

На правах рукописи

Мосикян Анна Альбертовна

**Оценка клинической значимости формирования анти-инсулиновых
антител при лечении препаратами инсулина**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Волгоград, 2021

Работа выполнена на кафедре Клинической фармакологии и этики применения лекарств
ЮНЕСКО Ярославского государственного медицинского университета

Научный руководитель:

член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук, профессор

Хохлов Александр Леонидович

Официальные оппоненты:

Ших Евгения Валерьевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней ФГАОУ ВО «Первого МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России

Батищева Галина Александровна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Воронежского Государственного Медицинского Университета им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России

Ведущая организация:

ФГАОУ ВО «Российский Университет Дружбы Народов», 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

Защита диссертации состоится «__»_____2021 г. в _____ч. на заседании Диссертационного Совета Д 208.008.02 ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу 400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте (www.volgmed.ru) ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Автореферат разослан «__»_____2021 г.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета,
доктор биологических наук

Любовь Ивановна Бугаева

Общая характеристика работы

Актуальность исследования. Применение биологических лекарственных препаратов (ЛП) способно приводить к развитию иммунного ответа или к иммунологически опосредованным нежелательным клиническим явлениям (иммуногенности). К возможным клиническим последствиям иммуногенности относятся изменение активности препарата, общие иммунные реакции гуморального и клеточного типов, а также перекрестная реактивность с эндогенным белком, например, при использовании лекарственного препарата для заместительной терапии. (Решение № 89 от 3 ноября 2016 года).

ЛП инсулинов являются биологическими (биотехнологическими) и обладают свойством иммуногенности, однако клиническая значимость этого не определена. Образование антител, в том числе связывающих и/или нейтрализующих, может быть как клинически значимым, т.е. приводить к неэффективности препарата и необходимости увеличения его дозы, так и клинически незначимым, т.е. не иметь никакого влияния на эффективность и безопасность лечения (Shankar G. и соавт., 2014).

В настоящее время критерии определения клинически значимого иммунного ответа при введении инсулина не установлены, что затрудняет интерпретацию частоты его развития и оценку роли формирования различных типов анти-инсулиновых антител в снижении клинической эффективности или повышении рисков безопасности лечения. Тем не менее, при регистрации ЛП инсулинов, как оригинальных, так и биоаналогичных, требуется проведение исследований иммуногенности, однако необходимый размер выборки и конечные точки иммуногенности в данных исследованиях не конкретизируются регуляторными документами (Решение № 89 от 3 ноября 2016 года, ЕМЕА/СНМР/ВМWP/32775/2005_Rev. 1, 2015).

Границы нормы для определения значимого повышения концентрации антител к инсулину в настоящее время отсутствуют, равно как и понимание критериев клинически значимого иммунного ответа при инсулинотерапии. При этом также отсутствуют данные о негативном влиянии развития иммунного ответа на инсулинотерапию на ее эффективность.

С учетом этого, особенно остро стоит дискуссия о необходимости проведения многоцентровых сравнительных клинических исследований биоподобных инсулинов, поскольку доклинические ортогональные сравнительные тесты являются значительно более чувствительными для выявления различий свойств препаратов, чем клинические исследования, где вариабельность результатов значительно выше из-за гетерогенности параметров пациентов, также влияющих на иммунный ответ (Webster и соавт., 2019).

Степень разработанности темы. Опубликованные сравнительные данные об иммуногенности различных препаратов инсулина неоднозначны: в некоторых работах показано отсутствие различий препаратов по параметрам иммуногенности (Naahg и соавт., 2019; Mianowska и соавт., 2011), но существуют публикации, свидетельствующие о большей иммуногенности инсулинов гларгин и аспарт (Hattori и соавт., 2014).

Влияние развития иммунного ответа на параметры эффективности инсулинотерапии в настоящее время также однозначно не определено: тогда как данные научных публикаций свидетельствуют об отсутствии такого влияния (Naahg и соавт., 2019), в регуляторных руководствах по регистрации препаратов инсулина отражены требования оценивать влияние различных параметров иммуногенности (без уточнения, каких именно) на

гипогликемическую эффективность и дозы инсулина (Решение № 89 от 3 ноября 2016 года).

В настоящее время всё больше компаний производят биоподобные препараты инсулинов – аналогичные референтным по характеристикам качества, эффективности и безопасности, однако в связи с существующими противоречиями в отношении клинической значимости иммуногенности инсулинов, вопрос о необходимости проводить сравнительные клинические исследования иммуногенности для биоподобных препаратов не решен.

К настоящему моменту ни в одном из сравнительных исследований иммуногенности биоподобных препаратов инсулина не было получено различий с референтными лекарственными препаратами (Altman и соавт., 2017; Blevins и соавт., 2018, 2019; Derwahl и соавт., 2018; Garg и соавт., 2017, 2020; Home и соавт., 2018; Paag и соавт., 2016; Lamb и соавт., 2018), тогда как когда речь идет о тестировании биоподобных лекарственных препаратов, информация, получаемая в результате проведения ортогональных физико-химических и *in vitro* фармакодинамических тестов, является крайне чувствительной к выявлению различий, и позволяет убедительно продемонстрировать, что отсутствие различий в качественных характеристиках препаратов означает отсутствие различий в их эффективности и безопасности (ICH Q5E, 2005). Webster и соавт. предлагают изменение существующего подхода к регистрации биоподобных лекарственных препаратов, при этом в новом подходе рекомендуется отказаться от сравнительных клинических исследований эффективности. Для большинства препаратов (за исключением инсулинов) также нет необходимости в проведении сравнительных исследований фармакодинамики. Оценка иммуногенности при этом должна быть включена в сравнительное исследование фармакокинетических свойств с последующей экстраполяцией данных (Webster и соавт., 2019).

В Российской Федерации (и на территории Евразийского Экономического Союза) в настоящее время сохраняются требования о проведении сравнительных клинических исследований эффективности и иммуногенности биоподобных препаратов инсулина, и несмотря на указание на возможность их не проводить при наличии убедительных доказательств отсутствия различий на доклиническом этапе и в клэмп-исследовании, эти исследования требуются для регистрации биоподобного препарата (Решение № 89 от 3 ноября 2016 года).

Цель исследования. Разработать критерии клинической значимости формирования анти-инсулиновых антител при лечении препаратами инсулина и оценить практическую значимость проведения сравнительных клинических исследований иммуногенности.

Задачи исследования:

1. Оценить статус пациентов с сахарным диабетом 1 типа в отношении различных параметров иммуногенности (общая концентрация анти-инсулиновых антител, наличие нейтрализующих антител).
2. Установить клинические проявления значимого иммунного ответа при лечении препаратами инсулина.
3. Определить частоту развития клинически значимого иммунного ответа у пациентов с сахарным диабетом 1 типа при лечении препаратами инсулинов гларгин и аспарт.

4. Выявить влияние различных параметров иммуногенности и факта развития иммунного ответа на эффективность инсулинотерапии.

5. Сравнить параметры эффективности и иммуногенности биоподобных препаратов инсулина и их референтных препаратов

6. Оценить целесообразность проведения сравнительных исследований иммуногенности в рамках программы разработки биоподобных препаратов инсулина.

Научная новизна. В работе впервые предложены:

1. Референсные интервалы для концентрации антител к инсулину у пациентов с сахарным диабетом 1 типа, определяемой методом иммуноферментного анализа (ИФА) в Ед/мл.

2. Критерии клинически значимого иммунного ответа, основанные на клинических проявлениях неэффективности инсулинотерапии.

В работе впервые показано:

3. У пациентов с сахарным диабетом 1 типа, получающих различные инсулины, параметры развития иммунного ответа не отличаются вне зависимости от схемы инсулинотерапии, которую получает пациент.

4. Частота развития клинически значимого иммунного ответа по предложенным критериям у пациентов с сахарным диабетом 1 типа при лечении препаратами инсулинов гларгин и аспарт не превышает 5 %.

5. Развитие лабораторного иммунного ответа (нарастание концентрации антител к инсулину или формирование нейтрализующих антител) не влияет на эффективность инсулинотерапии.

6. Параметры иммуногенности биоподобных лекарственных препаратов GP40061 (инсулин гларгин) и GP40071 (инсулин аспарт) не отличаются от таковых у соответствующих референтных препаратов.

В работе получены дополнительные данные о:

7. Нецелесообразности проведения сравнительных клинических исследований иммуногенности в рамках программы клинической разработки биоподобных лекарственных препаратов инсулина

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическое значение выполненной работы состоит в том, что ее результаты снижают неопределенность в вопросе клинической значимости иммунного ответа на инсулинотерапию и показывают чрезмерность регуляторных требований в отношении изучения этих параметров для биоподобных препаратов инсулина.

Практическое значение исследования состоит в том, что на основе данных о низкой клинической значимости развития иммунного ответа на инсулинотерапию могут быть скорректированы регуляторные подходы к разработке биоподобных препаратов инсулинов, а клинические решения о выборе препарата инсулина могут приниматься без учета параметров иммуногенности.

Методология исследования. Два клинических исследования, выполненные в рамках диссертации, – проспективные (по времени сбора данных и формированию выборки); многоцентровые; открытые (по отсутствию или наличию ослепления); рандомизированные (по отсутствию или наличию рандомизации); интервенционные (по отсутствию или наличию вмешательства). Всего в исследования были включены 444 субъекта (180 субъектов в сравнительное исследование биоподобного и референтного

инсулинов гларгин, 264 субъекта в сравнительное исследование биоподобного и референтного инсулинов аспарт).

Диссертационная работа состояла из анализа данных, собранных у субъектов до начала исследуемой терапии, а также непосредственно из двух проспективных исследований. Клинические исследования были выполнены в течение двух лет - с июля 2018 по февраль 2020 гг. Объект исследований – пациенты с сахарным диабетом 1 типа.

Использованы клинические (оценка диабетологического анамнеза, сбор информации о нежелательных явлениях, оценка суточной дозы инсулина) и лабораторные (определение гликированного гемоглобина, общей концентрации антител к инсулину, наличия нейтрализующих инсулин антител) методы диагностики. Проведена статистическая обработка результатов релевантными методами в зависимости от типа данных (ANCOVA, модель линейной регрессии, t-критерий Стьюдента, U-критерий Манна-Уитни, критерий Вилкоксона, критерий хи-квадрат Пирсона, точный критерий Фишера, критерий МакНемара).

Положения, выносимые на защиту:

1. Референсным интервалом для концентрации антител к инсулину у пациентов с сахарным диабетом 1 типа, определяемой методом ИФА, является 0 – 12, 69 Ед/мл. Развитием иммунного ответа может считаться нарастание концентрации антител к инсулину на фоне лечения выше 12,69 Ед/мл.

2. Для определения клинической значимости иммунного ответа на инсулинотерапию следует ориентировать на совокупное присутствие указанных признаков: отсутствие снижения гликированного гемоглобина на фоне лечения инсулином в адекватно подобранных дозах в сочетании с необходимостью повышения дозы инсулина при условии лабораторного подтверждения нарастания концентрации антител или формирования нейтрализующих антител.

3. У пациентов с сахарным диабетом 1 типа, получающих различные инсулины, параметры развития иммунного ответа не отличаются вне зависимости от схемы инсулинотерапии, которую получает пациент.

4. Проведение сравнительных клинических исследований иммуногенности биоподобных и референтных препаратов инсулинов нецелесообразно в виду низкой чувствительности этих исследований для выявления различий в параметрах иммуногенности, редкого развития у пациентов клинически значимого иммунного ответа, отсутствия влияния иммунного ответа на дозу инсулина и на эффективность инсулинотерапии.

Степень достоверности. Достоверность результатов определяется большой выборкой пациентов с сахарным диабетом (444 человека), рандомизацией, формированием групп активного контроля с использованием референтных инсулинов, адекватными методами планирования исследования, точными измерительными приборами и результатами лабораторных анализов, длительными сроками наблюдения и корректными методами статистической обработки.

Реализация результатов. Результаты исследования внедрены в клиническую практику в Российской Федерации и в Казахстане. По результатам предшествующей программы доклинических испытаний, клэмп-исследований и включенных в настоящую

работу сравнительных исследований иммуногенности и эффективности биоподобный препарат инсулина гларгин был зарегистрирован в Российской Федерации и Республике Казахстан. Биоподобный инсулин аспарт зарегистрирован в Российской Федерации. На основании результатов, полученных в настоящей диссертационной работе, ведется активный диалог с врачебным и пациентским сообществами, а также с регуляторными органами на территории Евразийского Экономического Союза.

Апробация результатов. Материалы диссертации были представлены на конференции «СТРФ-2019: Клинические исследования в ЕАЭС» (Санкт-Петербург, Россия, 2019), на 13й ежегодной международной конференции «Advanced Technologies & Treatments for Diabetes» (Мадрид, Испания, 2020).

Апробация диссертации прошла на заседании кафедры клинической фармакологии Ярославского государственного медицинского университета, на межкафедральном заседании Ярославского государственного медицинского университета, на заседание проблемной комиссии и диссертационного совета Д 208.008.02 Волгоградского государственного медицинского университета.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, из них 2 работы в рецензируемых журналах, индексируемых в SCOPUS, 4 работы в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, 1 работа в научном издании, входящем в базу РИНЦ и 2 тезиса зарубежной научной конференции.

Личный вклад автора. Автором написаны протоколы обоих исследований, данные которых используются в настоящей работе. Автор осуществлял медицинский мониторинг при проведении обоих исследований и являлся контактным лицом по любым научным и медицинским вопросам в отношении исследований. Автором полностью выполнены статистический анализ полученных данных для настоящей работы, оформление рукописи, а также подготовка всех публикаций по данной работе.

Практическая реализация результатов. Результаты исследования внедрены в регуляторную и клиническую практику Российской Федерации.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 141 странице и состоит из введения, обзора литературных источников, описания материалов и методов исследований, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа проиллюстрирована 17 таблицами и 6 рисунками.

Литературный указатель содержит ссылки на 176 научных публикаций и нормативно-правовых документов (13 отечественных и 163 зарубежных).

Основное содержание работы

Глава 1 представляет собой обзор литературы и описывает проблемы разработки биотехнологических лекарственных препаратов, возможные клинические последствия развития иммунного ответа, параметры иммуногенности референтных и биоподобных лекарственных препаратов инсулина, вопросы определения клинически значимого иммунного ответа при инсулинотерапии и неудовлетворенные регуляторные потребности.

Глава 2 включает описание основных методических приемов, которые были использованы при выполнении диссертации. Тип исследования: проспективное открытое, рандомизированное сравнительное исследование с этапом кросс-секционного

исследования. В настоящую работу включены данные двух исследований – «КИ аспарт» (лечение инсулином аспарт) и «КИ гларгин» (лечение инсулином гларгин).

На включение всех необходимых данных обоих исследований было получено разрешение спонсора исследований (ЗАО «Фарм-Холдинг») от 12.09.2019 г. Проведение исследований было одобрено Министерством Здравоохранения Российской Федерации и Советом по Этике:

1. «Многоцентровое, открытое, рандомизированное сравнительное исследование не худшей иммуногенности препаратов РинГлар®, раствор для подкожного введения, 100 ЕД/мл (ООО «ГЕРОФАРМ») и инсулина Лантус® СолоСтар®, раствор для подкожного введения, 100 ЕД/мл («Санофи-Авентис Дойчланд ГмбХ») у больных сахарным диабетом 1 типа». Код протокола GLARGIN-IM. Условием для проведения клинического исследования являлось Разрешение МЗ РФ № 282 от 14.06.2018 г. и одобрение исследования Советом по Этике (выписка из протокола заседания Совета по Этике № 168 от 24.04.2018 г.).

2. «Многоцентровое, открытое, рандомизированное сравнительное исследование не худшей иммуногенности препаратов GP40071 (Инсулин Аспарт производства ООО «ГЕРОФАРМ») раствор для внутривенного и подкожного введения, 100 ЕД/мл и инсулина НовоРапид® Пенфилл®, раствор для внутривенного и подкожного введения, 100 ЕД/мл («Ново Нордиск», Дания) у больных сахарным диабетом 1 типа». Код протокола GP40071-P4-31. Условием для проведения клинического исследования являлось Разрешение МЗ РФ № 217 от 26.04.2019 г. и одобрение исследования Советом по Этике (выписка из протокола заседания Совета по Этике № 188 от 12.03.2019 г.).

Проведение диссертационной работы было одобрено этическим комитетом Ярославского Государственного Медицинского Университета (протокол заседания №33 от 26 сентября 2019 года).

Исследуемая популяция: пациенты с сахарным диабетом 1 типа, которым показана терапия инсулином гларгин 100 ЕД/мл в составе базис-болюсной терапии и пациенты с сахарным диабетом 1 типа, которым показана терапия инсулином аспарт в составе базис-болюсной терапии. В исследование были включены 444 пациента с сахарным диабетом 1 типа, 215 из них (48 %) – женщины. Основными критериями включения были верифицированный по критериям ВОЗ диагноз сахарного диабета 1 типа, поставленный не менее чем за 12 месяцев до подписания информированного согласия, предшествующая базис-болюсная терапия в стабильных дозах в течение не менее 30 дней до включения в исследование, уровень гликированного гемоглобина на момент включения в исследование от 6,5 до 12,0 % в исследовании биоподобного инсулина гларгин и от 7,1 до 12,0 % в исследовании биоподобного инсулина аспарт. Основными критериями не включения были выраженная инсулинорезистентность (потребность в инсулине более 1,5 ЕД/кг/сутки, помповая инсулинотерапия в течение 3-6 месяцев до включения в исследование, регулярное использование иммуносупрессирующей терапии и/или иммуномодуляторов, наличие в анамнезе аутоиммунных заболеваний за исключением аутоиммунного тиреоидита, отягощенный аллергологический анамнез.

Оценку клинических и лабораторных данных пациентов проводили на скрининге, через 12 недель лечения и через 26 недель лечения. Оценку суточной дозы инсулина также проводили через 4 недели лечения – по окончании этапа титрации дозы (на основании дневников пациента). Оценку лабораторных параметров проводили

стандартными методами. Оценка параметров иммуногенности (концентрация анти-инсулиновых антител и их нейтрализующая активность) проводилась до начала применения исследуемых препаратов и через 6 месяцев их применения (периоды титрации доз и лечения стабильными дозами). Концентрация анти-инсулиновых антител также определялась через 12 недель от начала лечения.

Для определения концентрации анти-инсулиновых антител использовали широко распространенные в клинико-лабораторной диагностике коммерчески доступные наборы для иммуноферментного анализа (ИФА) производства ORGENTEC. Метод основан на связывании антител к инсулину в сыворотке или плазме пациента с иммобилизованными антигенами (высоко очищенные инсулины: человеческий, бычий, свиной) на дне лунок набора, связывании ферментного конъюгата с образовавшимся комплексом антиген-антитело и гидролиза ферментным конъюгатом вносимого субстрата с изменением цвета субстрата, в результате чего становится возможным измерение интенсивности окрашивания, которое коррелирует с концентрацией комплекса антиген-антитело и может быть измерена фотометрически при длине волны 450 нм. Система для анализа калибрована производителем. Измеряемый диапазон данного ИФА метода составляет от 0 до 100 Ед/мл, предел чувствительности – 0,5 Ед/мл

Нейтрализующую активность антител определяли с использованием трансгенной клеточной системы с детекцией продукта реакции по иммунохемилюминесценции. Анализ был выполнен испытательным центром ООО «КАЯР» в соответствии с Планом исследования, предоставлен отчет по валидации методики. Метод анализа основан на использовании трансфицированной клеточной линии iLite™ Insulin Assay Ready Cells, способной экспрессировать люциферазу светлячка (Firefly luciferase) под контролем промотора, чувствительного к инсулину, а также люциферазу рениллы (Renilla luciferase) под контролем конститутивного промотора. Детектирование продуктов реакций люцифераз осуществляется методом иммунохемилюминесцентного анализа (после окисления люциферинов). Инсулин проявляет свою активность за счет взаимодействия с высокоаффинным гетеродимерным рецептором CD 220, который обладает внутренней тирозинкиназной активностью. Связывание инсулина с альфа-цепью рецептора к инсулину приводит к димеризации рецептора, его автофосфорилированию, передаче сигнала через бета-цепь рецептора и активации гена-репортера люциферазы светлячка. Люминесцентный сигнал продукта реакции люциферазы светлячка может быть измерен с помощью люминометра, после проведения инкубации с люциферином. Интенсивность сигнала продукта реакции люциферазы светлячка пропорциональна функциональной активности инсулина в исследуемом образце. В присутствии нейтрализующих антител к инсулину, количество свободного инсулина снижается, приводя к снижению стимуляции продукции люциферазы светлячка. Таким образом, интенсивность сигнала продукта реакции люциферазы светлячка обратно пропорциональна количеству нейтрализующих антител в исследуемом образце.

Схема проведения исследования представлена на рис. 1.

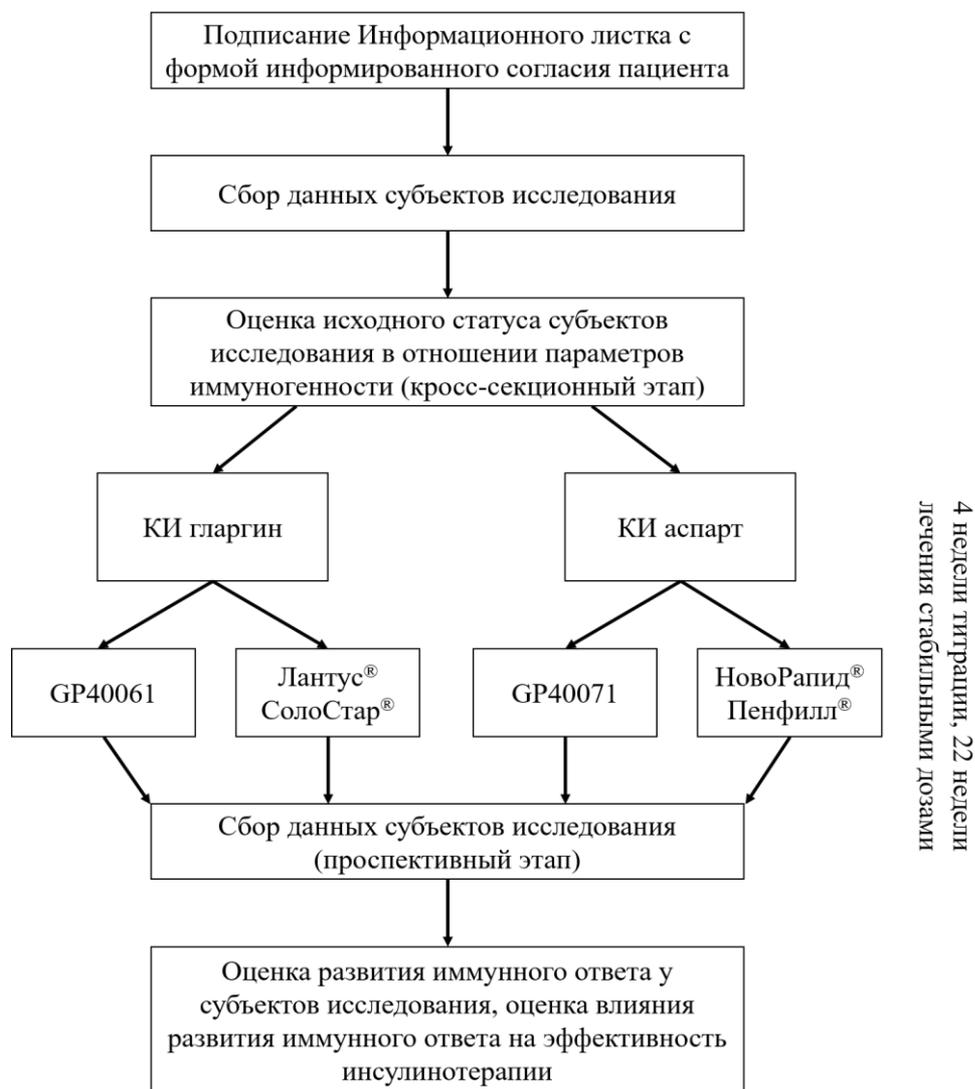


Рисунок 1. Схема проведения исследования

Статистическая обработка данных и оформление результатов проводились с помощью пакетов программного обеспечения R V3.5.0.

Непрерывные (количественные) данные представлены с помощью количества наблюдений, среднего арифметического, 95 % доверительного интервала (ДИ) для среднего (если не указано иное), стандартного (среднеквадратического) отклонения, медианы, нижнего и верхнего квартилей, минимума и максимума. Качественные данные представлены с помощью абсолютных частот (количества наблюдений), относительных частот (процентов) и 95 % ДИ для доли (если не указано иное).

Вероятность ошибки I рода (двусторонний уровень значимости) была установлена на уровне 0,05 для всех сравнений.

Для анализа изменений относительно исходного уровня для непрерывных переменных использовался ковариационный анализ (ANCOVA). Модель ANCOVA включала в себя исходный уровень показателя в качестве ковариаты, а также группу лечения и клинический центр в качестве фиксированных факторов.

Сопоставимость исследуемых групп для количественных переменных, не предусматривающих анализ изменений относительно исходного уровня, определялась с помощью t-критерия Стьюдента или U-критерия Манна-Уитни, в зависимости от

результатов проверки соблюдения нормальности распределения в каждой из исследуемых групп.

Сравнение групп для качественных данных осуществлялось с помощью критерия χ^2 Пирсона (с поправкой на непрерывность в случае, если хотя бы в одной из ячеек ожидаемая частота явления будет от 5 до 10) или точного критерия Фишера (в случае если в одной из ячеек ожидаемая частота явления будет равна 5 или меньше).

Для анализа динамики категориальных дихотомических переменных относительно исходного уровня использовался критерий Мак-Немара.

Для пропорций (нейтрализующие антитела):

$$n_A = \kappa n_B \quad \text{и} \quad n_B = \left(\frac{p_A(1-p_A)}{\kappa} + p_B(1-p_B) \right) \left(\frac{z_{1-\alpha/2} + z_{1-\beta}}{p_A - p_B} \right)^2$$

где p_A – доля субъектов с наличием нейтрализующих антител в группе 1,

p_B – доля субъектов с наличием нейтрализующих антител в группе 2,

κ – соотношение размера групп 1 и 2 в планируемом исследовании (в настоящей работе принято $\kappa = 1$),

α – ошибка первого рода (в настоящей работе принята равной 0,05),

β – ошибка второго рода (в настоящей работе принята равной 0,20),

$1-\beta$ – мощность исследования (в настоящей работе равна 80 %),

n_A – расчетное число субъектов в группе 1,

n_B – расчетное число субъектов в группе 2.

Для разницы средних (общая концентрация антител к инсулину):

$$n_A = \kappa n_B \quad \text{и} \quad n_B = \left(1 + \frac{1}{\kappa} \right) \left(\sigma \frac{z_{1-\alpha/2} + z_{1-\beta}}{\mu_A - \mu_B} \right)^2$$

где μ_A – средняя концентрация антител к инсулину в группе 1,

μ_B – средняя концентрация антител к инсулину в группе 2,

σ – величина стандартного отклонения,

κ – соотношение размера групп 1 и 2 в планируемом исследовании (в настоящей работе принято $\kappa = 1$),

α – ошибка первого рода (в настоящей работе принята равной 0,05),

β – ошибка второго рода (в настоящей работе принята равной 0,20),

$1-\beta$ – мощность исследования (в настоящей работе равна 80 %),

n_A – расчетное число субъектов в группе 1,

n_B – расчетное число субъектов в группе 2.

Глава 3 объединяет результаты собственных исследований по статусу пациентов с сахарным диабетом 1 типа в отношении различных параметров иммуногенности (общей концентрации анти-инсулиновых антител и наличия нейтрализующих антител к инсулину).

Средний возраст пациентов составил (среднее \pm стандартное отклонение) $38,15 \pm 11,08$ лет, средняя длительность сахарного диабета – $13,77 \pm 9,62$ года, что совпадает с длительностью инсулинотерапии. Практически все пациенты были европеоидной расы (99,6 %; 1 пациент был монголоидной расы), средняя масса тела была равна $72,40 \pm 12,96$ кг, средний индекс массы тела – $24,62 \pm 3,37$ кг/м². Гликемический контроль пациентов

был неудовлетворительным: среднее значение гликированного гемоглобина (HbA1c) составляло $8,66 \pm 1,12$ %, среднее значение гликемии натощак – $10,99 \pm 4,33$ ммоль/л.

Пациенты вводили 4 различных МНН базального инсулина (гларгин (n=346), детемир (n=33), деглудек (n=27), инсулин-изофан (n=38)) и 4 различных МНН болюсного инсулина (лизпро (n=162), аспарт (n=156), глулизин (n=87), человеческий растворимый (n=39)). Среднесуточная доза базального инсулина составила $24,32 \pm 9,57$ ЕД(МЕ)/сутки, болюсного инсулина – $25,79 \pm 8,30$ ЕД(МЕ)/сутки, суммарная доза инсулина составила $50,12 \pm 14,97$ ЕД(МЕ)/сутки, или $0,70 \pm 0,18$ ЕД(МЕ)/кг/сутки, что соответствует нормальной суточной потребности в инсулине.

Общая концентрация антител к инсулину

Общая концентрация антител (АТ) к инсулину у пациентов была в диапазоне от 0,2 Ед/мл до значений выше порога определения метода (> 100 Ед/мл). На основании этих данных были определены интервалы, в которые попадают результаты 95 % субъектов – от 0 до 95 квантиля и от 2,5 до 97,5 квантиля. Эти интервалы составили 0,2 – 12,69 Ед/мл и 0,8 – 22,29 Ед/мл, соответственно. С учетом того, что у значения концентрации АТ к инсулину клинически нецелесообразно выделять показатели «ниже нормы», представляется разумным принять 0 – 12,69 Ед/мл в качестве нормы для пациентов с СД 1 типа.

В отношении базальных инсулинов, концентрация АТ к инсулину у пациентов, получавших инсулин гларгин, составила $4,36 \pm 9,34$ Ед/мл, инсулин детемир – $5,14 \pm 6,50$ Ед/мл, инсулин деглудек – $5,97 \pm 18,64$ Ед/мл, инсулин изофан – $3,61 \pm 2,54$ Ед/мл. При попарном сравнении концентрации АТ у пациентов, использующих различные базальные инсулины (с применением статистического метода Холма-Бонферрони для поправки на множественность сравнений), также не было получено различий: гларгин-детемир ($p = 0,041 > 0,008$), деглудек-детемир ($p = 0,058 > 0,010$), гларгин-изофан ($p = 0,061 > 0,013$), деглудек-изофан ($p = 0,075 > 0,017$), детемир-изофан ($p = 0,659 > 0,025$), гларгин-деглудек ($p = 0,701 > 0,050$).

В отношении болюсных инсулинов, концентрация АТ к инсулину у пациентов, получавших инсулин лизпро, составила $4,87 \pm 11,44$ Ед/мл, инсулин глулизин – $4,81 \pm 10,50$ Ед/мл, инсулин аспарт – $3,18 \pm 3,87$ Ед/мл, инсулин растворимый человеческий – $4,17 \pm 5,66$ Ед/мл. При попарном сравнении концентрации АТ у пациентов, использующих различные болюсные инсулины, также не было получено различий: человеческий-лизпро ($p = 0,342$), человеческий-аспарт ($p = 0,251$), человеческий-глулизин ($p = 0,081$), лизпро-аспарт ($p = 0,873$), лизпро-глулизин ($p = 0,335$), аспарт-глулизин ($p = 0,453$). Метод Холма-Бонферрони не применялся, поскольку ни в одном из сравнений не было получено значения $p < 0,05$.

Также было проведено сравнение доли пациентов со значениями концентрации АТ $> 12,69$ Ед/мл и $\leq 12,69$ Ед/мл, а также со значениями концентрации АТ $> 22,29$ Ед/мл и $\leq 22,29$ Ед/мл для проверки клинической значимости «отсечения» нормы от повышения показателя по данным значениям. Концентрация АТ к инсулину у пациентов, получавших различные базальные инсулины, не отличалась между теми, у кого концентрация АТ была больше 12,69 Ед/мл и не превышала 12,69 Ед/мл ($p = 0,649$), а также между теми, у кого концентрация АТ была больше 22,29 Ед/мл и не превышала 22,29 Ед/мл ($p = 0,749$). Концентрация АТ к инсулину у пациентов, получавших различные болюсные инсулины, также не отличалась между теми, у кого концентрация АТ была больше 12,69 Ед/мл и не

превышала 12,69 Ед/мл ($p = 0,854$), а также между теми, у кого концентрация АТ была больше 22,29 Ед/мл и не превышала 22,29 Ед/мл ($p = 0,735$).

Для понимания необходимой выборки исследования, которое могло бы показать статистически значимые различия между инсулинами по параметру общей концентрации антител к инсулину, была применена формула расчета размера выборки для гипотезы равенства (Chow, 2017). Эти значения показывают, сколько пациентов надо было бы включить в исследование при ошибке первого рода 0.05 и ошибке второго рода 0.20, чтобы доказать, что инсулины отличаются друг от друга по параметру иммуногенности. Результаты расчетов приведены в табл.1.

Таблица 1. Размер выборки клинического исследования, необходимый для выявления различий концентрации АТ к инсулину между различными инсулинами

Группы	Инсулин-изофан	Гларгин	Детемир	Деглудек
Инсулин-изофан	-	4098	306	816
Гларгин		-	4294	1276
Детемир			-	8022
Деглудек				-
	Растворимый человеческий	Лизпро	Аспарт	Глулизин
Растворимый человеческий	-	6932	6988	662
Лизпро		-	523670	988
Аспарт			-	904
Глулизин				-

Нейтрализующие антитела

У всех пациентов было определено наличие нейтрализующих антител к инсулину. Всего нейтрализующие антитела были выявлены у 111 пациентов (25 %): у 54 (30 %) в исследовании инсулинов гларгин и у 57 (22 %) в исследовании инсулинов аспарт.

Распределение количества пациентов, у которых были обнаружены нейтрализующие антитела к инсулину, в зависимости от МНН базального и болусного инсулинов приведено в табл. 2. Различия в доле пациентов с нейтрализующими АТ не были статистически значимыми при применении различных МНН базального инсулина ($p = 0,086$), но были статистически значимы при применении различных МНН болусного инсулина ($p = 0,0007$).

Таблица 2. Распределение пациентов по наличию или отсутствию нейтрализующих антител и МНН инсулинов, которые они получают

МНН базального инсулина	Нейтрализующие антитела		МНН болусного инсулина	Нейтрализующие антитела	
	Обнаружены	Не обнаружены		Обнаружены	Не обнаружены
Инсулин-изофан	15	23	Растворимый человеческий	20	19
Гларгин	78	268	Лизпро	33	129
Детемир	11	22	Аспарт	40	116

Деглудек	7	20	Глулизин	18	69
----------	---	----	----------	----	----

При попарном сравнении доли пациентов, использующих различные базальные инсулины, в отношении наличия у них нейтрализующих АТ к инсулину также не было получено различий: гларгин-изофан ($p = 0,035 > 0,008$, согласно методу Холма-Бонферрони для множественных сравнений), деглудек-изофан ($p = 0,384$), детемир-изофан ($p = 0,773$), гларгин-детемир ($p = 0,237$), деглудек-детемир ($p=0,734$), гларгин-деглудек ($p=0,869$).

При попарном сравнении доли пациентов, использующих различные болюсные инсулины, в отношении наличия у них нейтрализующих АТ к инсулину, были получены различия между теми, кто получал человеческий растворимый инсулин и аналоги человеческих инсулинов: человеческий-лизпро ($p = 0,0002 < 0,008$), человеческий-глулизин ($p = 0,0012 < 0,010$), человеческий-аспарт ($p = 0,0036 < 0,017$) – был применен метод Холма-Бонферрони для множественных сравнений. При этом различий между теми, кто получал различные аналоги человеческого инсулина, получено не было: лизпро-аспарт ($p = 0,325$), лизпро-глулизин ($p = 1,000$), аспарт-глулизин ($p = 0,477$); метод Холма-Бонферрони не применялся, поскольку ни в одном из сравнений не было получено значения $p < 0,05$.

Дополнительно был проведен анализ подгрупп пациентов, которые получали только генно-инженерные инсулины человека, одни генно-инженерный и один аналоговый инсулины, а также только аналоги инсулина человека. По результатам анализа было выявлено, что доля пациентов, у которых обнаруживаются нейтрализующие антитела к инсулину, выше среди тех, кто получает только генно-инженерные инсулины человека по сравнению с теми, кто получает только аналоги инсулина человека ($p = 0,009$) – за счет влияния болюсного инсулина, иных различий выявлено не было. Пациенты, получающие растворимый человеческий инсулин, были старше ($p < 0,0001$), но с меньшей длительностью сахарного диабета ($p < 0,0001$); среди них было больше мужчин ($p = 0,031$), и у большего процента пациентов в этой группе были выявлены нейтрализующие антитела к инсулину ($p = 0,0002$). Уровень гликированного гемоглобина, абсолютной и относительной дозы инсулина между группами не различались ($p = 0,431$, $p = 0,869$ и $p = 0,965$, соответственно).

Сравнение пациентов с наличием нейтрализующих антител к инсулину и без них было проведено по параметрам возраста, пола, длительности течения сахарного диабета, дозе инсулина (абсолютной и на килограмм массы тела). Сравнение выше перечисленных параметров (за исключением пола пациентов) было проведено с поправкой на МНН базального инсулина и МНН болюсного инсулина, которые получал пациент. При сравнении пациентов с нейтрализующими антителами по полу была отмечена тенденция к более частому выявлению нейтрализующих антител у мужчин (27,5 %), чем у женщин (22,3 %), но различия не были статистически значимыми ($p = 0,061$). Ни возраст пациента, ни длительность течения диабета (длительность инсулинотерапии), ни доза базального инсулина (абсолютная или отнесенная к массе тела) не были ассоциированы с наличием или отсутствием у пациента нейтрализующих антител к инсулину.

Для понимания необходимой выборки исследования, которое могло бы показать статистически значимые различия между инсулинами, была применена формула расчета размера выборки для гипотезы равенства (Chow, 2017). Эти значения показывают, сколько пациентов надо было бы включить в исследование при ошибке первого рода 0.05 и

ошибке второго рода 0.20, чтобы доказать, что инсулины отличаются друг от друга по способности вызывать образование нейтрализующих антител к инсулину. Результаты расчетов, основанные на доле пациентов с наличием нейтрализующих антител к инсулину для каждой пары препаратов, приведены в табл. 9.

Таблица 3. Размер выборки клинического исследования, необходимый для выявления различий по наличию нейтрализующих антител

Группы	Инсулин-изофан	Гларгин	Детемир	Деглудек
Инсулин-изофан	-	226	1880	366
Гларгин		-	534	4964
Детемир			-	1186
Деглудек				-
	Растворимый человеческий	Лизпро	Аспарт	Глулизин
Растворимый человеческий	-	68	106	70
Лизпро		-	2046	568374
Аспарт			-	2314
Глулизин				-

Глава 4 объединяет результаты собственных исследований по выявлению критериев и частоты развития клинически значимого иммунного ответа у пациентов с сахарным диабетом 1 типа при лечении препаратами инсулинов гларгин и аспарт.

Критериями клинически значимого иммунного ответа для любого биотехнологического лекарственного препарата являются: снижение эффективности терапии, которое отражается в необходимости повышения дозы или неэффективности препарата вне зависимости от дозы и аллергические реакции (местные и генерализованные).

При инсулинотерапии доза препарата значительно варьирует (особенно у пациентов с сахарным диабетом 1 типа) вследствие влияния различных факторов, не связанных с иммуногенностью препарата: физической нагрузкой, приемом пищи, гормональным статусом пациентов. По этой причине, клинически значимый иммунный ответ на лечение препаратами инсулина представляется целесообразным сформировать как композитную точку: повышение дозы инсулина (необходимой для поддержания удовлетворительного гликемического контроля) в сочетании с отсутствием снижения уровня гликированного гемоглобина или его повышением и с зарегистрированным повышением концентрации антител к инсулину или с появлением нейтрализующих антител, если их не было до начала терапии – при условии, что исключены иные причины неэффективности терапии.

Для оценки частоты развития клинически значимого иммунного ответа в проведенном исследовании факт его развития регистрировался двумя способами:

1. Как обязательное сочетание трёх параметров: «любое повышение дозы инсулина по сравнению с окончанием периода титрации дозы», «отсутствие изменения или повышение показателя гликированного гемоглобина по сравнению с исходным значением перед началом терапии» и «любое повышение концентрации антител».

2. Как обязательное сочетание трёх параметров: «любое повышение дозы инсулина по сравнению с окончанием периода титрации дозы», «отсутствие изменения или повышение показателя гликированного гемоглобина по сравнению с исходным значением перед началом терапии» и «появление нейтрализующих антител к инсулину при их отсутствии до начала терапии».

Изменение общей дозы инсулина было оценено у 440 пациентов через 12 недель лечения (8 недель относительно окончания периода титрации) составило в среднем $0,30 \pm 4,85$ ЕД, а через 26 недель лечения (22 недели относительно окончания периода титрации) составило $1,05 \pm 5,59$ ЕД. При этом доля пациентов с увеличением дозы инсулина на $0,01$ ЕД и более составила 43 % через 12 недель и 47 % через 26 недель лечения.

Изменение гликированного гемоглобина также было оценено у 440 пациентов через 12 недель лечения и составило в среднем $-0,67 \pm 1,10$ %, и у 437 пациентов через 26 недель и составило $-0,63 \pm 1,11$ %. Доля пациентов, у которых не было зарегистрировано снижение показателя, составила 27,5 % через 12 недель и 29,5 % через 26 недель.

Изменение концентрации антител к инсулину оценивали у 439 пациентов, и оно составило в среднем $0,66 \pm 6,72$ Ед/мл через 12 недель и $0,66 \pm 4,69$ Ед/мл через 26 недель. Повышение концентрации антител к инсулину было зарегистрировано у 54 % пациентов как через 12, так и через 26 недель.

Нейтрализующие антитела до начала лечения определяли у 441 пациента, через 26 недель лечения – у 439 пациентов. Доля пациентов с наличием нейтрализующих антител составила 25 % до начала лечения и 24 % через 26 недель лечения; из 331 пациента, у которых не было нейтрализующих антител до начала лечения, 58 (17,5 %) имели их через 26 недель терапии.

В результате все три критерия клинически значимого иммунного ответа (вариант 1) определялись у 23 пациентов (5 %) через 12 недель лечения (только у 11 из них – 2,5 % - повышение гликированного гемоглобина превышало 0,3 %) и у 24 пациентов (5 %) через 26 недель лечения (у 12 из них повышение гликированного гемоглобина превышало 0,3 %). Среднее повышение общей дозы инсулина у пациентов с критериями иммунного ответа составило $4,27 \pm 2,97$ ЕД/сутки (от 1 до 12 ЕД/сутки) через 12 недель лечения и $6,27 \pm 4,99$ ЕД/сутки (от 0,14 до 17,46 ЕД/сутки) через 26 недель лечения. Среднее повышение уровня гликированного гемоглобина составило $0,50 \pm 0,48$ % (от 0 до 1,6 %) через 12 недель лечения и $0,46 \pm 0,46$ % (от 0 до 2,1 %) через 26 недель лечения. Среднее повышение концентрации антител составило $1,95 \pm 3,70$ Ед/мл (от 0,1 до 17,2 Ед/мл) через 12 недель лечения и $1,34 \pm 1,45$ Ед/мл (от 0,1 до 5,5 Ед/мл) через 26 недель лечения.

Все три критерия клинически значимого иммунного ответа (вариант 2) определялись у 5 пациентов (1,1 %) через 12 недель лечения (повышение гликированного гемоглобина на $0,40 \pm 0,26$ % - от 0 до 0,7 %; повышение дозы инсулина на $5,11 \pm 2,56$ ЕД/сутки – от 2 до 9 ЕД/сутки) и у 7 пациентов (1,6 %) через 26 недель лечения (повышение гликированного гемоглобина на $0,49 \pm 0,68$ % - от 0 до 1,9 %; повышение дозы инсулина на $3,79 \pm 2,97$ ЕД/сутки – от 0,57 до 9,29 ЕД/сутки).

Было проведено сравнение эффективности лечения и дозы инсулина у пациентов, которые соответствуют возможным критериям клинически значимого иммунного ответа, и остальных пациентов. У пациентов со всеми предложенными критериями иммунного ответа нарастали как доза инсулина, так и гликированный гемоглобин (что обусловлено выбором критериев – нарастание обоих показателей), и это изменение значимо

отличалось от изменения дозы инсулина и содержания гликированного гемоглобина в группе пациентов, у которых присутствовали от 0 до 2 из предложенных критериев. Среднее нарастание дозы (3,79 – 6,27 Ед/сутки) и содержания гликированного гемоглобина в крови (0,40 – 0,50 %) у пациентов со всеми предложенными критериями является клинически значимым, в связи с чем предложенные критерии могут рассматриваться как релевантные. Однако следует отметить, что хотя нарастание концентрации антител было выше ($p < 0,0001$) через 12 недель в группе пациентов с наличием иммунного ответа (вариант критериев 1), в абсолютных значениях, с учетом определенного диапазона значений у 95 % пациентов, различия были незначимы: $1,95 \pm 3,70$ Ед/мл у пациентов с иммунным ответом и $0,59 \pm 6,85$ Ед/мл у пациентов без него. Через 26 недель различия также были статистически значимы ($p < 0,0001$), но незначительны клинически: $1,34 \pm 1,45$ Ед/мл у пациентов с иммунным ответом и $0,61 \pm 4,82$ Ед/мл у пациентов без него. С учетом небольшого изменения концентрации антител к инсулину и отсутствия корреляции между эффективностью инсулинотерапии и доз инсулина клиническая значимость повышения концентрации антител к инсулину неоднозначна.

Реакции в месте введения препарата являются вариантом иммунного ответа. В проведенных исследованиях реакции в месте введения были зарегистрированы у 2 пациентов (3 случая), введших препарат GP40061, у 1 пациента (1 случай), введшего Лантус® СолоСтар®, и у 1 пациента (1 случай), введшего препарат GP40071. У пациентов, использовавших НовоРапид® Пенфилл®, местных реакций зарегистрировано не было. Таким образом, частота развития реакций в месте введения не превышала 3 % и не различалась для биоподобного и референтного препаратов инсулина ($p = 1,000$).

Глава 5 содержит результаты собственных исследований по влиянию различных параметров иммуногенности и факта развития иммунного ответа на эффективность инсулинотерапии и изменение дозы инсулина.

Требования к клинической разработке препарата инсулина содержат необходимость оценивать влияние параметров иммунного ответа на эффективность терапии (в отношении гликированного гемоглобина) и изменение дозы инсулина для того. Аналогичная оценка была проведена на полученных данных при помощи построения модели линейной регрессии. Модели были построены для изменения уровня гликированного гемоглобина через 12 и 26 недель лечения с поправкой на изменение суточной дозы инсулина и без этой поправки, с включением факторов «концентрация антител к инсулину до начала лечения», «изменение концентрации антител к инсулину», «наличие нейтрализующих антител к инсулину до начала лечения»; в модель для 26 недель лечения также был добавлен фактор «формирование нейтрализующих антител к инсулину во время лечения». Также были построены модели для изменения дозы инсулина через 12 и 26 недель лечения с включением факторов «концентрация антител к инсулину до начала лечения», «изменение концентрации антител к инсулину», «наличие нейтрализующих антител к инсулину до начала лечения»; в модель для 26 недель лечения также был добавлен фактор «формирование нейтрализующих антител к инсулину во время лечения».

В результате проведенного анализа было получено, что изменение концентрации антител к инсулину не коррелирует с изменением гликированного гемоглобина как через 12, так и через 26 недель лечения, как с поправкой, так и без поправки на изменение дозы

инсулина. При этом отмечается слабая ($r = 0,10$) положительная корреляция изменения концентрации антител к инсулину с дозой инсулина ($p = 0,025$). Однако эти модели объясняют крайне незначительную вариабельность ($R^2 < 3\%$), в связи с чем нельзя сказать, что изменение общей концентрации антител у инсулину является значимым фактором, ассоциированным с нарастанием дозы инсулина.

Был проведен анализ влияния нейтрализующих антител на дозу инсулина и эффективность инсулинотерапии. В результатах проведенного анализа была значимой корреляция между абсолютной суточной дозой болюсного инсулина и наличием или отсутствием нейтрализующих антител ($p = 0,003$). Абсолютная доза болюсного инсулина у пациентов, имеющих нейтрализующие антитела, была выше, чем у пациентов без нейтрализующих антител ($p = 0,009$ для растворимого инсулина человека и $p = 0,011$ для аналогов инсулина человека), однако относительная доза (ЕД(МЕ)/кг) при этом не различалась ($p = 0,089$ для растворимого инсулина человека и $p = 0,170$ для аналогов инсулина человека) (рис. 2). Поскольку метаболическую потребность отражает прежде всего относительная суточная доза инсулина, можно говорить о том, что нейтрализующие антитела не влияют на суточную потребность в болюсном инсулине.

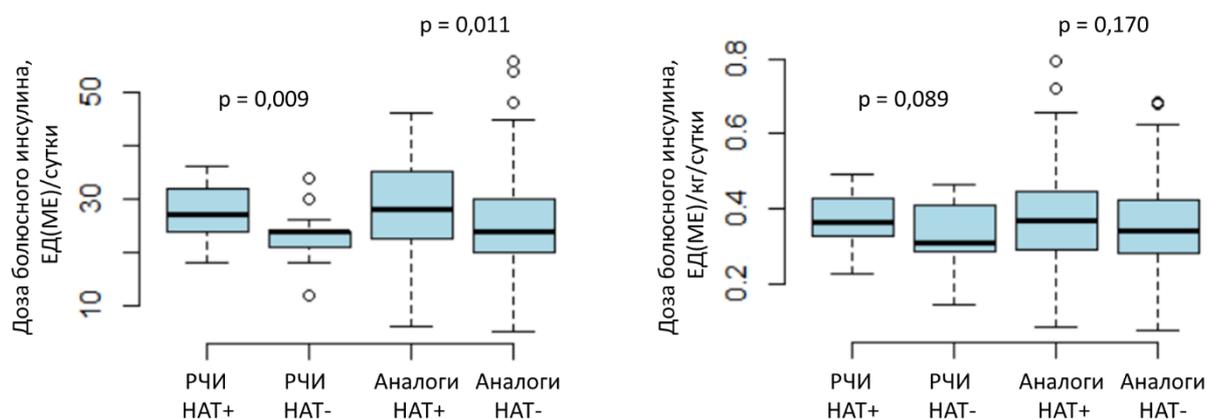


Рисунок 2. Доза болюсного инсулина в зависимости от его типа и наличия нейтрализующих антител

Наличие нейтрализующих антител не оказывает влияния на уровень гликированного гемоглобина у пациентов ($p = 0,127$ в однофакторной модели). При проведении ковариационного анализа с поправкой на фактор дозы инсулина, наличие нейтрализующих антител также не является статистически значимым фактором ($p = 0,083$ для фактора абсолютной суммарной суточной дозы инсулина и $p = 0,109$ для фактора суммарной суточной дозы инсулина на килограмм массы тела).

Наличие нейтрализующих антител не оказывает влияния на уровень гликемии натощак у пациентов ($p = 0,245$ в однофакторной модели). При проведении ковариационного анализа с поправкой на фактор дозы инсулина, наличие нейтрализующих антител также не является статистически значимым фактором ($p = 0,141$ для фактора абсолютной суммарной суточной дозы инсулина и $p = 0,226$ для фактора суммарной суточной дозы инсулина на килограмм массы тела).

Глава 6 содержит результаты собственных исследований по иммуногенности биосимиляров инсулинов гларгин и аспарт в сравнении с референтными препаратами.

В проспективном этапе исследования пациенты получали лечение инсулинами гларгин (180 человек: 90 человек – GP40061, 90 человек – Лантус® СолоСтар®) и аспарт

(264 человека: 132 человека – GP40071, 132 человека – НовоРапид® Пенфилл®). По результатам лечения было проведено сравнение параметров эффективности и иммуногенности биоподобных лекарственных препаратов (GP40061, GP40071) с соответствующими им референтными инсулинами.

В сравнительном клиническом исследовании GP40061 и Лантус® СолоСтар® пациенты были исходно сравнимы по показателю гликированного гемоглобина ($8,62 \pm 1,27$ % и $8,68 \pm 1,16$ %, соответственно, $p = 0,572$). Снижение гликированного гемоглобина через 12 недель лечения ($0,71 \pm 1,03$ % и $0,85 \pm 1,15$ %, соответственно, $p = 0,308$) и через 26 недель лечения ($0,66 \pm 1,01$ % и $0,77 \pm 1,06$ %, соответственно, $p = 0,326$) не отличалась между группами. Средняя суточная доза инсулина (базального и болюсного инсулинов) также была сопоставима при окончании этапа титрации дозы ($46,36 \pm 16,91$ ЕД/сутки и $46,66 \pm 16,93$ ЕД/сутки для GP40061 и Лантус® СолоСтар®, соответственно, $p = 0,964$) и изменялась одинаково в обеих группах как через 12 недель лечения ($0,62 \pm 5,46$ ЕД/сутки и $-0,60 \pm 5,24$ ЕД/сутки, соответственно, $p = 0,123$) и через 26 недель лечения ($1,05 \pm 5,07$ ЕД/сутки и $0,18 \pm 5,96$ ЕД/сутки, соответственно, $p = 0,237$).

Концентрация антител к инсулину была сопоставима до начала лечения ($4,34 \pm 7,66$ Ед/мл и $5,03 \pm 11,76$ Ед/мл для GP40061 и Лантус® СолоСтар®, соответственно, $p = 0,730$), и ее изменение не различалось между группами ни через 12 недель ($-0,19 \pm 2,49$ Ед/мл и $1,38 \pm 10,98$ Ед/мл, соответственно, $p = 0,399$), ни через 26 недель лечения ($-0,02 \pm 2,85$ Ед/мл и $0,30 \pm 4,07$ Ед/мл, соответственно, $p = 0,167$). Нейтрализующие антитела до начала лечения присутствовали у 29 % пациентов в группе GP40061 и у 30 % пациентов в группе Лантус® СолоСтар® ($p = 1,000$). Среди тех, у кого нейтрализующие антитела до начала лечения не выявлялись, они возникли на фоне лечения у 26,5 % в группе GP40061 и у 24 % в группе Лантус® СолоСтар® ($p = 0,879$). Доля пациентов с развитием клинически значимого иммунного ответа (по выше приведенным критериям) для оценки повышения концентрации антител к инсулину не различалась: через 12 недель лечения составила 8 % в группе GP40061 и 6 % в группе Лантус® СолоСтар® ($p = 0,765$), через 26 недель лечения – 3 % в группе GP40061 и 1 % в группе Лантус® СолоСтар® ($p = 0,613$); для оценки формирования нейтрализующих антител при их отсутствии до начала лечения – также не различалась: через 12 недель лечения составила 2 % в группе GP40061 и 1 % в группе Лантус® СолоСтар® ($p = 1,000$), через 26 недель лечения – 1 % в группе GP40061 и 1 % в группе Лантус® СолоСтар® ($p = 1,000$).

В сравнительном клиническом исследовании GP40071 и НовоРапид® Пенфилл® пациенты были исходно сравнимы по показателю гликированного гемоглобина ($8,69 \pm 1,05$ % и $8,63 \pm 1,05$ %, соответственно, $p = 0,580$). Снижение гликированного гемоглобина через 12 недель лечения ($0,55 \pm 1,10$ % и $0,64 \pm 1,09$ %, соответственно, $p = 0,542$) и через 26 недель лечения ($0,57 \pm 1,21$ % и $0,56 \pm 1,10$ %, соответственно, $p = 0,955$) не отличалась между группами. Средняя суточная доза инсулина (базального и болюсного инсулинов) также была сопоставима при окончании этапа титрации дозы ($50,20 \pm 14,31$ ЕД/сутки и $49,43 \pm 16,48$ ЕД/сутки для GP40071 и НовоРапид® Пенфилл®, соответственно, $p = 0,541$) и изменялась одинаково в обеих группах как через 12 недель лечения ($0,55 \pm 4,76$ ЕД/сутки и $0,45 \pm 4,15$ ЕД/сутки, соответственно, $p = 0,975$) и через 26 недель лечения ($1,25 \pm 6,43$ ЕД/сутки и $1,45 \pm 4,67$ ЕД/сутки, соответственно, $p = 0,667$).

Концентрация антител к инсулину была сопоставима до начала лечения ($4,86 \pm 12,62$ Ед/мл и $3,74 \pm 4,21$ Ед/мл для GP40071 и НовоРапид® Пенфилл®, соответственно, $p =$

0,545), и ее изменение не различалось между группами ни через 12 недель ($1,18 \pm 7,77$ Ед/мл и $0,21 \pm 2,09$ Ед/мл, соответственно, $p = 0,718$), ни через 26 недель лечения ($1,65 \pm 7,11$ Ед/мл и $0,40 \pm 2,45$ Ед/мл, соответственно, $p = 0,084$). Нейтрализующие антитела до начала лечения присутствовали у 22 % пациентов в обеих группах ($p = 1,000$). Среди тех, у кого нейтрализующие антитела до начала лечения не выявлялись, они возникли на фоне лечения у 11,6 % в группе GP40071 и у 13,6 % в группе НовоРапид® Пенфилл® ($p = 0,834$). Доля пациентов с развитием клинически значимого иммунного ответа (по выше приведенным критериям) для оценки повышения концентрации антител к инсулину не различалась: через 12 недель лечения составила 7 % в группе GP40071 и 2 % в группе НовоРапид® Пенфилл® ($p = 0,065$), через 26 недель лечения – 10 % в группе GP40071 и 6 % в группе НовоРапид® Пенфилл® ($p = 0,363$); для оценки формирования нейтрализующих антител при их отсутствии до начала лечения – также не различалась: через 12 недель лечения составила 1,5 % в группе GP40071 и 0 % в группе НовоРапид® Пенфилл® ($p = 0,478$), через 26 недель лечения – 1 % в группе GP40071 и 3 % в группе НовоРапид® Пенфилл® ($p = 0,367$).

Таким образом, не было получено различий в эффективности и иммуногенности биоподобных препаратов инсулинов аспарт и гларгин по сравнению с их референтными препаратами.

Заключение

Проведенное исследование показало ограниченную клиническую значимость развития иммунного ответа на инсулинотерапию. Общий пул антител не влияет на эффективность лечения и на дозу инсулина. Формирование нейтрализующих инсулин антител не влияет на эффективность терапии и приводит к незначительному повышению дозы инсулина, которое можно провести без каких-либо клинических последствий. Предложенные критерии клинически значимого иммунного ответа должны рассматриваться только в комплексе (отсутствие снижения гликированного гемоглобина при увеличении дозы инсулина и при наличии лабораторного подтверждения развития иммунного ответа), при этом иммунный ответ как причина неудовлетворительного гликемического контроля может рассматриваться только при исключении других причин (неправильная техника инъекций, болезнь, изменения в диете и образе жизни). Различия между инсулинами с различными МНН в отношении их иммуногенности в целом незначительны, и для их выявления зачастую требуется включение в клиническое исследование нескольких тысяч пациентов. Различия между биоподобными и референтными препаратами меньше, чем между различными МНН, и сопоставимы с различиями между разными сериями референтных препаратов, следовательно, с учетом существования высокочувствительных ортогональных доклинических методик выявления различий между молекулами, проведение сравнительных исследований иммуногенности биосимиляров не рационально и избыточно в программе разработки продукта.

Выводы

1. Доля пациентов с нейтрализующими инсулин антителами в популяции сахарного диабета 1 типа составила 22 % и 30 % в исследованиях инсулина аспарт и инсулина гларгин, соответственно. Концентрация антител к инсулину находилась в пределах 0 – 12,69 Ед/мл у 95 % пациентов и в пределах 0-22,29 Ед/мл у 97,5 % пациентов, что

позволяет считать концентрации менее 12,69 Ед/мл нормальным фоновым значением при сахарном диабете 1 типа, при этом концентрация антител к инсулину положительно коррелирует с длительностью инсулинотерапии (длительностью течения диабета) в данной группе.

2. Клиническими проявлениями значимого иммунного ответа могут считаться отсутствие снижения гликированного гемоглобина на фоне адекватно подобранной дозы инсулина, а также необходимость повышения дозы инсулина при отсутствии изменений других параметров пациента (диеты, физических нагрузок, инфекционных, гормональных и иных факторов, оказывающих влияние на гликемический контроль) при лабораторном подтверждении нарастания концентрации антител или формирования нейтрализующих антител у пациентов без них до начала лечения.

3. Частота развития клинически значимого иммунного ответа у пациентов с сахарным диабетом 1 типа, в соответствии с предложенными в работе критериями клинически значимого иммунного ответа, не превышает 5 %, если лабораторным критерием является повышение концентрации антител к инсулину, и не превышает 2 %, если лабораторным критерием подтверждения развития иммунного ответа является формирование нейтрализующих антител к инсулину.

4. Ни нарастание концентрации антител, ни формирование нейтрализующих антител не коррелирует с эффективностью инсулинотерапии в общей популяции, что, вероятно, связано с особенностями подбора доз инсулина (титрация до цели, высокая вариабельность доз болюсного инсулина в зависимости от метаболических потребностей пациента). Нарастание концентрации антител и формирование нейтрализующих антител также не коррелируют с дозой инсулина на килограмм массы тела в общей популяции пациентов с сахарным диабетом 1 типа. Параметры иммунного ответа имеют низкую прогностическую ценность в отношении эффективности инсулинотерапии.

5. Биоподобные препараты инсулинов гларгин и аспарт не отличаются от своих референтных препаратов по параметрам эффективности и иммуногенности. Для выявления различий в параметрах иммуногенности потребовалось бы включить до 2020 и 834 пациентов соответственно, что значительно превышает экономически и клинически целесообразные выборки в такого рода исследованиях.

6. Тренд на смягчение регуляторных требований к регистрации биоподобных лекарственных препаратов и на отказ от проведения сравнительных клинических исследований эффективности и безопасности биоподобных лекарственных препаратов, в том числе препаратов инсулина, представляется своевременным и научно обоснованным в связи с большей чувствительностью сравнительных аналитических методов к выявлению различий между препаратами, и в связи с низкой клинической значимостью развития иммунного ответа на инсулинотерапию.

Научно-практические рекомендации

1. Выбор препарата инсулина следует осуществлять на основании сопоставимости фармакологических профилей и особенностей образа жизни пациента без поправки на наличие и концентрацию антител к инсулину у пациента и иммуногенность самого инсулина.

2. В редких случаях (< 5 %), при подозрении на низкую эффективность инсулинотерапии на фоне повышения дозы инсулина и при исключении иных факторов, которые могут оказать на это влияние (техника инъекций, исключение инфекционного

процесса, нарушений диеты и т.д.), возможно определение нейтрализующих антител к инсулину с последующим решением вопроса о необходимости изменения МНН инсулина. Концентрация антител в данном случае будет неинформативной.

3. Проведение сравнительных клинических исследований эффективности и иммуногенности биоподобных и референтных препаратов инсулинов не целесообразно включать в обязательную программу разработки биоподобного препарата инсулина. Решение о необходимости проведения этого исследования следует принимать на основании тщательной оценки сравнительных доклинических данных и результатов сравнительной оценки фармакокинетики и фармакодинамики в исследовании с использованием метода гиперинсулинемического эугликемического клэмпса.

4. Коррекция регуляторных подходов к разработке и регистрации биоподобных препаратов инсулина может заключаться в пересмотре требований к программе клинических исследований биоподобных препаратов инсулина и в отказе от предрегистрационных клинических исследований иммуногенности «по умолчанию». Решение о необходимости проведения сравнительных исследований иммуногенности на предрегистрационном этапе в данном случае должно быть научно обоснованным и приниматься на основании всего комплекса данных, представленных в досье лекарственного препарата, и с учетом остаточной неопределенности после проведения доклинических исследований и клинического сравнительного исследования фармакокинетики и (при необходимости) фармакодинамики инсулинов.

Список научных трудов, опубликованных по теме диссертации

1. Мосикян, А.А. Иммуногенность препаратов инсулинов: краеугольный камень в оценке безопасности / **Мосикян А.А.**, Бабенко А.Ю., Макаренко И.Е. // *PMЖ*. – 2019. – №4. – 32-37.

2. Залевская А.Г. Многоцентровое открытое рандомизированное сравнительное исследование безопасности (иммуногенности) и эффективности препаратов GP40041 и Хумулин® НПХ / Залевская А.Г., **Мосикян А.А.**, Афонькина О.В., Драй Р.В. // *Качественная клиническая практика*. – 2019. – №1. – 53-64.

3. Абраменко Н.Б. Разработка и валидация методики определения нейтрализующих антител к инсулину (гларгин) в плазме крови человека / Абраменко Н.Б., Головина Е.С., Макаренко И.Е., **Мосикян А.А.**, и соавт. // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2019. – №8(3). – 70-78.

4. Karonova T.L. Safety and efficacy of GP40061 insulin glargine compared with originator insulin glargine (Lantus): A randomized open-label clinical trial / Karonova T.L., **Mosikian A.A.**, Mayorov A.Y., Makarenko I.E., et al. // *Journal of Comparative Effectiveness Research*. – 2020. – №9(4). – 263-273.

5. **Мосикян А.А.** Иммуногенность биологических лекарственных препаратов: причины, механизмы, последствия / **Мосикян А.А.**, Хохлов А.Л. // *Медицинская этика*. – 2020. – №1. – 28-35.

6. **Мосикян А.А.** Иммуногенность инсулинов: клинические проявления и ее значимость / **Мосикян А.А.**, Исаева Ю.Е. // *PMЖ*. – 2020. – №1. – 19-22.

7. Mayorov A.Y. Efficacy and safety of GP40021 insulin lispro biphasic compared to Humalog Mix 25 in type 2 diabetes mellitus patients / Mayorov A.Y., **Mosikian A.A.**, Alpenidze D.N., Makarenko I.E., et al. // *Journal of Comparative Effectiveness Research*. – 2021. – №10(1). – 55-66

8. **Mosikian A.** Anti- insulin antibody concentration in type 1 diabetes mellitus patients injecting different types of insulin / **Mosikian A.**, Makarenko I., Belikova T., Drai R. // *Diabetes Technology & Therapeutics*. – 2020. – №22(S1). – A-275.

9. **Mosikian A.** Insulin glargine biosimilar (GP40061) shows no difference of immunogenicity as compared to the reference drug / **Mosikian A.**, Makarenko I., Afonkina O., Zinnatulina B., Drai R. // *Diabetes Technology & Therapeutics*. – 2020. – №22(S1). – A-277.

Список сокращений

АТ	–	Антитела
ВАК	–	Высшая аттестационная комиссия
ДИ	–	Доверительный интервал
ЕАЭС	–	Евразийский Экономический Союз
ЗАО	–	Закрытое акционерное общество
ИФА	–	Иммуноферментный анализ
КИ	–	Клиническое исследование
ЛП	–	Лекарственный препарат
МНН	–	Международное непатентованное наименование
НАТ	–	Нейтрализующие антитела
ООО	–	Общество с ограниченной ответственностью
РИНЦ	–	Российский индекс научного цитирования
РЧИ	–	Растворимый человеческий инсулин
ANCOVA	–	Analysis of covariance (ковариационный анализ)
СТРФ	–	Clinical Trials Pharmaceutic Forum (Фармацевтический форум «Клинические исследования в ЕАЭС»)
ICH	–	The International Council for Harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use (Международный совет по гармонизации технических требований к лекарственным препаратам для человека)

МОСИКЯН АННА АЛЬБЕРТОВНА

**ОЦЕНКА КЛИНИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ АНТИ-
ИНСУЛИНОВЫХ АНТИТЕЛ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ПРЕПАРАТАМИ ИНСУЛИНА**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология

Подписано в печать __. __. 202__ г.

Формат 60x84/16. Печать офсетная. Усл.-печ. л. __.

Усл. изд. л. __ Тираж 100 экз. Заказ __

Отпечатано в типографии