

Primjena bioloških lijekova u veterinarskoj medicini

Kramarić, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:291730>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -
Repository of PHD, master's thesis](#)



**VETERINARSKI FAKULTET
SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

Martina Kramarić

**PRIMJENA BIOLOŠKIH LIJEKOVA U VETERINARSKOJ
MEDICINI**

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

ZAVOD ZA FARMAKOLOGIJU I TOKSIKOLOGIJU

Predstojnik: Doc. dr. sc. Jelena Šuran

Mentor: Doc. dr. sc. Jelena Šuran

dr. sc. Josipa Vlainić

Članovi povjerenstava za obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Frane Božić
2. dr. sc. Josipa Vlainić
3. doc.dr.sc. Jelena Šuran
4. zamjena prof. dr. sc. Andreja Prevendar Crnić

Zahvaljujem se svojim mentoricama doc.dr.sc. Jeleni Šuran i dr.sc. Josipi Vlanić na ustupljenom vremenu i pomoći tijekom pisanja ovog diplomskog rada. Posebne zahvale mojim roditeljima, obitelji, prijateljima na podršci tijekom cijelog studiranja, te kolegici Luciji Bastiančić, dr. vet. med. na pomoći kod oblikovanja diplomskog rada.

Popis kratica

ADCC- antitijelo ovisna stanična citotoksičnost (engl. antibody dependent cellular cytotoxicity)

ADCP- antitijelo ovisna stanična fagocitoza (engl. antibody dependent cellular phagocytosis)

AUC- analitičko ultracentrifugiranje (engl. analytical ultracentrifugation)

CDC- komplement ovisna citotoksičnost (engl. complement dependent cytotoxicity)

CD- nakupina diferencijacije (engl. cluster of differentiation)

CE- kapilarna elektroforeza (engl. capillary electrophoresis)

CHO- jajnik kineskog hrčka (engl. Chinese Hamster Ovary)

CRP- C - reaktivni protein (engl. C - reactive protein)

DNA- deoksiribonukleinska kiselina (engl. deoxyribonucleic acid)

EGA- Europsko udruženje za generičke i biološke lijekove (engl. European Generic and Biosimilar Medicines Association)

EMA- Europska agencija za lijekove (engl. European Medicines Agency)

EU- Europska unija (engl. European Union)

ESI- masena spektrometrija elektrosporne ionizacijom (engl. electrospray ionization mass spectrometry)

Fab- fragment koji veže antigen (engl. antigen-binding fragment)

Fac- fragment kristaliziran (engl. fragment crystallizable)

FFF- frakcioniranje u protočnom polju (engl. fractionation in the flow field)

GT- genska terapija (engl. gene therapy)

HALMED- Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode

HIC- kromatografija hidrofobnom interakcijom (engl. chromatography by hydrophobic interaction)

HPAEC-PAD- anionska kromatografija visoke pH s pulsirajućim ampermetrijskim detektorom (engl. high pH anion chromatography with pulsed ammeter detector)

IEC- ionsko - izmjenjivačka kromatografija (engl. ion exchange chromatograph)

LTCI- limfocitni T-stanični imunomodulator (engl. Lymphocyte T-cell immunomodulator)

MALDI-TOF MS- masena spektrometrija s matricom potpomognutom laserskom desorpcijom (engl. mass spectrometry with matrix assisted laser desorption)

MP- monoklinska protutijela (engl. monoclonal antibodies)

NK- prirodne (stanice) ubojice (engl. natural killer)

NMR- nuklearna magnetska rezonanca (engl. nuclear magnetic resonance)

PCR- metoda lančane reakcije polimeraze (engl. Polymerase chain reaction)

PRP- plazma bogata trombocitima (engl. Platelet rich plasma)

rDNA- rekombinirana DNA (engl. Recombinant deoxyribonucleic acid technology)

rAb- rekombinirana antitijela (engl. recombinant antibody)

rFP- rekombinantni fuzijski proteini (engl. recombinant fusion proteins)

RH-HPLC- tekućinska kromatografija obrnutih faza (engl. reverse phase liquid chromatography)

SEC- kromatografija isključenjem (engl. chromatography exclusion)

TPM- mapiranje peptida tripsinom (engl. trypsin peptide mapping)

USAD- Ministarstvo poljoprivrede Sjedinjenih Država (engl. United States Department of Agriculture)

WB- jednodimenzionalna poliakrilamid gel elektroforeza (engl. Western Blot)

WHO/SZO- Svjetska zdravstvena organizacija (engl. World Health Organization)

Sadržaj

1. UVOD.....	8
2. BIOLOŠKI LIJEKOVI – RAZVOJ BIOLOŠKE TERAPIJE.....	9
2.1. Što su biološki lijekovi?	10
2.2. Razlika biološke terapije i kemijske terapije.....	10
2.3. Bioslični lijekovi	12
3. MONOKLONSKA PROTUTIJELA I REKOMBINANTNI FUZIJSKI PROTEINI	13
3.1. Dobivanje monoklonskih protutijela i rekombiniranih fuzijskih proteina	16
3.2. Mehanizmi djelovanja monoklonskih protutijela i rekombiniranih fuzijskih proteina:.....	17
3.3. Indikacije	18
3.4. Učinkovitost	18
3.5. Sigurnost primjene.....	18
3.6. Prednosti i nedostaci.....	19
4. GENSKA TERAPIJA	20
4.1. Dobivanje genske terapije	20
4.2. Mehanizam djelovanja genske terapije	21
4.2. Indikacije	24
4.3. Učinkovitost i sigurnost.....	24
4.4. Prednosti i nedostaci.....	24
5. IMUNIZACIJA I ANTITUMORSKA CJEPIVA	25
5.1. Indikacije	25
5.2. Mehanizam djelovanja.....	26
5.3. Prednosti i nedostaci.....	27
6. IMUNOMODULATORI I IMUNOSUPRESIVI.....	28
6.1. Indikacije	29
6.2. Mehanizam djelovanja imunomodulatora	29
6.3. Prednosti i nedostaci.....	30
7. MATIČNE STANICE	31
7.1. Indikacije	32
7.2. Mehanizam djelovanja.....	33

7.3. Prednosti i nedostaci	34
8. PROCESI PROIZVODNJE BIOLOŠKIH LIJEKOVA – BIOTEHNOLOGIJA	35
8.1. Rekombinantna tehnika DNA	35
8.2. Proces proizvodnje rekombinantnih terapijskih proteina	36
9. PRIMJENA BIOLOŠKIH LIJEKOVA U VETERINARSKOJ MEDICINI	39
9.1. Biološke inovacije u veterini	40
9.1.1. Imunoterapija melanoma	43
9.1.2. Imunoterapija B i T limfoma	44
9.1.3. Imunoterapija osteoartritis i imunodeficijencije	45
9.1.4. Imunoterapija za atopijski dermatitis	47
9.1.5. Imunoterapija za tumor	48
9.1.6. Imunoterapija za tumor mliječne žlijezde	48
10. EKONOMSKI ASPEKTI BIOLOŠKIH LIJEKOVA	50
11. ZAKLJUČAK	52
12. LITERATURA	53
13. SAŽETAK	59
14. SUMMARY	60
15. ŽIVOTOPIS	61

1.UVOD

Znanstvenici i farmaceutska industrija sve više ulažu u istraživanja imunološkog sustava i razumijevanja patogeneze nastanka bolesti kako bi što bolje dizajnirali nove pametne lijekove, a među njima i biološke lijekove specifične za pojedine bolesti i stanja organizma u kojima su se pokazali učinkovitima (JOHNSTON, 2007.). Proteklih nekoliko godina napretkom biološke terapije u humanoj medicini, te obzirom na dobre rezultate u liječenju i remisiji bolesti, farmaceutske kompanije su odlučile ulagati u istraživanja te primjenu biološke terapije u kućnih ljubimaca i ostalih životinja (BAINBRIDGE, 2015.). Biotehnološkim postupcima znanstvenici dizajniraju nove biološke lijekove, uključujući matične stanice, plazmu bogatu trombocitima, faktore rasta i druge biološki aktivne dodatke koji se koriste u liječenju upala, kroničnih bolesti, tumora, alergija, zaraznih bolesti, te jačanju imunološkog sustava, stimulirajući pritom rad obrambenog sustava organizma (LA PRADE i sur., 2016.).

2. BIOLOŠKI LIJEKOWI – RAZWOJ BIOLOŠKE TERAPIJE

Razvoj biološke terapije počinje početkom prošlog stoljeća:

- 1913. godine donesena je prva licencirana dozvola za korištenje biološke terapije,
- 1941. godine odobrena su inaktivirana cjepiva protiv kolere u veterinarskoj medicini,
- 1943. godine odobrena su živa cjepiva,
- 1954. godine kombinacija virusa,
- 1979. godine prvo monoklonsko tijelo kao dijagnostički kit (USAD, 2013.).

Početkom 1986. godine dozvoljeno je korištenje prvog virusnog cjepiva s izbrisanim genima u veterinarskoj medicini, dok je 2005. godine korišteno prvo veterinarsko deoksiribonukleinsko (DNA) cjepivo. Prvo cjepivo protiv tumora dozvoljeno je 2007. godine, dok 2009. godine su istraživanja bioloških lijekova bila ubrzana zbog pandemije H1N1 influence i stvaranja kvalitetnijeg i učinkovitijeg cjepiva. Tokom 2012. godine dozvoljeno je korištenje prvog ribonukleinskog (RNA) cjepiva (USAD, 2013.). Paralelno s razvojem bioloških lijekova u Americi i Europi se provode istraživanja te je prvi biološki lijek u EU proizveden tehnologijom rDNA odobren krajem 1980-tih godina. Istraživanja, provjera kakvoće, administrativne procedure, te krajnje odobravanje su skup proces koji traje po nekoliko godina, pa i desetljeće. Mnogi s nestrpljenjem čekaju nadolazeće godine zbog isteka perioda zaštite pojedinih patenata i zaštite podataka o načinu proizvodnje pojedinih cjepiva i nosača (dodataka), obzirom se time otvara prostor za razvoj i odobravanje jeftinijih kopija bioloških i biosličnih lijekova koji će uvelike smanjiti troškove lijeka i povećati njihovu dostupnost (EGA, 2018.).

2.1. Što su biološki lijekovi?

Biološki lijekovi su specifično dizajnirani lijekovi koji sadrže jednu ili više djelatnih tvari dobivenih iz živog organizma, bilo da se radi o pojedinoj stanici ili nakupini njih, odnosno organu ili tkivu. Napretkom biotehnologije i genetskog inženjeringa omogućeno je otkrivanje i ugrađivanje sekvence gena koja kodira određeni proteinu u živu stanicu, koja u povoljnim uvjetima proizvodi željeni protein. Isti se daljnjim složenim postupcima izolira, te koristi kao djelatna tvar za određen lijek (KATZUNG i sur., 2011.).

U biološke lijekove se ubrajaju imunološki lijekovi (cjepiva, toksini, serumi i proizvodi alergena), lijekovi iz ljudske i životinjske krvi ili plazme (npr. albumini ili imunoglobulini), lijekovi dobiveni biološkim postupcima (postupci koji uključuju upotrebu živih sustava ili organizama), lijekovi za naprednu terapiju (lijekovi koji se temelje na genskoj terapiji, terapiji somatskim stanicama ili tkivnom inženjerstvu), te ostali lijekovi dobiveni iz biološkog izvora npr. heparin ili pankreatin (HALMED, 2015.).

2.2. Razlika biološke terapije i kemijske terapije

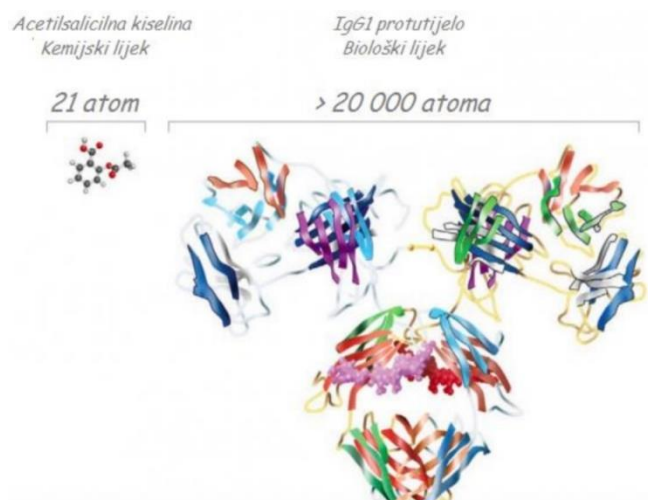
<i>Parametar</i>	<i>Kemijski lijek</i>	<i>Biološki lijek</i>
<i>Veličina</i>	Mala molekularna masa (100-1000 Da)	Velika molekularna masa (10000-150000 Da)
<i>Struktura molekule</i>	Jednostavna	Kompleksna
<i>Proizvodnja</i>	Kemijska sinteza (jednostavna procesna kontrola i pročišćavanje)	Biotehnološka proizvodnja iz živih organizama ili kultura stanica (složena procesna kontrola, dugotrajno i kompleksno pročišćavanje)
<i>Karakterizacija</i>	Potpuna karakterizacija (neovisna o proizvodnom postupku)	Nije moguća potpuna karakterizacija (ovisna o proizvodnom postupku)

<i>Stabilnost</i>	Većinom stabilni	Nestabilni/osjetljivi na vanjske uvijete
<i>Imunogeničnost</i>	Većinom nisu imunogenični	Imunogenični
<i>Putovi primjene</i>	Različiti	Parenteralno

Tablica 1. Usporedba kemijskih i bioloških lijekova (SOKOL, 2016.).

Kemijska lijek se dobiva sintetskim putem, kemijskim sintezama i postupcima koji obuhvaćaju jednostavniji proces kontrole i pročišćavanja, dok se biološki lijekovi dobivaju kompleksnim biološkim postupcima koje obuhvaćaju složenu procesnu kontrolu i pročišćavanje. Biološki lijekovi se sastoje od velikih kompleksnih molekula, često heterogene smjese proteina te je proizvodnja uvelike zahtjevnija (KATZUNG i sur., 2011.).

Biološki lijekovi se gotovo uvijek primjenjuju parenteralno u venu, mišić, te potkožno u obliku injekcije ili pomiješani s infuzijskom otopinom, i to zbog hidrofilnosti, velike molekularne mase, te moguće enzimatske razgradnje djelatne tvari. Biološki lijekovi se moraju pohranjivati u odgovarajućim uvjetima zbog proteinske strukture koja je osjetljiva, no istovremeno mogu izazvati imune odgovore upravo zbog kompleksne građe i same veličine molekule pa ih organizam prepoznaje kao strane pa tada dolazi do neželjenog odgovora tj. imunogeničnosti (DAVIS i sur., 2016.).



Slika 1. Usporedba veličine molekule kemijskog i biološkog lijeka (SOKOL, 2016.).

2.3. Bioslični lijekovi

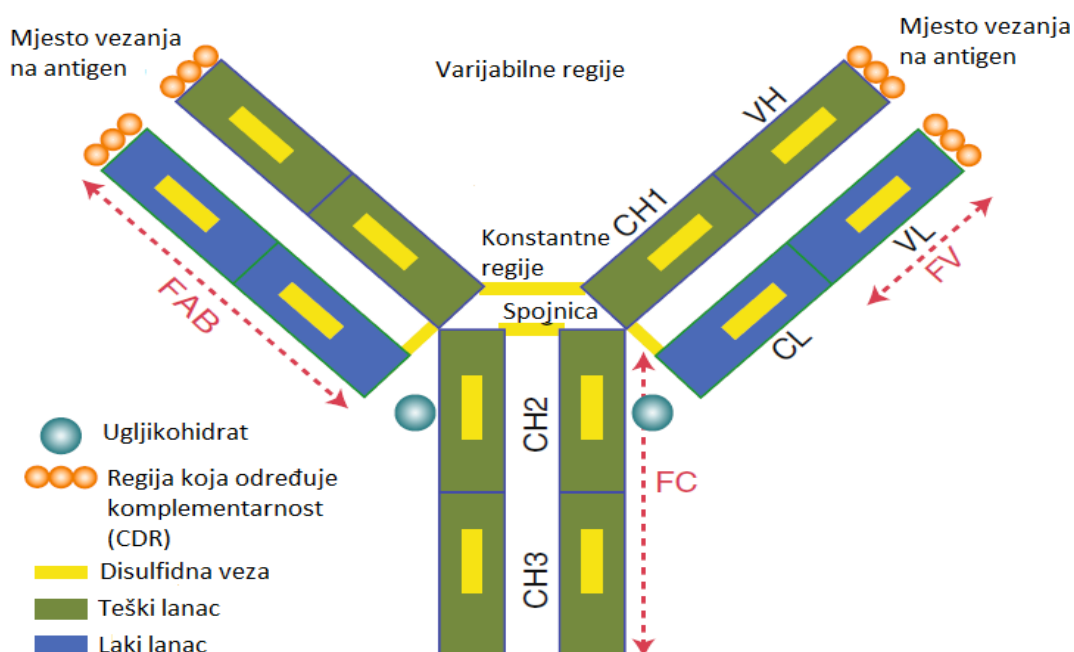
Biosličan lijek pripada skupini bioloških lijekova, te mu je sličan u pogledu kakvoće, biološke aktivnosti, sigurnosti primjene i djelotvornosti. Zbog složenosti strukture djelatne tvari i načina proizvodnje bioloških lijekova, teško je, odnosno gotovo nemoguće, proizvesti popuno identičnu strukturu djelatne tvari koju ima izvorni biološki lijek, te se na osnovu istraživanja i ispitivanja koja pokazuju sličnost daju odobrenja biosličnim lijekovima (HALMED, 2015.). Pošto većini prvih odobrenih bioloških lijekova istječe period zaštite industrijskog i intelektualnog vlasništva, rad na dizajnu novih biosličnih lijekova ubrzano raste. Prvi biosličan lijek u EU je odobren 2006. godine, te je EU postala prva u svijetu s postavljenim zakonskim okvirima za odobravanje biosličnih lijekova. EMA je odobrila nekoliko biosličnih monoklonskih protutijela, fuzijskih proteina, te hormona kao što su inzulin, hormon rasta i eritropoetin (EMA, 2019.).

Trenutno su u Europi postavljeni visoki standardi kvalitete, sigurnosti i djelotvornosti biosličnih lijekova. EU definira biosličan lijek kao onaj kojemu je dokazana velika sličnost s referentnim biološkim lijekom. Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) biosličan lijek definira kao biološki proizvod koji je sličan odobrenom referentnom biološkom proizvodu u kakvoći, djelotvornosti i sigurnosti. U Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) je biosličan lijek definiran kao sličan biološkom lijeku, te bez značajki u sigurnosti, čistoći i aktivnosti. Tako da i dalje postoje varijacije u definicijama, terminologiji i regulativnim podacima. Dakako da je kvaliteta a time i djelotvornost u EU i SAD-u veća, nego na slabije reguliranim tržištima Azije i Afrike (WANG i sur., 2012.).

3. MONOKLONSKA PROTUTIJELA I REKOMBINANTNI FUZIJSKI PROTEINI

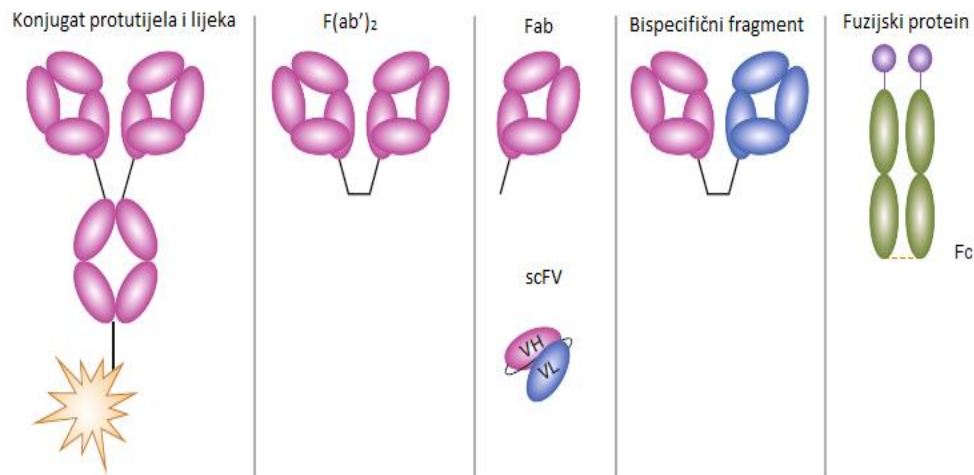
Imunologija je biomedicinska znanost koja proučava ustrojstvo i funkcije imunološkog sustava, te obrambene reakcije koje štite organizam od različitih agensa bilo živih ili kemijskih, a posebice je to izraženo za zarazne bolesti. Imunosni sustav se nalazi posvuda u tijelu, a čine ga stanice, tkiva i organi (HAJSING i sur., 2014.). Postoje dvije vrste imunosti, a to su nespecifična (urođena) i specifična (stečena), koja se dijeli na humoralnu i staničnu. Humoralna imunost posredovana je protutijelima koji su proizvod B limfocita, a stanična T limfocitima (HAJSING i sur., 2014.).

Protutijela su glikoproteini građeni od četveročlane jedinice koje se sastoje od dva laka i dva teška lanca, proizvode ih plazma stanice; koje su zadnji stadij diferencijacije limfocita B te se nalaze u krvnoj plazmi (HAJSING i sur., 2014.). Protutijela se sastoje od 2 različita dijela, a to su ulomak Fab i Fc. Fab je dio protutijela koji obavlja funkcije prepoznavanja i vezanja s antigenom, dok Fc aktivira efektorske mehanizme, kao što su sustav komplementa, makrofazi i stanice NK koje mogu uništiti antigen (ABBAS i sur., 2012.).



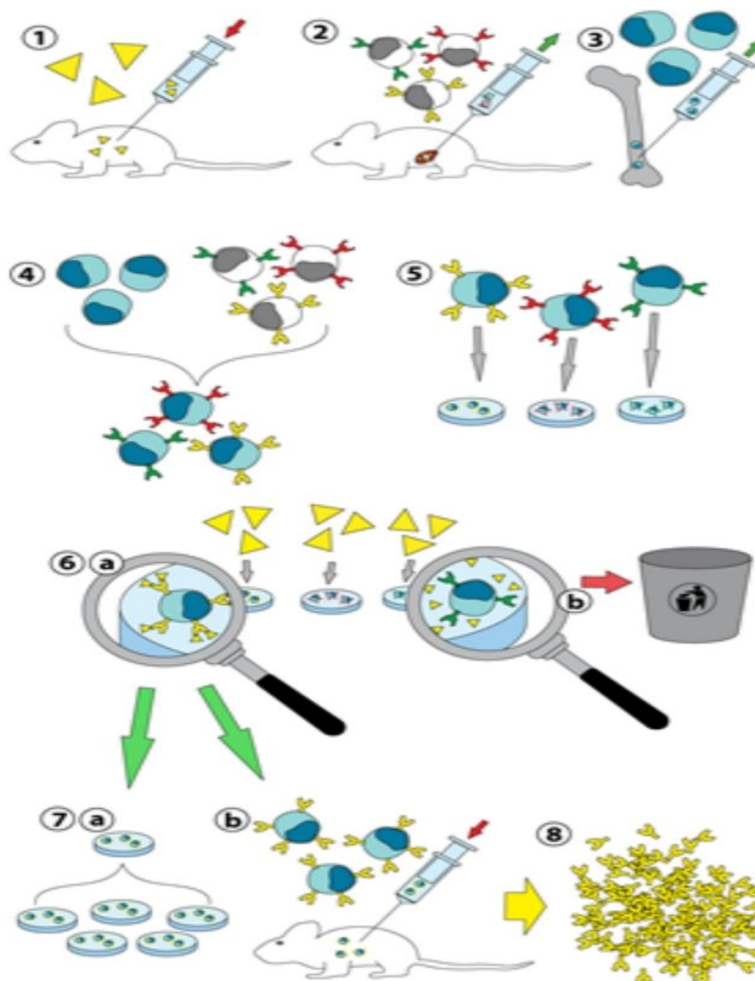
Slika 2. Struktura imunoglobulina G (BRBLIĆ, 2017.).

Protutijela se dijele na monoklonska i poliklonska - poliklonska se vežu na različite epitope antigena ili na različite antigene, te ih izlučuju plazma stanice. Monoklonska protutijela su skup imunoglobulina koji su proizvod plazma stanica jednog jedinog klona B limfocita, te se njihova proizvodnja odvija nakon stvaranja hibridoma - fuzije limfocita B koji proizvodi protutijelo (ABBAS i sur., 2012.).



Slika 3. Konjugati i inačice monoklonskih protutijela (MILIČIĆ, 2016.).

Umjesto proizvodnje konvencionalnih antitijela imuniziranjem pokusnih životinja, prije gotovo tri desetljeća otkrivena je laboratorijska metoda kojom je moguće ista stvarati u *in vitro* uvjetima. Metodu su prvi objavili 1975. godine Köhler i Milstein, a temeljila se na *in vitro* fuziji stanica koje proizvode antitijela s tumorskim stanicama čime nastaje „hibrid“. Tako stvorena stanica je sposobna proizvoditi antitijela zahvaljujući genomu limfocita koji proizvodi antitijela, te neograničeno dugo živjeti zahvaljujući genomu tumorske stanice koja se može razmnožavati u neograničenom broju generacija. Tom je metodom moguće *in vitro* proizvesti neograničene količine antitijela zadane specifičnosti protiv bilo kojeg antigena, koja su našla široku primjenu u laboratorijskoj dijagnostici i liječenju (ABBAS i sur., 2012.).

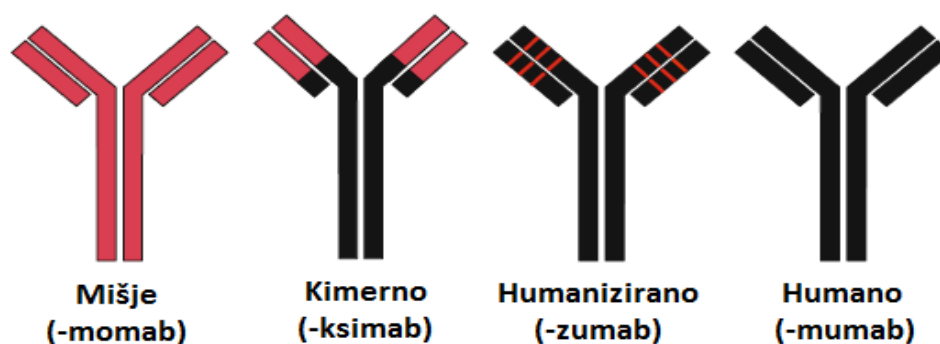


Slika 4. Proizvodnja monoklonskih protutijela: 1. Antigenom izložen miš, 2. Proizvodnja antitijela, 3. Matične stanice izolirane iz koštane srži, 4. Stapanje s tumorskom stanicom, 5. Uzgoj u staničnoj kulturi, 6. Hibridne stanice izložene specifičnom antigenu, 7. Hibridne stanice uzgoj u staničnoj kulturi i mišu 8. Monoklonska protutijela (ABBAS i sur., 2012.)

Postoji nekoliko vrsta monoklonskih protutijela koja se rabe u terapijske svrhe, a to su mišje, kimerno, humanizirano i humano.

Mišja protutijela se proizvode na način da nakon aplikacije antigena, mišu vadimo slezenu iz koje dobivamo plazma stanice koje proizvode protutijela specifična za antigen, te ih spajamo s imortaliziranim mijelomskim stanicama miša. Nakon tih postupaka stvoreni hibridi idu na daljnje uzgajanje te se kasnije specifičnim postupcima izoliraju protutijela. Kimerna protutijela se sastoje od humane konstante koja čini 70% i varijabilne mišje regije,

proizvode se PCR tehnologijom zbog replikacije gena koji kodiraju varijabilne regije mišjih protutijela i zatim dijeljenja tih gena na konstante genske regije humanih protutijela. Humanizirana protutijela su 95 % humanog podrijetla jer se proizvode spajanjem antigen-vezujućih regija varijabilnih regija mišjih protutijela s ostatkom varijabilne i konstantne regije humanog protutijela. Humana protutijela su genskom sekvencom identična ljudskim (DAVIS i sur., 2013.).



Slika 5. Vrste monoklonskih protutijela (BRBLIĆ, 2017.).

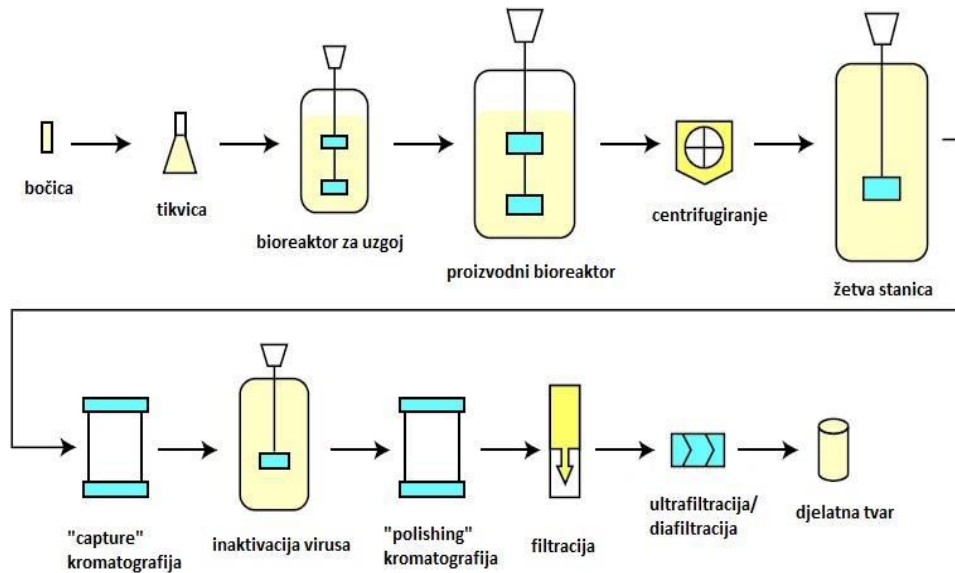
3.1. Dobivanje monoklonskih protutijela i rekombiniranih fuzijskih proteina

Proizvodnja rekombiniranih terapijskih proteina odvija se u nekoliko faza: uzvodna faza, nizvodna faza, oblikovanje ljekovitog pripravka, te provjera kakvoće bioloških lijekova.

U uvodnoj fazi proizvodnje u Petrijevim zdjelicama ili tikvicama koje sadrže tekuću hranjivu podlogu za rast i razvoj stanica se dodaju stanične kulture koje sadrže gen za sintezu željenog proteina te započinje njihov uzgoj. Potom se stanice postepeno prenose u veće posude za uzgoj, sve do proizvodnih bioreaktora volumena do 20 000 litara u kojima se provodi biosinteza, u uvjetima optimalnim za rast i sintezu rekombiniranog proteina.

Druga faza je nizvodna faza u njoj se nakon biosinteze dobivena masa centrifugira na velikim brzinama kako bi se željeni protein izolirao iz stanica (ili hranjivih podloga). Nakon toga slijedi pročišćavanje proteina do 99 % čistoće u nekoliko filtracijskih i kromatografskih

stupnjeva. Nakon što je dobiven željeni protein važno je odrediti njegova osnovna svojstva: molekularnu masu, naboj, hidrofobnost te čistoću i kvalitetu. Pročišćenom proteinu (djelatna tvar) dodaju se pomoćne tvari te se oblikuje u optimalni farmaceutski oblik, filtrira, aseptički puni u sterilne spremnike i upućuje na distribuciju (SKOWICKI i sur., 2016.; SOKOL, 2016.).



Slika 6. Shematski prikaz proizvodnje rekombinantnog proteina (SOKOL, 2016.).

3.2. Mehanizmi djelovanja monoklonskih protutijela i rekombiniranih fuzijskih proteina:

Monoklonska protutijela djeluju na više načina:

- a) uništavanjem ciljnih limfocita mehanizmom citotoksičnosti ovisne o protutijelima (ADCC)
- b) uništavanjem ciljnih limfocita aktivacijom fagocita (ADCP) i stanica NK
- c) kočenjem funkcije limfocita nakon vezanja s funkcijskim limfocitnim molekulama, čime je onemogućeno vezanja aktivacijskih molekula.
- d) citotoksičnost ovisna o komplementu (CDC)
- e) blokada staničnog rasta

f) blokada rasta krvnih žila

g) direktan učinak na tumorsku stanicu

h) „nosači“ za radioterapiju ili kemoterapiju (BRBLIĆ, 2017.).

3.3. Indikacije

Indikacije za korištenje monoklonskih protutijela su višestruke. Monoklonska protutijela se koriste u terapiji metaboličkih i upalnih bolesti te brojnih karcinoma (karcinomi pluća, želudca, dojke, rektuma; Non-hodgkinov limfom, multipli mijelom, metastatski melanom, neuroblastom, akutna i kronična limfoblastična leukemija, akutna mijeloidna leukemija), virusnih i bakterijskih oboljenja, Crohnove bolesti, ulceroznog kolitisa, mutiple skleroze, reumatoidnog i psorijatičnog artritisa, psorijaze, reumatoidnog artritisa, ankiloznog spondilitisa, osteroporoze, povišenog kolesterola, astme, kardioloških bolesti, za sprječavanje zgrušavanja krvi, te kod odbacivanja bubrežnog presatka (MILČIĆ, 2016.).

3.4. Učinkovitost

Današnjom tehnologijom moguće je razviti monoklonsko protutijelo za gotovo svaki antigen, a specifičnost vezanja protutijela na ciljani antigen visokim afinitetom je osnova za njegovu sve širu upotrebu u terapijske svrhe. Danas se mnoga istraživanja provode na poboljšanju vezanja na antigen, smanjenju imunogenosti, povećanju djelotvornost monoklonskih protutijela i rekombiniranih proteina (DAVIS i sur.,2013.).

3.5. Sigurnost primjene

Monoklonska protutijela imaju svoje sigurnosne prednosti, a to su da mAb imaju specifične ciljeve, te nemaju međustanične aktivnosti zbog čega postoji malo očekivanih nuspojava i reakcija na njih. Monoklonska protutijela se ne metaboliziraju u bubrezima ili

jetri, već se kataboliziraju u stanicama, što rezultira stvaranjem animokiselina koje se recikliraju u tijelu (OLIVRY i sur., 2015.).

3.6. Prednosti i nedostaci

Imunogenost predstavlja problem u terapiji monoklonskim protutijelima, te tako smanjuje njihovu djelotvornost. Stvaranjem protutijela na monoklonska protutijela povećava se rizik od nuspojava. Nime, poznato je da mišja monoklonska protutijela mogu uzrokovati serumsku bolest tip III, hipersenzitivne reakcije, te im je klinička primjena ograničena zbog stvaranja humanih anti-mišjih protutijela u organizmu koji je primio terapiju u kojoj su ona sadržana. Kimerna monoklonska protutijela također mogu potaknuti stvaranje humanog anti-kimernog protutijela (CHEIFETY i sur., 2005.).

Na imunogenost bioloških lijekova utječe jako puno čimbenika. Posljedice imunogenosti mogu biti razne od toga da primijenjena terapija potpuno izgubi terapijski odgovor, ozbiljnih nuspojava do reakcija preosjetljivosti. Monoklonska protutijela su kod nekih osoba imunogenija nego kod drugih, na što mogu djelovati razni čimbenici poput starosti pojedinca (mlađe jedinke stvaraju veću količinu protutijela), sekundarnih oboljenja, te trenutnog stanja imunološkog sustava pacijenta (HARDING i sur., 2010.).

4. GENSKA TERAPIJA

Razvojem tehnologije rekombinantne DNA omogućeno je mnogo novih terapijskih oblika u medicini, kao što su genska terapija i transplantacija novih tkiva ili organa. Geni su građevne i funkcionalne jedinice svake stanice u organizmu. Svi geni se nalaze u svim stanicama te imaju svoje stalno mjesto na kromosomu, ali nisu svi aktivni u svim stanicama. Geni sadrže upute za sintezu bjelančevina koje se prepisuju na glasničku RNK pomoću transportne RNK, putem koje se zapis prenosi iz jezgre stanice do citoplazme i ribosoma, te se u ribosomima aminokiseline povezuju u peptidni lanac. Prosječni gen ima 1000 nukleotida, dok skup svih gena čini genom organizma (CLARK i sur., 2009.).

Genska terapija omogućava liječenje poremećaja kontroliranih genima uvođenjem vektora koji unose zdrave kopije pogrešnih gena u stanicu domaćina. Svaka identifikacija i otkrivanje genetičkih oštećenja, te stvaranje zdrave kopije gena otkrivaju mogućnost tretmana genske terapije potrebnom pacijentu (WIRTH i sur., 2014.). Genska terapija je osmišljena tako da uvođenjem genskog materijala u stanicu nadoknadi bolesni gen ili potakne stvaranje poželjnog proteina. Za isporuku gena stanici potreban je vektor, koji je najčešće virus (CLARK i sur., 2009.).

Američka uprava za hranu i lijekove (FDA) prvi protokol genske terapije odobrila je 1989. godine gdje su limfocitne infiltracije tumora prikupljane od bolesnika s uznapredovalim melanomom, te *ex vitro* transducirani markerski genom se aplicirao natrag oboljelom (USAD, 2013.).

4.1. Dobivanje genske terapije

Genske terapije se provodi u visoko specijaliziranim i odobrenim ustanovama. Terapeutski gen ili komplementarna DNA isporučuje se putem vektora izravnom injekcijom (*in vitro* isporuka) ili kroz modificirane stanice koje se unose u ciljanu stanicu (*ex vitro*) (LUNDSTROM, 2018.). Trenutno se virusni vektori smatraju najučinkovitijim od svih metoda „davanja“ gena za *in vitro* prijenos gena. U idealnom slučaju, vektor za prijenos gena trebao bi biti u mogućnosti ciljati određeno tkivo s visokim učinkom transdukcije i održavati stabilnu, reguliranu ekspresiju gena, bez nuspojava ili imunogenih odgovora. Nažalost, nijedan trenutno korišteni vektor isporuke gena ne ispunjava sve navedene kriterije. Lokalna

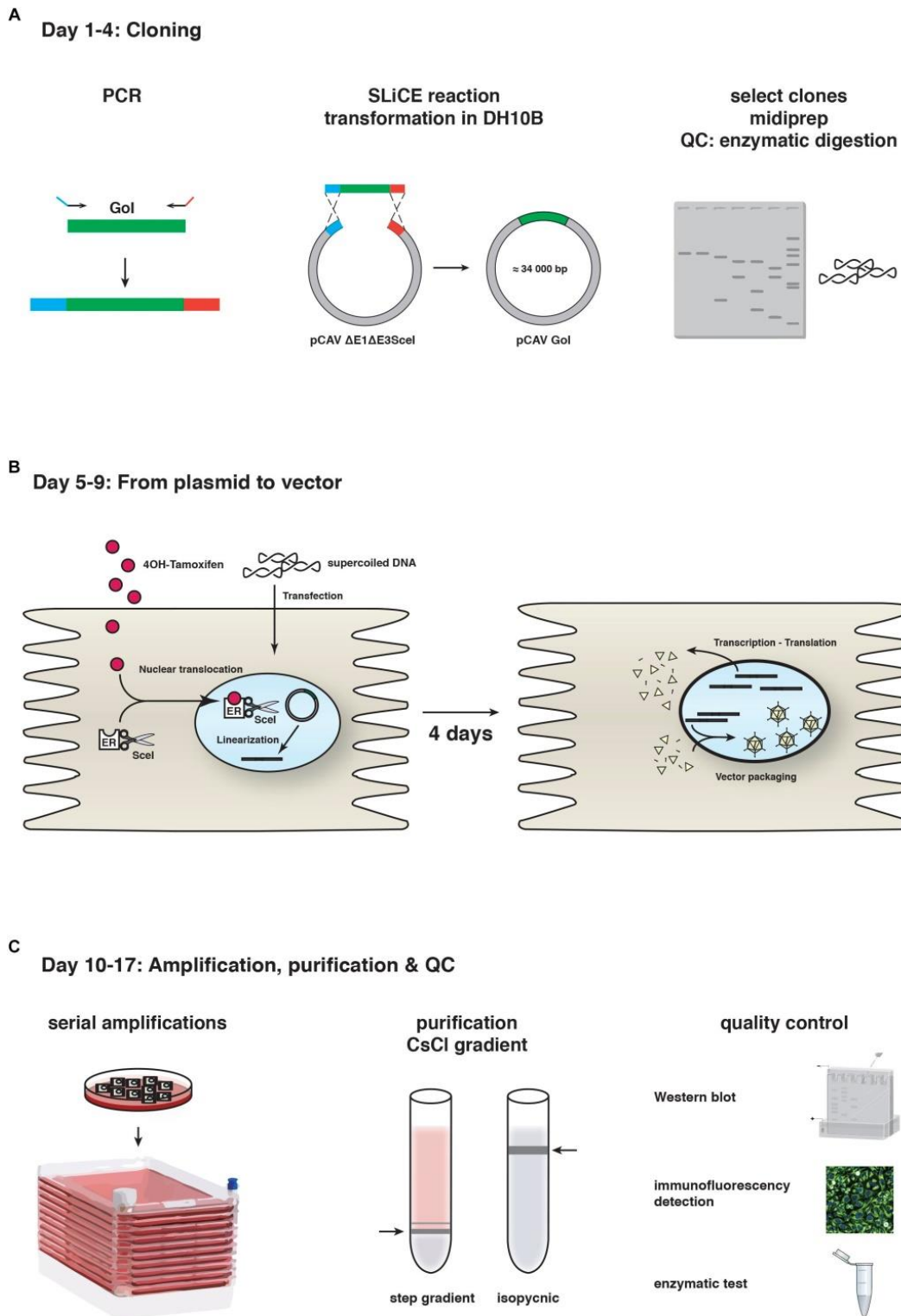
injekcija vektora obično rezultira ograničenim, ali preciznim područjem učinka (DEL RIO i sur., 2019.).

4.2. Mehanizam djelovanja genske terapije

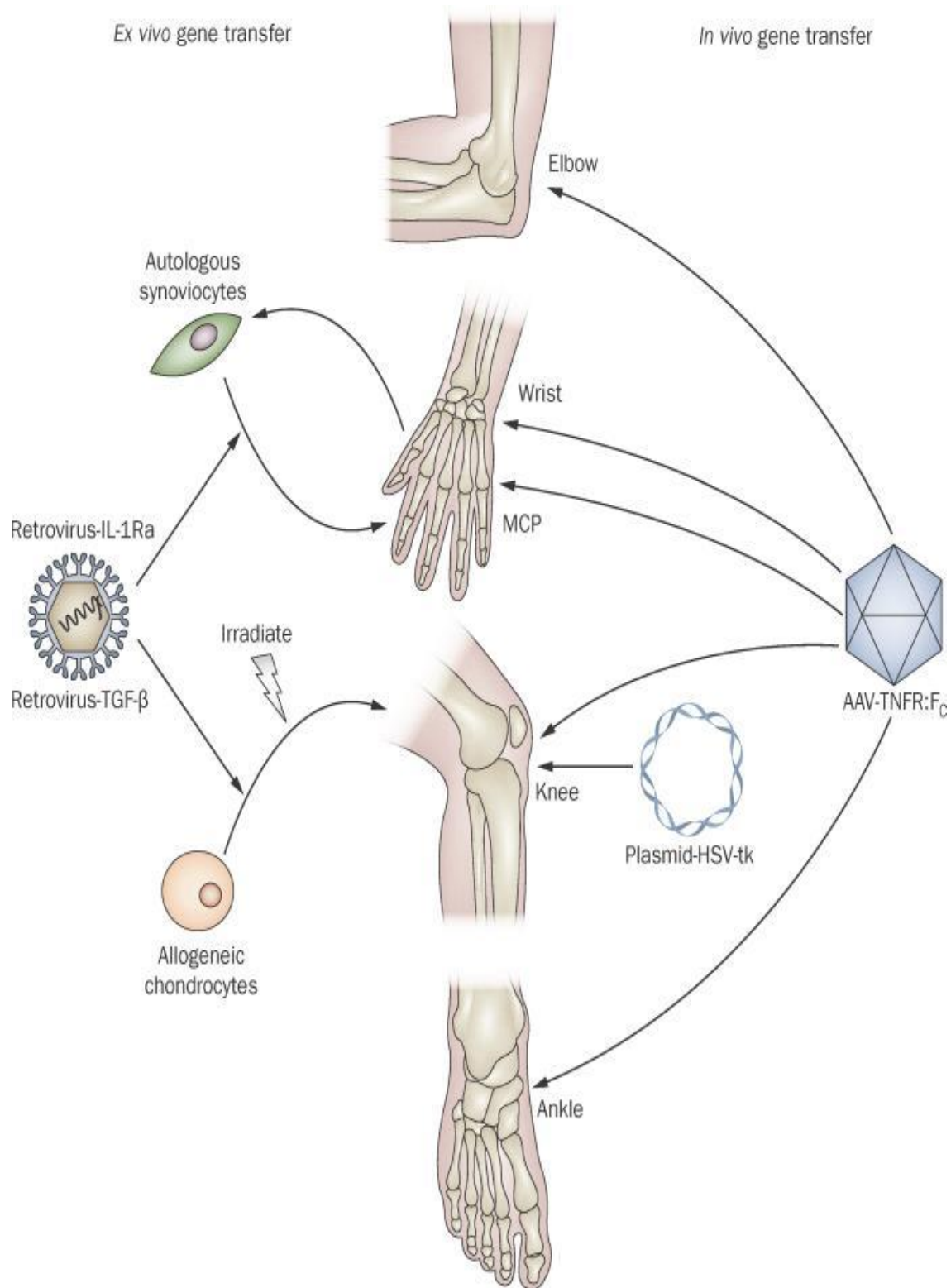
Unatoč napretku i boljim kliničkim protokolima za gensku terapiju potrebno je još mnogo godina istraživanja kako bi ovaj oblik liječenja postao rutinski. Za ulazak kopije „zdravog“ gena u stanicu domaćina potreban je vektor. Jedan od najširih područja istraživanja je dizajn vektora, jer su oni ključni za prijenos i ekspresiju gena, a postojeći imaju svoja ograničenja. Postoji nekoliko tipova vektora: virusni i nevirusni vektori, te gola plazmidna DNA (WIRTH i sur., 2014.). Naime, broj i spektar virusnih vektora je raznolik, no najčešće korišten virusni vektor je adenovirus te je identificirano više od 50 različitih serotipova podobnih za takvu funkciju.

Retrovirusi mogu primiti do 8 kb stranih uložaka i predstavljali su zlatni standardni vektor za dugotrajnu primjenu genske terapije. Jedini nedostatak retrovirusa je nesposobnost inficiranja stanica koje se ne dijele, što je povećalo interes za primjenu lentivirusnih vektora. Iako lentivirusi pripadaju obitelji retrovirusa, oni imaju sposobnost inficiranja stanica koje se dijele no i onih koje se ne dijele što osigurava nisku citotoksičnost. Alfavirusi se uglavnom primjenjuju u pretkliničkim studijama genske terapije za liječenje tumora. Posebnost je da alfavirusni vektori mogu isporučiti голу RNK, slojevite plazmidne DNK i čestica s nedostatkom replikacije. Vektori virusa newcastleske bolesti (NDV) često su korišteni u pretkliničkim studijama terapije karcinoma zbog njihovog onkolitičkog djelovanja. Poksvirusi imaju također primjenu kao vektori (LUNDSTROM, 2018.).

Trenutno je većina protokola za gensku terapiju ograničena na lokalnu primjenu vektora za prijenos gena ili na *ex vivo* pristup prijenosa gena. Jedan od izazova u genskoj terapiji je i niska učinkovitost transdukcije i minimalna raspodjela vektora unutar tkiva, no treba naglasiti da se fokus ne smije usmjeriti samo prema razvoju vektora, već i prema njihovoj proizvodnji. Za naglasiti je posebno visoke troškove koji su dio procesa proizvodnje virusnih vektora, zbog brojnih koraka pročišćavanja (DEL RIO i sur., 2019.).



Slika 7. Proizvodnja vektora; shematski prikaz koraka i vremenske trake kloniranja, stvaranja vektora iz plazmida, zatim umnažanje vektora u staničnim kulturama, pročišćavanje i kontrola kvalitete (DEL RIO i sur., 2019.).



Slika 8. Lokalna genska terapija za artritis, prijenos gena *ex vivo* pomoću retrovirusnih vektora (EVANS i sur.,2011.).

4.2. Indikacije

Danas se genska terapija koristi u liječenju karcinoma, artritisa, mišićne distrofije, cistične fibroze, krvnih oboljenja, te imunodeficijencije. Najčešći karcinomi kod kojih se ona primjenjuje su maligni melanom, mijelogenska leukemija, neuroblastom, tumori mozga, debelog crijeva, dojke, jajnika, te mliječne žlijezde (WIRTH i sur., 2014.).

4.3. Učinkovitost i sigurnost

Farmakogenomika je proučavanje utjecaja gena na reakciju osobe na određene lijekove. Ovo relativno novo područje kombinira farmakologiju (znanost o lijekovima) i genomiku (proučavanje gena i njihovih funkcija) kako bi se razvili učinkoviti, sigurni lijekovi i doze prilagođene varijacijama u genima. Genska terapija je dio personalizirane medicine gdje je lijek individualiziran i precizno dizajniran za određen organizam, te je ona danas sve češća posebice zbog povećanja njene učinkovitosti razvojem pojedinih biotehnoloških rješenja. Istovremeno personalizirana medicina zahtijeva od liječnika znanje biokemije, biotehnologije i genetike, te u budućnosti i tumačenje rezultata genskih testova (CLARK i sur., 2009.).

4.4. Prednosti i nedostaci

Genska terapija je najnovija vrsta terapije koja nema masovnu upotrebu. O njezinim prednostima i nedostacima se mnogo raspravlja i nema dovoljno znanstvenih istraživanja koja bi ih kategorizirala. Najveći trenutni nedostatak genske terapije je visoka cijena koja ju čini pristupačnom samo maloj skupini pacijenata (KATZUNG i sur., 2011.).

5. IMUNIZACIJA I ANTITUMORSKA CJEPIVA

Aktivna imunizacija je postupak primjene antigena u organizam domaćina kako bi se potaklo stvaranje protutijela i stanične imunosti. Imunizacijom su se tijekom povijesti spriječile i sprečavaju mnoge zarazne bolesti, a može se temeljiti na primjeni mrtvih (inaktiviranih) ili živih (oslabljenih) mikroorganizama. Idealna svojstva imunogena uključuju potpunu prevenciju bolesti, prevenciju kliconoštva, stvaranje dugotrajne imunosti uz najmanji mogući broj imunizacija, netoksičnost i prikladnost za masovnu imunizaciju (HAJSIG i sur.,2014.). Aktivna imunizacija je u prednosti pred pasivnom imunizacijom uglavnom zbog toga što se stvaraju veće količine protutijela. Pasivna imunizacija podrazumijeva unos stvorenih protutijela u organizam. Pasivna imunizacija protutijelima postiže se upotrebom životinjskih ili humanih imunoglobulina različite čistoće, pripravci mogu sadržavati visoki titar protutijela usmjerenih prema specifičnom antigenu (HAJSING i sur., 2014.).

U području imunizacije i imunoterapije tumora u zadnjih nekoliko godina došlo je do značajnih otkrića, uključujući imunoterapiju tumora, upotrebu T inhibitora kontrolnih točaka stanica, inženjering T stanica, cjepiva, anti-B stanična i T- stanična antitijela (HAJSING i sur., 2014.).

Antitumorska cjepiva se dijele na preventivne i terapijske. Cjepivom se unose male količine modificiranih tumorskih stanica u tijelom kako bi se potaklo organizam na proizvodnju antitijela te da pripreme tijelo za moguću invaziju. Terapijsko cjepivo djeluje na ubijanje virusa koji potiče stvaranje tumora ili napad na patološke stanice i njihovu eliminaciju, a preventivno je namijenjeno poticanju imunološkog sustava na obranu te može biti sastavljeno od tumorskih stanica, njihovih dijelova ili samo antigena (KATZUNG i sur., 2011.).

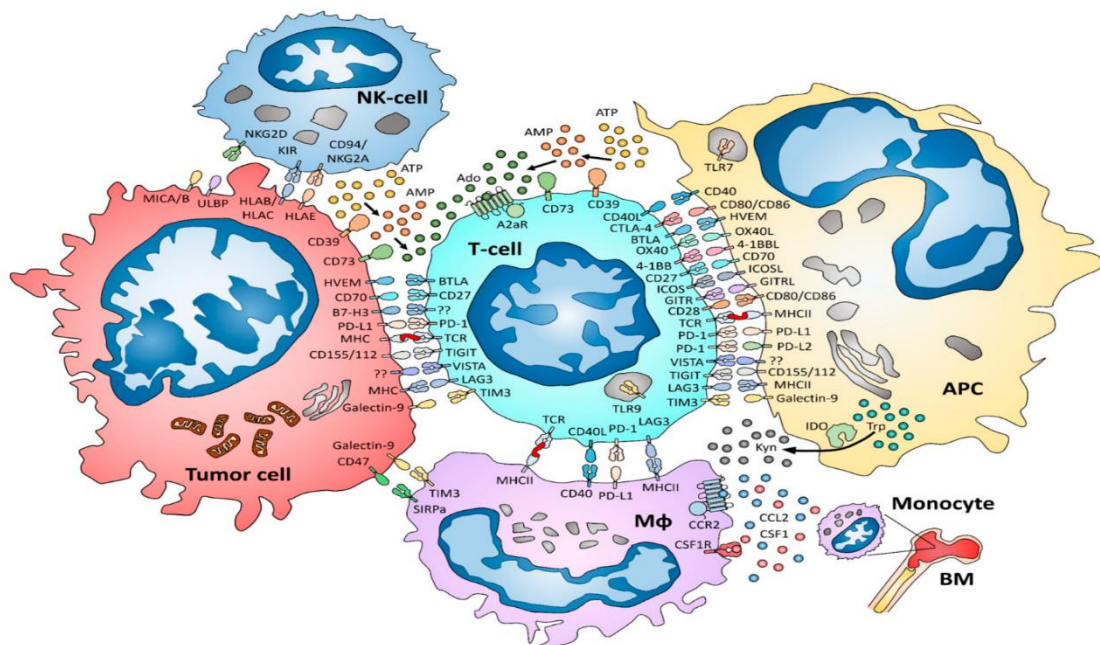
5.1. Indikacije

Imunizacija i antitumorska cjepiva daju se osobama oboljelima od tumora; prvenstveno protiv tumora mliječne žlijezde, melanoma, limfoma i osteosarkoma (AAHA, 2017.).

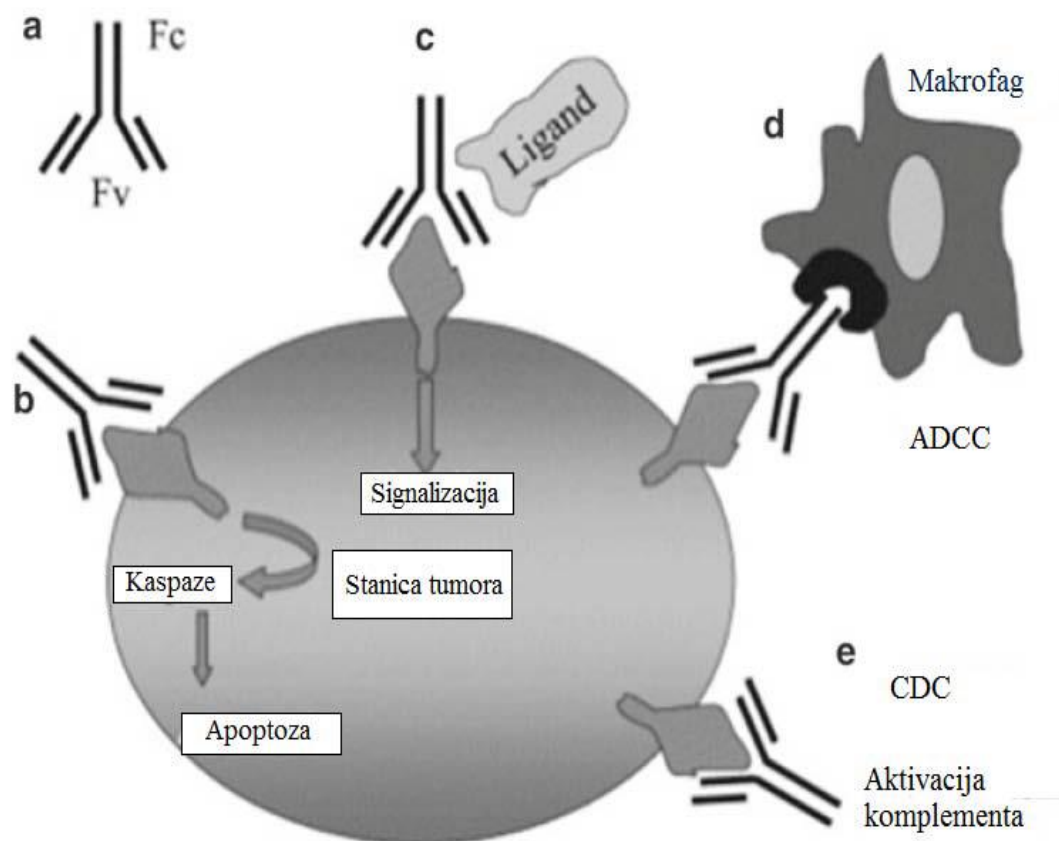
5.2. Mehanizam djelovanja

Glavni cilj terapijskih antitumorskih cjeviva je smanjenje tumorske mase ojačavanjem imunskog sustava te dodatnim poticanjem na proizvodnju antitijela koja su usmjerena protiv specifičnih tumorskih stanica. Tumorske stanice koje se koriste u pripremi cjeviva mogu biti autologne tj. stanice dobivene izolacijom iz tumorskog tkiva oboljelog ili stanice od prethodno uspostavljene tumorske stanične linije. Stanice se genetički modificiraju uvođenjem gena za imunostimulanse poput proupalnih molekula (WIRTH i sur., 2014.).

Cjeviva protiv tumora su bazirana na manipulaciji genima u kojima DNK konstrukti kodiraju tumorske antigene, te se daju pacijentima. Ovi konstrukti mogu se dostaviti samostalno ili unutar vektora i namijenjeni su lokalnoj primjeni pomoću stanica koje prezentiraju antigen (REGAN i sur., 2016.).



Slika 9. Međusobna interakcija između tumorskih stanica i komponenti imunološkog sustava (CHRETIEN i sur., 2019.).



Slika 10. Mehanizmi djelovanja monoklonskih protutijela na stanicu tumora.

a. monoklonsko protutijelo b. može imati direktan učinak na apoptozu ili programiranu smrt stanice c. može se vezati na receptor na površini stanice i time spriječiti njihovu interakciju s ligandom d. može aktivirati staničnu citotoksičnost ovisno o protutijelima e. može aktivirati citotoksičnost ovisnu o komplementu (MILČIĆ, 2016.).

5.3. Prednosti i nedostaci

Prednosti imunizacije i antitumorskih cjepiva se svakim danom povećavaju. Iako su biotehnologija monoklonskih protutijela i stvaranje cjepiva protiv karcinoma još su u ranoj fazi razvoja, dobiveni su izvanredni rezultate i snažan potencijal u liječenju. Njihov glavni nedostatak je cijena (WANG, 2009.).

6. IMUNOMODULATORI I IMUNOSUPRESIVI

Funkcioniranje imunološkog sustava se temelji na sposobnosti da razlikuje vlastite od stranih tvari, te da pokrene reakciju kojom se uklanja strana tvar. Takav način rada naziva se prirodna imunost. Ukoliko mehanizam imunosne podnošljivosti tj. imunotolerancije zakaže tada dolazi do proizvodnje protutijela za vlastitu tvar i nastaje autoimunosna reakcija. Važnu ulogu u ovom procesu imaju genetski čimbenici, specifično kod životinja pasmina, dob, hormoni, te nepovoljni utjecaji iz okoliša. U autoimunost se svrstavaju i autoimunosne reakcije nakon cijepljenja i odbacivanje organa nakon transplantacije. Neke od najpoznatijih autoimunosnih bolesti današnjice s visokom prevalencijom su primjerice reumatoidni artritis, multipla skleroza, te Chronova bolest (HAJSING i sur., 2014).

Imunomodulatori i imunosupresivi su lijekovi za brojne autoimunosne bolesti. Svaki od njih ima svoje specifično djelovanje u određenom indikacijskom području. Imunomodulatori su tvari koje utječu na imunosni sustav i sprječavaju upalnu reakciju, te uspješno pomažu otklanjanju antigena i mogućih patogena. Imunosupresivni lijekovi su lijekovi koji djeluju u fazi indukcije imunološkog sustava, smanjujući proliferaciju limfocita. Tvari koje suprimiraju aktivnost imunosnog sustava imaju važnu ulogu u prevenciji odbacivanja presatka organa ili tkiva, te u liječenju nekih bolesti koje su posljedica poremećene regulacije imunosnog sustava. Iako precizni mehanizmi djelovanja za mnoge od tih lijekova nisu jasni, poznavanje glavnih elemenata imunosnog sustava važno je za razumijevanje njihovih učinaka (KATZUNG i sur., 2011.). Lijekovi koji pojačavaju imunosni odgovor ili selektivno mijenjaju ravnotežu različitih dijelova imunosnog sustava također postaju važni u liječenju bolesti poput tumora, autoimunih i upalnih bolesti. Sve veći broj stanja, kao što su infekcije, kardiovaskularne bolesti, presađivanja organa i druge slične bolesti, su potencijalni kandidati za liječenje modulacijom imunosnog sustava. Sustav urođene imunosti prva je crta obrane protiv invazije patogena (antigena) i uključuje fizikalne (npr. koža), biokemijske (npr. komplement, lizozimi, interferoni) i stanične obrambene mehanizme (neutrofili, monociti, makrofagzi, stanice ubojice (NK) i stanice ubojice –T (NKT)) (ABBAS i sur., 2012.).

Imunomodulacijsku terapiju koristimo kada ne možemo ukloniti antigen, te ona mijenja reakciju na antigen ili uklanja neposredne produkte reakcije s antigenom. Uključuje specifičnu imunoterapiju i anti IgE imunoterapiju. Specifična imunoterapija alergena

(alergijsko cijepljenje ili hiposenzibilizacija) provodi se tako da se subkutano ili sublingvalno u organizam postupno unose rastuće doze uzročnog alergena, čime se djeluje u dva smjera: preusmjeravanje Th2-odgovora na Th1-odgovor (imunodevijacija) i prevođenje specifičnih Th2 u Th0-limfocite (anergizacija) (ABBAS i sur., 2012). Preduvjet imunoterapije jest točna identifikacija uzročnog alergena.

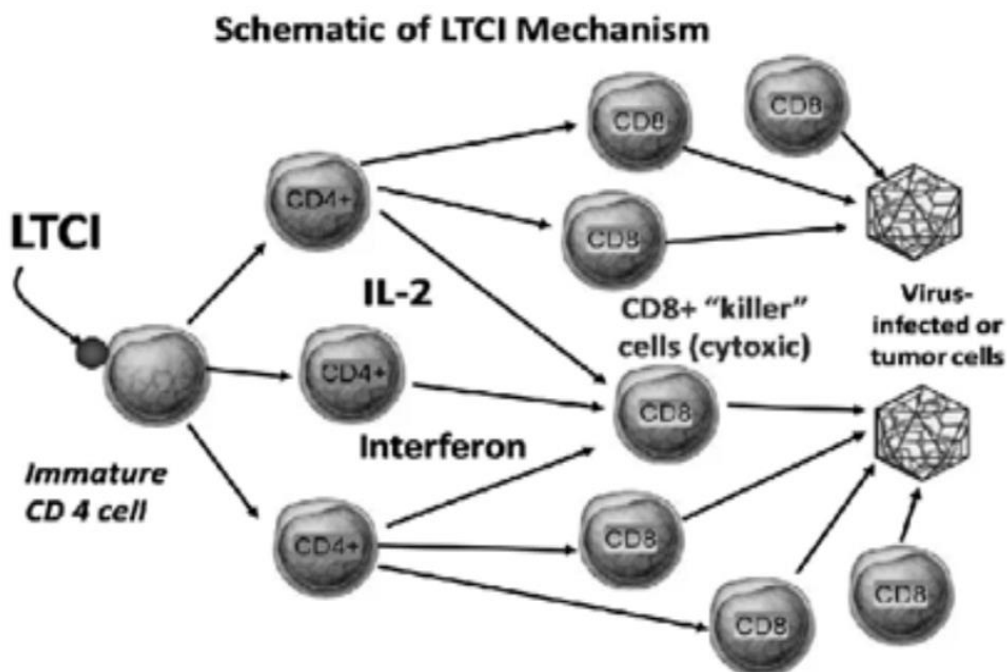
Liječenje alergijskih bolesti uključuje: prekidanje izlaganja uzročnom alergenu, imunomodulacijsku terapiju, protuupalno liječenje, simptomatsko liječenje. Imunomodulatori i imunosupresivni lijekovi svaki od njih ima specifično djelovanje u određenom indikacijskom području (KATZUNG i sur., 2011.).

6.1. Indikacije

Imunomodulatori su indicirani kod stanja kao što su autoimunosne bolesti (osteoartritis, reumatoidni artritis, upalne bolesti crijeva, Crohnova bolest, atopijski dermatitis), virusnih i bakterijskih bolesti, posebice kod retrovirusnih infekcija i imunodeficijencije (KATZUNG i sur., 2011.).

6.2. Mehanizam djelovanja imunomodulatora

Za napad tumorskih stanica i virusa, CD-4 stanice kodiraju ukupni imunološki odgovor i pomažu aktiviranju CD-8 T-limfocita. Često se nazivaju efektorske ili citotoksične T-stanice. CD-8 i T-limfociti odgovaraju na poticaje nastale unutarstaničnim patogenima i stanicama tumora. Pod virusnim napadom CD-4 i T-stanice ne sazrijevaju, ne proizvode IL-2 i gama interferone, te ne uspijevaju kodirati CD-8 reakcije na viruse. Imunomodulatori povećavaju proizvodnju CD-4 i T- stanica i mogu pobijediti imunosupresiju (GINGERICH, 2008.).



Slika 11. Mehanizam djelovanja imunomodulatora (GINGERICH, 2008.).

6.3. Prednosti i nedostaci

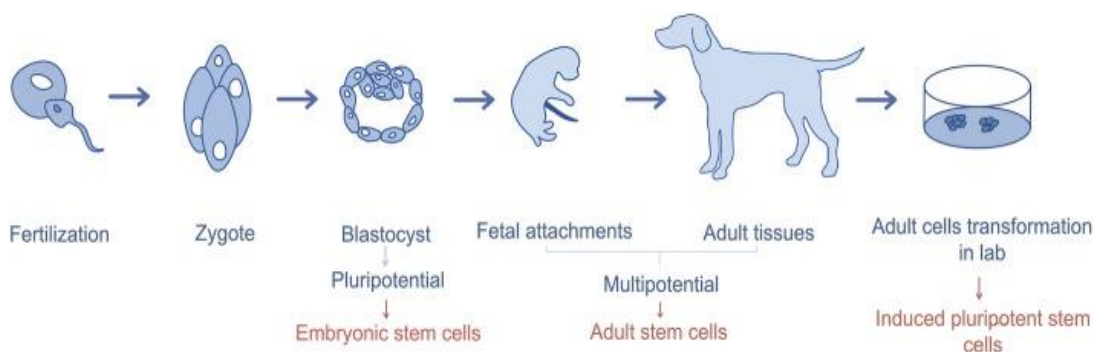
Prednost je što imunomodulatori uvelike potpomažu borbu organizma protiv antigena i patogena, te doprinose boljoj kvaliteti života. Važno je da neželjene reakcije nakon terapije biološkim tvarima, tako i imunomodulatorima, budu svedene na minimum ili ih uopće ne bude. Dostupnost ove terapije je vrlo ograničena obzirom ju mogu provoditi samo visoko specijalizirane ustanove s visokom razinom skrbi. Ovakve vrste terapije su individualizirane i liječnik prati cijeli proces, te ukoliko i dođe do komplikacija liječnik postupa po zadanim protokolima imunskih reakcija (AAHA, 2017.).

7. MATIČNE STANICE

Matične stanice su skupina stanica koje su prisutne unutar različitih vrsta tkiva koje se brzo mobiliziraju nakon ozljede ukoliko je organizam zdrav i funkcionalan. Matične stanice su nediferencirane stanice koje se mogu pretvarati u specifične stanice kako ih tijelo treba. Znanstvenici su matične stanice su podijelili na embrionalne i matične stanice u diferenciranom odraslom tkivu, te si ih pronašli u koštanoj srži, masnom tkivu, plućima, placenti, krvi i krvnim žilama, koži, crijevima, jetri, skeletni mišićima, te mozgu (GADE i sur., 2012.).

Znanstvenici su 2001. godine izdvojili matične stanice iz masnog tkiva, te ih koristili u regenerativnom medicini, te je masno tkivo postalo najpoželjniji izvor matičnih stanica zbog dostupnosti, te njihovog broja koji je veći nego u odnosu na koštanu srž (LA PRADE i sur., 2016.). Matične stanice često se primjenjuju s plazmom bogatom trombocitima koji obiluju faktorima rasta, koja služi kao nosač za matične stanice i poboljšava karakteristike matičnosti, odnosno mogućnosti prilagodbe stanica zadatku. Plazma se može koristiti i zasebno za cijeljenje rana i regeneraciju površinskih oštećenja (GADE i sur., 2012.).

Poznajemo nekoliko vrsta embrionalnih matičnih stanica, a to su totipotentne, pluripotentne, multipotentne, oligopotentne i unipotentne. Totipotentne stanice su stanice koje se pojave kada se zigota počne dijeliti. Pluripotentne stanice su iz ranog embrija, te se one mogu pretvoriti u gotovo bilo koju stanicu. Multipotentne, oligopotentne i unipotentne usko povezuju obitelj stanica u koje će se kasnije razviti (VILAR i sur., 2014.).

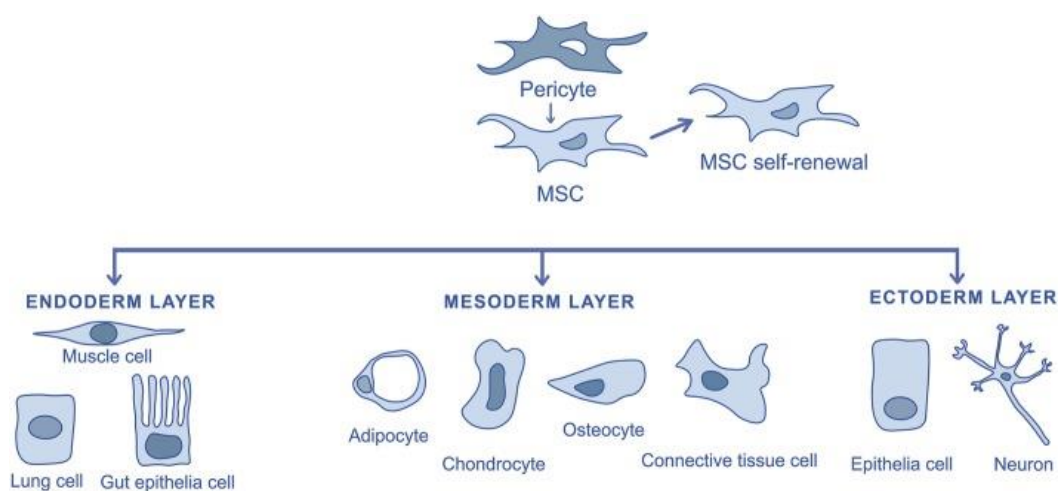


Slika 12. Diferencijacija matičnih stanica (DIAS i sur.,2019.).

7.1. Indikacije

Matične stanice primjenjuju se kod ortopedskih stanja osteoartritisa i displazije kukova, kod oštećenja kosti i fraktura, cijeljenja rana, mišićnih ozljeda, te kardioloških i neuroloških oštećenja, te bolesti krvi, kao što je leukemija. Matične stanice iz masnog tkiva koje se koriste u regenerativnoj medicini pokazuju izvanredne rezultate (HARMAN i sur., 2016.).

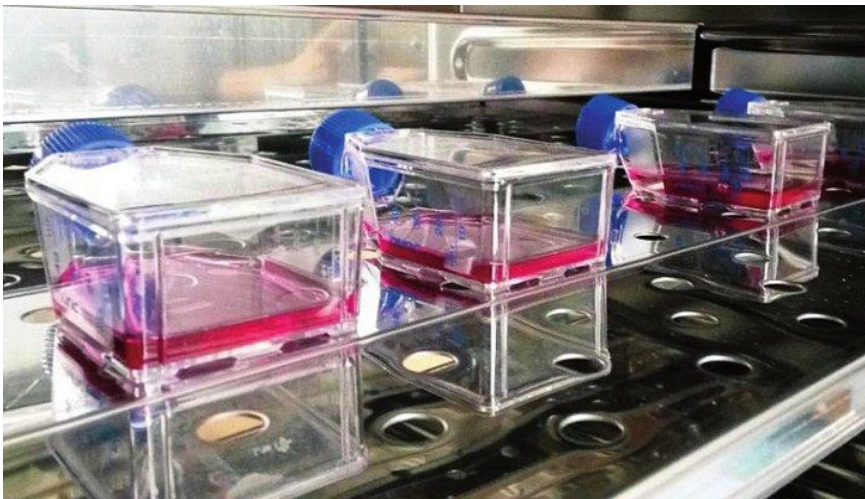
Znanstvenici smatraju da će u budućnosti pomoću matičnih stanica u laboratoriju moći proizvoditi zdrave stanice za kardiološka, imunološka, neurološka, kožna i mnoga druga oboljenja. Matične stanice također bi se mogle koristiti u znanstvenim istraživanjima tako da zamijene životinje za istraživanja i testiranja, jer bi ranije uzgojili potrebna tkiva za testiranje i razvoj novih terapija. Naoružani novim znanjima i tehnologijama uz pomoć matičnih stanica mogli bi upoznati polje patogenezu i dizajnirati nove pametne lijekove za bolesti koje još uvijek nemaju službenog lijeka (DIAS i sur., 2019.).



Slika 13. Potencijal matičnih stanica (DIAS i sur., 2019.).

7.2. Mehanizam djelovanja

Donor je organizam izvor matičnih stanica, bilo za njegovu vlastitu upotrebu ili za drugi tkivno podudaran organizam. Nakon postupka skupljanja masnih naslaga, stanice se podvrgavaju postupku centrifugiranja, odvajanja od ostatka tkiva, te se uzgajaju u tikvicama za kulturu tkiva. Stanice se proizvode u skladu s strogim operativnim procedurama i kriterijima za ocjenjivanje stanica. Stanice se testiraju na sterilnost, endotoksine, dali su zadovoljile identitet, te fizikalna i kemijska svojstva. Ispitani proizvod se zamrzava te je preporučena terapijska doza 12×10^6 živih masnih matičnih stanica (DIAS i sur., 2019.).



Slika 14. Umnožavanje matičnih stanica u hranjivom mediju (Krešić i sur., 2019.)

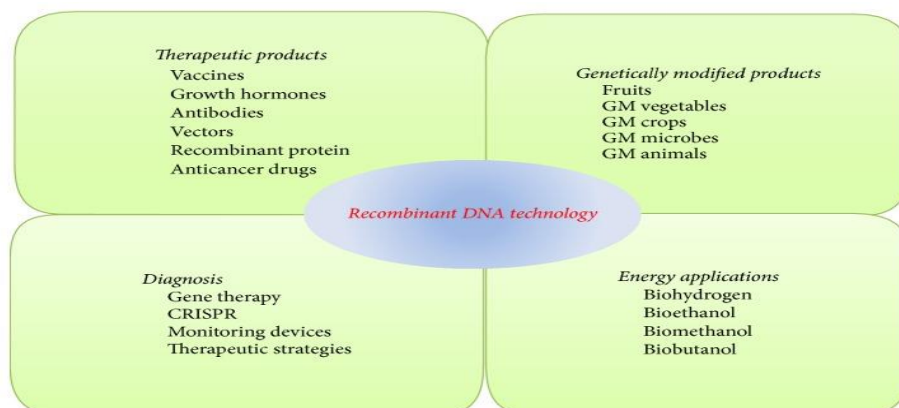
Matičnu stanicu lijekom čini njezina sposobnost samoobnove, multipotencije, te imunomodulatorni potencijal. Mehanizam djelovanja sastoji se u kontaktu stanica – stanica. Matične stanice se apliciraju primjerice intraartikularno gdje pomažu u regeneraciji zglobnih tkiva, pospješuju metaboličku aktivnost hondrocita, pospješuju stvaranje ekstracelularnog matriksa, stišavaju stanice imunosnog sustava i smanjuju upalu, te pospješuju aktivnost matičnih stanica koje se nalaze na površini zgloba (CUERVO i sur., 2014.).

7.3. Prednosti i nedostaci

Matične stanice kao autotransplantant čine najbolju mogućnost jer je najmanja mogućnost reakcije organizma u smislu odbacivanja. Istovremeno su pojedine linije matičnih stanica lako dostupne (masno tkivo). Potreban je individualan pristup pacijentu i praćenje tijekom bolesti. Također terapija matičnim stanicama nije lako dostupna obzirom se može provoditi samo u specijaliziranim ustanovama, te je skupa za distribuciju. Znanstvenici terapiju matičnim stanicama vide kao terapiju budućnosti modernog zdravstva (GADE i sur., 2012.).

8. PROCESI PROIZVODNJE BILOŠKIH LIJEKOVA – BIOTEHNOLOGIJA

Otkrićem rDNA i fokusiranjem na gene došlo je do napretka u znanosti; i to u različitim granama znanosti te su ta istraživanja iskorištena i u medicini, veterini, farmaciji i agrokulturi (CLARK i sur., 2009.).



Slika 15. Različita primjena DNA tehnologije (KHAN i sur., 2016.).

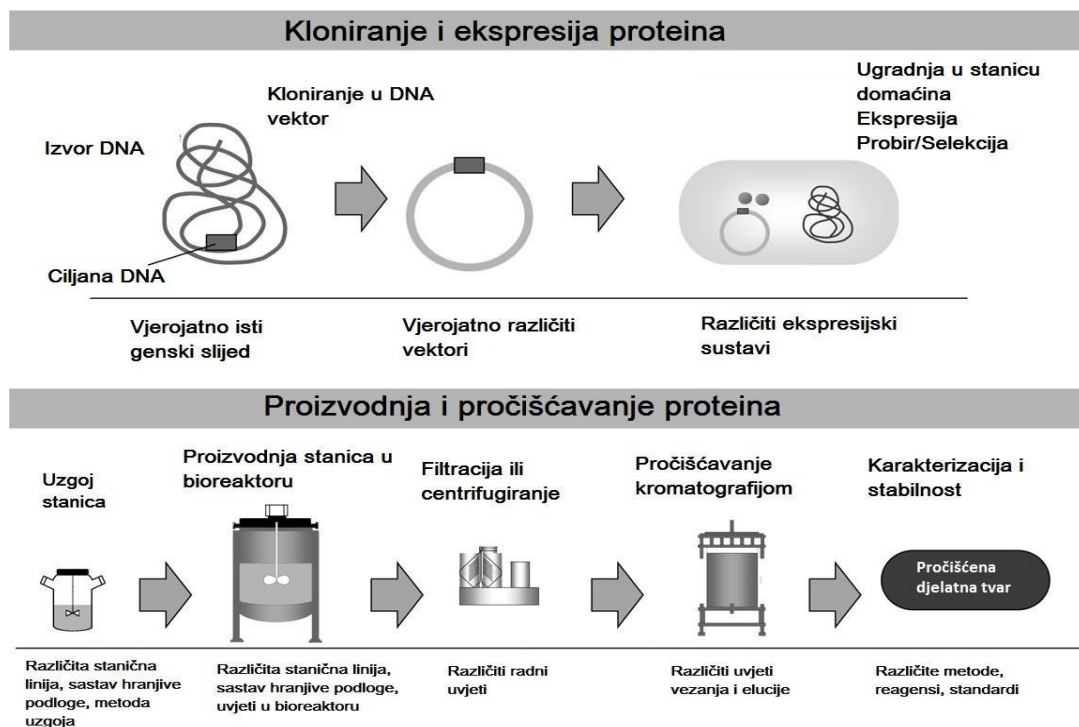
8.1. Rekombinantna tehnika DNA

Rekombinantna DNA tehnologija podrazumijeva metode kojima se geni prenose iz jednog organizma u drugi. Rezultat tog postupka jest da gen koji stvara protein u stanici ili organizmu jedne vrste, to sada čini u drugoj stanici ili organizmu. To se može postići korištenjem specifičnog enzima restrikcijske endonukleaze, koji prepoznaje određenu nukleotidnu sekvencu (restrikcijsko mjesto) te cijepa dvolančanu DNA na specifičnom mjestu. Izrezana DNA se zatim ugrađuje u vektorsku DNA pomoću enzima ligaze i ubacuje u stanicu domaćina gdje se umnožava stvarajući mnogobrojne kopije strane DNA. Za opisivanje takvih aktivnosti često se rabe izrazi poput „genetička manipulacija“, „genetička modifikacija“, „genetičko inženjerstvo“ ili „biotehnologija“. Prvi rekombinantni protein proizveden je uz pomoć bakterija. Unatoč prednostima, bakterije imaju značajan nedostatak - teško sintetiziraju proteine sa složenom strukturom; dok kvasci nemaju nemogućnosti glikozilacije proteina. Isto se riješilo ubacivanjem gena za proizvodnju enzima u stanicu domaćina (HOUDEBINE, 2009). Primjerice, stanice kukaca zaražene bakulovirusom (Sf9)

imaju široku primjenu u proizvodnji rekombinantnih proteina no nemaju nemogućnost pravilne posttranslacijske modifikacije. Brojne stanične linije se koriste za proizvodnju rekombinantnih, manje ili više uspješno kao i transgenične biljke (nedostatak im je što tijekom posttranslacijske modifikacije ne dodaju sijalinsku kiselinu te koriste šećer ksilozu koji može izazvati imunološku reakciju kod ljudi). Transgenične životinje nam nude zanimljive načine za proizvodnju farmaceutskih proteina. Prednosti su visoka kvaliteta proteina te prihvatljiva cijena (HOUDEBINE, 2009.).

8.2. Proces proizvodnje rekombinantnih terapijskih proteina

Složeni proizvodni postupci dobivanja rekombiniranih proteina obuhvaća uzgoj proteina, proizvodnju u bioreaktoru, izolaciju, pročišćavanje proteina, te formulaciju i pakiranje lijeka (KHAN i sur., 2016.).



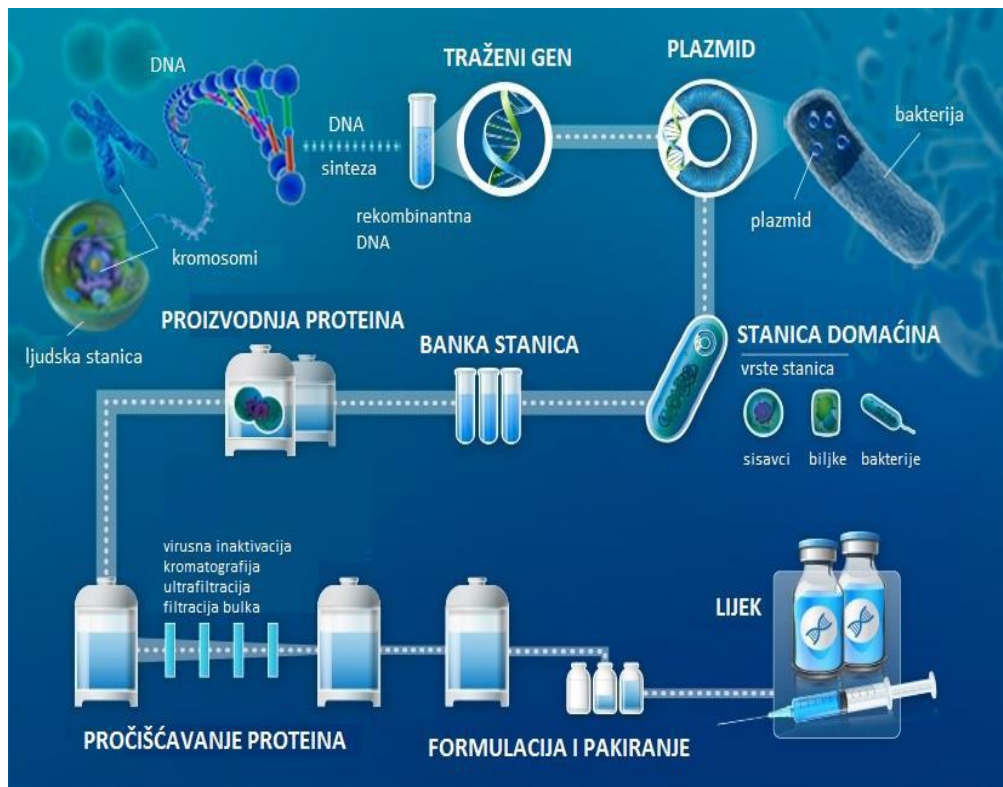
Slika 16. Proizvodnja rekombiniranih proteina, moguće razlike među proizvođačima (SOKOL, 2016.).

Rekombinirani proteini su heterogena smjesa dobivena iz žive stanice, te su tijekom svog proizvodnog ciklusa podložni cijelom nizu procesnih i strukturalnih onečišćenja. Kompleksne proteinske strukture su također predmetom cijelog niza kemijskih promjena, koje mogu uvelike utjecati na njihovu funkciju i biološku aktivnost. Stoga terapijski proteini prolaze cijeli niz sigurnosnih fizikalno-kemijskih i bioloških analiza koje su nabrojane u tablici kako bi se osigurala funkcionalna terapija njima (SOKOL, 2016.).

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

Tablica 2. Analitičke metode koje se koriste za ispitivanje terapijskih proteina (SOKOL, 2016.).

Nakon ispitivanja biološke aktivnosti, imunokemijskih ispitivanja, fizikalno-kemijskih ispitivanja, te ispitivanja kakvoće i čistoće lijek prolazi neklinička ispitivanja, klinička ispitivanja uključujući farmakokinetička ispitivanja, *in vitro* i farmakodinamička ispitivanja, zatim ispitivanja djelotvornosti i sigurnosti. Tek kad je prošao sve zadane protokole farmakoloških obrazaca lijek je spreman za regulatorne smjernice ka registraciji lijeka (LIU, 2014.)



Slika 17. Shematski prikaz uobičajenog postupka proizvodnje biološkog lijeka (SOKOL, 2016.).

9. PRIMJENA BIOLOŠKIH LIJEKOVA U VETERINARSKOJ MEDICINI

Analiza koja se temelji na antitijelima izuzetno je važna u istraživanju stanične i molekularne biologije, a ovo je jedno od područja koje ima veliki potencijal za veterinarska istraživanja, budući da reagensi i antitijela nisu lako dostupni za sve vrste. Međutim u novije vrijeme je broj reagensa koji su testirani na unakrsnu reaktivnost na veterinarskim vrstama porastao, te biotehnoške tvrtke uviđaju veću potrebu u stvaranju protutijela za konje i pse i mačke zbog povećane potražnje. Idealno bi bilo kada bi bilo koje antitijelo koje imunoprecipitira protein bilo validirano masenom spektroskopijom. Drugi pristup validaciji je identifikacija istog putem Western blot analize i da su razine ekspresije (bilo na Western blotu, imunofluorescenciji, bilo protočnoj citometriji) u korelaciji sa uočenom promjenom ili promjenom na razini ekspresije (brisani gen, utišani gen). Bez stvaranja modela s manipulacijama u genomu te s ograničenom dostupnošću unaprijed dizajniranih komercijalno dostupnih reagensa, poput siRNA za životinjske vrste, ovaj je proces teži i skuplji.

Nadalje, važno je napomenuti da proteinskim blotovima detektiramo ne samo denaturirane i ne-denaturirane proteine, već i nespecifične proteinske konfiguracije. Sekundarna, tercijarna i kvartarna nativna struktura proteina može biti presudna za prepoznavanje epitopa, a nativna struktura često je važna za prepoznavanje epitopa i efikasne reagense za antitijelo za protočnu citometriju i imunofluorescenciju koje čine nužan alat kod stvaranja novih bioloških lijekova u veterinarskoj medicini.

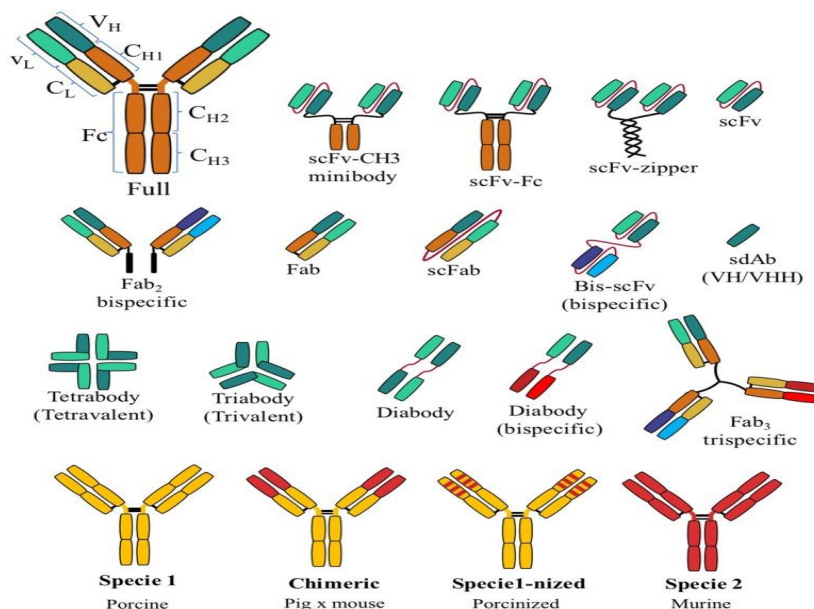
Biološki lijekovi u veterinarskoj medicini brzo se šire i razvijaju, te je značajan napredak u mogućnosti liječenja različitih bolesti, nadasve tumoroznih oboljenja u onkologiji (JOHANNES, 2019.). Biotehnologija u veterini koristi se također i za reprodukciji, te se proizvode željeni hormoni i stimulatori rasta. Međutim, još uvijek su veliki troškovi proizvodnje bioloških i biosličnih lijekova pa se radi i na pronalasku alternativnih strategija proizvodnje, poput nanotehnologije koja bi u kombinaciji s rekombinantnom tehnologijom učinila terapiju jeftinijom (GIFRE i sur., 2017).

Rekombinantna tehnologija omogućila je proizvodnju proteina od interesa za veterinarsku proizvodnju i proizvodnju hrane. Rekombinirani hormoni komercijalno su dostupni, tako npr. rekombinantni FSH koji se koristi za razvoj folikula životinja i superovulaciju uglavnom je proizveden od stanica jajnika kineskog hrčka (CHO). Neki

primjeri su Merck (SAD) i Puregon Organon BV (Europa) (GIFRE i sur.,2017.). Trenutno se hormoni koji se najčešće koriste u reproduktivne svrhe pročišćavaju od materijala životinjskog podrijetla, poput hipofize. Iako je široko rasprostranjena praksa, ona ima značajne probleme kao što su nedosljednosti u proizvodnji, dovodi do varijacija u superovulatornom odgovoru između životinja, problemi s čistoćom zbog prisutnosti drugih hormona, kontaminiranje uzorka, moguće kontaminacije uzročnicima koji prenose bolest. Sve to zahtijeva razvoj i primjenu protokola pročišćavanja za koncentriranje i pročišćavanje proteina kako bi se zajamčila kvaliteta konačnog proizvoda (GIFRE i sur., 2017.).

9.1. Biološke inovacije u veterini

Kontinuirana potraga za alternativnim načinima suzbijanja patogena utjecala je na primjenu rAb u veterinarskoj medicini, upravo je biotehnologija smanjila upotrebu pokusnih životinja. Glavna prednost hibridnog rAb je smanjena imunogenost, a scFv je najčešći oblik rAb koji se istražuje i koristi (BUSTAMANTE-CORDOVA i sur., 2018.).



Slika 18. Grafički prikaz raznolikosti rekombinantnih antitijela u usporedbi s potpunim klasičnim antitijelom. (Kratice: varijabilna domena lakog lanca (VL), varijabilna

domena teškog lanca (VH), konstantna lagana domena (CL), konstantna teška domena (CH), varijabilna fragmentna jednog lanca (scFv), vezanje antigena fragment (Fab), fragment koji se može kristalizirati (Fc) (BUSTAMANTE-CORDOVA i sur., 2018.).

Vrsta	Ab format	Ekspresijski sustav	Razultat
Krava	scFv	<i>E coli</i>	Spriječavanje adhezije tkiva pomoću <i>S. aureus</i> kako bi se spriječio goveđi mastitis.
Krava	sdAb(VHH)	<i>E coli</i>	Prepoznaje β -hemolizin bakterije <i>S. aureus</i> . Pokazuje neutralizaciju aktivnosti <i>in vitro</i>
Krava	scFv	HEK293	Otkrivanje HSP65 od <i>M. tuberculosis</i> .
Krava	sdAb(VHH)	E coli	Prepoznaje soj <i>B. melitensis</i> Riv1 od strane ELISA.
Krava	Potpuno Ab	CHO	Veća osjetljivost na prepoznavanje patogene izoforme prionskog proteina (PrP ^{sc}) od njegovog scFv oblika.
Krava	scFv	E coli	Blokira staničnu adheziju ETEC-a. Smanjena ETEC infekcija <i>in vivo</i> .
Krava	scFv	E coli	Inhibira staničnu adheziju ETEC blokirajući K99 faktor, procijenjen <i>in vitro</i> .
Pas	Potpuno pseće Ab	CHO	Liječenje atopijskog dermatitisa, smanjenje pruritusa.

Pas	scFv	CHO i E coli	Anti-pasji CD20, potencijalna upotreba u liječenju i dijagnosticiranju maligniteta B stanica.
Pas	Potpuno pseće Ab	CHO	Prepoznaje EGFR. Antiproliferativni učinak stanica raka <i>in vitro</i> .
Pas	scFV	E coli	Potencijalna upotreba za ciljanje pasjih dendritičkih stanica.
Svinja	sdAb	E coli	Visoka specifičnost i afinitet kapsidnom proteinu PVC tipa II.
Svinja	sdAb	E coli	Visoka osjetljivost i specifičnost prepoznaju kapsidni protein PCV tipa II pomoću ELISA.
Svinja	scFV	E coli	Prepoznavanje <i>B. hyodysenteriae</i> za dijagnozu dizenterije svinja.
Svinja	sdAb	E coli	Specifično prepoznavanje antigena <i>T. solium</i> za kontrolu cistierkoze.
Svinja	sdAb (VHH)	E coli	Ciljanje antigena glikoproteina 4 od PRRSV na CD169 receptor.
Svinja	scFc	E coli	Prepoznaje rekombinantnu C podjedinicu pAPN od strane ELISA.
Svinja	Himerni M x P Puni	Kvasac	Inhibicija rasta <i>H.</i>

	Ab		<i>parasuis in vitro</i> i djelomična zaštita <i>in vivo</i> kako bi se spriječila Glasserova bolest.
Svinja	Potpuni Ab	CHO	Smanjena bruto patologija u plućima nakon izazova virusom gripe A. Nema učinka na virusne titre.
Svinja	Potpuni Ab	HEK293	Prepoznavanje hemaglutinina iz skupine 1 i 2 i neutralizacija aktivnosti protiv virusa gripe.
Svinja	scFv	Vero	Usmjerenost antigena ASFV na SLA.

Tablica 3. Rekombinantna antitijela s mogućom upotrebom u veterini (BUSTAMANTE-CORDOVA i sur., 2018.).

9.1.1. Imunoterapija melanoma

Melanom pripada skupini agresivnih tumora, rezistentnih na dostupne terapije. Maligni tumor melanocita očituje se lokalnom invazivnošću, te sklonosti limfogenom i hematogenom metastaziraju. Oralni melanom jedna je od najčešćih zloćudnih tumora usne šupljine u pasa s jačom pigmentacijom kože. Dijagnostika se temelji na citološkoj, histopatološkoj i imunohistokemijskoj pretrazi (HERAK-PERKOVIĆ i sur., 2012.).

Cjepivo se sastoji od ksenogenske (humane) plazmidne DNA koja kodira sekvencu gena za humanu tirozinazu (cTyr). Protein ljudske tirozinaze je dovoljno različit od proteina pseće tirozinaze da će stimulirati imunološki odgovor, ali ipak dovoljno sličan psećoj tirozinazi da je imunološki odgovor učinkovit protiv stanica melanoma pasa (BERGMAN i sur., 2006.). Cjepivo se daje transdermalno. Početno liječenje zahtijeva četiri doze cjepiva u intervalima od 2 tjedna, nakon toga cjepivo treba primjenjivati u intervalima od 6 mjeseci.

Ksenogeno antitijelo tirozinaze djeluje na tirozinazu maligno promijenjenih melanocita čime se ometaju stanični metabolički događaji. Očekivani ishod terapije cjepivom uključuje značajno produljenje vremena preživljavanja (AAHA, 2017.), a također dovodi do stvaranja antitijela na tirozinazu (ALMELA i sur., 2019.).



Slika 19. Cjepivo protiv melanoma pasa (AAHA, 2017.).

9.1.2. Imunoterapija B i T limfoma

Limfom su skupina novotvorevina koji pripadaju skupini hemolimfatičnih i retikuloendotelnih tvorbi. Istraživanja pokazuju kako retrovirusi imaju jednu od glavnih uloga u nastanku takve vrste novotvorevina. Histološki se ovi tumori svrstavaju u limfome, histiocitni sarkom i mijelogenu leukemiju. Limfomi se anatomske dijele: multicentrični oblik oboljenja na perifernim limfnim čvorovima, medijastinalni unutar probavnog sustava, te kožni (GIEGER, 2011.). Limfomi se prema imunofenotipu dijele na limfome podrijetla B-limfocita i T-limfocita, te ne-B i ne-T limfome, prema staničnoj morfologiji gledamo veličinu, broj mitozu, histološki dali su difuzni ili nodularni, te biološko ponašanje i stupanj malignosti (GIEGER, 2011.).

Monoklonsko antitijelo protiv CD20 (BLONTRESS®, Aratana) i anti-CD52 (TACTRESS®, Aratana) za pseći B i T-limfom koriste se već nekoliko godina, te su pokazali dobre rezultate. Licencirani su 2015. i 2016. kao pomoć u liječenju limfoma, a primjenjuju se intravenozno (AAHA, 2017.).



Slika 20. blontress® i tactress®, Aratana Therapeutics (ARATANA THERAPEUTICS, 2019.).

9.1.3. Imunoterapija osteoartritisa i imunodeficijencije

Osteoartritis je degenerativna bolest svih zglobnih tkiva, koja rezultira gubitkom zglobne hrskavice i ima karakteristični klinički znak boli (HERAK-PERKOVIĆ, 2012.).

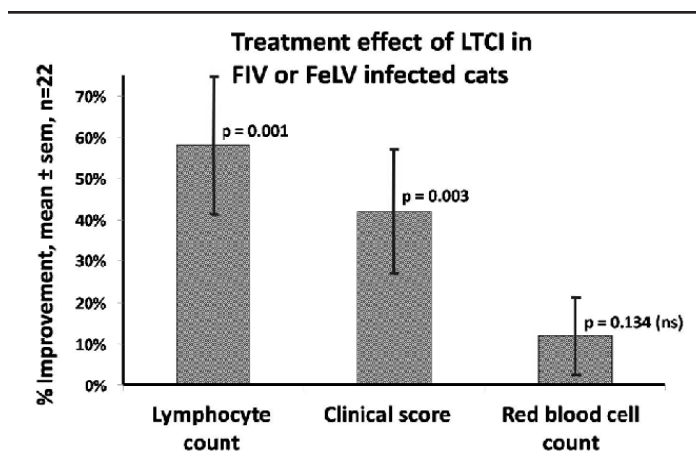
Otpuštanje degradacijskih produkata iz ekstracelularnog matriksa zglobne hrskavice zbog mehaničke i enzimске razgradnje može uzrokovati otpuštanje kataboličkih i proupalnih medijatora kao što su citokini IL-1, IL-6 i TNF- α , dušikov oksid te destruktivne enzime iz hondrocita i sinoviocita. Sve to stvara upalni odgovor koji mijenja normalnu ravnotežu razgradnje i izgradnje hrskavičnog matriksa, te potiču proizvodnju ostalih citokina što vodi do ubrzanog oštećenja zglobnoga tkiva (SMOLEC i sur., 2018.).

Imunomodulator limfocita T-stanica (LTCI) je nespecifični polipeptid koji regulira imunitet. Polipeptid djeluje putem regulacije proizvodnje i funkcije CD-4 limfocita. Pokazalo se da povećava broj limfocita i proizvodnju interleukina-2 (IL-2) kod životinja (GINGERICH, 2008.). Proizvod je indiciran za smanjenje boli povezane s osteoartritisom kod pasa starijih od 1 godine (EHRENZWEIG i sur., 2019.). Proizvod se primjenjuje supkutano, tijekom 6 tjedana. LTCI je sigurna opcija za pse koji ne mogu koristiti kortikosteroide zbog problema s bubrezima, jetrom ili srcem, te starije jedinke. Do danas nisu poznate kontraindikacije povezane s liječenjem osteoartrisa ovim lijekom (AAHA, 2017.).



Slika 21. LTCI T-Cyte Therapeutics (AAHA, 2017.).

LTCI T-Cyte Therapeutics je proizvod također odobren za liječenje infekcije virusom leukmije mačaka FeLV kod mačaka i virusom imunodeficijencije mačaka FIV (AAHA, 2017.).



Slika 22. Postotak ukupnog poboljšanja hematologije i kliničkih parametara u terenskim slučajevima mačaka zaraženih FIV ili FeLV-om (GINGERICH, 2008.).

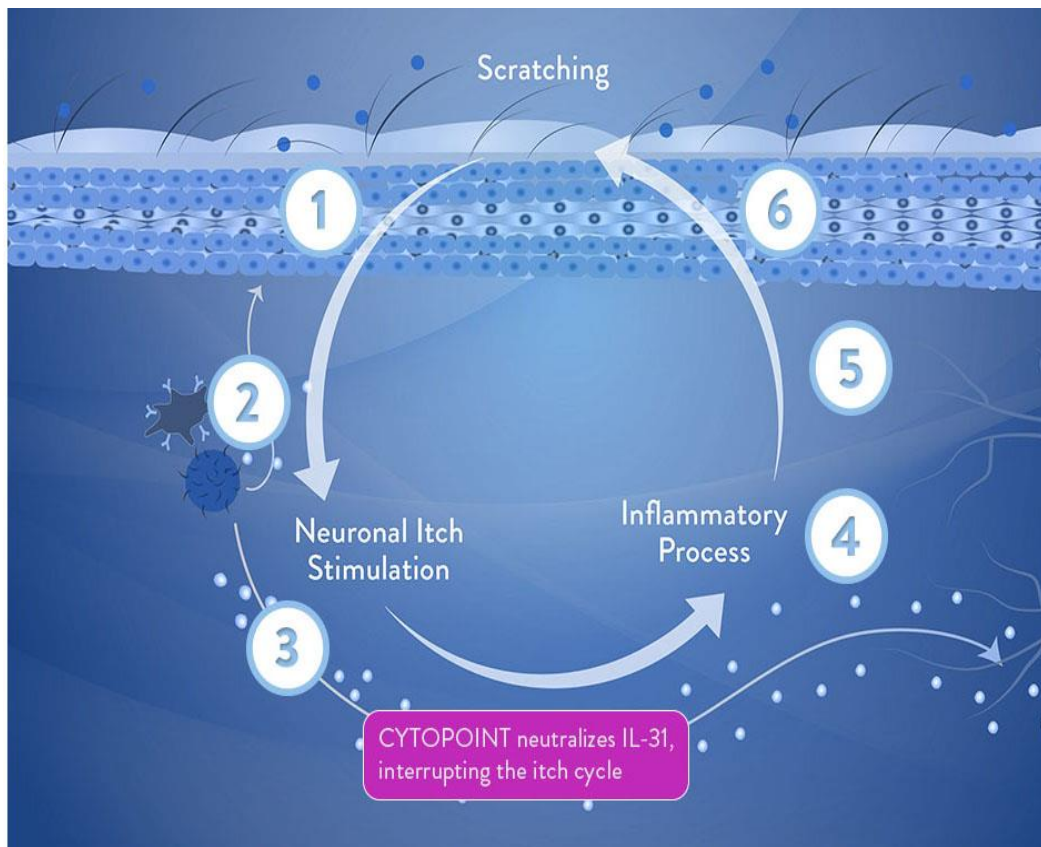
9.1.4. Imunoterapija za atopijski dermatitis

Atopijski dermatitis je kožna kronična upala povezana s alergenim svojstvima iz okoline, kao što su kućne grinje, prašina, pelud, te ostali sastojci iz okoliša. Nakon što dođe do oštećenja kože pasa zbog mehaničkih ozljeda, mogu se razviti sekundarne bakterijske i gljivične infekcije (HERAK-PERKOVIĆ, 2012.).

Cytopoint je veterinarsko- medicinski proizvod koji se koristi u liječenju atopijskog dermatitisa u pasa, a sadrži djelatnu tvar lokivetmab - monoklonsko protutijelo koje prepoznaje interleukin-31 te se veže uz njega (EMA, 2017.). Interleukin-31 je protein koji ima važnu ulogu u aktivaciji atopijskog dermatitisa u pasa, upravo blokiranjem proteina interleukina-31 smanjuje se svrbež kože i upala.

Alergeni najčešće ulaze preko kože, a upravo izloženost alergenima pokreće aktivaciju T-stanica i oslobađanje citokina koji uzrokuju svrbež i upalu. Interleukin-31 aktivira periferne živce, a svrbež u mozgu aktivira grebanje, što u kombinaciji s citokinima dodatno urušava epidermalnu barijeru te je ona još pogodnija za ulazak alergena, što produžuje začaran krug (GONZALES i sur., 2013.).

U istraživanju koje je obuhvaćalo pse s atopijskim dermatitisom, 142 psa su tokom tri mjeseca primala lijek Cytopoint, dok su druga 132 psa liječena ciklosporinom. Cytopoint bio je jednako djelotvoran kao i ciklosporin u liječenju svrbeža kože. Istraživanje pokazuje da se nakon 28 dana stupanj pruritusa smanjio za 52 % u pasa koji su primali Cytopoint, a 44 % u onih koji su primali ciklosporin. Tijekom tri mjeseca stupanj pruritusa u pasa koji su primili Cytopoint smanjio se s početne vrijednosti od 74% na 26% na kraju ispitivanja. U slijedećem ispitivanju terapija Cytopointom nastavljena je kod 81 psa dodatnih šest mjeseci, a svrbež kože dodatno se smanjio na vrijednost od 14% (EMA, 2017.).



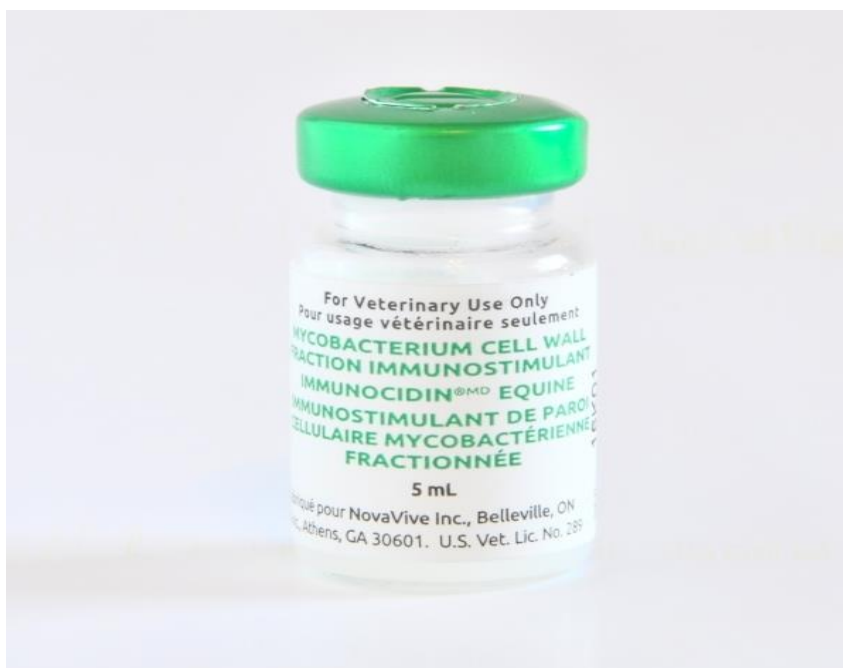
Slika 23. Djelovanje Cytopointa na neutralizaciju IL-31 (EMA, 2017.).

9.1.5. Imunoterapija za tumor

Tumorska imunoterapija pripada u skupinu autolognog liječenja raka. Terapija je usmjerena na pacijenta i koristi pacijentove vlastite tumorske stanice za liječenje solitarnih tumora (AAHA, 2017.).

9.1.6. Imunoterapija za tumor mliječne žlijezde

Tumor mliječne žlijezde predstavlja neprekidan rast atipičnih stanica. Benigni tumori najčešće su adenomi, fibroadenomi, te benigne mješavine tumora, maligni tumori su kompleksni karcinomi i sarkomi (HERAK-PERKOVIĆ i sur., 2012.).



Slika 24. Immunocidin za upotrebu u veterinarskoj medicini (AAHA,2017.).

Immunocidin je imunostimulans mikobakterijske stanične stjenke za liječenje tumora dojke i adenokarcinoma dojke kod pasa. Može se primjenjivati u kombinaciji s operacijom ili kemoterapijom, te kod pasa za smanjivanje veličine tumora prije pokušaja kirurškog otklanjanja tumora. Doziranje varira s veličinom tumora (AAHA, 2017.).

10. EKONOMSKI ASPEKTI BIOLOŠKIH LIJEKOVA

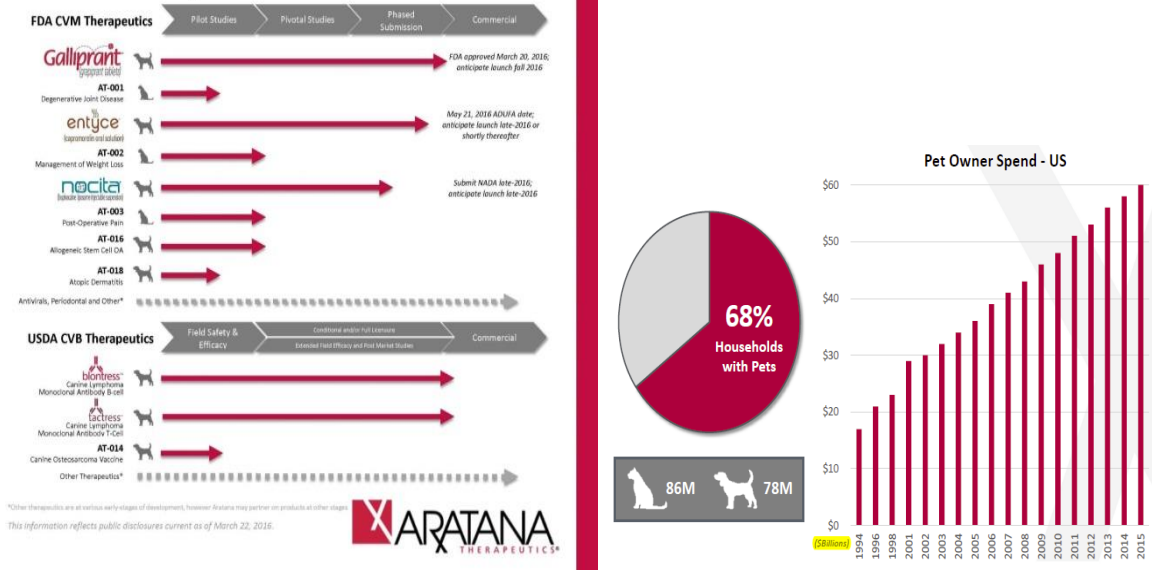
Skupa ulaganja u znanstvena istraživanja bioloških lijekova, te dugi procesi od patenta do komercijalnog lijeka utječu na trenutnu cijenu bioloških terapeutika. Ponekad taj proces traje minimalno desetak godina (KATZUNG i sur., 2011.).



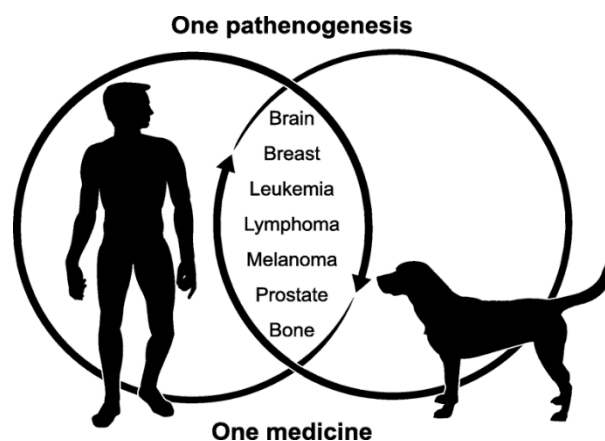
Slika 25. Slikovni prikaz razvoja farmakološkog pripravka (ARATANA THERAPEUTICS, 2019.).

Globalno tržište biološke terapije kućnih ljubimaca procjenjuje se na 180 milijuna američkih dolara u 2018. godini, a rasti će na 330 milijuna do kraja 2025. godine. Od glavnog je značenja proširiti znanje o limfomima, melanomima i drugim karcinomima kako bi poboljšali biološku terapiju (THETOKEN TIDE, 2019.). Neki od ključnih proizvođača uključenih na tržište su Aratana Therapeutics, Inc, AB Science, Boehringer Ingelheim International GmbH, Zenoaq, Morphogenesis, Vet DC, Karyopharm Therapeutics, Rhizen Pharmaceutical SA, Regeneus, Oasmia Pharmaceuticals AB, Zoetis (THETOKEN TIDE, 2019.).

Pet Therapeutics



Slika 26. Uspjesi pojedinih farmakoloških pripravaka, te sve veći broj kućnih ljubimaca i potreba za terapijom (ARATANA THERAPEUTICS, 2019.).



Slika 27. Česti karcinomi u pasa i ljudi koji imaju gotovo istu patogenezu, kliničku sliku i način liječenja (MOCHAL i sur., 2019.).

11. ZAKLJUČAK

Napretkom tehnologije znanost je podignuta na veću razinu, tako da danas možemo točnije dijagnosticirati bolesti i potom uspješnije liječiti. To je omogućeno staničnom terapijom i liječenjem modificiranim stanicama i genima. Prateći humani napredak i veterina je ušla u korak s dizajniranim rekombiniranim proteinima za teške bolesti i bolesti koje nisu imale odgovarajuću terapiju. Rekombinantna DNK tehnologija omogućuje moduliranje slijeda proteina, te dobivanje rekombinantnih proizvoda s poboljšanim svojstvima u usporedbi s onima izoliranim od izvornih domaćina. Genska terapija se oslanja na isporuku terapijskog DNA u stanice. Prijenos DNA može se postići nevirusnim vektorima, virusnim vektorima, te golom DNA. Virusni vektori su genetski modificirani virusi koji još uvijek mogu prenijeti genetski materijal u stanicu domaćina. Genska terapija je najnovija vrsta terapije, koja je još u fazi istraživanja i nema puno poznatih i odobrenih protokola liječenja; ona neće u potpunosti zamijeniti konvencionalne oblike liječenja, ali će u kombinaciji s njima zasigurno poboljšati cjelokupan status organizma.

Mnogi od spomenutih rekombiniranih proteina i antitijela koji se koriste pokazali zavidne rezultate u smanjenju stanica tumora i aktiviranju imunološkog sustava, te imaju budućnost u vidu daljnjeg istraživanja i komercijalizacije. Trenutno, najistaknutija terapija je uporaba ciljanih monoklonskih antitijela (mAbs). Imunoterapiji je cilj povećati prepoznavanje ili prezentiranje antigena povezanih s tumorima. Nažalost, postoje česti izazovi s kojima se suočava imunoterapija, uključujući prirodnu toleranciju organizma prema tumoru, te imunogenost terapije. Otkrivanje tumorskih antigena omogućilo je razvoj tehnika kojima se neoplazme specifično „ciljaju“. Strategije terapijskog cijepljenja protiv raka temelje se na konceptu poticanja imunološkog sustava na obranu organizma. Cijepljenje ima za cilj „educirati“ imunološki sustav da prepozna strane komponente. Imunomodulatori također djeluju na imunološki sustav, pomažu proizvodnji CD-4 i T- stanica kako bi pobijedile patogene. Imunomodulatori zajedno s matičnim stanicama pokazali su se kao izvrsna biološka terapija. Matična terapija se koristi za patološka stanja kao što je osteoartritis, sportske ozljede, frakture, kardiološke i neurološke bolesti, te kao regenerativna terapija. Matične stanice zajedno s plazmom su tražena terapija s odličnim rezultatom.

12. LITERATURA

1. AAHA (2017): American Animal Hospital Association: Canine Vaccination Guidelines [pristupljeno 2019.] <https://www.aaha.org/aaha-guidelines/vaccination-canine-configuration/vaccination-canine/>
2. ABBAS A.K., A.H. LICHTMAN, S. PILLAI (2012): Basic Immunology: Function and Disorders of the Immune System, Philadelphia, Elsevier Saunders.
3. ALMELA, R.M., A. ANSON (2019): A Review of Immunotherapeutic Strategies in Canine Malignant Melanoma, Veterinary sciences, 6(1), 15
4. ARATANA THERAPEUTICS (2019.): Aratana Therapeutics Present in Veterinary Conference [pristupljeno 2019.] <https://aratana.investorroom.com/2019-05-07-Aratana-Therapeutics-to-Present-at-Stifel-2019-Dental-Veterinary-Conference>
5. BAINBRIGE, G. (2015): Clinical notes: Advances in Veterinary Medicine: Therapeutic Monoclonal Antibodies for Companion Animals, Zoetis
6. BERGMAN P.J., M.A. CAMPS-PALAU, J.A. MCKNIGHT, N.F. LEIBMAN, D.M. CRAFT, C. LEUNG, et al. (2006): Development of a xenogeneic DNA vaccine program for canine malignant melanoma at the Animal Medical Center, Elsevier, Vaccine, 24, 4582-4585
7. BRBLIĆ (2017): Monoklonska protutijela u liječenju limfocitnih neoplazmi, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
8. BUSTAMANTE-CORDOVA L., E.A. MELGOZA-GONZALEZ, J. HERNANDEZ (2018): Recombinant Antibodies in Veterinary Medicine: An Update, Frontiers in Veterinary Science, 5, 175
9. CHEIFETZ A., L. MAYER (2005): Monoclonal antibodies, immunogenicity, and associated infusion reactions., The Mount Sinai Journal of Medicine, New York, 72 (4), 250-256
10. CHRETIEN S., ZERDES I., BERQH J., MATIKAS A., FOUKAKIS T. (2019.): Beyond PD-1/PD-L1 Inhibition: What the Future Holds for Breast Cancer Immunotherapy, Cancers (Basel), 5,11 (5)

11. CLARK D.P., N.J. PAZDERNIK (2009): Biotechnology, Applying the Genetic Revolution, Amsterdam, Elsevier.
12. CUERVO B., RUBIO M., SOPENA J., DOMINGUEZ J.M. (2014): Hip osteoarthritis in dogs: a randomized study using mesenchymal stem cells from adipose tissue and plasma rich in growth factors, *Int. J. Mol. Sci.*, 15 (8), 13437-60
13. DAVIS J., R. DENG, C. BOSWELL, D. CROMMELIN, R. SINDELAR, B. MEIBOHM (2013): Monoclonal antibodies: from structure to therapeutic application, *Pharmaceutical Biotechnology*, New York- Springer Science+Business Media
14. DEMARIA S., E. PIKARSKY, M. KARIN, L.M. COUSSENS, Y. CHEN, et al. (2010): Cancer and Inflammation: Promise for Biological Therapy, *Journal of Immunotherapy*, 33 (4), 335-351
15. DEL RIO D., B. BEUCHER, M. LAVIGNE, A. WEHBI, I. GONZALEZ, et al. (2019): CAV-2 Vector Development and Gene Transfer in the Central and Peripheral Nervous Systems, *Front. Mol. Neurosci.*
16. DIAS I.E., PINTO P.O., BARROS L.C., VIEGAS C.A., DIAD I.R., et al. (2019.): Mesenchymal stem cells therapy in companion animals: useful for immune-mediated diseases?, *BMC Vet. Res.*, 15 (1), 358
17. EHRENZWEIG J., W. JONES, C. BELEW, M. E. GOLDBERG (2019): Lymphocyte T-Cell Immunomodulator (LTCl), a Potent Immune Modulating Biologic; Exhibits Safety and Efficacy in the Pain Management of Dogs with Moderate- Severe Osteoarthritis, *Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 10 (4), 281-288
18. EGA (2018): European Generic and Biosimilar medicines Association - Biosimilar [pristupljeno 2019.] <https://www.medicinesforeurope.com/biosimilar-medicines/>
19. EMA (2017): European medicines agency - Cytoint, lokivetmab [pristupljeno 2019.] <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/cytopoint>
20. EMEA (1999): European Agency for the Evaluation of Medicinal Products - Development Pharmaceuticals for Biotechnological and Biological Products [pristupljeno 2019.]
21. EVANS C.H., GHIVIZZANI S.C., ROBBINS P.D. (2011.): Getting arthritis gene therapy into the clinic, *Nat. Rev. Rheumatol.*, 7 (4), 244-249

22. GADE N.E., M. D. PRATHEESH, A. NATH, et. al (2012): Therapeutic potential of stem cells in veterinary practice, *Vet. World*, 5 (8), 499-507
23. GIFRE L., A. ARIS, A. BACH, E. GARCIA-FRUITOS (2017): Trends in recombinant protein use in animal production, *Microbial Cell Factories*, 16, 40
24. GIEGER T. (2011): Alimentary lymphoma in cats and dogs, *Vet. Clin. North Am Small Anim. Pract.*, 41 (2), 419-32
25. GINGERICH D.A. (2008): Lymphocyte T-cell Immunomodulator (LTCl): Review of the Immunopharmacology of a New Veterinary Biologic, *Journal of Applied Research in Veterinary Biologic*, 6 (2), 61-68
26. GONZALES A.J., HUMPHREY W.R., MESSAMORE J.E., FLECK T.J. et.al. (2013): Interleukin-31: its role in canine pruritus and naturally occurring canine atopic dermatitis, *Vet. Dermatol*, 24 (1): 48-53
27. HAJRING D., L. PINTAR, R. ANTOLOVIĆ, J. MANDIĆ (2014): Veterinarska imunologija. Zagreb, Medicinska naklada.
28. HALMED (2015.): Agencija za lijekove i medicinske proizvode - Biološki i bioslični lijekovi [pristupljeno 2019.] <http://www.halmed.hr/Lijekovi/Informacije-o-lijekovima/Bioloski-i-bioslicni-lijekovi/>
29. HARDING F.A., M.M. STICKLER, J. RAYO, R.B. DUBRIDGE (2010): The immunogenicity of humanized and fully human antibodies, Residual immunogenicity resides in the CDR regions, *MAbs*, 2(3), 256-265
30. HARMAN R., CARLSON K., GAYNOR J., GUSTAFSON S., et. al. (2016): A Prospective, Randomized, Masked, and Placebo- Controlled Efficacy Study of Intraarticular Allogeneic Adipose Stem Cells for the Treatment of Osteoarthritis in Dogs, *Front Vet. Sci.*, 3, 81
31. HERAK-PERKOVIĆ V., Ž. GRABAREVIĆ, J. KOS (2012.): Veterinarski priručnik. Zagreb, Medicinska naklada
32. HOUDEBINE L.M. (2009): Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 32 (2), 107-21

33. JOHANNES C.M. (2019): The future is now – New oncology therapeutics, American veterinarian [pristupljeno 2019.] <https://interstatevet.org/wp-content/uploads/2017/04/10-6SmallAnimalSessionTalk3-TheFutureisNow-NewOncologyTherapeutics.pdf>
34. JOHNSTON, S.L. (2007): Biologic therapies: what and when?, Journal of Clinical Pathology, 60 (1), 8-17
35. KATZUNG G.B., S.B. MASTERS, A.J. TREVOR (2011): Temeljna i klinička farmakologija, Zagreb, Medicinska naklada
36. KHAN S., ULLAH M. W., SIDDIQUE R., NABI G., et. al. (2016.): Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life, Int. J. Genomics, 2016, 2405954
37. LA PRADE R.F., A.G. GEESIN, I.R. MURRAY, V. MUSAH, J.P. ZLOTNICKI, F. PETRIGLIANO, B.J. MANN (2016): Biologic Treatments for Sports Injuries II Think Tank- Current Concepts, Future Reserch, and Barriers to Advancement, Part 1: Biologics Overview, Ligament Injury, Tendinopathy, The American Journal of Sport Medicine, 44 (12), 3270-3283
38. LIU J. (2014): The history of monoclonal antibody development- progress, remaining challenges and future innovations, Annals of Medicine and Surgry, 3 (4), 113-116
39. LUNDSTROM K. (2018): Viral Vectors in Gene Therapy, Diseases, 6 (2), 42
40. MILIČEVIĆ E.(2016): Monoklonska protutijela: humanizacija i imunogenost, Farmaceutsko biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
41. MOCHEL J., EKKER S., JOHANNES C., JERGENS A., et. al. (2019): CAR T-Cell Immunotherapy in Human and Veterinary Oncology: Changing the Odda Against Hematological Malignancies, American Association of Pharmaceutical Scientists Journal, 21 (3), 10
42. OLIVRY T., BAINBRIDGE G. (2015.): Advances in veterinary meicine: therapeutic monoclonal antibodies for companion animals, Clinicians Brief, Zoetis
43. REGAN D., A. GUTH, J. COY, S. DOW (2016): Cancer immunotherapy in veterinary medicine: Current options and new developments, Veterinary Journal, 207, 20-28

44. SCHELLEKENS H. (2009): Biosimilar therapeutics- what do we need to consider?, Oxford Journal- Nephrol Dial Transplant, 2 (1), i27-i36
45. SCHULZE-KOOPS H., J.R. KALDEN (2000): Where is biological therapy going?, Arthritis Research, 2 (5), 337-341
46. SKOWICKI M., T. LIPINSKI (2016): The development of methods for obtaining monoclonal antibody- producing cells, Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej, 70, 376-79
47. SMOLEC O., I. VLADIMIR, M. VUČKOVIĆ, P. KOSTEŠIĆ, N. BRKLJAČA BOTTEGARO, et. al. (2018): Osteoarthritis u pasa, Hrvatski veterinarski vjesnik, 26/2018, 1-2
48. SOKOL P. (2016): Razvoj i odobravanje biosličnih lijekova u Europskoj uniji, Farmaceutsko biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
49. THETOKEN TIDE (2019) : Pet Cancer Therapeutics Market A Comprehensive Study By Key Players Aratana Therapeutics, Inc, AB Science, Boehringer, Blockchain Magazine News, [pristupljeno 2019.] <https://thetokentide.com/pet-cancer-therapeutics-market-a-comprehensive-study-by-key-players-aratana-therapeutics-inc-ab-science-boehringer/56841/>
50. USDA (2013): United States Department of Agriculture – Veterinary Biologics, use and regulation [pristupljeno2019.] <https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/animalhealth/veterinary-biologics>
51. VILAR J.M., BATISTA M., MORALES M., SANTANA A., et. al. (2014): Assessment of the effect of intraarticular injection of autologous adiposederived mesenchymal stem cells in osteoarthritic dogs using a double blinded force platform analysis, BMC Vet. Res., 10, 143
52. WANG J., S. CHOW (2012): On the Regulatory Approval Pathway of Biosimilar Products, Pharmaceuticals, 5 (4), 34-40
53. WANG E., A. MONACO, V. MONSURRO, M. SABATINO, Z. POS, et al. (2009): Antitumor vaccines, immunotherapy and the immunological constant of rejection, HHS Public Access, Author manuscript, 12 (5), 297-301

54. WIRTH T., S. YLA-HERTTUALA (2014): Gene therapy Used in Cancr Treatment, Biomedicines, 2 (2), 149-162

13. SAŽETAK

Primjena bioloških lijekova u veterinarskoj medicini

Biološki lijekovi su proteini dobiveni iz žive stanice, za razliku od „klasičnih“ lijekova koji su kemijski sintetizirane male molekule. Posljednjih desetljeća je, zahvaljujući napretku biotehnologije, primjena bioloških lijekova donijela značajna poboljšanja u terapiji kroničnih i malignih bolesti ljudi. Skupine proteina koje se koriste u biološkoj terapiji su terapijska protutijela, fuzijski proteini i hormoni. U veterinarskoj medicini je broj odobrenih bioloških lijekova trenutno vrlo ograničen, no to će se s vremenom promijeniti. Naime, u svijetu postoji nekoliko farmaceutskih kompanija koje se bave kliničkim istraživanjem primjene biološke terapije u veterinarskoj medicini (maloj praksi), a ona se odnose na primjenu terapijskih protutijela u stanjima kronične boli i upale, imunologije i kod alergija. Obzirom na ulaganja i interes industrije, očito je da primjena bioloških lijekova u maloj praksi predstavlja budućnost veterinarske medicine.

Ključne riječi: biološki lijekovi, imunoterapija, imunologija, alergije, upala

14. SUMMARY

The use of biological medicines in veterinary medicine

Biological remedies are proteins derived from living cell, unlike „classic“ drugs that are chemically synthesized by small molecules. Over the last decades, due to the advancement of biotechnology, the use of biological drugs has brought significant improvements in the treatment of chronic and malignant diseases of humans. Protein groups used in biological therapy include therapeutic antibodies, fusion proteins and hormones. In veterinary medicine, the number of approved biological drugs is very limited, but this will change over time. In fact, there are several pharmaceutical companies in the world deal with clinical trials of biological therapy in veterinary medicine (small practice), relating to the use of therapeutic antibodies in conditions of chronic pain and inflammation, immunology and allergies, as well as investment and industry interest, it is obvious the use of biological drug in small practice is the future of veterinary medicine.

Key words: biological drugs, immunotherapy, immunology, allergies, inflammation

15. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 13. studenog 1991. u Slavonskom Brodu. Nakon osnovne škole upisala sam srednju školu za medicinske sestre Vinogradska u Zagrebu, te maturirala s odličnim uspjehom 2010. godine. Veterinarski fakultet sam upisala 2011. godine. Tijekom svih šest godina bila sam redovan student, za vrijeme studija sam radila studentske poslove, te trenirala rukomet i plivanje. U slobodno vrijeme bavim se kreativnim radom.