



Dopuszczanie do obrotu produktów leczniczych biopodobnych

Waldemar Zieliński

Zakład Farmakoekonomiki, Wydział Farmaceutyczny,
Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

Marketing authorization of biosimilar medical products

Summary

Biosimilars present a new category of products when compared with conventional generics. While the demonstration of a pharmacokinetic similarity is the main method to demonstrate therapeutic equivalence of generic medicinal products, a number of issues will make the approval of biosimilars more complicated. Therefore, the centralised procedure of marketing authorization is the only procedure allowed for these products in EU.

New manufacturers will need to ensure that their biopharmaceutical has similar efficacy and safety profile to the reference product through more extensive clinical trials than the limited testing done for generic versions of low-molecular-weight chemical medicines. The primary issue of concern for the safety of these agents is the potential for immunogenicity.

This review presents background information on the differences between biosimilars and low-molecular-weight generic drugs and the current regulatory situation, and provides information on the main sources of variability of biosimilars.

Key words:

biosimilars, generics, commercialization, immunogenicity.

Adres do korespondencji

Waldemar Zieliński,
Zakład
Farmakoekonomiki,
Wydział Farmaceutyczny,
Warszawski Uniwersytet
Medyczny,
ul. Pawińskiego 3a,
02-106 Warszawa.

1. Leki biologiczne

Produktami leczniczymi biologicznymi lub biofarmaceutykami określane są produkty, których substancja czynna jest syntetyzowana przez żywe organizmy lub jest z nich izolowana. Zwykle leki te zastępują lub uzupełniają naturalnie wytwarzane białka. W tej grupie produktów mieszczą się zarówno produkty

otrzymywane za pomocą nowoczesnych metod biotechnologicznych, takie jak rekombinowane białka, przeciwciała monoklonalne, szczepionki, produkty przeniesienia genów i produkty do terapii komórkami somatycznymi jak i syntetyczne polipeptydy, syntetyczne oligonukleotydy otrzymywane na drodze syntezy chemicznej oraz konwencjonalne leki biologiczne (np. produkty krwiopochodne, toksyny, surowice) nie otrzymywane zaawansowanymi metodami biotechnologicznymi (1).

Pierwsze produkty lecznicze otrzymywane nowoczesnymi metodami biotechnologicznymi zostały wprowadzone do obrotu w latach 80. XX w. Grupa tych oryginalnych produktów, określanych niekiedy jako pierwsza generacja biofarmaceutyków, obejmuje produkty będące kopiami endogennych białek człowieka, takich jak insulina, hormon wzrostu, erytropoetyna, interferon i cytokiny. Dzięki wprowadzeniu ich do obrotu dokonała się swoista rewolucja w leczeniu takich chorób jak cukrzyca, niedokrwistość, nowotwory, stwardnienie rozsiane. Tym produktom poświęcona jest aktualnie największa uwaga ze względu na wygasającą ochronę patentową tych produktów i wprowadzanie do obrotu produktów leczniczych naśladowujących produkty oryginalne, określanych jako produkty biopodobne (ang. *biosimilar*) (2,3). Aktualnie ocenia się, że w użyciu jest około 120 biofarmaceutyków, a kolejnych kilkadziesiąt jest w trakcie prac rozwojowych. Wydatki na biofarmaceutyki w 2008 r. w Unii Europejskiej szacowane są na ok. 60 mld euro. Dlatego za wprowadzeniem produktów biopodobnych przemawiają racje ekonomiczne, choć należy pamiętać, że produkcja tej kategorii leków jest znacznie bardziej skomplikowana niż w przypadku produktów leczniczych zawierających syntetyczne związki o niskim ciężarze cząsteczkowym (4).

2. Dopuszczanie do obrotu produktów leczniczych

Dopuszczenie do obrotu produktu leczniczego wymaga przedstawienia odpowiednim władzom rejestracyjnym dokumentacji chemiczno-farmaceutycznej i biologicznej, farmakologiczno-toksykologicznej oraz klinicznej. Pełen zakres tych danych wymagany jest w stosunku do produktów oryginalnych, po raz pierwszy dopuszczanych do obrotu i określanych jako referencyjne. Wprowadzenie do obrotu ich kopii, określanych jako produkty lecznicze generyczne (odpowiedniki), może nastąpić po upływie okresu tzw. wyłączności danych, w którym firma generyczna nie może odwoływać się do wyników badań nieklinicznych i klinicznych leku referencyjnego oraz okresu ochrony patentowej. Po upływie okresu wyłączności danych wynoszącego aktualnie w Unii Europejskiej 8 lat nie jest zatem wymagane, w przypadku leków generycznych, dostarczanie wyników badań farmakologicznych, toksykologicznych i klinicznych, z wyjątkiem badania równoważności biologicznej. Warunkiem niezbędnym do zaliczenia produktu do kategorii generycznych jest zawartość dokładnie tej samej ilości substancji czynnej (moc produktu) w tej samej postaci farmaceutycznej co produkt referencyjny. Wprowadzenie do obrotu produktu ge-

nerycznego może jednak nastąpić dopiero po kolejnych 2 latach ze względu na wyłączność rynkową, a w przypadku wprowadzenia nowego wskazania dla produktu referencyjnego w czasie jego pierwszych 8 lat istnienia na rynku, o 1 rok później. Niekiedy zasada ta jest opisywana równaniem 8+2+1. Zasada ta dotyczy produktów referencyjnych, które zależnie od zastosowanej procedury obowiązującej w UE dopuszczone zostały do obrotu po 1 listopada 2005 r. lub 20 listopada 2005 r. W stosunku do wcześniej dopuszczanych do obrotu produktów referencyjnych obowiązują inne, uprzednio obowiązujące przepisy dotyczące wyłączności danych, w których zasadą był 10- lub 6-letni okres wyłączności danych, zależnie od państwa członkowskiego UE. W stosunku do produktów referencyjnych, stanowiących istotny postęp technologiczny okres ten był jednolity i wynosił w całej UE 10 lat. Do kategorii tej zaliczano także produkty biologiczne referencyjne otrzymywane za pomocą metod inżynierii genetycznej. Zasadom tym podlega również dopuszczanie do obrotu produktów biopodobnych.

Zaznaczyć należy, że w polskim prawie farmaceutycznym przyjęte zostały niezgodne z prawem UE zasady dopuszczania do obrotu produktów generycznych. Nie mają one jednakże wpływu na dopuszczanie do obrotu produktów biopodobnych otrzymywanych metodami inżynierii genetycznej, gdyż podlegają one w tym zakresie całkowicie prawu UE.

Terminem produkty lecznicze biopodobne (ang. *biosimilars*) określane są produkty, które są podobne do produktów leczniczych referencyjnych. Nasuwa się w tym kontekście analogia do produktów leczniczych generycznych (odpowiedników), które są zasadniczo podobne (ang. *essentially similar*) do produktów referencyjnych. Terminem produktu referencyjnego określanym jest produkt, którego dopuszczenie do obrotu nastąpiło na podstawie pełnego zestawu wymaganych badań jakościowych, nieklinicznych i klinicznych. Przyjęty termin „biopodobny” wynika z trudności z wykazaniem równoważnej skuteczności i bezpieczeństwa tego typu produktów na takiej zasadzie jak to ma miejsce w przypadku produktów leczniczych generycznych. Ich struktura białkowa uniemożliwia wykazanie równoważności biologicznej tylko metodami stosowanymi w odniesieniu do produktów generycznych, o niskiej masie cząsteczkowej. Brak jest także ilościowego określenia terminu „podobny”, który może różnić się w odniesieniu do poszczególnych klas produktów biologicznych (5).

Często w piśmiennictwie w kontekście biofarmaceutyków wymieniany jest termin „porównywalność” (ang. *comparability*) i „podobieństwo” (ang. *similarity*). Termin „porównywalność” jest używany w odniesieniu do biofarmaceutyków wytwarzanych w tym samym zwalidowanym procesie technologicznym, w celu np. porównania serii produktu tego samego wytwórcy. O „podobieństwie” mówimy częściej opisując produkty różnych wytwórców (6). Nie można również wykluczyć sytuacji, że produkt biopodobny wyprodukowany z użyciem współczesnych technologii będzie „lepszy” od produktu referencyjnego, który został wprowadzony do obrotu w latach 80. XX w. (4).

Zakres wymaganych badań dla produktów generycznych, jak wskazano, jest bardzo ograniczony. To podejście, akceptowane w odniesieniu do produktów zawierających syntetyczne substancje czynne o małej masie cząsteczkowej nie ma zastosowania w przypadku produktów leczniczych biopodobnych, zawierających w swoim składzie makrocząsteczki, w odniesieniu do których muszą być dostarczone w pełnym zakresie wyniki badań nieklinicznych i klinicznych, porównujących ich właściwości z produktami referencyjnymi. Z tego też względu niekiedy spotykany termin biogeneryk w odniesieniu do produktów biopodobnych nie jest właściwy, gdyż leki te zawierają zwykle mieszaninę izoform białek, zwykle różniących się między produktami, których biofarmaceutycznej równoważności nie można ustalić za pomocą dostępnych aktualnie technik analitycznych (2,7,8).

2.1. Produkty lecznicze biopodobne

Zgodnie z definicją zawartą w Załączniku I do dyrektywy 2001/83/EC (9) biologicznym produktem leczniczym jest produkt zawierający w swoim składzie substancję biologiczną, tj. taką, która jest wytwarzana lub ekstrahowana z materiału biologicznego, a do jej charakterystyki i określenia jakości konieczne jest zastosowanie kombinacji badań fizykochemicznych i biologicznych, obejmujących proces wytwarzania i jego kontrolę. Do kategorii biologicznych produktów leczniczych zaliczane są produkty immunologiczne oraz pochodzące z krwi i osocza, produkty przeznaczone do zaawansowanych terapii komórkowych i genowych oraz produkty lecznicze podlegające obowiązkowo tzw. procedurze scentralizowanej dopuszczania do obrotu w Unii Europejskiej określone w załączniku do rozporządzenia (WE) nr 726/2004 (10). Są do nich zaliczane produkty otrzymywane w wyniku zastosowania jednego z następujących procesów biotechnologicznych:

- technologia rekombinacji DNA,
- kontrolowana ekspresja genów kodujących aktywne biologicznie białka w komórkach eukariotycznych i prokariotycznych, łącznie z transformowanymi komórkami ssaków,
- metoda przeciwciał monoklonalnych i techniki hybrydoma.

Z kolei w dyrektywie 2001/83/WE sformułowane zostały wymagania wobec produktu leczniczego biopodobnego: *W przypadku gdy biologiczny produkt leczniczy, który jest podobny do referencyjnego produktu leczniczego, nie spełnia wymagań dla odpowiednika referencyjnego produktu leczniczego, w szczególności ze względu na różnice dotyczące materiałów wyjściowych lub procesów wytwarzania tych produktów, podmiot odpowiedzialny jest obowiązany do przedstawienia odpowiednich wyników badań klinicznych lub nieklinicznych w zakresie wymagań, które nie zostały spełnione, zgodnie z załącznikiem I do dyrektywy 2001/83/WE i odpowiednimi szczegółowymi wytycznymi.*

Produkty biopodobne produkowane za pomocą jednej z wymienionych metod, podobnie jak produkty referencyjne, również obowiązkowo podlegają dopuszcze-

niu do obrotu w Unii Europejskiej w toku procedury scentralizowanej. Zasadą tej procedury jest prowadzenie całego procesu dopuszczania do obrotu przez Europejską Agencję Leków (EMA, ang. *European Medicines Agency*). W toku tej procedury dokonywana jest ocena merytoryczna wymaganej dokumentacji chemiczno-farmaceutycznej i biologicznej, nieklinicznej i klinicznej. Na tej podstawie wydawana jest przez Agencję ocena, która stanowi podstawę do wydania przez Komisję Europejską decyzji o wprowadzeniu do obrotu produktu leczniczego. Decyzja Komisji Europejskiej ma moc obowiązującą we wszystkich państwach członkowskich Unii Europejskiej. Należy zwrócić uwagę, że niemożliwe jest w tym przypadku rozpatrywanie dopuszczenia do obrotu takiego produktu przez krajowe władze rejestracyjne państw członkowskich. Przedstawiciele państw członkowskich mogą i mają obowiązek czynnie uczestniczyć na etapie oceny dokumentacji leku biopodobnego w EMA. W odniesieniu do produktów biopodobnych otrzymywanych innymi, klasycznymi metodami stosowane mogą być inne procedury dopuszczania do obrotu obowiązujące w UE.

Wprowadzenie do obrotu produktu biopodobnego, podobnie jak w przypadku produktu generycznego, może nastąpić po wygaśnięciu ochrony patentowej i wyłączności danych dla produktu referencyjnego. W tym zakresie nie występują różnice formalne w wymaganiach wobec produktów generycznych i biopodobnych (2,7,8,11-13).

Złożoność produktów biofarmaceutycznych sprawia, że trudno jest nawet uniknąć różnic między seriami produktu pochodzącymi z tego samego procesu produkcyjnego tego samego wytwórcy, jak również tych samych białek pochodzących od różnych wytwórców. Stąd zrozumiałe jest, że trudności napotyka również wykazanie terapeutycznej równoważności między produktami biopodobnymi a referencyjnymi (2,5,8,14,15).

Pociąga to za sobą poważne konsekwencje, gdyż nie może zostać zagwarantowane podobieństwo terapeutyczne między produktem referencyjnym i biopodobnym. Potwierdzeniem tego jest stanowisko EMA stwierdzające: *Ponieważ produkty lecznicze biopodobne i biologiczne produkty lecznicze referencyjne są podobne, lecz nie identyczne, decyzja czy leczyć pacjenta produktem biopodobnym czy referencyjnym powinna być podjęta na podstawie opinii kwalifikowanego personelu medycznego* (16). W ten sposób władze europejskie odpowiedzialne za dopuszczanie do obrotu produktów biopodobnych przenoszą odpowiedzialność na indywidualnego lekarza, który nie zawsze jest wyposażony w pełną wiedzę w tym zakresie, która jest w posiadaniu władz rejestracyjnych. Jest to zwłaszcza istotne w kontekście stosowania tych leków we wskazaniach, które nie były przedmiotem badań klinicznych, a jedynie – zgodnie z wytycznymi EMA – ekstrapolacji wyników uzyskanych w stosunku do innych wskazań. Problem ten powinien znaleźć odzwierciedlenie w informacji przekazywanej personelowi fachowemu (17,18).

Wymagania, które stosowane są przy dopuszczeniu do obrotu produktów generycznych, z reguły nie są wystarczające dla wykazania podobieństwa dwóch biolo-

gicznych produktów leczniczych. Wynika to zwykle z różnic w procesie wytwarzania, stosowanych materiałów wyjściowych, budowy molekularnej i działania terapeutycznego. W związku z tym konieczne może być przedstawienie dodatkowych badań nieklinicznych i klinicznych, których charakter uzależniony jest od specyfiki produktu i jest określony w publikowanych przez EMEA szczegółowych wytycznych (7,9).

Począwszy od 2004 r. Komitet ds. Leków Stosowanych u Ludzi (CHMP, ang. *Committee for Medicinal Products for Human Use*) w EMEA wydał kilkanaście wytycznych dotyczących zakresu wymaganych badań przy dopuszczaniu do obrotu biopodobnych produktów leczniczych. Wytyczne obejmują ogólne zasady wykonywania badań jakościowych, nieklinicznych i klinicznych produktów biopodobnych oraz szczególne wymagania dla poszczególnych kategorii substancji czynnych (erytropoetyna, somatotropina, insulina i rekombinowany czynnik wzrostu kolonii granulocytów), mających na celu wykazanie ich podobieństwa do produktów referencyjnych. Do dyskusji przedstawione zostały projekty kolejnych wytycznych dotyczących interferonu-alfa, nowelizacji wytycznej dotyczącej erytropoetyny oraz heparyn drobnocząsteczkowych. Ta ostatnia kategoria produktów leczniczych, pomimo że nie należy do białek i nie jest otrzymywana metodami biotechnologicznymi podobnymi do wykorzystywanych przy syntezie białek, ze względu na złożoną budowę węglowodanową rozpatrywana jest również w kategorii produktów biopodobnych. Aktualną listę wytycznych przedstawiono w tabeli 1, natomiast opublikowane przez EMEA projekty wytycznych przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 1

Wytyczne EMEA dotyczące biopodobnych produktów leczniczych

Wytyczna (w brzmieniu oryginalnym)	Numer	Rok wejścia w życie
1	2	3
Similar Biological Medicinal Products containing Biotechnology-derived Proteins as Active Substance: Quality Issues.	EMEA/CHMP/49348/05	2006
Similar Biological Medicinal Product	CHMP/437/04	2005
Step 4 Note for Guidance on Biotechnological/Biological Products Subject to changes in their Manufacturing Process	CPMP/ICH/5721/03 ICH Topic Q5E	2005
Comparability of Medicinal Products containing Biotechnology-derived Proteins as Active Substance -Quality Issues	CPMP/BWP/3207/00 Rev.1	2003
Comparability of Biotechnology-Derived Medicinal Products after a change in the Manufacturing Process – Non-Clinical and Clinical Issues	CHMP/BMWP/101695/06	2007
Immunogenicity Assessment of Biotechnology-derived Therapeutic Proteins	CHMP/BMWP/14327/06	2008
Similar Biological Medicinal Products Containing Biotechnology-Derived Proteins as Active Substance: Quality	CHMP/49348/05	2006
Similar Biological Medicinal Products containing Biotechnology-Derived Proteins as Active Substance: Non-Clinical and Clinical Issues	CHMP/42832/05	2006

1	2	3
Annex to Guideline on Similar Biological Medicinal Products containing Biotechnology-Derived Proteins as Active Substance: Non-Clinical and Clinical Issues – Guidance on Similar Medicinal Products containing Recombinant Erythropoietins	CHMP/94526/05	2006
Annex to Guideline on Similar Biological Medicinal Products containing Biotechnology-Derived Proteins as Active Substance: Non-Clinical and Clinical Issues – Guidance on Biosimilar Medicinal Products containing Recombinant Granulocyte-Colony Stimulating Factor	CHMP/31329/05	2006
Annex to Guideline on Similar Biological Medicinal Products containing Biotechnology-Derived Proteins as Active Substance: Non-Clinical and Clinical Issues – Guidance on Similar Medicinal Products containing Somatropin	CHMP/94528/05	2006
Annex to Guideline on Similar Biological Medicinal Products containing Biotechnology-Derived Proteins as Active Substance: Non-Clinical and Clinical Issues – Guidance on Similar Medicinal Products containing Recombinant Human Insulin	CHMP/32775/05	2006
Similar Biological Medicinal Product	CHMP/437/04	2005
Comparability of Medicinal Products containing Biotechnology-derived Proteins as Active Substance -Quality Issues	CPMP/BWP/3207/00 Rev. 1	2003
Comparability of Medicinal Products containing Biotechnology-derived Proteins as Drug Substance – Non Clinical and Clinical Issues (Replaced by CHMP/BMWP/101695/06)	CPMP/3097/02	2004

Tabela 2**Projekty wytycznych EMEA dotyczące biopodobnych produktów leczniczych**

Projekt wytycznej	Numer	Rok publikacji
Revision of the guidance on Similar medicinal products containing recombinant Erythropoietins	EMEA/CHMP/BMWP/170734/08	2008
Similar biological medicinal products containing low-molecular-weight-heparins	CHMP/BMWP/118264/07	2008
Similar medicinal products containing recombinant interferon alpha	CHMP/BMWP/102046/06	2007
Similar biological medicinal products containing low molecular weight heparins – Clinical and Non-Clinical Issues	CHMP/BMWP/496286/06	2007
Similar Biological Medicinal Products containing Recombinant Alpha-Interferon annex to the guideline on Similar Biological Medicinal Products containing Biotechnology Derived Proteins as Active Substance – (Non) Clinical Issues	CHMP/BMWP/7241/2006	2006

Badania kliniczne obejmują najbardziej istotną populację pacjentów i dotyczą najważniejszych wskazań. Zakłada się, że badanie powinno trwać minimum 6 miesięcy (19). Wytyczne EMEA pozwalają na ekstrapolację danych z jednego wskazania

terapeutycznego na inne, pozwalając na stosowanie leku biopodobnego we wszystkich wskazaniach zatwierdzonych dla leku referencyjnego, które nie były badane w odniesieniu do danego produktu biopodobnego (4,18). Pomimo że w przypadku niektórych kategorii produktów, np. insuliny, możliwe jest wykazanie równoważności na podstawie porównawczych badań farmakokinetycznych po podaniu podskórnym leku biopodobnego wobec referencyjnego, jak również porównania efektów farmakodynamicznych, to ocena immunogenności musi być dokonana na podstawie badań trwających co najmniej 12 miesięcy, z czego faza porównawcza wobec leku referencyjnego musi trwać co najmniej 6 miesięcy (20).

Z kolei bardziej złożona budowa erytropoetyny w stosunku do insuliny pociąga za sobą o wiele bardziej rozbudowany zakres badań obejmujących:

1) badania niekliniczne:

– dostarczenie wyników badań *in vitro* z badań porównawczych,
– porównawcze badania *in vivo* na zwierzętach przeprowadzone zgodnie z *Farmakopeą Europejską* na myszach polycytemicznych oraz normocytemicznych. Dodatkowe informacje o aktywności erytrogennej osiągnąć można z badań toksykologicznych z podaniem wielokrotnym;

2) badania kliniczne:

– porównanie właściwości farmakokinetycznych produktu biopodobnego i referencyjnego po dawce jednorazowej podanej podskórnie i dożylnie. W trakcie badań farmakokinetycznych zalecana jest ocena markera działania farmakodynamicznego, jakim jest liczba retykulocytów. Wskaźnik ten nie może być jednak punktem końcowym oceny skuteczności klinicznej. Z tego względu konieczne jest przeprowadzenie porównawczych, posiadających odpowiednią moc, badań klinicznych, w co najmniej dwóch randomizowanych próbach z grupami równoległymi, które powinny być w miarę możliwości zaślepiene.

Grupą docelową pacjentów powinny być osoby z niedokrwistością nerkową. Zalecane jest, aby badania porównawcze trwały 6 miesięcy w celu oceny skuteczności klinicznej. W zakresie bezpieczeństwa stosowania powinny zostać dostarczone wyniki co najmniej 12-miesięcznych porównawczych badań immunogenności. Powinien zostać także przedstawiony plan zarządzania ryzykiem oraz plan monitorowania działań niepożądanych (4,18).

3. Czynniki wpływające na zmienność produktów leczniczych biopodobnych

Problem bezpieczeństwa i skuteczności działania leków biofarmaceutyków nie może być rozpatrywany odrębnie, gdyż często istnieje współzależność między tymi efektami; na przykład wiązanie cząsteczki przez system immunologiczny często zmniejsza efekt kliniczny. Z kolei zmiany struktury przestrzennej białka mogą zmieniać wiązanie z receptorami systemu immunologicznego, jak również z fizjologicznymi receptorami docelowymi. Stąd wystąpić mogą poważne konsekwencje klinicz-

ne. Tego typu przypadki opisano w odniesieniu do produktów biofarmaceutycznych zawierających hormon wzrostu lub erytropoetynę. W wyniku krzyżowej reakcji przeciwciał zobojętniających powstałych pod wpływem epoetyny alfa doszło do zagrażającej życiu pacjentów aplazji czerwonych krwinek (PRCA) (21-23).

Możliwe różnice w sile działania i immunogenności produktów biopodobnych mogą wynikać ze zmian w glikozylacji, innego profilu zanieczyszczeń oraz zmian struktury trzecio- i czwartorzędowej białek zachodzących w toku procesu produkcyjnego. Głównym problemem z punktu widzenia bezpieczeństwa stosowania jest immunogenność produktów biopodobnych. Jednakże również wahania siły działania mogą mieć swoje odzwierciedlenie na przykład w wahaniami stężenia hemoglobiny (Hb) w wyniku zastąpienia oryginalnej erytropoetyny produktem biopodobnym, co może mieć przełożenie na podwyższoną śmiertelność dializowanych pacjentów. Istotne wahania stężenia Hb opisywane są w odniesieniu do dużych grup dializowanych pacjentów i otrzymujących erytropoetynę (24,25).

3.1. Proces glikozylacji

Glikozylacja rekombinowanych białek może mieć wpływ na ich degradację, wiązanie z receptorami, prezentację antygenów, rozpuszczalność i immunogenność. Zmiany w procesie degradacji białek mogą prowadzić do powstania nowych antygenowych epitopów o zmienionej immunogenności, jak również zmieniać biologiczny okres półtrwania. Białka glikozylowane są w mniejszym stopniu immunogenne niż cząsteczki nieglikozylowane (2,26).

Rekombinowane glikoproteiny stanowią ok. 70% wszystkich dopuszczonych do obrotu białek mających zastosowanie terapeutyczne. Ze względu na konieczność N-glikozylacji typu ludzkiego ich produkcja wymaga zastosowania linii komórkowych ssaków, które mogą przeprowadzać pożądany sposób glikozylacji. Tego typu białkami jest interferon β , erytropoetyna i rekombinowane przeciwciała, takie jak trastuzumab i rituximab (27).

Stopień glikozylacji zależy w dużym stopniu od ekspresji informacji genetycznej komórek gospodarza. Przykładem może być rekombinowany czynnik wzrostu kolonii granulocytów (filgrastim), który syntetyzowany przez *E. coli* nie jest glikozylowany, natomiast podlega temu procesowi gdy jest syntetyzowany w komórkach jagnięka chomika chińskiego (lenograstim). Różnica ta rzutuje także na aktywność biologiczną lenograstimu i filgrastimu, jak również różnice parametrów farmakokinetycznych obu leków (28). Z tego względu leki te nie mogą być stosowane wymiennie i posiadają inny zakres zaakceptowanych wskazań (17).

W zależności od komórek gospodarza zmieniać się może również zawartość niektórych cukrów, co może wpływać na parametry farmakokinetyczne cząsteczki białka. Na przykład białka syntetyzowane w komórkach drożdży zawierają dużą zawartość cząsteczek mannozy. Obecność dużej ilości mannozy powoduje szybką elimi-

nację białka z krążenia, przez co znacząco skraca się półokres trwania (29). W przypadku erytropoetyny cząsteczki słabo uglikozylowane podlegają szybszemu klirensowi nerkowemu, a cząsteczki o niskim usjalowaniu są szybko usuwane przez hepatocyty i makrofagi (6).

Także warunki hodowli komórek gospodarza mogą wpływać na glikozylację białek. Hodowla komórek jajnika chomika chińskiego w zależności od stężenia rozpuszczonego tlenu w różnym stopniu przyłączała fukozę do cząsteczki erytropoetyny (30).

Nie zawsze możliwe jest podanie przyczyny obserwowanych różnic między produktami biopodobnymi. Na przykład wśród sześciu dostępnych na rynku somatotropin, z których żadna nie jest glikozylowana i wszystkie mają tę samą masę cząsteczkową, biologiczny półokres waha się od 1,75 do 7-10 godzin (31).

3.2. Zmiany struktury trzeciorzędowej

Zmiany w strukturze trzeciorzędowej białek mają poważne konsekwencje dla ich aktywności biologicznej. Przyczyn tego niekorzystnego zjawiska można upatrywać w procesach utleniania, deamidacji, a zwłaszcza w agregacji białek, która zwykle dotyczy białek denaturowanych, co może wynikać z oddziaływania z rozpuszczalnikami, wpływu temperatury, sposobu przechowywania i sposobu zamrażania. Agregaty białkowe mogą być rozpoznawane przez system immunologiczny jako przypominające strukturę drobnoustrojów, co wywołuje odpowiedź immunologiczną. Z tego względu w procesie produkcyjnym należy dążyć do osiągnięcia minimalnego poziomu agregatów. Jest to istotne zwłaszcza w przypadkach wprowadzania jakichkolwiek zmian w procesie produkcyjnym (4,32-34). Również obecność zanieczyszczeń, wpływająca na jakość każdego produktu leczniczego, jest w przypadku produktów biologicznych szczególnie istotna, gdyż mogą one zmieniać strukturę trzeciorzędową białek, jak również powodować ich agregację (8,21). Agregacja jest rozważana jako jedna z potencjalnych przyczyn przypadków wybiórczej czerwono-krwinkowej aplazji szpiku (PRCA, ang. *Pure Red Cell Aplasia*) w związku ze zmianą stabilizatora w preparacie erytropoetyny (23).

Utlenianie białek może występować zarówno w roztworze jak również w trakcie zamrażania i wynikać może z obecności zanieczyszczeń o charakterze utleniaczy lub ekspozycji na światło w czasie przechowywania (32).

3.3. Zanieczyszczenia

Zanieczyszczenia występujące w biofarmaceutykach mogą mieć charakter chemiczny i biologiczny. Związki chemiczne i antybiotyki pochodzą z procesu produkcyjnego. Zanieczyszczenia mikrobiologiczne, jak endotoksyny czy denaturo-

wane białka o aktywności adiuwantów, już w niskich stężeniach mogą wyzwać reakcje immunologiczne (32).

3.4. Wytwarzanie

Konwencjonalne leki są związkami chemicznymi o masie cząsteczkowej rzędu 100-1000 Da. Masa stosowanych biofarmaceutyków będących złożonymi białkami waha się od 20 000 do 270 000 Da, a nawet powyżej (np. w przypadku przeciwciał). Dlatego proces produkcyjny tych produktów leczniczych jest wielokrotnie bardziej skomplikowany niż produktów zawierających syntetyczne substancje czynne oraz posiada wielokrotnie więcej krytycznych etapów produkcji, wymagających wielokrotnie większej liczby badań kontrolnych i dostarczenia wielokrotnie więcej danych procesowych (2,3,6). Na przykład w procesie wytwarzania interferonu- α -2b wymagane jest przeprowadzenie ponad 240 testów analitycznych (11,35).

Cały proces wytwarzania produktu biofarmaceutycznego obejmujący syntezę białka w odpowiedniej linii komórkowej, oczyszczanie i nadanie postaci farmaceutycznej w określonym rodzaju opakowania, łatwo podlega zmianom i dlatego uprawnione jest stwierdzenie, że niemożliwe jest w tych warunkach wytworzenie identycznych cząsteczek. Istotne są również warunki przechowywania i postępowanie z gotowym produktem leczniczym (2,4).

Nie istnieją identyczne macierzyste banki komórek i jest to jedna z przyczyn różnic występujących między produktem referencyjnym i biopodobnym. Tak jak twierdzą producenci referencyjnych produktów biofarmaceutycznych cały proces produkcyjny jest „produktem”, którego nawet niewielkie zmiany prowadzić mogą do zmian końcowego produktu (2,3).

Producent leku biopodobnego nie mając dostępu do szczegółów procesu technologicznego nie jest w stanie powtórzyć całego procesu produkcyjnego leku innowacyjnego i musi opracować własną linię produkcyjną łącznie z macierzystymi bankami komórek, metodami kontroli, kryteriami akceptacji, oczyszczaniem itp. W efekcie musi powstać całkowicie nowa dokumentacja dotycząca jakości produktu wraz z odpowiednimi wynikami badań nieklinicznych i klinicznych (3).

Aktualnie większość nieglikozyłowanych białek mających zastosowanie terapeutyczne wytwarzana jest na bazie komórek *E. coli* lub komórek drożdży. Wykorzystaniu komórek drobnoustrojów w miejsce linii komórek ssaków ma jednak tę przewagę, że pozwala na wytwarzanie prawie dokładnych kopii. Na przykład w komórkach *E. coli* nie zachodzą zmiany potranslacyjne, co pozwala na stosunkowo powtarzalne wytwarzanie produktów o wysokiej czystości. Na podstawie tej zasady wytwarzana jest większość biofarmaceutyków pierwszej generacji (2,27).

Z kolei większość glikozyłowanych białek o znaczeniu terapeutycznym wytwarzana jest na bazie linii komórkowych ssaków. Prowadzenie kultury komórek ssaków jest kosztowne i długotrwałe. Utrudniona jest także kontrola całego procesu,

gdyż komórki ssaków są bardzo wrażliwe na zmiany środowiska reakcji, co może prowadzić do obniżenia jakości produktu w wyniku heterogennej N-glikozylacji. Oczekuje się, że opracowane zostaną metody pozwalające na prowadzenie N-glikozylacji białek w komórkach drożdży, która będzie przypominała glikozylację występującą w komórkach ludzkich. Stworzy to perspektywy zastąpienia linii komórek ssaków przez komórki drobnoustrojów (27,36).

W tym kontekście poważnym problemem są często dokonywane zmiany po dopuszczeniu produktu biologicznego do obrotu, obejmujące zmiany w samym procesie technologicznym jak i zmiany miejsca wytwarzania. W wyniku tych operacji może dochodzić do fizykochemicznych zmian właściwości białek, zmiany aktywności i właściwości immunogennych. Wymaga to wówczas przedstawienia władzom rejestracyjnym odpowiednich badań potwierdzających porównywalność produktu sprzed i po zmianie. Dotyczy to w równym stopniu produktów referencyjnych jak i biopodobnych (14).

Niewielkie zmiany lub różnice między procesami wytwarzania mogą mieć w związku z tym istotny wpływ na jakość, czystość, charakterystykę biologiczną i aktywność kliniczną produktu końcowego (2,7,11,14,37). Na przykład niewielkie zamiany konformacyjne białka mogą nie zostać wykryte za pomocą najnowocześniejszych technik analitycznych. Oznaczenia jakościowe w przypadku produktów biofarmaceutycznych są mniej czułe niż w przypadku związków drobnocząsteczkowych. Brak jest również standaryzacji stosowanych metod oznaczeń, co oznacza że jedynie dane otrzymane w obrębie tego samego laboratorium mogą być porównywane. Ponadto należy pamiętać, że nawet potwierdzenie charakterystyki budowy molekularnej i dostępności biologicznej nie gwarantuje porównywalnego efektu klinicznego (11).

Podane potencjalne źródła różnic między produktami referencyjnymi i biopodobnymi z pewnością stwarzają trudności w ich interpretacji. Do jakiego bowiem stopnia mogą się różnić między sobą biofarmaceutyki? O tym, że takie różnice są akceptowane świadczy chociażby decyzja europejskich władz rejestracyjnych dopuszczająca pewien zakres różnic między produktami. Na przykład zgodnie z opinią EMEA w przypadku dopuszczonej do obrotu w 2007 r. epoetyny zeta, pod handlową nazwą Silapo, jak produktu biopodobnego do epoetyny alfa (Eprex, Janssen-Cilag Ltd), różnica dawki wynosząca 35,1 j.m./kg/tydzień nie posiada znaczenia klinicznego (38).

3.5. Wymienne stosowanie produktów referencyjnych i biopodobnych

Poważnym problemem jest substytucja produktów referencyjnych lekami biopodobnymi. W niektórych krajach UE, w przypadku produktów generycznych, zastąpienie produktu referencyjnego może się dokonywać w aptece, bez wiedzy lekarza, na bazie tej samej nazwy INN (ang. *International Non-proprietary Name*) nadanej przez

Światową Organizację Zdrowia (WHO). Jednakże w przypadku leków biopodobnych taka automatyczna substytucja została zakazana w takich krajach, jak Niemcy, Francja, Hiszpania i Włochy (4). W przeważającej części innych krajów Unii Europejskiej istnieją wytyczne o różnej randze prawnej zakazujące substytucji referencyjnych produktów biologicznych przez produkty biopodobne. Jest to argumentowane tym, że nie są one produktami generycznymi (17,39).

Istnieją sugestie ze strony przemysłu, aby różne produkty biopodobne posiadały różne nazwy INN i aby unikać automatycznej substytucji produktów referencyjnych (40). Podobne stanowisko zajmują także niektórzy autorzy publikacji (35) wskazując, że stosując aktualną nomenklaturę INN ani lekarze ani farmaceuci nie mają świadomości, że operują lekami otrzymanymi w różnych procesach technologicznych, co może mieć przełożenie na ich skuteczność i bezpieczeństwo. W związku z tym zakazane powinno być automatyczne zastępowanie jednego produktu biologicznego przez inny zawierający substancje o tym samym INN. Dodatkowo postuluje się, aby wprowadzić nowy niezależny od INN system nazewnictwa produktów biopodobnych.

WHO nie podjęła ostatecznego stanowiska w sprawie INN dla leków biotechnologicznych. W aktualnych dokumentach WHO przeważa stanowisko o braku potrzeby specyficznej nomenklatury dla tej kategorii produktów leczniczych (41,42). O stopniu skomplikowania problemu świadczy jednak propozycja *Japanese Accepted Names* (JAN) zgłoszona podczas posiedzenia komitetu WHO ds. nazw INN w 2007 r. Wskazano, że pomimo iż wszystkie znane epoetyny, od epoetyny α do epoetyny κ posiadają identyczną sekwencję aminokwasów, wiązania dwusiarczkowe i miejsca glikozytacji, różnią się linią komórkową syntetyzującą hormon, stopniem usjalowania i rodzajem wiązań glikanów. Zaproponowano, aby nazwa INN odzwierciedlała te różnice (41).

4. Bezpieczeństwo i skuteczność produktów biopodobnych

Omówione problemy rzutujące na potencjalną zmienność produktów biopodobnych znajdują swoje potwierdzenie w badaniach obejmujących produkty pochodzące z Azji lub Ameryki Południowej, które zostały dopuszczone do obrotu w tamtych regionach na podstawie lokalnych przepisów.

W badaniach *in vivo* na myszach oceniających aktywność epoetyny wobec standardu WHO wykazano, że aktywność 5 produktów wahała się w zakresie 71-226%, pomimo spełniania przez nie wymagań własnych specyfikacji. Niektóre z badanych próbek zawierały nawet o 50% więcej epoetyny niż zawartość deklarowana na etykiecie (2,17). Tak jak wskazuje Roger (2) o ile w przypadku np. epoetyny odpowiednie monitorowanie stężenia hemoglobiny powoduje, że zmienność mocy produktu nie jest problemem krytycznym, to w przypadku przeciwciał monoklonalnych stosowanych w transplantologii tego typu różnice są nie do zaakceptowania. Inni autorzy

wskazują, że zwiększone wahania stężenia hemoglobiny mogą być przyczyną zwiększonej śmiertelności dializowanych pacjentów (25).

Jednym z najczęściej dyskutowanych problemów w kontekście bezpieczeństwa stosowania biofarmaceutyków jest immunogenność tych leków. Immunologiczny mechanizm indukcji powstawania przeciwciał zależy od typu produktu. W wyniku odpowiedzi immunologicznej może dojść do utraty skuteczności, rzadziej jej zwiększenia oraz powstania przeciwciał zobojętniających związki endogenne. Problem immunogenności związany jest z drogą i częstością podania produktu biofarmaceutycznego, chorobą podstawową i towarzyszącym leczeniem, a także stopniem jego oczyszczenia, zastosowanymi substancjami pomocniczymi, sposobem przechowywania leku i jego transportem. Potencjalnym czynnikiem sprzyjającym powstawaniu immunogenności biofarmaceutyków jest sam proces produkcyjny obejmujący liczne etapy ekstrakcji, oczyszczania i zagęszczania, które mogą uszkadzać przestrzenną strukturę białek, ich stabilność i aktywność biologiczną. Jeśli w wyniku tych operacji dojdzie do denaturacji białek może to być czynnikiem wyzwalającym reakcję immunologiczną. Wpływ na reakcję immunologiczną może mieć pierwszorzędowa struktura białka czego przykładem może być porównanie struktury insuliny ludzkiej, wołowej i wieprzowej oraz ich immunogenności. Również fizyczne uszkodzenie trójwymiarowej struktury białka w procesie produkcyjnym może być czynnikiem sprzyjającym reakcjom immunologicznym. Zwłaszcza agregacja jest procesem zwiększającym immunogenność wielu białek o znaczeniu terapeutycznym. Znanym czynnikiem wpływającym na immunogenność białek jest ich glikozylacja. W równym stopniu problematyka immunogenności dotyczy leków innowacyjnych jak i biopodobnych. Z tego również powodu leki biopodobne powinny być oceniane jak produkty innowacyjne, jak również podobnie monitorowane pod kątem bezpieczeństwa stosowania (2,3,31-33,43,44).

Przykłady występowania reakcji immunogennych znane są zarówno w przypadkach produktów referencyjnych jak i biopodobnych. U pacjentów leczonych na stwardnienie rozsiane różnymi interferonami wykazano, że pacjenci otrzymujący interferon-1b posiadają wyższe miano przeciwciał zobojętniających niż u leczonych interferonem beta-1a. Związane było to z faktem otrzymywania interferonu beta-1a w linii komórek ssaków w postaci glikozylowanej, podczas gdy interferon-1b otrzymywany w komórkach *E. coli* nie był glikolizowany (44).

W przypadku pierwszego dopuszczonego do obrotu leku biopodobnego Omnitrope, na etapie badań klinicznych u około 60% pacjentów pojawiły się nieneutralizujące przeciwciała. W wyniku udoskonalenia procesu oczyszczania produktu z białek gospodarza, tworzenie przeciwciał wróciło do poziomu opisywanego dla innych produktów zawierających hormon wzrostu. Ponadto w przypadku tego produktu przeniesienie produkcji z jednej fabryki do innej związane było ze zmianą immunogenności, pomimo braku różnic w badaniach analitycznych (45).

Najczęściej opisywanym w ostatnich latach przykładem powstania przeciwciał w związku ze stosowaniem produktu biofarmaceutycznego są przypadki PRCA, po-

wstającej w wyniku stosowania referencyjnego produktu epoetyny α – Eprexu. Wystąpienie PRCA związane było prawdopodobnie z wprowadzeniem niepowlekanych kauczukowych korków i ich reakcji ze zmienionym stabilizatorem zastosowanym w produkcie (polisorbat 80). W wyniku tej zmiany w okresie 2001-2003 częstość PRCA wyniosła 46,1/100 000 pacjentów na rok wobec 2,6/100 000 pacjentów na rok w przypadku stosowania korków powlekanych. Bezpośrednią przyczyną było wymywanie związków indukujących powstanie przeciwciał przeciwerytropoetynie z kauczukowego korka przez polisorbat 80. Na podstawie analizy chromatograficznej wykazano występowanie co najmniej 10 niepeptydowych związków powstających w obecności polisorbatu 80 i korków niepowlekanych. Liczba ta wzrastała wraz z czasem przechowywania i temperaturą przechowywania (43,44,46).

Ten przypadek dotyczący produktu referencyjnego wskazuje na konieczność bardzo ścisłej kontroli wszystkich produktów biofarmaceutycznych, a zwłaszcza biopodobnych, które zgodnie z obowiązującymi przepisami mają ograniczony zakres wymaganych badań. Z tego też względu wytyczne EMEA w odniesieniu do wszystkich leków biopodobnych wymagają prowadzenia badań immunogenności (47).

Istotnym problemem jest monitorowanie bezpieczeństwa leków biopodobnych po ich wprowadzeniu do obrotu. Dzięki temu możliwe jest uchwycenie działania immunogennego, którego wystąpienia nie można przewidzieć. Przedstawiany zgodnie z wymaganiami EMEA plan monitorowania działań niepożądanych powinien pozwolić na identyfikację każdego produktu i odróżnienie go od innych produktów biopodobnych i preparatu referencyjnego (11,17,39).

5. Produkty biopodobne dopuszczone do obrotu

Do lutego 2009 r. EMEA zaakceptowała biopodobne wersje somatotropiny, rekombinowanej ludzkiej erytropoetyny i filgrastimu.

Jednocześnie EMEA odrzuciła wniosek o dopuszczenie do obrotu biopodobnej wersji interferonu α -2A (Alpheon), argumentując tę decyzję brakiem podobieństwa między produktem biopodobnym i referencyjnym (Roferon-A) w zakresie jakości (profil zanieczyszczeń, stabilność) oraz skuteczności i bezpieczeństwa (podwyższona częstość nawrotów zapalenia wątroby typu C i większa częstość działań niepożądanych) (35). Ponadto wnioskodawcy wycofali 3 biopodobne wersje insuliny wobec niezdolności odpowiedzi na pytania EMEA w wyznaczonym terminie.

W Stanach Zjednoczonych brak jest, jak dotąd, podstaw prawnych i wytycznych do prowadzenia procesu rejestracyjnego tych produktów, podobnych do obowiązujących w Unii Europejskiej. Pomimo to, na podstawie wcześniej istniejących przepisów dopuszczone zostały biopodobne wersje kilku produktów: rekombinowany glukagon (GlucaGen), rekombinowana hialuronidaza ludzka (Hylenex), hialuronidaza (Hydase, Amphadase) i rekombinowana kalcytonina łososiowa (Fortical) (48).

Należy zwrócić uwagę na obecność produktów biofarmaceutycznych na rynkach państw o mniej restrykcyjnych systemach rejestracyjnych. Na podstawie ich porównania na przykład w odniesieniu do epoetyny wykazano podstawowe różnice w odniesieniu do struktury, stabilności, składu, stężenia i aktywności, co nie pozwala na zakwalifikowanie ich do kategorii biopodobnych w rozumieniu przepisów UE (48).

6. Podsumowanie

Produkty lecznicze biopodobne otrzymywane za pomocą zaawansowanych metod biotechnologicznych są nową kategorią produktów leczniczych, których historia rozpoczęła się od dopuszczenia w 2006 r. pierwszego w UE produktu biopodobnego – Omnitrope. Podobnie jak produkty referencyjne, mają one za zadanie uzupełniać naturalnie występujące białka. W przypadku produktów biopodobnych, inaczej niż w przypadku produktów generycznych, obok badań farmakokinetycznych niezbędne jest przeprowadzenie porównawczych badań nieklinicznych oraz klinicznych, których zakres zależy od rodzaju produktu. Szczególne znaczenie ma ocena immunogenności tych produktów.

Dopuszczanie do obrotu produktów biopodobnych odbywa się w UE na drodze procedury scentralizowanej i podlega całkowicie jurysdykcji EMEA i Komisji Europejskiej. Stąd wpływ narodowych władz rejestracyjnych na ten proces jest ograniczony. Ważnym problemem jest dyskutowana automatyczna substytucja produktu referencyjnego produktem biopodobnym i wymienne ich stosowanie. Na podstawie dostępnych danych wskazuje się, że w większości krajów UE jest to zakazane lub niezalecane. Wynika to ze znacznych różnic występujących między produktem biopodobnym i referencyjnym. Szczególnie istotna w tym zakresie jest informacja przekazywana fachowemu personelowi medycznemu, od którego zgodnie ze stanowiskiem EMEA, zależy wybór stosowanego produktu: biopodobnego lub referencyjnego.

Literatura

1. Brennan F. R., et al., (2004), *Molecular Biotechnology*, 27, 59-74.
2. Roger S. D., (2006), *Nephrology (Carlton)*, 11, 341-346.
3. Schellekens H., (2004), *Trends in Biotechnology*, 22, (8), 406-410.
4. Covic A., et al., (2008), *Nephrol. Dial. Transplant.*, 23, 3731-3737.
5. Locatelli F., Roger S., (2006), *Nephrol. Dial. Transplant.*, 21(Suppl 5), v13-v16.
6. Goldsmith D., et al., (2007), *Clin. Exp. Nephrol.*, 11, 191-195.
7. Dyrektywa 2001/83/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z 6 listopada 2001 r. w sprawie wspólnotowego kodeksu odnoszącego się do produktów leczniczych stosowanych u ludzi (Dz.U., nr L 311, z 28.11.2001, 67).
8. Crommelin D. J., et al., (2005), *Eur. J. Hosp. Pharm. Sci.*, 1, 11-17.
9. Dyrektywa Komisji 2003/63/WE z 25 czerwca 2003 r. zmieniająca dyrektywę 2001/83/WE Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie wspólnotowego kodeksu odnoszącego się do produktów leczniczych stosowanych u ludzi (Dz.U., nr L 159, 27.6. 2003, 46-49).

10. Rozporządzenie (WE) Nr 726/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z 31.03.2004 r. ustanawiające wspólnotowe procedury wydawania pozwoleń dla produktów leczniczych stosowanych u ludzi i do celów weterynaryjnych i nadzoru nad nimi oraz ustanawiające Europejską Agencję Leków (Dz.U., nr L 136 z 30.4.2004, 1).
11. Schellekens H., (2009), *Nephrol. Dial. Transplant.*, Plus 2 (Suppl 1), i27-i36.
12. European Medicines Agency, (2005), Guideline on similar biological medicinal products, <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/biosimilar/043704en.pdf>
13. Schellekens H., (2005), *Nephrol. Dial. Transplant.*, 20, iv31-iv36.
14. Chirino A. J., Mire-Sluis A., (2004), *Nat. Biotechnol.*, 22, 1383-1391.
15. Rice M., (2005), Difficulties with Biosimilar Drugs *European Journal of Cancer*, 41, 2203.
16. European Medicines Agency, (2008), Questions and Answers on biosimilar medicines (similar biological medicinal products), EMEA/74562/2006 Rev, <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/pcwp/7456206en.pdf>
17. H. Mellstedt H., et al., (2008), *Annals of Oncology*, 19(3), 411-419.
18. European Medicines Agency, (2006), Annex Guideline on Similar Biological Medicinal Products Containing Biotechnology derived Proteins as Active Substance: Non-clinical and Clinical Issues: Guidance on Biosimilar Medicinal Products Containing Recombinant Erythropoietins, EMEA/CHMP/94526/2005, <http://www.emea.eu.int/>
19. European Medicines Agency, (2006), Guideline on Similar Biological Medicinal Products Containing Biotechnology-derived Proteins as Active Substance: Non-Clinical and Clinical Issues, CHMP/42-832/2005, <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/biosimilar/043704en.pdf>
20. European Medicines Agency, (2006), Annex to Guideline on Similar Biological Medicinal Products containing Biotechnology-Derived Proteins as Active Substance: Non-Clinical and Clinical Issues – Guidance on Similar Medicinal Products containing Recombinant Human Insulin. EMEA/CHMP/BMWP/32775/2005. London, 22 February 2006, <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/biosimilar/3277505en.pdf>
21. Kessler M., et al., (2006), *Nephrol. Dial. Transplant.*, 21(Suppl 5), v9-v12.
22. Casadevall N., et al., (2002), *N. Engl. J. Med.*, 346, 469-475.
23. Schellekens H., (2006), *Nature Biotechnology*, 24, 6, 613-614.
24. Berns J. S., et al., (2003), *Kidney Int.*, 64, 1514-1521.
25. Yang W., et al., (2007), *J. Am. Soc. Nephrol.*, 18, 3164-3170.
26. Koren E., et al., (2002), *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 3, 349-360.
27. Wildt S., Gerngross T., (2005), *Nat. Rev. Microbiol.*, 3, 119-128.
28. Hoglund M., (1998), *Med. Oncol.*, 15, 229-233.
29. Dove A., (2002), *Nat. Biotechnol.*, 20, 777-779.
30. Restelli V. I., et al., (2006), *Biotechnol. Bioeng.*, 94, 481-494.
31. Genazzani A. A., et al., (2007), *Biodrugs*, 21 (6), 351-356.
32. Sharma B., (2007), *Biotechnol. Adv.*, 25, 310-317.
33. Hermeling S., et al., (2004), *Pharm. Res.*, 21, 897-903.
34. Rosenberg A. S., (2006), *AAPS J.*, 8, E501-E507.
35. Declerck P. J., (2007), *Drug Safety*, 30 (12), 1087-1092.
36. Johnson P. E., (2008), *Am. J. Health*, 65(Suppl 6), S16-22.
37. Schellekens H., (2005), *Nephrol. Dial. Transplant.*, 20, vi3-vi9.
38. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use, (2007), *Silapo European Public Assessment Report*, <http://www.emea.eu.int>
39. Mikhail A., (2007), *Kidney Blood Press Res*, 30 (Suppl 1), 18-22.
40. European Biopharmaceutical Enterprises, (2006), EBE – EFPIA Position Paper Naming off Biosimilar Medicinal Products: Options for Addressing Unique Safety Concerns, <http://www.ebe-biopharma.org>
41. WHO 46th Consultation on International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances, (2008), Geneva, 1-3 April, http://www.who.int/medicines/services/inn/46thINNConsultation_ExecSummary.pdf

42. Joung J., et al., (2008), *Biologicals*, 36, 269-276.
43. Sharma B., (2007), *Biotechnology Advances*, 25, 318-324.
44. Sharma B., (2007), *Biotechnology Advances*, 25, 325-331.
45. European Medicines Agency (2006), Omnitrope R_ SmPC, Sandoz, <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/Omnitrope/H-607-PI-en.pdf>
46. Boven K., Knight J., Bader F., Rossert J., Eckardt K. U., Casadevall N., (2005), *Nephrol. Dial. Transplant.*, 20 (Suppl. 3), iii33-40.
47. European Medicines Agency, (2007), Guideline on immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins, <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/biosimilar/1432706enfin.pdf>
48. US Food and Drug Administration, (2006), Omnitrope (somatropin [rDNA origin]) questions and answers <http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/somatropin/qa.htm>
49. Deechongkit S., et al., (2006), *J. Pharm. Sci.*, 95, 1931-1943.