

На правах рукописи

Тутер Елена Александровна

**ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ИЗУЧЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ
АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ
МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ В ДОКЛИНИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЯХ КАК БАЗОВЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ ИХ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ АНАЛОГИЧНОСТИ**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Волгоград – 2017

Работа выполнена в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Васильев Андрей Никифорович

Официальные оппоненты:

Артюшкова Елена Борисовна – доктор биологических наук, директор Института экспериментальной медицины ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России

Наровлянский Александр Наумович – доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории цитокинов ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

Ведущее учреждение:

ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России

Защита диссертации состоится «__» _____ 2017 г. в ____ часов на заседании Диссертационного Совета Д 208.008.02 при ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России по адресу: г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте (www.volgmed.ru) ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь Диссертационного Совета,
доктор биологических наук

Бугаева Любовь Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В настоящее время особую актуальность приобретает разработка инновационных лекарственных препаратов (ЛП) и ускоренное внедрение новых фармакотерапевтических подходов в практическое здравоохранение [Петров В.И., 2011]. Особый интерес отечественных и зарубежных разработчиков вызывают инновационные биотехнологические ЛП, созданные на основе моноклональных антител (мАТ), которые применяются для лечения онкологических, аутоиммунных, аллергических и других заболеваний [Морозов Д.В., 2016; Иванов А.А. и др., 2011; Ягудина Р.И. и др., 2013; Авдеева Ж.И. и др., 2014; Орлов С.В., Шимановский Н.Л. и др., 2016], и область их клинического применения постоянно расширяется [Sabatine M.S. et al., 2015].

Оригинальные биотехнологические ЛП на основе мАТ являются весьма эффективными, но имеют высокую стоимость. Подсчитано, что средняя стоимость лечения для оригинальных ЛП, полученных методом химического синтеза, составляет около 1 долл. в сутки, а соответствующим генерическим препаратом всего несколько центов в сутки, в то время как при применении оригинальных биотехнологических препаратов средняя стоимость лечения составляет 22 долл. в сутки [McCamish M. et al., 2011]. Поэтому очевидно, что выполненная на высоком научно-методическом уровне разработка и рациональное применение аналогичных биотехнологических ЛП позволит снизить стоимость лечения пациентов с социально значимыми заболеваниями [Зырянов С.К., Белоусов Ю.Б., 2011].

На сегодняшний день в Российской Федерации из 37 зарегистрированных ЛП мАТ и их производных (-цепт молекулы) 5 являются биоаналогами – это 2 биоаналога ритуксимаба, а также биоаналоги инфликсимаба, бевацизумаба и трастузумаба [Государственный реестр лекарственных средств Российской Федерации, ГРЛС РФ, 2016].

Такие мАТ, как бевацизумаб, ритуксимаб и трастузумаб входят в Перечень стратегически значимых лекарственных средств, производство которых должно быть обеспечено на территории Российской Федерации [«Перечень стратегически значимых лекарственных средств, производство которых должно быть обеспечено на территории Российской Федерации», 2015].

Кроме того, согласно Плану мероприятий по импортозамещению в отрасли фармацевтической промышленности [Приказ «Об утверждении отраслевого плана мероприятий по импортозамещению в отрасли

фармацевтической промышленности Российской Федерации», 2015], до 2020-2023 годов должна сократиться доля импорта следующих мАТ: трастузумаба, бевацизумаба, инфликсимаба, ранибизумаба, экулизумаба, адалимумаба, цетуксимаба, этанерцепта, тоцилизумаба, абатацепта, базиликсимаба, устекинумаба, цертолизумаба пэгола, натализумаба, ритуксимаба, паливизумаба.

Таким образом, в свете указанных нормативных документов, разработка биоаналогичных мАТ является особенно актуальной.

Степень разработанности проблемы

Изучение сравнительной специфической активности биоаналогов как первичного доказательства их фармакологических свойств и соответствия по данному показателю оригинальному ЛП на этапе доклинического изучения, является одним из важных этапов подтверждения биоаналогичности.

В настоящее время в РФ обращение биоаналогичных ЛП регулирует Федеральный закон № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» от 12 апреля 2010 года, в котором отсутствуют конкретные требования по подтверждению, в частности, сопоставимой специфической активности биоаналогичных мАТ. Кроме того, в России также отсутствуют нормативно-правовые акты, регламентирующие требования к доказательству биоаналогичности с учетом международного опыта, которые бы носили обязательный характер [Васильев А.Н., 2012].

Отсутствие в России конкретных рекомендаций по методам подтверждения сравнительной специфической активности биоаналогов мАТ затрудняет и затягивает разработку и последующую регистрацию таких препаратов.

В связи с вышеизложенным, определение общих принципов изучения специфической активности ЛП мАТ в доклинических исследованиях представляет собой актуальное направление научных исследований.

Цель исследования

Определить общие принципы изучения специфической активности лекарственных препаратов моноклональных антител в доклинических исследованиях.

Задачи исследования

1. На основании данных регистрационных досье установить перечни методов определения специфической активности мАТ на этапе их доклинического фармакодинамического изучения с целью подтверждения их биоаналогичности.

2. Апробировать и воспроизвести методику определения сопоставимости по специфической активности мАТ в условиях эксперимента на подходящей (релевантной) модели *in vitro* на примере ритуксимаба.
3. Разработать программу проведения сравнительного изучения специфической активности биоаналогов ритуксимаба на этапе их доклинического изучения.

Научная новизна

Впервые обобщены методы подтверждения биологической аналогичности на этапе сравнительного доклинического фармакодинамического изучения таких мАТ, заявленных к регистрации в России, как ритуксимаб, адалимумаб, инфликсимаб, бевацизумаб, трастузумаб на основании данных регистрационных досье.

Впервые, как необходимый элемент доклинического фармакодинамического изучения сопоставимости биоаналогичных мАТ в соответствии с нормативными документами РФ и требованиями Европейских руководств по биотехнологическим ЛП, апробирована и воспроизведена важная методика подтверждения сопоставимости по специфической активности биоаналогов большинства мАТ – комплемент-зависимая цитотоксичность (КЗЦ) на примере ритуксимаба.

Впервые разработана программа подтверждения сопоставимости по специфической активности на этапе доклинического фармакодинамического изучения биоаналогов ритуксимаба.

Теоретическая и практическая значимость работы

Установленные методы подтверждения биоаналогичности по специфической активности мАТ на этапе их доклинического фармакодинамического изучения могут быть использованы разработчиками на этапе планирования и реализации программы изучения сопоставимости биоаналогов мАТ и ЛП сравнения, что позволит уменьшить расходы и оптимизировать ресурсы на разработку таких дорогостоящих ЛП как мАТ.

Апробация и воспроизведение методики определения КЗЦ на примере биоаналогичного ритуксимаба подтверждает ее пригодность с целью изучения сравнительной специфической активности биоаналогов мАТ и ЛП сравнения.

Результаты настоящего исследования использованы:

- 1) на Федеральном уровне:
 - в методических указаниях по контролю качества, доклиническим и клиническим исследованиям биологически аналогичных ЛП, вошедших в «Руководство по экспертизе лекарственных средств», том I [утверждены и изданы в 2013 г.];

– в методических указаниях по разработке биоаналогичных (биоподобных) ЛП, содержащих в качестве фармацевтической субстанции мАТ, вошедших в «Руководство по экспертизе лекарственных средств», том IV [утверждены и изданы в 2014 г.].

2) на уровне Учреждения:

– в практике экспертной работы центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России [акт о внедрении от 05.07.2016 г.].

Методология и методы исследования

Проведенное исследование состояло из двух этапов – теоретического и практического.

На первом этапе был проведен анализ данных регистрационных досье биоаналогов ритуксимаба, адалимумаба, инфликсимаба, бевацизумаба и трастузумаба из информационной системы «Документооборот» ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Была использована информация о проведенных исследованиях специфической активности мАТ, представленная в разделе «Доклинические исследования» регистрационных досье.

На втором этапе исследования было проведено изучение сравнительной комплемент-зависимой цитотоксичности с целью определения специфической активности ритуксимаба. Исследование проведено на базе ООО «Международный биотехнологический центр «Генериум» (МБЦ «Генериум»).

В процессе исследования были использованы: системный и информационно-аналитический подход, общенаучные методы исследования, методы логического, документального, статистического анализа, а также контент-анализа.

Положения, выносимые на защиту

1. На основании анализа 22 регистрационных досье биоаналогов ЛП мАТ ритуксимаба (4 досье), адалимумаба (5 досье), инфликсимаба (4 досье), бевацизумаба (4 досье) и трастузумаба (5 досье) обобщены методы подтверждения специфической активности в доклинических исследованиях, которые должны включать в себя как исследования *in vitro*, так и, в случае наличия репрезентативной модели животных, исследования *in vivo*.
2. В тесте КЗЦ показана сопоставимость двух образцов биоаналогичного ритуксимаба (МБЦ «Генериум») и стандартного образца (СО)

ритуксимаба. При хранении образцов при температуре плюс 5 и минус 80°C показана высокая стабильность биоаналога.

3. Для доказательства биоаналогичности по специфической активности ритуксимаба на этапе доклинического изучения необходимы результаты исследований *in vitro*: аффинность связывания с антигеном CD20, индукция апоптоза, связывание с Fc-рецепторами, связывание с компонентом комплемента C1, индукция антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) и КЗЦ, а также исследования *in vivo*: влияние на развитие зародышевых центров в брыжеечных лимфатических узлах и селезенке у яванских макаков.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов проведенного исследования подтверждается использованием адекватных методов статистической обработки.

Основные положения и результаты исследования доложены и обсуждены на:

1. Заседании рабочей группы ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России по направлению «Биоаналоги» (Москва, 2014 год).
2. Четвертой научно-практической конференции молодых ученых ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России «Научно-методические подходы оценки качества, эффективности и безопасности лекарственных средств в Российской Федерации» (Москва, 2015 год).
3. Заседании Ученого совета ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, 2016 год).

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в выборе научного направления исследования и разработке плана исследования. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах научно-практического исследования: в ходе постановки задач, непосредственном участии их экспериментальной реализации, статистической обработке, анализе и обобщении полученных результатов. В публикациях, написанных в соавторстве, авторский вклад составляет не менее 80 %.

Связь темы диссертационной работы с планом научных работ учреждения

Диссертационная работа выполнена в соответствии с Государственным заданием, утвержденным Минздравом России, по теме «Научное обоснование методических подходов к доклиническому и клиничко-

фармакологическому изучению и экспертной оценке эффективности и безопасности лекарственных средств» (№ Государственной регистрации 01201172531).

Сведения о публикациях по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 3 статьи в журналах, включенных в перечень рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций, определенных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования и обсуждения, заключения, выводов, рекомендаций по использованию научных выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, включающего 154 источника, в том числе 106 иностранных авторов. Также диссертация включает в себя 5 приложений. Работа изложена на 137 страницах машинописного текста, содержит 16 таблиц, 15 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе представлен обзор литературы, в котором приведена информация о биоаналогичных ЛП МАТ и перспективах их разработки. Описаны биологические свойства МАТ и их производных. Представлены общие принципы подтверждения биологической аналогичности, а также особенности подтверждения биоаналогичности ЛП МАТ.

Во второй главе диссертации представлено описание материалов и методов исследования. В соответствии с поставленными задачами проведенное исследование состояло из двух этапов.

На первом этапе исследования был проведен сбор и обобщение данных, а также контент-анализ результатов доклинических фармакодинамических исследований, проведенных с целью подтверждения сопоставимости по специфической активности биоаналогичных ЛП МАТ (заявленных к регистрации в России) с соответствующим препаратом сравнения с целью установления методов подтверждения их биоаналогичности на этапе сравнительного доклинического фармакодинамического изучения.

При проведении анализа были использованы данные 22 регистрационных досье биоаналогов: ритуксимаба (4 досье), адалимумаба (5 досье), инфликсимаба (4 досье), бевацизумаба (4 досье) и трастузумаба (5 досье) из информационной системы «Документооборот» ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Для работы была использована информация о

проведенных исследованиях специфической активности биоаналогов указанных МАТ, представленная в разделе «Доклинические исследования» регистрационных досье за период, начиная с поступления первого потенциального биоаналога (ритуксимаб) на экспертизу в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (2013 год) по июль 2015 года. Доступ к указанной базе данных осуществлялся с персонального компьютера на рабочем месте.

На втором этапе исследования с целью определения специфической активности ритуксимаба было проведено изучение сравнительной КЗЦ. Указанное исследование проведено в рамках договора о сотрудничестве с ООО «Международный биотехнологический центр «Генериум» (МБЦ «Генериум»).

Исследование представляло собой изучение стабильности двух серий биоаналогичного ЛП ритуксимаба в лекарственной форме концентрат для приготовления раствора для инфузий, 10 мг/мл, разработанных и произведенных МБЦ «Генериум» (далее – Образец 1 и Образец 2). Указанные серии представляли собой серии, заложенные на хранение при различных условиях – при температуре плюс 5 (Образец 1) и минус 80 °С (Образец 2).

В качестве стандарта активности была использована одна из серий препарата ритуксимаб, концентрат для приготовления раствора для инфузий, 10 мг/мл, произведенных МБЦ «Генериум», которая при проведении сравнительных исследований в рамках подтверждения биоаналогичности как по физико-химическим свойствам, так и по результатам исследования КЗЦ в рамках изучения специфической активности была наиболее близка к оригинальному ЛП Мабтера (держатель регистрационного удостоверения – Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд., Швейцария).

Разработка методики анализа, а также его валидация проведены МБЦ «Генериум».

В работе использована линия клеток Wil2-S («ATCC® CRL-8885™», США) – клеточная линия человеческих лимфобластных клеток, экспрессирующих CD20-антиген.

Также в постановке метода КЗЦ было использовано два контроля:

1 – контроль максимального лизиса клеток с использованием агента, полностью лизирующего клетки – 5 % раствор Triton™ X-100 («Sigma-Aldrich», США);

2 – контроль спонтанной цитотоксичности сывороточного компонента – суспензия клеток с компонентом без добавления ритуксимаба.

Детектирование полученных результатов проводилось с использованием многофункционального микропланшетного ридера Infinite

M200 («Tecan», Австрия) при длине волны возбуждения/испускания 560/590 нм.

Для построения таблиц, рисунков и статистической обработки данных были использованы приложения для персонального компьютера: Microsoft Excel 2010, Microsoft Word 2010, GraphPad Prism 6, Statistica 10, R-project.

Для описания данных, полученных в ходе эксперимента по определению сравнительной КЗЦ, а именно численных оценок интенсивности флуоресценции, были использованы среднее, медиана, минимум, максимум, стандартное отклонение.

Поскольку именно IC50 (The half maximal inhibitory concentration – 50% ингибирующая концентрация) является наиболее удобной концентрацией для выявления различия между исследуемыми образцами препарата, по соответствующей данной концентрации интенсивности флуоресценции было проведено сравнение исследуемых образцов ритуксимаба и СО.

Сравнивали среднюю интенсивность флуоресценции для Образца 1 и СО, а также Образца 2 и СО с использованием t-критерия (критерия Стьюдента). Кроме того, был применен дисперсионный анализ и проведено сравнение соответственно дисперсии между группами с использованием F-критерия.

Поскольку ответ живой системы (в частности культуры клеток) на введение одного и того же ЛП варьируемых и полного сходства биоаналога и ЛП сравнения не ожидается, был рассчитан 90 % CI (Confidence Interval – доверительный интервал) для разности средних, а также отношения средних.

В качестве приемлемой для 90 % CI для отношения средних была выбрана граница признания биоаналогичности $\pm 20\%$.

В третьей главе диссертации приведены результаты исследования и их обсуждение.

В первом разделе представлены принципы проведения доклинических исследований сопоставимости по специфической активности биологически аналогичных ЛП мАТ, заявленных к регистрации в России, а также возможные методы подтверждения биоаналогичности по специфической активности биоаналогов ритуксимаба, адалимумаба, инфликсимаба, бевацизумаба и трастузумаба.

В таблице 1 представлено число проведенных сравнительных исследований специфической активности биоаналогов в рамках нашего анализа. При подсчете исследований не учитывались количество повторов и серий исследуемого ЛП и ЛП сравнения. Исследования на разных клеточных линиях с разными методами детектирования результатов считались разными

исследованиями. Для ритуксимаба, инфликсимаба и бевацизумаба было рассмотрено 4 биоаналога, для адалимумаба и трастузумаба – 5.

Таблица 1 – Число проведенных сравнительных исследований специфической активности биоаналогов ритуксимаба, адалимумаба, инфликсимаба, бевацизумаба и трастузумаба

Ритуксимаб	Адалимумаб	Инфликсимаб	Бевацизумаб	Трастузумаб
11	14	17	12	6
8	12	14	6	5
5	11	9	7	4
14	16	14	2	5
-	15	-	-	5

Из представленной таблицы видно, что число методов, необходимое для подтверждения сопоставимости по специфической активности разнится от биоаналога к биоаналогу. Причины такого отличия следующие:

- Во-первых, не каждый разработчик провел необходимый объем исследований и полностью сравнил каждый участок молекулы мАТ и ЛП сравнения и вследствие были запрошены дополнительные материалы к представленному досье.

- Во-вторых, объем необходимых исследований специфической активности любого биоаналога зависит от характера полученных результатов на предшествующих этапах разработки и качества данных. При возникновении различий на этапе сравнительных доклинических фармакодинамических исследований могут потребоваться дополнительные исследования, однако при высокой убедительности результатов можно попытаться обосновать сокращение объема исследований.

- В-третьих, понимание разработчиком целесообразности проведения большего числа исследований биологической активности, так как, чем убедительнее подтверждено сходство между биоаналогом и ЛП сравнения на начальных этапах подтверждения биоаналогичности, тем больше вероятность ненахождения различий на этапе клинических исследований [«Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза», 2015].

В таблице 2 представлены установленные возможные методы подтверждения биоаналогичности ЛП мАТ (ритуксимаба, адалимумаба, бевацизумаба, инфликсимаба, трастузумаба) на этапе сравнительного доклинического фармакодинамического изучения, а также количество проведенных сравнительных исследований специфической активности биоаналогов мАТ по результатам анализа 22 регистрационных досье.

Таблица 2 – Методы подтверждения биоаналогичности по специфической активности биоаналогов моноклональных антител

Методы	Все		Ритуксимаб		Адалимумаб		Инфликсимаб		Бевацизумаб		Трастузумаб	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
<i>In vitro</i>												
Связывание с антигеном-мишенью	44	20,7	7	18,4	8	11,8	18	33,3	8	29,7	3	12,0
Связывание с Fc-рецепторами	69	32,5	10	26,3	31	45,6	17	31,5	6	22,2	5	20,0
Связывание с субкомпонентом C1q	10	4,7	2	5,3	3	4,4	3	5,6	2	7,4	-	-
АЗКЦ	21	9,9	4	10,5	6	8,8	4	7,4	2	7,4	5	20,0
КЗЦ	16	7,5	4	10,5	5	7,4	4	7,4	2	7,4	1	4,0
Индукция апоптоза	9	4,3	5	13,2	2	2,9	2	3,7	-	-	-	-
Ингибирование пролиферации клеток	9	4,3	-	-	-	-	-	-	3	11,1	6	24,0
Ингибирование индуцированного ФНО α апоптоза	9	4,3	-	-	5	7,4	4	7,4	-	-	-	-
Нейтрализация индуцированной ФНО α секреции цитокинов	6	2,8	-	-	6	8,8	-	-	-	-	-	-

Методы	Все		Ритуксимаб		Адалимумаб		Инфликсимаб		Бевацизумаб		Трастузумаб	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
<i>In vivo</i>												
Определение истощения пула В-клеток на яванских макаках	3	1,4	3	7,9	-	-	-	-	-	-	-	-
Оценка купирования симптомов заболевания на модели полиартрита у трансгенных мышей	4	1,9	-	-	2	2,9	2	3,7	-	-	-	-
Оценка роста опухоли на ксенотрансплантатных мышечных моделях	12	5,7	3	7,9	-	-	-	-	4	14,8	5	20,0

При планировании исследований сопоставимости необходимо охарактеризовать структуру мАТ с точки зрения его механизма действия и биологической активности (т.е. специфической способности препарата оказывать определенный биологический эффект), а также проанализировать механизм действия и значение эффекторных функций препарата для выявления различий между биоаналогом и ЛП сравнения.

При сравнении специфической активности биоаналога и ЛП сравнения, необходимо провести ряд исследований, которые косвенно позволят сравнить каждый участок молекул антител. Поскольку мАТ состоят из двух потенциально активных участков (Fab- и Fc-), определяющих их биологическую активность, все сравнительные исследования *in vitro* можно разделить на 3 группы: изучение Fab-ассоциированных функций, Fc-ассоциированных функций и Fc-Fab-ассоциированных функций.

Изучение Fab-ассоциированных функций

При подтверждении биоаналогичности в доклинических исследованиях специфической активности сравнение, как правило, начинают с изучения связывания с соответствующим антигеном-мишенью. Для ритуксимаба – это связывание с CD20 на В-лимфоцитах, для адалимумаба и инфликсимаба – связывание с фактором некроза опухоли альфа (ФНО α), для бевацизумаба – с VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor – фактор роста эндотелия сосудов), для трастузумаба – с HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 – рецептор эпидермального фактора роста человека второго типа). Исследования проводятся на соответствующих клеточных моделях, экспрессирующих искомым антиген. Аффинность связывания с антигеном возможно изучить с помощью стандартных методов, таких как иммуноферментный анализ (ИФА), поверхностный плазмонный резонанс, проточная цитометрия и другие.

Для некоторых мАТ (например, ритуксимаб, адалимумаб, инфликсимаб) целесообразно изучать способность к апоптозу на соответствующих клеточных линиях с детектированием полученных результатов, например, с использованием проточного цитофлуориметра.

Для таких мАТ как бевацизумаб и трастузумаб необходимо изучить способность к ингибированию пролиферации клеток репрезентативных клеточных линий, что связано с оценкой непосредственного механизма действия указанных мАТ в отношении угнетения роста опухоли вследствие взаимодействия с VEGF (бевацизумаб) и HER2 (трастузумаб).

Для адалимумаба и инфликсимаба следует изучать способность к ингибированию апоптоза, индуцированного человеческим ФНО α , на

соответствующих культурах клеток. Кроме того, для адалимумаба возможно изучение нейтрализации индуцированной ФНО α секреции цитокинов.

Изучение Fc-ассоциированных функций

Для изучения свойств мАТ, ассоциированных с Fc-фрагментом, целесообразно изучить связывание с репрезентативными изоформами Fc-рецепторов, таких как Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII и FcRn. Эти исследования следует проводить для всех рассмотренных нами мАТ. Связывающую способность оценивают, как и в случае связывания с антигеном-мишенью, с помощью ИФА, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии и других методов. Отметим, что не все мАТ способны к связыванию со всеми изоформами Fc-рецепторов, поскольку Fc γ -рецепторы отличаются сродством к антителам и также каждое антитело обладает уникальным сродством к каждому из Fc γ -рецепторов [Maverakis E., 2015].

Изучение Fc-Fab-ассоциированных функций

Для мАТ необходимым исследованием является оценка связывания с компонентом комплемента C1, которая позволяет сравнить функции Fab- и Fc-фрагментов мАТ, поскольку при реализации данного свойства на поверхности клеток происходит связывание Fab-фрагмента мАТ с антигеном, позволяя Fc-фрагменту затем связаться с компонентом комплемента C1. Связывающую способность оценивают стандартными методами: ИФА, поверхностный плазмонный резонанс, проточная цитометрия и др. Отметим, что в связи с различиями в строении не каждое мАТ способно к связыванию с C1q.

Многие мАТ обладают способностью проявлять АЗКЦ и КЗЦ. Однако, например, бевацизумаб не проявляет активности ни в отношении АЗКЦ, ни КЗЦ, поскольку Fab-фрагмент бевацизумаба не связывается с мишенью, фиксированной на клетке. Трастузумаб же не оказывает КЗЦ из-за присутствия регуляторных белков, таких как CD35, CD46 или CD55 [Scientific discussion: Herceptin / European Medicines Agency, 2015]. Однако рекомендуется изучать сравнительные АЗКЦ и КЗЦ биоаналога и ЛП сравнения даже при отсутствии активности, поскольку целью проводимых исследований является не изучение активности как таковой, а выявление различий в свойствах сравниваемых ЛП. При постановке методов АЗКЦ и КЗЦ в качестве клеток-мишеней используют репрезентативные клеточные линии, экспрессирующие соответствующий антиген, с которым связывается мАТ. В качестве эффекторных клеток в методе АЗКЦ возможно использовать мононуклеарные клетки периферической крови человека, либо естественные

клетки-киллеры здоровых добровольцев, либо клеточные линии, экспрессирующие FcγRIIIa, либо другие аналогичные.

Для всех из изученных в нашей работе мАТ возможно изучение специфической активности *in vivo* на соответствующих моделях животных. Для ритуксимаба – это изучение истощения пула В-клеток на яванских макаках, а также оценка роста опухоли у мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом, являющихся носителями ксенотрансплантатов опухоли человека. Для бевацизумаба и трастузумаба – это также оценка роста опухоли на ксенотрансплантатных мышинных моделях. Для адалимумаба и инфликсимаба, применяемых для лечения ревматоидного артрита – это оценка купирования симптомов заболевания на модели полиартрита у трансгенных мышей.

Отметим, что представленных выше методов может быть недостаточно для подтверждения сопоставимости биоаналога и ЛП сравнения. На каждом этапе проведения сравнительных исследований (сравнительное изучение качества, сравнительные доклинические и клинические исследования) необходимо оценивать клиническую значимость обнаруженных различий между биоаналогом и ЛП сравнения (поскольку полного сходства во всех показателях не ожидается) и влияние обнаруженных различий на безопасность и эффективность биоаналога и соответственно объем необходимых дальнейших исследований.

Таким образом, методы определения специфической активности для различных мАТ отличаются и зависят от характера антигена и строения молекулы конкретного антитела. Тем не менее, существуют общие методы определения активности, такие как, например, связывание с Fc-рецепторами, комплементом, АЗКЦ, КЗЦ, используемые за некоторым исключением для многих мАТ. Поэтому в экспериментальной части работы был воспроизведен именно метод КЗЦ как один из ключевых методов определения биологической активности мАТ.

Во втором разделе представлены результаты экспериментального изучения сравнительной комплемент-зависимой цитотоксичности ритуксимаба.

Была измерена интенсивность флуоресценции образцов ритуксимаба в зависимости от его концентрации в лунках аналитического 96-луночного планшета в трех повторах как для Образца 1, так и для СО.

По результатам эксперимента IC50 составила 0,123 мкг/мл.

В программе Statistica 10 были получены описательные статистики для Образца 1 и СО, представленные в таблице 3, где Sample 1 – Образец 1;

Standart – CO; N набл. – число наблюдений (равное количеству повторов – 3);
Ст. откл. – стандартное отклонение.

Таблица 3 – Описательные статистики для Образца 1 и CO, полученные в программе Statistica 10

Переменная	Описательные статистики (Таблица данных1)					
	N набл.	Среднее	Медиана	Минимум	Максим.	Ст.откл.
Sample 1	3	5559,33	5491,00	5472,00	5715,00	135,145
Standart	3	4984,33	4980,00	4751,00	5222,00	235,529

В таблице 4 представлены показатели интенсивности флуоресценции, соответствующие IC50 (относительные флуоресцентные единицы), в трех повторах; результаты тестирования с использованием t-критерия и F-критерия, а также рассчитанные 90% CI разности средних и отношения средних Образца 1 и CO; где Sample 1 – Образец 1, Standart – CO; mean – среднее; t-знач. – расчетное значение t-критерия; p – расчетный уровень значимости при тестировании с использованием t-критерия; F-отн. дисперс. – расчетное значение F-критерия; p дисперс. – расчетный уровень значимости в дисперсионном анализе; CI delta – 90% CI для разности средних; CI S1/St – 90% CI для отношения средних.

Таблица 4 – Сводные результаты проведенного исследования КЗЦ ритуксимаба для Образца 1 и CO

Показатель	Sample 1	Standart
1 повтор	5472	5222
2 повтор	5491	4751
3 повтор	5715	4980
mean	5559,33	4984,33
t-знач.	3,66759	
p	0,02143	
F-отн. дисперс.	3,03730	
p дисперс.	0,49538	
CI delta	165,6648-984,3352	
CI S1/St *	103,32%-119,75%	

* – принятый допустимый диапазон CI 80-120%

Таким образом, полученный 90% CI отношения средних Образца 1 и CO попадает в принятый диапазон, равный 80-120%. Следовательно, можно сделать вывод о сопоставимости Образца 1 и CO по КЗЦ.

Также была измерена интенсивность флуоресценции образцов ритуксимаба в зависимости от его концентрации в лунке в трех повторах для Образца 2 и CO.

По результатам эксперимента IC50 составила 0,123 мкг/мл.

В программе Statistica 10 были получены описательные статистики для Образца 2 и СО, представленные в таблице 5, где Sample 2 – Образец 2; Standart – СО; N набл. – число наблюдений (равное количеству повторов – 3); Ст. откл. – стандартное отклонение.

Таблица 5 – Описательные статистики для Образца 2 и СО, полученные в программе Statistica 10

Переменная	Описательные статистики					
	N набл.	Среднее	Медиана	Минимум	Максим.	Ст.откл.
Sample 2	3	4976,33	5001,00	4913,00	5015,00	55,293
Standart_	3	5192,00	5193,00	5014,00	5369,00	177,502

В таблице 6 представлены показатели интенсивности флуоресценции, соответствующие IC50 (относительные флуоресцентные единицы), в трех повторах; результаты тестирования с использованием t-критерия и F-критерия, а также рассчитанные 90% CI разности средних и отношения средних Образца 2 и СО; где Sample 2 – Образец 2, Standart – СО; mean – среднее; t-знач. – расчетное значение t-критерия; p – расчетный уровень значимости при тестировании с использованием t-критерия; F-отн. дисперс. – расчетное значение F-критерия; p дисперс. – расчетный уровень значимости в дисперсионном анализе; CI delta – 90% CI для разности средних; CI S2/St – 90% CI для отношения средних.

Таблица 6 – Сводные результаты проведенного исследования КЗЦ ритуксимаба для Образца 2 и СО

Показатель	Sample 2	Standart
1 повтор	4913	5369
2 повтор	5015	5014
3 повтор	5001	5193
mean	4976,33	5192,00
t-знач.	-2,0092	
p	0,11490	
F-отн. дисперс.	10,3053	
p дисперс.	0,17690	
CI delta	-495,917-64,58329	
CI S2/St *	90,45%-101,24%	

* – принятый допустимый диапазон CI 80-120%

Полученный 90% CI отношения средних Образца 2 и СО попадает в принятый диапазон, равный 80-120%. Следовательно, можно сделать вывод о сопоставимости Образца 2 и СО по КЗЦ.

Таким образом, было исследовано 2 экспериментальные серии разработанного биоаналога ритуксимаба. По результатам проведенного эксперимента показана сопоставимая специфическая активность двух серий препарата ритуксимаб стандартному образцу активности. Таким образом, хранение образцов ритуксимаба при температуре плюс 5 и минус 80°C является приемлемым и не снижает качество препарата по специфической активности по результатам изучения КЗЦ.

В третьем разделе представлена программа изучения сравнительной специфической активности биоаналогов ритуксимаба в рамках подтверждения их биоаналогичности, разработанная по результатам анализа регистрационных досье биоаналогичных ЛП ритуксимаба, заявленных к регистрации в России, а также по результатам апробации одного из методов подтверждения специфической активности биоаналогов МАТ – КЗТ.

При подтверждении сопоставимости по специфической активности изучаемого биоаналога ритуксимаба и ЛП сравнения, которым для ритуксимаба является ЛП Мабтера, на этапе доклинического изучения, минимальный объем необходимых исследований представлен в таблице 7:

Таблица 7 – Минимальный объем сравнительных исследований сопоставимости по специфической активности биоаналогов ритуксимаба

Исследования <i>in vitro</i>	Исследование <i>in vivo</i>
Аффинность связывания с антигеном CD20	Исследование влияния на развитие зародышевых центров в брыжеечных лимфатических узлах и селезенке у яванских макак
Индукция апоптоза	
Связывание с Fc-рецепторами	
Связывание с субкомпонентом комплемента C1	
Индукция АЗКЦ	
Индукция КЗЦ	

Отметим, что в исследованиях связывания с CD20, индукции апоптоза, АЗКЦ и КЗЦ для презентации антигена следует использовать следующие клеточные линии: Wil2-S, Ramos (клеточная линия человеческих лимфобластоидных клеток), Raji (клеточная линия человеческой В-клеточной лимфомы).

Исследование *in vivo* предпочтительно проводить на яванских макаках, поскольку для МАТ основной релевантной моделью являются нечеловекообразные приматы. Возможно в качестве модели животных использовать мышей, являющихся носителями ксенотрансплантатов опухоли человека, в качестве дополнительного подтверждения сопоставимости по специфической активности *in vivo*.

Все исследования необходимо направить на выявление потенциальных различий между биоаналогом и ЛП сравнения, а также, при обнаружении таких различий, на установление их клинической значимости. Всякое выявленное значимое различие необходимо должным образом обосновать, поскольку оно может противоречить принципу биоаналогичности и, в случае необходимости, провести дополнительные исследования. Результаты исследований всегда необходимо рассматривать с позиций потенциального влияния на безопасность и эффективность биоаналога.

Таким образом, установлен минимальный объем сравнительных исследований сопоставимости по специфической активности биоаналогов ритуксимаба. Объем необходимых исследований специфической активности любого биоаналога зависит от характера полученных результатов и качества данных. При возникновении различий на этапе сравнительных доклинических фармакодинамических исследований могут потребоваться дополнительные исследования.

ВЫВОДЫ

1. При подтверждении биоаналогичности следует использовать принцип сопоставимости и проводить сравнительные исследования качества (включающие исследования подлинности, чистоты (родственные соединения, родственные примеси и производственные примеси) и биологической активности), сравнительные доклинические исследования (включающие токсикологические и фармакодинамические исследования (*in vitro* и *in vivo*)), а также сравнительные клинические исследования.
2. Методами, позволяющими подтвердить биоаналогичность мАТ (ритуксимаба, адалимумаба, инфликсимаба, бевациумаба, трастузумаба) на этапе доклинического фармакодинамического изучения *in vitro*, в зависимости от механизма действия конкретного мАТ, являются: связывание с антигеном-мишенью, связывание с Fc-рецепторами, связывание с субкомпонентом C1q, АЗКЦ, КЗЦ, индукция апоптоза, ингибирование пролиферации клеток, ингибирование индуцированного ФНО α апоптоза, нейтрализация индуцированной ФНО α секреции цитокинов.
3. Методами, позволяющими подтвердить биоаналогичность мАТ (ритуксимаба, адалимумаба, инфликсимаба, бевациумаба, трастузумаба) на этапе доклинического фармакодинамического изучения *in vivo*, в зависимости от механизма действия конкретного мАТ, являются: определение истощения пула В-клеток на яванских

макаках, оценка купирования симптомов заболевания на модели полиартрита у трансгенных мышей, оценка роста опухоли на ксенотрансплантатных мышинных моделях.

4. Образцы биоаналогичного ритуксимаба (МБЦ «Генериум») и стандартный образец ритуксимаба сопоставимы. Полученные 90% CI для отношения средней интенсивности флуоресценции, соответствующей IC50, для двух исследованных образцов попадают в принятый диапазон, равный 80-120% (для Образца 1 – 90% CI: 103,32-119,75%; для Образца 2 – 90% CI: 90,45-101,24%). При хранении образцов при температуре плюс 5 и минус 80°C показана их высокая стабильность.
5. Программа проведения сравнительного изучения специфической активности биоаналогов ритуксимаба на этапе их доклинического изучения должна включать исследования *in vitro*: аффинность связывания с антигеном CD20, индукция апоптоза, связывание с Fc-рецепторами, связывание с субкомпонентом комплемента C1q, индукция АЗКЦ и КЗЦ, а также исследование *in vivo*: влияние на развитие зародышевых центров в брыжеечных лимфатических узлах и селезенке у яванских макак.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ

1. Установленные методы подтверждения специфической активности биоаналогичных мАТ могут быть использованы разработчиками указанной группы ЛП при планировании программы проведения доклинических исследований. Вид и количество указанных исследований определяется всякий раз индивидуально для каждого биоаналога с учетом влияния полученных результатов на его безопасность и эффективность.
2. Особенности постановки метода КЗЦ и статистическую обработку полученных результатов рекомендуется использовать при воспроизведении указанного метода не только в рамках подтверждения сравнительной специфической активности биоаналогов мАТ, обладающих способностью индуцировать КЗЦ, но и в рамках рутинного подтверждения качества мАТ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Васильев, А.Н. Биологически аналогичные лекарственные препараты в Российской Федерации и перспективы их разработки [Текст] / А.Н. Васильев, Е.В. Гавришина, Р.Р. Ниязов, А.В. Добровольский, Е.А. Тутер, А.Г. Бекерман // Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике. – 2013. – №7-8. – С. 67-70.
2. Васильев, А.Н. Подтверждение качества, доклинические и клинические исследования биологически аналогичных лекарственных препаратов. Общие принципы [Текст] / А.Н. Васильев, Р.Р. Ниязов, Г.Н. Енгальчева, Е.В. Гавришина, Е.А. Тутер, А.Г. Бекерман // Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике. – 2013. – №6. – С. 22-26.
3. Тутер, Е.А. Биоаналоги ритуксимаба: программа изучения сравнительной специфической активности и постановка метода оценки комплемент-зависимой цитотоксичности [Текст] / Е.А. Тутер, Г.Н. Порошин, М.А. Драницына, А.Н. Васильев, Р.Р. Ниязов // Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике. – 2016. – № 6. – С. 37-42.

Статьи в научных сборниках и журналах:

1. Руководство по экспертизе лекарственных средств [Текст] / под ред. А.Н. Миронова // Издание ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России / А.Н. Васильев, Д.В. Горячев, Е.В. Гавришина, Р.Р. Ниязов, Е.А. Тутер, Ж.И. Авдеева, Н.А. Алпатова, А.А. Солдатов, Р.А. Волкова, И.В. Сакаева, В.А. Меркулов, А.Н. Миронов. – Том IV. – М. : ПОЛИГРАФ-ПЛЮС, 2014. – Гл. 2. – С. 31-53.
2. Руководство по экспертизе лекарственных средств [Текст] / под ред. А.Н. Миронова // Издание ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России / В.И. Петров, Ф.И. Ершов, Н.В. Медуницын, А.Н. Васильев, Е.В. Гавришина, Д.В. Горячев, А.Л. Кузнецов, А.Н. Миронов, Р.И. Ягудина, Р.Р. Ниязов, М.В. Проценко, И.В. Сакаева, С.В. Недогода, М.Ю. Фролов, А. Шнайдер, Е.А. Тутер, А.Г. Бекерман. – Том I. – М. : Гриф и К, 2013. – Гл. 13. – С. 289-303.
3. Васильев, А.Н. XII международная конференция по биоаналогам (Лондон, Великобритания) [Текст] / А.Н. Васильев, Р.Р. Ниязов,

- Е.А. Тутер // Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2014. – № 2. – С. 64.
4. Тутер, Е.А. Общие принципы изучения специфической активности лекарственных препаратов моноклональных антител в доклинических исследованиях, как базовый показатель их биологической аналогичности [Текст] / Е.А. Тутер // Научно-методические подходы оценки качества, эффективности и безопасности лекарственных средств в Российской Федерации: Материалы IV научно-практической конференции молодых ученых. – М.: ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 2015. – С. 84-89.
 5. Руководство по экспертизе лекарственных средств [Текст] / под ред. А.Н. Миронова // Издание ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России / А.Н. Васильев, О.Л. Верстакова, Г.Н. Енгальчева, А.Н. Миронов, Р.Р. Ниязов, И.В. Сакаева, Р.Д. Сюбаев, Е.А. Тутер. – Том I. – М. : Гриф и К, 2013. – Гл. 1. – С. 6-23.
 6. Васильев, А.Н. Анализ зарубежных и отечественных научных и методических подходов к выбору препарата сравнения в доклинических и клинических исследованиях [Текст] / А.Н. Васильев, Е.В. Гавришина, Р.Р. Ниязов, В.К. Адонин, Е.А. Тутер, Н.Д. Бунятян, В.А. Меркулов // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 10-4. – С. 671-673.
 7. Васильев, А.Н. Анализ зарубежных и отечественных научных и методических подходов к планированию и проведению доклинических и клинических исследований и составу регистрационного досье референтных лекарственных препаратов [Текст] / А.Н. Васильев, Е.В. Гавришина, Р.Р. Ниязов, В.К. Адонин, Е.А. Тутер, В.А. Меркулов, Н.Д. Бунятян // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 10-4. – С. 630-633.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЗКЦ	антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность
ИФА	иммуноферментный анализ
КЗЦ	комплемент-зависимая цитотоксичность
ЛП	лекарственный препарат
мАТ	моноклональное антитело
МБЦ «Генериум»	Международный биотехнологический центр «Генериум»
НЦЭСМП	Научный центр экспертизы средств медицинского применения
СО	стандартный образец активности
ФГБУ	Федеральное государственное бюджетное учреждение
ФНО α	фактор некроза опухоли альфа
CI	Confidence Interval (доверительный интервал)
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (рецептор эпидермального фактора роста человека второго типа)
IC50	The half maximal inhibitory concentration (50% ингибирующая концентрация)
Raji	клеточная линия человеческой В-клеточной лимфомы
Ramos	клеточная линия человеческих лимфобластоидных клеток
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (фактор роста эндотелия сосудов)
Wil2-S	клеточная линия человеческих лимфобластных клеток

Благодарности

Автор выражает благодарность всем, кто оказывал помощь в проведении исследования: своему научному руководителю Васильеву Андрею Никифоровичу за помощь в организации и проведении исследования, за поддержку на протяжении всего периода выполнения работы и профессиональные советы при ее написании, а также Ниязову Равилу Рашидовичу, Горячеву Дмитрию Владимировичу, Драницыной Маргарите Александровне, Порошину Григорию Николаевичу за профессиональную помощь на разных этапах исследования.

Тутер Елена Александровна

**ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ИЗУЧЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ
АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ
МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ В ДОКЛИНИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЯХ КАК БАЗОВЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ ИХ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ АНАЛОГИЧНОСТИ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Подписано в печать __. __. 2017 г.
Формат 60x84/16. Печать офсетная Усл. -печ. л. __.
Усл. изд. л. __ Тираж 100 экз. Заказ __
Отпечатано в типографии