, ki so še pred nekaj desetletji veljale za neobvladljive. Številnih bolezenskih stanj seveda tudi danes ne znamo ozdraviti, a z razkritji molekularnih mehanizmov patofizioloških procesov se je močno razširil nabor prijemašč, na katera lahko zelo selektivno delujemo s strukturno zapletenimi (proteinskimi) učinkovinami in posledično vsaj učinkovito zavremo napredovanje bolezni ali izboljšamo kakovost bolnikovega življenja. Proteinske učinkovine izdelujemo z genskim inženirstvom (npr. hormone, citokine, dejavnike koagulacije in terapevtske encime), sintezno (le zelo majhne proteine, zgrajene iz do ~50 aminokislinskih ostankov) ali s hibridno tehnologijo (monoklonska protitelesa). Izražamo jih v celičnih kulturah ali transgenih organizmih, ki jih gojimo v nadzorovanih laboratorijskih pogojih, in jih izoliramo ter prečistimo v večstopenjskih procesih. Proizvodni proces izrazito vpliva na kakovost biološke učinkovine in je eden osrednjih dejavnikov, ki sooblikujejo njen imunogeni potencial (1). Aplikacija bioloških zdravil pri mnogih pre-

## POVZETEK

Odziv imunskega sistema prejemnika na učinkovino je eden od najpomembnejših in hkrati najpogostejših neželenih učinkov, povezanih z aplikacijo bioloških zdravil. Protitelesa, usmerjena proti učinkovini, lahko vplivajo na metabolizem in zadrževanje učinkovine v organizmu ali neposredno tekmujejo z endogenimi receptorji za njeno vezavo in so zato odgovorna za znižano učinkovitost zdravljenja. Dejavniki, ki vplivajo na imunogenost, so številni in ne povsem pojasnjeni. Prispevek poskuša povzeti aktualno razumevanje zapletenih procesov, ki vodijo do indukcije protiteles, in na osnovi tega pojasniti, katere ukrepe lahko sprejmemo za omejevanje imunogenosti v vseh fazah življenjskega cikla biološkega zdravila.

## KLJUČNE BESEDE:

biološka zdravila, imunogenost, protitelesa proti učinkovini

## ABSTRACT

Immunogenicity is one of the most important as well as most common adverse effects accompanying the application of biological drugs. Anti-drug antibodies can either affect metabolism and biological half-life of therapeutic proteins or compete with endogenous receptors for drug binding, thereby being responsible for the loss of efficacy over time. Factors contributing to immunogenicity are diverse and not fully understood. In the paper, current understanding of complex processes leading to induction of anti-drug antibodies is presented. Appropriate actions to mitigate immunogenicity of biological drugs are also discussed.

## KEY WORDS:

biological drugs, immunogenicity, anti-drug antibodies

jemnikih izzove imunski odziv, kar se največkrat kaže kot pojav protiteles proti učinkovini. Protitelesa so odgovorna za spremenjeno farmakokinetiko biološke učinkovine, lahko pa z vezavo na učinkovino neposredno onemogočijo njeno vezavo na receptor (2). Nekatera biološka zdravila pri subpopulacijah bolnikov sprožijo alergijske reakcije ali sindrom sproščanja citokinov, ki veljata za resna neželena učinka. V prispevku bomo pojasnili klinične posledice imunogenosti in jih podkrepili s primeri. Predstavili bomo imunske me-



hanizme, ki vodijo do pojava protiteles proti biološkim učinkovinam, in dejavnike, ki vplivajo na imunogenost. Na kratko bomo povzeli metodološke pristope za napovedovanje imunogenosti učinkovine med predkliničnimi raziskavami in za spremljanje imunogenosti biološkega zdravila v okviru kliničnih vrednotenj. Orisali bomo tudi ukrepe za omejevanje imunogenosti.

## 2 KLINIČNE POSLEDICE IMUNOGENOSTI BIOLOŠKIH ZDRAVIL

Protitelesa ali imunoglobulini (Ig) pripadajo več strukturnim in funkcijskim razredom. Zreli naivni limfociti B proizvajajo transmembranska nizkoafinitetna protitelesa razredov M ali D, t. i. B-celične receptorje (BCR). Aktivacija limfocitov B zahteva interakcijo pripadajočih antigenov z BCR in (običajno) sodelovanje limfocitov T (glejte tudi **3**). To vodi v proliferacijo in diferenciacijo limfocitov B, izločanje protiteles in afinitetno maturacijo ter zamenjavo izotipa imunoglobulinov v protitelesa razredov G, A ali E. Celice potomke aktiviranega limfocita B tako proizvajajo protitelesa z nespremenjeno antigensko specifičnostjo, a z novimi funkcijami, ki jih določa konstantna regija imunoglobulina. Posledice imunskega odziva na učinkovino so med drugim odvisne od razreda in podrazreda protiteles (**3**). Tako na primer IgE povežujemo z alergijskimi reakcijami, IgM zaradi visoke valence vezavnih mest za antigene (navkljub nizki afiniteti) učinkovito aktivirajo komplement in premrežijo Fc-receptorje na imunskih celicah, IgG<sub>4</sub> imajo visok nevtralizacijski potencial itd. Odziv imunskega sistema na biološko učinkovino kot tujek je razmeroma pogost pojav, a v večini primerov so neželeni učinki blagi ali s kliničnega vidika celo neopazni. Pred razvojem tehnologije rekombinantne DNA, ko so terapevtske proteine pridobivali izključno z izolacijo iz živalskih ali človeških tkiv in so uporabljali manj sofisticirane metode čiščenja učinkovin, je bila verjetnost alergijskih reakcij pri prejemnikih bioloških zdravil neprimerno večja. Danes so iatrogene anafilaktične reakcije razmeroma redke. Do njih pride, kadar pacient biološko zdravilo prejme večkrat. Ob prvem stiku z učinkovino (senzitivizaciji) imunski sistem tvori protitelesa razreda E, ki se s konstantno regijo usidrajo na receptorje FcεR na bazofilcih in mastocitih, pri naslednji aplikaciji zdravila pa učinkovina z vezavo na protitelesa izzove degranulacijo teh imunskih celic in sproščanje vnetnih mediatorjev histamina, levkotrienov in prostaglandinov (**4**). Druga vrsta t. i. infuzijskih reakcij, sindrom sproščanja citokinov, ni po-

gojena s predhodno senzitivizacijo, temveč sloni na aktivaciji nespecifičnih imunskih komponent, kot so sistem komplementa, fagociti in naravne celice ubijalke. Značilna je za monoklonska protitelesa, usmerjena proti površinskim antigenom (rakavih) celic, kakršna sta rituksimab in alemtuzumab. Iz uničenih celic (kot tudi iz rekrutiranih imunskih celic) se lahko sprostijo večje količine citokinov (**4**, **5**). V obeh primerih simptomi segajo od blagih, kot so srbečica, rdečica in povišana telesna temperatura, ki jih blažimo z antihistaminiki in antipiretiki, do življenjsko ogrožajočih, ki zahtevajo prekinitev infuzije in urgentno zdravljenje.

Protitelesa, ki jih tvori prejemnikov imunski sistem proti učinkovini, praviloma pospešijo njeno izločanje na račun obsežnega odstranjevanja s fagociti retikuloendotelijskega sistema (**2**, **6**). Pogosto zato beležimo upad učinkovitosti zdravljenja s časom. Dejstvo, da so biološke učinkovine imunogene, zaplete odnos med farmakokinetiko in farmakodinamiko in s tem otežuje napovedovanje odzivnosti na zdravilo. V nekaterih primerih protitelesa podaljšajo biološki razpolovni čas učinkovine. Če so imunski kompleksi relativno majhni, predstavljajo slabše substrate za fagocitozo; k daljšemu zadrževanju učinkovine v telesu pripomorejo z recikliranjem prek vezave na neonatalne Fc-receptorje v endosomih endotelijskih celic ter z omejevanjem glomerulne filtracije (**2**, **6**, **7**).

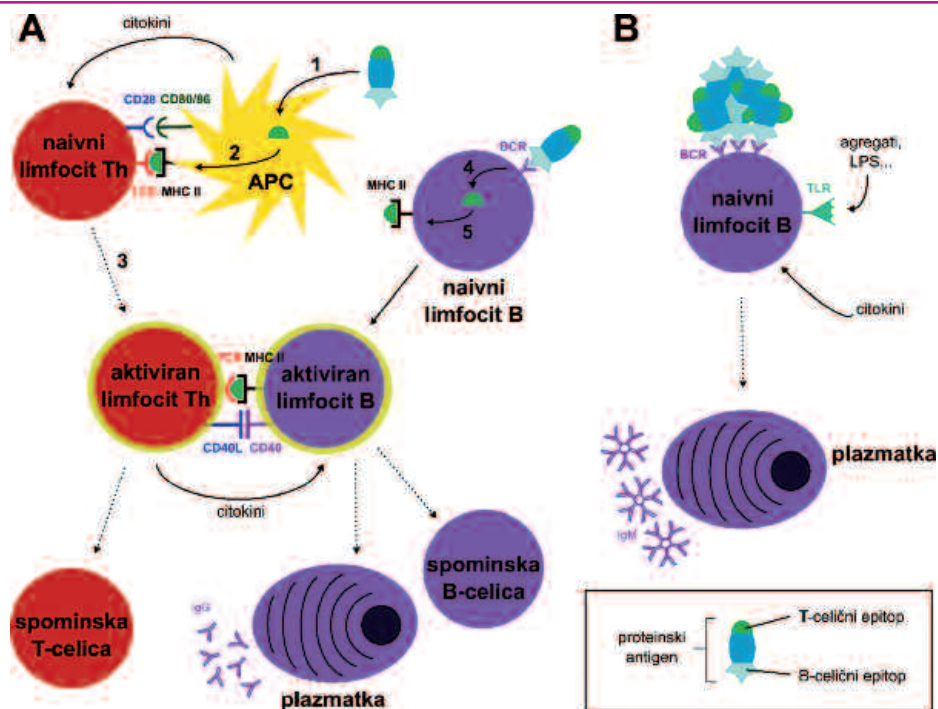
Posebna vrsta protiteles proti biološki učinkovini so nevtralizacijska protitelesa (**2**). Ta zasedejo vezavna mesta za receptor na površini molekule terapevtskega proteina, s čimer z receptorji tekmujejo za vezavo učinkovine. Neposreden vpliv protiteles na farmakodinamiko so med drugim opisali za rekombinantni rastni hormon (**8**), eritropoetin (**9**) in dejavnik koagulacije VIII (**10**). Številne biološke učinkovine so posnetki endogenih molekul, zato obstaja nevarnost, da nevtralizacijska protitelesa ob navzkrižni reaktivnosti onemogočijo delovanje tudi telesu lastnim proteinom. Najbolj razvpit je izbruh popolne aplazije rdečih krvničk pri bolnikih, zdravljenih z rekombinantnim eritropoetinom (**9**) (glejte **3.2.2**). Edini preostali terapevtski poseg pri neodzivnosti na eritropoetin je redna transfuzija.

## 3 IMUNSKI MEHANIZMI, ODGOVORNI ZA POJAV PROTITELES PROTI BIOLOŠKIM UČINKOVINAM

Proteinske učinkovine lahko v splošnem sprožijo tvorbo protiteles po dveh poteh. V prvi pri aktivaciji limfocitov B

sodelujejo T-celice pomagalk (1, 11), zato jo imenujemo *od limfocitov T odvisna aktivacija limfocitov B* (slika 1A). Povezujemo jo predvsem z (rekombinantnimi) proteinskimi učinkovinami, ki ne izhajajo iz človeškega organizma (torej s takimi, ki v strukturi nosijo tuje T-celične epitope). Pri tem

nastajajo visokoafinitetna protitelesa razreda IgG, ki so prisotna v visokih titrih. Značilno je tudi oblikovanje imunskega spomina, saj nekateri aktivirani limfociti B postanejo dolgožive spominske celice B, ki se v primeru ponovnega stika z antigenom hitro preobrazijo v efektorske celice (plaz-



**Slika 1:** Dve poti proženja tvorbe protiteles proti proteinski učinkovini (prirejeno po (12)). A. *Od limfocitov T odvisna aktivacija limfocitov B:* Antigen predstavljena celica (APC) fagocitira protein [1], ga razgradi na krajše antigenske peptide, ki jih predstavi na svoji površini vezane na poglobilni histokompatibilnostni kompleks razreda II (major histocompatibility complex class II, MHC II) [2]. Naivna T-celica pomagalka (Th) s T-celičnim receptorjem (TCR) »prepozna« pripadajoči T-celični epitop in sočasno prejme še dodatne aktivacijske signale (posredovane s CD80/86 na CD28), kar sproži aktivacijo in proliferacijo Th [3]. Naivni limfocit B »prepozna« B-celični epitop enakega antigena z B-celičnim receptorjem (BCR), antigen internalizira [4], razgradi in predstavi T-celične epitope na MHC II [5]. Slednje »spoznajo« predhodno aktivirani limfociti Th, ki spodbudijo proliferacijo specifičnih limfocitov B in njihovo diferenciacijo do plazmatk in dolgoživih spominskih limfocitov B. Podobno kot pri aktivaciji Th tudi aktivacija limfocitov B zahteva dodatno stimulatorno signalizacijo (vezavo CD40L na CD40). B. *Neposredna (od limfocitov T neodvisna) aktivacija limfocitov B:* Ponavljajoči epitopi na površini proteinskega agregata so odgovorni za združevanje BCR na površini naivnih limfocitov B, kar sproži znotrajcelično signalizacijo, ki vodi v aktivacijo in diferenciacijo do plazmatk. Kostimulatorni signali v obliki ligandov receptorjev TLR tudi prispevajo k aktivaciji, proliferaciji in diferenciaciji limfocitov B, podobno velja za nekatere citokine, ki jih izločajo naravne celice ubijalke in limfociti T. LPS – lipopolisaharid.

**Figure 1:** Two pathways leading to anti-drug antibodies (adopted from (12)). A. *T-cell dependent B-cell activation:* Antigen-presenting cell (APC) takes up a protein by phagocytosis, processes it and displays short antigenic peptides bound to major histocompatibility complex II (MHC II). Naive helper cell (Th) "recognizes" the cognate T-cell epitope via T-cell receptor (TCR). Concurrent stimulatory signals (conveyed by CD80/86 binding to CD28) trigger activation and proliferation of Th lymphocytes. Naive B-cell "recognizes" the B-cell epitope of the same antigen via B-cell receptor (BCR), internalizes the antigen, processes it and displays T-cell epitopes bound to MHC II. These, in turn, are "recognized" by previously activated Th-cells, responsible for proliferation of specific B-cells and inducing their differentiation into antibody-producing plasma cells and long-lived memory B-cells. As with Th-cell activation, activation of B-cells requires additional stimulatory signaling (binding of CD40L to CD40). B. *Direct (T-cell independent) activation of B-cells:* Epitope arrays on the surface of protein aggregates induce clustering of BCRs on naive B-cells, leading to intracellular signaling, resulting in activation and differentiation into plasma cells. Co-stimulatory signals, such as TLR ligands, contribute to the activation, proliferation and differentiation of B-cells, as do cytokines secreted by natural killer cells and T-cells. LPS – lipopolysaccharide.



matke). Alternativno aktivacija limfocitov B lahko poteka tudi brez pomoči T-celic pomagalk, pri čemer sodelujejo periferne dendritične celice, ki predstavijo antigen limfocitom B (1). *Neposredna aktivacija limfocitov B* (slika 1B) je pogojena s prisotnostjo agregatov – topnih ali netopnih skupkov proteinov v nativni ali denaturirani obliki, povezanih s kovalentnimi ali nekovalentnimi vezmi – ki s ponavljajočimi površinskimi epitopi izzovejo združevanje B-celičnih receptorjev, in sekundarnih signalov – snovi, ki izzovejo aktivacijo nespecifičnih imunskih mehanizmov (eksogenih ali endogenih ligandov t. i. vzorčno prepoznavnih receptorjev (*pattern-recognition receptors*), npr. receptorjev TLR (*Toll-like receptors*)) (12). Po tej poti nastala protitelesa so praviloma nizkoafinitetna in pretežno pripadajo razredu IgM. Brez sodelovanja T-celic pomagalk se imunski spomin ne oblikuje.

### 3.1 IMUNOGENOST ČLOVEŠKIH PROTEINOV

Imunski sistem se načeloma ne odziva na avtologne (endogene) proteine (in rekombinantne »posnetke« endogenih proteinov). Razlog za to sta negativna selekcija limfocitov, ki med dozorevanjem v primarnih limfatičnih organih pridejo v stik s telesu lastnimi proteini, in odsotnost kostimulacije ob stiku zrelih limfocitov z avtoantigenom. Nasprotno je verjetnost odziva na telesu tuje proteine (neoantigene) bistveno večja – pojav je relativno hiter in obsežen. Kljub temu opazamo, da tudi človeški proteini lahko sprožijo tvorbo protiteles. To se kaže tako v primeru avtoimunskih bolezni kot (relativno pogosto) pri aplikaciji rekombinantnih učinkovin. Govorimo o pojavu *porušenja tolerance* do lastnih antigenov. Domnevno je toleranca do lastnih antigenov nepopolna (tj. limfociti B in T, specifični za posamezne avtoantigene, med procesom dozorevanja ne odmrejo v celoti), kadar je stopnja izražanja endogenega proteina nizka (1). Preživeli limfociti ob stiku z (rekombinantnim) antigenom, a brez dodatnih stimulatornih signalov, postanejo anergični (11). Če pa prejmejo še kostimulatorne signale (*danger signals*; npr. snovi, ki se sproščajo iz poškodovanih tkiv, evolucijsko ohranjene sestavne dele patogenov ali proteinske agregate), pride do imunskega odziva (12). Pojav protiteles proti učinkovini kot posledica porušenja imunske tolerance je dolgotrajen proces in je običajno povezan s kronično aplikacijo biološkega zdravila.

### 3.2 DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA IMUNOGENOST BIOLOŠKIH UČINKOVIN

Dejavniki, ki vplivajo na imunogenost proteinskih učinkovin, so raznovrstni in jih ne razumemo popolnoma. V splošnem

jih lahko razdelimo na 1) dejavnike, povezane s samim produktom (npr. narava proteina, izbran ekspresijski sistem, pogoji, ki jim je učinkovina izpostavljena v fermentorju, med procesom izolacije, formulacije in pri shranjevanju, učinkovitost odstranitve nečistot), 2) dejavnike, povezane s prejemnikom (npr. morebitna imunokompromitiranost, bolezensko stanje, genetsko ozadje) in 3) dejavnike, povezane z zdravljenjem (npr. koterapija z imunosupresivnimi zdravili, pogostost aplikacije, odmerek).

#### 3.2.1 Vpliv narave proteina in izbire ekspresijskega sistema na imunogenost proteinske učinkovine

Čeprav vsi proteini, torej tudi človeški, lahko inducirajo nastanek protiteles, je pojav bistveno bolj verjeten pri bioloških učinkovinah s tujimi T-celičnimi epitopi. Primeri takšnih učinkovin so streptokinaza, trombolitik iz beta-hemolitičnih streptokokov, ali himerna protitelesa, ki vsebujejo dobršen del strukture mišjih imunoglobulinov. Določene bolezni, ki so posledica odsotnosti endogenih proteinov zaradi mutacij v genih, ki jih kodirajo, zdravimo z aplikacijo eksogenih, običajno pridobljenih s tehnologijo rekombinantne DNA (pristopu pravimo nadomestno zdravljenje). V teh primerih predstavljajo tudi človeški proteini za prejemnika neoantigene, saj limfociti med dozorevanjem ne naletijo nanje. To pojasni opažanja, da pri bolnikih s hujšo obliko hemofilije A (ko dejavnik koagulacije VIII (fVIII) endogeno sploh ne nastaja), ki jih zdravimo z rekombinantnim fVIII, pogosto pride do indukcije protiteles (t. i. inhibitorjev) (13, 14), ki močno znižajo učinkovitost zdravljenja.

Pomemben dejavnik imunogenosti je intrinzična biološka aktivnost proteina (15). Na primer, incidenca indukcije protiteles pri zdravljenju z imunostimulativnimi molekulami, kot so aldeslevkin (rekombinantni človeški interleukin 2 (rhIL-2)) in interferoni, je relativno visoka. Po drugi strani so rhIL-2 in interferoni izjemno slabo topni, kar utegne biti vzrok za agregacijo učinkovine (1).

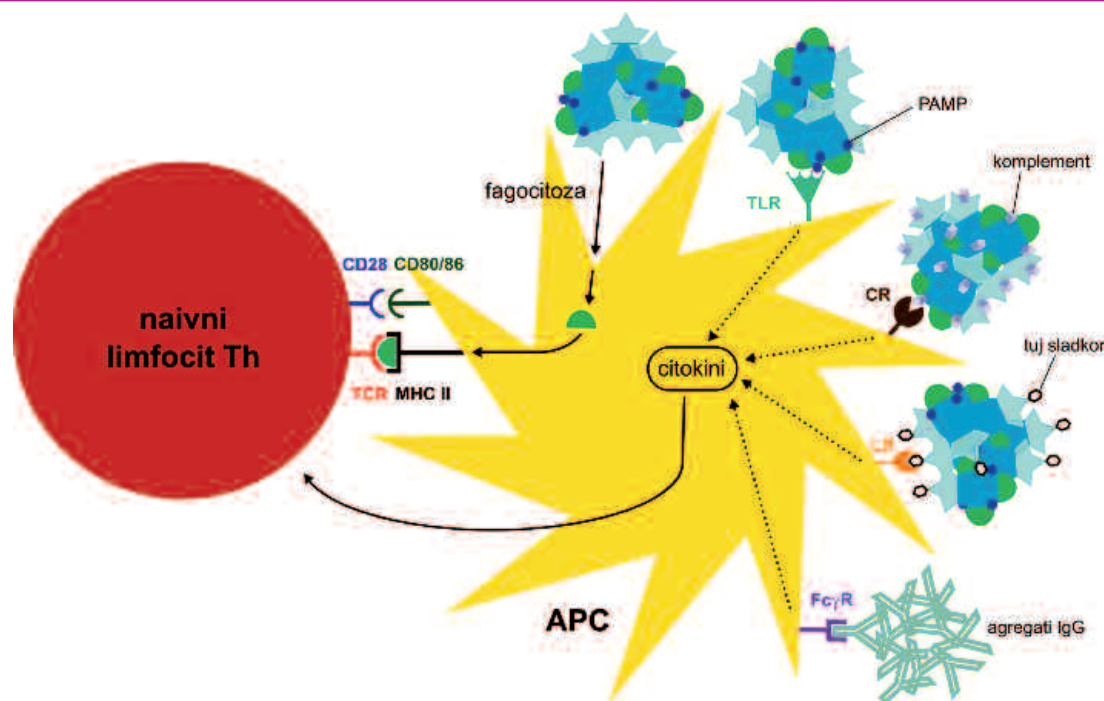
Biološka aktivnost nekaterih terapevtskih proteinov je odvisna od glikozilacije, kar narekuje izbiro ekspresijskega sistema (le evkariontske celice so namreč sposobne konjugacije proteinov s sladkornimi komponentami, zato za izražanje proteinov z bolj zapleteno zgradbo uporabljamo predvsem sesalske celične kulture in kvasovke). Kvasovke pripenjajo sladkorje tudi na položaje, na katerih jih v človeških proteinih ni, poleg tega se glikozilacijski profil pri kvasovkah (sladkorji so sestavljeni pretežno iz manoznih ostankov, t. i. hipermanozilacija) močno razlikuje od tistega pri sesalcih (kjer je nabor sladkorjev širši). Napačen glikozilacijski profil je lahko vzrok povišane imunogenosti, saj tuji

oligosaharidi okrepijo fagocitozo antigen-predstavitvenih celic prek vezave na lektinske vzorčno prepoznavne receptorje (16) (zlasti v primeru tvorbe agregatov (glejte **3.2.2**)) ali predstavljajo neoepitope (17). Izrazit primer je v tem pogledu sladkorni epitop Gal $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R (krajše  $\alpha$ -Gal). Primati smo med evolucijo izgubili funkcionalnost encima UDP-Gal:3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc  $\alpha$ 1-3-galaktoziltransferaze, odgovornega za sintezo epitopa  $\alpha$ -Gal, in pri ljudeh zaradi senzitivacije s hrano ali s piki klosov predstavljajo protitelesa, usmerjena proti  $\alpha$ -Gal, kar do 1 % vseh imunoglobulinov, vključujoč razred E (18). Dokumentirani so primeri, ko so pacienti pri infuziji cetuksimaba (himernega protitelesa, izraženega v glodalski celični liniji CHO (ovarijske celice kitajskega hrčka; *Chinese hamster ovary cells*)) do-

živeli anafilaktično reakcijo zaradi prisotnosti epitopa  $\alpha$ -Gal (19, 20).

Aktivnost nekaterih terapevtskih proteinov je sicer neodvisna od glikozilacije in jih posledično lahko ekonomično izražamo v bakteriji *Escherichia coli*, a sladkorne komponente domnevno maskirajo potencialne epitope in izboljšajo topnost (tj. preprečujejo agregacijo učinkovine). Tako je neglikozilirani interferon  $\beta$ 1b, ki ga izražamo v *E. coli*, bolj imunogen od glikoziliranega  $\beta$ 1a, izraženega v celicah CHO (21).

Profil nečistot, ki lahko učinkujejo kot adjuvanti (npr. lipo polisaharidi iz zunanje membrane *E. coli*, nemetilirani motivi CpG bakterijske DNA in rezidualni proteini gostiteljskih celic), je primarno odvisen od izbranega ekspresijskega si-



**Slika 2:** Interakcije proteinskih agregatov z antigen predstavitvenimi celicami (APC) (prirejeno po (12)): Receptorji TLR vežejo agregate, ki spominjajo na molekularne vzorce, povezane s patogeni (pathogen-associated molecular patterns, PAMP). Receptorji komplementa (CR) prepoznavajo s komplementom opsonizirane (gliko)proteinske agregate. Na lektinske receptorje (LR) se vežejo glikoproteini s telesu tujimi sladkorji. Agregati terapevtskih protiteles se lahko vežejo na receptorje za imunoglobulinsko regijo Fc (Fc $\gamma$ R). Opisane interakcije so pogoj za receptorsko posredovano fago- in endocitozo (ni prikazano) kot tudi proženje signalizacijskih poti, ki vodijo v aktivacijo antigen predstavitvenih celic in s tem sproščanje citokinov ter povišano izražanje MHC II in ligandov kostimulatornih receptorjev (npr. CD80 in CD86). Ti procesi prispevajo k aktivaciji naivnih limfocitov Th in posledični aktivaciji limfocitov B (glejte sliko 1).

**Figure 2:** Interactions of (glyco)protein aggregates with antigen-presenting cells (APC) (adopted from (12)): TLR receptors bind aggregates mimicking pathogen-associated molecular patterns (PAMP). Complement receptors (CR) interact with complement-opsonized aggregates. Lectin receptors (LR) bind foreign saccharides. Aggregates of therapeutic antibodies are bound by Fc receptors (Fc $\gamma$ R). In addition to providing stimulatory signals via receptor binding, aggregates are taken up by receptor-mediated phago-/endocytosis (not shown). APC activation results in cytokine secretion and upregulation of MHC II and co-stimulatory receptors (e.g., CD80 and CD86). The described processes contribute to activation of naïve Th-cells and (indirectly) B-cells (see Figure 1).

stema, njihova vsebnost pa od procesa čiščenja učinkovine (glejte **3.2.2**).

### 3.2.2 Vpliv proizvodnega procesa in razmer shranjevanja biološkega zdravila na imunogenost proteinske učinkovine

Proizvodni proces določa lastnosti biološkega zdravila. Glikozilacijski profil rekombinantnega proteina je primarno odvisen od izbranega ekspresijskega sistema, a na porazdelitev glikozilacijskih izooblik močno vplivajo tudi razmere v fermentorju (22-24). Katere nečistote in v kakšnem obsegu bodo prisotne v končnem zdravilu, je med drugim odvisno od tega, ali celice rekombinantni protein izločajo v gojišče (v nasprotnem primeru je celice potrebno lizirati, pri čemer se iz njih ob rekombinantni učinkovini sprostijo tudi celični proteini) in kako načrtujemo proces izolacije in čiščenja, npr. afinitetna kromatografija je izjemno specifična in omogoča odstranitev večine nečistot, povezanih z ekspresijskim sistemom, že v enem koraku (25). Razmere, ki jim je biološka učinkovina izpostavljena v fermentorju, med izolacijo, čiščenjem in formulacijo (povišana temperatura ali zamrzovanje, prisotnost kisika, svetloba, visok tlak, hidroliza s proteazami in glikozidazami, ekstremi pH in ionske jakosti, adsorpcija na površine, velika koncentracija učinkovine, z učinkovino nekompatibilne pomožne snovi), lahko privedejo do sprememb na (gliko)proteinu, kot so denaturacija, agregacija, fragmentacija, deamidacija in oksidacija, ki spremenijo imunogeni profil učinkovine (1). Podobno moramo biti pozorni tudi na razmere med shranjevanjem in transportom zdravila ter pri izdaji pacienta opozoriti na posebnosti biološkega zdravila.

Agregati proteinske učinkovine predstavljajo največji dejavnik tveganja za pojav imunogenosti. Antigen predstavljene celice namreč učinkoviteje vzorčijo proteinske antigene v agregirani obliki v primerjavi z monomeri, kar je osnovni razlog za večjo verjetnost vpletenosti limfocitov Th v oblikovanje imunskega odziva proti učinkovini (12). Ne le da so agregati boljši substrat za fagocitozo, prek interakcij z raznovrstnimi receptorji (slika 2) spodbudijo aktivacijo antigen predstavitevnih celic, kar se odraža v izločanju provnetnih citokinov in povišanem izražanju MHC II ter kostimulatornih membranskih proteinov. Podobno lahko tudi rezidualni proteini gostiteljskih celic, lipopolisaharidi, bakterijska DNA ali afinitetni ligandi, sproščeni iz kromatografskih kolon, aktivirajo površinske in znotrajcelične vzorčno prepoznavne receptorje antigen predstavitevnih celic.

V znanstveni literaturi je opisanih nekaj primerov imunogenosti proteinskih učinkovin, ki so verjetno posledica prisotnosti agregatov v biološkem zdravilu (12). Vzročna analiza

je sicer težavna, saj na pojav protiteles vplivajo številni drugi dejavniki, ki jih slabo razumemo, kot je genetika (glejte **3.2.3**), pa tudi kvantitativna analitika agregatov je težavna, saj zajemajo zelo široko območje velikosti (od topnih dimerov pa vse do makroskopskih delcev). Veliko je poročil o povišani imunogenosti proteinov, izpostavljenih stresnim dejavnikom, na živalskih modelih, medtem ko je vrednotenje imunogenosti med kliničnim preizkušanjem zdravila težavno (tako zaradi relativne redkosti pojavnosti kot pomanjkanja standardiziranih metod (glejte **4**)). Najbolje dokumentiran pojav indukcije nevtralizacijskih protiteles proti biološki učinkovini, zaznan s farmakovigilancnim nadzorom, sega v pozna devetdeseta leta in je povezan s spremembo formulacije in/ali zamenjavo primarne ovojnine rekombinantnega eritropoetina, epoetina alfa (9, 26). Pred tem časom so kot ekscipient uporabljali humani serumski albumin, izoliran iz plazme krvodajalcev, nakar ga je proizvajalec za evropsko tržišče s ciljem stabilizacije učinkovine zamenjal s sintezniema polisorbatom 80 in glicinom. Hkrati so spremenili vsebnik – iz večodmerne viala so prešli na enoodmerne brizge. Produktno spremembo je spremljal skokovit porast v frekvenci pojavnosti nevtralizacijskih protiteles proti učinkovini med prejemniki v Evropi. Vzrok zanjo so pripisali vgrajevanju epoetina v micelle polisorbata 80 in s tem posnemanju strukture proteinskih agregatov z vidika ponavljajočih se površinskih epitopov (26). Druga hipoteza skuša pojasniti vzrok za nenadno povišano imunogenost biološkega zdravila s sproščanjem adjuvantov iz gumijastih batnih tesnil brizg (26). Zanimiv je tudi pojav nevtralizacijskih protiteles proti epoetinu alfa, opisan med kliničnim vrednotenjem podobnega biološkega zdravila, zaradi česar so raziskavo prekinili (27). Kot vzrok imunogenosti so identificirali sproščanje volframovih spojin iz sten steklenih brizg, kamor so zašle med proizvodnjo primarne ovojnine. V kasnejših poskusih *in vitro* so dokazali, da različne volframove spojine že v koncentracijah 200 ppm izzovejo denaturacijo in agregacijo epoetina (28).

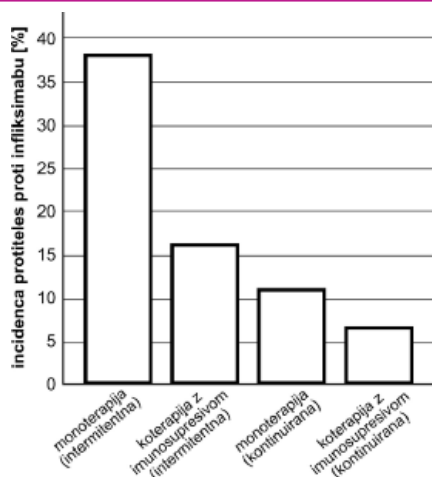
### 3.2.3 Dejavniki, povezani s prejemnikom, ki vplivajo na imunogenost biološke učinkovine

Protitelesa proti učinkovini se pri nekaterih pacientih pojavijo relativno hitro, pri drugih pozno ali sploh ne. Razlogi za to niso povsem pojasnjeni, a verjetno ima pomemben vpliv genetsko ozadje, saj so v več raziskavah potrdili povezavo med alelnim polimorfizmom genov *HLA*, ki kodirajo komponente MHC II, in indukcijo protiteles pri bolnikih, zdravljenih z biološkim zdravilom (29, 30). Predpostavljajo, da različice MHC II vežejo posamezne antigenske peptide z različno afiniteto. Imunokompetenca prejemnika je še en

pomemben dejavnik – pri starejših bolnikih (ki jim imunski sistem peša) in tistih, ki sočasno prejemajo imunosupresivne učinkovine, je verjetnost indukcije protiteles manjša (31) (glejte **3.2.4**).

### 3.2.4 Vpliv terapevtskega režima in koterapije na imunogenost biološke učinkovine

Kratkotrajno zdravljenje z biološkimi zdravili povezujemo z manjšo verjetnostjo indukcije protiteles proti učinkovini, kot to velja za kronično terapijo. Pri dolgotrajnem zdravljenju so manjši odmerki praviloma bolj imunogeni kot veliki odmerki, kar se sklada s popolnejšo tolerančnostjo imunskega sistema do obsežneje izraženih lastnih antigenov. Strategijo večjih odmerkov in krajših odmernih intervalov na začetku zdravljenja zato včasih izkoriščamo za omejevanje imunogenosti biološkega zdravila (31, 32). Podoben pristop uporabljamo tudi, kadar skušamo doseči indukcijo tolerance, ko se protitelesa pri pacientu že pojavijo. V nekaterih primerih, npr. pri zdravljenju kroničnih vnetnih črevesnih bolezni, je tudi z vidika omejevanja imunogenosti biološkega zdravila (in ne zgolj za doseg sinergističnega učinka) smiselna sočasna aplikacija imunosupresivnih učinkovin (slika 3) (31). Poročajo tudi o večji incidenci indukcije protiteles pri intermitentnem zdravljenju v primerjavi z enakomernim odmerjanjem zdravila (slika 3).



**Slika 3:** Incidenca pojava protiteles, usmerjenih proti infliksimabu, med 72-tedensko raziskavo pri pacientih s Crohno boleznijo, ki so prejemali zdravilo občasno ali v rednih intervalih (tj. kontinuirano), bodisi kot monoterapijo ali v kombinaciji z imunosupresivom ((33), povzeto po (31)).

**Figure 3.** Incidence of anti-infliximab antibodies at any time during 72-week-trial in Crohn disease patients receiving the drug as monotherapy or in combination with an immunosuppressive, either episodically or continuously ((33), adopted from (31)).

Način aplikacije sicer ni dejavnik, ki bi sam po sebi določal imunogenost biološkega zdravila, a je znano, da je verjetnost oblikovanja protiteles proti učinkovini največja pri subkutani aplikaciji (34). Podkožna tkiva so namreč bogata z antigen predstavitvenimi celicami, ključnimi za oblikovanje močnega imunskega odziva (slika 1). Učinkovina tvori na mestu aplikacije depo, od koder se le počasi sprošča in njena lokalna koncentracija je tam zelo velika, kar prispeva k večji verjetnosti vzorčenja in imunskega procesiranja proteinske učinkovine. Tudi bezgavke, kjer se zbirajo zreli naivni limfociti, so v neposredni bližini podkožja.

## 4 SPREMLJANJE IMUNOGENOSTI MED RAZVOJEM ZDRAVIL

Evropska agencija za zdravila (EMA) je že pred več kot desetletjem oblikovala smernice za ovrednotenje imunogenosti učinkovin in zdravil med njihovim razvojem; prenovljena splošna smernica bo stopila v veljavo z decembrom 2017 (35). Ker je napovedna vrednost ocen imunogenosti med predkliničnim razvojem omejena (vezana je na uporabo živalskih modelov, večina terapevtskih proteinov pa je človeške narave in so zaradi medvrstnih razlik za živali imunogeni), EMA ne zahteva spremljanja odziva imunskega sistema na učinkovino že v tej fazi razvoja. V nekaterih primerih je kljub temu smiselno izvesti poskuse na živalih, npr. kadar želimo pridobiti informacije o posledicah imunskega odziva na učinkovino, s katero nimamo bogatih izkušenj. Nekatere alternative poskusom na živalih v zgodnjih fazah razvoja so napovedovanje T-celičnih epitopov *in silico*, vrednotenje vezave na MHC II *in vitro* (npr. kompeticija proteinskih fragmentov (sinteznih peptidov) z visokoafinitetnimi agretopi (tj. peptidi, ki se vežejo na MHC II)) in spremljanje citokinskega odziva na učinkovino *in vitro*, zlasti s kokultivacijo dendritičnih celic in limfocitov T, izoliranih iz naivnih prostovoljcev, v prisotnosti potencialnega imunogena (indukcijo citokinov, ki je indikator aktivacije celične komponente imunskega odziva, nato spremljamo s tehniko elisot ali s pretočno citometrijo) (11). Tudi ti pristopi imajo le omejeno napovedno vrednost. Zanimivi so tudi modeli transgenih miši, ki bodisi izražajo človeški protein, katerega imunogenost vrednotimo, s čimer v osnovi izkazujejo imunsko toleranco do učinkovine, ali nosijo v genomu zapis za človeške gene *HLA* in tako bolje posnemajo imunsko procesiranje antigenov pri človeku (11).



Med kliničnim vrednotenjem zdravila EMA izrecno zahteva analizo imunogenosti, običajno vezano na spremljanje pojava in karakterizacijo protiteles proti učinkovini, tipično v korelaciji z učinkovitostjo (tj. vpliv na farmakokinetiko in farmakodinamiko) in varnostjo. Protitelesa v serumu pacientov je potrebno spremljati celoten čas raziskave. Tako lahko ocenimo, ali je imunski odziv le prehodnega značaja (torej s časom izzveni) ali pa je persistenten. Analitika protiteles proti učinkovini poteka po korakih. Praviloma najprej uporabimo zelo občutljiv presejalni test, ki mu sledi potrditveni test, s katerim izločimo lažno pozitivne rezultate. V nadaljevanju z biološkimi testi preverimo, ali imajo protitelesa nevtralizacijski značaj, in ocenimo še njihov titer, afiniteto, izotip in/ali kartiramo pripadajoče antigenske determinante na proteinski učinkovini. Pri validaciji testov uporabljamo tako pozitivno kontrolo (v idealnem primeru humani serum z visokim titrom protiteles proti učinkovini, a ga smemo nadomestiti tudi z živalskim serumom) kot negativno kontrolo (serum naivnih prostovoljcev). Vsakemu pacientu odvzamemo še serum pred začetkom zdravljenja z biološkim zdravilom za oceno nespecifične reaktivnosti z učinkovino (*baseline signal*).

V nekaterih primerih so resni neželeni učinki, povezani z imunogenostjo zdravila, izjemno redki in jih zato ne znamo med kliničnimi raziskavami. EMA zaradi tega predpisuje spremljanje imunogenosti zdravila tudi po sprostitvi na trg v okviru farmakovigilančnega nadzora, katerega pomemben del je načrt obvladovanja tveganja. Ta mora med drugim vsebovati navedbo kazalcev imunskega odziva, podrobne opise metod za detekcijo, kvantifikacijo in karakterizacijo protiteles, ukrepe za minimizacijo tveganja in omejevanje imunogenosti (npr. načrt prehoda na intravensko aplikacijo zdravila), navodila zdravstvenim delavcem, kako ravnati ob pojavu protiteles (npr. povečanje odmerka, skrajšanje odmernega intervala ali prekinitve zdravljenja) ter komunikacijske kanale ob detekciji neželenih učinkov. Spremljanje imunogenosti je tudi v tej stopnji vrednotenja zdravila precej problematično, saj testi niso robustni in standardizirani. Tako prihaja do precejšnjih odstopanj med rezultati različnih analizičnih laboratorijev. Največ so v uporabi imunokemijski testi (npr. encimskoimunski test (ELISA: direktna, indirektna, premostitvena, kompetitivna) ali radioimunski test (RIA)) in biosenzorji na osnovi površinske plazmonske resonance, s katerimi spremljamo protitelesa proti učinkovini. Kot komplementarne pristope uporabljamo teste stimulacije (sproščanje citokinov) ali proliferacije limfocitov Th ob stiku z antigen predstavitevimi celicami, ki so procesirale učinkovino.

## 5 SKLEP

Odziv imunskega sistema na učinkovino je najpogostejši neželeni učinek, povezan z aplikacijo bioloških zdravil. Klinične posledice je težko napovedati in so zelo raznolike: od nezaznavnih do življenje ogrožajočih. Številne dejavnike, ki vplivajo na imunogenost, slabo poznamo, zato je toliko pomembneje, da posvečamo večjo pozornost kakovosti zdravila. Nedvomno lahko z optimizacijo proizvodnje na vseh korakih (od izbire genske informacije, ki kodira rekombinantni protein, do ekspresijskega sistema, ki izvaja zahtevane posttranslacijske modifikacije, učinkovitega čiščenja učinkovine (npr. zagotavljanje odsotnosti agregatov in/ali kontaminantov, ki bi utegnili delovati kot adjuvant) in pazljive formulacije, ki ohranja nativno konformacijo terapevtskega proteina) močno omejimo imunogenost, ne moremo pa je povsem odpraviti. Spregledati ne gre niti pravilnega shranjevanja biološkega zdravila, saj v nasprotnem primeru tvegamo, da nastajajo s produktom povezane imunogene nečistote tudi kasneje med življenjskim ciklom zdravila. Kot učinkovit pristop za omejevanje imunskega odziva sta se v nekaterih primerih izkazala modulacija terapevtskega režima in koterapija z imunosupresivi. Učinkovita strategija zniževanja imunogenega potenciala je konjugacija proteinske učinkovine s hidrofilno verigo polietilenglikola (t. i. PEGilacija) (36). PEGilacija izboljša topnost proteinov (posredno omejuje agregacijo), ovira procesiranje proteina v antigen predstavitevni celici, maskira epitope (preprečuje dostop protiteles do učinkovine) ter upočasni eliminacijo iz organizma (posledica so manjša nihanja v plazemskih koncentracijah učinkovine). Zgolj na eksperimentalnem nivoju se kot možnost omejevanja imunogenosti omenja mutageneza proteinov s ciljem odstranjevanja agretopov ali T-celičnih epitopov (11). Težavo pri tem predstavlja nevarnost, da s poseganjem v strukturo proteinov izgubimo biološko aktivnost ali oblikujemo nove antigenske determinante.

Vsakršen poseg v proizvodni proces teoretično lahko vodi v spremembo imunogenega potenciala rekombinantne učinkovine, kar utegne biti posledica že minimalnih fizikalno-kemijskih ali strukturnih sprememb proteina, ki jih z analizičnimi metodami morebiti ne zaznamo. Pri *spremembah proizvodnega procesa* je zato običajno potrebno potrditi, da je incidenca protiteles proti učinkovini (ter njihov potencialen vpliv na varnost in učinkovitost) pri pacientih, zdravljenih z novim produktom, *primerljiva* s tisto, ki jo



opazimo pri bolnikih, zdravljenih z zdravilom, pripravljenim po starem postopku. *Podobna biološka zdravila* so relativno nova kategorija zdravil, pri razvoju katerih se naslanjamo na izkušnje z referenčnim biološkim zdravilom (37, 38). Pripravljamo jih s proizvodnim procesom, ki je drugačen od tistega, s katerim je izdelano referenčno zdravilo. To seveda pomeni, da je moč pričakovati razlike v imunogenosti obeh zdravil. Čeprav je potrebno v sklopu celovitega vrednotenja podobnih bioloških zdravil (*similarity exercise*) dokazati tudi *podobno* imunogenost, obstaja tveganje, da morebitnih manjših razlik v imunogenosti zaradi redkega pojava med kliničnim vrednotenjem ne bomo zaznali. S tega vidika in predvsem zaradi interindividualnih razlik v dovzetnosti za odziv imunskega sistema na učinkovino *avtomatična* zamenljivost, kakršna velja za generična zdravila, za podobna biološka zdravila ni priporočljiva, zlasti pri bolnikih s kronično boleznijo (ki zahteva dolgotrajno zdravljenje), ki se stabilno odzivajo na aktualno terapijo (osebno mnenje avtorja). V odgovoru na vprašanje Mednarodnega foruma znanstvenoraziskovalnih farmacevtskih družb (GIZ) o zamenljivosti in nadomestljivosti med podobnimi biološkimi zdravili ter (referenčnimi) originalnimi biološkimi zdravili je Javna agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke (JAZMP) podala naslednje stališče: »JAZMP podpira uvajanje PBZ [podobnih bioloških zdravil], ker mora biti podobnost oz. primerljivost PBZ v razmerju do zadevnih referenčnih bioloških zdravil z vidika kakovosti, varnosti in učinkovitosti dokazana v okviru postopka pridobitve dovoljenja za promet za vsako PBZ. [...] Odločitev o njihovi uporabi oz. njihovo zamenjevanje (terapevtski preklap) lahko poteka v le v kliničnem oz. ambulantnem okolju in mora biti predmet medicinske obravnave vsakega posameznega bolnika.« (39). Ob tem velja izpostaviti, da klinične raziskave, osredotočene na primerjavo učinkovitosti in varnosti (vključno z imunogenostjo), niso zaznale značilnih razlik pri pacientih, ki so jim referenčna zdravila zamenjali za podobna biološka zdravila, in tistih, ki so obdržali prvotno terapijo (40).

## 6 LITERATURA

1. Singh SK. Impact of product-related factors on immunogenicity of biotherapeutics. *J Pharm Sci* 2011; 100(2): 354-387.
2. Smith A, Manoli H, Jaw S et al. Unraveling the effect of immunogenicity on the PK/PD, efficacy, and safety of therapeutic proteins. *J Immunol Res* 2016; 2016: 2342187.
3. Krishna M, Nadler SG. Immunogenicity to biotherapeutics - the role of anti-drug immune complexes. *Front Immunol* 2016; 7: 21.
4. Asselin B. Immunology of infusion reactions in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. *Future Oncol* 2016; 12(13): 1609-1621.
5. Breslin S. Cytokine-release syndrome: overview and nursing implications. *Clin J Oncol Nurs* 2007; 11(1 Suppl): 37-42.
6. Zhao L, Ren TH, Wang DD. Clinical pharmacology considerations in biologics development. *Acta Pharmacol Sin* 2012; 33(11): 1339-1347.
7. Chirmule N, Jawa V, Meibohm B. Immunogenicity to therapeutic proteins: impact on PK/PD and efficacy. *AAPS J* 2012; 14(2): 296-302.
8. Chernauek SD. Growth hormone-resistant syndromes: long-term follow-up. *Endocr Dev* 2009; 14: 135-142.
9. Casadevall N, Nataf J, Viron B et al. Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N Engl J Med* 2002; 346(7): 469-475.
10. van den Berg HM. Different impact of factor VIII products on inhibitor development? *Thromb J* 2016; 14(Suppl 1): 31.
11. Jawa V, Cousens LP, Awwad M et al. T-cell dependent immunogenicity of protein therapeutics: Preclinical assessment and mitigation. *Clin Immunol* 2013; 149(3): 534-555.
12. Moussa EM, Panchal JP, Moorthy BS et al. Immunogenicity of therapeutic protein aggregates. *J Pharm Sci* 2016; 105(2): 417-430.
13. Gouw SC, van den Berg HM, Oldenburg J et al. F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis. *Blood* 2012; 119(12): 2922-2934.
14. Pratt KP. Inhibitory antibodies in hemophilia A. *Curr Opin Hematol* 2012; 19(5): 399-405.
15. Gribble EJ, Sivakumar PV, Ponce RA et al. Toxicity as a result of immunostimulation by biologics. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2007; 3(2): 209-234.
16. Jefferis R. Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8(3): 226-234.
17. Li H, d'Anjou M. Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol* 2009; 20(6): 678-684.
18. Macher BA, Galili U. The Galalpha1,3Galbeta1,4GlcNAc-R (alpha-Gal) epitope: a carbohydrate of unique evolution and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1780(2): 75-88.
19. Chung CH, Mirakhor B, Chan E et al. Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *N Engl J Med* 2008; 358(11): 1109-1117.
20. Bosques CJ, Collins BE, Meador JW, 3rd, et al. Chinese hamster ovary cells can produce galactose-alpha-1,3-galactose antigens on proteins. *Nat Biotechnol* 2010; 28(11): 1153-1156.
21. Bertolotto A, Deisenhammer F, Gallo P et al. Immunogenicity of interferon beta: differences among products. *J Neurol* 2004; 251 Suppl 2: II15-II24.
22. Ahn WS, Jeon JJ, Jeong YR et al. Effect of culture temperature on erythropoietin production and glycosylation in a perfusion culture of recombinant CHO cells. *Biotechnol Bioeng* 2008; 101(6): 1234-1244.
23. Gawlitsek M, Estacio M, Furch T et al. Identification of cell culture conditions to control N-glycosylation site-occupancy of recombinant glycoproteins expressed in CHO cells. *Biotechnol Bioeng* 2009; 103(6): 1164-1175.
24. Nam JH, Zhang F, Ermonval M et al. The effects of culture conditions on the glycosylation of secreted human placental

- alkaline phosphatase produced in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* 2008; 100(6): 1178-1192.
25. Wang X, Hunter AK, Mozier NM. Host cell proteins in biologics development: Identification, quantitation and risk assessment. *Biotechnol Bioeng* 2009; 103(3): 446-458.
  26. Schellekens H, Jiskoot W. Erythropoietin-associated PRCA: Still an unsolved mystery. *J Immunotoxicol* 2006; 3(3): 123-130.
  27. Haag-Weber M, Eckardt KU, Horl WH et al. Safety, immunogenicity and efficacy of subcutaneous biosimilar epoetin-alpha (HX575) in non-dialysis patients with renal anemia: a multi-center, randomized, double-blind study. *Clin Nephrol* 2012; 77(1): 8-17.
  28. Seidl A, Hainzl O, Richter M et al. Tungsten-induced denaturation and aggregation of epoetin alfa during primary packaging as a cause of immunogenicity. *Pharm Res* 2012; 29(6): 1454-1467.
  29. Barbosa MD, Vielmetter J, Chu S et al. Clinical link between MHC class II haplotype and interferon-beta (IFN-beta) immunogenicity. *Clin Immunol* 2006; 118(1): 42-50.
  30. Billiet T, Vande Casteele N, Van Stappen T et al. Immunogenicity to infliximab is associated with HLA-DRB1. *Gut* 2015; 64(8): 1344-1345.
  31. Hindryckx P, Novak G, Van de Casteele N et al. Incidence, prevention and management of anti-drug antibodies against therapeutic antibodies in inflammatory bowel disease: A practical overview. *Drugs* 2017; 77(4): 363-377.
  32. Strober BE. Why biologic therapies sometimes lose efficacy. *Semin Cutan Med Surg* 2016; 35(4 Suppl 4): S78-S80.
  33. Hanauer SB, Wagner CL, Bala M et al. Incidence and importance of antibody responses to infliximab after maintenance or episodic treatment in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2(7): 542-553.
  34. Schellekens H. Factors influencing the immunogenicity of therapeutic proteins. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20 Suppl 6: vi3-9.
  35. CHMP, EMA. Guideline on immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2017/06/WC500228861.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2017/06/WC500228861.pdf). Dostop: 20. 6. 2017.
  36. Veronese FM, Mero A. The impact of PEGylation on biological therapies. *BioDrugs* 2008; 22(5): 315-329.
  37. Markus R, Liu J, Ramchandani M et al. Developing the totality of evidence for biosimilars: Regulatory considerations and building confidence for the healthcare community. *BioDrugs* 2017; 31(3): 175-187.
  38. Štrukelj B. Varnost, kakovost in učinkovitost originalnih in podobnih bioloških zdravil. *Farm Vest* 2015; 66(3): 256-259.
  39. JAZMP, Odgovori na vprašanja GlZ Foruma o uvajanju podobnih bioloških zdravil, junij 2014. [https://www.jazmp.si/fileadmin/datoteke/dokumenti/SRZH/Uvajanje\\_PodBiolZdr\\_QA\\_GlZForum\\_junij\\_2014.pdf](https://www.jazmp.si/fileadmin/datoteke/dokumenti/SRZH/Uvajanje_PodBiolZdr_QA_GlZForum_junij_2014.pdf). Dostop: 20-06-2017.
  40. Moots R, Azevedo V, Coindreau JL et al. Switching between reference biologics and biosimilars for the treatment of rheumatology, gastroenterology, and dermatology inflammatory conditions: Considerations for the clinician. *Curr Rheumatol Rep* 2017; 19(6): 37.