Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Мосикян
Анна Альбертовна

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

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Научный руководитель:

член-корреспондент РАН, профессор, доктор медицинских наук,
Александр Леонидович Хохлов

Ярославль, 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 5

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 11

1.1. Иммуногенность биологических лекарственных препаратов 11

1.1.1. Понятие биологических и биотехнологических лекарственных препаратов 11

1.1.2. Понятие иммуногенности и патогенетические варианты ее проявления 12

1.2. Клинические последствия развития иммунного ответа 15

1.2.1. Изменение активности лекарственного препарата 15

1.2.2. Генерализованные иммунные реакции 17

1.2.3. Нейтрализация эндогенных белков 18

1.3. Факторы, влияющие на иммуногенность биологических лекарственных препаратов 19

1.3.1. Характеристики пациента 19

1.3.2. Свойства лекарственного препарата 20

1.4. Лекарственные препараты инсулина 23

1.4.1. Типы препаратов инсулина в зависимости от их происхождения 23

1.4.2. Оригинальные и биоподобные препараты инсулина 23

1.4.3. Свойства ЛП инсулина, определяющие вероятность развития иммунного ответа 25

1.5. Результаты клинических исследований иммуногенности ЛП инсулинов 28

1.5.1. Образование антител к инсулину при лечении оригинальными ЛП инсулина 28

1.5.2. Сравнительные исследования иммуногенности биоподобных и референтных ЛП инсулина 30

1.6. Определение клинически значимого иммунного ответа при лечении ЛП инсулина 32

1.7. Неудовлетворенные регуляторные потребности 34

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 36

2.1. Тип и организация исследования 36

2.2. Методы исследования 47

2.2.1. Получение письменного информированного согласия 47

2.2.2. Сбор данных субъектов исследования 49

2.2.3. Оценка суточной дозы инсулина 49

2.2.4. Характеристика зарегистрированных нежелательных явлений 50

2.2.5. Лабораторные методы исследования 50

2.2.6. Статистические методы исследования 55

ГЛАВА 3. СТАТУС ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1 ТИПА В ОТНОШЕНИИ РАЗЛИЧНЫХ ПАРАМЕТРОВ ИММУНОГЕННОСТИ 58

3.1. Концентрация антител к инсулину и МНН применяемого инсулина 58

3.2. Концентрация антител к инсулину и параметры пациентов с сахарным диабетом 1 типа 64

3.3. Нейтрализующие антитела к инсулину и МНН применяемого инсулина 69

3.4. Нейтрализующие антитела к инсулину и параметры течения сахарного диабета 74

3.4.1. Оценка корреляций наличия нейтрализующих антител к инсулину с исходными параметрами пациентов 74

3.4.2. Параметры пациентов, получающих растворимый человеческий инсулин и аналоги инсулина человека ультракороткого действия 78

3.4.3. Влияние нейтрализующих антител к инсулину на эффективность инсулинотерапии 81

3.5. Резюме..... 86

ГЛАВА 4. КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ПРЕПАРАТАМИ ИНСУЛИНА. 89

4.1. Критерии клинически значимого иммунного ответа при лечении препаратами инсулина. 89

4.2. Частота развития клинически значимого иммунного ответа у пациентов с сахарным диабетом 1 типа при лечении препаратами инсулинов гларгин и аспарт 90

4.3. Реакции в месте введения 92

4.4. Резюме..... 92

ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ПАРАМЕТРОВ ИММУНОГЕННОСТИ И ФАКТА РАЗВИТИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНСУЛИНОТЕРАПИИ И ИЗМЕНЕНИЕ ДОЗЫ ИНСУЛИНА 96

ГЛАВА 6. ИММУНОГЕННОСТЬ БИОСИМИЛЯРОВ ИНСУЛИНОВ ГЛАРГИН И АСПАРТ В СРАВНЕНИИ С РЕФЕРЕНТНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ. 104

ГЛАВА 7. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ..... 107

ВЫВОДЫ 117

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ..... 119

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ 121

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... 123

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Применение биологических лекарственных препаратов 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 [11].

Лекарственные препараты инсулинов являются биологическими (биотехнологическими) и обладают свойством иммуногенности, т.е. способны вызывать образование антител и в очень редких случаях (<1/10 000) – генерализованные аллергические реакции в ответ на их введение. 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 влияния на эффективность и безопасность лечения [146].

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 новых лекарственных препаратов инсулинов, как оригинальных, так и биоаналогичных, требуется проведение исследований иммуногенности, однако клинически значимые конечные точки и необходимый размер выборки в данных исследованиях не конкретизируется регуляторными документами [11, 51].

Опубликованные сравнительные данные об иммуногенности различных препаратов инсулина неоднозначны: в некоторых работах показано отсутствие различий препаратов по параметрам иммуногенности [79, 120], но существуют

публикации, свидетельствующие о большей иммуногенности инсулинов гларгин и аспарт [81].

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 [79], в регуляторных руководствах по регистрации препаратов инсулина отражены требования оценивать влияние различных параметров иммуногенности (без уточнения, каких именно) на гипогликемическую эффективность и дозы инсулина [11].

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.

В рамках планируемого диссертационного исследования была изучена иммуногенность различных инсулинов и было оценено влияние образования анти-инсулиновых антител на эффективность и безопасность инсулинотерапии.

Цель исследования

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

Основные 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 и регистрации 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).

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 и лабораторные методы диагностики. Проведена статистическая обработка результатов.

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.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, из них 2 работы, рецензируемых SCOPUS, 4 работы, рецензируемые ВАК, 1 работа, входящая в базу РИНЦ и 2 тезиса зарубежной научной конференции.

Аппробация работы

Материалы диссертации были представлены на конференции «CTPF-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.

Личный вклад автора в проведенное исследование

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 выполнен статистический анализ полученных данных для настоящей работы.

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 (13 отечественных и 163 зарубежных).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Иммуногенность биологических лекарственных препаратов

1.1.1. Понятие биологических и биотехнологических лекарственных препаратов

Биологический лекарственный препарат (ЛП) – это препарат, действующее вещество которого произведено или выделено из биологического источника. Биотехнологический ЛП – это препарат, произведенный при помощи биотехнологических процессов с применением методов с использованием технологии рекомбинантной ДНК, контролируемой экспрессии генов, кодирующих выработку биологически активных белков, гибридомных технологий, моноклональных антител или других биотехнологических процессов [11].

Понятие биологических ЛП шире, чем биотехнологических ЛП; последние являются частью всей группы биологических ЛП наряду с ЛП, полученными из крови или плазмы крови человека и животных (за исключением цельной крови), а также с генотерапевтическими ЛП [12]. При этом Совет Евразийской Экономической Комиссии (ЕЭК) трактует понятие биологических ЛП шире, чем Федеральный Закон «Об обращении лекарственных средств» N 61-ФЗ от 12.04.2010, дополняя его препаратами пробиотиков (эубиотиков), препаратами бактериофагов, и ЛП, содержащими активные фармацевтические субстанции (АФС) нерекомбинантного происхождения, произведенные или выделенные из биологических источников (например, хорионический гонадотропин человека, стрептокиназа, ботулинические токсины, гепарин, хондроитина сульфат, интерферон альфа человека, лизаты бактерий и другие АФС) [11].

Актуальная редакция Решения Совета ЕЭК от 3 ноября 2016 г. N 89 «Об утверждении правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза» во многом соответствует отдельным руководствам Европейского Агентства Лекарственных Средств

(ЕАЛС) и, таким образом, гармонизирует требования к разработке биологических лекарственных препаратов с требованиями высоко регулируемых фармацевтических рынков.

Присвоение статуса биологического лекарственного препарата является критически важным с точки зрения программы разработки лекарственного препарата с целью обеспечения безопасности пациентов, для которых предназначается данный ЛП. Помимо стандартных испытаний общей токсичности, репродуктивной и онтогенетической токсичности, а также канцерогенного потенциала, для биологических препаратов требуется проводить оценку их потенциальной иммуногенности – способности ЛП инициировать образование [11, 89].

1.1.2. Понятие иммуногенности и патогенетические варианты ее проявления

Иммуногенность – это способность ЛП вызывать развитие иммунного ответа (ИО) на себя и родственные белки или приводить к иммунологически опосредованным нежелательным клиническим явлениям [11].

Биологический препарат, попадая в организм человека, может захватываться антиген-представляющими клетками и, при распознавании антигена как чужеродного, будет происходить активация CD4+ Т-лимфоцитов, созревание В-лимфоцитов и их превращение в лимфоцитарные плазмоциты и, как следствие, образование антител к препарату [67, 102].

Антитела (АТ) к биологическому ЛП классифицируются на нейтрализующие и не-нейтрализующие (связывающие) антитела. Нейтрализующие АТ приводят к инактивации ЛП как за счет значительного повышения его почечного клиренса, так и за счет связывания с активным центром ЛП или любой частью молекулы ЛП с нарушением конформации активного центра ЛП, что не позволяет ЛП взаимодействовать с рецептором и приводит к его неэффективности. Не-нейтрализующие (связывающие) антитела

могут снижать почечный клиренс ЛП, тем самым повышая его эффективность и увеличивая риски передозировки ЛП [58, 77, 80]. Таким образом, как нейтрализующие, так и не-нейтрализующие АТ могут изменять фармакокинетические и фармакодинамические свойства ЛП, и изменение фармакокинетики ЛП может быть ранним признаком формирования антител [11].

Патогенетические варианты развития иммунного ответа не ограничиваются образованием антител и их прямым влиянием на фармакологические свойства препарата [76, 168]. Образующиеся в ответ на введение ЛП антитела, связываясь с препаратом, образуют иммунные комплексы антиген-антитело, которые запускают различные варианты иммунных реакций, таких как активация Fc рецепторов, активация комплемента, запуск сигнального пути цитокинов и другие иммунологические реакции, которые, по своей сути, будут являться вторичными по отношению к образованию антител к биологическому ЛП [18, 102]. Потенциально возможные варианты развития иммунных реакций в данном случае зависят от строения биологического ЛП [8].

Моноклональные антитела и их производные, содержащие Fc фрагмент, способны приводить к активации Fc-гамма рецепторов (FcγR) и комплемента. FcγR участвуют в распознавании объектов фагоцитоза и присутствуют на различных антиген-представляющих клетках, включая моноциты, макрофаги, дендритные клетки, В-лимфоциты, а также на гранулоцитах, включая нейтрофилы, базофилы, эозинофилы и тучные клетки [106, 109, 151]. FcγRI обладают высокой аффинностью и связывают мономеры иммуноглобулина G (IgG), тогда как FcγRII и FcγRIII являются низкоаффинными и связывают в основном комплексы антиген-антитело и агрегаты антител небольших и средних размеров [157], что в итоге приводит к высвобождению провоспалительных цитокинов [118] и к развитию реакции гиперчувствительности немедленного типа III [102, 169]. Активация комплемента происходит по классическому пути

при связывании Fc фрагмента комплекса антиген(ЛП)-антитело с C1q фрагментом комплемента [69, 100], приводя в итоге к еще большей продукции антител и к прямой активации Т-лимфоцитов [102]. При этом различные биологические ЛП активируют FcγR и комплемент в разной степени. Lagassé и соавт. сравнили зарегистрированные в Соединенных Штатах Америки моноклональные антитела и другие белки, содержащие Fc-фрагмент, в отношении их взаимодействия с FcγR и C1q и показали высокую вариабельность взаимодействия в зависимости от строения молекулы, экспрессионной системы и пост-трансляционных модификаций [106].

Кроме того, при использовании биологических ЛП, в большой степени сходных с эндогенными белками, возможна перекрестная реактивность с эндогенными белками с последующим изменением их функции. Перекрестная реактивность может приводить к особенно тяжелым осложнениям в тех случаях, когда биологический ЛП является копией какого-либо рецептора или цитокина, в норме экспрессирующегося на поверхности клеток [50, 64].

Так, для некоторых биологических цитотоксических ЛП (Chimeric antigen receptor therapy (CAR-T), муромонаб, алемтузумаб, ритуксимаб, блинатомумаб и некоторые другие моноклональные антитела) описаны случаи развития синдрома высвобождения цитокинов («цитокиновый шторм») [66, 108, 113, 126, 138]. Синдром высвобождения цитокинов обычно развивается вскоре после начала лечения и обусловлен масштабной неспецифической активацией Т-лимфоцитов с последующим высвобождением провоспалительных цитокинов: интерлейкина-1, интерлейкина-6, фактора некроза опухоли, интерферона-гамма [42, 113 ,138].

Важно отметить, что иммунные реакции, опосредованные наличием Fc-фрагмента в молекуле биологического ЛП или масштабной неспецифической активацией Т-лимфоцитов, непосредственно связаны с лекарственным

препаратом (его строением или механизмом действия) и не характерны для молекул других классов [8].

1.2. Клинические последствия развития иммунного ответа

1.2.1. Изменение активности лекарственного препарата

Все биологические ЛП подлежат дополнительному мониторингу безопасности не менее 5 лет после их регистрации для выявления редких нежелательных лекарственных реакций, в том числе обусловленных иммуногенным потенциалом ЛП [10, 49, 52].

Тем не менее, образование антител к терапевтическому белку не всегда приводит к каким-либо клинически значимым последствиям [8]. Например, при лечении семаглутидом – агонистом глюкагоноподобного пептида 1 – образование антител к семаглутиду не ведет ни к изменению эффективности терапии (по сравнению с пациентами без антител к семаглутиду), ни к увеличению частоты генерализованных аллергических реакций или реакций в месте введения препарата (по сравнению с пациентами, получавшими плацебо или получавшими инъекции семаглутида, и не имевшими антител к ЛП) [47].

При лечении другим агонистом глюкагоноподобного пептида 1 – ликсисенатидом – образование антител к ЛП приводит к значительному изменению фармакокинетических свойств ликсисенатида в результате связывания АТ с молекулой ЛП: активная фракция ликсисенатида у пациентов с АТ к ЛП составила 22 % по сравнению с 72 % у пациентов без АТ к ЛП, и концентрация ЛП была обратно пропорциональна количеству циркулирующих АТ к препарату. Образование АТ в данном случае также приводило к повышению риска развития реакций в месте инъекции (но не генерализованных аллергических реакций). Тем не менее, развитие иммунного ответа на введение ЛП не оказывало влияния на фармакодинамические параметры ликсисенатида и, следовательно, на его эффективность [46].

Развитие иммунного ответа при лечении инфликсимабом также ассоциировано с изменениями фармакокинетических характеристик ЛП: с повышением почечного клиренса и, как следствие, с уменьшением периода полувыведения препарата и его концентрации в крови [45, 149]. Несмотря на то, что формирование антител к инфликсимабу является не единственной причиной снижения его экспозиции, способность АТ снижать концентрацию ЛП в крови должна приниматься во внимание, поскольку достижение терапевтической концентрации ЛП является высоко значимым с точки зрения эффективности терапии [149].

Снижение эффективности при развитии иммунного ответа (в частности, из-за образования нейтрализующих антител) было зарегистрировано для эксенатида – первого из зарегистрированных агонистов глюкагоноподобного пептида 1. Эффективность лечения, оцененная по изменению концентрации гликированного гемоглобина, была ниже у пациентов с высокими титрами антител к эксенатиду, но не отличалась у пациентов с низкими титрами и с отсутствием антител [24, 56, 99].

Вышеописанные проявления иммунного ответа – нередкое явление, и они могут быть оценены при проведении клинических исследований лекарственного препарата как с позиции частоты, так и с позиции их клинической значимости. Последствия изменения фармакокинетических и фармакодинамических свойств во многом зависят от терапевтического диапазона лекарственного препарата и от заболевания, для лечения которого предназначен ЛП. Иммуногенность биологических ЛП, оцениваемая по интенсивности формирования антител, в том числе, нейтрализующих, значительно варьирует как между классами ЛП, так и внутри одного класса, от практически полного отсутствия иммуногенности (секукинумаб, эстекинумаб, семаглутид, ромиплостим) до более чем 50-процентной вероятности образования АТ (эксенатид, инфликсимаб) [50, 56, 94, 153, 155].

1.2.2. Генерализованные иммунные реакции

Генерализованные иммунные реакции при введении биологических ЛП встречаются значительно реже, чем формирование АТ к ЛП без развития аллергических реакций. Патофизиологический механизм, лежащий в основе развития генерализованной реакции, зависит от параметров молекулы терапевтического белка, как было описано ранее. Например, для моноклональных антител, в зависимости от клинических проявлений и тактики ведения, выделяют три основных механизма реакций гиперчувствительности немедленного типа: IgE-опосредованный (по типу реакции гиперчувствительности немедленного типа I), IgG-опосредованный (связанный с активацией FcγR, активацией комплемента, изменением клиренса ЛП и/или блокированием активного сайта ЛП) и синдром высвобождения цитокинов [15, 68, 131, 140, 170].

IgE-опосредованные реакции обычно развиваются после нескольких введений, поскольку в основе реакций гиперчувствительности данного типа лежит сенситизация к аллергену. Однако в редких случаях (например, при введении цетуксимаба), когда антитела к молекуле ЛП или ее части сформированы у пациента до начала лечения, возможно развитие IgE-опосредованной реакции при первом введении ЛП [37, 98, 162]. Предсказать развитие генерализованной IgE-опосредованной реакции можно посредством проведения кожного теста, а снизить риск ее развития – посредством проведения протокола десенситизации [131].

IgG-опосредованные реакции развиваются на фоне многократного введения ЛП и могут иметь различные клинические проявления: в случае активации FcγR и/или комплемента клиническая картина будет сходна с таковой для IgE-опосредованных реакций [57, 102], но кожные тесты при этом будут отрицательными [117], а в случае изменения (чаще всего – повышения) клиренса

ЛП и/или связывания активного центра ЛП будет регистрироваться снижение эффективности ЛП [23, 116, 131].

Синдром высвобождения цитокинов описан для CAR-T терапии и ряда моноклональных антител. Клинические проявления синдрома могут быть как специфическими (головная боль, повышение артериального давления, боли в спине и груди, лихорадка, озноб), так и неспецифическими (приливы, одышка, стеснение в горле, головокружение, снижение артериального давления и желудочно-кишечные симптомы) [83, 110]. Данный тип реакции обычно возникает при первом введении, и его клинические проявления уменьшаются при последующих введениях ЛП. Предотвратить или уменьшить выраженность симптомов «цитокинового шторма» можно с помощью премедикации ацетаминофеном и препаратами глюкокортикостероидов, а также посредством снижения скорости инфузии ЛП, при этом в случае развития синдрома высвобождения цитокинов, как и в случае развития IgG-опосредованной реакции, возможно возобновление лечения тем же ЛП при соблюдении протоколов десенситизации [131].

1.2.3. Нейтрализация эндогенных белков

Кроме всех выше перечисленных последствий формирования иммунного ответа на введение ЛП при разработке биологических ЛП особенное внимание уделяется потенциальной перекрестной реактивности: формированию АТ, которые будут связываться с эндогенными белками и нейтрализовать их [8]. Классическим примером перекрестной реактивности является поражение кардиомиоцитов при ревматической лихорадке антителами, образующимися в ответ на поражение стрептококком группы А [96]. Основной теорией, лежащей в основе перекрестной реактивности, является теория молекулярной мимикрии: гомологичность структуры экзогенного антигена и эндогенных белков [41, 142, 145, 166].

Перекрестная реактивность с последующим развитием чистой красноклеточной аплазии была описана у пациентов, получавших лечение рекомбинантным эритропоэтином [26, 115, 135]. Shin и соавт. также описали случай развития тромбоцитопении у пациента, получавшего лечение рекомбинантным эритропоэтином [148]. Перекрестная реактивность с эндогенным тромбопоэтином описана для пегелированного рекомбинантного агониста рецепторов тромбопоэтина (PEG-rHuMGDF), разработка которого была остановлена из соображений безопасности [105]. Современные агонисты тромбопоэтинового рецептора не вызывают перекрестную реактивность и имеют благоприятное соотношение польза-риск [73, 74].

1.3. Факторы, влияющие на иммуногенность биологических лекарственных препаратов

Все факторы, влияющие на вероятность развития иммунного ответа, делятся на факторы-характеристики пациента и на факторы-свойства лекарственного препарата.

1.3.1. Характеристики пациента

Одной из ключевых характеристик пациента, оказывающих влияние на ожидаемый риск развития ИО у пациента, является его иммунный статус: по сравнению с риском развития ИО у здоровых добровольцев, у пациентов с иммунной супрессией риск будет ниже (в том числе при иммунной супрессии, вызванной приемом лекарственных препаратов, например, метотрексата), а у пациентов с повышенной иммунной реактивностью (например, при наличии аутоиммунного заболевания) – выше. На потенциальную иммуногенность препарата у пациента также может влиять полиморфизм генов, кодирующих некоторые цитокины (например, интерлейкин-10 (IL-10), трансформирующий фактор роста бета (TGF-β) и другие) [11, 50, 64].

Другим пациент-ассоциированным фактором развития иммунного ответа является возраст пациента: риск развития иммунного ответа уменьшается по

мере увеличения возраста пациента, однако механизм, лежащий в основе этого явления до конца не ясен: на данный момент предполагается, что с возрастом снижается иммунологическая реактивность [88].

В связи с наличием меж-индивидуальной вариабельности в параметрах функционирования иммунной системы, люди обладают различной толерантностью к эндогенным белкам, и от этого зависит выраженность реакции на введение биологического ЛП, часть молекулы или вся молекула которого является копией части или целой молекулы эндогенного белка. В особенности это касается таких молекул, как, например, цитокины и ростовые факторы, концентрация которых в плазме крови измеряется в диапазоне нанограммов или пикограммов на миллилитр. Таким образом, наивные по отношению к ЛП пациенты уже могут иметь антитела к этому ЛП. Антитела к ЛП могут также определяться у пациентов, которые ранее получали этот или сходный с ним по молекулярному строению биологический ЛП, а также у пациентов, имеющих генетическую мутацию по типу «нокаут», приводящую к отсутствию у них эндогенного белка. В этом случае вводимый в качестве заместительной терапии биологический ЛП может быть воспринят иммунной системой как чужеродный, поскольку отсутствующий у пациента эндогенный белок не был представлен иммунокомпетентным клеткам и является для них чужеродным белком [11, 50, 64].

1.3.2. Свойства лекарственного препарата

Вероятность развития ИО в ответ на введение биологического ЛП зависит как от пути и режима введения ЛП, так и непосредственно от физико-химических свойств препарата [11, 50, 64].

В отношении пути введения известно, что подкожное или внутримышечное введение препаратов ассоциировано с большей потенциальной иммуногенностью по сравнению с внутривенным путем введения. С большей иммуногенностью также ассоциирована большая длительность терапии и

периодическое (нерегулярное) введение препарата, в особенности – введение с большими перерывами в лечении [11, 50, 64]

Одной из характеристик ЛП, потенциально влияющей на его иммуногенность, является происхождение молекулы и связанные с этим особенности структуры молекулы. Так, риск развития ИО в ответ на молекулу животного происхождения, например, мышиные моноклональные антитела, выше, чем гуманизированные или человеческие антитела [128, 143, 150]. В целом, любые отличия терапевтической молекулы от эндогенного белка, в том числе новые эпитопы (в случае, например, моноклональных антител и их производных) или замена аминокислотных последовательностей или единичных остатков (в случае, например, генно-инженерных аналогов человеческого инсулина) ассоциированы с повышением риска развития ИО по сравнению с ответом на введение полностью гомологичных молекул [11, 27, 50, 64, 175].

При разработке новых терапевтических белков особое внимание уделяется пост-трансляционным модификациям и их потенциальному влиянию на иммуногенность биологических лекарственных препаратов. Модификации, для которых наиболее характерно влияние на иммуногенность ЛП, включают в себя (но не ограничиваются данным перечнем) изменения Т-клеточных эпитопов [14, 127], гликозилирование, пегилирование, окисление, дезамидирование, сульфатирование и альдегидную модификацию белков [104, 174], при этом иммунный ответ может развиваться как на присоединенный к молекуле компонент, так и на всю молекулу. Повышенные риски развития ИО характерны и для белков, получаемых методом слияния (фузии) поскольку при их создании в зоне слияния формируются участки молекулы, являющиеся неоантигенами для иммунной системы человека [11, 50, 64].

Среди препарат-ассоциированных факторов иммуногенности также выделяют образование агрегатов. При агрегации мономеров терапевтического белка может изменяться количество доступных для связывания эпитопов, могут

«оголяться» новые эпитопы вследствие изменения конформации молекулы, а также могут формироваться ранее отсутствующие поливалентные эпитопы. Всё это приводит к активации гуморального иммунного ответа по механизму, описанному ранее [157].

Важное значение имеют примеси и контаминаты в готовой лекарственной форме терапевтического белка. Производственные примеси образуются в ходе процесса производства, например, из клеточных субстратов (контаминаты), клеточной культуры (например, индукторы, антибиотики или компоненты питательной среды) или вследствие последующей переработки. Контаминаты – белки клетки-продуцента (липополисахариды клеточной стенки, бета-глюкан, флагеллин, нуклеиновые кислоты) или вирусные фрагменты, использующиеся при создании лекарственного препарата – могут быть причиной развития аллергических или других иммунологических реакций. Примеси делятся на производственные и родственные. Родственные примеси (например, прекурсоры, определенные продукты деградации) – это молекулярные варианты, образующиеся при производстве и хранении готового лекарственного препарата, которые не обладают активностью, эффективностью и безопасностью сопоставимыми с целевым продуктом. Тем не менее, любые примеси могут быть ассоциированы с развитием ИО [11, 50, 64].

Вспомогательные вещества используются для сохранения конформации молекул, препятствуют деградации белка и применяются для достижения необходимых фармакологических свойств, но при этом они могут влиять на иммуногенность ЛП. В некоторых случаях, например, при производстве готовых лекарственных форм инсулинов, содержащих нейтральный протамин Хаггедорна, являющийся белком, иммуногенность препарата может быть обусловлена именно вспомогательными веществами [11, 50, 64].

1.4. Лекарственные препараты инсулина

1.4.1. Типы препаратов инсулина в зависимости от их происхождения

Инсулин впервые был выделен в 1922 году, и с 1923 по 1977 годы инсулины животного происхождения (преимущественно бычий и свиной) были единственным вариантом лечения инсулинозависимого сахарного диабета. В 1977 году впервые был получен генно-инженерный инсулин человека (ГИИЧ), повторяющий молекулу эндогенного инсулина человека, с 1990-х годов стали доступны аналоги инсулина человека – ГИИЧ, в молекуле которых изменяли несколько аминокислот (например, инсулин лизпро: замена пролина в позиции B29 на лизин, замена лизина в позиции B28 на пролин; инсулин аспарт: замена пролина в позиции B28 на аспарагиновую кислоту), или к молекуле которых присоединяли другие молекулы (например, инсулин гларгин: присоединение двух остатков аргинина в позициях B31 и B32; инсулин деглудек: молекула жирной кислоты присоединена к лизину в позиции B29 с помощью линкера) [6, 159].

Как для инсулинов животного происхождения, так и для ГИИЧ и аналогов инсулина человека существуют готовые лекарственные формы, содержащие нейтральный протамин Хагедорна, являющийся по своей сути белком и модифицирующий фармакокинетические свойства инсулина за счет замедления его абсорбции [159]. В настоящее время ведется разработка новых аналогов инсулина человека посредством коньюгации с другими молекулами: полиэтиленгликолем [123], Fc-фрагментом [173], альбумином [43], однако в настоящий момент данные препараты не зарегистрированы, а часть программ закрыта из-за неэффективности или небезопасности препаратов.

1.4.2. Оригинальные и биоподобные препараты инсулина

Биоподобный лекарственный препарат – это биологический ЛП, который содержит версию действующего вещества зарегистрированного биологического оригинального (референтного) ЛП и для которого продемонстрировано сходство

(подобие) на основе сравнительных исследований с оригинальным (референтным) ЛП по показателям качества, биологической активности, эффективности и безопасности [11].

Биоподобные ЛП играют важную роль в повышении экономической доступности лекарственного обеспечения при сохранении эффективности и безопасности, характерных для оригинального биологического ЛП [114, 130, 176]. В Европейском Союзе на начало 2020 года одобрено 3 биоподобных ЛП аналогов инсулина человека (два – инсулин гларгин, один – инсулин лизпро), один ЛП (инсулин аспарт) находится на рассмотрении комиссии, и регистрация одного ЛП (инсулин гларгин) отозвана производителем [52]. В Российской Федерации на начало 2020 года зарегистрированы 4 биоподобных ЛП инсулина гларгин и 3 биоподобных ЛП инсулина лизпро [2].

Разработка биоподобных ЛП инсулина на территории Евразийского экономического союза регулируется Решением от 3 ноября 2016 г. N 89 «Об утверждении правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза» (главы 1-14, 15.1, 15.2, 15.7) и имеет целью доказательство отсутствия различий биоподобного ЛП от референтного ЛП, а не полную характеристику биоподобного ЛП. Для доказательства биоподобия ЛП инсулина применяется поэтапный подход: сравнительные исследования физико-химических свойств, сравнительные *in vitro* фармакодинамические исследования, сравнительные клинические исследования эффективности, безопасности и иммуногенности [7].

Сравнительные *in vivo* исследования фармакодинамических эффектов считаются недостаточно чувствительными для обнаружения различий, не выявленных в *in vitro* испытаниях, в связи с чем включать их в программу изучения сопоставимости не требуется. При доклиническом исследовании биоподобного ЛП, содержащего инсулин или аналоги инсулина, проведение исследований фармакологической безопасности, репродуктивной токсичности и

канцерогенности не требуется. Проведение исследований местной переносимости не требуется, если только не использованы вспомогательные вещества, в отношении которых отсутствует опыт (или он ограничен) их применения при намеченном пути введения [11].

Поскольку иммуногенность биологических ЛП определяется прежде всего свойствами молекулы [11, 50, 64], особенной важностью обладают сравнительные взаимодополняющие, ортогональные исследования, включающие сравнение структуры (I, II, III, IV) молекул биоподобного и референтного инсулинов и профиля основных примесей в готовых лекарственных формах, тогда как сравнительные клинические исследования иммуногенности являются подтверждающими для ранее полученных данных и могут не проводиться на предрегистрационном этапе при наличии достаточно убедительных доказательств биоподобия на основании проведенных физико-химических, *in vitro* функциональных и фармакологических клинических исследований, а также при отсутствии опасений в отношении профиля примесей и свойств вспомогательных веществ в готовой лекарственной форме [11, 50].

1.4.3. Свойства ЛП инсулина, определяющие вероятность развития иммунного ответа

Из всех описанных свойств биологических ЛП, оказывающих влияние на их иммуногенность, актуальными для инсулина являются его происхождение (инсулин животного происхождения, ГИИЧ, аналог инсулина человека), профиль примесей, вспомогательные вещества (нейтральный протамин Хагедорна), а также путь, доза и частота введения ЛП [7, 11, 50].

Вероятность развития ИО при введении инсулина животного происхождения значительно выше, чем при использовании ГИИЧ или аналогов инсулина человека. Выраженность иммунного ответа в данном случае определяется величиной различий в структуре молекулы экзогенного и эндогенного инсулина. Переход к лечению ГИИЧ и аналогами инсулина

человека, а также эволюция системы очистки ЛП привели к выраженному снижению иммуногенности данного класса ЛП, однако ГИИЧ, хоть и в меньшей степени, чем инсулины животного происхождения, способен вызвать ИО при введении [141], вероятнее всего в силу иных, нежели молекулярная структура, причин: например, вспомогательных компонентов и примесей [50, 55, 64].

Аналоги инсулина человека в целом обладают иммуногенностью, сопоставимой с генно-инженерным человеческим инсулином [38, 54, 112, 120]. Данные непрямых сравнений иммуногенности не позволяют сказать, какие из аналогов инсулина человека являются наиболее иммуногенными: в одном исследовании было показано, что наиболее выраженный ИО развивается при введении инсулинов гларгин и аспарт [81], тогда как данные других клинических исследований опровергают это утверждение [112, 132, 167]. Подобная неоднозначность вероятнее всего связана с различиями в методиках регистрации образования антител и будет разрешена с усовершенствованием и приведением аналитических методик к единообразию [88].

Профиль примесей и контаминатов также является значимым фактором, определяющим риск развития ИО. Следует отметить, при появлении на фармацевтическом рынке референтных препаратов ГИИЧ и аналогов инсулина человека не было четких руководств для оценки данных примесей. С этой точки зрения биосимляры инсулинов находятся в более выигрышном положении, поскольку в настоящее время для рутинного анализа доступны простые в использовании методы, которые могут количественно определять низкие уровни примесей, тем самым обеспечивая высокую степень очистки выпускаемых инсулинов [78, 84, 161].

С точки зрения потенциально иммуногенных вспомогательных веществ одной из наиболее значимых модификаций инсулинов является добавление нейтрального протамина Хагедорна с целью изменения фармакокинетических свойств ЛП путем формирования кристаллов, которые пролонгируют время

всасывания инсулина из подкожно-жировой клетчатки. Таким образом, удается получить инсулины средней продолжительности действия и миксы – готовые смеси инсулинов разной продолжительности действия. Несмотря на широкое применение, наличие нейтрального протамина Хагедорна потенциально может привести к развитию ИО. Например, среди лекарственных препаратов инсулин растворимый, инсулин изофан НПХ и инсулин двухфазный по данному параметру наибольшая иммуногенность ожидается у препарата инсулин изофан НПХ, поскольку в этом ряду он содержит наибольшее количество протамина, и если производитель разрабатывает все три биоподобных ЛП, сравнительное клиническое исследование иммуногенности он будет проводить только на наиболее потенциально иммуногенном ЛП [11, 50].

Основным путем введения ЛП инсулина в настоящее время является подкожное введение в режиме многократных инъекций или непрерывной подкожной инфузии с использованием инсулиновых помп [3]. Разрабатываемые ингаляционные инсулины в целом обладают большей иммуногенностью, чем инсулины для подкожного введения [19, 72, 82, 85].

Препарат-ассоциированные факторы могут быть модифицированы и до некоторых пределов учтены при производстве ЛП инсулина, и именно они могут определять различия в иммуногенности биосимилярного и оригинального препаратов. При этом важно отметить, что строение молекул инсулина, зарегистрированных в настоящее время, не может приводить к связыванию FcγR, а также к развитию синдрома высвобождения цитокинов, а генерализованные IgE-опосредованные реакции для них описаны с частотой редко (<1/1 000) [5, 13] и очень редко (<1/10 000) [9].

1.5. Результаты клинических исследований иммуногенности ЛП инсулинов

1.5.1. Образование антител к инсулину при лечении оригинальными ЛП инсулина

У пациентов с сахарным диабетом инсулин может циркулировать в свободном и в связанном с антителами состоянии. Связывание является обратимым, однако циркулирующие АТ к инсулину, регистрируемые как на старте, так и во время терапии, связывая инсулин, приводят к уменьшению его концентрации в свободной форме [79].

В клинических исследованиях иммуногенности инсулинов аспарт и ультрабыстрого аспарт (препараты содержат одну молекулу, но разные вспомогательные вещества) количество антител определялось при помощи радиоиммунного анализа: сыворотка крови пациентов, получивших препарат, инкубировалась с меченным I^{125} инсулином аспарт. При наличии в сыворотке антител к инсулину аспарт происходила преципитация комплексов антиген-антитело, и количество антител определялось как соотношение связанного меченного инсулина аспарт (В) к его общему количеству (Т), таким образом %В/Т был пропорционален содержанию антител к инсулину в сыворотке крови [30, 31, 32, 33, 34].

Объединенный анализ данных, полученных в этих исследованиях (112 пациентов в трёх исследованиях фармакологических свойств ЛП и 692 пациента в долгосрочном исследовании эффективности и безопасности), выявил, что показатель %В/Т находился в диапазоне от 0 до 66,94 % (квартили: 0 – 3,11 %, 3,12 – 6,53 %, 6,65 – 15,68 %, 15,84 – 66,94 %) и не оказывал статистически значимого влияния на гипогликемическую эффективность терапии [79].

Формирующиеся антитела к одному из ЛП экзогенного инсулина могут также перекрестно реагировать с другим экзогенным инсулином. Например, такая перекрестная реактивность наблюдалась при одновременном лечении инсулинами аспарт и детемир пациентов, ранее получавших терапию инсулином

аспарт и ГИИЧ [158]. Наиболее активное образование перекрестно реактивных АТ происходило в первые 39 недель лечения (среднее значение %В/Т нарастало с 20-30 % до 45-50 % в зависимости от возраста пациентов), после чего их содержание несколько уменьшалось (%В/Т 35-45 %) и оставалось стабильным на протяжении следующих 65 недель наблюдения. Показатель %В/Т АТ, специфичных только к инсулину детемир и только к инсулину аспарт, в этом исследовании имел аналогичную динамику, однако составлял не более 8 и 6 %, соответственно. Доза инсулина аспарт оставалась стабильной, тогда как доза инсулина детемир увеличивалась во всех возрастных группах на протяжении всего исследования (в среднем от 0,43 до 0,66 ЕД/кг), при этом гликемический контроль в течение двух лет оставался стабильным [158].

Данные по иммуногенности инсулина лизпро, полученные компанией, производящей оригинальный ЛП, отсутствуют в открытом доступе. Однако в клиническом исследовании иммуногенности инсулинов аспарт и лизпро у инсулин-наивных пациентов было показано отсутствие различий в концентрации антител при инициации терапии инсулинами аспарт и лизпро как через 6, так и через 24 месяца от начала терапии. Средние значения показателя %В/Т составили 25,3 ± 15,4 % и 24,5 ± 14,2 % через 6 месяцев терапии и 29,6 ± 17,0 % и 26,2 ± 17,0 % через 24 месяца терапии в группах инсулинов лизпро и аспарт, соответственно [120]. Эти данные согласуются с таковыми, полученными в исследовании Thalange и соавт. [158]. Кроме того, Mianowska и соавт. показали, что через 24 месяца терапии показатель %В/Т не различался в группах пациентов, получавших терапию ГИИЧ (25,7 ± 17,2 %) и аналогами инсулина короткого действия (28,1 ± 17,3 %) [120].

Доля пациентов с наличием антител к инсулину была определена в небольшой группе с сахарным диабетом 2 типа. Было показано, что доля пациентов с инсулин-специфичными антителами не отличалась среди тех, кто получал только ГИИЧ (27 пациентов), инсулин детемир (18 пациентов) и

инсулин лизпро (в том числе инсулин лизпро двухфазный 50/50, 68 пациентов), и была выше у тех, кто получал инсулины гларгин (17 пациентов) и аспарт (в том числе аспарт двухфазный 30/70, 47 пациентов) [81].

Данное исследование не согласуется с более ранними испытаниями [87, 112, 132], и авторы объясняют эти расхождения вероятными различиями в методике определения концентрации антител, однако также представляется важным обратить внимание на объединение в одну группу пациентов, получавших раствор инсулина лизпро и инсулина лизпро двухфазного (содержащего 50% более иммуногенной протаминовой фракции инсулина лизпро), и аналогичное объединение для инсулина аспарт и инсулина аспарт двухфазного (70% протаминовой фракции инсулина аспарт), а также на отсутствие данных о перекрестной реактивности антител к различным экзогенным инсулинам [6]. Данная работа также показывает связывание антител с инсулином со значимым уменьшением соотношения концентрации свободного и общего инсулина, в особенности у пациентов, которые получали инсулинотерапию на момент включения в исследование или ранее [81].

1.5.2. Сравнительные исследования иммуногенности биоподобных и референтных ЛП инсулина

Большая часть зарегистрированных к настоящему моменту биоподобных ЛП инсулина была исследована в сравнительных с референтным ЛП клинических исследованиях иммуногенности, эффективности, безопасности [6].

Биоподобный инсулин гларгин MYL-1501D у 558 пациентов с сахарным диабетом 1 типа в течение 52 недель применения показал сравнимый с референтным препаратом профиль иммуногенности при аналогичной эффективности, безопасности и частоте местных реакций на введение инсулина (1,8 % и 2,2 % в группе MYL-1501D и референтного инсулина гларгин, соответственно, p = 0,752) [21]. Аналогичные результаты были получены для MYL-1501D и у 560 пациентов с сахарным диабетом 2 типа, при этом антитела к

инсулину определялись у 25,4 % и 27,0 % в группе MYL-1501D и референтного инсулина гларгин, соответственно, p = 0,693, а перекрестно-реагирующие АТ к инсулину – у 26,1 % и 25,5 % в группе MYL-1501D и референтного инсулина гларгин, соответственно, p = 0,921 [22].

Биоподобный инсулин гларгин LY2963016 обладал схожими характеристиками как у пациентов с сахарным диабетом 1 типа (через 24 недели лечения индуцированные терапией АТ к инсулину в группе, получавшей LY2963016, обнаружены у 30,2% пациентов, в группе референтного инсулина гларгин – 33,7 %, p = 0,404; через 52 недели лечения – 40,4 % и 39,3 % в группах LY2963016 и референтного инсулина гларгин, соответственно, p = 0,859), так и у пациентов с сахарным диабетом 2 типа (через 24 недели лечения индуцированные терапией АТ к инсулину в группе, получавшей LY2963016, обнаружены у 15,3%, в группе референтного инсулина гларгин – 11,0 %, p = 0,100) [16, 91, 107].

При исследовании биоподобного инсулина лизпро SAR342434 через 24 недели лечения также не было получено различий в иммуногенности SAR342434 по сравнению с референтным инсулином лизпро ни у 480 пациентов с сахарным диабетом 1 типа (22,6 % пациентов с АТ к ЛП в группе SAR342434 и 24,2 % в группе референтного инсулина лизпро) [71], ни у 505 пациентов с сахарным диабетом 2 типа (18,8 % и 14,5 % пациентов с индуцированным лечением образованием АТ; 3,6 % и 4,0 % пациентов с хотя бы одной реакцией гиперчувствительности; 0,4 % и 1,6 % с реакцией в месте инъекции в группах SAR342434 и референтного инсулина лизпро, соответственно) [39]. При этом отмечалось, что у пациентов в обоих исследованиях был крайне высокий уровень перекрестной реактивности к инсулину гларгин (84,4 – 92,7 % у пациентов с сахарным диабетом 1 типа и 81,0 – 89,9 % у пациентов с сахарным диабетом 2 типа) и метаболиту M1 инсулина гларгин (71,0 – 79,7 % у пациентов с сахарным диабетом 1 типа и 65,2 – 85,5 % у пациентов с сахарным диабетом 2 типа), при

этом формирование антител не влияло ни на эффективность, ни на безопасность терапии [86].

Биоподобный инсулин аспарт SAR341402 у 497 пациентов с сахарным диабетом 1 типа и у 100 пациентов с сахарным диабетом 2 типа также показал иммуногенность, сопоставимую с референтным инсулином аспарт (доля пациентов с индуцированным терапией образованием АТ – 16,9 % SAR341402 для и 20,5 % для референтного инсулина аспарт). При этом у большинства пациентов (83,9 – 98,1 %) была зарегистрирована перекрестная реактивности SAR341402 с человеческим инсулином – без влияния на эффективность и безопасность лечения [70].

В Российской Федерации также были проведены исследования биоподобного генно-инженерного человеческого инсулина НПХ. Особенностью биоподобных ГИИЧ является то, что многие из них были созданы до появления законодательства в области доказательства биоподобия инсулинов, и сравнительные исследования иммуногенности проводились на пост-регистрационном этапе. Частота развития иммунного ответа не отличалась в группах биоподобного и референтного ГИИЧ (через 12 недель лечения – 5,8 % и 2,1 %, соответственно, p = 0,279; через 24 недели лечения – 3,9 % и 3,1 %, соответственно, p = 1,000) [4].

При проведении систематического обзора сравнительных исследований иммуногенности биоподобных и оригинальных препаратов инсулинов не было обнаружено различий между биосимилярами и их референтными препаратами [160].

1.6. Определение клинически значимого иммунного ответа при лечении ЛП инсулина

Клиническими проявлениями развития иммунного ответа при лечении препаратами инсулина является необходимость увеличения дозы препарата для поддержания стабильного гликемического контроля, аллергические реакции

(местные и генерализованные), а также синдром аутоиммунитета к инсулину (САИ) [6].

САИ, или болезнь Хирата, был впервые описан в 1970 году, и с тех пор представлено несколько сотен его случаев [17, 28, 29, 40, 88, 93, 129, 137, 147, 165]. САИ является редким состоянием, ассоциированным с генетической предрасположенностью (HLA-DR4), которое имеет различные клинические проявления: реакции гиперчувствительности, высокую вариабельность гликемии, инсулинорезистентность или спонтанное развитие гипогликемии [25, 88]. В основе патогенеза САИ лежит обратимое связывание инсулина антителами, в результате чего значительно увеличивается период полувыведения инсулина и временно снижается его активность, что приводит к гипергликемии, а при диссоциации комплексов инсулин-антитело связанный инсулин высвобождается в кровоток, приводя к спонтанному развитию гипогликемического эпизода, что на долгосрочном горизонте приводит к значительному повышению вариабельности гликемии [92, 111].

Другим клинически значимым проявлением иммуногенности ЛП инсулина (по аналогии с другими ЛП, например, с инфликсимабом) может быть снижение эффективности терапии и повышение дозы инсулина, необходимой для достижения целевого гликемического контроля [6], в связи с чем в исследованиях иммуногенности инсулинов рекомендуется проводить оценку эффективности инсулинотерапии с учетом фактора концентрации или факта образования антител: необходимо изучить потенциальное влияние антиинсулиновых антител на контроль гликемии, потребность в инсулине и безопасность, особенно местные и системные реакции гиперчувствительности [11, 50].

Несмотря на то, что в настоящее время для биоподобных препаратов как группы регуляторными органами различных стран в рамках программы клинической разработки биоподобного ЛП рекомендовано производить

сравнительную оценку иммуногенности биоподобного и референтного ЛП в многоцентровом клиническом исследовании длительностью от 6-12 месяцев [11, 50, 64], биологические ЛП являются высоко гетерогенной группой в связи со значительными различиями в строении молекулы, технологии синтеза и прочими свойствами ЛП, влияющими на иммуногенность, которые обсуждались ранее [6].

Данный подход является традиционно приемлемым и ожидаемым, и прямое сравнение иммуногенности нередко считается значимым в программе клинической разработки [101, 133, 144]. При этом отмечается, что существует множество методологических подходов к определению АТ к ЛП, что затрудняет сравнительный анализ полученных результатов [144], а границы клинической значимости невозможно и не следует устанавливать, основываясь исключительно на концентрации АТ, поэтому оценку иммуногенности следует проводить в сочетании с оценкой эффективности и безопасности биоподобного и референтного ЛП [133].

1.7. **Неудовлетворенные регуляторные потребности**

В настоящее время вопрос необходимости проведения сравнительных исследований иммуногенности для биоподобных лекарственных препаратов широко обсуждается [65, 95, 143, 154, 171], и в особенности неоднозначны подходы к требованиям по клинической разработке биоподобных препаратов инсулина. Тогда как регулятор ЕАЭС требует проведения этих исследований за исключением случаев, когда однозначно доказаны критерии биоподобия на доклиническом этапе и при проведении эугликемического гиперинсулинемического клэмп-исследования [11]. Аналогичной позиции в настоящее время придерживается и EMA [48, 50], однако на фоне активной научной дискуссии FDA снимает требования проведения таких исследований «по умолчанию», то есть проведение сравнительного исследования иммуногенности биоподобных препаратов не требуется, если нет высокого

уровня остаточной неопределенности в результате проведения предыдущих этапов [61].

В настоящее время не указан метод определения необходимого размера выборки для выявления различий, и предполагается, что он составит тысячи пациентов [65], при этом нет убедительных данных о влиянии развития иммунного ответа на эффективность и безопасность инсулинотерапии. В настоящее время также не утверждена единая методика, по которой необходимо определять параметры иммунного ответа, и нет критериев его клинической значимости. В связи с этим проведение настоящего исследования представляется своевременным с точки зрения получения научных данных об иммуногенности различных инсулинов, о влиянии её параметров на эффективность инсулинотерапии и необходимую дозу инсулина, а также о целесообразности проведения сравнительных исследований иммуногенности с позиций необходимого размера выборки и ожидаемого клинического эффекта различий.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Тип и организация исследования

Тип исследования: проспективное открытое, рандомизированное сравнительное исследование кросс-секционным этапом. 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 (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 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. Средний возраст пациентов составил (среднее ± стандартное отклонение) 38,15 ± 11,08 лет, средняя длительность сахарного диабета – 13,77 ± 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 ± 12,96 кг, средний индекс массы тела – 24,62 ± 3,37 кг/м^2. Гликемический контроль пациентов был неудовлетворительным: среднее значение гликированного гемоглобина (HbA1c) составляло 8,66 ± 1,12 %, среднее значение гликемии натощак – 10,99 ± 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 ± 9,57 ЕД(МЕ)/сутки, болюсного инсулина – 25,79 ± 8,30 ЕД(МЕ)/сутки, суммарная доза инсулина составила 50,12 ± 14,97 ЕД(МЕ)/сутки, или 0,70 ± 0,18 ЕД(МЕ)/кг/сутки, что соответствует нормальной суточной потребности в инсулине.

Критерии включения:

1. Подписанное информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

2. Мужчины и женщины в возрасте от 18 до 65 лет включительно (на момент скрининга).
3. Верифицированный диагноз сахарного диабета 1 типа, который должен быть поставлен не менее, чем за 12 месяцев до даты подписания формы информированного согласия.
4. Предшествующая базис-болюсная инсулинотерапия в стабильных дозах в течение периода не менее 30 дней в режиме множественных подкожных инъекций.
5. HbA1c 6,5 – 12,0 % (в «КИ гларгин») и 7,1 – 12,0 % (в «КИ аспарт») на фоне базис-болюсной инсулинотерапии в стабильных дозах.
6. Индекс массы тела 18,5 – 35,0 кг/м^2 во время скрининга.
7. Субъект согласен и способен соблюдать график визитов в центр и процедуры протокола, в т.ч. рекомендации по диете и образу жизни, ежедневный контроль глюкозы и т.д. Субъект понимает и согласен соблюдать запреты и ограничения, предусмотренные протоколом исследования.

Критерии невключения:

1. Наличие противопоказаний к терапии препаратом инсулин гларгин (в «КИ гларгин») или препаратом инсулин аспарт (в «КИ аспарт»).
2. Выраженная инсулинорезистентность (определяемая как потребность к инсулину ≥ 1,5 ЕД/кг в день).
3. Смена МНН болюсного или базального инсулина в течение 6 месяцев до предполагаемой даты рандомизации (в «КИ аспарт»).
4. Лечение каким-либо биоподобным препаратом инсулина.
5. Применение любых экспериментальных препаратов или экспериментальных устройств медицинского назначения в течение 3 месяцев до первого введения исследуемого препарата.
6. Помповая инсулинотерапия в течение 90 дней (в «КИ гларгин») или 180 дней (в «КИ аспарт») до момента подписания информированного

добровольного согласия или наличие показаний к помповой инсулинотерапии.

7. Любое из нижеперечисленных осложнений сахарного диабета (СД) в анамнезе или впервые выявленное во время скрининга:
    - пролиферативная диабетическая ретинопатия по данным анамнеза, которая на усмотрение Главного Исследователя может повлиять на проведение и результаты исследования;
    - тяжелая диабетическая периферическая или автономная нейропатия;
    - диабетическая нефропатия со снижением скорости клубочковой фильтрации <45 мл/мин;
    - установленный синдром диабетической стопы.
8. Эпизод тяжелой гипогликемии (потребовавшей помощи постороннего лица) в течение 6 месяцев, предшествующих подписанию информированного добровольного согласия.
9. Наличие более 15 эпизодов легкой гипогликемии (симптоматической или бессимптомной) в течение 1 месяца, предшествующего подписанию информированного добровольного согласия.
10. Наличие в анамнезе одного или более эпизода гипергликемической комы или обращений за помощью к специалистам по поводу неконтролируемого диабета, приводившим к госпитализации за последние 6 месяцев до начала скрининга.
11. Субъекты, получавшие 14 или более дней подряд пероральную, ингаляционную или внутримышечную / внутривенную глюкокортикостероидную терапию за 1 год до скрининга.
12. Регулярное использование иммуносупрессирующей терапии и/или иммуномодуляторов, а также любых других препаратов, которые, по мнению исследователя, могут влиять на иммунный статус пациента.
    - Иммуносупрессирующая терапия включает в себя глюкокортикостероиды, цитостатики, моноклональные антитела, и

другие лекарственные препараты, оказывающие подавляющее действие на иммунную систему.

- Иммуномодуляторы – интерфероны, интерлейкины, колониестимулирующие факторы, индукторы интерферонов и другие лекарственные препараты, оказывающие стимулирующее действие на звенья иммунной системы.

13. Вакцинация, проведенная в течение 6 месяцев до предполагаемой даты рандомизации или планируемая на период участия субъекта в настоящем исследовании (в «КИ аспарт»).
14. Наличие в анамнезе аутоиммунных заболеваний, за исключением витилиго и контролируемых аутоиммунных заболеваний, входящих в состав аутоиммунного полиэндокринного синдрома (типы 1-3) за исключением надпочечниковой недостаточности.
15. Отягощенный аллергологический анамнез, который, по мнению исследователя, может повлиять на результаты исследования или поставить под угрозу безопасность пациента.
16. Наличие в анамнезе гиперчувствительности к любому из компонентов исследуемого препарата или значительных аллергических реакций к лекарственным препаратам, в том числе инсулинам любых типов.
17. Беременные и кормящие женщины.
18. Острые воспалительные заболевания в течение 3-х недель от момента полного выздоровления до периода скрининга.
19. Отклонение результатов следующих лабораторных исследований, проведенных на этапе скрининга в центральной лаборатории, от значений, указанных ниже:
    - уровень гемоглобина <9,0 г/дл (система СИ: <90 г/л);
    - гематокрит <30%;
    - активность АЛТ и АСТ в сыворотке крови > 2 верхних границ нормы (ВГН);

- уровень сывороточного билирубина > 1,5 верхних границ нормы (ВГН) (за исключением субъектов с ранее диагностированным синдромом Жильбера).

20. Гемоглобинопатия или иные факторы, могущие повлиять на оценку HbA1c.
21. Значительная потеря крови за 3 месяца до скрининга, вследствие, например, но не ограничивающаяся следующими пунктами:

    - донорской сдачи крови;

    - расширенное оперативное вмешательство или травма, приведшая к значительной кровопотере.
22. Неполное восстановление после хирургического вмешательства или хирургическое вмешательство, запланированное на время участия пациента в исследовании.
23. Госпитализация по любой причине, запланированная на период участия пациента в исследовании.
24. Наличие в анамнезе или выявленной в период скрининга клинически значимой патологии в том числе, но не ограничиваясь:
    - нестабильной стенокардии, инфаркта миокарда, аритмии, требующей медикаментозной терапии, застойной сердечной недостаточности III или IV класса по классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации в течение 1 года до скрининга;
    - инсульта или транзиторной ишемической атаки в течение 6 месяцев до скрининга.
25. Психические, физические и прочие причины, не позволяющие адекватно оценивать свое поведение и правильно выполнять условия протокола исследования, в т.ч. наличие психических заболеваний в анамнезе.
26. Наличие в настоящий момент или в анамнезе (за три года до первого введения исследуемого препарата) сведений об алкоголизме, наркотической, лекарственной и/или токсикомании.

27. Положительные серологические реакции на инфекции:
    a. вирус иммунодефицита человека (антитела к ВИЧ-1/2),
    b. гепатит В (*поверхностный антиген*),
    c. гепатит С (антитела к антигенам вируса гепатита С),
    d. сифилис (антитела к Treponema pallidum),
28. Наличие онкологических и/или онкогематологических заболеваний в течение 5 лет до этапа скрининга.
29. Трансплантация органов и/или костного мозга в анамнезе (за исключением пересадки роговицы, выполненной более чем за 3 месяца до первого введения исследуемого препарата).
30. Наличие любых других патологий, которые, по мнению исследователя, являются противопоказанием для участия пациента в исследовании (т.е. могут негативным образом повлиять на состояние пациента в случае его участия в исследовании), могут помешать проведению процедур или сказаться на возможности интерпретации результатов.
31. Недееспособность пациента.

Исследование было проведено в соответствии с утвержденными протоколами «КИ гларгин» и «КИ аспарт», а также в соответствии с:

- Конституцией РФ от 12 декабря 1993 г.
- Федеральным законом от 21 ноября 2011 г. № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации».
- Федеральным законом от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».
- Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 г. № 200н «Об утверждении Правил надлежащей клинической практики».

- Решением от 3 ноября 2016 года № 89 «Об утверждении правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».
- Национальным стандартом РФ ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика»;
- Правилами обязательного страхования жизни и здоровья пациента, участвующего в клинических исследованиях лекарственного препарата, утвержденными Постановлением Правительства РФ от 13 сентября 2010 г. № 714.
- Постановлением Правительства РФ от 18 мая 2011 г. N 393 «О внесении изменений в Типовые правила обязательного страхования жизни и здоровья пациента, участвующего в клинических исследованиях лекарственного препарата».
- Приказом Министерства здравоохранения РФ от 29 ноября 2012 г. N 986н «Об утверждении Положения о Совете по этике».
- Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации 1964 г. в редакции, принятой в Форталезе (Бразилия) в 2013 г.

Этапы проведения и организация исследования соответствовали поставленной цели и задачам. Проведению исследования предшествовал литературный поиск для установления клинических проявлений значимого иммунного ответа при лечении препаратами инсулина. Кросс-секционный этап исследования был проведен на данных, полученных при скрининге субъектов исследования (до рандомизации), проспективный этап исследования состоял из 4 недель титрации дозы препаратов Лантус® СолоСтар® или инсулина гларгин GP40061 (в «КИ гларгин») или НовоРапид® Пенфилл® или инсулина аспарт GP40071 (в «КИ аспарт») и из 22 недель лечения стабильными дозами теми же лекарственными препаратами. Таким образом, каждый субъект исследования получал тестируемый препарат (GP40061, GP40071) или препарат сравнения (Лантус® СолоСтар®, НовоРапид® Пенфилл® - соответственно) в течение 6

месяцев, что соответствует релевантному сроку для оценки иммуногенности инсулина.

В табл.1 приведено соответствие задач и этапов исследования.

Таблица 1.

Соответствие задач и этапов исследования

Задача	Этап исследования	Комментарий
Установить клинические проявления значимого иммунного ответа при лечении препаратами инсулина	Литературный поиск	
Оценить статус пациентов с сахарным диабетом 1 типа в отношении различных параметров иммуногенности	Кросс-секционный этап	На основании данных, полученных на скрининге – до начала лечения препаратами исследования
Определить частоту развития клинически значимого иммунного ответа у пациентов с сахарным диабетом 1 типа при лечении препаратами инсулинов гларгин и аспарт	Проспективный этап	На основании изменения оцениваемых параметров иммуногенности к концу лечения (26 недель) по сравнению с исходным значением на скрининге
Выявить влияние различных параметров иммуногенности и факта	Проспективный этап	На основании статистического анализа

Задача	Этап исследования	Комментарий
развития иммунного ответа на эффективность инсулинотерапии		данных, полученных на проспективном этапе
Сравнить параметры эффективности и иммуногенности биоподобных препаратов инсулина и их референтных препаратов	Проспективный этап	На основании статистического анализа данных, полученных на проспективном этапе

Всего в исследование было включено 444 субъекта с сахарным диабетом 1 типа, соответствующих критериям включения и невключения. В исследовании «КИ гларгин» 90 субъектов получали инсулин Лантус® СолоСтар®, 90 – инсулин GP40061 (все субъекты продолжали получать тот же болюсный инсулин, который использовали до начала исследования), а в исследовании «КИ аспарт» 132 субъекта получали инсулин НовоРапид® Пенфилл®, а 132 – инсулин GP40071 (все субъекты продолжали получать тот же базальный инсулин, который использовали до начала исследования).

Субъекты вводили исследуемые препараты в соответствии с утвержденными алгоритмами лечения (Дедов и соавт., 2014). Доза болюсного инсулина в обоих исследованиях на протяжении всего исследования определялась индивидуально в зависимости от клинической ситуации (уровня гликемии, планируемого приема пищи или физической нагрузки). В период титрации врачи-исследователи обучали субъектов расчету количества углеводов в пище (например, по методу «хлебных единиц», но не ограничиваясь им), а также определяли индивидуальное значение углеводного коэффициента и коэффициента чувствительности к инсулину:

- Углеводный коэффициент показывает, сколько единиц прандиального инсулина требуется на усвоение 12 г углеводов (1 хлебная единица).
- Коэффициент чувствительности показывает, на сколько ммоль/л введение одной единицы прандиального инсулина снижает значение гликемии.

Таким образом, доза болюсного инсулина в обоих исследованиях не была фиксированной и изменялась в зависимости от потребности субъекта как в период титрации дозы, так и в период лечения. В период титрации дозы в «КИ аспарт» также допускалась коррекция дозы базального инсулина. В период лечения стабильными дозами доза базального инсулина не должна была изменяться более чем на 15% от уровня, установленного в конце периода титрации доз (за исключением обоснованной клинической необходимости в интересах безопасности субъекта исследования). Смена международного непатентованного наименования (МНН) принимаемого ранее болюсного (в «КИ гларгин») или базального (в «КИ аспарт») инсулина не допускалась.

На протяжении всего исследования субъектам было необходимо ежедневно проводить самоконтроль гликемии столько раз, сколько требуется согласно текущей ситуации, но не менее 4 раз в сутки с помощью портативного глюкометра (перед основными приемами пищи: натощак, перед обедом, перед ужином и на ночь) и записывать полученные показатели уровня глюкозы в крови в специальный дневник субъекта исследования. Также субъекты ежедневно регистрировали дозы введенных препаратов инсулина и количество измерений гликемии портативным глюкометром, которые они произвели за сутки.

Общая схема проведения исследования приведена на рис. 1.

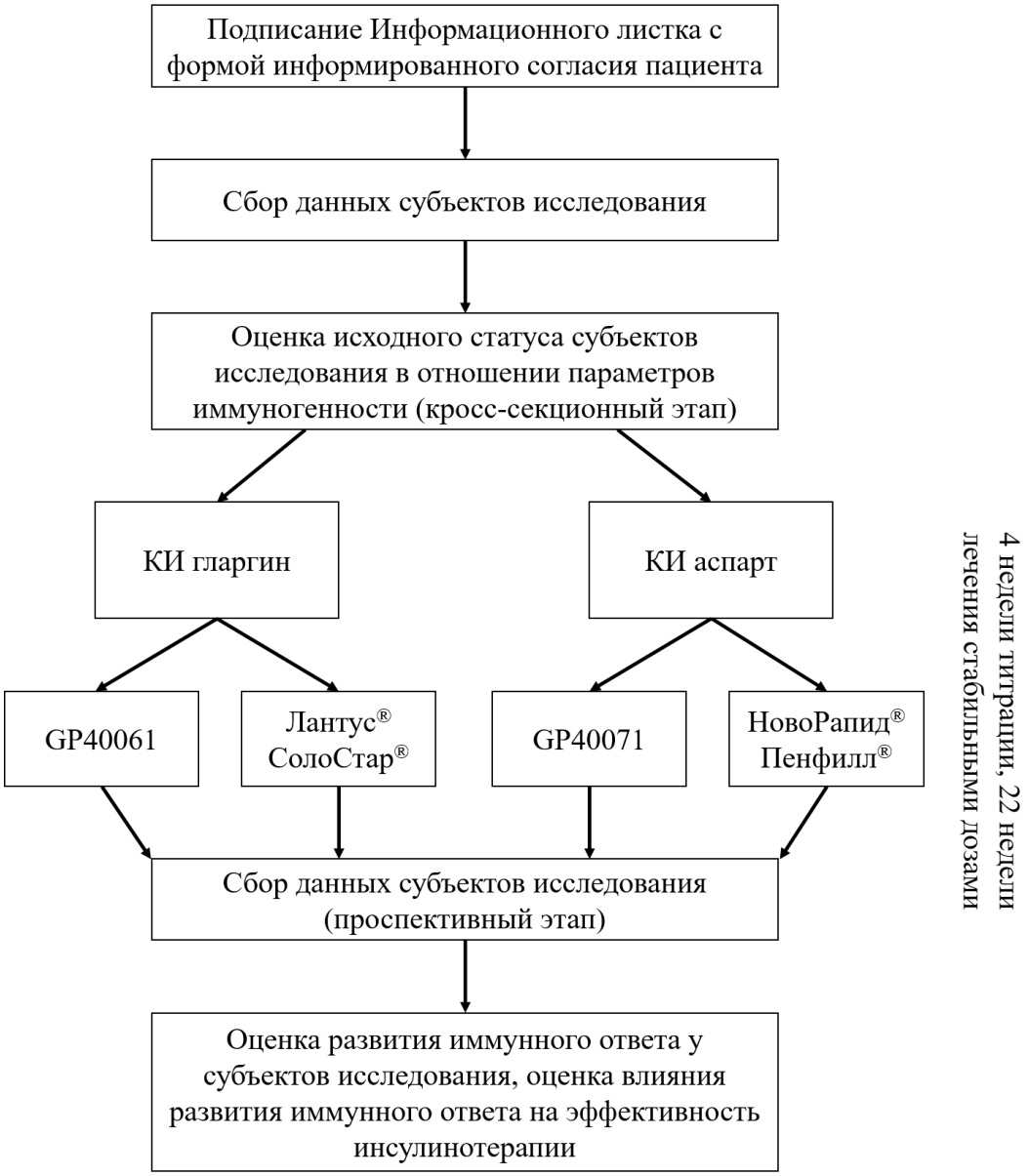

Рисунок 1. Схема проведения исследования

2.2. Методы исследования

2.2.1. Получение письменного информированного согласия

Перед проведением любых процедур субъекты подписывали и датировали в двух экземплярах информационный листок пациента с формой информированного согласия пациента на участие в исследовании. Информационный листок пациента содержал информацию:

- о лекарственном препарате для медицинского применения и сущности клинического исследования этого лекарственного препарата;
- о безопасности лекарственного препарата для медицинского

применения и степени риска для субъекта;

- об условиях участия субъекта в клиническом исследовании лекарственного препарата для медицинского применения, в том числе о необходимости соблюдения надежных методов контрацепции на протяжении участия в исследовании;
- о цели, задачах и продолжительности клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения;
- о действиях субъекта в случае непредвиденных эффектов влияния лекарственного препарата для медицинского применения на состояние его здоровья и о гарантиях оказания субъекту квалифицированной медицинской помощи (при необходимости) как во время так и после проведения исследования;
- об ограничениях исследования;
- о длительности исследования;
- об условиях обязательного страхования жизни, здоровья пациента;
- о гарантиях конфиденциальности участия пациента в клиническом исследовании лекарственного препарата для медицинского применения.

Субъектам исследования предоставляли достаточно времени на размышления относительно их участия в исследовании, а также предоставляли возможность задать дополнительные вопросы. Врачи-исследователи также подписывали и датировали Информационный листок с формой информированного согласия пациента, засвидетельствовав тем самым, что беседа с субъектом была проведена и согласие получено, и что субъект имел возможность задать вопросы, и получил на них полные ответы. После подписания Информированного согласия субъекту присваивался скрининговый номер, а также на субъекта оформляли индивидуальный страховой полис, который, как и один экземпляр подписанного и датированного Информационного листка пациента, выдавали субъекту.

2.2.2.Сбор данных субъектов исследования

После подписания Информационного листка с формой информированного согласия пациента у субъектов исследования до начала использования исследуемых лекарственных препаратов собирали демографические (пол, раса, дата рождения) и антропометрические данные (масса тела, рост, индекс массы тела (индекс Кетле) равный отношению массы тела в килограммах к квадрату роста в сантиметрах), данные анамнеза жизни и анамнеза болезни (сахарного диабета), а во время проведения исследования – данные об изменении гипогликемической терапии (доза базального инсулина на основании дневников субъектов) и данные о нежелательных явлениях, включая данные о реакциях в месте инъекции.

Данные анамнеза жизни собирали для оценки наличия у субъекта критериев включения и невключения в исследование, а также для получения характеристики течения и лечения сахарного диабета. Информация об анамнезе сахарного диабета включала в себя дату постановки диагноза, а также название и дозы инсулинов, используемых субъектов при подписании Информационного листка с формой информированного согласия пациента. В «КИ аспарт» дополнительно собирали информацию о дате назначения каждого из препаратов инсулина, которые использовали субъекты на скрининге.

2.2.3. Оценка суточной дозы инсулина

Субъекты записывали все инъекции инсулина в дневник самоконтроля как минимум в период титрации и за 1 неделю перед каждым визитом в исследовательский центр. Средняя суточная доза болюсного инсулина рассчитывалась как арифметическое среднее суточных доз на протяжении 7 дней, предшествующих визиту. Суточная доза базального инсулина определялась в день визита по дозе инъекции накануне визита. Общая средняя суточная доза инсулина рассчитывалась как сумма суточной дозы базального инсулина и средней суточной дозы болюсного инсулина в день визита.

2.2.4. Характеристика зарегистрированных нежелательных явлений

Под нежелательным явлением (НЯ) понимали «любое выявленное у субъекта клинического исследования после применения лекарственного продукта неблагоприятное с медицинской точки зрения медицинское событие, которое может и не иметь причинно-следственной связи с его применением». НЯ могло представлять собой любой симптом (включая клинически значимое отклонение лабораторного показателя от референсных значений), жалобу или заболевание, время возникновения которых не исключает причинно-следственной связи с применением исследуемого препарата вне зависимости от наличия или отсутствия такой связи.

Аллергические реакции и реакции в месте инъекции в настоящем исследовании рассматривали как НЯ особого интереса. Информацию о них собирали на основании дневника субъекта исследования и детальных вопросов о наличии таких реакций. Информация, помимо стандартной (описанной выше) характеристики НЯ включала в себя время последней инъекции, название препарата, детальное описание симптомов реакции.

2.2.5. Лабораторные методы исследования

Лабораторные исследования включали в себя:

- определение концентрации гликированного гемоглобина и глюкозы крови (по венозной плазме) натощак – для оценки эффективности терапии,
- определение общей концентрации анти-инсулиновых антител, определение нейтрализующей активности антител – для оценки иммуногенности исследуемых препаратов,
- проведение стандартных общего и биохимического анализа крови и общего анализа мочи – для мониторинга безопасности в исследовании.

Лабораторные исследования были выполнены в центральной лаборатории ЗАО «Юнимед Лабораториз». Центральная лаборатория предоставила лабораторное руководство по клиническому исследованию со специальными указаниями по получению, подготовке проб, хранению и отправке биообразцов,

которое было направлено в исследовательские центры и в точности соблюдалось. Пробы крови для лабораторных исследований забирались натощак, т.е. в течение 10 часов перед взятием проб субъект не должен был принимать пищу и пить что-либо кроме воды.

Врачи-исследователи получали результаты исследований, просматривали, оценивали клиническую значимость каждого параметра, отклоняющегося от нормальных значений (используемых в центральной лаборатории). Клинически значимые изменения лабораторных показателей по сравнению с исходными значениями расценивали как НЯ и соответствующим образом регистрировали.

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. На дно лунок нанесены высокоочищенные свиной, бычий и человеческий инсулины. Присутствующие в образце сыворотки или плазмы пациента антитела к инсулину связываются с иммобилизованными на дне лунок антигенами. После инкубации при промывке удаляются все не связавшиеся с антигенами антитела. После этого вносится ферментный конъюгат, который связывается с комплексом антиген-антитело, проводится повторная инкубация и промывка, в ходе которой не связавшийся ферментный конъюгат удаляется. После внесения раствора субстрата связанный ферментный конъюгат гидролизует субстрат, при этом образуется синий окрашенный продукт. Внесение кислоты останавливает реакцию с образованием желтого конечного продукта. Интенсивность желтого окрашивания 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. Коэффициент вариации внутри серии не превышает 4,0 %, а между сериями – 6,0 %. Не наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемией (до 3 г/дл триглицеридов) или повышенным содержанием билирубина (до 40 мг/дл). Какого-либо влияния на результаты антикоагулянтов (ЭДТА, цитрат, гепарин) также не было зарегистрировано.

Пробы крови для проведения анализа собираются обычным способом с контролем гемолиза. После образования в пробирке сгустка, сыворотка или плазма отделяется от форменных элементов крови посредством центрифугирования. Образцы для анализа должны быть прозрачные, без гемолиза и липемии и могут храниться при температуре от 2 до 8 ºС до 5 суток и при температуре менее -20 ºС до 6 месяцев. Перед проведением анализа все пробы должны достичь комнатной температуры (от 20 до 28 ºС).

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 отчёт по валидации методики. Метод анализа основан на использовании трансфицированной клеточной линии iLite™ Insulin Assay Ready Cells, способной экспрессировать люциферазу светлячка (Firefly luciferase) под контролем промоутера, чувствительного к инсулину, а также люциферазу рениллы (Renilla luciferase) под контролем конститутивного промоутера. 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 исследуем образце.

Поскольку на снижение интенсивности сигнала продукта реакции инсулин-зависимой люциферазы светлячка могут оказывать влияние как специфичные (действие инсулина), так и неспецифичные факторы (гибель клеток, вариабельность начального количества клеток, ингибирование клеточного роста и т.д.) требуется механизм дифференцировки этих специфических и неспецифических влияний. Таким механизмом является нормализация сигнала экспериментального репортера (люцифераза светлячка) с помощью контрольного репортера (люцифераза рениллы). Таким образом, снижение интенсивности сигнала продукта реакции люциферазы светлячка при неизменной интенсивности сигнала продукта реакции люциферазы рениллы свидетельствует о специфическом воздействии экспериментальных условий на клетки. Снижение интенсивностей сигналов продуктов реакций обеих люцифераз свидетельствует о неспецифичном влиянии экспериментальных условий на клеточную популяцию.

Образцы плазмы были доставлены в испытательный центр ООО «КАЯР». Полученные образцы были немедленно помещены в морозильную камеру с температурой не более -20°C. В течение периода хранения образцов осуществлялся мониторинг температуры в морозильной камере; показания фиксировались с помощью валидированной компьютеризированной системы Comet MS6-Rack и с помощью поверенных аналоговых стеклянных термометров.

Результаты анализа трактовались как положительные в случаях, когда значения измеренных концентраций превышали величину cut point 35527 нг/мл, установленную при выполнении валидации аналитической методики.

Алгоритм подготовки проб и инкубации:

- разработать схему планшета; рекомендуется выполнять тесты как минимум в двух повторах;

- приготовить серийное разведение калибровочных образцов, содержащих нейтрализующий инсулин антитела;

- добавить 20 мкл разведений нейтрализующих инсулин антител, контролей и образцов в назначенные лунки (конечная концентрация будет составлять четверть от концентрации раствора);

- добавить 20 мкл раствора инсулина с концентрацией 1000 нг/мл во все лунки (конечная концентрация инсулина будет составлять 250 нг/мл);

- поместить крышку на планшет, перемешать и инкубировать планшет в течение 30 минут при 37°C с 5% CO2;

- разморозить флакон с клеточной средой iLite Insulin Assay Ready Cells на водяной бане при 37°C при легком перемешивании; клеточную суспензию очень тщательно перемешать десять раз с помощью дозатора, чтобы обеспечить однородное распределение клеток;

- разбавить 250 мкл клеток с 11.75 мл раствора Diluent*;

- добавить 40 мкл разведенных клеток в каждую лунку;

- поместить крышку на планшет, перемешать и инкубировать планшет в течение 5 часов при 37°C с 5% углекислого газа;

- выдержать планшет и растворы субстрата до комнатной температуры;

- приготовить субстрат люциферазы Firefly в соответствии с инструкциями поставщика и добавить по 80 мкл в лунки, перемешать, защитить планшет от света; после 10 минут инкубации при комнатной температуре считать планшет в люминометре;

- приготовить субстрат люциферазы Renilla в соответствии с инструкциями поставщика и добавить по 80 мкл в лунки, перемешать, защитить планшет от света; после 20 минут инкубации при комнатной температуре считать планшет в люминометре.

* раствор Diluent готовился следующим образом: 89 мл раствора RPMI 1640 с GlutaMax, 10 мл FBS и 1 мл раствора Penicillin-Streptomycin.

Все измерения выполнены в дублях с расчётом среднего значения и коэффициента вариации между дублями (CV ≤ 20%). [1].

2.2.6. Статистические методы 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 $\chi 2$ 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 понимания необходимой выборки исследования, которое могло бы показать статистически значимые различия между инсулинами, были применены формулы расчета размера выборки для гипотезы равенства [36].

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,

К – соотношение размера групп 1 и 2 в планируемом исследовании (в настоящей работе принято К = 1),

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

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

1-β – 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,

К – соотношение размера групп 1 и 2 в планируемом исследовании (в настоящей работе принято К = 1),

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

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

1-β – 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. СТАТУС ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1 ТИПА В ОТНОШЕНИИ РАЗЛИЧНЫХ ПАРАМЕТРОВ ИММУНОГЕННОСТИ

В настоящее время не определены границы нормальных популяционных значений концентрации антител к инсулину. В связи с этим, для интерпретации результатов работы, полученных в отношении параметров иммуногенности, необходимо ее определить.

Общая концентрация АТ 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 – 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.

3.1. Концентрация антител к инсулину и МНН применяемого инсулина

Выполнен анализ статистических корреляций между общей концентрацией антител к инсулину и МНН инсулина (отдельно для базального и отдельно для болюсного инсулина, а также всех вариантов их совместного применения). Распределение попарных сочетаний базального и болюсного инсулинов приведено в табл.2.

Таблица 2.

Распределение попарных сочетаний базального и болюсного инсулина по МНН (количество пациентов)

	Растворимый человеческий	Лизпро	Аспарт	Глулизин
Инсулин-изофан	28	6	3	1

	Растворимый человеческий	Лизпро	Аспарт	Глулизин
Гларгин	10	139	114	83
Детемир	1	11	20	1
Деглудек	0	6	19	2

Наиболее частыми сочетаниями были инсулин гларгин + инсулин лизпро и инсулин гларгин + инсулин аспарт, что связано в основном с большей частотой назначения инсулина гларгин по сравнению с другими базальными инсулинами (табл.3).

Результаты однофакторного анализа (анализа корреляций) общей концентрации антител к инсулину и МНН инсулинов приведены в табл.3. МНН инсулина не является статистически значимым фактором, от которого может зависеть общая концентрация антител.

Таблица 3.

Результаты анализа корреляций общей концентрации антител к инсулину и МНН инсулинов

Фактор	Число степеней свободы	Сумма квадратов	Средняя сумма квадратов	F-критерий	p-значение
МНН базального инсулина	3	107	35,82	0,387	0,762
Остатки	439	40737	92,80		
МНН болюсного инсулина	3	192	63,95	0,692	0,557

Остатки	440	40654	92,40		
Пары МНН базального и болюсного инсулинов	1	31	30,75	0,34	0,560
Остатки	441	39874	90,42		

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 ($p = 0,701 > 0,050$).

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 $p < 0,05$.

Результаты определения концентрации антител к инсулину у пациентов, получающих различные инсулины, приведены на рис. 2.

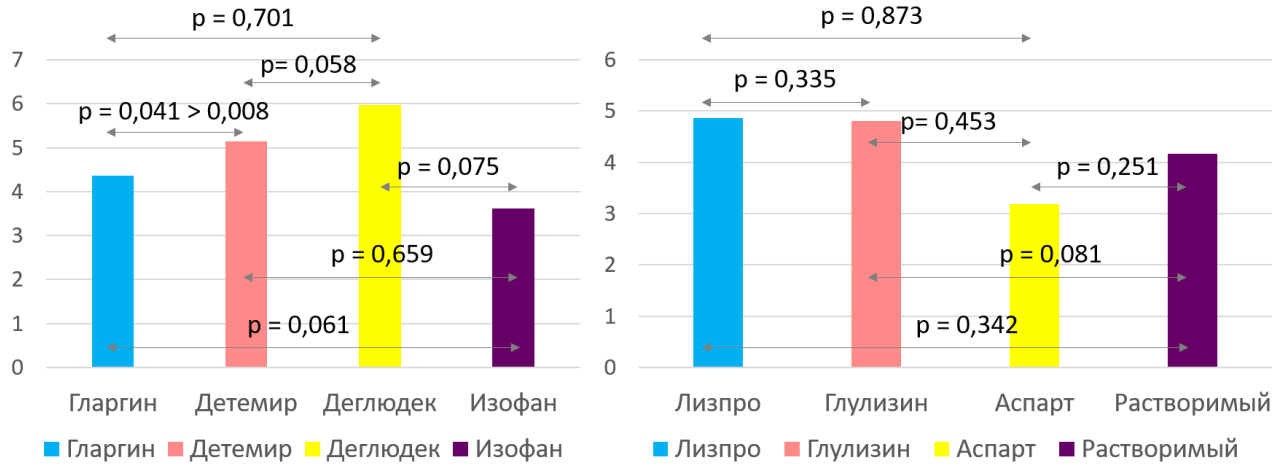

Рисунок 2. Концентрация антител к инсулину у пациентов с сахарным диабетом 1 типа, которые получают различные инсулины

Также было проведено сравнение доли пациентов со значениями концентрации АТ > 12,69 Ед/мл и ≤ 12,69 Ед/мл, а также со значениями концентрации АТ > 22,29 Ед/мл и ≤ 22,29 Ед/мл для проверки клинической значимости «отсечения» нормы от повышения показателя по данным значениям. В табл. 4 приведены данные распределения пациентов по МНН вводимого базального или болюсного инсулина и по отношению их концентрации АТ к указанным выше отсечкам, а также результаты статистического анализа различий между группами с превышением и без превышения отсечки.

Таблица 4.

Сравнение групп пациентов, получающих различные МНН инсулинов, по отношению к превышению 95 и 97,5 квантилей значений общей концентрации АТ к инсулину

Группы/концентрация АТ	АТ ≤ 12,69 Е/мл	АТ > 12,69 Е/мл	p-значение	АТ ≤ 22,29 Е/мл	АТ > 22,29 Е/мл	p-значение
Базальные инсулины						
Инсулин-изофан	37	1	0,649	38	0	0,749

Гларгин	328	18		336	10	
Детемир	30	3		32	1	
Деглудек	26	1		26	1	
Болюсные инсулины						
Растворимый человеческий	37	2	0,854	38	1	0,735
Лизпро	155	7		159	3	
Аспарт	146	10		150	6	
Глулизин	83	4		85	2	

МНН инсулина не является статистически значимым фактором в отношении превышения 95 и 97,5 квантилей значений общей концентрации АТ к инсулину, то есть нельзя говорить о том, что какой-либо из применяемых инсулинов является более иммуногенным, чем другой инсулин.

Различные инсулины, включая ГИИЧ и аналоги человеческих инсулинов, обладают сходной иммуногенностью, и различия в концентрации антител к инсулину не являются статистически значимыми ни по параметру абсолютного значения концентрации, ни по параметру превышения значения 95 и 97,5 квантилей для популяции пациентов с сахарным диабетом 1 типа.

Для понимания необходимой выборки исследования, которое могло бы показать статистически значимые различия между инсулинами, была применена формула расчета размера выборки для гипотезы равенства [36]. 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 на основании средних значений концентрации АТ для каждого препарата и стандартного отклонения для совокупности данных каждой пары препаратов приведены в табл. 5.

Таблица 5.

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				-

Количество пациентов, которых необходимо было бы включить в одно исследование, превышает таковое во всей программе клинической разработки инновационного инсулина для пар «инсулин изофан – гларгин», «гларгин – детемир», «детемир – деглудек», «инсулин растворимый человеческий – лизпро», «инсулин растворимый человеческий – аспарт», «лизпро – аспарт». Необходимое количество пациентов для других пар инсулинов (за исключением пары «инсулин-изофан – детемир») превышает принятое количество пациентов, включаемых в одно исследование III фазы и значительно превышает то количество, которое необходимо для оценки эффективности оригинального инсулина по сравнению со стандартом терапии. Это говорит о том, что различия

в иммуногенности инсулинов не выражены. Необходимость проведения такого рода исследований сомнительна при наличии других, более точных методов сравнения свойств препарата, которые могут оказывать влияние на иммуногенность.

3.2. Концентрация антител к инсулину и параметры пациентов с сахарным диабетом 1 типа

У всех пациентов с сахарным диабетом 1 типа, у которых определяли концентрацию антител к инсулину, также собирали информацию об их возрасте, поле, длительности течения сахарного диабета, показателе гликированного гемоглобина, гликемии натощак и дозы инсулина (абсолютной и на килограмм массы тела). Оценивали наличие статистически значимых взаимосвязей между этими показателями и общей концентрацией антител к инсулину.

Концентрация антител к инсулину не была ассоциирована с возрастом ($p = 0,579$), полом ($p = 0,098$), абсолютной дозой инсулина ($p = 0,802$) и дозой инсулина на килограмм массы тела ($p = 0,260$). Единственным из оцениваемых параметров, ассоциированным с общей концентрацией антител к инсулину, была длительность течения диабета (которая у пациентов с сахарным диабетом 1 типа совпадает с длительностью инсулинотерапии, $p = 0,0012$): коэффициент линейной регрессии (B) равен 0,153, коэффициент корреляции (r) равен 0,153. Индивидуальные данные и графическое отображение линейной регрессии приведены на рис. 3.

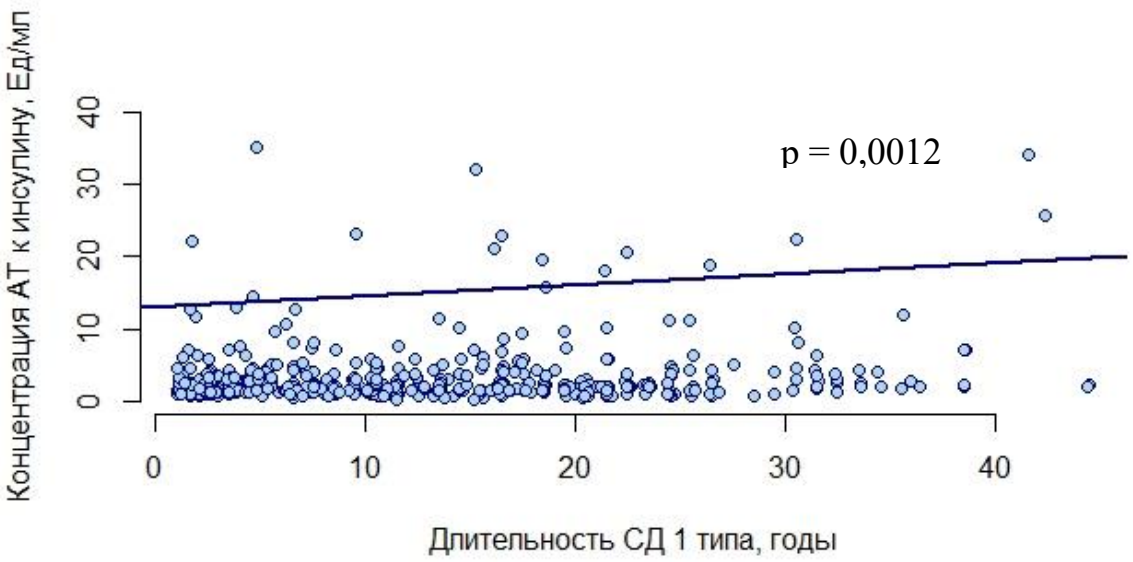

Рисунок 3. Ассоциация между концентрацией антител к инсулину и длительностью течения сахарного диабета

Коэффициент корреляции относительно невысокий, и, с учетом линейного коэффициента, каждый год инсулинотерапии ассоциирован с увеличением общей концентрации АТ к инсулину на 0,153 Ед/мл, однако данная ассоциация является статистически значимой и соответствует существующим знаниям о терапии биотехнологическими лекарственными препаратами.

При исключении из анализа данных трех пациентов, у которых концентрация антител была выше 99 Ед/мл, статистическая значимость корреляции сохраняется ($p < 0,0001$), коэффициент линейной регрессии составляет 0,117 (каждый год инсулинотерапии ассоциирован с увеличением общей концентрации АТ к инсулину на 0,117 Ед/мл), коэффициент корреляции равен 0,204. Таким образом, полученные результаты стабильны и не меняются при исключении аутлайеров.

При одновременном анализе факторов длительности инсулинотерапии, дозы инсулина (на килограмм массы тела), возраста пациента и МНН инсулина, для базального инсулина длительность инсулинотерапии остается единственным

статистически значимым фактором (p = 0,0003), тогда как для болюсного инсулина значимыми являются и длительность инсулинотерапии (p = 0,0006), и доза болюсного инсулина на килограмм массы тела (p = 0,016) (табл. 6).

Таблица 6.

Результаты многофакторного анализа для концентрации антител к инсулину в качестве зависимой переменной (базальные и болюсные инсулины)

Фактор	Линейный коэффициент	Стандартная ошибка	t-значение	p-значение
Базальные инсулины				
Интерсепт	6,406	2,691	2,381	0,018
Доза инсулина, ЕД(МЕ)/кг	-2,588	3,854	-0,671	0,502
Возраст, лет	-0,073	0,044	-1,664	0,097
Длительность инсулинотерапии, лет	0,188	0,052	3,618	0,0003
Гларгин (реф. инсулин-изофан)	-1,166	1,712	-0,681	0,496
Детемир (реф. инсулин-изофан)	0,478	2,283	0,209	0,834
Деглудек (реф. инсулин-изофан)	-0,442	2,524	-0,175	0,861
Болюсные инсулины				
Интерсепт	2,392	2,925	0,818	0,414
Доза инсулина, ЕД(МЕ)/кг	10,151	4,215	2,408	0,016
Возраст, лет	-0,069	0,045	-1,535	0,125

Фактор	Линейный коэффициент	Стандартная ошибка	t-значение	p-значение
Длительность инсулинотерапии, лет	0,181	0,052	3,481	0,0006
Лизпро (реф. растворимый)	-1,313	1,804	-0,728	0,467
Аспарт (реф. растворимый)	-1,411	1,821	-0,775	0,439
Глулизин (реф. растворимый)	-2,406	1,868	-1,288	0,198

Примечание: реф. – референсная группа, относительно которой рассчитываются параметры многофакторного анализа для аналогов инсулина

Доза болюсного инсулина положительно коррелировала с концентрацией антител к инсулину (коэффициент линейной регрессии (B) равен 10,15 при учете всех факторов, включенных в описанную выше модель, и равен 9,88 в однофакторной модели). Длительность инсулинотерапии положительно коррелировала с концентрацией АТ к инсулину как для базального, так и для болюсного инсулина. Для базального инсулина коэффициент линейной регрессии (B) равен 0,19, а для болюсного инсулина – 0,18 с учетом факторов дозы и МНН инсулина (базального или болюсного инсулина, соответственно) и возраста пациента, и равен 0,15 для всего пула данных без учета других факторов (кроме непосредственно длительности инсулинотерапии).

Поскольку при дальнейшем анализе данных (см. раздел 3.4) была выявлена статистически значимая корреляция между дозой базального инсулина и его МНН, в выше приведенный анализ как для базального, так и для болюсного инсулина был дополнительно включен фактор взаимодействия между МНН инсулина и дозой инсулина. При внесении данного фактора в анализ, доза инсулина не являлась статистически значимым фактором в отношении

концентрации антител к инсулину, тогда как результаты в отношении длительности инсулинотерапии не изменились (табл. 7).

Таблица 7.

Результаты многофакторного анализа для концентрации антител к инсулину в качестве зависимой переменной (базальные и болюсные инсулины) с фактором взаимодействия между МНН и дозой инсулина

Фактор	Линейный коэффициент	Стандартная ошибка	t-значение	p-значение
Базальные инсулины				
Интерсепт	6,511	4,457	1,461	0,145
Доза инсулина, ЕД(МЕ)/кг	-2,629	10,043	-0,262	0,794
Возраст, лет	-0,076	0,044	-1,732	0,084
Длительность инсулинотерапии, лет	0,197	0,052	3,760	0,0002
Гларгин (реф. инсулин-изофан)	-0,463	4,343	-0,107	0,915
Детемир (реф. инсулин-изофан)	-1,500	6,091	-0,246	0,806
Деглудек (реф. инсулин-изофан)	-7,695	7,121	-1,081	0,280
Доза : гларгин	-2,379	11,065	-0,215	0,830
Доза : детемир	5,048	15,034	0,336	0,737
Доза : деглудек	24,472	21,291	1,149	0,251
Болюсные инсулины				
Интерсепт	5,083	7,704	0,660	0,510

Фактор	Линейный коэффициент	Стандартная ошибка	t-значение	p-значение
Доза инсулина, ЕД(МЕ)/кг	2,915	20,120	0,145	0,885
Возраст, лет	-0,072	0,045	-1,598	0,111
Длительность инсулинотерапии, лет	0,183	0,052	3,516	0,0005
Лизпро (реф. растворимый)	-5,912	7,874	-0,751	0,453
Аспарт (реф. растворимый)	-3,861	7,720	-0,500	0,617
Глулизин (реф. растворимый)	-2,091	8,337	-0,251	0,802
Доза : лизпро	12,823	21,452	0,598	0,550
Доза : аспарт	6,780	21,034	0,322	0,747
Доза : глулизин	-0,482	22,565	-0,021	0,983

У пациентов, которые участвовали в исследовании инсулинов аспарт, дополнительно была собрана информация о длительности терапии теми инсулинами, которые они получали на скрининге. На данных этих 264 пациентов проведен дополнительный анализ зависимости параметра концентрации антител к инсулину от МНН инсулина с поправкой на длительность терапии именно этим инсулином и на длительность инсулинотерапии в целом (длительность течения сахарного диабета).

3.3. Нейтрализующие антитела к инсулину и МНН применяемого инсулина

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 болюсного инсулинов приведено в табл. 8. 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 болюсного инсулина (p = 0,0007).

Таблица 8.

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

МНН базального инсулина	Нейтрализующие антитела		МНН болюсного 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 $p < 0,05$.

Вышеописанные результаты приведены на рис. 4.

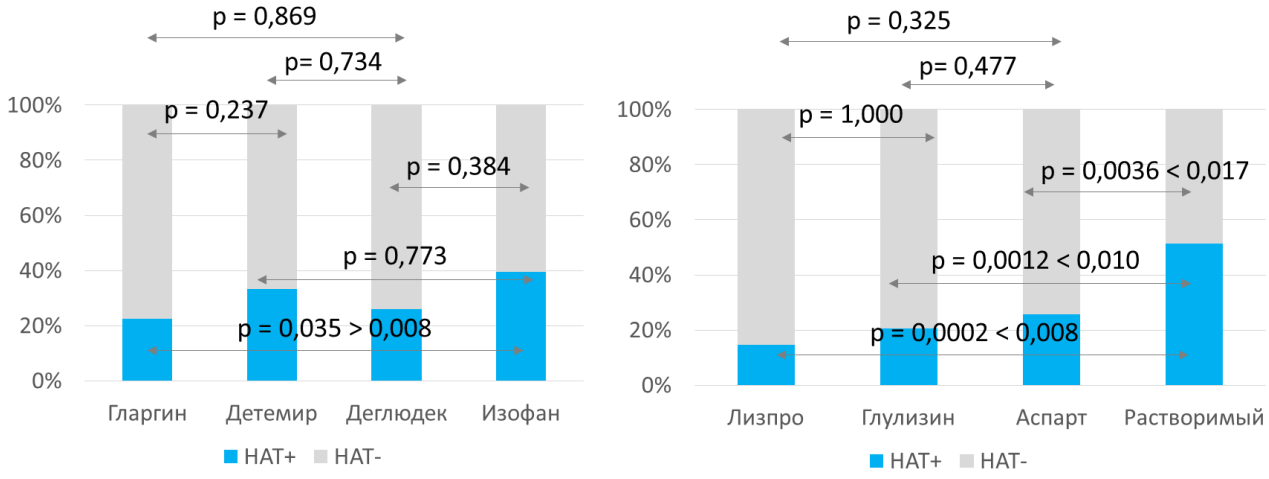

Рисунок 4. Доля нейтрализующих антител у пациентов с сахарным диабетом 1 типа, применяющих различные инсулины

Для понимания необходимой выборки исследования, которое могло бы показать статистически значимые различия между инсулинами, была применена формула расчета размера выборки для гипотезы равенства [36]. 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 9.

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				-

Из результатов расчета необходимого размера выборки следует, что количество пациентов, которых необходимо было бы включить в одно исследование, довольно значительно при сравнении между собой аналогов инсулина человека. Для получения статистически значимых различий между болюсными инсулинами по параметру «пациенты, у которых обнаружены нейтрализующие антитела к инсулину» потребуется включить более 2000 пациентов для пар «лизпро – аспарт» и «глулизин – аспарт» и более 500 тысяч

пациентов для пары «лизпро-глулизин». Также довольно большие выборки потребуются для выявления различий между инсулином-изофан и инсулином детемир, а также между инсулином деглудек и инсулинами гларгин и детемир.

Генно-инженерные человеческие инсулины короткого действия были ассоциированы с большей долей пациентов с нейтрализующими антителами, чем любой из аналогов человеческого инсулина короткого действия, и для выявления этих различий нужно небольшое количество пациентов.

Как известно, практически все пациенты с сахарным диабетом 1 типа получают инсулинотерапию в базис-болюсном режиме. В связи с этим, а также в связи с выявленными различиями в доле пациентов с нейтрализующими антителами для генно-инженерных инсулинов человека был отдельно проведен анализ этого показателя для пациентов, которые получали два генно-инженерных инсулина человека (и инсулин-изофан, и растворимый человеческий инсулин – группа 1), только один генно-инженерный инсулин человека (второй инсулин мог быть любым аналогом человеческого инсулина – группа 2: человеческий растворимый + базальный аналог, группа 3: инсулин-изофан + болюсный аналог, группа 4 – любой генно-инженерный инсулин человека и любой аналог) и два аналога человеческого инсулина (группа 5). Распределение пациентов по группам приведено в табл. 10.

Таблица 10.

Распределение пациентов относительно типа инсулинов, которые они получают

№ Группы	1	2	3	4	5
Сочетание инсулинов	2 ГИИЧ	Растворимый человеческий + аналог ИЧ	Изофан + аналог ИЧ	1 ГИИЧ + 1 аналог ИЧ	2 аналога ИЧ
Всего	28	11	10	21	395
НАТ +	13	7	2	9	89

НАТ -	15	4	8	12	306

Примечание: НАТ – нейтрализующие антитела, ГИИЧ – генно-инженерный инсулин человека, ИЧ – инсулин человека

При сравнении пациентов в группах 1, 2, 3 и 5 получены статистически значимые различия между группами ($p < 0,0001$). При попарном сравнении выявлено, что различаются группы 2 и 5 ($p = 0,005 < 0,008$) и группы 1 и 5 ($p = 0,009 < 0,010$); был применен метод Холмса-Бонферрони для множественных сравнений. Между группами 1 и 2 ($p = 0,541$), 1 и 3 ($p = 0,275$), 2 и 3 ($p = 0,115$), 3 и 5 ($p = 1,000$) различия выявлены не были.

При введении в анализ группы 4, которая является объединением групп 2 и 3, также были получены статистически значимые различия между группами ($p< 0,0001$). При попарном сравнении различия были выявлены только между группами 1 и 5 ($p = 0,009 < 0,017$), но не между группами 1 и 4 ($p = 1,000$) или группами 4 и 5 ($p = 0,061$).

Таким образом, было получено, 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.

3.4. Нейтрализующие антитела к инсулину и параметры течения сахарного диабета

3.4.1. Оценка корреляций наличия нейтрализующих антител к инсулину с исходными параметрами пациентов

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 (табл. 11). 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).

Таблица 11.

Анализ корреляции наличия нейтрализующих антител и МНН инсулинов с возрастом, длительностью течения сахарного диабета и дозой инсулина

Фактор	Число степеней свободы	Сумма квадратов	Средняя сумма квадратов	F-критерий	p-значение
Возраст пациента, лет					
Нейтрализующие антитела	1	1	0,5	0,004	0,947
МНН болюсного инсулина	3	2882	960,6	8,224	<0,0001
МНН базального инсулина	3	543	181,1	1,551	0,201
Остатки	436	50800	116,8		
Длительность течения сахарного диабета, лет					
Нейтрализующие антитела	1	28	28,1	0,332	0,565
МНН болюсного инсулина	3	2681	893,7	10,558	<0,0001
МНН базального инсулина	3	1365	455,1	5,377	0,001
Остатки	436	36907	84,6		
Доза базального инсулина, ЕД(МЕ)/сутки					
Нейтрализующие антитела	1	0	0,00	0,001	0,982

Фактор	Число степеней свободы	Сумма квадратов	Средняя сумма квадратов	F-критерий	p-значение
МНН болюсного инсулина	3	92	30,6	0,339	0,797
МНН базального инсулина	3	1099	366,3	4,051	0,007
Остатки	436	39419	90,4		
Доза базального инсулина, ЕД(МЕ)/кг/сутки					
Нейтрализующие антитела	1	0,017	0,0175	1,252	0,263
МНН болюсного инсулина	3	0,014	0,0047	0,334	0,801
МНН базального инсулина	4	0,222	0,0741	5,319	0,001
Остатки	436	6,077	0,0139		
Доза болюсного инсулина, ЕД(МЕ)/сутки					
Нейтрализующие антитела	1	581	581,4	8,687	0,003
МНН болюсного инсулина	3	240	80,0	1,195	0,311
МНН базального инсулина	3	526	175,3	2,620	0,050
Остатки	436	29180	66,9		
Доза болюсного инсулина, ЕД(МЕ)/кг/сутки					
Нейтрализующие антитела	1	0,039	0,0386	3,389	0,066

Фактор	Число степеней свободы	Сумма квадратов	Средняя сумма квадратов	F-критерий	p-значение
МНН болюсного инсулина	3	0,040	0,0134	1,179	0,316
МНН базального инсулина	3	0,045	0,0149	1,314	0,269
Остатки	436	4,950	0,0114		

Согласно полученным результатам, 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. Ассоциация между длительностью инсулинотерапии и МНН инсулина должна рассматриваться как статистическая находка, а не клинически значимая ассоциация, поскольку не учитывает давность назначения именно того инсулина, который рассматривается в анализе, и не имеет под собой клинического обоснования.

В результатах проведенного анализа значимыми являются корреляции между дозой базального инсулина и МНН базального инсулина, а также между суточной дозой болюсного инсулина и наличием или отсутствием нейтрализующих антител.

В связи с тем, что была выявлена взаимосвязь между дозой базального инсулина и его МНН, представляется важным внести данный фактор в многофакторный анализ, представленный в табл. 6. Добавление указанного фактора не ведет к принципиальным изменениям в результатах анализа: фактор длительности инсулинотерапии остается единственным статистически значимым фактором (табл. 7).

Отдельный интерес представляет положительная корреляция между наличием нейтрализующих антител к инсулину и дозой болюсного инсулина (без связи с МНН болюсного инсулина; наличие нейтрализующих антител ассоциировано с увеличением дозы болюсного инсулина на 2,64 ЕД(МЕ)/сутки) в совокупности с результатами, представленными в разделе 3.3 о большей доле пациентов с нейтрализующими антителами в группе растворимого человеческого инсулина по сравнению с аналогами инсулина ультракороткого действия.

3.4.2. Параметры пациентов, получающих растворимый человеческий инсулин и аналоги инсулина человека ультракороткого действия

В табл. 12 приведено сравнение пациентов (среднее ± стандартное отклонение), которые получали растворимый человеческий инсулин и аналоги инсулина человека ультракороткого действия. 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 между группами не различался ($p = 0,431$), однако концентрация глюкозы крови натощак была ниже в группе пациентов, получающих аналоги инсулина человека ($p = 0,0005$). Тем не менее, следует отметить, что уровень гликемии натощак не отражает действие болюсного инсулина (так как действие вечерней инъекции заканчивается за несколько часов до взятия крови, а непосредственно перед посещением исследовательского центра некоторые пациенты могут вводить болюсный инсулин для коррекции гипергликемии без приема пищи).

Таблица 12.

Характеристика пациентов, получающих растворимый человеческий инсулин и аналоги инсулина ультракороткого действия

Параметры пациентов	Растворимый человеческий инсулин	Аналоги инсулина ультракороткого действия	p-значение
Возраст, лет	45,54 ± 10,65	37,44 ± 10,87	< 0,0001
Пол (% женщин)	30,8	50,1	0,031
Длительность сахарного диабета	7,28 ± 5,27	14,39 ± 9,71	< 0,0001
Доза болюсного инсулина, ЕД(МЕ)/сутки	25,64 ± 5,47	25,81 ± 8,53	0,869
Доза болюсного инсулина, ЕД(МЕ)/кг/сутки	0,35 ± 0,08	0,36 ± 0,11	0,965
Нейтрализующие антитела, %	51,3	22,5	0,0002
Концентрация антител, Ед/мл	4,17 ± 5,66	4,48 ± 9,90	0,190
Гликированный гемоглобин, %	8,53 ± 1,09	8,67 ± 1,12	0,431
Гликемия натощак, ммоль/л	12,79 ± 2,90	10,82 ± 4,40	0,0005

Как было указано ранее, статистически значимая корреляция между наличием нейтрализующих антител и возрастом, полом и длительностью сахарного диабета отсутствует, таким образом, различия между группами в этих параметрах не могут объяснить разницу в доле пациентов с нейтрализующими антителами к инсулину между группами растворимого инсулина человека и аналогами человеческого инсулина. При этом доза болюсного инсулина не различается между группами, несмотря на то, что наличие нейтрализующих антител положительно коррелирует с абсолютной (но не относительной) дозой болюсного инсулина.

На рис. 5 приведены данные о дозе болюсного инсулина у пациентов, получающих растворимый человеческий инсулин и аналоги инсулина человека в зависимости от того, были ли у них обнаружены нейтрализующие антитела к инсулину. 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). 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.

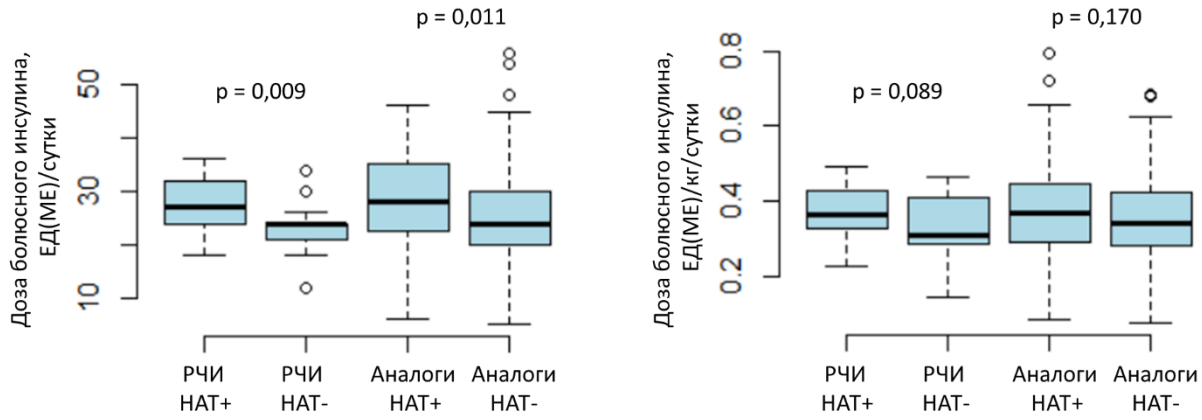

Рисунок 5. Доза болюсного инсулина в зависимости от его типа и наличия нейтрализующих антител (РЧИ – растворимый человеческий инсулин, НАТ – нейтрализующие антитела)

3.4.3. Влияние нейтрализующих антител к инсулину на эффективность инсулинотерапии

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). Однако, доза инсулина положительно коррелирует со значением гликированного гемоглобина: коэффициент линейной регрессии (B) равен 0,010 для абсолютной суммарной суточной дозы инсулина (p = 0,007) и равен 1,017 для суммарной суточной дозы инсулина на килограмм массы тела (p = 0,0005).

Был проведен анализ влияния дозы болюсного и базального инсулина в отдельности на уровень гликированного гемоглобина (с поправкой на наличие нейтрализующих антител и фактор взаимодействия дозы инсулина и наличия нейтрализующих антител). Результаты приведены в табл. 13. Не выявлено статистически значимых корреляций между дозой инсулина (как базального, так

и болюсного) и гликированным гемоглобином, а также между наличием нейтрализующих антител и показателем гликированного гемоглобина. Различия с результатами выше приведенного анализа связаны с тем, что в текущем анализе учтен фактор взаимодействия дозы инсулина и наличия нейтрализующих антител, который мог выступать в качестве неучтенного конфаундера в выше приведенном анализе.

Таблица 13.

Зависимость уровня гликированного гемоглобина от дозы инсулина и наличия нейтрализующих антител

Фактор	Линейный коэффициент	Стандартная ошибка	t-значение	p-значение
Модель 1 (фактор – доза болюсного инсулина, ЕД(МЕ)/сутки)				
Интерсепт	8,705	0,368	23,665	<0,0001
Доза инсулина, ЕД(МЕ)/сутки	-0,007	0,013	-0,533	0,594
Нейтрализующие антитела (реф. – да)	-0,489	0,417	-1,174	0,241
Доза : нейтрализующие антитела	0,026	0,015	1,781	0,076
Модель 2 (фактор – доза болюсного инсулина, ЕД(МЕ)/кг/сутки)				
Интерсепт	8,581	0,361	23,755	<0,0001
Доза инсулина, ЕД(МЕ)/кг/сутки	-0,169	0,921	-0,184	0,854
Нейтрализующие антитела (реф. – да)	-0,448	0,421	-1,066	0,287
Доза : нейтрализующие антитела	1,784	1,091	1,636	0,103
Модель 3 (фактор – доза базального инсулина, ЕД(МЕ)/сутки)				

Фактор	Линейный коэффициент	Стандартная ошибка	t-значение	p-значение
Интерсепт	8,199	0,313	26,175	<0,0001
Доза инсулина, ЕД(МЕ)/сутки	0,013	0,012	1,079	0,281
Нейтрализующие антитела (реф. – да)	0,166	0,353	0,472	0,637
Доза : нейтрализующие антитела	0,001	0,014	0,060	0,952
Модель 4 (фактор – доза базального инсулина, ЕД(МЕ)/кг/сутки)				
Интерсепт	7,892	0,352	22,402	<0,0001
Доза инсулина, ЕД(МЕ)/кг/сутки	1,920	1,033	1,859	0,064
Нейтрализующие антитела (реф. – да)	0,372	0,394	0,944	0,346
Доза : нейтрализующие антитела	-0,627	1,141	-0,549	0,583

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). Однако, доза инсулина положительно коррелирует со значением гликемии натощак: коэффициент линейной регрессии (B) равен 0,053 для абсолютной суммарной суточной дозы инсулина (p = 0,0001) и равен 2,799 для суммарной суточной дозы инсулина на килограмм массы тела (p = 0,015).

Был проведен анализ влияния дозы болюсного и базального инсулина в отдельности на уровень гликемии натощак (с поправкой на наличие нейтрализующих антител и фактор взаимодействия дозы инсулина и наличия нейтрализующих антител). При этом важно отметить, что на уровень гликемии натощак в первую очередь влияет именно доза базального инсулина, поскольку действие болюсного инсулина за исключением случаев, когда пациент его вводит для коррекции утренней гипергликемии без приема пищи, заканчивается за несколько часов до взятия крови для проведения анализа. Результаты многофакторного анализа приведены в табл. 14.

Таблица 14.

Зависимость уровня гликемии натощак от дозы инсулина и наличия нейтрализующих антител

Фактор	Линейный коэффициент	Стандартная ошибка	t-значение	p-значение
Модель 1 (фактор – доза болюсного инсулина, ЕД(МЕ)/сутки)				
Интерсепт	6,927	1,415	4,895	<0,0001
Доза инсулина, ЕД(МЕ)/сутки	0,131	0,049	2,692	0,007
Нейтрализующие антитела (реф. – да)	2,145	1,603	1,338	0,182
Доза : нейтрализующие антитела	-0,050	0,057	-0,877	0,381
Модель 2 (фактор – доза болюсного инсулина, ЕД(МЕ)/кг/сутки)				
Интерсепт	8,367	1,404	5,958	<0,0001
Доза инсулина, ЕД(МЕ)/кг/сутки	5,889	3,581	1,644	0,101
Нейтрализующие антитела (реф. – да)	1,229	1,635	0,751	0,453

Фактор	Линейный коэффициент	Стандартная ошибка	t-значение	p-значение
Доза : нейтрализующие антитела	-1,555	4,241	-0,367	0,714
Модель 3 (фактор – доза базального инсулина, ЕД(МЕ)/сутки)				
Интерсепт	7,934	1,212	6,544	<0,0001
Доза инсулина, ЕД(МЕ)/сутки	0,109	0,047	2,314	0,021
Нейтрализующие антитела (реф. – да)	2,098	1,365	1,537	0,125
Доза : нейтрализующие антитела	-0,064	0,053	-1,207	0,228
Модель 4 (фактор – доза базального инсулина, ЕД(МЕ)/кг/сутки)				
Интерсепт	8,511	1,379	6,172	<0,0001
Доза инсулина, ЕД(МЕ)/кг/сутки	6,340	4,042	1,569	0,117
Нейтрализующие антитела (реф. – да)	2,063	1,541	1,339	0,181
Доза : нейтрализующие антитела	-4,711	4,466	-1,055	0,292

По результатам анализа также получено отсутствие корреляции между наличием нейтрализующих антител и уровнем гликемии натощак, однако доза инсулина (как базального, так и болюсного) остается статистически значимым фактором и положительно коррелирует с концентрацией тощаковой глюкозы. Взаимодействие факторов дозы инсулина и наличия нейтрализующих антител не является статистически значимым в отношении тощаковой гликемии.

С клинической точки зрения факт положительной корреляции между дозой инсулина и уровнем гликемии натощак может объясняться тем, что доза обоих инсулинов подбирается индивидуально на основании конценрации глюкозы: чем выше у пациента уровень гликемии, тем большую дозу инсулина он введет. При гипергликемии (в том числе натощак) пациентам рекомендуется вводить дополнительный болюсный инсулин на коррекцию дозы, что может объяснять большую суточную дозу болюсного инсулина у тех, кто имел более высокую концентрацию глюкозы в крови натощак. При этом гипергликемия после пробуждения в ряде случаев свидетельствует о недостаточности дозы базального инсулина, что также может сопровождаться повышением дозы при следующем введении (утром или вечером в этот день). Однако наверняка объяснить данную корреляцию на основании имеющихся данных не представляется возможным в связи с кросс-секционным дизайном данного этапа исследования и с отсутствием возможности детально изучить параметры инсулинотерапии и гликемического контроля пациентов до сбора данных.

3.5. Резюме

При анализе данных, полученных на кросс-секционном этапе исследования, было получено, что пациенты с сахарным диабетом значительно чаще используют аналоги человеческого инсулина, чем генно-инженерные инсулины человека, и самыми распространенными комбинациями базального и болюсного инсулина в настоящем исследовании были «инсулин гларгин + инсулин лизпро» и «инсулин гларгин + инсулин аспарт». При этом общая концентрация антител к инсулину не различается при использовании различных МНН инсулинов, но положительно коррелирует с длительностью инсулинотерапии любым инсулином (с длительностью течения сахарного диабета 1 типа) и не коррелирует с возрастом и полом пациентов, а также с дозами инсулина, которые они себе вводят.

По данным включенной в исследование субпопуляции пациентов с сахарным диабетом 1 типа были выбраны «отсечки нормы» для значения общей

концентрации антител к инсулину, соответствующие 95 и 97,5 квантилям распределения показателя. Эти значения составили 12,69 Ед/мл и 22,29 Ед/мл соответственно. Ни по одной из этих отсечек нет отличий между различными инсулинами по частоте превышения общей концентрации антител к инсулину над предложенными референсными значениями. С учетом данных о концентрации антител у пациентов, получающих различные инсулины, для выявления отличий в отношении общей концентрации антител к инсулину между различными инсулинами в сравнительное клиническое исследование безопасности потребовалось бы включить существенное количество пациентов, в некоторых случаях – превышающее их общее число, которые участвуют во всей программе клинической разработки оригинального препарата. С учетом низкой клинической значимости образования антител к инсулину, целесообразность такого исследования представляется сомнительной.

Нейтрализующие антитела к инсулину в настоящем исследовании чаще выявлялись у пациентов, которые получали растворимый генно-инженерный человеческий инсулин, чем у тех, кто получал аналоги инсулинов ультракороткого действия. Наличие нейтрализующих антител к инсулину положительно коррелирует с суточной дозой инсулина, однако в среднем различия в дозе между теми, у кого есть нейтрализующие антитела, и у кого их нет, не превышают 10 % от общей суточной дозы и не являются статистически значимыми, если пересчитывать дозу на килограмм массы тела: несмотря на то, что в группе пациентов, получавших растворимый человеческий инсулин, было значительно больше пациентов с нейтрализующими антителами к инсулину, его доза в этих группах была одинаковой. Формирование нейтрализующих антител не оказывает влияния на эффективность инсулинотерапии (по показателям гликированного гемоглобина и гликемии натощак).

Для выявления отличий в доле пациентов, у которых сформируются нейтрализующие антитела в ответ на терапию инсулином, в сравнительное

клиническое исследование безопасности потребовалось бы включить существенное количество пациентов, в некоторых случаях (например, при сравнении между собой аналогов инсулина человека) – превышающее общее количество пациентов, которые участвуют во всей программе клинической разработки оригинального препарата. С учетом низкой клинической значимости образования нейтрализующих антител к инсулину, целесообразность такого исследования представляется сомнительной.

ГЛАВА 4. КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ПРЕПАРАТАМИ ИНСУЛИНА.

4.1. Критерии клинически значимого иммунного ответа при лечении препаратами инсулина.

На основании литературных данных, приведенных в разделе 1.6, 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 нагрузки, приема пищи, гормонального статуса 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 нарастанием концентрации антител к инсулину или с появлением нейтрализующих антител, если их не было до начала терапии. Пограничные значения для повышения дозы инсулина, а также для нарастания концентрации антител к инсулину в настоящее время не определены.

4.2. Частота развития клинически значимого иммунного ответа у пациентов с сахарным диабетом 1 типа при лечении препаратами инсулинов гларгин и аспарт

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 ± 4,85 ЕД, а через 26 недель лечения (22 недели относительно окончания периода титрации) – 1,05 ± 5,59 ЕД. При этом доля пациентов с увеличением дозы инсулина на 0,01 ЕД и более равнялась 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 ± 1,10 %, и у 437 пациентов через 26 недель и составило -0,63 ± 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 было в среднем 0,66 ± 6,72 Ед/мл через 12 недель и 0,66 ± 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 % – уровень гликированного гемоглобина увеличился более чем на 0,3 %) и у 24 пациентов (5 %) через 26 недель лечения (у 12 из них уровень гликированного гемоглобина вырос на 0,3 % и более). Среднее повышение общей дозы инсулина у пациентов с критериями иммунного ответа составило 4,27 ± 2,97 ЕД/сутки (от 1 до 12 ЕД/сутки) через 12 недель лечения и 6,27 ± 4,99 ЕД/сутки (от 0,14 до 17,46 ЕД/сутки) через 26 недель лечения. Среднее повышение уровня гликированного гемоглобина равнялось 0,50 ± 0,48 % (от 0 до 1,6 %) через 12 недель лечения и 0,46 ± 0,46 % (от 0 до 2,1 %) через 26 недель лечения. Среднее повышение концентрации антител составило 1,95 ± 3,70 Ед/мл (от 0,1 до 17,2 Ед/мл) через 12 недель лечения и 1,34 ± 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 ± 0,26 % - от 0 до 0,7 %; повышение дозы инсулина на 5,11 ± 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 ± 0,68

% - от 0 до 1,9 %; повышение дозы инсулина на 3,79 ± 2,97 ЕД/сутки – от 0,57 до 9,29 ЕД/сутки).

4.3. Реакции в месте введения

Реакции в месте введения препарата являются вариантом иммунологической реакции. В проведенных исследованиях реакции в месте введения были зарегистрированы у 2 пациентов (3 случая), вводивших препарат GP40061, у 1 пациента (1 случай), вводившего Лантус® СолоСтар®, и у 1 пациента (1 случай), вводившего 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).

4.4. Резюме

Критерии клинически значимого иммунного ответа в отношении эффективности при лечении препаратами инсулина не установлены. Выявление клинически значимого иммунного ответа требует комплексного подхода: оценки эффективности терапии, необходимости повышения дозы препарата и параметров развития иммунного ответа. Рассмотрение этих факторов по отдельности не представляется целесообразным, поскольку на эффективность инсулинотерапии могут влиять многие другие параметры кроме развития иммунного ответа.

В работе предложено два набора признаков, на которые следует опираться, предполагая развитие у пациента клинически значимого иммунного ответа, при этом фактор «формирование нейтрализующих антител» представляется более патофизиологически обоснованным, поскольку не все антитела нейтрализуют инсулин. Доля пациентов с иммунным ответом в данном случае не превышает 5 % для фактора «повышение концентрации антител к инсулину» и 2 % для

фактора «формирование нейтрализующих антител» с учетом гликемического ответа и изменения дозы инсулина.

Было проведено сравнение эффективности лечения и дозы инсулина у пациентов, которые соответствуют возможным критериям клинически значимого иммунного ответа, и остальных пациентов. Результаты сравнения пациентов для первого варианта совокупности критериев иммунного ответа приведены в табл. 15, а для второго – в табл. 16. У пациентов со всеми предложенными критериями иммунного ответа нарастали как доза инсулина, так и гликированный гемоглобин (что обусловлено выбором критериев – нарастание обоих показателей), однако это нарастание в значительной мере 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 и содержания гликированного гемоглобина в крови у пациентов со всеми предложенными критериями является клинически значимым, в связи с чем они могут рассматриваться как релевантные.

Таблица 15.

Сравнение параметров гликированного гемоглобина и суточной дозы у пациентов с предложенными критериями иммунного ответа (вариант 1) и без них

Оцениваемый параметр	Есть критерии иммунного ответа	Нет критериев иммунного ответа	p-значение
Изменение гликированного гемоглобина через 12 недель лечения	0,50 ± 0,48	-0,74 ± 1,09	< 0,0001
Изменение гликированного	0,46 ± 0,49	-0,69 ± 1,10	< 0,0001

Оцениваемый параметр	Есть критерии иммунного ответа	Нет критериев иммунного ответа	p-значение
гемоглобина через 26 недель лечения			
Изменение суточной дозы инсулина через 12 недель лечения	4,27 ± 2,97	0,08 ± 4,84	< 0,0001
Изменение суточной дозы инсулина через 26 недель лечения	6,27 ± 4,99	0,74 ± 5,47	< 0,0001

Таблица 16.

Сравнение параметров гликированного гемоглобина и суточной дозы у пациентов с критериями иммунного ответа (вариант 2) и без них

Оцениваемый параметр	Есть критерии иммунного ответа	Нет критериев иммунного ответа	p-значение
Изменение гликированного гемоглобина через 12 недель лечения	0,40 ± 0,26	-0,68 ± 1,10	0,005
Изменение гликированного гемоглобина	0,49 ± 0,68	-0,65 ± 1,10	0,003

Оцениваемый параметр	Есть критерии иммунного ответа	Нет критериев иммунного ответа	p-значение
через 26 недель лечения			
Изменение суточной дозы инсулина через 12 недель лечения	5,11 ± 2,56	0,25 ± 4,84	0,005
Изменение суточной дозы инсулина через 26 недель лечения	3,79 ± 2,97	1,01 ± 5,61	0,030

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 ± 3,70 Ед/мл у пациентов с иммунным ответом и 0,59 ± 6,85 Ед/мл у пациентов без него. Через 26 недель различия также были статистически значимы ($p < 0,0001$), но незначительны клинически: 1,34 ± 1,45 Ед/мл у пациентов с иммунным ответом и 0,61 ± 4,82 Ед/мл у пациентов без него.

ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ 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) на и изменение дозы инсулина. 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». Результаты приведены в табл. 17.

Таблица 17.

Характеристика линейных моделей изменения уровня гликированного гемоглобина и дозы инсулина в зависимости от параметров иммунного ответа

Фактор	Линейный коэффициент	Стандартная ошибка	t-значение	p-значение
Модель 1. Изменение уровня гликированного гемоглобина через 12 недель лечения (без учета изменения дозы инсулина)				
Интерсепт	-0,746	0,109	-6,846	<0,0001
Концентрация антител к инсулину до начала лечения (Ед/мл)	0,005	0,006	0,881	0,379
Изменение концентрации антител к инсулину через 12 недель лечения (Ед/мл)	-0,021	0,008	-2,654	0,008
Наличие нейтрализующих антител к инсулину до начала лечения (референс – «да»)	0,080	0,122	0,656	0,512
R^2				0,019
Модель 2. Изменение уровня гликированного гемоглобина через 12 недель лечения (с учетом изменения дозы инсулина)				
Интерсепт	-0,742	0,109	-6,833	<0,0001
Концентрация антител к инсулину до начала лечения (Ед/мл)	0,006	0,006	0,945	0,345

Фактор	Линейный коэффициент	Стандартная ошибка	t-значение	p-значение
Изменение концентрации антител к инсулину через 12 недель лечения (Ед/мл)	-0,018	0,008	-2,353	0,019
Наличие нейтрализующих антител к инсулину до начала лечения (референс – «да»)	0,062	0,122	0,510	0,610
Изменение дозы инсулина через 12 недель лечения (ЕД/сутки)	0,021	0,011	1,979	0,048
R^2				0,028
Модель 3. Изменение уровня гликированного гемоглобина через 26 недель лечения (без учета изменения дозы инсулина)				
Интерсепт	-0,771	0,111	-6,401	<0,0001
Концентрация антител к инсулину до начала лечения (Ед/мл)	0,001	0,006	0,155	0,877
Изменение концентрации антител к инсулину через 12 недель лечения (Ед/мл)	-0,027	0,011	-2,312	0,021
Наличие нейтрализующих антител к инсулину до	0,114	0,127	0,897	0,370

Фактор	Линейный коэффициент	Стандартная ошибка	t-значение	p-значение
начала лечения (референс – «да»)				
Формирование нейтрализующих антител к инсулину на фоне лечения (референс – «нет»)	0,055	0,164	0,338	0,735
R^2				0,014
Модель 4. Изменение уровня гликированного гемоглобина через 26 недель лечения (с учетом изменения дозы инсулина)				
Интерсепт	-0,717	0,111	-6,444	<0,0001
Концентрация антител к инсулину до начала лечения (Ед/мл)	0,001	0,006	0,119	0,906
Изменение концентрации антител к инсулину через 12 недель лечения (Ед/мл)	-0,028	0,012	-2,396	0,017
Наличие нейтрализующих антител к инсулину до начала лечения (референс – «да»)	0,112	0,127	0,882	0,378
Формирование нейтрализующих антител к инсулину на	0,055	0,164	0,336	0,737

Фактор	Линейный коэффициент	Стандартная ошибка	t-значение	p-значение
фоне лечения (референс – «нет»)				
Изменение дозы инсулина через 26 недель лечения (ЕД/сутки)	0,009	0,010	0,925	0,355
R^2				0,016
Модель 5. Изменение дозы инсулина через 12 недель лечения				
Интерсепт	-0,178	0,482	-0,369	0,712
Концентрация антител к инсулину до начала лечения (Ед/мл)	-0,018	0,027	-0,648	0,517
Изменение концентрации антител к инсулину через 12 недель лечения (Ед/мл)	-0,103	0,034	-2,999	0,003
Наличие нейтрализующих антител к инсулину до начала лечения (референс – «да»)	0,829	0,538	1,541	0,124
R^2				0,025
Модель 6. Изменение дозы инсулина через 26 недель лечения				
Интерсепт	-0,169	0,482	-0,350	0,726
Концентрация антител к инсулину до начала лечения (Ед/мл)	-0,019	0,027	-0,710	0,478

Фактор	Линейный коэффициент	Стандартная ошибка	t-значение	p-значение
Изменение концентрации антител к инсулину через 12 недель лечения (Ед/мл)	-0,096	0,035	-2,744	0,006
Наличие нейтрализующих антител к инсулину до начала лечения (референс – «да»)	0,968	0,550	1,759	0,079
Формирование нейтрализующих антител к инсулину на фоне лечения (референс – «нет»)	-0,852	0,715	-1,192	0,234
R^2				0,028

Отсутствие влияния изменения концентрации антител к инсулину на гликемический контроль (HbA1c) и дозу инсулина наглядно продемонстрировано на рис. 6.

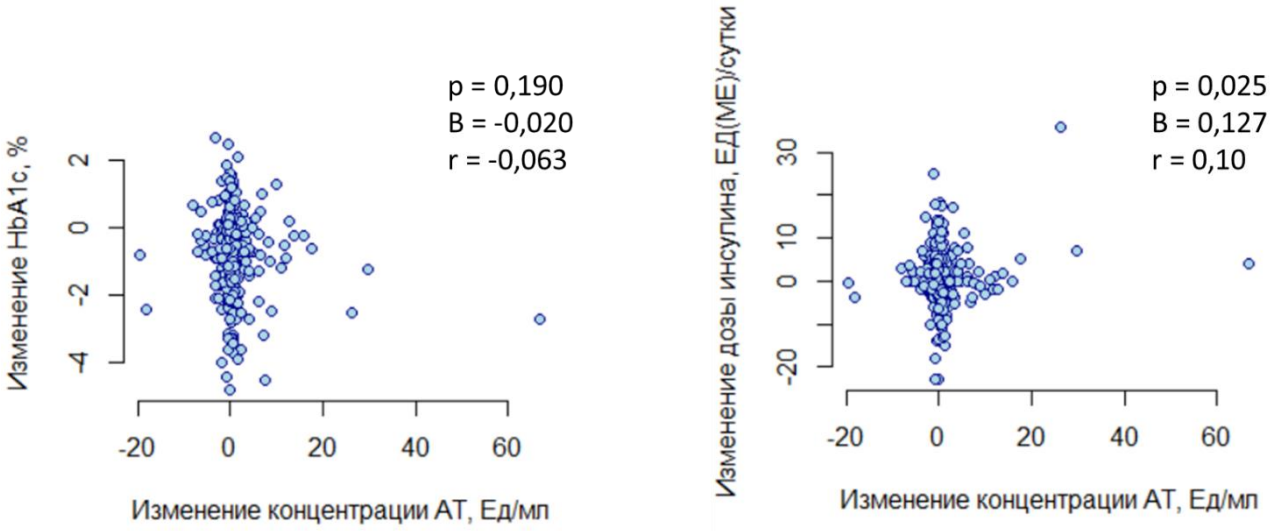

Рисунок 6. Отсутсвие влияния изменения концентрации антител к инсулину на гликемический контроль и дозу инсулина

В результате проведенного анализа было получено, что изменение концентрации антител к визиту оценки является статистически значимым параметром во всех моделях и отрицательно коррелирует с изменением гликированного гемоглобина как через 12, так и через 26 недель лечения, как с поправкой на изменение дозы инсулина, так и без нее. В сформированной базе данных отрицательное изменение гликированного гемоглобина соответствовало его снижению, а положительное – повышению, таким образом в клиническом аспекте данную корреляцию следует интерпретировать как «повышение концентрации антител к инсулину положительно коррелировало со снижением уровня гликированного гемоглобина». Данная интерпретация не укладывается в клинические представления о связи развития иммунного ответа и снижения эффективности терапии, и с учетом клинической несогласованности, а также с учетом того, что факторы, включенные в модель, описывают не более 3 % вариабельности изменения гликированного гемоглобина (долю описываемой моделью вариабельности отражает показатель R^2), данная находка, вероятнее всего, является статистической. Этот вывод подкрепляется тем, что ни исходная концентрация антител к инсулину, ни наличие нейтрализующих антител перед началом инсулинотерапии, ни их формирование на фоне инсулинотерапии не

являются статистически значимыми факторами в отношении эффективности лечения ни в одной из моделей, а также тем, что однофакторная модель зависимости изменения гликированного гемоглобина от изменения концентрации антител также дает отрицательный коэффициент линейной регрессии при крайне низком коэффициенте корреляции (<0,15).

Изменение концентрации антител к инсулину также является единственным статистически значимым фактором в моделях изменения дозы инсулина, показывая отрицательную корреляцию. Отрицательная корреляция с дозой инсулина также противоречит клиническим представлениям о развитии иммунного ответа и его возможных эффектах. В совокупности с низкими значениями R^2 (менее 3 %), а также с противоположным направлением корреляции между изменением дозы и изменением концентрации антител в однофакторной модели (на 26 недель лечения), данную модель нельзя считать клинически валидной и релевантной.

ГЛАВА 6. ИММУНОГЕННОСТЬ 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 ± 1,27 % и 8,68 ± 1,16 %, соответственно, p = 0,572). Снижение гликированного гемоглобина через 12 недель лечения (0,71 ± 1,03 % и 0,85 ± 1,15 %, соответственно, p = 0,308) и через 26 недель лечения (-0,66 ± 1,01 % и -0,77 ± 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 ± 16,91 ЕД/сутки и 46,66 ± 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 ± 5,46 ЕД/сутки и -0,60 ± 5,24 ЕД/сутки, соответственно, p = 0,123) и через 26 недель лечения (1,05 ± 5,07 ЕД/сутки и 0,18 ± 5,96 ЕД/сутки, соответственно, p = 0,237).

Концентрация антител к инсулину была сопоставима до начала лечения (4,34 ± 7,66 Ед/мл и 5,03 ± 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 ± 2,49 Ед/мл и 1,38 ± 10,98 Ед/мл, соответственно, p = 0,399), ни через 26 недель лечения (-0,02 ± 2,85 Ед/мл и 0,30 ± 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 ± 1,05 % и 8,63 ± 1,05 %, соответственно, p = 0,580). Снижение уровня гликированного гемоглобина через 12 (0,55 ± 1,10 % и 0,64 ± 1,09 %, соответственно, p = 0,542) и через 26 недель лечения (-0,57 ± 1,21 % и -0,56 ± 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 ± 14,31 ЕД/сутки и 49,43 ± 16,48 ЕД/сутки для GP40071 и НовоРапид® Пенфилл®, соответственно, p = 0,541) и изменялась одинаково в обеих группах как через 12 (0,55 ± 4,76 ЕД/сутки и 0,45 ± 4,15 ЕД/сутки, соответственно, p = 0,975) и через 26 недель лечения (1,25 ± 6,43 ЕД/сутки и 1,45 ± 4,67 ЕД/сутки, соответственно, p = 0,667).

Концентрация антител к инсулину была сопоставима до начала лечения (4,86 ± 12,62 Ед/мл и 3,74 ± 4,21 Ед/мл для GP40071 и НовоРапид® Пенфилл®, соответственно, p = 0,545), и ее изменение не различалось между группами ни

через 12 (1,18 ± 7,77 Ед/мл и 0,21 ± 2,09 Ед/мл, соответственно, p = 0,718), ни через 26 недель лечения (1,65 ± 7,11 Ед/мл и 0,40 ± 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), а через 26 – 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), а через 26 – 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.

ГЛАВА 7. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее исследование были включены результаты двух клинических исследований иммуногенности биосимиляров инсулина гларгин [97, 121] и инсулина аспарт, в которых участвовали 444 пациента с сахарным диабетом 1 типа. Всего в двух исследованиях было 90 пациентов, которые получали оригинальный инсулин гларгин, 90 – биоподобный инсулин гларгин, 132 – оригинальный инсулин аспарт и 132 – биоподобный инсулин аспарт. Исходно пациенты получали 4 различных МНН базальных и 4 МНН болюсных инсулинов. Таким образом, в рамках настоящего исследования благодаря сочетанию кросс-секционного и проспективного интервенционного этапов стало возможным скрининговое сравнение иммунного статуса (в отношении инсулинотерапии) пациентов, использующих различные инсулины, а также сравнение иммуногенности оригинальных и разработанных биоподобных препаратов инсулина гларгин и аспарт.

Проведенное исследование показало, что общая концентрация антител к инсулину не отличается у пациентов, получающих различные препараты инсулина (генно-инженерные инсулины человека, различные аналоги инсулина человека) [122]. Ранее приведенные литературные данные [79, 120], полученные преимущественно для инсулинов аспарт и лизпро, а также для генно-инженерных инсулинов человека, хоть и отражают значительную вариабельность результатов оценки иммуногенности для одного и того же МНН инсулина, но показывают отсутствие различий в прямых сравнениях, что соответствует результатам настоящего исследования, полученных другим методом детекции антител к инсулину. Отсутствие отличий в концентрациях антител к инсулинам с различной структурой молекулы и с различным составом готовых лекарственных форм поднимает вопрос о целесообразности проведения сравнительных исследований.

По нашим данным, для выявления различий между инсулинами по этому параметру, потребуется несколько сотен, а чаще – несколько тысяч человек, что в некоторых случаях значительно превышает общее число субъектов исследования во всей программе клинических испытаний оригинального лекарственного препарата. Эти результаты являются оцифрованным подтверждением тезиса о необоснованно проводимых клинических исследованиях для выявления минимальных различий показателя с сомнительной клинической значимостью. Субъекты клинических исследований вынуждены испытывать сопряженные с проведением исследования неудобства, при этом медицинские работники нерационально тратят свои временные ресурсы, а производители лекарственных препаратов тратят значительные бюджеты, которые впоследствии закладываются в стоимость лекарственного препарата, снижая его доступность, тогда как добавленная польза в отношении снижения остаточной неопределенности при помощи таких исследований крайне низка [65].

Общая концентрация антител, по полученным данным, положительно коррелирует с длительностью инсулинотерапии (длительностью течения сахарного диабета) у пациентов с сахарным диабетом 1 типа, однако не коррелирует ни с возрастом, ни с полом пациентов. Вероятно, в данном случае длительность инсулинотерапии, а также особенности критериев включения и невключения пациентов в исследование (в частности, ограничение на включение пациентов с аутоиммунными заболеваниями и с иммунодефицитом) оказались более значимы, чем фактор возраста. В литературе можно встретить данные о том, что риск развития иммунного ответа при введении инсулина инсулин-наивным пациентам уменьшается на 3 % на каждый прожитый год, однако механизм, лежащий в основе этого явления до конца не ясен: на данный момент предполагается, что с возрастом снижается иммунологическая реактивность [50, 64]. Тем не менее, следует учитывать, что факт развития иммунного ответа, будучи бинарной переменной, лишь отчасти отражает повышение концентрации

антител. Положительная корреляция концентрации антител с длительностью инсулинотерапии была ранее получена для генно-инженерных, но не аналоговых инсулинов человека [125], тогда как в текущем исследовании данная корреляция наблюдалась у всей включенной популяции, однако не была статистически значимой у пациентов, которые получали только генно-инженерные инсулины человека (p = 0,093) и которые получали один генно-инженерный и один аналоговый инсулин (p = 0,749) и была статистически значима у пациентов, которые получали аналоги инсулина человека (p = 0,001; коэффициент корреляции 0,16 – слабая степень связи). Различия в результатах могут быть обусловлены маленькой выборкой пациентов, получающих генно-инженерные инсулины человека, а также различными методами анализа: в настоящем исследовании использовалась линейная регрессия для абсолютного значения концентрации антител, а в исследовании Nishimura и соавт. – логистическая регрессия для бинарного исхода (отсутствие или наличие иммунного ответа). Использование бинарной переменной исхода возможно с определенными ограничениями, поскольку границы нормы («отсутствия иммунного ответа») для использовавшейся в исследовании методики не установлены.

Определение границ нормы концентрации антител было выполнено в рамках настоящей работы. Эти значения составили 12,69 Ед/мл и 22,29 Ед/мл соответственно, однако ни по одной из этих отсечек нет отличий между различными инсулинами по частоте превышения общей концентрации антител к инсулину над референсными значениями. В связи с этим, были предложены иные критерии клинически значимого иммунного ответа без опоры на данные отсечки (которые, однако, могут рассматриваться в дальнейшем для невключения в исследования иммуногенности пациентов с высокими значениями исходной концентрации антител) [50, 64].

Предложенные критерии включали в себя отсутствие снижения гликированного гемоглобина на фоне терапии в сочетании с необходимостью

повышать дозу инсулина и либо нарастанием общей концентрации антител к инсулину, либо появлением нейтрализующих антител к инсулину у пациентов, у которых они не детектировались до начала лечения. Данное сочетание включает в себя клиническое обоснование, исходя из цели инсулинотерапии – достижение удовлетворительного гликемического контроля у пациентов с гипергликемией, имеет лабораторный субстрат, частично исключающий неоптимальный подбор дозы инсулина, а также основывается на объективно подтвержденном развитии иммунного ответа. С учетом того, что изменение концентрации антител к инсулину не коррелирует с эффективностью инсулинотерапии, в отношении дозы корреляция представляется скорее статистической находкой, объясняющей крайне низкую долю вариабельности показателя, в рутинной клинической практике скрининговое определение антител к инсулину не представляется целесообразным, а в клинических исследованиях выявление различий по данному показателю имеет ограниченное применение. С учетом низкой клинической значимости показателя, а также с учетом небольших различий для препаратов инсулина с разными молекулами и вспомогательными веществами, проведение клинических исследований, нацеленных на выявление различий по данному показателю представляется нерациональным.

Для выявления различий в отношении формирования нейтрализующих антител в ответ на введение различных препаратов аналогов человеческого инсулина также потребуются значительные выборки субъектов клинических исследований, при этом нейтрализующие антитела не оказывают влияния ни на дозу, ни на эффективность инсулинотерапии у пациентов, получающих как аналоги инсулина, так и генно-инженерные инсулины человека (при оценке относительной дозы: МЕ/кг массы тела).

В настоящее исследование не включали пациентов с аутоиммунными заболеваниями или иммунодефицитными состояниями, которые могли исказить данные о наличии иммунного ответа на инсулинотерапию, и различие в доле

пациентов с нейтрализующими антителами, получающих растворимый инсулин человека, и аналоги человеческого инсулина ультракороткого действия может быть обусловлено либо базальным инсулином (пациенты, использующие растворимый человеческий инсулин, чаще использовали также инсулин-изофан, НПХ-фракция которого, являясь белком, может обусловливать дополнительный иммунный ответ), либо параметрами самих препаратов (например, степенью очистки продукта от примесей, вспомогательными веществами) [50, 64]. Для ответа на этот вопрос требуется проводить неклинические исследования сопоставимости разных серий различных препаратов. В рамках настоящего исследования также нельзя исключить смещение (и неточность) данных у пациентов, получавших генно-инженерные инсулины человека, так как эта группа была значительно меньше и имела большую вариабельность параметров иммуногенности, чем группа пациентов, которые получали генно-инженерные инсулины человека.

При прямом сравнении биоподобных препаратов инсулина с их референтными препаратами не было получено различий в параметрах иммуногенности и эффективности ни для инсулина гларгин, ни для инсулина аспарт. Для получения статистически значимых различий между группами пациентов, получавших референтный и биоподобный инсулины, по предложенным критериям клинически значимого иммунного ответа потребовалось бы до 2020 пациентов для инсулина гларгин и 834 пациента для инсулина аспарт, что превышает ожидаемые и оправданные объемы выборки в исследованиях биоподобных лекарственных препаратов. Кроме того, к настоящему моменту ни в одном из сравнительных исследований иммуногенности биоподобных препаратов инсулина не было получено различий с референтными лекарственными препаратами [16, 21, 22, 39, 70, 71, 86, 91, 107].

Все эти данные, а также результаты других исследований, подводят к необходимости формирования особого подхода к разработке биоподобных

препаратов инсулинов, не экстраполируя требования к разработке всех биоподобных лекарственных препаратов, включая моноклональные антитела. Регуляторные требования к исследованию биоподобных препаратов инсулина постепенно упрощаются. Так, например, в руководствах EMA (EMEA/CHMP/BMWP/32775/2005, 2006) и FDA [60] ранее присутствовали требования проводить доклиническое исследование хронической токсичности, и, в случае FDA, сравнительное исследование фармакокинетических и фармакодинамических свойств у релевантного вида животных, тогда как в 2015 году EMA [51] исключили требование о проведении исследований биоподобных препаратов инсулина на животных за исключением тех случаев, когда используются новые вспомогательные вещества [134].

В отношении необходимости проведения многоцентровых клинических исследований эффективности и иммуногенности биоподобных лекарственных препаратов, в частности инсулинов, также ведется обширная дискуссия с наиболее жесткими регуляторными требованиями, было замечено, что ни одно из заявлений за всё время не было отклонено, если биоподобный и референтный лекарственный препарат не отличались в аналитических (доклинических) испытаниях и в сравнительном исследовании фармакокинетических свойств [172]. «Подтверждающие» клинические исследования в данном случае не уменьшают остаточную неопределенность, поскольку ее просто нет [59, 60]. Аналитические и фармакокинетические исследования значительно более чувствительны в отношении выявления различий между препаратами, чем многоцентровые исследования, где они маскируются различиями пациентов [152]. Результаты этих исследований предсказуемы до начала их проведения, в связи с чем этичность их проведения в настоящее время находится под вопросом [61, 65, 172]. Кроме того, получение выгоды от участия в исследовании для пациента в отношении препарата сомнительно: референтный препарат присутствует на рынке в свободном доступе, и тестируемый препарат априори

не дает добавленной клинической ценности по отношению к референтному препарату [171].

Когда речь идет о тестировании биоподобных лекарственных препаратов, информация, получаемая в результате проведения ортогональных физико-химических и *in vitro* фармакодинамических тестов, является крайне чувствительной и позволяет убедительно продемонстрировать, что отсутствие различий в качественных характеристиках препаратов означает отсутствие различий в их эффективности и безопасности [90]. 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 [171].

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.

С учетом низкой клинической значимости развития иммунного ответа при инсулинотерапии, отсутствия однозначных данных о различии иммуногенности разных препаратов инсулина, а также значительно большей чувствительности аналитических и доклинических методик в отношении определения возможных отличий в эффективности и иммуногенности препаратов, представляется

целесообразным общий тренд на упрощение регуляторных подходов к регистрации препаратов инсулина, в частности, биоподобных.

Дискуссия об иммуногенности биосимиляров является высоко значимой с позиции их взаимозаменяемости. Взаимозаменяемость является во многом экономическим, а не клиническим вопросом, в связи с чем подходы к ее признанию различаются от страны к стране [20]. Данные клинических исследований, полученные при строгом соблюдении протокола, подтверждают отсутствие различий между биоподобным и оригинальным продуктами (в противном случае биоподобные продукты не были бы зарегистрированы, поскольку не соответствовали бы регуляторным требованиям), однако в рутинной клинической практике нередко наблюдается несколько большая частота прекращения терапии биоподобными препаратами и меньшая субъективная эффективность этих препаратов по сравнению с референтными. Данное явление объясняют проявлением ноцебо эффекта предубежденности в отношении воспроизведенных продуктов [44, 103, 136, 139].

В частности, были опубликованы два систематических обзора эффективности и безопасности переключения пациентов с оригинального препарата на биоподобный, при этом в обоих обзорах было показано отсутствие снижения эффективности или безопасности терапии при переключении, равно как и отсутствие повышения частоты прекращения лечения – в слепых контролируемых экспериментах, где пациенты не знали, какой препарат они получают [35, 119]. Однако в открытых и в наблюдательных исследованиях отмечались различия в безопасности препаратов или в приверженности пациентов к лечению.

Например, в некоторых наблюдательных исследованиях переключения на биоподобные препараты инфликсимаба или этанерцепта регистрировалась большая, чем при использовании соответствующего оригинального препарата, частота прекращения лечения, связанная с развитием нежелательных явлений и

субъективными оценками результатов лечения, которые не подтверждались объективными методами диагностики [75, 124, 164]. При переключении пациентов на биоподобный инфликсимаб в открытом исследовании регистрировали различия в частоте субъективных, но не объективных нежелательных явлений [163]. При этом у пациентов, которые начинали лечение с биоподобного препарата, не наблюдалось различий в частоте субъективных жалоб и прекращения терапии по сравнению с таковым при использовании оригинальных препаратов [156].

В то время как FDA в настоящее время требует проводить исследования переключения с особым дизайном для доказательства правомерности признания взаимозаменяемости препаратов [62], другие регуляторы, в частности EMA, не выставляют подобных условий и зачастую не регулируют вопрос взаимозаменяемости [48]. Целесообразность проведения исследований переключения – вопрос для открытой в настоящее время дискуссии. Основным аргументом «за» их проведение являются опасения снижения эффективности терапии при переключении из-за образующихся антител к биоподобному препарату, которые могут нейтрализовать оригинальный продукт. Однако за пятнадцать лет изучения иммуногенности биотехнологических лекарственных препаратов не было получено подтверждения того, что развитие иммуногенности может влиять на эффективность терапии при переключении между оригинальным и биоподобным лекарственным препаратами [44]. Риск переключения между биоподобным и оригинальным препаратами при этом оценивается значительно ниже, чем между биологическими препаратами одной группы с разными МНН, и более того, он представляется сопоставимым с переключением между разными сериями одного препарата [44].

Проведенное исследование показало, что различия в иммуногенности между различными МНН инсулина настолько незначительные, что для их выявления в клинических исследованиях в большинстве случаев потребуется

участие нескольких тысяч пациентов. С учетом того, что ожидаемые различия в иммуногенности биоподобного и оригинального продуктов меньше, чем для препаратов с различными МНН (если различия не были выявлены на доклиническом этапе), проведение исследований иммуногенности для биоподобных инсулинов не представляется целесообразным.

Таким образом, настоящее исследование является своевременным и актуальным в отношении дополнительной оценки данных, лежащих в основе тренда на отказ от сравнительных клинических исследований иммуногенности биоподобных лекарственных препаратов. Полученные результаты подтверждают правомерность смягчения регуляторных требований к регистрации биоподобных лекарственных препаратов и говорят о низкой значимости выбора препарата инсулина из существующих на рынке возможностей в отношении параметров иммуногенности. Выбор препарата может быть обусловлен гликемической потребностью и соответствием фармакологического профиля и особенностей образа жизни пациента с сахарным диабетом независимо от данных по иммуногенности того или иного инсулина.

ВЫВОДЫ

1. 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 аспартне 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.

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 клэмпа.

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 СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЛТ	–	Аланинаминотрансфераза
АСТ	–	Аспартатаминотрансфераза
АТ	–	Антитела
АФС	–	Активная фармацевтическая субстанция
ВАК	–	Высшая аттестационная комиссия
ВГН	–	Верхняя граница нормы
ВИЧ	–	Вирус иммунодефицита человека
ГИИЧ	–	Генно-инженерный инсулин человека
ГОСТ	–	Межгосударственный стандарт
ГРЛС	–	Государственный Реестр Лекарственных Средств
ДИ	–	Доверительный интервал
ДНК	–	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ЕАЛС	–	Европейское Агентство Лекарственных Средств
ЕАЭС	–	Евразийский Экономический Союз
ЕЭК	–	Евразийская Экономическая Комиссия
ЗАО	–	Закрытое Акционерное Общество
ИМП	–	Инструкция по медицинскому применению
ИО	–	Иммунный ответ
ИФА	–	Иммуноферментный анализ
ИЧ	–	Инсулин человека
КИ	–	Клиническое исследование
ЛП	–	Лекарственный препарат
МЕ	–	Международная единица
МНН	–	Международное непатентованное наименование
НАТ	–	Нейтрализующие антитела
НПХ	–	Нейтральный протамин Хагедорна
НЯ	–	Нежелательное явление
РИНЦ	–	Российский индекс научного цитирования

РФ	–	Российская Федерация
РЧИ	–	Растворимый человеческий инсулин
САИ	–	Синдром аутоиммунитета к инсулину
СД	–	Сахарный диабет
ФЗ	–	Федеральный Закон
ANCOVA	–	Analysisofcovariance (ковариационныйанализ)
CAR-T	–	Chimeric antigen receptor therapy (терапия с использованием химерных рецепторов антигена)
CTPF	–	ClinicalTrialsPharmaceuticForum (Фармацевтивческийфорум «Клинические исследования в ЕАЭС»)
EC	–	EuropeanComission
EMA	–	EuropeanMedicinesAgency (Европейское агентство лекарственных средств)
FDA	–	FoodandDrugAdministration (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов)
HbA1c	–	Гликированный гемоглобин
ICH	–	The International Council for Harmonisation of technical requirementsforpharmaceuticalsforhumanuse (Международный совет по гармонизации технических требований к лекарственным препаратам для человека)
SmPC	–	Summary of Product Charachteristics

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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. [и соавт.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. - 2019. - Т.8. - №3. - С. 70-78.
2. Государственный реестр лекарственных средств (ГРЛС). 2020.
3. Дедов И.И., Шестакова М.В., Майоров А.Ю., и др. «Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом» Под редакцией И.И. Дедова, М.В. Шестаковой, А.Ю. Майорова 9-й выпуск // Сахарный диабет. - 2019. - Т. 22. - №1S1. - С. 1-144.
4. 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. [и соавт.] // Качественная клиническая практика. – 2019. – №(1). – 53-64.
5. Лантус®СолоСтар®. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата (ИМП). – 2018.
6. Мосикян А.А. Иммуногенность инсулинов: клинические проявления и ее значимость / Мосикян, А.А., Исаева, Ю.Е. // РМЖ. – 2020. – №1. – 19–22.
7. Мосикян А.А. Иммуногенность препаратов инсулинов: краеугольный камень в оценке безопасности / Мосикян, А.А., Бабенко, А.Ю., Макаренко, И.Е. //РМЖ. – 2019. – №4. – 32–37.
8. Мосикян А.А. Иммуногенность биологических лекарственных препаратов: причины, механизмы, последствия / Мосикян, А.А., Хохлов, А.Л. // Медицинская этика. – 2020. – №(1). – 28-35.
9. НовоРапид® Пенфилл®. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата (ИМП). – 2018.
10. Решение Коллегии ЕЭК № 88 от 3 ноября 2016 года «Об утверждении требований к инструкции по медицинскому применению лекарственных

препаратов и общей характеристике лекарственных препаратов для медицинского применения».

11. Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».
12. Федеральный закон от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» в редакции от 03.04.2020.
13. Хумалог®. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата (ИМП). – 2020.
14. Adhikari, U.K. Immunoinformatics approach for epitope-based peptide vaccine design and active site prediction against polyprotein of emerging oropouche virus / Adhikari, U.K., Tayebi, M., Rahman, M.M. // *J Immunol Res*. – 2018. – № 2018. – 6718083.
15. Akarsu, A. Hypersensitivity reactions to biologicals: from bench to bedside. / Akarsu, A., Soyer, O., Sekerel, B.E. // Curr Treat Options Allergy. – 2020. – №7(1). – 71-83.
16. Altman, J.J. LY2963016 insulin glargine: the first biosimilar insulin approved in the European Union / Altman, J.J., Chevalier, N., Delemer, B., [et al.] // Presse Med. – 2018. – № 47(10). – 854-866.
17. Alrashidi, E. Insulin autoimmune syndrome in a 25-year-old, previously healthy kuwaiti man /Alrashidi, E., Alessa, T. // Case Rep Endocrinol. – 2019. – №2019. – 8919457.
18. Andrea, M. Immunogenicity-unwanted immune responses to biological drugs - can we predict them? / Andrea, M., Francesca, N., Emanuele, V., [et al.] // Expert Rev Clin Pharmacol. – 2020. – 1-7.
19. Ang, E. Safety and efficacy of AIR inhaled insulin compared with subcutaneous insulin in patients having diabetes and asthma: a 12-month, randomized, noninferiority trial / Ang, E., Lawrence, M.K., Heilmann, C.R., [et al.] // Diabetes Technol Ther. – 2009. – №11(Suppl.2). – S35–S44.

20. Biosimilar medicines. Positioning statements on physician-led switching for biosimilar medicines. – 2019. https://www.medicinesforeurope.com/wp-content/uploads/2017/03/M-Biosimilars-Overview-of-positions-on-physician-led-switching.pdf (дата доступа: 13.06.2020)
21. Blevins, T.C. Efficacy and safety of MYL-1501D vs insulin glargine in patients with type 1 diabetes after 52 weeks: Results of the INSTRIDE 1 phase III study / Blevins, T.C., Barve, A., Sun, B., [et al.] // Diabetes, Obes and Metab. – 2018. – № 20(8). – 1944-1950.
22. Blevins, T.C. Efficacy and safety of MYL-1501D versus insulin glargine in patients with type 2 diabetes after 24 weeks: results of the phase III INSTRIDE 2 study / Blevins, T.C., Barve, A., Sun, B., [et al.] // Diabetes Obes Metab. – 2019. – № 21(1). – 129-135.
23. Brennan, P.J. Hypersensitivity reactions to mAbs: 105 desensitizations in 23 patients, from evaluation to treatment / Brennan P.J., Rodriguez Bouza T., Hsu F.I., [et al.] // *J Allergy Clin Immunol*.– 2009. –№ 124(6). – 1259-1266.
24. Byetta Summary of Product Characteristics (SmPC). – 2016.
25. Cappellani, D. Insulin autoimmune syndrome (hirata disease): a comprehensive review fifty years after its first description / Cappellani, D., Macchia, E., Falorni, A., [et al.] // Diabetes Metab Syndr Obes. – 2020. – №13. – 963-978.
26. Casadevall, N. Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin / Casadevall N., Nataf J., Viron B, [et al.] // *N Engl J Med*. – 2002. – № 346(7). – 469-475.
27. Castelli, M.S. The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies / Castelli, M.S., McGonigle, P., Hornby, P.J. // Pharmacol Res Perspect. –2019. – 7(6). – e00535.
28. Censi, S. Insulin autoimmune syndrome (Hirata's disease) in an Italian patient: a case report and review of the literature / Censi S., Albergoni M.P., Gallo N., [et al.] // Clin Chem Lab Med. – 2018. – № 56(6). – 889-895.

29. Chen, F. Insulin autoimmune syndrome: Three case reports / Chen, F., Yang, J., Liu, Y., [et al.] // Medicine (Baltimore). – 2018. – №97(51). – e13486.
30. ClinicalTrials.gov: NCT01618188. – 2018.
31. ClinicalTrials.gov: NCT01831765. – 2019.
32. ClinicalTrials.gov: NCT01934712. – 2018.
33. ClinicalTrials.gov: NCT02003677. – 2018.
34. ClinicalTrials.gov: NCT02568280. – 2018.
35. Cohen, H.P. Switching reference medicines to biosimilars: a systematic literature review of clinical outcomes. / Cohen, H.P., Blauvelt, A., Rifkin, R.M., [et al.] // Drugs. –2018. –№78(4). –463-478.
36. Chow, S.-C. Sample size calculations in clinical research 3rd Ed. s.l. / Chow, S.-C., Shao, J., Wang, H., Lokhnygina, Y. – Chapman & Hall/CRC Biostatistics Series, 2017.
37. Chung, C.H. Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose / Chung, C.H., Mirakhur, B., Chan, E., [et al.] // *N Engl J Med*. – 2008. – № 358. – 1109-1117.
38. Dailey, G. Insulin glulisine provides improved glycemic control in patients with type 2 diabetes / Dailey, G., Rosenstock, J., Moses, R.G., [et al.] // Diabetes Care. – 2004. – №27(10). – 2363–2368.
39. Derwahl, K.M. Efficacy and safety of biosimilar SAR342434 insulin lispro in adults with type 2 diabetes, also using insulin glargine: SORELLA 2 study / Derwahl, K.M., Bailey, T.S., Wernicke-Panten, K., [et al.] // Diabetes Technol Ther. – 2018. – № 20(1). – 49-58.
40. Dos Santos, T.J. Pitfalls in the diagnosis of insulin autoimmune syndrome (Hirata's disease) in a hypoglycemic child: a case report and review of the literature / Dos Santos, T.J., Passone, C.G.B., Ybarra, M., [et al.] // J Pediatr Endocrinol Metab. – 2019. – № 32(4). – 421-428.
41. Dreyfus, D.H. Molecular mimicry, genetic homology, and gene sharing proteomic "molecular fingerprints" using an EBV (Epstein-Barr virus)-derived microarray as a

potential diagnostic method in autoimmune disease / Dreyfus, D.H., Farina, A., Farina, G.A. // Immunol Res. – 2018. – №66(6). – 686-695.

42. Du, M. Biomarkers in individualized management of chimeric antigen receptor T cell therapy. / Du, M., Hari, P., Hu, Y., Mei, H. // Biomark Res. – 2020. – №8. – 13.
43. Duttaroy, A. Development of a long-acting insulin analog using albumin fusion technology / Duttaroy, A., Kanakaraj, P., Osborn, B.L., [et al.] // Diabetes. –2005. – №54(1). –251-258.
44. Ebbers, H.C. Are we ready to close the discussion on the interchangeability of biosimilars? / Ebbers, H.C., Schellekens, H. // Drug Discov Today. –2019. – №24(10). –1963-1967.
45. Ehrenpreis, E.D. Pharmacokinetic effects of antidrug antibodies occurring in healthy subjects after a single dose of intravenous infliximab / Ehrenpreis, E.D. // *Drugs R D*. – 2017. – № 17(4). – 607-613.
46. EMA. Lyxumia Assessment Report. EMA/CHMP/703852/2012. – 2012.
47. EMA. Ozempic Assessment Report. EMA/CHMP/715701/2017. – 2017.
48. European Medicines Agency (EMA) and European Commission (EC). Biosimilars in the EU. Information guide for healthcare professionals. – 2017. https://ec.europa.eu/docsroom/documents/22924/attachments/1/translations/en/renditions/native (дата доступа: 13.06.2020).
49. European Medicines Agency (EMA). Guideline on good pharmacovigilance practices (GVP) Module X – Additional monitoring. EMA/169546/2012. – 2013.
50. European Medicines Agency (EMA). Guideline on immunogenicity assessment of therapeutic proteins. – 2017.
51. European Medicines Agency (EMA). Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant human insulin and insulin analogues. EMEA/CHMP/BMWP/32775/2005_Rev. 1. – 2015.
52. European Medicines Agency (EMA). List of EMA biosimilars. https://www.ema.europa.eu/en/medicines/Human/ema_group_types/ema_medicine

/field_ema_med_status/authorised-36/ema_medicine_types/field_ema_med_biosimilar/search_api_aggregation_ema_medicine_types/field_ema_med_biosimilar (дата доступа: 12.06.2020)

53. European Medicines Agency (EMA). Medicines under additional monitoring. https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/post-authorisation/pharmacovigilance/medicines-under-additional-monitoring (дата доступа: 12.06.2020).
54. Fineberg, S.E. Effect of long-term exposure to insulin lispro on the induction of antibody response in patients with type 1 or type 2 diabetes / Fineberg, S.E., Huang, J., Brunelle, R., [et al.] // Diabetes Care. – 2003. – №26(1). – 89–96.
55. Fineberg, S.E. Immunological responses to exogenous insulin / Fineberg, S.E., Kawabata, T.T., Finco-Kent ,D., [et al.] // Endocr Rev. – 2007. – №28(6). – 625–652.
56. Fineman, M.S. Clinical relevance of anti-exenatide antibodies: safety, efficacy and cross-reactivity with long-term treatment / Fineman, M.S., Mace, K.F., Diamant, M., [et al.] // *Diabetes Obes Metab*. – 2012. – № 14(6). – 546-554.
57. Finkelman, F.D. Human IgE-independent systemic anaphylaxis / Finkelman, F.D., Khodoun, M.V., Strait, R. // *J Allergy Clin Immunol*. – 2016. – № 137. – 1674-1680.
58. Fleisher, B. A retrospective examination of the US Food and Drug Administration's clinical pharmacology reviews of oncology biologics for potential use of therapeutic drug monitoring. / Fleisher, B., Ait-Oudhia, S. // Onco Targets Ther. – 2017. – №11. – 113-121.
59. Food and Drug Administration (FDA). Biosimilars: additional questions and answers regarding implementation of the Biologics Price Competition and Innovation Act of 2009. – 2015.
60. Food and Drug Administration (FDA). Biosimilars: questions and answers regarding implementation of the Biologics Price Competition and Innovation Act of 2009: Guidance for Industry. – 2009.

61. Food and Drug Administration (FDA). Clinical immunogenicity considerations for biosimilar and interchangeable insulin products. Guidance document. – 2019.
62. Food and Drug Administration (FDA). Considerations in demonstrating interchangeability with a reference product guidance for industry. – 2019. https://www.fda.gov/media/124907/download (дата доступа: 13.06.2020).
63. Food and Drug Administration (FDA). Facilitating Competition and Innovation in the Biological Products Marketplace; Public Hearing; Request for Comments. – 2018. Docket ID: FDA-2018-N-2689—BioApprovals comment, https://www.regulations.gov/document?D=FDA-2018-N-2689-0005 (дата доступа: 13.06.2020).
64. Food and Drug Administration (FDA). Immunogenicity assessment for therapeutic protein products. Guidance for industry. – 2014.
65. Frapaise, F.-X. The end of phase 3 clinical trials in biosimilars development? / Frapaise, F.-X. // BioDrugs. – 2018. - №32(3). –319-324.
66. Frey, N. Cytokine release syndrome: Who is at risk and how to treat / Frey, N. // Best Pract Res Clin Haematol. – 2017. – № 30(4). – 336-340.
67. Fu, K. Immunogenicity of protein therapeutics: a lymph node perspective. / Fu, K., March, K., Alexaki, A., [et al.] // Front Immunol. – 2020.– №11. – 791.
68. Fülöp, T.Infusion reactions associated with the medical application of monoclonal antibodies: the role of complement activation and possibility of inhibition by factor H. / Fülöp, T., Mészáros, T., Kozma, G.T., [et al.] // Antibodies (Basel). – 2018. – №7(1). – 14.
69. Garcia, B.L. Novel evasion mechanisms of the classical complement pathway / Garcia B.L., Zwarthoff S.A., Rooijakkers S.H., [et al.] // *J Immunol*. – 2016. – № 197(6). – 2051-2060.
70. Garg, S. Efficacy and safety of insulin aspart biosimilar SAR341402 versus originator insulin aspart in people with diabetes treated for 26 weeks with multiple daily injections in combination with insulin glargine: A randomized, open-label trial

(GEMELLI 1) / Garg, S., Wernicke-Panten, K., Wardecki, M., [et al.] // Diabetes Technol Ther. – 2020. – № 22(2). – 85-95.

71. Garg, S.K. Efficacy and safety of biosimilar SAR342434 insulin lispro in adults with type 1 diabetes also using insulin glargine —SORELLA 1 study / Garg, S.K., Wernicke-Panten, K., Rojeski, M., [et al.] // Diabetes Technol Ther. – 2017. – № 19(9). – 516–526.
72. Garg, S.K. Two-year efficacy and safety of AIR inhaled insulin in patients with type 1 diabetes: an open-label randomized controlled trial / Garg, S.K., Mathieu, C., Rais, N., [et al.]// Diabetes Technol Ther. – 2009. – №11(Suppl.2). – S5–S16.
73. Ghanima, W. Thrombopoietin receptor agonists: ten years later / Ghanima, W., Cooper, N., Rodeghiero, F., [et al.] // *Haematologica*. – 2019. № 104(6). – 1112-1123.
74. Gill, H. From chronic immune thrombocytopenia to severe aplastic anemia: recent insights into the evolution of eltrombopag. / Gill, H., Wong, R.S.M., Kwong, Y.L. // Ther Adv Hematol. – 2017. – №8(5). – 159-174.
75. Glintborg, B. To switch or not to switch: results of a nationwide guideline of mandatory switching from originator to biosimilar etanercept. One-year treatment outcomes in 2061 patients with inflammatory arthritis from the DANBIO registry. / Glintborg, B., Loft, A.G., Omerovic, E., [et al.] // Ann Rheum Dis. – 2019. – №78(2). – 192-200.
76. Gülsen, A. Hypersensitivity reactions to biologics (part I): allergy as an important differential diagnosis in complex immune-derived adverse events / Gülsen, A., Wedi, B., Jappe, U. // Allergo J Int. – 2020.– 1-29.
77. Gunn, G.R. 3rd. From the bench to clinical practice: understanding the challenges and uncertainties in immunogenicity testing for biopharmaceuticals / Gunn, G.R. 3rd, Sealey, D.C., Jamali, F., [et al.] // *Clin Exp Immunol*. – 2016. – № 184(2). – 137-146.

78. Gupta, S.K. Sophisticated cloning, fermentation, and purification technologies for an enhanced therapeutic protein production: A Review. / Gupta, S.K., Shukla, P. // Front Pharmacol. – 2017. – №8. – 419.

79. Haahr, H. Clinical pharmacology of fast-acting insulin aspart versus insulin aspart measured as free or total insulin aspart and the relation to anti-insulin aspart antibody levels in subjects with type 1 diabetes mellitus / Haahr, H., Pieber, T.R., Mathieu, C., [et al.] // Clin Pharmacokinet. – 2019. – № 58(5). – 639-649.

80. Harth, S. Generation by phage display and characterization of drug-target complex-specific antibodies for pharmacokinetic analysis of biotherapeutics / Harth S., Ten Haaf A., Loew C., [et al.] // *MAbs*. – 2019. – № 11(1). – 178-190.

81. Hattori, N. Development of insulin antibodies and changes in titers over a long-term period in patients with type 2 diabetes / Hattori, N., Duhita, M.R., Mukai, A., [et al.] // Clin Chim Acta. – 2014. – № 433. – 135–138.

82. Heise, T. The effect of insulin antibodies on the metabolic action of inhaled and subcutaneous insulin: a prospective randomized pharmacodynamic study / Heise, T., Bott, S., Tusek, C., [et al.] // Diabetes Care. – 2005. – №28(9). – 2161–2169.

83. Hennessey, A.Adverse infusion reactions to rituximab in systemic lupus erythematosus: a retrospective analysis. / Hennessey, A., Lukawska, J., Cambridge, G., [et al.] // BMC Rheumatol. – 2019. – №29(3). – 32.

84. Henry, S.M.ELISA reagent coverage evaluation by affinity purification tandem mass spectrometry. / Henry, S.M., Sutlief, E., Salas-Solano, O., [et al.] // MAbs. – 2017. – №9(7). – 1065-1075.

85. Hermansen, K. Intensive therapy with inhaled insulin via the AERx insulin diabetes management system: a 12-week proof-of-concept trial in patients with type 2 diabetes / Hermansen, K., Ronnemaa, T., Petersen, A.H., [et al.] // Diabetes Care. – 2004. – №27(1). – 162–167.

86. Home, P. Anti-insulin antibodies and adverse events with biosimilar insulin lispro compared with Humalog insulin lispro in people with diabetes / Home, P., Derwahl, K.M., Ziemen, M., [et al.] // Diabetes Technol Ther. – 2018. – № 20(2). – 160-170.

87. Home, P.D. A randomized multicentre trial of insulin glargine compared with NPH insulin in people with type 1 diabetes / Home, P.D., Rosskamp, R., Forjanic-Klapproth, J., [et al.] // Diabetes Metab Res Rev. – 2005. – № 21(6). – 545-553.
88. Hu, X. Exogenous insulin antibody syndrome (EIAS): a clinical syndrome associated with insulin antibodies induced by exogenous insulin in diabetic patients / Hu, X., Chen F. // *Endocr Connect*. – 2018. – № 7(1). – R47-R55.
89. ICH guideline S6 (R1) – preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals (EMA/CHMP/ICH/731268/1998).– 2011.
90. ICH guideline Q5E – Comparability of biotechnological/biological productssubject to changes in their manufacturing process. (CPMP/ICH/5721/03). – 2005.
91. Ilag, L.L. Evaluation of immunogenicity of LY2963016 insulin glargine compared with Lantus® insulin glargine in patients with type 1 or type 2 diabetes mellitus / Ilag, L.L., Deeg, M.A., Costigan, T., [et al.] // Diabetes Obes Metab. – 2016. – № 18(2). – 159-168.
92. Ismail, A.A. The insulin autoimmune syndrome (IAS) as a cause of hypoglycaemia: an update on the pathophysiology, biochemical investigations and diagnosis / Ismail, A.A. // Clin Chem Lab Med. – 2016. – № 54(11). – 1715-1724.
93. Izzo, V.Insulin autoimmune syndrome in an Argentine woman taking α-lipoic acid: A case report and review of the literature / Izzo, V., Greco, C., Corradini, D., [et al.] // SAGE Open Med Case Rep. – 2018. – №26(6). – 2050313X18819601.
94. Jawa, V. Assessment of immunogenicity of romiplostim in clinical studies with ITP subjects / Jawa, V., Hokom, M., Hu, Z., [et al.] // *Ann Hematol*. – 2010. – № 89 Suppl 1. – 75-85.
95. Kabir, E.R. The Breakthrough of Biosimilars: A Twist in the Narrative of Biological Therapy / Kabir, E.R., Moreino, S.S., Sharif Siam, M.K. // Biomolecules. – 2019. – №9(9). – 410.
96. Kaplan, M.H. An immunological cross-reaction between group-A streptococcal cells and human heart tissue / Kaplan, M.H., Meyeserian M. // *Lancet*. – 1962. – № 1(7232). – 706-710.

97. 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., [et al.]// Journal of Comparative Effectiveness Research. –2020. – №9(4). –263-273.

98. Kernstock, R. Clinical immunogenicity risk assessment strategy for a low risk monoclonal antibody. / Kernstock, R., Sperinde, G., Finco, D., [et al.] // AAPS J. – 2020. – №22(3). – 60.

99. Knudsen, L.B. Inventing liraglutide, a glucagon-like peptide-1 analogue, for the treatment of diabetes and obesity/ Knudsen, L.B. // ACS Pharmacol Transl Sci. – 2019. – №2(6). – 468-484.

100. Kolev, M. Keeping it all going-complement meets metabolism/ Kolev, M., Kemper, C. // Front Immunol. – 2017. – №8. – 1.

101. Kowalski, S.C. PANLAR consensus statement on biosimilars / Kowalski, S.C., Benavides, J.A., Roa, P.A.B., [et al.] // Clin Rheumatol. – 2019. – №38(5). – 1485-1496.

102. Krishna, M. Immunogenicity to biotherapeutics - the role of anti-drug immune complexes. / Krishna, M., Nadler, S.G. // *Front Immunol*. – 2016. № 7. – 21.

103. Kristensen, L.E. Non-pharmacological effects in switching medication: the nocebo effect in switching from originator to biosimilar agent / Kristensen, L.E., Alten, R., Puig, L., [et al.]// BioDrugs. – 2018. – №32(5). – 397-404.

104. Kuriakose, A. Immunogenicity of biotherapeutics: causes and association with posttranslational modifications / Kuriakose, A., Chirmule, N., Nair, P. // *J.Immunol. Res*. – 2016. – № 2016. – 1298473.

105. Kuter, D.J. Milestones in understanding platelet production: a historical overview / Kuter, D.J. // Br J Haematol. – 2014. – № 165(2). – 248-258.

106. Lagassé, H.A.D. Fc-fusion drugs have FcγR/C1q binding and signaling properties that may affect their immunogenicity / Lagassé, H.A.D., Hengel, H., Golding, B., [et al.] // *The AAPS Journal*. – 2019. – № 21(4). – 62.

107. Lamb, Y.N. LY2963016 insulin glargine: a review in type 1 and 2 diabetes / Lamb, Y.N., Syed, Y.Y. // BioDrugs. – 2018. – №32(1). – 91-98.

108. Lee, C.H. IgG Fc domains that bind C1q but not effector Fcγ receptors delineate the importance of complement-mediated effector functions / Lee, C.H., Romain, G., Yan, W., [et al.] // Nat Immunol. – 2017. – №18(8). – 889-898.

109. Lee, D.W. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome / Lee, D.W., Gardner, R., Porter, D.L., [et al.] // *Blood*. – 2014. – № 124 (2). – 188-195.

110. Levin, A.S. Reactions to rituximab in an outpatient infusion center: a 5-year review / Levin, A.S., Otani, I.M., Lax, T., [et al.] // *J Allergy Clin Immunol Pract*. – 2017. – № 5(1). – 107-113.

111. Lin, S.D. Glucose changes in a patient with insulin autoimmune syndrome demonstrated by continuous glucose monitoring /Lin, S.D., Hsu, S.R. // AACE Clin Case Rep. – 2019. – №5(1). – e35-e39.

112. Lindholm, A. Immune responses to insulin aspart and biphasic insulin aspart in people with type 1 and type 2 diabetes / Lindholm, A., Jensen, L.B., Home, P.D., [et al.] // Diabetes Care. – 2002. – № 25(5). – 876-882.

113. Liu, D. Cytokine release syndrome: grading, modeling, and new therapy / Liu, D, Zhao, J. // J Hematol Oncol. – 2018. – № 11(1). – 121.

114. Lyman, G.H. Rationale, opportunities, and reality of biosimilar medications / Lyman, G.H., Zon, R., Harvey, R.D. // N. Engl. J. Med. – 2018. – №379(7). –694-695.

115. Macdougall, I.C. Pure red cell aplasia with anti-erythropoietin antibodies occurs more commonly with one formulation of epoetin alfa than another / Macdougall, I.C. // Curr Med Res Opin. – 2004. – № 20(1). – 83-86.

116. Makowska, J. Desensitization to biological agents used in rheumatology. / Makowska, J., Lewandowska-Polak, A. // Reumatologia. – 2020. – №58(1). – 25-33.

117. Matucci, A. Allergological in vitro and in vivo evaluation of patients with hypersensitivity reactions to infliximab / Matucci, A., Pratesi, S., Petroni, G., [et al.] // *Clin Exp Allergy*.– 2013. – № 43. – 659-664.

118. Mayadas, T.N. Mechanisms of immune complex-mediated neutrophil recruitment and tissue injury / Mayadas, T.N., Tsokos, G.C., Tsuboi, N. // *Circulation*. – 2009. – № 120(20). – 2012-2024.

119. McKinnon, R.A. Biosimilarity and interchangeability: principles and evidence: a systematic review. / McKinnon, R.A., Cook, M., Liauw, W., [et al.] // BioDrugs. –2018. –№32(1). –27-52.

120. Mianowska, B. Immunogenicity of different brands of human insulin and rapid-acting insulin analogs in insulin-naïve children with type 1 diabetes / Mianowska, B., Szadkowska, A., Pietrzak, I., [et al.] // Pediatr Diabetes. – 2011. – № 12(2). – 78-84.

121. Mosikian, A. Insulin glargine biosimilar (GP40061) shows no difference of immunogenicity as compared to the reference drug / Mosikian, A., Makarenko, I., Afonkina, O., [et al.] // Diabetes Technology & Therapeutics. - 2020. - №22(S1). - A-277.

122. Mosikian, A. Anti-insulin antibody concentration in type 1 diabetes mellitus patients injecting different types of insulin / Mosikian, A., Makarenko, I., Belikova, T., [et al.] // Diabetes Technology & Therapeutics. - 2020. - №22(S1). - A-275.

123. Muñoz-Garach, A. How can a good idea fail? Basal insulin peglispro [LY2605541] for the treatment of type 2 diabetes / Muñoz-Garach, A., Molina-Vega, M., Tinahones, F.J.// *Diabetes Ther*. –2017. –№8(1). –9-22.

124. Nikiphorou, E. Clinical effectiveness of CT-P13 (Infliximab biosimilar) used as a switch from Remicade (infliximab) in patients with established rheumatic disease. Report of clinical experience based on prospective observational data. / Nikiphorou, E., Kautiainen, H., Hannonen, P., [et al.] // Expert Opin Biol Ther. – 2015. – №15(12). –1677-1683.

125. Nishimura, H. Protamine-containing insulin but not analog insulin and duration of insulin use are risk factors for the production of insulin autoantibodies in insulin-treated patients withdiabetes mellitus / Nishimura, H., Iizuka, K., Takeda, J. // Endocrine Journal. – 2014. – №61(6). – 635-640.

126. Norelli, M. Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells / Norelli, M., Camisa, B., Barbiera, G., [et al.] // *Nat Med*. – 2018. – № 24(6). – 739-748.

127. Oli, A.N. Immunoinformatics and vaccine development: an overview / Oli, A.N., Obialor, W.O., Ifeanyichukwu, M.O., [et al.] // Immunotargets Ther. – 2020. – №9. – 13-30.

128. Ovacik, M. Tutorial on monoclonal antibody pharmacokinetics and its considerations in early development / Ovacik, M., Lin, K. // Clin Transl Sci. –2018. –№11(6). – 540-552.

129. Pant, V. Insulin autoimmune syndrome as a cause of recurrent hypoglycemia in a carbimazole user: a case report from Nepal. / Pant, V., Bhandari, B., Baral, S., [et al.] // Int Med Case Rep J. – 2019. – №12. – 29-32.

130. Patel, D. The rise of biosimilars: How they got here and where they are going / Patel, D., Gillis, C., Naggar, J., [et al.] // Metabolism. – 2017. – №75. – 45-53.

131. Picard, M. Current knowledge and management of hypersensitivity reactions to monoclonal antibodies / Picard, M., Galvão, V. R. // *J Allergy Clin Immunol Pract*. – 2017. – № 5(3). – 600-609.

132. Pieber, T.R. Efficacy and safety of HOE 901 versus NPH insulin in patients with type 1 diabetes. The European Study Group of HOE 901 in type 1 diabetes / Pieber, T.R., Eugene-Jolchine, I., Derobert, E. // Diabetes Care. – 2000. – № 23(2). – 157-162.

133. Pineda, C. Assessing the immunogenicity of biopharmaceuticals / Pineda, C., Castañeda Hernández, G., Jacobs, I.A., [et al.]. // BioDrugs. – 2016. – №30(3). – 195-206.

134. Pipalava, P. An update on the animal studies conducted for biosimilar approvals – Regulatory requirement vs actual scenario / Pipalava, P., Patel, R., Mehta, M., [et al.] // Regulatory Toxicology and Pharmacology. – 2019. – №104415.

135. Pollock, C. Pure red cell aplasia induced by erythropoiesis-stimulating agents / Pollock C., Johnson D.W., Hörl W.H., [et al.] // *Clin J Am Soc Nephrol*. – 2008. – № 3(1). – 193-199.

136. Pouillon, L.The nocebo effect: a clinical challenge in the era of biosimilars / Pouillon, L., Socha, M., Demore, B., [et al.] // Expert Rev Clin Immunol. – 2018. – №14(9). – 739-749.

137. Reis, M.Z.R. Insulin autoimmune syndrome in an occidental woman: a case report and literature review / Reis, M.Z.R., Fernandes, V.O., Fontenele, E.G.P., [et al.] // Arch Endocrinol Metab. – 2018. – № 62(5). – 566-570.

138. Rooney, C. Modeling cytokine release syndrome / Rooney, C., Sauer, T. // Nat Med. – 2018. – № 24(6). – 705-706.

139. Rezk, M.F. To see or NOsee: the debate on the nocebo effect and optimizing the use of biosimilars/ Rezk, M.F., Pieper, B. // Adv Ther. – 2018. – №35(6). – 749-753.

140. Sachs, B. Acute hypersensitivity reactions associated with monoclonal antibodies for targeted therapy. / Sachs, B., Merk, H.F. // Hautarzt. – 2018. – №69(4). – 268-277.

141. Sauerborn M. Immunological mechanism underlying the immune response to recombinant human protein therapeutics / Sauerborn, M., Brinks, V., Jiskoot, W., [et al.] // Trends Pharmacol Sci. – 2010. – №31(2). – 53–59.

142. Saylor, K. designs of antigen structure and composition for improved protein-based vaccine efficacy / Saylor, K., Gillam, F., Lohneis, T., [et al.] // Front Immunol. – 2020. – №11. – 283.

143. Schiestl, M. The path towards a tailored clinical biosimilar development / Schiestl, M., Ranganna, G., Watson, K., [et al.] // BioDrugs. – 2020. – №34(3). – 297-306.

144. Schreitmüller, T. Comparative immunogenicity assessment of biosimilars / Schreitmüller, T., Barton, B., Zharkov, A., [et al.]. // Future Oncol. – 2019. – №15(3). – 319-329.

145. Segal, Y. Vaccine-induced autoimmunity: the role of molecular mimicry and immune crossreaction / Segal, Y., Shoenfeld, Y. // *Cell Mol Immunol*. – 2018. – № 15(6). – 586-594.

146. Shankar, G. Assessment and reporting of the clinical immunogenicity of therapeutic proteins and peptides-harmonized terminology and tactical recommendations. / Shankar, G., Arkin, S., Cocea, L., [et al.] // AAPS J. –2014. – №16(4). –658-673.

147. Shen, Y. Insulin autoimmune syndrome induced by exogenous insulin injection: a four-case series / Shen, Y., Song, X., Ren, Y. // BMC Endocr Disord. – 2019. – №19(1). – 148.

148. Shin, S.K. Anti-erythropoietin and anti-thrombopoietin antibodies induced after administration of recombinant human erythropoietin / Shin, S.K., Pack S.P., Oh J.G., [et al.] // *Int Immunopharmacol*. – 2011. – № 11(12). – 2237-2241.

149. Siljehult, F. Concentrations of infliximab and anti-drug antibodies in relation to clinical response in patients with rheumatoid arthritis / Siljehult, F., Ärlestig, L., Eriksson, C., [et al.] // *Scand J Rheumatol*. – 2018. – № 47(5). – 345-350.

150. Singh, S.K. Impact of product-related factors on immunogenicity of biotherapeutics / Singh, S.K. // *J Pharm Sci.*– 2011. – № 100(2). – 354-387.

151. Sperinde, G. Clinical Immunogenicity Risk Assessment for a Fusion Protein / Sperinde, G., Montgomery, D., Mytych, D.T. // AAPS J. – 2020. – №22(3). – 64.

152. Stangler, T. Recent trends in the evaluation of analytical biosimilarity. / Stangler, T. // WCBP Conference. – 2016. https://cdn.ymaws.com/www.casss.org/resource/resmgr/WCBP_Speaker_Slides/2016_WCBP_StanglerThomas.pdf (дата доступа: 30.05.2020).

153. Strand, V. Immunogenicity of biologics in chronic inflammatory diseases: a systematic review / Strand, V., Balsa, A., Al-Saleh, J., [et al.] //*BioDrugs*. – 2017. – № 31(4). – 299-316.

154. Stebbing, J. Understanding the role of comparative clinical studies in the development of oncology biosimilars / Stebbing, J., Mainwaring, P.N., Curigliano, G., [et al.] // J Clin Oncol. – 2020. – №38(10). – 1070-1080.

155. Strand, V. Immunogenicity of biosimilars for rheumatic diseases, plaque psoriasis, and inflammatory bowel disease: a review from clinical trials and regulatory documents / Strand, V., Gonçalves, J., Hickling, T.P., [et al.] // *BioDrugs*. – 2020. – № 34(1). – 27-37.

156. Strangfeld, A. THU0192 Retention rates for etanercept: comparing the original with a biosimilar. / Strangfeld, A. // Ann. Rheum. Dis. 2018. – №77.– 315-316.

157. Tada, M. Fcγreceptor activation by human monoclonal antibody aggregates / Tada, M., Aoyama, M., Ishii-Watabe, A. // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2020. – № 109(1). – 576-583.

158. Thalange, N. Development of insulin detemir/insulin aspart cross-reacting antibodies following treatment with insulin detemir: 104-week study in children and adolescents with type 1 diabetes aged 2-16 years / Thalange, N., Bereket, A., Jensen, L.B., [et al.] // Diabetes Ther. – 2016. – № 7(4). – 713-724.

159. Tibaldi, J.M. Evolution of insulin: from human to analog / Tibaldi, J.M. // *Am J Med*. – 2014. - №127(10 Suppl). – S25-S38.

160. Tieu, C. Efficacy and safety of biosimilar insulins compared to their reference products: A systematic review / Tieu, C., Lucas, E.J., DePaola, M., [et al.] // PLoS One. – 2018. – №13(4). – e0195012.

161. Tscheliessnig, A.L. Host cell protein analysis in therapeutic protein bioprocessing–methods and applications / Tscheliessnig, A.L., Konrath, J., Bates, R., [et al.]// Biotechnol J. – 2013. – №8(6). – 655-670.

162. Turner, P.J.Global Trends in Anaphylaxis Epidemiology and Clinical Implications. / Turner, P.J., Campbell, D.E., Motosue, M.S., [et al.] // J Allergy Clin Immunol Pract. – 2020. – №8(4). – 1169-1176.

163. Tweehuysen, L. Open-label non-mandatory transitioning from originator Etanercept to biosimilar SB4: 6-month results from a controlled cohort study. / Tweehuysen, L., Huiskes, V.J.B., van den Bemt, B.J.F., [et al.] // Arthritis Rheumatol. – 2018. – №70(9). – 1408-1418.

164. Tweehuysen, L.Subjective complaints as the main reason for biosimilar discontinuation after open-label transition from reference infliximab to biosimilar infliximab. / Tweehuysen, L., van den Bemt, B.J.F., van Ingen, I.L., [et al.] // Arthritis Rheumatol. – 2018. – №70(1). – 60-68.

165. Uchigata, Y. Insulin autoimmune syndrome (Hirata disease): clinical features and epidemiology in Japan / Uchigata, Y., Eguchi, Y., Takayama-Hasumi, S., [et al.] // Diabetes Res Clin Pract. – 1994. – № 22(2-3). – 89-94.

166. Venigalla, S.S.K. A possible role for autoimmunity through molecular mimicry in alphavirus mediated arthritis. / Venigalla, S.S.K., Premakumar, S., Janakiraman, V. // Sci Rep. – 2020. – №10(1). – 938.

167. Vora, J. Insulin degludec does not increase antibody formation versus insulin glargine: an evaluation of phase IIIa trials. / Vora, J., Seufert, J., Solberg, H., [et al.] // Diabetes Obes Metab. – 2016. – №18(7). – 716-20.

168. Vultaggio, A. How the immune system responds to therapeutic biological agents / Vultaggio, A., Petroni, G., Pratesi, S., [et al.] // J Int Med Res. – 2016. – № 44 (1 suppl). – 38-42.

169. Wang, Y. Expression, Role, and Regulation of Neutrophil Fcγ Receptors/ Wang, Y., Jönsson, F. // Front Immunol. – 2019. – №10. – 1958.

170. Warrington, R. Drug allergy. / Warrington, R., Silviu-Dan, F., Wong, T. // Allergy Asthma Clin Immunol. – 2018.– №14(Suppl 2). – 60.

171. Webster, C.J. An efficient development paradigm for biosimilars / Webster, C.J., Wong, A.C., Woollett, G.R. // BioDrugs. – 2019. – №33(6). – 603-611.

172. Webster, C.J. Comment on “The end of phase 3 trials in biosimilars development?” / Webster, C.J., Woollett, G.R. // BioDrugs. – 2018.

173. Wronkowitz, N. LAPS Insulin115: a novel ultra-long-acting basal insulin with a unique action profile / Wronkowitz, N., Hartmann, T., Görgens, S.W., [et al.] // Diabetes Obes. Metab. – 2017. – №19(12). – 1722-1731.

174. Yari, M. Decreasing the immunogenicity of Erwinia chrysanthemi asparaginase via protein engineering: computational approach / Yari, M., Eslami, M., Ghoshoon, M.B., [et al.] // Mol Biol Rep. – 2019. – №46(5). – 4751-4761.

175. Zhuang, Y.Risk-based comparability assessment for monoclonal antibodies during drug development: a clinical pharmacology perspective / Zhuang, Y., Chen, D., Sharma, A., [et al.] // AAPS J. – 2018. – №20(6). – 109.

176. Zinzani, P.L. Are biosimilars the future of oncology and haematology? / Zinzani, P.L., Dreyling, M., Gradishar, W., [et al.] // Drugs. – 2019. – №79(15). – 1609-1624.