

Sub redacția:

Prof. Dr. **RUXANDRA IONESCU**,  
Dr. **DANIELA OPRIȘ-BELINSKI**

**Terapia biologică  
în  
bolile inflamatoare  
reumatice ale  
adultului**



**Editura Medicală**  
București, 2019

<b>Cuvânt înainte</b> - Ruxandra Ionescu .....	<b>7</b>
<i>Capitolul I</i>	
<b>Biotehnologia – progres major în terapia bolilor inflamatoare reumatice, biologice originale/Biosimilare</b> – Mirela Pârvu, Ruxandra Ionescu .....	<b>9</b>
<i>Capitolul II</i>	
<b>Agenți biologici utilizați în reumatologie</b> .....	<b>31</b>
2.1. <i>Terapia anticitokinică în bolile reumatice</i> – Claudia Cobilinschi, Ruxandra Ionescu .....	<b>31</b>
2.2. <i>Terapia biologică cu țintă celulară</i> – Sânziana Daia-Iliescu, Daniela Opreș-Belinski .....	<b>72</b>
<i>Capitolul III</i>	
<b>Efectele adverse ale terapiilor biologice utilizate în reumatologie</b> – Laura Groșeanu .....	<b>107</b>
<i>Capitolul IV</i>	
<b>Terapia biologică în poliartrita reumatoidă</b> – Diana Mazilu, Ruxandra Ionescu .....	<b>155</b>
<i>Capitolul V</i>	
<b>Terapia biologică în spondilartritele axiale</b> – Claudia Cobilinschi, Ruxandra Ionescu .....	<b>207</b>
<i>Capitolul VI</i>	
<b>Terapia biologică a uveitei din spondilartrite</b> – Traian Costin Mitulescu..	<b>255</b>
<i>Capitolul VII</i>	
<b>Terapia biologică în artrita psoriazică</b> – Andreea-Ileana Borangiu .....	<b>275</b>
<i>Capitolul VIII</i>	
<b>Terapia biologică în vasculitele sistemice</b> – Daniela Opreș-Belinski.....	<b>303</b>
<i>Capitolul IX</i>	
<b>Terapia biologică în lupusul eritematos systemic</b> – Ioana-Cristina Săulescu	<b>331</b>

Respect pentru oameni și cărți

*Capitolul X*

**Terapia biologic în scleroza sistemică** - Laura Groșeanu ..... 359

*Capitolul XI*

**Imunogenicitatea, o caracteristică a terapiilor biologice** - Diana Mazilu,  
Daniela Opreș- Belinski ..... 383

*Capitolul XII*

**Protocoale terapeutice de utilizare a terapiilor biologice aprobate în  
România pentru patologia reumatică** - Comisia de Specialitate a  
Ministerului Sănătății ..... 405

# Biotehnologia - progres major în terapia bolilor inflamatoare reumatice, biologice originale/Biosimilare

*Mirela Pârvu, Ruxandra Ionescu*

## Introducere în biotehnologie

Strategia terapeutică în bolile inflamatorii reumatismale este de a introduce cât mai precoce tratamentul de fond, pentru a reduce inflamația, dar și pentru a îmbunătăți funcționalitatea și a crește calitatea vieții pacienților, înainte ca distrucția articulară și disabilitatea să apară.

În bolile autoimune inflamatorii, unde producția de citokine guvernează debutul și parcursul bolii, tratamentul s-a canalizat pe a suprima producția și eliberarea acestor citokine, și a permis aplicațiile biotehnologiei în domeniul îngrijirii medicale prin dezvoltarea și promovarea unor agenți profilactici, instrumente diagnostice și produse terapeutice (1, 2, 3). Considerate ca fiind „produse farmaceutice inteligente”, medicamentele biologice sunt produse biotehnologice care oferă adesea noi abordări ale controlului bolii, cu rate de succes clinice mai mari și îngrijiri îmbunătățite ale pacienților, dar și o protecție extinsă a brevetelor și o probabilitate semnificativă de rambursare (4).

Agenția Europeană a Medicamentului (EMA) definește produsele biologice ca „medicamente care conțin una sau mai multe substanțe active produse sau obținute dintr-o sursă biologică. Substanțele active din medicamentele biologice sunt mai mari și mai complexe decât medicamentele non-biologice, iar organismele vii sunt singurele care pot

reproduce această complexitate" (5). Unele medicamente biologice sunt reproduceri ale unor substanțe deja prezente în corpul uman, precum proteinele, insulina, hormonul de creștere și eritropoietinele. Altele sunt obținute prin procesare din sânge uman, organe și țesuturi, cum ar fi vaccinurile și ADN-ul recombinat (3, 6, 7). În 1982 a fost aprobat primul produs biologic, Insulina. Astăzi sunt comercializate peste 200 de produse biotehnologice, iar peste 900 sunt în fază de cercetare clinică (1).

Medicamentele biologice sunt alcătuite din substanțe care se regăsesc adesea în mod natural în corpul uman precum hormonul de creștere, insulina, eritropoietina, enzime, anticorpilor. Dezvoltarea și producția de medicamente biologice este un proces complex care a deschis un spectru larg de servicii în ceea ce privește utilizarea materialului biologic în scop diagnostic și de tratament al celor mai grave boli - cancer, diabet, boli cardiovasculare, neurologice, boli autoimune etc. (1). Spre deosebire de medicamentele clasice, care sunt obținute prin sinteză chimică, medicamentele biologice sunt produse de organisme vii - celule vegetale sau animale, bacterii, virusuri și drojdii.

Pentru anticorpilor monoclonali (mAb), se folosesc linii celulare modificate genetic, astfel ca celula să producă substanța dorită (7). Produse din celule vii, medicamentele biologice au fost concepute să mimeze comportamentul anticorpilor produși în mod natural în organism, cu rol de a ținti precis anumite celule din sistemul imunitar (7).

Fiecare companie de biotehnologie are o bancă proprie de celule, cu linii celulare unice, care sunt folosite pentru fabricarea medicamentelor, proceduri standardizate, și platforme de producție, care în timp pot fi modificate și adoptate strategii adecvate de dezvoltare a proceselor, adaptate cerințelor cu respectarea reglementărilor în vigoare (7, 8).

Similitudinea caracteristicilor și proprietățile moleculare în cazul mAb-urilor, face ca abordarea platformelor de producție să fie fezabile, deși este posibil ca procesele folosite să nu fie pe deplin optimizate pentru fiecare moleculă (8, 9).

## Ce este biotehnologia și aplicarea ei în domeniul medical

Termenul de biotehnologie vine de la cuvintele grecești „bios” – viață, „technikos” – tehnici și „logos” – studiu (10).

Dezvoltată ca știința bazată pe biologie, biotehnologia are ca scop utilizarea în tehnică a microorganismelor sau a produselor derivate de la acestea, a culturilor de celule vegetale și animale, pentru producerea de substanțe utile în agricultură, în industria alimentară, farmaceutică etc. în folosul activității umane (11).

Convenția ONU (Organizația Națiunilor Unite) privind diversitatea biologică, definește biotehnologia drept „orice aplicație tehnologică care utilizează sisteme biologice, organisme vii, sau derivate ale acestora, pentru a crea sau modifica produse sau procese în scopuri bine determinate” (10, 11).

În domeniul medical, biotehnologia, cunoscută ca *biotehnologie roșie*, s-a dezvoltat utilizând materialul biologic în producerea unui medicament, test de diagnostic sau un vaccin, care a fost produs folosind organisme vii, utilizând tehnici de recombinare a ADN-ului. ADN-ul recombinat este o formă creată prin combinarea de secvențe genice care, în mod normal, nu coexistă în același organism (12).

În medicina modernă, biotehnologia a permis descoperirea și producerea de noi medicamente, descoperirea în care genomul influențează răspunsul la medicamente și screeningul genetic. Bazată pe legile eredității descoperite de Mendel, și cercetările în domeniul geneticii efectuate de Thomas H. Morgan, termenul de biotehnologie a fost folosit pentru prima dată de către inginerul de origine ungară Karl Ereky în 1919, cercetările în domeniul ingineriei genetice fiind continuate de Herbert W. Boyer, Stanley N. Cohen, și Paul Berg, care au contribuit la dezvoltarea tehnologiei ADN-ului recombinat, adică modul în care materialul genetic dintr-un organism este introdus artificial în genomul unui alt organism și apoi reprodus și exprimat de acel organism (13, 14). Pionieratul în industria biotehnologiei medicale apare la începutul anilor 1980, când apar pri-

mele investiții cu potențial medical și se extinde cu rapiditate după ce Kary Mullis a primit premiul Nobel pentru chimie, pentru descoperirea tehnologiei polimerasechain-reaction (PCR) și co-descoperirea lui Phillip A. Scharp și Richard J. Roberts, care au primit premiul Nobel pentru Medicină și Fiziologie în 1993, și definirea termenului de matisare genetică (splicing) – adică un proces complex de transcripție a ADN-ului la nivel nuclear și translație a ARN-ului mesager (ARNm) la nivel citoplasmatic, astfel că, putem obține secvențe de nucleotide din ADN care nu codifică anumiți aminoacizi și întrerupe secvența de codificare a unei gene (15, 16).

Istoria cercetării și dezvoltării mAbs terapeutici, începe în 1975 când Gerges J.F. Kohler și César Milstein, au pus la punct tehnologia hibridoma pentru a crea anticorpii monoclonali, activitatea lor fiind recunoscută, prin acordarea în 1984 a Premiului Nobel pentru Medicină și Fiziologie, alături de Niels K. Jerne, „pentru teoriile privind specificitatea în dezvoltarea și controlul sistemului imunitar și descoperirea principiului pentru producerea de anticorpi monoclonali” (17, 18). Această descoperire a stat la baza dezvoltării, producerii și aprobării primului anticorp monoclonal, orthoclone-OKT3 (muromonab-CD3), derivat din hibridomul de șoarece, care a fost utilizat la pacienți, pentru a preveni respingerea transplantului (18).

Ingenieria genetică a stat la baza biotehnologiei medicale în producerea produselor biofarmaceutice, prin aplicarea proceselor biologice în scopul obținerii unor substanțe necesare în medicină. Tehnologia ADN recombinat reprezintă un ansamblu de metode și tehnici prin care se obțin organisme modificate genetic prin introducerea în ADN-ul unei specii a unor segmente de ADN (gene) de la alte specii (19).

Un prim pas în producerea medicamentelor biologice îl constituie identificarea și izolarea proteinei de interes, și a genei care o codifică. Apoi prin folosirea unor vectori de expresie (plasmidele R, bacteriofagul  $\lambda$ , virusul simian SV-40, cosmidele, cromozomi artificiali bacterieni-BAC, cromozomi artificiali ai drojdiilor-YAC etc.), proteina identificată este

Respect pentru oameni și cărți

introdusă în nucleul celulei gazde unde are loc procesul de transcripție și translație a informației la nivelul ARN-ului mesager, iar proteina astfel modificată este supusă unui proces de glicozilare prin adăugarea unor grupări ce îi întăresc proprietățile farmacologice (20, 21). Clonarea, procesul de obținere a unui număr mare de copii ale secvenței de interes, se poate realiza *in vivo* - folosind enzime de restricție și ligaze, și *in vitro* - utilizând tehnica polymerase chain reaction-PCR(19). Gazdele de clonare pot fi organisme procariote (bacterii Gram - negative sau pozitive) sau eucariote (plante, animale, drojdii) (19, 22, 23). Alegerea gazdei se bazează pe proprietățile proteinei țintă și scopul său de viitor (22), fiecare organism gazdă având propriile caracteristici, puncte forte și puncte slabe, legate în principal de ușurința în utilizare, nivelurile de expresie, randamentul final obținut/costul de producție (19-23). Clonele de ADN sunt utilizate pentru determinarea structurii primare, cartare restrictivă, producere de sonde moleculare, analiza genelor, sinteza proteinelor solicitate (21, 23). Pentru analiza ADN poate fi utilizată orice celulă nucleată (de ex. la om pot fi folosite celule dintr-o picătură de sânge, din salivă, fire de păr, țesut epitelial etc.). În cercetare sunt folosite bibliotecile de ADN, bibliotecile genomice, bibliotecile cromozomiale și bibliotecile de ADN complementar (ADNc) formate din colecțiile fragmentelor de ADN clonate dintr-o celulă, țesut sau organism (19).

De exemplu, pentru producerea anticorpilor monoclonali (mAb) terapeutici, sunt folosite câteva linii celulare, de ovar de hamster chinezesc CHO, celule murine NSO, Sp2/0, celule umane PER.C6® (8). Celulele CHO au atribute de performanță a proceselor, cum ar fi: creșterea rapidă, expresia înaltă și capacitatea de a fi adaptate pentru creșterea în medii bine definite chimic (9,23,24). Cercetările recente au arătat că fragmente de anticorpi neglicozilate pot fi produse și în bacteria *E. coli* BL21 (DE3), care are ca avantaj, productivitatea ridicată și creșterea pe medii ieftine (24). Pentru producția mAb-urilor s-au folosit și sistemele de expresie a drojdiilor *Saccharomyces cerevisiae* și *Pichia pastoris*, însă, încă sunt unele probleme legate de glicozilare



și plierea corespunzătoare a proteinelor în acest sistem de expresie, care necesită cercetare și îmbunătățiri (25).

Calitatea și comparabilitatea produselor trebuie să fie monitorizate atent atunci când apar modificări ale procesului atât în faza de dezvoltare, cât și în cea de stadiu avansat. Stabilirea și selectarea liniilor celulare, cu profile de concentrație intracelulară stabile și fără modificări ale ratei de reacție datorate reglării genei, mediul de fermentație/dezvoltare și condițiile din bioreactor, au impus folosirea unor platforme de producție speciale, bine studiate cu parametrii de funcționare binecunoscuți, modificabili în timp pentru ca procesele să fie optimizate pentru fiecare moleculă și lot (8, 23).

## Medicamente biologice originale și biosimilare

Medicamentele tradiționale sunt medicamente chimice obținute prin sinteză chimică, care urmează aceeași rețetă de a combina ingrediente chimice în obținerea aceluiași produs finit.

Medicamentele biologice sunt medicamente produse de organisme vii, fiind compuse din proteine sau alte substanțe derivate dintr-o sursă biologică. Un medicament biologic trebuie cultivat, respectând anumite etape și procese complexe pentru a obține un produs stabil. Medicamentele biologice sunt macromolecule cu o structură complexă (până în 50.000 atomi/moleculă și peste 1.000 de aminoacizi/moleculă) cu greutate moleculară de peste 20.000 daltoni/moleculă, spre deosebire de medicamentele chimice, care sunt molecule mici, până în 100 atomi/moleculă, și cu structură chimică bine cunoscută și reproductibilă (6, 21). Medicamentele biologice sunt alcătuite din proteine, unitatea structurală a proteinei fiind aminoacidul. Succesiunea de aminoacizi determină structura primară a proteinelor, care constituie baza informației genetice. Interacțiunile sterice dintre resturile de aminoacizi determină formarea structurii secundare a proteinei care se împachetează apoi într-un anumit volum formând structura tridimensională a proteinei, care este responsabilă de proprietățile biologice.

Respect pentru oameni și cărți

Proteinele oligomere, alcătuite din mai multe lanțuri polipeptidice, au o structură cuaternară (26).

Anticorpii monoclonali sunt structuri complexe cu o anumită aranjare a aminoacizilor în lanțul polipeptidic și o structură terțiară individuală, îndreptați împotriva unor antigene țintă de pe suprafața celulară (27, 29). mAb pot intercepta prin reacția antigen-anticorp orice structură biologică străină organismului-celule, receptori, enzime, proteine, deci pot influența procesul patologic prin țintirea exactă a structurilor implicate (26).

În mod fiziologic, anticorpii sunt o componentă importantă pentru răspunsul imun dobândit, jucând un rol important în recunoașterea antigenelor străine și în stimularea unui răspuns imun față de acesta. Biotehnologia medicală a făcut posibilă realizarea de mAb îndreptați împotriva unor antigene specifice și care sunt substanțe care neutralizează orice agent patologic cu structură proteică. Cercetările și studiile de inginerie genetică s-au concentrat pe îmbunătățirea mAbs, în ceea ce privește modificarea timpului de înjumătățire, creșterea eficacității și o toxicitate redusă. Ex: În acest scop, pentru a reduce imunogenitatea s-a recurs la chimerizarea anticorpilor și umanizarea prin înlocuirea porțiunii de anticorp murin cu omologii umani, iar ulterior s-au dezvoltat mAb umani (18, 27, 28).

După originea lor, mAbs folosiți în scop terapeutic sunt clasificați astfel:

- anticorpi monoclonali chimerici, cu origine umană și murină, conțin 25% din fracțiunea murină în fragmentul Fab, restul fiind uman. Denumirea lor se termină în -ximab. Ex: infliximab (IFX), rituximab (RTX) (27, 28);

- anticorpii monoclonali umanizați, care conțin 2-5% din fracțiunea murină în regiunile hipervariabile ale fragmentului Fab. Denumirea lor se termină în -zumab. Ex: tocilizumab (TCZ) (27, 28);

- anticorpii monoclonali umani. Denumirea lor se termină în - umab. Ex: adalimumab (ADA), golimumab (GOL), certolizumabpegol (CEP), sekukinumab (SEK) (3, 28);

- anticorpii monoclonali murini, obținuți din șoareci și șobolani cu ajutorul tehnologiei hibridome. Denumirea lor se termină în -omab (27, 28).

De exemplu, în bolile autoimune, suprimarea inflamației se poate realiza prin atacarea moleculelor implicate în răspunsul inflamator precum: interleukinele (IL), factorul de necroză tumorală alfa ( $TNF-\alpha$ ), limfocitul B sau T.

RTX este un mAb chimeric, uman/șoarece, produs prin inginerie genetică care reprezintă o imunoglobulină glicozilată, cu regiuni constante de IgG 1 uman și cu secvențe regionale variabile de lanțuri murine ușoare și grele. Este direcționat împotriva CD 20, receptor aflat pe suprafața unor celule B (LB) (29).

IFX a fost primul inhibitor al  $TNF-\alpha$  dezvoltat și este o imunoglobulină chimeră (Ig) compusă dintr-o regiune variabilă murină și o regiune constantă umană împotriva  $TNF-\alpha$  (27, 28).

TCZ este un mAb de receptor anti-IL-6 de clasă IgG1 umanizat, care a fost generat prin altoirea regiunilor determinante de complementaritate ale anticorpului receptorului anti-IL-6 de șoarece (Ab) în IgG1 uman, direcționat împotriva receptorilor solubili și ai celor membranari ai IL-6 (27, 28).

ADA și GOL sunt mAbs complet umani îndreptați împotriva  $TNF-\alpha$ . CEP este un fragment Fab umanizat conjugat cu polietilen glicol (PEG). Atașarea PEG prelungește perioada de înjumătățire a medicamentului, în timp ce absența unui fragment Fc previne funcțiile efectoare, cum ar fi citotoxicitatea celulară dependentă de Ab și citotoxicitatea celulară dependentă de complement, precum și transferul activ al CEP peste placentă în timpul sarcinii (27, 28).

SEK este un anticorp monoclonal uman complet recombinant, selectiv pentru IL-17A (30).

Etanerceptul (ETA) este o proteină de fuziune constând din două domenii extracelulare ale receptorului TNF 2 (cunoscut și ca receptor p75TNF) și un fragment Fc uman de clasa IgG1. Deoarece  $TNF-\alpha$  și limfotoxina se leagă la receptorul TNF 2, ETA neutralizează activitatea biologică a ambelor citokine (22, 28).

Abatacept (ABA) o proteină de fuziune solubilă constând din domeniul extracelular al CTLA4 uman și un fragment al porțiunii Fc a IgG1 umană, este un inhibitor de

Respect pentru oameni și cărți

**costimulare B7/CD28** care poate împiedica răspunsul imun prin prevenirea activării celulelor T native (31).

Procesul de producție pentru produsele biofarmaceutice este unul complex, izolarea proteinelor recombinante fiind o sarcină dificilă, care începe cu clonarea secvenței corespunzătoare, urmată de selecția unei linii celulare (gazda pentru creșterea proteinei) care exprimă proteina recombinată în cantități suficiente și cu modificările dorite post-tranlațional (20, 25) figura I.1.

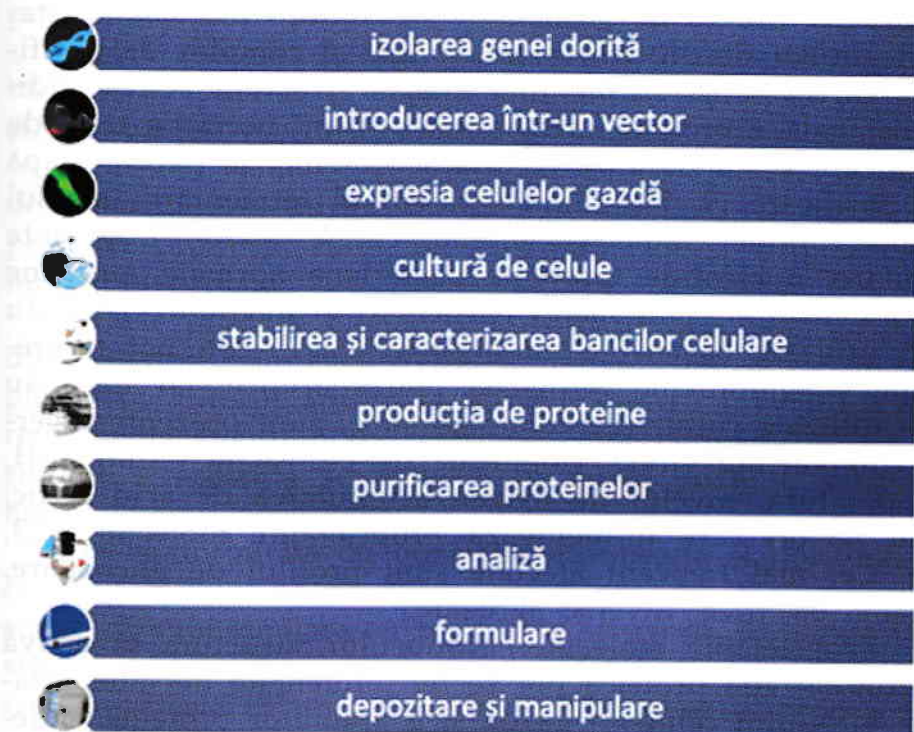


Figura I.1. Model ce rezumă procesul de producție a medicamentului biologic. (după M. Kuhlmann and A. Covic).

Clonarea genelor sau clonarea moleculară cuprinde mai multe etape:

1. obținerea pasagerului prin extracția ADN-ului de la un organism donor și scindarea lui cu ajutorul enzimelor de restricție,

2. pregătirea pasagerului și a vectorului, adică ADN-ul străin este introdus în interiorul unei celule bacteriene gazdă pentru a evita degradarea lui în celula receptoare,

3. introducerea și exprimarea ADN-ului recombinat în celula receptoare, care are rolul de a accepta, multiplica și exprima moleculele de ADN recombinat ce conțin pasagerul cu informația dorită.

Ca orice organism viu, aceste celule au nevoie de condiții speciale de supraviețuire și creștere, nutrienți, anumite condiții de pH, presiune, temperatură, oxigen, sterilitate prin absența totală a microorganismelor în mediu. Acestea sunt menținute constante pe toată durata procesului. Urmează un proces de fermentare în condiții foarte bine stabilite urmat de un proces îndelungat și complex de purificare care trebuie să mențină intactă structura activă tridimensională a proteinei recombinante, fiind necesare teste de verificare a activității și cantității proteinei la fiecare etapă de purificare (9, 23, 25). Pe parcursul fermentării, mediul lichid conține celule bacteriene, celule lezate, fragmente celulare, nucleotide, proteine bacteriene normale, proteine recombinante și componenți particulari ai mediului. Dacă au fost utilizate bacterii Gram-negative ca *E. coli* pot fi prezente și endotoxine pirogene, polizaharidice, iar dacă au fost utilizate culturi de celule animale, sunt prezente diverse componente virale. Condițiile de bioreacție - timp, pH, temperatură, nivelul de oxigen/acumularea de acid lactic, sunt factori care influențează proprietățile moleculei (23, 25). Cel mai frecvent afectate sunt profilul de glicozilare, sarcina electrică, diverse agregate.

Proprietățile moleculei/produsului, structura sa activă și concentrația proteică pot să fie influențate de îndepărtarea ADN-ului celulei - gazdă și a anumitor proteine, îndepărtarea unor fragmente și agregate (23). Sunt folosite bioreactoare cu un singur val, de unică folosință, sau cuve fixe din oțel inoxidabil (23, 25).

În etapa următoare, proteinele sunt izolate din culturile celulare respective purificate și formulate ca medicament. Purificarea include mai multe etape ca înlăturarea particulelor prin centrifugare, filtrare, ultrafiltrare și filtrarea prin flux tangențial, concentrarea, când volumul amestecului este redus, ceea ce duce la creșterea concentrației proteinei active, purificarea inițială, intermediară și finală