Współczesna Onkologia (2005) vol. 9; 6 (231–236)

Miejsce erytropoetyny w leczeniu niedokrwistości

Importance of erythropoietin in the treatment of anemia

Jacek Mackiewicz, Piotr J. Wysocki, Andrzej Mackiewicz

Zakład Immunologii Nowotworów, Katedra Onkologii, Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego, Wielkopolskie Centrum Onkologii, Poznań

Rynek zbytu erytropoetyny (Epo) na świecie osiąga wartość kilku miliardów dolarów rocznie. Mijające okresy ochronne własności intelektualnej i regionalne ograniczenia ochrony patentowej stymulują badaczy i firmy farmaceutyczne do tworzenia generycznych lub też modyfikowanych preparatów Epo. W przeglądzie obecnej sytuacji na rynku próbowaliśmy zebrać aktualne dane, dotyczące istniejących preparatów Epo oraz trendów badawczych, dążących do zastąpienia nadal kosztownych preparatów białkowych polipeptydami czy też genami Epo wprowadzanymi bezpośrednio chorym. Niezmiernie interesujące jest również wykorzystanie innych niż krwiotwórcze właściwości erytropoetyny do celów terapeutycznych.
15-letnie doświadczenie w leczeniu niedokrwistości przy użyciu rHuEpo-α pozwoliło nam na dogłębne poznanie farmakokinetyki, farmakoekonomiki i zysków klinicznych związanych ze stosowaniem tego leku. Środowiska nefrologów, hematologów czy onkologów wypracowały standardy używania w różnych jednostkach klinicznych rHu-Epo-α – cytokiny/hormonu otrzymywanego dzięki inżynierii genetycznej, cząsteczki najbardziej zbliżonej do naturalnej endogennej erytropoetyny. Miliony dawek podanych chorym oraz wieloletnie obserwacje kliniczne pozwoliły na dobór bezpiecznych i przyjaznych chorym schematów leczenia.
Ostatnio wprowadzane nowe preparaty Epo czy to biogeneryki, czy tzw. NESP, mają przed sobą jeszcze długą drogę do osiągnięcia sukcesu na rynku zarówno terapeutycznego, jak i ekonomicznego. Te pierwsze wymagają standaryzacji produkcji i – mimo znanych efektów terapeutycznych Epo – badań klinicznych. Z kolei darbepoetyna-α wymaga bardziej ekstensywnych badań (większość badań trwała 12 tyg., ostatnie nieco dłużej), obejmujących liczne grupy chorych, aby dogłębnie poznać *biologię* tego preparatu oraz bezpośrednio, w poprawnie zaplanowanych badaniach klinicznych porównać go z Epo-α. Również koszty leczenia darbepoetyną-α, mimo prób rzadszego dawkowania, są dotychczas wyższe niż leczenie Epo-α.

Słowa kluczowe: erytropoetyna, darbepoetyna, epomimetyki, biogeneryki.

Erytropoetyna (Epo) i receptor Epo (Epo-R)

Występowanie i funkcja

Epo jest hormonem/cytokiną o szerokim zakresie aktywności biologicznej. Jest kluczowym czynnikiem regulującym erytropoezę. Stymuluje proliferację i różnicowanie późnych erytroidalnych komórek prekursorowych oraz hamuje ich apoptozę [1]. Epo ma również wpływ na angiogenezę; stymuluje migrację komórek śródbłonka naczyń (endotelium) *in vitro* [2] i angiogenezę *in vivo* [3]. Epo posiada też właściwości ochronne dla komórek układu nerwowego [4]. Epo w życiu płodowym wytwarzana jest przez wątrobę, a w życiu pozapłodowym głównie przez komórki śródmiąższowe nerki oraz hepatocyty i komórki Ito w wątrobie [5]. Ostatnio wykryto, że Epo jest też produkowana w mózgu [6], macicy i jajnikach [7], a w życiu płodowym przez woreczek żółtkowy [8]. Ponadto Epo może być wytwarzana przez komórki nowotworowe, takie jak np. *hepatoma* czy rak nerkokomórkowy [9, 10]. Niedotlenienie wzmaga wytwarzanie Epo, a hiperoksja je obniża [1, 6].

Epo działa poprzez aktywację swoistego receptora – Epo-R, który należy do rodziny receptorów cytokin typu I [11]. Przyłączenie Epo do Epo-R powoduje jego homodimeryzację oraz aktywację kinaz tyrozynowych JAK 2. Następnie dochodzi do aktywacji kaskady przekazywania sygnału kinazy Raf i MAP, kinazy PI3, czynników STAT (STAT5) i fosfolipazy C [12]. Kompleks receptora Epo, który jest odpowiedzialny za aktywność neuroprotekcyjną Epo, różni się od tzw. receptora hematopoetycznego w zakresie powinowactwa do Epo, masy cząsteczkowej czy związanych z nim białek [4]. Epo-R jest funkcjonalnie powiązany z innymi receptorami cytokinowymi, np. CD 131, a aktywność neuroprotekcyjna Epo związana jest z domenami Epo-R, innymi niż te odpowiedzialne za hematopoezę [13]. Epo-R znajduje się na wczesnych progenitorach erytropoezy, megakariocytach, limfocytach B i macierzystych komórkach hematopoetycznych [14]. Epo-R stwierdzono również na innych komórkach poza szeregiem hematopoetycznym, takich jak komórki łożyska, śródbłonka naczyń, komórki Leydiga czy neurony [15]. Epo-R może też występować na komórkach nowotworowych, np. raka piersi, białaczki erytroblastycznej, wątrobiaka (*hepatoma*), *neuroblastoma*, *glioma*, raka szyjki macicy, raka jajnika, raka płuc czy *medulloblastoma* [16].

Struktura i farmakokinetyka

Epo jest α_2-globuliną, zbudowaną ze 165 aminokwasów, o ciężarze cząsteczkowym 30 400 Da [1]. Około 40 proc. masy cząsteczkowej stanowią węglowodany. Epo ma 4 heteroglikany: 3 N- przyłączone do aspargin 24, 38 i 83 i jeden O- przyłączony do seryny 126. N-glikany są to struktury antenarne typu kompleksowego z 2, 3 lub 4 łańcuchami laktozowymi, które na końcach mogą mieć kwas sialowy. Maksymalnie cząsteczka Epo może mieć 14 reszt kwasu sialowego (12 na N- i 2 na O-glikanach). Ilość cząsteczek kwasu sialo-

The world market for erythropoietin (Epo) accounts for several billion dollars a year. Due to the expiring term of protection of intellectual property rights or regional limitations of patent protection researchers and pharmaceutical companies are stimulated to design generic or so called modified Epo preparations. The aim of the review was to screen Epo preparations currently available on the market and search for new concepts developed in order to replace existing recombinant Epo protein preparations with active polypeptides or gene therapy strategies. Strategies of using Epo properties other than erythropoietic ones for therapeutic purposes are also extremely interesting.
Over fifteen years of experience of anemia treatment with recombinant human Epo α (rHuEpo α) allowed us to understand pharmacokinetics, pharmacoeconomics and clinical benefits of this drug. Nephrologists, hematologists and oncologists have developed standard procedures for clinical application in various diseases of rHuEpo α, a cytokine/hormone manufactured using recombinant DNA technology whose structure is very close to natural endogenous Epo. Millions of doses administered to patients allowed safe and patient-friendly treatment procedures to be developed.
New Epo preparations recently placed on the market, biogenerics or so called NESP have a long way to achieve therapeutic and economic success. Biogenerics need manufacture standardization and clinical studies apart from known therapeutic properties of Epo. Darbepoetin α in turn requires more extensive clinical studies (most of the studies lasted 12 weeks, the recent ones lasted a little longer) engaging larger patient cohorts in order to understand the "biology" of this preparation better and compare it with rHu Epo α in well designed studies. Moreover, costs of darbepoetin α treatment, despite a different schedule of administration, are so far higher than costs of rHuEpo α treatment.

Key words: erythropoietin, darbepoetin, epo mimetics, biogenerics.

wego związana jest z powinowactwem do Epo-R i okresem półtrwania Epo w krążeniu [17]. Glikoformy Epo mniej usialowane wykazują większe powinowactwo do Epo-R, jednak mają krótszy okres półtrwania. Enzymatycznie deglikozylowana Epo całkowicie traci aktywność biologiczną *in vivo* [18].

U ludzi zdrowych stężenie Epo w osoczu wynosi 6–32 IU/l (IU – jednostki międzynarodowe – *international units*; 1 IU odpowiada ilości Epo, która stymuluje erytropoezę u zwierząt doświadczalnych w takim stopniu, jak 5 µmoli chlorku kobaltu). Okres półtrwania Epo w krążeniu jest stosunkowo krótki i wynosi wg różnych autorów 4–11 godz. [19]. Obserwowany zakres półtrwania może być związany nie tylko z metodyką badań, a także z występowaniem różnych glikoform Epo u poszczególnych osobników lub zmian glikozylacji (mikroheterogenność) w różnych stanach patologicznych, podobnie jak to się obserwuje w przypadku innych białek osocza [20]. Dotychczasowe badania nie wykazały jednoznacznie mechanizmu degradacji Epo. Obecnie uważa się, że Epo jest eliminowana poprzez wychwyt i wysycenie swoistego Epo-R, głównie w szpiku kostnym, w mniejszym stopniu w nerkach i wątrobie [19].

Rekombinowana ludzka Epo (rHuEpo)

Gen ludzkiej Epo sklonowano w 1985 r. [21]. W tym samym roku wyprodukowano rekombinowaną Epo (AMGen Corp) i rozpoczęto badania kliniczne u ludzi [22, 23]. W Polsce pierwsze badania kliniczne z zastosowaniem Epo (Eprex-Cilag) rozpoczęto w latach 1988/89, co w 1989 r. doprowadziło do rejestracji Epo-α (Eprex) [24]. W 1992 r. zarejestrowano w Polsce Epo-β (Recormon) firmy Boehringer Mannheim, a w latach 1999/2000 podjęto badania kliniczne Epo-ω (Epomax) produkcji Lek Ljubljana.

Epo-α i Epo-β produkowane są w komórkach jajnika chomika chińskiego (CHO; *Chinese hamster ovary*), a Epo-ω w komórkach nerki młodego chomika (BHK, *baby hamster kidney cells*). Mimo że komórki CHO i BHK glikozylują podobnie jak komórki ludzkie, ze względu na brak niektórych enzymów glikozylujących struktury heteroglikanów rHuEpo różnią się od endogennej ludzkiej Epo. Różnice między Epo i rHuEpo dotyczą głównie ilości reszt sialowych łańcuchów laktozowych struktur N-antenarnych [25]. W odróżnieniu od Epo wytwarzanej w komórkach CHO, tylko 60 proc. Epo-ω jest O-glikozylowane. Ten typ glikozylacji nie wpływa jednak na okres półtrwania. Ponadto w jednym z N-glikanów mannoza jest fosforylowana. Okres półtrwania rHuEpo wynosi ok. 8,5 godz.

rHuEpo podana *i.v.* wykazuje 100-procentową biodostępność. Podawana s. c. absorbowana jest wolno, z ok. 30-procentową biodostępnością, co prawdopodobnie jest związane z degradacją rHuEpo przez peptydazy w skórze.

Biopodobne Epo (biogeneryczne czynniki erytropoetyczne)

Biopodobne Epo nie są dostępne w Europie oraz USA ze względu na ochronę patentową, rejestrację oraz problemy technologiczne związane z ich produkcją i jakością. Zastosowanie tych samych genów, linii komórkowych do ich ekspresji czy podobnych procesów produkcyjnych nie gwarantuje wytworzenia produktu, który będzie odpowiadał oryginalnemu biopreparatowi. 11 preparatów biopodobnych Epo pochodzących od 8 różnych producentów z Korei, Argentyny czy Chin znacznie odbiega nawet od własnych specyfikacji dotyczących np. bioaktywności (w zakresie 71–226 proc.). Kolejne serie tego samego preparatu różniły się między sobą, a niektóre z nich zawierały niedopuszczalne ilości endotoksyn bakteryjnych [26]. Powyższe obserwacje wskazują, że konieczna będzie standaryzacja biogenerycznych Epo, szczegółowa charakterystyka farmakokinetyki u ludzi oraz badania kliniczne, mające na celu ocenę efektywności klinicznej oraz bezpieczeństwa stosowania.

Epo-mimetyki

rHuEpo ze względu na wielkość cząsteczki oraz strukturę (glikoproteina) nie może być podawana doustnie, wziewnie czy przezskórnie. Fakt ten spowodo-

Tabela 1. Porównanie cech rHuEpo-α i darbepoetyny-α
Table 1. *Comparison of rHuEpo α and darbepoetin α*

Cecha	RHuEpo-α	Darbepoetyna-α
struktura	identyczna jak endogenna ludzka Epo	różni się od endogennej ludzkiej Epo
liczba aminokwasów	165	165 z 5 zmianami
liczba N-glikanów/O-glikanów	3/1	5/1
liczba reszt kwasu sialowego	≤14	≤22
ciężar cząsteczkowy	30 400 Da	37 100 Da
zawartość węglowodanów	40 proc.	51 proc.
powinowactwo do Epo-R	wysokie IC_{50}[(a)] 138 pikomoli	niskie IC_{50} 703 pikomoli
aktywność biologiczna *in vivo*	taka jak endogennej Epo	u gryzoni 13 do 14 razy wyższa niż endogenna Epo
aktywność biologiczna *in vitro*	EC_{50}[(b)] 11,5 pikomoli	EC_{50} 58,9 pikomoli
czas półtrwania w krążeniu po podaniu *i.v.*	8,5 godz.	25,3 godz.
czas półtrwania w krążeniu po podaniu *s.c.*	16–19 godz.	33–48 godz.
biodostępność po podaniu *s.c.*	20–30 proc.	37 proc.
względna eliminacja po podaniu *s.c.*	24,7 ml/godz./kg	3,7 ml/godz./kg
czas do maksymalnego stężenia w surowicy	16±7,5 godz (*s.c.* u ochotników)	86,1±22,8 godz. (*s.c.* u chorych na nowotwory)
czas do maksymalnego stężenia w surowicy chorych dializowanych (*s.c.*)	18 godz.	54,1±5,1 godz.

[(a)] *– stężenie hamujące;* [(b)] *– stężenie efektywne*

wał poszukiwanie mniejszych cząsteczek (peptydów), wykazujących powyższe cechy i zdolnych do aktywacji Epo-R. Poszukiwania rozpoczęto od charakterystyki domeny Epo-R wiążącej Epo (EBP – *Epo binding protein*). Wykazano, że EBP obejmuje aminokwasy 1–225 części zewnątrzkomórkowej Epo-R [27]. Na tej podstawie skonstruowano agonistyczny 20-aminokwasowy peptyd Epo-mimetyczny – EMP1, który mimo braku homologii z Epo naśladował jej aktywność biologiczną zarówno *in vitro*, jak *in vivo* [28, 29]. Efektywność EMP1 była niższa niż Epo. Na podstawie badań krystalograficznych, które wykazały, że aktywny kompleks EBP-EMP1 składa się z 2 peptydów związanych z dwoma cząsteczkami receptora (2:2), próbowano zwiększyć aktywność EMP1 poprzez tworzenie dimerów, stosując glikol polietylenowy. Zabieg ten tysiąckrotnie polepszył potencjał EMP1 *in vitro* oraz *in vivo*.

Inne poszukiwania oparte były na konstrukcji peptydu identycznego z sekwencją aminokwasów 194–216 Epo-R (ERP), domeny odpowiedzialnej za dimeryzację receptora. ERP wiąże się z Epo-R w obszarze objętym aminokwasami 174–223 (w stosunku 1:1), w miejscu innym niż Epo [30]. Oba czynniki mogą działać synergistycznie [31].

Modyfikowane Epo

Hiperglikozylowana Epo – tzw. nowe białko stymulujące erytropoezę (NESP, *darbepoetyn-α*)

W oparciu o dane wskazujące, że czas eliminacji z krążenia jest związany z ilością reszt kwasu sialowego w cząsteczce Epo, podjęto próbę modyfikacji łańcucha polipeptydowego w celu utworzenia dodatkowych miejsc N-glikozylacji. Poprzez zmianę aminokwasów w 5 pozycjach (Ala30Asn, His 32Thr, Pro 87Val, Trp88Asn, Pro90Thr), w pozycjach 30 i 88 uzyskano asparginę, do której przyłączają się 2 dodatkowe N-glikany [32]. Poprzez powyższą modyfikację ilość węglowodanów w cząsteczce wzrasta o 22 proc., a całkowity ciężar cząsteczkowy wynosi 37 100 Da. Hipotetycznie maksymalna ilość reszt kwasu sialowego z 14 cząsteczek wzrasta do 22 (ryc. 1.). Wzrost usialowania Epo spowodował wydłużenie czasu jej (darbepoetyny-α) półtrwania w krążeniu po podaniu i. v. średnio do 25,3 godz., ok. 3 razy dłużej niż Epo-α (8,5 godz.). Jednocześnie zmniejszyło się powinowactwo darbepoetyny-α (4,3 raza) w porównaniu z Epo do Epo-R (tab. 1.).

Karbamylowana Epo (CEpo)

Epo i desializowana Epo mają zdolność przekraczania nienaruszonej bariery krew – mózg po podaniu *s.c.* czy *i.v.* [33]. Jednak karbamylacja lizyn Epo, która istotnie zmienia strukturę i funkcję tej cytokiny, neutralizuje właściwości erytropoetyczne Epo, ale zachowuje jej aktywność neuroprotekcyjną [34]. Ostatnio wykazano [34], że CEpo wykazuje działanie ochronne dla neuronów po wylewie krwi do mózgu, nie wpływając na erytropoezę. CEpo wykazała również działanie przeciwzapalne, redukując poziom interleukiny-6 czy MCP-1 w uszkodzonym mózgu. Ta nowa pochodna, która zachowuje podstawowe cechy *matczynej* Epo, tzn. stabilność, okres półtrwania w osoczu, antygenowość czy farmakodynamikę, wykazuje unikalną aktywność biologiczną poprzez aktywację kompleksu receptorowego, opisanego powyżej. Zaplanowano już badania kliniczne CEpo u chorych z wylewem krwi do mózgu.

Terapia niedokrwistości poprzez transfer genu Epo *in vivo*

Wraz z rozwojem technologii transferu genów podjęto próby zastąpienia częstych wstrzyknięć Epo poprzez wprowadzenie genu Epo *in vivo*. W tym celu stosowano różne wektory i systemy ekspresyjne, takie jak rekombinowane wirusy czy *nagie* DNA. Przykłady obejmują próby terapii genowej niedokrwistości pochodzenia nerkowego w modelu zwierzęcym, polegające na domięśniowym wstrzyknięciu połączonym z elektroporacją plazmidowego DNA kodującego szczurzą Epo pod kontrolą promotora CMV nefrektomizowanym szczurom [35]. Epo wytwarzana przez komórki mięśniowe korygowała niedokrwistość u większości zwierząt laboratoryjnych. W innych badaniach ekspresja genu Epo w plazmidowym DNA była kontrolowana przez promotor niedotlenienia, co zapewniło regulację wytwarzania Epo zależnie od zapotrzebowania [36]. Kolejne badania wykorzystywały nieimmunogenne rekombinowane adenowirusy 3. generacji, tzw. *gutless* czy *helper dependent* (Ad-HD), niosące gen Epo pod kontrolą promotora EF1-α wstrzykiwane *i.v.* Ad-HD wybiórczo wprowadzały cDNA Epo do hepatocytów (w niewielkim stopniu do komórek nerkowych), gdzie zachodziła produkcja białka terapeutycznego [37]. Hepatocyty przez wiele miesięcy produkowały Epo, która korygowała niedokrwistość. Proces produkcyjny Ad-HD wymaga wirusa pomocniczego, który jest naturalnym patogennym adenowirusem. Przy próbach podniesienia skali produkcji Ad-HD do badań klinicznych u ludzi okazało się jednak, że wirus pomocniczy może zanieczyszczać preparaty Ad-HD nawet w ilości 1 proc., co stanowi poważne zagrożenie bezpieczeństwa terapii. W związku z powyższym próby z użyciem Ad-HD nie zostały dopuszczone do badań klinicznych. Dotychczasowe badania przedkliniczne wykazały jednak, że terapia genowa niedokrwistości może być skuteczna i kontrolowana, jednak rozwój nowych bezpiecznych systemów dostarczania genów *in vivo* jest konieczny.

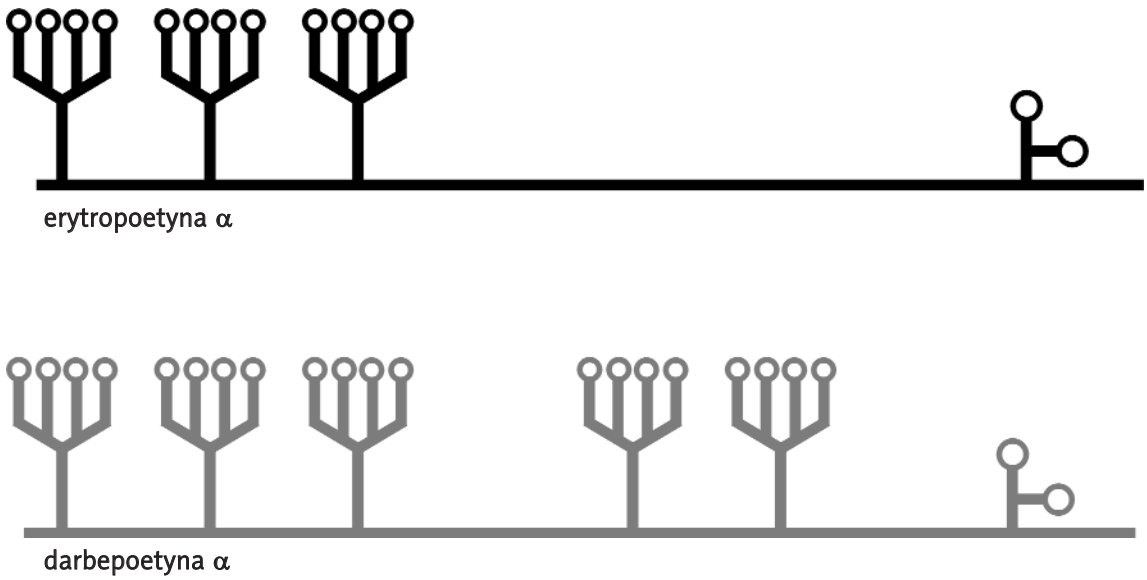
Epo-α i darbepoetyna-α

Porównanie struktury i funkcji

Charakterystykę obu czynników przedstawiono w tab. 1. Z zestawienia wynika, że ich struktura nieco się różni, jednak mechanizm działania poprzez aktywację Epo-R jest ten sam. Podstawowe różnice to powinowactwo do Epo-R *in vitro*, okres półtrwania w krążeniu *in vivo* po podaniu *i.v.* i *s.c.*, dynamika eliminacji z krążenia oraz czas do osiągnięcia maksymalnego stężenia w surowicy po podaniu *s.c.* Darbepoetyna-α ma dłuższy okres półtrwania w surowicy, mniejsze powinowactwo do Epo-R oraz 3–5 razy dłuższy czas osiągnięcia maksymalnego stężenia w surowicy niż Epo-α. Znaczenie kliniczne różnic przedstawionych powyżej jest nieznane, jednak teoretycznie mogą one wpływać na dawkowanie i ewentualnie na koszt leku [38].

Dłuższy okres półtrwania darbepoetyny-α w surowicy powinien teoretycznie pozwolić na jej rzadsze podawanie. Jednakże dane kliniczne i doświadczalne wskazują, że efekt terapeutyczny zarówno darbepoetyny-α oraz Epo-α przy rzadszym podawaniu obu czynników jest podobny [38–40]. W związku z tym, że oba czynniki muszą przedostać się do szpiku kostnego, aby aktywować Epo-R, znaczenie kliniczne wydłużonego okresu półtrwania w surowicy jest kontrowersyjne. Czas obniżania się poziomu hemoglobiny (Hb) u chorych, u których przerwano terapię darbepoetyną-α lub Epo-α po osiągnięciu tej samej wartości Hb, był podobny [41]. Powyższa obserwacja wskazuje, że czas półtrwania pojedynczego czynnika w krążeniu nie jest koniecznie związany z okresem jego działania. W podanym przykładzie ważniejszym czynnikiem może być np. okres półtrwania erytrocytów. Nadal również nie wiadomo, jakie znaczenie kliniczne ma obniżenie powinowactwa darbepoetyny-α do Epo-R.

Następny z parametrów farmakokinetycznych, tzn. czas do osiągnięcia maksymalnego stężenia w surowicy, może mieć natomiast znaczenie kliniczne. Zwykle dłuższy czas związany jest z późniejszym efektem terapeutycznym. Tym



Ryc. 1. Łańcuchy cukrowcowe Epo-α i darbepoetyny-α
Fig. 1. *Heteroglycans of Epo-α and darbepoetin-α*

samym efekt terapeutyczny osiągany przez Epo jest szybszy niż przez darbepoetynę-α.

Efektywność kliniczna

Dotychczas dostępne dane kliniczne dotyczące efektywności klinicznej obu czynników pochodziły z badań oddzielnie oceniających Epo-α lub darbepeotynę-α. Producenci i eksperci związani z danym preparatem wykazywali *wyższość* jednego nad drugim i odwrotnie. Dopiero w czerwcu 2004 r. na kongresie Amerykańskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej przedstawiono wstępne wyniki wcześniej anonsowanych badań (w 2003 r., na konferencji Amerykańskiego Towarzystwa Hematologicznego), które bezpośrednio porównały Epo-α i darbepoetynę-α. Badania te wykazały, że Epo-α z wyższą efektywnością niż darbepoetyna-α podnosi Hb i obniża konieczność przetoczeń krwi. Przeprowadzono 2 niezależne badania, w których porównano efektywność standardowych dawek Epo-α i darbepoetyny-α u chorych na nowotwory leczone chemicznie, u których wystąpiła niedokrwistość. Jedno badanie sponsorowane było przez *Ortho Biotech Clinical Affairs*, LCC (Waltzman, et al. Proc Am Soc Clin Oncol 2004; 23: 763, abstract 8153), drugie przez Amgen, Inc. (Schwartzberg, et al. Proc Am Soc Clin Oncol 2004; 23: 741, abstract 8063). W badaniach III fazy *Ortho Biotech* u chorych z guzami litymi leczonymi chemicznie średni wzrost Hb w trakcie całego badania był wyższy, a liczba przetoczeń niższa po zastosowaniu Epo-α w porównaniu z darbepoetyną-α. W badaniu *Amgen Inc.* na podstawie danych zebranych z 3 badań II fazy, obejmujących chorych na raka piersi, niedrobnokomórkowego raka płuc czy nowotwory ginekologiczne, stwierdzono, że po upływie 17 tyg. badania przyrost Hb oraz liczba przetoczeń były dla obu preparatów podobne. Wyniki badań *Ortho Biotech* wykazały wyższość Epo-α nad darbepoetyną-α w szybkości przyrostu Hb, średniej przyrostu Hb w trakcie całego badania, końcowego poziomu Hb, konieczności zastosowania przetoczeń oraz powierzchni objętej przez tzw. wykres zmian Hb (HbAUC). Natomiast wnioski wyciągnięte z wyników badań *Amgen Inc.* brzmiały, że oba czynniki mają podobną efektywność kliniczną. Gdy jednak poddamy analizie metodyki obu badań, okazuje się, że są one rozbieżne, np. w badaniu *Amgen* nie analizowano przyrostu Hb w pierwszych 16 tyg. Po przeanalizowaniu szczegółowo wyników badania *Amgen*, okazuje się, że również w tym badaniu Epo-α jest bardziej efektywna niż darbepoetyna-α. Przykłady obejmują dane wykazujące, że poziom Hb ≥11 g/dL w grupie Epo uzyskało 86 proc. chorych, a w grupie darbepoetyny-α 82 proc. Ponadto w większej grupy chorych leczonych Epo niż darbepoetyną-α (odpowiednio 17 i 11 proc.) utrzymywał się osiągnięty poziom Hb >13 g/dL. Chorzy leczeni Epo otrzymali średnią dawkę 40 000 IU (równą dawce wyjściowej), a leczeni darbepoetyną-α 220 µg (10 proc. więcej od dawki wyjściowej).

Koszty a efekty terapeutyczne

Szereg ostatnio opublikowanych danych podsumowujących efekty terapeutyczne, równoważność dawek i koszty terapii jasno wskazuje na wyższość Epo-α nad darbepoetyną-α w leczeniu niedokrwistości u chorych na nowotwory i przewlekłe nefropatie. Koszty terapii darbepoetyną-α są od 1,2 do 3 razy wyższe niż Epo-α [38, 42]. Powyższa rozpiętość związana jest z grupą leczonych chorych i dawkowaniem leku. Rzadsze podawanie darbepoetyny-α nie wpływa na koszty terapii, mimo że zmniejsza się liczba wizyt u lekarza.

Powikłania związane ze stosowaniem Epo

Podawanie biopreparatów *s.c.* może czasami powodować indukcję odpowiedzi immunologicznej, która jeśli wyraża się produkcją swoistych neutralizujących przeciwciał skierowanych przeciwko tym preparatom, może mieć skutki kliniczne [43, 44]. Od czasu wprowadzenia na rynek oczyszczanych białek ludzkich lub ich rekombinowanych genetycznie odpowiedników powyższe zjawisko obserwuje się bardzo rzadko, w porównaniu z wcześniej stosowanymi preparatami pochodzenia zwierzęcego. Od 1998 r. zaobserwowano u chorych leczonych Epo wzrost powikłań w postaci tzw. wybiórczej czerwonokrwinkowej aplazji szpiku (PRCA – *pure red cell aplasia*) zależnej od przeciwciał. Przypadki PRCA obserwowano sporadycznie zarówno u chorych, którzy otrzymywali Epo-α (Eprex, Epogen), jak i Epo-β (Neorecormon). Jednak liczba przypadków PRCA po leczeniu Epo-α była wyższa niż po leczeniu Epo-β, szczególnie w 2001 r. Producent Epo-α przeprowadził szczegółowe analizy potencjalnych przyczyn tego zjawiska. Zaobserwowano, iż wzrost PRCA związany był ze zmianą formuły stabilizatorów Epo-α, szczególnie zastąpieniem ludzkiej albuminy przez niejonowy detergent polisorbat 80. Okazało się, że polisorbat 80 *wypłukuje* z gumy tłoczków ampułko-strzykawki substancje o właściwościach adjuwantów immunologicznych, tzw. *leachates*, które indukują zależną od limfocytów T aktywację limfocytów B do produkcji neutralizujących przeciwciał anty-Epo klasy IgG. W związku z tym gumowe tłoczki pokryto teflonem, co doprowadziło do obniżenia występowania PRCA po stosowaniu Epo-α o 83 proc. [45]. Wprowadzenie powyższej procedury ostatecznie rozwiązało problem PRCA występujący po leczeniu Eprexem i zakończyło dyskusje go dotyczące. Liczba odnotowanych nowych przypadków PRCA jest efektem klasy i nie różni się obecnie pomiędzy poszczególnymi preparatami Epo. W Polsce jak dotąd nie rozpoznano żadnego przypadku PRCA, niezależnie od stosowanych preparatów Epo.

Piśmiennictwo

1. Krantz SB. Erythropoietin. Blood 1991; 77: 419-434.
2. Abagnostou A, Lee ES, Kessimian N, et al. Erythoropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 5978-82.
3. Carlini RG, Reyes AA, Rothstein M. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis in vitro. Kidney Int 1995; 47: 740-5.
4. Masuda S, Nagao M, Takahata K, et al. Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells. J Biol Chem 1993; 268: 11208-16.
5. Crivellato E, Nico B, Vacca A, et al. Recombinant human erythropoietin induces intussusceptive microvascular growth in vivo. Leukemia 1993; 18: 331-6.
6. Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, et al. Erythorpoietin gene expression in human, monkey and murine brain. Eur J Neurosc 1996; 8: 666-76.
7. Yasuda Y, Fujita Y, Musha T, et al. Expression of erythropoietin in human female reproductive organs. Ital J Anat Embryol. 2001; 106) 2 suppl 2): 215-22.

8. Yasuda Y, Okano M, Nagao M, et al. Erythropoietin in mouse avascular yolk sacs is increased by retinoic acid. Dev Dyn 1996; 207: 184-94.
9. Okabe T, Urabe A, Kato T, et al. Production of erythropoietin by human renal and hepatic carcinomas in cell culture. Cancer 1985; 55: 1918-23.
10. Matsuyama M, Yamazaki O, Horii K, et al. Erythrocytosis cased by an erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma. J Surg Oncol 2000; 75: 197-202.
11. Mackiewicz A, Koj A, Sehgal P. Interleukin 6-type cytokines. Ann NY Acad Sci 1995; 495
12. Tilbrook PA, Klinken SP. The erythropoietin receptor. Int J Biochem and Cell Biol 1999; 31: 1001-5.
13. Camoana WM, Misasi R, O'Brien JS. Identification of a neurotrophic sequence in erythropoietin. Int J Mol Med 1998; 1: 235-41.
14. Farrel F, Lee A. The Erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues. Oncologist 2004; 9 (suppl 5): 18-30.
15. Beleslin-Cokic BB, Cokic VP, Yu X, et al. Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells. Blood 2004; 104: 2073-80.
16. Acs G, Acs P, Beckwith SM, et al. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. Cancer Res 2001; 61: 3561-5.
17. Egrie JC, Grant JR, Gillies D, et al. The role of carbohydrate on the biological activity of erythropoietin. Glycoconiougate J 1993; 10: 263 (Abstract).
18. Dordal MS, Wang FF, Goldwasser E. The role of carbohydrate in erythropoietin action. Endocrinology 1985; 116: 2293-9.
19. Jelkmann W. The enigma of the metabolic fate of circulating erythropoietin (Epo) in view of the pharmacokinetics of the recombinant drugs rhEpo and NESP. Eur J Haematology 2002; 69: 265-274.
20. Mackiewicz A, Mackiewicz K. Glycoforms of serum alpha 1-acid glycoprotein as markers of inflammation and cancer. Glycoconiougate J 1995; 12: 241-7.
21. Lin FK, Suggs S, Lin CH, et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82: 7580-4.
22. Eschbach JW, Egrie JC, Downing MR, et al. Corrections of anaemia of end stage renal disease with recombinant human erythropoietin: Results of a phase I and II clinical trial. N Engl J Med 1987; 316: 73-8.
23. Winearls CG, Oliver DO, Pippard MJ, et al. Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anemia of patients maintained by chronic haemodialysis. Lancet 1986; 2: 1175-8.
24. Rutkowski B, Kubiak W, Rutkowski P i wsp. Od odkrycia erytropoetyny do jej zastosowań klinicznych. W: Erytropoetyna – od odkrycia do zastosowań klinicznych. B. Rutkowski (red.). Wydawnictwo Medyczne MAKmed, Gdańsk, 2001: 16-25.
25. Skibeli V, Nissen-Lie G, Torjesen P. Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. Blood 2001; 98: 3626-34.
26. Schmidt CA, Ramos AS, Silva JE, et al. Activity evaluation and characterization of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical products. Arq Bras Endocrinol Metab 2003; 47: 183-9.
27. Middleton SA, Barbone FP, Johnson DL. Shared and unique determianats of the erythropoietin (EPO) receptor are important for binding EPO and Epo mimetic peptide. J Biol Chem 1999; 274: 14163-9.
28. Johnson DL, Middleton SA, McMahon F, et al. Refolding, purification, and characterization of human erythropoietin binding protein produced in Escherichia coli. Protein Expr Purif 1996; 7: 104-13.
29. Wrighton NC, Farrell FX, Chang R, et al. Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. Science 1996; 273: 458-64.
30. Naranda T, Kaufman RI, Li J, et al. Activation of erythropoietin receptor through a novel extracellular binding site. Endocrinology 2002; 143: 2293-302.
31. Naranda T, Wong K, Kaufman RI, et al. Activation of erythropoietin receptor in the absence of hormone by a peptide that binds to a domain different from the hormone binding site. Mol Cell Biol 1999; 14: 2266-77.
32. Elliott SG, Lorenzini T, Strickland T, et al. Rational design of novel erythropoiesis stimulating protein (ARANESP) a super-sialylated molecule with increased biological activity (Abstract 352). Blood 2000; 96: 82.
33. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 10526-31.
34. Leist M, Ghezzi P, Grasso G, et al. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. Science 2004; 305: 239-42.
35. Rizzuto G, Cappelletti M, Mennuni C, et al. Gene electrotransfer results in a high-level transduction of rat skeletal muscle and corrects anemia of renal failure. Hum Gene Ther 2000; 11: 1891-900.
36. Szulc J. Regulacja ekspresji genu erytropoetyny wprowadzonego do tkanki mięśniowej dla celów terapii genowej. Rozprawa doktorska. Poznań, 2001.
37. Maione D, Wiznerowicz M, Delmastro P, et al. Prolonged expression and effective readministration of erythropoietin deliverd with a fully deleted adenoviral vector. Hum Gene Ther 2000; 11: 859-68.
38. Morreale A, Plowman B, DeLattre M, et al. Clinical and economic comparison of epoetin α and darbepoetin α. Curr Med Res Opin 2004; 20: 381-95.
39. Cheung W, Minton N, Gunawardena K. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of epoetin alfa onece weekly and three times weekly. Eur J Clin Pharmacol 2001; 57: 411-8.
40. Gabrilove JL, Cleeland CS, Livingstone RB, et al. Clinical evaluation of once-weekly dosing of epoetin alfa in chemotherapy patients: improvement in hemoglobin and quality of live are similar to three-times-weekly dosing. J Clin Oncol 2001; 19: 2875-82.
41. Locatelli F, Olivares J, Walker R, et al. Novel erythropoiesis stimulating protein for treatment of anemia in chronic renal insufficiency. Kidney Int 2001; 60: 741-7.
42. Glaspy JA, Jadeja JS, Justice G, et al. A randomized, active-control, pilot trial of front-loaded dosing regimens of darbepoetin-alfa for the treatment of patients with anemia during chemotherapy for malignant disease. Cancer 2003; 97: 1312-20.
43. Chamberlain P. Immunogenicity of therapeutic proteins. Part 1. Causes and clinical manifestations of immunogeneicity. Reg Rev 2002; 5: 4-9.
44. Koren F, Zukerman LA, Mire-Sluis AR. Immune responses to therapeutic proteins in humans – clinical significance, assessment and prediction. Curr Pharm Biotechnol 2002; 3: 349-60.
45. Bennett Ch, Luminari S, Nissenson AR, et al. Pure red-cell aplasia and epoetin therapy. N Eng J Med 2004; 351: 1403-8.

Adres do korespondencji

prof. dr hab. med. Andrzej Mackiewicz
Zakład Immunologii Nowotworów
Katedra Onkologii
Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego
Wielkopolskie Centrum Onkologii
ul. Garbary 15
61-866 Poznań
e-mail: andrzej.mackiewicz@wco.pl