

WŁAŚCIWOŚCI LECZNICZE I BEZPIECZEŃSTWO STOSOWANIA LEKÓW REKOMBINOWANYCH

mgr Jolanta RODZIEWICZ

Redakcja „Czasopisma Aptekarskiego” w Warszawie
e-mail: cza@cza.pl

Medical properties and the application safety of recombinant medicines

Streszczenie. Preparaty lecznicze najnowszej generacji, nazywane lekami rekombinowanymi, na rynku farmaceutycznym pojawiły się na początku XXI wieku i spowodowały prawdziwy przełom w medycynie, zmieniając radykalnie skuteczność terapii wielu dotąd nieuleczalnych, genetycznych i nie tylko, chorób. Określenie „leki rekombinowane” oznacza, że w odróżnieniu od tzw. leków chemicznych, uzyskiwanych w drodze syntezy chemicznej lub chemicznej modyfikacji substancji pochodzenia naturalnego, które zazwyczaj nie są wytwarzane przez organizm, powstają one w drodze procesów biotechnologicznych, przy użyciu metod inżynierii genetycznej. W ich efekcie powstają rekombinanty białkowe – kopie endogennych, aktywnych biologicznie białek, jak np. hormony, przeciwciała, szczepionki, środki diagnostyczne. Obecnie w wyniku fragmentacji i łączenia nici DNA pochodzących od kilku różnych organizmów, dzięki technologii rekombinowanego DNA, uzyskiwane są białka wykorzystywane w leczeniu nowotworów, alergii, chorób autoimmunologicznych i neurologicznych, chorób krwi, infekcji czy chorób genetycznych.

Słowa kluczowe: *biofarmaceutyki, czynnik rekombinowany, hemofilia, inżynieria genetyczna, leki biologiczne, leki biotechnologiczne, lek monoklonalny, lek rekombinowany, przeciwciała monoklonalne, układ immunologiczny, zastosowanie terapeutyczne.*

Summary. The newest generation of medicinal products – called recombinant medicines – appeared on the pharmaceutical market at the beginning of the 21st century, and caused a real breakthrough in medicine, radically changing the efficiency of therapies for many diseases which, until then, had been incurable. The term „recombinant medicines” refers to those medicines that – apart from so-called chemical medicines, which are obtained either via chemical synthesis or via chemical modification of natural substances that usually cannot be produced by an organism – are made via a biotechnological process, using engineering methods. As a result, the recombinant proteins are created-copies of endogenic, biologically active proteins such as hormones, antibodies, vaccines, and diagnostics. Currently, by the fragmentation and connection of DNA threads – which come from a few different organisms – and owing to recombinant DNA technology, we can receive the proteins which are used in the treatment of cancer, allergy, autoimmune and neurological diseases, blood related diseases, infections or genetic disorders.

Keywords: *biopharmaceutics, haemophilia, recombinant factor, genetic engineering, biological medicines, biotechnological medicines, monoclonal medicine, recombinant medicine, monoclonal antibodies, therapeutic use.*

WSTĘP

Do końca ubiegłego wieku na światowym rynku farmaceutycznym dominowały leki chemiczne uzyskiwane w drodze syntezy

chemicznej lub chemicznej modyfikacji substancji pochodzenia naturalnego (zazwyczaj substancje te nie są wytwarzane przez organizm). Z początkiem XXI wieku, wraz z nadejściem metod inżynierii



- genetycznej i wykorzystaniem biotechnologii w przemyśle farmaceutycznym, rozpoczęła się era leków biologicznych i stosującej je terapii biologicznej.

Leki biologiczne to grupa leków ściśle związanych z cząsteczkami biologicznie czynnymi, naturalnie występującymi w organizmie człowieka, działających przez wpływ na mechanizmy przez nie mediowane.

Biotechnologia wykorzystująca inżynierię genetyczną oferuje także możliwości poprawy właściwości farmakokinetycznych i dostępności biologicznej już znanych środków leczniczych.

Rozwój inżynierii genetycznej i biologii molekularnej oraz wiedzy o procesach immunologicznych towarzyszących wielu chorobom doprowadził do stworzenia nowej generacji leków, zwanych lekami biologicznymi. Leki te stały się obecnie alternatywą w terapii wielu chorób, zwłaszcza o podłożu autoimmunologicznym, w sytuacjach, gdy zawodzą środki tradycyjne. Zająły one znaczącą pozycję w onkologii, endokrynologii, gastroenterologii i reumatologii.

Leki biologiczne to grupa leków ściśle związanych z cząsteczkami biologicznie czynnymi, naturalnie występującymi w organizmie człowieka, działających przez wpływ na mechanizmy przez nie mediowane. Mogą one naśladować funkcje prawdziwych białek ludzkich, wpływać na interakcje między różnymi biologicznie czynnymi cząsteczkami, na receptory komórkowe. Niekiedy są to cząsteczki naturalnie występujące (insulina, erytropoetyna, czynniki wzrostu), kiedy indziej substancje te są tak zaprojektowane, by wpływały na różne mechanizmy leżące u podłoża chorób (antagoniści interleukin). Są one wytwarzane metodami biotechnologicznymi przy użyciu metod inżynierii genetycznej przez komórki bakterii, grzybów, roślin lub ssaków (rekombinanty białkowe – kopie endogennych, aktywnych biologicznie białek – np. hormony, przeciwciała, szczepionki) i nazywamy je lekami biotechnologicznymi.

Główne grupy leków biologicznych to przeciwciała monoklonalne, rekombinowane białka ludzkie, leki wpływające na reakcje immunologiczne, działające wybiórczo na poziomie molekularnym na różne etapy patogenezы chorób (głównie zapalnych i nowotworowych – wybiórcze leki immunosupresyjne lub immunomodulujące).

Biotechnologia wykorzystująca inżynierię genetyczną oferuje także możliwości poprawy właściwości farmakokinetycznych i dostępności biologicznej już znanych środków leczniczych [1].

OD PENICYLINY DO BIOFARMACEUTYKÓW

W wieku XX miały miejsce dwa szczególnie ważne dla rozwoju nowoczesnej biotechnologii leków momenty, które spowodowały silny wzrost pozycji rynkowej nowoczesnych leków biotechnologicznych i rozszerzenie się możliwości ich zastosowań terapeutycznych. Pierwszy z tych momentów to rozpoczęcie w połowie lat czterdziestych XX w. wielkoprzemysłowej produkcji pierwszego antybiotyku naturalnego – penicyliny G, a w ślad za nią opracowanie nowych technologii biosyntezy kolejnych antybiotyków i innych bioproduktów. Drugi moment, który stał się początkiem ery nowoczesnej biotechnologii, to lata osiemdziesiąte – rok 1982, gdy do lecznictwa wprowadzono pierwszy lek uzyskany drogą inżynierii genetycznej – rekombinowaną ludzką insulinę, rok 1985 r., gdy zarejestrowano pierwszy rekombinowany hormon wzrostu, i rok 1986, gdy zarejestrowano dwie pierwsze rekombinowane cytokiny: interferon alfa-2a i interferon alfa-2b oraz pierwszą rekombinowaną szczepionkę przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B.

Tempo wzrostu udziału leków biotechnologicznych w wartości światowego rynku leków okazało się zawrotne: w roku 2004 szacowano go na 20%, zaś na rok 2010 przewiduje się, że będzie stanowił już 50% rynku farmaceutycznego na świecie.

Dzięki szybkiemu rozwojowi biologii molekularnej i technologii rekombinowanego DNA oraz technologii przeciwciał monoklonalnych rozpoczęto w skali przemysłowej produkcję leków o strukturze polipeptydowo-białkowej. Określa się je najczęściej mianem „biofarmaceutyków”, ale zaliczane są także do znacznie szerszej klasy leków nazywanych „biotechnologicznymi” lub „biologicznymi produktami leczniczymi” (używa się także terminów: „białka terapeutyczne” lub „terapeutyczne przeciwciała monoklonalne”, które obejmują biofarmaceutyki, czyli leki o strukturze polipeptydowo-białkowej, otrzymywane z za-

stosowaniem metod rekombinowanego DNA lub technologii przeciwciał monoklonalnych) [2].

Leki biotechnologiczne to białka wytwarzane wewnątrz żywych, wyizolowanych komórek, które dzięki swojej strukturze precyzyjnie rozpoznają właściwe miejsce w organizmie (np. konkretne receptory) i działają w sposób celowany. Aby komórka mogła wytwarzać białka lecznicze, wprowadza się do jej genomu specjalnie przygotowany łańcuch DNA, zawierający informację dotyczącą produkcjiżądanego białka. Następnie komórki są namnażane, a po uzyskaniu odpowiedniej ilości komórek rozpoczyna się faza produkcji białka. Kolejnym etapem jest oczyszczanie białka. Ostatnia faza produkcji leków biotechnologicznych, to wytworzenie stabilnej postaci farmaceutycznej. Uzyskuje się ją poprzez rozpuszczenie białka w specjalnych roztworach i schłodzenie. Ponieważ białka lecznicze po przyjęciu doustnym zostałyby zniszczone w kwaśnym soku żołądkowym, a następnie po prostu strawione, iniekcje nadal są więc podstawową drogą dostarczania leków biotechnologicznych do organizmu.

Większość biofarmaceutyków wytwarza się z użyciem rekombinowanych bakterii (głównie *Escherichia coli*) i drożdży (głównie *Saccharomyces cerevisiae*), rekombinowanych linii komórkowych organizmów wyższych oraz – w przypadku przeciwciał monoklonalnych – w hybrydowych kulturach międzygatunkowych. W skład biofarmaceutyków wchodzi rekombinowane hormony, interferony, interleukiny, hematopoetyczne czynniki wzrostu, czynnik martwicy nowotworów, czynniki krzepnięcia krwi, preparaty trombolityczne, enzymy terapeutyczne, przeciwciała monoklonalne i szczepionki, które znalazły zastosowanie w leczeniu lub zapobieganiu takich schorzeń, jak: cukrzyca, niedobór wzrostu u dzieci i osób dorosłych, zawał serca, zastoinowa niewydolność serca, udar mózgu, stwardnienie rozsiane, neutropenia, trombocytopenia, anemia, zapalenie wątroby, reumatoidalne zapalenie stawów, choroba

Crohna, astma, białaczka i wiele chorób nowotworowych.

Jako pierwsze biofarmaceutyki na światowe rynki farmaceutyczne wprowadzono rekombinowane białka o strukturze aminokwasowej, identycznej z natywnymi białkami ludzkimi, wytworzone w celu zastąpienia lub uzupełnienia niedoboru naturalnych białek. Stanowią one obecnie pierwszą generację tych leków.

W grupie drugiej generacji biofarmaceutyków jako pierwsze pojawiły się te, w których naturalne białko zostało celowo poddane modyfikacjom dotyczącym zmiany sekwencji aminokwasów, zmiany składników cukrowych (w przypadku biofarmaceutyków glikozylowanych), kowalencyjnego przyłączenia innych cząsteczek chemicznych do białek leczniczych, np. polietylenoglikolu, lub fuzji dwu- albo więcej polipeptydów.

Jednymi z pierwszych biofarmaceutyków, które zostały poddane takiemu modyfikowaniu, były insuliny i preparaty trombolityczne. Zmiany sekwencji niektórych aminokwasów (inercja, delecja lub substytucja) w łańcuchach insuliny spowodowały otrzymanie szybko- i długodziałających analogów insuliny, a w wyniku usunięcia określonych domen strukturalnych lub zastąpienia aminokwasów w trzech pozycjach w tkankowym aktywatorze plazminogenu uzyskano drugą generację trombolityków o przedłużonym okresie półtrwania. W przypadku biofarmaceutyków glikozylowanych (np. erytropoetyna, glukocerebrozydaza) zmiana ilości i jakości rozgałęzionych struktur cukrowych powoduje wydłużenie okresu półtrwania w zmodyfikowanej cząsteczce.

W ostatnich latach wprowadzono do lecznictwa formy PEG-interferonu alfa-2a i alfa-2b oraz zmodyfikowany poprzez pegylację hematopoetyczny czynnik wzrostu – filgrastim.

Do drugiej generacji biofarmaceutyków należą także białka fuzyjne (hybrydowe), stanowiące jedne z najbardziej innowacyjnych produktów inżynierii genetycznej i składające się z dwóch lub więcej natural-

*Większość biofarmaceutyków wytwarza się z użyciem rekombinowanych bakterii (głównie *Escherichia coli*) i drożdży (głównie *Saccharomyces cerevisiae*), rekombinowanych linii komórkowych organizmów wyższych oraz – w przypadku przeciwciał monoklonalnych – w hybrydowych kulturach międzygatunkowych.*



- nych białek albo fragmentów białek połączonych ze sobą bezpośrednio lub za pomocą krótkiego linkera. Łączenie białek terapeutycznych z fragmentami lub całymi przeciwciałami ma na celu uzyskanie białek fuzyjnych o ulepszonych właściwościach.

Do grupy biofarmaceutyków zaliczane są także przeciwciała monoklonalne. Przeciwciała monoklonalne I generacji to preparaty pochodzenia mysiego, otrzymane klasyczną technologią hybrydową opracowaną w 1975 roku przez biologa argentyńskiego, prof. uniwersytetu w Cambridge Cesara Milsteina i Georgesa Koehlera, immunologa niemieckiego (obaj zostali laureatami Nagrody Nobla w dziedzinie medycyny w roku 1984). Ze względu na wywoływanie reakcji alergicznych wykorzystywano je głównie w celach analitycznych i diagnostycznych. Ponadto charakteryzowały się one relatywnie krótkim okresem biologicznego półtrwania. Tylko niektóre z nich znalazły zastosowanie terapeutyczne.

Dzięki wprowadzeniu do technologii przeciwciał monoklonalnych i metod inżynierii genetycznej otrzymano humanizowane, do stosowania w medycynie, preparaty zaliczane do II generacji przeciwciał monoklonalnych, które stanowią bardzo ważną grupę leków stosowanych w onkologii i wielu chorobach o podłożu immunologicznym. Charakterystyczną cechą tego typu przeciwciał monoklonalnych jest znacząco zredukowana lub wyeliminowana immunogenność.

Najnowsza generacja biofarmaceutyków to cząsteczki nonsensowne, które mogą zaburzać proces komunikacji prowadzący do wytwarzania przez komórki niepożądanych białek. Pierwszy lek z tej grupy, oligonukleotyd nonsensowny, stosowany w leczeniu zapalenia siatkówki spowodowanego zakażeniem cytomegalowirusem (CMV) u chorych na zespół nabytego niedoboru odporności, zarejestrowano niedawno w Stanach Zjednoczonych [2].

Dużym wyzwaniem i przyszłością dla terapii biologicznej z udziałem biofarmaceutyków jest grupa chorób o podłożu zapalnym, w powstawaniu których uczestniczy

układ immunologiczny. Charakteryzują się one zaburzeniami immunologicznymi, przewlekłym procesem zapalnym i uszkodzeniem tkanek. Ponieważ choroby zapalne dotyczą wielu układów, takich jak pokarmowy, krążenia, kostno-stawowy, nerwowy, oddechowy czy skóra, różnią się one obrazem klinicznym, mają natomiast wspólne szlaki molekularne powstałe wskutek nieprawidłowego lub nadmiernego wytwarzania cytokin. Do grupy cytokin prozapalnych należą m.in. TNF-alfa, IL-1 i IL-6 uczestniczące w wielu typach schorzeń o podłożu zapalnym. Dlatego celowe było wprowadzenie do terapii leków ingerujących w poziom cytokin, w tym preparatów uzyskanych drogą rekombinacji DNA i technik przeciwciał monoklonalnych.

Biofarmaceutyki blokujące czynnik martwicy nowotworów TNF-alfa i interleukinę-1 (IL-1), które wprowadzono do leczenia w końcu lat dziewięćdziesiątych, stanowią przełom w hamowaniu postępu reumatoidalnego zapalenia stawów. W latach 2000-2003 dla preparatów etanercept, infliximab i adalimumab rozszerzono wskazania terapeutyczne o nieswoistą chorobą zapalną jelita – chorobę Leśniowskiego-Crohna, w której dochodzi m.in. do zaburzenia równowagi pomiędzy aktywnością cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych, oraz o leczenie łuszczycy.

Niezwykle ważnym celem terapeutycznym dla nowych biofarmaceutyków są choroby układu krążenia, takie jak miażdżycy, choroba niedokrwienna serca i przewlekła niewydolność serca. Istnieją dowody na to, że w patogenezie miażdżycy ważną rolę odgrywa proces zapalny dotyczący ściany naczyń, na którego rozwój i przebieg wpływają cytokiny prozapalne, m.in. IL-1, IL-6 i TNF-alfa. Nasilenie zmian miażdżycowych stwarza ryzyko zaostrzenia choroby niedokrwiennej, a w konsekwencji zawału serca. Także w przewlekłej niewydolności serca stwierdzono w surowicy krwi podwyższony poziom cytokin prozapalnych z grupy interleukin oraz TNF-alfa.

Na różnych etapach badań są prace oceniające skuteczność biofarmaceutyków

Dzięki wprowadzeniu do technologii przeciwciał monoklonalnych i metod inżynierii genetycznej otrzymano humanizowane, do stosowania w medycynie, preparaty zaliczane do II generacji przeciwciał monoklonalnych, które stanowią bardzo ważną grupę leków stosowanych w onkologii i wielu chorobach o podłożu immunologicznym.

blokujących działania cytokin prozapalnych (np. etanercept) i stosowanych dożylnie immunoglobulin, które poprawiają frakcję wyrzutową lewej komory serca u chorych z niedokrwioną i samoistną kardiomiopatią rozstrzeniową oraz powodują wzrost wydolności wysiłkowej chorych, w skojarzeniu ze stosowanym dotychczas standardowym leczeniem. Muszą one być potwierdzone w badaniach klinicznych przeprowadzonych w dużych grupach chorych, z twardym punktem końcowym dotyczącym śmiertelności.

Inne ważne cele terapeutyczne dla nowych preparatów biofarmaceutycznych to astma będąca schorzeniem układu oddechowego o podłożu zapalnym, stwardnienie rozsiane (z nadprodukcją TNF-alfa, IL-6, IL-12 i IL-23), gorączka u chorych przebywających na oddziałach intensywnej terapii występująca z przyczyn innych niż zakażenia, w powstaniu której odgrywają rolę cytokiny.

TRADYCYJNY LEK SYNTETYCZNY A LEK BIOTECHNOLOGICZNY

Wytwarzane na relatywnie dużą skalę (znacznie krótszy, 4-10 zamiast 14-17 lat, jest czas upływający od ich klonowania do wprowadzenia na rynek), leki biotechnologiczne stają się bardziej dostępne dla pacjenta. Rozwijający się rynek biofarmaceutyków przyniósł ogromny postęp w terapii wielu chorób: produkty te zoptymalizowały przez tysiąclecia doskonalone przez naturę, a nawet poprawione struktury i otworzyły nowe możliwości terapeutyczne, dając absolutną pewność zamierzonych w leczeniu efektów terapeutycznych oraz bezpieczeństwo stosowanych w nim produktów leczniczych [3].

Leki wytwarzane metodami biotechnologicznymi odgrywają obecnie główną rolę w farmakoterapii wielu chorób, zwłaszcza tych, w których tradycyjne leki chemiczne były nieskuteczne. Jedną z głównych dziedzin, w których stosuje się biofarmaceutyki, jest zatem onkologia. Obecnie dostępne leki biotechnologiczne uważa się za bez-

pieczne i bardzo dobrze tolerowane, a typowe dla tej grupy preparatów zawierających białka i polipeptydy reakcje immunologiczne są rzadkie.

Leki biotechnologiczne i konwencjonalne leki chemiczne różnią się fundamentalnie pod względem struktury i mechanizmów działania [1, 3]. Całkowicie odmiennie są sposoby ich wytwarzania. Leki biotechnologiczne są wytwarzane przez żywe komórki, a leki chemiczne w procesach chemicznych. Struktura cząsteczek bioleków jest w związku z tym nieporównywalnie bardziej złożona i znajduje to odzwierciedlenie w ich masie cząsteczkowej, która jest średnio 100-1000-krotnie większa. Dla porównania biofarmaceutyk, interferon b, charakteryzuje się masą cząsteczki 19 000 D, podczas gdy cząsteczka przedstawiciela leków klasycznych, kwasu acetylosalicylowego ma masę jedynie 180 D [4]. Tak różna masa cząsteczki nie jest jednak główną przyczyną ich odmienności, gdyż należy pamiętać, że złożona budowa białek stanowiących produkty farmaceutyczne jest też uwarunkowana ich strukturą (drugorzędową, trzeciorzędową oraz tzw. czwartorzędową), która wyznacza specyficzne interakcje z wieloma innymi białkami i receptorami w narządach docelowych.

Właściwości farmakodynamiczne farmaceutyków biologicznych i chemicznych zależą od ich zdolności do swoistych interakcji z procesami biologicznymi. Podczas gdy leki chemiczne wpływają na ogół na jeden lub najwyżej kilka procesów (zazwyczaj reakcji enzymatycznych), biofarmaceutyki wykazują znacznie bardziej złożone działanie. Przykładem jest wspomniany interferon, który oddziałuje na ekspresję ponad 40 genów. Z tych też powodów pełnego mechanizmu działania leków biologicznych w zasadzie nie można określić [5]. W przeciwieństwie do tego procesy syntezy leków chemicznych są zazwyczaj łatwe do opisanego, podobnie jak sama struktura leku, opisywana wzorem chemicznym. Ponadto w wielu przypadkach lek biologiczny w swojej postaci finalnej, czyli tej, w której jest podawany pacjentowi,

Leki biotechnologiczne są wytwarzane przez żywe komórki, a leki chemiczne w procesach chemicznych.

Leki wytwarzane metodami biotechnologicznymi odgrywają obecnie główną rolę w farmakoterapii wielu chorób, zwłaszcza tych, w których tradycyjne leki chemiczne były nieskuteczne. Jedną z głównych dziedzin, w których stosuje się biofarmaceutyki, jest zatem onkologia.



Leki biologiczne niemal zawsze podaje się parenteralnie lub wziewnie i dlatego są one bardzo wrażliwe na warunki zewnętrzne, takie jak temperatura czy nasłonecznienie, a to z kolei wymaga ścisłego przestrzegania zasad ich przechowywania.

Czynniki rekombinowane, koncentraty czynników krzepnięcia stosowane w leczeniu chorych na hemofilię, opracowano dzięki zaawansowanym technikom biologii molekularnej. Ich źródłem są przecinane i łączone nici DNA pochodzące od kilku różnych organizmów.

- ▶ nie zawiera jednej ściśle określonej cząsteczki, ale jest mieszaniną różnych izoform. Na przykład w skład preparatu czynnika wzrostu, rekombinowanej ludzkiej erytropoetyny, wchodzi wiele izoform o różnych właściwościach farmakokinetycznych [6, 7]. Ponadto leki biologiczne niemal zawsze podaje się parenteralnie lub wziewnie i dlatego są one bardzo wrażliwe na warunki zewnętrzne, takie jak temperatura czy nasłonecznienie, a to z kolei wymaga ścisłego przestrzegania zasad ich przechowywania.

REKOMBINOWANE CZYNNIKI KRZEPNIĘCIA

Jedną z dziedzin, w której znajdują zastosowanie leki rekombinowane, jest hemofilia, w leczeniu której naśladują one działanie ludzkich białek, a jednocześnie dzięki procesowi produkcji pozwalają na całkowite wyeliminowanie zagrożeń związanych z nieznanymi obecnie patogenami przenoszonymi przez krew.

Hemofilia to rzadkie, genetycznie uwarunkowane zaburzenie krzepnięcia krwi – zwane też wrodzoną skazą krwotoczną. Powoduje ją brak lub obniżenie poziomu białka osocza uczestniczącego w procesie krzepnięcia krwi. Osoby zdrowe posiadają wszystkie czynniki krzepnięcia, począwszy od I do XIII. Osoby chore na hemofilię nie mają jednego z tych czynników lub też jego poziom jest niewystarczający.

Najczęstsza postać hemofilii – hemofilia A – jest efektem zmniejszenia aktywności czynnika krzepnięcia VIII, a hemofilia B – czynnika IX. Ponieważ geny kodujące te białka są sprzężone z płcią, na hemofilię chorują przede wszystkim mężczyźni. Schorzenie ujawnia się zazwyczaj na przełomie 1. i 2. roku życia, gdy po zwykłym skaleczeniu u dziecka występuje przedłużone krwawienie.

Najbardziej charakterystycznymi objawami ciężkiej hemofilii są samoistne krwawienia do stawów, które zaczynają się między 3. i 4. rokiem życia. W ciągu roku chory może doznać od 20 do 40 takich krwawień,

co prowadzi do zwyrodnienia stawów, które to jest źródłem silnego bólu i stopniowo prowadzi do kalectwa. W hemofilii dochodzi również do krwawień do innych tkanek i narządów, jak mięśnie czy mózg, co może być groźne dla życia.

Uszkodzenie stawów powodowane powtarzającymi się krwawieniami do stawów, zwane artropatią hemofilową, jest jednym z najbardziej wyniszczających i kosztownych następstw hemofilii. Może ono prowadzić do długotrwałego procesu zapalnego oraz pogorszenia funkcji stawów, a w końcu do utraty jego ruchomości.

Historycznym krokiem w kierunku zapewnienia pacjentom bezpiecznej terapii i uchronienia ich przed zakażeniami przenoszonymi drogą krwiopochodną było opracowanie pierwszych osoczo pochodnych koncentratów czynników krzepnięcia, lecz mimo ogromnego postępu w zakresie produkcji oraz inaktywacji wirusów, bezpieczeństwo ich stosowania okazało się niepełne. Przez niemal dwadzieścia lat poszukiwano więc kolejnej generacji rekombinowanego czynnika VIII tworzonego z myślą o całkowitym uniezależnieniu produkcji tej cząsteczki od białek ludzkich i zwierzęcych. Rekombinowane czynniki krzepnięcia VIII i IX trzeciej generacji wprowadzono na rynek na początku XXI wieku.

Czynniki rekombinowane, koncentraty czynników krzepnięcia stosowane w leczeniu chorych na hemofilię, opracowano dzięki zaawansowanym technikom biologii molekularnej. Ich źródłem są przecinane i łączone nici DNA pochodzące od kilku różnych organizmów. W czynnیکach rekombinowanych gen ludzkiego czynnika krzepnięcia wprowadzono do komórek zwierzęcych i za ich pośrednictwem produkowany jest ludzki czynnik krzepnięcia. Czynniki rekombinowane nie są produkowane z krwi. Koncentraty rekombinowane są bardzo starannie przebadane, a ich wysoka jakość stale doskonała. Produkty trzeciej generacji są całkowicie wolne od patogenów, które mogłyby zawierać krew.

Chociaż w przypadku koncentratów re-

kombinowanych źródłem czynników krzepnięcia nie jest krew, otrzymywany czynnik krzepnięcia jest prawie identyczny z naturalnym. Proces naturalny i proces produkcji czynników rekombinowanych wykorzystuje te same lub trochę zmodyfikowane instrukcje zapisane w genie kodującym czynnik krzepnięcia.

Obecnie produkty rekombinowane stosowane w hemofilii dzielimy na:

- produkty pierwszej generacji (np. Recombinate), które nie są wytwarzane z krwi ludzkiej, ale w procesie produkcji oraz dla stabilizacji końcowego produktu wykorzystano niektóre proteiny ludzkie – albuminy, surowicę ludzką),
- produkty rekombinowane drugiej generacji stabilizowane cukrami zamiast albuminy ludzkiej (np. czynnik IX BeneFIX, produkowany bez krwi czy też innych produktów krwiopochodnych, zbliżony do produktów pierwszej generacji, ale w końcowej fazie jego produkcji nie są dodawane albuminy ludzkie),
- produkty trzeciej generacji (np. Advate w trakcie procesu produkcyjnego i w końcowym produkcie nie ma dodawanych protein ludzkich lub zwierzęcych).

Produkty trzeciej generacji powstały dlatego, że dodawanie protein ludzkich i zwierzęcych niesło ryzyko zanieczyszczenia produktu końcowego. Aby całkowicie je wyeliminować, wprowadzono modyfikacje technologii wytwarzania czynników rekombinowanych. Dodatkowo dla produktu trzeciej generacji Advate zastosowano wysoce skuteczną metodę eliminacji wirusów. Advate okazał się produktem, który nie wywołuje prawie żadnych reakcji alergicznych i jest bardzo dobrze tolerowany przez chorych na hemofilię. Badania wykazały bardzo rzadkie występowanie inhibitora czynnika krzepnięcia w wyniku stosowania tego leku.

Synteza rekombinowanego czynnika krzepnięcia VIII odbywa się w komórkach jajnika lub komórkach nerki zarodka chomika chińskiego. Oba rodzaje komórek są wykorzystywane do wytworzenia różnych

rekombinowanych białek od wielu lat (m.in. erytropoetyny, interferonu). Komórki chomika chińskiego pozwalają na modyfikację genów czynnika VIII, a przede wszystkim nie przenoszą ludzkich wirusów. Jedną pobraną komórkę powiela się na skalę produkcyjną.

Geny ludzkie, które są odpowiedzialne za produkcję czynnika VIII, naukowcy dołączają do genetycznie zmienionego wirusowego DNA. W wyniku działań inżynierii genetycznej specjalny odcinek DNA ulega otwarciu za pomocą enzymu, a następnie do łańcucha DNA wbudowywana jest kopia genu kodującego czynnik krzepnięcia VIII, po czym łańcuch DNA jest zamykany. Taką hybrydę nazywamy wektorem. Wektor przenosi gen ludzkiego czynnika krzepnięcia do komórek zwierzęcych. Tak przygotowane komórki zwierzęce są umieszczane w dużym zbiorniku z płynem, tzw. medium, który zawiera substancje odżywcze potrzebne dla rozwoju linii tkankowych.

Rekombinowany czynnik VIII jest wydzielany z komórek do podłoża hodowlanego, a następnie ekstrahowany metodą chromatograficzną. Produkt umieszczany jest w zamrażarce (-60°C), a kolejne kroki to finalna formuacja i dodanie syntetycznych substancji stabilizujących. Na zakończenie procesu produkcji czynnik trafia do opakowań, poddawany jest procesowi liofilizacji i etykietowania.

Ludzkie i zwierzęce białka dotychczas stosowane w celu wzbogacenia podłoża hodowlanego oraz ludzka albumina, która pełniła rolę stabilizatora końcowego produktu, były potencjalnym źródłem zakażenia chorobami, których dziś jeszcze nie potrafimy rozpoznać. Chodzi tu głównie o takie wirusy, których dotąd jeszcze nie znamy, oraz o wirusy bezotoczkowe i priony. Aby całkowicie wyeliminować to ryzyko, w technologii wytwarzania czynników rekombinowanych zastąpiono białka zwierzęce roślinnymi. Do czasu rejestracji w 2003 roku rekombinowanego czynnika krzepnięcia VIII produkowanego bez kontaktu oraz niezawierającego białek pochodzenia ludzkiego lub zwierzęcego

Geny ludzkie, które są odpowiedzialne za produkcję czynnika VIII, naukowcy dołączają do genetycznie zmienionego wirusowego DNA.

Produkty trzeciej generacji powstały dlatego, że dodawanie protein ludzkich i zwierzęcych niesło ryzyko zanieczyszczenia produktu końcowego. Aby całkowicie je wyeliminować, wprowadzono modyfikacje technologii wytwarzania czynników rekombinowanych.



Wiele krajów z uwagi na ryzyko zakażeń i związane z nimi dodatkowe koszty leczenia postanowiło zapewnić wszystkim pacjentom chorym na hemofilię dostęp do preparatów rekombinowanych.

W polskich zaleceniach postępowania we wrodzonych skazach krwotocznych oraz europejskich zasadach opieki nad chorymi na hemofilię podkreślono bezpieczeństwo koncentratów rekombinowanych i zasugerowano stosowanie tych leków w leczeniu hemofilii.

- ▶ w procesie oczyszczania wszystkich rekombinowanych czynników krzepnięcia VIII używano przeciwciał monoklonalnych pochodzących z mysich linii komórkowych. Z uwagi jednak na możliwość przenoszenia nieznanymi współcześnie czynników chorobotwórczych, w najnowszych lekach wykorzystuje się wyłącznie syntetyczne aminokwasy.

Od połowy lat osiemdziesiątych oprócz rutynowych testów krwi czynniki krzepnięcia poddawane są skomplikowanym procedurom oczyszczającym za pomocą przeciwciał monoklonalnych, nanofiltracji oraz procesowi inaktywacji wirusów (pasteryzacja, metoda rozpuszczalnik/detergent). Rezultaty takich procedur bezpieczeństwa stosowanych wobec preparatów krwiopochodnych są pozytywne: od prawie 20 lat na całym świecie wśród chorych na hemofilię nie wykryto przypadku infekcji wirusem HIV [3, 4, 7, 11, 13].

Zalety leków rekombinowanych w porównaniu do leków osoczopochodnych to:

- znaczne obniżenie ryzyka a w przypadku czynników krzepnięcia produkowanych bez kontaktu oraz niezawierających białek pochodzenia ludzkiego czy zwierzęcego całkowita (do zera) likwidacja ryzyka przeniesienia nawet nieznanymi współcześnie czynników chorobotwórczych,
- łatwiejsza dostępność (nie wymagają pozyskiwania osocza).

Rekombinowane czynniki krzepnięcia są jednak w podobnym do osoczopochodnych czynników procencie obarczone ryzykiem wystąpienia inhibitora, czyli niekorzystnego zjawiska powstawania alloprzeciwciał przeciwko podawanemu czynnikowi u wcześniej leczonych pacjentów. Mniejsza jest także objętość infuzyjna preparatów rekombinowanych niż preparatów otrzymywanych z krwi [4, 9, 13].

W zaleceniach postępowania obowiązujących w wielu krajach rekombinowane czynniki krzepnięcia VIII i IX uznawane są za leki z wyboru odpowiednio w hemofilii A i B. Kanada jako pierwsza wprowadziła takie zalecenia już w 1999 roku. W 2003 ro-

ku, jako standard, przyjęła to Wielka Brytania, a USA w 2006 r. Rok później zalecenia takie ogłosiła rada naukowa powołana przez kraje bałtyckie: Litwę, Łotwę i Estonię. W Hiszpanii podobne wytyczne przyjęto w 2008 roku, podobnie jak w Polsce.

Wiele krajów z uwagi na ryzyko zakażeń i związane z nimi dodatkowe koszty leczenia postanowiło zapewnić wszystkim pacjentom chorym na hemofilię dostęp do preparatów rekombinowanych (Anglia, Irlandia, Dania, Szkocja, Kanada), a w większości krajów „starej” Unii Europejskiej rekombinowany czynnik VIII już w 2003 r. stanowił 50-80% ogólnego zużycia koncentratów czynnika VIII (Szwecja, Niemcy, Holandia, Anglia, Francja, Belgia, Norwegia, Włochy, Szwajcaria, Portugalia, Austria, Grecja). Ekspertki podkreślają, że w sytuacji ograniczonych środków finansowych pierwszeństwo w dostępie do koncentratów rekombinowanych należy przyznać pacjentom uprzednio nieleczonym, w drugiej kolejności pacjentom, którzy nie zostali zakażeni wirusami HIV ani HCV, następnie pacjentom HIV-dodatnim, a w ostatniej kolejności zakażonym wirusem HCV.

W polskich zaleceniach postępowania we wrodzonych skazach krwotocznych oraz europejskich zasadach opieki nad chorymi na hemofilię podkreślono bezpieczeństwo koncentratów rekombinowanych i zasugerowano stosowanie tych leków w leczeniu hemofilii. Upowszechnienie nowoczesnych leków rekombinowanych zapewne wpłynie również na koszt ich wytwarzania, co pozwoli wkrótce udostępnić leki rekombinowane wszystkim zainteresowanym [3, 5, 6, 11, 13].

PODSUMOWANIE

Biotechnologia i wytwarzane dzięki jej osiągnięciom leki są dzisiaj powszechnie stosowane niemal we wszystkich dziedzinach medycyny. Biofarmaceutyki stworzyły bowiem możliwości, jakich nie dawały tradycyjne leki chemiczne. Wygasanie ochrony patentowej na wiele bioleków spowoduje pojawienie się w najbliższych latach wie-

lu preparatów biopodobnych, które stwarzają alternatywy leczenia wielu chorób, pod warunkiem, że zasady ich rejestracji, oznaczania i monitorowania działań niepożądanych będą ściśle przestrzegane. Wymaga to jednak wprowadzenia szczegółowych i jednoznacznych uregulowań prawnych. By zapewnić pacjentom bezpieczeństwo i skuteczność leczenia biofarmaceutykami, lekarze i farmaceuci muszą mieć świadomość istotnych różnic, jakie występują w przypadku generyków leków chemicznych i produktów biopodobnych.

Adres do korespondencji:

Redakcja
„Czasopisma Aptekarskiego”
ul. Obarowska 23/2
04-337 Warszawa
tel. 022 879 98 69

12. Kaliszan R.: *Biotechnologia farmaceutyczna: nowe sposoby terapii skutecznej i bezpiecznej*, Czosopismo Aptekarskie nr 8-9, 2009.
13. Moskała M., Polak J., Chruściel M., Fenikowski D.: *Zastosowanie rekombinowanego aktywowanego czynnika VII w leczeniu krwotoku z części nosowej gardła u chorego z rozległym urazem czołowo-podstawnym*. *Neurol. Neurochirur. Pol.* 2004; 38.

Piśmiennictwo:

1. Kaliszan R.: *Fascynująca farmacja XXI wieku*, wykład w PAN, 2008.
2. Jarecka M., Borowicz P.: *Terapeutyczne i rynkowe perspektywy rekombinowanych leków*, *Biotechnologia*, 2005, 4(71), 7-27.
3. Białik W.: *Leki biotechnologiczne – możliwości i zagrożenia*, materiał z prezentacji na konferencji prasowej na temat leków rekombinowanych w Warszawie, 2009.
4. Zdziarska J., Chojnowski K., Klukowska A., Łętowska M., Mital A., Podolak-Dawidziak M., Windyga J., Zawilska K.: *Właściwości lecznicze i bezpieczeństwo rekombinowanych preparatów czynnika VIII i IX krzepnięcia*. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 2009, 119(6).
5. Windyga J.: *Skazy krwotoczne*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2006.
6. *Europejskie zasady opieki nad chorymi na hemofilię*, przedruk z czasopisma World Federation of Hemophilia „Haemophilia”, 2008, nr 14, 361-374.
7. Łopaciuk S.: *Zaburzenia krzepnięcia krwi*. [w:] *Interna*, red. Janicki K., PZWL, Warszawa 1992.
8. Kayser O., Müller H.m (red.): *Biotechnologia farmaceutyczna*, PZWL, Warszawa 2000.
9. Walsh G.: *New Drugs*, 2002, 2, 26-32.
10. Steinberg F.M., Raso J.: *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 1998, 1, 48-59.
11. Nowicki M., Zimmer-Nowicka J.: *Biofarmaceutyki oryginalne i leki biopodobne – co należy o nich wiedzieć, aby zapewnić bezpieczne leczenie?* *Onkologia w Praktyce Klinicznej*, 2007, tom 3, nr 3, 120-127.