

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО
ПРИМЕНЕНИЯ»

На правах рукописи

Тутер Елена Александровна

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

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Васильев А.Н.

Москва – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Биоаналогичные лекарственные препараты моноклональных антител и перспективы их разработки.....	11
1.2 Общие принципы подтверждения биологической аналогичности.....	18
1.3 Биологические свойства моноклональных антител и их производных	22
1.4 Подтверждение биоаналогичности лекарственных препаратов моноклональных антител	27
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	37
2.1 Описание первого этапа исследования.....	37
2.2 Описание второго этапа исследования	38
2.2.1 Подготовка клеток	40
2.2.2 Приготовление последовательных разведений исследуемых образцов и стандартного образца активности.....	41
2.2.3 Определение комплемент-зависимой цитотоксичности.....	42
2.2.4 Детектирование полученных результатов изучения комплемент- зависимой цитотоксичности	43
2.3 Статистическая обработка результатов.....	45
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	47
3.1 Принципы проведения доклинических исследований сопоставимости по специфической активности биологически аналогичных лекарственных препаратов моноклональных антител, заявленных к регистрации в России.....	47
3.1.1 Подтверждение биоаналогичности по специфической активности биоаналогов ритуксимаба.....	64

3.1.2 Подтверждение биоаналогичности по специфической активности биоаналогов адалимумаба	66
3.1.3 Подтверждение биоаналогичности по специфической активности биоаналогов инфликсимаба	69
3.1.4 Подтверждение биоаналогичности по специфической активности биоаналогов бевацизумаба	71
3.1.5 Подтверждение биоаналогичности по специфической активности биоаналогов трастузумаба.....	73
3.2 Результаты экспериментального изучения сравнительной комплемент-зависимой цитотоксичности ритуксимаба	75
3.3 Программа изучения сравнительной специфической активности биоаналогов ритуксимаба в рамках подтверждения их биоаналогичности	90
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	94
ВЫВОДЫ.....	95
РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ	97
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	98
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	104
ПРИЛОЖЕНИЕ А (информационное). Моноклональные антитела, зарегистрированные в Российской Федерации	126
ПРИЛОЖЕНИЕ Б (информационное). Проверка на нормальность выборок для Образца 1 и стандартного образца	130
ПРИЛОЖЕНИЕ В (информационное). Проверка на нормальность выборок для Образца 2 и стандартного образца	132
ПРИЛОЖЕНИЕ Г (информационное)134 Диаграммы размаха (Образец 1 и стандартный образец)	134
ПРИЛОЖЕНИЕ Д (информационное). Диаграммы размаха (Образец 2 и стандартный образец)	136

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В настоящее время в клинической практике все большее распространение получают лекарственные препараты (ЛП), созданные на основе моноклональных антител (мАТ), которые применяются для лечения онкологических, аутоиммунных, аллергических и других заболеваний [2, 15, 48], и область их клинического применения постоянно расширяется [123].

Биологические ЛП, в том числе мАТ, являются весьма эффективными, но они имеют высокую стоимость и часто применяются для лечения хронических заболеваний, требующих постоянного применения ЛП. Подсчитано, что средняя стоимость лечения для химической молекулы оригинального препарата составляет около 1 долл. в сутки (по сравнению с химической молекулой генерического препарата со стоимостью несколько центов в сутки), в то время как при применении оригинальных биологических препаратов стоимость лечения составляет 22 долл. в сутки [109]. Разработка и применение аналогичных биологических ЛП позволит снизить стоимость лечения пациентов с такими социально значимыми заболеваниями как, например, злокачественные новообразования.

На сегодняшний день в Российской Федерации из 37 зарегистрированных ЛП мАТ и их производных (-цепт молекулы) [13], 5 являются биоаналогами – это 2 биоаналога ритуксимаба, а также биоаналоги инфликсимаба, бевацизумаба и трастузумаба [5, 6, 32, 39, 42].

Такие мАТ, как бевацизумаб, ритуксимаб и трастузумаб входят в Перечень стратегически значимых лекарственных средств, производство которых должно быть обеспечено на территории Российской Федерации [31].

Кроме того, согласно Плану мероприятий по импортозамещению в отрасли фармацевтической промышленности [28], до 2020-2023 годов должна сократиться доля импорта следующих мАТ: трастузумаба, бевацизумаба, инфликсимаба, ранибизумаба, экулизумаба, адалимумаба, цетуксимаба, этанерцепта,

тоцилизумаба, абатацепта, базиликсимаба, устекинумаба, цертолизумаба пэгола, натализумаба, ритуксимаба, паливизумаба.

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

Степень разработанности проблемы

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

В настоящее время в РФ обращение биоаналогичных ЛП регулирует Федеральный закон № 61-ФЗ от 12 апреля 2010 года (далее – Закон) [41], в котором отсутствуют конкретные требования по подтверждению, в частности, сопоставимой специфической активности биоаналогичных мАТ. Кроме того, в России также отсутствуют нормативно-правовые акты, регламентирующие требования к доказательству биоаналогичности с учетом международного опыта, которые бы носили обязательный характер [9].

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

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

Цель исследования

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

Задачи исследования

1. На основании данных регистрационных досье установить перечни методов определения специфической активности мАТ на этапе их доклинического фармакодинамического изучения с целью подтверждения их биоаналогичности.
2. Воспроизвести и апробировать методику определения сопоставимости по специфической активности мАТ в условиях эксперимента на подходящей (релевантной) модели *in vitro* на примере ритуксимаба.
3. Разработать программу проведения сравнительного изучения специфической активности биоаналогов ритуксимаба на этапе их доклинического изучения.

Научная новизна

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

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

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

Теоретическая и практическая значимость работы

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

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

Результаты настоящего исследования использованы:

1) на Федеральном уровне:

- в методических указаниях по контролю качества, доклиническим и клиническим исследованиям биологически аналогичных ЛП, вошедших в «Руководство по экспертизе лекарственных средств», том I [утверждены и изданы в 2013 г.];
- в методических указаниях по разработке биоаналогичных (биоподобных) ЛП, содержащих в качестве фармацевтической субстанции мАТ, вошедших в «Руководство по экспертизе лекарственных средств», том IV [утверждены и изданы в 2014 г.].

2) на уровне Учреждения:

- в практике экспертной работы центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Методология и методы исследования

Проведенное исследование состояло из двух этапов – теоретического и практического.

На первом этапе был проведен анализ данных регистрационных досье биоаналогов ритуксимаба, адалимумаба, инфликсимаба, бевацизумаба и трастузумаба из информационной системы «Документооборот» ФГБУ

«НЦЭСМП» Минздрава России. Была использована информация о проведенных исследованиях специфической активности мАТ, представленная в разделе «Доклинические исследования» регистрационных досье.

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

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

Положения, выносимые на защиту

1. На основании анализа 22 регистрационных досье биоаналогов ЛП мАТ ритуксимаба (4 досье), адалимумаба (5 досье), инфликсимаба (4 досье), бевацизумаба (4 досье) и трастузумаба (5 досье) обобщены методы подтверждения специфической активности в доклинических исследованиях, которые должны включать в себя как исследования *in vitro*, так и, в случае наличия репрезентативной модели животных, исследования *in vivo*.
2. В тесте КЗЦ показана сопоставимость двух образцов биоаналогичного ритуксимаба (МБЦ «Генериум») и стандартного образца ритуксимаба. При хранении образцов при температуре плюс 5 и минус 80°C показана высокая стабильность биоаналога.
3. Для доказательства биоаналогичности по специфической активности ритуксимаба на этапе доклинического изучения необходимы результаты исследований *in vitro*: аффинность связывания с антигеном CD20, индукция апоптоза, связывание с Fc-рецепторами, связывание с компонентом комплемента C1, индукция антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) и КЗЦ, а также исследования *in vivo*: влияние на

развитие зародышевых центров в брыжеечных лимфатических узлах и селезенке у яванских макак.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов проведенного исследования подтверждается использованием адекватных методов статистической обработки.

Основные положения и результаты исследования доложены и обсуждены на:

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

Личный вклад автора

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

Связь темы диссертационной работы с планом научных работ учреждения

Диссертационная работа выполнена в соответствии с Государственным заданием, утвержденным Минздравом России, по теме «Научное обоснование

методических подходов к доклиническому и клинико-фармакологическому изучению и экспертной оценке эффективности и безопасности лекарственных средств» (№ Государственной регистрации 01201172531).

Сведения о публикациях по теме диссертации

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

Структура и объем диссертации

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

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Биоаналогичные лекарственные препараты моноклональных антител и перспективы их разработки

Главное направление развития медицины и системы здравоохранения – это стремление к сохранению здоровья населения, увеличению продолжительности жизни и улучшению ее качества [25]. Современные и доступные ЛП являются основой терапии и профилактики большинства болезней человека, поэтому создание и внедрение новых высокоэффективных лекарственных средств (ЛС) является главной задачей ученых, технологов, врачей и органов здравоохранения [36].

Регистрация и внедрение в медицинскую практику новых ЛП предполагает подтверждение в соответствии с современными требованиями благоприятного отношения пользы к рискам их применения, в основе которого лежит оптимальное сочетание параметров безопасности и эффективности и высокое качество. Это – один из приоритетов, на котором основывается стратегия развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года (далее – Стратегия) [29]. Для обеспечения указанных свойств ЛП должен выполняться установленный порядок проведения научных исследований на различных уровнях, из которых первичной является оценка фармакологических свойств и безопасности на этапе доклинических исследований [36].

Стоит отметить, что основными задачами Стратегии являются увеличение обеспечения населения жизненно необходимыми и важнейшими ЛП отечественного производства, повышение конкурентоспособности российской фармацевтической промышленности за счет гармонизации стандартов по разработке и производству ЛС с международными требованиями; выравнивание условий доступа на рынок для зарубежных и отечественных производителей; стимулирование разработки инновационных ЛС; совершенствование системы

подтверждения соответствия качества ЛС, включая меры по устранению избыточных административных барьеров по регистрации отечественных ЛП [29].

Согласно законодательству Европейского союза (ЕС), а также проекту Правил регистрации и экспертизы ЛС для медицинского применения Евразийского экономического союза (ЕАЭС), биологический лекарственный препарат – ЛП, действующее вещество которого произведено или выделено из биологического источника, и для описания свойств и контроля качества которого необходимо сочетание биологических и физико-химических методов анализа с оценкой производственного процесса и методов его контроля. К биологическим ЛП относятся иммунологические ЛП, ЛП, полученные из крови и плазмы крови человека и животных (за исключением цельной крови), биотехнологические ЛП, генотерапевтические и соматотерапевтические ЛП [26, 63].

В свою очередь биотехнологический лекарственный препарат – ЛП, произведенный путем биотехнологических процессов с применением технологии рекомбинантной ДНК, метода контролируемой экспрессии генов, кодирующих выработку биологически активных белков, с применением моноклональных антител, полученных с помощью гибридных технологий, тканевой инженерии [26].

На сегодняшний день в мировой медицинской практике применяются уже более 150 биотехнологических ЛП (84 белка): мАТ, интерфероны, эритропоэтины, инсулины, низкомолекулярные гепарины, человеческий гормон роста, колониестимулирующие факторы, факторы свертывания крови, ферменты и др. [8, 124].

По производству биотехнологической продукции первое место в мире занимают США, которые в 2011 г. выделили 22,3 млрд долл. на разработку в области биотехнологии, далее следуют Франция (2,7 млрд долл.), Германия (1,2 млрд долл.), Южная Корея (1,1 млрд долл.). Россия выделила на эти цели не более 0,15 млрд долл. [103].

Объем мирового фармацевтического рынка биотехнологических ЛП составил 162 млрд. долл. США в 2014 году и, как ожидается, достигнет 278 млрд.

долл. США к 2020 году. Наиболее быстрая динамика роста продаж биотехнологических препаратов наблюдается в сегменте мАТ [74].

Лекарственные препараты, разработанные в качестве аналога существующим оригинальным биологическим ЛП, называют биоаналогичными (биоаналоговыми, биоподобными) ЛП (биоаналогами). Лекарственный препарат, на основе которого разработан биоаналог, называют «оригинальным ЛП», а также «препаратом сравнения». Согласно Закону, ЛП, который используется для оценки биоэквивалентности или терапевтической эквивалентности, качества, эффективности и безопасности воспроизведенного или биоаналогового (биоподобного) лекарственного препарата, называется «референтным лекарственным препаратом» [41].

Согласно определению Закона, биоаналоговый (биоподобный) лекарственный препарат (биоаналог) – биологический ЛП, схожий по параметрам качества, эффективности и безопасности с референтным биологическим ЛП в такой же лекарственной форме и имеющий идентичный способ введения [41].

Согласно законодательству ЕС, биоаналогичный ЛП (биоаналог) – биологический ЛП, сходный с ЛП сравнения (оригинальным ЛП), но не подпадающий под определение воспроизведенного ЛП, особенно в силу различий по исходному сырью или различий в технологическом процессе производства между биологическим ЛП и ЛП сравнения. В таких случаях необходимо представить соответствующие результаты доклинических и клинических исследований в отношении указанных различий [63, 88].

Согласно проекту Правил регистрации и экспертизы ЛС для медицинского применения ЕАЭС биоаналогичный лекарственный препарат (биоподобный препарат) – биологический ЛП, у которого доказан высокий уровень подобия по параметрам качества, эффективности и безопасности референтному биологическому ЛП в такой же лекарственной форме, дозировке и с таким же путем введения. К биоаналогичным (биоподобным) препаратам не относятся вакцины и препараты, полученные из крови и плазмы крови человека [26].

Согласно законодательству США, биоаналогичный (биоподобный) лекарственный препарат (биоаналог) – биологический ЛП, высоко сопоставимый по свойствам с оригинальным биологическим ЛП, невзирая на незначительные различия в клинически неактивных компонентах, при этом клинически значимые различия между такими препаратами с позиций их безопасности, качества и эффективности отсутствуют [126].

Таким образом, из представленных определений видно, что главной особенностью биоаналога является «сопоставимость», «подобие» оригинальному ЛП по качеству, безопасности и эффективности. Полного соответствия свойств оригинальному ЛП, характерного для воспроизведенных ЛП, не ожидается.

В настоящее время закончилось или заканчивается действие патентов на некоторые оригинальные биологические ЛП, что позволяет фармацевтическим компаниям начать разработку и производство их аналогов [7]. По данным компании Frost&Sullivan, к 2017 г. на фоне патентного «обвала» объем рынка биоаналогов в Европе достигнет 4 млрд. долл. США [69].

В настоящее время все более широкое применение в клинической практике находят высокоэффективные ЛП, созданные на основе мАТ. На сегодняшний день они используются в терапии заболеваний, большинство из которых еще несколько десятков лет назад считались неизлечимыми, таких как онкологические заболевания, рассеянный атеросклероз, влажная форма макулярной дегенерации и другие. Указанные ЛП также применяются для лечения заболеваний, характеризующихся длительным прогрессирующим течением – заболевания онкологического профиля, аутоиммунной природы, аллергические заболевания, а также в трансплантологии для профилактики и подавления реакции отторжения, однако область их клинического применения постоянно расширяется [2, 15, 48, 123].

10 сентября 2013 года Европейской комиссией было принято решение о регистрации первого в Европейском союзе биоаналогичного мАТ инфликсимаба, реализуемого в рамках двух торговых наименований – Ремзима и Инфлектра. Ремзима/Инфлектра были зарегистрированы по тем же показаниям, что и ЛП

сравнения Ремикейд, охватывающим широкий круг аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, болезнь Крона, язвенный колит, болезнь Бехтерева, псориатический артрит и псориаз [68, 70, 95]. Комитет по лекарственным препаратам для медицинского применения Европейского агентства по лекарственным средствам 19 ноября 2015 вынес положительное заключение относительно биоаналогичного этанерцепта (торговое наименование – Бенепали) [52], а 1 апреля 2016 года – относительно еще одного биоаналога инфликсимаба – Фликсаби [73].

В настоящее время в США единственным биоаналогичным ЛП мАТ также является препарат Инфлектра (дата одобрения 5 апреля 2016 года) [98].

В Российской Федерации зарегистрировано 37 лекарственных препаратов мАТ и их производных (-цепт молекулы) [13], из них 5 являются биоаналогами – это 3 препарата отечественного разработчика – компании ЗАО «БИОКАД»: Ацеллбия (ритуксимаб), зарегистрированный в апреле 2014 года и препараты Бевацизумаб и Трастузумаб, зарегистрированные в ноябре и декабре 2015 года соответственно; препарат Фламмэгис (инфликсимаб) компании Селлтрион Хэлскеа Ко., Лтд., Республика Корея, зарегистрированный в июле 2015 года; и препарат Реддитукс (ритуксимаб) компании Д-р Редди`с Лабораторис Лтд, Индия, зарегистрированный в апреле 2016 года.

Препарат Ацеллбия, как и препарат Реддитукс, предназначены для лечения пациентов с онкологическими заболеваниями (неходжкинская лимфома и хронический лимфолейкоз) [5, 32]. В настоящее время компания ЗАО «БИОКАД» проводит клинические исследования препарата Ацеллбия по дополнительным показаниям к применению [33]. Показания к применению препаратов Фламмэгис, Бевацизумаб и Трастузумаб соответствуют показаниям соответствующим им оригинальным препаратам [6, 42, 39].

Остальные ЛП мАТ являются оригинальными препаратами (Приложение А) [13]. Деносумаб зарегистрирован в виде двух торговых наименований – Пролиа, раствор для подкожного введения 60 мг/мл [30], и Эксджива, раствор для подкожного введения 70 мг/мл [45], применяемых при

различных показаниях. Кроме того, афлиберцепт зарегистрирован двумя разными производителями по двум разным показаниям: препарат Эйлеа, раствор для внутриглазного введения [44], применяемый в офтальмологии, и препарат Залтрап, концентрат для приготовления раствора для инфузий [14], применяемый для лечения метастатического колоректального рака.

На сегодняшний день в России находятся на этапе клинических исследований биоаналоги бевацизумаба, трастузумаба, инфликсимаба, ритуксимаба, адалимумаба и этанерцепта [33]. Но в связи с истекающими сроками патентной защиты на оригинальные ЛП мАТ, начнется разработка и других биоаналогичных мАТ.

Европейский союз является пионером в создании нормативно-правовой и научно-технической базы для разработки и регистрации аналогичных биологических ЛП; впервые соответствующие нормы были включены в Директиву 2001/83/ЕС в 2003 году [63]. В настоящее время ЕМА (European Medicines Agency – Европейское агентство по лекарственным средствам) принят ряд руководств, регулирующих подходы к изучению качества, безопасности, эффективности, иммуногенности биоаналогов в сравнении с соответствующими ЛП сравнения, а также фармаконадзора, которые постоянно пересматриваются и уточняются [111].

В 2010 году ЕМА выпустило проект руководства по аналогичным биологическим ЛП, содержащим мАТ. В руководстве рассматриваются соответствующие модели животных, доклинические и клинические исследования, проведение которых рекомендуется для установления сопоставимости биоаналога мАТ по отношению к препарату сравнения, зарегистрированному в ЕС. В окончательной редакции руководство принято в конце 2012 года [89]. В настоящее время оно является основным препарат-специфичным научным руководством, на которое ориентируются разработчики биоаналогичных мАТ при выводе их на рынки ЕС.

В 2010 году в США принят закон, который вносит изменения в Закон о службе здравоохранения (PHS Act) с целью создания сокращенной процедуры

регистрации биологических ЛП, которые доказали свою биоаналогичность по отношению к оригинальному ЛП, зарегистрированному FDA (Food and Drug Administration – Администрация по пищевым продуктам и лекарственным средствам), и являются взаимозаменяемыми по отношению к последнему. Эта часть закона получила отдельное название: Biologics Price Competition and Innovation Act (BPCIA) [54].

В апреле 2015 года FDA утвердило 3 руководства, описывающих подходы к подтверждению биоаналогичности в США [79, 80, 81]. Как и в ЕС, биоаналогичные препараты, предназначенные для американского рынка, должны пройти строго регламентированное изучение сопоставимости, включая физико-химические, аналитические, функциональные, доклинические и клинические исследования [51].

В настоящее время в РФ обращение биологических и биоаналогичных ЛП регулирует Закон, в котором даны определения биоаналогов, референтных ЛП, взаимозаменяемых ЛП [41]. В Законе отсутствуют какие-либо требования и подходы к подтверждению сопоставимости биоаналогов и референтных ЛП, поскольку эти вопросы являются предметом подзаконных актов и научных руководств.

Соответственно, учитывая вышеизложенное, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России) опубликовало научно-методические руководства, носящие рекомендательный характер, которые освещают принципы подтверждения сопоставимости по показателям качества, принципы сравнительной фармако-токсикологической оценки, а также рекомендации к исследованиям фармакокинетики, фармакодинамики, эффективности и безопасности и вопросы фармаконадзора различных групп биоаналогов, в том числе МАТ [37].

Стоит отметить, что регуляторные стандарты разработки ЛП, полученных биотехнологическим путем, Европейского союза и США сопоставимы друг с

другом. Эти страны утвердили научно-обоснованные подходы к оценке биоаналогов на этапе доклинических и клинических исследований. Согласно рекомендациям Васильева А.Н. [9], в России существует необходимость подготовки нормативно-правовых актов, регламентирующих требования к оценке качества, доклиническим и клиническим исследованиям, правилам государственной регистрации и пострегистрационного контроля биоаналогов с учетом международного опыта, которые бы носили обязательный характер.

Однако, поскольку в настоящее время не выработано единых регуляторных требований к количественной оценке биоаналогичности, разработчик не может быть уверен, что попадание в выбранные им границы признания биоаналогичности позволит сделать однозначный вывод о сопоставимости биоаналога и оригинального ЛП. В любом случае, окончательное решение о возможности выхода на рынок биоаналогичного препарата стоит за регуляторным органом.

1.2 Общие принципы подтверждения биологической аналогичности

Стандартный подход, применяемый к воспроизведенным ЛП (подтверждение биоэквивалентности ЛП сравнения путем проведения фармакокинетических исследований) не приемлем для биоаналогичных ЛП, поскольку их физико-химические и биологические свойства, как правило, гораздо сложнее поддаются изучению, т.е. невозможно подтвердить отсутствие клинически значимых различий между двумя ЛП, опираясь лишь на один критерий. Кроме того, такие параметры как трехмерная структура, количество кислотно-основных вариантов или посттрансляционных модификаций, например, профиль гликозилирования, могут существенно изменяться. Профиль безопасности и эффективности биоаналогов в значительной степени зависит от постоянства и воспроизводимости производства и контроля качества как производственных материалов, включая готовый ЛП, так и производственных процессов [92, 124, 128].

Главная задача производителя биоаналога – это подтверждение биоаналогичности оригинальному ЛП [82, 83, 84, 88, 89, 112, 129, 130, 131, 132], то есть создание копии ЛП сравнения, что позволит претендовать на экстраполяцию всего профиля безопасности и эффективности оригинального ЛП без проведения полного комплекса доклинических и клинических исследований.

Для подтверждения аналогичности биоаналога оригинальному ЛП по качеству, безопасности и эффективности, следует проводить сравнительные исследования и использовать принцип сопоставимости [38, 92], т.е. необходимо подтвердить сопоставимость по показателям качества, сравнительной фармако-токсикологической оценки, провести исследования сравнительной фармакокинетики, фармакодинамики, безопасности и эффективности.

Препарат сравнения должен быть оригинальным, то есть представлять собой препарат с новым действующим веществом, который был зарегистрирован и размещен на мировом фармацевтическом рынке впервые на основании досье, содержащего результаты доклинических и клинических исследований в полном объеме, подтверждающих его качество, безопасность и эффективность [26].

Согласно Закону, ЛФ и способ введения биоаналога и ЛП сравнения не должны различаться [41]. Согласно европейским рекомендациям [88], дозировка и путь введения биоаналога также не должны отличаться от таковых препарата сравнения, однако, допускаются отклонения в ЛФ биоаналога, что всегда требует обоснования и при необходимости дополнительных данных. Такие различия не должны оказывать влияние на безопасность препарата.

В США ЛФ и способ введения, а также дозировка биоаналога и препарата сравнения должны совпадать, однако возможны различия в доставке или системе контейнер/укупорка (например, изделие с автоматическим инжектором или предварительно заполненный шприц для биоаналога и обычный флакон для препарата сравнения), при условии, что доказана биоаналогичность ЛП сравнения и указанные выше изделия имеют адекватную производительность. Кроме того, необходимы исследования экстрагирования и исследования стабильности, а также, в некоторых случаях, и исследования на людях [81].

В США биоаналог может быть взаимозаменяемым, если он будет приводить к одинаковому с оригинальным ЛП клиническому результату у любого пациента и, если биоаналог вводится пациенту неоднократно, риск с позиций безопасности и сниженной эффективности в связи с чередованием между биоаналогом и оригинальным ЛП или сменой одного другим не превышает риск применения оригинального ЛП без такого чередования или смены. Взаимозаменяемыми ЛП допускается заменять оригинальный ЛП без вмешательства назначившего его медицинского работника [126].

В ЕС вопрос о взаимозаменяемости биоаналогичных ЛП отнесен к компетенции регуляторных органов отдельных стран-участниц Евросоюза [88]. Кроме того, в Руководстве по аналогичным биологическим ЛП, содержащим мАТ [89] указано, что на национальном уровне возможны «переключение» и «замена» ЛП, содержащих мАТ.

Согласно Закону [41], в России биоаналоги могут считаться взаимозаменяемыми на основании следующих параметров: сопоставимости качественных и количественных характеристик фармацевтических субстанций, сопоставимости состава вспомогательных веществ ЛП (при этом различия состава вспомогательных веществ не должны приводить к риску возникновения серьезных нежелательных реакций у отдельных групп пациентов или повышения частоты их возникновения), если при проведении соответствующих клинических исследований доказано отсутствие клинически значимых различий фармакокинетики и (или) безопасности и эффективности ЛП; на основании данных об отсутствии клинически значимых различий безопасности, эффективности и иммуногенности ЛП по результатам проведенных клинических исследований; а также в случае идентичности способа введения и применения ЛП и соответствия производителя ЛС требованиям надлежащей производственной практики.

Таким образом, единого подхода к определению взаимозаменяемости биоаналогичных ЛП в Европе, США и России не выработано.

Всестороннее сравнение структурных свойств и функциональных характеристик биоаналога и препарата сравнения составляет основу изучения биоаналогичности. Первичная аминокислотная последовательность должна быть одинаковой для биоаналога и препарата сравнения [88]. Небольшие различия в микрогетерогенной структуре молекулы могут быть приемлемыми, если они оправданы в связи с потенциальным влиянием на безопасность, фармакокинетические и фармакодинамические свойства препарата [51].

Придерживаясь подхода, основанного на сопоставимости, и используя достаточно надежные чувствительные аналитические системы, сравнительные исследования на этапе изучения качества могут позволить снизить объем доклинических и клинических исследований. Таким образом, количество и объем сравнительных исследований, которые требуются на предрегистрационном этапе, определяется всякий раз индивидуально для каждого биоаналога [10, 79, 93, 101].

Основными рекомендациями по проведению исследований биоаналогов являются доклинические исследования *in vitro*, исследования *in vivo*, токсикологические исследования на животных релевантного вида, клинические исследования, включающие в себя изучение сравнительной фармакокинетики и сравнительной фармакодинамики с последующим, как правило, проведением сравнительного исследования эффективности и безопасности, а также дальнейший контроль безопасности применения биоаналога после регистрации [11, 20, 63, 79, 89, 90, 151].

Предварять эти исследования должно подтверждение качества. Недостаточно сравнения биоаналога с общедоступным стандартом, например, фармакопейной статьей, для целей сопоставимости. Необходимо провести сравнительные исследования с оригинальным ЛП [38, 79, 88]. Кроме исследований сопоставимости необходимо подтвердить качество биоаналогичного ЛП согласно требованиям, предъявляемым к досье по качеству [27].

Стоит отметить, что полного соответствия показателей качества биоаналога и ЛП сравнения не ожидается. Вследствие особенностей структуры

биологических молекул и сложности процесса производства, практически невозможно создать точную копию оригинального биологического ЛП [88, 91, 128]. Производство и контроль качества биоаналогов осуществляется по собственному плану разработки на основании современных данных. Разработчик должен подтвердить постоянство и надежность собственного процесса производства.

1.3 Биологические свойства моноклональных антител и их производных

Моноклональные антитела для медицинского применения – это препараты иммуноглобулина или фрагмента иммуноглобулина, со специфичностью в отношении определенного антигена, выработанные одним клоном клеток [71].

Типичное мАТ состоит из четырех цепей (двух легких и двух тяжелых) и имеет постоянный и гипервариабельный домены [17]. В структуре иммуноглобулина выделяют два фрагмента: антиген-связывающий Fab-фрагмент и Fc-фрагмент, выполняющий эффекторную функцию. Fab-фрагмент содержит вариабельную область, которая состоит из трех гипервариабельных участков, определяющих комплементарность, которые образуют сайт связывания антигена и придают антигенную специфичность. Иммуные эффекторные функции определяет Fc-фрагмент, который способен инициировать КЗЦ, связывание с Fcγ-рецепторами (FcγR), и связывание с неонатальным рецептором Fc (FcRn). Структура иммуноглобулина стабилизирована благодаря наличию дисульфидных связей [3, 152] (рисунок 1).

Моноклональные антитела могут быть получены из линии «бессмертных» В-лимфоцитов, которые клонированы и поддерживаются в качестве банка клеток. Также мАТ получают из линии клеток с рекомбинантной ДНК.

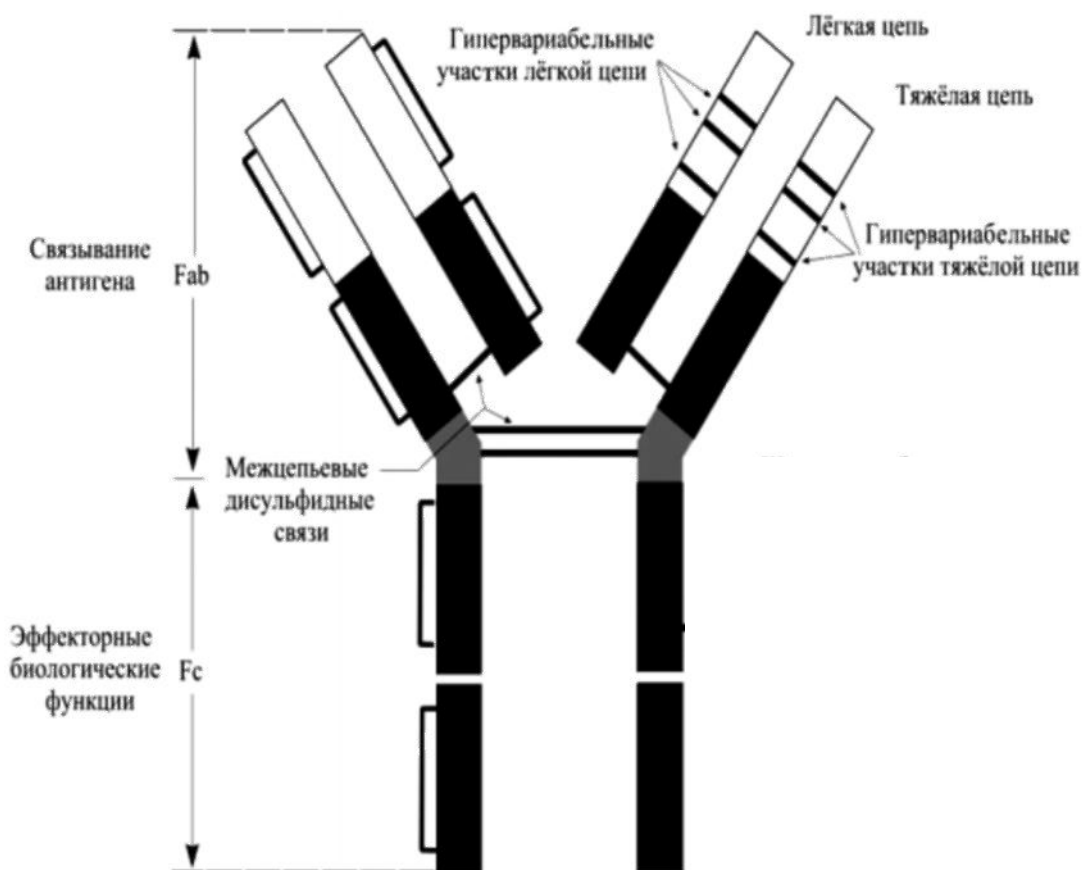


Рисунок 1 – Строение моноклонального антитела [17]

В настоящее время выпускаются следующие генно-инженерные рекомбинантные антитела:

1. Химерные мАТ: переменные домены тяжелых и легких цепей антител человека заменяют на домены антител животных, которые обладают необходимой антигенной специфичностью.
2. Гуманизированные мАТ: 3 короткие гипервариабельные последовательности (комплементарные детерминантные области) переменных доменов каждой цепи антитела других видов животных встраивают в структуру переменных доменов антител человека; другие изменения последовательности могут быть сделаны для улучшения связывания антигена.

3. Рекомбинантные человеческие мАТ: переменные домены тяжелых и легких цепей человеческих антител комбинируют с константной областью антитела человека [71].

Указанные типы мАТ отличаются своей иммуногенностью. Чем меньше мышинового белка содержится в молекуле мАТ, тем меньшей иммуногенностью обладает антитело. Таким образом рекомбинантные человеческие мАТ вызывают наименьший иммунный ответ [17].

Моноклональные антитела могут быть конъюгированы с другими веществами, включая радиоактивные метки, а также представлять собой гибридные белки, включающие фрагменты мАТ. Такими гибридными белками на основе IgG1 являются, например, абатацепт, этанерцепт и афлиберцепт [14, 22, 46, 137, 138, 139].

Моноклональные антитела в зависимости от изотипа могут содержать несколько функциональных доменов в молекуле (антигенсвязывающий участок, комплементсвязывающий участок, константная часть, взаимодействующая с Fc-рецепторами). Каждое мАТ имеет уникальный профиль с точки зрения антигенсвязывающего участка, эффекторной функции Fc-цитотоксичности и связывания с Fc-рецепторами, поэтому различные мАТ имеют разнообразные механизмы действия [27] (рисунок 2).

Например, ритуксимаб специфично связывается с трансмембранным белком CD20 на В-лимфоцитах и инициирует иммунологические реакции, опосредующие лизис В-клеток. Возможными механизмами клеточного лизиса являются КЗЦ, АЗКЦ, индукция апоптоза. Ритуксимаб (Мабтера) применяется при таких онкологических заболеваниях как неходжкинская лимфома и хронический лимфолейкоз, а также при ревматоидном артрите, гранулематозе с полиангиитом (гранулематозе Вегенера) и микроскопическом полиангиите [16, 140].

Трастузумаб избирательно взаимодействует с внеклеточным доменом рецепторов эпидермального фактора роста человека второго типа (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 – HER2). Трастузумаб (Герцептин) применяется для лечения рака молочной железы и рака желудка [12, 141].



Рисунок 2 – Возможные механизмы действия некоторых мАТ
[адаптировано с 104]

Бевацизумаб селективно связывается с биологически активным фактором роста эндотелия сосудов (Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF) и таким образом ингибирует его связывание с рецепторами 1 и 2 типа на поверхности эндотелиальных клеток, что приводит к снижению васкуляризации и угнетению роста опухоли. Бевацизумаб (Авастин) имеет широкое применение в онкологии, в том числе для лечения колоректального рака; рака молочной железы; рака легкого; почечно-клеточного рака; глиобластомы (глиомы IV степени злокачественности по классификации Всемирной организации здравоохранения); рака яичника, маточной трубы и рака брюшины [1, 142].

Пертузумаб избирательно взаимодействует с отвечающим за димеризацию внеклеточным субдоменом II HER2 и блокирует процесс лиганд-зависимой гетеродимеризации HER2 с другими белками семейства HER, включая рецептор

эпидермального фактора роста человека (Epidermal Growth Factor Receptor–EGFR), рецептор эпидермального фактора роста человека третьего типа (Human Epidermal Growth Factor Receptor 3 – HER3) и рецептор эпидермального фактора роста человека четвертого типа (Human Epidermal Growth Factor Receptor 4 – HER4). Кроме того, пертузумаб способствует активации АЗКЦ. Применяется пертузумаб (Перьета) для лечения рака молочной железы [23, 143].

Цетуксимаб специфично связывается с рецептором эпидермального фактора роста (Epidermal Growth Factor Receptor – EGFR) и индуцирует его интернализацию, что может приводить к ингибированию функции рецептора, а также сенсibiliзирует цитотоксические иммунные эффекторные клетки в отношении экспрессирующих EGFR опухолевых клеток (АЗКЦ). Цетуксимаб (Эрбитукс) применяется для лечения колоректального рака, рака головы и шеи [47, 144].

Катумаксомаб – мАТ против молекул адгезии клеток эпителия (Epithelial Cell Adhesion Molecule – ЕpСAM), экспрессирующихся на поверхности большинства клеток злокачественной опухоли, и CD3 антигена, экспрессирующихся преимущественно на зрелых Т-лимфоцитах и являющихся компонентом рецепторов Т-лимфоцитов. Механизм действия препарата реализуется через активацию Т-лимфоцитов, АЗКЦ, КЗЦ и фагоцитоз. Катумаксомаб (Ремоваб) применяется для лечения карциноматозного асцита у больных с ЕpСAM-положительными злокачественными опухолями [35, 145].

Таким образом, спектр применения мАТ очень широкий и зависит от механизма действия конкретного мАТ, поскольку различные препараты мАТ обладают некоторыми общими свойствами, например, цитотоксичностью в отношении их мишени или нейтрализацией цитокина, но различаются по таким свойствам, как механизм действия [27].

Стоит отметить, что мАТ очень активно применяются в лечении онкологических заболеваний. Противоопухолевые антитела составляют 50% объема рынка всех продаваемых препаратов мАТ, 37% рынка занимают антитела

для коррекции аутоиммунных/воспалительных нарушений, 11% – для лечения заболеваний органов дыхания и 2% – для сердечно-сосудистых заболеваний [19].

1.4 Подтверждение биоаналогичности лекарственных препаратов моноклональных антител

Анализ законодательных актов и данных литературы, регламентирующих доклиническое и клиническое изучение биоаналогичных ЛП в зарубежных странах и в России, позволил установить показатели качества биоаналога, которые необходимо подвергать сравнению с оригинальным ЛП [38, 79, 88, 92, 128]. Они включают в себя подлинность, чистоту (родственные соединения, родственные примеси и производственные примеси) и биологическую активность. Другие показатели не являются специфичными характеристиками и являются общими для всех ЛП [9].

В зависимости от природы мАТ для определения подлинности следует использовать ряд различных испытаний. Необходимо сопоставлять следующие группы показателей: первичная структура, структуры высоких порядков, гетерогенность размеров, заряженные изоформы, содержание белка, гликозилирование. Минимум два ортогональных метода необходимо использовать при сравнении каждой из перечисленных групп показателей [11, 149].

Изучение чистоты биоаналогичного мАТ должно включать определение его родственных соединений, продуктов деградации и производственных примесей (таких как белки клетки-хозяина, ДНК клетки-хозяина, компоненты питательной среды, реактивы, растворители и т.д.), а также количественную оценку содержания перечисленных выше соединений [11].

Изучение биологической активности, как одного из базовых показателей биоаналогичности, позволяет охарактеризовать зависимость между физико-химическими и биологическими свойствами исследуемого биоаналога, оценить характер различий, найденных на предыдущих этапах разработки, оценить

структурно-функциональную зависимость и начать обоснование клинической незначимости данных различий, которое будет продолжено на этапе доклинических исследований *in vivo* и клинических исследований. Если обосновать это не удастся, следует вернуться к доработке процесса производства, либо начать разработку биоаналога как оригинального ЛП [62, 100].

Стоит отметить, что при проведении физико-химических и биологических испытаний не рекомендуется ограничиваться только испытаниями, предусмотренными фармакопейными требованиями (например, Европейской фармакопеей или фармакопеей США [72, 147]). Целесообразно сравнивать показатели исследуемого биоаналога с таковыми ЛП сравнения, придерживаясь алгоритма анализа, основанного на принципе «отпечатков пальцев», который с большой чувствительностью может позволить проанализировать большое число показателей ЛП и их комбинаций. Эта стратегия позволит рассчитать совокупную аналогичность двух ЛП и станет основой более прицельного подхода к последующим доклиническим и (или) клиническим исследованиям [11, 66].

Тем не менее, нельзя исключить, что не смотря на полную «одинаковость», подтвержденную с помощью большого числа физико-химических методов, останутся невыявленными различия, которые могут иметь клиническую значимость и не позволить дать заключение о биоаналогичности. Изучение биологической активности позволяет удостовериться в отсутствии ошибки при нахождении различий по результатам физико-химических испытаний. Если при изучении биологической активности обнаруживаются различия, которые обладают потенциальной клинической значимостью, то, возможно, было использовано недостаточное количество методов для выявления различий. Это характерно, например, для таких крупных молекул, как мАТ, физико-химические свойства и структурно-функциональная зависимость которых изучены недостаточно [20, 21].

Стоит отметить, что понятие фармакодинамических исследований *in vitro* (специфической активности *in vitro*) на доклиническом этапе разработки

биоаналога представляет собой тоже самое, что и сопоставление биологической активности на этапе подтверждения сопоставимости по качеству.

На этапе доклинических исследований биоаналога первоначально необходимо провести сравнительные исследования специфической активности *in vitro*, а затем определить необходимость и объем проведения исследований *in vivo* [11, 89].

Доклинические исследования *in vitro* следует проводить, используя достаточное количество серий препарата, которые впоследствии будут использованы в клинических исследованиях и которые, соответственно, должны быть сопоставимыми с сериями, которые поступят в гражданский оборот. Иначе может потребоваться проведение связующих исследований [59, 60].

При определении сравнительной специфической активности биоаналогичного мАТ необходимыми являются следующие исследования [11, 89]:

- связывания с антигеном(ами)-мишенью(ями) [64, 97, 149];
- связывания с репрезентативными изоформами соответствующих трех Fc-гамма-рецепторов (FcγRI, FcγRII и FcγRIII), FcRn и комплементом (C1q) [97, 149];
- Fab-ассоциированных функций (например, активация или блокада рецептора, нейтрализация растворимого лиганда) [64, 96, 97, 149];
- Fc-ассоциированных функций (например, активация комплемента, КЗЦ, АЗКЦ) [64, 97, 122, 149].

Изучить представленные выше свойства возможно различными методами. Например, АЗКЦ, КЗЦ можно определить с помощью иммуногистохимических методов; связывание с антигеном-мишенью – методом конкурентного связывания на культуре клеток [153]. Степень связывания с антигеном-мишенью, с рецепторами типа Fc, комплементом оценивают с помощью иммуноферментного анализа (ИФА), поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии, флуоресцентной микроскопии [97, 149].

При проведении исследований с использованием живой системы (например, мембранных рецепторов, культуры клеток, образца ткани или цельного животного) необходимо учитывать, что экспериментальная система обладает вариабельностью, что мешает определению истинного эффекта сравниваемых ЛП. Кроме того, так как серии биоаналога могут по некоторым характеристикам незначительно отличаться друг от друга, на результаты эксперимента также оказывает влияние межсерийная вариабельность, характерная как для биоаналога, так и для препарата сравнения. Следовательно эксперимент следует проводить на некотором множестве объектов, чтобы сделать поправку на вариабельность экспериментальной системы [20].

При проведении исследований также необходимо учитывать высокую вариабельность влияния биологических ЛП на человека [56, 121, 154], и поэтому в испытание следует включать, как минимум, две серии препарата сравнения [102]. Чем больше серий как биоаналога, так и препарата сравнения изучено в эксперименте, тем более убедительно в случае получения положительных результатов подтверждение биоаналогичности по исследуемому показателю. Использование нескольких серий биоаналога позволяет валидировать однородность его производства (по меньшей мере, по исследуемому показателю) [146].

Необходимо провести, по меньшей мере, два ортогональных исследования. Однако, нередко для подтверждения биоаналогичности может потребоваться проведение более 20 исследований *in vitro* [97].

Согласно европейским рекомендациям [89, 118], исследования перекрестной тканевой реактивности не пригодны для обнаружения незначительных изменений ключевых параметров качества, поэтому проведение таких исследований с целью оценки сопоставимости биоаналога ЛП сравнения, не рекомендуется. Исследования перекрестной тканевой реактивности на панели тканей человека рекомендуется проводить как компонент оценки безопасности, необходимый для начала клинической разработки. По результатам таких исследований можно получить информацию о распределении мишени, а также

сведения о потенциально неожиданном связывании. Связывание с тканями *per se* не предполагает наличие биологической активности *in vivo*, кроме того связывание с участками, которые обычно недоступны для антител *in vivo* (например, цитоплазмой), как правило, считается незначимым.

При определении необходимости проведения доклинических исследований *in vivo* следует учитывать ряд факторов – факторов настороженности [11, 27, 89, 91]:

- наличие потенциально значимых показателей качества, которые ранее не были выявлены у ЛП сравнения (например, новая пострансляционная модификация);

- наличие потенциально значимых количественных различий в показателях качества между биоаналогом и препаратом сравнения;

- значимые различия в составе (например, наличие вспомогательных веществ, редко используемых в препаратах мАТ).

Если проведенные исследования биоаналогичности *in vitro* признаны удовлетворительными, а настораживающие факторы не обнаружены или же не препятствуют применению у человека, исследования на животных *in vivo* допускается не проводить [11, 89, 91].

Однако, если модель *in vivo* более чувствительна для выявления потенциальных различий (которые могут оказаться клинически значимыми) между ЛП сравнения и исследуемым биоаналогом, чем модель *in vitro*, то подобные исследования не только желательны, но и необходимы [131]. Кроме того, некоторые мАТ могут опосредовать эффекты, которые с помощью исследований *in vitro* полностью выявить невозможно [11, 89]. В то же время, следует иметь в виду, что исследования *in vitro* могут оказаться более чувствительными и специфичными, чем исследования на животных и соответственно иметь большее значение в подтверждении доклинической сопоставимости [27].

В случае проведения исследования *in vivo* их направленность определяется получением требуемых сведений. При планировании исследований на животных следует учесть необходимость получения максимума данных [11, 89].

Проведение исследований *in vivo* возможно, если имеется подходящая по виду животного и дизайну модель *in vivo*. Возможно будет необходима разработка трансгенных, нокаутных, гуманизированных и прочих моделей, позволяющих имитировать исследуемое заболевание человека у животных [11, 89, 91].

Например, исследование специфической активности ритуксимаба *in vivo* можно провести, изучая его противоопухолевую активность на ксенотрансплантатной модели неходжкинской лимфомы у мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID); а также относительное и абсолютное содержание В-клеток у яванских макаков [62]. Исследование специфической активности этанерцепта *in vivo* можно провести на модели пристан-индуцированного артрита у крыс с изучением параметров артрита и уровня фактора некроза опухоли альфа (ФНО α) [115, 148], а также модели коллаген-индуцированного артрита [94, 105, 106].

Токсикологические исследования рекомендуется проводить в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practice – GLP) [114], однако не все исследования, основанные на специализированных тест-системах, могут соответствовать правилам GLP, при этом в некоторых случаях неполное соответствие не ведет к неприменимости полученных результатов для дальнейшего изучения биоаналога [77].

Исследование токсичности мАТ проводят при многократном введении, по крайней мере, на одном виде животных, общепринятыми методами. Длительность исследования должна быть достаточной для выявления имеющих значимость различий в токсичности между биоаналогом и ЛП сравнения и составлять, по меньшей мере, 4 недели. Способ введения должен соответствовать предполагаемому в клинической практике [38, 85, 113].

При проведении исследования необходимо придерживаться гибкого подхода, если единственными релевантными видами животных являются

нечеловекообразные приматы, что особенно характерно для мАТ. Проведение стандартных исследований токсичности при многократном введении у нечеловекообразных приматов, как правило, не рекомендуется, однако при достаточном обосновании возможно провести исследование с измененным дизайном (например, используя лишь одну дозу препаратов и (или) один пол и (или) исключив группу восстановления) или провести прижизненную оценку параметров безопасности [26, 89].

Изучение местной переносимости, как правило, не требуется, кроме тех случаев, когда препарат содержит вспомогательные вещества, для которых опыт применения при рассматриваемом пути введения отсутствует или мал. Указанное исследование может быть выполнено в рамках исследования токсичности при многократном введении, упомянутого выше [26, 89].

При доклиническом изучении биоаналогов, содержащих мАТ, исследования фармакологической безопасности, репродуктивной токсичности, мутагенности и канцерогенности, как правило, не требуются [11, 89], что также согласуется с результатами, полученными в работе Васильева А.Н. [9].

Отдельного внимания заслуживает оценка иммуногенности на этапе доклинического изучения биоаналогов, не смотря на низкую прогностическую ценность для иммуногенности у человека. Такие данные могут потребоваться для интерпретации результатов исследований на животных *in vivo*, а также могут способствовать выявлению агрегатов (несущих высокий риск развития иммуногенности у человека) и служить ценным источником информации о последствиях иммунного ответа у человека, особенно если белковый ЛП является аналогом эндогенного соединения [118].

При подтверждении биоаналогичности мАТ клинические исследования необходимо проводить во всех случаях [66], поскольку на данном этапе можно окончательно доказать, что возможные различия в производстве биоаналога и ЛП сравнения не привели к клинически значимым последствиям, т.е. не явились причиной различий в безопасности и (или) эффективности биоаналога по сравнению с препаратом сравнения [20].

На этапе клинической разработки, также как и на этапе доклинических исследований, рекомендуется придерживаться поэтапного подхода; объем и характер исследований зависит от результатов, полученных на предыдущем(их) этапе(ах) [11, 89].

Исследования клинической фармакологии (фармакокинетические (ФК-) и фармакодинамические (ФД-) исследования) являются обязательным этапом в подтверждении биоаналогичности и служат источником данных, позволяющим определить степень аналогичности экспозиции биоаналога по отношению к ЛП сравнения [11, 89].

Первым этапом разработки биоаналогичного мАТ на этапе клинических исследований является, как правило, сравнение ФК-свойств. При разработке дизайна исследования следует учитывать рекомендации, изложенные в методических рекомендациях по клиническому изучению фармакокинетики терапевтических беков [58], рекомендациях по изучению биоэквивалентности [38], а также методических рекомендациях по валидации биоаналитических методик [53], поскольку используемые при изучении фармакокинетики биоаналитические методы требуют должной валидации.

По каждому из зарегистрированных показаний определять ФК-профиль, как правило, не требуется. Однако если мАТ применяется в различных клинических областях (например, ревматологии и онкологии), могут быть необходимы отдельные ФК-исследования, поскольку в различных областях мишень-опосредованный клиренс может различаться [11, 89].

Для определенных мАТ и по некоторым показаниями ФД-параметры могут внести свой вклад в исследования сопоставимости и соответственно могут применяться либо как основное, либо как дополнительное подтверждение сопоставимости биоаналога и ЛП сравнения [11, 89].

Если в ходе ФД-исследований невозможно убедительно подтвердить клиническую сопоставимость, аналогичную клиническую эффективность следует подтверждать в ходе рандомизированных параллельных сравнительных клинических исследований, предпочтительно двойных слепых и, как правило, в

исследованиях эквивалентности. Основной принцип таких исследований заключается в подтверждении аналогичной безопасности и эффективности биоаналога и ЛП сравнения, а не пользы для пациента *per se*, которая ранее уже была установлена для оригинального ЛП [11, 89].

Клиническая безопасность играет важную роль на протяжении всей клинической разработки и подлежит изучению как в процессе ФК- и (или) ФД-исследований, так и клинических исследований сравнительной эффективности, направленных на установление сопоставимости. Необходимо сравнивать вид, тяжесть и частоту нежелательных реакций между биоаналогом и ЛП сравнения [11, 89].

В связи с высокой распространенностью в Российской Федерации туберкулеза [40], а также повышенным риском развития туберкулеза у пациентов, применяющих мАТ [67, 76, 127], важен мониторинг возможного возникновения симптомов указанного заболевания, в том числе и на пострегистрационном этапе.

Во всех случаях при разработке биоаналогов на этапе клинических исследований необходимо оценивать иммуногенность, при изучении которой рекомендуется следовать методическим рекомендациям по изучению иммуногенности терапевтических белков, полученных биотехнологическим путем [38, 78]. Необходимо использовать валидированные высоко чувствительные методики изучения антител, способные обнаружить все антитела (т.е. с различной аффинностью, различных классов и подклассов). Во избежание ложноотрицательных результатов следует использовать подходы, не допускающие специфического маскирования определенных эпитопов [53, 58, 86].

Стоит отметить, что возможна экстраполяция данных клинической эффективности и безопасности ЛП сравнения на другие показания к применению биоаналога, отдельно не изучавшиеся в клинических исследованиях, на основании подтверждения сопоставимости, полученного по результатам всех сравнительных исследований, и при достаточном обосновании [11, 89].

Например, для инфликсимаба при проведении исследований на пациентах с ревматоидным артритом и пациентах с анкилозирующим спондилитом, при

изучении двух рекомендуемых доз инфликсимаба, двух различных групп пациентов и двух различных видов применения (при монотерапии и в комбинации с метотрексатом), при надлежащей характеристике профиля иммуногенности, возможна экстраполяция на другие показания к применению ЛП сравнения – язвенный колит у взрослых, язвенный колит у детей и подростков, болезнь Крона у взрослых, болезнь Крона у детей и подростков, псориатический артрит и псориаз [34, 97, 134].

Пострегистрационное изучение является важным элементом обеспечения качества, безопасности и эффективности биоаналогов, поэтому в регистрационное досье биоаналога необходимо включать план управления рисками [87].

Таким образом, именно изучение специфической активности биоаналогичных ЛП является важным начальным этапом во всей программе разработки биоаналога. Изучение биологической активности позволяет установить структурно-функциональную зависимость для ЛП. Изучение этого показателя в рамках подтверждения биоаналогичности является обязательным. Именно отсутствие качественно выполненных доклинических фармакодинамических исследований мешает выходу на отечественный фармацевтический рынок многих биоаналогичных мАТ.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для достижения поставленной цели и выполнения задач в процессе исследования были использованы: системный и информационно-аналитический подход, общенаучные методы исследования, методы логического, документального и статистического анализа, а также контент-анализа.

В соответствии с поставленными задачами проведенное исследование состояло из двух этапов – теоретического и практического.

2.1 Описание первого этапа исследования

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

При проведении анализа были использованы данные 22 регистрационных досье биоаналогов: ритуксимаба (4 досье), адалимумаба (5 досье), инфликсимаба (4 досье), бевацизумаба (4 досье) и трастузумаба (5 досье) из информационной системы «Документооборот» ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Для работы была использована информация о проведенных исследованиях специфической активности биоаналогов указанных МАТ, представленная в разделе «Доклинические исследования» регистрационных досье за период, начиная с поступления первого потенциального биоаналога (ритуксимаб) на экспертизу в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (2013 год) по июль 2015 года. Доступ к указанной базе данных осуществлялся с персонального компьютера на рабочем месте.

2.2 Описание второго этапа исследования

На втором этапе исследования с целью определения специфической активности ритуксимаба было проведено изучение сравнительной комплемент-зависимой цитотоксичности. Указанное исследование проведено в рамках договора о сотрудничестве с МБЦ «Генериум».

Комплемент-зависимая цитотоксичность (КЗЦ) – один из механизмов лизиса клеток-мишеней, вызванный каскадом реакций системы комплемента. Количественное определение КЗЦ позволяет получить численную характеристику биологической активности мАТ по его влиянию на гибель клеток-мишеней. Это позволяет провести относительно точное сравнение двух и более ЛП по этому критическому показателю качества, т.е. показателю, определяющему свойства препарата в организме человека.

Комплемент-зависимая цитотоксичность является одним из основных методов изучения Fc-опосредованных функций практически всех мАТ, антиген которых ассоциирован с клеточной мембраной. КЗЦ является важным механизмом действия таких мАТ как, например, ритуксимаб [16, 140], офатумумаб [4, 135] и другие.

При реализации КЗЦ Fab-фрагмент мАТ сначала связывается с антигеном на поверхности клеток, позволяя Fc-фрагменту затем связаться с компонентом комплемента C1, который в свою очередь активирует многоэтапную систему комплемента. На последнем её этапе расщепление компонента C5 катализирует формирование мембраноатакующего комплекса, который образует поры на мембране, ведущие к лизису клетки путем осмотического шока (рисунок 3) [99].

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

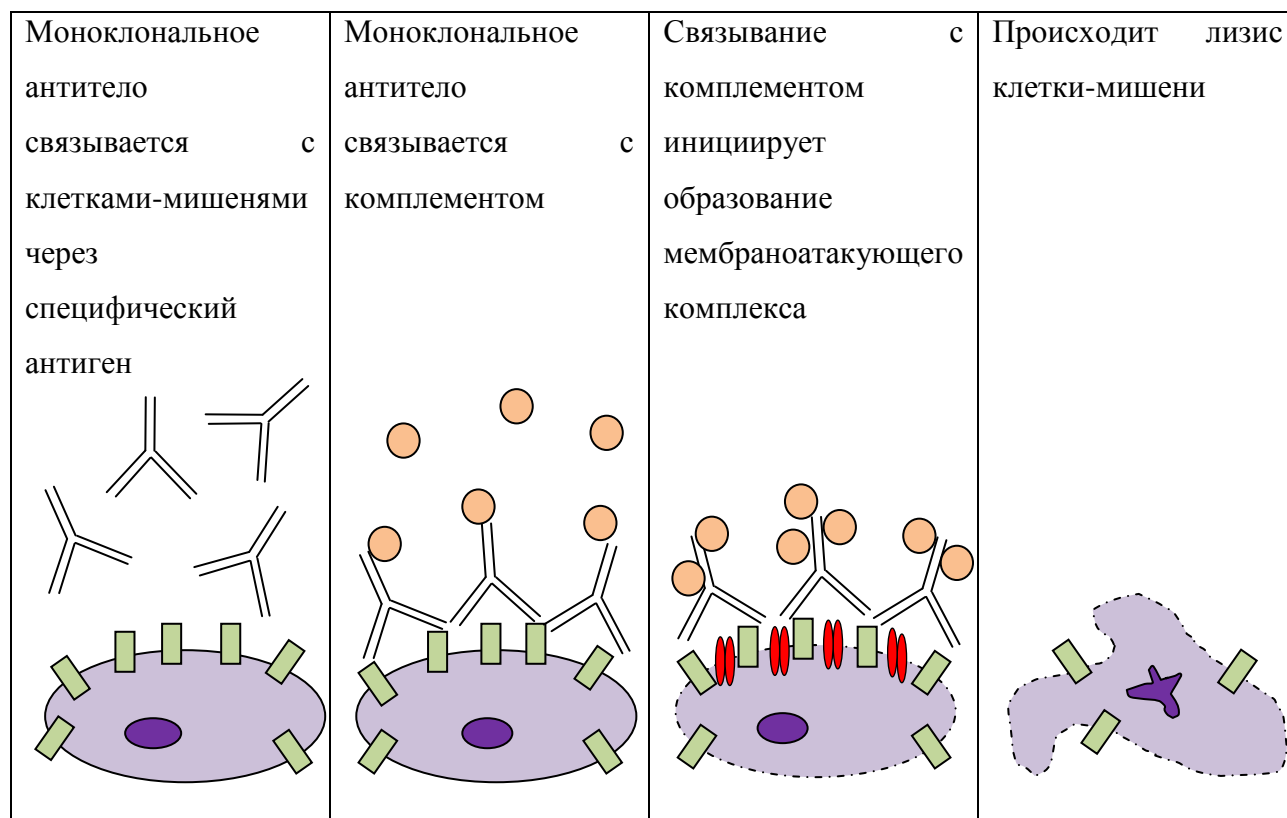


Рисунок 3 – Механизм реализации комплемент-зависимой цитотоксичности
[адаптировано с 50]

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

Необходимость анализа стандарта активности и (или) контрольных образцов параллельно препарату при проведении эксперимента заключается в обеспечении соответствия работы методики ожидаемому. Кроме того, контроли позволяют убедиться в том, что оборудование и реактивы работают в заданных пределах. Хорошо спланированный набор контрольных образцов может

существенно повысить уверенность в обоснованности и надежности результатов [65].

Стоит отметить, что сравнительное изучение специфической активности биоаналогичного ЛП как с оригинальным ЛП в рамках подтверждения биоаналогичности, так и со стандартным образцом активности (СО) в рамках рутинного подтверждения качества разработанного биоаналога проводится одинаковыми методами, а обработка результатов таких исследований – сходная.

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

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

Также в постановке метода КЗЦ было использовано два контроля:

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

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

2.2.1 Подготовка клеток

Клеточную культуру осматривали под микроскопом («Nikon Eclipse Ti-E», Япония) с целью оценки морфологии клеток, контаминации, а также гомогенности клеток. Ресуспендировали клетки с целью избавления от клеточных агрегатов путем многократного перемешивания. Затем отбирали часть культуры клеток для оценки их жизнеспособности (с целью дальнейшего расчета количества необходимой культуры на лунку планшета). Расчет количества жизнеспособных клеток проводили на приборе Countess™ Automated Cell Counter («Invitrogen», США), предварительно смешав клеточную суспензию с трипановым синим («Invitrogen», США) – красителем, используемым для

окрашивания мертвых клеток. Итоговая жизнеспособность клеток составила 88 % (при норме не менее 85%), т.е. 1,8 млн/мл, что является приемлемым для проведения эксперимента. Далее пробирки с клеточной суспензией ресуспендировали на центрифуге Centrifuge 5810 R («Eppendorf», Германия) в течение 5 мин с ускорением 200g. Надосадочную жидкость отбирали и отбрасывали, добавляли свежую культуральную среду («HyClone™ ADCF-MAb Media», США).

2.2.2 Приготовление последовательных разведений исследуемых образцов и стандартного образца активности

Разведения анализируемых образцов и СО проводили в 96-луночных планшетах («Sigma-Aldrich», США) в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1– Схема приготовления последовательных разведений анализируемых образцов и стандартного образца активности

	Объем ЛП, мкл	Номера столбцов круглодонного планшета										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Переносимый объем, мкл	36	30	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Объем среды для культивирования клеток, мкл		264	270	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Концентрация ЛП в разведении, мкг/мл		1200	120	40	12	4	1,2	0,4	0,12	0,04	0,01	

В каждую лунку планшета предварительно поместили среду для культивирования клеток в соответствии с таблицей 1.

Исходный раствор ритуксимаба в объеме 36 мкл помещали в 1 лунку планшета к 264 мкл культуральной среды. Из этой лунки отбирали 30 мкл полученного раствора и помещали во 2-ю лунку планшета к 270 мкл культуральной среды. Далее из 2-й лунки отбирали 100 мкл раствора и помещали

В лунки с ритуксимабом добавляли подготовленную суспензию клеток по 50 мкл на лунку (100 тыс./лунка). Планшеты с суспензией клеток и ритуксимабом помещали в инкубатор («Eppendorf», Германия) на 60 мин в атмосферу 5 % CO₂ при температуре 37 °С.

Далее в планшеты добавляли по 100 мкл предварительно разбавленного раствора комплемента человека Normal Human Serum Complement («Quidel Corporation», США) до получения конечной концентрации комплемента в лунке 20 %. Затем планшеты инкубировали в атмосфере 5 % CO₂ при температуре 37 °С в течение 60 мин.

Затем в каждую лунку планшетов добавляли метаболический краситель Presto BlueTM Cell Viability Reagent («Invitrogen», США), перемешивали раствор в каждой лунке при помощи многоканальной пипетки и инкубировали в атмосфере 5 % CO₂ при температуре 37 °С в течение 22 часов.

2.2.4 Детектирование полученных результатов изучения комплемент-зависимой цитотоксичности

Детектирование полученных результатов проводилась с использованием многофункционального микропланшетного ридера Infinite M200 («Tecan», Австрия) при длине волны возбуждения/испускания 560/590 нм.

На рисунке 4 показан пример фотографии 96-луночного планшета с результатами проведенного эксперимента по определению КЗЦ Образца 1 и СО активности.

Лунки, окрашенные в синий цвет, соответствуют концентрации ритуксимаба, при которой происходит гибель клеток. Лунки, окрашенные в розовый, отражают концентрацию ритуксимаба, при которой гибель клеток уже не происходит. По резкому изменению цвета в столбце 7 можно судить о концентрации ритуксимаба, соответствующей IC₅₀.

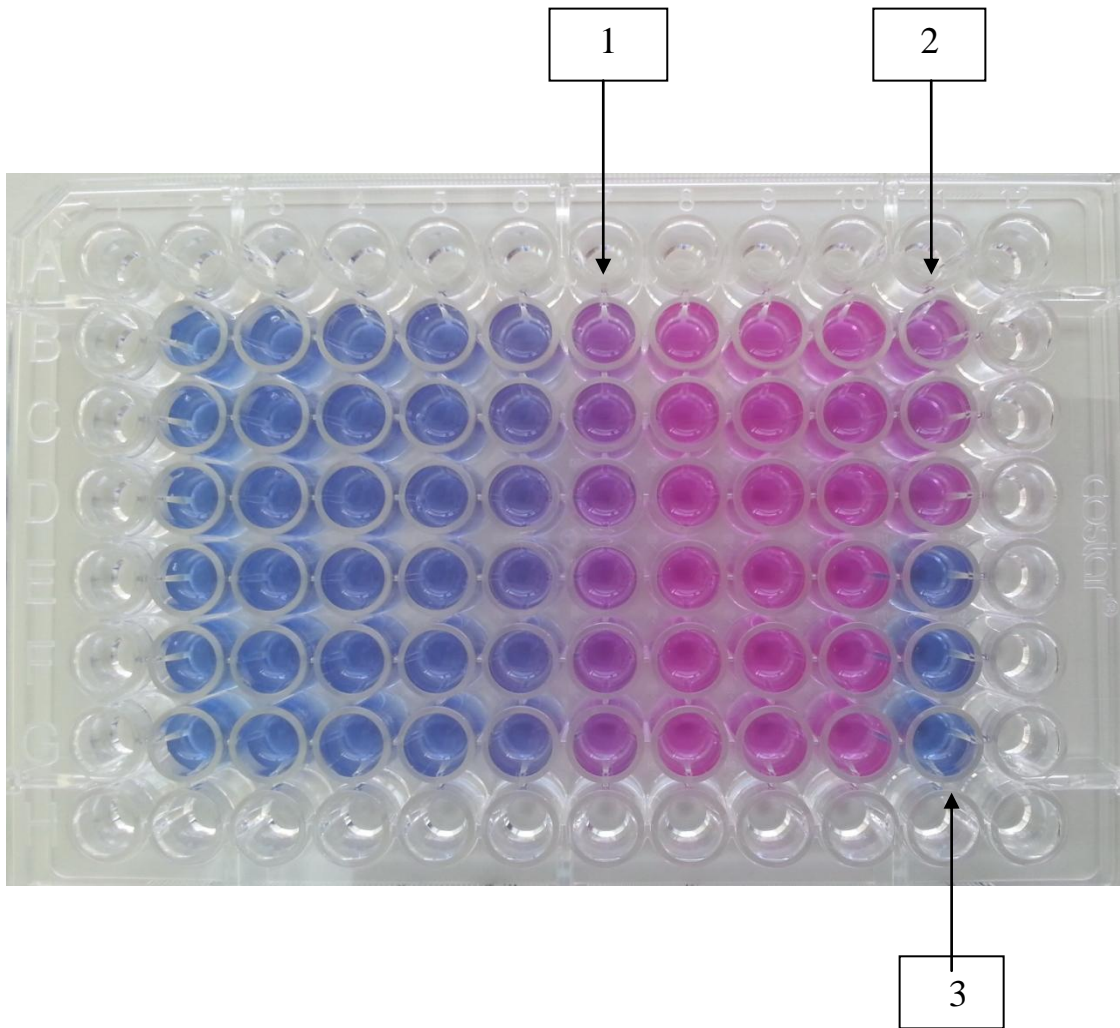


Рисунок 4 – Результат проведенного исследования КЗЦ для Образца 1 и СО активности. 1 – лунки, соответствующие IC_{50} ритуксимаба (столбец 7); 2 – лунки с контролем спонтанной цитотоксичности сывороточного компонента (столбец 11); 3 – лунки с контролем максимального лизиса клеток (столбец 11)

То есть на первом этапе оценки результатов исследования можно предварительно проконтролировать его успех при помощи визуального контроля максимального лизиса клеток (лунки 11Е, 11F и 11G, окрашенные в синий цвет), а также контроля спонтанной цитотоксичности сывороточного компонента (лунки 11В, 11С и 11D, окрашенные в розовый цвет, свидетельствующие о высокой метаболической активности клеток и, следовательно, отсутствии лизиса, на

основании чего можно сделать вывод о том, что компоненты комплемента активируются только в присутствии антител).

2.3 Статистическая обработка результатов

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

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

Изначально предполагалось, что совокупность имеет нормальное распределение, поскольку полученные данные всегда будут с высокой вероятностью колебаться вокруг среднего при объеме выборки более 30 на каждую исследуемую группу. Это связано с природой данных, т.к. при измерении интенсивности флуоресценции на одном приборе образцов вещества с одинаковой концентрацией даже с учетом внутри- и межсерийной вариабельности от эксперимента к эксперименту не будет большого разброса значений и они будут колебаться относительно близко неизвестных истинных величин. Тем не менее, была проведена проверка нормальности выборок с использованием критерия Шапиро-Уилка и графиков квантилей (Q-Q plots, Quantile-Quantile plots) для Образца 1 и СО (Приложение Б) и Образца 2 и СО (Приложение В). Гипотеза о нормальности анализируемых совокупностей не была отклонена.

Согласно рекомендациям Chow [57], общим подходом в исследованиях на биологических системах является сравнение агрегированных показателей, однако в силу большей вариабельности целесообразно также подтверждение сопоставимости вариабельности (дисперсий) данных биоаналога и ЛП сравнения. Поэтому было проведено сравнение средней интенсивности флуоресценции для Образца 1 и СО, а также Образца 2 и СО с использованием t-критерия (критерия

Стьюдента). За нулевую гипотезу (H_0) было принято отсутствие различий в интенсивности флуоресценции между группами (Образец 1 и СО, а также Образец 2 и СО). Альтернативная гипотеза (H_1) – существуют различия в интенсивности флуоресценции между группами. Различия считались статистически значимыми при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

Кроме того, был применен дисперсионный анализ и проведено сравнение соответственно дисперсии между группами с использованием F-критерия. За нулевую гипотезу (H_0) было принято отсутствие различий в дисперсиях между группами. Альтернативная гипотеза (H_1) – существуют различия в дисперсиях между группами. Различия считались статистически значимыми при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

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

Для оценки и интерпретации построенных доверительных интервалов существует несколько способов выбора границ признания биоаналогичности в биологических исследованиях [20], которые в настоящее время пока не одобрены в качестве регуляторных стандартов и носят рекомендательный характер. Одним из таких способов является использование интервала $\pm 20\%$, именно указанный диапазон в нашей работе был принят в качестве приемлемого для 90 % CI для отношения средних.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Принципы проведения доклинических исследований сопоставимости по специфической активности биологически аналогичных лекарственных препаратов моноклональных антител, заявленных к регистрации в России

Моноклональные антитела для медицинского применения представляют собой очень разнородную группу веществ, что связано со сложностью строения их молекулы. Каждое мАТ имеет уникальное строение антигенсвязывающего участка Fab- и участка Fc-, отвечающего за эффекторные функции и связывание с Fc-рецепторами. Биологическая активность мАТ обусловлена способностью связываться с антигеном, и может зависеть от иммунной эффекторной функции, например, АЗКЦ и КЗЦ. Именно благодаря неоднородности этой группы ЛП невозможно создать программу подтверждения сопоставимости по специфической активности биоаналогов, единую для всех мАТ. Однако некоторые методы подтверждения фармакодинамической активности применимы для мАТ, обладающих схожими свойствами.

Были рассмотрены методы подтверждения биоаналогичности по специфической активности следующих биоаналогов мАТ: ритуксимаба, адалимумаба, инфликсимаба, бевацизумаба и трастузумаба.

Заметим, что выбор мАТ для лечения определенного заболевания непосредственно зависит от механизма действия молекулы.

Например, ритуксимаб, связываясь с антигеном CD20 на В-лимфоцитах, индуцирует иммунологические реакции и вызывает их лизис. В связи с этим ритуксимаб применяется в онкологии, поскольку при лимфомах он избирательно действует на опухолевые В-клетки, несущие на своей поверхности CD20, и для лечения аутоиммунных заболеваний, при которых препарат подавляет поликлональный гуморальный ответ на собственные антигены за счет того же механизма [18, 24].

Поскольку ФНО α является важным иммунорегуляторным и провоспалительным цитокином и занимает центральное место в патогенезе

различных воспалительных и аутоиммунных заболеваний, адалимумаб и инфликсимаб, нейтрализуя функциональную активность ФНО α , применяются при таких аутоиммунных воспалительных заболеваниях как ревматоидный артрит, болезнь Крона и другие [49, 55].

Так как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) является главным медиатором ангиогенеза, связанного с опухолями, бевацизумаб, связываясь с VEGF, ингибирует его взаимодействие с рецепторами, приводя к уменьшению васкуляризации и роста опухоли, поэтому применяется препарат при различных видах опухолей [110, 119].

Трастузумаб, взаимодействуя с рецептором HER2, применяется для лечения рака молочной железы и рака желудка, поскольку экспрессия указанного рецептора наблюдается на клетках ряда злокачественных новообразований: раке желудка, молочной железы, кишечника, пищевода, мочевого пузыря [117].

Таким образом, основной механизм действия адалимумаба, инфликсимаба и бевацизумаба заключается в связывании и блокировании антигена. Ритуксимаб и трастузумаб в свою очередь при связывании с целевым антигеном запускают серию цитотоксических реакций, результатом которых является гибель клеток-мишеней. Таким образом, исследования, направленные на изучение этих свойств будут являться ключевыми при планировании программы исследований.

Стоит отметить, что при планировании сравнительных доклинических фармакодинамических исследований, как одного из базовых показателей биоаналогичности, необходимо учитывать, что результаты изучения специфической активности *in vitro* могут быть получены в том числе на этапе сравнительного изучения качества, поскольку на этапе изучения качества часто прибегают к испытаниям с использованием биологических систем, что практически стирает границу между фармацевтическим и доклиническим этапами разработки биоаналога. В любом случае, при планировании сравнительных исследований необходимо охарактеризовать структуру МАТ с точки зрения его механизма действия и биологической активности (т.е. специфической способности препарата оказывать определенный биологический эффект), а также

проанализировать механизм действия и значение эффекторных функций препарата для выявления различий между биоаналогом и ЛП сравнения.

Биологическая активность представляет собой способность ЛП, определяемую с помощью соответствующих лабораторных испытаний или адекватно контролируемых клинических данных, полученных при введении ЛП предлагаемым способом, давать определенный результат [65]. На этапе изучения качества биоаналога разработчик устанавливает его физико-химические свойства, данные которых о сложных молекулах достаточно обширны, тем не менее, часто такие данные не позволяют подтвердить структуру более высокого порядка, однако о ней можно судить по биологической активности, которая косвенно характеризует структуру биологической молекулы [27]. Применяемые методы определения специфической активности должны отражать механизм действия препарата, то есть значимую терапевтическую активность или целевое биологическое действие [65].

Отметим, что замена биологической методики количественного определения, измеряющей биологическую активность, на физико-химические исследования допускается только в случае, если имеется хорошо документированная история производства и с помощью таких физико-химических методов можно получить достаточно подробные сведения о препарате, включая информацию о структуре высокого порядка при условии подтверждения соответствующей корреляции с биологической активностью [27].

При проведении исследований биоаналогичности природа и сложность строения оригинального ЛП влияют на объем доклинических или клинических исследований. Различия, обнаруженные на этапе физико-химических и биологических испытаний, задают направление планированию таких исследований. К другим факторам, требующим учета, относятся механизм действия по всем зарегистрированным показаниям к применению ЛП сравнения и патогенетические механизмы заболеваний, утвержденных в качестве показаний к применению, а также иммуногенность оригинального ЛП [27].

На первом этапе исследования для проведения анализа с целью установления методов подтверждения биологической аналогичности на этапе сравнительного доклинического фармакодинамического изучения аналогичных биологических ЛП мАТ, заявленных к регистрации в России, были использованы данные регистрационных досье биоаналогов ритуксимаба, адалимумаба, инфликсимаба, бевацизумаба, трастузумаба из информационной системы «Документооборот» ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

В таблице 3 представлено число проведенных сравнительных исследований специфической активности биоаналогов в рамках нашего анализа. При подсчете исследований не учитывались количество повторов и серий исследуемого ЛП и ЛП сравнения. Исследования на разных клеточных линиях с разными методами детектирования результатов считались разными исследованиями. Для ритуксимаба, инфликсимаба и бевацизумаба было рассмотрено 4 биоаналога, для адалимумаба и трастузумаба – 5.

Таблица 3 – Число проведенных сравнительных исследований специфической активности биоаналогов ритуксимаба, адалимумаба, инфликсимаба, бевацизумаба и трастузумаба

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

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

- Во-первых, не каждый разработчик провел необходимый объем исследований и полностью сравнил каждый участок молекулы мАТ и ЛП

сравнения и вследствие были запрошены дополнительные материалы к представленному досье.

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

- В-третьих, понимание разработчиком целесообразности проведения большего числа исследований биологической активности, так как, чем убедительнее подтверждено сходство между биоаналогом и ЛП сравнения на начальных этапах подтверждения биоаналогичности, тем больше вероятность ненахождения различий на этапе клинических исследований [27].

В таблице 4 представлены установленные возможные методы подтверждения биоаналогичности ЛП мАТ (ритуксимаба, адалимумаба, бевацизумаба, инфликсимаба, трастузумаба) на этапе сравнительного доклинического фармакодинамического изучения, а также количество проведенных сравнительных исследований специфической активности биоаналогов мАТ по результатам анализа 22 регистрационных досье.

Таблица 4 – Методы подтверждения биоаналогичности по специфической активности биоаналогов моноклональных антител

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

Методы	Все		Ритуксимаб		Адалимумаб		Инфликсимаб		Бевацизумаб		Трастузумаб	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Нейтрализация индуцированной ФНО α секреции цитокинов	6	2,8	-	-	6	8,8	-	-	-	-	-	-
<i>In vivo</i>												
Определение истощения пула В-клеток на яванских макаках	3	1,4	3	7,9	-	-	-	-	-	-	-	-
Оценка купирования симптомов заболевания на модели полиартрита у трансгенных мышей	4	1,9	-	-	2	2,9	2	3,7	-	-	-	-
Оценка роста опухоли на ксенотрансплантатных мышечных моделях	12	5,7	3	7,9	-	-	-	-	4	14,8	5	20,0

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

Изучение Fab-ассоциированных функций

При подтверждении биоаналогичности на этапе фармакодинамического изучения, сравнение, как правило, начинают с изучения связывания с соответствующим антигеном-мишенью, что позволяет охарактеризовать Fab-фрагмент антитела, поскольку именно от способности связываться с целевой мишенью и зависит эффективность многих мАТ. Для ритуксимаба – это связывание с CD20 на В-лимфоцитах, для адалимумаба и инфликсимаба – связывание с ФНО α , для бевацизумаба – с VEGF, для трастузумаба – с HER2. Исследования проводятся на соответствующих клеточных моделях, экспрессирующих искомым антиген. Аффинность связывания с антигеном возможно изучить с помощью стандартных методов, таких как ИФА, поверхностный плазмонный резонанс, проточная цитометрия и другие.

Для некоторых мАТ (например, ритуксимаб, адалимумаб, инфликсимаб) целесообразно изучать способность к апоптозу на соответствующих клеточных линиях с детектированием полученных результатов, например, с использованием проточного цитофлуориметра. Данное исследование показывает способность указанных мАТ вызывать гибель соответствующих клеток-мишеней.

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

Для адалимумаба и инфликсимаба следует изучать способность к ингибированию апоптоза, индуцированного человеческим ФНО α , на соответствующих культурах клеток, что связано со способностью этих мАТ связываться с ФНО α и подавлять гибель клеток, активированную ФНО α , на клеточных линиях, чувствительных к нему. Кроме того, для адалимумаба возможно изучение нейтрализации секреции цитокинов, индуцированной ФНО α , что характеризует способность адалимумаба ингибировать секрецию цитокинов, индуцированную ФНО α , за счет связывания с последним.

Изучение Fc-ассоциированных функций

Для изучения свойств мАТ, ассоциированных с Fc-фрагментом, целесообразно изучить связывание с репрезентативными изоформами Fc-рецепторов, таких как Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII и FcRn. Эти исследования следует проводить для всех рассмотренных нами мАТ. Связывающую способность оценивают, как и в случае связывания с антигеном-мишенью, с помощью ИФА, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии и других методов. Отметим, что не все мАТ способны к связыванию со всеми изоформами Fc-рецепторов, поскольку Fc γ -рецепторы отличаются сродством к антителам и также каждое антитело обладает уникальным сродством к каждому из Fc γ -рецепторов [108].

Изучение Fc-Fab-ассоциированных функций

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

Многие мАТ обладают способностью проявлять АЗКЦ и КЗЦ. Эти функции реализуются в результате взаимодействия с участием Fc домена мАТ, и,

следовательно, могут варьировать в зависимости от изотипа мАТ и модификации Fc-фрагмента, такой как изменения в гликозилировании. То есть, мАТ, соответствующие одной и той же мишени, не следует рассматривать в качестве эквивалентов в их способности стимулировать иммуноопосредованные эффекторные функции, такие как КЗЦ и АЗКЦ [133]. Кроме того, например, бевацизумаб не проявляет активности ни в отношении АЗКЦ, ни КЗЦ, поскольку Fab-фрагмент бевацизумаба не связывается с мишенью, фиксированной на клетке. Трастузумаб же не оказывает КЗЦ из-за присутствия регуляторных белков, таких как CD35, CD46 или CD55 [125]. Однако рекомендуется изучать сравнительные АЗКЦ и КЗЦ биоаналога и ЛП сравнения даже при отсутствии активности, поскольку целью проводимых исследований является не изучение активности как таковой, а выявление различий в свойствах сравниваемых ЛП. При постановке методов АЗКЦ и КЗЦ в качестве клеток-мишеней используют репрезентативные клеточные линии, экспрессирующие соответствующий антиген, с которым связывается мАТ. В качестве эффекторных клеток в методе АЗКЦ возможно использовать мононуклеарные клетки периферической крови человека, либо естественные клетки-киллеры здоровых добровольцев, либо клеточные линии, экспрессирующие Fc γ RIIIa, либо другие аналогичные.

Стоит отметить, что несмотря на то, что такие методы определения активности как метод связывания, т.е. метод определения активности, измеряющий связывание с мишенью, и клеточный, т.е. метод, позволяющий измерить эффекторные функции, зачастую дают сопоставимые результаты, такие методы не следует считать взаимозаменяемыми, поскольку некоторые свойства препарата могут не влиять на связывание с мишенью (например, гликозилирование, фрагментация), но влиять на дальнейшее распространение сигнала или экспрессию рецептора, поэтому при определении специфической активности следует использовать методы количественного определения, основанные на различных взаимодополняющих принципах. В зависимости от биологических свойств препарата допускается использовать различные способы количественного определения (например, количественное определение

связывания с лигандом или рецептором, функциональные методы и методы на основе клеток, а также ферментные методы), принимая во внимание их ограничения. Кроме того, в целях преодоления ограничений, обусловленных валидационными характеристиками отдельных количественных биологических методов, рекомендуется придерживаться ортогональных (взаимодополняющих) подходов.

Один метод не позволяет в достаточной степени определить биологическую активность, например, в следующих случаях: если ЛП обладает сложным и (или) полностью не охарактеризованным механизмом действия; ЛП содержит несколько активных ингредиентов и (или) обладает множественной биологической активностью; в случае ограниченной стабильности препарата; если биологический метод является неколичественным, недостаточно устойчив или имеет низкую прецизионность (высокую вариабельность) [65].

Поэтому, если применимо, при проведении сравнительных исследований необходимо использовать различные методы для оценки связи и активации рецепторов, то есть применять комбинацию методов: с целью измерения специфичности и для определения сравнительной эффекторной функции. Также в ходе исследований следует подтвердить, что количественные биологические методы чувствительны, специфичны и обладают достаточной дискриминантной способностью. Все эти исследования должны охватывать весь спектр фармакологических аспектов, известных своей клинической значимостью для всего класса МАТ и соответствующего ЛП сравнения [27].

В исследованиях биологической активности следует сравнивать зависимость «концентрация–активность (связывание)» биоаналога и ЛП сравнения с фармакологической мишенью, охватив диапазон концентраций, с наибольшей чувствительностью выявляющий потенциальные различия между ними [27].

Отметим, что представленные выше методы могут быть недостаточны для подтверждения сопоставимости биоаналога и ЛП сравнения. На каждом этапе проведения сравнительных исследований (сравнительное изучение качества,

сравнительные доклинические и клинические исследования) необходимо оценивать клиническую значимость обнаруженных различий между биоаналогом и ЛП сравнения (поскольку полного сходства во всех показателях не ожидается) и влияние обнаруженных различий на безопасность и эффективность биоаналога и соответственно объем необходимых дальнейших исследований.

Для оценки биологической активности с целью оценки клинической значимости различий между биоаналогом и ЛП сравнения используют модели *in vitro*. Использование клеточных линий и (или) первичных культур клеток может быть полезным для изучения прямого действия на клеточный фенотип и пролиферацию. Клеточные линии, полученные из клеток млекопитающих, *in vitro* могут способствовать определению активности *in vivo*. Такие исследования проводят, например, для определения связывания с рецептором, аффинности связи с рецептором и (или) фармакологических эффектов, а также играют вспомогательную роль для определения необходимых видов животных для дальнейших фармакодинамических исследований *in vivo*. Исследования *in vitro* и *in vivo* в совокупности вносят вклад в экстраполяцию полученных результатов на человека [38].

На этапе изучения качества необходимо уделять должное внимание оценке степени гликозилирования (например, относительных количеств гликановых структур Fc-фрагментов, степеней гликозилирования, фукозилирования и сиалилирования), принимая во внимание потенциальное влияние этого показателя на биологическую активность мАТ (например, гликозилирование Fab-фрагмента). Моноклональные антитела, как правило, имеют один участок N-гликозилирования на каждой тяжелой цепи, расположенный в Fc-фрагменте. Легкая цепь, как правило, не гликозилируется. Однако тяжелые цепи могут содержать дополнительные участки гликозилирования, поэтому необходимо установить их наличие или отсутствие.

Одним из примеров влияния степени гликозилирования на биологическую активность является опыт Европейской комиссии в регистрации первого биоаналога в ЕС – Ремзимы/Инфлектры. В рамках исследований сопоставимости

было показано, что все основные физико-химические характеристики и биологическая активность Ремзимы/Инфлектры были сопоставимы с оригинальным ЛП Ремикейд, выступающим в качестве препарата сравнения. Однако, была отмечена небольшая разница в размере афукозилирования биоаналогичного инфликсимаба, что привело к более низкому сродству к Fc-рецепторам и соответственно более низкой АЗКЦ, являющимся наиболее чувствительным анализом. Эта разница, однако, не была клинически значимой, так как она не оказала влияния на активность Ремзимы/Инфлектры в экспериментальных моделях, рассмотренных как наиболее чувствительные для патофизиологических состояний пациентов [97].

Кроме того, такие различия в родственных соединениях, как профиль гликозилирования и варианты заряженности, могут оказать влияние на иммуногенный потенциал или потенциал вызывать гиперчувствительность, которые с помощью исследований на животных сложно спрогнозировать, поэтому в таких случаях они требуют дальнейшего изучения в клинических исследованиях [89].

Таким образом, различия в профилях примесей и между родственными соединениями могут влиять на объем доклинических и клинических исследований, которые потребуются для удовлетворительного обоснования сопоставимости по эффективности и безопасности биоаналога и ЛП сравнения.

Отметим, что данные об эффективности, полученные по результатам контролируемых клинических исследований, могут служить свидетельством того, что препарат обладает биологической активностью и, таким образом, активен. Вместе с тем, использование клинических данных может не быть практичным методом количественного определения активности в целях выпуска серии (например, клинические данные перед выпуском отдельных серий препарата могут отсутствовать, клинические данные могут быть не соотнесены с отдельными сериями) [65].

Качество биоаналогичного ЛП является фундаментальным элементом исследований сопоставимости с ЛП сравнения, однако вопросы качества всегда

следует рассматривать с позиций эффективности и безопасности. Полного соответствия показателей качества биоаналога качеству ЛП сравнения не ожидается. Считается допустимым, например, наличие незначительных структурных различий в фармацевтической субстанции – вариация посттрансляционных модификаций, однако, подобные различия всегда необходимо обосновать. Аналогично, различия между профилями примесей следует обосновать и рассмотреть в каждом отдельно взятом случае и в сравнительных исследованиях показать влияние параметров качества на эффективность и безопасность [38].

Некоторые мАТ могут опосредовать эффекты, которые с помощью исследований *in vitro* полностью выявить невозможно, что влечет за собой необходимость проведения исследований *in vivo*. Если биоаналог производится с использованием другой экспрессионной конструкции клеток или существенно отличается в разработке от оригинального препарата, дополнительные исследования *in vivo* на животных также могут быть необходимы.

При планировании программы исследований *in vivo*, ввиду видоспецифичности мАТ, необходимо выбрать подходящие виды животных.

Релевантным видом животных является тот, при проведении исследования на котором изучаемый материал проявляет фармакологическую активность за счет взаимодействия препарата с эпитопом. При изучении мАТ релевантными видами животных являются виды, экспрессирующие искомый эпитоп. Для определения подходящих видов животных используют ряд методов (например, иммунохимические или функциональные тесты) [27, 38].

В большинстве случаев подходящими для изучения специфической активности *in vivo* моделями животных для мАТ являются нечеловекообразные приматы, однако всегда необходимо принимать во внимание ограничения исследования *in vivo* (например, чувствительность и вариацию). В случае отсутствия подходящей модели животных *in vivo* возможно начать исследования у человека, принимая во внимание принципы по снижению потенциальных рисков [89].

Однако, в последние годы наметился значительный прогресс в разработке моделей животных, которые считаются эквивалентами заболеваниям человека, включающие спонтанные и индуцированные модели заболеваний, нокаут гена(ов) и трансгенные животные, такие как, например, бестимусные мыши, либо мыши с тяжелым комбинированным иммунодефицитом. Эти модели позволяют определить не только фармакологическое действие ЛП, фармакокинетику и подбор дозы, но и изучить безопасность (например, оценить нежелательное стимулирование прогрессирования заболевания) [38].

При планировании изучения фармакодинамической активности биоаналога на животных следует максимизировать получаемые данные, а также иметь в виду, что в зависимости от необходимых конечных точек, умерщвление животных в конце исследования может и не потребоваться [89].

Для всех из изученных в нашей работе мАТ возможно изучение специфической активности *in vivo* на соответствующих моделях животных.

Для ритуксимаба – это изучение истощения пула В-клеток на яванских макаках, что характеризует способность ритуксимаба к лизису В-клеток, несущих CD20-антиген; а также оценка роста опухоли у мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом, являющихся носителями ксенотрансплантатов опухоли человека, показывающее способность ритуксимаба лизировать опухолевые клетки, экспрессирующие антиген CD20.

Для бевацизумаба и трастузумаба – это также оценка роста опухоли на ксенотрансплантатных мышинных моделях, характеризующий способность бевацизумаба угнетать рост опухолей, экспрессирующих антиген VEGF, а также способность трастузумаба ингибировать рост опухолевых клеток, экспрессирующих HER2.

Для адалимумаба и инфликсимаба, применяемых для лечения ревматоидного артрита – это оценка купирования симптомов заболевания на модели полиартрита у трансгенных мышей, что характеризует способность этих мАТ купировать симптомы артрита вследствие нейтрализации функций ФНО α в отношении прогрессирования этого воспалительного заболевания.

Таким образом, не смотря на различия в механизме действия мАТ, некоторые методы оценки специфической активности являются общими для всех, но с учетом особенностей строения. Поэтому для составления программы изучения подтверждения сопоставимости по специфической активности биоаналогов необходим индивидуальный подход к каждому мАТ, принимая во внимание то, что объем сравнительных исследований определяется всякий раз индивидуально для каждого биоаналога, поскольку полученные результаты следует рассматривать с позиций потенциального влияния на безопасность и эффективность биоаналога. Кроме того, для крупных молекул, таких как мАТ, может потребоваться сравнительно большое количество методов изучения специфической активности, особенно в случае выявления различий, обладающих потенциальной клинической значимостью. Также с учетом того, что биологическая активность определяется показателями качества препарата, достаточность испытаний оценивается в индивидуальном порядке [65]. Следовательно, в каждом случае необходимо обосновывать выбор программы исследований и адекватность используемых методов.

Заявители нередко сталкиваются с проблемами, связанными с формированием регистрационного досье, в частности раздела «Доклинические исследования». Рассмотрим наиболее частые причины отказов и необходимости доработки регистрационных досье на биоаналоги мАТ, представленных на экспертизу отношения ожидаемой пользы к возможному риску применения ЛП с целью определения возможности проведения клинического исследования ЛП либо его государственной регистрации в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России по заданию Минздрава России.

Среди наиболее часто встречающихся недостатков раздела «Доклинические исследования» регистрационного досье можно отметить:

- отсутствие обоснования доклинической программы разработки биоаналога, например, сведений об изучении сравнительной специфической активности или иммуногенности; либо, например, описание проведенных исследований (либо отчетов об исследованиях) без пояснения целесообразности и

необходимости их проведения в случае разработки конкретного биоаналога при отсутствии оценки клинической значимости полученных различий и возможного влияния таких различий на безопасность и эффективность биоаналога;

- отсутствие подробного описания проведенных методов изучения, а предоставление лишь кратких результатов, как, например, указание на то, что ЛП сопоставимы без подтверждающих статистических расчетов и анализа исследования;

- недостаточность программы разработки биоаналога, отсутствие результатов ряда необходимых исследований для оценки сопоставимости, например, по специфической активности (в случае мАТ – отсутствие одного или нескольких исследований, необходимых для всесторонней оценки биологической активности, как то отсутствие исследований связывания с антигеном-мишенью, либо исследований связывания с Fc-рецепторами и комплементом, либо отсутствие оценки Fab- или Fc-ассоциированных функций), а также отсутствие исследований *in vivo* при необходимости и возможности их проведения.

- отсутствие информации о том, каким образом разрабатывается препарат – как оригинальный или как биоаналог.

Таким образом, при разработке биоаналога необходимо иметь четкое представление о программе необходимых исследований. Кроме того, важным аспектом является соблюдение этапности сравнительных исследований, а также статистическая обработка полученных результатов на каждом этапе разработки биоаналога и обоснование выбора границ признания биоаналогичности.

Недостаточность данных при формировании регистрационных досье на биоаналоги мАТ (в частности, недостаточное количество проведенных исследований, отсутствие статистической обработки результатов таких исследований) обуславливает необходимость анализа конкретных методов определения специфической активности биоаналогов мАТ, разработки программы изучения сравнительной специфической активности биоаналогов мАТ на примере ритуксимаба и постановки метода КЗЦ как одного из основных методов подтверждения активности Fc-фрагмента мАТ.

Далее подробно рассмотрим возможные методы подтверждения сопоставимости по специфической активности для каждого мАТ.

3.1.1 Подтверждение биоаналогичности по специфической активности биоаналогов ритуксимаба

Механизмом действия ритуксимаба является специфичное связывание с трансмембранным антигеном CD20 на В-лимфоцитах и инициирование иммунологических реакций, опосредующих лизис В-клеток [16, 140]. Ритуксимаб применяется при неходжкинской лимфоме и хроническом лимфолейкозе, при ревматоидном артрите, гранулематозе с полиангиитом и микроскопическом полиангиите. Оригинальным ЛП ритуксимаба является препарат Мабтера, раствор для подкожного введения, 1400 мг/11.7 мл (держатель РУ – Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд., Германия); концентрат для приготовления раствора для инфузий, 100 мг/10 мл, 500 мг/50 мл (держатель РУ – Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд., Швейцария).

По результатам анализа регистрационных досье установлены следующие методы подтверждения биоаналогичности ритуксимаба по специфической активности.

Возможными методами определения сопоставимости *in vitro* являются:

1. Определение аффинности связывания с антигеном CD20 с помощью, например, ИФА, клеточного (конкурентного, каскадного) ИФА, поверхностного плазмонного резонанса, либо проточной цитометрии на В-клеточных линиях Wil2-S или Ramos (клеточных линиях человеческих лимфобластоидных клеток, экспрессирующих CD20-антиген) – характеризует способность Fab-фрагмента ритуксимаба связываться с антигеном-мишенью на клеточных линиях, экспрессирующих этот антиген.
2. Определение индукции апоптоза на клетках человеческой В-клеточной лимфомы (линия Raji), экспрессирующих CD20-антиген, или клеточной линии Ramos с использованием проточного цитофлуориметра –

характеризует способность ритуксимаба оказывать влияние на гибель клеток, несущих соответствующий антиген-мишень.

3. Определение связывания с Fc-рецепторами (FcγRI, FcγRII и FcγRIII, FcRn) с помощью, например, поверхностного плазмонного резонанса – характеризует способность Fc-фрагмента связываться с соответствующими рецепторами.
4. Определение связывания с субкомпонентом комплемента C1q с помощью, например, ИФА – характеризует свойство Fc-фрагмента ритуксимаба в отношении связывания с компонентом комплемента C1.
5. Определение АЗКЦ – на В-клеточных линиях Raji либо Ramos в качестве клеток-мишеней и мононуклеарных клетках периферической крови человека или естественных клетках-киллерах человека (NK-клеток) здоровых добровольцев в качестве эффекторных клеток – показывает способность ритуксимаба к реализации иммунной эффекторной функции, а именно оказывать клеточно-опосредованную цитотоксичность в отношении соответствующих клеток-мишеней.
6. Определение КЗЦ на клеточных линиях лимфоидных В-клеток человека Wil2-S или Ramos – показывает способность ритуксимаба к лизису клеток-мишеней, вызванному каскадом реакций системы комплемента.

Поскольку для ритуксимаба существует релевантная модель животных, необходимо проведение исследований специфической активности *in vivo*. Возможные методы подтверждения сопоставимости *in vivo* для ритуксимаба являются:

1. Определение истощения пула В-клеток (влияние на развитие зародышевых центров в брыжеечных лимфатических узлах и селезенке у яванских макаков) – характеризует способность ритуксимаба к лизису В-клеток, несущих CD20-антиген.
2. Оценка роста опухоли у мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом на моделях ксенотрансплантата таких клеточных линий как, например, Raji, Ramos, а также на модели ксенотрансплантата

диффузной В-крупноклеточной лимфомы WSU-DLCL2 – показывает способность ритуксимаба к снижению роста опухолевых клеток, экспрессирующих антиген CD20.

3.1.2 Подтверждение биоаналогичности по специфической активности биоаналогов адалимумаба

Механизм действия адалимумаба заключается в селективном связывании с ФНО α и нейтрализации его биологических функций за счет блокады взаимодействия с поверхностными клеточными p55 и p75 рецепторами к ФНО α [43, 136]. ФНО α – это естественный цитокин, который принимает участие в регуляции нормального воспалительного процесса и иммунного ответа. Адалимумаб применяется для лечения ревматоидного артрита, псориатического артрита, анкилозирующего спондилита, болезни Крона, хронического бляшечного псориаза, ювенильного идиопатического артрита. Оригинальный ЛП адалимумаба – Хумира, раствор для подкожного введения, 40 мг/0.8 мл (держатель РУ – ООО «ЭббВи», Россия).

Для адалимумаба возможны следующие методы подтверждения биоаналогичности по специфической активности *in vitro*:

1. Определение связывания с ФНО α , в том числе трансмембранным, человека и обезьян-циномольгусов, например, на линии клеток мышинной лимфомы (EL-4), стабильно экспрессирующих трансмембранный ФНО α (ФНО α /EL-4), а также с ФНО β человека с помощью, например, поверхностного плазмонного резонанса либо метода проточной цитометрии, а также технологии, основанной на AR2G-биосенсорах (Amine Reactive Second-Generation – аминный реактив второго поколения). При исследовании связывания с ФНО β связывание не обнаруживается.

Кроме того, возможна оценка связывания с ФНО α на клетках HEK293 (Human Embryonic Kidney – человеческих эмбриональных клеток почек), стабильно трансфицированных геном-репортером люциферазы NF-kB

(Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells – ядерного фактора «каппа-би») с последующей оценкой подавления продукции люциферазы адалимумабом с помощью хемилюминисцентного анализа.

Указанный метод характеризует способность адалимумаба связываться с соответствующим антигеном-мишенью – ФНО α , при этом связывания с ФНО β , соответственно, не обнаруживается.

2. Определение индукции апоптоза на линии клеток лейкемических Т-лимфоцитов человека (Jurkat) либо клеток ФНО α /EL-4 с помощью метода проточной цитометрии – показывает способность адалимумаба вызывать гибель соответствующих клеток-мишеней.
3. Оценка ингибирования индуцированного человеческим ФНО α апоптоза на клеточных линиях, чувствительных к ФНО α , в том числе, например, на культуре клеток фибросаркомы мыши (WENI-13VAR), на клетках линии лимфомы человека (U-937); а также сенсibilизированных актиномицином D клетках фибросаркомы мыши (L929) с последующим определением жизнеспособности клеток – характеризует способность адалимумаба подавлять гибель клеток, активированную ФНО α , на клеточных линиях, чувствительных к нему.
4. Оценка нейтрализации индуцированной человеческим ФНО α секреции ИЛ-8 (интерлейкина-8) в эндотелиальных клетках пупочной вены человека, макрофагального воспалительного белка-1 β (Macrophage Inflammatory Protein-1 β – MIP-1 β) и моноцитарного хемотаксического белка-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1 – MCP-1)) в цельной крови человека, а также оценка нейтрализации индуцированной ФНО α обезьян-циномольгусов MIP-1 β и MCP-1 в цельной крови обезьян-циномольгусов. При оценке влияния на индуцированную ФНО β секрецию ИЛ-8 действие не обнаруживается.

Представленный метод характеризует способность адалимумаба ингибировать секрецию цитокинов, индуцированную ФНО α , за счет связывания с ним.

5. Определение связывания с FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa, FcγRIIIb, FcγRn с помощью, например, поверхностного плазмонного резонанса, либо ИФА – характеризует способность Fc-фрагмента адалимумаба связываться с указанными рецепторами.
6. Оценка связывания с субкомпонентом комплемента C1q с помощью, например, ИФА, а также технологии, основанной на AR2G-биосенсорах – показывает способность Fc-фрагмента адалимумаба связываться с компонентом комплемента C1.
7. Определение АЗКЦ на экспрессирующих ФНО α клетках CHO (Chinese Hamster Ovary – клеток яичников китайских хомячков) в качестве клеток-мишеней и клеточной линии естественных киллеров человека (NK92-M1), стабильно трансфицированной человеческим CD16, экспрессирующей FcγRIIIa, в качестве эффекторных клеток, либо на клетках ФНО α/EL4 в качестве клеток-мишеней и NK-клетках в качестве эффекторных клеток. Также оценка АЗКЦ возможна на клетках Jurkat, экспрессирующих ФНО α, либо линии миеломных клеток мыши (NS0) в качестве клеток-мишеней и клетках Jurkat, экспрессирующих FcγRIIIa и содержащих ген-репортер люциферазы NFAT (Nuclear factor of activated T-cells – ядерного фактора активированных Т-клеток) в качестве эффекторных клеток с последующей оценкой дозозависимой выработки люциферазы с помощью хемилюминисцентного анализа.

Представленный метод показывает способность адалимумаба проявлять антитело-зависимую цитотоксичность, опосредованную клетками, в отношении соответствующих клеток-мишеней.

7. Оценка КЗЦ на экспрессирующих ФНО α линиях клеток CHO, либо клеток Jurkat, либо клеток NS0, либо клеток ФНО α/EL4 – характеризует способность адалимумаба к цитотоксичности в отношении клеток-мишеней, обусловленной активацией реакций системы комплемента.

Специфическую активность *in vivo* можно подтвердить в следующем эксперименте:

1. Оценка купирования симптомов заболевания на модели полиартрита, моделирующего ревматоидный артрит человека у трансгенных мышей линии Tg197, продуцирующих человеческий ФНО α (huTNF-Tg197) – характеризует способность адалимумаба купировать симптомы артрита вследствие нейтрализации функций ФНО α в отношении прогрессирования этого воспалительного заболевания.

3.1.3 Подтверждение биоаналогичности по специфической активности биоаналогов инфликсимаба

Механизм действия инфликсимаба заключается в связывании с высоким сродством с растворимой и трансмембранной формами ФНО α и ингибировании его функциональной активности [34, 134]. Инфликсимаб применяется при ревматоидном артрите, болезни Крона у взрослых и детей, язвенном колите у взрослых и детей, анкилозирующем спондилите, псориатическом артрите и псориазе. В качестве препарата сравнения при разработке биоаналога необходимо использовать оригинальный препарат Ремикейд, лиофилизат для приготовления раствора для инфузий, 100 мг (держатель РУ – ООО «МСД Фармасьютикалс», Россия).

Методами определения сопоставимости по специфической активности инфликсимаба *in vitro* являются:

1. Определение связывания растворимого ФНО α человека в мономерной и тримерной формах с помощью, например, ИФА либо поверхностного плазмонного резонанса. А также оценка связывания с трансмембранной формой ФНО α , в том числе на поверхности клеток NSO с помощью, например, ИФА, а также проточной цитометрии – характеризует способность инфликсимаба связываться с соответствующим антигеном-мишенью – ФНО α .

2. Оценка отсутствия связывания с ФНО β , а также ФНО α мыши, кролика, собаки, свиньи или макак-резус с помощью, например, поверхностного плазмонного резонанса – характеризует видоспецифичность инфликсимаба в отношении связывания с антигеном-мишенью и показывает способность связываться только с ФНО α человека.
3. Определение индукции апоптоза на линии клеток Jurkat с помощью, например, проточной цитометрии – показывает способность инфликсимаба вызывать гибель соответствующих клеток-мишеней.
4. Оценка ингибирования индуцированного человеческим ФНО α апоптоза на культуре клеток WENI-13VAR или U-937, а также на клеточной линии фибросаркомы мыши (WENI-164) с последующим определением жизнеспособности клеток – характеризует способность инфликсимаба подавлять гибель клеток, активированную ФНО α , на клеточных линиях, чувствительных к нему.
5. Определение аффинности связывания с Fc-рецепторами (Fc γ RIa, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIIa, Fc γ RIIIb и FcRn) с помощью, например, поверхностного плазмонного резонанса – характеризует способность Fc-фрагмента инфликсимаба связываться с указанными рецепторами.
6. Определение связывания с субкомпонентом комплемента C1q человека с помощью, например, ИФА – показывает способность Fc-фрагмента инфликсимаба связываться с компонентом комплемента C1.
7. Определение АЗКЦ на культуре экспрессирующих ФНО α клеток CHO, либо Jurkat в качестве клеток-мишеней и периферических мононуклеарных клетках крови (Peripheral Blood Mononuclear Cell – PBMC) человека в качестве эффекторных клеток.
Также оценка АЗКЦ возможна на клетках NSO, экспрессирующих ФНО α , в качестве клеток-мишеней и клетках Jurkat, экспрессирующих Fc γ RIIIa и содержащих ген-репортер люциферазы NFAT в качестве эффекторных клеток с последующей оценкой дозозависимой выработки люциферазы с помощью хемилюминисцентного анализа.

Представленный метод показывает способность инфликсимаба оказывать клеточно-опосредованную цитотоксичность в отношении клеток-мишеней, экспрессирующих ФНО α .

8. Оценка КЗЦ на экспрессирующих ФНО α культурах клеток CHO или NSO – показывает способность инфликсимаба к лизису клеток-мишеней, вызванному каскадом реакций системы комплемента.

Специфическую активности инфликсимаба *in vivo* следует подтвердить в следующем эксперименте:

1. Оценка купирования симптомов заболевания на модели полиартрита, моделирующего ревматоидный артрит человека у трансгенных мышей линии Tg197, продуцирующих человеческий ФНО α (huTNF-Tg197) – характеризует способность инфликсимаба купировать симптомы артрита вследствие нейтрализации функций ФНО α в отношении прогрессирования этого воспалительного заболевания.

3.1.4 Подтверждение биоаналогичности по специфической активности биоаналогов бевацизумаба

Бевацизумаб селективно связывается с биологически активным VEGF и ингибирует его связывание с рецепторами 1 и 2 типа на поверхности эндотелиальных клеток, что приводит к снижению васкуляризации и угнетению роста опухоли [1, 142]. Применяется препарат для лечения колоректального рака, рака молочной железы, рака легкого, почечно-клеточного рака, глиобластомы, рака яичника, маточной трубы и рака брюшины. Лекарственным препаратом сравнения при проведении исследований сопоставимости является препарат Авастин, концентрат для приготовления раствора для инфузий, 100 мг/4 мл, 400 мг/16 мл (держатель РУ – Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд., Швейцария).

Оценку специфической активности бевацизумаба возможно проводить как методами *in vitro*, так и методами *in vivo*. Некоторые из них представлены ниже.

Методы оценки специфической активности бевацизумаба *in vitro*:

1. Определение связывающей способности с изоформами rHuVEGF (recombinant Human Vascular Endothelial Growth Factor – рекомбинантный человеческий фактор роста эндотелия сосудов) – rHuVEGF-121 и rHuVEGF-165 с помощью, например, поверхностного плазмонного резонанса, либо ИФА.

Также возможно определение связывающей способности с VEGF на клеточной линии аденокарциномы яичника человека (SKOV-3), экспрессирующей VEGF, например, с помощью ИФА.

Представленный метод характеризует способность бевацизумаба связываться с соответствующими изоформами антигена-мишени – VEGF.

2. Оценка ингибирования пролиферации эндотелиальных клеток кровеносных сосудов, индуцированной VEGF, на культуре клеток HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells – эндотелиальных клетках пупочной вены человека) с оценкой результата исследования с помощью электрохемилюминисцентного анализа – характеризует способность бевацизумаба связываться с антигеном VEGF и снижать васкуляризацию тканей, клетки которых экспрессируют указанный антиген.
3. Определение связывания с рецепторами FcγRI, FcγRIIIa, FcRn с помощью, например, поверхностного плазмонного резонанса – характеризует способность Fc-фрагмента бевацизумаба связываться с указанными рецепторами.
4. Определение связывания с C1q, например, с помощью ИФА – показывает способность Fc-фрагмента бевацизумаба связываться с компонентом комплемента C1.
5. Определение АЗКЦ и КЗЦ. Действие не обнаруживается, поскольку Fab-фрагмент бевацизумаба не связывается непосредственно с мембранной мишенью.

Методы оценки специфической активности бевацизумаба *in vivo*:

1. Оценка способности ингибирования роста опухоли на ксенотрансплантатных мышинных моделях, полученных с использованием клеточной линии эпидермоидной карциномы человека (A431), либо с использованием клеточной линии колоректальной аденокарциномы человека (COLO 205) – характеризует способность бевацизумаба угнетать рост опухолей, экспрессирующих антиген VEGF.
2. На представленных выше моделях также возможно провести оценку ингибирования роста сосудистой сети, применяя иммуногистохимическое окрашивание к CD31 (маркеру эндотелиальных клеток) с дальнейшей оценкой площади кровеносных сосудов путем окрашивания срезов опухоли – характеризует способность бевацизумаба к снижению васкуляризации опухоли и, таким образом, гибели опухолевых клеток.

3.1.5 Подтверждение биоаналогичности по специфической активности биоаналогов трастузумаба

Механизмом действия трастузумаба является избирательное взаимодействие с внеклеточным доменом рецепторов эпидермального фактора роста человека 2 типа (HER2), блокирование пролиферации опухолевых клеток с гиперэкспрессией HER2 и АЗКЦ в отношении этих клеток [12, 141]. Применяется трастузумаб для лечения рака молочной железы и распространенного рака желудка. Оригинальным препаратом трастузумаба является препарат Герцептин, раствор для подкожного введения, 600 мг/5 мл; лиофилизат для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий, 440 мг (держатель РУ – Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд., Германия).

По результатам анализа досье биоаналогичных ЛП трастузумаба определены методы определения сопоставимости *in vitro*, например:

1. Определение аффинности связывания с HER2 с помощью, например, поверхностного плазмонного резонанса либо метода резонансного переноса энергии флуоресценции (Fluorescence Resonance Energy Transfer – FRET) –

характеризует способность трастузумаба связываться с соответствующим антигеном-мишенью.

2. Оценка ингибирования пролиферации HER2-сверхэкспрессирующих опухолевых клеток на клеточных линиях рака молочной железы человека (BT-474 и SK-BR-3), например, с помощью колориметрического анализа – показывает способность трастузумаба угнетать рост опухолевых клеток, экспрессирующих HER2.
3. Определение связывания с Fc γ - и FcRn-рецепторами, например, с помощью метода AlphaScreen (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay Screen – гомогенный анализ усиленной за счёт эффекта близости люминесценции) – характеризует способность Fc-фрагмента трастузумаба связываться с Fc-рецепторами.
4. Определение АЗКЦ на клеточных линиях рака молочной железы человека – HCC2218 или SK-BR-3, гиперэкспрессирующих HER2, в качестве клеток-мишеней и мононуклеарных клетках периферической крови человека, а также на клетках NK92-M1, стабильно трансфицированных человеческим CD16, в качестве эффекторных клеток – характеризует способность трастузумаба оказывать клеточно-опосредованную цитотоксичность в отношении клеток-мишеней, экспрессирующих HER2.
5. Оценка отсутствия КЗЦ, например, на линии клеток BT-474. Активность не обнаруживается, вероятно, из-за присутствия регуляторных белков, таких как CD35, CD46 или CD55 [125].

Возможными методами подтверждения сопоставимости по специфической активности *in vivo* для трастузумаба являются:

1. Оценка ингибирования роста опухолевого трансплантата молочной железы человека BT-474, пересаженного в организмы бестимусных мышей, либо мышей с сахарным диабетом без ожирения/с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency – NOD/SCID). Возможна как подкожная, так и ортотопическая ксенотрансплантация опухолевых клеток. Указанный метод показывает

способность трастузумаба ингибировать рост опухолевых клеток, экспрессирующих HER2.

Таким образом, методы определения специфической активности для различных мАТ отличаются и зависят от характера антигена и строения молекулы конкретного антитела. Тем не менее, существуют общие методы определения активности, такие как, например, связывание с Fc-рецепторами, комплементом, АЗКЦ, КЗЦ, используемые за некоторым исключением для многих мАТ (рисунок 5). Поэтому в экспериментальной части работы был воспроизведен именно метод КЗЦ как один из ключевых методов определения биологической активности мАТ.

3.2 Результаты экспериментального изучения сравнительной комплемент-зависимой цитотоксичности ритуксимаба

В соответствии с одной из задач исследования была определена сравнительная КЗЦ ритуксимаба в рамках изучения его специфической активности для двух серий препарата: Образец 1 (серия, хранящаяся при температуре плюс 5°C) и Образец 2 (серия, хранящаяся при температуре минус 80 °C) по сравнению со стандартным образцом активности.

Детектирование результатов исследования проводилось с использованием многофункционального микропланшетного ридера, определяющего интенсивность флуоресценции (единицы измерения – относительные флуоресцентные единицы) в каждой лунке планшета.

Полученные результаты для Образца 1 и СО активности из 1-го аналитического планшета представлены в таблице 5, в которой можно видеть интенсивность флуоресценции образцов ритуксимаба в зависимости от его концентрации в лунке в трех повторах.



ритуксимаб

адалимумаб

инфликсимаб

бевацизумаб

трастузумаб

Рисунок 5 – Общие методы определения сравнительной специфической активности для биоаналогов ритуксимаба, адалимумаба, инфликсимаба, бевацизумаба и трастузумаба

Таблица 5 – Интенсивность флуоресценции в лунках аналитического планшета для Образца 1 и СО в зависимости от концентрации

Концентрация, мкг/мл	Интенсивность флуоресценции СО, относительные флуоресцентные единицы			Интенсивность флуоресценции Образца 1, относительные флуоресцентные единицы		
	1	2	3	1	2	3
30,000	988	986	1004	996	1018	997
10,000	1003	1016	1027	1022	1025	1021
3,333	1048	1067	1083	1096	1056	1055
1,111	1132	1099	1110	1137	1090	1126
0,370	1757	1725	1825	1818	1673	1782
0,123	5222	4751	4980	5472	5491	5715
0,041	7387	7340	7377	7398	7431	7380
0,014	7478	7523	7554	7456	7502	7020
0,005	7515	7017	7500	7483	7488	7466

На рисунке 6 представлен график зависимости величины интенсивности флуоресценции от логарифма концентрации ритуксимаба для Образца 1 и СО.

Поскольку именно IC50 является наиболее удобной концентрацией для выявления различия между исследуемыми образцами препарата, по соответствующей данной концентрации интенсивности флуоресценции было проведено сравнение исследуемых образцов ритуксимаба и СО.

По представленным рисунку 6, а также таблице 5 было определено, что IC50 составляет 0,123 мкг/мл. Показатели интенсивности флуоресценции, соответствующие IC50, использованные в анализе, представлены в таблице 6.

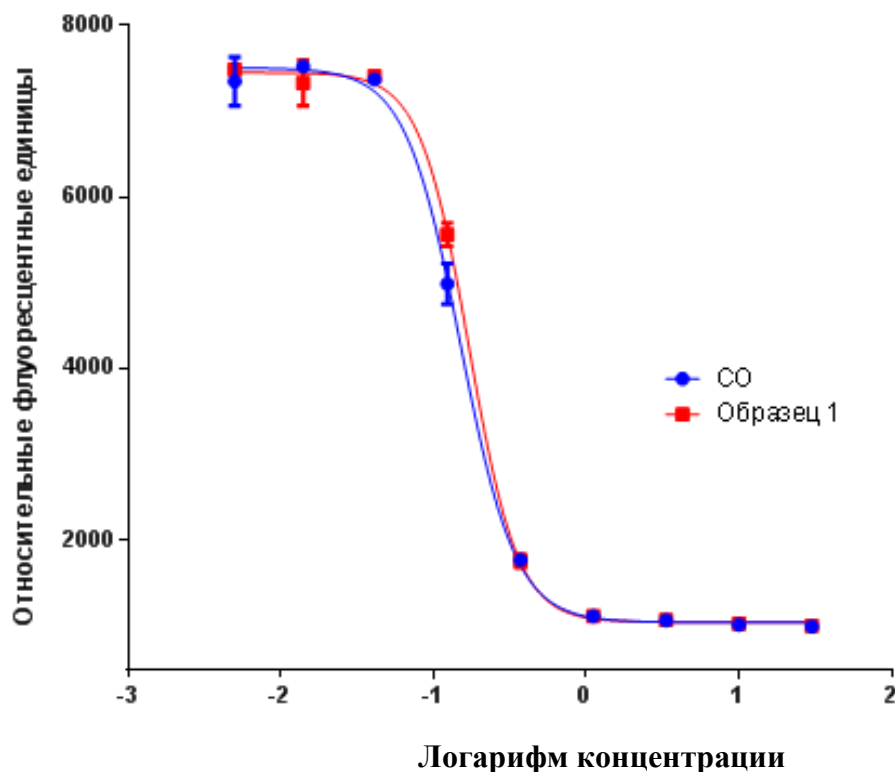


Рисунок 6 – Кривая зависимости величины интенсивности флуоресценции от логарифма концентрации ритуксимаба для Образца 1 и СО

Таблица 6 – Показатели интенсивности флуоресценции, соответствующие IC50, для Образца 1 и СО

Интенсивность флуоресценции Образца 1, относительные флуоресцентные единицы	Интенсивность флуоресценции СО, относительные флуоресцентные единицы
5472	5222
5491	4751
5715	4980

В программе Statistica 10 были получены описательные статистики для Образца 1 и СО, представленные в таблице 7, где Sample 1 – Образец 1; Standart – СО; N набл. – число наблюдений (равное количеству повторов – 3); Ст. откл. – стандартное отклонение.

Таблица 7 – Описательные статистики для Образца 1 и СО, полученные в программе Statistica 10

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

В Приложении Г представлены диаграмма размаха для выборок и диаграмма размаха для средних.

Было проведено тестирование гипотезы об отсутствии различий в интенсивности флуоресценции между группами (Образец 1 и СО), а также гипотезы об отсутствии различий в дисперсиях между группами. Полученные результаты представлены в таблице 8, где Sample 1 – Образец 1, Standart – СО; t-знач. – расчетное значение t-критерия; сс – число степеней свободы, определяемое как $2*(n-1)$, где n – объем выборки; p – расчетный уровень значимости при тестировании с использованием t-критерия; F-отн. дисперс. – расчетное значение F-критерия; p дисперс. – расчетный уровень значимости в дисперсионном анализе.

Таблица 8 – Результаты тестирования с использованием t-критерия и F-критерия Образца 1 и СО в программе Statistica

Группа 1 и Группа 2	Т-критерий независимых выборок (Таблица данных1)						
	Замечание: Переменные рассм. как независимые выборки						
	Среднее Группа 1	Среднее Группа 2	t-знач.	сс	p	F-отн. дисперс.	p дисперс.
Sample 1vs. Standart	5559,33	4984,33	3,66759	4	0,021437	3,03730	0,49538

Таким образом, рассчитанное фактическое значение t-критерия = 3,668 оказалось больше критического, для уровня значимости 0,05 (и фактическое значение $p = 0,021$ меньше 0,05). Полученные данные позволили отвергнуть нулевую гипотезу о том, что различий в интенсивности флуоресценции между группами нет, и принять альтернативную гипотезу о существовании

статистически значимых различий в интенсивности флуоресценции между исследуемыми группами.

По результатам дисперсионного анализа определено, что рассчитанное фактическое значение F–критерия = 3,037 оказалось меньше критического, для уровня значимости 0,05 (и фактическое значение $p = 0,495$ больше 0,05). Полученные данные позволили принять нулевую гипотезу о том, что различий в дисперсиях между исследуемыми группами нет.

Кроме того, был рассчитан 90% CI для разности средних, а также отношения средних, поскольку, как отмечено выше, полного сходства в интенсивности флуоресценции между исследуемым образцом препарата и СО активности не ожидалось.

Сводные результаты и полученные границы 90% CI для Образца 1 и СО с использованием программы Microsoft Excel 2010 представлены в таблице 9, где Sample 1 – Образец 1, Standart – СО; mean – среднее; median – медиана; stdev – стандартное отклонение; var – дисперсия; delta – дельта, определяемая как разность средних; S delta – стандартное отклонение разности средних; CI delta – 90% CI для разности средних; CI S1/St – 90% CI для отношения средних; S1/St – отношение средних.

Таблица 9 – Сводные результаты и границы 90% CI для Образца 1 и СО, полученные в программе Microsoft Excel 2010

Показатель	Sample 1	Standart
Повтор 1	5472	5222
Повтор 2	5491	4751
Повтор 3	5715	4980
mean	5559,333	4984,333
median	5491	4980
stdev	135,1456	235,5299

Показатель	Sample 1	Standart
var	18264,33	55474,33
delta	575	
S delta	192,0139	
CI delta	165,6648-984,3352	
CI S1/St	103,32%-119,75%	
S1/St	1,115361	

Таким образом, из таблицы 9 видно, что полученный 90% CI для отношения средней интенсивности флуоресценции, соответствующей IC50, для Образца 1 и СО составляет 103,32-119,75%, который попадает в принятый диапазон, равный 80-120%. Следовательно, можно сделать вывод о сопоставимости Образца 1 и СО по КЗЦ.

Также была определена сравнительная КЗЦ ритуксимаба в рамках изучения его специфической активности для серии препарата ритуксимаб (Образец 2) по сравнению со стандартным образцом активности.

Полученные результаты для Образца 2 и СО активности из 2-го аналитического планшета представлены в таблице 10, в которой можно видеть интенсивность флуоресценции образцов ритуксимаба в зависимости от его концентрации в лунке в трех повторах.

На рисунке 7 представлен график зависимости величины интенсивности флуоресценции от логарифма концентрации ритуксимаба для Образца 2 и СО.

Таблица 10 – Интенсивность флуоресценции в лунках аналитического планшета для Образца 2 и СО в зависимости от концентрации

Концентрация, мкг/мл	Интенсивность флуоресценции СО, относительные флуоресцентные единицы			Интенсивность флуоресценции Образца 2, относительные флуоресцентные единицы		
	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3
30,000	993	981	978	985	997	983
10,000	1027	998	1043	1013	1005	985
3,333	1070	1056	1074	1041	1042	1041
1,111	1149	1151	1141	1091	1127	1086
0,370	1703	1638	1683	1580	1633	1564
0,123	5369	5014	5193	4913	5015	5001
0,041	7223	7323	7369	7267	7236	7214
0,014	7250	7287	7364	7478	7372	7379
0,005	7250	7336	7302	7334	7215	7286

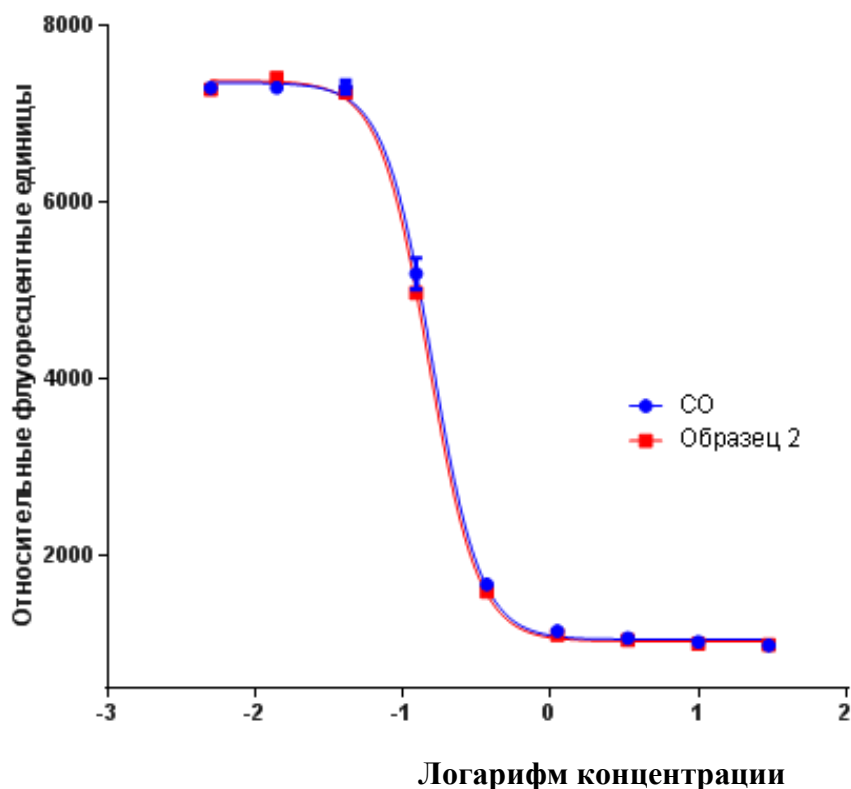


Рисунок 7 – Кривая зависимости величины интенсивности флуоресценции от логарифма концентрации ритуксимаба для Образца 2 и СО

По представленным рисунку 7, а также таблице 10 было определено, что IC₅₀ составляет 0,123 мкг/мл. Показатели интенсивности флуоресценции, использованные в анализе, представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Показатели интенсивности флуоресценции, соответствующие IC₅₀, для Образца 2 и СО

Интенсивность флуоресценции Образца 2, относительные флуоресцентные единицы	Интенсивность флуоресценции СО, относительные флуоресцентные единицы
4913	5369
5015	5014
5001	5193

В программе Statistica 10 были получены описательные статистики для Образца 2 и СО, представленные в таблице 12, где Sample 2 – Образец 2; Standart – СО; N набл. – число наблюдений (равное количеству повторов – 3); Ст. откл. – стандартное отклонение.

Таблица 12 – Описательные статистики для Образца 2 и СО, полученные в программе Statistica 10

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

В Приложении Д представлены диаграмма размаха для выборок и диаграмма размаха для средних.

Было проведено тестирование гипотезы об отсутствии различий в интенсивности флуоресценции между группами (Образец 2 и СО), а также гипотезы об отсутствии различий в дисперсиях между группами. Полученные результаты представлены в таблице 13, где Sample 2 – Образец 2, Standart – СО; t-знач. – расчетное значение t-критерия; сс – число степеней свободы, определяемое как $2*(n-1)$, где n – объем выборки; p – расчетный уровень значимости при тестировании с использованием t-критерия; F-отн. дисперс. – расчетное значение F-критерия; p дисперс. – расчетный уровень значимости в дисперсионном анализе.

Таблица 13 – Результаты тестирования с использованием t-критерия и F-критерия Образца 2 и СО в программе Statistica 10

Группа 1 и Группа 2	Т-критерий независимых выборок						
	Замечание: Переменные рассм. как независимые выборки						
	Среднее Группа 1	Среднее Группа 2	t-знач.	сс	p	F-отн. дисперс.	p дисперс.
Sample 2vs. Standart_	4976,33	5192,00	-2,0092	4	0,11490	10,3053	0,17690

Таким образом, рассчитанное фактическое значение t-критерия = -2,009 оказалось меньше критического, для уровня значимости 0,05 (и фактическое значение $p = 0,115$ больше 0,05). Полученные данные позволили принять нулевую гипотезу о том, что различий в интенсивности флуоресценции между исследуемыми группами нет.

По результатам дисперсионного анализа определено, что рассчитанное фактическое значение F-критерия = 10,305 оказалось меньше критического, для уровня значимости 0,05 (и фактическое значение $p = 0,177$ больше 0,05). Полученные данные позволили принять нулевую гипотезу о том, что различий в дисперсиях между исследуемыми группами нет.

Кроме того, был рассчитан 90% CI для разности средних, а также отношения средних.

Сводные результаты и полученные границы 90% CI для Образца 2 и СО с использованием программы Microsoft Excel 2010 представлены в таблице 14, где Sample 2 – Образец 2, Standart – СО; mean – среднее; median – медиана; stdev – стандартное отклонение; var – дисперсия; delta – дельта, определяемая как разность средних; S delta – стандартное отклонение разности средних; CI delta – 90% CI для разности средних; CI S2/St – 90% CI для отношения средних; S2/St – отношение средних.

Таблица 14 – Сводные результаты и границы 90% CI для Образца 2 и СО, полученные в программе Microsoft Excel 2010

Показатель	Sample 2	Standart
Повтор 1	4913	5369
Повтор 2	5015	5014
Повтор 3	5001	5193
mean	4976,333	5192
median	5001	5193

Показатель	Sample 2	Standart
stdev	55,29316	177,5021
var	3057,333	31507
delta	-215,667	
S delta	131,4617	
CI delta	-495,917-64,58329	
CI S2/St	90,45%-101,24%	
S2/St	1,115361	

Таким образом, из таблицы 14 видно, что полученный 90% CI для отношения средней интенсивности флуоресценции, соответствующей IC50, для Образца 2 и СО составляет 90,45-101,24%, который попадает в принятый диапазон, равный 80-120%. Следовательно, можно сделать вывод о сопоставимости Образца 2 и СО по КЗЦ.

Существует три возможных механизма действия для антител, подобных ритуксимабу, приводящих к гибели В-клетки путём связывания с мембран-ассоциированным антигеном: КЗЦ, АЗКЦ и индукция апоптоза. Нами был воспроизведен метод КЗЦ, однако следует отметить, что имеются только косвенные данные, свидетельствующие о значимости того или иного из перечисленных выше механизмов терапевтического эффекта в условиях *in vivo* [61, 75].

Восприимчивость различных злокачественных В-клеток к КЗЦ *in vitro* согласуется с устойчивостью соответствующей злокачественной опухоли к ритуксимабу *in vivo*, кроме того, в эксперименте Manches O. и др. [107] было показано, что мыши, дефицитные по компоненту комплемента C1, показывают нарушение гибели В-клеток. Было отмечено, что эффективность КЗЦ может зависеть от близости целевого эпитопа МАТ к клеточной поверхности [150].

На этапе изучения качества проводят сравнение биоаналога и ЛП сравнения, используя различные методы *in vitro*, например хроматографию, пептидное картирование, масс-спектрометрию и другие. В том числе, в рамках изучения биологической активности на этапе сравнительного изучения качества нередко используют и метод КЗЦ. Эти аналитические методы также используются для оценки качества различных серий биотехнологических ЛП, с целью изучения стабильности готового препарата, а также для характеристики изменений, произошедших в случае изменения процесса производства уже зарегистрированного биологического препарата, либо препарата, еще находящегося в разработке, поскольку с технической точки зрения производство и обеспечение качества всех биологических ЛП, в том числе мАТ, имеет много общего и подход к разработке и производству таких препаратов строится, в первую очередь, с позиций обеспечения и контроля их качества.

У разработчика биоаналога нет доступа к деталям производственного процесса оригинального ЛП. Таким образом, производители биоаналогов должны разрабатывать новые методы производства и демонстрировать *in vitro*, что потенциальный биоаналог обладает достаточным структурным и функциональным сходством с оригинальным препаратом, прежде чем приступить к дальнейшим исследованиям. Этот процесс является более сложным для больших молекул, таких как ритуксимаб, которые имеют множество пост-трансляционных модификаций. Однако, поскольку биоаналоги производятся значительно позже введения оригинального препарата в клинику, производители биоаналогов могут воспользоваться достижениями в биофармацевтическом производстве, что может позволить сэкономить средства по сравнению с первоначальным производственным процессом оригинального препарата [150].

Для таких ЛП, активные компоненты которых представляют собой белки и / или полипептиды, поддержание конформации молекулы и, следовательно биологической активности, зависит от нековалентных, а также ковалентных связей. Биологические ЛП особенно чувствительны к факторам окружающей среды, таким как изменение температуры, окисление, свет, ионный состав и др.

Как правило, необходимы жесткие условия для хранения таких препаратов, чтобы обеспечить поддержание биологической активности и избежания деградации, поэтому исследования биологической активности, где это применимо, должны быть частью основных исследований стабильности мАТ, включающие в себя соответствующие биохимические и иммунохимические методы анализа, которые проводятся на меньшей мере с использованием 3 серий препарата, для которых производство и хранение являются репрезентативными промышленному масштабу производства [120].

С учетом сказанного выше, разработчику необходимо использовать соответствующие условия для поддержания стабильности биотехнологического / биологического препарата и учитывать множество внешних условий, которые могут повлиять на активность, чистоту и качество препарата. Заметим, что качество произведенных серий ЛП должно быть репрезентативным по отношению в качестве ЛП, используемого в доклинических и клинических исследованиях, а также качеству ЛП, которое будет производиться в промышленном масштабе [120].

Производители биотехнологических / биологических препаратов часто вносят изменения в процесс производства, как во время разработки ЛП, так и после вывода препарата на рынок. Причины таких изменений включают в себя улучшение производственного процесса, увеличение масштаба производства, улучшение стабильности препарата и соблюдение изменений в нормативных требованиях. При внесении изменений в производственный процесс, как правило, производитель оценивает качество препарата с целью продемонстрировать, что изменение процесса производства не оказывает неблагоприятного влияния на безопасность и эффективность ЛП [60].

Определение сопоставимости препарата до изменения процесса производства и после его изменения может быть основано на сочетании аналитического тестирования, биологических анализов, а в некоторых случаях, доклинических и клинических исследований. Объем необходимых исследований

требует обоснования и зависит от выявленных различий на предыдущем этапе [60].

Таким образом, изучение биологической (специфической) активности может быть необходимо на различных этапах жизненного цикла препарата.

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

При проведении исследований сравнительной специфической активности в рамках подтверждения биоаналогичности необходимо использовать серии биоаналога, которые будут использованы в дальнейших клинических исследованиях.

Для более полного понимания структуры разрабатываемой молекулы и как следствие для построения более полного целевого профиля качества биоаналога [116] целесообразно изучить и подробно охарактеризовать множество серий ЛП сравнения, что позволит получить большие значения межсерийной вариабельности, т.е. биоаналогу будет легче попасть в соответствующие диапазоны показателей (если показатели качества задаются диапазоном) [20].

Разброс значений специфической активности биоаналога должен быть в такой степени близок к разбросу значений специфической активности ЛП сравнения, либо совпадать или быть меньше, чтобы эти различия не позволили отличить биоаналог от ЛП сравнения по профилю безопасности и эффективности [20]. В любом случае, в связи с вариабельностью, характерной для биологических ЛП, идентичности в качестве препаратов не ожидается и полученные значения должны попадать в установленные границы эквивалентности.

Выбор границы биоаналогичности представляет собой риск разработчика биоаналога: чем больше обнаружено различий на этапах физико-химических,

биологических испытаний и доклинических исследований, тем выше риск получения несопоставимого клинического профиля, т.е. тем выше риск убытков разработчика вследствие необходимости доработки процесса производства и повторения всей программы исследований. С помощью метода количественной оценки аналогичности биологических свойств возможна оценка наиболее значимых свойств и своевременная оптимизация технологических этапов разработки биоаналога [20].

На наш взгляд, в настоящее время, пока не разработаны требования по определению границ признания биоаналогичности на этапе сравнительных доклинических фармакодинамических исследований, целесообразно использовать границу, применяемую в исследованиях биоэквивалентности химических ЛП, составляющую 80-120%.

3.3 Программа изучения сравнительной специфической активности биоаналогов ритуксимаба в рамках подтверждения их биоаналогичности

Ритуксимаб представляет собой химерное мАТ, связывается с белком CD20, находящимся в основном на поверхности В-клеток иммунной системы. Ритуксимаб разрушает В-клетки и, следовательно, применяется для лечения заболеваний, которые характеризуются чрезмерным количеством В-клеток, гиперактивностью или нарушением функций В-клеток, например, лимфом, лейкоз, реакций отторжения трансплантата и аутоиммунных расстройств. Объем продаж оригинального препарата ритуксимаб, Мабтера, в 2013 году составил 7 млрд швейцарских франков (5,8 млрд евро), поэтому в настоящее время многие компании занимаются разработкой более дешевых аналогов дорогого и не всегда доступного оригинатора [150].

Рекомендации по проведению исследований специфической активности биоаналогичных мАТ, описанные выше, с учетом существующего понимания механизма клеточного лизиса ритуксимаба, следующие [150]:

- изучение связывания с антигеном-мишенью;
- изучение связывания с изоформами Fc-гамма-рецепторов и компонентом;
- изучение Fab-ассоциированных функций (например, индукция апоптоза);
- изучение Fc-ассоциированных функций (например, АЗКЦ и КЗЦ).

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

При подтверждении сопоставимости по специфической активности изучаемого биоаналога ритуксимаба и ЛП сравнения, которым для ритуксимаба является ЛП Мабтера, на этапе доклинического изучения, минимальный объем необходимых исследований представлен в таблице 15.

Таблица 15 – Минимальный объем сравнительных исследований сопоставимости по специфической активности биоаналогов ритуксимаба

Исследования <i>in vitro</i>	Исследование <i>in vivo</i>
Аффинность связывания с антигеном CD20	Исследование влияния на развитие зародышевых центров в брыжеечных лимфатических узлах и селезенке у яванских макак
Индукция апоптоза	
Связывание с Fc-рецепторами	
Связывание с субкомпонентом комплемента C1q	
Индукция АЗКЦ	
Индукция КЗЦ	

Отметим, что в исследованиях связывания с CD20, индукции апоптоза, АЗКЦ и КЗЦ для презентации антигена следует использовать следующие клеточные линии: Wil2-S, Ramos, Raji.

Не смотря на то что исследования *in vivo* не всегда обязательны для всех биоаналогов, и могут потребоваться для выявления эффектов мАТ, которые в исследованиях *in vitro* выявить невозможно, такие исследования становятся необходимыми применительно к биоаналогам ритуксимаба [150].

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

Отметим, что объем необходимых исследований специфической активности любого биоаналога зависит от характера полученных результатов на предшествующих этапах разработки и качества данных. При возникновении различий на этапе сравнительных доклинических фармакодинамических исследований могут потребоваться дополнительные исследования, однако при высокой убедительности результатов можно попытаться обосновать сокращение объема исследований. Однако, если получены сомнительные результаты, недопустимо отказываться от проведения дополнительных исследований.

Все исследования необходимо направить на выявление потенциальных различий между биоаналогом и ЛП сравнения, а также, при обнаружении таких различий, на оценку их клинической значимости. Всякое выявленное значимое различие необходимо должным образом охарактеризовать, поскольку оно может противоречить принципу биоаналогичности и, в случае необходимости, провести дополнительные исследования.

Как было отмечено выше, сравнение биоаналога с оригинальным ЛП необходимо провести на достаточном количестве серий препарата и проводимые исследования должны быть достаточно чувствительными, чтобы измерить различия в зависимости «концентрация – активность».

Важно отметить, что дизайн соответствующего доклинического исследования требует четкого понимания свойств ЛП. Результаты исследований

по изучению биологической активности всегда необходимо рассматривать с позиций потенциального влияния на безопасность и эффективность биоаналога.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение отметим, что разработка и внедрение на рынок биологически аналогичных ЛП мАТ позволит снизить затраты здравоохранения на лечение пациентов с такими тяжелыми заболеваниями, как, например, онкологические и аутоиммунные заболевания.

Однако, в связи с тем, что в России отсутствуют конкретные рекомендации по проведению исследований сопоставимости биологически аналогичных мАТ, необходима разработка программы проведения сравнительных исследований на этапе изучения качества, доклинических и клинических исследований биоаналогов. Кроме того, поскольку мАТ имеют очень сложную химическую структуру и свойства каждого конкретного мАТ зависят от его строения и соответственно механизма действия, необходима разработка рекомендаций для подтверждения сопоставимости каждого мАТ. Однако слепо следовать такой программе также нельзя, поскольку объем и количество необходимых исследований всегда зависят от результатов, полученных на предыдущих этапах разработки.

Установленный перечень методов определения специфической активности мАТ ритуксимаба, адалимумаба, инфликсимаба, бевацизумаба, трастузумаба на этапе их доклинического фармакодинамического изучения может послужить основой для планирования разработчиком программы изучения специфической активности, как одного из базовых показателей биоаналогичности.

ВЫВОДЫ

1. При подтверждении биоаналогичности следует использовать принцип сопоставимости и проводить сравнительные исследования качества (включающие исследования подлинности, чистоты (родственные соединения, родственные примеси и производственные примеси) и биологической активности), сравнительные доклинические исследования (включающие токсикологические и фармакодинамические исследования (*in vitro* и *in vivo*)), а также сравнительные клинические исследования.
2. Методами, позволяющими подтвердить биоаналогичность мАТ (ритуксимаба, адалимумаба, инфликсимаба, бевациумаба, трастузумаба) на этапе доклинического фармакодинамического изучения *in vitro*, в зависимости от механизма действия конкретного мАТ, являются: связывание с антигеном-мишенью, связывание с Fc-рецепторами, связывание с субкомпонентом C1q, АЗКЦ, КЗЦ, индукция апоптоза, ингибирование пролиферации клеток, ингибирование индуцированного ФНО α апоптоза, нейтрализация индуцированной ФНО α секреции цитокинов.
3. Методами, позволяющими подтвердить биоаналогичность мАТ (ритуксимаба, адалимумаба, инфликсимаба, бевациумаба, трастузумаба) на этапе доклинического фармакодинамического изучения *in vivo*, в зависимости от механизма действия конкретного мАТ, являются: определение истощения пула В-клеток на яванских макаках, оценка купирования симптомов заболевания на модели полиартрита у трансгенных мышей, оценка роста опухоли на ксенотрансплантатных мышечных моделях.
4. Образцы биоаналогичного ритуксимаба (МБЦ «Генериум») и стандартный образец ритуксимаба сопоставимы. Полученные 90% CI для отношения средней интенсивности флуоресценции, соответствующей IC50, для двух исследованных образцов попадают в принятый диапазон, равный 80-120% (для Образца 1 – 90% CI: 103,32-119,75%; для Образца 2 – 90% CI: 90,45-

101,24%). При хранении образцов при температуре плюс 5 и минус 80°C показана их высокая стабильность.

5. Программа проведения сравнительного изучения специфической активности биоаналогов ритуксимаба на этапе их доклинического изучения должна включать исследования *in vitro*: аффинность связывания с антигеном CD20, индукция апоптоза, связывание с Fc-рецепторами, связывание с субкомпонентом комплемента C1q, индукция АЗКЦ и КЗЦ, а также исследование *in vivo*: влияние на развитие зародышевых центров в брыжеечных лимфатических узлах и селезенке у яванских макаков.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЗКЦ	антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ЕАЭС	Евразийский экономический союз
ЕС	Европейский союз
ЗАО	закрытое акционерное общество
ИЛ-8	интерлейкин-8
ИФА	иммуноферментный анализ
КЗЦ	комплемент-зависимая цитотоксичность
ЛП	лекарственный препарат
ЛС	лекарственное средство
ЛФ	лекарственная форма
мАТ	моноклональное антитело
МБЦ «Генериум»	Международный биотехнологический центр «Генериум» «Генериум»
мин	минута
мкг	микрограмм
мкл	микролитр
мл	миллилитр
нм	нанометр
НЦЭСМП	Научный центр экспертизы средств применения медицинского
РУ	регистрационное удостоверение
РФ	Российская Федерация
СО	стандартный образец активности
сс	число степеней свободы
ст. откл.	стандартное отклонение

ст. ош.	стандартная ошибка среднего
США	Соединенные Штаты Америки
тыс	тысяча
ФГБУ	Федеральное государственное бюджетное учреждение
ФД	фармакодинамический
ФК	фармакокинетический
ФНО α	фактор некроза опухоли альфа
ФНО α /EL-4	клеточная линия мышиной лимфомы EL-4, стабильно экспрессирующая трансмембранный ФНО α
ФНО β	фактор некроза опухоли бета
A431	клеточная линия эпидермоидной карциномы человека
AlphaScreen	Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay Screen (Гомогенный анализ усиленной за счёт эффекта близости люминесценции)
AR2G	Amine Reactive Second-Generation (Аминный реактив второго поколения)
BPCIA	Biologics Price Competition and Innovation Act (Закон о ценовой конкуренции и инновациях биологических препаратов)
BT-474	клеточная линия рака молочной железы человека
C1q	субкомпонент комплемента C1
СНО	Chinese Hamster Ovary (клеточная линия яичников китайских хомячков)
CI	Confidence Interval (доверительный интервал)
CI delta	90% доверительный интервал для разности средних
CI S1/St	90% доверительный интервал для отношения средних Sample 1 к Standart
CI S2/St	90% доверительный интервал для отношения средних Sample 2 к Standart
CO ₂	углекислый газ

COLO 205	клеточная линия колоректальной аденокарциномы человека
delta	дельта
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor (рецептор эпидермального фактора роста человека)
EL-4	клеточная линия мышиной лимфомы
EMA	European Medicines Agency (Европейское агентство по лекарственным средствам)
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule (молекула адгезии клеток эпителия)
FcRn	неонатальный рецептор Fc
FcγR	Fc-гамма-рецептор
FDA	Food and Drug Administration (Администрация по пищевым продуктам и лекарственным средствам)
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer (резонансный перенос энергии флуоресценции)
F-отн. дисперс.	расчетное значение F–критерия
GLP	Good Laboratory Practice (надлежащая лабораторная практика)
HCC2218	клеточная линия рака молочной железы человека
HEK293	Human Embryonic Kidney (человеческие эмбриональные клетки почек)
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (рецептор эпидермального фактора роста человека второго типа)
HER3	Human Epidermal Growth Factor Receptor 3 (рецептор эпидермального фактора роста человека третьего типа)
HER4	Human Epidermal Growth Factor Receptor 4 (рецептор эпидермального фактора роста человека четвертого типа)
huTNF- Tg197	трансгенные мыши линии Tg197, продуцирующие человеческий ФНО α

HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells (эндотелиальные клетки пупочной вены человека)
IC50	The half maximal inhibitory concentration (50% ингибирующая концентрация)
IgG1	иммуноглобулин G1
Jurkat	клеточная линия лейкемических Т-лимфоцитов человека
L929	клеточная линия фибросаркомы мыши
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1 (моноцитарный хемотаксический белок-1)
mean	среднее
median	медиана
MIP-1 β	Macrophage Inflammatory Protein-1 β (макрофагальный воспалительный белок-1 β)
n	объем выборки
n набл.	число наблюдений
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (ядерный фактор «каппа-би»)
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells (ядерный фактор активированных Т-клеток)
NK92-M1	клеточная линия естественных киллеров человека
NK-клетки	естественные клетки-киллеры человека
NOD/SCID	Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency (сахарный диабет без ожирения/тяжелый комбинированный иммунодефицит)
NS0	клеточная линия миеломных клеток мыши
p	расчетный уровень значимости при тестировании с использованием t-критерия
p дисперс.	расчетный уровень значимости в дисперсионном анализе
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell (периферические

	моноклеарные клетки крови)
PHSAct	Public Health Service Act (Закон о службе здравоохранения)
Q-Q plots	Quantile-Quantile plots (графики квантилей)
Raji	клеточная линия человеческой В-клеточной лимфомы
Ramos	клеточная линия человеческих лимфобластоидных клеток
rHuVEGF	Recombinant Human Vascular Endothelial Growth Factor (рекомбинантный человеческий фактор роста эндотелия сосудов)
S delta	стандартное отклонение разности средних
S1/St	отношение средних Sample 1 к Standart
S2/St	отношение средних Sample 2 к Standart
Sample 1	образец 1
Sample 2	образец 2
SCID	Severe Combined Immunodeficiency (тяжелый комбинированный иммунодефицит)
SK-BR-3	клеточная линия рака молочной железы человека
SKOV-3	клеточная линия аденокарциномы яичника человека
Standart	стандартный образец
stdev	стандартное отклонение
t-знач.	расчетное значение t-критерия
U-937	клеточная линия лимфомы человека
var	дисперсия
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (фактор роста эндотелия сосудов)
WEHI-13VAR	клеточная линия фибросаркомы мыши
WEHI-164	клеточная линия фибросаркомы мыши
Wil2-S	клеточная линия человеческих лимфобластных клеток
WSU-DLCL2	клеточная линия диффузной В-крупноклеточной лимфомы

Благодарности

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авастин // Государственный реестр лекарственных средств [официальный сайт]. — URL: http://grls.rosminzdrav.ru/ImgInstr.aspx?folder=ScanVavilova&Filepath=\Ne_trebuets_vnesenia\Net_ND_IZM\432799\IP&idReg=38326&isOld=1&fileType=jpg&pfolder=2 (дата обращения 16.10.2014).
2. Авдеева, Ж.И. Требования к производству и контролю препаратов на основе моноклональных антител, применяемых для лечения / Ж.И. Авдеева, Н.А. Алпатова, Р.А. Волкова [и др.] // Биопрепараты. – 2014. – № 4 (40). – С. 11-14. 1
3. Альтшулер, Е.П. Получение рекомбинантных антител и способы увеличения их аффинности / Е.П. Альтшулер, Д.В. Серебряная, А.Г. Катруха // Успехи биологической химии. – 2010. – Т. 50. – С. 206.
4. Арзерра // Государственный реестр лекарственных средств [официальный сайт]. — URL: http://grls.rosminzdrav.ru/ImgInstr.aspx?folder=ScanVavilova&Filepath=\Ne_trebuets_vnesenia\Net_ND_IZM\440492\IP&idReg=27729&isOld=1&fileType=jpg&pfolder=2 (дата обращения 19.09.2015).
5. Ацеллбия // Государственный реестр лекарственных средств [официальный сайт]. — URL: http://grls.rosminzdrav.ru/ImgInstr.aspx?folder=ScanVavilova&Filepath=\Ne_trebuets_vnesenia\Net_ND_IZM\456893\IP&idReg=85058&isOld=1&fileType=jpg&pfolder=2 (дата обращения 21.09.2015).
6. Бевацизумаб // Государственный реестр лекарственных средств [официальный сайт]. — URL: http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?idReg=1309914&t= (дата обращения 07.06.2016).
7. Белоусов, Ю.Б. Биологические лекарственные препараты и их аналоги: вопросы регистрации, эффективности и безопасности при клиническом

- использовании / Ю.Б. Белоусов, С.К. Зырянов, М.В. Давыдовская // Журнал неврологии и психиатрии. – 2011. – № 9. – Вып. 2. – С. 19-24.
8. Бредер, В.В. Биоаналоги: копии или похожие, но иные лекарства? / В.В. Бредер // Медицинский вестник. – 2007. – № 26-27. – С. 411-412.
 9. Васильев, А.Н. Разработка национальной программы качественных доклинических исследований биологически аналогичных лекарственных препаратов рекомбинантного интерферона альфа-2b: дисс. ... докт. биол. наук: 14.03.06 / Васильев Андрей Никифорович. – М. – 2012. – 286 с.
 10. Васильев, А.Н. Введение в европейское законодательство о лекарственных средствах. Биологические лекарственные средства / А.Н. Васильев, Е.В. Гавришина, Р.Р. Ниязов [и др.] // Ремедиум. – 2013. – № 9. – С. 52-57.
 11. Васильев, А.Н. Разработка биоаналогичных (биоподобных) лекарственных препаратов, содержащих в качестве фармацевтической субстанции моноклональные антитела / А.Н. Васильев, Д.В. Горячев, Е.В. Гавришина [и др.] // Руководство по экспертизе лекарственных средств. – Том IV. – Гл. 2. – М.: ПОЛИГРАФ-ПЛЮС, 2014. – С. 31-53.
 12. Герцептин // Государственный реестр лекарственных средств [официальный сайт]. – URL: http://grls.rosminzdrav.ru/ImgInstr.aspx?folder=ScanVavilova&Filepath=\Ne_tre_buet_vnesenia\Net_ND_IZM\432380\IP&idReg=26724&isOld=1&fileType=jpg&pfolder=2 (дата обращения 16.10.2014).
 13. Государственный реестр лекарственных средств [официальный сайт]. – URL: <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx> (дата обращения 07.06.2016).
 14. Залтрап // Государственный реестр лекарственных средств [официальный сайт]. – URL: http://www.grls.rosminzdrav.ru/ImgInstr.aspx?folder=ScanVavilova&Filepath=\Vneseno_v_Grls\436719\IP&idReg=147932&isOld=0&fileType=jpg&pfolder=2 (дата обращения 07.06.2016).

15. Иванов, А.А. Терапия моноклональными антителами – панацея или паллиатив? / А.А. Иванов, И.П. Белецкий // Ремедиум. – 2011. – № 3. – С. 7-11.
16. Мабтера // Государственный реестр лекарственных средств [официальный сайт]. – URL: http://grls.rosminzdrav.ru/ImgInstr.aspx?folder=ScanVavilova&Filepath=\Ne_tre_buet_vnesenia\Net_ND_IZM\437115\IP&idReg=85739&isOld=1&fileType=jpg&pfolder=2 (дата обращения 16.10.2014).
17. Моисеенко, В.М. Возможности моноклональных антител в лечении злокачественных опухолей / В.М. Моисеенко // Практическая онкология. – 2002. – Т. 3. – № 4. – С. 253-254.
18. Насонов, Е.Л. Перспективы применения ритуксимаба при аутоиммунных заболеваниях человека / Е.Л. Насонов // РМЖ. – 2007. – Том 15. – № 26. – С. 1958-1963.
19. Никитин, Е.А. «Волшебные пули»: моноклональные антитела в онкологии [электронный ресурс] / Е.А. Никитин, О.И. Глазкова // Лечащий врач. – 2007. – №6. – URL: <http://www.lvrach.ru/2007/06/4535331/> (дата обращения 05.09.2013).
20. Ниязов, Р.Р. Выбор и обоснование границ признания биоаналогичности (биоподобия) / Р.Р. Ниязов, Д.В. Горячев, А.Н. Васильев [и др.] // Руководство по экспертизе лекарственных средств. – Том IV. – Гл. 1. – М.: ПОЛИГРАФ-ПЛЮС, 2014. – С. 4-30.
21. Ниязов, Р.Р. Обоснование границ признания эквивалентности показателей качества, безопасности и эффективности при разработке биоаналогов / Р.Р. Ниязов, Д.В. Горячев, Е.В. Гавришина [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – № 6. – Т. 78. – С. 37-44.
22. Оренсия // Государственный реестр лекарственных средств [официальный сайт]. – URL: <http://www.grls.rosminzdrav.ru/ImgInstr.aspx?folder=ScanVavilova&Filepath=\>

Ne_trebueta_vnesenia\Net_ND_IZM\441110\IP&idReg=138493&isOld=0&fileType=jpg&pfolder=2 (дата обращения 03.01.2015).

23. Перьета // Государственный реестр лекарственных средств [официальный сайт]. – URL: http://grls.rosminzdrav.ru/ImgInstr.aspx?folder=ScanVavilova&Filepath=\Vneseno_v_Grls\426561\IP&idReg=141030&isOld=0&fileType=jpg&pfolder=2 (дата обращения 16.10.2014).
24. Пивник, А.В. Применение ритуксимаба у гематологических больных с ВИЧ-инфекцией / А.В. Пивник // Клиническая онкогематология. – 2013. – Том 6. – № 1. – С. 84-90.
25. План деятельности Министерства здравоохранения Российской Федерации на 2013 – 2018 годы // Министерство здравоохранения Российской Федерации [официальный сайт]. – URL: <http://www.rosminzdrav.ru/ministry/programms/stranitsa-922> (дата обращения 24.08.2015).
26. Правила регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения // Евразийский экономический союз [официальный сайт]. – URL: <https://docs.eaeunion.org/ru-ru/Pages/DisplayRIA.aspx?s=e1f13d1d-5914-465c-835f-2aa3762eddda&w=9260b414-defe-45cc-88a3-eb5c73238076&l=d70984cf-725d-4790-9b12-19604c34148c&EntityID=587> (дата обращения 26.08.2015).
27. Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза // Евразийский экономический союз [официальный сайт]. – URL: <https://docs.eaeunion.org/ru-ru/Pages/DisplayRIA.aspx?s=e1f13d1d-5914-465c-835f-2aa3762eddda&w=9260b414-defe-45cc-88a3-eb5c73238076&l=d70984cf-725d-4790-9b12-19604c34148c&EntityID=769> (дата обращения 24.12.2015).
28. Приказ Министерства промышленности и торговли Российской Федерации от 31 марта 2015 г. № 656 «Об утверждении отраслевого плана мероприятий по импортозамещению в отрасли фармацевтической промышленности

- Российской Федерации» [Электронный ресурс]. – Доступ из справ.-правовой системы «КонсультантПлюс».
29. Приказ Министерства промышленности и торговли Российской Федерации от 23 октября 2009 г. № 956 «Об утверждении Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года» // ФАРМА2020 [официальный сайт]. – URL: <http://pharma2020.ru/> (дата обращения 04.09.2013).
 30. Пролиа // Государственный реестр лекарственных средств [официальный сайт]. – URL: http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?idReg=434073&t= (дата обращения 07.06.2016).
 31. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 6 июля 2010 г. № 1141-р «Перечень стратегически значимых лекарственных средств, производство которых должно быть обеспечено на территории Российской Федерации» // Российская Газета [официальный сайт]. – URL: <http://www.rg.ru/2010/07/13/perechen-dok.html> (дата обращения 23.10.2015).
 32. Реддитукс // Государственный реестр лекарственных средств [официальный сайт]. – URL: http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?idReg=1400580&t= (дата обращения 07.06.2016).
 33. Реестр выданных разрешений на проведение клинических исследований лекарственных препаратов [РКИ] // Государственный реестр лекарственных средств [официальный сайт]. – URL: <http://grls.rosminzdrav.ru/CIPermissionReg.aspx> (дата обращения 07.06.2016).
 34. Ремикейд // Государственный реестр лекарственных средств [официальный сайт]. – URL: http://grls.rosminzdrav.ru/ImgInstr.aspx?folder=ScanVavilova&Filepath=\Ne_tre_buet_vnesenia\Net_ND_IZM\434086\IP&idReg=25509&isOld=1&fileType=jpg&pfolder=2 (дата обращения 08.10.2014).
 35. Ремоваб // Государственный реестр лекарственных средств [официальный сайт]. – URL:

<http://grls.rosminzdrav.ru/InstrImgMZ.aspx?regNr=%D0%9B%D0%9F-001872&page=1> (дата обращения 16.10.2014).

36. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под ред. А.Н. Миронова. – Ч. 1. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
37. Руководство по экспертизе лекарственных средств. – Том IV. – М.: ПОЛИГРАФ-ПЛЮС, 2014. – 172 с.
38. Руководство по экспертизе лекарственных средств. – Том I. – М.: Гриф и К, 2013. – 328 с.
39. Трастузумаб // Государственный реестр лекарственных средств [официальный сайт]. – URL: http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?idReg=1310770&t= (дата обращения 07.06.2016).
40. Туберкулез. Информационный бюллетень № 104, март 2014 г. // Всемирная организация здравоохранения [официальный сайт]. – URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/ru/> (дата обращения 12.05.2014).
41. Федеральный закон от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» [Принят Гос. Думой 24 марта 2010 года с изменениями и дополнениями по состоянию на 13 июля 2015 г.] // Российская газета. – Федеральный выпуск № 5157 от 14 апреля 2010 г.
42. Фламмегис // Государственный реестр лекарственных средств [официальный сайт]. – URL: http://grls.rosminzdrav.ru/ImgInstr.aspx?folder=ScanVavilova&Filepath=\Vneseno_v_Grls\451428\IP&idReg=459285&isOld=1&fileType=jpg&pfolder=2 (дата обращения 07.09.2015).
43. Хумира // Государственный реестр лекарственных средств [официальный сайт]. – URL: http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?idReg=85872&t= (дата обращения 18.08.2015).
44. Эйлеа // Государственный реестр лекарственных средств [официальный сайт]. – URL:

- http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?idReg=1397653&t= (дата обращения 07.06.2016).
45. Эксджива // Государственный реестр лекарственных средств [официальный сайт]. – URL: http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?idReg=425821&t= (дата обращения 07.06.2016).
46. Энбрел // Государственный реестр лекарственных средств [официальный сайт]. – URL: http://www.grls.rosminzdrav.ru/ImgInstr.aspx?folder=ScanVavilova&Filepath=\Ne_trebuet_vnesenia\Net_ND_IZM\459889\IP&idReg=9470&isOld=1&fileType=jpg&pfolder=2 (дата обращения 03.01.2015).
47. Эрбитукс // Государственный реестр лекарственных средств [официальный сайт]. – URL: http://grls.rosminzdrav.ru/ImgInstr.aspx?folder=ScanVavilova&Filepath=\Ne_trebuet_vnesenia\Net_ND_IZM\446720\IP_IZM&idReg=10254&isOld=1&fileType=jpg&pfolder=2 (дата обращения 16.10.2014).
48. Ягудина, Р.И. История развития моноклональных антител, их настоящее и будущее / Р.И. Ягудина, А.В. Тихомирова // Современная организация лекарственного обеспечения. – 2013. – № 1. – С. 6–27. 2
49. Ackermann, C. Tumor necrosis factor as a therapeutic target of rheumatologic disease / C. Ackermann, A. Kavanaugh // Expert. Opin. Ther. Targets. – 2007. – № 11(11). – P. 1369-1384.
50. Automated non-radioactive assay methods for ADCC and CDC assays // BioTek. – URL: <http://www.biotek.com/resources/articles/automated-non-radioactive-assay-methods-for-adcc-cdc-assays.html> (дата обращения 21.09.2015).
51. Beck, A. Approval of the first biosimilar antibodies in Europe: a major landmark for the biopharmaceutical industry / A. Beck, J.M. Reichert // mAbs. – 2013. – № 5(5). P. 621-623.
52. Venepali // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: <http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicine>

s/004007/smops/Positive/human_smop_000900.jsp&mid=WC0b01ac058001d127 (дата обращения 07.06.2016).

53. Bioanalytical method validation // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf (дата обращения 12.05.2014).
54. Biosimilars // Food and Drug Administration [официальный сайт]. – URL: <http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/TherapeuticBiologicApplications/Biosimilars/default.htm> (дата обращения 08.04.2014).
55. Bradley, J.R. TNF-mediated inflammatory disease / J.R. Bradley // J. Pathol. – 2008. – № 214(2). – P. 149-160.
56. Chow, S.C. Statistical assessment of biosimilar products / S.C. Chow, J.P. Liu // J. Biopharm. Stat. – 2010. – № 20(1). – P. 10-30.
57. Chow, S.C. Biosimilars: Design and analysis of follow-on biologics. Chapman&Hall / S.C. Chow – CRCbiostatisticsseries, 2013. – 444 p.
58. Clinical investigation of the pharmacokinetics of therapeutic proteins // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003029.pdf (дата обращения 05.08.2014).
59. Comparability of biotechnology-derived medicinal products after a change in the manufacturing process – non-clinical and clinical issues // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003935.pdf (дата обращения 16.05.2014).
60. Comparability of Biotechnological/ Biological Products Subject to Changes in their Manufacturing Process (Q5E) // The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [официальный сайт]. – URL:

- http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5E/Step4/Q5E_Guideline.pdf (дата обращения 16.05.2014).
61. Cragg, M.S. Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents / M.S. Cragg, M.J. Glennie // *Blood*. – 2004. – № 103(7). – P. 2738-2743.
 62. da Silva, A. Target-directed development and preclinical characterization of the proposed biosimilar rituximab GP2013 / A. da Silva, U. Kronthaler, V. Koppenburg [et al.] // *Leuk. Lymphoma*. – 2014. – № 55(7). – P. 1609-1617.
 63. Directive 2001/83/EC of The European Parliament and of The Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use // *OJ. L. 311*, 28.11.2001, p. 67. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Regulatory_and_procedural_guideline/2009/10/WC500004481.pdf (дата обращения 04.09.2013).
 64. Dorvignit, D. Expression and biological characterization of an anti-CD20 biosimilar candidate antibody: a case study / D. Dorvignit, J.L. Palacios, M. Merino [et al.] // *MAbs*. – 2012. – № 4(4). – P. 488-496.
 65. Draft Guidance for Industry: Potency Tests for Cellular and Gene Therapy Products // Food and Drug Administration [официальный сайт]. – URL: <http://www.fda.gov/downloads/biologicsbloodvaccines/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/cellularandgenetherapy/ucm078687.pdf> (дата обращения 04.01.2016).
 66. Draft Guidance for Industry: Clinical Pharmacology Data to Support a Demonstration of Biosimilarity to a Reference Product // Food and Drug Administration [официальный сайт]. – URL: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM397017.pdf> (дата обращения 16.05.2014).
 67. Ehlers, S. Why does tumor necrosis factor targeted therapy reactivate tuberculosis? / S. Ehlers // *J. Rheumatol. Suppl.* – 2005. – № 74. – P. 35-39.

68. EMA approves first monoclonal antibody biosimilar // Generics and Biosimilars Initiative. – URL: <http://www.gabionline.net/Biosimilars/News/EMA-approves-first-monoclonal-antibody-biosimilar> (дата обращения 09.07.2014).
69. European biosimilar market will be worth \$4bn a year by 2017 // The PMLiVE. – URL: [http://www.pmlive.com/pharma_news/european_biosimilar_market_worth_\\$4bn_2017_370868](http://www.pmlive.com/pharma_news/european_biosimilar_market_worth_$4bn_2017_370868) (дата обращения 05.09.2013).
70. European public assessment reports // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages%2Fmedicines%2Flanding%2Fepar_search.jsp&mid=WC0b01ac058001d124&searchTab=&alreadyLoaded=true&isNewQuery=true&status=Authorised&status=Withdrawn&status=Suspended&status=Refused&startLetter=R&keyword=Enter+keywords&searchType=name&taxonomyPath=&treeNumber=&searchGenericType=generics (дата обращения 09.07.2014).
71. European Pharmacopoeia: Monoclonal Antibodies for Human Use (2031) // European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare [Электронный ресурс]. – URL: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm> (дата обращения 30.05.2014).
72. European Pharmacopoeia // European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care [Электронный ресурс]. – URL: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm> (дата обращения 24.07.2014).
73. Flixabi // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/004020/smops/Positive/human_smp_000958.jsp&mid=WC0b01ac058001d127 (дата обращения 07.06.2016).
74. Global Biopharmaceuticals Market Will Reach US\$ 278 Bn by 2020 // Persistence Market Research. – URL: <http://www.persistencemarketresearch.com/mediarelease/biopharmaceutical-market.asp> (дата обращения 09.06.2016).

75. Golay, J. Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis / J. Golay, L. Zaffaroni, T. Vaccari [et al.] // *Blood*. – 2000. – № 95(12). – P. 3900-3908.
76. Gómez-Reino, J.J. Treatment of rheumatoid arthritis with tumor necrosis factor inhibitors may predispose to significant increase in tuberculosis risk: a multicenter active-surveillance report / J.J. Gómez-Reino, L. Carmona, V.R. Valverde [et al.] // *Arthritis Rheum*. – 2003. – № 48(8). – P. 2122-2127.
77. Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals (M3(R2)) // International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [официальный сайт]. – URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M3_R2/Step4/M3_R2__Guideline.pdf (дата обращения 04.01.2015).
78. Guidance for Industry: Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products // Food and Drug Administration [официальный сайт]. – URL: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm338856.pdf> (дата обращения 05.10.2015).
79. Guidance for Industry: Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product // Food and Drug Administration [официальный сайт]. – URL: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM291128.pdf> (дата обращения 04.08.2015).
80. Guidance for Industry: Quality Considerations in Demonstrating Biosimilarity of a Therapeutic Protein Product to a Reference Product // Food and Drug Administration [официальный сайт]. – URL: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM291134.pdf> (дата обращения 04.08.2015).
81. Guidance for Industry on Biosimilars: Questions and Answers Regarding Implementation of the Biologics Price Competition and Innovation Act of 2009 //

- Food and Drug Administration [официальный сайт]. – URL: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM444661.pdf> (дата обращения 04.08.2015).
82. Guidance on Similar Medicinal Products Containing Recombinant Granulocyte-Colony Stimulating Factor (ЕМЕА/СНМР/ВМWP/31329/2005) // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003955.pdf (дата обращения 04.01.2015).
83. Guidance on similar medicinal products containing somatropin (ЕМЕА/СНМР/ВМWP/94528/2005) // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003956.pdf (дата обращения 04.01.2015).
84. Guidance on similar medicinal products containing recombinant human insulin (ЕМЕА/СНМР/ВМWP/32775/2005) // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003957.pdf (дата обращения 04.01.2015).
85. Guideline on repeated dose toxicity (СРМР/SWP/1042/99 Rev 1 Corr*) // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/03/WC500079536.pdf (дата обращения 05.10.2015).
86. Guideline on immunogenicity assessment of monoclonal antibodies intended for in vivo clinical use (ЕМА/СНМР/ВМWP/86289/2010) // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/06/WC500128688.pdf (дата обращения: 04.01.2015).
87. Guideline on good pharmacovigilance practices: Module V – Risk management systems // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL:

- http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/06/WC500129134.pdf (дата обращения 16.05.2014).
88. Guideline on similar biological medicinal products (CHMP/437/04 Rev 1) // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2014/10/WC500176768.pdf (дата обращения 02.03.2015).
89. Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies – non-clinical and clinical issues (EMA/CHMP/BMWP/403543/2010) // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/06/WC500128686.pdf (дата обращения 03.01.2015).
90. Guideline on good pharmacovigilance practices: Module VIII – Post-authorisation safety studies (EMA/330405/2012) // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/06/WC500129137.pdf (дата обращения 04.01.2015).
91. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2015/01/WC500180219.pdf (дата обращения 02.03.2015).
92. Guidelines for assuring the quality of pharmaceutical and biological products prepared by recombinant DNA technology // WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-first report. Geneva, World Health Organization, 1991, Annex 3 (WHO Technical Report Series No. 814). – URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/41100/1/WHO_TRS_814.pdf (дата обращения 03.01.2015).
93. Guidelines on Evaluation of Similar Biotherapeutic Products (SBPs) (WHO/BS/09.2110) // World Health Organization [официальный сайт]. – URL:

http://www.who.int/biologicals/areas/biological_therapeutics/BIOTHERAPEUTICS_FOR_WEB_22APRIL2010.pdf (дата обращения 04.01.2015).

94. Hou, W. A systematic comparison between collagen-induced arthritis and pristane-induced arthritis in Dark Agouti rats / W. Hou, L. Meng, L. Tian [et al.] // *Clin. Exp. Rheumatol.* – 2010. – № 28(4). – P. 532-538.
95. Huneycutt, B.J. Clinical trials in the development of biosimilars: future considerations / B.J. Huneycutt, E. Gillespie, G.R. Woollett // *Biosimilars.* – 2015. – № 5. – P. 49–63.
96. Hurst, S. Comparative nonclinical assessments of the proposed biosimilar PF-05280014 and trastuzumab (Herceptin®) / S. Hurst, A.M. Ryan, C.K. Ng [et al.] // *BioDrugs.* – 2014. – № 28(5). – P. 451-459.
97. Inflectra // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/002778/WC500151490.pdf (дата обращения 30.05.2014).
98. Inflectra // Food and Drug Administration [официальный сайт]. – URL: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=SearchDrugDetails> (дата обращения 07.06.2016).
99. Introna, M. Complement in antibody therapy: friend or foe? / M. Introna, J. Golay // *Blood.* – 2009. – № 114(26). – P. 5247-5248.
100. Jiang, X.R. Advances in the assessment and control of the effector functions of therapeutic antibodies / X.R. Jiang, A. Song, S. Bergelson [et al.] // *Nat. Rev. Drug. Discov.* – 2011. – № 10. – P. 101-111.
101. Joung, J. WHO informal consultation on regulatory evaluation of therapeutic biological medicinal products held at WHO Headquarters, Geneva, 19-20 April 2007 / J. Joung, J.S. Robertson, E. Griffiths, I. Knezevic // *Biologicals.* – 2008. – № 36(4). – P. 269-276.
102. Kang, S.H. Statistical assessment of biosimilarity based on relative distance between follow-on biologics / S.H. Kang, S.C. Chow // *Stat. Med.* – 2013. – № 32(3). – P. 382-392.

103. Key Biotechnology Indicators (December 2011) // Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) [официальный сайт]. – URL: <http://www.oecd.org/science/inno/49303992.pdf> (дата обращения 05.09.2013).
104. Kresse G.B. EMEA Workshop on Biosimilar Monoclonal Antibodies, July 2, 2009: Session 1 – CMC – Innovator Industry Presentation // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Presentation/2009/11/WC500008474.pdf (дата обращения 25.08.2015).
105. Lindquist, S. Bile salt-stimulated lipase plays an unexpected role in arthritis development in rodents / S. Lindquist, E.L. Andersson, L. Lundberg, O. Hernell // PLoS One. – 2012. – № 7(10). – P. 1-9.
106. Lon, H.K. Pharmacokinetic-pharmacodynamic disease progression model for effect of etanercept in Lewis rats with collagen-induced arthritis / H.K. Lon, D. Liu, Q. Zhang [et al.] // Pharm. Res. – 2011. – № 28(7). – P. 1622-1630.
107. Manches. O. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas / O. Manches, G. Lui, L. Chaperot [et al.] // Blood. – 2003. – № 101(3). – P. 949-954.
108. Maverakis, E. Glycans in the immune system and the altered glycan theory of autoimmunity: a critical review / E. Maverakis, K. Kim, M. Shimoda [et al.] // J. Autoimmun. – 2015. – № 57. – P. 1-13.
109. McCamish, M. Worldwide experience with biosimilar development / M. McCamish, G. Woollett // MAbs. – 2011. – № 3(2). – P. 209-217.
110. Mesiano, S. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer: inhibition of ascites formation by immunoneutralization / S Mesiano, N. Ferrara, R.B. Jaffe // Am. J. Pathol. – 1998. – № 153(4). – P. 1249-1256.
111. Multidisciplinary: Biosimilar // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000408.jsp&mid=WC0b01ac058002958c (дата обращения 04.01.2015).

112. Non-clinical and clinical development of similar medicinal products containing recombinant interferon alpha (EMA/CHMP/BMWP/102046/2006) // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003930.pdf (дата обращения 04.01.2015).
113. Note for Guidance on Toxicokinetics: The Assessment of Systemic Exposure in Toxicity Studies (S3A) // International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [официальный сайт]. – URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S3A/Step4/S3A_Guideline.pdf (дата обращения 05.10.2015).
114. OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice (GLP) and Compliance Monitoring // Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) [официальный сайт]. – URL: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testingofchemicals/oecdseriesonprinciplesofgoodlaboratorypracticeglpandcompliancemonitoring.htm> (дата обращения 04.01.2015).
115. Olofsson, P. Pristane-induced arthritis in the rat / P. Olofsson, R. Holmdahl // *Methods Mol. Med.* – 2007. – № 136. – P. 255-268.
116. Pharmaceutical development (Q8(R2)) // The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [официальный сайт]. – URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step4/Q8_R2_Guideline.pdf (дата обращения 09.10.2015).
117. Pivot, X. 6 months versus 12 months of adjuvant trastuzumab for patients with HER2- positive early breast cancer (PHARE): a randomised phase 3 trial / X. Pivot, G. Romieu, M. Debled [et al.] // *Lancet. Oncol.* – 2013. – № 14(8). – P. 741-748.
118. Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals (S6(R1)) // International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for

- Registration of Pharmaceuticals for Human Use [официальный сайт]. – URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S6_R1/Step4/S6_R1_Guideline.pdf (дата обращения 05.10.2015).
119. Presta, L.G. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders / L.G. Presta, H. Chen, S.J. O'Connor [et al.] // *Cancer Res.* – 1997. – № 57(20). – P. 4593-4599.
120. Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products (Q5C) // The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [официальный сайт]. – URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5C/Step4/Q5C_Guideline.pdf (дата обращения 09.10.2015).
121. Roger, S.D. Biosimilars: How similar or dissimilar are they? / S.D. Roger // *Nephrology (Carlton)*. – 2006. – № 11(4). – P. 341-346.
122. Ryan, A.M. Comparative nonclinical assessments of the proposed biosimilar PF-05280586 and rituximab (MabThera®) / A.M. Ryan, S.A. Sokolowski, C.K. Ng [et al.] // *Toxicol. Pathol.* – 2014. – № 42(7). – P. 1069-1081.
123. Sabatine, M.S. Efficacy and safety of evolocumab in reducing lipids and cardiovascular events / M.S. Sabatine, R.P. Giugliano, S.D. Wiviott [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2015. – № 372(16). – P. 1500-1509.
124. Schellekens, H. Biosimilar epoetin: how similar are they? / H. Schellekens // *Eur. J. Hosp. Pharm.* – 2004. – № 3. – P. 43-47.
125. Scientific discussion: Herceptin // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000278/WC500049816.pdf (дата обращения 16.09.2015).
126. Sections 7001-7003 (Biologics Price Competition and Innovation Act of 2009) of the Patient Protection and Affordable Care Act (Public Law No. 111-148) // Food and Drug Administration [официальный сайт]. – URL:

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/UCM216146.pdf> (дата обращения 27.08.2015).

127. Seong, S.S. Incidence of tuberculosis in Korean patients with rheumatoid arthritis (RA): effects of RA itself and of tumor necrosis factor blockers / S.S. Seong, C.B. Choi, J.H. Woo, K.W. Bae // J. Rheumatol. – 2007. – № 34(4). – P. 706-711.
128. Similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (ЕМЕА/СНМР/ВМРР/49348/2005) // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003953.pdf (дата обращения 03.01.2015).
129. Similar biological medicinal product containing recombinant interferon beta (СНМР/ВМРР/652000/20100) // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/01/WC500120652.pdf (дата обращения 04.01.2015).
130. Similar biological medicinal products containing low-molecular-weight heparins (ЕМЕА/СНМР/ВМРР/118264/2007) // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003927.pdf (дата обращения 04.01.2015).
131. Similar biological medicinal products containing recombinant erythropoietins (ЕМЕА/СНМР/ВМРР/301636/08 Corr.) // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/04/WC500089474.pdf (дата обращения 04.01.2015).
132. Similar biological medicinal products containing recombinant follicle stimulation hormone (СНМР/ВМРР/671292/2010) // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/11/WC500117986.pdf (дата обращения 04.01.2015).

133. Strome, S.E. A mechanistic perspective of monoclonal antibodies in cancer therapy beyond target-related effects / S.E. Strome, E.A. Sausville, D. Mann // *Oncologist*. – 2007. – № 12(9). – P. 1084-1095.
134. Summary of product characteristics: Remicade // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000240/WC500050888.pdf (дата обращения 04.01.2015).
135. Summary of product characteristics: Arzerra // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/001131/WC500093091.pdf (дата обращения 19.09.2015).
136. Summary of product characteristics: Humira // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000481/WC500050870.pdf (дата обращения 18.08.2015).
137. Summary of product characteristics: Orencia // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000701/WC500048935.pdf (дата обращения 03.01.2015).
138. Summary of product characteristics: Enbrel // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000262/WC500027361.pdf (дата обращения 03.01.2015).
139. Summary of product characteristics: Zaltrap // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL:

- http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002532/WC500139484.pdf (дата обращения 03.01.2015).
140. Summary of product characteristics: MabThera // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000165/WC500025821.pdf (дата обращения 03.01.2015).
141. Summary of product characteristics: Herceptin // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000278/WC500074922.pdf (дата обращения 03.01.2015).
142. Summary of product characteristics: Avastin // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000582/WC500029271.pdf (дата обращения 03.01.2015).
143. Summary of product characteristics: Perjeta // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002547/WC500140980.pdf (дата обращения 03.01.2015).
144. Summary of product characteristics: Erbitux // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000558/WC500029119.pdf (дата обращения 03.01.2015).
145. Summary of product characteristics: Removab // European Medicines Agency [официальный сайт]. – URL:

- http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000972/WC500051809.pdf (дата обращения 03.01.2015).
146. Tse, S.K. Statistical quality control process for traditional Chinese medicine / S.K. Tse, J.Y. Chang, W.L. Su [et al.] // *J. Biopharm. Stat.* – 2006. – № 16(6). – P. 861-874.
 147. United States Pharmacopeia (USP 35–NF 30) // USP-NF Online [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.uspnf.com/uspnf/> (дата обращения 24.07.2014).
 148. Vingsbo, C. Pristane-induced arthritis in rats: a new model for rheumatoid arthritis with a chronic disease course influenced by both major histocompatibility complex and non-major histocompatibility complex genes / C. Vingsbo, P. Sahlstrand, J.G. Brun [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 1996. – № 149(5). – P. 1675-1683.
 149. Visser, J. Physicochemical and functional comparability between the proposed biosimilar rituximab GP2013 and originator rituximab / J. Visser, I. Feuerstein, T. Stangler [et al.] // *BioDrugs.* – 2013. – № 27. – P. 495-507.
 150. Vital, E.M. Rituximab biosimilars / E.M. Vital, J. Kay, P. Emery // *Expert Opin. Biol. Ther.* – 2013. – № 13(7). – P. 1049-1062.
 151. VOLUME 9A of The Rules Governing Medicinal Products in the European Union: Guidelines on Pharmacovigilance for Medicinal Products for Human Use // European Commission [официальный сайт]. – URL: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-9/pdf/vol9a_09-2008_en.pdf (дата обращения 04.01.2015).
 152. Weiner, L. Antibodies and cancer therapy: versatile platforms for cancer immunotherapy / L. Weiner, R. Surana, S. Wang // *Nat. Rev. Immunol.* – 2010. – № 10(5). – P. 317–327.
 153. Wild, D. The Immunoassay Handbook. Theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques / D. Wild – 4th Edition, 2013. – 1036 p.

154. Woodcock, J. The FDA's assessment of follow-on protein products: a historical perspective / J. Woodcock, J. Griffin, R. Behrman [et al.] // Nat. Rev. Drug Discov. – 2007. – № 6(6). – P. 437-442.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

(информационное)

Моноклональные антитела, зарегистрированные в Российской Федерации

Таблица А.1. Моноклональные антитела и их производные (-цепт молекулы), зарегистрированные в Российской Федерации

Торговое наименование	МНН	Производитель (готовой ЛФ)	Страна производителя	Год регистрации в РФ	Год регистрации в ЕС
Мабтера	Ритуксимаб	Дженентек Инк.	США	1999	1998
		Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд.	Швейцария		
		Рош Диагностикс ГмбХ	Германия		
Герцептин	Трастузумаб	Рош Диагностикс ГмбХ	Германия	2000	2000
		Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд.	Швейцария		
Ремикейд	Инфликсимаб	Шеринг-Плау (Бринни) Компани	Ирландия	2001	1999
		МСД Интернешнл ГМБх (Сингапур Бранч)	Сингапур		
Авастин	Бевацизумаб	Дженентек Инк.	США	2005	2005
		Рош Диагностикс ГмбХ	Германия		
		Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд.	Швейцария		
Хумира	Адалimumаб	Веттер Фарма-Фертигунг ГмбХ и Ко.КГ	Германия	2006	2003
Симулект	Базиликсимаб	Новартис Фарма Штейн АГ	Швейцария	2006	1998
Ксолар	Омализумаб	Новартис Фарма Штейн АГ	Швейцария	2007	2005
Эрбитукс	Цетуксимаб	Берингер Ингельхайм Фарма ГмбХ и Ко.КГ	Германия	2007	2004
Луцентис	Ранибизумаб	Новартис Фарма Штейн АГ	Швейцария	2008	2007

Торговое наименование	МНН	Производитель (готовой ЛФ)	Страна производителя	Год регистрации в РФ	Год регистрации в ЕС
Вектибикс	Панитумумаб	Берингер Ингельхайм Фремонт, Инк.	США	2009	2007
Зевалин	Ибритумомаб тиуксетан	Байер Фарма АГ	Германия	2009	2004
Актемра	Тоцилизумаб	Чугай Фарма Мануфактуринг Ко. Лтд	Япония	2009	2009
Стелара	Устекинумаб	Силаг АГ	Швейцария	2009	2009
Энбрел	Этанерцепт	Берингер Ингельхайм Фарма ГмбХ и Ко.КГ	Германия	2009	2000
		Пфайзер Айрлэнд Фармасьютикалз	Ирландия		
Оренсия	Абатацепт	Бристол-Майерс Сквибб Холдингс Фарма Лтд.	США	2009	2007
Синагис	Паливизумаб	Берингер Ингельхайм Фарма ГмбХ и Ко.КГ	Германия	2010	1999
Тизабри	Натализумаб	Хоспира Инк.	США	2010	2006
		Веттер Фарма-Фертигунг ГмбХ и Ко.КГ	Германия		
Симзия	Цертолизумаба пэгол	Веттер Фарма-Фертигунг ГмбХ и Ко.КГ	Германия	2010	2008
Пролиа	Деносумаб	Амджен Европа Б.В.	Нидерланды	2011	2010
Эксджива	Деносумаб	Амджен Европа Б.В.	Нидерланды	2011	2011
Солирис	Экулизумаб	Патеон Маньюфэчуринг Сервисез ЛЛС	США	2011	2007
		Патеон Италия С.п.А.	Италия		

Торговое наименование	МНН	Производитель (готовой ЛФ)	Страна производителя	Год регистрации в РФ	Год регистрации в ЕС
Бенлиста	Белимумаб	Хоспира Инк.	США	2012	2011
Симпони	Голимумаб	Бакстер Фармасьютикал Солюшнз	США	2012	2009
Иларис	Канакинумаб	Новартис Фарма Штейн АГ	Швейцария	2012	2009
Ремоваб	Катумаксомаб	Ветгер Фарма - Фертигунг ГмбХ и Ко.КГ	Германия	2012	2009
Арзерра	Офатумумаб	Глаксо Оперэйшенс Великобритания Лимитед	Великобритания	2012	2010
Перьета	Пертузумаб	Рош Диагностикс ГмбХ	Германия	2013	2013
Залтрап	Афлиберцепт	Санофи-Авентис Дойчланд ГмбХ	Германия	2014	2013
<i>Ацеллбия*</i>	<i>Ритуксимаб</i>	<i>ЗАО «БИОКАД»</i>	<i>Россия</i>	<i>2014</i>	–
Газива	Обинутузумаб	Рош Диагностикс ГмбХ	Германия	2015	2014
<i>Бевацизумаб*</i>	<i>Бевацизумаб</i>	<i>ЗАО «БИОКАД»</i>	<i>Россия</i>	<i>2015</i>	–
<i>Трастузумаб*</i>	<i>Трастузумаб</i>	<i>ЗАО «БИОКАД»</i>	<i>Россия</i>	<i>2015</i>	–
<i>Фламмегис*</i>	<i>Инфликсимаб</i>	<i>СЕЛЛТРИОН, Инк.</i>	<i>Республика Корея</i>	2015	2013
		<i>Мустафа Невзат Илач Санаи А.Ш.</i>	<i>Турция</i>		
<i>Реддитукс*</i>	<i>Ритуксимаб</i>	<i>Д-р Редди`с Лабораторис Лтд</i>	<i>Индия</i>	2016	–
Эйлеа	Афлиберцепт	Регенерон Фармасетикелз Инк.	США	2016	2012
Ервой	Ипилимумаб	Бакстер Фармасьютикал Солюшнз ЛЛС	США	2016	2011

Торговое наименование	МНН	Производитель (готовой ЛФ)	Страна производителя	Год регистрации в РФ	Год регистрации в ЕС
Репата	Эволокум аб	Амджен Мэньюфэкчуринг Лимитед	Пуэрто-Рико, США	2016	2015

Примечание: * – биоаналоги моноклональных антител

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

(информационное)

**Проверка на нормальность выборок для Образца 1 и стандартного
образца**Shapiro-Wilk normality test

data: Sample1

W = 0.80826, p-value = 0.1344

data: Standart

W = 0.99975, p-value = 0.9696

На рисунках Б.1 и Б.2 представлены графики квантилей для Образца 1 и стандартного образца соответственно.

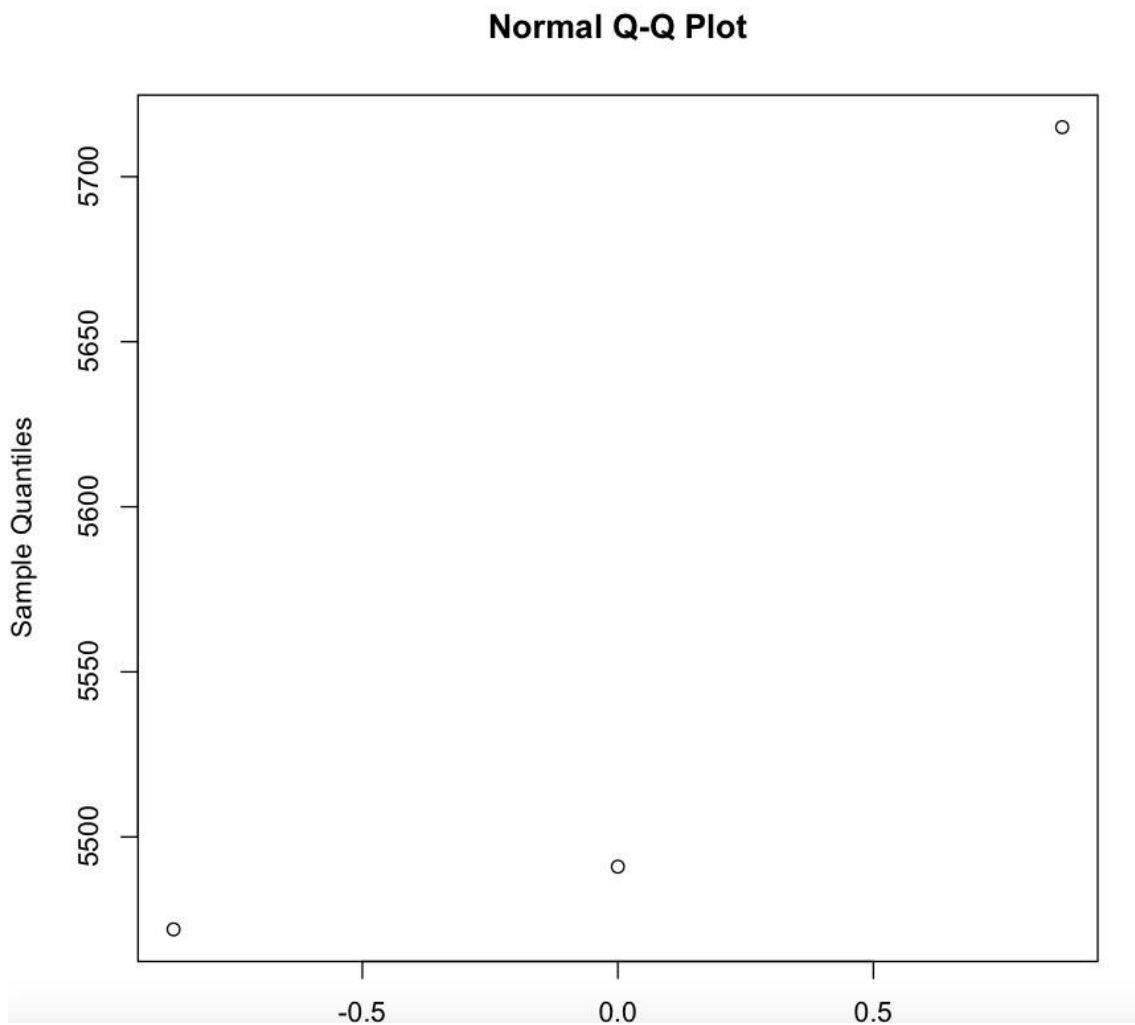


Рисунок Б.1 – График квантилей для Образца 1

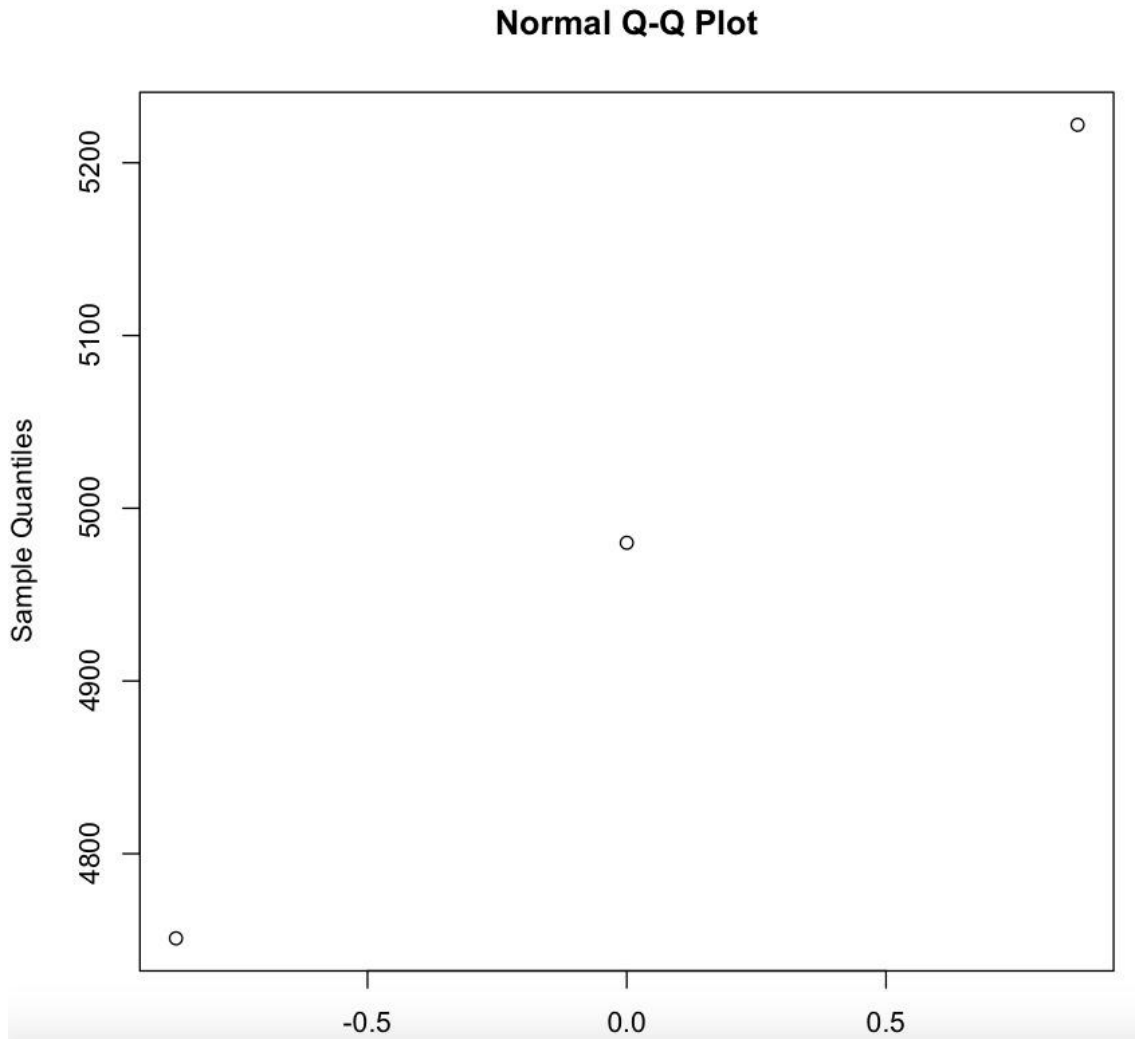


Рисунок Б.2 – График квантилей для стандартного образца

ПРИЛОЖЕНИЕ В

(информационное)

Проверка на нормальность выборок для Образца 2 и стандартного образцаShapiro-Wilk normality test

data: Sample2

W = 0.85074, p-value = 0.2424

data: Standart

W = 0.99998, p-value = 0.9907

На рисунках В.1 и В.2 представлены графики квантилей для Образца 2 и стандартного образца соответственно.

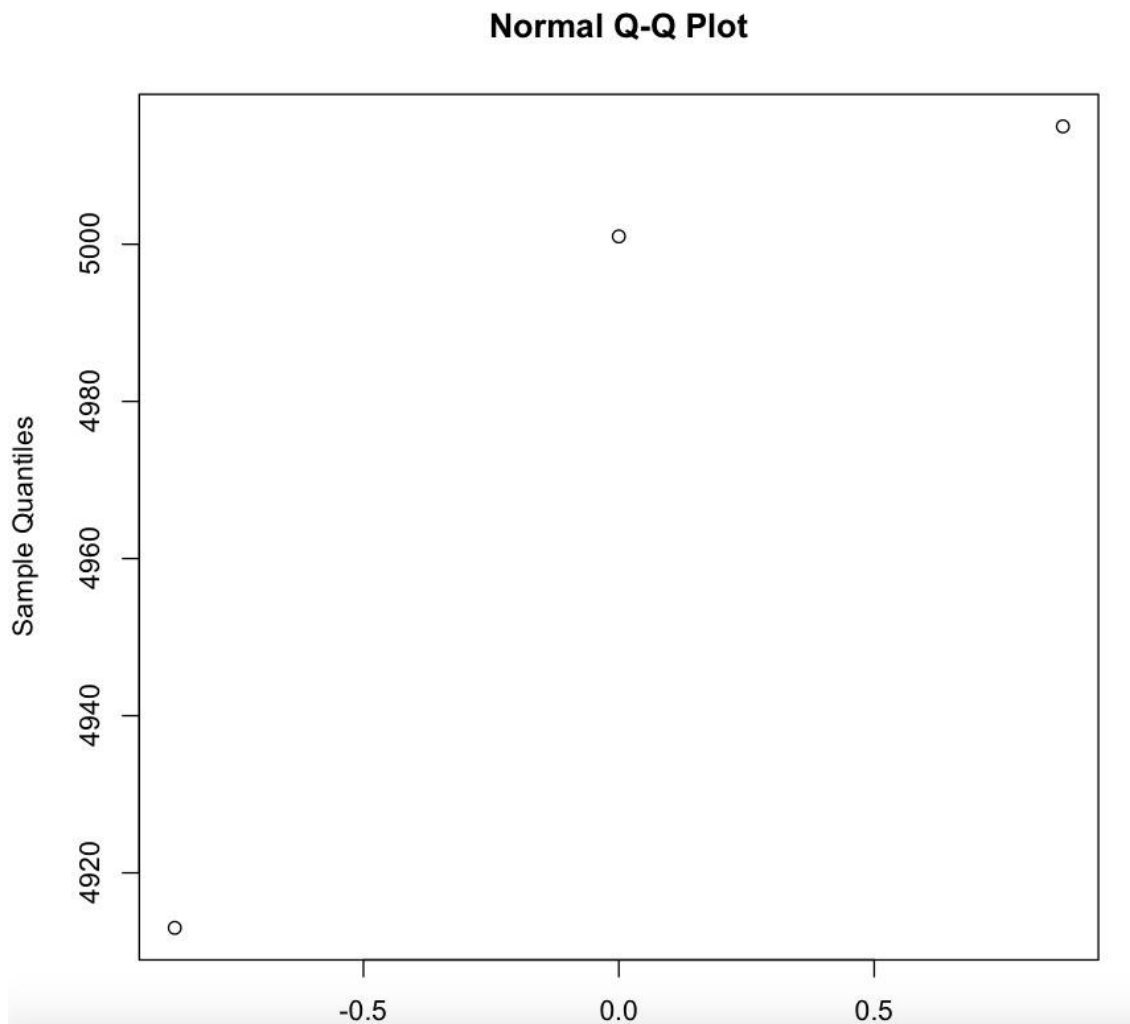


Рисунок В.1 – График квантилей для Образца 2

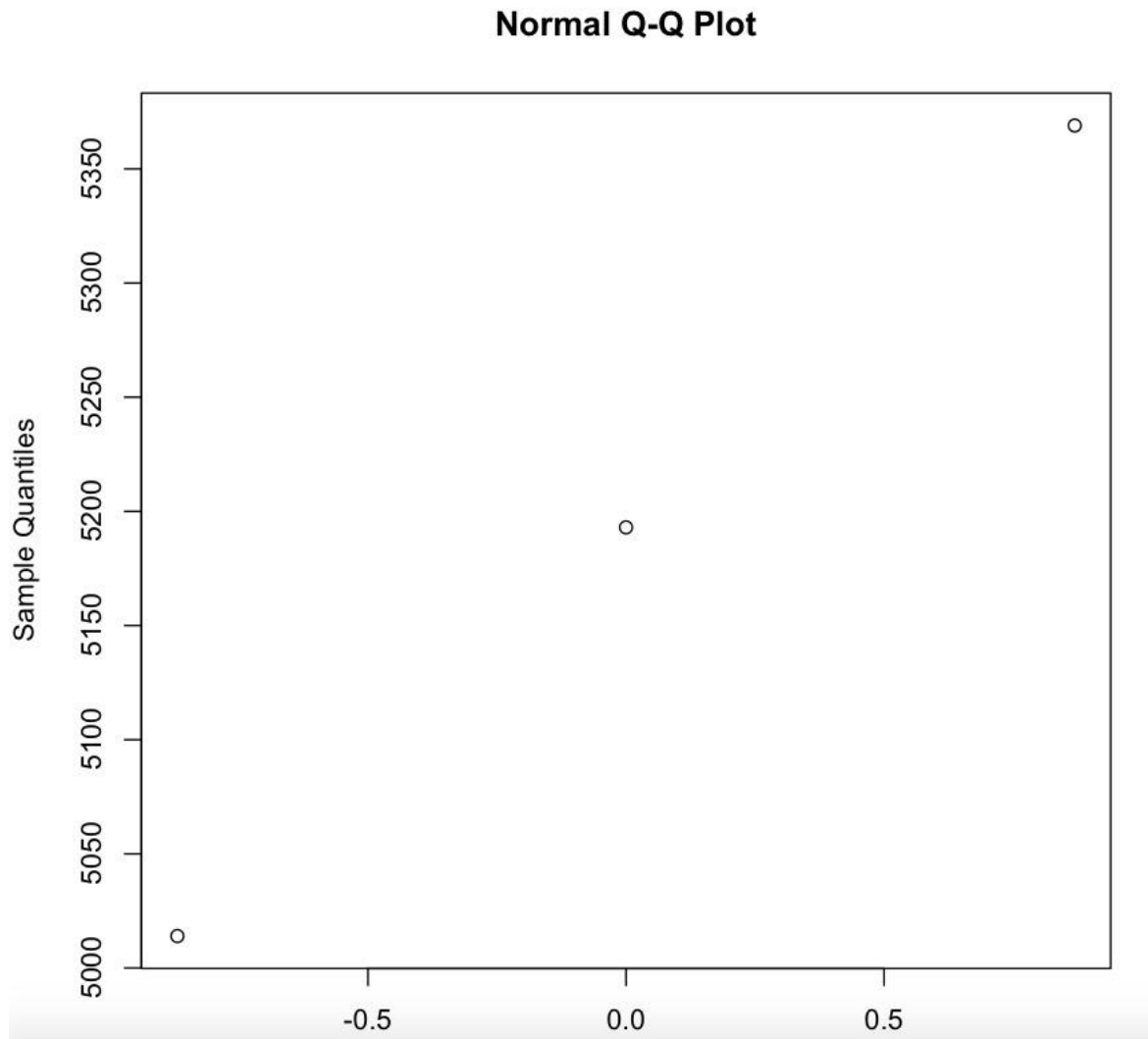


Рисунок В.2 – График квантилей для стандартного образца

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

(информационное)

Диаграммы размаха (Образец 1 и стандартный образец)

На рисунках Г.1 и Г.2 представлены диаграммы размаха для выборок и для средних соответственно.

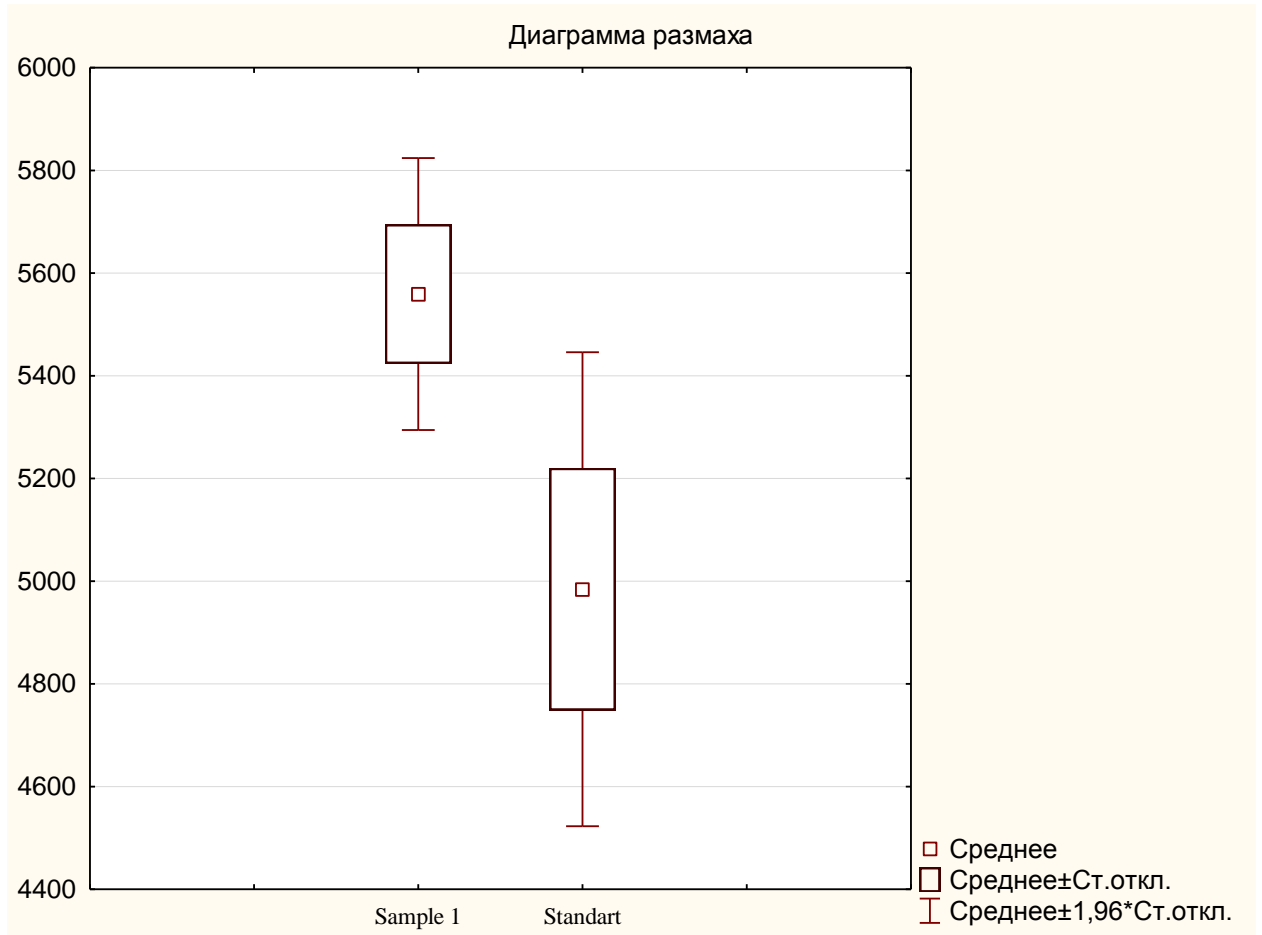


Рисунок Г.1 – Диаграмма размаха для выборок

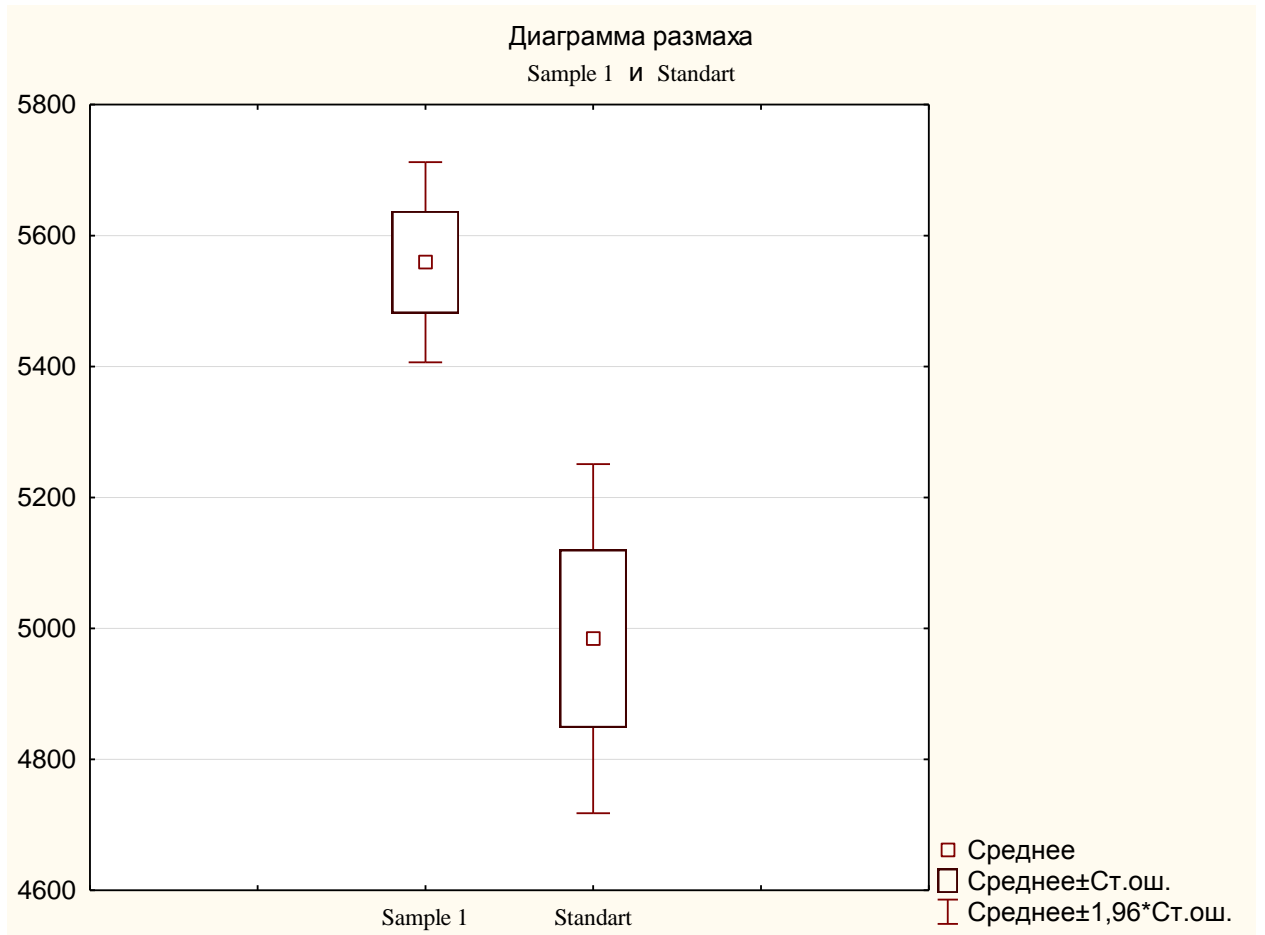


Рисунок 9 – Диаграмма размаха для средних

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

(информационное)

Диаграммы размаха (Образец 2 и стандартный образец)

На рисунках Д.1 и Д.2 представлены диаграммы размаха для выборок и для средних соответственно.

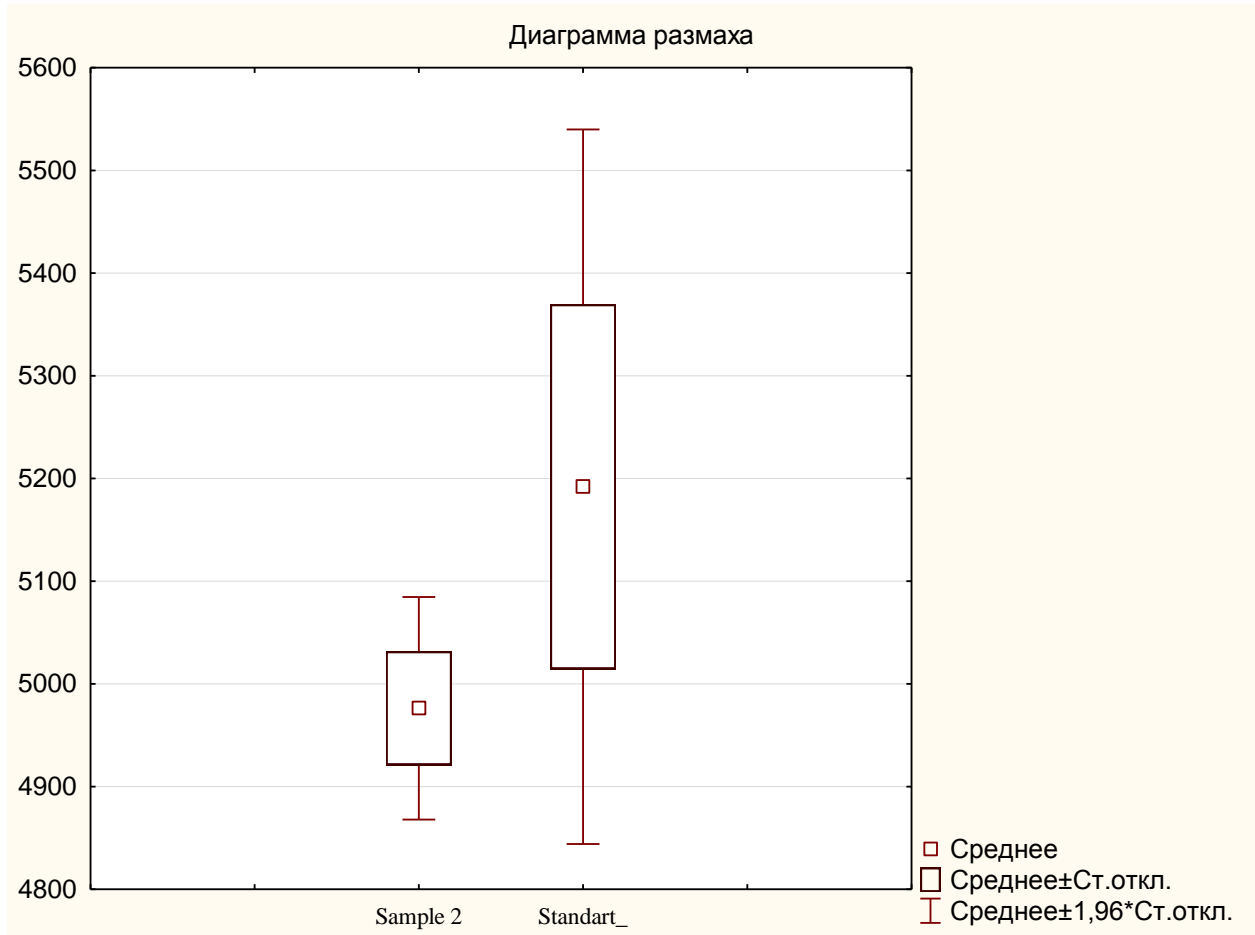


Рисунок Д.1 – Диаграмма размаха для выборок

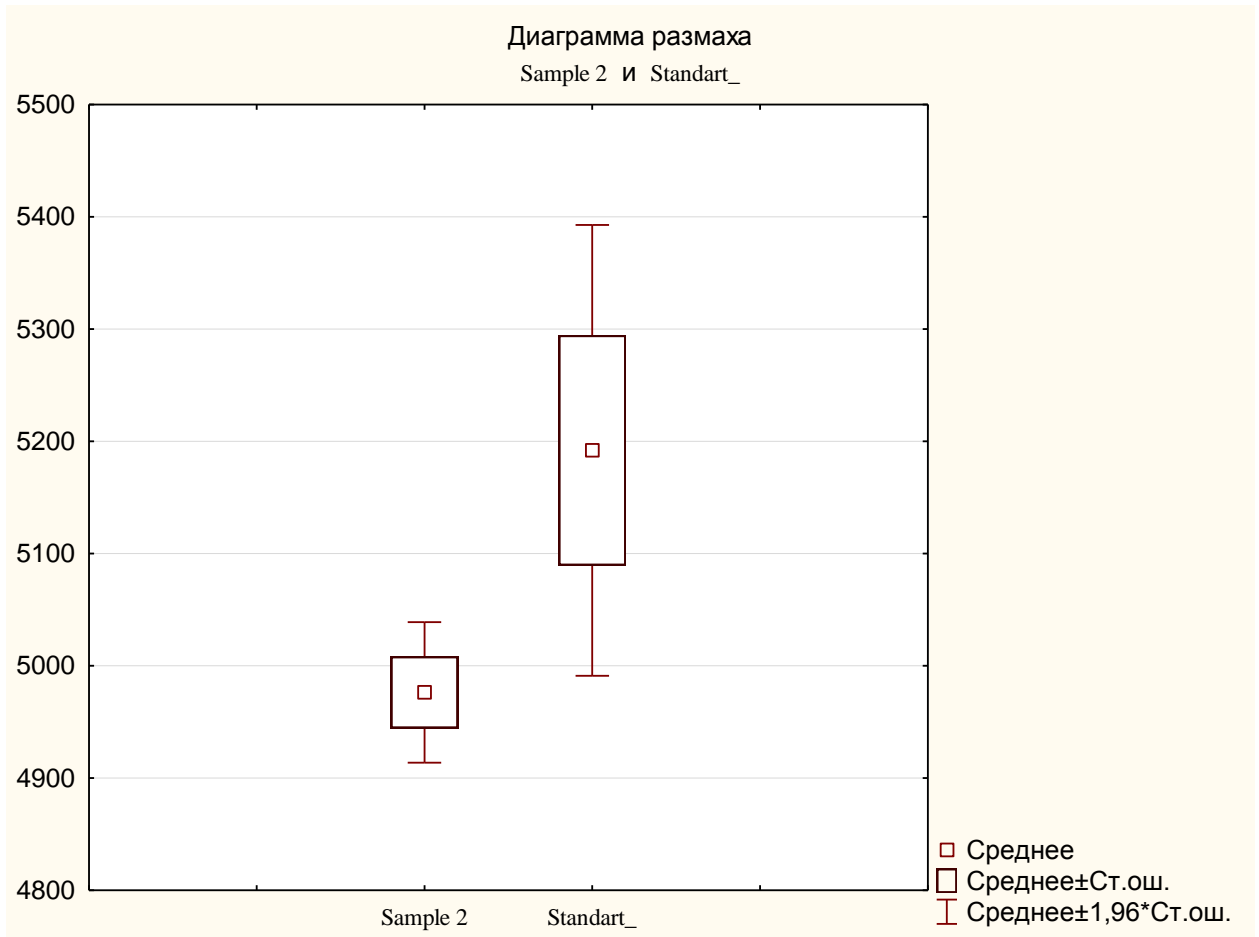


Рисунок Д.2 – Диаграмма размаха для средних