

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

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

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Научные руководители:

доктор фармацевтических наук, профессор
Раменская Галина Владиславовна

доктор фармацевтических наук
Шохин Игорь Евгеньевич

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Требования к разработке и регистрации препаратов-биоаналогов	18
1.2. Трастузумаб: структура, механизм действия, фармакокинетика и иммуногенность.....	20
1.3. Биоаналоговые препараты на основе молекулы трастузумаба	27
1.4. Методики определения трастузумаба и анти-лекарственных антител к трастузумабу в биологических объектах	38
1.5. ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1	49
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	50
2.1. Оборудование	50
2.2. Реактивы и расходные материалы.....	51
2.3. Приготовление растворов.....	53
2.3.1. Растворы, приготовленные при выполнении анализа согласно методике количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека методом ИФА	53
2.3.2. Растворы, приготовленные при выполнении анализа согласно методике полуколичественного определения антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом ИФА	54
2.4. Исследуемые образцы.....	57
2.5. Приготовление калибровочных образцов, образцов для контроля качества, образцов положительного и отрицательного контроля	58
2.6. Методики проведения анализа.....	59
2.6.1. Методика количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека методом ИФА	59
2.6.2. Методика полуколичественного определения анти-лекарственных антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом ИФА.....	60

2.7. Дизайн сравнительного клинического исследования препаратов трастузумаба	63
ГЛАВА 3. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	66
3.1. Разработка методики количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека методом ИФА	66
3.2. Валидация методики количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека методом ИФА	68
3.2.1. Минимально необходимое разведение	69
3.2.2. Селективность.....	71
3.2.3. Калибровочная кривая и нижний предел количественного определения.....	72
3.2.4. Правильность и прецизионность	74
3.2.5. Линейность (возможность) разведения	76
3.2.6. Специфичность	77
3.2.7. Стабильность	78
3.2.8. Параллелизм	80
3.3. Разработка методики полуколичественного определения анти-лекарственных антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом ИФА	81
3.4. Валидация методики полуколичественного определения анти-лекарственных антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом ИФА	84
3.4.1. Предел исключения (cut-point)	85
3.4.2. Чувствительность, «хук»-эффект	90
3.4.3. Селективность.....	93
3.4.4. Устойчивость методики к присутствию лекарственного препарата	94
3.4.5. Прецизионность.....	96
3.4.6. Стабильность	98
3.5. Анализ исследуемых образцов субъектов клинического исследования биоаналогичности	100
3.6. Оценка фармакокинетики и иммуногенности препаратов трастузумаба	105

3.6.1. Расчет фармакокинетических параметров.....	105
3.6.2. Оценка биоаналогичности препаратов трастузумаба	110
3.6.3. Оценка иммуногенности препаратов трастузумаба	112
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	113
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	115
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	116
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	117
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	118
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	120
Приложение А. Акты внедрения результатов научно-исследовательской работы.....	135
Приложение Б. Индивидуальные концентрации трастузумаба (мкг/мл), полученные при анализе исследуемых образцов сыворотки крови здоровых добровольцев	138

ВВЕДЕНИЕ

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 [1, 2]. Похожую статистику приводит и Международное агентство по изучению рака, сообщая примерно о 19,9 миллиона новых случаев рака за 2022 г. [3]. В России по состоянию на начало 2022 г. также отмечается рост вновь выявленных случаев онкозаболеваний, как среди мужчин, так и среди женщин [4], при этом за 2021 г. процент выявления новых случаев рака увеличился на 4,4 %, а за 2022 г. вырос еще на 7,6 % [5, 6]. Одно из ведущих мест в структуре онкозаболеваний занимает рак молочной железы (РМЖ) – самый распространенный тип рака у женщин [1 – 6].

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 [7], тем не менее, наряду с хорошей эффективностью и безопасностью, трастузумаб имеет высокую стоимость курса терапии, что ограничивает доступ пациентов к препарату [8, 9, 10].

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 [11] и в Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения [12]. Таким образом, принимая во внимание общий курс российской фармацевтической промышленности на импортозамещение лекарственных препаратов [13, 14], 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 HER-2 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 подкреплён 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.) [15] и «Правилами проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» (утверждены решением Совета ЕЭК № 85 от 03.11.2016 г.) [16]. 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 [15, 16], 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 СТРФ-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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В составе современного мирового фармацевтического рынка можно условно выделить три основные группы лекарственных препаратов – малые молекулы, биологические препараты и препараты передовой терапии. Малые молекулы – это лекарственные вещества относительно небольшой молекулярной массы, разработка которых была начата еще в XIX веке, и до сих пор препараты на основе «малых молекул» занимают наибольшую часть рынка, в том числе потому, что предназначены для лечения самых разных заболеваний от вирусных или бактериальных инфекций до онкологических и аутоиммунных заболеваний. Биологические лекарственные препараты – это такие ЛП, действующее вещество которых произведено или выделено из биологического источника, для определения свойств и качества которых необходима комбинация биологических и физико-химических методов. Согласно официальной формулировке Федерального закона №61-ФЗ [17] к биологическим ЛП относят: иммунобиологические препараты, лекарственные препараты, полученные из крови, плазмы крови человека и животных (за исключением цельной крови), биотехнологические и генотерапевтические лекарственные препараты.

Биологические препараты начали свое активное развитие с конца XX века, и при этом произвели своего рода «революцию» в фармации и медицине, способствуя внедрению таргетной терапии различных заболеваний в клиническую практику. К препаратам передовой терапии, а именно к наиболее инновационным методам лечения, появившимся в последние годы, обычно относят генную и клеточную терапию (терапию биомедицинскими клеточными продуктами). Многие инновационные препараты из группы генной или клеточной терапии на данный момент находятся на этапе разработки, доклинических исследований или в ранних фазах клинических исследований. При этом использование передовой терапии открывает перед пациентами по всему миру новые возможности, заключающиеся в высокой степени персонализации терапии, учитывающей индивидуальные особенности каждого пациента. Каждый из описанных классов

препаратов обладает своими особенностями, при этом глобально на мировом фармацевтическом рынке хорошо заметно преобладание препаратов малых молекул над биологическими и генными ЛП. Несмотря на этот факт, нельзя не отметить неуклонный рост мирового фармацевтического рынка как в стоимостном, так и в натуральном выражении, особенно для биологических ЛП и ЛП передовой терапии [18].

Среди биологических препаратов можно выделить много различных классов: вакцины и сыворотки, ферменты, факторы свертывания, пептидные гормоны, моноклональные антитела, препараты бактериофагов и др. При этом значительную часть биотехнологических препаратов составляет именно подкласс препаратов моноклональных антител (МкАТ). Препараты МкАТ основаны на фундаментальной технологии гибридом, созданной в 1970-х годах учеными Ж. Келером и С. Мильштейном. С конца XX века технологии получения моноклональных антител претерпели значительные изменения, что позволило получать препараты с высокой степенью «гуманизации», то есть с большим объемом человеческих фрагментов в структуре МкАТ. Препараты МкАТ обладают направленным (таргетным) действием по отношению к определенным мишеням в организме человека, что определило их широкое применение в клинической практике. Сейчас различные препараты МкАТ можно встретить в клинических рекомендациях по лечению различных онкологических [19], аутоиммунных [20, 21], инфекционных [22], и даже сердечно-сосудистых заболеваний [23].

Одним из перспективных направлений последних лет, к примеру, стала иммуноонкология, где МкАТ выступают в качестве ингибиторов контрольных точек иммунного ответа, не позволяя опухолевым клеткам ускользать от иммунной системы. Наиболее часто в качестве мишеней используют такие контрольные точки как CTLA-4 (цитотоксический белок 4, ассоциированный с Т-лимфоцитами), а также PD-1/PD-L1 (рецептор программируемой клеточной смерти и его лиганд) [24]. В норме взаимодействие PD-1/PD-L1 ингибирует активность цитотоксических Т-лимфоцитов, предотвращая аутоиммунные реакции и повреждение клеток организма собственными клетками иммунной системы,

например, в случае воспаления. Однако некоторые опухоли способны экспрессировать PD-L1, при связывании которого с рецептором PD-1 происходит ингибирование пролиферации Т-лимфоцитов и продукции цитокинов, что позволяет опухолевым клеткам избегать иммунного ответа [25]. Терапия, направленная на подобные контрольные точки иммунитета, и, в частности, терапия препаратами МкАТ становится все более распространенной. Так, в клинических рекомендациях для различных видов онкологических заболеваний можно встретить моноклональные антитела, одобренные к применению сравнительно недавно (в период с 2015 по 2020 год) и направленные на такие мишени, как PD-1 (ниволумаб, пембролизумаб, цемипламаб), PD-L1 (атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб) или CTLA-4 (ипилимумаб) [24].

Еще одним примером развития технологии МкАТ стали такие классы препаратов как: конъюгаты антитело-лекарственный препарат, би- и триспецифические антитела, направленные сразу на несколько мишеней в организме, а также гибридные или «фьюжн»-белки.

Примерами конъюгатов моноклональных антител с малыми молекулами могут служить, такие противоопухолевые препараты как гемтузумаб озогамицин (одобрен к применению в 2010 г.), брентуксимаб ведотин (одобрен к применению в 2011 г.), трастузумаб эмтанзин (одобрен к применению в 2013 г.) и трастузумаб деркустекан (одобрен к применению в 2019 г.). Основным преимуществом данных препаратов является снижение неспецифического воздействия низкомолекулярного компонента ЛП за счет специфического взаимодействия моноклонального антитела с мишенью, обеспечивающего направленную доставку ЛП к сайту действия. По состоянию на 2021 год всего 10 подобных препаратов были одобрены к медицинскому применению в различных странах (США, ЕС, Россия и др.) [26].

Биспецифические и триспецифические моноклональные антитела стали закономерным продолжением развития технологии получения МкАТ. Такие препараты, по сути, сочетают в себе два разных антитела и направлены сразу на две или более мишеней в организме, что зачастую позволяет усилить получаемый

терапевтический эффект по сравнению с применением «моноспецифических» МкАТ. Механизмы действия биспецифических антител могут включать в себя активацию иммунных клеток (в частности, Т-лимфоцитов), ингибирование сразу нескольких контрольных точек иммунного ответа, таких как PD1, CTLA-4, LAG-3 [27], блокирование провоспалительных цитокинов, а также блокирование сигнальных путей, как например, в случае антител, направленных на рецепторы эпидермального фактора роста первого (HER1 или EGFR) и второго (HER2) типов. Основой для биспецифических антител такого типа могут стать такие «классические» препараты МкАТ как трастузумаб или цетуксимаб. Отличительной особенностью некоторых биспецифических антител является способность проникать через гематоэнцефалический барьер, но это в первую очередь применимо для так называемых «нанотел» (nanobodies) [28], которые в силу этой особенности могут использоваться при различных заболеваниях центральной нервной системы. Однако поскольку биспецифические и тем более триспецифические антитела являются крайне сложными для разработки препаратами, и многие из перспективных молекул не показывают хороших результатов по эффективности в клинических исследованиях [29], для клинического применения по состоянию на конец 2021 года были одобрены всего 3 подобных ЛП: катумаксамаб, блинатумомаб и эмицизумаб [27].

Лекарственные препараты «фьюжн-белки» или гибридные белки, также как и биспецифические антитела, призваны усиливать фармакологический эффект за счет наличия в структуре частей различных белков. Получают такие препараты рекомбинантными методами, в результате чего конечная молекула может состоять из двух фрагментов. К примеру, из Fc-фрагмента человеческого IgG и части рецептора фактора некроза опухоли альфа (ФНО α) состоит препарат этанерцепт. Остальные известные «-цепты» (рилонацепт, алефацепт, афлиберцепт и др.) также представляют собой гибридные белки, при этом механизм их действия, как и в случае этанерцепта, обычно ассоциирован со связыванием растворимых лигандов (ФНО α , интерлейкины или фактор роста эндотелия сосудов, VEGF). Схожим образом действует и российский инновационный препарат гофликицепт,

структурно состоящий из части рецептора интерлейкина-1 (ИЛ-1) первого типа (IL-1 R1) и акцессорного белка интерлейкина-1 (IL-1 RAcP), слитых с Fc-фрагментом человеческого IgG. Гофликицепт связывает ИЛ-1 (преимущественно ИЛ-1 β), в результате чего подавляет связывание провоспалительного цитокина с мембранными рецепторами и ингибирует его внутриклеточные сигнальные пути, снижая выраженность воспаления. Учитывая плеiotропность интерлейкинов и, в частности, ИЛ-1, а также фундаментальную роль провоспалительных цитокинов в развитии различных острых и хронических иммуновоспалительных заболеваний человека [30], гофликицепт имеет потенциально широкий спектр показаний к применению, включая орфанные заболевания, такие как идиопатический рецидивирующий перикардит и семейная средиземноморская лихорадка [31, 32].

Широкая область применения и многообразие препаратов на основе МкАТ делает моноклональные антитела привлекательными в том числе для разработки биоаналоговых препаратов [33], то есть биологических лекарственных препаратов, схожих по параметрам качества, эффективности и безопасности с референтными биологическими лекарственными препаратами в такой же лекарственной форме и имеющих идентичный способ введения [17]. Однако в отличие от воспроизведенных лекарственных препаратов (ЛП на основе малых молекул), биоаналоговые препараты в силу своей природы и способа получения не могут быть 100 % идентичной «копией» оригинального ЛП, что накладывает отпечаток на существующие процедуры разработки, регистрации и применения в клинической практике препаратов-биоаналогов.

1.1. Требования к разработке и регистрации препаратов-биоаналогов

Сложность структуры и свойств высокомолекулярных ЛП, определяет подходы к разработке и регистрации таких препаратов, включая также отдельную процедуру регистрации биоаналоговых препаратов. В отличие от воспроизведенных препаратов на основе малых молекул, биоаналоги должны подвергаться более тщательному и всестороннему изучению, включающему

комплекс исследований *in vitro*, проводимых производителем, а также различные доклинические и клинические исследования I-III фазы, направленные в том числе на установление фармакокинетической эквивалентности оригинального и биоаналогового препаратов. Характерной иллюстрацией необходимости детального изучения биоаналогового продукта является, например, тот факт, что несмотря на непростую геополитическую обстановку в России и риск возможной дефектуры препаратов, согласно постановлению Правительства Российской Федерации № 593 от 05.04.2022 [34] «Об особенностях обращения лекарственных средств для медицинского применения при возникновении дефектуры или риска возникновения дефектуры в связи с введением в отношении Российской Федерации ограничительных мер экономического характера» для регистрации биоаналоговых ЛП, в отличие от воспроизведенных, требуется куда больший объем информации, полученной при этом непосредственно производителем. Так, в ряде случаев, согласно данному постановлению, основанием для регистрации воспроизведенного ЛП может служить обзор научных работ о результатах клинических исследований, вместо проведения собственных, при этом в отношении биоаналогов такой подход остается недопустимым.

Как в стратегии «Фарма-2020» [14], так и в ее продолжении, в виде недавно принятой стратегии «Фарма-2030», отмечается важность локализации производства препаратов по полному циклу на территории РФ, а также необходимость разработки и внедрения в клиническую практику как инновационных, так и биоаналоговых препаратов, предназначенных для лечения заболеваний, преобладающих в структуре заболеваемости и смертности населения Российской Федерации [13]. Применительно к основному объекту исследования данной работы – препарату «Трастузумаб», стоит также отметить, что он входит в Перечень стратегически значимых лекарственных средств, производство которых должно быть обеспечено на территории Российской Федерации [11], а также в Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения (в ред. распоряжения Правительства РФ от 24.08.2022 N 2419-р) [12]. При этом в настоящее время на территории РФ зарегистрирован

всего один биоаналог трастузумаба – препарат Гертикад[®], производства компании Биокад, имеющий полный производственный цикл на территории России.

Основным нормативным документом, регулирующим процесс разработки и регистрации биологических препаратов, помимо таких основополагающих документов как Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств» N 61-ФЗ, в настоящее время можно назвать Правила проведения исследований биологических лекарственных средств на территории Евразийского экономического союза, утвержденные решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03 ноября 2016 г. № 89 [15]. Согласно этому документу, процесс разработки и регистрации новых препаратов-биоаналогов, в том числе препаратов на основе технологии МкАТ, должен включать как минимум следующие этапы: всестороннее изучение структуры молекулы препарата и его физико-химических свойств (включая гликановые профили), полную характеристику клона-производителя и самого процесса производства (включая оценку вирусологической безопасности и характеристику банка клеток производителя), оценку специфической активности молекулы *in vitro*, а также доклинические и клинические исследования I и III фазы, направленные на оценку фармакокинетической эквивалентности, эффективности и безопасности разработанного биоаналога [15]. При этом, в отличие от разработки инновационных препаратов, при разработке и регистрации биоаналоговых ЛП обычно не требуется проведение клинических исследований II фазы, в рамках которых проводится подбор доз для введения пациентам, так как дизайн сравнительных КИ подразумевает введение биоаналогового ЛП в той же дозировке и в таком же режиме, как вводится оригинальный препарат сравнения.

1.2. Трастузумаб: структура, механизм действия, фармакокинетика и иммуногенность

Трастузумаб (торговое наименование «Герцептин[®]») представляет собой рекомбинантные гуманизированные антитела IgG1 (каппа) подкласса, получаемые

в системе экспрессии CHO (Chinese hamster ovary cells, клетки яичников китайского хомячка), молекулярная масса трастузумаба составляет примерно 150 кДа [35]. Трастузумаб селективно связывается с внеклеточным доменом человеческого рецептора эпидермального фактора роста второго типа (HER2).

Рецептор HER2 – мембранный тирозинкиназный белок, состоящий из внеклеточного лигандсвязывающего домена, трансмембранной части и внутриклеточного (цитоплазматического) тирозинкиназного домена. HER2 является частью семейства рецепторов эпидермального фактора роста EGFR/ErbB, состоящего из 4 белков (HER1 – HER4), кодируется геном человека ERBB2/neu (протоонкоген) и, в отсутствие собственного специфического лиганда, активируется при формировании гомо- или гетеродимеров с другими белками семейства, например, с HER1 или HER3 [36, 37]. Образование гетеродимеров HER2 приводит к аутофосфорилированию тирозиновой протеинкиназы или внутриклеточному фосфорилированию тирозиновых остатков EGFR, тем самым вызывая активацию молекулярных сигнальных путей, включая такие каскады, как: MAPK (митоген-активируемая протеинкиназа), PI3K/Akt (фосфоинозитид-3-киназа), PLC-гамма (фосфолипаза C гамма), PKC (протеинкиназа C) и Jak/STAT (янус-киназы/ сигнальный белок и активатор транскрипции). Активация сигнальных путей в свою очередь приводит к транскрипции генов, отвечающих за пролиферацию клетки и препятствующих ее апоптозу [40], Рисунок 1.

Для некоторых типов опухолей, как правило эпителиальных, может наблюдаться патологическая гиперэкспрессия рецептора HER2, приводящая к гиперактивации сигнальных путей и интенсивной пролиферации опухолевых клеток. Именно поэтому рецептор HER2 с момента своего открытия в середине 80-х годов был признан крайне перспективной мишенью для онкотерапии [38]. Наиболее часто гиперэкспрессия HER2 наблюдается при раке молочной железы в случае HER2-положительного подтипа. Такой подтип РМЖ до внедрения в клиническую практику трастузумаба считался одним из наиболее неблагоприятных для пациенток, при этом распространенность HER2+ подтипа составляет вплоть до 20 % всех случаев рака молочной железы [39] – первого по

распространенности онкологического заболевания у женщин в России [4 – 6] и в мире [1 – 3].

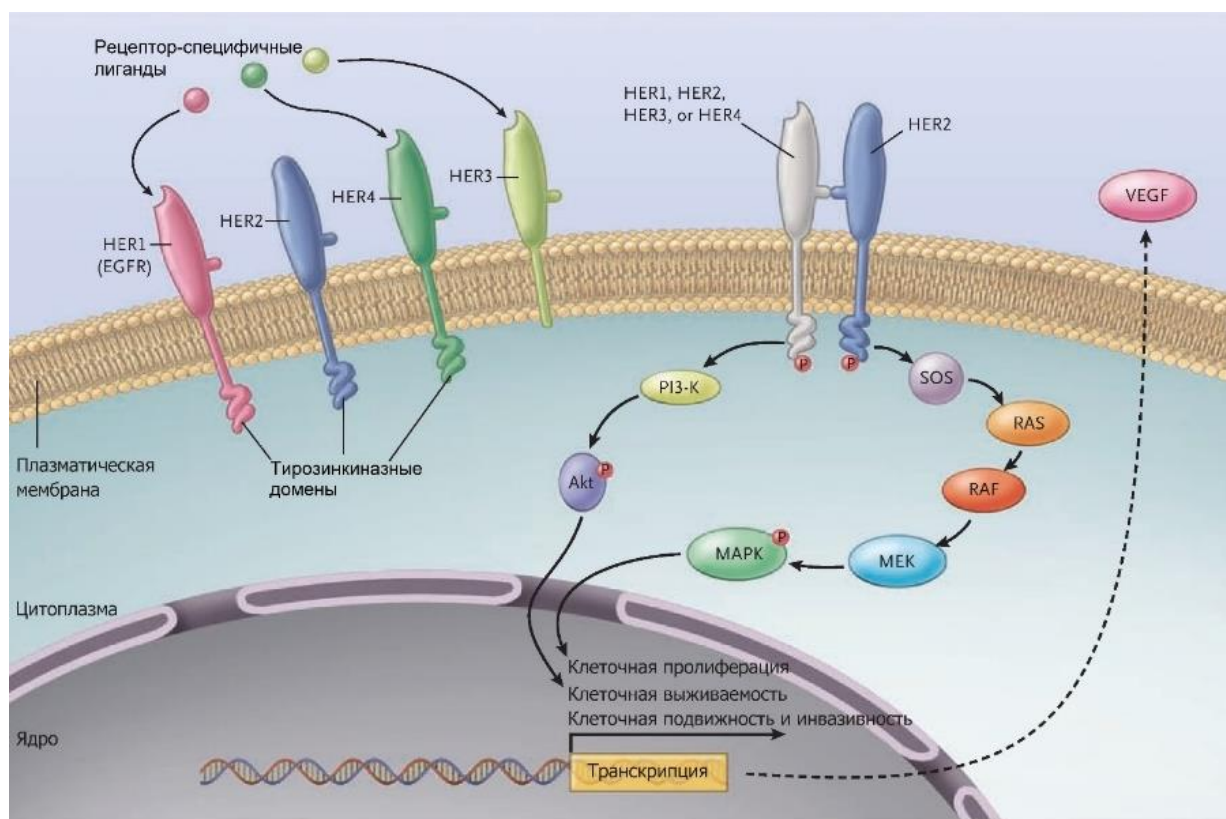


Рисунок 1 – Схема внутриклеточной передачи сигнала для белков семейства рецепторов эпидермального фактора роста [40]

Связывание трастузумаба с HER2 блокирует отщепление и гетеродимеризацию внеклеточного домена HER2, тем самым ингибируя все последующие внутриклеточные сигнальные пути, а также опосредует активацию механизма антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности, способствуя привлечению эффекторных клеток иммунной системы (NK-клетки, Т-лимфоциты и др.) к месту локализации опухоли (Рисунок 2, А, Б). Считается также, что связывание трастузумаба с HER2 способствует эндоцитозу и деградации последнего под действием внутриклеточных ферментов (Рисунок 2, В) [40, 41].

Описанные механизмы действия позволяют трастузумабу прерывать клеточный цикл опухолевых клеток и подавлять клеточный рост и пролиферацию. Исходя из механизма действия, основными зарегистрированными показаниями к применению трастузумаба на данный момент являются: рак молочной железы с опухолевой гиперэкспрессией HER2 (в виде монотерапии или в составе

комбинированной терапии), а также распространенная аденокарцинома желудка или пищеводно-желудочного перехода с опухолевой гиперэкспрессией HER2 (в составе комбинированной терапии) [42].

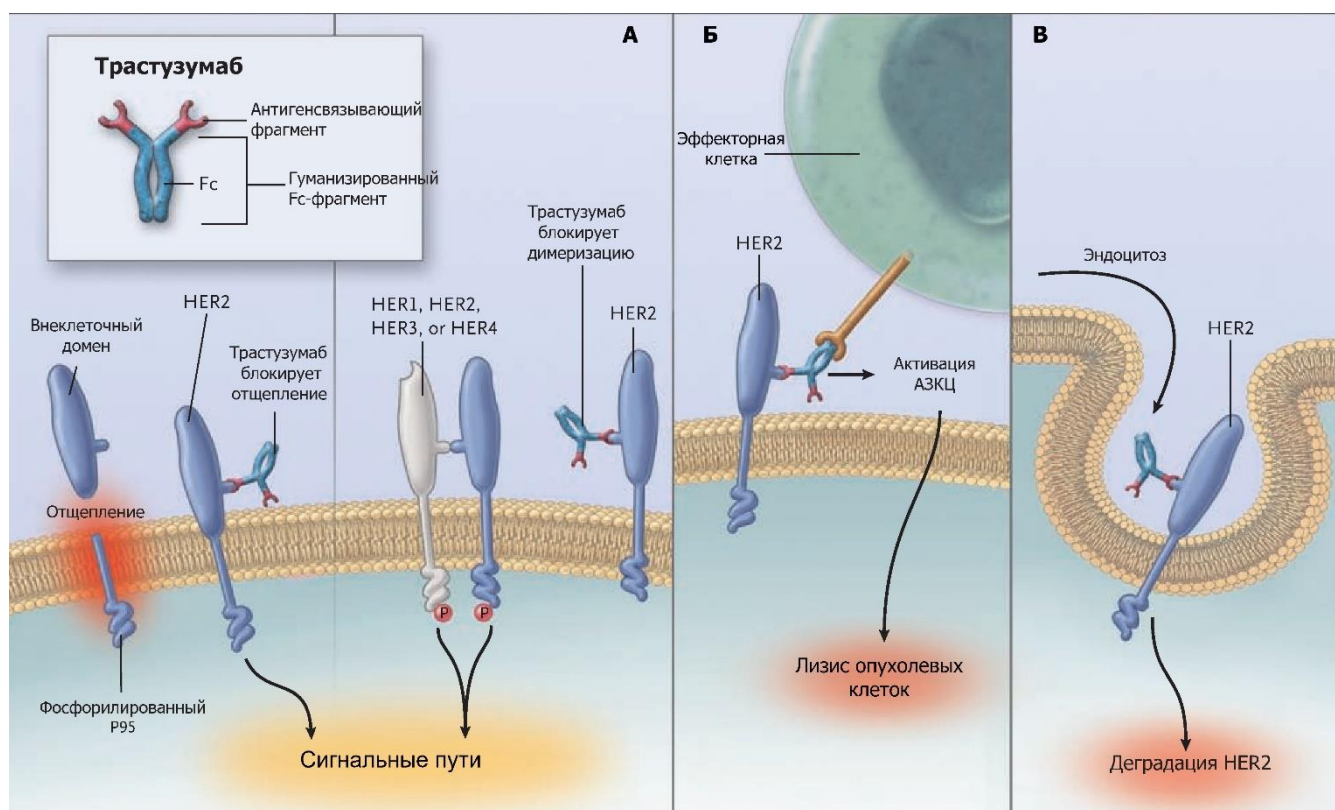


Рисунок 2 – Механизм действия трастузумаба [40]

Данные по фармакокинетике трастузумаба при многократном внутривенном введении были первично получены для оригинального препарата «Герцептин®» от 1582 субъектов в ходе 18 различных клинических исследований I, II и III фазы. Для описания фармакокинетического профиля трастузумаба используют двухкамерную модель с параллельной линейной и нелинейной элиминацией препарата из центральной камеры. Вследствие дозозависимого нелинейного выведения препарата из организма отмечено увеличение общего клиренса трастузумаба с уменьшением его концентрации в организме, что в свою очередь затрудняет однозначное определение фиксированного значения периода полувыведения препарата из организма ($t_{1/2}$). Так, среднее значение $t_{1/2}$ при многократном (каждые три недели) введении в дозе 6 мг/кг с нагрузочной дозой 8 мг/кг составляет около 28 дней [37]. При этом, согласно полученным для «Герцептина®» данным, значение $t_{1/2}$ уменьшается при уменьшении концентрации

трастузумаба в интервале дозирования при многократном введении [43, 44]. Метаболизм трастузумаба до коротких пептидов и отдельных аминокислот происходит преимущественно в эпителиальных клетках после связывания с HER2, элиминация препарата представляет собой комплексный процесс, который, в основном, также специфически опосредован эпителиальными клетками. В первую очередь именно внутриклеточный метаболизм и механизмы элиминации трастузумаба определяют его нелинейное дозозависимое выведение из организма [37].

Принимая в расчет биологическую природу трастузумаба, отдельным вопросом, требующим изучения, является его иммуногенность, то есть способность препарата вызывать иммунный ответ организма при введении человеку или лабораторным животным. Для биологических препаратов на основе МкАТ, включая трастузумаб, характерны различные механизмы, лежащие в основе явления иммуногенности [45, 46]. При этом различают два основных пути формирования анти-лекарственных антител в организме: Т-зависимый иммунный ответ и Т-независимый иммунный ответ, опосредованный В-клетками. Степень иммуногенности различных препаратов на основе МкАТ варьируется и зависит в том числе от ряда факторов, ассоциированных с организмом пациента/добровольца или с самим используемым препаратом.

К факторам, зависящим от организма пациента/ добровольца, относят генетические факторы (чаще всего рассматривают фактор полиморфизма HLA-аллелей в популяции, а также потенциальную возможность наличия в составе МкАТ эпитопа пептида МНС-II), прием сопутствующих препаратов или определенное заболевание пациента. Так, например, у пациентов с ревматоидным артритом более часто выявляют антитела к вводимым препаратам МкАТ, чем у пациентов со спондилоартритом [45]. Такие различия в иммуногенности препарата при введении различным группам пациентов зачастую объясняются состоянием их иммунной системы, а в случае онкопациентов иммуногенность препарата может зависеть от стадии рака.

К факторам, связанным с самим препаратом и потенциально влияющим на его иммуногенность, относят, в первую очередь, природу МкАТ (мышинные, химерные, гуманизированные или полностью человеческие антитела). Несмотря на усилия по «гуманизации» препаратов МкАТ, даже в случае полностью человеческих антител может наблюдаться иммунный ответ организма, связанный с новыми эпитопами CDR-фрагментов в составе препарата. Другими факторами, потенциально повышающими иммуногенность молекулы МкАТ являются пост-трансляционные изменения белка, гликановые профили антител, а также лекарственная форма препарата, наличие примесей или агрегатов, и, естественно, дозировка, режим и путь введения препарата в организм [15, 45].

Трастузумаб, несмотря на то что не является полностью человеческим антителом, а представляет собой гуманизированные IgG1 антитела, согласно данным различных исследований является относительно низко иммуногенным препаратом. В сравнительных исследованиях первой фазы при однократном введении здоровым добровольцам антитела к препарату не образуются практически никогда [47 – 49]. В случае исследований третьей фазы, при многократном введении пациенткам с различными стадиями и типами РМЖ (нагрузочная доза 8 мг/кг, поддерживающая 6 мг/кг, введение каждые 3 недели, срок лечения вплоть до 12 месяцев) антитела к трастузумабу вырабатываются примерно у 0,3 % – 2,6 % [50, 51] пациенток (приведены данные, полученные для оригинального препарата «Герцептин®» в рамках различных сравнительных исследований биоаналогичности с участием различных популяций пациенток).

Поскольку одобренный в 1998 г. трастузумаб произвел «революцию» в лечении HER2+ подтипа РМЖ, по истечении срока патентной защиты препарата, на рынке стали появляться биоаналоги трастузумаба. В большинстве случаев регистрация препаратов-биоаналогов обусловлена не только непосредственной финансовой выгодой для производителя, но и фармакоэкономическими причинами. К примеру, согласно фармакоэкономическим исследованиям, лечение трастузумабом («Герцептин®») в формате неадьювантной и адьювантной (в том числе комбинированной) терапии является более экономически эффективным по

сравнению с различными вариантами химиотерапии при РМЖ (на ранней стадии или в случае развития метастазов) как во всем мире [52], так и, в частности, в России [53].

В некоторых случаях анализ прямых затрат на терапию биоаналогом трастузумаба позволил выявить преимущество препарата-биоаналога перед оригинальным «Герцептином[®]» по параметрам «минимизация затрат» и «влияние на бюджет» [54]. Также данный анализ позволил смоделировать и рассчитать ощутимую экономию для системы здравоохранения страны (исследование проведено в Хорватии), составляющую от 0,26 до 0,69 миллионов евро (в рассматриваемом периоде 1 год), что при использовании сэкономленных средств гипотетически позволило бы вылечить еще от 14 до 47 пациенток в зависимости от выбранного курса лечения [55]. В отдельно рассматриваемом случае терапии таким препаратом на основе трастузумаба, как Кадсила[®] (трастузумаб эмтанзин, препарат-конъюгат «антитело-ЛП»), лечение, согласно различным подсчетам [56, 57], является не только экономически эффективным в ряде клинически сложных случаев РМЖ (метастатический РМЖ при неэффективности стандартной адъювантной терапии или РМЖ с метастатическим поражением головного мозга), но и не превышает порога готовности платить, несмотря на свою высокую стоимость.

Отдельно стоит отметить, что на данный момент в мировой практике в некоторых странах Европейского союза существуют рекомендации по назначению препаратов-биоаналогов определенному (минимальному) числу пациентов, либо требование о назначении наиболее дешевого варианта терапии, который зачастую будет включать в себя именно препараты-биоаналоги [58]. При этом, все это вовсе не означает «экономия» во вред пациенткам, поскольку и в Евросоюзе, и в США активно прорабатываются вопросы взаимозаменяемости оригинальных препаратов и их биоаналогов, а также вопросы экстраполяции показаний оригинатора на его биоаналоги [59].

Таким образом, учитывая доказанную эффективность терапии трастузумабом, наличие зарегистрированных препаратов-биоаналогов и

разработка подходов к их взаимозаменяемости с оригинальным ЛП делают HER2-направленную терапию более доступной для пациенток, а также снижают затраты (в первую очередь прямые) и финансовую нагрузку на систему здравоохранения.

1.3. Биоаналоговые препараты на основе молекулы трастузумаба

Окончание в 2014 году в Европе и в 2019 году в США срока патентной защиты препарата «Герцептин®» (производства компании «Ф. Хоффман-Ля Рош Лтд.», Швейцария), его высокая стоимость, но одновременно с этим и высокая эффективность в случае HER2+ подтипа РМЖ, привела к разработке и выводу на мировой фармацевтический рынок различных биоаналогов трастузумаба (Таблица 1).

Таблица 1 – Препараты-биоаналоги трастузумаба

Биоаналог	Производитель, страна	Регистрация биоаналога на мировых рынках (одобряющий орган, дата)	Регистрация биоаналога в России, дата
Онтрузант® (Ontruzant®)	Samsung Bioepis, Корея	EMA, ЕС 11.2017 FDA, США 01.2019	нет
Огиври® (Ogivri®)	Mylan, США	FDA, США, 12.2017 EMA, ЕС, 12.2018	нет
Герзума® (Herzuma®)	Celltrion Healthcare, Венгрия	EMA, ЕС, 02.2018 FDA, США, 12.2018	нет
Канджинти® (Kanjinti®)	Amgen, США	EMA, ЕС 05.2018 FDA, США, 06.2019	нет
Тразимера® (Trazimera®)	Pfizer, Ирландия	EMA, ЕС, 07.2018 FDA, США, 03.2019	да, 11.2019
Гертикад®	Биокад, Россия	нет	да, 12.2015
Зерцепак® (Zercepac®)	Shanghai Henlius Biotech, Китай Accord BioPharma, США	EMA, ЕС 07.2020	нет
Гервенда® (Herwenda®)	Sandoz, Германия EirGenix, Тайвань	EMA, ЕС 11.2023	нет

Помимо биоаналогов, зарегистрированных на территории стран Европейского Союза и США, еще около десятка препаратов находятся на поздних стадиях разработки в разных странах по всему миру, например:

- AyoTrust[®] (AryoGen Pharmed Co., Иран) – завершено КИ III фазы и постмаркетинговое исследование безопасности трастузумаба [60];
- Hervusta[®] (Dr. Reddy's laboratories, Индия) – завершены КИ I и III фазы по оценке эффективности и безопасности трастузумаба [61, 62];
- SIBP-01 (Shanghai Institute of biological products, Китай) – завершено КИ III фазы по оценке эффективности, безопасности и иммуногенности трастузумаба [63];
- TrastuRel (Reliance Life Sciences Pvt, Ltd., Индия) – завершено КИ III фазы по оценке эффективности и безопасности трастузумаба [64];
- HD-201 (Prestige Biopharma Ltd., Сингапур) – завершено КИ III фазы по оценке эффективности, безопасности и фармакокинетики трастузумаба [65];
- AK-HER2 (Anhui Anke Biotechnology Group Co. Ltd., Китай) – завершено сравнительное КИ I фазы по оценке фармакокинетики, безопасности и иммуногенности трастузумаба [66];
- DMB-3111 (Dong-A Socio Holdings, Южная Корея, Meiji Seika Pharma, Япония,) – завершено сравнительное КИ I фазы по оценке фармакокинетики, безопасности и иммуногенности трастузумаба [67].

Некоторые из представленных биоаналогов уже зарегистрированы для медицинского применения местными регуляторными органами стран-производителей. При этом в России регистрационные удостоверения помимо оригинального «Герцептина[®]» имеют только «Тразимера[®]» и «Гертикад[®]», и только последний имеет полный производственный цикл на территории РФ.

В ходе разработки и регистрации биоаналогов трастузумаба по всему миру был проведен целый ряд различных сравнительных клинических исследований I – III фазы, что позволило к настоящему моменту накопить достаточное количество данных о фармакокинетики и иммуногенности трастузумаба, как для оригинального препарата «Герцептин[®]» (в дополнение к оригинальным исследованиям по изучению эффективности и безопасности препарата), так и для

его биоаналогов. Данные клинических исследований трастузумаба приведены в Таблице 2. При этом в случае сравнительных исследований биоаналогичности представлены данные для оригинального препарата «Герцептин®», выступающего в качестве препарата сравнения. В ходе планирования и проведения сравнительных КИ для нового биоаналога опираются именно на данные, полученные для оригинального препарата, поскольку каждый биоаналог, в отличие от воспроизведенных ЛП на основе малых молекул, представляющих собой точную копию оригинального препарата, является уникальной по своей структуре молекулой.

Таблица 2 – Проведенные клинические исследования трастузумаба и полученные в исследованиях данные по фармакокинетике и иммуногенности

Фаза и тип исследования, ссылка, идентификационный номер clinicaltrials.gov	Дизайн исследования, популяция, нозология	Доза, режим введения	Основные результаты (рассчитанные параметры фармакокинетики и иммуногенности)
Клинические исследования I фазы препарата Герцептин® [68]	15-17 пациенток с РМЖ, подбор и оценка переносимости доз	10 – 500 мг, в/в	данные не представлены
Клинические исследования II фазы препарата Герцептин® [69, 70]	39 – 222 пациентки с мРМЖ, оценка эффективности и безопасности препарата	250 мг (нагрузочная доза), далее 100 мг еженедельно, в/в или 4 мг/кг (нагрузочная доза), далее 2 мг/кг еженедельно, в/в	N = 39: C _{max} (мкг/мл) 113 (±35), C _{SS} (мкг/мл) 52,3 (±23,6), t _{1/2} (ч) 220,8 (±127,2). N = 222: C _{max} (мкг/мл) 100,3, C _{SS} (мкг/мл) 59,7, t _{1/2} (ч) 148,8. Антитела выявлены у 1 из 211 пациенток (иммуногенность – 0,5 %)

Продолжение Таблицы 2

<p>Клиническое исследование III фазы препарата Герцептин® [43]</p>	<p>Пациентки с мРМЖ</p>	<p>Адьювантная терапия 8 мг/кг нагрузочная доза, далее 6 мг/кг, каждые 3 недели, до 12 циклов</p>	<p>C_{SS} 216 мкг/мл, $t_{1/2}$ 384 ч (264-552 ч), C_{trough} 63 мкг/мл</p>
<p>Сравнительное клиническое исследование I фазы препаратов SB3 (Онтрузант) и Герцептин® (производства ЕС и США) [47], NCT02075073</p>	<p>109 здоровых добровольцев, 3 группы (1:1:1), параллельный дизайн</p>	<p>6 мг/кг, однократно</p>	<p>$AUC_{0-\infty}$ (мкг*ч/мл) 35 890 (5761) – 37 370 (5620); C_{max} (мкг/мл) 153 (\pm25) – 156 (\pm26); медиана t_{max} (ч) 1,61 (1,53 – 48,07) – 1,57 (1,53 – 24,03); $t_{1/2}$ (ч) 198(\pm42) – 215 (\pm53); CL (мл/ч) 13,52 (\pm2,43) – 12,82 (\pm2,24). Антител к трастузумабу у добровольцев не выявлено</p>
<p>Сравнительное клиническое исследование I фазы препаратов СТ-Р6 (Герзума) и Герцептин® [49], NCT02665637</p>	<p>70 здоровых добровольцев, 2 группы (1:1), параллельный дизайн</p>	<p>6 мг/кг, однократно</p>	<p>$AUC_{0-\infty}$ (мкг*ч/мл) 19 709; C_{max} (мкг/мл) 132,48; медиана t_{max} (ч) 1,52; $t_{1/2}$ (ч) 183,68 (\pm37,53); CL (мл/ч) 23,0 (\pm4,8). Анти-лекарственных антител к трастузумабу у добровольцев не выявлено.</p>

Продолжение Таблицы 2

<p>Сравнительное клиническое исследование I фазы препаратов MYL-1401O (Огиври) и Герцептин® (производства ЕС и США) [48], NCT02594761</p>	<p>132 здоровых добровольца, 3 группы (1:1:1), параллельный дизайн</p>	<p>8 мг/кг, однократно</p>	<p>AUC_{0-∞} (мкг*ч/мл) 51 902 (CV, % 20,01) – 52 259 (CV, % 14,36); C_{max} (мкг/мл) 199,4 (CV, % 13,69) – 205,8 (CV, % 15,67); t_{max} (ч) 3,028 (CV, % 118,2) – 2,625 (CV, % 53,37); t_{1/2} (ч) 173,8 (CV, % 32,92) – 176,4 (CV, % 29,85). Антитела к трастузумабу выявлены у 2 добровольцев до введения (в группах Герцептина® ЕС и США), и у 1 добровольца после введения (иммуногенность – 2,5%)</p>
<p>Сравнительное клиническое исследование I фазы препаратов АВР 980 (Канджинти) и Герцептин® (производства ЕС и США) [71]</p>	<p>157 здоровых добровольцев, 3 группы (1:1:1), параллельный дизайн</p>	<p>6 мг/кг, однократно</p>	<p>AUC_{0-∞} (мкг*ч/мл) 33 342 (CV, % 17) – 35 123 (CV, % 18); C_{max} (мкг/мл) 134,6 (CV, % 13) – 140,5 (CV, % 12); медиана t_{max} (ч) 2,0 (1,53-5,00) – 2,0 (1,55–24,00); t_{1/2} (ч) 154,0 (27,97) – 154,8 (39,78). Анти-лекарственных антител к трастузумабу у добровольцев не выявлено.</p>

Продолжение Таблицы 2

<p>Сравнительное клиническое исследование I фазы препаратов PF-05280014 (Тразимера) и Герцептин® (производства ЕС и США) [72], NCT01603264</p>	<p>105 здоровых добровольцев, 3 группы (1:1:1), параллельный дизайн</p>	<p>6 мг/кг, однократно</p>	<p>AUC_{0-∞} (мкг*ч/мл) 40 330 (±6994) – 37 310 (±6728); C_{max} (мкг/мл) 174 (±31) – 164 (±31); t_{1/2} (ч) 220 (±42) – 212 (±47); CL (мл/ч*кг) 0,153 (±0,025) – 0,166 (±0,032). Анти-лекарственные антитела к трастузумабу выявлены у 1 добровольца (иммуногенность – 2,86 %).</p>
<p>Сравнительное клиническое исследование I фазы препаратов HLX02 (Зерцепак) и Герцептин® (производства ЕС и Китай) [73], NCT02581748</p>	<p>111 здоровых добровольцев, 3 группы (1:1:1), параллельный дизайн</p>	<p>6 мг/кг однократно</p>	<p>AUC_{0-∞} (мкг*ч/мл) 20 943 (±3208) – 21 748 (±3220); C_{max} (мкг/мл) 128,9 (±21,7) – 122,9 (±22,3); медиана t_{max} (ч) 2,0; t_{1/2} (ч) 147,5 (±28,5) – 148,3 (±27,2); CL (мл/ч) 19,12 (±2,9) 18,11 (±3,4). Анти-лекарственных антител к трастузумабу у добровольцев не выявлено.</p>

Продолжение Таблицы 2

<p>Сравнительное клиническое исследование I фазы препаратов DRL-TZ (Гервикта) и Герцептин® [61]</p>	<p>32 здоровых добровольца, 2 группы (1:1), параллельный дизайн</p>	<p>6 мг/кг однократно</p>	<p>AUC_{0-∞} (мкг*ч/мл) 36526,80 (±6781,78); C_{max} (мкг/мл) 137,81 (±21,04); медиана t_{max} (ч) 2,0; t_{1/2}(ч) 190,13 (±46,79); CL (мл/ч) 12,94 (±2,3). Анти-лекарственные антитела к трастузумабу выявлены у 7 добровольцев (иммуногенность – 43,75 %).</p>
<p>Сравнительное клиническое исследование III фазы препаратов SB3 (Онтрузант) и Герцептин® [74], NCT02149524</p>	<p>764 пациентки с РМЖ, 2 группы, неoadъювантная, адъювантная терапия, параллельный дизайн</p>	<p>8 мг/кг (нагрузочная доза), далее 6 мг/кг 1 раз в 3 недели (7 циклов)</p>	<p>Данные по ФК не представлены. Анти-лекарственные антитела к трастузумабу выявлены у 3 пациенток (иммуногенность – 0,7 %), из них у 2 пациенток выявленные анти-лекарственные антитела нейтрализующие (0,5 %).</p>
<p>Сравнительное клиническое исследование III фазы препаратов СТ-Р6 (Герзума) и Герцептин® [50], NCT02162667</p>	<p>549 пациенток с РМЖ, 2 группы, неoadъювантная терапия с таксанами, далее адъювантная монотерапия, параллельный дизайн</p>	<p>Неoadъювантная терапия: 8 мг/кг нагрузочная доза, далее 6 мг/кг, шесть 3-нед. циклов; адъювантная терапия: 6 мг/кг каждые 3 недели, <10 циклов</p>	<p>Данные по ФК не представлены. Антител к трастузумабу у пациенток (неoadъювантный, адъювантный режим терапии) выявлено не было.</p>

Продолжение Таблицы 2

<p>Сравнительное клиническое исследование III фазы препаратов MYL-1401O (Огиври) и Герцептин® (производства ЕС и США) [75], NCT02472964</p>	<p>342 пациентки с мРМЖ, 2 группы, комбинированная терапия с таксанами (24 нед.), затем монотерапия трастузумабом (24 нед.)</p>	<p>Данные не представлены</p>	<p>Данные по ФК не представлены. Анти-лекарственные антитела к трастузумабу выявлены у 10 пациенток (иммуногенность – 4,4%), из них у 3 пациенток выявлены анти-лекарственные нейтрализующие антитела (1,3 %). Исключая случаи наличия антител до введения иммуногенность – 1,8 %, из них 0,9 % нейтрализующих антител.</p>
<p>Сравнительное клиническое исследование III фазы препаратов АВР 980 (Канджинти) и Герцептин® (производства ЕС и США) [76], NCT01901146</p>	<p>725 пациенток с РМЖ, 2 группы, неоадьювантная терапия с таксанами, далее адьювантная монотерапия</p>	<p>Неоадьювантная терапия: 8 мг/кг нагрузочная доза, далее 6 мг/кг, три 3-нед. цикла; адьювантная терапия 6 мг/кг каждые 3 недели, вплоть до 1 года</p>	<p>Данные по ФК не представлены. Анти-лекарственные антитела к трастузумабу выявлены у 1 пациентки (иммуногенность – 1 %), нейтрализующих анти-лекарственных антител не выявлено.</p>

Продолжение Таблицы 2

<p>Сравнительное клиническое исследование III фазы препаратов PF-05280014 (Тразимера) и Герцептин® (производства ЕС и США) [77], NCT02187744</p>	<p>226 пациенток с РМЖ, 2 группы, неоадьювантная терапия с таксанами и препаратами платины</p>	<p>8 мг/кг нагрузочная доза, далее 6 мг/кг каждые 3 недели, 6 циклов</p>	<p>Среди ФК-параметров оценивали C_{trough} после 5 цикла: C_{trough} (мкг/мл) 34,56. Анти-лекарственные антитела к трастузумабу выявлены у 1 пациентки до введения ЛП в 1 цикле (иммуногенность – 0,89 %), нейтрализующих анти-лекарственных антител не выявлено.</p>
<p>Сравнительное клиническое исследование III фазы препаратов HLX02 (Зерцепак) и Герцептин® [51], NCT03084237</p>	<p>649 пациенток с мРМЖ, 2 группы, комбинированная терапия с таксанами</p>	<p>8 мг/кг нагрузочная доза, далее 6 мг/кг каждые 3 недели, вплоть до 1 года</p>	<p>C_{max} после введения нагрузочной дозы 175 мкг/мл; $C_{trough} < 25$ мкг/мл. Анти-лекарственные антитела к трастузумабу выявлены у 17 пациенток до введения ЛП в 1 цикле (иммуногенность – 5,2 %), из них у 6 пациенток выявлены нейтрализующие антитела. Общая иммуногенность составила – 0,62 % (2 пациентки).</p>

Продолжение Таблицы 2

Сравнительное клиническое исследование III фазы препаратов BCD-022 (Гертикад) и Герцептин® [78]	126 пациенток с мРМЖ	8 мг/кг нагрузочная доза, далее 6 мг/кг каждые 3 недели, 6 циклов	После введения нагрузочной дозы: C_{max} (мкг/мл) 236,8 ($\pm 106,1$); медиана t_{max} (ч) 5,4; $t_{1/2}$ (ч) 105,7 ($\pm 25,2$), медиана C_{trough} (мкг/мл) 31,3. Анти-лекарственные антитела к трастузумабу выявлены у 1 пациентки (иммуногенность – 1,64%).
---	----------------------	---	---

Как видно из Таблицы 2, для сравнительных исследований I фазы препаратов-биоаналогов трастузумаба целевой популяцией зачастую являются здоровые мужчины-добровольцы. Это в первую очередь связано с нежеланием исследователей подвергать риску развития резистентности или иммуногенности по отношению к трастузумабу здоровых женщин-добровольцев [47]. Более того согласно данным статьи X. Pivot et al. [47] мужчины-добровольцы считаются более гомогенной исследуемой популяцией, подходящей для изучения фармакокинетики сравниваемых препаратов. Также стоит отметить, что большинство сравнительных исследований препаратов-биоаналогов проведены с использованием параллельного дизайна, хотя и считается, что перекрестный дизайн предпочтителен при проведении сравнительных клинических исследований, так как он позволяет снизить вариабельность получаемых ФК-профилей препаратов. Такой выбор объясняется длительностью выведения препаратов МкАТ и, в частности, трастузумаба, из организма, и, соответственно, длительностью периода отмывки добровольцев, что потенциально затрудняет и удлинняет проведение клинических исследований с перекрестным дизайном [47, 48].

Согласно накопленным данным из исследований I фазы значения максимальной концентрации (C_{max}) после однократного введения трастузумаба

могут составлять от 122,9 [73] до 205,8 мкг/мл [48] (без учета рассчитанных значений SD), медианное время достижения максимальной концентрации (t_{\max}) – около 2 часов, а период полувыведения ($t_{1/2}$) варьируется от 147,5 часов до 220 часов [47, 72] (6-9 дней). В рамках клинических исследований III фазы в основном сравнивают эффективность, безопасность и иммуногенность трастузумаба и его биоаналогов. Целевая популяция в данном случае – пациентки с впервые диагностированным, рецидивирующим или метастатическим HER2+ подтвержденным РМЖ. Исследования III фазы включают от 120-200 пациенток и более, а также характеризуются в первую очередь получением результатов по клинической эффективности, безопасности и иммуногенности препарата. В некоторых случаях в исследованиях III фазы дополнительно изучают фармакокинетику при многократном введении (расчет C_{trough} и C_{ss}). Согласно данным, полученным в исходных исследованиях для оригинального ЛП, равновесная концентрация трастузумаба при многократном введении может составлять от 100 мкг/мл до 216 мкг/мл [43, 69, 70], а концентрация перед очередным введением препарата (C_{trough}) – от 32 до 63 мкг/мл [43, 44]. При этом в различных исследованиях биоаналогичности III фазы, при введении нагрузочной дозы 8 мг/кг трастузумаба и последующем многократном введении в дозе 6 мг/кг каждые три недели, максимальная концентрация после введения нагрузочной дозы составила от 175 до 236 мкг/мл [51, 78], а концентрация перед очередным введением препарата (C_{trough}) – 25-34 мкг/мл [51, 77, 78].

Иммуногенность в исследованиях трастузумаба как I, так и III фазы является довольно низкой, процент выявления анти-лекарственных антител составляет от 0,62 % до 1,8 % [51, 75] (не учитывая иммуногенность до введения ЛП). Дополнительно стоит отметить, что при интерпретации данных по иммуногенности препарата стоит учитывать селективность, специфичность и устойчивость к ЛП биоаналитической методики, используемой для выявления анти-лекарственных антител в биологических образцах.

1.4. Методики определения трастузумаба и анти-лекарственных антител к трастузумабу в биологических объектах

Регистрация большого количества препаратов-биоаналогов трастузумаба в течение последних 7-8 лет потребовала разработки различных биоаналитических методик определения трастузумаба и анти-лекарственных антител к трастузумабу в биологической матрице с целью получения данных о фармакокинетике и иммуногенности препарата, необходимых, в том числе, для проведения сравнительных клинических исследований биоаналогичности. В частности, методики количественного определения трастузумаба в биологических образцах (плазма или сыворотка крови человека или животных) наиболее часто используются при проведении клинических исследований I-II фазы (Таблица 3) с участием здоровых добровольцев, включая исследования биоаналогичности.

Таблица 3 – Обзор методик определения трастузумаба в биологических объектах

Метод определения, исследуемые образцы	Анализируемое в-во	Нижний предел количественного определения (НПКО) или аналитический диапазон методики	Особенности пробоподготовки и проведения анализа	Область применения методики, ссылка
Аффинная хроматография, ВЭЖХ МС/МС; сыворотка крови человека	Трастузумаб, Пертузумаб	0,250-250 мкг/мл (трастузумаб)	Аффинная хроматография (белок А, сорбированный на магнитных частицах), восстановление и алкилирование и протеолиз пептидов, фильтрование, центрифугирование. Далее ВЭЖХ МС/МС для полученного фильтрата	Клиническое исследование (фаза II) препаратов пертузумаб и трастузумаб при совместном введении в рамках неoadьювантной терапии [79]
Непрямой ИФА; сыворотка крови человека	Трастузумаб	10 – 180 мкг/мл	Покрытие планшета биотинилированным HER2-подобным пептидом, детектирующие антитела – козы анти тела к человеческому IgG, минимально необходимое разведение (MRD) – 1:500 (0,2% сыворотка крови)	Терапевтический лекарственный мониторинг, клиническое исследование (фаза III) препарата трастузумаб [80]

Продолжение Таблицы 3

Непрямой «сэндвич» ИФА; сыворотка крови человека, плазма крови человека	Трастузумаб	0,0016 – 1,6 мкг/мл	Покрытие планшета антиидиотипическими антителами к трастузумабу, детектирующие антитела – антиидиотипические биотинилированные антитела к трастузумабу, MRD 1:10 (10% сыворотка крови)	Клиническое исследование эффективности и безопасности трастузумаба, с участием пациенток с РМЖ [81]
Непрямой ИФА; сыворотка крови человека	Трастузумаб	1,56 – 100 мкг/мл	Покрытие планшета внеклеточным доменом HER2, детектирующие антитела – козы антитела к человеческому IgG, MRD – 1:100 (1% сыворотка крови)	Клиническое исследование (фаза II) фармакокинетики и иммуногенности трастузумаба, с участием 39 пациенток с мРМЖ [69]
Непрямой «сэндвич» ИФА; сыворотка крови человека	Трастузумаб	10 – 200 мкг/мл	Покрытие планшета антителами к HER2, детектирующие антитела – козы антитела к человеческому IgG, MRD 1:2000 (0,05% сыворотка крови человека). Пре-инкубация образцов человеческими IgG для связывания Rf-подобных антител, повышающих фоновый сигнал	Апробация методики на 20 модельных образцах сыворотки крови человека, содержащих Герцептин® [82]

Продолжение Таблицы 3

Непрямой ИФА; сыворотка крови человека	Трастузумаб	НПКО – 150 нг/мл	Покрытие планшета внеклеточным доменом HER2, детектирующие антитела – козы антитела к человеческому IgG, MRD – 1:100 (1% сыворотка крови)	Клиническое исследование (фаза II) эффективности, безопасности и фармакокинетики трастузумаба при многократном введении, с участием 105 пациенток с HER2+ мРМЖ [83]
Непрямой ИФА; сыворотка крови человека, сыворотка крови яванских макак	Трастузумаб эмтанзин (Кадсила®): конъюгированный трастузумаб, свободный трастузумаб	0,16 – 20 нг/мл	Покрытие планшета внеклеточным доменом HER2, детектирующие антитела – козы антитела (F(ab') ₂) к человеческому IgG, MRD 1:100 (1% сыворотка крови)	Доклиническое исследование препарата трастузумаб эмтанзин, клиническое исследование (фаза I) препарата трастузумаб эмтанзин с участием 15 пациенток с мРМЖ [84]
Непрямой ИФА в сочетании с клеточным тестом специфической активности трастузумаба; плазма крови человека	Трастузумаб	10 – 120 мкг/мл	Посев и фиксация на культуральном планшете клеточной линии SKBR3 HER2+, детектирующие антитела – козы антитела к человеческому IgG, MRD 1:4000 (0,025% сыворотка крови)	Терапевтический лекарственный мониторинг у 30 пациенток с РМЖ при многократном введении трастузумаба [85]

Продолжение Таблицы 3

Нейлоновые мембраны, с сорбированным мимотопом HER2 совместно с флуоресцентным анализом; сыворотка крови человека	Трастузумаб	10 – 120 мкг/мл	Связывание трастузумаба на поверхности нейлоновой полупроницаемой мембраны с помощью синтетического мимотопа специфичного для трастузумаба эпитопа HER2, после элюирования трастузумаба – флуоресцентный анализ	н/п (методика апробирована исключительно на модельных образцах) [86]
Непрямой «сэндвич» ИФА; сыворотка крови человека	Трастузумаб	0,3 – 3 мкг/мл	Покрытие планшета антиидиотипическими антителами, детектирующие антитела – мышинные антитела к человеческому IgG	Сравнительное клиническое исследование биоаналога трастузумаба (фаза I) с участием 109 здоровых добровольцев [47]
Непрямой «сэндвич» ИФА; сыворотка крови человека	Трастузумаб	НПКО 75 нг/мл	Покрытие планшета моноклональными антиидиотипическими антителами к трастузумабу, детектирующие антитела – информация не представлена	Сравнительное клиническое исследование биоаналога трастузумаба (фаза I) с участием 134 здоровых добровольцев [48]
Мостиковый ИФА формат электрохемилюминесцентного анализа; сыворотка крови человека	Трастузумаб	данные не представлены	Покрытие планшета мышинными антителами к трастузумабу, детектирующие антитела – sulfo-tag конъюгат мышинных антител к трастузумабу, электрохемилюминесцентный анализ	Сравнительное клиническое исследование биоаналога трастузумаба (фаза I) с участием 157 здоровых добровольцев [71]

Как видно из Таблицы 3, методики количественного определения трастузумаба в биологических объектах преимущественно основаны на методе ИФА, однако существует также некоторое количество специализированных методик, например, на основе хроматографических методов – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-селективным детектированием (ВЭЖХ МС/МС) в сочетании с аффинной хроматографией [79], или методик с использованием клеточных культур [85]. В более ранних методиках определения трастузумаба в биообъектах, в том числе в рамках исследований оригинального ЛП «Герцептин[®]», в основном использовали классический непрямой ИФА с покрытием планшета рекомбинантным HER2, полученным непосредственно в лаборатории (*in-house*) [69, 83]. Наряду с этим, в исследованиях также встречается «сэндвич»-формат ИФА-методик с использованием антиидиотипических антител к трастузумабу [81] или к HER2 [82] в качестве покрытия. При этом стоит отметить, что любые реактивы, полученные *in-house*, требуют установления и регулярной проверки показателей качества и стабильности, а также теоретически могут увеличить вариабельность получаемых данных (включая межсерийную вариабельность), по сравнению с коммерческими реактивами, особенно если эти реактивы относятся к разряду «критических» для ИФА-методик. Для преодоления проблемы ограниченной доступности HER2, некоторые авторы использовали его синтетические аналоги [80], в том числе, в методиках не иммуноферментного характера [86], однако применимость таких методик была либо подтверждена на ограниченном количестве исследуемых образцов, либо и вовсе исключительно на модельных образцах. Подходящим методом ИФА стал и для анализа препарата трастузумаб эмтанзин (конъюгат «антитело-ЛП») в сыворотке крови человека, при этом, учитывая специфику метода, ИФА подходит как для определения самого трастузумаба, так конъюгированного с эмтанзином варианта, для чего авторы [84] разработали две отдельные методики. При этом свободные молекулы эмтанзина, в свою очередь, предлагается определять с помощью отдельной методики ВЭЖХ МС/МС.

Таким образом можно отметить, что в противовес методикам количественного определения лекарственных препаратов на основе малых молекул, для которых обычно используют различные хроматографические методы и масс-спектрометрию [84], для высокомолекулярных соединений, к которым относятся и МкАТ, предпочтение отдают иммунным методам (или методам связывания лиганда) [47-48, 71, 82-83]. Высокомолекулярные соединения характеризуются гетерогенностью состава, могут образовывать многозарядные ионы, а также обладают большой молекулярной массой, что затрудняет использование классических методов масс-спектрометрии, либо требует предварительной трудоемкой пробоподготовки [79], тогда как методы связывания лиганда представляют собой более простую и вместе с тем подходящую для поставленных задач альтернативу. Среди современных иммунных методов, используемых для анализа биологических образцов, можно выделить иммунофлуоресцентный анализ, электрохемилюминисценцию, радиоиммунный анализ, а также классический иммуноферментный анализ. Именно последний из перечисленных – метод ИФА, зачастую является вариантом выбора, как наиболее простой в исполнении и доступный метод анализа, обладающий высокой чувствительностью и специфичностью в отношении анализируемого вещества. Проведение ИФА, в отличие от методов электрохемилюминисценции или радиоиммунного анализа, не требует использования высокотехнологичного оборудования или компонентов, меченных радионуклидами, что позволяет выполнять анализ в условиях практически любой лаборатории. При этом можно отметить, что согласно литературным данным для количественного определения трастузумаба в биологических объектах наиболее часто реализуют непрямой или «сэндвич» формат иммуноферментного анализа, поскольку необходимые реактивы обычно коммерчески доступны, а использование конъюгата антител к человеческому IgG в качестве детектирующего реактива позволяет улучшить чувствительность и специфичность анализа, так как конъюгат подбирается именно к Fc-фрагменту человеческого иммуноглобулина класса G, входящего в состав молекулы трастузумаба [47-48, 69, 81-84].

Иммунные методы, и конкретно метод ИФА, считаются подходящими и для определения анти-лекарственных антител, обычно представляющих собой преимущественно иммуноглобулины класса G. Иммунные методы широко используются для определения антител к трастузумабу, что подтверждается описанными в литературе методиками оценки иммуногенности трастузумаба в рамках сравнительных клинических исследований биоаналогичности (Таблица 4). Стоит отметить, что больше внимания иммуногенности обычно уделяют в исследованиях III фазы, где основной целью является оценка клинической эффективности, а иммуногенность рассматривают как составляющую комплексной оценки безопасности препарата. При этом обычно для анализа биологических образцов используют методику определения анти-лекарственных антител, разработанную исходно для сравнительных исследований I фазы. Тем не менее, при таком подходе непосредственно перед анализом биологических образцов пациентов-участников исследований III фазы методика определения анти-лекарственных антител должна быть обязательно подвергнута частичной валидации с использованием биологической матрицы целевой популяции пациентов, так как свойства сыворотки или плазмы крови пациентов с учетом их заболевания или приема сопутствующих препаратов, могут значительно отличаться от свойств биологических образцов в популяции здоровых добровольцев.

Исходя из Таблицы 4 видно, что методики определения анти-лекарственных антител зачастую представлены качественными или полуколичественными вариантами, с определением титра антител. В ходе исследований препарата «Герцептин®» применяли ИФА-методику мостикового формата с использованием трастузумаба как в качестве покрытия планшета, так и в качестве детектирующих антител [69]. В более поздних исследованиях предпочтение отдается методикам ИФА с электрохемилюминесцентным детектированием [47, 48, 72], однако такие методики требуют специализированного высокотехнологичного оборудования и реактивов, которые кратно увеличивают стоимость проводимого анализа.

Таблица 4 – Обзор методик определения анти-лекарственных антител к трастузумабу в биологических объектах

Метод определения, исследуемые образцы	Анализируемое в-во	Формат анализа, чувствительность	Особенности пробоподготовки и проведения анализа	Область применения методики, ссылка
Мостиковый ИФА	Анти-лекарственные антитела к трастузумабу	Полуколичественное определение титра антител	Покрытие планшета – трастузумаб, детектирующие антитела – конъюгированный трастузумаб. MRD 1:100	Клиническое исследование (фаза II) фармакокинетики и иммуногенности трастузумаба, с участием 39 пациенток с мРМЖ [69]
Мостиковый ИФА на автоматическом анализаторе с использованием тест-системы Shikari® (S-ATT) Anti-Trastuzumab ELISA; плазма крови человека	Анти-лекарственные антитела к трастузумабу	Качественный анализ	Покрытие планшета – трастузумаб, детектирующие антитела – конъюгированный трастузумаб	Сравнительное клиническое исследование (фаза III) препарата трастузумаб при подкожном и внутривенном введении с участием 51 пациентки с мРМЖ [87]
Мостиковый ИФА; сыворотка крови человека	Анти-лекарственные антитела к трастузумабу	Полуколичественное определение титра антител	Покрытие планшета – трастузумаб, этап кислотной диссоциации образцов и аффинного отделения ЛП, детектирующие антитела – конъюгированный трастузумаб	Апробация методики с использованием образцов 101 пациентки с РМЖ [88]

Продолжение Таблицы 4

Мостиковый ИФА формат электрохемилюминесцентного анализа; сыворотка крови человека	Анти-лекарственные антитела к трастузумабу	Полуколичественное определение титра антител, чувствительность 2,88 нг/мл	Покрытие планшета со стрептавидином биотинилированным трастузумабом, дополнительный этап кислотной диссоциации образцов, детектирующие антитела sulfo-tag трастузумаб, электрохемилюминесцентный анализ	Сравнительное клиническое исследование биоаналога трастузумаба (фаза I) с участием 109 здоровых добровольцев [47]
Мостиковый ИФА формат электрохемилюминесцентного анализа; сыворотка крови человека	Анти-лекарственные антитела к трастузумабу	Полуколичественное определение титра антител, чувствительность 50 нг/мл антител в присутствии 100 мкг/мл трастузумаба	Покрытие планшета со стрептавидином биотинилированным трастузумабом, дополнительный этап кислотной диссоциации образцов, детектирующие антитела – sulfo-tag конъюгат трастузумаба, электрохемилюминесцентный анализ	Сравнительное клиническое исследование биоаналога трастузумаба (фаза I) с участием 134 здоровых добровольцев [48]
Иммуноферментный анализ	Анти-лекарственные антитела к трастузумабу	Полуколичественное определение титра антител, устойчивость 100 нг/мл антител в присутствии 20 мкг/мл трастузумаба и 500 нг/мл антител в присутствии 100 мкг/мл трастузумаба	данные не представлены	Сравнительное клиническое исследование биоаналога трастузумаба (фаза I) с участием 157 здоровых добровольцев [71]

Другим более простым вариантом является дополнительная к мостиковому ИФА пробоподготовка образцов: этапы кислотной диссоциации и аффинного разделения трастузумаба, однако для реализованной у авторов [88] подобной методики не приведены полные данные по ее валидации, а также весьма ограничен объем апробации разработанной методики (101 образец, вне клинических исследований).

Отдельно стоит отметить, что некоторые исследователи делают выбор в пользу автоматических анализаторов и коммерческих ИФА тест-систем, как для анализа фармакокинетики, так и для оценки иммуногенности препарата [73, 87]. Такой подход в первую очередь направлен на увеличение скорости получения данных (производительности анализа), а также призван снизить вариабельность получаемых значений, особенно если используется агрессивная пробоподготовка образцов (например, кислотная диссоциация с дальнейшей нейтрализацией). Использование коммерчески доступных тест-систем для проведения биоаналитических исследований препаратов МкАТ распространено и в России [89 – 91]. Кроме того, такой подход также может быть актуальным для упрощения процесса проведения многоцентровых исследований с использованием валидированных методик сразу на нескольких площадках.

Подходит метод ИФА и для оценки нейтрализующей активности антилекарственных антител, которая обычно является завершающим этапом оценки иммуногенности препарата. Методики оценки нейтрализующей активности зачастую похожи по своей сути на оценку общей иммуногенности, но обязательно включают в себя использование биологической мишени, то есть, по сути, представляют собой конкурентный формат иммуноферментного анализа. В случае трастузумаба в качестве мишени используется рекомбинантный HER2 (внеклеточный домен), который позволяет выявить нарушают ли антилекарственные антитела из исследуемого образца взаимодействие трастузумаба и HER2 [72, 92].

1.5. ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1

1. Проведен обзор различных препаратов класса моноклональных антител, представленных на фармацевтическом рынке. Установлено, что различные препараты МкАТ обладают высокой эффективностью и широко используются в клинической практике для терапии различных заболеваний, что обуславливает растущие темпы разработки и регистрации как инновационных препаратов данного класса, так и их биоаналогов.

2. Охарактеризовано гуманизированное моноклональное антитело трастузумаб. Отмечена высокая эффективность и хороший профиль безопасности препарата в рамках монотерапии и комбинированной терапии рака молочной железы – наиболее распространенного типа онкологических заболеваний у женщин во всем мире.

3. Проведен обзор клинических исследований препаратов трастузумаба, включая сравнительные исследования биоаналогичности. Изучены данные по фармакокинетике и иммуногенности оригинального препарата «Герцептин®», которые не только учитываются при разработке и регистрации новых биоаналоговых препаратов трастузумаба, но и являются основополагающей информацией для разработки биоаналитических методик, предназначенных для определения концентрации препарата и выявления анти-лекарственных антител к нему при проведении аналитической части клинических исследований.

4. Подтверждено, что методом выбора для проведения биоаналитических исследований биологических препаратов и выявления анти-лекарственных антител к ним является метод ИФА. Установлено, что в рамках разработки новых препаратов-биоаналогов требуется проведение собственных клинических исследований и разработка собственных биоаналитических методик, специфичных для каждого конкретного препарата-биоаналога.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Оборудование

Разработка методики количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека методом ИФА, а также методики полуколичественного определения анти-лекарственных антител к трастузумабу методом ИФА, с последующей их валидацией и применением для анализа исследуемых биологических образцов субъектов КИ, проводилась с использованием следующего оборудования:

- Планшетный иммуноферментный анализатор Stat Fax 3200 (Awareness Technology Inc, США);
- Фотометр микропланшетный, Multiskan FC (ThermoFisher Scientific, США);
- Промыватель планшетов автоматический «Акварин» (АО «Вектор-Бест-Европа», Россия);
- Термошейкер для планшетов PST-60HL (BioSan, Латвия);
- Термошейкер для пробирок MTH-100 (MIU Lab, Китай);
- Весы аналитические Ohaus Pioneer PA 214C (Ohaus Corporation, США);
- pH-метр-милливольтметр ph-420 (ООО «НПО Аквилон», Россия);
- Система водоподготовки, Аквалаб AL-1 Plus (НПК АО «Медиана-Фильтр», Россия);
- Дозаторы пипеточные одноканальные переменного объема «Техно»: 1-10 мкл, 10-100 мкл, 100-1000 мкл, 500-5000 мкл (ThermoFisher Scientific, США);
- Дозатор пипеточный восьмиканальный переменного объема 30-300 мкл (ThermoFisher Scientific, США);
- Цилиндры мерные ГОСТ-1770-74: 1-25 мл, 1-50 мл, 1-100 мл; 1-250 мл, 1-500 мл и 1-1000 мл (Химлаборприбор, МиниМед, Россия);
- Колбы мерные класса А вместимостью 10 мл, 25 мл, 50 мл, 100 мл, 200 мл и 1000 мл (ISOLAB GmbH, Германия);

- Встряхиватель типа «вортекс» Reax Top (Heidolph, Германия);
- Встряхиватель орбитальный Vortex 2 (IKA-Werke, Германия);
- Цифровая магнитная мешалка Intelli-Stirrer MSH-300i (BioSan, Латвия);
- Центрифуга-встряхиватель медицинская CM-50M (SIA «ELMI», Латвия);
- Холодильник фармацевтический ХФ-400-2 (Pozis, Россия);
- Морозильник микропроцессорный MM-180 (Pozis, Россия);
- Морозильник низкотемпературный, DW-HL100 (Meling Biomedical, Китай).

2.2. Реактивы и расходные материалы

Для приготовления калибровочных образцов и образцов для контроля качества (в ходе количественного определения трастузумаба), а также образцов положительного и отрицательного контроля (в ходе полуколичественного определения анти-лекарственных антител к трастузумабу) использовались следующие стандартные образцы и лекарственные препараты:

- Герцептин[®], лиофилизат для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий, 440 мг/ 20 мл, (производство «Ф. Хоффман-Ля Рош Лтд.», Швейцария);
- Трастузумаб, лиофилизат для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий, 440 мг/ 20 мл, (производство ООО «Мабскейл», Россия);
- Рекомбинантные, человеческие (подкласс IgG1), высокоаффинные, антиидиотипические, паратоп-специфичные, нейтрализующие моноклональные антитела к трастузумабу, 0,5 мг/мл (BioRad Laboratories, США).

Для разработки и валидации методик, а также непосредственно для проведения иммуноферментного анализа использовали следующие критические (непосредственно взаимодействующие с анализируемым веществом и напрямую влияющие на получаемые результаты) и вспомогательные (не взаимодействующие напрямую с анализируемым веществом) реактивы и материалы:

Критические реактивы и материалы

- Планшет 96-луночный, плоскодонный, полистироловый, высокое связывание, покрытый человеческим рекомбинантным рецептором эпидермального фактора роста 2 типа (HER2) и заблокированный от неспецифического связывания (НПЦ Пробиотек, Россия);
- Планшет 96-луночный, плоскодонный, полистироловый, высокое связывание, Costar[®] (Corning Inc., США);
- Конъюгат козьих поликлональных антител к Fc-фрагменту человеческого IgG с пероксидазой хрена (Sigma Aldrich, США);
- Конъюгат пероксидазы со стрептавидином стафилококковым (Имтек, Россия);
- Набор реагентов для биотинилирования белков и антител (Силекс, Россия).

Вспомогательные реактивы и материалы

- Бычий сывороточный альбумин (БСА), heat shock фракция, pH = 7,0, чистота ≥ 98 % (Sigma Aldrich, США);
- Полисорбат-20 (Tween[®] 20), pure, pharma grade (PanReac, Испания);
- Калия хлорид (KCl), х.ч. (Компонент-реактив, Россия);
- Натрия хлорид (NaCl) х.ч. (Компонент-реактив, Россия);
- Калия дигидрофосфат б/водн. (KH₂PO₄), ч.д.а. (Компонент-реактив, Россия);
- Натрия гидрофосфат, б/водн. (Na₂HPO₄) pure, pharma grade (PanReac, Испания);
- Натрия карбонат б/водн. (Na₂CO₃) х.ч. (Химмед, Россия);
- Натрия гидрокарбонат (NaHCO₃) pure, pharma grade (PanReac, Испания);
- Глицин, pure EP USP, $\geq 98,5$ % (Диаэм, Россия);
- Трис(гидроксиметил)-аминометан, чистота $\geq 99,0$ % (Sigma Aldrich, США);
- 3, 3', 5, 5'-тетраметилбензидин (ТМБ) субстрат, двухкомпонентный набор (Имтек, Россия)
- Серная кислота концентрированная (H₂SO₄), х.ч. (Химмед, Россия);

– Соляная кислота концентрированная (HCl), ос.ч. (СигмаТек, Россия).

2.3. Приготовление растворов

2.3.1. Растворы, приготовленные при выполнении анализа согласно методике количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека методом ИФА

1. *Фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ 1X), pH = 7,4 – 7,6.* В мерную колбу объемом 1 л вносили 1,2183 г Na_2HPO_4 , 0,1904 г KH_2PO_4 и 8,8 г NaCl. В колбу добавляли 500 мл воды очищенной и перемешивали до полного растворения солей. Доводили раствор водой очищенной до метки, измеряли pH, фильтровали полученный раствор через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Приготовленный буферный раствор хранили не более 7 суток при температуре от +2 °С до +8 °С.

2. *Разбавитель (0,1 % БСА + 0,1 % полисорбата-20 в растворе ФСБ 1X).* В химический стакан объемом 150 мл вносили 0,1 г БСА и приливали 100 мл ФСБ 1X. При перемешивании добавляли 100 мкл (v/v) или 110 мг (m/v) полисорбата-20. Перемешивали до полного растворения всех компонентов. Полученный раствор хранили не более 3 суток при температуре от +2 °С до +8 °С.

3. *Промывочный буфер (0,025 % твин-20 в ФСБ 1X, раствор ФСБ-Т).* В химический стакан объемом 1 л вносили 0,5 л ФСБ 1X, после чего добавляли 250 мкл (v/v) или 0,257 г (m/v) полисорбата-20, доводили объем раствора до 1 л и тщательно перемешивали до полного растворения полисорбата-20. Полученный раствор хранили не более 7 суток при температуре от +2 °С до +8 °С

4. *Конъюгат вторичных антител с пероксидазой (1:20 000).* Смешивали 0,6 мл концентрата конъюгата козьих поликлональных антител к Fc-фрагменту человеческого IgG с пероксидазой и 11,4 мл разбавителя. Раствор использовали свежеприготовленным.

5. *ТМБ субстрат*. Смешивали ТМБ-концентрат и субстратный буфер (из набора ИМТЕК) в соотношении 1:10 (например, 1200 мкл ТМБ-концентрата и 10 800 мкл субстратного буфера). Раствор использовали свежеприготовленным.

6. *Стоп-реагент (2н серная кислота)*. В мерную колбу объемом 100 мл вносили около 50 мл воды очищенной, затем медленно добавляли аликвоту 5,63 мл концентрированной серной кислоты и аккуратно перемешивали. Доводили объем до метки водой очищенной и тщательно перемешивали. Приготовленный раствор хранили не более 3 месяцев при комнатной температуре от +15 °С до +25 °С.

2.3.2. Растворы, приготовленные при выполнении анализа согласно методике полуколичественного определения антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом ИФА

1. *Карбонатный буферный раствор, pH=9,4-9,5*. В мерной колбе объемом 200 мл смешивали 7 мл 0,1М раствора натрия карбоната (Na_2CO_3 безводный, 10,6 г/л) и 43 мл 0,1М раствора гидрокарбоната натрия (NaHCO_3 безводный, 8,4 г/л). Доводили полученный раствор водой очищенной до 200 мл, тщательно перемешивали, измеряли pH, при необходимости доводили pH до 9,4-9,5 с помощью 10 % раствора NaOH. Приготовленный буферный раствор хранили не более 2 месяцев при температуре от +2 °С до +8 °С.

2. *Раствор для покрытия планшета (трастузумаб в карбонатном буфере, 40 мкг/мл)*. Готовили разведение трастузумаба карбонатным буферным раствором из исходного раствора 22 мг/мл до концентрации 40 мкг/мл. Раствор использовали свежеприготовленным.

3. *0,2М Глициновый буферный раствор, pH=2,30*. В мерную колбу объемом 100 мл вносили около 50 мл воды очищенной, растворяли в воде 1,5 г глицина, тщательно перемешивали и доводили раствор до метки водой очищенной. Измеряли pH, доводили pH до 2,30 с помощью концентрированной хлористоводородной кислоты. Приготовленный буферный раствор хранили не более 2 месяцев при температуре от +2 °С до +8 °С.

4. *Трис-НСI буфер, рН=9,5.* В мерную колбу объемом 100 мл вносили около 50 мл воды очищенной, растворяли в воде 12,114 г трис-основания, тщательно перемешивали и доводили раствор до метки водой очищенной. Измеряли рН, доводили рН до 9,50 концентрированной хлористоводородной кислотой. Приготовленный буферный раствор хранили не более 2 месяцев при температуре от +2 °С до +8 °С.

5. *Фосфатно-солевой буферный раствор концентрат (ФСБ 5Х).* В мерную колбу объемом 1 л вносили около 400 мл воды очищенной, после чего добавляли: 40 г натрия хлорида (NaCl), 1 г калия хлорида (KCl), 5,75 г натрия гидрофосфата (Na₂HPO₄) и 1 г калия дигидрофосфата (KH₂PO₄) и тщательно перемешивали до полного растворения солей. Раствор доводили до метки водой очищенной. Полученный раствор фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, измеряли рН. Приготовленный буферный раствор хранили не более 2 месяцев при температуре от +2 °С до +8 °С. Готовый раствор использовали для приготовления однократного фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБ 1Х) путем смешивания концентрата с водой очищенной в соотношении 1:5 (например, 200 мл концентрата и 800 мл воды очищенной).

6. *Промывочный буфер (0,1 % раствор полисорбата-20 в однократном фосфатно-солевом буфере).* В химический стакан вносили 1000 мкл v/v (или 1100 мг m/v) полисорбата-20, прибавляли до 1 л фосфатно-солевой буферный раствор 1Х и тщательно перемешивали. Приготовленный раствор хранили не более 2 месяцев при температуре от +2 °С до +8 °С.

7. *Раствор для блокировки планшета (1 % БСА в фосфатно-солевом буфере 1Х).* В химический стакан вносили 1 г БСА, прибавляли 100 мл фосфатно-солевого буферного раствора 1Х и перемешивали до полного растворения БСА. Раствор использовали свежеприготовленным.

8. *Буфер для анализа (1% БСА и 0,05% полисорбат-20 в фосфатно-солевом буфере 1Х).* В химический стакан вносили 1 г БСА и 50 мкл v/v (или 55 мг m/v) полисорбата-20. Добавляли 100 мл ФСБ 1Х фосфатно-солевого буферного

раствора 1X и перемешивали до полного растворения компонентов. Раствор использовали свежеприготовленным.

9. *Первичный детектирующий реагент (биотинилированный трастузумаб)*. Для биотинилирования трастузумаба использовали «набор для биотинилирования антител» (Силекс, Россия, кат. № K0321). Биотинилирование проводили согласно рекомендациям производителя:

- Готовили раствор трастузумаба 5 мг/мл ($C_{\text{исх.}} = 22$ мг/мл). Для этого смешивали 300 мкл трастузумаба ($C=22$ мг/мл) и 1020 мкл 1x буфера для конъюгации, входящего в состав набора;
- 1 мг реагента для биотинилирования растворяли в 100 мкл буфера для растворения реагента из набора ($C_{\text{РЕАГЕНТА}} = 10$ мг/мл);
- Смешивали 1 мл раствора трастузумаба (5 мг/мл) и 60 мкл раствора реагента для биотинилирования. Инкубировали приготовленную смесь в течение ночи (не менее 12 часов) при температуре от +2 °C до +8 °C. В случае необходимости после инкубации проводили этап диализа биотинилированного трастузумаба, для очистки смеси от свободного биотина;
- Использовали готовые биотинилированные антитела в разведении 1:100 (например, 120 мкл исходного раствора биотинилированных антител и 11 880 мкл буфера для анализа).

10. *Вторичный детектирующий реагент (конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена, рабочее разведение 1:2500)*. Смешивали 5 мкл исходного раствора конъюгата и 495 мкл буфера для анализа (разведение I), тщательно перемешивали. Затем смешивали 480 мкл разведения I и 11 520 мкл буфера для анализа. Раствор использовали свежеприготовленным.

11. *ТМБ субстрат*. Смешивали ТМБ-концентрат и субстратный буфер (из набора ИМТЕК) в соотношении 1:10 (например, 1200 мкл ТМБ-концентрата и 10 800 мкл субстратного буфера). Раствор использовали свежеприготовленным.

12. *Стоп-реагент (2n серная кислота)*. В мерную колбу объемом 100 мл вносили около 50 мл воды очищенной, затем медленно добавляли аликвоту 5,63 мл

концентрированной серной кислоты и аккуратно перемешивали. Доводили объем до метки водой очищенной и тщательно перемешивали. Приготовленный раствор хранили не более 3 месяцев при комнатной температуре от +15 °С до +25 °С.

2.4. Исследуемые образцы

В ходе разработки и валидации методик в качестве исследуемых биологических образцов выступали:

- калибровочные образцы, приготовленные путем добавления различных концентраций трастузумаба к интактной сыворотке крови человека;
- образцы для контроля качества, приготовленные путем добавления различных концентраций трастузумаба к интактной сыворотке крови человека;
- индивидуальные образцы интактной сыворотки крови здоровых добровольцев, включая гиперлипидемические (хилезные) и гемолизованные образцы;
- образцы положительного контроля, приготовленные путем добавления различных концентраций антител к трастузумабу к интактной сыворотке крови человека;
- образцы отрицательного контроля, приготовленные путем пулирования индивидуальных образцов интактной сыворотки крови человека.

В ходе проведения сравнительного клинического исследования в качестве препарата сравнения и исследуемого препарата выступали:

- Герцептин[®], лиофилизат для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий, 440 мг/ 20 мл, растворитель – бактериостатическая вода для инъекций, производство «Ф. Хоффман-Ля Рош Лтд.», Швейцария, серия: N3911B02 (лиофилизат) и B3113 (растворитель).
- Трастузумаб, лиофилизат для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий, 440 мг/ 20 мл, растворитель – бактериостатическая вода для инъекций, производство ООО «Мабскейл», Россия,

использованные серии: ЛП010319ОП (лиофилизат) и ЛП010419ОП (растворитель), ЛП010920ОП (лиофилизат) и ЛП010920ОП (растворитель).

В ходе проведения сравнительного клинического исследования в качестве исследуемых биологических образцов выступали:

– Образцы сыворотки крови здоровых добровольцев-субъектов сравнительного клинического исследования препаратов трастузумаба, полученные в соответствии с процедурами, описанными в протоколе клинического исследования.

2.5. Приготовление калибровочных образцов, образцов для контроля качества, образцов положительного и отрицательного контроля

В ходе проведения разработки и валидации методики количественного определения трастузумаба в сыворотке крови методом ИФА рабочие растворы трастузумаба готовили из исходного стандартного раствора 22 мг/мл трастузумаба. Для приготовления калибровочных образцов с концентрациями трастузумаба в сыворотке крови: 3, 6, 30, 90, 160, 250 и 300 мкг/мл и образцов для контроля качества с концентрациями трастузумаба в сыворотке крови: 3, 8,5, 150, 225 и 300 мкг/мл соответствующие рабочие растворы трастузумаба добавляли в пулированную интактную сыворотку крови здоровых добровольцев. Приготовленные образцы подвергали замораживанию при температуре не выше минус 20 °С в течение не менее 12 часов.

В ходе проведения разработки и валидации методики полуколичественного определения анти-лекарственных антител к трастузумабу в сыворотке крови методом ИФА рабочие растворы антител к трастузумабу готовили из исходного стандартного раствора 0,5 мг/мл антител к трастузумабу. Образцы положительного контроля на верхнем (НРС и РС1) и нижнем уровнях (РС2 и LPC) с концентрациями 2580, 1000, 500 и 129 нг/мл антител к трастузумабу готовили путем разбавления исходного раствора антител к трастузумабу интактной пулированной сывороткой крови здоровых добровольцев. После приготовления образцы инкубировали в

термошейкере при +37 °С и перемешивании 500 об/мин в течение 1 часа, после чего подвергали замораживанию при температуре не выше минус 20 °С в течение не менее 12 часов. Образцы отрицательного контроля представляли собой пулированную интактную сыворотку крови добровольцев, не содержащую антител к трастузумабу.

2.6. Методики проведения анализа

2.6.1. Методика количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека методом ИФА

Разработанная методика количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека основана на методе твердофазного иммуноферментного анализа. Анализ включал в себя следующие этапы:

1. Разбавление образцов. Все образцы (калибровочные/ контроля качества/ исследуемые) разбавляли раствором Разбавителя (0,1 % полисорбат-20 и 0,1 % БСА в растворе ФСБ) в соответствии с выбранным MRD (0,02 % сыворотка крови человека, 1:5000) в два этапа – 10 мкл образца + 990 мкл Разбавителя (разведение I), затем 20 мкл разведения I + 980 мкл Разбавителя.

2. Внесение образцов в планшет, инкубация. В лунки планшета, покрытого рекомбинантным внеклеточным доменом HER-2, в соответствии со схемой цикла вносили по 100 мкл образцов, планшет заклеивали пленкой, инкубировали 60 минут при комнатной температуре с перемешиванием 250 об/мин.

3. Промывка планшета. По окончании инкубации планшет трижды промывали промывочным раствором (0,025 % полисорбат-20 в ФСБ), внося по 250 мкл раствора в каждую лунку. Замачивание между циклами составляло 60 секунд. По окончании промывки остатки раствора удаляли, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

4. Внесение конъюгата, инкубация. Во все лунки планшета вносили по 100 мкл рабочего раствора конъюгата вторичных антител (1:20 000, в растворе

Разбавителя), планшет заклеивали и инкубировали 30 минут при комнатной температуре с перемешиванием 250 об/мин.

5. Промывка планшета. По окончании инкубации планшет трижды промывали промывочным раствором (0,025 % полисорбат-20 в ФСБ), внося по 250 мкл раствора в каждую лунку. Замачивание между циклами составляло 60 секунд. По окончании промывки остатки раствора удаляли, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

6. Внесение субстрата, инкубация. Во все лунки планшета вносили по 100 мкл раствора ТМБ-субстрата. Планшет заклеивали пленкой и инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте.

7. Остановка реакции. По окончании инкубации пленку удаляли, во все лунки планшета вносили по 100 мкл стоп-реагента. Планшет заклеивали пленкой и перемешивали на шейкере при комнатной температуре в течение 1 минуты с перемешиванием 250 об/мин.

8. Измерение оптической плотности. По окончании перемешивания пленку удаляли и измеряли оптическую плотность образцов при тестовой длине волны 450 нм и референсной длине волны 630 нм. Регистрацию данных осуществляли с помощью ПО PC Recorder вер. 1.4.

2.6.2. Методика полуколичественного определения анти-лекарственных антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом ИФА

Разработанная методика полуколичественного определения антител к трастузумабу в сыворотке крови человека основана на методе твердофазного мостикового иммуноферментного анализа с дополнительным этапом кислотной диссоциации комплексов «трастузумаб – антитела к трастузумабу», которые могут содержаться в сыворотке крови. Анализ включал в себя следующие этапы:

1. Покрытие планшета. Во все лунки планшета вносили по 100 мкл реагента для покрытия (трастузумаб в карбонатном буферном растворе, $C = 40$ мкг/мл). Планшет заклеивали пленкой и инкубировали при температуре

от +2 °С до +8 °С в течение ночи (не менее 12 часов). По окончании инкубации планшет выдерживали при комнатной температуре в течение не менее 30 минут.

2. Кислотная диссоциация образцов. Все образцы (исследуемые, положительного/ отрицательного контроля) размораживали при комнатной температуре в течение не менее 30 мин. Затем разбавляли образцы с помощью 0,2М глицинового буферного раствора (рН = 2,30) в соотношении 1:10. Образцы инкубировали на термошейкере при температуре +37 °С и перемешивании 500 об/мин в течение 25 минут.

3. Промывка планшета. Все лунки планшета промывали 3 раза с помощью промывочного буфера, внося по 300 мкл буфера в каждую лунку за один цикл промывки, замачивание между циклами составляло 20 секунд. По окончании промывки остатки буфера удаляли, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

4. Внесение образцов, инкубация.

4а) Скрининг: после промывки во все лунки планшета вносили по 50 мкл трис-НСl буфера (рН = 9,50), а затем вносили по 100 мкл образцов после кислотной диссоциации в дублях (в соответствии со схемой внесения образцов в цикле).

4б) Подтверждающий анализ: после промывки во все лунки планшета вносили по 50 мкл трис-НСl буфера (рН = 9,50), содержащего трастузумаб в концентрации 2 мг/мл, а затем вносили по 100 мкл образцов после кислотной диссоциации в дублях (в соответствии со схемой внесения образцов в цикле).

После внесения образцов планшет заклеивали пленкой и инкубировали на термошейкере при температуре +37 °С и перемешивании 500 об/мин в течение 1 часа.

5. Промывка планшета. Все лунки планшета промывали 3 раза с помощью промывочного буфера, внося по 300 мкл буфера в каждую лунку за один цикл промывки, замачивание между циклами составляло 20 секунд. По окончании промывки остатки буфера удаляли, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

6. Элюирование антител. Во все лунки планшета вносили по 120 мкл глицинового буферного раствора ($pH = 2,30$). Планшет заклеивали пленкой и инкубировали на термошейкере при температуре $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ и перемешивании 500 об/мин в течение 25 минут.

7. Иммуобилизация антител к трастузумабу. По окончании инкубации во все лунки нового (непокрытого) полистиролового планшета вносили по 50 мкл трис-HCl буфера, а затем переносили в новый планшет по 100 мкл элюированных образцов. Планшет заклеивали пленкой и инкубировали на термошейкере при температуре $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ и перемешивании 500 об/мин в течение 1 часа.

8. Промывка планшета. Все лунки планшета промывали 3 раза с помощью промывочного буфера, внося по 300 мкл буфера в каждую лунку за один цикл промывки, замачивание между циклами составляло 20 секунд. По окончании промывки остатки буфера удаляли, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

9. Блокировка планшета. Для предотвращения неспецифического связывания во все лунки планшета вносили по 250 мкл блокирующего раствора (1 % БСА в растворе ФСБ). Планшет заклеивали пленкой и инкубировали при температуре $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ и перемешивании 500 об/мин в течение 1 часа.

10. Промывка планшета. Все лунки планшета промывали 3 раза с помощью промывочного буфера, внося по 300 мкл буфера в каждую лунку за один цикл промывки, замачивание между циклами составляло 20 секунд. По окончании промывки остатки буфера удаляли, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

11. Внесение первичного детектирующего реагента, инкубация. Во все лунки планшета вносили по 100 мкл первичного детектирующего реагента (биотинилированный трастузумаб). Планшет заклеивали пленкой и инкубировали на термошейкере при температуре $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ и перемешивании 500 об/мин в течение 1 часа.

12. Промывка планшета. Все лунки планшета промывали 3 раза с помощью промывочного буфера, внося по 300 мкл буфера в каждую лунку за один цикл

промывки, замачивание между циклами составляло 20 секунд. По окончании промывки остатки буфера удаляли, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

13. Внесение вторичного детектирующего реагента, инкубация. Во все лунки планшета вносили по 100 мкл вторичного детектирующего реагента (конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена). Планшет заклеивали пленкой и инкубировали на термошейкере при температуре +37 °С и перемешивании 500 об/мин в течение 1 часа.

14. Промывка планшета. Все лунки планшета промывали 3 раза с помощью промывочного буфера, внося по 300 мкл буфера в каждую лунку за один цикл промывки, замачивание между циклами составляло 20 секунд. По окончании промывки остатки буфера удаляли, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

15. Внесение субстрата, инкубация. Во все лунки планшета вносили по 100 мкл ТМБ-субстрата. Планшет заклеивали пленкой и инкубировали на термошейкере при температуре +37 °С и перемешивании 300 об/мин в течение 30 минут.

16. Внесение стоп-реагента. По окончании инкубации во все лунки планшета вносили по 100 мкл стоп-реагента. Слегка перемешивали, постукивая по краю планшета, после чего измеряли оптическую плотность образцов при тестовой длине волны 450 нм и референсной длине волны 630 нм. Регистрацию данных осуществляли с помощью ПО PC Recorder ver. 1.4.

2.7. Дизайн сравнительного клинического исследования препаратов трастузумаба

Сравнительное клиническое исследование фармакокинетики и безопасности препаратов трастузумаба I фазы проводилось на базе аккредитованного клинического центра «Научный клинический центр открытого акционерного общества «Российские железные дороги». Исследование было проведено в строгом

соответствии с принципами Хельсинкской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации, а также в соответствии с требованиями надлежащей клинической практики GCP (РКИ №611 от 23.10.2019, выдано Министерством здравоохранения Российской Федерации). Проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом клинического центра.

В исследовании принимали участие здоровые добровольцы (N = 100, 92 участника, 8 дублеров), мужчины в возрасте от 18 до 45 лет, соответствующие критериям включения/невключения в исследование. В ходе исследования 92 добровольца были рандомизированы в две группы в соотношении 1:1 (по 46 человек в каждой группе), и получали однократную внутривенную 90-минутную инфузию исследуемого препарата (Трастузумаб, 440 мг/20 мл, ООО «Мабскейл», Россия) или препарата сравнения (Герцептин[®], 440 мг/20 мл, «Ф. Хоффман-Ля Рош Лтд.», Швейцария) в дозе 6 мг/кг. Отбор проб крови осуществляли с помощью кубитального гепаринизированного катетера, который добровольцам устанавливали на 12 часов в локтевую вену противоположной от введения препарата руки, отбор образцов крови после снятия катетера (24-часовая точка и далее) осуществляли путем венепункции. После отбора образцов цельной крови из них получали исследуемые биологические образцы сыворотки крови, которые замораживали, передавали в биоаналитическую лабораторию и хранили при температуре не выше минус 20 °С до момента анализа. Для оценки фармакокинетики препаратов трастузумаба, согласно протоколу клинического исследования, у каждого добровольца образцы крови забирали до введения, а также через 90 минут (по окончании инфузии препарата) и через 3, 6, 12, 24, 72, 120, 168, 336, 504, 672, 744, 1008, 1248, 1440 и 1704 часа после инфузии одного из препаратов (исследуемого или препарата сравнения). Для оценки иммуногенности препаратов трастузумаба, согласно протоколу клинического исследования, у каждого добровольца образцы крови забирали до введения, а также через 336, 744, 1248 и 1704 часа после инфузии одного из препаратов (исследуемого или препарата сравнения).

Первичной задачей исследования было продемонстрировать фармакокинетическую эквивалентность (биоаналогичность) двух препаратов, дополнительно оценивали их безопасность, в том числе иммуногенность. Расчет ФК-параметров сравниваемых препаратов осуществляли с помощью описательных статистик в программном обеспечении MS Excel 2021, а также используя программу PK Solutions 2.0 (для вычисления значений площади под фармакокинетической кривой «концентрация-время»). Для установления эквивалентности (биоаналогичности) сравниваемых препаратов использовали подход, основанный на оценке параметрических, двусторонних 90 % доверительных интервалов для отношений средних геометрических значений основных фармакокинетических параметров: $AUC_{0-\infty}$, AUC_{0-t} и C_{max} для исследуемого препарата и препарата сравнения. Выбранные пределы границ эквивалентности (границы 90 %-го доверительного интервала), согласно протоколу, составляли 80,00 % – 125,00 %. Для расчета доверительных интервалов и статистического сравнения ФК-параметров препаратов использовали дисперсионный анализ (ANOVA), проведенный в программе Statistica®.

ГЛАВА 3. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Разработка методики количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека методом ИФА

В основе методики лежит непрямой ИФА, с покрытием белком-мишенью. В качестве мишени трастузумаба, использовали коммерчески доступный рекомбинантный внеклеточный домен эпидермального фактора роста HER2. После нанесения антигена на планшет с высоким связыванием проводили блокирование мест неспецифического связывания с помощью раствора БСА. Поскольку при проведении КИ предпочтение зачастую отдают большей стандартизации процесса анализа, в работе использовались подготовленные планшеты (НПЦ Пробиотек, Россия), покрытые антигеном (внеклеточный домен рецептора HER2) и заблокированные от неспецифического связывания. Принципиальная схема анализа приведена на Рисунке 3.

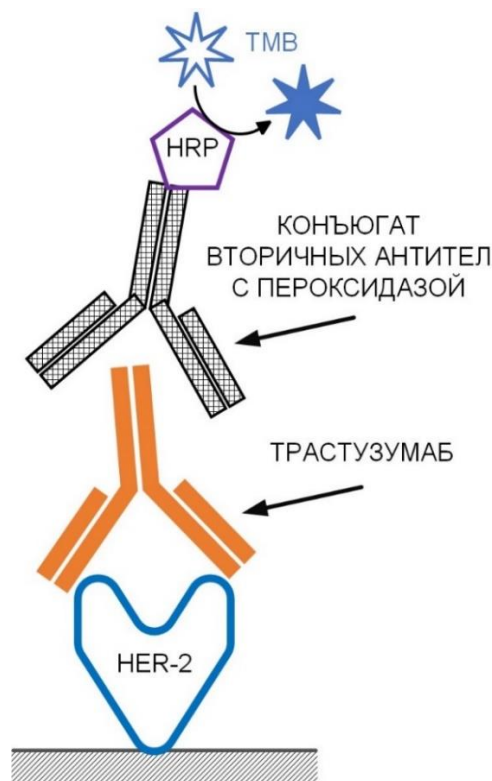


Рисунок 3 – Схематичное изображение этапов проведения ИФА в ходе количественного определения трастузумаба в сыворотке крови (HER2 – рецептор эпидермального фактора роста второго типа, ТМВ – тетраметилбензидин)

Аналитический диапазон методики подбирали исходя из поставленных задач исследования, а именно для обеспечения определения концентраций трастузумаба в сыворотке крови, соответствующих ожидаемым значениям C_{max} препарата после однократного введения здоровым добровольцам в дозе 6 мг/кг. Согласно литературным данным, ожидаемые значения максимальной концентрации трастузумаба в крови могут составлять от 122,9 [73] до 174 мкг/мл [72] у различных групп добровольцев, с возможным максимальным значением до 200 мкг/мл у некоторых добровольцев [72], поэтому верхний предел количественного определения трастузумаба в методике был выбран на уровне 300 мкг/мл. Значение НПКО выбирали, опираясь в том числе на требования нормативной документации [16], согласно которым НПКО методики должен обеспечивать обнаружение концентраций анализируемого вещества на уровне не более 5 % от ожидаемой максимальной концентрации аналита (C_{max}). В качестве НПКО методики была выбрана концентрация 3 мкг/мл трастузумаба в нативной (неразбавленной) сыворотке крови. Дополнительной задачей, ввиду отсутствия в большинстве случаев в методе ИФА пробоподготовки биологических образцов, было подобрать оптимальное значение минимально необходимого разведения. Результаты определения MRD методики приведены далее в разделе 3.2.1., выбранное значение составило 1:5000 (0,02% сыворотка крови человека). Таким образом, для выбранного в ходе разработки методики аналитического диапазона от 3 до 300 мкг/мл трастузумаба в сыворотке крови, чувствительность методики непосредственно в лунках планшета составила 0,6 нг/мл. Использование подготовленного иммуносорбента (планшета) из ИФА-набора производства ООО «НПЦ Пробиотек», в свою очередь, позволило сделать анализ образцов более стандартизованным и высокопроизводительным, что зачастую благоприятно воздействует на воспроизводимость результатов, получаемых для исследуемых образцов. Тем не менее, несмотря на использование готовых тест-систем, биоаналитическая методика количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека методом ИФА с фотометрическим способом детектирования в видимом диапазоне спектра (п. 2.6.1.) подлежит полной

валидации, в соответствии с рекомендациями актуальной нормативной документации [16].

3.2. Валидация методики количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека методом ИФА

Валидация методики количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека методом ИФА проводилась в соответствии со следующими нормативными документами:

1. Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза, утвержденные решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03 ноября 2016 г. № 85. В частности, в соответствии с требованиями Приложения № 6 «Требования к валидации биоаналитических методик испытаний и анализу исследуемых биологических образцов». Кроме того, поскольку основной использованный метод – иммуноферментный анализ с фотометрическим способом детектирования в видимом диапазоне спектра относится к методам связывания лиганда (полимерсвязывающим методам), к валидации методики применимы непосредственно требования раздела V приложения №6 «Полимерсвязывающие методы (методы связывания лиганда)» [16].
2. Правила проведения исследований биологических лекарственных средств на территории Евразийского экономического союза, утвержденные решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03 ноября 2016 г. № 89 [15].
3. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2018 [93]. Документ, который на территории Российской Федерации носит рекомендательный характер, однако, в некоторой степени дополняет требования Приложения №6 к Правилам проведения исследований биоэквивалентности лекарственных

препаратов в рамках ЕАЭС, которые были созданы на основе Руководства ЕМА Guideline on bioanalytical method validation, принятого в 2011 году [94].

4. Протокол клинического исследования «Двойное слепое, рандомизированное, сравнительное клиническое исследование фармакокинетики и безопасности, при однократном внутривенном введении препаратов Трастузумаб, лиофилизат для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий, производства ООО «Мабскейл», Россия и Герцептин[®], лиофилизат для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий, производства «Ф. Хоффман-Ля Рош Лтд.», Швейцария здоровым добровольцам», который в числе прочего описывает требования к методу определения трастузумаба в сыворотке крови добровольцев-участников исследования.

Полную валидацию биоаналитической методики количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека методом ИФА с фотометрическим способом детектирования в видимом диапазоне спектра проводили по следующим параметрам: минимально необходимое разведение (MRD), селективность, калибровочная кривая и НПКО, правильность (на уровнях внутри цикла, между циклов), прецизионность (на уровнях внутри цикла, между циклов), возможность (линейность) разведения, специфичность, стабильность и параллелизм.

3.2.1. Минимально необходимое разведение

Минимально необходимое разведение (или minimum required dilution, MRD) – это разведение, которое применяется ко всем без исключения биологическим образцами (контрольным, калибровочным, исследуемым) при выполнении анализа методом ИФА, с целью минимизации фонового влияния биологических образцов в отсутствии пробоподготовки. В ходе установления значения MRD, необходимого и достаточного для устранения влияния эндогенных компонентов сыворотки крови на аналитический сигнал, использовали образцы

контроля качества с концентрацией 3 мкг/мл трастузумаба – уровень нижнего предела количественного определения (НПКО) в методике. Образцы НПКО для оценки параметра MRD готовили, используя пулированную интактную сыворотку крови человека, после чего их дополнительно разбавляли раствором разбавителя в 10, 100, 1000 и 5000 раз. Образцы для построения калибровочной кривой в цикле (п. 2.5) были приготовлены с использованием раствора разбавителя в качестве растворителя (без добавления интактной сыворотки крови). В Таблице 5 представлены полученные концентрации для образцов НПКО, а также рассчитанные значения относительной погрешности (RE, %, правильность) и относительного стандартного отклонения (RSD, %, прецизионность).

Таблица 5 – Определение минимально необходимого разведения (MRD) методики количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека методом ИФА

Номинальная концентрация трастузумаба	3 мкг/мл			
	1:10	1:100	1:1000	1:5000
Использованное разведение	1:10	1:100	1:1000	1:5000
Рассчитанная концентрация трастузумаба, мкг/мл	10,6	4,7	3,2	2,9
	11,4	4,4	3,3	3,0
	10,7	4,6	3,2	3,4
Среднее значение, мкг/мл	10,9	4,6	3,2	3,1
RSD, %	3,6	3,2	1,6	8,4
RE, %	263,6	52,3	7,0	3,7

Исходя из полученных данных, значения прецизионности (RSD, %) и правильности (RE, %), соответствующие требованиям нормативной документации не более ± 25 %, наблюдались для разведений 1:1000 (0,1 % сыворотка крови) и 1:5000 (0,02 % сыворотка крови). При этом в качестве оптимального, учитывая ожидаемые концентрации трастузумаба в биологических образцах добровольцев-участников клинического исследования и аналитический диапазон методики, было выбрано разведение 1:5000. Таким образом, MRD методики составило 1:5000 – 0,02 % сыворотка крови человека.

3.2.2. Селективность

Селективность методики – это ее способность определять анализируемое вещество, в данном случае трастузумаб, в биологических образцах в присутствии неродственных ему соединений, например, различных ферментов, белков, антител, или других интерферирующих компонентов сыворотки [16]. Для того чтобы подтвердить селективность разработанной методики были использованы 10 индивидуальных образцов интактной сыворотки крови человека, полученных из разных источников (взяты у 10 добровольцев). Кроме того, учитывая возможность получения в ходе биоаналитического этапа КИ биологических образцов с выраженным гемолизом или хилезом, подобные интактные образцы были также включены в анализ. Помимо образцов интактной сыворотки крови в циклы оценки селективности включали образцы на уровне НПКО методики, приготовленные путем добавления рабочих растворов трастузумаба к индивидуальным образцам интактной сыворотки крови человека. Каждый образец анализировали в трех повторах. Для интерпретации полученных данных рассчитывали значения относительной погрешности для образцов на уровне НПКО (Таблица 6), а также сравнивали значения оптической плотности (ОП) образцов на уровне НПКО с ОП индивидуальных образцов интактной сыворотки крови.

Таблица 6 – Оценка селективности методики количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека методом ИФА

Номинальная концентрация трастузумаба	3 мкг/мл									
Образец №	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Рассчитанная концентрация трастузумаба, мкг/мл	3,1	3,1	3,1	3,3	3,1	3,0	2,9	2,5	2,3	2,9
	3,0	3,1	2,8	3,0	3,2	3,1	2,6	2,5	2,4	2,6
	3,2	2,9	2,8	2,8	2,8	3,1	2,9	2,5	2,6	3,4
Среднее значение, мкг/мл	3,1	3,0	2,9	3,0	3,0	3,1	2,8	2,5	2,4	3,0
RE, %	2,1	0,0	-3,1	1,1	0,9	2,3	-6,0	-15,8	-19,0	-0,4

Согласно полученным результатам, значения ОП индивидуальных образцов сыворотки крови не превышали оптическую плотность образцов с содержанием трастузумаба на уровне НПКО. Полученные значения относительной погрешности также соответствовали требованиям нормативной документации (относительная погрешность не менее 80 % образцов с содержанием трастузумаба на уровне НПКО должна составлять не более ± 25 %). По результатам относительная погрешность 100 % образцов с содержанием трастузумаба на уровне НПКО (3 мкг/мл) составила не более ± 25 % от номинального значения.

3.2.3. Калибровочная кривая и нижний предел количественного определения

Аналитический диапазон валидированной методики составил от 3 до 300 мкг/мл трастузумаба в нативной (неразбавленной) сыворотке крови человека. При этом после разбавления образцов в соответствии с MRD методики (1:5000) чувствительность методики непосредственно в лунках планшета составила 0,6 нг/мл, а аналитический диапазон – от 0,6 до 60 нг/мл трастузумаба. Для построения калибровочной кривой использовали 7 калибровочных образцов с ненулевой концентрацией трастузумаба, равномерно распределенные в диапазоне от 3 до 300 мкг/мл анализируемого вещества, а также 1 образец интактной пулированной сыворотки крови человека. Анализ проводили в течение 6 независимых аналитических циклов. График зависимости оптической плотности образцов от концентрации трастузумаба имел сигмоидный S-образный вид (Рисунок 4) и описывался уравнением с четырьмя параметрами вида:

$$y = B + \frac{A - B}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^d},$$

где:

A, B, C, d – параметры уравнения,

y – оптическая плотность образца,

x – концентрация трастузумаба в образце, мкг/мл.

Для построения калибровочных графиков и расчета параметров уравнения использовали программу Origin Pro 2018 ver. (trial) 9.5.1.195. Релевантность выбранной калибровочной кривой подтверждалась путем расчета значений относительной погрешности (RE, %) для фактических (рассчитанных по графику) концентраций калибровочных образцов в каждом цикле. Значения RE, % не превышали установленных нормативными документами требований – не более $\pm 20\%$ (не более $\pm 25\%$ для образцов НПКО и ВПКО). Кроме того, с целью дополнительного подтверждения приемлемости выбранного типа калибровочной кривой рассчитывали коэффициенты детерминации, которые для каждой кривой составляли не менее 0,99.

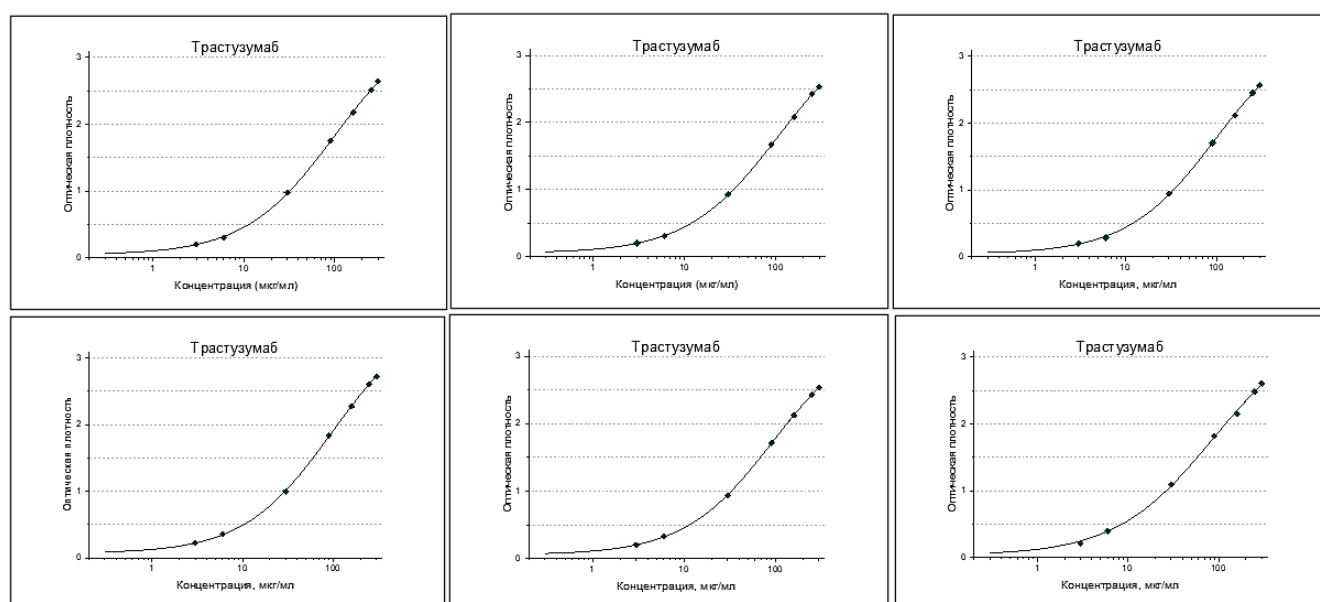


Рисунок 4 – Калибровочные кривые зависимости оптической плотности образцов от концентрации трастузумаба

В ходе оценки параметра «калибровочная кривая» было также финализовано значение НПКО методики на уровне 3 мкг/мл трастузумаба. Для данной концентрации анализируемого вещества в шести независимых циклах была подтверждена возможность достоверного (с приемлемой правильностью и прецизионностью – не более $\pm 25\%$) количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека.

3.2.4. Правильность и прецизионность

Оценку правильности и прецизионности значений концентрации трастузумаба, получаемых с помощью разработанной методики, проводили совместно с оценкой параметра «калибровочная кривая» в ходе 6 независимых циклов. Для определения прецизионности и правильности методики использовали образцы контроля качества с пятью различными концентрациями трастузумаба, распределенными внутри аналитического диапазона, включая образцы НПКО и ВПКО. В каждом цикле анализировали по 3 образца контроля качества для каждого из 5 уровней концентрации трастузумаба. Правильность и прецизионность оценивали как внутри аналитического цикла (N=3), так и между циклами (N=18), путем расчета значений относительного стандартного отклонения (RSD, %) – для оценки прецизионности, относительной погрешности (RE, %) – для оценки правильности, а также величины общей ошибки (TE, %), рекомендованной к расчету требованиями приложения 6 к «Правилам проведения исследований биоэквивалентности ЕАЭС» и представляющей собой сумму абсолютных значений RE, % и RSD, % для образцов на каждом уровне концентраций. Полученные значения и расчеты для правильности и прецизионности методики внутри и между циклами представлены в Таблице 7.

Таблица 7 – Правильность (RE, %) и прецизионность (RSD, %) методики количественного определения трастузумаба в сыворотке крови внутри и между циклами

№ цикла	Параметр	Номинальная концентрация трастузумаба, мкг/мл				
		3,0	8,5	150,0	225,0	300,0
1	Среднее значение в цикле (N=3)	3,0	7,9	135,0	207,3	259,8
	RE, %	0,8	-7,1	-10,0	-7,9	-13,4
	RSD, %	3,0	3,3	1,8	4,3	2,6
	TE, %	3,8	10,4	11,7	12,2	16,0

Продолжение Таблицы 7

2	Среднее значение в цикле (N=3)	3,0	8,2	141,6	213,8	273,9
	RE, %	-1,6	-4,1	-5,6	-5,0	-8,7
	RSD, %	1,1	4,6	2,3	1,4	4,3
	TE, %	2,6	8,7	7,9	6,4	13,0
3	Среднее значение в цикле (N=3)	3,1	8,0	133,7	204,0	256,2
	RE, %	2,9	-6,4	-10,9	-9,3	-14,6
	RSD, %	4,2	2,6	1,4	3,2	3,7
	TE, %	7,1	9,0	12,2	12,6	18,3
4	Среднее значение в цикле (N=3)	2,9	8,4	134,7	221,5	280,5
	RE, %	-3,1	-1,2	-10,2	-1,6	-6,5
	RSD, %	6,5	2,4	11,1	13,9	13,0
	TE, %	9,6	3,7	21,3	15,5	19,5
5	Среднее значение в цикле (N=3)	2,9	8,8	123,7	199,2	253,5
	RE, %	-2,4	2,9	-17,5	-11,5	-15,5
	RSD, %	7,0	7,0	8,0	7,5	9,0
	TE, %	9,5	10,0	25,5	18,9	24,5
6	Среднее значение в цикле (N=3)	2,4	7,6	139,7	217,0	285,3
	RE, %	-19,0	-10,2	-6,9	-3,5	-4,9
	RSD, %	4,4	6,5	2,3	2,6	4,2
	TE, %	23,4	16,7	9,2	6,1	9,1
1 – 6	Среднее значение в 6 циклах (N=18)	2,9	8,1	134,7	210,5	268,2
	RE, %	-3,7	-4,4	-10,2	-6,5	-10,6
	RSD, %	8,6	6,1	6,4	7,0	7,7
	TE, %	12,4	10,5	16,6	13,5	18,3

Согласно полученным результатам, как внутри цикла, так и между аналитическими циклами абсолютные значения относительной погрешности (RE, %), а также значения относительного стандартного отклонения (RSD, %) для образцов контроля качества не превышали 20 % (25 % для образцов ВПКО и НПКО), а значения общей ошибки (TE, %) составляли не более 30 % (не более 40 %

для образцов НПКО и ВПКО), что полностью соответствует критериям приемлемости нормативной документации. Таким образом, исходя из полученных данных был сделан вывод, что разработанная методика количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека методом ИФА обладает достаточной правильностью и прецизионностью получаемых значений.

3.2.5. Линейность (возможность) разведения

Несмотря на достаточно широкий аналитический диапазон методики, в ходе валидации необходимо учитывать возможность присутствия трастузумаба в исследуемых образцах в концентрации выше, чем ВПКО валидированной методики. Для того, чтобы оценить возможность дополнительного (сверх MRD) разведения исследуемых образцов использовали модельные образцы с крайне высокой (600 мкг/мл) концентрацией трастузумаба. Перед проведением анализа образцы разбавляли интактной сывороткой крови для получения ожидаемых концентраций, укладываемых в аналитический диапазон методики. Для образцов с концентрацией 600 мкг/мл трастузумаба использовали дополнительное разбавление в 2 и в 4 раза, при этом для каждого разбавления готовили по 3 повтора, после чего образцы анализировали и рассчитывали значения RE, % и RSD, % с целью оценки правильности и прецизионности конечных значений. Рассчитанные для усредненных (N=3) концентраций значения RE, % и RSD, % составляли не более 20 %, а именно: -10,4 % и 1,3 % для образцов 600 мкг/мл после разбавления в 2 раза (до 300 мкг/мл) и - 3,9 % и 3,3 % после разбавления образцов 600 мкг/мл в 4 раза (до 150 мкг/мл). Соответственно, исходя из полученных результатов была подтверждена возможность разбавления образцов с высокой концентрацией трастузумаба в 2 и 4 раза дополнительно к минимально необходимому разведению (MRD), то есть в ходе анализа исследуемых образцов конечные разведения образцов с учетом MRD могут достигать 1:10 000 и 1:20 000, соответственно.

3.2.6. Специфичность

Специфичность методики, в отличие от ее селективности, представляет собой способность методики однозначно определять анализируемое вещество, в данном случае трастузумаб, в присутствии структурно родственных соединений. Под структурно родственными соединениями обычно подразумевают различные изоформы, аналогичные по физико-химическим свойствам соединениями или лекарственные препараты сопутствующей терапии. В данном случае для оценки специфичности были выбраны два препарата на основе МкАТ: цетуксимаб и бевацизумаб (Эрбитукс[®] и Авастин[®], соответственно). Специфичность методики количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека оценивалась на уровнях ВПКО и НПКО – 300 мкг/мл и 3 мкг/мл, соответственно. Для получения образцов оценки специфичности методики готовили образцы интактной сыворотки крови, содержащие двукратные (относительно необходимых номинальных) концентрации трастузумаба, а также образцы сыворотки, содержащие двукратные (относительно необходимых номинальных) концентрации интерферирующих соединений – цетуксимаба и бевацизумаба. После смешивания в соотношении 1:1 получали исследуемые образцы с итоговыми концентрациями трастузумаба на уровне НПКО и ВПКО и четырьмя различными концентрациями каждого из интерферирующих компонентов (30, 60, 150 и 300 мкг/мл). Всего в ходе оценки специфичности методики использовали 16 образцов (по 8 образцов для каждой из концентраций трастузумаба – 3 и 300 мкг/мл). После приготовления образцы разбавляли раствором разбавителя в соответствии с MRD методики и подвергали анализу согласно методике количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека п. 2.6.1. Результаты, полученные в ходе оценки параметра специфичность (рассчитанные концентрации и относительная погрешность), приведены в Таблице 8.

Таблица 8 – Результаты оценки специфичности методики количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека методом ИФА

Номинальная концентрация трастузумаба, мкг/мл	Концентрация цетуксимаба, мкг/мл	Концентрация бевацизумаба, мкг/мл	Рассчитанная концентрация трастузумаба, мкг/мл	RE, %
300,0	300,0	–	302,8	0,9
300,0	150,0	–	294,3	-1,9
300,0	60,0	–	296,5	-1,2
300,0	30,0	–	263,9	-12,0
300,0	–	300,0	305,8	1,9
300,0	–	150,0	317,0	5,7
300,0	–	60,0	296,6	-1,1
300,0	–	30,0	274,7	-8,4
3,0	300,0	–	2,3	-22,4
3,0	150,0	–	2,5	-16,5
3,0	60,0	–	2,9	-4,5
3,0	30,0	–	2,5	-16,5
3,0	–	300,0	2,6	-14,1
3,0	–	150,0	2,4	-20,0
3,0	–	60,0	2,5	-16,5
3,0	–	30,0	2,6	-14,1

По результатам оценки параметра специфичность, методика была признана специфичной, поскольку сочетание рецептора HER2 на покрытии планшета и конъюгата козьих антител к Fc-фрагменту человеческого IgG с пероксидазой позволило однозначно определять трастузумаб в образцах сыворотки крови человека.

3.2.7. Стабильность

В ходе проведения валидации методики оценивалась стабильность анализируемого вещества в условиях, аналогичных потенциальным условиям хранения и обращения с исследуемыми биологическими образцами сыворотки крови человека. В отсутствие как таковой специфической пробоподготовки образцов при проведении анализа, стабильность трастузумаба оценивали в составе биологической матрицы в следующих условиях:

– краткосрочная стабильность: хранение образцов в течение 6 часов при комнатной температуре (от +15 °С до +25 °С).

– стабильность замораживания-размораживания: после выполнения трех последовательных циклов замораживания (не менее 12 часов, при температуре от минус 35 °С до минус 50 °С) и размораживания (не менее 30 минут при комнатной температуре от +15 °С до +25 °С) образцов перед анализом.

– долгосрочная стабильность: хранение образцов в условиях низкотемпературной заморозки (от минус 35 °С до минус 50 °С) в течение длительного периода времени. Долгосрочную стабильность образцов оценивали поэтапно, при этом самый длительный период хранения образцов составил 171 день и был выбран таким образом, чтобы доказанный период долгосрочной стабильности образцов превышал период хранения исследуемых образцов из клинического исследования.

Для исследования различных видов стабильности готовили образцы контроля качества на верхнем (225 мкг/мл) и нижнем (8,5 мкг/мл) уровнях концентраций трастузумаба. После выполнения требуемых условий хранения образцов (согласно каждому исследованному виду стабильности) образцы разбавляли в соответствии с MRD и проводили анализ согласно методике п 2.6.1. Для каждого вида стабильности использовали по 3 аликвоты образца на каждом уровне концентраций трастузумаба, после анализа которых рассчитывали среднее значение ($N=3$) концентрации трастузумаба. Стабильность образцов оценивали путем расчета правильности (RE, %) и прецизионности (RSD, %) полученных средних значений. Результаты оценки различных видов стабильности приведены в Таблице 9, при этом была доказана стабильность трастузумаба во всех изученных условиях, так как рассчитанные значения RE, % и RSD, % не превышали 20 % для всех образцов, на всех уровнях концентраций.

Таблица 9 – Результаты изучения стабильности трастузумаба в составе биологической матрицы в различных условиях

Вид стабильности	Конц. образца, мкг/мл	RE, % (N=3)	RSD, % (N=3)
Краткосрочная (от +15 до +25 °С, 6 ч)	8,5	-2,5	3,0
	225,0	-0,5	2,1
3 цикла замораживания-размораживания	8,5	-11,4	7,7
	225,0	-5,2	3,5
Долгосрочная (от минус 35 до минус 50 °С, 171 день)	8,5	-11,5	12,6
	225,0	-8,1	5,7

3.2.8. Параллелизм

Параллелизм – один из параметров валидации, применимый преимущественно к методам связывания лиганда в связи с их спецификой. Параллелизм служит для доказательства того, что модельные образцы контроля качества и калибровочные образцы, использованные в ходе валидации методики и приготовленные путем добавления рабочих растворов трастузумаба к интактной пулированной сыворотке крови, отражают поведение анализируемого вещества в исследуемых образцах при серийном разведении. Для оценки параллелизма использовали исследуемые образцы, полученные от добровольцев-участников клинического исследования препаратов трастузумаба. В ходе оценки параллелизма использовали образцы с высокой концентрацией трастузумаба (рассчитанной при первичном анализе), которые подвергали последовательному двукратному разбавлению интактной сывороткой крови, после чего образцы разбавляли в соответствии MRD и анализировали согласно методике. Конечной целью анализа была оценка прецизионности полученных значений после пересчета дополнительного разведения (RSD, %), при этом, согласно нормативной документации, значение RSD, % не должно превышать 30 %. Всего для оценки параллелизма использовали пять исследуемых образцов с высокой концентрацией трастузумаба, от пяти разных добровольцев. Прецизионность конечных значений

трастузумаба во всех исследованных образцах после пересчета разведений не превышала 10,75 %, что подтвердило применимость валидированной методики для анализа исследуемых биологических образцов.

Согласно полученным результатам, все изученные валидационные параметры методики количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека методом ИФА соответствовали установленным нормам, что позволило признать методику пригодной для дальнейшего анализа исследуемых образцов сыворотки крови добровольцев. Разработанная и валидированная методика обладает широким аналитическим диапазоном и при этом большим значением MRD, а следовательно, высокой чувствительностью к трастузумабу непосредственно в лунках планшета (0,6 нг/мл трастузумаба для образца НПКО 3 мкг/мл трастузумаба в сыворотке). Подобные свойства методики позволяют анализировать образцы содержащие трастузумаб как в очень высоких концентрациях, наблюдаемых в крови после введения нагрузочных доз, так и в достаточно низких, например на уровне C_{trough} при курсовом многократном введении. Кроме того, использование в качестве твердой фазы (планшета) компонентов коммерческой тест-системы делает ИФА-анализ образцов простым, быстрым и высокопроизводительным.

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

В основе методики лежит мостиковый ИФА (один из вариантов непрямого иммуноферментного анализа, bridging ELISA) с дополнительным этапом пробоподготовки – кислотной диссоциацией исследуемых образцов. Учитывая сравнительно высокие концентрации исследуемого препарата в крови субъектов исследования, этап кислотной диссоциации образцов необходим для разрушения иммунокомплексов «трастузумаб–антитела к трастузумабу», которые потенциально могут образоваться в крови после инфузии препарата.

Диссоциированные антитела в составе образца переносят в ИФА-планшет, предварительно покрытый трастузумабом, после чего в планшете снова образуются иммунокомплексы «трастузумаб–антитела к трастузумабу», но уже сорбированные на твердой фазе. После отмывки интерферирующих компонентов сыворотки аналогичным образом, с помощью кислотной диссоциации, происходит элюирование антител с поверхности твердой фазы и их иммобилизация в новом ИФА-планшете. Дальнейший анализ включает в себя блокирование мест неспецифического связывания и выявление сорбированных антител с помощью трастузумаба, конъюгированного с меткой. В данной методике использовалась биотин-стрептавидиновая система детектирования антител к трастузумабу. Используемая техника кислотной диссоциации с аффинным отделением мешающего препарата от антител называется Affinity Capture Elution (ACE) и является наиболее простым способом улучшить толерантность методики к присутствию ЛП. Принципиальная схема анализа приведена на Рисунке 5.

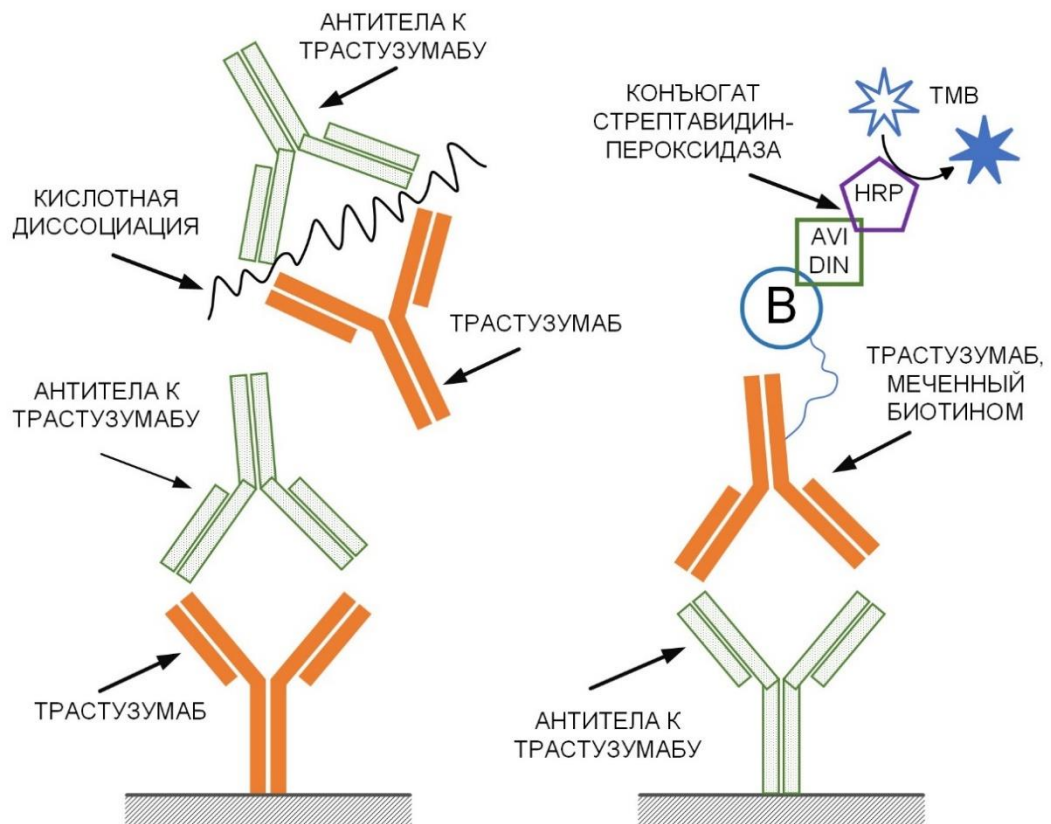


Рисунок 5 – Схематичное изображение этапов проведения ИФА в ходе полуколичественного определения анти-лекарственных антител к трастузумабу в сыворотке крови (B – биотин, Avidin-HRP – стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена, ТМБ – тетраметилбензидин)

На этапе разработки методики подбирали оптимальное значение MRD, которое достигалось после выполнения двух этапов – кислотной диссоциации образцов сыворотки крови (разбавление 1:10) и их дальнейшей нейтрализации в реакционном планшете (разбавление 1:1,5). Таким образом, итоговое MRD в методике составило 1:15 (6,67 % сыворотки крови человека). Кроме того, на этапе разработки выбирали предварительные значения концентраций антител к трастузумабу (положительный контроль, рекомбинантные, человеческие IgG1, высокоаффинные, антиидиотипические, паратоп-специфичные, нейтрализующие моноклональные антитела к трастузумабу), использованных для контроля пригодности планшетов. Концентрации выбирали исходя из необходимости получения устойчивого положительного сигнала в ходе выполнения первых 18 циклов валидации методики, посвященных установлению пределов исключения, поскольку данные циклы в качестве основных исследуемых образцов включают в себя исключительно образцы интактной сыворотки крови, то есть заведомо «отрицательные» образцы, для которых не наблюдается аналитический сигнал. Концентрации образцов положительного контроля анти-лекарственных антител к трастузумабу составили 1000 нг/мл и 500 нг/мл для образцов на верхнем (Positive Control 1, PC1) и нижнем (Positive Control 2, PC2) уровне, соответственно. При этом выбранные концентрации были в дальнейшем скорректированы после установления значений пределов исключения в ходе выполнения циклов по оценке параметра «чувствительность». Дополнительно в ходе разработки методики изучали и финализировали различные параметры инкубации образцов (время, перемешивание, температура), уделяя, в частности, особое внимание двум наиболее критичным этапам – кислотной диссоциации и последующему элюированию антител с поверхности планшета. Финализируемая по результатам разработки методика (п.2.6.2) была далее валидирована и использована при проведении анализа исследуемых образцов субъектов клинического исследования препаратов трастузумаба [95].

3.4. Валидация методики полуколичественного определения анти-лекарственных антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом ИФА

Валидация методики полуколичественного определения анти-лекарственных антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом ИФА проводилась в соответствии со следующими нормативными документами:

1. Правила проведения исследований биологических лекарственных средств на территории Евразийского экономического союза, утвержденные решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03 ноября 2016 г. № 89 [15].
2. Руководство FDA Guidance for Industry: Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products – Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection; U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER); Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), 2019 [96].

В частности, «Правила проведения исследований биологических лекарственных средств на территории ЕАЭС» описывают общие подходы к разработке, валидации и применению различных методик для оценки безопасности лекарственных препаратов, включая их иммуногенность. Тогда как руководство FDA в большей степени сфокусировано на прикладных аспектах разработки и валидации методик.

Поскольку методика определения анти-лекарственных антител к трастузумабу в биологических объектах, в отличие от методики определения самого трастузумаба, является полуколичественной (то есть в качестве характеристики содержания анти-лекарственных антител в образцах может быть определен только титр антител), методика была валидирована по следующим параметрам: предел исключения (cut-point), чувствительность, «хук»-эффект (эффект сползания), селективность, устойчивость методики к присутствию ЛП (drug tolerance), прецизионность и стабильность. Кроме того, особенностью исследования образцов на наличие или отсутствие анти-лекарственных антител

является поэтапный подход к анализу: на первом этапе проводится скрининг всех исследуемых образцов, а затем, для доказательства специфичности выявленных антител к исследуемому препарату, проводится подтверждающий анализ, в ходе которого образцы анализируют одновременно с добавлением и без добавления ЛП на определенном этапе. Дальнейшие исследования образцов, содержащих антитела, могут включать в себя определение титра антител, определение изотипа антител, а также оценку их нейтрализующей активности. В случае специфичности выявленных на первом этапе антител, при добавлении препарата в ходе подтверждающего анализа будет наблюдаться ингибирование сигнала (снижение оптической плотности). В связи с этим, в ходе валидации методики некоторые параметры, для которых это применимо, проверяют сразу в формате скрининга и подтверждающего анализа. В частности, такие параметры, как: предел исключения, селективность и прецизионность в ходе валидации были изучены как в формате скрининга, так и в формате подтверждающего анализа.

3.4.1. Предел исключения (cut-point)

Предел исключения биоаналитической методики определения антилекарственных антител – это значение, которое устанавливается в самом начале валидации методики и позволяет в дальнейшем разделять значения на положительные и отрицательные, на основании сравнения с установленным значением предела. Для определения предела исключения, согласно рекомендациям [96], используется не менее 50 образцов интактной биологической матрицы, полученной от добровольцев или пациентов с соответствующим заболеванием. В случае валидированной методики определения антилекарственных антител к трастузумабу использовали индивидуальные образцы сыворотки крови от 50 здоровых добровольцев, которые ранее не получали трастузумаб (до введения ЛП), то есть потенциально не должны иметь в крови специфических антител к нему. Выбранные образцы были проанализированы в течение нескольких дней двумя аналитиками, что позволило получить выборку

данных, представляющих собой «фоновые» значения оптической плотности интактной сыворотки крови, получаемые в используемой методике. Использование именно индивидуальных сывороток позволило также оценить вариабельность получаемых значений, в зависимости от особенностей того или иного добровольца. Оценку предела исключения проводили одновременно в формате скрининга и подтверждающего анализа, поскольку в самом начале валидации методики необходимо получить предел исключения как для этапа скрининга, так и для этапа подтверждающего анализа. Для оценки скринингового предела исключения использовали полученные в ходе анализа значения оптической плотности образцов интактной сыворотки крови (Рисунок 6), а для расчета предела исключения для подтверждающего анализа использовали значения % ингибирования сигнала (Рисунок 7), рассчитанные по формуле:

$$\% inh = \left(1 - \frac{ОП_{П}}{ОП_{С}}\right) \times 100 \%,$$

где:

ОП_П – оптическая плотность образца в формате подтверждающего анализа (с добавлением трастузумаба, 2 мг/мл)

ОП_С – оптическая плотность образца в формате скрининга.

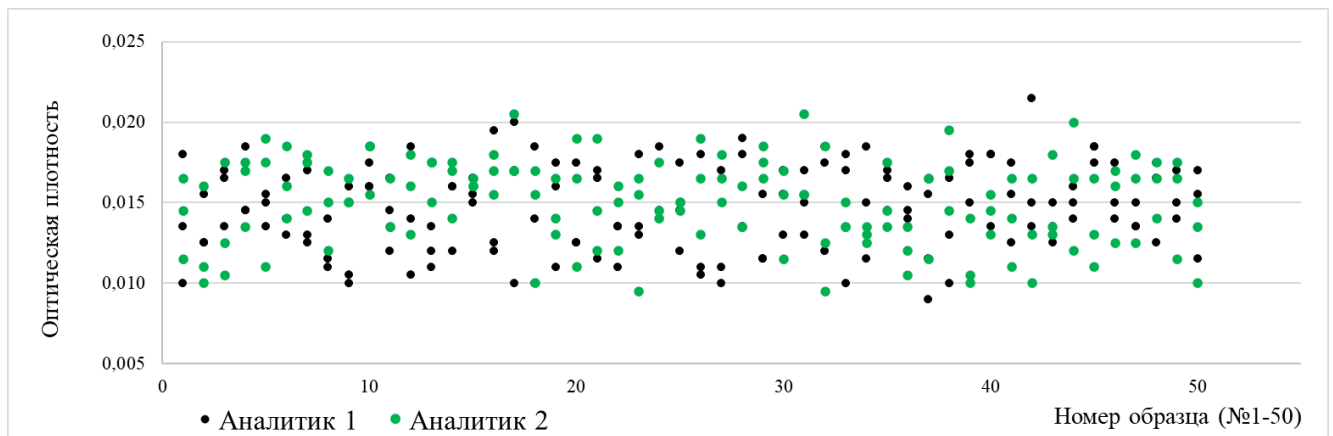


Рисунок 6 – Усредненные значения оптической плотности 50 индивидуальных образцов интактной сыворотки крови, полученные аналитиками в ходе пяти дней определения предела исключения для этапа скрининга (по 3 значения на каждый образец)

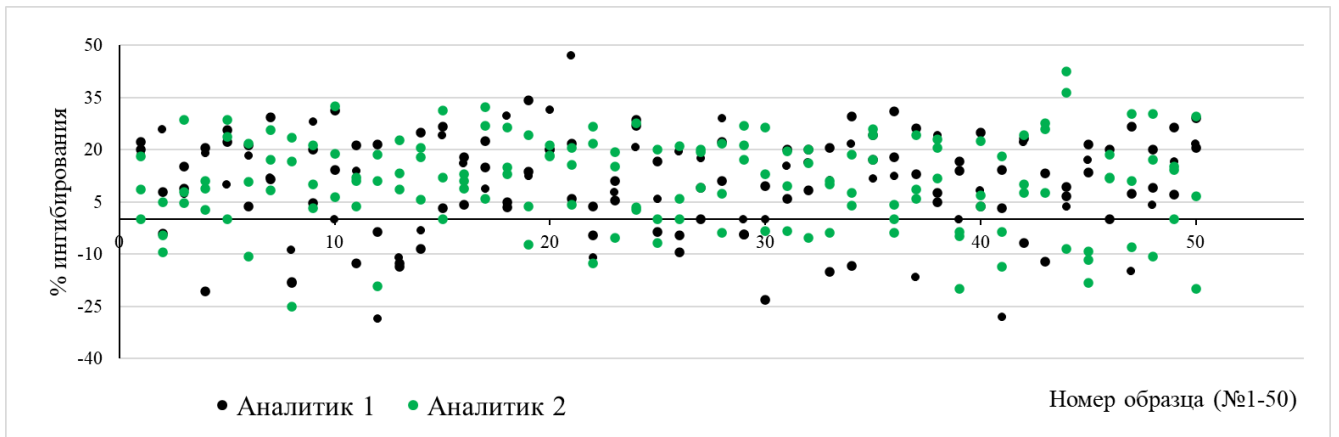


Рисунок 7 – Значения % ингибирования сигнала 50 индивидуальных образцов интактной сыворотки крови, полученные аналитиками в ходе пяти дней определения предела исключения для подтверждающего анализа (по 3 значения на каждый образец)

После получения выборки исходных значений (оптическая плотность, % ингибирования) для расчета соответствующего предела исключения (для скринингового или подтверждающего анализа) была проведена статистическая обработка соответствующих значений, согласно алгоритму, рекомендованному в различных публикациях, посвященных расчету значения cut-point [97 – 100]. Все подобные рекомендации, в общем и целом, сводятся к проверке нормальности распределения полученных данных, их нормировке (при необходимости), а затем непосредственно к выбору типа и расчету предела исключения. Всего существует три рекомендованных типа предела исключения: фиксированный, плавающий и динамический. Фиксированный представляет собой рассчитанное на этапе валидации значение (оптическая плотность или % ингибирования сигнала, в зависимости от этапа анализа), с которым сравниваются все остальные значения ОП образцов во всех последующих циклах. Такой тип предела исключения обычно хорошо подходит для подтверждающего анализа, тогда как в ходе скрининга исследуемые образцы могут обладать более высоким фоном, чем сыворотки, использованные при валидации, что приведет к высокой частоте ложноположительных значений, или наоборот обладать низкими фоновыми значениями, что может не позволить выявить анти-лекарственные антитела в образцах с низкими титрами. Поэтому для скринингового анализа зачастую

используют плавающий предел исключения, который представляет собой рассчитанный фактор нормализации (мультипликативный или аддитивный). При использовании плавающего cut-point в каждой планшете анализируют образцы отрицательного контроля, среднее значение оптической плотности которых умножается/прибавляется к фактору нормализации в результате чего получается планшет-специфичный предел исключения (plate-specific cut-point, PSCP). Третий тип предела исключения – динамический, он рассчитывается как среднее значение образцов отрицательного контроля в цикле плюс 2 стандартных отклонения. Однако, использование динамического предела исключения не рекомендуется нормативными документами, поскольку обычно получение на валидационном этапе динамического cut-point свидетельствует о крайне высокой вариабельности методики (значения получаемые двумя аналитиками и в разные дни сильно разнятся), в таком случае может быть более целесообразным решением внести какие-либо изменения в саму методику, прежде чем продолжать ее валидацию.

В ходе валидации методики определения анти-лекарственных антител к трастузумабу в сыворотке крови человека в качестве скринингового предела исключения был выбран плавающий предел. Значения оптической плотности 50 образцов, проанализированных в течение 5 дней двумя аналитиками (N=300), были подвергнуты статистической обработке с использованием R ver. 4.3.0, согласно алгоритму, рекомендованному для расчета Devanarayan с соавт. [98].

Для расчета предела исключения для скринингового анализа использовали значения оптической плотности индивидуальных образцов интактной сыворотки крови 50 здоровых добровольцев, а также значения для образцов отрицательного контроля (NC), представляющего собой пулированную интактную сыворотку крови этих же 50 добровольцев. На первом этапе статистической обработки проводили нормализацию полученных значений путем расчета соотношения «аналитический сигнал-фоновый шум» (S/N) для каждого из 50 образцов в каждом цикле относительно среднего значения ОП для образцов отрицательного контроля в цикле. Для полученной выборки значений S/N проводили процедуру исключения выбросов по методу Тьюки. На первом этапе исключали «аналитические»

выбросы – аномальные значения, выбивающиеся из 6 повторных измерений каждого индивидуального образца. Для этого считали медиану нормализованных значений S/N для 6 повторных измерений каждого образца, после чего рассчитывали остаток (residue) для каждого образца и к выборке полученных значений остатков применяли метод Тьюки, то есть исключали из выборки значения, не входящие в диапазон $[Q1-1,5IQR; Q3+1,5IQR]$, где $Q1$ и $Q3$ – это первый и третий квартили выборки, а IQR межквартильный размах. Всего из выборки было исключено 6 аналитических выбросов. На втором этапе для оставшейся выборки ($N=294$) применяли процедуру исключения «биологических» выбросов – аномальных значений, выбивающихся из общей выборки наиболее вероятно ввиду индивидуальных особенностей сыворотки конкретного субъекта. При оценке биологических выбросов аналогичным образом считали медиану 6 повторных измерений каждого образца, после чего по методу Тьюки исключали из выборки рассчитанных медиан значения, не входящие в диапазон $[Q1-1,5IQR; Q3+1,5IQR]$. При этом, в ходе проверки данных биологических выбросов выявлено не было. После удаления всех выбросов из выборки значений S/N проводили их \log -преобразование и проверяли нормальность полученной выборки ($N=294$) с помощью теста Шапиро-Уилка. Значения полученной выборки распределялись ненормально ($W = 0,97648$, $p = 0,00009298$), поэтому для расчета мультипликативного фактора скринингового предела исключения (SCPF) использовали 95-й процентиль выборки (5% FPR, то есть вероятность ошибки «положительный образец ниже предела исключения»). Значение SCPF составило 1,345455 (округл. 1,3455), далее для расчета планшет-специфичного (плавающего) предела исключения использовали формулу: $PSCP = SCPF * NC_{cp}$, где NC_{cp} – усредненное значение оптической плотности образцов отрицательного контроля, проанализированных в данном конкретном планшете.

Для расчета предела исключения для подтверждающего анализа использовали полученные значения % ингибирования сигнала 50 индивидуальных образцов интактной сыворотки крови здоровых добровольцев, которые подвергали аналогичной статистической обработке. Для исходной выборки значений

%ингибирования последовательно проводили исключение аналитических и биологических выбросов, согласно методу Тьюки и описанному выше алгоритму с расчетом медианных значений % ингибирования для каждого образца. В ходе исключения аналитических выбросов было исключено 4 значения, в ходе исключения биологических – 5 значений. Оставшиеся после исключения выбросов значения % ингибирования проверяли на нормальность распределения с помощью теста Шапиро-Уилка. Значения полученной выборки распределялись ненормально ($W = 0,97978$, $p = 0,0003907$), поэтому для расчета фиксированного значения предела исключения для подтверждающего анализа (ССР, %) использовали 99-й процентиль выборки (1% FPR, вероятность ошибки «положительный образец ниже предела исключения», FRP для подтверждающего анализа ниже, чем для скринингового). Рассчитанное значение фиксированного предела исключения для подтверждающего анализа составило 32,61776 % (округл. 32,618 %). Во всех дальнейших циклах на основании сравнения % ингибирования образца со значением фиксированного предела исключения делалось заключение о наличии (положительный образец, % inh образца $\geq 32,618$ %) или отсутствии (отрицательный образец, % inh образца $< 32,618$ %) анти-лекарственных антител к трастузумабу в образце.

3.4.2. Чувствительность, «хук»-эффект

После определения предела исключения проводили оценку чувствительности методики, а также параметра «хук»-эффект (или эффект сползания). Эффект сползания характерен для ИФА-методик, в случае возникновения «хук»-эффекта наблюдается снижение сигнала (ОП) в присутствии в образце высоких концентраций анализируемого вещества. В данном случае, учитывая специфику методики, возникновение эффекта сползания является маловероятным, однако проверка данного параметра была выполнена, поскольку она рекомендуется нормативными документами.

Чувствительность методики оценивали для формата скрининга, для этого использовали образцы, содержащие различные концентрации антител к трастузумабу от 31,25 до 25 000 нг/мл, всего 10 образцов положительного контроля. Стоит также отметить, что в данном случае оценка чувствительности носит примерный характер и призвана уточнить соответствие характеристик валидируемой методики нормам, рекомендуемым нормативными документами (не выше 100 нг/мл). Это связано с природой используемого положительного контроля антител – аффинно очищенные антиидиотипические антитела к трастузумабу (IgG1 подкласс), такой контрольный образец является суррогатом исследуемых антител и лишь опосредованно отражает сумму анти-лекарственных антител в организме человека, которые могут образовываться при применении трастузумаба.

Для совместной оценки чувствительности и «хук»-эффекта анализировали образцы положительного контроля, после чего использовали минимальную концентрацию анти-лекарственных антител, которая давала положительный сигнал (выше предела исключения скринингового анализа). Чувствительность оценивали в 2 циклах, по 3 серии контрольных образцов в каждой. Полученные значения минимальной положительной концентрации для каждой серии подвергали статистической обработке (Таблица 10). Рекомендованное значение чувствительности подобных методик составляет 100 нг/мл, поскольку такие концентрации антител могут быть ассоциированы с клинически значимыми побочными эффектами или снижением эффективности терапии МкАТ [96].

На основании расчета чувствительности аналогичным образом рассчитывали концентрацию положительного контроля на нижнем уровне (LPC, low positive control), результаты расчета также представлены в Таблице 10. Концентрацию LPC выбирали таким образом, чтобы образец определялся «положительным» в 99 % случаев анализа (1 % FPR). Такой выбор концентрации позволяет сразу заметить какие-либо проблемы с методикой или образцами, поскольку образец LPC в случае каких-либо негативных изменений в методике определяется отрицательным от цикла к циклу.

Таблица 10 – Результаты расчета чувствительности методики определения анти-лекарственных антител к трастузумабу

Серия №	Минимальная положительная конц. антител в цикле, нг/мл	Минимальная положительная конц. антител в цикле (log-форма)
1	62,5	1,796
2	62,5	1,796
3	62,5	1,796
4	62,5	1,796
5	62,5	1,796
6	100,0	2,000
Среднее значение (log-форма)		1,830
SD (log- форма)		0,083
$t_{0,05,5}$		2,015
$t_{0,01,5}$		3,365
Чувствительность (log-форма)		1,998
Чувствительность, нг/мл		99,5
LPC (log-форма)		2,110
LPC, нг/мл		128,9

Оценочная чувствительность методики составила 99,5 нг/мл антител к трастузумабу. Исходя из тех же данных, полученных для образцов с различными концентрациями антител к трастузумабу, был проведен расчет оптимальной концентрации образца положительного контроля на нижнем уровне (LPC), которая составила 128,9 нг/мл (129 нг/мл после округления до целого числа). Значение концентрации образца положительного контроля на верхнем уровне (HPC) было выбрано на этапе оценки чувствительности методики как точка в верхней части линейного диапазона кривой, описывающей зависимость оптической плотности образцов от концентрации антител к трастузумабу. Концентрация образца HPC составила 2580 нг/мл антител к трастузумабу, в том числе для удобства и точности приготовления образцов положительного контроля в последующих циклах.

Оценку эффекта сползания проводили с использованием значений оптической плотности, полученных для образцов с концентрацией антител к трастузумабу 25 000, 10 000 и 5000 нг/мл, для которых был проведен расчет соотношения «аналитический сигнал/фоновый шум» (S/N) относительно предела

исключения в цикле. Увеличение соотношения S/N с повышением концентрации анализируемого вещества в образце подтвердило отсутствие «хук»-эффекта в методике.

3.4.3. Селективность

Аналогично методике количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека, оценку селективности методики полуколичественного определения анти-лекарственных антител проводили с использованием 10 индивидуальных образцов интактной сыворотки крови человека (от 10 здоровых добровольцев), включая образцы сыворотки с выраженным гемолизом и хилезом. С использованием этих сывороток готовили образцы положительного контроля (на верхнем и нижнем уровнях, НРС и LPC), при этом сами 10 образцов интактной сыворотки крови выступали в качестве образцов отрицательного контроля (NC) в циклах. Селективность методики оценивали одновременно в формате скрининга и подтверждающего анализа, в ходе 2 циклов, по 5 наборов образцов (НРС, LPC, NC) в каждом. В Таблице 11 приведены результаты изучения селективности методики.

Таблица 11 – Результаты изучения селективности методики определения анти-лекарственных антител к трастузумабу

Скрининговый анализ (значения ОП)										
Образец	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
NC	0,015	0,018	0,015	0,016	0,012	0,015	0,019	0,015	0,018	0,017
НРС	1,041	1,199	0,814	1,153	0,953	1,179	1,020	0,977	1,126	1,155
LPC	0,039	0,035	0,039	0,044	0,027	0,034	0,034	0,037	0,039	0,042
PSCP	0,020					0,022				
Подтверждающий анализ (значения % ингибирования)										
NC	10,000	14,286	17,241	16,129	16,667	0,000	21,622	-6,897	33,333	17,647
НРС	98,703	99,082	98,525	98,872	98,793	99,024	98,480	98,618	98,801	98,874
LPC	65,385	59,420	66,667	69,318	58,491	54,412	60,294	68,919	70,130	67,470
ССР, %	32,618									

Методика продемонстрировала приемлемую селективность в отношении анти-лекарственных антител к трастузумабу, так как 9 из 10 (90 %) индивидуальных образцов интактной сыворотки крови имели отклик ниже рассчитанного значения предела исключения в цикле. При этом 100 % исследованных образцов положительного контроля (НРС, ЛРС) были положительными как по результатам скрининга, так и по результатам подтверждающего анализа.

3.4.4. Устойчивость методики к присутствию лекарственного препарата

Устойчивость методики к присутствию лекарственного препарата в исследуемых образцах является крайне важной характеристикой. Именно для повышения устойчивости в методике используется техника ACE (affinity capture elution), позволяющая отделить анти-лекарственные антитела от трастузумаба в исследуемых образцах. Высокая устойчивость методики к ЛП позволяет определять анти-лекарственные антитела в присутствии больших концентраций препарата. Это особенно важно в случае трастузумаба, поскольку после однократного введения концентрация препарата в крови достигает высоких значений, что потенциально может маскировать при анализе анти-лекарственные антитела, связанные с ЛП.

Для оценки устойчивости методики к трастузумабу использовали образцы, содержащие трастузумаб и анти-лекарственные антитела к нему в различных соотношениях. Учитывая характер проводимого клинического исследования (исследование биоаналогичности), для которого разрабатывалась методика, актуальным является требование нормативной документации, согласно которому методика должна обеспечивать детекцию анти-лекарственных антител как к исследуемому препарату, так и к препарату сравнения. При этом, однозначно, основной фокус внимания должен оставаться на выявлении анти-лекарственных антител именно к исследуемому препарату-биоаналогу [15]. Образцы для изучения параметра готовили с использованием пулированной интактной сыворотки крови

человека, а также антител к трастузумабу и исследуемого препарата в двукратных концентрациях, в соответствии с Таблицей 12. После смешивания образцов в соотношении 1:1 получали исследуемые образцы для оценки устойчивости методики с целевыми концентрациями аналита и интерферирующего препарата.

Таблица 12 – Приготовление образцов для оценки устойчивости методики определения анти-лекарственных антител к присутствию трастузумаба в образцах

№ образца	Исходная концентрация антител, нг/мл	Исходная концентрация Трастузумаба, мкг/мл	Конечная концентрация антител, нг/мл	Конечная концентрация Трастузумаба, мкг/мл
1	5000	1000	2500	500
2	5000	500	2500	250
3	5000	200	2500	100
4	5000	100	2500	50
5	5000	0	2500	0
6	2000	1000	1000	500
7	2000	500	1000	250
8	2000	200	1000	100
9	2000	100	1000	50
10	2000	0	1000	0
11	1000	1000	500	500
12	1000	500	500	250
13	1000	200	500	100
14	1000	100	500	50
15	1000	0	500	0
16	200	1000	100	500
17	200	500	100	250
18	200	200	100	100
19	200	100	100	50
20	200	0	100	0
21	100	1000	50	500
22	100	500	50	250
23	100	200	50	100
24	100	100	50	50
25	100	0	50	0

Анализ приготовленных образцов проводили в формате скрининга, значения оптической плотности, полученные при оценке устойчивости методики, приведены в Таблице 13.

Таблица 13 – Результаты оценки устойчивости методики к трастузумабу

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
PSCP	0,020				

Количественной характеристикой устойчивости методики к трастузумабу стала наименьшая концентрация антител в присутствии наибольшей концентрации ЛП, для которой наблюдался положительный сигнал (выше PSCP цикла). Для исследуемого препарата «Трастузумаб» устойчивость методики на уровне 500 нг/мл анти-лекарственных антител составила 50 мкг/мл препарата.

3.4.5. Прецизионность

В отличие от методик количественного определения анализируемых веществ, для полуколичественных методик не свойственна оценка параметра «правильность», оценивается только прецизионность получаемых значений, поскольку основными величинами, используемыми в расчетах, являются значения оптической плотности или % ингибирования сигнала. Тем не менее, оценка прецизионности получаемого сигнала имеет критическое значение для признания методики пригодной для целей проведения аналитического этапа клинических исследований иммуногенности, поскольку по своей природе такие методики, особенно с дополнительным этапом кислотной диссоциации и колебаниями pH используемых растворов (как в рассматриваемом случае), могут обладать высокой

вариабельностью и демонстрировать колебания получаемых значений в достаточно широком диапазоне. Прецизионность методики внутри и между циклами (intra-day, inter-day) изучали в ходе 6 аналитических циклов, выполненных двумя аналитиками в течение 3 разных дней. Образцы для оценки прецизионности анализировали как в формате скрининга, так и в формате подтверждающего анализа.

Для изучения прецизионности методики внутри цикла анализировали 6 наборов образцов положительного (HPC, LPC). По результатам анализа значение относительного стандартного отклонения (RSD, %) рассчитывали для измеренных значений оптической плотности (прецизионность для формата скрининга), а также для значений % ингибирования (прецизионность для формата подтверждающего анализа) образцов HPC и LPC. Для изучения прецизионности методики между циклами использовали по 3 набора образцов положительного (HPC, LPC), проанализированные в 5 циклах. Расчет прецизионности между циклами проводили с использованием значений, полученных в первом цикле (для 6 наборов HPC и LPC), и значений, полученных в остальных пяти циклах (по 3 набора HPC и LPC в каждом цикле). Дополнительно в целях оценки пригодности получаемых данных в каждый цикл включали образцы отрицательного контроля (NC). Рассчитанные значения RSD % для оценки прецизионности внутри и между циклами представлены в Таблице 14.

Таблица 14 – Прецизионность методики определения анти-лекарственных антител внутри и между циклами

Формат анализа	Образец	Внутри цикла (N=6)	Между циклами (N=21)
		RSD, %	RSD, %
Скрининг	HPC	11,76	12,13
	LPC	9,86	13,64
Подтверждающий анализ	HPC	0,19	0,18
	LPC	6,00	6,74

Рассчитанные значения RSD, % не превышали 20 % как внутри, так и между циклами, что подтвердило прецизионность значений оптической плотности и

% ингибирования сигнала, получаемых для образцов, в ходе анализа согласно разработанной методике.

3.4.6. Стабильность

Аналогично описанной выше методике количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека, для методики определения анти-лекарственных антител к трастузумабу исследовали несколько видов стабильности анти-лекарственных антител в биологической матрице, а именно, изучали стабильность в следующих условиях:

- краткосрочная стабильность образцов: в течение 24 часов при комнатной температуре (от +15 °С до +25 °С).
- стабильность при замораживании-размораживании: после выполнения 3 последовательных циклов замораживания (не менее 12 часов, при температуре от минус 35 °С до минус 50 °С) и размораживания (не менее 30 минут при комнатной температуре от +15 °С до +25 °С) образцов.
- долгосрочная стабильность: хранение образцов в условиях низкотемпературной заморозки (от минус 35 °С до минус 50 °С) в течение длительного периода времени. Долгосрочную стабильность в данном случае также оценивали поэтапно, при этом самый длительный период хранения образцов составил 137 дней, и был выбран таким образом, чтобы доказанный период долгосрочной стабильности образцов превышал период хранения исследуемых образцов из клинического исследования.

Стабильность анти-лекарственных антител к трастузумабу оценивали с использованием образцов положительного контроля на верхнем и нижем уровнях концентраций (HPC, LPC). Для оценки каждого вида стабильности использовали по 3 набора образцов HPC и LPC, которые анализировали в формате скрининга с дальнейшим расчетом прецизионности полученных значений оптической плотности на каждом уровне концентраций (расчет RSD, %). Результаты оценки различных видов стабильности приведены в Таблице 15, при этом образцы во всех

изученных условиях были признаны стабильными, поскольку рассчитанные значения RSD, % не превышали 20 %.

Таблица 15 – Результаты оценки стабильности анти-лекарственных антител к трастузумабу в составе биологической матрицы в различных условиях

Вид стабильности	Образец	RSD, % (N=3)
Краткосрочная (от +15 °С до +25 °С, 24 ч)	НРС	17,79
	LPC	12,72
3 цикла замораживания-размораживания	НРС	12,59
	LPC	17,00
Долгосрочная (от минус 35 °С до минус 50 °С, 137 дней)	НРС	13,15
	LPC	7,78

По результатам валидации методики полуколичественного определения анти-лекарственных антител к трастузумабу все исследованные валидационные параметры соответствовали установленным нормам, что позволило признать методику пригодной для дальнейшего анализа исследуемых образцов сыворотки крови добровольцев. Разработанная и валидированная методика характеризуется требуемой чувствительностью (99,5 нг/мл антител к трастузумабу), а также высокой устойчивостью к присутствию в анализируемых образцах интерферирующего трастузумаба, которая обеспечивается специальной пробоподготовкой образцов с кислотной диссоциацией и аффинным отделением препарата. При этом, несмотря на агрессивные условия пробоподготовки образцов прецизионность значений, получаемых с использованием разработанной методики, соответствует установленным требованиям, а также подвергается постоянному мониторингу путем включения в каждый цикл образцов положительного и отрицательного контролей для оценки пригодности.

3.5. Анализ исследуемых образцов субъектов клинического исследования биоаналогичности

Разработанные и валидированные методики определения трастузумаба и анти-лекарственных антител к трастузумабу в сыворотке крови человека были использованы для проведения аналитической части сравнительного клинического исследования фармакокинетики и безопасности при однократном внутривенном введении препаратов «Трастузумаб», лиофилизат для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий, производства ООО «Мабскейл», Россия и «Герцептин[®]», лиофилизат для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий, производства «Ф. Хоффман-Ля Рош Лтд.», Швейцария здоровым добровольцам. В рамках аналитической части клинического исследования биоаналогичности препаратов трастузумаба в качестве исследуемых образцов выступали биологические образцы сыворотки крови добровольцев, полученные в соответствии с процедурами, описанными в протоколе клинического исследования, утвержденного Министерством здравоохранения РФ. Краткое описание исследуемых образцов и процедуры их получения приведено ранее в разделе 2.7 главы 2 «Материалы и методы». Анализ образцов проводили согласно предварительно разработанным и валидированным методикам (п. 2.6.1 и 2.6.2), а также в соответствии с актуальной нормативной документацией [15, 16, 94, 96].

В ходе исследования фармакокинетики трастузумаба было выполнено 45 аналитических циклов по определению концентрации трастузумаба в образцах сыворотки крови добровольцев. Каждый цикл включал в себя помимо исследуемых образцов добровольцев, калибровочные образцы (в диапазоне 3 – 300 мкг/мл трастузумаба) и образцы контроля качества на нижнем, среднем и верхнем уровнях концентраций трастузумаба. Для каждого аналитического цикла строили отдельную калибровочную кривую зависимости оптической плотности от концентрации трастузумаба в образцах, а также проводили расчет концентраций образцов контроля качества и обратный пересчет концентраций калибровочных образцов. Для полученных значений концентраций трастузумаба в калибровочных

образцах и образцах контроля качества рассчитывали значения относительной погрешности (RE, %), значения которой в ходе всех выполненных циклов не превышали нормы, установленные нормативной документацией для методик на основе методов связывания лиганда – не более $\pm 25\%$ на уровне НПКО и ВПКО методики и не более $\pm 20\%$ для остальных точек внутри аналитического диапазона. Дополнительно для оценки правильности и прецизионности получаемых с использованием валидированной методики значений проводили расчет относительной погрешности (RE, %) и относительного стандартного отклонения (RSD, %) для калибровочных образцов и образцов контроля качества на каждом уровне, с использованием данных, полученных во всех 45 циклах. Полученные результаты представлены в Таблице 16 для калибровочных образцов и в Таблице 17 для образцов контроля качества.

Таблица 16 – Правильность и прецизионность концентраций калибровочных образцов в ходе проведения аналитического этапа исследования (45 аналитических циклов)

Рассчитанный параметр	Концентрация трастузумаба, мкг/мл							
	0	3	6	30	90	160	250	300
Минимальное значение конц. образца, мкг/мл	0,0	2,4	5,0	28,4	85,6	144,9	221,6	286,6
Минимальная относительная погрешность, RE, %	–	-21,2	-17,2	-5,3	-4,9	-9,5	-11,4	-4,5
Максимальное значение конц. образца, мкг/мл	0,0	3,5	6,9	31,8	100,2	169,5	266,4	323,8
Максимальная относительная погрешность, RE, %	–	16,0	14,3	5,9	11,3	5,9	6,6	7,9
Среднее (N=45), мкг/мл	0,0	2,9	5,9	29,9	90,9	159,2	248,0	302,2
RE, %	–	-3,3	-1,5	-0,4	1,0	-0,5	-0,8	0,7
RSD, %	–	8,6	8,1	2,3	3,1	2,8	3,5	2,4

Таблица 17 – Правильность и прецизионность концентраций образцов контроля качества в ходе проведения аналитического этапа исследования (45 аналитических циклов)

Рассчитанный параметр	Образцы контроля качества		
	Нижний уровень концентраций	Средний уровень концентраций	Верхний уровень концентраций
Минимальное значение конц. образца, мкг/мл	2,4	189,6	272,1
Минимальная относительная погрешность, RE, %	-18,6	-15,7	-9,3
Максимальное значение конц. образца, мкг/мл	3,3	252,8	336,9
Максимальная относительная погрешность, RE, %	10,4	12,4	12,3
Среднее (N=45), мкг/мл	2,8	221,5	298,3
RE, %	-6,6	-1,5	-0,6
RSD, %	8,3	7,4	4,9

Результаты определения концентрации трастузумаба в исследуемых образцах сыворотки крови добровольцев приведены в Приложении Б (Таблица Б.1 и Таблица Б.2). В таблицах значения концентрации трастузумаба ниже НПКО методики обозначены в таблице как «0,00», пропуск визита добровольцем (образец крови не был отобран) обозначен как «-». Значения концентраций трастузумаба, полученные после введения сравниваемых препаратов были проанализированы с использованием методов описательной статистики. В Таблице 18 представлены усредненные значения (мкг/мл) и рассчитанные показатели описательной статистики для полученных концентраций трастузумаба в каждой временной точке отбора образцов, отдельно для исследуемого препарата «Трастузумаб» (ООО Мабскейл, Россия) и для препарата сравнения «Герцептин®» («Ф. Хоффман-Ля Рош Лтд.», Швейцария).

Таблица 18 – Показатели описательной статистики для индивидуальных значений концентрации трастузумаба (мкг/мл) в сыворотке крови добровольцев после введения исследуемого препарата или препарата сравнения

Время отбора образца крови (после инфузии), часы	Среднее арифметическое	Среднее геометрическое	Медиана	SD	CV, %	Первый квартиль (Q1)	Третий квартиль (Q3)	Min значение	Max значение	Ст. ошибка среднего (SE)
Трастузумаб, (ООО «Мабскейл», Россия)										
0	0,00	–	0,00	0,00	–	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,5	163,55	160,02	159,57	34,51	21,10	144,84	182,47	95,81	254,31	5,20
3	166,43	162,70	163,06	35,95	21,60	142,06	184,24	105,17	245,42	5,42
6	149,24	146,98	151,50	26,53	17,78	129,80	165,04	94,91	234,36	4,00
12	135,83	132,40	135,99	27,62	20,34	123,86	151,41	41,28	193,74	4,16
24	130,80	127,82	128,13	27,96	21,37	111,88	150,11	70,50	187,95	4,21
72	88,10	85,69	86,62	20,92	23,75	75,51	98,66	50,04	137,42	3,15
120	73,13	70,39	71,21	20,37	27,85	59,55	83,39	30,01	139,04	3,07
168	61,73	59,95	62,57	14,24	23,06	53,98	71,11	26,85	87,60	2,15
336	38,69	37,28	38,00	10,24	26,47	32,38	44,52	16,46	64,04	1,54
504	23,38	22,48	23,49	6,26	26,79	19,73	27,77	11,76	34,48	0,94
672	13,25	12,21	13,31	5,01	37,84	9,90	15,71	4,24	23,51	0,76
744	10,30	–	9,27	5,33	51,75	6,30	13,48	0,00	22,82	0,80
1008	2,82	–	0,00	3,67	130,33	0,00	5,29	0,00	17,11	0,55
1248	0,15	–	0,00	0,71	465,61	0,00	0,00	0,00	3,68	0,11
1440	0,08	–	0,00	0,50	655,74	0,00	0,00	0,00	3,29	0,08
1704	0,00	–	0,00	0,00	–	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Продолжение Таблицы 18

Время отбора образца крови (после инфузии), часы	Среднее арифмети- ческое	Среднее геометри- ческое	Медиана	SD	CV, %	Первый квартиль (Q1)	Третий квартиль (Q3)	Min значение	Max значение	Ст. ошибка среднего (SE)
Герцептин® («Ф. Хоффман-Ля Рош Лтд.», Швейцария)										
0	0,00	–	0,00	0,00	–	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,5	151,66	148,06	152,10	33,37	22,00	129,22	171,46	94,76	222,20	5,09
3	146,06	142,38	145,20	33,48	22,92	119,86	172,03	85,05	236,40	5,11
6	132,03	129,17	132,30	26,77	20,27	121,84	149,76	72,59	188,00	4,08
12	126,18	123,28	119,16	28,18	22,33	105,23	141,92	84,49	195,23	4,30
24	112,47	109,48	111,00	26,01	23,12	89,97	132,34	55,13	168,04	3,97
72	82,80	80,38	78,71	20,65	24,93	66,15	98,25	53,06	126,94	3,15
120	67,44	65,65	65,53	15,15	22,46	58,80	80,32	31,84	98,50	2,31
168	53,86	51,91	52,33	13,33	24,75	47,09	61,54	13,78	80,13	2,03
336	33,97	32,90	32,98	8,57	25,22	28,67	40,29	17,04	56,36	1,31
504	20,39	19,67	19,43	5,45	26,72	16,53	23,92	10,66	31,45	0,83
672	11,35	10,66	11,09	3,92	34,57	8,74	13,85	3,87	23,72	0,60
744	8,75	–	8,58	3,78	43,20	6,14	12,02	0,00	16,92	0,58
1008	1,51	–	0,00	2,49	165,24	0,00	3,11	0,00	9,01	0,38
1248	0,28	–	0,00	1,05	370,84	0,00	0,00	0,00	4,79	0,16
1440	0,09	–	0,00	0,57	632,46	0,00	0,00	0,00	3,59	0,09
1704	0,09	–	0,00	0,57	655,74	0,00	0,00	0,00	3,76	0,09

По окончании анализа образцов добровольцев для подтверждения достоверности полученных результатов был проведен повторный выборочный анализ исследуемых образцов, предусмотренный нормативной документацией [16]. Объем повторного анализа образцов рассчитывали исходя из общего количества проанализированных образцов, которое составило 1492 шт., при таком объеме исследуемых образцов количество образцов, выбранное для повторного анализа, должно составлять не менее 5 %. Таким образом, в рамках повторного выборочного анализа было проанализировано 78 образцов (5,23 % от общего количества). Количество образцов, удовлетворяющих критериям приемлемости (относительная погрешность полученных концентраций не менее чем для 67,0 % повторно проанализированных образцов должна укладываться в диапазон $\pm 30,0$ % [16]) составило 94,87 %.

В рамках исследования иммуногенности трастузумаба было выполнено 14 аналитических циклов по определению анти-лекарственных антител к трастузумабу в образцах сыворотки крови добровольцев. На первом этапе анализа проводили скрининг всех исследуемых образцов на наличие/отсутствие анти-лекарственных антител к трастузумабу, всего в формате скрининга было выполнено 11 циклов. Далее для образцов, которые были классифицированы как «потенциально положительные» в скрининговом анализе проводили подтверждающий анализ (с добавлением 2 мг/мл трастузумаба в образцы), в ходе подтверждающего анализа анти-лекарственных антител к трастузумабу в образцах сыворотки крови добровольцев выявлено не было.

3.6. Оценка фармакокинетики и иммуногенности препаратов трастузумаба

3.6.1. Расчет фармакокинетических параметров

Расчет фармакокинетических параметров исследуемого препарата «Трастузумаб» (производства ООО «Мабскейл», Россия) и препарата сравнения «Герцептин®» (производства «Ф. Хоффман-Ля Рош Лтд.», Швейцария) проводили

с использованием данных о концентрациях трастузумаба в биологических образцах, полученных в ходе анализа исследуемых образцов субъектов клинического исследования биоаналогичности [101]. Анализ фармакокинетики трастузумаба проводили в популяции добровольцев, завершивших исследование в соответствии с протоколом клинического исследования, утвержденного Министерством здравоохранения РФ. Согласно протоколу значительным отклонением считался пропуск добровольцем двух и более визитов подряд, поэтому, в итоговый статистический анализ были включены 87 добровольцев из 92 рандомизированных: в основной группе было исключено 2 добровольца, в контрольной группе – 3 добровольца.

Фармакокинетические параметры трастузумаба рассчитывались в программах MS Excel 2021 и PK Solutions 2.0 для каждого сравниваемого препарата отдельно, с использованием методов описательной статистики (среднее значение, стандартное отклонение, коэффициент вариации, среднее геометрическое, медиана, нижний (первый) квартиль, верхний (третий) квартиль, стандартная ошибка среднего). Основными параметрами, рассчитанными в ходе исследования для оценки фармакокинетики препаратов трастузумаба, согласно протоколу клинического исследования, стали индивидуальные (для каждого добровольца) и усредненные значения: C_{\max} (максимальная концентрация трастузумаба в сыворотке крови добровольца), $AUC_{(0-t)}$ (площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-время») и $AUC_{(0-\infty)}$ (площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-время», экстраполированная до бесконечности). Индивидуальные значения C_{\max} (мкг/мл) были получены непосредственно исходя из данных анализа исследуемых биологических образцов добровольцев, после чего с использованием индивидуальных значений рассчитывали среднее значение C_{\max} для каждого из препаратов. Значения площади под кривой «концентрация-время» для каждого добровольца были рассчитаны с помощью метода трапеций (где основания трапеций были параллельны оси ординат для построенных индивидуальных ФК-профилей добровольцев), а значения площади под фармакокинетической кривой «концентрация-время», экстраполированной до

бесконечности рассчитывали по формуле: $AUC_{(0-\infty)} = AUC_{(0-t)} + \frac{C_{last}}{k_{el}}$, где C_{last} – расчетное (моделируемое) значение концентрации действующего вещества в последней пробе, k_{el} – константа элиминации. С использованием рассчитанных значений $AUC_{(0-t)}$ и $AUC_{(0-\infty)}$ проверяли достаточность периода наблюдения концентраций трастузумаба после введения, при этом используемый критерий [16]: $AUC_{(0-t)} \geq 80 \% AUC_{(0-\infty)}$ был достигнут для всех добровольцев в исследовании.

Дополнительно рассчитывались такие фармакокинетические параметры, как t_{max} (время достижения максимальной концентрации действующего вещества в сыворотке крови добровольца) и $t_{1/2}$ (период полувыведения трастузумаба). Основные и дополнительные ФК-параметры, рассчитанные для исследуемого препарата приведены в Таблице 19, для препарата сравнения – в Таблице 20.

Таблица 19 – Фармакокинетические параметры, рассчитанные для исследуемого препарата Трастузумаб (ООО «Мабскейл», Россия)

Статистический показатель	Фармакокинетические параметры				
	$AUC_{(0-t)}$, мкг*ч/мл	$AUC_{(0-\infty)}$, мкг*ч/мл	C_{max} , мкг/мл	t_{max} , ч.	$t_{1/2}$, сут.
Среднее арифметическое	35365	35511	178,6	3,1	8,4
Среднее геометрическое	34305	34434	174,9	2,6	8,3
Медиана	36855	36973	177,1	3,0	8,2

Таблица 20 – Фармакокинетические параметры, рассчитанные для препарата сравнения (Герцептин[®], Ф. Хоффман-Ля Рош Лтд., Швейцария)

Статистический показатель	Фармакокинетические параметры				
	$AUC_{(0-t)}$, мкг*ч/мл	$AUC_{(0-\infty)}$, мкг*ч/мл	C_{max} , мкг/мл	t_{max} , ч.	$t_{1/2}$, сут.
Среднее арифметическое	31156	31280	162,2	2,7	8,3
Среднее геометрическое	30479	30594	159,1	2,3	8,2
Медиана	31244	31284	162,3	1,5	8,1

После расчета основных параметров было проведено вычисление относительной биодоступности трастузумаба после применения исследуемого препарата по сравнению с применением препарата сравнения, и показатель относительной степени всасывания по формулам: $f = (AUC_{(0-\infty)})_T / (AUC_{(0-\infty)})_R$; $f' = (AUC_{(0-t)})_T / (AUC_{(0-t)})_R$ и $f'' = (C_{max})_T / (C_{max})_R$, где Т и R – это исследуемый препарат и препарат сравнения, соответственно. Рассчитанные значения f , f' и f'' далее использовались для оценки биоаналогичности сравниваемых препаратов.

Помимо расчета основных и дополнительных параметров фармакокинетики с использованием значений концентрации трастузумаба в сыворотке крови добровольцев были построены индивидуальные ФК-профили трастузумаба для исследуемого препарата и препарата сравнения, представленные на Рисунке 8, а также усредненные ФК-профили в непрелогарифмических и полупелогарифмических координатах (Рисунок 9).

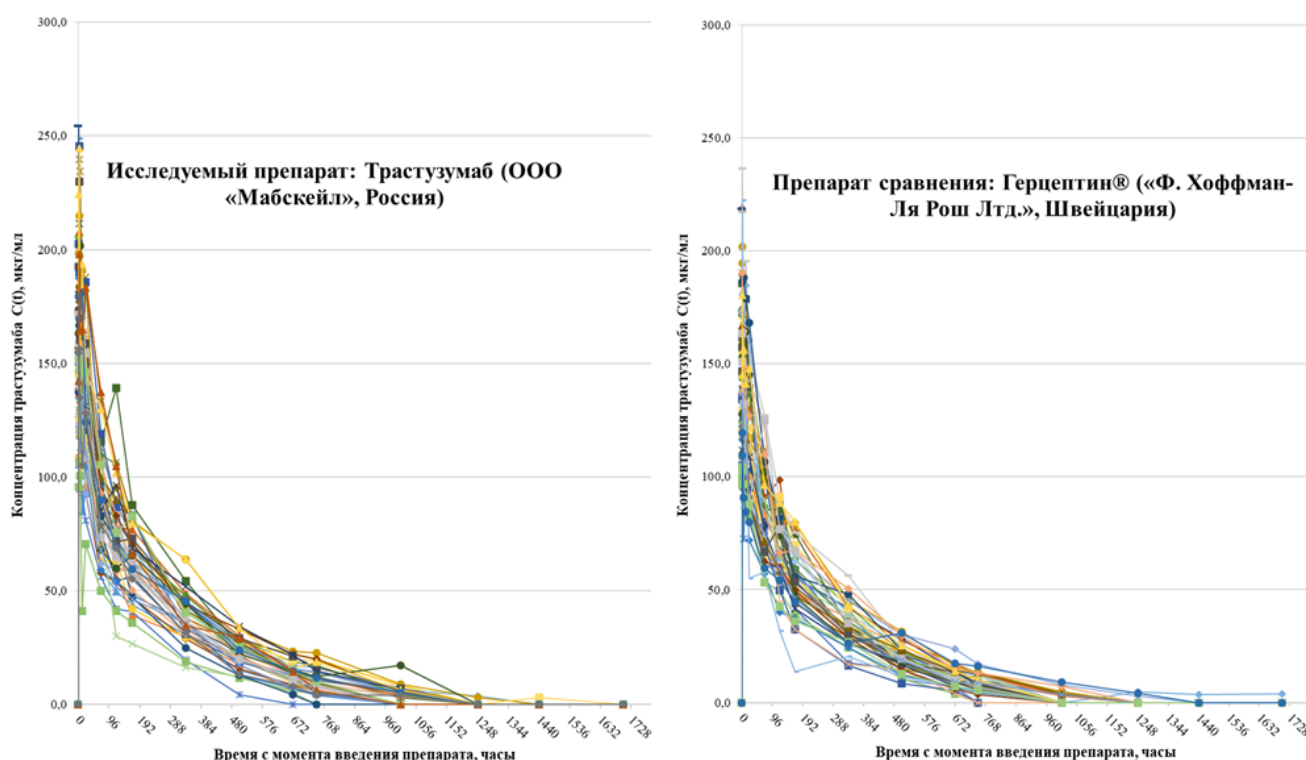


Рисунок 8 – Индивидуальные фармакокинетические профили исследуемого препарата («Трастузумаб») и препарата сравнения («Герцептин®»)

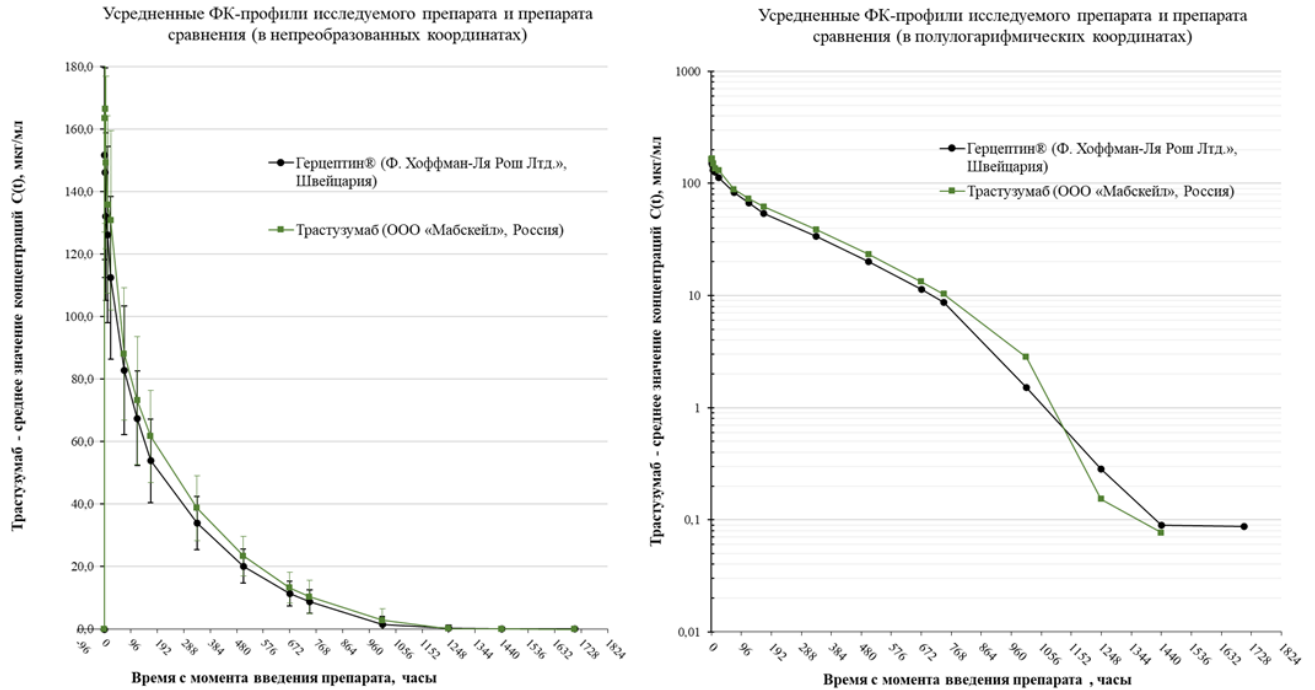


Рисунок 9 – Усредненные фармакокинетические профили исследуемого препарата («Трастузумаб») и препарата сравнения («Герцептин®»)

Из представленных на рисунках 8 и 9 фармакокинетических кривых видно, 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. При этом для индивидуальных значений концентраций трастузумаба характерен умеренный разброс данных внутри каждой группы, что подтверждается рассчитанными значениями коэффициента вариации для концентраций трастузумаба в области достижения C_{max} (от 1,5 до 6 часов), которые не превышают 30 % (Таблица 18) как для исследуемого препарата, так и для препарата сравнения.

По результатам расчета фармакокинетических параметров было отмечено, что полученные значения для препарата сравнения «Герцептин®» преимущественно совпадают с литературными данными, приведенными для аналогичных исследований (с участием популяции здоровых добровольцев и введением препарата в той же дозе). Так например, среднее значение C_{max} составило 162,2 мкг/мл при ожидаемом диапазоне от 122,9 до 174 мкг/мл [72, 73], а средние

значения $AUC_{(0-\infty)}$ и $AUC_{(0-t)}$ в исследовании – 31 280 мкг*ч/мл и 31 156 мкг*ч/мл, соответственно, при ориентировочных значениях от 21 103 до 38 510 мкг*ч/мл [72, 73]. Таким образом, соответствие рассчитанных значений ожидаемым можно рассматривать как подтверждение релевантности полученных данных и правильности проведения аналитической части клинического исследования.

3.6.2. Оценка биоаналогичности препаратов трастузумаба

Для оценки биоаналогичности исследуемого препарата «Трастузумаб» (ООО «Мабскейл», Россия) и препарата сравнения «Герцептин®» (Ф. Хоффман-Ля Рош Лтд., Швейцария) в программе STATISTICA® 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. Процедура статистического сравнения для оценки эквивалентности (биоаналогичности) препаратов трастузумаба состояла в вычислении двусторонних 90 % доверительных интервалов для вычисленных показателей биодоступности f , f' , f'' , то есть для отношения геометрических средних фармакокинетических параметров C_{max} , $AUC_{(0-t)}$, $AUC_{(0-\infty)}$ сравниваемых препаратов (μ_T/μ_R , где Т и R – исследуемый препарат и препарат сравнения, соответственно). Статистическая гипотеза эквивалентности (биоаналогичности) исследуемого препарата и препарата сравнения по каждому из показателей биодоступности (f , f' , f'') была равносильна двум односторонним проверкам нулевой гипотезы об отсутствии эквивалентности (о неэквивалентности). Препараты считались эквивалентными (биоаналогичными), если границы оцененных 90 % доверительных интервалов находились в пределах 80,00 % – 125,00 % [15].

Статистический анализ основных параметров фармакокинетики C_{max} , $AUC_{(0-t)}$ и $AUC_{(0-\infty)}$ проводился с предположением о нормальном распределении их логарифмов. При проведении ANOVA к факторам относились препарат

(*formulation*) и «группа одновременно госпитализируемых добровольцев» (*group*). Включение второго фактора объясняется госпитализацией добровольцев в разные дни. Перед проведением статистического сравнения препаратов, в интересах проведения дисперсионного анализа используемые ФК-параметры (C_{max} , $AUC_{(0-t)}$, $AUC_{(0-\infty)}$) были прологарифмированы (натуральный логарифм), далее с полученными значениями логарифмов оперировали как с выборкой нормально распределенных случайных величин. Полученные в логарифмической шкале доверительные интервалы были подвергнуты обратному преобразованию для того, чтобы построить искомые доверительные интервалы для отношения средних геометрических в исходных (непреобразованных) единицах измерения. Остаточные квадраты отклонений (величины MSE), которые не объясняла использованная в ANOVA модель, были использованы для расчета коэффициента внутрииндивидуальной вариабельности (CV_{intra} , %). Рассчитанные точечные оценки отношений средних геометрических и их двухсторонние 90 % доверительные интервалы приведены в Таблице 21.

Таблица 21 – Результаты оценки критериев эквивалентности (биоаналогичности) препаратов трастузумаба

Параметр	Коэффициент вариации CV_{intra} , %	Отношение средних геометрических ($\mu T/\mu R$)	90 % доверительный интервал для $\mu T/\mu R$
$AUC_{(0-\infty)}$ (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 %

Полученные доверительные интервалы лежали в границах, установленных протоколом исследования 80,00 % – 125,00 % (Рисунок 10), что позволило сделать вывод о фармакокинетической эквивалентности (биоаналогичности) исследуемого препарата «Трастузумаб» (производства ООО «Мабскейл», Россия) и препарата сравнения «Герцептин®» (производства Ф. Хоффман-Ля Рош Лтд., Швейцария).

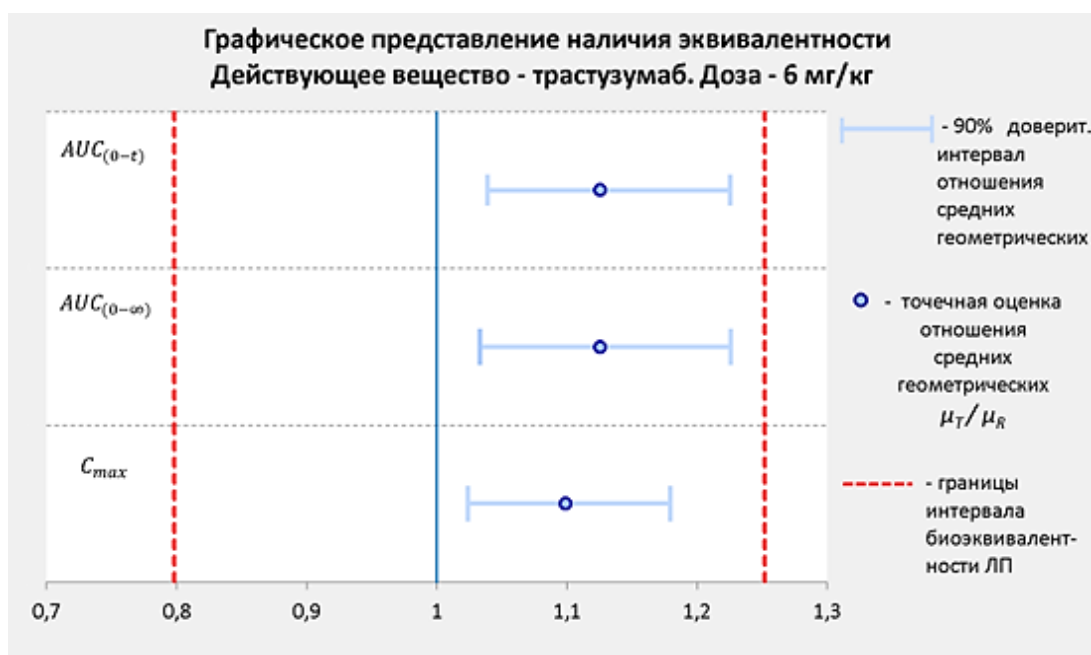


Рисунок 10 – Графическое представление биоаналогичности препаратов «Трастузумаб» (ООО «Мабскейл», Россия) и «Герцептин®» (Ф. Хоффман-Ля Рош Лтд., Швейцария)

3.6.3. Оценка иммуногенности препаратов трастузумаба

Согласно результатам проведенного анализа биологических образцов добровольцев-участников сравнительного клинического исследования препаратов «Трастузумаб» и «Герцептин®» (п. 3.5), ни у одного из добровольцев не было выявлено анти-лекарственных антител к трастузумабу. Полученные результаты свидетельствуют о сходимости данных по иммуногенности для исследуемого препарата-биоаналога и препарата сравнения, а также согласуются с литературными данными о низкой иммуногенности трастузумаба, и, непосредственно, с данными, полученными в аналогичных сравнительных клинических исследованиях с участием здоровых добровольцев [47, 48, 72, 73].

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Проведен обзор препаратов трастузумаба, представленных на фармацевтическом рынке, а также дана всесторонняя характеристика гуманизированного 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- БСА – бычий сывороточный альбумин;
- ВПКО – верхний предел количественного определения;
- ВЭЖХ МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemным масс-селективным детектированием;
- ЕАЭС – Евразийский экономический союз;
- ИФА – иммуноферментный анализ;
- КИ – клиническое исследование, клинические исследования;
- ЛП – лекарственный препарат;
- МкАТ – моноклональное антитело, моноклональные антитела;
- мРМЖ – метастатический рак молочной железы;
- НПКО – нижний предел количественного определения;
- ОП – оптическая плотность;
- РКИ – разрешение на проведение клинического исследования;
- РМЖ – рак молочной железы;
- ТМБ – 3, 3', 5, 5-тетраметилбензидин субстрат;
- ФК – фармакокинетика;
- ФСБ – фосфатно-солевой буферный раствор;
- ФСБ-Т – фосфатно-солевой буферный раствор с добавлением твин-20;
- АСЕ – кислотная диссоциация с аффинным отделением мешающего лекарственного препарата (affinity capture elution);
- $AUC_{0-\infty}$ – площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-время», экстраполированная до бесконечности;
- AUC_{0-t} – площадь под фармакокинетической кривой «концентрация – время»;
- ССР, % – предел исключения для подтверждающего анализа (confirmatory cut-point);
- C_{max} – максимальная концентрация действующего вещества в сыворотке крови после введения препарата;
- C_{ss} – равновесная концентрация действующего вещества в крови;

C_{trough} – концентрация действующего вещества перед очередным введением при многократном введении;

CV, % – коэффициент вариации;

EGFR – рецептор эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor);

EMA – Европейское агентство лекарственных средств (European Medicines Agency);

FDA – Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (Food and Drug Administration);

FPR – доля ложных положительных классификаций (false positive rate);

HER2 – рецептор эпидермального фактора роста второго типа (human epidermal growth factor receptor 2);

HPC – образец положительного контроля на верхнем уровне (high positive control);

IgG – иммуноглобулины класса G;

LPC – образец положительного контроля на нижнем уровне (low positive control);

MRD – минимально необходимое разведение (minimum required dilution);

NC – образец отрицательного контроля (negative control);

PSCP – планшет-специфичный предел исключения (plate-specific cut-point);

RE, %, – относительная погрешность (relative error, %);

Rf – ревматоидный фактор;

RSD, % – относительное стандартное отклонение (relative standard deviation, %);

S/N – соотношение «аналитический сигнал-фоновый шум» (signal to noise ratio);

SCPF – фактор скринингового предела исключения (screening cut-point factor);

SD – стандартное отклонение (standard deviation);

$t_{1/2}$ – период полувыведения препарата из организма;

TE, % – общая ошибка (total error, %);

t_{max} – время достижения максимальной концентрации действующего вещества в сыворотке крови после введения препарата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Global cancer burden growing, amidst mounting need for services // World Health Organization. – URL: <https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services> (дата обращения: 23.03.2024).
2. WHO factsheet: Breast cancer services // World Health Organization. – URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer> (дата обращения: 23.03.2024).
3. Cancer factsheets: Cancer today. GLOBOCAN 2022 // International Agency for Research on Cancer. – URL: <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/cancers/39-all-cancers-fact-sheet.pdf> (дата обращения: 23.03.2024).
4. Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. – Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022. – 252 с. – ISBN 978-5-85502-280-3.
5. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. – Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021. – 252 с. – ISBN 978-5-85502-268-1.
6. Злокачественные новообразования в России в 2022 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой, И.В. Лисичниковой. Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2023. – 275 с. – ISBN 978-5-85502-290-2.
7. Swain, S.M. Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions/ S.M. Swain M. Shastry, E. Hamilton // Nature Reviews Drug Discovery. – 2023. – Vol. 22. – №2. – P. 101-126. DOI:10.1038/s41573-022-00579-0.
8. Фармакоэкономические аспекты применения биоаналогов / А.А Трякин, А.В. Рудакова, С.Н. Фогт [и др.] // Современная Онкология. – 2017. – Том 19. – №1. – С. 42–47. DOI: 10.26442/1815-1434_19.1.42-47.

9. Косторов, В.А. Клинические и фармакоэкономические аспекты неоадьювантной терапии HER2-позитивного рака молочной железы / В.А. Косторов, Т.Ю. Семиглазова, А.В. Павлыш // Медицинский Совет. – 2018. – №10. – С.140-145. DOI: 10.21518/2079-701X-2018-10-140-145.

10. Обновленные результаты клинико-экономической оценки применения трастузумаба эмтазина у пациенток с HER2-положительным раком молочной железы и метастатическим поражением головного мозга / А.С. Колбин, А.А. Курылев, Ю.Е. Балыкина, М.А. Проскурин // Качественная клиническая практика. – 2018. – №4. – С.25-32. DOI: 10.24411/2588-0519-2018-10056.

11. Об утверждении прилагаемого перечня стратегически значимых лекарственных средств, производство которых должно быть обеспечено на территории Российской Федерации: распоряжение Правительства РФ от 6 июля 2010 г. № 1141-р (в ред. распоряжения Правительства РФ от 01.08.2020 № 2015-р) [Электронный ресурс] // Правительство России. – URL: <http://government.ru/docs/all/73124/> (дата обращения 24.03.2024).

12. Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, а также перечней лекарственных препаратов для медицинского применения и минимального ассортимента лекарственных препаратов, необходимых для оказания медицинской помощи: распоряжение Правительства РФ от 12 октября 2019 г. № 2406-р (в ред. распоряжения Правительства РФ от 9 июня 2023 года №1508-р) [Электронный ресурс] // КонсультантПлюс. – URL: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_35635/a80818c7d9593b31dbd0d3418aec02298bd57d6d/ (дата обращения: 24.03.2024).

13. Об утверждении прилагаемой Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2030 года: распоряжение Правительства РФ от 7 июня 2023 г. № 1495-р [Электронный ресурс] // Правительство России. – URL: <http://static.government.ru/media/files/HqCzKkoTf7fzVdKSYbhNiZHzWTEAAQ3p.pdf> (дата обращения 24.03.2024).

14. Об утверждении Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года: приказ Минпромторга РФ от 23 октября 2009 г. № 965 [Электронный ресурс] // КонсультантПлюс. – URL: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_94066/ (дата обращения 24.03.2024).

15. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 89 (с изменениями на 4 июля 2023 г.) «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза» [Электронный ресурс] // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/456026116> (дата обращения: 18.11.2023)

16. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» [Электронный ресурс] // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/456026107> (дата обращения: 18.11.2023)

17. Об обращении лекарственных средств: Федеральный закон от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ (ред. от 30.01.2024, с изм. и доп., вступ. в силу с 01.04.2024) [Электронный ресурс] // КонсультантПлюс. – URL: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_99350/ (дата обращения: 23.03.2024).

18. Makurvet, F.D. Biologics vs. small molecules: Drug costs and patient access / F.D. Makurvet // *Medicine in Drug Discovery*. – 2021. – Vol. 10. – 100075 DOI: 10.1016/j.medidd.2020.100075.

19. Zahavi, D. Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. *Antibodies* / D. Zahavi, L. Weiner // Basel, Switzerland. – 2020. – Vol. 9. – № 3. – 34. DOI: 10.3390/antib9030034.

20. A brief synopsis of monoclonal antibody for the treatment of various groups of diseases / A. Puthenpurail, H. Rathi, S.M. Nauli, A. Ally // *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. – 2021. – Vol 10. – № 11. – С.14–22.
21. Hafeez, U. Monoclonal antibodies as immunomodulatory therapy against cancer and autoimmune diseases / U. Hafeez, H.K. Gan, A.M. Scott // *Current Opinion in Pharmacology*. – 2018. – Vol. 41. – С. 114–121. DOI: 10.1016/j.coph.2018.05.010.
22. Otsubo, R. Monoclonal antibody therapeutics for infectious diseases: Beyond normal human immunoglobulin / R. Otsubo, T. Yasui // *Pharmacology & therapeutics*. – 2022. – Vol. 240. – 108233. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2022.108233.
23. Ji, E. Antibody-Based Therapeutics for Atherosclerosis and Cardiovascular Diseases / E. Ji, S. Lee // *International journal of molecular sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 11. – 5770. DOI: 10.3390/ijms22115770.
24. Shiravand, Y., Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy / Y. Shiravand, F. Khodadadi, S.M.A. Kashani [et al.] // *Current Oncology*. – 2022. – № 29. – P. 3044-3060. DOI: 10.3390/curroncol29050247.
25. 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. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-31-36.
26. Pettinato, M.C. Introduction to Antibody-Drug Conjugates / M.C. Pettinato // *Antibodies (Basel)*. – 2021. – Vol. 10. – № 4. – Art. 42. – P.11. DOI: 10.3390/antib10040042.
27. Bispecific Antibodies: From Research to Clinical Application / J. Ma, Y. Mo, M. Tang [et al.]. // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – Art. 626616. – P. 19. DOI: 10.3389/fimmu.2021.626616.
28. Steeland, S. Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies / S. Steeland, R.E. Vandenbroucke, C. Libert // *Drug discovery today*, 2016. – Vol 21. – № 7. – P. 1076–1113. DOI: 10.1016/j.drudis.2016.04.003.
29. Солопова, О.Н. Биспецифические антитела в клинике и клинических исследованиях (обзор литературы) / О.Н. Солопова, В.А. Мисюрин // *Клиническая*

онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2019. – Том 12. – № 2. – С. 125-144.

30. Насонов, Е.Л. Роль интерлейкина 1 в развитии заболеваний человека / Е.Л. Насонов, М.С. Елисеев // Научно-практическая ревматология. – 2016. – Т. 54. – № 1. – С. 60-77. DOI: 10.14412/1995-4484-2016-60-77.

31. Affinity Capture Elution (ACE) ELISA Method Development and Validation for Novel RPH-104 Drug Immunogenicity Evaluation / M.A. Kolganova, E.V. Melnik, E.N. Fisher [et al.] // Biomedicines. – 2022. – Vol. 10 № 11. – Art. 2750. – P. 15 DOI: 10.3390/biomedicines10112750.

32. 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, [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2022. –Том 56. – №12. – С. 66-70. DOI: 10.30906/0023-1134-2022-56-12-66-70.

33. 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

34. Об особенностях обращения лекарственных средств для медицинского применения при возникновении дефектуры или риска возникновения дефектуры в связи с введением в отношении Российской Федерации ограничительных мер экономического характера: постановление Правительства Российской Федерации от 05 апреля 2022 № 593 [Электронный ресурс] // Официальное опубликование правовых актов. – URL: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202204110030> (дата обращения 04.01.2024).

35. Trastuzumab // DRUGBANK [Электронный ресурс]. – URL: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00072> (дата обращения: 26.02.2024).

36. Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies: scientific update on trastuzumab and 2C4 / J. Albanell, J. Codony, A. Rovira [et al.] // Advances in

Experimental Medicine and Biology. – 2003. – Vol. 532. – P. 253-68. DOI: 10.1007/978-1-4615-0081-0_21.

37. Boekhout, A.H. Trastuzumab / A.H. Boekhout, J.H. Beijnen, J.H. Schellens // Oncologist. – 2011. Vol. 16. – № 6. – P. 800-810. DOI: 10.1634/theoncologist.2010-0035.

38. Inhibition of tumor growth by a monoclonal antibody reactive with an oncogene-encoded tumor antigen / J.A. Drebin, V.C. Link, R.A. Weinberg, M.I. Greene // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. –1986. Vol. – 83. – № 23. – P. 9129-9133. DOI: 10.1073/pnas.83.23.9129.

39. Classic and New Markers in Diagnostics and Classification of Breast Cancer / R. Beňáčka, D. Szabóová, Z. Guľašová [et al.] // Cancers. – 2022. – Vol. 14. – Art. 5444. DOI: 10.3390/cancers14215444.

40. Clifford, A. Trastuzumab – Mechanism of action and use in clinical practice / A. Clifford, C.A. Hudis // The New England Journal of Medicine. – 2007. – Vol. 357. – P. 39-51.

41. Roy, V. Beyond trastuzumab: small molecule tyrosine kinase inhibitors in HER-2-positive breast cancer / V. Roy, E.A. Perez // The oncologist. – 2009. – Vol. 14. – № 11. – P. 1061–1069. DOI: 10.1634/theoncologist.2009-0142.

42. Трастузумаб, описание // Справочник лекарственных средств Видаль «Лекарственные препараты в России» [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.vidal.ru/drugs/molecule/1321> (дата обращения 27.02.2024).

43. FDA Approved Drug Products: Herceptin (trastuzumab) for intravenous injection // FDA label [Электронный ресурс]. – URL: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/103792s5345lbl.pdf (дата обращения 27.02.2024).

44. Herceptin: EPAR – Product Information // EMA public assessment report [Электронный ресурс]. – URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/herceptin-epar-product-information_en.pdf (дата обращения 27.02.2024).

45. The Molecular Mechanisms That Underlie the Immune Biology of Anti-drug Antibody Formation Following Treatment With Monoclonal Antibodies / A. Vaisman-

Mentesh, M. Gutierrez-Gonzalez, B.J. DeKosky, Y. Wine // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – Art. 1951. – P. 16. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01951>.

46. Mosch, R. Immunogenicity of Monoclonal Antibodies and the Potential Use of HLA Haplotypes to Predict Vulnerable Patients / R. Mosch, H. Guchelaar // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13. DOI: [10.3389/fimmu.2022.885672](https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.885672).

47. Randomized Phase I Pharmacokinetic Study Comparing Biosimilar Candidate SB3 and Trastuzumab in Healthy Male Subjects / X. Pivot, E. Curtit, Y.J. Lee [et al.] // *Clinical therapeutics*. – 2016. – Vol. 38. – № 7. – P. 1665–1673. DOI: [10.1016/j.clinthera.2016.06.002](https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.06.002).

48. A pharmacokinetics phase 1 bioequivalence study of the trastuzumab biosimilar MYL-14010 vs. EU-trastuzumab and US-trastuzumab / C.F. Waller, A. Vutikullird, T.E. Lawrence [et al.] // *British journal of clinical pharmacology*. – 2018. – Vol. 84. – № 10. – P. 2336–2343. DOI: [10.1111/bcp.13689](https://doi.org/10.1111/bcp.13689).

49. Esteva, F. J. A randomised trial comparing the pharmacokinetics and safety of the biosimilar CT-P6 with reference trastuzumab / F.J. Esteva, J. Stebbing, R.N. Wood-Horral // *Cancer chemotherapy and pharmacology*. – 2018. – Vol. 81. – № 3. – P. 505–514. DOI: [10.1007/s00280-017-3510-7](https://doi.org/10.1007/s00280-017-3510-7).

50. Long-term efficacy and safety of CT-P6 versus trastuzumab in patients with HER2-positive early breast cancer: final results from a randomized phase III trial / J. Stebbing, Y.V. Baranau, V. Baryash [et al.] // *Breast cancer research and treatment*. – 2021. – Vol. 188. – № 3. – P. 631–640. DOI: [10.1007/s10549-021-06240-5](https://doi.org/10.1007/s10549-021-06240-5).

51. Efficacy, Safety, and Immunogenicity of HLX02 Compared with Reference Trastuzumab in Patients with Recurrent or Metastatic HER2-Positive Breast Cancer: A Randomized Phase III Equivalence Trial / B. Xu, Q. Zhang, T. Sun [et al.] // *BioDrugs: clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. – 2021. – Vol. 35. – № 3. – P. 337–350. DOI: [10.1007/s40259-021-00475-w](https://doi.org/10.1007/s40259-021-00475-w).

52. Ягудина, Р.И. Обзор зарубежных фармакоэкономических исследований применения Герцептина при лечении рака молочной железы / Р.И. Ягудина, А.Ю. Куликов, Т. Нгуен // *Фармакоэкономика. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология*. – 2009. – №2. – С. 28-35.

53. Куликов, А.Ю. Фармакоэкономический анализ одногодичной адьювантной терапии трастузумабом при her2-положительном раке молочной железы ранней стадии / А.Ю. Куликов, Т. Нгуен // Фармакоэкономика. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология. – 2010. – Том 3. – №4. – С. 28-34.

54. Доказательство фармакоэкономической рентабельности и целесообразности использования отечественного биосимиляра трастузумаб при HER2-позитивном раке молочной железы / М.А. Нургалиев, А.Е. Гуляев., С.К. Жаугашева [и др.] // Медицина и экология. – 2020. – №1 – С. 125-132.

55. Cesarec, A. Budget Impact Analysis of Biosimilar Trastuzumab for the Treatment of Breast Cancer in Croatia / A. Cesarec, R. Likić // Applied Health Economics and Health Policy. – 2016. – Vol. 15. – № 2. – P. 277–286. DOI:10.1007/s40258-016-0285-7.

56. Куликов, А.Ю. Фармакоэкономический анализ лекарственного средства «Кадсила» (трастузумаб эмтанзин) в лечении рака молочной железы у больных с HER2+ формой заболевания / А.Ю. Куликов, И.А. Комаров // Фармакоэкономика: теория и практика. – 2015. – Т. 3. – № 2. – С. 35–39.

57. Клинико-экономическая оценка применения трастузумаб эмтазина в сравнении с комбинацией лапатиниб+капецитабин у пациенток с HER2-положительным раком молочной железы с метастатическим поражением головного мозга / А.С. Колбин, А.А. Курылев, Ю.Е. Балыкина [и др.] // Качественная клиническая практика. – 2017. – № 2. – С. 4-11. DOI:10.24411/2588-0519-2017-00010.

58. Policies for biosimilar uptake in Europe: An overview / E. Moorkens, A.G. Vulto, I. Huys [et al.] // PLoS ONE. – 2017. – Vol. 12. – № 12. – P. 17. DOI: 10.1371/journal.pone.0190147.

59. Regulation of biosimilar medicines and current perspectives on interchangeability and policy / J. O’Callaghan, S.P. Barry, M. Bermingham [et al.] // European Journal of Clinical Pharmacology. – 2019. – Vol. 75. – P. 1-11. DOI:10.1007/s00228-018-2542-1.

60. A randomized, double-blind, parallel pharmacokinetic study comparing the trastuzumab biosimilar candidate, AryoTrust[®], and reference trastuzumab in healthy subjects / M. Farmahini Farahani, P. Maghzi, N. Jafari Aryan [et al.] // Expert opinion on investigational drugs. – 2020. – Vol. 29. – № 12– P. 1443-1450. DOI: 10.1080/13543784.2020.1831470.

61. A randomized, double-blind, parallel-group, single-dose comparative pharmacokinetic study of DRL-TZ, a candidate biosimilar of trastuzumab, with Herceptin[®] (EU) in healthy adult males / J.D. Lickliter, R.N. Dadhania, R.K. Trivedi [et al.] // The Indian journal of medical research. – 2021. – Vol. 154. – № 3. – P. 509-519. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR_1119_18.

62. Efficacy, Safety, Pharmacokinetics, and Immunogenicity of DRL-Trastuzumab Versus Herceptin in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Metastatic Breast Cancer: A Randomized Controlled Trial / N. Reddy, P. Reddy, A. Ranpura [et al.] // JCO global oncology. – 2024. – Vol. 10. – e2200328. DOI: 10.1200/GO.22.00328.

63. A randomized Phase I pharmacokinetic trial comparing the potential biosimilar trastuzumab (SIBP-01) with the reference product (Herceptin[®]) in healthy Chinese male volunteers / H. Zhou, S. Cao, X. Zhu [et al.] // Expert opinion on drug metabolism & toxicology. – 2020. – Vol. 16. – P. 997–1003. DOI: 10.1080/17425255.2020.1807935.

64. A comparative phase III clinical study to evaluate efficacy and safety of TrastuRel[™] (biosimilar trastuzumab) and innovator trastuzumab in patients with metastatic human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-overexpressing breast cancer / P. Apsangikar, S. Chaudhry, M. Naik [et al.] // Indian journal of cancer. – 2017. – Vol. 54. – № 4. – P. 664-668. DOI: 10.4103/ijc.IJC_449_17.

65. A Randomized Phase I Study Comparing the Pharmacokinetics of HD201, a Trastuzumab Biosimilar, With European Union-sourced Herceptin / X. Pivot, J.P. Deslypere, L.S. Park, [et al.] // Clinical therapeutics. – 2018. – Vol. 40. – № 3. – P. 396-405. DOI: 10.1016/j.clinthera.2018.01.009.

66. A randomized phase I clinical trial comparing the pharmacokinetic, safety, and immunogenicity of potential biosimilar recombinant human HER2 monoclonal antibody for injection and trastuzumab in healthy Chinese adults / J. Wang, S. Niu, W. Dong [et al] // Expert opinion on investigational drugs. – 2020. – Vol. 29. – № 7. – P. 755-762. DOI: 10.1080/13543784.2020.1770226.

67. Pharmacokinetic Bioequivalence, Safety, and Immunogenicity of DMB-3111, a Trastuzumab Biosimilar, and Trastuzumab in Healthy Japanese Adult Males: Results of a Randomized Trial / J. Morita, M. Tanaka, M. Nomoto [et al.] // BioDrugs: clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy. – 2016. – Vol. 30. – № 1. – P. 17-25. DOI: 10.1007/s40259-015-0153-2.

68. Baselga, J. Phase I and II clinical trials of trastuzumab /J. Baselga // Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology. – 2001. – Vol. 12. – № 1. – P. 49-55. DOI: 10.1093/annonc/12.suppl_1.s49.

69. Phase II Study of Receptor-Enhanced Chemosensitivity Using Recombinant Humanized Anti-p185HER2/neu Monoclonal Antibody Plus Cisplatin in Patients With HER2/neu-Overexpressing Metastatic Breast Cancer Refractory to Chemotherapy Treatment / M.D. Pegram, A. Lipton, D.F. Hayes [et al.] // Journal of Clinical Oncology. 1998. – Vol 16. – № 8. – P. 2659-2671. DOI: 10.1200/JCO.1998.16.8.2659.

70. Multinational Study of the Efficacy and Safety of Humanized Anti-HER2 Monoclonal Antibody in Women Who Have HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer That Has Progressed After Chemotherapy for Metastatic Disease / M.A. Cobleigh, C.L. Vogel, D. Tripathy [et al.] // Journal of Clinical Oncology. 1999. – Vol. 17. – № 9. – P. 2639-2648. DOI: 10.1200/JCO.1999.17.9.2639.

71. A randomized, single-blind, single-dose study evaluating the pharmacokinetic equivalence of proposed biosimilar ABP 980 and trastuzumab in healthy male subjects / V. Hanes, V. Chow, N. Zhang, R. Markus // Cancer chemotherapy and pharmacology. – 2017. – Vol. 79. – № 5. – P. 881-888. DOI: 10.1007/s00280-017-3286-9.

72. A randomized phase 1 pharmacokinetic trial comparing the potential biosimilar PF-05280014 with trastuzumab in healthy volunteers (REFLECTIONS B327-

01) / D. Yin, K.B. Barker, R. Li [et al.] // British journal of clinical pharmacology. – 2014. – Vol. 78. – № 6. – P. 1281-1290. DOI: 10.1111/bcp.12464.

73. Phase 1 randomized study compare the pharmacokinetics, safety and immunogenicity of HLX02 to reference CN- and EU-sourced trastuzumab in healthy subjects / X. Zhu, Y. Ding, Y. Yu [et al.] // Cancer chemotherapy and pharmacology. – 2021. – Vol. 87. – № 3. – P. 349-359. DOI: 10.1007/s00280-020-04196-9.

74. A phase III study comparing SB3 (a proposed trastuzumab biosimilar) and trastuzumab reference product in HER2-positive early breast cancer treated with neoadjuvant-adjuvant treatment: Final safety, immunogenicity and survival results / X. Pivot, I. Bondarenko, Z. Nowecki [et al.] // European journal of cancer. – 2018. – Vol. 93. – P. 19-27. DOI: 10.1016/j.ejca.2018.01.072.

75. Correlation between week 24 trastuzumab-dkst response and week 48 progression-free survival: the HERITAGE trial / H.S. Rugo, E.J. Pennella, U. Gopalakrishnan [et al.] // Breast (Edinburgh, Scotland). – 2021. – Vol. 58. – P. 18-26. DOI: 10.1016/j.breast.2021.03.009.

76. Efficacy and safety of ABP 980 compared with reference trastuzumab in women with HER2-positive early breast cancer (LILAC study): a randomised, double-blind, phase 3 trial / G. von Minckwitz, M. Colleoni, H.C. Kolberg [et al.] // The Lancet. Oncology. – 2018. – Vol. 19. – № 7. – P. 987-998. DOI: 10.1016/S1470-2045(18)30241-9.

77. Neoadjuvant PF-05280014 (a potential trastuzumab biosimilar) versus trastuzumab for operable HER2+ breast cancer / P.E. Lammers, M. Dank, R. Masetti [et al.] // British journal of cancer. – 2018. – Vol. 119. – № 3. – P. 266-273. DOI: 10.1038/s41416-018-0147-1.

78. Оценка биоэквивалентности препарата BCD-022 (трастузумаб производства ЗАО «Биокад», Россия) по сравнению с препаратом Герцептин® (Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд., Швейцария), применяемых в сочетании с паклитакселом у больных метастатическим раком молочной железы с гиперэкспрессией HER2: результаты международного двойного слепого

клинического исследования III фазы / Е.О. Игнатова, О.Н. Бурдаева, М.В. Копп [и др.] // Современная онкология. – 2016. – Т. 18. – №2. – С. 39-47.

79. Development and validation of an LC-MS/MS method for simultaneous quantification of co-administered trastuzumab and pertuzumab / S. Schokker, F. Fusetti, F. Bonardi [et al.] // mAbs. – 2020. – Vol. 12. – № 1. DOI: 10.1080/19420862.2020.1795492.

80. Trastuzumab quantification in serum: a new, rapid, robust ELISA assay based on a mimetic peptide that specifically recognizes trastuzumab / B. Cardinali, G. Lunardi, E. Millo [et al.] // Analytical and bioanalytical chemistry. – 2014. – Vol. 406. – № 18. – P. 4557-4561. DOI: 10.1007/s00216-014-7842-4.

81. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of trastuzumab in human serum and plasma / C.W. Damen, E.R. de Groot, M. Heij [et al.] // Analytical biochemistry. – 2009. – Vol. 391. № 2. – P. 114-120. DOI: 10.1016/j.ab.2009.05.030.

82. Development and validation of ELISA for Herceptin detection in human serum / L. Maple, R. Lathrop, S. Bozich [et al.] // Journal of immunological methods. – 2004. – Vol. 295. – № 1-2. – P. 169-182. DOI: 10.1016/j.jim.2004.09.012.

83. Phase II Study of Efficacy, Safety, and Pharmacokinetics of Trastuzumab Monotherapy Administered on a 3-Weekly Schedule / J. Baselga, X. Carbonell, N. Castañeda-Soto [et al.] // Journal of Clinical Oncology. – 2005. – Vol. 23. – P. 2162-2171. DOI: 10.1200/JCO.2005.01.014.

84. PK assays for antibody-drug conjugates: case study with ado-trastuzumab emtansine / R. Dere, J.H. Yi, C. Lei [et al.] // Bioanalysis. – 2013. – Vol. 5. – № 9. – P. 1025-1040. DOI: 10.4155/bio.13.72.

85. Development and validation of cell-based ELISA for the quantification of trastuzumab in human plasma / D. Jamieson, N. Cresti, M.W. Verrill, A.V. Boddy // Journal of immunological methods. – 2009. – Vol. 345. – № 1-2. – P. 106-111. DOI: 10.1016/j.jim.2009.04.006.

86. Monoclonal Antibody Capture and Analysis Using Porous Membranes Containing Immobilized Peptide Mimotopes / W. Liu, A.L. Bennett, W. Ning [et al.] //

Analytical chemistry. – 2018. – Vol 90. – № 20. – P. 12161-12167.
DOI: 10.1021/acs.analchem.8b03183.

87. Anti-drug antibodies anti-trastuzumab in the treatment of breast cancer / I.M. Padrón, J.G. García, R.R. Díaz [et al] // Journal of oncology pharmacy practice: official publication of the International Society of Oncology Pharmacy Practitioners. – 2021. – Vol 27. – № 6. – P. 1354-1356. DOI: 10.1177/1078155220953873.

88. Trastuzumab immunogenicity development in patients' sera and in laboratory animals / L.A.A. Kilany, A.A.S. Gaber, M.M. Aboulwafa, H.H. Zedan // BMC Immunology. – 2021. – Vol. 22. – 15. DOI: 10.1186/s12865-021-00405-z.

89. Писарев, В.В. Валидация тест-системы на основе твердофазного иммуноферментного анализа для оценки фармакокинетики этанерцепта у пациентов / В.В. Писарев, А.В. Иванов // Химико-фармацевтический журнал. – 2023. – Том 57. – № 7. – С.61-64

90. 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 др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2019. – Том 8. – № 3. – С.91-100. DOI: 10.33380//2305-2066-2019-8-3-91-100.

91. Писарев, В.В. Валидация иммуноферментной тест-системы для доклинических исследований фармакокинетики ритуксимаба / В.В. Писарев, М.М. Уляшова, Г.Н. Гильдеева // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. – 2019. – Том 9. – № 2. – С. 131-139. DOI: 10.30895/1991-2919-2019-9-2-131-139.

92. 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 [и др.] // Разработка и

регистрация лекарственных средств. – 2023. – Том 12. – № 2. – С. 190-197.
DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-2-190-197.

93. Bioanalytical method validation. Guidance for Industry [Электронный ресурс] // U.S. Food and Drug Administration. – 2018. – URL: <https://www.fda.gov/media/70858/download> (дата обращения: 18.11.2023).

94. Guideline on bioanalytical method validation [Электронный ресурс] // European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use. – 2011. – URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf (дата обращения: 18.11.2023).

95. Разработка и валидация методики определения антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа / О.А. Елисеева, М.А. Колганова, И.Е. Шохин [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2022. – Том 11. – № S4. – С. 120-127. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-120-127.

96. Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products – Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection. Guidance for Industry [Электронный ресурс] // U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). – 2019. – URL: <https://www.fda.gov/media/119788/download> (дата обращения: 18.11.2023).

97. Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products / G. Shankar, V. Devanarayan, L. Amaravadi [et al.] // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2008. – Vol. 48. – № 5. – P. 1267-1281. DOI: 10.1016/j.jpba.2008.09.020.

98. Recommendations for Systematic Statistical Computation of Immunogenicity Cut Points / V. Devanarayan, W.C. Smith, R.L. Brunelle [et al.] // The AAPS journal. – 2017. – Vol. 19. – № 5. – P. 1487–1498. DOI: 10.1208/s12248-017-0107-3.

99. Statistical methods and tool for cut point analysis in immunogenicity assays / L. Zhang, J.J. Zhang, R.J. Kubiak, H. Yang // Journal of immunological methods. –

2013. – Vol. 389. – № 1-2. – P. 79-87. DOI: 10.1016/j.jim.2012.12.008.

100. Anti-drug Antibody Validation Testing and Reporting Harmonization / Н. Myler, J. Pedras-Vasconcelos, К. Phillips [et al.] // The AAPS journal. – 2022. – 24. – № 4. DOI: 10.1208/s12248-021-00649-y.

101. 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 [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2023. – Том 12. – № 3. – С. 240-249. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-3-240-249.

ПРИЛОЖЕНИЕ А.

**АКТЫ ВНЕДРЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ**

ЦФА | центр
фармацевтической
аналитики

**Общество с ограниченной ответственностью
«ЦЕНТР ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ АНАЛИТИКИ»**

Юр./факт. адрес: 117149, Россия, Москва, Симферопольский бульвар, д.8, пом.1/1.
ИНН 9701010444, КПП 772701001, ОГРН 1157746853780, ОКПО 49285758,
Р/с 40702810838000271503 в ПАО СБЕРБАНК г. Москва, к/с 30101810400000000225,
Тел. +7 (499) 281-81-11 website: cpha.ru

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор ООО «ЦФА»
И.Е. Шохин
2023 г.



АКТ
внедрения результатов научно-исследовательской работы

Я, нижеподписавшийся, генеральный директор Общества с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики (ООО «ЦФА») Шохин Игорь Евгеньевич удостоверяю факт внедрения биоаналитических методик определения трастузумаба и анти-лекарственных антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом ИФА, применяемых для изучения фармакокинетики и иммуногенности трастузумаба, а также внедрение результатов проведения исследований фармакокинетики и иммуногенности препаратов трастузумаба. Данные методики были разработаны в ходе выполнения научно-исследовательской диссертационной работы по теме «Разработка методик определения трастузумаба и анти-лекарственных антител к трастузумабу в биологических объектах методом ИФА» соискателем ученой степени кандидата фармацевтических наук Колгановой Марией Алексеевной.

Предложенные методики используются для определения трастузумаба и анти-лекарственных антител к трастузумабу методом ИФА и внедрены в научно-практическую деятельность исследовательского центра ООО «Центр Фармацевтической Аналитики».

Генеральный директор ООО «ЦФА»
д.фарм.н. Шохин И.Е.

_____ *Игорь Шохин*

Общество с ограниченной ответственностью «Сайнтифик Комплайнс»
 ОГРН 1237700156099, ИНН 9728089480, КПП 772801001
 Юр. адрес: 117246, г. Москва, Научный проезд, д. 19, пом. 6д



Акт внедрения

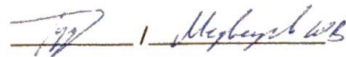
результатов диссертационной работы Колгановой М.А.
 «Разработка методик определения трасузумаба и анти-лекарственных антител к трасузумабу в биологических объектах методом ИФА»

Мы, нижеподписавшиеся, генеральный директор Общества с ограниченной ответственностью «Сайнтифик Комплайнс» (ООО «СК») Поляунов Андрей Михайлович, заведующий лабораторией Медведев Юрий Владимирович удостоверяем факт внедрения биоаналитической методики определения трасузумаба и анти-лекарственных антител к трасузумабу в сыворотке крови человека методом ИФА, применяемой для изучения фармакокинетики и иммуногенности трасузумаба, а также методологических подходов к изучению фармакокинетики и иммуногенности препаратов-биоаналогов.

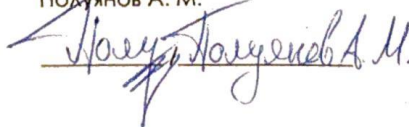
Данная методика была разработана соискателем ученой степени кандидата фармацевтических наук Колгановой Марией Алексеевной.

Предложенные биоаналитические методики определения трасузумаба и анти-лекарственных антител к трасузумабу методом ИФА, а также описанные методологические подходы к проведению исследований фармакокинетики и иммуногенности препаратов-биоаналогов внедрены в научно-практическую деятельность исследовательского центра ООО «СК».

Заведующий лабораторией
 Медведев Ю. В.



Генеральный директор ООО «СК»
 Поляунов А. М.







ООО «Мабскейл»
 ИНН 6382076000 КПП 632001001 ОГРН 1176313095331
 Юридический адрес: 445043, Российская Федерация
 Самарская область, г.о. Тольятти Территория ОЭЗ ППТ
 Шоссе №4, здание 5А
mabscale@mabscale.ru
 Тел. +7(8482) 67-89-90, 71-854

Акт внедрения

результатов диссертационной работы Колгановой М.А.
 «Разработка методик определения трастузумаба и анти-лекарственных антител
 к трастузумабу в биологических объектах методом ИФА»

Предмет внедрения: Биоаналитические методики определения трастузумаба и анти-лекарственных антител к трастузумабу в сыворотке крови человека, применяемые для проведения клинических исследований фармакокинетики и иммуногенности препарата «Трастузумаб» (производства ООО «Мабскейл», Россия). Результаты проведения исследований фармакокинетики и иммуногенности препарата «Трастузумаб» (производства ООО «Мабскейл», Россия).

Кем предложен: соискателем ученой степени кандидата фармацевтических наук Колгановой Марией Алексеевной.

Где внедрено: ООО «Мабскейл», Российская Федерация, Самарская область, г.о. Тольятти.

Цель внедрения: Изучение фармакокинетики и иммуногенности трастузумаба с целью внесения информации в регистрационное досье препарата.

Результат внедрения: Полученные результаты исследования фармакокинетики и иммуногенности препарата «Трастузумаб» (производства ООО «Мабскейл», Россия) внесены в регистрационное досье.

Заместитель генерального директора
 по разработке ООО «Мабскейл»,
 к.м.н.



Петров А.В.

«22» 09 2023

ПРИЛОЖЕНИЕ Б.

**ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ТРАСТУЗУМАБА (МКГ/МЛ), ПОЛУЧЕННЫЕ ПРИ АНАЛИЗЕ
ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ**

Таблица Б.1 – Концентрации трастузумаба (мкг/мл), измеренные в образцах, полученных от добровольцев, которым вводили исследуемый препарат «Трастузумаб», производства ООО «Мабскейл», Россия

№ Добро- вольца	Время отбора образца крови (после инфузии), часы																
	0	1,5	3	6	12	24	72	120	168	336	504	672	744	1008	1248	1440	1704
1	0,00	127,96	150,40	118,37	85,10	92,89	59,12	49,83	43,79	30,69	15,09	8,78	6,31	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	136,73	119,08	133,86	132,63	112,31	71,20	56,10	39,17	29,83	17,48	6,18	4,79	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	181,38	163,66	130,29	124,07	121,71	91,69	58,85	59,16	33,50	24,71	15,04	9,56	3,22	0,00	0,00	0,00
8	0,00	108,26	107,82	128,08	138,81	128,59	97,38	68,85	62,77	48,11	27,72	22,54	20,06	8,47	0,00	0,00	0,00
10	0,00	105,64	105,17	94,91	92,88	80,89	56,17	41,93	40,73	19,75	–	4,24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11	0,00	205,71	197,72	143,59	139,05	124,08	86,50	71,47	59,42	44,64	20,43	10,90	7,63	0,00	0,00	0,00	0,00
15	0,00	192,61	189,63	163,32	137,32	151,71	88,32	81,60	69,99	43,65	27,82	16,69	10,75	5,36	0,00	0,00	0,00
16	0,00	138,75	145,64	125,47	124,15	93,37	57,99	53,61	46,97	28,85	15,60	8,58	6,05	0,00	0,00	0,00	0,00
17	0,00	150,84	154,12	155,51	137,79	125,33	87,66	73,03	62,43	35,34	22,87	13,57	8,75	–	0,00	0,00	0,00
20	0,00	164,95	239,65	234,36	171,47	187,95	133,38	106,38	82,31	38,00	26,75	13,39	9,15	0,00	0,00	0,00	0,00
21	0,00	137,42	181,05	170,27	127,29	120,44	76,17	54,24	56,52	30,96	21,60	10,02	9,08	0,00	0,00	0,00	0,00
24	0,00	155,87	173,26	158,57	150,38	158,23	115,58	139,04	87,60	54,44	25,89	13,24	12,23	3,28	0,00	0,00	0,00
25	0,00	155,94	142,19	127,73	154,52	133,33	79,94	71,35	62,71	43,47	25,78	17,03	16,48	6,42	3,68	0,00	0,00
28	0,00	157,36	141,19	163,37	129,56	96,36	85,31	59,66	60,29	33,07	20,12	12,08	8,86	0,00	0,00	0,00	0,00

Продолжение Таблицы Б.1

31	0,00	166,16	160,70	166,99	154,95	134,09	93,21	83,76	55,51	45,51	29,05	14,36	14,24	4,51	0,00	0,00	0,00
32	0,00	108,71	141,67	124,76	104,69	110,59	63,04	63,29	42,05	29,37	19,86	9,52	6,04	0,00	0,00	0,00	0,00
34	0,00	248,78	184,29	154,09	132,40	128,21	95,78	71,03	62,85	44,18	27,54	15,58	14,49	5,29	0,00	0,00	0,00
35	0,00	95,81	107,17	100,61	41,28	70,50	50,04	41,08	35,91	18,76	11,76	6,17	5,14	0,00	0,00	0,00	0,00
39	0,00	187,32	134,38	142,05	118,89	104,60	58,93	54,20	48,17	36,20	13,06	6,98	4,22	0,00	0,00	0,00	0,00
40	0,00	160,52	207,74	183,23	125,41	107,92	107,46	77,77	76,99	48,88	29,97	14,78	11,80	3,97	0,00	0,00	0,00
41	0,00	201,92	178,83	169,88	115,70	162,68	112,72	88,23	73,17	33,39	19,75	10,05	6,30	0,00	0,00	0,00	0,00
43	0,00	198,36	214,98	183,70	190,80	184,77	79,20	95,28	80,72	63,95	33,52	23,51	22,82	8,83	3,06	0,00	0,00
45	0,00	202,50	245,42	173,13	139,10	185,89	119,04	86,83	83,08	–	31,08	18,76	12,72	5,25	0,00	0,00	0,00
47	0,00	162,84	184,23	129,84	135,44	146,25	109,87	105,90	67,89	47,94	28,45	18,90	17,18	4,80	0,00	0,00	0,00
49	0,00	148,32	151,06	135,25	120,05	135,45	82,70	77,06	63,06	42,40	23,49	12,77	9,30	0,00	0,00	–	0,00
52	0,00	185,73	164,56	169,79	155,21	164,91	105,79	83,27	61,65	38,13	23,01	12,98	9,27	3,64	0,00	0,00	0,00
55	0,00	158,61	153,31	139,36	143,54	108,47	81,38	64,29	57,36	34,75	20,93	10,03	8,38	0,00	0,00	0,00	0,00
56	0,00	145,68	125,15	125,74	126,04	117,23	86,74	71,06	72,22	41,52	27,37	19,26	19,26	5,92	0,00	3,29	0,00
57	0,00	150,66	162,47	130,70	119,04	93,01	62,09	59,22	68,58	36,94	19,48	13,13	7,64	0,00	0,00	0,00	0,00
58	0,00	129,36	127,52	129,67	116,57	112,94	77,23	30,01	26,85	16,46	12,35	5,42	–	0,00	0,00	0,00	0,00
62	0,00	254,31	166,75	173,72	127,23	123,45	82,80	72,43	47,26	24,92	12,91	4,37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
64	0,00	192,47	183,23	153,03	145,66	151,53	94,55	83,21	70,74	43,84	33,28	22,08	19,89	5,58	0,00	0,00	0,00
65	0,00	172,73	229,78	160,35	132,19	158,87	98,23	71,43	73,12	45,21	29,08	21,17	16,45	7,13	0,00	0,00	0,00
68	0,00	181,04	178,24	156,48	139,03	125,32	99,93	90,20	82,52	41,32	27,49	13,94	9,60	0,00	0,00	0,00	0,00
69	0,00	148,01	211,47	162,52	179,81	131,17	85,16	96,24	68,60	51,83	34,48	21,99	14,93	6,57	0,00	0,00	0,00

Продолжение Таблицы Б.1

72	0,00	163,23	171,45	201,75	156,85	149,64	68,05	59,79	65,53	44,41	22,23	15,18	12,34	17,11	0,00	0,00	0,00
75	0,00	171,19	171,32	180,77	170,05	127,66	–	93,84	84,82	51,07	–	–	14,89	–	–	–	–
76	0,00	169,42	140,96	154,83	158,39	128,80	92,99	69,09	50,48	31,00	21,07	11,64	7,43	0,00	0,00	0,00	0,00
78	0,00	171,23	122,53	148,18	123,22	154,50	73,51	65,37	57,99	36,66	19,70	12,18	7,81	0,00	0,00	0,00	0,00
80	0,00	224,31	244,71	149,97	193,74	145,79	130,15	101,96	79,89	64,04	33,78	16,10	18,86	6,38	0,00	0,00	0,00
83	0,00	121,00	148,76	110,70	136,54	109,94	67,84	51,88	46,50	35,60	17,19	7,64	4,70	0,00	0,00	0,00	0,00
84	0,00	151,62	146,74	119,62	148,54	145,97	105,51	75,61	82,83	40,60	25,06	14,81	10,26	0,00	0,00	0,00	0,00
85	0,00	179,18	169,64	169,77	181,04	124,25	89,85	68,95	59,41	45,48	24,12	14,80	11,73	5,28	0,00	0,00	0,00
88	0,00	142,34	198,12	164,39	164,98	183,43	137,42	104,77	66,14	34,56	29,41	14,43	6,13	0,00	0,00	0,00	0,00
89	0,00	154,47	156,28	134,86	105,20	128,05	78,96	68,64	55,15	31,70	13,17	8,10	4,42	4,11	0,00	0,00	0,00
91	0,00	71,17	95,20	93,51	88,79	73,39	57,73	46,17	38,46	25,26	14,79	–	–	–	–	–	–

Таблица Б.2 – Концентрации трастузумаба (мкг/мл), измеренные в образцах, полученных от добровольцев, которым вводили препарат сравнения «Герцептин®», производства «Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд», Швейцария

№ Добро- вольца	Время отбора образца крови (после инфузии), часы																
	0	1,5	3	6	12	24	72	120	168	336	504	672	744	1008	1248	1440	1704
2	0,00	129,73	136,32	141,23	115,14	107,67	62,50	55,58	50,92	30,30	20,74	10,04	7,81	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	101,45	153,05	105,27	114,65	108,06	66,16	59,32	48,69	29,35	22,53	11,51	9,64	3,03	0,00	0,00	0,00
6	0,00	94,76	118,93	103,07	115,65	112,32	73,41	52,59	51,29	30,00	18,08	7,88	12,37	3,11	0,00	0,00	0,00
7	0,00	168,95	136,96	149,35	138,15	103,96	63,38	65,34	50,38	34,00	22,54	14,36	13,39	4,30	0,00	0,00	0,00
9	0,00	123,87	125,98	72,59	116,18	88,73	61,02	59,54	41,51	17,75	14,52	6,45	5,43	0,00	0,00	0,00	0,00

Продолжение Таблицы Б.2

54	0,00	139,20	189,88	163,62	148,86	142,37	123,63	44,04	32,42	17,04	14,53	4,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
59	0,00	217,16	236,40	159,21	195,23	154,63	126,94	89,62	75,33	56,36	26,00	11,59	9,11	0,00	0,00	0,00	0,00
60	0,00	129,34	158,09	146,79	133,21	121,27	60,36	91,15	69,89	41,56	16,38	9,88	10,25	0,00	0,00	–	0,00
61	0,00	185,94	172,02	164,39	184,67	160,31	109,80	81,68	66,78	45,04	30,28	23,72	16,92	7,86	3,10	0,00	0,00
63	0,00	152,10	145,88	129,67	122,94	96,91	89,94	64,84	52,33	38,75	19,47	11,09	11,89	0,00	0,00	0,00	0,00
66	0,00	218,50	186,30	188,00	178,90	168,04	106,53	81,84	56,01	48,03	23,30	13,57	7,50	0,00	0,00	–	0,00
67	0,00	137,17	165,52	129,16	115,42	90,03	62,35	60,04	49,90	28,57	14,60	5,94	3,69	0,00	0,00	–	0,00
70	0,00	146,72	157,51	134,60	139,99	87,71	66,71	78,59	53,45	30,65	17,42	13,57	8,58	0,00	0,00	0,00	0,00
71	0,00	161,71	111,42	147,88	96,26	87,87	71,18	58,31	47,38	33,14	23,11	13,78	13,45	3,95	0,00	0,00	0,00
73	0,00	138,77	111,63	93,15	104,82	108,59	76,39	58,88	41,56	26,09	16,97	7,18	4,93	0,00	0,00	0,00	0,00
74	0,00	152,71	127,62	159,26	164,13	145,24	102,09	74,17	47,09	26,44	17,89	8,77	7,40	0,00	0,00	0,00	0,00
77	0,00	222,20	85,05	84,43	142,64	55,13	57,86	31,84	13,78	20,44	11,62	7,35	4,91	0,00	0,00	0,00	0,00
79	0,00	190,23	137,23	164,46	132,16	127,12	109,90	66,43	67,42	50,32	29,51	14,87	12,92	7,24	0,00	0,00	0,00
81	0,00	150,80	163,48	132,30	105,65	88,36	124,86	76,81	67,02	35,15	19,38	10,06	6,94	0,00	0,00	0,00	0,00
82	0,00	180,49	145,20	156,36	141,20	147,82	96,26	88,44	80,13	43,13	25,39	13,92	10,03	0,00	0,00	0,00	0,00
86	0,00	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
87	0,00	136,82	106,19	104,07	106,93	87,61	74,66	59,01	46,15	25,76	18,88	9,21	8,90	3,44	0,00	0,00	0,00
90	0,00	104,27	102,63	96,83	90,50	87,18	53,29	42,47	36,15	26,97	12,62	7,37	5,37	0,00	0,00	0,00	0,00
92	0,00	119,42	109,21	90,60	84,49	79,93	59,69	54,21	44,70	26,35	30,88	17,30	16,01	9,01	4,05	0,00	0,00