

ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΑΝΟΙΚΤΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΤΑ ΒΙΟΟΜΟΕΙΔΗ ΣΤΗΝ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑ

ΠΕΤΡΙΝΑ ΜΑΝΘΑΚΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ
ΣΚΟΡΙΛΑΣ ΑΝΔΡΕΑΣ, ΓΕΩΡΓΑΚΙΛΑΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία της φοιτήτριας Πετρίνας Μανθάκου που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο/η συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του/της συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του/της συγγραφέα/δημιουργού. Ο/Η συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος “Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση”, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους επιβλέποντες καθηγητές, για την καθοδήγηση και την υποστήριξή τους.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον σύζυγο μου Βαρδουνιώτη Γεώργιο και τον γιο μου Ευστάθιο, για την υποστήριξη, τη συμπαράσταση και την υπομονή τους κατά τη διάρκεια των 2 ετών που απαιτήθηκαν για την ολοκλήρωση του μεταπτυχιακού μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	iv
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ.....	v
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	ix
ABSTRACT.....	x
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 - ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΑ ΒΙΟΟΜΟΕΙΔΗ.....	4
1.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ & ΒΙΟΟΜΟΕΙΔΗ.....	4
1.2 ΒΙΟΟΜΟΕΙΔΗ vs ΓΕΝΟΣΗΜΑ.....	6
1.3 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ – ΠΟΙΟΤΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ.....	7
1.4 ΠΡΟΚΛΙΝΙΚΗ ΦΑΣΗ.....	11
1.1.1 Δοκιμή ομοιότητας.....	11
1.1.2 Δομικός χαρακτηρισμός.....	12
1.1.3 Αναλυτικές μέθοδοι για δομικό χαρακτηρισμό.....	14
1.1.4 In vitro μέθοδοι για λειτουργικό και ανοσολογικό χαρακτηρισμό....	15
1.1.5 Ανοσολογικές μελέτες.....	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΓΙΑ ΤΑ ΒΙΟΟΜΟΕΙΔΗ.....	17
2.1 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ.....	17
2.1.1 Μελέτες συγκρισιμότητας.....	17
2.1.2 Φαρμακοκινητικές / Φαρμακοδυναμικές (ΦΚ/ΦΔ) μελέτες.....	18
2.1.3 Ανοσογονικότητα.....	20
2.1.4 Περιορισμοί συγκριτικών αξιολογήσεων ανοσογονικότητας.....	22
2.1.5 Αποτελεσματικότητα – Ασφάλεια.....	23
2.2 ΠΑΡΕΚΤΑΣΗ ΕΝΔΕΙΞΕΩΝ.....	25
2.3 ΦΑΡΜΑΚΟΕΠΑΓΡΥΠΙΝΗΣΗ.....	27
2.4 ΕΝΑΛΛΑΞΙΜΟΤΗΤΑ.....	29
2.5 ΤΟ ΚΑΝΟΝΙΣΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΣΤΗΝ Ε.Ε.....	30
2.6 ΤΟ ΚΑΝΟΝΙΣΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΣΤΙΣ Η.Π.Α.....	34
2.7 ΤΟ ΚΑΝΟΝΙΣΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΣΕ ΑΛΛΕΣ ΧΩΡΕΣ.....	38

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 - ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΒΙΟΟΜΟΙΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ.....	42
3.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ.....	42
3.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΩΤΕΡΩΝ ΔΟΜΩΝ.....	43
3.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΣΗΣ.....	46
3.3.1 Χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC).....	48
3.3.2 Χρωματογραφία ανταλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης με παλμική αμπερομετρική ανίχνευση (HPAEC-PAD).....	49
3.3.3 Φασματομετρία μάζας (MS).....	50
3.3.4 Πολυδιάστατες χρωματογραφικές προσεγγίσεις.....	51
3.3.5 Φασματομετρία κινητικότητας ιόντων (IM-MS).....	51
3.4 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ.....	53
3.4.1 Προσδιορισμός δεσμευτικής ικανότητας.....	53
❖ Συντονισμός πλασμονίου επιφάνειας (SPR).....	53
3.4.2 Προσδιορισμός μηχανισμού δράσης.....	54
3.4.3 Προσδιορισμός ανοσογονικότητας.....	56
❖ Ανοσοδοκιμασία ηλεκτροχημειοφωταύγειας (ECL).....	56
❖ Ανοσοπροσρόφηση δεσμευμένου ενζύμου (ELISA).....	57
❖ Ραδιοανοσοδοκιμασία (RIA).....	57
❖ Δοκιμασία μετατόπισης ομογενούς κινητικότητας (HMSA).....	58
3.4.4 Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας.....	58
❖ Κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα (CDC).....	59
❖ Κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από αντισώματα (ADCC).....	60
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 - ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΑ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ & ΤΑ ΒΙΟΟΜΟΕΙΔΗ ΤΟΥΣ.....	61
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	61
4.2 ΤΡΑΣΤΟΥΖΟΥΜΑΜΠΗ.....	64
4.2.1 Καρκίνος του μαστού και μοριακός υποτύπος HER2.....	64
4.2.2 Μηχανισμός δράσης της τραστουζουμάμπης.....	66
4.2.3 Συγκριτικές μελέτες της τραστουζουμάμπης με τα βιοομοειδή της...67	
4.3 ΜΠΕΒΑΣΙΖΟΥΜΑΜΠΗ.....	68
4.3.1 Στόχευση VEGF σε διάφορες μορφές καρκίνου.....	68

4.3.2	Μηχανισμός δράσης της μπεβασιζουμάμπης.....	70
4.3.3	Μοριακή βάση των συχνότερων μορφών καρκίνου στους οποίους χρησιμοποιείται η μπεβασιζουμάμπη.....	71
❖	Καρκίνος του παχέος εντέρου.....	71
❖	Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα.....	72
4.3.4	Συγκριτικές μελέτες της μπεβασιζουμάμπης με τα βιοομοειδή της...	73
4.4	ΡΙΤΟΥΞΙΜΑΜΠΗ.....	75
4.4.1	Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία & Λέμφωμα Non-Hodgkin.....	75
❖	Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία.....	75
❖	Λέμφωμα μη Hodgkin.....	77
4.4.2	Μηχανισμός δράσης της ριτουξιμάμπης.....	78
4.4.3	Συγκριτικές μελέτες της ριτουξιμάμπης με τα βιοομοειδή της.....	80
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	82
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	84

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Βήματα διαδικασίας παραγωγής προϊόντος αναφοράς και βιοομοειδούς....8	8
Εικόνα 2: Θεωρητική παρουσίαση γλυκοζυλίωσης.....10	10
Εικόνα 3: Μέθοδοι ανίχνευσης αποκρίσεων αντισωμάτων.....21	21
Εικόνα 4: Συγκριτική αξιολόγηση ανοσογονικότητας. Α)Προσέγγιση δύο δοκιμασιών Β)Προσέγγιση μίας ανάλυσης.....23	23
Εικόνα 5: Η παρέκταση ενδείξεων για το προτεινόμενο βιοομοειδές βασίζεται στην εν τω βάθει γνώση του προϊόντος αναφοράς και την επιστημονική αιτιολόγηση.....26	26
Εικόνα 6: Υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης υψηλής απόδοσης για σύγκριση της πρωτοταγούς δομής του βιοομοειδούς Zarxio και του προϊόντος αναφοράς Neupogen.....43	43
Εικόνα 7: Φάσμα NMR για σύγκριση της δευτεροταγούς δομής του βιοομοειδούς GP2013 και του προϊόντος αναφοράς Rituximab. Α) Αμιδική περιοχή, Β) Αλειφατική περιοχή.....45	45
Εικόνα 8: Χημική δομή N-γλυκανών και O-γλυκανών που εντοπίζονται συνήθως στα μονοκλωνικά αντισώματα.....47	47
Εικόνα 9: Ανάλυση με IM-MS και διαφορές στο προφίλ γλυκοζυλίωσης, των αρχικών προϊόντων τραστοζουμάμπη (a) και κετουξιμάμπη (c) με τα προτεινόμενα βιοομοειδή τους (b, d) αντίστοιχα.....52	52
Εικόνα 10: Αισθητόγραμμα SPR προϊόντος αναφοράς (Zarxio) και βιοομοειδούς (Neupogen).....54	54
Εικόνα 11: Μέθοδοι ανίχνευσης αντισωμάτων απόκρισης.....58	58
Εικόνα 12: Περίληψη των μοριακών μηχανισμών που επηρεάζονται από τη δράση της μπεβασιζουμάμπης.....71	71
Εικόνα 13: Πρόκληση κυτταροτοξικότητας CDC και ADCC.....79	79

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

ΣΥΜΒΟΛΟ	ΠΛΗΡΗΣ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ
ADA	Anti-Drug Antibody	Αντίσωμα κατά του φαρμάκου
ADCC	Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity	Κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από το αντίσωμα
BCR	B-Cell Receptor	Υποδοχέας Β-κυττάρων
BLA	Biologics License Application	Αίτηση Βιολογικής Άδειας
BPCI	Biological Product Innovation and Competition	Καινοτομία και Ανταγωνισμός Βιολογικών Προϊόντων
CCS	Collision Cross Section	Διατομή σύγκρουσης
CD	Circular Dichroism	Κυκλικός διχρωμισμός
CDC	Complement-Dependent Cytotoxicity	Κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα
CDER	Center for Drug Evaluation and Research	Κέντρο Αξιολόγησης και Έρευνας Φαρμάκων
CIMP	CpG Island Methylator Phenotype	Φαινότυπος μεθυλίωσης νησίδας CpG
CIN	Chromosomal Instability	Χρωμοσωμική αστάθεια
CLL	Chronic Lymphocytic Leukemia	Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία
CRC	Colorectal Cancer	Καρκίνος παχέος εντέρου
DFSR	Disease-Free Survival Rates	Ποσοστά επιβίωσης χωρίς νόσο
ECL	Electrochemiluminescence Immunoassay	Ανοσοδοκιμασία ηλεκτροχημειοφωταύγειας
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	Υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	Ανοσοπροσρόφηση δεσμευμένου ενζύμου
EMA	European Medicines Agency	Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων
ER	Estrogen Receptor	Υποδοχέας οιστρογόνου

ESI	Electrospray Ionization	Ιονισμός ηλεκτροψεκασμού
FDA	Food and Drug Administration	Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων
GAPDH	Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase	3-φωσφορική αφυδρογονάση της γλυκεραλδεϋδης
GMP	Good Manufacturing Practice	Καλή κατασκευαστική πρακτική
HILIC	Hydrophilic Interaction Chromatography	Χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης
HIV	Human Immunodeficiency Virus	Ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας
HMSA	Homogeneous Mobility Shift Assay	Δοκιμασία μετατόπισης ομογενούς κινητικότητας
HPAEC	High Performance Anion Exchange Chromatography	Χρωματογραφία ανταλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
ICH	International Council for Harmonization	Διεθνές Συμβούλιο για την Εναρμόνιση
IEX	Ion Exchange Chromatography	χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων
IM	Ion Mobility	Κινητικότητα ιόντων
IR	Infrared Imaging	Απεικόνιση υπερύθρου
LC	Liquid Chromatography	Υγρή χρωματογραφία
LOD	Limit of Detection	Όριο ανίχνευσης
LOQ	Limit of Quantification	Όριο ποσοτικού προσδιορισμού
mAb	Monoclonal Antibody	Μονοκλωνικό αντίσωμα
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization	Ιονισμός εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενος από υλικό μήτρας
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase	Πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιημένη από μιτογόνο
MBC	Metastatic Breast Cancer	Μεταστατικός καρκίνος του μαστού

MHC	Major Histocompatibility Complex	Μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας
MMR	Mismatch Repair system	Σύστημα επιδιόρθωσης ασυμφωνίας
MS	Mass Spectrometry	Φασματομετρία μάζας
MSI	Microsatellite Instability	Μικροδορυφορική αστάθεια
NK	Natural Killers	Φυσικοί φονείς
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Πυρηνικός μαγνητικός Συντονισμός
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer	Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα
OS	Overall Survival	Συνολική επιβίωση
PAD	Pulse Amperometric Detection	Παλμική αμπερομετρική ανίχνευση
PARP	Poly (ADP-ribose) Polymerase	Πολυμεράση της πολυ (ADP-ριβόζης)
PD	Pharmacodynamics	Φαρμακοδυναμική
PGF	Placental Growth Factor	Αυξητικός παράγοντας του πλακούντα
PHS	Public Health Service	Δημόσια Υπηρεσία Υγείας
PHSA	Public Health Services of America	Υπηρεσίες Δημόσιας Υγείας της Αμερικής
PK	Pharmacokinetics	Φαρμακοκινητική
PR	Progesterone Receptor	Υποδοχέας προγεστερόνης
RAG	Recombination-Activating Gene	Γονίδιο που ενεργοποιεί τον ανασυνδυασμό
RIA	Radioimmunoassay	Ραδιοανοσοδοκιμασία
RP-HPLC	Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης
SEC	Size Exclusion Chromatography	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους

SPR	Surface Plasmon Resonance	Συντονισμός πλασμονίου επιφάνειας
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription	Μετατροπέας σήματος και ενεργοποιητής μεταγραφής
TMB	Tumor Mutation Burden	Φορτίο μεταλλαγών όγκου
TME	Tumor Microenvironment	Μικροπεριβάλλον όγκου
TNF	Tumor Necrosis Factor	Παράγοντας νέκρωσης όγκου
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
VEGFR	Vascular Endothelial Growth fFactor Receptor	Υποδοχέας αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα
AE		Ανεπιθύμητες ενέργειες
E.E.		Ευρωπαϊκή Ένωση
H.Π.Α.		Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής
ΦΔ		Φαρμακοδυναμική
ΦΚ		Φαρμακοκινητική

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος είναι μια από τις κύριες αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Η πρόοδος στην κατανόηση της βιολογίας του καρκίνου και οι εξελίξεις στον εντοπισμό μοριακών στόχων και η ανάπτυξη βιολογικών στοχευμένων θεραπειών, όπως τα ογκολογικά μονοκλωνικά αντισώματα, έχουν οδηγήσει σε καλύτερα κλινικά αποτελέσματα σε αρκετούς τύπους όγκων. Παράγοντες όπως η τραστουζουμάμπη και η ριτουξιμάμπη αντιπροσωπεύουν σημαντικές θεραπευτικές προόδους που έχουν αυξημένη ίαση του καρκίνου του μαστού και του λεμφώματος. Μετά τη λήξη των αποκλειστικών διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας για αυτά τα βιολογικά φάρμακα, αρκετές φαρμακευτικές βιομηχανίες ανέπτυξαν και εισήγαγαν στην αγορά παρόμοια βιολογικά προϊόντα, τα βιοομοειδή. Σύμφωνα με τους ρυθμιστικούς οργανισμούς, ο όρος "βιοομοειδές" χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα βιολογικό που είναι πολύ παρόμοιο με ένα αδειοδοτημένο βιολογικό προϊόν, το προϊόν αναφοράς. Για την επιτυχή ανάπτυξη των βιοομοειδών απαιτούνται συγκριτικά προκλινικά και κλινικά δεδομένα, με δοκιμές που στοχεύουν στον εκτενή δομικό και λειτουργικό χαρακτηρισμό, ώστε να αποδεικνύεται η αποτελεσματικότητα και η ασφάλειά τους. Δεδομένου ότι οι κανονισμοί δεν παρέχουν συγκεκριμένες λεπτομέρειες σχετικά με την απόδειξη της βιοομοιότητας οι κατασκευαστές βιοομοειδών πρέπει να αναπτύξουν το δικό τους σχέδιο και τελικά οι ρυθμιστικές αρχές λαμβάνουν υπόψη το σύνολο των δεδομένων και των πληροφοριών που συγκεντρώθηκαν κατά τη διάρκεια όλης αυτής της διαδικασίας. Οι ρυθμιστικοί οργανισμοί επικεντρώνονται επίσης στην ύπαρξη σχεδίου φαρμακοεπαγρύπνησης και μελετών για την παρέκταση ενδείξεων, ενώ ακόμα βρίσκεται υπό συζήτηση η έννοια της εναλλαξιμότητας. Η χρήση των βιοομοειδών στην ογκολογία θα έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του κόστους στην περίθαλψη του καρκίνου και την ανάπτυξη της φαρμακευτικής καινοτομίας στον συγκεκριμένο τομέα. Στην παρούσα βιβλιογραφική ανασκόπηση περιγράφεται η παραγωγική διαδικασία ανάπτυξης των βιοομοειδών και οι κανονισμοί που εφαρμόζονται σε αυτή, οι μέθοδοι ελέγχου της βιοομοιότητας και τα διαθέσιμα στοιχεία για τα εγκεκριμένα μονοκλωνικά αντισώματα, το μηχανισμό δράσης τους και τις συγκριτικές μελέτες τους με τα εγκεκριμένα και τα υπό ανάπτυξη βιοομοειδή.

Λέξεις – κλειδιά: στοχευμένες θεραπείες, βιολογικά προϊόντα, μονοκλωνικά αντισώματα, βιοομοειδή, βιοομοιότητα, συγκριτικές μελέτες, ρυθμιστικές αρχές

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of death worldwide. Advances in the understanding of cancer biology, the identification of molecular targets and the development of targeted therapies, such as monoclonal antibodies, have led to better clinical outcomes in several tumor types. Agents such as trastuzumab and rituximab represent major therapeutic advances that have increased cure rates for breast cancer and lymphoma. After the expiration of the exclusive patents for these biological drugs, several pharmaceutical industries developed and marketed similar biological products, which are described as biosimilars. According to regulatory agencies, the term "biosimilar" is used to describe a biologic that is very similar to a licensed biologic, the reference product. Successful development of biosimilars requires comparative preclinical and clinical data, with trials aimed at extensive structural and functional characterization to demonstrate their efficacy and safety. Since the regulations do not provide specific details on the proof of biosimilarity, biosimilar manufacturers have to develop their own plan and ultimately the regulatory authorities take into account all the data and information gathered during this whole process. Regulatory agencies are also focusing on pharmacovigilance plans and extrapolation of indications, while the concept of interchangeability is still under discussion. The use of biosimilars in oncology will result in the reduction of costs in cancer care and the development of pharmaceutical innovation in this field. This literature review describes the manufacturing process of biosimilar development and applied regulations, biosimilarity testing methods, and the available data on approved monoclonal antibodies, their mechanism of action, and comparative studies between reference products and approved or under development biosimilars.

Keywords: targeted therapies, biological products, monoclonal antibodies, biosimilars, biosimilarity, comparative studies, regulatory authorities

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος είναι μια από τις κύριες αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Σε παγκόσμιο επίπεδο, ο καρκίνος ευθύνεται για περίπου έναν στους έξι θανάτους, που είναι περισσότεροι από τον HIV, τη φυματίωση και την ελονοσία μαζί. Το 2020, υπήρχαν περίπου 19,3 εκατομμύρια υπολογιζόμενα νέα κρούσματα και 10 εκατομμύρια θάνατοι από καρκίνο παγκοσμίως. Μέχρι το 2040, το παγκόσμιο βάρος του καρκίνου αναμένεται να αυξηθεί σε περίπου 27,5 εκατομμύρια περιπτώσεις και 16,3 εκατομμύρια θανάτους.⁽³⁾

Η πρόοδος στην κατανόηση της βιολογίας του καρκίνου, καθώς και οι πρόσφατες εξελίξεις στον εντοπισμό μοριακών στόχων και η ανάπτυξη συνοδευτικών μοριακών διαγνωστικών, επέτρεψαν την ανάπτυξη καινοτόμων θεραπειών για τον καρκίνο, όπως στοχευμένες ή εξατομικευμένες θεραπείες.^(29, 49) Η ανακάλυψη καρκινικών δεικτών, καθώς και η χρήση της ανοσοϊστοχημείας στην αναζήτηση υπερεκφραζόμενων υποδοχέων στα καρκινικά κύτταρα, επέτρεψαν την ανάπτυξη φαρμάκων με δράση που κατευθύνεται σε αυτούς τους υπερεκφρασμένους υποδοχείς.⁽⁵⁷⁾ Πράγματι, οι νέες εξελίξεις στη φαρμακευτική χημεία και στη μηχανική αντισωμάτων έχουν οδηγήσει σε καλύτερα κλινικά αποτελέσματα σε μεγάλους τύπους όγκων, όπως ο καρκίνος του πνεύμονα, του παχέος εντέρου και του μαστού.⁽⁴⁹⁾

Τα μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs) είναι η ταχύτερα αναπτυσσόμενη κατηγορία θεραπευτικών παραγόντων.⁽²⁸⁾ Τα μονοκλωνικά αντισώματα (mAb) είναι εξαιρετικά πολύπλοκα, μεγάλα βιολογικά προϊόντα, κατασκευασμένα σε ζωντανά συστήματα, που επηρεάζουν ουσιαστικά την κλινική διαχείριση μιας ποικιλίας ασθενειών συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου. Η αντικαρκινική δράση του μονοκλωνικού αντισώματος μεσολαβείται από διάφορους μηχανισμούς δράσης που μπορούν να λειτουργήσουν ανεξάρτητα ή όχι από τις αποκρίσεις του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως η επαγωγή ενός σήματος θανάτου που προκαλείται από τη διασύνδεση ενός επιφανειακού υποδοχέα στο καρκινικό κύτταρο στόχο ή αντίστοιχα η εξαρτώμενη από αντίσωμα κυτταροτοξικότητα.⁽¹⁵⁾

Η ιδέα η θεραπεία να στοχεύει και να εξειδικεύεται για κάθε όγκο φαίνεται να λειτουργεί. Η εισαγωγή προϊόντων που παράγονται από βιολογικά υλικά κερδίζει χώρο κάθε χρόνο, επιτρέποντας την ανάπτυξη νέων φαρμάκων με μειωμένη τοξικότητα και

με θεραπευτικές δυνατότητες, πολλές φορές ακόμη και ανώτερα από τα εμπορικά φάρμακα, καθώς επιτρέπει συγκεκριμένη στόχευση.⁽⁵⁷⁾ Δεδομένου ότι τα βιολογικά μονοκλωνικά αντισώματα παρουσιάζουν πολύπλοκη δομή και παράγονται σε ζωντανό σύστημα υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες, η ανάπτυξη και η κατασκευή τους απαιτεί πολύ υψηλό κόστος, και κατά συνέπεια, αυτές οι υψηλές τιμές είναι δύσκολα προσιτές από τις δομές των υπηρεσιών υγείας.⁽⁴³⁾

Μετά τη λήξη των αποκλειστικών διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας για αυτά τα βιολογικά φάρμακα, αρκετές βιοφαρμακευτικές βιομηχανίες ανέπτυξαν και εισήγαγαν στην αγορά παρόμοια βιολογικά προϊόντα, που ονομάζονται βιοομοειδή, επιτρέποντας σημαντική μείωση της τιμής με μείωση του κόστους για θεραπείες καρκίνου.⁽⁴³⁾ Οι πατέντες φαρμάκων χορηγούνται από το γραφείο διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας και εμπορικών σημάτων και λήγουν 20 χρόνια μετά την αρχική κατάθεση. Ο όρος αποκλειστικότητα αναφέρεται στα δικαιώματα μάρκετινγκ που χορηγούνται από τον εκάστοτε οργανισμό μετά την έγκριση του φαρμάκου και μπορεί να εκτελούνται παράλληλα με το δίπλωμα ευρεσιτεχνίας. Τα δικαιώματα αποκλειστικότητας αναπτύχθηκαν για να εξισορροπηθεί η καινοτομία των νέων φαρμάκων και ο ανταγωνισμός των γενόσημων φαρμάκων.⁽⁹⁾

Για οποιοδήποτε πρόγραμμα ανάπτυξης βιοομοειδών, είναι ζωτικής σημασίας να πραγματοποιηθεί εκτενής βιοφυσικός χαρακτηρισμός με ισχυρές μεθοδολογίες προκειμένου να ανιχνευθούν οι δομικές διαφορές μεταξύ του προϊόντος αναφοράς και του προτεινόμενου βιοομοειδούς.⁽³²⁾ Η έλευση βιοομοειδών προϊόντων ώθησε την ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων για τον καλύτερο χαρακτηρισμό των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους, προκειμένου να αποδειχθεί η ομοιότητα μέσω μιας διεξοδικής άσκησης συγκρισιμότητας με ένα εγκεκριμένο καινοτόμο προϊόν. Εάν είναι επιτυχής, θα απαιτηθεί μειωμένο σύνολο κλινικών μελετών για την απόκτηση άδειας κυκλοφορίας.⁽²⁸⁾

Στην παρούσα εργασία, γίνεται μια προσπάθεια ανασκόπησης και αποτύπωσης των γενικών στοιχείων για τα βιοομοειδή προϊόντα, συμπεριλαμβανομένων των διαδικασιών παραγωγής, του ρυθμιστικού και κανονιστικού πλαισίου που ακολουθείται για την παροχή έγκρισης κυκλοφορίας στα ογκολογικά βιοομοειδή προϊόντα, των εργαστηριακών δοκιμών ελέγχου της βιοομοιότητας του προτεινόμενου

βιοομοειδούς με το προϊόν αναφοράς του, καθώς και των εγκεκριμένων ογκολογικών μονοκλωνικών αντισωμάτων και των αντίστοιχων βιοομοειδών τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΑ ΒΙΟΟΜΟΕΙΔΗ

1.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ & ΒΙΟΟΜΟΕΙΔΗ

Από τότε που το πρώτο βιολογικό φάρμακο με βάση τις πρωτεΐνες εγκρίθηκε το 1982, με την Eli Lilly να αναπτύσσει μια μέθοδο χρησιμοποιώντας βακτήρια για τη σύνθεση ανθρώπινης ινσουλίνης μέσω τεχνολογίας ανασυνδυασμένου DNA, η πρόοδος στη βιοτεχνολογία επέτρεψε την ανάπτυξη μονοκλωνικών αντισωμάτων (mAbs) και πρωτεϊνών σύντηξης που έχουν γίνει οι μεγαλύτερες κατηγορίες βιολογικών φαρμάκων.^(5, 24, 42) Τα τελευταία 20 χρόνια, τα βιολογικά φάρμακα αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο της θεραπείας για προχωρημένους συμπαγείς όγκους και αιματολογικές κακοήθειες.^(29, 70) Στην ογκολογία, τα βιολογικά που χρησιμοποιούνται συνήθως περιλαμβάνουν ανασυνδυασμένους αιμοποιητικούς αυξητικούς παράγοντες και μονοκλωνικά αντισώματα. Ιδιαίτερα τα τελευταία έχουν γνωρίσει σημαντική επιτυχία, με αποτέλεσμα το όφελος επιβίωσης.⁽¹⁷⁾ Από την εισαγωγή της εποεΐνης άλφα το 1989, η χρήση θεραπευτικών πρωτεϊνών στην ογκολογία έχει ραγδαία ανάπτυξη, με περισσότερους από 50 νέους παράγοντες ή/και ενδείξεις να έχουν εγκριθεί από το 2012.⁽²⁶⁾ Παράγοντες όπως η τραστουζουμάμπη και η ριτουξιμάμπη αντιπροσωπεύουν σημαντικές θεραπευτικές προόδους που έχουν αυξημένη ίαση του καρκίνου του μαστού και του λεμφώματος.⁽¹⁷⁾

Τα βιολογικά είναι φαρμακευτικά προϊόντα που προέρχονται από γενετικά τροποποιημένες κυτταρικές σειρές.⁽⁶¹⁾ Είναι μεγάλα πολύπλοκα μόρια (πολυπεπτίδια) που παράγονται μέσω της βιοτεχνολογίας σε ένα ζωντανό σύστημα όπως μικροοργανισμοί, φυτικά κύτταρα ή ζωικά κύτταρα.^(3, 58) Αυτά τα πολυπεπτίδια, τα οποία συχνά είναι υψηλού μοριακού βάρους και πολύπλοκης τριτοταγούς και τεταρτοταγούς δομής, συνήθως υφίστανται σημαντικές μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις.^(17, 65) Το μοριακό τους βάρος κυμαίνεται από 4000 Da για μη γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες όπως οι ορμόνες, έως πάνω από 140.000 Da για τα μονοκλωνικά αντισώματα. Εμβόλια, ορμόνες, αυξητικοί παράγοντες και μονοκλωνικά

αντισώματα έχουν παραχθεί και έχουν εισέλθει με επιτυχία στην κλινική πρακτική.⁽¹⁷⁾ Τα βιολογικά είναι απαραίτητα και χρησιμοποιούνται ευρέως στη θεραπεία του καρκίνου ως θεραπευτικοί παράγοντες και ως παράγοντες υποστηρικτικής φροντίδας.⁽¹³⁾

Όπως όλα τα βιολογικά, τα βιοομοειδή είναι δομικά πολύπλοκα και παρασκευάζονται χρησιμοποιώντας γενετικά τροποποιημένα συστήματα κυτταροκαλλιέργειας ζώων, βακτηρίων ή φυτών. Ως συνέπεια, αυτή η μοριακή πολυπλοκότητα και η φύση της διαδικασίας παραγωγής, έχουν ως αποτέλεσμα τη χρήση διαφορετικών κυτταρικών σειρών ξενιστών και συστημάτων έκφρασης καθώς και σχετικών διαφορών στις συνθήκες παραγωγής, καθιστώντας αδύνατη την κατασκευή ακριβών αντιγράφων του προϊόντος αναφοράς.⁽⁵⁵⁾ Ως εκ τούτου, ο όρος "βιοομοειδές" χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα βιολογικό που είναι πολύ παρόμοιο με ένα αδειοδοτημένο βιολογικό προϊόν, το προϊόν αναφοράς.^(3, 13) Σύμφωνα με τον FDA των ΗΠΑ, ένα βιοομοειδές είναι ένα βιολογικό προϊόν που είναι πολύ παρόμοιο και δεν έχει κλινικά σημαντικές διαφορές από το εγκεκριμένο προϊόν αναφοράς, που απαιτεί εκτενή ανάλυση όσον αφορά τη δομή και τη φαρμακολογική λειτουργία του προϊόντος αναφοράς και του προτεινόμενου βιοομοειδούς.^(57, 65) Ο EMA παρέχει έναν παρόμοιο γενικό ορισμό.

Η εκτενής σύγκριση των φυσικοχημικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών του βιοομοειδούς με το προϊόν αναφοράς είναι το θεμέλιο της βιοομοειδούς ανάπτυξης.⁽²⁹⁾ Αν και τα βιοομοειδή έχουν δυσδιάκριτη αλληλουχία αμινοξέων ως προς το προϊόν αναφοράς τους, ποικίλλουν ως προς τη συσσωμάτωση πρωτεϊνών, τα προφίλ των ισομορφών τους, τις θέσεις γλυκοζυλίωσης τους και την τριδιάστατη δομή.⁽⁵²⁾ Η γλυκοζυλίωση είναι η κύρια αιτία ετερογένειας μεταξύ των θεραπευτικών πρωτεϊνών όπως τα μονοκλωνικά αντισώματα, την κύρια κατηγορία βιοφαρμακευτικών. Η ετερογένεια όχι μόνο αντανάκλα τη φυσική διακύμανση αυτών των μορίων, αλλά αντικατοπτρίζει επίσης την ετερογένεια της διαδικασίας παραγωγής. Αυτή η ετερογένεια συμβάλλει στη διακύμανση από παρτίδα σε παρτίδα που είναι χαρακτηριστική στην κατασκευή βιολογικών. Οι ακαθαρσίες και η τροποποίηση του προϊόντος που προέρχονται από κύτταρα ξενιστές, όπως η αποαμίδωση, η οξειδωση και η συσσωμάτωση, κατά την παραγωγή και την αποθήκευση, προστίθενται στις παραλλαγές των παρτίδων.⁽⁵⁴⁾ Τα βιοομοειδή έχουν την ίδια ισχύ, δοσολογική μορφή, οδό χορήγησης, μηχανισμό δράσης και θεραπευτικές ενδείξεις. Επιτρέπονται ελάχιστες διαφορές στα έκδοχα, αλλά η ασφάλεια του φαρμάκου δεν πρέπει να τίθεται σε

κίνδυνο.⁽⁵²⁾ Επομένως, το επίπεδο ομοιότητας με το αρχικό βιολογικό προϊόν πρέπει να διαπιστωθεί ως προς τα ποιοτικά χαρακτηριστικά, τη βιολογική δραστηριότητα, την αποτελεσματικότητα, την ανοσογονικότητα και την ασφάλεια, με βάση ολοκληρωμένες μελέτες συγκρισιμότητας και σύμφωνα με τις οδηγίες των αντίστοιχων ρυθμιστικών αρχών.^(3, 29, 42, 61)

1.2 ΒΙΟΟΜΟΙΩΣΗ vs ΓΕΝΟΣΗΜΑ

Σε γενικές γραμμές, τα βιοομοειδή είναι ανάλογα με τα γενόσημα προϊόντα βιολογικών παραγόντων εγκεκριμένων από τον FDA.⁽⁴⁴⁾ Τα γενόσημα φάρμακα είναι μικρά μόρια που είναι ακριβή αντίγραφα των φαρμάκων αναφοράς τους σε όλα τα χαρακτηριστικά. Παράγονται με χημική σύνθεση, χρησιμοποιώντας καλά καθορισμένες διαδικασίες παραγωγής που έχουν ως αποτέλεσμα προβλέψιμα αποτελέσματα.⁽⁶¹⁾ Τα γενόσημα έχουν τα ίδια δραστικά συστατικά με τα επώνυμα φάρμακα και δεν έχουν δείξει σημαντική διαφορά στον ρυθμό και την έκταση στην οποία το δραστικό συστατικό καθίσταται διαθέσιμο όταν χορηγείται υπό συγκρίσιμες συνθήκες.⁽⁴²⁾ Έχουν δημιουργηθεί για να έχουν ίδια δοσολογική μορφή, ασφάλεια, αντοχή, οδό χορήγησης, ποιότητα, χαρακτηριστικά απόδοσης και χρήση για την οποία προορίζονται.⁽³⁾ Επιπλέον, τα γενόσημα είναι βιοϊσοδύναμα με τα επώνυμα φάρμακα. Για να αποδειχθεί ότι ένα γενόσημο είναι ισοδύναμο με ένα επώνυμο φάρμακο, οι κατασκευαστές πρέπει να καθορίσουν τη βιοϊσοδυναμία στο εργαστήριο. Ένα γενόσημο φάρμακο και ένα επώνυμο φάρμακο θεωρούνται βιοϊσοδύναμα εάν απελευθερώνουν το δραστικό συστατικό τους στην κυκλοφορία του αίματος στην ίδια ποσότητα και με τον ίδιο ρυθμό, με αναμενόμενο παρόμοιο αποτέλεσμα στη θέση της φυσιολογικής δραστηριότητας. Δεδομένου ότι η θεραπευτική χημική ένωση είναι το ίδιο μόριο στα γενόσημα φάρμακα και στα επώνυμα φάρμακα, η αποτελεσματικότητα των 2 θεωρείται ότι δεν διαφέρει.⁽⁴²⁾

Σε αντίθεση με τα γενόσημα, στα βιοομοειδή επιτρέπονται μικρές διαφορές στα κλινικά ανενεργά συστατικά, εφόσον δεν υπάρχουν κλινικά σημαντικές διαφορές στην καθαρότητα, την ισχύ ή την ποιότητα, την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα σε σύγκριση με το αρχικό προϊόν.⁽⁶⁵⁾ Αυτές οι διαφορές προκύπτουν λόγω της εγγενούς

πολυπλοκότητας των βιοομοειδών καθώς και των σχετικών διαδικασιών παραγωγής τους.⁽³⁾ Σε αντίθεση με τα γενόσημα, οι βιοομοειδείς κανονισμοί απαιτούν συγκριτικά προκλινικά και κλινικά δεδομένα λόγω αβεβαιοτήτων σχετικά με το επίπεδο χαρακτηρισμού που μπορεί να επιτευχθεί και τις πιθανές κλινικές συνέπειες των διαφορών στα φυσικά χημικά χαρακτηριστικά.⁽⁵⁴⁾ Αυτές οι δοκιμές πραγματοποιούνται μετά από εκτενή δομικό και λειτουργικό χαρακτηρισμό του βιοομοειδούς για να δικαιολογηθεί η συνέχιση της κλινικής μελέτης σε ανθρώπους.⁽⁴²⁾ Επιπρόσθετα, οι διαφορές μεταξύ βιοομοειδών και των φαρμάκων αναφοράς τους μπορεί να οδηγήσουν σε μικρές διακυμάνσεις στην ανοσογονικότητα.^(42, 44) Η ανοσογονικότητα θεωρείται η σημαντικότερη ανησυχία για την ασφάλεια των βιολογικών στους κανονισμούς του EMA.⁽⁵⁴⁾ Συνεπώς, οι ρυθμιστικοί φορείς αναγκάστηκαν να εφαρμόσουν εναλλακτικούς κανόνες και κατευθυντήριες γραμμές για τη διαδικασία έγκρισης βιοομοειδών από εκείνες για τα γενόσημα, ακριβώς όπως οι οργανισμοί ανέπτυξαν εναλλακτικές κατευθυντήριες γραμμές για τα βιολογικά όταν εισήχθησαν πριν από περισσότερα από 30 χρόνια.

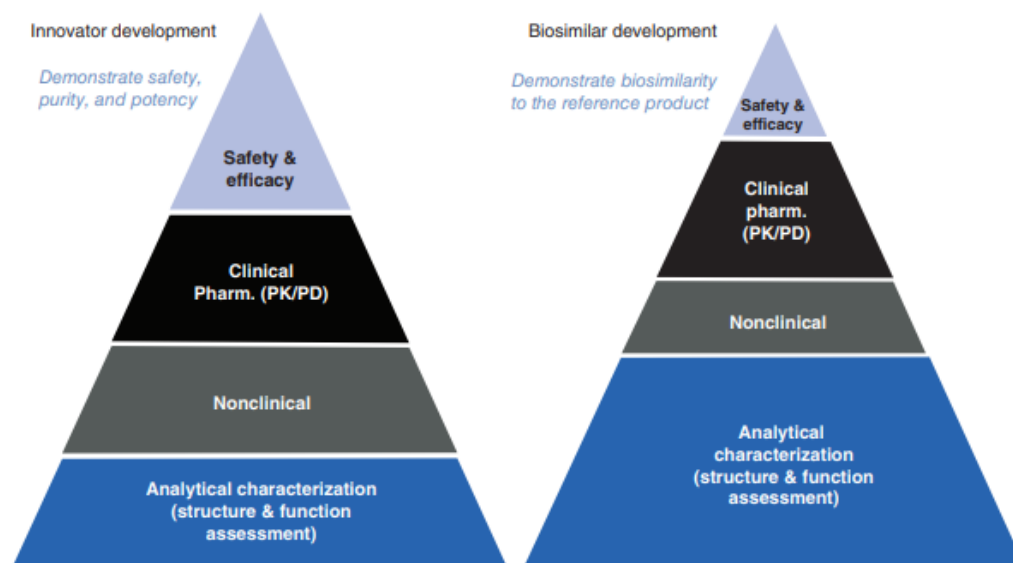
1.3 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ – ΠΟΙΟΤΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ

Το μονοπάτι ανάπτυξης για ένα πρωτότυπο βιολογικό προϊόν, απαιτεί μακρά ερευνητική διαδρομή, καθιέρωση μιας διαδικασίας παραγωγής και καθαρισμού, και επίδειξη της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας του προϊόντος, που ακολουθείται από ένα εκτεταμένο πρόγραμμα κλινικών δοκιμών, ιδιαίτερα στην ανάπτυξη Φάσης III.⁽⁶⁵⁾ Κατά τη διάρκεια της συνήθους διαδικασίας παραγωγής ενός βιολογικού, υπάρχουν τρία κύρια στάδια ⁽¹⁾:

1. κυτταρική επέκταση και έκφραση
2. απομόνωση και καθαρισμός πρωτεϊνών
3. σκεύασμα και συσκευασία φαρμακευτικών προϊόντων για χρήση από ασθενείς

Για κάθε ένδειξη, το φάρμακο απαιτεί συνήθως μια ξεχωριστή, μεγάλη, πολυκεντρική, τυχαιοποιημένη, ελεγχόμενη δοκιμή που είναι κατάλληλου προτύπου καταχώρισης. Αντίθετα, για τα βιοομοειδή, το μεγαλύτερο μέρος της εργασίας έγκειται στην ανάπτυξη μιας κατάλληλης διαδικασίας παραγωγής και καθαρισμού και στην απαίτηση

για εκτεταμένη φυσικοχημική και λειτουργική σύγκριση in vitro με το προϊόν αναφοράς.⁽⁶⁵⁾



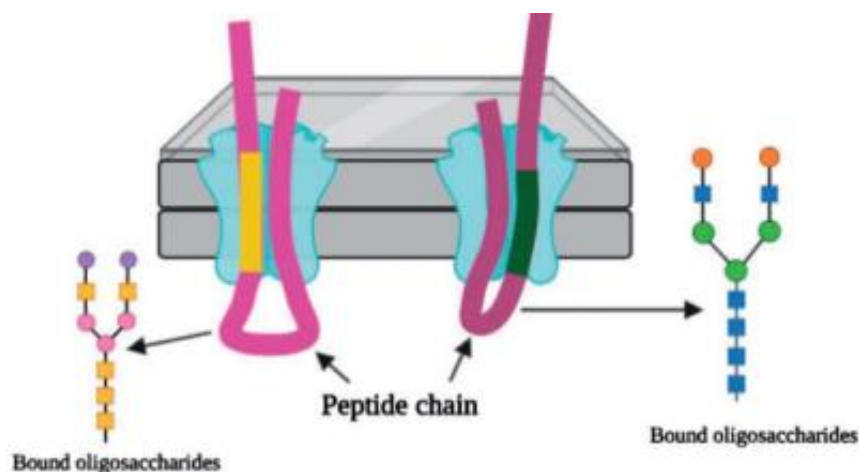
Εικόνα 1. Βήματα της διαδικασίας παραγωγής προϊόντος αναφοράς και βιοομοειδούς.⁽⁶¹⁾

Η κατασκευή ενός βιολογικού προϊόντος περιλαμβάνει τη χρήση ενός ζωντανού συστήματος, όπως οι κυτταρικές σειρές ζώων-ξενιστών, τυπικά μέσω της χρήσης τεχνολογίας ανασυνδυασμένου DNA.⁽⁵⁾ Συνεπώς, το βασικό πρώτο βήμα είναι η δημιουργία μιας καλά χαρακτηρισμένης κυτταρικής σειράς παραγωγής. Αρχικά, αυτό γίνεται σε μικρή κλίμακα με σχετικά μικρό αριθμό κυττάρων. Ωστόσο, για να παραχθεί το βιολογικό σε βιομηχανική κλίμακα, τα κύτταρα πρέπει να περάσουν από πολλούς διαδοχικούς γύρους πολλαπλασιασμού μέχρι να μπορέσουν να καλλιεργηθούν σε μεγάλους βιοαντιδραστήρες. Από αυτά τα κύτταρα και/ή το μέσο καλλιέργειας, το βιολογικό πρέπει να καθαριστεί χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές διήθησης και χρωματογραφίας. Απαιτούνται αυστηρές δοκιμές σε όλα τα εμπλεκόμενα στάδια, από την ανάπτυξη της τράπεζας κυττάρων έως την επικύρωση της διαδικασίας, τη μαζική παραγωγή και την τελική αξιολόγηση παρτίδας.⁽⁶⁵⁾

Για οποιοδήποτε βιολογικό προϊόν, αναπόφευκτα θα υπάρχουν διαφορετικές μορφές της πρωτεΐνης ακόμη και στην ίδια παρτίδα.⁽⁶⁵⁾ Αν και τα συστήματα που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιολογικών είναι ευαίσθητα σε πολύ μικρές αλλαγές που μπορούν να επηρεάσουν τη φύση του τελικού προϊόντος, υπάρχουν πολλοί, ελάχιστοι προβλέψιμοι, παράγοντες στη διαδικασία ανάπτυξης ενός βιολογικού, που μπορούν να επηρεάσουν τη δομή της πρωτεΐνης.⁽⁵⁾ Ως εκ τούτου, οι

διαδικασίες ελέγχονται αυστηρά και παρακολουθούνται για την επίτευξη υψηλής ποιότητας όλων των χαρακτηριστικών, συμπεριλαμβανομένης της κύριας δομής, της δομής ή της διαμόρφωσης υψηλότερης τάξης και των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων.⁽¹⁾ Στην πράξη, είναι σαφές ότι θα υπάρχουν πάντα μεγάλοι αριθμοί παραλλαγών, που ακόμη και με ευαίσθητα αναλυτικά εργαλεία είναι αδύνατο να εντοπιστούν με σαφήνεια. Επομένως, η αναπαραγωγικότητα μπορεί να εξασφαλιστεί μόνο με συνέπεια στη διαδικασία παραγωγής. Ωστόσο, μερικές φορές απαιτούνται αλλαγές, οι οποίες πρέπει να αποδεικνύεται ότι δεν έχουν καμία επίδραση στην αποτελεσματικότητα, την ασφάλεια ή την ανοσογονικότητα του προϊόντος και ο αυστηρός ποιοτικός έλεγχος είναι απαραίτητη προϋπόθεση.⁽⁶⁵⁾

Με τα βιοομοειδή, ισχύουν οι ίδιες γενικές αρχές. Αυτά τα προϊόντα απαιτούν την ίδια αυστηρή επίβλεψη της διαδικασίας παραγωγής όπως τα βιολογικά προϊόντα αρχικής παραγωγής. Φυσικά, ένα βιοομοειδές πρέπει να έχει ταυτόσημη αλληλουχία αμινοξέων με το προϊόν αναφοράς.⁽⁶⁵⁾ Μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις με την ανάπτυξη των βιοομοειδών, είναι η εξασφάλιση επαρκούς ομοιότητας με το προϊόν αναφοράς όσον αφορά το προφίλ γλυκοζυλίωσης (Εικόνα 2). Συνήθως αποτελεί την πιο απαιτητική μετα-μεταφραστική τροποποίηση για έλεγχο, λόγω της ευαισθησίας σε μικρές αλλαγές στις συνθήκες διεργασίας.⁽⁵⁾ Επίσης μπορεί να έχει αξιοσημείωτο αντίκτυπο σε διάφορες ιδιότητες της πρωτεΐνης, όπως η σταθερότητα και η διαλυτότητα, και στις εγγενείς λειτουργικές της ιδιότητες.⁽⁶⁵⁾ Άλλοι τύποι μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων περιλαμβάνουν τη φωσφορυλίωση, τη μεθυλίωση, την ακετυλίωση και τη θείωση, και μπορεί να έχουν κλινικά σχετικό αντίκτυπο στη βιολογική δραστηριότητα καθώς και στην ανοσογονικότητα των υποψήφιων βιοομοειδών. ^(5, 65) Επιπλέον, κατά τη διάρκεια του καθαρισμού και στη συνέχεια της αποθήκευσης, η πρωτεΐνη μπορεί να υποβληθεί σε χημικές τροποποιήσεις, όπως οξείδωση και αποαμίδωση.⁽⁶⁵⁾ Οι προαναφερθείσες αλλαγές μπορούν να εμφανιστούν κατά τη διαδικασία παραγωγής, αλλά και να εισαχθούν από εξωτερικούς παράγοντες όπως το pH και η θερμοκρασία, με αποτέλεσμα διαφορετικούς βαθμούς συσσωμάτωσης πρωτεϊνών.^(5, 65) Με βάση όλες αυτές τις πιθανές τροποποιήσεις, έχει υπολογιστεί ότι περίπου 100 εκατομμύρια μοριακές παραλλαγές είναι θεωρητικά δυνατές για οποιοδήποτε δεδομένο μονοκλωνικό αντίσωμα.⁽⁶⁵⁾



Εικόνα 2. Θεωρητική παρουσίαση γλυκοζυλίωσης.⁽⁵⁷⁾

Ως εκ τούτου, τόσο για τα αρχικά βιολογικά προϊόντα όσο και για τα βιοομοειδή, είναι σημαντικό να κατανοηθεί το εύρος διακύμανσης των χαρακτηριστικών ποιότητας που δεν επηρεάζει την ασφάλεια ή την αποτελεσματικότητά τους. Για να εγκριθεί ένα βιοομοειδές, τα ποιοτικά χαρακτηριστικά που είναι σημαντικά για τη λειτουργία του μορίου απαιτείται να είναι πολύ παρόμοια με αυτά του αρχικού βιολογικού.⁽⁶⁵⁾ Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά ορίζονται από τις ιδιότητες του προϊόντος αναφοράς. Ένας λεπτομερής χαρακτηρισμός του προϊόντος αναφοράς, συμπεριλαμβανομένης της μεταβλητότητας της παρτίδας και των ακαθαρσιών, μέσω της χρήσης υπερσύγχρονων ορθογώνιων αναλυτικών εργαλείων, αποτελεί προϋπόθεση για την έναρξη της βιοομοειδούς ανάπτυξης. Για να εξακριβωθεί το εύρος μεταβλητότητας του προϊόντος αναφοράς, διεξάγεται δοκιμή σε πολλές παρτίδες του αρχικού προϊόντος, ανάλογα με τη διαθεσιμότητα.⁽¹⁾

Τα βασικά ζητήματα για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών ποιότητας περιλαμβάνουν⁽¹⁾:

- Την κατανόηση του ποια ποιοτικά χαρακτηριστικά είναι σημαντικά για τη βιολογική δραστηριότητα και την κλινική απόδοση της πρωτεΐνης. Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά για τα μονοκλωνικά αντισώματα περιλαμβάνουν την αμινοξική αλληλουχία, την καθαρότητα, την παρουσία συσσωματωμάτων, την ετερογένεια του φορτίου, τις δομές υψηλότερης τάξης, τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και τη βιολογική δραστηριότητα.

- Εάν υπάρχουν πολλαπλοί μηχανισμοί δράσης και ενδείξεις, την κατανόηση του μηχανισμού δράσης για συγκεκριμένες ενδείξεις και χαρακτηριστικά ποιότητας για κάθε μηχανισμό δράσης.

Ο αριθμός των κρίσιμων ποιοτικών χαρακτηριστικών μπορεί να ποικίλλει μεταξύ των προϊόντων και μπορεί να είναι εκτεταμένος. Για παράδειγμα, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα μπορεί να έχει περισσότερα από 40, τα οποία μπορεί να χρειαστεί να αξιολογηθούν χρησιμοποιώντας περισσότερες από 50 διαφορετικές δοκιμασίες.⁽⁶¹⁾ Με τα μονοκλωνικά αντισώματα, ένα καλό παράδειγμα κρίσιμου χαρακτηριστικού είναι ο βαθμός φουκοζυλίωσης εντός της περιοχής Fc του αντισώματος, που μπορεί να έχει σημαντικό αντίκτυπο στην εξαρτώμενη από το αντίσωμα κυτταροτοξικότητα των κυττάρων (ADCC).⁽⁶⁵⁾

1.4 ΠΡΟΚΛΙΝΙΚΗ ΦΑΣΗ

1.4.1 Δοκιμή ομοιότητας

Σύμφωνα με τα έγγραφα καθοδήγησης του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, απαιτείται «αξιολόγηση ομοιότητας» μεταξύ του υποψήφιου βιοομοειδούς προϊόντος και του προϊόντος αναφοράς, προκειμένου να εγκριθεί ένα βιοομοειδές. Δεδομένου ότι η διαδικασία παρασκευής του αρχικού βιολογικού προϊόντος είναι αποκλειστική πληροφορία και άγνωστη στον κατασκευαστή του βιοομοειδούς, θα πρέπει να αναπτυχθεί νέα διαδικασία παραγωγής. Επομένως, η διαδικασία με την οποία κατασκευάζεται το βιοομοειδές είναι σχεδόν σίγουρα διαφορετική από το αρχικό βιολογικό προϊόν αναφοράς και είναι επιτακτική ανάγκη η άσκηση βιοομοιότητας να αποκλείσει οποιαδήποτε πιθανή επίπτωση στην ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα. Αυτά δεν μπορούν να προβλεφθούν μόνο από την αναλυτική αξιολόγηση, οπότε η άσκηση βιοομοιότητας, που περιλαμβάνει το «σύνολο των αποδεικτικών στοιχείων», αποτελείται από έναν πλήρη ποιοτικό φάκελο δεδομένων, συμπεριλαμβανομένων των κατάλληλων αναλυτικών, λειτουργικών, μη κλινικών και κλινικών μελετών.⁽¹⁾

Ένας υψηλός βαθμός δομικής και λειτουργικής ομοιότητας μεταξύ βιοομοειδούς και προϊόντος αναφοράς μπορεί να επιτευχθεί μέσω εκτεταμένου χαρακτηρισμού. Η βάση

των αποδεικτικών στοιχείων βιοομοιότητας είναι τα συγκριτικά αναλυτικά δεδομένα που αποδεικνύουν ότι το δυνητικό βιοομοειδές έχει παρόμοια δομή και χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένων παρόμοιων ισομορφών και λειτουργίας με το προϊόν αναφοράς. Οι μη κλινικές και κλινικές μελέτες ξεκινούν μόλις η διαδικασία παραγωγής παράγει ένα μόριο που αποδεικνύεται ότι είναι «πολύ παρόμοιο» σε αναλυτικό επίπεδο. ⁽¹⁾

Δεδομένου ότι οι κανονισμοί δεν παρέχουν συγκεκριμένες λεπτομέρειες για δομικές ή λειτουργικές δοκιμές ή προκλινικές και κλινικές μελέτες που απαιτούνται για την απόδειξη της βιοομοιότητας, οι κατασκευαστές βιοομοειδών πρέπει να αναπτύξουν το δικό τους σχέδιο. Τα χαρακτηριστικά των απαραίτητων μελετών ποικίλλουν μεταξύ προϊόντων διαφορετικών κατηγοριών και καθορίζονται κατά περίπτωση. Οι κανονισμοί απαιτούν όπου ανιχνεύονται ποιοτικές ή/και ποσοτικές διαφορές, να αιτιολογούνται και να αποδεικνύεται ότι δεν έχουν καμία επίδραση στην κλινική απόδοση του βιοομοειδούς σε σχέση με το βιολογικό προϊόν αναφοράς. Τα κλινικά φαρμακοκινητικά και φαρμακοδυναμικά δεδομένα, καθώς και τα δεδομένα αποτελεσματικότητας και ασφάλειας, απαιτούνται πάντα για να επιβεβαιωθεί ότι δεν υπάρχουν κλινικά σημαντικές διαφορές. Οι ρυθμιστικές αρχές λαμβάνουν υπόψη το σύνολο των δεδομένων και των πληροφοριών που συγκεντρώθηκαν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας στην αξιολόγηση της απόδειξης της βιοομοιότητας. ⁽¹⁾

Η επιτυχής ανάπτυξη βιοομοειδών, επομένως, εξαρτάται από μια σταδιακή διαδικασία στην οποία το επίπεδο ομοιότητας που αποδεικνύεται από αναλυτικά δεδομένα επηρεάζει τα προκλινικά και κλινικά μέρη της ανάπτυξης. Η όσο το δυνατόν μεγαλύτερη συμμόρφωση με το προϊόν αναφοράς μπορεί να επιτρέψει ένα μειωμένο πακέτο κλινικών δεδομένων. Η επίδειξη υψηλού επιπέδου αναλυτικής ομοιότητας που βασίζεται σε έναν εκτεταμένο αναλυτικό χαρακτηρισμό είναι, επομένως, το θεμέλιο για στοχευμένες, συγκριτικές, μη κλινικές και κλινικές μελέτες ανάπτυξης. ⁽¹⁾

1.4.2 Δομικός χαρακτηρισμός

Εφόσον δεν υπάρχει ενιαία αναλυτική δοκιμή που να μπορεί να αποδείξει επαρκώς υψηλό επίπεδο ομοιότητας ενός βιοομοειδούς με ένα βιολογικό αναφοράς, το έργο της επίδειξης της μοριακής ισοδυναμίας απαιτεί μια ομάδα αναλυτικών μεθόδων. ⁽¹⁾

Με την εφαρμογή των διαθέσιμων προηγμένων τεχνολογιών, είναι πλέον δυνατό να καθοριστεί η μοριακή ομοιότητα μεταξύ ενός βιοομοειδούς και του αρχικού προϊόντος, ακόμη και για πολύπλοκα μόρια όπως τα μονοκλωνικά αντισώματα. Διάφορες ευαίσθητες, εξαιρετικά υψηλής ακρίβειας αναλυτικές τεχνικές και ισχυρές λειτουργικές δοκιμασίες έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια που επιτρέπουν τον εν βάθει χαρακτηρισμό σύνθετων πρωτεϊνών, για τον προσδιορισμό της ομοιότητας σε βασικά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά ποιότητας του υποψηφίου βιοομοειδούς και του προϊόντος αναφοράς του.⁽¹⁾

Εκτός από τη συγκρισιμότητα, αυτές οι τεχνικές χρησιμοποιούνται παντού για την ανάπτυξη της διαδικασίας και τη λεπτή ρύθμιση, την απελευθέρωση προϊόντος και την αξιολόγηση της σταθερότητας. Για παράδειγμα, η ταυτοποίηση μιας παραλλαγής αλληλουχίας σε ένα βιοομοειδές θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως οδηγός για τη διόρθωση της επιλογής κλώνων, εξοικονομώντας σημαντικό χρόνο και χρήμα στην ανάπτυξη βιοομοειδών.⁽¹⁾

Σύμφωνα με τις ρυθμιστικές αρχές, η άσκηση ομοιότητας πρέπει να είναι επιστημονικά προσαρμοσμένη με χρήση σύγχρονων αναλυτικών εργαλείων και ευαίσθητων δοκιμών για την ανίχνευση ακόμη και μικρών διαφορών μεταξύ του βιοομοειδούς και του προϊόντος αναφοράς. Οι κατασκευαστές βιοομοειδών έχουν στη διάθεσή τους ευαίσθητες αναλυτικές μεθόδους που επιτρέπουν τον εντοπισμό μικρών αλλαγών στα ποιοτικά χαρακτηριστικά τους. Επιπλέον αναπτύσσουν, τελειοποιούν, επικυρώνουν και εφαρμόζουν αναλυτικές δοκιμασίες και εργαλεία που επιτρέπουν τον λεπτομερή χαρακτηρισμό των προϊόντων αναφοράς και των βιοομοειδών προϊόντων, κάτι που βοηθά στην επιδίωξη υψηλής ομοιότητας.⁽¹⁾

Παρά την τεχνικά απαιτητική, δαπανηρή και χρονοβόρα φύση της εφαρμογής αυτών των τεχνολογιών, αξιολογούνται όλα τα δομικά στοιχεία της πρωτεΐνης και όλες οι τροποποιήσεις. Κανονικά, μια τέτοια ανάλυση θα περιλαμβάνει τις ακόλουθες συγκρίσεις του βιοομοειδούς και του βιολογικού αναφοράς⁽¹⁾:

- ❖ Πρωτοταγής δομή
- ❖ Δομές ανώτερης τάξης
- ❖ Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις
- ❖ Ουσίες που σχετίζονται με το προϊόν

1.4.3 Αναλυτικές μέθοδοι για δομικό χαρακτηρισμό

Οι σύγχρονες μέθοδοι φασματομετρίας μάζας (MS), σε συνδυασμό με μεθόδους διαχωρισμού υψηλής ανάλυσης, όπως η υγρή χρωματογραφία (LC) και η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση, είναι παραδείγματα των βασικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της ομοιότητας. Με την ανάπτυξη προγραμμάτων λογισμικού για αυτοματοποιημένη επεξεργασία και αξιολόγηση δεδομένων, η ταυτότητα πρωτεΐνης, οι παραλλαγές αλληλουχίας, το προφίλ γλυκοζυλίωσης και άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και ακαθαρσίες μπορούν πλέον να χαρακτηριστούν γρήγορα.⁽¹⁾

Ο στόχος της δομικής ανάλυσης είναι πρώτα να επιβεβαιωθεί ότι η κύρια αλληλουχία του βιομοειδούς είναι πανομοιότυπη με το προϊόν αναφοράς μέσω της χρήσης αναλυτικών μεθόδων τελευταίας τεχνολογίας όπως η χαρτογράφηση πεπτιδίων με υγρή χρωματογραφία (LC) ή φασματομετρία μάζας (MS), ακολουθούμενη από τον χαρακτηρισμό πρωτεϊνικών δομών υψηλότερης τάξης.⁽⁵⁾ Οι δομές υψηλότερης τάξης του βιομοειδούς συνήθως προσδιορίζονται χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές, όπως η κρυσταλλογραφία ακτίνων X, ο κυκλικός διχρωισμός, η φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier, η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης και η φασματοσκοπία φθορισμού κοντά στην υπεριώδη ακτινοβολία.^(1, 5)

Η αξιολόγηση της δομικής ομοιότητας περιλαμβάνει άλλες φυσικές και χημικές παραλλαγές, όπως η οξείδωση, αλλά επικεντρώνεται ιδιαίτερα στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η γλυκοζυλίωση.⁽⁵⁾ Για τη συγκρισιμότητα γλυκοζυλίωσης, μπορεί να πραγματοποιηθεί εκτεταμένος χαρακτηρισμός γλυκοζυλίωσης των βαριών αλυσίδων σε επίπεδα πρωτεΐνης, πεπτιδίου και ελεύθερης γλυκάνης.⁽¹⁾ Οι γλυκάνες που συνδέονται με την πρωτεΐνη μπορούν να αναγνωριστούν με χρήση ηλεκτροψεκασμού ιονισμού-MS και στη συνέχεια να αφαιρεθούν μέσω ενζυμικής διαδικασίας. Τα μεμονωμένα συστατικά μπορούν να διαχωριστούν χρησιμοποιώντας κανονική LC ή πιο προηγμένες τεχνικές όπως χρωματογραφία ανταλλαγής ανιόντων με παλμική αμπερομετρική ανίχνευση (HPAEC-PAD).

Δεδομένου ότι ο στόχος είναι να παραχθεί ένα πολύ παρόμοιο μόριο και να αποδειχθεί ότι το βιομοειδές περιέχει ουσιαστικά την ίδια δραστική ουσία με το προϊόν αναφοράς, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι όλες οι αναλύσεις ομοιότητας πραγματοποιούνται σε κάθε βήμα ως συγκρίσεις μεταξύ του βιομοειδούς και του προϊόντος αναφοράς του.⁽¹⁾

1.4.4 In vitro μέθοδοι για λειτουργικό και ανοσολογικό χαρακτηρισμό

Οι βιολογικές λειτουργικές δοκιμασίες παρέχουν πληροφορίες σχετικά με χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τη λειτουργία του προϊόντος και την αποτελεσματικότητά του και είναι κρίσιμες για την ανάπτυξη βιοομοειδών. Αυτές οι δοκιμασίες συμπληρώνουν τη δομική ανάλυση επιτρέποντας τον προσδιορισμό της πιθανής επίδρασης των παρατηρούμενων δομικών διαφορών μεταξύ του βιοομοειδούς και του βιολογικού αναφοράς. Εκτός από τη συγκρισιμότητα για την επίδειξη βιοομοιότητας, οι βιοδοκιμασίες χρησιμοποιούνται επίσης για την επιλογή υποψηφίων φαρμάκων, την απελευθέρωση προϊόντος και την αξιολόγηση της σταθερότητας. Τέτοιες αναλύσεις προβλέπουν πώς ένα βιοομοειδές μπορεί να συμπεριφέρεται in vivo όσον αφορά την αποτελεσματικότητα.^(1, 5)

Όσον αφορά τις βασικές λειτουργικές δοκιμασίες για τα μονοκλωνικά αντισώματα, σύμφωνα με την καθοδήγηση του EMA, σχετίζονται με περιοχές δέσμευσης αντιγόνου στο αντίσωμα (Fab) και/ή τη δέσμευση της περιοχής Fc με υποδοχείς που βρίσκονται στα κύτταρα του ανοσοποιητικού. Μέσω αυτών, τα mAbs επιτυγχάνουν τα αποτελέσματά τους είτε άμεσα προκαλώντας απόπτωση είτε έμμεσα επάγοντας κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από τα αντισώματα (ADCC) ή εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα (CDC).^(1, 5) Οι δοκιμασίες λειτουργίας του τελεστή περιλαμβάνουν την αποτελεσματικότητα δέσμευσης με το αντιγόνο και τους υποδοχείς Fcγ. Τα παραπάνω μπορούν να μετρηθούν με ακρίβεια χρησιμοποιώντας τεχνικές συντονισμού επιφανειακού πλασμονίου (SPR) και κυτταρομετρίας ροής, και κυτταρικές αναλύσεις που σχετίζονται με τις περιοχές Fc, όπως οι προσδιορισμοί της κυτταροτοξικότητας (ADCC, CDC). Η καθοδήγηση του EMA αναφέρει συγκεκριμένα ότι η δέσμευση συγγένειας με τους υποδοχείς Fc θα πρέπει να προσδιορίζεται. Παραδείγματα περιλαμβάνουν την αξιολόγηση της συγγένειας δέσμευσης με τον υποδοχέα Fcγ για τον προσδιορισμό της ικανότητας ενός αντισώματος να στρατολογεί ανοσοκύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των φυσικών φονικών κυττάρων, ουδετερόφιλων και μακροφάγων, ή ανάλυση δέσμευσης νεογνικού υποδοχέα Fc, η οποία μπορεί να προβλέψει τον in vivo χρόνο ημιζώης του αντισώματος.⁽¹⁾ Επιπρόσθετα, συνολικές λειτουργικές μελέτες επιτρέπουν τη σύγκριση της βιολογικής δραστηριότητας ενός βιοομοειδούς με το προϊόν αναφοράς του, συμπεριλαμβανομένων των ενδείξεων παρόμοιου μηχανισμού δράσης εάν ο τελευταίος είναι γνωστός.⁽⁵⁾

Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων της βιοδοκιμασίας βασίζεται στη στατιστική σημασία για κάθε χαρακτηριστικό που μετράται για το βιοομοειδές και το προϊόν αναφοράς και τα εύρη σημαντικότητας θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την αξιολόγηση της βιοομοιότητας σε αυτό το επίπεδο.⁽¹⁾ Εάν η βιοομοιότητα ως προς τα ποιοτικά χαρακτηριστικά, τη βιολογική δραστηριότητα, την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα είναι καλά τεκμηριωμένη *in vitro*, συνήθως δεν απαιτούνται προκλινικές *in vivo* μελέτες. Ωστόσο, εάν διεξαχθούν, αυτά συνήθως έχουν σχεδιαστεί για να αποκλείσουν περαιτέρω οποιεσδήποτε σημαντικές διαφορές στη βιολογική δραστηριότητα ή απροσδόκητες τοξικότητες που σχετίζονται με αναλυτική ανομοιότητα.⁽⁵⁾

1.4.5 Ανοσολογικές μελέτες

Τα βιολογικά είναι μεγάλα μόρια που είναι γνωστό ότι μπορούν να πυροδοτήσουν μια ανοσολογική απόκριση, που γενικά αναφέρεται ως απόκριση αντισώματος κατά του φαρμάκου (ADA). Αυτές οι αποκρίσεις μπορεί να συμπεριφέρονται ως εξουδετερωτικά αντισώματα, μπλοκάροντας την ενεργό θέση του βιολογικού και επηρεάζοντας την αποτελεσματικότητά του. Μπορεί επίσης να αναγνωρίσουν άλλους επιτόπους που ευνοούν το σχηματισμό ανοσοσυμπλεγμάτων που τελικά μπορεί να επηρεάσουν το προφίλ ΦΚ/ΦΔ.⁽¹⁾

Εκτός από τις πιθανές αρνητικές επιπτώσεις στην αποτελεσματικότητα οι αποκρίσεις αντισωμάτων μπορούν να οδηγήσουν σε απρόβλεπτες παρενέργειες, όπως η επίδραση στο ανοσογονικό δυναμικό ενός προϊόντος. Οι ανοσολογικές ιδιότητες και των δύο προϊόντων θα πρέπει επομένως να χαρακτηριστούν και να συγκριθούν. Η αξιολόγηση ανοσογονικότητας του βιοομοειδούς συνεχίζεται μέσω κλινικών δοκιμών και προγραμμάτων φαρμακοεπαγρύπνησης.⁽¹⁾

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΓΙΑ ΤΑ ΒΙΟΟΜΟΙΩΔΗ

2.1 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

2.1.1 Μελέτες συγκρισιμότητας

Τα βιοομοειδή, σε αντίθεση με τα γενόσημα, δικαίως απαιτείται από τις ρυθμιστικές αρχές να υποβληθούν σε συγκριτική κλινική δοκιμή μη κατωτερότητας έναντι του καινοτόμου φαρμάκου. Αυτοί οι τύποι μελετών αποτελούν ένα νέο παράδειγμα στον τομέα της κλινικής έρευνας καθώς δεν εκτελούνται με σκοπό να ωφεληθούν οι ασθενείς είτε μέσω της βελτίωσης της αποτελεσματικότητας είτε της μείωσης της τοξικότητας μιας νέας θεραπείας, αλλά καθαρά για να καταδειχθεί η εγγενής μεταβλητότητα στη συνέπεια.⁽¹⁷⁾ Ο αντίκτυπος στις κλινικές ιδιότητες σε σχέση με την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα τυχόν διαφορών στα ποιοτικά χαρακτηριστικά θα πρέπει να αξιολογείται κατά τη διάρκεια της κλινικής φάσης, εάν είναι δυνατόν, και ενδείκνυται.⁽¹⁾

Έτσι, ως το τελευταίο βήμα στην αξιολόγηση της βιοομοιότητας, ο σκοπός της κλινικής ανάπτυξης είναι να επιβεβαιώσει ότι το βιοομοειδές είναι πολύ παρόμοιο με αυτό του βιολογικού αναφοράς όσον αφορά την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα και να επιλύσει τυχόν υπολειπόμενες αβεβαιότητες. Σύμφωνα με τη θεμελιώδη αρχή της βιοομοιότητας, και που περιγράφηκε προηγουμένως σε αυτήν τη σειρά συμπληρωμάτων, δεν απαιτείται η καθιέρωση de novo αποτελεσματικότητας και ασφάλειας του βιοομοειδούς. Μόλις αποδειχθεί πειστικά η αναλυτική ομοιότητα του βιοομοειδούς με εκείνη του βιολογικού αναφοράς, ο παραγωγός του βιοομοειδούς μπορεί να βασιστεί, εν μέρει, στα προηγούμενα ευρήματα ποιότητας, ασφάλειας και αποτελεσματικότητας (σύμφωνα με τον EMA) ή ασφάλειας, καθαρότητας και ισχύος (σύμφωνα με τον FDA). Επειδή τα βιοομοειδή προορίζονται να χρησιμοποιηθούν στην ίδια δόση και δοσολογικό σχήμα με τα προϊόντα αναφοράς τους, δεν απαιτείται μελέτη εύρεσης δόσης Φάσης II.⁽¹⁾

Παρόλο που τα βιοομοειδή μπορούν, επομένως, να εγκριθούν με μειωμένο πακέτο κλινικών δεδομένων, σε σύγκριση με αυτό που απαιτείται για το προϊόν αναφοράς, οι απαιτήσεις για κλινικά δεδομένα είναι σημαντικές και η έκτασή τους εξαρτάται από τον βαθμό ομοιότητας που διαπιστώθηκε κατά τη φάση χαρακτηρισμού καθώς και από την έκταση γνώση που αποκτήθηκε με το προϊόν αναφοράς.⁽¹⁾ Η κλινική συγκρισιμότητα περιλαμβάνει σημαντικές πτυχές όπως η αποτελεσματικότητα ή/και η φαρμακοδυναμική και η ασφάλεια, συμπεριλαμβανομένης της ανοσογονικότητας. Η ισοδύναμη κλινική αποτελεσματικότητα καθορίζεται κανονικά με τη διασταυρούμενη σύγκριση του βιοομοειδούς με το φαρμακευτικό προϊόν αναφοράς του σε μια κλινική μελέτη που χρησιμοποιεί ένα ευαίσθητο κλινικό τελικό σημείο που επιτρέπει την ανίχνευση τυχόν διαφορών.⁽⁶⁴⁾ Ο Schneider και οι συνεργάτες του συνόψισαν τις βασικές αρχές που θέσπισε ο EMA, οι οποίες είναι σύμφωνες με τις αρχές του FDA, ως εξής⁽¹⁾:

1. Το πρώτο βήμα πρέπει να περιλαμβάνει μια αντιμέτωπη σύγκριση των φαρμακοκινητικών και φαρμακοδυναμικών ιδιοτήτων.
2. Απαιτείται τουλάχιστον μία συγκριτική κλινική δοκιμή με επαρκή ισχύ, τυχαιοποιημένη, παράλληλης ομάδας, κατά προτίμηση διπλά τυφλή, για σύγκριση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας ενός βιοομοειδούς σε σχέση με το αδειοδοτημένο προϊόν αναφοράς.
3. Απαιτείται επίδειξη ισοδύναμης αποτελεσματικότητας για την υιοθέτηση των συστάσεων δόσης που έχουν καθοριστεί για το προϊόν αναφοράς.
4. Με στόχο την επιβεβαίωση της ομοιότητας, η δοκιμή θα πρέπει να εγγράψει έναν ομοιογενή πληθυσμό ασθενών σε μια κλινική κατάσταση που είναι πιο ευαίσθητη για την ανίχνευση σχετικών διαφορών στα μόρια, εάν υπάρχουν.
5. Στο πλαίσιο της σταδιακής άσκησης συγκρισιμότητας που περιγράφεται παραπάνω, το κλινικό πρόγραμμα θα πρέπει να σχεδιαστεί ανάλογα με το επίπεδο των αποδεικτικών στοιχείων που αποκτήθηκαν από τα προηγούμενα βήματα που υποστηρίζουν τη συγκρισιμότητα.

2.1.2 Φαρμακοκινητικές / Φαρμακοδυναμικές (ΦΚ/ΦΔ) μελέτες

Αφού επιβεβαιωθεί η αναλυτική ομοιότητα (δομική και λειτουργική), το επόμενο βήμα είναι η αξιολόγηση της κλινικής ομοιότητάς της. Αυτή η διαδικασία ξεκινά με

αξιολόγηση του κλινικού φαρμακολογικού προφίλ (ΦΚ/ΦΔ) του προτεινόμενου βιοομοειδούς.⁽⁶¹⁾ Ο κύριος στόχος είναι να αποδειχθεί συγκρίσιμη έκθεση πριν από την έναρξη περαιτέρω κλινικών δοκιμών για την επίδειξη ασφάλειας και αποτελεσματικότητας.⁽³⁵⁾ Η ομοιότητα του φαρμακολογικού προφίλ αξιολογείται σε μια μελέτη Φάσης Ι η οποία συνήθως διεξάγεται σε υγιή άτομα. Υγιή άτομα περιλαμβάνονται σε μελέτες ΦΚ/ΦΔ για να διασφαλιστεί ότι ο πληθυσμός της μελέτης είναι ομοιογενής και ανοσοεπαρκής, επιτρέποντας μια ευαίσθητη σύγκριση μεταξύ του προτεινόμενου βιοομοειδούς και του προϊόντος αναφοράς.⁽⁶¹⁾

Η φαρμακοκινητική των πρωτεϊνών ορίζεται από το μέγεθός τους, τα μικρά πεπτίδια και τα πολυπεπίδια εξαλείφονται με τη νεφρική κάθαρση, ενώ οι μεγαλύτερες πρωτεΐνες αποβάλλονται από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα. Τα συμβατικά σχέδια μελέτης βιοϊσοδυναμίας και τα εύρη ισοδυναμίας μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βάση για τον σχεδιασμό των μελετών φαρμακοκινητικής συγκρισιμότητας. Ωστόσο, το γεγονός είναι ότι οι χημικά συντιθέμενες ενώσεις μπορούν να θεωρηθούν πανομοιότυπες, ενώ διαφορετικές εκδοχές θεραπευτικών πρωτεϊνών μπορεί να έχουν μικρές διαφορές που ενδέχεται να έχουν αντίκτυπο στη φαρμακοκινητική, ειδικά στη φάση αποβολής. Η ανοσογονικότητα είναι ένας κοινός λόγος για διαφορετικό ρυθμό αποβολής. Ως εκ τούτου, τα αντισώματα κατά του φαρμάκου πρέπει πάντα να μετρώνται σε μελέτες για την απόδειξη συγκρίσιμης φαρμακοκινητικής. Ένας παράγοντας σύγχυσης μπορεί να είναι η παραλλαγή των προϊόντων από παρτίδα σε παρτίδα, η οποία μπορεί να μετριάσει με διόρθωση για την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, εάν είναι εφικτό.⁽³⁵⁾ Η φαρμακοκινητική βιοϊσοδυναμία θεωρείται ότι έχει τεκμηριωθεί όταν το 90% της γεωμετρικής μέσης αναλογίας των τιμών ΦΚ μεταξύ του προτεινόμενου βιοομοειδούς και του προϊόντος αναφοράς εμπίπτει σε ένα προκαθορισμένο περιθώριο βιοϊσοδυναμίας 80-125% για τη συνολική έκθεση.⁽⁶¹⁾

Οι μελέτες ΦΚ/ΦΔ Φάσης Ι περιλαμβάνουν φαρμακοκινητικές αξιολογήσεις (απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμός και απέκκριση του φαρμάκου) καθώς και φαρμακοδυναμικές εκτιμήσεις (φαρμακολογικές επιδράσεις των φαρμάκων στον οργανισμό). Ενώ οι φαρμακοδυναμικές μελέτες μπορούν να παρέχουν χρήσιμες πρόσθετες ενδείξεις για τη λειτουργία του φαρμάκου, αυτές μπορούν να αξιολογηθούν μόνο όταν υπάρχει διαθέσιμος κατάλληλος δείκτης.⁽⁶¹⁾ Οι φαρμακοδυναμικοί δείκτες θα πρέπει να είναι σχετικοί με τη φαρμακολογική δραστηριότητα και, εάν είναι δυνατόν, με την κλινική έκβαση.⁽³⁵⁾ Αφού αποδειχθεί η δομική, λειτουργική και κλινική

φαρμακοκινητική ομοιότητα του βιοομοειδούς με το προϊόν αναφοράς, το κλινικό πρόγραμμα μπορεί να μετακινηθεί απευθείας σε μια επιβεβαιωτική δοκιμή Φάσης III.⁽⁶¹⁾

Υπάρχουν τρία διαφορετικά σενάρια στα οποία οι φαρμακοδυναμικές μελέτες μπορούν να εξασφαλίσουν κλινική συγκρισιμότητα χωρίς κλινικές μελέτες αποτελεσματικότητας⁽³⁵⁾:

- I. Ένας φαρμακοδυναμικός δείκτης είναι ένα γενικά αποδεκτό υποκατάστατο για την αποτελεσματικότητα μιας δεδομένης θεραπευτικής πρωτεΐνης.
- II. Εάν ένας φαρμακοδυναμικός δείκτης δεν είναι αποδεκτό υποκατάστατο, αλλά εξακολουθεί να είναι σημαντικός για τη φαρμακολογική δράση της πρωτεΐνης, μπορεί να διεξαχθεί μελέτη μίας ή πολλαπλής δόσης σε δύο ή περισσότερα επίπεδα δόσης, προκειμένου να διασφαλιστεί η σύγκριση στο απότομο μέρος της καμπύλης δόσης-έκθεσης-απόκρισης.
- III. Σε εξαιρετικές περιπτώσεις, η επιβεβαιωτική κλινική δοκιμή μπορεί να ακυρωθεί εάν οι φυσικοχημικές, δομικές και οι *in vitro* βιολογικές αναλύσεις και μελέτες φαρμακοκινητικότητας στον άνθρωπο, μαζί με το συνδυασμό φαρμακοδυναμικών δεικτών, που αντικατοπτρίζουν τη φαρμακολογική δράση και τη συγκέντρωση της δραστικής ουσίας, παρέχουν επαρκή στοιχεία για βιοομοιότητα.

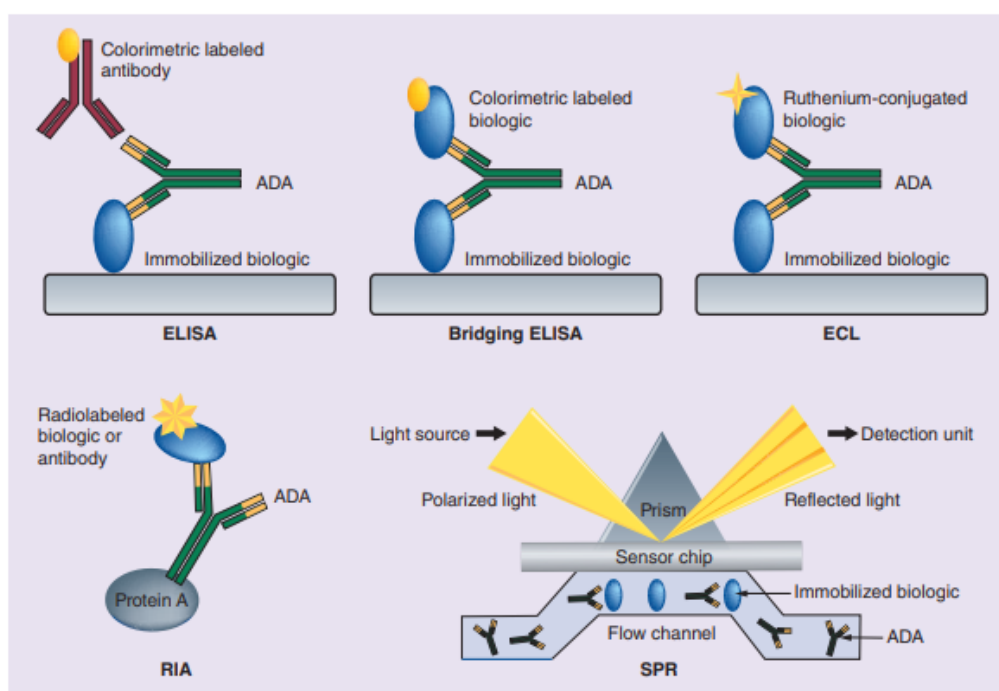
2.1.3 Ανοσογονικότητα

Οι αξιολογήσεις ανοσογονικότητας για τη σύγκριση ενός βιοομοειδούς με το προϊόν αναφοράς του συνεχίζονται κατά τη διάρκεια της κλινικής φάσης ανάπτυξης.⁽¹⁾ Η ανοσογονικότητα καθορίζεται από διαφορετικούς παράγοντες όπως η διαδικασία παρασκευής ενός βιολογικού φαρμακευτικού προϊόντος, το ιατρικό ιστορικό του ασθενούς και η συγχορήγηση άλλων φαρμάκων. Επιπλέον, κάθε φαρμακευτική εταιρεία παράγει φαρμακευτικά προϊόντα χρησιμοποιώντας διαφορετικές κυτταρικές σειρές και μέσα από διαφορετικές διαδικασίες παραγωγής, δημιουργώντας την πραγματική πιθανότητα διαφορετικής ανοσογονικότητας λόγω δομικών διακυμάνσεων

της τριτογενούς και τεταρτοταγούς δομής και πιθανών προσμίξεων. Η ανοσογονικότητα μπορεί επίσης να επηρεαστεί από την οδό χορήγησης.⁽¹⁷⁾

Κατά τη δοκιμή ομοιότητας της ανοσογονικότητας αξιολογούνται τόσο τα δεσμευτικά αντισώματα όσο και τα εξουδετερωτικά αντισώματα. Αυτό γενικά συνεπάγεται την ανάπτυξη και την επικύρωση αναλυτικών δοκιμών για την ειδική ανίχνευση αντισωμάτων. Διάφορες μέθοδοι είναι διαθέσιμες για τη μέτρηση της ανοσογονικότητας, στις οποίες περιλαμβάνονται⁽¹⁾ (Εικόνα 3):

- ✓ Η ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασίας (ELISA)
- ✓ Η ραδιοανοσοδοκιμασία
- ✓ Οι ανοσοπροσδιορισμοί ηλεκτροχημειοφωταύγειας
- ✓ Οι ομοιογενείς προσδιορισμοί μετατόπισης κινητικότητας (HMSA)
- ✓ Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης



Εικόνα 3. Μέθοδοι ανίχνευσης αποκρίσεων αντισωμάτων.⁽⁵⁵⁾

Τα αποτελέσματα μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με τη μεθοδολογία που χρησιμοποιείται και άλλους παράγοντες, όπως τα επίπεδα κυκλοφορίας του βιολογικού παράγοντα. Το τελευταίο οφείλεται στο φάρμακο που υπάρχει στο πλάσμα, το οποίο

μπορεί να “δεσμεύσει” τα ειδικά για το φάρμακο αντισώματα καθιστώντας τα μη διαθέσιμα για δέσμευση στην ανάλυση, με αποτέλεσμα να μην είναι ανιχνεύσιμα.⁽¹⁾

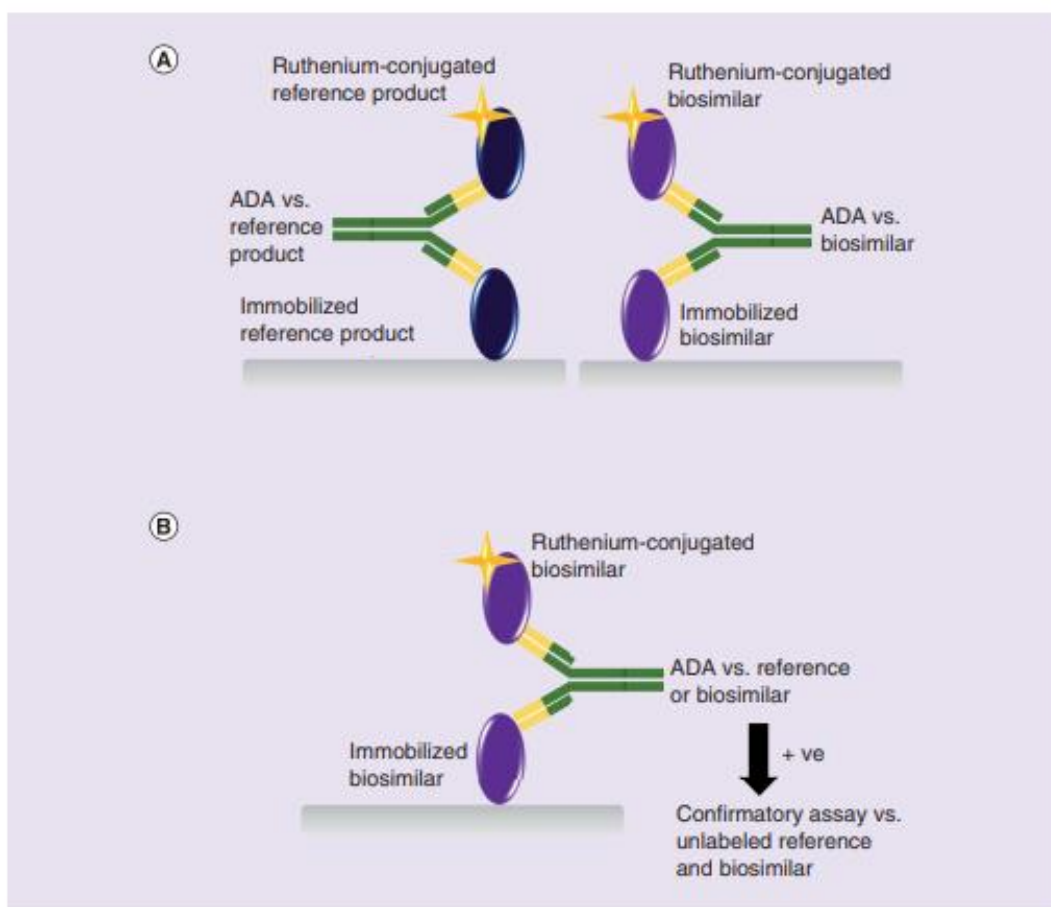
2.1.4 Περιορισμοί συγκριτικών αξιολογήσεων ανοσογονικότητας

Οι στρατηγικές αξιολόγησης ανοσογονικότητας για βιοομοειδή καθορίζονται κατά περίπτωση. Ο στόχος της αξιολόγησης είναι να χαρακτηρίσει τις πιθανές διαφορές μεταξύ του βιοομοειδούς υποψήφιου και του προϊόντος αναφοράς όσον αφορά τη συχνότητα εμφάνισης και τη σοβαρότητα των ανθρώπινων ανοσολογικών αποκρίσεων. Για να επιτευχθεί αυτός ο στόχος, οι βιοαναλυτικές δοκιμές που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό παρόμοιας ανοσογονικότητας πρέπει να έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν τις αποκρίσεις αντισωμάτων κατά των βιοομοειδών και των προϊόντων αναφοράς με συγκρίσιμο τρόπο. Ωστόσο, μια γενική προσέγγιση για τη συγκριτική αξιολόγηση της ανοσογονικότητας δεν είναι καλά καθορισμένη, ούτε υπάρχει πλήρης συναίνεση μεταξύ των ειδικών. Ως εκ τούτου, η χρήση μίας ή δύο δοκιμασιών για τη σύγκριση των ποσοστών αποκρίσεων αντισωμάτων παραμένει θέμα συζήτησης (Εικόνα 4).⁽⁵⁵⁾

Η προσέγγιση δύο δοκιμασιών χρησιμοποιεί δύο παράλληλες αναλύσεις, μία με αντιδραστήρια που ανιχνεύουν αντισώματα έναντι του προϊόντος αναφοράς και μία με αντιδραστήρια για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του βιοομοειδούς. Ενώ δύο ξεχωριστά βελτιστοποιημένες αναλύσεις μπορεί να προσφέρουν καλύτερη αναπαράσταση των μεμονωμένων προφίλ ανοσογονικότητας του βιοομοειδούς και προϊόν αναφοράς, αυτή η προσέγγιση είναι προκλητική από λειτουργική σκοπιά, καθώς τα δείγματα είτε πρέπει να εκτελούνται δύο φορές (μία με κάθε ανάλυση) είτε, εναλλακτικά, να αφαιρούνται τα τυφλά. Επιπλέον, η χρήση χωριστών προσδιορισμών/αντιδραστηρίων μπορεί να αναμένεται να μειώσει την αξιοπιστία των συγκρίσεων δεδομένων λόγω της μεταβλητότητας μεταξύ των προσδιορισμών.⁽⁵⁵⁾

Αντίθετα, η προσέγγιση της μίας ανάλυσης χρησιμοποιεί έναν μόνο προσδιορισμό για την ελαχιστοποίηση της βιοαναλυτικής μεροληψίας. Η δέσμευση αντισωμάτων μετράται πρώτα σε μια δοκιμασία διαλογής που χρησιμοποιεί μόνο βιοομοειδή. Στη συνέχεια εφαρμόζεται ένα επιβεβαιωτικό βήμα για την αξιολόγηση της αναστολής της δέσμευσης χρησιμοποιώντας τόσο μη επισημασμένο προϊόν αναφοράς όσο και βιοομοειδές ως ανταγωνιστικά αντιγόνα. Με αυτήν την προσέγγιση, η ανίχνευση

αντισωμάτων κατά των βιοομοειδών βελτιστοποιείται και η μεταβλητότητα μεταξύ των προσδιορισμών ελαχιστοποιείται, αλλά λαμβάνονται λιγότερες πληροφορίες σχετικά με την ανοσογονικότητα του προϊόντος αναφοράς. Ωστόσο, καθώς η παραγωγή νέων πληροφοριών σχετικά με το προϊόν αναφοράς δεν είναι ο σκοπός της συγκριτικής αξιολόγησης ανοσογονικότητας, συνιστάται γενικά από ρυθμιστικές αρχές και εμπειρογνώμονες της βιοαναλυτικής βιομηχανίας μια επικυρωμένη προσέγγιση μιας ανάλυσης και όχι μια προσέγγιση δύο δοκιμασιών.⁽⁵⁵⁾



Εικόνα 4. Συγκριτική αξιολόγηση ανοσογονικότητας. Α) Προσέγγιση δύο δοκιμασιών, Β) Προσέγγιση μίας ανάλυσης.⁽⁵⁵⁾

2.1.5 Αποτελεσματικότητα – Ασφάλεια

Ο στόχος της συγκριτικής μελέτης κλινικής αποτελεσματικότητας δεν είναι να καταδείξει κλινικό όφελος, καθώς αυτό έχει ήδη καθιερωθεί ανεξάρτητα για το προϊόν αναφοράς.⁽⁵⁸⁾ Αντίθετα, ο στόχος είναι να επιβεβαιωθεί η κλινική ισοδυναμία του δυνητικού βιοομοειδούς και του προϊόντος αναφοράς, με βάση προκαθορισμένα

περιθώρια, χρησιμοποιώντας πληθυσμό μελέτης και τελικό σημείο αποτελεσματικότητας που είναι αρκετά ευαίσθητα για την ανίχνευση πιθανών διαφορών που σχετίζονται με το προϊόν, ενώ ταυτόχρονα ελαχιστοποιούν την επίδραση των παραγόντων που σχετίζονται με τον ασθενή ή την ασθένεια.^(35, 58)

Η επίδειξη κλινικής ομοιότητας σε μια συγκριτική μελέτη Φάσης III είναι το τελικό βήμα για την επίδειξη βιοομοιότητας μεταξύ του προτεινόμενου βιοομοειδούς και του αρχικού προϊόντος.⁽⁶¹⁾ Κατά το σχεδιασμό τέτοιων μελετών, προκύπτουν τουλάχιστον τρία βασικά ζητήματα⁽⁶⁵⁾:

- Στατιστικός σχεδιασμός.
- Πληθυσμός μελέτης.
- Τελικά σημεία μελέτης.

Περαιτέρω βασικά ζητήματα στο σχεδιασμό συγκριτικών δοκιμών για βιοομοειδή περιλαμβάνουν την επιλογή της θεραπευτικής ένδειξης, το βασικό πρότυπο θεραπείας περίθαλψης, τον σχεδιασμό μετάβασης και τον ορισμό των περιθωρίων ισοδυναμίας.⁽⁵⁾

Όσον αφορά τον στατιστικό σχεδιασμό, αυτός βασίζεται συνήθως σε δοκιμές ισοδυναμίας. Όπως και με τη φαρμακοκινητική αξιολόγηση, η ισοδυναμία αξιολογείται συχνότερα με βάση τις σχετικές και όχι απόλυτες διαφορές μεταξύ του αρχικού προϊόντος και του βιοομοειδούς, με την αναλογία αποτελέσματος να είναι ιδανικά όσο το δυνατόν πιο κοντά στο 1. Τα περιθώρια συγκρισιμότητας θα πρέπει να προκαθορίζονται και να αιτιολογούνται με βάση τόσο στατιστικές όσο και κλινικές εκτιμήσεις από τα δεδομένα του αρχικού προϊόντος.⁽⁶⁵⁾ Τα περιθώρια ισοδυναμίας θα πρέπει να είναι επιστημονικά αιτιολογημένα και να είναι αρκετά επαρκή ώστε να επιτρέπουν την ανίχνευση οποιασδήποτε κλινικά σημαντικής διαφοράς στην αποτελεσματικότητα, εάν υπάρχει τέτοια διαφορά.⁽⁶¹⁾

Ο πληθυσμός της μελέτης, είναι ιδιαίτερα σημαντικό σημείο, επειδή η απόδειξη της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας σε μία ένδειξη μπορεί, υπό συγκεκριμένες συνθήκες, να επεκταθεί και σε άλλες ενδείξεις του αρχικού προϊόντος. Η καθοδήγηση από τον EMA και τον FDA αναφέρει ότι θα πρέπει να επιλεγεί ο πιο ομοιογενής και ευαίσθητος πληθυσμός ασθενών για να μεγιστοποιηθεί η πιθανότητα εντοπισμού τυχόν διαφορών που σχετίζονται με το προϊόν.⁽⁶⁵⁾ Ένας ευαίσθητος πληθυσμός μελέτης θα ήταν συνήθως αυτός για τον οποίο η επίδραση της θεραπείας του προϊόντος αναφοράς έχει αποδειχθεί ότι είναι ισχυρή σε προηγούμενες δοκιμές, γεγονός που ενισχύει έτσι

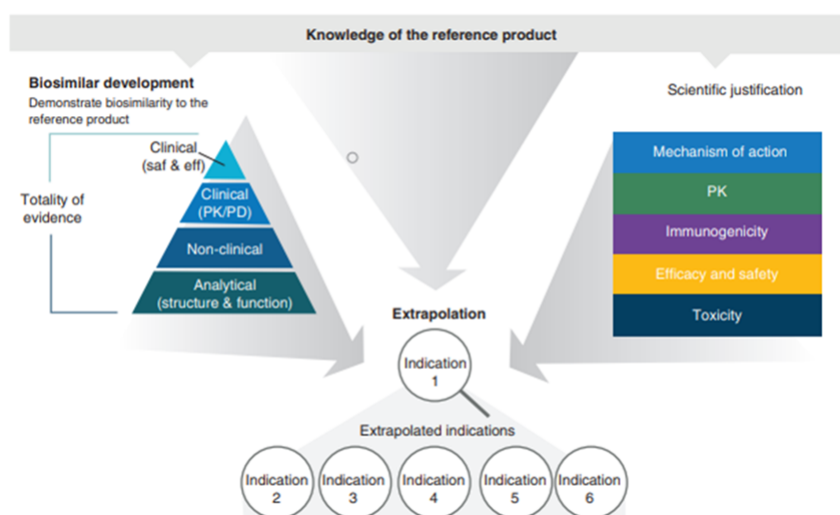
την ικανότητα ανίχνευσης μικρών διαφορών στην αποτελεσματικότητα. Παράγοντες όπως οι προηγούμενες γραμμές θεραπείας και η επίδραση των συγχωρηγούμενων φαρμάκων σχετίζονται επίσης με την ευαισθησία.⁽⁵⁸⁾

Τα τελικά σημεία αποτελεσματικότητας που επιλέγονται, μπορεί να μην είναι τα ίδια με αυτά της βασικής κλινικής δοκιμής του προϊόντος αναφοράς.⁽³⁵⁾ Η συνολική επιβίωση, η επιβίωση χωρίς ασθένεια ή η εξέλιξη της νόσου, αποτελούν χρυσά πρότυπα για την απόδειξη κλινικού οφέλους στις ογκολογικές δοκιμές.^(58, 61) Ωστόσο, δεν αποτελούν ρεαλιστικά τελικά σημεία για την κλινική αξιολόγηση των βιοομοειδών καθώς ο στόχος εδώ δεν είναι να αποδειχθεί ή να αποκατασταθεί το εγγενές κλινικό όφελος, αλλά να εντοπιστεί και να προσδιοριστεί εάν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των κλινικών επιδράσεων του βιοομοειδούς έναντι του προϊόντος αναφοράς. Το κλειδί είναι η επιλογή ενός κατάλληλου τερματικού σημείου, το οποίο θα πρέπει να είναι αρκετά ευαίσθητο ώστε να ανιχνεύει μια διαφορά στη δραστηριότητα, εάν αυτή υπάρχει.⁽⁶¹⁾ Έχει προταθεί πως βραχυπρόθεσμα υποκατάστατα τελικά σημεία, όπως το συνολικό ποσοστό απόκρισης που μετράται σε ένα ορισμένο χρονικό σημείο ή η παθολογική πλήρης απόκριση, θεωρούνται επαρκή και καταλληλότερα για τον εντοπισμό πιθανών διαφορών που σχετίζονται με το αρχικό προϊόν σε μια συγκριτική κλινική μελέτη ενός πιθανού αντικαρκινικού βιοομοειδούς.^(58, 61) Επιπλέον, δεδομένου ότι πρόκειται για ελεγχόμενες συγκριτικές δοκιμές μεταξύ δύο πιθανώς πολύ όμοιων προϊόντων, μπορεί να είναι σκόπιμο να χρησιμοποιηθεί η αναλογία των συνολικών ρυθμών απόκρισης, ως το κύριο τελικό σημείο. Όσο πιο κοντά είναι αυτή η αναλογία στο 1, τόσο μικρότερη είναι η διαφορά στα ποσοστά απόκρισης μεταξύ των δύο προϊόντων, και επομένως τόσο μεγαλύτερη η ομοιότητά τους.⁽⁶¹⁾

2.2 ΠΑΡΕΚΤΑΣΗ ΕΝΔΕΙΞΕΩΝ

Για την έγκριση βιοομοειδών, κλινικές μελέτες που αποδεικνύουν ισοδύναμη αποτελεσματικότητα και ασφάλεια σε μία μόνο ένδειξη είναι συνήθως επαρκείς για τη χορήγηση έγκρισης για όλες τις καταχωρημένες ενδείξεις του προϊόντος αναφοράς. Αυτό είναι γνωστό ως “παρέκταση ενδείξεων”.⁽⁴⁵⁾ Η παρέκταση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας, από τη θεραπευτική ένδειξη που έχει

διερευνηθεί σε άλλες θεραπευτικές ενδείξεις, είναι δυνατή εάν αιτιολογείται δεόντως. (Εικόνα 5) Είναι σημαντικό η θεραπευτική ένδειξη να είναι αντιπροσωπευτική άλλων θεραπευτικών ενδείξεων. Η καταλληλότητα μιας θεραπευτικής ένδειξης πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν συνδυάζοντας διάφορους παράγοντες. Για παράδειγμα, η επιλεγμένη ένδειξη θα πρέπει να είναι ευαίσθητη για διαφορές σε όλες τις πτυχές που σχετίζονται με τις θεραπευτικές ενδείξεις.⁽³⁵⁾



Εικόνα 5. Η παρέκταση ενδείξεων για το προτεινόμενο βιοομοειδές βασίζεται στην εν τω βάθει γνώση του προϊόντος αναφοράς και την επιστημονική αιτιολόγηση.⁽³⁵⁾

Η παρέκταση ενδείξεων αποτελεί εγγενές μέρος της άσκησης συγκρισιμότητας και αποτελεί τη βάση της κανονιστικής αξιολόγησης των αλλαγών στη διαδικασία παρασκευής βιολογικών φαρμάκων για πολλά χρόνια. Οι αλλαγές στην κατασκευή είναι κοινές και απαιτούνται συχνά για σκοπούς βελτίωσης του προϊόντος, κλιμάκωσης ή για την κάλυψη νέων κανονιστικών απαιτήσεων. Σε τέτοιες περιπτώσεις, διεξάγεται μια άσκηση συγκρισιμότητας με το προϊόν πριν και μετά την αλλαγή. Καθώς τα βιοχημικά αναλυτικά δεδομένα θεωρούνται πιο ευαίσθητα στην ανίχνευση πιθανών αλλαγών του προϊόντος από τα δεδομένα κλινικών δοκιμών, η συγκρισιμότητα υποστηρίζεται γενικά μόνο από ποιοτικές (φυσικοχημικές και βιολογικές) μελέτες. Ωστόσο, μπορεί να απαιτείται υποστήριξη μη κλινικών και κλινικών δεδομένων σε συνδυασμό με συνεχή παρακολούθηση της ασφάλειας όταν τα ποιοτικά δεδομένα δεν είναι επαρκή για να διασφαλιστεί ότι η αλλαγή δεν θα επηρεάσει την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου.⁽⁴⁵⁾

Καταστάσεις στις οποίες η παρέκταση δεν είναι δυνατή χωρίς πρόσθετα δεδομένα, παρουσιάζονται παρακάτω:

- ✓ Η δραστική ουσία αντιδρά με αρκετούς σχετικούς υποδοχείς που μπορεί να παίζουν διαφορετικούς ρόλους σε διαφορετικές θεραπευτικές ενδείξεις.
- ✓ Η ίδια η δραστική ουσία έχει περισσότερες από μία δραστικές θέσεις και αυτές οι θέσεις μπορεί να έχουν διαφορετικές επιπτώσεις σε διαφορετικές θεραπευτικές ενδείξεις. Μια τέτοια κατάσταση μπορεί να προκύψει με μονοκλωνικά αντισώματα.
- ✓ Υπάρχει μια ανησυχία για την ασφάλεια που δεν αντιμετωπίστηκε σωστά στην κλινική δοκιμή που διεξήχθη, όπως η ανοσογονικότητα.

Σε αυτές τις περιπτώσεις, ο αιτών πρέπει να παράσχει πρόσθετα δεδομένα για την υποστήριξη της παρέκτασης.⁽³⁵⁾

Όσον αφορά τα μονοκλωνικά αντισώματα, δεδομένου του μηχανισμού δράσης τους, της μη γραμμικής φαρμακοκινητικής και της δόσης κορεσμού στόχου που χρησιμοποιούνται συνήθως στην πράξη, δεν αναμένονται διαφορές αποτελεσματικότητας. Παρόλα αυτά, κατά τη χρήση στη θεραπεία διάφορων μορφών καρκίνου, ενδέχεται να απαιτούνται δεδομένα μακροπρόθεσμης τοξικότητας εκτός από την αποτελεσματικότητα προτού γίνει μετάβαση στο βιοομοειδές. Επομένως, ενισχύεται η ανάγκη για ιχνηλασιμότητα και φαρμακοεπαγρύπνηση.⁽¹⁷⁾

2.3 ΦΑΡΜΑΚΟΕΠΑΓΡΥΠΝΗΣΗ

Ο τομέας της φαρμακοεπαγρύπνησης παρακολουθεί, αναφέρει και αξιολογεί όλα τα φάρμακα, ακόμη και αυτά που έχουν χρησιμοποιηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα.⁽¹⁹⁾

Η συστηματική και συνεχής παρακολούθηση της ασφάλειας είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό και την αξιολόγηση των σημάτων ασφαλείας μετά την έγκριση για οποιοδήποτε εγκεκριμένο φάρμακο. Αυτά τα σήματα μπορεί να περιλαμβάνουν τον αντίκτυπο των εγγενών διαφορών στην ανοσογονικότητα μεταξύ των προϊόντων και την ανίχνευση σπάνιων συμβάντων που μπορεί να σχετίζονται μοναδικά με ένα συγκεκριμένο προϊόν.⁽¹⁰⁾ Η επιτήρηση μετά την κυκλοφορία (ουσιώδες μέρος της φαρμακοεπαγρύπνησης) είναι το σύνολο των διεπιστημονικών δραστηριοτήτων που στοχεύουν να κάνουν τη χρήση των φαρμάκων όσο το δυνατόν ασφαλέστερη, δηλαδή

να διασφαλίζουν ότι τα οφέλη τους συνεχίζουν να υπερτερούν των κινδύνων ακόμη και μετά την κυκλοφορία τους.⁽¹⁹⁾

Το καθήκον της φαρμακοεπαγρύπνησης είναι να ανιχνεύσει πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες ή αλλαγές στη συχνότητα ανεπιθύμητων ενεργειών, οι οποίες είναι προβλέψιμες και ήδη γνωστές, και να εφαρμόσει, εάν είναι απαραίτητο, ειδικά προληπτικά μέτρα.⁽¹⁹⁾ Όπως και τα καινοτόμα βιολογικά προϊόντα, τα βιοομοειδή απαιτούν επίσης εξειδικευμένο και έμπειρο προσωπικό φαρμακοεπαγρύπνησης λόγω της πολυπλοκότητας των δεδομένων ασφαλείας και των προκλήσεων στην ανίχνευση ανεπιθύμητων ενεργειών.⁽⁴⁷⁾

Όλα τα βιολογικά φάρμακα, συμπεριλαμβανομένων των βιοομοειδών, έχουν ειδικές εκτιμήσεις που ισχύουν για τη φαρμακοεπαγρύπνησή τους, συμπεριλαμβανομένης της ανοσογονικότητας και της παραγωγικής μεταβλητότητας. Για παράδειγμα, στην περίπτωση αλλαγών στην παραγωγική διαδικασία, τα αναλυτικά δεδομένα συγκρισιμότητας και οι υποστηρικτικές κλινικές μελέτες (εάν υπάρχουν) ενδέχεται να μην είναι πάντα σε θέση να προβλέψουν σπάνιες ανεπιθύμητες ενέργειες που θα μπορούσαν να προκύψουν από τη μεταβολή της ανοσογονικότητας. Αν και σπάνια, υπάρχουν περιστατικά όπου έχουν προκύψει σοβαρά ζητήματα ασφάλειας μετά από τέτοιες αλλαγές. Επιπλέον, στην περίπτωση βιοομοειδών, είναι σημαντικό η κλινική ασφάλεια να παρακολουθείται σε συνεχή βάση μετά την έγκριση, καθώς οι κλινικές δοκιμές είναι συνήθως ανεπαρκείς για τον εντοπισμό σπάνιων ανεπιθύμητων ενεργειών.⁽⁴⁵⁾

Μία από τις μεγαλύτερες ανησυχίες σχετικά με τα βιολογικά φάρμακα είναι οι κίνδυνοι που συνδέονται με αυτά τα προϊόντα με την πάροδο του χρόνου λόγω των δομικών αλλαγών που μπορεί να συμβούν στο μόριο. Είναι πολύ πιθανό το προφίλ κινδύνου-οφέλους που καθορίστηκε τη στιγμή της έγκρισης να αλλάξει με την πάροδο του χρόνου μέσω της εκτεταμένης χρήσης, των χαρακτηριστικών του ασθενούς και της έκθεσης του ασθενούς. Ως εκ τούτου, η φαρμακοεπαγρύπνηση θα πρέπει να συνεχιστεί όσο το βιοομοειδές βρίσκεται στην αγορά.⁽⁴⁷⁾

2.4 ΕΝΑΛΛΑΞΙΜΟΤΗΤΑ

Ένα βασικό ζήτημα είναι εάν τα βιοομοειδή θα πρέπει να χορηγούνται εξ αρχής ως θεραπευτικό σχήμα ή εάν είναι σκόπιμο οι ασθενείς που λαμβάνουν ήδη θεραπεία με φάρμακο αναφοράς να αλλάξουν σε βιοομοειδές. Με άλλα λόγια, υπάρχουν ερωτήματα σχετικά με το εάν τα βιοομοειδή είναι “εναλλάξιμα” και εάν πρακτικές όπως η “εναλλαγή” ή η “υποκατάσταση” είναι κατάλληλες.⁽⁴⁵⁾ Τα εγκεκριμένα βιοομοειδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ασθενείς που είχαν λάβει προηγούμενη θεραπεία με το προϊόν αναφοράς, και συνήθως για λόγους που σχετίζονται με το κόστος, η θεραπεία αλλάζει με τη λήψη ενός εγκεκριμένου βιοομοειδούς. Αυτή η κατάσταση είναι πιο πιθανό να προκύψει κατά τη διάρκεια της θεραπείας συντήρησης παρά κατά τη διάρκεια της θεραπείας επαγωγής στο πλαίσιο του καρκίνου.⁽⁷⁰⁾

Η ιατρική κοινότητα έχει εκφράσει ορισμένες επιφυλάξεις σχετικά με την εναλλαξιμότητα και την εναλλαγή. Μία από τις πιο συχνά εκφραζόμενες ανησυχίες είναι ο κίνδυνος ανοσογονικότητας που προκύπτει από μια αλλαγή. Ανάλογοι κίνδυνοι είναι εγγενείς σε όλα τα βιολογικά φάρμακα και όχι μόνο στα βιοομοειδή. Η ρυθμιστική γνώμη στην Ευρώπη είναι ότι είναι απίθανο να προκληθεί ανεπιθύμητη ανοσογονικότητα από τη μετάβαση σε βιοομοειδές, εκτός εάν το βιοομοειδές είναι κατώτερης ποιότητας (δηλαδή δεν είναι πραγματικά συγκρίσιμο) με το αρχικό προϊόν. Αυτό είναι απίθανο να συμβαίνει σε περιοχές με αυστηρούς και υψηλής ποιότητας ρυθμιστικούς ελέγχους, όπου ισχύουν τα εξής⁽⁴⁵⁾:

- ✓ το βιοομοειδές είναι πολύ παρόμοιο με το φάρμακο αναφοράς όσον αφορά τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και τη βιολογική λειτουργία,
- ✓ ένα πρόγραμμα δοκιμής ανοσογονικότητας συγκρίνει τη συχνότητα εμφάνισης, την εμμόνη, τον τίτλο και την ικανότητα εξουδετέρωσης των αντισωμάτων αναφοράς και των βιοομοειδών αντισωμάτων κατά των φαρμάκων,
- ✓ το βιοομοειδές φάρμακο και το φάρμακο αναφοράς έχουν πανομοιότυπη πρωτογενή αλληλουχία αμινοξέων και επομένως μοιράζονται τους ίδιους γραμμικούς επιτόπους T-λεμφοκυττάρων,
- ✓ δυνητικά ανοσογόνες ακαθαρσίες και συσσωματώματα ελέγχονται αυστηρά κατά την απελευθέρωση, και

- ✓ πληροφορίες σχετικά με την ανοσογονικότητα του φαρμάκου αναφοράς είναι ήδη διαθέσιμες, επιτρέποντας έτσι την αντιμετώπιση πιθανών κινδύνων ανοσογονικότητας στις δραστηριότητές της φαρμακοεπαγρύπνησης.

Οι περισσότερες μελέτες μεταγωγής που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα αφορούν μια εναλλαγή από το προϊόν αναφοράς σε βιοομοειδές.⁽⁴⁵⁾ Επίσης, σημαντικά περισσότερες μελέτες έχουν αξιολογήσει την αλλαγή βιοομοειδών σε μη καρκινικές ενδείξεις, και αξίζει να σημειωθεί πως δεν αναφέρθηκαν διαφορές στην αποτελεσματικότητα ή την ασφάλεια μετά την αλλαγή στην πλειονότητα των μελετών.⁽⁷⁰⁾ Είναι σαφές ότι τα στοιχεία που υποστηρίζουν την εναλλαξιμότητα αυξάνονται. Ωστόσο, η απόδειξη της εναλλαξιμότητας συνδέεται με σημαντικές επιστημονικές και πρακτικές προκλήσεις. Υπάρχουν εκκλήσεις για μελέτες μεταγωγής ώστε να συμπεριληφθούν σχέδια που ενσωματώνουν πολλαπλές εναλλαγές μεταξύ των βιοομοειδών προϊόντων και των προϊόντων αναφοράς. Αν και αυτό θα παρείχε διαβεβαίωση στους επαγγελματίες υγείας, υπάρχουν αρκετοί περιορισμοί με αυτήν την προσέγγιση, όπως η αύξηση του κόστους ανάπτυξης βιοομοειδών φαρμάκων. Επιπλέον, καθώς διατίθενται αυξανόμενοι αριθμοί βιοομοειδών φαρμάκων, θα είναι δύσκολο να σχεδιαστούν μελέτες αλλαγής που θα αντιμετωπίζουν όλα τα πιθανά κλινικά σενάρια που μπορεί να προκύψουν.⁽⁴⁵⁾ Αυτού του είδους οι μελέτες φαίνονται περιττές, καθώς τα διαθέσιμα δεδομένα για τη μεταγωγή υποδεικνύουν ότι εφόσον η βιοομοιότητα έχει καθιερωθεί μέσω μιας αυστηρής κανονιστικής οδού, παρέχεται η διαβεβαίωση ότι η πρακτική της αλλαγής δεν επηρεάζει αρνητικά την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα της θεραπείας, και η μετάβαση από το αρχικό προϊόν σε ένα εγκεκριμένο βιοομοειδές θα πρέπει να είναι μια αποδεκτή προσέγγιση.⁽⁷⁰⁾

2.5 ΤΟ ΚΑΝΟΝΙΣΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΣΤΗΝ Ε.Ε.

Σύμφωνα με την Ε.Ε., ένα φαρμακευτικό προϊόν με παρόμοια βιολογική δράση, που ονομάζεται “βιοομοειδές”, είναι ένα βιολογικό φάρμακο που έχει αναπτυχθεί για να είναι παρόμοιο με ένα υπάρχον βιολογικό φάρμακο (φάρμακο αναφοράς ή πρωτότυπο βιοφαρμακευτικό) του οποίου τα δικαιώματα προστασίας δεδομένων και

αποκλειστικότητα έχουν λήξει ή πλησιάζουν στη λήξη τους, αλλά δεν είναι αυστηρά το ίδιο με μια γενική έννοια.⁽⁶⁴⁾

Η έννοια της “βιοομοιότητας”, για τις εφαρμογές αδειοδότησης παρασκευής και κυκλοφορίας, για παρόμοιες εκδόσεις καινοτόμων φαρμακευτικών προϊόντων στην Ε.Ε., εισήχθη το 2003 μέσω της εφαρμογής δύο Οδηγιών της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (ΕΚ) που τροποποιούν την Οδηγία 2001/83 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, η οποία τέθηκε σε ισχύ το 2005.^(35, 64) Η οδηγία αυτή διέκρινε τα βιοομοειδή από τα χημικά συντιθέμενα γενόσημα, και περιείχε τις βασικές τεχνικές απαιτήσεις. Η οδηγία αναφέρει ότι ο αιτών για ένα παρόμοιο βιολογικό προϊόν πρέπει να παρέχει όχι μόνο πλήρη τεκμηρίωση ποιότητας και στοιχεία βιοϊσοδυναμίας με το προϊόν αναφοράς, αλλά και αποτελέσματα μη κλινικών δοκιμών και κλινικών μελετών που θα οριστούν σε επιστημονικές οδηγίες.⁽³⁵⁾ Το OmnitropeTM (σωματοτροπίνη) ήταν το πρώτο βιοομοειδές φάρμακο που κυκλοφόρησε στην αγορά το 2006 στην ΕΕ. Αργότερα, με αναθεώρηση των κατευθυντήριων γραμμών, διαπιστώθηκε ότι οι μη κλινικές μελέτες (φαρμακοδυναμικές μελέτες *in vitro*, φαρμακοδυναμικές *in vivo* μελέτες, τοξικολογικές μελέτες), κλινικές μελέτες (φαρμακοκινητική, φαρμακοδυναμική, κλινική αποτελεσματικότητα), καθώς και συγκριτικά δεδομένα ασφάλειας μετά την κυκλοφορία, σχέδιο φαρμακοεπαγρύπνησης και μελέτες για την παρέκταση της ένδειξης, απαιτήθηκαν προκειμένου να συμπληρωθεί το κύριο κείμενο οδηγιών για την απόδειξη της συγκρισιμότητας.⁽⁶⁴⁾

Το ρυθμιστικό σύστημα στην Ε.Ε. έχει τέσσερις διαδικασίες άδειας κυκλοφορίας. Μια κεντρική διαδικασία άδειας κυκλοφορίας καθώς και αποκεντρωμένες διαδικασίες, διαδικασίες αμοιβαίας αναγνώρισης και εθνικές διαδικασίες άδειας κυκλοφορίας. Αυτές οι διαδικασίες άδειας κυκλοφορίας αντιπροσωπεύουν διαφορετικά στάδια ανάπτυξης στο ρυθμιστικό σύστημα της Ε.Ε. Σχεδόν όλα τα καινοτόμα φαρμακευτικά προϊόντα αδειοδοτούνται μέσω της κεντρικής διαδικασίας. Όλα τα τρέχοντα βιοομοειδή είναι πρωτεΐνες που προέρχονται από τη βιοτεχνολογία και, σύμφωνα με τη νομοθεσία της Ε.Ε., πρέπει να εγκρίνονται μέσω της κεντρικής διαδικασίας που εποπτεύεται από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (EMA).⁽³⁵⁾

Οι απαιτήσεις αδειοδότησης της Ε.Ε. για βιοομοειδή βασίζονται σε μια άσκηση συγκρισιμότητας πλήρους κλίμακας. Το ευρωπαϊκό νομοθετικό πλαίσιο για τα βιοομοειδή υποστηρίζεται από μια σειρά από κατευθυντήριες γραμμές. Εν συντομία,

εκτός από τις δύο οδηγίες που αναφέρθηκαν προηγουμένως, τρεις βασικές κατευθυντήριες γραμμές καλύπτουν τις βασικές αρχές, την ποιότητα και τα μη κλινικά και κλινικά ζητήματα που σχετίζονται με τα βιοομοειδή. Επιπλέον, διατίθενται ειδικές οδηγίες προϊόντος που περιγράφουν μη κλινικά και κλινικά ζητήματα που σχετίζονται με συγκεκριμένες κατηγορίες βιοομοειδών πρωτεϊνικών προϊόντων. Το νέο βιοομοειδές προϊόν με βάση τις πρωτεΐνες θα πρέπει να κατασκευάζεται και να ελέγχεται σύμφωνα με τις σχετικές οδηγίες που εκδόθηκαν από τη Διεθνή Διάσκεψη για την Εναρμόνιση των Τεχνικών Απαιτήσεων για την Καταχώριση Φαρμάκων για Ανθρώπινη Χρήση (ICH) και υπό συνθήκες καλής παρασκευαστικής πρακτικής (GMP). Επομένως, ο αιτών, αφού εξετάσει όλες τις διαθέσιμες πληροφορίες, μπορεί να επιλέξει ένα φαρμακευτικό προϊόν αναφοράς που θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί για πλήρεις μελέτες συγκρισιμότητας.⁽⁶⁴⁾

Η Κατευθυντήρια γραμμή για Παρόμοια Βιολογικά Φαρμακευτικά Προϊόντα που Περιέχουν Πρωτεΐνες Προερχόμενες από Βιοτεχνολογία ως Δραστική Ουσία: Ζητήματα Ποιότητας (EMA/CHMP/BWP/49348/ 2005) περιγράφει τις απαιτήσεις ποιότητας για ένα βιοομοειδές. Ένα μέρος αυτής της κατευθυντήριας γραμμής είναι αφιερωμένο στη διαδικασία παραγωγής. Ορισμένα από αυτά τα έγγραφα υπόκεινται σε επανεξέταση και αναθεώρηση όπου χρειάζεται, προκειμένου να αντικατοπτρίζουν την περαιτέρω εξέλιξη της έννοιας της βιοομοιότητας. Οι ίδιες απαιτήσεις ισχύουν επίσης για οποιοδήποτε άλλο βιολογικό (πρωτότυπο ή μη) όταν ο αιτών επιθυμεί να αλλάξει τη διαδικασία παραγωγής, προβλέποντας κατ' αυτόν τον τρόπο επιδράσεις στην ασφάλεια, την αποτελεσματικότητα, τη σταθερότητα και τη συνολική τοξικότητα.⁽⁶⁴⁾

Ο EMA έχει εκδώσει δύο κατευθυντήριες γραμμές για την ανοσογονικότητα των πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των βιοομοειδών. Η γενική οδηγία είναι υπό αναθεώρηση και η κατευθυντήρια γραμμή για τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι σχετικά νέα. Λεπτομερέστερη καθοδήγηση σχετικά με την εκτίμηση κινδύνου περιλαμβάνεται στην κατευθυντήρια οδηγία για τα μονοκλωνικά αντισώματα. Οι οδηγίες τονίζουν ότι ο σχεδιασμός του προγράμματος ανοσογονικότητας είναι μια διεπιστημονική άσκηση. Το πρόγραμμα δειγματοληψίας και δοκιμών ανοσογονικότητας πρέπει να συγχρονιστεί με τη φαρμακοκινητική και τη φαρμακοδυναμική, καθώς και τις κλινικές μελέτες ασφάλειας και αποτελεσματικότητας, προκειμένου να παρέχονται χρήσιμα δεδομένα σχετικά με τον κλινικό αντίκτυπο της ανοσογονικότητας. Ζητείται από τον αιτούντα να παρουσιάσει

τη στρατηγική ανάλυσης κατά του φαρμάκου-αντισώματος που περιλαμβάνει το σκεπτικό της επιλογής δοκιμασιών για διαλογή, επιβεβαίωση και εξουδετέρωση των αντισωμάτων. Τα δεδομένα για τη συχνότητα και τον τίτλο των εξουδετερωτικών αντισωμάτων πρέπει να συνοδεύονται από δεδομένα για την εξουδετερωτική ικανότητα και την ανθεκτικότητα των αντισωμάτων αυτών.⁽³⁵⁾

Δεδομένου ότι τα βιοομοειδή διαφέρουν από τα γενόσημα από πολλές απόψεις, η νομοθεσία της Ε.Ε. απαιτεί φαρμακοεπαγρύπνηση και σχέδιο διαχείρισης κινδύνου για τη διασφάλιση και την παρακολούθηση της ασφάλειας των βιοομοειδών μετά την είσοδό τους στην αγορά και την κλινική χρήση τους (όπως για κάθε άλλο βιολογικό).⁽⁶⁴⁾ Τα βιολογικά και βιοομοειδή φάρμακα θεωρούνται προτεραιότητα για τις δραστηριότητες της φαρμακοεπαγρύπνησης και, για το λόγο αυτό, η Ε.Ε. τα έχει συμπεριλάβει στον “Κατάλογο Φαρμάκων που υπόκεινται σε Πρόσθετη Παρακολούθηση”.⁽¹⁹⁾ Η ευρωπαϊκή νομοθεσία (Οδηγία 2010/84/ΕΕ) περιγράφει τις απαιτήσεις για ένα πρόγραμμα βιοομοειδούς φαρμακοεπαγρύπνησης ως ευθύνη της φαρμακευτικής εταιρείας.⁽¹⁷⁾ Σύμφωνα και με την καθοδήγηση του EMA για τη φαρμακοεπαγρύπνηση, τα στοιχεία ενός προτεινόμενου βιοομοειδούς συστήματος φαρμακοεπαγρύπνησης θα πρέπει να περιλαμβάνουν εξειδικευμένο προσωπικό υπεύθυνο για τη φαρμακοεπαγρύπνηση, προσδιορισμό της οργάνωσης και των τοποθεσιών των κύριων δραστηριοτήτων και βάσεις δεδομένων φαρμακοεπαγρύπνησης. Η EudraVigilance, μια κεντρική βάση δεδομένων υπολογιστή του EMA που δημιουργήθηκε το 2001, αποτελεί σημαντικό στοιχείο της φαρμακοεπαγρύπνησης στην Ε.Ε. Το EudraVigilance είναι ένα δίκτυο επεξεργασίας δεδομένων και ένα σύστημα διαχείρισης για την αξιολόγηση αναφορών ανεπιθύμητων ενεργειών (ΑΕ) που λαμβάνονται από ρυθμιστικούς οργανισμούς φαρμάκων και φαρμακευτικές εταιρείες σε όλη την Ε.Ε. Επιπλέον, ο EMA ξεκίνησε την Ευρωπαϊκή Στρατηγική Διαχείρισης Κινδύνων το 2002.⁽¹⁰⁾ Το σχέδιο διαχείρισης κινδύνου ενός βιοομοειδούς βασίζεται στη μακρόχρονη εμπειρία που αποκτήθηκε με την κλινική χρήση του φαρμακευτικού προϊόντος αναφοράς, το οποίο αποτελεί πλεονέκτημα σε σύγκριση με την εισαγωγή ενός εντελώς νέου βιολογικού προϊόντος όπου υπάρχει περιορισμένη εμπειρία ασφάλειας κατά τη στιγμή της έγκρισης.⁽⁶⁴⁾

Σύμφωνα με τον EMA, η εναλλαξιμότητα αναφέρεται στη “δυνατότητα ανταλλαγής ενός φαρμάκου με ένα άλλο που αναμένεται να έχει το ίδιο κλινικό αποτέλεσμα”. Η αντικατάσταση μπορεί να γίνει με “εναλλαγή” ή “αντικατάσταση”.⁽⁴⁵⁾ Από νομική

άποψη, η εναλλαξιμότητα στην Ε.Ε. συνδέεται με την υποκατάσταση, την οποία διαχειρίζεται κάθε κράτος μέλος. Ως εκ τούτου, ο EMA δεν έχει δώσει συστάσεις σχετικά με την εναλλαξιμότητα. Προς το παρόν, δεν υπάρχει συναίνεση μεταξύ των κρατών μελών σχετικά με την εναλλαξιμότητα των σημερινών βιοομοειδών.⁽³⁵⁾ Αν και τα βιοομοειδή εγκρίνονται κεντρικά από τον EMA, η ρυθμιστική αρχή κάθε μεμονωμένης χώρας θεσπίζει πολιτικές υποκατάστασης στον τομέα της.⁽⁶¹⁾

2.6 ΤΟ ΚΑΝΟΝΙΣΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΣΤΙΣ Η.Π.Α.

Στις Η.Π.Α. η ομοσπονδιακή εποπτεία των βιολογικών προϊόντων ξεκίνησε το 1902 με τον νόμο για τον έλεγχο των βιολογικών προϊόντων. Παρόλα αυτά τα βιολογικά προϊόντα δεν αναφέρθηκαν ούτε από τον νόμο του 1906 “Pure Food and Drug Act”, ο οποίος θέσπισε κανόνες σχετικά με την επισήμανση φαρμάκων που περιελάμβαναν την υποχρεωτική αποκάλυψη ορισμένων εθιστικών ουσιών ούτε από τον νόμο του 1938 για τα τρόφιμα, τα φάρμακα και τα καλλυντικά, ο οποίος απαιτούσε να υποβληθεί η αξιολόγηση της ασφάλειας των φαρμάκων στον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) των ΗΠΑ, πριν από την έγκριση. Ωστόσο, τμήματα της τελευταίας πράξης εφαρμόστηκαν σε αυτούς. Ο νόμος για τις υπηρεσίες δημόσιας υγείας του 1944 ενημέρωσε τον νόμο για τον έλεγχο των βιολογικών προϊόντων, θέτοντας τα βιολογικά υπό την αρμοδιότητα της νέας Υπηρεσίας Δημόσιας Υγείας και το 1972 η βιολογική διαχείριση μεταφέρθηκε στον FDA.⁽⁵³⁾ Όταν το Κογκρέσο ψήφισε τον νόμο Hatch-Waxman το 1984 για να δημιουργήσει μια συντομευμένη διαδρομή εφαρμογής για εκδόσεις εγκεκριμένων φαρμάκων που κατασκευάζονται από διαφορετικούς κατασκευαστές, εφαρμόστηκε σε φάρμακα μικρού μορίου και όχι σε βιολογικά.⁽⁵³⁾ Όμως ο νόμος Hatch-Waxman δημιούργησε συντομευμένες οδούς για την έγκριση φαρμακευτικών προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων μη πανομοιότυπων φαρμακευτικών προϊόντων που έχουν εγκριθεί σύμφωνα με την οδό 505(b), σύμφωνα με τον Ομοσπονδιακό νόμο περί τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών.^(38, 53) Αυτή η οδός επέτρεψε στους κατασκευαστές να βασίζονται σε ορισμένα δεδομένα που χρησιμοποιούνται για την έγκριση παρόμοιων αλλά όχι βιοϊσοδύναμων φαρμάκων, μειώνοντας έτσι την ανάγκη για κάποιες κλινικές δοκιμές. Μετά το 1984, ένας μικρός αριθμός καλά χαρακτηρισμένων βιολογικών που είχαν εγκριθεί από το Κέντρο

Αξιολόγησης και Έρευνας Φαρμάκων (CDER), συμπεριλαμβανομένης της καλσιτονίνης, της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης και των προϊόντων ινσουλίνης, ακολουθήθηκαν από παρόμοια προϊόντα που εγκρίθηκαν μέσω της οδού 505(b). Επιπλέον, μετά την έγκριση το 2006 μέσω της οδού 505(b), μιας έκδοσης της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης σωματοτροπίνης, ο FDA προειδοποίησε ότι παρόμοια έγκριση εκδόσεων των περισσότερων βιολογικών σκευασμάτων θα απαιτούσε νέα νομοθεσία.⁽⁵³⁾

Τέτοια νομοθεσία ακολούθησε 4 χρόνια αργότερα. Η βιοομοειδής οδός, που θεσπίστηκε βάσει του νόμου για τον ανταγωνισμό και την καινοτομία των βιολογικών προϊόντων (BPCI) στις 23 Μαρτίου 2010, παραχώρησε στην FDA την εξουσία να εγκρίνει ένα βιολογικό προϊόν σύμφωνα με την ενότητα 351(ια) του νόμου περί Δημόσιας Υπηρεσίας Υγείας (PHS) που έχει αποδειχθεί να είναι βιοομοειδές ή να εναλλάσσεται με ένα προϊόν αναφοράς. Ένα προϊόν αναφοράς είναι ένα βιολογικό προϊόν με άδεια χρήσης στις Η.Π.Α. σύμφωνα με την ενότητα 351(α) του νόμου περί δημόσιας υπηρεσίας υγείας.^(18, 38) Σύμφωνα με τον FDA, η βιοομοιότητα σημαίνει ότι “το βιολογικό προϊόν είναι πολύ παρόμοιο με το προϊόν αναφοράς παρά τις μικρές διαφορές στα κλινικά ανενεργά συστατικά” και “δεν υπάρχουν κλινικά σημαντικές διαφορές μεταξύ του βιολογικού προϊόντος και του προϊόντος αναφοράς όσον αφορά την ασφάλεια, την καθαρότητα και την ισχύ του προϊόντος”.⁽³⁸⁾

Προκειμένου να υποστηριχθεί η επίδειξη βιοομοιότητας με το προϊόν αναφοράς, ο νόμος BPCI απαιτεί από τους κατασκευαστές βιοομοειδών να περιλαμβάνουν δημόσια διαθέσιμες πληροφορίες στην Αίτηση Άδειας Χρήσης Βιολογικών (BLA), σχετικά με την απαίτηση του FDA ότι το προϊόν αναφοράς είναι ασφαλές, καθαρό και αποτελεσματικό. Επιπλέον, με επαρκή επιστημονική αιτιολόγηση, μπορούν να προεκτείνουν δεδομένα που υποστηρίζουν τη βιοομοιότητα από μία ένδειξη σε άλλες ενδείξεις και να ζητήσουν άδεια χρήσης του προτεινόμενου βιοομοειδούς προϊόντος για συνθήκες χρήσης (π.χ. ενδείξεις) που έχουν προηγουμένως εγκριθεί για το προϊόν αναφοράς αλλά δεν έχουν μελετηθεί άμεσα στο πρόγραμμα βιοομοειδούς ανάπτυξης. Ως εκ τούτου, το μονοπάτι ανάπτυξης βιοομοειδών είναι μια συντομευμένη οδός αδειοδότησης, όπου ο στόχος είναι να αποδειχθεί η βιοομοιότητα μεταξύ του βιοομοειδούς και του προϊόντος αναφοράς και όχι η ανεξάρτητη διαπίστωση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας του βιοομοειδούς προϊόντος. Οι στόχοι του νόμου BPCI είναι παρόμοιοι, ως προς την ιδέα, με τους στόχους του Νόμου περί

Ανταγωνισμού Τιμής Φαρμάκων και Αποκατάστασης Όρων Ευρεσιτεχνίας του 1984 (“Νόμος Hatch Waxman”).⁽³⁸⁾

Ο νόμος BPCI απαιτεί να προσκομίζονται δεδομένα από⁽³⁸⁾:

1. αναλυτικές μελέτες που αποδεικνύουν ότι το προϊόν είναι πολύ παρόμοιο,
2. μελέτες σε ζώα, συμπεριλαμβανομένης αξιολόγησης της τοξικότητας,
3. κλινικές μελέτες, συμπεριλαμβανομένης της αξιολόγησης ανοσογονικότητας και φαρμακοκινητικής (PK) ή φαρμακοδυναμικής (PD), σε μία ή περισσότερες κατάλληλες συνθήκες χρήσης.

Τον Φεβρουάριο του 2012, η FDA εξέδωσε νέα έγγραφα καθοδήγησης για να αντικατοπτρίζει τα στοιχεία και τις ερωτήσεις από ρυθμιστικές συνεδριάσεις για την ανάπτυξη βιοομοειδών προϊόντων. Οι οδηγίες περιγράφουν μια σταδιακή διαδικασία που απαιτείται για την απόδειξη της βιοομοιότητας, ξεκινώντας με περιεκτικές δομικές και λειτουργικές αναλύσεις, ακολουθούμενες από μελέτες σε ζώα για την αξιολόγηση της τοξικότητας και κλινικές μελέτες φαρμακοκινητικής, φαρμακοδυναμικής και ανοσογονικότητας. Το σχέδιο καθοδήγησης προτείνει επίσης ότι ο FDA μπορεί να επιτρέψει την παρέκταση μεταξύ των ενδείξεων με επαρκή επιστημονική αιτιολόγηση.⁽¹⁸⁾

Η νομοθεσία στις ΗΠΑ ορίζει δύο επίπεδα βιοομοιότητας, τα βιοομοειδή και τα εναλλάξιμα βιοομοειδή.⁽³⁵⁾ Προκειμένου ο FDA να ορίσει ένα βιολογικό προϊόν ως εναλλάξιμο, μια διάταξη που επιτρέπει την υποκατάσταση του προϊόντος αναφοράς με το εναλλάξιμο προϊόν χωρίς την παρέμβαση ενός παρόχου υγειονομικής περίθαλψης, ένα προϊόν πρέπει να πληρούνται τα εξής⁽³⁸⁾:

- α. να είναι βιοομοειδές
- β. να παράγει το ίδιο κλινικό αποτέλεσμα με το προϊόν αναφοράς σε οποιονδήποτε δεδομένο ασθενή
- γ. για ένα προϊόν που χορηγείται σε έναν ασθενή περισσότερες από μία φορές, ο κίνδυνος όσον αφορά την ασφάλεια ή τη μειωμένη αποτελεσματικότητα της εναλλαγής ή της εναλλαγής μεταξύ του εναλλάξιμου προϊόντος και του προϊόντος αναφοράς να μην είναι μεγαλύτερος από τον κίνδυνο χρήσης του προϊόντος αναφοράς χωρίς εναλλαγή.

Σύμφωνα με το άρθρο 351(ια) του Νόμου για τις Υπηρεσίες Δημόσιας Υγείας των ΗΠΑ (PHSA), ορίζει ότι ένα εναλλάξιμο προϊόν “μπορεί να αντικαταστήσει το προϊόν αναφοράς χωρίς την παρέμβαση του παρόχου υγειονομικής περίθαλψης που συνταγογραφεί το προϊόν αναφοράς”. Πρόσφατα δημοσιεύτηκε η τελική καθοδήγηση του FDA για την απόδειξη της εναλλαξιμότητας, διευκρινίζοντας ότι τα βιοομοειδή θα πρέπει να πληρούν το πρότυπο εναλλαξιμότητας σύμφωνα με το PHSA. Η καθοδήγηση του FDA διευκρινίζει επίσης ότι απαιτείται τουλάχιστον μία μελέτη μεταγωγής, που περιλαμβάνει τουλάχιστον δύο εναλλασσόμενες εκθέσεις στο προϊόν αναφοράς και το προτεινόμενο εναλλάξιμο βιοομοειδές, προκειμένου να αποδειχθεί η εναλλαξιμότητα. Μετά τον χαρακτηρισμό του βιοομοειδούς ως εναλλάξιμου από τον FDA, οι νόμοι της πολιτείας των ΗΠΑ θα ρυθμίζουν την ικανότητα των φαρμακοποιών να αντικαθιστούν το προϊόν αναφοράς με ένα βιοομοειδές. Αν και ο FDA δεν έχει ακόμη προβεί σε τέτοιο χαρακτηρισμό, η πλειοψηφία των πολιτειών των ΗΠΑ έχουν ήδη εγκρίνει σχετική νομοθεσία.⁽⁷⁰⁾

Οι ονομασίες και η επισήμανση βιοομοειδών προϊόντων θα πρέπει να παρέχουν τη βέλτιστη σαφήνεια του συγκεκριμένου παράγοντα και όλων των άλλων βασικών πληροφοριών που είναι σημαντικές για τους ασθενείς, τους φροντιστές και όλους τους παρόχους υγειονομικής περίθαλψης. Επειδή τα βιοομοειδή αναφέρονται σε ένα υπάρχον εγκεκριμένο προϊόν αλλά μπορεί να έχουν ελαφρώς διαφορετικά βιολογικά προφίλ, η ονομασία πρέπει να είναι συνεπής με το προϊόν αναφοράς και πρέπει να έχει ένα μοναδικό αναγνωριστικό, σε αντίθεση με τα συμβατικά γενόσημα φάρμακα. Τον Ιανουάριο του 2017, ο FDA εξέδωσε τελικές οδηγίες σχετικά με την ονομασία των βιολογικών προϊόντων. Σύμφωνα με την τελική καθοδήγησή του, ο FDA βεβαιώνει ότι τα βιολογικά προϊόντα θα πρέπει να φέρουν μια μη αποκλειστική ονομασία που περιλαμβάνει ένα επίθημα που ορίζεται από τον FDA και αποτελείται από τέσσερα πεζά γράμματα. Η χρήση ενός μοναδικού επιθέματος τεσσάρων πεζών χαρακτήρων που ορίζεται από τον FDA έχει σκοπό να βελτιστοποιήσει τις προσπάθειες φαρμακοεπαγρύπνησης.⁽²⁶⁾

Η καθοδήγηση του FDA για την καλή φαρμακοεπαγρύπνηση αναφέρει ότι η συλλογή δεδομένων ασφάλειας μετά την κυκλοφορία και η αξιολόγηση κινδύνου με βάση δεδομένα παρατήρησης είναι κρίσιμες για την αξιολόγηση και τον χαρακτηρισμό του προφίλ κινδύνου ενός προϊόντος και για τη λήψη τεκμηριωμένων αποφάσεων σχετικά με την ελαχιστοποίηση του κινδύνου. Αυτές οι αναφορές εισάγονται στο Σύστημα

Αναφοράς Ανεπιθύμητων Συμβάντων του FDA για ανάλυση και τα πιθανά σήματα ασφάλειας που σχετίζονται με ένα φάρμακο αναφέρονται μέσω του MedWatch. Εάν ο FDA καθορίσει (μέσω ανάλυσης των πιθανών σημάτων) ότι ένα φάρμακο σχετίζεται με έναν νέο ή τροποποιημένο σημαντικό κίνδυνο ασφάλειας, οι συνταγογραφικές πληροφορίες του προϊόντος ενδέχεται να ενημερωθούν και μια στρατηγική αξιολόγησης και μετριάσμου κινδύνου, συμπεριλαμβανομένου ενός οδηγού φαρμάκων, φαρμακοεπιδημιολογικών μετά την έγκριση μπορεί να απαιτούνται μελέτες ή τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές. Μια άλλη προσέγγιση για τη λήψη πρόσθετων δεδομένων ασφαλείας αξιοποιεί την ευρεία εφαρμογή ηλεκτρονικών ιατρικών αρχείων στις ΗΠΑ. Το FDA Sentinel System, το οποίο βρίσκεται σε εξέλιξη, είναι ένα εθνικά ολοκληρωμένο ηλεκτρονικό δίκτυο δεδομένων για την επιτήρηση της ασφάλειας που θα περιλαμβάνει ηλεκτρονικά ιατρικά αρχεία και διοικητικά δεδομένα υγειονομικής περίθαλψης από 100 εκατομμύρια ασθενείς.⁽¹⁰⁾

2.7 ΤΟ ΚΑΝΟΝΙΣΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΣΕ ΆΛΛΕΣ ΧΩΡΕΣ

Στις περισσότερες χώρες που συμμετέχουν στην παραγωγή βιοομοειδών προϊόντων οι κανονισμοί ακολουθούν τις συστάσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας και οι βασικές προϋποθέσεις ανάπτυξης ενός βιοομοειδούς δεν απέχουν πολύ από αυτές του EMA και του FDA. Παρόλα αυτά, κάθε χώρα βρίσκεται σε διαφορετικό στάδιο ανάπτυξης του νομοθετικού πλαισίου και περιλαμβάνει διαφορετικά σημεία στις κατευθυντήριες γραμμές σχετικά με έννοιες όπως η βιοομοιότητα, η φαρμακοεπαγρύπνηση ή η εναλλαξιμότητα.

Στην ιαπωνική κατευθυντήρια γραμμή για την ανάπτυξη βιοομοειδών προϊόντων, οι εταιρείες παραγωγής υποχρεούνται να καθιερώσουν τη δική τους παραγωγική διαδικασία, να διευκρινίσουν τα χαρακτηριστικά ποιότητας και να αποδείξουν την υψηλή ομοιότητα αυτών των χαρακτηριστικών με τα προϊόντα αναφοράς. Για την ανάπτυξη ενός βιοομοειδούς προϊόντος, ένα προϊόν αναφοράς πρέπει να εγκριθεί στην Ιαπωνία και ένα μόνο προϊόν αναφοράς θα πρέπει να χρησιμοποιείται κατά την ανάπτυξη του βιοομοειδούς προϊόντος. Σύμφωνα με το νέες ιαπωνικές οδηγίες, η χρήση προϊόντων αναφοράς που έχουν εγκριθεί σε ξένες χώρες είναι αποδεκτή εάν τα

προϊόντα αναφοράς που έχουν εγκριθεί στην Ιαπωνία και στο εξωτερικό μπορούν να αποδειχθούν τα ίδια με δεδομένα κυρίως αναλυτικών μελετών. Μια άλλη πρόκληση στην ανάπτυξη βιοομοειδών στην Ιαπωνία, αφορά την αναγκαιότητα των ιαπωνικών δεδομένων. Στις νέες οδηγίες αναφέρεται ότι είτε μια συγκριτική μελέτη φαρμακοκινητικής είτε μια μελέτη Φάσης III θα πρέπει να περιλαμβάνει έναν ιαπωνικό πληθυσμό. Το επίκεντρο μιας τέτοιας άσκησης βιοομοιότητας είναι να επιδείξει παρόμοια αποτελεσματικότητα και ασφάλεια σε σύγκριση με τα προϊόντα αναφοράς, και οι εθνικές διαφορές έχουν ήδη αποδειχθεί σε ορισμένα προϊόντα αναφοράς. Επίσης απαιτείται οι κλινικές μελέτες για ένα βιοομοειδές προϊόν να διεξάγονται για τις ίδιες ενδείξεις και με τη χρήση των ίδιων δόσεων του προϊόντος αναφοράς. Όταν οι ενδείξεις και οι δοσολογίες του προϊόντος αναφοράς διαφέρουν μεταξύ της Ιαπωνίας και άλλων χωρών, καθίσταται δύσκολη η συμμετοχή της Ιαπωνίας σε παγκόσμιες κλινικές μελέτες και απαιτούνται πρόσθετα ιαπωνικά δεδομένα.⁽²⁾

Στη Λατινική Αμερική, οι ρυθμιστικές αρχές έχουν αρχίσει να καθιερώνουν καλά καθορισμένα και τυποποιημένα μονοπάτια που επιτρέπουν σε ένα βιοομοειδές να λαμβάνει καταχώρηση στην αγορά. Το ρυθμιστικό σενάριο για τα βιολογικά φάρμακα στη Λατινική Αμερική βρίσκεται σε διαδικασία πλήρους ενοποίησης, καθώς η περιοχή προχωρά προς μια αυστηρότερη προσέγγιση. Υπάρχουν χώρες, όπως η Βραζιλία και η Αργεντινή, με ενοποιημένα ρυθμιστικά ορόσημα, και άλλες, όπως η Παραγουάη και η Βολιβία, με προσχέδια ακόμη σε φάση ανάπτυξης. Υπάρχει επίσης η κατάσταση χωρών όπως η Χιλή και η Κολομβία, οι οποίες δημοσίευσαν πρόσφατα τους κανονισμούς τους και εξακολουθούν να συζητούν ποια μέτρα πρέπει να ληφθούν όσον αφορά τα βιολογικά φάρμακα που δεν συμμορφώνονται με τους κανονισμούς. Μέχρι στιγμής, καμία από αυτές τις χώρες δεν έχει ορίσει ποιες ενέργειες θα αναληφθούν, αλλά η επιστημονική κοινότητα είναι ενήμερη και συμμετέχει σε αυτή τη διαδικασία. Στη Βραζιλία, η πρώτη σημαντική διαφορά που παρατηρείται είναι η ονοματολογία που χρησιμοποιείται από τον τοπικό οργανισμό για τον ορισμό των βιολογικών φαρμάκων (σύμφωνα με το RDC 55/2010). Μια άλλη ιδιαιτερότητα είναι ότι το RDC 55/20108 έχει δύο οδούς για την έγκριση συγκρίσιμων βιολογικών προϊόντων, που διαφέρουν ως προς τον όγκο των δεδομένων που απαιτούνται για έγκριση αγοράς, τη συγκριτική και την ατομική οδό ανάπτυξης. Το Μεξικό είναι μια άλλη χώρα που έχει ιδιαιτερότητες σε σχέση με τους κανονισμούς του. Στις συγκεκριμένες περιπτώσεις των “προβλεπόμενων αντιγράφων”, το NOM-257-SSA1 2014 και το COFEPRIS δεν

υιοθετεί το όνομα “βιοομοειδές” αλλά “βιοσυγκρίσιμο”. Επιπλέον, ο κανόνας υπαγορεύει ότι η έγκριση κλινικών δοκιμών για φάρμακα βιοτεχνολογίας θα ακολουθεί την ίδια διαδικασία με οποιοδήποτε άλλο φαρμακευτικό προϊόν. Η φαρμακοεπαγρύπνηση πρέπει να διεξάγεται σύμφωνα με το NOM-220-SSA1-2012 και οι μελέτες βιοσυγκρισιμότητας σύμφωνα με το NOM-177-SSA1-2013. Όσον αφορά την Κεντρική Αμερική, η μεγάλη πλειοψηφία των χωρών δεν έχουν κανονισμούς για βιολογικά και βιοομοειδή φάρμακα. Μόνο ο Παναμάς (Decreto Ejecutivo 340/2007 και Decreto Ejecutivo 32/2008), η Κόστα Ρίκα (RTCR 440: 2010) και η Γουατεμάλα (Norma Técnica 67-2015) έχουν δημοσιεύσει κανονισμούς. Προκειμένου να βοηθήσει τους νομοθέτες των πολιτικών υγείας στη Λατινική Αμερική με ζητήματα που αφορούν την υποκατάσταση και την εναλλαξιμότητα, το Αμερικανικό Ίδρυμα Υγείας συγκέντρωσε μια ομάδα ειδικών για να αναπτύξει συστάσεις για την περιοχή. Μεταξύ όλων των κανονισμών που ισχύουν στη Λατινική Αμερική, μόνο οι μεξικανικοί προβλέπουν απαιτήσεις και αποδείξεις εναλλαξιμότητας, μέσω του NOM-177-SSA1-2013. Ωστόσο, αυτές οι απαιτήσεις ισχύουν για φάρμακα συνθετικής προέλευσης, όπως η απόδειξη βιοϊσοδυναμίας, τα οποία δεν ισχύουν για βιολογικά φάρμακα. Στη Βραζιλία, υπάρχει μια συζήτηση σχετικά με τη δυνατότητα δημιουργίας ενός συγκεκριμένου κανονισμού που υποδεικνύει την ανάγκη για κλινικές δοκιμές εναλλαξιμότητας.⁽²¹⁾

Στον Καναδά, ένα βιοομοειδές αναφέρεται ως βιολογικό προϊόν μεταγενέστερης εισόδου. Για να λάβει άδεια κυκλοφορίας, πρέπει να είναι “μεταγενέστερο” και “παρόμοιο” με το βιολογικό προϊόν αναφοράς. Σε αντίθεση με τα γενόσημα φαρμακευτικά προϊόντα, τα βιολογικά μεταγενέστερης εισόδου χρησιμοποιούν την οδό έγκρισης που παραδοσιακά ισχύει για νέα φάρμακα, η οποία πραγματοποιείται μέσω μιας “Υποβολής νέου φαρμάκου”, στην οποία πρέπει να περιλαμβάνονται εκτενή δεδομένα σχετικά με την απόδειξη ομοιότητας. Η Health Canada εξέδωσε ένα έγγραφο καθοδήγησης που διέπει τη διαδικασία έγκρισης της αγοράς το 2010. Από το 1993 ο Καναδάς χρησιμοποιεί ένα σύστημα “σύνδεσης διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας” για την άδεια κυκλοφορίας των γενόσημων φαρμακευτικών προϊόντων. Αυτό το σύστημα, το οποίο βασίζεται στους Κανονισμούς για τα Κατοχυρωμένα Φάρμακα (Ειδοποίηση Συμμόρφωσης), “συνδέει” τη διαδικασία έγκρισης της Health Canada με τα δικαιώματα ευρεσιτεχνίας των καινοτόμων προϊόντων. Οι ίδιοι αυτοί κανονισμοί

ισχύουν επίσης για τα βιολογικά μεταγενέστερης εισόδου, παρέχοντας έτσι ένα οικείο σύστημα για την αντιμετώπιση των επίμαχων δικαιωμάτων ευρεσιτεχνίας.⁽²⁰⁾

Τα τελευταία χρόνια, η βιομηχανία βιοομοειδών φαρμάκων της Κίνας έχει αναπτυχθεί γρήγορα. Μέχρι το τέλος του 2019, η Κίνα είχε τον υψηλότερο αριθμό βιοομοειδών φαρμάκων υπό έρευνα. Από τις 31/12/2020, 11 βιοομοειδή φάρμακα είχαν εγκριθεί για κυκλοφορία στην Κίνα. Ωστόσο, οι νόμοι και οι κανονισμοί για τα βιοομοειδή φάρμακα στην Κίνα, ιδιαίτερα ένα πλήρες σύστημα διαχείρισης καταχώρισης και υποστηρικτικές πολιτικές για την εποπτεία των βιοομοειδών φαρμάκων, δεν έχουν ακόμη διαμορφωθεί με σαφήνεια. Το φάρμακο αναφοράς που χρησιμοποιείται στην ανάπτυξη βιοομοειδών φαρμάκων θα πρέπει να είναι ένα πρωτότυπο βιολογικό προϊόν εγκεκριμένο από την κινεζική ρυθμιστική αρχή με βάση δεδομένα κλινικής ασφάλειας και αποτελεσματικότητας. Υπάρχουν δύο συστάσεις για την απόκτηση φαρμάκων αναφοράς, φάρμακα αναφοράς που αγοράζονται από την κινεζική αγορά και αυτά που αγοράζονται από τις εθνικές αγορές του Διεθνούς Συμβουλίου για την Εναρμόνιση των Τεχνικών Απαιτήσεων για Φαρμακευτικά για Ανθρώπινη Χρήση (ICH) που έχουν εγκριθεί από την Κίνα. Η Κίνα εξέδωσε την παρέκταση βιοομοειδών φαρμάκων και διευκρινίζει τις προϋποθέσεις για την παρέκταση των ενδείξεων βιοομοειδών φαρμάκων (Center for Drug Evaluation of the National Medical Products Administration, 2021). Σε αυτή τη βάση, προτείνεται οι ενδείξεις που προέκτασαν να είναι αυτές που έχουν εγκριθεί για εμπορία στην Κίνα, προκειμένου να μειωθούν οι άγνωστοι κίνδυνοι που ενέχουν οι εθνοτικές διαφορές.⁽⁶⁹⁾

Υπάρχουν και άλλες χώρες οι οποίες έχουν προωθήσει επιθετικά την ανάπτυξη και χρήση βιοομοειδών. Για παράδειγμα, η Νότια Κορέα δημιούργησε ένα συντομευμένο μονοπάτι έγκρισης ανάλογο με το μονοπάτι Biologics Price Competition and Innovation Act και έχει επενδύσει πολλά στη βιομηχανία βιοομοειδών. Από την άλλη η Αυστραλία άρχισε να ενθαρρύνει επίσημα τη συνταγογράφηση βιοομοειδών προϊόντων από τους ιατρούς έναντι των αρχικών βιολογικών προϊόντων για ασθενείς που δεν είχαν λάβει θεραπεία.⁽⁵³⁾

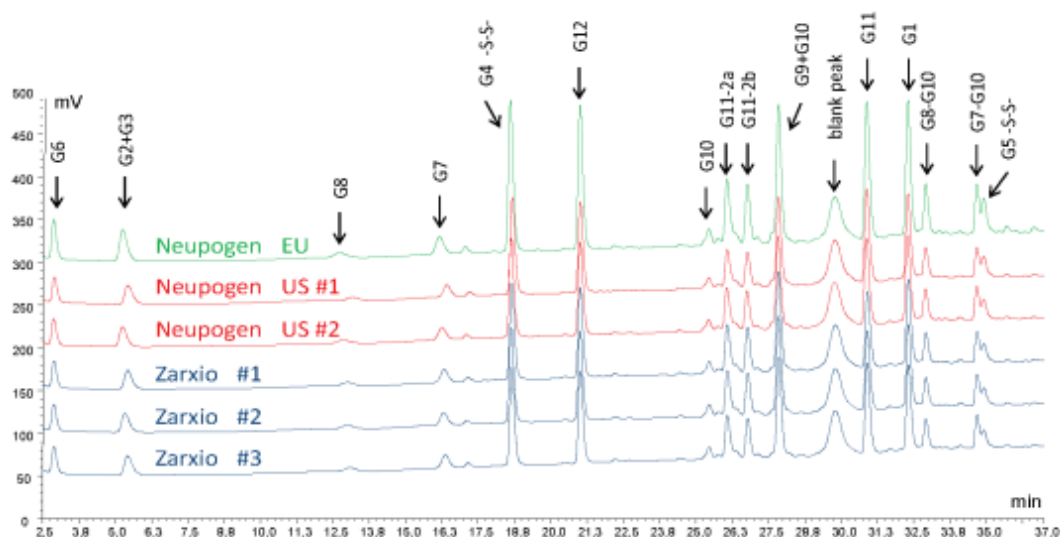
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΒΙΟΟΜΟΙΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

3.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ

Η πρώτη και πιο σημαντική πτυχή στην απόδειξη της βιοομοιότητας είναι η πρωτοταγής δομή να είναι ακριβώς η ίδια για το βιοομοειδές προϊόν και το προϊόν αναφοράς. Οι κοινώς χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για την αξιολόγηση της πρωτοταγούς δομής περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό αλληλουχίας αμινοξέων, τη χαρτογράφηση πεπτιδίων, τον χαρακτηρισμό των δισουλφιδικών δεσμών και τον προσδιορισμό του επιπέδου γλυκοζυλίωσης. Εάν η αλληλουχία αμινοξέων δεν είναι πανομοιότυπη, οι ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις αμινοξέων μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορετική αναδίπλωση, αλλάζοντας την ασφάλεια, την αποτελεσματικότητα και την ανοσογονικότητα του επιθυμητού προϊόντος. Εκτός από την αλληλουχία αμινοξέων, οι δισουλφιδικοί δεσμοί παίζουν κρίσιμο ρόλο στον καθορισμό της δομής της πρωτεΐνης, η οποία θα μπορούσε να επηρεάσει τη βιολογική δραστηριότητα.⁽⁵⁹⁾

Μία ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για τη σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας και του σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών, μεταξύ του βιοομοειδούς και του προϊόντος αναφοράς, είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) αντίστροφης φάσης. Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη χρωματογραφική τεχνική, πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν προηγουμένως υποστεί πέψη με πρωτεάσες, διαχωρίζονται και αξιολογούνται για διαφορές στην αλληλουχία αμινοξέων και στους δισουλφιδικούς δεσμούς.⁽⁵⁹⁾ Ο διαχωρισμός γίνεται με χρήση μη πολικής στατικής φάσης και πολικής κινητής φάσης. Συνεπώς τα πολικότερα συστατικά εκλούνται πρώτα και με αύξηση της πολικότητας της κινητής φάσης, ο χρόνος έκλουσης αυξάνει. Η ανίχνευση των χρωματογραφικών κορυφών συνήθως γίνεται με ανιχνευτές φασματομετρίας μαζών (MS) και κάθε κορυφή που προκύπτει αντιπροσωπεύει ένα πεπτιδικό θραύσμα για σύγκριση (Εικόνα 6) .



Εικόνα 6. Υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης υψηλής απόδοσης για σύγκριση της πρωτοταγούς δομής του βιομοειδούς Zarxio και του προϊόντος αναφοράς Neupogen.⁽⁵⁹⁾

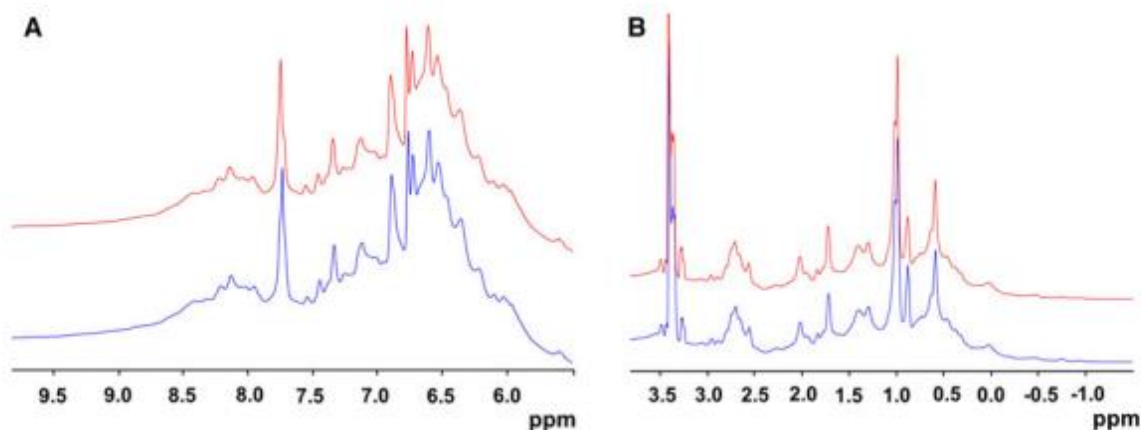
3.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΩΤΕΡΩΝ ΔΟΜΩΝ

Η διατήρηση της ακεραιότητας των ανώτερων δομών σε όλη τη διαδικασία παραγωγής και την αλυσίδα εφοδιασμού είναι απαραίτητη για την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα των βιομοειδών.⁽⁷⁾ Άρα, εφόσον τα δομικά στοιχεία μιας πρωτεΐνης καθορίζουν τη λειτουργία της, είναι σημαντικό οι δομές ανώτερης τάξης ενός προτεινόμενου βιομοειδούς να διερευνηθούν διεξοδικά χρησιμοποιώντας μια σειρά από μεθόδους.⁽⁶⁶⁾ Οι δομές ανώτερης τάξης αναλύουν την τρισδιάστατη δομή που σχηματίζεται από την αναδίπλωση πρωτεΐνης και περιλαμβάνουν αναλύσεις δευτεροταγούς, τριτοταγούς και τεταρτοταγούς δομής.⁽⁵⁹⁾

Για τον προσδιορισμό της δευτεροταγούς δομής, και την ανάλυση της ραχοκοκαλιάς του πεπτιδίου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η τεχνική της φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού (CD). Αυτή η τεχνική αναλύει την περιέλιξη των αμινοξέων που δημιουργεί τις α -έλικες και τα β -φύλλα. Η φασματοσκοπία CD μετρά την απορρόφηση του πολωμένου φωτός, με βάση τη συγκεκριμένη χειρόμορφη δομή του μορίου, καθώς η συντριπτική πλειοψηφία των πρωτεϊνών και των βιολογικών προϊόντων είναι χειρόμορφα. Όχι μόνο τα μεμονωμένα υπολείμματα ή αμινοξέα έχουν συγκεκριμένα

φάσματα CD, αλλά ολόκληρο το μακρομόριο έχει μια συγκεκριμένη αποτύπωση. Επομένως, τα φάσματα ενός βιολογικού προϊόντος μπορούν να συγκριθούν με τα φάσματα ενός άλλου για να εντοπιστούν διαφορές στα δομικά στοιχεία.⁽⁵⁹⁾ Επίσης, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier, μια τεχνική που προσφέρει ταχεία μέτρηση ασθενών σημάτων, υψηλή διακριτική ικανότητα και επαναληψιμότητα, η οποία παρέχει πληροφορίες για τις καταστάσεις δόνησης των μορίων. Οι αμιδικές ομάδες της πρωτεϊνικής ραχοκοκαλιάς δημιουργούν έναν αριθμό χαρακτηριστικών IR ζωνών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της διαμόρφωσης του σκελετού της πρωτεΐνης.⁽⁶⁶⁾

Η τριτοταγής δομή αφορά τις αλληλεπιδράσεις πλευρικής αλυσίδας και μπορεί να αξιολογηθεί μέσω πολυάριθμων μεθόδων, μία εκ των οποίων είναι η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Η φασματοσκοπία NMR αξιολογεί την τριτοταγή δομή συγκρίνοντας μεμονωμένες θέσεις αμινοξέων μέσα σε ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα.⁽⁵⁹⁾ Αυτή η τεχνική αναλύει τη συγκεκριμένη αναδίπλωση μιας τριτοταγούς δομής μέσω ενός μαγνητικού πεδίου, που δημιουργείται από την κίνηση των φορτισμένων πυρήνων των ατόμων γύρω από τον άξονά τους (πυρηνικό spin). Σε ένα μόριο πρωτεΐνης, το μεμονωμένο ηλεκτρονιακό περιβάλλον κάθε πρωτονίου είναι άμεση συνέπεια της τρισδιάστατης πτυχής της πρωτεΐνης.⁽⁶⁶⁾ Οπότε, με την εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου προκύπτουν αλληλεπιδράσεις που δημιουργούν ένα μοναδικό σήμα διασποράς το οποίο και δείχνει τη δομή της πρωτεΐνης. Κάθε μόριο έχει ένα μοναδικό αριθμό και μοτίβο κορυφών σε έναν συντονισμό (Εικόνα 7). Οι διαφορές στη δομή μπορούν να εντοπιστούν συγκρίνοντας τον συντονισμό του βιοομοειδούς με αυτόν του προϊόντος αναφοράς.⁽⁵⁹⁾ Παρότι τα μονοκλωνικά αντισώματα, όπως τα περισσότερα βιοομοειδή, είναι πολύ μεγάλα για πλήρη δομικό προσδιορισμό μέσω της εφαρμογής της τεχνικής NMR, η συγκεκριμένη φασματοσκοπική τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη λήψη δομικών δακτυλικών αποτυπωμάτων, παρέχοντας έτσι πληροφορίες σχετικά με την ομοιότητα της τρισδιάστατης δομής του αρχικού προϊόντος και του προτεινόμενου βιοομοειδούς.⁽⁶⁶⁾



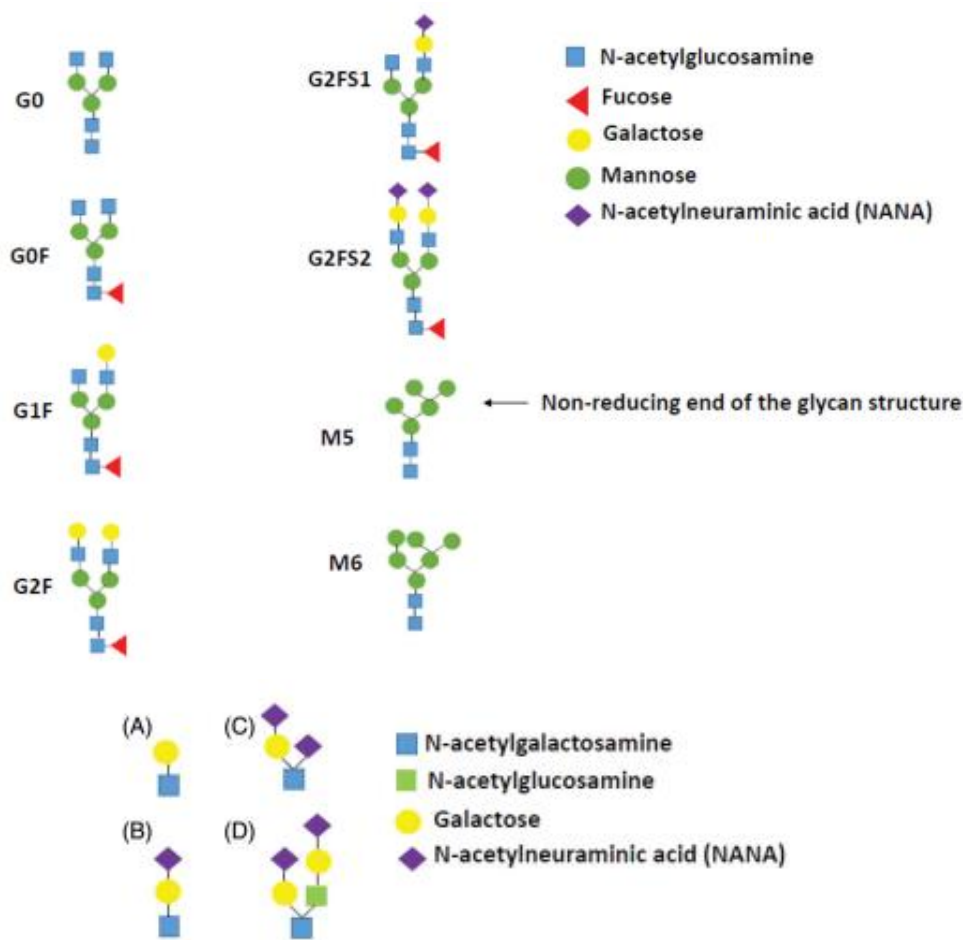
Εικόνα 7. Φάσμα NMR για σύγκριση της δευτεροταγούς δομής του βιοομοειδούς GP2013 και του προϊόντος αναφοράς Rituximab. Α) Αμιδική περιοχή, Β) Αλειφατική περιοχή.⁽⁶⁶⁾

Η τεταρτοταγής δομή σχηματίζεται μέσω της αναδίπλωσης και των αλληλεπιδράσεων δύο ή περισσότερων αλυσίδων και μπορεί να προσδιοριστεί με τη μέτρηση του μοριακού βάρους της στο διάλυμα. Επιπλέον, η δοκιμή δομής υψηλότερης τάξης αναλύει τη λειτουργία των βιολογικών προϊόντων ορίζοντας τις αλληλεπιδράσεις με τον σχετικό υποδοχέα επιβεβαιώνοντας τις αλληλεπιδράσεις της πεπτιδικής ραχοκοκαλιάς και της πλευρικής αλυσίδας.⁽⁵⁹⁾ Όμως οι φασματοσκοπικές τεχνικές και οι τεχνικές ανάλυσης του μοριακού μεγέθους δεν είναι ευαίσθητες στην ανίχνευση δομικών λεπτομερειών. Δεδομένου πως τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι πολύ μεγάλα μόρια, αλλά διαμορφωτικά πολύ παρόμοια μεταξύ τους, η ανάλυση της κρυσταλλικής δομής με ακτίνες X μπορεί να προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα, καθώς το σχέδιο περίθλασης ενός συγκεκριμένου πολυμορφικού κρυστάλλου πρωτεΐνης αντιπροσωπεύει μια εξαιρετική δομική υπογραφή. Η τεχνική της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία όσον αφορά τον προσδιορισμό της καθαρότητας της ουσίας, τη σύγκριση των ανώτερων δομών μεταξύ του βιοομοειδούς και του προϊόντος αναφοράς, την ανίχνευση μικροετερογένειας των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, αλλά και τον προσδιορισμό των παραλλαγών φορτίου μεταξύ των συγκρινόμενων πρωτεϊνικών προϊόντων.⁽⁷⁾

3.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΣΗΣ

Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις είναι ενζυμικές τροποποιήσεις που επηρεάζουν τις φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες μιας πρωτεΐνης, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν την ανοσογονικότητα, την ανοσοαπόκριση και την κλινική αποτελεσματικότητα. Η γλυκοζυλίωση, η οποία αποτελεί την πιο κοινή τροποποίηση, συνδέει μια γλυκάνη σε ένα μόριο για να βελτιώσει τη διαλυτότητα, τη σταθερότητα, την ανοσογονικότητα ή την αναδίπλωση πρωτεΐνης.⁽⁵⁹⁾ Τα θεραπευτικά αντισώματα υφίστανται δύο βασικούς τύπους πρωτεϊνικής γλυκοζυλίωσης: N-συνδεδεμένη γλυκοζυλίωση και O-συνδεδεμένη γλυκοζυλίωση (Εικόνα 8).⁽³³⁾ Για το προφίλ γλυκομορφών και την αξιολόγηση ομοιότητας/συγκρισιμότητας των φαρμακευτικών γλυκοπρωτεϊνών, είναι σημαντικό να ανιχνευθεί και να κατανοηθεί πώς αλλάζουν οι δομές ή οι υποδομές της γλυκάνης, που θα επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια.⁽²⁵⁾

Η ποικιλομορφία και η πολυπλοκότητα των δομών της γλυκάνης καθιστά τον διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον ποσοτικό προσδιορισμό μια αρκετά απαιτητική εργασία. Σε συνδυασμό με χημικές και βιοχημικές επεξεργασίες, υπάρχει ένα ευρύ φάσμα αναλυτικών μεθοδολογιών που χρησιμοποιούνται από εργαστήρια για τον δομικό χαρακτηρισμό των γλυκανών σε διαφορετικά στάδια της διεργασίας και της συνολικής ανάπτυξης του προϊόντος. Η επιλογή των μεθόδων για συγκεκριμένη εφαρμογή γλυκάνης εξαρτάται από τον τύπο του δείγματος, την ποσότητα του δείγματος διαθεσιμότητας, την προσβασιμότητα στην τεχνολογία και τον εξοπλισμό, την αποτελεσματικότητα της μεθόδου, το κόστος και το είδος των πληροφοριών που απαιτούνται. Αυτές οι αναλυτικές τεχνολογίες όχι μόνο καθορίζουν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά σε πραγματικό χρόνο της τελικής φαρμακευτικής ουσίας και του φαρμακευτικού προϊόντος, αλλά επιτρέπουν επίσης τον ποιοτικό χαρακτηρισμό σε πρώιμα στάδια ανάπτυξης μονοκλωνικών αντισωμάτων.⁽³³⁾ Είναι διαθέσιμος ένας αριθμός μεθόδων με βάση τη χρωματογραφία και τη φασματομετρία μάζας που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον χαρακτηρισμό των προτύπων γλυκοζυλίωσης.^(33, 59)



Εικόνα 8. Χημική δομή N-γλυκανών και O-γλυκανών που εντοπίζονται συνήθως στα μονοκλωνικά αντισώματα.⁽³³⁾

Η ανάλυση της γλυκοζυλίωσης μπορεί εύκολα να υποδιαιρεθεί σε τρεις κύριες προσεγγίσεις που αντιστοιχούν στο επίπεδο μεγέθους της αναλυόμενης ουσίας κατά την ανάλυση⁽¹⁶⁾:

- i. άθικτη πρωτεΐνη
- ii. γλυκοπεπτίδια
- iii. απελευθερωμένες γλυκάνες

Η ανάλυση σε επίπεδο άθικτης πρωτεΐνης πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας ένα ευρύ φάσμα τεχνικών χρωματογραφίας, ηλεκτροφόρησης και φασματομετρίας μάζας. Αυτό συνήθως εκτελείται κατά τη διάρκεια πολλαπλών σταδίων της διαδικασίας ανάπτυξης και παρέχει πληροφορίες για τη μοριακή μάζα της πρωτεΐνης και τις κύριες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η γλυκοζυλίωση. Η ανάλυση των γλυκοπεπτιδίων παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την αλληλουχία των αμινοξέων,

τη γλυκοζυλίωση και μικρές χημικές και ενζυμικές τροποποιήσεις. Μετά από πρωτεολυτική διάσπαση τα ληφθέντα πεπτίδια και γλυκοπεπτίδια αναλύονται με MALDI-MS ή ESI-MS, είτε άμεσα είτε μετά από μια χρωματογραφική ή ηλεκτροφορητική τεχνική διαχωρισμού. Η ανάλυση των απελευθερωμένων γλυκανών είναι μια καθιερωμένη προσέγγιση τόσο σε ακαδημαϊκό όσο και σε βιομηχανικό επίπεδο και χρησιμοποιείται συχνά ως τεχνική αναφοράς στην ανάπτυξη νέων μεθόδων. Οι γλυκάνες μπορούν να απελευθερωθούν ενζυμικά ή χημικά από την άθικτη πρωτεΐνη. Γενικά, υπάρχουν τρεις τρόποι ανάλυσης των απελευθερωμένων γλυκανών, με χρήση χρωματογραφίας ανταλλαγής ανιόντων με ανάλυση παλμικής αμπερομετρικής ανίχνευσης (HPAEC-PAD), με απευθείας φασματομετρική ανάλυση (MS), και με χρωματογραφία υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση και ανίχνευση φθορισμού. Ορισμένες από τις ανφερόμενες τεχνικές περιγράφονται παρακάτω.⁽¹⁶⁾

3.3.1 Χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC)

Η χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC) είναι μια παραλλαγή της υγρής χρωματογραφίας κανονικής φάσης, που χρησιμοποιείται ευρέως για διαχωρισμό των γλυκανών και είναι μια συμπληρωματική μέθοδος προς την προεξέχουσα χρωματογραφία διαχωρισμού αντιστροφής φάσης (RP-HPLC) για τον διαχωρισμό μορίων. Η μέθοδος λειτουργεί με βάση την αρχή της χρωματογραφίας κατανομής υγρού-υγρού όπου η κατακράτηση βασίζεται στο υδρόφιλο δυναμικό της αναλυόμενης ουσίας και οι αναλυόμενες ουσίες εκκλούνται με σειρά αυξανόμενης πολικότητας. Όσο πιο υδρόφιλη είναι η αναλυόμενη ουσία, τόσο περισσότερος χρόνος απαιτείται για την έκλουση. Η διαφορά στην υδροφιλικότητα βασίζεται στις διαφορές στο μέγεθος, την πολικότητα, τη δομή, τη σύνθεση, το φορτίο, τη σύνδεση και τη διακλάδωση του ολιγοσακχαρίτη.⁽³³⁾

Η ανίχνευση γίνεται με τη χρήση τεχνικών φασματομετρίας μάζας. Σε πρόσφατες συγκριτικές μελέτες των αρχικών προϊόντων (mAbs) με τα βιοομοειδή προϊόντα τους σε επίπεδο πρωτεΐνης, η ανάλυση HILIC-MS παρείχε ποιοτικές πληροφορίες για το πρότυπο γλυκοζυλίωσης και επέτρεψε την άμεση σύγκριση μεταξύ του αρχικού προϊόντος και του βιοομοειδούς προϊόντος. Επιπλέον, τα χρωματογραφικά διαχωρισμένα προφίλ γλυκάνης προώθησαν την ευκολότερη ενσωμάτωση του MS, λόγω της ακριβέστερης αποσυνέλιξης κορυφής σε σύγκριση με το RPLC-MS.⁽¹⁶⁾

Συγκεκριμένα, για την ανίχνευση με φασματομετρία μάζας ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS), έχουν αναπτυχθεί αντιδραστήρια σήμανσης (Rapi-Fluor MS - RFMS), που αντιδρούν γρήγορα με τις γλυκάνες μετά την ενζυμική απελευθέρωσή τους και διευκολύνουν την ανίχνευση με ESI-MS με υψηλή ευαισθησία για τη λήψη πληροφοριών για αυτές τις γλυκάνες. Οι σημασμένες με RFMS N-γλυκάνες μπορούν να ανιχνευθούν τόσο με βάση το φθορισμό όσο και με τον ιονισμό, με υψηλή ευαισθησία. Τέλος, οι λαμβανόμενες κορυφές γλυκάνης από την ανάλυση HILIC προσδιορίζονται χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμα πρότυπα γλυκάνης όπου ο σχετικός χρόνος κατακράτησης είναι τυπικά μέρος των κριτηρίων αποδοχής για την αναπτυγμένη μέθοδο. Τυπικά χαρακτηριστικά επικύρωσης που πρέπει να ληφθούν υπόψη στην επικύρωση γλυκάνης είναι η ειδικότητα, η ακρίβεια (ενδιάμεση ακρίβεια και επαναληψιμότητα), η γραμμικότητα, το όριο ανίχνευσης (LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ).⁽³³⁾

3.3.2 Χρωματογραφία ανταλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης με παλμική αμπερομετρική ανίχνευση (HPAEC-PAD)

Η χρωματογραφία ανταλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με τον παλμικό αμπερομετρικό ανιχνευτή (HPAEC-PAD) χρησιμοποιείται συνήθως για τον χαρακτηρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των υδατανθράκων χωρίς παραγωγή. Αυτή η ισχυρή αναλυτική τεχνική με τον συνδυασμό ενός χρωματογραφικού συστήματος και ενός ηλεκτροχημικού ανιχνευτή λειτουργεί με βάση την αρχή της χρωματογραφίας ανταλλαγής ανιόντων εκμεταλλευόμενη ασθενώς όξιους υδατάνθρακες (ή ανιόντα) σε διάλυμα που φέρει αρνητικό φορτίο και οδηγεί σε επιλεκτικό και ευαίσθητο διαχωρισμό ουδέτερων και φορτισμένων υδατάνθρακες (ή ολιγοσακχαρίτες) σε υψηλό pH (pH 13). Οι υδατάνθρακες έχουν συνήθως pKas στην περιοχή από 12-13. Μόλις το pH ανέβει πάνω από το pKa του υδατάνθρακα, αυτοί οι υδατάνθρακες ιονίζονται (πιο συγκεκριμένα, γίνονται οξυανιόντα με μερικό αρνητικό φορτίο). Ο ιονισμός οδηγεί σε έκλυση γλυκανών με ανηγμένα άκρα ταχύτερα από τα αναγωγικά άκρα, καθώς δεν έχουν την ανωμερή υδροξυλική ομάδα που είναι πολύ όξινη και είναι κύριος συντελεστής του μερικού αρνητικού φορτίου.⁽³³⁾

Μόλις διαχωριστούν, αυτοί οι μη παραγωγικοί υδατάνθρακες ανιχνεύονται σε μια επιφάνεια ηλεκτροδίου εργασίας χρυσού από το PAD, η οποία είναι μια τεχνική άμεσης

ανίχνευσης και λειτουργεί σε συνθήκες υψηλού pH. Το PAD ανιχνεύει ενώσεις που περιέχουν λειτουργικές ομάδες που μπορούν να οξειδωθούν στη συγκεκριμένη τάση ανίχνευσης και το ρεύμα που δημιουργείται είναι ευθέως ανάλογο με τη συγκέντρωση των υδατανθράκων σε λύση. Η ανίχνευση είναι ευαίσθητη και εξαιρετικά επιλεκτική για ηλεκτροενεργά είδη, καθώς πολλά είδη που δυνητικά παρεμβάλλονται δεν μπορούν να οξειδωθούν ή να μειωθούν, και έτσι δεν ανιχνεύονται.⁽³³⁾

Λαμβάνοντας υπόψη την υψηλή ευαισθησία και απόδοση του HPAEC-PAD, αυτή η μέθοδος έχει αποδειχθεί αρκετά χρήσιμη για την ανίχνευση και ανάλυση N-συνδεδεμένων και O-συνδεδεμένων ολιγοσακχαριτών, ιδιαίτερα την εκτίμηση του σιαλικού οξέος σε αυτούς τους ολιγοσακχαρίτες. Οι ολιγοσακχαρίτες με περισσότερα από ένα τερματικά τμήματα σιαλικού οξέος επιδεικνύουν μεγαλύτερη μεταβλητότητα απόκρισης κυττάρων PAD από τους ολιγοσακχαρίτες χωρίς ή ένα τερματικό υπόλειμμα σιαλικού οξέος, καλύπτοντας έτσι την ανάγκη προσδιορισμού της συνοχής από παρτίδα σε παρτίδα. Η ποσοτικοποίηση των σιαλικών οξέων είναι μία από τις μεθόδους χαρακτηρισμού στην ανάπτυξη προϊόντων μονοκλωνικών αντισωμάτων για την κάλυψη των κανονιστικών απαιτήσεων.⁽³³⁾

3.3.3 Φασματομετρία μάζας (MS)

Την τελευταία δεκαετία, η χρήση υγρής χρωματογραφίας (HPLC) σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (MS/MS) έφερε επανάσταση στον χαρακτηρισμό των μονοκλωνικών αντισωμάτων και σταδιακά αύξησε την εφαρμογή του για ανάλυση γλυκοζυλίωσης σε αυτά. Ο ισχυρός συνδυασμός LC με MS ή MS/MS παρέχει λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη δομική ανάλυση των γλυκανών και των γλυκοπεπτιδίων με υψηλή ευαισθησία. Αυτή η πολλά υποσχόμενη τεχνική χρησιμοποιείται για τον αναλυτικό χαρακτηρισμό της γλυκοζυλίωσης στα αντισώματα, ξεκινώντας από την ανάπτυξη της πρώιμης φάσης έως την απελευθέρωση και την άδεια κυκλοφορίας φαρμάκων. Η φασματομετρία μάζας λειτουργεί με βάση την αρχή του κατακερματισμού του μορίου σε μικρά φορτισμένα ιόντα με τη διαδικασία ιονισμού που ακολουθείται από την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των ιόντων που διαχωρίζονται με βάση την αναλογία φορτίο/μάζα. Οι δύο ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές μαλακού ιονισμού για την ανάλυση γλυκάνης είναι ο ιονισμός

ηλεκτροψεκασμού (ESI) και ο ιονισμός εκρόφησης λέιζερ με υποβοήθηση μήτρας (MALDI).⁽³³⁾

3.3.4 Πολυδιάστατες χρωματογραφικές προσεγγίσεις

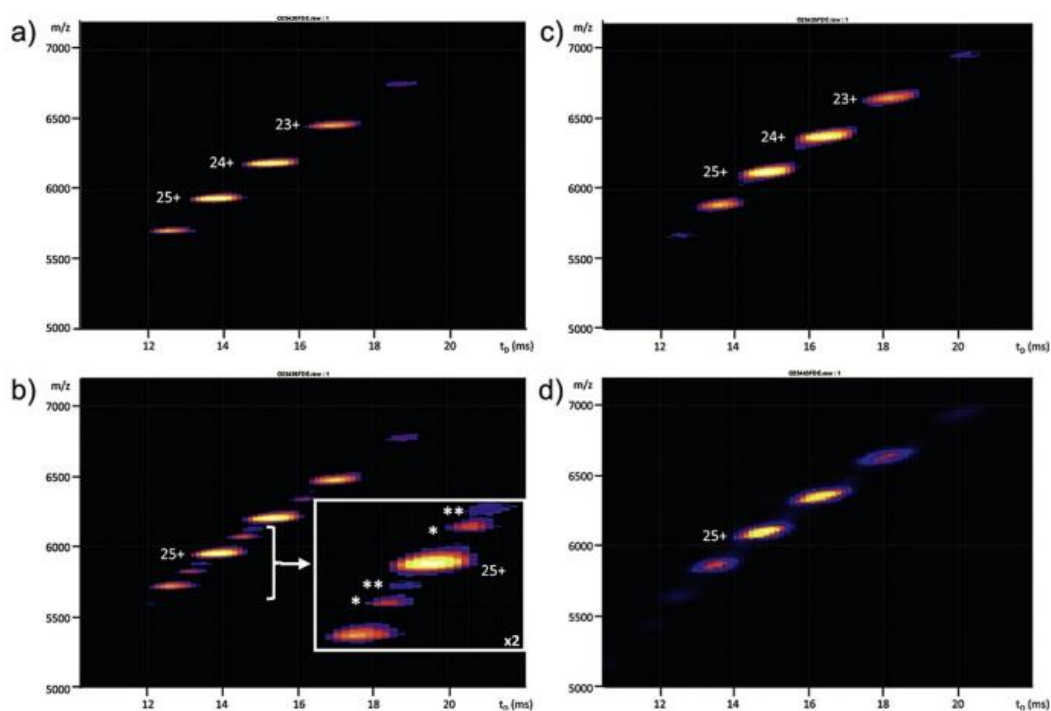
Ενώ οι τρέχουσες τεχνικές μονοδιάστατου διαχωρισμού φτάνουν στη βέλτιστη απόδοσή τους, οι νέες τεχνικές δισδιάστατου διαχωρισμού παρέχουν μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική προσέγγιση για τα μονοκλωνικά αντισώματα. Οι δισδιάστατες προσεγγίσεις επιτρέπουν τον συνδυασμό δύο χρωματογραφικών τεχνικών, όπως η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων (IEX), η χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC), η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RPLC) και η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC), σε μια ενιαία αναλυτική πλατφόρμα. Οι κοινές δισδιάστατες προσεγγίσεις περιλαμβάνουν τη σύζευξη IEX με RPLC, HILIC με RPLC και HILIC με SEC. Η χρήση μιας συμπληρωματικής διάστασης παρέχει δισδιάστατα μοτίβα κορυφής που διευκολύνουν την αναγνώριση άγνωστων παραλλαγών πρωτεΐνης.⁽¹⁶⁾

3.3.5 Φασματομετρία κινητικότητας ιόντων (IM-MS)

Η χρήση της φασματομετρίας ιόντων κινητικότητας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (IM-MS) έχει κερδίσει αυξανόμενη προσοχή χάρη στην εισαγωγή σημαντικών τεχνικών προόδων. Το IM-MS επιτρέπει τον διαχωρισμό ιόντων με βάση το μέγεθος, το φορτίο και το σχήμα τους, καθώς μεταναστεύουν μέσω ενός ρυθμιστικού αερίου που κινείται από ένα ηλεκτρικό πεδίο. Λόγω των διαφορών κινητικότητάς τους, η κατανομή του χρόνου άφιξης μπορεί να μετρηθεί και να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της διατομής σύγκρουσης (CCS). Η διατομή σύγκρουσης είναι μια φυσική ιδιότητα που σχετίζεται με το σχήμα του ιόντος, που αντιπροσωπεύει ένα τρισδιάστατο δακτυλικό αποτύπωμα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατά τον χαρακτηρισμό. Εκτός από την παροχή δομικών πληροφοριών, τα δεδομένα IM-MS μπορούν να μειώσουν σημαντικά την πολυπλοκότητα των φασμάτων μάζας με διαχωρισμό ομάδων σε πολύπλοκα βιολογικά δείγματα. Με βάση τα δεδομένα διατομής σύγκρουσης, οι διαφορές στους χρόνους μετατόπισης μεταξύ, π.χ., πεπτιδίων, λιπιδίων και υδατανθράκων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση και τον αποκλεισμό

συγκεκριμένων μοριακών τάξεων από τα δεδομένα. Ως εκ τούτου, το IM-MS προσφέρει σημαντική βελτίωση στη διεκπεραίωση χρησιμοποιώντας μία ενιαία αναλυτική πλατφόρμα για τη μέτρηση τόσο των γλυκανών όσο και των πεπτιδίων αμέσως μετά την απελευθέρωσή τους.⁽¹⁶⁾

Η χρήση του IM-MS για την ανάλυση του αρχικού μονοκλωνικού αντισώματος και βιοομοειδών προϊόντων έχει πρόσφατα εμφανιστεί ως μια ενδιαφέρουσα αναλυτική τεχνική για τον παγκόσμιο διαμορφωτικό χαρακτηρισμό (Εικόνα 9). Το IM-MS επιτρέπει τη δημιουργία ενός τρισδιάστατου δακτυλικού αποτυπώματος της δομής υψηλότερης τάξης της πρωτεΐνης και είναι εύκολο να ενσωματωθεί σε ανάλυση ρουτίνας, λόγω της περιορισμένης ή της απουσίας προετοιμασίας δείγματος. Οι δομικές πληροφορίες σχετικά με την ετερογένεια της δισουλφιδικής γέφυρας καθώς και την παρουσία μονομερών και διμερών διαμορφώσεων μπορούν να ληφθούν γρήγορα μέσω της τεχνικής IM-MS.⁽¹⁶⁾



Εικόνα 9. Ανάλυση με IM-MS και διαφορές στο προφίλ γλυκοζυλίωσης, των αρχικών προϊόντων τραστουζουμάμπη (a) και κετουξιμάμπη (c) με τα προτεινόμενα βιοομοειδή τους (b, d) αντίστοιχα.⁽¹⁶⁾

3.4 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

3.4.1 Προσδιορισμός δεσμευτικής ικανότητας

Ο δομικός χαρακτηρισμός των προϊόντων αναφοράς και των βιοομοειδών προϊόντων μπορεί να καθορίσει την πραγματική δομή των μορίων αλλά δεν μπορεί να παρέχει ολοκληρωμένες πληροφορίες σχετικά με τη λειτουργική τους διαμόρφωση και τον τρόπο αλληλεπίδρασης με τον επιδιωκόμενο στόχο. Εφόσον αυτός ο τελευταίος είναι ο πιο κρίσιμος καθοριστικός παράγοντας των επακόλουθων βιολογικών δράσεων, μόνο λειτουργικές βιοδοκιμασίες, συμπεριλαμβανομένων των προσδιορισμών σύνδεσης και ισχύος, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το σκοπό αυτό. Η έναρξη της ανάπτυξης λειτουργικών δοκιμασιών με δεσμευτικές αναλύσεις ως μέρος μιας σταδιακής προσέγγισης είναι μια κοινή και εγκεκριμένη στρατηγική για την υποστήριξη της βιοομοειδούς ανάπτυξης. Λόγω των πρακτικών τους πλεονεκτημάτων, οι μέθοδοι δέσμευσης καθιερώνονται συνήθως στις πρώτες φάσεις της ανάπτυξης του προϊόντος, έτσι ώστε να απομένει περισσότερος χρόνος για την καθιέρωση πιο περίπλοκων (συνήθως κυτταρικών) βιοδοκιμών.⁽³⁶⁾

❖ *Συντονισμός πλασμονίου επιφάνειας (SPR)*

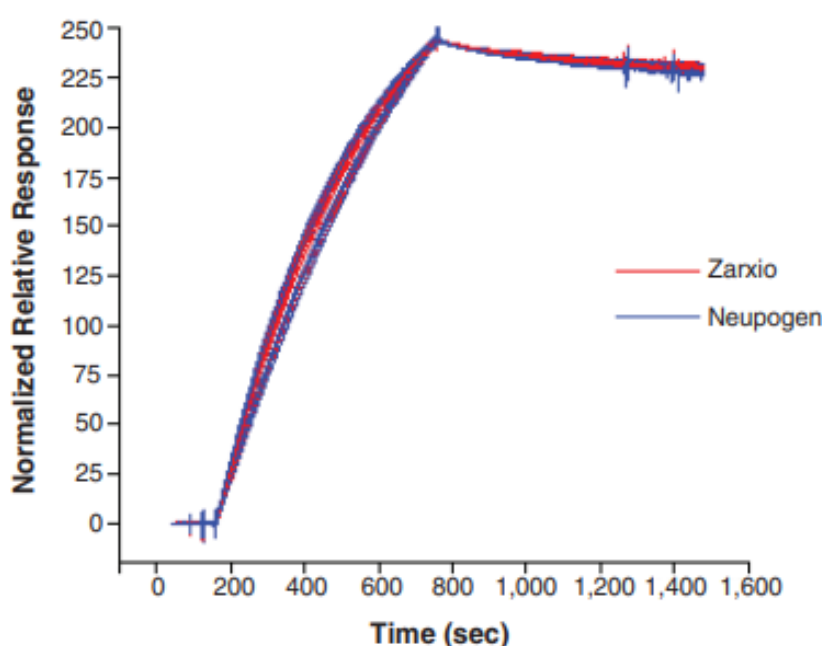
Η ικανότητα ενός βιολογικού να συνδέεται με τον υποδοχέα στόχο αντανακλά ότι η σωστή διάταξη πρωτεΐνης και η δομική ακεραιότητα του μορίου είναι απαραίτητα για την έναρξη της φαρμακολογικής δράσης. Ο συντονισμός πλασμονίου επιφάνειας (SPR) είναι μια οπτική τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μοριακών αλληλεπιδράσεων ή δέσμευσης στόχου. Σε αυτή τη δοκιμή, η σύνδεση μιας κινητής πρωτεΐνης σε έναν ακινητοποιημένο υποδοχέα αλλάζει έναν δείκτη διάθλασης κατά τη διάρκεια μιας αλληλεπίδρασης δέσμευσης και μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με ακρίβεια μετρώντας τις αλλαγές στη συγκέντρωση των μορίων σε μια επιφάνεια αισθητήρα. Οι σταθερές ρυθμού δέσμευσης υποδοχέα θα πρέπει να είναι πολύ παρόμοιες σε ένα αισθητόγραμμα SPR μεταξύ ενός βιολογικού προϊόντος αναφοράς και ενός προτεινόμενου βιοομοειδούς (Εικόνα 10).⁽⁵⁹⁾

Οι αναλύσεις δέσμευσης σταθερής κατάστασης παρέχουν μόνο ανίχνευση τελικού σημείου της ισορροπίας δέσμευσης και μια εκτίμηση της σταθεράς διάστασης

ισορροπίας (KD), ωστόσο παρόμοιες τιμές KD μπορούν να καλύψουν σημαντικά διαφορετική κινητική συμπεριφορά. Αυτές οι διαφορές μπορούν να ανιχνευθούν μόνο με προσδιορισμούς κινητικής δέσμευσης που επιτρέπουν:

- τον χαρακτηρισμό της αλληλεπίδρασης σε πραγματικό χρόνο
- την εκτίμηση της συσχέτισης (k_a) και των σταθερών ρυθμού διάστασης (k_{dis})

Από την άλλη πλευρά, οι δοκιμασίες κινητικής δέσμευσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν ευέλικτα για να υποστηρίξουν την πρώιμη βιοθεραπευτική ανάπτυξη όταν χρησιμοποιούνται για κατάταξη υποψηφίων ή επιλογή κλώνων.⁽³⁶⁾



Εικόνα 10. Αισθητόγραμμα SPR προϊόντος αναφοράς (Zarxio) και βιοομοειδούς (Neupogen).⁽⁵⁹⁾

3.4.2 Προσδιορισμός μηχανισμού δράσης

Ο σχεδιασμός και η καθιέρωση ακριβών και ισχυρών δοκιμασιών ισχύος, που μπορούν να μιμηθούν *in vivo* το μηχανισμό δράσης ενός θεραπευτικού αντισώματος, είναι σίγουρα μία από τις πιο περίπλοκες και απαιτητικές αναλυτικές εργασίες κατά την ανάπτυξη του βιοομοειδούς προϊόντος. Οι ρυθμιστικές κατευθυντήριες γραμμές για βιοομοειδή αντισώματα παρέχουν μια γενική βάση για τον λειτουργικό χαρακτηρισμό, αλλά δεν προσδιορίζουν ακριβώς ποιοι τύποι αναλύσεων θα χρησιμοποιηθούν και πώς. Επιπλέον, δεν καθορίζουν ακριβώς πόσο παρόμοιο πρέπει να είναι ένα βιοομοειδές με

το προϊόν αναφοράς. Γενικά, κάθε υποτιθέμενος μηχανισμός δράσης του αρχικού μορίου πρέπει να αναπαραχθεί με μια *in vitro* δοκιμασία και η λειτουργική ισοδυναμία του βιομοειδούς υποψηφίου θα πρέπει επίσης να αποδεικνύεται για καθένα από αυτά.⁽³⁶⁾

Η θεραπευτική δράση των μονοκλωνικών αντισωμάτων βασίζεται εξ ορισμού στην ειδική δέσμευσή τους με το αντιγόνο στόχο, το οποίο μπορεί να συναντάται σε διαλυτή μορφή ή δεσμευμένο στην επιφάνεια του κυττάρου (ή και τα δύο). Βασικά, στην περίπτωση των διαλυτών στόχων, ο μηχανισμός δράσης του αντισώματος περιλαμβάνει την εξουδετέρωση των βιολογικών επιδράσεων του στόχου. Ενώ για τα δεσμευμένα στην επιφάνεια του κυττάρου αντιγόνα, η δέσμευση του αντισώματος στον στόχο του μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα διεγερτικά ή ανασταλτικά αποτελέσματα, όπως την ανοσο-μεσολαβούμενη εξάλειψη των κυττάρων που εκφράζουν αντιγόνο. Ωστόσο, σε μοριακό και φαινοτυπικό επίπεδο, είναι πολύ πιο δύσκολο να οριστούν γενικές κατηγορίες μηχανισμών, καθώς λόγω της πολυπλοκότητας της φυσιολογίας του κυττάρου ο αριθμός των πιθανοτήτων είναι άπειρος. Η επιλογή και ο σχεδιασμός των αναλύσεων ισχύος που μιμούνται το μηχανισμό δράσης θα πρέπει να υπαγορεύονται κυρίως από τη βιολογία του εν λόγω αντιγόνου και τις στοχευμένες ενδείξεις. Έτσι, η ομάδα των επιλεγμένων δοκιμασιών ισχύος είναι σχεδόν πάντα μοναδική για το συγκεκριμένο μόριο.⁽³⁶⁾

Αρκετές καινοτόμες τεχνικές που συμπληρώνουν τις συμβατικές δοκιμές ισχύος έχουν λάβει έγκριση από τους κανονισμούς. Στη μέτρηση των πρώιμων μοριακών συνεπειών της δέσμευσης στόχων, τέτοιες καινοτόμες προσεγγίσεις περιελάμβαναν τη δοκιμασία εξουδετέρωσης στόχου με βάση το γονίδιο αναφοράς, τη δοκιμασία ενεργοποίησης υποδοχέα με βάση την ηλεκτροχημειοφωταύγεια και τη δοκιμασία ετεροδιμερισμού του υποδοχέα με βάση την τεχνολογία συμπλήρωσης θραύσματος ενζύμου. Αυτές οι λύσεις έχουν το πλεονέκτημα ότι είναι συχνά διαθέσιμες σε έτοιμα προς χρήση μορφές (π.χ. κιτ) που εξασφαλίζουν απλότητα, βελτιωμένη αναπαραγωγιμότητα και δυνατότητα μεταφοράς καθώς και μικρότερους χρόνους ανάλυσης και λιγότερη προετοιμασία.⁽³⁶⁾

Οι πιο συμβατικές δοκιμασίες ισχύος περιλαμβάνουν φαινοτυπικό χαρακτηρισμό με κυτταρομετρία ροής, αξιολόγηση της έκκρισης του διαλυτού μεσολαβητή χρησιμοποιώντας ποσοτικοποίηση βάσει της τεχνικής ELISA και αξιολόγηση

κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή κυτταρικού θανάτου. Μεταξύ αυτών, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να παρουσιάσουν τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία όσον αφορά τις πιθανές προσεγγίσεις μέτρησης *in vitro*.⁽³⁶⁾

3.4.3 Προσδιορισμός ανοσογονικότητας

Τα τελευταία χρόνια, έχει δοθεί αυξανόμενη εστίαση στην επιλογή των καταλληλότερων μεθόδων ανοσοδοκιμασίας για τον έλεγχο ανοσογονικότητας σε κλινικές μελέτες. Ωστόσο, η ακριβής ανίχνευση και η ποσοτική μέτρηση των αντισωμάτων απόκρισης κατά του φαρμάκου ήταν γεμάτη δυσκολίες λόγω τεχνικών προβλημάτων που επηρεάζουν την ευαισθησία διαφορικής ανάλυσης. Με τα χρόνια, έχει χρησιμοποιηθεί μια σειρά μεθόδων για τη μέτρηση των επιπέδων αυτών των αντισωμάτων, συμπεριλαμβανομένης της ανοσοδοκιμασίας ηλεκτροχημειοφωταύγειας (ECL), της ανοσοενζυμικής μεθόδου (ELISA), της ραδιοανοσοδοκιμασίας (RIA) και της ανάλυσης ομογενούς μετατόπισης κινητικότητας (HMSA).⁽³⁴⁾

❖ *Ανοσοδοκιμασία ηλεκτροχημειοφωταύγειας (ECL)*

Μέσω της ανοσοδοκιμασίας ηλεκτροχημειοφωταύγειας ανιχνεύονται τα αντισώματα απόκρισης κατά του φαρμάκου με βάση τα δισθενή χαρακτηριστικά τους. Για να πραγματοποιηθούν τέτοιου είδους αναλύσεις, είναι βασικό το σημείο της επώασης, κατά το οποίο τα αντισώματα απόκρισης συνδέονται τόσο με σουλφονυλιωμένες όσο και βιοτινυλιωμένες μορφές του προς ανάλυση προϊόντος, ώστε να σχηματιστεί μια γέφυρα συμπλέγματος αντισώματος. Στη συνέχεια, τα δείγματα φορτώνονται σε πλάκα ηλεκτροδίου με επικάλυψη στρεπταβιδίνης. Μετά από ένα βήμα έκπλυσης, μόνο τα δείγματα που περιέχουν αντισώματα απόκρισης συνδεδεμένα και με τις δύο προαναφερθείσες μορφές παράγουν σήμα ECL (Εικόνα 11).⁽³⁴⁾

Η συγκεκριμένη τεχνική παρέχει πλεονεκτήματα ανίχνευσης αντισωμάτων χαμηλής συγγένειας, ευαισθησίας, απόδοσης και δυναμικού εύρους. Επιπλέον, έχει υψηλή ανοχή στον ορό και η ικανότητα ανίχνευσης μπορεί να βελτιωθεί αυξάνοντας το ποσοστό ορού που χρησιμοποιείται στην ανάλυση. Παρόλο που έχει παρατηρηθεί το φαινόμενο εμφάνισης ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων, που προκύπτουν από την

πολύ υψηλή συγκέντρωση των αντισωμάτων απόκρισης, αυτή η μέθοδος μπορεί ακόμα να ανιχνεύσει συγκεντρώσεις αντισωμάτων μεγαλύτερες από 1 mg/ml, ελαχιστοποιώντας έτσι τις ανησυχίες σχετικά με την έλλειψη αποκρίσεων υψηλού τίτλου.⁽³⁴⁾

❖ *Ανοσοπροσρόφηση δεσμευμένου ενζύμου (ELISA)*

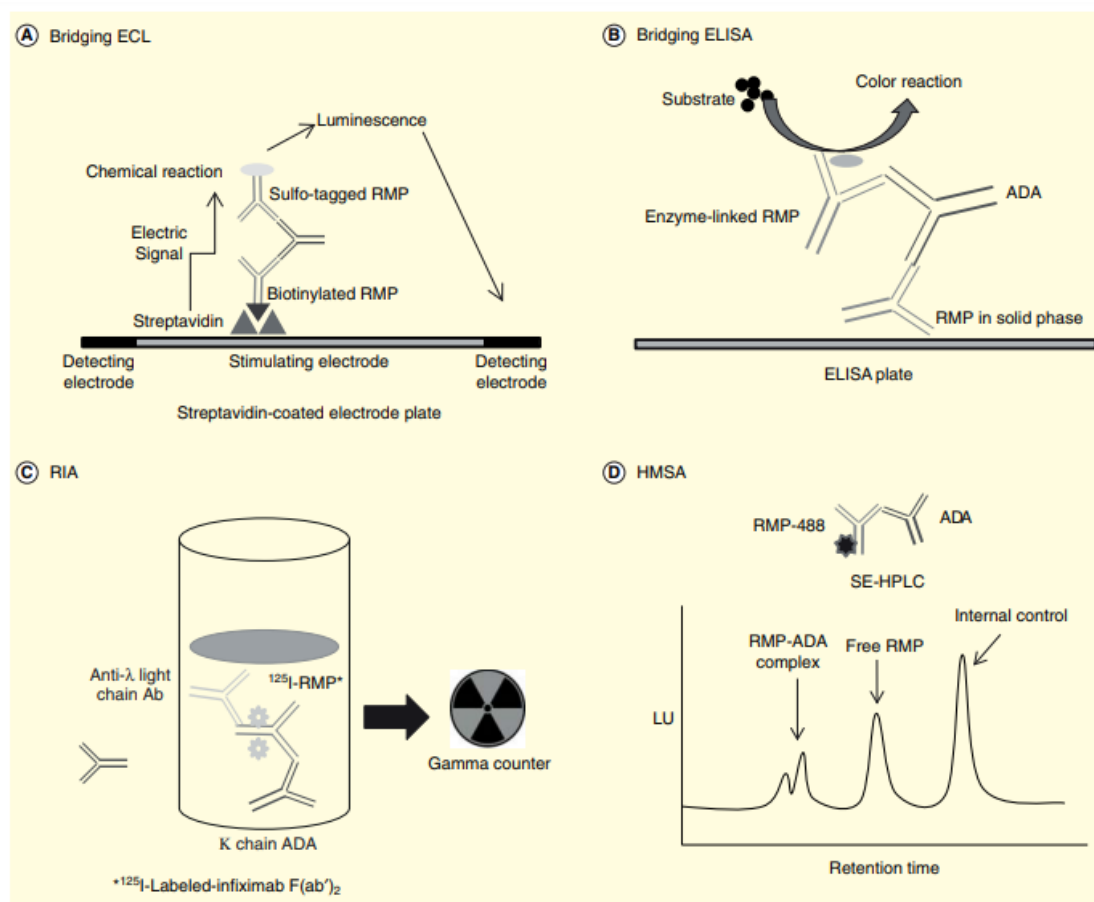
Η πιο κοινή μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση αντισωμάτων απόκρισης είναι η ELISA γεφύρωσης, η οποία βασίζεται στη μορφή διπλού αντιγόνου, δηλαδή το προϊόν που αναλύεται χρησιμοποιείται τόσο κατά τη στερεά φάση για τη σύλληψη αντισωμάτων όσο και κατά τη φάση της βιοτινυλιωμένης ανίχνευσης με τη χρήση υπεροξειδάσης (Εικόνα 11). Η ανάλυση δεν μπορεί να προσδιορίσει αντισώματα κάτω από ορισμένα όρια, κυρίως λόγω των επαναλαμβανόμενων πλύσεων. Τα ψευδώς θετικά ευρήματα που προκαλούνται από μη ειδική δέσμευση άλλων ανοσοσφαιρινών ή ρευματοειδών παραγόντων είναι ένα άλλο πρόβλημα με την ELISA στερεάς φάσης.⁽³⁴⁾

❖ *Ραδιοανοσοδοκιμασία (RIA)*

Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή ότι το προς ανάλυση προϊόν είναι ένα αντίσωμα κατασκευασμένο αποκλειστικά από ελαφριές αλυσίδες κ και ότι οποιοδήποτε ραδιενεργό σύμπλοκο που εκχυλίζεται από αντισώματα με ελαφριές αλυσίδες λ θα είναι το προϊόν συνδεδεμένο με άλλο αντίσωμα και όχι ελεύθερο. Μια άλλη προσέγγιση, ανιχνεύει τα αντισώματα απόκρισης του ορού με ένα αντιδραστήριο δεσμευμένο στη σεφαρόζη και ακολουθεί επώαση με σημασμένο το προϊόν που αναλύεται (Εικόνα 11). Ένα σημαντικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι το προϊόν είναι σε διάλυμα και δεν υφίσταται τη μετουσιωτική επίδραση της επικάλυψης όπως φαίνεται σε ορισμένες άλλες μεθόδους. Έτσι, μπορεί να αποφευχθεί ο κίνδυνος ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων που παρατηρούνται στις γεφυρώσεις ELISA. Τα μειονεκτήματα της μεθόδου RIA σχετίζονται με την πολυπλοκότητα της δοκιμής, τον παρατεταμένο χρόνο επώασης και ανησυχίες για την ασφάλεια που σχετίζονται με το χειρισμό ραδιενεργού υλικού σε πολλά κλινικά εργαστήρια.⁽³⁴⁾

❖ Δοκιμασία μετατόπισης ομογενούς κινητικότητας (HMSA)

Η τεχνική HMSA βασίζεται στην επώαση δειγμάτων ορού με επισημασμένη με φθορισμό προϊόν για την ανίχνευση των επιπέδων αντισωμάτων απόκρισης. Τα ανοσοσύμπλοκα που σχηματίζονται στο μίγμα επώασης διαχωρίζονται με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αποκλεισμού μεγέθους, με την ποσότητα των αντισωμάτων απόκρισης στα δείγματα να υπολογίζεται από τις αναλυμένες περιοχές κορυφής (Εικόνα 11).⁽³⁴⁾



Εικόνα 11. Μέθοδοι ανίχνευσης αντισωμάτων απόκρισης.⁽³⁴⁾

3.4.4 Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας

Οι λειτουργίες τελεστή πρέπει να αξιολογούνται ως μέρος της άσκησης λειτουργικού χαρακτηρισμού και συγκρισιμότητας, όποτε συνιστούν γνωστό μηχανισμό δράσης για

το προϊόν αναφοράς ή πιθανή ανησυχία για την ασφάλεια σχετικά με ανεπιθύμητες ανοσοφαρμακολογικές επιδράσεις. Αυτές οι λειτουργίες περιλαμβάνουν τις:

- κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα (CDC)
- κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από το αντίσωμα (ADCC)

❖ *Κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα (CDC)*

Τα θεραπευτικά αντισώματα που μπορούν να ενεργοποιήσουν το σύστημα του συμπληρώματος το κάνουν δεσμεύοντας το συστατικό C1q και στη συνέχεια ενεργοποιώντας την κλασική οδό ενεργοποίησης του συμπληρώματος. Η ικανότητα ενός αντισώματος να ενεργοποιεί αποτελεσματικά το CDC εξαρτάται από πολλές πτυχές του αντιγόνου-αντισώματος και των αλληλεπιδράσεων αντισώματος-μικροπεριβάλλοντος. Ο προσδιορισμός CDC μπορεί να πραγματοποιηθεί *in vitro* χρησιμοποιώντας ορό αίματος ή εμπορικά διαθέσιμα κλάσματα συμπληρώματος. Η θανάτωση των κυττάρων-στόχων μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με αντιδραστήρια βιωσιμότητας κυττάρων. Αυτές οι αναλύσεις έχουν το πλεονέκτημα της άμεσης αξιολόγησης της κυτταρικής λύσης αντί για άλλα ενδιάμεσα τελικά σημεία όπως η δέσμευση C1q ή η εξάντληση των συστατικών του συμπληρώματος.⁽³⁶⁾

Στο πλαίσιο των εγκεκριμένων βιοομοειδών, το CDC είναι γνωστό ότι αποτελεί πρωταρχικό μηχανισμό δράσης αν και η σχετική συμβολή του στη συνολική θεραπευτική αποτελεσματικότητα είναι ασαφής. Η ικανότητα επαγωγής CDC των θεραπευτικών αντισωμάτων είναι γνωστό ότι είναι ευαίσθητη στις αλλαγές στη δομή της γλυκάνης Fc, ιδιαίτερα στις τροποποιήσεις του επιπέδου γαλακτοζυλίωσης ή σιαλυλίωσης. Αυτή η στενή σχέση μεταξύ της δομής και της βιολογικής δραστηριότητας του μορίου είναι σημαντική στο πλαίσιο της αξιολόγησης ομοιότητας υποψηφίων βιοομοειδών, αλλά σημαίνει επίσης μια δυνητικά υποσχόμενη ευκαιρία για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών αντισωμάτων με βελτιωμένη κλινική αποτελεσματικότητα.⁽³⁶⁾

❖ *Κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από αντισώματα (ADCC)*

Ομοίως, όπως περιγράφηκε για το CDC, η επαγωγή του ADCC εξαρτάται επίσης από το συγκεκριμένο μόριο και το στοχευόμενο αντιγόνο. Είναι καλά πλέον αποδεδειγμένο ότι η επαγωγή ADCC μπορεί να είναι ένας θεμελιώδης μηχανισμός δράσης για ορισμένα θεραπευτικά αντισώματα που στρέφονται εναντίον δεσμευμένων στη μεμβράνη στόχων και μπορεί ουσιαστικά να εξηγήσει την κλινική τους αποτελεσματικότητα. Ωστόσο, η σχετική συμβολή του ADCC στη συνολική θεραπευτική δράση δεν είναι πάντα πλήρως κατανοητή και μπορεί επίσης να ποικίλλει μεταξύ των συγκεκριμένων ενδείξεων. Είναι γενικά αποδεκτό ότι ο μηχανισμός δράσης βασίζεται στην εξουδετέρωση του TNF-α με τη μεσολάβηση Fab (π.χ. ρευματοειδής αρθρίτιδα).⁽³⁶⁾

Η in vitro μέτρηση του ADCC βασίζεται στην ταυτόχρονη παρουσία τριών βασικών συστατικών:

- i) δραστικά κύτταρα που φέρουν FcγR,
- ii) αντίσωμα που δημιουργεί μια γέφυρα μεταξύ του οψωνοποιημένου κυττάρου στόχου και του κυττάρου τελεστή,
- iii) βιολογικά σχετικά κύτταρα στόχοι που εκφράζουν το ειδικό αντιγόνο.

Έχει αποδειχθεί ότι πολλαπλοί τύποι κυττάρων, όπως φυσικά φονικά κύτταρα (NK), μονοκύτταρα ή ουδετερόφιλα, αλλά και ορισμένες υποομάδες λεμφοκυττάρων μπορούν να μεσολαβήσουν στο ADCC. Οι κλασικές ποσοτικές μέθοδοι βασίζονται στη λύση των κυττάρων-στόχων που ανιχνεύονται μέσω της απελευθέρωσης ή της πρόσληψης φθορίζουσών χρωστικών σε μια ανάλυση που βασίζεται σε κυτταρόμετρο ροής. Πιο καινοτόμες και αναδυόμενες προσεγγίσεις περιλαμβάνουν την ανίχνευση βιοφωταύγειας του ενζύμου GAPDH που απελευθερώνεται από νεκρά κύτταρα-στόχους καθώς και τη βασισμένη σε πραγματικό χρόνο παρακολούθηση της αποκόλλησης των κυττάρων-στόχων.⁽³⁶⁾

Όπως συμβαίνει και με το CDC, οι αλλαγές στο προφίλ γλυκοζυλίωσης μπορεί να έχουν σημαντικό αντίκτυπο στο ADCC. Η στενή σχέση μεταξύ του προτύπου γλυκοζυλίωσης και της ικανότητας επαγωγής ADCC είναι ιδιαίτερα σημαντική για την παρακολούθηση της διαδικασίας παραγωγής βιοομοειδών προϊόντων.⁽³⁶⁾

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΑ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ & ΤΑ ΒΙΟΟΜΟΙΩΔΗ ΤΟΥΣ

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Μέσα στο τρέχον πλαίσιο υγείας, τα βιολογικά προϊόντα έχουν γίνει ένας εξαιρετικά σημαντικός παράγοντας για τη θεραπεία και τον έλεγχο του καρκίνου, λαμβάνοντας υπόψη τις μεγάλες προκλήσεις και τα οφέλη της χρήσης βιοομοειδών φαρμάκων. Με την απώλεια της προστασίας διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας για βιολογικά φάρμακα, η ανάπτυξη βιοομοειδών προϊόντων γίνεται όλο και πιο συνηθισμένη, προκαλώντας μια σημαντική αλλαγή στη φαρμακευτική βιομηχανία. Ως αποτέλεσμα, αρκετά βιοομοειδή προϊόντα γίνονται διαθέσιμα για ένα μόνο φάρμακο αναφοράς.⁽⁵⁷⁾ Τα βιοομοειδή έχουν ενσωματωθεί στη φροντίδα του καρκίνου για πάνω από μια δεκαετία, καθώς τα πρώτα βιοομοειδή της εποεΐνης και της φιλγραστίμης, που χρησιμοποιούνται ως υποστηρικτική θεραπεία στην ογκολογία, εγκρίθηκαν από τον EMA το 2007 και το 2008, αντίστοιχα, ενώ οι πρώτες βιοομοειδείς εκδόσεις μονοκλωνικών αντισωμάτων στην ογκολογία, συγκεκριμένα της ριτουξιμάμπης, εγκρίθηκαν από τον EMA το 2017.⁽⁴⁾ Η εμφάνιση βιοομοειδών δεύτερης γενιάς σημαίνει ότι τα βιοομοειδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία ασθενών με καρκίνο με θεραπευτική πρόθεση, παράλληλα με το ρόλο των βιοομοειδών πρώτης γενιάς στην υποστηρικτική φροντίδα.⁽⁶⁵⁾

Τα αντικαρκινικά μονοκλωνικά αντισώματα χρησιμοποιούνται συχνά σε συνδυασμό με άλλες πιο τοξικές θεραπείες, γεγονός που καθιστά δύσκολο τον σχεδιασμό μελετών που επιτρέπουν τον εντοπισμό διαφορών στην ασφάλεια. Ακόμη και στην περίπτωση μονοκλωνικών αντισωμάτων που έχουν δείξει αποτελεσματικότητα ως μονοθεραπείες, όπως η τραστουζουμάμπη ή η ριτουξιμάμπη, αυτοί οι παράγοντες χρησιμοποιούνται συχνότερα σε συνδυασμό με τη ραχοκοκαλιά της χημειοθεραπείας, περιπλέκοντας την απόφαση σχετικά με την καταλληλότερη ένδειξη και τον πληθυσμό ασθενών στους οποίους θα πραγματοποιηθεί δοκιμές για να δείξουν βιοομοιότητα.⁽⁵⁴⁾

Τα βιοφαρμακευτικά είναι γενικά ασφαλή φάρμακα, τα οποία δρουν ως επί το πλείστον εξωκυτταρικά δεσμεύοντας σε έναν συγκεκριμένο συνδέτη ή υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη. Είτε απεκκρίνονται είτε καταβολίζονται, είτε και τα δύο, σε αμινοξέα, σάκχαρα και άλλα φυσικά προϊόντα και ανακυκλώνονται. Σε αντίθεση με τα μικρά μόρια που εισέρχονται στα κύτταρα και μερικές φορές παρεμβαίνουν στον εσωτερικό μεταβολισμό, τα βιολογικά δεν ασκούν τέτοιες τοξικές επιδράσεις. Αντίθετα, οι συστηματικές ανεπιθύμητες ενέργειες των βιοφαρμακευτικών φαρμάκων είναι τις περισσότερες φορές οι φαρμακοδυναμικές επιδράσεις του φαρμάκου και επομένως σχετίζονται στενά με την ισχύ του βιοφαρμακευτικού.⁽⁵⁴⁾

Τα βιοφαρμακευτικά φάρμακα ενίονται γενικά και οι δερματικές αντιδράσεις είναι η πιο συχνή παρενέργεια. Αυτές οι αντιδράσεις είναι τυπικά ήπιες και μη ειδικές. Ορισμένες αντιδράσεις προκαλούνται από το σκεύασμα ή, σπάνια, από φαρμακολογικές και ανοσολογικές επιδράσεις. Η ανοσογονικότητα θεωρείται το κύριο ζήτημα ασφάλειας για τα βιοφαρμακευτικά προϊόντα. Σχεδόν όλα τα βιοφαρμακευτικά προϊόντα είναι ανοσογόνα. Αν και πολλοί παράγοντες ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση, οι κύριες αιτίες σχετίζονται με το προϊόν. Εκτός από την εγγενή ανοσογονικότητα της πρωτεΐνης, παράγοντες που σχετίζονται με το προϊόν, όπως συσσωματώσεις και πρωτεΐνες κυττάρου-ξενιστή, είναι υπεύθυνοι για την ανοσογονικότητα. Επειδή η εγγενής ανοσογονικότητα μεταξύ του βιομοιοειδούς και του αρχικού προϊόντος θα είναι πανομοιότυπη, οι διαφορές στην ανοσογονικότητα μπορούν να προκύψουν μόνο από διαφορές στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά. Με άλλα λόγια, εάν δεν υπάρχουν σχετικές διαφορές στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, η πιθανότητα διαφορών στην ανοσογονικότητα μεταξύ του βιομοιοειδούς και του αρχικού προϊόντος είναι χαμηλή.⁽⁵⁴⁾

Αναγνωρίζοντας την εξαιρετικά πολύπλοκη δομή των μονοκλωνικών αντισωμάτων, ο EMA δημοσίευσε πρόσθετες οδηγίες ειδικά για αυτά. Αυτές οι κατευθυντήριες οδηγίες αναφέρουν ότι η παρέκταση των δεδομένων κλινικής ασφάλειας και αποτελεσματικότητας σε άλλες ενδείξεις που έχουν εγκριθεί για το προϊόν αναφοράς είναι δυνατή με βάση τα αποτελέσματα των συνολικών στοιχείων που παρέχονται στην άσκηση συγκρισιμότητας και με επιστημονική αιτιολόγηση. Στο ογκολογικό περιβάλλον, επειδή τα προτιμώμενα τελικά σημεία για τη δημιουργία αντικαρκινικής δραστηριότητας, δηλαδή η επιβίωση χωρίς εξέλιξη/ελεύθερη νόσο ή η συνολική επιβίωση, ενδέχεται να μην είναι εφικτά ή αρκετά ευαίσθητα για να τεκμηριωθεί

παρόμοια αποτελεσματικότητα των βιοομοειδών και των μονοκλωνικών αντισωμάτων αναφοράς, ο EMA συνιστά χρησιμοποιώντας ένα κλινικό τελικό σημείο που μετρά τη δραστηριότητα ως πρωτεύον τελικό σημείο (π.χ. συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης ή παθολογική πλήρη απόκριση). Για να καταστεί δυνατή η ανίχνευση πιθανών διαφορών που σχετίζονται με το προϊόν και να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος για απρόβλεπτες ανοσολογικές αποκρίσεις, συνιστάται η παρέκταση κλινικών δεδομένων από έναν πληθυσμό που είναι δυνητικά πιο ομοιογενής και όχι ανοσοποιητικός έναντι ενός πληθυσμού που είναι λιγότερο ομοιογενής και ανοσοκατεσταλμένος.⁽¹³⁾ Μέχρι σήμερα, τα βιοομοειδή που έχουν εγκριθεί για θεραπεία καρκίνου είναι γενικά αδειοδοτημένα για όλες τις ενδείξεις που κατέχονται από το προϊόν αναφοράς τους, καθώς η παρέκταση ενδείξεων κρίθηκε κατάλληλη σε αυτές τις περιπτώσεις.⁽⁶⁵⁾

Τα βιολογικά φάρμακα είναι ζωτικής σημασίας, αλλά συχνά υψηλού κόστους συστατικά της θεραπείας του καρκίνου, με τις ευρωπαϊκές τιμές καταλόγου να ορίζονται σε δεκάδες χιλιάδες ευρώ ανά κύκλο θεραπείας. Οι τιμές των νέων αντικαρκινικών φαρμάκων κατά την κυκλοφορία έχουν αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, παράλληλα με την εισαγωγή θεραπειών υψηλού κόστους, όπως η θεραπεία με χημειοθεραπευτικούς υποδοχείς αντιγόνου T-κυττάρων. Το κόστος των καθιερωμένων βιολογικών έχει επίσης αυξηθεί. Ευτυχώς, καθώς τα διπλώματα ευρεσιτεχνίας για το πρώτο κύμα βιολογικών αντικαρκινικών φαρμάκων έχουν λήξει, αναδύονται βιοομοειδή για να ενισχύσουν το ογκολογικό θεραπευτικό οπλοστάσιο, έχοντας επιπλέον τη δυνατότητα να προσφέρουν σημαντική εξοικονόμηση κόστους.⁽⁶⁵⁾

Για να αξιοποιηθούν πλήρως τα πιθανά οφέλη των βιοομοειδών θεραπειών για τον καρκίνο, θα χρειαστεί να ληφθούν διάφορα μέτρα για την αλλαγή των αντιλήψεων των ενδιαφερομένων και την ενθάρρυνση της αποδοχής, συμπεριλαμβανομένης της στοχευμένης εκπαίδευσης, της συλλογής δεδομένων αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας. Η συμπερίληψη βιοομοειδών στις κατευθυντήριες γραμμές θεραπείας θα επηρεάσει επίσης την αποδοχή του γιατρού. Φυσικά, οι προοπτικές και οι ανάγκες των ασθενών θα πρέπει να παραμείνουν πρωταρχικό μέλημα. Από αυτή την άποψη, η εκπαίδευση σχετικά με τις ελάχιστες διαφορές μεταξύ ενός βιοομοειδούς και του επώνυμου προϊόντος αναφοράς του θα είναι απαραίτητη, καθώς και η σαφής ένδειξη των πιθανών προσωπικών και κοινωνικών οφελών των βιοομοειδών όσον αφορά το μειωμένο κόστος ή/και την αυξημένη πρόσβαση στη θεραπεία.

4.2 ΤΡΑΣΤΟΥΖΟΥΜΑΜΠΗ

4.2.1 Καρκίνος του μαστού και μοριακός υποτύπος HER2

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο πιο συχνά διαγνωσμένος καρκίνος στον κόσμο στις γυναίκες. Η συχνότητα εμφάνισης και η θνησιμότητά του έχουν αυξηθεί τις τελευταίες δεκαετίες, κυρίως λόγω των αλλαγών στους παράγοντες κινδύνου και της καλύτερης καταγραφής και ανίχνευσης. Η επιβίωση εξαρτάται τόσο από το στάδιο όσο και από τον μοριακό υποτύπο. Ο διηθητικός καρκίνος του μαστού περιλαμβάνει όγκους που παρουσιάζουν διαφορές στην κλινική τους εμφάνιση, συμπεριφορά και μορφολογία. Με βάση τα επίπεδα έκφρασης του mRNA, μπορεί να χωριστεί σε διάφορους μοριακούς υποτύπους (π.χ. HER2 θετικό/HER2+). Οι μοριακοί υποτύποι βοηθούν στον καθορισμό νέων θεραπευτικών στρατηγικών και στον διαχωρισμό των ασθενών, επηρεάζοντας έτσι τη θεραπευτική τους διαχείριση. Η όγδοη έκδοση της ταξινόμησης TNM ορίζει ένα νέο σύστημα σταδιοποίησης του καρκίνου του μαστού που, εκτός από τα ανατομικά χαρακτηριστικά του όγκου, λαμβάνει υπόψη και βιολογικούς παράγοντες.⁽⁶³⁾

Η θεραπεία του καρκίνου του μαστού περιλαμβάνει έναν συνδυασμό διαφορετικών θεραπευτικών στρατηγικών που εφαρμόζονται σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία, συμπεριλαμβανομένης της χειρουργικής επέμβασης, της ακτινοθεραπείας, της χημειοθεραπείας, της ορμονοθεραπείας και της θεραπείας με βιολογικούς παράγοντες. Ο τρόπος με τον οποίο αντιμετωπίζεται ο καρκίνος του μαστού σήμερα έχει αλλάξει σημαντικά ως συνέπεια του λεπτομερούς ορισμού των μοριακών χαρακτηριστικών του, των ανοσοϊστοχημικών υποδοχέων (π.χ. ER, PR, HER2 (ERBB2), του δείκτη πολλαπλασιασμού κυττάρων Ki-67 (MKI67)), των γονιδιωματικών δεικτών (π.χ. BRCA1, BRCA2 και PIK3CA) και των ανοσολογικών δεικτών (π.χ. λεμφοκύτταρα διείσδυσης όγκου και PD-L1). Νέοι αναδυόμενοι συνδυασμοί βιοδεικτών αποτελούν τη βάση ολοένα και πιο περίπλοκων διαγνωστικών αλγορίθμων. Η συνδυαστική θεραπεία αποτελεί το πρότυπο φροντίδας (ειδικά σε HER2+) καθώς και τη βάση για την αποκλιμάκωση της χειρουργικής επέμβασης μαστού, ενώ η ακτινοθεραπεία εξακολουθεί να είναι μεταξύ των θεμελιωδών λίθων στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Οι θετικοί στο ER όγκοι αντιμετωπίζονται για μεγάλο χρονικό διάστημα (5-10 χρόνια) με ορμονοθεραπεία και χημειοθεραπεία, με βάση την ατομική εκτίμηση

κινδύνου. Για το μεταστατικό καρκίνο του μαστού, οι τυπικές θεραπευτικές επιλογές περιλαμβάνουν στοχευμένες προσεγγίσεις, όπως αναστολείς CDK4 και CDK6, αναστολείς PI3K, αναστολείς PARP και ανοσοθεραπεία PD-L1, ανάλογα με τον τύπο και το μοριακό προφίλ του όγκου.⁽⁶³⁾

Ο HER2 είναι ένας υποδοχέας πρωτεΐνης στην κυτταρική επιφάνεια που προάγει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησής του. Συνοπτικά, οι οδοί σηματοδότησης του HER2 είναι οι εξής:

- ✓ Η δέσμευση του υποδοχέα προκαλεί διμερισμό μεταξύ των υποδοχέων της οικογένειας των υποδοχέων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) και του υποδοχέα HER2.
- ✓ Στη συνέχεια, τα ομοδιμερή ή ετεροδιμερή διεγείρουν μια σειρά από καταρράκτες σηματοδότησης. Μεταξύ των διαφόρων οδών σηματοδότησης, η 3-κινάση της φωσφατιδυλνινοσιτόλης (PI3K) και η ενεργοποιημένη από μιτογόνο πρωτεϊνική κινάση (MAPK) είναι οι δύο κύριες και πιο μελετημένες οδοί που παίζουν κεντρικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό του όγκου.
- ✓ Ολόκληρη η διαδικασία μεταγωγής σήματος χωρίζεται σε τρεις ενότητες: είσοδος σήματος (σύνδεση υποδοχέα και διμερισμός), επεξεργασία σήματος (σειρά καταρράκτες σήματος) και έξοδος σήματος (αντίστοιχες κυτταρικές διεργασίες).

Στο 20-25% των περιπτώσεων, το HER2 υπερεκφράζεται, γεγονός που οδηγεί σε ταχύτερη ανάπτυξη του καρκίνου και υψηλότερο ποσοστό υποτροπής. Η υπερέκφρασή του σχετίζεται με έναν πιο επιθετικό φαινότυπο νόσου, καθώς και με χειρότερα ποσοστά επιβίωσης χωρίς νόσο (DFS) και συνολική επιβίωση (OS) σε σύγκριση με ασθενείς με αρνητικό HER2. Αρκετοί παράγοντες anti-HER2 χρησιμοποιούνται επί του παρόντος σε κλινική χρήση, όπως τα μονοκλωνικά αντισώματα τραστουζουμάμπης και περτουζουμάμπης, οι μικρομοριακοί αναστολείς λαπατινίμπης, νερατινίμπης και τουκατινίμπης καθώς και σύμπλοκα αντισώματος-φαρμάκου. Αυτοί οι παράγοντες διαφέρουν σημαντικά στο είδος των παρενεργειών καθώς και στις εγκεκριμένες ενδείξεις, από την πρόιμη νόσο έως την πρώτη και τελευταία γραμμή θεραπείας στη μεταστατική νόσο.⁽⁶³⁾

4.2.2 Μηχανισμός δράσης της τραστοζουμάμπης

Η τραστοζουμάμπη είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα κ ελαφριάς αλυσίδας που στοχεύει ειδικά το HER2. Ως αποτέλεσμα της ανάπτυξής της μέσω εξανθρωπισμένων γονικών αντισωμάτων ποντικού, η τραστοζουμάμπη αποτελείται από γονιδιώματα ανθρώπου και ποντικού. Ο μηχανισμός δράσης της σχετίζεται με την αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων που υπερεκφράζουν το HER2 αναστέλλοντας τις οδούς MAPK και PI3K/Akt.⁽⁶³⁾ Ένας άλλος σημαντικός μηχανισμός είναι η προσέλκυση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος σε περιοχές του όγκου που υπερεκφράζουν το HER2, τη λεγόμενη κυτταροτοξικότητα που προκαλείται από αντισώματα.⁽³⁰⁾ Κατά την προσάρτηση του αντιγόνου στο μονοκλωνικό αντίσωμα, το αποτέλεσμα προκαλείται από τη σύνδεση του θραύσματος Fc στον υποδοχέα Fcγ (FcγR) IIIa (FcγRIIIa), επίσης γνωστό ως CD16a. Το HER2 ενεργοποιείται με διμερισμό, ο οποίος επάγει την ενεργοποίηση της Ras/Raf/ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης (MAPK), του PI3K/Akt και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων φωσφολιπάσης Cγ (PLCγ)/C. Ο χρόνος ημιζωής μετά από ενδοφλέβια και υποδόρια χορήγηση τραστοζουμάμπης είναι 10 ημέρες. Η υποδόρια χορήγηση τραστοζουμάμπης σε δόση 600 mg έχει ως αποτέλεσμα ελάχιστα αποτελεσματικά επίπεδα φαρμάκου ισοδύναμα με αυτά που χορηγούνται ενδοφλεβίως.⁽⁶³⁾

Η τραστοζουμάμπη είναι μια βιολογική θεραπεία για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού και του μεταστατικού γαστρικού καρκίνου σε HER2+ ασθενείς. Το φάρμακο εγκρίθηκε από τον FDA των ΗΠΑ το 1998 και τον EMA το 2000 ως θεραπεία για μεταστατικό καρκίνο του μαστού (HER2+ MBC). Η έγκριση αυτού του εξανθρωπισμένου μονοκλωνικού αντισώματος άλλαξε την πορεία της θεραπείας των γυναικών ασθενών με HER2+ καρκίνο του μαστού, καθιστώντας το πρότυπο για τη νεοεπικουρική και επικουρική χημειοθεραπεία, καθώς και τη θεραπεία της μεταστατικής νόσου.⁽⁶³⁾

Ένας μεγάλος αριθμός κλινικών δοκιμών έχει δείξει ότι η τραστοζουμάμπη βελτιώνει σημαντικά τη συνολική επιβίωση και την περίοδο χωρίς νόσο σε γυναίκες με πρώιμο HER2+ καρκίνο του μαστού. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η τραστοζουμάμπη που χορηγήθηκε για 1 χρόνο βελτίωσε σημαντικά τα ποσοστά επιβίωσης χωρίς νόσο και τη συνολική επιβίωση σε σύγκριση με σχήματα χωρίς χορήγηση τραστοζουμάμπης. Στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού, η πρώιμη προσθήκη τραστοζουμάμπης στην

κυτταροτοξική χημειοθεραπεία βελτίωσε σημαντικά τόσο τα ποσοστά ανταπόκρισης όσο και τη συνολική επιβίωση. Σε σχετικές μελέτες, ο συνδυασμός τραστοζουμάμπης και ταξάνης αναγνωρίστηκε ως το χρυσό πρότυπο για τη θεραπεία πρώτης γραμμής σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο.⁽⁶³⁾

4.2.3 Συγκριτικές μελέτες της τραστοζουμάμπης με τα βιοομοειδή της

Οι δοκιμές που οδήγησαν στην έγκριση βιοομοειδών τα συνέκριναν με την τραστοζουμάμπη σε ασθενείς με χειρουργήσιμο καρκίνο του μαστού πρώιμου ή μεταστατικού σταδίου. Το Ogivri (trastuzumab-dkst) ήταν το πρώτο βιοομοειδές που εγκρίθηκε από τον FDA για την τραστοζουμάμπη. Αντίστοιχα, το Ontruzant (SB3) ήταν το πρώτο βιοομοειδές της τραστοζουμάμπης που έλαβε ρυθμιστική έγκριση από τον EMA τον Νοέμβριο του 2017 και ήταν επίσης το πρώτο που κυκλοφόρησε στο Ηνωμένο Βασίλειο. Το Herzuma (CT-P6) εγκρίθηκε από τον EMA τον Φεβρουάριο του 2018 και από τον FDA τον Δεκέμβριο του 2018 ως μέρος της επικουρικής και νεοεπικουρικής θεραπείας για καρκίνο του μαστού που υπερεκφράζει το γονίδιο HER2. Το Kanjinti (ABP 980) εγκρίθηκε από τον EMA τον Μάιο του 2018 για νεοενισχυτική και επικουρική θεραπεία σε πρώιμο ενισχυμένο HER2+ καρκίνο του μαστού αλλά η έγκρισή του απορρίφθηκε από τον FDA. Τέλος το Trazimera (PF-05280014) εγκρίθηκε τον Ιούλιο του 2018 από τον EMA.⁽⁷¹⁾

Τα κύρια καταληκτικά σημεία των συγκριτικών μελετών μεταξύ της τραστοζουμάμπης και των βιοομοειδών της διέφεραν και περιελάμβαναν:

- ❖ Το συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης σε συνδυαστική θεραπεία με ταξάνη για ασθενείς με HER2+ μεταστατικό καρκίνο του μαστού (Ogivri).
- ❖ Τη σύγκριση του ποσοστού πλήρους παθολογικής απόκρισης του μαστού σε συνδυαστική θεραπεία με ντοσεταξέλη ακολουθούμενη από χειρουργική επέμβαση (Ontruzant).
- ❖ Το ποσοστό παθολογικής πλήρους απόκρισης κατά τη χειρουργική επέμβαση (Herzuma).
- ❖ Τις διαφορές κινδύνου και το λόγο κινδύνου της πλήρους παθολογικής απόκρισης στον ιστό του μαστού και στους μασχαλιαίους λεμφαδένες μετά από νεοεπικουρική χημειοθεραπεία (Kanjinti).

- ❖ Το ποσοστό αντικειμενικής απόκρισης σε συνδυαστική θεραπεία με πακλιταξέλη για ασθενείς με HER2+ μεταστατικό καρκίνο του μαστού (Trazimera).

Τα δευτερεύοντα καταληκτικά σημεία στις περισσότερες συγκριτικές μελέτες περιελάμβαναν συγκρίσεις του συνολικού ποσοστού παθολογικής πλήρους απόκρισης, του συνολικού ποσοστού ανταπόκρισης, της επιβίωσης χωρίς συμβάν, της συνολικής επιβίωσης, της ασφάλειας, της φαρμακοκινητικής και της ανοσογονικότητας. Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια μεταξύ των ομάδων θεραπείας, αποδεικνύοντας την ισοδυναμία και των συγκρινόμενων φαρμάκων.^(63, 71)

4.3 ΜΠΕΒΑΣΙΖΟΥΜΑΜΠΗ

4.3.1 Στόχευση VEGF σε διάφορες μορφές καρκίνου

Τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν θεμελιωδώς από τα φυσιολογικά κύτταρα, ως αποτέλεσμα του ότι έχουν αποκτήσει χαρακτηριστικά γνωρίσματα που επιτρέπουν την ανάπτυξη και την εξέλιξη του όγκου. Λόγω των υψηλών μεταβολικών απαιτήσεών τους, οι αναπτυσσόμενοι συμπαγείς όγκοι εξαρτώνται από την αγγείωση για την παροχή θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου και τη διάθεση των μεταβολικών αποβλήτων. Η αγγείωση μπορεί να προωθηθεί με την αγγειογένεση, δηλαδή τη δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων με βλάστηση από υπάρχοντα αιμοφόρα αγγεία. Ενώ η αγγειογένεση ελέγχεται αυστηρά από μια περίπλοκη αλληλεπίδραση προ- και αντι-αγγειογενετικών παραγόντων, μπορεί να ενεργοποιηθεί με την ανάπτυξη συμπαγών όγκων.⁽²²⁾

Μεταξύ των προ-αγγειογενετικών παραγόντων που εκκρίνονται από όγκους, οι αγγειακοί ενδοθηλιακοί αυξητικοί παράγοντες (VEGFs) έχουν αναγνωριστεί ως βασικοί παράγοντες για την πρόκληση αγγειογένεσης όγκου.^(22, 40) Οι VEGF ενεργοποιούν τη σηματοδότηση VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα δεσμεύοντας σε κινάσες τυροσίνης υποδοχέα VEGF (VEGFR-1/ VEGFR-3). Με αυτά τα μέσα, ο VEGF μπορεί να διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων και να αυξήσει τη διαπερατότητα των αγγείων, υποστηρίζοντας έτσι τις μεταβολικές απαιτήσεις του αναπτυσσόμενου όγκου.⁽²²⁾ Εκτός από την αγγειογενετική

διαδικασία, η οδός του υποδοχέα VEGF/VEGF (VEGFR) μπορεί να εμπλέκεται σε μια άμεση οδό που προάγει τον όγκο και η αναστολή του VEGF μπορεί να έχει άμεσες κυτταροτοξικές επιδράσεις. Οι VEGF προκαλούν διμερισμό του VEGFR, ο οποίος ενεργοποιεί την εγγενή κινάση τυροσίνης, οδηγώντας στην ενεργοποίηση οδών σηματοδότησης, όπως RAS/Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt και PLC-γ/PKC, για την ενίσχυση της αγγειογένεσης και του πολλαπλασιασμού του όγκου.⁽⁴⁶⁾

Η έκφραση του VEGF σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση ή πιο επιθετική νόσο στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, τον καρκίνο του παχέος εντέρου, το γλοιοβλάστωμα και τον καρκίνο των ωοθηκών. Στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, η έκφραση του VEGF σχετίζεται με μεταστατική εμπλοκή των κόμβων, μειωμένη συνολική επιβίωση και αυξημένη νεοαγγείωση του όγκου. Στον καρκίνο του παχέος εντέρου, ο VEGF είναι σημαντικά αυξημένος σε ασθενείς με ηπατικές μεταστάσεις σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες και ασθενείς χωρίς ηπατικές μεταστάσεις. Ο VEGF συχνά υπερεκφράζεται στον καρκίνο των ωοθηκών, ο οποίος σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο μεταστατικής νόσου και κακή πρόγνωση.⁽⁴⁰⁾

Πρόσφατη έρευνα έχει δείξει ότι η σηματοδότηση VEGF, ιδιαίτερα η επαγόμενη από VEGF-A σηματοδότηση, έχει επιπρόσθετους ρόλους ανεξάρτητους από την αγγειογένεση στην υποστήριξη της εξέλιξης του όγκου⁽²²⁾:

- ✓ προώθηση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, της μετανάστευσης και της διεισδυτικότητας μέσω της ενεργοποίησης της σηματοδότησης του υποδοχέα αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGFR-1.
- ✓ προαγωγή της στελέχωσης των καρκινικών βλαστοκυττάρων μέσω της ενεργοποίησης της οδού VEGFA/νευροπιλίνη-1 και αυτοανανέωσης μέσω της σηματοδότησης VEGFR-2/STAT3.
- ✓ ανοσοκαταστολή στο μικροπεριβάλλον του όγκου μέσω σηματοδότησης VEGFR σε αιμοποιητικά κύτταρα (VEGFR-1), δένδριτικά κύτταρα (VEGFR-3), μακροφάγα (VEGFR-1 και VEGFR-3), T κύτταρα (VEGFR-1 και VEGFR-2) και ρυθμιστικά T κύτταρα (VEGFR-1).

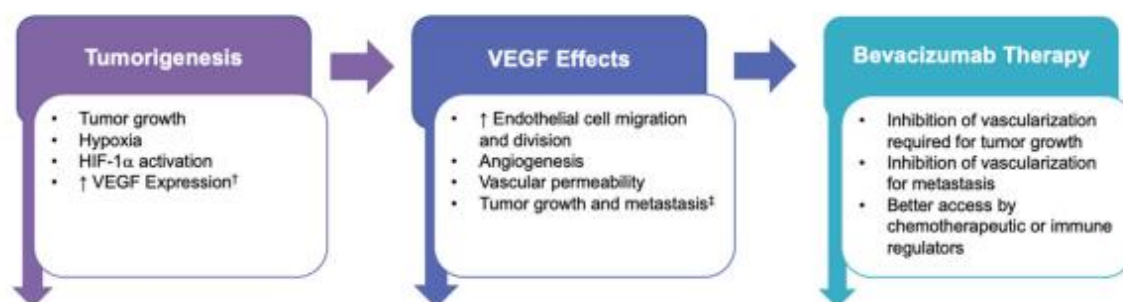
4.3.2 Μηχανισμός δράσης της μπεβασιζουμάμπης

Η πρώτη διαθέσιμη αντι-αγγειογενετική θεραπεία ήταν η μπεβασιζουμάμπη (Avastin), ένα εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα που στρέφεται κατά του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGF.^(22, 40) Είναι εγκεκριμένη ως θεραπεία μιας σειράς καρκίνων, με τις περισσότερες μελέτες να εστιάζονται στο μεταστατικό μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC) και το μεταστατικό καρκίνου του παχέος εντέρου (CRC). Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του νεφρικού καρκινώματος, του καρκίνου των ωοθηκών και του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Επιπλέον σε πολλές χώρες ενδείκνυται για τη θεραπεία ασθενών με γλοιοβλάστωμα, ενώ στην Ευρώπη χρησιμοποιείται και στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού.⁽⁴⁰⁾

Η μπεβασιζουμάμπη δεσμεύει έναν επίτοπο στον VEGF και αποτρέπει τη δέσμευση του VEGF με τον VEGFR στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, αποτρέποντας έτσι την αλληλεπίδραση συνδέτη-υποδοχέα και τη μετάδοση σηματοδότησης. Η μπεβασιζουμάμπη δρα μέσω αναστολής της σηματοδότησης του VEGF και μπορεί να ασκήσει τις αντικαρκινικές της επιδράσεις μέσω της αναστολής της ανάπτυξης νέων αγγείων, της παλινδρόμησης των νεοσχηματισμένων αγγείων, της ομαλοποίησης των αγγείων για τη διευκόλυνση της χορήγησης κυτταροτοξικής χημειοθεραπείας και των άμεσων επιδράσεων στα καρκινικά κύτταρα.^(22, 40) In vitro, η μπεβασιζουμάμπη αναστέλλει τις επαγόμενες από τον VEGF επιδράσεις, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής ανάπτυξης, της αυξημένης διαπερατότητας, της παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου και της κυτταρικής μετανάστευσης (Εικόνα 12). Έμμεσα κλινικά στοιχεία από ασθενείς υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η μπεβασιζουμάμπη έχει πρωταρχικά κυτταροστατικά αποτελέσματα, υποδεικνύοντας ότι αναστέλλει την ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων.⁽⁴⁰⁾

Με βάση τον τρόπο δράσης της, η κλινική ανάπτυξη της μπεβασιζουμάμπης επικεντρώθηκε σε τύπους όγκων που είναι γνωστό ότι οφείλονται στην αγγειογένεση. Συγκεκριμένα, ένας σημαντικός ρόλος του VEGF στην εξέλιξη του καρκίνου υποστηρίχθηκε από τη συσχέτιση των αυξημένων επιπέδων έκφρασης του VEGF εντός του όγκου με χειρότερη πρόγνωση ή πιο επιθετική νόσο σε αρκετούς τύπους συμπαγών όγκων.⁽²²⁾ Οι φαρμακοδυναμικοί βιοδείκτες (VEGF, PGF) επιδεικνύουν σταθερή επίδραση σε διαφορετικούς τύπους όγκων μετά τη χορήγηση μπεβασιζουμάμπης,

καθώς τα κυκλοφορούντα επίπεδα αυξάνονται ως απόκριση στην αντι-VEGF θεραπεία ασθενών με διάφορες κακοήθειες.⁽⁴⁰⁾



Εικόνα 12. Περίληψη των μοριακών μηχανισμών που επηρεάζονται από τη δράση της μπεβασιζουμάμπης.⁽²³⁾

4.3.3 Μοριακή βάση των συχνότερων μορφών καρκίνου στους οποίους χρησιμοποιείται η μπεβασιζουμάμπη

❖ Καρκίνος του παχέος εντέρου

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι ο δεύτερος πιο συχνός καρκίνος στις γυναίκες και ο τρίτος πιο συχνός στους άνδρες. Η συχνότητα εμφάνισης συσχετίζεται με την προχωρημένη ηλικία και, στις ανεπτυγμένες χώρες, η διάμεση ηλικία κατά τη διάγνωση είναι περίπου τα 70 έτη. Εάν διαγνωστεί σε πρώιμο στάδιο, σχετίζεται με καλή πρόγνωση, ωστόσο, το 20-25% των ασθενών παρουσιάζουν μεταστάσεις και περίπου οι μισοί ασθενείς θα αναπτύξουν τελικά μεταστατική νόσο. Η διαχείριση του μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου έχει εξελιχθεί σημαντικά τα τελευταία 20 χρόνια και τα ποσοστά επιβίωσης έχουν βελτιωθεί κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου. Αν και αρκετοί παράγοντες έχουν συμβάλει στη βελτίωση των κλινικών αποτελεσμάτων, μια βασική εξέλιξη ήταν η εισαγωγή νέων βιολογικών θεραπειών που στοχεύουν είτε τη σηματοδότηση του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα είτε την αγγειογένεση.⁽⁵¹⁾ Από την έγκρισή της πριν από μια δεκαετία, η μπεβασιζουμάμπη παραμένει μια τυπική θεραπεία φροντίδας στο μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου, που συνιστάται σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία για επαγωγή και ως θεραπεία συντήρησης.^(22, 46) Τυχαιοποιημένες δοκιμές έχουν δείξει βελτιώσεις στη συνολική επιβίωση σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου που

έλαβαν θεραπεία με μπεβασιζουμάμπη σε συνδυασμό με κυτταροτοξική χημειοθεραπεία. Επίσης αυξήθηκαν τα οφέλη στην επιβίωση χωρίς εξέλιξη και στο ποσοστό ανταπόκρισης.⁽⁵¹⁾

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου δεν είναι ομοιογενές νόσημα, αλλά μπορεί να ταξινομηθεί σε διαφορετικούς υποτύπους, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένες μοριακές και μορφολογικές αλλοιώσεις. Ένα κύριο χαρακτηριστικό του είναι η γενετική αστάθεια που μπορεί να προκύψει από τουλάχιστον δύο διαφορετικούς μηχανισμούς.⁽⁴¹⁾ Η πιο κοινή (περίπου ~84 % του σποραδικού καρκίνου του παχέος εντέρου) χαρακτηρίζεται από χρωμοσωμική αστάθεια (CIN), με αλλαγές στον αριθμό και τη δομή των χρωμοσωμάτων. Αρκετές μελέτες έχουν συσχετίσει το αυτή τη χρωμοσωμική αστάθεια με αδρανοποιητικές μεταλλάξεις ή απώλειες στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο APC, οι οποίες εμφανίζονται ως πρώιμο γεγονός στην ανάπτυξη νεοπλασίας του παχέος εντέρου, ακολουθούμενες από ενεργοποίηση RAS ή απώλεια λειτουργίας του TP53. Η δεύτερη ομάδα εμφανίζει μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) λόγω ελαττωματικής επιδιόρθωσης της ασυμφωνίας του DNA (MMR).^(14, 41) Επιπλέον, ο φαινότυπος μεθυλίωσης νησίδας CpG (CIMP) είναι ένα χαρακτηριστικό που προκαλεί επιγενετική αστάθεια μέσω υπερμεθυλίωσης του προαγωγέα και σίγασης μιας σειράς ογκοκατασταλτικών γονιδίων.⁽⁴¹⁾

❖ *Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα*

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι ένας από τους πιο συχνούς καρκίνους τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες, με την πλειοψηφία των ασθενών να παρουσιάζουν προχωρημένη νόσο. Πριν από τη διαθεσιμότητα στοχευμένων θεραπειών, η διάμεση επιβίωση για ασθενείς με μη πλακώδες προχωρημένο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, την πιο κοινή μορφή καρκίνου του πνεύμονα, ήταν μόνο επτά έως οκτώ μήνες, παρά την επιθετική χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα. Η μπεβασιζουμάμπη ήταν από τις πρώτες στοχευμένες θεραπείες που διατίθενται για αυτόν τον καρκίνο και το πρώτο φάρμακο που βοήθησε αυτούς τους ασθενείς να ζήσουν περισσότερο από ένα χρόνο όταν προστέθηκε στη χημειοθεραπεία.⁽²²⁾

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι μια μοριακά ετερογενής ασθένεια που αποτελείται από υποπληθυσμούς κυττάρων, ή κλώνων, με διακριτά μοριακά χαρακτηριστικά. Οι συχνότητες παραλλαγών αλληλόμορφων για σωματικές μεταλλάξεις έχουν δείξει ότι

οι μεταλλάξεις στα γονίδια KRAS καθώς και του υποδοχέα του EGFR διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη του όγκου και αντιπροσωπεύουν στόχους για θεραπευτική παρέμβαση. Οι μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη TP53 παρατηρούνται συχνότερα σε καρκίνο προχωρημένου σταδίου υποδηλώνοντας έναν ρόλο κατά την εξέλιξη του όγκου. Το γονιδιωματικό τοπίο του καρκίνου του πνεύμονα είναι αξιοσημείωτα διαφορετικό μεταξύ μη καπνιστών και καπνιστών, με την τελευταία κατηγορία να εμφανίζει σημαντικά υψηλότερη συχνότητα μετάλλαξης, κυρίως μετατροπές νουκλεοτιδίων κυτοσίνης σε αδενίνη (C>A) και μη δραστικές μεταλλάξεις όπως αυτές στο KRAS και TP53. Αντίθετα, οι μη καπνιστές έχουν συνήθως μια κυρίαρχη μετάβαση της κυτοσίνης στη θυμίνη (C>T) και υψηλότερο επιπολασμό ενεργών γονιδιακών αλλαγών συμπεριλαμβανομένων των ενεργοποιητικών μεταλλάξεων του EGFR.⁽²⁷⁾

Γενετικά γεγονότα που ξεκινούν και οδηγούν την εξέλιξη του όγκου διαμορφώνουν επίσης το μικροπεριβάλλον του όγκου (TME). Ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα έχει ένα ιδιαίτερα υψηλό φορτίο μεταλλαγών όγκου (TMB), που ορίζεται ως ο αριθμός των μη συνώνυμων κωδικοποιητικών μεταλλάξεων ανά μεγαβάση. Συνολικά, ο αριθμός των μεταλλάξεων είναι σημαντικά υψηλότερος στις μεταστάσεις από ότι στις πρωτογενείς βλάβες του πνεύμονα.⁽²⁷⁾

4.3.4 Συγκριτικές μελέτες της μπεβασιζουμάμπης με τα βιοομοειδή της

Το προϊόν αναφοράς μπεβασιζουμάμπης (Avastin) χρησιμοποιείται ευρέως για τη θεραπεία διαφόρων καρκίνων σε προχωρημένα, υποτροπιάζοντα και μεταστατικά περιβάλλοντα, με την αρχική έγκριση από τον FDA το 2004 να αφορά τη θεραπεία του προχωρημένου καρκίνου του παχέος εντέρου. Το δίπλωμα ευρεσιτεχνίας έληξε στις Ηνωμένες Πολιτείες τον Ιούλιο του 2019 και στην Ευρωπαϊκή Ένωση τον Ιανουάριο του 2022, γεγονός που οδήγησε πολλές εταιρείες φαρμάκων να αναζητήσουν έγκριση για βιοομοειδείς ουσίες. Έχουν εγκριθεί 2 βιοομοειδή στις Ηνωμένες Πολιτείες: το ABP 215 (Mvasi) τον Σεπτέμβριο του 2017 και το PF-06439535 (Zirabev) τον Ιούνιο του 2019. Και οι δύο έχουν λάβει επίσης έγκριση από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή τον Ιανουάριο του 2018 και τον Φεβρουάριο του 2019.⁽⁴⁴⁾ Ένα τρίτο βιοομοειδές της μπεβασιζουμάμπης, το SB8, έχει υποβληθεί τόσο στον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων όσο και στον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ για έγκριση,

και 5 ακόμη προϊόντα, το FKB238, το MB02/BEVZ929, το MyL-1402O (Krabeva), το CT-P16 και το BAT1706 έχουν υποβληθεί στον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων.⁽⁶⁰⁾

Οι συγκριτικές μελέτες της μπεβασιζουμάμπης με τα εγκεκριμένα βιοομοειδή της (Mvasi, Zirabev) είχαν ως καταληκτικά σημεία τη φαρμακοκινητική βιοϊσοδυναμία, η οποία αποδείχθηκε και στις δύο παραπάνω περιπτώσεις, αλλά και το προφίλ ασφαλείας του εκάστοτε προτεινόμενου βιοομοειδούς σε σύγκριση με το προϊόν αναφοράς.⁽⁴⁴⁾

- ❖ Με βάση τη μελέτη των Markus et al., το βιοομοειδές Mvasi επέδειξε παρόμοιο προφίλ ασφαλείας με το Avastin, με τις ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με το φάρμακο της μελέτης να είναι ελαφρώς υψηλότερες στο βιοομοειδές.⁽³⁹⁾ Σε δεύτερη συγκριτική μελέτη (μελέτη MAPLE) τα δεδομένα κλινικής αποτελεσματικότητας και ασφάλειας δεν έδειξαν διαφορές μεταξύ του βιοομοειδούς προϊόντος και του προϊόντος αναφοράς σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα όταν συνδυάζονται με 4 έως 6 κύκλους καρβοπλατίνης και πακλιταξέλης.^(44, 62)
- ❖ Η αξιολόγηση ασφάλειας που πραγματοποιήθηκε για το βιοομοειδές Zirabev έδειξε χαμηλότερες ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με τη θεραπεία σε σύγκριση με το προϊόν αναφοράς.⁽⁴⁴⁾ Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μια μελέτη φάσης 3 από τους Reinmuth et al., η οποία έδειξε παρόμοια αποτελεσματικότητα σε ασθενείς που έλαβαν είτε το βιοομοειδές Zirabev είτε το προϊόν αναφοράς, σε συνδυασμό με 4 έως 6 κύκλους καρβοπλατίνης και πακλιταξέλης.⁽⁵⁰⁾

Παρόμοια δεδομένα έχουν προκύψει και από τις συγκριτικές μελέτες του προτεινόμενου βιοομοειδούς της μπεβασιζουμάμπης SB8, το οποίο έχει υποβληθεί σε διαδικασία έγκρισης από τους κανονιστικούς φορείς των Η.Π.Α. και της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

4.4 ΡΙΤΟΥΞΙΜΑΜΠΗ

4.4.1 Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία & Λέμφωμα Non-Hodgkin

Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία και το λέμφωμα μη Hodgkin είναι οι δύο κατηγορίες αιματολογικών καρκίνων για τους οποίους έχει εγκριθεί η χρήση της ριτουξιμάμπης.

Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία είναι η μη φυσιολογική προοδευτική συσσώρευση λειτουργικά ανίκανων Β-λεμφοκυττάρων στο αίμα, τον μυελό των οστών, τους λεμφαδένες και τον σπλήνα. Είναι η πιο συχνή λευχαιμία ενηλίκων στις δυτικές χώρες, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 30% των συνολικών λευχαιμιών.⁽¹²⁾ Από την άλλη πλευρά, τα μη-Hodgkin λεμφώματα είναι μια διαφορετική ομάδα αιματολογικών κακοηθειών που χαρακτηρίζονται από ένα ευρύ φάσμα μορφολογικών, ανοσοφαινοτυπικών και κλινικών χαρακτηριστικών, και εντοπίζονται στο λεμφικό και στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα.^(6, 68) Η λεμφογένεση σε αυτές τις διαταραχές καθοδηγείται από γενετικές αλλοιώσεις που επιτρέπουν τη διαφυγή από τους φυσιολογικούς περιορισμούς γύρω από την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και τον κυτταρικό θάνατο, με αποτέλεσμα μια σειρά γενετικών βλαβών που διαφέρει τόσο μεταξύ των διαφόρων υποτύπων όσο και από περίπτωση σε περίπτωση σε κάθε μεμονωμένο υποτύπο.⁽⁶⁾

❖ *Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία*

Πολλά βασικά χαρακτηριστικά της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας έχουν περιγραφεί αρκετά καλά μέχρι σήμερα. Για παράδειγμα, η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία συμπίπτει με μια κλωνική επέκταση ενός πληθυσμού ώριμων Β-κυττάρων CD5+, CD19+, CD20+ και CD23+ που δεν είναι λειτουργικά. Αυτά τα κύτταρα είναι γνωστά ως κύτταρα B-CLL. Ως αποτέλεσμα αυτής της επέκτασης σε μη φυσιολογικά κύτταρα, υπάρχει μειωμένος αριθμός φυσιολογικών κυττάρων του ανοσοποιητικού. Επιπλέον, σε αντίθεση με τις περισσότερες λευχαιμίες στις οποίες τα καρκινικά κύτταρα αναδιπλασιάζονται με υψηλό ρυθμό, τα περισσότερα από τα κυκλοφορούντα κύτταρα B-CLL είναι σε ηρεμία και βρίσκονται στη φάση G0 του κυτταρικού κύκλου. Έτσι, η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία είναι μια ασθένεια που προκαλείται από

απώλεια κατάλληλης απόπτωσης και όχι από αυξημένο πολλαπλασιασμό. Ωστόσο, δεν υπάρχουν ελαττώματα στις αποπτωτικές οδούς στα B-CLL κύτταρα από μόνα τους, καθώς θα πεθάνουν γρήγορα όταν καλλιεργηθούν *in vitro*, υποδηλώνοντας ότι υπάρχουν μικρο-περιβαλλοντικοί παράγοντες που ρυθμίζουν τον θάνατο στα κύτταρα B-CLL.⁽¹²⁾

Οι αλλοιωμένες αποπτωτικές οδοί στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία έχουν μελετηθεί από την άποψη τόσο των γονιδιακών ελλείψεων όσο και των περιβαλλοντικών διεγερτών. Οι γενετικές ανεπάρκειες θεωρούνται ότι αποκτώνται κυρίως μετά τη γέννηση λόγω αστάθειας των χρωμοσωμάτων. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορεί επίσης να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο καθώς κύτταρα από ασθενείς με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία υφίστανται ταχεία απόπτωση όταν καλλιεργούνται *in vitro*. Ωστόσο, τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών καθώς και ορισμένες κυτοκίνες όπως η ιντερφερόνη-γάμμα, η ιντερφερόνη-άλφα και η ιντερλευκίνη-13, μπορούν να παρεμποδίσουν εν μέρει την απόπτωση των B-CLL κυττάρων *in vitro* για σύντομο χρονικό διάστημα, προάγοντας την επιβίωση αυτών των κυττάρων μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού BAFF/APRIL.⁽¹²⁾

Η σταθερότητα των χρωμοσωμάτων επηρεάζεται από ανωμαλίες στο μήκος των τελομερών και παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον το γεγονός ότι τα τελομερή είναι μικρότερα σε ασθενείς με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, παρότι τα επίπεδα του ενζύμου τελομεράση εντοπίζονται σε αφθονία στα B-λεμφοκύτταρα ασθενών παρά σε υγιή άτομα. Η πιο κοινή χρωμοσωμική ανωμαλία είναι η απώλεια μιας περιοχής του χρωμοσώματος 13 που δεν κωδικοποιεί γονίδια, αλλά κωδικοποιεί τα microRNAs miR15A και miR-16-1, τα οποία έχει αποδειχθεί ότι χάνονται στο 66% των ασθενών με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία. Η διαγραφή αυτών των microRNAs έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί αύξηση στο Bcl2, έναν αναστολέα της απόπτωσης και επομένως έναν ισχυρό παράγοντα υπέρ της επιβίωσης. Όσον αφορά τις κοινές χρωμοσωμικές ανωμαλίες που εντοπίζονται στις περιπτώσεις χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας, τρεις από αυτές σχετίζονται με το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53, και πρόκειται είτε για έλλειψη σε συχνότητα 10-15% είτε για μεταλλαγή στο γονίδιο ATM (χρωμόσωμα 11q22), με αποτέλεσμα τη μείωση της απόπτωσης.⁽¹²⁾

❖ *Λέμφωμα μη Hodgkin*

Το ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα έχει την αξιοσημείωτη ικανότητα να ανταποκρίνεται με συγκεκριμένο και προσαρμοστικό τρόπο σε έναν ουσιαστικά άπειρο αριθμό πιθανών αντιγόνων. Αυτή η ποικιλομορφία ειδικότητας επιτυγχάνεται με τη δημιουργία ενός ρεπερτορίου κλώνων B-κυττάρων με το καθένα να εκφράζει έναν μοναδικό υποδοχέα B κυττάρων (BCR) που έχει την ικανότητα να δεσμεύεται σε όλα τα πιθανά αντιγόνα. Ενώ οι διεργασίες που αναδιατάσσουν τα γονίδια της ανοσοσφαιρίνης απαιτούνται για τη δημιουργία ποικιλομορφίας στους υποδοχείς BCR, η διάσπαση, η απορρύθμιση και οι επιδράσεις εκτός στόχου αυτών των ίδιων διεργασιών είναι που προκαλούν τις γενετικές βλάβες που εμφανίζονται στο λέμφωμα μη Hodgkin.⁽⁶⁾

Αυτές οι γενετικές διεργασίες εμπλέκονται τόσο σε εκτροπές μεγάλης κλίμακας, οι οποίες σε χρωμοσωμικό επίπεδο οδηγούν σε απορρύθμιση των ογκογονιδίων, όσο και σε μικρότερης κλίμακας σωματικές μεταλλάξεις που οδηγούν σε απορρύθμιση των ενδοκυτταρικών οδών στο αναπτυσσόμενο B-λεμφοκύτταρο. Οι ενδοκυτταρικές οδοί που επηρεάζονται στο λέμφωμα μη Hodgkin περιλαμβάνουν τα μονοπάτια BCR, NF-kB, PI3K/AKT/mTOR, επιγενετικές ρυθμιστικές και οδούς ελέγχου του κυτταρικού κύκλου.⁽⁶⁾

Ενώ η νόσος χαρακτηρίζεται ετερογενής συναντάται απορρύθμιση συγκεκριμένων ογκογόνων οδών. Οι κύριες γενετικές διεργασίες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των φυσιολογικών BCR υποδοχέων εμπλέκονται και στη δημιουργία του λεμφώματος:

- ανασυνδυασμός V(D)J με συμμετοχή των RAG ρεκομπινασών
- ανασυνδυασμός διαμεσολαβούμενος από την απαμινάση της κυτιδίνης (AID)

Επαναλαμβανόμενες αμοιβαίες μετατοπίσεις παρατηρούνται συχνά στο λέμφωμα μη Hodgkin και συνήθως περιλαμβάνουν το γονίδιο IGH. Ο κυρίαρχος μηχανισμός λεμφογένεσης που εμπλέκεται στις μετατοπίσεις του IGH είναι η παράθεση πρωτοογκογονιδίων (π.χ. BCL2, BCL6, κ.λπ.) σε ρυθμιστικά στοιχεία του IGH όπως η περιοχή του ενισχυτή. Η εμπλοκή υψηλής συχνότητας του τόπου IGH σε χρωμοσωμικές μεταθέσεις στο λέμφωμα μη Hodgkin δεν είναι σαφώς τυχαία, αλλά μάλλον εξηγείται από την απαίτηση για γενετικό ανασυνδυασμό και υπερμετάλλαξη σε αυτή τη θέση κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης των B-κυττάρων.

Αντίθετα, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο στοχεύονται συγκεκριμένα πρωτοογκογονίδια (π.χ. BCL2) για συμμετοχή σε αυτές τις μετατοπίσεις παραμένει σχετικά ασαφής.⁽⁶⁾

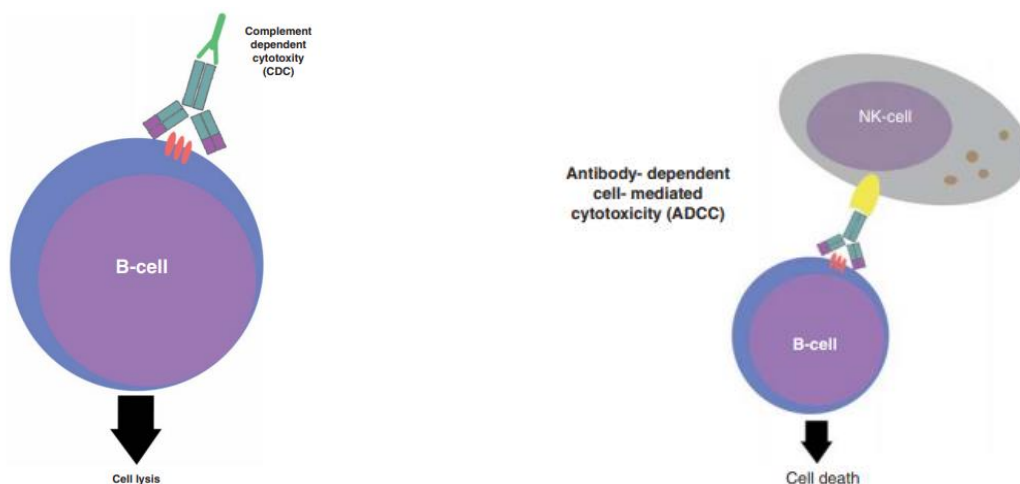
4.4.2 Μηχανισμός δράσης της ριτουξιμάμπης

Η ριτουξιμάμπη (Rituxan) ήταν το πρώτο μονοκλωνικό αντίσωμα που εγκρίθηκε ποτέ από τον FDA τον Νοέμβριο του 1997 για χρήση στον καρκίνο. Η αρχική ένδειξη που έλαβε ήταν για χρήση σε υποτροπιάζον ή ανθεκτικό λέμφωμα CD20+, μη Hodgkin λέμφωμα. Έκτοτε, έχει λάβει εγκρίσεις σε διάφορες κακοήθειες θετικές σε CD20, όπως η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, κ.α.⁽⁴⁴⁾

Το CD20 είναι μια μη γλυκοζυλιωμένη φωσφοπρωτεΐνη 33-37 kDA που εκφράζεται στα περισσότερα ώριμα B κύτταρα. Βρίσκεται σε μικρολάχνες με υποδοχέα B κυττάρων (BCR), CD40 και MHC κατηγορίας II. Το CD20 είναι ένας κατάλληλος στόχος για την εξάντληση των B-λεμφοκυττάρων λόγω του σχεδίου έκφρασής του στη φυσιολογική σειρά B-λεμφοκυττάρων. Η έκφραση του CD20 παρατηρείται για πρώτη φορά στο όψιμο στάδιο προ-B κυττάρων. Στη συνέχεια, εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε όλη τη σειρά των B κυττάρων, αλλά δεν υπάρχει ούτε σε πλασμοβλάστες ούτε σε πλασμοκύτταρα. Το CD20 εκφράζεται επίσης έντονα σε πολλές κακοήθειες των B κυττάρων και, για το λόγο αυτό, θεωρήθηκε ως ιδανικός στόχος θεραπείας.^(56, 67)

Τα μονοκλωνικά αντισώματα με ειδικότητα για το CD20, όπως η ριτουξιμάμπη, διαφέρουν ως προς την ικανότητά τους να σκοτώνουν τα B κύτταρα και τους μηχανισμούς με τους οποίους το κάνουν. Η δέσμευση του CD20 από διαφορετικά αντισώματα μπορεί να οδηγήσει σε ανόμοιες αποκρίσεις των B-κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της αναστολής της ανάπτυξης και του κυτταρικού θανάτου. Υπάρχουν τρεις πιθανοί μηχανισμοί δράσης για τα αντισώματα αντι-CD20 που σκοτώνουν τα B-κύτταρα^(11, 56, 67):

- i. μέσω της πρόκλησης κυτταροτοξικότητας ADCC (Εικόνα 13)
- ii. μέσω της πρόκλησης κυτταροτοξικότητας CDC (Εικόνα 13)
- iii. μέσω της πρόκλησης απόπτωσης



Εικόνα 13. Πρόκληση κυτταροτοξικότητας CDC και ADCC.⁽⁵⁶⁾

Όπως έχει επιβεβαιωθεί από μια σειρά πειραμάτων, είναι πιθανό ότι η δέσμευση της ριτουξιμάμπης στο αντιγόνο CD20 μπορεί να προκαλέσει απευθείας απόπτωση. Οι Pedersen et al. διαπίστωσαν ότι η ριτουξιμάμπη επάγει απόπτωση σε B-λεμφοκύτταρα ασθενών με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από την πρωτεΐνη κινάση που ενεργοποιείται από το μιτογόνο p38.⁽⁴⁸⁾ Αρκετοί συγγραφείς έχουν επίσης αναφέρει ότι η ριτουξιμάμπη μπορεί να προκαλέσει άμεσο κυτταρικό θάνατο και/ή να ευαισθητοποιήσει τα καρκινικά κύτταρα σε κυτταροτοξικά φάρμακα σε διάφορα B-κύτταρα από μη Hodgkin λεμφώματα.⁽⁵⁶⁾

Δύο από τους αποπτωτικούς μηχανισμούς που ενεργοποιούνται από τη ριτουξιμάμπη είναι γνωστό ότι είναι η προς τα κάτω ρύθμιση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης BclxL και η ενεργοποίηση κασπασών όπως η κασπάση-9 και η κασπάση-3. Η ριτουξιμάμπη υπερνικά την αντίσταση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-XL και ευαισθητοποιεί τα ανθεκτικά κύτταρα στη δράση των προαποπτωτικών κυτταροστατικών. Επιπλέον, κύτταρα B-CLL που απομονώθηκαν πρόσφατα από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ριτουξιμάμπη εμφανίζουν ενεργοποίηση της κασπάσης-3 και -9, αλλά όχι της κασπάσης-8. Ωστόσο, η εξωγενής αποπτωτική οδός πιθανότατα εμπλέκεται επίσης σε κυτταροτοξικότητα με τη μεσολάβηση της ριτουξιμάμπης, η οποία αποδείχθηκε από την ανακάλυψη ότι η τελευταία ευαισθητοποιεί τα B-κύτταρα λεμφώματος μη Hodgkin στην απόπτωση μέσω της προς τα πάνω ρύθμισης της έκφρασης του αντιγόνου Fas. Καθώς παρατηρήθηκε διάσπαση της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Bid σε κύτταρα λεμφώματος μη Hodgkin που

υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ριτουξιμάμπη, φαίνεται ότι υπάρχει η δυνατότητα ενεργοποίησης και των δύο οδών.⁽⁵⁶⁾

Η ικανότητα της ριτουξιμάμπης να ενεργοποιεί πολλά μονοπάτια σηματοδότησης που οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο υποδηλώνει έντονα ότι άλλα μόρια επιφάνειας συμβάλλουν στην επαγόμενη απόκριση. Αρκετές οδοί επιβίωσης, συμπεριλαμβανομένων των Raf-MEK1/2 ERK1/2, MAPKs και p38 έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλονται από τη ριτουξιμάμπη. Επιπλέον, η αναστολή της δραστηριότητας του NF-kB επάγει, με τη σειρά του, μείωση της ρύθμισης του Bcl-XL. Επιπρόσθετα, πρόσφατα περιγράφηκε μια συσχέτιση μεταξύ των μελών της οικογένειας των υποδοχέων TNF CD40 και CD20 στην επιφάνεια των B κυττάρων. Το CD40 προτάθηκε να έχει άμεση λειτουργία στην επαγωγή ειδικού κυτταρικού θανάτου, με το CD40 να συμβάλλει επίσης στην προαποπτωτική απόκριση με τη μεσολάβηση του συμπλόκου ριτουξιμάμπης-CD20.⁽⁵⁶⁾

Αρκετές αναφορές υποδηλώνουν επίσης ότι ο ανεξάρτητος από κασπάση κυτταρικός θάνατος είναι ένας σημαντικός μηχανισμός δράσης της ριτουξιμάμπης. Αυτός ο ανεξάρτητος από κασπάση κυτταρικός θάνατος βασίζεται σε μια εισροή εξωκυτταρικού ασβεστίου, η οποία αυξάνει την ενδοκυτταρική συγκέντρωση ασβεστίου, με αποτέλεσμα την παραγωγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου. Η ενεργοποίηση ενζύμων που εξαρτώνται από το ασβέστιο, όπως οι καλπαΐνες, που δρουν ως πρωτεάσες κυστεΐνης, βασίζεται στην ανοδική ρύθμιση της εισροής ασβεστίου. Πράγματι, αυτά τα ένζυμα και άλλα όπως οι καθεψίνες είναι πλέον γνωστό ότι συνεργάζονται με κασπάσες για να προκαλέσουν απόπτωση, και επιπλέον, αυτές οι πρωτεάσες μπορούν οι ίδιες να πυροδοτήσουν κυτταρικό θάνατο που μοιάζει με απόπτωση.⁽⁵⁶⁾

4.4.3 Συγκριτικές μελέτες της ριτουξιμάμπης με τα βιοομοειδή της

Η ριτουξιμάμπη ήταν το πρώτο μονοκλωνικό αντίσωμα και η πρώτη στοχευμένη θεραπεία σε B-κύτταρα που εγκρίθηκε για θεραπευτική χρήση στην ογκολογία. Από την πρώτη έγκρισή της έφερε επανάσταση στη θεραπεία του λεμφώματος μη Hodgkin βελτιώνοντας σημαντικά τις θεραπευτικές αποκρίσεις, όπως υποδεικνύεται από τα αυξημένα ποσοστά ανταπόκρισης. Σχετίζεται επίσης με μεγαλύτερη επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου από τα προηγούμενα διαθέσιμα σχήματα και παραμένει ένα

θεμελιώδεις συστατικό των θεραπευτικών σχημάτων για λέμφωμα μη Hodgkin και χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία σήμερα.⁽³¹⁾

Δύο βιοομοειδή έχουν εγκριθεί επί του παρόντος, το CT-P10 ((εμπορικές ονομασίες Truxima®/Ritemvia®/Rituzena®/Blitzima®) στη Νότια Κορέα και την Ευρώπη έχει εγκριθεί για τη θεραπεία της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας και του λεμφώματος μη Hodgkin, και το GP2013 (εμπορικές ονομασίες Rixathon®/Riximyo®) εγκρίθηκε πρόσφατα στην Ευρώπη για όλες τις ενδείξεις του φαρμάκου αναφοράς.⁽⁸⁾ Και για τα δύο βιοομοειδή, χρησιμοποιούνται πολλές διαφορετικές εμπορικές ονομασίες λόγω των διαφορών μεταξύ των χωρών όσον αφορά την αδειοδότηση και την προστασία των διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας, καθώς και τις εναλλακτικές ρυθμίσεις διανομής. Και τα δύο βιοομοειδή εγκρίθηκαν σύμφωνα με την αυστηρή ρυθμιστική οδό που περιγράφεται παραπάνω, μετά από απόδειξη ότι ταιριάζουν με το προϊόν αναφοράς.⁽³¹⁾

Για τα δύο αυτά εγκεκριμένα βιοομοειδή, έχουν δημοσιευθεί ολοκληρωμένα προκλινικά δεδομένα σύμφωνα με τα οποία τα μόρια είχαν αντίστοιχες αλληλουχίες αμινοξέων και ήταν δυσδιάκριτα ως προς τη μοριακή μάζα, την τρισδιάστατη δομή, τα μοτίβα γεφύρωσης δισουλφιδίου, τις παραλλαγές φορτίου, τις τροποποιήσεις αμινοξέων και τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η γλυκοζυλίωση. Και στις δύο περιπτώσεις αποδείχθηκε παρόμοια ετερογένεια μεγέθους και επίπεδα ακαθαρσιών συσσωματωμάτων και σωματιδίων, σε σύγκριση με το προϊόν αναφοράς. Επιπλέον, σε όλες τις αναλύσεις λειτουργικού χαρακτηρισμού, η δραστηριότητα για τα βιοομοειδή ήταν εντός του εύρους της δραστηριότητας της αρχικής ριτουξιμάμπης, όπως αντίστοιχα και τα προφίλ PK/PD και αντικαρκινικής δραστηριότητας.^(31, 37)

Εκτός από τα δύο εγκεκριμένα βιοομοειδή, πέντε νέα προτεινόμενα βιοομοειδή (MabionCD20, RTX83, PF-05280586, ABP 798, SAIT101) της ριτουξιμάμπης βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο ανάπτυξης, σε τυχαιοποιημένες, διπλά τυφλές, συγκριτικές μελέτες φάσης III.^(8, 31)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η χρήση βιοομοειδών εξελίσσεται ταχέως και θα συνεχίσει να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μελλοντική φροντίδα των ασθενών με καρκίνο. Καθώς ορισμένα από τα διπλώματα ευρεσιτεχνίας που καλύπτουν ογκολογικά βιολογικά μονοκλωνικά αντισώματα έχουν λήξει ή θα λήξουν τα επόμενα χρόνια, αναμένεται η έγκριση των αντίστοιχων βιοομοειδών για ογκολογικές ενδείξεις.

Ο ακρογωνιαίος λίθος για την ανάπτυξη ενός βιοομοειδούς είναι η καθιέρωση υψηλής ομοιότητας ώστε να μπορέσει το βιοομοειδές να βασιστεί για την αδειοδότηση, εν μέρει, στην εκτεταμένη γνώση που αποκτήθηκε με το προϊόν αναφοράς. Η βιοομοιότητα καθιερώνεται με βάση ολοκληρωμένες αναλυτικές, λειτουργικές, μη κλινικές και κλινικές μελέτες συγκρισιμότητας. Η εγγενής βιολογική μεταβλητότητα των βιοομοειδών αποτελεί σημαντική πρόκληση για τις τρέχουσες αναλυτικές πλατφόρμες. Ως αποτέλεσμα, έχει αναπτυχθεί μια πληθώρα νέων τεχνικών για την παρακολούθηση διαφόρων χαρακτηριστικών του προϊόντος που μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα του βιοομοειδούς προϊόντος.

Όλες οι τεχνικές και οι ασκήσεις συγκρισιμότητας που πραγματοποιούνται έχουν ως ζητούμενο την ικανοποίηση των κανονιστικών απαιτήσεων, σχετικά με την παραγωγή των βιοομοειδών, όπως αυτές έχουν θεσπιστεί από τους αρμόδιους ρυθμιστικούς φορείς. Ωστόσο, η εκπαίδευση των ασθενών και των επαγγελματιών υγείας σχετικά με διάφορες πτυχές των βιοομοειδών είναι απαραίτητη για την αύξηση της εμπιστοσύνης στα βιοομοειδή και για την επιτυχή ενσωμάτωσή τους στην ογκολογική πρακτική.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιείται βιβλιογραφική ανασκόπηση των διαθέσιμων δεδομένων που αφορούν την ανάπτυξη των ογκολογικών βιοομοειδών σε μια προσπάθεια αποσαφήνισης όλων των διαδικασιών που διέπουν αυτή την ανάπτυξη, καθώς και καταγραφή των βιοομοειδών για ογκολογικά μονοκλωνικά αντισώματα. Συνοπτικά στο παραπάνω κείμενο παρατίθενται:

- οι δοκιμές που διενεργούνται στην πλειοψηφία των μελετών συγκρισιμότητας,

- οι κανόνες που εφαρμόζονται κατά την παραγωγική διαδικασία σύμφωνα με τις ρυθμιστικές απαιτήσεις και με στόχο την αδειοδότηση κυκλοφορίας των αναπτυσσόμενων βιοομοειδών,
- οι μέθοδοι και οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται σε εργαστηριακό επίπεδο προκειμένου να αποδειχθεί η βιοομοιότητα του προτεινόμενου βιοομοειδούς με το προϊόν αναφοράς,
- τα αρχικά βιολογικά μονοκλωνικά αντισώματα που έχουν εγκριθεί για τη θεραπεία διαφόρων μορφών και τύπων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του μηχανισμού δράσης τους, καθώς και
- τα εγκεκριμένα και τα υποψήφια προς έγκριση βιοομοειδή με αναφορά στα καταληκτικά σημεία των συγκριτικών μελετών.

Ο κύριος στόχος όλων των μελετών για τα βιοομοειδή είναι η αυξανόμενη εξοικείωση με τα βιοομοειδή και η εμπιστοσύνη στις διαδικασίες ανάπτυξης και ρύθμισης, ώστε να επιτευχθεί ταχύτερη απορρόφηση από ό,τι έχει συμβεί μέχρι τώρα. Η αύξηση της χρήσης βιοομοειδών θα μπορούσε να συμβάλει στη μείωση του κόστους υγειονομικής περίθαλψης, στην αντιμετώπιση της αναμενόμενης αύξησης του επιπολασμού του καρκίνου και στην προώθηση της φαρμακευτικής καινοτομίας, ώστε να γίνουν διαθέσιμες περισσότερες νέες, αποτελεσματικές θεραπείες για τους ασθενείς με αποτέλεσμα την αύξηση της βιωσιμότητας στη φροντίδα του καρκίνου.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Al-Sabbagh, A., Olech, E., McClellan, J.E., Kirchhoff, C.F. (2016). Development of biosimilars. *Semin Arthritis Rheum*, 45(5 Suppl):S11-8. doi: 10.1016/j.semarthrit.2016.01.002.
2. Arato, T. (2016). Japanese regulation of biosimilar products: past experience and current challenges. *Br J Clin Pharmacol*, 82(1):30-40. doi: 10.1111/bcp.12931.
3. Bachu, R.D., Abou-Dahech, M., Balaji, S., Boddu, S.H.S., Amos, S., Singh, V., et al. (2022). Oncology biosimilars: New developments and future directions. *Cancer Rep (Hoboken)*, 5(11):e1720. doi: 10.1002/cnr2.1720.
4. Barbier, L., Declerck, P., Simoens, S., Neven, P., Vulto, A.G., Huys, I. (2019). The arrival of biosimilar monoclonal antibodies in oncology: clinical studies for trastuzumab biosimilars. *Br J Cancer*, 121(3):199-210. doi: 10.1038/s41416-019-0480-z.
5. Bellinvia, S., Edwards, C.J. (2020). Explaining biosimilars and how reverse engineering plays a critical role in their development. *Expert Opin Drug Discov*, 15(11):1283-1289. doi: 10.1080/17460441.2020.1796627.
6. Blombery, P.A., Wall, M., Seymour, J.F. (2015) The molecular pathogenesis of B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Eur J Haematol*, 95(4):280-93. doi: 10.1111/ejh.12589.
7. Brader, M.L., Baker, E.N., Dunn, M.F., Laue, T.M., Carpenter, J.F. (2017). Using X-Ray Crystallography to Simplify and Accelerate Biologics Drug Development. *J Pharm Sci*, 106(2):477-494. doi: 10.1016/j.xphs.2016.10.017.
8. Brown, J.R., Cymbalista, F., Sharman, J., Jacobs, I., Nava-Parada, P., Mato, A. (2018). The Role of Rituximab in Chronic Lymphocytic Leukemia Treatment and the Potential Utility of Biosimilars. *Oncologist*, 23(3):288-296. doi: 10.1634/theoncologist.2017-0150.
9. Camacho, L.H. (2017). Current Status of Biosimilars in Oncology. *Drugs*, 77(9):985-997. doi: 10.1007/s40265-017-0743-z.
10. Casadevall, N., Edwards, I.R., Felix, T., Graze, P.R., Litten, J.B., Strober, B.E., et al. (2013). Pharmacovigilance and biosimilars: considerations, needs and challenges. *Expert Opin Biol Ther*, 13(7):1039-47. doi: 10.1517/14712598.2013.783560.

11. Cerny, T., Borisch, B., Introna, M., Johnson, P., Rose, A.L. (2002). Mechanism of action of rituximab. *Anticancer Drugs*, 13 Suppl 2:S3-10. doi: 10.1097/00001813-200211002-00002.
12. Chen, J., McMillan, N.A.J. (2008). Molecular basis of pathogenesis, prognosis and therapy in chronic lymphocytic leukaemia. *Cancer Biol Ther*, 7(2):174-9. doi: 10.4161/cbt.7.2.5262.
13. Curigliano, G., O'Connor, D.P., Rosenberg, J.A., Jacobs, I. (2016). Biosimilars: Extrapolation for oncology. *Crit Rev Oncol Hematol*, 104:131-7. doi: 10.1016/j.critrevonc.2016.06.002.
14. Dekker, E., Tanis, P.J., Vleugels, J.L.A., Kasi, P.M., Wallace, M.B. (2019). Colorectal cancer. *Lancet*, 394(10207):1467-1480. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32319-0.
15. Díaz, L.P., Millán, S., Chaban, N., Del Campo, A., Spitzer, E. (2019). Current state and comparison of the clinical development of bevacizumab, rituximab and trastuzumab biosimilars. *Future Oncol*, 17(19):2529-2544. doi: 10.2217/fon-2020-0923.
16. Duivelshof, B.L., Jiskoot, W., Beck, A., Veuthey, J.L., Guilleme, D., D'Atri, V. (2019). Glycosylation of biosimilars: Recent advances in analytical characterization and clinical implications. *Anal Chim Acta*, 1089:1-18. doi: 10.1016/j.aca.2019.08.044.
17. Emmanouilides, C.E., Karampola, M.I., Beredima, M. (2016). Biosimilars: Hope and concern. *J Oncol Pharm Pract*, 22(4):618-24. doi: 10.1177/1078155215603232.
18. Epstein, M.S., Ehrenpreis, E.D., Kulkarni, P.M., et al. (2014). Biosimilars: the need, the challenge, the future: the FDA perspective. *Am J Gastroenterol*, 109(12):1856-9. doi: 10.1038/ajg.2014.151.
19. Francescon, S., Fornasier, G., Baldo, P. (2016). Biosimilar Oncology Drugs in Europe: Regulatory and Pharmacovigilance Considerations. *Oncol Ther*, 4(2):173-182. doi: 10.1007/s40487-016-0028-9.
20. Furlanetto, A., Purcell, N. (2016). Biologics and biosimilars: a legal perspective from Canada. *Pharm Pat Anal*, 5(2):79-81. doi: 10.4155/ppa-2016-0001.
21. Garcia, R., Araujo, D.V. (2016). The Regulation of Biosimilars in Latin America. *Curr Rheumatol Rep*, 18(3):16. doi: 10.1007/s11926-016-0564-1.

22. Garcia, J., Hurwitz, H.I., Sandler, A.B., Miles, D., Coleman, R.L., Deurloo, R., et al. (2020). Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook. *Cancer Treat Rev*, 86:102017. doi: 10.1016/j.ctrv.2020.102017.
23. Goldschmidt, J., Hanes, V. (2021). The Totality of Evidence and Use of ABP 215, a Biosimilar to Bevacizumab. *Oncol Ther*, 9(1):213-223. doi: 10.1007/s40487-020-00133-1.
24. Hair, J., Maryon, T., Lieneck, C. (2022). Identification of Barriers Preventing Biosimilar Oncology Medication Adoption. *Medicina (Kaunas)*, 58(11):1533. doi: 10.3390/medicina58111533.
25. Harazono, A., Hashii, N., Kuribayashi, R., Nakazawa, S., Kawasaki, N. (2013). Mass spectrometric glycoform profiling of the innovator and biosimilar erythropoietin and darbepoetin by LC/ESI-MS. *J Pharm Biomed Anal*, 83:65-74. doi: 10.1016/j.jpba.2013.04.031.
26. Harvey, R.D. (2017). Science of Biosimilars. *J Oncol Pract*, 13(9_suppl):17s-23s. doi: 10.1200/JOP.2017.026062.
27. Herbst, R.S., Morgensztern, D., Boshoff, C. (2018). The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*, 553(7689):446-454. doi: 10.1038/nature25183.
28. Hodgson, D.J., Ghasriani, H., Aubin, Y. (2019). Assessment of the higher order structure of Humira®, Remicade®, Avastin®, Rituxan®, Herceptin®, and Enbrel® by 2D-NMR fingerprinting. *J Pharm Biomed Anal*, 163:144-152. doi: 10.1016/j.jpba.2018.09.056.
29. Hübel, K., Kron, F., Lux, M.P. (2020). Biosimilars in oncology: Effects on economy and therapeutic innovations. *Eur J Cancer*, 139:10-19. doi: 10.1016/j.ejca.2020.07.037.
30. Hutterer, K.M., Polozova, A., Kuhns, S., McBride, H.J., Cao, X., Liu, J. (2019). Assessing Analytical and Functional Similarity of Proposed Amgen Biosimilar ABP 980 to Trastuzumab. *BioDrugs*, 33(3):321-333. doi: 10.1007/s40259-019-00350-9.
31. Jurczak, W., Długosz Danecka, M., Buske, C. (2019). Rituximab biosimilars for lymphoma in Europe. *Expert Opin Biol Ther*, 19(10):1045-1056. doi: 10.1080/14712598.2019.1665017.

32. Kang, J., Halseth, T., Vallejo, D., Najafabadi, Z.I., Sen, K.I., Ford, M., et al. (2020). Assessment of biosimilarity under native and heat-stressed conditions: rituximab, bevacizumab, and trastuzumab originators and biosimilars. *Anal Bioanal Chem*, 412(3):763-775. doi: 10.1007/s00216-019-02298-9.
33. Kaur, H. (2021). Characterization of glycosylation in monoclonal antibodies and its importance in therapeutic antibody development. *Crit Rev Biotechnol*, 41(2):300-315. doi: 10.1080/07388551.2020.1869684.
34. Kim, J.S., Kim, S.H., Kwon, B., Hong, S. (2015). Comparison of immunogenicity test methods used in clinical studies of infliximab and its biosimilar (CT-P13). *Expert Rev Clin Immunol*, 11 Suppl 1:S33-41. doi: 10.1586/1744666X.2015.1090312.
35. Kurki, P., Ekman, N. (2015). Biosimilar regulation in the EU. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 8(5):649-59. doi: 10.1586/17512433.2015.1071188.
36. Láng, J.A., Balogh, Z.C., Nyitrai, M.F., Juhász, C., Gilicze, A.K.B., Iliás, A. (2020). In vitro functional characterization of biosimilar therapeutic antibodies. *Drug Discov Today Technol*, 37:41-50. doi: 10.1016/j.ddtec.2020.11.010.
37. Lee, K.H., Lee, J., Bae, J.S., Kim, Y.J., Kang, H.A., Kim, S.H., et al. (2018). Analytical similarity assessment of rituximab biosimilar CT-P10 to reference medicinal product. *MAbs*, 10(3):380-396. doi: 10.1080/19420862.2018.
38. Lemery, S.J., Ricci, M.S., Keegan, P., McKee, A.E., Pazdur, R. (2017). FDA's Approach to Regulating Biosimilars. *Clin Cancer Res*, 23(8):1882-1885. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1354.
39. Markus, R., Chow, V., Pan, Z., Hanes, V. (2017). A phase I, randomized, single-dose study evaluating the pharmacokinetic equivalence of biosimilar ABP 215 and bevacizumab in healthy adult men. *Cancer Chemother Pharmacol*, 80(4):755-763. doi: 10.1007/s00280-017-3416-4.
40. Melosky, B., Reardon, D.A., Nixon, A.B., Subramanian, J., Bair, A.H., Jacobs, I. (2018). Bevacizumab biosimilars: scientific justification for extrapolation of indications. *Future Oncol*, 14(24):2507-2520. doi: 10.2217/fon-2018-0051.
41. Müller, M.F., Ibrahim, A.E.K., Arends, M.J. (2016). Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch*, 469(2):125-34. doi: 10.1007/s00428-016-1956-3.

42. Nabhan, C., Parsad, S., Mato, A.R., Feinberg, B.A. (2018). Biosimilars in Oncology in the United States: A Review. *JAMA Oncol*, 4(2):241-247. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.2004.
43. Nikitina, V., Santi Laurini, G., Montanaro, N., Motola, D. (2023). Comparative Safety Profiles of Oncology Biosimilars vs. Originators in Europe: An Analysis of the EudraVigilance Database. *Cancers (Basel)*, 15(14):3680. doi: 10.3390/cancers15143680.
44. Ngo, D., Chen, J. (2021). A Clinical Review of Biosimilars Approved in Oncology. *Ann Pharmacother*, 55(3):362-377. doi: 10.1177/1060028020944596.
45. O'Callaghan, J., Barry, S.P., Bermingham, M., Morris, J.M., Griffin, B.T. (2019). Regulation of biosimilar medicines and current perspectives on interchangeability and policy. *Eur J Clin Pharmacol*, 75(1):1-11. doi: 10.1007/s00228-018-2542-1.
46. Ohishi, T., Kaneko, M.K., Yoshida, Y., Takashima, A., Kato, Y., Kawada, M. (2023). Current Targeted Therapy for Metastatic Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*, 24(2):1702. doi: 10.3390/ijms24021702.
47. Oza, B., Radhakrishna, S., Pipalava, P., Jose, V. (2019). Pharmacovigilance of biosimilars - Why is it different from generics and innovator biologics?. *J Postgrad Med*, 65(4):227-232. doi: 10.4103/jpgm.JPGM_109_19.
48. Pedersen, I.M., Buhl, A.M., Klausen, P., Geisler, C.H., Jurlander, J. (2002). The chimeric anti-CD20 antibody rituximab induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells through a p38 mitogen activated protein-kinase-dependent mechanism. *Blood*, 99(4):1314-9. doi: 10.1182/blood.v99.4.1314.
49. Peeters, M., Planchard, D., Pegram, M., Gonçalves, J., Bocquet, F., Jang, H. (2021). Biosimilars in an era of rising oncology treatment options. *Future Oncol*, 17(29):3881-3892. doi: 10.2217/fon-2021-0546.
50. Reinmuth, N., Bryl, M., Bondarenko, I., Syrigos, K., Vladimirov, V., Zereu, M., Bair, A.H. (2019). PF-06439535 (a Bevacizumab Biosimilar) Compared with Reference Bevacizumab (Avastin®), Both Plus Paclitaxel and Carboplatin, as First-Line Treatment for Advanced Non-Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer: A Randomized, Double-Blind Study. *BioDrugs*, 33(5):555-570. doi: 10.1007/s40259-019-00363-4.

51. Rosen, L.S., Jacobs, I.A., Burkes, R.L. (2017). Bevacizumab in Colorectal Cancer: Current Role in Treatment and the Potential of Biosimilars. *Target Oncol*, 12(5):599-610. doi: 10.1007/s11523-017-0518-1.
52. Safdar, A., Butt, M.H., Ahmad, A., Zaman, M. (2021). Progress in oncology biosimilars till 2020: Scrutinizing comparative studies of biosimilar monoclonal antibodies. *J Oncol Pharm Pract*, 27(5):1195-1204. doi: 10.1177/10781552211016083.
53. Sarpatwari, A., Barenie, R., Curfman, G., Darrow, J.J., Kesselheim, A.S. (2019). The US Biosimilar Market: Stunted Growth and Possible Reforms. *Clin Pharmacol Ther*, 105(1):92-100. doi: 10.1002/cpt.1285.
54. Schellekens, H., Smolen, J.S., Dicato, M., Rifkin, R.M. (2016). Safety and efficacy of biosimilars in oncology. *Lancet Oncol*, 17(11):e502-e509. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30374-6.
55. Schreitmüller, T., Barton, B., Zharkov, A., Bakalos, G. (2019). Comparative immunogenicity assessment of biosimilars. *Future Oncol*, 15(3):319-329. doi: 10.2217/fon-2018-0553.
56. Smolewski, P., Robak, T. (2015). The preclinical discovery of rituximab for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Expert Opin Drug Discov*, 10(7):791-808. doi: 10.1517/17460441.2015.1045295.
57. Soares, J.C.S., Cavalcanti, I.D.L., Vasconcelos, J.L.A. (2021). Can biosimilar products be interchangeable? Pharmaceutical perspective in the implementation of biosimilars in oncology. *J Oncol Pharm Pract*, 27(6):1491-1502. doi: 10.1177/10781552211016099.
58. Stebbing, J., Mainwaring, P.N., Curigliano, G., Pegram, M., Latymer, M., Bair, A.H., et al. (2020). Understanding the Role of Comparative Clinical Studies in the Development of Oncology Biosimilars. *J Clin Oncol*, 38(10):1070-1080. doi: 10.1200/JCO.19.02953.
59. Sullivan, P.M., DiGrazia, L.M. (2017). Analytic characterization of biosimilars. *Am J Health Syst Pharm*, 74(8):568-579. doi: 10.2146/ajhp150971.
60. Taïeb, J., Aranda, E., Raouf, S., Dunn, H., Arnold, D. (2021). Clinical and Regulatory Considerations for the Use of Bevacizumab Biosimilars in Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer*, 20(1):42-51.e3. doi: 10.1016/j.clcc.2020.10.005.

61. Thill, M., Thatcher, N., Hanes, V., Lyman, G.H. (2019). Biosimilars: what the oncologist should know. *Future Oncol*, 15(10):1147-1165. doi: 10.2217/fon-2018-0728.
62. Thomas, M., Thatcher, N., Goldschmidt, J., Ohe, Y., McBride, H.J., Hanes, V. (2019). Totality of evidence in the development of ABP 215, an approved bevacizumab biosimilar. *Immunotherapy*, 11(15):1337-1351. doi: 10.2217/imt-2019-0125.
63. Triantafyllidi, E., Triantafyllidis, J.K. (2022). Systematic Review on the Use of Biosimilars of Trastuzumab in HER2+ Breast Cancer. *Biomedicines*, 10(8):2045. doi: 10.3390/biomedicines10082045.
64. Tsiftoglou, A.S., Ruiz, S., Schneider, C.K. (2013). Development and regulation of biosimilars: current status and future challenges. *BioDrugs*, 27(3):203-11. doi: 10.1007/s40259-013-0020-y.
65. Verrill, M., Declerck, P., Loibl, S., Lee, J., Cortes, J. (2019). The rise of oncology biosimilars: from process to promise. *Future Oncol*, 15(28):3255-3265. doi: 10.2217/fon-2019-0145.
66. Visser, J., Feuerstein, I., Stangler, T., Schmiederer, T., Fritsch, C., Schiestl, M. (2013). Physicochemical and functional comparability between the proposed biosimilar rituximab GP2013 and originator rituximab. *BioDrugs*, 27(5):495-507. doi: 10.1007/s40259-013-0036-3.
67. Vital, E.M., Kay, J., Emery, P. (2013). Rituximab biosimilars. *Expert Opin Biol Ther*, 13(7):1049-62. doi: 10.1517/14712598.2013.787064.
68. Vose, J.M. (2013). Molecular pathogenesis in non-Hodgkin lymphoma: implications for therapy. *Transfus Apher Sci*, 49(2):155-6. doi: 10.1016/j.transci.2013.07.019.
69. Yang, J., Zhao, X., Li, J., Zhang, K., Zhang, Z., Chang, S., et al. (2022). Creating China's Biosimilar Drugs Regulatory System: A Calculated Approach. *Front Pharmacol*, 13:815074. doi: 10.3389/fphar.2022.815074.
70. Zinzani, P.L., Dreyling, M., Gradishar, W., Andre, M., Esteva, F.J., Boulos, S., et al. (2019). Are Biosimilars the Future of Oncology and Haematology?. *Drugs*, 79(15):1609-1624. doi: 10.1007/s40265-019-01193-y.
71. Zucchetti, B.M., Nicolò, E., Curigliano, G. (2019). Biosimilars for breast cancer. *Expert Opin Biol Ther*, 19(10):1015-1021. doi: 10.1080/14712598.2019.