

ERYTHROPOETINY V TERAPII Z POHLEDU FARMACEUTICKÉHO CHEMIKA

OLDŘICH FARSA a PETER ZUBÁČ

Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1946/1, 612 42 Brno
farsao@vfu.cz

Došlo 10.3.18, přepracováno 18.1.19, přijato 21.3.19.

Klíčová slova: bioléčiva, hematopoetické faktory, erythropoetin

Obsah

1. Úvod
2. Otázky nomenklatury
3. Faktory stimulující tvorbu erytrocytů
4. Biosimilars
5. Závěr

1. Úvod

Látky stimulující tvorbu různých typů krevních buněk jsou významnými léčivy, používanými u závažných patologických stavů. Ze strukturního pohledu patří naprostá většina z nich mezi tzv. bioléčiva či prostředky biologické léčby neboli, dle definice terminologické komise Světové zdravotnické organizace (WHO), mezi biologické a biotechnologické substance¹. Jde totiž převážně o proteiny s relativní molekulovou hmotností mezi 14 000 a 19 000, u glykosylovaných proteinů, mezi něž patří i erythropoetiny, až do 31 000. Přípravují se převážně rekombinantní technologií v modifikovaných savčích buňkách, přitom je možné setkat se i s polysyntetickou obměnou, jakou je pegylace.

2. Otázky nomenklatury

Nomenklaturní komise WHO ve svém dokumentu International Nonproprietary Names (INN) for biological and biotechnological substances (a review)¹ stanovuje pro stimulatory tvorby červených krvinek koncovku -poetin. Jednotlivé erythropoetiny, lišící se cukernou složkou, se pak dle této normy označují názvem epoetin následovným hláskovaným písmenem řecké abecedy (např. epoetin delta).

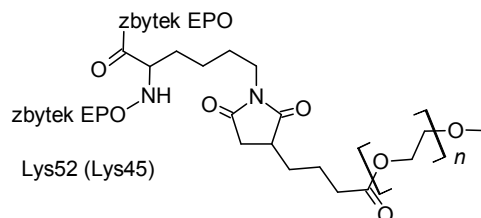
3. Faktory stimulující tvorbu erytrocytů

Erythropoetin (EPO) je glykosylovaný protein přirozeně tvořený v peritubulárních intersticiálních buňkách ledvin dospělých jedinců a v játrech u plodu. Jeho sekven- ce čítá 165 aminokyselinových zbytků, M_r průměrně glykosylovaného přirozeného hormonu (též urinární humánní erythropoetin – uhEPO) je asi 30 400–30 600. Ve struktuře jsou dva disulfidové můstky, a to Cys7-Cys161 a Cys29-Cys33. Tři místa *N*-glykosylace se nacházejí na Asn24, Asn38 a Asn83, jedno místo *O*-glykosylace je pak na Ser126. Nejrozšířenějšími oligosacharidy připojenými na atomy dusíku Asn jsou diantennární, 2,4-rozvětvené triantennární, 2,6-rozvětvené triantennární a tetraantennární řetězce (v poměru cca 7 : 6 : 5 : 82), přičemž poslední jmenované obsahují nula až tři opakující se *N*-acetyl-laktosaminové jednotky v dobře definovaných rozvětveních. Většina (> 95 %) di-, tri- a tetraantennárních struktur je plně sialylována, tj. mají dva, tři nebo čtyři zbytky sialové (*N*-acetyl- α -D-neuraminové) kyseliny, jež jsou připojeny výlučně α -(2→3) vazbou k D-galaktosovým zbytkům. Většina struktur napojených na atomy dusíku (> 95 %) obsahuje L-fukosu připojenou vazbou α -(1→6) na proximální zbytek *N*-acetylglukosaminu. Na kyslík Ser126 je vázán zbytek *N*-acetylgalaktosaminu, na nějž je vazbou β -(1→3) připojena D-galaktosa. Na ni může být ještě vazbou α -(2→3) připojen zbytek sialové kyseliny, zatímco na prvním *N*-acetylgalaktosaminu může být vytvořeno rozvětvením napojením sialové kyseliny vazbou α -(2→3) (cit.^{2,3}). Cukerná složka hraje důležitou roli v biologických aktivitách EPO *in vitro* i *in vivo*, biologickém poločase EPO v krevním oběhu i jeho biosyntéze, sekreci a stabilitě. Isoformy s vyšším obsahem sialové kyseliny vykazují *in vitro* vyšší aktivitu a *in vivo* delší biologický poločas. Sialylace preterminálních galaktosylových zbytků je nutná pro ochranu před rychlým odbouráváním v játrech, zatímco tetraantennární *N*-glykanové řetězce před rychlým vylučováním ledvinami. Poměr tetraantennárních glykanů ku biantennárním je přímo úměrný aktivitě *in vivo*⁴. Pro terapeutické účely je EPO produkován metodou založenou na rekombinantní DNA převážně v buňkách hlodavců. Rekombinantní EPO byl poprvé podán pacientům v roce 1985 (cit.⁵). Český a Evropský lékopis nedefinují vlastně EPO jako takový, ale obsahují článek *Erythropoietini solutio concentrata* (koncentrovaný roztok erythropoetinu), který je zde definován jako roztok obsahující skupinu blízkce příbuzných glykoproteinů, které nejsou rozlišitelné od přirozeného lidského erythropoetinu (uhEPO) z hlediska pořadí 165 aminokyselin a jejich průměrného profilu glykosylace^{6,7}. S lékopisným EPO je nejsnáze ztotožnitelný erythropoetin α , pro nějž byl zaveden INN název epoetin

alfa¹. Kromě léčebných účelů je zneužíván k dopingování sportovců⁸. Jeho podání má totiž stejný efekt jako trénink ve vysokých horách; dochází ke zmožení erytrocytů a tím k lepšímu oxykličení svalstva^{9,10}. Jde v podstatě o látku tělu vlastní, proto je přítomnost „přidaného“ epoetinu alfa hůře zjištělná než přítomnost dopingových látek charakteru malých molekul. Usuzovat na zneužití epoetinu lze i z vývoje zastoupení hemoglobinu a retikulocytů v krvi v průběhu 25 dnů⁸. K okamžitému zjištění přítomnosti přidaného epoetinu lze použít metody založené na gelové elektroforéze⁹. Zde se dostáváme k relativitě lékopisného požadavku na shodu „průměrného profilu glykosylace“ s uhEPO, poněvadž glykosylace rekombinantně vyráběných epoetinů alfa se chtě nechtě poněkud liší od uhEPO vylučovaného lidskými ledvinami. Japonský lékopis se k těmto otázkám staví jinak než Český a Evropský, a v samostatných člancích Epoetin Alfa (Genetical Recombination) a Epoetin Beta (Genetical Recombination) přímo charakterizuje zmíněné dva epoetiny³. U nás je v současnosti epoetin alfa registrován v přípravcích Abseamed[®], Binocrit[®], Epoetin alfa Hexal[®] a Eporex[®]. Stejně jako jiná léčiva charakteru proteinů, i epoetiny lze podávat pouze parenterálně, konkrétně intravenózně (*i.v.*) nebo subkutánně (*s.c.*), v zaživacím traktu se rozkládají. Dodávají se buď jako lyofilizované prášky pro přípravu injekčního roztoku doplněné ampulí s rozpouštědlem¹¹ nebo jako roztoky v předplněných injekčních stříkačkách¹². Jsou schváleny k léčbě symptomatické anemie spojené s chronickým renálním selháním, při protinádorové chemoterapii nemyeloidních malignit nebo i pro zvýšení počtu erytrocytů před odběrem krve k autotransfuzi¹⁰. Epoetiny beta, gama, delta, epsilon, zeta, théta, kapa a omega se od epoetinu alfa liší „pouze“ profilem glykosylace. Jsou rozlišitelné pomocí elektromigračních metod, např. kapilární zónové elektroforézy (CZE), gelové elektroforézy (typicky na polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným – SDS-PAGE)¹³ nebo izoelektrické fokusace¹⁴, které jsou však citlivé hlavně na změny v sialylaci, nebo přesněji pomocí chromatografických metod spojených s hmotnostní spektroskopií, např. HPLC na reverzní fázi kombinovaná s hmotnostní spektrometrií s elektrosprejovou ionizací a kvadrupólem s následným měřením doby letu (electrospray ionisation – quadrupole time of flight mass spectrometry – RP-HPLC/ESI-QTOF-MS). Je však třeba mít na paměti, že se jedná vždy o směsi řetězců o různé glykosylaci a liší se jejich kvantitativní zastoupení³. Sekvence 165 aminokyselin lidského erythropoetinu zůstává stále zachována. Přesto nejsou epoetiny beta až omega většinou považovány za tzv. biosimilars epoetinu alfa, ale většinou za tzv. inovátorské produkty, v podstatě tedy originální léčiva¹⁵. Epoetin beta (Neorecormon[®]) má podobné použití jako epoetin alfa¹⁰. Rozdíly v glykosylaci oproti epoetinu alfa umožňují rozlišení obou látek pomocí 2D gelové elektroforézy, HPLC na reverzní fázi (RP-HPLC) s detekcí hmotnostní spektrometrií s měřením doby letu (TOF MS) pak naznačuje celkově vyšší lipofilitu epoetinu beta oproti epoetinu alfa a také převahu řetězců s vyššími M_r u epoetinu beta⁸. Polosynteticky modifikova-

ným pegylovaným analogem epoetinu beta je methoxy-polyethylenglykol-epoetin beta. Molekulová hmotnost aglykonu je připojením polyethylenglykolového (PEG) řetězce zvětšena na asi 60 000. Jeden methoxy-PEG polymerní řetězec je zde napojen na terminální ϵ -aminoskupinu Lys52 nebo Lys45 pomocí tzv. monoamidové spojky. Konkrétně je dusík příslušné aminoskupiny uzavřen do fragmentu sukcinimidylmáslé kyseliny, přesněji 3-(2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)butanové kyseliny, jejíž karboxyl je pak esterifikován zmíněným PEG řetězcem, zakončeným methoxyskupinou (obr. 1).

V důsledku pegylace má látka biologický poločas asi 139 hodin, tedy výrazně delší než uhEPO nebo nekonjugovaný epoetin alfa, u nichž se pohybuje v rozmezí 4–8 hodin (cit.^{5,12}). Proto je označována jako kontinuální aktivátor erythropoetinového receptoru (continuous erythropoietin receptor activator, CERA)¹⁶. Přípravek Mircera[®] má obdobné použití jako ostatní epoetiny¹⁷. Epoetin gama (TYB-5220) je produkován v myších buňkách označovaných jako C127 transfekovaných cDNA pro uhEPO. M_r glykoproteinu se pohybuje mezi 28 000 a 31 000, izoelektrický bod v rozmezí 3,5–4,5 (cit.¹⁸). Látka prošla preklinickým zkoušením a dostala se do první fáze klinického hodnocení. Zde vykazovala plazmatická koncentrace látky po *i.v.* podání nezvyklý dvoufázový průběh s plazmatickými poločasy α -fáze 4,5–9,9 min a β -fáze 59,9–169,2 min (cit.¹⁹). Do terapeutické praxe látka nepronikla, nevyhnuło se jí však zneužití v dopingování¹⁹. Epoetin delta (Dynepo[®]) je produkován v buněčné kultuře lidského fibrosarkomu. Od ostatních rekombinantních epoetinů se liší nižším zastoupením *O*-acetylových skupin v *O*-glykanovém řetězci, čímž se blíží struktuře přirozeného uhEPO, takže byl jako doping hůře zjištělný. V posledních letech byla ale vypracována mj. hmotnostně-spektrometrická metoda s vysokým rozlišením, využívající systém LTQ-Orbitrap[®] a studující tryptický štěp – *O*-glykopeptid Glu117-Arg131, kde je patrný rozdíl v *O*-acetylaci sialové kyseliny oproti uhEPO (cit.²⁰). Epoetin gama měl stejné indikace jako ostatní epoetiny, jeho registrace v EU však byla v r. 2009 zrušena na základě žádosti výrobce, k níž ho vedly „komerční důvody“²¹. Epoetin epsilon má přiděleno CAS 154725-65-2 a je označován „1-165-Erythropoietin (human clone lambdaHEPOFL 13 protein moiety), glycoform epsilon“²². Látka má kromě doporučeného INN názvu, přiděleného v r. 1995 (cit.²²), též JAN (nechráněný



Obr. 1. Napojení ω -methoxy-PEG řetězce přes ϵ -aminoskupinu Lys52 nebo Lys45 na epoetin beta

název účinné látky platný v Japonsku) „epoetin epsilon (genetical recombination)²³. Jakékoliv bližší strukturní či terapeutické informace o této látce jsou však prakticky nedohledatelné. Epoetin zeta (Retacrit[®], Silapo[®]) je naproti tomu registrován v řadě evropských zemí od r. 2007, nikoliv v USA²⁴. Přípravek Retacrit[®] se při analýze kapilární elektroforézou s UV detekcí (CE-UV) za podmínek uvedených v lékopisném článku⁶ rozdělil, stejně jako epoetin alfa, na 6 isoform, přičemž u něho převažovala isoforma 6. U dvou preparátů epoetinu alfa Eporex[®] a Binocrit[®] dominovala isoforma 5, zatímco u epoetinu delta, přípravku Dynepo[®], bylo nalezeno dokonce 9 isoform¹². Lékopisný článek zde přitom očekává rozdělení pouze na 8 isoform. Lze tedy zhruba říci, že profil glykosylace a zejména sialylace epoetinu zeta se dosti podobá epoetinu alfa. Indikace jsou obdobné jako u ostatních epoetinů. Epoetin théta (Biopoin[®], Eporatio[®]), látka německého původu, je registrován Evropskou lékovou agenturou (EMA) od r. 2009 s indikacemi obdobnými jako jiné epoetiny. Podíl sacharidové složky je u této látky kolem 40 % molekulové hmotnosti²⁵. Epoetin kapa (Epoetin alfa BS injection[®]) byl uveden na trh v Japonsku^{9,26} v r. 2010. Jak naznačuje název přípravku, byl vyvinut jako biosimilar – kopie epoetinu alfa, konkrétně přípravku Espo[®] (cit.¹⁹), profil jeho glykosylace je ale natolik odlišný, že mu byl přidělen samostatný INN název. Epoetin omega (Epomax[®], Hemax[®]) je vyráběn procesem, který popsali Powell a spol.^{27,28} už v r. 1986. Na rozdíl od většiny ostatních epoetinů je produkován v kultuře z buněk ledvin mláďat křečička čínského (v tzv. BHK-21 buňkách). Od EPOa se liší větší sialylací tetraantennárních na dusík připojených řetězců a nižším výskytem *O*-glykosylace na Ser126 (jen 60 % ve srovnání s > 95 % u epoetinu alfa). Místně specifická glykosylace Asn24, Asn38 a Asn83 je rovněž rozdílná²⁹. Má zřetelně vyšší biologickou dostupnost i antianemický efekt ve vztahu k podané dávce při *s.c.* podání³⁰. Stejně jako většině epoetinů, ani jemu se nevyhnulo zneužití jako dopingové látky⁷. Darbepoetin alfa (Aranesp[®]) je rekombinantní analog epoetinu alfa, od kterého se liší záměnou pěti aminokyselinových zbytků, konkrétně byly do příslušných pozic vneseny Asn30, Thr32, Val87, Asn88 a Thr90. Na obou Asn vznikla dvě nová místa pro *N*-glykosylaci, takže *N*-připojených sacharidových řetězců je celkem 5 (u epoetinu jen 3). Celková M_r glykoproteinu se pohybuje v rozmezí 30 000–37 000. Má obdobné indikace jako epoetiny. Aranesp[®] je registrován v USA i EU od r. 2001 (cit.³¹). Peginesatid (Omontys[®]) je syntetický agonista EPO receptoru, jeho primární struktura se však nepochybně podobá struktuře epoetinů. Byl vyvinut rovněž k léčbě anemie spojené se symptomatickým onemocněním ledvin u dospělých pacientů podstupujících dialýzu. Je to neglykosylovaný kovalentní dimer složený ze dvou totožných peptidových řetězců. Spojku mezi nimi tvoří fragment iminodioctové kyseliny, k jejímž karboxylům jsou řetězce připojeny koncovými aminoskupinami svých C-terminálních lysinamidů. Dusík iminodioctové kyseliny je pak substituován zbytkem *N*⁷,*N*⁶-dikarboxylsínu, jehož oba karboxyly jsou esterifikovány PEG řetězci, zakončenými methoxyskupinami.

Každý z peptidových řetězců obsahuje kromě zbytků přirozených proteinogenních aminokyselin také fragment naftalen-1-ylalaninu. Tento fragment je součástí dekapetidového cyklu, uzavřeného disulfidovými můstky mezi rezidui Cys v každém z řetězců³². Celková M_r PEG řetězců je asi 40 000, M_r peptidové části bez PEG řetězců pak 5174. Peginesatid byl krátce používán v USA a v EU podstoupil u EMA registrační řízení pro výše uvedenou indikaci, v roce 2013 byl ale stažen z amerického trhu a následně z evropského registračního procesu zejména pro zjištěné zvýšené riziko úmrtí z kardiovaskulárních příčin a nebezpečné alergie³³.

4. Biosimilars

Čtenáře z chemického prostředí možná překvapil fakt, že zatímco v těle se nám vytváří, aspoň zdánlivě, vždy pouze jediná hormonálně účinná látka, např. uhEPO, terapeuticky užívaných cytokinů s ním více či méně totožných může být celá řada, což je skvěle vidět právě u epoetinů. Stejně jako u klasických léčiv charakteru malých molekul, i u bioléciv celá řada menších firem čeká, až vyprší platnost patentu na originální přípravek, aby se mohla vrhnout do výroby levnějších kopií. V případě malých molekul jsou to tzv. generika, přípravky obsahující stejné množství stejné účinné látky ve stejné lékové formě (ovšem stejné po stránce vlastností, složení např. tablety z hlediska použitých pomocných látek být stejně nemusí). Podmínkou schválení generika pro uvedení na trh je hlavně tzv. bioekvivalence, tedy schopnost uvolnit do těla za stejných podmínek zhruba stejné množství účinné látky, jaké uvolní originál. Totožnost účinné látky je zde jasně definována její chemickou strukturou. U bioléciv lze ovšem těžko hovořit o tom, že dva různé přípravky různých výrobců obsahují stejnou účinnou látku, otázkou je, „jak moc“ jsou účinné látky stejné. Proto se zde užívá termín biosimilars (oficiální termín v EU, v terminologii WHO similar biopharmaceutical products – SBP nebo v USA follow-on protein products³⁴). Má-li být látka v EU schválena jako biosimilar, musí vykazovat vysokou míru shody fyzikálních, chemických a biologických vlastností s referenčním léčivem (tj. původní schválenou látkou, typicky tou, jejíž patent vypršel; tzv. „originator“ nebo „innovator product“). Jsou přípustné drobné odlišnosti od referenčního léčiva, ty však nesmějí mít vliv na účinnost ani bezpečnost při klinickém užití. Zejména jde o otázky imunogenicity. V terapeutické použitelnosti nemají být žádné rozdíly. Klinické ověření terapeutické shodnosti potenciálního biosimilars s referenční látkou smí být provedeno pouze v některé z jeho léčebných indikací, účinnost v ostatních se předpokládá na základě extrapolace, pokud pro ni existují dostatečné vědecké důkazy³⁵. Variabilita ve složení mezi jednotlivými šaržemi (výrobními dávkami) schvalovaného biosimilars nesmí ovlivňovat jeho bezpečnost a účinnost a má se pohybovat ve stejném rozpětí jako u referenčního přípravku³⁶. Přitom je zajímavé, že referenční léčivo a jeho biosimilar nemusejí mít shodný INN název, např. dvě

biosimilars originálního epoetinu alfa (Eprex[®]) obsahují epoetin zeta (Retacrit[®], Silapo[®])¹⁹ a jedno epoetin kapa (Epoetin alfa BS injection[®])¹¹. Pravidla pro registraci bioléciv jako biosimilars, podobná těm v EU, platí též např. v USA, Japonsku, Kanadě, Austrálii a Jižní Koreji³⁷. Naproti tomu registrační úřady mnoha zemí registrují kopie zavedených bioléciv jako zcela nová léčiva a registraci kopií typu biosimilars zavádějí postupně, např. v Indii v roce 2016 (zde jim říkají „similar biologics“)³⁸. Americký Food and Drug Administration (FDA), který byl prvním, jenž registroval bioléciva, a snažil se pomocí různých programů jejich schvalování usnadnit, byl dlouho k biosimilars poněkud skeptický a s jejich registrací začal až v roce 2015, ačkoliv jeho experti dlouhodobě spolupracují s odborníky na tuto problematiku z EMA v rámci společného klastru (biosimilars cluster), do něhož později vstoupili i experti z Health Canada a japonské Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA)³⁹, a předpoklady pro vědeckou⁴⁰ a kvalitativní analytickou⁴¹ demonstraci biosimilarity měli dávno zpracované. Biosimilars, vzhledem k jejich nižší ceně ve srovnání s originály, představují každopádně vhodnou terapeutickou alternativu, díky níž se může dostat biologické terapie širšímu okruhu pacientů, než kdyby byly používány pouze inovátorské produkty, i když pokles ceny oproti originálu není tak výrazný, jako u klasických generik⁴².

6. Závěr

Stimulátory tvorby červených krvinek představují významnou skupinu léčiv, často život zachraňujících. S jedinou výjimkou, kterou je již neužívaný syntetický pegisenatid, se jedná o rekombinantně vyráběné glykoproteiny, které mohou být modifikovány konjugací s PEG.

Seznam zkratk

CE-UV	kapilární elektroforéza s UV detekcí
CERA	continuous erythropoietin receptor activator
CZE	kapilární zónová elektroforéza
EMA	European Medicines Agency, Evropská léčivá agentura
EPO	erythropoetin, epoetin
ESI-QTOF-MS	electrospray ionisation – quadrupole time of flight mass spectrometry; hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací a kvadrupólem s následným měřením doby letu
FDA	Food and Drug Administration, Úřad pro potraviny a léky (USA)
INN	international non-proprietary name(s), mezinárodní nechráněný/é název (názvy)
i.v.	intravenózní(ě), nitrožilní(ě)
JAN	Japanese Accepted Names, japonské

PEG	národní nechráněné názvy léčiv polyethylenglykol(ový)
PMDA	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, Agentura pro léčiva a lékařská zařízení (JP)
RP-HPLC	HPLC na reverzní fázi
SBP	similar biotherapeutic products
s.c.	subkutánní(ě), podkožní(ě)
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným
uhEPO	urinární humánní erythropoetin
WHO	World Health Organisation, Světová zdravotnická organizace

LITERATURA

1. World Health Organisation: *International Nonproprietary Names (INN) for biological and biotechnological substances (a review)*, WHO, Ženeva 2016. <https://www.who.int/medicines/services/inn/BioReview2016.pdf>, staženo 29. 9. 2017.
2. Watson E., Bhide A., van Halbeek H.: *Glycobiology* 4, 227 (1994).
3. Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan: *The Japanese Pharmacopoeia – 17. vyd. anglická verze* (2016). <http://jpdn.nihs.go.jp/jp17e/000217653.pdf>, staženo 11. 1. 2019.
4. Harazono A., Hashii N., Kuribayashi R., Nakazawa S., Kawasaki N.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 83, 65 (2013).
5. Winearls C.: *Nephrol. Dial. Transplant.* 13 (Suppl2), 3 (1998).
6. Ministerstvo zdravotnictví ČR: *Český lékopis 2017*, Grada, Praha 2017.
7. European Directorate for Quality of Medicines and Health Care: *European Pharmacopoeia – 9. vyd. s dodatkem 9.5* (2018). <http://online6.edqm.eu/ep905/>, staženo 11. 1. 2019.
8. Bejder J., Aachmann-Andersen N. J., Bonne T. C., Olsen N. V., Nordborg N. B.: *Drug Test. Anal.* 8, 1049 (2016).
9. Caldini A., Moneti G., Fanelli A., Bruschetini A., Mercurio S., Pieraccini G., Cini E., Ognibene A., Luceri F., Messeri G.: *Proteomics* 3, 937 (2003).
10. Okano M., Sato M., Kaneko E., Kageyama S.: *Drug Test. Anal.* 3, 798 (2011).
11. http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000116/WC500024979.pdf, staženo 15. 10. 2017.
12. http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000727/WC500020661.pdf, staženo 18. 4. 2018.
13. Brinks V., Hawe A., Basmeleh A. H. H., Joachin-Rodriguez L., Haselberg R., Somsen G. W., Jiskoot W., Schellekens H.: *Pharm. Res.* 28, 386 (2011).
14. Reichel C.: *Drug Test. Anal.* 4, 728 (2012).
15. <http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/>

- biological_therapeutics/TRS_977_Annex_2.pdf?ua=1, staženo 8. 1. 2018.
16. Topf J. M.: *Expert Opin. Pharmacother.* 9, 839 (2008).
 17. http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000739/WC500033672.pdf, staženo 24. 11. 2017.
 18. Miyashita M., Michibuchi K., Tominaga T., Kamiya T., Saiki N., Kitaura I., Komazawa T., Miki N.: *Yakuri to Chiryō* 18, Suppl. 8, S2061 (1990); *Chem. Abstr.* 115:1773 (1990).
 19. Nakashima M., Kanamaru M., Nagashima S., Okumura K., Aoki S.: *Yakuri to Chiryō* 18, Suppl. 5, 1215 (1990); *Chem. Abstr.* 113:224059 (1990).
 20. Reichel C.: *Drug Test. Anal.* 5, 877 (2013).
 21. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Public_statement/2009/11/WC500011292.pdf, staženo 8. 11. 2017.
 22. <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/154725-65-2>, staženo 5. 1. 2018.
 23. http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?hsa:2057+H00236+D03231+D03232+D03651+D04032+D09737+D09946+D09947+D09998+D10000, staženo 5. 1. 2018.
 24. http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000872/WC500054377.pdf, staženo 16. 5. 2018.
 25. Klener P.: *Remedia* 21, 212 (2011).
 26. Kawasaki A., Mukai K., Kirihara S.: (JCR Pharmaceuticals) US 20110105734 (C12P 21/00).
 27. Powell J. S.: (University of Washington) US 5 688 679 (C12N 15/27).
 28. Powell J. S., Berkner K. L., Lebo R. V., Adamson J. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 6465 (1986).
 29. Nimtz M., Martin W., Wray V., Kloppel K. D., Augustin J., Conradt H. S.: *Eur. J. Biochem.* 213, 39 (1993).
 30. Milutinović S., Plavljančić E., Trkulja V.: *Fundam. Clin. Pharmacol.* 20, 493 (2006).
 31. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/bla/2002/103951Orig1s5001.pdf, staženo 22. 12. 2017.
 32. <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/913976-27-9>, staženo 30. 10. 2017.
 33. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Medicine_QA/2013/06/WC500144933.pdf, staženo 30. 10. 2017.
 34. http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/biological_therapeutics/TRS_977_Annex_2.pdf?ua=1, staženo 20. 2. 2018.
 35. Weise M., Kurki P., Wolf-Holz E., Bielsky M.-C., Schneider C. K.: *Blood* 124, 3191 (2014).
 36. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Leaflet/2017/05/WC500226648.pdf, staženo 9. 2. 2018.
 37. Thorpe R., Wadhwa M.: *GaBI J.* 1, 132 (2012).
 38. <http://www.cdsc.nic.in/writereaddata/CDSCO-DBT2016.pdf>, staženo 20. 2. 2018.
 39. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Work_programme/2009/11/WC500014447.pdf, staženo 20. 2. 2018.
 40. <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm291128.pdf>, staženo 20. 2. 2018.
 41. <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm291134.pdf>, staženo 20. 2. 2018.
 42. Manova M., Savova A., Vasileva M., Terezova S., Kamusheva M., Grekova D., Petkova V., Petrova G.: *Front. Pharmacol.* 9, 1070 (2018).
- O. Farsa and P. Zubáč** (*Department of Chemical Drugs, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno*): **Erythropoietins in Therapy from the Point of View of a Medicinal Chemist**
- Hematopoietic growth factors are cytokines which stimulate growth of hematopoietic pluripotent stem cells and their differentiation and maturation into fully functional blood cells, either erythrocytes or various types of white blood cells. Erythropoietin is a glycosylated peptide hormone which stimulates production of red blood cells. It is used for treatment of anaemia caused by a chronic kidney failure. For therapeutic purposes, it is produced by recombinant technologies predominantly using modified mammalian cells. This procedure leads, however, to peptides of the same sequence of 165 amino acids but with different glycosylation patterns. These different mixtures of erythropoietin glycoforms have been designated with different INN names epoetin alfa – omega. Peginesatid (Omontys®) is a synthetic erythropoietin receptor agonist, the structure of which does not match that of erythropoietin. It has been abandoned due to an increased mortality from cardiovascular reasons and due to dangerous allergies.
- Keywords: biological therapeutics, haematopoietic factors, erythropoietin