

Ежегодная конференция с международным участием «Разработка и регистрация биотехнологических лекарственных средств» состоялась 25 июня

В этот раз ежегодная научно-практическая конференция состоялась в живом формате в Москве. Организаторами конференции выступили ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» и научно-производственный журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств». Мероприятие прошло 25 июня в Москве в Технопарк «КАЛИБР». Мероприятие было посвящено жизненному циклу биотехнологических лекарственных средств. Мы обсудили отдельные аспекты разработки, исследований и производства различных групп биотехнологических лекарственных средств, таких как моноклональные антитела, низкомолекулярные гепарины, инсулины, пептидные препараты и другие.

The annual conference with international participation "Development and registration of biotechnological drugs" was held on June 25

This time the annual scientific and practical conference was held in a live format in Moscow. The conference was organized by Center of Pharmaceutical Analytics and research and production peer-reviewed journal "Drug development & registration". The event took place on June 25 in Moscow in Technopark "KALIBR". The event was dedicated to the life cycle of biotechnological medicines. We discussed certain aspects of the development, research and production of various groups of biotechnological drugs, such as monoclonal antibodies, low molecular weight heparins, insulins, peptide drugs, and others.

Лекторами конференции выступили представители академической общественности, фармацевтических предприятий, а также регуляторных органов.

Мероприятие прошло при поддержке наших партнеров: ТД Химмед, компания Аврора, Сарториус РУС, ДИАЭМ, ЭРВЕКА.

Программа конференции состояла из нескольких секций, посвященных различным вопросам исследования биопрепаратов.

Отрывал конференцию доклад **Игоря Шохина**, д. фарм. н., генерального директора ООО «ЦФА», о роли исследовательских лабораторных центров в борьбе с пандемией COVID-19. **Игорь Евгеньевич** рассказал о работе исследовательского центра на примере ЦФА, группах исследуемых препаратов, а также применяемых методиках.

О Центре:

- ✓ Лабораторный исследовательский центр, сертифицированный по GLP (ГОСТ 33044).
- ✓ Три лаборатории: две биоаналитические (ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ-МС/МС, ИФА-анализаторы), одна фарм. аналитическая (тест «Растворение», ВЭЖХ с различными видами детектирования).
- ✓ 20 сотрудников, 3 кандидата фарм наук, 1 доктор фарм наук.

Группы препаратов, исследуемых в Центре:

- ✓ Низкомолекулярные гепарины-биоаналоги (эноксапарин натрия, надропарин кальция): сравнительные исследования специфичности *in vitro* (анти-Ха, анти-IIa активность), аналитический этап клинического сравнительного исследования фармакокинетики и фармакодинамики (анти-Ха, анти-IIa

активность, TFPI), иммуногенности (анти-лекарственные антитела, вызывающие гепарин-индуцированную тромбоцитопению).

- ✓ Новые оральные антикоагулянты (ривароксабан): сравнительный тест кинетики растворения для биосерий препарата (10 и 20 мг), био-вейвер для дополнительных дозировок (2,5 и 15 мг), биоаналитический этап исследования биоэквивалентности.
- ✓ Противовирусные препараты (фавипиравир): исследование фармакокинетики в рамках фазы 1 клинического исследования для новой лекарственной формы препарата (раствор для инфузий).
- ✓ Ингибиторы интерлейкинов (новая биотехнологическая молекула-моноклональное антитело RPH-104): исследование фармакокинетики и иммуногенности (анти-лекарственные антитела) у разных популяций пациентов.
- ✓ Препараты иммуноглобулинов (КОВИД-глобулин): исследование фармакокинетики в рамках фазы 1 (добровольцы) и фазы 2 (пациенты).

Виктор Милокумов, Сарториус РУС, в рамках секции *оборудование для исследования биотехнологических препаратов*, рассказал об обеспечении целостности, достоверности и соответствия требованиям GxP результатов лабораторных измерений массы с применением весов Sartorius Cubis II.

Целостность и достоверность лабораторных данных критически важны для обеспечения доверия к результатам испытаний и исследований, и в результате – к качеству продукции. Особенную важность в

современных условиях это приобретает в сфере разработки и производства лекарственных средств.

На территории Российской Федерации данные требования регулируются правилами надлежащей лабораторной и производственной практики (GxP). Суммировать эти требования можно следующим образом:

- оборудование должно обеспечивать требуемую точность измерений;
- оборудование должно быть поверено и откалибровано;
- все действия с оборудованием должны сохраняться;
- оборудование и записи должны быть защищены от несанкционированного доступа;
- данные должны храниться длительное время, быть защищены от повреждений, потери и изменений.



При разработке новой серии весов компанией Sartorius особый упор был сделан на соответствие требованиям фармацевтической отрасли, в связи с чем в серии весов Cubis II реализован набор программных и аппаратных функций, направленных на обеспечение точности, а также целостности и достоверности результатов измерений, в том числе:

- автоматическая калибровка по времени и температуре;
- автоматическая установка по уровню;
- автоматическая компенсация погрешности от нецентрального положения нагрузки;
- автоматический встроенный ионизатор для удаления статического заряда с образцов;
- центр приложений с более 60 приложениями, объединенных в тематические пакеты;
- измерительные задачи с гибкими настройками и пошаговыми инструкциями по их выполнению;
- настраиваемый формат протокола с идентификацией весов, объекта взвешивания, измерительной задачи, даты и времени;
- «алиби-память», сохраняющая все результаты измерений;
- контрольный журнал, сохраняющий все действия с весами;

- функция электронной подписи протокола;
- функция контроля минимальной навески;
- приложение «Пользовательская калибровка» для контроля погрешности измерений;
- широкий набор интерфейсов и поддерживаемых форматов передачи данных
- управление пользователями с разграничением уровней доступа и политикой паролей.

Данные решения позволяют гарантировать полную целостность и достоверность результатов измерений в соответствии с требованиями надлежащей лабораторной и производственной практики, а также Фармакопеи США и Европейского союза. Более того, весы Cubis II – это единственные в мире весы, в которых без использования дополнительного программного обеспечения реализовано соответствие принципам ALCOA+ – наиболее распространенной схемы для обеспечения целостности и достоверности лабораторных данных.

Продолжил секцию доклад **Леонида Усовича**, ДИАЭМ, о применении одноразовых технологий для масскультивирования клеток и очистки фармстанций.

Сегодня на биофармацевтическом рынке четко прослеживается тенденция перехода к использованию одноразовых материалов. Если в 2006 году одноразовые реакторы составляли 21 % от суммы всех произведенных многоразовых установок, то к 2013 году соотношение поднялось до 81 %. Данный скачок роста говорит о явных преимуществах таких технологий, связанных с удобством, гибкостью, сокращением времени запуска, а также легкостью адаптации при переходе на выпуск нового продукта.

В чем же заключается привлекательность перехода к одноразовым решениям?

1. Снижение риска контаминации. Риск составляет порядка 3 %. Это невысокий показатель. Но когда речь идет о дорогостоящем и долгом процессе, каждая забракованная серия может вылиться во многомиллионные потери.
2. Сокращение производственного цикла. Подготовка отнимает до 8 часов времени и задействует минимум двух квалифицированных операторов.
3. Простота использования. Однозначность, скорость и легкость использования уменьшают риск ошибки.

При выборе технологии в расчет берутся некоторые капитальные затраты.

- При строительстве помещений учитывают: стоимость, сроки, площадь.
- Наличие необходимой инфраструктуры: сип мойка, парогенератор, обвязка реактора.
- Оборудование: стоимость, время установки, обслуживание.

Одноразовые технологии помогают сэкономить 30 % электроэнергии для работы, 62 % энергии, потребляемой для производства системы, 87 % воды и 95 % моющих средств в сравнении с классическим оборудованием (рисунок 1).

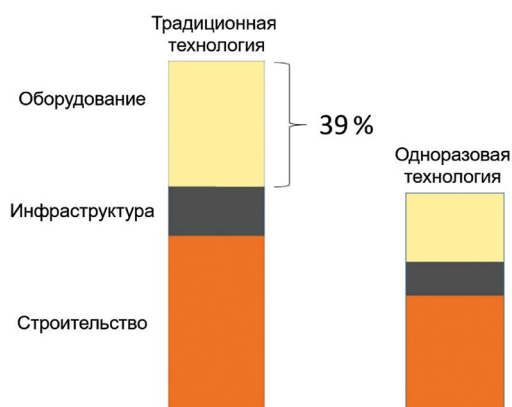


Рисунок 1. Экономия 39 % на этапе проектирования
Figure 1. Savings of 39 % during the design phase

При выборе поставщика одноразовых решений необходимо понимать некоторые важные критерии:

1. Безопасность состава и отсутствие влияния на скорость роста чувствительных линий клеток.
2. Прочность и надежность полимерной пленки одноразовых мешков.
3. Гарантия стабильности поставок.

Компания ДИАЭМ, совместно с компанией Thermo Fisher Scientific развивает направление одноразовых технологий, связанное с производством фармстанций по стандартам GMP и GLP. Thermo FS уже более 20 лет занимается разработкой продуктов и систем разового использования, и зарекомендовала себя как поставщик надежных материалов для лабораторий и производств.

В рамках секции, посвященной исследованиям биоаналогичности, руководитель медицинского департамента ГЕРОФАРМ, **Игорь Макаренко**, рассказал о разработке и доклинических исследованиях биосимиляров инсулинов. Медицинский научный советник отдела ранних фаз клинических исследований ГЕРОФАРМ, **Артем Доротенко**, выступил с докладом на тему «Изучение фармакокинетики и фармакодинамики высококонцентрированных инсулинов».

Мария Колганова, старший химик-аналитик ООО «ЦФА», поделилась со слушателями особенностями проведения исследований фармакокинетики и иммуногенности препаратов моноклональных антител.

Моноклональные антитела (МкАТ) – это антитела, вырабатываемые иммунными клетками, принадлежащими к одному клеточному клону, то есть произошедшими из одной плазматической клетки-предшественницы. Моноклональные антитела обладают высокой молекулярной специфичностью для соответствующих им биологических мишеней, поэтому с использованием МкАТ было создано множество методов лабораторной диагностики *in vitro*, а также МкАТ широко применяются для терапии и диагности-

ки различных заболеваний (например, онкологических и аутоиммунных).

Полная валидация аналитической методики для целей анализа фармакокинетики опирается на руководство FDA Bioanalytical Method Validation и Правила проведения исследований биоэквивалентности ЛП в рамках ЕАЭС и включает в себя следующие параметры: MRD, селективность, калибровочная кривая и чувствительность, правильность и прецизионность, линейность разведения, стабильность, специфичность, параллелизм и эффект переноса. По окончании валидационного этапа исследования методику применяют для аналитического этапа (фармакокинетического анализа реальных образцов), следуя при этом описанным в нормативной документации требованиям и критериям приемлемости.

Анализ фармакокинетики: Практическое применение

Анализируемое вещество (МНН)	НПКО	MRD	Дизайн КИ/ДКИ	Эквивалентность
Бевацизумаб	3 мкг/мл	1:1000	Сравн. КИ	Да
Трастузумаб	3 мкг/мл	1:5000	Сравн. КИ	Да
Молекула-ингибитор PD-L1	40 нг/мл	1:50	Несравн. ДКИ	N/A
Молекула-ингибитор ИЛ	1 мкг/мл	1:100	Несравн. КИ	N/A
Цетуксимаб	0,16 мкг/мл	1:1000	Сравн. КИ	N/A

Полная валидация аналитической методики для целей анализа иммуногенности опирается на руководство FDA Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products – Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection и Правила проведения исследований биологических ЛС ЕАЭС, включает в себя следующие параметры: MRD, предел исключения (cut point), чувствительность и концентрация образцов положительного контроля, селективность, прецизионность, толерантность к присутствию ЛП, специфичность и стабильность. Однако, в отличие от методик для фармакокинетического анализа, в методиках оценки иммуногенности возникает проблема интерференции вследствие наличия в образцах исходного биологического препарата МкАТ, который связывается с выявляемыми противолечательными антителами (ADA – anti-drug antibodies). Для преодоления этой проблемы обычно используют один из трех вариантов: откладывают отбор проб иммуногенности на более поздний срок, применяют методики с этапом кислотной диссоциации или используют сильное разведение исследуемых образцов для снижения концентрации мешающего препарата. Оптимальный подход – скомбинировать несколько способов, например, диссоциировать комплексы ADA – ЛП (методики с этапом кислотной диссоциации) и разбавлять образцы буферным раствором, соблюдая при этом баланс между чувствительностью методики и разведением, достаточным для нивелирования фоновой интерференции.

Анализ иммуногенности: Практическое применение

Анализируемое вещество (МНН)	Пробоподготовка	Чувствительность	Дизайн: КИ/ДКИ	Толерантность к ЛП
Бевацизумаб	разведение	63 нг/мл	Сравн. КИ	5 мкг/мл
Трастузумаб	АСЕ, разведение	99,5 нг/мл	Сравн. КИ	50 мкг/мл
Молекула-ингибитор PD-L1	АСЕ, разведение	250 нг/мл	Несравн. ДКИ	50 мкг/мл
Молекула-ингибитор ИЛ	АСЕ, разведение	115 нг/мл	Несравн. КИ	200 мкг/мл
Цетуксимаб	АСЕ, разведение	198,5 нг/мл	Сравн. КИ	200 мкг/мл
Бевацизумаб	АСЕ, разведение	60,8 нг/мл	Сравн. ДКИ	100 мкг/мл

По окончании валидационного этапа исследования методику применяют для аналитического этапа (анализа иммуногенности реальных образцов), который обычно является многоступенчатым и состоит из этапов скрининга образцов, подтверждающего анализа, определения титра антител и определения нейтрализующей активности антител.

Наталья Багаева, биостатистик ООО «ЦФА», в рамках секции *отдельные вопросы исследований био-препаратов* рассказала о статистических методах при проведении валидации методик полуколичественного определения анти-лекарственных антител.

Предел исключения для скрининга определяет как уровень отклика анализа, при котором (и выше) образец определяется как «реактивный» («потенциально положительный») на присутствие anti-drug antibody (ADA), а ниже которого он, вероятно, отрицательный. Допустимый предел исключения анализа устанавливается во время валидации перед исследованием путем систематической и статистической оценки результатов анализа для подмножества образцов, которые считаются репрезентативными для целевой группы пациентов/субъектов, не принимавших лекарственные препараты.

При использовании подхода к оценке иммуногенности, основанного на оценке риска, во время скрининга более целесообразно иметь ложноположительные результаты, чем ложноотрицательные. Скрининговый анализ, который вообще не идентифицирует какие-либо реактивные образцы, может поставить под сомнение способность анализа обнаруживать слабоположительные образцы. Скрининговый анализ, позволяющий выявить некоторые (например, $\geq 5\%$) положительные результаты, которые впоследствии могут оказаться неспецифичными в подтверждающем анализе, обеспечивает уверенность в том, что будут обнаружены истинно низкие положительные результаты. На практике выявление любых ложных срабатываний лучше, чем их отсутствие.

Обычно в клинических исследованиях анализируют значения матрикса от ≥ 50 людей. Из практических соображений в доклинических исследованиях может быть достаточно как минимум 15 образцов. Использование объединенных образцов матрицы для определения предела исключения нецелесообразно, поскольку при тестировании реплицируемых образцов из объединенной смеси измеряется аналитическая, но не биологическая вариация. Если несколько

аналитиков будут проводить анализ исследуемых образцов во время исследования, исследование предела исключения во время предварительной валидации должно включать как минимум двух аналитиков.

Для определения предела исключения необходимо проверить массив данных на нормальность, при необходимости – преобразовать данные и исключить выбросы. Далее необходимо сравнить средние значения и проверить однородность дисперсий для циклов/аналитиков/инструментов. С помощью полученных результатов расчета определяем, какой предел исключения для скрининга будет использован в дальнейшем анализе (рисунок 2).

Для определения предела исключения для подтверждающего анализа необходимо проверить массив данных на нормальность, при необходимости – преобразовать данные и исключить выбросы.

Подробная схема определения предела исключения описана в статье G. Shankar et al. (Shankar G. et al. Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. *J Pharm Biomed Anal.* 2008;48(5):1267–1281.)

Завершил мероприятие доклад **Юлии Амму**, к.б.н., зав. лаб. экспериментальной иммунологии НИИВС им. И. И. Мечникова, о клеточных методах для исследования нейтрализующих антител к терапевтическим белкам.

В ответ на биологические лекарственные препараты образуются несколько типов связывающих антител, но только один тип антител против терапевтических белков является нейтрализующим. Нейтрализующие антитела ингибируют эффекты биологического препарата и приводят к подавлению терапевтического эффекта. При этом остальные связывающие антитела не оказывают прямого воздействия на механизмы терапевтического эффекта, но могут оказывать влияние на фармакокинетические и фармакодинамические характеристики препарата и приводить к развитию анафилактических реакций.

В то время как стандартные иммунные методы, такие как ИФА, могут обнаружить антитела против терапевтических молекул, они не могут выделить из них нейтрализующие антитела (NAb). Таким образом, обнаружение NAb требует использования более специализированных анализов. Клеточные анализы *in vitro* должны имитировать механизм, с помощью которого NAb проявляют свой эффект *in vivo*.

Различают прямой, основанный на непосредственном взаимодействии NAb с клеточными белками, и непрямой анализ определения антител, основанный на конкурентной связи как непосредственно NAb, так и их специфических лигандов с клеточной поверхностью.

Используемая культура клеток должна быть чувствительна и специфична для мишени, анализ должен быть воспроизводимым, минимально подверженным влиянию матричных эффектов и позволять обнаружить NAb в присутствии терапевтического средства.

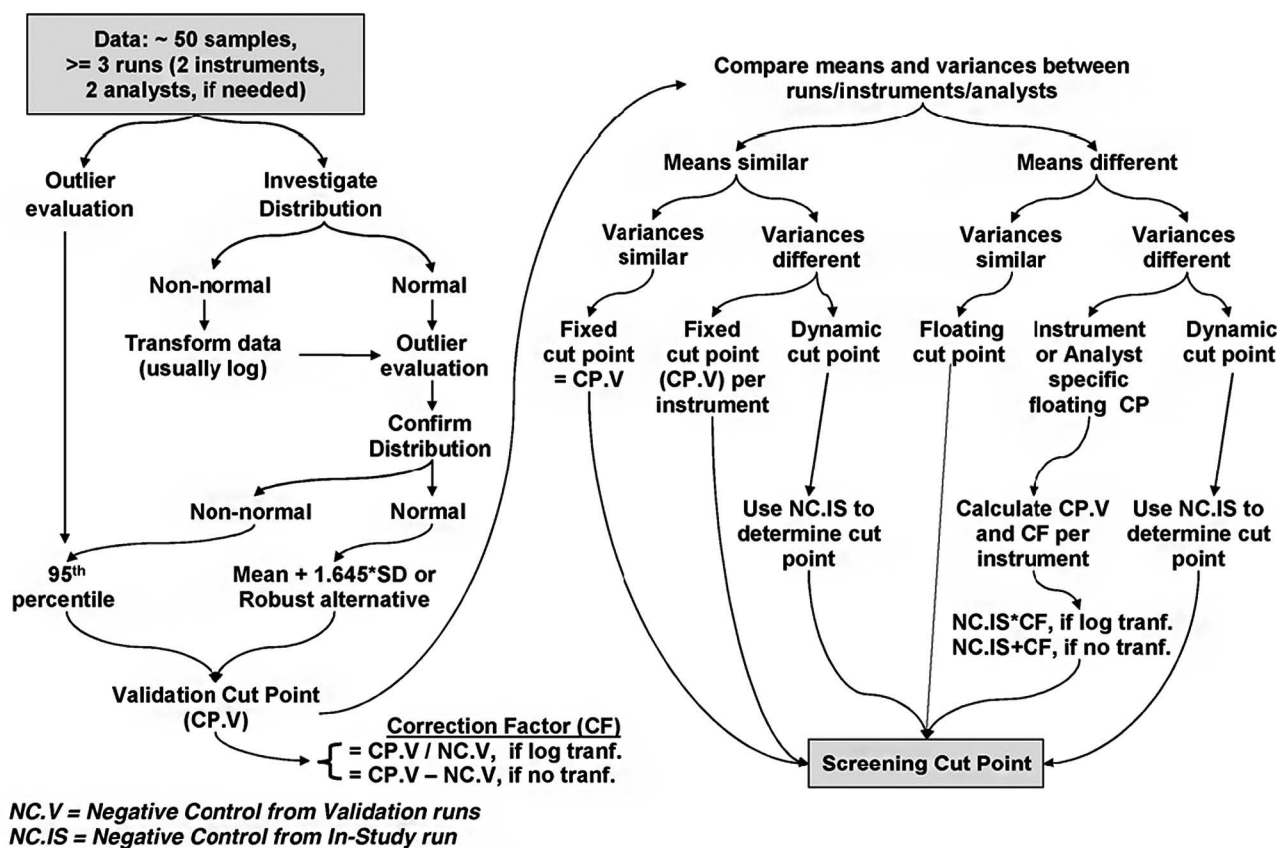


Рисунок 2. Определения предела исключения для скрининга [Shankar G. et al. Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008;48:1272 p.]

Figure 2. Definitions of the screening exclusion limit [Shankar G. et al. Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008;48:1272 p.]

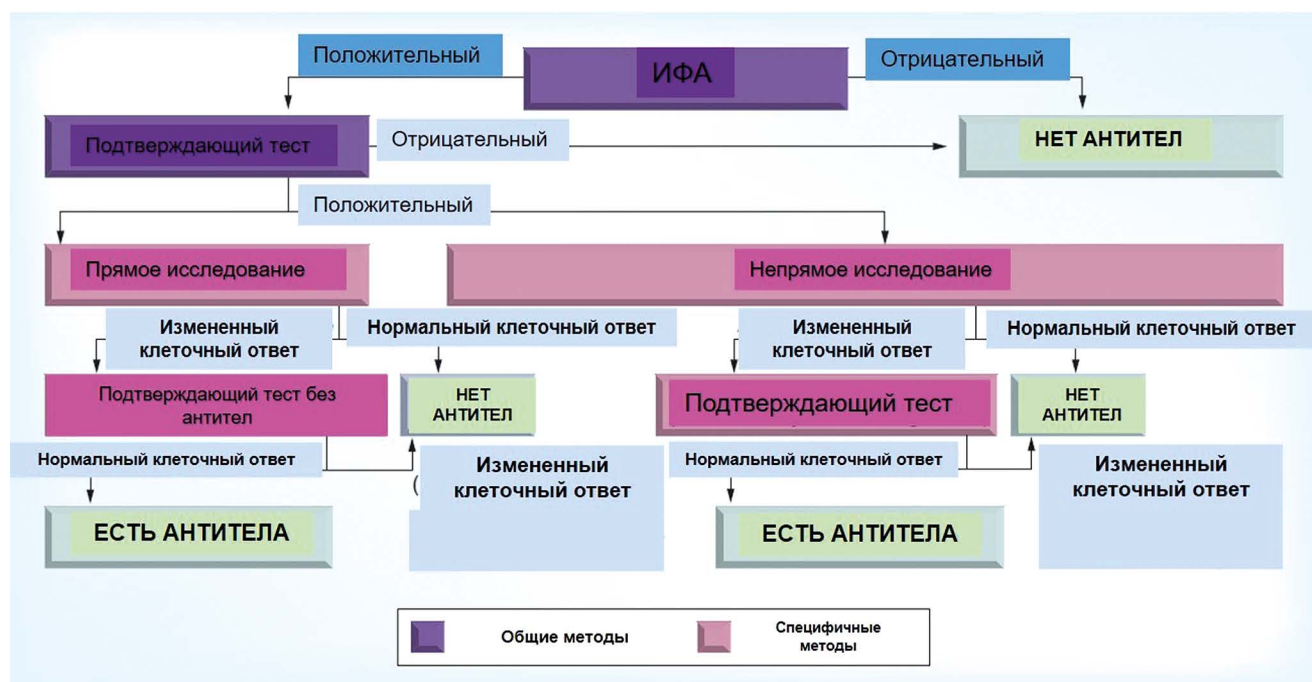


Схема определения предела исключения

В зависимости от механизма действия могут быть реализованы различные форматы анализов, включая анализ: пролиферации клеток и их жизнеспособности, антителозависимой клеточно-опосредованной и комплемент-зависимой цитотоксичности, ингибирования цитопатического эффекта, апоптоза, передачи сигналов клеток, стимулированных лигандами, активности ферментов, репортерных генов, секреции белков, метаболической активности, функции митохондрий. Детекция может проходить по уровню сигналов абсорбции, флуоресценции, люминесценции, хемилюминесценции или проточной цитометрии.

Таким образом, сначала образец проверяют с помощью иммуноанализа (например, ИФА), для обнаружения каких-либо специфических антител к лекарственным средствам. Если образец положительный, его проверяют в подтверждающем количественном тесте. Если образец остается положительный, его проверяют в специфическом анализе на культуре клеток. Если клеточный ответ нормальный (без изменений по сравнению с контролем), образец не содержит NAbs. Образцы, приводящие к изменению измеряемого параметра (реактивные образцы), обычно подвергают дальнейшему тестированию. Реактивные образцы из прямого анализа проверяют в подтверждающем тесте, в котором NAbs удаляют из образца перед испытанием. Отсутствие клеточного ответа указывает на то, что исходный реактивный образец содержал NAbs. Измененный клеточный ответ указывает, что более

ранний результат был ложноположительным, вероятно, из-за наличия активных компонентов в матрице.

Конференция «Разработка и регистрация биотехнологических лекарственных средств» состоялась в живом формате при строгом соблюдении всех противоэпидемических мер. Как докладчики, так и слушатели принимали активное участие в мероприятии, задавая вопросы и участвуя в обсуждении интересующих вопросов. Участники выразили благодарность организаторам конференции и желание принимать участие в подобных мероприятиях в дальнейшем. Для получения дополнительной информации о конференции просьба обращаться к организаторам по электронной почте info@pharmjournal.ru.

О конференции:

Ежегодная научно-практическая конференция «Разработка и регистрация лекарственных средств» проводится 2 раза в год: весна, осень. Организаторами конференции выступают ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» и научно-производственный журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств». Целью мероприятия является обобщение научных и практических достижений в сфере разработки ЛС, обсуждение актуальных вопросов, связанных с разработкой, исследованиями, а также регистрацией ЛС. По вопросу участия в дальнейших мероприятиях как в качестве слушателя, так и в качестве докладчика просьба обращаться к организаторам info@pharmjournal.ru