

Razvoj i odobravanje biosličnih lijekova u Europskoj uniji

Sokol, Petra

Professional thesis / Završni specijalistički

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:000656>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO - BIOKEMIJSKI FAKULTET

Petra Sokol

RAZVOJ I ODOBRAVANJE BIOSLIČNIH LIJEKOVA U EUROPSKOJ UNIJI

Specijalistički rad

Zagreb, 2016. g.

Poslijediplomski specijalistički studij Razvoj lijekova

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Jasmina Lovrić

Specijalistički rad obranjen je dana 25. studenog 2016. godine u Zagrebu na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, pred Povjerenstvom u sastavu:

1. Izv. prof. dr. sc. Anita Hafner
2. Izv. prof. dr. sc. Jasmina Lovrić
3. Dr. sc. Srećko Marušić, znanstv. sur., KB Dubrava.

Rad ima 100 listova.

Ovaj specijalistički rad izrađen je u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Jasmine Lovrić.

Iskreno zahvaljujem svojoj mentorici Jasmini Lovrić na pruženoj pomoći, posvećenom vremenu i konstruktivnim savjetima tijekom pisanja ovog rada. Željela bih zahvaliti svojoj obitelji i prijateljima na velikoj podršci tijekom studiranja. Zahvalu upućujem i Agenciji za lijekove i medicinske proizvode koja me potiče i podržava u prihvatanju novih izazova.

SAŽETAK

CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je ovog specijalističkog rada sustavnim pregledom dostupne literature prikazati specifičnosti razvoja i odobravanja biosličnog lijeka u Europskoj uniji prema znanstveno-regulatornom principu usporedivosti s referentnim biološkim lijekom. Predloženo istraživanje nastojat će razjasniti i pregledno prikazati povijesni razvoj regulatorne osnove, specifičnih zahtjeva i smjernica za odobravanje biosličnih lijekova te centraliziranog postupka davanja odobrenja za stavljanje lijeka u promet. Istraživanje će pružiti detaljan uvid u odobrene bioslične lijekove na području EU, a s naglaskom na ocjenu kakvoće, djelotvornosti i sigurnosti primjene te dokaza sličnosti biosličnog lijeka s referentnim lijekom. Također će se razmatrati aktualne teme vezane uz primjenu biosličnih lijekova, kao što je potencijalna imunogeničnost, ekstrapolacija indikacija, zamjenjivost te tržišno natjecanje s izvornim biološkim lijekovima.

MATERIJAL I METODE

Pretraživanje znanstvenih, stručnih i preglednih radova o razvoju i proizvodnji biosličnih lijekova obavljeno je elektroničkim putem, pretraživanjem bibliografske baze podataka (*PubMed*) i baze podataka s cjelovitim tekstom (*Science Direct*). Postupci davanja odobrenja za stavljanje u promet biosličnih lijekova na području Europske unije analizirani su korištenjem raspoloživih baza lijekova Agencije za lijekove i medicinske proizvode Republike Hrvatske (HALMED) i Europske agencije za lijekove (EMA). Pravni dokumenti (uredbe, direktive, zakoni, pravilnici) preuzeti su s mrežnih stranica Narodnih novina i Europske komisije. Za analizu razvojnih strategija i ekonomskih aspekata na tržištu bioloških/biosličnih lijekova korišteni su podaci s mrežnih stranica proizvođača takvih lijekova te Instituta *IMS Health* koji provodi analize tržišta lijekova.

REZULTATI

Bioslični lijekovi odobravaju se prema znanstveno-regulatornom principu usporedivosti, koji se temelji na dokazu sličnosti s referentnim lijekom u kakvoći, djelotvornosti i sigurnosti primjene. EMA, koju slijede i ostala visoko regulirana tržišta poput Australije, Kanade, Japana i SAD-a, propisuje detaljne znanstvene smjernice za razvoj biosličnog lijeka, uzevši u obzir varijabilnost bioloških sustava, kompleksnost proizvodnog postupka i potencijalnu imunogeničnost terapijskih proteina. Razvoj biosličnog lijeka kompleksniji je i dugotrajniji od razvoja generičkog lijeka te se sastoji od karakterizacije referentnog lijeka, razvoja postupka proizvodnje te usporednih ispitivanja biosličnog i referentnog lijeka na razini parametara kakvoće, nekliničkih i kliničkih ispitivanja. S obzirom na to da se odobravaju centraliziranim postupkom, bioslični lijekovi nakon provedene ocjene i donošenja odluke o davanju odobrenja za stavljanje u promet, postaju dostupni za primjenu na cijelom Europskom gospodarskom prostoru. Trenutačno je u Europskoj uniji odobren za primjenu ukupno 21 bioslični lijek s djelatnom tvari filgrastim, epoetin (alfa, zeta), somatropin, inzulin glargin, infliksimab, etanercept i folitropin alfa.

ZAKLJUČAK

Bioslični lijekovi su kvalitetna, djelotvorna i sigurna terapijska alternativa referentnom biološkom lijeku te je njihovom primjenom omogućena bolja dostupnost lijekova za liječenje teških bolesti uz financijske uštede u zdravstvu, jačanje inovativnosti u farmaceutskoj industriji te stimuliranje tržišnog natjecanja. Princip razvoja i odobravanja biosličnih lijekova temelji se na znanstveno-regulatornom principu usporedivosti s referentnim lijekom, utemeljenom u Europskoj uniji. S obzirom na to da je razvoj biosličnog lijeka vrlo opsežan, skup i dugotrajan te načelno nije značajno jeftiniji i vremenski kraći od razvoja originalnog lijeka, razlike u cijeni između originalnog i biosličnog lijeka i dalje su premale te ne donose značajne uštede u zdravstvu, kao kod primjene generičkih lijekova. Razlozi nepovjerenja liječnika prema biosličnim lijekovima su rizik od neželjenih imunih reakcija, mogućnost ekstrapolacije indikacija referentnog lijeka bez provođenja kliničkih ispitivanja te izostanak jasnih i transparentnih smjernica za propisivanje i zamjenjivost biosličnih lijekova.

SUMMARY

OBJECTIVES

The aim of this work is a to systematically review the available literature in order to present the basic principles in development and approval of biosimilar medicinal products in the European Union, which are based on scientific and regulatory principle of comparability with the reference biological medicinal products. The proposed research aims to clarify and clearly show the historical development of the regulatory basis, specific requirements and scientific guidelines, as well as the centralised procedure required for the marketing authorisation of biosimilars. The study will particularly discuss and describe biosimilars already approved in the European Union, with emphasis on evaluation of the quality, efficacy and safety, in order to prove the similarity with a reference medicinal product. The current issues related to the biosimilars, such as potential immunogenicity, extrapolation of indication, interchangeability and market competition with the original biologics, will also be considered.

MATERIAL AND METHODS

The original and review articles on the development and manufacturing of biosimilars are searched electronically, using bibliographical database (PubMed) and the database with full text (Science Direct). The procedures for the approval of the biosimilars in the European Union are analyzed using the existing medicinal product databases of the Agency for the medicinal products and medical devices of Croatia (HALMED) and the European Medicines Agency (EMA). Legal documents (regulations, directives, laws) are taken from the web pages of the Official Gazette and the European Commission. For the analysis of development strategies and economic aspects on the biologicals/biosimilars markets, data from the manufacturers' websites and the IMS Health Institute are used.

RESULTS

Biosimilar medicinal products, a cheaper therapeutic alternative to the expensive biological medicinal products, are approved according to the scientific-regulatory principle of comparability, which is based on the demonstration of similarity to a reference medicinal product in terms of the quality, effectiveness and safety. EMA, followed by other highly regulated regulatory markets such as Australia, Canada, Japan and the United States, lays down detailed scientific guidelines for the development of biosimilar, taking into account the variability of biological systems, the complexity of the manufacturing process and the potential immunogenicity of therapeutic proteins. The development of biosimilar medicinal product, which is more complex and time-consuming than the generic medicinal product, consists of the characterization of a reference product, the development of the manufacturing process and comparability testing of the biosimilar and the reference product at the level of quality, non-clinical and clinical studies. After granting approval for the marketing authorisation by the centralised procedure, biosimilars become available for use across the European Economic Area. Twenty one biosimilars containing filgrastims, epoetins (alfa, zeta), somatropins, insulins, infliximab, etanercept and follitropin alfa as active substances are currently approved and in therapeutic use in the European Union.

CONCLUSION

Biosimilars are high-quality, effective and safe therapeutic alternatives to a reference biological product and are used in treatment of serious and life-threatening diseases, thereby providing financial savings in health care, strengthening innovation in the pharmaceutical industry and stimulate competition. The principle of development and approval of biosimilars, based on scientific and regulatory concept of comparability with the reference product, was founded in the European Union. Since the development of biosimilar is expensive and time consuming, the price difference between the original and biosimilar are still too small and do not bring significant savings in health care, as the generic medicinal products. The reasons for lack of confidence in biosimilars among the doctors (and therefore significant savings in health care) are the risk of adverse immune responses,

the possibility of extrapolation of indications of a reference product without conducting clinical trials (suspect in the clinical efficacy) and the absence of clear and transparent guidelines for prescribing and interchangeability of biosimilars.

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1. BIOLOŠKI LIJEKOVI	2
1.1.1. RAZLIKE IZMEĐU BIOLOŠKIH I KEMIJSKIH LIJEKOVA	5
1.1.2. PROIZVODNJA BIOLOŠKIH LIJEKOVA	8
1.2. BIOSLIČNI LIJEKOVI	10
1.2.1. ZAKONSKA OSNOVA BIOSLIČNIH LIJEKOVA	10
1.2.2. BIOSLIČNI LIJEKOVI ODOBRENI U EUROPSKOJ UNIJI	14
1.3. CENTRALIZIRANI POSTUPAK DAVANJA ODOBRENJA	16
1.4. DOKUMENTACIJA UZ ZAHTJEV ZA DAVANJE ODOBRENJA	21
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	23
3. MATERIJAL I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI	25
4. RASPRAVA	27
4.1. RAZVOJ BIOSLIČNOG LIJEKA	28
4.1.1. KARAKTERIZACIJA REFERENTNOG LIJEKA	29
4.1.2. RAZVOJ POSTUPKA PROIZVODNJE BIOSLIČNOG LIJEKA	33
4.1.3. USPOREDNA ISPITIVANJA BIOSLIČNOG I REFERENTNOG LIJEKA	36
4.1.3.1. Usporedna ispitivanja kakvoće	37
4.1.3.2. Usporedna ispitivanja na razini nekliničkih i kliničkih ispitivanja	39
4.1.3.2.1. Neklinička ispitivanja	40
4.1.3.2.2. Klinička ispitivanja	42
4.1.4. REGULATORNE SMJERNICE ZA BIOSLIČNE LIJEKOVE	45
4.1.4.1. Krovna smjernica za bioslične lijekove	47
4.1.4.2. Opća smjernica o kakvoći biosličnih lijekova	48
4.1.4.3. Opća smjernica o nekliničkim i kliničkim ispitivanjima biosličnog lijeka	49
4.1.4.4. Specifične smjernice za skupine biosličnih lijekova	50
4.1.4.5. Ostale smjernice primjenive za bioslične lijekove	51
4.1.5. RAZVOJ BIOSLIČNOG LIJEKA U VREMENSKIM I FINACIJSKIM OKVIRIMA	51
4.2. SKUPINE BIOSLIČNIH LIJEKOVA U TERAPIJSKOJ PRIMJENI	53

4.2.1.	BIOSLIČNI LIJEKOVI S DJELATNOM TVARI FILGRASTIM	53
4.2.1.1.	Biograstim®, Ratiograstim® i Tevagrastim®	55
4.2.1.2.	Filgrastim Hexal i Zarzio®	57
4.2.1.3.	Nivestim®	58
4.2.1.4.	Grastofil® i Accofil®	59
4.2.2.	BIOSLIČNI LIJEKOVI S DJELATNOM TVARI SOMATROPIN	60
4.2.3.	BIOSLIČNI LIJEKOVI S DJELATNOM TVARI EPOETIN	61
4.2.4.	BIOSLIČNI LIJEKOVI S DJELATNOM TVARI INFLIKSIMAB	64
4.2.5.	BIOSLIČNI LIJEKOVI S DJELATNOM TVARI ETANERCEPT	65
4.2.6.	BIOSLIČNI LIJEKOVI S DJELATNOM TVARI FOLITROPIN ALFA	66
4.2.7.	BIOSLIČNI LIJEKOVI S DJELATNOM TVARI INZULIN GLARGIN	67
4.3.	SIGURNA PRIMJENA BIOSLIČNIH LIJEKOVA	69
4.3.1.	FARMAKOVIGILANCIJA	69
4.3.2.	ZAMJENJIVOST	70
4.3.3.	IMUNOGENIČNOST	71
4.4.	GLOBALNA REGULATIVA BIOSLIČNIH LIJEKOVA	73
4.5.	BIOSLIČNI LIJEKOVI DRUGE GENERACIJE	76
4.6.	EKONOMSKI ASPEKTI BIOSLIČNIH LIJEKOVA	77
<u>5.</u>	<u>ZAKLJUČAK</u>	<u>79</u>
<u>6.</u>	<u>LITERATURA</u>	<u>82</u>
<u>7.</u>	<u>ŽIVOTOPIS</u>	<u>88</u>

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Biološki lijekovi

Biološki lijek je lijek čija je djelatna tvar biološka tvar, a biološka tvar je tvar koja se proizvodi ili izlučuje iz biološkog izvora i za čiju su karakterizaciju i utvrđivanje kakvoće potrebna fizičko-kemijska i biološka ispitivanja zajedno s podacima o postupku proizvodnje i njegove kontrole (1). Biološkim lijekovima se smatraju:

- imunološki lijekovi (cjepiva, toksini, serum i proizvodi alergena)
- lijekovi iz ljudske krvi ili ljudske plazme (npr. albumin ili imunoglobulini)
- lijekovi dobiveni biotehnološkim postupcima (postupci koji uključuju uporabu živih sustava ili organizama)
- lijekovi za naprednu terapiju (lijekovi koji se temelje na genskoj terapiji, terapiji somatskim stanicama ili tkivnom inženjerstvu)
- ostali lijekovi dobiveni iz biološkog izvora (npr. heparin ili pankreatin) (2).

S obzirom na strukturu, biološki lijekovi mogu biti proteini, peptidi, monoklonska antitijela i nukleinske kiseline. Relativno mali broj proteinskih lijekova danas se dobiva izolacijom i pročišćavanjem iz njihovih prirodnih izvora, primjerice pankreatini iz tkiva gušterače svinje (Kreon®), heparini iz crijeвне mukoze svinja, antitrombini iz ljudske plazme ili hormoni iz urina žena u postmenopauzi (Menopur®) (3).

Većina proteinskih lijekova proizvodi se tehnologijom rekombinantne DNA (engl. *Recombinant deoxyribonucleic acid technology*, rDNA) koja omogućuje manipulaciju genima i stanicama s ciljem proizvodnje strukturno složenih lijekova koje nije moguće ili je teško dobiti kemijskom sintezom ili izolacijom iz prirodnih izvora. Postupcima tehnologije rDNA izolira se DNA koja kodira za željeni protein, ugrađuje se u ekspresijski vektor (plazmid, bakteriofag) koji se ugrađuje u stanicu domaćina koja će proizvoditi željeni protein u velikim količinama (4). Proizvodni sustavi (stanice domaćina) uključuju bakterije, kvasce, stanice insekata, stanice sisavaca te transgenične biljke i životinje. Genetički modificirane stanične linije pomno se odabiru i kultiviraju u bioreaktorima i proizvode željeni protein koji se kasnije izolira i pročišćava kompleksnim postupcima (5).

Rekombinantni proteini imaju značajne terapijske i komercijalne prednosti ispred proteina izoliranih iz prirodnih izvora. Transkripcijom i translacijom točno određenog ljudskog gena dobiva se protein visoke specifičnosti i smanjuje se mogućnost imune reakcije bolesnika, a proizvodnja rekombinantnih proteina jeftinija je i učinkovitija od skupe izolacije iz prirodnih izvora s niskim prinosima. Primjerice, za dobivanje enzima beta-glukocerebrozidaze, koja se koristi u liječenju Gaucherove bolesti, potrebno je za godišnje liječenje jednog pacijenta izolirati protein iz 50 000 ljudskih placenti dok se tehnologijom rDNA dobivaju visoka iskorištenja, a pritom nema rizika od prijenosa bolesti (virusnih i prionskih) povezanih s pročišćavanjem proteina iz ljudskih tkiva. Kod primjera rekombinantne beta-glukocerebrozidaze poboljšana je i terapijski učinak zamjenom aminokiseline arginin 495 u histidin, što pokazuje na činjenicu da su tehnologijom rDNA moguće razne modifikacije proteina ili izbor određene varijante gena za poboljšanje funkcije ili specifičnosti (6).

Odabir ekspresijskog sustava ovisit će o troškovima proizvodnje i modifikacijama proteina potrebnim za postizanje biološke aktivnosti. Primjerice, bakterijske stanice ne provode glikozilaciju dok svaki od gore navedenih ostalih sustava proizvodi drukčiji tip glikozilacije, a poznato je da glikozilacija ima značajni utjecaj na aktivnost, poluvijek i imunogeničnost rekombinantnog proteina u ljudskom tijelu. Poluvijek nativnog eritropoetina može se produljiti povećanjem glikozilacije, što je iskorišteno kod proizvodnje darbepoetina, analoga eritropoetina koji je konstruiran tako da sadrži dvije dodatne aminokiseline koje su supstrati za reakciju N-glikozilacije. Prilikom ekspresije u stanicama jajnika kineskog hrčka (engl. *Chinese hamster ovary cells*, CHO stanice), sintetizira se protein s pet umjesto tri N-vezana glikana što uzrokuje produljenje poluvijeka darbepoetina tri puta u odnosu na eritropoetin (7).

Razvojem bioloških lijekova naprednim biotehnološkim metodama koje omogućuju kopiranje i poboljšanje kompleksnih peptida, proteina i glikoproteina prirodno prisutnih u ljudskom tijelu, omogućen je potpuno nov i jedinstven način liječenja ozbiljnih i životno ugrožavajućih bolesti poput karcinoma, srčanog i moždanog udara, multiple skleroze, dijabetesa, reumatoidnog artritisa i autoimunih bolesti.

Prodaja i primjena bioloških lijekova stoga pokazuje trend rasta kako u Europi tako i u svijetu. Prema podacima tvrtke *IMS Health Institute*, u Europskoj uniji (EU) je 2013. među 10 najprodavanijih lijekova bilo čak osam bioloških lijekova, većinom monoklonskih protutijela koji se koriste za liječenje reumatoidnog artritisa i karcinoma (tablica 1), dok je od 20 najprodavanijih lijekova u svijetu u 2014. bilo 10 bioloških/biotehnoloških lijekova (tablica 2), također većinom monoklonskih protutijela (Humira®, Avastin®, Rituxan®, Herceptin®, Remicade®, Mabthera®, Lucentis®), jedan fuzijski protein koji sadrži komponente monoklonskog protutijela (Enbrel®) te terapijski inzulini (Lantus®, Novorapid®) i pegfilgrastim (Neulasta®).

Tablica 1. Najprodavaniji lijekovi u EU u periodu od 2008. do 2013. (8).

	2008	2009	2010	2012	2013
1.	Lipitor® (atorvastatin)	Lipitor® (atorvastatin)	Seretide® (fluticasone/ salmeteron)	Humira® (adalimumab)	Humira® (adalimumab)
2.	Seretide® (fluticasone/ salmeteron)	Seretide® (fluticasone/ salmeteron)	Lipitor® (atorvastatin)	Seretide® (fluticasone/ salmeteron)	Seretide® (fluticasone/ salmeteron)
3.	Plavix® (clopidogrel)	Plavix® (clopidogrel)	Humira® (adalimumab)	Herceptin® (trastuzumab)	Enbrel® (etanercept)
4.	Herceptin® (trastuzumab)	Enbrel® (etanercept)	Enbrel® (etanercept)	Enbrel® (etanercept)	Herceptin® (trastuzumab)
5.	Enbrel® (etanercept)	Herceptin® (trastuzumab)	Herceptin® (trastuzumab)	Lipitor® (atorvastatin)	Mabthera® (rituximab)
6.	Zyprexa® (olanzapine)	Humira® (adalimumab)	Lovenox® (enoxaparin)	Mabthera® (rituximab)	Remicade® (infliximab)
7.	Lovenox® (enoxaparin)	Lovenox® (enoxaparin)	Mabthera® (rituximab)	Lovenox® (enoxaparin)	Lovenox® (enoxaparin)
8.	Glivec® (imatinib)	Glivec® (imatinib)	Avastin® (bevacizumab)	Remicade® (infliximab)	Avastin® (bevacizumab)
9.	Pantozol® (pantoprazole)	Zyprexa® (olanzapine)	Remicade® (infliximab)	Avastin® (bevacizumab)	Lucentis® (ranibizumab)
10.	Symbicort® (budesonide/ formoterol)	Mabthera® (rituximab)	Glivec® (imatinib)	Spiriva® (tiotropium)	Lyrica® (pregabalin)
biološki lijek					

Tablica 2. 20 najprodavanijih lijekova u svijetu u 2014. (9).

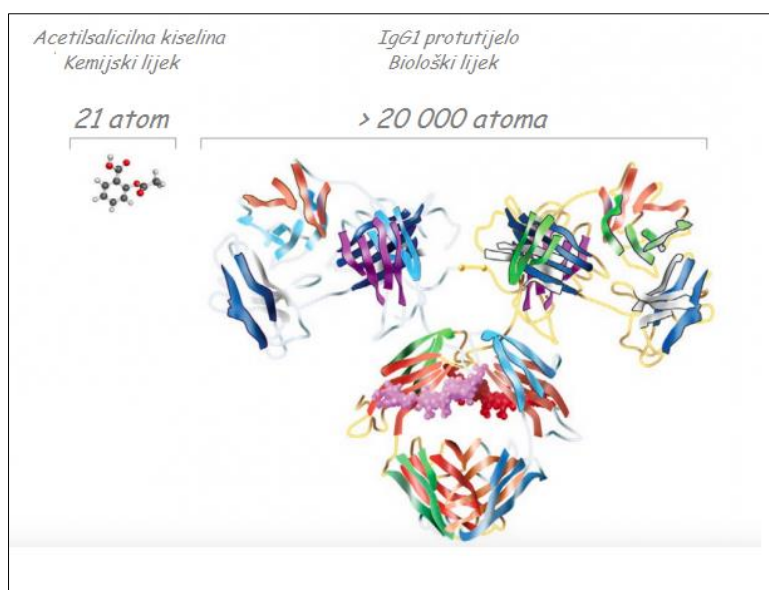
	Lijek	Djelatna tvar	Prodaja (milijarde dolara)
1.	Humira®	adalimumab	11,844
2.	Lantus®	insulin glargine	10,331
3.	Sovaldi®	sofosbuvir	9,375
4.	Abilify®	aripiprazole	9,285
5.	Enbrel®	etanercept	8,707
6.	Seretide®	fluticasone/salmeterol	8,652
7.	Crestor®	rosuvastin	8,473
8.	Remicade®	infliximab	8,097
9.	Nexium®	esomeprazole	7,681
10.	Mabthera®	rituximab	6,552
11.	Avastin®	bevacizumab	6,070
12.	Lyrica®	pregabalin	6,02
13.	Herceptin	trastuzumab	5,564
14.	Spiriva®	tiotropium bromide	5,483
15.	Januvia®	sitagliptin	4,991
16.	Copaxone	glatiramer acetate	4,788
17.	Novorapid®	insulin aspart	4,718
18.	Neulasta®	pegfilgrastim	4,627
19.	Symbicort®	budesonide/formoterol	4,535
20	Lucentis®	ranibizumab	4,437
biološki lijek			

1.1.1. Razlike između bioloških i kemijskih lijekova

S obzirom na to da se proizvode u živim sustavima poput mikroorganizama ili kultura stanica, biološki lijekovi značajno se razlikuju od kemijskih lijekova dobivenih sintetskim putem. Biološki lijekovi sastoje se od velikih, kompleksnih molekula djelatne tvari, često heterogenih smjesa proteina te je njihova proizvodnja kompleksnija od proizvodnje malih molekula kemijskih djelatnih tvari. Dok se kemijski lijekovi dobivaju kemijskom sintezom i postupcima koji obuhvaćaju jednostavniju procesnu kontrolu i pročišćavanje (prosječno 50 ispitivanja u procesnoj kontroli), biološki lijekovi dobivaju se kompleksnim biotehnološkim postupcima koji obuhvaćaju složenu procesnu kontrolu te dugotrajno i kompleksno pročišćavanje (prosječno 250 ispitivanja u procesnoj kontroli) (10).

Prosječna molekulska masa kemijskog lijeka kreće se između 100 i 1000 Daltona dok se molekulska masa biološkog lijeka kreće između 18 000 do 145 000 Da. Primjerice, molekula aspirina je veličine 180 Daltona, sastoji se od 21 atoma, ima malu mogućnost izazivanja imunog odgovora i stabilna je

tijekom čuvanja dok je tipična molekula monoklonskog protutijela veličine 150 000 Daltona, sastoji se od 20 000 atoma, podložna je razgradnji tijekom vremena i ima značajan potencijal za razvoj imunog odgovora (slika 1). Molekule bioloških lijekova općenito su 100 do 1000 puta veće od molekula kemijskih lijekova te je njihova struktura kompleksnija: proteini su građeni od linearnog slijeda aminokiselina (primarna struktura) koje su smotane u strukturne elemente (α -uzvojnici ili β ploču) stabilizirane relativno slabim fizikalnim i/ili kovalentnim disulfidnim vezama (sekundarna struktura), a koji su dodatno smotani i organizirani u trodimenzionalnu strukturu stabiliziranu relativno slabim hidrofobnim vezama (tercijarna struktura) i u nekim slučajevima u kvaternu strukturu (povezivanje monomera). Suprotno tome, male molekule kemijskih lijekova imaju dobro definiranu i stabilnu kemijsku strukturu te ih je moguće u potpunosti karakterizirati analitičkim metodama (11).



Slika 1. Usporedba veličine molekule kemijskog i biološkog lijeka (5).

S obzirom na to da se dobivaju iz živih sustava, biološki lijekovi pokazuju veću varijabilnost i kompleksnost u strukturi i svojstvima od lijekova dobivenih kemijskom sintezom te ih je teže karakterizirati u odnosu na male molekule s dobro definiranim kemijskim strukturama. Zbog visoke varijabilnosti biološkog sustava, biološki lijekovi prilično su osjetljivi na promjene u postupku koje mogu značajno utjecati na kakvoću, djelotvornost i sigurnost lijeka. Na varijabilnost biološkog lijeka utječu ekspresijski sustav (bakterija, kvasac, stanice sisavaca), uvjeti uzgoja, postupak pročišćavanja, formulacija te uvjeti čuvanja i transporta lijeka. Posttranslacijske modifikacije koje nastaju tijekom

biosinteze, poput glikozilacije, fosforilacije, sulfacije, metilacije, acetilacije i hidroksilacije, mogu utjecati na biološku aktivnost molekule i unutarnju heterogenost molekule.

Unatoč širokom rasponu novih, sofisticiranih analitičkih metoda za ispitivanje strukture i fizikalno-kemijskih svojstava, potpuna karakterizacija biološke molekule nije moguća baš zbog navedene strukturne kompleksnosti. Male promjene u proizvodnom postupku mogu značajno utjecati na trodimenzionalnu strukturu molekule, što dalje može utjecati na sigurnost i djelotvornost lijeka. Također, biološki lijekovi mogu izazvati imuni odgovor. Ljudsko tijelo ih zbog kompleksne i velike molekule može prepoznati kao "strane" pa stoga imaju potencijal izazivanja najčešće neželjenog imunog odgovora, što se naziva imunogeničnost. Kemijski su lijekovi većinom premali da bi ih organizam prepoznao. Većina je imunih odgovora blaga i nema negativni učinak na bolesnika no u rijetkim slučajevima neželjeni imuni odgovor može prouzročiti ozbiljne i štetne posljedice na zdravlje bolesnika. Primjer je stvaranje tzv. neutralizirajućih antitijela koja umanjuju terapijski učinak biološkog lijeka (10).

Biološki lijekovi primjenjuju se većinom parenteralno (u venu, u mišić i potkožno; kao bolus injekcija ili infuzija) jer je bioraspoloživost pri drugim putovima primjene ograničena zbog hidrofilnosti, velike molekulske mase i enzimске razgradnje djelatne tvari.

Biološki lijekovi zahtijevaju posebne uvjeta čuvanja i transporta jer su peptidne/proteinske molekule vrlo osjetljive na vanjske uvjete. Iz istih razloga rukovanje biološkim lijekovima također zahtjeva posebnu pozornost.

Tablica 3. Usporedba kemijskih i bioloških lijekova (11, 12).

Parametar	Kemijski lijek	Biološki lijek
Veličina	Mala molekulska masa (100-1000 Da)	Velika molekulska masa (10 000-150 000 Da)
Struktura molekule	Jednostavna	Kompleksna
Proizvodnja	Kemijska sinteza (jednostavna procesna kontrola i pročišćavanje)	Biotehnološka proizvodnja iz živih organizama ili kultura stanica (složena procesna kontrola, dugotrajno i kompleksno pročišćavanje)
Karakterizacija	Potpuna karakterizacija (neovisna o proizvodnom postupku)	Nije moguća potpuna karakterizacija (ovisna o proizvodnom postupku)
Stabilnost	Većinom stabilni	Nestabilni/osjetljivi na vanjske uvjete
Imunogeničnost	Većinom nisu imunogenični	Imunogenični
Putovi primjene	Različiti putovi primjene	Parenteralna primjena

1.1.2. Proizvodnja bioloških lijekova

Postupak proizvodnje rekombinantnih terapijskih proteina sastoji se od tri osnovne faze:

1. Uzvodna faza (engl. *Upstream*)

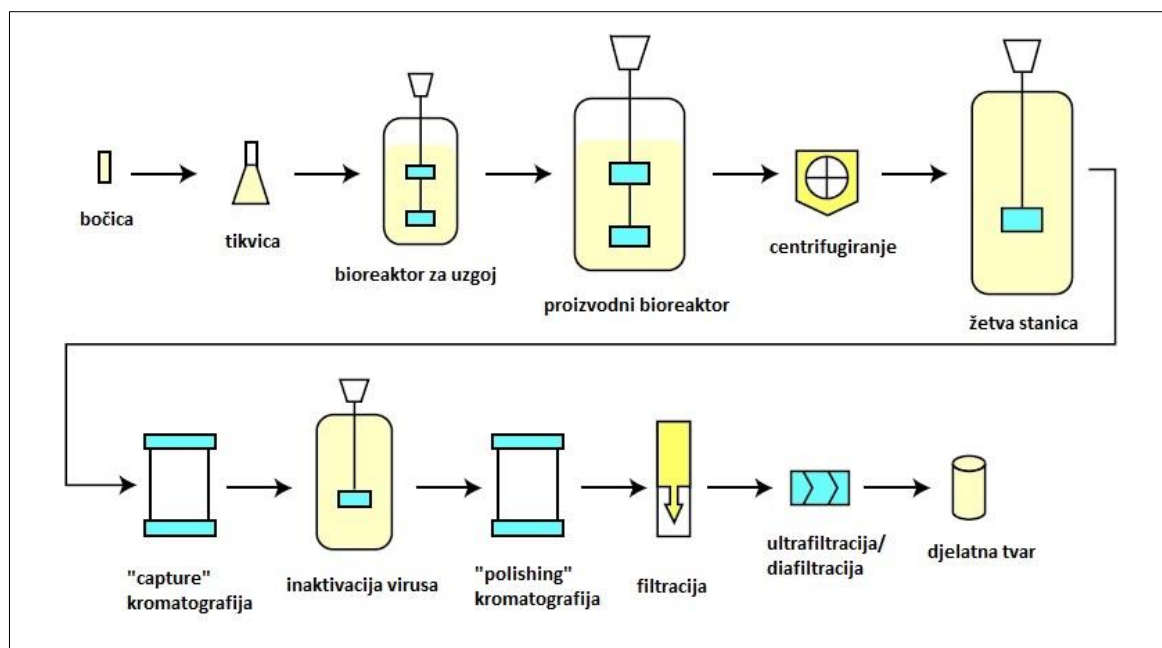
Iz stanične kulture koja sadrži gen za sintezu željenog proteina započinje uzgoj u laboratorijskom mjerilu, obično u Petrijevim zdjelicama ili tikvicama koje sadrže tekuću hranjivu podlogu za rast i razvoj stanica. Zatim se stanice postupno prenose u veće mjerilo (engl. *scale-up*) sve do proizvodnih bioreaktora volumena do 20 000 litara u kojima se provodi biosinteza u uvjetima podešenim za rast stanica i sintezu rekombinantnog proteina. Praćenjem procesnih parametara poput temperature, pH, kisika, hranjivih tvari i dr., osigurava se kakvoća i konzistentnost proizvoda.

2. Nizvodna faza (engl. *Downstream*)

Nakon biosinteze, biomasa se ultracentrifugira, žanju se stanice (engl. *harvest*) te se željeni protein izolira iz stanica ili hranjive podloge, ovisno o tome gdje se sintetizira. Slijedi pročišćavanje proteina do 98-99 % čistoće u nekoliko filtracijskih i kromatografskih stupnjeva (od početnog koncentriranja molekule (engl. *capture*) do završnog pročišćavanja (engl. *polishing*)) koji se odabiru i optimiraju prema svojstvima željenog proteina (molekulska masa, naboj, hidrofobnost i dr.) te inaktivacija virusa i ultrafiltracija.

3. Oblikovanje lijekovitog pripravka

Pročišćeni protein (djelatna tvar) dodatkom pomoćnih tvari oblikuje se u prikladni farmaceutski oblik, filtrira i aseptički puni u sterilni spremnik kako bi postao dostupan za primjenu bolesniku (13).



Slika 2. Shematski prikaz proizvodnje rekombinantnog proteina (13).

1.1.2. Provjera kakvoće bioloških lijekova

Kakvoća bioloških lijekova ispituje se kao i kod kemijskih lijekova tijekom razvoja, u procesnoj kontroli proizvodnog postupka te na gotovom lijeku, ispitivanjem fizikalno-kemijskih svojstava, biološke aktivnosti, imunokemijskih svojstava te sadržaja onečišćenja i djelatne tvari prikladnim metodama ispitivanja (14). No zbog kompleksnosti i veličine proteinske molekule, karakterizacija je proteinske molekule složenija pa postupci ispitivanja najčešće uključuju spregu više različitih sofisticiranih analitičkih metoda od kojih svaka daje po dio informacije o svojstvima ispitivanog proteina (tablica 4). Rekombinantni proteini najčešće su heterogena smjesa izoformi sa sličnim molekulskim masama i nabojem, a s obzirom na to da potječu iz živih sustava, sadrže cijeli niz procesnih (engl. *process-related*) i strukturnih (engl. *product-related*) onečišćenja. Kompleksne proteinske strukture također su podložne različitim kemijskim promjenama (posttranslacijske modifikacije, agregacije) koje mogu utjecati na biološku aktivnost i funkciju proteina. Stoga je sveobuhvatna fizikalno-kemijska karakterizacija ključna za razumijevanje heterogenosti, profila onečišćenja i biološke aktivnosti rekombinantnog proteina namijenjenog kliničkoj primjeni.

Tablica 4. Analitičke metode koje se koriste za ispitivanje terapijskih proteina (15).

Svojstvo	Metoda
Primarna struktura	Analiza sastava aminokiselina, MS, N/C-terminalni slijed, TPM/MS
Sekundarna i tercijarna struktura	CD, NMR, imunoreaktivnost, TPM/MS, biološka aktivnost
Veličina/molekulska masa	AUC, FFF, MALDI-TOF MS, LC-ESI, SDS-PAGE, SEC-HPLC
Naboj	CE, IEC, IEF
Hidrofobnost	HIC-HPLC, RP-HPLC
Imunoreaktivnost	Imunoprecipitacija, WB
Vrsta glikozilacije	CE, HPAEC-PAD, LC-ESI, MALDI-TOF MS, RP-HPLC
Mjesto glikozilacije	TPM/MS

AUC (analitičko ultracentrifugiranje); CE (kapilarna elektroforeza); ESI (masena spektrometrija elektrosposređivanjem); FFF (frakcioniranje u protočnom polju); HPAEC-PAD (anionska kromatografija visoke pH s pulsirajućim amperometrijskim detektorom); HIC (kromatografija hidrofbnom interakcijom); IEC (ionsko-izmjenjivačka kromatografija); MALDI-TOF MS (masena spektrometrija s matricom potpomognutom laserskom desorpcijom); NMR (nuklearna magnetska rezonanca); RH-HPLC (tekućinska kromatografija obrnutih faza); SEC (kromatografija isključenjem); TPM (mapiranje peptida tripsinom); WB (Western Blot; Jednodimenzionalna poliakrilamid gel elektroforeza);

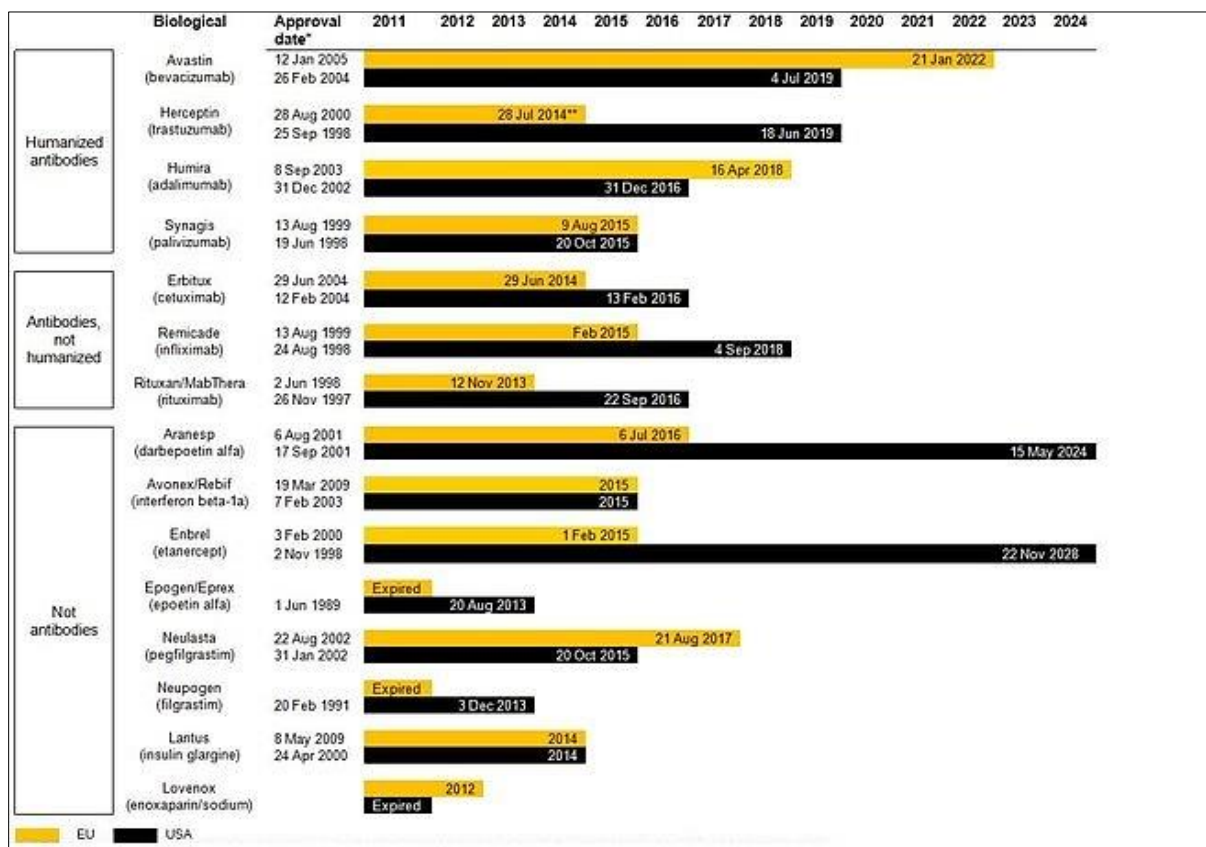
1.2. Bioslični lijekovi

1.2.1. Zakonska osnova biosličnih lijekova

Biološki lijekovi nalaze se na europskom tržištu više od 20 godina te je njihovom primjenom značajno unaprijeđeno liječenje mnogih ozbiljnih bolesti, produljen životni vijek te poboljšana kvaliteta života brojnim bolesnicima. No takvi su lijekovi u odnosu na klasične kemijske lijekove vrlo skupi i predstavljaju veliko financijsko opterećenje zdravstvenom sustavu. Dok prosječni trošak dnevnog liječenja kemijskim lijekom iznosi otprilike 1 dolar na dan, s biološkim lijekom on iznosi oko 22 dolara na dan. Primjerice, troškovi godišnjeg liječenja karcinoma dojke biološkim lijekom Herceptin® iznose 37 000 dolara po bolesniku, a liječenja reumatoidnog artritisa lijekom Humira® 50 000 dolara godišnje po bolesniku (16).

Prvi biološki lijek proizveden tehnologijom rDNA odobren je još 1980-tih godina te je nekim od skupina bioloških lijekova istekao ili će u sljedećem desetljeću isteći period zaštite industrijskog i intelektualnog vlasništva (patentne zaštite) te period zaštite podataka (engl. *data exclusivity*) lijeku koji je odobren na području EU na temelju potpune dokumentacije. Time se otvara prostor za razvoj i odobravanje jeftinijih „kopija“ bioloških lijekova koji mogu smanjiti troškove u zdravstvu, povećati dostupnost bioloških lijekova te stimulirati natjecanje i inovativnost u farmaceutskoj industriji (17). U

sljedećih 10 godina istječe period zaštite podataka vrlo skupim i kompleksnim monoklonskim protutijelima (slika 3).



Slika 3. Istek perioda zaštite najprodavanijim biološkim lijekovima u Europi i SAD-u (18).

*period zaštite podataka: EU 8+2+1 godina; SAD 12 godina; **u Velikoj Britaniji; u ostalim zemljama EU istekao 25.8.2015.;

Ubrzo nakon odobranja i stavljanja na tržište prvih bioloških lijekova, regulatorna tijela u suradnji s industrijom započela su s razvijanjem i osmišljavanjem pristupa za razvoj i odobranje bioloških lijekova sličnih referentnom biološkom lijeku. Biološki lijekovi dobivaju se složenim biotehnološkim postupcima i sastoje se od djelatnih tvari s vrlo složenim strukturama pa nije moguće izbjeći varijabilnost biološkog sustava i proizvesti biološki lijek koji ima potpuno identičnu strukturu djelatne tvari kao referentni biološki lijek. Stoga se standardni pristup razvoju i odobravanju generičkih kemijskih lijekova, koji se temelji na dokazu bioekvivalentnosti s izvornim lijekom, ne može primijeniti kod bioloških lijekova. Iako se dugi niz godina smatralo da nije moguće proizvesti kopiju biološkog lijeka, to se mišljenje mijenjalo s vremenom, kako je rasla količina znanja, iskustva i napretka u biotehnološkim postupcima, uz istovremeni pritisak javnosti i vlada za smanjenje cijena učinkovitih, ali vrlo skupih bioloških lijekova (19).

Smatralo se da bi, nakon isteka perioda zaštite podataka originalnog biološkog lijeka, bilo neetično i neekonomično ponovno provoditi sva neklinička i klinička ispitivanja kojima je dokazana djelotvornost i sigurnost primjene referentnog biološkog lijeka te da je potrebno uspostaviti skraćeni princip razvoja i odobravanja biosličnog lijeka. Istovremeno, zbog složenosti proizvodnog postupka i strukture djelatne tvari biološkog lijeka ("Proces je proizvod"), nije bio primjenjiv skraćeni generički princip odobravanja te je utvrđeno da će se regulatorni pristup za odobravanje biološki sličnih lijekova po opsegu potrebnih ispitivanja (i potrebne dokumentacije) nalaziti negdje između skraćene generičke i potpune dokumentacije za referentni lijek (20).

Terminologija koja se primjenjuje uz generičke lijekove također nije primjenjiva za bioslične lijekove – oni se ne mogu nazivati biogenericima jer bi izraz biogenerik upućivao na to da je djelatna tvar u potpunosti karakterizirana i jednaka djelatnoj tvari referentnog lijeka, a ne najčešće kompleksna smjesa izoformi proteina velike molekulske mase koju je nemoguće u cijelosti karakterizirati. Dvije djelatne tvari biološkog lijeka ne mogu biti jednake te ne postoji niti jedna analitička metoda koja bi dokazala bioekvivalenciju s referentnim biološkim lijekom (21). Stoga je uveden pojam „biosličnosti“ kao prikladniji za lijekove slične biološkom lijeku.

Direktivom 2003/63/EZ od 25. lipnja 2003., kojom se dopunjuje Direktiva 2001/83/EZ koja se odnosi na lijekove za primjenu kod ljudi, u europsko zakonodavstvo uvodi se pojam biološkog lijeka sličnog referentnom biološkom lijeku (engl. *similar biological medicinal product*). U Dijelu II (4) Dodatka I navodi se da količina potrebne dokumentacije za odobravanje biološkog lijeka sličnog referentnom biološkom lijeku ne može biti jednaka kao za generičke lijekove, već je za dokaz sličnosti dva biološka lijeka potrebno, uz podatke obuhvaćene Modulima 1, 2 i 3, dostaviti dodatne rezultate nekliničkih i kliničkih ispitivanja (Modul 4 i 5). Zbog kompleksnosti bioloških lijekova, količina potrebnih dodatnih podataka ovisit će o specifičnim karakteristikama biološkog lijeka i definirat će se od slučaja do slučaja, u skladu sa znanstvenim smjernicama (22).

Direktivom 2004/27/EZ od 31. ožujka 2004. kojom se izmjenjuje i dopunjuje Direktiva 2001/83/EZ, donesena je zakonska osnova za odobravanje biosličnog lijeka, a navodi se u Članku 10 (4) koji je

prenesen u Članak 33. Zakona o lijekovima Republike Hrvatske njezinim pristupanjem EU. Podnositelj zahtjeva za davanje odobrenja obavezan je uz zahtjev priložiti rezultate odgovarajućih nekliničkih ili kliničkih ispitivanja ako biološki lijek sličan referentnom biološkom lijeku ne odgovara definiciji generičkog lijeka zbog razlika u sirovinama ili razlika u proizvodnom postupku biološkog lijeka i referentnog biološkog lijeka. Referentni biološki lijek je odobren ili je bio odobren u državi članici EU na temelju potpune dokumentacije o kakvoći, djelotvornosti i sigurnosti primjene lijeka (1). U tom se slučaju davanje odobrenja za stavljanje u promet biosličnog lijeka temelji na dokazu sličnosti s referentnim biološkim lijekom, što znači da je potrebno provesti dodatna usporedna ispitivanja biosličnog lijeka i referentnog lijeka kako bi se dokazala njihova sličnost u kakvoći, djelotvornosti i sigurnosti, što je osnova regulatornog principa biosličnosti koji se u EU intenzivno razvija već više od 10 godina.

Princip razvoja i odobravanja biosličnog lijeka temelji se na znanstveno-regulatornom konceptu usporedivosti, preuzetom iz tripartitne smjernice o usporedivosti biotehnoloških/bioloških lijekova (engl. *Comparability of Biotechnological/Biological Products, ICH Topic Q5E*), koju su 2005. izdale članice Međunarodne konferencije o harmonizaciji (engl. *International Conference on Harmonisation*, ICH) EU, Japan i SAD. Navedena smjernica primjenjuje se za biološke lijekove s ciljem usporedbe kakvoće, djelotvornosti i sigurnosti biološkog lijeka prije i nakon provedenih izmjena u postupku proizvodnje. Naime, proizvođači bioloških lijekova često uvođe promjene u proizvodnom postupku tijekom razvoja lijeka ili nakon dobivanja odobrenja za stavljanje lijeka u promet s ciljem poboljšanja ili uvećanja postupka, poboljšanja stabilnosti lijeka ili zbog usklađivanja s regulatornim zahtjevima. Kod uvođenja promjene, provode se ispitivanja parametara kakvoće lijeka kako bi se dokazalo da provedene promjene nemaju negativni utjecaj na sigurnost i djelotvornost lijeka, a dobiveni rezultati pokazuju je li potrebno i u kojem opsegu provoditi dodatna neklinička i klinička ispitivanja. Ovdje se prvi put uvodi pojam usporednih ispitivanja (engl. *Comparability exercise*) te se definira kao skup aktivnosti, uključujući dizajn i provođenje ispitivanja te analizu podataka osmišljenih s ciljem provjere usporedivosti dva proizvoda. Cilj je usporednih ispitivanja osigurati kakvoću, sigurnost i djelotvornost

lijeka proizvedenog izmijenjenim postupkom proizvodnje, kroz sakupljanje i procjenu relevantnih podataka kako bi se utvrdilo postoji li negativni utjecaj provedenih izmjena na lijek. Dokaz usporedivosti ne znači nužno da su parametri kakvoće lijeka (engl. *quality attributes*) prije i poslije izmjena identični, već da su vrlo slični (engl. *highly similar*) i da je postojeće znanje dovoljno prediktivno kako bi se osiguralo da moguće razlike u parametrima kakvoće nemaju negativni utjecaj na sigurnost i djelotvornost lijeka (23). S obzirom na to da je i kod biosličnih lijekova potrebno dokazati sličnost s referentnim biološkim lijekom, primjena navedenog principa usporedivosti proširena je i na bioslične lijekove, što je definirano krovnom smjernicom Europske agencije za lijekove (engl. *European Medicines Agency, EMA*) za bioslične lijekove (engl. *Guideline on similar biological medicinal products*), objavljenoj 2005. godine. Ubrzo su, tijekom 2006., objavljene i specifične smjernice o ispitivanjima i potrebnoj dokumentaciji o kakvoći biosličnog lijeka (engl. *Similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues*) te nekliničkim i kliničkim ispitivanjima (engl. *Similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues*) sa zasebnim dodacima o specifičnostima skupina biosličnih lijekova koji sadrže djelatnu tvar inzulin, eritropoetin, somatropin, filgrastim, folitropin, interferon, heparin niske molekulske mase i monoklonsko protutijelo (24).

1.2.2. Bioslični lijekovi odobreni u Europskoj uniji

Ubrzo je, 2006. godine, istekom perioda zaštite referentnom biološkom lijeku Genotropin® (somatropin), EMA odobrila prvi bioslični lijek - Omnitrope® te je EU tako postala prva regija u svijetu s postavljenim zakonskim okvirima i regulatornim pristupom za odobravanje biosličnih lijekova. Do danas je EMA odobrila ukupno 23 bioslična lijeka, od kojih su dva hormona rasta (somatropin), devet faktora stimulacije rasta kolonija granulocita/G-CSF (filgrastim), pet eritropoetina (epoetin alfa, epoetin zeta), tri monoklonska protutijela (infliksimab), jedan inzulin (inzulin glargin), dva folikulostimulirajuća hormona (folitropin alfa) i jedan fuzijski protein (etanercept) (tablica 5). Zahtjevi za davanje odobrenja za bioslični interferon alfa-2a (Alpheon®, BioPartners GmbH) i ljudski inzulin

(Solumarv®, Marvel Lifesciences Ltd) odbijeni su - Alpheon® zbog značajnih razlika s referentnim lijekom Roferon-A®, a Solumarv® zbog uočenih značajnih nedostataka u proizvodnom postupku. Odobrenja za lijekove Filgrastim Ratiopharm® i Valtropin® povučena su od strane nositelja odobrenja (24).

Tablica 5. Bioslični lijekovi odobreni na području EU (24).

Naziv lijeka	Djelatna tvar	Indikacija	Status	Datum odobrenja
Abasaglar®	inzulin glargin	šećerna bolest	Odobren	9.9.2014.
Abseamed®	epoetin alfa	anemija, tumor, kronično zatajenje bubrega	Odobren	28.8.2007.
Accofil®	filgrastim	neutropenija	Odobren	18.9.2014.
Alpheon®	interferon alfa-2a	kronični hepatitis C	Odbijen	-
Bemfol®	folitropin alfa	anovulacija	Odobren	27.3.2014.
Benepali®	etanercept	reumatoidni artritis, psorijatični artritis, psorijaza	Odobren	14.1.2016.
Binocrit®	epoetin alfa	anemija, tumor, kronično zatajenje bubrega	Odobren	28.8.2007.
Biograstim®	filgrastim	tumor, presađivanje koštane srži, neutropenija	Odobren	15.9.2008.
Epoetin Alfa Hexal	epoetin alfa	anemija, tumor, kronično zatajenje bubrega	Odobren	28.8.2007.
Filgrastim Hexal	filgrastim	tumor, presađivanje koštane srži, neutropenija	Odobren	06.2.2009.
Filgrastim ratiopharm	filgrastim	tumor, presađivanje koštane srži, neutropenija	Povučen	15.9.2008.
Grastofil®	filgrastim	neutropenija	Odobren	18.10.2013.
Flixabi®	infliksimab	artritis, psorijatični artritis, reumatoidni kolitis, ulcerozni kolitis, Crohnova bolest, ankilozantni spondilitis	Odobren	26.5.2016.
Inflectra®	infliksimab	artritis, psorijatični artritis, reumatoidni kolitis, ulcerozni kolitis, Crohnova bolest, ankilozantni spondilitis	Odobren	10.9.2013.
Nivestim®	filgrastim	tumor, presađivanje koštane srži, neutropenija	Odobren	08.6.2010.
Omnitrope®	somatropin	poremećaji rasta, Prader-Willijev sindrom, Turnerov sindrom	Odobren	12.4.2006.
Ovaleap®	folitropin alfa	anovulacija	Odobren	27.9.2013.
Ratiograstim®	filgrastim	tumor, presađivanje koštane srži, neutropenija	Odobren	15.9.2008.
Remsima®	infliksimab	artritis, psorijatični artritis, reumatoidni kolitis, ulcerozni kolitis, Crohnova bolest, ankilozantni spondilitis	Odobren	10.9.2013.
Retacrit®	epoetin zeta	anemija, tumor, autologna transfuzija krvi, kronično zatajenje bubrega	Odobren	18.12.2007.
Silapo®	epoetin zeta	anemija, tumor, autologna transfuzija krvi, kronično zatajenje bubrega	Odobren	18.12.2007.
Solumarv®	ljudski inzulin	šećerna bolest	Odbijen	19.11.2015.
Tevagrastim®	filgrastim	tumor, presađivanje koštane srži, neutropenija	Odobren	15.9.2008.
Valtropin®	somatropin	poremećaji rasta, Turnerov sindrom	Povučen	24.4.2006.
Zarzio®	filgrastim	tumor, presađivanje koštane srži, neutropenija	Odobren	6.2.2009.

Trenutačno se u ocjeni Europske agencije za lijekove nalaze još 12 novih biosličnih lijekova (tablica 5), među kojima su i tri zahtjeva za prvi bioslični pegilirani filgrastim.

Tablica 6. Bioslični lijekovi u postupku ocjene od strane EMA-e, podaci od 13.4.2016. (24).

Djelatna tvar	Terapijska skupina	Broj zahtjeva	Referentni lijek	Proizvođač referentnog lijeka
Enoksaparin natrij	Antitrombotici	2	Lovenox®	Sanofi
Etanercept	Imunosupresivi	1	Enbrel®	Amgen
Rituksimab	Antineoplastici	2	MabThera®	Roche
Adalimumab	Imunosupresivi	2	Humira®	Abbvie
Inzulin glargin	Antidijabetici	1	Lantus®	Sanofi
Pegfilgrastim	Imunostimulansi	3	Neulasta®	Amgen
Teriparatid	Paratiroidni hormoni	1	Forteo®	Eli Lilly
Ukupno		12		

1.3. Centralizirani postupak davanja odobrenja za stavljanje lijeka u promet

Lijekovi dobiveni biotehnološkim postupcima se u EU od 1995. odobravaju centraliziranim postupkom davanja odobrenja za stavljanje u promet lijeka (engl. *Centralised procedure*, CP), u skladu s odredbama Uredbe (EZ) broj 726/2004 Europskog parlamenta i Vijeća. Centralizirani postupak odobravanja obavezan je za sljedeće skupine lijekova (25):

1. lijekovi koji se dobivaju biotehnološkim postupcima (tehnologija rDNA, hibridoma stanice)
2. lijekovi za naprednu terapiju (genska terapija, terapija somatskim stanicama, lijekovi dobiveni tkivnim inženjersvom)
3. lijekovi za veterinarsku primjenu namijenjeni prvenstveno kao promotori rasta životinja
4. lijekovi koji sadrže novu djelatnu tvar indiciranu za liječenje HIV/AIDS-a, tumora, dijabetesa, neurodegenerativnih bolesti, virusnih bolesti, autoimunih bolesti i drugih imunoloških poremećaja
5. lijekovi za liječenje rijetkih i teških bolesti kod ljudi (engl. *orphans*).

Lijekovi iz ostalih skupina ne podliježu centraliziranom postupku, već se navedeni postupak za njih može pokrenuti samo uz uvjet da predstavljaju značajnu terapijsku, znanstvenu ili tehnološku inovaciju ili je njihovo odobrenje centraliziranim postupkom od značajnog interesa za zaštitu javnog zdravlja. Zahtjev za davanje odobrenja za stavljanje lijeka u promet centraliziranim postupkom predaje su direktno EMA-i, koja provodi procjenu i donosi mišljenje, na temelju čega Europska komisija kao izvršno tijelo EU donosi odluku kojom daje odobrenje za stavljanje lijeka u promet.

Navedena odluka važeća je na području svih zemalja članica EU te na Islandu, u Norveškoj i Lihtenštajnu (26).

Za ocjenu dokumentacije i davanje mišljenja EMA-e o svim pitanjima vezanim uz lijek u centraliziranom postupku odgovorna su znanstvena povjerenstva EMA-e (24):

- Povjerenstvo za lijekove za primjenu kod ljudi (engl. *Committee for Medicinal Products for Human Use*, CHMP) je povjerenstvo sastavljeno od predstavnika država članica EU i imenovanih stručnjaka zaduženo za pripremu mišljenja EMA-e o svim pitanjima koja se odnose na lijekove za primjenu kod ljudi, u skladu s Uredbom (EZ) broj 726/2004.
- Povjerenstvo za ocjenu rizika na području farmakovigilancije (engl. *Pharmacovigilance Risk Assessment Committee*, PRAC) je povjerenstvo sastavljeno od predstavnika država članica EU te drugih imenovanih stručnjaka zaduženo za donošenje obvezujućih odluka, preporuka i savjeta u vezi sa svim aspektima upravljanja rizikom primjene lijekova u skladu s Uredbom (EU) broj 1235/2010 i Direktivom 2010/84/EZ.
- Povjerenstvo za lijekove za primjenu kod životinja (engl. *Committee for Medicinal Products for Veterinary Use*, CVMP) je povjerenstvo sastavljeno od predstavnika država članica EU i imenovanih stručnjaka zaduženo za pripremu mišljenja EMA-e o svim pitanjima koja se odnose na lijekove za primjenu kod životinja u skladu s Uredbom (EZ) broj 726/2004.
- Povjerenstvo za lijekove za rijetke i teške bolesti ("orphan" lijekovi) (engl. *Committee for Orphan Medicinal Products*, COMP) je povjerenstvo sastavljeno od predstavnika država članica EU i imenovanih stručnjaka zaduženo za pregled i ocjenu zahtjeva tvrtki koje traže status lijeka za rijetke i teške bolesti.
- Povjerenstvo za biljne lijekove (engl. *Committee on Herbal Medicinal Products*, HMPC) je povjerenstvo sastavljeno od predstavnika država članica EU i imenovanih stručnjaka zaduženo za pripremu mišljenja EMA-e o svim pitanjima koja se odnose na biljne lijekove.
- Povjerenstvo za lijekove za naprednu terapiju (engl. *Committee for Advanced Therapies*, CAT) je povjerenstvo sastavljeno od predstavnika država članica EU i imenovanih stručnjaka

zaduženo za ocjenu kakvoće, sigurnosti primjene i djelotvornosti lijekova za naprednu terapiju i praćenje znanstvenih dostignuća na tom polju.

- Povjerenstvo za lijekove za pedijatrijsku primjenu (engl. *Paediatric Committee*, PDCO) je povjerenstvo sastavljeno od predstavnika država članica EU i imenovanih stručnjaka zaduženo za ocjenu sadržaja plana pedijatrijskih ispitivanja i prihvaćanje njihovih mišljenja.

Osim što je odgovorno za ocjenu kakvoće, djelotvornosti i sigurnosti lijeka za koji je podnesen zahtjev, povjerenstvo CHMP odgovorno je i za različite aktivnosti u životnom ciklusu lijeka nakon davanja odobrenja kao što su izmjene, proširenja i obnove odobrenja, ima ulogu arbitra u arbitražnom postupku u slučaju neslaganja u mišljenju zemalja članica u decentraliziranom postupku (engl. *Decentralised procedure*, DCP) ili postupku međusobnog priznavanja (engl. *Mutual recognition procedure*, MRP) te sudjeluje u referalnom postupku (engl. *Community referral procedure*) koji se pokreće kada postoji zabrinutost za interese javnog zdravlja. Ostale važne aktivnosti CHMP-a su znanstveni savjet proizvođača lijeka i nositelja odobrenja (engl. *Scientific advice*), priprema znanstvenih i regulatornih smjernica (engl. *guidelines*) za farmaceutsku industriju te suradnja s međunarodnim regulatornim tijelima s ciljem harmonizacije regulatornih zahtjeva za lijekove. CHMP također osniva radne skupine koje se sastoje od stručnjaka u pojedinim znanstvenim područjima, a koji su odabrani s Europskog popisa stručnjaka (engl. *European expert list*) koji održava EMA. Radnim skupinama delegirani su specifični zadaci iz područja njihove stručnosti, a vezani su uz znanstvenu ocjenu zahtjeva za davanje odobrenja te izrade i obnavljanja znanstvenih smjernica. Osnovane su stalne radne skupine, npr. Radna skupina za kakvoću lijeka (engl. *Quality Working Party*, QWP), Radna skupina za zdravstvene djelatnike (engl. *Healthcare Professionals' Working Party*, HCPWP), Radna skupina za biološke i biotehnoške lijekove (engl. *Biologics Working Party*, BWP), Radna skupina za pacijente i potrošače (engl. *Patients' and Consumers' Working Party*, PCWP), Radna skupina za sigurnost lijeka (engl. *Safety Working Party*, SWP) i Radna skupina za znanstveni savjet (engl. *Scientific Advice Working Party*, SAWP). Po potrebi (priprema prijedloga specifične znanstvene teme, specifičnog odgovora CHMP-a, ažuriranje smjernice i sl.) se sastaju i privremene radne skupine,

kao što su Radna skupina za bioslične lijekove (engl. *Biosimilar Medicinal Products Working Party*, BMWP), Radna skupina za biostatistiku (engl. *Biostatistics Working Party*), Radna skupina za farmakokinetiku (engl. *Pharmacokinetics Working Party*), Radna skupina za cjepiva (engl. *Vaccines Working Party*) i druge. Također, CHMP je osnovao i druge skupine prema različitim područjima stručnosti u poslovima odobravanja lijeka, npr. Radna skupina za informacije o lijeku (engl. *Working Group on Quality Review of Documents*, QRD), Radna skupina za naziv lijeka (engl. *(The (Invented) Name Review Group*, NRG), Radna skupina za dokumentaciju o djelatnoj tvari (engl. *Active Substance Master File Working Group*, ASMF WG) i druge.

Tijek centraliziranog postupka može se podijeliti u nekoliko faza (27):

- Faza prije predaje zahtjeva

Faza prije predaje zahtjeva može obuhvatiti npr. znanstveni savjet, sastanak prije predaje zahtjeva, predaju zahtjeva za davanje odobrenja za stavljanje lijeka u promet, imenovanje izvjestitelja i doizvjestitelja (engl. *rapporteur, co-rapporteur*), validaciju zahtjeva i dr.

- Prva faza prije mišljenja (*Pre-opinion Phase I*)

Postupak započinje ocjenom dokumentacije u razdoblju od 80 dana (engl. *day 0–80*) koju provode izvjestitelj i doizvjestitelj te do dana 80 šalju izvješća o ocjeni dokumentacije o lijeku (engl. *Assessment report*) članovima CHMP koji do dana 100 postupka šalju svoje komentare na izvješća. Do dana 115 postupka priprema se zajednički popis pitanja izvjestitelja, recenzenata, članova CHMP i EMA-e te se na dan 120 postupka šalje podnositelju zahtjeva i zaustavlja se vrijeme postupka (engl. *clock-stop*). Podnositelj zahtjeva dužan je u roku od 3 mjeseca odgovoriti na postavljena pitanja.

- Druga faza prije mišljenja (*Pre-opinion Phase II*)

Nakon što je podnositelj zahtjeva dostavio odgovore, s danom 121 nastavlja se postupak. Izvjestitelji do dana 150 pripremaju zajedničko izvješće o ocjeni dokumentacije o lijeku. Na dan 170 postupka članovi CHMP šalju svoje komentare izvjestiteljima, drugim članovima CHMP i EMA-i te se do dana 180 postupka odlučuje je li potrebno usmeno obrazloženje podnositelja zahtjeva ili je potrebno poslati popis s otvorenim pitanjima. Ako je potrebno usmeno obrazloženje, postupak se zaustavlja

kako bi se podnositelj zahtjeva pripremio, kada je potrebno. Ako je potreban popis otvorenih pitanja, isti se šalje podnositelju zahtjeva i postupak se zaustavlja. Na dan 181 postupak se nastavlja ili se održava usmeno obrazloženje. Do dana 210 postupka podnositelj zahtjeva dostavlja završni nacrt tekstova informacija o lijeku izjaviteljima, članovima CHMP i EMA-i. Na dan 210 postupka povjerenstvo daje mišljenje može li se lijek odobriti ili ne.

- Faza nakon mišljenja (*Post-opinion Phase*)

Nakon što je doneseno pozitivno mišljenje, podnositelj zahtjeva dužan je u roku od 5 dana dostaviti EMA-i prijevode tekstova informacija o lijeku na svim jezicima članica EU koji se zatim šalju nacionalnim regulatornim tijelima na pregled. Do dana 232 postupka podnositelj zahtjeva šalje EMA-i završne verzije tekstova u koje je uključio komentare pristigle od nacionalnih regulatornih tijela, koji se onda prosljeđuju Europskoj komisiji. Na dan 277 postupka Europska komisija daje odobrenje za stavljanje lijeka u promet koje vrijedi na području cijele EU te Islanda, Lihtenštajna i Norveške.

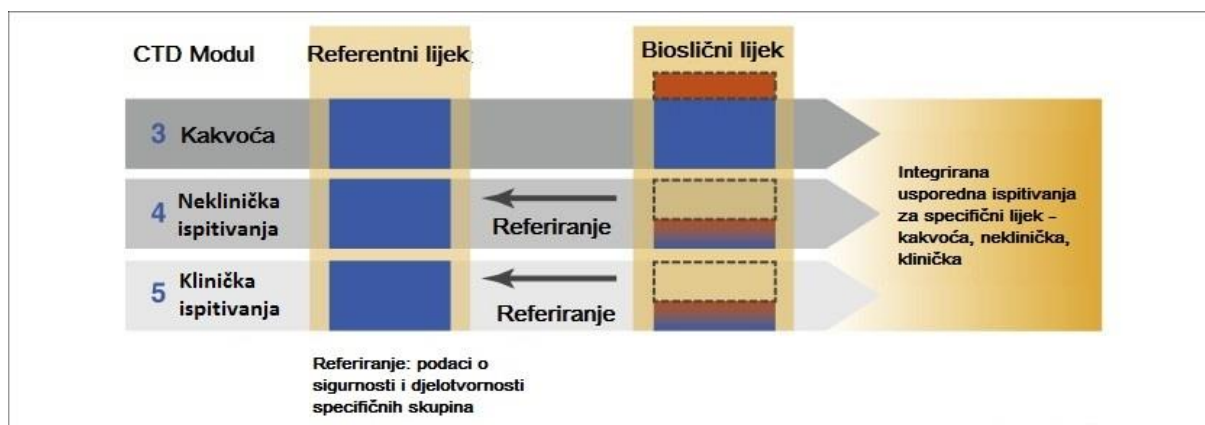
Za svaki lijek kojem je dano odobrenje putem centraliziranog postupka, CHMP objavljuje Europsko javno izvješće o ocjeni dokumentacije o lijeku (engl. *European public assessment report*, EPAR) u kojem su navedene znanstvene osnove za davanje odobrenja, proceduralni koraci postupka ocjene lijeka te tekstovi Sažetka opisa svojstava lijeka (engl. *Summary of Product Characteristic*, SPC) namijenjenog zdravstvenim djelatnicima, Upute o lijeku (engl. *Patient Information Leaflet*, PIL) namijenjene pacijentima i Označivanja unutarnjeg i vanjskog pakiranja lijeka (engl. *Labelling*). EPAR se objavljuje na mrežnim stranicama EMA-e na službenim jezicima EU kako bi se zdravstveni djelatnici upoznali s važnim informacijama vezanim uz kakvoću, djelotvornost i sigurnost lijeka kojem je dano odobrenje centraliziranim postupkom kao i potencijalno utvrđenim omjerima koristi i rizika primjene lijeka.

1.4. Dokumentacija uz zahtjev za davanje odobrenja

Dok traje period zaštite industrijskog i intelektualnog vlasništva (patentne zaštite) i zaštite podataka (engl. *data exclusivity*) referentnom lijeku, proizvođač biosličnog lijeka ne može proizvoditi niti dobiti odobrenje za stavljanje lijeka u promet. Period zaštite podataka za referentne lijekove za koje je inicijalni zahtjev za davanje odobrenja centraliziranim postupkom podnesen prije 20. studenog 2005. godine vrijedi razdoblje zaštite podataka u trajanju od 10 godina. Za referentne lijekove za koje je inicijalni zahtjev za davanje odobrenja centraliziranim postupkom podnesen od 20. studenog 2005. godine nadalje primjenjuje se pravilo "8 + 2 + 1", što obuhvaća 8 godina zaštite podataka (nije moguće podnijeti zahtjev za davanje odobrenja za generički/bioslični lijek) + 2 godine za zaštitu stavljanja u promet (nije moguće staviti generički/bioslični lijek u promet) + 1 godina za dodatnu zaštitu stavljanja u promet ako nositelj odobrenja u prvih 8 godina dobije odobrenje za jednu ili više terapijskih indikacija koje donose klinički značajnu korist u usporedbi s postojećim liječenjem (27).

Nakon isteka navedenog perioda, podnositelj zahtjeva može EMA-i predati zahtjev za davanje odobrenja za stavljanje biosličnog lijeka u promet u skladu s Člankom 10 (4) Direktive 2001/83/EZ i osloniti se na dio dokumentacije referentnog lijeka za koji je dano odobrenje na temelju potpune dokumentacije (engl. *full dossier*). Dokumentacija o lijeku, koja se predaje uz zahtjev za davanje odobrenja, dostavlja se u obliku Zajedničkog tehničkog dokumenta (eng. *Common Technical Document*, CTD), u skladu s uputom Europske komisije: *Volume 2B, Notice to Applicants, Medicinal Products for Human Use, Presentation and Content of the Dossier* (28). Osnovna struktura CTD-a (Modul 1 - 5) za bioslični lijek skraćena je u odnosu na referentni biološki lijek no dodatno sadrži podatke o usporednim ispitivanjima referentnog i biosličnog lijeka. U Modulu 1, koji sadrži administrativne podatke i informacije o lijeku, poglavlje 1.5.2 dopunjava se obrazloženjem zahtjeva za bioslični lijek, odnosno sažeto se navode dokazi da je lijek za koji se predaje zahtjev bioslični lijek u skladu s Člankom 10 (4) (29). U Modulu 2 prilažu se sažeci dokumentacije o kakvoći, nekliničkim i kliničkim ispitivanjima. Potrebno je pripremiti potpunu dokumentaciju o kakvoći (Modul 3) koja obuhvaća podatke o djelatnoj tvari (Modul 3.2.S) i lijeku (Modul 3.2.P), dopunjeno detaljnim

podacima o usporednim ispitivanjima koji se prilažu u poglavlju Modul 3.2.R. Vrsta i količina potrebnih podataka o nekliničkim (Modul 4) i kliničkim ispitivanjima (Modul 5) skraćena je u odnosu na potpunu dokumentaciju za referentni lijek, određuje se od slučaja do slučaja, u skladu s relevantnim znanstvenim smjernicama za specifične skupine biosličnih lijekova, a ovisi o rezultatima usporednih ispitivanja referentnog i biosličnog lijeka na razini kakvoće (slika 3, tablica 7). Općenito, količina potrebnih podataka za odobravanje biosličnog lijeka najčešće je veća nego za generički lijek i manja nego za novi biološki lijek.



Slika 3. Shematska usporedba CTD Modula za referentni i bioslični lijek (30).

Tablica 7. Pregled podataka u dokumentaciji za odobravanje biosličnog lijeka u usporedbi s referentnim lijekom (12).

Kakvoća	Neklinička ispitivanja	Klinička ispitivanja
Djelatna tvar	Farmakologija	Farmakologija
- Proizvodnja	- Primarna	Farmakokinetika
- Karakterizacija	- Sekundarna	- Jednokratna doza
- Provjera kakvoće	- Sigurnost	- Ponovljena doza
- Poredbeni standardi	- Interakcije	- Posebne skupine
- Primarno pakiranje	- Usporedna ispitivanja (primarna farmakodinamika)	- Usporedna ispitivanja (jednokratna doza PK)
- Stabilnost	Farmakokinetika	Farmakodinamika
- Usporedna ispitivanja (analitička usporedba s referentnim lijekom)	- ADME	- Prikladni markeri
Lijek	- Interakcije	- Usporedna ispitivanja (PD)
- Opis i sastav	Toksikologija	Djelotvornost i sigurnost
- Farmaceutski razvoj	- Jednokratna doza	- Raspon doze
- Proizvodnja	- Ponovljena doza	- Režim doziranja
- Pomoćne tvari	- Genotoksičnost	- Pivotalno
- Provjera kakvoće	- Kancerogenost	o Indikacija X
- Poredbeni standardi	- Reprodukcijska toksičnost	o Indikacija Y
- Primarni spremnik	- Lokalna podnošljivost	o Indikacija Z
- Stabilnost	- Usporedna ispitivanja (ponovljena doza)	- Usporedna ispitivanja (indikacija X)
- Usporedna ispitivanja (analitička usporedba s referentnim lijekom)		Nakon davanja odobrenja
		- Sigurnost
		- Ostale indikacije
		- Imunogeničnost

Označeno crnom bojom – zahtjevi za referentni i bioslični lijek; sivom bojom – zahtjevi za referentni lijek;

zelenom bojom – zahtjevi za bioslični lijek;

PK – farmakokinetika; PD – farmakodinamika; ADME – apsorpcija/distribucija/metabolizam/izlučivanje;

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je ovog specijalističkog rada sustavnim pregledom dostupne literature prikazati specifičnosti razvoja i odobravanja biosličnih lijekova u Europskoj uniji, prema znanstveno-regulatornom principu usporedivosti s referentnim biološkim lijekom.

Predloženo istraživanje nastojat će razjasniti i pregledno prikazati povijesni razvoj zakonske osnove, specifičnih zahtjeva i smjernica za odobravanje biosličnih lijekova te centraliziranog postupka za davanje odobrenja. Istraživanje će pružiti detaljan uvid u odobrene bioslične lijekove koji se nalaze u terapijskoj primjeni, što obuhvaća analizu skupina lijekova prema djelatnoj tvari (struktura, fizikalno-kemijska svojstva, proizvodni postupak, proizvođači, referentni lijek, odobrene indikacije) i analizu postupka odobravanja lijeka, a s naglaskom na ocjenu kakvoće, djelotvornosti i sigurnosti te dokaz sličnosti biosličnog lijeka s referentnim lijekom.

Također će se razmatrati neke od aktualnih tema vezanih uz primjenu biosličnih lijekova, o kojima proizvođači, liječnici i regulatorna tijela iznose različita stajališta, a odnose se na pitanje sigurnosti primjene biosličnih lijekova zbog potencijalne imunogeničnosti, djelotvornosti u smislu ekstrapolacije indikacija referentnog lijeka, zamjenjivosti biosličnih lijekova te tržišnog natjecanja s izvornim biološkim lijekovima prve i druge generacije.

3. MATERIJAL I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI

Pretraživanje znanstvenih, stručnih i preglednih radova o razvoju i proizvodnji biosličnih lijekova, s naglaskom na usporedna ispitivanja s referentnim lijekom, obavljeno je elektroničkim putem uz pomoć umreženog računala koje ima *online* pristup bazama podataka. Pretražene su bibliografska baza podataka (*PubMed*) i baza podataka s cjelovitim tekstom (*Science Direct*).

Literatura je pretražena prema temi istraživanja, predmetu istraživanja, autorima i časopisu. Pri pretraživanju literature traženi su odgovori na specifična pitanja vezana uz problematiku ovog specijalističkog rada. Literatura je pretraživana od općih prema specijaliziranim člancima pri čemu su odabrani članci relevantni za problematiku ovoga specijalističkog rada. Na temelju proučavanih članaka izvedena su vlastita razmatranja proučavane problematike, koja su sastavni dio ovog specijalističkog rada.

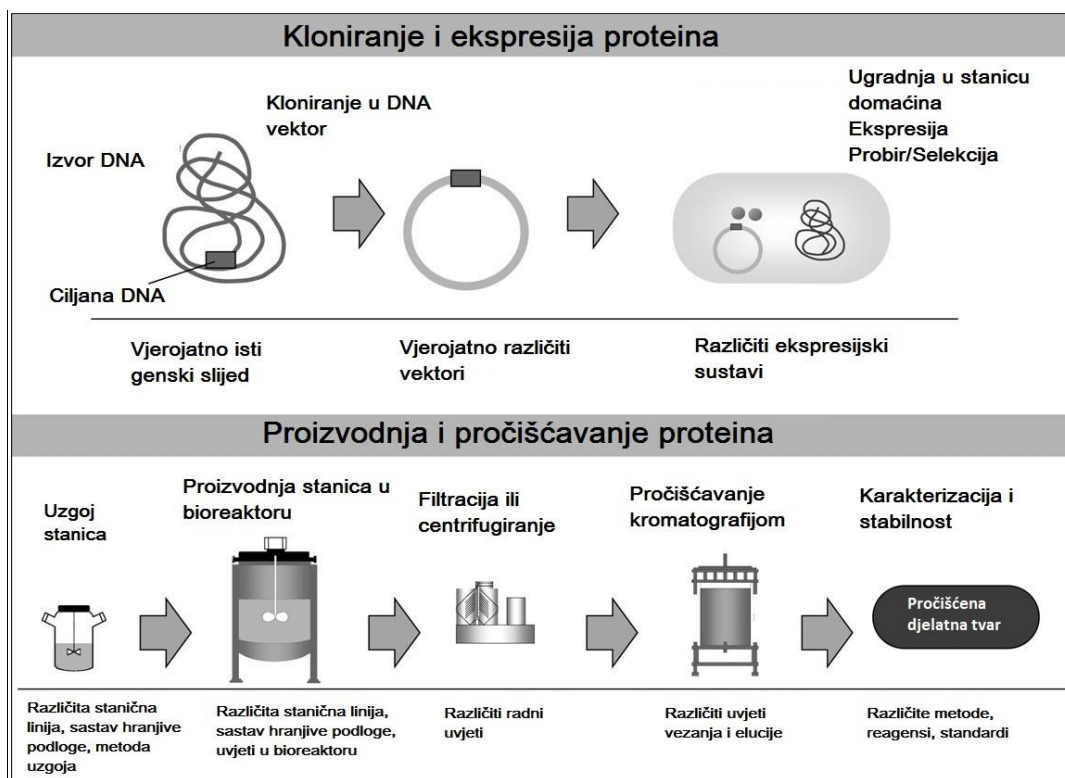
Postupci davanja odobrenja za stavljanje u promet biosličnih lijekova na području EU, uključujući zakonske osnove odobravanja, znanstvene smjernice kao i specifičnosti pojedinih skupina biosličnih lijekova, analizirani su korištenjem raspoloživih baza lijekova Agencije za lijekove i medicinske proizvode Republike Hrvatske (HALMED) i Europske agencije za lijekove (EMA). Pravni dokumenti (uredbe, direktive, zakoni, pravilnici) preuzeti su s mrežnih stranica Narodnih novina i Europske komisije. Za analizu razvojnih strategija i ekonomskih aspekata na tržištu bioloških/biosličnih lijekova korišteni su podaci s mrežnih stranica proizvođača bioloških lijekova te Instituta *IMS Health* koji provodi analize tržišta lijekova.

4. RASPRAVA

4.1. Razvoj biosličnog lijeka

Primarni je cilj razvoja biosličnog lijeka potvrditi visoki stupanj sličnosti između biosličnog i referentnog biološkog lijeka i time osigurati da su djelotvornost i sigurnost, ranije utvrđene za referentni lijek, primjenjive i na bioslični lijek. Uspješnost razvoja biosličnog lijeka ovisit će o sposobnosti dobivanja lijeka koji je sličan referentnom lijeku te uvjerljivim dokazima da su dva lijeka slične prirode, što obuhvaća opsežnu fizikalno-kemijsku i biološku karakterizaciju i usporedbu te zahtijeva specifična znanja u analitičkim postupcima i tumačenju uočenih razlika između ispitivanih lijekova (24).

Izazovi razvoja biosličnog lijeka leže u kompleksnosti strukture biološkog lijeka i vrlo ograničenim informacijama o referentnom lijeku zbog dobro zaštićenih vlasničkih podataka o proizvodnom postupku, pročišćavanju, zahtjevima kakvoće, korištenim sirovinama i formulaciji referentnog lijeka. Proizvođači biosličnog lijeka nemaju pristup bankama stanica (DNA klonovima) referentnog lijeka i moraju sami klonirati i proizvesti svoje stanične linije. Nadalje, proizvođač referentnog lijeka često tijekom životnog ciklusa lijeka uvodi promjene u proizvodnji s ciljem poboljšanja postupka, optimizacije, uvećanja mjerila, transfera proizvodnje i dr. te i sam mora dokazivati visoki stupanj sličnosti lijeka prije i nakon izmjene. To znači da se i sam referentni lijek zbog uvedenih promjena može razlikovati u nekim parametrima kakvoće tijekom svog životnog ciklusa pa je proizvođaču biosličnog lijeka još veći izazov dokazati biosličnost (31). Shema na slici 4 prikazuje koje su sve moguće razlike u proizvodnom postupku među različitim proizvođačima biološkog/biotehnološkog lijeka. Bez obzira na to što će slijediti gotovo sve korake iz proizvodnje lijeka, zbog varijabilnosti biološkog sustava nije moguće proizvesti bioslični lijek koji će biti identičan referentnom lijeku.



Slika 4. Proizvodnja rekombinantnih proteina: moguće razlike među proizvođačima (32).

Tako je, primjerice, temeljni princip razvoja biosličnog lijeka tvrtke Sandoz dokazivanje visoke sličnosti lijeka s referentnim biološkim lijekom, kakva je i sličnost referentnog lijeka prije i nakon provedenih izmjena u postupku proizvodnje (16). Bioslični lijek smatra se vrlo sličnim ako se njegova svojstva nalaze unutar prihvatljivih granica varijabilnosti referentnog lijeka nakon promjene u proizvodnji.

Razvoj biosličnog lijeka može se podijeliti u 3 osnovne faze (17):

- Faza 1: karakterizacija referentnog lijeka
- Faza 2: razvoj postupka proizvodnje biosličnog lijeka
- Faza 3: usporedna ispitivanja biosličnog i referentnog lijeka.

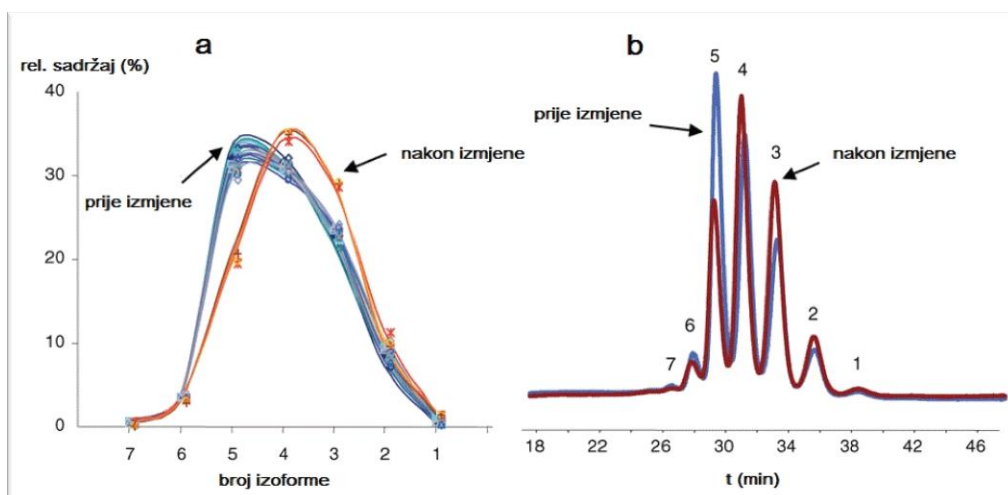
4.1.1. Karakterizacija referentnog lijeka

Prva i najkritičnija faza, detaljna analitička karakterizacija (struktura, sastav) i razumijevanje referentnog biološkog lijeka, započinje pribavljanjem što većeg broja serija referentnog lijeka s relevantnih regulatornih područja (Europski gospodarski prostor - EGP, SAD). Uzimaju se uzorci nekoliko serija lijeka proizvedenih u različitim vremenskim periodima kako bi se dobio uvid u

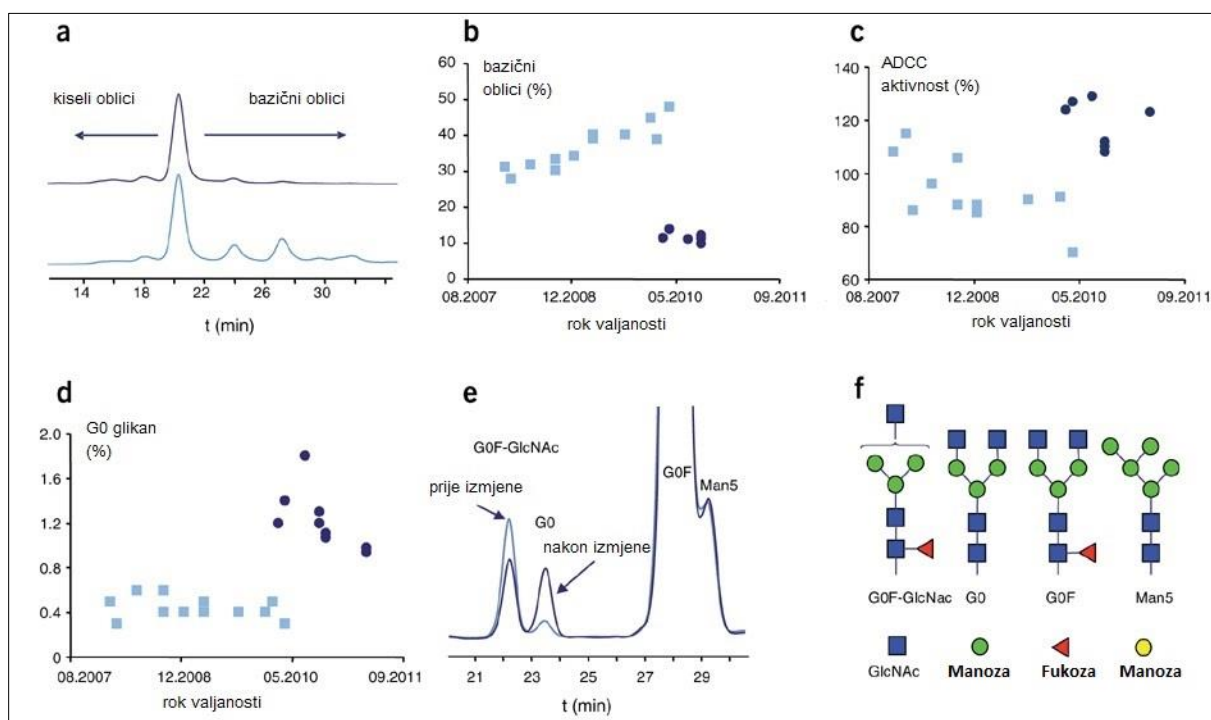
varijabilnost serija zbog mogućih promjena u proizvodnom postupku tijekom životnog ciklusa referentnog lijeka.

U ovoj fazi razvijaju se i validiraju sofisticirane (engl. *state of the art*) analitičke i biotehnološke metode (tablica 4) za detaljnu fizikalno-kemijsku karakterizaciju referentnog lijeka i provjeru kakvoće biosličnog lijeka, uključujući neke koje nisu bile dostupne u vrijeme odobravanja referentnog lijeka (17). Dobivene informacije o parametrima kakvoće (engl. *quality attributes*) koje se mijenjaju tijekom životnog ciklusa lijeka predstavljaju okvire (engl. *target range/goal posts*) unutar kojih će se razvijati bioslični lijek (16).

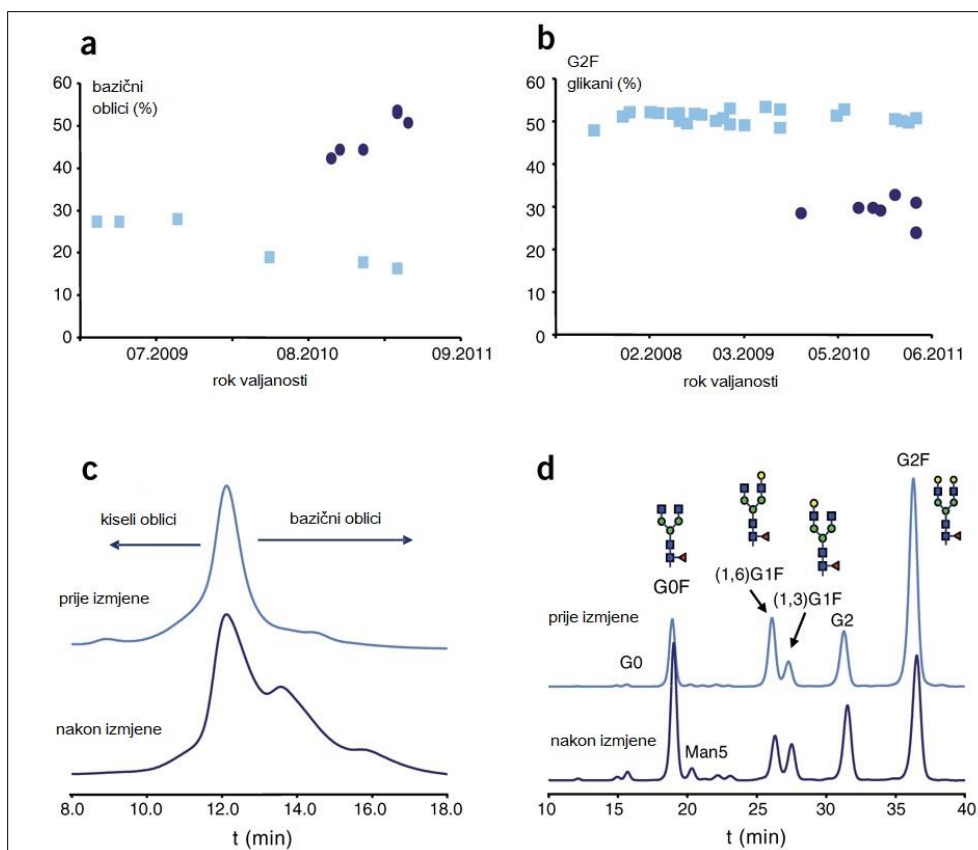
Zanimljivo je da napredne analitičke metode, koje mogu detektirati i najmanje razlike, istovremeno otkrivaju varijabilnost između serija referentnog lijeka koji se nalazi na tržištu. Tako su analizom većeg broja serija najprodavanijih bioloških lijekova, glikoziliranih terapijskih proteina Aranesp® (darbepoetin alfa), Rituxan®/Mabthera® (rituksimab) i Enbrel® (etanercept), detektirane značajne promjene u profilu glikozilacije. Na različitim serijama lijekova Rituxan® i Enbrel® uočene su promjene u C- i N- terminalnoj heterogenosti te su kod lijeka Rituxan® dokazane promjene u stanično posredovanoj citotoksičnosti ovisnoj o protutijelima (engl. *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC aktivnost) između serija (slike 5-7). No s obzirom na to da se ispitivani lijekovi nalaze neprekinuto na europskom tržištu, zaključeno je da su sve uočene promjene prihvatljive (i odobrene od strane EMA-e), a rezultat su promjena u proizvodnom postupku te da je za njih ranije predviđeno da neće utjecati na klinički profil lijeka (7). Navedeni primjeri navode na zaključak da proizvođači izvornog biološkog lijeka na neki način proizvode bioslične lijekove svojeg biološkog lijeka kroz izmjene u postupku.



Slika 5. Usporedba analize serija lijeka Aranesp® kapilarnom zonskom elektroforezom prije i nakon izmjene (7).
(a) Relativni sadržaj pojedinačnih izoformi u serijama prije (n = 18) i nakon (n = 4) izmjene;
(b) Reprezentativni elektroferogrami; pikovi su označeni brojem izoforme.



Slika 6. Usporedba analize serija lijeka Rituxan®/Mabthera® prije i nakon izmjene (7).
(a) Primjer kromatograma kationske kromatografije; (b) Sadržaj bazičnih oblika kationskom kromatografijom prije (n = 12) i nakon (n = 8) izmjene; (c) ADCC aktivnost (stanično posredovana citotoksičnost ovisna o protutijelima) prije (n = 11) i nakon (n = 8) izmjene; (d) Relativni sadržaj G0 glikana prije (n = 13) i nakon (n = 11) izmjene; (e) Primjer kromatograma mapiranja glikana; (f) legenda strukture glikana;



Slika 7. Usporedba analize serija lijeka Enbrel® prije i nakon izmjene (7).

(a) Relativni sadržaj bazičnih oblika prije (n = 6) i nakon (n = 6) izmjene, mjereno kationskom kromatografijom;

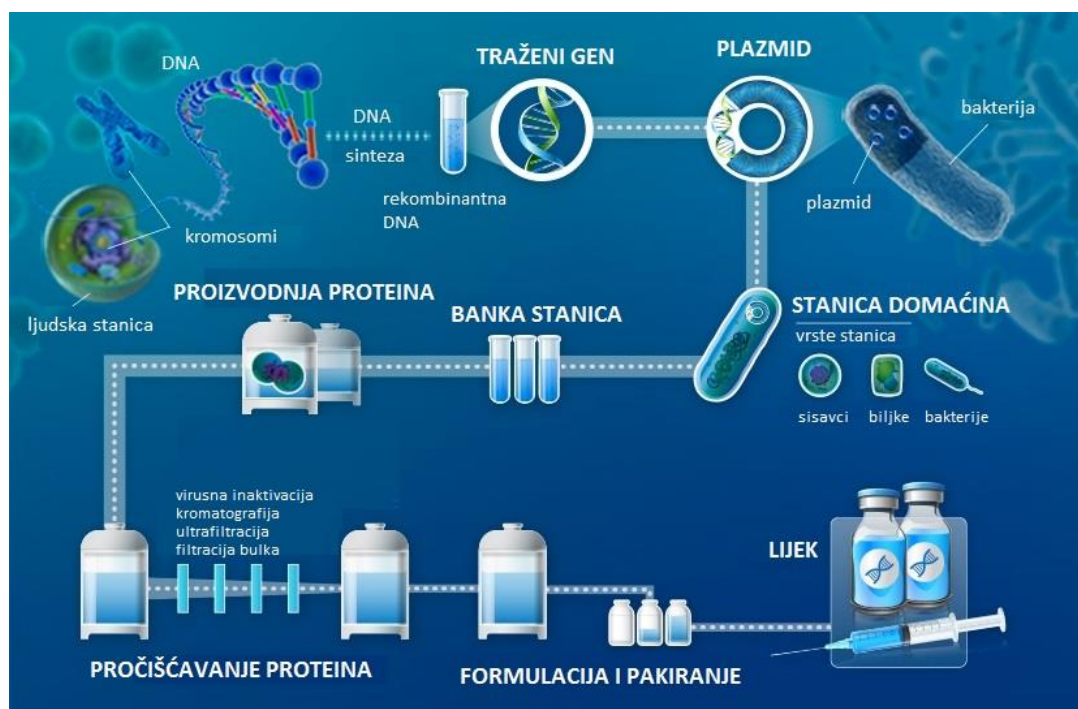
(b) Relativni sadržaj G2F glikana prije (n = 25) i nakon (n = 9) izmjene;

(c) Primjer kromatograma kationske kromatografije; (d) Primjer kromatograma za mapiranje glikana.

Prema smjernici ICH Q5E, proizvođač treba obrazložiti da promjene uočene u parametrima kakvoće lijeka neće negativno utjecati na sigurnost i djelotvornost lijeka. No, u praksi je češći slučaj da usporedna ispitivanja na razini kakvoće ne pružaju dovoljno dokaza o usporedivosti prije i poslije promjena te se traže dodatni dokazi kroz neklinička i klinička ispitivanja. Opseg i vrsta potrebnih nekliničkih i kliničkih ispitivanja određuju se od slučaja do slučaja, uzimajući u obzir različite čimbenike, poput vrste i opsega uočenih razlika u kakvoći djelatne tvari/lijeka (npr. nova onečišćenja zahtijevaju kvalifikaciju, što uključuje toksikološka ispitivanja), rezultata validacije postupka i procesne kontrole nakon provedenih promjena, kompleksnosti molekule, načina djelovanja lijeka, indikacija, režima doziranja, puta primjene lijeka, prijašnjih iskustava (nuspojave, imunogeničnost) i dr. (26).

4.1.2. Razvoj postupka proizvodnje biosličnog lijeka

Sljedeća faza obuhvaća razvoj proizvodnog postupka s ciljem dobivanja molekule visoke sličnosti s referentnim lijekom te učinkovitog i reproducibilnog vlastitog proizvodnog postupka. Primjenom najnovijih tehničkih i znanstvenih dostignuća u razvoju biotehnološkog procesa i sofisticiranih analitičkih tehnika, sustavno se razvija bioslična molekula sa svojstvima unutar ranije postavljenih okvira. Svaki dio proizvodnog postupka optimira se u ponavljajućim koracima sve dok se ne proizvede vrlo slična molekulska struktura kao ona referentnog lijeka. Složeni proizvodni postupak je, kao i kod ostalih bioloških lijekova, usko povezan uz specifični protein ("Proces je proizvod"), a najčešće obuhvaća uzgoj stanica, proizvodnju u bioreaktoru, izolaciju i pročišćavanje proteina te formulaciju i pakiranje lijeka (slika 8).



Slika 8. Shematski prikaz uobičajenog postupka proizvodnje biosličnog lijeka (33).

U ovoj se fazi istovremeno provode inicijalna usporedna ispitivanja referentnog i biosličnog lijeka. Ako se detektiraju značajne razlike, nastavlja se s optimiranjem postupka. Dobivanje molekule visoke sličnosti dio je razvoja koji traje značajno dulje od razvoja novog biološkog lijeka (16).

Kao i kod ostalih bioloških lijekova, bioslični lijek definira molekulski sastav njegove djelatne tvari koja zbog specifičnosti vlastitog proizvodnog postupka može sadržavati različite molekulske oblike poput

izoformi, srodnih spojeva i procesnih onečišćenja. Stoga je, za postizanje zadanih okvira unutar kojih će se razvijati bioslični lijek, važno da proizvodni postupak bude prikladno dizajniran. Ekspresijski sustav treba biti pomno odabran, uzimajući u obzir da razlike u ekspresijskim sustavima mogu dovesti do neželjenih posljedica, npr. netipične glikozilacije, veće varijabilnosti ili različitog profila onečišćenja u odnosu na referentni lijek (34).

Formulacija biosličnog lijeka može biti različita od referentnog lijeka te je potrebno dokazati prikladnost predložene formulacije s obzirom na stabilnost, kompatibilnost (interakcije djelatne tvari s pomoćnim tvarima, otapalima, primarnim spremnikom), aktivnost i jačinu djelatne tvari. Odabir različite formulacije i/ili primarnog spremnika u odnosu na referentni lijek potrebno je obrazložiti s obzirom na mogući utjecaj na djelotvornost i sigurnost primjene lijeka. Serije lijeka proizvedene optimiranim postupkom u industrijskom mjerilu koriste se za usporedna neklinička i klinička ispitivanja.

Suvremeni i inovativni razvoj postupka proizvodnje biosličnog lijeka doveo je i do razvoja novih pristupa u proizvodnim procesima. Klasični proizvodni pogoni koji se sastoje od nefleksibilnih sustava cijevi i velikih bioreaktora i tankova za međuprodukte i pufere od nehrđajućeg čelika u posljednje vrijeme se zamjenjuju sustavima za jednokratnu upotrebu, kako u razvoju biosličnih lijekova tako i u razvoju novih bioloških lijekova (35). Takvi sustavi smanjuju troškove izgradnje i opremanja novih postrojenja, rizik od unakrsnih kontaminacija u pogonima za proizvodnju više proizvoda, komunalne troškove zbog smanjene potrebe za sterilizaciju parom (engl. *Steam-in-place*, SIP), potrebu za provođenje validacije čišćenja te omogućuju brzo prebacivanje iz faza proizvodnje. Istraživanja su pokazala da hibridni proizvodni pogon sa značajnim udjelom ugrađene tehnologije za jednokratnu upotrebu smanjuje kapitalne troškove za 40 % u usporedbi s klasičnim postrojenjem od nehrđajućeg čelika. Stoga bi takva višenamjenska postrojenja mogla poboljšati razvoj biosličnog lijeka.

Još jedan moderni i znanstveno utemeljen pristup u razvoju biosličnog lijeka, koji primjenjuju i proizvođači inovativnih bioloških lijekova, temelji se na konceptu kakvoće kroz dizajn (engl. *Quality by Design*, QbD) kojim se osigurava kakvoća lijeka primjenom statističkih i analitičkih metodologija

(engl. *Process analytical technology*, PAT; engl. *Design of Experiments*, DoE) te upravljanjem rizika tijekom dizajniranja, razvoja i proizvodnje lijeka. Cilj QbD koncepta je dobrim poznavanjem proizvoda i postupka proizvodnje osigurati da se svaka potencijalna varijabilnost identificira, obrazloži i njome upravlja prikladnim mjerama, čime se postiže dosljedna kakvoća lijeka i kontrola procesa od samog početka razvoja (21). QbD se sastoji od definiranja profila kakvoće ciljanog proizvoda (engl. *quality target product profile*, QTPP), utvrđivanja kritičnih parametara kakvoće (engl. *critical quality attributes*, QCAs) proizvodnog postupka i lijeka, utvrđivanja operativnih raspona tih parametara unutar kojih se dosljedno postiže prihvatljivo iskorištenje postupka/proizvoda te definiranja prostora za dizajn (engl. *design space*, DS), odnosno proizvodnog područja unutar kojeg je osigurano postizanje QCA. Sve promjene unutar prostora za dizajn smatraju se prihvatljivim i mogu se implementirati bez prijave izmjena regulatornim tijelima (35).

QbD koncept pojašnjen je u tripartitnim smjernicama o farmaceutskom razvoju (*ICH guideline Q8 (R2) on pharmaceutical development*), upravljanju rizicima (*ICH guideline Q9 on quality risk management*), sustavima kakvoće (*ICH guideline Q10 on pharmaceutical quality system*) te razvoju i proizvodnji djelatne tvari (*ICH guideline Q11 on development and manufacture of drug substances (chemical entities and biotechnological/ biological entities)*).

Primjena QbD koncepta u proizvodnji kompleksnih bioloških/biosličnih lijekova ima mnoge prednosti kao što su dobro poznavanje karakteristika staničnih kultura, skraćeno vrijeme prijenosa u proizvodno mjerilo (engl. *scale up*) i smanjenje količine proizvodnih pogrešaka. Konačno, QbD osigurava homogenost procesa i postizanje visokih standarda kakvoće lijeka. Iako su za implementaciju QbD-a u sustav potrebna velika financijska ulaganja na početku razvoja, nakon što biološki postupak proizvodnje započne s radom puno je lakše uvoditi male promjene u postupak na temelju prethodno skupljenih saznanja o procesu. Konačni rezultat je ušteda na vremenu, postizanje visokog stupnja kakvoće lijeka i, posljedično, poboljšana djelotvornost i sigurnost primjene lijeka (35).

4.1.3. Usporedna ispitivanja biosličnog i referentnog lijeka

Nakon što se optimiranim postupkom proizvedu dovoljne količine biosličnog lijeka, započinju detaljna usporedna ispitivanja biosličnog i referentnog lijeka koja se temelje na znanstveno-regulatornom principu usporedivosti (engl. *Comparability exercise*), a s ciljem dokazivanja visokog stupnja sličnosti biosličnog i referentnog biološkog lijeka. Usporedna ispitivanja provode se stupnjevitim pristupom (engl. *stepwise*) u tri osnovna koraka:

- Usporedna ispitivanja kakvoće
- Usporedna neklinička ispitivanja
- Usporedna klinička ispitivanja.

Nakon provedene opsežne fizikalno-kemijske i biološke karakterizacije, opseg i vrsta potrebnih *in vivo* nekliničkih i kliničkih ispitivanja ovisiti će o jačini dokaza u prethodnom koraku i robusnosti fizikalno-kemijskih, bioloških i *in vitro* nekliničkih podataka (36). Princip usporedivosti ne podrazumijeva da dva lijeka budu identična već da se dokaže kako uočene razlike u parametrima kakvoće neće negativno utjecati na djelotvornost i sigurnost lijeka. Dokazivanje biosličnosti prema navedenom principu usporedivosti temelj je razvoja biosličnog lijeka, davanja odobrenja za stavljanje lijeka u promet i stjecanja povjerenja zdravstvenih djelatnika (37). Prema krovnoj smjernici za bioslične lijekove, djelatna tvar biosličnog lijeka mora biti slična djelatnoj tvari referentnog lijeka na molekulskoj i biološkoj razini. Režim doziranja i put primjene biosličnog lijeka moraju biti jednaki referentnom lijeku. Moguće razlike u jačini, farmaceutskom obliku, formulaciji i pomoćnim tvarima s referentnim lijekom moraju biti obrazložene i ne smiju ugrožavati sigurnost lijeka. Ako se usporednim ispitivanjem ne dokaže sličnost biosličnog lijeka s referentnim lijekom ili se pak dokažu bolja svojstva biosličnog lijeka od referentnog lijeka (tzv. *biobetters* lijekovi), nositelj odobrenja može razmotriti samostalni razvoj lijeka za davanje odobrenja na temelju potpune dokumentacije o kakvoći, nekliničkim i kliničkim ispitivanjima, u skladu s Člankom 8(3) Direktive 2001/83/EZ (36).

4.1.3.1. Usporedna ispitivanja kakvoće

Usporedna ispitivanja na razini kakvoće obuhvaćaju usporedbu fizikalno-kemijskih i bioloških svojstava biosličnog i referentnog lijeka korištenjem niza sofisticiranih i ortogonalnih analitičkih metoda koje mogu detektirati male razlike između dva lijeka, kako bi se dokazalo da bioslični i referentni lijek imaju vrlo slične profile kakvoće. Odgovornost je podnositelja zahtjeva dokazati da su korištene metode dovoljno osjetljive da detektiraju male razlike u svim aspektima kakvoće (npr. detekcija izoformi proteina). Ne očekuje se da ispitivani parametri biosličnog lijeka budu jednaki referentnom lijeku, no svaku uočenu kvalitativnu i/ili kvantitativnu razliku potrebno je obrazložiti i, gdje je to bitno, dokazati da neće imati negativni utjecaj na djelotvornost i sigurnost lijeka, što uključuje dodatne nekliničke i kliničke podatke. Posebnu pozornost potrebno je obratiti na razlike u parametrima kakvoće koji mogu utjecati na imunogeničnost ili biološku aktivnost lijeka.

a) Fizikalno-kemijska ispitivanja

Fizikalno-kemijska karakterizacija obuhvaća određivanje sastava, fizikalno-kemijskih svojstava i strukture djelatne tvari prikladnim analitičkim metodama. Strukturnom karakterizacijom potvrđuju se slijed i sastav aminokiselina biosličnog i referentnog lijeka uz usporedbu N- i C-terminalnog slijeda aminokiselina, slobodnih tiolnih skupina i disulfidnih mostova te peptidnog mapiranja. S obzirom na heterogenost proteina dobivenih iz živih sustava, također se ispituje prisutnost i učestalost posttranslacijskih modifikacija (npr. glikozilacija) te, ako postoje, potrebno je detaljno usporediti ugljikohidratne strukture (neutralni šećeri, aminošećeri, sijalična kiselina, struktura ugljikohidratnih lanaca, oligosaharidi, profil glikana, mjesto glikozilacije). Uočene modifikacije u strukturi potrebno je kvantificirati te opisati i obrazložiti uočene varijabilnosti povezane s ekspresijskim sustavom (14).

Usporedno ispitivanje fizikalno-kemijskih svojstava sastoji se od određivanja molekulskih masa i veličine molekula (kromatografija isključenjem-SEC; SDS elektroforeza u poliakrilamidnom gelu-SDS PAGE; masena spektrometrija-MS), profila izoformi (izoelektrično fokusiranje-IEF), molarnog apsorpcijskog ekstinkcijskog koeficijenta i ukupnih proteina (UV/vis spektrofotometrija na 280 nm), elektroforetskih profila (SDS PAGE; IEF; *Western Blot*-WB; kapilarna elektroforeza-CE),

kromatografskih profila za identifikaciju, homogenost i čistoću (kromatografija isključenjem-SEC; kromatografija obrnutih faza-RP HPLC; ionsko-izmjenjivačka kromatografija-IEC; afinitetna kromatografija-AC) te spektroskopskih profila za strukture višeg reda (UV/vis; nuklearna magnetska rezonanca-NMR; cirkularni dikroizam-CD) (16).

b) Biološka aktivnost

Biološka aktivnost je specifična sposobnost ili svojstvo proizvoda da postigne definirani biološki učinak, a određuje se biološkim testovima (engl. *biological assay*). Biološki testovi koji se koriste za mjerenje biološke aktivnosti obuhvaćaju testove sa životinjama koji mjere biološku reakciju organizma na lijek, testove sa staničnim kulturama koji mjere biokemijski ili fiziološki odgovor na staničnoj razini, biokemijske testove koji mjere biološku aktivnost kroz brzinu enzimske reakcije ili biološki odgovor induciran imunim interakcijama te testove koji se temelje na vezanju liganda i receptora. Potentnost (izražena u jedinicama aktivnosti kalibriranim s referentnim standardom) je kvantitativna mjera biološke aktivnosti temeljena na svojstvu proteina koje je povezano sa značajnim biološkim karakteristikama dok je količina (izražena kao masa) fizikalno-kemijska mjera sadržaja proteina (14).

Preporučuje se korištenje više testova s ortogonalnim ili komplementarnim principima rada, ovisno o biološkim svojstvima lijeka, npr. test vezanja liganda ili receptora, enzimski testovi, testovi na stanicama, funkcionalni testovi i dr., kako bi se prevladala ograničenja pojedinog testa. Potrebno je dokazati da su korišteni biološki testovi osjetljivi, specifični i diskriminatorni te usklađeni sa zahtjevima Europske farmakopeje za biološke testove.

c) Imunokemijska ispitivanja

Usporednu imunokemijsku karakterizaciju lijekova koji sadrže monoklonska protutijela detaljnije opisuje smjernica *Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies – non-clinical and clinical issues*, koja navodi da je potrebno u potpunosti usporediti imunološku funkciju monoklonskih protutijela i srodnih spojeva (fuzijski proteini), što uključuje

usporedbu afiniteta za ciljano mjesto (metu), afiniteta vezanja Fc na receptore (FcγR, C1q, FcRn) i sposobnosti induciranja Fab- i Fc-povezanih funkcija (14).

d) Čistoća i onečišćenja

Potrebno je provesti kvantitativnu i kvalitativnu usporedbu čistoće i profila onečišćenja biosličnog i referentnog lijeka kombinacijom prikladnih ortogonalnih sofisticiranih analitičkih metoda, uzimajući u obzir specifičnosti poput putova razgradnje djelatne tvari (oksidacija, deamidacija, agregacija) i mogućih posttranslacijskih modifikacija proteina. Kao podupiruća ispitivanja provodi se i usporedba parametara kakvoće u ispitivanju stabilnosti u stresnim i ubrzanim uvjetima kako bi se dobila bolja slika o razgradnji djelatne tvari, odnosno o sličnosti profila razgradnih produkata djelatne tvari. Onečišćenja koja potječu iz djelatne tvari (engl. *product-related impurities*) kao što su prekursori ili razgradni produkti (agregati, izoforme, deamidirani, oksidirani i glikozilirani oblici) molekulske su varijante djelatne tvari koje nastaju tijekom proizvodnje i/ili čuvanja i moraju biti slične referentnom lijeku. S druge strane, procesna onečišćenja (engl. *process-related impurities*) kao što su ostatni proteini stanica domaćina (engl. *Host Cell Proteins*, HCP), stanična DNA, sastojci hranjive podloge (serum, antibiotici), onečišćenja iz postupka pročišćavanja (puferi, otapala, reagensi, kromatografska punila) kvalitativno će se razlikovati od postupka do postupka te njihova usporeba nije značajna za dokaz biosličnosti. No preporučljivo ih je ukloniti pročišćavanjem ili ih temeljito karakterizirati i obrazložiti mogući rizik prisutnosti takvih onečišćenja na, primjerice, imunogeničnost lijeka. Sadržaj onečišćenja, kao i sadržaj djelatnih tvari, najčešće se ispituju tehnikama kao što su HPLC, SEC, CE, MS i CD (14).

4.1.3.2. Usporedna ispitivanja na razini nekliničkih i kliničkih ispitivanja

Nakon što se potvrdi usporedivost biosličnog lijeka s referentnim lijekom na razini kakvoće, utvrđuje se opseg reduciranih nekliničkih i kliničkih ispitivanja potrebnih za konačnu potvrdu biosličnosti i to najčešće na temelju znanstvenog savjeta s regulatornim tijelima. Pritom je potrebno naglasiti da cilj usporednih ispitivanja koja slijede nije ponovno dokazivanje sigurnosti i djelotvornosti *per se*, jer ih je

ranije dokazao proizvođač referentnog lijeka, već potvrda sličnosti s referentnim lijekom na razini sigurnosti i djelotvornosti lijeka (38).

Na vrstu i opseg potrebnih (ne)kliničkih ispitivanja za potvrdu biosličnosti utjecati će karakteristike i kompleksnost referentnog lijeka, odnosno uočene razlike u usporedbi kakvoće biosličnog i referentnog lijeka, mehanizam djelovanja djelatne tvari u odobrenim indikacijama referentnog lijeka, patomehanizmi poremećaja uključenih u indikacije te imunogeničnost referentnog lijeka (39). S obzirom na specifičnosti skupina biosličnih lijekova, dizajn potrebnih nekliničkih i kliničkih ispitivanja, kao i pristup ocjeni dostavljenih podataka, provode se po principu od slučaja do slučaja (engl. *case by case*).

4.1.3.2.1. Neklinička ispitivanja

Kao i kod ostalih bioloških lijekova, prije početka kliničkih ispitivanja na ljudima, potrebno je provesti neklinička ispitivanja. Kod biosličnih lijekova provodi se skraćeni program *in vitro* i *in vivo* ispitivanja koja najčešće uključuju ispitivanje toksičnosti ponovljenih doza, ispitivanja PK (engl. *pharmacokinetic*)/PD (engl. *pharmacodynamic*) na životinjskim modelima te ispitivanje lokalne podnošljivosti. Cilj je ispitivanja dodatna potvrda usporedivosti biosličnog i referentnog lijeka ili uočavanje potencijalnih razlika između njih. Za dizajn ispitivanja koristi se stupnjeviti pristup – prvo se provode *in vitro* ispitivanja nakon čega se donosi odluka jesu li i u kojem opsegu potrebna *in vivo* ispitivanja na životinjama (17).

a) *In vitro* ispitivanja

In vitro ispitivanja provode se s ciljem detekcije razlika u biološkoj aktivnosti referentnog i biosličnog lijeka, s time da se jedan dio *in vitro* usporedbe biološke aktivnosti provodi još u fazi usporedivosti kakvoće. Najčešće se provode ispitivanja vezanja na ciljno mjesto (receptori, antigeni, enzimi) te stanični testovi (funkcionalna aktivnost/vijabilnost stanica) za koje je poznato da su značajni za farmako-toksikološki učinak referentnog lijeka. Takva ispitivanja trebaju biti usporedna i trebaju pokazati odnos koncentracije i aktivnosti/vezanja između referentnog i biosličnog lijeka te pokriti široki spektar farmakoloških i toksikoloških svojstava koja su značajna za referentni lijek i skupinu

lijekova kojoj pripada. U slučaju da se već u toj ranoj fazi pokažu značajne razlike između referentnog i biosličnog lijeka i nije moguće dokazati biosličnost, treba uzeti u obzir zasebni razvoj i predaju zahtjeva za davanje odobrenja na temelju potpune dokumentacije (39).

b) *In vivo* ispitivanja

Poznato je da biotehnološki lijekovi mogu izazvati *in vivo* učinke koji se ne mogu u potpunosti razjasniti u *in vitro* ispitivanjima te je često potrebno podatke dopuniti *in vivo* ispitivanjima. Faktori koje treba uzeti u obzir kod razmatranja potrebnih *in vivo* ispitivanja obuhvaćaju prisutnost značajnih parametara kakvoće koji nisu uočeni kod referentnog lijeka (npr. nove posttranslacijske strukture), značajne kvantitativne razlike u parametrima kakvoće između referentnog i biosličnog lijeka te značajne razlike u formulaciji lijeka (korištenje pomoćnih tvari koje nisu uobičajene za biotehnološke lijekove). Također, ako se usporedna ispitivanja u *in vitro* uvjetima pokažu zadovoljavajućima (nisu identificirani faktori koji bi sprečavali direktnu primjenu lijeka kod ljudi), ispitivanja na životinjama nisu nužna. Ako faktori svojstveni lijeku koji utječu na farmakodinamiku poput glikozilacije, ne mogu biti dovoljno karakterizirani u *in vitro* uvjetima, potrebno je provoditi *in vivo* ispitivanja, odnosno proizvođač mora procijeniti hoće li se potrebna ispitivanja provoditi na životinjama ili na zdravim dobrovoljcima kao dio kliničkog ispitivanja, što će ovisiti o dostupnosti životinjskih modela (39).

U članku koji su nedavno objavili članovi EMA-ine radne skupine za bioslične lijekove (BMWP), iznosi se novo regulatorno stajalište o provođenju nekliničkih ispitivanja bez korištenja životinjskih modela. Argumenti se oslanjaju na nedostatak novih robusnih informacija koje mogu proistjeći iz ispitivanja na životinjama, uz ranije dobivene podatke fizikalno-kemijske karakterizacije i bioloških *in vitro* ispitivanja. Autori predlažu promjenu u paradigmi koja će se temeljiti na činjenici da su testovi na životinjama nedovoljno osjetljivi i nisu prikladni za detekciju malih razlika između biosličnog i referentnog lijeka (40).

Ako su *in vivo* ispitivanja potrebna, dizajn ispitivanja (PK i/ili PD i/ili sigurnost) ovisit će o količini potrebnih podataka, uzevši u obzir 3R princip (engl. *replacement, refinement, reduction*). PK i PD biosličnog i referentnog lijeka potrebno je kvantitativno usporediti, uključujući odnos između

koncentracija i odziva koji pokriva raspon terapijske doze kod ljudi. Ispitivanja koja se odnose na farmakologiju, reproduktivnu toksičnost i kancerogeničnost nisu potrebna u nekliničkim ispitivanjima, kao ni ispitivanje lokalne podnošljivosti, osim ako se uvode neuobičajene pomoćne tvari o kojima ima malo iskustva vezano uz njihov put primjene (40).

4.1.3.2.2. Klinička ispitivanja

Klinička ispitivanja provode se u manjem opsegu u odnosu na ispitivanja za novu djelatnu tvar, zbog sakupljenog kliničkog iskustva i podataka za referentni lijek tijekom godina primjene. U kojoj mjeri će kliničko ispitivanje biti skraćeno u odnosu na referentni lijek, ovisi o ranije provedenom ispitivanju usporedivosti na razini kakvoće i nekliničkih ispitivanja. Što je sličniji profil biosličnog i referentnog lijeka dokazan usporedbom parametara kakvoće i nekliničkih parametara, to će skraćeniji program kliničkog ispitivanja biti prihvaćen od strane EMA-e. Skraćenim programom izbjegavaju se nepotrebna ispitivanja na ljudima koja značajno povećavaju troškove razvoja lijeka. Za klinička ispitivanja koriste se reprezentativne serije lijeka dobivene konačnim proizvodnim postupkom koje predstavljaju profil kakvoće lijeka koji će se stavljati u promet. Usporedna klinička ispitivanja također su stupnjeviti proces koji započinje s PK ispitivanjima i, ako je moguće, PD ispitivanjima nakon čega slijedi ispitivanje kliničke djelotvornosti i sigurnosti te, u nekim slučajevima, potvrдна PK/PD ispitivanja za dokaz kliničke usporedivosti.

a) Farmakokinetička ispitivanja

Usporedna PK ispitivanja za dokaz sličnosti PK profila biosličnog i referentnog lijeka, s naglaskom na ključne PK parametre, temeljni su dio kliničkog razvoja biosličnog lijeka. Dizajn ispitivanja ovisi o različitim faktorima kao što su klinički kontekst, sigurnost, PK karakteristike referentnog lijeka i dr. Prije provođenja usporednog ispitivanja potrebno je postaviti i obrazložiti granice za glavne PK parametre (npr. AUC, C_{max} , t_{max}). Preporučuje se ukriženi dizajn kliničkog ispitivanja nakon primjene jedne doze (engl. *single dose cross-over*) ispitivanja s potpunom karakterizacijom PK profila, uključujući fazu eliminacije na zdravim dobrovoljcima ili, ako nije moguće, na bolesnicima kao dio kliničkog ispitivanja nakon višekratne primjene (engl. *multiple dose*).

b) Farmakodinamička ispitivanja

Preporučuje se korištenje PD markera gdje god je to moguće u PK ispitivanjima, a odabir se temelji na njihovu značaju za klinički ishod. U nekim su situacijama usporedna PK/PD ispitivanja dovoljna za dokaz kliničke usporedivosti biosličnog i referentnog lijeka, pod uvjetom da je odabrani PD marker/biomarker prihvatljivi surogat marker, npr. apsolutni broj neutrofila za praćenje učinka G-CSF-a ili ako postoje PD markeri koji nisu surogat markeri za djelotvornost, ali su relevantni za farmakološko djelovanje djelatne tvari. U nekim je slučajevima moguće izuzeće od potvrdnih kliničkih ispitivanja – ako fizikalno-kemijska, strukturna i *in vitro* biološka karakterizacija kao i PK ispitivanja na ljudima u kombinaciji s PD markerima koji odražavaju farmakološko djelovanje i koncentraciju djelatne tvari, pružaju robustan dokaz usporedivosti biosličnog i referentnog lijeka.

c) Ispitivanje djelotvornosti

Usporedno ispitivanje djelotvornosti ne provodi se s ciljem dokaza djelotvornosti lijeka jer je to već napravljeno s referentnim lijekom. Svrha je pokazati postoji li klinički značajna razlika između referentnog i biosličnog lijeka. U nedostatku surogat markera za djelotvornost, najčešće je potrebno dokazati usporedivu kliničku djelotvornost biosličnog i referentnog lijeka u randomiziranom kliničkom ispitivanju u paralelnim skupinama, po mogućnosti dvostruko slijepog dizajna, korištenjem ishoda djelotvornosti (engl. *efficacy endpoints*). Ispitivana skupina treba biti reprezentativna za odobrenu indikaciju referentnog lijeka i dovoljno osjetljiva da detektira potencijalne razlike između ispitivanih lijekova (39). Nije nužno koristiti iste primarne ishode djelotvornosti koji su korišteni kod referentnog lijeka no preporučuje se uključiti neke uobičajene mjere ishoda (sekundarne) kako bi se olakšala usporedba s kliničkim ispitivanjem provedenim na referentnom lijeku. Granice za kliničku usporedivost trebale bi biti definirane i obrazložene na statističkim i kliničkim temeljima te korištenjem podataka o referentnom lijeku.

d) Ispitivanje sigurnosti

Ispituje se tijekom početnih PK/PD ispitivanja te kao dio pivotalnog kliničkog usporednog ispitivanja. Usporedni podaci o sigurnosti uglavnom se prikupljaju prije davanja odobrenja, a njihova količina ovisi o vrsti i ozbiljnosti sigurnosnih pitanja povezanih s referentnim lijekom. Važna je usporedba vrste, ozbiljnosti i učestalosti nuspojava između biosličnog i referentnog lijeka, posebno onih koje su navedene u Sažetku opisa svojstava referentnog lijeka. U dokumentaciji je potrebno dostaviti procjenu rizika „predviđenih“ za bioslični lijek, što obuhvaća opis mogućih sigurnosnih pitanja vezanih uz reakcije povezane s infuzijom lijeka (engl. *infusion-related reactions*) i imunogeničnosti koje mogu rezultirati iz proizvodnog postupka različitog od onog za referentni lijek. Potencijalna imunogeničnost uvijek mora biti ispitana kao usporedba s referentnim lijekom te će biti ovisna o specifičnoj skupini lijekova. Usporedno se mjeri imuni odgovor (pojava antitijela i titar antitijela) na lijek kojeg je primio bolesnik. Veća imunogeničnost u usporedbi s referentnim lijekom stavlja u pitanje omjer koristi i rizik te biosličnost dok manja imunogeničnost neće spriječiti odobravanje biosličnog lijeka (39).

e) Ekstrapolacija indikacija

Ako se u usporednim kliničkim ispitivanjima dokaže biosličnost na jednoj indikaciji, moguća je ekstrapolacija kliničkih podataka o sigurnosti i djelotvornosti na druge odobrene indikacije referentnog lijeka, uz znanstveno obrazloženje i prethodni dokaz biosličnosti na razini fizikalno-kemijske i strukturne analize te *in vitro* testova dopunjenih kliničkim podacima za jednu terapijsku indikaciju (39). Jedan od razloga otpora mnogih liječnika propisivanju biosličnih lijekova upravo je mogućnost ekstrapolacije indikacija bez provođenja kliničkih ispitivanja.

4.1.4. Regulatorne smjernice za bioslične lijekove

S utemeljenjem zakonske osnove za bioslične lijekove 2004. godine, EMA s Povjerenstvom CHMP i radnim skupinama BWP i BMWP te suradnjom i savjetovanjem s nacionalnim regulatornim tijelima, Radnom skupinom za znanstveni savjet (engl. *Scientific advice working party*, SWP), industrijom, liječnicima i skupinama bolesnika objavljuje specifične smjernice (engl. *guidelines*) koje obuhvaćaju područje razvoja, proizvodnje, ispitivanja i odobravanja bioloških/biotehnoloških i biosličnih lijekova (17).

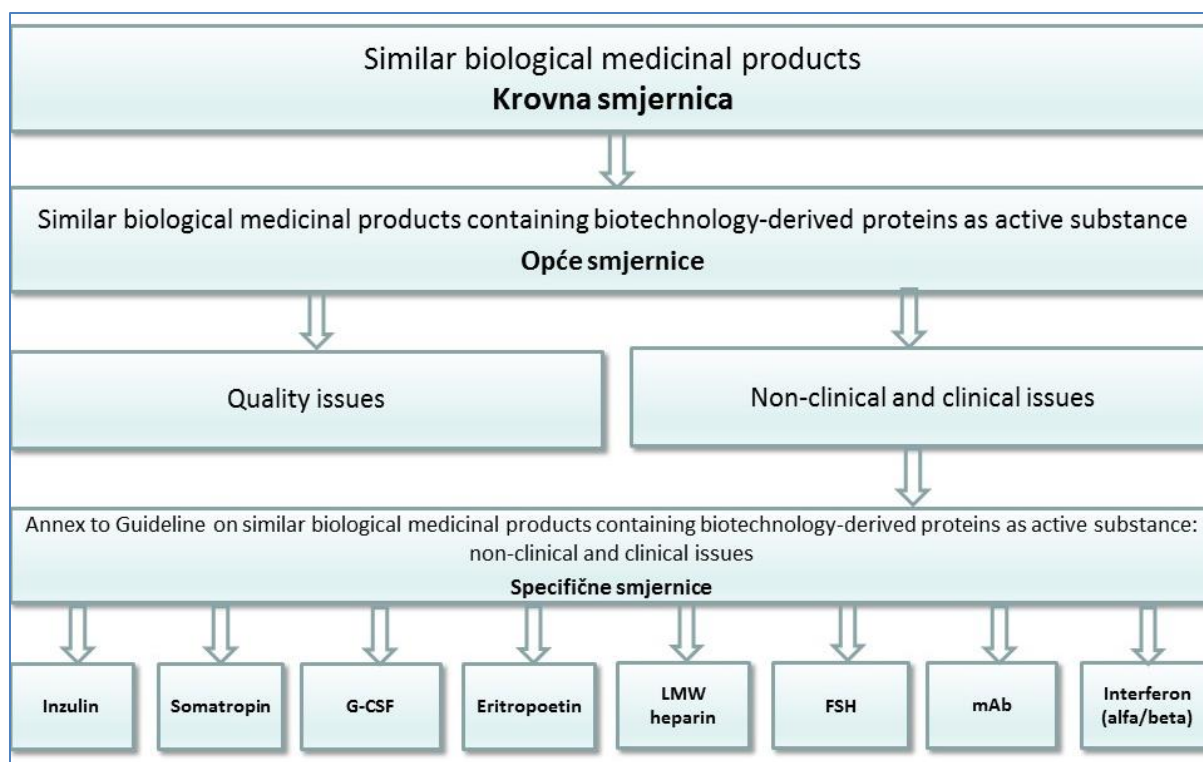
S obzirom na to da se područje biosličnih lijekova vrlo brzo znanstveno i tehnološki razvija te je sakupljeno višegodišnje iskustvo u odobravanju biosličnih lijekova i njihovu praćenju u primjeni, navedene smjernice se često i redovito revidiraju/obnavljaju kako bi njihov sadržaj bio u toku s najnovijim znanstvenim i regulatornim dostignućima. Smjernice se objavljuju na EMA-inim mrežnim stranicama, a namijenjene su proizvođačima biosličnih lijekova za lakše snalaženje u regulatornim principima za razvoj i odobravanje biosličnih lijekova.

Krovna smjernica (engl. *Overarching guideline*) navodi opće informacije o zakonskoj osnovi za davanje odobrenja za bioslični lijek i pojašnjava princip usporedivosti za dokaz biosličnosti, opće smjernice (engl. *General guidelines*) zasebno navode podatke potrebne za usporedna ispitivanja kakvoće te neklinička i klinička usporedna ispitivanja dok su specifične smjernice (engl. *Product specific guidelines*) izdane zasebno po skupinama biosličnih lijekova i navode detaljnije zahtjeve za neklinička i klinička usporedna ispitivanja ovisno o specifičnostima pojedinih skupina terapijskih proteina (tablica 8, slika 9).

Tablica 8. Smjernice EMA-e za bioslične lijekove.

Naziv smjernice	Oznaka	Izdana (PD) Na snazi (ED)
Krovna smjernica		
Similar biological medicinal products	CHMP/437/04 Rev. 1	PD Listopad 2014. ED 30. travnja 2015.
Opće smjernice		
Similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues	EMA/CHMP/BWP/247713/2012	PD Lipanj 2014. ED 1. prosinca 2014.
Similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues	EMA/CHMP/BMWP/42832/2005 Rev. 1	PD Siječanj 2015. ED Srpanj 2015.
Specifične smjernice		
Annex to Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues, Guidance on similar medicinal products containing recombinant granulocyte-colony stimulating factor*	EMA/CHMP/BMWP/31329/2005	PD Veljača 2006. ED Lipanj 2006.
Annex to Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues guidance on similar medicinal products containing Somatropin	EMA/CHMP/BMWP/94528/2005	PD Veljača 2006. ED Lipanj 2006.
Similar biological medicinal products containing recombinant follicle-stimulating hormone	CHMP/BMWP/671292/2010	PD Ožujak 2013. ED 1. rujna 2013.
Similar biological medicinal products containing recombinant erythropoietins	EMA/CHMP/BMWP/301636/08	PD Travanj 2010. ED 30. rujna 2010.
Similar biological medicinal products containing interferon beta	CHMP/BMWP/652000/2010	PD Ožujak 2013. ED 1. rujna 2013.
Similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies: non-clinical and clinical issues	EMA/CHMP/BMWP/403543/2010	PD Lipanj 2012. ED 1. prosinca 2012.
Similar biological medicinal products containing low-molecular-weight heparins*	EMA/CHMP/BMWP/118264/2007	PD Travanj 2009. ED Listopad 2009.
Non-clinical and clinical development of similar medicinal products containing recombinant interferon alpha*	EMA/CHMP/BMWP/102046/2006	PD Lipanj 2009. ED Travanj 2009.
Revision of the guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant human insulin and insulin analogues	EMA/CHMP/BMWP/32775/2005 Rev. 1	PD Ožujak 2015. ED Rujan 2015.

PD – datum izdavanja; ED – datum stupanja na snagu; *smjernica je trenutačno u reviziji



Slika 9. Shematski prikaz smjernica EMA-e za bioslične lijekove.

G-CSF (faktor stimulacije rasta kolonija granulocita); LMW heparin (heparin niske molekulske mase); FSH (folikulostimulirajući hormon); mAb (monoklonsko protutijelo);

4.1.4.1. Krovna smjernica za bioslične lijekove

Krovna smjernica za bioslične lijekove objavljena je 2005., ubrzo nakon uspostavljanja zakonske osnove za davanje odobrenja za bioslični lijek. S obzirom na to da je od izdavanja prve verzije smjernice prikupljeno dosta iskustva i novih saznanja iz znanstvenih savjeta, postupaka za davanje odobrenje i stavljanja u promet, CHMP je 2011. započeo s revizijom krovne smjernice s ciljem jasnijeg pojašnjenja principa biosličnosti, terminologije biosličnih lijekova, odabira referentnog lijeka i dokazivanja biosličnosti kroz ispitivanje usporedivosti s referentnim lijekom (21). Nakon rada skupina BWP i BMWP na smjernici te raspravama s predstavnicima industrije koji su dali svoje komentare (engl. *Overview of comments*), 2013. je objavljen nacrt revidirane smjernice, a 2014. je objavljena usvojena smjernica CHMP/437/04 Rev. 1 koja je postala važeća u travnju 2015. Smjernica pojašnjava osnovu regulatornog principa usporedivosti koji obuhvaća usporedna ispitivanja referentnog i biosličnog lijeka s ciljem dokaza sličnosti u kakvoći, djelotvornosti i sigurnosti.

Nova verzija smjernice donosi nove informacije o problematici referentnog lijeka. Naime, ranije je bila obaveza proizvođača u usporednim ispitivanjima koristiti referentni lijek odobren na EGP-u te je došlo do ponavljanja velikog broja usporednih nekliničkih i kliničkih ispitivanja jer se u EU nisu prihvaćali podaci s referentnim lijekom odobrenim izvan EGP-a. Pritisak industrije zbog velikih troškova nepotrebnih ispitivanja utjecao je na promjene u smjernici, prema kojoj je sada u nekim ispitivanjima moguće koristiti referentni lijek izvan EGP-a: „Ipak, kako bi se potaknuo globalni razvoj biosličnih lijekova i izbjeglo nepotrebno ponavljanje kliničkih ispitivanja, u nekim kliničkim i *in vivo* nekliničkim usporednim ispitivanjima moguće je koristiti referentni lijek koji je odobren izvan EGP-a te od strane tijela sa sličnim znanstvenim i regulatornim standardima, npr. zemlje ICH regije. U tom slučaju je odgovornost podnositelja zahtjeva dokazati da je korišteni lijek reprezentativan referentnom lijeku odobrenom na EGP-u. Za usporedna ispitivanja kakvoće obavezno se koristi referentni lijek s EGP-a.“ (36).

U obrascu prijave za davanje odobrenja tako se navode tri referentna biološka lijeka (27):

1. Referentni lijek odobren na EGP-u na čiju se potpunu dokumentaciju oslanja zahtjev za bioslični lijek, a kojemu je istekao period zaštite. Može biti različite jačine, farmaceutskog oblika ili puta primjene od biosličnog lijeka.
2. Referentni lijek koji služi kao osnova za informacije o lijeku koje se navode u Sažetku opisa svojstava lijeka, Uputi o lijeku i Označavanju lijeka.
3. Referentni lijek koji je korišten za usporedna ispitivanja, a kojemu se proizvođač odgovoran za puštanje lijeka u promet nalazi na EGP-u.

4.1.4.2. Opća smjernica o kakvoći biosličnih lijekova

Ubrzo nakon izdavanja krovne smjernice, 2006. objavljena je smjernica za kakvoću biosličnih lijekova koja je također s prikupljenim iskustvom i novim saznanjima prošla kroz postupak revizije. Nacrt revidirane smjernice donesen je 2012. te je nakon rasprava i komentara smjernica postala važeća 1. prosinca 2014. Nova verzija uzima u obzir životni ciklus lijeka, odnosno promjene profila kakvoće biosličnog i referentnog lijeka tijekom njihovih životnih ciklusa. Naime, proizvođači biotehnoloških

lijekova često uvode promjene u proizvodnom postupku i moraju dokazati da potencijalne izmjene u parametrima kakvoće neće negativno utjecati na sigurnost i djelotvornost lijeka. To znači da jedan lijek može imati različitu kakvoću tijekom svog životnog ciklusa, što dodatno komplicira odabir referentnog lijeka za usporedna ispitivanja s biosličnim lijekom tijekom njegova životnog ciklusa. Navodi se pojam profila kakvoće ciljanog proizvoda (engl. *quality target product profile*, QTPP), odnosno biosličnog lijeka koji se temelji na prikupljenim podacima o referentnom lijeku, uključujući javno dostupne informacije i podake o detaljnoj karakterizaciji koju je proveo proizvođač biosličnog lijeka. QTPP predstavlja temelj razvoja biosličnog lijeka i njegova proizvodnog postupka.

Smjernica detaljno propisuje zahtjeve vezane uz kakvoću biosličnog lijeka, što obuhvaća proizvodni postupak, usporedna ispitivanja kakvoće uzevši u obzir odabir referentnog lijeka, analitičke metode, fizikalno-kemijsku karakterizaciju, biološku aktivnost i čistoću te parametre za zahtjev kakvoće biosličnog lijeka (34).

4.1.4.3. Opća smjernica o nekliničkim i kliničkim ispitivanjima biosličnog lijeka

Od 2006., kada je izdana prva verzija smjernice, prikupljeno je puno iskustva i novih saznanja od velikog broja znanstvenih savjeta, postupaka za davanje odobrenja kao i stavljanja na tržište kompleksnijih biosličnih lijekova poput monoklonskih protutijela čiji razvoj predstavlja veliki izazov industriji i regulatornim tijelima. Tako je 2011. započela revizija smjernice ciljem usklađivanja s WHO smjernicom *Guidelines on Evaluation of Similar Biotherapeutic Products*, koja daje detaljne preporuke za neklinički i klinički razvoj biosličnog lijeka te uzima u obzir načelo „3R“ koje se odnosi na smanjenje broja pokusa na životinjama (24). Nacrt revidirane smjernice objavljen je 2013. te je nakon rasprava s komentarima i prijedlozima CHMP-a i predstavnika industrije postala važeća u srpnju 2015. Smjernica propisuje vrstu i količinu nekliničkih i kliničkih podataka i ispitivanja potrebnih za dokaz sličnosti biosličnog i referentnog lijeka.

Poglavlje o nekliničkim ispitivanjima navodi zahtjeve za farmako-toksikološka ispitivanja odnosno parametre za odabir opsega nekliničkih *in vivo* farmakodinamičkih i/ili toksikoloških ispitivanja prema principu temeljenom na riziku. Poglavlje o kliničkim podacima navodi potrebne zahtjeve za

farmakokinetička i farmakodinamička ispitivanja te studije djelotvornosti, naglašava potrebu za PD markerima kao dodatak PK parametrima u fazi I ispitivanja i uključivanje surogat markera u dizajn faze III. U dijelu o kliničkoj sigurnosti i farmakovigilanciji propisani su zahtjevi za ispitivanje sigurnosti (uključujući imunogeničnost) i plan upravljanja rizicima (engl. *Risk management plan*, RMP) te mogućnost ekstrapolacije podataka o sigurnosti i djelotvornosti iz jedne terapijske indikacije na drugu.

4.1.4.4. Specifične smjernice za skupine biosličnih lijekova

Iako su općeniti regulatorni principi iz općih smjernica primjenjivi za sve bioslične lijekove, ne postoji jedan standardni skup podataka (nekliničkih i kliničkih) koji bi bio primjenjiv na sve skupine bioloških lijekova. Svaka skupina bioloških lijekova, bilo da su to rekombinantni proteini, monoklonska protutijela, fuzijski proteini i dr., razlikuje se u mehanizmima djelovanja, farmakodinamici (PD), farmakokinetici (PK) i/ili PK/PD odnosima te nuspojavama koji zajedno utječu na omjer koristi i rizika biološkog lijeka. Stoga je EMA razvila smjernice za specifične skupine biosličnih lijekova koje daju detaljni opis potrebnih nekliničkih i kliničkih ispitivanja za ispitivanje usporedivosti s referentnim lijekom, temeljeno na specifičnim karakteristikama pojedine skupine bioloških lijekova.

Smjernice se objavljuju kao dodaci (engl. *Annex*) općoj smjernici *Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues* te navode nekliničke i kliničke podatke potrebne za dokaz slične djelotvornosti i sigurnosti dva lijeka koja sadrže:

- rekombinantni G-CSF
- rekombinantni ljudski inzulin i analog inzulina
- rekombinantni somatropin
- rekombinantni interferon alfa
- rekombinantni interferon beta
- rekombinantni eritropoetin
- rekombinantni folikulostimulirajući hormon

- monoklonska protutijela
- heparin niske molekulske mase.

4.1.4.5. Ostale smjernice primjenjive za bioslične lijekove

S obzirom na to da su bioslični lijekovi prema definiciji biološki/biotehnološki lijekovi, i za njih se primjenjuju regulatorno-znanstvene smjernice za proizvodnju i provjeru kakvoće bioloških/biotehnoloških lijekova, također objavljene na mrežnim stranicama EMA-e. Najznačajnije smjernice su navedene u tablici 9.

Tablica 9. Smjernice za biološke/biotehnološke lijekove.

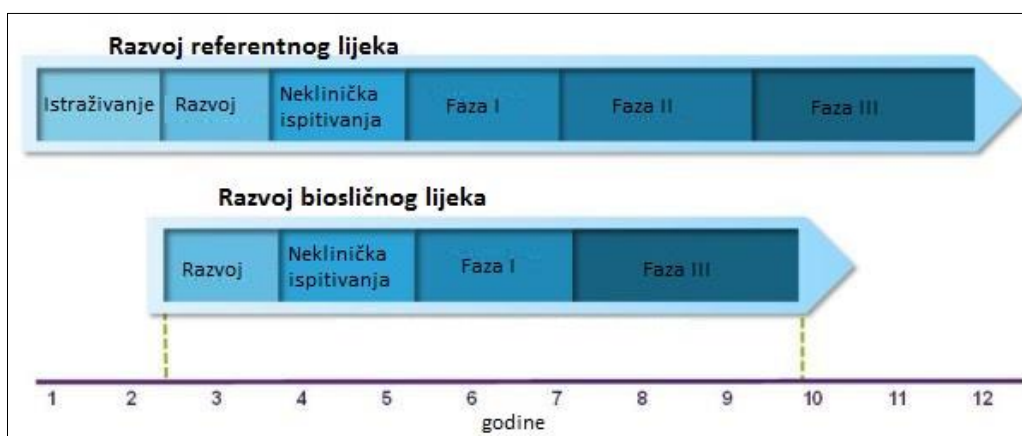
Naziv smjernice	Oznaka	Izdana (PD) Na snazi (ED)
Immunogenicity assessment of monoclonal antibodies intended for in vivo clinical use	EMA/CHMP/BMWP/8628 9/2010	PD Lipanj 2012. ED 1. prosinca 2012.
Note for guidance on biotechnological / biological products subject to changes in their manufacturing process	ICH Topic Q 5 E (CPMP/ICH/5721/03)	PD Prosinac 2004. ED Lipanj 2005.
Comparability of biotechnology-derived medicinal products after a change in the manufacturing process - non-clinical and clinical issues	EMA/CHMP/BMWP/101 695/2006	PD Srpanj 2007. ED Studeni 2007.
Immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins	EMA/CHMP/BMWP/143 27/2006	PD Siječanj 2008. ED Travanj 2008.
Production and quality control of medicinal products derived by recombinant DNA technology	3AB1A	ED Srpanj 1995.
Process validation for the manufacture of biotechnology-derived active substances and data to be provided in the regulatory submission	EMA/CHMP/BWP/187338 /2014	PD Travanj 2014.
Specifications: Test procedures and acceptance criteria for biotechnological / biological products	ICH Topic Q 6 B (CPMP/ICH/365/96)	Ožujak 1999.
Quality of biotechnological products: Stability testing of biotechnological / biological products	ICH Q5C (CPMP/ICH/138/95)	Srpanj 1996.
Quality of Biotechnological Products: Viral safety Evaluation of Biotechnology Products derived from Cell Lines of Human or Animal Origin	CPMP/ICH/295/95 ICH Topic Q5A	PD Veljača 1996. ED Kolovoz 1996.
Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals (ICH S6 (R1))	CHMP/ICH/731268/1998	PD Srpanj 2011. ED Prosinac 2011.
Guideline on the clinical investigation of the pharmacokinetics of therapeutic proteins	CHMP/EWP/89249/2004	PD Siječanj 2007. ED Srpanj 2007.

PD – datum izdavanja; ED – datum stupanja na snagu;

4.1.5. Razvoj biosličnog lijeka u vremenskim i financijskim okvirima

Cijeli proces razvoja biosličnog lijeka vrlo je opsežan, skup i dugotrajan i načelno nije značajno jeftiniji i vremenski kraći od razvoja originalnog lijeka. Troškovi razvoja biosličnog lijeka na visoko reguliranim tržištima kao što su Europa i SAD kreću se oko 75-250 milijuna dolara (16). Prema vremenskoj crti na slici 9, vremenske i financijske uštede u odnosu na razvoj referentnog lijeka vidljive su u fazi istraživanja lijeka i fazi II kliničkih ispitivanja (doziranje) koje se ne provode za bioslični lijek jer se

očekuje da će režim doziranja biosličnog lijeka biti jednak referentnom lijeku. Također, faza III usporednih kliničkih ispitivanja djelotvornosti provodi se za bioslični lijek na manjem broju bolesnika (35). No detaljna analitička karakterizacija zahtijeva nabavu veće količine skupog referentnog lijeka često proizvedenog na različitim proizvodnim mjestima i odobrenog na različitim tržištima. Razvoj i optimiranje kompleksnog postupka proizvodnje dugotrajan je i skup kao kod referentnog lijeka, a strogi zahtjevi za usporednim nekliničkim i kliničkim ispitivanjima i odabirom referentnog lijeka također poskupljuju cijenu lijeka. U konačnici, s obzirom na to da je razlika u cijeni biosličnog i referentnog lijeka još uvijek premala, uštede u zdravstvu primjenom biosličnih lijekova još uvijek su nedostatne.



Slika 9. Vremenski okviri razvoja referentnog biološkog lijeka i biosličnog lijeka (41).

4.2. Skupine biosličnih lijekova u terapijskoj primjeni

Prema podacima EMA-e, trenutačno je u EU odobreno te se u kliničkoj primjeni nalazi ukupno 21 bioslični lijek, od čega je osam filgrastima, pet eritropoetina, jedan hormon rasta, jedan inzulin, tri monoklonska protutijela, dva folikulostimulirajuća hormona i jedan fuzijski protein (tablica 10).

Tablica 10. Skupine biosličnih lijekova odobrenih u EU.

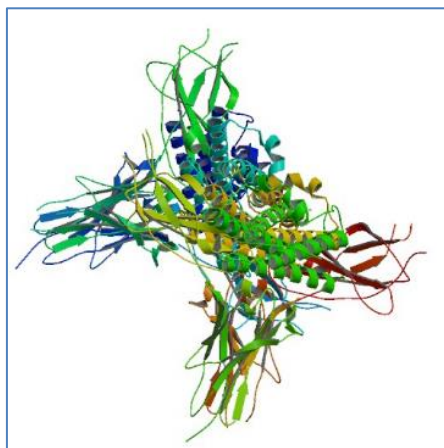
Djelatna tvar	Referentni lijek	Bioslični lijek
Filgrastim	Neupogen®	Accofil®, Biograstim®, Filgrastim Hexal, Grastofil®, Nivestim®, Ratiograstim®, Tevagrastim®, Zarzio®
Epoetin alfa, Epoetin zeta	Eprex®/Erypo®	Abseamed®, Binocrit®, Epoetin Alfa Hexal, Retacrit®, Silapo®
Somatropin	Genotropin®	Omnitrope®
Inzulin glargin	Lantus®	Abasaglar®
Infliksimab	Remicade®	Flixabi®, Inflectra®, Remsima®
Folitropin alfa	Gonal®	Bemfola®, Ovaleap®
Etanercept	Enbrel®	Benepali®

Karakteristike pojedinih skupina terapijskih proteina odobrenih prema zakonskoj osnovi za bioslični lijek (Članak 10(4) Direktive 2004/27/EZ) kao i osvrt na specifičnosti postupka davanja odobrenja navedenih o javnim izvješćima o ocjeni dokumentacije o kakvoći, nekliničkim i kliničkim ispitivanjima (EPAR), prikazani su u narednim poglavljima. Detaljnije je analizirana najbrojnija skupina terapijskih proteina - bioslični filgrastimi, s obzirom na dostupnost većeg broja javnih izvješća, literaturnih podataka kao i iskustva iz kliničke primjene.

4.2.1. Bioslični lijekovi s djelatnom tvari filgrastim

Filgrastim je rekombinantni ljudski faktor stimulacije rasta kolonija granulocita vezan na metionil (engl. *recombinant methionyl human granulocyte colony-stimulating factor*, r-metHuG-CSF), dobiven tehnologijom rDNA iz bakterije *E. coli* ugradnjom gena koji kodira za navedeni protein. Rekombinantni G-CSF se, kao i ljudski G-CSF, sastoji od 175 aminokiselina i ima molekulsku masu od 18,8 kDa (slika 10) no rekombinantni protein sadrži dodatni metioninski ostatak na N-terminalnom kraju molekule i nije glikoziliran, što je posljedica ekspresije u bakteriji *E. coli*. Biološki lijekovi koji sadrže djelatnu tvar filgrastim djeluju na isti način kao i ljudski G-CSF – stimuliraju koštanu srž na stvaranje bijelih krvnih stanica (4). Stoga su indicirani za liječenje smanjenog broja krvnih neutrofila ili

neutropenije, posebno za skraćanje trajanja neutropenije kod bolesnika na kemoterapiji te za mobilizaciju perifernih matičnih stanica krvi kod transplantacijskih bolesnika (31).



Slika 10. Struktura filgrastima (42).

Proizvodnja filgrastima sastoji se od uzgoja i rasta stanica *E. coli* na specifičnim hranjivim podlogama, gdje dolazi do ekspresije proteina u obliku netopljivih inkluzijskih tijela koja se izoliraju razbijanjem stanica i centrifugiranjem te otapaju kako bi se protein ponovno smotao (engl. *refolding*). Slijedi pročišćavanje u nekoliko koraka kromatografije i ultrafiltracije. Pročišćena djelatna tvar se uz dodatak pomoćnih tvari (voda za injekcije, acetatni pufer, sorbitol i polisorbat 80) oblikuje u konačni ljekoviti oblik te sterilno puni u bočice ili štrcaljke.

Komercijalni oblici rekombinantnog G-CSF-a mogu biti:

- neglikozilirani (filgrastim) - dobivaju se iz *E. coli* (Neupogen®, Amgen)
- glikozilirani (lenograstim) - dobivaju se iz CHO stanica (Granocyte®, Chugai Pharma).

Referentni biološki lijek za bioslične filgrastime odobrene u EU (tablica 11) je Neupogen®, proizvođača Amgen. Indiciran je za skraćivanje trajanja neutropenije i smanjivanje incidencije febrilne neutropenije u bolesnika liječenih utvrđenom citotoksičnom kemoterapijom zbog zloćudnih bolesti, skraćivanje trajanja neutropenije u bolesnika koji se liječe mijeloablativnom terapijom nakon koje slijedi transplantacija koštane srži, za mobilizaciju matičnih stanica periferne krvi (engl. *peripheral blood progenitor cells* - PBPCs), povećanje broja neutrofila i smanjenje incidencije i trajanja događaja povezanih s infekcijama u bolesnika s teškom kongenitalnom, cikličkom ili idiopatskom neutropenijom i teškim ili rekurentnim infekcijama u anamnezi dugotrajnom primjenom lijeka te za

liječenje perzistirajuće neutropenije u bolesnika s uznapredovalom infekcijom HIV-om, kako bi se smanjio rizik od razvoja bakterijskih infekcija kada druge mogućnosti za kontrolu neutropenije nisu primjerene (43). Navedene indikacije odobrene su svim biosličnim filgrastimima.

Tablica 11. Proizvođači biosličnog filgrastima.

Zaštićeno ime	Datum odobrenja	Nositelj odobrenja za stavljanje lijeka u promet	Proizvođač odgovoran za puštanje u promet	Proizvođač djelatne tvari	Proizvođač lijeka
Biograstim®	15.9.2008.	AbZ-Pharma GmbH, Njemačka	Merckle Biotec GmbH, Njemačka	SICOR Biotech UAB, Litva	Lemery SA de CV, Meksiko
Ratiograstim®		ratiopharm GmbH, Njemačka	Merckle Biotec GmbH		
Tevagrastim®		Teva GmbH, Njemačka	Teva Pharma B.V., Nizozemska		
Filgrastim Hexal	6.2.2009.	Hexal AG, Njemačka	Sandoz GmbH, Austrija	Sandoz GmbH, Austrija	Sandoz GmbH, Austrija
Zarzio®		Sandoz GmbH, Austrija			
Nivestim®	8.6.2010.	Hospira UK Ltd., Velika Britanija	HOSPIRA Enterprises B.V., Nizozemska	Hospira Zagreb d.o.o., Hrvatska	Hospira Zagreb d.o.o., Hrvatska
Grastofil®	18.10.2013.	Apotex Europe BV, Nizozemska	Apotex Europe BV, Nizozemska	Intas Pharmaceuticals Ltd, Indija	Intas Pharmaceuticals Ltd, Indija
Accofil®	18.9.2014.	Accord Healthcare Ltd, Velika Britanija	Accord Healthcare Ltd, Velika Britanija		

4.2.1.1. Biograstim®, Ratiograstim® i Tevagrastim®

Prvi bioslični filgrastimi, Biograstim®, Ratiograstim® i Tevagrastim®, dobili su odobrenje u E 15.9.2008. S obzirom na to da je riječ o istim lijekovima od istih proizvođača djelatne tvari i lijeka, a različitih nositelja odobrenja (tablica 11), za sva tri lijeka predana je jednaka dokumentacija o kakvoći, nekliničkim i kliničkim ispitivanjima te je CHMP proveo jedinstvenu ocjenu. Pozitivno je ocijenjena dokumentacija o kakvoći, nekliničkim i kliničkim ispitivanjima te je u usporednim ispitivanjima dokazana slična kakvoća, djelotvornost i sigurnost s referentnim lijekom Neupogenom®.

Dostavljena dokumentacija o kakvoći djelatne tvari i lijeka, koja obuhvaća podatke o proizvodnom postupku, procesnoj kontroli i validaciji proizvodnog postupka, zahtjeve kakvoće i postupke ispitivanja djelatne tvari i lijeka te podatke o stabilnosti, ocijenjena je prihvatljivom. Farmaceutski

oblik lijeka (otopina za injekciju ili infuziju), kvalitativni sastav pomoćnih tvari (natrijev acetat, sorbitol, polisorbit 80, voda za injekcije), jačina lijeka (30 MIU/0,5 ml, 48 MU/0,5 ml; dodatno Biograstim® 48 MIU/0,8 ml) i pakiranje (napunjena štrcaljka) jednaki su referentnom lijeku Neupogenu®. Provedena je opsežna usporedna karakterizacija biosličnog i referentnog lijeka te je pokazano da su sastav, fizikalno-kemijska svojstva, struktura (primarna i višeg reda), profil onečišćenja i biološka aktivnost ispitivanog lijeka slični Neupogenu®. Većim nedostatkom u dokumentaciji smatrao se izvor referentnog lijeka za usporedna ispitivanja: korišten je Neupogen® iz tri različita izvora (Amgen Njemačka, Amgen Litva i Roche Litva). Poznato je da referentni lijek mora biti odobren na EGP-u na temelju potpune dokumentacije, a u vrijeme provođenja ispitivanja Litva nije bila članica EU. S obzirom na to da nije bilo poznato koji je referentni lijek korišten za usporedbu profila onečišćenja, proizvođač je naknadno dokumentaciju dopunio podacima o usporedbi Neupogena®, Njemačka i Neupogena®, Litva te je dokazao reprezentativnost sva tri korištena izvora referentnog lijeka. Na razini kakvoće dokazana je biosličnost ispitivanog filgrastima i Neupogena® (44).

Neklinička farmakodinamička ispitivanja obuhvaćala su usporedna *in vitro* ispitivanja vezanja receptora i biološke aktivnosti te *in vivo* ispitivanja na miševima s neutropenijom (sličan porast broja neutrofila kod oba lijeka). Dokazana je sličnost u farmakokinetičkim parametrima (AUC , C_{max} , t_{max} , $t_{1/2}$ i dr.) te su dodatno provedena opsežna toksikološka ispitivanja na štakorima i majmunima (jednokratna i ponovljena doza) kao i ispitivanja farmakološke sigurnosti (imunogeničnost), u skladu sa smjernicom za bioslične filgrastime (*Guidance on similar medicinal products containing recombinant granulocyte-colony stimulating factor, EMEA/CHMP/BMWP/31329/2005*). Smjernica je trenutačno u reviziji te se očekuje da će u revidiranoj verziji naglasak biti na *in vitro* usporednim nekliničkim ispitivanjima. Nisu uočene značajne razlike u PD karakteristikama te nisu otkrivena posebna sigurnosna pitanja i potencijalne opasnosti za zdravlje ljudi. Provedena klinička ispitivanja Faze I (na zdravim dobrovoljcima) i Faze III (na bolesnicima s karcinomom) dokazala su usporedivost PK i PD karakteristika ispitivanog i referentnog lijeka nakon subkutane i intravenske primjene.

Djelotvornost i sigurnost ispitane su u Fazi III na bolesnicima s karcinomom dojke, karcinomom pluća i ne-Hodgkinovim limfomom te nisu uočene značajne razlike u trajanju teške neutropenije ili incidenciji febrilne neutropenije između ispitivanog lijeka i Neupogena®. Ispitivanjem imunogeničnosti na ljudima nisu uočena vezujuća i neutralizirajuća antitijela, što odgovara ranije utvrđenom niskom riziku od imunog odgovora pri primjeni Neupogena® (44).

4.2.1.2. Filgrastim Hexal i Zarzio®

Filgrastim Hexal i Zarzio® dva su ista lijeka proizvođača Sandoz GmbH, Austrija (tablica 11), odobrena 6.2.2009., za koje je također CHMP proveo jedinstvenu ocjenu dokumentacije o kakvoći, nekliničkim i kliničkim ispitivanjima te dodatnim usporednim ispitivanjima. Dostavljeni podaci o sirovinama, proizvodnom postupku, zahtjevima kakvoće i stabilnosti djelatne tvari i lijeka ocijenjeni su prihvatljivima. Lijek je farmaceutskog oblika otopina/koncentrat za injekciju ili infuziju, dostupne su jačine 30 MIU/0,5 ml i 48 MU/0,5 ml te se pakira u napunjene štrcaljke. Kvalitativni sastav pomoćnih tvari jednak je Neupogenu® osim puferskog sustava (glutamat umjesto acetatnog pufera). Podaci o karakterizaciji filgrastima (djelatne tvari i lijeka) i Neupogena® sofisticiranim analitičkim metodama pokazuju usporedivost u fizikalno-kemijskim (primarna, sekundarna i tercijarna struktura, molekulska masa, naboj, hidrofobnost) i biološkim svojstvima (afinitet vezanja, *in vitro* bioaktivnost). Profili onečišćenja uglavnom su slični no uočen je niži sadržaj deamidiranih i oksidiranih formi kod ispitivanog lijeka te je dodatnim ispitivanjima potvrđeno da navedene razlike nemaju utjecaja na bioaktivnost i stabilnost lijeka. Plan usporedne karakterizacije dva lijeka temeljen je na prethodnom znanstvenom savjetu proizvođača s CHMP-om (45).

Neklinička ispitivanja (*in vivo* PD, toksičnost ponovljenih doza, imunogeničnost) i klinička ispitivanja (faza I PK/PD parametri, faza III usporedna djelotvornost, procjena sigurnosti, podnošljivosti i imunogeničnosti) također su provedena na temelju znanstvenog savjeta s CHMP-om u skladu s tada važećom smjernicom za bioslični filgrastim te nisu uočene značajne razlike između ispitivanih lijekova (45).

4.2.1.3. Nivestim®

Nivestim®, bioslični filgrastim proizvođača Hospira, odobren je 8.6.2010. te je zasad jedini odobreni bioslični lijek koji se proizvodi u Hrvatskoj (Hospira Zagreb d.o.o.). Dolazi u obliku otopine za injekciju ili infuziju u napunjenim štrcaljkama s odobrenim jačinama lijeka od 12 MIU/0,2ml (nema Neupogen®), 30 MIU/0,5 ml i 48 MIU/0,5 ml. Jednakog je kvalitativnog i kvantitativnog sastava kao Neupogen®.

Postupak proizvodnje djelatne tvari optimiran je tijekom razvoja lijeka (nakon Faze I, a prije Faze III kliničkih ispitivanja) s ciljem povećanja robusnosti te je proizvođač proveo detaljna usporedna ispitivanja kako bi dokazao da je kakvoća filgrastima prije i nakon provedenih izmjena usporediva. Podaci o proizvodnom postupku, validaciji postupka, kritičnim procesnim parametrima i stabilnosti ocijenjeni su prihvatljivima. Veći nedostaci odnosili su se na metodu za određivanje biološke aktivnosti/potentnosti djelatne tvari i postavljene granice za biološku aktivnost u zahtjevu kakvoće djelatne tvari te nedovoljnu osjetljivost komercijalno dostupne metode (ELISA) za određivanje ostalih proteina stanice domaćina (HCP). Proizvođač se obavezao da će nakon davanja odobrenja razmotriti izmjenu granica za biološku aktivnost te razviti novu osjetljiviju metodu za ispitivanje HCP-a (46).

Provedena je detaljna karakterizacija djelatne tvari sofisticiranim analitičkim metodama te usporedna ispitivanja djelatne tvari i lijeka s Neupogenom®. Ispitivana su fizikalno-kemijska svojstva (izgled, pH, IEF, SDS-PAGE, koncentracija proteina UV, SEC-HPLC, RP-HPLC, IC, peptidno mapiranje, CD, fluorescentna spektroskopija, molekulska masa, disulfidni mostovi, slijed aminokiselina), biološka aktivnost (*in vitro* testovi), imunokemijska svojstva (WB) te čistoća i profil onečišćenja (SDS PAGE, SEC-HPLC, RP-HPLC, IC, IEF). Dokazana je biosličnost Nivestima® i Neupogena® na razini parametara kakvoće lijeka. Dodatno su provedena usporedna ispitivanja u stresnim uvjetima te su uočene slične promjene tijekom čuvanja kod oba lijeka (pad biološke aktivnosti).

Neklinička ispitivanja (*in vitro* PD biotestovi, *in vivo* PD na glodavcima s neutropenijom, PK kao dio ispitivanja toksičnosti ponovljenih doza, imunogeničnost) i klinička ispitivanja (faza I usporedba

PK/PD i sigurnosnih parametara, faza III usporedba terapijske ekvivalencije u profilaksi kod bolesnika s rakom dojke na kemoterapiji, sigurnost, imunogeničnost) provedena su na temelju znanstvenog savjeta s CHMP-om i u skladu sa smjernicom za bioslične filgrastime te nisu uočene značajne razlike između ispitivanih lijekova (46).

4.2.1.4. Grastofil® i Accofil®

Grastofil®, bioslični filgrastim proizvođača Intas Pharmaceuticals Ltd, Indija i nositelja odobrenja Apotex Europe BV, Nizozemska, odobren je 18.10.2013., a 18.9.2014. odobren je i njegov duplikat Accofil®, od istog proizvođača djelatne tvari i lijeka, a drugog nositelja odobrenja Accord Healthcare Ltd, Velika Britanija (tablica 11). Dokumentacija o kakvoći, nekliničkim i kliničkim ispitivanjima, kao i izvješće o ocjeni CHMP-a za Grastofil®, korišteni su u postupku odobravanja Accofila®.

Oba lijeka dolaze u obliku otopine za injekciju ili infuziju, iste jačine (30 MIU/0,5 ml, 48 MIU/0,5 ml) i sastava pomoćnih tvari kao Neupogen®. Dostavljeni su odgovarajući podaci o sirovinama (karakterizacija banki stanica), proizvodnom postupku i procesnoj kontroli, zahtjevima kakvoće, metodama ispitivanja te pakiranju i stabilnosti djelatne tvari i lijeka. S obzirom na izmjene u postupku proizvodnje djelatne tvari (Procesi I-IX) i lijeka tijekom razvoja (Proces I - za neklinička ispitivanja, Proces II - za klinička ispitivanja, Proces III – za komercijalnu proizvodnju), provedena su opsežna usporedna ispitivanja kako bi se dokazala usporedivost u kakvoći djelatne tvari/lijeka proizvedenih različitim postupcima. Djelatna tvar detaljno je karakterizirana prikladnim analitičkim metodama (N-terminalno sekvencioniranje, SDS-PAGE, IEF, peptidno mapiranje, MS, biološka aktivnost, CD, FTIR, ultracentrifugiranje, DSC, RP-HPLC i SEC-HPLC, HCP) te su provedena usporedna ispitivanja djelatne tvari i lijeka iz faza razvoja i proizvodnih serija s Neupogenom® (fizikalno-kemijska i biološka karakterizacija, usporedba profila onečišćenja u ubrzanim i stresnim uvjetima čuvanja). Dokazana je međusobna sličnost svih ispitanih lijekova te usporedivost s Neupogenom® u parametrima kakvoće. Neklinička ispitivanja provedena su s biosličnim filgrastimom istog proizvođača Intas Pharmaceuticals Ltd (Neukine®, nije odobren u EU) koji se dobiva iz Procesu V proizvodnje djelatne tvari te je prihvaćena ekstrapolacija rezultata na Proces IX iz kojeg se dobiva Grastofil®/Accofil®. Provedena su

usporedna ispitivanja PD *in vitro/in vivo*, toksičnosti ponovljenih doza i lokalne podnošljivosti te nisu uočene značajne razlike s Neupogenom®. Usporednim kliničkim ispitivanjima (faza I usporedba PK/PD, faza III djelotvornost kod bolesnika s rakom dojke, sigurnost, imunogeničnost) dokazana je slična djelotvornost i sigurnost ispitivanog lijeka i referentnog lijeka (47).

4.2.2. Bioslični lijekovi s djelatnom tvari somatropin

Somatropin je rekombinantni ljudski hormon rasta, hGH (engl. *human growth hormone*) dobiven tehnologijom rDNA te je strukturno (protein građen od 191 aminokiseline, s dvije međulančane disulfidne veze, molekulske mase oko 22 kDa) i funkcionalno (poticanje normalnog tjelesnog rasta, utjecaj na stanični metabolizam) identičan ljudskom hormonu (4).



Slika 11. Struktura somatropina (48).

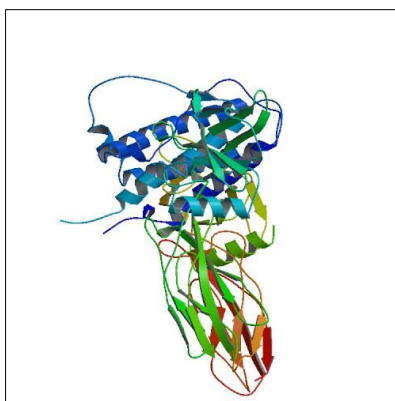
Terapijski potencijal hormona nalazi se u liječenju niskog rasta uzrokovano nedostatkom hormona ili različitim stanjima kao što su Turnerov sindrom, idiopatski niski rast i kronično zatajenje bubrega. Do 1985. lijek se dobivao ekstrakcijom iz hipofize mrtvih ljudskih donora, no tada se dogodio slučaj smrti mladića koji je primao hormon rasta za koji se doznalo da potječe iz hipofize zaražene Creutzfeld–Jacobovom bolešću (CJD). Nakon toga prijavljeno je još 12 takvih slučajeva te se hormon rasta prestao proizvoditi na taj način. Danas se somatropin komercijalno proizvodi isključivo tehnologijom rDNA, odnosno uzgojem bakterije *E. coli*, stanica kvasaca ili sisavaca s ugrađenim genom koji kodira za hormon rasta, nakon čega slijedi centrifugiranje i homogenizacija stanične biomase, dobivanje sirovog rhGH precipitacijom s polietileniminom i amonijevim sulfatom te kromatografsko pročišćavanje u nekoliko koraka.

Referentni biološki lijek za odobravanje biosličnog somatotropina je Genotropin®, proizvođača Pfizer, odobren u EU 01.2.1996. Indiciran je kod djece za liječenje poremećaja u rastu uzrokovanih nedovoljnim izlučivanjem hormona rasta (nedostatak hormona rasta) i poremećaja u rastu povezanih s Turnerovim sindromom ili kroničnom bubrežnom insuficijencijom, poremećaja u rastu u niske djece koja su rođena mala za gestacijsku dob, koja nisu uspjela nadoknaditi zaostajanje u rastu do dobi od 4 godine ili kasnije te za liječenje Prader-Willijeva sindroma (PWS), za poboljšanje rasta i oblikovanje tijela. Također se koristi u nadomjesnoj terapiji u odraslih osoba sa značajnim nedostatkom hormona rasta (49).

Omnitrope®, bioslični somatotropin proizvođača Sandoz GmbH, Austrija (proizvodnja djelatne tvari, puštanje lijeka u promet, nositelj odobrenja) i Novartis, Švicarska (proizvođač lijeka), odobren je 12.4.2006. prema Članku 10(4) Direktive 2004/27/EZ kao prvi bioslični lijek u EU. Usporednim ispitivanjem biosličnog somatotropina s referentnim lijekom Genotropin® dokazana je sličnost na razini kakvoće, nekliničkih i kliničkih ispitivanja te su mu odobrene iste indikacije kao lijeku Genotropin®. Sličnog je kvalitativnog i kvantitativnog sastava pomoćnih tvari (glicin, dinatrijev hidrogenfosfat heptahidrat, natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, manitol-samo Genotropin®) te dolazi u obliku praška za otopinu za injekciju, u dvije jačine 1,3 mg/ml i 5 mg/ml, pakiran u stakleni uložak, kao i referentni lijek.

4.2.3. Bioslični lijekovi s djelatnom tvari epoetin

Epoetin (engl. *recombinant human erythropoietin*, rhEPO) je eritropoetin dobiven tehnologijom rDNA iz kultura stanica sisavaca. Slične je strukture i identičnog slijeda aminokiselina kao ljudski eritropoetin (glikoprotein građen od 165 aminokiselina, molekulske mase oko 36 kDa) te ima jednaku terapijsku ulogu u stimulaciji i regulaciji eritropoeze. Manje razlike u strukturi klinički dostupnih oblika epoetina (alfa, beta, delta, zeta) uglavnom se odnose na vrstu glikozilacije (4).



Slika 12. Struktura epoetina (50).

Epoetin stimulira eritropoezu tako da povećava broj stanica koje su sposobne diferencirati se u eritrocite, ubrzava brzinu diferencijacije prekursora i povećava brzinu sinteze hemoglobina. Proizvodi se isključivo tehnologijom rDNA na staničnim linijama, najčešće CHO stanicama, te se nakon uzgoja izolira iz hranjive podloge centrifugiranjem i filtracijom i dalje pročišćava u više kromatografskih koraka (afinitetna, ionska, kromatografija obrnutih faza).

Referentni biološki lijek za odobravanje biosličnog eritropoetina je Eprex®/Erypo®, proizvođača Janssen-Cilag GmbH, odobren u EU 10.7.1996. Indiciran je za liječenje simptomatske anemije povezane s kroničnim zatajenjem bubrega, anemije i smanjivanje potreba za transfuzijama u odraslih bolesnika koji primaju kemoterapiju, za povećanje produkcije autologne krvi kod bolesnika u predonacijskom programu te za smanjenje izloženosti alogenoj transfuziji kod odraslih bolesnika bez deficita željeza neposredno prije većih elektivnih ortopedskih operacija kod kojih postoji povećan rizik za komplikacije pri transfuziji (51).

Tablica 12. Proizvođači biosličnog eritropoetina.

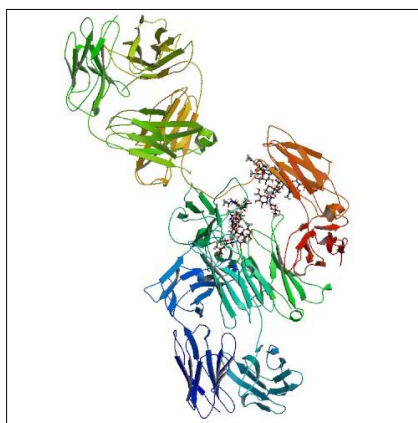
Zaštićeno ime	Djelatna tvar	Datum odobrenja	Nositelj odobrenja za stavljanje lijeka u promet	Proizvođač odgovoran za puštanje u promet	Proizvođač djelatne tvari
Abseamed®	Epoetin alfa	28.8.2007.	Medice Arzneimittel Pütter GmbH & Co. KG, Njemačka	Sandoz GmbH, Austrija	Rentschler Biotechnologie GmbH, Njemačka; Lek Pharmaceuticals d.d., Slovenija
Binocrit®			Sandoz GmbH, Austrija		
Epoetin Alfa Hexal			Hexal AG, Njemačka		
Retacrit®	Epoetin zeta	18.12.2007.	Hospira UK Limited, Velika Britanija	Hospira UK Limited, Velika Britanija	Norbitec GmbH, Njemačka
Silapo®			Stada Arzneimittel AG, Njemačka	Stada Arzneimittel AG, Njemačka	

Prvi bioslični eritropoetini (epoetin alfa), Abseamed®, Binocrit® i Epoetin Alfa Hexal, odobreni su u EU 28.8.2007. Riječ je o istim lijekovima koje proizvode Rentschler Biotechnologie GmbH, Njemačka i Lek Pharmaceuticals d.d., Slovenija (djelatna tvar) i Sandoz GmbH, Austrija (lijek) te je u postupku odobravanja CHMP proveo jedinstvenu ocjenu dokumentacije o kakvoći, nekliničkim i kliničkim ispitivanjima te dodatnim usporednim ispitivanjima (tablica 12). Istog su kvalitativnog i kvantitativnog sastava kao referentni lijek (pomoćne tvari: fosfatni pufer, voda za injekcije, polisorbat 80, glicin, natrijev klorid), te dolaze u obliku za otopine za injekciju, u dvije jačine 16,8 µg/ml i 84 µg/ml, pakirani u napunjenu štrcaljku, kao i referentni lijek.

Retacrit® i Silapo® dva su ista lijeka proizvođača epoetina zeta Norbitec GmbH, Njemačka, odobrena u EU 18.12.2007. jedinstvenom ocjenom dokumentacije o kakvoći, nekliničkim i kliničkim ispitivanjima. Sličnog su kvalitativnog i kvantitativnog sastava pomoćnih tvari te dolaze u obliku za otopine za injekciju, u jačinama 3,333 IU/ml, 10,000 IU/ml i 40,000 IU/ml, pakirani u napunjenu štrcaljku, kao i referentni lijek. Svim biosličnim eritropoetinima odobrene su iste indikacije kao referentnom lijeku.

4.2.4. Bioslični lijekovi s djelatnom tvari infliksimab

Infliksimab je kimerno (25 % mišje i 75 % ljudsko) monoklonsko protutijelo IgG₁, molekulske mase 149 kDa, proizvedeno na mišjim hibridoma stanicama tehnologijom rDNA. U terapijskoj primjeni djeluje kao blokator čimbenika nekroze tumora alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*, TNF- α), citokina odgovornog za upalne procese i regulaciju imunog sustava. Monoklonsko protutijelo jakim se afinitetom veže na TNF- α , čime sprječava vezanje TNF- α receptora te neutralizira biološku aktivnost TNF- α . Rekombinantne stanične linije uzgajaju se u perfuzijskim bioreaktorima te se monoklonska protutijela centrifugiranjem i filtracijom izoliraju iz staničnog medija i pročišćavaju u koracima kromatografije (afinitetna, ionska) i ultrafiltracije (4).



Slika 13. Struktura infliksimaba (52).

Referentni lijek s monoklonskim protutijelom infliksimab je Remicade®, proizvođača Janssen Biologics B.V., odobren CP postupkom 13.8.1999. Indiciran je za smanjivanje znakova i simptoma reumatoidnog artritisa, liječenje Crohnove bolesti, ulceroznog kolitisa, ankilozantnog spondilitisa, psorijatičnog artritisa i psorijaze (53).

Prva bioslična monoklonska protutijela, Inflectra® i Remsima®, od istog proizvođača infliksimaba Celltrion Inc., Koreja, odobrena su u EU 10.9.2013. te je u postupku odobravanja CHMP proveo jedinstvenu ocjenu dokumentacije o kakvoći, nekliničkim i kliničkim ispitivanjima i dodatnim usporednim ispitivanjima. Nedavno je odobren još jedan bioslični infliksimab, Flixabi®, proizvođača Biogen Manufacturing ApS, Danska (tablica 13). Sva tri lijeka istog su kvalitativnog i kvantitativnog sastava kao referentni lijek, dolaze u istom farmaceutskom obliku (100 mg praška za koncentrat za

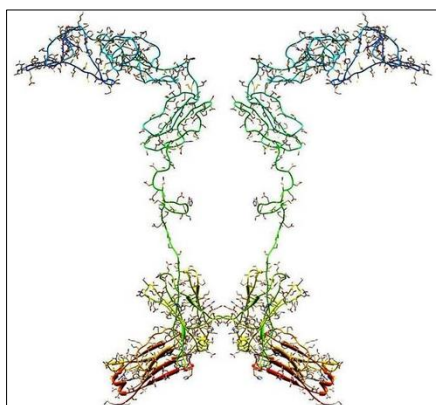
otopinu za infuziju), jačini (10 mg/ml) i pakiranju (staklena bočica) te su im odobrene iste indikacije kao referentnom lijeku Remicade®.

Tablica 13. Proizvođači biosličnog infliksimaba.

Zaštićeno ime	Datum odobrenja	Nositelj odobrenja za stavljanje lijeka u promet	Proizvođač odgovoran za puštanje u promet	Proizvođač djelatne tvari
Inflectra®	10.9.2013.	Hospira UK Limited, Velika Britanija	HOSPIRA Enterprises B.V., Nizozemska	CELLTRION Inc., Republika Koreja
Remsima®		Celltrion Healthcare Hungary Kft.	Biotech Services International Ltd., Velika Britanija	
Flixabi®	26.5.2016.	Samsung Bioepis UK Limited, Velika Britanija	Biogen Manufacturing ApS, Danska	Biogen Manufacturing ApS, Danska

4.2.5. Bioslični lijekovi s djelatnom tvari etanercept

Etanercept je fuzijski protein koji čine receptor TNF veličine 75 kDa (p75) spojen na Fc fragment ljudskog IgG₁ te djeluje kao inhibitor TNF- α . Dimer kimeričnog proteina sastoji se od 934 aminokiseline (467 aminokiseline po lancu), veličine oko 150 kDa te je glikoziliran (svaki monomer sadrži 3 N- i 13 O-vezujućih mjesta glikozilacije). Proizvodi se tehnologijom rDNA u ekspresijskom sustavu CHO stanica – nakon uzgoja stanica, izlučuje se topljivi protein koji se dalje pročišćava kromatografskim i ultrafiltracijskim tehnikama (4).



Slika 14. Struktura etanercepta (54).

Referentni etanercept je Enbrel®, proizvođača Pfizer Limited, Velika Britanija, odobren u EU 3.2.2000. Indiciran je za liječenje umjerenog do teškog aktivnog reumatoidnog artritisa kod odraslih, poliartritisa (s pozitivnim ili negativnim reumatoidnim faktorom) i produljenog oligoartritisa u

adolescenata i djece od navršene dvije godine, psorijatičnog artritisa, ankilozantnog spondilitisa te plak psorijaze (55).

Benepali® je jedini bioslični etanercept odobren u EU (14.1.2016.), nositelja odobrenja Samsung Bioepis UK Limited, Velika Britanija i proizvođača Biogen Manufacturing ApS, Danska. Dolazi u obliku praška za otopinu za injekciju, pakiranog u napunjenu štrcaljku ili brizgalicu, jačine 50 mg/ml te sličnog sastava pomoćnih tvari i istih odobrenih indikacija kao referentni lijek.

4.2.6. Bioslični lijekovi s djelatnom tvari folitropin alfa

Folitropin alfa je rekombinantni ljudski folikulostimilirajući hormon (engl. *recombinant human follicle stimulating hormone*, r-hFSH), proizveden tehnologijom rDNA u CHO stanicama te kao prirodni FSH koji luči hipofiza, kontrolira reproduktivnu funkciju kod žena (stimulira rast folikula) i muškaraca (potiče spermatogenezu). Po strukturi je glikoprotein veličine 22,6 kDa koji se sastoji od dvije nekovalentno vezane polipeptidne jedinice (alfa-96 aminokiselina i beta-111 aminokiselina) te je strukturno vrlo sličan prirodnom proteinu - isti slijed aminokiselina, uz manje razlike u strukturi bočnih ugljikohidratnih lanaca.

U kliničkoj primjeni nalazi se još folitropin beta (Purgeon®, Merck) s jednakim fizikalno-kemijskim svojstvima i malim razlikama u kliničkom odgovoru u odnosu na folitropin alfa. FSH se može dobiti i izolacijom iz urina žena u menopauzi, no s obzirom na malo iskorištenje postupka (2,5 l urina za jednu dozu ljudskog FSH), danas se većinom proizvodi tehnologijom rDNA – uzgoj CHO stanica u bioreaktoru, izolacija filtracijom i pročišćavanje kromatografijom i ultrafiltracijom (4).



Slika 14. Struktura folitropina (56).

Referentni lijek s djelatnom tvari folitropin alfa je Gonal-f®, proizvođača Merck Serono S.A., odobren u EU 20.10.1995. Indiciran je u liječenju anovulacija (uključujući sindrom policističnih jajnika), stimulaciji razvoja većeg broja folikula u žena kod kojih se stimulira superovulacija za metode medicinski potpomognute oplodnje, stimulaciji razvoja folikula u žena s teškim nedostatkom LH i FSH te u stimulaciji spermatogeneze u muškaraca s kongenitalnim ili stečenim hipogonadotropnim hipogonadizmom (57).

Dva su bioslična lijeka s djelatnom tvari folitropin alfa odobrena u EU, Ovaleap® i Bemfola® (tablica 14) te su im odobrene jednake indikacije kao referentni lijek Gonal-f®. Dolaze u obliku otopine za injekciju, pakirani u napunjene brizgalice, jačine 600 IU/ml te sličnog sastava pomoćnih tvari kao referentni lijek.

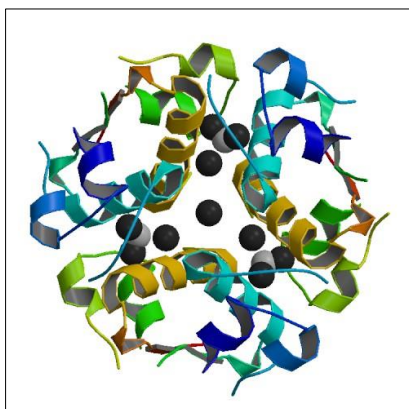
Tablica 14. Proizvođači biosličnog folitropina alfa.

Zaštićeno ime	Datum odobrenja	Nositelj odobrenja za stavljanje lijeka u promet	Proizvođač odgovoran za puštanje u promet	Proizvođač djelatne tvari
Ovaleap®	29.9.2013.	Teva Pharma B.V., Nizozemska	Merckle Biotec GmbH, Njemačka Teva Pharma B.V., Nizozemska ; Teva Operations Poland Sp. z o.o., Poljska;	Merckle Biotec GmbH, Njemačka
Bemfola®	27.3.2014.	Finox Biotec AG, Lihtenštajn	Finox Biotec AG, Lihtenštajn	Polymun Scientific Immunobiologische Forschung GmbH, Austrija

4.2.7. Bioslični lijekovi s djelatnom tvari inzulin glargin

Inzulin glargin je analog ljudskog inzulina s produljenim djelovanjem. Po strukturi je dvolančani peptid koji se sastoji od 53 aminokiseline (A-lanac 21 AK, B lanac 32 AK), nije glikoziliran, a lanci A i B su međusobno povezani s dva disulfidna mosta. Mala razlika u strukturi u odnosu na ljudski inzulin je dodatak dva argininska ostatka na C-terminalni dio B-lanca (mjesto B31 i B32) i zamjena asparagina s glicinom na mjestu A21. Proizvodi se tehnologijom rDNA na bakteriji *E. coli*. Uzgojem u fermentoru dolazi do ekspresije u obliku granula pre-pro-inzulina koje se izoliraju iz staničnih ostataka centrifugiranjem te se provodi otapanje i sulfacija (otvaraju se disulfidne veze). Protein se ponovno

smata (engl. *refolding*) u međuprodukt pro-inzulin te se enzimatski prevodi u djelatnu tvar koja se kromatografski pročišćava, kristalizira i suši (58).



Slika 15. Struktura insulina glargin (59).

Referentni lijek s djelatnom tvari inzulin glargin je Lantus®, proizvođača Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Njemačka, odobren u EU 09.6.2000. Indiciran je u liječenju šećerne bolesti u odraslih, adolescenata i djece u dobi od dvije ili više godina te djeluje na isti način kao i prirodni inzulin, uz dodatno produljeno oslobađanje s mjesta primjene tijekom 24 sata.

Abasaglar® (raniji naziv Abasria®), Eli Lilly GmbH, sadrži djelatnu tvar inzulin glargin te je jedini dosad odobreni bioslični inzulin u EU, odobren 9.9.2014. Dolazi u obliku otopine za injekciju, jačine 100 IU/ml, pakiran u napunjenu brizgalicu ili uložak. Kvalitativnim i kvantitativnim sastavom jednak je referentnom lijeku, uz manje razlike u pomoćnim tvarima (dodaje se cinkov oksid umjesto cinkovog klorida, koji se otapanjem u 10 %-tnoj kloridnoj kiselini prevodi u klorid; dodaje se 100 %-tni glicerol umjesto 85 %-tnog glicerola) (58).

4.3. Sigurna primjena biosličnih lijekova

4.3.1. Farmakovigilancija

S obzirom na to da podaci prikupljeni tijekom predmarketinške faze razvoja lijeka (neklinička i klinička ispitivanja) ne mogu predvidjeti sve nuspojave koje se mogu pojaviti nakon stavljanja lijeka u promet, s praćenjem lijeka nastavlja se i u postmarketinškoj fazi, što se naziva farmakovigilancija. To je skup aktivnosti vezanih uz otkrivanje, procjenu, razumijevanje, prevenciju i postupanje u slučaju nuspojava lijekova kao i novih saznanja o škodljivosti primjene lijekova te je obavezna za sve lijekove nakon davanja odobrenja za stavljanje u promet (60).

Uz zahtjev za davanje odobrenja za bioslični lijek prilaže se opis farmakovigilancijskog sustava i plan upravljanja rizicima (engl. *Risk management plan*, RMP), u skladu s europskim zakonodavstvom i smjernicama za farmakovigilanciju. RMP treba uzeti u obzir identificirane potencijalne rizike povezane s primjenom referentnog lijeka i navesti plan kako će se ti rizici rješavati tijekom post-marketinškog praćenja. Kod bioloških lijekova posebno treba obratiti pozornost na potencijalnu imunogeničnost (39). RMP se nakon davanja odobrenja objavljuje u sastavu izvješća EPAR i važno je da ga proizvođač ažurira tijekom životnog ciklusa lijeka. U post-marketinškoj fazi proizvođač priprema i redovna izvješća o prikupljenim sigurnosnim podacima (engl. *Periodic Safety Update Reports*, PSUR) s ciljem uočavanja potencijalnih promjena u omjeru koristi i rizika lijeka (17).

Svaki biološki lijek, pa tako i bioslični, može se identificirati prema svojem zaštićenom ili novoizumljenom nazivu (engl. *brand name*), prihvaćenom u postupku odobravanja, što je važno za točnu identifikaciju, sigurno propisivanje i doziranje te praćenje sigurnosti primjene tijekom životnog ciklusa lijeka, a svaka djelatna tvar biološkog lijeka ima svoj znanstveni ili uobičajeni naziv (engl. *International Non-proprietary Name*, INN). Nova europska farmakovigilancijska regulativa propisuje mjere za identifikaciju i praćenje bioloških lijekova. Tako je za sve lijekove s novom djelatnom tvari i nove biološke lijekove, uključujući nove bioslične lijekove, predviđeno dodatno praćenje na način da se u Sažetku opisa svojstava lijeka i uputi o lijeku navodi simbol crni trokut ▼ (engl. *black triangle*) uz rečenicu „Ovaj je lijek pod dodatnim praćenjem“. Ako je lijek označen crnim trokutom, to znači da ga

se prati intenzivnije od ostalih lijekova. To je općenito zbog toga što je o tom lijeku dostupno manje informacija nego o drugim lijekovima, primjerice, jer je nov na tržištu ili zato što postoje ograničeni podaci o njegovoj dugoročnoj primjeni (60).

Kod prijave nuspojava svih bioloških lijekova, pa tako i biosličnih, potrebno je navesti zaštićeni (engl. *brand*) naziv lijeka, proizvođača lijeka i broj serije lijeka, što znači da se biološki lijekovi propisuju prema zaštićenom nazivu lijeka, a ne prema INN nazivu. Razlog je takve identifikacije lakše praćenje reakcija (npr. imunogeničnosti) na moguće razlike između serija istog lijeka kao i između lijekova iste djelatne tvari, a različitih proizvođača (10).

4.3.2. Zamjenjivost

(Ne)mogućnost zamjene bioloških/biosličnih lijekova tijekom trajanja terapije donosi podijeljena stajališta liječnika, ljekarnika, proizvođača i regulatornih tijela. Iako je EMA definirala bioslični lijek kao kvalitetnu, djelotvornu i sigurnu terapijsku alternativu referentnom lijeku, preporuke i principe zamjenjivosti biosličnog i referentnog lijeka određuje svaka država članica zasebno na nacionalnoj razini. Većina država članica zauzima stav da izravna zamjena bioloških lijekova (tzv. automatska ili generička supstitucija), koja ne zahtijeva savjetovanje i posebno praćenje liječnika specijalista, kao što je moguće s generičkim lijekovima, nije dopuštena.

Navedeno se ne odnosi samo na zamjenu originalnog biološkog lijeka s biosličnim lijekom već i biosličnog lijeka s originalnim biološkim lijekom ili jednog biosličnog lijeka s drugim biosličnim lijekom. Glavni je argument protiv izravne zamjenjivosti nemogućnost identifikacije, analize podataka i praćenja nuspojava lijeka tijekom primjene. To istovremeno ne znači da bioslični lijekovi nisu djelotvorni i sigurni kao originalni biološki lijekovi, već je važno da svaki lijek bude identificiran i praćen tijekom primjene, što kod izravne zamjene ne bi bilo moguće. Također, automatska zamjena mogla bi biti problem i s praktičnog gledišta, a posebno u bolesnika koji sami primjenjuju lijekove (npr. različiti način pripreme, primjene ili pakiranja lijeka), što može povećati rizik za pogrešku i/ili smanjiti suradnju bolesnika (2).

Također, praksa je većine europskih zemalja da se biološke lijekove u terapiji istog pacijenta može zamjenjivati samo na temelju preporuke i uz nadzor liječnika koji propisuje lijek i koji će pratiti prijelaz na drugi lijek te uz informiranost bolesnika. Na taj način donošenje odluke o propisivanju biosličnog ili referentnog lijeka postaje odgovornost liječnika u dogovoru s bolesnikom. Engleski nacionalni zdravstveni sustav (engl. *National Health System, NHS*) u svojim preporukama navodi kako bi liječnici kod donošenja odluka o propisivanju biosličnog lijeka trebali uzeti u obzir jesu li su lijeku odobrene sve potrebne indikacije, je li dostupan u potrebnim putovima primjene, jačinama i farmaceutskim oblicima te jesu li dodaci za primjenu lijeka prikladni za bolesnika (61). Stoga je očito da je od velike važnosti podrška liječnicima i bolesnicima u obliku edukacija i smjernica o liječenju biosličnim lijekovima kao i prikupljanje informacija i dokaza o sigurnosti biosličnih lijekova u terapijskoj primjeni.

Iako se nepovjerenje u zamjenjivost bioloških lijekova temelji na nedostatnim podacima o sigurnosti ovakve primjene bioloških lijekova, dosad nisu objavljeni podaci o nuspojavama uzrokovanim zamjenom referentnog lijeka biosličnim lijekom, a teorijska je osnova za pojavom takvih nuspojava slaba. Rizik od pojave nuspojava tijekom zamjene sličan je riziku povezanom s promjenama u postupku proizvodnje biološkog lijeka, što je čest slučaj. Njemački Paul-Ehrlich Institut navodi kako dosad nije zaprimljen niti jedan izvještaj o problemima u terapiji biosličnim infliksimabom zbog zamjene referentnog lijeka biosličnim (62).

Tematika zamjenjivosti biosličnih i referentnih lijekova važna je i zbog velikih troškova u zdravstvu koje donosi kronična dugotrajna terapija biološkim lijekom. Tako je preporuka nizozemske agencije da novi bolesnici započnu terapiju liječenja s biosličnim lijekom (63).

4.3.3. Imunogeničnost

Biološki lijekovi, za razliku od kemijskih lijekova, mogu uzrokovati pojavu imunogeničnosti, odnosno izazivanja imunog odgovora u ljudskom organizmu, jer su po strukturi proteini ili peptidi te ih imunološki sustav čovjeka može prepoznati kao strano tijelo. Na imunogeničnost proteina, odnosno pojavu neželjene imune reakcije, utječu čimbenici povezani s lijekom (postupak proizvodnje,

promjene u aminokiselinskom slijedu, glikozilacija, denaturacija ili agregacija, prisutnost onečišćenja), čimbenici povezani s bolesnikom (dob, spol, nasljeđe, povijest bolesti) te čimbenici povezani s liječenjem (jačina lijeka, put primjene, ostali lijekovi u terapiji) (64).

Potencijalna imunogeničnost predstavlja glavni sigurnosni problem s biološkim/biosličnim lijekovima. Iako nastanak protutijela uopće ne mora imati nepoželjni sigurnosni ili klinički učinak, ipak su mogući i neželjeni učinci poput pojave reakcija preosjetljivosti ili pak može doći do neutralizacije biološke aktivnosti endogenog proteina. Često citirani primjer utjecaja varijabilnosti između bioloških lijekova na sigurnost je povećana pojava čiste aplazije crvenih krvnih stanica (engl. *Pure red cell aplasia*, PRCA) u periodu između 1998. i 2003., kod bolesnika s kroničnom bubrežnom bolesti (engl. *Chronic kidney disease*, CKD) koji su uzimali biološki lijek Eprex® (epoetin alfa). Slučajevi su bili su povezani s padom imune tolerancije pri primjeni rekombinantnog ljudskog eritropoetina, posebno pri subkutanoj primjeni, što je rezultiralo stvaranjem neutralizirajućih protutijela za rekombinantni i prirodni (endogeni) eritropoetin. Značajni porast imunogeničnosti podudara se s malom promjenom u formulaciji lijeka 1998., zamjenom pomoćnih tvari stabilizatora ljudskog serumskog albumina (engl. *Human serum albumin*, HSA) s glicinom i polisorbatom 80, s ciljem udovoljavanja europskim regulativama o korištenju sirovina ljudskog/životinjskog porijekla. Nakon što je subkutana primjena definirana kao kontraindikacija, učestalost PRCA-e se smanjila. Slučaj Eprexa® ističe zabrinutost vezanu uz nepredvidivost i ozbiljnost imunogeničnosti bioloških lijekova kao i potencijalne kliničke posljedice njihove široke primjene. Očito je da mala izmjena u proizvodnom postupku može imati značajni utjecaj na klinički učinak. Mehanizam kojim Eprex® izaziva PRCA-u nije sasvim pojašnjen te postoje dvije hipoteze. Jedna navodi da dolazi do stvaranja micela/agregata iz polisorbata 80 i eritropoetina tijekom čuvanja lijeka, a druga uzrok nalazi u reakciji organskih spojeva koji se otpuštaju iz neobloženog gumenog čepa u štrcaljki za supkutanu primjenu (engl. *leachables*) s polisorbatom 80 (18). Problem s gumenim čepom je kod biosličnog epoetina Abseamed® riješen korištenjem gumenog čepa obloženog teflonom, kako bi se spriječilo potencijalno otpuštanje spojeva iz spremnika u lijek.

Rizik od imunogeničnosti postoji kod svih bioloških lijekova, a ne samo kod biosličnih lijekova. Za odobrene bioslične lijekove dokazano je da imaju sigurnosni profil usporediv s referentnim lijekom stoga nije znanstveno utemeljeno smatrati da biosličan lijek može izazvati više imunih reakcija od referentnog lijeka. Štoviše, dosad nije bilo dokaza o klinički relevantnom povećanju imunogeničnosti kod odobrenih biosličnih lijekova (35).

4.4. Globalna regulativa biosličnih lijekova

Zbog postavljenih visokih standarda kakvoće, djelotvornosti i sigurnosti, europski regulatorni princip odobravanja biosličnih lijekova predstavlja odličan model ostalim zemljama širom svijeta. Navedeni princip usvojile su zemlje visoko reguliranih tržišta poput Australije, Kanade, Japana i Južne Afrike dok je u SAD-u, zbog nedostatka novijih jasnijih smjernica (*Biologics Price Competition and Innovation Act-BPCI Act* iz 2009.), tek nedavno (6.3.2015.) odobren prvi bioslični lijek Zarxio® (filgrastim), Sandoz te 5.4.2016. Inflectra® (infliksimab), Celltrion.

WHO je 2010. objavio smjernicu *Guidelines on Evaluation of Similar Biotherapeutic Products* za ocjenu SBP (*Similar biotherapeutic products*), temeljenu na sličnim znanstvenim principima kao EMA-ine smjernice, a koja je namijenjena nacionalnim regulatornim tijelima za uspostavljanje/definiranje regulatornog pristupa za odobravanje biosličnih lijekova.

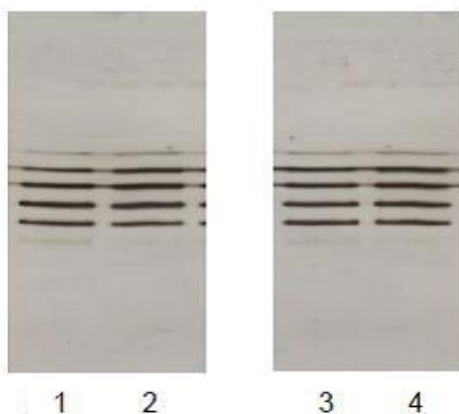
Iako se regulativa biosličnih lijekova globalno brzo razvija i velik broj zemalja ima uspostavljen regulatorni pristup za njihovo odobravanje temeljen na EMA i WHO principima, i dalje postoje varijacije u definicijama, terminologiji, referentnom lijeku za ispitivanje usporedivosti i opsegu podataka potrebnih za davanje odobrenja (65). Osnovna razlika u regulatornom pristupu za bioslične lijekove između EMA-e i FDA-e mogućnost je izravne zamjenjivosti biosličnog lijeka s referentnim biološkim lijekom. U SAD-u ljekarnik može zamijeniti referentni lijek sa zamjenjivim biosličnim lijekom bez posredovanja liječnika koji propisuje lijek dok je u EU zamjenjivost biosličnih lijekova prepuštena nacionalnim regulativama članica koje većinom ne dopuštaju izravnu zamjenjivost s referentnim biološkim lijekom.

Tablica 15. Definicije i terminologija biosličnih lijekova (65).

Izvor	Naziv	Definicija	Referentni lijek
EU	<i>Biosimilar</i>	Biološki lijek kojem je dokazana sličnost s referentnim biološkim lijekom	Odobren na EGP-u na temelju potpunih podataka o Q/S/E
WHO	<i>Similar biotherapeutic product (SBP)</i>	Biološki proizvod koji je sličan odobrenom referentnom biološkom proizvodu u kakvoći, djelotvornosti i sigurnosti	Odobren na tržištu zemlje članice s uređenim regulatornim sustavom, na temelju potpunih podataka o Q/S/E
SAD	<i>Follow on biologic (FOB)</i>	Biološki lijek visoke sličnosti referentnom biološkom lijeku odobrenom u SAD-u, bez značajnih razlika u sigurnosti, čistoći i aktivnosti	Moguće je koristiti referentni lijek s drugih tržišta pod uvjetom da se provede usporedno ispitivanje s referentnim lijekom iz SAD-a
Kanada	<i>Subsequent-entry biologic (SEB)</i>	Biološki lijek koji dolazi na tržište nakon prethodno odobrene verzije te je sličan referentnom biološkom lijeku	Odobren na temelju potpunih podataka o Q/S/E na dobro uređenom regulatornom tržištu
Japan	<i>Follow-on Biologics</i>	Biološki lijek, usporediv s odobrenim biološkim lijekom od inovativnog proizvođača	Odobren na tržištu Japana na temelju potpunih podataka o Q/S/E

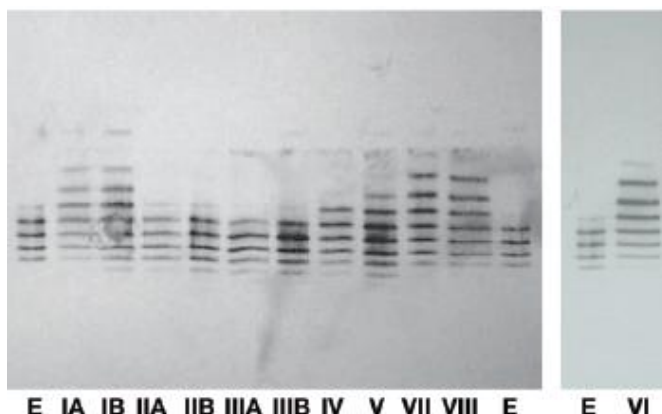
Q/S/E (kakvoća/sigurnost/djelotvornost);

Važnost WHO smjernice za odobravanje biosličnih lijekova je primjena u slabije reguliranim tržištima gdje su kakvoća, sigurnost i djelotvornost lijekova koji nastoje biti slični biološkim lijekovima često upitni. Kolike su razlike između visoko reguliranih (EU, SAD, Australija, Kanada, Japan) i slabije reguliranih tržišta (Azija, Afrika), pokazuju primjeri usporedne analize rekombinantnih eritropoetina s tržišta Azije i Južne Amerike s referentnim lijekom Eprex® (18) te biosličnog eritropoetina Binocrit® odobrenog u EU s istim referentnim lijekom (66). Dok je metodom izoelektričnog fokusiranja dokazana visoka sličnost lijeka Binocrit® s referentnim lijekom (slika 16), istom metodom pokazano je da eritropoetini s azijskog tržišta nisu usporedivi s referentnim lijekom (slika 17). Naime, u nekim uzorcima detektirane su dodatne vrpce izoformi u odnosu na izoforme referentnog lijeka te su uočena odstupanja od postavljenih zahtjeva kakvoće u određivanju ukupnih proteina i biološke aktivnosti, što ne mora imati klinički značaj, ali upućuje na to da neki proizvođači nemaju odgovarajuću kontrolu nad proizvodnim postupkom.



Slika 16. Usporedni gelovi izoelektričnog fokusiranja – epoetini s tržišta EU (66).

1, 2 = Eprex®; 3, 4 = Binocrit®;



Slika 17. Usporedni gelovi izoelektričnog fokusiranja – epoetini s azijskog i južnoameričkog tržišta (21).

E = Eprex®; IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB = EPO Koreja; IV, V = EPO Argentina; VI = EPO Indija; VII, VIII = Kina;

Globalna harmonizacija regulatornih pristupa dugoročni je cilj nacionalnih regulatornih tijela koji će značajno unaprijediti zdravstvo i povećati dostupnost biosličnih lijekova. Bez obzira na veće ili manje razlike u regulatornim principima, osnovne smjernice u odobravanju biosličnih lijekova trebale bi biti ujednačene:

- Generički pristup se ne može primijeniti na bioslične lijekove
- Bioslični lijekovi trebaju biti slični referentom lijeku u kakvoći, djelotvornosti i sigurnosti
- Sličnost između biosličnog i referentnog lijeka dokazuje se usporednim ispitivanjima, s naglaskom da rezultati usporedbe na razini kakvoće određuju opseg usporednih nekliničkih i kliničkih ispitivanja
- Ocjena biosličnih lijekova temelji se na *case by case* principu za pojedinu skupinu lijekova
- Važnost farmakovigilancije biosličnih lijekova s ciljem praćenja sigurnosti biosličnih lijekova (65).

4.5. Bioslični lijekovi druge generacije

Na tržištu bioloških lijekova nalaze se i nove, poboljšane verzije bioloških lijekova (engl. *biobetters*), dizajnirane s ciljem dobivanja superiornog proizvoda u odnosu na izvorni lijek, u smislu poboljšane djelotvornosti ili primjene lijeka. Strategija razvoja takvih lijekova obuhvaća najčešće modifikacije molekule izvornog lijeka (vezanje stabilizacijskih struktura-PEG, modifikacije Fc regije protutijela, ciljana mutageneza, promjene u glikozilaciji), promjene u formulaciji lijeka ili puta primjene lijeka (manje invazivan put primjene). Dobiva se lijek istih indikacija kao izvorni lijek, ali s prednostima u liječenju zbog produljenja poluvijeka, smanjene toksičnosti i imunogeničnosti ili poboljšanih PD učinaka (54). Primjer je Neulasta®, Amgen, pegilirani filgrastim, odnosno poboljšana verzija filgrastima Neupogena®. Oba lijeka imaju isti mehanizam djelovanja, a to je povećanje proizvodnje neutrofila kod bolesnika u kemoterapiji no, zbog duljeg poluvijeka, Neulasta® se primjenjuje jednom u ciklusu kemoterapije dok se Neupogen® primjenjuje jednom dnevno. Aranesp®, Amgen, darbepoetin alfa je analog eritropoetina također dizajniran s ciljem produljenja poluvijeka u odnosu na eritropoetin Epogen®, Amgen (povećanje stupnja glikozilacije). Zanimljiv primjer biološkog lijeka druge generacije koji bi mogao smanjiti potrošnju i izvornog biološkog lijeka i biosličnog lijeka je Gazyvaro®, Roche (obinutuzumab), anti-CD20 monoklonsko protutijelo poboljšane djelotvornosti u odnosu na izvorni lijek MabThera®, Roche (rituksimab). Gazyvaro® je odobren u EU od 2014. dok prvi bioslični rituksimab još čeka svoje odobrenje u EU (67).

Očito je da biološki lijekovi druge generacije uzimaju veliki dio tržišnog udjela zbog svojih poboljšanih karakteristika. No s obzirom na to da se odobravaju na temelju potpune dokumentacije, kao novi biološki lijek, i cijena im je viša u odnosu na bioslični lijek zbog troškova nekliničkih i kliničkih ispitivanja. Također, i za *biobetter* lijekove se nakon isteka perioda zaštite očekuje zaprimanje zahtjeva za njihove bioslične verzije. U postupku ocjene od strane CHMP-a trenutno se nalaze čak tri zahtjeva za bioslični pegfilgrastim (tablica 5) koji će u slučaju pozitivnog ishoda ocjene dobiti

odobrenje za stavljanje u promet nakon isteka perioda zaštite referentnom lijeku Neulasta® u kolovozu 2017. godine.

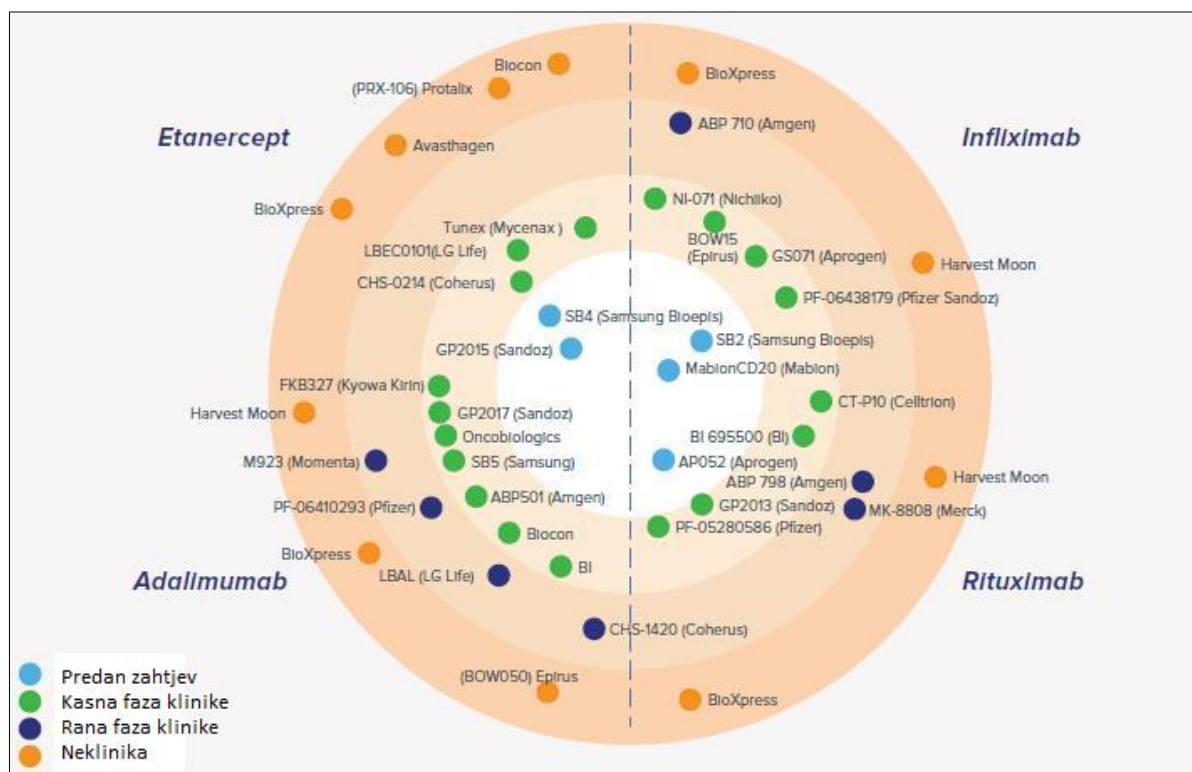
4.6. Ekonomski aspekti biosličnih lijekova

Vrijednost svjetskog tržišta biosličnih lijekova u 2015. iznosila je 2,29 milijardi dolara, no očekuje se da će do 2020., uz godišnji rast od 22,1 %, iznositi 6,22 milijardi dolara. Ključni igrači na tržištu biosličnih lijekova trenutačno su Sandoz International GmbH (Njemačka), Hospira, Inc. (SAD), Teva Pharmaceutical Industries Ltd. (Izrael), Dr. Reddy's Laboratories (Indija), Biocon Limited (Indija), Mylan, Inc. (SAD), Amgen (SAD), Celltrion Inc. (Južna Korea), Roche Diagnostics (Švicarska) i Merck KGaA (Njemačka) (68).

Na rast tržišta u narednim godinama pozitivno će utjecati pritisak zdravstva za smanjenjem velikih troškova liječenja originalnim biološkim lijekovima i većom potražnjom biosličnih lijekova zbog niže cijene i sve većeg broja prikupljenih dokaza o njihovoj djelotvornosti i sigurnosti. Također je sve veći broj originalnih bioloških lijekova kojima ističe period zaštite podataka. No, čimbenici poput kompleksnosti i velikih troškova razvoja i proizvodnje lijeka, strogi regulatorni zahtjevi, inovativnost proizvođača novih generacija zaštićenih bioloških lijekova i otpor tradicionalnih liječnika propisivanju biosličnih lijekova još uvijek obuzdavaju rast ovog tržišta. Razlika u cijeni između originalnog i biosličnog lijeka još uvijek je premala i uštede u zdravstvu primjenom biosličnih lijekova nisu toliko značajne kao kod primjene generičkih lijekova. Troškovi bržeg i jednostavnijeg razvoja generičkog lijeka kreću se oko 2-3 milijuna dolara dok su troškovi složenog i dugotrajnog razvoja biosličnog lijeka oko 75-250 milijuna dolara (38).

U sljedećih pet godina očekuje se najznačajniji rast u skupini glikoziliranih rekombinantnih proteina, prvenstveno zbog velike potražnje za monoklonskim protutijelima u liječenju karcinoma, autoimunih i infektivnih bolesti te krvnih poremećaja. Naime, nekim od najprodavanijih monoklonskih protutijela isteći će period zaštite i očekuje se značajni porast broja biosličnih monoklonskih protutijela, što, s obzirom na vrlo visoku cijenu takvih lijekova, predstavlja dugoročnu uštedu troškova u zdravstvu (68). Većina kandidata biosličnih lijekova koji se trenutačno nalaze u različitim fazama razvoja dolaze iz

četiri ključne skupine monoklonskih protutijela (slika 18). Do 2020. se, zbog dolaska sve većeg broja biosličnih monoklonskih protutijela, očekuju uštede čak do 100 milijardi eura.



Slika 18. Kandidati biosličnih monoklonskih protutijela u različitim fazama razvoja lijeka (71).

Talijanski istraživači proveli su retrospektivnu analizu troškova liječenja 56 bolesnika koji su prošli autolognu transplantaciju hematopoetskih matičnih stanica (engl. *Haematopoietic stem cell transplantation*, HSCT) te su u periodu od 2011. do 2014. primali bioslične filgrastime (Tevagrastim® i Zarzio®) i originalni filgrastim (Neupogen®). Zaključeno je da ukupni troškovi liječenja Tevagrastimom® iznose 250,73 eura po bolesniku, što je za 56 % manje od liječenja Neupogenom®, dok ukupni troškovi liječenja lijekom Zarzio® iznose 76,22 eura po bolesniku, što je za 86 % manje od liječenja originalnim lijekom (69).

Na europskom tržištu bioslični lijekovi čine 12 % tržišta svih epoetina alfa, 7 % tržišta hormona rasta i 18 % tržišta filgrastima (70). Udio biosličnih lijekova u ukupnoj potrošnji bioloških lijekova najznačajniji je u Njemačkoj, Velikoj Britaniji, Francuskoj, Španjolskoj i Italiji.

5. ZAKLJUČAK

- Bioslični lijekovi su kvalitetna, djelotvorna i sigurna terapijska alternativa referentnim biološkim lijekovima te je njihovom primjenom omogućena bolja dostupnost lijekova za liječenje teških bolesti, uz financijske uštede u zdravstvu, jačanje inovativnosti u farmaceutskoj industriji te stimuliranje tržišnog natjecanja.
- Zbog varijabilnosti bioloških sustava i kompleksnosti proizvodnog postupka, za bioslične lijekove ne može se primijeniti generički princip odobravanja, već se primjenjuje znanstveno-regulatorni princip usporedivosti, temeljen na dokazu visokog stupnja sličnosti u kakvoći, djelotvornosti i sigurnosti između biosličnog i referentnog lijeka.
- Visoke standarde razvoja i odobravanja biosličnih lijekova, koje je utemeljila i već 10 godina intenzivno razvija Europska agencija za lijekove, preuzela su i ostala visoko regulirana tržišta poput Kanade, Australije, Japana i SAD-a.
- Budući da se bioslični lijekovi odobravaju centraliziranim postupkom, raspoloživi su za terapijsku primjenu na cijelom području Europske unije.
- Točna identifikacija, sigurno propisivanje i doziranje te praćenje sigurnosti primjene tijekom životnog ciklusa biološkog lijeka omogućeno je praćenjem lijeka prema zaštićenom nazivu, nazivu proizvođača i serijskom broju lijeka.
- Za odobrene bioslične lijekove dokazano je da imaju sigurnosni profil usporediv s referentnim lijekom te stoga nije znanstveno utemeljeno smatrati da bioslični lijek može izazvati više imunih reakcija od referentnog lijeka.
- S obzirom na to da je razvoj biosličnog lijeka vrlo opsežan, skup i dugotrajan te načelno nije značajno jeftiniji i vremenski kraći od razvoja originalnog lijeka, razlike u cijeni između originalnog i biosličnog lijeka i dalje su premale te ne donose znatnije uštede u zdravstvu, kao kod primjene generičkih lijekova. Rast tržišta biosličnih lijekova obuzdavaju i inovativni proizvođači poboljšanih verzija bioloških lijekova novih generacija.

- U većini europskih zemalja nije dopuštena izravna zamjena bioloških/biosličnih lijekova bez preporuke liječnika specijalista. Biološke lijekove u terapiji istog pacijenta moguće je zamjenjivati samo na temelju preporuke i uz nadzor liječnika specijalista koji će pratiti prijelaz na drugi lijek uz informiranost bolesnika.
- Razlozi su nepovjerenja liječnika prema biosličnim lijekovima rizik od neželjenih imunih reakcija zbog nedostatnih podataka o sigurnosti primjene, mogućnost ekstrapolacije indikacija referentnog lijeka bez provođenja kliničkih ispitivanja te izostanak jasnih i transparentnih smjernica za propisivanje i zamjenjivost biosličnih lijekova.

6. LITERATURA

1. Zakon o lijekovima. Narodne novine, broj: 76/2013. Dostupno na: http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_06_76_1522.html. Pristupano: 12.7.2014.
2. Agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED): Biološki i bioslični lijekovi. Dostupno na: <http://www.almp.hr/Lijekovi/Informacije-o-lijekovima/Bioloski-i-bioslicni-lijekovi/>. Pristupano 22.11.2015.
3. Agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED): Baza lijekova. Dostupno na: <http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/>. Pristupano: 23.11.2015.
4. Walsh G. Pharmaceutical Biotechnology: Concepts and Applications. John Wiley & Sons Ltd; 2007, str. 37-54.
5. Amgen Inc.: Biologics and biosimilars - An overview. Dostupno na: <http://www.amgenbiosimilars.com/resources/amgen-biosimilars-materials/>. Pristupano: 12.10.2014.
6. Leader B, Baca QJ, Golan DE. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. Nat Rev Drug Discov 2008; 7(1):21-39.
7. Schiestl M, Stangler T, Torella C i sur. Acceptable changes in quality attributes of glycosylated biopharmaceuticals. Nat Biotechnol 2011; 29 (4): 310-2.
8. GaBI Online - Generics and Biosimilars Initiative. Dostupno na: <http://gabionline.net/Reports/Biologicals-dominate-Europe-s-best-sellers>. Pristupano: 15.09.2016.
9. IMS Health: Top-Line Market Data. Dostupno na: <http://www.imshealth.com/en/about-us/news/top-line-market-data>. Pristupano: 15.9.2016.
10. EuropaBio: Guidel to Biological Medicines – A focus on Biosimilar Medicines. Dostupno na: http://www.europabio.org/sites/default/files/report/guide_to_biological_medicines_a_focus_on_biosimilar_medicines.pdf. Pristupano 12.10.2014.
11. Sekhon BS, Saluja V. Biosimilars - an overview. Biosimilars 2011; 1:1-11.
12. Declerck PJ. Biologicals and biosimilars: a review of the science and its implications. GaBI J 2012; 1(1): 13-6.
13. Ahmed I, Kaspar B, Sharma U. Biosimilars: impact of biologic product life cycle and European experience on the regulatory trajectory in the United States. Clin Ther 2013; 34(2):400-19.
14. European Medicines Agency (EMA): Note for guidance on Specifications: Test procedures and acceptance criteria for Biotechnological/Biological Products, CPMP/ICH/365/96 ICH Q6B. Dostupno na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002824.pdf. Pristupano: 23.11.2015.
15. Chirino AJ, Mire-Sluis A. Characterizing biological products and assessing comparability following manufacturing changes. Nat Biotechnol 2004; 22(11): 1383-91.
16. McCamish M, Woollett G. Worldwide experience with biosimilar development. mAbs 2011; 3(2): 212-220.

17. European Generic and Biosimilar medicines Association (EGA): Biosimilars handbook. Dostupno na: http://www.egagenerics.com/images/Website/EGA_BIOSIMILARS_handbook_en.pdf. Pristupano 5.8.2014.
18. GaBI Online - Generics and Biosimilars Initiative. Dostupno na: <http://www.gabionline.net/Biosimilars/General/US-67-billion-worth-of-biosimilar-patents-expiring-before-2020>. Preuzeto: 15.9.2016.
19. Rovira J i sur. The Impact of Biosimilars' Entry in the EU Market. Granada: Andalusian School of Public Health; 2011.
20. Minghetti P i sur. The regulatory framework of biosimilars in the European Union. Drug Discov. Today 2012; 17: 63–70.
21. Schellekens H. Biosimilar therapeutics – what do we need to consider. Nephrol Dial Transplant Plus 2009; 2(1): i27 – i36.
22. European Commission Directive 2003/63/EC of 25 June 2003 amending Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council on the Community code relating to medicinal products for human use. Official Journal of the European Union 2003; L 159/46-94.
23. European Medicines Agency (EMA): Comparability of Biotechnological/Biological Products, CPMP/ICH/5721/03 ICH Q5E. Dostupno na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002805.pdf. Pristupano: 12.7.2014.
24. European Medicines Agency (EMA): Mrežne stranice. Dostupno na: <http://www.ema.europa.eu/ema/>. Pristupano: 25.11.2015.
25. Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 laying down Community procedures for the authorisation and supervision of medicinal products for human and veterinary use and establishing a European Medicines Agency. Official Journal of the European Union 2004; L 136/1-70.
26. Bego M. Provjera točnosti i prikladnosti prijevoda informacija o lijeku na jezike zemalja članica Europske unije za lijekove odobrene centraliziranim postupkom. Farm. Glas. 2014; 70: 255-257.
27. European Medicines Agency (EMA): EMA Procedural advice for users of the Centralised Procedure for Similar Biological Medicinal Products applications, EMA/940451/2011. Dostupno na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Regulatory_and_procedural_guideline/2012/04/WC500125166.pdf. Pristupano: 24.7.2014.
28. Narodne novine: Pravilnik o davanju odobrenja za stavljanje lijeka u promet, broj: 83/2013. Dostupno na: http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_07_83_1802.html. Pristupano: 11.12.2015.
29. EudraLex Volume 2B: Notice to Applicants, Medicinal products for human use, Presentation and Content of the Dossier. Dostupno na: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-2/b/update_200805/ctd_05-2008_en.pdf. Pristupano: 11.12.2015.
30. Bui LA i sur. Key considerations in the preclinical development of biosimilars. Drug Discov Today. 2015; S1 (20): 3-15.

31. Herzyk DJ. Chapter 5 - Overview of Biosimilar Therapeutics. U: Plitnick M, Herzyk DJ. Nonclinical Development of Novel Biologics, Biosimilars, Vaccines and Specialty Biologics. Elsevier Inc. 2013; str. 141-157.
32. Mellstedt H, Niederwieser D, Ludwig H. The challenge of biosimilars. Annals of Oncology 2008; 19 (3): 411–419.
33. Biosimilar facts: Manufacturing variations. Dostupno na: <http://www.biosimilarfacts.com/what-is-a-biosimilar/manufacturing-variations/>. Pristupano: 12.4.2016.
34. European Medicines Agency (EMA): Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (revision 1), EMA/CHMP/BWP/247713/2012. Dostupno na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2014/06/WC500167838.pdf. Pristupano: 9.1.2015.
35. Tsuruta LR, dos Santos ML, Moro AM. Biosimilars Advancements: Moving on to the Future. Biotechnol. Prog. 2015; 31(3): 1-11.
36. European Medicines Agency (EMA): Guideline on similar biological medicinal products, CHMP/437/04 Rev 1. Dostupno na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2014/10/WC500176768.pdf. Pristupano: 08.1.2015.
37. Berkowitz, SA i sur. Analytical tools for characterizing biopharmaceuticals and implications for biosimilars. Nat Rev Drug Discov. 2012; 11(7): 527-540.
38. Sandoz: Science-based Development of Biosimilars. Dostupno na: <http://www.sandoz-biosimilars.com/en/biosimilars/development-of-biosimilars-en.shtml>. Pristupano 12.10.2014.
39. European Medicines Agency (EMA): Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues, EMEA/CHMP/BMWP/42832/2005 Rev1. Dostupno na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2015/01/WC500180219.pdf. Pristupano: 1.5.2016.
40. Van Aerts, LA i sur. Biosimilars entering the clinic without animal studies: a paradigm shift in the European Union. MAbs. 2014; 6: 1155–1162.
41. Hospira Inc.: Developing biosimilars. Dostupno na: https://www.hospira.com.au/en/about_hospira/biologics/developing_biosimilars. Pristupano: 15.09.2016.
42. Drug Bank – Drug & Drug Target Database: Filgrastim. Dostupno na: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00099>. Pristupano: 15.9.2016.
43. Agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED): Baza lijekova-Neupogen. Dostupno na: <http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Neupogen-30-MU-06-mgml-otopina-za-injekciju-u-napunjenjoj-scarontrcaljki/9405/>. Pristupano: 26.7.2016.
44. European Medicines Agency (EMA): Assessment report for Biograstim, EMEA/H/C/826. Dostupno na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/000826/WC500053904.pdf. Pristupano: 26.7.2016.

45. European Medicines Agency (EMA): Assessment report for Zarzio, EMEA/H/C/000917. Dostupno na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/000917/WC500046528.pdf. Pristupano: 26.7.2016.
46. European Medicines Agency (EMA): Assessment report for Nivestim, EMEA/H/C/001142. Dostupno na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/000917/WC500046528.pdf. Pristupano: 26.7.2016.
47. European Medicines Agency (EMA): Assessment report for Accofil, EMEA/H/C/003956. Dostupno na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/003956/WC500176711.pdf. Pristupano: 17.1.2015.
48. Drug Bank – Drug & Drug Target Database: Somatropin. Dostupno na: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00052>. Pristupano: 15.9.2016.
49. Agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED): Baza lijekova-Genotropin. Dostupno na: <http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Genotropin-12-mg-prascaronak-i-otapalo-za-otopinu-za-injekciju/7865/>. Pristupano: 27.7.2016.
50. Drug Bank – Drug & Drug Target Database: Erythropoietin. Dostupno na: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00016>. Pristupano: 15.9.2016.
51. Agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED): Baza lijekova-Eprex. Dostupno na: <http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Eprex-10-000-IU1-ml-otopina-za-injekciju-u-napunjenoj-strcaljki-/7368/>. Pristupano: 28.7.2016.
52. Drug Bank – Drug & Drug Target Database: Infliximab. Dostupno na: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00065>. Pristupano: 15.9.2016.
53. European Medicines Agency (EMA): Product information-Remicade. Dostupno na: http://www.ema.europa.eu/docs/hr_HR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000240/WC500050888.pdf. Pristupano 28.7.2016.
54. Drug Bank – Drug & Drug Target Database: Etanercept. Dostupno na: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00005>. Pristupano: 15.9.2016.
55. European Medicines Agency (EMA): Product information-Enbrel. Dostupno na: http://www.ema.europa.eu/docs/hr_HR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000262/WC500027361.pdf. Pristupano: 29.7.2016.
56. Drug Bank – Drug & Drug Target Database: Follitropin beta. Dostupno na: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00066>. Pristupano: 15.9.2016.
57. European Medicines Agency (EMA): Product information-Gonal-f. Dostupno na: http://www.ema.europa.eu/docs/hr_HR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000071/WC500023748.pdf. Pristupano: 29.7.2016.
58. European Medicines Agency (EMA): Assessment report for Abasalgar, EMEA/H/C/002835. Dostupno na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/002835/WC500175383.pdf. Pristupano: 29.7.2016.
59. Drug Bank – Drug & Drug Target Database: Insulin Glargine. Dostupno na: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00047>. Pristupano: 15.9.2016.

60. Agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED): Farmakovigilancija. Dostupno na: <http://www.halmed.hr/Farmakovigilancija/Sto-je-farmakovigilancija/Kako-pratimo-sigurnost-lijekova/>. Pristupano 29.7.2016.
61. National Health System England: Biosimilars. Dostupno na: <https://www.england.nhs.uk/wp-content/uploads/2015/09/biosimilar-guide.pdf>. Pristupano: 29.7.2016.
62. Paul Ehrlich-Institute: Position of Paul-Ehrlich-Institut regarding the use of biosimilars. Dostupno na: <http://www.pei.de/EN/medicinal-products/antibodies-immunoglobulins-fusion-proteins/monoclonal-antibodies/biosimilars/position-pei-interchangeability-biosimilars-content.html>. Pristupano: 29.7.2016.
63. Medicines Evaluation Board: MEB stance on prescribing biosimilars. Dostupno na: <https://english.cbg-meb.nl/latest/news/2015/03/31/meb-stance-on-prescribing-%E2%80%9Cbiosimilars%E2%80%9D>. Pristupano: 29.7.2016.
64. Schellekens H. Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2002; 1(6): 457-462.
65. Wang J, Chow S. On the Regulatory Approval Pathway of Biosimilar Products. *Pharmaceuticals* 2012; 5(4): 353-368.
66. Brockmeyer C, Seidl A. Binocrit: assessment of quality, safety and efficacy of biopharmaceuticals. *Eur J Hosp Pharm Prac* 2009; 15(2):34-40.
67. Anour R. Biosimilars versus 'biobetters' —a regulator's perspective. *GaBI J* 2014; 3(4): 166-7.
68. Markets and markets: Biosimilars Market by Product (Recombinant Non-Glycosylated Proteins (Insulin, Filgrastim, Interferons, rHGH), Glycosylated (Monoclonal Antibodies, EPO), Peptides (Glucagon, Calcitonin) & Application (Oncology, Blood Disorders) - Global Forecast to 2020. Dostupno na: <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biosimilars-40.html>. Pristupano 23.7.2015.
69. Bassi S i sur. Safety and efficacy of granulocyte colony-stimulating factor biosimilars in engraftment after autologous stem cell transplantation for haematological malignancies: a 4-year, single institute experience with different conditioning regimens. *Blood Transfus.* 2015; 2: 1-6.
70. Abbas R i sur. Considerations in the early development of biosimilar products. *Drug Discov Today.* 2015; 20(2): 1-9.
71. IMS Health: Delivering on the Potential of Biosimilar Medicines. Dostupno na: <http://www.imshealth.com/files/web/IMSH%20Institute/Healthcare%20Briefs/Documents/Institute%20Biosimilar%20Media%20Webinar%20March%2024%202016.pdf>. Pristupano: 15.9.2016.