

# Leki biopodobne

## Badania przedkliniczne *in vitro*

**STRESZCZENIE** | Szacuje się, że do 2015 r. światowy rynek leków biologicznych osiągnie wartość blisko 170 mld dolarów. Biorąc pod uwagę fakt, że terapie oparte na lekach biologicznych są zwykle bardzo kosztowne, na świecie rośnie zainteresowanie ich potencjalnie tańszymi odpowiednikami, tzw. lekami biopodobnymi. Zainteresowanie to stymulowane jest zarówno przez potencjalnych producentów leków biopodobnych, jak i przez rządy państw, w szczególności USA, których strategicznym celem jest obniżenie kosztów terapii. W artykule przedstawiono zarys wymagań agencji regulacyjnych w zakresie badań porównawczych *in vitro* leków biopodobnych na etapie przedklinicznym.

**SŁOWA KLUCZOWE** |

leki biopodobne, badania przedkliniczne, farmakodynamika

**SUMMARY** | It is estimated that by 2015 the world biological drugs market will be worth nearly \$ 170 bn. For the reason that a therapy based on biological drugs is usually high-priced, an increasing attention is being paid to the potentially cheaper equivalent versions of biological drugs, so called biosimilars. This increasing interest is inspired both by the prospective biosimilar medicinal products drug makers, as well as by the governments, particularly the US administration, whose strategic goal is to decrease the cost of such treatment. In this paper a regulatory view on comparative studies of biosimilar medicinal products at the preclinical *in vitro* phase is presented.

**KEY WORDS** | biosimilars, preclinical studies, pharmacodynamics

dr Jan Smagur, dr Robert Królicki

BIOCENTRUM SP. Z O.O., GRUPA SELVITA SA

**Leki biologiczne** (biofarmaceutyki) definiuje się jako farmaceutyki wyprodukowane metodami biotechnologicznymi z wykorzystaniem żywych organizmów lub ich aktywnych składników (w tym sekwencji białek/genów). Zgodnie z wyżej wymienioną definicją w skład leków biologicznych wchodzi: przeciwciała monoklonalne, białka rekombinowane, szczepionki oraz produkty pochodzenia komórkowego (składniki osocza/surowicy, hodowle komórkowe lub tkankowe). Leki biologiczne pod wieloma względami zdecydowanie różnią się od standardowych leków pochodzenia chemicznego. Podstawową różnicą jest rozmiar. Częsteczki leków biologicznych są zdecydowanie większe niż cząsteczki chemiczne, a co za tym idzie – charakteryzują się złożoną strukturą oraz różnorodnością (heterogenność). Dodatkowo, ze względu na złożoną strukturę trójwymiarową, leki biologiczne najczęściej podawane są doustnie, podczas gdy leki małowczątkowe – w postaci form doustnych.

Charakterystyczną grupą leków biologicznych są **leki biopodobne**, zwane także **biogenerykami**. Według wytycznych Europejskiej Agencji Leków (EMA) leki biopodobne to leki biologicznie podobne do leku już zarejestrowanego i dopuszczonego do obrotu. Produkty biopodobne, należące do leków biologicznych, podlegają innym regulacjom niż leki oparte na syntezie chemicznej, z uwagi na złożoność ich struktury i produkcję w żywych komórkach. Podczas gdy substancja czynna tradycyjnych leków generycznych stanowi dokładną kopię substancji czynnej leków oryginalnych (jest to po prostu ta sama cząsteczka), w przypadku leków biopodobnych ich heterogeniczność oraz proces produkcji wykluczają sprecyzowanie jednoznacznych kryteriów identyczności. Dlatego też



badania przedkliniczne leków biopodobnych są niezbędne, ale niewystarczające do udowodnienia podobieństwa leku badanego oraz referencyjnego.

Tak jak w przypadku każdego nowego leku pochodzenia chemicznego (i niektórych generycznych), testy przedkliniczne dla produktów biopodobnych są również wymagane w procesie rejestracji biofarmaceutyków, przed przeprowadzeniem badań klinicznych. Szeroko dyskutowany, zarówno w UE, jak i USA, jest zakres badań klinicznych niezbędnych do procesu rejestracji biogeneryku. Przyjęto, że wszystkie badania i testy, związane z procesem rozwoju i wprowadzenia nowych leków biopodobnych, muszą wykazać podobieństwo w zakresie jakości, bezpieczeństwa i skuteczności do zarejestrowanego referencyjnego leku biopodobnego. Badania te są badaniami czysto porównawczymi i przeprowadza się je w celu wykrycia różnic w odpowiedzi pomiędzy podobnymi produktami biologicznymi a ich referencyjnymi odpowiednikami, a nie ich aktywności jako takiej (bezwzględnych wartości określanych parametrów). Zakres analizy zależy od rodzaju testowanych produktów medycznych i jest zaplanowany w oparciu o znajomość ich charakterystyki i aktywności. Wybrane testy mogą całkowicie różnić się



produktu, jak i dla substancji aktywnej, w celu wykazania podobieństw do produktu referencyjnego. Chociaż dobór testów może się różnić w zależności od badanej substancji czy produktu, zwykle oprócz standardowych testów, takich jak np.: wygląd, rozpuszczalność, zawartość, osmolarność, testy czystości mikrobiologicznej, dużą grupę testów stanowią badania czystości i struktury, takie jak: badanie rozkładu masowego za pomocą technik sączenia molekularnego, elektroforeza 2D, izoogniskowanie, dichroizm kołowy, mapowanie peptydowe technikami HPLC oraz LC/MS, sekwencjonowanie N-terminalne oraz C-terminalne, wreszcie badanie struktury technikami dyfrakcji rentgenowskiej czy magnetycznego rezonansu jądrowego. Na etapie badawczo-rozwojowym projektu nie jest konieczna walidacja metod analitycznych, jednak przed pierwszym badaniem klinicznym produktu wszystkie metody powinny być zwalidowane.

w przypadku rekombinowanej insuliny ludzkiej, ludzkiego hormonu wzrostu, czynników krzepnięcia, czynników wzrostu, erytropoetyn czy wreszcie najbardziej obiecujących w perspektywie kilku najbliższych lat preparatów opartych na przeciwciałach monoklonalnych.

Podstawowe porównawcze badania przedkliniczne leków biopodobnych można podzielić na dwie główne grupy, tj. analizę struktury leków badanego i referencyjnego metodami z zakresu biochemii analitycznej oraz analizę aktywności obu preparatów przy zastosowaniu badań farmakodynamicznych z zakresu biologii molekularnej i komórkowej.

Celem pierwszej grupy badań, tj. **badania opartych na metodach biochemii analitycznej**, jest porównanie leku biopodobnego z lekiem referencyjnym na poziomie identyfikacji, struktury oraz właściwości fizykochemicznych. Po raz kolejny należy podkreślić, że z uwagi na stopień skomplikowania strukturalnego leków biologicznych, w porównaniu z lekami małowcząsteczkowymi, lek biopodobny oraz referencyjny nigdy nie będą identyczne. Dopuszczalne są np. niewielkie różnice strukturalne, jednak muszą być one dokładnie przebadane. Stąd zakres testów analitycznych jest zwykle dużo szerszy niż w przypadku leków małowcząsteczkowych. W badaniach leków biopodobnych należy używać najnowocześniejszych obecnie dostępnych metod analitycznych, zarówno dla samego

Podsumowując, porównanie właściwości fizykochemicznych dla leku biopodobnego oraz referencyjnego ma na celu zbadanie składu, właściwości fizycznych, struktury pierwszorzędowej oraz struktur wyższych rzędów substancji czynnej produktu, a także badań zanieczyszczeń. Profil zanieczyszczeń produktu gotowego musi zostać oceniony w kategoriach jakościowych, jak również ilościowych. Należy także przeprowadzić badania degradacyjne, które pomogą w uzyskaniu kompletnych informacji, a także identyfikacji zanieczyszczeń produktu biopodobnego.

Drugą, o wiele bardziej obszerną i złożoną grupę testów stanowią **badania aktywności biologicznej porównywalnych preparatów technikami biologii molekularnej i komórkowej**. Zadaniem farmakodynamiki jako działu farmakologii jest określenie mechanizmu działania leku na poziomie molekularnym oraz zbadanie jego efektów fizjologicznych i biochemicznych na organizm. Badania farmakodynamiczne odpowiadają więc na pytanie, w jaki sposób badany lek wywiera efekt farmakologiczny. W zależności od struktury oraz aktywności fizjologicznej badanego leku biopodobnego badania farmakodynamiczne mogą wykorzystywać różne techniki oraz podejścia badawcze. Dobór odpowiedniego panelu farmakodynamicznych badań przedklinicznych

*in vitro* wymaga wnikliwej analizy oraz dokładnego zrozumienia mechanizmu działania badanego leku biopodobnego w układach komórkowych. **Metodami naukowymi** najczęściej używanymi w badaniach farmakodynamicznych biogeneryków są: testy wiązania radioligandu określające wiązanie leku badanego i referencyjnego przez receptory błonowe, regulacja aktywności kluczowych enzymów szlaków metabolicznych oraz regulatorowych, porównawcza analiza przekazu sygnału poprzez badanie produkcji wtórnych przekaźników oraz fosforylację kluczowych białek (autofosforylacja receptorów czy fosforylacja kinaz i czynników transkrypcyjnych) czy też badanie zmian ekspresji białek. Zdecydowana większość wymienionych testów zaliczana jest często do tzw. funkcjonalnych testów komórkowych i przeprowadzana jest na odpowiednio dobranych modelach komórkowych. Co więcej, metody i techniki badawcze z zakresu współczesnej genomiki i proteomiki, jak łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym oraz mikromacierze, mogą także być bardzo przydatne w wykrywaniu niewielkich różnic w biologicznej odpowiedzi komórek na porównywane biologiczne substancje aktywne. Ponadto, zgodnie z dyrektywami EMA, powyższe badania powinny być zgodne z wymaganiami i wytycznymi dotyczącymi testów biologicznych zawartymi w Farmakopei Europejskiej.

Należy podkreślić, iż porównawcze badania przedkliniczne leków biopodobnych mają ogromne znaczenie, gdyż decydują niejednokrotnie o ramach i zakresie badań klinicznych. Im bliższe są podobieństwo strukturalne, profile farmakodynamiczny (PD) czy wyznaczony w fazie badań *in vivo* profil farmakokinetyczny (PK) biogeneryku oraz leku referencyjnego w badaniach przedklinicznych, tym bardziej skrócony jest program badań klinicznych.

Badania kliniczne leku biopodobnego leżą poza obszarem tematycznym niniejszego artykułu, trzeba jednak podkreślić znaczenie testów immunogenności (badań reakcji układu immunologicznego pacjentów na podanie leku biopodobnego), analizy zanieczyszczeń wynikających z procesu produkcji (zawartość obcych białek i DNA) oraz konieczność ścisłego monitorowania powyższych badań w ramach programu czujności farmakologicznej. □