

## Bioléčiva

- oficiálně (WHO) „biologické a biotechnologické substance“

### Základní charakteristiky bioléchiv

- získáno jinak než klasickou chem. syntézou (polosynt. úpravy možné)
- Mr > 1000 (do 1000 „malé molekuly“) - větší, složitější, vykazují obvykle *primární strukturu* (sekvence aminokyselin, popř. nukleotidů), *sekundární strukturu* ( $\alpha$ -helix, skládaný list, vliv -S-S- můstků), *terciární strukturu* (celkové prostorové uspořádání monomerní molekuly) a *kvarterní strukturu* (agregace monomerů); mnoho proteinů je glykosylováno

## Biofarmaceutika?

- terminologický konflikt: biofarmacie, biofarmaceutika
- pharmaceutics** = farmaceutická technologie



- biopharmaceutics** ≈ biofarmacie = „nauka o vstřebávání léčiv“ na pomezí farm. technologie a farmakokinetiky (farmakologie)
- biologicals**: protiváha k chemicals (chemikálie) ⇒ zahrnují „bioléčiva“, ale též např. diagnostické monoklonální protilátky, technicky užívané enzymy...
- biologics**: termín převážně užívaný pro „bioléčiva“

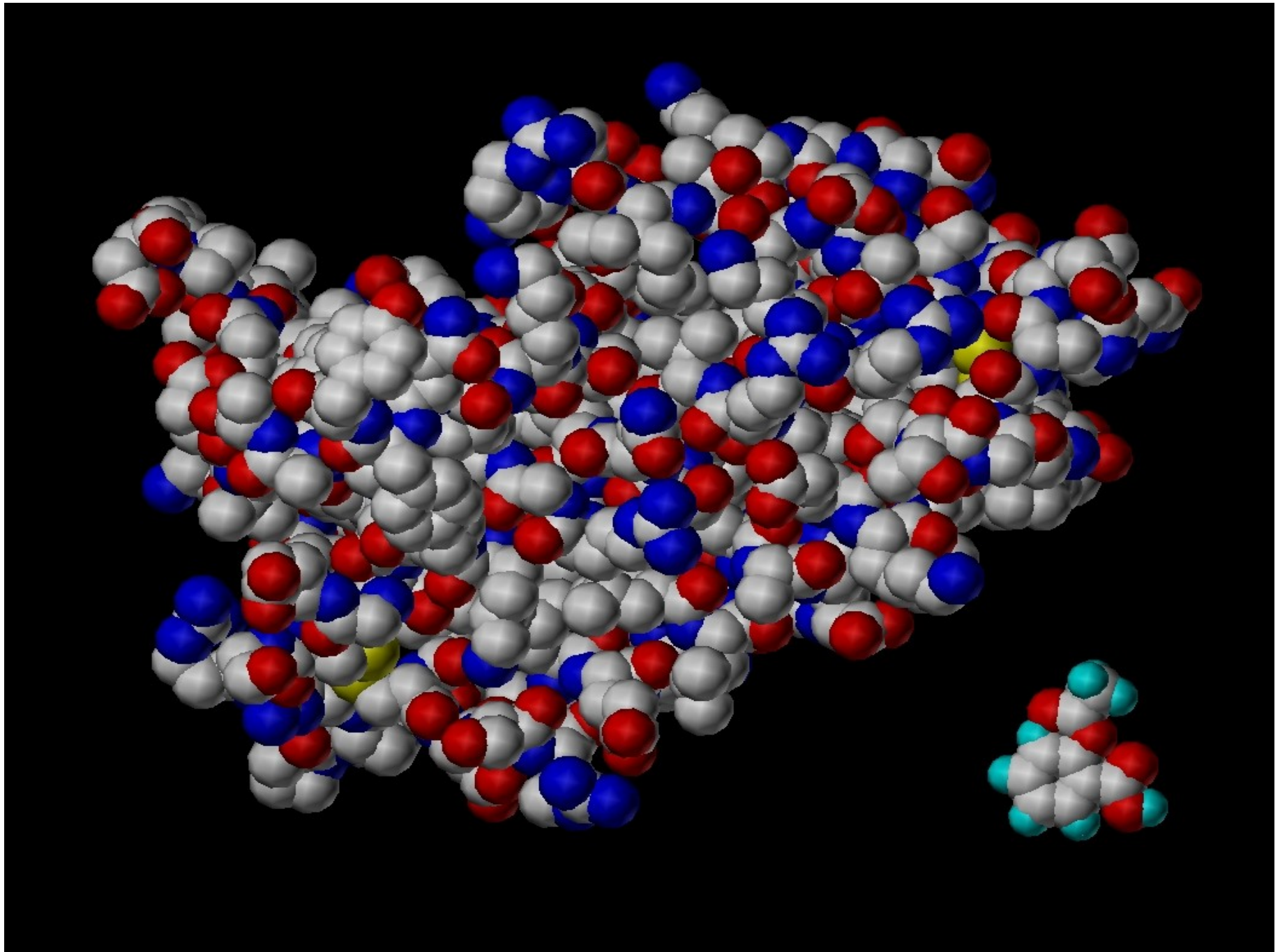


„Biofarmaceutika“ není optimální český termín

## Rozdíly ve výrobě „malých molekul“ a bioléciv

- malé molekuly – klasická organická syntéza: chemikálie s přesně definovanou chemickou strukturou a čistotou reagují za přesně definovaných podmínek s předvídatelným a přesně ověřitelným výsledkem
- bioléciva- příprava izolací („harvesting“) látek produkovaných a secernovaných uměle zkonstruovanými buňkami (genetické inženýrství)

Ilustrace rozdílu mezi biolécivem a „malou molekulou“  
erythropoetin a acetylsalicylová kys.



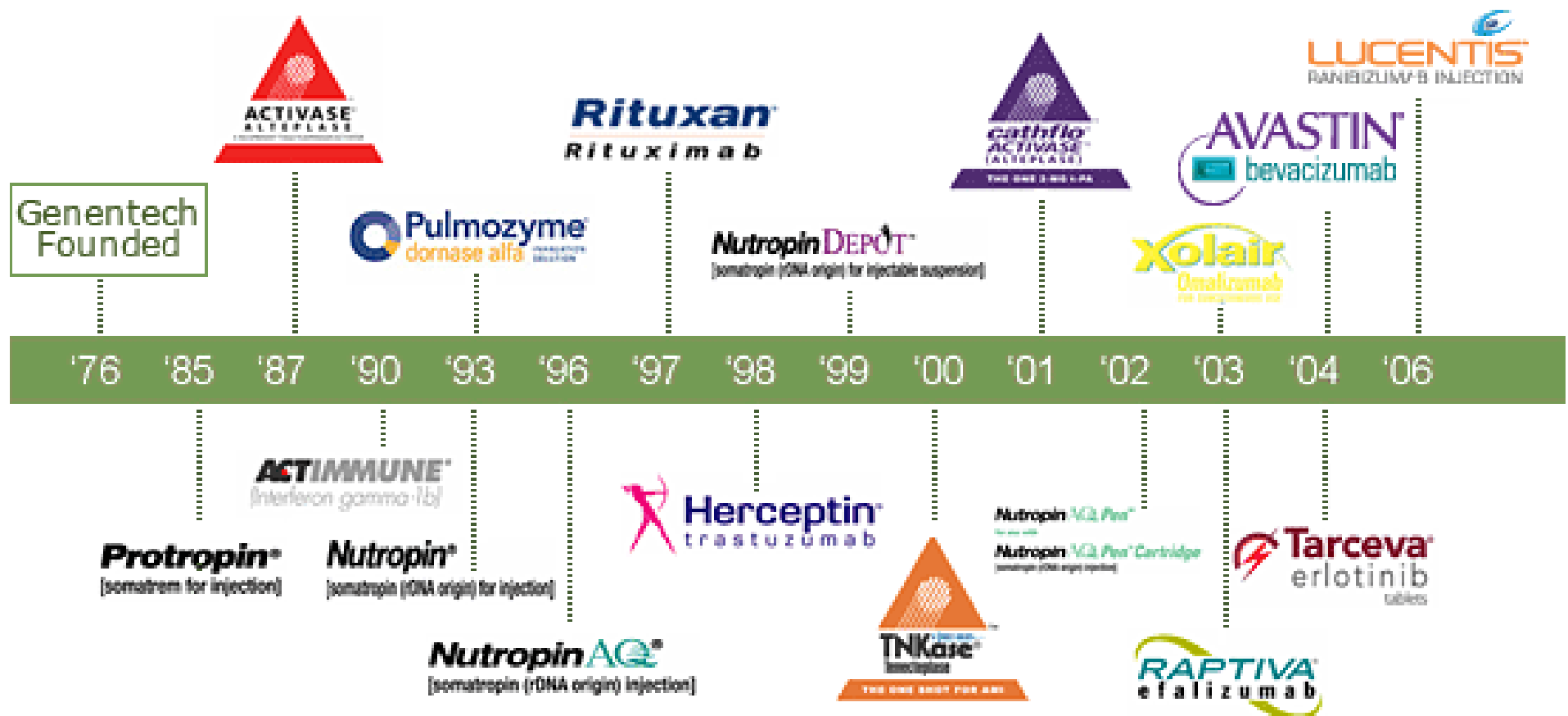
## Historie bioléciv

- starověk a středověk – využití pijavic k léčbě oběhových a krevních onemocnění (hirudin)
- klasické vakcíny – příprava usmrcených či oslabených bakteriálních kultur nebo oslabených či inaktivovaných virů (např. neštovice: přenos infekce „z kůže na kůži“ znám už kolem r. 1000 v Číně; 1796 – Edward Jenner prokázal, že vpravení hnisu z vředu z kravských neštovic pod kůži chrání před nákazou pravými neštovicemi; 1805 – v Itálii připravena první vakcína proti neštovicím na kůži telat; 1864 – hromadné použití této vakcíny; po r. 1940 – lyofilizované vakcíny (Collier))
- (polyklonální) protilátky („séra“) - imunizace vhodného produkčního makroorganismu toxou (toxin, např. hadí jed), sérum získané z krve používáno jako „protijed“; na obdobném principu získávány monoklonální protilátky pro analytické a diagnostické účely, pak vhodná úprava (RIA, ELISA)
- peptidy – izolace (inzulin: Banting a Best 1921)

### Novodobá historie – genetické inženýrství

- 1977 - rekombinantně na *E. coli* připraven somatostatin (Genetech, USA)
- 1978 – naklonován humánní inzulin
- 1982 – rekombinantní lidský inzulin připravený na *E. coli* na trhu
- 1984 – poprvé laboratorně připraven Faktor VIII
- 1985 – FDA povolil somatrem, analog somatotropinu

# Historie z pohledu jedné firmy (Genentech)



## Vývoj bioléciv

EMA (EU): normální schvalovací procedura jako pro jakékoliv jiné nové léčivo

FDA (USA): možnost zařazení do tzv. Fast Track Drug Development Program (od r. 1998, revidován 2004) – podmínkou použitelnost na vážné či život ohrožující onemocnění a opodstatněná naděje na lepší klinickou účinnost než dosud používaná léčiva

## Generika a „biosimilars“

Generika – malé molekuly – obsahují stejnou účinnou látku jako originál

„Biosimilars“ nebo „Follow-up Proteins“ - obsahují bioléčivo připravené obdobným způsobem a s obdobnými účinky jako originál

Rozdílné přístupy FDA (USA) a EMA (EU)

- EMA: důsledné testování účinků ve vztahu k navrhovanému terapeutickému využití; postatná je bezpečnost pacienta
- FDA: liberálnější přístup; plná podpora registracím „biosimilars“



# Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Guideline on Similar Biological Medicinal Products

(CHMP/437/04)

---

“It should be recognised that, **by definition, similar biological medicinal products are not generic medicinal products**, since it could be expected that there may be **subtle differences** between similar biological medicinal products from different manufacturers or compared with reference products, which **may not be fully apparent until greater experience in their use has been established**. Therefore, in order to support pharmacovigilance monitoring, the specific medicinal product given to the patient should be clearly identified.”

## Farmakologická klasifikace biologických a biotechnologických léčiv dle WHO

- Léčiva zažívacího traktu a metabolismu: insuliny.
- Antiinfektiva: antibakteriální, baktericidní polypeptidy zvyšující permeabilitu membrán bakteriálních buněk. Humánní papilomavirus.
- Antineoplastika: peptidové vakcíny, rekombinantní vakcíny, toxiny.
- Složky krve a látky ovlivňující hemopoetický systém (krvetvorbu): antitrombiny, inhibitory kaskády krevní koagulace, koagulační faktory, krevní faktory typu erythropoetinu. Deriváty heparinu včetně heparinů o nízké molekulové hmotnosti (heparinoidů), deriváty hirudinu, trombomoduliny.
- Imunomodulátory a imunostimulancia: faktory stimulující kolonie, interferony, antagonisté interleukinového receptoru, látky typu interleukinu. Monoklonální protilátky, receptorové molekuly, nativní nebo modifikované, antagonisté tumor necrosis faktoru (TNF).
- Hormony, antagonisté hormonů, peptidy stimulující nebo inhibující uvolňování hormonů (kromě inzulinů): deriváty růstového hormonu, jeho antagonisté, deriváty oxytocinu, glykoproteinové hormony hypofýzy a placenty, peptidy stimulující uvolňování hormonů hypofýzy, syntetické peptidy s účinkem podobným kortikotropinu, vasokonstriktory, deriváty vasopresinu.
- Různé: „antisense“ oligonukleotidy, enzymy, produkty pro genovou terapii, růstové faktory, peptidy a glykopeptidy jinde nezařazené.

## Základy názvosloví bioléciv dle doporučení WHO

[INTERNATIONAL NONPROPRIETARY NAMES (INN) FOR BIOLOGICAL AND BIOTECHNOLOGICAL SUBSTANCES (A REVIEW) INN Working Document 05.179 08/11/2007]

### Koncovky INN názvů bioléciv

„antisense“ oligonukleotidy	<i>-rsen</i>
inhibitory krevní koagulační kaskády	<i>-cogin (-kogin)</i>
krevní koagulační faktory	<i>-cog (-kog)</i>
colonie stimulující faktory	<i>-stim</i>
enzymy	<i>-ase (-asa)</i>
krevní faktory erythropoetinového typu	<i>-poetin</i>
růstové faktory	<i>-ermin</i>
deriváty růstového hormonu	<i>-som</i>
deriváty heparinu včetně heparinů s nízkou molekulovou hmotností	<i>-parin</i>
deriváty hirudinu	<i>-irudin</i>
peptidy inhibující uvolňování hormonů	<i>-relix</i>
antagonisté interleukinového receptoru	<i>-kinra</i>
látky typu interleukinu	<i>-kin</i>
monoklonální protilátky	<i>-mab</i>
deriváty oxytocinu	<i>-tocin</i>
peptidy a glykopeptidy (pro zvláštní skupiny peptidů viz <i>-actide</i> , <i>-pressin</i> , <i>-relin</i> , <i>-tocin</i> )	<i>-tide (-tid)</i>
peptidy stimulující uvolňování hormonů hypofýzy	<i>-relin</i>
receptorové molekuly, nativní nebo modifikované (předcházející vsuvka označuje cíl)	<i>-cept</i>
syntetické polypeptidy s účinkem podobným kortikotropinu	<i>-actide (-aktid)</i>
antagonisté tumor necrosis faktoru	<i>-nercept</i>
vasokonstriktory, deriváty vasopresinu	<i>-pressin (-presin)</i>

Obecné zásady tvorby názvů monoklonálních protilátek

Společná koncovka pro monoklonální protilátky je *-mab* (z **monoclonal antibody**)

• Předchází **kmen** dle zdroje produktu (zdrojového organismu):

*a* potkan

*axo* potkaní-myší hybrid

*e* křeček

*i* primát

*o* myš

*u* člověk

*xi* chimévní

*zu* humanizovaný

Rozdíl mezi chimévními a humanizovanými protilátkami:

- chimévní obsahuje delší souvislé řetězce aminokyselin pocházející z cizího organismu, navázané na obdobné řetězce lidského původu
- humanizovaná protilátka má krátké řetězce cizích aminokyselin včleněné mezi proměnné oblasti lidských aminokyselin

## Názvosloví monoklonálních protilátek – pokračování

- předchází **předkmen** dle onemocnění nebo terapeutického cíle:

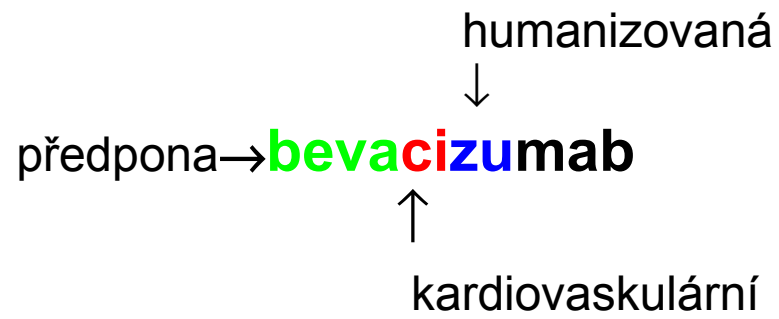
- <i>ba(c)</i> -	bakteriální
- <i>ci(r)</i> -	kardiovaskulární
- <i>fung</i> -	fungální
- <i>ki(n)</i> -	interleukin
- <i>le(s)</i> -	zánětlivé léze
- <i>li(m)</i> -	imunomodulátor
- <i>os</i> -	kost
- <i>vi(r)</i> -	virový

### Tumory:

- <i>co(l)</i> -	tlusté střevo
- <i>go(t)</i> -	varlata
- <i>go(v)</i> -	vaječníky
- <i>ma(r)</i> -	mléčná žláza
- <i>me(l)</i> -	melanom
- <i>pr(o)</i> -	prostata
- <i>tu(m)</i> -	jiné, smíšené

- kdekoliv je problém s výslovností, koncové písmeno předkmeně může být vypuštěno
- předchází libovolně volená **předpona**, nutno dbát na dobrou vyslovitelnost a jednoznačné rozlišení jednotlivých látek, zvláště stejného určení

# Příklad INN názvu monoklonální protilátky



## Antineoplastika

### **ramucirumab**

syn. IMC-1121B

- humanizovaná
- inhibitor angiogeneze
- proti receptoru VEGFR-2
- vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), pro-angiogenní faktor, se váže na 2 receptory VEGFR-1 (Flt-1) a VEGFR-2 (Flk-1/KDR), aktivuje receptorovou tyrosinkinasu (RTK) a indukuje angiogenezi
- VEGF a jeho receptory jsou často nadexprimovány u nádorů, proto byla angiogeneze navržena jako cíl zásahu protinádorové terapie navržena Folkmanem a kol. již v 70.letech
- VEGFR-2 je selektivně exprimován na nádorových endoteliálních buňkách, současně v přímém kontaktu s krví ⇒ slibný terapeutický cíl
- protilátky proti izoformě Flk-1 antagonizovaly vazbu VEGF na receptor, přenos signálu prostřednictvím VEGFR-2 a VEGF indukovaný růst endoteliálních buněk ⇒ antiangiogenní, antitumorová, antimetastatická aktivita
- klinické zkoušení: 2. fáze na kolorektální karcinom

## bevacizumab

Avastin®

- chimévní
- inhibitor angiogeneze
- protilátka proti vaskulárnímu endoteliálnímu růstovému faktoru (VEGF)
- bevacizumab r. 2004 povolen v USA jako LČ metastazujícího kolorektálního karcinomu v kombinaci s fluorouracilem; později i proti nádoru plic nevycházejícímu z malých buněk (2006) a nádoru prsu (2008)
- účinnost, samostatně nebo v kombinacích, prokázána u řady dalších nádorů včetně neuroendokrinních (nádory vycházející z nervového a hormonálního systému, mohou být funkční (sekreční) nebo nefunkční, funkční se obvykle symptomaticky léčí analogy somatostatinu; v metastazujícím stadiu špatně odpovídají na chemoterapii)



## **cetuximab**

Erbitux®

- chimévní
- blokuje receptory pro epidermální růstový faktor (EGFR)
- rodina receptorů pro epidermální růstový faktor zahrnuje 4 strukturně velmi podobné receptory: Erb/HER (EGFR; HER-1, a ERBB1), humánní EGFR-2 (HER-2 and ERBB2), HER-3, a HER-4, transmembránové glycoproteiny obsahující doménu vážící extracelulární ligand a intracelulární receptorovou tyrozinasovou (RTK) doménu
- dysregulace cesty Erb/HER nadexpresí nebo konstitutivní aktivací může spustit nádorový proces včetně angiogeneze a metastazování a u mnoha typů lidských nádorů má špatnou prognózu
- cetuximab povolen FDA i EMA k terapii metastazujícího kolorektálního karcinomu, exprimujících EGFR

## etaracizumab

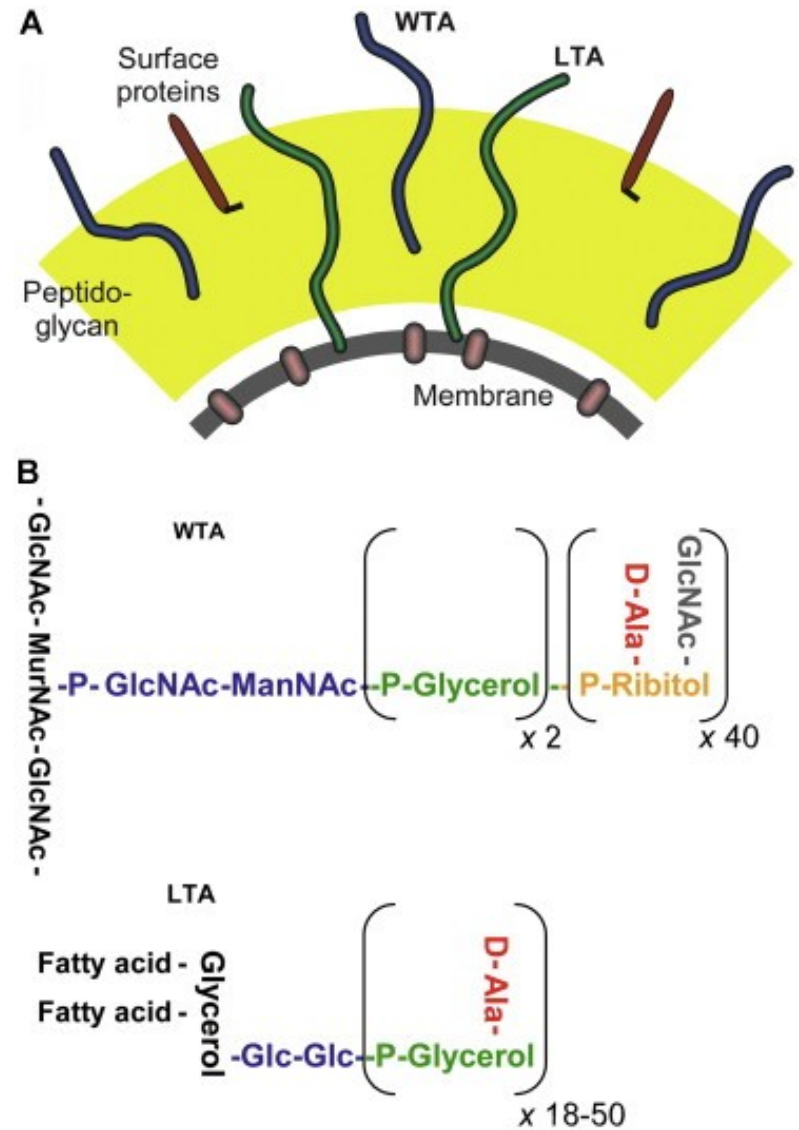
Abegrin<sup>®</sup>

- humanizovaná
- proti  $\alpha_v\beta_3$  integrinu
- integriny: rodina receptorů na povrchu buňky zodpovědných za výměnu informací mezi buňkami a extracelulární matrix, která je obklopuje (ECM)
- heterodimery složené z 1 – 10  $\alpha$ -podjednotek a 1 z 8  $\beta$ -podjednotek
- každý subtyp má specifitu pro jiný protein ECM
- jako odpověď na navázání složek ECM, jako jsou kolagen, fibronectin nebo vitronectin, jsou v buňce generovány signály, které ovlivňují růst, schopnost migrace, diferenciaci, invazivitu a přežívání buňky
- hrají důležitou roli v biologii tumoru; použitelný cíl protinádorové terapie
- $\alpha_v\beta_3$  integriny jsou exprimovány více v cévách, které se vyvíjejí, než v „dospělých“, a jsou považovány za významný faktor angiogeneze
- primárním ligandem vitronectin, reagují též s fibronectinem a trombospondinem
- prokázána souvislost  $\alpha_v\beta_3$  mj. s vaskulárním endoteliálním růstovým faktorem (VEGF)
- podání myší monoklonální protilátky proti  $\alpha_v\beta_3$  (LM609) přerušilo angiogenezi na kuřecí chorioalantoické membráně, vyvolanou nádorem
- v dalších studiích potvrzena schopnost zastavovat vaskularizaci nádoru a způsobovat jeho regresi bez poškození normálních zralých cév na myších modelech různých nádorů *in vitro*
- etaracizumab** je plně humanizovaná forma
- byla prokázána exprese  $\alpha_v\beta_3$  u ovariálního karcinomu myši *in vivo* a současně účinnost etanerceptu vůči němu

## Antibakteriální látky

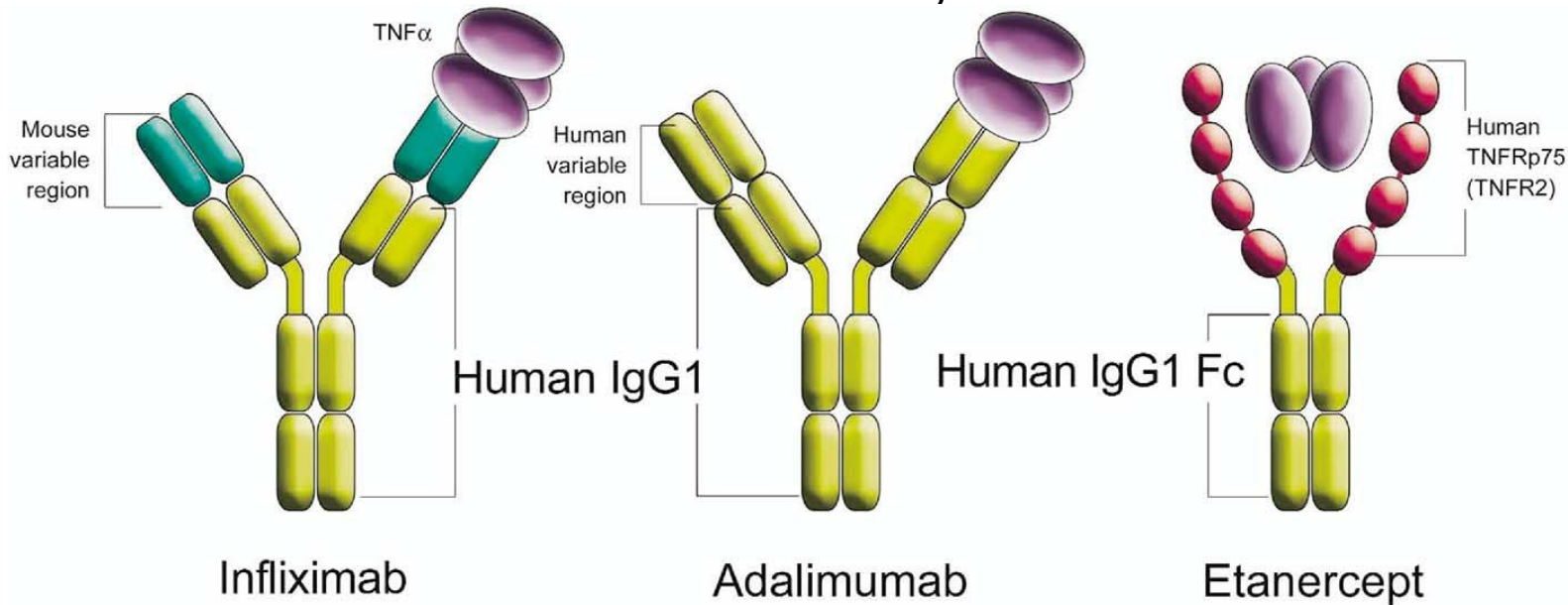
### **pagibaximab** syn. BSYX-A110

- chimérní
- proti stafylokokové lipoteichové kyselině (LTA) – důležité složce buněčné stěny stafylokoků; LTA je zakotvena v buněčné membráně svým lipofilním koncem, inhibuje fagocytózu bakterií *in vitro*, indukuje kaskádu cytokinů a zdá se být nezbytná pro přežívání stafylokoků, též napomáhá průniku stafylokoků přes hematoencefalickou bariéru
- prevence stafylokokové sepse u nedonošených novorozenců s velmi nízkou porodní váhou – účinnost ověřena zaslepenou klinickou studií



## Léčiva chronických zánětlivých onemocnění

### Inhibitory TNF- $\alpha$



„Anti-TNF molekuly“ - váží se na TNF a neutralizují jeho aktivitu

**Infliximab**: myší/humánní chiméra, kde jsou variabilní oblasti myší protilátky napojeny na konstantní oblasti lidského IgG1

**Adalimumab**: (rekombinantní) humánní protilátka typu IgG1

**Golimumab** (Simponi ®): rekombinantní humánní protilátka typu IgG<sub>1</sub>, vyráběná myší hybridomovou buněčnou kulturou

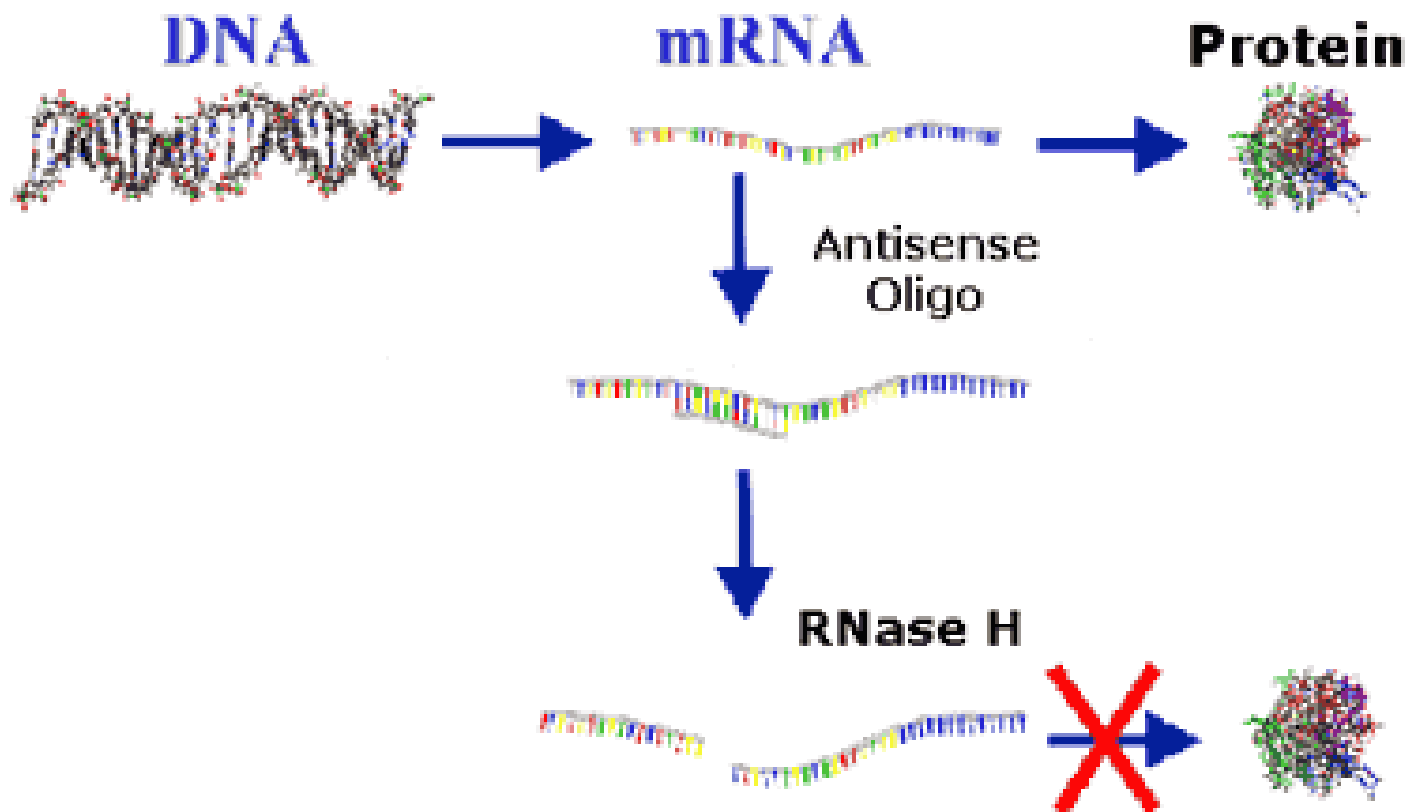
**Certolizumab pegol** (Cimzia ®): rekombinantní, humanizovaný Fab' fragment protilátky proti TNF exprimovaný na *Escherichia coli* a konjugovaný s polyoxoethylenovým (PEG) řetězcem.

**Etanercept**: rozpustný dimerní fúzní protein, v němž je humánní p75 TNF receptor napojen na Fc doménu humánního IgG1

Použití: terapie reumatoidní artritidy, zánětlivých střevních (ulcerativní kolitida, Crohnova choroba...) a dalších zánětlivých onemocnění

## Příklady konkrétních bioléciv: antisense oligonukleotidy

- zpravidla krátké komplementární řetězce modifikované RNA, jež mají vazbou na RNA či DNA zabránit translaci vadné nebo nežádoucí sekvence

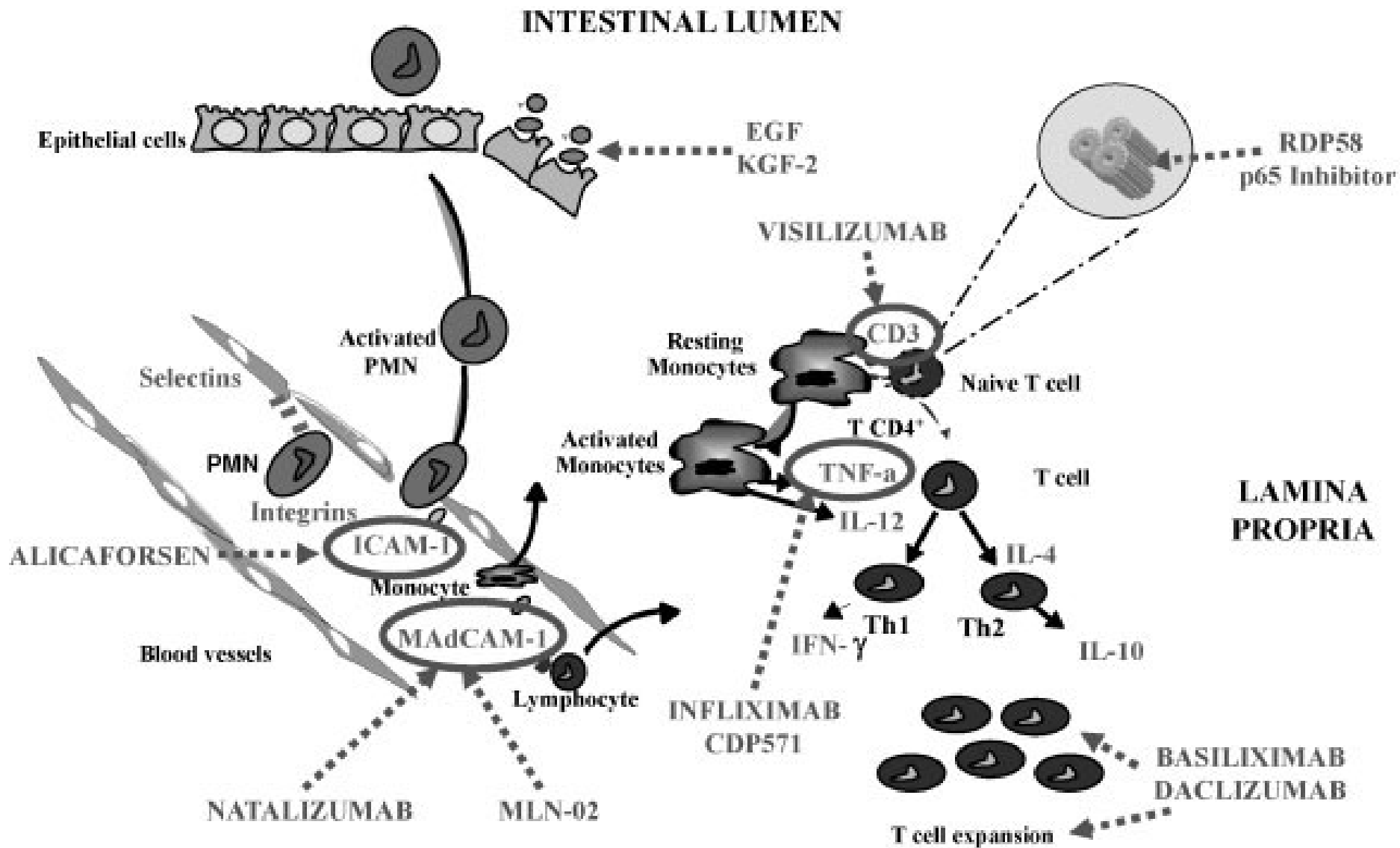


Příklady použití modifikovaných antisense oligonukleotidů:

### Inhibitory intercelulární adhezní molekuly (ICAM)

Ulcerativní kolitida = chronické relapsující zánětlivé onemocnění mukosní vrstvy střeva

- idiopatická = etiologie neznámá
- převládá přesvědčení, že patogeneze je multifaktoriální a zahrnuje genetické, environmentální a imunologické faktory
- chronický zánět se projevuje zejména díky dysregulaci adaptivního imunitního systému, která vede ke změně tolerance ke střevním bakteriím a k anomální odpovědi na normální lumenální mikroflóru  $\Rightarrow$  imunologická nerovnováha  $\Rightarrow$   $\uparrow$  produkce zánětlivých cytokinů a **adhesních molekul** (např. ICAM),  $\uparrow$  aktivace polymorfonukleárních monocytů (PMN); jejich migrace do střeva a interakce s epitelem ovlivňuje funkci epitelu od bariérové až po hospodaření s elektrolyty



Mechanismus vzniku ulcerativní kolitidy, biomolekuly v něm zapojené a místa účinku (terapeutické cíle) vybraných bioléciv

**ICAM-1** intercelulární adhezní molekula 1  
 MadCAM mukózní adresná adhezní molekula  
 IFN interferon  
 IL interleukin

EGF epidermální růstový faktor  
 PMN – polymorfonukleární monocyt

# Alicaforsen

syn. ISIS 2302

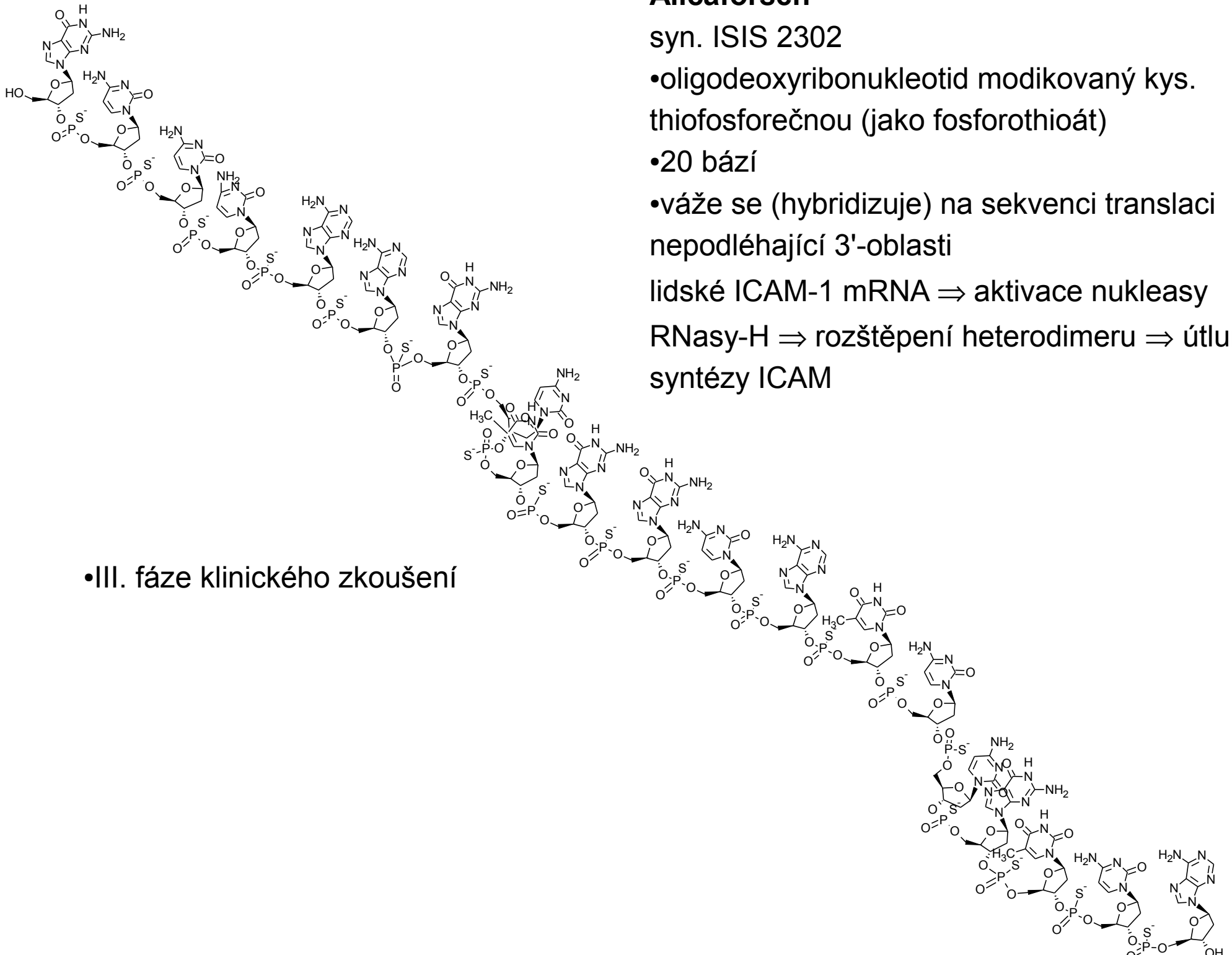
- oligodeoxyribonukleotid modifikovaný kys. thiofosforečnou (jako fosforothioát)

- 20 bází

- váže se (hybridizuje) na sekvenci translaci nepodléhající 3'-oblasti

lidské ICAM-1 mRNA  $\Rightarrow$  aktivace nukleasy

RNasy-H  $\Rightarrow$  rozštěpení heterodimeru  $\Rightarrow$  útlum syntézy ICAM



- III. fáze klinického zkušení



Příklady použití modifikovaných antisense oligonukleotidů: [antineoplastika](#)

### Antagonista onkogenu Bcl-2

- Bcl-2: antiapoptický protein; jeho převaha nad strukturně příbuzným proapoptickým Bax představuje u nádorů špatnou odpověď na obvyklé protinádorové terapie a špatnou prognózu

**oblimersen**, G3139, augmerosen, Genasense<sup>®</sup>

- deoxyribonukleotid, 18 nukleotidů, fosforthoát, heptadekasodná sůl
- T-C-T-C-C-C-A-G-C-G-T-G-C-G-C-C-A-T
- komplementární k prvním šesti kodónům humánní Bcl-2 mRNA
- podání i.v. infúzí
- v 1. - 3. fázi klinického zkoušení proti různým typům nádorů; účinný; rel. nízká toxicita

Nevýhody bioléciv (kromě NÚ obecně stejných jako u malých molekul)

- **imunogenicita** – indukce tvorby protilátek proti léčivu
- HAMA – human anti-mouse antibodies – humánní protimyšší protilátky – tvoří se proti myším peptidickým sekvencím v chimérních biolécivech
- HAHA – human anti-human antibodies – humánní protihumánní protilátky – tvoří se proti plně humánním protilátkám nebo jiným biolécivům, vážou se na unikátní vazebné místo, na němž je imunitní systém netoleruje
- neutralizující × neneutralizující; jsou-li neutralizující, snižují účinnost léčby
- vývoj protilátek proti léčivům (např. látkám působícím proti TNF) závisí též na přítomnosti infekce
- **vysoká cena**
- **mnohdy nedostatečně garantovaná účinnost a bezpečnost**
- **špatná biologická dostupnost vyžadující speciální způsoby aplikace**