

Predviđanje imunogeničnosti bioloških lijekova

Lazarić Bošnjak, Petra

Professional thesis / Završni specijalistički

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:808724>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Petra Lazarić Bošnjak

PREDVIĐANJE IMUNOGENIČNOSTI BIOLOŠKIH LIJEKOVA

Specijalistički rad

Zagreb, 2015.

PSS studij: Klinička farmacija

Mentor rada: prof. dr. sc. Jelena Filipović-Grčić

Specijalistički rad obranjen je dana 09. srpnja 2015. godine u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Jelena Filipović-Grčić
2. doc. dr. sc. Jasmina Lovrić
3. dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek, znanstvena savjetnica

Rad ima 99 listova.

Predgovor

Ovaj rad napisan je sa željom da naučim što je više moguće o biološkim lijekovima preko teme koja izvrsno spaja naprednu farmaceutsku industriju i specifičnu kliničku praksu. Hvala svima koji su mi pomogli s prijevodima stručnih izraza, objašnjenjima nedoumica i na sve druge načine. Posvećujem ga malom lavu velikog srca.

Sažetak

Biološki lijekovi se zbog porijekla i kompleksne strukture razlikuju od kemijski sintetiziranih molekula. Procjena imunogeničnosti važna je za biološke lijekove, a radi se prema važećim smjernicama u pretkliničkim i kliničkim studijama te je uključena u farmakovigilancijski Plan upravljanja rizicima.

U ovom radu obrađuju se uzroci, kliničke posljedice i mogućnosti predviđanja imunogeničnosti terapijskih proteina. Mrežnom pretragom literature s ključnim riječima immunogenicity, biopharmaceuticals, biosimilars odabrani su znanstveni radovi, smjernice, preporuke i knjige na tu temu.

Terapijski proteini se proizvode pomoću genetski modificiranih staničnih linija ili transgeničnih životinja. Zaostala procesna onečišćenja mogu biti uzrok imunogeničnosti. Glikozilacija ili pegilacija molekule mogu maskirati imunogenične epitope. Tvari koje migriraju iz primarne ambalaže mogu potaknuti stvaranje agregata većeg imunogeničnog potencijala.

Produkcija protutijela kreće nakon podražaja imunosnog sustava iz diferenciranih limfocita B. Ona se selektivno vežu na komplementarni antigen tvoreći imunokompleks koji se neutralizira ili precipitira. Specijalizirane predočne stanice prerađuju strane antigene i na svojoj površini izlažu njihove dijelove (epitope) limfocitima T.

Jačina imunoreakcije ovisi o imunogeničnosti, veličini, količini, filogenetskoj udaljenosti i putu unosa antigena te stanju organizma.

Klinički je beznačajna prolazna pojava protutijela na rekombinantni somatropin. Stvaranje veznih protutijela dovodi do promijenjene farmakokinetike inzulina, gubitka učinkovitosti rekombinantnih interferona α i β ili inhibitora TNF- α i natalizumaba i pojačanih nuspojava (najčešće alergijskih reakcija). Neutralizirajuća protutijela u križnoj reakciji mogu neutralizirati endogeni protein s važnom fiziološkom funkcijom i ugroziti život bolesnika (eritropoetin ili

trombopoetin). Nadomjesna terapija u bolesnika s genskim defektima može u potpunosti propasti zbog stvaranja protutijela (čimbenik VIII ili IX).

Probir uzoraka u kojima su protutijela prisutna i njihova karakterizacija na neutralizirajući učinak provode se kombinirano s pregledima pacijenata.

Modeli ograničene vrijednosti kojima se predviđa imunogeničnost postojećih ili novih proteina su pokusne životinje, in vitro testovi otkrivanja epitopa koje prepoznaju limfociti i računalni alati za analizu proteina.

Summary

Biopharmaceuticals differ from chemical drugs due to their origin and complex structure. Immunogenicity assessment is important for all biopharmaceuticals and is a part of preclinical and clinical studies and pharmacovigilance Risk Management Plan.

This paper discusses about causes, clinical consequences and ways of predicting immunogenicity of therapeutic proteins. References (papers, guidelines, recommendations and books) were found by web search that included key words immunogenicity, biopharmaceuticals, biosimilars.

Therapeutic proteins are produced by genetically modified cell lines or transgenic animals. Process-related impurities can induce drug immunogenicity. Glycosilation and PEGylation of a molecule can hide immunogenic epitopes. Leachables can induce formation of more immunogenic aggregates.

B lymphocytes produce antibodies after immune system stimulation. They complementarily bind with antigens to an immunocomplex that is then neutralized or precipitated. Epitopes of the foreign antigens are presented to the T lymphocytes by the antigen presenting cells.

Intensity of an immunoreaction depends on immunogenic potential, size, amount and phylogenetic diversity of an antigen, route of administration and some patient-related characteristics.

Transient antibody formation has no apparent clinical relevance in a case of recombinant somatotropine. Formation of binding antibodies alters insulin pharmacokinetics. Loss of drug efficacy is noted for recombinant interferons α and β or for the TNF- α inhibitors and natalizumab. Side effects such as allergic reactions are more common. Neutralizing antibodies can cross-react with an endogenous protein which is life-threatening condition.

Replacement therapy in gene deficient patients can fail completely due to antibody formation (factor VIII or IX).

Screening tests and in vitro characterization of found antibodies (their neutralizing effect is analyzed in cell-based tests) are performed together with the physical exams of the patients.

Models for predicting immunogenicity (animals, in vitro epitope recognition by lymphocytes and bioinformatics, tools for structure analysis) have limited value but are used and combined.

Sadržaj

| | |
|--|----|
| Uvod i pregled područja istraživanja | 1 |
| Cilj istraživanja | 2 |
| Materijal i metode | 3 |
| Rasprava..... | 4 |
| Biološki lijekovi | 4 |
| Razlike između bioloških i kemijskih lijekova | 6 |
| Proizvodnja bioloških lijekova | 9 |
| Pročišćavanje proteina | 14 |
| Dobivanje gotovih proizvoda bioloških lijekova | 16 |
| Onečišćenja u biološkim lijekovima | 18 |
| Analitika strukture bioloških lijekova..... | 22 |
| Pregled ljudskog imunosnog sustava..... | 23 |
| Kako biološki lijekovi izazivaju imunoreakciju | 30 |
| Imunogeničnost bioloških lijekova..... | 33 |
| Čimbenici koji utječu na imunogeničnost bioloških lijekova | 35 |
| Čimbenici povezani s proizvodom (eng. product-related)..... | 35 |
| Čimbenici povezani s karakteristikama pacijenta (eng. patient-related) | 38 |
| Ostali čimbenici | 40 |

| | |
|---|----|
| Imunološke laboratorijske metode | 41 |
| Biotehnološke metode najčešće primjenjivane u imunološkim istraživanjima | 41 |
| Metode za dokazivanje imunoreakcije | 42 |
| Metode za dokazivanje humoralne imunosti (vezanja antigena i protutijela) | 42 |
| Metode za dokazivanje stanične imunosti | 45 |
| Metode detekcije protutijela na biološke lijekove | 46 |
| Stanični neutralizirajući testovi | 47 |
| Strategije procjene imunogeničnosti bioloških lijekova | 50 |
| Modeli za predviđanje imunogeničnosti terapijskih proteina | 51 |
| Imunogeničnost bioloških lijekova - dosadašnje kliničko iskustvo | 57 |
| Hormon rasta | 57 |
| Inzulin i inkretinski mimetici | 58 |
| Imunogeničnost citokina | 64 |
| Imunogeničnost inhibitora čimbenika tumorske nekroze (anti-TNF protutijela) | 77 |
| Imunogeničnost bioloških lijekova u pacijentima s genskim defektima | 78 |
| Zaključak | 81 |
| Literatura | 83 |
| Životopis | 86 |
| Curriculum Vitae | 88 |

Uvod i pregled područja istraživanja

Biološki lijekovi ciljana su i skupa terapija mnogih malignih, metaboličkih, imunskih i genetskih bolesti. Proizvode se pomoću živih organizama te se zbog toga uvelike razlikuju od kemijski sintetiziranih spojeva, što priznaju i svjetski vodeće regulatorne agencije. Zbog veličine molekula i kompleksnosti strukture koja je lako podložna suptilnim promjenama, proizvodni proces, izolacija, pročišćavanje i identifikacija djelatnih tvari bioloških lijekova zahtijevaju opsežnu analitičku podršku i kontrolu. Formuliranje gotovih proizvoda bioloških lijekova podrazumijeva poman i oprezan odabir pomoćnih tvari jer o njima ovisi stabilnost djelatne tvari i sigurnost primjene za pacijente.

Biološki su lijekovi većinom proteini i u ljudskom organizmu potencijalni antigeni. U dosadašnjoj praksi njihove upotrebe zabilježene su i klinički teške posljedice stvaranja protutijela na njih. Imunogeničnost terapijskih proteina postala je sigurnosna stavka koja se obavezno provjerava u pretkliničkim i kliničkim ispitivanjima te nadzire postmarketinški. Imunosni sustav različit je u pojedincima i nije uvijek predvidljiv intenzitet njegove reakcije na vanjski podražaj.

U ovom radu istražuju se razlozi pojačane imunogeničnosti terapijskih proteina, razmjer kliničkih posljedica zbog stvorenih protutijela na njih, mogućnosti prevencije tih neželjenih događaja te načini ispitivanja protutijela. Prikazani su klinički slučajevi imunogeničnosti bioloških lijekova i opisana provedena ispitivanja, a da bi se sve to moglo smisleno sumirati i detaljnije objasniti, obrađene su i teme proizvodnje i analize bioloških lijekova, imunosni sustav u ljudi te imunološke laboratorijske metode i testovi detekcije i karakterizacije protutijela.

Cilj istraživanja

Može li se predvidjeti, a potom i spriječiti imunogenični odgovor u ljudi na terapijske proteine.

Materijal i metode

Pretraženi su objavljeni znanstveni i pregledni radovi, smjernice regulatornih agencija, preporuke struke za razvoj metoda i knjige na temu bioloških i biosličnih lijekova koji se bave njihovom imunogeničnošću. Na preporuku mentorice, područje istraživanja šireno je i obrađivano prema stavkama koje se navode u radu Schellekens H. Bioequivalence and the Immunogenicity of Biopharmaceuticals, a kao ključne riječi za daljnu mrežnu pretragu literature korišteni su pojmovi immunogenicity, biopharmaceuticals, biosimilars. Knjige urednika van de Weert M, Horn Møller E. Immunogenicity of Biopharmaceuticals i autora Geigert J. The Challenge of CMC Regulatory Compliance for Biopharmaceuticals and other Biologics citiraju na stotine provedenih istraživanja i objavljenih studija, opisuju stvarne događaje i postupke vezane za proizvodnju, analizu i primjenu bioloških lijekova. Sveučilišni udžbenici Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Marušić M, Taradi M, Višnjic D. Imunologija, Stryer L. Biokemija, Cooper GM, Hausman RE. Stanica i Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija poslužili su za objašnjenje osnovnih spomenutih pojmova.

Rasprava

Bioški lijekovi

Bioški lijekovi su lijekovi čija se djelatna tvar proizvodi ili izlučuje iz biološkog izvora (ljudskog, životinjskog ili mikrobiološkog), a zbog načina proizvodnje i porijekla, djelatne tvari bioloških lijekova značajno su složenije strukture od djelatnih tvari kemijskog porijekla. Neke od djelatnih tvari bioloških lijekova mogu se nalaziti i u ljudskom organizmu, poput inzulina, hormona rasta ili eritropoetina. Bioškim lijekovima smatraju se **imunološki lijekovi** (cjepiva, toksini, serumi i proizvodi alergena), **lijekovi iz ljudske krvi ili plazme** (npr. albumin ili imunoglobulini), **lijekovi dobiveni biotehnološkim postupcima** (postupci koji uključuju upotrebu genetski modificiranih živih sustava ili organizama), **lijekovi za naprednu terapiju** (lijekovi koji se temelje na genskoj terapiji, terapiji somatskim stanicama ili tkivnom inženjerstvu) i **ostali lijekovi dobiveni iz biološkog izvora** (npr. heparin ili pankreatin).

Tablica 1.: Primjeri porijekla bioloških lijekova, prilagođeno prema Geigert J. The Challenge of CMC Regulatory Compliance for Biopharmaceuticals and other Biologics

| Primjeri porijekla bioloških lijekova | |
|--|--|
| Iz životinja ili biljaka | Iz biotehnološki modificiranih staničnih kultura |
| Heparini | Rekombinantni proteini |
| Inzulin (nekad) | Monoklonska protutijela |
| Proteini, enzimi, alergeni | Alergeni, cjepiva |
| Imunološki serumi | Vektori i plazmidi za gensku terapiju |
| Iz transgeničnih životinja ili biljaka | Iz ljudi |
| Rekombinantni proteini | Enzimi, hormoni |
| Cjepiva, alergeni | Krvni pripravci |
| Iz virusa, bakterija ili staničnih kultura | Iz ljudi ili životinja |
| Cjepiva, proteini, enzimi | Lijekovi za naprednu terapiju |

Za karakterizaciju i utvrđivanje kakvoće bioloških lijekova potrebna su fizikalnokemijska i biološka ispitivanja zajedno s podacima o postupku proizvodnje i kontrole.

Odobrenje za stavljanje bioloških lijekova u promet na području Europske unije (EU) daje Europska komisija nakon stručno-znanstvene ocjene dokumentacije o lijeku u Centraliziranom postupku davanja odobrenja (CP) kojeg provodi Europska agencija za lijekove (EMA). Stručno-znanstvena ocjena provodi se prema unaprijed definiranim kriterijima te utvrđenim normama i standardima koje nalazimo u europskim propisima i smjernicama vezanim za lijekove te prema najnovijim znanstvenim spoznajama. U ocjenu kakvoće, djelotvornosti i sigurnosti svakog lijeka pri EMA-i uključeni su stručnjaci iz svih zemalja članica EU.

Biotehnološki postupci kojima se dobivaju biološki lijekovi uključuju rekombinantnu DNK tehnologiju i transgenične životinje, kontroliranu ekspresiju gena kojima se kodiraju biološki aktivni proteini u prokariotskim i eukariotskim stanicama (uključujući i transformiranim staničnim linijama sisavaca) i tehnologiju hibridoma (u proizvodnji monoklonskih protutijela).

Proteini su raznolike makromolekule, građevni materijal stanica i tkiva i nositelji brojnih bioloških funkcija (enzimske katalize, prijenosa i pohrane drugih tvari, imunosne zaštite, kontrole rasta i diferencijacije, itd). Izgrađeni su od dvadesetak različitih aminokiselina povezanih u lanac amidnim (peptidnim) vezama između α -amino- jedne i α -karboksilne skupine druge aminokiseline. Ogranke polipeptidnog lanca čine njihovi ostaci. Slijed aminokiselina u proteinu precizno je definiran (slijedom nukleotida na odsječku DNK, genom), a sinteza proteina odvija se procesom translacije, od amino- ili N-kraja prema karboksilnom ili C-kraju, postupnim dodavanjem zadanih aminokiselina. Posttranslacijska dorada proteina podrazumijeva neke modifikacije polipeptidnog lanca, npr. hidrolizu nekolicine N- ili C-terminalnih aminokiselina ili specifično cijepanje molekule u aktivni oblik, oksidaciju cisteinskih ostataka (i stvaranje disulfidnih mostova), hidroksilaciju prolinskih ili lizinskih ostataka, i glikozilaciju (povezivanje šećera) asparaginskih, serinskih ili treoninskih

ostataka. Nativni oblik i funkcionalnost proteina određeni su strukturnom konformacijom, a ona disulfidnim, vodikovim, hidrofobnim i van der Waalsovima vezama među aminokiselinskim ograncima. **Struktura proteina** definira se na četiri razine. Primarna struktura običan je lančani slijed aminokiselina. Sekundarna struktura prostorni je odnos aminokiselinskih ostataka koji su si blizu, odnosno periodične polipeptidne strukture, α -uzvojnica i β -nabrana ploča. Tercijarna struktura također je prostorni odnos aminokiselinskih ostataka, ali onih udaljenih (trodimenzionalna struktura polipeptidnog lanca). Kvartalnu strukturu proteina čini više podjedinica (polipeptidnih lanaca) spojenih u funkcionalnu cjelinu. (1-5)

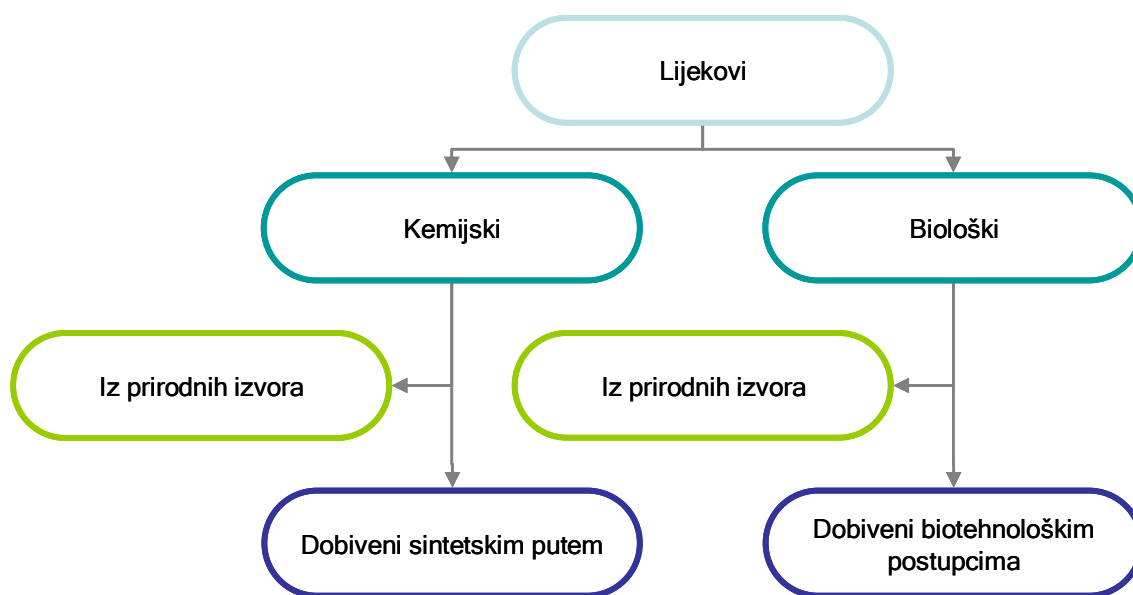
Razlike između bioloških i kemijskih lijekova

Razlike proizlaze iz **komplikiranosti u postupcima proizvodnje** i iz **veliĉine i kompleksnosti strukture** samih molekula. Zahtjevniji su kontrola i osiguranje kvalitete za vrijeme razvoja i proizvodnje te ispitivanja stabilnosti bioloških lijekova.

Kemijski se lijekovi najĉešće dobivaju sintezom, odnosno miješanjem poznatih kemijskih tvari s reagensima u seriji dobro kontroliranih i predvidljivih kemijskih reakcija.

Biološki lijekovi (terapijski proteini) dobivaju se Źetvom proteina proizvedenih i izluĉenih iz genetski modificiranih organizama, mnogobrojnim postupcima izolacije ciljnog proteina iz smjese proteina i proĉišćavanja od npr. zaostalih stanica domaćina.

Usporedbu veliĉina molekula lijekova zorno prikazuje sljedeći primjer: molekulska masa acetilsalicilatne kiseline iznosi 180 Da, inzulina 5800 Da, eritropoetina 30,4 kDa, a monoklonskog protutijela IgG klase 150 kDa. Dalton (Da), iako nije službena jedinica SI sustava, ĉesto se koristi u biokemijskoj literaturi za odreĉivanje veliĉine molekula. Oznaĉava masu jednaku relativnoj masi atoma vodika ($1 \text{ Da} = 1$).



Slika 1.: Podjela lijekova po strukturi i porijeklu, prilagođeno prema Geigert J. The Challenge of CMC Regulatory Compliance for Biopharmaceuticals and other Biologics

Kemijski lijek može biti odobren kao generički lijek. **Generički lijek** sadrži iste djelatne tvari u istoj količini kao izvorni lijek te dolazi u istom obliku kao izvorni lijek, jedino pomoćne tvari generičkog lijeka mogu biti različite u odnosu na izvorni lijek. Sigurnost i djelotvornost generičkog i izvornog lijeka moraju biti jednake, što se dokazuje provođenjem ispitivanja bioekvivalencije. Druga preklinička i klinička ispitivanja se ne zahtijevaju. Izvorni i generički lijekovi mogu se izravno zamjenjivati osim iznimno, ako se radi o lijekovima uske terapijske širine i varijabilne interindividualne apsorpcije (npr. ciklosporin, takrolimus, varfarin, digoksin), lijekovima s više od dvije djelatne tvari i lijekovima koji se primjenjuju uz pomoć medicinskih proizvoda na različite načine.

Verifikacija sličnosti biosličnog lijeka s odobrenim izvornim biološkim lijekom glavni je izazov za proizvođača. **Biosličan lijek** je biološki lijek kojem je dokazana sličnost u pogledu kakvoće, biološke aktivnosti, sigurnosti primjene i djelotvornosti s odobrenim izvornim biološkim lijekom. Zbog složene strukture djelatne tvari i načina proizvodnje bioloških lijekova, nije vjerojatno da je moguće proizvesti dva potpuno identična biološka lijeka. Usporedna ispitivanja karakterizacije strukture uvijek će pokazati neke razlike između izvornog biološkog

i biosličnog lijeka jer je ona usko povezana i ovisna o proizvodnom procesu iz biološkog materijala. Usporedna ispitivanja obavezna su da se nađene razlike mogu kritički i klinički procijeniti.

Standardni se pristup razvoju i odobravanju generičkih kemijskih lijekova, koji se temelji na dokazivanju bioekvivalencije s izvornim lijekom, ne može primijeniti kod biosličnih lijekova, već su za razvoj i postupak davanja odobrenja biosličnim lijekovima potrebna dodatna pretklinička, klinička i analitička ispitivanja. Kritična sigurnosna stavka bioloških lijekova je njihova **imunogeničnost** koja se mora ispitati prije davanja odobrenja i opširno nadzirati postmarketinški. Stupanj imunogeničnosti može se značajno razlikovati među proizvodima koji se smatraju vrlo sličnima.

Osim očekivanih suptilnih razlika u proizvodima različitih proizvođača, manjka nam i iskustva oko upotrebe biosličnih lijekova. Lijekovi s istom biološkom djelatnom tvari nisu izravno međusobno zamjenjivi jer ne postoje dostatni podaci o sigurnosti i/ili djelotvornosti s obzirom na mogućnost povećanog razvoja protutijela na lijek ili pojave odgođenih nuspojava koje je onda teže povezati s lijekom koji ih je uzrokovao, veću vjerojatnost za medikacijske pogreške zbog razlika u primjeni i pripremi lijekova ili smanjenu suradljivosti pacijenta.

Svi bioslični lijekovi trenutno odobreni u EU odobreni su CP davanja odobrenja. Proizvođač je u svrhu odobrenja biosličnog lijeka bio dužan provesti opsežna usporedna pretklinička (tolerancija, farmakokinetika (FK), farmakodinamika (FD)) i klinička (faze I - FK, FD i faze III - indikacija) ispitivanja koja dokazuju da je biosličan lijek sličan izvornom biološkom lijeku u kakvoći, sigurnosti primjene i djelotvornosti. Nekad su razlike između izvornih bioloških i biosličnih lijekova koje potencijalno mogu imati utjecaj na sigurnost i djelotvornost prihvatljive, ako usporedne kliničke studije nisu pokazale negativan učinak tih razlika (npr. povećanu učestalost nuspojava). Ponekad značajnije razlike nemaju negativan utjecaj na imunogeničnost, neškodljivost i učinkovitost (profil glikozilacije, matična stanična banka, formulacija), a ponekad vrlo male razlike imaju značajan utjecaj na imunogeničnost lijeka

(formulacija, primarno pakiranje, proizvodni proces, npr. filteri, dodirne površine) jer uzrokuju pogrešno nabiranje proteina ili formiranje agregata.

Aktivno praćenje sigurnosti lijekova nakon odobrenja obavezno je za sve lijekove, ali je u slučaju bioloških lijekova nuspojave potrebno dodatno pratiti, prijavljivati i obrađivati na razini zaštićenog naziva lijeka i serijskog broja.

EMA je izdala brojne znanstvene smjernice kojima se osiguravaju standardi kakvoće, sigurnosti i djelotvornosti primjene biosličnih lijekova. Bioslični lijekovi proizvode se prema jednako strogim standardima kao i svi drugi lijekovi, što se potvrđuje inspekcijskim nadzorima proizvođača od strane regulatornih tijela. (1-2, 4, 6-8)

Proizvodnja bioloških lijekova

Strategija razvoja i proizvodnja bioloških lijekova jedinstvene su za svaki pojedini slučaj. Tako se razlikuju proizvodnja terapijskih proteina iz staničnih linija u bioreaktoru od proizvodnje u transgeničnim životinjama ili proizvodnje genske ili autologne stanične terapije. Važno je procijeniti sve moguće rizike i primijeniti minimalne uvjete koje zahtjeva Dobra proizvođačka praksa (DPP) za svaku pretkliničku i kliničku fazu te voditi opsežnu dokumentaciju. Ovdje će se razmotriti proizvodnja terapijskih proteina prema regulativi važećoj u EU.

Živi sustavi odnosno **linije stanica** koji se koriste u proizvodnji bioloških lijekova mogu biti bakterijskog, gljivičnog, životinjskog ili ljudskog porijekla te **virusi** i **transgenične životinje** ili **biljke**.

Proizvodnja biološkog lijeka iz **linije stanica** se provodi u zatvorenom sustavu (bioreaktoru) koji je potpuno odvojen od vanjskih utjecaja (zbog rizika od zagađenja), pod strogo kontroliranim uvjetima i u vodenoj otopini. Stanične linije moraju se održavati živima i

zdravima kako bi proizvodnja i prinos bili predvidljivi. Potrebno ih je hraniti odgovarajućim nutrijentima i držati u odgovarajućim uvjetima (npr. koncentracija kisika i ugljikovog dioksida, pH i temperatura medija) jer to može utjecati na stanični metabolizam pa tako i na sintezu i glikozilaciju ciljnih proteina. Treba ih zaštititi i od potencijalnih zaraza bakterijama, gljivicama, mikoplazmama, mikobakterijama, virusima, protozoama, parazitima i/ili prionima jer se u protivnom ugrožavaju i ishod proizvodnog procesa i ispravnost i sigurnost samog proizvoda.

Proteini su molekule osjetljive na okolišne promjene pa tako čuvanje i skladištenje bioloških lijekova mora biti pod strogo definiranim uvjetima. Neodgovarajuća temperatura, sile smicanja ili izlaganje svjetlosti mogu uzrokovati konformacijske pomake.

Kao što se posttranslacijski modificiraju endogeni proteini, iste molekulske varijante moguće je dobiti i u procesu proizvodnje bioloških lijekova, kao njihovih kopija. One se ne mogu ignorirati jer je između ostalog i klinička sigurnost lijeka povezana s njima, odnosno mogu dovesti do neželjenih imunoreakcija u ljudskom organizmu (promjena aminokiselinskog slijeda na N- ili na C- kraju polipeptidnog lanca pri sintezi, hidroliza pojedinih amidnih veza, sulfatacija ili oksidacija pojedinih aminokiselinskih ostataka). I proces glikozilacije je podložan promjenama. Ako se ugljikohidratni lanac veže na kriva mjesta, ili složi od drugačijih vrsta monosaharida, bude nejednake duljine i razgranatosti, to može utjecati na imunogeničnost proteina. Treba napomenuti da se u bakterijskim sustavima ne odvija glikozilacija proteina jer su one prokariotski organizmi, a kvasci i biljke često koriste šećere različite od životinjskih stanica (manan, ksilozu, manozu).

Potencijalnu opasnost za sigurnost lijeka predstavljaju zaraze proizvodnih linija (virusima ili mikoplazmama), nekontrolirani okoliš za transgenične životinje i biljke (npr. tlo ili susjedna farma), replikacija genetski modificiranih retrovirusa i adenovirusa u genskoj terapiji (iako im je uklonjena sposobnost replikacije, kad uđu u stanice domaćina spontano im se može vratiti), prisutnost priona (rizik je najveći za proizvode dobivene iz ljudske plazme i

transgeničnih životinja) i rizik od nastanka tumora (važno je da nema dijela DNK koji promovira tumorogenezu).

Proizvodnja djelatne tvari biološkog lijeka (terapijskog proteina) iz staničnih kultura podrazumijeva njegovu **ekspresiju (biosintezu)**, **žetvu (izolaciju)** i **pročišćavanje**. Za proizvodni je proces poželjno da je prinos djelatne tvari konstantan i predvidljiv tako da ne utječe na njezin identitet, kvalitetu, čistoću, djelovanje ni sigurnost. Bilo kakva promjena u proizvodnom procesu zahtjeva novu validaciju.

Stanične linije ili banke (matična i radna) skup su staničnih klonova, okarakterizirani (određenim je identitet, stupanj čistoće, prisutnost odabranog gena, vektora ili domaćina) i prikladni za proizvodnju biološkog lijeka. Ispituju se i na odsutnost stanica drugih domaćina, endogenih virusa i slučajnih zaraza (prionima, mikoplazmama, mikrobima).

Ekspresija terapijskih proteina iz bakterija

Sojevi *E. coli* koriste se u biotehnološkoj proizvodnji više od 30 godina (prvi rekombinantni inzulin i somatropin proizvedeni su pomoću nje). Toj je gram-negativnoj bakteriji potrebno samo nekoliko dana fermentacije da proizvede biološki lijek u prinosu koji se mjeri u gramima po litri. Genetskim se inženjeringom postiglo i to da eksprimirani proteini budu topljivi i izlučeni u periplazmatski prostor što pojednostavljuje izolaciju. Proizvodnja se kontrolira uključivanjem promotorskih DNK sekvenci, koje su isključene u fazi rasta (do postizanja željene gustoće stanica u mediju). Žetva proteina se obavlja centrifugiranjem, homogeniziranjem i daljnim izdvajanjem ciljnih proteina od staničnih ostataka. *E. coli* ne obavlja posttranslacijske modifikacije proteina, npr. glikoziliranje.

Ekspresija terapijskih proteina iz kvasaca

Korišteni i dobro poznati sojevi kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* i *Pichia pastoris* rastu u jednostavnim i jeftinim medijima, imaju kratko vrijeme umnožavanja i u samo par dana fermentacije proizvedu biološki lijek u prinosu koji se također mjeri u gramima po litri.

Eksprimiraju ispravno smotane proteine izravno u medij, a zbog čvrste stanične stijenke, stanice domaćina otporne su i na grublje manipulacije prilikom žetve (miješanje, trešenje).

Ekspresija terapijskih proteina iz kultura stanica kukaca

Kulture stanica kukaca (leptira *Spodoptera frugiperda* zaražene bakulovirusom) stabilne su i obećavajuća alternativa bakterijskim i kvašćevim ekspresijskim sustavima u budućnosti, daju visok prinos rekombinantnog proteina.

Ekspresija terapijskih proteina iz kultura životinjskih/ljudskih stanica

Životinjske i ljudske stanične kulture koriste se u proizvodnji monoklonskih protutijela i kompleksnijih rekombinantnih proteina. Proizvodnja u njima značajno je skuplja od one u jednostavnijim organizmima. Besmrtna i genetski modificirane linije stanica ovarija kineskog hrčka (CHO) koriste se u proizvodnji bioloških lijekova više od 20 godina.

Ekspresija terapijskih proteina iz transgeničnih životinja

Transgenične životinje se koriste za proizvodnju kompleksno posttranslacijski modificiranih proteina, za koje se želi da budu ekspimirani u nativnom i biološki aktivnom obliku. Međutim, proizvodni proces je dugotrajan jer prođe i tri godine od uvođenja gena u životinju do korisnog prinosa. Protein se najčešće dobiva iz mliječnih žlijezda u prinosu koji se mjeri u gramima po litri mlijeka. Teoretski se mogu koristiti koze, ovce, krave, svinje, zečevi, miševi, svaka vrsta sa svojim prednostima i nedostacima. Stabilnost transgena i proizvodnje biološkog lijeka mora se pokazati kroz nekoliko generacija.

Ekspresija terapijskih proteina iz transgeničnih biljaka

Kao potencijalni domaćini predlažu se lišće krumpira i duhana te zrna kukuruza i riže. Izdane su smjernice za odabir lokacije uzgoja i primarne obrade transgeničnih biljaka (probira, čišćenja, sortiranja, maceriranja, transporta i skladištenja). Potrebno je dokazati genetsku stabilnost od faze transformacije do trenutka žetve i ograničiti starost biljaka.

Tablica 2.: Pregled nekih značajki stanica domaćina za proizvodnju terapijskih proteina, prilagođeno prema Geigert J. The Challenge of CMC Regulatory Compliance for Biopharmaceuticals and other Biologics

| Vrste stanica domaćina za proizvodnju terapijskih proteina | |
|---|---|
| Bakterijske | |
| Prednosti | Nedostaci |
| Opsežno regulatorno iskustvo | Nema posttranslacijskih modifikacija proizvedenog proteina |
| Brz rast u jeftinom mediju | Često potrebno naknadno smatanje dobivenog proteina |
| Nema (nenamjerne) glikozilacije | Visoke razine endotoksina i stanica domaćina u vrijeme žetve |
| Nema rizika od infekcija prionima ili virusima | |
| Kvaščeve | |
| Prednosti | Nedostaci |
| Opsežno regulatorno iskustvo | Moguća pretjerana glikozilacija |
| Jeftin rast u velikim razmjerima | Glikozilacija nije ista kao ljudska |
| Neke posttranslacijske modifikacije | Proteoliza eksprimiranog proteina |
| Sekrecija eksprimiranog proteina izravno u medij | |
| Kukčeve | |
| Prednosti | Nedostaci |
| Sekrecija eksprimiranog proteina izravno u medij | Neko regulatorno iskustvo |
| Zadovoljavajući prinosi | Rizik od zaraze virusa sisavaca |
| Mnogo posttranslacijskih modifikacija | Stanice su donekle osjetljive na sile smicanja |
| Bakulovirusni vektori su bezopasni za ljude | Otpuštanje unutarstaničnih proteina ako se stanice inficiraju |

Tablica 2.: Nastavak

| Životinjske/ljudske | |
|--|--|
| Prednosti | Nedostaci |
| Opsežno regulatorno iskustvo | Duga ekspanzijska faza stanica |
| Posttranslacijska modifikacija | Skupi mediji i zahtjevaju kompleksne nutrijente |
| Uspješna ekspresija kompleksnih proteina | Rizik od infekcije virusima |
| Sekrecija eksprimiranog proteina u medij u nativnom obliku | Osjetljive na sile smicanja i ekstreme u osmolalnosti |
| Biljne | |
| Prednosti | Nedostaci |
| Nema ljudskih patogena | Oskudno regulatorno iskustvo |
| Jeftin rast u velikim razmjerima | Glikozilacija nije ista kao ljudska |
| | Potrebno je ukloniti imunogenične β 1-2 vezane ksiloze i α 1-3 vezane fukoze s proteina |

Pročišćavanje proteina

Proces pročišćavanja proteina podrazumijeva skup postupaka kojima se veliki volumen sirovog proizvoda (smjese proteina) prevodi u manji volumen čisteg proizvoda (djelatnu tvar, odnosno terapijski protein ili monoklonsko protutijelo). Početna sirovina je otopina iz bioreaktora nakon žetve ako se radi o proizvodnji biološkog lijeka iz staničnih kultura, mlijeko iz transgeničnih životinja, dijelovi transgeničnih biljaka ili smjesa prirodnih proteina iz ljudske plazme.

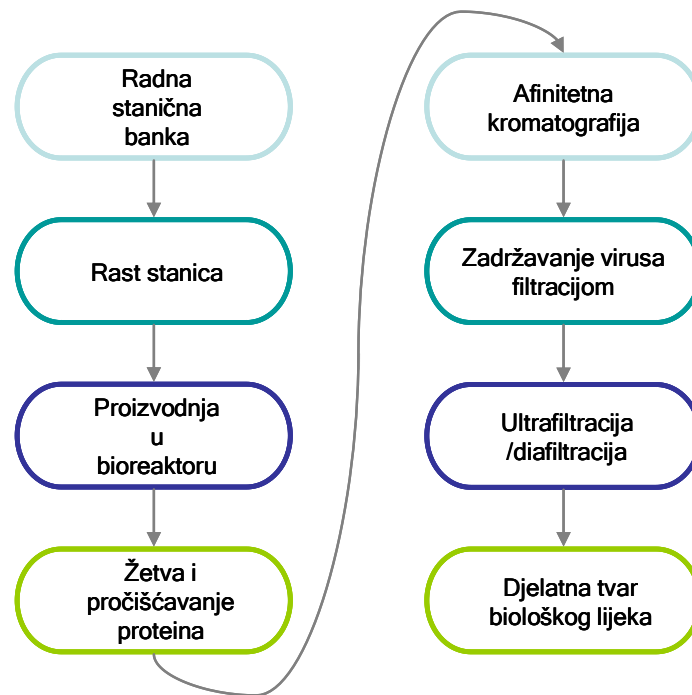
Fizikalne metode separacije su **precipitacija** i **filtracija**. Prilikom precipitacije se željeni protein ciljano pretvara u slabije topljivi oblik dodatkom soli ili polimera (npr. amonijevog sulfata ili polietilen glikola) ili se slično selektivno talože onečišćenja (kompleksiranjem s kratkolančanim masnim kiselinama ili organskim bazama).

Filtracija se provodi kroz membrane fiksne veličine pora (koje su otprilike tri puta manje od molekulske mase proteina) na kojima se zadržavaju i ukoncentriravaju velike molekule proteina (**ultrafiltracija**). Ako se protočna filtracija koristi za ispiranje ostataka manje molekulske mase ili izmjenu pufera govorimo o **diafiltraciji**.

Nanofiltracija služi za retenciju virusa na membrani pora nanoveličina kroz koje proteini slobodno prolaze. Izvodi se pod stalnim tlakom i drugim parametrima vezanim za same filtere, otopinu i koncentraciju proteina da ne dođe do agregacije.

Brojne su **kromatografske metode** dostupne za pročišćavanje proteina i monoklonskih protutijela. Odvajanje proteina određene molekulske veličine zadržavanjem na koloni s porama zadanih promjera osnova je **gel isključive kromatografije** (eng. size exclusion chromatography). Molekule veće od pora prve se isperu s kolone. Rezolucija, kapacitet i brzina ove kromatografske metode slabije su u usporedbi s drugima. Pri **ionskoj kromatografiji** (eng. ion exchange chromatography) proteini se odvajaju prema naboju aminokiselinskih ostataka, α -amino- i α -karboksilnog kraja i sijalinske kiseline na glikoproteinima. Protein se veže za anion izmjenjivačke dijelove kolone pri pH pokretne faze višem od njegove izoelektrične točke (pI), a za kation izmjenjivačke dijelove kolone pri pH pokretne faze nižem od njegove pI. Ispiranje s kolone slijedi nakon mijenjanja pH otopine. Anion izmjenjivačke kolone čvrsto vežu i zadržavaju molekule DNK i bakterijske endotoksine, a proteini se samo ispiru, dok je na kation izmjenjivačkim kolonama situacija obrnuta. Ovom se metodom proteini ne denaturiraju. **Kromatografija obrnutih faza** (eng. reversed phase chromatography) koristi se za razdvajanje proteina prema njihovoj hidrofobnosti, od manje prema većoj ako se ispiranje obavlja mijenjanjem omjera vode (\downarrow) i organskih otapala (\uparrow) u pokretnoj fazi. Postupak može biti denaturirajući. **Afinitetna kromatografija** za razdvajanje koristi interakcije između liganada vezanih za kolonu i otopljenih proteina. Kemijski ligandi su kelirajući metali (npr. nikel s kojim reagira histidin) ili boje, a biokemijski protein A (komponenta stanične stijenke zlatnog stafilokoka koji veže IgG monoklonska protutijela), protein G i lektini. Smatra se nedenaturirajućom metodom za odlično odvajanje onečišćenja

koja potječu od ostataka stanica domaćina, ali mora se pripaziti da se ne isperu i ligandi u otopinu proteina.



Slika 2.: Primjer proizvodnog procesa djelatne tvari biološkog lijeka, prilagođeno prema Geigert J. The Challenge of CMC Regulatory Compliance for Biopharmaceuticals and other Biologics

Dobivanje gotovih proizvoda bioloških lijekova

Oblikovanje gotovog proizvoda podrazumijeva odabir **prikladne formulacije** za određenu djelatnu tvar i **aseptičko punjenje** u dozirne oblike. No, da bi se poboljšala neka svojstva djelatne tvari (struktura ili funkcija) može ju se najprije **kemijski doraditi** (konjugirati ili pegilirati). Proizvodnja završava pomnim odabirom materijala za **spremnike** (plastika, guma, metal, staklo) zbog dokazane osjetljivosti bioloških lijekova kad su u doticaju s njima. Svi se postupci trebaju provoditi u aseptičkim uvjetima, otopine trebaju proći sterilnu filtraciju (kojom se zadržavaju bakterije i gljivice), a ambalaža i otporne pomoćne tvari trebaju se zasebno sterilizirati.

Pegilacija je postupak kovalentnog povezivanja molekula polietilen glikola (PEG) na biološku makromolekulu ili monoklonsko protutijelo. Često se koristi metoksi polietilen glikol (mPEG). Struktura PEG-a je $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$, a mPEG-a $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$. Prednosti koje može donijeti pegilacija proteina vidljive su u boljem farmakokinetičkom profilu lijeka (zbog prividnog povećanja volumena molekule i promjenjene biodistribucije smanjena je bubrežna filtracija i klirens in vivo), smanjenoj imunogeničnosti lijeka (zbog sakrivanja antigenskih epitopa), te poboljšanoj fizikalnoj i termičkoj stabilnosti i topljivosti.

Slobodna hidroksilna skupina na mPEG-u prvo se aktivira tako da se zamijeni nekom od kemijski aktivnijih skupina (sukcinimidil, maleimidil, aldehid ili sulfhidril). Ovisno o odabiru te funkcionalne skupine, mPEG će se vezati na amine, tiole ili oksidirane ugljikohidrate prisutne na proteinu. Reakcije pegilacije nisu specifične i odvijaju se posvuda po proteinu (npr. na sve lizinske ostatke). Važno je voditi računa o kvaliteti i čistoći ulazne sirovine PEG-a te paziti na uvjete u kojima se kemijska reakcija izvodi.

Konjugacijom se uglavnom protein ili monoklonsko protutijelo spaja s nekim kemijskim agensom (lijekom, toksinom ili radioizotopom) da bi se postigla njegova ciljane dostava na mjesto djelovanja.

Pomoćne tvari odabrane za formulaciju lijeka potrebne su za održavanje stabilnosti i konformacije djelatne tvari te producibilnost i prihvatljivost od strane pacijenata. Najčešći oblici gotovih bioloških lijekova su otopine, smrznute otopine i liofilizirani prašci. Za svaku dodanu pomoćnu tvar u gotovi oblik biološkog lijeka zahtjeva se njena identifikacija, kontrola, te opis i opravdanje svrhe zašto je dodana. Ne nose sve pomoćne tvari jednaki rizik za sigurnost lijeka, najrizičnije su one životinjskog ili ljudskog porijekla jer mogu biti kontaminirane prionima ili virusima, kao i one nove, koje do sada nisu korištene u formulacijama bioloških lijekova ili za namjenjeni put primjene, zbog nedostatka iskustva s njima. Nedoželjna je prisutnost vidljivih i subvidljivih čestica (agregata) u gotovom

proizvodu. Promjene u formulaciji nakon odobrenja lijeka smatraju se visokorizičnima i potrebno ih je opravdati regulatornim agencijama.

Dobar je za to primjer rekombinantni GM-CSF, sargramostim, u čiju je otopinu dodana EDTA za bolju stabilnost proteina, a godinu dana nakon uvođenja te promjene dobrovoljno je povučen s tržišta jer je zabilježen porast pojavnosti nuspojava, posebno sinkope, što se uspjelo izravno dovesti u vezu s novom pomoćnom tvari. Tek kad se lijek ponovo počeo proizvoditi u originalnoj formulaciji vraćen je na tržište.

Optimalan **sustav zatvaranja spremnika** gotovog biološkog lijeka kompatibilan je s djelatnom i pomoćnim tvarima (poželjno inertan prema njima), osigurava sterilnost proizvoda i krajnjem je korisniku (pacijentu ili medicinskom osoblju) jednostavan za korištenje. Najviše su upotrebljavane staklene ampule s gumenim čepom i napunjene brizgalice. Kao i s pomoćnim tvarima, sastav i izbor materijala spremnika i sustava za zatvaranje moraju biti opravdani i ispitani (kvaliteta i moguće interakcije).

Bilo je primjera da volfram iz primarne ambalaže uzrokuje pojačanu agregaciju proteina i veću imunogeničnost tako čuvanih proizvoda.

Formuliranjem gotovog lijeka i aseptičkim punjenjem u spremnike (naknadna sterilizacija nije moguća jer je preagresivna) završava proizvodni proces. Svaki korak tog procesa mora biti validiran da se osigura kvaliteta proizvoda.

Onečišćenja u biološkim lijekovima

Postoje opće regulatorne smjernice za sigurnosni rizik onečišćenja prisutnih u kemijskim lijekovima, dok se sigurnosni rizik onečišćenja prisutnih u biološkim lijekovima određuje slučaj po slučaj.

Onečišćenja u gotovom biološkom proizvodu mogu potjecati iz svih faza proizvodnje, pročišćavanja i oblikovanja lijeka, npr. zbog lize stanica domaćina uslijed povišenog tlaka prilikom procesa pročišćavanja ako je proizvodnja bila pretjerana, ili zbog previše dodanog silikonskog ulja pri podmazivanju aparature čije kapljice prisutne u otopini proteina potiču stvaranje agregata.

Primarni je cilj pročišćavanja biološkog lijeka učinkovito razdvajanje djelatne tvari od **procesnih onečišćenja** (eng. process-related impurities) bez promjena u kvaliteti, čime se osigurava njegova prikladnost za upotrebu, posebno ako je lijek namjenjen za višekratnu primjenu, i sprječava razvoj neželjenih imunskih ili toksičnih reakcija na onečišćenja. Procesna onečišćenja potječu iz proizvodnog procesa (dijelovi stanica, ostaci medija, reagensi) i treba ih razlikovati od **onečišćenja koja potječu od proizvoda** (eng. product-related impurities) (prekursori ili degradacijski produkti).

Onečišćenja koja potječu iz živog sustava

Onečišćenja koja potječu iz staničnih kultura su **dijelovi stanica** (DNK koja je potencijalno onkogenična i proteini domaćina koji su potencijalno imunogenični) i **ostaci medija**. Onečišćenja koja potječu iz transgeničnih životinja su proteini iz domaćina i mlijeka.

Primjerice, preporuke Svjetske zdravstvene organizacije prihvaćene od većine svjetskih regulatornih agencija za ograničenje unosa **strane DNK** iznosi 0,01 µg/dozi lijeka primjenjenog parenteralnim putem i 100 µg/dozi lijeka primjenjenog oralnim putem. Zaostala DNK iz stanica domaćina se pri postupcima pročišćavanja djelatne tvari obično uklanja uz pomoć digestivnih enzima te afinitetnom i anion izmjenjivačkom kromatografijom.

Nema službenih regulatornih ograničenja za količinu prisutnih **zaostalih proteina iz stanica domaćina**, ali dopušta se 1-100 ppm kad se određuje ELISA testom. Za potencijalnu imunogeničnost zaostalih proteina iz stanica domaćina važni su i drugi čimbenici kao što su

doza i put primjene lijeka, vrsta od koje potječu (kvasci ili sisavci), način žetve, način pročišćavanja, itd.

Za humani inzulin koji je u kroničnoj primjeni, rizik za imunogeničnost zaostalih proteina iz stanica domaćina procjenjen je visokim pa Američka farmakopeja (USP) propisuje da im sadržaj ne smije biti veći od 10 ppm. Suprotno tome, rizik za imunogeničnost zaostalih proteina iz stanica domaćina u cjepivu protiv HPV-a (rekombinantni antigen proizveden je u kvascu) smatra se niskim i dopušten im je sadržaj oko 6%. Razlog je tome što se primjenjuje samo tri puta u životu, u razmacima od više mjeseci.

Dobar primjer imunogeničnosti proteina zaostalih iz stanica domaćina dolazi iz kliničke faze ispitivanja biosličnog somatropina kad je oko 60% pacijenata razvilo vezna protutijela na lijek, a 100% pacijenata je razvilo protutijela na proteine iz E. coli. Nasreću, razvitak protutijela nije utjecao na učinkovitost lijeka, a ustanovljeno je i da se radilo o samo jednoj seriji lijeka. Zbog tog je događaja promijenjen proces pročišćavanja rekombinantnog proteina i pojavnost protutijela se smanjila na očekivane vrijednosti.

Komponente medija u kojem se uzgajaju stanične kulture i **aditivi** također mogu zaostati kao procesna onečišćenja. **Antibiotici** se dodaju ili kao agensi za gensku selekciju (npr. tetraciklinima se probiru bakterije koje sadrže plazmid s genom za otpornost prema tetraciklinima) ili za sprječavanje zaraza (neomicin, polimiksin B, streptomycin, gentamicin). Dodatak β -laktama se ne preporučuje zbog čestih pojava alergijskih reakcija u ljudskoj populaciji. Svaki primjenjeni antibiotik korišten za vrijeme proizvodnje mora biti naveden. **Fetalni goveđi serum** dobar je dodatak mediju jer je bogat nutrijentima, faktorima rasta, albuminima i imunoglobulinima. U gotovom proizvodu navedeni se proteini smatraju onečišćenjima zbog potencijalne imunogeničnosti, te im nije dozvoljen sadržaj viši od 1 $\mu\text{g/ml}$ otopine. Aditivi kulturi se dodaju da se **poveća prinos** (genski amplifikatori za određene stanične sustave sisavaca su metotreksat i metionin sulfoksamin u rezistentnim stanicama), da se **odgodi apoptoza** (inzulin i čimbenik rasta sličan inzulinu dodaju se u kulture stanica

sisavaca, a zbog hormonske aktivnosti važno ih je maknuti iz gotovog proizvoda) i da se **smanji pjenjenje** (silikonski polimeri dodaju se vodenom mediju u koncentraciji 0,005-0,02%). Metotreksat je potencijalno toksičan lijek za autoimune bolesti i karcinome, a metionin sulfoksamin je potencijalni neurotoksin.

Mlijeko transgeničnih životinja kompleksna je smjesa proteina, laktoze, masnoća, vitamina, minerala i proizvedenog lijeka. Spomenuti proteini mogu biti uzrok neželjenim imunskim nuspojavama, npr. anafilaksije, a u mlijeku je moguće naći i tragove životinjske krvi. Tretiranje životinja antibioticima i hormonima u vrijeme kad bi se mogao kontaminirati i biološki lijek nije dozvoljeno. Biljna biomasa koja sadrži proizvedeni lijek može sadržavati druge proteine, biljnu DNK, svoje metabolite, npr. alkaloida, te pesticide iz okoliša ili teške metale iz tla.

Onečišćenja koja potječu iz procesa pročišćavanja

Da bi se postupci pročišćavanja uopće mogli izvesti (filtracija i kromatografija) potrebno je dodati različite **pufere**, **reagense** i **otapala**, a lijek je prilikom izvođenja u dodiru s kolonom čije **afinitetne** ili **funkcionalne skupine** mogu biti imunogenične. Ostatna organska otapala moraju se ukloniti da odgovaraju specifikacijama proizvoda ili zahtjevima DPP.

Tvari koje migriraju iz pakirnog materijala u lijek (eng. extractables i leachables)

Navedeno su sve tvari koje mogu migrirati iz pakirnog materijala u različita otapala pod definiranim uvjetima (extractables) i tvari koje mogu migrirati iz pakirnog materijala u lijek za vrijeme roka valjanosti na uvjetima skladištenja (leachables). To su metali, masne kiseline, ciklički esteri, organska otapala, katalizatori, antioksidansi, ftalati, itd. Ispituju ih proizvođači jer njihova prisutnost u gotovom biološkom lijeku nije bezopasna. Mogu uzrokovati oksidaciju ili agregaciju proteina, povećati toksičnost i imunogeničnost proteina i interferirati s rezultatima ispitivanja koja se nad lijekom provode. Od pakirnog se materijala zato očekuje da ne ispušta po pacijente opasne i neželjene tvari.

Analitika strukture bioloških lijekova

Biološki lijekovi su velike molekule kompleksne strukture čije čak i suptilne promjene mogu utjecati na učinkovitost (aktivnost) i sigurnost (imunogeničnost). Analiziraju se potencijalne promjene u primarnom aminokiselinskom redosljedu (deamidacija, oksidacija), posttranslacijske modifikacije (glikozilacija) i strukturne promjene višeg reda (smatanje, agregacija). Potrebno je kombinirati i nekoliko desetaka sofisticiranih analitičkih metoda u procesnim kontrolama i rutinskim analizama da bi se okarakterizirala čitava struktura i odredio stupanj čistoće biološkog lijeka. Svaka od korištenih kromatografskih, elektroforetskih i spektroskopskih metoda ima svoje prednosti i ograničenja.

Za karakterizaciju i potvrdu strukture terapijskog proteina koriste se **analize slijeda i sastava aminokiselina**, posebno **N- i C- krajeva** proteina, **peptidno mapiranje**, provjera **sulfidrilnih grupa i disulfidnih mostova** i, za glikoproteine, **analiza ugljikohidratnih lanaca** (sastav, uzorci, vezna mjesta na proteinu). Nakon potpune hidrolize peptidnih lanaca kromatografski se odvajaju i kvantificiraju pojedinačne aminokiseline čime se obavlja analiza aminokiselinskog sastava proteina. Selektivnim kemijskim ili enzimatskim ukljanjanjem sekvencioniraju se N- i C- kraj proteina. Proteini se mogu digestirati i sa specifičnim proteazama, a nastali fragmenti idu u daljne analize.

Od fizikalnokemijskih svojstava proteina analiziraju se **molekulska veličina ili težina i izoforma proteina**, te elektroforetski, kromatografski i spektroskopski profili prema metodama koje se odabiru kao najprikladnije. Pri **kromatografskom profiliranju** molekule i fragmenti odvajaju se zbog različitog afiniteta prema stacionarnoj ili pokretnoj fazi, najčešće prema veličini, ionskom naboju, hidrofobnim interakcijama. **Elektroforetsko profiliranje** odvija se prema molekulskoj veličini ili naboju, u SDS-poliakrilamid gel elektroforezi (SDS-PAGE), kapilarnoj gel elektroforezi (CGE) i izoelektričnom fokusiranju (IEF), a detekcija razdvojenih fragmenata obavlja se bojanjem ili imunoblotom. Masenom i tandemskom masenom spektrometrijom razdvajaju se i analiziraju fragmentirani i ionizirani dijelovi molekule.

Onečišćenja koja potječu od proizvoda, posebno **degradacijski produkti** koji nastaju za vrijeme proizvodnje i/ili skladištenja u značajnijim količinama, moraju se pratiti. Oni su često strukturno slični djelatnoj tvari pa ih je potrebno dobro izolirati i okarakterizirati da se otkriju promjene koje nastupaju (hidrolitičko ili enzimatsko cijepanje; deamidirane, oksidirane, drugačije konjugirane izoforme; agregati).

Dostupne i korištene metode u takvoj analizi proteina su **dinamično raspršenje svjetla** (eng. dynamic light scattering, DLS) koja mjeri raspršenje laserske zrake u otopini proteina, **cirkularni dikroizam** (eng. circular dichroism, CD) kojom se mjere razlike u apsorpciji lijevo ili desno polarizirane svjetlosti u funkciji aminokiselinskih kromofora na proteinu, **analitička ultracentrifuga** (eng. analytical ultracentrifugation, AUC) za vrijeme koje pri visokim brzinama centrifuge proteini sedimentiraju prema veličini ili konformaciji, **nuklearna magnetna rezonanca** (eng. nuclear magnetic resonance, NMR) koja mjeri sposobnost jezgre da apsorbira i emitira energiju iz elektromagnetnog pulsa, a na reakciju utječu atomski okoliš i interakcije, i **mikrokalorimetrija**, termodinamička metoda koja mjeri toplinski kapacitet proteina. (2)

Pregled ljudskog imunosnog sustava

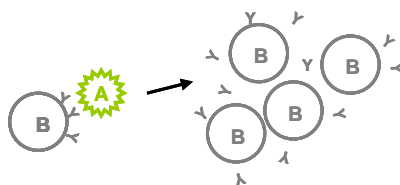
Imunost je sposobnost organizma da se odupre djelovanju stranih tvari (antigena). Ta otpornost temelji se na dva obrambena mehanizma - **nespecifičnoj (urođenoj, konstitucijskoj)** i **specifičnoj (stečenoj, adaptivnoj)** imunosti. Stanice imunosnog sustava rađaju se, a većina i sazrijeva, u koštanoj srži, cirkuliraju krvlju i limfom te obitavaju u perifernim tkivima koja nadziru. Prema izvršnim mehanizmima postoje dva oblika obrambenih reakcija - **humoralne** i **stanične**. Zadaća imunoreakcija je obrana organizma od infekcija i tumora i održavanje antigenske i genske homeostaze.

Prvu liniju imunosti obrane organizma čini **nespecifična imunost**, a prva barijera ulasku antigena u organizam jest ona anatomsko - koža i sluznice sa svojim sekretima, fiziološkom florom i mehanizmima mehaničkog uklanjanja antigena s površine. Slijede zatim razne fiziološke zapreke - vrućica, pH tkiva i mikrobicidne kemijske tvari u izvanstaničnoj tekućini koje djeluju nespecifično (lizozim, interferon, komplement, C-reaktivni protein i dr.). Stanični nositelji nespecifične imunosti jesu **fagociti** (monociti-makrofagi i leukociti) i **prirodnoubilačke stanice** (stanice NK, eng. natural killer), koji osim prepoznavanja najčešćih ili novih antigena i njihovog fagocitiranja izlučuju i brojne tvari kojima se potiču upala i specifična imunoreakcija. Upala je jedinstvena standardna reakcija organizma na bilo koje oštećenje, a uvertira je za specifičnu imunoreakciju.

Specifična imunost temelji se na **imunoreakcijama** usmjerenima baš protiv antigena koji je ušao u organizam i rezultat su podražaja imunostnog sustava. Temeljne značajke imunoreakcije su **prepoznavanje na temelju komplementarnosti** (kemijskih biljega koji su temelj razlikovanja vlastitog od tuđeg), **specifičnost** (odvija se samo prema onom antigenu koji je pokrenuo reakciju), **imunološko pamćenje** (imunokompetentne stanice su sposobne na ponovni ulazak istog antigena odgovoriti bržom, žešćom i učinkovitijom reakcijom i godinama kasnije) i **različitost** (ogromna heterogenost klonova limfocita u funkciji i specifičnosti).

Humoralna specifična imunost je posredovana **protutijelima** koja se stvaraju nakon ulaska nekog antigena u organizam. Protutijela su glikoproteini koje sintetiziraju **diferencirani limfociti B (kratkovjeke plazma-stanice)** i izlučuju u izvanstaničnu tekućinu. Nastala protutijela se specifično selektivno i reverzibilno vežu s antigenima koji su potakli njihovu sintezu, tvoreći imunokomplekse čime dolazi do precipitacije, aglutinacije ili neutralizacije antigena. Pošto ne razaraju ili ubijaju antigen izravno, služe kao biljeg za raspoznavanje cilja drugim obrambenim mehanizmima (sustavu komplementa, makrofagima, stanicama NK i dr.). Brzina sinteze protutijela ovisi o broju plazma-stanica, a on o uvjetima imunizacije (imunogeničnosti antigena, količini, obliku, molekulskoj masi, topljivosti; adjuvansima, putu imunizacije, promociji i kompeticiji antigena; svojstvima organizma - vrsti, genskom ustrojstvu, dobi,

uhranjenosti, postojanju imunološke memorije, koncentraciji već gotovih specifičnih protutijela). Dio limfocita B diferencira se i u **dugovjeke stanice s pamćenjem (memorijske stanice)**.



Slika 3.: Shematski prikaz prepoznavanja antigena limfocitima B nakon koje slijedi njihova proliferacija i produkcija protutijela, prilagođeno prema Mijić I, Marinc S, Cindrić M. Imunogeničnost agregata terapijskih proteina

A=antigen, B=limfocit B, Y=protutijelo

Stanična specifična imunost je posredovana **limfocitima T** i **makrofagima**, a razvija se pri ulasku unutarstaničnih bakterija, virusa, stanica presatka ili tumora. Osnovni izvršni mehanizam citotoksično je djelovanje limfocita T i njihovih humoralnih produkata, citokina.

Imunosna reaktivnost nakon dodira s antigenom u organizmu može biti primjerena (imunost), preosjetljiva (alergija) i autoimuna, a **imunosna nereaktivnost** posljedica je specifične imunotolerancije, imunosupresije ili imunodeficijencije.

Tablica 3. Podjela imunološke preosjetljivosti, prilagođeno prema Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Marušić M, Taradi M, Višnjic D. Imunologija

| Imunološka preosjetljivost | Oblik | Imunoreakcija | Vrsta protutijela | Vrijeme nastupa reakcije |
|--|-------|-----------------------------|-------------------|--------------------------|
| Rana (posredovana protutijelima) | I. | Anafilaktička | IgE | Minute ili sati |
| | II. | Citotoksična | IgG, IgM | Različito |
| | III. | Uzrokovana imunokompleksima | IgG | 1-3 tjedna |
| Kasna (odgođena) | IV. | Posredovana stanicama | ∅ | 2-7 dana |

Antigeni su složene molekule što ih imunski sustav prepoznaje kao tuđe. **Imunogeničnost** je jedno od svojstava antigena - da mogu potaknuti specifičnu imunoreakciju tj. proizvodnju protutijela. Ponašanje, pa tako i imunogeničnost strane tvari u organizmu ovisi o mnogo čimbenika koji se odnose i na jedinku u kojeg je antigen unesen i na samu molekulu antigena - najvažniji su **stupanj različitosti i nesrodnosti** (filogenetska udaljenost), **molekulska masa** (u načelu su tek molekule relativne molekulske mase veće od 10 kDa imunogenične, od kojih se posebno ističu proteini relativne molekulske mase veće od 100 kDa), **složenost molekulske građe** (homopolimeri nisu imunogenični bez obzira na molekulsku masu, kao ni molekule s nestalnom prostornom konfiguracijom), **dostupnost predočnim stanicama** (antigeni koji se ne mogu obraditi nisu imunogenični), **količini unešenog antigena** (višekratnim uštrcavanjem malih doza ili jednokratnim uštrcavanjem vrlo visoke doze topljivog antigena vjerojatnije je da će se postići imunotolerancija), **putu unošenja** (intrakutani i subkutani put unosa pospješuju imunoreaktivnost, dok intravenski i peroralni put unosa pogoduju nastanku tolerancije), itd. Od fizikalnih svojstava antigena koji pridonose imunogeničnosti valja spomenuti **topljivost, agregiranost** (agregate lako upijaju predočne stanice), **naboj i optičku konfiguraciju**. Proteini (i lipoproteini i glikoproteini) najjači su prirodni antigeni, a njihova imunogeničnost ovisi o sekundarnoj i terciarnoj strukturi. Imunogenični polisaharidi su oni razgranati, izolirani iz mikroorganizama (npr. dekstran, levan), bakterijski endotoksini (lipoglikoproteini i lipopolisaharidi) i npr. glikoproteini koji tvore eritrocitne antigene za AB0 sustav krvnih grupa. Lipidi i nukleinske kiseline su imunogenični tek u spoju s drugim tvarima.

Imunotolerancija je specifična imunonereaktivnost na određeni antigen i stječe se aktivno (specifičan klon autoreaktivnih limfocita T ili B biva uklonjen ili inaktiviran u ranoj fazi svog razvoja, već u koštanoj srži ili timusu), kao npr. imunotolerancija na organospecifične i druge vlastite antigene. Takva tolerancija se lakše postiže u nerazvijenom imunskom sustavu.

Za ocjenu imunogeničnosti antigena važna je i osjetljivost metode kojom pokušavamo zabilježiti imunoreakciju.

Protutijela i limfociti ne prepoznaju i ne reagiraju na čitavu antigensku molekulu, već samo na njene ograničene dijelove - **antigenske determinante ili epitope** - i ta su područja odgovorna za specifičnost reakcije između antigena i protutijela ili limfocita. Specifičnost epitopa određena je slijedom građevnih jedinica i prostornom konformacijom. Područja antigenske molekule s izraženijim antigeničnim svojstvima nazivaju se imunodominantni epitopi i na njih će se većina protutijela vezati. Ona se nalaze na vanjskim, izloženim dijelovima molekule, npr. petljama polipeptidnih lanaca. Najmanji epitop može sadržavati samo tri aminokiseline. Jedno protutijelo može reagirati s nekoliko antigena u **križnoj reakciji** zato što različiti manje ili više kompleksni antigeni mogu imati zajedničke ili slične determinante. Takva križnoreaktivna protutijela dobivaju se imunizacijom na jedan, a reakcijom na drugi antigen.

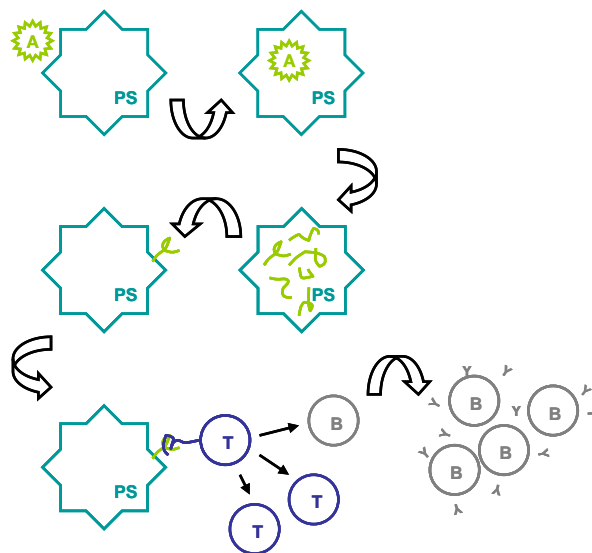
Antigeni specifični za vrstu nalaze se na stanicama svih jedinki određene životinjske vrste i nazivaju se **kseoantigenima** (odgovorni za reakcije odbacivanja, npr. inzulina). Antigeni specifični za jedinku razlikuju se od jedinke do jedinke iste vrste i nazivaju se **aloantigenima** (izazivaju reakciju na presadak). Antigeni specifični za tkivo specifični su za određenu funkcijsku skupinu stanica i na sve njih postoji prirodna imunotolerancija u zdravoj jedinki. Tumorski specifični antigeni su proteini koji se pojavljuju na stanici kad se ona zloćudno preobrazila (embrionalni ili potpuno novi antigeni). Svi antigeni neke jedinke nazivaju se **autoantigenima**.

Sustav jakih antigena tkivne podudarnosti određen je trima skupinama gena koje se nazivaju **glavnim kompleksom gena tkivne podudarnosti** (MHC, eng. major histocompatibility complex). Njihovi produkti, **antigeni MHC**, čine sustav antigena koji se u čovjeka naziva HLA (eng. human leukocyte antigens). Antigeni MHC se dijele u tri skupine, a skupina I (MHC-I) i skupina II (MHC-II) imaju ključne imunoregulacijske uloge (stvaranje kompleksa s prerađenim tuđim antigenima i predočavanje istih limfocitima). To su membranski proteini čije su izvanstanične domene varijabilne i tvore pukotine u koje ovisno o stereokemijskoj podudarnosti sjedaju peptidni ulomci koji nastaju unutarstaničnom razgradnjom proteina tj. preradom stranih antigena.

Egzogeni put prerade antigena obavljaju specijalizirane predočne stanice koje hvataju i fagocitiraju antigene, razgrađuju ih na male peptide, vežu na vlastite **molekule MHC-II** i prenose na površinu stanice. Tada se aktivira imunski odgovor posredovan limfocitima T. **Specijalizirane ili profesionalne predočne stanice** su dendritične stanice (s dugim i razgranatim citoplazmatskim izdancima koji čine finu mrežu za hvatanje uljeza), makrofagi i limfociti B (kojima je važno da antigen bude prisutan u organizmu u dovoljno visokoj koncentraciji i otopljen).

Endogeni put prerade antigena odvija se u citoplazmi svih stanica s jezgrom, a kompleks prerađenih unutarstaničnih proteina i **molekule MHC-I** izrazi se na površini stanice. Tako se prerađuju i tumorski antigeni i produkti unutarstaničnih mikroorganizama (npr. virusa).

Antigeni MHC-II navode pomagačke limfocite T $CD4^+$ na predočne stanice, a antigeni MHC-I navode citotoksične limfocite T $CD8^+$ na zaražene stanice vlastitog organizma. Biljezi limfocita, odnosno leukocitni diferencijacijski antigeni svrstani su u CD-sustav (eng. clusters of differentiation).



Slika 4.: Shematski prikaz prerade i predočavanja antigena limfocitima T te proliferacije limfocita B koji produciraju protutijela, prilagođeno prema Mijić I, Marinc S, Cindrić M. Imunogeničnost agregata terapeutskih proteina

A=antigen, B=limfocit B, PS=predočna stanica, T=limfocit T, Y=protutijelo

Imunološko prepoznavanje osniva se na stvaranju klonova limfocita. Limfociti prepoznaju izložene antigenske determinante po načelu komplementarnosti. Limfociti B prepoznaju prostornu konformaciju topljivih antigena kojima su epitopi na površini molekule, a limfociti T prepoznaju linearne epitope proteina izložene unutar kompleksa s antigenima MHC na površini antigen predočnih stanica. Prepoznavanje i vezanje antigena odvija se pomoću **posebnih receptora na površini limfocita**. Receptori na stanicama koje pripadaju istom klonu limfocita u pravilu reagiraju samo s jednim antigenom - selekcijska teorija o specifičnom imunološkom prepoznavanju, izuzetak su rijetke moguće križne reakcije. Stanice NK ne izražavaju receptore specifične za antigen već njihovi receptori prepoznaju molekule koje su normalno izražene na vlastitim stanicama. Receptor za antigen na limfocitima B je molekula protutijela (membranski imunoglobulin koji veže slobodne, nativne antigene), a receptor za antigen na limfocitima T je dvolančani polipeptid, najčešće (95%) TCR- $\alpha\beta$ (eng. T-cell receptor). Limfociti T- $\gamma\delta$ su intraepitelni limfociti kojih je najviše na sluznicama i prepoznaju glikolipidne antigene mikroba u sklopu molekule CD1a na predočnim stanicama i spadaju u urođenu imunost.

Klonotipski receptori limfocita T imaju varijabilnu, hipervarijabilnu i konstantnu regiju. Limfociti T- $\alpha\beta$ dijele se u dvije fenotipske subpopulacije - pomagački T_H (CD4⁺CD8⁻) koji pomažu sazrijevanje limfocita B i proizvodnju protutijela, i citotoksični T_C (CD4⁻CD8⁺) koji pomažu daljnje sazrijevanje citotoksičnih limfocita T i aktivaciju makrofaga. Limfociti T_{H1} potiču staničnu imunost kao protuupalni odgovor, a limfociti T_{H2} potiču limfocite B na proizvodnju protutijela kao humoralni odgovor. Oni se razlikuju po vrsti citokina koje izlučuju i međusobno se inhibiraju.

Protutijela (imunoglobulini) su građena od dva para istovrsnih polipeptidnih lanaca, lakih od 220 aminokiselina i teških od 440 aminokiselina, međusobno simetrično povezanih s dvadesetak disulfidnih veza (koje određuju i stabiliziraju konformaciju molekule), u obliku slova Y. Varijabilnost im proizlazi iz promjenjivosti primarnog slijeda aminokiselina. Sadrže dva funkcijski i topološki različita dijela - Fab ulomak za prepoznavanje i specifično

reverzibilno vezanje s antigenom (smješten u gornjim kracima, promjenjivog kuta 0-180°), i efektorski Fc ulomak za aktiviranje drugih obrambenih mehanizama i određivanje bioloških svojstava pojedinog razreda imunoglobulina (prema građi teškog lanca svrstavaju se u pet razreda - IgA, IgD, IgE, IgG i IgM). Vezno mjesto za antigen na Fab ulomku naziva se paratopom. Membranski imunoglobulini, odnosno receptori na limfocitima B, pripadaju razredima IgM i IgD. Dvije ili pet jedinica monomera imunoglobulina mogu se udružiti u polimere IgA i IgM. Molekulska masa monomera iznosi oko 150 kDa. Ugljikohidratni dio čini 3-18% molekule, to su postranični lanci oligosaharida kovalentno vezani za konstantnu regiju teškog lanca. Njihov sastav i broj nije stalan za neki razred ili određen genima, već se dodaje u Golgijevom aparatu. Ima djelomičnu ulogu u sekreciji protutijela, vezanju za površinu nekih stanica i produljenju poluvijeka u plazmi. Imunoglobulini su stabilni smrznuti, a blaže denaturirani ponovo poprimaju nativni oblik nakon vraćanja u fiziološke uvjete. (9)

Kako biološki lijekovi izazivaju imunoreakciju

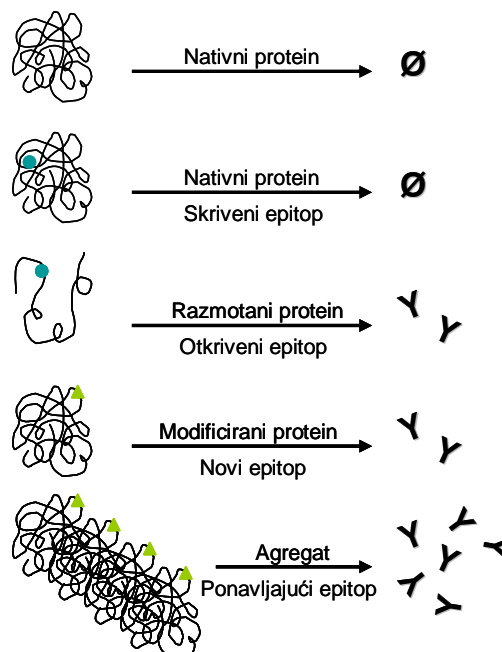
Teorijska pozadina potencijalnih imunoreakcija protiv bioloških lijekova podrazumijeva aktivaciju imunskog sustava preko pobude alarmnih signala za antigen predočne stanice. Ti signali mogu biti povezani sa samom **djelatnom tvari, formulacijom lijeka** (nastali agregati, prisutna onečišćenja, neodgovarajući izbor pomoćnih tvari), **putem primjene** (npr. zbog nekroze na mjestu primjene) i **općem imunskom statusu bolesnika**.

U slučaju cjepiva, od kojih se upravo zahtjeva ta dodatna stimulacija antigen specifičnog imunskog odgovora, poznat je niz pomoćnih tvari (adjuvansa) koje se dodaju da bi se inducirao efikasan i robustan odgovor stečenog imunskog sustava protiv lijeka koji sadrži određene ksenogene proteine.

Opće je prihvaćeno da je imunogeničnost terapijskih proteina pod utjecajem **stupnja različitosti u slijedu aminokiselina** između terapijskog i endogenog proteina. Prema tome,

proteini dobiveni iz ljudskih izvora (npr. pročišćeni iz krvi) ili rekombinantnom tehnologijom bi trebali biti najmanje imunogenični. Imunosne ili kliničke posljedice u tim slučajevima posljedica su aloantigene varijabilnosti (najbolji primjer je presadak tkiva). Terapijski proteini ksenogenog porijekla imaju najveći rizik za imunogeničnost zbog prisustva stranih epitopa u svojoj strukturi. Oni nakon prerade u predočnim stanicama mogu izravno stimulirati limfocite B i makrofage čime se potiče kaskada reakcija - proizvodnja specifičnih protutijela, stimulacija limfocita T i indukcija memorijskih stanica. Takav odgovor smanjuje terapijski učinak primjenjenog lijeka zbog njegove neutralizacije i povećanog klirensa.

U početnoj fazi stvaraju se **vezna protutijela**, što obično nema kliničke posljedice, ali zabilježeni su utjecaj na farmakokinetiku lijeka i anafilaktičke reakcije. U drugoj fazi, koja ne mora nužno uslijediti, stvaraju se **neutralizirajuća protutijela** koja se vežu na aktivno mjesto i inaktiviraju lijek. Uzrok najozbiljnijih komplikacija vezanje je neutralizirajućih protutijela na aktivno mjesto endogenog proteina u križnoj reakciji. Nadalje, mogu se inducirati upalna ili alergijska reakcija koje također mogu biti od izvjesne kliničke važnosti.



Slika 5.: Potencijalna imunogeničnost pojedinih strukturnih promjena terapijskog proteina, prilagođeno prema van Beers M, Bardor M. Minimizing immunogenicity of biopharmaceuticals by controlling critical quality attributes of proteins

Čimbenici koji utječu na imunogeničnost gotovog biološkog lijeka, a vezani su za njegovu proizvodnju, prvenstveno su **zaostala onečišćenja materijala stranog porijekla**. Pročišćavanje proteina kompleksno je i male promjene u tom procesu mogu rezultirati nekim strukturnim promjenama (npr. stvaranju novih epitopa), odnosno različitom imunogeničnošću, a isto može prouzročiti i kemijska nestabilnost proizvoda (oksidacija ili deamidacija). Opetovana primjena tako nastalih epitopa, zajedno s određenim adjuvansima, može pojačati imunogeničnost određenog terapijskog proteina i intenzitet imunoreakcija.

Za neke terapijske proteine primjećeno je da mogu **prevladati imunotoleranciju** na vlastiti antigen i izazvati specifičan imunosni odgovor (rekombinantni inzulin ili GS-CSF). Probijanje imunotolerancije spor je proces koji se razvija mjesecima ili duže i nema nužno klinički važne posljedice po pacijenta.

Mnogim se mehanizmima osigurava da limfociti budu tolerantni na vlastite antigene. Međutim, periferni autoreaktivni limfociti B i T mogu se aktivirati ako je konstitutivni antigen predodređen kao signal za opasnost. Jedan od signala za opasnost je i unakrsno povezivanje nekoliko antigena u svojevrsne antigenske komplekse (ponavljajući slijed antigena povećava izlučivanje specifičnih protutijela 30 puta u odnosu na monomerni antigen i viđa se kod agregata terapijskih proteina).

Mikrobni infektivni agensi, onečišćenja ili agregati terapijskih proteina uzrokuju aktivaciju autoreaktivnih limfocita kroz otpuštanje odvojenih autoantigena nakon alarmnih signala ili molekularnu mimikriju s autoantigenima. Rezultat autoantigenom potaknutog imunosnog odgovora proizvodnja je autoprotutijela i širenje dugoživućih memorijskih stanica. Autoantigen specifični limfociti B učinkovito surađuju s limfocitima T_H i nakon doticaja s niskim koncentracijama autoantigena, mehanizmima koji posjeduju potencijalni rizik za niz patoloških posljedica za pojedinca.

Ljudski imunosni sustav sastavljen od urođenih i stečenih obrambenih mehanizama evoluirao je da prepoznaje strano, a tolerira vlastito. Biološki lijekovi izuzev cjepiva optimalno bi trebali

biti sastavljeni od molekula sličnih sebi. Ako zbog određenih okolnosti sadrže strane epitope, mogu aktivirati imunski sustav i probiti toleranciju. Razumijevanje osnovnih mehanizama koji predhode aktivaciji i regulaciji imunskih odgovora pomaže razvoju formulacija budućih bioloških lijekova, kojima će se smanjiti rizik neželjene imunoreaktivnosti. (9-11)

Imunogeničnost bioloških lijekova

Imunogeničnost se oduvijek povezivala s upotrebom terapijskih proteina, nehumanog ili humanog porijekla, jer imunski odgovor može uslijediti čak i ako je aminokiselinski slijed terapijskog proteina u potpunosti jednak humanom proteinu. Većina terapijskih proteina potiče neželjeni imunski odgovor kojeg okida više od jednog čimbenika. Imunski odgovor je kompleksan i uz stvaranje protutijela podrazumijeva i aktivaciju limfocita i/ili stanica urođenog imunskog sustava, koja doprinose potencijalnom nastanku nuspojava.

Imunoreakcije na terapijski protein različitog su intenziteta, od prolazne pojave protutijela koja nema kliničku značajnost do po život ugrožavajućih komplikacija. Zbog potencijalnih ozbiljnih kliničkih posljedica koje može prouzročiti (gubitak učinkovitosti terapije ili sustavnih nuspojava, anafilaksije i križne reaktivnosti protutijela na endogeni protein s važnom fiziološkom ulogom) važno je ustanoviti i razumijeti čimbenike koji mogu doprinijeti imunogeničnosti bioloških lijekova. Najopasnija posljedica razvitka protutijela na terapijski protein spomenuta je neutralizacija endogenog proteina istima.

Kod prvotne upotrebe životinjskih proteina kao lijekova (npr. goveđeg ili svinjskog inzulina), smatralo se da je njihovo **strano porijeklo** glavni uzrok imunogeničnosti. Kasnije je nađeno da i pročišćeni proteini iz ljudskih tkiva ili seruma (npr. hormon rasta ili čimbenik VIII) također induciraju imunski odgovor. Ti su proizvodi davani pacijentima s **urođenim genskim deficijencijama** pa je imunogeničnost objašnjena **nedostatkom autotolerancije**. Uvođenje rekombinantne tehnologije u proizvodnju lijekova iz genetski modificiranih stanica omogućilo

je razvoj identičnih ili gotovo identičnih proteina onim ljudskim, nativnim, i problem imunogeničnosti je smanjen, iako i dalje postoji. Prva generacija biotehnoški dobivenih proteina uglavnom su bile kopije čimbenika rasta, citokina i hormona, ponekad s malim modifikacijama koje bi im poboljšale stabilnost ili omogućile ekspresiju u bakterijama. Posljednja tri desetljeća raste broj bioloških lijekova koji ulaze u kliničku praksu. Neželjene imunosne odgovore koje oni induciraju u liječenih pacijenata pod utjecajem su različitih čimbenika, koje dijelimo na one povezane s proizvodom, pacijentom i bolešću.

Za biološke lijekove koji imaju visok stupanj homologije s nativnim proteinima, glavni uzrok imunogeničnosti dokazano su **onečišćenja, formiranje agregata i degradacija**. Svaki se od tih faktora može se pratiti fizikalnokemijskim karakterizacijama za vrijeme proizvodnje i skladištenja. Sofisticirane metode kao površinska plazmonska rezonanca (eng. surface plasmon resonance, SPR) i trodimenzionalno računalno modeliranje koriste se za proučavanje interakcija protutijela i antigena i važan su dijagnostički alat za otkrivanje potencijalnih čimbenika koji utječu na imunogeničnost proteina.

Konkomitantna terapija i vrsta bolesti mogu imati utjecaj na kliničku prezentaciju imunogeničnosti biološkog lijeka pa se ona mora procjenjivati individualno za svaku indikaciju ili populaciju pacijenata. Pravilo je da se terapijski proteini smatraju individualnim i jedinstvenim proizvodima, a iskustvo sa sličnim proteinima može se smatrati samo potporom.

Podaci o mogućim neželjenim imunosnim reakcijama na terapijski protein potrebni su prije odobrenja za stavljanje biološkog lijeka u promet i pregled svih retrospektivnih istraživanja imunogeničnosti trebaju biti uključena registracijsku dokumentaciju, ali, ovisno o imunogeničnom potencijalu i rijetkosti bolesti, obujam tih podataka može biti oskudan. Pažljiva procjena imunogeničnosti biološkog lijeka uključuje i sustavno prikupljene podatke od dovoljnog broja pacijenata nakon odobrenja lijeka. Postmarketinško ispitivanje imunogeničnosti zahtjeva se u farmakovigilancijskom planu upravljanja rizicima (eng. risk management plan). Testovi koji se u tu svrhu koriste moraju moći razlikovati neutralizirajuća

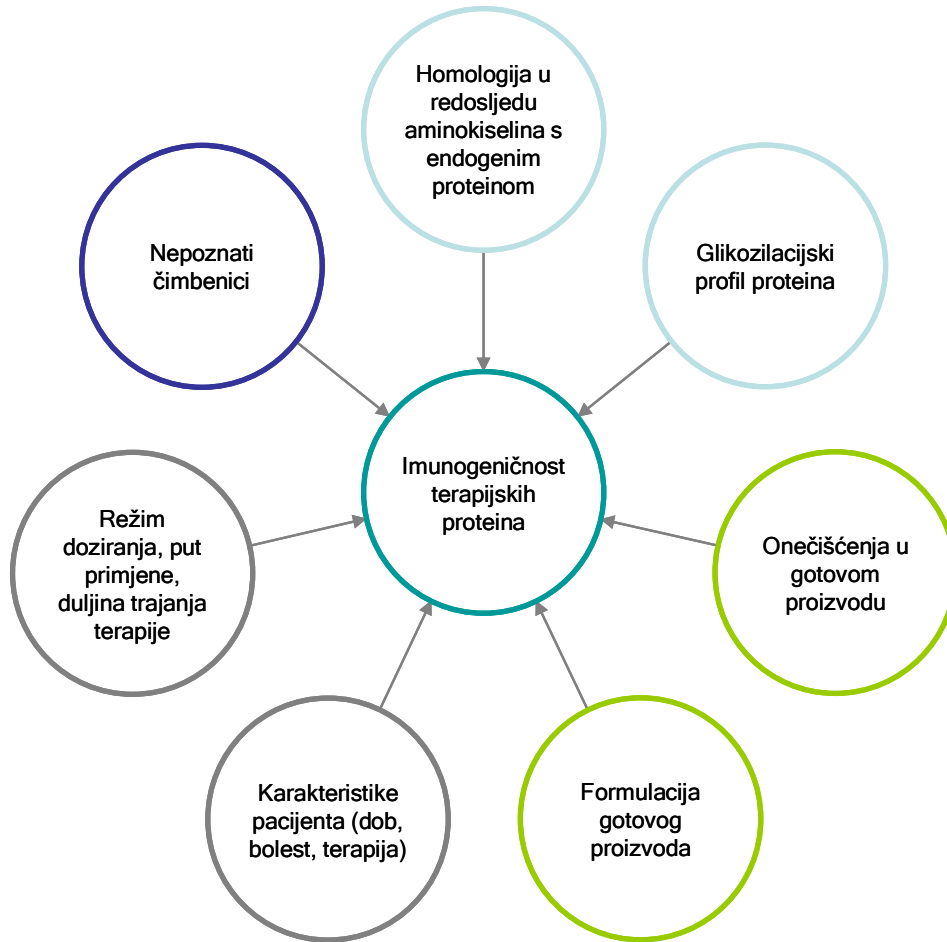
od veznih protutijela i biti prikladni za upotrebu i u malim pilot kliničkim studijama i u velikom postmarketinškom praćenju. Uzorkovanje treba biti standardizirano, po, za pojedini slučaj, prikladno i smisleno određenom rasporedu. Usvojena strategija probira uzoraka i potvrde određenog imunosnog odgovora protiv biološkog lijeka služi za skupljanje podataka o utjecaju imunogeničnosti na učinkovitost i sigurnost terapije i doprinosi razumijevanju kliničkih posljedica imunosnog odgovora. Proizvođač mora uzeti u obzir ulogu imunogeničnosti biološkog lijeka kod određenih događaja kao što su **preosjetljivost, infuzijske reakcije, autoimunost ili izostanak djelovanja**.

Procjena imunogeničnosti važna je za sve biološke lijekove, a podatke o imunogeničnosti biosličnih lijekova treba dobiti iz usporednih kliničkih ispitivanja s izvornim biološkim lijekom korištenjem modernih i validiranih testova odgovarajuće specifičnosti i osjetljivosti. Iskustva s izvornim biološkim lijekom korisna su u nadzoru imunogeničnosti tijekom razvoja biosličnog lijeka, a važeće smjernice za razvoj i odobrenje biosličnih lijekova na visoko regulirana tržišta doprinose vrednovanju imunogeničnosti lijeka.

Čimbenici koji utječu na imunogeničnost bioloških lijekova

Čimbenici povezani s proizvodom (eng. product-related)

Odnose se na njegovo **porijeklo**, **djelatnu tvar** (strukturnu homologiju s nativnim proteinom i posttranslacijske modifikacije), **proizvodni proces** (npr. modifikacije nativnog proteina kao što je pegilacija), **formulaciju** (odabire se da bude potpora nativnoj konformaciji proteina za što je važno poznavati fizikalna i kemijska svojstva i djelatne i pomoćnih tvari i predvidjeti njihove moguće interakcije), **primarnu ambalažu**, **način pripreme**, **stabilnost gotovog proizvoda** (koju je važno pratiti za vrijeme roka valjanosti) i **onečišćenja** (npr. agregacijom proteina nastaju novi multivalentni epitopi ili prisutne zaostale stanice domaćina ili njihovi dijelovi koji djeluju kao adjuvansi).



Slika 6.: Čimbenici koji utječu na imunogeničnost terapijskih proteina, prilagođeno prema Schellekens H.

Bioequivalence and the Immunogenicity of Biopharmaceuticals

Varijacije u primarnoj strukturi proteina (slijedu aminokiselina)

Očekivano je da terapijski proteini dobiveni iz neljudskih izvora (npr. bakterijska streptokinaza i stafilokinaza, goveđa adenzin deaminaza, lososov kalcitonin) pokazuju određenu imunogeničnost u ljudi. Odstupanje od aminokiselinskog slijeda ljudskog proteina u potpunosti objašnjava njihovu imunogeničnost.

Stupanj homologije terapijskog s nativnim proteinom opisan je kao cjelokupni postotak identičnosti i samo je gruba mjera sekvencijskih razlika pošto one mogu biti raspoređene

posvuda po proteinu ili koncentrirane na određenim dijelovima. Upravo distribucija tih razlika služi za procjenu vjerojatnosti hoće li se generirati novi epitopi za limfocite T ili B.

No, potpuna istovjetnost sa sekvencom humanog proteina ne znači nužno i odsutnost imunogeničnosti. Postoje slučajevi stvaranja protutijela u visokom i/ili klinički relevantnom titru nakon primjene prirodnih bioloških lijekova dobivenih iz ljudskih izvora (čimbenik VIII, hormon rasta). Nadalje, lijekovi dobiveni rekombinantnom DNK tehnologijom koji su proizvedeni prema genskoj sekvenci identičnoj humanoj pokazuju imunogeničnost (eritropoetin, interferon- β). Nasuprot tome, mnogo je primjera terapijskih proteina koji su različitog slijeda aminokiselina od prirodnog, a da nisu doveli do povećane imunogeničnosti (interferon- α -2a, metionilirani ljudski hormon rasta).

Sekvencijskom analizom proteina imunogeničnost se može smanjiti, dizajniraju se i razvijaju algoritmi koji bi predviđali potencijalne epitope. Imajući na umu da su i drugi čimbenici važni za imunogeničnost proteina i da je imunosni odgovor genetički uvjetovan i jako individualan, sama sekvencijska analiza vjerojatno nikad neće biti dovoljna da se predvidi ili izbjegne indukcija stvaranja protutijela.

Glikozilacija proteina

Imunogeničnost nekolicine bioloških lijekova povezana je s deglikolizacijom (IFN- β , GM-CSF). Povećana imunogeničnost neglikoziliranih proteina dobivenih iz bakterija objašnjava se većom izloženosti antigenskih mjesta ili smanjenom topljivošću. Ugljikohidratni postranični lanci štite ili prikrivaju hidrofobna mjesta i epitope. Hiperglikozilacija proteina do sada nije povezana s povećanom imunogeničnošću.

Odabir stanica domaćina u proizvodnji proteina

Konkretna vrsta stanica korištena u proizvodnji rekombinantnog proteina važna je za njegovu imunogeničnost, ali relativni doprinos toga ovisi o završnom proizvodu tj. procesu pročišćavanja ili daljnim modifikacijama. Primjer su IFN- α ili IL-2 koji su manje imunogenični

prirodni nego kad su rekombinantno proizvedeni u *E. coli*, dok je za hormon rasta i IFN- β pokazano suprotno.

Onečišćenja u gotovom proizvodu

Mnogo je primjera koji pokazuju kako su baš onečišćenja u gotovom proizvodu povezana s imunogeničnošću bioloških lijekova i smatraju se vodećim uzrokom već godinama. Zaostale stanice domaćina ili njihovi dijelovi (lipopolisaharidi, DNK), strukturne promjene proteina (oksidacija, deamidacija) i stvaranje agregata povezuju se s imunogeničnošću mnogih bioloških lijekova. Ponekad su ta onečišćenja prisutna samo na početku proizvodnje pa poboljšanje procesa pročišćavanja proteina smanjuje problem, no bilo je slučajeva da se povećana imunogeničnost pojavila nakon uvođenja određenih promjena u proizvodnji ili kasnijim procesima.

Formulacija i skladištenje lijeka

Formulacije koje ne štite djelatnu tvar od oksidacije i agregacije mogu povećati imunogeničnost, pogotovo ako čuvanje takvih lijekova nije adekvatno (npr. liofilizati na sobnoj temperaturi). Čimbenici koji mogu pridonijeti agregaciji proteina su formulacija, procesi pročišćavanja i inaktivacije virusa i uvjeti skladištenja. Za humani se serumski albumin smatra da reducira agregaciju proteina pa se često dodaje kao stabilizator.

Čimbenici povezani s karakteristikama pacijenta (eng. patient-related) ili bolesti

Genetska predispozicija

Pojedinci deficijentni na neke funkcijske gene često nemaju normalno razvijenu imunitet na proteine koje ti geni kodiraju (čimbenik VIII, hormon rasta) i skloniji su produkciji protutijela od onih koji normalno ekspimiraju protein. Terapijski protein njima je supstitucija za endogeni, ali i predstavlja neoantigen. Imunogeničnost je u tim slučajevima

ovisna o vrsti genskog defekta. Interindividualna varijabilnost HLA tipova, polimorfizam MHC gena (zbog kojeg može doći do različitih interakcija između molekula MHC i stranih antigena), polimorfizam gena koji kodiraju TCR (mogu inducirati imunotoleranciju) ili polimorfizam citokina mogu biti povezani s različitim intenzitetom imunogeničnosti.

Imunitet

Pacijenti koji boluju od raka ili metastaza, malnutricije, infekcije HIV-om ili zatajenja bubrega oštećenog su imunskog sustava i manje je vjerojatno da će razviti protutijela na biološke lijekove od onih s intaktnim imunskim sustavom. Razvoj protutijela često ovisi i o stadiju same bolesti za koju se koriste. Pacijenti koji pate od kroničnih infekcija skloniji su imunoreakcijama jer im je imunski sustav stalno aktiviran.

Dob

Djeca i starije osobe posebne su skupine bolesnika i razlikuju se od populacije odraslih, posebno u karakteristikama imunskog sustava (nezrelost ili oštećenja). Podaci o imunogeničnosti pojedinog biološkog lijeka za jednu dobnu skupinu ne mogu se projicirati na druge već je potrebno provesti posebne studije.

Konkomitantna terapija

Od imunosupresiva se očekuje da smanje rizik od pojave imunogeničnosti, a neka prijašnja terapija možda je izmijenila imunski sustav što individualno može smanjiti ili povećati taj rizik. Također, prijašnja izloženost sličnim proteinima mogla je dovesti do senzibilizacije, već stvorenih križnih protutijela ili memorijskih stanica.

Put primjene lijeka

Intramuskularni i subkutani put primjene lijeka pokazali su se najvjerojatnijima za imunogenične reakcije, intravenski put manje je vjerojatan, a lokalna je aplikacija najmanje

povezana s imunogeničnošću. Ipak, aplikacija kalcitonina i deoksiribonukleaze na sluznicu može biti povezana sa značajnom produkcijom protutijela.

Doza i trajanje liječenja

U pravilu, doza i ukupno primljena količina lijeka te duljina tretmana povezani su s imunogeničnošću. Akutnom je primjenom manje vjerojatno da će se izazvati imunogeničnost nego kroničnom, tj. kraće liječenje manje je rizično od dugotrajnog, kao i kontinuirano od intermitentnog. Oba IFN- β , onaj dobiven iz E. coli i onaj dobiven iz CHO, induciraju stvaranje protutijela nakon 6-12 mjeseci primjene iako se ukupne količine proteina primljene injekcijama razlikuju deseterostruko.

Ostali čimbenici

Sadržaj i tip protutijela

Krivicu za varijabilne i ponekad konfliktne rezultate vezane za imunogeničnost snose različite tehnike primjenjene za detekciju i određivanje protutijela. Zbog manjka internacionalne standardizacije ispitivanja i referentnih pripravaka često nije moguće uspoređivati rezultate dobivene iz različitih laboratorija.

Nepoznati čimbenici

Iako su važni čimbenici koji pridonose imunogeničnosti bioloških lijekova identificirani tijekom godina, još je uvijek nekoliko nepoznanica. Primjer za takvu nesigurnost je IFN- β dobiven iz CHO jer je zabilježena značajna redukcija imunogeničnosti kad je promjenjeno mjesto proizvodnje. Iako je proizvođač intenzivno istraživao, nije uspio otkriti razlog tome. Slučaj rekombinantnog EPO-a i PRCA-e pokazuje koliko problem imunogeničnosti može biti nepredvidljiv. Iako nije službeno identificiran, zbog geografske distribucije slučajeva i

vremena kad su se dogodili, te vrste i trajanja liječenja, uzrokom se također smatra promjena u proizvodnom procesu. (6-7, 9-10, 12-13)

Imunološke laboratorijske metode

Biotehnološke metode najčešće primjenjivane u imunološkim istraživanjima

Razgradnja DNK restrikcijskim endonukleazama. Restrikcijske endonukleaze su enzimi koji razgrađuju DNK unutar specifičnih restrikcijskih mjesta, kratkih odsječaka na molekuli DNK od 4 do 8 nukleotida. Nakon razgradnje istom endonukleazom, završeci različitih molekula DNK su međusobno komplementarni i mogu biti spojeni DNK ligazom. Ovaj postupak osnova je stvaranja rekombinantne molekule DNK.

Kloniranje dijelova DNK. Rekombinantom se tehnologijom odabrani fragment (gen) DNK ugrađuje u vektor, tj. molekulu DNK (bakteriofaga ili bakterijskih plazmida) koja se može samostalno replicirati, a vektor se unosi u stanice koje se dijele i tako umnažaju novi ugrađeni gen.

Polimerazna lančana reakcija (eng. polymerase chain reaction, PCR). Metoda kojom se dobivaju velike količine određenog dijela DNK, npr. ispitivanog gena. Važno je poznavati slijed od dvadesetak nukleotida koji se nalaze ispred i iza istraživnog dijela DNK tako da se mogu sintetizirati primeri (začetnici) koji su im komplementarni. U otopinu se pomiješaju ispitivana DNK, začetnici, deoksiribonukleotidi i polimeraza, smjesa se inkubira na različitim temperaturama, odvajaju se lanci DNK, hibridiziraju začetnici s komplementarnim dijelovima i sintetiziraju dijelovi koji su njima omeđeni. Opisani ciklus ponavlja se tridesetak puta i kroz par sati proizvede se više od milijun kopija željenog segmenta DNK.

Pokusne životinje

Najčešće se ispitivanja obavljaju nad miševima, koji mogu biti čistog soja ili s posebnim genskim obilježjima.

Transgenični miševi. U jedan pronukleus izolirane oplodene jajne stanice vektorom se usadi klonirani gen. Jajna se stanica potom prenese u lažno trudnu ženku (koja se parila sa sterilnim mužjakom). U nekim se tako obrađenim i preživjelim jajnim stanicama usađeni gen ugradi u stanični genom, on je dodatni gen poznate strukture, odnosno transgen. Ekspresija transgena može biti u stanicama svih ili samo određenih tkiva što ovisi o promotorima. Transgeni se prenose i na potomstvo.

Knock-out miševi ili miševi s izbačenim genom. Ovakvim se ciljanim djelovanjem na gene proizvode životinje kojima nedostaje neki gen ili je on nefunkcionalan (normalni se gen in vivo zamjenio defektnim, mutiranim).

Metode za dokazivanje imunoreakcije

Metode za dokazivanje humoralne imunosti (vezanja antigena i protutijela)

Slijedi kratki prikaz općih zakonitosti vezanja antigena i protutijela, o kojima ovisi jakost veze između epitopa na antigenu i odgovarajućeg paratopa na protutijelu, te pregled metoda kojima se stvoreni kompleksi mogu detektirati.

Broj epitopa na nekom antigenu može bit velik pa smjesa protutijela koja s njim reagiraju može biti heterogena. U istraživanjima se zato koriste monovalentni hapteni i pročišćena protutijela. Veza koja se između njih stvara reverzibilna je i slaba, nikad kovalentna, a rezultat je privlačnih i odbojnih sila (Van der Waalsove, elektrostatičke, vodikove, hidrofobne), jakost joj ovisi o stupnju prostorne komplementarnosti i udaljenosti. Osim navedenog, na čvrstoću

veze utječu i pH, ionska jakost i temperatura medija. Vezanje antigena i protutijela dinamično je, a skup čimbenika koji utječu na čvrstoću te veze određuju afinitet protutijela (odnosi se na monovalentni haptent). Avidnost protutijela pokazuje ukupnu valenciju antigena (više epitopa) i heterogenost protutijela.

Precipitacija (taloženje). Stvaranje netopljivih kompleksa (agregata) poslije reakcije topljivih antigena i protutijela pri optimalnim koncentracijama, sastavu i pH medija, temperature. Izvodi se kao dodirna precipitacija ili imunodifuzija u gelu, linearno ili radijalno.

Elektroforeza i imunoelektroforeza. Metoda kojom se pomoću istosmjerne električne struje razdvajaju pojedine komponente složene otopine ili smjese. Imunoelektroforeza je kombinacija elektroforeze i imunodifuzije u gelu. Zonska elektroforeza izvodi se na inertnim podlogama, za analizu proteina. pH i ionska jakost otopine pufera utječu na pokretljivost komponenata smjese. Za izvođenje imunoelektroforeze potrebno je u podlogu još dodati antiserum (serum s protutijelima) i na mjestu reakcije dolazi do precipitacije. Izvodi se radijalno ili dvodimenzionalno.

Aglutinacija. Reakcija čitavih stanica (s površinskim antigenima) i protutijela pri kojoj dolazi do precipitacije i stvaranja velikih nakupina. Praktični primjer je određivanje krvnih grupa.

Imunofluorescencija. Vrlo osjetljiva metoda pri kojoj se rabe protutijela obilježena fluorescentnom tvari. Nakon što protutijela izreagiraju s antigenima obasjana ih se svjetlošću prikladne valne duljine i pod mikroskopom se mogu prepoznati mjesta reakcije. Fluorescentna tvar ne smije mijenjati specifičnost protutijela ni sposobnost reagiranja s antigenom, a najčešće rabljeni su fluorescein, rodamin i fikoeritin. U direktnoj imunofluorescenciji obilježena protutijela reagiraju sa specifičnim antigenima, a u indirektnoj postoje dvije faze reakcije. Prvo neobilježena protutijela reagiraju s antigenom, a potom se dodaju obilježena antiimunoglobulinska protutijela koja se vežu na neobilježena protutijela. Rezultat je puno jača fluorescencija i koristi se za dokazivanje antibakterijskih protutijela ili autoprotutijela.

Obilježavanje protutijela enzimima. Histokemijska metoda u kojoj enzimi mijenjaju boju supstratu djelujući na njega (najčešće se koristi peroksidaza). U preparat se dodaju peroksid i diaminobenzidin i pojavljuje se tamnosmeđa boja na mjestima gdje su zaostala enzimom obilježena protutijela. Iako se mogu koristiti za ista ispitivanja, prednost ove metode pred imunofluorescencijom jest da ne treba mikroskop za očitavanje i preparati su trajniji. **ELISA** test (eng. enzyme-linked immunosorbent assay) služi i za kvantitativna istraživanja.

Reakcija vezanja komplementa. U smjesi antigena, antiseruma i komplementa, dolazi do vezanja protutijela i antigena pri čemu se veže i komplement, a nestajanje slobodnog komplementa iz smjese znak je da je došlo do reakcije. Može se koristiti za dokazivanje bilo kojeg protutijela ako raspoložemo sa specifičnim antigenom, a za pouzdanost metode važna je standardizacija svih reagenasa i serum koji je predhodno zagrijan na 56°C (na toj temperaturi komplement se inaktivira).

Radioimunotest. Spada među najosjetljivije metode, mjeri u pikogramima količinu tvari na koju se mogu proizvesti protutijela. Osnova je kompeticija antigena obilježenih radioaktivnim izotopom i neobilježenih antigena za vezna mjesta na protutijelima. Protutijela ne raspoznaju obilježene od neobilježenih antigena, a dodane su poznata količina obilježenog i nepoznata količina neobilježenog antigena. Na kraju reakcije, količina obilježenog antigena vezanog na protutijelima bit će to manja koliko je više neobilježenog antigena. Nakon odvajanja obilježenih antigena vezanih na protutijelo od slobodnih (koji se zbog kompeticije nisu uspjeli vezati) mjeri se radioaktivnost. Razdvajanje se obavlja kromatografski, elektroforetski ili taloženjem kompleksa. Što je više neobilježenih antigena, to je omjer vezani/slobodni obilježeni antigen manja. Krivulja omjer vezanog/slobodnog obilježenog antigena nasprem koncentracije neobilježenog antigena može se napraviti uz pomoć poznatih količina neobilježenog antigena.

RIST (radioimunosorbentni test) i **RAST** (radioalergosorbentni test) inačice su radioimunotesta. Koriste se za određivanje IgE (RIST za ukupno u serumu - anti-IgE

protutijela se adsorbiraju na netopljive čestice inertnog nosača i inkubiraju se smjesom poznate količine obilježenih IgE i ispitivanog seruma; a RAST za specifični antigen - na netopljive čestice adsorbira se antigen, inkubira serumom, a potom radioaktivno obilježenim protutijelima anti-IgE. Prvo se specifična protutijela IgE iz seruma vežu na antigen, a onda se na vezana protutijela IgE vežu obilježena anti-IgE protutijela).

Western blot inačica je testa za identifikaciju antigena u nekoj smjesi. Prvo se elektroforetski razdvoje antigeni iz smjese i komponente se prenesu na nitroceluloznu opnu u koju su dodana izotopom obilježena protutijela za specifični antigen. Vidljive su one pruge koje su pozitivno reagirale.

Metode za dokazivanje stanične imunosti

Za izvođenje in vitro metoda dokazivanja stanične imunosti potrebno je prvo razdvojiti imunosne stanice dobivene iz krvi, koštane srži ili drugih tkiva ljudi ili životinja. Limfociti se razdvajaju na Ficoll-Hypaque gradijentu (smjesi ugljikohidratnih polimera gustoće veće od gustoće limfocita, a manje od gustoće eritrocita i leukocita) te centrifugiranjem. Subpopulacije limfocita razdvajaju se na osnovi afiniteta prema inkubiranom monoklonskom protutijelu protiv nekog staničnog biljega.

Protočnim razvrstačem stanica (citometrom) imunofenotipiziraju se stanice po prisutnosti pojedinog staničnog biljega kojeg prepoznaju fluorescentno obilježena protutijela. Označene stanice prolaze kroz kapilaru preko laserske zrake koja se pritom raspršuje, a detektorima se bilježi stupanj raspršenosti laserske zrake (pokazatelj veličine i znatosti stanice) i emisija fluorescencije. Računalnom obradom prikaže se citogram, točkasti prikaz veličine i znatosti stanica, kojim se razlikuju limfociti, monociti i granulociti, a histogram prikazuje intenzitet fluorescencije obilježenih stanica. Ovo je jedan od najtočnijih i najsigurnijih načina identificiranja i kvantificiranja stanica.

Proliferacijskim testovima ispituje se funkcionalna sposobnost limfocita (pri reakcijama na mitogenike, specifične antigene, aloantigene ili monoklonska protutijela).

U **testovima stanične limfolize** (eng. cell-mediated lympholysis, CML) miješaju se ispitivani limfociti i ciljane stanice i određuje litički učinak limfocita nekim od testova citotoksičnosti. Njima se pokazuje učinak dokazane i određene imunoreakcije na živu stanicu (npr. može li ona izazvati staničnu smrt).

ELISPOT test inačica je sendvič ELISA testa kojim se kvantitativno određuju limfociti, odnosno stanice koje luče citokine. Može se izvesti za određivanje i limfocita T i limfocita B.

Kožni test kasne preosjetljivosti izvodi se in vivo i njime se utvrđuje stupanj senzibiliziranosti ispitanika na neki antigen. Nakon intradermalnog ubrizgavanja antigena promatra se hoće li doći do odgođene kožne reakcije preosjetljivosti (nakon 48-72 sata), odnosno pojave crvenila i otekline, koja je pokazatelj prisutnosti senzibiliziranih limfocita T.

Metode detekcije protutijela na biološke lijekove

Probna ispitivanja protutijela na terapijske proteine u biološkim uzorcima najčešće se provode imunoprecipitacijom, radioimunotestom, indirektnom imunooznačavanjem. Njima se potvrđuje **prisustvo ili odsustvo protutijela** koja se mogu vezati na **relevantne antigenske determinante terapijskog proteina**, no ne može se izmjeriti i neutralizirajuća sposobnost protutijela, koja je zapravo i najvažnija za procjenu imunogeničnosti proteina. Zahtjeva se dvostruka potvrda pozitivnih uzoraka, zbog potvrde specifičnosti detektiranih protutijela. Za ispitivanje neutralizirajućeg učinka protutijela koriste se in vitro stanični testovi koji se zasnivaju na funkciji ili mehanizmu djelovanja proteina.

Stanični neutralizirajući testovi

Praćenje imunogeničnosti biološkog lijeka važno je započeti već kroz njegov razvojni ciklus. Imunotestovi služe za probir uzoraka u kojima su protutijela prisutna, a in vitro staničnim testovima karakterizira ih se na **neutralizirajući učinak**.

Karakterizacija protutijela na terapijske proteine radi se zbog određivanja njihove kliničke značajnosti. Procjenjuju se njihove imunološke i/ili biološke karakteristike i istražuje utjecaj na djelovanje lijeka. Kombinirano se provode in vitro testovi i pregledi pacijenata.

Ako se prilikom liječenja stvaranje protutijela inducira, pozitivni uzorci plazme ili seruma iz pacijenata moraju se okarakterizirati na **koncentraciju ili titar i neutralizirajući kapacitet protutijela**, te druge kriterije koji ovise od slučaja do slučaja (vrsti biološkog lijeka, tipu bolesnika, težini kliničkih simptoma, itd.). Ponekad se određuju i vrsta, afinitet ili specifičnost protutijela. Ako je moguće treba omogućiti razlikovanje jesu li protutijela nastala na djelatnu tvar ili onečišćenja i provjeriti križnu preosjetljivost na endogeni protein.

Neutralizirajuća protutijela blokiraju biološku aktivnost lijeka izravnim vezanjem na epitop(e) koji su smješteni unutar aktivnog mjesta proteina ili blokiranjem aktivnog mjesta steričkim zaklanjanjem jer se vežu za epitope blizu njega. Ponekad sama njihova prisutnost nema klinički učinak, ali u slučajevima kada im je razina visoka smanjuju učinkovitost lijeka. I neneutralizirajuća protutijela mogu umanjiti klinički odgovor. Zato treba utvrditi postojanje korelacije između imunogeničnosti koja je određena testovima in vitro sa stvarnim kliničkim učincima. Primjeri su neutralizirajuća protutijela na interferon (endogeni protein je multiforman) koja se učestalo javljaju i umanjuju djelovanje lijeka, ali ne uzrokuju druge nuspojave, ili neutralizirajuća protutijela na MGDF ili EPO koja vrlo rijetko mogu inducirati opasnu trombocitopeniju odnosno anemiju jer križno reagiraju s endogenim proteinom.

Stanični neutralizirajući testovi razvijaju se specifično za svaki pojedini proizvod. Često korištene tehnike su ELISA, ELISPOT, protočna citometrija, ispitivanje citotoksičnosti.

Ponekad se ispituju i detaljniji stanični imunosni odgovori, npr. memorijski limfociti B ili razvoj odgovora IgG (antigen specifična upletenost limfocita T_H).

Za prikladan **oblik i dizajn testa** važno je odabrati način mjerenja učinka (direktno ili indirektno), prikladne stanice (koje će odgovoriti na učinak lijeka) i matriks uzorka, te odrediti točku završetka testa (vremenska detekcija signala) i odgovarajuću koncentraciju lijeka koja će se dodavati u rutinskim ispitivanjima. Testovi trebaju biti odabrani i optimirani za namjenjenu analizu. Jednom kad se metoda optimira, mora se rigorozno validirati tako da se osigura valjanost rezultata. Često su u praksi specifičnost i robustnost testa važniji od same osjetljivosti.

Detekcija signala može biti rana, ako se radi o bilježenju interakcije protein-receptor, ili kasna, ako se očitava kumulativni stanični odgovor. Detekcija neutralizirajućih protutijela vrši se po principu da ako su ona prisutna u uzorku, smanjit će se ili izostati biološka aktivnost koju inducira poznata koncentracija biološkog lijeka u staničnom testu.

Proteini po svom djelovanju su agonisti (npr. citokini, čimbenici rasta, hormoni, neka monoklonska protutijela), što znači da induciraju terapijski odgovor direktnim vezanjem za receptore na površini ciljnih stanica, ili antagonisti (topljivi receptori, neka monoklonska protutijela), što znači da blokiraju vezanje liganada za receptore na površini ciljnih stanica.

Na protutijela pozitivna kontrola ili standard potrebni su za usporedbu i kalibraciju rezultata, a negativna kontrola ili standard potrebni su da se izmjeri šum testa (eng. baseline). Najbolje je koristiti uzorke dobivene iz ljudi (pacijenata na dotičnoj terapiji i zdravih pojedinaca).

Tablica 4.: Vrste staničnih neutralizirajućih testova i relevantnih kontrola, prilagođeno prema Gupta S, Indelicato SR, Jethwa V, i sur. Recommendations for the design, optimization, and qualification of cell-based assays used for the detection of neutralizing antibody responses elicited to biological therapeutics

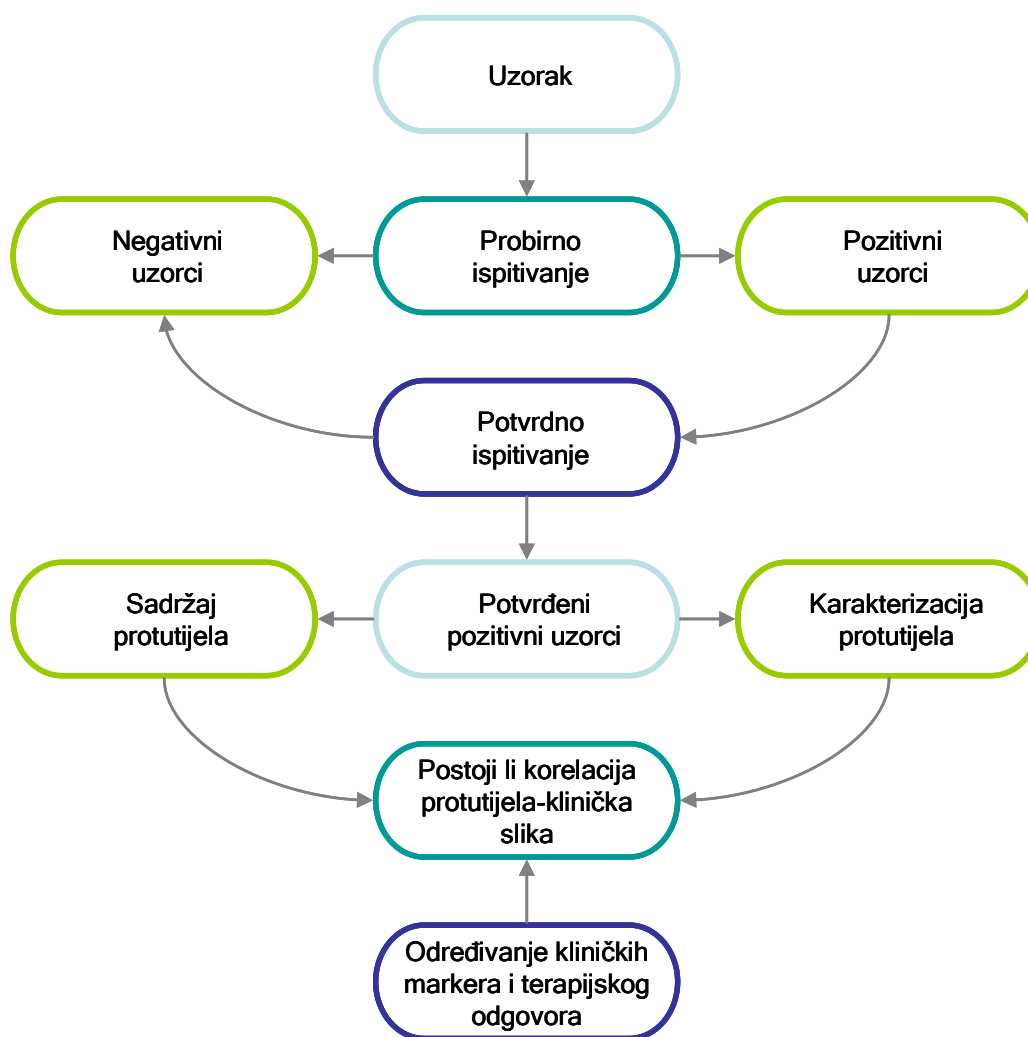
| Stanični neutralizirajući testovi | | |
|--|--|--|
| Izvedba | Direktni | Indirektni |
| Reakcija | Izravni utjecaj na stanice da provedu biološki odgovor | Interferiranje ili pojačavanje vezanja liganda na receptor na površini stanice |
| Primjenjivo za biološke lijekove | Citokine, čimbenike rasta, peptide, neka monoklonska protutijela | Neka monoklonska protutijela, topljive receptore |
| Komponente testa | Stanice, lijek, ispitivani serum, pozitivna kontrola protutijela | Stanice, ligand, lijek, ispitivani serum, pozitivna kontrola protutijela |
| Kontrole testa | 1. Stanice | 1. Stanice |
| | 2. Stanice + lijek | 2. Stanice + ligand |
| | 3. Stanice + lijek + pozitivna kontrola protutijela | 3. Stanice + ligand + lijek |
| | | 4. Stanice + ligand + lijek + pozitivna kontrola protutijela |

Pri interpretaciji rezultata treba se voditi jasnim kriterijima za donošenje odluke o tome je li uzorak pozitivan ili negativan i o tome kako potvrditi pozitivne uzorke. Čest način za uspostavljanje pozitivne granične vrijednosti imunotestova (eng. positive cut-off) je raspoznavanje nespecifičnog signala testa (eng. assay background). Statističkim se pristupom najprikladnije utvrđuju granične vrijednosti testa, a dvostruki iznos nespecifičnog signala testa ili stvarno izmjereni podaci (eng. real data) mogu se smatrati najnižom vrijednosti pozitivnog rezultata.

Ovi su testovi kvalitativni i kvazi-kvantitativni jer uglavnom referentni standardi nisu dostupni. Jednostavna analiza, tj. pozitivno ili negativno očitavanje neutralizirajuće aktivnosti protutijela dobiva se pri najnižem razrijeđenju uzorka, a uz minimalne interferencije matriksa. Za direktno očitavanje uzorak se inkubira s lijekom prije dodatka u stanice, a za indirektno uzorak se inkubira s lijekom pa s ligandom i tek onda dodaje u stanice. Relativna kvantifikacija dobiva se nizom razrijeđenja uzoraka pri odabranoj konstantnoj koncentraciji biološkog lijeka, odnosno određivanjem titra prisutnih protutijela. Titar je posljednje razrijeđenje uzorka u kojem je vidljiva reakcija i vrlo dobro služi definiranju razine pri kojoj nastala neutralizirajuća protutijela imaju klinički učinak, a pri kojoj ne. (5, 9-10, 14-15)

Strategije procjene imunogeničnosti bioloških lijekova

Strategija podrazumijeva pažljivo i prospektivno isplanirane studije koje uključuju odabir testova (za mjerenje i karakterizaciju protutijela i kliničkog odgovora na njih), proces uzorkovanja (vremenske periode prikupljanja uzoraka, njihov volumen, način čuvanja), i odabir statističke metode za analizu podataka. Te studije donose važne informacije o značajnosti imunogeničnosti biološkog lijeka, odnosno potencijalnih kliničkih posljedica. Mogu se koristiti za komparativne studije imunogeničnosti za bioslične lijekove ili pri uvođenju promjena u proizvodni proces ili formulaciju lijeka.



Slika 7.: Strategija detekcije i karakterizacije protutijela, prilagođeno prema EMA: Guideline on immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins

Modeli za predviđanje imunogeničnosti terapijskih proteina

Svaka organizmu strana tvar ima sposobnost pokrenuti visoko organizirani i regulirani sustav urođenog i stečenog imuniteta - mrežu stanica i topljivih i membranskih molekula koje su se evolucijski razvile da štite čovjeka od filogenetski udaljenih organizama i njihovih proizvoda. Ozbiljne kliničke posljedice imunogeničnosti terapijskih proteina su smanjena učinkovitost lijeka, provokacija autoimunosti ako nastala protutijela reagiraju s endogenim proteinom,

nuspojave zbog reakcija preosjetljivosti tipa I, II i III. Proizvodnjom nativnih i rekombinantnih ljudskih proteina taj se rizik smanjuje.

Trenutno dostupni modeli za predviđanje imunogeničnosti terapijskih ili budućih proteina daleko su od idealnih i nisu uvijek točni. Zato se kombiniraju, a obavezno se provode i klinička ispitivanja jer je prediktivna vrijednost pretkliničkih studija za evaluaciju imunogeničnosti bioloških lijekova u ljudi mala.

Pokusne životinje se koriste u istraživanjima i pretkliničkim studijama, no dobiveni rezultati nisu relevantni za projiciranje na ljude, iako se provode na više vrsta, od miševa do primata. Razlog je tome što pojedine vrste različito predočavaju antigene i ljudski i životinjski limfociti različito prepoznaju epitope. Samo imunoreakcije na biološke lijekove mikrobnog ili biljnog porijekla u životinjama slične su kao u ljudima jer su oni usporedivo i zajednički strani svim sisavcima. Životinjski modeli mogu poslužiti kao **procjena posljedica** imunskog odgovora jer ako ne dolazi do stvaranja protutijela u životinjama to se smatra niskom vjerojatnošću za imunogeničnost, a ako se stvaraju, visokom vjerojatnošću. Provjera i mjerenje stvaranja protutijela u pretkliničkim studijama zahtjeva se u dijelu toksikoloških studija.

Moguće je koristiti transgenične miševe kojima je dana imunotolerancija prema nativnom humanom proteinu tako da ga i sami eksprimiraju. Postoje brige oko usporedbe nehumanih i humanih protutijela, ali u takvom se modelu bar može procijeniti je li ispitivani lijek uopće sposoban **probiti imunotoleranciju**.

Ispitivanja provedena na miševima koji su transgenični na ljudski inzulin pokazala su da je imunogeničnost različitih varijanti molekula inzulina ovisna o broju supstitucija aminokiselina. Varijante tkivnog aktivatora plazminogena s pojedinačnim supstitucijama aminokiselina pokazale su se imunogeničnima u miševima koji su transgenični na ljudski tkivni aktivator plazminogena. U miševima transgeničnim na ljudski IFN- α -2 i u stvarnim pacijentima paralelno se dokazala imunogeničnost proteina zbog nastalih agregata i oksidiranih produkata.

Na temelju limitiranih podataka ovo je potencijalan model, najbolji među životinjskima, za predviđanje imunogeničnosti biološkog lijeka u ljudi. Daljne evaluacije su potrebne zbog moguće različitih prerade antigena i prepoznavanja epitopa između miševa i ljudi.

Testiranje na životinjama koristan je model za **usporedne studije**, tj. predviđanje relativne imunogeničnosti uspoređivanjem sličnih proteina (npr. nativnog i rekombinantnog proteina ili različitih varijanti rekombinantnih proteina).

Proteini nativni primatima općenito su visokog stupnja homologije s ispitivanim terapijskim proteinima za upotrebu u ljudima pa se očekuje da su te životinje na njih imunotolerantne. Predložen je i hiperimunizacijski protokol tako da se lijeku dodaju adjuvansi čime bi se mogao uočiti najgori mogući scenarij imunogeničnosti.

Analize stimulacije limfocita T određenim proteinom također se provode u životinjama, ali prvenstveno da bi se razumjeli odgovori domaćina vezani za autoimunost i senzibilizaciju, te analizirali mehanizmi kojima upravljaju specifičnost, indukcija i ekspanzija limfocita T za vrijeme imunoreakcije.

Razumijevanje povezanosti stanica imunskog sustava i reakcija na molekularnoj razini pridonijelo je razvoju **in vitro testova za predviđanje imunogeničnosti proteina**. Jednima se ispituje **urođeni odgovor** epitelnih i dendritičnih stanica nakon dodira s proučavanim proteinom, a drugima **identificiraju epitopi** iz primarne strukture proteina s kojima bi limfociti T i B mogli reagirati. Serumi životinja koje su pozitivne na protutijela koriste se za razvoj i validaciju takvih testova.

Epitelne stanice kože i sluznica važne za homeostazu i obrambene reakcije domaćina, nakon njihove traume inducira se upala, privlače stanice imunskog sustava i započinje cijeljenje rane. Komplement je glavna humoralna komponenta urođene imunosti, veže se na ugljikohidratne strukture na površini mikroorganizama ili na protutijela koja su se već s njima povezala. Rezultat te reakcije je brzo ubijanje stranog antigena i lučenje posrednika koji

privlače druge stanice imunskog sustava. Vezano uz ovaj dio imunskog sustava, a za imunogeničnost proteina, može se spomenuti pojava komplemantom posredovane lize stanica, inducirane specifičnim ili križno reaktivnim IgM i IgG protutijelima koja prepoznaju strane proteine adsorbirane na staničnu površinu.

Da bi se in vitro provjera imunogeničnosti dobro provela, važno je znati put primjene lijeka i režim doziranja te imati razjašnjen mehanizam djelovanja lijeka. Terapijski protein može stvarno stupati u interakcije s epitelnim i dendritičnim stanicama, makrofagima ili limfocitima T, ali ako se daje intravenski nije vjerojatno da će u stvarnosti ikada doći u kontakt s epitelnim stanicama. Nasuprot tome, ako se primjenjuje na sluznice, epitelne i dendritične stanice i makrofagi prvi su s kojima će doći u kontakt.

Testovi kojima se određuju interakcije između ispitivane tvari i stanica urođenog imunskog sustava razvijeni su, ali nema ih još validiranih za određivanje imunogeničnosti bioloških lijekova.

In vitro alati služe za određivanje i dokazivanje općenite imunogeničnosti proteina **na nivou epitopa**. Za njih je potrebno uzeti uzorke krvi koji sadrži reaktivne ili križno reaktivne stanice i protutijela od ljudi ili životinja koji su u tretmanu ispitivanim lijekom. Zatim se analiziraju epitopi koje su prepoznali limfociti T i B da bi se bolje razumijeli mehanizmi nastanka imunoreakcije - specifičnost, indukcija i ekspanzija pojedinih stanica te njihov utjecaj, autoimunost ili senzibilizacija, na ispitivani protein. Reaktivnost seruma pacijenta koji je pozitivan na protutijela na originalnu verziju terapijskog proteina iskorištena je za ispitivanje razine imunogeničnosti proteinskih varijanti (uspoređivanje imunogeničnosti sličnih proteina). Time se pokazuje jesu li originalni epitopi (djelomično) nestali, ali pojava novih epitopa neće se uočiti ili otkriti.

Drugačiji pristup jest da se imunogeničnost proteina ocjeni tako da se identificira epitop kojeg prepoznaju ljudski limfociti T, u ljudi koji do tada nisu bili izloženi tom proteinu. Limfociti T imaju glavnu ulogu u razvoju imunskog odgovora i od svih stanica stečenog imunskog

sustava smatra se da su limfociti T_H najodgovorniji za imunogeničnost proteina jer prepoznaju njihove linearne epitope nakon što im antigen bude predodčen. Od ovakvih metoda očekuje da će postati alati za **određivanje imunogeničnosti novih proteina** i razumijevanje mehanizama kojima imunosni sustav reagira protiv svojih proteina nakon što se probije imunotolerancija.

Da bi se predviđanje imunogeničnosti proteina pomoću epitopa s kojima reagiraju limfociti T bilo moguće, potrebni su prvo alati kojima će se identificirati peptidi koji se normalno izlažu na antigenima MHC-II. Oni se mogu predvidjeti iz već poznatih sekvenci aminokiselina ili baza podataka.

Identifikacija relevantnih epitopa za limfocite T vrši se prema analizi specifičnosti limfocita T, in vitro propagiranih iz periferne krvi ili ex vivo iz svježih splenocita. Ti limfociti T karakteriziraju se i identificiraju ELISPOT tehnikom prema bazama podataka. Ispituje se i njihovo vezanje na antigene MHC jer to znači da će moći potaknuti imunosni odgovor.

Metode koje se naširoko koriste u ispitivanjima alergena (proteinskih modela) iz hrane danas se mogu primjenjivati i za in vitro određivanje imunogeničnosti novih proteina. One u svojoj osnovi koriste limfocite T $CD4^+$ iz pojedinaca koji nisu prije bili izloženi proteinu. Kultiviraju se dendritične stanice skupa sa sintetskim polipeptidima željenih sekvenci i dodaju se limfociti T kojima se potom mjeri daljna proliferacija.

Određivanje imunogeničnosti proteina **prepoznavanjem epitopa s limfocitima B** daje opću i usporednu informaciju iz **kompetitivnih testova** (npr. dva proteina) o potencijalnom epitopu kojeg prepoznaju limfociti B. Najčešće su to ELISA testovi. Monoklonska ili poliklonska protutijela često se koriste za imunoprobir oligopeptida ako se želi dobiti detaljniji uvid u sekvence epitopa za koje se vežu protutijela.

Mapiranjem i korištenjem nekog od opisanih modela identificirani su brojni epitopi za brojne proteine i stvorene su **baze podataka** koje su iskorištene za razvoj mnogih **računalnih alata**

(eng. bioinformatics). Oni služe za analizu fizikalno-kemijskih i strukturnih značajki proteina i trebali bi pomoći u određivanju imunogeničnosti proteina. Važno ih je i dalje usavršavati da bi se **kalkulacije** i **predviđanja** mogla iskoristiti za svaki mogući protein. Predviđanje imunogeničnosti s računalnim alatima proizlazi, dakle, iz epitopa s kojima reagiraju limfociti, iz primarne ili trodimenzionalne strukture proteina, iz sličnosti nepoznatog s poznatim. Računalni algoritmi mogu pomoći pri dizajnu manje imunogeničnih proteina, no za sada, ni jednom se tehnikom ne može definitivno predvidjeti stvarna imunogeničnost pojedinog proteina. (10, 12-15)

Tablica 5.: Popis baza podataka i računalnih alata za predviđanje imunogeničnih epitopa i njihove mrežne adrese, prilagođeno prema van de Weert M, Horn Møller E. Immunogenicity of Biopharmaceuticals

| Baze podataka i računalnih alata za predviđanje imunogeničnih epitopa | | | |
|---|-----------------------|------------|----------------------------|
| ABCpred | www.imtech.res.in | LPPEP | zlab.bu.edu |
| AntiJen | www.jenner.ac.uk | MAPPP | www.mpiib-berlin.mpg.de |
| Bcipep | www.imtech.res.in | MHCPred | www.jenner.ac.uk |
| Bepipred | www.cbs.dtu.dk | MHC2Pred | www.imtech.res.in |
| BIMAS | thr.cit.nih.gov | MHC-Thread | www.csd.abdn.ac.uk |
| CEP | bioinfo.ernet.in | MMPred | www.imtech.res.in |
| CTLPred | www.imtech.res.in | MPID-T | surya.bic.nus.edu.sg |
| DiscoTope | www.cbs.dtu.dk | Net MHC | www.cbs.dtu.dk |
| Epipredict | www.epipredict.de | nHLAPred | www.imtech.res.in |
| Epitome | www.rostlab.org | PREDEP | margalit.huji.ac.il |
| Epitope binding | hlaligand.ouhsc.edu | PREDICT | research.i2r.a-star.edu.sg |
| HIV database | hiv-web.lanl.gov | PROPPRED | www.imtech.res.in |
| HLADR4Pred | www.imtech.res.in | ProPred1 | www.imtech.res.in |
| IEDB | www.immuneepitope.org | RANKPEP | mif.dfci.harvard.edu |
| IEDB B-cell epitope | www.immuneepitope.org | SYFPEITI | syfpeiti.de |

Imunogeničnost bioloških lijekova - dosadašnje kliničko iskustvo

Većina bioloških lijekova inducira nekakvu imunoreakciju, ali razvoj imunog odgovora ne nosi uvijek i kliničke posljedice jer klinička manifestacija imunogeničnosti ovisi o individualnoj aktivaciji limfocita i lučenju protutijela. Ako se razvijaju samo vezna protutijela, posljedice su najčešće klinički neznčajne, no mogu se promijeniti farmakokinetika, smanjiti djelotvornost lijeka i pojačati nuspojave (alergije, serumska bolest). Razvoj neutralizirajućih protutijela može dovesti do neutralizacije endogenog proteina, što je ujedno i najveći klinički udar.

Tablica 6.: Pregled čimbenika koji pomažu procjeni kliničkih posljedica imunogeničnosti terapijskih proteina, prilagođeno prema Koren E, Smith HW, Shores E, i sur. Recommendations on risk-based strategies for detection and characterization of antibodies against biotechnology products

| Čimbenici u procjeni kliničkih posljedica imunogeničnosti terapijskih proteina | |
|--|---|
| Proizvodi s visokim rizikom | Proizvodi s niskim rizikom |
| Endogeni protein postoji i jedinstven je - terapijski protein je nadomjesna terapija | Endogeni protein ne postoji ili je raznovrsan |
| Kronična ili opetovana primjena | Jedna doza |
| Subkutana primjena | Intravenska primjena |
| Pacijent boluje od teške, upalne ili autoimune bolesti | Pacijent je imunosuprimiran |
| Jedina terapija | Konkomitantna terapija |
| Ksenogeno porijeklo | Humanizirani proizvod |
| Nečist proizvod | Čist proizvod |
| Prisutni agregati proteina | Nema agregata |

Hormon rasta

Somatropin, ljudski hormon rasta, proizveden je tehnologijom rekombinantne DNK u soju *E. coli*. Fiziološki, hormon rasta luči se iz prednjeg režanja hipofize i to je jednolančani

polipeptid koji se sastoji od 191 aminokiseline. Rekombinantni somatropin istovjetne je strukture. Na području EU odobren je i biosličan lijek. Primjenjuje se intravenskim ili subkutanim injiciranjem.

Indiciran je za liječenje djece s poremećajem u rastu (zbog nedostatka hormona rasta, Turnerovog sindroma ili kronične bubrežne insuficijencije), niske djece koja su rođena mala za gestacijsku dob i koja nisu uspjela nadoknaditi zaostajanje u rastu do dobi od 4 godine ili kasnije, i djece koja boluju od Prader-Willijevog sindroma. Koristi se i kao nadomjesna terapija u odraslih osoba sa značajnim nedostatkom hormona rasta.

Imunogeničnost hormona rasta

Prvim studijama provedenim 1980-ih godina zabilježeno je stvaranje protutijela na somatropin u 2 do čak 71% pacijenata. Svejedno, nije primjećen značajan utjecaj na brzinu rasta osim u nekolicine pacijenata čiji je titar protutijela bio izrazito visok. Zaključci tih studija bili su slični, visina titra protutijela na somatropin ovisila je o porijeklu (npr. izoliranog iz goveđe hipofize) i čistoći samog pripravka (metionilirani rekombinantni protein nasprem nemetioniliranoj).

Današnji pripravci daleko su manje imunogenični, prijavljeno je da približno 1% bolesnika razvije protutijela na somatropin. Kapacitet vezanja tih protutijela i dalje je nizak i nema utjecaja na brzinu rasta. Određivanje protutijela na somatropin treba provesti u svakog bolesnika s izostankom kliničkog odgovora bez objašnjivog uzroka. (10, 17)

Inzulin i inkretinski mimetici

Inzulin

Inzulin je mali peptidni hormon sastavljen od dva lanca aminokiselina, α -lanca od 21 aminokiseline i β -lanca od 30 aminokiselina, međusobno povezanih disulfidnim vezama.

Šećerna bolest je sindrom poremećaja metabolizma ugljikohidrata, masti i bjelančevina, uzrokovan nedostatnim lučenjem inzulina iz gušterače (šećerna bolest tipa 1) i/ili smanjenom osjetljivošću tkiva na inzulin (šećerna bolest tipa 2).

Početak nadomjesne terapije inzulinom seže u davne 1920-e godine, kad se oboljelima davao izolat goveđe ili svinjske gušterače. Svinjski se inzulin razlikuje od ljudskog u 2 aminokiseline na β -lancu, a goveđi u 2 aminokiseline na α -lancu.

Imunogeničnost inzulina

Studije provedene između 1950-ih i 1990-ih godina pokazale su da je i do 100% pacijenata liječenih pripravcima inzulina životinjskog porijekla razvilo visoke količine veznih protutijela na inzulin (u početku se njihova detekcija vršila in vitro s radioaktivnim ^{131}I -inzulinom). Nadalje, opisane su česte lokalne i rijetke sistemske alergijske reakcije povezane s IgE protutijelima na inzulin te inzulinska rezistencija (utvrđena je korelacija između visine titra veznih IgG protutijela na inzulin i potrebne doze inzulina za postizanje zadovoljavajuće glikemijske kontrole). Jakoj imunogeničnosti prvih nadomjesnih pripravaka inzulina životinjskog porijekla pridonosili su i drugi izolirani peptidi prisutni - proinzulin, C-peptid, glukagon. Incidencija stvaranja protutijela na inzulin smanjivala se boljim pročišćavanjem tih pripravaka i uvođenjem prvih rekombinantnih humanih inzulina u terapiju 1980-ih godina. I tada se bilježilo stvaranje IgE i IgG protutijela na inzulin (u razdoblju od 2 mjeseca do 2 godine od uvođenja nove terapije novim bolesnicima), ali njihov je titar bio znatno niži. Samo pojedincima s visokim titrom IgG protutijela na inzulin javljala se inzulinska rezistencija jer su ona neutralizirala unešeni inzulin, onemogućavajući mu vezanje za ciljne receptore. Druge su studije opisivale promjenjenu farmakokinetiku inzulina zbog prisutnosti veznih protutijela (potrebno je bilo povisiti primjenjenu dozu za isti učinak), ali dugoročno to nije izravno utjecalo na glikemijsku kontrolu.

Danas je imunogeničnost nadomjesnog inzulina toliko smanjena da se inzulinska rezistencija posredovana protutijelima smatra iznimno rijetkom komplikacijom koja zahtjeva samo manju

korekciju u doziranju lijeka. Velike globalne studije završene u 2000-tim godinama zaključuju da eventualna prisutnost protutijela na inzulin u pojedincu ne utječe na kliničku učinkovitost i sigurnost terapije. Mjerenje visine titra prisutnih protutijela kroz vrijeme pokazalo je najviše vrijednosti nakon jedne godine, a potom njegovo smanjivanje.

Na području EU odobreni su rekombinantni inzulini proizvedeni u *E. coli* ili *S. cerevisiae* - humani inzulini i inzulinski analozi - inzulin aspart, inzulin degludek, inzulin detemir, inzulin glargin, inzulin glulizin, inzulin lizpro, izofan (NPH) inzulin te biosličan inzulin glargin.

Nadomjesni se inzulini daju dnevno višestukim subkutanim injekcijama ili kontinuirano subkutano inzulinskom pumpom. Tako se pokušava oponašati fiziološko lučenje inzulina iz gušterače (nisko kontinuirano bazalno i visoko kratkotrajno za vrijeme obroka). Inzulinski analozi s malim promjenama u slijedu aminokiselina poboljšanog su farmakokinetičkog profila u odnosu na humani inzulin (bržeg su nastupa djelovanja i/ili djeluju kroz dulji period), a moderne formulacije predmješanih inzulina sadrže i otopljenu i suspendiranu komponentu za postizanje takvog učinka primjenom samo jedne doze.

Upozorenja o mogućem stvaranju protutijela na primjenjeni inzulin u Sažecima opisa svojstava lijeka nisu navedena za trenutno odobrene humane inzuline, ali jesu za inzulinske analoge.

Posebno je ispitivana imunogeničnost inzulina u liječene djece i adolescenata te trudnica s dijabetesom. Razina protutijela na inzulin aspart u novodijagnosticirane djece bila je niska tijekom cijele studije, a u nekih su postojala križna protutijela između inzulina asparta i humanog inzulina ako je terapija bila kombinirana. Nije utvrđen nikakav utjecaj na učinkovitost i sigurnost liječenja.

Veza između potvrđenog prelaska protutijela na inzulin s majke koja boluje od dijabetesa tipa 1 na plod preko posteljice i krvi iz pupkovine i neonatalnih komplikacija nije potvrđena. Pokazano je da se za vrijeme trudnoće razina protutijela na inzulin ne povećava bez obzira

na vrstu i dozu primjenjenog inzulina, nego se ona čak i smanjuje. Prevalencija prisutnosti protutijela na inzulin ne razlikuje se ni između netrudnih ispitanica s dijabetesom ili trudnica s gestacijskim dijabetesom. (10, 16, 18)

Inkretinski mimetici

Inkretini su endogeni regulatorni peptidi koje luče stanice crijeva uz obrok i koji djeluju sinergistički s inzulinom. Najviše su proučavani glukagonu sličan peptid-1 (GLP-1) i inzulinotropni hormon ovisan o glukozu (GIP). Oba hormona imaju kratak poluvijek, između dvije i pet minuta, jer ih brzo inaktivira u krvotoku široko rasprostranjen enzim dipeptidil-peptidaza (DPP-4). Inkretinski mimetici su peptidi koji imaju mogućnost aktivacije receptora za GLP-1, a zbog razlika u molekularnoj strukturi otporni su na razgradnju s DPP-4. Indicirani su za liječenje šećerne bolesti tipa 2 u pretilih bolesnika u kombinaciji s drugim oralnim hipoglikemicima i/ili bazalnim inzulinom, uz promjene stila života (dijeta, tjelevožba).

Prednosti su im što kontrolu glikemije postižu bez rizika za pojavu hipoglikemija osim u kombinaciji sa sulfonilurejama, dovode do gubitka tjelesne mase, snižavaju povišeni krvni tlak, usporavaju pražnjenje želuca i u pretkliničkim ispitivanjima pokazali su pozitivan učinak na funkciju β -stanica i njihovu masu. Nedostaci su im relativno česte nuspojave od strane probavnoga sustava, nedostatak dugoročnih iskustava, stvaranje protutijela s nedovoljno ispitanim učinkom na učinkovitost i moguće interakcije s drugim lijekovima zbog usporavanja pražnjenja želuca.

Eksenatid

Eksenatid je agonist receptora za GLP-1, sintetska verzija proteina eksendina-4 izoliranog iz slina Gila guštera te ima 50% podudarnosti s aminokiselinskim slijedom humanog GLP-1. Odobrene su dvije formulacije eksenatida, subkutane injekcije za primjenu dva puta dnevno ili jedan puta tjedno.

Liraglutid

Liraglutid je rekombinantni analog humanog GLP-1 proizveden u *S. cerevisiae*. Dijeli 97% sekvencijske analogije s endogenim GLP-1 i veže se na endogeni receptor. Boljeg je farmakokinetičkog profila od endogenog GLP-1 - nakon subkutane primjene slijedi spora apsorpcija zbog asocijacije molekula, veže se za albumin, stabilniji je prema enzimatskoj razgradnji s DPP-4 i stoga mu je produljen poluvijek i prikladan je za doziranje jednom dnevno.

Albiglutid

Albiglutid je posljednji odobreni GLP-1 agonist. To je rekombinantni fuzijski protein sastavljen od dvije kopije modificiranog humanog GLP-1 proizvedenog u *S. cerevisiae* i humanog albumina. Otporan je na razgradnju s DPP-4 i zbog poluvijeka u plazmi od četiri do sedam dana prikladan je za primjenu jedanputa tjedno.

Imunogeničnost inkretinskih mimetika

Kao što je svaki proteinski ili peptidni lijek potencijalno imunogeničan u ljudskom organizmu, pojedinci mogu razviti protutijela i na subkutano injicirane GLP-1 agoniste. Prisutnost protutijela može povećati rizik od nastupa nuspojava ili smanjiti terapijski učinak lijeka. U rujnu 2010. godine obustavljen je daljni razvoj **taspoglutida** zbog gastrointestinalnih nuspojava i nerazjašnjenih problema s imunogeničnošću (ozbiljne reakcije na mjestu primjene) u kliničkim ispitivanjima faze III.

Kliničke studije koje su provedene u svrhu ispitivanja stvaranja protutijela na **eksenatid u primjeni dva puta dnevno** pokazale su da se ona mogu potvrditi u konstantnom postotku ispitanika i da gotovo iščezavaju u periodu od 82 tjedna (najviši titar protutijela zabilježen je u periodu između 6 i 22 tjedna od početka liječenja nakon čega je u stalnom opadanju). U grupi ispitanika pozitivnih na protutijela češće su zabilježene reakcije na mjestu primjene, npr. koprivnjača ili svrbež, u usporedbi s grupom ispitanika negativnih na protutijela. Ostali profil

nuspojava podjednak je u obje te skupine pacijenata. Podaci iz pet studija u kojima je sudjelovalo oko 1500 ispitanika pokazali su da je u oko 38% ispitanika zabilježen nizak titar protutijela nakon 30 tjedana terapije, ali da je postignuta glikemijska kontrola (mjereći postotak HbA_{1c}) bila usporediva sa skupinom ispitanika koji su bili negativni na protutijela, što znači da nastala protutijela na eksenatid nisu utjecajala na djelotvornost lijeka. U dodatnih 6% ispitanika zabilježen je visok titar protutijela u istom periodu i polovica od njih nije reagirala na lijek (izostala je očekivana glikemijska kontrola). Nije nađena križna preosjetljivost na endogene peptide (glukagon ili GLP-1).

U fazi III kliničkih ispitivanja **eksenatida u primjeni jedan puta tjedno** u trajanju od 24 i 30 tjedana, protutijela na eksenatid potvrđena su u ukupno 57% ispitanika (45% s niskim titrom i 12% s visokim titrom). Od ukupnog broja ispitanika, glikemijska kontrola izostala je u onih koji su imali visok titar protutijela na eksenatid (2,6%) i u onih koji su bili negativni na protutijela na eksenatid (1,6%). Potencijalno imunogenične reakcije na mjestu primjene javljale su se s učestalošću od 9% (13% u ispitanika pozitivnih na protutijela nasprem 4% u ispitanika negativnih na protutijela).

LEAD (Liraglutide Effect and Action in Diabetes) studije su iz faze III kliničkih ispitivanja **liraglutida**. Rezultati vezani za imunogeničnost liraglutida skupljeni su iz svih šest provedenih LEAD studija, s namjerom da se izmjeri i okarakterizira formiranje protutijela te ispita njihov eventualni utjecaj na glikemijsku kontrolu (in vitro neutralizirajući učinak i promjene postotka HbA_{1c} u odnosu na status protutijela - negativan, pozitivan, visok titar, nizak titar) i sigurnost terapije te odredi udio ispitanika pozitivnih na protutijela i postojanje križne reakcije na endogeni GLP-1. Rezultati nakon 26 tjedana primjene pokazali su da je oko 9% ispitanika razvilo protutijela na liraglutid koja nisu utjecala na smanjenje HbA_{1c} (za 1,1 do 1,3% u skupini ispitanika pozitivnih na protutijela nasprem 1,2% u skupini ispitanika negativnih na protutijela). Nisu prijavljene ozbiljne imunosne ili sistemske nuspojave. U oko 5% ispitanika liječenih liraglutidom zabilježena su protutijela koja su križno reagirala s endogenim GLP-1 i

u oko 1% ispitanika liječenih liraglutidom zabilježena su neutralizirajuća protutijela. Reakcije na mjestu primjene prijavljene su na oko 1% ukupno ispitanika.

Reakcije na mjestu primjene (osip, koprivnjača ili svrbež) pojavljuju se u oko 15% pacijenata liječenih **albiglutidom** i dovode do prekida terapije u oko 2% pacijenata. Inače su umjerenog intenziteta koji ne zahtjeva intervenciju. Protutijela na albiglutid pojavljuju se u oko 4% pacijenata, ali je njihova pojava prolazna i ona ne pokazuju neutralizirajući učinak in vitro kao ni utjecaj na glikemijsku regulaciju. Reakcije na mjestu primjene češće su prijavljivane za pojedince pozitivne na protutijela (njih 41%) nasprem pojedinih negativnih na protutijela (njih 14%). Nije primjećena razlika u prijavi drugih nuspojava između te dvije skupine pacijenata. (19-22)

Imunogeničnost citokina

Za razliku od protutijela na inzulin koja utječu na farmakokinetiku, slijede primjeri kad ona utječu na farmakodinamiku biološkog lijeka.

Imunogeničnost čimbenika poticanja granulocitnih i makrofagnih kolonija (GM-CSF)

Čimbenici poticanja kolonija su citokini koji stimuliraju proizvodnju stanica iz koštane srži, povećavaju im broj u krvi i aktiviraju ih (potiču sazrijevanje neutrofila, granulocita, monocita, makrofaga ili miješanih loza). Vežu se za specifične receptore koji dijele određenu homologiju s ostalim receptorima za hematopoetske čimbenike rasta (interleukine IL-2b, IL-3, IL-6, IL-7, eritropoetin). Receptori za GM-CSF prisutni su u tkivima hematopoetskih stanica i živčanom sustavu.

Rekombinantni GM-CSF se koristi za ubrzanje oporavaka koštane srži nakon kemoterapije. Može pojačati imunogeničnost tumorskih stanica i olakšati predočavanje tumorskih antigena. Studije na životinjskim modelima i in vitro pokazale su da sam ili u kombinaciji s drugim

agensima (IL-2) može smanjiti rast tumorskih stanica zbog aktivacije makrofaga tako da se koristi u imunoterapijskom liječenju pacijenata s karcinomom.

Podaci s početka 1990-ih godina o rekombinantnom humanom GM-CSF proizvedenom u *E. coli* (jednolančanom neglikoziliranom polipeptidu od 127 aminokiselina molekulske mase 14,5 kDa) pokazuju da terapijska primjena u pacijenata uzrokuje razvoj protutijela, ali manjka informacija o indukciji protutijela u imunosuprimiranih pacijenata. Opisano je stvaranje protutijela i na rekombinantni humani GM-CSF proizveden u kvascu (sargramostim) u 31% bolesnika sa solidnim tumorima rezistentnim na kemoterapiju, u 40% tih slučajeva dokazana je neutralizirajuća aktivnost in vitro. 100% pacijenata s rakom prostate razvilo je protutijela nakon trećeg ili kasnijeg ciklusa, od kojih je 60% neutralizirajućih in vitro.

Zaključak je da je stvaranje protutijela usmjereno izravno protiv redosljeda aminokiselina, bez obzira na ekspresijski sustav, zato što nije maskiran ugljikohidratnim ostacima kao u endogenom proteinu. (10)

Imunogeničnost čimbenika poticanja granulocitnih kolonija (G-CSF)

U EU uz izvorni filgrastim ima čak osam odobrenih biosličnih lijekova između 2008. i 2014. godine, te pegfilgrastim i lipegfilgrastim varijante djelatne tvari. Indicirani su za liječenje neutropenija, karcinoma i stanja nakon presađivanja hematopoetskih matičnih stanica.

Protutijela na sve molekulske varijante proteina vjerojatno su križno reaktivna i treba se posumnjati na njihovu prisutnost ako izostane očekivani rezultat liječenja ili nastupe ozbiljne alergijske reakcije. Do danas, njihova je pojavnost iznimno niska i nije povezana s neutralizirajućim učinkom. (23)

Imunogeničnost megakariocitnih čimbenika rasta i diferencijacije (MDGF)

Razvoj prve generacije MDGF, rekombinantnog i pegiliranog trombopoetina (TPO) zaustavljen je nakon kliničke studije u kojoj su se u 4% zdravih dobrovoljaca i 0,6%

dobrovoljaca oboljelih od karcinoma razvila protutijela koja su križnom reakcijom neutralizirala i endogeni TPO čime im je uzrokovana ozbiljna trombocitopenija. Sva anti-TPO protutijela bila su IgG klase, a djelovanje endogenog TPO inhibirano je vezanjem tih protutijela na niz prvih 163 aminokiselina sprječavajući mu daljnje vezanje za receptore.

Novi neimunogenični trombopoetički čimbenici rasta su razvijeni i ispitani u zdravim dobrovoljcima, uzrokuju o dozi ovisan rast trombocita bez nuspojava. Druga generacija trombopoetskih čimbenika rasta su romiplostim (polipeptid proizveden rekombinantnom DNK tehnologijom u *E. coli*) i eltrombopag (nepeptidni oralni lijek).

Romiplostim je fuzijski protein (Fc-peptid ili peptidijelo) koji signalizira i aktivira unutarstanične transkripcijske puteve preko cMpl receptora za TPO da bi se povećala proizvodnja trombocita. Sastoji se od Fc domene humanog imunoglobulina IgG1, a svaki je lanac kovalentno povezan s C-krajem peptidnog lanca koji sadrži dvije TPO domene koje se vežu na ciljani receptor. Romiplostim nema homologije u primarnoj strukturi s endogenim TPO. U slučaju da izostane terapijski učinak romiplostima treba što prije ispitati uzroke, uključujući i potencijalnu imunogeničnost lijeka, a pri sumnji na imunogeničnu reakciju treba kontaktirati lokalnog nositelja odobrenja da se testira neutralizirajući potencijal protutijela.

U pretkliničkim studijama na životinjama pokazano je da protutijela utječu na farmakodinamiku lijeka, smanjujući mu učinak nakon produljenog liječenja, ali taj se podatak naravno ne može direktno projicirati na ljude. U kliničkim su studijama odrasli pacijenti razvili vezna (6%) i neutralizirajuća (0,4%) protutijela na romiplostim, no nije došlo do križne reakcije s endogenim TPO. Četiri mjeseca nakon ukidanja terapije svi su pacijenti bili negativni na protutijela na romiplostim.

Eltrombopag aktivira receptor za TPO vezanjem na mjesto različito od TPO stoga mu nije kompetitivni agonist. (10, 24-25)

Imunogeničnost eritropoetina (EPO)

Rekombinantni humani eritropoetin (rhEPO) uspješno se koristi za liječenje anemije zbog kroničnog zatajenja bubrega, u stadijima kad je produkcija endogenog EPO nedostatna. Upotreba rhEPO započinje 1988. godine kad se primjenjivao intravenski, a od 1990. godine primjenjuje se i subkutanim putem. Molekulska masa peptidnog dijela EPO iznosi 18 kDa, a skupa s tri N-vezana i jednim O-vezanim postraničnim ugljikohidratnim lancem raste na oko 30 kDa. Polipeptidni lanac EPO od 165 aminokiselina smotan je u četiri α -zavojnice stabilizirane dvijema disulfidnim vezama koje su važne za biološku aktivnost. Pošto je i posttranslacijska modifikacija (glikozilacija) rhEPO važna za biološku aktivnost (poluvijek u plazmi), proizvodi u staničnim linijama sisavaca (CHO). Razlike između endogenog i rekombinantnih varijanti EPO međusobno (epoetin- α , epoetin- β , epoetin- θ , epoetin- ζ) male su (varijacije u sastavu sijalinske kiseline ili drugih oligosaharidnih skupina) i pridonose boljim farmakokinetičkim svojstvima. Darbepoetin- α ima pet zamjenjenih aminokiselina i dodatna glikozilacijska mjesta.

Moguća je i pegilacija EPO, a takav bi proizvod bio kontinuirani aktivator eritropoetskih receptora jer se drugačije veže za njih od endogenog EPO. EPO-Fc fuzijski protein razvijen je za inhalacijski put primjene, odnosno pulmolarnu dostavu. Sintetske verzije peptida koji oponašaju samo djelovanje, ali ne i strukturu EPO (eritropoetski stimulatívni agensi), također se razvijaju jer one ne bi trebale biti cilj imunom sustavu.

Slučajevi nekolicine bolesnika s kroničnim zatajenjem bubrega liječenih epoetinom- α koji su razvili izoliranu aplaziju crvene loze (eng. pure red cell aplasia, PRCA) prouzročenu križno reaktivnim protutijelima na terapijski i endogeni protein, izazvali su veliku pažnju. PRCA je rijedak, ali težak oblik anemije posredovan IgG i liječi se opetovanim transfuzijama krvi i imunosupresivnom terapijom. Spontano ili udruženo se događa s limfoidnim proliferacijama ili autoimunskim poremećajima (sustavni eritematozni lupus ili reumatoidni artritis), a

sekundarno zbog virusnih infekcija (hepatitisa) ili lijekova. U odraslih je to najčešće autoimunosti poremećaj.

Detekcija anti-EPO protutijela u serumu ili plazmi bolesnika moguća je RIPA ili ELISA testom osjetljivosti 8 ili 10 ng/ml i SPR analizom korištenjem BIAcore tehnologijom, koja je manje osjetljiva, ali superiornija u točnoj karakterizaciji protutijela. Stanični testovi kojima se mjeri neutralizirajući kapacitet protutijela koriste bioptate koštane srži.

U prvih deset godina primjene rhEPO prijavljena su tri, a onda je uočen nagli porast broja slučajeva PRCA-e, između 1998. i 2001. godine opisan je 21 slučaj u Europi. Svim je pacijentima dokazana prisutnost cirkulirajućih neutralizirajućih protutijela na EPO.

U početku su svi imali normalno očekivani terapijski odgovor na rhEPO, a potom su razvili tešku anemiju koja je bila rezistentna na povećanje doze ili prebacivanje na drugi EPO pripravak. Vrijeme nastupa anemije bilo je nakon devet mjeseci (vrijednost medijana). U većini slučajeva lijek je primjenjivan subkutano.

Proučavanjem bolesnikovih seruma prvih slučajeva PRCA-e pokazalo se da stvorena protutijela prepoznaju i reagiraju i s endogenim i s deglikoziliranim EPO. Štoviše, za obje se vrste vežu jednakim afinitetom. Nakon čišćenja tih seruma od IgG in vitro, dogodila se reverzija inhibicije eritroidnih proliferacijskih stanica posredovane protutijelima. Većini je pacijenata nakon obustave terapije EPO trebala i imunosupresivna terapija da bi se zaustavila produkcija protutijela.

Očigledan porast imunogeničnosti lijeka povezan je s manjom promjenom u formulaciji. Humani serumski albumin koji je služio kao stabilizator zamjenjen je 1998. godine glicinom i polisorbatom 80. Mehanizam kojim je nova formulacija inducirala PRCA nije do kraja razjašnjen, ali predloženo je nekoliko uzroka. Sumnjalo se na formiranje micela polisorbata 80 i epoetina- α , otpuštanje kapljica silikona iz napunjenih brizgalica ili migriranje tvari iz gumenih čepova koje su kao adjuvansi probili toleranciju limfocita B. Povećano stvaranje

agregata za vrijeme skladištenja, iako ne veće od dopuštenog specifikacijama, također je pronađeno te nije isključeno kao uzrok jer se specifikacije definiraju pojedinačno po biološkom proizvodu. Svaki od predloženih uzroka vjerojatno to nije mogao biti samostalno (micele su nestabilne i ne mogu objasniti epidemiološke razmjere nuspojave, silikoni su uglavnom inertni i ne bi trebali potaknuti imunosni sustav). Možda je i pogrešna primjena lijeka pridonijela svemu tome (npr. u Njemačkoj su tada EPO davali nefrolozi u bolnicama, a u Francuskoj su si pacijenti sami davali EPO kod kuće). Kontraindikacija za subkutanu primjenu pripravka dovela je do ponovnog smanjenja incidencije PRCA, a danas je opet dozvoljena kao alternativa intravenskom putu primjene.

Za različite pripravke EPO između 2001. i 2003. godine prijavljeno je od 0,2 do 18 slučajeva protutijelima posredovane PRCA na 100000 pacijenata godišnje - ta je vrlo ozbiljna nuspojava vrlo rijetka. Zbog odobravanja biosličnih pripravaka EPO-a i sigurnosti pacijenata u budućnosti važno je razumijeti uzroke njegove imunogeničnosti.

Ovaj slučaj naglašava brigu zbog nepredvidivosti i ozbiljnosti posljedica imunogeničnosti bioloških lijekova. Samo mala promjena u proizvodnji dovela je do promijenjenih karakteristika gotovog lijeka s drastičnim utjecajem na klinički ishod.

U pretkliničkim studijama primjećuje se, kao normalna i očekivana reakcija, razvoj protutijela u životinjama nakon primjene terapijskog ljudskog proteina. Ako se pritom razvije i neki biološki ili klinički učinak, on može pomoći identificiranju mogućih posljedica imunogeničnosti lijeka. Upravo su se slučajevi PRCA zbog križne neutralizacije EPO dogodili u pretkliničkim ispitivanjima tog lijeka na psima. Biosličan epoetin- ζ je u usporednoj pretkliničkoj studiji na psima pokazao drugačiji imunogenični profil od izvornog epoetina- α (nastala protutijela nisu bila neutralizirajuća), no samo dugoročna klinička praćenja moći će to definitivno i potvrditi.

Bolesnici kod kojih se razvije PRCA nakon liječenja bilo kojim pripravkom EPO, ne smiju više primati EPO zbog rizika od križne reakcije. (7, 10, 13, 26)

Interferoni α i β

Interferoni (IFN) spadaju u porodicu lokalnih regulatornih glikoproteina, protuupalnih i imunopoticajnih citokina. Najviše ih luče imunosne i upalne stanice u svrhu međusobne komunikacije. Sastavljeni su od niza od 166 aminokiselina i molekulske su mase oko 20 kDa. Otkrivene su tri glavne skupine interferona, IFN- α , IFN- β i IFN- γ , i njihove različite podvrste, npr. 14 je IFN- α . Membranski izvanstanični receptori za interferone specifični su i isključivi za životinjsku vrstu.

IFN- α posjeduje antivirusnu aktivnost (inhibira virusnu replikaciju u virusima zaraženim stanicama), pojačava izražavanje molekula MHC-I, stimulira limfocite T_H1 , a inhibira proliferaciju nekih drugih stanica. Koristi se u terapiji mnogih malignih bolesti i kroničnog hepatitisa B i C. Rekombinantno proizvedeni IFN- α -2a i IFN- α -2b razlikuju se u aminokiselini na poziciji 23 (lizin/arginin), a u EU su odobreni IFN- α -2b te pegilirani IFN- α -2a i IFN- α -2b.

Gen za **IFN- β** pokazuje 45% homologije s genom za IFN- α . Fiziološke funkcije IFN- β također su protuvirusne, protuproliferativne i imunomodulatorne. Lijek je prve linije za liječenje relapsno remitirajućeg oblika multiple skleroze (RRMS), iako taj mehanizam djelovanja nije u potpunosti razjašnjen. Dvije su vrste rekombinantnog IFN- β komercijalno dostupne, IFN- β -1a koji je proizveden u CHO i IFN- β -1b koji je proizveden u E. coli. IFN- β -1a je glikozilirani peptid, aminokiselinskog slijeda kao i prirodni IFN- β , a IFN- β -1b nije glikoziliran, nema metionin na poziciji 1 i ima serin umjesto cisteina na poziciji 17. Ista im je regija za koju se vežu na ciljani receptor, a razlikuju se u farmakokinetici i imunogeničnosti. Pokazalo se da nedostatak glikozilacije može uzrokovati formaciju agregata i posljedično smanjenje in vitro aktivnosti. U EU je 2014. godine odobren i pegilirani IFN- β -1a.

Imunogeničnost IFN- α

Studijama iz 1980-ih godina pokazalo se da 19-61% pacijenata u kroničnoj primjeni razvija protutijela na IFN- α . Veća incidencija zabilježena je u onima koji su primali IFN- α -2a nego u

onima koji su primali IFN- α -2b te se smatralo da u strukturi IFN- α -2a postoji neoantigen. Nekoliko je studija provedeno nad pacijentima koji su liječeni od različitih vrsta leukemija. Onima koji bili su pozitivni na protutijela na rekombinantni IFN- α , izostao je terapijski odgovor u sljedećim postocima: 19%, 38% i 100%. 27-63% pacijenata koji su bili liječeni s IFN- α -2a intramuskularno protiv renalnog karcinoma razvijali su protutijela, njih čak do 50% neutralizirajuća, ali nisu opaženi smanjeni klinički odgovor ili povećana klinička toksičnost. Ustanovljeno je da je brzina stvaranja protutijela različita ovisno o vrsti bolesti protiv koje se lijek primjenjuje. U bolesnika s renalnim karcinomom to se događa već nakon dva mjeseca od početka primjene terapije, a u bolesnika s leukemijom vlasastih stanica nakon sedam mjeseci.

Rezultati studija provedenih 1990-ih godina nad bolesnicima liječenim IFN- α -2a protiv kroničnog hepatitisa C pokazuju da je unutar šest mjeseci od početka terapije njih 32-61% pozitivno na protutijela uz naglasak da je u čak 40-75% njih izostao terapijski odgovor. Nasuprot tome, u studiji u kojoj su bolesnici liječeni s IFN- α -2b, protutijela su nađena u samo 1 od 175 pacijenata tako da se njima nije uspio objasniti neuspjeh terapije. Tada i u liječenju hepatitisa B s IFN- α -2a 39% pacijenata razvija protutijela, češće oni kojima je primijenjen u nižim dozama, a neuspjeh terapije definitivno je dokazan u onima s visokim titrom protutijela.

Uvođenjem pegiliranog IFN- α u terapiju prevalencija neutralizirajućih protutijela smanjuje se na ukupno 1-2%. To podupire hipotezu da glikozilacija ili pegilacija štite antigenični epitop čime se smanjuje neželjeni razvoj protutijela.

U Sažecima opisa svojstava lijeka, dakle podacima novijeg datuma, navode se mogući razvoj auto-protutijela i autoimunskih poremećaja za vrijeme terapije s IFN- α -2b te da bi se pacijenti sa znakovima ili simptomima koji odgovaraju autoimunskim poremećajima trebali pažljivo pratiti uz ponovnu procijenu rizika i koristi od nastavka terapije interferonom. Neutralizirajuća protutijela na IFN- α -2b potvrđena su u 2,9% bolesnika liječenih protiv raka i 6,2% bolesnika liječenih od hepatitisa. Detektirani titar neutralizirajućih protutijela je u gotovo

svakom slučaju bio nizak i nije povezan s gubitkom odgovora na terapiju ili pojavom autoimunskog poremećaja.

1-5% pacijenata liječenih s peginterferonom- α -2a razvija neutralizirajuća anti-IFN protutijela, a kao i s drugim interferonima veća je incidencija kod bolesnika s kroničnim hepatitisom B. Izostanak terapijskog odgovora ne povezuje se ni s jednom bolešću posebno.

Klinička incidencija neutralizirajućih protutijela u pacijenata koji primaju peginterferon- α -2b je 1,1%.

Imunogeničnost IFN- β

Terapija IFN- β za MS povezana je s potencijalnim razvojem neutralizirajućih protutijela koji mogu negativno utjecati na njen ishod i dokazi koji upućuju da njihov pozitivan status smanjuje kliničku učinkovitost su snažni. Nedostaju standardizirani testovi i titar neutralizirajućih protutijela u pojednicu varira kroz vrijeme, ali to testiranje je kritično za brigu o pacijentu jer daje informaciju o jednom od najvažnijih čimbenika povezanih s kliničkim odgovorom na terapiju IFN- β .

Zaključci nakon provedenih velikih kliničkih ispitivanja govore da udio ispitanika pozitivnih na neutralizirajuća protutijela ovisi o proizvodu (6-38%, više od IFN- β -1b nego IFN- β -1a), putu primjene (više od subkutane nego intramuskularne) i tipu testa korištenog za detekciju. Zbog križne preosjetljivosti anti-IFN- β protutijela, jednom kad ih bolesnik razvije, nema ga smisla prebacivati na drugi preparat.

Većina pacijenata razvije neutralizirajuća protutijela između 6 i 18 mjeseci od početka primjene terapije, a klinički vidljive posljedice su zakašnjele, tek nakon 24 mjeseca. Oni liječeni IFN- β -1b postaju pozitivni ranije od onih liječenih IFN- β -1a i vjerojatnije je da će se vratiti u negativan status. No, neutralizirajuća protutijela često ostaju prisutna i dug period nakon ukidanja terapije. Studije su pokazale da 37% seropozitivnih bolesnika tek kroz tri ili šest godina postaje seronegativno. Oni koji bi zadržali negativan status na neutralizirajuća

protutijela kroz prvih 24 mjeseca terapije, rijetko bi ih kasnije razvijali. Titar neutralizirajućih protutijela iznad 200 održava pozitivan status 22 mjeseca (vrijednost medijana). Spontani je nestanak neutralizirajućih protutijela primjećen samo u onih s niskim titrom, a u onih s visokim titrom ona ostaju prisutna usprkos imunosupresivnoj terapiji.

U studiji kojom su bili obuhvaćeni pacijenti s klinički izoliranim sindromom multiple skleroze, neutralizirajuća anti-IFN protutijela su se mjerila svakih šest mjeseci i barem jedan pozitivan nalaz nađen je u 32% njih. U razdoblju od pet godina, 60% njih vratilo se u negativan status, ali kroz to vrijeme zamijećen im je statistički značajan veći broj novih lezija na MRI snimkama.

Ukratko, neutralizirajuća protutijela utječu na učinkovitost IFN- β (prateći kliničku sliku bolesnika i radiološke nalaze), zbog njihove prisutnosti smanjena je biodostupnost IFN- β (mjereno prema smanjenim razinama bioloških markera) i mogu biti dugotrajan fenomen.

Analiza farmakodinamičkog odgovora na IFN- β -1a u pacijenata s RRMS u PRISMS studiji u odnosu na status neutralizirajućih protutijela pokazuje njegovo smanjenje nakon 1 godine, ali ne i nakon 4 godine, s time da su u tom periodu primjećene značajne razlike u radiološkim nalazima (MRI) i učestalosti relapsa između pozitivne (iznad 20 NU/mL) i negativne skupine bolesnika na neutralizirajuća protutijela. Njihov postotak je 14% koji su primali dozu od 44 μ g i 24% koji su primali dozu 22 μ g, tri puta tjedno. Prisutnost samo veznih protutijela nije imala utjecaj na ishod terapije.

Hipotetsko uklanjanje protutijela podrazumijeva plazmaferezu i intravenski tretman imunoglobulinima (IgG) koji se trenutno koriste za liječenje autoimunskih bolesti. Oni ne utječu na memorijske ili plazma-stanice tako da bi pomogli samo pri uklanjanju cirkulirajućih protutijela, ali ne i na njihov ponovni nastanak. Druga hipotetska strategija je povećanje doze IFN- β kojom bi se nadišla neutralizacija protutijelima, ali ona vjerojatno propada ako je titar protutijela visok. Naposljetku, korištenje rituksimaba, monoklonskog protutijela za terapiju

limfoma koji uništava limfocite B, bi teoretski mogao smanjiti titar neutralizirajućih protutijela, ali još ne postoje konkretni podaci o tome.

Uspoređivane su i skupine pacijenata liječenih samo s IFN- β -1a ili u kombinaciji s kortikosteroidima kroz godinu dana. U skupini liječenoj i kortikosteroidima bilo je 50% manje slučajeva nastanka neutralizirajućih protutijela, no bez utjecaja na visinu titra. Za korištenje imunosupresiva u kombiniranoj terapiji nisu se uspjeli donijeti zaključci o uspješnom smanjenju nastanka neutralizirajućih protutijela. Koadministracija NSAID i korištenje autoinjektora smanjuju učestalost lokalnih reakcija na mjestu primjene i sustavnih simptoma nalik gripi, najčešćih nuspojava interferona.

Naposlijetku, modifikacije u tehničkoj pripremi lijeka od iznimne su važnosti za imunogeničnost lijeka (tako npr. IFN- β -1a istog proizvođača 1996. godine uzrokuje imunogenični odgovor u 22% bolesnika, 2002. godine u 2-3%, a njegov trenutni Sažetak opisa svojstava lijeka navodi u 8%).

Nove ili drugačije nuspojave nisu povezane s razvojem neutralizirajućih protutijela.

IFN- β modificira prirodan tijek MS (smanjuje broj relapsa i usporava progresiju bolesti) pa se uvodi rano u terapiju (odgađa i početak bolesti nakon klinički izoliranog sindroma), a zbog visokog troška terapije i kasnim uočavanjem skupine bolesnika u kojih se nije postigao željeni odgovor (njih oko 15%), želi se razviti metoda kojom bi se identificirali oni u kojih će se javiti trajno prisutna neutralizirajuća protutijela, da bi se možda na vrijeme i uspješnije liječili drugim dostupnim terapijama (GA, mitoksantron, azatioprin). Odluka o prestanku ili nastavku terapije ne donosi se isključivo prema statusu neutralizirajućih protutijela.

Peginterferon- β -1a proizveden je u CHO i pegiliran u odnosu 1 mol polimera na 1 mol proteina. Nakon liječenja u kliničkim ispitivanjima u trajanju od 2 godine, manje od 1% pacijenata je razvilo trajna neutralizirajuća protutijela na proteinsku komponentu lijeka. Nije pokazan njihov utjecaj na sigurnost ili učinkovitost lijeka, ali zbog premalog broja analiziranih

pacijenata taj podatak ima svoja ograničenja. Također, 3% pacijenata je razvilo trajna neutralizirajuća protutijela na PEG komponentu lijeka. Njihov utjecaj na sigurnost ili učinkovitost lijeka također nije pokazan. (9-10, 27-30)

Imunogeničnost glatiramer acetata (GA)

Glatiramer acetat sintetski je nasumični polimer alanina, glutamata, tirozina i lizina definiranih molarnih omjera, s molekulskom masom između 5000 i 9000 Da. Sintetiziran je prije tridesetak godina da oponaša svojstva bazičnog mijelinskog proteina. Na iznenađenje, zamijećeno je da blokira inducirani eksperimentalni encefalomijelitis te je nakon toga ispitivan u kliničkim studijama na pacijentima s MS i odobren je za upotrebu kod RRMS jer je na MRI snimkama pokazao značajno smanjenje broja novih ili pojačanih lezija, smanjenje broja relapsa i smanjenu progresiju bolesti.

Razvoj anti-GA protutijela poznat je fenomen, ali kliničko značenje još nije razjašnjeno jer dosadašnje studije nude neuvjerljive rezultate. Pokazano je postojanje i prirodnih anti-GA protutijela niskog afiniteta u placebo skupini bolesnika iz kliničkih studija. (10)

Imunogeničnost natalizumaba

Natalizumab je lijek iz skupine selektivnih adhezijskih inhibitora. To je rekombinantno protutijelo usmjereno protiv α_4 -integrina. Dobiva se humaniziranjem mišjeg monoklonskog protutijela u prirodni IgG₄. Odobren je kao lijek druge linije u liječenju RRMS u monoterapiji. Razvijena anti-natalizumab protutijela stvaraju s njim kompleks zbog čega se pojačava klirens lijeka i smanjuje terapijski učinak.

Preklinička ispitivanja pokazala su imunogeničnost natalizumaba u nekoliko životinjskih vrsta. U velikim je kliničkim studijama faze III, AFFIRM i SENTINEL, koje su trajale dvije godine, između ostalog praćen i razvoj protutijela na natalizumab. Kapacitet vezanja im se mjerio ELISA testom, a neutralizirajući učinak protočnim citometrijskim testom. Negativan status definiran je s izmjerenom koncentracijom od <0,5 $\mu\text{g/ml}$ na svim mjerenjima do

završetka studije, prolazno pozitivan status s izmjerenom koncentracijom od $\geq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$ na jednom mjerenju do završetka studije, i trajno pozitivan status s izmjerenom koncentracijom od $\geq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$ na dva ili više mjerenja do završetka studije. Razmak između mjerenja bio je šest tjedana. 3% pacijenata bilo je prolazno pozitivno, a 6% trajno pozitivno na anti-natalizumab protutijela, koja se se razvila već do 12. tjedna terapije. U 50% trajno pozitivnih pacijenata serokonverzija se dogodila do završetka studije.

Protutijelima blokirano vezanje natalizumaba na receptore α_4 -integrina zamijećeno je tek u malom broju pacijenata pa se ne može odrediti postojanje korelacije između stvaranja protutijela i smanjenog farmakodinamičkog učinka lijeka. Međutim, serumske su koncentracije natalizumaba bile značajno smanjene u svim pacijentima pozitivnima na protutijela, bez obzira na visinu titra. U 12. tjednu od početka terapije serumska koncentracija lijeka u skupini pacijenata negativnih na protutijela prosječno je iznosila 15 $\mu\text{g/ml}$, a u skupini pozitivnoj na protutijela samo 1 $\mu\text{g/ml}$. U 36. tjednu koncentracije lijeka u skupini pacijenata negativnih na protutijela prosječno je iznosila 24 $\mu\text{g/ml}$, u skupini prolazno pozitivnih 17 $\mu\text{g/ml}$, a u skupini trajno pozitivnih na protutijela 2 $\mu\text{g/ml}$. Očit je utjecaj anti-natalizumab protutijela na farmakokinetiku lijeka.

Terapijski učinak lijekova protiv MS klinički se provjerava brojem relapsa bolesti i novih lezija na MRI snimkama. Negativan utjecaj protutijela u ovom slučaju pokazan je u obje kategorije.

Incidencija i vrsta nuspojava liječenja natalizumabom nije se razlikovala među skupinama na protutijela pozitivnih i negativnih pacijenata osim infuzijskih reakcija (glavobolja, crvenilo, mučnina, nelagoda i ukočenost dva sata unutar početka davanja infuzije), koje su gotovo četiri puta bile češće u skupini pacijenata pozitivnih na protutijela u odnosu i na placebo skupinu i u odnosu na skupinu pacijenata negativnih na protutijela.

Rutinsko praćenje razvoja protutijela na natalizumab nije potrebno jer se ono neće dogoditi u preko 90% pacijenata, ali se preporuča provjeriti ako pacijent iskusi infuzijsku reakciju. (10)

Imunogeničnost inhibitora čimbenika tumorske nekroze (anti-TNF protutijela)

Ovakva je terapija važna za liječenje kroničnih imunskih i upalnih bolesti, u čijoj patogenezi TNF- α ima središnju ulogu (npr. reumatoidnog artritisa, Chronove bolesti i teške psorijaze), jer im smanjuje aktivnost, čak i inducira remisiju. **Infliksimab** je kimerno IgG₁- κ anti-TNF- α monoklonsko protutijelo, **adalimumab** i **golimumab** su humana IgG₁- κ anti-TNF- α monoklonska protutijela, **etanercept** je fuzijski protein ljudskog TNF receptora 2 i ljudskog IgG₁, **certolizumab pegol** je pegilirani Fab fragment humaniziranog anti-TNF- α monoklonskog protutijela. Razlozi zbog kojih pojedinci ne reagiraju na ovu terapiju nisu do kraja razjašnjeni, ali interindividualne razlike u biodostupnosti i farmakokinetici te imunogeničnost ovih lijekova sigurno imaju svoj doprinos u tome. Ponekad je praćenje razine cirkulirajućih protutijela važno za korekciju doze ove skupe i dugotrajne terapije te smanjenje rizika za pacijente.

Ciljna mjesta djelovanja ovih monoklonskih protutijela su topljivi i membranski TNF- α i moguće je da potiču i razaranje stanica za koje je vezan. Osim infliksimaba koji se primjenjuje intravenski, ostali se spomenuti lijekovi daju subkutano ili intramuskularno, čak i kod kuće. Koncept individualizacije terapije (praćenje adherencije pacijenta, biodostupnosti i farmakokinetike lijeka) se primjenjuje tek ako standardni režim liječenja zakaže. Subkutana primjena može dovesti do stvaranja agregata na mjestu primjene čime se smanjuje biodostupnost i provocira stvaranje anti-protutijelo protutijela.

Održavana serumska koncentracija ovih lijekova važna je za postizanje klinički vidljivih rezultata i razvijen je prvo enzimski u krutoj, a onda i radioimunotest u tekućoj fazi kojim se ona mjeri (prema kapacitetu vezanja lijeka na ¹²⁵I-TNF- α). Prilagođen je za sve navedene lijekove i za mjerenje razine anti-protutijelo protutijela u serumu u svrhu pronalaska korelacije s biodostupnošću lijeka, aktivnošću bolesti, nuspojavama (infuzijskim reakcijama) i predviđanjem terapijskog neuspjeha.

13% od 106 ispitanika u prvoj takvoj provedenoj studiji razvilo je anti-infliksimab protutijela nakon druge primljene doze, odnosno nakon mjesec i pol, i njima je serumska koncentracija

lijeka bila najniža. Nakon tri i šest mjeseci i više primljenih infuzija infliksimaba taj je postotak rastao na 30% i 44%. U opservacijskom periodu od 18 mjeseci povezan je izostanak očekivanog terapijskog učinka s niskim serumskim koncentracijama u na početku spomenutih bolesnika, kao i potreba za povećanjem doze lijeka i učestalost nuspojava s visokim razinama anti-infliksimab protutijela, koju prednizolon i metotreksat nisu uspješno smanjili.

Kimerni anti-TNF lijek može potaknuti stvaranje protutijela zbog dijelova molekule stranog (mišjeg) porijekla koji su drugačijeg aminokiselinskog slijeda od ljudskog, a humani anti-TNF lijekovi zbog različitih alotipova IgG₁-Fc fragmenta (četiri) i/ili κ lakog lanca (tri).

Klinička važnost anti-protutijelo protutijela, iako nije uvijek prepoznata, može se sažeti ovako: uzrokuju nuspojave ili smanjenu učinkovitost terapije i trebalo bi im pratiti razvoj i razinu i u pacijenata kojima je postignuta remisija; osim protutijela s in vitro dokazanim neutralizirajućim učinkom, i neneutralizirajuća protutijela mogu in vivo smanjiti biodostupnost i promijeniti farmakokinetiku (apsorpciju, poluvijek u plazmi) monoklonskog protutijela, npr. formirajući imunokomplekse na mjestima primjene.

Zanimljiv je podatak da anti-infliksimab protutijela uglavnom ne reagiraju križno s etanerceptom i adalimumabom pa se pacijenti mogu uspješno prebaciti na drugu terapiju.
(10)

Imunogeničnost bioloških lijekova u pacijentima s genskim defektima

Zanimljivi su pokušaji liječenja genetskih bolesti nadomještanjem proteina kojeg, zbog određenih mutacija gena, ti pacijenti djelomično ili uopće ne ekspimiraju. S imunološkog gledišta, to predstavlja posebnu situaciju jer mutirani segmenti gena uzrokuju i promijenjeni imunosni repertoar pojedinca tj. nedostatak imunotolerancije na proteine koji su kodirani tim genima, pa se i očekuje da će nadomjesna terapija s divljim tipom proteina biti donekle

imunogenična. Klinički učinak imunogeničnosti varira ovisno o stupnju genske manjkavosti. Iskustvo s hemofilicarima uči nas da uz opsežnost genskog defekta i ozbiljnost fenotipa raste i vjerojatnost da će se razviti neutralizirajuća protutijela. Zbog toga u onih s težim oblikom bolesti supstitucijska ili genska terapija ima najveći rizik da propadne te mora biti upotpunjena, čak i imunosupresijom.

Hemofilija A (klasična hemofilija)

Genetska je bolest krvarenja povezana s X kromosomom i prenosi se s majke na sina. Bolest, odnosno poremećaj zgrušavanja krvi, nastaje zbog mutacije ili delecije gena koja mijenja ekspresiju i sekreciju, odnosno uzrokuje nedostatak čimbenika VIII. Klinički se bolest manifestira produljenim vremenom krvarenja nakon traume i spontanim krvarenjima.

Nadomjesna terapija može biti uspješna. Koriste se pripravci iz donirane krvi i rekombinantno proizvedeni proteini. Formiranje protutijela (IgM i IgG klase) na terapijski čimbenik VIII događa se zbog toga što mu dijelove bolesnikov imunosti sustav prepoznaje kao strane antigene. Incidencija stvaranja protutijela na pripravke dobivene iz ljudske plazme iznosila je oko 20-25% (prema podacima iz više studija provedenih u 1990-im godinama). U oko trećine od tih pacijenata titar protutijela bio je nizak i prolazan, a njihov vezni ili blokirajući utjecaj na lijek premostio se povećanjem primjenjene doze. Međutim, kod onih u kojih je titar protutijela bio visok, i dalje su se javljala krvarenja koja su zahtjevala alternativne puteve liječenja (npr. korištenje rekombinantnog čimbenika VIIa ili koncentrata aktiviranog kompleksa protrombina).

In vitro je dokazano da neutralizirajuća IgG protutijela na čimbenik VIII djeluju proteolitički na ciljnu molekulu. Pacijanti s teškom hemofilijom A, kojima u potpunosti nedostaje endogeni čimbenik VIII, nikako nemaju koristi od nadomjesnog liječenja baš zbog ovih imunoreakcija.

Hemofilija B

Bolest je rjeđa i također se nasljeđuje s majke na sina, a poremećaj krvarenja nastupa zbog nedostatka čimbenika IX.

Incidencija stvaranja anti-čimbenik IX protutijela je oko 1-3%, ali posljedice su puno ozbiljnije - teške alergijske reakcije i anafilaksija u oko 50% njih. Pacijenti s protutijelima trebaju dodatnu terapiju s čimbenikom VIIa i koncentratom aktiviranog kompleksa protrombina.

Pompeova bolest

Rijedak je autosomno recesivni poremećaj, metabolička bolest zbog nedostatka lizosomalnog enzima kisele α -glukozidaze (GAA). Zbog genskog defekta lizosomalni se glikogen nakuplja u raznim tkivima, prvenstveno u srčanom i skeletnim mišićima. Ovisno o ostatnoj aktivnosti GAA razlikujemo dva oblika bolesti. Klasičan oblik je infantilni tip karakteriziran progresivnom kardiomiopatijom, slabošću mišića, respiratornom insuficijencijom i smrću kroz prvu godinu života. Odrasli oblik manje je ozbiljan jer srčani mišić uglavnom nije zahvaćen.

Rekombinantni prekursor ljudske GAA proizvodio se prvo iz mlijeka transgeničnih zečeva, a danas u staničnoj kulturi CHO. U fazi II kliničkih ispitivanja sudjelovala su dva dojenčeta i oba su razvila protutijela, koja se nisu pokazala štetnima. Najveća kohortna studija provedena je s 18 dojenčadi, intravenskom terapijom koja je započela prije navršenog šestog mjeseca života. Terapija se pokazala sigurnom i učinkovitom, kod jednog su se ispitanika razvila protutijela koja su inhibirala aktivnost GAA in vitro, ali pošto je broj ukupnih ispitanika ograničen ne mogu se donijeti zaključci o djelovanju protutijela i daljnje dugotrajne studije su potrebne da se procijeni potencijal ovog liječenja i eventualne posljedice imunogeničnosti.

(10)

Zaključak

Protutijela koja se u određenom postotku pacijenata stvaraju protiv bioloških lijekova mogu utjecati na ishod i sigurnost terapije. Njihov nastanak povezuje se s određenim nuspojavama (npr. reakcijama preosjetljivosti na mjestu primjene), promjenjenom farmakokinetikom (koja može zahtijevati korekciju doze), smanjenom djelotvornošću ili neutralizacijom endogenih proteina (što je po život ugrožavajuća pojava).

Razvoj i odobravanje biosličnih lijekova proteklih godina potaknulo je razmišljanje kliničara, farmaceutske industrije i krovnih regulatornih agencija o ovoj temi.

Mogući uzroci imunogeničnosti terapijskih proteina ispitani su i razrađeni u detalje, ali i dalje postoje neke nedoumice i svjedočimo nepredvidivim situacijama. Mjesto i način proizvodnje biološkog lijeka moraju zadovoljavati najviše standarde DPP te pratiti druge smjernice struke i najnovija saznanja iz tog područja kako sam proizvodni proces ne bi bio uzrok povećanoj imunogeničnosti. Odgovornom proizvodnjom, potpunom izolacijom djelatne tvari i ispravnim formuliranjem i skladištenjem biološkog lijeka mogu se eliminirati prisutnost različitih procesnih onečišćenja ili nastajanje agregata proteina kao najčešćim uzrocima imunogeničnosti u novije vrijeme. Razvoj analitičkih metoda kojima je moguće otkriti i najmanje nepravilnosti ili odstupanja od zadanih specifikacija treba podržavati od predkliničkih faza razvoja biološkog lijeka.

Razumijevanje interakcija protutijela i antigena pridonosi razvoju metoda detekcije i karakterizacije imunoreakcije. Manipulacijom gena danas se uzgajaju transgenične životinje i stanične linije koje se, osim za proizvodnju rekombinantnih terapijskih proteina, mogu koristiti i kao korisni modeli za ispitivanje potencijalne imunogeničnosti, usporedne studije svojstava različitih proteina ili detekciju i karakterizaciju protutijela.

Kombinirano dosadašnjim kliničkim iskustvom, pokusnim životinjama, in vitro modelima i računalnim analizama donekle je moguće otkriti imunogenični potencijal proteina, odnosno

naći imunogenične epitope koje prepoznaju limfociti. Njih se potom prilikom dizajna i razvoja biotehnološkim postupcima ili posttranslacijskom doradom može ukloniti ili sakriti.

Čimbenici na koji se najmanje može utjecati osobine su i interindividualne razlike među pacijentima. Imunogeničnost bi se u kliničkoj praksi mogla smanjiti pravilnom upotrebom biološkog lijeka i, koliko je moguće, izbjegavanjem poznatih rizika (odabrati za stvaranje protutijela manje rizični put primjene lijeka i korigirati režim doziranja ili skratiti trajanje terapije). U fazama pretkliničkih i kliničkih ispitivanja lijeka, ako je uključen dovoljan broj ispitanika, moguće je otkriti određene rizike za nastanak protutijela u određenim skupinama bolesnika, u kojim slučajevima je to klinički nepovoljno ili čak štetno, te sastaviti preporuke za njihovo buduće testiranje i sanaciju. Praćenje imunogeničnosti lijekova u svakom se slučaju nastavlja i u fazi IV što može rezultirati novim spoznajama.

Potrebno je standardizirati razvijene imunološke testove i laboratorije na međunarodnoj razini da se rezultati i podaci iz studija mogu uspoređivati.

Literatura

1. Biološki i bioslični lijekovi. Dostupno na www.halmed.hr. Pristupljeno 27. listopada 2014.
2. **Geigert J. The Challenge of CMC Regulatory Compliance for Biopharmaceuticals and other Biologics. Springer; 2013, str. 1-3, 15-18, 21-28, 40-42, 105-107, 110, 116-119, 139-143, 155-157, 160-163, 179-198, 199-210, 213-217, 221-229, 231-232, 291-307, 310-316**
3. Zakon o lijekovima, Narodne novine br. 76 od 21.06.2013. Dostupno na www.nn.hr. Pristupljeno 27. listopada 2014.
4. Stryer L. Biokemija. Školska knjiga; 1991, str. 11-33
5. Cooper GM, Hausman RE. Stanica. Medicinska naklada; 2004, str. 50-56, 104-117, 125-128, 305-307
6. Zuñiga L, Calvo B. Biosimilars: pharmacovigilance and risk management. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety* 2010;19:661-669
7. Schellekens H. Biosimilar therapeutics - what do we need to consider?. *Nephrol Dial Transplant Plus* 2009;2,1:27-36.
8. Mellstedt H. Clinical considerations for biosimilar antibodies. *Europ Jour of Canc supplements* 2013;11,3:1-11
9. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Marušić M, Taradi M, Višnjčić D. *Imunologija. Medicinska naklada; 2004, str. 3-16, 17-26, 27-59, 69-75, 77-98, 105-120, 123-130, 211-232, 245-249, 277*
10. **van de Weert M, Horn Møller E. Immunogenicity of Biopharmaceuticals. Springer; 2008, str. 1-204**
11. Mijić I, Marinc S, Cindrić M. Imunogeničnost agregata terapeutskih proteina. *Medicina Fluminensis* 2009;45,3:245-251

12. EMA: Guideline on immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins, Doc. Ref. EMEA/CHMP/BMWP/14327/2006. Dostupno na www.ema.europa.eu. Pristupljeno 10. rujna 2014.
13. Schellekens H. Bioequivalence and the Immunogenicity of Biopharmaceuticals. *Nature Reviews Drug Discovery* 2002;1:457-462.
14. Mire-Sluis AR, Chen Barrett Y, Davanarayan V, i sur. Recommendations for the design and optimization of immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products. *Journal of Immunological Methods* 2004;289:1-16
15. Gupta S, Indelicato SR, Jethwa V, i sur. Recommendations for the design, optimization, and qualification of cell-based assays used for the detection of neutralizing antibody responses elicited to biological therapeutics. *Journal of Immunological Methods* 2007;321:1-18
16. Guyton AC, Hall JE. *Medicinska fiziologija*; 2003, str. 894
17. Summary of product characteristics: Omnitrope. Dostupno na www.ema.europa.eu. Pristupljeno 15. listopada 2014. i Sažetak opisa svojstava lijeka: Genotropin. Dostupno na www.halmed.hr. Pristupljeno 15. listopada 2014.
18. Summary of product characteristics: Abasaglar, Actraphane, Actrapid, Apidra, Humalog, Insulatard, Insuman, Lantus, Levemir, Liprolog, Mixtard, NovoMix, NovoRapid, Optisulin, Protaphane, Ryzodeg, Tresiba. Dostupno na www.ema.europa.eu. Pristupljeno 16. listopada 2014.
19. Kokić S, Prašek M, Pavlić Renar I, i sur. Hrvatske smjernice za liječenje šećerne bolesti tipa 2. *Medix* 2011;96:Suplement 2:23-24
20. Fineman MS, Mace KF, Diamant M, i sur. Clinical relevance of anti-exenatide antibodies: safety, efficacy and cross-reactivity with long-term treatment. *Diabetes Obesity and Metabolism* 2012;14(6):546-54.
21. Liraglutide Phase 3 LEAD Data. Dostupno na www.glucagon.com. Pristupljeno 12. studenog 2014.

22. Summary of product characteristics: Byetta, Bydureon, Victoza, Eperzan. Dostupno na www.ema.europa.eu. Pristupljeno 12. studenog 2014.
23. Summary of product characteristics: Lonquex, Neulasta. Dostupno na www.ema.europa.eu. Pristupljeno 6. studenog 2014.
24. Summary of product characteristics: Nplate. Dostupno na www.ema.europa.eu. Pristupljeno 6. studenog 2014.
25. Kuter DJ. New thrombopoietic growth factors. Clin Lymphoma Myeloma. 2009;9 Suppl 3:S347.
26. Sažetak opisa svojstava lijeka: Eprex. Dostupno na www.halmed.hr. Pristupljeno 6. studenog 2014.
27. Summary of product characteristics: IntronA, Pegasys, PegIntron, Avonex, Extavia, Rebif, Betaferon, Plegridy. Dostupno na www.ema.europa.eu. Pristupljeno 6. studenog 2014.
28. Hartung HP, Polman C, Bertolotto A, i sur. Neutralising antibodies to interferon beta in multiple sclerosis: expert panel report. J Neurol. 2007;254(7):827-37.
29. Francis GS, Rice GP, Alsop JC, PRISMS Study Group. Interferon beta-1a in MS: results following development of neutralizing antibodies in PRISMS. Neurology. 2005;65(1):48-55.
30. Sorensen PS, Koch-Henriksen N, Ross C, Clemmesen KM, Bendtzen K; Danish Multiple Sclerosis Study Group. Appearance and disappearance of neutralizing antibodies during interferon-beta therapy. Neurology. 2005;65(1):33-9.