



Оригинальная статья/Research article

Оценка иммуногенности препаратов пэгфилграстима у пациентов с диагнозом «рак молочной железы»

Ю. В. Медведев^{1,2*}, М. А. Колганова², О. А. Сас², Т. Н. Комаров², Е. Н. Фишер^{1,2},
И. Е. Шохин^{2,3}, Ю. И. Аммура⁴

1 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

2 – ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3

3 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (Российский университет дружбы народов, РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

4 – ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова» (ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова), 105064, г. Москва, Малый Казенный пер., д. 5А

*Контактное лицо: Медведев Юрий Владимирович. E-mail: y125195@yandex.ru

Статья получена: 09.04.2020. Статья принята к печати: 25.05.2020

Резюме

Введение. Одним из побочных эффектов, развивающихся при противоопухолевой терапии (лекарственной или лучевой), является нейтропения, при которой наблюдается снижение числа нейтрофилов в крови. Нейтропения может привести к повышению риска и тяжести развития бактериальной и грибковой инфекции. Для предотвращения развития нейтропении, а также для лечения применяют гранулоцитарные колониестимулирующие факторы, например филграстим и его конъюгированные формы. Одним из нежелательных явлений характерных для лекарственных веществ пептидной природы является развитие иммуногенности, что обуславливает необходимость изучения иммуногенности у таких ЛС.

Цель. Валидировать методику определения антител к пэгфилграстиму в сыворотке крови, оценить иммуногенность препаратов пэгфилграстима.

Материалы и методы. Для оценки наличия антител к пэгфилграстиму, оценки ингибирования сигнала и установления титра антител использовался набор PEGylated Filgrastim (Neulasta®) ADA ELISA. Для подтверждения применимости данного набора к требуемым задачам методика анализа была подвергнута валидации. Оптическую плотность образцов измеряли с помощью планшетного иммуноферментного анализатора Stat Fax 3200, промывку планшетов осуществляли с помощью автоматического промывателя планшетов.

Результаты и обсуждения. В ходе выполнения работы была проведена валидация методики определения антител к пэгфилграстиму в сыворотке крови. Разработанная методика была применена в рамках простого слепого сравнительного многоцентрового рандомизированного исследования эффективности и безопасности препаратов пэгфилграстима у пациентов с диагнозом «рак молочной железы», получающих миелосупрессивную терапию. Образцы, полученные от клинического центра, были подвергнуты скринингу на наличие антител к пэгфилграстиму, были выявлены пробы, содержащие антитела, проведен подтверждающий анализ, рассчитан процент ингибирования и установлен титр антител.

Заключение. Методика определения антител была подвергнута валидации, после чего применена для оценки иммуногенности препаратов пэгфилграстима.

Ключевые слова: пэгфилграстим, иммуногенность, ИФА, противолечкарственные антитела.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Ю. В. Медведев, М. А. Колганова, О. А. Сас и Ю. И. Аммура валидировали методику определения антител к пэгфилграстиму в сыворотке крови, проводили исследования и измерения. Т. Н. Комаров и Е. Н. Фишер провели обработку данных. И. Е. Шохин, М. А. Колганова и Ю. И. Аммура проводили интерпретацию результатов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Медведев Ю. В., Колганова М. А., Сас О. А., Комаров Т. Н., Фишер Е. Н., Шохин И. Е., Аммура Ю. И. Оценка иммуногенности препаратов пэгфилграстима у пациентов с диагнозом «рак молочной железы». *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2020; 9(2): 140–144.

Immunogenicity Assessment of Pegfilgrastim in Patients with Breast Cancer

Yuri V. Medvedev^{1,2*}, Maria A. Kolganova², Olga A. Sas², Timofey N. Komarov²,
Elizaveta N. Fisher^{1,2}, Igor E. Shohin^{2,3}, Yulia I. Ammour⁴

1 – I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

2 – LLC «СРНА», 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

3 – Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

4 – Federal State Budgetary Scientific Institution «I. I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», 5A, Maly Kazenny lane, Moscow, 105064, Russia

*Corresponding author: Yuri V. Medvedev. E-mail: y125195@yandex.ru

Received: 09.04.2020. Accepted: 25.05.2020

Abstract

Introduction. Neutropenia, which is an abnormally low concentration of neutrophils in the blood, is one of the common side effects in patients receiving radio- or chemotherapy. Neutropenia usually leads to higher risks of severe bacterial and fungal infections. Such medicines as colony-stimulating factor filgrastim (and its conjugates) are used to prevent and treat neutropenia in oncology patients. Immunogenicity is a potential concern for any biological product, thus, its assessment is one of the most critical necessities during the development and registration of such products.

Aim. The main aim of this study was to validate the ELISA method for anti-pegfilgrastim antibodies detection in human serum samples and to apply the validated method to pegfilgrastim drugs immunogenicity assessment.

Materials and methods. To assess pegfilgrastim immunogenicity, the commercial ELISA kit «PEGylated Filgrastim (Neulasta®) ADA ELISA» was used for screening, confirmatory and titer assay. Moreover, to confirm the chosen commercial kit suits the study aims it was revalidated. The absorbance values were obtained using plate immunoassay analyzer Stat Fax 3200, plate washing was performed using an automatic two-channel plate washer.

© Медведев Ю. В., Колганова М. А., Сас О. А., Комаров Т. Н., Фишер Е. Н., Шохин И. Е., Аммура Ю. И., 2020

© Medvedev Yu. V., Kolganova M. A., Sas O. A., Komarov T. N., Fisher E. N., Shohin I. E., Ammour Yu. I., 2020

Results and discussion. The ELISA method for anti-pegfilgrastim antibodies determination in human serum samples was validated and applied to the analytical part of the comparative, multicenter, blind, randomized study of pegfilgrastim efficacy and safety in patients with breast cancer, receiving myelosuppressive chemotherapy. Human serum samples were first screened for anti-drug antibodies, then «screening positive» samples were analyzed in confirmatory assay with % inhibition calculation for each sample. The «confirmed positive» samples were further characterized in titer assay.

Conclusions. The ELISA method for anti-pegfilgrastim antibodies determination in human serum samples was successfully validated and applied for pegfilgrastim drugs immunogenicity assessment.

Keywords: pegfilgrastim, immunogenicity, ELISA, anti-drug antibodies (ADA).

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Yuri V. Medvedev, Maria A. Kolganova, Olga A. Sas and Yulia I. Ammur validated the method for determining antibodies to pegfilgrastim in blood serum, conducted research and measurements. Timofey N. Komarov and Elizaveta N. Fisher conducted data processing. Igor E. Shokhin, Maria A. Kolganova and Yulia I. Ammur interpreted the results. All authors participated in the discussion of the results and the writing of the text of the article.

For citation: Medvedev Yu. V., Kolganova M. A., Sas O. A., Komarov T. N., Fisher E. N., Shohin I. E., Ammour Yu. I. Immunogenicity assessment of Pegfilgrastim in patients with breast cancer. *Drug development & registration*. 2020; 9(2): 140–144.

ВВЕДЕНИЕ

Филграстим – негликолизированный белок, состоящий из 175 аминокислот, который вырабатывается штаммом *Escherichia coli*, в геном которой введен ген колониестимулирующего фактора человека. Является гемопоэтическим фактором роста, регулирует образование функционально активных нейтрофилов в костном мозге и стимулирует их выход в кровь. Филграстим применяют при нейтропении, фебрильной нейтропении, для стимуляции периферических стволовых клеток крови, при тяжелой врожденной нейтропении у детей и взрослых с тяжелыми инфекциями в анамнезе, при стойкой нейтропении у пациентов с ВИЧ инфекцией. [1–5].

Пэгфилграстим – ковалентный конъюгат филграстима с полиэтиленгликолем с молекулярной массой 20 кДа. В результате конъюгации филграстима и полиэтиленгликоля снижается почечный клиренс препарата, что выражается в пролонгировании его действия. Пэгфилграстим применяют при нейтропениях, возникающих при цитотоксической химиотерапии [6].

Помимо пэгфилграстима применяют и другие конъюгированные формы филграстима – липэпфилграстим и эмпэгфилграстим со схожими показаниями к применению.

Липэпфилграстим – ковалентный конъюгат филграстима, связанного с молекулой метоксиполиэтиленгликоля через олигопептид, состоящий из глицина, N-ацетилнейраминовой кислоты и N-ацетилгалактозамина [7].

Эмпэгфилграстим – ковалентный конъюгат филграстима с полиэтиленгликолем с молекулярной массой 30 кДа [8].

Период полувыведения ($T_{1/2}$) филграстима – около 3,5 часов; $T_{1/2}$ пэгфилграстима – 15–80 часов [9]; $T_{1/2}$ липэпфилграстима – 32–49 часов [7]; $T_{1/2}$ эмпэгфилграстима – 78 часов [8].

Одним из наиболее вероятных нежелательных явлений характерных для лекарственных веществ

пептидной природы является развитие иммуногенности, как результат ответа иммунной системы на попадание чужеродного белка в организм человека. При этом последствия иммунного ответа могут быть как несущественными, так и весьма тяжелыми, поэтому на этапе регистрации таких ЛС важно произвести оценку иммуногенности. Одним из наиболее распространенных методов определения антител к ЛВ является иммуноферментный анализ [10], в частности, в настоящее время опубликован ряд работ по определению антител к филграстиму и его конъюгированным формам в сыворотке крови [11–13] с применением ИФА теста.

Цель

Проведение валидации методики определения антител к пэгфилграстиму в сыворотке крови и оценка иммуногенности препаратов пэгфилграстима.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для оценки безопасности исследуемых препаратов проводили скрининг проб сыворотки на содержание в них специфических антител к пэгфилграстиму. Нами был выбран набор PEGylated Filgrastim (Neulasta®) ADA ELISA, производства Somru BioScience, который представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ «сэндвич»-типа для определения концентрации антител к пэгфилграстиму. Оптическую плотность образцов измеряли с помощью планшетного иммуноферментного анализатора Stat Fax 3200, Awareness Technology, Inc. (США); промывку планшетов осуществляли с помощью промывателя планшетов автоматического двухканального ПП2-428, Иммедтех (Россия); термостатирование и перемешивание проводили, используя термошейкер для планшетов PST-60HL, Biosan (ЕС). Воду очищенную типа 1 получали с помощью установки «АКВАЛАБ» УВОИ-«МФ»-1812-1 AL-1 plus (Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ИФА анализ проводили согласно инструкции к набору, общее время анализа – около 3 часов с учетом этапов внесения проб и отмывки. По результатам скрининга проводили подтверждающий анализ антител к пэгфилграстиму по идентичной методике. Для проб, которые по результатам скрининга были признаны «потенциально положительными» была проведена оценка ингибирования сигнала с помощью ЛВ, а также был установлен титр антител, который определяли, подвергая анализу разбавленные образцы (в 2, 4, 8 и 16 раз).

Валидация методики

Для оценки наличия антител к пэгфлиграстиму, оценки ингибирования сигнала и установления титра антител использовался набор PEGylated Filgrastim (Neulasta®) ADA ELISA. Для подтверждения применимости данного набора к требуемым задачам методика анализа, приведенная в инструкции, была подвергнута валидации по следующим параметрам: специфичность, прецизионность, предел определения.

Для определения специфичности использовались образцы Negative Control, входящие в состав набора и образцы сыворотки, достоверно не содержащие антител к пэгфилграстиму. Было показано, что оптическая плотность образца, не содержащего антител к пэгфилграстиму, не превышала оптическую плотность образца, содержащего антитела к пэгфилграстиму на уровне предела обнаружения.

Для оценки прецизионности проводили анализ образцов High Positive Control и Low Positive Control. Анализ проводили для 3 последовательностей. Исследование проводили в течение 1-ой последовательности (внутри цикла), 2-ой и 3-ей последовательности (между циклов). Значения относительного стандартного отклонения (RSD, %), приведенные в таблице 1.

Таблица 1. Прецизионность методики

Table 1. Precision methods

Образец	О.П., среднее значение (n = 5)	RSD, % (n = 5)	О.П., среднее значение (n = 10)	RSD, % (n = 10)	О.П., среднее значение (n = 15)	RSD, % (n = 15)
Low Positive Control	0,73	10,2	0,73	11,2	0,74	10,0
High Positive Control	3,17	1,1	3,17	1,0	3,17	0,9

Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) соответствуют нормам [14] (не более 20 % для нижнего диапазона линейности, не более 15 % – для остальных точек).

Предел количественного определения (ПКО) методики определяли на основании данных по прецизионности. Предел определения методики составил 23 нг/мл (концентрация антител к пэгфилграстиму в образце Low Positive Control согласно инструкции к набору).

По результатам валидации методика была признана пригодной для оценки наличия антител к пэгфлиграстиму, оценки ингибирования и установления титра антител.

Скрининг образцов

Процедуре скрининга были подвергнуты образцы сыворотки крови пациентов женского пола с диагнозом «рак молочной железы», получающих миелосупрессивную терапию. Введение препаратов, в том числе проведение курсов химиотерапии, регистрация нежелательных явлений, отбор образцов для анализа и другие медицинские процедуры осуществлялись в соответствующем клиническом центре согласно протоколу исследования. Режим дозирования лекарственных препаратов пэгфилграстима – 6 мг, подкожно, через 24 часа после введения цитотоксических химиотерапевтических средств, число курсов химиотерапии – 4. Отбор проб для оценки иммуногенности проводился в 1 визит, 5 визит (13 неделя после визита 1), 6 визит (26 неделя после визита 1).

В общей сложности процедуре скрининга было подвергнуто 60 образцов. Анализ проводился в двух повторах. Процедура анализа включала следующие этапы:

- подготовка реагентов, входящих в состав ИФА-набора, разморозка проб;
- разбавление образцов в 100 раз и внесение их в лунки планшета;
- инкубация в течение 60 минут при температуре 25 °С;
- трехкратная промывка планшета;
- внесение детектирующего агента;
- инкубация в течение 60 минут при температуре 25 °С;
- трехкратная промывка планшета;
- внесение субстрата (тетраметилбензидин);
- инкубация в течение 15 минут при температуре 25 °С;
- внесение стоп-реагента;
- измерение оптической плотности при длине волны 450 нм и референсной длине волны 630 нм.

Для определения «потенциально положительных» образцов сыворотки крови на этапе скрининга было выбрано значение предела исключения мето-

дики (screening cut-point). Предел исключения определяли согласно инструкции к набору по следующей формуле:

$$\text{Cut point} = \text{Ср. знач. ОП} + 2 \text{ S.D.},$$

где Cut point – предел исключения для этапа скрининга; Ср. знач. ОП – среднее значение оптической плотности 6 образцов интактной сыворотки крови; S.D. – стандартное отклонение для значений оптической плотности 6 образцов интактной сыворотки крови.

По результатам анализа значение предела исключения для этапа скрининга составило 0,373 о.е. Соответственно, «потенциально положительными» были признаны исследуемые образцы, оптическая плотность которых превышала значение предела исключения. На этапе скрининга 2 пробы были признаны «сомнительными» (оптическая плотность находилась в диапазоне $\pm 10\%$ от cut point) и 3 пробы были признаны «потенциально положительными».

Подтверждающий анализ

Для проб, признанных «сомнительными» или «потенциально положительными», был проведен подтверждающий анализ. Процедура подтверждающего анализа в целом повторяла этапы проведения ИФА при скрининге, однако в исследуемые и контрольные образцы добавляли пэгфилграстим. Анализ проводился в двух повторах.

В результате проведения подтверждающего анализа было выявлено, что во всех исследованных образцах происходит снижение оптической плотности (ингибирование сигнала) при внесении в образец лекарственного средства пэгфилграстим, что говорит о наличии видоспецифических антител в данных образцах.

Для каждого образца был рассчитан процент ингибирования в соответствии с формулой:

$$X = 100 \times [1 - (A/B)],$$

где А – оптическая плотность образца с добавлением ЛС; В – оптическая плотность образца без добавления ЛС; О.П. – оптическая плотность.

Процент ингибирования составил 90–94 %.

Определение титра антител

Для установления титра антител проводили анализ контрольных образцов, «положительных» исследуемых образцов (с добавлением пэгфилграстима и без него), а также исследуемых образцов, разбавленных в 2, 4, 8 и 16 раз с помощью буфера для разбавления проб (assay buffer входит в состав набора). В остальном схема анализа повторяла этапы проведения ИФА при скрининге. Разведения образцов было выбрано таким образом, чтобы оптическая плотность как минимум одного из разведений была ниже

значения предела исключения. Титр антител в исследуемых образцах – максимальное разведение, при котором значение ОП исследуемого образца превышает значение предела исключения. Титр антител к пэгфилграстиму во всех исследуемых образцах составил 1:4.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения работы была проведена валидация методики определения антител к пэгфилграстиму в сыворотке крови по следующим валидационным параметрам: селективность, прецизионность, предел определения. Образцы, полученные от клинического центра, были подвергнуты скринингу на наличие антител к пэгфилграстиму (общее количество проб – 60), 2 пробы были признаны «сомнительными» и 3 пробы были признаны потенциально «положительными». В ходе подтверждающего анализа все исследованные пробы были признаны положительными. Для них был рассчитан процент ингибирования, который составил 90–94 %, а также установлен титр антител к пэгфилграстиму, равный 1:4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Нейпоген®. Available at: https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_2263.htm.
2. Динова Е. А., Зимин С. Б., Щербина А. Ю. Применение препарата Грасальва в лечении первичной и вторичной иммунной нейтропении у детей. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. 2008; 7(4): 38–40.
3. Грицаев С. В., Кузяева А. А., Запорева И. М. и др. Опыт применения пэгфилграстима в посттрансплантационном периоде у больных множественной миеломой при трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2016; 58 (4): 37–44.
4. Алексеева Е. И., Валиева С. И., Бзарова Т. М. и др. Эффективность и безопасность отечественного рекомбинантного человеческого гранулоцитарного колониестимулирующего фактора при нейтропениях, развивающихся на фоне анти- в клеточной и иммуносупрессивной терапии у больных ювенильным ревматоидным артритом. *Вопросы современной педиатрии*. 2010; 9(4): 94–100.
5. Финогенова Н. А. Характеристика гранулоцитарного колониестимулирующего фактора: показания к применению. *Современная онкология*. 2007; 9(4): 18–20.
6. Неуластим®. Available at: https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_35598.htm.
7. Липэпфилграстим. Available at: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_6542.htm.
8. Эмпэгфилграстим. Available at: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_6712.htm.
9. Pegfilgrastim. Available at: <https://www.drugs.com/monograph/pegfilgrastim.html>.
10. Kramer D. Binding Antibodies: Assay Methodologies, Screening Confirmation, Characterization of Anti-Drug-Antibodies. *EIP Open Symposium Munchen 2013*. Germany. 2013.
11. A Comparison of Proposed Biosimilar LA-EP2006 and Reference Pegfilgrastim for the Prevention of Neutropenia in Patients With Early-Stage Breast Cancer Receiving Myelosuppressive Adjuvant or Neoadjuvant Chemotherapy: Pegfilgrastim Randomized Oncology (Supportive Care) Trial to Evaluate Comparative Treatment (PROTECT-2), a Phase III, Randomized, Double-Blind

- Trial. *Oncologist*. 2016; 21(7): 789–794. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0011>.
12. Advani S. H., Achrecker S., Thomas D., Krishnanrutty B. Granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim) in chemotherapy-induced febrile neutropenia. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*. 2010; 31: 79–82. DOI: 10.4103/0971-5851.73590.
 13. Waller C., Ranganna G. M., Pennella E. et al. Comparison of Immunogenicity between the Proposed Pegfilgrastim Biosimilar MYL-1401H and Reference Pegfilgrastim. *Blood*. 2017; 130: 3568. DOI: https://doi.org/10.1182/blood.V130.Suppl_1.3568.3568/
 14. А. Н. Миронов. Руководство по экспертизе лекарственных средств. – М.: Гриф и К. Том I. 2013: 328.

REFERENCES

1. Neupogen®. Available at: https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_2263.htm (in Russ.).
2. Dinova E. A., Zimin S. B., Shcherbina A.Yu. Grasalva treatment of primary and secondary immune neutropenia in children. *Pediatric Hematology / oncology and Immunopathology*. 2008; 7(4): 38–40 (in Russ.).
3. Gritsaev S. V., Kuzyaeva A. A., Zapreeva I. M. et al. Pegfilgrastim after autologous stem cell transplantation in patients with multiple myeloma Federal State Budget Institution «Russian Research Institution of Hematology and Transfusiology at Federal Medical Biological Agency». *Medicine of Extreme Situations*. 2016; 58 (4): 37–44 (in Russ.).
4. Alekseeva E. I., Valieva S. I., Bzarova T. M. et al. Effectiveness and safety of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in treatment of granulocytopenia developed during immunosuppressive therapy in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Current pediatrics*. 2010; 9(4): 94–100 (in Russ.).
5. Finogenova N. A. Characteristics of granulocyte colony stimulating factor: indications for use. *Journal of Modern Oncology (Sovremennaya onkologiya)*. 2007; 9(4): 18–20 (in Russ.).
6. Neulastim®. Available at: https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_35598.htm (in Russ.).
7. Lipegfilgrastim. Available at: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_6542.htm (in Russ.).
8. Empegfilgrastimum. Available at: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_6712.htm (in Russ.).
9. Pegfilgrastim. Available at: <https://www.drugs.com/monograph/pegfilgrastim.html>.
10. Kramer D. Binding Antibodies: Assay Methodologies, Screening Confirmation, Characterization of Anti-Drug-Antibodies. *EIP Open Symposium Munchen 2013*. Germany. 2013.
11. A Comparison of Proposed Biosimilar LA-EP2006 and Reference Pegfilgrastim for the Prevention of Neutropenia in Patients With Early-Stage Breast Cancer Receiving Myelosuppressive Adjuvant or Neoadjuvant Chemotherapy: Pegfilgrastim Randomized Oncology (Supportive Care) Trial to Evaluate Comparative Treatment (PROTECT-2), a Phase III, Randomized, Double-Blind Trial. *Oncologist*. 2016; 21(7): 789–794. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0011>.
12. Advani S. H., Achrecker S., Thomas D., Krishnanrutty B. Granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim) in chemotherapy-induced febrile neutropenia. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*. 2010; 31: 79–82. DOI: 10.4103/0971-5851.73590.
13. Waller C., Ranganna G. M., Pennella E. et al. Comparison of Immunogenicity between the Proposed Pegfilgrastim Biosimilar MYL-1401H and Reference Pegfilgrastim. *Blood*. 2017; 130: 3568. DOI: https://doi.org/10.1182/blood.V130.Suppl_1.3568.3568.
14. Mironov A. N. Guidelines for the examination of medicines. V. I. – М.: Гриф и К. 2013: 328 (in Russ.).