

*pre-clinical*

ООО «Институт доклинических исследований»

# ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОАНАЛОГОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Кательникова Анастасия Евгеньевна

[katelnikova.ae@doclinika.ru](mailto:katelnikova.ae@doclinika.ru)

# ИСТОЧНИКИ:

---

**EMA. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (revision 1); EMA: London, UK, 2014; EMA/CHMP/BWP/247713/2012**

**EMA. Guideline on Similar Biological Medicinal Products Containing Biotechnology-Derived Proteins as Active Substance: Non-Clinical and Clinical Issues; EMA: London, UK, 2006; EMEA/CHMP/BMW/42832.**

**FDA. Quality Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Protein Product; FDA: Silver Spring, USA, 2012.**

**WHO. Guidelines on Evaluation of Similar Biotherapeutic Products (SBPs); WHO: Geneva, Switzerland, 2009.**

# ИСТОЧНИКИ:

---

**Федеральный закон от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» с изменениями и дополнениями по состоянию на 12.03.2014 г.**

**Национальный стандарт ГОСТ Р 56699-2015 «Лекарственные средства для медицинского применения. Доклинические исследования безопасности биотехнологических лекарственных препаратов. Общие рекомендации».** Дата введения в действие: 01.07.2016 г. (перевод ICH S6(R1): 2011 Addendum to Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals, IDT)

**Национальный стандарт ГОСТ Р 56700-2015 «Лекарственные средства для медицинского применения. Доклинические фармакологические исследования безопасности».** Дата введения в действие: 01.07.2016 г. (перевод ICH S7A: 2001 Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals , IDT )

# ВОЗ и ЕМА было введено название

---

**“Similar biotherapeutic product” (“SBPs”, “biosimilars”)**

**“biosimilar” - “препарат, который имеют высокое сходство по показателям качества, безопасности и эффективности с оригинальным (препаратом сравнения)”**

**Guidelines on Evaluation of Similar Biotherapeutic Products (SBPs). Expert Committee on Biological Standardization. Geneva. 19 to 23 October. – 2009**

## FDA к данному определению добавили

---

- “препарат, который имеют высокое сходство по показателям качества, безопасности и эффективности с оригинальным (препаратом сравнения), а незначительные отличия не имеют клинической значимости”.

**Guidance for Industry. Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Biosimilarity. February. – 2012**

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ (ДИРЕКТИВА 2001/83/ЕС)

**Биологический лекарственный препарат** – это препарат, активная субстанция которого является биологической субстанцией.

Согласно Директиве, к биологическим лекарственным препаратам относятся:

- (1) иммунологические лекарственные препараты,
- (2) лекарственные препараты, получаемые из донорской крови и донорской плазмы,
- (3) лекарственные препараты, получаемые с помощью биотехнологических процессов,
- (4) лекарственные препараты передовой терапии (препараты генной терапии, препараты терапии соматическими клетками, препараты тканевой терапии).

# Объем доклинических исследований биотехнологических лекарственных препаратов

Тип исследования	Оригинальный лекарственный препарат	Биоаналогичный лекарственный препарат
<b>Общетоксические свойства</b>		
Острая токсичность	+	-
Хроническая токсичность длительностью, соответствующей клиническому применению	Грызуны	-
	Не грызуны	+
Местно-раздражающее действие	+	+
<b>Метаболизм</b>		
Токсикокинетика <i>in vivo</i>	-	+
Фармакокинетика <i>in vivo</i>	+	-
Изучение метаболизма <i>in vitro</i>	+	-
Взаимодействие лек. средств	+	-
<b>Специфическая токсичность</b>		
Иммуногенность	-	+
Иммунотоксичность	+	-
Аллергизирующие свойства	+	-
Мутагенность	+	-
Канцерогенность	+	-
Репродуктивная токсичность (Генеративная функция)	+	-
Репродуктивная токсичность (эмбрио, фето и тератогенное действие)	+	-
<b>Фармакодинамика</b>		
Исследования <i>in vitro</i>	+	+
Исследования <i>in vivo</i>	+	+

# Разработка биоаналогичных лекарственных препаратов, содержащих в качестве фармацевтической субстанции рекомбинатные эритропоэтины

---

1. Изучение фармакологической активности *in vitro* и *in vivo*:
  - 1) Исследования *in vitro*:
    - связывание с рецептором;
    - пролиферативные эффекты на клеточных линиях.
  - 1) Исследования *in vivo*:
    - экспериментальные модели на животных.
2. Токсикологические исследования
  - Хроническая токсичность при многократном введении на крысах с оценкой местной переносимости;
  - Токсикокинетика.



# АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

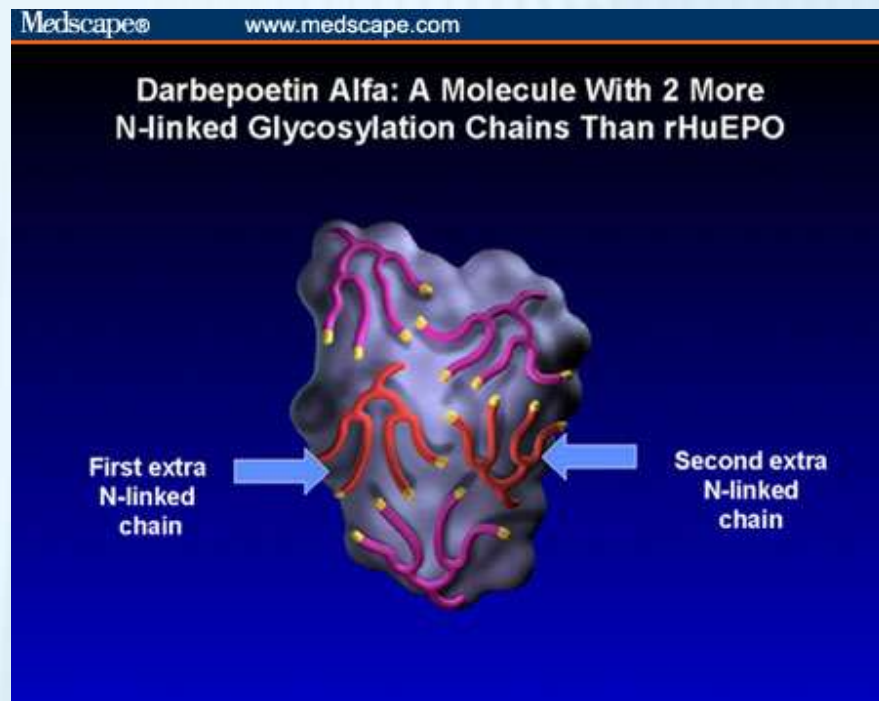
- Хроматографические
- Микробиологические
- Спектрофотометрические
- Полярографические
- Иммунологические
- Радиоизотопные и др.

**Достаточно использовать  
одну валидированную  
методику!**

В идеальном случае в исследованиях у человека и животных используют одинаковые (по принципу действия) количественные методики.

# ЭРИТРОПОЭТИН / ДАРБЕПОЭТИН АЛЬФА. СТРУКТУРА.

Дарбэпоэтин альфа (ДЭПО) является аналогом ЭПО второго поколения. ДЭПО имеет широкое клиническое применение при лечении анемий различного генеза и ряда онкологических заболеваний.



Дарбопоэтин альфа с двумя дополнительными N-углеводными цепями

# ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

---

Целью настоящего исследования стала разработка методики количественного определения дарбопозтина альфа в плазме крови лабораторных животных с помощью коммерчески доступного набора и ее валидации в соответствии с требованиями, предъявляемыми к биоаналитическим методам, и апробация разработанной методики для изучения фармакокинетики дарбопозтина.

# МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

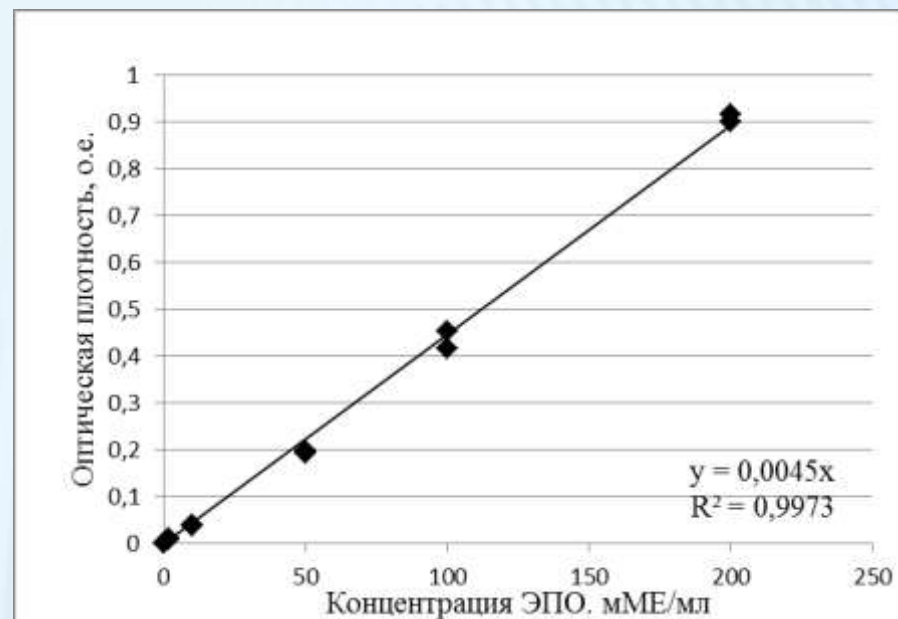
- препарат «Аранесп» в форме раствора для инъекций (Amgen Manufacturing Limited, Пуэрто-Рико);
- наборы реагентов для ИФА-анализа «Эритропоэтин-ИФА-БЕСТ» (А-8776, ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск).



# ЭРИТРОПОЭТИН. ОЦЕНКА РАБОТЫ НАБОРА.

Концентрация ЭПО по паспорту -  
25,78 мМЕ/мл (предел 20-30 мМЕ/мл),  
RSD 8%;

Полученные значения -  $23,8 \pm 1,9$   
мМЕ/мл, RSD 7,96%



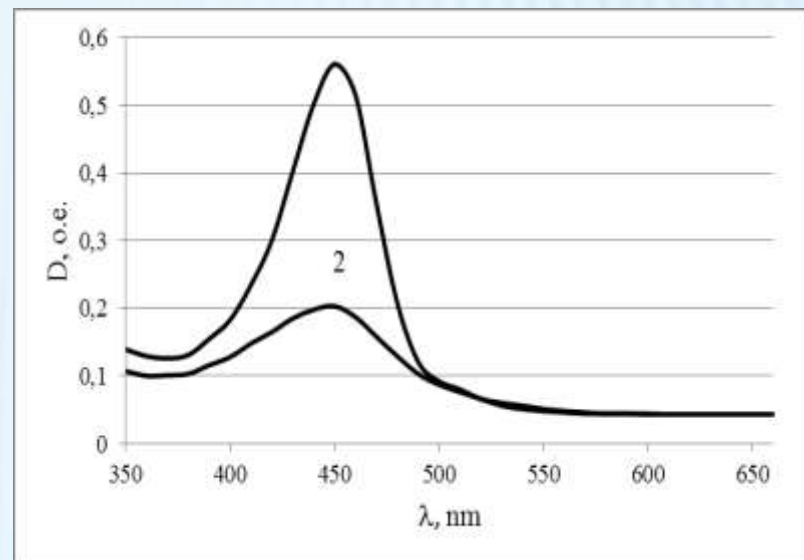
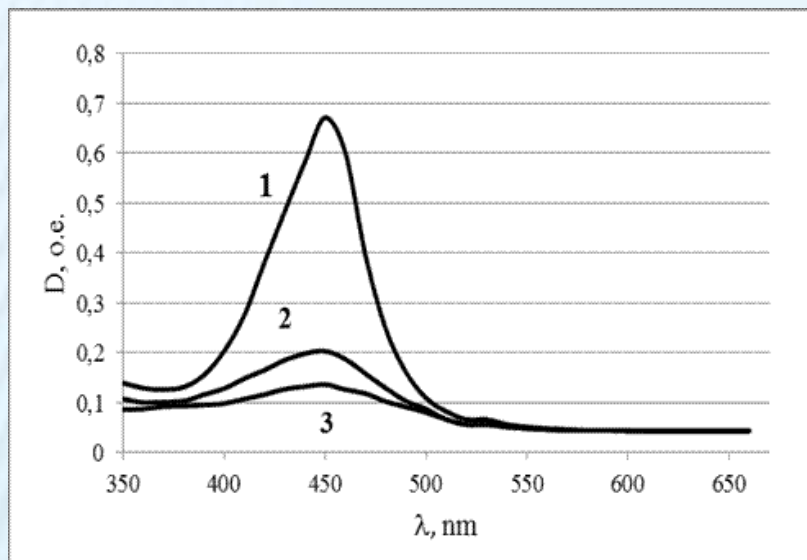
Типичная линейная зависимость оптической плотности реакционной смеси от концентрации ЭПО в калибровочных образцах (мМЕ/мл)

# ЭРИТРОПОЭТИН. ВЫБОР ТИПА БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА.

Тип биологического материала	Антикоагулянт	Концентрация ЭПО, мМЕ/мл	RSD, %
Сыворотка	-	10,4±1,1	10,6
Плазма	Гепарин	10,8±2,1	19,4
Плазма	ЭДТА	10,3±0,2	2,0

Наименьшее значение RSD (2,0%) было получено для плазмы кроликов с ЭДТА. Поэтому для дальнейших экспериментов была выбрана плазма с добавлением в качестве антикоагулянта ЭДТА.

# ЭРИТРОПОЭТИН/ДАРБОПОЭТИН АЛЬФА. РЕВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ЭПО/ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ДЭПО.



УФ-спектр продуктов реакции калибровочного раствора ЭПО концентрацией 100 мМЕ/мл (1), плазмы интактного кролика (2) и калибровочного раствора с концентрацией ЭПО 0 мМЕ/мл (3)

УФ-спектр продуктов реакции плазмы кролика с добавкой ДЭПО (1) и интактной плазмы (2).

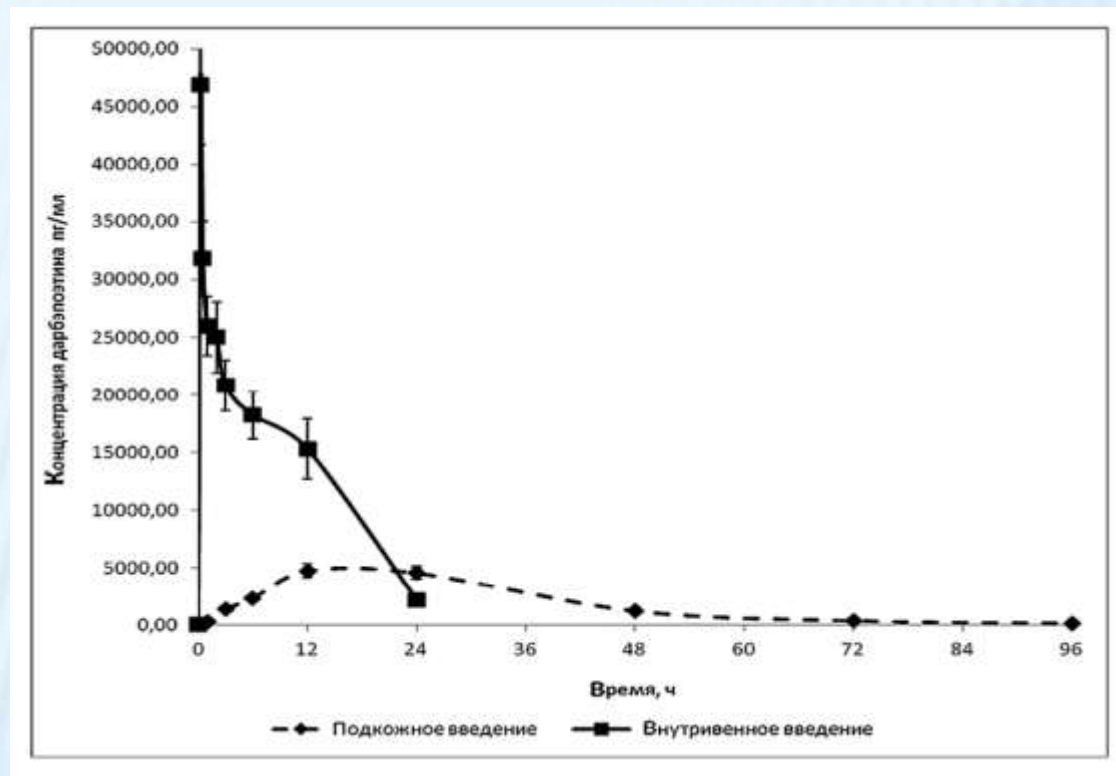
# ЭРИТРОПОЭТИН/ДАРБПОЭТИН АЛЬФА. РЕВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ЭПО/ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ДЭПО.

Валидационный параметр	Результат			
	Эритропоэтин		Дарбэпоэтин	
Специфичность де-тектирования окра-шенного продукта	Подтверждена увеличением оптической плотности в мак-симуме при 450 нм на фоне компонентов плазмы крови			
Линейный (калибро-вочный) диапазон	16–1600 пг/мл, r>0,996		67–2000 пг/мл, r>0,995	
Нижний предел коли-чественного опреде-ления (НПКО)	16 пг/мл		67 пг/мл 12,9 15,6	
Предел обнаруже-ния, пг/мл	3,84		45,0	
Точность, %	1600 пг/мл	0,91	2000 пг/мл	2,0
	800 пг/мл	3,8	1000 пг/мл	4,8
	48 пг/мл	12,6	201 пг/мл	6,3
	16 пг/мл	12,5	67 пг/мл	12,9
Внутридневная // междневная преци-зионность, %	1600 пг/мл	3,1–5,7//11,0	2000 пг/мл	2,4–5,2//3,3
	800 пг/мл	3,5–7,2//13,6	1000 пг/мл	2,1–7,2//5,1
	48 пг/мл	10,1– 14,3//14,1	201 пг/мл	4,2–8,8//6,2
	16 пг/мл	17,2–9,3//11,9	67 пг/мл	8,3–11,3//13,0



# ДАРБЕПОЭТИН АЛЬФА. АНАЛИЗ БИОПРОБ.

Метод был применен для количественного определения ДЭПО в образцах кроличьей плазмы, полученных после внутривенного и подкожного введения в дозе 1 мкг/кг препарата «Аранесп» (Amgen Europe B.V., Нидерланды).



Кривая «концентрация - время» суммы ЭПО и ДЭПО при однократном внутривенном и подкожном введении препарата «Аранесп» (n=6)

# ДАРБЕПОЭТИН АЛЬФА. АНАЛИЗ БИОПРОБ.

Основные фармакокинетические параметры ДЭПО.

Путь введения	$C_{max}$ , pg/ml	$AUC_{0-t}$ , h·pg/ml	MRT, h	$T_{1/2}$ , h
внутривенно	46839±12464	341924±102390	7.77±0.49	5.38±0.34
подкожно	5348±1102	173637±39045	25.2±3.20	17.69±1.87

Таким образом, набор реагентов «Эритропоэтин-ИФА-Бест» (Вектор-Бест, Россия) может быть использован для количественной оценки в кроличьей плазме, как ЭПО, так и ДЭПО.

# ВЫВОД

---

Метод иммуноферментного анализа с использованием коммерчески доступных наборов реагентов, после дополнительной проверки может быть использован для исследования биоэквивалентности и токсикокинетики кандидата в биоаналоги и соответствующего препарата сравнения.

# СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ

