

На правах рукописи



Колганова Мария Алексеевна

Разработка методик определения трастузумаба и анти-лекарственных антител к трастузумабу в биологических объектах методом ИФА

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научные руководители:

доктор фармацевтических наук, профессор

Раменская Галина Владиславовна

доктор фармацевтических наук

Шохин Игорь Евгеньевич

Официальные оппоненты:

Белоусов Михаил Валерьевич – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтического анализа, заведующий кафедрой

Калёкин Роман Анатольевич – доктор фармацевтических наук, федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория судебно-химических и химико-токсикологических исследований, заведующий лабораторией

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «22» января 2025 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.002.02 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр.2.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета ДСУ 208.002.02

доктор фармацевтических наук, профессор



Демина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Онкологические заболевания занимают одну из лидирующих позиций в списке основных причин смертности во всем мире. По данным международных организаций число вновь выявленных случаев рака неуклонно растет. Так, по данным Всемирной организации здравоохранения за 2022 год в мире было зарегистрировано около 20 миллионов выявленных случаев онкологических заболеваний и порядка 9,7 миллиона случаев смерти от различных видов злокачественных опухолей. Похожую статистику приводит и Международное агентство по изучению рака, сообщая примерно о 19,9 миллиона новых случаев рака за 2022 г. В России по состоянию на начало 2022 г. также отмечается рост вновь выявленных случаев онкозаболеваний, как среди мужчин, так и среди женщин, при этом за 2021 г. процент выявления новых случаев рака увеличился на 4,4 %, а за 2022 г. вырос еще на 7,6 %. Одно из ведущих мест в структуре онкозаболеваний занимает рак молочной железы (РМЖ) – самый распространенный тип рака у женщин.

HER2 положительный подтип (HER2 – человеческий рецептор эпидермального фактора роста второго типа) – один из четырех подтипов РМЖ, который ранее считался наиболее неблагоприятным по прогнозу для пациенток. Однако в начале 2000-х годов лекарственные препараты (ЛП) HER2-направленной терапии вошли в состав комбинированной адъювантной и неоадъювантной терапии HER2+ подтипа РМЖ и радикально изменили ситуацию. Первым представителем подобных препаратов на фармацевтическом рынке стало гуманизированное моноклональное антитело (МкАТ) трастузумаб. Введение трастузумаба в клиническую практику значительно улучшило общую выживаемость и прогноз для пациенток, тем не менее, наряду с хорошей эффективностью и безопасностью, трастузумаб имеет высокую стоимость курса терапии, что ограничивает доступ пациентов к препарату.

В настоящий момент в России пациенткам с РМЖ доступен оригинальный ЛП «Герцептин®» (международное непатентованное наименование – трастузумаб) и два его биоаналога, лишь один из которых имеет полный производственный цикл на территории РФ. Кроме того, трастузумаб входит в Перечень стратегически значимых лекарственных средств, производство которых должно быть обеспечено на территории Российской Федерации и в Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения. Таким образом, принимая во внимание общий курс российской фармацевтической промышленности на импортозамещение лекарственных препаратов, задача разработки и регистрации отечественных биоаналогов трастузумаба представляется крайне актуальной.

Проведение сравнительных клинических исследований (КИ) – неотъемлемая часть процесса регистрации биоаналоговых препаратов. Поэтому актуальным также остается вопрос разработки и валидации биоаналитических методик, позволяющих проанализировать биологические образцы участников КИ с целью оценки фармакокинетики и иммуногенности препаратов-биоаналогов.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время в научной литературе представлены данные об оригинальном лекарственном препарате Герцептин[®], его структуре, механизме действия, эффективности и безопасности. Кроме того, в международных научных изданиях приведены результаты клинических исследований нескольких препаратов-биоаналогов трастузумаба. Помимо описания результатов клинических исследований в литературе также представлены немногочисленные методики количественного определения трастузумаба и анти-лекарственных антител к нему в биологических объектах. Однако в отличие от воспроизведенных препаратов на основе малых молекул, биоаналоги не являются 100 % «копией» оригинального ЛП. Поэтому, принимая в расчет некую «уникальность» молекулы биоаналога, каждый такой препарат требует проведения собственных клинических исследований и разработки собственных биоаналитических методик, предназначенных для определения исследуемого биоаналога и антител к нему.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы является разработка и валидация методик определения трастузумаба и анти-лекарственных антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА) для оценки фармакокинетики и иммуногенности препаратов трастузумаба в рамках проведения сравнительных клинических исследований биоаналогичности.

Основные задачи исследования:

1. Провести анализ литературных данных, посвященных вопросам разработки и регистрации препаратов МкАТ, включая препараты трастузумаба, представленные на фармацевтическом рынке, а также охарактеризовать молекулу трастузумаба и оценить основные существующие подходы к проведению биоаналитических исследований препаратов-биоаналогов трастузумаба.

2. Разработать и валидировать методику количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека методом ИФА со спектрофотометрическим способом детектирования.

3. Разработать и валидировать методику полуколичественного определения анти-лекарственных антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом ИФА со спектрофотометрическим способом детектирования.

4. Применить разработанные методики для анализа исследуемых образцов сыворотки крови в соответствии с протоколом КИ, утвержденным Минздравом России, с целью определения анти-лекарственных антител к трастузумабу и концентрации препарата в образцах здоровых добровольцев.

5. Изучить фармакокинетику препарата-биоаналога «Трастузумаб», а также провести оценку фармакокинетической эквивалентности (биоаналогичности) исследуемого препарата и препарата сравнения.

6. Оценить иммуногенность исследуемого препарата, используя данные о наличии/отсутствии анти-лекарственных антител в сыворотке крови добровольцев.

Научная новизна

В ходе выполнения работы разработана и валидирована методика количественного определения трастузумаба, характеризующаяся простотой выполнения и высокой производительностью анализа, а также методика полуколичественного определения анти-лекарственных антител к трастузумабу, для которой впервые предложена пробоподготовка образцов сыворотки крови с кислотной диссоциацией и аффинным отделением интерферирующего препарата, позволяющая детектировать антитела в присутствии высоких концентраций ЛП.

Разработанные методики использованы для определения концентрации препарата-биоаналога «Трастузумаб» и выявления антител к нему в исследуемых образцах субъектов сравнительного КИ I фазы. На основании полученных данных впервые изучена иммуногенность и фармакокинетика препарата «Трастузумаб», а также проведена оценка биоаналогичности исследуемого препарата и препарата сравнения.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость диссертационной работы заключается в выявленной возможности использования разработанных и валидированных методик не только для проведения биоаналитического этапа КИ, но и для мониторинга эффективности и безопасности терапии препаратами трастузумаба. Методика количественного определения трастузумаба, учитывая ее широкий аналитический диапазон, производительность и простоту выполнения, подходит для целей терапевтического лекарственного мониторинга трастузумаба, курс терапии

которым может продолжаться более года. Методика полуколичественного определения анти-лекарственных антител к трастузумабу может быть использована для оценки иммуногенности препарата, как части общего мониторинга безопасности терапии. Кроме того, описанный в работе подход к пробоподготовке биологических образцов с кислотной диссоциацией и аффинным отделением препарата при анализе иммуногенности может служить теоретической основой для разработки методик определения анти-лекарственных антител к другим препаратам на основе технологии МкАТ.

Результатом проведенных исследований, обуславливающим практическую значимость выполненной работы, стали разработанные и валидированные методики количественного определения трастузумаба и полуколичественного определения антител к трастузумабу, с помощью которых была изучена фармакокинетика и иммуногенность препарата-биоаналога «Трастузумаб» (ООО «Мабскейл», Россия) и установлена биоаналогичность исследуемого препарата и препарата сравнения. Внесение результатов исследования в регистрационное досье препарата «Трастузумаб» способствует его регистрации, а следовательно, повышению доступности HER2 направленной терапии для пациенток на территории Российской Федерации.

Методология и методы исследования

Основной метод, использованный в исследовании, – метод твердофазного иммуноферментного анализа со спектрофотометрическим способом детектирования, а именно, такие форматы как непрямой ИФА и мостиковый ИФА. Выбор метода был подкреплен обзором литературы, посвященной биоаналитическим исследованиям препаратов на основе молекулы трастузумаба. Основные этапы исследования: валидацию биоаналитических методик, анализ исследуемых образцов, расчет фармакокинетических (ФК) параметров и статистическое сравнение параметров для установления биоаналогичности препаратов проводили руководствуясь «Правилами проведения исследований биологических лекарственных средств на территории Евразийского экономического союза» (утверждены решением Совета ЕЭК № 89 от 03.11.2016 г.) и «Правилами проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» (утверждены решением Совета ЕЭК № 85 от 03.11.2016 г.). Статистическую обработку результатов валидации методик проводили в программном обеспечении R (вер. 4.3.0) и MS Excel 2021. Расчет ФК-параметров и построение ФК-профилей сравниваемых препаратов проводили в программах PK Solutions 2.0 и MS Excel 2021. Для статистического сравнения рассчитанных ФК-параметров, а также для расчета доверительных интервалов использовали дисперсионный анализ, реализованный в программе Statistica®.

Положения, выносимые на защиту

- Результаты разработки и валидации методики количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека методом ИФА со спектрофотометрическим способом детектирования.
- Результаты разработки и валидации методики полуколичественного определения анти-лекарственных антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом ИФА со спектрофотометрическим способом детектирования и дополнительным этапом пробоподготовки образцов сыворотки крови с кислотной диссоциацией и аффинным отделением интерферирующего трастузумаба.
- Результаты проведения сравнительного исследования фармакокинетики препаратов «Трастузумаб» (ООО «Мабскейл», Россия) и «Герцептин[®]», («Ф. Хоффман-Ля Рош Лтд.», Швейцария), представленные в виде фармакокинетических профилей, фармакокинетических параметров и заключения о биоаналогичности сравниваемых препаратов.
- Результаты сравнительной оценки иммуногенности препаратов «Трастузумаб» (ООО «Мабскейл», Россия) и «Герцептин[®]» (Ф. Хоффман-Ля Рош Лтд.», Швейцария), полученные в ходе анализа исследуемых образцов сыворотки крови, в рамках апробации методики определения анти-лекарственных антител к трастузумабу.

Степень достоверности и апробация результатов

В ходе проведения исследования выполнен достаточный объем испытаний, экспериментальные данные получены методом ИФА с использованием сертифицированного оборудования, имеющего действительный статус поверки. Достоверность первичных данных, положенных в основу диссертации, подтверждается актом проверки первичной документации. Разработанные методики количественного определения трастузумаба и полуколичественного определения антител к трастузумабу были подвергнуты полной валидации в соответствии с актуальными нормативными документами, при этом все валидационные характеристики методик удовлетворяли критериям приемлемости. Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с использованием современных общепринятых подходов (описательные статистики, дисперсионный анализ).

Результаты диссертационной работы были доложены на III Международной научно-практической конференции «Гармонизация подходов к фармацевтической разработке» (Москва, 2020 г.), на ежегодной конференции с международным участием «Разработка и регистрация биотехнологических лекарственных средств» (Москва, 2021 г.), на IV ежегодной международной научной конференции «IPharmS Annual Conference» (Иран, онлайн, 2022 г.), на ежегодной научно-практической конференции «Разработка и регистрация биотехнологических

лекарственных средств» (Москва, 2022 г.), на V ежегодной конференции СТПФ-2022: Регистрация и клинические исследования в ЕАЭС и на III международном российско-китайском симпозиум молодых ученых (Москва, 2022 г.). Диссертационная работа апробирована на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии имени А.П. Арзамасцева Института Фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол № 1 от «28» августа 2024.

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в планировании и проведении экспериментальных исследований, а также в обобщении и анализе полученных результатов. Автором лично проведена разработка и валидация методик количественного определения трастузумаба и полуколичественного определения анти-лекарственных антител к трастузумабу в сыворотке крови человека, а также выполнен анализ исследуемых образцов добровольцев с дальнейшей обработкой полученных данных с целью установления биоаналогичности сравниваемых препаратов и оценки их иммуногенности.

Внедрение результатов в практику

Разработанные методики определения трастузумаба и анти-лекарственных антител к трастузумабу в сыворотке крови человека были внедрены в научно-практическую деятельность ООО «ЦФА», акт б/н от 25.08.2023 г (Приложение А). Предложенные методы исследования фармакокинетики и иммуногенности биоаналоговых препаратов МкАТ внедрены в научно-практическую деятельность исследовательского центра ООО «СК», акт б/н от 04.12.2023 г. (Приложение А). Результаты сравнительного изучения фармакокинетики и иммуногенности биоаналогового препарата «Трастузумаб» были внесены компанией ООО «Мабскейл» в регистрационное досье препарата в рамках проведения клинического исследования I фазы, акт б/н от 22.09.2023 г. (Приложение А).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертационной работы соответствуют пункту 4 паспорта специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, а также пункту 11 паспорта специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Диссертационная работа выполнена в соответствии с научным планом и согласно тематике исследований кафедры фармацевтической и токсикологической химии имени

А.П. Арзамасцева Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) «Совершенствование образовательных технологий додипломного и последипломного медицинского и фармацевтического образования» (№ государственной регистрации: 01.2.011.68237).

Публикации по теме диссертации

По результатам диссертационной работы опубликовано 8 научных работ, из которых 4 – оригинальные статьи в журналах, индексируемых в международной базе данных Scopus, 3 иные публикации по результатам исследования, а также 1 публикация в сборнике материалов международной научной-практической конференции.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 142 страницах, содержит 10 рисунков и 23 таблицы (21 таблица в основной части, 2 – в приложениях). Диссертация состоит из введения, трех глав, включающих обзор литературы, материалы и методы, основные результаты и их обсуждение, общих выводов, заключения, практических рекомендаций и перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы и двух приложений. Список литературы содержит 101 источник, из которых 69 – на иностранном языке.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В качестве основного метода при выполнении диссертационной работы был выбран метод иммуноферментного анализа, который, согласно литературным данным, является наиболее подходящим для анализа высокомолекулярных соединений, и в том числе – препаратов МкАТ.

Основное оборудование: планшетный иммуноферментный анализатор Stat Fax 3200 (Awareness Technology Inc, США). В качестве вспомогательного оборудования использовали промыватель планшетов «Аквамарин» (Вектор-Бест, Россия), термошейкеры PST-60HL (Biosan, Латвия), а также общелабораторное оборудование (весы аналитические, дозаторы пипеточные одно- и многоканальные, рН-метр, встряхиватели, установка получения воды очищенной) и мерную посуду. Для хранения исследуемых биологических образцов и некоторых реактивов использовали морозильные и холодильные камеры (Pozis, Россия; Meling Biomedical, Китай).

Критические реактивы и материалы, использованные в ходе исследования: планшеты 96-луночные, покрытые человеческим рекомбинантным HER2 и заблокированные от неспецифического связывания (НПЦ Пробиотек, Россия), конъюгат козьих поликлональных

антител к Fc-фрагменту человеческого IgG с пероксидазой хрена (Sigma Aldrich, США), конъюгат пероксидазы со стрептавидином (Имтек, Россия) и набор реагентов для биотинилирования белков и антител (Силекс, Россия). Помимо критических реактивов при проведении анализа использовали общелабораторные реактивы (соли натрия и калия, глицин, трис(гидроксиметил)-аминометан, серную и соляную кислоты), а также реактивы для ИФА (бычий сывороточный альбумин, полисорбат-20, субстратный раствор тетраметилбензидина).

В качестве объектов исследования в ходе разработки и валидации биоаналитических методик выступали: модельные биологические образцы – калибровочные, образцы контроля качества (с известными концентрациями трастузумаба); модельные биологические образцы – положительного и отрицательного контроля (с известными концентрациями анти-лекарственных антител к трастузумабу); индивидуальные образцы интактной сыворотки крови здоровых добровольцев (включая гемолизированные и хилезные образцы). Для приготовления модельных биологических образцов использовали лекарственные препараты: Герцептин® («Ф. Хоффман-Ля Рош Лтд.», Швейцария) и Трастузумаб (ООО «Мабскейл», Россия), а также стандартный образец рекомбинантных, человеческих, антиидиотипических, нейтрализующих моноклональных антител к трастузумабу (BioRad Laboratories, США). В рамках сравнительного КИ I фазы в качестве объектов исследования выступали: «Герцептин®», лиофилизат для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий, 440 мг/ 20 мл (серия N3911B02/ B3113, «Ф. Хоффман-Ля Рош Лтд.», Швейцария) – препарат сравнения; «Трастузумаб», лиофилизат для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий, 440 мг/ 20 мл (серии ЛП010319ОП/ ЛП010419ОП, ЛП010920ОП, ООО «Мабскейл», Россия) – исследуемый препарат; биологические образцы сыворотки крови здоровых добровольцев-субъектов сравнительного клинического исследования биоаналогичности препаратов трастузумаба.

Исследуемые биологические образцы были получены от субъектов КИ, проведенного на базе аккредитованного центра «Научный клинический центр открытого акционерного общества «Российские железные дороги» (РКИ №611 от 23.10.2019, выдано Минздравом РФ). Исследование проводилось в соответствии с принципами Хельсинкской Декларации, требованиями надлежащей клинической практики, а также было одобрено локальным этическим комитетом клинического центра. Сравнительное исследование биоаналогичности было проведено с параллельным дизайном: 92 здоровых добровольца, мужчины 18-45 лет, рандомизированные в 2 группы 1:1, получали однократную 90-минутную инфузию одного из препаратов в дозе 6 мг/кг. После инфузии, в установленные протоколом КИ точки отбора (до 1704 часов после введения), у каждого добровольца проводили забор образцов крови для оценки фармакокинетики (17 точек) и иммуногенности (5 точек) трастузумаба. Образцы обрабатывали для получения сыворотки, замораживали и передавали для анализа. Всего с учетом выбывания

добровольцев и пропуска ими визитов было взято и проанализировано 1492 образца для оценки фармакокинетики трастузумаба и 440 образцов для оценки иммуногенности. Полученные значения концентрации трастузумаба в образцах добровольцев использовались для построения ФК-профилей, расчета ФК-параметров и оценки биоаналогичности сравниваемых препаратов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка и валидация методики количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека методом ИФА

В основе методики количественного определения трастузумаба лежит метод непрямого ИФА с покрытием планшета рекомбинантным белком HER2 и выявлением препарата конъюгатом козьих антител к Fc-фрагменту человеческого IgG с пероксидазой (рисунок 1).

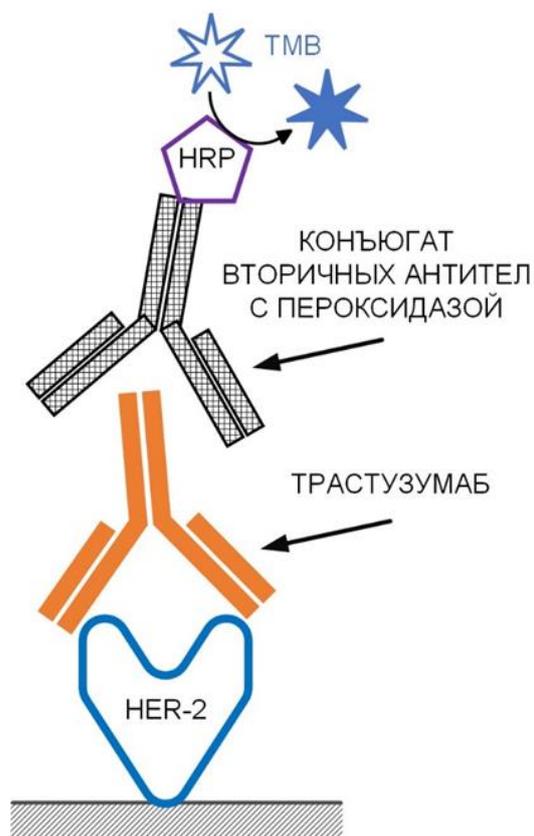


Рисунок 1 – Схема проведения ИФА в ходе количественного определения трастузумаба в сыворотке крови (HRP – пероксидаза хрена, ТМВ – тетраметилбензидин)

Для стандартизации анализа использовались подготовленные планшеты, покрытые рекомбинантным белком HER2 и заблокированные от неспецифического связывания. Аналитический диапазон методики подбирали, исходя из ожидаемых концентраций трастузумаба в сыворотке крови добровольцев после однократного введения в дозе 6 мг/кг. Выбранный диапазон составил от 3 до 300 мкг/мл трастузумаба в сыворотке крови человека. Дополнительно, ввиду отсутствия в методе ИФА пробоподготовки биологических образцов, на этапе разработки подбирали значение минимально необходимого разведения (MRD), для оптимизации соотношения «аналитический сигнал - фоновый шум». Значение MRD составило 1:5000 (0,02 % сыворотка крови).

По результатам разработки итоговый аналитический диапазон методики в лунках планшета составил от 0,6 нг/мл трастузумаба на уровне нижнего предела количественного определения (НПКО, 3 мкг/мл трастузумаба в сыворотке крови) до 60 нг/мл на уровне верхнего предела количественного определения (ВПКО, 300 мкг/мл трастузумаба в сыворотке крови). По окончании разработки проводили полную валидацию биоаналитической методики по

параметрам: минимально необходимое разведение, селективность, калибровочная кривая и НПКО, правильность и прецизионность (внутри цикла, между циклами), линейность (возможность) разведения, специфичность, стабильность и параллелизм.

Выбранное значение MRD сыворотки крови было подтверждено в ходе валидации. Для разведения 1:5000 наблюдалось оптимальное значение правильности получаемых концентраций трастузумаба. При этом выбранное разведение позволило не только снизить фоновый «шум» биологической матрицы, но и обеспечить широкий аналитический диапазон и высокую чувствительность методики – важные составляющие успешного анализа исследуемых образцов.

В ходе оценки селективности методики для 10 индивидуальных образцов сыворотки крови, включая гемолизные и хилезные, не наблюдалось превышения значений оптической плотности (ОП) по сравнению с образцами на уровне НПКО (3 мкг/мл трастузумаба), при этом абсолютные значения относительной погрешности ($RE_{abs}, \%$) для образцов на уровне НПКО не превышали 19,0 % при норме не более 25 %.

Калибровочные кривые, построенные с использованием 7 образцов с ненулевой концентрацией трастузумаба от 3 до 300 мкг/мл, носили сигмоидный S-образный характер и были описаны уравнением с четырьмя параметрами (рисунок 2), где A, B, C, d – параметры уравнения; y – оптическая плотность; x – концентрация трастузумаба (мкг/мл).

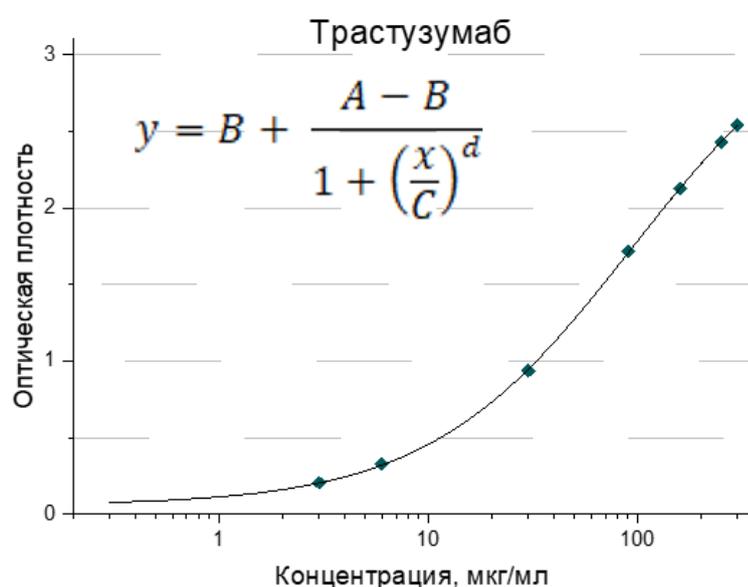


Рисунок 2 – Калибровочная кривая зависимости оптической плотности образцов от концентрации трастузумаба

Выбранная модель является типичной для методов связывания лиганда, к которым относится ИФА. В ходе валидации в 6 независимых циклах значения коэффициента детерминации калибровочных кривых составили не ниже 0,99, а значения $RE, \%$ для обратно пересчитанных концентраций калибровочных образцов не превышали установленных норм. Валидированное значение НПКО методики составило 3 мкг/мл трастузумаба в сыворотке крови.

Правильность и прецизионность методики оценивалась внутри и между 6 аналитическими циклами на 5 уровнях концентраций трастузумаба (по 3 повтора для каждого уровня). Для оценки параметров рассчитывали: значения $RE_{abs}, \%$, относительное стандартное отклонение ($RSD, \%$) и общую ошибку ($TE, \%$ – сумма абсолютных значений $RE, \%$ и $RSD, \%$). Соответствие

полученных значений установленным нормам – $RE_{abs}, \%$ и $RSD, \%$ не более 20 % (25 % для НПКО и ВПКО), $TE, \%$ не более 30 % (40 % для НПКО и ВПКО), позволило сделать вывод о приемлемой правильности и прецизионности получаемых значений концентрации трастузумаба.

Для оценки линейности (возможности) разведения образцов использовали образцы с концентрацией 600 мкг/мл трастузумаба, которые дополнительно разбавляли в 2 и 4 раза. Значения $RE_{abs}, \%$ и $RSD, \%$ образцов после пересчета разведения не превышали 20 %. Соответственно, разведения исследуемых образцов с учетом MRD могут достигать 1:10 000 – 1:20 000 без потери правильности и прецизионности значений концентрации трастузумаба.

Специфичность методики, обусловленную использованием сочетания рецептора HER2 на покрытии планшета и конъюгата козьих антител к Fc-фрагменту человеческого IgG с пероксидазой, оценивали в присутствии других препаратов МкАТ (цетуксимаб, бевацизумаб) на уровнях НПКО и ВПКО. При этом было установлено, что методика позволяет однозначно определять трастузумаб в образцах сыворотки крови человека в присутствии структурно-родственных соединений, так как значения $RE, \%$ образцов не превышали $\pm 25 \%$.

Стабильность трастузумаба в образцах сыворотки крови человека была доказана в течение 6 часов при комнатной температуре, после 3 циклов замораживания-размораживания, а также при долгосрочном хранении (171 день, температура от минус 35 °С до минус 50 °С).

Параметр «параллелизм» (параллельность разведения) оценивали с использованием исследуемых образцов добровольцев с концентрациями трастузумаба близкими к C_{max} . Серийное разбавление исследуемых образцов с дальнейшим пересчетом фактора разведения для получения исходной концентрации позволило доказать схожий характер поведения анализируемого вещества при разбавлении в модельных и реальных исследуемых образцах, а значения $RSD, \%$ образцов после пересчета разведения не превышали 10,75 % (при норме не более 30 %).

Согласно полученным результатам, представленным в Таблице 1, все изученные валидационные параметры методики количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека методом ИФА соответствовали установленным нормам, что позволило признать методику пригодной для анализа исследуемых образцов сыворотки крови добровольцев.

Таблица 1 – Сводная таблица валидационных параметров методики количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека методом ИФА

Параметр	Полученные результаты	Критерии приемлемости
MRD	Для разведения 1:5000 на уровне НПКО $RE, \%=3,7 \%$, $RSD, \%=8,4 \%$	Для образца НПКО: $RSD, \%$ и $RE \% \leq \pm 25 \%$
Селективность	Для 10 из 10 (100 %) образцов сыворотки с концентрацией трастузумаба на уровне НПКО значения $RE_{abs}, \%$ не превышали 19 %	Не менее чем для 80 % образцов на уровне НПКО: $RE \% \leq \pm 25 \%$.

Продолжение Таблицы 1

Калибровочная кривая и НПКО	В ходе 6 циклов для 100 % калибровочных образцов: RE, % \leq 22,0 % (для НПКО и ВПКО); RE, % \leq 9,5% (для остальных точек). Значения R ² составили не ниже 0,99. Валидированное значение НПКО составило 3 мкг/мл трастузумаба в сыворотке крови.	Не менее чем для 75 % калибровочных образцов в 6 циклах: RE, % \leq \pm 25 % (для НПКО и ВПКО), RE, % \leq \pm 20 % (для остальных образцов). R ² \geq 0,99.
Правильность (внутри цикла, между циклами)	<u>Для образцов НПКО и ВПКО:</u> внутри цикла RE _{abs} , % \leq 19,0 %, TE, % \leq 24,5 %; между циклами RE _{abs} , % \leq 10,6 %, TE, % \leq 18,3 %. <u>Для остальных точек:</u> внутри цикла RE _{abs} , % \leq 17,5 %, TE, % \leq 25,5 %; между циклами RE _{abs} , % \leq 10,2 %, TE, % \leq 16,6 %;	Для НПКО и ВПКО: RE _{abs} , % \leq 25 %, TE, % \leq 40 %. Для остальных точек: RE _{abs} , % \leq 20 %, TE, % \leq 30 %.
Прецизионность (внутри цикла, между циклами)	<u>Для образцов НПКО и ВПКО:</u> внутри цикла – RSD, % \leq 13,0 %, TE, % \leq 24,5 %; между циклами RSD, % \leq 8,6 %, TE, % \leq 18,3 %. <u>Для остальных точек:</u> внутри цикла – RSD, % \leq 13,9 %, TE, % \leq 25,5 %; между циклами RSD, % \leq 7,0 %, TE, % \leq 16,6 %.	Для НПКО и ВПКО: RSD, % \leq 25 %, TE, % \leq 40 %. Для остальных точек RSD, % \leq 20 %, TE, % \leq 30 %.
Возможность (линейность) разведения	Для образца 600 мкг/мл: 1:2 (300 мкг/мл) RE, % = -10,4 %, RSD, % = 1,3 %; 1:4 (150 мкг/мл) RE, % = -3,9 % RSD, % = 3,3 %. Валидированное разведение образцов: от 1:10 000 и 1:20 000 (с учетом MRD).	Для усредненных концентраций на каждом уровне разведения RE, % \leq \pm 20 %; RSD, % \leq 20 %
Специфичность	Доказана в присутствии цетуксимаба и бевацизумаба на уровнях НПКО и ВПКО методики, RE _{abs} % \leq 22,4 %	Для НПКО и ВПКО: RE, % \leq \pm 25 %
Стабильность	Доказана для трастузумаба в сыворотке крови: 6 ч. при комнатной температуре (RE _{abs} , % = 2,5 %; RSD, % = 3,0 %); 3 цикла замораживания-размораживания (RE _{abs} , % = 11,4 %; RSD, % = 7,7 %); долгосрочное хранение 171 день, -35°C...-50°C (RE _{abs} , % = 11,5 %; RSD, % = 12,6 %).	Для усредненных (N=3) концентраций на каждом уровне RE, % \leq \pm 20 %; RSD, % \leq 20 %
Параллелизм	Для 5 исследованных образцов добровольцев с концентрацией трастузумаба в области C _{max} RSD, % \leq 10,75 %.	После пересчета разведения RSD, % \leq 30 % (для каждого из образцов)

По результатам валидации было подтверждено, что методика обладает широким аналитическим диапазоном и большим MRD, а следовательно, характеризуется высокой чувствительностью к трастузумабу (0,6 нг/мл на уровне НПКО). Кроме того, использование в качестве твердой фазы компонентов коммерческой тест-системы делает анализ образцов простым, быстрым и высокопроизводительным. Подобные свойства разработанной методики позволяют анализировать биологические образцы, содержащие трастузумаб, как в очень высоких концентрациях (после введения нагрузочных доз), так и в более низких – в фазе элиминации.

Разработка и валидация методики полуколичественного определения анти-лекарственных антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом ИФА

Методика полуколичественного определения анти-лекарственных антител к трастузумабу основана на «мостиковом» варианте ИФА с дополнительным этапом пробоподготовки – кислотной диссоциацией биологических образцов (рисунок 3). Использование кислотной диссоциации было предложено с целью разрушения иммунных комплексов «трастузумаб - антитела к препарату», которые могут образовываться в крови добровольцев после инфузии ЛП.

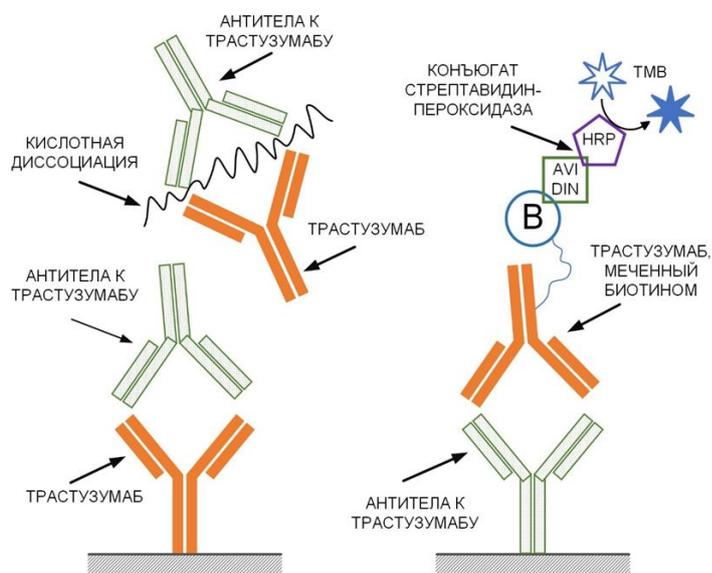


Рисунок 3 – Схема проведения ИФА в ходе полуколичественного определения анти-лекарственных антител к трастузумабу (В – биотин, ТМВ – тетраметилбензидин)

В ходе разработки были выбраны предварительные концентрации образцов положительного контроля (рекомбинантные антиидиотипические нейтрализующие моноклональные антитела к трастузумабу), составившие 500 и 1000 нг/мл антител к трастузумабу, а также значение MRD – 1:15. Также были подобраны рабочие параметры методики (время, перемешивание, температура инкубации), при этом особое внимание уделяли двум наиболее критичным этапам анализа – кислотной диссоциации и элюированию антител.

Биоаналитическая методика определения анти-лекарственных антител к трастузумабу была валидирована по параметрам: предел исключения, чувствительность и «хук»-эффект, селективность, устойчивость методики к присутствию ЛП, прецизионность и стабильность. Кроме того, для ряда параметров валидация проводилась как для формата скрининга, так и для формата подтверждающего анализа (с добавлением избытка препарата после диссоциации для доказательства специфичности выявленных антител к трастузумабу).

В начале валидации методики были установлены значения пределов исключения (cut-point) для скрининга и подтверждающего анализа. Предел исключения устанавливали на основании статистической обработки значений ОП (для скрининга) и значений % ингибирования сигнала (для подтверждающего анализа, где $\% inh = (1 - ОП_{скрин.}/ОП_{подтв.}) * 100\%$), полученных для 50 индивидуальных образцов интактной сыворотки крови добровольцев. Каждый из 50 образцов анализировали в ходе 6 циклов (2 аналитика, 3 разных дня), что позволило оценить вариабельность значений, получаемых для интактных образцов при анализе согласно

разработанной методике (рисунок 4). Помимо интактных образцов, в каждый цикл включали образцы положительного контроля (Positive Control, PC1, PC2 – 1000 и 500 нг/мл антител), которые демонстрировали устойчивый положительный сигнал, тем самым подтверждая пригодность каждого выполненного цикла (рисунок 5).

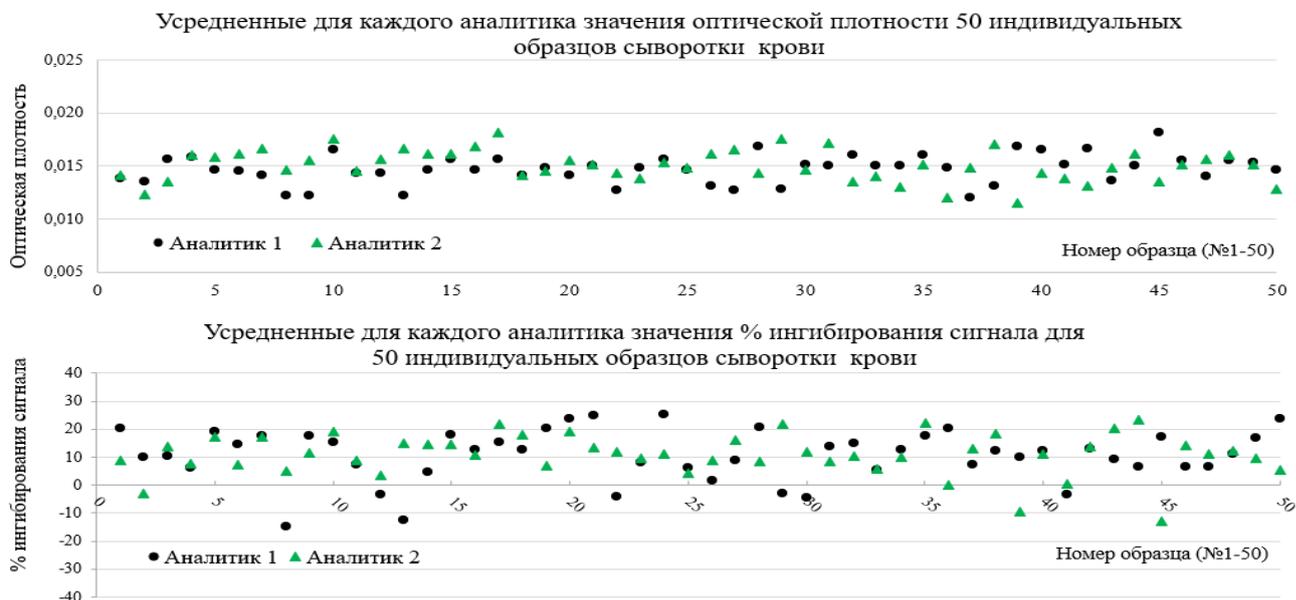


Рисунок 4 – Значения ОП и % ингибирования для 50 индивидуальных образцов интактной сыворотки крови, полученные двумя аналитиками в ходе определения пределов исключения

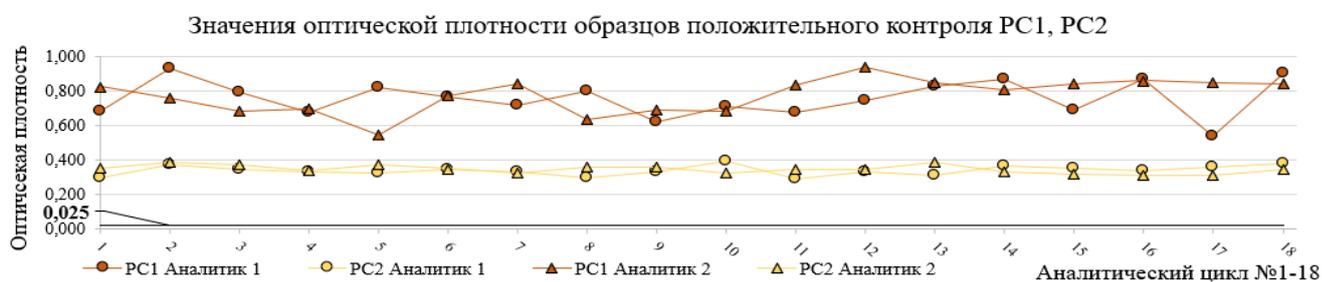


Рисунок 5 – Значения оптической плотности образцов положительного контроля (анти-лекарственные антитела к трастузумабу) в циклах по определению предела исключения для скрининга

По результатам статистической обработки значение фактора скринингового предела исключения (95-й процентиль выборки) составило 1,3455, а значение предела исключения для подтверждающего анализа (99-й процентиль выборки) – 32,618 %.

Оценку чувствительности методики и отсутствия «хук»-эффекта проводили в 6 циклах путем анализа образцов с содержанием антител к трастузумабу от 31,25 до 25 000 нг/мл. Отсутствие «хук»-эффекта было доказано вплоть до 25 000 нг/мл антител к трастузумабу, а чувствительность рассчитывали, исходя из наименьших концентраций антител в образцах, демонстрирующих положительный сигнал в каждом цикле. Значение чувствительности составило 99,5 нг/мл антител (рекомендуемое значение – не более 100 нг/мл). Рассчитанные концентрации антител в образцах положительного контроля на нижнем (low positive control, LPC) и верхнем (high positive control, HPC) уровнях составили 129 нг/мл и 2580 нг/мл, соответственно.

Селективность методики оценивалась с помощью 10 образцов НРС и LPC, приготовленных с использованием индивидуальных образцов интактной сыворотки крови, включая гемолизированные и хилезные. В ходе изучения параметра в формате скрининга и в формате подтверждающего анализа все образцы НРС и LPC были «положительными» по результатам анализа, а 90 % образцов интактной сыворотки крови (отрицательный контроль) демонстрировали сигнал ниже предела исключения (при норме не менее 80 % образцов).

Для оценки устойчивости методики к трастузумабу (Таблица 2) анализировали образцы с различными концентрациями антител к трастузумабу и самого трастузумаба в образцах.

Таблица 2 – Результаты оценки устойчивости методики к трастузумабу (оптическая плотность)

Концентрация антител, нг/мл	Концентрация трастузумаба, мкг/мл				
	500	250	100	50	0
2500	0,024	0,033	0,055	0,097	1,667
1000	0,018	0,017	0,018	0,034	0,534
500	0,015	0,018	0,017	0,020	0,200
100	0,012	0,013	0,015	0,014	0,052
50	0,012	0,013	0,012	0,014	0,021
Предел исключения	0,020				

Количественной характеристикой устойчивости методики к трастузумабу стала наименьшая концентрация антител (500 нг/мл) в присутствии наибольшей концентрации ЛП (50 мкг/мл), для которой наблюдался положительный сигнал.

Оценку прецизионности значений ОП и % inh проводили с использованием образцов положительного контроля (НРС и LPC). Прецизионность оценивали внутри цикла и между 6 циклами. Рассчитанные значения RSD, % не превышали 20 %, что подтвердило приемлемую прецизионность получаемых значений оптической плотности и % ингибирования сигнала.

Стабильность антител к трастузумабу в составе сыворотки крови человека была доказана в течение 24 часов при комнатной температуре, после 3 циклов замораживания-размораживания и при долгосрочном низкотемпературном хранении (137 дней, от минус 35 °С до минус 50 °С).

В ходе валидации методики все исследованные параметры соответствовали критериям приемлемости (Таблица 3), и методика была признана пригодной для анализа исследуемых образцов сыворотки крови добровольцев.

Таблица 3 – Сводная таблица валидационных параметров методики полуколичественного определения анти-лекарственных антител к трастузумабу в сыворотке крови методом ИФА

Параметр	Полученные результаты	Критерии приемлемости
Предел исключения (для скрининга, для подтверждающего анализа)	Скрининговый фактор предела исключения – 1,3455; предел исключения для подтверждающего анализа – 32,618 %. Образцы РС1, РС2 были выше значений отрицательного контроля в циклах.	Значения ОП и %inh образцов РС1, РС2 должны демонстрировать сигнал выше усредненного значения ОП или %inh отрицательного контроля.

Продолжение Таблицы 3

Чувствительность методики, «хук»-эффект	Чувствительность 99,5 нг/мл антител к трастузумабу; концентрации LPC и HPC: 129 нг/мл и 2580 нг/мл антител к трастузумабу. «Хук»-эффект отсутствовал до 25 000 нг/мл антител к трастузумабу.	Чувствительность – наименьшая конц. антител в образце, демонстрирующем сигнал выше предела исключения (в каждом из 6 циклов). Должно отсутствовать подавление сигнала высокими концентрациями антител.
Селективность	<u>Для образцов интактной сыворотки крови:</u> 9 из 10 (90 %) ниже предела исключения. <u>Для образцов HPC, LPC:</u> 10 из 10 (100 %) выше предела исключения (в скрининге и подтверждающем анализе).	Для образцов интактной сыворотки крови: ≥ 80 % образцов должны быть ниже предела исключения; для образцов HPC, LPC: ≥ 80 % образцов должны быть выше предела исключения.
Устойчивость методики к присутствию ЛП	50 мкг/мл трастузумаба на уровне 500 нг/мл анти-лекарственных антител к препарату.	Как минимум для 1 концентрации антител должна быть доказана устойчивость.
Прецизионность для формата скрининга (внутри, между циклами)	<u>Для образцов HPC:</u> внутри цикла (N=6) RSD, % = 11,76 %, между циклами (N=21) RSD, % = 12,13 %; <u>Для образцов LPC:</u> внутри цикла (N=6) RSD, % = 9,86 %, между циклами (N=21) RSD, % = 13,64 %.	Для ОП образцов HPC и LPC: RSD, % ≤ 20 % внутри и между циклами.
Прецизионность для формата подтверждающего анализа (внутри, между циклами)	<u>Для образцов HPC:</u> внутри цикла (N=6) RSD, % = 0,19 %, между циклами (N=21) RSD, % = 0,18 %; <u>Для образцов LPC:</u> внутри цикла (N=6) RSD, % = 6,00 %, между циклами (N=21) RSD, % = 6,74 %.	Для % inh образцов HPC и LPC: RSD, % ≤ 20 % внутри и между циклами.
Стабильность	Доказана для антител к трастузумабу в сыворотке крови: 24 ч. при комнатной температуре (RSD, % $\leq 17,79$ %); 3 цикла замораживания-размораживания (RSD, % $\leq 17,00$ %); при низкотемпературном хранении от минус 35 °C до минус 50 °C, 137 дней (RSD, % $\leq 13,15$ %).	Значения RSD, % для образцов HPC и LPC (N=3) не должны превышать 20 %.

Методика продемонстрировала требуемую чувствительность и высокую устойчивость к трастузумабу, которая обеспечивается пробоподготовкой образцов с кислотной диссоциацией и аффинным отделением препарата. При этом прецизионность значений, получаемых в методике, соответствует установленным требованиям и подвергается постоянному мониторингу путем включения в каждый цикл образцов положительного и отрицательного контроля.

Анализ исследуемых образцов субъектов клинического исследования биоаналогичности

Разработанные и валидированные методики были применены для анализа исследуемых образцов субъектов клинического исследования биоаналогичности препаратов «Трастузумаб»

(ООО «Мабскейл», Россия) и «Герцептин®» (Ф. Хоффман-Ля Рош Лтд., Швейцария). В ходе количественного определения трастузумаба в сыворотке крови здоровых добровольцев было выполнено 45 циклов, в результате чего получены данные для расчёта ФК-параметров, построения ФК-профилей сравниваемых препаратов и оценки их биоаналогичности. Также был проведен повторный выборочный анализ образцов, дополнительно подтвердивший правильность определения концентраций трастузумаба в исследуемых биологических образцах.

В ходе полуколичественного определения анти-лекарственных антител к трастузумабу было выполнено 11 циклов в формате скрининга и 3 в формате подтверждающего анализа, при этом антител к препарату не было выявлено ни у одного из добровольцев.

Оценка фармакокинетики и иммуногенности препаратов трастузумаба

Фармакокинетические параметры трастузумаба рассчитывались в программах MS Excel 2021 и PK Solution 2.0 для каждого сравниваемого препарата отдельно, с использованием методов описательной статистики. Максимальную концентрацию трастузумаба (C_{max}) рассчитывали исходя из данных анализа образцов. Значения площади под фармакокинетической кривой от 0 до времени t ($AUC_{(0-t)}$) рассчитывали методом трапеций, а площадь экстраполированную до бесконечности ($AUC_{(0-\infty)}$) – по уравнению, учитывающему область конечного отрезка ФК-профиля. При этом критерий $AUC_{(0-t)} \geq 80 \% \cdot AUC_{(0-\infty)}$ был достигнут для всех добровольцев. Помимо основных ФК-параметров (C_{max} , $AUC_{(0-t)}$ и $AUC_{(0-\infty)}$) рассчитывали также t_{max} (время достижения C_{max}) и $t_{1/2}$ (период полувыведения). Рассчитанные параметры приведены в Таблице 4.

Таблица 4 – Рассчитанные ФК-параметры исследуемого препарата и препарата сравнения

Показатель	Фармакокинетические параметры					Исследуемый препарат
	$AUC_{(0-t)}$, мкг*ч/мл	$AUC_{(0-\infty)}$, мкг*ч/мл	C_{max} , мкг/мл	t_{max} , ч.	$t_{1/2}$, сут.	
Среднее арифмет.	35365	35511	178,6	3,1	8,4	Трастузумаб, ООО «Мабскейл», Россия
Среднее геометр.	34305	34434	174,9	2,6	8,3	
Медиана	36855	36973	177,1	3,0	8,2	
Показатель	Фармакокинетические параметры					Препарат сравнения
	$AUC_{(0-t)}$, мкг*ч/мл	$AUC_{(0-\infty)}$, мкг*ч/мл	C_{max} , мкг/мл	t_{max} , ч.	$t_{1/2}$, сут.	
Среднее арифмет.	31156	31280	162,2	2,7	8,3	Герцептин®, Ф. Хоффман-Ля Рош Лтд., Швейцария
Среднее геометр.	30479	30594	159,1	2,3	8,2	
Медиана	31244	31284	162,3	1,5	8,1	

По результатам расчета ФК-параметров было отмечено, что полученные значения для препарата сравнения «Герцептин®» совпадают с литературными данными, приведенными для аналогичных КИ, что можно рассматривать как подтверждение релевантности полученных данных и правильности проведения аналитической части клинического исследования.

Усредненные ФК-профили (рисунок 6) наглядно демонстрируют, что характер зависимости «средняя концентрация трастузумаба – время» для сравниваемых препаратов практически не отличается, а различия в концентрациях действующего вещества, измеренных после введения сравниваемых препаратов, не носят систематического характера.

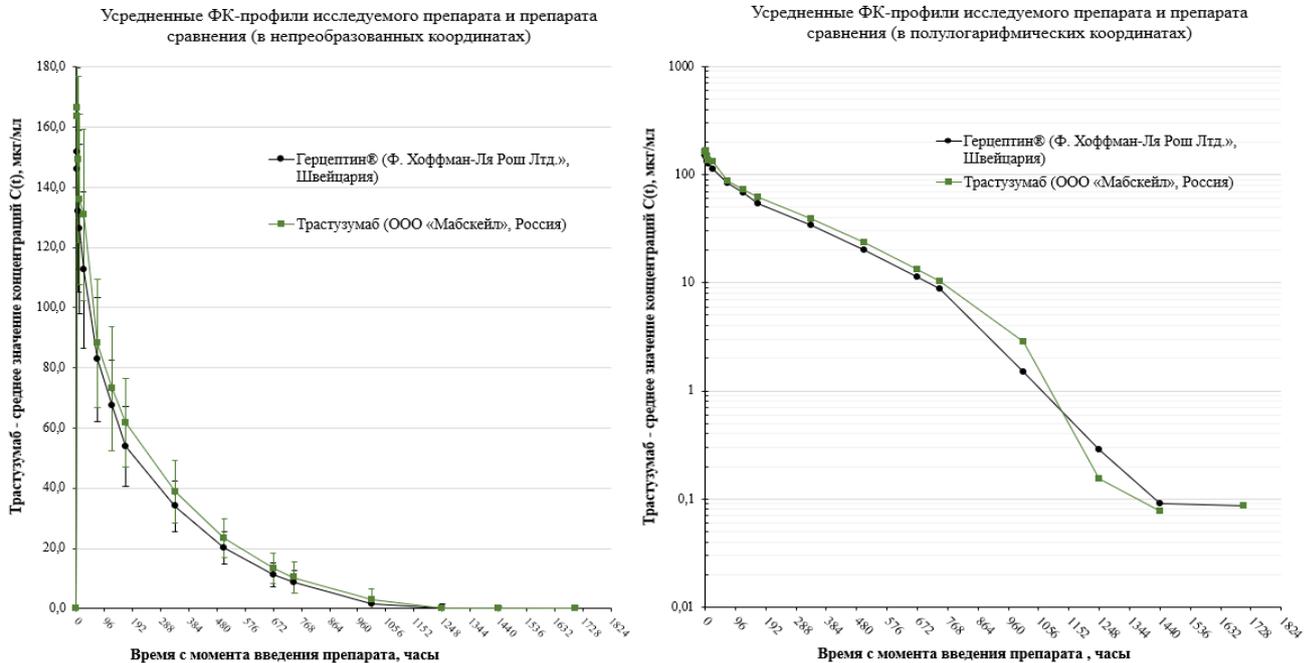


Рисунок 6 – Усредненные фармакокинетические профили исследуемого препарата («Трастузумаб») и препарата сравнения («Герцептин®»)

В части оценки иммуногенности сравниваемых препаратов, учитывая отсутствие антилекарственных антител к трастузумабу в образцах добровольцев-участников сравнительного КИ, было отмечено, что полученные результаты не только свидетельствуют о сходимости данных для исследуемого препарата и препарата сравнения, но и согласуются с литературными данными о низкой иммуногенности молекулы трастузумаба.

Оценка биоаналогичности (биоэквивалентности) сравниваемых препаратов

В ходе оценки биоаналогичности исследуемого препарата «Трастузумаб» (ООО «Мабскейл», Россия) и препарата сравнения «Герцептин®» (Ф. Хоффман-Ля Рош Лтд., Швейцария) с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) проводилось статистическое сравнение основных фармакокинетических параметров ($AUC_{(0-t)}$, $AUC_{(0-\infty)}$ и C_{max}), а также проверка гипотезы об эквивалентности препаратов. Для оценки эквивалентности (биоаналогичности) препаратов трастузумаба вычисляли двусторонние 90 % доверительные интервалы для отношения средних геометрических основных ФК-параметров C_{max} , $AUC_{(0-t)}$, $AUC_{(0-\infty)}$ сравниваемых препаратов, а также коэффициенты внутрииндивидуальной вариабельности (CV , % $_{intra}$), представленные в Таблице 5.

Таблица 5 – Результаты оценки критериев эквивалентности (биоаналогичности) препаратов трастузумаба

ФК-параметр	Коэффициент вариации CV_{intra} , %	Отношение средних геометрических (μ_T/μ_R)	90 % доверительный интервал для μ_T/μ_R
$AUC_{(0-\infty)}$ (f)	24,30	112,55 %	103,32 – 122,60 %
$AUC_{(0-t)}$ (f')	24,16	112,55 %	103,38 – 122,55 %
C_{max} (f'')	20,01	109,90 %	102,39 – 117,96 %

Согласно полученным результатам, отношения средних геометрических ФК-параметров исследуемого препарата и препарата сравнения и их 90 % двусторонние доверительные интервалы лежали в границах, установленных протоколом исследования: 80,00 % – 125,00 %. Это позволило сделать вывод о биоаналогичности исследуемого препарата и препарата сравнения (рисунок 7).

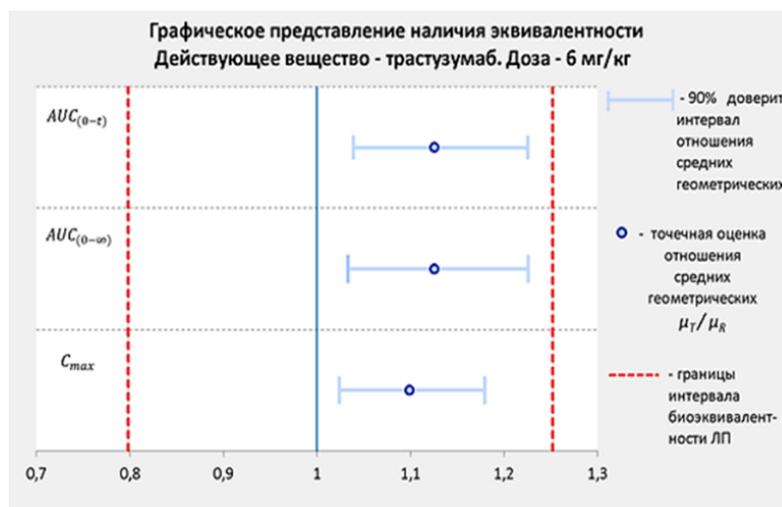


Рисунок 7 – Графическое представление биоаналогичности препаратов «Трастузумаб» (ООО «Мабскейл», Россия) и «Герцептин®» (Ф. Хоффман-Ля Рош Лтд., Швейцария)

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Проведен обзор препаратов трастузумаба, представленных на фармацевтическом рынке, а также дана всесторонняя характеристика гуманизованного моноклонального антитела трастузумаб. Установлено, что оптимальный метод определения трастузумаба и анти-лекарственных антител к нему в биологических объектах – метод ИФА, а также что для целей регистрации препаратов-биоаналогов требуется проведение сравнительных КИ и разработка собственных биоаналитических методик.

2. Разработана и валидирована методика количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека методом ИФА. Аналитический диапазон составил 3 – 300 мкг/мл, MRD образцов – 1:5000. В ходе валидации подтверждена селективность и специфичность методики, правильность и прецизионность получаемых значений, возможность и параллельность разведения образцов, а также стабильность трастузумаба в сыворотке крови при различных условиях хранения. Все валидационные параметры удовлетворяли критериям приемлемости, что позволяет применять методику для анализа биологических образцов при проведении КИ с целью оценки фармакокинетики препаратов трастузумаба.

3. Разработана и валидирована методика полуколичественного определения анти-лекарственных антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом ИФА с дополнительным этапом пробоподготовки биологических образцов. Чувствительность составила 99,5 нг/мл, устойчивость к трастузумабу – 50 мкг/мл препарата на уровне 500 нг/мл анти-лекарственных антител. Подтверждена прецизионность, селективность и специфичность методики, а также стабильность антител к трастузумабу при различных условиях хранения биологических образцов. По результатам валидации доказана применимость методики для выявления антител к трастузумабу в сыворотке крови человека для оценки иммуногенности трастузумаба при проведении КИ.

4. Проведен анализ биологических образцов участников сравнительного клинического исследования биоаналогичности. Для оценки фармакокинетики трастузумаба выполнено 45 аналитических циклов, для оценки иммуногенности – 14 циклов. В ходе анализа получены данные о концентрации трастузумаба, а также о наличии/отсутствии антител к препарату в сыворотке крови добровольцев после однократного внутривенного введения препарата в дозе 6 мг/кг.

5. Рассчитаны основные (C_{max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$) и дополнительные (t_{max} , $t_{1/2}$) ФК-параметры препарата-биоаналога «Трастузумаб» и оригинального препарата «Герцептин®», проведена оценка их фармакокинетической эквивалентности. Установлено, что исследуемый препарат и препарат сравнения имеют схожие ФК-профили, при этом рассчитанные значения двусторонних 90 % доверительных интервалов соотношений средних геометрических основных ФК-параметров лежат в диапазоне 80,00 % – 125,00 %, что позволяет сделать вывод о биоаналогичности сравниваемых препаратов.

6. Проведена оценка иммуногенности препаратов трастузумаба, в результате которой не было выявлено анти-лекарственных антител к препарату ни у одного из 92 добровольцев. Подтверждена сопоставимая иммуногенность сравниваемых препаратов, которая соотносится с литературными данными, свидетельствующими о низкой иммуногенности молекулы трастузумаба, в частности, при однократном введении здоровым добровольцам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения работы разработаны и валидированы методики количественного определения трастузумаба и полуколичественного определения анти-лекарственных антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом ИФА. Для методики полуколичественного определения анти-лекарственных антител к трастузумабу предложена специальная пробоподготовка биологических образцов, улучшающая устойчивость методики к интерферирующему препарату. Валидированные методики использованы для проведения

биоаналитической части сравнительного КИ препаратов «Трастузумаб» (ООО «Мабскейл», Россия) и «Герцептин®» (Ф. Хоффман-Ля Рош Лтд., Швейцария) с участием здоровых добровольцев. Результаты, полученные в ходе анализа исследуемых биологических образцов, использованы для изучения фармакокинетики сравниваемых препаратов, а также для оценки их биоаналогичности и иммуногенности. Установлено, что сравниваемые препараты имеют схожие фармакокинетические профили, являются фармакокинетически эквивалентными (биоаналогичными), а также характеризуются схожими низкими значениями иммуногенности. Полученные результаты способствуют регистрации отечественного препарата-биоаналога трастузумаба и выводу его на фармацевтический рынок, а следовательно, повышению доступности HER2-направленной терапии для пациенток в России.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Разработанные и валидированные методики могут быть использованы в биоаналитических лабораториях для определения концентрации трастузумаба и выявления антител к препарату в биологических образцах субъектов клинических исследований биоаналогичности. Методика количественного определения трастузумаба применима для проведения терапевтического лекарственного мониторинга трастузумаба у пациенток при многократном введении, а методика определения анти-лекарственных антител к трастузумабу подходит для оценки иммуногенности препарата в рамках мониторинга безопасности терапии трастузумабом.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В ходе последующих исследований возможно изучение применимости методики пробоподготовки биологических образцов с кислотной диссоциацией и аффинным отделением препарата для выявления антител к другим препаратам МкАТ. Кроме того, разработанные методики после частичной валидации, учитывающей биохимические свойства биологической матрицы пациентов, могут использоваться для анализа образцов пациентов в рамках КИ III и последующих фаз. Потенциально перспективным направлением также является применение разработанных методик для определения концентрации препаратов-конъюгатов «антитело-ЛП» на основе биоаналога «Трастузумаб» и анти-лекарственных антител к таким препаратам.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Оценка биоаналогичности и иммуногенности препаратов «Трастузумаб» (ООО «Мабскейл», Россия) и «Герцептин®» (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Швейцария) в рамках двойного слепого рандомизированного сравнительного клинического исследования I фазы с

участием здоровых добровольцев / **М.А. Колганова**, Е.Е. Бекетов, В.В. Писарев, А.В. Иванов, С.В. Васильев, И.Е. Шохин // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2023. – Том 12. – № 3. – С. 240-249. [**Scopus**].

2. Разработка и валидация методики определения нейтрализующих антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа / **М.А. Колганова**, О.С. Сагимбаева, Ю.С. Борисова, Е.Е. Бекетов, И.Е. Шохин // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2023. – Том 12. – № 2. – С. 190-197. [**Scopus**].

3. Разработка и валидация методики определения антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа / О.А. Елисеева, **М.А. Колганова**, И.Е. Шохин, С.П. Дементьев, А.М. Власов, А.А. Замятнин, Н.С. Дубовик, А.Ю. Савченко, Н.В. Дозморова, В.Г. Лужанин // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2022. – Том 11. – № 54. – С. 120-127.

4. Разработка и валидация методики количественного определения рекомбинантного гетеродимерного белка RPH-104 в сыворотке крови как инструмента персонализации фармакотерапии / **М.А. Колганова**, Е.В. Мельник, Е.Н. Фишер, В.И. Гегечкори, А.А. Замятнин, Д.О. Неймышева, Н.В. Горпинченко, О.В. Салтыкова, И.Е. Шохин, Г.В. Раменская // **Химико-фармацевтический журнал.** – 2022. – Том 56. – № 12. – С. 66-70. [**Scopus**].

5. Affinity Capture Elution (ACE) ELISA Method Development and Validation for Novel RPH-104 Drug Immunogenicity Evaluation / **М.А. Kolganova**, E.V. Melnik, E.N. Fisher, V.V. Smirnov, A.M. Vlasov, V.I. Gegechkori, N.A. Shulga, I.E. Shokhin, G.V. Ramenskaya // **Biomedicines.** – 2022. – Vol. 10 № 11. – Art. 2750. – P. 15. [**Scopus, Q1**].

6. PD-L1 как потенциальная мишень в противораковой терапии (обзор) / Н.Н. Андрусова, **М.А. Колганова**, А.В. Алешина, И.Е. Шохин // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2021. – Том 10. – № 1. – С.31-36.

7. Сравнительное исследование фармакокинетики и иммуногенности препарата-биоаналога бевацизумаба (RPH-001, АО «Р-Фарм», Россия) и оригинального биотехнологического препарата Авастин® (Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд., Швейцария) в параллельных группах при однократном внутривенном введении у здоровых добровольцев / **М.А. Колганова**, Н.С. Багаева, Ю.В. Медведев, И.Е. Шохин, А.В. Демчинская, Т.Н. Палкина, Д.А. Салазанов, Г.Е. Коноплева, М.С. Шереметьева, Ш.З. Арчуадзе, Я.В. Лавровский, А.Ю. Савченко, М.Ю. Самсонов // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2019. – Том 8. – № 3. – С.91-100.

8. **Колганова, М.А.** Моноклональные антитела: современная классификация и области применения / **М.А. Колганова** // Гармонизация подходов к фармацевтической разработке: сборник тезисов III Международной научно-практической конференции. Москва, РУДН. 25 ноября 2020 г. – М.: РУДН, 2020. – С. 16-20.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

% inh – процент ингибирования сигнала;
HER2 – человеческий рецептор эпидермального фактора роста 2 типа;
HPC – образец положительного контроля на верхнем уровне;
LPC – образец положительного контроля на нижнем уровне;
MRD – минимально необходимое разведение;
RE, % – относительная погрешность;
REabs, % - абсолютное значение относительной погрешности;
RSD, % – относительное стандартное отклонение;
TE, % – общая ошибка;
ВПКО – верхний предел количественного определения;
ИФА – иммуноферментный анализ;
КИ – клиническое исследование;
ЛП – лекарственный препарат;
МкАТ – моноклональное антитело;
НПКО – нижний предел количественного определения;
ОП – оптическая плотность;
РМЖ – рак молочной железы;
ФК – фармакокинетика.