

## BIOLÉČIVA – JAKÝ JE JEJICH SKUTEČNÝ POTENCIÁL?

ZUZANA CHRASTILOVÁ<sup>a,b</sup>, MARTINA MACKOVÁ<sup>a</sup>, JAN ŠOTOLA<sup>b</sup> a VLADIMÍR KRÁL<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6, <sup>b</sup> Zentiva a.s. Praha, U Kabelovny 130, 102 37 Praha 10

Došlo 5.12.06, přijato 18.12.06.

Klíčová slova: bioléčiva, biofarmaceutika, terapeutické proteiny, produkce bioléčiv

### Obsah

1. Úvod
2. Současný vývoj farmaceutického průmyslu aneb stanou se bioléčiva jeho nezbytnou součástí?
3. Oblasti terapeutického využití bioléčiv
4. Nové technologické přístupy pro produkci bioléčiv
  - 4.1. Produkce v bakteriích
  - 4.2. Produkce v kvasinkách
  - 4.3. Produkce v hmyzích buňkách s použitím bakulovirových vektorů
  - 4.4. Produkce v savčích buňkách
  - 4.5. Produkce v transgenních zvířatech
  - 4.6. Produkce v transgenních rostlinách a rostlinných tkáňových kulturách
5. Cesty zdokonalení terapeutických vlastností bioléčiv
6. „Biosimilars“ – nová generace bioléčiv
7. Závěr

### 1. Úvod

Bioléčiva neboli biofarmaceutika nesporně zaujímají významné místo mezi prodávanými léčivými. Na rozdíl od klasických nízkomolekulárních léčiv zahrnují bioléčiva molekuly s velkou molekulovou hmotností (protilátky až 150 kDa). Mezi biofarmaceutika patří rozličné peptidy (např. insulin pro léčbu diabetes mellitus), proteiny (např. srážecí faktor VIII pro léčbu hemofilie, interferon  $\beta$  pro léčbu roztroušené sklerózy atd.) i velké molekuly protilátek (např. protilátka proti receptoru CD-20 pro léčbu rakoviny lymfatického systému – tzv. non-Hodgkin lymfomu). V některých případech bioléčiva dokonce představují jedinou účinnou terapii. Například dříve neléčitelné nemoci, jako je nanismus nebo neplodnost, mohou být nyní úspěšně léčeny pomocí biofarmaceutik. Terapeutické proteiny navíc mohou být upraveny tak, aby měly optimální farma-

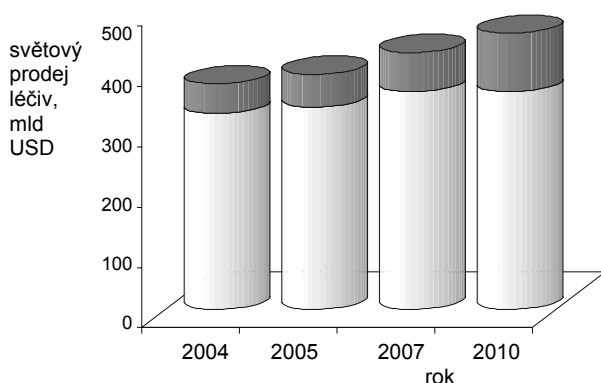
kologické vlastnosti.

V posledních dvaceti letech byl zaznamenán neobyčejný nárůst produkce v biofarmaceutickém průmyslu založeném na vývoji rekombinantní DNA a hybridních technologiích. Rozsah a kvalita proteinů vhodných pro klinické využití byla dříve limitována závislostí na extrakci z přírodních zdrojů. Rekombinantní DNA technologie umožnily masovou produkci širokého spektra přírodních a modifikovaných proteinů. Navíc hybridní technologie zavedly přípravu nové třídy proteinů – monoklonálních protilátek – které poskytují alternativní přístup k léčbě mnoha onemocnění.

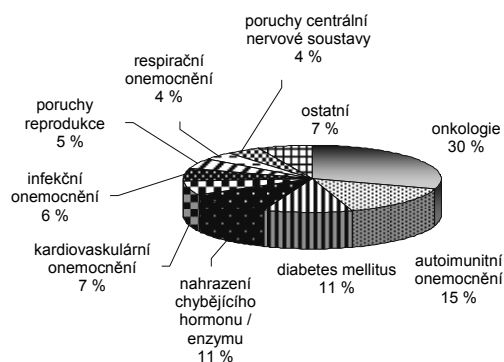
První rekombinantní proteiny nahrazovaly existující proteiny, které byly izolovány z přírodních zdrojů, jako je např. krev nebo hypofýza. Prvním schváleným rekombinantním proteinem byl v roce 1982 insulin. Následoval lidský růstový hormon a srážecí faktor VIII. V některých případech byl výzkum a následná rekombinantní produkce bioléčiv také motivována bezpečností spojenou s izolací požadovaných látek z přírodních zdrojů. V roce 1980 se objevila obava, že růstový hormon izolovaný z lidské hypofýzy může přenášet prionové částice způsobující Creutzfeld-Jacobovu nemoc, což vedlo k přípravě geneticky modifikovaných bakterií *Escherichia coli* produkujících lidský růstový hormon. Rekombinantní technologie také umožnily produkci virových vakcín, např. proti hepatitidě B, aniž by bylo potřeba při výrobě pracovat s nebezpečným virem<sup>1</sup>. Významný podíl aplikací je v oblasti terapie rakoviny, další pak zahrnují léčbu imunitních a infekčních onemocnění. Počet schválených produktů stabilně roste. V roce 2000 bylo schváleno 84 biofarmaceutik v Evropě a USA, zatímco v roce 2003 to bylo již 148 (cit.<sup>1</sup>). V roce 2006 tento počet narůstá až na 165 schválených bioléčiv<sup>2</sup>.

### 2. Současný vývoj farmaceutického průmyslu aneb stanou se bioléčiva jeho nezbytnou součástí?

Farmaceutický trh zaznamenává postupné vytěšňování klasických nízkomolekulárních léčiv velkými molekulami bioléčiv. Analýza společnosti Datamonitor ukazuje, že globální prodej bioléčiv v roce 2004 padesáti šesti „top“ farmaceutickými a biotechnologickými firmami dosáhl 56,2 mld USD, což je oproti roku 2003 nárůst o 18,3 %. Z toho 20,2 mld USD zahrnoval prodej šesti klíčových tříd produktů: insulin, lidský růstový faktor, faktor stimulující kolonie (CSF), epoetin, interferon  $\alpha$  a interferon  $\beta$ . Zatímco nejprodávanějšími produkty v minulosti byly epoetin a insulin, v budoucnu to budou monoklonální protilátky a terapeutické vakcíny<sup>3</sup>. Podle analýzy společnosti Datamonitor trh s terapeutickými proteiny nadále poroste.



Obr. 1. Světový prodej bioléciv ve srovnání s prodejem ostatních léčiv<sup>4</sup>; □ světový prodej nízkomolekulárních léčiv, ■ světový prodej bioléciv



Obr. 2. Hlavní oblasti terapeutického využití bioléciv<sup>21</sup>

V roce 2010 by se měl téměř zdvojnásobit a dosáhnout tak 105 mld USD (cit.<sup>4</sup>) (obr. 1).

Monoklonální protilátky představují největší a nejrychleji se rozvíjející skupinu biofarmaceutik, která zahrnuje široké spektrum aplikací (léčbu rakoviny, poruchy imunitního systému a některé infekční nemoci). V roce 1995 monoklonální protilátky představovaly 1 % biofarmaceutického trhu, 14 % v roce 2001 a 22 % v roce 2002. Odhaduje se, že prodej monoklonálních protilátek ročně poroste o 17,2 % do roku 2010 a zvýší se tak z 3,6 mld USD v roce 2002 na 7,9 mld USD v roce 2006 a 12,1 mld USD v roce 2010 (cit.<sup>3</sup>).

### 3. Oblasti terapeutického využití bioléciv

Významný podíl aplikací bioléciv je v oblasti rakoviny (např. rakovina lymfatického systému – tzv. non-Hodgkin lymfomu, rakovina prsu, rakovina tlustého střeva, leukémie), dále zahrnují léčbu autoimunitních onemocnění (např. roztroušená skleróza, revmatoidní artritida, Crohnova nemoc, psoriáza), léčbu diabetes mellitus, anémie,

nahrazení chybějícího proteinu (např. lidského růstového hormonu) a další. Hlavní oblasti terapeutického využití jsou shrnuty na obr. 2.

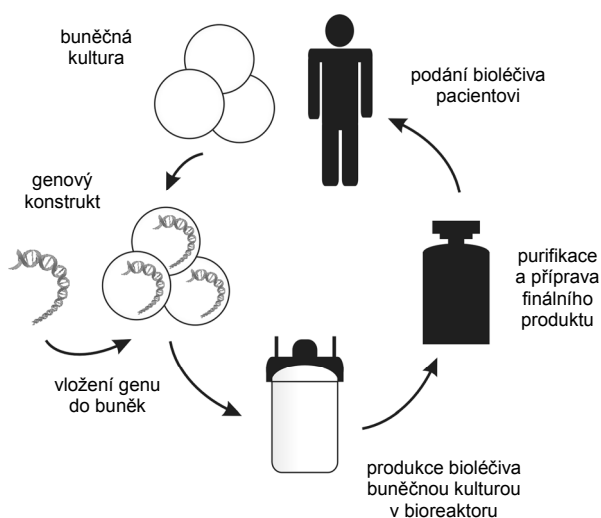
Podstatnou část mezi prodávány biolécivy zahrnuje prodej insulinu, lidského růstového hormonu, erythropoetinu, faktoru stimulujícího kolonie (CSF), interferonu  $\alpha$  a interferonu  $\beta$  (cit.<sup>4</sup>). Vedle nich zaujímají důležitou oblast monoklonální protilátky. V tabulce I jsou shrnuty nejčastěji používané terapeutické proteiny a oblasti jejich terapeutického využití.

### 4. Nové technologické přístupy pro produkci bioléciv

Původně byly proteiny s terapeutickým účinkem získávány z přírodních zdrojů, např. srážecí faktory a lidský sérový albumin z lidské krevní plasmy, insulin ze slinivky prasete, lidský růstový hormon z lidské hypofýzy (postmortem) a glukocerebrosidasa z lidské placenty. Jak již bylo zmíněno v úvodu, přírodní zdroje s sebou nesou určitá rizika, jako je přenos prionových částic prostřednic-

Tabulka I  
Klíčové produkty na biofarmaceutickém trhu

Produkt	Indikace
Insulin	léčba diabetes mellitus
Lidský růstový hormon	léčba nedostatku růstového hormonu (nanismu)
Erythropoetin	léčba anémie
Kolonie stimulující faktor (CSF)	při léčbě autologních transplantací kostní dřeně, při léčbě toxických stavů leukocytů po chemoterapiích aj.
Interferon $\alpha$	léčba některých typů leukémie, Kaposiho sarkomu, hepatitidy aj.
Interferon $\beta$	léčba roztroušené sklerózy
Monoklonální protilátky	léčba rakoviny, autoimunitních onemocnění, prevence odmítnutí transplantovaných orgánů aj.



Obr. 3. Schéma přípravy bioléciv

tím hypofýzy nebo jiné, např. virové kontaminace. Genové inženýrství kromě zamezení těchto problémů navíc přináší možnosti úpravy proteinů „na míru“ tak, aby byly optimalizovány i jejich farmakologické vlastnosti. Z těchto důvodů se produkce terapeutických proteinů přesunula k rekombinantním expresním systémům. Nejčastěji používanými expresními systémy jsou bakterie, kvasinky, hmyzí buňky, savčí buňky a v poslední době se studuje i možnost využití rostlinných buněk pro expresi proteinů. Schéma přípravy bioléciv je na obr. 3.

Většina terapeutických proteinů jsou glykoproteiny, které pro správnou biologickou aktivitu vyžadují *N*-glykosylace, jež probíhají jako posttranslační modifikace u eukaryot. Mezi různými expresními systémy existují podstatné rozdíly v posttranslačních modifikacích. Např. v bakteriích glykosylace neprobíhá vůbec, proto se nehodí pro produkci glykoproteinů.

#### 4.1. Produkce v bakteriích

Expres rekombinantních proteinů v bakteriálních buňkách (nejčastěji v bakteriích *Escherichia coli*) zpravidla umožňuje získání velkého množství požadovaného produktu. Výhodou bakterií je rychlý růst v poměrně levném médiu, který vede k vysokému výtěžku. Obecné metody produkce v těchto buňkách zahrnují přímou intracelulární expresi, sekreci proteinu do periplasmatického prostoru a expresi fúzních proteinů zajišťujících lokalizaci produktu buď v cytoplasmě, nebo v membráně hostitelské buňky<sup>5</sup>.

Bakterie neumí produkovat proteiny, které vyžadují posttranslační modifikace pro jejich biologickou aktivitu, jako jsou např. glykosylace. Další nevýhodou bakteriální exprese je to, že proteiny jsou často exprimovány ve formě inkluzních tělísek, z kterých se biologicky aktivní protein

získává poměrně obtížně (purifikace zahrnuje denaturaci a renaturaci) a tato cesta je i finančně náročná<sup>6</sup>.

Bakteriální buňky nicméně představují výhodný expresní systém pro proteiny nevyžadující posttranslační modifikace (viz tab. II). V bakteriích *E. coli* je exprimován lidský insulin nebo jeho analogy pro léčbu cukrovky (Humulin<sup>®</sup>, Humalog<sup>®</sup>, Lantus<sup>®</sup>, Exubera<sup>®</sup>), lidský růstový hormon pro léčbu nanismu (Protropin<sup>®</sup>, Humatrope<sup>®</sup>, Nutropin<sup>®</sup>, Norditropin<sup>®</sup>, Genotropin<sup>®</sup>, Omnitrope<sup>®</sup>), parathyroidní hormon pro léčbu osteoporózy (Forteo<sup>®</sup>), interferon  $\alpha$  pro léčbu leukémie a hepatitidy C (Intron A<sup>®</sup>, Peg-Intron<sup>®</sup>, Pegasys<sup>®</sup>), interferon  $\beta$  pro léčbu roztroušené sklerózy (Betaseron<sup>®</sup>), faktor stimující kolonie granulocytů (G-CSF) používaný při chemoterapiích (Neupogen<sup>®</sup>, Neulasta<sup>®</sup>). *E. coli* je také běžně používaným expresním systémem pro produkci fragmentů protilátek<sup>7</sup>.

#### 4.2. Produkce v kvasinkách

Produkce proteinů v kvasinkách nabízí několik výhod. Je to rychlá a jednoduchá produkce s vysokým výtěžkem (který je ale nižší než v bakteriích), nízká cena kulturačního média a v neposlední řadě existence posttranslačních modifikací, jako je *N*-glykosylace<sup>6,8</sup>. Rekombinantní proteiny mohou být produkovány intracelulárně nebo může být upravena sekreční dráha tak, aby byly proteiny sekretovány do média<sup>6</sup>, což značně usnadňuje purifikaci proteinu. Jako kvasinkový expresní systém se zpravidla používá *Saccharomyces cerevisiae* a *Pichia pastoris*.

Nevýhodou kvasinek je odlišná glykosylace od savčích buněk, která tak potenciálně může způsobit i nežádoucí imunogenitu produkovaných proteinů. Přítomnost mannosy – specifického cukru kvasinek – limituje využití kvasinkového expresního systému pro produkci proteinů, které *N*-glykosylace nevyžadují<sup>8</sup>.

Kvasinkový expresní systém *Saccharomyces cerevisiae* je používán pro produkci několika terapeutických proteinů (viz tab. II), jako je lidský insulin a jeho analogy pro léčbu cukrovky (Novolin<sup>®</sup>, NovoLog<sup>®</sup>), lidský růstový hormon pro léčbu nanismu (Valtropin<sup>®</sup>), faktor stimující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF) používaný při chemoterapiích (Leukine<sup>®</sup>) a další.

Inženýrství glykosylace kvasinek *Pichia pastoris* zaznamenalo v poslední době veliký pokrok. U kvasinek *Pichia pastoris* byla docílena eliminace syntézy nežádoucích cukrů během glykosylace a ukázalo se, že kvasinky mohou být upraveny tak, aby jejich glykosylace byly velmi podobné glykosylacím lidských proteinů<sup>8</sup>. Choi a spol.<sup>9</sup> docílili humanizaci glykanů v kvasinkách *Pichia pastoris* tak, že inaktivovali gen pro  $\alpha$ -1,6-mannosyltransferasu a naopak aktivovali gen pro  $\alpha$ -1,2-mannosidasu a  $\beta$ -1,2-*N*-acetylglukosaminyltransferasu. Upravená kvasinka *Pichia pastoris* tak poskytuje knihovnu individuálních kmenů k produkci proteinů se specifickými humánními glykoformami s vysokým stupněm homogeneity<sup>8</sup>. Např. byl použit panel navržených *Pichia pastoris* k produkci různých glykoforem monoklonální protilátky se stejnou aminokyselinovou sekvencí jako má komerční

Tabulka II  
Výběr bioléciv schválených v Evropě a USA

Produkt	Protein	Oblast terapie	Expresní systém	Schváleno v roce	Firma uvádějící produkt na trh
Humulin <sup>®</sup>	lidský insulin	diabetes mellitus	<i>E. coli</i>	1982	Eli Lilly
Protropin <sup>®</sup> (Somatrem)	lidský růstový hormon	nedostatek růstového hormonu	<i>E. coli</i>	1985	Genetech
Intron A <sup>®</sup>	interferon $\alpha$ -2b	některé typy leukémie, Kaposiho sarkom, hepatitída C aj.	<i>E. coli</i>	1986	Schering-Plough
Humatrope <sup>®</sup> (Somatropin)	lidský růstový hormon	nedostatek růstového hormonu	<i>E. coli</i>	1987	Eli Lilly
Epogen <sup>®</sup> (Epoetin- $\alpha$ )	erythropoetin $\alpha$	anémie	CHO	1989	Amgen
Procrit <sup>®</sup> (Epoetin- $\alpha$ )	erythropoetin $\alpha$	anémie	CHO	1990	Ortho Biotech / J&J
Novolin <sup>®</sup>	lidský insulin	diabetes mellitus	<i>S. cerevisiae</i>	1991	Novo Nordisk
Neupogen <sup>®</sup> (Filgrastim)	faktor stimulující kolonie granulocytů (G-CSF)	neutropenie indukovaná chemoterapií	<i>E. coli</i>	1991	Amgen
Leukine <sup>®</sup> (Sargramostim)	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF), jedna mutace	autologní transplantace kostní dřeně, toxické stavy leukocytů po chemoterapiích, chemoterapie aj.	<i>S. cerevisiae</i>	1991	Bertex
Nutropin <sup>®</sup> (Somatropin)	lidský růstový hormon	nedostatek růstového hormonu	<i>E. coli</i>	1993	Genetech
Betaseron <sup>®</sup>	interferon $\beta$ -1b	roztroušená skleróza	<i>E. coli</i>	1993	Bertex / Chiron
Cerezyme <sup>®</sup> (Imiglucerase)	$\beta$ -glukocerebrosidasa	Gaucherova choroba typu 1	CHO	1994	Genzyme
ReoPro <sup>®</sup> (Abciximab)	chimerický Fab fragment protilátky proti receptoru fibrinogenu na krevních destičkách	snížení nebezpečí tvorby trombů u pacientů léčených angioplastikou a při koronárních operacích	myší limie Sp2/0	1994	Eli Lilly / Centocor / J&J
Norditropin <sup>®</sup> (Somatropin)	lidský růstový hormon	nedostatek růstového hormonu	<i>E. coli</i>	1995	Novo Nordisk
Genotropin <sup>®</sup> (Somatropin)	lidský růstový hormon	nedostatek růstového hormonu	<i>E. coli</i>	1995	Pfizer/Pharmacia
Humalog <sup>®</sup> (Insulin Lispro)	analóg lidského insulinu	diabetes mellitus	<i>E. coli</i>	1996	Eli Lilly
Avonex <sup>®</sup>	interferon $\beta$ -1a	roztroušená skleróza	CHO	1996	Biogen Idec
Retavase <sup>®</sup> (Retepase)	neglykosylovaná mutantní forma lidského tkáňového aktivátoru plasminogenu	trombolýza	<i>E. coli</i>	1996	Centocor / J&J

Tabulka II  
Pokračování

Produkt	Protein	Oblast terapie	Expresní systém	Schváleno v roce	Firma uvádějící produkt na trh
Gonal-F® (Folliotropin- $\alpha$ )	folliotropin $\alpha$ (folikuly stimulující hormon)	neplodnost	CHO	1997	Serono
BeneFIX®	faktor IX	hemofilie	CHO	1997	Genetics Institute / Wyeth Pharmaceuticals
Rituxan® (Rituximab)	chimerická protilátka proti receptoru CD20 na B-buňkách	rakovina lymfatického systému (Non-Hodgkin lymfom)	CHO	1997	Genetech / Biogen Idec
Simulect® (Basiliximab)	chimerická protilátka proti receptoru IL-2	prevence odmítnutí transplantovaných orgánů	myší linie NS0	1998	Novartis
Synagis® (Palivizumab)	humanizovaná protilátka proti fúznímu proteinu RSV (Respiratory Syncytial Virus)	prevence vážných onemocnění nižších dýchacích cest rizikových pediatrických pacientů	myší linie NS0	1998	Medimmune
Remicade® (Infliximab)	chimerická protilátka proti TNF $\alpha$ (Tumor Necrosis Factor $\alpha$ )	Chrohnova nemoc, revmatoidní artritida	Myší linie Sp2/0	1998	Centocor / J&J
Hereptin® (Trastuzumab)	humanizovaná protilátka proti HER-2 receptoru	rakovina prsu	CHO	1998	Genetech
Enbrel® (Etanercept)	vázající doména TNF (Tumor Necrosis Factor) receptoru fúzovaná s Fc fragmentem lidských IgG1	revmatoidní artritida a další autoimunitní nemoci jako psoriasis, spondylitida	CHO	1998	Amgen / Wyeth
Lantus® (Insulin glargine)	analog lidského insulínu (sekvence je na 3 místech odlišná od nativního insulínu)	diabetes mellitus 2. typu	<i>E. coli</i>	2000	Aventis
NovoLog® (Insulin Aspart)	analog lidského insulínu (mutace aminokyseliny v pozici 28)	diabetes mellitus	<i>S. cerevisiae</i>	2000	Novo Nordisk
ReFacto® (Moroctocog- $\alpha$ )	faktor VIII	hemofilie	CHO	1999	Genetics Institute / Wyeth Pharmaceuticals
Mylotarg® (Gemtuzumab Ozogamicin)	humanizovaná protilátka proti CD33 konjugovaná s chemoterapeutikem calicheamicinem	akutní myeloidní leukémie	myší linie NS0	2000	Wyeth / Celtech
Peg-Intron® (Peginterferon $\alpha$ -2b)	pegylovaný interferon $\alpha$ -2b	hepatitida C	<i>E. coli</i>	2001	Schering-Plough / Enzon
Humira® (Adalimumab)	lidská protilátka proti TNF $\alpha$ (Tumor Necrosis Factor $\alpha$ ) připravená technikou fágového displeje	revmatoidní artritida	CHO	2001	Abbot Laboratoires / Cambridge Antibody Technologies

Tabulka II  
Pokračování

Produkt	Protein	Oblast terapie	Expresní systém	Schváleno v roce	Firma uvádějící produkt na trh
Forteo <sup>®</sup> (Teriparatide)	parathyroidní hormon	osteoporóza	<i>E. coli</i>	2002	Eli Lilly
Aranesp <sup>®</sup> (Darbepoetin- $\alpha$ )	mutantní erythropoetin	anémie	CHO	2002	Amgen
Neulasta <sup>®</sup> (Pegfilgrastim)	pegylovaný faktor stimulující kolonie granulocytů (G-CSF)	neutropenie při chemoterapiích	<i>E. coli</i>	2002	Amgen
Rebif <sup>®</sup>	interferon $\beta$ -1a	roztroušená skleróza	CHO	2002	Serono / Pfizer
Pegasys <sup>®</sup> (Peginterferon $\alpha$ -2a)	pegylovaný interferon $\alpha$ -2b	hepatitida C	<i>E. coli</i>	2002	Hoffmann-La Roche
Zevalin <sup>®</sup> (Ibritumomab Tiuxetan)	myší protilátka proti CD20 konjugovaná s radioaktivním Y <sup>90</sup>	rakovina lymfatického systému (Non-Hodgkin lymfom)	CHO	2002	Biogen Idec
Somavert <sup>®</sup> (Pegvisomant)	mutantní somatotropin s aktivitou antagonisty somatotropinu kovalentně vázaný na polyethylenglykol	akromegalie (chorobné zvětšení okrajových částí těla) u pacientů po chirurgických zákrocích, po radioterapii	<i>E. coli</i>	2002	Pfizer/Pharmacia
Xolair <sup>®</sup> (Omalizumab)	humanizovaná protilátka proti lidským IgE	astma	CHO	2003	Genetech / Novartis / Tanox
Bexxar <sup>®</sup> (Tositumomab)	myší protilátka proti CD20 konjugovaná s radioaktivním I <sup>131</sup>	rakovina lymfatického systému (Non-Hodgkin lymfom)	hybridomy	2003	GSK / Corixa
Erbitux <sup>®</sup> (Cetuximab)	chimerická protilátka proti receptoru EGF (Epidermal Growth Factor)	rakovina tlustého střeva	hybridomy	2004	ImClone / Bristol Myers Squibb
Avastin <sup>®</sup> (Bevacizumab)	humanizovaná protilátka proti VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)	rakovina tlustého střeva	CHO	2004	Genetech
Exubera <sup>®</sup>	analog lidského insulinu (inhalovatelný)	diabetes mellitus	<i>E. coli</i>	2006	Pfizer / Aventis
Valtropin <sup>®</sup> (Somatropin)	lidský růstový hormon	nedostatek růstového hormonu	<i>S. cerevisiae</i>	2006	Biopartners
Omnitrope <sup>®</sup> (Somatropin)	lidský růstový hormon	nedostatek růstového hormonu	<i>E. coli</i>	2006	Sandoz

protilátka Rituxan<sup>®</sup> (proti receptoru CD-20), která se využívá k léčbě rakoviny lymfatického systému – tzv. non-Hodgkin lymfomu<sup>10</sup>.

#### 4.3. Produkce v hmyzích buňkách s použitím bakulovirových vektorů

Hmyzí buňky patří mezi účinné expresní systémy pro produkci glykoproteinů, zahrnující i monoklonální protilátky<sup>8</sup>.

Bakulovirový expresní systém je eukaryotický, jelikož exprese probíhá v hmyzích buňkách. Hmyzí buňky jsou tedy schopné posttranslačních modifikací, jako jsou glykosylace<sup>5,8</sup>. Na rozdíl od bakterií, kde zůstávají produkovány proteiny většinou nerozpustné, jsou rekombinantní proteiny produkovány v hmyzích buňkách rozpustné. Další výhodou je velikost virového genomu (~130 kbp), což umožňuje vložení delšího úseku cizorodé DNA (cit.<sup>5,11</sup>). Kultivace hmyzích buněk není tak drahá jako kultivace savčích buněk. Na rozdíl od savčích buněk hmyzí buňky nevyžadují zvýšený obsah CO<sub>2</sub> v atmosféře a pro jejich kultivaci tedy není zapotřebí drahý CO<sub>2</sub> inkubátor<sup>5</sup>.

Nevýhodou proteinů produkováných v hmyzích buňkách je rozdílný typ glykosylace od glykosylace lidských proteinů. Možnost přítomnosti nehumánní  $\alpha$ -1,3-fukosy (zaleží na hmyzím druhu) může zvýšit imunogenitu proteinu. Hmyzí buňky navíc nejsou vhodné pro expresi glykoproteinů, u nichž je požadována dlouhá doba přítomnosti v séru, jelikož *N*-glykany hmyzích buněk jsou rychle eliminovány z organismu<sup>8</sup>.

Příkladem terapeutických proteinů produkováných hmyzími buňkami je erythropoetin<sup>12</sup> nebo různé monoklonální protilátky<sup>13</sup>.

#### 4.4. Produkce v savčích buňkách

Nejčastěji používanou linií savčích buněk pro produkci terapeutických glykoproteinů jsou buněčné linie Chinese Hamster Ovary (CHO). Dále se pak používají myší buňky NS0 a Sp2/0 (cit.<sup>14</sup>).

Savčí buňky jsou preferovány z několika hledisek, z nichž nejdůležitější je produkce proteinů s *N*-glykany, které jsou velmi podobné lidským<sup>8</sup>.

Vedle výše uvedených výhod má exprese proteinů v savčích buňkách také řadu nevýhod. Jsou zde kladeny vysoké nároky na sterilitu, jejíž porušení se projeví mnohem výrazněji než při kultivaci mikrobiálních buněk. Růst kontaminace je také podporován složením velmi bohatých médií. Zásadním nedostatkem použití savčích buněk je finanční náročnost spojená s jejich kultivací. Ta je odvozena především od vysoké ceny složek médií a enormní spotřebou sterilního plastového materiálu<sup>5</sup>. Drahá je i následná purifikace terapeutického proteinu. Savčí buňky mohou také přenášet infekční částice, jako jsou viry nebo priony. Nevýhodou je také dlouhá doba potřebná k vytvoření produkční linie a obtížnost kontrolovat odpovídajícím způsobem *N*-glykosylace<sup>8</sup>.

CHO buňky jsou použitelné pro expresi glykoproteinů obsahujících kyselinu sialovou. Nicméně některé proteiny vyžadují glykoformy bez kyseliny sialové. Toho se dá docílit úpravou *in vitro*<sup>8</sup>.

Další problém může představovat přítomnost fukosylovaných glykanových struktur u monoklonálních protilátek produkovaných CHO buňkami. Odstranění fukosy vede ke zlepšení funkce protilátek. To bylo dosaženo některými vědeckými skupinami, jež připravily buněčné linie, které proteiny nefukosylují a produkují protilátky s vyšší ADCC aktivitou (buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách)<sup>8</sup>.

V CHO je produkována řada terapeutických proteinů (viz tab. II), např. srážecí faktor VIII pro léčbu hemofilie (ReFacto<sup>®</sup>), srážecí faktor IX pro léčbu hemofilie (BeneFIX<sup>®</sup>), erythropoetin a jeho analogy pro léčbu anémie (Epogen<sup>®</sup>, Procrit<sup>®</sup>, Aranesp<sup>®</sup>), interferon  $\beta$  pro léčbu roztroušené sklerózy (Avonex<sup>®</sup>, Rebif<sup>®</sup>), tkáňový aktivátor plasminogenu nebo jeho analogy pro léčbu trombolýzy (Retavase<sup>®</sup>),  $\beta$ -glukocerebrosidasa pro léčbu Gaucherovy nemoci (Cerezyme<sup>®</sup>) a řada monoklonálních protilátek, např. pro léčbu rakoviny lymfatického systému – tzv. non-Hodgkin lymfomu (Rituxan<sup>®</sup>, Zevalin<sup>®</sup>), pro léčbu rakoviny prsu (Herceptin<sup>®</sup>), pro léčbu rakoviny tlustého střeva (Avastin<sup>®</sup>), pro léčbu autoimunitních onemocnění (Enbrel<sup>®</sup>, Humira<sup>®</sup>, Raptiva<sup>®</sup>) nebo pro zmírnění astmatu (Xolair<sup>®</sup>).

V buňkách myších linií NS0 jsou produkovány např. monoklonální protilátky (viz tab. II) pro prevenci odmítnutí transplantovaných orgánů (Simulect<sup>®</sup>), pro prevenci onemocnění dýchacích cest (Synagis<sup>®</sup>) a pro léčbu akutní myeloidní leukémie (Mylotarg<sup>®</sup>).

V myších buňkách Sp2/0 jsou exprimovány monoklonální protilátky (viz tab. II) pro snížení nebezpečí tvorby trombů (ReoPro<sup>®</sup>) nebo pro léčbu autoimunitních onemocnění (Remicade<sup>®</sup>).

#### 4.5. Produkce v transgenních zvířatech

V poslední době se pozornost obrací k transgenním zvířatům jako alternativním expresním systémům. Některé glykoproteiny, např. monoklonální protilátky, již v těchto systémech byly exprimovány<sup>8</sup>.

Proteiny produkovány transgenními živočichy obsahují více mannosy a glykany s nižším obsahem kyseliny sialové ve srovnání s lidskými glykoproteiny. To může omezit produkci proteinů, u kterých je vyžadována dlouhá doba přítomnosti v séru<sup>8</sup>.

Byla připravena transgenní myš produkující lidské monoklonální protilátky<sup>15</sup>. Van Berkel a spol.<sup>16</sup> studovali možnost produkce rekombinantního lidského laktoferrinu v mléce transgenní krávy. Roku 2005 bylo docíleno produkce monoklonálních protilátek v kuřeti a jejich sekrece do vajec<sup>17</sup>.

Přes veškeré úspěchy je průmyslová produkce terapeutických proteinů transgenními zvířaty prozatím budoucností.

#### 4.6. Produkce v transgenních rostlinách a rostlinných tkáňových kulturách

Transgenní rostliny pro produkci terapeutických glykoproteinů představují v současnosti důležitou oblast výzkumu. Rostliny jsou jako expresní systémy velkým a slibným potenciálem pro produkci monoklonálních protilátek, ale i dalších glykoproteinů<sup>8</sup>.

Rostliny mohou být kultivovány jako tkáňové kultury na aseptickém agarovém nebo tekutém médiu, jako protoplasty (tzn. bez buněčné stěny) a v neposlední řadě mohou být regenerovány v celou rostlinu, která již může být pěstována i v nesterilní půdě. V závislosti na zvolení signální sekvence lze ovlivnit lokalizaci rekombinantního proteinu. Protein může být asociován s cytoplasmatickou membránou nebo může být sekretován do média. Velkou výhodou rostlinné produkce proteinů jsou velké výtěžky za relativně nízkou cenu<sup>18</sup>.

Hlavní limitace rostlin jako expresních systémů je produkce nehumánních glykanových struktur. Rostlinné glykoproteiny postrádají galaktosu a sialovou kyselinu a navíc obsahují imunogenní cukry  $\beta$ -1,2-xylosu a  $\alpha$ -1,3-fukosu. Potenciální alergická reakce k těmto cukrům může značně omezit vývoj transgenních rostlin pro produkci terapeutických proteinů. V této souvislosti byly zaznamenány snahy humanizace rostlinných *N*-glykanů. Na rostlinné glykoproteiny se dají enzymově připojit chybějící cukry (tzn. galaktosa a kyselina sialová) a naopak odstranit ty nežádoucí (tzn.  $\beta$ -1,2-xylosu a  $\alpha$ -1,3-fukosu)<sup>8</sup>. Strasser a spol.<sup>19</sup> připravili transgenní rostliny *Arabidopsis thaliana* s pozměněnou dráhou glykosylace, přičemž tyto rostliny produkují glykoproteiny blízké lidským – tzn. bez  $\beta$ -1,2-xylosy a  $\alpha$ -1,3-fukosy.

Ve 2. fázi klinických testů je protilátka CaroRX (Planet Biotechnology, Kalifornie) produkovaná rostlinami. Jedná se o hybrid monoklonální protilátky, která váže streptokokální antigen I/II, což je hlavní povrchový glykoprotein bakterie *Streptococcus mutans*. *S. mutans* způsobují bakteriální zubní kaz. Zmíněná protilátka brání bakterii, aby se mohla udržet na zubním povrchu<sup>2</sup>.

### 5. Cesty zdokonalení terapeutických vlastností bioléciv

Kromě rekombinantních verzí přírodních proteinů je také možné připravit proteiny, které jsou upraveny s cílem modifikovat jejich vlastnosti, a to z hlediska jejich terapeutické aktivity. To znamená zvýšit jejich stabilitu, snížit rychlost eliminace látky z organismu (tzv. clearance) apod. Modifikace proteinů zahrnují substituci aminokyselin v proteinech, odstranění určitých domén, úpravu glykosylací a další. Přibližně 50 % schválených bioléciv má modifikovanou genovou sekvenci právě z výše uvedeného hlediska<sup>1</sup>.

Existuje několik metod, jak lze upravit primární pro-

teinovou strukturu. Jedná se např. o cílenou mutagenézi pro změnu specifické aminokyseliny proteinu. V případě insulínu bylo vyvinuto několik jeho analogů s pozměněnými aminokyselinovými sekvencemi, které ovlivňují rychlost působení hormonu. Přírodní forma insulínu existuje jako neaktivní hexamer, jenž se pomalu disociuje na aktivní monomer. Humalog<sup>®</sup> a NovoLog<sup>®</sup> jsou rychle působící analogy insulínu se specifickou aminokyselinou na C-konci, které omezují skládání insulínu na neaktivní hexamer. Na druhé straně Lantus<sup>®</sup> je dlouho působící varianta insulínu, která pomalu disociuje z mikrokrytalického precipitátu, což má za následek dlouhotrvající účinek.

Tkáňový aktivátor plasminogenu Retavase<sup>®</sup> je příkladem produktu, kde byla odstraněna celá proteinová doména. Tkáňový aktivátor plasminogenu aktivuje přeměnu plasminogenu na plasmin, který štěpí fibrin, a tím rozpouští trombus (krevní sraženinu). V preparátu Retavase<sup>®</sup> byla odstraněna doména, která zodpovídala za rychlou eliminaci tkáňového aktivátoru, čímž se prodloužil účinek jeho působení.

Dalším příkladem modifikace proteinových charakteristik je fúze genových sekvencí různých proteinů, což má za následek vznik nového proteinu s novými vlastnostmi. Takovým produktem je např. Enbrel<sup>®</sup>. Jedná se o fúzní protein používaný pro léčbu revmatoidní artritidy. Obsahuje vázající doménu TNF (faktor nekrotizující nádory) fúzovanou s Fc fragmentem lidských imunoglobulinů třídy IgG.

Podstatný vliv na různé funkce proteinů, zahrnující aktivitu, dobu působení, rychlost eliminace z organismu a stabilitu, může mít glykosylace. Počet produktů, u nichž glykosylace proteinů byla modifikována s cílem ovlivnit jejich terapeutické vlastnosti, stále roste. Příkladem takového produktu je Aranesp<sup>®</sup> (varianta erythropoetinu pro léčbu anémie) a Cerezyme<sup>®</sup> ( $\beta$ -glukocerebrosidasa pro léčbu Gaucherovy choroby typu I). V současnosti jsou uplatňovány tři přístupy úpravy glykosylací proteinů: 1) úprava glykosylačních míst v proteinu, např. zavedení nového glykosylačního místa; 2) enzymatické modifikace glykanů *in vitro*; 3) genové manipulace s buněčným glykosylačním mechanismem.

Pro omezení proteolytické degradace terapeutických proteinů a snížení rychlosti eliminace z organismu *in vivo* bývá používána metoda pegylace, což je proces, při kterém se na protein naváže polyethylenglykol. Příkladem schválených pegylovaných produktů je Pegasys<sup>®</sup> (léčba hepatitidy C), Peg-Intron<sup>®</sup> (léčba hepatitidy C), Neulasta<sup>®</sup> (léčba neutropenie při chemoterapiích) a Somavert<sup>®</sup> (léčba akromegalie). Vyvíjejí se i další pegylované proteiny, jako jsou např. pegylované fragmenty protilátek.

Dalším příkladem chemických modifikací je navázání radioisotopů nebo cytotoxických léčiv k monoklonálním protilátkám, používaným zejména při léčbě rakoviny. Takovým produktem je Bexxar<sup>®</sup> (léčba rakoviny lymfatického systému – tzv. non-Hodgkin lymfomu) – monoklonální protilátka konjugovaná s radioaktivním jodem I<sup>131</sup>, Zevalin<sup>®</sup> (léčba rakoviny lymfatického systému – tzv. non-



Hodgkin lymfomu) – monoklonální protilátka konjugovaná s radioaktivním yridiem  $Y^{90}$ , a Mylotarg<sup>®</sup> (léčba leukémie) – monoklonální protilátka konjugovaná s chemoterapeutikem calicheamicinem.

## 6. „Biosimilars“ – nová generace bioléciv

Generické léky jsou ekvivalenty originálních léčivých přípravků, které mohou být uvedeny na trh po expiraci jejich patentové ochrany, obsahují stejnou účinnou látku, odpovídají stejným náročným pravidlům při vývoji, výrobě a posuzování bezpečnosti a mají stejnou kvalitu, bezpečnost a účinnost jako originální značkové léky. Hlavním významem generických ekvivalentů je jejich nižší cena ve srovnání s originálními léčivy, čímž je zvýšena dostupnost těchto moderních léků. Hlavním důvodem nižší ceny je především nižší náročnost na testování těchto léčiv, neboť není třeba opakovat všechny preklinické a klinické zkoušky, ale je možné se odkázat na klinická data originálního produktu.

Vedle generických léčiv se na trhu začínají objevovat tzv. „biosimilars“, které jsou jejich obdobou a vychází ze stejného principu jako generická léčiva. „Biosimilars“ jsou účinná biofarmaceutika představující velké molekuly (protilátky až 150 kDa) se složitou 3D strukturou a k jejich přípravě jsou používány organismy. Často se jedná o heterogenní produkty, které je obtížné kompletně charakterizovat fyzikálně-chemickými analytickými metodami, a z těchto důvodů je i často velmi obtížné deklarovat jejich vždy stejné složení a strukturu. I malá změna při výrobním procesu, např. změna v produkční buněčné linii, může způsobit potenciální variace ve vlastnostech konečného biofarmaceutického produktu. Z tohoto hlediska je asi nejzávažnějším problémem nežádoucí imunogenita, jelikož i velmi malé rozdíly v těchto molekulách mohou způsobit rozdílné reakce organismu<sup>2,20</sup>. Tím se „biosimilars“ liší od klasických chemických generických léčiv, u kterých není obtížné zajistit identické složení účinné látky, jako má originální produkt. Z výše uvedených hledisek vyplývá, že v současnosti nejde zajistit, aby dva různí výrobci produkovali dvě identická biofarmaceutika, přinejlepším mohou být podobná neboli bioekvivalentní. Jako bioekvivalentní můžeme označit produkty, které mají stejné kvalitativní a kvantitativní složení, tzn. že obsahují stejnou aktivní látku ve stejné farmaceutické formě, která se chová stejně i v pacientově těle (stejná absorpční rychlost, distribuce v těle, odbourávání a exkrece)<sup>20</sup>.

Do roku 2009 řadě biolécivům expiruje jejich patentová ochrana. Několika schváleným biofarmaceutikům patent již vypršel (např. Nutropin<sup>®</sup> – lidský růstový hormon pro léčbu nanismu, Humulin<sup>®</sup> – insulin pro léčbu diabetes mellitus, Cerezyme<sup>®</sup> –  $\beta$ -glukocerebrosidasa pro léčbu Gaucherovy choroby, Intron A<sup>®</sup> – Interferon  $\alpha$ -2b pro léčbu leukémie a hepatitidy C, Epogen<sup>®</sup> – erythropoetin  $\alpha$  pro léčbu anémie a další). Někteří analytici předpokládají, že až 75 schválených terapeutických proteinů se

stane cílem generických společností. Prvním „biosimilar“ je léčivo Omnitrope<sup>®</sup> (lidský růstový hormon), které bylo schváleno v roce 2005 v Austrálii a v roce 2006 v Evropě a USA. Omnitrope<sup>®</sup> je obdobou léku Genotropin<sup>®</sup> od firmy Pfizer/Pharmacia, jehož patent již vypršel<sup>2</sup>. Schválení Omnitropu<sup>®</sup> však zároveň přineslo několik rozporů, a to především otázku, nakolik je podobný originálnímu produktu Genotropinu<sup>®</sup>, zda je stejně účinný a bezpečný.

Bylo nezbytné zavést novou legislativu týkající se „biosimilars“, která by zaručovala bezpečnost těchto nových produktů. V Evropě se touto problematikou zabývá EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) a v USA FDA (Food and Drug Administration). Od roku 2001 došlo k revizi legislativy týkající se farmacie. Ačkoliv v USA zůstává legislativa prozatím nejasná, v členských státech EU v roce 2005 a 2006 bylo přijato několik dokumentů týkající se „biosimilars“. Tyto dokumenty jsou dostupné na internetových stránkách EMEA: <http://www.emea.eu.int>. Pro zajištění bezpečnosti „biosimilars“ a jejich stejné účinnosti, jako mají originální produkty, je v oficiálních dokumentech kladen důraz na preklinické a klinické testování těchto nových bioléciv<sup>2,20</sup>.

Evropské regulační orgány potvrdily, že akceptují principy „biosimilars“ tím, že v dubnu 2006 schválily druhý takový produkt – Valtropin<sup>®</sup> (lidský růstový hormon)<sup>2</sup>.

## 7. Závěr

Bioléciva nabízí nové možnosti pro léčbu dříve neléčitelných nebo obtížně léčitelných onemocnění. Významný podíl aplikací biofarmaceutik je v oblasti terapie rakoviny, další důležité oblasti zahrnují imunitní onemocnění a infekční onemocnění. Mezi biolécivy zažívají obrovský rozmach monoklonální protilátky. V současné době je na trhu 165 schválených produktů a odhaduje se, že 2500 terapeutických proteinů je ve fázi výzkumu a 1600 v preklinických a klinických testech<sup>2</sup>.

Mezi nejprodávějšími biolécivy v současnosti zaujímají místo následující produkty (tab. II): erythropoetin pro léčbu anémie (Procrit<sup>®</sup>, Epogen<sup>®</sup>, Aranesp<sup>®</sup>), insulin pro léčbu diabetes mellitus (Novolin<sup>®</sup>, Humulin<sup>®</sup>, Humalog<sup>®</sup>), monoklonální protilátky pro léčbu autoimunitních onemocnění (Remicade<sup>®</sup>, Enbrel<sup>®</sup>), faktor stimulující kolonie (CSF) používaný při chemoterapiích (Neupogen<sup>®</sup>, Neulasta<sup>®</sup>), interferon  $\alpha$  pro léčbu leukémie a hepatitidy C (Intron A<sup>®</sup>), monoklonální protilátky pro léčbu rakoviny lymfatického systému – tzv. non-Hodgkin lymfomu (Rituxan<sup>®</sup>) a interferon  $\beta$  pro léčbu roztroušené sklerózy (Avonex<sup>®</sup>).

Přes nesporný přínos biofarmaceutik je nutné připomenout i jejich problémy, které zatím čekají na řešení. Jedná se především o vysokou cenu produkce a potenciální imunogenitu. Klíčem pro snížení nákladů produkce by mohly být nové levnější expresní systémy, jako jsou kvasinky, hmyzí buňky nebo rostliny, jelikož kultivace nejčastěji používaných expresních systémů – savčích CHO buněk – je poměrně drahou záležitostí. Snížit cenu bioléciv

by se dalo docílit, vedle snížení nákladů kultivace v podobě levnějších expresních systémů, i zlevněním purifikačních procesů.

Snaha snížit imunogenitu nových biotechnologicky připravených produktů vedla k návrhu a úpravě některých organismů (např. kvasinka *Pichia pastoris*<sup>9</sup> nebo rostlina *Arabidopsis thaliana*<sup>19</sup>) k využití pro produkci terapeutických proteinů<sup>8</sup>. Úpravy spočívají především v modifikaci glykosylačních drah, které zajišťují glykosylace proteinů vlastní lidským bílkovinám.

Bioléčiva představují stále rozvíjející se oblast, která má nesporný pozitivní význam. Cílem farmaceutických společností by mělo být snížení jejich ceny, a tím i rozšíření jejich dostupnosti široké veřejnosti.

*Tato studie byla podpořena granty GA ČR 203/06/1038 a MZ NR/8355-3.*

## Zkratky

ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity)
CHO	ovariální buňky čínské křečka (Chinese Hamster Ovary)
CSF	faktor stimulující kolonie (Colony-Stimulating Factor)
EGF	epidermální růstový faktor (Epidermal Growth Factor)
EMA	evropský úřad pro kontrolu léčiv (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products)
FDA	americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
G-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů
GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (Granulocyte-Monocyte Colony-Stimulating Factor)
TNF	faktor nekrotizující nádory (Tumor Necrosis Factor)
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (Vascular Endothelial Growth Factor)

## LITERATURA

- Birch J. R., Onakunle Y., v knize: *Methods in Molecular Biology* (Smales C. M., James D. C., ed.), sv. 308, kap. 1. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey 2005.
- Walsh G.: *Nat. Biotechnol.* 24, 769 (2006).
- Datamonitor Report 2002: <http://www.datamonitor.com/~71f089ad335e4c2d931ad9a22a34da04~/products/free/Report/DMHC1803/010dmhc1803.pdf>, staženo 15. listopadu 2006.
- Belsey M. J., Hartus L. M., Das R. R., Chertkow J.: *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 535 (2006).
- Ruml T., Rumlová M., Pačes V. (ed.): *Genove inženýrství*. VŠCHT, Praha 2002.
- Lee S. Y., Choi J. H. a Lee S. J., v knize: *Methods in Molecular Biology* (Smales C. M., James D. C., ed.), sv. 308, kap. 3. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey 2005.
- Popplewell A. G., Sehdev M., Spitali M., Weir A. N. C., v knize: *Methods in Molecular Biology* (Smales C. M., James D. C., ed.), sv. 308, kap. 2. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey 2005.
- Sethuraman N., Stadheim T. A.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 341 (2006).
- Choi B. K., Bobrowicz P., Davidson R. C., Hamilton S. R., Kung D. H., Li H., Miele R. G., Nett J. H., Wildt S., Gerngross T. U.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 5022 (2003).
- Li H., Sethuraman N., Stadheim T. A., Zha D., Prinz B., Ballew N., Bobrowicz P., Choi B. K., Cook W. J., Cukan M., Houston-Cummings N.R., Davidson R., Gong B., Hamilton S. R., Hoopes J. P., Jiang Y., Kim N., Mansfield R., Nett J.H., Rios S., Strawbridge R., Wildt S., Gerngross T. U.: *Nat. Biotechnol.* 24, 210 (2006).
- Jin Z., Lusheng S., Yili W., v knize: *Methods in Molecular Biology* (Smales C. M., James D. C., ed.), sv. 308, kap. 7. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey 2005.
- Kim Y. K., Shin H. S., Tomiya N., Lee Y. C., Betenbaugh M. J., Cha H. J.: *Biotechnol. Bioeng.* 92, 452 (2005).
- zu Pultz J., Kubasek W. L., Duchene M., Marget M., von Specht B. U., Domdey H.: *Biotechnology (NY)* 8, 651 (1990).
- Chu L., Blumentals I., Maheswari G., v knize: *Methods in Molecular Biology* (Smales C. M., James D. C., ed.), sv. 308, kap. 10. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey 2005.
- He Y., Honnen W. J., Krachmarov C. P., Burkhart M., Kayman S. C., Corvalan J., Pinter A.: *J. Immunol.* 169, 595 (2002).
- van Berkel P. H., Welling M. M., Geerts M., van Ven H. A., Ravensbergen B., Salaheddine M., Pauwels E. K., Pieper F., Nuijens J. H. a Nibbering P. H.: *Nat. Biotechnol.* 20, 484 (2002).
- Zhu L., van de Lavoie M. C., Albanese J., Beenhouwer D. O., Cardarelli P. M., Cuisson S., Deng D. F., Deshpande S., Diamond J. H., Green L., Halk E. L., Heyer B. S., Kay R. M., Kerchner A., Leighton P. A., Mather C. M., Morrison S. L., Nikolov Z. L., Passmore D. B., Pradas-Monne A., Preston B. T., Rangan V. S., Shi M., Srinivasan M., White S. G., Winters-Digiaccinto P., Wong S., Zhou W., Etches R. J.: *Nat. Biotechnol.* 23, 1159 (2005).
- Hiatt A., Ma J. K.-C.: *Int. Rev. Immunol.* 10, 139 (1993).
- Strasser R., Altmann F., Mach L., Glossl J., Steinkellner H.: *FEBS Lett.* 561, 132 (2004).

20. Edfjäll C.: *Eur. Biotech. News* 4, 33–34 (2003).  
21. Business Insight: [http://www.pharmalive.com/special\\_reports/sample.cfm?reportID=193](http://www.pharmalive.com/special_reports/sample.cfm?reportID=193), staženo 11. prosince, 2006.

**Z. Chrastilová<sup>a,b</sup>, M. Macková<sup>a</sup>, J. Šotola<sup>b</sup>, and V. Král<sup>a,b</sup>** (<sup>a</sup>*Institute of Chemical Technology, Prague*, <sup>b</sup>*Zentiva Co., Prague*): **Biopharmaceuticals – What Is Their Real Potential?**

The current and future situation in the field of biopharmaceuticals is reviewed. The position of biopharmaceuticals on pharmaceutical market is still strengthening. Biopharmaceuticals cover many therapeutic areas involving treatment of cancer, autoimmune diseases, diabetes, anemia, disorders associated with lack of some proteins

(e.g. human growth hormone) and others. Production of therapeutic proteins has shifted to new biotechnologies such as recombinant DNA and hybridoma technologies for production of monoclonal antibodies. Different types of expression systems suitable for production of biopharmaceuticals are described and compared. Mammalian cells, which are currently the most often used production system for glycoproteins, have several disadvantages including high production costs. This is why several cheaper expression systems are now being explored as alternatives. Yeast, plant and insect expression systems provide a new approach and potential for reduction of cost of biopharmaceuticals. The expiration of patents on original biopharmaceuticals give a chance to develop production of new drugs – biosimilars. Production of biosimilars can also reduce the cost of biopharmaceuticals, but under the condition that the safety and efficiency of biosimilars are the same as those of the original products.