УТВЕРЖДЕНЫ

Решением Совета
Евразийской экономической комиссии
от « » 20 г. №

ПРАВИЛА
проведения исследований биологических лекарственных средств на территории Евразийского экономического союза

I. ВВЕДЕНИЕ

Настоящие указания по правилам проведения исследований биологических лекарственных средств на территории Еразиийского экономического союза (далее – Правила) разработаны на основе нормативно-правовой базы Евразийского экономического союза (далее – Союз) и международных рекомендаций (ВОЗ, ICH и EMA).

Единые правила исследования биологических препаратов в Союзе необходимы для создания и поддержания системы взаимного признания результатов фармацевтических и биологических испытаний, доклинических и клинических исследований лекарственных препаратов с целью их дальнейшей регистрации. Основополагающими принципами осуществления исследований биологических препаратов является выполнение требований нормативно-правовой базы Союза с учетом национального законодательства в данной области государств-членов Союза, при отсутствии нормативно-правового регулирования вопросов на уровне права Союза.

Выбор вида и объемов фармацевтических и биологических испытаний, доклинической и клинической оценки новых лекарственных препаратов должен основываться на актуальной научной информации.

Основной целью правил исследования биологических препаратов является поддержание высокого уровня проведения фармацевтических и биологических испытаний, доклинических и клинических исследований, их единообразия.

Требования настоящего документа распространяются на разработчиков, исследователей и производителей лекарственных средств, а также держателей регистрационных удостоверений лекарственных препаратов и их доверенных лиц, уполномоченные органы в сфере обращения лекарственных средств, экспертные организации государств – членов Союза.

Цель настоящих Правил – упростить сбор и предоставление данных, прилагаемых к заявкам на регистрацию биологических лекарственных препаратов. Данные Правила следует рассматривать одновременно с законодательством Союза в сфере обращения лекарственных средств и с другими специализированными документами Союза (в том числе Надлежащими фармацевтическими практиками Союза).

Проведение фармацевтических и биологических, доклинических и клинических исследований биологических препаратов должно проводиться с учетом особенностей, связанных как со свойствами и природой этих препаратов (инактивированные и живые вакцины, биотехнологические препараты на основе рекомбинантных белков, аллергены, препараты из плазмы крови человека, гетерологичные сыворотки и др.), так и сферой их применения в практике здравоохранения.

Классификация биологических лекарственных препаратов

К биологическим лекарственным препаратам относятся иммунобиологические лекарственные препараты, биотехнологические

лекарственные препараты, лекарственные препараты полученные из плазмы крови человека, препараты пробиотиков (эубиотиков), препараты бактериофагов, высокотехнологические лекарственные препараты. Настоящие Правила не распространяются на цельную кровь, плазму и клетки крови человека (за исключением плазмы крови, приготовленной по методу, включающему промышленный процесс), а также антибиотики, если в нормативных документах Союза не сделано соответствующих ссылок на указанные Правила.

II. ТЕРМИНЫ, СОКРАЩЕНИЯ

Аллергены – препараты, получаемые в результате экстракции или с использованием технологии рекомбинатной ДНК, для диагностики и проведения аллергенспецифической иммунотерапии аллергических заболеваний.

Анатоксин – токсин, сохранивший антигенные свойства, но утративший токсичность в результате химического или физического воздействия.

Анатоксины – препараты, содержащие обезвреженные токсины различных видов микробов, которые при введении в организм обеспечивают выработку антитоксического иммунитета и применяются для активной иммунизации.

Банк клеток – набор контейнеров с однородным по составу содержимым, который хранят в определенных условиях. Каждый контейнер содержит аликвоту одного пула клеток.

Биологическая активность – специфическая способность препарата оказывать заданное биологическое действие. Степень активности – количественная оценка биологической активности.

Биологические лекарственные препараты – лекарственные препараты, действующее вещество которых произведено или выделено из биологического источника, и для описания свойств и контроля качества которых необходимо сочетание биологических и физико-химических методов анализа с оценкой производственного процесса и методов его контроля.

Биоподобные (биоаналогичные, биосимиляры) лекарственные препараты – биологический лекарственный препарат, который содержит новую версию действующего вещества зарегистрированного в Союзе оригинального препарата (референтного), и для которого продемонстрировано сходство (подобие) на основании сравнительных исследований с референтным препаратом по показателям качества, биологической активности, эффективности и безопасности.

Биотехнологический лекарственный препарат – лекарственный препарат, произведенный путем биотехнологических процессов с применением рекомбинантной ДНК-технологии, метода контролируемой экспрессии генов, кодирующих выработку биологически активных белков, с применением моноклональных антител, полученных с помощью гибридомных технологий, тканевой инженерии.

Биотехнология – производство промышленной продукции на основе ферментов или микроорганизмов, в том числе со свойствами, измененными при помощи методов генной инженерии, или из биологического источника с использованием высокой степени очистки.

Вакцина – препарат, получаемый из живых аттенуированных штаммов или убитых культур микроорганизмов, или их антигенов, предназначенный для активной иммунизации людей и животных.

Вирус – внутриклеточно реплицирующиеся инфекционные агенты, обычно являющиеся патогенными и несущие только один тип нуклеиновой кислоты (либо РНК, либо ДНК), не способны расти и не подвергаются бинарному делению; размножаются генетическим материалом.

Вирусоподобные частицы – структуры, различимые под электронным микроскопом, морфология которых сходна с морфологией известных вирусов.

Высокотехнологичные лекарственные препараты – генотерапевтические лекарственные препараты, лекарственные препараты на основе соматических клеток, препараты тканевой инженерии.

Генотерапевтические лекарственные препараты – лекарственный препарат следует считать генотерапевтическим, если в его состав входит генетически модифицированный микроорганизм (ГММ). Должна быть исследована возможность выделения ГММ после введения препарата и предусмотрен последующий мониторинг окружающей среды. Для подобных препаратов требуется предоставление информации о вероятности обмена генетической информации с природными штаммами и другими микроорганизмами. Для получения данной информации может потребоваться проведение соответствующих доклинических исследований.

Главный Банк Клеток (ГБК) – аликвота из единого пула клеток, которую обычно получают из выбранного клона клеток в заданных

условиях, распределяют по множеству контейнеров и хранят в заданных условиях. ГБК применяют для получения всех Рабочих банков клеток. Анализ, проводимый на новом ГБК (полученном из предшествующего первоначального клона клеток, ГБК или Рабочего банка клеток), должен совпадать с анализом предшествующего ГБК, если не была обоснована другая последовательность действий.

Иммуно(био)логические лекарственные препараты – лекарственные препараты, предназначенные для формирования активного или пассивного иммунитета, или диагностики наличия иммунитета, или диагностики (выработки) специфического приобретенного изменения иммунологического ответа на аллергизирующие вещества. К иммунобиологическим лекарственным препаратам относятся вакцины, анатоксины, токсины, сыворотки, иммуноглобулины и аллергены.

Иммуногенность препарата – способность биологического (иммунобиологического) лекарственного препарата индуцировать специфические антитела или факторы клеточного иммунитета (в случае вакцинного препарата – обеспечивающие защиту человека от соответствующих микроорганизмов).

Иммуноглобулины – препараты, получаемые из сыворотки крови человека путем фракционирования донорской, плацентарной крови человека с извлечением активной иммуноглобулиновой фракции; специфические иммуноглобулины направленного действия: противостолбнячный, противогриппозный, против клещевого энцефалита, противостафилококковый и др.

Инактивация – снижение инфицирующей способности вируса, обусловленное его химической или физической модификацией.

Исследование процесса очистки от вирусов – исследование элиминации вирусов, в котором используют неспецифичные, «релевантные» и (или) специфичные «модельные» вирусы для определения способности процесса производства удалять и (или) инактивировать вирусы.

Исследование биоаналогичной сопоставимости – исследования обосновывающие подобие (сходство) референтного и биоподобного лекарственного препарата в процессе разработки последнего.

Исследование сопоставимости – исследование обосновывающее подобие (сходство) препарата после внесения изменений в его технологию (процесс) производства относительно препарата, произведенного по неизмененной технологии.

Клетки-продуценты – клетки, используемые для производства препарата.

Клеточная линия – тип клеточной популяции, образующейся путем последовательных пересевов популяции первичных клеток, которую можно использовать для создания банка клеток.

Клеточный возраст *in vitro* (продолжительность жизни клеток *in vitro*) – период с момента оттаивания флаконов с клетками Главного банка (МСВ) до сбора выхода препарата в производственной емкости, измеряемый по прошедшему времени в культуре, степени удвоения популяции клеток или по числу пассажей клеток при культивировании.

Клеточный субстрат – клетки, используемые для производства иммунобиологического лекарственного продукта

Контаминанты – любые случайно занесенные материалы (например, химические, биохимические или вирусные и микробные

агенты), не используемые в процессе производства лекарственной субстанции или лекарственного препарата.

Лекарственные препараты на основе соматических клеток – препараты, которые содержат жизнеспособные человеческие клетки (в том числе генетически модифицированные) аллогенного или аутологичного происхождения, подвергающиеся процессу производства.

Лекарственные препараты, полученные из плазмы – лекарственные препараты, произведенные промышленным способом из компонентов крови человека. К данным препаратам относятся альбумины, факторы свертывания крови и иммуноглобулины человеческого происхождения.

Линия диплоидных клеток (диплоидная клеточная линия) - клеточная линия, обладающая конечной продолжительностью жизни *in vitro*, в которой хромосомы являются парными (эуплоидными) и структурно идентичными хромосомам видов, из которых эти клетки были получены.

Необработанный нерасфасованный продукт – см. **Промежуточный продукт**

Неспецифичный модельный вирус – вирус, используемый для характеристики способности процесса элиминации вирусов удалять и (или) инактивировать вирусы в целом, т. е. надежность процесса очистки.

Неэндогенный вирус – вирусы из внешних источников, присутствующие в главном банке клеток.

Очистка от вирусов – элиминация вируса путем физического удаления частиц вируса или инактивация его инфицирующей способности.

Перевиваемая клеточная линия – клеточная линия, обладающая бесконечной возможностью роста. Такую клеточную линию часто называют «бессмертной».

Пилотная серия (опытно-промышленная серия, валидационная серия) – серия фармацевтической субстанции или лекарственного препарата, изготовленная способом, который полностью соответствует и воспроизводит промышленный способ производства.

Посторонний вирус – непреднамеренно попавший в продукт контаминирующий вирус.

Предельный для производства клеточный возраст *in vitro* – величина, равная или не превышающая предлагаемую продолжительность культивирования клеток при указанных условиях для производственного процесса.

Препарат сравнения – зарегистрированный препарат с установленными значениями содержания компонентов, обладающий наилучшей эффективностью, а при его отсутствии любой зарегистрированный препарат, используемый для сравнения в клиническом исследовании и предназначенный для подтверждения правильности проведения исследований.

Промежуточный продукт – для биологических препаратов это материал, получаемый в процессе производства и не являющийся лекарственной субстанцией или лекарственным препаратом, его производство является критическим этапом технологического процесса.

Для завершения определенного этапа перед продолжением процесса производства следует измерить количество промежуточного продукта и определить соответствующие спецификации. К промежуточным продуктам могут относиться вещества, подвергаемые дальнейшей молекулярной модификации или сохраняемые на протяжении длительного периода времени перед дальнейшей переработкой.

Промышленная серия – серия фармацевтической субстанции или лекарственного препарата, произведенная промышленным способом с использованием производственного оборудования на производственной площадке, указанной в досье.

Рабочий банк клеток (РБК) – рабочий банк клеток готовят из аликвот гомогенной суспензии клеток, полученных при культивировании Главного банка клеток в заданных условиях.

Реактогенность вакцин – свойство препарата вызывать местные или общие реакции организма.

Рекомбинантные лекарственные препараты – лекарственные препараты, произведенные при помощи технологии рекомбинантной ДНК, разработанные для диагностики, профилактики и лечения заболеваний.

Релевантный вирус – вирус, используемый в исследованиях процесса элиминации вирусов. Он является либо идентифицированным вирусом, либо вирусом того же вида, что и известный вирус, контаминирующий клеточный субстрат и (или) реагенты или материалы, используемые в процессе производства.

Родительские клетки (исходные клетки, клетка-хозяин, host-cells) – клетки, используемые для создания клеточного субстрата или промежуточной клеточной линии. В случае экспрессионных систем на

основе микроорганизмов родительские клетки обычно называют клетками хозяина. В случае гибридом родительские клетки также называют сливающимися клетками.

Соответствующий (релевантный) вид животных – вид животных, для которого исследуемый препарат фармакологически (биологически) активен, что обусловлено наличием соответствующих рецепторов или эпитопов.

Специфичный «модельный» вирус – вирус, обладающий близким родством с известным или предполагаемым контаминирующим вирусом (того же рода или семейства), имеющий физические и химические свойства, подобные свойствам предполагаемого контаминирующего вируса.

Сыворотки иммунные – препараты, полученные путем специальной обработки крови искусственно иммунизированных животных, а также крови людей, перенесших соответствующее заболевание или иммунизированных соответствующим вакцинным препаратом.

Элиминация вирусов – удаление частиц вируса физическим способом или инактивация его инфицирующей способности.

Эндогенный вирус – вирус, геном которого интегрирован в геном клетки животного, из которого была получена родительская клеточная линия. В настоящем документе к эндогенным вирусам также относятся преднамеренно введенные, неинтегрированые вирусы, такие как вирус Эпштейна–Барр, используемый для иммортализации клеточных субстратов, или вирус папилломы крупного рогатого скота.

Препараты пробиотиков (эубиотиков) – препараты, действующим веществом которых являются непатогенные для человека

бактерии или другие микроорганизмы, обладающие антагонистической активностью в отношении патогенных и условно патогенных микроорганизмов и обеспечивающие восстановление нормальной микрофлоры человека или выполняющие другие полезные для человека функции через стабилизацию и оптимизацию функции его нормальной микрофлоры.

Препараты бактерофагов – препараты на основе вирусов, способных проникать в бактериальную клетку, размножиться в ней, вызывать ее лизис или переход в состояние лизогении (фагоносительства).

В настоящих Правилах применяют следующие сокращения:

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГБК – главный банк клеток

ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа

ГММ – генетически модифицированный микроорганизм

ГНТ – гиперчувствительность немедленного типа

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИГ – иммуноглобулин

ИФА – иммуноферментный анализ

$ЛД_{50}$ – доза, вызывающая гибель 50% животных

МЕ – международная единица

НЛР – нежелательная лекарственная реакция

НЯ – нежелательное явление

ОФС – общая фармакопейная статья

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РБК – рабочий банк клеток

РНК – рибонуклеиновая кислота

РТГА – реакция торможения гемагглютинации

СНЯ – серьезная нежелательная реакция

ФС – фармакопейная статья

ЦНС – центральная нервная система

GXP – правила, распространяющиеся на все этапы обращения лекарственных средств и устанавливающие общие требования к Надлежащей лабораторной практике (GLP), Надлежащей клинической практике (GCP), Надлежащей производственной практике (GMP), Надлежащей дистрибьюторской практике (GDP), Надлежащей практике фармаконадзора (GPV) и другие.

Ig – иммуноглобулин

TSE – (Transmissible Spongiform Encephalopathy) трансмиссивная губчатая энцефалопатия

Th – лимфоциты Т-хелперов

IL – интерлейкин

TGF β – трансформирующий фактор роста

HRQoL – связанное со здоровьем качество жизни

VAS – визуальная аналоговая шкала

DBPCFC – двойное слепое, плацебо контролируемое исследование переносимости пищевых продуктов

III. ОСНОВНОЙ ТЕКСТ ПРАВИЛ

ГЛАВА 1. ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНЫХ СУБСТРАТОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ(БИОЛОГИЧЕСКИХ) ПРЕПАРАТОВ

1. Введение, область применения

Ряд проблем, связанных с качеством получаемых из клеток биологических лекарственных препаратов, возникают из-за наличия посторонних контаминантов или обусловлены свойствами клеток, используемых в производстве препарата. Для препаратов, получаемых с использованием технологии рекомбинантной ДНК, кроме того, характерны проблемы качества, связанные с экспрессирующей конструкцией клеточного субстрата. Таким образом, свойства клеточного субстрата и процессов, затрагивающих клеточный субстрат, в результате могут влиять на качество лекарственного препарата и безопасность его применения. Кроме того, эффективный контроль качества этих препаратов требует надлежащей проверки всех манипуляций с клеточным субстратом.

Данная глава дополняет другие главы и рекомендации Комиссии, что позволяет обеспечить всесторонний подход к оценке результатов качества, связанных с биологическими параметрами технологии получения препаратов из культур клеток *Metazoa* и микроорганизмов.

Действие настоящей Главы распространяется на клеточные субстраты, в отношении которых создана система банков клеток. В данном документе под «клеточным субстратом» подразумеваются микробные клетки или линии клеток, выделенные из источников человеческого или животного происхождения, обладающие полным

потенциалом, необходимым для продуцирования в условиях *in vivo* или *ex vivo* биотехнологических (биологических) препаратов для медицинского применения. Реактивы для диагностического применения в условиях *in vitro* в настоящей Главе не рассматриваются. Источники клеточных линий животного происхождения включают все организмы, принадлежащие *metazoa*. Описаны перевиваемые клеточные линии с неограниченной продолжительностью жизни *in vitro*, диплоидные клетки с ограниченным сроком жизни *in vitro*, а также клеточные субстраты микробиологического происхождения: (бактерии, грибы, дрожжи и другие одноклеточные организмы).

Глава включает общие вопросы по стандартам получения клеточных линий человека и животных, микробных клеток, а также вопросы формирования и характеристики банков клеток, используемых для производства биологических препаратов, рекомендации по получению данных, которые необходимо включить в регистрационное досье при подаче заявления на регистрацию биологического препарата в государствах – членах Союза.

Глава касается биологических препаратов, полученных из клеток, культивируемых из банков клеток, за исключением микробных метаболитов, таких как антибиотики, аминокислоты, углеводы и прочие низкомолекулярные вещества. Банки клеток, используемые для получения препаратов для генной терапии или вакцин, должны соответствовать рекомендациям, представленным в настоящей Главе. Некоторые биологические препараты, такие как определенные вирусные вакцины, получают на первичных клеточных культурах, полученных непосредственно из тканей или органов животных. Первичные клетки не используют для создания банка клеток, и поэтому

данный документ на них не распространяется. Однако в Приложении 1 включены другие подходы, которые могут быть применимы к таким первичным клеткам.

2. Требования к клеточным субстратам

2.1. Источник, история и получение клеточного субстрата

Необходимо предоставить первичную документацию, в которой описывается общая информация по клеточному субстрату, используемому для производства биологического препарата, а также общая информация по каждой родительской клеточной линии, из которой клеточный субстрат был выделен полностью или частично. Мероприятия, проводимые на этапе научных исследований и разработок клеточного субстрата, могут оказывать существенное влияние на риски, связанные с использованием в производстве конкретного клеточного субстрата. Представленная в связи с этим информация облегчает всестороннюю оценку рисков, позволяющую гарантировать качество и безопасность применения препарата.

Все производимые с клеточным субстратом манипуляции необходимо подробно документировать на протяжении всего процесса разработки. Описание истории клетки является одним из множества инструментов, используемых при установлении характеристики клеточного субстрата. Как правило, недостаточность данных в описанной истории клеток сама по себе не может служить препятствием для регистрации лекарственного препарата, но отсутствие достаточно большого объема данных может в результате привести к повышенной зависимости от других методов, используемых для характеристики клеточного субстрата.

2.1.2. Происхождение, источник и история клеток

Необходимо указать источник клеток (лабораторная коллекция или коллекция культур), из которого был получен клеточный субстрат, и привести соответствующие ссылки на научный литературный источник. Предпочтительны данные, полученные непосредственно из исходной лаборатории. Если эта информация недоступна, можно использовать данные литературных ссылок.

Для клеточных линий человека необходимо описать следующие характеристики первоначального донора: происхождение ткани или органа, этническое и географическое происхождение, возраст, пол и общее физиологическое состояние. При наличии следует привести данные о состоянии здоровья или анамнез донора наряду с результатами любого тестирования донора на наличие патогенных агентов. Поскольку для диплоидных фибробластов человека возраст донора может влиять на продолжительность жизни клеточной линии *in vitro*, эти данные (при их наличии) следует представлять. При использовании линии животных клеток в описании источника необходимо указать виды, породы, условия разведения, происхождение ткани или органа, географическое происхождение, возраст, пол, а также результаты тестирования на наличие патогенных агентов и общее физиологическое состояние первичного донора.

При использовании микроорганизмов производители должны указать их вид, штамм и известные генотипические и фенотипические характеристики организма, из которого был выделен клеточный субстрат. Производители также должны привести данные по патогенности, токсигенности и прочую информацию о биологической опасности, если таковая имеет место.

Должна быть документально оформлена история культивирования клеток. Наряду с процедурами культивирования клеток *in vitro* и всеми процедурами создания клеточных линий (например, использование физических, химических, биологических методов или введение нуклеотидных последовательностей) необходимо описать метод, первоначально использованный для выделения клеток. Необходимо описать все имевшие место генетические манипуляции или генетический отбор (селекцию). Вся доступная информация, относящаяся к идентификации, характеристикам этих клеток и результатам их испытания на наличие эндогенных или посторонних агентов, тоже должна быть предоставлена.

Для перевиваемых клеточных линий, полученных от *Metazoa*, обычно бывает достаточно определить продолжительность культивирования путем оценки либо числа удвоений популяции, либо числа субкультивирований при определенном коэффициенте разведения или времени культивирования в днях. Для линий диплоидных клеток, обладающих ограниченным сроком жизни *in vitro*, важна точная оценка числа удвоений на протяжении всех стадий исследования, разработки и производства. Для клеток микроорганизмов считают достаточным представление документации, содержащей сведения по определению частоты субкультивирования после создания клеточного субстрата.

В отношении получения клеточного субстрата заявители должны провести тщательный анализ процессов, при использовании которых возможен занос инфекционных агентов. Должно быть представлено описание компонентов культуральной среды, особенно информация, касающаяся воздействия на клетки компонентов человеческого и животного происхождения, таких как сыворотка, ферменты,

гидролизаты или другие живые клетки. Описание должно включать источник, метод приготовления и контроля, результаты испытаний и обеспечение качества. Могут быть приведены соответствующие ссылки на литературные источники, если таковые доступны. Эта информация позволит провести детальный анализ возможных путей проникновения посторонних агентов из перечисленных источников и станет составной частью анализа соотношения риск/польза для препарата.

2.1.3. Создание клеточного субстрата (получение клеток-продуцентов)

Ключевой стадией является выбор подходящей родительской клеточной линии. Для рекомбинантных препаратов родительской клеточной линией служит, как правило, клеточная линия-реципиент, не подвергшаяся трансфекции. В этой ситуации рекомендуется использование охарактеризованных банков родительских клеток. Охарактеризованный банк родительских (исходных) клеток может предоставить данные, на основании которых может быть проведена оценка качества главного банка клеток (ГБК), особенно в случаях, когда множество клеточных субстратов образовано из одного и того же типа родительских клеток. Например, клеточная линия миеломы может быть заготовлена в качестве родительской (исходной) клеточной линии для гибридом.

При окончательной разработке требуемых характеристик в процессе создания клеточного субстрата возможно использование одной или нескольких специфических процедур. К ним относят, например, слияние (гибридизацию) клеток, трансфекцию, отбор клонов, выделение колоний, клонирование, амплификацию генов и адаптацию к специфическим условиям культивирования или средам. Информация,

касающаяся методологии, используемой при разработке клеточного субстрата, может помочь в обеспечении четкого понимания истории клеточного субстрата. Некоторые клеточные субстраты, например, диплоидные фибробласты человека, могут не требовать интенсивной обработки или предварительного клонирования перед созданием банка клеток.

В рекомбинантных препаратах клеточным субстратом служат трансфецированные клетки, содержащие требуемые последовательности, которые были клонированы из единственной клетки предшественника. При создании клеточных субстратов с использованием технологии рекомбинантной ДНК необходимо учитывать рекомендации соответствующего раздела Главы 5.2. Для нерекомбинантных препаратов (в том числе нерекомбинантных вакцин) клеточным субстратом служат клетки из линии родительских (исходных) клеток, отобранных для создания ГБК, без дальнейшей модификации. Для препаратов, получаемых из гибридом, клеточным субстратом служит гибридомная клеточная линия, полученная путем слияния родительской клеточной линии миеломы с другими родительскими клетками, например иммунными клетками селезенки.

2.2. Создание банка клеток

Одним из наиболее важных преимуществ использования серийно субкультивируемых клеток для производства биотехнологических (биологических) препаратов является возможность иметь охарактеризованный общий источник для каждой производственной серии, т.е. иметь законсервированный банк клеток. Производители могут создавать свои собственные банки клеток или получать их из внешних источников. Производители обязаны обеспечивать качество

каждого банка клеток и проводить с каждым из них необходимые испытания.

2.2.1. Система банков клеток

Концепция двухуровневой структуры банка клеток, в которой ГБК используют для создания рабочего банка клеток (РБК), как правило, принимается в качестве наиболее практичного подхода, обеспечивающего получение клеточного субстрата для непрерывного производства препарата. Производители должны описать свою стратегию обеспечения непрерывного получения клеток из банка (банков), включая ожидаемую скорость расходования банка клеток при производстве, ожидаемые интервалы между созданием новых банков клеток и показатели, по которым аттестуют (характеризуют) банки клеток.

Как правило, сначала создают ГБК, обычно непосредственно из исходного клона или из предварительного банка клеток, полученного из исходного клона. Приготовление банка клеток из клонов не является обязательным для определенных типов клеток (например, диплоидных клеток, продолжительность жизни которых *in vitro* ограничена, или при наличии других технических факторов, делающих клонирование клеток непрактичным) или в случаях, когда неклонированная клеточная популяция уже достаточно гомогенна для предполагаемого применения.

Для создания РБК используют один или более контейнеров с клетками из ГБК. Именно РБК, как правило, используют непосредственно для нужд производственного процесса. По мере необходимости из ГБК создают дополнительные РБК. Свежеприготовленный РБК должен быть соответствующим образом

квалицирован путем установления его характеристик и проведения испытаний.

ГБК и РБК могут отличаться друг от друга по ряду параметров, например, компонентам культуральной среды и условиям культивирования. Кроме того, условия культивирования, используемые при приготовлении ГБК и РБК, могут отличаться от используемых в процессе производства. Если изменения процесса культивирования клеток не оказывают неблагоприятного воздействия на качество препарата, повторное клонирование клеток или повторное создание ГБК или РБК не требуется. Необходимо убедиться, что охарактеризоанный банк обеспечивает получение продукта с постоянным качеством.

Допускается использование одноуровневого банка, состоящего только из ГБК и не содержащего РБК, например, если для производства препарата каждый год требуется относительно небольшое число контейнеров с клетками.

В некоторых микробных экспрессирующих системах для каждой новой серии контейнеров с клеточным субстратом проводят новую трансформацию, используя аликвоты тщательно испытанных банков клеток хозяина и банков плазмид для каждой новой трансформации. Кроме того, проводят испытание каждого банка трансформированного клеточного субстрата. Такой банк трансформированного клеточного субстрата рассматривают как ГБК и используют его в качестве источника клеточного субстрата для производственного процесса. Банки клетки хозяина, банки плазмид и ГБК сохраняют с помощью соответствующих методов консервации. Эта альтернативная система считается достаточной, поскольку трансформация бактерий и дрожжей, как правило, представляет легко воспроизводимый процесс, в отличие

от процедуры, применяемой для трансфекции клеток *metazoa*. Производители должны предоставлять информацию о клетках хозяина, молекулах рекомбинантной ДНК (таких как плазмиды), методе трансформации и о создании банка клеток, а также о результатах исследований по характеристике их свойств.

2.2.2. Процедуры создания и поддержания банка клеток

Необходимо предотвратить использование контаминированного клеточного субстрата (или банка клеток) в процессе производства препарата и избежать снижения доступности или производства препарата, или потерь времени при разработке, возникающих в результате необходимости повторного создания банка клеток, который оказался непригодным вследствие контаминации. Ни один режим испытаний банка клеток не позволяет выявлять все возможные контаминанты; поэтому использование описанных предупредительных мер во время создания банка клеток важно для обеспечения достаточной уверенности в отсутствии контаминации, а также для создания надежного источника клеточного субстрата.

Производители должны описать тип используемой системы создания банка, размер банка клеток, тип контейнера (флаконы, ампулы или другие подходящие емкости) и используемую систему укупорки, методы приготовления банка клеток, включая используемые криопротекторы и среду, а также условия криоконсервации и хранения.

Производители должны описать процедуры, используемые для предотвращения микробной контаминации и перекрестной контаминации другими типами клеток, присутствующими в лаборатории, а также описать процедуры, позволяющие отслеживать емкости банка клеток. К этим мероприятиям относят описание системы

документации, а также системы маркировки, которая может выдержать процесс консервации, хранения и восстановления без потери информации нанесенной на контейнер.

Производители должны описать технологию создания и поддержания банка клеток. Как правило, клетки готовят для банка путем наращивания объемов культивирования за счет постепенного увеличения числа сосудов или использования сосудов большего размера до тех пор, пока не смогут получить пул клеток, которого будет достаточно для создания необходимого числа контейнеров с клетками для банка клеток. Для того чтобы обеспечить однородный состав содержимого каждого контейнера, каждый пул клеток для создания банка должен быть приготовлен путем объединения клеток из всех сосудов для культивирования (при использовании более одного сосуда).

Аликвоты клеток, суспендированных в среде для консервации, переносят из объединенного пула в стерильные контейнеры, которые затем укупоривают и хранят в необходимых условиях. Например, клетки животных в средах, содержащих криопротектор, замораживают в укупоренных контейнерах при заданных контролируемых условиях, а затем переносят на хранение в жидком азоте или его парах, или при соответствующих сверхнизких температурах. В зависимости от используемого организма допускается применять иные методы консервации и хранения. Однако они должны позволять поддерживать такую степень жизнеспособности клеток после разведения, которая была бы и постоянной и пригодной для производственных целей.

Для обеспечения постоянного, непрерывного производства лекарственных препаратов производители должны предусмотреть меры по защите от аварийных ситуаций, которые могут привести банк клеток

в непригодное для использования состояние. К таким ситуациям относят: пожары, перебои в электроснабжении и человеческий фактор. Производители должны описать планы предупредительных мероприятий для таких случаев. Например, к подобным мероприятиям можно отнести хранение контейнеров банка клеток в нескольких морозильных камерах, использование резервных источников питания, использование систем автоматизированного заполнения жидким азотом для контейнеров хранения, хранение части ГБК и РБК в удаленных помещениях или регенерация ГБК.

Исходной точкой для оценки возраста клеток *in vitro* в процессе производства должен служить момент оттаивания одного или более контейнеров с ГБК. В случае линий диплоидных клеток продолжительность жизни клеток *in vitro* следует оценивать, исходя из скорости удвоения клеточной популяции. Для диплоидных клеток следует определять допустимый уровень удвоения клеточной популяции, т.е. уровень, при котором наступает биологическое старение.

2.3. Общие принципы установления характеристик и испытания банков клеток

Установление характеристик и испытание клеточных субстратов из банков представляет собой критическую составляющую контроля биологических и биотехнологических препаратов. Установление характеристик ГБК позволяет производителю оценить этот источник с точки зрения наличия клеток других клеточных линий, посторонних агентов, эндогенных агентов и молекулярных контаминантов (например, токсинов или антибиотиков из организма хозяина). Задача подобного тестирования состоит в подтверждении подлинности, чистоты и пригодности клеточного субстрата для использования в

производстве. В некоторых случаях целесообразно проведение дополнительных испытаний, таких как проверка на туморогенность или кариотипирование. Программа проведения испытаний, выбранная для конкретного клеточного субстрата, может варьировать в зависимости от биологических свойств клеток (например, потребности в питательных веществах для роста), истории культивирования клеточного субстрата (включая использование биологических реагентов человеческого или животного происхождения) и наличия подходящих аналитических методик. Объем исследований при установлении характеристик клеточного субстрата может влиять на вид или масштаб стандартных испытаний, необходимых на последующих стадиях производства. Для каждого ГБК производители должны проводить испытания клеточного субстрата на подлинность и чистоту однократно; а также однократное испытание стабильности в ходе культивирования клеток для каждого подлежащего регистрации лекарственного препарата. Кроме того, испытания на чистоту и подлинность, следует проводить однократно для каждого РБК. Заявители также должны принять во внимание Главу 2 настоящих Правил. Необходимо провести соответствующие испытания из числа описанных ниже; их описание и полученные результаты необходимо представить в составе регистрационного досье.

При установлении характеристик клеточных линий, содержащих экзогенные экспрессирующие конструкции, созданные с использованием технологии рекомбинантной ДНК, следует руководствоваться также соответствующими разделами Главы 5.2 настоящих Правил. С помощью аналогичных методов целесообразно также провести анализ кодирующих последовательностей в некоторых клеточных линиях, при получении которых рекомбинантная ДНК не

использовалась, если генные последовательности охарактеризованы и хорошо изучены. Однако, не обязательно проводить исследования последовательностей, кодирующих такие сложные природные продукты, как, например, антигены микробных вакцин, моноклональные антитела из гибридом, семейства родственных генных препаратов.

При установлении характеристики клеточного субстрата и проведении испытаний производителям рекомендуется использовать современные методы и технологические достижения (при их доступности), при условии, что специфичность, чувствительность и прецизионность новых методов, по крайней мере, эквивалентна таковым параметрам существующих методов.

Производители могут проводить установление характеристик РБК вместо ГБК, представив соответствующие обоснования.

2.3.1. Испытания на подлинность

Чтобы удостовериться в подлинности клеток в банке клеток, необходимо провести соответствующие испытания. При проверке подлинности могут быть оценены как фенотипические, так и генотипические характеристики, которые были установлены при разработке препарата. Не обязательно проводить все возможные испытания, однако объем выполненных испытаний должен быть обоснован. Испытания на подлинность обычно проводят для ГБК. Кроме того, ограниченный объем испытаний на подлинность, как правило, проводят для каждого РБК.

2.3.1.1. Клетки *Metazoa*

Морфологический анализ клеток человека или животных, выращиваемых в виде прикрепляющихся культур, может быть

полезным инструментом в сочетании с другими тестами. В большинстве случаев, для подтверждения происхождения клеточных линий человека или животных достаточно проведения изоферментного анализа; возможно использование других тестов в зависимости от истории клеточной линии. Для верификации вида организма, из которого были получены клетки, могут быть использованы другие методики, включая, например, дифференциальное окрашивание хромосом (бэндинговая цитогенетика) или использование видоспецифичных антисывороток. Альтернативным подходом является демонстрация наличия уникальных маркеров, например, использование бэндинговой цитогенетики для обнаружения уникальной маркерной хромосомы или анализа ДНК для обнаружения геномного полиморфизма (например, полиморфизм длин рестрикционных фрагментов, вариабельность числа тандемных повторов или повторы геномных динуклеотидов). Достаточным испытанием на подлинность считается и установление вида животного, являющегося источником, и наличие изученных уникальных маркеров для клеточной линии. Экспрессия требуемого продукта может служить дополнением к подтверждению подлинности.

2.3.1.2. Клетки микроорганизмов

Для большинства клеток микроорганизмов анализ роста на селективных средах обычно достаточен для подтверждения подлинности клетки-хозяина на уровне вида для банка клеток хозяина и банка трансформированных клеток. В случае *E. coli*, когда могут быть использованы разные штаммы, в качестве дополнительных методов испытания на подлинность следует рассматривать такие методы определения биологических характеристик, как фаготипирование. Для банков плазмид оценка подлинности может быть выполнена с помощью

анализа экспрессирующей конструкции в соответствии с Главой 5.2 настоящих Правил. Экспрессия требуемого продукта также может быть использована для подтверждения подлинности экспрессирующей конструкции.

2.3.2. Испытания на чистоту

Важнейшим (критичным) аспектом разработки клеточной линии и создания банка клеток является оценка биологической чистоты ГБК и РБК, т. е. доказательство того, что они свободны от посторонних микробных и клеточных контаминантов. При планировании и проведении этих испытаний необходимо учитывать влияние селективных агентов и антибиотиков на обнаружение посторонних микробных контаминантов.

2.3.2.1. Клетки *Metazoa*

Для проведения испытаний по оценке микробиологической чистоты (бионагрузки) (наличие бактерий и грибов) следует использовать индивидуальные контейнеры (1% от общего числа контейнеров, но не менее двух контейнеров) ГБК и РБК. В отношении остальных показателей следует использовать методологию испытаний микробиологических показателей или стерильности, описанных в Фармакопее Союза или иных фармакопеях в соответствии с Концепцией гармонизации Фармакопей Союза.

ГБК и РБК должны быть испытаны на содержание микоплазм. Считаются достаточными методики Фармакопеи Союза, включающие посев на агар и мясо-пептонный бульон, а также метод индикаторной клеточной культуры. Как правило, для проведения испытания достаточно клеток из одного контейнера. Для линий клеток немлекопитающих животных могут быть пригодны альтернативные

методы контроля и (или) условия проведения испытаний. Для выбора соответствующей методики производители могут проконсультироваться с уполномоченными органами.

Для обнаружения возможной контаминации вирусами должна быть разработана стратегия контроля клеточных субстратов на наличие вирусов, которая позволяет обнаруживать широкий спектр вирусов с использованием подходящих скрининг-тестов и соответствующих специфичных испытаний, исходя из истории культивирования клеточной линии. Заявители должны следовать указаниям Главы 2 настоящих Правил. В отношении классов препаратов, не охваченных вышеупомянутой Главой 2, следует руководствоваться действующими рекомендациями ВОЗ по использованию животных клеток.

Чистота клеточных субстратов может быть нарушена в результате контаминации другими клеточными линиями, происходящими от того же или иного вида животных. Выбор необходимых испытаний зависит от существования возможности перекрестной контаминации другими клеточными линиями. В некоторых случаях необходимо поддержание роста разных клеточных линий в одной и той же лаборатории. При проведении процедур по созданию банка клеток, предусматривающих проведение открытых манипуляций, необходимо исключить одновременное проведение открытых манипуляций с другими клеточными линиями. Если в помещении, в котором осуществляется работа с банком клеток, находилась другая клеточная линия в момент, когда происходили открытые манипуляции с банком клеток (например, культивирование клеток, объединение, отбор аликвот выбранной клеточной линии), необходимо провести их испытания на наличие клеток (или продуктов полученных из них) из второй клеточной линии.

Как правило, описанные в разделе 2.3.1 методы оценки подлинности клеток достаточны для выявления перекрестной контаминации другими клеточными линиями. Дополнительным подтверждением отсутствия перекрестной контаминации может быть получение препарата, соответствующего установленным требованиям.

2.3.2.2. Клетки микроорганизмов

При планировании и проведении специфических испытаний на посторонние микробные и клеточные контаминанты в банках клеток микроорганизмов необходимо учитывать свойства клеток в банках, возможные контаминанты, упоминаемые в научной литературе, источники, методы и материалы, используемые при культивировании клеток, а также другие организмы, присутствующие в лаборатории, в которой создают банк клеток. Например, возможно проведение визуальной оценки характеристик изолированных колоний с использованием разных микробиологических сред, поддерживающих и не поддерживающих рост клеточного субстрата. Тем не менее, от производителей не требуется обязательно охарактеризовывать устойчивые мутанты клеточного субстрата, возникающие при таких исследованиях, или другие артефакты таких испытаний. Цель таких испытаний состоит, скорее, в выявлении существующих контаминантов.

2.3.3. Стабильность клеточного субстрата

Одним из направлений изучения характеристик клеток является установление их пригодности для целевого использования в производстве. Существуют две проблемы, связанные со стабильностью клеточного субстрата: постоянство производства целевого продукта и сохранение производительности при его хранении в определенных условиях.

В целях оценки стабильности в ходе культивирования для производства необходимо провести исследования не менее чем в двух временных точках: первая – на клетках, подвергшихся минимальному количеству субкультивирований, вторая – на клетках при предельном для производства клеточном возрасте *in vitro*, описанном в регистрационном досье, или при превышении его. Предельный для производства клеточный возраст *in vitro* следует определять на основании данных, полученных на клетках-продуцентах, выращиваемых в опытно-промышленном или промышленном масштабе до предлагаемого предельного клеточного возраста *in vitro* или до возраста, превышающего его. Как правило, клетки-продуценты получают из РБК. Клетки из ГБК можно использовать при соответствующем обосновании. Оценку стабильности клеточного субстрата проводят обычно один раз для каждого регистрируемого лекарственного препарата.

Первостепенное значение имеет оценка способности клеточного субстрата обеспечить постоянство производства требуемого продукта. Вид проводимых испытаний и объекты исследований зависят от типа клеточного субстрата, продукта и методов культивирования. Для клеточных линий, содержащих экспрессирующие конструкции на основе рекомбинантной ДНК, неизменность кодирующей области экспрессирующей конструкции должна быть подтверждена на предназначенных для производства клетках, культивируемых до предельного клеточного возраста *in vitro* или дольше. Такую проверку проводят путем испытания нуклеотидной последовательности, для этих целей также могут быть использованы испытания продукта, как описано в Главе 5.2 настоящих Правил. Для нерекомбинантных клеточных

линий, в которых кодирующая последовательность требуемого продукта уже была проанализирована на уровне ГБК или РБК, стабильность кодирующей белок последовательности на протяжении процесса производства должна быть подтверждена в клетках-продуцентах, культивированных до предполагаемого предельного клеточного возраста *in vitro* или дольше, путем либо испытания нуклеотидной последовательности, либо путем анализа очищенного белкового продукта.

Если продукт не может быть исследован так, как указано выше, для оценки стабильности клеточного субстрата можно использовать другие специфичные методы, например, установление морфологических характеристик, параметров роста, биохимических и иммунологических маркеров, прочих генотипических или фенотипических маркеров или выход требуемого продукта. В некоторых случаях, когда прямое сравнение характеристик ГБК с характеристиками клеток-продуцентов на предельном клеточном возрасте *in vitro* или при его превышении осуществить трудно или невозможно, для оценки стабильности клеточного субстрата на протяжении процесса прозиодвтсва можно сравнивать характеристики клеток на начальной стадии культивирования или производства с характеристиками клеток с предельным клеточным возрастом *in vitro* или при его превышении. Для подобного рода испытания можно использовать такие показатели, как, например, скорость потребления кислорода или глюкозы, скорость выделения аммиака или лактата. Увеличение установленного предельного для производства клеточного возраста *in vitro* должно быть подтверждено данными для клеток, культивирование которых продолжалось до нового предложенного

предельного клеточного возраста *in vitro*. Для линий диплоидных клеток должны быть представлены данные, устанавливающие конечный предел продолжительности жизни клеток из РБК в условиях, идентичных используемым при производстве.

Подтверждение стабильности клеток в банке клеток в установленных условиях хранения, обычно получают во время производства материала для клинических исследований. Данные по определению жизнеспособности законсервированных клеток должны подтвердить, что клетки пережили процесс консервации и могут быть использованы для получения требуемого продукта. Данные о производстве материалов для клинических исследований позволяют удостовериться, что из восстановленных клеток можно получить требуемый продукт. Доступные данные должны быть четко отражены в документах регистрационного досье. Кроме этого, должен быть представлен план мониторинга стабильности банков клеток. Предлагаемый мониторинг допускается осуществлять в момент, когда один или более контейнеров банков клеток, подвергшихся консервации, оттаивают в производственных целях, при надлежащем наблюдении за постоянством свойств продукта или производства, или при оттаивании одного или более подвергшихся криоконсервации ГБК с целью приготовления новых РБК (новые РБК должным образом квалифицированы). Если производство не проводилось в течение длительного времени, определение жизнеспособности банка клеток, используемого в качестве источника продуцирующего субстрата, должно проводиться через определенный интервал, указанный в регистрационном досье. Если жизнеспособность клеточного субстрата

снижается незначительно, как правило, дальнейшие испытания ГБК или РБК считают нецелесообразным.

2.3.4. Кариотипирование и исследование туморогенности

Для оценки безопасности линии диплоидных клеток или для характеристики новой клеточной линии проводят кариотипирование и исследование туморогенных свойств в зависимости от типа клеток, свойств продукта и производственного процесса. Применение расширенного анализа для определения относительного содержания анеуплоидных клеток считается нецелесообразным. Нет необходимости проводить кариотипирование клеточных линий грызунов или новых клеточных линий, не относящихся к диплоидным. Как указано в разделах 2.3.1. и 2.3.2. настоящей Главы, цитогенетический анализ является достаточным методом для оценки подлинности клеточного субстрата или его чистоты. Повторное испытание туморогенности на клетках с уже подтвержденным туморогенным потенциалом проводить не требуется.

Кариотипирование и исследование туморогенности для высокоочищенных продуктов, не содержащих клетки, как правило, не требуются при условии того, что доказано постоянство предельного остаточного содержания ДНК клетки-хозяина по результатам валидации процесса производства, либо испытания серии при выпуске.

Как правило, проведение характеристики клеточного субстрата необходимо для препаратов, в которых нельзя исключить наличие живых клеток или которые подвергаются незначительной очистке в процессе выделения (например, некоторые живые вирусные вакцины). Целесообразность проведения исследований туморогенности и хромосомного анализа на новых клеточных субстратах для неочищенных препаратов следует оценивать в каждом конкретном

случае. Возможность использования клеточных линий, с известным туморогенным потенциалом или обладающих аномальным кариотипом, следует оценивать по соотношению риск/польза для каждого лекарственного препарата в случаях, когда он содержит клетки, или когда степень его очистки невысока.

Если для производства препаратов используют генетически немодифицированные клетки MRC-5 или WI-38, нет необходимости характеризовать клеточные субстраты по кариологическим или туморогенным параметрам, поскольку эти клеточные линии достаточно охарактеризованы и результаты опубликованы. Тем не менее, для каждого созданного РБК MRC-5 и WI-38 производители должны один раз подтвердить, что клетки, полученные при культивировании в условиях, аналогичных планируемому к использованию в производстве, являются диплоидными и имеют ожидаемую продолжительность жизни.

Для новых или ранее не охарактеризованных субстратов диплоидных клеток должно быть представлено подтверждение диплоидного кариотипа, а туморогенность должна быть установлена с использованием клеток из ГБК. Методы кариологического анализа и оценки туморогенности содержатся в документе ВОЗ «Требования к использованию клеток животных в качестве *in vitro* субстратов для производства биологических препаратов» (47-й отчет Экспертной комиссии ВОЗ по стандартизации в Биологии, Женева, ВОЗ. Серия технических отчетов ВОЗ).

ПРИЛОЖЕНИЕ № 1

к Главе 1 Правил проведения исследования биологических лекарственных препаратов

ПЕРВИЧНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ

1. Введение

Изложенные в данном документе принципы в большинстве случаев относятся к биотехнологическим (биологическим) препаратам, полученным из охарактеризованных банков клеток. Однако, для производства ряда биологических лекарственных препаратов, в частности некоторых вирусных вакцин, используют первичные клеточные культуры.

Поскольку первичные клеточные культуры используют в рамках первого пассажа после создания из ткани источника, невозможно всесторонне охарактеризовать клетки до их использования, как это делается для клеточного субстрата, получаемого из банка клеток. Кроме того, биологические препараты, для производства которых используют первичные клеточные субстраты, зачастую не подвергаются интенсивной обработке (например, очистке). Несмотря на эти различия для обеспечения пригодности и безопасности применения субстратов первичных клеток для создания биологических препаратов используется подход, во многих отношениях аналогичный изложенному в настоящей главе и в других главах настоящих Правил.

В данном Приложении приводится информация, относящаяся к клеточному субстрату, которую следует включать в регистрационное досье лекарственного препарата, для производства которого

используются первичные клетки. Эта информация разделяется на три основные категории:

(1) информация, относящаяся к источнику ткани (органа) и другим исходным материалам животного происхождения, используемым для создания первичных клеточных субстратов;

(2) информация, относящаяся к подготовке первичных клеточных субстратов и

(3) информация, относящаяся к испытаниям, проводимым на первичных клеточных субстратах с целью обеспечения безопасности препарата.

2. Источники тканей и другие исходные материалы (сырье)

Должна быть предоставлена информация о животных, используемых в качестве источника ткани для приготовления первичного клеточного субстрата. Ткань должна быть взята у здорового животного, прошедшего ветеринарный и лабораторный контроль для подтверждения отсутствия патогенных агентов. В случаях, когда это возможно, животные-доноры должны быть выращены в закрытых, беспатогенных (SPF) колониях или стадах. Животные, используемые в качестве доноров ткани, ранее не должны были использоваться для экспериментальных исследований. Прежде чем использовать животных для получения клеток, они должны пройти обязательный карантинный контроль на протяжении установленного периода времени. Производители должны получить разъяснения национальных уполномоченных органов по вопросам, касающимся особых требований.

Необходимо предоставить информацию о материалах и компонентах, используемых для получения субстратов первичных

клеток, включая указание типа и источника реагентов человеческого и животного происхождения. Необходимо включить описание испытаний, проведенных с компонентами животного происхождения, чтобы удостовериться в отсутствии поддающихся обнаружению контаминантов и посторонних агентов.

3. Приготовление первичных клеточных субстратов

Необходимо описать методы, используемые для выделения клеток из ткани, создания первичных культур клеток и их поддержания.

4. Испытания первичных клеточных субстратов

Необходимо описать испытания, которые проводят на первичных клеточных субстратах для того, чтобы оценить возможность их использования в производстве. Поскольку природа первичных клеточных субстратов исключает возможность всесторонней проверки и определения характеристик перед их использованием, проводят параллельно испытания с целью подтверждения отсутствия в этих субстратах посторонних агентов. Таким образом, испытания в целях подтверждения отсутствия посторонних агентов в таких субстратах проводятся параллельно и могут включать: наблюдение за производством или неинфицированными контрольными культурами до, в ходе и после процесса производства; инокуляцию культуральной жидкости после производства и из неинфицированных контрольных культур в различные восприимчивые индикаторные клеточные культуры, способные обнаруживать широкий круг вирусов с последующим изучением цитопатических изменений и испытаниями на гемадсорбирующие вирусы; прочие испытания на специфичные агенты (например, значимые ретровирусы) при необходимости. Дополнительные сведения о специфичных испытаниях на вирусы

описаны в соответствующих национальных (региональных, международных) руководствах.

Надлежащие режимы и методы испытаний клеток, используемых в производстве конкретных препаратов, могут варьировать в зависимости от вида животного-донора, используемого в качестве источника ткани, возможного наличия посторонних агентов, природы препарата, его предполагаемых показаний к применению, особенностей производственного процесса и объема испытаний, проводимых на лекарственном препарате. Заявители должны объяснять и обосновывать подходы, использованные для конкретного препарата.

ГЛАВА 2. ОЦЕНКА ВИРУСНОЙ БЕЗОПАСНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ (БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ) ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО И ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

1. Введение

В настоящем документе описаны испытания и оценка вирусной безопасности биологических (биотехнологических) лекарственных средств, полученных из охарактеризованных клеточных линий человеческого или животного происхождения (т. е. млекопитающих, птиц и насекомых), в нем также представлены данные, которые необходимо представлять в составе регистрационного досье, подаваемого в уполномоченные органы государств-членов Союза при регистрации биологического лекарственного препарата. В настоящем документе в рамках понятия «вирус» не рассматриваются нетрадиционные трансмиссивные агенты, такие как возбудители губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота и скрейпи овец и коз.

Положения настоящего документа относятся к лекарственным средствам, полученным с применением клеточных культур из охарактеризованных банков клеток. К ним относятся лекарственные препараты, полученные с применением клеточных культур *in vitro*, такие как интерфероны, моноклональные антитела и препараты, полученные по технологии рекомбинантной ДНК, включая рекомбинантные субъединичные вакцины. К ним относятся также препараты, полученные при помощи гибридомной технологии *in vivo* из асцитической жидкости. К последнему случаю предъявляются особые требования; дополнительная информация по проведению тестирования

клеток, выращиваемых *in vivo*, представлена в Приложение 1 к настоящей главе.

Положения настоящей Главы применимы также к прочим биологическим средствам, частные требования к которым включают ссылку на настоящую Главу данных Правил. Настоящая глава не распространяется на инактивированные вакцины, все живые вакцины, в том числе полученные методами генной инженерии.

Риск вирусной контаминации – особенность всех биотехнологических препаратов, получаемых из клеточных линий. Такая контаминация может быть результатом контаминации исходных клеточных линий (субстратов клеток) или случайной контаминации вирусом в течение процесса производства и может иметь серьезные клинические последствия. Предполагается, что безопасность данных препаратов в отношении вирусной контаминации может быть в разумной степени обеспечена применением программы тестирования на наличие вируса, а также оценкой эффективности удаления (элиминации) и инактивации вируса в процессе производства в соответствии с рекомендациями, изложенными ниже.

Разработано 3 основных взаимодополняющих подхода к контролю потенциальной вирусной контаминации биотехнологических продуктов:

a) отбор и испытание клеточных линий и другого сырья, включая компоненты среды, на отсутствие контаминации вирусами, которые могут быть инфекционными и (или) патогенными для человека;

b) оценка возможностей процесса производства по очистке от инфекционных вирусов;

с) испытания продукта на соответствующих этапах процесса производства на отсутствие контаминации инфекционными вирусами.

Всем испытаниям присуще характерное для всех количественных методик определения вирусов ограничение: способность обнаруживать низкое содержание вирусов зависит – со статистической точки зрения – от размера выборки. В связи с этим ни один метод как таковой не позволяет установить безопасность препарата. Достоверность отсутствия вирусов в готовом препарате во многих случаях основана не только на прямых методах определения их наличия, но также на подтверждении того, что процесс очистки способен элиминировать и (или) инактивировать вирусы.

Необходимые виды и объем испытаний на вирусы и исследований очистки от вирусов на различных стадиях производства зависит от различных факторов, которые необходимо учитывать на каждой стадии в индивидуальном порядке. К факторам, которые необходимо принимать во внимание, относятся: степень характеристики и квалификации банка клеток, природа обнаруженных вирусов, состав питательных сред, методы культивирования, конструкции производственной площадки и оборудования, результаты испытаний на вирусы после культивирования клеток, способность процесса обеспечивать элиминацию вирусов, а также вид препарата и его предполагаемое клиническое применение.

Цель настоящей Главы состоит в описании: общих подходов к испытанию продукта на наличие (отсутствие) вируса, экспериментов по оценке эффективности очистки от вирусов, рекомендованного подхода к планированию испытаний на наличие вирусов и исследований по очистке от вирусов.

Производители должны использовать рекомендации настоящей Главы с учетом особенностей производимого препарата и применяемого процесса производства. Необходимо объяснить и обосновать подход, использованный производителями для построения стратегии обеспечения вирусной безопасности. В дополнение к представлению подробных данных, в целях ускорения экспертизы уполномоченным органом рекомендуется представить резюме по оценке вирусной безопасности. В такое резюме необходимо включить краткое описание всех аспектов исследований вирусной безопасности и стратегий, использованных для предотвращения контаминации вирусами, описанных в настоящей Главе.

2. Потенциальные источники вирусной контаминации

Вирусная контаминация биотехнологических препаратов может происходить от первичного источника клеточных линий или при случайном привнесении вируса во время процесса производства.

2.А. Вирусы, которые могут обнаруживаться в главном банке клеток (ГБК)

Клетки могут иметь латентную или персистирующую вирусную инфекцию (например, герпетическую) или быть заражены эндогенным ретровирусом, который может передаваться вертикально от одного поколения клеток к другому, поскольку вирусный геном встроен в клеточный. Такие вирусы могут экспрессироваться конститутивно или их экспрессия может проявиться спонтанно.

Вирусы могут попасть в ГБК несколькими путями:

1) при получении клеточных линий от инфицированных животных;

2) при использовании вируса для создания клеточной линии;

3) при применении контаминированных биологических реагентов, таких как компоненты сыворотки животных;

4) при контаминации во время работы с клетками.

2.В. Посторонние вирусы, которые могут быть привнесены во время процесса производства.

Вирусы могут быть занесены в лекарственный препарат разными путями, но не ограничиваться ими:

1) при использовании контаминированных биологических реагентов, таких как компоненты сыворотки животных;

2) при применении вируса для стимуляции экспрессии генов, кодирующих необходимый белок;

3) при использовании контаминированного материала, например, колонки для аффинной хроматографии моноклональных антител;

4) при использовании контаминированного вспомогательного вещества во время получения лекарственной формы;

5) при контаминации в процессе производства, а также во время работы с клетками и культуральными средами. Мониторинг параметров клеточной культуры может способствовать раннему выявлению потенциальной контаминации посторонними вирусами.

3. Квалификация (аттестация) клеточной линии: испытание на наличие вирусов

Важная часть характеристики клеточной линии для использования ее в производстве биотехнологичного препарата – надлежащее испытание на наличие вирусов.

3.A. Рекомендуемые испытания на наличие вирусов для ГБК, РБК и клеток с предельным для производства клеточным возрастом *in vitro*.

В табл. 1 приведены примеры испытаний на наличие вирусов, которые необходимо проводить однократно для клеток разных уровней, включая ГБК, РБК и клетки с предельным для производства клеточным возрастом *in vitro*.

3.A.1. Главный банк клеток

На клетках ГБК нужно проводить интенсивные исследования по выявлению эндогенной и неэндогенной вирусной контаминации. В отношении гетерогибридных клеточных линий, в которых один или более партнеров являются человекообразными или нечеловекообразными обезьянами, необходимо провести испытания на вирусы человекообразных и нечеловекообразных обезьян, поскольку вирусная контаминация таких клеток может представлять собой особую опасность.

Выявление неэндогенных вирусов должно включать инокуляционные испытания *in vitro* и *in vivo* и любые другие специальные методы, в том числе видоспецифичные тесты, такие как тест продукции мышиных антител (МАР – *mouse antibodies production*), которые подходят для определения возможных контаминирующих вирусов с учетом истории пассажей клеточной линии.

3.A.2. Рабочий банк клеток

Каждый РБК как исходный клеточный субстрат для производства биотехнологического продукта необходимо проверить на наличие посторонних вирусов либо непосредственно, либо анализом клеток с предельным для производства клеточным возрастом *in vitro*,

полученных из РБК. Если проводились испытания на наличие неэндогенных вирусов в РБК, а клетки, культивируемые до предельного для производства клеточного возраста *in vitro* или дольше, полученные из ГБК, были испытаны на наличие посторонних вирусов, сходные испытания на первоначальном РБК проводить необязательно. Тесты образования антител на РБК обычно не проводят. Приемлем также альтернативный подход, в соответствии с которым полный набор исследований проводят с РБК, а не с ГБК.

3.А.3. Клетки с предельным для производства клеточным возрастом in vitro

Предельный для производства клеточный возраст *in vitro* определяют, опираясь на данные, полученные на клетках-продуцентах, выращенных в условиях опытно-промышленного или промышленного производства до предполагаемого предельного клеточного возраста *in vitro* или более. Клетки-продуценты получают путем экспансии РБК; для их получения допускается также использовать ГБК. Клетки с предельным клеточным возрастом *in vitro* необходимо однократно проверить на наличие эндогенных вирусов, которые могли быть не выявлены в ГБК и РБК. По крайней мере, однократное испытание (*in vitro* и *in vivo*) клеток с предельным для производства клеточным возрастом *in vitro* позволяет убедиться в том, что процесс производства не подвержен контаминации посторонними вирусами. Если на этом этапе выявляют посторонние вирусы, процесс необходимо подвергнуть тщательной проверке для определения причины контаминации и при необходимости полностью реорганизовать его.

3.В. Рекомендуемые исследования для выявления и идентификации вирусов

Для выявления эндогенных и посторонних вирусов можно использовать разные методы количественного определения. В табл. 2 приведены примеры таких испытаний. К ним относят все рекомендованные для использования в настоящее время протоколы количественного определения, однако этот перечень не является исчерпывающим или строго заданным. Поскольку большинство используемых методик может изменяться с учетом научного прогресса, возможно использование альтернативных подходов при наличии данных, обосновывающих их применение. Производителям рекомендуется обсуждать такие альтернативные подходы с уполномоченными органами. В отдельных ситуациях может потребоваться проведение других испытаний. Испытания должны включать надлежащие контрольные материалы, гарантирующие достаточную чувствительность и специфичность. Во всех случаях, когда по виду животного – источнику происхождения клеточного субстрата – можно, с относительно высокой вероятностью, предсказать наличие определенного вируса, могут потребоваться специальные испытания и (или) подходы.. Если используемая в производстве клеточная линия получена от человекообразных или нечеловекообразных обезьян, необходимо дополнительно, в отсутствие должного обоснования, проверить ее на наличие вирусов человека, таких как вирусы, вызывающие иммунодефициты или гепатиты. Для выявления последовательностей нуклеиновых кислот, характерных для упомянутых и других специфичных вирусов, можно использовать полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Далее представлено краткое

описание общих принципов и рассуждения, на основании которых производитель должен обосновать свои действия.

3.B.1. Испытания на наличие ретровирусов

При испытании клеток ГБК и клеток, культивируемых до предельного для производства клеточного возраста *in vitro* и дольше, следует проводить испытания на наличие ретровирусов, включая оценку инфицирующей способности на чувствительных клеточных культурах и электронную микроскопию. Если инфицирующая способность не выявлена и при помощи электронной микроскопии не были обнаружены ретровирусы или ретровирусоподобные частицы, проводят исследования с использованием обратной транскриптазы или другие подходящие испытания на ретровирусы, которые могут не иметь инфицирующей способности. Исследования индукции в данном случае не эффективны.

3.B.2. Исследования *in vitro*

Исследования *in vitro* проводят, инокулируя исследуемый материал (см. табл. 2) в разные восприимчивые индикаторные клеточные культуры, что позволяет определять большое число вирусов человека и животных. Выбор клеток для испытаний определяется видами животных, из которых получен подлежащий испытанию банк клеток, при этом необходимо включить клеточные линии человекообразных или нечеловекообразных обезьян, чувствительные к вирусам человека. Метод и материал для исследования выбирают в зависимости от типа вируса, наличие которого в материале предполагается, учитывая происхождение клеток и проведенные с ними манипуляции. Необходимо проводить выявление как цитопатических, так и гемадсорбирующих вирусов.

3.B.3. Исследования *in vivo*

Для выявления некультивируемых вирусов (не растущих в клеточных культурах) исследуемый материал (см. табл. 2) вводят животным, включая новорожденных и взрослых мышей, а также в развивающиеся эмбрионы птиц. В зависимости от происхождения исследуемых клеточных линий возможно проведение исследований на других видах животных. Следует контролировать состояние здоровья опытных животных и любые отклонения от нормы нужно исследовать с целью установления причины заболевания.

3.B.4. Испытания образования антител

Видоспецифичные вирусы, присутствующие в клеточных линиях грызунов, можно выявить, инокулируя исследуемый материал (см. табл. 2) незараженным вирусом (безвирусным) животных с последующим определением сывороточных антител или ферментативной активности, проявляющихся спустя определенное время. В качестве примера можно привести тесты продукции мышиных (MAP), крысиных (RAP) и хомячьих (HAP) антител. Вирусы, для выявления которых в настоящее время используют испытания продукции антител, представлены в табл. 3.

3.C. Приемлемость клеточных линий

Некоторые клеточные линии, используемые для производства продукта, содержат эндогенные ретровирусы, другие вирусы или вирусные последовательности. Рекомендации по организации производства в таких случаях описаны в Разделе V настоящей Главы. Приемлемость клеточных линий, содержащих вирусы, не являющиеся эндогенными ретровирусами, определяется в индивидуальном порядке уполномоченными органами с учетом анализа пользы и риска, исходя из пользы препарата и его предлагаемого клинического применения,

свойств контаминирующих вирусов, их потенциала заражать человека или вызывать у него заболевания, процесса очистки препарата (например, анализ данных очистки от вирусов) и объема проведенных с очищенным нерасфасованным продуктом испытаний на вирусы.

4. Испытание необработанного нерасфасованного продукта на наличие вирусов

Необработанный нерасфасованный продукт представляет собой один или несколько объединенных сборов клеток и культуральной среды. Если доступ к клеткам затруднен (например, при использовании полых волокон или аналогичных систем), то необработанный продукт может представлять собой жидкость, собранную из такого биореактора. Репрезентативный образец необработанного продукта, отобранного из промышленного биореактора перед дальнейшей обработкой, представляет один из наиболее подходящих материалов, на котором можно с высокой вероятностью выявить контаминацию посторонними вирусами. Соответствующие испытания на наличие вирусов можно проводить на необработанном продукте, если только начальная частичная обработка не повышает чувствительность испытаний на вирусы (например, необработанный продукт может быть токсичным для исследуемых клеточных культур, в то время как частично обработанный продукт может быть нетоксичным).

В определенных случаях более приемлемым может быть анализ смеси, содержащей как интактные, так и разрушенные клетки и культуральные супернатанты, отобранные из промышленного биореактора перед последующей обработкой. В регистрационное досье необходимо включить данные, полученные как минимум на 3 сериях

необработанного продукта, произведенного в опытно-промышленном или промышленном масштабе производства.

Производителям рекомендуется разрабатывать программы постоянной оценки на наличие посторонних вирусов в промышленных сериях продукта. Объем, количество и частоту проведения испытаний на наличие вирусов в необработанном продукте определяют, учитывая несколько факторов: природу клеточных линий, используемых для производства требуемого лекарственного препарата, результаты и объем испытаний на наличие вирусов, проведенного во время квалификации клеточных линий, метод культивирования, источники сырья и результаты исследований по очистке от вирусов. В целях испытания необработанного продукта, как правило, проводят скрининговые испытания *in vitro* с использованием одной или нескольких клеточных линий. При необходимости можно применять методы на основе ПЦР или другие подходящие методы.

Собранный материал, в котором обнаружен посторонний вирус, не должен использоваться для производства продукта. Если на этом этапе выявляют посторонние вирусы, процесс производства необходимо тщательно проанализировать для определения причины контаминации и принятия соответствующих мер.

5. Обоснование и план действий при проведении исследований по очистке от вирусов и испытаний на наличие вирусов в очищенном нерасфасованном продукте

Необходимо разработать наиболее подходящий и рациональный протокол проведения испытаний на наличие вирусов, начиная с ГБК, на разных этапах производства вплоть до получения лекарственного

препарата, включая оценку и характеристику эффективности очистки от вирусов необработанного продукта. Оценка и описание характеристик очистки от вирусов играет основную роль в данной схеме, целью которых является получение надежного подтверждения того, что продукт не контаминирован вирусами.

При выборе вирусов, которые будут использоваться в исследовании очистки, целесообразно разделять необходимость анализа возможностей процессов очищать продукт от вирусов, о наличии которых известно, от потребности оценить устойчивость процесса путем описания очистки от неспецифических «модельных» вирусов (см. ниже). Определения «подходящих», специфичных и неспецифичных «модельных» вирусов представлены в глоссарии. При оценке вирусной безопасности препарата, для анализа процесса необходимо знать количество вирусов, которое может содержаться в нем (например, в необработанном нерасфасованном продукте) и какое их количество можно инактивировать и элиминировать в процессе очистки. Знание временно́й зависимости процедур инактивации позволяет удостовериться в их эффективности. При анализе очистки от известных контаминантов потребуются детальные зависимые от времени исследования инактивации, подтверждение воспроизводимости инактивации и (или) элиминации и анализ параметров процесса. При описании процесса производства с точки зрения надежности очистки с использованием неспецифичных «модельных» вирусов, в дизайне исследования необходимо уделить особое внимание безоболочечным вирусам. Объем исследований по описанию очистки от вирусов зависит от результатов испытания клеточных линий и необработанного

продукта. Такие исследования необходимо проводить по нижеописанной методологии (см. раздел 6).

В табл. 4 представлен пример плана действий с точки зрения анализа процесса и описания очистки от вирусов, а также испытания на вирусы очищенного продукта в зависимости от результатов испытаний клеток и (или) необработанного продукта на вирусы. Далее рассматриваются различные варианты такого плана действий. Во всех случаях необходимо провести описание очистки от вирусов, используя неспецифичные «модельные» вирусы. Наиболее частыми являются ситуации A и B. Клетки-продуценты, контаминированные вирусом, не являющимся ретровирусом грызунов, как правило, не используются. Если имеются убедительные и должным образом обоснованные основания для производства препаратов с использованием клеточной линии, описанной в ситуациях C, D или E, их необходимо согласовать с уполномоченным органом. В случаях C, D и E необходимо предусмотреть валидированные эффективные этапы, направленные на инактивацию и (или) элиминацию обнаруженного вируса в процессе производства.

Ситуация A. Если в клетках и необработанном продукте вирусы, вирусоподобные частицы и ретровирусоподобные частицы не обнаружены, необходимо провести исследования элиминации и инактивации вирусов с ранее упомянутыми неспецифичными «модельными» вирусами.

Ситуация B. Если обнаружены лишь ретровирусы грызунов (или ретровирусоподобные частицы, которые считаются непатогенными, например, частицы A- и R-типов грызунов), необходимо провести анализ процесса с использованием специфичных «модельных» вирусов,

например, вируса лейкоза мышей. Испытание очищенного продукта необходимо проводить, используя подходящие методы, обладающие высокой специфичностью и чувствительностью в отношении рассматриваемого вируса. В регистрационном досье необходимо представить данные, по меньшей мере, о трех сериях очищенного продукта, полученных опытно-промышленным или промышленным способом. В качестве субстратов для производства препаратов часто используются такие клеточные линии, как CHO, C127, BHK и клеточные линии гибридомы мышей, в отношении которых данные о проблемах с безопасностью, обусловленных вирусной контаминацией препаратов, не поступали. В отношении этих клеточных линий, эндогенные частицы которых хорошо описаны и налажена их очистка, определять наличие неинфекционных частиц в очищенном продукте, как правило, не требуется. Необходимо провести исследования с неспецифичными «модельными» вирусами, как описано для ситуации А.

Ситуация С. Если клетки или необработанный продукт содержат вирусы (за исключением ретровирусов грызунов), в отношении которых не известна их способность инфицировать человека (например, описанные в сноске 2 к табл. 3, за исключением ретровирусов грызунов (ситуация В)), в исследованиях по изучению элиминации и инактивации вирусов необходимо использовать обнаруженный вирус. Если обнаруженный вирус использовать невозможно, в целях подтверждения приемлемости очистки необходимо использовать «релевантный» или специфичный «модельный» вирус. Зависимая от времени инактивация идентифицированных (или «релевантных», или специфичных «модельных») вирусов на критических стадиях инактивации должна стать частью анализа процесса на предмет наличия таких вирусов.

Испытание очищенного продукта необходимо проводить, используя подходящие методы, обладающие высокой специфичностью и чувствительностью в отношении рассматриваемого вируса. В регистрационном досье необходимо представить данные, по меньшей мере, о трех сериях очищенного продукта, полученных опытно-промышленным или промышленным способом.

Ситуация D. Если обнаружен известный патоген человека (например, описанный в сноске 1 к табл. 3), использовать продукт допускается в исключительных случаях. В связи с этим, в исследованиях по изучению элиминации и инактивации вирусов рекомендуется использовать обнаруженный вирус, используя подходящие методы, обладающие высокой специфичностью и чувствительностью в отношении него. Если обнаруженный вирус использовать невозможно, необходимо использовать описанный далее «релевантный» и (или) специфичный «модельный» вирус. Необходимо подтвердить способность процесса в ходе очистки и инактивации элиминировать и инактивировать отобранные вирусы. В ходе анализа процесса на ключевых этапах инактивации необходимо получить данные о зависимой от времени инактивации. Испытание очищенного продукта необходимо проводить, используя подходящие методы, обладающие высокой специфичностью и чувствительностью в отношении рассматриваемого вируса. В регистрационном досье необходимо представить данные, по меньшей мере, о трех сериях очищенного продукта, полученных опытно-промышленным или промышленным способом.

Ситуация E. Если в клетках или необработанном продукте обнаруживается вирус, который невозможно классифицировать с

помощью имеющихся методов, продукт, как правило, считается непригодным, поскольку вирус может быть патогенным. В очень редких случаях при наличии убедительных и хорошо обоснованных причин для производства препарата с использованием такой клеточной линии, перед продолжением процесса производства необходимо согласование с уполномоченным органом.

6. Оценка и характеристика процедур очистки от вирусов

Анализ и описание процедур элиминации и (или) инактивации вирусов играют важную роль в обеспечении безопасности биологических (биотехнологических) препаратов. Ранее во многих случаях происходила контаминация агентами, о наличии которых не было известно и это не предполагалось. Такие ситуации имели место с биологическими препаратами, которые получали из не описанных всесторонне клеточных линий. Оценка очистки от вирусов обеспечивает определенную уверенность, что все неизвестные, неподозреваемые и опасные вирусы будут элиминированы. Исследования следует проводить, надлежащим образом документируя и контролируя их.

Целью исследований по очистки от вирусов являются оценка этапов процесса производства, которые можно считать эффективными для инактивации (элиминации) вирусов, и количественная оценка суммарного снижения содержания вирусов с помощью таких этапов. Это достигается за счет преднамеренного одномоментного добавления значимого количества вируса в необработанный материал и (или) к различным фракциям, получаемым на различных этапах процесса производства, и подтверждения, что на последующих этапах достигается их необходимая элиминация или инактивация. Если надлежащая очистка достигается за счет меньшего количества этапов,

то оценивать и описывать с точки зрения оценки вирусной безопасности остальные этапы процесса производства не требуется. Следует помнить, что остальные этапы процесса производства могут косвенно влиять на достигнутую инактивацию (элиминацию). Производители должны объяснить и обосновать подход, использованный для проведения исследований очистки от вирусов.

Снижение инфицирующей способности вирусов достигается за счет элиминации вирусных частиц или их инактивации. Необходимо описать возможные механизмы снижения инфицирующей способности вируса на каждом изученном этапе процесса производства, указав, за счет чего они достигнуты: инактивации или элиминации. Исследование этапов инактивации необходимо спланировать таким образом, чтобы пробы отбирались в различные временные точки, и построить кривую инактивации (см. раздел 6.B.5).

Исследования по оценке очистки от вирусов проводятся в целях подтверждения очистки от вирусов, которые содержатся в ГБК, и (или) обеспечения определенной степени уверенности в том, что посторонние вирусы, которые могли быть не выявлены, или могли контаминировать процесс производства, были устранены. Факторы снижения вирусной нагрузки, как правило, выражают в логарифмических координатах, т.е. несмотря на то что остаточная инфицирующая способность вируса никогда не будет снижена до нуля, ее можно значительно снизить с математической точки зрения.

В дополнение к исследованиям по очистке от вирусов, о наличии которых известно, необходимо провести исследования по оценке возможностей процесса элиминировать и (или) инактивировать другие вирусы. Цель исследований с вирусами, проявляющими различные

биохимические и биофизические свойства, о содержании которых неизвестно или их наличие в принципе не ожидается, заключается, как правило, в изучении надежности процедур, но не в обеспечении определенной степени их инактивации или элиминации (специфического риска). Подтверждение способности процесса производства инактивировать или элиминировать вирусы желательно (см. раздел 6.C). Такие исследования не направлены на оценку специфического (определенного) риска безопасности, то есть не требуется достигать определенной степени очистки для данного риска.

6.A. Выбор вирусов для оценки и характеристики элиминации вирусов

Чтобы испытать общую способность системы очищать продукт от вирусов, в исследования по оценке очистки и описанию процесса необходимо включать вирусы, напоминающие по свойствам те, которые могут контаминировать препарат, и обладающие широким диапазоном физико-химических свойств. Руководствуясь настоящей Главой, производитель должен обосновать выбор вирусов в соответствии с целями исследований по оценке и описанию и на основании настоящей Главы.

6.A.1. «Релевантные» вирусы и «модельные» вирусы

Основным аспектом проведения исследования очистки от вирусов является определение, какие вирусы в него включать. Такие вирусы делятся на три категории: «релевантные» вирусы, специфичные «модельные» вирусы и неспецифичные «модельные» вирусы.

«Релевантные» вирусы – это вирусы, используемые в исследованиях по оценке процесса очистки от вирусов, которые являются либо выявленными вирусами, либо принадлежат тому же виду

вирусов, которые контаминировали или с высокой вероятностью могут контаминировать клеточный субстрат или какие-либо реактивы или материалы, использованные в процессе производства. Необходимо подтвердить способность процесса очистки и (или) инактивации удалять и (или) инактивировать такие вирусы. Если «релевантного» вируса нет в наличии или он не адаптирован к исследованиям по оценке процесса очистки от вирусов (например, его невозможно вырастить в достаточно высоких титрах *in vitro*), в качестве замены необходимо использовать специфичные «модельные» вирусы. Надлежащим специфичным «модельным» вирусом может служить вирус, являющийся близкородственным выявленному или подозреваемому вирусу (принадлежит тому же роду или семейству), обладающий схожими с ним физическими и химическими свойствами.

Клеточные линии, полученные от грызунов, обычно содержат частицы эндогенного ретровируса или ретровирусоподобные частицы, которые могут быть инфекционными (частицы С-типа) или неинфекционными (цитоплазматические частицы А- и R-типа). Необходимо определить способность процесса производства элиминировать и (или) инактивировать ретровирусы в продуктах, полученных с использованием таких клеток. Этого можно достичь, используя вирус лейкемии мышей, – специфичный «модельный» вирус для клеток мышиного происхождения. Например, когда при иммортализации Влимфоцитов вирусом Эпштейна–Барр (EBV) были получены клеточные линии человека, секретирующие моноклональные антитела, нужно было определить способность процесса производства элиминировать и (или) инактивировать вирус герпеса. В качестве

специфичного «модельного» вируса можно также использовать вирус псевдобешенства.

Если целью служит описание общей способности процесса производства элиминировать и (или) инактивировать вирусы (т.е. описание надежности процесса очистки), необходимо провести исследования по характеристике очистки с неспецифичными «модельными» вирусами, обладающими различными свойствами. В такой анализ могут вносить определенный вклад результаты исследований с «релевантными» и (или) специфичными «модельными» вирусами. Проводить испытания со всеми типами вирусов не требуется. Необходимо отдавать предпочтение вирусам, которые проявляют значительную устойчивость к физическим и (или) химическим воздействиям. Результаты изучения таких вирусов служат источником полезных сведений об общей способности процесса производства элиминировать и (или) инактивировать вирусы. Выбор и количество использованных вирусов зависят от качества и степени описания клеточных линий и процесса производства.

Примеры подходящих «модельных» вирусов, обладающих широким диапазоном физико-химических структур, и примеры вирусов, использованных в исследованиях очистки от вирусов, представлены в Приложении 2 и табл. A-1.

6.A.2. Рассмотрение других аспектов

Дополнительно необходимо учесть следующее:

a) Предпочтительно использовать вирусы, которые можно вырастить (обогатить) до высокого титра, однако это не всегда возможно.

b) Необходимо располагать эффективной и надежной методикой количественного определения каждого использованного вируса на каждом исследуемом этапе производства.

c) Необходимо учитывать потенциальный вред здоровью, который может быть нанесен персоналу, проводящему исследования очистки.

6.B. Дизайн и обязательные условия проведения исследований по оценке и описанию характеристик очистки вирусов

6.B.1. Производственные помещения, оборудование и персонал

В соответствии с правилами Надлежащей производственной практики вносить какие-либо вирусы в производственное оборудование не допускается. В связи с этим исследования по очистке от вирусов должны проводиться в отдельной лаборатории, оборудованной для работы с вирусами, персоналом с вирусологической квалификацией в сотрудничестве с производственным персоналом, занимавшимся планированием и подготовкой уменьшенной версии процесса очистки.

6.B.2. Система производства в уменьшенном масштабе

Необходимо доказать валидность (пригодность) уменьшенного масштаба производства. Уровень очистки в уменьшенном масштабе должен максимально соответствовать методу производства. Необходимо подтвердить, что все параметры: хроматографическое оборудование, высота слоя сорбента колонки (*column bed-height*), линейная скорость потока (*linear flow-rate*), отношение скорости потока к объему слоя сорбента (*flow-rate-to-bed-volume ratio*) (т.е. время контакта), виды буферных растворов и гелей, значение pH, температура и концентрация белка, соли и продукта максимально приближены к промышленному способу производства. Необходимо получить тот же профиль элюирования. В отношении процедур необходимо соблюсти аналогичные требования. Неизбежные отклонения необходимо проанализировать с точки зрения их влияния на результаты.

6.B.3. Анализ поэтапной элиминации вирусов

При проведении исследований по очистке от вирусов желательно оценить вклад более чем одного этапа производства в элиминацию вирусов. Этапы, которые, вероятнее всего, устраняют вирусы, необходимо отдельно оценить на предмет их способности элиминировать и инактивировать вирусы, при этом следует уделить особое внимание точному разграничению отдельных этапов. На каждом, подлежащем испытанию этапе, материал должен содержать достаточное количество вируса, необходимое для оценки эффективности каждого этапа. Как правило, на каждом подлежащем испытанию этапе, вирус добавляют во внутрипроизводственный материал. В некоторых случаях, достаточно просто добавить вирус в высоком титре в необработанный продукт и измерять его концентрацию между последовательными этапами. Если элиминация вируса достигается с помощью процедур отделения, рекомендуется, по необходимости и возможности, изучить распределение вирусной нагрузки по различным фракциям. Если на множестве этапов процесса производства используются вирулицидные буферные растворы, как часть оценки всего процесса допускается использовать альтернативные стратегии, например, параллельное добавление менее вирулицидных буферных растворов. Титр вируса необходимо определять до и после каждого исследуемого этапа. В целях обеспечения необходимой статистической значимости результатов необходимо использовать методики количественного определения инфицирующей способности с высокой чувствительностью и воспроизводимостью с достаточным числом повторностей. При достаточном обосновании допускается использовать количественные методики, не направленные на выявление инфицирующей способности. В целях обеспечения чувствительности методов во все

методики по определению инфицирующей способности необходимо включать надлежащие вирусные контроли. К тому же необходимо принимать во внимание статистические особенности отбора проб вируса в низких концентрациях (Приложение 3).

6.B.4. Определение вклада физической элиминации и инактивации вирусов

Снижение инфицирующей способности вируса достигается за счет его элиминации или инактивации. Необходимо описать возможные механизмы снижения инфицирующей способности вируса на каждом изученном этапе процесса производства, указав, достигнуты ли они за счет инактивации или элиминации. Если процесс производства не позволяет добиться удовлетворительного снижения инфицирующей способности, а элиминация вируса рассматривается в качестве основного фактора безопасности препарата, необходимо внедрить специальные или дополнительные этапы инактивации и (или) элиминации. На определенном этапе может потребоваться разграничить элиминацию от инактивации, например, если есть вероятность того, что буферный раствор, использованный более чем на одном этапе, может вносить вклад в инактивацию на каждом из них, т.е. вклад буферного раствора в инактивацию распределяется между несколькими хроматографическими этапами, и необходимо определить степень элиминации, достигаемую за счет каждого из этих хроматографических этапов.

6.B.5. Оценка инактивации

Для оценки инактивации вируса в необработанном продукте или промежуточном материале должен быть введен инфекционный вирус и рассчитан фактор (коэффициент) снижения вирусной нагрузки. Следует учитывать, что инактивация вируса не является простым процессом

первого порядка, обычно она более сложная и имеет быструю «фазу 1» и медленную «фазу 2». Именно поэтому исследование должно быть спланировано так, чтобы отбор проб проводился в разные временные точки, и была построена кривая инактивации. В исследования по инактивации помимо временной точки, соответствующей минимальной экспозиции, рекомендуется включать не менее одной временной точки, которая предшествует точке минимальной экспозиции и отличается от ноля. Дополнительные данные особенно необходимы, если «релевантный» вирус является патогенным для человека и создан процесс эффективной его инактивации. Однако в исследованиях инактивации, в которых неспецифичные «модельные» вирусы или специфичные «модельные» вирусы используются в качестве суррогатов вирусных частиц, например, внутрицитоплазматические ретровирусоподобные частицы в клетках яичника китайского хомячка, воспроизводимость очистки необходимо подтвердить, по меньшей мере, в двух исследованиях. Начальную вирусную нагрузку, по возможности, необходимо определять путем выявления вируса после его добавления в исходный материал. Если это невозможно, то начальную вирусную нагрузку рассчитывают по титру вируса в добавляемом к исходному материалу препарате. Если высокая скорость инактивации не позволяет построить кривую инактивации, используя условия процесса, необходимо предусмотреть надлежащие контроли, чтобы подтвердить, что в ходе инактивации инфицирующая способность была устранена.

6.B.6. Использование и регенерация хроматографических колонок

Со временем или при повторном (многократном) использовании хроматографических колонок и других систем, используемых в процессе

очистки, их способность к элиминации вируса может изменяться. Определение стабильности очистки от вирусов после многократного применения обосновывает возможность повторного использования колонок. Необходимо подтвердить, что вирусы, которые были потенциально задержаны производственной системой, должным образом уничтожены и удалены перед повторным ее использованием. Таким подтверждением, к примеру, может служить демонстрация того, что процедуры очистки и регенерации инактивируют или элиминируют вирус.

6.B.7. Особые меры предосторожности

а. При приготовлении вирусов с высоким титром необходимо соблюдать осторожность, чтобы не допустить их агрегации, которая может улучшить физическую элиминацию, но снизить инактивацию, искажая таким образом корреляцию с фактическим производством.

б. Необходимо учитывать минимальное количество вируса, содержание которого можно достоверно определить.

в. В целях анализа снижения инфицирующей способности вируса вследствие разведения, концентрации, фильтрации или хранения проб перед их разведением, в исследование необходимо включать параллельные контрольные методики количественного определения.

г. «Добавление» вирусов необходимо осуществлять в небольшом объеме, чтобы не разводить или не изменить свойства продукта. Проба испытуемого белка после его разведения больше не является идентичной продукту, получаемому промышленным способом.

д. Небольшие различия в буферных растворах, питательной среде, реактивах и т.п. могут значительно повлиять на очистку от вирусов.

е. Инактивация вирусов зависит от времени, поэтому время, в течение которого продукт, в который добавлен вирус, остается в определенном

буферном растворе или определенной хроматографической колонке, должно соответствовать условиям промышленного процесса производства.

ж. Буферные растворы и продукт необходимо оценивать отдельно на токсичность и влияние на результаты методик, применяемых для определения титра вируса, так как эти компоненты могут негативно влиять на индикаторные клетки. Если такие растворы токсичны для индикаторных клеток, могут потребоваться разведение, коррекция pH или диализ буферного раствора, содержащего добавленный вирус. Если продукт обладает собственной противовирусной активностью, может потребоваться проведение исследования очистки без продукта в «имитационном» цикле (“*mock*” *run*), хотя при этом исключение продукта или замена его на аналогичный белок, не обладающий противовирусной активностью, может повлиять на поведение вирусов на некоторых этапах производства. Необходимо включить достаточные контроли для оценки влияния процедур, используемых исключительно для приготовления проб для методик определения (например, диализ, хранение), на элиминацию и (или) инактивацию добавленного вируса.

з. Во многих схемах очистки повторно используются одинаковые или схожие буферные растворы или колонки. При анализе данных это необходимо принимать во внимание. Эффективность конкретного метода элиминации вируса может зависеть от этапа производства, на котором он используется.

и. Если условия производства или буферные растворы чрезмерно цитотоксичны или вируцидны, совокупные факторы (коэффициенты) снижения вирусной нагрузки могут быть недооценены; в этом случае оценка проводится в индивидуальном порядке. Ввиду внутренних ограничений или несоответствующего дизайна исследований по очистке

от вирусов общие факторы (коэффициенты) снижения вирусной нагрузки могут быть также переоценены.

6.C. Интерпретация результатов исследований по очистке от вирусов

Приемлемость. Целью оценки инактивации и (или) элиминации вирусов является анализ и описание этапов процесса, считающихся эффективными для инактивации и (или) элиминации вирусов, и количественное определение общего снижения содержания вирусов, достигаемого при производстве. При наличии вирусных контаминантов (ситуации B-E), чтобы обеспечить надлежащий уровень безопасности лекарственного препарата, необходимо не только подтвердить, что вирус элиминирован или инактивирован, но и показать, что в процессе очистки от вирусов остается запас эффективности. Количество элиминированного или инактивированного в ходе процесса производства вируса необходимо сравнить с количеством, которое содержалось в необработанном продукте.

Для осуществления такого сравнения необходимо оценить содержание вируса в необработанном продукте. Такую оценку осуществляют, используя методики определения инфицирующей способности или иные, например, трансмиссионную электронную микроскопию (ТЭМ). Весь процесс очистки должен обладать способностью элиминировать значительно большее количество вируса, чем ожидаемое его содержание в объеме необработанного продукта, эквивалентном одной дозе лекарственного препарата. В Приложении 4 представлен способ расчета факторов (коэффициентов) снижения вирусной нагрузки, в Приложении 5 – расчет ожидаемого количества частиц на дозу.

Механизмы очистки от различных классов вирусов могут отличаться. При анализе данных, подтверждающих эффективность

процедур инактивации и (или) элиминации вирусов, необходимо использовать комбинацию факторов:

(i) пригодность использованных тест-вирусов;

(ii) дизайн исследований очистки;

(iii) достигнутое lg-снижение вирусной нагрузки;

(iv) зависимость инактивации от времени;

(v) потенциальное влияние изменения параметров процесса производства на инактивацию и (или) элиминацию вируса;

(vi) чувствительность (пределы определения и обнаружения) аналитических методик;

(vii) селективность процедур инактивации и (или) элиминации в отношении определенных классов вирусов.

Эффективная очистка достигается любым из нижеописанных способов: многоэтапной инактивацией, многоэтапным дополнительным отделением или комбинацией этапов инактивации и отделения. Отделение «модельных» вирусов может происходить иначе, нежели искомого вируса, поскольку методы отделения могут зависеть от высокоспецифичных физико-химических свойств вируса, которые влияют на их взаимодействие с гелевыми матрицами и на свойства преципитации. Параметры производства, влияющие на отделение, подлежат надлежащему описанию и контролю. Различия могут быть обусловлены изменением поверхностных свойств, например, гликозилированием. Однако, несмотря на такие потенциальные различия, эффективная элиминация достигается путем комбинации дополнительных этапов отделения или комбинации этапов инактивации и отделения. Таким образом, хорошо спланированные этапы отделения, например, хроматографические процедуры, фильтрация и экстракция, могут оказаться эффективными способами элиминации

вирусов, если они осуществляются в хорошо контролируемых условиях. Эффективный этап элиминации вирусов должен обладать воспроизводимостью в отношении снижения вирусной нагрузки, которую необходимо подтвердить в не менее чем двух независимых исследованиях.

Совокупный фактор (коэффициент) снижения, как правило, выражают в виде суммы отдельных факторов. Если индивидуальный фактор (коэффициент) снижения составляет 1,0 lg или менее, то он признается незначительным, и в отсутствие обоснования не учитывается в расчете совокупного фактора (коэффициента) снижения.

Если процесс производства не позволяет добиться удовлетворительного снижения инфицирующей способности, а элиминация вируса рассматривается в качестве основного фактора безопасности препарата, необходимо внедрить дополнительные этапы инактивации и (или) элиминации. В отношении всех вирусов производители должны обосновать приемлемость полученных факторов (коэффициентов) снижения. Результаты должны быть оценены на основании факторов, перечисленных выше.

6.D. Ограничения исследований по очистке от вирусов

Исследования по очистке от вирусов вносят вклад в обеспечение приемлемого уровня безопасности лекарственного препарата, однако сами по себе не определяют его безопасность. Тем не менее, ряд элементов дизайна и выполнение исследований по очистке от вирусов могут привести к некорректной оценке способности процесса снижать инфицирующую способность вирусов. К таким факторам относятся:

1. Вирусные препараты, использованные в исследованиях по очистке, как правило, получают на культуре тканей. Поведение вируса из культуры ткани на этапе производства может отличаться от свойств

природного вируса, например, если природный и выращенный вирусы различаются по чистоте или степени агрегации.

2. Инактивация инфицирующей способности вирусов, как правило, описывается двухфазной кривой, в которой быстрая начальная фаза сменяется медленной. Существует вероятность, что вирусы, оставшиеся после первого этапа инактивации, могут быть более устойчивыми к последующим этапам. Например, если резистентная фракция принимает форму вирусных агрегатов, их инфицирующая способность может быть устойчива к различным химическим воздействиям и нагреванию.

3. Способность совокупного процесса снижать инфицирующую способность выражается в виде суммы логарифмов снижения вирусной на каждом этапе. Суммирование факторов (коэффициентов) снижения на различных этапах, особенно этапах с небольшим снижением (например, менее 1,0 lg), может привести к завышению истинного показателя оценки элиминации вируса. Кроме того, не допускается суммировать факторы (коэффициенты) снижения, полученные за счет повторения идентичных или схожих процедур, без должного обоснования.

4. Выражение факторов (коэффициентов) снижения в виде логарифма снижения титра означает, что несмотря на существенное снижение остаточной инфицирующей способности вируса, она никогда не снизится до нуля. Например, снижение инфицирующей способности препарата, содержащего 8,0 lg инфицирующих единиц на миллилитр, на фактор 8,0 lg дает 0,0 lg на миллилитр или одну инфицирующую единицу на миллилитр с учетом предела обнаружения методики.

5. Опытно-промышленный способ обработки может отличаться от промышленного, даже несмотря на дизайн процесса с уменьшенным масштабом.

6. Сложение индивидуальных факторов (коэффициентов) снижения вирусной нагрузки, достигнутых за счет схожих механизмов инактивации, может привести к переоценке совокупной очистки от вирусов.

6.E. Статистический анализ данных

В целях интерпретации результатов исследований очистки от вирусов они должны включать статистический анализ данных. Для подтверждения полученных выводов результаты исследования должны быть статистически значимы (см. Приложение 3).

6.F. Повторная оценка очистки от вирусов

При значимых изменениях процесса производства или очистки необходимо оценить прямое и косвенное их влияние на очистку от вирусов и, при необходимости, подвергнуть систему повторной оценке. Например, изменения процессов производства могут служить причиной изменения продукции вирусов клеточной линией, изменения этапов производства могут повлиять на степень очистки от вирусов.

7. Заключение

В настоящей Главе рассматриваются подходы к оценке рисков вирусной контаминации и очистке от вирусов продукта, которые вносят вклад в производство безопасных биотехнологических препаратов, получаемых из клеточных линий человека или животных; в ней описывается значение многих стратегий, включая:

A. тщательное описание/скрининг исходного материала клеточного субстрата на предмет наличия вирусных контаминантов;

B. оценку риска путем выявления контаминантов, тропных к организму человека;

C. внедрение надлежащей программы испытаний на посторонние вирусы в необработанном продукте;

D. детальное планирование исследований очистки от вирусов, используя различные методы инактивации или элиминации вирусов в одном и том же процессе производства с целью достижения максимальной очистки от вирусов; и

E. проведение исследований, направленных на анализ инактивации и элиминации вирусов.

Таблица 1. Испытания на наличие вирусов, которые необходимо однократно провести на клетках различного уровня

Испытания	ГБК	РБК[a]	Клетки с предельным возрастом *in vitro*[b]
ИСПЫТАНИЯ НА НАЛИЧИЕ РЕТРОВИРУСОВ И ДРУГИХ ЭНДОГЕННЫХ ВИРУСОВ			
Инфицирующая способность	+	–	+
Электронная микроскопия[c]	+[c]	–	+[c]
Обратная транскриптаза[d]	+[d]	–	+[d]
Прочие вирус-специфичные тесты[e]	Если применимо[e]	–	Если применимо[e]
ИСПЫТАНИЯ НА НАЛИЧИЕ НЕЭНДОГЕННЫХ ИЛИ ПОСТОРОННИХ ВИРУСОВ			
Испытания *in vitro*	+	–[f]	+
Испытания *in vivo*	+	–[f]	+
Испытания выработки антител[g]	+[g]	–	–
Прочие вирус-специфичные тесты[h]	+[h]	–	–

a. См. Раздел 3.A.2.

b. Клетки с предельным возрастом *in vitro*: клетки с предельным для производства клеточным возрастом *in vitro* (См. Раздел 3.A.3).

c. Позволяет также выявить и другие агенты.

d. Не является необходимым при обнаружении инфицирующей способности ретровируса.

e. Если применимо, применяется для клеточных линий, о которых известно, что они были инфицированы такими агентами.

f. Для первого РБК данное испытаний должно проводиться на клетках с пределом клеточного возраста *in vitro*, полученных из этого РБК; для последующих РБК один тест *in vitro* и *in vivo* нужно проводить либо непосредственно на РБК, либо на клетках с пределом клеточного возраста *in vitro*.

g. т.е. испытания продукции мышиных (MAP), крысиных (RAP), хомячьих (HAP) антител – обычно применяют для клеточных линий грызунов.

h. т.е. испытания для клеточных линий, полученных от человека или нечеловекообразных приматов, или других клеточных линий в зависимости от обстоятельств.

Таблица 2: Примеры использования и ограничения испытаний на наличие вирусов

ИСПЫТАНИЯ	**ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ**	**СПОСОБНОСТЬ К ОБНАРУЖЕНИЮ**	**ОГРАНИЧЕНИЯ К ОБНАРУЖЕНИЮ**
Образование антител	Лизат клеток и их культуральная среда	Специфичные вирусные антигены	Антигены, не инфекционные для животной тест-системы
Скрининг вируса *in vivo*	Лизат клеток и их культуральная среда	Широкий спектр вирусов, патогенных для человека	Возбудители, которые не реплицируются или не вызывают заболеваний в тест-системах
Скрининг вируса *in vitro* для:		Широкий спектр вирусов, патогенных для человека	Возбудители, которые не способны к репликации или не вызывают поражений в тест-системах
1. Характеристики Банка клеток	1. Лизат клеток и их культуральная среда (при совместном культивирования исследуемый материал должен содержать интактные клетки)		
2. Скрининга производства	2. Сбор необработанного продукта или лизат клеток и их культуральные среды из промышленного реактора		
Трансмиссионная электронная микроскопия на:		Вирус и вирусоподобные частицы	Качественный анализ с оценкой идентичности
1. Клеточном субстрате	1. Жизнеспособные клетки		
2. Супернатанте клеточной культуры	2. Бесклеточный супернатант культуры		
Обратная транскриптаза (RT)	Бесклеточный супернатант культуры	Ретровирусы и экспрессированная ретровирусная обратная	Определяет только ферменты с оптимальной активностью при предпочтительных условиях.

		транскриптаза	Интерпретация может представлять сложность в связи с наличием клеточных ферментов, фона в некоторых концентрированных образцах
Инфицирующая способность ретровирусов (RV)	Бесклеточный супернатант культуры	Инфекционные ретровирусы	Ретровирусы, не способные реплицироваться или не формирующие дискретные очаги или бляшки в выбранной тест-системе
Совместное культивирование	Жизнеспособные клетки	Инфекционные ретровирусы	Ретровирусы, не способные реплицироваться
1. Конечная точка инфицирующей способности			1. См. выше в «Инфицирующая способность ретровирусов»
2. Конечная точка трансмиссионной электронной микроскопии			2. См. выше в «Трансмиссионная электронная микроскопия»[a]
3. Конечная точка обратной транскриптазы			3. См. выше в «Обратная транскриптаза»
ПЦР (полимеразная цепная реакция)	Клетки, культуральная жидкость и прочие материалы	Специфичные последовательности вируса	Должны присутствовать праймеры. Не определяет инфицирующую способность вируса

а Кроме того, сложно отличить исследуемый материал от индикаторных клеток.

Таблица 3: Вирусы, выявляемые в испытаниях продукции антител

ТЕСТ ПРОДУКЦИИ МЫШИНЫХ (MAP) АНТИТЕЛ	**ТЕСТ ПРОДУКЦИИ ХОМЯЧЬИХ (HAP) АНТИТЕЛ**	**ТЕСТ ПРОДУКЦИИ КРЫСИНЫХ (RAP) АНТИТЕЛ**
Вирус эктромелии [2,3]	Вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCM)[1,3]	Вирус хантаан[1,3]
Вирус хантаан[1,3]	Вирус пневмонии мышей (PVM)[2,3]	Крысиный вирус Килхама (KRV)[2,3]
K-вирус[2]	Реовирус типа 3 (Reo3)[1,3]	Вирус энцефаломиелита мышей (Theilers, GDVII)[2]
Вирус лактатдегидрогеназы (LDM)[1,3]	Вирус Сендай[1,3]	Вирус пневмонии мышей (PVM)[2,3]
Вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCM)[1,3]	SV5	Коронавирус крыс (RCV)[2]
Мелкий вирус мышей[2,3]		Реовирус типа 3 (Reo3)[1,3]
Аденовирус мышей (MAV)2,3		Вирус Сендай [1,3]
Цитомегаловирус мышей (MCMV)[2,3]		Вирус сиалодакриоадеита (SDAV)[2]
Вирус энцефаломиелита мышей (Theilers, GDVII)[2]		Вирус Тоолан (HI)[2,3]
Вирус гепатита мышей (MHV)[2]		
Ротавирус мышей (EDIM)[2,3]		
Вирус пневмонии мышей (PVM)[2,3]		
Полиомавирус[2]		
Реовирус типа 3 (Reo3)[1,3]		
Вирус Сендай[1,3]		
Тимический вирус[2]		

1. Вирусы, для которых доказана их способность инфицировать человека или приматов.

2. Вирусы, для которых данные, доказывающие способность инфицировать человека, отсутствуют.

3. Вирусы, способные реплицироваться *in vitro* в клетках человека или приматов.

Таблица 4. План действий при проведении оценки процесса очистки от вирусов и испытаний на вирусы в очищенном продукте

Ситуация	A	B	C[2]	D[2]	E[2]
СТАТУС					
Наличие вируса[1]	–	–	+	+	(+)[3]
Вирусоподобные частицы[1]	–	–	–	–	(+)[3]
Ретровирусоподобные частицы[1]	–	+	–	–	(+)[3]
Выявлен вирус	не применимо	+	+	+	–
Вирус, патогенный для человека	не применимо	–[4]	–[4]	+	неизвестно
ДЕЙСТВИЯ					
Характеристика процесса очистки от вирусов при использовании неспецифичных «модельных» вирусов	да[5]	да[5]	да[5]	да[5]	да[7]
Оценка процесса очистки от вирусов при использовании «релевантных» или специфичных «модельных» вирусов	нет	да[6]	да[6]	да[6]	да[7]
Испытания на наличие вируса в очищенном продукте	не применимо	да[8]	да[8]	да[8]	да[8]

1. Результаты испытаний на наличие вируса на уровне клеточного субстрата и (или) на необработанного продукта. Как правило, не допускается использовать в производстве контаминированные вирусом клеточные культуры. Однако, допускается использовать эндогенные вирусы (например, ретровирусы) или вирусы, являющиеся интегральной (составной) частью ГБК, если проведены надлежащие процедуры оценки вирусной очистки.

2. Использование в качестве источника материала, контаминированного вирусами (независимо от их инфекционности и (или) патогенности для человека), допускается в исключительных случаях.

3. Вирус обнаружен с помощью прямых или непрямых методов.

4. Считающийся непатогенным.

5. Необходимо провести описание очистки с помощью неспецифичных «модельных» вирусов.

6. Необходимо провести оценку процесса с помощью «релевантных» или специфичных «модельных» вирусов.

7. См. описание ситуации E.

8. Необходимо подтвердить с помощью подходящих методов, обладающих высокой специфичностью и чувствительностью обнаружения искомого вируса, что в очищенном продукте вирусы не обнаруживаются. В регистрационном досье необходимо представить данные, по меньшей мере, о трех сериях необработанного продукта, полученного опытно-промышленным или промышленным способом. Однако определять наличие неинфекционных частиц в очищенном продукте из клеточных линий (например, клетки CHO), эндогенные частицы которых хорошо описаны и налажена их очистка, как правило, не требуется.

ПРИЛОЖЕНИЕ № 1

к Главе 2 Правил проведения исследования
биологических лекарственных препаратов

Препараты, полученные из охарактеризованных банков клеток, которые были впоследствии выращены *in vivo*

Для препаратов, производимых из жидкостей, полученных от животных, инокулированных клетками охарактеризованных банков, необходимо предоставлять дополнительные сведения о животных.

Если возможно, животных, используемых при производстве биотехнологических (биологических) продуктов, необходимо отбирать из четко охарактеризованных беспатогенных колоний. Должно быть проведено полноценное исследование на наличие вирусов (например, описанные в табл. 3). Должны быть описаны карантинные мероприятия для вновь прибывших и заболевших животных, а также обеспечить достаточность всех методов изоляции, очистки и деконтаминации, применяемых в питомнике, для сдерживания распространения посторонних агентов. Это можно сделать при использовании программы-сигнализатора. Необходимо представить перечень агентов, в отношении которых проводятся испытания. В питомнике или в непосредственной близости к нему должна быть организована ветеринарная служба. Необходимо описать, насколько хорошо виварий изолирован от других отделов производственного объекта. Методы, используемые персоналом в процессе производства препарата, должны быть достаточны для обеспечения вирусной безопасности.

Необходимо полностью описать процедуры содержания животных, включая рацион, график уборки и кормления, положение о периодическом ветеринарном наблюдении, если применимо, а также сведения о

содержании животных, которым инокулирован возбудитель. Необходимо также представить описание режимов предварительной иммунизации животных, подготовки инокулята, а также точку и метод инокуляции.

Первичный собранный материал от животных может рассматриваться в качестве эквивалентна необработанного продукта, полученного из биореактора. Именно поэтому к нему применяют все положения для испытаний, описанные в Разделе IV настоящего документа. В дополнение к этому производитель должен оценить бионагрузку в необработанном продукте, определить, свободен ли материал от микоплазм, и провести видоспецифичные пробы, а также испытания *in vivo* на взрослых и новорожденных мышах.

ПРИЛОЖЕНИЕ № 2

к Главе 2 Правил проведения исследования
биологических лекарственных препаратов

Примеры полезных «модельных» вирусов

1. Неспецифичные «модельные» вирусы, обладающие широким набором физико-химических структур:

– SV40 (полиомавирус макак 1), вирус полиомиелита человека 1 (Сэбина), парвовирус животных или некоторые другие некрупные безоболочечные вирусы;

– вирусы гриппа и парагриппа, вирус Синдбис или другие безоболочечные РНК-вирусы от средних до крупных размеров;

– вирусы герпеса (например, ВПГ-1 или вирус псевдобешенства) или некоторые другие ДНК-вирусы от средних до крупных размеров.

Указанные вирусы являются лишь примерами, их использование необязательно.

2. В качестве специфичных в отношении клеточных линий грызунов «модельных» вирусов используются ретровирусы мышей.

А. Примеры вирусов, используемые в исследованиях по очистке от вирусов

В табл. А-1 перечислены некоторые вирусы, используемые в исследованиях по очистке от вирусов. Однако, поскольку это исключительно примеры, использование каких-либо вирусов из этой таблицы необязательно, производителям разрешается предлагать другие вирусы, особенно если они лучше подходят для отдельного процесса производства. Необходимо, как правило, проанализировать способность процесса очищать продукт, по меньшей мере, от трех различных вирусов с различными характеристиками.

Таблица А-1. Примеры вирусов, используемые в исследованиях очистки от вирусов

Вирус	Семейство	Род	Естественный хозяин	Геном	Оболочка	Размер (нм)	Форма	Резистентность*
Вирус везикулярного стоматита	Рабдо	Везикуловирус	Лошади, коровы	РНК	Да	70×150	Пуля	Низкая
Вирус парагриппа	Парамиксо	Парамиксовирус	Различные	РНК	Да	100-200+	Плео/сфера	Низкая
Вирус лейкемии мышей (MuLV)	Ретро	Онковирус С типа	Мыши	РНК	Да	80-110	Сферическая	Низкая
Вирус Синдбис	Тога	Альфавирус	Человек	РНК	Да	60–70	Сферическая	Низкая
Вирус вирусной диареи коров (BVDV)	Флави	Пестивирус	Коровы	РНК	Да	50–70	Плеосфера	Низкая
Вирус псевдобешенства	Герпес		Свиньи	ДНК	Да	120-200	Сферическая	Средняя
Вирус полиомиелита 1 типа	Пикорна	Энтеровирус	Человек	РНК	Нет	25-30	Икосаэдрическая	Средняя
Вирус энцефало-миокардита (EMC)	Пикорна	Кардиовирус	Мыши	РНК	Нет	25-30	Икосаэдрическая	Средняя
Реовирус 3	Рео	Ортореовирус	Различные	РНК	Нет	60-80	Сферическая	Средняя
SV40	Папова	Полиомавирус	Обезьяны	ДНК	Нет	40-50	Икосаэдрическая	Очень высокая

Парвовирусы (собак, свиней)	Парво	Парвовирус	Собаки, свиньи	ДНК	Нет	18-24	Икосаэдрическая	Очень высокая

* Резистентность к физико-химическим воздействиям основана на исследованиях процессов производства. Резистентность относительна к специфичному воздействию и используется в контексте понимания биологии вируса и характера процесса производства. Фактические результаты будут зависеть от вида воздействия.

Указанные вирусы являются примерами, их использование необязательно.

ПРИЛОЖЕНИЕ № 3

к Главе 2 Правил проведения исследования
биологических лекарственных препаратов

Статистические подходы к интерпретации результатов испытания на вирусы

Определению титра вирусов присущи те же проблемы, что и для всех биологических методов анализа. Чтобы определить достоверность исследования, необходимо проанализировать правильность (*accuracy*) определения вирусных титров и факторов (коэффициентов) снижения вирусной нагрузки, полученных на их основании, и провести валидацию методик. Цель статистического анализа – подтвердить, что исследование проведено с приемлемым уровнем компетентности в отношении вирусологических данных.

1. Аналитические методики могут быть качественными и количественными. К качественным методикам относятся методики определения инфицирующей способности на животных и методики инфекционной дозы на культуре ткани (TCID), в которых подсчитывается количество инфицированных и неинфицированных животных или клеток. Затем по доле инфицированных животных или клеток определяют инфицирующие титры. В количественных методиках определяемая инфекционность зависит от вирусной нагрузки. К количественным методикам относятся методики бляшкообразования, в которых каждая бляшка принимается за одну инфекционную единицу; ПЦР в режиме реального времени. Результаты как качественных, так и количественных аналитических методик подлежат статистической обработке.

2. Вариабельность результатов методик может быть обусловлена ошибками при разведении, статистическими (случайными) эффектами и

различиями в аналитических системах, которые либо неизвестны, либо трудно поддаются контролю. Величина таких эффектов выше при сравнении результатов различных аналитических циклов (вариация между циклами [*between-assay variation*]), чем результатов внутри одного цикла (вариация внутри цикла [*within-assay variation*]).

3. Границы 95 % доверительных интервалов результатов внутри одного цикла должны, как правило, укладываться в интервал ±0,5 lg от среднего. Вариабельность внутри цикла оценивают с помощью стандартных статистических тестов. Вариабельность между циклами можно определить путем включения препарата сравнения, значение активности (*potency*) которого должно укладываться в 0,5 lg от среднего значения, установленного в лаборатории, чтобы методика была приемлемой. При должном обосновании допускается использовать методики с худшей прецизионностью.

4. По возможности в исследованиях по очистке с «релевантными» и специфичными «модельными» вирусами необходимо рассчитывать границы 95 % доверительных интервалов для установленного фактора (коэффициента) снижения вирусной нагрузки. Если границы 95 % доверительных интервалов для вирусологических методик изучения исходного материала равны ±*s*, а для вирусологических методик изучения материала на следующем этапе обработки равны ±*a*, то границы 95 % доверительных интервалов для фактора (коэффициента) снижения равны:

$$\pm\sqrt{s^2 + a^2} \quad (1)$$

Вероятность обнаружения вирусов в низкой концентрации

Очевидно, что при низкой концентрации вируса (например, 10-1000 инфекционных частиц на литр), проба объемом несколько мл

может не содержать инфекционных частиц. Вероятность (p), что такая проба не содержит инфекционных вирусов, равна:

$$p = (\frac{\mathrm{V} - \mathrm{v}}{\mathrm{V}})^{\mathrm{n}}$$

где V (л) – общий объем подлежащего испытанию материала, v (л) – объем пробы, n – абсолютное количество инфекционных частиц, статистически распределенных в объеме V.

Если $\mathrm{V} \gg \mathrm{v}$, то уравнение приближенно описывается распределением Пуассона:

$$p = \mathrm{e}^{-\mathrm{cv}}$$

где c – концентрация инфекционных частиц на литр.

или $\mathrm{c} = \ln\left(\frac{p}{-\mathrm{v}}\right)$

Пример: если испытуемая проба объемом 1 мл, вероятность (p), что в ней не содержится вирус, истинные концентрации которого находятся в диапазоне 10-1000 инфекционных частиц на литр, равны:

c	10	100	1000
p	0,99	0,90	0,37

То есть при концентрации 1000 вирусов на литр, 37 % проб объемом 1 мл не будут содержать вирусных частиц.

Если лишь часть проб испытывается на вирусы, и результаты отрицательны, необходимо рассчитать количество вирусов, которое должно содержаться в общем количестве проб, чтобы результаты оказались положительными. Полученное значение необходимо учитывать при расчете фактора снижения вирусной нагрузки. Рекомендуется рассчитать 95 % доверительные интервалы. Однако в некоторых случаях, ввиду недостаточного количества материала, их расчет невозможен.

ПРИЛОЖЕНИЕ № 4

к Главе 2 Правил проведения исследования
биологических лекарственных препаратов

Расчет факторов (коэффициентов) снижения в исследованиях для определения очистки от вирусов

Фактор (коэффициент) снижения вирусной нагрузки отдельного этапа очистки или инактивации выражается в виде десятичного логарифма отношения вирусной нагрузки в материале до очистки к вирусной нагрузке в материале после очистки, готовом для передачи его на следующий этап. Если:

Исходный материал:

объем v', титр $10^{a'}$;

вирусная нагрузка равна $(v')\times(10^{a'})$;

Продукт, прошедший этап очистки (инактивации):

объем v'', титр $10^{a''}$;

вирусная нагрузка равна $(v'')\times(10^{a''})$,

то индивидуальные факторы (коэффициенты) снижения (R_i) рассчитываются следующим образом:

$$10^{R_i} = \frac{\mathrm{v}' \times 10^{a'}}{\mathrm{v}'' \times 10^{a''}}$$

Формула учитывает как титры, так и объемы материалов до и после этапа очистки.

Ввиду неизбежной погрешности при определении титра некоторых вирусов, индивидуальный фактор (коэффициент) снижения,

используемый для расчета совокупного фактора (коэффициента) снижения вирусной нагрузки, должен превышать 1.

Совокупный фактор (коэффициент) снижения вирусной нагрузки всего процесса производства равен сумме логарифмов индивидуальных факторов (коэффициентов) снижения каждого этапа. Он представляет собой логарифм отношения вирусной нагрузки до начала первого этапа очистки и вирусной нагрузки по завершении всех этапов очистки. Факторы (коэффициенты) снижения, как правило, выражают в логарифмических координатах, т.е. несмотря на то что остаточная инфицирующая способность вируса никогда не будет снижена до нуля, ее можно значительно снизить с математической точки зрения.

ПРИЛОЖЕНИЕ № 5

к Главе 2 Правил проведения исследования
биологических лекарственных препаратов

Расчет примерного количества частиц на дозу

Расчет применим к тем вирусам, для которых можно рассчитать исходное их количество, например, для эндогенных вирусов.

Пример:

1. Допущения

Измеренная или расчетная концентрация вирусов в сборе клеточной культуры равна 10^6/мл

Расчетный фактор очистки от вирусов составляет $>10^{15}$

Объем сбора культуры, необходимый для приготовления одной дозы препарата равен 1 л (или 10^3 мл)

2. Расчет примерного количества частиц на дозу

$$\frac{(10^6 \text{ вирусных частиц/мл}) \times (10^3 \text{ мл/доза})}{\text{фактор очистки } > 10^{15}} =$$

$$\frac{10^9 \text{ вирусных частиц/доза}}{\text{фактор очистки } > 10^{15}} = < 10^{-6} \text{ вирусных частиц/доза}$$

Таким образом, ожидаемое содержание равно менее одной частицы на миллион доз.

ГЛАВА 3. ОЦЕНКА ВИРУСНОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ИССЛЕДУЕМЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ (ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ), ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

1. Введение

Обеспечение вирусной безопасности лекарственных препаратов, полученных с помощью биотехнологических методов – комплексный процесс, при этом надежная оценка вирусной безопасности исследуемого лекарственного препарата (ИЛП) имеет критическое значение. Настоящая Глава содержит рекомендации по данным и документации о вирусной безопасности, которые необходимо представлять в разделе досье на получение разрешения для проведения клинического исследования биотехнологических препаратов для медицинского применения. Следует также руководствоваться Главой 2 настоящих Правил, в котором приведены соответствующие требования к составлению регистрационного досье. Несмотря на то что Глава 2 настоящих Правил не содержит конкретных рекомендаций по биотехнологическим лекарственным препаратам, изучаемым в клинических исследованиях, их основные принципы совпадают и подлежат выполнению.

Настоящая Глава содержит гармонизированный подход к оценке вирусной безопасности биотехнологических исследуемых лекарственных препаратов во время клинических исследований как для спонсоров, так и для регулирующих органов. Оно особенно ценно при проведении многоцентровых исследований, потенциально включающих различные государства-члены Союза.

2. Область применения

Область применения настоящей Главы распространяется на биотехнологические исследуемые лекарственные препараты для медицинского применения, произведенные из культивированных in vitro клеток, полученных из охарактеризованных банков клеток человеческого или животного происхождения, описанных в Главе 2 настоящих Правил. Многие исследуемые лекарственные препараты получены из хорошо охарактеризованных клеточных линий грызунов, например, CHO, NS0 или SP2/0, хотя также используется и находится в стадии разработки ряд других клеточных линий, использование которых следует рассматривать в индивидуальном порядке.

Положения настоящей Главы распространяются на моноклональные антитела и исследуемые лекарственные препараты, полученные методом рекомбинантной ДНК, включая рекомбинантные субъединичные вакцины. Однако настоящая Глава не применима к исследуемым лекарственным препаратам, содержащим рекомбинантные вирусы или бактерии (как реплицирующиеся, так и нереплицирующиеся), или живым аттенуированным и инактивированным вакцинам. Исследуемые лекарственные препараты, полученные из гибридомных клеток, выращенных *in vivo*, также не входят в сферу применения настоящей Главы.

В настоящей Главе изложены требования к вирусной безопасности, применимые ко всем этапам клинической разработки лекарственных препаратов. Она не распространяется на исследуемые лекарственные препараты, исследуемые исключительно в доклинических испытаниях. Требования к данным, подлежащим включению в регистрационное досье, содержатся в Главе 2 настоящих Правил.

3. Правовая основа

Проведение клинических исследований в государствах-членах Союза регулируется правом Союза и законодательством государств-членов Союза. Исследуемые лекарственные препараты, изучаемые в клинических исследованиях, должны быть произведены в соответствии с Правилами надлежащей производственной практики Союза.

4. Правила

4.1. Общие принципы

Цель исследований вирусной безопасности биотехнологических исследуемых лекарственных препаратов – подтвердить приемлемый уровень безопасности для субъектов клинических исследований.

Вирусная безопасность зарегистрированного биотехнологического лекарственного препарата обеспечивается тремя взаимодополняющими подходами, включающими:

– отбор и испытание клеточных линий и другого сырья человеческого или животного происхождения на вирусную контаминацию,

– оценку возможностей последующих после культивирования процессов обработки обеспечивать очистку от инфекционных вирусов,

– испытание препарата на определенных этапах производства на наличие контаминирующих вирусов (см. Главу 2 настоящих Правил).

В связи с экспериментальным характером производственного процесса и препарата в отношении биотехнологических исследуемых лекарственных препаратов предусматривается сокращенная программа испытаний по обеспечению вирусной безопасности в сравнении с требованиями к данным, необходимых для регистрации лекарственного препарата: во-первых, по объему оценки на наличие вирусов в клетках-

продуцентах по завершении производства или в необработанном нерасфасованном продукте (см. раздел 4.2.3) и, во-вторых, по объему исследований по валидации снижения вирусной нагрузки (см. раздел 4.2.4). Такая сокращенная программа будет применима только к клеточным линиям, относимым, согласно Главе 2 настоящих Правил, к «ситуации А» и «ситуации В». Собственный опыт компании (см. раздел 4.2.4) также может способствовать сокращению объема исследований вирусной безопасности. Помимо предоставления данных, оценку риска следует осуществлять с учетом нескольких или всех нижеследующих факторов:

– природы и истории клеточной линии;

– степени установления свойств клеточной линии;

– использования сырья человеческого и (или) животного происхождения во время производства и контроля их качества;

– возможности контаминации продукта посторонними агентами;

– опыт работы производителя с используемой клеточной линией;

– опыт применения производителем специальных методик снижения вирусной нагрузки, которые будут использоваться;

– опубликованные данные.

4.2. Обеспечение вирусной безопасности биотехнологических исследуемых лекарственных препаратов

4.2.1. Квалификация клеточной линии: испытание на наличие вирусов

Перед началом исследований I фазы необходимо выполнить испытание главного банка клеток (ГБК) на наличие вирусной контаминации в соответствии с Главой 2 настоящих Правил. Создание рабочего банка клеток (РБК) возможно только в процессе клинического исследования, поэтому в отношении некоторых биотехнологических исследуемых лекарственных препаратов, используемых на ранних

этапах клинического исследования, он может быть еще не создан. После создания первого рабочего банка клеток он должен быть испытан в соответствии с Главой 2 настоящих Правил. Тем не менее, при испытании необработанного нерасфасованного продукта в соответствии с разделом 4.2.3 (таблицей 1) испытание клеток с предельным для производства клеточным возрастом *in vitro* не требуется.

Поскольку эндогенные ретровирусы или ретровирусоподобные частицы присутствуют в большинстве клеточных линий, используемых в настоящее время, и есть вероятность того, что они будут содержаться в новой клеточной линии, особое внимание следует уделять испытанию клеточной линии на их наличие.

4.2.2. Сырье биологического происхождения

При оценке вирусной безопасности биотехнологических исследуемых лекарственных препаратов необходимо учитывать биологическое сырье (особенно животного или человеческого происхождения), используемое в производстве. Приемлемым подходом к оценке его вирусной безопасности является оценка с учетом рисков вида и происхождения сырья, условий его переработки и испытания, а также его использование в производстве лекарственных препаратов и испытания, проведенные с необработанным нерасфасованным материалом (см. раздел 4.2.3).

В отношении вирусной безопасности сырья биологического происхождения необходимо представить соответствующие документы. Следует руководствоваться документами по обеспечению безопасности при использовании бычьей сыворотки и требованиям Фармакопеи Союза по минимизации риска передачи губчатой энцефалопатии животных.

4.2.3. Испытание необработанного нерасфасованного продукта на наличие вирусов

Независимо от этапа исследования каждая серию необработанного нерасфасованного продукта, которая будет использоваться для производства материалов для клинического исследования (т.е. исследуемого лекарственного препарата), необходимо испытать в соответствии с требованиями Главы 2 настоящих Правил. Испытуемый образец должен включать клетки при необходимости, а испытания должны включать тесты *in vitro* и ПЦР-скрининг на посторонние агенты и оценку наличия ретровирусоподобных частиц, если это применимо. Для нерасфасованных материалов, полученных из клеточных линий CHO, дополнительных испытаний не требуется. Если производство основано на клеточных линиях NS0 или Sp2/0, испытания на инфекционные ретровирусы следует проводить однократно, но в случае существенных изменений в культурах клеток-продуцентов, например перевод производства на промышленный масштаб, их необходимо провести повторно. Если производство основано на иных клеточных линиях, испытания на инфекционные ретровирусы и испытания *in vivo* (в соответствии с разделом 3.2.3 Главы 2 настоящих Правил) следует проводить однократно, но в случае существенных изменений в культурах клеток-продуцентов, например перевод производства на промышленный масштаб, их необходимо провести повторно. В табл. 1 представлены рекомендации по испытаниям. Целесообразно включить испытание на мелкий вирус мышей (MMV), если клеточная линия восприимчива к этому вирусу.

При разработке испытаний для необработанного нерасфасованного материала необходимо принять во внимание источник и вирусную безопасность сырья, используемого во время культивирования клеток (см. раздел 4.2.2). Если используется сырье человеческого или животного

происхождения, например, бычья сыворотка, могут потребоваться дополнительные специальные испытания.

Таблица 1. Требования к испытаниям необработанного нерасфасованного продукта

	Испытания *in vitro*	**Испытания на инфекционные ретровирусы***	**Испытания *in vivo****
CHO	Да, все полученные нерасфасованные продукты§	Нет	Нет
NS0 Sp2/0	Да, все полученные балк-препараты§	Да, 1 раз для заданного масштаба производства	Нет
Все иные клеточные линии	Да, все полученные балк-препараты§	Да, 1 раз для заданного масштаба производства	Да, 1 раз для заданного масштаба производства

* По возможности, для выявления вирусов, ассоциированных с клетками, испытуемый материал должен содержать клетки или фрагменты клеток. В отношении клеточных культур, подвергающихся перфузии, производитель должен определить и обосновать наиболее подходящий этап для отбора проб, содержащих клетки для целей испытаний. Также допускается получение испытуемого материала из клеток, культивированных сверх срока, используемого для производства серии продукта; в этом случае необходимо обосновать выбранный подход. Испытания на инфекционные ретровирусы могут быть опущены, если более чувствительные тесты показали отрицательные результаты.

§ Количественное определение ретровирусов или ретровирусоподобных частиц следует проводить только в отношении первых трех серий нерасфасованного продукта на определенном этапе разработки (или на меньшем количестве, если произведено менее трех серий нерасфасованного продукта).

4.2.4. Валидация методов обеспечения вирусной безопасности

Цель валидации включает два этапа: во-первых, это характеристика и оценка этапов процесса, которые могут считаться эффективными в инактивации (элиминации) вирусов, и, во-вторых – количественная оценка общей величины снижения содержания вирусов (вирусных частиц), например эндогенных ретровирусных частиц. Учитывая характеристики

клеточной линии, использование сырья биологического происхождения, а также природу этапов процесса, которые могут быть эффективными в инактивации (элиминации) вирусов, в каждом случае потребуется индивидуальный подход.

Независимо от объема прямых испытаний линии клеток-продуцентов на вирусы, в связи с ограничениями методик обнаружения вирусов сохраняется возможность неизвестной контаминации клеток вирусом, изначально присутствующим в клетках или содержащимся в материале биологического происхождения, используемом во время культивирования клеток-продуцентов. Следовательно, даже если сырье биологического происхождения не используется и клеточная линия полностью проверена, необходимо оценить последующие этапы обработки всех исследуемых лекарственных препаратов на предмет способности инактивировать (элиминировать) вирусы.

Валидацию методов обеспечения вирусной безопасности следует провести до начала клинического исследования. Потенциальными контаминантами могут быть оболочечные и безоболочечные вирусы, и исследования по вирусной безопасности должны включать определение как оболочечных, так и малых безоболочечных вирусов, желательно парвовирусов. Особенно важно подтвердить то, что все вирусы или вирусные частицы, о наличии которых в нерасфасованном сборе было заведомо известно, эффективно инактивированы или элиминированы в ходе последующей обработки продукта. При ситуации В (в соответствии с определением Главы 2 настоящих Правил), содержащие эндогенные ретровирусы или ретровирусо-подобные частицы, при валидации инактивации (элиминиации) вирусов необходимо использовать ретровирус для подтверждения полной очистки от частиц, присутствующих в нерасфасованном сборе.

Исследования по снижению вирусной нагрузки следует осуществлять в соответствии с принципами, изложенными в Главе 2 настоящих Правил, однако, в соответствии с нижеописанным, не всегда требуется подтверждение устойчивости (т.е. влияние показателей процесса производства на снижение вирусной нагрузки). Необходимо представить описание соответствующих этапов очистки препарата, способствующих обеспечению вирусной безопасности. Во время инактивации (элиминации) потенциальных вирусов на этих этапах следует учитывать вирусную безопасность линии клеток-продуцентов, например вид и степень эндогенной ретровирусной контаминации или использование во время производства материалов человеческого или животного происхождения, а также возможную степень контаминации. Глава 4 настоящих Правил также содержит полезную подробную информацию об этих исследованиях.

Желательно исследовать влияние более одного этапа производства на обеспечение вирусной безопасности и произвести оценку не менее двух ортогональных стадий. Ортогональные стадии – это стадии процесса, характеризующиеся разными механизмами инактивации (элиминации) вирусов. Критерии эффективности приведены в Главе 4 настоящих Правил. Не требуется исследовать этапы производства, которые не предполагают существенного обеспечения вирусной безопасности.

Воспроизводимость эффективного этапа обеспечения вирусной безопасности должна быть подтверждена не менее чем в двух независимых экспериментах.

При проведении валидационного исследования необходимо использовать предельные параметры технологического процесса (т.е. наихудший сценарий), если они известны. Однако в ходе разработки такие наихудшие предельные параметры нового технологического процесса могут быть не установлены. В этих случаях обосновано применение

репрезентативных (модельных) условий, при условии, что производитель может подтвердить осуществление фактического процесса производства в заданном режиме.

Условия, способствующие сокращению объема вышеуказанных исследований:

– Исследование одного конкретного этапа инактивации (элиминации) вирусов может быть достаточным, если во время этого этапа может быть продемонстрировано эффективное снижение вирусной нагрузки, обусловленной широким спектром вирусов, включая малые безоболочечные вирусы, такие как парвовирусы. Однако для подтверждения полноценной очистки клеток, подпадающих под ситуацию В, от ретровирусных частиц обычно необходимо провести оценку более одного этапа производства.

– Предыдущий опыт производителя по использованию определенных стадий производства, следующих после культивирования. Если производитель разрабатывает подобные типы препаратов путем применения отработанных и хорошо охарактеризованных процессов производства, данные по снижению вирусной нагрузки таких препаратов могут быть применены к новому препарату на эквивалентном этапе производства.

Как правило, чтобы использовать данные по этому этапу производства, он должен пройти тщательную проверку, включая детальное изучение параметров процесса производства, обеспечивающих снижение вирусной нагрузки. Если в отношении конкретного этапа есть данные, которые можно использовать для более чем одного препарата, эффективность обеспечения вирусной безопасности в каждом случае должна быть сопоставимой. Обработка нового и уже производимого ранее

препарата (препаратов) до этого конкретного этапа должна осуществляться по сходной стратегии.

Необходимо представить обоснование применению внутренних данных разработчика для производства нового препарата, например, на данные по обеспечению вирусной безопасности на определенном этапе производства можно будет ссылаться, если промежуточный продукт, полученный на стадии, предшествующей этому этапу, имеет сопоставимые биохимические свойства и проходит очистку идентичными методами. Производитель должен представить критический анализ этапа производства, на котором будут применяться внутренние данные разработчика, и состав соответствующего промежуточного продукта. Эти сведения должны включать, например, тип фильтра, удельную нагрузку на фильтр, скорость потока, давление и состав промежуточных продуктов – в отношении вирусных фильтров, или размеры колонок, включая высоту слоя наполнителя, нагрузку, состав буферного раствора и промежуточных продуктов производства, а также линейные скорости потоков для хроматографических методов. Помимо этого, каждый новый препарат может иметь компоненты, не содержащиеся в предыдущих препаратах, поэтому необходимо учитывать потенциальное влияние компонентов, специфичных для этого препарата. Анализ должен полностью подтвердить вывод о том, что в обоих случаях используемый этап производства имеет аналогичную способность инактивировать (элиминировать) потенциальные вирусные контаминанты. Если сравнение этого этапа не убедительно или если база данных недостаточно убедительная, чтобы исключить опосредованное препаратом влияние на способность процесса снижать вирусную нагрузку, для подтверждения фактической эффективности этапа необходимо осуществить не менее одного цикла обработки с соответствующим вирусом. Если показатели технологического процесса

явно отличаются, например, при использовании аналогичного оборудования получены различные хроматографические профили, этап подлежит валидации в соответствии с вышеуказанной методикой и принципами, содержащимися в Главе 2 настоящих Правил.

Опубликованные данные могут оказаться полезными для определения возможностей этапа инактивировать (элиминировать) вирусы, а также способствовать пониманию механизмов, лежащих в их основе. Это упрощает изучение ключевых технологических параметров, влияющих на снижение вирусной нагрузки, и установление наихудших предельных значений на определенных этапах, подлежащих валидации. Тем не менее, применение опубликованных факторов снижения вирусной нагрузки к конкретному препарату потребует расширенного подтверждения сопоставимости технологических процессов, промежуточных продуктов и гарантирования того, что опосредованные препаратом факторы производства не влияют на снижение вирусной нагрузки. Снижение вирусной нагрузки может зависеть от разных технологических параметров и конкретного состава промежуточного продукта. Более того, заданная способность по снижению вирусной нагрузки может быть специфична для выбранных вирусов (например, хроматографические методы). Именно поэтому опубликованные данные должны быть тщательно проанализированы.

В связи с использованием специализированных колонок и малым количеством серий препарата на ранних этапах разработки, в отношении исследуемых лекарственных препаратов специальных исследований по повторному использованию и регенерации колонок, как правило, не требуется. Тем не менее, во всех случаях интенсивного повторного использования колонок для производства исследуемых

лекарственных препаратов этот факт следует учитывать при исследовании способности процесса снижать вирусную нагрузку.

Ревалидация методов снижения вирусной нагрузки. Данные по исследуемым лекарственным препаратам, использованным в предыдущем исследовании (например, первом исследовании I фазы), могут быть применены в последующих исследованиях. Однако во время разработки исследуемых лекарственных препаратов могут произойти значительные изменения в процессе производства, и эти изменения могут повлиять прямо или косвенно (если изменения не учитывались во время оценки этапов производства) на способность снижения вирусной нагрузки. Следовательно, если имеющиеся данные не отражают производство исследуемых лекарственных препаратов, используемых в предстоящем клиническом исследовании, повторная оценка должна быть произведена до начала следующих клинических исследований. В зависимости от введенных изменений следует пересмотреть подбор вирусов и при необходимости ввести дополнительные вирусы для обеспечения возможностей процесса снижать вирусную нагрузку. Даже если в соответствии с Главой 2 настоящих Правил в продленных клинических исследованиях на поздних стадиях (например, III фазы) полная валидация не требуется, производители должны обосновать выбранный подход с учетом модельных вирусов и оценки этапов процесса производства. В соответствии Главой 2 настоящих Правил полномасштабные валидационные исследования вирусной безопасности необходимо проводить после создания окончательного процесса производства и очистки.

4.2.5. Описание и аттестация аналитических методик

Для испытания исходного материала и промежуточных продуктов на наличие вирусов или при оценке способности процесса снижать

вирусную нагрузку могут использоваться различные разновидности аналитических методик. Методы исследований по обнаружению вирусов включают широкий спектр испытаний *in vitro* по оценке цитопатического эффекта (ЦПД) и гемоадсорбции на множестве индикаторных клеточных линий, испытаний *in vivo* и специфических испытаний на наличие вирусов с применением, например, ПЦР. Для проведения испытаний на наличие ретровирусов могут быть использованы трансмиссионная электронная микроскопия (TEM), анализ методом совместного культивирования с использованием разных линий клеток и исследования на обратную транскриптазу, такие как усиленная в препарате обратная транскриптаза (PERT).

Независимо от фазы клинического исследования необходимо обосновать пригодность аналитических методик, используемых для проверки на наличие вирусов, как качественных, так и количественных методов. Как правило, применяются разделы 3.2 и 4 Главы 2 настоящих Правил. Чтобы дать точное представление об используемом методе и способе его контроля, следует предоставить достаточно подробное описание аналитических методик, включая реагенты, контроли, процедуру испытания и критерии валидности. При использовании фармакопейных методик необходимо привести точные ссылки.

При необходимости в отношении аналитических методик, использованных при квалификации системы банков клеток и других исходных материалов, так же как для испытания необработанного нерасфасованного материала на наличие вирусов, следует предоставить табличное резюме результатов квалификации и (или) валидации аналитических методик (например, результаты значений, полученных в отношении специфичности с применением положительного и отрицательного контроля, чувствительности, количественного

определения и предела обнаружения). Полный отчет о квалификации каждого метода представлять не следует, но необходимо иметь их в наличии, чтобы представить по запросу.

В отношении дополнительных аналитических методик, используемых в исследованиях по снижению вирусной нагрузки, необходимо представить подробную информацию, подтверждающую пригодность этих методик для определения количества вирусных частиц. Информация должна включать исследования по оценке, например, предела количественного определения, специфичности, вариабельности внутри исследования, влиянии буферного раствора (матрицы) на определение вирусной инфекционности, а также цитотоксичности препарата и буферного раствора, которые могут повлиять на способность выбранных модельных вирусов инфицировать индикаторные клетки. Рекомендации по статистической оценке результатов вирусологических испытаний приведены в Приложении 3 к Главе 2 настоящих Правил. Если применимо, возможно принятие отчета контрактной лаборатории, выполнившей проверку на наличие вирусов.

4.3. Оценка риска вирусной безопасности

Помимо получения и предоставления данных по вирусной безопасности препарата, вместе с заявлением о получении разрешения на проведение клинического исследования необходимо представить оценку риска вирусной безопасности. Основными факторами следует считать факторы, указанные в разделе 4.1 и 4.2.1-4.2.4. В соответствии с Главой 2 настоящих Правил необходимо учитывать результаты испытаний клеточной линии и всего сырья человеческого и животного происхождения на наличие вирусных контаминантов, валидацию вирусной безопасности и проверку препарата на соответствующих этапах процесса производства на отсутствие инфекционных вирусов.

Оценка риска должна включать определение количества предполагаемых частиц на дозу (см. Приложение 5 к Главе 2 настоящих Правил) и содержать все этапы производственного процесса.

В отдельных случаях при оценке совокупного риска для клинического исследования целесообразно рассмотреть такие клинические параметры, как показание к применению, доза, частота применения, число лиц, которые подвергнутся экспозиции, длительность исследования и иммунологический статус пациентов. В этом контексте следует учесть, что некоторые из этих параметров могут измениться в период между фазами I, II и III. Клинические параметры не должны рассматриваться в качестве параметров, используемых для принятия первоочередных решений, но они могут учитываться при принятии заключительного решения о выдаче разрешения на проведение клинического исследования с точки зрения вирусной безопасности.

Каждую ситуацию следует рассматривать индивидуально.

4.4. Повторная оценка вирусной безопасности во время исследования

Во время испытаний исследуемых лекарственных препаратов часто вносятся технологические изменения, при этом некоторые из них могут повлиять на ранее определенную оценку вирусной безопасности. Во всех случаях внесения изменений в процесс производства исследуемого лекарственного препарата, для которого уже была выполнена оценка риска вирусной безопасности, производитель должен документировать все внесенные изменения и принять решение о необходимости переоценки риска по каждому из них. В некоторых случаях будет ясно, что изменение не влияет на оценку риска вирусной безопасности. Однако явном влиянии или неопределенности исхода, следует провести повторную оценку риска и в необходимых случаях провести надлежащие экспериментальные

исследования. В этих случаях необходимо учитывать все аспекты обеспечения вирусной безопасности.

В отношении изменений, которые могут снизить валидность исследований по вирусной безопасности, следует обратиться к абзацу «Ревалидация» раздела 4.2.4.

4.5. Формат документации для получения разрешения на проведение клинического исследования

В составе досье для получения разрешения на проведение клинического исследования необходимо предусмотреть отдельный блок документов (раздел), посвященный вирусной и ТГЭ безопасности. Все данные должны быть собраны в этом разделе воедино, что позволит оценить их самостоятельно и во всей полноте с минимальным числом ссылок на другие разделы основного досье. Полные отчеты, включая исходные данные об испытании клеточных линий и исследования по вирусной безопасности, необходимо предоставлять по требованию. Во время оценки представленных данных уполномоченные органы вправе запросить эти отчеты, чтобы получить наиболее точное и ясное представление о вирусной безопасности исследуемых лекарственных препаратов. Исходные данные могут быть представлены контрактными или собственными лабораториями как часть отчета. Если заявитель использует ранее полученные собственные данные (т.е. данные по другим препаратам), необходимо предоставить достаточный комплект данных, позволяющих оценить собственные данные и получить уверенность в том, что они валидны или обосновывают разработку рассматриваемого исследуемого лекарственного препарата.

ГЛАВА 4. ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДОВ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ВИРУСНОЙ БЕЗОПАСНОСТИ: РАЗРАБОТКА, ПРОВЕДЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ВАЛИДАЦИИ МЕТОДОВ ИНАКТИВАЦИИ И УДАЛЕНИЯ ВИРУСОВ

1. Введение

1.1 В настоящей Главе рассматривается необходимость и вклад валидационных исследований на вирусы по обеспечению вирусной безопасности биологических препаратов. Основная цель данной Главы заключается в представлении рекомендаций по планированию валидационного исследования, включая выбор используемых вирусов, и интерпретации полученных данных, особенно в отношении определения этапа процесса, который можно считать эффективным для инактивации и (или) элиминации вирусов.

1.2 В данной Главе рассматривается валидация процедур инактивации и (или) элиминации вирусов из всех категорий биологических лекарственных препаратов для медицинского применения, за исключением живых вирусных вакцин (в том числе генно-инженерных живых векторов). Виды рассматриваемых препаратов:

- препараты, получаемые при культивировании *in vitro* клеточных линий человеческого или животного происхождения,
- препараты, получаемые при культивировании *in vivo* или из органов и тканей человека или животных,
- препараты, полученные из крови или мочи, или других биологических жидкостей человека или животных.

1.3 Риск вирусной контаминации характерен для всех биологических препаратов, производство которых предполагает

использование материала животного или человеческого происхождения. Вирусная контаминация биологического препарата может быть обусловлена исходным материалом, например, банками клеток животного происхождения, кровью человека, тканями человека или животных; посторонние агенты могут быть привнесены в процесс производства, например, при использовании сыворотки животных при культивировании клеток.

1.4 В прошлом ряд биологических препаратов, вводимых человеку, был контаминирован вирусами. В некоторых случаях вирус обнаруживался лишь спустя годы после ввода препарата в оборот, поскольку контаминация происходила до получения достаточных знаний о наличии инфекционных агентов. Основной причиной такой передачи вирусов была контаминация исходных материалов. Примерами служат: вакцина для профилактики желтой лихорадки, которая была контаминирована вирусом лейкоза птиц, который естественным образом инфицирует куриные яйца; вирус SV40 контаминировавший вакцины для профилактики полиомиелита и аденовирусной инфекции, производимые в 1950-е годы на первичных культурах клеток почек, взятых от макак-резусов, которые являются естественным резервуаром вируса SV40. Кроме того, вирусы, содержащиеся в плазме человека, например, ВИЧ и вирус гепатита С, контаминировали препараты крови. Контаминация биологического препарата может также происходить при использовании инфицированного материала в процессе производства или с вспомогательным веществом. Наиболее известным случаем является вакцина для профилактики желтой лихорадки, контаминированная вирусом гепатита В, содержавшегося в сыворотке человека, использованной в качестве стабилизатора в 1940-х годах.

1.5 В целях контроля потенциальной вирусной контаминации биологических препаратов можно использовать три основных взаимодополняющих подхода:

(i) отбор и испытание исходных материалов на предмет отсутствия обнаруживаемых вирусов,

(ii) испытание способности производственных процессов элиминировать или инактивировать вирусы,

(iii) испытание препарата на соответствующих этапах производства на предмет отсутствия обнаруживаемых вирусов.

Ни один из подходов сам по себе не дает достаточной гарантии, поэтому в целях ее достижения необходимо использовать их комбинацию.

1.6 Испытание исходных материалов является обязательным условием минимизации вирусной контаминации. Испытания могут обнаруживать один или более видов вирусов, однако ни одно отдельное испытание не способно подтвердить присутствие всех известных вирусов. Более того, в целях получения положительного результата любые аналитические системы требуют некоторой минимальной вирусной контаминации, испытания также ограничены статистическими погрешностями при отборе проб. Некоторые испытания, например, на антитела к вирусному гепатиту С в плазме человека, способны измерять маркеры инфекции, которые появляются спустя некоторое время после инфицирования. Аналогичные соображения справедливы и в отношении испытания лекарственного препарата.

1.7 В связи с этим, подтверждение отсутствия в биологическом лекарственном препарате инфекционных вирусов во многих случаях происходит не только за счет прямого испытания на их наличие, но также путем подтверждения того, что процесс производства способен

элиминировать или инактивировать их. Валидация процесса инактивации и (или) элиминации вирусов может играть ключевую роль в установлении безопасности биологических препаратов, особенно при высокой вероятности контаминации исходного материала и сырья патогенными для человека вирусами, например, препаратов, полученных из плазмы. Кроме того, поскольку во многих случаях в прошлом происходила контаминация агентами, о которой не было известно, и даже отсутствовали подозрения о такой возможности на момент производства, оценка процесса может дать определенную уверенность в том, что широкий спектр вирусов (включая неизвестные опасные вирусы) подвергается элиминации.

1.8 Целью настоящей Главы является представление общих принципов проведения валидационных исследований и вирусологического подхода, который необходимо использовать при планировании валидационных исследований на вирусную нагрузку. Производители должны использовать правила, содержащиеся в настоящей Главе в отношении конкретного препарата, принимая во внимание свойства исходного материала и сырья, используемых при производстве и процедурах очистки, а также любые другие факторы, которые могут влиять на этот аспект безопасности. Производители должны объяснить и обосновать подход, использованный ими в исследованиях по оценке элиминации вирусов в регистрационном досье.

2. Источники вирусной контаминации

Вирусная контаминация биологических препаратов может быть обусловлена следующим:

2.1 Исходный материал и сырье могут быть контаминированы вирусами, инфицирующими вид животных, являющийся источником

материала или сырья. Кровь может содержать различные вирусы, и применение препаратов, полученных из плазмы человека, приводило к инфицированию вирусами гепатитов В и С, ВИЧ, парвовирусом В19 и иногда вирусом гепатита А. Мышиные вирусы, некоторые из которых патогенны для человека, могут контаминировать мышиные гибридомы. Клеточные линии, предназначенные для осуществления генетической манипуляции, могут быть контаминированы вирусами, в связи с чем необходимо внимательно подходить к их выбору и проводить испытания на предмет отсутствия обнаруживаемых посторонних агентов еще до генетической манипуляции, чтобы начать работу с должным образом охарактеризованной клеточной линией.

2.2 Клетки могут быть источником латентной или персистирующей инфекции, например, вирусом герпеса или ретровирусом, которые могут передаваться вертикально от одного поколения клеток к следующему в виде вирусного генома, и который может периодически экспрессироваться в качестве инфекционного вируса.

2.3 При создании производственной клеточной линии может быть привнесен контаминирующий вирус, характерный для других видов животных, например, трансформированная вирусом Эпштейна-Барр лимфобластоидная клеточная линия человека, секретирующая моноклональные антитела, может быть инфицирована мышиным ретровирусом после слияния с клетками миеломы мышей.

2.4 Посторонние вирусы могут быть привнесены при использовании в процессе производства контаминированных животных продуктов, например, клеточные культуры могут быть контаминированы бычьими вирусами вследствие использования бычьей сыворотки, или мышиные моноклональные антитела, используемые в аффинной хроматографии, могут контаминировать препарат вирусами мышей.

2.5 Возможны иные источники контаминации, например, производственный персонал или сырье небиологического происхождения.

3. Процесс валидации

3.1 Цель валидационных исследований по очистке от вирусов заключается в:

(i) подтверждении того, что процесс производства эффективно инактивирует и (или) элиминирует вирусы, которые известны своей способностью контаминировать исходные материалы и сырье или вирусы, которые, предположительно, обладают такими свойствами, и

(ii) непрямом подтверждении того, что процесс производства способен инактивировать и (или) элиминировать новые или непредвиденные вирусы.

Это достигается за счет преднамеренного добавления (*spiking*) вируса к материалу, находящемуся на различных этапах производства, и измерения степени его элиминации или инактивации в ходе последующего этапа или этапов. Этот подход позволяет определить этапы производства, которые эффективны в обеспечении снижения содержания инфекционного вируса; он характеризует общую способность процесса элиминировать инфекционность контаминирующих вирусов.

3.2 Валидационные исследования на вирусы, подобно прямому испытанию материалов на соответствующих этапах, вносят вклад в обеспечение вирусологической безопасности препарата. Вместе с тем, все валидационные исследования на вирусы следует рассматривать как некоторую приближенную оценку истинных возможностей процесса, поскольку проведение идеального валидационного исследования

процесса может оказаться затруднительным в связи с вовлечением большого числа сложных переменных. Результаты свидетельствуют о том, что даже незначительные модификации в процедуре или определенном лабораторном штамме используемого вируса могут оказывать большое влияние на элиминацию и инактивацию вирусов.

3.3 Если исходный материал или сырье недостаточно охарактеризованы, например, кровь, ткани и органы человека или животных, или если культивирование клеток осуществлялось в условиях *in vivo*, повышается вероятность вирусной контаминации, поэтому процесс производства, как правило, должен включать один или несколько эффективных этапов инактивации и (или) элиминации вирусов. Препараты, полученные из плазмы, вызывают особые опасения в отношении вирусной безопасности; специальные рекомендации приведены в Главе настоящих Правил, посвященной плазме.

3.4 Ранее полагали, что, если исходный материал (такой как полностью охарактеризованный банк клеток) представлял меньший вирусологический риск, процесс очистки, как правило, не включал специального этапа инактивации и (или) элиминации вирусов, и считали, что валидированный процесс очистки обеспечивал достаточную степень инактивации и (или) элиминации вирусов. Имеющийся клинический опыт не обнаружил какие-либо недостатки этого подхода. Однако некоторые производители моноклональных антител (МкАТ) используют специальные этапы инактивации и (или) элиминации вирусов в процессе производства, поскольку клеточные линии-продуценты МкАТ мышиного происхождения выделяют различное количество потенциально инфекционных ретровирусов.

3.5 Следует помнить, что системам культур клеток присуще поддержание репликации вирусов. В связи с этим, несмотря на то, что

банк клеток хорошо охарактеризован, сохраняется риск вирусной контаминации культуры; имеются сообщения о единичных случаях контаминации посторонними вирусами.

3.6 Обоснование проведения требуемых валидационных исследований и их объем зависят от процесса производства и типа препарата (например, вида животных, являющихся источником исходного материала, степени вариабельности исходного материала и сырья, стабильности активного продукта и т.д.). Достаточность исследований будет определяться в индивидуальном порядке.

4. Выбор вирусов для валидации

4.1 Вирусы для целей валидации должны, во-первых, как можно ближе по своей природе к вирусам, которые могут контаминировать препарат, а, во-вторых, обладать как можно более широким диапазоном физико-химических свойств, чтобы определить способность системы элиминировать вирусы в целом.

4.2 В большинстве валидационных исследований используются штаммы вирусов, которые легко получить и количественно определить. Различные лабораторные штаммы вирусов могут обладать отличными друг от друга, а также от естественно встречающихся вирусов свойствами. Следовательно, любой вирус, использованный в валидационном исследовании, является, фактически, «модельным» вирусом. Производитель должен обосновать выбор вирусов в соответствии с целями валидационного исследованиями и принципами, изложенными в настоящей Главе. В случае, когда два сходных вируса можно использовать для валидационых исследований из-за их большого сходства с возможными контаминантами либо из-за сходства их

свойств, следует использовать более резистентный вирус, если не обосновано иное.

4.3 Примеры выбора вирусов:

(i) Концентраты факторов свертывания, полученные из плазмы человека, подвергались контаминации ВИЧ. В связи с этим процесс производства подобных материалов необходимо оценить на его способность инактивировать и (или) элиминировать инфекционный ВИЧ.

(ii) Клеточные линии, полученные от грызунов, как правило, содержат эндогенные ретровирусные частицы, которые могут быть инфекционными (частицы С-типа) или неинфекционными (частицы А-типа). Если исходный материал или сырье получают из клеточных линий грызунов, процесс производства необходимо оценить на его способность инактивировать и (или) элиминировать один из близкородственных лабораторных ретровирусов мышей.

(iii) Примерами вирусов, обладающих широким диапазоном физико-химических свойств, использованных для оценки общей способности процесса элиминировать вирусную инфекционность, являются:

a) SV40, полиовирус и парвовирус животных – в качестве небольших безоболочечных вирусов,

b) парагрипп или мышиный ретровирус – в качестве крупных оболочечных РНК-вирусов,

c) герпесвирус – в качестве крупного ДНК-вируса.

Примеры вирусов, использованных в прошедших валидационных исследованиях, приведены в таблице 1. Однако поскольку эти вирусы и вирусы, описанные выше, являются исключительно примерами, их использование не является обязательным, поэтому производители могут использовать другие вирусы, особенно более подходящие для

конкретных процессов. Более подробные рекомендации по выбору вирусов в целях валидации процессов производства препаратов из плазмы приведены в Главе настоящих Правил, посвященной плазме.

4.4 Необходимо располагать эффективным, чувствительным и надежным методом количественного определения инфекционности использованных вирусов. Предпочтительно использовать вирусы, которые можно получить в высоком титре, однако это не всегда достижимо.

4.5 Препараты, получаемые из овечьих, козьих и бычьих тканей, могут быть контаминированы агентами трансмиссивной губчатой энцефалопатии, такими как скрейпи, которые накапливаются в центральной нервной системе и лимфоидной ткани. Эти агенты являются предметом соответствующей статьи (монографии) Фармакопеи Союза и отдельной Главы настоящих правил.

5. Дизайн валидационных исследований

5.1 Валидационные исследования предполагают намеренное добавление вирусов на различных этапах производства и измерение степени его элиминации (инактивации) в ходе последующего специального этапа или этапов. Необязательно валидировать каждый отдельный этап процесса производства. Предметом валидационного исследования необходимо сделать лишь те этапы, которые, вероятнее всего, вносят вклад в инактивацию (элиминацию) вируса.

5.2 Правила надлежащей производственной практики Союза не допускают намеренное привнесение какого-либо вируса в производственные мощности. В связи с этим валидацию необходимо проводить на отдельном лабораторном оборудовании, предназначенном для вирусологической работы, на разукрупненной (уменьшенной) версии процесса производства; ей должен заниматься персонал с

вирусологическим опытом и опытом промышленной биоинженерии. Исследования необходимо проводить в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики Союза.

5.3 В целях оценки вирусной безопасности препарата обязательным условием принятия результатов, полученных на разукрупненной системе, является сопоставимость модельных и полномасштабных процедур. В связи с этим, необходимо путем сравнения таких параметров процесса, как pH, температура, концентрация белка и других компонентов, время реакции, высота колонки (column bed height), линейная скорость потока, отношение скорости потока к высоте (bed height), профиль элюирования и эффективность этапа (например, выход, баланс, специфическая активность, состав), подтвердить валидность разукрупнения. Необходимо проанализировать неизбежные отклонения с позиций их потенциального влияния на результаты.

5.4 По возможности, необходимо показать, за счет какого процесса достигается снижение вирусной инфекционности: инактивации вируса или элиминации вирусных частиц. Этого можно достичь, определяя кинетику снижения и (или) баланса сообразно обстоятельствам. Процесс, снижающий вирусную инфекционность, потенциально легче поддается моделированию, чем таковые, обеспечивающие элиминацию частиц. Необходимо изучить кинетику инактивации этапа инактивации вирусов и описать ее в отчетах в табличном и графическом формате. Если слишком быстрая инактивация не позволяет отразить кинетику с помощью условий процесса, необходимо провести дополнительные исследования, чтобы доказать, что инфекционность действительно снижается за счет инактивации. Таким образом, необходимо внедрить надлежащие контроли, направленные на обнаружение возможного

искажающего влияния образца или матрицы, в которую привнесен вирус, на методику количественного определения с установлением пределов обнаружения.

5.5 Необходимо изучить производственные параметры, влияющие на эффективность этапа инактивировать (элиминировать) вирусы, и привести результаты, использованные для установления надлежащих внутрипроизводственных пределов содержания. К критическим параметрам относятся:

– такие механические параметры, как скорость потока, скорость перемешивания, размеры колонок, повторное использование колонок и т.д.

– такие физико-химические параметры, как содержание белка, pH, температура, содержание влаги и т.д.

5.6 Антитела, содержащиеся в исходном материале, могут влиять на поведение вируса на этапах разделения и инактивации. В валидационных исследованиях необходимо учесть данное обстоятельство.

5.7 Валидность достигаемого лог-снижения вирусной нагрузки определяется влиянием вариации критических параметров процесса, использованных для установления внутрипроизводственных пределов.

5.8 Опубликованные работы по способности схожих или таких же процессов инактивировать (элиминировать) вирусы могут позволить выявить наиболее эффективные этапы. Однако вариабельность, присущая валидационным исследованиям и обусловленная необходимостью моделирования процесса, выбора используемых вирусов и определения параметров полномасштабного производства в лабораторном масштабе, означает, что данные о валидации, должны основываться на экспериментальных исследованиях, представленных самим заявителем.

5.9 Количество добавляемого в исходный материал вируса на производственном этапе, подлежащем изучению, должно быть как можно большим, чтобы определить способность производственного этапа должным образом инактивировать (элиминировать) вирусы. Однако количество добавляемого вируса не должно существенно нарушать состав производимого материала (количество добавляемого вируса обычно составляет менее 10 %). По возможности, вычисленные факторы снижения вирусной нагрузки должны основываться на вирусе, который можно обнаружить в исходном материале с добавленным вирусом, а не на количестве добавленного вируса.

5.10 По возможности, вирус из образцов, взятых из модельных экспериментов, следует титровать без дальнейших манипуляций, таких как ультрафильтрация. Если дальнейшая обработка неизбежна, например, удаление ингибиторов или токсических веществ, или предполагается хранение, направленное на обеспечение одновременного титрования всех образцов, необходимо включить надлежащие контроли с целью определения, какое влияние оказывают эти процедуры на результат исследования. Влияние образца на систему обнаружения, включая токсические эффекты, необходимо документировать, поскольку они влияют на пределы обнаружения.

5.11 Количественное определение инфекционности необходимо проводить в соответствии с принципами, изложенными в Правилах надлежащей лабораторной практики Союза; они могут включать бляшкообразование, обнаружение других цитопатических эффектов, таких как образование синцития или очагов, титрования по конечным точкам (например, методики определения TCID50), обнаружение синтеза вирусных антигенов и другие методы. Метод с целью обеспечения надлежащей статистической правильности результата

должен обладать достаточной чувствительностью и воспроизводимостью, проводиться с достаточным количеством повторов и контролями (см. Приложение 1).

5.12 Методы амплификации нуклеиновых кислот, например, ПЦР, являются многообещающим подходом, обладающим большой чувствительностью для выявления вирусных геномов, они также способны обнаруживать такие вирусы, как гепатит В и С, которые не растут на культурах клеток. Однако важным ограничением этой технологии является обнаружение инактивированного вируса в методике амплификации генома, что может недооценивать степень вирусной инактивации, достигнутой с помощью потенциально эффективного процесса. С другой стороны, ПЦР может обладать ценностью в исследованиях процессов, зависящих от элиминации вирусов. Основными затруднениями при использовании этой технологии являются квантификация, стандартизация, контроль качества и интерпретация результатов. Необходимо однозначно валидировать и стандартизировать эти методики перед их взятием на вооружение, необходимо проявлять предельную осторожность при интерпретации как положительных, так и отрицательных результатов.

5.13 Необходимо обеспечить надлежащие уничтожение любого вируса, который потенциально мог задержаться в системе, перед повторным использованием последней, например, путем очистки колонок и т.д.

6. Интерпретация данных

6.1 При определении эффективности этапа инактивации (элиминации) вирусов необходимо учитывать комбинацию факторов. Оценка этапа лишь на основании количества инактивированного

(элиминированного) вируса может привести к заключению о том, что процесс, обеспечивающий определенную степень снижения содержания вирусов, будет приводить к получению безопасного препарата. Это не всегда верно. Следующие факторы вносят вклад в эффективность этапа, поэтому в каждом случае необходимо тщательно оценивать следующее:

(i) Правильность использованных испытуемых вирусов (см. раздел 4).

(ii) Дизайн валидационных исследований (см. раздел 5).

(iii) Достигнутое значение снижения вирусной нагрузки (lg). Факторы снижения вирусной нагрузки, равные или превышающие 4,0 lg, свидетельствуют об однозначном влиянии на конкретный исследуемый испытуемый вирус. Вместе с тем, следует отметить, что численное значение фактора снижения вирусной нагрузки нельзя использовать в качестве единственной, абсолютной меры эффективности этапа.

(iv) Кинетика инактивации. Она указывает, является ли измеренный лог-фактор снижения консервативной оценкой. Инактивация вирусов, как правило, не является простой реакцией первого порядка; она обычно состоит из быстрой начальной фазы с последующей медленной фазой. Однако существенное снижение скорости инактивации со временем может свидетельствовать о снижении эффективности инактивирующего агента или о том, что остаточное содержание вирусов устойчиво к инактивирующему агенту, а это значит, что этап не является ни высокоэффективным, ни устойчивым.

(v) Характер инактивации (элиминации) и ее селективность в отношении лишь определенных классов вирусов. Этап процесса может быть высокоэффективен в отношении одних вирусов и неэффективен в отношении других, например, обработка Р/Д эффективна против оболочечных, но не безоболочечных вирусов.

(vi) Подверженность инактивации (элиминации) вирусов небольшим вариациям параметров процесса будет влиять на степень доверия к этапу.

(vii) Пределы чувствительности методик количественного определения.

На основании совокупной оценки вышеперечисленных факторов принимается решение об отнесении этапа к эффективным, умеренно эффективным или неэффективным по способности к инактивации (элиминации) вирусов.

6.2 Следующие примеры иллюстрируют некоторые из этих принципов, однако они не являются ни определяющими, ни всеохватывающими:

(i) Если на этап процесса привнесено 6,0 lg вируса и из них обнаружено 4,0 lg, этап нельзя признать эффективным, хотя он и может вносить вклад в общую элиминацию.

(ii) Если на этап процесса привнесено 6,0 lg вируса, однако вследствие цитотоксичности препарата предел чувствительности методики в препарате составляет 4,0 lg, подтверждается лишь элиминация 2,0 lg вируса, а этап не признается эффективным. Этап процесса фактически способен элиминировать большее количество вируса, что можно подтвердить с помощью другого дизайна эксперимента.

(iii) Если на этап процесса привнесено 6,0 lg вируса и из них обнаружено 2,0 lg, элиминировано значительное количество вируса. Препарат не является вирусологически стерильным. Однако если такое снижение содержания вирусов воспроизводимо и на него не влияют переменные процесса, процесс обладает некоторой эффективностью. Он вносит вклад в совокупное снижение вирусной нагрузки и может признаваться в качестве такового.

(iv) Если на этап процесса привнесено 6,0 lg вируса и он не обнаруживается в препарате с пределом чувствительности, равным 2,0 lg, подтверждена элиминация приблизительно 4,0 lg вируса. Это существенная цифра, а процесс, фактически, способен элиминировать гораздо большее количество, чем можно количественно определить или заявить.

(v) Если вирус подвергается инактивации, важна кинетика снижения инфекционности. Если этап процесса предполагает продолжительную инкубацию, например, нагревание в течение десяти часов, а инфекционность быстро достигает пределов обнаружения, процесс, вероятнее всего, обладает большим, чем зачастую можно подтвердить, вирулицидным эффектом. С другой стороны, если инфекционность снижается медленно, а пределы обнаружения достигаются к концу обработки, этап дает меньшую гарантию вирусной безопасности.

6.3 Процессы разделения, в целом, не являются эффективными этапами элиминации вирусов, однако они могут вносить вклад в их элиминацию. Процессы разделения, как правило, обладают рядом переменных, которые сложно поддаются контролю и зачастую трудно разукрупняются для валидационных целей. Более того, разделение зависит от крайне специфичных физико-химических свойств вируса, которые влияют на его взаимодействие с гелевыми матрицами, и свойствами преципитации. Таким образом, разделение модельного вируса может полностью не соответствовать профилю разделения целевого вируса в связи с относительно небольшими различиями в таких поверхностных свойствах, как гликозилирование. Даже релевантный вирус, полученный в лаборатории, может проявлять в этом отношении другие свойства по сравнению с «диким» вирусом. Однако если процесс разделения дает воспроизводимое снижение вирусной нагрузки и если параметры производства, влияющие на разделение,

можно должным образом охарактеризовать и контролировать, и если желаемую фракцию можно надежно отделить от фракции, предположительно содержащей вирусы, тогда он может подпадать под критерии эффективного этапа.

6.4 Цель валидации заключается в выявлении эффективных этапов инактивации (элиминации) вирусов и получении оценки общей способности процесса производства инактивировать (элиминировать) их. Совокупный фактор снижения вирусной нагрузки, как правило, выражается суммой отдельных факторов (см. Приложение 2). Однако простое суммирование малых факторов снижения может вводить в заблуждение. Снижение вирусного титра на 1,0 lg и менее является ненадежным вследствие ограничений валидационных исследований на вирусы, в связи с чем факторы такой величины следует игнорировать. Производители должны дифференцировать эффективные этапы от этапов процесса, которые могут вносить вклад в элиминацию, но обладающие меньшей надежностью. Необходимо также учесть вероятность резистентности вируса, выжившего на одном этапе, к последующему этапу, или, наоборот, наличия у него повышенной восприимчивости. В целом, один этап, обладающий большим эффектом, дает большую гарантию вирусной безопасности, чем несколько этапов, обладающих таким же совокупным эффектом.

6.5 Если с помощью процесса производства достигается небольшое снижение вирусной нагрузки и основным фактором безопасности препарата является элиминация вируса, необходимо предусмотреть специфический дополнительный этап или этапы инактивации (элиминации).

6.6 В отношении всех вирусов производители должны обосновать приемлемость достигнутых факторов снижения вирусной нагрузки. Результаты будут рассматриваться в индивидуальном порядке.

6.7 Необходимо строго следовать принципу Правил надлежащей производственной практики Союза, предусматривающему разграничение материала, подвергшегося эффективному этапу инактивации (элиминации) вирусов, от необработанного материала.

7. Ограничения валидационных исследований

Валидационные исследования вносят вклад в обеспечение установления приемлемого уровня безопасности лекарственного препарата, самостоятельно не обеспечивая безопасность. Ряд факторов планирования и проведения валидационных экспериментов по очистке от вирусов может привести к некорректной оценке способности процесса элиминировать естественную вирусную инфекционность. К этим факторам относятся следующие:

7.1 Опыт свидетельствует, что различные лабораторные штаммы вируса могут отличаться по своей чувствительности к одному и тому же виду обработки. Таким образом, конкретный выбранный вирус может не отражать свойства вируса, для моделирования которого он выбран. Природные вирусы могут обладать непредсказуемыми свойствами, например, при взаимодействии с липидами, которое могут влиять на их свойства. Вирусные препараты, используемые в целях валидации процесса производства, скорее всего, получают на культуре тканей. Поведение вируса из тканевой культуры на производственном этапе может отличаться от такового природного вируса, например, если природный и культивированный вирусы отличаются по чистоте или степени агрегации. Необходимо документировать штаммы вируса, их

культивирование и количественное определение, а также пробоподготовку и хранение.

7.2 В некоторых случаях сложение логарифмических факторов снижения не допустимо. Например, если матрица способна адсорбировать 10^4 инфекционных единиц вируса и далее не способна адсорбировать материал с сопоставимой аффинностью, тогда будут удалены все вирусы, введенные в количестве 10^4 инфекционных единиц, но только 1 % при введении 10^6. Таким образом, измеряемый клиренс будет розниться в зависимости от введенного титра.

7.3 Инактивация вирусной инфекционности зачастую представляет собой двухфазную кривую с быстрой начальной фазой и более медленной последующей фазой. Не исключено, что вирус, избежавший первого этапа инактивации, будет более устойчив к последующим этапам. Как следствие, совокупный фактор снижения вирусной нагрузки необязательно является суммой факторов снижения, рассчитанных на каждом этапе, на котором привносилась суспензия свежеприготовленного вируса. Например, если резистентная фракция принимает форму вирусных агрегатов, инфекционность может быть устойчива к различным видам химической обработки и нагреванию.

7.4 Обработка модельного масштаба, скорее всего, будет отличаться от полномасштабной обработки, невзирая даже на усилия по созданию разукрупненного процесса.

7.5 Наличие антител к природному вирусу может влиять на отделение от вируса или его чувствительность к химической инактивации, но оно также может осложнять планирование исследования за счет нейтрализации инфекционности. Определение правильности дизайна исследования может быть затруднительным. Содержание антител может являться значимой переменной процесса.

7.6 Небольшие различия в таких производственных параметрах, как содержание белка или температура, могут приводить к большим различиям в снижении вирусной инфекционности за счет различных механизмов.

8. Повторные исследования

8.1 Изменение процесса производства могут требовать проведения нового валидационного исследования.

8.2 По мере накопления научного опыта процессы будут требовать перепроверки в целях обеспечения того, что они продолжают удовлетворять приемлемому стандарту.

ПРИЛОЖЕНИЕ № 1

к Главе 4 Правил проведения исследования
биологических лекарственных препаратов

Статистическая оценка вирусных титров и факторов снижения их содержания, а также оценка их валидности

Титрование вирусов подвержено вариации, что характерно всем биологическим системам количественного определения. В связи с этим необходимо обеспечить правильность оценки вирусных титров и факторов снижения, полученных на их основе, а также валидность методик, чтобы определить надежность исследования. Цель статистической оценки заключается в установлении того, что исследование проведено на приемлемом уровне вирусологической компетентности.

1. Методы количественного определения могут быть квантовыми и количественными. К квантовым методам относятся методики определения инфекционности у животных и методики определения инфекционной дозы для тканевой культуры (TCID), в которых определяется число инфицированных и неинфицированных животных или клеточных культур. Титр инфекционности определяют как доля инфицированных животных или культур. В количественных методах измеренная инфекционность непрерывно варьирует в зависимости от количества введенного вируса. К количественным методам относятся методики бляшкообразования, в которых каждая бляшка соответствует одной инфекционной единице. Как квантовые, так и количественные методики подлежат статистической оценке.

2. Вариабельность методики может быть обусловлена ошибками разведения, статистическими эффектами и различиями в системе,

которые либо неизвестны, либо сложно поддаются контролю. Эти эффекты, скорее всего, будут более выражены при сравнении различных аналитических циклов (вариабельность между аналитическими циклами), чем при сравнении результатов одного аналитического цикла между собой (вариабельность внутри цикла).

3. 95%-ные доверительные границы вариабельности внутри цикла и между циклами в норме должны равняться ±0,5 lg или меньше. Вариабельность между аналитическими циклами можно контролировать путем включения собственного стандартного препарата, оценка активности которого должна находиться приблизительно в пределах ±0,5 lg от средней оценки, установленной в лаборатории для методики в качестве приемлемой. Вариабельность внутри цикла можно определять с помощью стандартных методов, описанных в учебниках. При достаточном обосновании могут быть приняты результаты любого эксперимента, даже если прецизионность титрования меньше указанных целевых значений.

4. Снижение вирусной нагрузки необходимо рассчитать на основании экспериментально установленных вирусных титров. По возможности, необходимо определить 95%-ные доверительные границы факторов снижения. Их можно приблизительно задать с помощью $\pm\sqrt{(s^2 + a^2)}$, где $\pm s$ – 95%-ные границы для содержания вирусов в исходном материале и $\pm a$ – для содержания вирусов в материале после прохождения этапа инактивации (элиминации).

Если после этапа инактивации (элиминации) инфекционность в образце не обнаруживается, фактор снижения невозможно рассчитать статистическими методами. В целях получения оценки минимального фактора снижения титр необходимо принять за менее или равным одной

инфекционной единице в объеме с наибольшей испытанной концентрацией. Отсутствие признаков инфекционности в пробе будет особенно характерно после мощных процессов инактивации. Чтобы максимально увеличить расчетный минимальный фактор снижения вирусной нагрузки с помощью эффективного процесса инактивации, необходимо отбирать как можно большее количество обработанного неразведенного материала.

ПРИЛОЖЕНИЕ № 2

к Главе 4 Правил проведения исследования
биологических лекарственных препаратов

Расчет факторов снижения вирусной нагрузки

Фактор снижения вирусной нагрузки, ***R***, отдельного этапа инактивации или элиминации задается следующим выражением:

$$R = \log \frac{V1 \times T1}{V2 \times T2}$$

где R – фактор снижения вирусной нагрузки,

V1 – объем исходного материала,

T1 – концентрация вируса в исходном материале,

V2 – объем материала после этапа инактивации (элиминации) и

T2 – концентрация вируса после этапа инактивации (элиминации)

Данная формула учитывает как титр, так и объем материала до и после этапа инактивации (элиминации).

Факторы снижения, как правило, выражают на логарифмической шкале, это значит, что даже при существенном снижении вирусной инфекционности она никогда не будет равна нулю. Согласно правилу Фармакопеи Союза[1], в отношении методов стерилизации достаточными признаются процессы, которые обеспечивают гарантированный уровень стерильности (ГУС), равный 10^{-6} или меньше, в отношении бактерий, плесеней и дрожжей. ГУС, равный 10^{-6}, обозначает вероятность содержания не более одного жизнеспособного микроорганизма на 1×10^6 стерилизованных единиц лекарственного препарата.

[1] Статья Фармакопеи Союза «Методы приготовления стерильных препаратов».

Таблица 1. Примеры вирусов, использованных в валидационных исследованиях на вирусы

Вирус	Семейство	Род	Естественный хозяин	Геном	Оболочка	Размер (нм)	Форма	Резистентность к физико-химической обработке*
Вирус везикулярного стоматита	Рабдо	Везикуловирус	Лошади, коровы	РНК	Да	70×150	Пуля	Низкая
Вирус парагриппа	Парамиксо	Парамиксовирус	Различные	РНК	Да	100-200	Плео/сфера	Низкая
Вирус иммунодефицита человека	Ретро	Лентивирус	Человек	РНК	Да	80-100	Сферическая	Низкая
Вирус лейкоза мышей	Ретро	Онковирус С типа	Мыши	РНК	Да	80-110	Сферическая	Низкая
Вирус Синдбис	Тога	Альфавирус	Человек?	РНК	Да	60-70	Сферическая	Низкая
Вирус бычьей вирусной диареи	Тога	Пестивирус	Коровы	РНК	Да	50-70	Плео-сфера	Низкая
Вирус псевдобешенства	Герпес	Варицелловирус	Свиньи	ДНК	Да	120-200	Сферическая	Средняя
Вирус полиомиелита 1 типа	Пикорна	Энтеровирус	Человек	РНК	Нет	25-30	Икосаэдрическая	Средняя
Вирус энцефаломиокардита	Пикорна	Кардиовирус	Мыши	РНК	Нет	25-30	Икосаэдрическая	Средняя
Реовирус 3	Рео	Ортореовирус	Различные	РНК	Нет	60-80	Сферическая	Средняя
Гепатит А	Пикорна	Гепатовирус	Человек	РНК	Нет	25-30	Икосаэдрическая	Высокая

SV40	Папова	Полиомавирус	Обезьяны	ДНК	Нет	40-50	Икосаэдрическая	Очень высокая
Парвовирусы (собак, свиней)	Парво	Парвовирус	Собаки, свиньи	ДНК	Нет	18-24	Икосаэдрическая	Очень высокая

Данная таблица содержит неполный перечень вирусов, использованных в валидационных исследованиях. Следовательно, необязательно использовать вирусы, указанные в таблице; производителям рекомендуется использовать и другие вирусы, особенно если они более пригодны для конкретных производственных процессов.

ГЛАВА 5.1. ПРОИЗВОДСТВО И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК

1. Область применения

Исследования в области молекулярной генетики и химии нуклеиновых кислот сделали возможным выявление, детальный анализ, передачу между организмами и экспрессию при заданных условиях (для синтеза полипептидов) генов, кодирующих естественные, биологически активные белки.

Многие лекарственные препараты, которые ранее было трудно получить из природных источников, сегодня можно получать, используя технологию рекомбинантной ДНК. Кроме того, возможность синтезировать нуклеиновые кислоты и осуществлять над ними манипуляции позволяет конструировать гены, кодирующие модифицированные продукты, обладающие отличными их от природных аналогов свойствами, или даже принципиально новые продукты.

Общая стратегия при разработке препаратов с помощью технологии рекомбинантной ДНК – внедрение естественных, или намеренно модифицированных естественных последовательностей или новых нуклеотидных последовательностей в вектор, вводимый в подходящий организм-хозяин, для обеспечения эффективной экспрессии целевого продукта. Разработаны и используются прокариотические и эукариотические экспрессирующие системы «вектор/клетка-хозяин». На экспрессию чужеродных генов, вводимых в новый организм с помощью подходящего вектора, влияет комплекс факторов, поэтому важным аспектом разработки препарата является

стабильная управляемая экспрессия клонированных ДНК-последовательностей.

В целях контроля качества этих препаратов необходимо придерживаться гибкого подхода, чтобы по мере накопления опыта производства и применения, а также вследствие разработки новых технологий можно было модифицировать приведенные рекомендации. Выполнение этих рекомендаций в отношении отдельных препаратов должно отражать их предполагаемое клиническое применение.

Цель данной главы – упростить сбор и предоставление данных, прилагаемых к заявлениям о регистрации лекарственных препаратов на основе полипептидов, получаемых по технологии рекомбинантной ДНК и предназначенных для медицинского применения в Союзе. Настоящая глава неразрывно связана с другими применимыми документами Союза в сфере обращения лекарственных средств.

2. Вопросы производства

Производители лекарственных препаратов, получаемых по технологии рекомбинантной ДНК, должны соответствовать требованиям, предъявляемым Правилами надлежащей производственной практики Союза, законодательству о генетически модифицированных организмах, а также соответствовать общим требованиям по контролю качества биологических лекарственных препаратов.

Необходимо уделить должное внимание качеству всех реагентов, используемых при производстве лекарственных препаратов, включая компоненты среды культивирования, спецификации на них необходимо включить в регистрационное досье, они должны соответствовать всем действующим Руководствам (например, требованиям по минимизации риска передачи возбудителя губчатой энцефалопатии через

лекарственные препараты). Соответствующие спецификации следует включать в досье на лекарственный препарат.

Испытания на активность, пирогены, стерильность и т. д., проводимые на препаратах, получаемых с помощью традиционных методов, также применимы к препаратам, получаемым по технологии рекомбинантной ДНК. При производстве препаратов не рекомендуется использовать агенты, способные вызывать сенсибилизацию у некоторых лиц, например, пенициллин или другие β-лактамные антибиотики.

Несмотря на важность всесторонней характеристики лекарственного препарата, следует уделить большое внимание внутрипроизводственному контролю. Эта концепция доказала свою высокую эффективность при контроле качества бактериальных и вирусных вакцин, произведенных традиционными способами.

Некоторые факторы могут негативным образом отразиться на постоянстве качества, безопасности и эффективности препаратов, полученных по технологии рекомбинантной ДНК, поэтому им следует уделить особое внимание. Ниже представлено их краткое описание:

а) все биологические системы претерпевают генетические изменения посредством мутаций и селекции, а чужеродные гены, вводимые в новые клетки хозяина, могут проявлять повышенную генетическую нестабильность. Цель молекулярно-генетических исследований показать, что была получена правильная последовательность и введена в клетку хозяина и что структура и число копий введенной последовательности остаются в клетке неизменными в ходе культивирования до завершения производства. Такие исследования могут дать ценную информацию, которую следует рассматривать в сочетании с результатами исследований целевого белка для обеспечения качества и постоянства свойств препарата;

b) целевые продукты, экспрессируемые чужеродными клетками-продуцентами, могут структурно, биологически или иммунологически отличаться от своих природных аналогов. Такие изменения могут возникнуть на посттрансляционном уровне или в ходе производства или очистки и приводить к нежелательным клиническим последствиям. Должно быть показано, что наличие этих изменений допустимо, т.е. не приводит к проявлению нежелательных клинических эффектов. В связи с этим, их присутствие необходимо обосновать и подтвердить наличие постоянного контроля над их содержанием;

c) выбор технологии производства влияет на свойства, разнообразие и количество потенциальных примесей в лекарственном препарате, а также определяет, в отношении каких процессов очистки необходимо подтверждать их способность элиминировать примеси. Примеры таких примесей – эндотоксины в препаратах, получаемых в бактериальных клетках, и посторонние агенты и ДНК в препаратах, получаемых в клетках млекопитающих;

d) нежелательная изменчивость культуры в ходе производства может привести к изменениям, благоприятствующим экспрессии других генов в системе хозяин/вектор, или вызывающим нарушения свойств препарата. Такая изменчивость может привести к изменению самого препарата (например, характера и степени гликозилирования) или его выход и (или) стать причиной возникновения количественных и качественных различий в профиле примесей. Именно поэтому обязательны процедуры, обеспечивающие постоянство условий производства, а также характеристик лекарственного препарата;

e) по мере перехода от лабораторной разработки к полномасштабному промышленному производству происходит существенное масштабирование процессов ферментации и (или)

очистки, что может значительно повлиять на качество продукта, включая воздействие на его пространственную структуру, выход и (или) количественные и качественные различия в примесях. В связи с этим, в ходе каждого производственного цикла необходимо предусмотреть внутрипроизводственный контроль и испытания по выпускающему контролю качества, для подтверждения неизменности свойств получаемого препарата.

Настоящая Глава применима ко всем препаратам, получаемым с использованием технологии рекомбинантной ДНК. Для отдельных препаратов могут возникнуть специфичные затруднения при контроле качества, поэтому при производстве и контроле качества каждого препарата следует учитывать все его свойства.

3. Генетическая разработка

Помимо приведенных ниже правил, генетическая разработка должна соответствовать требованиям, изложенным в Главе 5.2 настоящих Правил.

3.1. Целевой ген, вектор и клетка-хозяин

Следует представить подробное описание клонированного гена. Это описание должно включать данные о его происхождении, подлинности и выделении, а также данные о происхождении и структуре экспрессирующего вектора. Необходимо предоставить описание штамма-хозяина или клеточной линии, включая историю исходного штамма или клеточной линии, их идентификационные признаки и потенциальные вирусные контаминанты. Особое внимание необходимо уделить возможности перекрестной контаминации другими клетками или вирусами.

3.2. Экспрессирующая конструкция

Следует предоставить подробные сведения о нуклеотидной последовательности целевого гена и фланкирующих контрольных участков экспрессирующего вектора, чтобы подтвердить, что его конструкция идентична желаемой. Следует подробно описать этапы сборки экспрессирующей конструкции. Следует представить подробную карту и полную аннотированную последовательность функционально значимых участков вектора с указанием участков, секвенированных при создании конструкции, и участков, последовательность которых была определена на основе литературных данных. Последовательность в области точек лигирования фрагментов (непосредственно влияющих на экспрессию введенного гена) в ходе сборки конструкции, необходимо подтвердить секвенированием. Необходимо идентифицировать все известные экспрессирующиеся последовательности.

3.3. Состояние рекомбинантной ДНК в клетке хозяина

Следует описать метод, с помощью которого вектор введен в клетку хозяина, и состояние рекомбинантной ДНК в ней (интегрированная или внехромосомная, число копий и т.д.). В отношении внехромосомных экспрессирующих систем необходимо определить процент клеток, сохраняющих экспрессирующую конструкцию. Последовательность экспрессирующей конструкции, кодирующую рекомбинантный препарат, необходимо проверить на уровне банка клеток. В системах, содержащих множественные интегрированные копии гена, полученные в результате амплификации или без нее, в дополнение к секвенированию молекул мРНК или кДНК следует провести детальное исследование с использованием разных рестрикционных ферментов и Саузерн-блоттинга, чтобы представить убедительные данные о целостности экспрессирующегося гена (генов).

3.4. Экспрессия

Следует детально описать стратегию обеспечения и контроля экспрессии соответствующего гена в ходе производства.

3.5. Стабильность экспрессирующей системы

Стабильность генетических и фенотипических характеристик хозяина/вектора необходимо исследовать до и после достижения уровня удвоения популяции или числа генераций, используемых при рутинном производстве (клетки с предельным для производства клеточным возрастом *in vitro*). Экспрессирующую конструкцию следует анализировать в клетках с предельным для производства клеточным возрастом *in vitro,* по меньшей мере, один раз для каждого главного банка клеток.

По результатам исследований стабильности необходимо также получить подробную информацию о:

1) числе копий гена относительно производительности культуры;

2) делециях и (или) вставках, влияющих на любую часть экспрессирующего вектора;

3) произведенном белке.

Анализ следует выполнять таким образом, чтобы его результаты могли подтвердить то, что число вариантов продукта ниже допустимого предела, устанавливаемого в индивидуальном порядке в зависимости от природы препарата и его предлагаемого применения. Можно провести анализ на уровне белка и (или) ДНК. Какой бы метод ни использовался, он должен пройти валидацию и для него должен быть определен предел обнаружения.

4. Контроль банков клеток

Необходимо следовать требованиям, изложенным в Главе 1 настоящих Правил.

5. Ферментация или культивирование клеток

Необходимо представить четкое определение «серии» продукта, который подвергнется дальнейшей обработке.

Следует представить подробные данные по ферментации или культивированию клеток с описанием внутрипроизводственного контроля. Необходимо определить критерии отбраковки сбора клеток и преждевременного прекращения культивирования.

Наличие, степень и характер любой микробной контаминации в сосудах для культивирования следует внимательно изучить на соответствующей стадии в конце каждого производственного цикла. Необходимо представить подробную информацию для подтверждения достаточной чувствительности методов, используемых для выявления контаминации, и необходимо установить допустимые пределы контаминации.

В идеале одновременно в одной производственной зоне следует культивировать не более одной клеточной линии. При параллельном культивировании других линий клеток следует документировать данные по разным клеточным линиям и представить результаты валидации, подтверждающие отсутствие (невозможность) перекрестной контаминации.

5.1. Производство с однократным сбором

Следует определить максимально допустимое число пассажей или удвоений популяции клеток при производстве. При определении этих показателей необходимо основываться на данных по стабильности системы «клетка-хозяин/вектор» на предельном для производства клеточном возрасте *in vitro* и превышающим его. Следует представить данные о постоянстве роста культуры и по обеспечению выхода препарата в определенных пределах. В конце производственных циклов

следует проводить мониторинг характеристик клетки-хозяина и вектора. Необходимо представить подтверждение того, что вариабельность выхода препарата укладывается в установленные пределы и что основные свойства и качество препарата остаются неизменными по ряду специфичных параметров.

5.2. Производство с многократным сбором

Следует определить период непрерывного культивирования, основываясь на данных о стабильности системы и постоянстве качества продукта в рамках этого периода и сверх него. На протяжении культивирования требуется мониторирование системы производства. Требуемая частота и тип мониторинга зависят от нескольких факторов, включая тип экспрессирующей системы и препарата, а также общую продолжительность периода непрерывного культивирования. Приемлемость сборов для последующей обработки должна строго зависеть от использующегося режима мониторинга. Необходимо представить подтверждение того, что выход препарата укладывается в установленные пределы и что основные свойства и качество препарата остаются неизменными по ряду специфичных параметров.

6. Очистка продукта

6.1. Методы

Следует подробно описать, обосновать и валидировать методы, используемые для очистки продукта, а также применяемого внутрипроизводственного контроля, включая заданные в спецификациях допустимые пределы. Использование методик, включающих аффинную хроматографию, например, с использованием моноклональных антител, должно сопровождаться надлежащими мерами, обеспечивающими отсутствие негативного влияния этих

веществ и любых других потенциальных контаминантов, образующихся при их использовании, на качество и безопасность лекарственного препарата. Следует учитывать требования, содержащиеся в Главе 10 по разработке, производству, характеристике и спецификации моноклональных антител и их производных и Главе 4 по валидации методов обеспечения вирусной безопасности: разработка, проведение и интерпретация результатов исследований по валидации методов инактивации и удаления вирусов.

Следует тщательно определить, провести валидацию и обосновать критерии повторной переработки всех промежуточных продуктов и готового нерасфасованного продукта.

6.2. Валидация процедуры очистки

Следует тщательно проанализировать возможности процесса очистки элиминировать (инактивировать) нежелательные белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, вирусы, происходящие из клеток хозяина, и другие примеси, включая родственные белки.

Следует провести исследование с использованием тщательно отобранной группы вирусов, обладающих широким диапазоном физико-химических свойств, значимых для их поведения в ходе очистки (см. Главу 4 настоящих Правил по валидации методов обеспечения вирусной безопасности: разработка, проведение и интерпретация результатов исследований по валидации методов инактивации и удаления вирусов), намеренно привнесенных в неочищенный продукт (*spiking*). Следует также подтвердить способность процесса очистки элиминировать (инактивировать) специфичные контаминанты, такие как белки клетки-хозяина, ДНК и другие потенциальные производственные примеси. При необходимости с этой целью можно использовать такие контаминанты в концентрациях, превышающих

ожидаемую в ходе нормального производства (*spiking*). Следует определить фактор снижения содержания таких контаминантов на каждой стадии очистки и общий фактор снижения их содержания.

Валидация процесса очистки должна также включать обоснование рабочих условий, например, емкости колонки, регенерации и санитарной обработки колонок и продолжительности использования колонок. Колонки также следует подвергать валидации в отношении вымывания лигандов (например, красителя, аффинного лиганда и др.) и (или) хроматографического субстрата в течение ожидаемого срока службы колонки.

7. Активная фармацевтическая субстацния

7.1. Установление характеристик активной фармацевтической субстанции

7.1.1. Физико-химическая характеристика, относительная молекулярная масса, изоэлектрическая точка

Необходимо тщательно установить характеристики активной фармацевтической субстанции с помощью физико-химических и биологических методов. Особое внимание следует уделить использованию широкого диапазона аналитических методик, оценивающих разные физико-химические свойства молекулы; например, размер, заряд, изоэлектрическую точку и гидрофобность. Перечень аналитических возможностей не является предметом настоящей Главы. Далее приводятся примеры типов анализа.

7.1.2. Подтверждение структуры активной фармацевтической субстанции (включая сравнение с стандартным материалом или природным продуктом)

Следует представить данные об аминокислотной последовательности продукта гена в объеме, достаточном для его адекватной характеристики. Необходимая степень подробности описания последовательности зависит от размера и сложности молекулы, а также от использования других испытаний для установления характеристик. Во многих случаях для оценки последовательности возможно использование разделения с помощью ВЭЖХ с последующим секвенированием пептидов, полученных с помощью ферментативного расщепления. Следует обратить внимание на возможное наличие N-концевого метионина и N-формилметионина, сигнальных или лидерных последовательностей, других возможных N-и С-концевых модификаций (протеолитический процессинг). Следует рассмотреть возможность использования современных методов масс-спектрометрии при характеристике первичной структуры.

7.1.3. Посттрансляционные модификации

Помимо протеолитического процессинга потенциальными типами посттрансляционных модификаций являются N-и О-гликозилирование и, например, ацетилирование, гидроксилирование и γ-карбоксилирование. Кроме того, существуют посттрансляционные модификации, возникающие в результате процессов расщепления, например, дезаминирования и окисления.

Некоторые препараты рекомбинантных ДНК являются гликопротеинами. Существует огромное множество олигосахаридных структур, которые характеризуются гетерогенностью гликоформ как в их естественной форме, так и образующиеся по технологии

рекомбинантных ДНК. На характер этой гетерогенности могут влиять многие факторы. Профиль гликозилирования молекулы может играть важную роль при определении ее активности, особенно *in vivo*. Объем проводимого анализа должен определяться ролью, которую играют углеводные группы, если эти данные известны. Следует рассмотреть весь диапазон разных аналитических методик. Например: количественное изоэлектрическое фокусирование или капиллярный электрофорез, анионообменная хроматография для анализа моносахаридного компонента и определения олигосахаридов, лектин-аффинная хроматография и масс-спектрометрия.

7.1.4. Данные о конформации макромолекул

Рекомендуется применять соответствующие испытания, позволяющие установить то, что продукт имеет желаемую конформационную структуру и степень агрегированности. Примеры подходящих для таких целей методов: электрофорез в полиакриламидном геле, изоэлектрическое фокусирование, высокоэффективная жидкостная хроматография (эксклюзионная, обращено-фазная, ионообменная, аффинная), пептидное картирование с последующим секвенированием, светорассеяние, ультрафиолетовая спектроскопия, круговой дихроизм и масс-спектроскопия. Ценную информацию можно получить при проведении дополнительных исследований продукта, используя, например, ядерно-магнитную резонансную спектроскопию, рентгеновскую кристаллографию и соответствующие иммунохимические методы.

7.1.5. Установление биологических и иммунологических характеристик, способ выражения дозировки

Для биологической и иммунологической характеристики следует использовать как можно более широкий набор методов. Необходимо

определить удельную активность высокоочищенного материала (единицы активности на массу продукта).

По возможности биологическую активность продукта и его физические характеристики, включая аминокислотную последовательность, следует сравнивать с таковыми высокоочищенного продукта природного происхождения.

7.2. Чистота

Необходимо представить данные о контаминантах, наличие которых ожидается в готовом обработанном продукте. Необходимо обосновать допустимую степень контаминации и представить критерии приемлемости или отбраковки промышленной серии. Важно оценивать чистоту препарата с использованием как можно более широкого диапазона методик, включая физико-химические и иммунологические. Необходимо провести испытания на наличие нежелательных материалов, проистекающих от клеток хозяина, а также материалов, которые могли быть использованы (добавлены) в процессе производства или очистки, и, если применимо, контаминации вирусами и нуклеиновыми кислотами.

8. Постоянство характеристик и посерийный контроль готовой нерасфасованной (балк) фармацевтической субстанции

В целях установления постоянства характеристик подлинности, чистоты и активности необходимо провести всесторонний анализ начальных серий продукта. Впоследствии можно будет ограничиться сокращенным набором испытаний, описанным ниже. Следует четко различать аналитические испытания, проводимые в ходе разработки препарата с целью полного установления характеристик фармацевтической субстанции, и испытания, рутинно выполняемые с каждой серией очищенного нерасфасованного продукта.

8.1. Постоянство характеристик

Число последовательных серий нерасфасованного обработанного продукта должно составлять не менее 5 серий (при достаточном обосновании допустимо меньшее число серий). Их следует охарактеризовать настолько полно, насколько это возможно, чтобы подтвердить постоянство состава. При производстве с многократным сбором продукта, как правило, следует исследовать серии продукта из разных циклов культивирования. Следует использовать биологические, физико-химические и иммунологические методы для характеристики и анализа активной фармацевтической субстанции (включая методы, подтверждающие постоянство профиля гликозилирования гликопротеинов) и методы выявления и идентификации примесей. Все выявленные различия между сериями необходимо документировать.

8.2. Посерийный контроль качества

8.2.1. Подлинность

Для подтверждения подлинности каждой серии препарата необходимо выбрать часть испытаний, использованных для характеристики очищенной активной фармацевтической субстанции (см. раздел 7.1). Используемые методы должны включать испытания физико-химических и иммунологических свойств вместе с испытанием на ожидаемую биологическую активность. В зависимости от масштабов других испытаний на подлинность следует проводить верификацию N- или С-концевой аминокислотной последовательности или использовать другие методы, например, пептидное картирование.

8.2.2. Чистота

Степень желаемой и достижимой чистоты будет зависеть от нескольких факторов: природы и целевого назначения препарата, метода его производства и очистки, а также степени постоянства

характеристик производственного процесса. В целом, используя современные технологические процессы, можно добиться очень высокой степени чистоты большинства препаратов.

Следует определять чистоту продукта в каждой серии, она должна оставаться в заданных пределах. Анализ должен включать чувствительные и надежные методы исследования ДНК клетки-хозяина и (или) вектора, которым необходимо подвергать каждую серию продукта, приготовленного из линий клеток млекопитающих; при этом необходимо установить верхнее предельное содержание ДНК. Рекомендуется также проводить испытания каждой серии нерасфасованного продукта, полученного из других эукариотических клеточных систем, на содержание ДНК и установить предельное содержание ДНК. В прокариотических экспрессирующих системах следует проводить испытания на ДНК, если это необходимо для обеспечения качества препарата. Также необходимо с помощью достаточно чувствительного метода количественного определения определять остаточные клеточные белки путем проведения анализа с соответствующей чувствительностью (например, ppm, parts per million, частей на миллион) и установить строгое верхнее предельное их содержание. В некоторых случаях потенциальные примеси, например ДНК, могут быть выявлены в промежуточных продуктах очистки, на более раннем этапе.

8.2.3. Испытание на активность

Следует определить активность каждой серии препарата (например, в единицах биологической активности на миллилитр), по возможности, используя соответствующий национальный или международный стандартный препарат, калиброванный в единицах биологической активности (см. раздел 9).

Кроме того, рекомендуется оценить удельную активность (единицы биологической активности на единицу массы препарата), и ее

необходимо документировать. Для стандартизации определения удельной активности необходимо использовать высокоочищенный стандартный препарат (см. раздел 9).

Рекомендуется оценить корреляцию между результатами определения активности биологическими методами и результатами физико-химических методов анализа, и представить полученные данные. По возможности серии следует стандартизовать, используя точные физико-химические методики, а биологический анализ следует применять для подтверждения биологической активности препарата «в указанных пределах».

9. Спецификация и стандартные материалы

Исследования, описанные в разделе 7, помогают подготовить окончательную спецификацию на препарат, если они подтверждаются данными, полученными при исследованиях последовательных серий, и посерийного контроля (раздел 8).

Правильно подобранную серию препарата, предпочтительно изученную клинически, следует полностью охарактеризовать с точки зрения ее химического состава, чистоты, активности и биологической активности, включая, по возможности, полное аминокислотное секвенирование. Исследованную таким образом серию препарата рекомендуется сохранить для использования в качестве химического и биологического стандартного материала.

Следует установить критерии продолжительности использования (срока годности) и (или) возможного повторного испытания и квалификации стандартных образцов.

10. Лекарственный препарат и фармацевтическая разработка

Разработку лекарственного препарата необходимо подробно описать и обосновать, уделив особое внимание наличию и содержанию стабилизатора (например, альбумина и (или) детергентов). Необходимо подтвердить, что лекарственный препарат в окончательных контейнерах соответствует требованиям права Союза в сфере обращения лекарственных средств и Фармакопеи Союза. При невозможности выполнения испытаний производитель должен обосновать их исключение.

Определения

Готовая нерасфасованная фармацевтическая субстанция – готовый продукт, получаемый из нерасфасованного сбора по завершении процесса производства, хранится в одном контейнере или, при необходимости, в нескольких одинаковых контейнерах и используется при производстве готовой лекарственной формы. Производство серии готового продукта должно быть четко описано и подробно документировано производителем.

Лекарственный препарат – активная фармацевтическая субстанция в составе лекарственной формы, расфасованной в первичную упаковку (укупоренные контейнеры) для ее сохранности, является лекарственным препаратом. Контейнеры составляющие одну серию фасовки должны обрабатываться в рамках одного производственного цикла, их содержимое и биологическая активность должны быть однородны.

Нерасфасованный сбор – однородный пул отдельных сборов или лизатов, обрабатываемый в ходе одного цикла очистки.

ГЛАВА 5.2. АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ КОНСТРУКЦИИ КЛЕТОК, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ПРОИЗВОДСТВЕ БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ПО ТЕХНОЛОГИИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК

1. Область применения

Настоящая глава содержит рекомендации по определению характеристик экспрессирующей конструкции, предназначенной для синтеза белковых препаратов по технологии рекомбинантной ДНК в эукариотических и прокариотических клетках, данные, важные для оценки структуры экспрессирующих конструкций, используемых в производстве белков на основе рекомбинантной ДНК. Рассмотрение всех аспектов качества лекарственных препаратов, полученных по технологии рекомбинантной ДНК, не является целью настоящей главы.

Экспрессирующая конструкция – экспрессирующий вектор, содержащий последовательность, кодирующую рекомбинантный белок. Для обеспечения качества и постоянства свойств лекарственного препарата следует анализировать области экспрессирующих конструкций с использованием методов изучения нуклеиновых кислот в сочетании с подходами, применяемыми для анализа очищенных рекомбинантных белков. Анализ экспрессирующих конструкций на уровне нуклеиновых кислот является элементом целостного процесса оценки качества; при этом в таком исследовании оценивается только кодирующая последовательность рекомбинантного гена, но не точность трансляции или другие характеристики рекомбинантного белка, например вторичная, третичная структуры и посттрансляционные модификации.

2. Обоснование анализа экспрессирующей конструкции

Цель анализа экспрессирующей конструкции – подтвердить, что в клетку-хозяина внедрена правильная кодирующая последовательность продукта и что она поддерживается в ней в течение культивирования до окончания производственного процесса. Генетическая последовательность рекомбианантных белков, синтезируемая в живых клетках, может подвергаться мутациям, способным изменить свойства белка, что может привести к негативным последствиям у пациентов. Ни один экспериментальный подход не позволяет выявить одновременно все возможные модификации белков. Для изучения аминокислотной последовательности и структурных особенностей экспрессируещегося белка, обусловленного посттрансляционными модификациями, например протеолитическим процессингом, гликозилированием, фосфорилированием и ацетилированием, допускаться использова методы белкового анализа. Белковый анализ может не выявить все изменения структуры рекомбинантного белка, обусловленные мутациями в кодирующей его последовательности. В этом случае данные анализа нуклеиновых кислот могут представлять значительную ценность. Относительная важность анализа нуклеиновых кислот и белков для разных препаратов различается.

Анализ нуклеиновых кислот можно применять для верификации кодирующей последовательности, а также для оценки физического состояния экспрессирующей конструкции. Анализ нуклеиновых кислот проводят, чтобы убедиться, что экспрессируемый белок имеет правильную аминокислотную последовательность, однако этот метод не предназначен для обнаружения малых количеств вариантных последовательностей. Если клетки-продуценты содержат множество встроенных копий экспрессирующей конструкции, не все из которых транскрибируются, наиболее подходящим методом может быть исследование самих продуктов

транскрипции при помощи анализа мРНК или кДНК, а не исследование геномной ДНК. Аналитические подходы, направленные на изучение всей совокупности нуклеиновых кислот, например, проводимые на пуле клонов или материале, амплифицированном при помощи полимеразной цепной реакции, можно рассматривать как альтернативу методам, зависящим от отбора отдельных клонов ДНК. Возможно использование других методик, позволяющих быстро и с достаточной чувствительностью верифицировать в экспрессирующей конструкции последовательность, кодирующую рекомбинантный белок.

В последующих разделах описываются данные, которые следует учитывать при составлении характеристики экспрессирующей конструкции в процессе разработки и валидации производственного процесса. Аналитические методики должны пройти валидацию для подтверждения способности обнаружения последовательности. Валидационная документация должна, по меньшей мере, включать расчет пределов обнаружения вариантных последовательностей, для этого необходимо провести валидацию методик секвенирования нуклеиновых кислот либо белков. Для учета новых технических достижений и научных данных принципы и рекомендации по анализу, описанные в настоящей главе, необходимо регулярно пересматривать.

3. Установление характеристик экспрессирующей системы

3.1. Экспрессирующая конструкция и клон клеток, использованные для создания главного банка клеток

Производитель должен описать происхождение нуклеотидной последовательности, кодирующей белок. Это описание должно включать идентификацию и источник клеток, из которых исходно была получена последовательность нуклеотидов. Необходимо приложить описание

методов, применявшихся для получения ДНК, кодирующей белок.

Необходимо предоставить подробное описание этапов сборки экспрессирующей конструкции. Это описание должно включать источник и функцию компонентов конструкции, например ориджинов (точек начала) репликации, генов антибиотикорезистентности, промоторов, энхансеров, а также является ли белок продуктом слияния (химерным). Необходимо представить подробную карту компонентов и полную последовательность плазмиды с указанием участков, секвенированных в ходе создания конструкции, и участков, последовательность которых была взята из имеющихся в литературе данных. Необходимо указать другие экспрессирующиеся белки, кодируемые этой плазмидой. При помощи секвенирования ДНК необходимо определить нуклеотидную последовательность участка, кодирующего целевой ген, а также связанные с ним фланкирующие области, введенные в вектор, включая области в точках лигирования.

Следует представить описание метода введения экспрессирующей конструкции в клетку-хозяина. Кроме того, необходимо подробно описать методы, использованные для амплификации экспрессирующей конструкции, и критерии отбора клона клеток в качестве будущего продуцента.

3.2. Система банков клеток

Для синтеза рекомбинантных белков необходимо использовать только надлежащим образом охарактеризованные главный и рабочий банки клеток. Банк клеток представляет собой комплект контейнеров одинакового состава, хранящихся в определенных условиях, каждый из которых содержит аликвоту, отобранную из одного и того же пула клеток. Главный банк клеток обычно получают из отобранного клона клеток, содержащего экспрессирующую конструкцию. Рабочий банк клеток

получают, культивируя клетки из одного или нескольких контейнеров главного банка клеток. В представляемой документации необходимо подробно описать процесс получения клеточной линии и формирования банка клеток, включая методы и реагенты, применявшиеся при культивировании, клеточный возраст *in vitro* и условия хранения. Во всех банках клеток должно быть определено наличие значимых генотипических и фенотипических маркеров, которые могут включать экспрессию рекомбинантного белка и наличие экспрессирующей конструкции.

Экспрессирующую конструкцию в главном банке клеток следует анализировать согласно приведенной ниже схеме. Если такой анализ на главном банке клеток провести невозможно, его необходимо выполнить на каждом из рабочих банков.

Для определения числа копий экспрессирующей конструкции, выявления в ней инсерций или делеций, а также для установления числа участков интеграции следует применять картирование с использованием рестрикционных эндонуклеаз или другие подходящие методы. Для внехромосомных экспрессирующих систем следует определить процент клеток хозяина, сохраняющих экспрессирующую конструкцию.

Необходимо подтвердить (верифицировать) правильность последовательности экспрессирующей конструкции, кодирующей рекомбинантный белок. Для внехромосомных экспрессирующих систем следует изолировать экспрессирующую конструкцию и верифицировать нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, не проводя дальнейшее клонирование. Для клеток с хромосомными копиями экспрессирующей конструкции нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, следует подтверждать с помощью повторного клонирования и секвенирования хромосомных копий. В качестве

альтернативного варианта нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, можно верифицировать секвенированием пула клонов кДНК или материала, амплифицированного с помощью полимеразной цепной реакции. Кодирующая последовательность должна быть идентична (в границах предела обнаружения используемой методики) последовательности, требуемой для экспрессирующей конструкции, описанной в разделе 3.1, кроме того, она должна соответствовать ожидаемой аминокислотной последовательности белка.

3.3. Предельный для производства клеточный возраст *in vitro*

Предельный для производства клеточный возраст *in vitro* необходимо устанавливать на основе данных, полученных при культивировании клеток-продуцентов в рамках опытно-промышленного или промышленного производства до предлагаемого клеточного возраста in vitro или сверх него. В большинстве случаев клетки-продуценты получают, культивируя клетки из рабочего банка клеток; главный банк клеток следует применять для подготовки клеток-продуцентов только при надлежащем обосновании.

Экспрессирующую конструкцию клеток-продуцентов в главном банке клеток необходимо проанализировать однократно (в соответствии с разделом 3.2). Кроме того, последовательность экспрессирующей конструкции, кодирующей белок, в клетках-продуцентах может быть проверена при помощи анализа нуклеиновых кислот или анализа готового белкового препарата. Ранее установленный предельный для производства клеточный возраст *in vitro* можно увеличивать только основываясь на данных, полученных на клетках, культивированных до клеточного возраста *in vitro*, равного или превышающего новый предельный клеточный возраст *in vitro*.

4. Заключение

Определение характеристик экспрессирующей конструкции и готового очищенного белка – важные этапы обеспечения постоянства производства препарата, изготавливаемого по технологии рекомбинантной ДНК. Как было описано выше, оценка аналитических данных, полученных по результатам анализа нуклеиновых кислот и готового очищенного белка, необходима для обеспечения надлежащего качества рекомбинантных белковых препаратов.

Определения

Значимые генотипические и фенотипические маркеры – Маркеры, позволяющие идентифицировать штамм клеточной линии. Они должны включать экспрессию рекомбинантного белка или наличие экспрессионной конструкции.

Клеточный возраст *in vitro* – Период с момента оттаивания контейнеров с ГБК до сбора препарата в производственной емкости, измеряемый по прошедшему времени культивирования, степени удвоения популяции клеток или по числу пассажей клеток при субкультивировании с использованием определенной процедуры разведения культуры.

Опытно-промышленное производство – Получение рекомбинантного белка при помощи технологических процессов, полностью повторяющих или имитирующих полномасштабное промышленное производство. Методы культивирования клеток, сбора продукта и его очистки должны быть идентичными, за исключением масштаба производства.

Сайт интеграции – Участок, в котором в геном клетки встраивается одна или несколько копий экспрессирующей конструкции.

Фланкирующие контрольные области – Некодирующие нуклеотидные последовательности, прилегающие к 5'- и 3'-концам последовательности, кодирующей продукт. Фланкирующие контрольные области содержат важные элементы, влияющие на транскрипцию, трансляцию или стабильность кодирующей последовательности. Эти участки включают, например, промотор, энхансер и сплайсинговые последовательности и не содержат ориджины репликации и генов антибиотикорезистентности.

Экспрессирующая конструкция – Экспрессирующий вектор, содержащий последовательность, кодирующую рекомбинантный белок, и элементы, необходимые для ее экспрессии.

ГЛАВА 5.3. ДОКЛИНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ.

ЧАСТЬ I

1. Введение

1.1. Цели

Государства-члены Союза принимают гибкий, основанный на индивидуальном подходе, научно обоснованный принцип доклинической оценки безопасности, необходимый для подтверждения клинической разработки и регистрации. В этой быстро развивающейся научной области необходимо взаимопонимание и продолжение диалога между странами.

Основные задачи доклинической оценки безопасности: 1) определение первоначальной безопасной дозы и схемы последующего увеличения дозы лекарственного препарата при введении человеку; 2) выявление потенциальных органов-мишеней, в отношении которых проявляется токсическое воздействие препарата, и установление обратимости проявлений токсичности; 3) определение параметров безопасности лекарственного препарата для их последующего мониторинга в ходе клинического исследования. Соблюдение принципов, изложенных в настоящей главе, необходимо для улучшения качества, согласованности проведения и оценки результатов доклинических исследований безопасности, сопровождающих разработку биологических лекарственных препаратов.

1.2. Область применения

Положения, представленные в настоящей Главе, предназначены в первую очередь для описания базовой модели доклинической оценки

безопасности лекарственных препаратов, полученных с использованием биотехнологических методов. Они применимы в отношении препаратов, полученных из охарактеризованных клеток, с помощью различных экспрессирующих систем, к которым относятся бактериальные и дрожжевые клетки, клетки насекомых, растений и млекопитающих. Предполагаемые показания к применению могут включать *in vivo* диагностику, лечение и профилактику. Активные фармацевтические субстанции представляют собой белки, пептиды, их производные и препараты, в состав которых они входят. Активные фармацевтические субстанции могут быть выделены из клеточных культур или получены с использованием технологии рекомбинантной ДНК, включая производство с помощью трансгенных растений и животных. К ним относят (но не ограничиваются перечисленными): цитокины, активаторы плазминогена, рекомбинантные факторы плазмы крови, факторы роста, гибридные белки (фьюжен белки, химерные белки), ферменты, рецепторы, гормоны и моноклональные антитела.

Принципы, изложенные в настоящей Главе, могут быть также применимы к вакцинам, полученным с использованием технологии рекомбинантной ДНК, химически синтезированным пептидам, препаратам, полученным из плазмы, эндогенным белкам, выделенным из тканей человека, лекарственным препаратам на основе олигонуклеотидов.

Положения настоящей Главы не распространяется на антибиотики, экстракты аллергенов, гепарин, витамины, клеточные компоненты крови, традиционные бактериальные или вирусные вакцины, ДНК-вакцины, а также на препараты для клеточной и генной терапии, если только в документах (главах), регламентирующих изучение этих групп лекарственных препаратов не указано иное.

2. Спецификация на исследуемый материал

Риск, связанный с безопасностью применения биотехнологических лекарственных препаратов, может быть обусловлен присутствием в них примесей или контаминантов. Предпочтительнее удалять примеси и контаминанты с помощью процессов очистки, нежели полагаться на доклинические исследования для оценки их безопасности. В любом случае, в целях надлежащего планирования доклинических исследований безопасности необходимо всегда всесторонне охарактеризовать свойства лекарственного препарата.

Существуют потенциальные риски, обусловленные наличием контаминантов из клетки-хозяина, которыми могут быть бактерии, дрожжи, клетки насекомых, растений или млекопитающих. Наличие контаминантов из клетки-хозяина может быть причиной развития аллергических или других иммунологических реакций. Теоретически существует опасность возникновения нежелательных реакций, обусловленных присутствием контаминантов в виде нуклеиновых кислот клетки-продуцента, в связи с их возможной интеграцией в геном хозяина. Для лекарственных препаратов, полученных с использованием клеток насекомых, растений и млекопитающих или клеточного материала из трансгенных растений и животных, необходимо учитывать дополнительный риск вирусной контаминации.

Как правило, препарат, изученный в основных фармакологических и токсикологических исследованиях, должен быть сопоставим с препаратом, предлагаемым для начальных клинических исследований. Однако необходимо учитывать, что во время осуществления программ исследований могут происходить изменения производственного процесса, направленные на совершенствование качества препарата и процесса его

производства. При экстраполяции на человека данных, полученных в экспериментальных исследованиях на животных, необходимо рассмотреть возможное влияние изменений, внесенных в технологию производства, на свойства препарата и оценить потенциальную значимость подобных изменений, включая значимость посттрансляционных модификаций белка действующего вещества препарата.

Если в ходе программы разработки вводятся новый или модифицируется существующий производственный процесс или происходят другие значимые изменения лекарственного препарата или его состава, необходимо подтвердить сопоставимость характеристик изучаемого лекарственного препарата, полученного до и после изменений технологического процесса. Сопоставимость может быть установлена по результатам сравнительной оценки биохимических и биологических свойств (т.е. определения подлинности, чистоты, стабильности и активности). В отдельных случаях могут потребоваться дополнительные исследования (т.е. исследования фармакокинетических параметров, фармакодинамических свойств и (или) безопасности). Необходимо представить научное обоснование используемого подхода для оценки сопоставимости препаратов. Информация об оценке сопоставимости препаратов при внесении изменений в процесс производства приведена в Главах 9.1-9.2. настоящих Правил.

3. Доклинические исследования безопасности

3.1. Общие принципы

Целью доклинических исследований безопасности является определение фармакологического и токсического действия препарата, оцениваемого на протяжении всего периода клинической разработки, а не только на этапе до начала клинических исследований с участием

человека. Для такой характеристики могут потребоваться исследования как *in vivo*, так и *in vitro*. При этом для биологических лекарственных препаратов, которые структурно и фармакологически сопоставимы с препаратом, уже широко применяемым в клинической практике, исследования токсичности могут быть менее объемными.

При проведении доклинической оценки безопасности лекарственного препарата необходимо, в первую очередь, учитывать следующее:

1) выбор соответствующих (релевантных) видов животных, наиболее чувствительных в отношении фармакологического и токсического действия;

2) возраст экспериментальных животных;

3) физиологическое состояние животных;

4) способ введения лекарственного препарата, включая расчёт дозы, путь введения и режим дозирования;

5) стабильность исследуемого материала в условиях исследования.

Токсикологические исследования должны проводиться в соответствии с требованиями Надлежащей лабораторной практики (GLP) Союза. Однако некоторые исследования, требующие использования специфических тест-систем, которые часто необходимы при исследовании биотехнологических лекарственных препаратов, могут частично не соответствовать GLP. В этих случаях необходимо выявить области несоответствия и оценить степень их значимости по отношению к общей оценке безопасности. В отдельных случаях отсутствие полного соответствия исследований токсичности требованиям GLP не является строгим препятствием для перехода к

проведению клинических исследований и последующей регистрации биотехнологического лекарственного препарата.

Традиционные подходы, используемые для исследования токсичности лекарственных препаратов, могут не в полной мере подходить для биологических лекарственных препаратов. Причиной этого являются уникальность и разнообразие структурных и биологических свойств биотехнологических лекарственных препаратов, в частности видоспецифичность, иммуногенность и непредсказуемые плейотропные эффекты.

3.2. Биологическая активность (фармакодинамика)

Допускается оценивать биологическую активность с использованием испытаний *in vitro* в целях определения клинически значимых эффектов лекарственного препарата. Возможно использование клеточных линий и (или) первичных клеточных культур для оценки непосредственного влияния препарата на фенотип клеток и их пролиферацию. Вследствие видоспецифичности многих биотехнологических лекарственных препаратов в целях изучения их токсичности необходимо выбрать релевантный вид животных. Для прогнозирования активности в экспериментах *in vivo*, а также количественной оценки относительной чувствительности различных видов животных, в том числе человека, к данному биологическому лекарственному препарату, могут быть использованы эксперименты *in vitro* на клеточных линиях, полученных из клеток млекопитающих. Целью подобных исследований может являться определение, например, специфичности и аффинности связывания с рецептором и (или) фармакологических эффектов. Кроме того, на основании результатов этих исследований могут быть выбраны релевантные виды животных, которые будут использованы в дальнейших фармакологических и

токсикологических исследованиях *in vivo*. Объединённые результаты исследований *in vitro* и *in vivo* позволяют провести экстраполяцию полученных экспериментальных данных на человека. Для обоснования предлагаемого применения лекарственного препарата в клинических исследованиях часто используют результаты исследований *in vivo*, оценивающие фармакологическую активность, включая определение механизма действия препарата.

При исследовании лекарственных препаратов моноклональных антител необходимо подробно описать их иммунологические свойства, в частности антигенную специфичность, способность связывать комплемент, а также непредусмоpенную реактивность и (или) цитотоксичность по отношению к тканям человека, отличные от предполагаемых. Такие исследования перекрестной реактивности должны быть проведены с использованием соответствующих иммуногистохимических методик и различных тканей человека.

3.3. Выбор видов животных (животной модели)

Наличие биологической активности, а также видовая и (или) тканевая специфичность многих лекарственных препаратов, полученных с использованием биотехнологических методов, часто препятствуют проведению стандартных исследований токсичности на широко используемых видах животных (например, крысах и собаках). Программы исследований безопасности должны включать использование релевантных видов животных. Релевантным является такой вид животных, при проведении исследования на котором изучаемый материал является фармакологически активным за счет взаимодействия препарата с рецептором (или эпитопом, если речь идет о моноклональных антителах). Для поиска релевантных видов животных могут быть использованы различные методы (например, иммунохимические или функциональные

тесты). Сведения о распределении рецепторов и эпитопов позволяет получить более глубокое представление о потенциальной токсичности препарата в условиях *in vivo*.

При исследованиях моноклональных антител релевантными видами животных являются те, у которых экспрессируется необходимый эпитоп и для тканей которых можно продемонстрировать аналогичный профиль перекрестной реактивности по сравнению с тканями человека. Это позволяет правильно оценивать токсичность, обусловленную взаимодействием препарата с эпитопом, либо неспецифической перекрестной тканевой реактивностью. Использование видов животных, у которых необходимый эпитоп не экспрессируется, все же может быть полезно для оценки токсичности в случае, если показана сравнимая неспецифическая перекрестная реактивность препарата с тканями человека.

Программа оценки безопасности, как правило, должна включать исследования на двух релевантных видах животных. В то же время в некоторых обоснованных случаях достаточно использования одного релевантного вида животных (например, когда был найден только один релевантный вид или если биологическая активность биотехнологического лекарственного препарата хорошо изучена). Кроме того, даже в случаях, когда для характеристики токсичности в краткосрочных исследованиях необходимо использовать два вида животных, в последующих долгосрочных исследованиях токсичности может быть достаточным использование только одного вида животных (например, если в краткосрочных исследованиях профиль токсичности у двух видов сопоставим).

Результаты исследований токсичности, проведенных на нерелевантных видах животных, могут вводить в заблуждение, поэтому их

проведение не рекомендуется. Если релевантных видов животных не существует, можно использовать соответствующие виды трансгенных животных, у которых экспрессируются рецепторы, сходные по структуре с рецепторами человека (гуманизированные белки-рецепторы), или использовать гомологичные белки. Если взаимодействие между препаратом и рецептором человека оказывает сходные физиологические эффекты, сравнимые с теми, что ожидаются у человека, информация, полученная в ходе исследований на модели трансгенных животных, у которых экспрессируется рецептор человека, является наиболее адекватной. Полезная информация может быть получена и с использованием гомологичных белков. При этом следует учитывать, что производственный процесс, профиль примесей (контаминантов), фармакокинетика и точные фармакологические механизмы действия для гомологичной формы и исследуемого лекарственного препарата, предназначенного для клинического использования, могут различаться. Если использование трансгенных моделей и гомологичных белков невозможно, все же целесообразно оценить некоторые аспекты потенциальной токсичности в рамках ограниченных исследований токсичности на одном виде животных. Например, могут быть проведены исследования токсичности при многократном введении продолжительностью ≤14 суток, которые включают оценку показателей функционирования наиболее важных систем организма (например, сердечно-сосудистой и дыхательной системы).

В последние годы достигнут значительный прогресс в разработке животных моделей заболеваний, которые считаются сходными с заболеваниями человека. К ним относят животные модели в результате спонтанного или индуцированного развития заболеваний, нокаут гена(ов), а также трансгенные животные. Использование таких моделей может обеспечить проведение дальнейших исследований не только для изучения

фармакологического действия препарата, его фармакокинетики и установления диапазона доз. Модели могут быть использованы также и для исследования безопасности (например, для оценки перспективы нежелательного стимулирования прогрессирования заболевания). В некоторых случаях исследования, проведенные на животных моделях заболевания, могут использоваться в качестве подходящей альтернативы исследованиям токсичности на обычных животных (Примечание 1). При этом необходимо представить научное обоснование использования животных моделей заболевания для исследования безопасности.

3.4. Число и пол животных

Число животных, используемых в расчете на одну дозу препарата, должно быть достаточным для оценки токсического действия препарата. Небольшой размер выборки животных может привести к тому, что признаки токсичности не будут обнаружены только по причине небольшой частоты их проявления, независимо от их тяжести. Ограничения, обусловленные недостатком выборки, которые часто наблюдаются в случае исследований на нечеловекообразных приматах (НЧП), могут быть частично компенсированы повышением частоты и продолжительности мониторинга за их состоянием. Как правило, в экспериментах необходимо использовать животных обоих полов, либо должно быть представлено обоснование в случае отсутствия таких данных.

3.5. Способ введения и выбор дозы

Способ и частота введений лекарственного препарата экспериментальным животным должны быть максимально приближены к предполагаемым для клинического применения. Следует учитывать фармакокинетические характеристики исследуемого лекарственного препарата и его биодоступность у используемых видов животных. Кроме того, необходимо учитывать объем препарата, который можно

вводить экспериментальным животным в соответствии с принципами безопасности и гуманности. Например, частота введения препарата лабораторным животным может быть увеличена по сравнению с предлагаемым режимом введения препарата субъектам клинических исследований. Причиной такого увеличения может быть необходимость компенсировать более высококую клиренса или низкую растворимость действующего вещества исследуемого препарата. В данном случае необходимо определить соотношение величины экспозиции препарата в крови подопытного животного по отношению к величине экспозиции препарата у человека в клинических условиях. Также следует учитывать зависимость эффекта от объема вводимого препарата, концентрации действующего вещества, состава и места введения. В некоторых случаях допускается изменение способа введения по сравнению с тем, который предполагается использовать в клинических исследованиях. Причиной такого изменения могут быть низкая биодоступность, ограничения, обусловленные способом введения или размером (физиологическими особенностями) используемых видов животных.

В целях получения сведений о зависимости доза–эффект, включая токсическую дозу и высокую нетоксическую дозу (ВНТД, no observed adverse effect level (NOAEL)), необходимо выбрать исследуемые дозы. Установить максимальную дозу некоторых классов лекарственных препаратов с низкой или ничтожной токсичностью невозможно. В таких случаях необходимо представить научное обоснование стратегии выбора доз и предполагаемой кратности превышения экспозиции у человека. В целях обоснования выбора высоких доз необходимо проанализировать ожидаемые фармакологические (физиологические) эффекты, доступность подходящего исследуемого материала и предполагаемое клиническое применение. Если лекарственный

препарат обладает низкой аффинностью или активностью в отношении клеток выбранного вида животных по сравнению с клетками человека, может потребоваться исследование более высоких доз. Границы безопасности диапазона доз у человека, подлежащие определению, могут варьировать в зависимости от класса лекарственных препаратов, полученных биотехнологическим путем, и показаний к применению.

3.6. Иммуногенность

Многие лекарственные препараты для медицинского применения, полученные с использованием биотехнологических методов, являются иммуногенными у животных. Следовательно, определение концентрации антител, обусловленных введением препарата, необходимо осуществлять при проведении исследований токсичности при многократном введении (см. также часть II настоящей Главы). Такие исследования необходимы для правильной интерпретации результатов токсикологических исследований. Необходимо охарактеризовать гуморальный иммунный ответ на введение исследуемого лекарственного препарата (например, титр антител, количество животных, у которых зарегистрирована выработка антител, свойства индуцированных антител – нейтрализующая активность или отсутствие такой активности). Следует установить корреляцию между выработкой антител и любыми изменениями фармакологических и (или) токсических свойств исследуемого препарата на момент обнаружения антител. В частности, при интерпретации результатов исследования необходимо учитывать влияние образования антител на фармакокинетические (фармакодинамические) параметры препарата, частоту развития и (или) тяжесть проявления нежелательных явлений, активацию комплемента, появление новых токсических эффектов. Необходимо также оценить возможность появления патологических

изменений, обусловленных образованием и отложением иммунных комплексов в тканях.

Выявление антител не должно служить единственным основанием для досрочного прекращения доклинических исследований безопасности или изменения их продолжительности, за исключением случаев, когда развитие иммунного ответа является причиной нейтрализации фармакологического и (или) токсического эффектов, оказываемых биологическим лекарственным препаратом, у значительной части животных. Аналогично человеку, в большинстве случаев иммунный ответ на биотехнологический лекарственный препарат у животных бывает вариабельным. Если все эти вопросы не влияют на интерпретацию данных, полученных в ходе исследования безопасности, то можно не придавать серьезного значения развитию гуморальной реакции иммунитета у экспериментальных животных.

Индукция образования антител у животных не позволяет прогнозировать развитие иммунного ответа при клиническом применении препарата. У человека могут формироваться циркулирующие антитела к гуманизированным белкам, причем терапевтический эффект в присутствии таких антител часто сохраняется. У человека частота развития тяжелой анафилактической реакции в ответ на введение рекомбинантных белков невелика. В связи с этим результаты тестов на анафилактические реакции у морских свинок, которые, как правило, положительны для белковых препаратов, обычно не позволяют спрогнозировать реакцию у человека. В связи с этим, такие исследования считаются неинформативными для стандартной оценки данного типа препаратов.

4. Частные требования

4.1. Фармакологическая безопасность

Необходимо исследовать потенциальный риск развития нежелательных реакций, обусловленных нежелательной фармакологической активностью препарата, на соответствующих моделях животных. При необходимости следует включить контроль такой активности в программу исследований токсичности и (или) клинических исследований. В ходе исследований фармакологической безопасности обычно определяют функциональные индексы потенциальной токсичности препарата. Указанные функциональные индексы могут быть изучены в рамках отдельных исследований или включены в токсикологические исследования. Целью исследований фармакологической безопасности должно быть выявление влияния лекарственного препарата на жизненные функции основных физиологических систем организма (в том числе на сердечно-сосудистую, респираторную, выделительную, центральную нервную системы). Кроме того, вместо животных в ходе исследований могут быть использованы изолированные органы или другие тест-системы, без привлечения интактных животных. Подобные исследования позволяют объяснить возникновение органоспецифической токсичности, однако следует с осторожностью подходить к интерпретации этих результатов, учитывая показания и особенности применения препарата у человека.

4.2. Оценка экспозиции

4.2.1. Фармакокинетика и токсикокинетика

Сложно установить единые рекомендации относительно фармакокинетических исследований биотехнологических лекарственных препаратов. Информативными являются фармакокинетические исследования при однократном и многократном введении лекарственного препарата, токсикокинетические исследования, исследования

распределения в тканях на релевантных видах животных. В то же время стандартные исследования, направленные на оценку материального баланса введенного и элиминированного препарата, являются малоинформативными. Различия в фармакокинетических параметрах исследуемого препарата у разных видов животных могут иметь существенное значение для прогнозирования результатов при исследовании на животных и оценки кривой зависимости «доза–эффект» при исследовании токсичности. Изменения фармакокинетического профиля вследствие иммуноопосредованных механизмов элиминации могут повлиять на кинетические профили и интерпретацию результатов исследований токсичности. Для некоторых лекарственных препаратов (например, для цитокинов) может быть характерна значительная задержка в проявлении фармакодинамических эффектов относительно фармакокинетических характеристик. Кроме того, возможно пролонгирование фармакодинамических эффектов по сравнению с содержанием действующего вещества в плазме.

Фармакокинетические исследования следует, по мере возможности, проводить с использованием лекарственных препаратов, являющихся репрезентативными по отношению к препаратам, предназначенным для токсикологических исследований и клинического применения. Способ и частота их дозирования должны быть максимально приближены к тем, которые соответствуют планируемым клиническим исследованиям. Профиль абсорбции может зависеть от состава, концентрации, области введения и (или) объема вводимого препарата. По возможности, во время проведения исследований токсичности необходимо осуществлять мониторинг системной экспозиции.

При использовании белков с радиоактивной меткой важно доказать, что материал с радиометкой, используемый для исследования,

сохраняет активность и биологические свойства, эквивалентные таковым немеченного вещества. Величину радиоактивности в тканях и (или) данные ауторадиографии при использовании белков с радиоактивной меткой бывает сложно интерпретировать ввиду быстрого метаболизма белка *in vivo* или нестабильности связи радиоактивной метки с белком. Результаты исследований, в которых радиоактивная метка вводится в специфичные аминокислоты, необходимо интерпретировать с осторожностью. Следует учитывать возможность высвобождения радиоактивной метки, встроенной в специфические аминокислоты, и включение ее в аминокислоты, которые участвуют в синтезе белков и пептидов, не имеющих отношения к исследуемому лекарственному препарату.

Необходимо располагать некоторой информацией об особенностях абсорбции, распределения и клиренса исследуемого лекарственного препарата у релевантных видов животных до начала клинического исследования, с целью прогнозирования широты терапевтического действия препарата (безопасного диапазона доз) с учетом экспозиции и дозы.

4.2.2. Аналитические методы

Использование одного или нескольких методов количественного определения следует рассматривать в индивидуальном порядке, при этом необходимо представить научное обоснование. Как правило, достаточно одной валидированной методики. Например, достоверную информацию можно получить методом количественного определения радиоактивности в преципитате (белок с радиоактивной меткой, осажденный трихлоруксусной кислотой). В то же время более предпочтительным является специфичный метод количественного определения анализируемого вещества. Оптимально использовать одни

и те же методы количественного определения как в исследованиях на животных, так и в исследованиях с участием человека. Необходимо определить потенциальное влияние связывающих белков плазмы и (или) антител в плазме (сыворотке) крови на результаты количественного определения исследуемого вещества.

4.2.3. Метаболизм

Ожидается, что следствием метаболизма биотехнологических лекарственных препаратов является их деградация до небольших пептидов и отдельных аминокислот. Пути метаболизма таких препаратов, в целом, изучены. Следовательно, нет необходимости в проведении классических исследований биотрансформации, проводимых в отношении лекарственных препаратов, действующие вещества которых получены путем химического синтеза.

Для понимания природы фармакодинамического эффекта необходимы сведения о поведении биологических лекарственных препаратов в биологических жидкостях (например, в плазме, сыворотке, цереброспинальной жидкости), а также о возможном влиянии связывания с белками.

4.3. Исследования токсичности при однократном введении

По результатам исследований токсичности при однократном введении можно получить полезную информацию для описания зависимости системной и (или) местной токсичности от дозы. Эти данные могут быть использованы для выбора доз при исследовании токсичности при многократном введении. Информация о зависимости доза–эффект может быть получена при проведении исследований токсичности при однократном введении, которые являются частью программы исследований фармакологической активности или эффективности с использованием животных моделей. Следует

рассмотреть возможность включения в данную программу фармакологических исследований оценку показателей безопасности лекарственного препарата.

4.4. Исследования токсичности при многократном введении

В разделе 3.3 приведены принципы выбора видов животных для проведения исследований с многократным введением. Способ введения и режим дозирования (например, ежедневное введение или периодическое дозирование) должны быть максимально приближены к предлагаемому клиническому применению или воздействию. По возможности данные исследования должны включать изучение токсикокинетики.

Как правило, дизайн исследования должен предусматривать период последующего наблюдения после прекращения введения препарата. Это необходимо для того, чтобы выявить обратимость эффекта, потенциальное усиление фармакологических и (или) токсических эффектов или потенциально отсроченные токсические эффекты. Для биотехнологических лекарственных препаратов, которые оказывают длительные фармакологические и (или) токсические эффекты, группы животных в период восстановления должны находиться под наблюдением до тех пор, пока не будет продемонстрирована обратимость эффектов. Продолжительность исследований токсичности при многократном введении должна зависеть от предполагаемой длительности клинического применения и показаний к применению. Для большинства биотехнологических лекарственных препаратов длительность введения животным, как правило, составляет 1–3 месяца. Для препаратов, предназначенных для кратковременного применения (например, не более 7 дней), а также для лечения острых, угрожающих жизни заболеваний, достаточным

считается проведение исследований токсичности при многократном введении в течение двух недель. Считается, что этого времени достаточно для обоснования возможности проведения клинических исследований и регистрации лекарственного препарата. Для биотехнологических лекарственных препаратов, предназначенных для лечения хронических заболеваний, которые применяются длительно, достаточными являются исследования продолжительностью 6 месяцев. Однако в некоторых случаях возможно проведение более коротких или более длительных исследований для включения их в регистрационное досье. Продолжительность долгосрочных исследований токсичности биологических лекарственных препаратов, предназначенных для длительного применения, должна быть научно обоснована.

4.5. Исследования иммунотоксичности

Одним из аспектов оценки иммунотоксичности является оценка потенциальной иммуногенности (см. раздел 3.6). Многие биотехнологические лекарственные препараты предназначены для стимуляции или подавления иммунной системы. Следовательно, они могут оказывать влияние не только на гуморальный, но и на клеточный иммунитет. Воспалительные реакции в месте инъекции могут свидетельствовать о стимуляции иммунной системы организма в ответ на введение препарата. Однако необходимо учитывать, что обычная травма во время инъекции и (или) токсические эффекты, обусловленные веществами, входящими в состав лекарственного препарата, могут привести к токсическим изменениям в области инъекции. Кроме того, возможно изменение экспрессии антигенов на мембране клеток-мишеней, что может иметь значение для развития аутоиммунного ответа. Для уточнения подобных вопросов в схемы изучения иммунотоксических свойств препарата может быть включено проведение скрининговых исследований с

последующей оценкой механизма действия лекарственного препарата. Однако применение стандартного пошагового подхода или проведение стандартного набора тестов в отношении биотехнологических лекарственных препаратов не рекомендовано.

4.6. Исследование репродуктивной и онтогенетической токсичности

Необходимость проведения исследований репродуктивной и онтогенетической токсичности зависит от свойств лекарственного препарата, показаний к применению и целевой популяции пациентов (Примечание 2). Дизайн исследования и режим дозирования могут быть изменены в зависимости от факторов, обусловленных видоспецифичностью, иммуногенностью, биологической активностью и (или) длительным периодом полувыведения конкретного лекарственного препарата. Например, подозрения на наличие потенциальной онтогенетической иммунотоксичности, которые могут иметь место в отношении определенных моноклональных антител с длительным иммунологическим эффектом, могут быть учтены путем изменения дизайна исследования, с тем чтобы оценить иммунологический статус новорожденного.

4.7. Исследования генотоксичности

Диапазон и виды исследований генотоксичности, традиционно проводимых в отношении лекарственных препаратов, действующие вещества которых получены путем химического синтеза, не применимы в отношении биотехнологических лекарственных препаратов, поэтому их проведение не требуется. Кроме того, введение большого количества вещества пептидной (белковой) природы может привести к получению результатов, не поддающихся интерпретации. Эти вещества, по-видимому,

не взаимодействуют напрямую с ДНК или другим хромосомным материалом (Примечание 3).

Если имеются основания предполагать такие взаимодействия (например, ввиду присутствия органической молекулы-линкера в препарате на основе конъюгированного белка), необходимо проведение исследований с использованием доступных и подходящих систем, с включением новых тест-систем. Использование стандартных исследований генотоксичности для оценки генотоксического потенциала производственных примесей неприемлемо. При проведении таких исследований с этой целью требуется соответствующее обоснование.

4.8. Исследования канцерогенности

Как правило, для биотехнологических лекарственных препаратов стандартные тесты на канцерогенность с использованием биологических систем не приемлемы. В то же время оценка канцерогенности может быть необходима с использованием методов, специфичных для определенного препарата. Это зависит от предполагаемой продолжительности клинического применения препарата, популяции пациентов и (или) его биологической активности (например, факторы роста, иммунодепрессанты и др.). В том случае, если существуют опасения относительно канцерогенного потенциала препарата, могут быть использованы разные подходы для оценки такого риска.

Некоторые препараты могут обладать потенциальной способностью вызывать пролиферацию трансформированных клеток и клональную экспансию (экспансию клона), что может привести к развитию новообразований. В таком случае необходимо провести оценку препарата с учетом экспрессии рецепторов на различных злокачественных и нормальных клетках человека, которые потенциально значимы в отношении исследуемой популяции пациентов. Необходимо определить

способность препарата стимулировать рост нормальных или злокачественных клеток, экспрессирующих соответствующие рецепторы. Если в результате исследований *in vitro* получены данные, свидетельствующие о возможном канцерогенном потенциале препарата, необходимо провести дальнейшие исследования на подходящих животных моделях. Ценная информация может быть получена при включении в долгосрочные исследования токсичности с многократным введением оценку чувствительных показателей пролиферации клеток у экспериментальных животных.

Если препарат биологически активен и не вызывает развитие иммунного ответа у грызунов, однако информации, полученной на основании результатов других исследований, недостаточно для оценки канцерогенного потенциала препарата является оправданным использование одного вида грызунов. Особенно внимательно необходимо подойти к выбору дозы. Научно обоснованный подход к определению подходящих доз должен базироваться на комплексном анализе фармакокинетических и фармакодинамических конечных точек с учетом сравнительных характеристик рецепторов и предполагаемой экспозиции у человека. Выбранная дозировка должна быть обоснована.

4.9. Исследования местной переносимости

Необходимо провести оценку местной переносимости. При этом необходимо использовать лекарственный препарат, имеющий состав, который в дальнейшем будет представлен к регистрации. Однако при достаточном обосновании допускается использование препарата, имеющего репрезентативный состав. В отдельных случаях потенциальные нежелательные реакции лекарственного препарата могут быть оценены в рамках исследований токсичности при однократном или многократном

введении. Таким образом, исключается необходимость проведения отдельных исследований по оценке местной переносимости.

Примечания

Примечание 1

Использование животных моделей заболеваний может быть целесообразным при определении показателей токсичности, выборе клинических показаний и определении подходящей лекарственной формы, пути введения и режима дозирования. Следует учесть, что при использовании таких моделей заболевания зачастую имеется слишком мало исторических данных для использования в качестве контроля при оценке результатов исследований. Следовательно, для оптимизации дизайна исследований критически важно получение параллельно контрольных и исходных данных.

Примечание 2

Возможна ситуация, когда на основе опубликованных данных имеется значительный объем информации, касающейся потенциального воздействия определенных групп биотехнологических препаратов (например, интерферонов) на репродуктивную функцию и (или) эмбриогенез, которая была получена и может быть подтверждена только в исследованиях на единственном релевантном виде животных - нечеловекообразных приматах. В таких случаях исключается необходимость в проведении формальных исследований репродуктивной (онтогенетической) токсичности, если установлено, что структура и физико-химическая характеристика действующего вещества сопоставимы, поскольку родственные молекулы будут вызывать сходные биологические эффекты. В каждом конкретном случае должно быть приведено научное

обоснование оценки потенциального влияния препарата на репродуктивную функцию и развитие потомства.

Примечание 3

В отношении некоторых биотехнологических лекарственных препаратов существуют опасения в отношении аккумуляции спонтанно мутировавших клеток (например, за счет избирательного усиления пролиферации), что может способствовать канцерогенному эффекту. Стандартный набор исследований генотоксичности не подходит для выявления подобных ситуаций. Поэтому для изучения данного вопроса, по всей видимости, следует разработать и проанализировать альтернативные модели *in vitro* или *in vivo*.

ЧАСТЬ II (ДОПОЛНЕНИЕ)

1. Введение

1.1. Цель приложения

Цель настоящей части дополнить и разъяснить следующие вопросы, обсуждаемые в части I настоящей Главы: выбор видов животных, дизайн исследования, иммуногенность, репродуктивная и онтогенентическая токсичность, оценка канцерогенного потенциала.

Данные рекомендации должны способствовать своевременному проведению клинических исследований, сокращению использования животных при доклинических исследованиях в соответствии с принципом «трех «R» (сократить/оптимизировать/заменить «*reduce/refine/replace*») и снижению использования других ресурсов по разработке лекарственных препаратов. Необходимо рассмотреть возможность использования соответствующих альтернативных методов оценки безопасности *in vitro*, несмотря на то, что данный вопрос не обсуждается в настоящих рекомендациях. Если эти методы будут приняты всеми уполномоченными органами государств-членов Союза в сфере обращения лекарственных средств, они могут заменить действующие стандартные методы.

Настоящие рекомендации разработаны в целях содействия безопасной, этичной разработке и доступности новых биотехнологических лекарственных препаратов.

1.2. Справочная информация

Рекомендации, представленные в настоящей части, обеспечивают дальнейшую гармонизацию доклинических исследований безопасности биотехнологических лекарственных препаратов, проводимых на различных этапах клинической разработки в разных государствах.

1.3. Область применения

Настоящая часть не вносит изменения в область применения части I настоящей Главы. Для лекарственных препаратов, полученных с использованием биотехнологических методов, которые предназначены для использования в онкологии, необходимо обратиться к документу Союза по доклинической оценке противоопухолевых лекарственных препаратов.

2. Выбор видов животных

2.1. Общие принципы

При решении вопроса, является ли данный вид животных релевантным для проведения исследований, следует принимать во внимание несколько факторов. На первом этапе следует провести сравнение последовательностей молекул-мишеней с целью выявления гомологии между видами. Следующим этапом должна быть качественная и количественная межвидовая сравнительная оценка в тестах *in vitro* аффинности связывания действующего белкового вещества препарата с мишенью, распределения (занятости) рецепторов (лигандов) и кинетических характеристик такого связывания.

Также рекомендована оценка функциональной активности. Функциональная активность может быть продемонстрирована в исследованиях с использованием видоспецифичных клеточных систем и (или) в рамках фармакологических и токсикологических исследований *in vivo*. Доказательствами функциональной активности, которые можно использовать для обоснования выбора данного вида животных, может быть модуляция биологической реакции или показателей фармакодинамического маркера.

При изучении различий между видами по связыванию с мишенью и функциональной активности, в контексте предполагаемого режима дозирования, необходимо представить обоснование, что выбранная модель способна выявлять потенциально нежелательные последствия, связанные с модуляцией антигена-мишени. В некоторых случаях, у здоровых обычно используемых в доклинических исследованиях видов животных, уровень экспрессии антигенов-мишеней очень низкий (например, провоспалительные цитокины или опухолевые антигены), для обоснования выбора вида животных достаточно определить аффинность связывания и активность на клеточных системах.

При выборе вида животных оценка перекрестной тканевой реактивности на тканях животных имеет ограниченную ценность (см. Примечание 1). Однако в отдельных случаях (когда описанные выше подходы не могут быть использованы для поиска видов животных, релевантных по фармакологическим параметрам) при выборе видов животных для токсикологических исследований могут быть использованы исследования перекрестной тканевой реактивности (ПТР или TCR). При этом необходимо провести сравнение профилей связывания с тканями у человека и животных, с которыми предполагается связывание мишени.

Как описано в части I настоящей Главы, при отсутствии релевантных видов животных, по той причине, что биологический лекарственный препарат не взаимодействует с мишенями-ортологами ни у одного из исследуемых видов животных, допускается возможность использования гомологичных молекул или трансгенных моделей.

Для моноклональных антител и других препаратов на основе антител, направленных против чужеродных мишеней (бактериальные, вирусные антигенов и др.), может быть рассмотрена возможность

проведения краткосрочного исследования безопасности (см. рекомендации Часть I данной главы) с использованием одного вида животных (выбор такого вида животных должен быть обоснован). При этом нет необходимости в проведении дополнительных исследований токсичности, в том числе репродуктивной токсичности. В качестве альтернативного варианта можно включить оценку безопасности, если используется животная модель заболевания для проверки и подтверждения механизма действия лекарственного препарата. В этом случае целью оценки безопасности будет получение информации о потенциальных опосредованных мишенью угрозах безопасности. Если этого сделать невозможно, следует разработать подходящие стратегии для снижения риска при проведении клинических исследований.

Выбор вида животных при исследованиях конъюгатов антител с лекарственными препаратами или токсинами (ADC), в которых используется новый токсин (токсикант), проводится в соответствии с теми же основными принципами, которые применяются и для неконъюгированных антител (см. выше и см. Примечание 2).

2.2. Один или два вида животных

Если два вида животных являются фармакологически релевантными (один из отряда грызунов и другой, не относящийся к грызунам), в краткосрочных исследованиях общей токсичности (продолжительностью до 1 месяца) следует использовать оба вида животных. Если результаты обоих токсикологических исследований сходны или могут быть объяснены известным механизмом действия препарата, долгосрочные исследования общей токсичности достаточно провести только на одном виде животных. При этом следует использовать грызунов, если только для противоположного решения нет

научного обоснования. Исследования на двух видах, не относящихся к грызунам, считаются неприемлемыми.

Использование одного вида животных для всех исследований общей токсичности обосновано только в том случае, если исследуемый лекарственный препарат, который предполагается использовать в клинической практике, фармакологически активен только у этого вида. При этом исследования на другом виде животных с использованием гомологичного продукта не могут представить дополнительных данных по оценке риска и поэтому не рекомендуются.

2.3. Использование гомологичных белков

Использование гомологичных белков является одним из альтернативных подходов, описанных в разделе 3.3 Части I данной Главы. Исследования, в которых используются гомологичные белки, могут быть проведены для выявления опасностей и понимания потенциала развития нежелательных реакций, обусловленных усиленным фармакологическим действием препарата. В то же время такие исследования, как правило, не могут быть информативны для количественной оценки риска. Именно поэтому для выявления риска могут быть проведены исследования безопасности с одной контрольной группой и одной группой, получающей препарат. При этом необходимо представить научное обоснование дизайна исследования и выбранной дозы (например, максимальная фармакологическая доза).

3. Дизайн исследования

3.1. Выбор дозы и применение принципов фармакокинетики и фармакодинамики

Токсичность большинства биологических лекарственных препаратов связана с направленным механизмом их действия. В связи с этим,

относительно высокие дозы могут вызвать нежелательные реакции, которые являются следствием чрезмерного фармакологического действия препарата.

При выборе доз необходимо представить научное обоснование с учетом характеристик зависимости доза–эффект. Выбору высоких доз способствует использование принципов, применяемых при анализе данных фармакокинетики и фармакодинамики (например, выявление простой зависимости экспозиция–эффект или более сложные подходы, основанные на моделировании и симуляции). При этом возможны следующие варианты выявления доз: 1) доза, которая обеспечивает максимальный ожидаемый фармакологический эффект у выбранного вида животных, используемых в доклинических исследованиях; 2) доза, которая в 10 раз превышает максимальную дозу, предполагаемую для исследования в клинических условиях. Для группы с высокой дозой в доклинических токсикологических исследованиях необходимо выбрать наибольшую из этих двух доз. В противном случае необходимо представить обоснование использования более низкой дозы (например, максимально допустимой дозы).

Если нет доступных *in vivo/ex vivo* фармакодинамических конечных точек, выбор высокой дозы может быть основан на данных фармакокинетики и доступных данных по связыванию с рецептором в исследованиях *in vitro* и (или) фармакологических данных. При выборе верхней границы экспозиции в клинических условиях необходимо провести коррекцию с учетом степени связывания с мишенью и фармакологической активностью *in vitro* между видами животных, которые используются в доклинических исследованиях, и человеком. Например, значительное относительное различие в аффинности и (или) активности в условиях *in vitro* может свидетельствовать о целесообразности изучения

высоких доз в рамках доклинических исследований. Если при использовании данного подхода не удается обнаружить токсичность выбранных доз, то маловероятно, что дополнительные токсикологические исследования более высоких доз, кратных человеческим, приведут к получению дополнительной полезной информации.

3.2. Продолжительность исследований

Для препаратов, которые предполагается использовать в течение длительного времени, считается достаточным проведение исследований токсичности при многократном введении на грызунах или не-грызунах продолжительностью 6 месяцев. В таких исследованиях должны быть использованы высокие дозы, выбранные в соответствии с принципами, изложенными выше (см. раздел 3.1). Как правило, исследования с большей продолжительностью не дают дополнительную полезную информацию, которая повлияла бы на клиническую разработку.

Принципы определения продолжительности токсикологических исследований для биотехнологических лекарственных препаратов, разрабатываемых для длительного применения пациентами с распространенным раком, изложены в документе Союза, посвященном доклинической оценке противоопухолевых лекарственных препаратов.

3.3. Восстановление

Необходимо оценить восстановление животных после фармакологических и токсикологических эффектов, имеющих потенциальное значение для развития нежелательных реакций у человека, возникающих в клинически значимых дозах. Необходимая информация может быть получена при установлении обратимости (необратимости) конкретного наблюдаемого эффекта или путем включения периода без дозирования, как минимум, в одно исследование и, как минимум, в одной дозе, что должно быть обосновано спонсором. Цель периода без введения

исследуемого препарата заключается в установлении обратимости обнаруженных эффектов, а не оценка проявлений отсроченной (поздней) токсичности. Демонстрация полного восстановления не требуется. Включение периода восстановления только с целью оценки иммуногенного потенциала исследуемого препарата не требуется.

3.4. Поисковые клинические исследования

К биологическим лекарственным препаратам могут быть применимы гибкие подходы, описанные в документе Союза, посвященном доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов. Рекомендуется обсудить и согласовать эти подходы с соответствующими уполномоченными органами.

4. Иммуногенность

Оценка иммуногенности проводится для того, чтобы обеспечить правильную интерпретацию результатов исследований и разработку дизайна дальнейших исследований. Такой анализ в ходе доклинических исследований на животных не информативен в плане прогнозирования потенциальной иммуногенности человеческих или гуманизированных белков у человека.

Определение концентрации антител, вырабатываемых в ответ на биотехнологический лекарственный препарат (ADA) в рамках доклинических исследований, должно проводиться в следующих случаях:

1) при наличии доказательства изменения фармакодинамической активности;

2) при получении данных о неожиданном изменении экспозиции в отсутствие фармакодинамических маркеров;

3) при выявлении иммуноопосредованных реакций в ответ на введение препарата (болезнь иммунных комплексов, васкулиты, анафилактические реакции и т.д.).

Поскольку до завершения исследования трудно определить, будет ли необходимо проведение такого анализа, во многих случаях целесообразно получить соответствующие образцы в ходе исследования. В дальнейшем эти образцы могут быть проанализированы и в случае необходимости использованы для интерпретации результатов исследования. Если в ходе исследования обнаружены антитела к лекарственному препарату, потребуется оценка их влияния на интерпретацию результатов исследования (для дополнительных рекомендаций относительно влияния иммуногенности, см. также часть I настоящей Главы, раздел 3.6, п. 2).

При выявлении антител и одновременном отсутствии фармакодинамических маркеров, позволяющих продемонстрировать их устойчивую активность в условиях токсикологических исследований *in vivo,* необходима оценка нейтрализующей активности антител. Нейтрализующую активность антител можно оценить косвенно с помощью биологических методов *ex vivo* или путем соответствующей комбинации различных видов анализа показателей фармакокинетики/фармакодинамики, или непосредственно путём использования специальных методов, определяющих нейтрализующую способность антител.

5. Репродуктивная и онтогенетическая токсичность

5.1. Комментарии общего характера

Исследования репродуктивной токсичности препарата следует проводить в соответствии с принципами, изложенными в документе

Союза, регламентирующем проведение исследований репродуктивной токсичности. В то же время на основании знаний о видоспецифичности, природе исследуемого лекарственного препарата и механизме его действия, иммуногенности и (или) фармакокинетических свойств и об экспозиции в период эмбрио-фетального развития, отдельный дизайн исследования и режим дозирования могут варьировать.

В целом, предпочтительной является оценка репродуктивной токсичности на релевантных видах животных с использованием лекарственного препарата, который предполагается применять в клинических исследованиях. Оценка репродуктивной токсичности должна проводиться на видах животных, которые подходят по фармакологическим параметрам. Если препарат, который предполагается использовать в клинике, проявляет свою фармакологическую активность у грызунов и кроликов, то оба вида этих животных должны использоваться в исследованиях эмбрио-фетальной токсичности (ЭФТ или EFD). Исключением являются случаи, когда для одного вида животных установлена эмбрио-фетальная летальность или тератогенное действие.

Исследования онтогенетической токсичности на не-человекообразных приматах (НЧП) допускается проводить только, если они являются единственным релевантным видом животных.

Если исследуемый препарат является фармакологически активным только у НЧП, решение принимается в пользу проведения исследований препарата на данном виде животных. Однако вместо приматов изучение препарата-кандидата для клинических исследований может быть проведено с использованием альтернативных видов животных, если представлено соответствующее научное обоснование для выбора альтернативной модели.

Если релевантные виды животных, на которых могут быть проведены клинические исследования препарата-кандидата, отсутствуют, возможны следующие решения. Могут быть использованы трансгенные мыши, которые экспрессируют мишень человека, или использованы гомологичные белки соответствующих видов животных, экспрессирующих ортолог человеческого белка-мишени. Для этого необходимо, чтобы относительно используемой модели было накоплено достаточно информации (например, данные предшествующих исследований) (см. Часть 1 настоящей Главы, Примечание 1*)*. Для лекарственных препаратов, которые направлены против чужеродных мишеней, например бактериальных или вирусных, как правило, нет необходимости проводить исследования репродуктивной токсичности (см. раздел 2.1).

Если существуют весомые доказательства того, что препарат оказывает нежелательное влияние на фертильность или течение беременности (например, механизм действия; фенотипические данные, полученные на генетически модифицированных животных; сведения об эффектах препаратов, относящихся к данной группе), они могут представить достаточную информацию о существовании риска для репродуктивной системы. В этом случае, при соответствующих условиях, проведение дополнительных доклинических исследований безопасности может не потребоваться.

5.2. Фертильность

Оценка фертильности при исследовании препаратов, для которых мыши и крысы являются фармакологически релевантными видами, может проводиться на одном виде грызунов (см. документ Союза, регламентирующий проведение исследований репродуктивной токсичности). Дизайн исследований из соответствующего документа

Союза, регламентирующего проведение исследований репродуктивной токсичности, может быть адаптирован для других видов животных, если они являются фармакологически релевантными. Кроме того, дизайн исследования должен быть соответствующим образом дополнен для того, чтобы, например, в результате исследования была охарактеризована природа лекарственного препарата и проведена оценка его иммуногенного потенциала.

Считается, что при работе с НЧП проведение исследований со спариванием является нецелесообразным. В то же время, если НЧП являются единственным релевантным видом животных, может быть проведена оценка потенциального влияния препарата на фертильность самцов и самок. Для этого необходимо оценить влияние препарата на репродуктивную систему животных (например, массу органов и гистопатологические изменения) в рамках исследований токсичности с многократным введением длительностью не менее 3 месяцев. Для исследований необходимо использовать половозрелых НЧП. Если на основании данных о фармакологической активности или результатов предыдущих исследований существуют опасения относительно токсичности, может быть проведена оценка специальных параметров в ходе исследований токсичности многократного введения препарата. К таким параметрам относятся периодичность менструального цикла, число сперматозоидов, морфология и (или) подвижность сперматозоидов, содержание половых гормонов у самцов и самок.

Если НЧП являются единственным релевантным видом животных и при этом существуют специфические опасения относительно потенциального влияния препарата на оплодотворение (имплантацию), причиной которого является его фармакологическая активность, следует проверить такие опасения экспериментально. В случае наличия

опасений единственной практической возможностью оценить потенциальные эффекты на оплодотворение и имплантацию является использование гомологичных белков или трансгенных моделей. В то же время не рекомендуется разрабатывать гомологичные белки или трансгенные модели с единственной целью проведения исследований репродуктивной функции у грызунов. При отсутствии доклинических данных, минимизацию риска следует осуществлять путем соответствующих процедур в рамках клинических исследований, информированного согласия и внесения соответствующих сведений в информацию о лекарственном препарате.

5.3. Эмбрио-фетальное развитие и пре-/постнатальное развитие потомства

При выборе дизайна и интерпретации результатов исследования по оценке эмбрио-фетальной токсичности и влияния отдалённых эффектов токсичности на развитие потомства необходимо учитывать потенциальные различия между биотехнологическими лекарственным препаратами в отношении их способности проникать через плацентарный барьер (см. Примечание 3).

В отношении лекарственных препаратов, проявляющих свою фармакологическую активность только у НЧП, может быть рассмотрено несколько дизайнов исследования с учетом предполагаемого клинического применения и ожидаемых фармакологических эффектов. Целесообразно проведение отдельных исследований на этапах, охватывающие эмбрио-фетальное и (или) пре-/постнатальное развитие (ППНР или PPND). Возможны и другие дизайны исследования при условии их обоснования, особенно при наличии некоторых опасений относительно того, что нежелательное влияние на эмбрио-фетальное развитие или смерть плода во время беременности могут быть вызваны

самим механизмом действия исследуемого лекарственного препарата. Тем не менее, иногда более целесообразно проведение одного тщательного спланированного исследования на НЧП, которое предусматривает введение лекарственного препарата самкам с 20-го дня беременности и до рождения потомства (усиленное PPND, ePPND), чем проведение отдельных исследований EFD и (или) PPND.

В случае проведения единственного исследования ePPND, предусматривающего изучение влияния препарата на пре-/постнатальное развитие плода, дизайн которого описан выше, включение группы животных, которым проводят кесарево сечение, является нецелесообразным; при этом необходимо проводить оценку исходов беременности, завершившихся естественными родами. В рамках указанного исследования необходимо оценить жизнеспособность потомства, внешние пороки развития, аномалии развития скелета (например, с помощью рентгенографии), а также морфологию внутренних органов и тканей при вскрытии животных. Проведение ультразвуковых исследований эффективно для контроля протекания беременности, однако такие исследования являются малоинформативными для обнаружения пороков развития потомства. Оценка возможных пороков развития осуществляется в период послеродового наблюдения. Введение исследуемого препарата матери в послеродовом периоде не рекомендуется, поскольку это может оказывать неблагоприятное влияние на материнскую заботу о потомстве. При необходимости, в исследование можно включить анализ других конечных точек (параметров, оцениваемых у потомства), если они имеют значение для оценки фармакологической активности препарата. Продолжительность постнатальной фазы исследований зависит от дополнительных конечных точек, которые выбирают в

соответствии с механизмом действия исследуемого лекарственного препарата (см. Примечание 4).

Исследования онтогенетической токсичности на НЧП позволяют провести только идентификацию рисков. Число животных в группе должно быть достаточным для достоверной интерпретации полученных данных (см. Примечание 5).

При использовании других видов НЧП необходимо представить обоснование дизайна такого исследования. Описанные выше исследования онтогенетической токсичности, которые проводятся на НЧП, направлены только на выявление возможной угрозы, поэтому проведение таких исследований возможно с включением одной исследуемой группы (получающей одну дозу препарата) и одной контрольной группы. При этом необходимо представить научное обоснование выбора дозы. В качестве примера научного обоснования может быть рассмотрен опыт исследования моноклональных антител, способных связываться с растворимым антигеном-мишенью. При этом используются предлагаемые для клинического применения дозы препарата моноклональных антител, обеспечивающие насыщение связывания с мишенью. Если такое насыщение связывания с мишенью может быть продемонстрировано на выбранном для исследования виде животных и применяемая доза обеспечивает экспозицию, которая не более чем в 10 раз превышает достигаемое при клиническом применении, результаты исследования единственной дозы при наличии контрольной группы животных обеспечивают достаточную оценку угрозы исследуемого препарата на эмбриофетальное развитие.

5.4. Сроки проведения исследования

Если в клинические исследования включаются женщины с детородным потенциалом, до получения информация относительно

возможного влияния препарата на эмбрио-фетальное развитие, должны быть приняты соответствующие меры по ограничению клинического риска, например, рекомендации по использованию высокоэффективных методов контрацепции (см. документ Союза, регламентирующий проведение доклинических исследований безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов).

Для биотехнологических лекарственных препаратов, которые проявляют фармакологическую активность только у НЧП, доклинические исследования EFD и ePPND могут проводиться параллельно с клиническими исследованиями III фазы, при условии принятия мер предосторожности, достаточных для предотвращения наступления беременности у субъектов клинического исследования. В этом случае отчет о результатах проведенных исследований необходимо представить при подаче заявления о регистрации лекарственного препарата. Если спонсор не может обеспечить достаточные меры для предотвращения беременности у женщин, включённых в клинические исследования, необходимо до начала III фазы представить полный отчёт об исследовании токсичности при EFD, либо промежуточный отчёт об исследовании токсичности в ePPND (см. Примечание 6). Если препарат является фармакологически активным только у НЧП, и механизм его действия вызывает серьёзную обеспокоенность относительно его влияния на эмбрио-фетальное развитие, информация о лекарственном препарате должна включать указание о возможном существовании таких последствий. При этом проведение исследования онтогенетической токсичности на НЧП не требуются. В инструкции по применению необходимо указать, что женщинам с детородным потенциалом следует избегать применения такого лекарственного препарата.

Если релевантными видами животных являются грызуны или кролики, информация о сроках проведения исследований репродуктивной токсичности содержится в документе Союза, регламентирующем проведение доклинических исследований безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов. Рекомендаций указанного документа следует придерживаться также в вопросах о сроках проведения исследований при оценке влияния на фертильность тех препаратов, для которых грызуны являются релевантными видами животных.

Для препаратов, подходящих под требования документа Союза по доклинической оценке безопасности противоопухолевых лекарственных препаратов и предназначенных для лечения онкологических заболеваний, вопросы, связанные со сроками проведения исследований, должны соответствовать положениям данного документа.

6. Канцерогенность

Необходимость проведения специфичных для конкретного биологического лекарственного препарата исследований канцерогенного потенциала следует определять в соответствии с популяцией, у которой планируется клиническое применение препарата, а также длительностью его применения (см. *документ Союза по доклиническому изучению канцерогенности)*. Если такая оценка необходима, заявитель должен разработать программу исследований, которая позволила бы выявить потенциальную угрозу препарата.

Программа исследования должна основываться на анализе совокупности существующих данных, в том числе обзоре соответствующих сведений, полученных из разного рода источников. Среди источников могут быть публикации (например, информация, полученная в результате

исследования моделей заболевания у животных, трансгенных животных и животных с нокаутом генов, генетических заболеваний человека). Также это могут быть данные, характерные для всей группы препаратов, подробная информация о биологических функциях молекулы-мишени и механизме действия, результаты исследований *in vitro*, исследований хронической токсичности или клинических исследований. В некоторых случаях имеющейся информации может быть достаточно для выяснения канцерогенного потенциала и установления риска для клинического применения без проведения дополнительных доклинических исследований.

Механизм действия некоторых биологических лекарственных препаратов может свидетельствовать о том, что они могут обладать канцерогенным потенциалом (например, иммунодепрессанты и факторы роста). Если совокупность разных данных (см. выше) свидетельствует о существовании риска проявления канцерогенного потенциала, проведение биологических испытаний на грызунах не требуется. В такой ситуации наиболее приемлемым является указание в информации о лекарственном препарате риска, а также проведение мероприятий, направленных на минимизацию данного риска. В то же время, если совокупность разных данных не позволяет сделать однозначный вывод, заявитель должен рассмотреть вопрос о проведении дополнительных исследований, которые могли бы прояснить вопрос о наличии риска, предполагаемого на основании знания механизма действия препарата (см. часть I настоящей Главы, раздел 4.8).

Для некоторых лекарственных препаратов сведений о свойствах и механизме его действия недостаточно для того, чтобы выдвинуть предположения о его канцерогенном потенциале. В таких случаях считается оправданной более тщательная оценка (например, оценка взаимосвязи между биологическими функциями молекулы-мишени и

канцерогенным потенциалом или включение дополнительных конечных точек в токсикологические исследования препарата).

Если совокупность сведений, полученная в результате таких более обширных исследований, не указывает на наличие канцерогенного потенциала, проведение дополнительных доклинических исследований не рекомендуется. Напротив, если собранная информация свидетельствует о возможности проявления канцерогенного потенциала, заявитель может провести дополнительные доклинические исследования, которые позволили бы подтвердить отсутствие канцерогенного потенциала, в противном случае необходимо указать в информации о лекарственном препарате соответствующие предостережения.

Оценка канцерогенного потенциала, специфичная для данного препарата, используется для извещения о наличии риска и составления плана по управлению рисками, внесения соответствующих предостережений в информации о лекарственном препарате, обеспечения клинического мониторинга и пострегистрационного наблюдения. Могут использоваться сочетания перечисленных подходов.

Ценность количественных исследований биологической активности на грызунах (или краткосрочных исследований канцерогенности) с использованием гомологичных белков при оценке канцерогенного потенциала препарата, который предполагается использовать в клинической практике, обычно ограничена.

По мере разработки новых подходов (методов) исследований возможны альтернативные решения.

Примечания

Примечание 1

Исследования перекрестной тканевой реактивности (TCR) представляют собой изучение связывания исследуемого препарата с тканями в тестах *in vitro* с использованием иммуногистохимических методик (ИГХ). Данные тесты позволяют охарактеризовать связывание препаратов моноклональных антител и препаратов модифицированных антител с антигенными детерминантами в тканях. Вместо иммуногистохимических методов могут быть использованы другие аналитические технологии, которые позволяют изучить распределение мишеней (участков связывания) в тканях.

Исследование TCR с использованием панели тканей человека является рекомендуемым компонентом программы оценки безопасности, которая обосновывает применение начальной клинической дозы биотехнологического лекарственного препарата. Однако в отдельных случаях лекарственный препарат – кандидат для клинических исследований – не является хорошим реагентом, пригодным для использования в иммуногистохимических анализах, в связи с этим исследование перекрёстной тканевой реактивности может быть технически неосуществимо.

В исследованиях TCR могут быть получены полезные дополнительные сведения о распределении мишени, а также может быть получена информация о возможном непредвиденном связывании. Само по себе связывание препарата с тканями не является показателем возможного проявления его биологической активности *in vivo*. Кроме того, связывание исследуемого препарата с участками, которые обычно являются недоступными для него в условиях *in vivo* (т.е. с цитоплазмой), как правило, не имеет клинического значения. Именно

поэтому результаты исследований следует интерпретировать, учитывая всю полученную информацию, включая фармакологические данные и данные по оценке безопасности препарата.

В случае непредвиденного связывания с тканями человека, оценка TCR выбранных тканей животных может обеспечить дополнительную информацию относительно потенциальных корреляций либо их отсутствия в рамках доклинического исследования токсичности препарата. Исследования TCR с использованием полного набора тканей животных не рекомендованы.

Поскольку лекарственные препараты на основе антител с двойной специфичностью (биспецифичные гибридные антитела) подлежат исследованию TCR с использованием панели тканей человека, отпадает необходимость в изучении перекрёстной тканевой реактивности отдельных компонентов препарата.

Оценка связывания гомологичных белков с тканями не представляет дополнительной ценности, если исследования TCR препарата, предназначенного для клинических исследований, были проведены с использованием набора тканей человека, поэтому такая оценка не рекомендована.

Исследования TCR не предназначены для выявления незначительных изменений критических показателей качества лекарственного препарата. Поэтому исследования TCR не рекомендованы для оценки сопоставимости исследуемого препарата после внесения изменений в процесс его производства в ходе программы разработки препарата.

Примечание 2

Если для оценки безопасности конъюгатов антител с лекарственными препаратами или токсинами (ADC) использовались два

вида животных, необходимо провести дополнительное краткосрочное исследование (или часть краткосрочного исследования) с использованием неконъюгированного токсина, по крайней мере, на одном виде животных. В этих случаях предпочтительно использовать грызунов, за исключением случаев, когда токсин не активен при введении грызунам. Если доступен только один фармакологически релевантный вид животных, исследования ADC следует проводить на данном виде животных. Выбор видов животных, в случае исследования новых токсических веществ, должен проводиться аналогично используемому при изучении новых химических веществ и основываться на индивидуальном подходе. В случае токсинов или токсических веществ, которые не являются новыми и для которых доступно достаточное количество научной информации, проводить отдельное исследование неконъюгированного токсина не требуется. Должны быть представлены данные о сравнении метаболической стабильности ADC в организме животных и человека.

Примечание 3

При интерпретации результатов исследования необходимо учитывать профиль воздействия препарата на развитие эмбриона и плода во время беременности. Белки с высокой молекулярной массой (>5000 Да) не проникают через плацентарный барьер за счет простой диффузии. В случае моноклональных антител с высокой молекулярной массой (достигающей 150 000 Да) существует специфический транспортный механизм через плаценту с участием неонатального Fc рецептора (FcRn), который определяет экспозицию у плода и отличается у разных биологических видов.

У НЧП и человека трансплацентарная передача IgG в период органогенеза невысока, она начинает увеличиваться в начале второго

триместра беременности, достигая максимума в конце третьего триместра (5). Следовательно, проведение стандартных исследований эмбриофетальной токсичности на НЧП, получающих препарат с ранних сроков беременности и до 50-го дня гестации, не имеет большого значения при оценке непосредственного влияния на развитие эмбриона и плода в период органогенеза. В то же время такие исследования могут позволить оценить непрямое влияние на эмбрио-фетальное развитие в результате экспозиции препарата в организме матери. Кроме того, введение исследуемого препарата самкам НЧП после родов обычно не актуально, т.к. IgG экскретируются в грудное молоко только в раннем периоде (т.е. в молозиво), в более поздних фазах лактации и период кормления грудным молоком его выделение прекращается.

Грызуны отличаются от НЧП и человека тем, что у них IgG проникают через желточный мешок, благодаря транспорту с участием FcRn, в связи с этим экспозиция может возникать на относительно ранних сроках беременности по сравнению с НЧП и человеком. Кроме того, рождение потомства у грызунов происходят на этапе развития, когда они еще не достигли той степени зрелости, как у новорожденных НЧП и человека. Следовательно, чтобы детеныши подвергались экспозиции лекарственного препарата через молоко, самкам крыс (мышей) следует вводить препарат в период лактации, по крайней мере, до 9-го дня грудного вскармливания, когда зрелость потомства достигает того же уровня развития, что и новорожденные человека.

Примечание 4

С целью проведения ранних функциональных исследований (например, оценка роста и поведения), минимальная продолжительность постнатального периода наблюдения за

новорожденными после прекращения экспозиции препарата должна составлять один месяц.

В целом, если существуют доказательства нежелательного влияния на иммунную систему (или ее функции), полученные в ходе исследования общей токсичности, обосновано проведение исследований функций иммунной системы у потомства в послеродовом периоде в рамках исследований ePPND. При необходимости в раннем постнатальном периоде – до 28 дня после рождения следует провести иммунофенотипирование. Продолжительность постнатального наблюдения, целью которого является оценка функционального состояния иммунной системы, должна составлять 3–6 месяцев в зависимости от используемых функциональных тестов.

Нейроповеденческая оценка может быть ограничена наблюдениями за поведением в клинических условиях. Обучение пользоваться инструментами требует определенного времени, что может привести к продлению периода постнатального наблюдения, по крайней мере, до 9 месяцев и поэтому такой способ проверки не рекомендован.

Примечание 5

Подробное обсуждение подхода к определению размеров группы макаков-крабоедов в исследовании ePPND представлено в работе Jarvius et al., 2010 г. (6). При проведении исследований ePPND число молодых животных должно быть достаточным (6–8 особей в группе в возрасте до 7 дней) для оценки постнатального развития и обеспечения возможности проведения специальных исследований (например, оценки состояния иммунной системы).

В большинстве исследований ePPND беременных животных набирают в течение нескольких недель или месяцев. Необходимо

рассмотреть возможность прекращения дальнейшего набора в исследование беременных животных и коррекции дизайна исследования (например, путем использования кесарева сечения) в случае, когда потери в пренатальном периоде в группе, получающей исследуемый препарат, свидетельствуют о токсических эффектах, связанных с воздействием препарата.

Рекомендуется повторно использовать самок животных контрольной группы, получавших индифферентное вещество, например растворитель.

Если существуют основания предполагать, что за счет механизма действия препарат может оказывать влияние на эмбрио-фетальное развитие или приводить к прерыванию беременности, для подтверждения предполагаемой угрозы следует проводить исследования на ограниченном количестве животных.

Примечание 6

В промежуточный отчет о результатах исследований, проведенных в рамках ePPND на НЧП, включают следующие конечные точки:

данные о самках: выживаемость, клинические наблюдения, масса тела, данные о воздействии препарата в период беременности (при наличии), любые фармакодинамические конечные точки;

данные о беременности: количество беременных животных, включенных в исследование, состояние беременности на момент завершения органогенеза (50-й день беременности) и на 100-й день беременности, частота невынашивания беременности и срок прерывания беременности. Для промежуточного отчета нет необходимости в проведении ультразвукового исследования с целью

определения размера плода, в связи с наличием сведений о фактической массе тела при рождении;

данные об исходе беременности: число живо- и мертворожденных, масса тела новорожденных, выживаемость новорожденных, и их масса тела на 7-е сутки после рождения, качественная оценка внешних морфологических признаков (подтверждение, что внешний вид соответствует пределам нормы), данные об экспозиции у потомства (при наличии), фармакодинамические конечные точки у потомства (если применимо).

ГЛАВА 6. СПЕЦИФИКАЦИИ: МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ И КРИТЕРИИ ПРИЕМЛЕМОСТИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ (БИОЛОГИЧЕСКИХ) ПРЕПАРАТОВ

1. Введение

1.1. Цель

В настоящей Главе представлены общие принципы формирования и обоснования (насколько это возможно) единого свода международных спецификаций (нормативных документов по контролю качества) на биотехнологические и биологические препараты, подаваемых на рассмотрение с целью регистрации.

1.2. Вводная часть

Спецификация – это перечень испытаний, ссылок на аналитические методики и соответствующие критерии приемлемости, представляющие собой численные (количественные) пределы, диапазоны и прочие критерии для описанных испытаний. Она задает набор критериев, которым должны соответствовать активная фармацевтическая субстанция, лекарственный препарат или материалы других этапов производства[2], чтобы считаться приемлемыми для использования по целевому назначению. «Соответствие спецификациям» – есть удовлетворение активной фармацевтической субстанции и лекарственного препарата, подвергшихся испытаниям согласно описанным в них аналитическим методикам, перечисленным критериям приемлемости. Спецификации являются ключевыми стандартами качества, которые предлагаются и обосновываются

[2] Спецификации составляются на все исходные материалы, сырье, промежуточные продукты, вспомогательные вещества, активную фармацевтическую субстанцию, лекарственный препарат.

производителем и утверждаются уполномоченным органом в качестве условий регистрации.

Спецификации являются частью общей стратегии контроля, разработанной для обеспечения качества лекарственных препаратов и постоянства их характеристик. Другие элементы данной стратегии включают: подробное установление характеристик (описание свойств) в процессе разработки, на основании которых составляются многие спецификации, соответствие Правилам надлежащей производственной практики Союза, валидацию процесса производства, испытание сырья, внутрипроизводственные испытания, изучение стабильности и т.д.

Спецификации предназначены скорее для подтверждения качества активной фармацевтической субстанции и лекарственного препарата, чем для составления их полной характеристики, и должны описывать молекулярные и биологические свойства, которые могут быть использованы для подтверждения безопасности и эффективности лекарственного препарата.

1.3. Сфера применения

Принципы, вводимые и разъясняемые в настоящей Главе, применимы к белкам и полипептидам, их производным, а также лекарственным препаратам, компонентами которых они являются (например, конъюгатам). Такие белки и полипептиды продуцируются экспрессирующими системами рекомбинантных и нерекомбинантных клеточных культур и могут быть в надлежащей степени очищены и охарактеризованы с использованием подходящего множества аналитических методик.

Принципы, описанные в настоящей Главе, можно также применять к другим лекарственным препаратам, например белкам и полипептидам, изолированным из тканей и жидкостей организма. Для

определения применимости настоящей Главы в отношении таких лекарственных препаратов производители должны проконсультироваться с соответствующими уполномоченными органами. Если в других главах настоящих Правил указана ссылка на настоящую Главу, то на такие лекарственные препараты распространяются требования, приведенные в настоящей Главе, либо их следует учитывать.

Рекомендации настоящей Главы документа не распространяются на антибиотики, синтетические пептиды и полипептиды, гепарины, витамины, клеточные метаболиты, препараты ДНК, экстракты аллергенов, традиционные вакцины, клетки, цельную кровь и клеточные компоненты крови.

В настоящей Главе отсутствуют рекомендации по отдельным аналитическим методикам и частным критериям приемлемости. Кроме того, Глава не предназначена для применения к материалам, изучаемым в доклинических и (или) клинических исследованиях, однако приведенные в ней рекомендации следует принимать во внимание.

2. Принципы составления спецификаций

2.1. Установление характеристик (описание свойств)

Для составления надлежащих спецификаций необходимо с помощью надлежащих методов охарактеризовать свойства биологического или биотехнологического средства (включающие определение физико-химических свойств, биологической активности, иммунохимических свойств, чистоты и примесей). Критерии приемлемости следует устанавливать и обосновывать результатами анализа серий, использованных в доклинических и (или) клинических исследованиях, результатами анализа серий, использованных для

подтверждения постоянства производства, результатами исследований стабильности и соответствующих данных по разработке.

Подробное установление характеристик составляется на стадии разработки и, при необходимости, после внесения в процесс производства значительных изменений. На момент подачи документов на регистрацию препарат необходимо сравнить с соответствующим стандартным образцом (при наличии). По возможности (и если это применимости) препарат следует сравнить с его естественным аналогом. Кроме того, на момент подачи заявления о регистрации производитель должен располагать должным образом охарактеризованными собственными стандартными материалами, которые будут использоваться в ходе биологических и физико-химических испытаний промышленных серий. Постоянно разрабатываются новые аналитические технологии и модификации уже существующих технологий, которые следует применять при возникновении необходимости.

2.1.1. Физико-химические свойства

Программа установления физико-химических свойств обычно включает определение состава, физических свойств и первичной структуры целевого (требуемого) продукта. В некоторых случаях с помощью соответствующих физико-химических методов можно получить данные о структурах более высокого порядка (правильность которых, как правило, подтверждается наличием биологической активности).

Поскольку продукция белков живыми организмами осуществляется с помощью процессов биосинтеза, таким белкам присуща определенная степень структурной гетерогенности, поэтому желаемый продукт может представлять собой смесь ожидаемых постранслянционно модифицированных форм (например, гликоформ). Такие формы могут обладать активностью и не оказывать негативного

влияния на безопасность и эффективность препарата (раздел 2.1.4). Производитель должен установить профиль гетерогенности желаемого продукта и подтвердить его постоянство, подвергая испытаниям серии, использованные в доклинических и клинических исследованиях. Если показан постоянный профиль гетерогенности продукта, оценка активности, эффективности и безопасности (включая иммуногенность) отдельных форм может не потребоваться.

Гетерогенность может также быть обусловлена производственными причинами и (или) хранением фармацевтической субстанции или лекарственного препарата. Поскольку гетерогенность таких препаратов определяет их качество, для обеспечения постоянства серий необходимо охарактеризовать степень и профиль такой гетерогенности. Если такие варианты целевого продукта обладают свойствами, сопоставимыми со свойствами целевого продукта по активности, эффективности и безопасности, их рассматривают в качестве родственных соединений. Если изменение процесса производства или продукты деградации приводят к профилям гетерогенности, отличающимся от таковых для материала, использованного в доклинической и клинической разработке, необходимо изучить значимость таких изменений.

Аналитические методы, направленные на изучение физико-химических свойств, перечислены в Приложении 6.1. Постоянно разрабатываются новые аналитические технологии и модификации уже существующих технологий, которые следует использовать, если это обосновано.

В целях выпускающего контроля качества серий (раздел 4) необходимо отобрать надлежащий перечень этих методов и обосновать его.

2.1.2. Биологическая активность

Оценка биологических свойств является не менее важным компонентом установления полного профиля свойств. Важным свойством является биологическая активность, которая определяет особую способность или свойство препарата оказывать определенный биологический эффект.

Производитель должен представить валидную биологическую методику количественного определения, позволяющую измерить биологическую активность. Примеры методик, используемых для определения биологической активности:

Биологические методики количественного определения с использованием животных, которые определяют биологический ответ организма на препарат;

Биологические методики количественного определения с использованием культур клеток, которые определяют биохимический или физиологический ответ на клеточном уровне;

Биохимические методики количественного определения, которые определяют такие биологические активности, как скорость ферментативных реакций или биологические эффекты, обусловленные иммунологическими взаимодействиями.

Могут быть приемлемы и другие методики, такие как исследования лиганд-рецепторных взаимодействий.

Активность (potency) (выражаемая в единицах) – это количественная мера биологической активности, основанная на показателе качества препарата, связанном с его значимыми биологическими свойствами, тогда как количество содержание (quantity) (выражаемое в единицах массы) – это физико-химическая мера содержания белка. Не во всех случаях требуется имитировать биологическую активность в клинической

ситуации. В ходе фармакодинамических и клинических исследований необходимо установить корреляцию между ожидаемым клиническим эффектом и активностью, рассчитанную с помощью биологической методики количественного определения.

Результаты биологических методик количественного определения следует выражать в единицах активности, откалиброванных по международному или национальному стандартному образцу (при их наличии и пригодности для использованной методики). Если такой стандартный образец отсутствует, необходимо приготовить собственный стандартный материал, а результаты испытания промышленных серий выражать в разработанных единицах.

Физико-химические данные о сложных молекулах достаточно обширны, тем не менее, зачастую, они не позволяют подтвердить структуру более высокого порядка, однако о ней можно судить по биологической активности. В таких случаях приемлема комбинация биологической методики с расширенными доверительными пределами и специальная количественная мера. Следует отметить, что замена биологической методики количественного определения, измеряющей биологическую активность препарата, на физико-химические испытания допускается лишь при соблюдении следующих условий:

с помощью таких физико-химических методов можно получить достаточно подробные физико-химические данные о продукте, включая сведения о структуре высокого порядка, при этом подтверждена соответствующая корреляция с биологической активностью; и

имеется хорошо документированная история производства.

Если для расчета биологической активности (основанного на надлежащей корреляции) используются исключительно физико-химические испытания, их результаты следует выражать в единицах массы.

В целях выпускающего контроля качества сери (раздел 4) производитель должен обосновать выбор соответствующей методики количественного определения (биологической и (или) физико-химической).

2.1.3. Иммунохимические свойства

Если целевым продуктом является антитело необходимо всесторонне описать его иммунологические свойства. Для определения аффинности, авидности и иммунореактивности (включая перекрестную реактивность) необходимо (по возможности) использовать методики связывания антитела с очищенными антигенами и определенными участками антигенов. Кроме того, необходимо описать биохимические свойства молекулы-мишени, несущей соответствующий эпитоп, а также сам эпитоп (по возможности).

В некоторых случаях молекулу белка некоторых активных фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов необходимо изучить с помощью иммунохимических методик (например, ИФА, вестерн-блота), в которых используются антитела, распознающие различные эпитопы белковой молекулы. Иммунохимические свойства белка могут использоваться для установления его подлинности, постоянства свойств и чистоты или для количественного определения.

Если иммунохимические свойства используются в целях выпускающего контроля качества серий, необходимо представить все значимые сведения об антителе.

2.1.4. Чистота, примеси и контаминанты

Чистота

Установление абсолютной, равно как и относительной чистоты вызывает значительные аналитические затруднения, а результаты сильно зависят от использованного метода. Исторические сложилось,

что относительную чистоту биологического препарата выражают с помощью специфической активности (единицах биологической активности на мг препарата), которая также сильно зависит от использованного метода. Вследствие этого чистоту активной фармацевтической субстанции и лекарственного препарата изучают с помощью комбинации аналитических методик.

Ввиду уникальности биосинтетического процесса производства и молекулярных свойств биотехнологических и биологических препаратов активная фармацевтическая субстанция может состоять из нескольких молекулярных сущностей или вариантов. Если такие молекулярные сущности образуются в результате ожидаемых посттрансляционных модификаций, они являются частью целевого продукта. Если варианты целевого продукта образуются в ходе процесса производства и (или) хранения и обладают свойствами, сопоставимыми с целевым продуктом, их рассматривают в качестве родственных соединений, а не примесей (раздел 2.1.1).

Следует установить отдельные критерии приемлемости для отдельных родственных соединений или критерии приемлемости на их сумму.

В целях выпускающего контроля качества серий (раздел 4) для определения чистоты необходимо отобрать и обосновать подходящий перечень методов.

Примеси

Помимо изучения чистоты активной фармацевтической субстанции и лекарственного препарата, которые могут состоять из целевого продукта и множества родственных соединений, производитель также должен изучить примеси, которые могут в них содержаться. Примеси делятся на производственные и родственные. Они могут иметь изученную структуру,

быть описанными частично или неидентифицированными. Если удается получить достаточное количество примесей, их необходимо как можно подробнее охарактеризовать и, по возможности, изучить их биологическую активность.

Производственные примеси образуются в ходе процесса производства, например, из клеточных субстратов (например, белки клетки-хозяина, ДНК клетки-хозяина), клеточной культуры (например, индукторы, антибиотики или компоненты питательной среды) или вследствие последующей переработки (см. раздел 6.2.1 Приложения). Родственные примеси (например, прекурсоры, определенные продукты деградации) – это молекулярные варианты, образующиеся при производстве и хранении, которые не обладают сопоставимыми с целевымо продуктом активностью, эффективностью и безопасностью.

Кроме того, критерии приемлемости по содержанию примесей должны основываться на результатах анализа серий, использованных в доклинических и клинических исследованиях, и серий, испытанных для подтверждения постоянства производства.

Следует установить отдельные критерии приемлемости для отдельных родственных примесей или критерии приемлемости на их сумму. В определенных случаях для некоторых примесей критерии приемлемости устанавливать не требуется (раздел 2.3).

Примерный перечень аналитических методик, которые целесообразно использовать в испытаниях на примеси, перечислены в разделе 6.2 Приложения. Непрерывно возникают новые аналитические технологии и модификации ныне существующих. При достаточном обосновании их также следует использовать.

В целях выпускающего контроля качества серий (раздел 4) необходимо отобрать надлежащий перечень этих методов и обосновать его.

Контаминанты

К контаминантам препарата относятся все посторонним образом привнесенные материалы, не используемые в процессе производства, например, химические и биохимические материалы (например, микробные протеазы) и (или) микроорганизмы. Следует строго избегать наличия контаминантов и (или) надлежащим образом контролировать их содержание с помощью надлежащих внутрипроизводственных критериев приемлемости или пределов действия в спецификациях на фармацевтическую субстанцию или лекарственный препарат (раздел 2.3). При особых случаях контаминации посторонними вирусами или микоплазмой концепция пределов действия не применима, поэтому необходимо следовать стратегиям, описанным в Главах 1 и 2 настоящих Правил.

2.1.5. Количественное содержание

Количественная характеристика препарата, определяемая содержанием белка, имеет большое значение для биотехнологических и биологических препаратов и определяется с помощью соответствующих методов анализа, обычно физико-химических. В некоторых случаях можно показать, что установленные такими методами показатели качества могут быть непосредственно связаны с показателями, определенными в ходе биологического анализа. При наличии такой корреляции целесообразнее измерять количество, а не биологическую активность в ходе таких производственных процессов, как наполнение.

2.2. Аналитические вопросы

2.2.1. Стандартные образцы и стандартные материалы

При регистрации новых молекулярных соединений международные или национальные стандарты, скорее всего, будут отсутствовать. На момент подачи заявления о регистрации производитель должен разработать

надлежащим образом охарактеризованный собственный основный стандартный материал, приготовленный из серии(й), отражающей(их) свойства промышленного и клинического материалов. Собственные рабочие стандартные материалы, используемые для испытания промышленных серий, следует калибровать по основному стандартному материалу. При наличии международного или национального стандарта и его пригодности собственные стандартные материалы следует калибровать по нему. Несмотря на то что как в биологических методиках, так и физико-химических испытаниях рекомендуется использовать одинаковый стандартный материал, в некоторых случаях требуются различные стандартные материалы. Кроме того, могут потребоваться отдельные стандартные материалы на родственные соединения, родственные и производственные примеси. В соответствующих случаях в досье необходимо включить описание производства и (или) очистки стандартных материалов. Необходимо также представить документацию по характеристикам, условиям хранения и составу стандартных материалов, обосновывающую их стабильность.

2.2.2. Валидация аналитических методик

При подаче заявления о регистрации в уполномоченные органы заявители должны валидировать аналитические методики, использованные в спецификациях, в соответствии с соответствующи документом Союза, посвященному валидации аналитических методик, за исключением особых вопросов, присущих исключительно испытаниям, используемым для анализа биотехнологических и биологических лекарственных препаратов.

2.3. Контроль производства

2.3.1. Особенности технологического процесса

Правильное планирование процесса производства и знание его возможностей являются частью стратегии разработки контролируемого и воспроизводимого процесса производства, в результате которого образуется активная фармацевтическая субстанция и лекарственный препарат, удовлетворяющие спецификациям. В этом отношении пределы обосновывают ключевыми данными, полученными на протяжении всего процесса производства, начиная с раннего этапа разработки и заканчивая промышленным производством.

Испытания активной фармацевтической субстанции или лекарственного препарата на определенные примеси могут не потребоваться (их допускается не включать в спецификации), если с помощью подходящих исследований подтвержден эффективный контроль их содержания или приемлемая степень очистки. Такие испытания могут включать верификацию промышленных серий в соответствии с требованиями, содержащимися в применимых документах Союза. Очевидно, что на момент регистрации в распоряжении заявителя могут находиться лишь ограниченные данные. Таким образом, эту концепцию в некоторых случаях допускается внедрять на пострегистрационном этапе в соответствии с требованиями, содержащимися в применимых документах Союза.

2.3.2. Внутрипроизводственные критерии приемлемости и уровень действия

Внутрипроизводственные испытания проводятся на этапах принятия критических решений, а также других этапах, если результаты испытаний требуют удостовериться в постоянстве процесса производства активной фармацевтической субстанции или

лекарственного препарата. Результаты внутрипроизводственных испытаний регистрируют в виде пределов действия или критериев приемлемости. Проведение таких испытаний позволяет исключить испытания фармацевтической субстанции или лекарственного препарата (раздел 2.3.1). Внутрипроизводственные испытания клеток с предельным для производства клеточным возрастом *in vitro* на посторонние агенты – пример испытания, для которого необходимо установить критерии приемлемости.

Производитель также должен использовать собственные пределы действий для оценки процесса на менее значимых этапах. Основу для разработки предварительных пределов действий, устанавливаемых для процесса производства, должны составлять данные, полученные в ходе разработки и валидационных циклов. Такие пределы, являющиеся ответственностью производителя, используют для начала расследования или дальнейших действий. По мере накопления опыта производства и получения данных после регистрации лекарственного препарата их необходимо более подробно изучить.

2.3.3. Спецификации на исходные материалы и сырье и вспомогательные вещества

Качество исходных материалов и сырья, использовавшегося в производстве фармацевтической субстанции (или лекарственного препарата), должно удовлетворять стандартам, соответствующим их целевому назначению. Исходные материалы и сырье (включая реактивы) биологического происхождения требуют тщательного изучения на предмет наличия (или отсутствия) опасных эндогенных и посторонних агентов. Методики, позволяющие использовать аффинную хроматографию (например, применение моноклональных антител), должны сопровождаться соответствующими мерами, обеспечивающими отсутствие негативного

влияния таких производственных примесей и потенциальных контаминантов, образующихся в ходе производства, на качество и безопасность фармацевтической субстанции и лекарственного препарата. Необходимо представить соответствующие сведения, касающиеся антител.

По возможности, качество вспомогательных веществ, использующихся в производстве лекарственного препарата (и, в некоторых случаях, фармацевтической субстанции), а также упаковочно-укупорочная система должны удовлетворять фармакопейным стандартам. Иначе, для нефармакопейных вспомогательных веществ, необходимо установить удовлетворительные критерии приемлемости.

2.4. Фармакопейные спецификации

Фармакопеи содержат важные требования в отношении определенных аналитических методик и критериев приемлемости, которые, если они применимы, являются частью процесса оценки либо фармацевтической субстанции, либо лекарственного препарата. Такие статьи, применимые к биотехнологическим и биологическим препаратам, в целом, включают испытания на стерильность, эндотоксины, микробиологическую чистоту, объем в контейнере, однородность дозирования и механические включения, но не ограничиваются. С точки зрения использования фармакопейных методов и критериев приемлемости ценность настоящей Главы связана со степенью гармонизации аналитических методик между фармакопеями. Фармакопеи предназначены для разработки идентичных или методологически эквивалентных аналитических методик и критериев приемлемости.

2.5. Допустимые пределы на выпуск и допустимые пределы на срок годности (обращение)

При обосновании допускается использовать концепцию допустимых пределов на выпуск вместо допустимых пределов на срок годности (обращение). Эта концепция заключается в установлении допустимых пределов, которые более строгие на момент выпуска, чем на срок годности (обращение) активной фармацевтической субстанции или лекарственного препарата. Примерами применения концепции могут служить активность (potency) и продукты деградации. В некоторых регионах концепцию пределов на выпуск допускается применять исключительно в отношении собственных допустимых пределов, но не регуляторных допустимых пределов на срок годности.

2.6. Статистические концепции

При необходимости следует применять соответствующий статистический анализ выявленных количественных показателей. Методы анализа, включая обоснование и объяснения, должны быть полностью описаны. Приведенные описания должны быть достаточно понятными, чтобы на их основе можно было провести независимый расчет представленных результатов.

3. Обоснование спецификации

Составление спецификаций на фармацевтическую субстанцию и лекарственный препарат – это часть общей стратегии контроля качества, включающей контроль качества исходных материалов, сырья и вспомогательных веществ, внутрипроизводственные испытания, оценку или валидацию процесса производства, соблюдение Правил надлежащей производственной практики Союза, изучение стабильности и испытание постоянства свойств серий. В совокупности указанные

элементы обеспечивают надлежащее качество лекарственного препарата. Поскольку спецификации предназначены скорее для подтверждения качества, а не характеристики свойств лекарственного препарата (активной фармацевтической субстанции), производитель должен представить предпосылки и обоснование включения в спецификацию и (или) исключения из нее испытаний определенных показателей качества. При разработке научно обоснованных спецификаций необходимо учитывать нижеследующее.

Спецификации связаны с процессом производства

Спецификации должны основываться на результатах анализа серий, использованных для подтверждения постоянства производства. Необходимо увязать спецификации и процесс производства, особенно по родственным соединениям, родственным и производственным примесям. Изменения процесса производства и продукты деградации, образующиеся при хранении, могут приводить к гетерогенным профилям, отличающимся от таковых материала, использованного в доклинической и клинической разработке. Необходимо изучить значимость таких изменений.

Спецификации должны учитывать стабильность активной фармацевтической субстанции и лекарственного препарата

При разработке спецификаций необходимо учитывать деградацию (старение) активной фармацевтической субстанции и лекарственного препарата, которая происходит при хранении. Ввиду присущей этим продуктам сложности невозможно подобрать одну методику или один параметр, описывающий профиль стабильности. Вследствие чего производитель должен предложить профиль показателей стабильности. Результаты испытания такого профиля показателей стабильности должны в дальнейшем обеспечивать обнаружение изменения качества

лекарственного препарата (активной фармацевтической субстанции). Перечень включаемых испытаний зависит от свойств лекарственного препарата. Производителю следует обратиться к Главе 8 настоящих Правил.

Спецификации связаны с доклиническими и клиническими исследованиями

Спецификации необходимо составлять, основываясь на результатах анализа серий, использованных в доклинических и клинических исследованиях. Качество материала, производящегося в промышленном масштабе, должно соответствовать качеству серий, использованных в доклинических и клинических исследованиях.

Спецификации связаны с аналитическими методиками

Критические показатели качества включают, к примеру, биологическую активность (potency), свойства и количество родственных соединений, родственных и производственных примесей. Указанные показатели изучают с помощью множества аналитических методик, каждая из которых характеризует различные свойства. В ходе разработке препарата нередко вместе с препаратом происходит совершенствование аналитической технологии. В связи с этим необходимо подтвердить, что данные, полученные в ходе разработки, коррелируют с данными, полученными на момент подачи заявления о регистрации.

4. Спецификации

Выбор испытаний, включаемых в спецификации, зависит от лекарственного препарата. Необходимо описать научные предпосылки, на основании которых был установлен допустимый диапазон критериев приемлемости. Критерии приемлемости следует устанавливать и

обосновывать, руководствуясь результатами анализа серий, использованных в доклинических и (или) клинических исследованиях, результатами анализа серий, использованных для подтверждения постоянства производства, результатов исследований стабильности и релевантных данных по разработке.

В некоторых случаях допускается и приемлемо проводить испытания на промежуточных продуктах, а не стадиях фармацевтической субстанции или лекарственного препарата. В таких случаях результаты испытаний следует рассматривать в качестве внутрипроизводственных критериев приемлемости и включать их в спецификацию на фармацевтическую субстанцию или лекарственный препарат в соответствии с требованиями нациогальных уполномоченных органов.

4.1. Спецификация на активную фармацевтическую субстанцию

Следующие испытания и критерии приемлемости, в целом, применимы ко всем активным фармацевтическим субстанциям (аналитические методики описаны в разделе 2.2.2). В соответствующих случаях с активной фармацевтической субстанцией необходимо проводить фармакопейные испытания (например, определение эндотоксинов). Также могут потребоваться дополнительные критерии приемлемости, специфичные для активной фармацевтической субстанции.

4.1.1. Внешний вид и описание

Необходимо дать качественное описание физического состояния (например, твердое, жидкое) и цвета активной фармацевтической субстанции.

4.1.2. Подлинность

Испытание(я) на подлинность должно(ы) быть высоко специфичным(и) в отношении фармацевтической субстанции и основываться на уникальных свойствах ее молекулярной структуры и (или) иных особенностях. Для установления подлинности может потребоваться более одного испытания (физико-химическое, биологическое и (или) иммунохимическое). Испытание(я) могут носить качественный характер. В целях установления подлинности допускается использовать и (или) соответствующим образом модифицировать методы, традиционно используемые для установления свойств препарата и описанные в разделе 2.1 и разделе 6.1 Приложения.

4.1.3. Чистота и примеси

Абсолютную чистоту биотехнологических и биологических препаратов сложно установить, а результаты зависят от использованного метода (раздел 2.1.4). Вследствие чего чистоту фармацевтической субстанции, как правило, оценивают с помощью комбинации методов. При выборе и оптимизации аналитических методик следует стремиться к отделению целевого продукта от родственных соединений и примесей.

Примеси таких препаратов делятся на производственные и родственные:

– К производственным примесям (раздел 2.1.4) активной фармацевтической субстанции относятся питательные среды, белки и ДНК клетки-хозяина, моноклональные антитела, хроматографические среды, использованные при очистке, растворители и компоненты буферных растворов. Минимизировать содержание таких примесей необходимо, осуществляя надлежащий контроль производственных процессов.

– Родственные примеси (раздел 2.1.4) активной фармацевтической субстанции – это молекулярные варианты, образующиеся при производстве и (или) хранении, отличающиеся по свойствам от целевого продукта.

При выборе и оптимизации аналитических методик испытания на примеси следует стремиться к разделению целевого продукта и родственных соединений от примесей. Необходимо разработать критерии приемлемости на отдельные примеси и (или) на сумму примесей. В определенных случаях критерии приемлемости на некоторые примеси могут не потребоваться (раздел 2.3).

4.1.4. Активность (potency)

В спецификации необходимо включить подходящую валидированную методику испытания на активность (раздел 2.1.2) биотехнологических или биологических актиавных фармацевтической субстанции и (или) лекарственного препарата. Если для испытания на подлинность лекарственного препарата (раздел 4.2.4) используется надлежащая методика, то для количественного определения активной фармацевтической субстанции может быть достаточным альтернативный метод (физико-химический и (или) биологический). В некоторых случаях дополнительную ценность могут представлять результаты определения специфической активности.

4.1.5. Количественное содержание (quantity)

Используя надлежащую методику, необходимо определить количественное содержание фармацевтической субстанции, основанное, как правило, на содержании (массе) белка. Определение количественного содержания может осуществляться без стандартного образца или материала. Если производство лекарственного препарата

основывается на биологической активности, дополнительно определять количественное содержание может и не потребоваться.

4.2. Спецификация на лекарственный препарат

Следующие испытания и критерии приемлемости, в целом, применимы ко всем лекарственным препаратам. Каждый раздел (4.2.1–4.2.5) перекрестно ссылается на разделы по активной фармацевтической субстанции (4.1.1–4.1.5). К соответствующим лекарственным формам применяются фармакопейные требования. К стандартным испытаниям, описанным в фармакопее, относятся стерильность, эндотоксины, микробиологическая чистота, извлекаемый объем, механические включения, однородность единиц дозирования, содержание воды (влаги) в лиофилизате, но не ограничиваются ими. Если применимо, испытание на однородность единиц дозирования допускается проводить в качестве внутрипроизводственного контроля, устанавливая соответствующие критерии приемлемости.

4.2.1. Внешний вид и описание

Необходимо дать качественное описание физического состояния (например, твердое, жидкое), цвета и прозрачности лекарственного препарата.

4.2.2. Подлинность

Испытание(я) на подлинность должно(ы) быть высоко специфичным(и) в отношении лекарственного препарата и основываться на уникальных свойствах его молекулярной структуры и (или) иных особенностях. По своей природе испытание(я) на подлинность может(гут) быть качественными. Несмотря на то что в большинстве случаев достаточно одного испытания, для установления подлинности некоторых препаратов необходимо несколько испытаний (физико-химических, биологических и (или) иммунохимических). В

целях установления подлинности допускается использовать и (или) соответствующим образом модифицировать методы, традиционно используемые для описания свойств активной фармацевтической субстанции и описанные в разделе 2.1 и разделе 6.1 Приложения.

4.2.3. Чистота и примеси

При производстве и (или) хранении лекарственного препарата могут образовываться примеси или может увеличиваться их содержание. Они могут совпадать с таковыми активной фармацевтической субстанции, т.е. быть производственными, либо быть продуктами деградации, образующимися исключительно в лекарственном препарате при его приготовлении (формуляции) или хранении. Если качественное и количественное содержание примесей (т.е. относительные количества и (или) концентрации) совпадает с таковым активной фармацевтической субстанции, дополнительные испытания не требуются. Если известно, что примеси привносятся или образуются при производстве и (или) хранении лекарственного препарата, необходимо определить их содержание и установить критерии их приемлемости.

В целях определения изменений активной фармацевтической субстанции при производстве и (или) хранении лекарственного препарата критерии приемлемости и аналитические методики необходимо разрабатывать и обосновывать, опираясь на предыдущий опыт его изучения.

При выборе и оптимизации аналитических методик определения примесей следует стремиться к отделению целевого продукта и родственных соединений от примесей, включая продукты деградации, и вспомогательных веществ.

4.2.4. Активность (potency)

В спецификации необходимо включить подходящую валидированную методику испытания на активность (раздел 2.1.2) биотехнологических или биологических активной фармацевтической субстанции и (или) лекарственного препарата. Если для испытания на подлинность активной фармацевтической субстанции используется надлежащая методика, то для количественного определения лекарственного препарата может быть достаточным альтернативный метод (физико-химический и (или) биологический). Однако необходимо представить обоснование такого выбора.

4.2.5. Количественное содержание (quantity)

Используя надлежащую методику, необходимо определить количественное содержание активной фармацевтической субстанции в лекарственном препарате, основанное, как правило, на содержании (массе) белка. Если производство лекарственного препарата основывается на биологической активности, дополнительно определять количественное содержание может и не потребоваться.

4.2.6. Общие испытания

Зачастую, для оценки функциональных свойств лекарственного препарата необходимо охарактеризовать его физические свойства и определить иные показатели качества. Примерами таких испытаний служат pH и осмолярность.

4.2.7. Дополнительное испытание уникальных лекарственных форм

Следует отметить, что определенные лекарственные формы могут потребовать проведения дополнительных испытаний, не упомянутых выше.

5. Определения

Активная фармацевтическая субстанция (нерасфасованный материал) – Материал, который впоследствии смешивается со вспомогательными веществами для получения лекарственного препарата. Он может состоять из целевого продукта, родственных соединений и родственных и производственных примесей. Он также может содержать вспомогательные вещества, включая иные компоненты, например, буферные растворы.

Активность – Мера биологической активности, определяемая с помощью подходящей биологической методики количественного определения (также называемой методикой количественного определения активности (potency assay) или биометодикой (bioassay)), основанная на показателе качества продукта, который связан с релевантными биологическими свойствами.

Биологическая активность – Особая способность или свойство препарата оказывать определенный биологический эффект. Количественной мерой биологической активности является активность (potency).

Вспомогательное вещество – Компонент, преднамеренно добавляемый к активной фармацевтической субстанции, который в прибавляемых количествах не должен обладать фармакологическими свойствами.

Контаминанты – Любые привнесенные посторонние материалы (например, химические, биохимические или микробные), не предусмотренные процессом производства активной фармацевтической субстанции или лекарственного препарата.

Критерии приемлемости – Численные пределы, диапазоны и другие подходящие меры приемлемости результатов аналитических

методик, которым должны удовлетворять активная фармацевтическая субстанция, лекарственный препарат или материалы других этапов производства.

Лекарственный препарат (лекарственная форма, готовый препарат) – Разновидность фармацевтического продукта, содержащий активную фармацевтическую субстанцию, как правило, в комбинации со вспомогательными веществами.

Предел действий (предел, требующий принятия мер) – Собственное значение, используемое для оценки постоянства процесса производства на менее критических этапах.

Примесь – Всякий компонент, содержащийся в активный фармацевтической субстанции или лекарственном препарате, не являющийся целевым продуктом, родственным соединением или вспомогательным веществом, включая буферные компоненты. Различают производственные и родственные примеси.

Продукты деградации – Молекулярные варианты, образующиеся вследствие изменений целевого продукта или родственных соединений со временем и (или) под воздействием, к примеру, света, температуры, pH, влаги, или вследствие взаимодействия со вспомогательным веществом и (или) первичной упаковой/укупорочной системой. Такие изменения могут возникать при производстве и (или) хранении (например, дезаминирование, окисление, агрегация, протеолиз). Продукты деградации могут представлять собой либо родственные соединения, либо родственные примеси.

Производственные примеси – Примеси, образующиеся в процессе производства. Они могут проистекать из клеточных субстратов (например, белки клетки-хозяина, ДНК клетки-хозяина), клеточной культуры (например, индукторы, антибиотики или

компоненты питательной среды) или последующей обработки (например, реактивы для обработки или экстрагируемые (вымываемые) из колонки вещества).

Родственные примеси – Молекулярные варианты целевого продукта (например, прекурсоры, некоторые продукты деградации, образующиеся при производстве и (или) хранении), которые не обладают сопоставимыми с целевым продуктом активностью, эффективностью и безопасностью.

Родственные соединения – Молекулярные варианты целевого продукта, образующиеся при производстве и (или) хранении, обладающие активностью и не имеющие негативного влияния на безопасность и эффективность лекарственного препарата. Эти варианты обладают свойствами, сопоставимыми с целевым продуктом, и не рассматриваются в качестве примесей.

Собственный основный стандартный материал – Надлежащим образом охарактеризованный материал, приготовленный производителем из репрезентативной(ых) серии(й) в целях проведения биологических методик или физико-химических испытаний последующих серий, по которому также калибруют собственный рабочий стандартный материал.

Собственный рабочий стандартный материал – Материал, приготовленный аналогично основному стандартному материалу и предназначенный исключительно для анализа и контроля отдельных показателей качества последующих серий. Во всех случаях его калибруют по собственному основному стандартному материалу.

Спецификация – это перечень испытаний, ссылок на аналитические методики и соответствующие критерии приемлемости, представляющие собой численные (количественные) пределы,

диапазоны и прочие критерии для описанных испытаний. Она задает набор критериев, которым должны соответствовать фармацевтическая субстанция, лекарственный препарат или материалы других этапов производства, чтобы считаться приемлемыми для использования по целевому назначению. «Соответствие спецификациям» – есть удовлетворение фармацевтической субстанции и лекарственного препарата, подвергшихся испытаниям согласно описанным в них аналитическим методикам, перечисленным критериям приемлемости. Спецификации являются ключевыми стандартами качества, которые предлагаются и обосновываются производителем и утверждаются уполномоченным органом в качестве условий регистрации.

Стандартные образцы – См. международные и национальные стандарты.

Целевой продукт – (1) Белок, обладающий ожидаемой структурой или (2) белок, ожидаемый на основании последовательности ДНК и предполагаемой постранслящионной модификации (включая гликоформы) и на основании предлагаемой последующей обработки (после культивирования), направленной на получение активной (действующей) биологической молекулы.

6. Дополнение

6.1. Характеристика физико-химических свойств

Настоящее дополнение содержит примеры технических подходов, которые позволяют охарактеризовать и подтвердить структуру целевого продукта, активной фармацевтической субстанции и (или) лекарственного препарата и проанализировать их физико-химические свойства. Используемые подходы будут отличаться от к препарата к препарату, во многих случаях потребуется придерживаться подходов, не включенных в настоящее дополнение. Непрерывно возникают новые

аналитические технологии и модификации ныне существующих. При достаточном обосновании их также следует использовать.

6.1.1. Характеристика и подтверждение структуры

а) Аминокислотная последовательность

Необходимо, насколько это возможно, установить аминокислотную последовательность целевого продукта, используя подходы, подобно описанным в пунктах «б»–«д», и затем сравнить их с аминокислотной последовательностью, которая соответствует нуклеотидной последовательности гена целевого продукта.

б) аминокислотный состав

Общий аминокислотный состав определяют, используя различные гидролитические и аналитические методики, и сравнивают с аминокислотной последовательностью, которая соответствует нуклеотидной последовательности гена целевого продукта. Во многих случаях анализ аминокислотного состава позволяет получить определенные ценные сведения о структуре пептидов и небольших белков, однако для больших белков эти данные менее точны. Во многих случаях результаты количественного аминокислотного анализа позволяют установить содержание белка.

в) терминальные последовательности аминокислот

Анализ концевых аминокислот проводят для установления природы и однородности амино- и карбси-концевых аминокислот. Если целевой продукт является гетерогенным по концевым аминокислотам, с помощью соответствующей аналитической методики необходимо определить относительное содержание вариантных форм. Последовательность таких концевых аминокислот необходимо сравнить с последовательностью концевых аминокислот, соответствующей нуклеотидной последовательности гена целевого продукта.

г) пептидная карта

Избирательная фрагментация препарата на отдельные пептиды осуществляется при помощи подходящих ферментов или химических соединений, а образующиеся пептидные фрагменты подвергаются анализу с помощью ВЭЖХ или иной подходящей аналитической методики. Используя такие методы как анализ аминокислотного состава, N-концевое секвенирование или масс-спектрометрию, необходимо, насколько это возможно, идентифицировать пептидные фрагменты. Пептидное картирование активной фармацевтической субстанции или лекарственного препарата с помощью должным образом валидированной методики – это метод, часто использующийся для подтверждения структуры целевого продукта в целях выпускающего контроля качества серий.

д) сульфгидрильные группы и дисульфидные мостики

Если, согласно данным нуклеотидной последовательности гена целевого продукта, предполагается наличие остатков цистеина, необходимо, по возможности, определить количество и положения всех свободных сульфгидрильных групп и (или) дисульфидных мостиков. С этой целью используют пептидное картирование (в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях), масс-спектрометрию или иные подходящие технологии.

е) углеводная структура

Необходимо определить содержание углеводов в гликопротеинах (нейтральные сахара, аминосахара и сиаловые кислоты). Кроме того, необходимо, по возможности, проанализировать структуру углеводных цепей, олигосахаридный профиль (профиль ветвления) и участок(ки) гликозилирования полипептидной цепи.

6.1.2. Физико-химические свойства

а) молекулярная масса или размер

Молекулярную массу (или размер) определяют с помощью эксклюзионной хроматографии, электрофореза в полиакриламидном геле с натрия додецилсульфатом (в восстанавливающих и (или) невосстанавливающих условиях), масс-спектрометрии и прочих подходящих технологий.

б) профиль изоформ

Определяют с помощью изоэлектрического фокусирования или иных подходящих технологий.

в) коэффициент экстинкции (или молярный коэффициент поглощения)

Во многих случаях целесообразно определять коэффициент экстинкции (или молярного поглощения) целевого продукта при определенной длине волны в УФ или видимом спектре (например, 280 нм). Коэффициент экстинкции определяют с помощью УФ-спектрофотометрии (спектрофотометрии) в видимом диапазоне раствора препарата, содержащего известное количество белка, рассчитанного с помощью таких методов как анализ аминокислотного состава или определение содержания азота и т.д. Если для измерения содержания белка используется УФ-абсорбция, следует использовать коэффициент экстинкции этого препарата.

г) электрофоретические профили

Электрофоретические профили, данные о подлинности, однородности и чистоте получают с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, изоэлектрического фокусирования, электрофореза в полиакриламидном геле с натрия додецилсульатом, вестерн-блота, капиллярного электрофореза и прочих подходящих методов.

д) профили жидкостной хроматографии

Профили жидкостной хроматографии, данные о подлинности, однородности и чистоте получают с помощью эксклюзионной

хроматографии, обращенно-фазной жидкостной хроматографии, ионо-обменной жидкостной хроматографии, аффинной хроматографии и прочих подходящих методов.

е) спектроскопические профили

Определяют спектры абсорбции в ультрафиолетовом и видимом диапазонах. Структуры высокого порядка изучают с помощью таких методов как круговой дихроизм, ядерный магнитный резонанс (ЯМР) или другие подходящие технологии соответственно.

6.2. Дополнение по примесям

В настоящем дополнении перечислены потенциальные примеси, их источники и примеры применимых аналитических подходов их обнаружения. Подобно характеристике физико-химических свойств, профиль примесей и использующиеся технические подходы отличаются от к препарата к препарату; во многих случаях необходимо придерживаться подходов, не включенных в настоящее приложение. Непрерывно возникают новые аналитические технологии и модификации ныне существующих. При достаточном обосновании их также следует использовать.

6.2.1. Производственные примеси и контаминанты

Образуются в ходе процесса производства (раздел 2.1.4) и делятся на три основные категории: проистекающие из клеточного субстрата, клеточной культуры и вследствие последующей обработки.

а) К проистекающим из клеточного субстрата примесям относятся белки организма-хозяина, нуклеиновая кислота (геномная, векторная или вся ДНК клетки-хозяина), но ими не ограничиваются. Чувствительными к белкам клетки-хозяина методиками являются, к примеру, иммунологические методы, способные обнаруживать широкий диапазон белковых примесей. Поликлональные антитела, используемые в иммунологическом методе, получают путем иммунизации животных

препаратом клеток-продуцентов, не содержащих ген, кодирующий целевой продукт, препаратом партнеров гибридизации (фузии) и препаратом иных подходящих клеточных линий. Содержание ДНК клеток хозяина можно определить с помощью прямого анализа препарата (например, с помощью технологий гибридизации). Во избежание установления критериев приемлемости для этих примесей в некоторых случаях подтверждают удаление примесей, проистекающих из клеточного субстрата (например, нуклеиновых кислот и белков клетки-хозяина), для этого прибегают к исследованиям клиренса, которые могут включать лабораторные эксперименты с добавлением таких примесей.

б) К проистекающим из клеточной культуры примесям относятся индукторы, антибиотики, сыворотка и прочие компоненты питательных сред, но ими не ограничиваются.

в) К примесям, образующимся при последующей обработке, относятся ферменты, химические и биологические реактивы для обработки (например, бромциан, гуанидин, окисляющие и восстанавливающие вещества), неорганические соли (например, тяжелые металлы, мышьяк, неметаллические ионы), растворители, носители, лиганды (например, моноклональные антитела) и прочие экстрагируемые вещества, но ими не ограничиваются.

Необходимо в соответствии с Главой 2 настоящих Правил подтвердить способность процесса производства элиминировать и (или) инактивировать намеренно привнесенные, эндогенные и посторонние вирусы.

6.2.2. Родственные примеси, включая продукты деградации

Ниже представлены наиболее часто встречающиеся варианты целевого продукта и перечень соответствующих технологий их анализа. Указанные варианты могут потребовать значительных усилий для их

выделения и характеристики их свойств с целью установления вида модификации(й). Используя должным образом установленные критерии приемлемости, необходимо провести испытания и контролировать содержание продуктов деградации, в значительных количествах образующихся при производстве и (или) хранении.

а) Усеченные формы

Усеченные формы. Гидролитические ферменты и химические вещества могут катализировать разрыв пептидных связей, что можно обнаружить с помощью ВЭЖХ или электрофореза в ПААГ с НДС. В зависимости от свойств варианты возможно использование пептидного картирования.

б) Прочие модифицированные формы

Можно выявить дезаминированные, изомеризованные, с нарушенной дисульфидной связью, окисленные или измененные формы конъюгатов (гликозилирование, фосфорилирование) и охарактеризовать их с помощью хроматографических, электрофоретических и (или) других подходящих аналитических методов (например, высокоэффективной жидкостной хроматографии, капиллярного электрофореза, масс-спектроскопии, кругового дихроизма).

в) Агрегаты.

К агрегатам относятся димеры и полимеры целевого продукта. Их, как правило, не причисляют к целевому продукту и родственным соединениям и определяют их содержание с помощью подходящих аналитических методик (например, эксклюзионной хроматографии, капиллярного электрофореза).

ГЛАВА 7. ПРИМЕСИ ДНК И БЕЛКОВ КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА, СТАНДАРТНЫЕ ИСПЫТАНИЯ В СРАВНЕНИИ С ВАЛИДАЦИОННЫМИ ИССЛЕДОВАНИЯМИ

1. Область применения

Биотехнологические препараты, преимущественно рекомбинантные белки, получают с помощью сложной системы экспрессии (производства) с использованием генетически модифицированных клеток (клеток бактерий, дрожжей или млекопитающих). Среди примесей, подлежащих удалению в процессе очистки на конечном этапе производства, двумя компонентами, представляющими наибольший интерес с точки зрения безопасности и переносимости, являются остаточная ДНК клетки-продуцента и остаточные белки клетки-хозяина. С момента подачи первых заявок на регистрацию рекомбинантных белков европейские регуляторные органы утвердили разные подходы для работы с данными примесями, основываясь преимущественно на разновидности системы производства. В качестве стандартного испытания на белки клетки-хозяина, независимо от типа получаемого препарата и используемой клеточной системы, необходимо определять остаточные белки клетки-хозяина, в то время как исследования остаточной ДНК в качестве стандартного испытания проводят только для препаратов, полученных из перевиваемых клеточных линий млекопитающих.

Необходимо гарантировать, что содержание таких примесей в лекарственном препарате, предназначенном для пациента, снижено до допустимого уровня. Для достижения этой цели предлагается рассмотреть два подхода:

«валидационный подход»: выполнить валидацию процесса производства для демонстрации того, что на заданных этапах процесса

очистки эти примеси последовательно и воспроизводимо удаляются до тех пор, пока их уровень не станет приемлемым. Основываясь на коэффициентах снижения содержания примесей, можно предсказать и гарантировать остаточный уровень примеси в готовом препарате.

«стандартный подход»: разработать аналитические методики, позволяющие максимально точно контролировать уровень этих примесей на разных этапах процесса, и установить фиксированное предельное содержание примесей, что позволит надлежащим образом контролировать содержание таких примесей в готовом препарате.

Можно комбинировать эти два подхода, т. е. проводить стандартное испытание на раннем этапе процесса очистки, а валидационное испытание, демонстрирующее уменьшение содержания примесей, проводить на готовом препарате для выявления максимального содержания примесей.

Учитывая возможность применения рекомбинантных белков в международном масштабе, необходимо гармонизировать критерии оценки на международном уровне, чтобы производители могли разрабатывать свои препараты на одних и тех же производственных линиях, независимо от предполагаемых регионов регистрации и вывода препарата на рынок.

2. Остаточная ДНК клетки-продуцента

В отношении препаратов, полученных с помощью бактерий и дрожжей, нет необходимости проводить стандартные испытания при условии, что в готовом препарате не превышены допустимые уровни остаточной ДНК, а в досье представлены достаточные данные по валидации. ДНК из стабильной клеточной линии млекопитающих ранее считалась фактором риска из-за опасений, что остаточная ДНК клетки-хозяина может обладать туморогенным потенциалом. Однако полученная в дальнейшем информация показала, что ДНК из стабильной клеточной

линии представляет риск в гораздо меньшей степени, чем предполагалось раньше, и, следовательно, должна относиться к категории общих примесей.

Валидационные испытания (например, эксперименты по внесению заданных количеств примеси с соответствующим распределением фрагментов ДНК по размерам) должны проводиться с целью выявления основных этапов, на которых возможно снижение содержания ДНК, а также для занесения в документацию данных о способности данных этапов снижать содержание остаточной клеточной ДНК в готовом препарате до приемлемого и заданного уровня. В настоящее время методика количественного анализа ДНК подробно описана и обладает воспроизводимостью.

В дополнение к данным валидационных испытаний необходимо представить результаты количественного анализа ДНК для минимального количества производственных серий (например, 5 последовательных серий) с целью демонстрации воспроизводимости процесса производства в отношении снижения содержания остаточной ДНК до уровня, который предполагается получить в ходе валидационных испытаний. Учитывая удовлетворительные данные по валидации и достоверные результаты по ограниченному числу производственных серий, проведение стандартных испытаний для определения содержания ДНК в стабильной клеточной линии на этапе очистки не расфасованного препарата (или на других соответствующих этапах) представляется нецелесообразным.

В некоторых случаях (например, ранее не утвержденные перевиваемые клеточные линии, трансформация последовательностей ДНК вирусными векторами и т. д.) может возникнуть необходимость в применении стандартного контроля удаления ДНК.

Допустимо прекращение проведения стандартных испытаний ДНК для препаратов, выделенных из стабильных клеточных линий и уже

получивших регистрационное удостоверение. Однако в таком случае необходимо внести официальные изменения в регистрационное досье. Документация с изменениями должна содержать удовлетворительные результаты валидационного испытания наряду с ретроспективными данными, полученными заявителем с момента начала производственного процесса, что подтвердит стабильный уровень содержания остаточной ДНК в ходе процесса.

3. Остаточные белки клетки-хозяина

Вопрос об остаточных белках клетки-хозяина затрагивает все системы экспрессии (производства), а не только экспрессионную систему с использованием клеток млекопитающих. Действительно, наличие в любых рекомбинантных белках таких примесей поднимает вопрос о потенциальной иммуногенности препарата. По этой причине в настоящее время необходимо контролировать содержание остаточных белков клетки-хозяина на этапе очистки нерасфасованного препарата с помощью подходящих методов анализа. Результаты испытаний от серии к серии должны соответствовать друг другу и находиться в установленных спецификацией пределах.

При определении допустимых пределов необходимо помнить, что невозможно установить общее предельное содержание остаточных белков клетки-хозяина для всех биотехнологических препаратов. Действительно, белки клетки-хозяина – примеси, качественная и количественная характеристика которых изменяется от одного препарата к другому и даже от одной системы производства (очистки) к другой. Стандартизация аналитических методов затруднена, поскольку выбор реагентов, используемых в ходе испытаний, зависит от получаемого препарата и системы экспрессии. В отношении остаточных белков клетки-хозяина

трудно подобрать материал, обладающий схожими с примесями характеристиками, для использования на определенных этапах процесса или при использовании валидационного подхода («искусственно контаминированный материал»).

В большинстве случаев при удалении белков используют хроматографические колонки, для которых избирательность (селективность) и выход методик зависят не только от качества материала, но также и от способа первичного и повторного использования колонок, условий хранения, санитарной обработки и периода их эксплуатации. Валидационный подход не может охватить все эти критические параметры.

В отношении остаточных белков клетки-хозяина валидационный подход применяют только для каждого препарата индивидуально с учетом а) качества аналитической методики, используемой для определения и количественного анализа примесей остаточных белков клетки хозяина; б) дизайна и качества валидационных испытаний; в) предполагаемого использования препарата (доза, показания, длительность лечения и т. д.).

4. Вывод

В большинстве случаев валидационный подход считается допустимым способом определения остаточного содержания ДНК клетки-хозяина.

Этот подход не так широко используется в отношении таких примесей, как белки клетки-хозяина, при анализе которых предпочтительно использовать индивидуальный подход для каждого препарата.

Необходимо отметить, что в любом случае нужно периодически проводить оценку процессов и методик анализа для подтверждения того, что при их использовании возможно достичь запланированных результатов.

ГЛАВА 8. ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ (БИОЛОГИЧЕСКИХ) ПРЕПАРАТОВ

1. Введение

Рекомендации, содержащиеся в основных документах Союза, регламентирующих изучение стабильности лекарственных средств, применяются в целом к биотехнологическим (биологическим) лекарственным препаратам. Тем не менее, биотехнологические (биологические) лекарственные препараты различаются по ряду характеристик, которые необходимо учитывать при составлении программы испытаний, направленной на подтверждение стабильности в течение планируемого срока годности. Для лекарственных препаратов, активными фармацевтическими субстанциями которых обычно являются белки и или полипептиды, поддержание молекулярной конформации, а следовательно, и биологической активности, обусловлено как нековалентными, так и ковалентными связями в молекулах. Эти препараты особенно чувствительны к окружающим факторам, например, к температурным изменениям, окислению, действию света, ионному составу среды и механическим воздействиям. Для сохранения их биологической активности и предотвращения их деградации необходимо соблюдение строгих условий хранения.

Для оценки стабильности могут потребоваться сложные аналитические методики. Испытания на биологическую активность (если их проведение возможно) должны быть частью основных исследований стабильности. Программа оценки стабильности также должна включать соответствующие физико-химические, биохимические и иммунохимические методы анализа молекулярной сущности, а также

количественного определения продуктов деградации, если чистота и молекулярные характеристики изучаемого препарата позволяют использовать эти методики.

Учитывая все вышеперечисленное, заявитель должен получить надлежащие данные по стабильности биотехнологического (биологического) лекарственного препарата, учитывающие разнообразные условия окружающей среды, способные повлиять на активность, чистоту и качество. Основные данные, подтверждающие заявляемый срок годности как активной фармацевтической субстанции, так и лекарственного препарата, должны быть основаны на долгосрочных исследованиях стабильности (исследованиях естественного хранения) в реальном времени и в реальных условиях. Таким образом, разработка надлежащей программы естественного хранения является критически важным этапом успешной разработки лекарственного препарата. Задача настоящей Главы – представить заявителям рекомендации по видам исследований стабильности, результаты которых следует включить в регистрационное досье биологических лекарственных препаратов. В процессе экспертизы полученных сведений первичные данные по стабильности могут обновляться.

2. Область применения

Изложенные в настоящей Главе рекомендации распространяются на хорошо охарактеризованные белки и полипептиды, их производные и препараты, в состав которых они входят. Такие белки и полипептиды должны быть выделены из тканей, жидких сред организма, культур клеток или произведены с использованием технологии рекомбинантной ДНК. Таким образом, в настоящей Главе описывается получение данных и представление результатов иозучения стабильности таких

биотехнологических (биологических) препаратов, как цитокины (интерфероны, интерлейкины, колониестимулирующие факторы, факторы некроза опухоли), эритропоэтины, активаторы плазминогена, плазменные факторы свертывания крови, гормоны роста и факторы роста, инсулины, моноклональные антитела и вакцины, состоящие из хорошо охарактеризованных белков или полипептидов. Кроме того, представленные ниже требования могут распространяться на другие типы лекарственных препаратов, например, традиционные вакцины, если на это указано в специальных Главах настоящих Правил или других документах Союза. Рекомендации настоящей Главы не распространяются на антибиотики, экстракты аллергенов, гепарины, витамины, цельную кровь или клеточные компоненты крови.

3. Терминология

Для ознакомления с основными терминами, применяемыми в настоящей Главе, рекомендуется также обратиться к глоссарию основных документов Союза, регламентирующих изучение стабильности лекарственных средств. Тем не менее, поскольку производители биотехнологических (биологических) препаратов иногда используют традиционную терминологию, в скобках также указаны традиционные термины.

4. Выбор серий

4.1. Активная фармацевтическая субстанция (нерасфасованный материал)

При необходимости хранения нерасфасованного материала после его наработки до изготовления лекарственных форм и заключительных этапов производства требуется представить данные о стабильности, по

меньшей мере, трех серий, условия производства и хранения которых отражают условия промышленного масштаба. При необходимости хранения более 6 месяцев следует в первичное регистрационное досье необходимо включить результаты испытаний стабильности, продолжительностью не менее 6 месяцев. Для активных фармацевтических субстанций с периодами хранения менее 6 месяцев минимальный объем данных по стабильности на момент первоначальной подачи регистрационного досье определяется в индивидуальном порядке. При подаче регистрационного досье допускается представление данных по опытно-промышленным сериям активной фармацевтической субстанции, произведенным с уменьшенным масштабом ферментации и очистки, при этом заявитель должен взять на себя обязательство о включении в программу долгосрочной оценки стабильности первых трех серий промышленного масштаба после получения регистрационного удостоверения.

Качество серий активной фармацевтической субстанции, предназначенных для программы изучения стабильности, должно отражать качество материала, изученного в доклинических и клинических исследованиях, а также качества материала, который будет производиться в промышленном масштабе. Кроме того, активная фармацевтическая субстанция (нерасфасованный материал), полученная в рамках опытно-промышленного производства, должна быть произведена с использованием процесса и условий хранения, отражающих условия промышленного масштаба. Активная фармацевтическая субстанция, включенная в программу изучения стабильности, должна храниться в контейнерах (упаковке), соответствующих по свойствам контейнерам (упаковке), которые будут использоваться для хранения при промышленном производстве. При

изучении стабильности активной фармацевтической субстанции допускается использование контейнеров меньшего объема, если они произведены из аналогичного материала и с помощью той же упаковочно-укупорочной системы, которые будут использоваться в промышленном производстве.

4.2. Промежуточные продукты

В процессе производства биотехнологических (биологических) препаратов качество и контроль качества определенных промежуточных продуктов могут быть критически важны для получения лекарственного препарата. В целом, производитель должен идентифицировать промежуточные продукты и разработать собственные критерии и производственные ограничения, обеспечивающие их стабильность в рамках разработанного процесса. Несмотря на допустимость использования данных, полученных в опытно-промышленном масштабе, производитель должен подтвердить возможность экстраполирования полученных результатов на промышленный масштаб.

4.3. Лекарственный препарат (готовая лекарственная форма в первичной упаковке)

Данные по стабильности следует представить, по меньшей мере, для трех серий лекарственного препарата в первичной упаковке, соответствующего по свойствам тому, что будет производиться в промышленном масштабе. По возможности, серии лекарственного препарата в первичной упаковке, отобранные для изучения стабильности, необходимо произвести из разных серий активной фармацевтической субстанции. Если при регистрации заявленный срок годности превышает 6 месяцев, в регистрационное досье необходимо включить результаты изучения стабильности в течение не менее 6 месяцев. Для лекарственных препаратов со сроком годности менее 6 месяцев минимальный объем

данных по стабильности при первичной подаче регистрационного досье определяется в индивидуальном порядке. Дата истечения срока годности лекарственного препарата будет установлена на основании фактических сведений, содержащихся в регистрационном досье. Поскольку срок годности препарата устанавливают на основании исследований, проведенных в реальном времени и при реальной температуре, в процессе экспертизы следует обновлять первоначальные данные по стабильности. Качество препарата в первичной упаковке, включенного исследования стабильности, должно соответствовать качеству материала, изученного доклинических и клинических исследованиях. На момент подачи регистрационного досье могут быть представлены данные по сериям лекарственного препарата, полученным в опытно-промышленных масштабах, при этом заявитель должен взять на себя обязательство по выполнению программы изучения долгосрочной стабильности трех первых серий промышленного масштаба после получения регистрационного удостоверения. Если для установления срока годности препарата были представлены результаты испытания опытно-промышленных серий и если препарат, произведенный в промышленном масштабе, не выдерживает спецификации на долгосрочную стабильность, составленную по результатам хранения опытно-промышленных серий, или он не отражает свойства материала, изученного в доклинических и клинических исследованиях, заявитель в целях определения дальнейшей тактики должен уведомить об этом уполномоченные органы.

4.4. Отбор проб

Если один препарат реализуется в сериях, различающихся по номинальному объему (например, 1 мл, 2 мл или 10 мл), дозировке (например, 10, 20 и 50 ЕД) или массе (например, 1 мг, 2 мг или 5 мг), пробы для включения в программу оценки стабильности могут быть

выбраны на основе матричного метода и (или) в исследовании крайних вариантов (брекетинг).

Матричный метод – статистический план изучения стабильности, при котором в определенный момент времени исследуется лишь подгруппа из общего числа проб всех комбинаций факторов, подлежащих испытанию. Его допускается использовать лишь в том случае, если представлено должное обоснование, подтверждающее, что стабильность испытуемых проб отражает стабильность всех проб. К различиям проб одного и того же препарата, к примеру, относятся охват различных серий, различных дозировок, различных размеров одной и той же упаковочно-укупорочной системы и, возможно, в ряде случаев, различных упаковочно-укупорочных систем. Если отсутствует обоснование, подтверждающее, что серии в одинаковых условиях ведут себя сходным образом, не допускается применять матричный метод к пробам, различия между которыми могут повлиять на стабильность, например, к различным дозировкам и контейнерам.

Если для трех или более номинальных объемов используется одинаковая дозировка и та же упаковочно-укупорочная система, производитель вправе включить в программу лишь наименьший и наибольший размеры контейнера, т.е. провести исследование крайних вариантов. План исследования крайних вариантов предполагает, что стабильность крайних вариантов отражает стабильность промежуточных. В некоторых случаях необходимо представить данные, подтверждающие, что полученные данные отражают свойства всех проб.

5. Профиль, свидетельствующий о стабильности

Универсальной методики, или универсального перечня показателей, отражающего стабильность биотехнологического (биологического)

средства, не существует. В связи с этим производитель должен разработать перечень показателей стабильности, обеспечивающий обнаружение изменений подлинности, чистоты и активности препарата.

На момент подачи регистрационного досье заявители должны располагать валидированными методами, составляющими профиль, свидетельствующий о стабильности, и данными для целей экспертизы. Перечень испытаний зависит от свойств препарата. Описанный ниже перечень не является исчерпывающим, но он отражает характеристики препарата, которые, как правило, необходимо документировать в целях надлежащего подтверждения его стабильности.

5.1. Протокол

В состав досье на регистрацию необходимо включить подробный протокол изучения стабильности как активной фармацевтической субстанции, так и лекарственного препарата. На основе этого протокола будут установлены условия хранения и срок годности. Протокол должен включать всю необходимую информацию, подтверждающую стабильность биотехнологического (биологического) препарата, в течение всего предлагаемого срока годности, включая, например, должным образом составленные спецификации и интервалы испытаний. Статистические методы, которые следует применять при подготовке документации, представлены в основных документах Союза, регламентирующих изучение стабильности лекарственных средств.

5.2. Активность

Если предусмотренное применение лекарственного препарата связано с охарактеризованной и определяемой биологической активностью, то испытание на активность должно стать частью исследований стабильности. В целях испытания стабильности продуктов, описанных в настоящей Главе, под активностью понимается определенная способность или свойство

препарата оказывать свой планируемый эффект. Испытание основано на измерении некоторого показателя качества препарата и определяется подходящим количественным методом. Активность биотехнологических (биологических) препаратов, в целом, испытанная различными лабораториями, может быть сопоставлена, только если она нормирована по надлежащему стандартному материалу. С этой целью в методику необходимо включить стандартный материал, напрямую или косвенно калиброванный по соответствующему национальному или международному стандартному материалу.

Испытания на активность необходимо проводить через определенные интервалы, указанные в протоколе исследования стабильности, а результаты представлять в единицах биологической активности, калиброванных, по возможности, по национальному или международному стандарту. Если национальные и международные стандартные образцы отсутствуют, результаты исследования допускается выражать в самостоятельно разработанных единицах с использованием хорошо охарактеризованного стандартного материала.

Активность некоторых биотехнологических (биологических) препаратов зависит от конъюгации активной(ых) фармацевтической(их) субстанции(й) с другим соединением или связывания с адъювантом. Диссоциацию активной(ых) фармацевтической(их) субстанции(й) от носителя, используемого в качестве конъюгата или адъюванта, необходимо изучить в исследованиях реального времени при реальной температуре (включая условия транспортировки). Оценить стабильность таких препаратов бывает затруднительно, поскольку в некоторых случаях *in vitro* испытания на биологическую активность и для установления физико-химических свойств непрактичны или дают неточные результаты. В целях преодоления недостатков испытаний *in vitro*, необходимо разработать

надлежащие стратегии (например, испытание продукта до конъюгации (связывания), исследование высвобождения активной фармацевтической субстанции из связи с другим соединением, методики *in vivo*) или использовать подходящее суррогатное испытание.

5.3. Характеристика чистоты и молекулярных свойств

В целях испытания стабильности препаратов, описанных в настоящей Главе, чистота – понятие относительное. Ввиду влияния гликозилирования, дезаминирования и других гетерогенностей определить абсолютную чистоту биотехнологического (биологического) препарата крайне сложно. В связи с этим чистоту биотехнологического (биологического) препарата необходимо, как правило, определять с помощью не менее двух методов; получаемые значения чистоты зависят от выбранного метода. В целях испытания стабильности при испытании на чистоту необходимо сосредоточиться на методах обнаружения продуктов деградации.

По возможности, необходимо документировать и представить отчеты о степени чистоты, а также содержании в биотехнологическом (биологическом) препарате, включенном в исследование стабильности, отдельных продуктов деградации и их суммы. Допустимые предельные содержания продуктов деградации необходимо выработать на основании аналитического профиля серий активной фармацевтической субстанции и лекарственного препарата, использованных в доклинических и клинических исследованиях.

Используя соответствующую физико-химическую, биохимическую и иммунохимическую аналитическую методологию, необходимо всесторонне охарактеризовать свойства активной фармацевтической субстанции и (или) лекарственного препарата (например, молекулярную массу, заряд, гидрофобность), а также точно установить изменения, обусловленные деградацией, вследствие дезаминирования, окисления,

сульфоксилирования, агрегации или фрагментации при хранении. Примерами таких методов являются электрофорез (электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ), иммуноэлектрофорез, вестерн-блот, изоэлектрическое фокусирование), хроматография с высокой разрешающей способностью (например, обращенно-фазная хроматография, гель-фильтрация, ионный обмен, аффинная хроматография) и пептидное картирование.

Если по результатам естественного, ускоренного хранения и (или) стресс-исследований стабильности обнаруживаются значимые качественные или количественные изменения, свидетельствующие об образовании продукта деградации, следует проанализировать его потенциальную опасность и оценить необходимость установления характеристик продуктов деградации и их количественного определения в рамках программы естественного хранения. Необходимо представить и обосновать допустимые пределы, учитывая содержание продуктов в деградации в материале, использованном в доклинических и клинических исследованиях.

В отношении веществ, свойства которых охарактеризовать надлежащим образом невозможно, и лекарственных препаратов, чистоту которых невозможно определить с помощью стандартных аналитических методов, заявитель обязан предложить альтернативные аналитические методики и обосновать их.

5.4. Прочие характеристики препаратов

Необходимо отслеживать и представлять результаты испытаний следующих характеристик (которые, однако, не являются присущими исключительно биотехнологическим (биологическим) препаратам) лекарственного препарата, заключенного в окончательную первичную упаковку:

Внешний вид (цвет и мутность раствора (суспензии); цвет, консистенция и время растворения порошков), видимые включения в растворах или после восстановления порошков и лиофилизатов, pH и влажность порошков и лиофилизатов.

Необходимо, по меньшей мере, в начале и конце предлагаемого срока годности провести испытания на стерильность или альтернативные испытания (например, испытание целостности упаковочно-укупорочной системы).

В течение срока годности лекарственного препарата добавки (например, стабилизаторы, консерванты) и другие вспомогательные вещества могут подвергаться деградации. Если по результатам предварительных исследований стабильности обнаруживаются признаки реакции или деградации таких материалов, негативно влияющих на качество лекарственного препарата, может возникнуть необходимость контроля указанных показателей в рамках программы изучения стабильности.

Упаковочно-укупорочная система может негативно сказаться на качестве продукта и требует тщательного оценки (см. ниже).

6. Условия хранения

6.1. Температура

Поскольку большинство готовых биотехнологических (биологических) лекарственных препаратов подлежит хранению при строго заданной температуре, условия хранения в исследованиях стабильности в реальном времени при реальной температуре могут быть ограничены такой температурой хранения.

6.2. Влажность

Биотехнологические (биологические) препараты, как правило, выпускаются в контейнерах, защищающих их от влаги. В связи с этим, если подтверждено, что предлагаемый контейнер (и условия хранения) обеспечивают достаточную защиту от высокой и низкой влажности, то изучение стабильности при различной относительной влажности, как правило, не требуется. Если влагоустойчивые контейнеры не используются, необходимо представить соответствующие данные по стабильности.

6.3. Ускоренные и стресс-условия

Как указывалось ранее, срок годности необходимо определять на основании исследований в реальном времени при реальной температуре. В то же время, настоятельно рекомендуется проведение исследований активной фармацевтической субстанции и лекарственного препарата в ускоренных и стресс-условиях. При определении срока годности результаты ускоренного хранения могут послужить источником ценных вспомогательных данных для установления даты истечения срока годности, служить источником данных по стабильности для целей дальнейшей разработки (например, предварительной оценки предлагаемых изменений процесса производства, таких как изменение состава (формуляции), укрупнение), содействия в валидации аналитических методик для использования в программе изучения стабильности и наработки данных, позволяющих установить профиль деградации активной фармацевтической субстанции или лекарственного препарата. Исследования в стресс-условиях позволяют определить, насколько пагубно влияет на лекарственный препарат случайное воздействие условий, отличных от предлагаемых для хранения (например, при транспортировке), а также

выявить определенные испытуемые показатели качества, наилучшим образом отражающие стабильность препарата. Испытания активной фармацевтической субстанции и лекарственного препарата, помещенных в экстремальные условия, могут способствовать выявлению механизмов деградации; если таковая обнаруживается, то необходимо осуществлять контроль возможных изменений при хранении в предлагаемых условиях. Несмотря на то что в основных документах Союза, регламентирующих изучение стабильности лекарственных средств, описаны требования к исследованию в ускоренных и стресс-условиях, заявителю необходимо учитывать, что таковые могут не подходить для биотехнологических (биологических) лекарственных препаратов. В связи с этим, условия необходимо тщательно подбирать в индивидуальном порядке.

6.4. Свет

За получением рекомендаций по проведению испытаний заявителям необходимо обращаться в соответствующие уполномоченные органы в индивидуальном порядке.

6.5. Упаковочно-укупорочная система

Ввиду взаимодействия биотехнологического (биологического) лекарственного препарата с его упаковочно-укупорочной системой возможно изменение его качества. Поскольку для жидких лекарственных препаратов такое взаимодействие не исключается (за исключением запаянных ампул), в целях определения влияния укупорки на качество лекарственного препарата в исследование стабильности необходимо включить пробы, которые следует расположить в перевернутом или горизонтальном положении (т.е. в контакте с укупоркой), а также в вертикальном положении. Необходимо представить данные для всех

возможных комбинаций упаковочно-укупорочных систем, которые предполагается выпускать на рынок Союза.

В дополнение к стандартным данным, необходимым для обычного флакона для однократного использования, заявитель должен подтвердить, что укупорка, используемая во флаконе, содержащем несколько доз, способна выдержать условия многократных введений и извлечений, обеспечивая сохранение полной активности, чистоты и качества лекарственного препарата на максимальный срок, указанный в инструкциях по применению на контейнерах, упаковках и (или) в листках-вкладышах. Такая информация о лекарственном препарате должна соответствовать Требованиям к инструкции по медицинскому применению лекарственных средств и общей характеристике лекарственного препарата для медицинского применения Союза.

6.6. Стабильность восстановленного лиофилизированного лекарственного препарата

Необходимо подтвердить стабильность лиофилизированных лекарственных препаратов после их восстановления в условиях и при максимальном периоде хранения, указанных в инструкциях по использованию на контейнерах, упаковках и (или) в листках-вкладышах. Такая информация о лекарственном препарате должна соответствовать Требованиям к инструкции по медицинскому применению лекарственных средств и общей характеристике лекарственного препарата для медицинского применения Союза.

7. Частота испытаний

Срок годности биотехнологических (биологических) лекарственных препаратов может простираться от нескольких дней до нескольких лет. В связи с этим сложно составить универсальные

рекомендации по продолжительности исследования стабильности и частоте испытаний, которые были бы справедливы для всех видов биотехнологических (биологических) лекарственных препаратов. Тем не менее, за редким исключением, сроки годности ныне одобренных и потенциальных будущих лекарственных препаратов попадают в диапазон от полугода до 5 лет. Поэтому описанные ниже принципы ориентированы на срок годности, укладывающийся в этот диапазон. Вышеуказанное учитывает тот факт, что деградация биотехнологических (биологических) лекарственных препаратов может протекать под влиянием одних и тех же факторов в течение различных интервалов долгосрочного хранения.

Если предлагаемый срок годности короче 1 года, то исследования стабильности в реальных условиях в первые 3 месяца необходимо проводить ежемесячно, далее – каждые 3 месяца.

Если предлагаемый срок годности превышает 1 год, то исследования необходимо проводить каждые 3 месяца в течение первого года, каждые 6 – в течение второго, далее – ежегодно.

Несмотря на то что описанные выше интервалы испытаний подходят для предрегистрационного этапа, при наличии данных, подтверждающих требуемую стабильность, после получения регистрационного удостоверения допускается сократить частоту испытаний. Если данные подтверждают, что стабильность лекарственного препарата не снижается, заявителю рекомендуется представить протокол, обосновывающий исключение определенных интервалов испытаний (например, на сроке 9 месяцев) в рамках пострегистрационных долгосрочных исследований.

8. Спецификации

Несмотря на то что биотехнологические (биологические) лекарственные препараты могут подвергаться значительному снижению активности, физико-химическим изменениям или деградации при хранении, в международных и национальных правилах содержится недостаточно рекомендаций по составлению различающихся спецификаций на выпуск и конец срока годности (обращение). Рекомендации по максимально допустимому снижению активности, предельным физико-химическим изменениям и деградации в рамках предлагаемого срока годности для отдельных видов и групп биотехнологических (биологических) лекарственных препаратов не составлялись, поэтому их рассматривают в индивидуальном порядке. Каждый продукт должен соответствовать своим спецификациям в пределах, установленных для безопасности, чистоты и активности, на протяжении всего предлагаемого срока годности. Указанные спецификации и пределы необходимо устанавливать на основании всей доступной информации, используя необходимые статистические методы. Использование различающихся спецификаций на выпуск и конец срока годности (обращение) необходимо обосновать достаточным объемом данных, подтверждающих, что, как указано в основных документах Союза, регламентирующих изучение стабильности лекарственных средств, клинические свойства не ухудшаются.

9. Информация о препарате

Большинство биотехнологических (биологических) активных фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов рекомендуется хранить при строго заданных температурах. Необходимо предусмотреть специальные указания, особенно для активных

фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов, не выдерживающих замораживание. Такие условия и, в соответствующих случаях, рекомендации по защите от света и (или) влажности, необходимо указывать на контейнерах, упаковках и (или) в листках-вкладышах. Такая информация о препарате должна соответствовать Требованиям к инструкции по медицинскому применению лекарственных средств и общей характеристике лекарственного препарата для медицинского применения Союза.

Определения

Конъюгат – состоит из активной фармацевтической субстанции (например, пептида или углевода), ковалентно или нековалентно связанного с носителем (например, белком, пептидом или неорганическим минералом) – в целях улучшения эффективности или стабильности лекарственного препарата.

Опытно-промышленное производство – Производство активной фармацевтической субстанции или лекарственного препарата с помощью процедуры, полностью отражающей и повторяющей таковую при промышленном производстве. Методы культивирования клеток, сбора и очистки должны совпадать за исключением масштаба производства.

Примесь – Всякий компонент активной фармацевтической субстанции или лекарственного препарата, который не является активной фармацевтической субстанцией, вспомогательным веществом или иной добавкой лекарственного препарата.

Продукт деградации – Молекула, образующаяся вследствие изменения активной фармацевтической субстанции со временем. В целях испытания стабильности препаратов, описанных в настоящей Главе, такие изменения могут возникать вследствие обработки или хранения (например,

при дезаминировании, окислении, агрегации или протеолиза). Некоторые продукты деградации биотехнологических (биологических) препаратов могут обладать активностью.

Промежуточный продукт – В отношении биотехологического (биологического) препарата – материал, получаемый в ходе процесса производства, который не является активной фармацевтической субстанцией или лекарственным препаратом, но производство которого необходимо для успешного приготовления активной фармацевтической субстанции или лекарственного препарата. Промежуточный продукт, в целом, поддается количественному определению и для него разрабатывается спецификация, позволяющая до продолжения производственного процесса определить успешность предыдущего этапа производства. К ним относятся материалы, которые могут подвергаться дальнейшей молекулярной модификации или храниться в течение определенного времени до дальнейшей обработки.

Промышленное производство – Производство в масштабе, как правило, на оборудовании, предназначенном для производства лекарственного препарата, выпускаемого на рынок Союза.

ГЛАВА 9.1. СОПОСТАВИМОСТЬ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ (БИОЛОГИЧЕСКИХ) ПРЕПАРАТОВ ПРИ ВНЕСЕНИИ ИЗМЕНЕНИЙ В ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ПРОЦЕСС

1. Введение

1.1. Цели

В настоящей Главе представлены основные принципы оценки сопоставимости биотехнологических (биологических) препаратов[3], полученных до и после внесения изменений в производственный процесс[4] получения действующего вещества или готовой формы лекарственного препарата. Настоящая Глава содержит указания по сбору информации необходимой для подтверждения того, что изменения производственного процесса не окажут негативного влияния на показатели качества, безопасности и эффективности лекарственного препарата. Глава не предписывает конкретные аналитические, доклинические и клинические стратегии, основное внимание уделено вопросам качества.

1.2. Вступление

Производители[5] биотехнологических (биологических) лекарственных препаратов очень часто в процессе разработки и после регистрации лекарственного препарата вносят изменения в производственный процесс препарата. Изменения в производственный процесс вносятся с целью

---

[3] Для краткости, под термином «препарат» подразумевается промежуточный продукт, фармацевтическая субстанция и лекарственный препарат.

[4] Для краткости, под термином «производственный процесс» подразумеваются не только сам производственный процесс, но и производственные мощности (помещения) и оборудование, которые могут повлиять на критические параметры обработки и, таким образом, на качество.

[5] Для краткости под термином «производитель» также понимается любая третья сторона имеющая контрактное соглашение (договор) на производство промежуточных продуктов, активной фармацевтической субстанции или лекарственного препарата от имени держателя регистрационного удостоверения (или разработчика, если лекарственный препарат не зарегистрирован).

совершенствования технологического процесса, масштабирование производства, повышение стабильности препарата и при изменении регуляторных требований к производственному процессу. При внесении изменений в производственный процесс производитель, как правило, должен оценить соответствующие показатели качества и подтвердить, что вносимые изменения не оказывают негативного влияния[6] на показатели безопасности и эффективности препарата. На основании данных исследований делается заключение о необходимости проведения подтверждающих доклинических и клинических исследований.

1.3. Сфера применения

Настоящая Глава, взаимосвязана с другими главами настоящих Правил и содержит описание дополнительных подходов, посвященных:

– сравнению препарата до и после внесения изменения в производственный процесс,

– оценке влияния изучаемых различий по показателям качества, обусловленных изменением технологического процесса препарата, на показатели безопасности и эффективности препарата.

Представленные в настоящей Главе принципы[7] распространяются на:

– Белки и полипептиды, их производные, а также лекарственные препараты, в которых они являются компонентами, например, конъюгаты. Белки и полипептиды могут быть получены с помощью рекомбинантных и нерекомбинантных экспрессирующих систем,

---

[6] Если результаты исследований сопоставимости свидетельствуют о том, что улучшенные качества приводит к значимому повышению эффективности и (или) безопасности, то препарат до и после изменений может оказаться несопоставимым. Однако, такие результаты могут рассматриваться как приемлемые. Производителям рекомендуется обратиться, в данном случае, за консультацией в уполномоченный орган (организацию).

[7] Должны быть соблюдены все три принципа.

хорошо поддаются очистке и установлению характеристик с использованием соответствующего набора аналитических методик.

– Производственный процесс, изменения в котором сделаны одним производителем (включая контрактных производителей), который может прямо провести сравнение результатов испытаний препарата, полученных до и после внесения изменения в производственный процесс.

– Препараты, которые находятся в процессе разработки, и зарегистрированные лекарственные препараты.

Изложенные в настоящей Главе принципы применимы к другим типам биологических лекарственных препаратов, например, белкам или полипептидам, выделенным из тканей и жидкостей организма. При этом производителю рекомендуется проконсультироваться с уполномоченным органом.

1.4. Основные принципы

Целью исследований сопоставимости является обеспечение качества, безопасности и эффективности лекарственного препарата, полученного с измененным процессом производства, за счет сбора и анализа соответствующих данных, направленных на выявление любого неблагоприятного влияния на лекарственный препарат, обусловленного внесенными изменениями.

Подтверждение сопоставимости необязательно должно выражаться в идентичности показателей качества препарата до и после внесения изменений, однако они должны быть высоко аналогичны (сопоставимы), а текущие знания должны позволять провести достаточное прогнозирование возможности обеспечения отсутствия нежелательного влияния на безопасность и эффективность лекарственного препарата.

Определение сопоставимости основывается на результатах аналитических и биологических испытаний и, в некоторых случаях, на данных доклинических и клинических исследований. Если производителем представлены убедительные доказательства сопоставимости на основании аналитических исследований, проведение доклинических и клинических исследований с препаратом, полученным после внесения изменений, не требуется. Однако если зависимость безопасности и эффективности от отдельных показателей качества не установлена и выявлены различия в показателях качества препарата до и после внесения изменений, в программу подтверждения сопоставимости необходимо включить совокупность сравнительных испытаний качества, доклинических и (или) клинических исследований.

Для оценки влияния изменений производственного процесса, необходимо провести анализ всех потенциальных последствий для препарата. С учётом данной оценки необходимо установить критерии определения высокой сопоставимости измененного препарата. Проводится сбор и анализ всех данных, касающихся препаратов, полученных до и после внесения изменений, в том числе, таких как результаты рутинного контроля качества серий, внутрипроизводственного контроля, валидации (оценки) процесса производства, установления характеристик и оценки стабильности (если применимо). Сравнение полученных результатов, с заранее определенными критериями, должно позволить получить объективную оценку сопоставимости препаратов, полученных до и после внесения изменений в производственный процесс.

Результаты сравнительной оценки показателей качества позволяют сделать один из следующих выводов:

– Препараты до и после изменения высоко сопоставимы по показателям качества, т.е. отрицательного влияния на профили безопасности и эффективности не предвидится.

– Препараты, полученные до и после внесения изменений в производственный процесс, высоко сопоставимы, но используемых для сравнения аналитических методик недостаточно, чтобы выявить различия, которые могут повлиять на безопасность и эффективность препарата. Для получения окончательного вывода производитель должен рассмотреть вопрос о проведении дополнительных исследований (например, дополнительная оценка по показателям качества) или проведение доклинических и клинических исследований.

– Препараты, полученные до и после внесения изменений, высоко сопоставимы между собой, однако выявляются некоторые различия между ними по показателям качества. При этом представлено обоснование (на основании накопленного опыта, соответствующей информации и данных) того, что данные различия не оказывают отрицательного влияния на безопасность и эффективность препарата. В данной ситуации препараты, полученные до и после внесения изменений, сопоставимы.

– Препараты, полученные до и после внесения изменений, высоко сопоставимы между собой, но выявлены некоторые различия между ними по показателям качества и имеется опасение о неблагоприятном влиянии изменений на профили безопасности и эффективности. В данной ситуации дополнительный сбор информации по показателям качества вряд ли может быть полезным для положительного заключения о сопоставимости. Необходимо рассмотреть вопрос о проведении доклинических и клинических исследований.

– Показатели качества исследуемых препаратов различаются значительно, это не позволяет признать препараты до и после внесения изменений высоко сопоставимыми; положения, изложенные в настоящей Главе, на такие случаи не распространяются.

2. Основные положения главы

2.1. Принципы исследования сопоставимости

Основной целью данных исследований является подтверждение высокой сопоставимости препаратов, полученных до и после внесения изменений, по показателям качества, безопасности и эффективности. Для достижения данной цели препарат должен быть изучен на той стадии процесса, которая является наиболее подходящей для обнаружения изменения показателей качества. Поэтому может потребоваться проведение исследований на разных стадиях производства. Например, если изменение затронуло процесс производства активной фармацевтической субстанции и оно могло повлиять на качество лекарственного препарата, то для оценки сопоставимости целесообразно собрать данные как об активной фармацевтической субстанции, так и лекарственном препарате. Сопоставимость может быть установлена на основании испытаний показателей качества (ограниченных или полных), но иногда могут потребоваться дополнительные связующие исследования сопоставимости. Объем исследований сопоставимости зависит от следующих факторов:

– Стадии производства, на которой внесены изменения;

– Потенциального влияния внесенных изменений на чистоту, физико-химические и биологические свойства с учетом сложности и степени изученности препарата (например, примеси, родственные соединения);

– Доступности аналитических методик, позволяющих обнаружить потенциальные изменения характеристик, и результаты этих исследований;

– Зависимости между показателями качества и безопасностью и эффективностью, исходя из доклинического и клинического опыта.

Для оценки сопоставимости необходимо провести анализ следующих данных (перечень не является исчерпывающим):

– Физико-химические и биологические свойства, полученные при установлении характеристик по показателям качества препарата;

– Результаты анализа проб, взятых на разных стадиях производства (промежуточный продукт, активная фармацевтическая субстанция, лекарственный препарат);

– Необходимость данных по стабильности, в том числе полученных по результатам ускоренного хранения или стресс-стабильности, чтобы охарактеризовать потенциальные различия между путями деградации продукта и, как следствие, потенциальные различия между родственными соединениями и родственными примесями;

– Серии, использованные для подтверждения постоянства производственного процесса;

– Ранее полученные данные, позволяющие охарактеризовать потенциальный «дрейф»[8] показателей качества с точки зрения безопасности и эффективности после единичного изменения либо серии изменений процесса производства. То есть производитель обязан изучить влияние ряда изменений во времени, чтобы подтвердить, что

[8] Дреф – устойчивое во времени непрерывное изменение показателя, подтвержденное результатами статистического или графического анализа временного ряда.

неприемлемого влияния на профили безопасности и эффективности не произошло.

При оценке полученных данных необходимо также учитывать следующее:

– Критические контрольные точки производственного процесса, неблагоприятно влияющие на характеристики продукта, например, влияние изменения процесса производства на качество внутрипроизводственных материалов, а также возможность использования материала, полученного после изменения процесса культивирования клеток, на последующих этапах;

– Адекватность внутрипроизводственного контроля, включая критические контрольные точки и внутрипроизводственные испытания: в целях поддержания качества препарата необходимо подтвердить, модифицировать или создать внутрипроизводственные контрольные точки измененного процесса производства;

– Доклинические и клинические характеристики лекарственного препарата, а также его показания к применению (см. раздел 2.5).

2.2. Вопросы качества

2.2.1. Аналитические подходы

Набор аналитических методов при исследовании сопоставимости необходимо тщательно подобрать и оптимизировать по отношению к препарату для того, чтобы обеспечить максимальную возможность выявления значимых различий в показателях качества, являющихся следствием вносимых изменений в процесс производства. Для того чтобы достаточно полно оценить физико-химические, иммунохимические свойства и биологическую активность препарата, может потребоваться несколько аналитических методик для

исследования одного и того же показателя (например, молекулярной массы, примесей, вторичной и (или) третичной структуры белка). В таких случаях, методы должны быть основаны на разных физико-химических или биологических принципах, чтобы обеспечить максимальную возможность для выявления различий между препаратами, обусловленных изменением процесса производства.

В некоторых случаях в силу ограничений таких методик (например, прецизионности, специфичности и предела обнаружения) и сложности некоторых препаратов, обусловленной их молекулярной гетерогенностью, достаточно затруднительно обеспечить обнаружение модификации препарата с помощью набора аналитических методик, выбранного для такого препарата до внесения изменения. Соответственно производитель должен установить:

– Пригодны ли существующие испытания для их целевого назначения или их необходимо модифицировать. Например, если изменение процесса производства приводит к образованию другого профиля белков клеток хозяина, производители обязаны подтвердить, что испытание, использованное для количественного определения таких примесей все еще пригодно для его целевого назначения. В данном случае целесообразно модифицировать существующее испытание;

– Необходимость добавления новых испытаний вследствие изменений показателей качества, которые имеющиеся методики не способны определить. Таким образом, если при внесении изменений в производственный процесс ожидаются определенные изменения показателей качества (например, после использования нового сырья или изменения стадии хроматографической очистки), в целях установления характеристик или рутинных выпускающих испытаний целесообразно

разработать новые аналитические методики, т.е. предусмотреть дополнительные аналитические подходы, сверх ранее использованных.

Определение показателей качества в исследованиях по установлению характеристик необязательно влечет использование валидированных методик, но такие методики должны быть научно обоснованными и давать достоверные результаты. Методики, использованные для определения показателей качества при выпуске серий, требуют валидации в соответствии с Главой 8, Главой 6 и документом Союза по валидации аналитических методик.

2.2.2. Установление характеристик

В соответствии с Главой 6 установление характеристик биотехнологических (биологических) препаратов включает определение физико-химических свойств, биологической активности, иммунохимических свойств (если применимо), чистоты, примесей, контаминантов и количественного содержания (quantity).

Если внесено изменение в процесс производства, влияющее на показатели качества, в целях прямого сравнения препарата до и после изменения, как правило, требуется полное или ограниченное (при наличии обоснований) повторение установления характеристик, проведенного при регистрации лекарственного препарата. Тем не менее, в некоторых случаях может потребоваться дополнительное установление характеристик. Например, если изменения процесса производства приводят к профилю характеристик продукта, отличного от профиля, полученного по результатам доклинических и клинических исследований, или иного репрезентативного профиля (например, стандартные материалы, серии, находящиеся в обороте), необходимо изучить значимость таких изменений. Результаты всестороннего установления характеристик материала, использованного в опорных

клинических исследованиях, могут представлять собой ценную опорную точку для последующих исследований сопоставимости.

Каждый из приведенных ниже критериев следует рассматривать в качестве ключевого фактора при проведении исследований сопоставимости:

Физико-химические свойства

При планировании и проведении исследований сопоставимости производитель должен придерживаться концепции целевого продукта (и его вариантов), описанной в Главе 6. Необходимо также учесть сложность молекулярной структуры и степень ее молекулярной гетерогенности. Следует убедиться в сохранности вторичной, третичной и четвертичной структур белка, полученного после внесения изменений в производственный процесс. Если подобную информацию о структуре получить невозможно, результаты соответствующих методов количественного определения биологической активности (см. ниже) могут свидетельствовать о правильной конформационной структуре.

Биологическая активность

При подтверждении показателей качества лекарственного средства, которые представляют ценность при установлении свойств и анализе серий, результаты определения биологической активности могут служить нескольким целям, а в некоторых случаях могут свидетельствовать о клинических эффектах. Производители должны учитывать ограничения, присущие биологическим испытаниям, такие как высокая вариабельность, способные воспрепятствовать обнаружению различий, которые могут возникать вследствие изменения процесса производства.

Если определение биологической активности дополняет результаты физико-химических исследований, например, исследование структуры

белка, более высокого порядка, использование соответствующего биологического испытания с достаточной прецизионностью и правильностью может служить косвенным подтверждением того, что при изменении производственного процесса не произошло изменений структур более высокого порядка. Если физико-химические или биологические испытания не позволяют убедиться в неизменности структуры более высокого порядка, целесообразно провести доклинические и (или) клинические исследования.

Если изменения вносятся в процесс производства препарата, проявляющего широкий спектр биологических активностей, следует определить набор функциональных испытаний для оценки всего спектра этих активностей. Например, определенные белки обладают несколькими функционально активными доменами, которые обусловливают проявление ферментативной и рецептор-опосредованной активности. В подобных ситуациях необходимо предусмотреть изучение всех значимых видов функциональной активности препарата.

Если один или более видов активности не полностью коррелирует с клинической безопасностью и эффективностью или механизм действия не ясен, следует подтвердить, что доклинические и клинические эффекты препарата, полученные после изменения производственного процесса, не изменились.

Иммунохимические свойства

Если иммунохимические свойства являются частью установления характеристик препарата (например, для антител или препаратов на их основе), следует подтвердить, что препарат, полученный после изменения процесса производства, сопоставим по указанным специфическим свойствам с неизмененным.

Чистота, примеси и контаминанты

С помощью набора выбранных аналитических методик необходимо получить данные для оценки, произошло ли изменение профиля чистоты с точки зрения целевого продукта.

Если выявлены различия в профиле чистоты и примесей препаратов, должны быть проведены исследования по определению их влияния на безопасность и эффективность препарата, полученного после изменения процесса производства. Если изменение привело к появлению новых примесей, необходимо их идентифицировать и охарактеризовать (если это возможно). В зависимости от вида и количества примеси требуется проведение дополнительных доклинических и (или) клинических исследований с целью подтверждения отсутствия негативного влияния на профиль безопасности и эффективности лекарственного препарата. Отсутствие дополнительных исследований должно быть обосновано.

Используя удовлетворительные внутрипроизводственные критерии приемлемости или пределы действия для активной фармацевтической субстанции или лекарственного препарата, необходимо избегать наличия контаминантов и (или) надлежащим образом их контролировать. В целях определения влияния новых контаминантов на качество, безопасность и эффективность лекарственного средства, необходимо их оценить.

2.2.3. Спецификации

Методики, используемые для оценки показателей качества активной фармацевтической субстанции или лекарственного препарата, включенные в спецификацию, обычно не достаточны для оценки влияния изменений производственного процесса на качество препарата, так как они подобраны для рутинного подтверждения качества, а не для

полной характеристики препарата. Следует подтвердить, что после изменения процесса производства спецификации продолжают обеспечивать контроль качества препарата. Результаты анализа, соответствующие требованиям спецификации, но выходящие за пределы предыдущих «трендов» производства, могут свидетельствовать о различиях между препаратами до и после изменений и требовать дополнительного исследования или анализа. Если данные указывают на то, что предыдущее испытание более не подходит для рутинного выпускающего контроля качества серий измененного препарата, может потребоваться модификация, исключение или добавление испытания в спецификацию. Например, исключение из среды для культивирования клеток бычьей сыворотки позволяет исключить и проведение соответствующих испытаний. Однако в отсутствие обоснований расширение критериев приемлемости, как правило, не допустимо. В отдельных случаях, если в результате изменения процесса производства меняется профиль примесей, могут потребоваться дополнительные испытания и новые критерии приемлемости. При оценке как аналитических методик, так и критериев приемлемости измененного препарата необходимо руководствоваться общими принципами составления спецификаций, описанными в Главе 6, т.е. влиянием изменений на валидированный процесс производства, результатами исследований по установлению характеристик, данными анализа серий, данными по стабильности и доклиническим и клиническим опытом.

2.2.4. Стабильность

Изменение производственного процесса, даже небольшое, может повлиять на стабильность препарата. Любые изменения, которые могут привести к изменению структуры белка, показателей чистоты и профиля примесей, должны быть оценены в отношении их влияния на

стабильность, поскольку белки часто чувствительны к таким изменениям, как состав буферного раствора, условия обработки и перерыва в производстве (holding), использование органических растворителей и т.д. С помощью исследований стабильности возможно обнаружение незначительных различий, которые невозможно обнаружить в исследованиях по установлению характеристик. Например, наличие следовых количеств протеазы может быть определено только по продуктам деградации, которые образуются через продолжительный период хранения препарата; в некоторых случаях двухвалентные ионы, вымываемые из укупорочной системы, могут изменить профиль стабильности вследствие активации следовых протеаз, не обнаруженных в исследованиях стабильности неизмененного лекарственного средства. Таким образом, в соответствующих случаях в отношении измененного лекарственного средства необходимо начать исследования стабильности в реальном времени и при реальной температуре.

Ускоренные и стрессовые исследования стабильности также являются полезным инструментом для определения возможной деградации белкового продукта и обеспечивают возможность прямого сравнения свойств препаратов, полученных до и после изменения технологического процесса. Полученные таким образом результаты могут свидетельствовать о различиях между свойствами препарата, требующих дополнительного изучения, а также определить условия, свидетельствующие о том, что для устранения таких неожиданных различий в препарате необходимо ввести дополнительные контрольные мероприятия в процесс производства и хранения. Необходимо провести соответствующие исследования, подтверждающие, что условия хранения и контрольные испытания выбраны правильно.

В целях определения условий проведения исследований стабильности, которые позволят получить необходимые данные для осуществления сравнения лекарственного средства до и после изменений, необходимо обратиться к Главе 8 и документу Союза, регламентирующего изучение стабильности лекарственных средств.

2.3 Производственный процесс

Хорошо охарактеризованный процесс производства и его контроль обеспечивает получение препарата приемлемого качества на постоянной основе. Подходы к оценке влияния любых изменений производственного процесса зависят от особенностей процесса, самого препарата, знаний о процессе и опыта производителя, а также данных, полученных при разработке препарата. Следует подтвердить, что контроль измененного процесса обеспечит сходный или более эффективный контроль качества препарата, по сравнению с первоначальным процессом.

Необходимо обязательно провести тщательный анализ потенциального влияния планируемых изменений на последующие стадии производства и зависящие от них показатели качества (например, критерии приемлемости, внутрипроизводственные спецификации, внутрипроизводственные испытания, время хранения препарата между производственными стадиями, пределы действия, валидация (оценка)). Такой анализ позволяет выявить испытания, которые необходимо провести в ходе исследований сопоставимости, какие внутрипроизводственные критерии приемлемости или критерии приемлемости на выпуск серии или аналитические методики требуют пересмотра, а также стадии, на которые не должны повлиять предлагаемые изменения. Например, анализ промежуточных продуктов может выявить потенциальные различия в препарате, что требует

оценки пригодности использующихся аналитических методик для выявления таких различий. Решение об исключении из анализа некоторых этапов производственного процесса необходимо научно обосновать.

Если технологический процесс и связанные с ним методы контроля предполагается изменить, необходимо подтвердить, что препараты, полученные до и после внесения изменений, сопоставимы. Для подтверждения сопоставимости следует показать, что специфические промежуточные продукты сопоставимы или что измененный процесс может обеспечивать удаление производственных и родственных примесей, включая новые примеси, которые образовались в результате изменения процесса. Если изменения вносятся в процесс производства зарегистрированных лекарственных препаратов, как правило, требуется сравнение с данными о результатах испытаний серий промышленного масштаба.

При анализе процесса производства необходимо учитывать такие факторы, как критичность стадии производственного процесса и предлагаемого изменения, место изменения в производственном процессе и потенциальное влияние изменения на остальные стадии процесса производства, а также характер и степень изменения. Информацию, которая может в этом помочь, можно получить из разных источников: сведения, полученные в исследованиях по разработке, исследованиях по валидации или оценке (при невозможности валидации) маломасштабных серий; опыт ранее проведенных изменений, сведения об изменении схожих процессов производства аналогичных лекарственных препаратов, данные литературы. Несмотря на то, что сведения из внешних источников могут представлять

определенную ценность, анализ изменения необходимо осуществлять в контексте конкретного процесса производства и конкретного препарата.

При внесении изменений в производственный процесс производитель должен подтвердить, что соответствующие контрольные мероприятия, включая новые, обеспечат получение сопоставимого лекарственного препарата. Измененные стадии процесса производства необходимо повторно оценить и (или) валидировать. Внутрипроизводственный контроль, включая ключевые контрольные точки и внутрипроизводственные испытания, должны обеспечить надлежащий контроль измененного процесса и поддерживать качество препарата. В отсутствии каких-либо свидетельств, что изменение влияет на функционирование последующих после культивирования стадий производства или качество промежуточных продуктов, образующихся на последующих стадиях, повторную валидацию или оценку (при невозможности валидации) при простом изменении допускается, как правило, проводить в отношении измененного этапа. При внесении изменений в производственный процесс, которые затрагивают несколько стадий производственного процесса, может потребоваться более расширенный анализ и, как следствие, валидация.

Подтверждение наличия контроля над измененным процессом производства включает в том числе:

– Изменение спецификаций на сырье, исходные материалы и реагенты;

– Надлежащие испытания на биологическую нагрузку и (или) вирусную безопасность измененного банка клеток и клеток с предельным для производства клеточным возрастом *in vitro*;

– Очистка от посторонних агентов;

– Удаление родственных и производственных примесей, например, остаточных ДНК и белков клетки-хозяина;

– Поддержание необходимого профиля чистоты.

Для зарегистрированных лекарственных препаратов должно быть проанализировано достаточное число серий, произведенных после внесения изменений в процесс производства, с целью подтверждения постоянства производства.

Для обоснования анализа изменений и стратегии контроля качества производитель должен подготовить описание изменения, в котором резюмируется процесс производства до и после изменения и в котором четко обозначены изменения процесса и контроля в параллельном формате.

2.4. Подтверждение сопоставимости на этапе разработки препарата

При разработке препарата возможно внесение множества изменений в производственный процесс, которые могут повлиять на качество лекарственного препарата, его безопасность и эффективность. В целях содействия дальнейшей разработке и, в конце концов, регистрации проводят сравнительные исследования, подтверждающие, что полученные о неизмененном лекарственном препарате доклинические и клинические данные распространяются и на измененный препарат. Исследования сопоставимости препаратов на стадии разработки зависят от таких факторов, как стадия разработки, доступность валидированных аналитических методик, степень изученности препарата и процесса, которые в некоторых случаях ограничены лишь опытом самого производителя.

Если изменения осуществляются до начала доклинических исследований, то вопрос о сопоставимости не возникает, поскольку производитель впоследствии проводит доклинические и клинические исследования, используя в процессе разработки измененный лекарственный препарат. На ранних фазах доклинических и клинических исследований изучение сопоставимости, как правило, не столь обширно, как для зарегистрированного лекарственного препарата. По мере накопления знаний и сведений и разработки аналитических инструментов в исследованиях сопоставимости следует использовать всю имеющуюся информацию. Если изменения осуществляются на поздних этапах разработки и дополнительные клинические исследования в обоснование регистрации проводить не планируется, исследования сопоставимости должны быть столь же всесторонними и глубокими, как в случае, если они проводятся в отношении зарегистрированного лекарственного препарата. Некоторые результаты исследований сопоставимости по качеству могут потребовать проведения дополнительных доклинических и клинических исследований (см. разделы 2.1-2.3 настоящей Главы, а также Главу 9.2 настоящих Правил).

При проведении исследований сопоставимости в процессе разработки препарата необходимо использовать соответствующие методы оценки. Следует учитывать, что в процессе разработки аналитические методики могут быть не валидированы, но они должны быть всегда научно обоснованы и должны обеспечивать достоверные и воспроизводимые результаты. Ввиду ограниченности аналитических средств на ранней стадии клинической разработки, для установления сопоставимости результатов физико-химических и биологических испытаний может оказаться недостаточно, в связи с чем могут потребоваться связующие доклинические и (или) клинические исследования.

2.5 Доклинические и клинические исследования

2.5.1. Факторы, которые необходимо учитывать при планировании доклинических и клинических исследований

Если производитель сможет доказать сопоставимость с помощью аналитических исследований, описанных в настоящей Главе, возможно подтверждение сопоставимости измененного и неизмененного препарата исключительно с помощью показателей качества (см. раздел 2.2). Если результатов изучения качества недостаточно, то для установления сопоставимости необходимо дополнительно провести доклинические и (или) клинические исследования. Объем и разновидность доклинических и клинических исследований устанавливаются в индивидуальном порядке, принимая во внимание множество факторов, включая среди прочего следующее:

Результаты изучения качества:

– Лекарственный препарат – вид, характер и степень различия между препаратом, полученным после внесения изменений, и препаратом до внесения изменений с точки зрения показателей качества, включая, родственные соединения, профиль примесей, стабильность и вспомогательные вещества.

Например, новые примеси могут потребовать проведения токсикологических исследований с целью их квалификации.

– Результаты оценки (валидации) нового процесса производства, включая результаты значимых внутрипроизводственных испытаний;

– Доступность, возможности и ограничения испытаний, используемых для оценки сопоставимости.

Основные свойства и известные данные о препарате

– Сложность препарата, включая гетерогенность и структуры более высокого порядка – физико-химические и *in vitro* биологические испытания не всегда способны обнаруживать все структурные и (или) функциональные различия;

– Зависимость структура–активность и сила связи между показателями качества и безопасностью и эффективностью;

– Взаимосвязь между терапевтическим белком и эндогенными белками организма и их последствия для иммуногенности;

– Механизм действия препарата (известен или не известен, один или несколько активных центров).

Имеющиеся доклинические и клинические данные, значимые для лекарственного препарата, особенности его применения и фармакотерапевтическая группа

– Показания к применению и целевые группы пациентов – выявленные различия могут оказать разное влияние на разные популяции пациентов, например, риск нежелательной иммуногенности. При этом может потребоваться рассмотрение последствий внесенных изменений для каждого показания к применению;

– Способ применения, например, режим дозирования, путь введения – риск определенных последствий, например, иммуногенности, может быть выше при длительном введении, чем при краткосрочном; подкожное введение чаще предрасполагает к иммуногенности, чем внутривенное;

– Терапевтический диапазон (кривая доза–эффект): влияние определенных изменений на лекарственные препараты с широким терапевтическим диапазоном может отличаться от лекарственных препаратов с узким диапазоном. Даже незначительные изменения

фармакокинетики или профиля связывания с рецептором могут оказывать влияние на безопасность и эффективность лекарственных препаратов с крутой или колоколобразной кривой доза–эффект;

– Предыдущий опыт, например, в отношении иммуногенности, безопасности. Следует учитывать опыт применения неизмененного лекарственного препарата или лекарственных препаратов того же класса, особенно в отношении редких нежелательных реакций, таких последствия иммуногенности;

– Фармакокинетическо-фармакодинамическая зависимость, распределение и клиренс.

2.5.2. Тип исследования

К доклиническим и клиническим исследованиям, упомянутым в настоящей Главе, в зависимости от обстоятельств относятся: ФК-исследования, ФД-исследования, ФК/ФД-исследования, исследования клинической эффективности, исследования клинической безопасности, исследования иммуногенности, исследования в рамках фармаконадзора. Цель указанных исследований – сравнить измененный и неизмененный лекарственный препарат. По возможности, такие исследования должны носить прямой сравнительный характер.

3. Определения

Исследование сопоставимости – Деятельность, включающая планирование исследований, их проведение и анализ данных, направленных на установление сопоставимости лекарственных препаратов.

Показатели качества – Молекулярная характеристика и другие свойства препарата, отобранные в силу их способности определять

качество препарата. Показатели качества в совокупности определяют подлинность, чистоту, активность и стабильность препарата, а также безопасность с точки зрения посторонних агентов. Спецификации определяют определенный набор показателей качества.

Связующее исследование сопоставимости – Исследования, обеспечивающие возможность экстраполяции доклинических и клинических данных, полученных при изучении лекарственного препарата, произведенного с помощью неизмененного процесса производства, на лекарственный препарат, произведенный с помощью измененного процесса.

Сопоставимость – Заключение, что препараты обладают высокой степенью сходства по показателям качества препарата до и после изменений процесса производства, и отсутствует нежелательное влияние на безопасность или эффективность, включая иммуногенность, лекарственного препарата. Такое заключение можно сделать по результатам анализа показателей качества препарата. В некоторых случаях для такого заключения необходимы доклинические или клинические данные.

ГЛАВА 9.2. ИССЛЕДОВАНИЕ СОПОСТАВИМОСТИ БИТЕХНОЛОГИЧСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ВНЕСЕНИИ ИЗМЕНЕНИЙ В ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ПРОЦЕСС: ДОКЛИНИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Введение

Производители биотехнологических (биологических) лекарственных препаратов часто вносят изменения в производственный процесс на этапах разработки и после регистрации.

Подтверждение сопоставимости препаратов, полученных до и после внесения изменений, является последовательным процессом, который начинается с изучения качества (в ограниченном или полном объёме) и, при необходимости, может включать доклинические, клинические исследования и (или) исследования в рамках фармаконадзора.

В настоящей Главе представлены требования по проведению доклинических и клинических исследований в рамках исследования сопоставимости при сравнении препаратов, которые были получены до и после изменений процесса производства, внесенных одним производителем, включая контрактных производителей. В Главе представлены требования для проведения связующих доклинических и (или) клинических исследований после внесения изменений в производственный процесс для подтверждения отсутствия влияния таких изменений на эффективность и безопасность препарата.

Программа доклинических и клинических исследований должна основываться на свойствах препарата и быть составлена таким образом, чтобы достаточно точно предсказать и выявить возможные различия между сравниваемыми препаратами, которые получены до и после внесения изменения в производственный процесс.

Предполагается, что физико-химические свойства и биологическая активность в условиях *in vitro* и *in vivo*, препарата могут быть хорошо охарактеризованы с использованием современных методов.

Для большинства изменений, вносимых в производственный процесс, результаты сравнительного изучения физико-химических свойств и биологической активности (как показателя качества), позволяют подтвердить отсутствие различий по показателям качества, которые могут негативно влиять на безопасность и эффективность. Таким образом, исследования сопоставимости ограничиваются только валидацией измененного процесса или расширяются дополнительными критериями качества, за счет внутрипроизводственного контроля, физико-химических и биологических характеристик препарата и данных по стабильности (см. Главу 9.1 настоящих Правил). Однако, в некоторых случаях, можно ожидать влияние выявленных различий между препаратом до и после изменений на его безопасность и (или) эффективность, или наличие таких влияющих различий не может быть исключено, несмотря на современный уровень использованных физико-химических и биологических методов. В подобных ситуациях необходимо провести дополнительные доклинические и (или) клинические исследования.

Вид и объем доклинических и клинических исследований зависит от многих факторов, обусловленных активной фармацевтической субстанцией и лекарственным препаратом, таких как:

– информация о молекуле и других молекулах из данной группы препаратов;

– этап разработки еще не зарегистрированного препарата

– результаты сравнительных исследований физико-химических и биологических свойств по оценке сопоставимости;

– предлагаемого клинического применения.

2. Область применения

Представленные в настоящей Главе принципы распространяются на белки и полипептиды, их производные, а также препараты, в которых они являются компонентами, например, в конъюгатах. Такие белки и полипептиды могут быть получены с помощью рекомбинантных или нерекомбинантных экспрессирующих систем, они хорошо поддаются очистке и подробному установлению характеристик с использованием современных аналитических методов в следующих случаях:

– Изменения в производственный процесс вносятся одним производителем (в том числе контрактным), который может непосредственно сравнить процессы, результаты аналитических внутрипроизводственных испытаний, полученных до и после внесения изменений в производственный процесс;

– Изменения в производственный процесс вносятся в процессе разработки или после регистрации лекарственного препарата.

Принципы, представленные в настоящей Главе, могут быть применимы к другим биологическим лекарственным препаратам, таким как белки и полипептиды, полученные из тканей и жидкостей организма. В подобных ситуациях производителю необходимо проконсультироваться с уполномоченным органом, для возможности применения данных требований.

3. Общие положения

Настоящую Главу следует рассматривать в совокупности с другими Главами, настоящих Правил.

4. Основной текст правил

4.1. Потребность в доклинических и клинических исследованиях – подход, основанный на оценке рисков

Подтверждение сопоставимости препаратов, полученных до и после внесения изменений в производственный процесс, является последовательным процессом, который начинается с изучения качества (в ограниченном или полном объёме) и при необходимости может включать доклинические, и (или) клинические исследования, и (или) исследования в рамках фармаконадзора. Если производитель может подтвердить сопоставимость с помощью физико-химических и биологических исследований, проведение доклинических и клинических исследований не требуется. В противном случае необходимо провести дополнительные доклинические и (или) клинические исследования.

Необходимость проведения, объем и характер доклинических и клинических исследований сопоставимости определяются в индивидуальном порядке, с учетом различных факторов, которые связаны с риском, таких как:

– Сложность производственного процесса, характер изменения и его потенциальная возможность влияния на структуру молекулы действующего вещества и характеристики лекарственного препарата;

– Характер и степень различий, обнаруженных с помощью физико-химических и затрагивающих качество биологических

испытаний, включая родственные соединения, профиль примесей, стабильность и вспомогательные вещества. Хорошо охарактеризованные различия являются основой для рационального и направленного подхода к определению необходимости для проведения доклинических и клинических исследований.

– Сложность препарата, включая гетерогенность и структуры более высокого порядка, а также наличие, возможности и ограничения аналитических испытаний. Если аналитические методики не позволяют выявить различия, которые могут повлиять на безопасность и эффективность препарата после внесения изменений в производственный процесс, могут потребоваться дополнительные доклинические и (или) подтверждающие клинические исследования;

– Структурно-функциональная зависимость и сила связи показателей качества с безопасностью и эффективностью;

– Взаимосвязь между белковым препаратом и эндогенными белками, и тяжесть потенциальных последствий иммуногенности, например, риск развития аутоиммунных нарушений;

– Механизм(ы) действия: неизвестные и множественные механизмы действия усложняют оценку влияния изменений;

– Показания к применению и целевые группы пациентов: различия могут по-разному проявиться в различных группах пациентов при разных показаниях к применению;

– Способ применения, например, режим дозирования и путь введения (в частности, многократное подкожное введение препарата чаще ассоциировано с иммуногенностью, нежели однократное внутривенное введение);

– Терапевтический диапазон (кривая «доза–эффект»);

– Предыдущий опыт, например, иммуногенность и безопасность. Актуальным будет анализ данных, полученных до внесения изменений в производственный процесс, или данных о других препаратах из этой группы. Однако биотехнологические белки следует рассматривать индивидуально.

Данные особенности необходимо учитывать при изучении сопоставимости в процессе разработки препарата. Объем необходимых исследований сопоставимости будет больше при внесении изменений на более поздних этапах клинической разработки. Наиболее сложной проблемой является изучение сопоставимости при внесении изменений в производственный процесс после окончания подтверждающих клинических исследований эффективности и безопасности.

Выбор доклинических и клинических исследований определяется свойствами конкретного препарата, т.е. необходимо выбрать такую стратегию проведения исследований сопоставимости, которая оптимальным образом позволит достаточно точно спрогнозировать и выявить все потенциальные клинически значимые различия.

4.2 Доклинические исследования

Если для оценки сопоставимости препаратов до и после изменения результатов одних физико-химических и затрагивающих качество биологических испытаний недостаточно либо вследствие выявления различий между препаратами, либо вследствие характера изменения процесса производства, не позволяющего по результатам изучения одного лишь качества исключить различия, то результаты доклинических исследований могут обнаруживать полезные сигналы потенциальных различий в эффективности и безопасности.

В одних случаях целесообразно провести небольшое число доклинических исследований или не проводить их вовсе, однако в

других случаях необходимо провести большой объем исследований. Необходимо отметить, что составление надлежащей программы доклинических исследований требует четкого понимания структуры и активности препарата. При этом необходимо учитывать соответствующие документы, в частности Главу 5.3 настоящих Правил. Выявление изменений в профиле примесей необязательно требует проведения доклинических исследований. При этом держатели регистрационных удостоверений должны представить обоснование стратегии (плана) дальнейших действий.

Доклинические исследования сопоставимости носят сравнительный характер, основной целью которых является выявление возможных различий между ответами препараты, полученные до и после внесения изменений, а не ответа *per se*. При этом сопоставление препаратов, полученных до и после внесения изменений, необходимо проводить в одном исследовании.

При обосновании подхода к планированию доклинических исследований сопоставимости в Модуле 2 и 4 регистрационного досье необходимо представить достаточные сведения и ссылки на другие разделы регистрационного досье. Допускается придерживаться нижеследующего подхода, который следует в индивидуальном порядке адаптировать к рассматриваемому лекарственному препарату. Выбранный подход необходимо обосновать в доклиническом обзоре (Модуль 2.6. регистрационного досье).

Исследования in vitro

В целях выявления любых произошедших изменений в реактивности и обнаружения вероятных(ой) причин(ы) несопоставимости, необходимо, используя параллельный сравнительный дизайн, изучить препараты до и после внесения

изменений, с помощью биологических испытаний (например, связывание с рецептором или испытания на клетках), многие из которых могут быть доступны при оценке качества.

Исследования in vivo

При сохранении неопределенности или опасений[9] относительно значений (характеристик) фармакокинетических параметров или фармакодинамических эффектов, значимых для клинического применения и (или) безопасности, следует рассмотреть возможность проведения исследований *in vivo*, на одном или нескольких релевантных видах животных с использованием должным образом валидированных животных моделей. Большую достоверность представляют результаты исследований, проведенных на видах животных, в отношении которых на неизмененном препарате показано, что они являются релевантными для человека. При проведении данных исследований предпочтительно использовать лекарственный препарат, полученный после внесения изменения, нежели активную фармацевтическую субстанцию. В целях упрощения интерпретации данных, состав препарата, используемого при проведении доклинических исследований, должен совпадать с таковым, который планируется использовать в клинических исследованиях. При проведении доклинических испытаний следует использовать современные методы исследований.

В целом, и если позволяет модель, необходимо осуществлять наблюдение за несколькими конечными точками, такими как:

---

[9] Под «опасением» в контексте данного документа понимается обоснованное экспертное мнение или мнение разработчика препарата относительно отсутствия важных данных, сведений, поясняющих полученную информацию и сведения, содержащиеся в регистрационном досье, либо наличия в досье взаимно противоречащих сведений и данных. В случае необходимости подробного разъяснения значения может потребоваться разъяснение Экспертного комитета.

– Изменения показателей фармакодинамики, значимых для клинического применения (например, длительности действия);

– Изменения фармакокинетических параметров (например, клиренса);

– Специально подобранные токсикологические точки (прижизненные и посмертные). Дизайн исследования необходимо обосновать с учетом предполагаемой продолжительности клинического применения;

– Иммунный ответ, например, титры антител, нейтрализующая активность и перекрестная реактивность. Несмотря на то, что прогностическая ценность изучения иммуногенности на животных моделях для человека низкая, в целях упрощения интерпретации результатов исследований токсичности при многократном введении в них необходимо включить (сравнительные) конечные точки иммуногенности и забор образцов крови.

Учитывая технический прогресс, необходимо регулярно пересматривать методы исследования, например, определенную ценность могут представлять *in vitro* исследования связывания в режиме «реального времени». При проведении исследований *in vivo* могут быть использованы геномные или протеомные микропанели, которые могут позволить обнаружить незначительные изменения биологического ответа на фармакологически активные вещества.

4.3 Клинические исследования

Программа сравнительных клинических исследований эффективности и безопасности должна быть составлена с учетом: этапа разработки препарата, характера вносимых изменений и их влияние на показатели качества. Разработчики часто вносят изменения в процесс

производства препарата до его регистрации. Количество дополнительных данных, как правило, меньше при внесении изменений до проведения подтверждающих клинических исследований, чем при внесении изменений после проведения подтверждающих клинических исследований или после регистрации.

• *Изменения процесса производства до начала проведения подтверждающих исследований*

В этом случае в целях подтверждения того, что имеющиеся доклинические и клинические данные, полученные до изменения, остаются валидными и возможна их экстраполяция на препарат после изменения, как правило, достаточно представить соответствующие результаты физико-химических и биологических (*in vitro* и *in vivo*). В некоторых случаях, необходимы доклинические или клинические исследования сопоставимости, например, такие как фармакокинетические исследования с однократным введением.

• *Изменения процесса производства в ходе подтверждающих исследований*

Внесение изменений в ходе подтверждающих исследований не рекомендуется, однако при необходимости внесения таких изменений заявителю следует обратиться за научной консультацией.

• *Изменения процесса производства по окончании подтверждающих исследований или после регистрации*

Если изменение производства происходит по окончании подтверждающего(их) исследования(й) или после регистрации, как правило, необходимо провести более глубокие исследования сопоставимости, включая физико-химические и биологические исследования *in vitro* и, возможно, фармакокинетические и (или) фармакодинамические исследования сопоставимости. Если результаты

таких исследований сопоставимости не исключают влияния на профиль эффективности и безопасности препарата, могут потребоваться дополнительные клинические исследования. Отступление от этой концепции необходимо обосновать.

• *Дополнительные критерии, влияющие на необходимость сравнительных клинических данных*

При подготовке и обосновании программы клинических исследований необходимо учесть, другие важные вопросы, включая все результаты ранее проведенных доклинических исследований и клинический опыт, полученный в отношении неизмененного препарата и других препаратов из той же категории, например:

– Зависимость эффективности и безопасности от дозы (экспозиции);

– Наличие динамического маркера, который можно использовать в качестве суррогатного маркера клинической эффективности и безопасности;

– Зависимость этого суррогатного маркера от дозы (экспозиции);

– Взаимодействие препарата с рецептором(ами);

– Механизм действия, специфичный для заболевания;

– Орган(ы)-мишень(и) для проявления активности и токсичности;

– Способ применения.

Фармакокинетические исследования

Фармакокинетические исследования являются важнейшей частью клинического исследования сопоставимости. Поскольку целью является подтверждение сопоставимости препаратов, а не только характеристика клинической фармакологии препарата *per se*, полученного после внесения изменений в процесс производства, такие исследования должны быть сравнительными.

Наиболее приемлемым является перекрестное исследовании при однократном введении препарата, поскольку оно имеет более низкую вариабельность результатов, чем сравнительные исследования с параллельным дизайном. Следует отметить, что при изучении фармакокинетики и фармакодинамики необходимо учитывать такие факторы, как иммуногенность и ее возможное влияние на фармакокинетические параметры и (или) фармакодинамические эффекты.

Путь введения должен совпадать с тем, который планируется использовать при клиническом применении. Если планируется использовать не один путь введения препарата (например, внутривенное и подкожное введение), может потребоваться изучение каждого пути введения. В целях выявления значимых различий выбранная доза должна находиться на крутой части кривой «доза–эффект». При выборе популяции для исследований (здоровые добровольцы или пациенты), в первую очередь, следует учитывать механизм действия препарата. Поскольку фармакокинетические и фармакодинамические исследования рекомендуется комбинировать, выбор целевой группы должен основываться на том, какие фармакодинамические эффекты подлежат изучению, т.е. оптимально ли обнаружение таких эффектов в выбранной целевой группе. При планировании такого перекрестного исследования необходимо учитывать возможность возникновения эффекта переноса.

Дизайн сравнительных ФК-исследований необязательно должен воспроизводить стандартный дизайн «клинической сопоставимости» (см. Правила исследований биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных средств Союза), поскольку схожесть абсорбции и биодоступности не единственный интересующий параметр. Необходимо изучить различия между характеристиками элиминации препаратов, например, клиренсом и терминальным периодом полувыведения.

Фармакодинамические исследования

Фармакодинамику (ФД) следует предпочтительно оценивать в составе сравнительного фармакокинетического исследования, поскольку изменение ФД в некоторых случаях может быть обусловлено изменением фармакокинетических показателей. Исследования должны быть сравнительными, а не направлены на выявление фармакодинамических свойств препарата *per se*.

• *Маркеры первичной и вторичной ФД*

Выбранная конечная точка должна удовлетворять следующим требованиям:

– чувствительность, достаточная для выявления даже незначительных различий;

– прецизионность, достаточная для выявления даже незначительных различий;

– клиническая значимость для исследуемой целевой популяции.

Для подтверждения аналитической чувствительности следует соблюдать осторожность при определении правильного диапазона доз. Целесообразно проводить исследования нескольких доз. Необходимо обосновать выбор маркера(ов), а также заранее определить и обосновать границу эквивалентности для него.

В связи с этим выбор популяции необходимо обосновать. Выявление определенных первичных или вторичных ФД-маркеров возможно только у пациентов, а не здоровых добровольцах. Например, иммуномодуляторы, воздействующие на патологически измененные иммунные эффекторные клетки, не всегда будут вызывать аналогичный эффект у здоровых добровольцев.

• *ФД-маркеры как замена оценки эффективности*

При проведении клинических исследований эффективность обычно оценивается по одной или нескольким клиническим конечным точкам. Иногда для этого используются ФД-маркеры. ФД-маркер может рассматриваться как подходящий маркер эффективности, если его изменение под влиянием препарата в значительной степени объясняет изменения клинического исхода.

ФД-маркеры обычно более чувствительны к изменениям активности препарата и поддаются более ранней оценке, чем клинические конечные точки, поэтому в некоторых случаях они могут служить наиболее подходящей конечной точкой. Однако, поскольку цель сравнительного исследования заключается в подтверждении эквивалентности препаратов, как правило, необходимо представить данные о количественной зависимости между ФД-маркером и клинической конечной точкой, позволяющей определить и обосновать границу эквивалентности для эффективности. В некоторых ситуациях целесообразно использовать не один, а несколько ФД-маркеров.

Поскольку суррогатный маркер будет полезен для дальнейшей разработки препарата, изучение суррогатных конечных точек заявителями и держателями регистрационных удостоверений приветствуется.

Исследования эффективности

• *Дизайн исследования*

Если подходящие маркеры отсутствуют или если с помощью ФД-исследований не удалось однозначно подтвердить сопоставимость, необходимо, используя клинические конечные точки, провести сравнительное клиническое исследование эквивалентности. Исследования должны носить сравнительный характер с сопоставлением препаратов до и после изменений. Для исключения систематических ошибок клинические

исследования должны, как правило, быть рандомизированными, двойными слепыми. Потенциальные различия в эффективности необходимо изучить в исследованиях, позволяющих с наибольшей вероятностью обнаружить такие различия.

Приемлемую границу эквивалентности необходимо выбрать заранее, принимая во внимание спецификации препарата на выпуск, клиническую значимость и статистические аспекты. При определении размера выборки необходимо руководствоваться не только соображениями клинической эффективности, но также быть нацеленным на обнаружение различий в безопасности (см. ниже).

Если исследование с дизайном эквивалентности невыполнимо, необходимо рассмотреть возможность использования других дизайнов и проконсультироваться с уполномоченными органами (экспертными организациями).

• *Выбор наиболее подходящей популяции пациентов и показаний к применению*

Поскольку белковые лекарственные препараты могут применяться по нескольким показаниям и (или) у разных популяций пациентов, необходимо учитывать различия и особенности влияния препарата на показатели эффективности и (или) безопасности. Необходимо, как правило, выбрать такую популяцию пациентов или такое показание к применению, которые наилучшим образом позволят выявить различия, т.е. наиболее чувствительную модель оценки эффективности. Выбор популяции заявителем требует обоснования и зависит от ее восприимчивости и подверженности потенциальным рискам для безопасности. Заявитель должен всесторонне с достаточной достоверностью обосновать возможность экстраполяции результатов сравнительного изучения эффективности и безопасности по одному

показанию или у одной популяции на другие популяции и показания к применению.

• *Выбор подходящих конечных точек*

Необходимо выбрать такие конечные точки, которые позволяют с высокой степенью точности выявить возможные различия между препаратами. Требования к проведению клинических исследований сопоставимости могут отличаться от требований, которые предъявляются к проведению стандартных подтверждающих исследований. Клинические конечные точки зарегистрированных лекарственных препаратов необязательно должны совпадать с конечными точками, использованными в подтверждающих исследованиях, если их способность обнаруживать различия недостаточна. Как было указано выше, более подходящими могут оказаться фармакодинамические или иные маркеры, например, визуализационные. Выбор клинических конечных точек необходимо обосновать.

• *Продолжительность исследования*

Продолжительность исследования определяется, главным образом, выбором клинической конечной точки. Продолжительность должна быть достаточной, чтобы достаточно точно выявить даже минимальные различия. При обсуждении и обосновании продолжительности исследования необходимо также опираться на опубликованные данные. Поскольку сравнительная оценка безопасности является неотъемлемой частью исследования клинической сопоставимости, при определении продолжительности исследования следует также учесть необходимость надлежащего выявления значимых различий по показателям безопасности.

Требования к клинической безопасности и фармаконадзору

Даже если в процессе изучения эффективности доказана сопоставимость препаратов, полученных до и после внесения

изменений, они могут иметь различия по показателям безопасности (по характеру, серьезности или частоте возникновения нежелательных реакций). Данные по оценке безопасности препарата, не прошедшего регистрацию, необходимо получить в исследовании с участием достаточного числа пациентов, чтобы можно было провести сравнение профилей безопасности препаратов, полученных до и после внесения изменений в процесс производства. Необходимо с осторожностью сравнивать вид, тяжесть и частоту возникновения нежелательных реакций между препаратами до и после изменения.

После регистрации препарата могут потребоваться дополнительные исследования, например, фармакоэпидемиологические.

При оценке нежелательных реакций необходимо учитывать не только частоту возникновения нежелательных явлений, но также возможные различия в их клинических проявлениях (длительности, тяжести и серьезности, обратимости, ответе на лечение и т.д.).

Заявитель должен включить в регистрационное досье рассматриваемого лекарственного препарата спецификацию по безопасности. Она должна содержать описание возможных проблем с безопасностью, обусловленных изменениями процесса производства.

• *Объем базы данных по оценке безопасности*

Данные о безопасности могут быть получены в рамках клинического исследования, направленного на подтверждение эквивалентной эффективности. Продолжительность исследования и объём выборки определяют с учётом частоты возникновения, тяжести и серьезности ожидаемых нежелательных явлений, а также клинических условий применения лекарственного препарата (непродолжительное или длительное применение и др.). Цель такого исследования не

преследует выявление нежелательных явлений *per se*, она состоит в оценке различий в их возникновении.

• *Конечные точки безопасности*

При выборе конкретных конечных точек следует учитывать как типичные, характерные для препарата и (или) его класса аспекты безопасности, так и прочие потенциальные проблемы, которые можно вывести, исходя из механизма действия. Поскольку можно получить неожиданные результаты изучения безопасности, заявителям не рекомендуется в протоколе исследования ограничиваться методами, направленными на обнаружение исключительно известных проблем для безопасности. Оценка сравнительной иммуногенности должна быть составной частью оценки безопасности (см. Главу 11 настоящих Правил).

План управления рисками

При регистрации заявитель должен представить план управления рисками или после регистрации препарата представить обновленный план управления рисками в соответствии с действующим правом Союза. При этом необходимо учесть риски, которые были выявлены в процессе изучения безопасности препарата, и потенциальные риски.

При разработке плана управления рисками следует учитывать уже существующую информацию по безопасности применения ранее выпускавшегося препарата (препарата, полученного по исходной технологии до внесения изменений в процесс производства), а также лекарственных препаратов данной группы.

В периодических отчетах по безопасности лекарственных препаратов (ПООБ), регулярно предоставляемых держателем регистрационного удостоверения согласно праву Союза, должна содержаться вся информация о рисках и переносимости препарата, зависящих от внесенных изменений в процесс производства.

Периодичность представления ПООБ определяется в каждом конкретном случае индивидуально.

Сроки представления доклинических и (или) клинических данных

Доклинические и клинические исследования (если применимо) должны быть завершены до утверждения изменений производственного процесса, в соответствии с установленными в Союзе требованиями, т.е. до выпуска препарата. В зависимости от свойств препарата и показаний к применению вносимые изменения могут быть основаны на фармакодинамических данных. При этом дополнительные данные клинических исследований и данные по безопасности, включая сведения об иммуногенности, могут быть представлены после утверждения вносимых изменений.

ГЛАВА 10. РАЗРАБОТКА, ПРОИЗВОДСТВО, УСТАНОВЛЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК И СПЕЦИФИКАЦИИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

1. Введение

В настоящей главе рассматриваются требования к качеству моноклональных антител.

Моноклональные антитела – это иммуноглобулины (Ig), характеризующиеся определенной специфичностью, источником получения которых являются линии клеток одного клона. Их биологическая активность проявляется за счет специфичного связывания с соответствующим лигандом (обычно определяемым как антиген), и обусловливает такие эффекторные функции иммунной системы, как антитело-зависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) и комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC).

Моноклональные антитела могут быть получены по технологии рекомбинантной ДНК (рДНК), гибридомной технологии, иммортализацией В-лимфоцитов или других технологий (например, дисплей-технологии, генетически модифицированные животные).

В настоящей Главе изложены принципы и общие требования к разработке, производству, установлению характеристик и спецификации препаратов моноклональных антител, которые применяются в качестве лекарственных препаратов для медицинского применения или использованию в их производстве.

2. Область применения

В настоящей Главе рассматриваются вопросы качества при регистрации моноклональных антител, полученных из моноклональной

линии клеток, предназначенных для терапевтического и профилактического (в том числе для применения *ex vivo*), а также диагностического применения *in vivo.*

Принципы, изложенные в настоящей Главе, применимы к моноклональным антителам, используемым в качестве реагентов, а также к лекарственным препаратам, разработанным на основе моноклональных антител, таким как фрагменты иммуноглобулинов, конъюгаты, гибридные белки и др. Однако использование данных принципов определяется индивидуально для каждого конкретного препарата с учетом специфики их свойств и будет рассмотрена в отдельных документах.

Поликлональные антитела (фракционированные и рекомбинантные) в настоящей Главе не рассматриваются, однако, по возможности, следует использовать описанные в них принципы.

Настоящая Глава не распространяется на:

– моноклональные антитела, предназначенные для использования *in vitro*;

– моноклональные антитела, применяемые в клинических исследованиях.

Однако при производстве и контроле моноклональных антител для клинических исследований необходимо учитывать принципы, описанные в настоящей Главе; их применимость будет определяться в индивидуальном порядке.

3. Общие положения

Настоящая Глава неразрывно связана с остальными применимыми главами настоящих Правил, а также с требованиями Фармакопеи Союза «Моноклональные антитела для клинического применения».

4. Основные положения

4.1. Разработка моноклональных антител

Структуру моноклонального антитела необходимо обосновать с учетом механизма действия, биологической активности и стабильности препарата. Обоснование характеристики структуры моноклональных антител должно содержать, по крайней мере, рассмотрение пригодности иммунохимических свойств иммуноглобулинов (таких как аффинность, перекрестная реактивность, изотип, аллотип), а также важности и сохранности эффекторной функции. Кроме того, необходимо тщательно рассмотреть риск индукции иммунного ответа у пациентов, особенно если препарат не обладает высокой голомологией с иммуноглобулином человека или при выявлении в структуре потенциально иммуногенных эпитопов, поскольку это может привести к клиническим нежелательным реакциям и (или) изменению терапевтического потенциала.

Клеточный субстрат, используемый для получения моноклональных антител, должен представлять собой стабильную, непрерывно культивируемую линию клеток одного клона, разработанную по технологии рекомбинантной ДНК и (или) других соответствующих технологий. Основанием для выбора клеточного субстрата является оценка возможности получения продукта желаемого качества, по сравнению с возможностью использования других соответствующих подходов.

Если в качестве субстрата используются клетки, полученные по технологии рекомбинантной ДНК, и характеристика системы, используемой для производства антител, должна соответствовать принципам, изложенным в соответствующих главах настоящих Правил (Главы 1, 2, 5.1 и 5.2).

Если до получения моноклональной клеточной линии в ходе разработки осуществляется одна или более специфичных процедур,

например, гибридизация клеток, вирусная трансформация, генная библиотека скрининга в фаговом дисплее, использование технологий *in silico, in vitro* или *in vivo*, такие методики не требуют подробного описания. Однако необходимо представить достаточный объем сведений об этих процедурах, позволяющий оценить подлинность и чистоту моноклональной клеточной линии, значимых для безопасности и эффективности препарата (например, аминокислотные или посттрансляционные модификации, направленные на модуляцию иммуногенности или эффекторных функций, и сведения о посторонних агентах и потенциальных контаминантах).

Для получения стабильной и непрерывно культивируемой линии клеток, которая будет использована для производства антител может потребоваться иммортализация В-лимфоцитов человека или клеток другого происхождения путем слияния или трансформации клеток. Необходимо тщательно проанализировать выбранный подход с позиций безопасности и эффективности и должным образом обосновать его.

Использование В-лимфоцитов человека в качестве родительских клеточных линий поднимает проблемы, связанные с возможной передачей инфекционных агентов, в том числе агентов вариантной болезни Крейтцфельдта-Якоба (вБКЯ), а также других патогенных для человека микроорганизмов. Использование лимфоцитов человека, трансформированных вирусом Эпштейна-Барр (EBV), создает дополнительные трудности в связи с наличием вируса EBV, способного инфицировать человека.

Гибридома, полученная путем гибридизации В-лимфоцитов человека или клеток другого происхождения с миеломными клетками, может быть использована в качестве клеточного субстрата. Происхождение и установление характеристик родительских клеток

необходимо подробно описать и документировать, включая информацию о здоровье доноров, использованных партнерах гибридизации и материалах человеческого или животного происхождения, которые соприкасались с клетками (например, питающие клетки и миеломные клетки).

4.2. Производство моноклональных антител

4.2.1. Общие положения

Процесс производства необходимо должным образом описать и валидировать. Валидация должна, по меньшей мере, включать следующее:

(1) подтверждение того, что процесс способен производить продукт постоянного качества постоянного качества в соответствии с надлежащим образом заданной стратегией контроля качества;

(2) оценку производственных возможностей (например, элиминацию производственных примесей, вирусов);

(3) подтверждение того, что каждая операционная единица функционирует должным образом (например, валидация очистки колонок, асептическая фасовка).

Внимание должно быть направлено на обеспечение внутрипроизводственного контроля (включая показатели качества промежуточных продуктов и параметры процесса), а также составлению спецификаций на активную фармацевтическую субстанцию и готовый лекарственный препарат. Подобный контроль должен позволять отслеживать значимые показатели качества, такие как родственные соединения и примеси (например, правильность или неправильность дисульфидных связей, дезаминирование, окисление, укорочение, агрегаты) или производственные примеси (например, белки, ДНК, белок А клетки-хозяина, бычья сыворотка, остатки питательных сред), а также

релевантные параметры процесса (например, загрузка колонки, pH, температура).

Если белок А используется в процессе очистки, источник белка А (например, *S. aureus*, рекомбинантный) и способ его получения (например, очищенный с использованием IgG человека) должны быть надлежащим образом документированы. Если в производстве использовался IgG человека, необходимо подтвердить, что его качество пригодно для целевого назначения, особенно с позиций вирусной безопасности.

4.2.2. Платформенное производство

Разработка процессов, используемых для производства моноклональных антител, во многом зависит от знаний производителем как продукта, так и процесса производства.

Некоторые производители приобрели значительный опыт в области производства моноклональных антител и разработали стратегию производства, основанную на схожих производственных процессах (т.е. с использованием определенных клеток-хозяина, культуры клеток, процессов очистки целевого белка и т.д.). Такой подход часто называют «платформенным производством».

Подобно любому другому лекарственному препарату, процесс производства биотехнологического лекарственного препарата, который был разработан с использованием платформенного производства, должен быть валидирован к моменту его регистрации. Исследования по валидации должны включать данные, полученные от конечного процесса производства и производственной(ых) площадки(ок), которые будут использоваться для производства лекарственного препарата для реализации. Однако при должном обосновании и документировании в целях обоснования или снижения подаваемого объема данных,

полученных по результатам конечного коммерческого процесса, допускается представить результаты, полученные на основании иного релевантного опыта.

Принимая во внимание, что показатели качества специфичны для каждого препарата и процесса его производства необходимо в отношении регистрируемого препарата и процесса отдельно подтвердить пригодность аналитических методов и стратегии контроля качества в целом. Как следствие, необходимо тщательно пересмотреть пригодность стратегии контроля качества, являющуюся пригодной для анализа другой препаратов, полученных с помощью того же подхода платформенного производства, поскольку она может быть не адаптирована к регистрируемым препарату и процессу. Например, производственные примеси, такие как белки клетки-хозяина (БКХ), высоко зависимы от процесса, и методы контроля, использующиеся в отношении данного препарата и процесса, могут оказаться непригодными для других продуктов, использующих то же платформенное производство (например, различные клеточные субстраты, полученных из общей парентеральной клеточной линии, аналогичные культуры и условия очистки).

При изменении утвержденного процесса, основанного на платформенном производстве, необходимо отдельно проанализировать влияние такого изменения на рассматриваемые препарат и процесс. Тем не менее, при должном обосновании и документировании в целях обоснования или снижения подаваемого объема данных, полученных в отношении измененного препарата и процесса, допускается представить результаты, полученные на основании иного релевантного опыта. Более того, если с помощью общего платформенного процесса производства получают несколько препаратов, а изменения (например, оптимизация

или улучшение процесса) вводятся лишь в один или несколько из них, необходимо представить обоснование принятой стратегии гармонизации или отсутствия таковой.

4.2.3. Вирусная безопасность и трансмиссивная губчатая энцефалопатия

Вопросы вирусной безопасности моноклональных антител, рассмативаемых в настоящей Главе, должны соответствовать положениям, представленным в Главе 2 настоящих Правил. Требования, изложенные в настоящей главе, касаются моноклональных антител, полученных из гибридомных клеточных линий или из генетически модифицированных клеток, продуцирующих моноклональные антитела. Если производство моноклональных антител проводится с использованием животных (например, трансгенных животных или асцитической жидкости), необходимо учитывать требования Главе 2 настоящих Правил, в особенности Приложению 1 к указанной главе. Исходные клетки (например, клетки хозяина) должны пройти скрининг на посторонние агенты, т.е. на наличие посторонних или эндогенных агентов. Выбор вирусов, которые следует использовать в испытаниях, зависит от вида животных и ткани-источника клеток-продуцентов, а также свойств любого другого биологического сырья, используемого в производстве.

Необходимо в обязательном порядке провести надлежащие валидационные исследования по снижению вирусной нагрузки. Согласно Главе 2, в отношении заявленного на регистрацию лекарственного препарата и его процесса производства необходимо валидировать способность производственных стадий снижать вирусную нагрузку. В целях учета потенциальных и неожиданных препарат-специфичных факторов, влияющих на снижение вирусной нагрузки,

подобные валидационные исследования, как правило, проводят, используя промежуточные продукты, получаемые в отдельном процессе производства. Тем не менее, при должном обосновании и документировании в целях установления и анализа стадий по снижению вирусной нагрузки ценными являются и иные исследования (например, проведенные на основании подхода платформенного производства), которые могут позволить снизить объем подаваемых результатов валидационных исследований. Такие данные можно рассматривать как вспомогательные, например, при изучении потенциального влияния изменяющихся параметров процесса на снижение вирусной нагрузки, свойств колонок после множества производственных циклов, исследований переноса вирусов или исследований по очистке колонок. Во всех случаях производитель должен обосновать значимость таких данных для отдельного продукта. Необходимо представить обоснования возможности использования предварительных собственных данных в отношении нового препарата, например, допустимы ссылки на данные по снижению вирусной нагрузки на определенных стадиях процесса, если промежуточный продукт, получаемый на предыдущем этапе, обладает сопоставимыми биохимическими свойствами и подвергается очистке идентичными методами. Производитель должен представить критический анализ производственной стадии, в отношении которой будут использоваться подобные собственные вспомогательные данные, и состава соответствующего промежуточного продукта. По результатам анализа необходимо прийти к однозначному заключению, что в обоих случаях введенная производственная стадия аналогична по способности инактивировать (элиминировать) потенциальные вирусные контаминанты. Если сопоставимость этапов неубедительна или база данных не позволяет исключить препарат-специфичное влияние на

способность снижать вирусную нагрузку, необходимо провести подтверждающие циклы, используя препарат-специфичные промежуточные продукты.

Если в разработке или производстве использовались материалы крупного рогатого скота или иных видов животных, источников ТГЭ, необходимо следовать требованиям документа Союза по минимизации риска передачи агентов губчатой энцефалопатии животных посредством лекарственных препаратов для медицинского применения.

4.3. Установление характеристик моноклональные антитела

Моноклональные антитела необходимо подробно охарактеризовать. В соответствии с Главой 6 настоящих Правил, установление характеристик должна включать определение физико-химических и иммунохимических свойств, биологической активности, чистоты, примесей и количественного содержания моноклональных антител. На момент регистрации лекарственного препарата заявитель должен располагать соответствующим образом охарактеризованными собственными стандартными материалами, которые будут использоваться в биологических и физико-химических испытаниях промышленных серий.

4.3.1. Физико-химические характеристики

Программа установления физико-химических характеристик, как правило, включает определение класса, подкласса, строение легких цепей (каппа и (или) лямбда цепи) и первичной структуры моноклонального антитела.

По результатам секвенирования ДНК необходимо вывести аминокислотную последовательность и с помощью надлежащих методов (например, пептидного картирования, секвенирования аминокислот, масс-спектрометрического анализа) подтвердить ее экспериментально.

Необходимо проанализировать вариацию N- и С-концевых последовательностей аминокислот (например, С-концевых лизина(ов)).

Необходимо определить свободные сульфгидрильные группы и дисульфидные мостики. Необходимо определить сохранность или правильность дисульфидных связей.

Необходимо установить содержание углеводов (нейтральные сахара, аминосахара и сиаловые кислоты). Кроме того, необходимо проанализировать структуру углеводных цепей, олигосахаридный профиль (профиль ветвления), участки гликозилирования и их занятость.

Как правило, моноклональные антитела имеют один участок N-гликозилирования на каждой тяжелой цепи, расположенный в Fc-фрагменте. Легкая цепь, как правило, не гликозилируется. Однако тяжелые цепи могут содержать дополнительные участки гликозилирования, поэтому необходимо установить их наличие или отсутствие. Необходимо описать структуру гликанов, уделив особое внимание степени маннозилирования, галактозилирования, фукозилирования и сиалилирования. Необходимо определить распределение основных имеющихся гликановых структур (чаще всего G0, G1 и G2).

С помощью подходящей методологии необходимо описать структуру моноклонального антитела высшего порядка.

4.3.2. Иммунологические свойства

Иммунологические свойства антител необходимо всесторонне охарактеризовать. В целях определения их аффинности, авидности и иммунореактивности (включая перекрестную реактивность с другими структурно гомологичными белками) необходимо провести анализ связывания антител с очищенными антигенами и определенными участками антигенов. Необходимо изучить непредусмотренную реактивность (цитотоксичность) для тканей человека, отличных от

выбранных мишеней. Используя иммуногистохимические методики (см. Приложение 1 к настоящей Главе), необходимо установить перекрестную реактивность с тканями человека. В соответствующих случаях допускаются перекрестные ссылки на доклинический и (или) клинический разделы регистрационного досье.

В отсутствие должного обоснования необходимо идентифицировать области, определяющие комплементарность (гипервариабельные участки, CDR).

Необходимо определить эпитоп и молекулу, его несущую. Указанное должно включать биохимическую идентификацию таких структур (например, белок, олигосахарид, гликопротеин, гликолипид) и все возможные исследования по установлению характеристик (аминокислотная последовательность, структура углеводов).

Необходимо изучить способность связываться с комплементом и активировать его и (или) иные эффекторные функции, даже если целевая биологическая активность не требует наличия таких функций.

4.3.3. Биологическая активность

С помощью исследований *in vitro* и (или) *in vivo* соответственно необходимо определить биологическую активность (т.е. специфическую способность препарата оказывать определенный биологический эффект). Необходимо проанализировать механизм действия и значение (или последствия) эффекторных функций препарата для его безопасности и эффективности.

Если эффекторная функция антител может являться частью механизма действия и (или) влиять на безопасность и эффективность препарата, необходимо представить подробный анализ АЗКЦ, цитотоксических свойств (например, апоптоза), способности связываться с комплементом и активировать его, прочие эффекторные

функции, включая активность связывания с гамма Fc-рецепторами и неонатальными Fc-рецепторами.

4.3.4. Чистота, примеси и контаминаты

Как правило, выделяют несколько источников гетерогенности моноклональных антител (например, изменение С-концевого лизина, образование N-концевого пироглутамата, дезамидирование, окисление, изомеризация, фрагментация, образование нетипичных дисульфидных связей, N-связанный олигосахарид, гликирование), которые приводят к сложному профилю показателей чистота (примеси), представляющему собой несколько молекулярных структур и вариантов. Такой профиль чистоты (примесей) необходимо оценить с помощью совокупности ортогональных методов и для соответствующих родственных вариантов предусмотреть индивидуальные или суммарные критерии приемлемости.

К таким методам, как правило, относятся определение физико-химических свойств, например, молекулярной массы или размера, профиля изоформ, коэффициента экстинкции, электрофоретических профилей, хроматографических данных и спектроскопических профилей. Кроме того, необходимо предложить подходящие методы для качественного и количественного анализа гетерогенности заряженных вариантов.

Используя комбинацию методов, необходимо должным образом охарактеризовать мультимеры и агрегаты. Образование в лекарственном препарате агрегатов, видимых и невидимых включений является важным и требует изучения и тщательного контроля при выпуске серий и в ходе исследований стабильности. В дополнение к фармакопейным испытаниям на механические включения, в целях установления природы включений и их содержания могут потребоваться иные ортогональные аналитические методы.

Необходимо идентифицировать потенциальные производственные примеси (например, БКХ, ДНК клетки-хозяина, остаточное содержание питательных сред, остаточное содержание реактивов, использующихся на последующих этапах обработки) и в зависимости от обстоятельств проанализировать их качественно и (или) количественно.

Необходимо строго избегать и (или) должным образом контролировать содержание контаминантов, включающих в себя все привнесенные посторонние материалы, не являющиеся частью процесса производства (например, микроорганизмы, эндотоксины). При подозрении на наличие провоспалительных контаминантов неэндотоксиновой природы, например, пептидогликанов, необходимо провести дополнительные испытания, например, испытание на активацию моноцитов.

4.3.5. Количественное содержание

С помощью соответствующих физико-химических и (или) иммунохимических методик необходимо определить количественное содержание.

Необходимо подтвердить, что результаты испытания на содержание непосредственно коррелируют с результатами, полученными при испытании на биологическую активность. При наличии такой зависимости в информации о препарате или производственных процессах, например, фасовке, вместо меры биологической активности допускается использовать меру количественного содержания.

4.4. Спецификации

Спецификации являются составной частью общей стратегии контроля качества продукта, составляемые для обеспечения его качества и постоянства, продукт должен соответствовать спецификации. Необходимо разработать такие спецификации, которые учитывали бы

показатели качества, оказавшиеся по результатам исследований по установлению характеристик, значимыми. Выбор включаемых в спецификацию испытаний носит препарат-специфичный характер. Необходимо описать основания установления допустимых диапазонов для критериев приемлемости. В соответствии с Главой 6 настоящих Правил необходимо установить критерии приемлемости и обосновать их, учитывая данные, полученные по результатам испытаний серий, изученных в доклинических и (или) клинических исследованиях; серий, использованных при подтверждении воспроизводимости процесса производства; данных результатов исследований стабильности и значимых данных по разработке.

4.4.1. Подлинность

Испытание(я) на подлинность должно(ы) быть высоко специфичным(и) и основываться на уникальности молекулярной структуры препарата и (или) иных специфичных свойствах (например, пептидное картирование, анти-идиотипный иммуноанализ или иной подходящий метод). Принимая во внимание высокую аналогичность константных доменов различных антител, в целях установления подлинности могут потребоваться несколько испытаний (физико-химических, биологических и (или) иммунохимических); такие испытания должны позволять различать прочие антитела, которые могут производиться на той же производственной площадке.

4.4.2. Чистота и примеси

Как указывалось в разделе по установлению характеристик, профиль чистоты (примесей) моноклональных антител может быть сложным и требует анализа с помощью совокупности отрогональных методов, для которых необходимо установить индивидуальные и (или) суммарные критерии приемлемости по родственным вариантам.

Например, в целях качественного и количественного выявления заряженных вариантов необходимо использовать методы разделения, основанные на гетерогенности заряда.

Необходимо включить хроматографические и (или) электрофоретические методы, способные обнаружить укорочение, диссоциацию и полимеризацию продукта, а также предложить для указанных показателей количественные пределы.

Необходимо уделить особое внимание подтверждению пригодности использованных аналитических методик для контроля содержания мультимеров и агрегатов.

Принимая во внимание, что гликозилирование может оказывать влияние на фармакокинетику препарата и изменять его иммуногенные свойства, для данного показателя необходимо установить надлежащие критерии приемлемости. Кроме того, такой контроль в дальнейшем позволит подтверждать постоянство серий препарата.

Как следствие, необходимо тщательно подобрать испытания и критерии приемлемости гликозилирования (например, относительные количества G0, G1 и (или) G2 Fc-фрагментов, степеней гликозилирования, фукозилирования и сиалилирования), принимая во внимание предусмотренное и потенциальное влияние этого показателя на биологическую активность в клинической практике (например, наличие функциональных эффекторных функций, не нужных для реализации целевого механизма действия, гликозилирование Fab-фрагмента).

В стратегию контроля необходимо включить контроль значимых производственных примесей. В некоторых случаях, при должном подтверждении, контроль их содержания допускается осуществлять на промежуточном продукте, на соответствующем этапе производственного процесса. Для некоторых примесей, для которых

показано, что с помощью процесса производства удается значительно сократить их содержание, стандартные испытания не требуются. Контроль остаточного белка А, БКХ, остаточной ДНК и прочих потенциальных остаточных содержаний сред или очистки, как правило, является частью спецификации. Кроме того, такой контроль служит ценным источником информации по постоянству и функционированию процесса производства.

4.4.3. Активность

Активность (potency) – есть количественная мера биологической активности (biological activity), основанная на показателе качества препарата, связанном с его значимыми биологическими свойствами. Соответствующая аналитическая методика определения активности должна являться частью спецификаций на активную фармацевтическую субстанцию и (или) лекарственный препарат и должна, в идеале, отражать биологическую активность в клинической практике.

В отношении антител, чья клиническая активность зависит исключительно от связывающих (нейтрализиующих) свойств, при достаточном обосновании допускается использовать аналитическую методику определения активности, определяющую связывание с мишенью (т.е. методика связывания). Если для клинической активности необходимы эффекторные функции, необходимо использовать биологический метод количественного определения на основе клеток или иную методику, позволяющую определить эффекторные функции. Если биологический метод количественного определения на основе клеток неуместен или комбинация двух методов дает более точные результаты, следует использовать комбинацию двух отдельных методов: первый – с целью определения специфичности, второй – для

определения эффекторной функции (например, активация комплемента, связывание с C1q, связывание с Fc-гамма-рецептором).

Несмотря на то что два вида методик определения активности (связывания и на основе клеток) зачастую дают сопоставимые результаты, такие методики не следует считать взаимозаменяемыми, поскольку некоторые свойства препарата могут не влиять на связывание с мишенью (например, гликозилирование, фрагментация), но влиять на дальнейшее распространение сигнала или экспрессию рецептора.

В целях подтверждения постоянства процесса производства значительную ценность представляет специфическая активность (биологическая активность на массу).

4.4.4. Количественное содержание

Используя подходящую методику, необходимо определить содержание фармацевтической субстанции, как правило, по содержанию (массе) белка.

4.4.5. Общие показатели

В соответствующих случаях необходимо изучить внешний вид, растворимость, pH, осмоляльность, извлекаемый объем, стерильность, бактериальные эндотоксины, стабилизатор и воду.

Содержание видимых и невидимых механических включений в лекарственном препарате должно соответствовать требованиям, предъявляемым Фармакопеей Союза.

5. Препараты на основе модифицированных моноклональных антител

Помимо интактных, немодифицированных моноклональных антител, научные принципы, описанные в настоящем документе, могут быть применимы к прочим производным от моноклональных антител

препаратам, например, фрагментам антител (включая одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv)), гибридные белки, конъюгированные моноклональные антитела, биспецифичные антитела и радиоактивно меченые антитела. Однако их применимость будет определяться в индивидуальном порядке на основании свойств отдельного препарата.

В дальнейшем будут разработаны дополнительные специальные главы для производных моноклональных антител, которые будут дополнять настоящие Правила.

ПРИЛОЖЕНИЕ № 1

к Главе 10 Правил проведения
исследования биологических
лекарственных препаратов

Рекомендуемый перечень тканей человека для использования в иммуногистохимических или цитохимических исследованиях перекрестной реактивности моноклональных антител

Этот перечень должен отражать специфичность антитела и их клиническое практическое значение, он включает, но не ограничивается, следующим:

- миндалина, тимус, лимфатический узел;
- костный мозг, клетки крови;
- легкие, печень, почки, мочевой пузырь, селезенка, желудок, включая подлежащие гладкие мышцы, кишечник;
- поджелудочная железа, большая слюнная железа, щитовидная железа, паращитовидная железа, надпочечник, гипофиз;
- головной мозг, периферический нерв;
- сердце, поперечнополосатая мышца;
- яичник, яичко;
- кожа;
- кровеносные сосуды.

ГЛАВА 11. ОЦЕНКА ИММУНОГЕННОСТИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ, ПОЛУЧЕННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Резюме

Количество лекарственных препаратов, являющихся биологическими (полученными биотехнологическим путем) белками, неуклонно растет. Они могут вызывать у пациентов нежелательный иммунный ответ, на который влияют различные факторы, в том числе зависящие от пациента, опосредованные заболеванием или лекарственным препаратом. Настоящий документ содержит справочные сведения о потенциальных причинах возникновения и последствиях иммуногенности, а также общие указания по проведению систематической оценки иммуногенности при регистрации лекарственных препаратов.

Ввиду неизбежного возникновения у животных иммунного ответа к белкам человека прогностическая ценность доклинических исследований для оценки иммуногенности биологического лекарственного препарата у человека низкая. Несмотря на то что проведения доклинических исследований, направленных на прогнозирование иммуногенности у человека, как правило, не требуется, животные модели, к примеру, могут представлять ценность для оценки последствий иммунного ответа.

В целях измерения иммунного ответа на терапевтические белки необходимо выбрать надлежащую стратегию разработки подходящих методов скрининга и подтверждения наличия антител. Методы должны позволять отличать нейтрализующие антитела от антител, не обладающих такими свойствами, их использование как в основных

(опорных) клинических исследованиях, так и в рамках пострегистрационного наблюдения должно быть валидировано.

При тщательном планировании оценки иммуногенности в клиническом центре необходимо систематически набирать данные от достаточного числа пациентов. Предпочтительно, чтобы отбор проб препарата был стандартизирован на протяжении всего исследования (например, отбор проб до начала, во время и по завершении исследования). Схему отбора проб каждого препарата необходимо определять в индивидуальном порядке, учитывая также риски, обусловленные нежелательным иммунным ответом у пациентов. В целях всестороннего понимания клинических последствий иммунного ответа необходимо собирать данные о влиянии на эффективность и безопасность. В дальнейшем вопросы иммуногенности необходимо осветить в плане управления рисками.

Настоящая Глава имеет широкую применимость, поэтому общие концепции необходимо адаптировать к каждой отдельной программе разработки в индивидуальном порядке. За разъяснениями заявителям необходимо обращаться за научной консультацией в уполномоченный орган.

1. Введение

Большинство биологических (полученных биотехнологическим путем) белков вызывают нежелательный иммунный ответ, который обусловлен рядом факторов. Иммунный ответ – сложное явление, которое помимо образования антител, проявляется активацией Т-клеток и врожденного иммунитета, вносящих свой вклад в развитие нежелательных реакций.

Последствия иммунного ответа на терапевтические белки простираются от преходящего появления антител без клинических

проявлений до тяжелых угрожающих жизни состояний. Потенциальными клиническими последствиями нежелательного иммунного ответа являются: снижение эффективности терапевтических белков, тяжелые общие иммунные реакции, включая анафилаксию, и, для терапевтических белков, применяемых в качестве заместительной терапии, – потенциальная перекрестная реактивность с эндогенным аналогом, если продукция последнего сохранилась.

На иммуногенность терапевтических белков влияет множество факторов. Их можно разделить на зависящие от пациента и опосредованные заболеванием или лекарственным препаратом. Зависящие от пациента факторы могут предрасполагать к развитию иммунного ответа у субъекта, к ним относятся: основное заболевание, наследственная предрасположенность, иммунный статус, включая иммуномодулирующую терапию и режим дозирования. Опосредованные лекарственным препаратом факторы также могут влиять на вероятность развития иммунного ответа, например, процесс производства, лекарственная форма и состав лекарственного препарата, его стабильность.

Несмотря на то что данные о возможном нежелательном иммунном ответе на терапевтические белки необходимо представить до регистрации, эти проблемы могут возникнуть и на пострегистрационном этапе. В регистрационном досье необходимо представить резюме об изучении иммуногенности в соответствующих обзорных разделах со ссылками на полные данные в соответствующих модулях. В зависимости от иммуногенного потенциала терапевтического белка и редкости заболевания предрегистрационные данные об иммуногенности могут быть ограничены. После регистрации может потребоваться дальнейшая систематическая оценка иммуногенности, которую можно предусмотреть в плане управления рисками.

2. Область применения

Настоящей Главой вводятся и объясняются общие принципы, которые преимущественно затрагивают развитие нежелательного иммунного ответа на терапевтические белки у пациентов и способы систематической его оценки. Глава распространяется на белки и полипептиды, их производные, а также препараты, в которых упомянутые вещества являются компонентами, например, конъюгаты. Эти белки и полипептиды главным образом получают на рекомбинантных или нерекомбинантных экспрессирующих системах. В настоящей Главе используется термин «терапевтический белок».

Настоящая глава неразрывно связана с другими главами настоящих Правил, в частности с главами 9.1, 9.2 и 15.

Факторы свертывания крови в настоящей главе не рассматриваются.

3. Общие положения

Настоящая глава неразрывно связана с другими главами настоящих Правил, в частности с главами 9.1, 9.2 и 15.

4. Основные положения

Последствия развития иммунного ответа на терапевтические белки могут быть различными – от преходящего выявления антител, не сопровождающегося какими-либо значимыми клиническими явлениями, до тяжелых, угрожающих жизни состояний. Как правило, терапевтические белки следует рассматривать как отдельные лекарственные препараты, опыт применения родственных белков может рассматриваться только в качестве вспомогательных данных. При этом следует учитывать сопутствующую терапию и другие, зависящие от пациента факторы, в том

числе основное заболевание, поскольку все это также может влиять на клинические проявления иммуногенности. Поэтому оценку иммуногенности необходимо осуществлять в индивидуальном порядке по каждому показанию к применению и популяции пациентов.

Оценка иммуногенности требует междисциплинарного подхода, объединяющего совместные усилия специалистов по обеспечению качества, доклинической и клинической разработке.

В настоящей главе представлены рекомендации и принципы для разработчиков терапевтических белков, получаемых с использованием биотехнологических методов, в целях регистрации экспертов. Приведенные положения имеют широкую сферу применения, поэтому с целью создания оптимальной программы разработки допускается адаптировать изложенные ниже принципы применительно к конкретному лекарственному препарату. При обосновании выбранного подхода к исследованию иммуногенности заявители должны учитывать как изучение риска развития нежелательного иммунного ответа, так и возможные клинические последствия, описанные ниже. Необходимо полностью обосновать подход к плану изучения иммуногенности, в том числе при отказе от проведения определенных методик или замеров, рекомендуемых настоящей Главой. При необходимости заявители вправе обратиться за научной консультацией в уполномоченные органы государств-членов Союза.

4.1 Факторы, влияющие на развитие иммунного ответа против терапевтических белков

4.1.1 Факторы, зависящие от пациента или опосредованные заболеванием

К зависящим от пациента факторам, которые могут влиять на иммунный ответ к терапевтическим белкам, относятся генетические

особенности, возраст пациента; к опосредованным заболеванием факторам – сопутствующая терапия и введение аналогичных белков ранее.

Генетические факторы, модулирующие иммунный ответ

Генетические факторы могут изменить иммунный ответ на терапевтический белок и быть причиной межиндивидуальной вариабельности. Полиморфизм аллелей главного комплекса гистосовместимости (MHC), влияющий на аффинность и стабильность взаимодействия между молекулами MHC, антигенными пептидами и генами, кодирующими Т-клеточный рецептор Т-хелперов, может влиять на иммунный ответ и индукцию иммунной толерантности.

Иммунный ответ может развиваться даже, если последовательность аминокислот молекулы терапевтического белка полностью соответствует человеческой.

К другим генетическим факторам, влияющим на иммуногенность, может относиться полиморфизм генов, кодирующих цитокины, играющих роль в тонкой корректировке иммунного ответа (например, интерлейкин-10 (IL-10), трансформирующий фактор роста бета (TGF-β) и др.).

Генетические факторы, обусловленные поломкой генов

Если терапевтический белок применяется для замещения эндогенного белка, низкие концентрации или даже отсутствие этого белка могут влиять на иммунологическую толерантность, поскольку у таких пациентов физиологический антиген может восприниматься как неоантиген.

Возраст

Данные, полученные в одной возрастной группе, не всегда можно экстраполировать на другие, поскольку иммунный ответ на введение терапевтического белка может зависеть от возраста. Иммунный ответ детей на белки может отличаться от такового у взрослых. Если

лекарственный препарат предназначен для лечения детей, необходимо провести исследования иммуногенности в этой возрастной группе (см. раздел 4.5.4). Если препарат показан пожилым пациентам, то следует учитывать вероятность изменения иммунного ответа у пациентов пожилого возраста.

Факторы, опосредованные заболеванием

Заболевание пациента само по себе может быть важным фактором развития нежелательного иммунного ответа.

У некоторых пациентов с хроническими инфекциями наблюдается большая склонность к развитию иммунного ответа, поскольку их иммунная система находится в активированном состоянии.

При других состояниях, например, дефиците питания, метастазировании опухоли, поздних стадиях ВИЧ-инфекции, органной недостаточности, развитие иммунного ответа на введение терапевтического белка менее вероятно из-за нарушенной функции иммунной системы.

В отношении некоторых препаратов известно, что возможность развития гуморального иммунного ответа может различаться в зависимости от показаний к применению или стадии заболевания. В связи с этим иммуногенность следует изучать в рамках клинических исследований отдельно для каждого заболевания или стадии его развития.

Сопутствующая терапия

Сопутствующая терапия может как снижать, так и повышать риск развития иммунного ответа на терапевтические белки. Обычно иммунная реакция на введение терапевтического белка снижается при применении иммунодепрессантов. Следует учитывать и предыдущее лечение, которое также может модулировать иммунный ответ на введение терапевтического белка и влиять на иммунную систему в течение длительного времени. Если

клинические исследования проводились в комбинации с иммунодепрессантами, намерение применять терапевтический белок в монотерапии необходимо обосновать надлежащими клиническими данными по иммуногенности в отсутствии иммунодепрессантов, т.е. данные об иммуногенности в комбинации с иммунодепрессантами не будут играть роль при принятии решения о возможности применения препарата в монотерапии.

Продолжительность, путь введения, методы лечения

К факторам, способным усилить иммунный ответ к терапевтическому белку, относится путь введения, доза и режим дозирования.

Препараты, вводимые внутривенно, могут характеризоваться меньшей иммуногенностью, чем вводимые подкожно или внутримышечно.

При краткосрочном лечении вероятность развития иммунного ответа ниже, чем при долгосрочном; постоянное непрерывное применение реже вызывает развитие иммунного ответа, чем периодическое (нерегулярное) применение.

Нерегулярное лечение или повторное введение препарата после длительного перерыва может вызвать усиленный иммунный ответ.

Применение аналогичных или родственных белков в анамнезе

Ранее проведенная терапия аналогичными или родственными белками может вызвать предварительную сенсибилизацию организма и быть причиной развития иммунного ответа. Некоторые белки, при их использовании для заместительной терапии в прошлом, могут вызывать выработку перекрестно реагирующих антител или развитие иммунологической памяти, которые будут влиять на последующее лечение.

4.1.2. Факторы риска иммуногенности, опосредованные лекарственным препаратом

Факторы риска развития иммуногенности терапевтических белков биологического (биотехнологического) происхождения, опосредованные лекарственным препаратом, включают происхождение и природу активной фармацевтической субстанции (структурная гомология белка, посттрансляционные модификации), модификацию нативного белка (например, пэгилирование), родственные и производственные примеси (например, продукты деградации, агрегаты, белки, липиды и ДНК клетки-хозяина), а также состав и лекарственная форма.

Структура белка

Аналоги эндогенных человеческих белков, полученные с использованием биотехнологических методов, могут быть причиной развития иммунного ответа в силу различий в последовательности аминокислот или изменений в структуре белка, возникших в результате посттрансляционных модификаций, физической, химической или ферментативной деградации и (или) модификации, например, дезамидирования, окисления и сульфатирования, возникающие на любом из этапов производственного процесса или при хранении. Особого внимания требуют гибридные белки, полученные из чужеродных и собственных белков, поскольку чужеродные компоненты могут провоцировать формирование иммунного ответа на собственный белок (распространение эпитопа, epitope-spreading). В таких случаях рекомендуется проводить идентификацию антигенного компонента гибридного белка. Гликозилирование – частая посттрансляционная модификация терапевтических белков, полученных с использованием биотехнологических методов. Такие модификации могут различаться по количеству и положению участков гликозилирования, последовательности,

длине цепи и конформации олигосахаридных групп. В связи с этим, если один и тот же белок производится в различных условиях (например, изменение процесса культивирования клеток), характер посттрансляционных модификаций, а следовательно и иммуногенный потенциал белка могут изменяться. Это означает, что антитела, вырабатываемые в ответ на один лекарственный препарат, могут иначе реагировать на аналог, произведенный в измененных условиях, что необходимо учитывать при оценке иммуногенности.

Состав (рецептура)

Состав (рецептуру) препарата подбирают в целях наилучшего поддержания нативной конформации терапевтического белка. Выбор оптимального и стабильного состава зависит от понимания физической и химической природы фармацевтической субстанции и вспомогательных веществ самих по себе и в комбинации друг с другом. Состав и происхождение вспомогательных веществ могут влиять на иммуногенность терапевтических белков, эти факторы необходимо рассматривать в качестве возможных причин подобных явлений. Их необходимо учитывать при изменении рецептуры.

На иммуногенный потенциал терапевтического белка могут также повлиять материал первичной упаковки и условия клинического применения, например, разведение в инфузионных растворах и использование инфузионного оборудования, произведенного из различных материалов.

Агрегация и образование аддуктов

Агрегация и образование аддуктов белков могут приводить к оголению новых эпитопов, либо к образованию поливалентных эпитопов, что, в конечном счете, может стимулировать иммунную систему. Факторы, от которых, как считается, зависят агрегирование

или образование аддуктов, включают состав, процесс очистки, процедуры инактивации вирусов и условия хранения полуфабрикатов и готовых препаратов. Использование белков, например, альбумина в качестве вспомогательного вещества может приводить к образованию более иммуногенных агрегатов. Важно постоянно контролировать содержание агрегатов и аддуктов в лекарственном препарате на протяжении всего его срока хранения (годности).

Примеси

Выделяют ряд примесей терапевтических белков, которые потенциально могут быть адъювантами. Белки клетки-хозяина (БКХ) из клеточного субстрата, прошедшие очистку наряду с фармацевтической субстанцией, могут вызывать иммунный ответ к себе. Однако возможно, что такие БКХ, липиды из клетки-хозяина или ДНК выступят в качестве адъюванта терапевтического белка.

4.2 Доклиническая оценка иммуногенности и ее последствий

Терапевтические белки в большинстве случаев характеризуются видовыми различиями, т.е. белки человека воспринимаются организмом животного как чужеродные. В связи с этим прогностическая значимость доклинических исследований по оценке иммуногенности на животных считается низкой. Проведение доклинических исследований, направленных на прогнозирование иммуногенности у человека, обычно не требуется. Однако при этом следует учитывать возможное появление в будущем новых технологий (новые модели *in vivo, in vitro* и *in silico*), которые могут оказаться полезными.

Тем не менее, определение антител в доклинических исследованиях является обязательным элементом изучения токсичности при многократном введении с целью надлежащей интерпретации результатов таких исследований (см. Главу 5.3 настоящих Правил).

К тому же сравнение профиля антител с таковым препарата сравнения на животных моделях может являться частью исследований сопоставимости как для аналогичных биологических лекарственных препаратов (см. главы 15–15.11), так и при изменении процессов производства (см. главы 9.1–9.2).

Иммунный ответ на терапевтический белок, являющийся аналогом эндогенного белка, может привести к появлению перекрестно реагирующих антител, направленных против эндогенного белка, если синтез последнего сохраняется. На животных моделях необходимо изучить все имеющие значимость данные о последствиях индукции иммунного ответа к эндогенному белку или его отсутствие (дисфункцию). Необходимо учитывать реакции как гуморального, так и клеточного (если применимо) иммунитета. При отсутствии таких данных, но имеющихся теоретических предпосылках о возможном риске по безопасности применения, для получения информации о возможных последствиях нежелательного иммунного ответа необходимо проведение исследований с иммунизацией животных терапевтическим белком или гомологичным белком соответствующего вида животных.

4.3 Разработка методов обнаружения и определения иммунного ответа у человека

Нежелательная иммуногенность биологических лекарственных препаратов может проявляться как в виде гуморального, так и клеточного иммунного ответа. Именно поэтому очень важно выбрать и (или) разработать методы и методологию оценки такого иммунного ответа. Основное внимание исследователей, как правило, направлено на выявление антител и их характеристику, поскольку это технически выполнимо и имеет большое значение для определения клинической

значимости в плане безопасности и эффективности применения лекарственного препарата. Вместе с тем, клеточный иммунитет может также играть большую роль, заявитель должен рассматривать необходимость его оценки в индивидуальном порядке.

4.3.1 Стратегия количественного определения

Выбор подходящей стратегии для оценки нежелательной иммуногенности биологических лекарственных препаратов имеет ключевое значение. Обычно стратегия должна включать методы скрининга для идентификации образцов (пациентов) с наличием исследуемых антител, аналитические иммунохимические методы для подтверждения наличия антител и определения их специфичности и ряд функциональных методов для оценки нейтрализующей способности выявленных антител. Кроме того, необходимо предусмотреть другие аналитические методы, не направленные на выявление антител, например, методы определения имеющих значимость биомаркеров или фармакокинетических параметров (если применимо), которые позволят оценить и охарактеризовать влияние антител (и, возможно, других показателей иммунного ответа, если таковые выявлены (индуцированы)) на клинические эффекты. В соответствующих случаях у всех пациентов необходимо собирать исходные данные.

В Приложении 2 настоящей Главы приведен пример возможной стратегии выявления и установления характеристик антител.

4.3.2 Количественное определение антител

Скрининговые методы количественного определения

Скрининговые методы количественного определения должны позволять обнаруживать антитела, выработанные в ответ на введение биологического лекарственного препарата, у всех серопозитивных пациентов (т.е. во всех серопозитивных образцах). Следует учитывать,

что неизбежно появление ложноположительных результатов, поскольку обычно абсолютной специфичности любого скринингового метода достичь невозможно, но вместе с тем ложноотрицательных результатов быть не должно. Желательными характеристиками скрининговых методов количественного определения являются чувствительность, специфичность, прецизионность, воспроизводимость и устойчивость.

Методы, подтверждающие наличие антител

Такие методы необходимы для исключения ложноположительных образцов (пациентов), отобранных в результате скрининга. Для этой цели могут быть использованы разные подходы, но при выборе метода следует учитывать ограничения и характеристики методов скрининга. Простое повторение скринингового метода количественного определения в его оригинальной форме для подтверждения специфичности, как правило, недостаточно и нецелесообразно.

Методы градации специфичности антител

В некоторых случаях необходимо использовать дополнительные методы, позволяющие получить подтверждающую информацию о специфичности выявленных антител. Эти данные способствуют подтверждению специфичности иммунного ответа.

Методы определения нейтрализующей активности

Для оценки нейтрализующей способности антител обычно используют биологические методы. При этом необходимо выбрать или разработать такой метод, который бы наилучшим образом соответствовал биологическому лекарственному препарату. Количественное определение с использованием биологического метода, применяемого для определения специфической активности, например, при определении качества серии при ее выпуске, как правило, можно использовать и для анализа нейтрализующих антител. Однако для оптимального определения

нейтрализующей способности используемая методика зачастую требует доработки. При невозможности (недоступности) нейтрализующих методов количественного определения на основе клеток, допускается использовать методы конкурентного связывания с лигандом или другие альтернативы. Однако при их использовании необходимо подтвердить, что данные методы отражают нейтрализующую способность (активность) исследуемых антител.

4.3.3 Валидация методик

Валидация аналитической методики является непрекращающимся процессом на протяжении всей разработки препарата. В целях проверки возможности достижения поставленных целей используемые в основных (опорных) исследованиях методики требуют валидации. С помощью валидационных исследований необходимо подтвердить, что методики достаточно линейны и дают концентрационно-зависимые отклики на изучаемые аналиты, а также имеют достаточную правильность, прецизионность, чувствительность, специфичность и устойчивость. Во избежание межлабораторной вариабельности в рамках основных (опорных) клинических исследований предпочтительным является использование централизованной лаборатории. На пострегистрационном этапе также необходимо учитывать потенциальную межлабораторную вариабельность.

Валидацию также необходимо проводить для подтверждения того, что эффект матрицы, обусловленный реактивами или веществами, содержащимися в образцах, не влияет негативным образом на полученные результаты. Это можно осуществить путем проведения исследований «восстановления» («recovery») и наблюдая за влиянием таких веществ, содержащихся в матрице, на ответ, полученный в их отсутствие. Подобное исследование необходимо провести в отношении

всего диапазона разведений проб, используемых в анализах, и, по меньшей мере, в некоторых случаях в отношении предельных разведений, которые можно достоверно оценить.

Остаточное содержание биологического препарата в крови пациента может образовывать комплексы с антителами к нему и вследствие этого снижать поддающуюся обнаружению концентрацию антител. Данное обстоятельство может различным образом влиять на методику, в зависимости от ее разновидности, формата и типа антител. Существует несколько подходов к решению указанной проблемы, например, диссоциация иммунных комплексов кислотой, удаление избыточного количества биологического препарата путем твердофазной абсорбции, использование длительного периода инкубации и (или) использование методики, позволяющей проводить анализ в высоких разведениях. Сами подходы также подлежат валидации на применимость; решение об их использовании принимается в индивидуальном порядке. В некоторых случаях указанную проблему можно преодолеть, осуществляя отбор проб для оценки профиля антител спустя достаточное количество времени после введения препарата, что позволяет ему элиминироваться из кровотока до отбора проб. Однако такой подход не должен значительно усложнять процесс обнаружения антител и лечение пациента.

Стандартизация и контроль(и)

Аналитические методики необходимо стандартизовать, это требует подбора и (или) разработки соответствующих стандартных материалов, то есть использования соответствующих биологических стандартов и (или) хорошо описанных положительных и отрицательных контролей. Эти реактивы являются ключевыми для методики и необходимы для ее калибровки (градуировки) и валидации.

Стандартизация особенно важна для методик, используемых при изучении нежелательной иммуногенности, поскольку она тесно связана с интерпретацией результатов анализа и дифференциацией между серопозитивными и серонегативными образцами.

4.3.4 Установлению характеристик антител к терапевтическому белку

При обнаружении у пациентов, получающих лечение, индуцированных антител необходимо установить их клиническую значимость. К этим исследованиям относится иммунологическая и (или) биологическая оценка характеристик антител, а также изучение их влияния (или других проявлений индуцированного иммунного ответа) на действие лекарственного препарата. Некоторые исследования могут быть проведены без использования анализа антител в рамках исследований *in vitro*, однако при таком подходе может потребоваться клиническое обследование пациентов, получающих лечение.

Установление характеристик антител

Если у пациента индуцирована выработка антител, образцы сыворотки или плазмы необходимо охарактеризовать с точки зрения содержания антител (концентрация (титр)), их нейтрализующей способности и, возможно, других критериев, определяемых в каждом отдельном случае в зависимости от свойств биологического лекарственного препарата, целей исследования, особенностей пациентов, клинической симптоматики и других факторов. К ним может относиться необходимость определения класса и подкласса (изотипа) иммуноглобулинов, аффинность и специфичность антител. В зависимости от цели исследования и этапа разработки препарата объем установления характеристик может быть различным. Используемые методики должны соответствовать целевому назначению.

Антитела, присутствие которых в положительных образцах подтверждено, должны быть исследованы в отношении их специфичности к действующему веществу (белковому компоненту), а также, если возможно, дифференцировать их от антител, связывающихся с родственными и производственными компонентами. Известно, что антитела могут вырабатываться против всех и (или) любого из указанных веществ. Также желательно изучить перекрестную реактивность антител с другими лекарственными препаратами, содержащими сходные белки, и (если возможно и применимо) с их эндогенными аналогами.

Необходимо оценить нейтрализующую способность антител, обнаруженных в сероположительных образцах, поскольку обычно этот показатель коррелирует со снижением клинической эффективности биологического лекарственного препарата. В некоторых случаях имеет значение скрининг нейтрализующих образцов на наличие перекрестной нейтрализующей способности других лекарственных препаратов, содержащих такой же белок, или нейтрализации эндогенного белка, поскольку это может влиять на клиническую эффективность и безопасность применения исследуемого лекарственного препарата. Следует отметить, что нейтрализующая активность не обязательно соотносится с содержанием связывающих антител, т. е. образцы с высоким содержанием связывающих антител могут оказывать слабое нейтрализующее действие на биологическую активность, тогда как образцы с низким содержанием связывающих антител могут обладать различной степенью нейтрализующей способности (в зависимости от образца). Последнее обстоятельство зависит от лекарственного препарата и требует экспериментального изучения.

Стратегия оценки иммуногенности: дизайн и интерпретация

До начала оценки результатов клинических исследований необходимо тщательно и заранее продумать дизайн исследований иммуногенности, чтобы удостовериться, что в них включены все обязательные процедуры, а именно: выбор, оценка и установление характеристик аналитических методик; определение надлежащего режима отбора образцов, их объем; пробоподготовка и хранение, выбор статистических методов анализа данных. Это требуется в отношении методик, используемых для определения содержания антител и установлениях их характеристик, а также методов оценки клинического ответа в ответ на выработку антител, если последние образуются. Многое из вышеуказанного необходимо определять в индивидуальном порядке, принимая во внимание особенности лекарственного препарата, пациентов и ожидаемых клинических параметров. Эти исследования могут быть источником ценной информации о наличии высокой иммуногенности к биологическим препаратам, ее свойствах и потенциальных клинических последствиях. Они необходимы при изучении сравнительной иммуногенности биоаналогичных препаратов и изменении процесса производства зарегистрированных препаратов. Однако нежелательная иммуногенность может не обнаруживаться в рамках исследований, проводимых на предрегистрационном этапе, в силу ограниченного количества пациентов, в них участвующих. Ввиду вышеизложенного, зачастую, необходимо продолжать оценку иммуногенности и ее клинический последствий на пострегистрационном этапе в рамках фармаконадзора. В некоторых случаях в целях оценки риска, обусловленного нежелательным иммунным ответом, необходимы пострегистрационные клинические исследования.

Дополнительные подробности о методах оценки и описания иммуногенности приведены в Приложении 1 настоящей Главы.

4.4 Возможные клинические последствия иммуногенности

4.4.1 Влияние на эффективность

Факторы, которые определяют способность антител к терапевтическим белкам вызывать клинические последствия, включают распознаваемый эпитоп, аффинность, класс антител и количество выработанных антител, а также фармакологические свойства биотехнологического лекарственного препарата. Кроме того, влияние на клинический результат может оказывать способность иммунных комплексов активировать комплемент и скорость их элиминации. Считается, что антитела, распознающие эпитопы терапевтического белка, не связанные с проявлением активности этого белка, как правило, вызывают менее выраженные клинические последствия. Тем не менее, как указано ниже, такие антитела могут влиять на фармакокинетику и, тем самым, косвенно влиять на эффективность. Нейтрализующие антитела, подавляющие биологическое действие препарата путем связывания с активным центром (или расположенными вблизи него) или путем индукции конформационных изменений, могут быть причиной снижения эффективности. Должно быть проведено определение нейтрализующей способности антител в подтвержденных позитивных образцах с использованием соответствующих надежных аналитических методик (см. раздел 4.3). Крайне важно, чтобы методы, используемые для определения нейтрализующей способности, позволяли выявлять клинически значимые нейтрализующие антитела. Для определения зависимости между характеристиками антител и клиническим ответом требуется сравнение данных, полученных при оценке гуморального иммунного ответа (см. выше), с результатами изучения образцов, взятых от пациентов, и

результатами изучения клинического ответа (исхода). В большинстве случаев клинический эффект является специфичным для каждого отдельного препарата, например, увеличение популяции лейкоцитов под действием колониестимулирующих факторов либо повышение количества ретикулоцитов под действием эритропоэтина. Выбор такого типа исследований определяется свойствами лекарственного препарата и необходимостью их проведения. Во многих случаях бывает затруднительно идентифицировать клиническую конечную точку, достаточно чувствительную для подтверждения прямого влияния лекарственного препарата на клинический результат. Вариантом выхода из подобной ситуации может стать использование суррогатных конечных точек, например, фармакодинамических параметров или биомаркеров. Выбор подобных маркеров должен быть обоснован. Сравнение результатов лечения препаратом у пациентов до и после выработки антител может служить основанием для заключения о зависимости между выработкой антител (и их характеристиками) и клиническими результатами. Это может быть реализовано либо путем внутригруппового анализа (ответ пациентов до и после формирования антител), либо путем сравнения с пациентами, участвующими в исследовании, у которых иммунный ответ не развился.

4.4.2 Влияние на безопасность

Снижение эффективности и изменение профиля безопасности необязательно являются взаимосвязанными явлениями. Проблемы безопасности, например, реакции, обусловленные введением (инфузионные реакции), могут проявляться и в отсутствии изменения эффективности.

Немедленные последствия

У пациентов, в организме которых вырабатываются антитела, обычно развиваются реакции, обусловленные введением. Острые инфузионные реакции, включая анафилактические, могут развиваться во время введения

(в течение нескольких секунд) или через несколько часов после инфузии. Заявители должны различать понятия «инфузионные реакции» и «анафилаксия», а также подробно описывать симптомы, подпадающие под определение «реакции, обусловленные введением». «Инфузионные реакции» – это, как правило, симптомы, возникающие в тесной временной связи с введением препарата, и они необязательно являются проявлением анафилаксии или реакции гиперчувствительности. Тем не менее, острые реакции могут быть действительно аллергическими, а именно IgE-опосредованными реакциями I типа (анафилактические реакции), которые сопровождаются симптоматикой, включающей артериальную гипотензию, бронхоспазм, отек гортани или глотки, чихание и (или) крапивницу. Понятие «анафилаксия» должен применяться лишь в отношении таких проявлений, они являются абсолютным противопоказанием к дальнейшему применению препарата. Однако большинство инфузионных реакций сопровождаются менее специфичной симптоматикой, для некоторых препаратов они чаще возникают при первом введении; иногда менее частые/тяжелые реакции наблюдаются при повторном введении. В таких случаях инфузионная реакция может не являться противопоказанием к дальнейшему применению препарата. К симптомам, обусловленным введением препарата, относятся такие как головная боль, тошнота, повышение температуры тела, озноб, головокружение, «приливы», зуд, боли в грудной клетке или спине. Общеизвестно, что дифференциальная диагностика между инфузионными реакциями и анафилаксией может быть затруднительна, тем не менее, это разграничение очень важно ввиду различных клинических последствий этих состояний.

Заявители должны уделять внимание не только инфузионным реакциям и симптомам анафилаксии, которые могут развиться в ответ на введение препарата, но и другим проявлениям, поскольку последствия

иммуногенности зависят от индивидуальных свойств лекарственного препарата и могут сопровождаться неожиданными клиническими проявлениями.

Отсроченные последствия

Реакции гиперчувствительности замедленного типа иммунные комплексы

В дополнение к острым реакциям следует учитывать возможность развития гиперчувствительности замедленного типа (опосредованной Т-клетками) и реакций, опосредованных иммунными комплексами. Риск развития таких реакций возрастает с увеличением интервала между введением лекарственного препарата. Такие реакции гиперчувствительности замедленного типа следует четко отличать от инфузионных реакций. Заявители должны обеспечить систематический сбор данных об отсроченных клинических последствиях применения терапевтического белка. К клиническим проявлениям таких реакций относят миалгию, артралгию с повышением температуры тела, кожную сыпь, зуд и т.д., однако необходимо осуществлять систематический сбор данных и о других, более редких клинических симптомах.

Помимо влияния на фармакологические свойства, иммунные комплексы могут откладываться в тканях. Необходимо учитывать наличие сопутствующих заболеваний и критически оценивать потенциальное влияние иммунных комплексов на их течение, например, потенциальное ухудшение функции почек у пациентов с сопутствующей аутоиммунной патологией.

Перекрестная реактивность с эндогенными аналогами

Антитела, вырабатываемые в ответ на терапевтический белок, имеющий эндогенный аналог, могут перекрестно реагировать с последним, если образование эндогенного аналога сохранено

(например, эритропоэтины). Частью предрегистрационной программы разработки препарата должно быть углубленное изучение гуморального иммунного ответа и перекрестного связывания антител в сочетании со строгим наблюдением за клиническими последствиями. Опыт применения других подобных лекарственных препаратов может быть полезен, но только данного опыта как такового недостаточно.

Заявители, разрабатывающие лекарственные препараты нового поколения, такие как гибридные молекулы, совмещенные с физиологически функциональными молекулами, должны очень внимательно подходить к возможным последствиям перекрестной реактивности антител со всеми эндогенными компонентами.

4.5 Иммуногенность и клиническая разработка

4.5.1 Обоснование режима отбора образцов и кинетика гуморального иммунного ответа

Оценка иммуногенности должна быть частью клинических исследований, поскольку высока значимость ее корреляции с клинической эффективностью и безопасностью применения препарата. При проведении клинического исследования необходимо оценивать иммуногенность у всех субъектов исследования, а не ограничиваться лицами с клинической симптоматикой (т.е. обследовать только тех пациентов, у которых заподозрено изменение профиля безопасности или эффективности). В дополнение к запланированному периодическому отбору образцов у пациентов необходимо взять дополнительные образцы в случае возникновения каких-либо симптомов и при подозрении на развитие нежелательного иммунного ответа.

На развитие иммунного ответа на терапевтический белок влияют такие факторы как доза, режим дозирования и тактика лечения (см. 4.1). В связи с этим, режим отбора образцов для обнаружения иммунного

ответа необходимо адаптировать и подобрать индивидуально для каждого препарата с учетом его характеристик, включая фармакокинетические свойства. Необходимо всегда исследовать образцы, полученные до введения лекарственного препарата. Поскольку необходимо оценивать общую частоту проявления иммуногенности для данного препарата по всем показаниям, желательно, чтобы режимы отбора образцов были сопоставимыми с таковыми в других клинических исследованиях, что позволит обеспечить возможность прямого сравнения частоты появления антител к препарату. Любые отклонения от этого принципа должны быть обоснованы. Заявители должны попытаться стандартизировать режимы отбора образцов, проведения анализа, определения и т.д., принимая во внимание опыт работы с подобными лекарственными препаратами. Во время лечения образцы всегда следует брать до очередного введения препарата, поскольку остаточное содержание действующего вещества в плазме может искажать результаты количественного определения (см. раздел 4.3). Для обеспечения надлежащего качества исследуемого материала необходимо создать соответствующие условия хранения и транспортировки образцов.

Частота отбора образцов, а также сроки и объем проводимых анализов должны быть обоснованы, они зависят от степени риска, установленного в отношении конкретного лекарственного препарата, и возможных клинических последствий. В режиме необходимо предусмотреть регулярный отбор образцов и спланировать его таким образом, чтобы можно было отличить временно серопозитивных субъектов от пациентов со стойким образованием антител. Для определения общей иммуногенности препарата в заданных условиях необходимо учитывать результаты и тех и других. В частности,

набольшее значение имеет стойкий иммунный ответ, поскольку у пациентов со стойким формированием антител более вероятно развитие клинических последствий, влияющих на эффективность и безопасность, тогда как транзиторный гуморальный иммунный ответ может в последующем разрешиться без дальнейших последствий.

В отношении препаратов, предназначенных для длительного применения при хронических заболеваниях, может потребоваться изучение динамики и продолжительности наблюдаемого иммунного ответа. Усилия исследователей должны быть направлены на сбор данных о возможных изменениях характеристик антител с течением времени, например, изменение не-нейтрализующей активности антител на нейтрализующую, и по возможности – у каждого конкретного пациента. При планировании клинической программы по изучению иммуногенности необходимо в каждом отдельном случае, например при оценке степени риска, учитывать возможные последствия нежелательного иммунного ответа при долгосрочном применении. Более частый отбор образцов обычно практикуется на ранних этапах лечения, когда у пациентов обычно наблюдается самый высокий риск выработки антител. Поскольку долгосрочное лечение с большей вероятностью приводит к развитию иммунного ответа, в клинических исследованиях необходимо предусмотреть отбор образцов и на более поздних этапах лечения. Для препаратов, предназначенных для длительного непрерывного лечения, на предрегистрационном этапе необходимо получить данные по оценке иммуногенности в течение одного года. Любые отклонения необходимо полностью обосновать, например, более короткой экспозицией или различным объемом данных в связи с несколькими путями введения. Если предусмотрены разные пути введения, на этапе подачи заявления о регистрации лекарственного препарата заявитель должен обосновать

подход к оценке иммуногенности при всех путях введения. В зависимости от свойств лекарственного препарата и возможных рисков, обусловленных развитием нежелательного иммунного ответа, может потребоваться изучение достаточного количества экспозиций лекарственного препарата.

Для определения стойкости иммунного ответа, по возможности, необходимо провести анализ образцов, полученных после завершения терапии. Со временем, содержание антител к терапевтическому белку у пациентов, у которых они изначально образовались, может снижаться; однако возможна обратная картина, например, если лекарственный препарат обладает иммунодепрессивными свойствами и за счет этого подавляет иммунный ответ, в том числе в отношении себя.

Если применимо, заявитель должен в составе регистрационном досье представить врачам инструкцию, как работать с пациентами, у которых снизилась эффективность, например, увеличить дозу, сократить интервал между введениями или прекратить лечение.

Результаты иммунологических исследований необходимо включить в общую характеристику лекарственного препарата.

4.5.2 Влияние на фармакокинетику лекарственного препарата

Антитела, распознающие эпитопы, не связанные с активностью терапевтического белка, как правило, вызывают менее выраженные клинические последствия. Тем не менее, такие антитела могут влиять на фармакокинетику и, опосредованно, на эффективность. «Элиминирующие» антитела могут быть нейтрализующими или не обладать такой активностью (не-нейтрализующие антитела); они могут снижать эффективность за счет удаления терапевтического белка из кровотока. В некоторых случаях не-нейтрализующие (связывающие) антитела могут даже повышать эффективность лекарственного препарата, благодаря увеличению периода полувыведения действующего вещества или стимуляции механизмов его

действия. Нейтрализующие антитела могут инактивировать лекарственный препарат, как за счет повышения его клиренса, так и без вовлечения этого механизма. При необходимости снижение эффективности может быть описано в соответствии с принципами стратегии анализа, описанными в разделе 4.3. Изменение фармакокинетики может быть ранним признаком формирования антител. При обнаружении антител во время проведения исследований в соответствии с клинической программой необходимо изучать их возможное влияние на фармакокинетику лекарственного препарата (см. также документ Союза по клиническим исследованиям фармакокинетики терапевтических белков).

4.5.3 Методологические аспекты оценки сопоставимости иммуногенного потенциала как элемента сравнительных исследований

Известно, что внесение изменений в процесс производства может повлиять на иммуногенность лекарственного препарата. При изменении процесса производства зарегистрированного лекарственного препарата проводят поэтапные исследования сопоставимости (см. главы 9.1 и 9.2). Если результаты первичных физико-химических и биологических испытаний указывают на различия между лекарственными препаратами, полученными до и после внесения изменений в процесс производства, необходимо рассмотреть возможные последствия внесенных изменений на показатели безопасности и эффективности, включая влияние на иммуногенность. Даже если при первичных физико-химических и биологических испытаниях различия не выявлены, необходимо принимать во внимание изменение иммуногенности вследствие невыявленных причин. Объем исследований иммуногенности, при их необходимости, должен быть определен на основании анализа рисков с учетом характера наблюдаемых различий, возможного влиянии на клиническую картину заболевания, а также опыта, ранее накопленного

при разработке данного лекарственного препарата и для лекарственных препаратов этого класса. Выбор соответствующей категории пациентов необходимо осуществить так, чтобы наилучшим образом проследить все различия, не ограничиваясь только оценкой показателей иммуногенности. В целях проведения таких сравнений заявителям необходимо предпринять усилия для выбора однородной и клинически подходящей популяции пациентов. Ввиду ожидаемых различий в восприимчивости, данные об иммуногенности, полученные от здоровых добровольцев, не являются подходящей альтернативой. В целях подтверждения того, что изменение процесса производства не повлияло на эффективность и безопасность, иммуногенность большинства лекарственных препаратов изучают у ранее не леченых пациентов в рамках клинического исследования. Оценку иммуногенности как части клинического исследования при изучении сопоставимости предпочтительно проводить путем прямого сравнения лекарственного препарата, полученного до изменения процесса производства и после него. Необходимо использовать те же аналитические методики.

Изменения иммуногенности в результате изменения процесса производства могут потребовать специальной стратегии и обновления плана по управлению рисками (см. раздел 4.6). При наличии риска развития редких иммуноопосредованных нежелательных явлений, их можно оценить после внесения изменений на этапе пострегистрационного применения препарата.

4.5.4 Иммуногенность у детей

Терапевтические белки все чаще начинают применять у детей. Известно, что иммунный ответ ребенка отличается от такового взрослого человека.

При изучении препарата у детей тщательному выбору и обоснованию подлежат режим дозирования и тактика лечения. По возможности результаты исследований следует анализировать по возрастным группам, а данные по иммуногенности оценивать и представлять отдельно для каждой возрастной группы, что позволит выявить потенциально уязвимые группы.

Относительно заместительной терапии, рекомбинантные технологии позволили разработать белки, применяемые при генетических нарушениях. Наиболее вероятными субъектами клинических исследований таких лекарственных препаратов являются дети, которые могут быть подвержены повышенному риску образования антител.

4.6 План управления рисками

В состав регистрационного досье должен быть включен план управления рисками в соответствии с правом Союза в сфере обращения лекарственных средств, рекомендациями по фармаконадзору, включая правила надлежащей практики фармаконадзора. Вопросы иммуногенности всегда должны быть предметом рассмотрения в плане по управлению рисками (ПУР) с учетом всех рисков, выявленных во время разработки лекарственного препарата, а также потенциальных рисков и последствий нежелательного иммунного ответа у пациентов. Описание рисков и деятельность, направленная на минимизацию рисков, должны соответствовать принципам, изложенным в данной Главе. Следует подчеркнуть, что оценка иммуногенности основывается на междисциплинарном подходе и требует обязательного участия специалистов по качеству, доклиническим и клиническим исследованиям.

Объем данных по иммуногенности, которые могут быть получены в ходе программы клинической разработки биотехнологического лекарственного препарата до его регистрации, зависит от частоты

развития явлений, обусловленных иммуногенным потенциалом белка и частотой встречаемости заболевания. Таким образом, после регистрации может понадобиться дальнейшее систематическое изучение иммуногенности, что необходимо отразить в плане управления рисками.

Объем данных об иммуногенности, который необходимо собрать на пострегистрационном этапе, зависит от различных факторов, включая:

– факторы, опосредованные заболеванием, такие как распространенность, восприимчивость пациентов, доступность альтернативных способов лечения, продолжительность лечения и др.;

– данные по иммуногенности, полученные до регистрации, включая влияние на эффективность и безопасность;

– данные об опыте применения аналогичных белков или членов того же класса с оценкой проявлений иммуногенности, включая белки, полученные с помощью аналогичных производственных процессов;

– серьезность иммунных реакций.

Однако белки, полученные с использованием биотехнологических методов, следует рассматривать индивидуально, и, следовательно, возможность экстраполяции данных, полученных на других сходных белках, можно использовать ограниченно и только с полным обоснованием.

В последующем иммуногенность можно изучать на пострегистрационном этапе, например, путем усиленного сбора данных о возможных иммунноопосредованных нежелательных явлениях (включая снижение эффективности), или при проведении фармакоэпидемиологических исследований.

Поскольку систематический отбор образцов на пострегистрационном этапе затруднителен, необходимо уметь выявлять потенциальные нежелательные иммунные реакции на основании подозрительных сигналов о безопасности и (отсутствии) эффективности. Данное обстоятельство требует заблаговременного отражения в ПУР оценки таких явлений. Держатель регистрационного удостоверения должен разработать стандартизированный алгоритм подробного расследования случаев, подозрительных в отношении иммунного ответа, включая методы подтверждения образования антител.

План по управлению рисками должен включать следующее:

– идентификацию и описание рисков (например, описание случаев, методики количественного определения антител);

– мониторинг рисков (например, особые модели, выявляющие взаимосвязь между риском и лекарственным препаратом);

– стратегии минимизации и ослабления рисков (например, при необходимости – возможность использования только внутривенного введения, мероприятия при обнаружении риска и т.д.);

– оповещение по вопросам рисков (например, сообщение врачам и пациентам о способах минимизации и ослабления рисков, распространение среди врачей информации об аналитических системах и специфичных методах анализа для выявления антител);

– мониторинг мероприятий, необходимых для обеспечения эффективной минимизации рисков.

Заявители должны учитывать новые данные об иммуногенности путем принятия соответствующих мер, например, внесением в информацию о лекарственном препарате, обновлением ПУР и другими

мероприятиями по минимизации риска (например, образовательными программами и т. д.). При планировании оценки иммуногенности на пострегистрационном этапе в большинстве случаев применимы рекомендации, которые представлены в предыдущих разделах настоящей Главы.

При изменении процесса производства его последствия на иммуногенный потенциал необходимо отразить в ПУР.

ПРИЛОЖЕНИЕ № 1

к Главе 11 Правил проведения исследования
биологических лекарственных препаратов

Характеристика методов и оценки иммуногенности

Разновидности количественного определения антител

Методы скрининга

Необходимость скрининга относительно большого количества образцов требует использования высокопроизводительных аналитических методик с высокой степенью автоматизации. К этим методам относятся иммунологические методы, а также радиоиммунопреципитация и поверхностный плазмонный резонанс. Все они направлены на выявление взаимодействия между антигенами и антителами (связывание), но основаны на разных научных (технических) принципах.

Иммунологические виды анализа представляют большую группу методик и основаны на разнообразных способах и системах обнаружения. К ним относятся аналитические методики, выявляющие прямое связывание, связующие методики, методики захвата (сэндвич-анализ) и конкурентные иммунологические анализы, основанные на радиолигандных, ферментных, флюоресцентных, хемилюминесцентных и электрохимических люминесцентных системах обнаружения.

Методы, подтверждающие наличие антител

Для этих целей можно использовать различные аналитические методики; ввиду меньшего, по сравнению с методами скрининга, количества образцов, подлежащих анализу, здесь высокая производительность играет меньшую роль. В целях подтверждения специфичности, необходимо включать методики, позволяющие ее

оценить. Например, добавление избыточного количества антигена в образец до начала работы с методиками связывания, приводит к абсорбции антител и, как следствие, снижению частоты положительных сигналов от истинно серопозитивных образцов. Выявление в качестве анализируемого вещества иммуноглобулинов в некоторых аналитических методиках, например, путем использования антииммуноглобулиновых реактивов, может помочь в обнаружении доподлинно серопозитивных образцов.

В некоторых сложных случаях рекомендуется использовать аналитические методики, основанные на иных научных (технических) принципах, чем используемые в методах скрининга. Кроме того, следует учитывать различие характеристик используемых методик, например, их различную чувствительность.

Методы градации специфичности антител

Для дифференцирования специфичности выявленных антител используют аналитические иммунологические методы, такие как иммуноблоттинг и радиоиммунопреципитация.

Методы определения нейтрализующей активности

В зависимости от свойств лекарственного препарата для определения нейтрализующей активности антител могут быть использованы биологические методы количественного определения, включая функциональные.

Обычно для анализа выбирают определенную концентрацию биологического лекарственного препарата, а разведения используют для оценки ингибирующего действия при снижении концентрации антител. Это позволяет определить нейтрализующую дозу и рассчитать нейтрализующую способность (титр) антител для каждого образца.

Методы оценки клеточного иммунного ответа

Стратегия оценки клеточного иммунного ответа, обусловленного биологическим лекарственным препаратом, как правило, сложнее по сравнению с оценкой гуморального ответа. Если такие испытания необходимы, требуется их специальная разработка и выбор метода для каждого конкретного случая индивидуально. В большинстве случаев развитие эффективного ответа с участием IgG обусловлено участием антигенспецифных Т-хелперов.

Примерами методов количественного определения, используемых для обнаружения (оценки) клеточного иммунного ответа, являются методы определения стимуляции (пролиферации) Т-клеток, а также методы оценки выработки (высвобождения) цитокинов (например, IL-2, IL-4, ИФН-гамма). Это предполагает использование Т-клеток, иногда совместного культивирования Т-клеток с клетками других популяций, например дендритными клетками. Для этих целей обычно используют метод иммуноферментных пятен (Elispot) и проточную цитометрию. В некоторых случаях используют анализ клеточно-опосредованной цитотоксичности.

Иногда необходимо использовать более детальные исследования, включающие оценку клеточного иммунного ответа. Изучение В-клеток памяти (некоторых случаях Т-клеток памяти) может дать полезную информацию о природе иммунного ответа, результаты исследования также могут иметь прогностическую ценность в отношении потенциальной иммуногенности исследуемого лекарственного препарата. С этой целью могут быть проведены исследования с использованием пептидов или белков (в зависимости от вида анализа и его целей) и использован метод иммуноферментных пятен. В других случаях могут быть полезны более сложные исследования клеточного иммунитета, например изучение регуляторных Т-клеток. В зависимости

от целей и задач необходимость в таких исследованиях должна рассматриваться индивидуально.

Характеристики аналитических методов

Выбор, оптимизацию и анализ результатов испытаний следует выполнять в соответствии с поставленными задачами. Важность и требования к характеристикам методов (перечень некоторых из них приведен выше в подразделе «Методы скрининга») зависят от используемой методики. Например, может отсутствовать необходимость в высокой чувствительности метода, если его не используют для определения содержания антител, выработанных в ответ на лечение определенным биологическим лекарственным препаратом. Нецелесообразно разрабатывать и использовать высокочувствительные методы для определения таких антител, особенно если чувствительность метода достигается в ущерб других важных характеристик, например, специфичности, устойчивости.

Выбор самого простого метода, удовлетворяющего всем требованиям, является разумным подходом, особенно при высокой значимости большой производительности, например при скрининге. Тем не менее, следует внимательно следить, чтобы это отрицательно не сказывалось на других этапах оценки иммуногенности. Например, прямой иммуноферментный анализ (ИФА) с антигеном, иммобилизованным на поверхности лунок планшета, представляет простейший вид испытания, но он характеризуется очень большим количеством ложноположительных результатов. Кроме того, для этих методов характерна высокая частота ложноотрицательных результатов при использовании образцов, содержащих низкоаффинные антитела или определенные их изотипы или подклассы. Во избежание вышеуказанных проблем необходимо выбрать более подходящий вид анализа, например «связующие» методы, электрохемилюминесценцию или

поверхностный плазмонный резонанс. Могут встречаться ложноотрицательные результаты скринингового метода, обусловленные маскировкой эпитопов. Во избежание этого следует придерживаться соответствующей стратегии, например, использовать методы, при выполнении которых специфическая маскировка определенных эпитопов невозможна.

Стандартизация, стандартные материалы, хорошо охарактеризованные контроли и валидация методик

Для всех видов методик необходимы серопозитивные стандартные образцы (материалы, контроли). Они используются для подтверждения отклика методики и ее калибровки (градуировки). По возможности, они должны являться препаратами крови человека с высоким содержанием антител, полученными в достаточном количестве для продолжительного использования. Их свойства должны быть хорошо охарактеризованы; хранение такие материалов осуществляют в надлежащих условиях (в виде лиофилизата или замороженными при подходящих температурах). Стандартные препараты для биологических методов количественного определения, направленных на определение нейтрализующей активности, должны обладать высокой нейтрализующей способностью, однако, по меньшей мере, для проведения валидации, необходимо располагать препаратами антител, не обладающими нейтрализующей активностью.

Вместе с тем, в ряде случаев для приготовления необходимых стандартных препаратов в наличии может не оказаться достаточного количества плазмы человека. В этой ситуации наилучшим подходом, который в дополнение ко всему позволяет избежать проблем в силу особенностей определенного донора, является объединение образцов. Иногда объема человеческой плазмы не хватает не только для

объединения, но она может вообще отсутствовать, например, на ранней стадии разработки, в таких случаях единственно возможным решением является использование плазмы животных. При этом требуется тщательный выбор вида животных, а применение такой плазмы носит ограниченный характер по сравнению со стандартными препаратами, полученными из крови человека. Например, иммунохимические анализы, включающие использование антител к человеческим иммуноглобулинам, могут давать ложные результаты при инкубации с нечеловеческими антителами, а результаты любых исследований могут отличаться от результатов, полученных при изучении антител человека, содержащихся в человеческой плазме.

В силу гетерогенности структуры, специфичности и авидности иммуноглобулинов, содержащихся в стандартах образцах и пробах, калибровка (градуировка) иммунологических методов анализа является трудной задачей. Это обуславливает сложность, если не невозможность, прямого правильного сравнения испытуемых образцов и стандартных материалов, особенно по их массе. Вследствие чего калибровку таких методов анализа необходимо осуществлять, используя хорошо описанные приемлемые обоснованные подходы. Одним из способов может служить представление результатов иммунологических методов анализа в виде титра, основанное на стандартных процедурах вычисления его значения. Другим способом является вычисление относительной концентрации антител в испытуемых образцах и положительных контролях.

Биологические методы анализа, используемые для оценки нейтрализующей способности антител, необходимо калибровать с помощью международных стандартных образцов (стандартных препаратов) (при их наличии). Это позволяет выразить

нейтрализующую активность в понятных единицах биологической активности лекарственного препарата (препарата крови) и получить необходимую информацию для валидации аналитических методик. При недоступности указанных стандартов, необходимо разработать собственные препараты. Во многих случаях рекомендуется выражать нейтрализующую способность образцов по их объему, необходимому для нейтрализации постоянной биологической активности препарата, например, в мл плазмы или заранее заданных единицах биологической активности биологического препарата. В иных случаях допускается использовать разведение образцов или титр, необходимый для нейтрализации биологической активности препарата.

Также настоятельно рекомендуется располагать набором стандартных материалов, содержащих различные количества антител, и набором антител с различными свойствами, которые можно использовать для установления характеристик и валидации аналитических методик и которые могут служить показателями их функциональности. По возможности, они должны включать один или более препаратов с низким содержанием антител (близким к нижнему пределу обнаружения) и препаратов антител с низкой авидностью.

В целях определения исходных параметров аналитической методики, установления характеристик и валидации необходимы негативные стандартные образцы и контроли. Исходные параметры аналитической методики у здоровых субъектов можно с легкостью определить путем определения ее результатов при анализе образцов, полученных от достаточного числа таких субъектов и их анализа с целью получения статистически надежных исходных значений. Однако этот способ может не позволить охарактеризовать исходные параметры аналитической методики при анализе образцов, полученных от

пациентов, поэтому такие параметры придется определять отдельно, используя образцы от пациентов, полученных до начала лечения, или образцы, полученные от других подходящих субъектов. Как бы то ни было, в образцах некоторых субъектов (пациентов) могут содержаться антитела, выработанные еще до начала лечения, или другие вещества, которые могут давать значительные ложноположительные результаты, поэтому в целях обеспечения правильной интерпретации результатов, полученных после начала лечения, необходим скрининг пациентов.

Необходимо установить требования и подобрать приемлемые спецификации для используемых в анализах реактивов, по меньшей мере, важнейших.

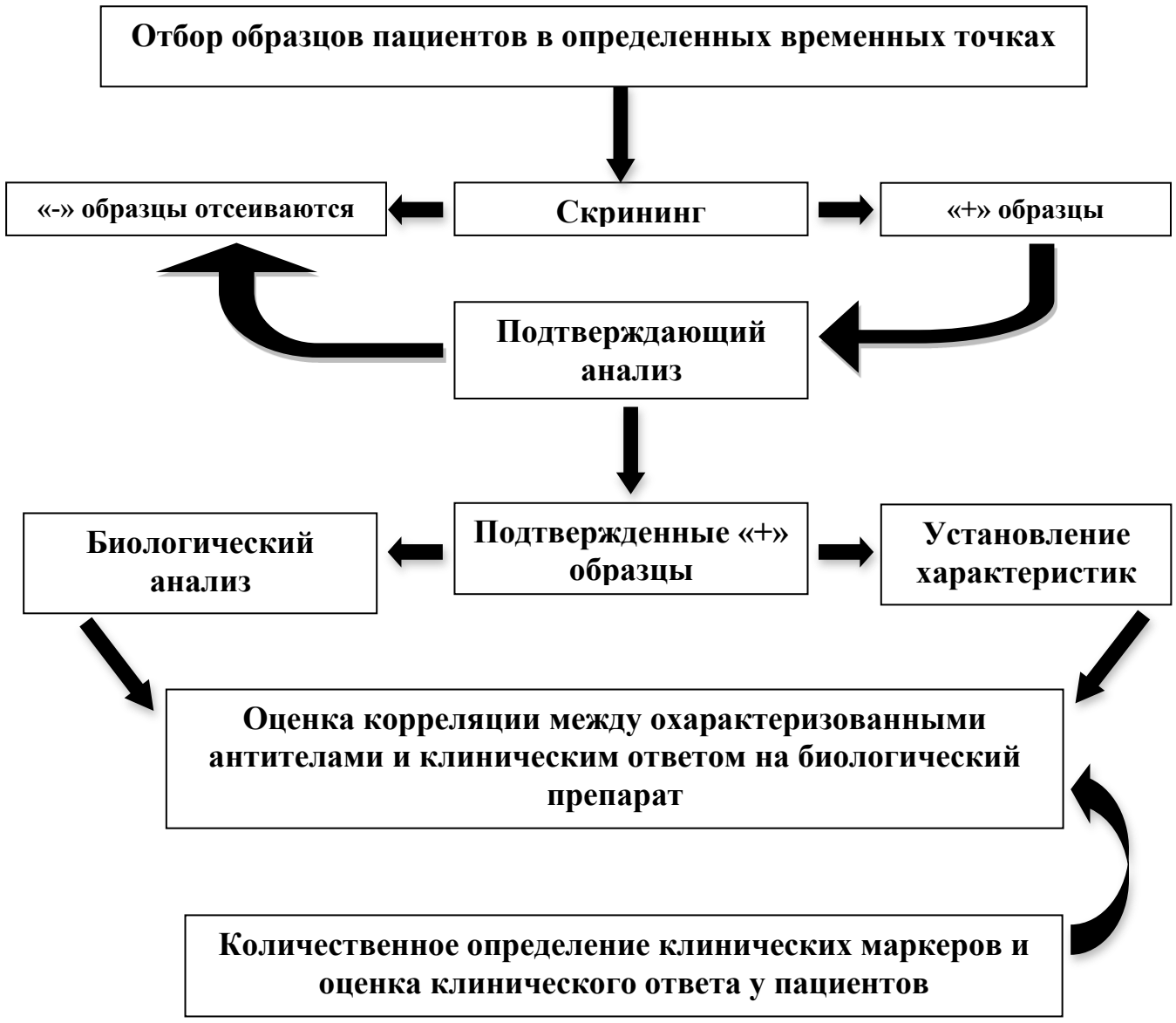
Интерпретация результатов

Необходимо установить четкие критерии разделения образцов на серопозитивные и серонегативные, а также критерии подтверждения положительного результата. Подходы к решению этой задачи могут быть разными в зависимости от метода и других факторов, что требует должного обоснования. Общим способом определения порога принятия результата как положительного при выполнении иммунологических методов является установление исходных параметров (см. выше). Для определения значения такого порога рекомендуется использовать статистические методы. С другой стороны, допускается использование реальных данных (например, удвоенное значений, установленное при изучении исходных параметров) в качестве минимального положительного значения.

ПРИЛОЖЕНИЕ № 2

к Главе 11 Правил проведения исследования
биологических лекарственных препаратов

Пример стратегии выявления и характеристики антител



«-» – отрицательный

«+» – положительный

ГЛАВА 12. ОЦЕНКА ИММУНОГЕННОСТИ ПРЕПАРАТОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ IN VIVO

Резюме

В данной главе рассматриваются вопросы, связанные с проявлениями нежелательной иммуногенности препаратов моноклональных антител (МкАТ), предназначенных для клинического использования. Рассмотрены клинические аспекты, связанные с проявлением иммуногенности, факторы риска и безопасности применения лекарственных препаратов МкАТ, приведен анализ проблем, возникающих при оценке нейтрализующих антител, выработка которых индуцирована препаратами МкАТ.

1. Введение

Проявление нежелательной иммуногенности может быть значительной проблемой в случае использования для лечения больных лекарственных препаратов, получаемых с использованием биотехнологии и генной инженерии. Рекомендации по оценке иммуногенности лекарственных препаратов на основе белков, полученных с использование биотехнологии, представлены в Главе 11 настоящих Правил, которые, в принципе, применимы и к лекарственным препаратам МкАТ. Несмотря на то, что многие аспекты иммуногенности МкАТ не отличаются от аспектов иммуногенности других терапевтических белков, некоторые из них требуют более пристального рассмотрения. В настоящей главе отражены как общие, так и конкретные положения, которые в первую очередь должны быть отнесены только к препаратам МкАТ. Предполагается, что лекарственные МкАТ при клиническом использовании не индуцируют

выработку антител, которые проявляют перекрестную активность и нейтрализуют соответствующий эндогенный белок, как это может произойти с рекомбинантным эритропоэтином (EPO), поскольку указанные препараты МкАТ не используются в качестве заместительной терапии. Чаще всего лекарственные препараты МкАТ используются в качестве терапевтических или диагностических средств. Тем не менее, некоторые специфичные аспекты иммуногенности характерны исключительно или преимущественно для препаратов МкАТ или новых препаратов на основе модифицированных МкАТ (например, Fab-фрагментов, scFv – одноцепочечных Fv-фрагментов, нанотел, миниантител), которые рассматриваются в данной главе.

Препараты МкАТ представляют значительную и очень важную подгруппу биологических лекарственных препаратов. Диапазон клинических показаний для возможности использования МкАТ при лечении тяжелых длительно протекающих заболеваний очень широк. Как известно, применение многих препаратов МкАТ сопровождается проявлениями нежелательной иммуногенности, в некоторых случаях это приводит к неполноценному клиническому ответу или развитию редких серьезных неблагоприятных реакций, которые требуют клинического вмешательства. Однако разрабатываемый широкий спектр новейших препаратов МкАТ и различные клинические показания для их применения исключают возможность разработки индивидуальных указаний для каждой конкретной группы препаратов МкАТ, характеризующихся определенной специфичностью.

2. Область применения

Общие принципы, изложенные в настоящей Главе, касаются вопросов разработки и проведения систематической оценки нежелательного

иммунного ответа в сравнении с терапевтическим или диагностическим эффектом МкАТ, развивающегося их использовании у пацентов. Требования относятся к препаратам МкАТ, их производным (например, Fab фрагменты, ScFv, наноантитела, миниантитела) и продуктам, содержащим компоненты МкАТ (например, конъюгаты, Fc- связанные гибридные белки – белки слияния).

В данной главе рассматриваются основные аспекты качества и клинические проявления, имеющие важное значение для адекватного решения проблем выявления и оценки риска развития нежелательного иммунного ответа на применение конкретного препарата МкАТ у пациентов с определенным клиническим показанием.

Положения, приведенные в настоящей Главе, распространяются на препараты находящиеся на завершающей стадии разработки, в частности, на этапе подачи заявки на регистрацию, однако многие положения относятся и к более ранним этапам разработки препаратов МкАТ.

3. Общие положения

Данную главу следует рассматривать в совокупности с другими разделами настоящих Правил и соответствующими документами Союза.

4. Проблемы скрининговых и подтверждающих исследований, используемых при оценке иммуногенности препаратов моноклональных антител

4.1. Аналитические методы выявления антител

В принципе, для измерения концентрации индуцированных антител, специфичных к препарату МкАТ могут быть использованы

любые виды иммуноферментного анализа. Однако, их применение для этих целей часто является трудно выполнимым и технически сложным, это связано с тем, что многие стандартные виды иммуноферментного анализа предполагают использование анти-иммуноглобулиновых реагентов, таких как антитела к иммуноглобулинам, протеинов A или G. Методики для выявления антител, специфичных к антигенным детерминантам МкАТ, не предполагают использования таких реагентов, поскольку они часто обладают способностью неспецифического связывания с самим препаратом МкАТ. Простые схемы ИФА (ELISA) и методы радиоиммуной преципитации, как правило, не пригодны для выявления антител к МкАТ, если эти методики не адаптированы к конкретному препарату и не подобраны условия для преодоления указанной выше проблемы. Именно поэтому, должны быть разработаны другие подходы к методам анализа, предназначенным для выявления антител к МкАТ. Общий подход состоит в использовании формата анализа bridge-методом, например, методики ИФА и электрохемилюминесценции (ECL), которые не требуют использования анти-иммуноглобулиновых реагентов и могут быть применены в исследованиях с МкАТ. Однако в некоторых случаях они могут быть менее чувствительны, чем другие методы иммуноанализа, в таких случаях может потребоваться разработка соответствующего адекватного метода. Кроме того, отдельные методики также не эффективны для выявления IgG_4 антител, которые могут быть индуцированы в некоторых случаях применения препаратов МкАТ. Другой подход заключается в использовании метода определения константы связывания макромолекул, основанного на явлении поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Данный метод не требует использования анти-иммуноглобулиновых реагентов для выявления

антител, специфичных к МкАТ. Анализ проводится в режиме реального времени и, следовательно, метод достаточно быстродействующий и позволяет быстро определять диссоциирующие антитела, которые могут быть пропущены другими методами.

Поскольку метод SPR только обнаруживает и регистрирует связывание белка с чипом, покрытым молекулами антигена, для подтверждения того, что сигнал вызван связыванием антителами, необходимы дополнительные подтверждающие исследования. Следует отметить, что метод SPR может быть менее чувствительным по сравнению с другими методами определения высоко аффинных антител и, в случае отсутствия автоматизированных систем отбора проб, может потребовать значительно больших временных затрат на его выполнение.

Необходимо учитывать, что исследуемые образцы (обычно сыворотка или плазма) могут содержать вещества, которые мешают постановке метода анализа, т. е. эффект матрицы в данном случае приводит к ложноположительным или отрицательным результатам и, следовательно, к неправильной интерпретации результатов при оценке содержания антител в исследуемом образце. Хорошо известными примерами таких интерферирующих веществ являются компоненты системы комлемента; белок, связывающий маннозу; Fc-рецепторы; растворимые молекулы-мишени; рецептор комплемента 1 (CR1) и ревматоидный фактор, однако и другие вещества, включая сам препарат, также могут создавать подобные проблемы. Поэтому для снижения воздействия различных артефактов и достижения приемлемого уровня фонового сигнала, достаточной чувствительности и специфичности методики должны быть специально адаптированы.

Должны быть представлены обоснования пригодности выбранной методики определения антител с учетом соответствующих ограничений.

4.2. Наличие препарата моноклональных антител в образцах для анализа

Лекарственные препараты МкАТ имеют относительно длительный период полувыведения и сохраняются в циркуляции в течение длительного периода времени. Даже фрагменты антител могут сохраняться в крови в течение нескольких дней. Присутствие препарата МкАТ в образцах, взятых для анализа антител, может сильно мешать определению иммунного ответа. Обычно это приводит к ошибочно-низкой оценке содержания антител в таких образцах, иногда настолько выраженной, что она приводит к ложноотрицательным результатам. Для преодоления этой проблемы существует несколько способов. Один из них заключается в более позднем взятии образцов для анализа, т.е. после того срока, когда уровень МкАТ снизится до достаточно низкого уровня, чтобы не стать причиной указанных проблем. Такой подход решает проблему с некоторыми препаратами МкАТ, но требует тщательного анализа и обоснования, т.к. не исключает возможности не определить иммуногенности, поскольку уровень индуцированных антител ко времени взятия образца может снизиться до неопределяемого уровня. Другой подход заключается в использовании методик, которые менее зависимы от этой проблемы. Некоторые методики, такие как метод электрохемилюминесценции (ECL), менее зависимы от остаточного содержания препарата в образцах, чем другие методы, включая традиционные иммуноферментные анализы (ИФА) bridge-методом. Для преодоления данной проблемы может быть использована процедура предварительной диссоциации комплекса антиген-антитело, как один из этапов в дизайне анализа, при котором

любые комплексы разрушаются перед этапом выявления антител. Различные варианты этого анализа, которые включают обработку исследуемых образцов при низких значениях pH, иногда в сочетании с аффинным разделением продукта, могут быть использованы, но нуждаются в тщательной оценке, чтобы подтвердить, что дополнительные процедуры не влияют на окончательные результаты анализа. Наконец, одним из возможных подходов является разбавление образцов, для того чтобы остаточное содержание препарата МкАТ, присутствующего в образце, не могло помешать проведению анализа. Такой подход также нуждается в тщательном предварительном анализе, поскольку он может привести к получению ложноотрицательной оценки иммуногенности, если чувствительность методики недостаточна для обнаружения антител в разбавленных образцах. В некоторых случаях может быть необходимым определение остаточного содержания МкАТ в исследуемых образцах. Следует учитывать, что во многих случаях, во время разработки, валидации и тестирования метода определения анти-МкАТ используется сочетание всех трех подходов с целью снижения до минимума влияния лекарственного препарата, обуславливающего эффекты интерференции.

4.3. Подтверждающие анализы

При выполнении подтверждающих тестов могут возникать те же проблемы, что и при скрининговых исследованиях. Важно выбрать соответствующий подтверждающий тест с учетом характеристик методик, используемых при скрининге. Использование протеина А или протеина G может быть уместным в подтверждающих тестах, для того чтобы продемонстрировать, что положительный результат действительно связан с выявлением иммуноглобулина, однако для этих целью могут быть использованы и другие подходы.

4.4. Контрольные образцы

Получение и использование положительной контрольной сыворотки является критическим этапом при проведении исследований по оценке иммуногенности МкАТ. Выбор положительной контрольной сыворотки или очищенного антитела очень важны для обеспечения чувствительности и специфичности анализов, выполняемых при мониторинге исследуемых образцов. Если соответствующая положительная сыворотка крови человека не доступна, что возможно на ранних этапах разработки препарата, единственным выходом является использование сыворотки животных. При этом выбор видов животных для этой цели может иметь серьезные последствия. У нечеловекообразных приматов развивается выраженный иммунный ответ, проявляющийся в формировании антител к CDR региону и константному региону МкАТ человека или гуманизированных МкАТ. Данный ответ имитирует иммунную реакцию человека на введение препарата МкАТ, и поэтому такие антитела животных могут быть использованы в качестве положительного контроля. Однако у животных, которые не являются приматами, обычно в первую очередь формируются антитела против константного региона иммуноглобулина МкАТ, что отличает их ответную реакцию от реакции у человека. Использование анти-идиотипической антисыворотки или соответствующих МкАТ в некоторых случаях возможно в качестве положительного контроля. Выбор отрицательного контроля также является не менее важным. Для подтверждения специфичности реакции при проведении подтверждающих анализов в качестве отрицательного контроля могут быть использованы образцы нерелевантных МкАТ другой специфичности.

5. Оценка нейтрализующей способности антител, индуцированных лекарственным препаратом моноклональных антител

МкАТ проявляют свою активность при помощи различных механизмов – от простого связывания с антигеном, который один опосредует клинический эффект, до связывания антигена и опосредованного запуска одного или более иммунобиологических механизмов, которые совместно формируют общий клинический ответ. В связи с этим, хотя простое связывание МкАТ с антигеном-мишенью может показаться единственным механизмом для достижения клинической эффективности, другие эффекты также могут играть определенную роль. В некоторых случаях многочисленные функции МкАТ могут за счет аддитивного или синергического воздействия вызывать общий комбинированный клинический эффект. Экспериментально трудно проанализировать, за счет каких механизмов проявляется клиническое действие препаратов МкАТ. Так, при использовании МкАТ трудно предполагать, что Fc-опосредованные иммунобиологические эффекты не участвуют в проявлении клинической эффективности препарата, даже если специфическое связывание с антигеном рассматривается в качестве основного механизма, опосредующего его клиническое действие. В связи с этим, использование для оценки нейтрализующей активности антител методик, выполняемых на клетках, имеет ряд преимуществ. В этих случаях необходимо провести подробную биологическую характеристику МкАТ, используя в каждом конкретном случае соответствующие биологические и иммунологические методы. После характеристики свойств МкАТ необходимо выбрать соответствующие

методики для определения нейтрализующей активности антител, индуцированных препаратом МкАТ.

Антитела, которые способны нейтрализовать биологическую активность лекарственного препарата МкАТ, могут снизить его клиническую эффективность. Стандартный подход заключается в том, что нейтрализующая способность любых индуцированных антител должна быть выявлена и количественно оценена. Все отклонения от этого следует обосновать. Для большинства биологических препаратов наиболее приемлемым методом анализа соответствующих нейтрализующих антител является метод биоанализа, в котором биологическая активность препарата нейтрализуется антителами. Учитывая механизм действия МкАТ, предполагается, что индуцированные препаратом антитела, которые блокируют связывание МкАТ с целевой мишенью и вызывают снижение его клинической эффективности. Поэтому, предпочтительными методами анализа нейтрализующих антител к МкАТ могут быть методы конкурентного связывания с лигандами, а не классические биологические методы анализа. Это отличает препараты МкАТ от других классов биологических препаратов в отношении оценки их иммуногенности.

6. Оценка безопасности и факторов риска, обусловленных проявлением иммуногенности препаратов моноклональных антител

6.1. Идентификация риска

Иммуногенность МкАТ сложное явление. Есть ряд часто встречающихся, но при этом плохо изученных факторов, затрудняющих достоверный прогноз того, сможет ли терапевтическое или диагностическое МкАТ вызвать клинически значимый иммунный ответ. Были разработаны доклинические методы *in vitro*, направленные на

выявление Т-клеточных эпитопов, но они обладают ограниченной способностью прогнозировать иммуногенность лекарственного препарата МкАТ у человека в клинических условиях. Однако такие исследования могут быть полезны для выбора кандидатных молекул для дальнейшего изучения в плане возможного формирования иммунных реакций у человека.

Стандартные исследования иммуногенности, описанные в Главе 11 настоящих Правил, следует проводить для каждого нового лекарственного препарата МкАТ с учетом его характеристик, способа применения и терапевтических показаний.

Предварительные данные по оценке иммуногенности, полученные при начальных этапах клинических исследований, могут дать информацию, которая может быть использована при планировании последующих исследований, например, при выборе биоаналитических методик, определении изначально существующих (предсуществующих) антител или установлении других факторов, которые могут снизить эффективность терапии за счет сформировавшихся антител к препарату МкАТ. Исходя из стратегии определения и оценки рисков, рассмотренной ниже, стандартная программа оценки иммуногенности может быть сокращена (при детальном обосновании) или нуждаться в интенсификации, в зависимости от уровня выявленного риска. Заявителю всегда необходимо представлять в регистрационном досье детальную идентификацию рисков с полным учетом свойств препарата и его предполагаемого назначения.

а) *Предварительные сведения*

Важным фактом является наличие или отсутствие сведений о других подобных лекарственных препаратах МкАТ (например, из того

же целевого класса антигена-мишени, экспрессируемого в той же экспрессионной системе). Уровень возможного риска может быть выше, если методика обнаружения антител против МкАТ или обнаружения клинических эффектов вследствие воздействия таких антител (например, остаточные концентрации МкАТ, параметры фармакодинамики (ФД) и ответная реакция при лечении препаратом МкАТ) не являются достаточно чувствительными. В таких случаях, потребуются широкомасштабные исследования по мониторингу динамики формирования антител на лекарственный препарат МкАТ относительно терапевтических исходов (результатов лечения).

б) *Структура МкАТ*

В принципе, антитела могут вырабатываться к различным эпитопам молекулы МкАТ, например, локализованным на вариабельных или константных регионах иммуноглобулина. У иммуноглобулинов МкАТ, имеющих гетерологичные последовательности грызунов или химерных МкАТ, указанные участки распознаются как чужеродные и являются причиной формирования гуморального иммунного ответа, однако антитела могут быть направлены (специфичны) к любому из участков молекулы МкАТ. В случае гуманизированных или полностью человеческих МкАТ, последние имеют только аминокислотные последовательности иммуноглобулина человека, иммунный ответ проявляется формированием, в основном, анти-идиотипических антител, специфичных к гипервариабельной последовательности регионов, определяющих комплементарность связывания с антигеном, и которые с большой долей вероятности могут поставить под угрозу клинический ответ на терапию МкАТ, за счет снижения ее эффективности. Однако в некоторых случаях, антитела могут быть направлены против

константного региона полностью человеческих или гуманизированных МкАТ, что также может повлиять на эффекторные функции этих антител с возможными последствиями для клинического ответа на терапию препаратом МкАТ. Клинический опыт применения новых модификаций (конструкций) препаратов МкАТ накоплен небольшой, это повышает степень возможного риска их применения. Особое внимание должно быть уделено лекарственным препаратам МкАТ следующего поколения, например, биспецифическим МкАТ, препаратам на основе фрагментов МкАТ, в связи с возможностью выявления скрытых антигенных детерминант у таких модифицированных молекул МкАТ.

Изменение профиля гликозилирования может снизить или увеличить иммуногенные свойства молекулы иммуноглобулина МкАТ (например, изменения остатков сахаров, связанных с белковой частью молекулы). Нетипичные профили гликозилирования, например профили, встречающиеся при введении совершенно новых экспрессионных систем, могут привносить более высокий риск возникновения иммуногенности по сравнению с более широко используемыми экспрессионными системами.

Другие факторы, влияющие на иммуногенность, включают наличие в препарате производственных примесей и другие показатели качества. Таким образом, как в аналитической, так в клинической части разработки должна быть выполнена подробная полная оценка, характеристика и, по возможности, снижение потенциальных рисков, при этом риск связанный с качеством препарата, следует должным образом идентифицировать.

Например, в случае, когда имеется ранее зарегистрированный препарат МкАТ, с опытом клинического применения и разрабатывается

новый лекарственный препарат МкАТ, имеющий такую же специфичность к антигену-мишени, но производимый с использованием новой экспрессионной системы. Риск изменения механизма его действия может быть небольшим, однако риск в отношении потенциального влияния примесей на безопасность препарата может быть значительно выше (если данные по влиянию этих примесей на безопасность практически отсутствуют).

c) *Механизм действия*

Механизм действия МкАТ (например, цитолитическое, индукция апоптоза) и особенно свойства сигнальных молекул, обусловливающих иммуносупрессирующее или иммуностимулирующее действие, необходимо достоверно охарактеризовать и всесторонне исследовать. Антитела, формирующиеся при терапевтическом использовании препарата МкАТ, специфичные к идиотипу МкАТ, как правило, приводят к снижению эффективности применения лекарственного препарата МкАТ. Кроме того, воздействие антител, специфичных к антигенам МкАТ, которые распознают аллотип или иные регионы иммуноглобулина, должно быть тщательно изучено, так как образование иммунных комплексов может привести к нежелательным эффектам у реципиентов.

Непрямое действие антител, индуцированных препаратом МкАТ, также может быть очень существенным, например, нельзя исключать, что МкАТ, направленные к молекулам, участвующим в сигнальных каскадах, могут вызывать выработку антител, которые перекрестно связывают молекулы, участвующие в агонистическом эффекте, что потенциально ведет к повышению активации иммунной системы и, возможно, к синдрому высвобождения цитокинов. Это трудно спрогнозировать на уровне отдельного пациента. На ранних этапах

клинических исследований агонистических МкАТ или МкАТ, чье перекрестное связывание с молекулой-мишенью может теоретически привести к активации иммунитета, заявители должны уделять особое внимание наблюдению за всеми включенными пациентам, чтобы проследить возникновение таких явлений.

d) *Клинические факторы*

Проявление иммуногенности в значительной степени зависит от клинических факторов. Проявления иммуногенности препаратов МкАТ могут быть обусловлены возрастом пациентов. Известно, что белковый обмен у детей отличается от обмена взрослых, это может привести к различиям в проявлении иммуногенности лекарственных препаратов (например, при применении в сопоставимых дозах препарата МкАТ, используемого для лечения ювенильного артрита по сравнению с ревматоидным артритом у взрослых). Ранее полученные дозы аналогичных или родственных моноклональных антител, также могут влиять на иммуногенность. Лекарственные препараты МкАТ, используемые с прерывистой (интермиттирующей) схемой введения (например, с различными интервалами между введениями препарата), могут иметь более высокую вероятность проявления иммуногенности, чем при использовании препаратов в режиме регулярного введения или по цикличным схемам.

Проявление клинически значимых эффектов за счет воздействия индуцированных антител зависит от сайта связывания антител, аффинности этого антитела к МкАТ и их титра. Антитела, специфичные к МкАТ, могут появляться в течение определенного времени, а затем исчезать во время дальнейшего лечения, могут сохраняться весь период лечения или даже выявляться в течение длительного периода времени после окончания лечения. При терапии некоторыми препаратами МкАТ

формирование антител не имеет явных неблагоприятных клинических последствий. Однако при применении других МкАТ возможно снижение эффективности терапии или развитие нежелательных явлений, связанных с проявлением их иммуногенности и вызывающих необходимость проведения соответствующей симптоматической терапии.

6.2. Оценка факторов риска и безопасности применения препаратов моноклональных антител

Многочисленные факторы способствуют развитию иммунного ответа на МкАТ при их клиническом применении, некоторые из них необходимо учитывать при оценке риска.

Факторы, влияющие на частоту развития и выраженность иммунного ответа на МкАТ (факторы риска, связанные со свойствами препарата, параметрами процесса производства и спецификой заболевания и (или) пациентов), могут быть положены в основу подхода, согласно которому эти факторы риска характеризуют с позиции возможности и целесообразности оценки (или идентификации) риска и стратегии его минимизации.

После идентификации риска, основанной на вышеуказанных факторах, выполняют оценку, в которой объединяют отдельные риски для клинического применения препарата и должным образом разработанную программу по оценке иммуногенности в рамках клинического исследования. Оценка риска требует многофакторного подхода с учетом всех выявленных рисков (например, связанных с программой по контролю качества препарата, включая получение лекарственной формы препарата, обоснование допустимых пределов опосредованных препаратом вариантов и производственных примесей). Общая оценка риска должна быть сопряжена с проверкой

сопоставимости, потенциально выполняемой во время разработки, в случае, если изменения в используемые МкАТ вносят на разных этапах разработки препарата.

Ключевой аспект оценки риска заключается в определении частоты возникновения и степени выраженности клинических проявлений нежелательного иммунного ответа, а также в установлении возможности предотвращения нежелательных последствий и оказании своевременной и адекватной медицинской помощи при развитии нежелательных явлений. В зависимости от идентифицированных рисков, доступности их оценки при мониторинге и возможностей снижения проявлений этого риска, программа исследований иммуногенности может включать меньше или больше тех положений, которые отражены в Главе 11 настоящих Правил**.** В любом случае подход к оценке безопасности применения лекарственных препаратов МкАТ должен быть обоснован.

В зависимости от класса и подкласса иммуноглобулинов МкАТ (что влияет на иммунобиологические функции, например, связывание с Fc- рецепторами и др.) и механизма их действия клинические проявления, обусловленные развитием нежелательного иммунного ответа, различаются для разных препаратов МкАТ. Например, МкАТ могут быть нейтрализованы индуцированными антителами, что приводит к снижению их клинической эффективности или возможно развитие нежелательных явлений, таких как инфузионные реакции и (или) реакции, обусловленные образованием иммунных комплексов. Инфузионные реакции могут быть очень тяжелыми, однако (в отличие от аллергических реакций гиперчувствительности), имеется потенциальная возможность их предотвращения путем использования соответствующих клинических мер, таких как премедикация. В случае

снижения или полной потери клинической эффективности, могут быть использованы другие лекарственные препараты МкАТ или препараты на основе рекомбинантных белков с близким механизмом действия в качестве альтернативных вариантов лечения, что позволяет снизить риск применения используемого препарата МкАТ.

В соответствии с общими требованиями представления регистрационного досье к моменту подачи заявления на регистрацию препарата в регистрационном досье должны находиться результаты анализа достаточного количества данных для оценки тяжести, частоты возникновения и выявляемости рисков. В дальнейшем, при необходимости вероятность, таких рисков может подтверждаться послерегистрационным наблюдением и мониторингом в соответствии с установленными требованиями.

Ниже перечислены основные положения, которые следует учитывать при оценке и минимизации факторов риска:

– стратификация риска, основанная на принципах его идентификации, рассмотренных в предыдущем разделе, в сочетании с опосредованными препаратом МкАТ факторами, такими, как, например, идентификация собственных иммуногенных мотивов молекулы, физико-химические характеристики, включая агрегаты или иные опосредованные препаратом или производством варианты молекул, данные о разработке лекарственной формы препарата, например растворимость при физиологическом значении pH, местонахождение антигена-мишени и т. д.

– детали проведения анализов, рассмотренные в данной главе, в частности степень, в которой на чувствительность выбранного формата

метода анализа на наличие МкАТ воздействует остаточный циркулирующий препарат.

– в случае неизбежных недостатков аналитических методов, доступность мер, которые могут дополнить мониторинг mAb, например определение фармакодинамических показателей или фармакокинетических параметров.

– доступность методов определения ранних иммунных ответов (например, раннее выявление связывания mAb, выявление IgM для установления раннего иммунного ответа).

– восприимчивость обследуемой группы больных; терапевтический индекс, аутоиммунный статус, использование иммунодепрессивных сопутствующих препаратов и т. д.

– следует учитывать, что при онкологических заболеваниях снижение ответа на терапию труднее установить, чем при другой патологии, поскольку бывает трудно дифференцировать, связано ли это с прогрессированием опухолевого процесса или с формированием антител к используемому лекарственному препарату МкАТ; как правило, прогрессирование заболевания, и как следствие этого снижение последующего ответа на терапию, наблюдается практически у всех больных через определенное время, что сложно отличить от эффектов, опосредованных антителами. Следовательно, во время клинических исследований может потребоваться более интенсивное проведение измерений показателей, чтобы оценить какой ответ следует ожидать в период после регистрации препарата, особенно при наличии альтернативных методов лечения.

– следует учитывать, назначается препарат для применения на дому или в клинике, поскольку лечение пациента препаратом МкАТ в

клинике может иметь преимущество в плане немедленного оказания медицинской помощи в случае развития инфузионных реакций или анафилаксии, однако при домашнем использовании подкожное введение препарата имеет преимущество для пациентов. Таким образом, заявители должны сопоставить риски нежелательных иммунных ответов и их последствий с предполагаемым клиническим применением и дать им оценку. Например, МкАТ с высокой частотой развития реакций после подкожного введения могут быть менее пригодными для использования в домашних условиях.

– доступность альтернативных способов терапии в случае снижения клинической эффективности, индукции инфузионных реакций или анафилаксии при применении препарата МкАТ.

6.3. Мониторинг безопасности применения препаратов моноклональных антител и снижение риска

В соответствии с таким подходом выявления и оценки рисков заявителям следует тщательно планировать программу по мониторингу и снижению риска на ранних этапах разработки препарата, а также регулярно пересматривать и корректировать ее во время развития и всего жизненного цикла препарата МкАТ по мере появления новых данных. В начале клинического исследования заявителям, возможно, придется присвоить МкАТ более высокий уровень риска, несмотря на то, что сам по себе механизм действия не обязательно предполагает такой уровень, но другие факторы делают это необходимым. В зависимости от результатов более крупных клинических исследований, может возникнуть необходимость в корректировке уровня риска. На момент подачи заявления на регистрацию препарата заявители должны всесторонне обосновать и проанализировать общую концепцию дизайна исследования и объем испытаний на иммуногенность, использованных

во время этого исследования, предоставить описание системы фармаконадзора и плана управления рисками в соответствии с правом Союза и руководствами по фармаконадзору.

В отношении препаратов, имеющих особые заявленные преимущества в отношении иммуногенного потенциала (например, одобренные в Общей характеристике лекарственного препарата), следует предоставить достоверные подтверждающие данные.

В зависимости от результатов оценки риска, в некоторых случаях могут быть необходимы более детальные и дополнительные исследования в ходе клинических исследований. В некоторых случаях, могут потребоваться предварительные исследования пациентов на наличие IgE антител до начала клинического применения препарата для того, чтобы предотвратить серьезные анафилактические реакции, например, если МкАТ содержат углеводные структуры, не характерные для иммуноглобулина человека, например, галактоза-α-1,3-галактоза. Еще один пример, когда следует провести анализ на IgE – высокая частота встречаемости аллергических реакций при первом приеме препарата, зафиксированная на ранних этапах его клинического исследования. Несмотря на то, что измерение концентрации подклассов IgG или иных классов иммуноглобулинов, как, например, IgA, обычно не является стандартным требованием для оценки иммуногенности mAb, оно может стать необходимым в рамках такого подхода при идентификации определенных рисков (например, при назальном введение). В рамках процедуры изучения, тем не менее, требуется разграничить нейтрализующую способность индуцированных антител от транзиторного выявления антител, относящихся к другому классу иммуноглобулинов, по сравнению с постоянно выявляемыми

антителами к МкАТ, что может быть установлено только на основании результатов повторного отбора и анализа образцов проб.

Периодичность и сроки отбора проб и сроки проведения анализов могут варьировать в зависимости от идентифицированного уровня относительного риска. При более низком уровне риска применения МкАТ возможно снижение частоты тестирования и проведение их в более поздние сроки применения препарата, при условии, что никаких неблагоприятных явлений или снижения эффективности не наблюдается. Несмотря на это на протяжении всей программы исследования следует постоянно пополнять банк образцов. Такой подход требует должного обоснования обоснован. Для препаратов МкАТ, риск применения которых более высокий, отбор проб может быть более частым в течение всего периода клинических исследований. В этой ситуации может быть рекомендовано проведение анализа образцов в режиме реального времени. Во время клинического исследования может потребоваться определение концентрации антител, фармакокинетики, фармакодинамических маркеров, эффективности и безопасности одновременно и в течение периода повторных курсов терапии. Такие исследования позволят оценить клиническую значимость повышения концентрации антител и, кроме того, оценить наблюдаются ли изменения эффекта воздействия антител с течением времени, т.е. установить, что может произойти в результате увеличения титра и (или) переключения изотипов антител или изменения их аффинности. Антитела к вводимым МкАТ, не обладающие нейтрализующей активностью, могут косвенно влиять на эффективность, связываясь с препаратом МкАТ и воздействуя на его фармакокинетические свойства. Следовательно, измерение фармакокинетических параметров может оказаться полезным при планировании порядка определения иммунного ответа на вводимые МкАТ.

Данные, полученные в результате проведения анализов, могут быть использованы для управления рисками. Например, если идентификация и оценка риска подтверждает необходимость определения иммунного ответа на ранней стадии и допускает возможность прекращения лечения МкАТ, увеличение концентрации низкоаффинных IgM-антител может быть показателем раннего иммунного ответа, и определение IgM-ответов может способствовать раннему выявлению больных с усиливающимся иммунным ответом. Аналогичным образом, обнаружение связывающих не-нейтрализующих антител может быть ранним показателем последующей выработки нейтрализующих антител.

Стратегии по снижению рисков могут включать, к примеру, исследование того, как эффективно вести больных, у которых развился иммунный ответ, например, можно ли усилить режим дозирования без угрозы безопасности больного, и т. д. В то же время важно учитывать целесообразность этих исследований.

При направлении заявки на регистрацию препарата заявителям необходимо представлять краткое изложение их комплексной программы по выявлению, характеристике, мониторингу, минимизации и снижению рисков. Этот подход, основанный на оценке риска, надо учитывать и при составлении Плана по управлению риском (ПУР), с обсуждением мер по управлению рисками, идентифицированными на основании данных программы разработки, а также потенциальными рисками или недостающей информацией после регистрации препарата.

ГЛАВА 13. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

1. Область применения

Несмотря на то, что некоторые вопросы, освещенные в данной Главе по фармацевтической разработке, имеют отношение к лекарственным препаратам, содержащим фармацевтические субстанции, полученные методом химического синтеза, указанные в данной Главе принципы применяются в отношении биологических или биотехнологических лекарственных препаратов.

2. Общие положения

Физико-химические характеристики биологических (биотехнологических) и препаратов, полученных методом химического синтеза различаются, в частности биотехнологические и биологические субстанции характеризуются неустойчивостью и сложностью структуры. Подобные различия могут привести к необходимости отдельного рассмотрения вопросов по фармацевтическим и биофармацевтическим препаратам в ходе составления плана их исследований и разработок.

В данной Главе рассматриваются исследования свойств субстанций-кандидатов и исследования по подбору состава лекарственных форм, проведение которых следует рассмотреть в процессе разработки соответствующей готовой лекарственной формы для фармацевтических субстанций биологического или биотехнологического происхождения. Цель таких исследований заключается в разработке стабильного состава лекарственной формы, чтобы при помощи анализа стабильности можно было гарантировать сохранение постоянства состава фармацевтической субстанции как на

биологическом, так и на химическом уровнях для предполагаемого использования: i) в клинической практике, ii) во время процесса производства и iii) в течение заданного срока годности. Более того, также следует тщательно изучить параметры процесса, которые могут повлиять на показатели однородности препарата при масштабировании производства.

При проведении фармацевтической разработки биологических (биотехнологических) препаратов необходимо тщательно изучить три важных взаимосвязанных области разработки и создания оптимальной лекарственной формы, а именно вопросы стабилизации, совместимости и биологической активности. При разработке лекарственного препарата в соответствии с положениями, представленными в данной Главе следует учитывать положения других Глав настоящих Правил.

3. Специфические факторы

3.1. Характеристика

Необходимо достаточно подробно охарактеризовать вид и свойства фармацевтических субстанций, вспомогательных веществ и лекарственных форм, включая размер молекулы, заряд и свойства поверхности, используя современные методы оценки физико-химических и биофизических свойств. Эти исследования нацелены на описание структурных элементов, отвечающих за биологическую активность, например активных участков, рецептори лиганд-связывающих участков, а также свойств, отвечающих за передачу сигнала. Они могут также указывать на соответствующие параметры, возможно влияющие на *in vivo* распределение препарата после введения, включая сайт-специфичную доставку.

Необходимо тщательно изучать любые взаимодействия между фармацевтической субстанцией и вспомогательными веществами на физико-химическом уровне. В случае с отдельными вирусными и бактериальными вакцинами характеристика физико-химических или биофизических свойств может быть недостаточной, при этом следует по возможности оценить биологические параметры, например иммуногенность.

3.2. Процесс производства

Биологические или биотехнологические препараты отличаются от своих химически синтезированных аналогов процессом производства и его влиянием на качество и безопасность лекарственного препарата. Качество биологических препаратов определяется выбранным методом выделения и технологией производства. Незначительные изменения в процессе могут воздействовать на качество лекарственного препарата и, следовательно, разработка производственного процесса имеет первостепенную важность для биологических препаратов, независимо от того, идет ли речь о вакцинах, биотехнологических средствах, препаратах крови или препаратах на основе олигонуклеотидов типа ДНК-вакцин и препаратов для генной терапии. В рамках стратегии разработки для обеспечения показателей однородности продукции следует тщательно изучить указанные выше производственные параметры, способные влиять на качество и стабильность фармацевтической субстанции в составе лекарственной формы, например pH, нагрев, степень измельчения (грануляции). Если для приема пациентом достаточного количества фармацевтической субстанции требуется превысить заявленную дозировку (например, в случае с предварительно заполненным шприцем), необходимо предоставить удовлетворительное обоснование с соответствующими подтверждающими данными. Конечная стерилизация биологических препаратов в контейнере

готовой первичной упаковки с помощью автоклавирования не представляется возможной из-за их физико-химических свойств. В большинстве случаев стерилизацию проводят методом мембранной фильтрации перед наполнением контейнеров. В связи с этим производство препарата в определенных, хорошо контролируемых асептических условиях считается достаточным.

3.3. Избыточные количества

На основании данных испытаний стабильности в состав определенных биологических (биотехнологических) препаратов, например вакцин, можно включать избыточные количества, чтобы гарантировать сохранение необходимой биологической или удельной активности в течение всего срока годности при заданных условиях хранения. При включении любых излишков необходимо также учитывать вариабельность используемого биологического метода определения активности препарата, особенно в случаях, когда для подобного определения необходимо проведение биологического анализа *in vivo*.

3.4. Совместимость

Имеется бесспорное доказательство того факта, что белки могут химически взаимодействовать со вспомогательными веществами в составе готового препарата, например, могут образовываться потенциально иммуногенные аддукты.

В процессе разработки любого препарата необходимо изучить возможные взаимодействия между первичной упаковкой и самим препаратом, чтобы свести к минимуму любое снижение эффективности или биологической активности готового препарата, которые могут возникнуть в результате сорбции (влаги или газов) в процессе хранения. Поскольку белки являются амфифильными полиэлектролитами, они демонстрируют некоторую степень поверхностной активности. В связи

с этим может произойти адсорбция (денатурация) за счет 1) диффузии молекул нативного белка к поверхности раздела двух сред и их последующей адсорбции, 2) разворачивания полипептидных цепей на поверхности раздела двух сред, 3) агрегации поверхностного денатурированного белка в коагулят.

Если лекарственной формой препарата (например, гормона роста) является лиофилизат для приготовления раствора для инъекций, упакованный в двухкамерный контейнер для растворения перед применением, следует обратить особое внимание на обеспечение правильного растворения порошка или, в случае суспензии, однородности ресуспендирования и дозировки. Эти данные должны быть в обязательном порядке отражены в инструкции по медицинскому применению препарата и в соответствующих разделах резюме характеристик препарата.

Также следует тщательно изучить совместимость с другими фармацевтическими субстанциями, например комбинацию вакцин для подкожного, внутримышечного введения или приема внутрь. Речь идет как о живых аттенуированных вакцинах, например вакцина от кори, паротита и краснухи, так и об инактивированных вакцинах, например АКДС и вакцина против Haemophilus influenzae типа b, когда сочетаемые компоненты изменяют антигенные свойства отдельных элементов.

Необходимо подробно рассмотреть клиническую значимость любых побочных эффектов. Влияние вспомогательного вещества на усиление иммуногенности следует тщательно изучить.

3.5. Стабильность фармацевтических субстанций

В ходе любого исследования свойств субстанций-кандидатов необходимо определить стабильность фармацевтической субстанции.

Чтобы белковая молекула сохранила свои биологические свойства, необходимо сохранение ее структуры и, как следствие, биологической активности в отношении целевых рецепторов. Вследствие иерархической организации белковой структуры обычно существует более одного механизма распада, как физического, так и химического. В связи с этим с помощью соответствующих физико-химических или биохимических методов необходимо определить пути расщепления белка, включая его механизмы и кинетику, если это возможно.

Стабильность фармацевтической субстанции в препаратах на основе ДНК нужно оценивать с учетом динамики процессов расщепления, например депуринизации и β-элиминации. Полученные результаты можно использовать при определении воздействия на целостность молекулы состава препарата, условия производства и хранения, включая факторы, влияющие на изменения температуры, pH, уровень соли, давление и измельчение, чтобы свести деградацию к минимуму.

3.6. Стабильность лекарственной формы

Для стандартных испытаний стабильности следует обратиться к Главе 8 настоящих Правил.

В связи с неустойчивостью отдельных биологических (биотехнологических) препаратов в состав лекарственной формы или готового препарата (на основании экспериментальных данных) вводят соответствующее количество подходящих вспомогательных веществ. Это необходимо для придания большей стабильности активному веществу, например, с учетом его первичной или третичной структуры, каждая из которых может напрямую влиять на биологическую активность готового препарата, например факторов коагуляции. Подобные изменения могут возникать в процессе производства и (или) во время хранения.

Необходимо изучить стабильность лекарственной формы или фармацевтической субстанции при разных режимах производственного процесса, например при лиофилизации, в целях оптимизации состава, например количества лиопротектора, необходимого для сохранения целостности фармацевтической субстанции.

Вспомогательные вещества и (или) реагенты, используемые в процессе производства фармацевтических субстанций или при разработке состава препаратов, могут быть человеческого или животного происхождения. При фармацевтической разработке неустойчивых биологических препаратов, например живых аттенуированных вакцин, желательно разработать и оценить альтернативные варианты использования материалов человеческого или животного происхождения в процессе производства и при разработке состава. По возможности следует использовать заменитель альбумина в качестве вспомогательного вещества.

ГЛАВА 14. ТРЕБОВАНИЯ К ДОКУМЕНТАЦИИ ПО УПРАВЛЕНИЮ КАЧЕСТВОМ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ, ИССЛЕДУЕМЫХ В КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

1. Область применения

Уполномоченными органами государств-членов Союза устанавливаются требования к получению заявителями разрешения на проведение клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения, уведомлению о существенных поправках и заявлению о завершении исследования, а также требования к данным в Досье (досье исследуемого лекарственного препарата – ДИЛП) на исследуемый лекарственный препарат (ИЛП), предоставляемым для получения разрешения на проведение клинического исследования.

В настоящей Главе разъясняются частные требования к документации по биологическому, химическому и фармацевтического качеству исследуемых лекарственных препаратов, содержащих биологические (биотехнологические) активные фармацевтические субстанции.

Кроме того, в настоящей Главе содержатся примеры изменений документации в отношении биологического, химического и фармацевтического качества исследуемых лекарственных препаратов, рассматриваемые, как правило, в качестве «существенных».

Требования настоящей Главы применимы к белкам и полипептидам, их производным и препаратам, компонентами которых они являются (например, к конъюгатам). Эти белки и полипептиды получают из рекомбинантных или нерекомбинантных экспрессирующих систем клеточных культур; они хорошо поддаются

очистке и установлению свойств с помощью соответствующего набора аналитических методик.

Эти принципы могут также применяться к другим типам препаратов, например белкам и полипептидам, выделенным из тканей и жидкостей организма.

2. Данные о биологическом, химическом и фармацевтическом качестве биологических лекарственных препаратов, исследуемых в клинических исследованиях

S. Активная фармацевтическая субстанция

Ссылки на мастер-файл на активную фармацевтическую субстанцию и сертификат соответствия Европейского директората по качеству лекарственных средств (CEP) в отношении биологических (биотехнологических) активных фармацевтических субстанций не применимы и не допускаются.

S.1. Общая информация

S.1.1. Номенклатура

Необходимо представить информацию по номенклатуре активной фармацевтической субстанции (например, предлагаемое международное непатентованное наименование (МНН), фармакопейное наименование, патентованное наименование (торговое наименование), код компании, другие наименования или коды при их наличии).

S.1.2. Структура

Необходимо представить краткое описание предполагаемой структуры, включая данные о структурах высокого порядка, схему аминокислотной последовательности с указанием участков гликозилирования и других посттрансляционных модификаций, и также привести значение относительной молекулярной массы.

S.1.3. Общие свойства

Необходимо представить перечень физико-химических и других важных свойств активной фармацевтической субстанции, включая биологическую активность (т.е. особую способность или свойство препарата оказывать определенный биологический эффект). Необходимо проанализировать предлагаемый механизм действия.

S.2. Процесс производства активной фармацевтической субстанции

S.2.1. Производитель (производители)

Необходимо представить название, адрес и ответственность каждого производителя, включая контрактных производителей, а также каждой предлагаемой производственной площадки, вовлеченной в производство и контроль качества.

S.2.2. Описание процесса производства и его контроля

Необходимо должным образом описать производственный процесс и контроль процесса производства. Обычно производственный процесс начинается с контейнера банка клеток и включает культивирование клеток, сбор (сборы), очистку, модификацию продукта и его фасовку. Следует также описать условия хранения и транспортировки.

Необходимо представить схему, отражающую последовательность всех стадий производства, включая внутрипроизводственные испытания. Результаты внутрипроизводственных испытаний допускается выражать в виде пределов действия или предварительных критериев приемлемости. По мере накопления данных в ходе разработки необходимо представить более подробные результаты внутрипроизводственных испытаний и критерии; критерии приемлемости подлежат пересмотру.

Необходимо определить размер серии и масштаб производства, включая информацию о любом объединении сборов или промежуточных продуктов.

Необходимо описать и обосновать процедуры повторной обработки в ходе процесса производства активной фармацевтической субстанции (например, невыдерживание испытания на целостность фильтра).

S.2.3. Контроль качества материалов

Сырье и исходные материалы

Необходимо представить перечень материалов, использованных в производстве фармацевтической субстанции (например, сырье, исходные материалы, питательные среды, факторы роста, хроматографические смолы, растворители, реактивы), с указанием на каком этапе процесса каждый из них используется. Необходимо представить ссылки на стандарты качества (например, фармакопейные статьи или собственные спецификации производителя). Необходимо представить сведения о качестве и контроле качества нефармакопейных материалов. Необходимо представить сведения, подтверждающие то, что материалы (включая материалы из биологических источников, например, компоненты среды, моноклональные антитела, ферменты) удовлетворяют стандартам их целевого назначения.

В отношении всего сырья биологического происхождения (включая использованные при формировании банка клеток) необходимо указать источник и соответствующий этап процесса производства, в котором оно использовалось. В Приложении А.2 необходимо представить резюме о вирусной безопасности материалов биологического происхождения.

Источник, история и образование клеточного субстрата

Необходимо представить резюме об источнике и наработке (блок-схема последовательности этапов) клеточного субстрата, анализ экспрессирующего вектора, использованного для генетической модификации клеток и включенного в исходную клетку/клетку-хозяина для создания главного банка клеток и стратегии усиления и контроля производства соответствующего гена (согласно принципам Главы 1 настоящих Правил).

Система банка клеток, установление характеристик и испытания

Главный банк клеток необходимо создать до начала I фазы исследований. Не во всех случаях требуется формировать рабочий банк клеток (РБК).

Необходимо представить сведения о получении, квалификации и формировании банков клеток. Необходимо описать ГБК и (или) РБК и представить результаты проведенных испытаний. Получение и установление характеристик банков клеток необходимо осуществлять в соответствии с принципами Главы 1 настоящих Правил.

Клеточные банки необходимо описывать с помощью соответствующих фенотипических или генотипических маркеров, чтобы обеспечить подлинность, жизнеспособность и чистоту клеток, использованных в производстве.

До начала клинических исследований необходимо подтвердить последовательность нуклеиновой кислоты экспрессирующей кассеты, включая последовательность кодирующего участка.

При необходимости в Приложении А.2 необходимо представить анализ безопасности относительно посторонних агентов и квалификации банков клеток, использованных для производства активной фармацевтической субстанции.

Стабильность клеточного субстрата

Необходимо представить все доступные данные о стабильности клеточного субстрата.

S.2.4 Контроль критических этапов и промежуточных продуктов

Необходимо представить описание испытаний и критерии приемлемости для контроля критических этапов процесса производства. Вследствие ограниченности данных на ранних этапах разработки (I–II фазы) полные сведения могут отсутствовать.

Необходимо, используя дополнительные данные, обосновать сроки и условия хранения промежуточных продуктов.

S.2.5. Валидация и (или) оценка процесса

На протяжении всего хода разработки необходимо собирать данные о валидации (оценке) процесса производства, однако такие данные для получения разрешения на проведение клинического исследования не требуются.

В Приложении А.2 необходимо представить сведения об этапах производства, направленных на элиминацию и инактивацию вирусных контаминантов.

S.2.6. Разработка процесса производства

Совершенствование процесса производства

Процессы производства и стратегии их контроля подлежат непрерывному совершенствованию и оптимизации, особенно на этапе разработки и на ранних фазах клинических исследований. Такое совершенствование и оптимизация рассматриваются в качестве естественного хода разработки, что требует соответствующего описания в документах, представляемых для получения разрешения на проведение клинического исследования. Необходимо обобщить

сведения об изменениях процесса производства и его контроля и представить обоснование таких изменений. В целях определения связи между сериями до внесения и после внесения изменений в описании необходимо однозначно представить сведения, позволяющие идентифицировать варианты процессов производства, использованных для получения каждой серии, использованной в доклинических и клинических исследованиях. Для описания эволюции процесса производства допускается представлять сравнительные блок-схемы и (или) перечень изменений процесса производства. Изменения процесса производства могут потребовать адаптации внутрипроизводственных и выпускающих испытаний, в связи с чем, после внесения изменений, такие испытания и соответствующие критерии приемлемости требуют пересмотра.

Исследования сопоставимости

В зависимости от последствий внесения изменений и этапа разработки в целях обеспечения отсутствия нежелательного влияния на клинические характеристики лекарственного препарата могут потребоваться исследования сопоставимости. Основная цель таких исследований – обеспечение пригодности препарата после его изменения для клинических исследований и отсутствия угрозы для безопасности пациентов, включенных в клинические исследования.

Исследования сопоставимости необходимо, как правило, проводить поэтапно, включая сравнение параметров качества активной фармацевтической субстанции и значимых промежуточных продуктов, используя подходящие аналитические методы. К аналитическим методам, как правило, относятся стандартные испытания, которые при необходимости допускается дополнять вспомогательными испытаниями для установления характеристик (включая ортогональные методы).

Если накопленный производителем опыт и прочие значимые сведения для оценки рисков, обусловленных изменениями, недостаточны или ожидаются потенциальные риски для пациентов, исследования сопоставимости, основанные исключительно на изучении вопросов качества, могут быть недостаточны.

В ходе ранних фаз доклинических и клинических исследований исследования сопоставимости, как правило, не столь многочисленны, как для зарегистрированного лекарственного препарата. Во впервые проводимых у человека клинических исследованиях рекомендуется применять исследуемый лекарственный препарат, отражающий свойства материала, использованного в доклинических исследованиях (см. документ Союза по стратегиям выявления и ослабления рисков исследуемых лекарственных препаратов в клинических исследованиях, впервые проводимых у человека).

S.3. Описание характеристик активной фармацевтической субстанции

S.3.1. Установление структуры и других характеристик

В целях составления спецификации необходимо с помощью соответствующих методик охарактеризовать биотехнологическую или биологическую фармацевтическую субстанцию (включающее определение физико-химических свойств, биологической активности, иммунохимических свойств, чистоты и примесей). Не допускается ограничиваться ссылками на литературные данные. На этапе разработки до начала I фазы клинических исследований и, при необходимости, после значительных изменений процесса производства, необходимо провести надлежащее установление характеристик.

В отношении целевого продукта необходимо представить подробные сведения о первичной, вторичной структуре и структуре

более высокого порядка, посттрансляционных (например, гликоформах) и прочих модификациях.

Необходимо представить подробные сведения о биологической активности (т.е. особой способности или свойстве препарата оказывать определенный биологический эффект). До начала исследований I фазы, как правило, необходимо, используя соответствующие надежные и квалифицированные методы, определить биологическую активность. Степень установления характеристик на более поздних фазах увеличится.

Необходимо представить научное обоснование использованных методов установления характеристик и обоснование их пригодности.

S.3.2. Примеси

Необходимо изучить производственные (например, белки клетки-хозяина, ДНК клетки-хозяина, остатки питательных сред, экстрагируемые из колонок вещества) и родственные примеси (например, прекурсоры, расщепленные формы, продукты деградации, агрегаты). Необходимо представить количественные данные о примесях, включая максимальное содержание в высшей клинической дозе. Может потребоваться оценка очистки от определенных производственных примесей (например, пеногасителей).

В отношении некоторых примесей необходимо обосновать представление исключительно качественных (без количественных) данных о них.

S.4. Контроль качества активной фармацевтической субстанции

В ходе фаз клинических исследований, если данные по валидации неполные, в целях подтверждения фармацевтического качества, постоянства и сопоставимости фармацевтической субстанции после

изменения процесса производства необходимо знать показатели качества для ее контроля. Вследствие чего показатели качества, контролируемые на протяжении всего процесса разработки, не должны ограничиваться испытаниями, включенными в спецификацию, для которых установлены предварительные критерии приемлемости.

S.4.1. Спецификация

В спецификации серий активной фармацевтической субстанции, которые будут использоваться в клинических исследованиях, необходимо описать их критерии приемлемости, а также испытания, использованные для установления надлежащего контроля за качеством активной фармацевтической субстанции. Испытания на количественное содержание, подлинность и примеси являются обязательными. В отсутствие должного обоснования необходимо включить испытание на биологическую активность. Необходимо установить верхние пределы содержания примесей, учитывая показатели безопасности. Необходимо охарактеризовать микробиологическую чистоту активной фармацевтической субстанции.

Поскольку критерии приемлемости, как правило, основаны на ограниченном количестве серий, использованных в разработке, и серий, использованных в доклинических и клинических исследованиях, они по своей природе изначально являются предварительными и требуют доработки и коррекции в ходе последующей разработки.

Необходимо также документировать свойства продукта, которые на определенном этапе разработки полностью не охарактеризованы, или в отношении которых имеются лишь ограниченные данные для установления критериев приемлемости. Как следствие, такие свойства продукта допускается включать в спецификацию без заранее

установленных пределов приемлемости. Результаты необходимо представить в разделе по посерийному анализу (S.4.4).

Дополнительная информация по клиническим исследованиям II и III фазы

По мере накопления информации и опыта может потребоваться добавление или исключение параметров и модификация аналитических методик. Спецификации и критерии приемлемости, установленные для предыдущих испытаний, следует пересмотреть и при необходимости скорректировать в соответствии с текущей стадией разработки.

S.4.2. Аналитические методики

Необходимо указать аналитические методики для всех испытаний фармацевтической субстанции, включенных в спецификацию (например, хроматографические методы, биологические методы и т.д.), включая испытания без пределов приемлемости. Необходимо представить краткое описание всех нефармакопейных аналитических методик, т.е. способа проведения анализа.

В отношении методов, соответствующих требованиям статей Фармакопеи Союза, фармакопеи государств – членов Союза, ведущих зарубежных фармакопей в соответствии с концепцией гармонизации, допускается ссылка на соответствующую статью.

S.4.3. Валидация аналитических методик

Валидация аналитических методик в ходе клинической разработки рассматривается в качестве постепенного процесса.

Аналитические методики, описанные в общей главе Фармакопеи Союза, фармакопеи государств – членов Союза, ведущих зарубежных фармакопеях в соответствии с концепцией гармонизации или связанные с частной фармакопейной статьей, обычно считаются валидированными.

Необходимо подтвердить пригодность использованных в клинических исследованиях I фазы аналитических методов. Пределы приемлемости (например, пределы приемлемости для определения содержания примесей) и параметры (специфичность, линейность, аналитическая область, правильность, прецизионность, пределы количественного определения и обнаружения) проведения валидации аналитических методик необходимо представить в табличной форме.

Информация по клиническим исследованиям II и III фазы

Необходимо подтвердить пригодность использованных аналитических методик. Необходимо представить табличное резюме результатов проведенной валидации (например, результаты или значения специфичности, линейности, аналитической области, правильности, прецизионности, пределов количественного определения и обнаружения). Полный отчет о валидации представлять не требуется.

S.4.4. Посерийный анализ

Поскольку первоначально спецификация может быть очень широкой, для оценки качества важны фактические данные по сериям. Для количественных параметров необходимо представить фактические численные значения.

Задача настоящего раздела – подтвердить качество серий (соответствие предварительной спецификации), подлежащих применению в конкретном клиническом исследовании. Для клинических исследований ранней фазы, для которых обычно характерно ограниченное число серий, необходимо представить результаты по релевантным доклиническим и клиническим сериям, включая результаты анализа серий, подлежащих применению в данном клиническом исследовании. Однако при более продолжительном

производстве при должном обосновании допускается представить только результаты нескольких репрезентативных серий.

Наряду с использованием серий необходимо представить сведения о номере серии, ее размере, производственной площадке, дате производства, методах контроля, критериях приемлемости и результатах испытаний. Необходимо описать процесс производства каждой серии.

S.4.5. Обоснование спецификации

Необходимо представить подробное обоснование всех показателей качества, включенных спецификацию, и критериев приемлемости по чистоте, примесям, биологической активности и любым другим показателям качества, которые могут повлиять на функциональные свойства лекарственного препарата. При обосновании необходимо руководствоваться соответствующими данными по разработке, данными о сериях, использованных в доклинических и (или) клинических исследованиях, и результатами исследований стабильности, учитывая методы, использованные для их контроля. Считается, что в ходе ранней клинической разработки критерии приемлемости могут быть шире и могут не отражать возможности технологического процесса. Если опыт ограничен, в I–II фазы допускается устанавливать более широкие пределы. Однако для тех показателей качества, которые могут повлиять на безопасность пациента, необходимо тщательно обосновывать пределы, принимая во внимание доступную информацию (например, возможности технологического процесса, вид лекарственного препарата, дозу, продолжительность введения и т.д.). Необходимо обосновать значимость выбранной методики количественного определения биологической активности и предлагаемых пределов ее приемлемости.

Необходимо описать и обосновать изменения, вносимые в ранее использовавшуюся спецификацию (например, включение или исключение параметров, расширение критериев приемлемости).

S.5. Стандартные образцы или материалы

Учитывая свойства биологических (биотехнологических) препаратов, в целях обеспечения постоянства между различными сериями ИЛП, а также сопоставимости препарата, подлежащего коммерческой реализации, с препаратом, использованным в клинических исследованиях, а также описания связи между процессом разработки и промышленным производством, необходимо использовать надлежащим образом охарактеризованный стандартный материал. Установление характеристик стандартного материала необходимо осуществлять с помощью современных аналитических методов, которые необходимо надлежащим образом описать. Необходимо представить сведения о процессе производства, использованного для получения стандартного материала.

Если в ходе клинической разработки использовался не один стандартный образец, необходимо представить историю квалификации, описывающую поддержание связи между различными стандартами.

В качестве первичного стандарта необходимо использовать международные или фармакопейные стандартные образцы (при их наличии). Однако следует учитывать, что использование международного стандартного образца или фармакопейного стандартного образца, может быть ограничено определенными методами испытаний, например, на биологическую активность. Если международный стандартный образец или фармакопейный стандартный образец отсутствует, необходимо произвести собственный стандартный материал.

S.6. Система упаковки/укупорки

Необходимо указать упаковочный материал, используемый для активной фармацевтической субстанции. Следует принять во внимание возможность взаимодействия между активной фармацевтической субстанцией и первичной упаковкой.

S.7. Стабильность

Резюме и выводы по стабильности (протокол (материал) и метод)

Необходимо представить программу изучения стабильности, охватывающий предлагаемый срок хранения активной фармацевтической субстанции, включая спецификацию, аналитические методики и интервалы между испытаниями. Интервалы между испытаниями должны, как правило, соответствовать Главе 8 настоящих Правил.

Качество серий активной фармацевтической субстанции, включенных в программу изучения стабильности, должно отражать качество материала, подлежащего использованию в планируемом клиническом исследовании.

Активную фармацевтическую субстанцию, включенную в программу изучения стабильности, необходимо хранить в контейнерах, в которых используются те же вид и материалы системы упаковки/укупорки, которые будут использоваться в отношении активной фармацевтической субстанции, подлежащей использованию в клиническом исследовании. При изучении стабильности активной фармацевтической субстанции допускается использовать контейнеры меньшего размера.

В исследованиях необходимо изучить стабильность активной фармацевтической субстанции в предлагаемых условиях хранения. Рекомендуется проводить исследования ускоренного хранения и стресс-стабильности, поскольку они позволяют понять профиль деградации и служат в качестве подкрепляющих данных при увеличении срока годности.

Чтобы удостовериться в том, что будут выявлены изменения профиля чистоты (примесей) и биологической активности активной фармацевтической субстанции, в программу изучения стабильности необходимо включить методы-индикаторы стабильности. В отсутствие должного обоснования в программу необходимо включить методику количественного определения активности.

Описанный в документе Союза, посвященном изучению стабильности, период повторного испытания для биологических (биотехнологических) активных фармацевтических субстанций не применим.

Данные (результаты) исследования стабильности

Необходимо представить данные по стабильности, по меньшей мере, одной серии, отражающей процесс производства материала, который будет использоваться в клиническом исследовании. Кроме того, допускается представить данные по стабильности соответствующих серий, использовавшихся в разработке, или серий, произведенных с помощью предыдущего процесса производства. Такие данные допускается использовать для определения срока годности активной фармацевтической субстанции при условии того, что представлено обоснование, что качество серии отражает качество материала, подлежащего изучению в клинических исследованиях.

Все значимые данные по стабильности необходимо обобщить в таблице с указанием испытанных серий, даты их производства, версии процесса производства, состава, условий хранения, временных точек, аналитических методик, критериев приемлемости и результатов.

Необходимо представить фактические числовые значения количественных параметров. Необходимо проанализировать все выявленные тенденции.

Для учета объема доступных данных и нарастающих знаний о стабильности активной фармацевтической субстанции в ходе различных фаз клинической разработки к стабильности необходимо предъявлять все более строгие требования. К III фазе заявитель должен всесторонне понимать профиль стабильности активной фармацевтической субстанции.

Установление срока годности

Необходимо описать заявленный срок годности активной фармацевтической субстанции в предлагаемых условиях хранения, сопроводив описание анализом доступных данных. Необходимо проанализировать все выявленные тенденции.

Как описано в Главе 8 настоящих Правил, запрашиваемый период хранения необходимо определять на основании результатов исследований естественного хранения в реальном времени и при реальной температуре. Однако допускается увеличить срок годности сверх данных по стабильности в реальном времени, если такое обосновано соответствующими данными, в том числе результатами исследований ускоренного хранения.

Максимальный срок годности после такого увеличения допускается увеличивать не более чем в два раза и не более чем на 12 месяцев по сравнению с данными по стабильности, полученными на репрезентативных сериях. Однако увеличение срока годности, превышающее предполагаемую длительность исследований естественного хранения, не допускается.

При составлении программы изучения стабильности допускается опираться на предыдущие данные, включая платформенные технологии. Однако сами по себе такие данные не являются достаточными для обоснования срока годности ИЛП.

При планировании увеличения срока годности заявитель должен принять обязательство выполнить предложенную программу стабильности в соответствии с представленным протоколом и, при возникновении непредвиденных ситуаций, уведомить о них уполномоченные органы, а также предложить план корректирующих мероприятий.

Сведения об увеличении срока годности путем внесения существенной поправки представлены в разделе 4.

P. Исследуемый лекарственный препарат

P.1. Описание и состав исследуемого лекарственного препарата

Следует указать качественный и количественный состав исследуемого лекарственного препарата. Предоставляемая информация должна включать:

краткое или табличное описание лекарственной формы;

состав, т.е. перечень всех компонентов лекарственной формы и их содержание в расчете на единицу (включая избытки, если таковые присутствуют), функциональное назначение компонентов, ссылки на их стандарты качества (например, на фармакопейные статьи или спецификации производителей);

описание прилагающихся разбавителей;

краткое описание типа контейнера и системы укупорки, используемых для лекарственной формы и прилагающегося разбавителя для ее приготовления, если это применимо.

P.2. Фармацевтическая разработка

На ранних этапах разработки информации для включения в настоящий раздел может быть недостаточно.

Необходимо представить краткое описание разработки состава, включая обоснование новой лекарственной формы или нового вспомогательного вещества.

В отношении лекарственных препаратов, требующих дополнительного приготовления (например, восстановления, разведения, смешивания), необходимо подтвердить совместимость с такими материалами (например, растворителями, разбавителями, средой) и резюмировать метод приготовления (допускается сослаться на полное описание, содержащееся в протоколе клинического исследования).

Необходимо представить обоснование, что комбинирование лекарственной формы и упаковочного материала не нарушает правильное дозирование, например, подтвердить, что препарат не абсорбируется на стенках контейнера или инфузионной системы. Выполнение этого требования особенно важно для форм выпуска с низкой дозой или высоким разведением. По возможности, как указано в документе Союза по стратегиям выявления и ослабления рисков исследуемых лекарственных препаратов в клинических исследованиях, впервые проводимых у человека, во клинических исследованиях, впервые проводимых у человека, необходимо удостовериться, что очень низкие дозы вводятся правильно.

Разработка процесса производства

Необходимо описать изменения процесса производства, включая изменения состава и лекарственной формы по сравнению с ранее проведенными клиническими исследованиями. Значительные изменения, например, изменения состава, необходимо обосновать соответствующими исследованиями сопоставимости. В этой связи необходимо следовать положениям, описанным в разделе S.2.6. Эти

данные необходимо подробно детализировать, чтобы надлежащим образом уяснить суть изменений и оценить возможные последствия для безопасности пациента.

Все изменения состава в ходе клинической разработки необходимо документировать и обосновать с точки зрения их влияния на качество, безопасность, клинические свойства, дозирование и стабильность лекарственного препарата.

P.3. Процесс производства исследуемого лекарственного препарата

P.3.1. Производитель (производители)

Необходимо представить название, адрес и ответственность каждого производителя, включая контрактных производителей, а также каждой предлагаемой производственной площадки, вовлеченной в производство, испытания и выпуск серии. Если в производстве ИЛП участвуют несколько производителей, необходимо четко описать обязанности каждого из них.

P.3.2. Материальный баланс (состав на серию)

Необходимо представить материальный баланс серии (серий), планируемых к использованию в клинических исследованиях. Эти данные должны включать перечень всех компонентов, которые будут использованы. Следует указать размеры или диапазон объема серий.

P.3.3. Описание процесса производства и его контроля

Необходимо представить схему всех последовательных этапов процесса, включая внутрипроизводственные испытания. Результаты внутрипроизводственных испытаний можно установить в качестве пределов действия или учитывать как предварительные критерии приемлемости. По мере накопления в ходе разработки данных о процессе необходимо представить более подробные результаты

внутрипроизводственных испытаний и критериев; критерии приемлемости подлежат пересмотру.

Большинство препаратов, содержащих рекомбинантные белки и моноклональные антитела, производятся с помощью асептических процессов, рассматриваемых в качестве нестандартных. Нестандартные процессы производства, новые технологии и новые упаковочные процессы требуют подробного описания (см. соответствующий документ Союза по валидации процесса производства).

P.3.4. Контроль критических этапов и промежуточных продуктов

Необходимо описать испытания и критерии приемлемости контроля ключевых этапов процесса производства. Вследствие ограниченности данных на ранних этапах разработки (I–II фазы) полная информация может отсутствовать.

Если для обработки промежуточных продуктов предусматривается их хранение, необходимо описать сроки и условия хранения и обосновать их данными изучения физико-химических, биологических и микробиологических свойств.

Для стерилизации методом фильтрации в досье для получения разрешения на проведение клинического исследования следует указать максимальную приемлемую биологическую нагрузку до фильтрации. В большинстве случаев приемлем показатель в 10 КОЕ/100 мл, в зависимости от соотношения фильтруемого объема и диаметра фильтра. Если это требование не выполняется, необходимо использовать предварительную фильтрацию через антибактериальный фильтр. Таким образом, можно получить желаемую низкую биологическую нагрузку. Вследствие небольших количеств приготовленного лекарственного препарата при достаточном обосновании допускается испытывать 100 мл нефильтрованного (фильтрованного) препарата.

Повторные манипуляции допускаются на конкретных этапах производства (например, повторная фильтрация), только если такие этапы должным образом описаны и обоснованы.

P.3.5. Валидация и (или) оценка процесса

Если применимо, необходимо кратко описать валидацию асептической обработки и лиофилизацию. Учитывая Приложение 13 «Производство исследуемых лекарственных препаратов» Правил надлежащей производственной практики Союза, стандарт валидации процессов стерилизации не должен отличаться от таковых, предусмотренных для зарегистрированного лекарственного препарата. В досье, в частности, необходимо включить сведения, напрямую затрагивающие безопасность лекармтаенного препарата, т.е. о бионагрузке и циклах добавления среды.

P.4. Контроль качества вспомогательных веществ

P.4.1. Спецификация

Допустимо использовать ссылки на Фармакопею Союза, ведущие зарубежные фармакопеи в соответствии с концепцией гармонизации. По вспомогательным веществам, не включенным в вышеупомянутые стандарты, Необходимо представить внутренние спецификации производителя.

P.4.2. Аналитические методики

При невозможности сослаться на фармакопейные статьи, перечисленные в разделе P.4.1 невозможно, необходимо описать использованные аналитические методики.

P.4.3. Валидация аналитических методик

Не применимо.

Р.4.4. Обоснование спецификаций

Для нефармакопейных вспомогательных веществ следует обосновать внутренние спецификации производителя, приведенные в разделе Р.4.1.

Р.4.5. Вспомогательные вещества человеческого или животного происхождения

В отношении вспомогательных веществ человеческого или животного происхождения в Приложении А.2 необходимо представить сведения об оценке безопасности относительно посторонних агентов (например, источники, спецификации, описание проведенных испытаний) и данные по вирусной безопасности в соответствие с Главой 3 настоящих Правил. Кроме того, в Приложении А.2 необходимо описать соответствие Главе по минимизации риска ТГЭ при применении лекарственных препаратов для медицинского применения в его текущей редакции.

Если в качестве вспомогательного вещества используется альбумин человека или иное вещество, полученное из плазмы, необходимо представить сведения об оценке безопасности относительно посторонних агентов согласно соответствующим главам о лекарственных препаратах, полученных из плазмы. Если полученный из плазмы компонент ранее использовался в зарегистрированном лекарственном препарате, допускается сослаться на это.

Р.4.6. Новые вспомогательные вещества

Для вспомогательного вещества (веществ), использованного в лекарственном препарате впервые или при новом пути введения, необходимо представить полное описание процесса производства, установления характеристик и контроля качества со ссылками на дополнительные данные по безопасности (доклинические и (или)

клинические) согласно формату активной фармацевтической субстанции (см. подробное описание в разделе А.3).

P.5. Контроль качества исследуемого лекарственного препарата

P.5.1. Спецификации

В отношении лекарственного препарата необходимо руководствоваться теми же принципами, которые описаны для составления активной фармацевтической субстанции. В спецификации серий ИЛП, которые будут использоваться в клинических исследованиях, необходимо описать испытания и критерии их приемлемости, использованные для установления надлежащего контроля за его качеством. Испытания на количественное содержание, подлинность и примеси являются обязательными. В отношении стерильных лекарственных препаратов обязательны испытания на стерильность и эндотоксины. В отсутствие должного обоснования необходимо включить испытание на биологическую активность. Необходимо установить верхние пределы содержания примесей, учитывая показатели их безопасности. Они могут потребовать пересмотра и коррекции в ходе последующей разработки.

Критерии приемлемости показателей качества лекарственного препарата требуют учета вопросов безопасности и этапа разработки. Поскольку критерии приемлемости, как правило, основаны на ограниченном количестве серий, использовавшихся в разработке, и серий, использованных в доклинических и клинических исследованиях, они по своей природе изначально являются предварительными. Они могут потребовать пересмотра и коррекции в ходе последующей разработки.

Аналитические методики и пределы содержания и биологической активности должны обеспечивать правильное дозирование.

Необходимо установить верхние пределы содержания примесей, не включенных в спецификацию активной фармацевтической субстанции, принимая во внимание вопросы безопасности.

Дополнительная информация по клиническим исследованиям II и III фаз

По мере накопления данных и опыта может потребоваться дополнение или исключение параметров и модификация аналитических методик. Спецификацию и критерии приемлемости, установленные для ранее проведенных испытаний, следует пересмотреть для клинических исследований III фазы и при необходимости адаптировать к текущим этапом разработки.

P.5.2. Аналитические методики

Необходимо описать аналитические методики всех испытаний, включенных в спецификацию. В отношении некоторых белков и комплексов, а также инновационных лекарственных форм, может потребоваться бóльшая детализация.

Более подробно см. раздел S.4.2.

P.5.3. Валидация аналитических методик

См. раздел S.4.3.

P.5.4. Посерийный анализ

Поскольку изначально спецификация может быть широкой, для оценки качества необходимо представить фактические данные о сериях. Необходимо представить фактические числовые значения количественных параметров.

Цель настоящего раздела – подтвердить качество серий (соответствие разработанной предварительной спецификации),

подлежащих применению в данном клиническом исследовании. В отношении клинических исследований ранней фазы, для которых характерно небольшое количество серий, необходимо представить результаты анализа серий, участвовавших в доклинических и клинических исследованиях, включая результаты анализа серий, подлежащих изучению в данном клиническом исследовании. Однако, по мере накопления опыта производства, при должном обосновании допускается представить результаты анализа лишь определенного количества репрезентативных серий.

Наряду с использованием серий необходимо представить сведения о номере серии, ее размере, производственной площадке, дате производства, методах контроля, критериях приемлемости и результатах испытаний. Необходимо описать процесс производства каждой серий.

P.5.5. Установление свойств примесей

Дополнительные примеси и продукты деградации, обнаруженные в ИЛП, но не описанные в разделе S.3.2, необходимо соответствующим образом идентифицировать и квалифицировать.

P.5.6. Обоснование спецификации

При обосновании показателей качества, включенных в спецификацию лекарственного препарата, необходимо главным образом руководствоваться спецификацией активной фармацевтической субстанции. Необходимо учесть показатели качества, отражающие стабильность. Необходимо обосновать предложенные критерии приемлемости.

P.6. Стандартные образцы или материалы

В соответствующих случаях необходимо представить параметры установления характеристик стандартного образца.

При необходимости допускается сослаться на раздел S.5.

P.7. Система упаковки/укупорки

Необходимо описать предполагаемую первичную упаковку ИЛП, подлежащего изучению в клиническом исследовании. Если применимо, следует сослаться на соответствующую фармакопейную статью. Если препарат упакован в нестандартное устройство введения или если использованы нефармакопейные материалы, необходимо представить их описание и спецификации. Если применимо, необходимо подтвердить знак Союза о регистрации изделия в качестве вспомогательного медицинского изделия.

В отношении парентеральных лекарственных препаратов, способных взаимодействовать с системой упаковка/укупорка, могут потребоваться дополнительные данные.

P.8. Стабильность лекарственного препарата

К лекарственному препарату применяются те же требования, что и к активной фармацевтической субстанции, включая программу изучения стабильности, результаты изучения стабильности, определение срока годности (в том числе увеличение срока годности свыше периода, охваченного данными естественного хранения), обязательства по стабильности и пострегистрационное расширение. Результаты исследований стабильности должны подтвердить, что ИЛП остается стабильным на протяжении всего периода хранения. Представленные данные должны подтверждать предлагаемый срок годности лекарственного препарата с момента его выпуска до введения пациентам. В протоколе изучения стабильности ИЛП необходимо учесть данные, приобретенные по результатам изучения стабильности активной фармацевтической субстанции.

При достаточном обосновании приемлемы исследование крайних вариантов и матричный метод.

В отношении препаратов, предназначенных для применения после восстановления, разведения или смешивания, необходимо представить данные по стабильности готового к применению лекарственного препарата. Такие данные не требуются, если приготовленный лекарственный препарат после вскрытия упаковки или восстановления подлежит немедленному применению.

3. Приложения

A.1. Производственные помещения и оборудование

Не применимо.

A.2. Оценка безопасности относительно посторонних агентов

Необходимо идентифицировать все материалы человеческого или животного происхождения, использованные в процессе производства как активной фармацевтической субстанции, так и лекарственного препарата, и материалы, соприкасающиеся с активной фармацевтической субстанцией или лекарственным препаратом в ходе процесса производства. В настоящем разделе необходимо представить данные по оценке риска с точки зрения потенциальной контаминации посторонними агентами.

Агенты трансмиссивной губчатой энцефалопатии

Необходимо представить подробные сведения по недопущению и контролю агентов трансмиссивной губчатой энцефалопатии. Такие сведения, к примеру, могут включать сертификацию и контроль процесса производства материала, процесса или агента соответственно.

Необходимо следовать документу Союза по минимизации риска передачи возбудителя губчатой энцефалопатии через лекарственные препараты для медицинского применения и ветеринарного применения.

Вирусная безопасность

В соответствующих случаях в настоящем разделе необходимо представить данные по оценке риска с позиций потенциальной вирусной контаминации. Документация должна соответствовать требованиям, изложенным в Главе 3 настоящих Правил

Прочие посторонние агенты

Подробную информацию по другим посторонним агентам, например? бактериям, микоплазме и грибам, необходимо представить в соответствующих основных разделах досье.

A.3. Новые вспомогательные вещества

В отношении новых вспомогательных веществ необходимо представить сведения, указанные в разделе S в формате общего технического документа (Модуль 3, 3.2.S), в соответствии с клинической фазой.

A.4. Растворители для восстановления и разбавители

Информация по растворителям для разведения и разбавителям должна быть предоставлена согласно разделу P регистрационного досье.

4. Существенные поправки

Ниже приводится неполный перечень поправок, рассматриваемых в качестве «существенных»:

– изменение производителя (производителей) активной фармацевтической субстанции или лекарственного препарата;

– существенные изменения процесса производства (например, новая экспрессирующая клеточная линия, добавление или исключение стадии очистки, изменение стадий, влияющих на очистку от вирусов, любые процедуры переработки, не указанные в ДИЛП);

– изменения, приводящие к образованию новых примесей и родственных соединений;

– изменение спецификации, характеризующиеся расширением критериев приемлемости или исключением или заменой аналитических методик;

– изменения в состава, включая изменение концентрации активной фармацевтической субстанции и содержания вспомогательного вещества;

– изменение материала первичной упаковки (изменение разновидности материала);

– увеличение срока годности, превышающее утвержденную программу стабильности;

– изменения утвержденных рекомендаций по сроку годности готового к применению лекарственного препарата (после вскрытия упаковки);

– любое увеличение срока годности, не соответствующее согласованной программе изучения стабильности или без предварительно взятия обязательства (см. разделы S.7 и P.8).

Тем не менее, увеличение срока годности на основании утвержденной программы стабильности обычно не считается существенной поправкой, если:

– каждое дополнительное увеличение срока годности превышает утвержденный срок годности не более чем в два раза и не более чем на 12 месяцев;

– увеличение охвачено и соответствует утвержденной программе изучения стабильности;

– в продолжающихся исследованиях стабильности при заданной температуре хранения значимые тенденции или несоответствие спецификации не выявлены;

– заявитель обязуется уведомлять уполномоченные органы о непредвиденных проблемах со стабильностью в продолжающемся исследовании (включая значимые тенденции или несоответствие спецификации) и предложить соответствующие корректирующие действия.

ГЛАВА 15. ПОДОБНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ

1. Введение

1.1. Регуляторная основа

Компания вправе начать разрабатывать новый биологический лекарственный препарат, заявляя его в качестве «подобного» референтному лекарственному препарату, зарегистрированному в Союзе на основании полного досье, удовлетворяющего требования части I Приложения 1 к Правилам регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения в Евразийском экономическом союзе. В этом случае правовая основа регистрации закладывается настоящими Правилами и частью II Приложения 1 к Правилам регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения в Евразийском экономическом союзе. В целях получения данных, обосновывающих подобие по качеству, безопасности и эффективности нового биологического препарата и выбранного референтного лекарственного препарата, зарегистрированного в Союзе, необходимо провести исследования сопоставимости.

1.2. Область применения

Целью настоящей Главы является описание концепции «подобных» биологических лекарственных препаратов (далее – «биоподобные препараты») и описание основных принципов, которые необходимо применять к ним в целях разработки, исследований и регистрации.

В целях получения более подробных сведений, чем содержащиеся в настоящих Правилах, компаниям, разрабатывающим биоаналоги,

рекомендуется обращаться в уполномоченные органы государств-членов Союза для получения консультации по вопросам разработки.

2. Общие положения

Настоящую Главу следует рассматривать в совокупности с другими Главами, настоящих Правил.

3. Основные принципы

3.1. Применение подхода биоаналогичности

Биоподобный лекарственный препарат – биологический лекарственный препарат, содержащий версию активной фармацевтической субстанции зарегистрированного в Союзе оригинального (референтного) лекарственного препарата. С помощью всесторонних исследований сопоставимости необходимо подтвердить отсутствие клинически значимых отличий от референтного лекарственного препарата по показателям качества, биологической активности, безопасности и эффективности.

Концепция биоаналогичности, в принципе, применима к любому биологическому лекарственному препарату. Однако на практике успех разработки биоподобного лекарственного препарата будет зависеть от возможности произвести лекарственный препарат подобный референтному лекарственному препарату и достоверно подтвердить аналогичность свойств рассматриваемых лекарственных препаратов. Это предполагает всестороннее установление и сравнение физико-химических и биологических характеристик и требует знаний по интерпретации любых различий между биоподобным и референтным лекарственными препаратами.

Таким образом:

Стандартный подход, применяемый к воспроизведенным лекарственным препаратам (подтверждение биоэквивалентности референтному лекарственному препарату с помощью исследований биодоступности), применимый к большинству лекарственных препаратов, полученных химическим путем, в принципе, не достаточен для подтверждения аналогичности биологических, в том числе биотехнологических, препаратов вследствие их сложности. В связи с этим необходимо следовать подходу биоаналогичности, основанному на всесторонних исследованиях сопоставимости.

Научные принципы исследований биоаналогичной сопоставимости основываются на таковых, применяемых к оценке влияния изменений производственного процесса биологического лекарственного препарата (изложенные в Главе 9.1 настоящих Правил) на его качество, безопасность, эффективность.

Применимость подхода биоаналогичности к конкретному биологическому лекарственному препарату зависит от доступности современных аналитических методов, использованных производственных процессов, а также наличия клинических моделей для оценки сопоставимости.

Подход биоаналогичности в первую очередь применим в отношении высоко очищенных препаратов, свойства которых могут быть более полно охарактеризованы (например, многие биотехнологические лекарственные препараты). Подход биоаналогичности сложнее применить к другим видам биологических препаратов, свойства которых в силу их происхождения сложнее охарактеризовать, к примеру, биологические субстанции, получаемые с помощью экстракции из биологических источников и (или) в

отношении которых накоплен лишь ограниченный клинический и регуляторный опыт.

Активная фармацевтическая субстанция биоподобного лекарственного препарата должна быть подобна в молекулярном и биологическом отношении активной фармацевтической субстанции референтного лекарственного препарата. Например, аминокислотные последовательности белков фармацевтических субстанций должны совпадать.

Режим дозирования и путь введения биоподобного и референтного лекарственных препаратов должны быть одинаковыми.

Несовпадение с дозировкой, лекарственной формой, составом, вспомогательными веществами или формой выпуска референтного лекарственного препарата требует обоснования. Такое обоснование требует представления дополнительных данных. Никакие различия не должны снижать безопасность.

Целенаправленные изменения для повышения эффективности препарата не совместимы с подходом биоаналогичности (например, оптимизация профиля гликозилирования препарата). Вместе с тем, необходимо изучить различия, которые могут способствовать повышению безопасности (например, меньшее содержание примесей или более низкая иммуногенность), такие различия могут не противоречить биоаналогичности.

Биоподобный лекарственный препарат в отношении данных по качеству должен соответствовать всем требованиям, содержащимся в модуле 3 части I Приложения 1 Правил регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения в рамках Евразийского экономического союза, и удовлетворять техническим

требованиям Фармакопеи Союза и всем дополнительным требованиям, например, предусмотренным настоящими Правилами.

Необходимо подтвердить сопоставимую безопасность и эффективность биоподобного и референтного лекарственного препарата или обосновать ее иным образом в соответствии с требованиями к данным, предусмотренным Правилами регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения в рамках Евразийского экономического союза. Общие технические и класс-специфичные для биоподобных лекарственных препаратов положения рассматриваются в отдельных главах настоящих Правил. В отсутствие класс-специфичных рекомендаций заявителям следует обращаться в уполномоченные органы за научной консультацией.

Если биоаналогичность была подтверждена в отношении одного показания к применению, то при надлежащем научном обосновании возможна экстраполяция на другие показания к применению референтного лекарственного препарата.

После регистрации регуляторное требование о необходимости повторного подтверждения биоаналогичности референтному лекарственному препарату отсутствует, например, в связи с изменением процесса производства.

В целях осуществления фармаконадзора и в соответствии с Надлежащей практикой фармаконадзора Союза следует принять все необходимые меры по однозначной идентификации любого биологического лекарственного препарата, являющегося предметом отчета о подозреваемой нежелательной реакции, с указанием его полного торгового наименования и номера серии.

3.2. Выбор референтного лекарственного препарата

Референтный лекарственный препарат должен быть зарегистрирован в Союзе на основании полного регистрационного досье, соответствующего по объему требованиям, приведенным в части I Приложения 1 к Правилам регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения в Евразийском экономическом союзе.

В целях получения согласованных данных и выводов на протяжении всей программы исследований сопоставимости по качеству, безопасности и эффективности в ходе разработки биоподобного лекарственного препарата в качестве препарата сравнения следует использовать один референтный лекарственный препарат, регистрационное досье которого находится в Союзе.

Однако с целью облегчения глобальной разработки биоподобных лекарственных препаратов и во избежание ненужного повторения клинических исследований, производитель вправе сравнить биоподобный лекарственный препарат в определенных клинических исследованиях и *in vivo* доклинических исследованиях (при необходимости) с препаратом сравнения, не зарегистрированном в Союзе (например, незарегистрированной в Союзе версией референтного лекарственного препарата), который должен быть зарегистрирован уполномоченным органом на основании научных и регуляторных стандартов, аналогичных таковым уполномоченных органов государств-членов Союза (например, государства-члены Международной конференции по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения). Кроме того, ответственностью производителя является установление соответствия препарата сравнения, зарегистрированного

за пределами Союза, референтному лекарственному препарату, зарегистрированному в Союзе.

В целях подтверждения биоаналогичной сопоставимости по качеству необходимо провести параллельный анализ биоподобного лекарственного препарата (в рамках промышленных серий, полученных с конкретной производственной площадки, включенной в регистрационное досье) и зарегистрированного в Союзе референтного лекарственного препарата. Однако для создания целевого профиля качества биоподобного лекарственного препарата допускается одновременное использование препарата сравнения, не зарегистрированного в Союзе, и зарегистрированного в Союзе референтного лекарственного препарата.

Кроме того, если часть клинических и *in vivo* доклинических исследований, вошедших в программу разработки, проведены с незарегистрированным в Союзе препаратом сравнения, заявитель должен представить достаточные данные или сведения, чтобы научно обосновать применимость этих сравнительных данных и связать их с референтным лекарственным препаратом, зарегистрированным в Союзе. С научной точки зрения к необходимым связующим данным в обязательном порядке относятся результаты аналитических исследований (например, структурные и функциональные данные), в которых сравнивались все три лекарственных препарата (биоподобный лекарственный препарат-кандидат, зарегистрированный в Союзе референтный лекарственный препарат и незарегистрированный в Союзе препарат сравнения), они также могут включать результаты связующих клинических ФК- и (или) ФД-исследований всех трех лекарственных препаратов. Общая приемлемость подобного подхода и вид требуемых связующих данных определяется в индивидуальном для каждого

лекарственного препарата порядке и требует заблаговременного обсуждения с уполномоченными органами. Однако конечное признание приемлемости научного обоснования и связующих данных будет произведено лишь в ходе экспертизы регистрационного досье.

3.3. Принципы установления биоаналогичности

Основной принцип программы разработки биоподобного лекарственного препарата – установить аналогичность между биоподобным и референтным лекарственными препаратами наилучшими из возможных способами, обеспечивая применимость ранее установленной безопасности и эффективности референтного лекарственного препарата также и к биоподобному лекарственному препарату.

Биоподобный лекарственный препарат должен быть высоко аналогичен референтному лекарственному препарату по физико-химическим и биологическим характеристикам. Любые выявленные различия необходимо должным образом обосновать с позиций их потенциального влияния на безопасность и эффективность.

На протяжении всей программы разработки рекомендуется применять поэтапный подход, начинающийся со всестороннего установления физико-химических и биологических характеристик. Объем и характер доклинических исследований *in vivo* и клинических исследований устанавливают в зависимости от качества доказательств, полученных на предыдущем этапе (этапах), включая надежность данных физико-химических, биологических и *in vivo* доклинических исследований.

Цель клинических исследований, в целом, заключается в анализе небольших различий, выявленных на предыдущих этапах, и подтверждение сопоставимости клинических свойств биоподобного и

референтного лекарственных препаратов. Клинические данные не допускается использовать для обоснования существенных различий между показателями качества.

Если исследования биоаналогичной сопоставимости указывают на значимые различия между биоподобным лекарственным препаратом-кандидатом и референтным лекарственным препаратом, ставя под сомнение подтверждение биоаналогичности, следует начать самостоятельную разработку для составления полного регистрационного досье.

Конечной целью исследований биоаналогичной сопоставимости является исключение каких-либо клинически значимых различий между биоподобным и референтным лекарственным препаратом. Вследствие чего в целях выявления таких различий дизайн, проведение, конечные точки исследования и (или) выбранная целевая популяция должны обеспечить достаточную чувствительность.

В определенных случаях подтверждающие клинические исследования могут не требоваться. Для этого биоаналогичная эффективность и безопасность должны быть однозначно выведены из аналогичности физико-химических характеристик, биологической активности (активности) и ФК- и (или) ФД-профилей биоподобного и референтного лекарственных препаратов. Кроме того, необходимо, чтобы профиль примесей и свойства вспомогательных веществ биоподобного лекарственного препарата сами по себе не вызывали опасений.

Подобные упрощенные подходы следует согласовывать с уполномоченными органами.

ГЛАВА 15.1. ПОДОБНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ, СОДЕРЖАЩИЕ В КАЧЕСТВЕ АКТИВНОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ БЕЛКИ: ВОПРОСЫ КАЧЕСТВА

Резюме

В настоящей Главе по биоподобным лекарственным препаратам, содержащим в качестве активной фармацевтической субстанции белки, полученные с использованием биотехнологии, отражены вопросы качества, установление требований к качеству биологического лекарственного препарата, заявляемого как подобный другому, ранее зарегистрированному в Союзе лекарственному препарату.

В настоящей Главе указаны требования относительно производственного процесса, выполнения сравнительных исследований по доказательству подобия качества, с учетом выбора референтного лекарственного препарата (препарата сравнения), аналитических методов, физико-химических характеристик, биологической активности, чистоты и соответствующих параметров показателей качества для спецификации биоподобного лекарственного препарата.

1. Введение

Как указывается в Главе 15 настоящих Правил, компания вправе начать разрабатывать новый биологический лекарственный препарат, заявляя его в качестве подобного (подобного биологического лекарственного препарата) по качеству, безопасности и эффективности референтному лекарственному препарату, зарегистрированному в Союзе. Разработка подобного биологического лекарственного препарата (биоаналога) частично основана на научных данных, полученных в отношении референтного лекарственного препарата, при условии, что

аналогичность активной фармацевтической субстанции биоаналога по физико-химическим и биологическим свойствам по отношению к активной фармацевтической субстанции референтного лекарственного препарата подтверждена.

Производство и контроль качества биоподобных лекарственных препаратов осуществляется по собственному плану разработки путем применения передовых подходов и учета современных данных. Разработку лекарственного препарата необходимо осуществлять в соответствии с применимыми документами Союза.

Сравнение биоподобного лекарственного препарата с общедоступным стандартом, например, фармакопейной статьей, для целей сопоставимости недостаточно. Необходимо подтвердить аналогичность биоподобного лекарственного препарата референтному лекарственному препарату, зарегистрированному в Союзе, избранному компанией для разработки биоподобного лекарственного препарата. Поэтому в целях подтверждения того, что профиль биоподобного лекарственного препарата по качеству, эффективности и безопасности аналогичен референтному лекарственному препарату, необходимо провести значительный объем сравнительных исследований с последним.

Предполагается, что производитель, разрабатывающий биоподобный лекарственный препарат, не имеет доступа ко всей информации, которая позволила бы провести исчерпывающее сравнение с референтным лекарственным препаратом, особенно о процессе производства. Тем не менее, подаваемые аналитические данные должны позволить прийти к твердому заключению о физико-химической и биологической аналогичности между референтным лекарственным препаратом и биоподобным лекарственным препаратом.

При правильном проведении, исследования биоаналогичной сопоставимости на этапе качества, включая анализ значимых показателей качества с помощью достаточно чувствительных аналитических методов, могут позволить подать заявление о регистрации биоподобного лекарственного препарата. В этом случае, чтобы завершить разработку биоподобного лекарственного препарата, заявителю, как правило, потребуется реализовать соответствующую программу доклинической и клинической сопоставимости, предусмотренную настоящими Правилами.

2. Область применения

В настоящей Главе рассматриваются вопросы качества при подтверждении биоаналогичной сопоставимости подобных биологических лекарственных препаратов, содержащих белки, полученные по технологии рекомбинантной ДНК, и их производные, с целью обоснования регистрации. Тем не менее, поскольку биоаналогичный подход применим к любым биологическим лекарственным препаратам, принципы, раскрываемые в настоящей Главе, могут быть применимы к другим биологическим препаратам в индивидуальном порядке.

Исследования сопоставимости при изменениях процесса производства определенного лекарственного препарата (т.е. изменения в ходе разработке и после регистрации), описанные в Главе 9.1 настоящих Правил, в настоящей Главе не рассматриваются.

3. Правовая основа

Необходимо представить полное досье по качеству (Модуль 3 регистрационного досье), соответствующее праву Союза, которое

следует дополнить подтверждением биоаналогичной сопоставимости в соответствии с настоящей Главой. Заявителям следует учитывать, что исследования сопоставимости биоподобного лекарственного препарата с референтным лекарственным препаратом являются дополнительным элементом к стандартным требованиям, предъявляемым к досье по качеству. Их результаты требуют отдельного описания в разделе 3.2.P регистрационного досье.

4. Процесс производства подобного биологического лекарственного препарата

Разработка биоподобного лекарственного препарата и ее документирование должны охватывать два различающихся аспекта:

i) молекулярные характеристики и показатели качества (ПК) целевого профиля препарата должны быть сопоставимы с референтным лекарственным препаратом;

ii) осуществление и постоянство процесса производства биоподобного лекарственного препарата как таковые.

Целевой профиль качества биоподобного лекарственного препарата (ЦПКП) должен быть основан на данных выбранного референтного лекарственного препарата, включая общедоступные сведения и данные, полученные при детальном установлении характеристик референтного лекарственного препарата. ЦПКП должен составлять основу разработки биоподобного лекарственного препарата и процесса его производства. Такой ЦПКП следует рассматривать в качестве инструмента разработки, отдельные целевые диапазоны которого, по мере получения новых сведений о референтном лекарственном препарате, могут изменяться в ходе разработки.

Производство биоподобного лекарственного препарата и контроль его качества осуществляются по собственному плану разработки с учетом современных сведений о производственных процессах и последствий для свойств препарата. Как в случае любого биологического лекарственного препарата, биоподобный лекарственный препарат характеризуется молекулярной композицией активной фармацевтической субстанции, образующейся в результате процесса ее производства, привносящего свои молекулярные варианты, изоформы и другие родственные вещества, а также производственные примеси. Как следствие, в целях достижения ЦПКП процесс производства необходимо должным образом спроектировать. Необходимо тщательно выбрать экспрессирующую систему, учитывая различия между экспрессирующими системами, которые могут привести к нежелательным последствиям, таким как атипичный профиль гликозилирования, повышенная вариабельность в содержании примесей и (или) иной по сравнению с референтным лекарственным препаратом профиль примесей.

При выборе состава биоподобного лекарственного препарата необходимо принимать во внимание современные технологии, идентичность составу референтного лекарственного препарата не является обязательной. Независимо от выбранного состава, необходимо подтвердить обоснованность предлагаемого состава с точки зрения его стабильности, сопоставимости (т.е. взаимодействия со вспомогательными веществами, растворителями и первичными упаковочными материалами), сохранности, активности и количественного содержания активной фармацевтической субстанции. Если состав и (или) система контейнер/укупорка отличаются от таковых референтного лекарственного препарата (включая любой материал, контактирующий с лекарственным препаратом), их

потенциальное влияние на эффективность и безопасность биоподобного лекарственного препарата необходимо должным образом обосновать.

Стабильность биоподобного лекарственного препарата определяется в соответствии с Главой 8 настоящих Правил. Любые утверждения относительно стабильности и совместимости необходимо обосновать собственными экспериментальными данными, они не могут быть экстраполированы на основании данных о референтном лекарственном препарате.

Поскольку биоподобный лекарственный препарат имеет собственный жизненный цикл, при внесении изменений в производство (активной фармацевтической субстанции и (или) лекарственного препарата) в ходе разработки, необходимо провести оценку сопоставимости (в соответствии с Главой 9.1 настоящих Правил). В целях упрощения экспертизы регистрационного досье все исследования сопоставимости изменений процесса, произведенных в ходе разработки, необходимо четко обозначить и представить отдельно от исследований сопоставимости для подтверждения биоаналогичности с референтным лекарственным препаратом. В ходе разработки биоподобного лекарственного препарата могут быть внесены изменения в процесс производства, однако при получении необходимых данных по качеству, безопасности и эффективности для подтверждения биоаналогичности по отношению к референтному лекарственному препарату, строго рекомендуется использовать лекарственный препарат, произведенный в рамках промышленного процесса производства, отражающего профиль качества серий, выпускаемых в реализацию.

5. Исследование сопоставимости с референтным лекарственным препаратом. Вопросы качества

5.1. Референтный лекарственный препарат

Необходимо четко обозначить референтный лекарственный препарат, использованный в исследованиях биоаналогичной сопоставимости на этапе качества (например, торговое наименование, лекарственная форма, состав, дозировка, происхождение лекарственного препарата, номера серий, номер партии, дата производства серий, назначение). В целях формирования репрезентативного профиля качества и получения достоверных данных по сопоставимости необходимо использовать несколько серий референтного лекарственного препарата. При наличии нескольких дозировок или лекарственных форм их выбор необходимо должным образом обосновать. При определении целевого профиля качества необходимо учитывать «возраст» (по отношению к его сроку годности) различных серий референтного лекарственного препарата.

Для подтверждения биоаналогичности в качестве референтного лекарственного препарата не могут быть использованы общедоступные стандартные образцы (например, фармакопейные). Однако, как указано в разделе 5.3, применение данных стандартных образцов играет важную роль в квалификации и стандартизации методов.

5.2. Исследование биоаналогичной сопоставимости

В целях подтверждения того, что профиль качества биоподобного лекарственного препарата высоко аналогичен референтному лекарственному препарату потребуется провести обширные исследования сопоставимости. Они должны включать всесторонний анализ предложенного биоподобного лекарственного препарата и референтного лекарственного препарата с использованием чувствительных

ортогональных методов для выявления не только сходств, но и потенциальных различий между показателями качества. Этот анализ, в отсутствие обоснования обратного, должен включать параллельные сравнительные исследования. Любые обнаруженные различия между показателями качества необходимо должным образом обосновать с позиций их потенциального влияния на безопасность и эффективность.

Если подтвердится наличие значимых различий по качеству (в отношении которых невозможно обосновать отсутствие их клинически значимого влияния), заявление разработчика об аналогичности по отношению к референтному лекарственному препарату вызовут сомнения. В таких случаях целесообразно рассмотрение вопроса о регистрации препарата на основе полного регистрационного досье. В качестве альтернативы заявитель вправе принять решение о пересмотре процесса производства в целях минимизации или предотвращения этих различий.

Цель исследований биоаналогичной сопоставимости заключается в подтверждении аналогичности биоподобного лекарственного препарата и выбранного заявителем референтного лекарственного препарата на уровне готовой лекарственной формы. Не требуется, чтобы все показатели качества биоподобного лекарственного препарата полностью совпадали с показателями качества референтного лекарственного препарата. Однако если обнаружены качественные и (или) количественные различия, их необходимо обосновать и, в соответствующих случаях, подтвердить отсутствие их влияния на клинические характеристики препарата. Как указано в Главе 15, а также Главе 15.2 настоящих Правил, это может потребовать представления дополнительных доклинических и (или) клинических данных. Особое внимание необходимо уделить показателям качества, которые могут

повлиять на иммуногенность или активность, или не выявленным у референтного лекарственного препарата.

Заявитель должен подтвердить, что целевой продукт (включая родственные соединения), содержащийся в биоподобном лекарственном препарате, аналогичен таковому референтного лекарственного препарата. В противоположность этому, производственные примеси референтного и биоподобного лекарственных препаратов могут различаться, однако эти различия необходимо минимизировать. Предпочтительно полагаться на процессы очистки, направленные на удаление примесей, чем реализацию доклинической программы испытаний в целях их квалификации. Различия, которые могут обладать преимуществами с точки зрения безопасности (например, меньшее содержание примесей), необходимо объяснить, однако они, скорее всего, не станут препятствием для установления биоаналогичности.

По возможности, для исследований биоаналогичной сопоставимости следует установить численные диапазоны показателей качества. Эти диапазоны должны преимущественно основываться на экспериментально определенных диапазонах показателей качества референтного лекарственного препарата и, в отсутствие обоснования обратного, не должны быть шире, чем вариабельность его репрезентативных серий. Выбранные диапазоны необходимо обосновать с учетом числа испытанных партий референтного лекарственного препарата, изученных показателей качества, «возраста» серий на момент испытаний и использованной аналитической методики. При обосновании в целях определения диапазонов показателей качества допускается использовать методы описательной статистики. Допустимые диапазоны, используемые в исследованиях биоаналогичной сопоставимости с референтным лекарственным

препаратом, следует рассматривать отдельно от диапазонов, указанных в спецификациях на выпуск (см. также раздел 6 настоящей Главы).

Поскольку процесс производства референтного лекарственного препарата протекает по собственному жизненному циклу, возможно возникновение различий по некоторым показателям качества. Такие случаи могут произойти в период разработки биоподобного лекарственного препарата и ЦПКП более не будет отражать референтный лекарственный препарат, находящийся на рынке. Диапазоны, установленные до и после обнаруженного сдвига профиля качества, как правило, допускается использовать для обоснования исследований биоаналогичной сопоставимости на этапе качества, поскольку любой из диапазонов отражает свойства референтного лекарственного препарата. Значения показателей качества, находящихся вне или между диапазоном(ами), установленным(и) для показателя качества референтного лекарственного препарата, необходимо должным образом обосновать с позиций их потенциального влияния на безопасность и эффективность. Следует также отметить, что регуляторное требование о повторном подтверждении биоаналогичности после регистрации отсутствует.

5.3. Аналитические вопросы

В целях достоверного подтверждения сопоставимости биоподобного лекарственного препарата и референтного лекарственного препарата по качеству необходимо провести параллельные исследования по установлению характеристик биоподобного лекарственного препарата и референтного лекарственного препарата с учетом современных достижений.

Обязанностью заявителя является подтвердить способность выбранных в целях исследований биоаналогичной сопоставимости

методов обнаруживать незначительные различия между всеми параметрами, влияющими на оценку качества (например, способность с высокой чувствительностью обнаруживать значимые варианты). Методы (методики), использованные в исследованиях по установлению характеристик, являются неотъемлемой частью комплекта данных по качеству и требуют надлежащей квалификации (подтверждения применимости) для целей изучения сопоставимости. Если применимо, в целях квалификации и стандартизации методов необходимо использовать стандартные образцы и материалы (например, фармакопейные, ВОЗ).

Прямой или параллельный анализ биоподобного лекарственного препарата и референтного лекарственного препарата с помощью некоторых аналитических методик может оказаться невозможным или быть малоинформативным (например, вследствие низкой концентрации активной фармацевтической субстанции и (или) наличия мешающих вспомогательных веществ, таких как альбумин, которые искажают или не позволяют получить адекватные результаты). В этом случае исследуемый образец может быть приготовлен из готовой лекарственной формы с использованием подходящих методов (например, экстракции, концентрирования и (или) других). В таких ситуациях, необходимо описать методики пробоподготовки, их влияние на пробы необходимо должным образом документировать и проанализировать (например, путем сравнения активных фармацевтических субстанций до и после получения готовой лекарственной формы с последующим извлечением из готовой лекарственной формы).

5.3.1. Физико-химические свойства

Сравнение физико-химических свойств включает не только оценку соответствующих параметров, но и установление структуры родственных соединений и родственных примесей. В программе установления физико-химических характеристик необходимо предусмотреть определение состава, физических свойств, первичной структуры и структур более высокого порядка биоподобного лекарственного препарата с применением соответствующих методов. Необходимо подтвердить целевую аминокислотную последовательность биоподобного лекарственного препарата, которая не должна отличаться от таковой референтного лекарственного препарата. В соответствующих случаях необходимо сопоставить N- и C-концевые аминокислотные последовательности, свободные SH-группы и дисульфидные мостики. Все модификации и (или) укорочения необходимо оценить количественно и описать внутренне присущую (собственную) или обусловленную экспрессирующей системой вариабельность. Любые выявленные различия между биоподобным и референтным лекарственными препаратами необходимо обосновать с позиций профиля микрогетерогенности референтного лекарственного препарата (например, вариабельностью C-концевого лизина).

Необходимо должным образом охарактеризовать наличие и степень постранслящионных модифициаций (например, гликозилирования, окисления, дезамидирования, укорочения). Необходимо тщательно сравнить углеводные структуры (при их наличии), включая общий гликановый профиль, сайт-специфичные профили гликозилирования, в том числе занятость сайтов гликозилирования. Наличие структур или вариантов гликозилирования, отсутствующих в референтном лекарственном препарате, может

вызвать возражения и требует надлежащего обоснования, уделяя особое внимание структурам, нехарактерным для человека (нехарактерные для человека ковалентные связи, последовательности или сахара).

5.3.2. Биологическая активность

В исследованиях биоаналогичной сопоставимости необходимо предусмотреть сравнительную оценку биологических свойств биоаналога и референтного лекарственного препарата как неотъемлемого этапа установления всестороннего профиля характеристик. Биологическая активность – это особая способность или свойство препарата оказывать определенный биологический эффект. В целях определения биологической активности необходимо использовать соответствующие биологические методы количественного определения, основанные на различных взаимодополняющих принципах. В зависимости от биологических свойств препарата допускается использовать различные способы количественного определения (например, количественное определение связывания с лигандом или рецептором, ферментные методы, методы на основе клеток и функциональные методы), приминая во внимание их ограничения. В целях преодоления ограничений, обусловленных валидационными характеристиками отдельных количественных биологических методов, рекомендуется придерживаться ортогональных (взаимодополняющих) подходов. Если применимо, необходимо использовать отдельные методы для оценки связи и активации рецепторов. В соответствующих случаях допускается приводить ссылки на доклинический и (или) клинический раздел(ы) досье. Необходимо подтвердить, что количественные биологические методы чувствительны, специфичны и обладают достаточной дискриминативной способностью. По возможности, результаты соответствующего(их) биологического(их)

метода(ов) следует представлять в калиброванных (градуированных) по международным или национальным стандартным образцам (при их наличии) единицах активности. Если применимо, эти методы должны удовлетворять соответствующим требованиям Фармакопеи Союза к биологическим методам количественного определения.

5.3.3. Иммунохимические свойства

Как указано в Главе 15.3 настоящих Правил, иммунологические функции моноклональных антител и производных от них веществ (например, гибридные белки на основе Fc-фрагментов IgG) необходимо всесторонне сравнить. Это обычно включает сравнение аффинности продуктов (целевого продукта, родственных соединений и родственных примесей) к их мишеням. Кроме того, в отсутствии обоснования обратного необходимо сравнить аффинность Fc-фрагментов к соответствующим рецепторам (например, FcγR, C1q, FcRn). В целях сравнения способности индуцировать Fab- и Fc-ассоциированные эффекторные функции необходимо использовать соответствующие методы.

5.3.4. Чистота и примеси

Используя комбинацию аналитических методик, необходимо провести качественное и количественное сравнение профилей чистоты и примесей биоподобного и референтного лекарственных препаратов. В целях идентификации и сравнения родственных соединений и примесей необходимо использовать подходящие ортогональные и современные методы. При таком сравнении необходимо принимать во внимание характерные пути деградации (например, окисление, дезамидирование, агрегация) биоподобного лекарственного препарата и потенциальные посттрансляционные модификации белков. Необходимо указать «возраст» и срок годности референтного лекарственного препарата на момент проведения испытаний; в соответствующих случаях

необходимо проанализировать его потенциальное влияние на профиль качества. В целях достоверного подтверждения аналогичности путей деградации референтного лекарственного препарата и биоподобного лекарственного препарата прибегают к сравнению значимых показателей качества, испытанных в определенные временные точки и при определенных условиях хранения (например, ускоренных или стрессовых).

Производственные примеси (например, белки клетки-хозяина, ДНК клетки-хозяина, реагенты, примеси, обусловленные последующей после культивирования обработкой и т.д.) будут отличаться от процесса к процессу. В связи с этим качественное сравнение указанных параметров в исследованиях биоаналогичной сопоставимости может быть не значимо. Тем не менее, следуя действующим рекомендациям и фармакопейным требованиям, следует использовать современные аналитические методы, а потенциальные риски, обусловленные этими обнаруженными примесями (например, иммуногенность), необходимо должным образом документировать и обосновывать.

5.3.5. Количественное содержание

Количественное содержание следует определять, используя соответствующие методы, и выражать в тех же единицах, что и у референтного лекарственного препарата. Необходимо подтвердить сопоставимость количественного содержания биоподобного и референтного лекарственных препаратов.

6. Спецификации

Подобно всякому биотехнологическому препарату, выбор испытаний, включаемых в спецификации (или стратегии контроля) как фармацевтической субстанции, так и лекарственного препарата зависит от

его характеристик и должен осуществляться в соответствии с Главой 6. Необходимо представить основания, руководствуясь которыми был выбран предлагаемый диапазон критериев приемлемости для рутинных испытаний.

Заявленный срок годности препарата должен быть обоснован полными данными по стабильности биоподобного лекарственного препарата. Сравнительные исследования стабильности в реальном времени и реальных условиях между биоподобным и референтным лекарственными препаратами не требуются.

ГЛАВА 15.2. ПОДОБНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ, СОДЕРЖАЩИЕ В КАЧЕСТВЕ АКТИВНОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ БЕЛКИ: ВОПРОСЫ ДОКЛИНИЧЕСКИХ И КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Резюме

Настоящая Глава освещает общие принципы доклинического и клинического этапов разработки и оценки регистрационных досье подобных биологических лекарственных препаратов, содержащих в качестве активной фармацевтической субстанции рекомбинантные белки.

В Главе изложены требования к данным, получаемым в ходе доклинических и клинических исследований лекарственного препарата, заявленного в качестве подобного («биоподобного лекарственного препарата»).

В разделе по доклиническим исследованиям приведена информация о фармако-токсикологической оценке, а в разделе по клиническим исследованиям – изложены требовании к исследованиям фармакокинетики, фармакодинамики и эффективности. В разделе по клинической безопасности и фармаконадзору рассматриваются исследования клинической безопасности, включая иммуногенность, а также план управления рисками. Рекомендуется придерживаться пошагового подхода к проведению доклинических и клинических исследований.

1. Введение

Биоподобный лекарственный препарат – биологический лекарственный препарат, содержащий версию активной фармацевтической субстанции зарегистрированного в Союзе

референтного лекарственного препарата. С помощью всесторонних исследований сопоставимости необходимо подтвердить отсутствие клинически значимых отличий от референтного лекарственного препарата по показателям качества, биологической активности, безопасности и эффективности.

Регистрационное досье биоподобного лекарственного препарата должно содержать полное досье по качеству вместе с данными, подтверждающими сопоставимость с референтным лекарственным препаратом, полученными при проведении надлежащих физико-химических и *in vitro* биологических испытаний, доклинических и клинических исследований.

Вопросы качества, значимые для подтверждения биоаналогичной сопоставимости, рассмотрены в Главе 15.1.

Природа и сложность строения референтного лекарственного препарата влияют на объем доклинических или клинических исследований для подтверждения биоаналогичности. Различия, обнаруженные по результатам физико-химических и биологических испытаний, задают направление планированию (до)клинических исследований. К прочим факторам, требующим учета, относятся механизм действия (например, вовлеченный(е) рецептор(ы)) по всем зарегистрированным показаниям к применению референтного лекарственного препарата и патогенетические механизмы заболеваний, утвержденных в качестве показаний к применению (например, общие механизмы между различными показаниями к применению), а также иммуногенность референтного лекарственного препарата.

Заявитель должен проанализировать результаты изучения референтного лекарственного препарата на предмет прогностической ценности *in vitro* испытаний и животных моделей, а также корреляции

между дозой (экспозицией) и фармакодинамикой. Кроме того, заявитель должен изучить корреляцию между фармакодинамикой и клиническим ответом. Наличие подходящих биомаркеров может сократить (до)клиническую разработку. Профиль безопасности референтного лекарственного препарата будет основным объектом внимания исследований клинической безопасности как на пред-, так и пострегистрационном этапе.

Если исследования биоаналогичной сопоставимости указывают на наличие значимых различий между биоподобным лекарственным препаратом и лекарственным препаратом сравнения, ставя под сомнение подтверждение биоаналогичности, следует начать самостоятельную разработку для составления полного регистрационного досье (см. Главу 15 настоящих Правил).

2. Область применения

В настоящей Главе рассмотрены общие принципы доклинической и клинической разработки и оценки регистрационных досье биоподобных лекарственных препаратов, содержащих в качестве активной фармацевтической(их) субстанции(й) биотехнологические белки. Тем не мене, принципы, изложенные в настоящей главе, могут быть применимы, в индивидуальном порядке, к другим биологическим лекарственным препаратам. Исследования сопоставимости при изменениях процесса производства определенного препарата (т.е. изменения в ходе разработке и после регистрации) в настоящей Главе не рассматриваются.

3. Связь с другими главами

В главах 15.3–15.11 содержатся класс-специфичные указания, облегчающие доклиническую и клиническую разработку биоподобных лекарственных препаратов в определенных областях.

4. Доклинические исследования

В целях обоснования биоаналогичности перед началом клинических исследований необходимо провести соответствующие доклинические исследования. При оценке аналогичности биоподобного лекарственного препарата и референтного лекарственного препарата рекомендуется придерживаться пошагового подхода. Сначала следует провести аналитические исследования (Глава 15.2 настоящих Правил) и *in vitro* фармако-токсикологические исследования, чтобы затем принять решение о необходимом объеме исследований на животных, если таковые потребуются.

Важно отметить, что для составления надлежащей программы доклинических исследований требуется четкое понимание характеристик референтного лекарственного препарата. Результаты физико-химических и биологических испытаний по установлению характеристик (т.е. биоподобного и референтного лекарственных препаратов) необходимо проанализировать с точки зрения влияния на эффективность и безопасность.

Предлагается следующие подход, который следует применять к рассматриваемому препарату в индивидуальном порядке. Принятый подход необходимо всесторонне обосновать в доклиническом обзоре регистрационного досье (модуль 2.4).

4.1. Шаг 1: Исследования *in vitro*

В целях оценки любого потенциального различия биологической активности между биоподобным и референтным лекарственными препаратами необходимо, как правило, представить результаты ряда сравнительных исследований *in vitro*, некоторые из которых могут быть доступны по итогам испытаний качества.

Такие исследования должны включать следующие испытания:

– связывания с мишенью (мишенями) (например, рецепторами, антигенами, ферментами), известной(ыми) своей вовлеченностью в фармако-токсикологические эффекты и (или) фармакокинетику референтного препарата.

– передачи сигнала и функциональной активности или жизнеспособности клеток, известных своей значимостью для фармако-токсикологических эффектов референтного лекарственного препарата.

Исследования по своему характеру должны быть сравнительными, а не направленными исключительно на оценку ответа *per se*. Для получения однозначных результатов методы должны быть научно обоснованными и пригодными для своего назначения.

Исследования должны быть чувствительными, специфичными и обладать достаточной дискриминативной способностью, чтобы подтвердить, что наблюдаемые различия в показателях качества клинически незначимы. В исследованиях необходимо сравнить зависимость «концентрация–активность (связывание)» биоподного и референтного лекарственных препаратов с фармакологической(ими) мишенью(ями), охватив диапазон концентраций, в котором потенциальные различия могут быть выявлены с наибольшей чувствительностью.

Их следует провести на достаточном числе серий референтного лекарственного препарата и биоподобного лекарственного препарата, отражающего свойства препарата, предназначенного для клинического применения. На необходимое число серий влияют вариабельность испытания и межсерийная вариабельность. Испытуемого числа серий должно быть достаточно, чтобы составить полноценное заключение о вариабельности конкретного параметра как биоподобного лекарственного препарата, так и референтного лекарственного препарата и аналогичности обоих лекарственных препаратов.

Все эти испытания должны охватывать весь спектр фармакологических и токсикологических аспектов, известных своей клинической значимостью для референтного лекарственного препарата и соответствующего класса препаратов.

Заявитель должен проанализировать степень репрезентативности (прогностической ценности) использованных *in vitro* испытаний для клинической ситуации в соответствии с актуальными научными знаниями.

Поскольку *in vitro* испытания могут быть более специфичны и чувствительны в выявлении различий между биоподобным лекарственным препаратом и референтным лекарственным препаратом, чем исследования у животных, их следует рассматривать в качестве первостепенных (основополагающих) в доклинических исследованиях биоаналогичной сопоставимости.

4.2. Шаг 2: Определение необходимости проведения *in vivo* исследований

Белки, полученные с помощью методов биотехнологии, могут опосредовать эффекты *in vivo*, которые нельзя полностью охарактеризовать в исследованиях *in vitro*. Следовательно, в целях

представления недостающих сведений может потребоваться доклиническая оценка в исследованиях *in vivo* при условии наличия релевантной *in vivo* модели (с точки зрения вида животных и дизайна исследования).

Факторы, принимаемые во внимание при оценке необходимости доклинических исследований *in vivo*, включают перечисленные ниже, но не ограничиваются ими:

– наличие потенциально значимых показателей качества, которые не выявлены у референтного лекарственного препарата (например, новые посттрансляционные модификации);

– наличие потенциально значимых количественных различий в показателях качества между рассматриваемым биоподобным и референтным лекарственными препаратами;

– значимые различия в составе, например, наличие вспомогательных веществ, редко используемых вместе с биотехнологическими белками.

Несмотря на то что указанные выше факторы, взятые по отдельности, необязательно требуют проведения испытаний *in vivo*, необходимо проанализировать эти факторы в комплексе, чтобы оценить степень опасений и необходимость проведения *in vivo* испытаний.

Если исследования биоаналогичной сопоставимости физико-химических и биологических характеристик и доклинические исследования *in vitro* (см. шаг 1) признаны удовлетворительными, а на шаге 2 вопросов, которые могли бы препятствовать непосредственному переходу к клиническим исследованиям, не возникает, исследования на животных *in vivo*, как правило, не требуются.

Если присущие препарату факторы, влияющие на ФК и (или) биораспределение, например, выраженное гликозилирование, на уровне качества или *in vitro* охарактеризовать в достаточной степени невозможно, могут потребоваться исследования *in vivo*. Заявитель должен подробно проанализировать, следует ли проводить подобные исследования на животных или в качестве отдельного этапа клинической разработки, например, у здоровых добровольцев.

При необходимости получения дополнительных данных *in vivo* необходимо принимать во внимание доступность релевантных видов животных или других релевантных моделей (например, трансгенных животных, трансплантатных моделей).

Если релевантная *in vivo* животная модель отсутствует, заявитель вправе начать исследования у человека, принимая во внимание принципы снижения любого потенциального риска.

4.3. Шаг 3: Исследования *in vivo*

Если *in vivo* оценка сочтена заявителем необходимой, цель исследования(й) (ФК и (или) ФД и (или) безопасности) зависит от требуемых дополнительных сведений. Исследования на животных следует спланировать так, чтобы получить максимально полные сведения. При планировании любого *in vivo* исследования необходимо учитывать принцип 3R (замена, улучшение, сокращение) (replacement, refinement, reduction). В зависимости от используемых конечных точек, в конце исследования может не потребоваться умерщвление животных. Необходимо обосновать продолжительность исследования (включая период наблюдения), принимая во внимание ФК-свойства референтного лекарственного препарата и его клиническое применение.

Если позволяет модель и в отсутствие обоснования иного, количественному сравнению подлежат ФК и ФД биоподобного и

референтного лекарственных препаратов, включая, если выполнимо, оценку зависимости «доза (концентрация)–эффект», в том числе предполагаемую экспозицию у человека.

В отношении исследований безопасности следует придерживаться гибкого подхода, в особенности, если единственными релевантными видами животных являются нечеловекообразные приматы. Проведение стандартных исследований токсичности при многократном введении у нечеловекообразных приматов, как правило, не рекомендуется. При достаточном обосновании можно провести исследование токсичности при многократном введении с измененным дизайном (например, используя лишь одну дозу биоподобного лекарственного препарата и референтного лекарственного препарата и (или) лишь один пол и (или) исключив группу восстановления) или прижизненную оценку параметров безопасности (таких как клинические признаки, масса тела и витальные функции). Если в исследованиях токсичности при многократном введении изучается только одна доза, она должна быть близка к верхней границе диапазона дозирования, ее следует обосновывать с позиций ожидаемой токсичности референтного лекарственного препарата.

Проведение токсикологических исследований на нерелевантных видах животных (например, с целью оценки исключительно неспецифической токсичности, обусловленной примесями) не рекомендуется. Вследствие различий в процессах, используемых производителями биоподобного и референтного лекарственных препаратов, могут возникать качественные различия в производственных примесях (например, белках клетки-хозяина). Содержание таких примесей должно быть минимально, что и является наилучшей стратегией минимизации любого ассоциированного риска.

Качественные или количественные различия в родственных вариантах (например, характере гликозилирования, вариантах, отличающихся зарядами) могут влиять на биологические функции биотехнологического белка, их следует оценить в надлежащих испытаниях *in vitro*. Эти различия и примеси могут влиять на иммуногенный потенциал и потенциал развития гиперчувствительности. Эти эффекты с помощью исследований на животных тяжело прогнозируются и требуют дальнейшей оценки в клинических исследованиях.

Оценка иммуногенности у животных, в целом, не прогнозирует иммуногенность у человека, но она может потребоваться для интерпретации *in vivo* исследований на животных (см. также часть II Главы 5.3 настоящих Правил). Следовательно, необходимо осуществлять сбор образцов крови и хранить их для будущего анализа фармакокинетических (токсикокинетических) данных, если в дальнейшем он потребуется.

При доклиническом испытании биоподобных лекарственных препаратов исследования фармакологической безопасности, репродуктивной токсичности и канцерогенности не требуются.

Исследования местной переносимости, как правило. не требуются. Однако, если препарат содержит вспомогательные вещества, для которых опыт использования при рассматриваемом пути введения отсутствует или мал, может потребоваться оценка местной переносимости. Если проводятся другие исследования *in vivo*, оценку местной переносимости можно включить в их дизайн, вместо того, чтобы проводить отдельные исследования.

5. Клинические исследования

Технология производства биоподобного препарата в процессе разработки будет подвергаться оптимизации. Однако клинические данные, необходимые для анализа биоаналогичной сопоставимости, рекомендуется получать, используя биоподобный лекарственный препарат, полученный с помощью коммерческого процесса производства и, следовательно, отражающий профиль качества серий, которые будут введены в реализацию. Любые отклонения от этого требования следует обосновать и подкрепить с помощью необходимых дополнительных связующих данных (в соответствии с Главой 9.1 настоящих Правил).

Клинический анализ биоаналогичной сопоставимости, как правило, пошаговый процесс, который следует начинать с ФК- и, если выполнимо, ФД-исследований, с последующим проведением исследования(й) эффективности и безопасности или, в определенных случаях, подтверждающих ФК/ФД-исследований для демонстрации клинической биоаналогичной сопоставимости.

5.1. Фармакокинетические исследования

Сравнительные ФК-исследования, направленные на подтверждение аналогичности ФК-профиля биоподобного и референтного лекарственных препаратов с позиций ключевых ФК-параметров, являются неотъемлемой частью программы разработки биоподобного лекарственного препарата.

Дизайн ФК-исследования зависит от различных факторов, включая клинический контекст, безопасность, ФК-характеристики референтного препарата (мишень-опосредованные распределение, метаболизм и элиминация; линейность и нелинейность ФК, временную зависимость, период полувыведения и т.д.), описанных в

Рекомендациях Союза по клиническому изучению фармакокинетики терапевтических белков, и, если это применимо, в Правилах исследования биоэквивалентности лекарственных препаратов Союза. Биоаналитические методики должны соответствовать своему целевому назначению и быть валидированы в соответствии с Приложением 7 к Правилам исследования биоэквивалентности лекарственных препаратов Союза.

Перед началом исследования необходимо задать и обосновать границы биоаналогичной сопоставимости основных фармакокинетических параметров. В отсутствие специальных критериев, обоснованной отправной точкой для планирования сравнительных фармакокинетических исследований биологических лекарственных препаратов могут служить критерии, используемые в стандартных исследованиях биоэквивалентности, изначально разработанные для лекарственных препаратов для приема внутрь, действующие вещества которых получены химическим путем. Однако в отличие от небольших молекул интерпретация исследований биоэквивалентности биологических лекарственных препаратов менее однозначна. В первом случае молекулы признаются идентичными, тогда как для биологических лекарственных препаратов ФК используется с целью обнаружения различий во взаимодействии референтного и биоподобного лекарственных препаратов с организмом. Это значит, что выдерживание 90 %-ных ДИ отношений биоподобным лекарственным препаратом к референтному лекарственному препарату в пределах заранее установленного обоснованного диапазона приемлемости, может, само по себе, быть недостаточным. При интерпретации аналогичности следует также учитывать расположение и ширину доверительного интервала. Например, потребуется объяснить и

обосновать в качестве не препятствующего биоаналогичности диапазон приемлемости статистически значимых различий в 90 %-ных ДИ соответствующих фармакокинетических параметров. С другой стороны, если 90 %-ный ДИ пересекает заранее установленные границы, заявитель должен объяснить подобные различия и установить их причину. В индивидуальном порядке допускается коррекция на содержание белка, если она заранее предусмотрена и должным образом обоснована с включением результатов испытания референтного и биоподобного лекарственных препаратов в протокол.

Несмотря на то что мишень-опосредованный клиренс представляет большую важность в исследованиях биоаналогичности, его изучение при выраженной вариабельности экспрессии мишени, включая вариабельность во времени, может оказаться невыполнимым. Однако поскольку ожидается, что исследования *in vitro* покажут сопоставимое взаимодействие между биоподобным лекарственным препаратом и его мишенью(ями) (включая FcRn для мАТ), отсутствие опорного ФК-исследования у целевой популяции допустимо, если дополнительные ФК-данные собраны в исследованиях эффективности, безопасности и (или) ФД-исследованиях, поскольку это позволит более глубоко изучить клиническое влияние вариабельной фармакокинетики и возможные изменения ФК во времени. Этого можно достичь, определяя ФК-профиль у подгруппы пациентов или с помощью популяционной фармакокинетики.

Предпочтительно проведение перекрестного исследования с однократным введением с полным описанием ФК-профиля, включая фазу поздней элиминации. В отношении веществ с длительным периодом полувыведения и (или) высоким риском иммуногенности могут потребоваться параллельные исследования. Дозы в ФК-

исследовании биоаналогичной сопоставимости с однократным введением у здоровых добровольцев могут быть ниже, чем рекомендуемые терапевтические дозы. ФК-исследования у здоровых добровольцев не всегда выполнимы. В этом случае, если исследование с однократным введением не выполнимо, ФК необходимо изучить у пациентов в качестве этапа исследования с многократным введением. Необходимо выбрать чувствительную модель (популяцию), т.е. такую, которая обладает меньшим количеством факторов, вызывающих выраженную межиндивидуальную или зависящую от времени вариабельность.

Если референтный лекарственный препарат вводится внутривенно и подкожно, изучения подкожного пути введения, как правило, достаточно, поскольку он охватывает как абсорбцию, так и элиминацию. Таким образом, допускается не проводить оценку внутривенного введения, если биоаналогичная сопоставимость при подкожном пути введения подтверждена как для абсорбции, так и элиминации. Отказ от проведения ФК-исследования при внутривенном введении необходимо обосновать, например, тем, что константа абсорбции молекулы гораздо меньше константы элиминации (инвертированная кинетика).

Основными параметрами ФК-исследования с однократным введением являются $AUC_{(0-\infty)}$ при внутривенном введении и $AUC_{(0-\infty)}$ и, как правило, C_{max} – при подкожном. Необходимо также оценить такие вторичные параметры, как t_{max}, объем распределения и период полувыведения. Основными параметрами в исследовании при многократном введении являются AUC, усеченная с момента первого введения до второго введения (AUC_{0-t}), и AUC на протяжении

интервала дозирования в равновесном состоянии ($AUC_{t,ss}$). Вторичными параметрами являются C_{max} и C_{trough} в равновесном состоянии.

В любом ФК-исследовании, наряду с ФК-оценкой, необходимо определять антитела к препарату, используя соответствующие временные точки взятия образцов.

5.2. Фармакодинамические исследования

К исследованиям фармакокинетики рекомендуется добавлять определение фармакодинамических маркеров, если это возможно. Фармакодинамические маркеры должны быть отобраны на основании их клинической значимости.

В некоторых случаях может оказаться достаточным подтверждения клинической сопоставимости биоподобного лекарственного препарата и референтного лекарственного препарата с помощью сравнительных ФК/ФД-исследований при выполнении следующих условий:

Выбранный ФД-маркер/биомаркер является принятым суррогатным маркером и соотносится с исходом у пациентов в такой степени, что подтверждение аналогичного влияния на ФД-маркер будет обеспечивать аналогичное влияние на клинический исход. К подходящим примерам относятся абсолютное число нейтрофилов при оценке влияния гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ), снижение ранней вирусной нагрузки при хроническом гепатите С при оценке влияния альфа-интерферонов и эугликемический клэмп-тест – в целях сравнения двух инсулинов. Для сравнения двух β-интерферонов можно прибегнуть к магнитно-резонансной томографии очагов при рассеянном склерозе.

Некоторые ФД-маркеры не являются подтвержденными суррогатами эффективности, но значимы для фармакологического

действия фармацевтической субстанции и имеют четкую зависимость доза–эффект или концентрация–эффект. В этом случае, во избежание исследования клинической эффективности, может оказаться достаточным исследования доза–экспозиция–ответ при однократном или многократном введении двух или более доз. Такой дизайн обеспечит сравнение биоаналога и препарата сравнения в пределах крутой части кривой доза–эффект (аналитическая чувствительность, см. документ Союза по выбору контрольной группы в клинических исследованиях).

В исключительных случаях подтверждающее клиническое исследование может не потребоваться при условии надежного подтверждения биоаналогичной сопоставимости с помощью физико-химических, структурных и *in vitro* биологических испытаний и ФК-исследований у человека вместе с комбинацией ФД-маркеров, отражающих фармакологическое действие и концентрацию активной фармацевтической субстанции.

Если подтверждение клинической биоаналогичной сопоставимости основано на ФК-исследованиях, подкрепленных исследованиями с несуррогатными ФД-/биомаркерами, подобный подход («отпечатки пальцев») рекомендуется обсудить с уполномоченными органами. План должен включать величину границ(ы) эквивалентности с ее клиническим обоснованием, а также меры по подтверждению сопоставимого профиля безопасности.

5.3. Исследования эффективности

В отсутствие суррогатных маркеров эффективности, как правило, требуется подтверждение сопоставимой клинической эффективности биоподобного лекарственного препарата и референтного лекарственного препарата в рандомизированном(ых) параллельном(ых)

сравнительном(ых) исследовании(ях) с достаточной мощностью, предпочтительно, двойном(ых) слепом(ых) с использованием конечных точек эффективности. Исследуемая популяция, в целом, должна отражать зарегистрированное(ые) показание(я) к применению референтного лекарственного препарата и быть чувствительной для выявления потенциальных различий между биоподобным лекарственным препаратом и референтным лекарственным препаратом. Иногда, изменение клинической практики может потребовать отклонения от зарегистрированного показания к применению, например, в части сопутствующей терапии, используемой в составе комбинированной терапии, очередности назначения препаратов или тяжести заболевания. Отклонения необходимо обосновать и обсудить с уполномоченными органами.

5.3.1. Дизайны исследований

Рекомендуется, в целом, использовать дизайн эквивалентности. Использование дизайна не меньшей эффективности приемлемо, если оно обосновано строгими научными данными и с учетом характеристик референтного лекарственного препарата, например, профиля безопасности и переносимости, диапазона доз, зависимости доза–эффект. Исследование не меньшей эффективности допустимо, если, исходя из научных и механистических оснований, можно исключить возможность существенного и клинически значимого повышения эффективности. Однако, как и в исследованиях эффективности, необходимо учесть аналитическую чувствительность.

Дизайн не меньшей эффективности рекомендуется обсудить с уполномоченными органами.

5.3.2. Конечные точки эффективности

Исследования эффективности биоподобных лекарственных препаратов не нацелены на подтверждение эффективности *per se*, поскольку она ранее уже была подтверждена для референтного лекарственного препарата. Целью исследований эффективности является подтверждение сопоставимости клинических характеристик биоподобного лекарственного препарата и референтного лекарственного препарата.

Составлены руководства по заболеваниям для разработки инновационных лекарственных препаратов. При разработке биоподобного лекарственного препарата выбор клинических конечных точек и сроков проведения анализа конечных точек может не совпадать с рекомендациями в отношении новых действующих веществ. В связи с этим настоящими Правилами предусмотрены главы, специфичные для классов препаратов, чтобы направлять разработку биоподобных лекарственных препаратов в определенных областях. В отсутствие подобной главы сопоставимость следует подтверждать с помощью достаточно чувствительных клинических моделей и условий исследования. Заявитель должен обосновать, что выбранная модель релевантна и чувствительна для выявления потенциальных различий в части эффективности и безопасности. Тем не мене, отклонение от рекомендуемых руководствами по заболеваниям конечных точек требует научного обоснования. Обнаруженные различия в эффективности между биоподобным лекарственным препаратом и референтным лекарственным препаратом всегда требуют анализа их клинической значимости. В целом, цель клинических данных заключается в оценке небольших различий, обнаруженных на предыдущих этапах и подтверждении аналогичности клинических

характеристик биоподобного лекарственного препарата и референтного лекарственного препарата. Использовать клинические данные с целью обоснования существенных различий в показателях качества не допускается.

Корреляция между «твердыми» клиническими конечными точками, рекомендуемыми руководствами в отношении новых действующих веществ, и другими клиническими и фармакодинамическими конечными точками, которые более чувствительны для выявления клинических значимых различий, может быть подтверждена с помощью ранее проведенных клинических исследований референтного лекарственного препарата. В этом случае необязательно использовать те же первичные конечные точки эффективности, которые были использованы для регистрации референтного лекарственного препарата. Однако рекомендуется включить некоторые общие конечные точки (например, в качестве вторичных конечных точек), чтобы содействовать сравнению клинических исследований, проведенных с референтном лекарственном препаратом.

Необходимо заранее оговорить границы сопоставимости и обосновать их статистически и клинически, используя данные о референтном лекарственном препарате (см. документы Союза по статистическим принципам клинических исследований и выбору границы не меньшей эффективности). Подобно всем клиническим исследованиям со сравнительным дизайном, необходимо учесть аналитическую чувствительность (см. документ Союза по выбору контрольной группы в клинических исследованиях).

5.4. Клиническая безопасность

Клиническая безопасность важна на протяжении всей программы клинической разработки и определяется в ходе начальных ФК- и (или) ФД-исследований, а также в составе опорных клинических исследований эффективности. Данные о сравнительной безопасности следует, в норме, собирать на предрегистрационном этапе, их количество зависит от вида и тяжести нарушений, вызываемых референтным лекарственным препаратом. Необходимо обосновать продолжительность наблюдения за безопасностью на предрегистрационном этапе. Необходимо тщательно оценивать разновидность, тяжесть и частоту нежелательных реакций между биоподобным лекарственным препаратом и референтным лекарственным препаратом, особенно тех из них, которые описаны в общей характеристике лекарственного препарата последнего. В регистрационном досье заявитель должен представить оценку конкретных рисков, ожидаемых в отношении биоподобного лекарственного препарата. Она, в частности, включает описание возможных опасений со стороны безопасности, которые могут быть обусловлены процессом производства, отличающимся от такового референтного лекарственного препарата, в особенности, риски инфузионных реакций и иммуногенности.

Принципы оценки иммуногенности терапевтических белков и моноклональных антител описаны в главах 11 и 12 настоящих Правил. Иммуногенный потенциал биоподобного лекарственного препарата необходимо сравнить с таковым референтного лекарственного препарата, следуя принципам, изложенным в вышеупомянутых главах, если только не представлено обоснование необходимости отклонения от этого подхода. Вид и объем данных об иммуногенности зависит от

опыта применения референтного лекарственного препарата и класса препарата.

Испытание иммуногенности биоподобного лекарственного препарата и референтного лекарственного препарата следует проводить в рамках исследований биоаналогичной сопоставимости, используя формат испытаний и схему взятия образцов, которые должны удовлетворять всем действующим стандартам. Аналитические испытания необходимо проводить как с препаратом сравнения, так и молекулой биоподобного лекарственного препарата параллельно (с ослеплением), чтобы измерить иммунный ответ на препарат, который был получен каждым пациентом. Предпочтительно, чтобы аналитические испытания были способны обнаруживать антитела как к биоподобному лекарственному препарату, так и молекуле референтного лекарственного препарата, но, по меньшей мере, обладали способностью обнаруживать все антитела, выработанные на молекулу биоподобного лекарственного препарата. Измерять и представлять, как правило, следует частоту возникновения и свойства (например, перекрестную реактивность, эпитопы-мишени и нейтрализующую активность) антител и титры антител, а также оценивать и интерпретировать их во взаимосвязи с потенциальным влиянием на параметры клинической эффективности и безопасности.

Продолжительность исследования иммуногенности следует обосновывать в индивидуальном порядке, исходя из продолжительности курса терапии, выведения препарата из кровотока (во избежание влияния антигена на методики) и сроков формирования гуморального иммунного ответа (по меньшей мере, через четыре недели при применении иммунодепрессанта). Продолжительность последующего наблюдения следует обосновывать сроками

возникновения и характеристиками нежелательного иммунного ответа, описанными для референтного лекарственного препарата, например, низким риском клинически значимой иммуногенности или несущественным трендом повышения иммуногенности во времени. При хроническом применении на предрегистрационном этапе, как правило, требуется представить данные годичного наблюдения. Данные наблюдения за более короткий срок (например, шесть месяцев) могут быть обоснованы, исходя из профиля иммуногенности референтного лекарственного препарата. При необходимости на пострегистрационном этапе могут впоследствии потребоваться дополнительные данные об иммуногенности за срок, продолжительностью до одного года. Рекомендации к отдельным препаратам представлены в главах 15.3–15.11.

Повышенная по отношению к референтному лекарственному препарату иммуногенность может затруднить анализ отношения пользы к рискам и поставить биоаналогичность под сомнение. Однако биоподобный лекарственный препарат может обладать и меньшей иммуногенностью, что не будет препятствием для регистрации его в качестве биоподобного лекарственного препарата. Если на биоподобный лекарственный препарат образуется меньше нейтрализующих антител, анализ эффективности всей исследуемой популяции может привести к ошибочному заключению, что биоподобный лекарственный препарат эффективнее референтного лекарственного препарата. В связи с этим рекомендуется заранее предусмотреть дополнительную поисковую подгруппу с целью анализа эффективности и безопасности у тех пациентов, у которых в ходе клинического исследования антитела к препарату не образовывались. Такой анализ может способствовать установлению того, что

эффективность биоподобного лекарственного препарата и референтного лекарственного препарата, в принципе, аналогична, если исключить влияние иммунного ответа.

6. Экстраполяция эффективности и безопасности с одного показания к применению на другое

Референтный лекарственный препарат может иметь несколько показаний к применению. Если биоаналогичная сопоставимость была подтверждена в отношении одного из них, возможна экстраполяция клинических данных на другие показания к применению референтного лекарственного препарата, но она требует научного обоснования. Если отсутствует определенность в отношении того, что безопасность и эффективность, подтвержденные в отношении одного показания к применению, будут релевантны для другого, потребуются дополнительные данные. Экстраполяцию следует проводить в свете всей совокупности данных, т.е. данных по качеству, доклинических и клинических данных. Предполагается, что экстраполяция безопасности и эффективности возможна, когда биоаналогичная сопоставимость была подтверждена с помощью доскональных физико-химических и структурных анализов, а также функциональных испытаний *in vitro*, подкрепленных клиническими данными (эффективности и безопасности и (или) ФК-/ФД-данными). В определенных ситуациях требуются дополнительные данные, например:

Действующее вещество референтного лекарственного препарата взаимодействует с несколькими рецепторами, которые могут оказывать различное влияние при изученных и не изученных показаниях к применению.

Само действующее вещество имеет несколько активных центров, которые могут оказывать различное влияние при различных показаниях к применению.

Изученное показание к применению не релевантно для других с позиций эффективности или безопасности, т.е. не обладает чувствительностью в отношении различий во всех значимых аспектах эффективности и безопасности.

Иммуногенность опосредована множеством факторов, включая путь введения, режим дозирования, факторы, опосредованные пациентами, и факторы, опосредованные заболеванием (например, сопутствующая терапия, разновидность заболевания, иммунный статус). Таким образом, иммуногенность при различных показаниях может различаться. Экстраполяция иммуногенности с изученного показания или пути введения на другие требует обоснования.

7. Фармаконадзор

Для выявления редких нежелательных реакций данных предрегистрационных клинических исследований, как правило, недостаточно. Следовательно, необходимо на постоянной основе вести пристальное наблюдение за клинической безопасностью биоподобных лекарственных препаратов в пострегистрационную фазу, включая непрерывную оценку пользы и рисков.

В рамках процедуры регистрации заявитель должен представить описание системы фармаконадзора и план управления рисками в соответствии с правом Союза, включая Правила надлежащей практики фармаконадзора Союза. План управления рисками должен учитывать выявленные и потенциальные риски, присущие применению референтного лекарственного препарата, с описанием их учета в ходе

пострегистрационного наблюдения. В этой связи необходимо отдельно рассмотреть иммуногенность. В плане фармаконадзора биоподобного лекарственного препарата необходимо должным образом отразить любой особый мониторинг безопасности, требуемый в отношении референтного лекарственного препарата или класса препаратов. Заявителям рекомендуется принимать участие во всех проводимых фармакоэпидемиологических исследованиях референтного лекарственного препарата. Однако может потребоваться проведение новых исследований. Действия по минимизации рисков, принимаемые в отношении референтного лекарственного препарата, следует, в принципе, также включать в программу управления рисками биоподобного лекарственного препарата. Любые отклонения от указанного (например, если минимизация рисков обусловлена изделием, используемом вместе с препаратом сравнения) требуют обоснования.

В отношении подозреваемых нежелательных реакций, обусловленных биологическими лекарственными препаратами, особую важность представляет точная идентификация рассматриваемого препарата с точки зрения его производства. Исходя из этого, следует принять все необходимые меры по четкой идентификации биологического лекарственного препарата, являющегося объектом сообщения о подозреваемой нежелательной реакции, с точным указанием его торгового наименования и номера серии.

ГЛАВА 15.3. БИОПОДОБНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ, СОДЕРЖАЩИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА: ВОПРОСЫ ДОКЛИНИЧЕСКИХ И КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Область применения

Настоящая Глава разработана в отношении моноклональных антител, она дополняет Главу 15.2 настоящих Правил и содержит требования для подтверждения сопоставимости двух лекарственных препаратов, содержащих моноклональные антитела (МкАТ), с целью составления регистрационного досье. Несмотря на то, что настоящая Глава составлена специально для моноклональных антител, обсуждаемые в ней принципы применимы к родственным веществам, например, к гибридным белкам на основе Fc-фрагмента IgG (-цепт молекулы).

МкАТ нового поколения, т.е. МкАТ с измененной по отношению к зарегистрированным референтным лекарственным препаратам структурой и (или) функциональностью (например, глико-инженерные МкАТ с повышенной активностью), направленной на улучшение или изменение клинических эффектов, не являются биоподобными лекарственными препаратами, и поэтому в настоящей Главе не рассматриваются.

В настоящей Главе приведены указания по доклиническим и клиническим исследованиям лекарственных препаратов, содержащих МкАТ, заявленных в качестве биоподобных лекарственных препаратов по отношению к зарегистрированному биологическому лекарственному препарату МкАТ. В разделе по доклиническим исследованиям описаны фармако-токсикологические требования. В разделе по клиническим исследованиям представлены требования к исследованиям

сравнительной фармакокинетики, фармакодинамики, эффективности и безопасности, а также фармаконадзору.

Основная цель настоящей Главы – установить общие принципы, которые позволят заявителю разработать программу, на основании которой можно установить сопоставимость биоподобного МкАТ с референтным МкАТ, сохраняя при этом ранее доказанную безопасность и эффективность препарата. В ходе разработки рекомендуется придерживаться пошагового подхода: объем и характер доклинических и клинических исследований зависят от результатов, полученных на предыдущем(их) этапе(ах). Все исследования должны быть направлены на выявление потенциальных различий между биоподобным лекарственным препаратом и референтным лекарственным препаратом, а также, при возникновении таких различий, на установление их значимости.

В целях индивидуального подхода к выбору и объему исследований *in vitro* и *in vivo* в ходе доклинической разработки рекомендуется придерживаться пошагового подхода к изучению МкАТ. Сначала для анализа функциональных различий и различий в связывании [с рецептором] необходимо провести сравнительные исследования *in vitro*. На втором этапе необходимо определить необходимость проведения дополнительных доклинических исследований *in vivo*. При необходимости проведения исследования *in vivo* его цель будет зависеть от требуемых дополнительных сведений и наличия релевантной животной модели. Проведение токсикологических исследований на нечеловекообразных приматах, как правило, не рекомендуется.

В ходе программы клинической разработки, включаемые пациенты, как правило, соответствуют степени подтверждения

сопоставимости препаратов, полученной на предыдущих этапах. Начальным этапом разработки биоподобного МкАТ, как правило, является сравнительное фармакокинетическое исследование у достаточно чувствительной и однородной популяции исследования (здоровые добровольцы или пациенты). Фармакокинетические данные могут помочь при решении вопроса об экстраполировании данных по безопасности и эффективности между различными показаниями референтного МкАТ. В некоторых случаях, устанавливаемых в индивидуальном порядке, может потребоваться проведение нескольких фармакокинетических исследований с многократным введением препарата у пациентов или даже ввести фармакокинетический этап в клиническое исследование, направленное на подтверждение аналогичной безопасности и эффективности. По возможности, фармакокинетические исследования допускается комбинировать с фармакодинамическими (ФД) конечными точками. Аналогичную клиническую эффективность необходимо подтвердить, как правило, с помощью достаточно мощного(ых) рандомизированного(ых) параллельного(ых) сравнительного(ых) клинического(их) исследования(й) эквивалентности, предпочтительно двойного(ых) слепого(ых). В целях подтверждения сопоставимости может потребоваться отклониться от руководств, составленных по отдельным заболеваниям. Основополагающий принцип заключается в подтверждении аналогичной клинической эффективности и безопасности по отношению к референтному лекарственному препарату, а не в установлении пользы для пациента *per se*, которая для референтного лекарственного препарата ранее уже была доказана. В целом, следует использовать наиболее чувствительные модели и условия исследования (фармакодинамического или клинического) у

однородной группы пациентов. Если для подтверждения аналогичной эффективности наиболее целесообразными являются сравнительные фармакодинамические исследования, заявители должны подобрать клинически значимые маркеры, обосновать свой выбор, а также представить достаточные данные по клинической безопасности, особенно иммуногенности. Основываясь на совокупных имеющихся результатах исследований сопоставимости и при должном обосновании, допускается экстраполяция данных клинической эффективности и безопасности на прочие показания к применению референтного МкАТ, которые в ходе клинической разработки отдельно не изучались. Концепция пострегистрационного наблюдения, предлагаемая заявителями, может превосходить стандартные требования к фармаконадзору и включать пострегистрационные исследования безопасности (ПРИБ).

МкАТ являются основным классом лекарственных препаратов, получаемых биотехнологическим путем. Различные препараты МкАТ обладают некоторыми общими свойствами, например, цитотоксичностью в отношении их мишени или нейтрализацией цитокина, но различаются по таким свойствам, как механизм действия. МкАТ имеют сложную структуру и, в зависимости от изотипа, могут содержать несколько функциональных доменов в молекуле (антигенсвязывающий участок, комплементсвязывающий участок, константная часть, взаимодействующая с Fc-рецепторами). Каждое МкАТ имеет уникальный профиль с точки зрения антигенсвязывающего участка, эффекторной функции Fc-цитотоксичности и связывания с Fc-рецепторами. В последние годы разработано множество методов подробного установления характеристик сложных белков, как на физико-химическом, так и функциональном уровне, например, методы

количественного определения активности; накоплен опыт оценки незначительных различий между показателями качества, обусловленными изменениями процесса производства моноклональных антител. Однако современный уровень знаний не позволяет интерпретировать значимость небольших различий между физико-химическими и биологическими характеристиками, обнаруженными при сопоставлении биоподобногоого МкАТ и референтного МкАТ.

2. Сфера применения

Настоящая препарат-специфичная Глава содержит доклинические и клинические требования к подтверждению биоаналогичности двух лекарственных препаратов, содержащих МкАТ.

3. Связь с другими главами

В главах 15–15.2 содержатся общие указания по разработке биоподобных лекарственных препаратов.

4. Доклинические исследования

При оценке аналогичности биоподобного МкАТ и референтного МкАТ в доклинической разработке применяется пошаговый подход.

Доклинические исследования должны быть проведены перед началом клинических исследований. Сначала необходимо провести исследования *in vitro*, а затем определить необходимость и объем проведения требуемых исследований *in vivo*.

В доклиническом обзоре регистрационного досье (Модуль 2.4) необходимо полностью обосновать выбранный подход.

4.1. Шаг 1: Исследования в условиях *in vitro*

Чтобы оценить различия в биологической активности между биоподобным и референтным лекарственными препаратами, необходимо представить данные ряда сравнительных исследований в условиях *in vitro,* некоторые из которых могут быть уже доступны по результатам исследований качества.

Доклинические исследования *in vitro* необходимо проводить, используя достаточное число серий препарата, отражающих свойства серий, которые будут использоваться в клинических исследованиях. Такие исследования должны включать установление:

– связывания с антигеном-мишенью (антигенами-мишенями);

– связывания с репрезентативными изоформами соответствующих трех Fcγ-рецепторов (FcγRI, FcγRII и FcγRIII), FcRn и комплементом (C1q);

– Fab-ассоциированных функций (например, нейтрализации растворимого лиганда, активации или блокады рецептора);

– Fc-ассоциированных функций (например, антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ), комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ), активации комплемента).

Указанные исследования должны носить сравнительный характер и быть достаточно чувствительными, позволяющими обнаружить различия в зависимости «концентрация–активность» между биоподобным лекарственным препаратом и референтным лекарственным препаратом, и не должны проводиться исключительно с целью изучения этих свойств *per se*. Следует отметить, что для МкАТ, направленных на немембранные мишени, изучать АЗКЦ и КЗЦ не требуется. Как указано в Главе 5.3 настоящих Правил, исследования

перекрестной тканевой реактивности не пригодны для обнаружения незначительных изменений ключевых параметров качества и, таким образом, не рекомендуются для изучения сопоставимости.

Такие исследования должны в совокупности широко охватывать функциональные свойства МкАТ, несмотря на то, что некоторые из них могут быть незначимы для реализации терапевтического эффекта. Поскольку исследования *in vitro* могут оказаться более специфичными и чувствительными, чем исследования на животных, они могут играть основную роль в подтверждении доклинической сопоставимости.

Если по результатам изучения сопоставимости с помощью описанной выше стратегии обнаруживается, что биоаналогичное МкАТ и референтное МкАТ нельзя признать биоподобными, следует рассмотреть возможность разработки препарата как самостоятельного.

4.2. Шаг 1: Установление потребности в исследованиях в условиях *in vivo*

Общепризнано, что некоторые МкАТ могут опосредовать эффекты, которые невозможно полностью выявить с помощью исследований *in vitro*. В связи с этим могут потребоваться исследования *in vivo* при условии того, что имеется релевантная по виду животного и дизайну модель *in vivo*. При определении необходимости проведения дополнительных доклинических исследований *in vivo* необходимо рассмотреть ряд факторов (перечень не исчерпывающий):

– Наличие значимых показателей качества, которые не были обнаружены в референтном лекарственном препарате (например, новая посттрансляционная структурная модификация).

– Наличие показателей качества, значимо различающихся количественно от таковых референтного лекарственного препарата.

– Значимые различия по составу, например, наличие вспомогательных веществ, редко используемых в препаратах МкАТ.

Несмотря на то, что каждый из упомянутых факторов не обязательно требует испытаний *in vivo*, для определения степени настороженности и необходимости проведения испытаний *in vivo,* их следует рассматривать одновременно.

Если результаты исследований сопоставимости *in vitro*, проведенные на шаге 1, признаются удовлетворительными, а на шаге 2 факторы настороженности не обнаруживаются или такие факторы настороженности не препятствуют прямому применению у человека, исследование на животных *in vivo* допускается не проводить.

При необходимости дополнительных сведений необходимо учесть наличие подходящих животных моделей или иных подходящих моделей (например, трансгенных животных или трансплантатов). Ввиду специфичности МкАТ релевантными для изучения животными моделями в большинстве случаев являются нечелевокообразные приматы. Во всех случаях необходимо принимать во внимание ограничения исследования *in vivo* (например, чувствительность и вариабельность).

В отсутствие релевантной животной модели *in vivo* заявитель вправе начать исследования у человека, принимая во внимание принципы по снижению потенциальных рисков.

4.3. Шаг 3: Исследования в условиях *in vivo*

При необходимости проведения исследования *in vivo* их направленность (ФК, и (или) ФД, и (или) безопасность[10]) определяется требуемыми сведениями. Исследования на животных необходимо

[10] Под «безопасностью» в данном случае понимается не полное исследование токсичности при многократном введении, а, скорее, прижизненный анализ параметров безопасности, таких как клинические признаки, масса тела и жизненно важные функции.

спланировать таким образом, чтобы получить максимальный объем информации. В зависимости от оцениваемых конечных точек, не всегда существует необходимость заканчивать исследование гибелью животных. При планировании исследования *in vivo* необходимо руководствоваться принципом 3R (*reduce/refine/replace*, сокращение/улучшение/замена). Приняв во внимание фармакокинетические свойства МкАТ и их клиническое применение, необходимо обосновать продолжительность исследования (включая период наблюдения).

Если позволяет модель, ФК и ФД биоподобного и референтного лекарственных препаратов необходимо сравнить количественно, в том числе провести анализ «концентрация–эффект», охватывающий терапевтические дозы у человека.

Проведение токсикологических исследований на нечеловекообразных приматах, как правило, не рекомендуется. К тому же не рекомендуется проводить токсикологические исследования на нерелевантных видах животных (например, изучать исключительно неспецифическую токсичность, обусловленную примесями). В силу различий в процессах производства биоподобного и референтного лекарственных препаратов могут возникать качественные различия в профилях производственных примесей (например, белках клетки-хозяина). Необходимо обеспечить наименьшее содержание таких примесей, что является наилучшей стратегией минимизации обусловленных ими рисков. Качественные или количественные различия в родственных вариантах (например, профили гликозилирования, варианты с различным зарядом могут повлиять на биологические функции МкАТ, поэтому их необходимо изучить с помощью подходящих *in vitro* методов количественного определения.

Такие различия по качеству могут оказать влияние на иммуногенный потенциал или возможность развития гиперчувствительности. Общепризнано, что указанные эффекты с помощью исследований на животных сложно спрогнозировать, поэтому они требуют дальнейшего изучения в клинических исследованиях. Оценка иммуногенности на животных в целом обладает низкой прогностической значимостью для иммуногенности у человека, однако такие данные могут потребоваться для интерпретации результатов исследований на животных *in vivo*. В целях будущих исследований (при возникновении потребности в них) необходимо отобрать и обеспечить хранение образцов крови.

При доклиническом подтверждении биоаналогичности МкАТ исследования фармакологической безопасности и репродуктивной токсичности не требуются. Исследования местной переносимости, как правило, не требуются. Если вводятся вспомогательные вещества, в отношении которых отсутствует опыт их клинического применения при заявленном пути введения или такой опыт сильно ограничен, могут потребоваться исследования местной переносимости. Чтобы не проводить отдельные исследования местной переносимости, при проведении прочих исследований *in vivo* изучение местной переносимости может являться их частью.

5. Клинические исследования

Сравнительные клинические исследования биоподобного и референтного лекарственных препаратов необходимо проводить во всех случаях. Количество и вид исследований зависят от референтного лекарственного препарата, их необходимо строго научно обосновать. В программе разработки рекомендуется, как правило, придерживаться пошагового подхода; объем и характер клинической программы зависит

от результатов, полученных на предыдущем(их) этапе(ах). В ходе программы клинической разработки, включаемые пациенты, как правило, соответствуют степени подтверждения сопоставимости препаратов, полученной на предыдущих этапах.

5.1. Шаг 1: Исследование фармакокинетических свойств

Первым этапом разработки биоподобного МкАТ, как правило, является сопоставление фармакокинетических свойств биоподобного и референтного лекарственных препаратов. Дизайн исследования зависит от ряда факторов, включая клинические особенности, безопасность, фармакокинетическую характеристику антитела (мишень-опосредованная диспозиция (связывание, распределение, метаболизм и элиминация), линейная или нелинейная ФК, временна́я зависимость, период полувыведения и др.) и должен учитывать рекомендации, изложенные в документе Союза по клиническому изучению фармакокинетики терапевтических белков и Правилах проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в Евразийском экономическом союзе. Более того, биоаналитические методики должны соответствовать их целевому назначению и требуют должной валидации в соответствии с Приложением 7 к Правилам проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в Евразийском экономическом союзе.

5.1.1. Дизайн (программа) исследования

Основной целью фармакокинетических исследований, результаты которых представляются в регистрационном досье биоподобного лекарственного препарата, является сопоставимость фармакокинетики биоподобного лекарственного препарата с референтным лекарственным препаратом у достаточно чувствительной и однородной популяции. Считается, что в этом случае снижается вариабельность и, таким

образом, размер выборки, необходимый для подтверждения эквивалентности, это также позволяет облегчить интерпретацию результатов.

У здоровых добровольцев может отмечаться более низкая фармакокинетическая вариабельность, поскольку по сравнению с пациентами мишень-опосредованный клиренс у них играет меньшую роль. В связи с этим, по возможности, для получения важных сведений о биоаналогичности рекомендуется провести исследование с однократным введением препарата у здоровых добровольцев. С фармакокинетической точки зрения в целях всесторонней характеристики ФК-профиля, включая фазу поздней элиминации, предпочтительно провести перекрестное исследование с однократным введением. Ввиду длительного периода полувыведения МкАТ и потенциального влияния на иммуногенность может потребоваться проведение исследования с параллельным дизайном.

При токсическом механизме действия или при недостаточности сведений для установления биоаналогичности исследование у здоровых добровольцев может быть нецелесообразным. В этом случае предпочтительно провести исследование у пациентов. Если исследование с однократным введением у пациентов нецелесообразно проводят исследование с многократным введением.

Может возникнуть необходимость проведения ФК-исследования у популяции, отличной от той, у которой будет подтверждаться аналогичность по клинической эффективности, поскольку наиболее чувствительная популяция для сравнения ФК-характеристик может отличаться от популяции, в которой наиболее целесообразно подтверждать аналогичность эффективности и безопасности. В этом случае в рамках исследования клинической эффективности

рекомендуется определять популяционные ФК-параметры, поскольку такие данные могут дополнить совокупную базу данных по подтверждению сопоставимости.

Основываясь на всестороннем изучении научной литературы в части чувствительности исследования и возможности распространения ФК-результатов на прочие клинические показания, утвержденные для референтного МкАТ, необходимо полностью обосновать выбор популяции для ФК-исследования.

Если ФК-исследование у здоровых добровольцев проводится с целью дополнительного подтверждения биоэквивалентности, в рамках клинических исследований у пациентов рекомендуется осуществлять сбор вспомогательных ФК-данных, которые могут служить веским обоснованием аналогичности ФК-свойств.

Следующие факторы могут оказать влияние на подготовку плана ФК-анализа:

Характеристики заболевания и пациентов

К факторам, которые могут повлиять на выбор популяции пациентов, относятся: возраст типичной манифестации заболевания и возрастной диапазон (поскольку в более молодом возрасте вероятность сопутствующей патологии ниже), объем предыдущего лечения, сопутствующая терапия и уровень экспрессии антигена (которая может зависеть от стадии заболевания). В отношении МкАТ, применяющихся как в монотерапии, так и в составе комбинированной терапии с иммунодепрессантами или химиотерапии, в целях снижения источников вариабельности целесообразно проводить сравнительное ФК-исследование в условиях монотерапии. Однако в некоторых случаях целесообразно включать пациентов, получающих первую линию терапии или адъювантную терапию на ранних этапах рака при низкой

опухолевой нагрузке; в таких случаях МкАТ, как правило, вводят в составе комбинированной терапии.

Фармакокинетические характеристики референтного МкАТ

Фармакокинетика противоопухолевых МкАТ может носить зависимый от времени характер, поскольку после многократного введения опухолевая нагрузка может измениться (например, вследствие увеличения периода полувыведения при многократном введении), что требует учета при планировании исследования.

Наличие двух механизмов клиренса (зависимого и независимого от мишени может повлиять на количество необходимых исследований. Если мишень-опосредованный клиренс незначим, как правило, достаточно одного ФК-исследования. Если референтное МкАТ элиминируется с помощью как мишень-опосредованного, так и неопосредованного механизмов, необходимо подтвердить сопоставимость фармакокинетики, при которой каждый из механизмов клиренса преобладает: рекомендуется провести одно исследование у здоровых добровольцев на предмет мишень-неопосредованного клиренса и одно вспомогательное исследование у пациентов, которое может являться частью исследования эффективности и быть направлено на установление сопоставимости по мишень-опосредованному клиренсу.

В отношении мишеней МкАТ, включающих рецепторы, экспрессируемые на опухолевых клетках и которые подвергаются шеддингу, в целях установления исходной сопоставимости сравниваемых групп рекомендуется измерять содержание сброшенных рецепторов до начала и, при необходимости, в ходе проведения исследования. Стратификация по опухолевой нагрузке или сбросу рецепторов (если таковая возможна) позволяет удостовериться в исходной сопоставимости. Целесообразно провести поисковый

статистический анализ последующей сопоставимости во временных точках, значимых для составления заключения о ФК-эквивалентности.

Для зарегистрированных по нескольким показаниям МкАТ определять фармакокинетический профиль по каждому из них, как правило, не требуется. Однако, если препарат МкАТ используется в различных областях медицины (например, иммунологии и онкологии), могут потребоваться отдельные ФК-исследования, поскольку в различных областях мишень-опосредованный клиренс может различаться.

Дозы

Фактически тестировать все терапевтические схемы приема препарата (указанные в инструкции по применению) не требуется; необходимо выбрать наиболее чувствительную дозировку, чтобы выявить потенциальные различия фармакокинетических свойств биоподобного и референтного препаратов. При наличии ограниченных данных о том, какая дозировка является наиболее чувствительной, рекомендуется исследовать низкую или минимальную рекомендуемую терапевтическую дозу, при которой подразумевается, что мишень-опосредованный клиренс еще не достиг максимума, и высокую или максимальную терапевтическую дозу, при которой подразумевается, что доминирует неспецифический механизм клиренса. Исследование однократного введения с минимальной терапевтической дозировкой у пациентов считается наиболее приемлемым для исследования различий мишень-опосредованного клиренса, если таковой имеется.

Изучать все режимы дозирования, как правило, не требуется; в целях выявления потенциальных различий между биоподобным и референтным лекарственными препаратами необходимо выбрать наиболее чувствительную дозу. Если сведения о наиболее чувствительной дозе ограничены, рекомендуется включить в

исследование низкую или наименьшую рекомендуемую терапевтическую дозу при допущении того, что при таких дозах мишень-опосредованный клиренс не насыщается, и высокую или наивысшую терапевтическую дозу, если постулируется, что преобладает неспецифический механизм клиренса. При наличии мишень-опосредованного клиренса наиболее целесообразным дизайном для выявления различий в нем считается исследование с однократным введением наименьшей терапевтической дозы пациентам.

Пути введения

Если референтный лекарственный препарат вводится и внутривенно, и подкожно, а биоподобнный лекарственный препарат предполагается вводить обоими путями, рекомендуется изучить оба пути введения. Однако поскольку анализ подкожного пути введения охватывает как абсорбцию, так и элиминацию, можно отказаться от изучения внутривенного пути введения, если при использовании дополнительных ФК-параметров, например, частичных AUC (см. раздел 3.1.2), в отношении подкожного пути введения показана сопоставимость и по абсорбции, и по элиминации.

5.1.2. Время отбора проб

В исследованиях с однократным введением режим отбора проб должен охватывать весь профиль, включая фазу поздней элиминации. Для лекарственных препаратов, вводящихся два (и более) раза, ценными являются сведения, полученные как после первого, так и последнего введения, поскольку первое введение предпочтительно в сравнительных целях, а последнее дает информацию о фазе терминальной элиминации, которую невозможно получить после первого введения.

Если в целях подтверждения аналогичности между биоподобным лекарственным препаратом и референтным лекарственным препаратом

используется фармакокинетическое исследование с многократным введением препаратов пациентам и если элиминацию после введения последней дозы охарактеризовать не удается, отбор проб должен позволить охарактеризовать профиль «концентрация–время» как после введения первой дозы, так и последующих (предпочтительно в равновесном состоянии). Установление характеристик полного профиля «концентрация–время» в равновесном состоянии наиболее целесообразно при нелинейной фармакокинетике референтного МкАТ (например, многие противоопухолевые МкАТ с клеточными мишенями проявляют дозозависимую и зависимую от времени ФК или затрагивающие иммуногенность изменения в кинетике деградации или элиминации).

5.1.3. Исследуемые фармакокинетические параметры

Первичным параметром в исследовании с однократным введением должна стать $AUC_{0-\infty}$. Необходимо также изучить вторичные параметры, такие как C_{max}, t_{max}, объем распределения и период полувыведения. При подкожном введении дополнительным первичным параметром становится C_{max}. Кроме того, если какие-либо данные о внутривенном пути отсутствуют, для обеспечения сопоставимости как в фазу абсорбции, так элиминации необходимо изучить частичные AUC.

Первичным параметром в исследовании с многократным введением должна стать AUC после первого введения, усеченная до второго введения (AUC_{0-t}) и AUC за интервал дозирования в равновесном состоянии (AUC_{τ}). Вторичные параметры: C_{max} и C_{min} в равновесном состоянии.

Используя наиболее подходящие временные точки, параллельно с изучением ФК необходимо определять антитела к препарату.

Необходимо заранее указать и обосновать границы сопоставимости. Известно о высокой межиндивидуальной вариабельности некоторых референтных МкАТ по некоторым параметрам, что необходимо учитывать при выборе границ сопоставимости, по крайней мере, этих параметров. Всякое расширение стандартной границы эквивалентности за пределы 80–125 % для первичных параметров, в принципе, требует подробного обоснования, включая оценку потенциального влияния на клиническую эффективность и безопасность. В отношении вторичных параметров достаточно указать доверительные интервалы (ДИ) для отношения или разности и описательные статистики, диапазоны допустимости определять не требуется. Необходимо проанализировать клиническую значимость полученных различий и соответствующих им доверительных интервалов.

5.1.4. Сроки ФК-анализа

Исследованиям клинической эффективности должно, как правило, предшествовать подтверждение аналогичности ФК-профилей. Однако в некоторых случаях, например, при неизбежно высокой ФК-вариабельности МкАТ даже по одному показанию к применению, из практических соображений, сравнительный ФК-анализ целесообразно провести в рамках клинического исследования, направленного на подтверждение аналогичной клинической эффективности (поскольку лишь такое исследование будет достаточно крупным для подтверждения ФК-эквивалентности). Проведение сравнительного клинического исследования эффективности, включающего на изучение ФК, без предварительного формального сравнительного ФК-исследования в зависимости от МкАТ может быть затруднительным, особенно в отсутствии опыта применении у биоаналогичного МкАТ человеку и

потенциальной ограниченности доклинических данных *in vivo*. В связи с этим, такое допускается лишь в индивидуальным порядке на основании полученного профиля показателей качества и доклинического профиля.

5.2. Фармакодинамика

Для определенных МкАТ и некоторых показаний свой вклад в исследования сопоставимости могут вносить ФД-параметры. В зависимости от МкАТ и доступности ФД-конечных точек теоретически возможны следующие сценарии:

5.2.1. Фармакодинамические маркеры как вспомогательное подтверждение сопоставимости

По возможности, в ФК-исследования следует включать ФД-конечные точки. Это позволяет получить ценные сведения о совокупной сопоставимости. ФД-маркеры представляют наибольшую ценность, если они позволяют обнаруживать незначительные различия и если их удается определить с высокой прецизионностью. Рекомендуется использовать несколько (при их наличии) ФД-маркеров одновременно. При фармакодинамическом анализе, как правило, ощущается недостаток специальных ФД-конечных точек. Поэтому основной упор необходимо сделать на доклиническую ФД-оценку, например, на испытания *in vitro*.

5.2.2. ФД-маркеры как опорное подтверждение сопоставимости

Заявители должны всегда работать над поиском зависимости «доза–концентрация–эффект» или «время–эффект», поскольку такой подход при его успешности служит *адекватным* подтверждением сопоставимости при условии того, что выбранные дозы находятся на линейной части кривой «доза–эффект».

Чтобы принять ФД-маркеры в качестве основного подтверждения клинической сопоставимости, должны быть соблюдены следующие условия:

– показана четкая зависимость доза–эффект;

– по меньшей мере, один ФД-маркер является принятым суррогатным маркером и может объяснить исход пациента в такой степени, что подтверждение аналогичного эффекта с ФД-маркером будет обеспечивать аналогичное влияние на переменную клинического исхода.

Если вышеуказанное не выполняется, следует перейти к шагу 2 (т.е. к клинической эффективности).

Если в качестве основного аргумента в пользу аналогичности предполагается использовать ФД-маркеры, этот шаг рекомендуется обсудить с уполномоченными органами. Обсуждение должно включать предложенную величину границы эквивалентности и ее клиническое обоснование с точки зрения достаточности клинически значимых различий.

Сравнительное исследование с однократным или многократным введением в насыщающей части кривой «доза–концентрация–эффект», скорее всего, не позволит обнаружить различия в активности при наличии таковой, а доза, соответствующая линейной части кривой «доза–эффект», может привести к назначению пациентам слишком низких доз. Известно, что данные о зависимости «доза–эффект» в отношении референтного МкАТ могут отсутствовать, а введение пациентам относительно низких доз МкАТ в худшем случае может привести к сенсибилизации и выработке анти-МкАТ антител и, впоследствии, к устойчивости к терапии. Однако для некоторых

референтных МкАТ такие исследования в определенных клинических условиях допустимы.

5.3. Шаг 2: Клиническая эффективность

Если дозо-сравнительные и высоко чувствительные ФД-исследования, убедительно подтверждающие клиническую сопоставимость, провести невозможно, аналогичную клиническую эффективность между биоподобным лекарственным препаратом и референтным лекарственным препаратом необходимо подтвердить в ходе достаточно мощного(ых), рандомизированного(ых), параллельного(ых) сравнительного(ых) клинического(их) исследования(й), предпочтительно двойного(ых) слепого(ых) и, как правило, исследования(й) эквивалентности.

Для большинства клинических состояний, при которых МкАТ разрешены к применению, разработаны отдельные руководства для подтверждения их эффективности. Однако в некоторых случаях в целях подтверждения сопоставимости потребуется отклониться от этих руководств (выбор конечной точки, сроки анализа конечной точки, характер или дозы сопутствующей терапии и т.д.). Такие отклонения требуют научного обоснования с позиций предложенной клинической концепции, направленной на установление биоаналогичности, используя ФД-маркеры, клинические исходы или те и другие. Основополагающий принцип заключается в подтверждении аналогичной эффективности и безопасности по отношению к референтному лекарственному препарату, а не пользы для пациента *per se*, которая ранее была установлена для референтного лекарственного препарата. Таким образом, в целях повышения прецизионности и облегчения интерпретации полученных результатов**,** в целом, целесообразно выбрать наиболее чувствительную популяцию

пациентов и клиническую конечную точку, способные выявлять зависящие от препарата различия (при наличии таковых) и в то же время сводящих к минимуму факторы, зависящие от пациента и заболевания. Например, ответы пациентов с различной тяжестью заболевания или получавших различные виды лечения могут различаться, поэтому различия между сравниваемыми группами могут оказаться трудно интерпретируемыми, таким образом может оказаться неясным, обусловлены ли обнаруженные различия факторами, зависящими от пациента и заболевания, или же различиями между биоподобным МкАТ и референтным МкАТ.

Сопоставимость необходимо подтвердить на научно обоснованной достаточно чувствительной клинической модели и в таких же условиях исследования (независимо от их регистрационного статуса), а заявитель обязан обосновать, что модель с точки зрения эффективности и безопасности является подходящей и чувствительной для подтверждения сопоставимости по заявленному(ым) показанию(ям). Исследования сопоставимости не должны снижать безопасность для пациентов, а пациенты должны подвергаться лечению только по медицинским показаниям. Если для выявления значимых различий достаточно чувствительные клинические точки отсутствуют, заявители обязаны принять дополнительные меры, позволяющие получить достаточную чувствительность совокупного объема клинических данных, на основании исследования. Например, в целях достоверного установления сопоставимости исследование можно объединить с исследованием при многократном введении, заявители также вправе изучать фармакодинамические маркеры в дополнение к клиническим конечным точкам.

Проведение клинических исследований у особых групп пациентов, например, детей и пожилых, как правило, не требуется, поскольку конечной целью программы разработки является установление сопоставимости, вследствие чего выбор основной популяции пациентов определяется требованиями однородности и чувствительности.

В отсутствие внутренних (*intrinsic*) различий в исследования допускается включать пациентов из неевропейских стран, однако это может повысить гетерогенность результатов. Для предварительного установления границы эквивалентности могут потребоваться сведения об эффективности и безопасности референтного МкАТ в определенном регионе (местности). Если в исследование включены пациенты из различных регионов мира, в целях подтверждения непротиворечивости общему эффекту необходимо, как правило, проводить стратификацию и анализ подгрупп. В целях предотвращения влияния внешних факторов стратегии диагностики и лечения должны быть сопоставимыми.

5.3.1. Дополнительные условия для противоопухолевых моноклональных антител

Установление аналогичной клинической эффективности и безопасности биоподобного и референтного МкАТ может оказаться особенно затруднительным для противоопухолевых препаратов. Рекомендуемой конечной точкой для подтверждения эффективности по онкологическому показанию является либо выживаемость без прогрессирования и без заболевания (ВБП/ВБЗ или PFS/DFS) или общая выживаемость (ОВ или OS). Такие клинические точки необходимы в целях подтверждения пользы нового противоопухолевого препарата, однако они могут быть недостаточно подходящими или чувствительными для установления сопоставимости биоподобного МкАТ референтному препарату МкАТ, поскольку на них могут влиять различные факторы, не

обусловленные различиями между биоподобным МкАТ и референтным МкАТ, например, опухолевая нагрузка, функциональный статус, предыдущая терапия, особенности клинического течения, последующая терапия (для ОВ (OS)) и т.д. Поэтому они могут оказаться непригодными для установления аналогичной эффективности биоподобного МкАТ и референтного МкАТ.

Цель исследования сопоставимости – подтверждение аналогичной эффективности и безопасности по отношению к референтному лекарственному препарату, а не пользы для пациента *per se*, которая ранее была установлена для референтного лекарственного препарата. В целях повышения прецизионности, в целом, целесообразно выбрать наиболее чувствительную популяцию пациентов и клиническую конечную точку, способные выявлять зависящие от препарата различия (при наличии таковых) и в то же время сводящие к минимуму факторы, зависящие от пациента и заболевания. Допускается провести клиническое исследование в однородной популяции пациентов, выбрав в качестве первичной клиническую конечную точку, измеряющую активность. Примером может служить суммарная эффективность терапии (СЭТ или ORR, доля пациентов у которых отмечен полный или частичный ответ (ПО и ЧО или CR и PR)). В некоторых случаях целесообразно определять СЭТ (ORR) в определенной временной точке (например, СЭТ (ORR) на *n*-ном месяце), доля изменения массы опухоли от исходного ее уровня или патологический полный ответ (пПО или pCR) в определенных клинических условиях. Заявители должны участвовать в мероприятиях по стандартизации оценки и разработке четких определений конечных точек у пациентов, подвергшихся обследованию через определенные промежутки времени. По возможности, необходимо регистрировать ВБП (PFS) и ОВ (OS).

Ввиду множества факторов, влияющих на выживаемость, не связанных со свойствами биоподобного МкАТ и референтного МкАТ, общепризнано, что данные по выживаемости следует интерпретировать с осторожностью. Однако в качестве меры исхода использование ВБП (PFS) более чувствительно, чем ОВ (OS), его и предпочтительно использовать, несмотря на возможное удлинение исследования.

В поисковых исследованиях допускается изучать новые конечные точки (например, время до ответа), которые могут служить дополнительным подтверждением биоаналогичности.

5.4. Клиническая безопасность

На протяжении всей клинической разработки важную роль играет клиническая безопасность, она подлежит изучению как в ходе начальных ФК- и (или) ФД-оценок, так и как часть ключевых клинических исследований, направленных на установление сопоставимости. Вид, тяжесть и частоту нежелательных реакций между биоподобным МкАТ и референтным МкАТ, особенно описанных для последнего, необходимо подвергать тщательному сравнению. Если единое определение параметров безопасности не выработано (например, измерение кардиотоксичности), рекомендуется использовать те же определения, которые использовались в программе разработки референтного МкАТ (при наличии сведений) или определения, использованные в ходе пострегистрационного наблюдения. В качестве дополнительного подтверждения клинической сопоставимости допускается также осуществлять сравнение фармакологически опосредованных нежелательных реакций (например, кардиотоксичности), т.е. фармакодинамических маркеров, затрагивающих безопасность; их анализ проводят в соответствии с принципами, описанными в отношении ФД-маркеров эффективности.

Если для получения основного подтверждения эквивалентности в части клинической эффективности достаточно провести сравнительные высокочувствительные ФД-исследования, заявители должны представить достаточные аргументы в пользу клинической безопасности, включая иммуногенность. Данные по безопасности в сравнении с активным контролем, как правило, получают на предрегистрационном этапе, на них оказывает влияние свойства МкАТ и количество пациентов, которым вводили препарат, а также продолжительность терапии. Длительность наблюдения за безопасностью на предрегистрационном этапе необходимо обосновать.

Часть данных по безопасности, а также дополнительные данные по безопасности может потребоваться набрать на пострегистрационном этапе (см. описание ниже). Вероятность выявления редких явлений, например, прогрессирующей многоочаговой лейкоэнцефалопатии на предрегистрационном этапе незначительна. В связи с этим в момент регистрации (см. раздел 5) заявитель должен описать свою деятельность по фармаконадзору и управлению рисками на пострегистрационном этапе. Вместо прямого сопоставления с референтным лекарственным препаратом, как правило, потребуется схожая с последним деятельность по фармаконадзору, поскольку сравнительные данные, скорее всего, будут трудно интерпретируемыми в силу редкости их возникновения, что приведет к неточности оценки выявленных различий.

Заявители должны отразить, каким образом будет осуществляться повторное лечение пациентов. На момент подачи заявления о регистрации необходимо представить концепцию о способе систематического определения безопасности многократного введения пациентам, например, по онкологическим показаниям, когда пациенты подвергаются нескольким циклам терапии. В соответствующих случаях,

по возможности, настоятельно рекомендуется продлить клиническое исследование до пострегистрационного наблюдательного исследования, чтобы охватить весь цикл лечения.

Относительно изучения иммуногенности заявители должны обращаться к Главе 12 настоящих Правил. Ввиду таких клинических последствий, как снижение эффективности, а также вероятной резистентности к дальнейшему лечению референтным лекарственным препаратом необходимо проводить систематическое сравнительные изучение иммуногенности. Целесообразно, по возможности, не включать пациентов, которым ранее вводили референтное МкАТ или заранее предусмотреть анализ подгруппы пациентов, ранее получавших лечение (с целью установления влияния предшествующего лечения на развитие иммуногенности), поскольку предшествующая терапия могла послужить причиной образования антител к препарату, которые могут осложнить интерпретацию данных по безопасности и, таким образом, также снизить чувствительность выявления различий. Сравнительную оценку нежелательного иммунного ответа к биоподобному МкАТ и референтному МкАТ, как правило, осуществляют как часть клинического исследования, направленного на установление аналогичной клинической эффективности и безопасности, используя те же валидированные методики (см. главы 11 и 12 настоящих Правил). Допускается использовать подход популяционной ФК, предусматривающий редкий отбор образцов и определение концентрации препарата, а также антител к нему. Однако антитела к некоторым МкАТ лучше обнаруживаются у здоровых добровольцев, у которых в течение нескольких дней после однократного введения развивается сильный иммунный ответ. Введенная доза также является важным фактором, требующим учета при изучении иммуногенности:

некоторые МкАТ при введении их в больших дозах препятствуют образованию антител, в связи с этим исследования, проведенные с низкими дозами, при их медицинской оправданности, более чувствительны для сравнения иммунного ответа к биоподобному лекарственному препарату и референтному лекарственному препарату.

Изучение нежелательной иммуногенности особенно необходимо, если в производстве биоподобного МкАТ использовалась иная по сравнению с референтным МкАТ экспрессирующая конструкция, что может, к примеру, приводить к образованию значимых показателей качества, которые не обнаруживались у референтного лекарственного препарата (например, новая пострансляционная структурная модификация), способных привести к повышенной иммуногенности. Это особенно необходимо, если опыт использования такой конструкции у человека ограничен. Такие подходы рекомендуется заранее согласовывать с уполномоченными органами.

Повышенная по отношению к референтному МкАТ иммуногенность может стать основным препятствием при анализе пользы к риску, она также ставит под сомнение биоаналогичность. Однако возможна и меньшая иммуногенность биоподобного МкАТ, которая не препятствует биоаналогичности. В таком случае при анализе эффективности всей популяции пациентов можно прийти к заключению, что биоаналог более эффективен (поскольку у меньшего количества пациентов развился иммунный ответ, в связи с чем у большего числа из них может проявиться терапевтический эффект биоподобного МкАТ). В связи с этим рекомендуется предусмотреть дополнительный поисковый анализ эффективности и безопасности в подгруппе пациентов, у которых в ходе клинического исследования антитела к препарату не образовались. Анализ такой подгруппы будет

способствовать установлению того, что эффективность биоподобного МкАТ и референтного МкАТ без учета иммунного ответа в целом аналогична.

На пострегистрационном этапе могут потребоваться дополнительные данные по долгосрочной иммуногенности и безопасности, например, в случаях небольшой продолжительности исследования, направленного на установление аналогичной клинической эффективности. В плане управления рисками следует проанализировать необходимость получения дополнительных данных по долгосрочной иммуногенности и безопасности и, если такие данные требуются, заявители не должны ограничиваться стандартными мерами по фармаконадзору, а провести пострегистрационное исследование безопасности. Относительно безопасности и иммуногенности по различным показаниям, разрешенным для референтного МкАТ и заявленным для биоподобного МкАТ, в целях получения более подробных данных по безопасности в зависимости от показаний может потребоваться реализовать пострегистрационную концепцию, описанную в разделе 5.

6. Экстраполяция показаний

Экстраполяция данных клинической эффективности и безопасности на другие показания референтного МкАТ, отдельно не изучавшихся в ходе клинической разработки биоподобного МкАТ, на основании совокупного подтверждения сопоставимости, полученного по результатам сравнительных исследований, и при достаточном обосновании возможна. Если основное подтверждение сопоставимости основывается на ФД, а заявленные показания реализуются за счет различных механизмов действия (либо имеется неопределенность в

данном вопросе), заявители должны представить соответствующие данные, обосновывающие экстраполяцию на все заявленные показания к применению. Заявители должны обосновать такую экстраполяцию всесторонним анализом имеющейся литературы, включая вовлеченные рецепторы антигенов и механизмы действия.

Например, если референтное МкАТ применяется как в качестве иммуномодулирующего, так и противоопухолевого антитела, научное обоснование экстраполяции между двумя (или более) показаниями более затруднительно. Основу такой экстраполяции образует большая база данных по качеству и доклиническим исследованиям, включая методы количественного определения активности и *in vitro* методы, устанавливающие функциональность молекулы, а также соответствующие клинические данные, описанные ниже. Возможность экстраполяции данных по безопасности, включая иммуногенность, также требует тщательного рассмотрения и может потребовать вовлечения более специфичных исследований (см. разделы 3 и 5). Относительно механизма действия: снижение числа иммунных клеток, к примеру, при различных состояниях может реализовываться за счет различных механизмов. Например, АЗКЦ более значима при одних показаниях, чем при других. Для представления более глубоких данных о механизме действия, также целесообразно провести литературный поиск с целью установления известных фактов, например, о потенциальном ингибировании передачи сигнала референтным лекарственным препаратом, которое не изучалось в испытаниях АЗКЦ/КЗЦ, в особенности прямой индукции апоптоза. Это может расширить знания о потенциальных аргументах, которые могут быть использованы для подтверждения сопоставимости на молекулярном уровне.

7. Фармаконадзор

В соответствии с правом Союза, включая Правила надлежащей практики по фармаконадзора Союза, в ходе процедуры регистрации заявитель должен представить план управления рисками и план фармаконадзора. Допускается осуществлять деятельность по минимизации рисков, разработанную для референтного лекарственного препарата, а также включить ее в план управления рисками биоподобного лекарственного препарата.

В целях углубленного анализа вопросов безопасности, описанных выше, на момент подачи заявления о регистрации заявители должны представить всеобъемлющую концепцию дальнейшего изучения безопасности на пострегистрационном этапе, включая следующие аспекты:

– В отсутствие обоснований – безопасность по показаниям, разрешенным для референтного МкАТ, зарегистрированным на основании экстраполяции данных по эффективности и безопасности, включая данные о долгосрочной безопасности.

– Возникновение редких и особо серьезных нежелательных явлений, описанных и прогнозируемых на основании фармакологических свойств референтного МкАТ. План фармаконадзора должен соответствовать выявленным и потенциальным рискам и должен содержаться в спецификации по безопасности МкАТ сравнения в дополнение к соответствующим данным об биоподобных лекарственных препаратах соответственно.

– Выявление новых сигналов по безопасности, подобно прочим биологическим лекарственным препаратам.

– Деятельность по получению дополнительных данных по иммуногенности, если таковые требуются.

Такая концепция, скорее всего, потребует превысить стандартные действия по фармаконадзору и потребует более активной деятельности по фармаконадзору, например, по возможности, ведения реестров или базы данных больших групп пациентов, в которых ввод данных осуществляется стандартизованно, обеспечивая правильность и постоянство регистрации (анализа). Кроме того, рекомендуется участие в уже имеющихся реестрах, что должно составлять часть плана управления рисками. Достаточность таких предложений должна оцениваться в свете данных по безопасности на момент регистрации, совокупности данных по результатам исследований сопоставимости и профиля безопасности референтного МкАТ. Необходимо четко оценить необходимость в дополнительной деятельности по минимизации рисков с учетом требований к референтному лекарственному препарату.

Необходимо особо тщательно идентифицировать подозреваемые нежелательные реакции на биологические лекарственные препараты с точки зрения их производства. В связи с этим следует принять все необходимые меры для четкой идентификации биологического лекарственного препарата, являющегося объектом отчета о нежелательных реакциях с точным указанием его наименования и номера серии.

В зависимости от особенностей обращения биоподобных и референтных лекарственных препаратов в клинической практике на национальном уровне возможен переход или взаимная замена препаратов, содержащих определенное МкАТ. В связи с этим заявителям рекомендуется и дальше работать в этом направлении и учитывать эти обстоятельства в плане управления рисками.

15.4. ДОКЛИНИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОПОДОБНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА РЕКОМБИНАНТНОГО ЭРИТРОПОЭТИНА

1. Вступление

В настоящей Главе изложены требования к доклиническим и клиническим исследованиям лекарственных препаратов, содержащих рекомбинантный человеческий эритропоэтин, заявленный при регистрации в качестве биоподобного уже присутствующим на рынке лекарственным препаратам. В разделе, посвященном доклиническим исследованиям, представлены рекомендации для оценки фармакотоксикологических свойств. В разделе, посвященном клиническим исследованиям, представлены требования для оценки фармакокинетических и фармакодинамических свойств, безопасности и эффективности и составления плана управления рисками. Кроме того, представлены критерии необходимые для экстраполяции клинических данных на другие показания, утвержденные для референтного препарата.

Эритропоэтин человека является гликопротеином, состоящим из 165 аминокислот, который секретируется почками и стимулирует продукцию эритроцитов. Препараты, которые являются аналогами эндогенного эритропоэтина, и которые производятся на основе технологии рекомбинантной ДНК с использованием клеток млекопитающих в качестве системы экспрессии, получили название эпоэтины. Применяемые в клинической практике эпоэтины имеют последовательность аминокислот, которая соответствует эндогенному эритропоэтину, однако могут различаться между собой по степени гликозилирования. От качественных и количественных характеристик гликозилирования эпоэтинов зависят фармакокинетические свойства

препаратов, а также его эффективность и безопасность, в том числе и иммуногенность. Для характеристики белка используют физико-химические и биологические методы.

Препараты, содержащие эпоэтины, применяются для лечения симптоматических анемий у больных с хронической почечной недостаточностью; анемий, которые развиваются под влиянием химиотерапии у больных онкологическими заболеваниями; для увеличения сбора аутологичной крови, у пациентов, участвующих в программе предварительного донорства. Механизм действия эпоэтинов одинаков при всех одобренных показаниях, однако дозы, необходимые для достижения терапевтического эффекта, могут значительно различаться (наиболее высокие дозы применяются при онкологических заболеваниях). Препараты на основе эпоэтинов вводятся внутривенно или подкожно.

Препараты рекомбинантных эпоэтинов имеют широкий терапевтический диапазон и, как правило, хорошо переносятся при условии надлежащего контроля стимуляции эритропоэза по показателю уровня гемоглобина и скорости его повышения. Скорость повышения уровня гемоглобина варьирует и зависит не только от дозы и схемы лечения, но и от таких факторов, как содержание железа, исходный уровень гемоглобина и уровень эндогенного эритропоэтина, а также наличия сопутствующих заболеваний (например, воспалительных).

Чрезмерный фармакодинамический ответ может приводить к развитию артериальной гипертензии и тромбоэмболических осложнений. Кроме того, при подкожном введении эпоэтина у больных с почечной анемией зарегистрированы случаи развития истинной парциальной красноклеточной аплазии, вызванной выработкой нейтрализующих антител к эпоэтину. Учитывая, что развитие истинной

парциальной красноклеточной аплазии встречается редко и для ее развития требуется длительное, в течение нескольких месяцев или даже лет применения препарата, вероятность ее выявления в ходе предрегистрационных исследований крайне низка. Кроме того, у некоторых групп пациентов особую важность приобретает ангиогенное и онкогенное действие эритропоэтина.

Регистрационное досье на новый лекарственный препарат, содержащий эритропоэтин, заявленный в качестве подобного ранее зарегистрированному на территории государств – членов Союза референтному препарату, должно содержать данные, демонстрирующие сопоставимое качество, безопасность и эффективность заявленного к регистрации препарата референтному лекарственному препарату, зарегистрированному в Союзе.

2. Сфера применения

Настоящая препарат-специфичная Глава содержит доклинические и клинические требования к подтверждению биоаналогичности двух лекарственных препаратов, содержащих эритропоэтин.

3. Связь с другими главами

В главах 15–15.2 содержатся общие указания по разработке биоподобных лекарственных препаратов.

4. Основные указания

4.1 Доклинические исследования

Доклинические исследования проводятся до начала клинических исследований. Основной целью сравнительных доклинических исследований является выявление возможных различий фармако-

токсикологических свойств между биоподобным и референтным препаратом, а не простое доклиническое изучение эффекта препарата как такового (per se). При этом выбор подхода (программа проведения и объем исследований) должен быть полностью обоснован, в доклиническом обзоре (модуль 2.4 регистрационного досье).

Изучение фармакодинамики

Исследования in vitro

Для выявления возможных различий в ответной реакции на биоподобный и референтный препараты должен быть проведен ряд сравнительных биологических исследований *in vitro* (например, изучение способности специфически взаимодействовать с соответствующим рецептором, оценка способности стимулировать пролиферацию соответствующих линий клеток). Многие из этих данных могут быть доступны в процессе сравнительного изучения показателей качества сравниваемых препаратов.

Исследование in vivo

Сравнительное изучение эритрогенной активности биоподобного и референтного препаратов проводится в соответствующих исследованиях на экспериментальных животных. Данные о способности препаратов стимулировать эритропоэз могут быть получены в процессе изучения хронической токсичности при многократном введении препарата или в специальном исследовании (например, при изучении специфической активности по степени стимуляции ретикулоцитоза на нормоцитемических или полицитемических мышах, в соответствии с Фармакопеей Союза; подобные данные могут быть получены на этапе изучения качества препарата).

Изучение токсичности

Изучение токсичности должно включать, как минимум, одно сравнительное исследование хронической токсичности (многократное введение одной дозы препарата) на релевантном виде животного (например, крысах). Продолжительность исследований должна быть не менее 4 недель Исследования токсичности проводятся с учётом требований, представленных в Главах 5.3 и 15.2 настоящих Правил, посвященных вопросам изучения безопасности терапевтических биотехнологических препаратов. В рамках исследования токсичности биоподобного препарата при многократном введении препарата должна быть выполнена соответствующая оценка токсикокинетики, а также должна быть изучена и определена возможность выработки к нему антител (Глава 11 настоящих Правил).

Кроме того, должны быть предоставлены данные о местной переносимости препарата, полученные по меньшей мере на одном виде животных. При этом рекомендуется определить местную переносимость в рамках описанного выше исследования токсичности при многократном введении препарата. Фармакологические исследования безопасности, исследования токсического действия на репродуктивную систему, исследования мутагенности и канцерогенности не входят в состав обязательных стандартных требований к доклиническим исследованиям подобных биологических лекарственных препаратов, содержащих в качестве фармацевтической субстанции эритропоэтин.

4.2 Клинические исследования

Изучение фармакокинетики

Изучение фармакокинетических свойств проводится в сравнительном перекрестном исследовании биоподобного и референтного препаратов при однократном применении с использованием разных путей введения – как

правило, подкожного и внутривенного. Перекрестные исследования целесообразно проводить с участием здоровых добровольцев. Для изучения фармакокинетики и проведения сравнительного анализа необходимо подобрать дозы, которые будут соответствовать наиболее крутой части кривой зависимости «доза–эффект». Изучение фармакокинетических свойств препаратов включает параметры AUC, C_{max} и $T_{½}$ или Cl/F. Пределы эквивалентности должны быть определены заранее и должным образом обоснованы. При разработке программы исследований необходимо учитывать различия в показателях $T_{½}$ при внутривенном и подкожном введении, и зависимости клиренса от дозы препарата.

Изучение фармакодинамики

Исследование фармакодинамики предпочтительно проводить в процессе сравнительного изучения фармакокинетики. Необходимо выбрать дозу, которая должна находиться в области линейной восходящей части кривой зависимости «доза–эффект». В качестве фармакодинамического маркера при оценке активности эпоэтина в исследованиях с однократным введением препарата наибольшую значимость имеет определение количества ретикулоцитов. При этом количество ретикулоцитов не является суррогатным маркером при оценке эффективности эпоэтина и поэтому не может быть использовано в качестве конечной точки при клиническом изучении эффективности препарата.

Изучение эффективности

Сходство (подобие) клинической эффективности биоподобного и референтного препаратов должно быть продемонстрировано в сравнительных рандомизированных клинических исследованиях достаточной статистической мощности, проведенных на параллельных группах пациентов. Учитывая, что дозы и фармакокинетические

показатели при внутривенном и подкожном введении препарата различаются, необходимо провести изучение эффективности и подтвердить сопоставимость препаратов при обоих путях введения. Это может быть выполнено при проведении отдельных клинических исследований для каждого способа введения или путем проведения одного клинического исследования для одного способа введения с адекватным экстраполированием соответствующих данных для другого способа введения (см. далее).

Подтверждающие исследования для исключения систематической ошибки следует проводить в виде двойного слепого клинического исследования. Если проведение данных исследований невозможно, то при распределении пациентов по группам сравнения необходимо предусмотреть маскирование данных о схемах лечения от медицинского персонала, вовлеченного в процесс принятия решений (например, при подборе дозы лекарственного препарата).

Для оценки эффективности эпоэтинов необходимо выбрать наиболее чувствительную популяцию пациентов, в частности, таковой является популяция больных с дефицитом эндогенного эритропоэтина, по сравнению с больными без дефицита. Кроме того, чувствительность пациентов к терапевтическому действию эпоэтина зависит от чувствительности костного мозга к эритропоэтину. Больные с симптоматической анемией, вызванной почечной недостаточностью при условии отсутствия у них серьезных осложнений (таких как тяжелые хронические заболевания, кровотечения или интоксикация солями алюминия), которые могут повлиять на эффективность препарата, являются наиболее оптимальной популяцией для изучения эффективности эритропоэтинов поскольку данная категория пациентов является наиболее трудно отвечающей на терапию. При этом

необходимо исключить развитие анемии в результате других причин. Дозы эпоэтинов, которые вводятся для достижения нормального уровня гемоглобина и его поддержания, различаются при назначении больным, находящимся на диализе, и преддиализным больным. Поэтому больных из указанных групп не рекомендуется смешивать в одном клиническом исследовании.

Для демонстрации подобия препаратов могут быть использованы представленные ниже варианты дизайна проведения исследований. Заявитель вправе выбрать любой из предложенных вариантов дизайна исследований или модифицировать его, при условии представления значимого научного обоснования выбранного подхода.

Демонстрация эффективности двух путей введения препарата

а) Эффективность обоих (подкожного и внутривенного) путей введения препарата может быть продемонстрирована при проведении двух отдельных исследований. Наиболее информативным с точки зрения получения данных о биоподобных эритропоэтинах является комбинированное исследование, которое включает изучение подкожного пути введения препарата в «фазу коррекции» (например, на группе преддиализных больных) и изучение при внутривенном введении в «поддерживающую фазу» (например, на группе больных, находящиеся на диализе).

В «фазу коррекции» проводится оценка динамики ответа и определяется схема дозирования препарата при коррекции анемии, также в данной фазе оценивается профиль безопасности, связанный с фармакодинамикой препарата. Исследование проводится среди больных, которые ранее никогда не получали препараты эпоэтинов или не получали данные препараты в течение достаточно длительного периода времени (как минимум около 3 месяцев) и которым не

проводилось переливание крови. В тех случаях, когда больные получали препараты эпоэтинов пролонгированного действия (например, пегелированный эпоэтин), период после их последнего применения должен быть еще более продолжительным.

Исследование в «поддерживающую фазу» является более чувствительным для выявления различий в уровне проявления биологической активности биоподобного и оригинального препаратов, хотя исследования в «фазу коррекции» также являются достаточно информативными (дискриминативными). При разработке стратегии исследования эффективности применения препаратов в «поддерживающую фазу» необходимо свести к минимуму исходную гетерогенность исследуемой группы пациентов, а также обеспечить учет возможного проявления терапевтического эффекта предшествующего лечения. Для пациентов, которых планируется включить в исследование по использованию препаратов в «поддерживающей фазе», должна быть правильно определена доза, установленная относительно препарата сравнения (доза эритропоэтина, обеспечивающая стабильный уровень гемоглобина в целевом диапазоне на фоне стабильной дозы эритропоэтина и стабильного режима введения при отсутствии гемотрансфузий) в течение длительного времени (обычно не менее 3 месяцев). После этого все включенные в исследование пациенты должны быть рандомизированы по группам, которые будут получать биоподобный или референтный препарат, сохраняя установленные до рандомизации дозу, схему и способ применения эритропоэтина.

Как вариант, при представлении объективного полного обосновании возможно проведение раздельных исследований эффективности

внутривенного и подкожного введения препаратов в «поддерживающую фазу».

В ходе проведения обоих исследований необходимо тщательно подобрать дозы эпоэтина, необходимые для достижения (в «фазу коррекции») или поддержания (в «поддерживающую фазу») целевого уровня концентрации гемоглобина. Алгоритм подбора дозы эпоэтина должен соответствовать правилам GCP и проводиться одинаково в обеих группах.

Предпочтительными первичными конечными точками исследований в «фазу коррекции» является «доля пациентов с положительным ответом на лечение» (доля пациентов в процентах, у которых количество гемоглобина повысилось до установленного уровня) или «изменение уровня гемоглобина». При проведении исследований в «поддерживающую фазу» первичными конечными точками являются «доля пациентов с сохранением ответа на лечение» (доля пациентов в процентах, у которых зафиксировано поддержание количества гемоглобина на заранее установленном целевом уровне) или «изменение уровня гемоглобина». Следует учитывать, что подбор дозы эпоэтина, которая необходима для повышения гемоглобина до установленного уровня, снижает чувствительность первичных конечных точек, которые определяются по динамике содержания гемоглобина, для выявления различий по показателям эффективности между сравниваемыми группами. Поэтому доза эпоэтина должна быть включена в состав комбинированной первичной конечной точки в обоих типах исследований.

Результаты оценки первичных конечных точек при изучении эффективности препарата должны быть собраны в течение определенного периода исследования. Четырехнедельный период с 5-го

по 6-й месяцы исследований как фазы коррекции, так и поддерживающей фазы является оптимальным как для предотвращения возникновения эффектов переноса, связанных с лечением на исходном уровне, так и для полной оценки возможных различий между обеими конечными точками при наличии стабильных уровней гемоглобина и одинаковых дозировок эритропоэтина. Если оценка первичной конечной точки проводится в более короткий промежуток времени, необходимо представить обоснование того, что данный период исследования позволит выявить потенциальные различия эффективности сравниваемых препаратов.

Пределы эквивалентности для обеих сопутствующих конечных точек должны быть определены и должным образом обоснованы заранее, так как они являются основой, обеспечивающей исследованиям статистическую значимость. Если в качестве первичной конечной точки используется изменение уровня гемоглобина в сравнении с исходным, то рекомендуемый порог эквивалентности составляет ±0,5 г/дл. Необходимость в переливании крови следует включить в качестве важной вторичной конечной точки.

б) Второй подход для доказательства сходства эффективности обоих путей введения препарата включает сравнительную оценку изучения эффективности при одном пути введения препарата с помощью сравнительного клинического исследования на пациентах и представления сопоставимых фармакокинетических (фармакодинамических) данных связующего исследования при однократном и многократном введении препарата пациентам из чувствительной к эритропоэтину группы (например, здоровым добровольцам), а затем экстраполировании этих данных на второй путь введения. При многократном введении препарата оценка

фармакокинетики/фармакодинамики проводится с использованием фиксированной дозы эпоэтина в пределах широты терапевтического диапазона. В качестве первичной конечной точки фармакодинамики необходимо использовать показатели изменения уровня гемоглобина, а длительность исследования должна составлять не менее 4 недель.

В связи с тем, что для подкожного пути введения обязательной является сравнительная оценка иммуногенности, наиболее предпочтительным при данном подходе является проведение клинического исследования при подкожном пути введения препарата и представление данных связующего исследования фармакокинетики/фармакодинамики для внутривенного введения препарата.

В том случае, когда пациенты включаются в группы, получающие препараты подкожно на протяжении 12 месяцев, они могут быть использованы для сравнительного изучения иммуногенности в течение 12 месяцев. После этого, пациентам, которые получали референтный препарат, назначают лечение биоподобным препаратом, наблюдение проводят еще в течение 6 месяцев, что позволяет расширить базу данных по оценке безопасности и иммуногенности исследуемого биоподобного препарата. Если нет возможности проведения исследований согласно данного дизайна, при подготовке программы исследования выбор популяции и конечных точек исследования необходимо проводить с учетом указанных выше рекомендаций (пункт а).

Изучение эффективности одного пути введения препарата

Если предполагается, что препарат будет регистрироваться только для одного пути введения, необходимо проведение исследования фармакокинетики/фармакодинамики при однократном введении препарата, используемого в одной из фаз - «фаза коррекции» или

«поддерживающая фаза», выбранной для данного пути введения. При разработке программы исследования, выборе популяции и первичных конечных точек исследования необходимо руководствоваться рекомендациями, указанными выше (пункт а).

Отсутствие данных для одного из путей введения должно быть четко указано в общей характеристике лекарственного препарата для данного биоподобного эритропоэтина.

4.3. Исследование безопасности

Обычно данных о безопасности, полученных при изучении эффективности на предрегистрационном этапе исследования, достаточно для создания адекватной базы данных предмаркетинговой безопасности. Основными нежелательными явлениями, представляющими особый интерес, при применении эпоэтинов являются развитие (усугубление) артериальной гипертензии и тромбоэмболические нарушения.

Исследование иммуногенности проводится в соответствии с Главой 11 настоящих Правил, согласно которой для регистрации препарата необходимо представить результаты, полученные в исследованиях по оценке иммуногенности препарата в течение не менее 12 месяцев. При отсутствии стандартизованных методов оценки иммуногенности, для правильной интерпретации результатов требуются сравнительные данные изучения иммуногенности референтного препарата. Период сравнительного изучения иммуногенности должен включать, как минимум, 12 месяцев. При изучении иммуногенности в более короткие сроки, необходимо представить убедительные аргументы в пользу того, что это не повлияет на объективную оценку иммуногенного потенциала биоподобного эпоэтина.

При изучении иммуногенности необходимо использовать современные, валидированные и высокочувствительные методы определения антител**,** которые формируются в ранние сроки после введения препарата (антител, характеризующихся низкой аффинностью, главным образом IgM), и антител, определяемых в поздние сроки (обладающих высокой аффинностью). Кроме того, необходимо провести дополнительную характеристику выявленных антител и, в первую очередь, оценить их нейтрализующую активность. При этом рекомендуется сохранять образцы, которые получены при применении препаратов в «фазу коррекции» и «поддерживающую фазу». Учитывая, что нейтрализующие антитела и истинная парциальная красноклеточная аплазия при лечении эпоэтином встречаются редко, вероятность их выявления на этапе клинических исследований в предрегистрационном периоде низкая. Однако если они все-таки будут выявлены при клинических исследованиях, это будет свидетельствовать о серьезных проблемах, связанных с безопасностью применения препарата. Несмотря на то, что значение связывающих ненейтрализующих антител до конца не ясно, тем не менее, определение их повышенного количества или частоты выявления в ответ на введение изучаемого препарата, не позволяет сделать положительный вывод о безопасности препарата и рассматривать его как биоподобный.

Иммуногенность препаратов эпоэтина выше при подкожном пути введения, чем при внутривенном. Больные с почечной недостаточностью имеют наибольший риск выработки антител к эпоэтину, которые могут инициировать развитие истинной парциальной красноклеточной аплазии. Поэтому оценка иммуногенности должна включать достаточное количество пациентов с данной патологией и

подкожным введением препарата, если только подкожное введение для данной популяции пациентов не противопоказано.

4.4 План фармаконадзора

При регистрации препарата в модуль 1 регистрационного досье необходимо включить план управления рисками (план по фармаконадзору) в соответствии с Правилами регистрации и экспертизы средств медицинского применения и надлежащей практикой фармаконадзора. В плане управления рисками (плане фармаконадзора) в частности должны быть отражены сведения по контролю за развитием редких серьезных побочных реакций, таких как реакции, опосредованные иммуногенностью, истинная парциальная красноклеточная аплазия и оценка канцерогенного потенциала препарата.

4.5 Экстраполяция результатов исследований на другие показания

Учитывая, что механизм действия эпоэтина является одинаковым для всех известных показаний к применению и имеется только один известный рецептор для эпоэтина, результаты, полученные при проведении исследований для доказательства эффективности и безопасности изучаемого препарата при анемии почечного происхождения, могут быть экстраполированы на другие показания к применению, указанные в общей характеристике лекарственного препарата для оригинального препарата, использованного в качестве препарата сравнения, при том же пути введения.

ГЛАВА 15.5. ДОКЛИНИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОПОДОБНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА РЕКОМБИНАНТНОГО ГРАНУЛОЦИТАРНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА

1. Введение

В настоящей Главе представлены указания по демонстрации сопоставимости двух лекарственных препаратов, содержащих в качестве действующего вещества рекомбинантный гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ).

В разделе о доклинических исследованиях обосновывается необходимость соответствующих фармакодинамических и токсикологических исследований. В разделе о клинических исследованиях приведены рекомендации о подходящих видах исследований фармакодинамики и фармакокинетики, определении параметров эффективности и безопасности, необходимых для демонстрации подобности двух лекарственных препаратов на основе рГ-КСФ, а также сведения о специальных мероприятиях, направленных на управление рисками. Также обсуждаются критерии экстраполирования клинических данных на другие показания, одобренные для референтного лекарственного препарата.

В регистрационное досье на вновь разработанный лекарственный препарат, содержащий в качестве действующего вещества рекомбинантный гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (рчГ-КСФ), и представляемый для регистрации как биоподобный референтному лекарственному препарату, зарегистрированному в государствах-членах Союза, должны быть включены материалы, обосновывающие доказательства сходства (подобия) указанных препаратов.

Эндогенный Г-КСФ человека является кислым гликопротеином, состоящим из одной полипептидной цепи 174 аминокислот, его молекулярная масса составляет 19,6 кДа. Молекула Г-КСФ содержит свободную сульфгидрильную группу цистеина (в положении Cys^{17}) и две внутримолекулярные дисульфидные связи в положениях Cys^{36}-Cys^{42} и Cys^{64}-Cys^{74}. Эндогенный Г-КСФ человека не содержит сайтов N-гликолизирования и единственная О-гликозильная группа присоединена к остатку треонина (Thr^{133}). Углеводный остаток на Thr^{133} составляет около 4% от общего молекулярной массы гликопротеина.

В клинической практике используются препараты, полученные с помощью технологии рекомбинантной ДНК в системе клеток *Escherichia coli* (филграстим), или в системе клеток яичников китайских хомячков (CHO) (ленограстим). Молекула рекомбинантного Г-КСФ, полученного в системе клеток E. coli, отличается отсутствием гликозилирования и наличием дополнительного метионина на N-конце молекулы от нативного Г-КСФ и рекомбинантного Г-КСФ, полученного в системе клеток млекопитающих. Молекула рчГ-КСФ содержит один свободный остаток цистеина и две дисульфидные связи.

Специфическое действие Г-КСФ человека реализуется в результате связывания со специфическим трансмембранным рецептором, экспрессированным на различных гемопоэтических клетках, включая стволовые клетки, предшественники мультипотентных клеток, предшественники миелоидных клеток, нейтрофилов и моноцитов. Выделяют семь мембранно-ассоциированных и одну растворимую изоформу рецептора Г-КСФ, внеклеточные лиганд-связывающие домены всех изоформ идентичны. Эффекты Г-КСФ (рекомбинантного и эндогенного) опосредованы взаимодействием с рецептором одного класса аффинности.

Антитела к уже присутствующему на рынке рчГ-КСФ, синтезированному в культуре клеток *E. coli*, вырабатываются не часто, поэтому не оказывают существенного влияния на безопасность и эффективность применения препаратов. Лекарственные препараты выпускаются для внутривенного и подкожного введения. Возможные факторы риска развития иммунного ответа, связанные с особенностями пациентов, не известны.

Данное руководство необходимо рассматривать совместно с другими главами настоящих Правил и применимыми руководствами Союза.

2. Сфера применения

Настоящая препарат-специфичная Глава содержит доклинические и клинические требования к подтверждению биоаналогичности двух лекарственных препаратов, содержащих рчГ-КСФ.

3. Связь с другими главами

В главах 15–15.2 содержатся общие указания по разработке биоподобных лекарственных препаратов.

4. Основной текст указаний

4.1. Доклинические исследования

Перед началом клинических исследований должны быть проведены доклинические испытания. Такие исследования носят сравнительный характер и направлены на выявление различий между фармако-токсикологическими эффектами применения подобного лекарственного препарата и референтного лекарственного препарата, а не на изучение результатов лечения как таковых. Выбор способа

исследования должен быть полностью обоснован в доклиническом обзоре.

Фармакодинамические исследования

Исследования in vitro

На рецепторном уровне доказательство подобия исследуемого и референтного препарата должно быть продемонстрировано при помощи *in vitro* клеточного биотеста или анализа связывания с рецептором. Также эти данные могут быть получены по результатам биотестов, проведенных для измерения активности при оценке биологических характеристик в модуле 3 регистрационного досье. Важно, чтобы методики, используемые для оценки доказательства подобия, обладали чувствительностью, достаточной для выявления различий, а также чтобы в ходе экспериментов использовалось такое количество разведений, чтобы составить кривую зависимости ответа от концентрации.

Исследования in vivo

Сравнение фармакодинамических эффектов исследуемого препарата и референтного лекарственного препарата необходимо проводить в опытах на грызунах *in vivo* - как с нейтропенией, так и без нее.

Исследование токсичности

Необходимо предоставить данные, полученные в ходе по меньшей мере одного исследования токсичности с повторным введением препарата подходящим видам животных (при этом следует учитывать этапный подход, изложенный в Главе 15.2 настоящих Правил). Продолжительность исследования должна составлять не менее 28 дней. Исследование по изучению токсичности при многократном введении препарата должно включать: определение фармакодинамических показателей; определение токсикокинетических показателей. Особое

внимание следует уделить изучению иммунного ответа на препарат. Также необходимо предоставить данные о местной переносимости, полученные, по меньшей мере, на одном виде животных. По возможности, в рамках исследования токсичности при многократном введении препарата необходимо произвести исследование местной переносимости. Исследования фармакологической безопасности, репродуктивной токсичности, мутагенности и канцерогенности не являются рутинными требованиями к доклиническим исследованиям подобных биологических лекарственных препаратов, содержащих в качестве действующего вещества Г-КСФ.

4.2. Клинические исследования

Исследование фармакокинетики

Демонстрация подобия (сходства) на клиническом этапе проводится поэтапно и начинается со сравнительной оценки фармакокинетических свойств биоподобного и референтного препаратов. Изучение проводится у здоровых добровольцев в перекрестном исследовании при однократном подкожном и внутривенном введении сравниваемых препаратов. При сравнительном изучении фармакокинетических свойств в качестве основного показателя необходимо использовать AUC, в качестве дополнительных показателей C_{max} и $T_{½}$. Для оценки результатов исследований могут быть использованы общие принципы оценки биоэквивалентности.

Исследование фармакодинамики

Основным маркером фармакодинамики препаратов Г-КСФ является абсолютное количество нейтрофилов. Доза препарата при изучении фармакодинамики должна быть подобрана таким образом, чтобы она соответствовала крутой части кривой «доза-эффект», для этого может потребоваться изучение нескольких доз препаратов.

Вторичной конечной точкой сравнительной оценки фармакодинамики является динамика количества CD34 клеток. Диапазон допустимого предела отклонения оцениваемых показателей должен быть обоснован с учетом данных изучения фармакодинамики референтного препарата.

Исследование эффективности

Показаниями для назначения препаратов являются:

- Сокращение сроков продолжительности нейтропении после цитотоксической химиотерапии по поводу злокачественных заболеваний или миелобластивной терапии с последующей пересадкой костного мозга;

- Мобилизация клеток, предшественников периферических клеток крови;

- Лечение врожденных, циклической или идиопатической нейтропений;

- Лечение нейтропении, которая развилась на фоне ВИЧ инфекции.

Режим дозирования препарата зависит от заболевания.

Наиболее подходящей клинической моделью для доказательства подобия биоподобного и референтного препаратов является предупреждение тяжелой нейтропении, которая развивается после цитостатической химиотерапии, на однородной группе больных (по типу опухоли, предыдущей химиотерапии, запланированной химиотерапии и стадии болезни). В исследование должны быть включены больные, которым планируется проведение химиотерапии, вызывающей развитие тяжелой нейтропении. При использовании химиотерапии с заранее известной частотой и продолжительностью тяжелой нейтропении достаточно проведение исследования в двух сравниваемых группах. При использовании других схем химиотерапии

может потребоваться исследование в трех группах, включая контрольную группу с использованием плацебо.

Основным показателем эффективности является продолжительность тяжелой нейтропении, при уровне абсолютного количества нейтрофилов ниже $0,5\times10^9$/л, допустимый предел отклонений которого должен быть обоснован. Вторичными показателями эффективности являются частота появления фебрильной нейтропении, развитие инфекционного процесса и зависимость клинических проявлений от дозы рГ-КСФ. Главный акцент следует сделать на первом цикле проведения химиотерапии.

Доказательство подобия в клинических исследованиях на модели нейтропении, вызванной химиотерапией, позволяет экстраполировать результаты исследования эффективности на другие показания к применению, указанные в инструкции для оригинального препарата, при условии, что они имеют аналогичный механизм действия.

При достаточном обосновании для демонстрации сходства могут быть использованы другие альтернативные модели исследования, включая изучение фармакодинамических свойств на здоровых добровольцах. Для этого необходимо представить научное обоснование выбора модели, дизайна исследования, продолжительности исследования, выбора доз, показателей и конечных точек исследования, эффективности и фармакодинамики и пределов сопоставимости.

Исследование безопасности

Данные по безопасности необходимо получать на группе пациентов, получивших многократное введение препарата, предпочтительно в ходе сравнительного клинического исследования. Суммарная экспозиция должна соответствовать экспозиции при обычном химио-терапевтическом лечении, содержащем несколько

циклов. Общая продолжительность периода последующего наблюдения должна составлять не менее 6 месяцев. Числа пациентов должно быть достаточно для оценки профиля нежелательных явлений (включая боли в костях) и отклонений в результатах лабораторных исследований. Данные об иммуногенности должны быть собраны в соответствии с принципами, описанными в Главе 15.2 настоящих Правил.

4.3 План фармаконадзора

При регистрации биоподобного препарата Г-КСФ необходимо представить план управления рисками (фармаконадзора) в соответствии с правом Союза и надлежащей практикой фармаконадзора. Основное внимание должно быть уделено изучению иммуногенности и выявлению возможных редких тяжелых нежелательных явлений, в первую очередь, среди больных, получающих препарат длительно, и пациентов, у которых отмечается снижение эффективности препарата при проведении мобилизации клеток предшественников гемопоэза.

ГЛАВА 15.6. ДОКЛИНИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОПОДОБНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ГЕПАРИНОВ НИЗКОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ

1. Вступление

Гепарин является высоко сульфированным и гетерогенным членом семейства гликозаминогликановых углеводов, состоящих из различных дисахаридных единиц. К наиболее распространенным дисахарам относятся: 2-O-сульфат α-L-идуроновой кислоты и 6-O-сульфат, N-сульфат α-D-глюкозамин и IdoA (2S)-GlcNS (6S). Эндогенный гепарин вырабатывается в гранулах тучных клеток (лаброцитов) и обладает самой высокой плотностью отрицательного заряда среди всех биологических молекул. Для изготовления препаратов гепаринов в основном используют гепарин, получаемый из слизистой оболочки кишечника свиней.

Гепарин угнетает образование нескольких сериновых протеаз системы свертывания крови посредством активации антитромбина. Основную роль в связывании гепарина с антитромбином играет пентасахаридная последовательность, содержащая 3-O-сульфатный глюкозаминовый остаток. После связывания с антитромбином гепарин вызывает конформационное изменение его молекулы, что приводит к активации области, ответственной за ингибирование активированных факторов свертывания. Кроме того, гепарин выступает в роли катализатора, связывая ингибитор и активированные протеазы серина (например, факторы IXa и XIa). Это свойство гепарина зависит главным образом от числа моносахаридов в молекуле гепарина.

Молекулы гепарина, содержащие менее 18 моносахаридов, не катализируют ингибирование тромбина, но угнетают действие фактора

свертывания Xa. После того, как сериновые протеазы начинают действовать на специфичную пептидную связь Arg-Ser (аргинин-серин) активного центра молекулы антитромбина, гепарин повышает скорость реакции между тромбином и антитромбином как минимум в тысячу раз, с образованием стабильного комплекса 1:1. Гепарин взаимодействует и с другими структурами плазмы и клеток, но в сравнении с ингибированием процесса свертывания крови, их клиническое значение изучено недостаточно.

Гепарин вводят парентерально, поскольку при пероральном приеме он разрушается. Его можно вводить внутривенно, внутриартериально или подкожно, внутримышечных инъекций следует избегать из-за риска гематом.

Низкомолекулярные гепарины получают из нефракционированного гепарина в процессе химической или ферментативной деполимеризации. Исходным материалом для получения низкомолекулярных гепаринов является вещество биологического происхождения, а характеристики фармацевтической субстанции определяются производственным процессом.

Сложность состава низкомолекулярных гепаринов обусловлена преимущественно особенностями исходного материала (нефракционированный гепарин, выделенный из слизистой оболочки свиней или других тканей животных), процессами выделения, фракционирования и производства.

Существует несколько современных методов для физико-химической характеристики препаратов низкомолекулярных гепаринов. Тем не менее, в настоящее время неизвестно, как именно множественные различия в полисахаридах влияют на клинические эффекты, связанные с эффективностью и безопасностью низкомолекулярных гепаринов.

Конкретный препарат низкомолекулярного гепарина отличается от нефракционированного гепарина и от других низкомолекулярных гепаринов по фармакокинетическим и фармакодинамическим свойствам. В результате процесса деполимеризации молекула действующего вещества содержит в основном цепочки состоящие менее чем из 18 моносахаров. Подобное уменьшение размера молекулы сопровождается снижением ингибирующей активности тромбина в сравнении со стандартным гепарином и повышением ингибирующей активности фактора свертывания крови Ха.

Из-за сложности определения низкомолекулярных гепаринов в крови невозможно оценить фармакокинетические свойства препаратов на основе гепаринов. Однако оценить всасывание и элиминацию низкомолекулярных гепаринов можно с использованием фармакодинамических тестов, таких как оценка анти-Ха и анти-IIа активности.

Существует несколько зарегистрированных низкомолекулярных гепаринов, которые различаются между собой по исходному сырью, производственному процессу, фармакокинетическим/фармакодинамическим свойствам и терапевтическим показаниям, включающим лечение и профилактику тромбоза глубоких вен, а также профилактику осложнений острого коронарного синдрома (нестабильная стенокардия, инфаркт миокарда как с подъемом сегмента ST, так и без него).

К наиболее частым нежелательным реакциям при применении гепаринов относятся кровотечения, а к наиболее серьезной нежелательной реакции относится, редко наблюдаемая, гепарин-индуцированная тромбоцитопения II типа. Данное осложнение развивается под влиянием образования антител к новым антигенам, которые образуются при формировании комплекса содержащего

тромбоцитарный фактор 4 (PF4) и гепарин. Связывание антител с новым антигеном (комплекс тромбоцитарный фактор 4 (PF4) и гепарин) вызывает активацию тромбоцитов с последующим образованием тромбогенных микроагрегатов тромбоцитов. У пациентов с тромбоцитопенией повышен риск артериальных и венозных тромбоэмболических осложнений (гепарин-индуцированная тромбоцитопения и тромбоз). Несмотря на то, что риск развития этих нежелательных реакций является более низким в сравнении с применением нефракционированного гепарина, при назначении препаратов низкомолекулярного гепарина необходимо регулярно контролировать содержание тромбоцитов у всех пациентов, а у тех пациентов, у которых выявлена тромбоцитопения или тромбоэмболические осложнения, необходимо определение антител к комплексу PF4-гепарин.

Следует отметить, что гетерогенность низкомолекулярных гепаринов очень велика**.** При этом влияние структуры действующего вещества на механизм действия препарата до конца не изучено, а фармакодинамические маркеры анти-FXa и FIIa активности не позволяют в полной мере охарактеризовать (спрогнозировать) терапевтическую эффективность. Поэтому при проведении клинических исследований, как правило, необходимо охарактеризовать те моменты, которые не получили полную оценку в процессе изучения физико-химических и биологических свойств.

Руководство дополняет, предыдущие требования для демонстрации подобия (сходства) двух препаратов низкомолекулярного гепарина. Данное руководство необходимо рассматривать совместно с другими соответствующими рекомендациями, принятыми в Союзе.

2. Сфера применения

Настоящая препарат-специфичная Глава содержит доклинические и клинические требования к подтверждению биоаналогичности двух лекарственных препаратов, содержащих низкомолекулярный гепарин.

3. Связь с другими главами

В главах 15–15.2 содержатся общие указания по разработке биоподобных лекарственных препаратов.

4. Доклинические исследования

Перед началом клинических исследований должны быть проведены доклинические исследования. Доклинические исследования носят сравнительный характер и направлены на выявление различий между фармакотоксикологическим действием подобного биологического лекарственного препарата и референтного низкомолекулярного гепарина, а не на изучение ответа на препарат как такового. Выбор подхода должен быть полностью обоснован в доклиническом обзоре.

Исследование фармакодинамики

Исследование in vitro

Для сопоставления разницы в активности подобного лекарственного препарата и референтного низкомолекулярного гепарина должны быть предоставлены данные нескольких сравнительных биологических анализов (на основании современных данных о клинически значимом фармакодинамическом влиянии низкомолекулярных гепаринов, включая как минимум оценку анти-Ха и анти-IIа активности). По возможности для измерения активности следует использовать стандартизированные методы (например, в

соответствии с Фармакопеей Союза). Такие данные могут быть получены ранее в процессе изучения качества препарата.

Исследование in vivo

Если при характеристике физико-химических и биологических свойств с использованием высокочувствительных современных методов установлена высокая степень сходства биоподобного и референтного препаратов, не требуется проведения исследований *in vivo* как части изучения сопоставимости. В остальных случаях, *in vivo* изучение фармакодинамической активности биоподобного и референтного низкомолекулярного гепарина включает:

– использование фармакодинамической модели *in vivo*, разработанной с учетом самых современных данных о клинически значимых фармакодинамических эффектах низкомолекулярных гепаринов, в которую включена по меньшей мере оценка анти-Ха и анти-IIа активности, а также оценка степени высвобождения ингибитора пути тканевого фактора, и (или)

– использование подходящей модели либо венозного, либо артериального тромбоза на животных, в соответствии с клиническими показаниями.

Исследование токсичности

Как правило, изучение токсичности при повторных введениях одной дозы не требуется.

В тех случаях, если в состав препарата включено новое или мало изученное вспомогательное вещество, необходимо проведение дополнительных исследований токсичности.

Проведение сравнительных исследований неспецифической токсичности только для оценки установленных различий в составе

примесей не рекомендуется. При разработке продукта a priori исходят из концепции его высокой степени подобия референтному препарату, что должно быть подтверждено физико-химическими методами исследования. Поэтому наилучшей стратегией для снижения рисков, обусловленными примесями (такими как белки) является, их сведение к минимуму в соответствии с требованиями фармакопейной статьи (монографии).

Исследования фармакологической безопасности, репродуктивной токсичности не являются обязательными при сравнительном исследовании биоподобного и референтного низкомолекулярных гепаринов. Исследования местной переносимости не проводятся, если в состав препарата не включены вспомогательные вещества для которых не имеется достаточного документально подтвержденного опыта использования при данном пути введения лекарственного препарата или же он ограничен. Если выполнялись иные исследования *in vivo*, то оценка местной переносимости может быть проведена как их часть.

5. Клинические исследования

Исследование фармакокинетики и фармакодинамики

Гетерогенность низкомолекулярных гепаринов не позволяет проведение обычного исследования фармакокинетических свойств. Поэтому оценка всасывания и элиминации низкомолекулярных гепаринов проводится при изучении фармакодинамических свойств, по показателям (включая анти-Ха и анти-IIа), которые могут быть использованы в качестве суррогатных маркеров концентрации препарата. При этом могут быть использованы и другие показатели, такие как активность ингибитора пути тканевого фактора и соотношение активности анти-Ха и анти-IIа факторов. Оценка данных

показателей позволит в значительной степени охарактеризовать полисахаридный профиль препарата. Изучение подобия (сходства) биоподобного и референтного препаратов по данным показателям проводят в рандомизированном перекрестном исследовании в двух группах здоровых добровольцев при подкожном введении препаратов. Если референтный препарат, кроме подкожного пути введения, зарегистрирован еще и для внутривенного или внутриартериального путей введения, то необходимо проведение дополнительного сравнительного исследования для данных путей введения.

Выбранная доза должна соответствовать крутой части кривой зависимости «доза–эффект» и находиться в рекомендуемом для разных показаний диапазоне доз. Пределы эквивалентности также должны быть определены и должным образом обоснованы заранее.

Исследование эффективности

Как правило, для демонстрации сходства биоподобного и референтного препаратов необходимо сравнительное изучение клинической эффективности. Сравнительные исследования эффективности могут не проводиться только в том случае, если биоподобный и референтный низкомолекулярный гепарины могут быть достоверно сопоставлены по своим физико-химическим характеристикам, биологической активности (силе действия) и характерному фармакодинамическому профилю установленным с применением современных высокочувствительных и специфичных методов исследования. Следует принимать во внимание, что это возможно в исключительном случае, при условии, что в регистрационном досье представлены данные значительного количества проведенных подтверждающих химико-аналитических и биоаналитических исследований.

Терапевтическая эквивалентность должна быть подтверждена в клиническом исследовании достаточной статистической мощности, рандомизированном, двойном слепом, проводимом в параллельных группах. Теоретически это можно осуществить при применении препарата для профилактики венозной или артериальной тромбоэмболии или при лечении венозной тромбоэмболии. При этом должна быть выбрана наиболее чувствительная модель для выявления различий эффективности между новым низкомолекулярным гепарином и референтным лекарственным препаратом.

Наиболее высокий показатель распространения венозной тромбоэмболии отмечается у хирургических больных, кроме того, подавляющее большинство опубликованных исследований проводилось с участием хирургических пациентов с высоким риском развития венозной тромбоэмболии, что особенно характерно для пациентов после полного эндопротезирования тазобедренного или коленного сустава. Таким образом, данная популяция больных наиболее полно изучена и накоплен большой объем данных, касающихся данных операции, продолжительности исследования и рисков развития кровотечений.

Учитывая это, оценку сравнительной эффективности рекомендуется проводить при применении препарата для профилактики венозной тромбоэмболии у пациентов, которым были проведены операции с высоким риском развития венозных тромбоэмболических осложнений. Предпочтительно, проведение исследований с участием больных, перенесших обширное ортопедическое оперативное вмешательство, например, на тазобедренном суставе. В клинические исследования рекомендуется включать достаточное количество больных с переломом шейки бедра, поскольку они обладают и высоким риском тромбозов, и высоким риском оперативного кровотечения. Доза

препарата должна соответствовать дозе, указанной в инструкции для применения референтного препарата для профилактики осложнений венозной тромбоэмболии.

При этом для выявления возможных различий эффективности биоподобного и референтного препаратов сравниваемые группы больных должны быть максимально однородными.

В качестве комбинированной конечной точки эффективности профилактики венозных тромбоэмболических осложнений можно использовать показатель частоты развития проксимального тромбоза глубоких вен, тромбоэмболии легочной артерии и летальных исходов, обусловленных венозной тромбоэмболией. Для сравнительной оценки двух препаратов можно использовать показатель суммарной точки, которая рассчитывается как сумма общего числа тромбоэмболических осложнений (тромбоэмболия легочной артерии и венозные тромбоэмболии, количество летальных исходов, обусловленных тромбозом глубоких вен). Решение о наличии венозной тромбоэмболии должно быть вынесено центральной независимой комиссией экспертов, на основании анализа “ослепленных” данных.

Для проведения сравнительных исследований необходимо определить статистически и клинически обоснованные допустимые пределы отклонения показателей. Исследование проводится для доказательства подобия (сходства) эффективности биоподобного и референтного препаратов на основании одной из указанных выше конечных точек.

Для оценки конечной точки необходимо использовать современные диагностические методики. Если для определения проксимального тромбоза глубоких вен с высокой специфичностью и чувствительностью можно использовать УЗИ, то выявить дистальный

тромбоз глубоких вен можно только с помощью двусторонней венографии. Поэтому использование данных методик является обязательным для определения конечных точек.

Для демонстрации подобия (сходства) биоподобного и референтного препаратов необходимо использовать соответствующие конечные точки, такие как количество случаев тромбоза глубоких вен, тромбоэмболии легочной артерии и летальных исходов.

Оценка первичной конечной точки проводится в момент появления симптомов, указывающих на венозную тромбоэмболию, или у пациентов без симптоматики в конце лечения. Наблюдение за больными должно проводиться не менее 60 дней, чтобы можно было обнаружить поздние тромботические осложнения.

Исследование безопасности

Даже если сделан вывод об аналогичной эффективности на основании сопоставления данных по физико-химическим свойствам, биологической активности (силе действия) и характерным фармакодинамическим профилям, до представления заявления на регистрацию биоподобного низкомолекулярного гепарина необходимо проведение сравнительной оценки его безопасности у человека.

Для регистрации биоподобного низкомолекулярного гепарина может быть достаточно данных о сравнительной безопасности, которые были получены в рамках клинических исследований эффективности в предрегистрационный период. Следует дать подробную сравнительную оценку нежелательных реакций по типу, частоте и тяжести между биоподобным и референтным препаратами. Обширные и клинически значимые необширные кровотечения должны быть зарегистрированы и описаны. При этом необходимо использовать клинически релевантную классификацию кровотечений. Подобно оценке эффективности,

решение о геморрагических явлениях должно выноситься центральным комитетом независимых экспертов слепым отбором в заранее определенных пределах. Рекомендуется контролировать функцию печени.

При изучении безопасности необходимо продемонстрировать достаточным числом повторных анализов, что иммуногенность биоподобного препарата не превышает иммуногенность референтного препарата. Для выявления гепарин-индуцированной иммунной тромбоцитопении (тип II) на протяжении всего исследования у пациентов с тромбоцитопенией и (или) тромбоэмболией необходимо определять количество тромбоцитов с использованием адекватных диагностических текстов (включая определение антител к комплексу PF4-гепарин). Определение антител у всех пациентов не имеет смысла, так как частота гепарин-индуцированной иммунной тромбоцитопении (тип II) очень низкая (определяется в <0,1% случаев) и она вряд ли может быть выявлена на этапе предрегистрационного исследования.

6. План фармаконадзора

При регистрации биоподобного препарата необходимо представить план по управлению рисками в соответствии с действующим законодательством и надлежащей практикой фармаконадзора ЕАЭС. В плане должны быть отражены выявленные и потенциальные риски применения референтного препарата в соответствии с инструкцией к применению референтного препарата, а также, мероприятия по отслеживанию параметров безопасности применения для соответствующих показаний референтного препарата, на которые проводилась экстраполяция результатов исследований по другим показаниям. Кроме того необходимо представить план

управления рисками, связанными с серьезными нежелательными явлениями при приеме препаратов низкомолекулярных гепаринов, такими как гепарин-индуцированная тромбоцитопения II типа, анафилактические и анафилактоидные реакции.

7. Экстраполяция показаний

Демонстрация подобной (сходной) эффективности и безопасности биоподобным и референтным препаратами, продемонстрированная в популяции хирургических больных с высоким риском венозной тромбоэмболии, при достаточном обосновании, позволяет экстраполировать полученные результаты исследований на другие показания, указанные для референтного препарата.

ГЛАВА 15.7. ДОКЛИНИЧЕСКАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА БИОПОДОБНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ РЕКОМБИНАНТНЫЙ ИНСУЛИН И АНАЛОГИ ИНСУЛИНА

Резюме

Настоящая Глава устанавливает доклинические и клинические требования к лекарственным препаратам, содержащим рекомбинантный инсулин, включая инсулин человека и аналоги инсулина человека (собирательно называемые инсулином), заявленным в качестве аналогичных другому зарегистрированному лекарственному препарату (референтному лекарственному препарату).

В доклиническом разделе рассматриваются требования к *in vitro* фармакодинамическим исследованиям и ситуациям, которые могут потребовать дополнительной токсикологической оценки *in vivo*. В клиническом разделе рассматриваются требования к фармакокинетическим, фармакодинамическим исследованиям и исследованиям безопасности, а также плану управления рисками.

В сферу применения были включены препараты инсулина средней продолжительности и длительного действия, а также аналоги инсулина; в отношении доклинических исследований *in vivo* вводится подход, основанный на рисках; даются более подробные рекомендации по дизайну, исследуемой популяции, дозам инсулина и конечным точкам инсулинового клэмп-исследования. Кроме того, подробно охарактеризованы требования к исследованиям безопасности, а также включены обязательные условия, при выполнении которых возможно непроведение такого исследования.

1. Введение

Регистрационное досье рекомбинантного инсулина человека или его аналога, заявленного в качестве аналогичного зарегистрированному референтному лекарственному препарату должно содержать подтверждение биоаналогичности заявленного препарата такому референтному лекарственному препарату.

Инсулин человека – это негликозилированной содержащий дисульфидную связь гетеродимер, состоящий из 51 аминокислоты. Аналоги инсулина отличаются от инсулина человека заменой аминокислот или другими химическими модификациями, такими как включение цепи жирной кислоты в молекулу. Препараты инсулина отличаются преимущественно по кинетическому и (или) фармакодинамическому профилям. Как правило, выделяют препараты ультракороткого (действие развивается быстрее, чем у растворимого инсулина человека), короткого (например, растворимый инсулин человека), средней продолжительности (например, инсулин-изофан человека = инсулин НПХ) и длительного действия (инсулины с профилями действия, существенно превышающими таковой инсулин НПХ) и применяются в монотерапии, в составе экстемпоральной смеси или комбинированных препаратов инсулина ультракороткого (короткого) действия и инсулина средней продолжительности (длительного) (двухфазного) действия в различных соотношениях.

Для детального установления характеристик первичной, вторичной и третичной структур молекулы рекомбинантного инсулина, а также его аффинности с рецептором и биологической активности *in vitro* и *in vivo* доступны подходящие физико-химические и биологические методы. Необходимо уделить внимание родственным соединениям и родственным примесям, а также производственным

примесям, в особенности дезамидо-формам, гликозилированным формам и прочим формам, которые могут быть обусловлены экспрессирующей системой или проистекать на этапах преобразования с целью удаления С-пептида и восстановления третичной структуры.

Доступные в настоящее время инсулины вводят подкожно и внутривенно. Действие инсулина преимущественно опосредовано стимуляцией инсулинового рецептора, однако инсулин также является слабым естественным лигандом рецептора инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1).

К инсулину часто вырабатываются антитела, преимущественно перекрестно реагирующие. Они, как правило, не сказываются на эффективности или безопасности. Необходимо оценить потенциал выработки антител к препарату и примесям. Возможные факторы риска развития иммунного ответа, обусловленные пациентом, неизвестны.

2. Сфера применения

Настоящая препарат-специфичная Глава содержит доклинические и клинические требования к подтверждению биоаналогичности двух лекарственных препаратов, содержащих рекомбинантный инсулин человека.

3. Связь с другими главами

В главах 15–15.2 содержатся общие указания по разработке биоподобных лекарственных препаратов.

4. Доклинические исследования

Перед началом клинической разработки необходимо провести доклинические исследования. Эти исследования должны носить

сравнительных характер и быть спланированы с целью достижения необходимой чувствительности для выявления значимых различий в ответ на биоподобный лекарственный препарат и референтный лекарственный препарат, а не оценивать ответ *per se*. Принятый подход необходимо всесторонне обосновать в доклиническом обзоре регистрационного досье.

Фармакодинамические исследования

Исследования *in vitro*

В целях оценки любых различий в свойствах между биоподобным и рефернтным лекарственными препаратами необходимо провести *in vitro* испытания на связывание с рецептором, а также испытания на последующую биологическую активность. Частично эти данные могут быть доступны по результатам испытаний, проведенных с целью определения активности при оценке физико-химических характеристик. Необходимо подтвердить чувствительность испытаний при изучении сопоставимости для выявления любых значимых различий и то, что эксперименты проведены с достаточным числом повторностей, разведений или временных точек на кривой с целью правильной характеристики зависимости «концентрация–эффект» или «время–эффект». Биоподобный и рефернтный лекарственные препараты необходимо сравнивать параллельно в одном эксперименте. Все испытания должны включать надлежащие контроли, подтверждающие валидность и пригодность метода.

Необходимо подтвердить сопоставимость связывания с обоими рецепторами инсулина человека (ИР-А и ИР-В), в том числе кинетику включения–выключения. С этой целью возможно использование клеток искусственно экспрессирующих ИР-А или ИР-В соответственно. При использовании клеток, эндогенно экспрессирующих ИР-А или ИР-В,

необходимо подтвердить то, что действительно присутствует лишь один рецептор. Иначе возникают затруднения в интерпретации результатов связывания. При использовании другого современного метода изучения связывания необходимо обосновать выбор такого метода.

Биологическую активность необходимо сравнить на двух уровнях: (1) аутофосфорилирование рецептора и (2) метаболическую активность. В целом, митогенная активность, опосредуемая стимуляцией рецептора ИФР-1, может быть не значима для инсулина человека и большинства аналогов инсулина. Однако, если применимо, допускается изучить сравнительное связывание с рецептором ИФР-1 и функциональную активность, чтобы охватить этот потенциальный токсикологический эффект. В отношении аутофосфорилирования рецепторов необходимо обеспечить, чтобы динамический диапазон используемого в испытании метода обнаружения не был слишком узким, поскольку это снизит возможность обнаружения значимых различий в степени аутофосфорилирования рецептора. Доступны различные методы изучения метаболической активности, включая методы определения образования гликогена, липогенеза, ингибирования стимулированного липолиза, а также транспорта глюкозы; эти процессы можно изучить на различных клетках. В целях подтверждения сопоставимости необходимо использовать, по меньшей мере, три различных метода изучения метаболической активности. Данные должны давать четкое видение соотношения агонистических свойств биоподобного и референтного лекарственных препаратов в отношении инсулинового рецептора. Выбор методов изучения метаболической активности необходимо обосновать в свете вышеизложенных критериев.

Исследования *in vivo*

Сравнительные *in vivo* исследования фармакодинамических эффектов, скорее всего, будут недостаточно чувствительны для обнаружения различий, не выявленных в *in vitro* испытаниях, в связи с чем включать их в программу изучения сопоставимости не требуется.

Токсикологические исследования

Отдельные исследования токсичности при многократном введении, в целом, не требуются. В определенных случаях, например, при использовании новых вспомогательных веществ, придерживаясь подхода, основанного на рисках, следует определить необходимость проведения дополнительных токсикологических исследований (см. также Главу 15.2 настоящих Правил).

При доклиническом исследовании биоподобного лекарственного препарата, содержащего инсулин или аналоги инсулина, проведение исследований фармакологической безопасности, репродуктивной токсичности и канцерогенности не требуется. Проведение исследований местной переносимости не требуется, если только не использованы вспомогательные вещества, в отношении которых отсутствует опыт (или он ограничен) их применения при намеченном пути введения.

5. Клинические исследования

Исследования фармакологии

В дополнение к аналогичности физико-химических и функциональных характеристик подтверждение аналогичности фармакокинетического (ФК) и фармакодинамического (ФД) профилей является основой доказательства аналогичной эффективности биоподобного и референтного инсулина. Для достижения этой цели наиболее подходящими считаются перекрестные, предпочтительно двойные слепые гиперинсулинемические эугликемические клэмп-

исследования (*clamp* – тиски) при однократном подкожном введении биоподобного и референтного инсулина. Во избежание эффектов переноса при определении отмывочной фазы необходимо учитывать продолжительность действия исследуемого препарата инсулина. Профили «время–концентрация» и «время–действие» предпочтительно изучать одновременно (в одном клэмп-исследовании). Дополнительные фармакологические исследования при внутривенном введении, если применимо, не требуются.

Исследуемая популяция

В целях наилучшего выявления различий, обулословленных препаратами, исследуемая популяция должна быть однородной и инсулин-чувствительной, ею могут быть здоровые добровольцы или пациенты с сахарным диабетом 1-го типа с нормальной массой тела.

Помимо большей доступности, здоровые добровольцы, как правило, проявляют меньшую внутрииндивидуальную вариабельность по сравнению с пациентами с сахарным диабетом 1-го типа (СД1Т), однако их недостатком является наличие эндогенного инсулина, который, не считая некоторых аналогов инсулина, невозможно с помощью доступных методов отличить от экзогенно вводимого инсулина. Возможно использование методов подавления секции эндогенного инсулина или коррекция значений сывороточной концентрации инсулина на вычисленную концентрацию эндогенного инсулина (см. ниже).

В целях обеспечения отсутствия значимой остаточной секреции эндогенного инсулина необходимо осуществлять скрининг содержания С-пептида у пациентов с СД1Т, включаемых в клэмп-исследования. В целях достижения сопоставимых базовых условий во всех экспериментах необходимо обеспечить стабильное и сопоставимое

базовое содержание глюкозы в крови и концентрации инсулина в течение некоторого времени (в идеале в течение одного часа) до начала исследования, что может вызвать большие затруднения у пациентов с СД1Т, чем у здоровых субъектов.

В целях сравнения инсулинов короткого или средней продолжительности действия в клэмп-исследования допускается включать как здоровых субъектов, так и пациентов с СД1Т, тогда как для сравнения инсулинов длительного действия предпочтительно исследовать пациентов с СД1Т.

Чувствительность к инсулину у женщин может варьировать в течение менструального цикла; на сегодняшний день неясно, может ли это повлиять на результаты исследования. В связи с этим в исследования предпочтительно включать только мужчин.

Инсулиновый клэмп («инсулиновые тиски»)

По общему мнению, эугликемический гиперинсулинемический клэмп-метод является наилучшим из доступных методов определения действия инсулина. В таких клэмп-экспериментах увеличивают плазменную концентрацию инсулина (например, за счет его подкожного введения), а содержание глюкозы в крови поддерживают («зажимают в тиски») на заданном уровне с помощью регулирования введения глюкозы.

Для поддержания содержания глюкозы в крови существуют различные клэмп-методы и алгоритмы обратной связи. Клэмп-исследования можно проводить вручную или с помощью автоматизированной процедуры. Оба подхода требуют большого опыта. Однако оба метода дают схожие и воспроизводимые результаты, если отсутствует быстрое изменение потребности в глюкозе, которое может быть вовремя не распознано в зависимости от длительности интервалов

между определением содержания глюкозы в крови в ходе ручного клэмп-метода. Настоятельно рекомендуется использовать двойной слепой дизайн, особенно при ручном методе, который больше подвержен систематическим ошибкам со стороны исследователя по сравнению с автоматизированным клэмп-исследованием. При невозможности этого необходимо прибегнуть к другим способам эффективного снижения потенциальных систематических ошибок со стороны исследователя.

В целях снижения вариабельности условия эксперимента в сравнительном клэмп-исследовании необходимо как можно больше стандартизировать. Во избежание искажающего влияния на результаты исследуемых субъектов следует включать в клэмп-эксперименты после ночного голодания (как правило, в течение 10–12 часов), они должны оставаться голодными в ходе всего исследования. У пациентов с сахарным диабетом необходимо минимизировать эффекты переноса, обусловленные введением инсулина до исследования. В идеале, целевого содержания глюкозы в клэмп-эксперименте необходимо достичь, по меньшей мере, за час до экспериментального введения инсулина без какого-либо введения глюкозы в течение этого последнего часа. Необходимо обеспечить стандартизацию клэмп-метода и факторов, влияющих на чувствительность к инсулину, таких как время суток, физическая активность и прием пищи и рацион, отказ от алкоголя, кофеинсодержащих напитков, курения, препаратов, за исключением исследуемых, и отсутствие сопутствующих заболеваний (в том числе инфекций) и психического стресса. В исследовательском центре субъектам следует позволить адаптироваться к экспериментальным условиям, чтобы достичь сопоставимого метаболического статуса; они должны находиться в спокойном

окружении и избегать физической активности в ходе всего исследования. Эти требования свидетельствуют о важности мельчайших деталей.

При включении в клэмп-исследования здоровых добровольцев выработка эндогенного инсулина у них может искажать ФК- и (или) ФД-параметры. Существуют специфические методы, способные различать некоторые аналоги инсулина от эндогенного инсулина. При наличии целесообразно использовать эти методы. В целях оценки прандиального инсулина считается, что болюсное введение инсулина будет в достаточной степени подавлять эндогенный инсулин в течение клэмп-эксперимента. Секрецию эндогенного инсулина можно, как правило, в достаточной степени подавить, удерживая концентрацию глюкозы в крови ниже ее содержания у субъекта натощак (см. ниже). В качестве альтернативы возможно введение первичной дозы инсулина ультракороткого или короткого действия с последующим поддержанием базовой скорости (например, 0,10-0,15 МЕ/мин/кг), однако показано, что дополнительная инфузия базального инсулина искажает поздний глюкодинамический профиль инсулина НПХ и, возможно, даже в большей степени препаратов инсулина длительного действия, завышая, тем самым, эффект исследуемых инсулинов. В целях максимального подавления секреции эндогенного инсулина, глюкагона и гормона роста в ходе клэмп-исследований прибегали к введению соматостатина, но в связи с низкой переносимостью его широкое применение не рекомендуется. Кроме того, следует отметить, что соматостатин снижает клиренс инсулина, искусственно увеличивая, таким образом, продолжительность его действия. В клэмп-исследованиях с участием здоровых добровольцев необходимо всегда определять концентрацию С-пептида параллельно с концентрацией

инсулина на протяжении всего эксперимента с целью оценки степени и постоянства подавления секреции эндогенного инсулина. В отсутствие подавления секреции инсулина, можно прибегнуть к методам коррекции по содержанию С-пептида. Независимо от используемого метода, в целях обеспечения сопоставимых экспериментальных условий он должен быть обоснован и одинаков во всех клэмп-исследованиях.

Инсулин в клэмп-исследованиях наиболее часто вводят в дозах 0,2–0,3 МЕ/кг массы тела – инсулины ультракороткого и короткого действия, 0,3–0,4 МЕ/кг массы тела – инсулины средней продолжительности действия и 0,4–0,6 МЕ/кг массы тела – инсулины длительного действия. Дозы в верхнем диапазоне, как правило, дают более надежный ФД-ответ, снижая тем самым ФД-вариабельность. Ожидается, что достигаемая степень гиперинсулинемии будет находиться на крутой части кривой «доза–эффект» инсулина, т.е. можно ожидать высокую чувствительность в выявлении потенциальных различий в профилях «время–действие» двух инсулинов. В целях снижения вариабельности необходимо стандартизировать место и технику введения.

Концентрация глюкозы в крови у здоровых добровольцев обычно удерживается ниже (например, на 0,3 ммоль/л (5 мг/дл) или 10 %) содержания глюкозы у субъекта натощак или при 4,4–5,6 ммоль/л (80–100 мг/дл). У пациентов с СД1Т, содержание глюкозы в крови обычно удерживается при 5,6 ммоль/л (100 мг/дл). Необходимо заранее указать допустимые отклонения в содержании сахара крови от этого значения в ходе клэмп-исследования. Необходимо избегать снижения концентрации глюкозы ниже 3,3 ммоль/л (60 мг/дл), поскольку это может привести к стимуляции выделения контр-регуляторных гормонов (адреналина, глюкагона, кортизола, гормона роста) для повышения

концентрации глюкозы в крови и привести к быстрому и выраженному снижению чувствительности к инсулину, влияя, тем самым, на оцениваемый профиль «время–активность» исследуемого препарата инсулина.

При определении продолжительности клэмп-исследований необходимо учитывать известную продолжительность действия препарата исследуемого инсулина и его дозозависимость. Продолжительность действия в глюкозных тисках может быть задана как время от момента введения инсулина до восстановления СВГ до базового или заранее установленного значения (например, 0,5 мг/кг/мин) или у пациентов с сахарным диабетом – до концентрации глюкозы в крови, превышающей заранее установленный порог, например, 8,3 ммоль/л (150 мг/дл). Обычная продолжительность клэмп-эксперимента составляет 8–10 часов и 10–12 для инсулинов ультракороткого и короткого действия соответственно. Рекомендуемая продолжительность клэмп-исследования для препаратов инсулина средней продолжительности и длительного действия составляет, по меньшей мере, 24 часа.

Необходимо во всех случаях представлять обоснование выбора продолжительности клэмп-эксперимента, принимая во внимание известное влияние дозы инсулина и применения соматостатина (если применимо) на продолжительность действия инсулина и этнические различия в клиренсе инсулина.

Конечные точки и статистический анализ

Фармакокинетика (ФК)

В качестве первичных конечных точек изучения инсулинов ультракороткого и короткого действия следует выбрать $AUC_{(0–t)}$ и C_{max}, а

в качестве вторичных конечных точек: $AUC_{(0–\infty)}$, частичные AUC (подобающие для соответствующего инсулина), t_{max} и $t_{½}$.

В качестве первичных конечных точек изучения инсулинов средней продолжительности действия следует выбрать $AUC_{(0–\tau)}$ и C_{max}, а в качестве вторичных конечных точек: $AUC_{(0–t)}$, $AUC_{(0–\infty)}$, подобающие частичные AUC, t_{max} и $t_{½}$.

Инсулины длительного действия, как правило, проявляют плоский ФК-профиль. В связи с этим в некоторых случаях определение C_{max} и t_{max} не всегда возможно и может не иметь смысла с клинической точки зрения. В таких случаях в качестве первичной конечной точки следует выбрать $AUC_{(0–\tau)}$, а в качестве вторичных – частичные AUC, например, $AUC_{(0–\tau 50\ \%)}$ и $AUC_{(\tau 50\ \%–\tau)}$. По возможности, следует определять $t_{½}$.

90 %-ный доверительный интервал отношения первичных ФК-конечных точек исследуемого препарата к референтному препарату должен укладываться в заранее выбранные границы эквивалентности. В отсутствие специальных для биологических лекарственных препаратов допустимых границ в целом и для инсулина в частности, в отсутствие обоснования иного, следует выбрать стандартный диапазон биоэквивалентности, т.е. 80–125 %. Если ожидается высокая вариабельность, в целях обоснования расширения допустимого диапазона следует воспользоваться повторным (репликативным) дизайном (например, трехпериодное перекрестное исследование с повторным введением препарата сравнения) (более подробно см. Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в Евразийском экономическом союзе).

Фармакодинамика (ФД)

Изменение скорости введения глюкозы (СВГ) во времени характеризует профиль «время–действие» препарата инсулина.

В качестве первичных конечных точек инсулинов ультракороткого и короткого действия, как правило, следует измерять СВГ-$AUC_{(0–t)}$ и $СВГ_{max}$; СВГ-$AUC_{(0–\tau)}$ и $СВГ_{max}$ – для инсулинов средней продолжительности действия и СВГ-$AUC_{(0–\tau)}$ – для инсулинов длительного действия. К другим информативным фармакодинамическим конечным точкам относятся время до начала действия и $tСВГ_{max}$ – для инсулинов ультракороткого, короткого и средней продолжительности действия и частичные $СВГ_{AUC}$ (информативные для соответствующего инсулина).

Если с помощью исчерпывающего аналитического установления характеристик и доклинических *in vitro* испытаний с использованием чувствительных ортогональных современных методов удается подтвердить высокую аналогичность физико-химических и функциональных характеристик биоподобного и референтного инсулина, все СВГ-параметры можно отнести к вторичным точкам. Тем не менее, ФД-данные должны всегда соотноситься с ФК-данными.

95 %-ные доверительные интервалы отношения первичных ФД-параметров биоподобного и референтного инсулина должны укладываться в заранее выбранные границы эквивалентности. При проведении исследования с повторным дизайном необходимо также документировать внутрииндивидуальную вариабельность ФД-конечных точек.

Качество инсулинового клэмп-исследования

Контроль концентрации глюкозы в крови ходе клэмп-исследования вызывает большие затруднения. В зависимости от интервалов осуществления замеров и алгоритма обратной связи и вследствие неизбежного запаздывания замеров между взятием образцов и коррекцией введения глюкозы и последующего запаздывания изменения концентрации глюкозы в крови в ответ на изменения СВГ,

значения концентрации глюкозы в крови, как правило, не соотносятся с точным целевым значением, а колеблются вокруг него. В связи с этим возникают вариация («шум») в СВГ. Заявитель должен представить оценку качества проведения клэмп-исследования, например, в виде расчета средних значений, среднеквадратичного отклонения и коэффициента вариации концентрации глюкозы в крови. Необходимо проанализировать результаты и, по возможности, сравнить их с результатами, описанными в литературе. Необходимо также представить перечень индивидуальных клэмп-результатов. Шум в измерении СВГ в целях расчета $СВГ_{max}$ и временны́х параметров (таких как $tСВГ_{max}$) можно снизить с помощью математического моделирования. Необходимо заранее указать алгоритм коррекции СВГ и подтвердить корректность использованного метода сглаживания. В противоположность этому, колебания (флуктуации) не сильно влияют на СВГ-AUC, поэтому ее можно рассчитать на основе несглаженных результатов измерения СВГ.

Особенности изучения препаратов инсулина длительного действия

Препараты инсулина длительного действия предназначены для получения профиля «время–концентрация», который, насколько возможно, воспроизводит базальную физиологическую секрецию инсулина. При очень плоском ФК-профиле определение C_{max} и t_{max} (инсулина и СВГ) может оказаться невозможным и не иметь смысла. Вследствие медленного снижения действия инсулина и неизбежной вариабельности СВГ, особенно в «хвостовой части» СВГ-кривой, может оказаться затруднительным определение продолжительности действия инсулина длительного действия, особенного у здоровых добровольцев вследствие искажающего влияния эндогенного инсулина. В связи с этим более пригодными для определения профиля «время–действие»

инсулинов длительного действия являются пациенты с сахарным диабетом 1-го типа.

С другой стороны, сравнение хвостовой части профиля инсулин/СВГ инсулина длительного действия, вводимого, к примеру, один раз в сутки, может не иметь высокую клиническую значимость, поскольку остаточное содержание инсулина и действие инсулина от предыдущего введения, как правило, будет небольшим по сравнению с эффектом очередной дозы инсулина. По этой причине в качестве первичной ФК-конечной точки рекомендуется выбирать $AUC_{(0–\tau)}$, а не $AUC_{(0–t)}$ (см. «Конечные точки и статистический анализ»). Обязанностью заявителя является обоснование выбора исследуемой популяции и чувствительности экспериментальной модели и условий эксперимента для выявления значимых различий (при их наличии) между ФК- и ФД-профилями биоподобного и референтного лекарственных препаратов.

Несмотря на упомянутые выше ограничения и повышенную внутрииндивидуальную вариабельность инсулинов длительного действия по сравнению с инсулинами короткого действия, гиперинсулинемическое эугликемическое клэмп-исследование показало свою успешность как инструмент сравнения ФК- и ФД-профилей зарегистрированных лекарственных препаратов инсулина длительного действия.

Требования к различным препаратам, содержащим одинаковую активную фармацевтическую субстанцию

Если производитель биоподобного лекарственного препарата разрабатывает другой препарат, например, препараты короткого действия, средней продолжительности действия и двухфазный, содержащие одинаковую активную фармацевтическую субстанцию,

ФД-данные для всех этих препаратов не требуются. Для подтверждения аналогичной эффективности таких препаратов инсулина по отношению к соответствующим препаратам сравнения будет приемлема следующая программа:

1) Подтверждение аналогичности ФК- и ФД-профилей для препаратов растворимого инсулина.

2) Подтверждение аналогичности ФК-профилей таких других препаратов инсулина по отношению к соответствующим референтным лекарственным препаратам. Необходимо представить все ФД-данные, полученные в ходе ФК-исследований.

Клиническая эффективность

Проводить отдельные исследования эффективности не требуется, поскольку конечные точки, изучаемые в этих исследованиях (обычно это HbA1), считаются недостаточно чувствительными для выявления потенциальных клинически значимых различий между двумя инсулинами.

Клиническая безопасность

Исследования безопасности, в целом, следует проводить с прицелом на иммуногенность. Исследования безопасности должны включать достаточное число пациентов с сахарным диабетом 1-го типа. Если включена смешанная популяция, необходима стратификация по типу сахарного диабета и наличию изначально присутствующих антиинсулиновых антител. Есть понимание того, что ослепление участников исследования, как правило, невыполнимо, однако, по меньшей мере, антиинсулиновые антитела следует определять слепым методом. Поскольку ожидается достаточно раннее образование антител, как правило, достаточно 6-месячного исследования, направленного на сравнение частоты образования и титров антител к исследуемому

препарату и референтному лекарственному препарату. С целью подтверждения не худшей иммуногенности достигать высокую мощность исследования нет необходимости. Тем не менее, размер такого исследования должен однозначно исключить клинически значимое повышение иммуногенности. Необходимо изучить потенциальное влияние антиинсулиновых антител (при их обнаружении) на контроль гликемии, потребность в инсулине и безопасность, особенно местные и системные реакции гиперчувствительности.

Если в ходе исследования применяется фоновый инсулин (например, зарегистрированный прандиальный или базальный инсулин в дополнение к исследуемому инсулину), в ходе периода оценки изменять вид и режим применения фонового инсулина не допускается. Если производитель биоподобного лекарственного препарата разрабатывает другие препараты, например, короткого, среднего действия и двухфазный препараты, содержащие одинаковый активный ингредиент, в исследование безопасности необходимо включить препарат с наибольшим ожидаемым иммуногенным потенциалом (изолированно или в комбинации с другими препаратами). Если препарат содержит вспомогательные вещества, в отношении которых отсутствует опыт применения или он ограничен, необходимо будет оценить безопасность и иммуногенность этого состава.

В определенных случаях допускается не проводить предрегистрационное исследование безопасности, предусматривающее оценку иммуногенности. Должны быть выполнены следующие условия: во-первых, должна быть убедительно показана биоаналогичность между биоподобным и референтным инсулином путем установления физико-химических и функциональных характеристик и сравнения их с

помощью чувствительных, ортогональных современных аналитических методов, а также путем сравнения фармакокинетических и фармакодинамических профилей. Эти данные уже дают достаточную гарантию того, что можно ожидать одинаковую частоту возникновения нежелательных лекарственных реакций, которые опосредуются чрезмерными фармакологическими эффектами (например, гипогликемия). Во-вторых, профиль примесей и свойства вспомогательных веществ биоподобного лекарственного препарата не должны давать повода для опасений. Необходимо во всех случаях представлять надлежащее научное обоснование отказа от проведения исследования безопасности (иммуногенности).

6. План фармаконадзора

В рамках процедуры регистрации заявитель должен представить план управления рисками в соответствии правом Союза и Правилами надлежащей практики фармаконадзора. В плане управления рисками биоподобного лекарственного препарата необходимо всегда учитывать идентифицированные и потенциальные риски, обусловленные применением референтного лекарственного препарата. Кроме того, необходимо подробно проанализировать, как эти опасения относительно безопасности будут учтены в ходе пострегистрационного наблюдения.

7. Экстраполяция показаний

Подтверждение биоаналогичности, основанное на установлении физико-химических и функциональных характеристик, фармакокинетическом и, при необходимости, фармакодинамическом профилях и отсутствии вопросов с точки зрения безопасности при

подкожном введении, позволяет провести экстраполяцию на внутривенное введение, если применимо, и на другие показания и популяции пациентов, зарегистрированных для референтного лекарственного препарата.

8. Определения

Фармакокинетические параметры

$AUC_{(0–t)}$ – площадь под кривой плазменной концентрации после введения и до завершения клэмп-эксперимента в момент t;

$AUC_{(0–\infty)}$ – площадь под кривой плазменной концентрации, экстраполированная на бесконечность;

$AUC_{(0–\tau)}$ – AUC в интервале дозирования (согласно СвХП препарата сравнения);

$AUC_{(0–\tau 50\ \%)}$ – AUC в ходе первой половины интервала дозирования (согласно СвХП препарата сравнения);

$AUC_{(\tau 50\ \%–\tau)}$ – AUC в ходе второй половины интервала дозирования (согласно СвХП препарата сравнения);

C_{max} – максимальная плазменная концентрация

t_{max} – время достижения C_{max};

$t_{½}$ – период полувыведения из плазмы;

Фармакодинамические параметры

СВГ-$AUC_{(0–t)}$ – площадь под кривой скорости введения глюкозы с момента начала введения и до завершения клэмп-эксперимента в момент t;

СВГ-$AUC_{(0–\tau)}$ – AUC в интервале дозирования;

$СВГ_{max}$ – максимальная скорость введения глюкозы;

$tСВГ_{max}$ – время до достижения максимальной скорости введения глюкозы;

Время до начала действия – время после введения инсулина, когда возникает потребность в первом введении глюкозы с целью поддержания эугликемии или время после введения инсулина, при котором увеличение СВГ по сравнению базальной превышает заранее установленный порог отсечения (например, 10 или 20 %-ное увеличение СВГ от базальной).

ГЛАВА 15.8. ДОКЛИНИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОПОДОБНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРФЕРОНА АЛЬФА

1. Введение

В данной Главе изложены требования к доклинической и клинической разработке лекарственных препаратов, содержащих рекомбинантный интерферон α (ИНФ-α), и заявленных к регистрации как подобные уже присутствующему на рынке референтному лекарственному препарату.

В разделе по доклиническим данным приведены сведения о сравнительной фармакотоксикологической оценке. В разделе по клиническим данным рассматриваются сравнительные исследования фармакокинетики, фармакодинамики, эффективности, безопасности, а также план по управлению рисками.

Молекулы человеческих интерферонов альфа 2a или 2b, состоящие из 165 аминокислот хорошо изучены и охарактеризованы. Молекулярная масса негликозилированной молекулы равна приблизительно 19 240 Да. Молекула интерферона имеет две дисульфидные связи – одна между остатками цистеина в положении 1 и 98, вторая между остатками цистеина в положении 29 и 138. Первичная структура молекулы содержит потенциальные области О-гликозилирования.

Рекомбинантные интерфероны альфа 2a или 2b (ИНФ-α) рекомендованы для лечения различных заболеваний, таких как вирусный гепатит В и С, лейкемия, лимфома, карцинома клеток почечного эпителия и множественная миелома. ИНФ-α применяется для монотерапии и в комбинации с другими препаратами, подтипы 2a и 2b

интерферона альфа имеют различные показания для применения. Интерферон альфа может вызывать несколько фармакодинамических эффектов, относительное значение данных эффектов при разных показаниях к применению не ясно. В целом, применение интерферона альфа 2a или 2b для лечения онкологических заболеваний значительно снизилось в результате замещения другими методами лечения.

Для достижения клинического эффекта при применении ИНФ- α доза и схема лечения могут значительно различаться в зависимости от заболевания. Обычно ИНФ-α вводится подкожно, но может вводиться внутримышечно и внутривенно. Лечение интерфероном альфа сопровождается рядом нежелательных реакций, таких как гриппоподобное состояние, усталость и миалгия. Кроме того, интерферон альфа может вызвать нежелательные реакции, связанные нарушением психической деятельности, гематологическими и почечными нарушениями.

Терапия интерфероном альфа 2a или 2b может вызвать выработку аутоантител. Применение ИНФ-α может привести к развитию иммунно-опосредованных состояний, таких как заболевания щитовидной железы, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, невропатии и васкулиты.

Введение препаратов ИНФ-α сопровождается выработкой ненейтрализующих и нейтрализующих антител.

2. Сфера применения

Настоящая препарат-специфичная Глава содержит доклинические и клинические требования к подтверждению биоаналогичности двух лекарственных препаратов, содержащих рекомбинантный ИНФ-α.

3. Связь с другими главами

В главах 15-15.2 содержатся общие указания по разработке биоподобных лекарственных препаратов.

4. Доклинические исследования

До начала клинических исследований проводятся доклинические исследования, которые носят сравнительный характер. Основной целью доклинических исследований является выявление возможных различий фармакотоксикологических свойств биоподобного и референтного интерферона альфа, а не простая характеристика данных свойств биоподобного препарата per se. При этом выбор подхода (программа проведения и объем исследований) должен быть полностью обоснован, в доклиническом обзоре (модуль 2.4 регистрационного досье).

Исследование фармакодинамики

Исследования in vitro

Исследование фармакодинамики *in vitro* проводится для сравнительной оценки биологической активности биоподобного и референтного препаратов. Необходимо представить нескольких сравнительных биотестов (например, исследования связывания с рецепторами, противовирусные эффекты в культуре клеток, антипролиферативное действие на человеческие опухолевые клеточные линии), многие из этих результатоы могут быть получены уже при изучении показателей качества и формировании соответствующего модуля регистрационного досье. Применяемые в подобных исследованиях методы должны быть стандартизированы и валидированы в соответствии с нормативными требованиями.

Необходимо учитывать ограничения при изучении противовирусного действия на клеточных системах, экспрессирующих

вирус гепатита С, так как результаты данного теста не коррелируют с клиническим ответом. По возможности, для оценки активности и эффективности препаратов необходимо использовать стандартизированные и валидированные методики.

Исследование in vivo

Для подтверждения сопоставимости клинических показаний к применению фармакодинамическая активность биоподобного и референтного препаратов количественно сопоставляется *in vivo* с помощью следующих методов (методик):

- адекватной экспериментальной модели на животных для характеристики фармакодинамических свойств препарата (например, для оценки маркеров фармакодинамических эффектов интерферона, в частности – определения в сыворотке активности 2′,5′-олигоаденилатсинтетазы). Если возможно, данные исследования могут быть проведены в рамках описанных ниже токсикологических исследований;

- или, на подходящей модели опухолевого процесса на животных (например, голые («nude») мыши с ксенотрансплантантной опухолью человека);

- или, на подходящей экспериментальной противовирусной модели на животных.

Токсикологические исследования

Изучение токсичности препарата должно включать проведение, как минимум, одного сравнительного исследования токсичности при многократном введении одной дозы препарата с использованием релевантного вида животных (например, на модели сирийского золотистого хомячка). Продолжительность исследования должна составлять не менее 4-х недель.

Исследования токсичности проводятся с учётом требований Глав 5.3 и 15.2 настоящих Правил. Следует провести соответствующие измерения токсикокинетики в рамках исследования токсичности при многократном введении препарата, которое должно включать оценку выработки антител (Глава 11 настоящих Правил).

Исследования местной переносимости должны быть проведены, по крайней мере, на одном виде животного. Если имеется возможность, данные исследования проводятся в рамках оценки токсичности при многократном введении одной дозы препарата.

Изучение фармакологической безопасности, влияния на репродуктивность, мутагенности и канцерогенности не входят в перечень стандартных требований к доклиническим исследованиям биоподобных лекарственных препаратов, содержащих человеческий рекомбинантный интерферон α.

5. Клинические исследования

Исследование фармакокинетики

Изучение фармакокинетики включает проведение сравнительных перекрестных исследований одной дозы препарата при подкожном и внутривенном введении здоровым добровольцам. Первичным фармакокинетическим параметром, подлежащим оценке является AUC, в качестве вторичных показателей используются C_{max} и $T_{½}$ или CL/F. Предельные значения параметров эквивалентности должны быть определены до начала исследования и должным образом обоснованы.

Исследование фармакодинамики

О взаимодействии интерферона альфа с системой иммунитета свидетельствуют следующие маркеры: β_2-микроглобулин, неоптерин и активность сывороточной 2′,5′-олигоаденилатсинтетазы. Сравнительную

оценку изучаемых показателей следует проводить для доз, соответствующих возрастающей линейной части кривой «доза-эффект». Так как относительная значимость этих эффектов в отношении разных терапевтических показаний не известна, дополнительная информация может быть получена при комплексной сравнительной оценке этих маркеров после введения биоподобного и референтного препаратов.

Исследование эффективности

Исследуемая целевая популяция

При проведении клинических исследований необходимо учитывать, что интерферон альфа вызывает несколько несвязанных между собой эффектов. Основной целью данного этапа клинического исследования является оценка подобия (сходства) эффективности биоподобного и референтного препаратов. Это может быть достигнуто при проведении исследований с применением этих препаратов в соответствии с общей характеристикой референтного лекарственного препарата в популяции больных с хроническим гепатитом С (HCV), которые ранее не получали лечения. Другие целевые популяции больных подбираются в зависимости от интересующих показаний, на которые планируется экстраполировать результаты клинических исследований (см. раздел 6 настоящей Главы).

Дизайн и продолжительность исследования

Оценка эффективности проводится в рандомизированном сравнительном исследовании в параллельных группах пациентов, получающих биоподобный и референтный препараты, продолжительностью как минимум 48 недель. Если позволяют условия, изучение эффективности необходимо проводить в двойном слепом исследовании, по крайней мере, для получения достаточных данных для проведения первичного анализа. Если использование данного дизайна невозможно, то необходимо в протоколе исследования четко указать

обоснование этого и описать мероприятия для снижения (устранения) возможных ошибок статистического заключения (bias).

Режим применения (дозы, путь введения и схема лечения) при проведении клинических испытаний должны быть такими же, как указано в общей характеристике референтного лекарственного препарата. При проведении клинических исследований биоподобного препарата интерферона альфа его применение должно соответствовать рекомендациям, указанным в общей характеристике референтного лекарственного препарата и текущему стандарту лечения хронического гепатита С.

Программа изучения эффективности препарата должна быть составлена таким образом, чтобы первичная оценка эффективности была проведена на 12 неделе исследования у всех больных. Предпочтительно проведение исследований в однородной популяции больных, прежде всего по генотипу вируса HCV. Если исследование эффективности проводится в неоднородной популяции больных, то оно должно быть стратифицировано на основе генотипа.

Конечные точки эффективности

Первичная: вирусологический ответ, измеряемый как доля пациентов с уровнем РНК HCV, не определяемым с помощью количественной ПЦР на 12-й неделе. Выбранная методика количественного определения, используемая для измерения уровня РНК HCV, и применяемые пороговые значения также подлежат обоснованию. Сопутствующей конечной точкой может быть снижение вирусной нагрузки в 2 log.

Вторичная: вирусологический ответ на 4-й неделе и в конце лечения; устойчивый вирусологический ответ (через 24 недели после завершения лечения); изменение биохимических показателей печени, включая уровни трансаминаз и заболеваемость.

Исследование безопасности

Сравнительная оценка безопасности проводится в период лечения и в течение 24 недель после его окончания в виде наблюдения за пациентами, получавшими повторные дозы препаратов в ходе сравнительного клинического исследования. Количество испытуемых должно быть достаточным, чтобы можно было провести сравнительную оценку сходства (различия) профиля нежелательных явлений в ответ на введение биоподобного и референтного препаратов. Кроме учёта нежелательных явлений, изучение безопасности включает оценку изменений лабораторных показателей. Профили безопасности биоподобного и референтного препаратов должны быть подобны в отношении основных нежелательных реакций (таких как гриппоподобные симптомы, алопеция, миалгия, лейкопения, анемия и тромбоцитопения).

Иммуногенность

Сравнительная оценка иммуногенности (определение уровня антител) препарата проводится в период лечения и в течение 24 недель после окончания применения препарата, в соответствии с требованиями Глав 11 и 15.2 настоящих Правил.

При обнаружении антител к препарату необходимо проведение исследований для их характеристики (например, оценка нейтрализующей активности и влияния на эффективность рекомбинантного интерферона альфа). Кроме того, необходимо оценить любую потенциальную возможность нейтрализующего действия антител на активность эндогенных интерферонов (например, развитии аутоиммунных заболеваний). Любое проявление иммуногенности подлежит тщательному изучению в следующих случаях:

– при отсутствии ответа на лечение;

– при снижении ответа на первичное лечение;

– при развитии непредвиденных нежелательных реакций или известных иммуноопосредованных реакций.

6. Экстраполяция результатов исследований

Экстраполяция полученных результатов безопасности и эффективности на другие показания препарата, которые не были изучены в клинических исследованиях, возможна при условии, что механизм действия и (или) рецепторы, участвующие в реализации эффекта для данного показания такие же, как и для показания, по которому сходство в эффективности было установлено в клинических исследованиях.

Если планируется экстраполяция результатов исследования на показание, для которого не доказано сходство механизма действия, то подобное экстраполирование должно быть подробно и полностью обосновано в регистрационном досье.

7. План фармаконадзора

При регистрации препарата необходимо представить в модуль 1 регистрационного досье план управления рисками, в соответствии с Правилами регистрации и экспертизы средств медицинского применения и надлежащей практикой фармаконадзора.

В пострегистрационном периоде основное внимание должно быть уделено контролю за иммуногенностью, редкими и (или) серьезными нежелательными реакциями в первую очередь среди больных, длительно принимающих препараты. Данные о безопасности должны быть получены на группах пациентов, соответствующих всем одобренным показаниям к применению.

ГЛАВА 15.9. БИОПОДОБНЫЙ ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ ИНТЕРФЕРОНА БЕТА

1. Введение

В настоящей Главе представлены требования для проведения доклинических и клинических исследований препаратов, содержащих рекомбинантный интерферон бета, для демонстрации подобия (сходства) с уже зарегистрированным референтным препаратом. В разделе, посвященном проведению доклинических исследований, представлены указания для изучения фармакотоксикологических свойств. В разделе, посвященном клиническим исследованиям, содержатся указания для оценки фармакодинамических и фармакокинетических свойств, эффективности и безопасности и вопросы фармаконадзора.

Рекомбинантный интерферон бета (ИФН-β-1a) представляет собой гликозилированную полипептидную цепь, содержащую 166 аминокислотных остатков. Зарегистрированные на сегодняшний день препараты ИФН-β-1a различаются между собой по молекулярной структуре, способу введения, терапевтическим дозам и показаниям при рассеянном склерозе.

Рекомбинантный ИФН-β-1b производится в виде негликозилированной полипептидной цепи, состоящей из 165 аминокислот, и не содержит N-концевого метионина, имеет аминокислотную замену в положении 17 и вводится подкожно.

Лекарственные препараты, содержащие рекомбинантный ИФН-β, обычно применяют у пациентов с ремитирующей формой рассеянного склероза, включая лиц с высоким риском развития рассеянного склероза после одного демиелинизирующего события. ИНФ-β относится к I

семейству интерферонов, которые взаимодействуют с рецептором IFNAR, запуская транскрипцию сотен генов.

Механизм действия ИНФ-β при рассеянном склерозе до конца не изучен. Предполагается, что ИНФ-β действует в качестве иммуномодулятора: 1) нарушая активацию Т-клеток по нескольким путям, которые могут включать подавление экспрессии молекул MHC II типа, подавление секреции Th1 лимфоцитами провоспалительных цитокинов, что стимулирует секрецию Th2 лимфоцитами противовоспалительных цитокинов и активирует супрессорные Т-клетки; 2) препятствуя разрушению гематоэнцефалического барьера и проникновению Т-лимфоцитов центральную нервную систему.

Применение рекомбинантного ИФН-β при рецидивирующем рассеянном склерозе (РРС) дает умеренный эффект и снижает частоту обострений по сравнению с плацебо только на 30 %, а данные о влиянии препарата на прогрессирование инвалидизации противоречивы.

Все препараты ИФН-β вызывают схожие нежелательные реакции, которые могут повлиять на приверженность пациента к лечению. Наиболее частыми нежелательными реакциями являются гриппоподобные симптомы: лихорадка, озноб, артралгия, недомогание, потливость, головная боль и миалгия. При подкожном введении препаратов ИФН-β чаще встречаются реакции в месте введения, бессимптомные нарушения печени и лейкоцитов. Менее распространенными нежелательными реакциями являются депрессия и аутоиммунные нарушения, проявляющиеся нарушением функции щитовидной железы или печени. Все препараты ИФН-β вызывают выработку антител, и особенно – нейтрализующих антител. Выработка антител к препаратам варьирует в широких пределах, при проведении

клинических исследований было установлено, что при внутримышечном еженедельном введении ИФН-β-1α антитела встречаются в 5% случаев, а при подкожном введении ИФН-β-1b через день – в 45% случаев. В большинстве случаев антитела образуются в течение первого года лечения, но они могут оказывать влияние на эффективность лечения после 18-24 месяца лечения.

2. Сфера применения

Настоящая препарат-специфичная Глава содержит доклинические и клинические требования к подтверждению биоаналогичности двух лекарственных препаратов, содержащих ИФН-β.

3. Связь с другими главами

В главах 15–15.2 содержатся общие указания по разработке биоподобных лекарственных препаратов.

4. Основной текст документа

4.1. Доклинические исследования

При планировании доклинических исследований следует применить пошаговый подход для оценки сходства биоподобного и референтного лекарственных препаратов.

Доклинические исследования нужно проводить перед началом клинических исследований. Исследования *in vitro* должны быть проведены в первую очередь, и по их результатам должно быть сделано заключение о том, какие потребуются (если потребуются) исследования *in vivo*. Принятый подход должен быть полностью обоснован в доклиническом обзоре (модуль 2.4 регистрационного досье).

Исследования in vitro

Для выявления различий биологической активности биоподобного и референтного препаратов необходимо провести сравнительную оценку специфической активности препаратов в ряде биотестов (например, исследование способности связываться с рецептором, изучение противовирусного, антипролиферативного и иммуномодулирующего действия препарата). Некоторые из данных показателей могут быть получены в процессе оценки качества препаратов (для препаратов ИФН-β-1α соответствующая статья Фармакопеи Союза).

Доклинические исследования носят сравнительный характер, должны иметь достаточную чувствительность для выявления различий в ответе между биоподобным и референтным лекарственными препаратами и не должны лишь оценивать ответ как таковой. Они должны быть проведены на достаточном числе репрезентативных серий препарата, который планируется использовать в клинических исследованиях.

Везде, где возможно, аналитические методы должны быть стандартизированы и валидированы в соответствии с действующими нормативными требованиями (например, оценка противовирусного действия в культуре клеток, согласно Фармакопеи Союза).

Исследования in vivo

Как правило, проведение экспериментальных исследований на животных не требуется.

Если по результатам оценки качества и (или) выполненных биотестов (фармакологических исследований) *in vitro* подобие биоподобного и референтного лекарственных препаратов окончательно

установить не удается, необходимо проведение дополнительных экспериментальных исследований.

Программа исследования *in vivo* должна быть разработана специально для оценки выявленных различий и может включать в себя изучение фармакологических свойств и (или) токсичности при многократном введении на релевантных видах животных.

Дальнейшие исследования с использованием релевантных видов животных следует проводить в том случае, если предполагается, что они позволят получить дополнительную информацию.

4.2. Клинические исследования

Клинические сравнительные исследования проводятся поэтапно, начиная с изучения фармакокинетики и фармакодинамики и последующей оценки эффективности и безопасности.

Исследование фармакокинетики

Сравнительное изучение фармакокинетических свойств биоподобного и референтного препаратов проводится в перекрестном исследовании для каждого пути введения препарата. Оптимальной популяцией для изучения фармакокинетики являются здоровые добровольцы. Доза препарата должна быть подобрана таким образом, чтобы позволить провести сравнение в восходящей линейной области кривой «доза – эффект». Если отсутствует полная информация о референтном препарате, то предпочтительным является изучение более чем одной дозы препарата. При оценке фармакокинетических свойств необходимо обоснование выбранного режима введения препарата: однократное или многократное введение (например, 3 раза в неделю). Предпочтительным является использование однократного введения, при условии, что методы оценки фармакокинетики достаточно чувствительные, чтобы охарактеризовать полный фармакокинетический

профиль. Несмотря на то, что при изучении фармакокинетики после нескольких введений ИФН-β не предполагается выработки антител, до и после проведения каждого курса введения препарата необходимо определение антител, любых возможных расхождений с истинным фармакокинетическим профилем.

Концентрация ИФН-β после его введения в терапевтических дозах в сыворотке очень низкая и её измерение является технически сложным. Учитывая это, можно использовать определение белка резистентности А к миксовирусам (МхА) на клетках, который позволяет количественно охарактеризовать биологическую активность ИФН-β в образцах сыворотки крови, и определение ИФН-β методом иммуноферментного анализа. При этом необходимо обосновать рациональность выбора метода исследования.

Сравнительная оценка фармакокинетических свойств биоподобного и референтного препаратов проводится на основании показателей AUC, C_{max} и $T_{½}$ или CL/F. Предел эквивалентности должен быть определен заранее и соответствующим образом обоснован, особенно принимая во внимание высокую изменчивость соответствующих фармакокинетических параметров. При планировании в протокол исследования можно включить двухэтапную схему проведения исследования при условии использования откорректированных уровней значимости для каждого из анализов в соответствии с Приложением 7 к Правилам проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в Евразийском экономическом союзе.

Исследование фармакодинамики

Оптимальной является оценка фармакодинамики в рамках сравнительных исследований фармакокинетики. В настоящее время не

установлен биологический маркер, который связан с влиянием ИФН-β на течение рассеянного склероза. Однако хорошо описаны маркеры биологической активности ИФН-β, которые можно использовать для всесторонней сравнительной оценки подобия (сходства) биоподобного и референтного препаратов (так называемый подход на основе «отпечатков пальцев»). В настоящее время наиболее чувствительным маркером биологической активности интерферонов I типа является белок А резистентности к миксовирусам (МхА), который можно оценить в крови и как сам белок и как его мРНК. Кроме данного маркера, к показателям характеризующим фармакодинамические свойства ИФН-β относится неоптерин, который позволяет оценить зависимости «доза – эффект», кроме того, для оценки фармакодинамики ИФН-β могут быть использованы активность сывороточной 2',5'-олигоаденилатсинтетазы, уровень интерлейкина-10 и TNF-подобного лиганда, индуцирующего апоптоз (TRAIL).

Информативным методом мониторинга очагов демиелинизации при рассеянном склерозе является магнитно-резонансная томография (МРТ). Показатели МРТ связаны с клиническими заболевания, например, области Т1, накапливающие гадолиний, свидетельствуют о повреждении, а ноые или повторяющие Т2 области – об увеличении очагов повреждения или рецидивах.

Исследование эффективности

При проведении клинических исследований необходимо продемонстрировать подобную (сходную) эффективность биоподобного и референтного препаратов в рандомизированном параллельном клиническом исследовании достаточной статистической мощности, предпочтительно двойном слепом. Если технически невозможно

провести ослепление, необходимо принять дополнительные меры, чтобы избежать получения ошибки в оценке результатов. Способ введения биоподобного препарата должен соответствовать способу, указанному в общей характеристике референтного препарата.

Приемлемый показатель первичной эффективности препарата, модифицирующего течение рассеянного склероза в ремитирующей форме, – число рецидивов заболевания, которое использовалось в базовых клинических исследованиях лекарственных препаратов, содержащих рекомбинантный INF-β. Несмотря на то, что данный показатель является наиболее предпочтительным для оценки эффективности, тем не менее, он не является необходимым в контексте исследования биоподобия, поскольку это исследование направлено на демонстрацию сопоставимого клинического действия биоподобного и референтного препаратов, которая затем позволит экстраполировать показатель польза–риск референтного препарата. Для демонстрации подобия (сходства) эффективности биоподобного и референтного препаратов достаточно использовать магнитнорезонансную томографию (МРТ) поражений, возникших при рассеянном склерозе в ремитирующей форме (см. Исследование фармакодинамики). В дополнение к этому клинические эффекты, такие как число рецидивов или процент пациентов без рецидивов, нужно использовать в качестве вторичных конечных точек в поддержку результатов МРТ.

Дизайн исследования эквивалентности должен обеспечить достаточную его чувствительность, т. е. выбор дизайна исследования, участников, длительности и конечных точек МРТ должны сделать возможным выявление различий биоподобного и референтного препаратов, если такие различия фактически существуют. В отношении дизайна исследования чувствительность анализа можно доказать

исследованием с участием трех групп, включая группу плацебо, в течение короткого периода времени (например, 4 месяца), достаточного для того, чтобы продемонстрировать преимущество как биоподобного, так и референтного препаратов над плацебо, используя конечную точку МРТ. В дальнейшем пациенты, которые получали плацебо, должны быть распределены в группы больных, которые получают биоподобный или референтный препарат.

Альтернативная схема может включать исследование на трех группах, в котором будут использоваться референтный препарат (одна группа) и биоподобный препарат в двух дозировках (две группы). При этом предполагается, что различия показателей МРТ и клинические исходы будут наблюдаться в течение 12 месяцев. Если при использовании разных доз препарата не будет отмечаться различий в показателях МРТ, то полученные результаты поставят под сомнение чувствительность данного дизайна исследования.

Независимо от программы, продолжительность исследования должна быть достаточной, чтобы провести сравнительную оценку эффективности по показателям МРТ и клиническим исходам, т.е. не менее 12 месяцев.

Необходимо подобрать наиболее чувствительную популяцию пациентов, которая позволила бы выявить возможные различия между биоподобным и референтным препаратами. Это должны быть однородные выборки больных с подтвержденным диагнозом рецидивирующе-ремитирующий рассеянный склероз, с активностью процесса (по показателям частоты рецидивов и (или) данных МРТ) которые позволят оценить быстрые изменения показателей МРТ.

Изменения показателей МРТ представляют собой приемлемые первичные конечные точки в рамках сравнения биоподобного

препарата, если они подкрепляются связанными с рецидивом клиническими исходами. Для полученных клинически значимых результатов не требуется формального испытания эквивалентности; они должны подтвердить тенденцию эффекта аналогичную той, которая наблюдается у изменения показателей, выявленных МРТ. При этом следует четко определить и дифференцировать рецидив от псевдообострения. В процессе исследования необходимо проведение повторных МРТ исследований. При этом необходимо предпринять все меры для обеспечения высокого качества и максимальной надежности измерений. Результаты МРТ должны быть ослепленными и оцениваться (расшифровываться) в одном центре (централизовано). Комбинированные уникальные активные очаги (определяемые как новые Т1-взвешенные очаги, накапливающие гадолиний, и новые (увеличивающиеся) Т2-взвешенные очаги без их раздельного подсчета) являются наиболее чувствительными МРТ критериями эффективности и должны рассчитываться при всех исследованиях. При этом может потребоваться кумулятивная оценка ряда изображений (сканограмм). При представлении достаточного обосновании в качестве первичной конечной точки допускается использование других показателей МРТ.

Границы эквивалентности для первичной конечной точки МРТ должны быть заранее установлены и в достаточной мере обоснованы на основании данных МРТ для референтного лекарственного препарата по сравнению с плацебо, или, если они недоступны, на основании экстраполяции других данных по INF-β. Следует отметить, что эти данные необходимы на этапе планирования исследования, но не требуются при интерпретации его результатов, поскольку в процессе исследования нужно провести анализ чувствительности. Особое внимание при организации исследования следует уделить критериям

выбытия из исследования, потенциальному числу преждевременно выбывающих из исследования пациентов и способу управления отсутствующими данными (методам их обработки).

Исследование безопасности

Изучение безопасности биоподобного препарата может быть проведено в рамках изучения сравнительной эффективности и является достаточными для исследования более частых нежелательных реакций и формирования базы данных по безопасности перед выпуском препарата на рынок для таких реакций, но не подходит для более редких нежелательных реакций, которые нужно оценить после выпуска препарата на рынок.

Учитывая, что все препараты ИНФ-β являются иммуногенными, при проведении клинических исследований проводится оценка иммуногенности препарата на основании Главы 11 настоящих Правил. Основная цель такой оценки – сравнение иммуногенности биоподобного и референтного препаратов на протяжении определенного периода времени, так как характеристики антител и последствия их появления могут изменяться с течением времени в результате изменения аффинности и (или) изменения эпитопа. Для регистрации биоподобного препарата необходимо представить данные изучения иммуногенности, как минимум в течение 12 месяцев наблюдения. Дальнейшая оценка иммуногенности проводится в пострегистрационном периоде в течение, как минимум, 6 месяцев. Для оценки сопоставимости динамики образования антител во время лечения необходимо определить стратегию отбора проб, включающую отбор сыворотки в начале исследования и через строго определенные регулярные интервалы. Например, каждый месяц в начале лечения (в первые 3 месяца), а затем каждые 3 месяца.

Обязательным условием оценки иммуногенности является использование высокочувствительных валидированных методик для выявления и характеристики всех антител (определение класса, подкласса и свойств антител). Необходимо использовать подходы, не допускающие специфической маскировки определенных эпитопов (антигенных детерминант), чтобы предотвратить получение ложноотрицательных результатов. При выявлении антител к ИНФ-β в сыворотке больного необходимо оценить нейтрализующую активность и перекрестную реактивность данных антител. Необходимо использовать стандартизированный тест на наличие нейтрализующих антител к белку MxA или метод определения нейтрализующих антител, валидированный относительно этого теста.

Должен быть описан подход, используемый для определения чувствительности анализа (например, при использовании различных пределов), при этом данные определения титров должны быть представлены для каждого временного интервала и каждой исследуемой группы больных. Кроме того, на основании заранее установленных критериев больные должны быть разделены на группы в зависимости от времени развития иммунной реакции. Например, по уровню и свойствам нейтрализующих антител больные могут быть разделены на группы: «негативные» (отрицательный ответ у всех образцов после проведения лечения в соответствии с заранее определенными низкими и высокими разведениями или титрами) и «позитивные», которые могут быть разделены на «транзиторно позитивные» (1 или более образцов после проведения лечения позитивные, сопровождаются негативными образцами на всех последующих или, по крайней мере, на 2 точках отбора проб) или «постоянно позитивные» (2 или более образцов после лечения постоянно позитивные). Активность на МРТ и клинические

рецидивы должны быть сравнимы между этими категориями как для биоподобного, так и для референтного препаратов. Влияние нейтрализующих антител на клинические результаты можно установить только по прошествии 12 месяцев терапии, поэтому его необходимо оценивать и после регистрации препарата в рамках плана управления рисками.

Предполагается, что иммунные ответы биоподобного и референтного препаратов будут подобны (сходны) по частоте развития и уровню титров антител (нейтрализующие или не-нейтрализующие) и их влияния на эффективность. Несмотря на то, что влияние на эффективность препаратов связывающих (не-нейтрализующих) антител до конца неизвестно, повышенная частота появления данных антител при введении биоподобного препарата (относительно референтного) не позволяет рассматривать разрабатываемый препарат как биоподобный. Выявление более низкой иммуногенности биоподобного препарата, в сравнении с референтным препаратом, необходимо обосновать. При этом препарат может рассматриваться как биоподобный при условии, что его эффективность сопоставима у различных категорий пациентов согласно их иммунному ответу (как ранее определено) и все остальные представленные данные (оценка качества, доклинические исследования, изучение фармакокинетики, фармакодинамики и безопасности) подтверждают биоподобие.

4.3. Фармаконадзор

При регистрации препарата необходимо представить в модуль 1 регистрационного досье план управления рисками, в соответствии с Правилами регистрации и экспертизы средств медицинского применения и надлежащей практикой фармаконадзора, в котором должны быть представлены выявленные и потенциальные риски,

связанные с использованием референтного лекарственного препарата, и безопасность при утвержденных для него показаниях, основываясь на экстраполировании. План управления рисками должен оценить редкие события, такие как аутоиммунные расстройства, нежелательные реакции, особенно такие, как гепатотоксичность и депрессия, потенциальные эффекты нежелательной иммуногенности и важные отсутствующие данные, такие как безопасность при беременности (указание особенностей применения при беременности для препаратов INF-β является обязательным). Этими событиями можно управлять при помощи рутинного фармаконадзора, подкрепленного расширением предрегистрационных исследований (особенно в отношении иммуногенности, как было указано ранее), специальным наблюдательным исследованием или включением в существующий реестр.

4.4. Экстраполяция результатов исследований

Экстраполяция результатов исследования клинической эффективности и безопасности, полученных при лечении подтвержденной ремиттирующе-рецессирующей формы рассеянного склероза, биоподобного препарата на другие показания, указанные для референтного препарата, возможна на основе совокупности доказательств, полученных при изучении подобия (сходства).

ГЛАВА 15.10. ДОКЛИНИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОПОДОБНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА СОМАТОТРОПНОГО ГОРМОНА

1. Введение

Настоящая Глава является дополнением к Главе 15.2 настоящих Правил и устанавливает требования проведения доклинических и клинических исследований для демонстрации подобия (сходства) лекарственных препаратов, содержащих соматотропин и заявленных как биоподобные уже представленному на рынке референтному препарату.

В разделе, посвященном проведению доклинических исследований, представлены рекомендации для оценки фармако-токсикологических свойств препаратов. В разделе, посвященном клиническим исследованиям, содержатся указания для демонстрации подобия (сходства) фармакодинамических, фармакокинетических свойств, эффективности и безопасности двух препаратов и план управления рисками. Также представлены критерии для экстраполяции клинических данных на другие показания, утвержденные для референтного препарата.

Регистрационное досье нового рекомбинантного гормона роста человека (соматотропина), заявленного в качестве подобного уже представленному на рынке лекарственному препарату, должно содержать доказательства сопоставимости рассматриваемого нового препарата референтному лекарственному препарату, уже зарегистрированному в Союзе.

Гормон роста человека продуцируется клетками передней доли гипофиза и представляет собой аминокислотную негликозилированную

цепочку, состоящую из 191 аминокислоты, с молекулярной массой 22 кДа. В клинической практике применяется гормон роста (рчГР), который имеет аналогичную (с эндогенным) аминокислотную последовательность и производится с использованием технологии рекомбинантной ДНК в системе экспрессирующей клеток *E. coli*, дрожжей или клеток млекопитающих. Для характеристики структуры и биологической активности соматотропина доступны соответствующие физико-химические и биологические методы. Ряд методик и биологических тестов необходимо использовать для характеристики активной фармацевтической субстанции и родственных примесей, таких как дезамидированные и окисленные формы и агрегаты.

Гормон роста обладает мощным анаболическим, липолитическим и контринсулярным (острая инсулиноподобная активность) эффектами. Данные эффекты обусловлены как непосредственным взаимодействием с рецепторами (например, на адипоцитах и гепатоцитах), так и косвенно в результате стимуляции инсулиноподобных факторов роста (преимущественно ИФР-1). Препараты, содержащие в качестве действующего вещества соматотропины, используются в клинической практике для стимуляции нормального роста и (или) формирования тела у больных с дефицитом гормона роста и некоторых состояниях без дефицита гормона роста. Считается, что при применении рекомбинантного гормона роста человека при всех одобренных в настоящее время показаниях он взаимодействует с одними и теми же рецепторами.

Препараты рчГР используются в широком диапазоне доз для лечения детей в период их роста, в то же время взрослые больные являются более чувствительными к побочным эффектам препарата.

Описаны случаи выработки антител в ответ на введение рчГР, в том числе очень редко, нейтрализующих антител. Это, в основном, было связано с чистотой и стабильностью применяемых препаратов. Препараты рчГР вводят подкожно, возможные факторы риска развития иммунного ответа, связанные с особенностями состояния больных, не известны.

Соматотропин имеет широкий терапевтический диапазон у детей в период роста, тогда как у взрослых наблюдается повышенная склонность к некоторым нежелательным реакциям. Описаны случаи выработки антител к соматотропину, в т. ч. очень редко – нейтрализующих антител. При этом основные проблемы были связаны с чистотой и стабильностью состава лекарственных препаратов. Соматотропин вводят подкожно; возможные факторы риска развития иммунного ответа, связанные с особенностями пациента не известны.

2. Сфера применения

Настоящая препарат-специфичная Глава содержит доклинические и клинические требования к подтверждению биоаналогичности двух лекарственных препаратов, содержащих рчГР.

3. Связь с другими главами

В главах 15-15.2 содержатся общие указания по разработке биоподобных лекарственных препаратов.

4. Основной текст документа

4.1. Доклинические исследования

До проведения клинических исследований необходимо провести сравнительные доклинические исследования. Основной целью

доклинических исследований является выявление возможных различий фармакотоксикологических характеристик биоподобного и референтного препаратов гормона роста, а не изучение результатов как таковых (per se). Выбор подхода к методу исследования должен быть полностью обоснован в доклиническом обзоре (модуль 2.4 регистрационного досье).

Исследование фармакодинамики

Исследование in vitro

Для оценки любых возможных различий биологической активности между биоподобным и референтным препаратами необходимо предоставить данные, полученные при проведении ряда сравнительных биотестов (например, исследований связывания с рецепторами, оценки пролиферации клеток), многие из которых могут быть получены в процессе изучения качества.

Исследование in vivo

Сравнительные исследования *in vivo* фармакодинамических свойств биоподобного и референтного препаратов проводятся с использованием экспериментальных моделей (на грызунах). Например, анализируется динамика увеличения массы тела и (или) роста большеберцовой кости у неполовозрелых гипофизэктомированных крыс. Такие данные могут быть получены в процессе выполнения тестов, связанных с оценкой качества препаратов.

Токсикологические исследования

Токсикологические исследования должны включать, по крайней мере, одно сравнительное исследование одной дозы при многократном введении с использованием релевантных видов животных (например, крыс), при длительности исследования не менее 4 недель. В процессе проведения исследований выполняют соответствующие измерения

токсикокинетики препарата, особое внимание необходимо уделить изучению иммунного ответа на препарат.

Необходимо представить данные изучения местной переносимости, по крайней мере, у одного вида животных. Если это возможно, данные исследования могут быть проведены в процессе оценки токсичности при многократном введении препарата.

Изучение фармакологической безопасности, репродуктивной токсичности, мутагенности и канцерогенности не входят в перечень стандартных требований к доклиническим исследованиям подобных биологических лекарственных препаратов, содержащих в качестве фармацевтической субстанции рчГР.

4.2. Клинические исследования

Исследование фармакокинетики

Сравнительная оценка фармакокинетических свойств рчГР проводится в одном перекрестном исследовании биоподобного и референтного препаратов при подкожном введении. В исследование можно привлекать здоровых добровольцев, однако при этом следует рассмотреть необходимость подавления продукции эндогенного гормона роста такими препаратами, как аналоги соматостатина.

К первичным показателям, на основании которых проводится характеристика фармакокинетических свойств препаратов, относится AUC, вторичными показателями фармакокинетики являются C_{max} и $T_{½}$. Пределы сопоставимости также должны быть определены заранее и должным образом обоснованы.

Исследование фармакодинамики

Изучение фармакодинамических свойств препарата предпочтительно проводить в рамках исследования фармакокинетики.

Для этого необходимо подобрать дозу таким образом, чтобы она соответствовала линейной восходящей части кривой «доза – эффект». Наиболее подходящим маркером для сравнительной оценки фармакодинамических свойств биоподобного и референтного препаратов является ИФР-1. Кроме того, для оценки фармакодинамики могут быть использованы и другие маркеры, например белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста (ИФРВР-3). Следует учитывать, что вследствие отсутствия четкой связи между уровнем ИФР-1 в сыворотке и индуцируемым им ростом тела, ИФР-1 не может использоваться как суррогатный маркер эффективности соматотропина в клинических исследованиях.

Исследование эффективности

Сравнительное изучение эффективности биоподобного и референтного препаратов должно быть продемонстрировано, как минимум в одном рандомизированном, параллельном исследовании достаточной статистической мощности. Для исключения системной ошибки (bias) исследование эффективности должно быть двойным слепым. Если это невозможно, необходимо закрыть доступ лицу, отвечающему за измерение параметров клинической эффективности, к данным о распределении испытуемых по группам.

Чувствительность к лечению рчГР выше среди больных с дефицитом гормона роста, чем среди больных, у которых отсутствует дефицит гормона роста. Оптимальной и хорошо изученной моделью оценки эффективности является популяция детей с дефицитом гормона роста, которые ранее не получали подобное лечение, поскольку такой подход обеспечит использование чувствительной и хорошо изученной модели. В исследование необходимо включать детей препубертатного периода для исключения трудности в интерпретации данных, связанной

с активным ростом в пубертатный период и ростом, обусловленным эффектом препарата. Это достигается лимитированием возраста (по календарному или костному возрасту) при включении в исследование. Важно, чтобы группы исследования были однородные по исходным характеристикам, поскольку это будет влиять на чувствительность исследования и точность конечных точек.

Первичной конечной точкой исследований эффективности является динамика (изменение) скорости роста или отклонения от динамики стандартной скорости роста по сравнению с исходным уровнем за определенный период времени. В качестве вторичной конечной точки рекомендуется показатель отставания от стандартного роста. Следует делать поправку на факторы, влияние которых на рост при лечении соматотропином уже известно.

При проведении сравнительных исследований необходимо не менее трех раз проводить измерение роста в каждой временной точке исследования и рассчитывать усредненные данные. При проведении измерений роста рекомендуется применение поверенных измерительных приборов, использование стандартных методик, проведение измерений в одно и то же время суток, предпочтительно одним и тем же исследователем. Это позволяет снизить число ошибок измерения и вариабельность.

Для получения достоверных результатов важно проводить измерение роста до исследования и в процессе исследования с помощью одной и той же стандартизованной методики и с использованием одних и тех же валидированных измерительных приборов.

При кратковременных измерениях роста велика вероятность появления ошибок, связанных со значительной вариабельностью кратковременных периодов роста и сезонными колебаниями, поэтому

рекомендованная продолжительность фазы сравнения составляет от 6 до 12 месяцев. Вычисление темпов роста при предварительной обработке данных должны включать данные, полученные в течение не менее чем 6 месяцев и не более чем за 18 месяцев. Диапазон параметров сопоставимости должен быть определен и полностью обоснован заранее, главным образом на основе клинических показателей, обеспечивающих достоверность исследования.

4.3. Исследование безопасности

Данных, полученных при наблюдении за пациентами в ходе исследований эффективности, обычно достаточно для создания адекватной предмаркетинговой базы данных по безопасности. Заявитель должен предоставить сравнительные показатели по иммуногенности, полученные от пациентов, участвовавших в исследовании(ях) эффективности, за 12-месячный период с интервалом забора образцов в 3 месяца. Тестирование нужно проводить с использованием валидированных методов, обладающих достаточной специфичностью и чувствительностью.

Кроме того, клиническое изучение безопасности включает контроль содержания ИФР-1, ИФРВР-3, определение инсулина и глюкозы в крови натощак.

4.4. План фармаконадзора

При регистрации препарата необходимо представить в модуль 1 регистрационного досье план управления рисками, в соответствии с Правилами регистрации и экспертизы средств медицинского применения и надлежащей практикой фармаконадзора. При этом необходимо учитывать риски, установленные в процессе разработки препарата, а также потенциальные риски, связанные с

иммуногенностью, а также указать, как эти вопросы будут исследованы при наблюдении в пострегистрационный период

4.5. Экстраполяция результатов исследований

Результаты исследований эффективности и безопасности, полученные в исследованиях, проведенных в популяции детей с дефицитом гормона роста, могут быть экстраполированы на другие показания, указанные для референтного препарата при условии должного обоснования со стороны заявителя.

ГЛАВА 15.11. ДОКЛИНИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОПОДОБНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА РЕКОМБИНАНТНОГО ФОЛЛИКУЛОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ГОРМОНА

1. Краткий обзор

В данной Главе представлены требования к проведению доклинических и клинических исследований для демонстрации подобия (сходства) двух рекомбинантных препаратов, содержащих в качестве действующего вещества фолликулостимулирующий гормон (рчФСГ).

В разделе, посвященном проведению доклинических исследований, представлены рекомендации для изучения фармако-токсикологических характеристик препаратов. В разделе, посвященном клиническим исследованиям, содержатся указания для демонстрации подобия (сходства) фармакодинамических, фармакокинетических свойств, эффективности и безопасности двух препаратов, содержащих в качестве действующего вещества фолликулостимулирующий гормон, а также по специфическим мерам управления рисками. Представлены критерии экстраполирования клинических данных на другие показания, утвержденные для референтного лекарственного препарата.

2. Введение

В регистрационное досье на вновь разработанный лекарственный препарат, содержащий в качестве действующего вещества рчФСГ, и представляемый для регистрации как биоподобный референтному лекарственному препарату, зарегистрированному в государствах – членах Союза, должны быть включены материалы, обосновывающие доказательства сходства (подобия) указанных препаратов.

Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) секретируется передней долей гипофиза и играет ключевую роль в регуляции репродуктивных функций женщин и мужчин. ФСГ является гетерогенным димерным гликопротеиновым гормоном, состоящим из двух связанных между собой субъединиц. Альфа субъединица, состоящая из 92 аминокислот, подобна субъединицам других гормонов имеющих гликопротеиновое строение, а бета субъединица, состоящая из 111 аминокислот специфична только для ФСГ. Обе субъединицы содержат олигосахаридные структуры. В зависимости от строения и количества углеводных цепочек выделяют несколько изоформ ФСГ с различным содержанием остатков сиаловых кислот. Изоформы с высоким содержанием сиаловых кислот имеют больший период полувыведения. Для описания характеристик белка имеются физико-химические и биологические методы.

Рекомбинантный человеческий фолликулостимулирующий гормон (рчФСГ) используется при нарушении репродуктивных функций у женщин для стимуляции роста и развития фолликулов яичников и у мужчин для стимуляции и поддержания сперматогенеза. Препарат вводится подкожно или внутримышечно.

Самым частым побочным эффектом применения рчФСГ является развитие синдрома гиперстимуляции яичников (OHSS). Это жизнеугрожающее состояние характеризуется развитием тяжелых асцитов, гемоконцентрацией, повышенной коагуляцией, нарушением электролитного баланса и гипертрофией яичников. Большое число стимулированных фолликулов и высокие концентрации эстрадиола (выделяемого созревшими фолликулами) являются факторами риска для развития синдрома гиперстимуляции яичников.

Препараты рчФСГ обладают низкой иммуногенностью, до настоящего времени отсутствуют сообщения о выработке

нейтрализующих антител в ответ на введение рчФСГ. При терапевтическом применении препаратов рчФСГ аллергические реакции наблюдались в 0,2% случаев всего и менее чем у 1 пациента на 10000 при введении 2 различных зарегистрированных препарата рчФСГ. Местные реакции наблюдались более часто (у 3% и у более чем 1 из 10 пациентов, принимавших 2 различных препарата рчФСГ).

3. Сфера применения

Настоящая препарат-специфичная Глава содержит доклинические и клинические требования к подтверждению биоаналогичности двух лекарственных препаратов, содержащих рчФСГ.

4. Связь с другими главами

В главах 15-15.2 содержатся общие указания по разработке биоподобных лекарственных препаратов.

5. Доклинические исследования

Доклинические исследования должны быть сравнительными и проводиться перед началом клинических исследований. Основной целью доклинических исследований является выявление возможных различий фармакотоксикологических характеристик биоподобного и референтного препаратов, а не оценка реакции на введение препарата как таковой. При этом выбор подхода (программа проведения и объем исследований) должен быть полностью обоснован, в доклиническом обзоре (модуль 2.4 регистрационного досье).

Исследования фармакодинамики

Исследование in vitro

Сравнительные исследования *in vitro* проводятся для выявления возможных различий фармакодинамических свойств по способности связываться с рецептором и вызывать их активацию между биоподобным и референтным препаратами. Данные исследования могут быть проведены в рамках изучения биологической (специфической) активности при характеристике препарата показателей качества препарата. Для реализации этой цели существует два основных подхода. При первом подходе в качестве клетки мишени используются зернистые (гранулезные) клетки или клетки Сертоли. При втором подходе создается постоянно культивируемая клеточная линия (например, на основе CHO), которая имеет стабильные трансфицированные рецепторы к рчФСГ. Преимущество первого подхода заключается в том, что изучение взаимодействия рчФСГ с рецептором осуществляется в условиях максимально приближенных к естественным, а недостатком данного подхода является ограниченное число клеток тест-системы, что, соответственно, ограничивает количество повторов и использования различных разведений препаратов рчФСГ, которые необходимы для получения достоверных результатов оценки соотношения «концентрация – ответ».

Второй подход позволяет получать в большом количестве материал для исследования, однако зависит от полученной искусственной клеточной конструкции (трансфицированных клеток). Должна быть показана соответствующая чувствительность биотеста, использованного для проверки сопоставимости и выявления потенциальных отличий. Эксперименты должны быть проведены с достаточным числом разведений на каждую кривую для полной характеристики взаимосвязи «концентрация–ответ».

В исследованиях *in vitro* необходимо продемонстрировать способность связывания с рецептором, включая кинетику включения–выключения (on-off-kinetics), а также результаты оценки активации рецепторов, т.е. продукции активатора плазминогена (только в классическом исследовании на первичных гранулезных клетках) или накопления внутриклеточного цАМФ. Возможны иные конечные точки (например, активация гена-репортера).

Должны быть предоставлены исследования связывания, включая кинетику включения–выключения (on-off-kinetics), а также результаты оценки активации рецептора, т. е. выработки активатора плазминогена (только в классическом исследовании на первичных гранулезных клетках) или накопления внутриклеточного цАМФ. Заявитель вправе выбрать другие конечные точки (например, активация гена-репортера). Заявитель должен обосновать выбранный подход в регистрационном досье.

Исследование in vivo

Рекомбинантный фолликулостимулирующий гормон является высокого гликозилированным белком и исследования в *in vitro* не могут в полной мере отразить свойства препарата, которые проявляются в естественных условиях. Таким образом, чтобы квалифицировать любые потенциальные различия между биоподобным рчФСГ и референтным препаратом, нужно рассмотреть потребность в дополнительных сравнительных исследованиях *in vivo*.

В настоящее время активность препаратов рчФСГ оценивается методом калибровки по международному стандарту (или внутреннему референтному стандарту, калиброванному относительно международного стандарта, метод Стилмана – Полея). Поскольку таким способом может быть оценена степень активности как биоподобного, так и референтного препарата, число различных проводимых анализов

может быть уменьшено при помощи разработки исследования, в котором будут одновременно проведены сравнение биоподобного и референтного лекарственных препаратов и их калибровка относительно референтного стандарта. Это позволит уменьшить вариабельность анализа и является более экономичным в отношении расхода реагентов и лабораторных животных. С помощью метода Стилмана – Полея можно лишь установить биологическую активность, но он не позволяет выявить небольшие различия в степени активности между биоподобным и референтным препаратами. Если возможно, оценка конечных точек безопасности, например масса тела и местная переносимость, может быть включена в рамки исследований фармакодинамических свойств *in vivo*.

Необходимо обосновать применение различных методов для сравнения плейотропных эффектов ФСГ в естественном тканевом окружении (например, исследования *ex vivo* с использованием культуры целых фолликулов или культуры клеток первичной гранулемы). Такой подход в последующем позволит сократить количество требуемых лабораторных животных, избежать вариабельности результатов, полученных при использовании животных, и представляет возможность оценить многие фармакодинамические показатели.

Токсикологические исследования

Проведение специальных исследований токсичности при многократном введении доз не требуется. В отдельных случаях, например, если в препарате используется новое вспомогательное вещество, или вещество, которое плохо изучено, необходимо рассмотреть необходимость проведение дополнительных исследований токсичности.

При проведении доклинических исследований биоподобных препаратов рчФСГ исследований фармакологической безопасности и репродуктивной токсичности не требуется. Оценка местной переносимости обычно не требуется. Однако если в состав препарата включены вспомогательные вещества, которые слабо изучены и, для которых опыт применения с предполагаемым путем введения очень мал, либо отсутствует, необходимо изучения местной переносимости. В данной ситуации оценку местной переносимости можно провести как часть других исследований *in vivo*.

5. Клинические исследования

Исследование фармакокинетики

Оценка фармакокинетических свойств биоподобного и референтного препаратов проводится в одном сравнительном перекрестном исследовании при подкожном введении одной дозы препаратов, на здоровых добровольцах женского пола. Для подготовки программы исследований рекомендуется учитывать требования правил проведения исследований биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных препаратов Союза. При этом рекомендуется стимулировать подавление секреции эндогенного чФСГ, например, с помощью агониста гонадотропин-высвобождающего гормона или комбинированных пероральных противозачаточных средств. Доза препарата должна быть обоснована с учетом того, что определение различий между биоподобным и референтным препаратами возможно в линейной части кривой «доза – эффект». Для оценки фармакокинетических свойств препарата необходимо использовать показатели AUC, C_{max}, t_{max}, $t_{½}$ и клиренса. 90% доверительный интервал отношения показателей AUC и C_{max} между референтным и

биоподобным препаратами должен составлять от 80 до 125%, за исключением случаев, когда обосновано использование иного интервала. Для представления данных о других параметрах целесообразно использовать методы описательной статистики. Если отсутствует особая необходимость, проведение отдельных фармакологических исследований с внутримышечным введением препаратов не требуется.

Исследование фармакодинамики

Изучение фармакодинамических свойств препарата должно быть проведено в рамках III фазы клинических исследований.

Исследование эффективности

Подобие (сходство) эффективности биоподобного и референтного препаратов должно быть продемонстрировано в рандомизированном клиническом исследовании достаточной статистической мощности, в параллельных группах. Оптимальной моделью для сравнительного изучения эффективности биоподобного и референтного препаратов является стимуляция мультифолликулярного развития у пациенток, у которых ранее наблюдалась гиперовуляция в рамках вспомогательных репродуктивных технологий, таких как экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), внутрифаллопиевый перенос гамет (GIFT) или внутрифаллопиевый перенос зиготы (ZIFT). Для сравнения эффективности необходимо использовать первый цикл лечения.

Рекомендуется проведение двойных слепых исследований. Если условия не позволяют проведение двойных слепых исследований, необходимо использовать ослепление на этапе оценки результатов. В первую очередь это касается результатов, на которые большое влияние оказывает субъективный фактор, например, ультразвуковые исследования и оценка состояния яйцеклетки и (или) эмбриона. Доза

рчФСГ препарата должна быть фиксированной в течение первых 5 дней стимуляции. Допускается использование в протоколе агонистов или антагонистов гонадотропин-высвобождающего гормона.

В качестве первичной конечной точки рекомендуется использовать показатель количества зрелых яйцеклеток (ооцитов). Должна быть продемонстрирована эквивалентная эффективность исследуемого и стандартного препаратов и проспективно определены и подтверждены пределы эквивалентности. Диапазон эквивалентности должен быть определен проспективно. При этом необходимо учитывать, что чрезмерная стимуляция, так же как и недостаточная стимуляция могут привести к задержке цикла и отсутствию зрелых яйцеклеток (нулевых ооцитов), которые являются основным показателем первичной конечной точки. Поэтому, данные должны быть представлены таким образом, чтобы можно было провести детальное сравнение причин отмены циклов вспомогательных репродуктивных технологий.

В качестве альтернативного подхода для сравнительной оценки эффективности с использованием критерия «не меньшей активности», может быть использован показатель «нормального течения беременности в течение 10 недель после пересадки эмбриона», который может быть использован и в качестве первичной конечной точки. В данном случае показатель «количества зрелых яйцеклеток (ооцитов)» должен быть включен в качестве дополнительной первичной конечной точки, с соответствующим диапазоном эквивалентности или в качестве наиболее важной вторичной конечной точки.

При определении вторичных конечных точек необходимо учесть следующие особенности:

– если количество зрелых яйцеклеток (ооцитов) используется в качестве первичной конечной точки, то показатель «нормального течения беременности в течение 10 недель после пересадки эмбриона» должен рассматриваться в качестве вторичной конечной точки;

– при искусственном оплодотворении доза рчФСГ подбирается на основании данных реакции яичников, что может скрывать различия, связанные с препаратами. Необходимо учитывать коррекцию дозы и возможные различия между дозами биоподобного и референтного препаратов. При анализе вторичных конечных точек необходимо учитывать суммарную дозу препарата рчФСГ, количество дней стимуляции препаратом рчФСГ и процент пациентов которым требовалось увеличение и уменьшение дозы препарата. Если основные отличия между биоподобным и референтным препаратами касаются применяемой дозировки, то такие препараты не соответствуют концепции биоподобия;

– следует изучать вспомогательные параметры, которые используются для демонстрации подобия (сходства) биоподобного и референтного препаратов. Соответствующие конечные точки должны включать количество фолликулов и их распределение по размерам во время лечения и в день индукции овуляции. Следующей конечной точкой, которая позволяет оценить фармакодинамические свойства препарата рчФСГ, является определение количества фолликулов после 5 дней стимуляции препаратом рчФСГ (перед проведением корректировки дозы). Кроме того, в сыворотке необходимо определить уровни ингибин-В, эстрадиола, лютеинизирующего гормона и прогестерона;

– необходимо учитывать показатели, характеризующие качественные свойства зрелых яйцеклеток (эмбрионов). При этом необходимо документально фиксировать количество ооцитов (эмбрионов) хорошего качества.

Исследование безопасности

Изучение безопасности биоподобного препарата в процессе исследования эффективности, как правило, бывает достаточно для характеристики профиля нежелательных реакций биоподобного препарата. В первую очередь необходимо обратить внимание на синдром гиперстимуляции яичников и при развитии OHSS подробно описать все его проявления: степень тяжести (легкая, средняя и тяжелая) и дифференцировать синдром гиперстимуляции яичников с поздним и ранним началом.

Вероятность развития иммунной реакции на препарат чаще связана с подкожным путем введения и прерывистым (периодическим) введении препарата, чем при однократном внутривенном введении. Оба этих фактора могут применяться к рФСГч, так как женщины могут получать более одного цикла вспомогательных репродуктивных технологий. Данные по иммуногенности должны предоставляться по всем женщинам, участвующим в исследовании эффективности, а также по всем женщинам, получающим более одного цикла вспомогательной репродуктивной терапии.

Определение иммуногенности нужно проводить до трех месяцев после проведеления терапии рФСГч с применением валидированных тестов на основе антител достаточной чувствительности и специфичности. При обнаружении потенциального влияния антител к ФСГ на эффективность и (или) безопасность оно должно быть оценено

и должна быть рассмотрена необходимость дальнейшей характеристики этих антител, например, в отношении их нейтрализующего потенциала.

6. Фармаконадзор

При регистрации препарата необходимо представить в модуль 1 регистрационного досье план управления рисками, в соответствии с Правилами регистрации и экспертизы средств медицинского применения и надлежащей практикой фармаконадзора. В плане управления рисками биоподобного препарата должны быть учтены выявленные и потенциальные риски, связанные с применением референтного препарата, и если возможно, безопасность при показаниях, одобренных для референтного препарата, основываясь на экстраполировании данных. При этом план должен содержать детальное обсуждение, каким образом указанные проблемы в будут устранены пострегистрационном периоде.

7. Экстраполяция результатов исследований

Демонстрация эффективности и безопасности исследуемого препарата в сравнении с референтным при стимуляции мультифолликулярного развития во время проведения вспомогательной репродуктивной терапии позволяет экстраполировать результаты исследования на другие показания, утвержденные для референтного препарата.

ГЛАВА 16. АДЪЮВАНТЫ ВАКЦИН ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

1. Введение.

Адъюванты (иммуностимуляторы или иммуномодуляторы) десятилетиями использовались для усиления иммунного ответа на антигены вакцин. Включение в состав вакцины адъювантов имеет целью более быстрое формирование выраженного и длительно сохраняющегося специфического иммунного ответа. Целью включения адъювантов в состав вакцины является усиление, ускорение и продление желательного специфического иммунного ответа на антигены вакцины. Преимущества использования адъювантов в вакцинах заключается в повышении иммуногенности антигенов, изменении характера иммунного ответа, снижении количества антигена, необходимого для успешной иммунизации, сокращение частоты необходимых повторных иммунизаций и улучшение иммунного ответа у пожилых и ослабленных вакцинированных субъектов. Адъюванты можно выборочно использовать для оптимизации требуемого иммунного ответа, например, по отношению к классам иммуноглобулинов и индукции реакций на основе цитотоксических лимфоцитов или Т-хелперов. Кроме того, некоторые адъюванты можно использовать для стимуляции гуморального ответа на поверхности слизистых.

Интерес к адъювантам вакцин объясняется несколькими причинами. Производители вакцин и органы здравоохранения, например ВОЗ, направляют усилия на улучшение существующих вакцин и разработку новых. В последние годы наметились новые потенциальные вакцины против инфекционных, аллергических и

аутоиммунных заболеваний, а так же для лечения рака и бесплодия. Во многих случаях из-за низкой иммуногенности вакцин требуются адъюванты. Новые технологии в области аналитической биохимии, возможности очистки на макромолекулярном уровне, использование рекомбинантных технологий и достижения в области глубокого понимания иммунологических механизмов и патогенеза заболеваний помогут улучшить техническую базу для разработки и применения адъювантов для новых вакцин.

Адъюванты могут быть классифицированы по происхождению (натуральные, синтетические или эндогенные), по механизму действия, а так же физическим или химическим свойствам. Классы адъювантов, наиболее часто описываемые в настоящее время, перечислены в примечании 2 (раздел 2.2).

Активность адъювантов является результатом нескольких факторов, и усиленный иммунный ответ, полученный с помощью одного антигена, как правило, не может быть распространен на другой антиген. Поскольку различные антигены различаются по физическим, биологическим и иммуногенным свойствам, им необходимы соответствующие адъюванты. Выбор адъювантов должен быть обусловлен типом желаемого иммунного ответа и должен быть соединен с антигеном таким способом, чтобы обеспечить развитие оптимального типа ответа с минимальными побочными эффектами.

Основное свойство большинства адъювантов заключается в их способности депонировать антиген, то есть адсорбировать его на своей поверхности и длительное время сохранять в организме, защищать антиген от разрушения и элиминации, что увеличивает продолжительность влияния антигена на иммунную систему. Основные аспекты воздействия адъювантов представляют собой: способностью

антигена, определяемую физическими свойствами антигена в вакцине; захват антигена/адъюванта; распределение (направленное воздействие на конкретные клетки); стимуляцию (модуляцию) иммунной системы, которая включает регуляцию как количественных, так и качественных аспектов последующих иммунных реакций; защиту антигена от разложения и выведения.

Наиболее сильные адъюванты содержат в своем составе микроорганизмы ослабленных штаммов или какие-либо субстанции, извлеченные из них. Эти компоненты являются стимуляторами компонентов системы врожденного иммунитета, включая макрофаги и другие антигенпрезентирующие клетки.

Для направленной доставки антигена в лимфоидные органы используют липосомы (липидные пузырьки). Это позволяет точно дозировать антиген и избежать его влияния на структуры, не вовлеченные в формирование иммунного ответа.

Основные механизмы проявления активности адъювантов:

- оптимизация презентация антигена, который определяет специфичность действия вакцины;

- формирование депо антигена, увеличивающего срок его воздействия на систему иммуннитета;

- распределение антигена в организме (направленная доставка антигена к клеткам иммунной системы);

- прямое стимулирующее (модулирующее) действие на клетки иммунной системы, которые в конечном итоге ответственны за количественные и качественные аспекты стимуляции иммунного ответа;

- защита антигена от деградации и элиминации.

В целом, механизм действия адсорбентов и мелкодисперсных адъювантов включает презентацию антигена иммунной системе, в то время как микробные, синтетические и эндогенные адъюванты действуют путем прямой стимуляции или модуляции иммунной системы. Помимо их роли в презентации антигена иммунной системе, механизм действия эмульсий заключается в стимуляции медленного высвобождения антигена и его защиты от быстрого выведения. Использование адъювантов продленного действия, например, минеральных солей, сопровождается образованием воспалительного очага в области инъекции, что может привести к синтезу провоспалительных цитокинов и стимуляции врожденного иммунитета, важного для первых этапов иммунного ответа.

Таким образом, оценка качества рецептуры вакцина/адъювант охватывает такие аспекты, как демонстрация совместимости адъюванта(ов) с антигенным(и) компонентом(ами), присутствующими в вакцине, доказательство правильной и стабильной ассоциации антигена с адъювантом, демонстрации отсутствия значительной диссоциации в ходе срока хранения, степени ассоциации на протяжении срока хранения, влияние адъюванта на анализ компонентов, биохимическую чистоту и пирогенность. В качестве примера ассоциации – адсорбция характерна для гелей гидроксида алюминия, гелей фосфата алюминия, гелей фосфата кальция и ISCOMS, в то время как ионные взаимодействия характерны для заряженных мицелл диметилдиоктадециламмония (DDA). Механизмом ассоциации для эмульсий или липосом является инкапсуляция. Для производных сапонинов или других экстрактов взаимодействие с антигенами является липофильным (гидрофильным) или ионным.

В прошлом разрабатывалось много адъювантов, однако они

никогда не использовались для плановой вакцинации из-за соображений безопасности, например, острой токсичности и возможности отсроченных побочных эффектов. Таким образом, следует сопоставлять преимущества адъювантной вакцины и риск вызываемой ей нежелательной реакции. Нынешняя точка зрения на соотношение риск-польза для вакцинации отдает предпочтение безопасности перед эффективностью, если вакцина предназначена для здорового населения. Однако в группах высокого риска, включая пациентов с онкологическими заболеваниями и СПИДом, и для других «терапевтических вакцин» при существенной пользе от вакцины может быть приемлемым повышенный уровень токсичности. Таким образом, в соответствующих случаях следует предусмотреть доклиническую оценку безопасности.

Даже при отсутствии серьезных нежелательных эффектов в ходе обширных доклинических исследований токсикологических аспектов и безопасности нельзя гарантировать, что новая рецептура вакцина/адъювант не представляет риска для вакцинированных и не приведет к неожиданным явлениям. Непредсказуемость влияния адъюванта на организм человека является результатом сложного взаимодействия между такими факторами, как путь введения, доза антигена и природа антигена. По этой причине окончательная оценка безопасности новой разработанной рецептуры вакцины может проводиться только на основании клинических исследований.

2. Область применения

В методических рекомендациях отражены вопросы оценки качества, доклинических и клинических исследований новых или уже используемых адъювантов в составе вакцин. Требования, изложенные в

данном документе, к используемым в настоящее время адъювантам (таким как, гидроксид алюминия, алюминий алюминия или кальция фосфат), зависят от особенностей индивидуальных вакцин и должны рассматриваться отдельно в каждом конкретном случае.

2.1. Вакцины

Вакцины[11], рассмотренные в данном документе, обеспечивают формирование иммунитета против инфекционных заболеваний. Эти вакцины содержат один или более микроорганизмов, инактивированных химическим или физическим воздействием с сохранением иммуногенных свойств.

Антигены могут находиться в нативном состоянии, могут быть укорочены или модифицированы вследствие мутаций, могут быть обезврежены за счет химических или физических средств и (или) агрегированы, полимеризованы или конъюгированы с носителем (см. также соответствующую статью Фармакопеи Союза). До настоящего времени адъюванты не используются в живых вакцинах для медицинского применения, однако этого нельзя исключить в будущем.

Основные положения данных рекомендаций применимы к оценке качества и доклиническим исследованиям по изучению «терапевтических вакцин» (например «антиидиотипические вакцины»,

---

[11] Вакцины могут содержать один или более из следующих компонентов:

- организмы, инактивированные химическим или физическим способом, сохраняющие адекватные иммуногенные свойства;
- живые организмы, которые естественно авирулентны или которые были подвергнуты воздействию для аттенуации их вирулентности, сохраняющие адекватные иммуногенные свойства;
- антигены, выделенные из инфекционного агента или секретируемые им;
- антигены, полученные методом рекомбинантной ДНК технологии;
- живые рекомбинантные векторы, продуцирующие антигены *in vivo* при вакцинации хозяина (носителя);
- плазмидные ДНК;
- антигены, полученные путем химического синтеза *in vitro*.

таких как моноклональные антитела, используемые в качестве иммуногенов, «противоопухолевые вакцины», аллергены для специфической иммунотерапии (аллергоиды) и вакцины, используемые для лечения инфицированных лиц), однако клинические аспекты «терапевтических вакцин» не входят в рамки данного документа.

2.2. Адъюванты

Адъювант[12] вакцины представляет собой компонент, стимулирующий иммунный ответ на антиген и (или) модулирующий желательные иммунные реакции.

---

[12] Адъюванты включают (но не ограничиваются) следующее:

- минеральные соли, например гидроксид алюминия и гель фосфата алюминия или кальция;
- масляные эмульсии и составы на основе сурфактантов, например MF59 (микропсевдоожиженный детергент стабилизированный эмульсией «масло в воде»), QS21 (очищенный сапонин), AS02 [SBAS2] (эмульсия «масло в воде» + MPL + QS21), Montanide ISA-51 и ISA-720 (стабилизированная эмульсия «масло в воде»);
- адъюванты в виде твердых частиц, например виросомы (униламеллярные липосомальные частицы с инкорпорированным гемагглютинином гриппа), AS04 ([SBAS4] соль алюминия с MPL), ISCOMS (структурированный комплекс сапонинов и липидов), полилактид-ко-гликолид (PLG);
- микробные дериваты (натуральные или синтетические), например монофосфорил липида А (MPL), Detox (MPL + структуры клеточной стенки *M. Phlei*), AGP [RC-529] (синтетический ацилированный моносахарид), DC_Chol (липоидный иммуностимулятор, способный самоорганизовываться в липосомы), OM-174 (производное липида А), CpG-мотивы (синтетические олигонуклеотиды, содержащие иммуностимулирующие CpG последовательности), модифицированные LT и CT (генетически модифицированные бактериальные токсины для обеспечения нетоксигенного адъювантного эффекта);
- эндогенные иммуномодуляторы человека, например гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (hGM-CSF) или интерлейкин-12 (hIL-12) (цитокины, которые применяются как в форме протеина так и в виде кодирующих их плазмид), Immudaptin (C3d тандемная область);
- инертные частицы, такие как частицы золота.

Кроме того, могут быть разработаны новые виды адъювантов, не перечисленные в данном примечании, на эти адъюванты также распространяются указания настоящей Главы.

Активный ингредиент комбинированной вакцины, оказывающий адъювантное действие на другие активные ингредиенты вакцины, не входит в сферу применения данного методической рекомендации. Кроме того, в сферу действия данной методической рекомендации не входят носители гаптенов, антигены (например, CRM197, менингококковый OMP, столбнячный и дифтерийный анатоксины, которые используются для конъюгирования полисахаридов) и вспомогательные вещества, например, HSA.

В готовой вакцине могут присутствовать несколько адъювантов. Они могут быть объединены с одним из антигенов или всеми антигенами, представленными в вакцине, либо каждый адъювант может быть объединен с одним конкретным антигеном. В любом случае указания, содержащиеся в данном руководстве, при необходимости применимы к каждому адъюванту и каждой комбинации антиген-адъювант.

3. Качество.

Происхождение и природа адъювантов, используемых или разрабатываемых в настоящее время, весьма разнообразны. Например, адъюванты на основе алюминия состоят из простых неорганических соединений, PLG представляет собой полимерный углевод, вирус-липосомные вакцины можно получить из неоднородных вирусных частиц, MDP получают из бактериальной клеточной стенки, сапонины имеют растительное происхождение, сквален получают из печени акулы, а рекомбинантные эндогенные иммуномодуляторы получают из рекомбинантных бактерий, дрожжей или клеток млекопитающих. Следовательно, в данной методической рекомендации нецелесообразно приводить полный список отдельных анализов, которые следует выполнять для любого конкретного адъюванта или комбинации адъювант/антиген.

Указания, приведенные ниже, должны использоваться производителями адъювантов/вакцин в индивидуальном порядке, исходя из того, насколько они подходят для их адъюванта. Следует придерживаться соответствующих статей Фармакопеи Союза. Для производителей рекомбинантных белков-адъювантов следует использовать соответствующие настоящих Правил, например, по клеточным субстратам (Глава 1), вирусологической безопасности (Главы 2-3), рекомбинантным ДНК и белкам (Глава 5).

3.1. Адъюванты

3.1.1. Описание

Следует подробно описать природу или химический состав адъюванта. При использовании более чем одного адъюванта, или если адъювант состоит из более чем одного компонента, следует описать функции каждого адъюванта или компонента в той степени, в какой они известны

3.1.2. Производство

Производство адъюванта должно быть описано максимально подробно. Особое внимание должно быть уделено источнику получения адъюванта, особенно, если он имеет биологическое происхождение или есть какие-либо особенности его применения.

Следует определить параметры, важные для правильных физических, биохимических, биологических или адсорбционных свойств адъюванта. Особое внимание должно быть обращено на использование любых биологических продуктов, получаемых от крупного рогатого скота (бычья сыворотка и др.), при использовании таких материалов требуется соблюдение требований соответствующих рекомендаций Союза и статей Фармакопеи Союза по минимизации риска передачи возбудителей губчатой энцефалопатии животных через лекарственные средства медицинского и ветеринарного назначения.

3.1.3. Характеристика

Следует описать результаты оценки ряда параметров, используемых для изучения характеристик адъювантов. Необходимо выявить и описать основные параметры. Такие параметры могут являться частью регулярных анализов партий адъюванта.

Кроме того, для изучения характеристик адъюванта следует анализировать другие параметры, и некоторые из них могут также входить в состав регулярных анализов. Параметры, которые определяют адъювант, зависят от природы адъюванта и могут включать, в числе прочего:

– химический состав (качественный и количественный)

– физические характеристики (например, визуальная оценка, плотность, вязкость, pH, размерность и распределение частиц по размерам, поверхностный заряд)

– биохимические характеристики

– чистота (например, содержание эндотоксинов, микробиологическая чистота, остаточное содержание производственных примесей).

3.1.4. Рутинные исследования

Перечень должен быть обоснован результатами оценки показателей при характеристике адъюванта, о чем указано выше. Должна быть установлена спецификация и определены требования к оцениваемым показателям.

3.1.5. Стабильность

Оценка соответствующих физико-химических и (или) биологических свойств, основанных на характеристике адъюванта, должна проводиться при изучении стабильности адъюванта во время хранения.

Важными параметрами могут быть степень диссоциации антигена

и адъюванта и целостность антигена.

3.2. Комбинация адъювант/антиген

3.2.1. Изучение и производство комплексного препарата

Объединение антигена с адъювантом является главным ключевым моментом в получении конечного комплекса адъювант-антиген. Механизм ассоциации (связывания) и эффективность (связывания) между антигеном и адъювантом должны быть определены и описаны. Аспекты, которые важны для биологических свойств комплекса (комбинации) адъювант-антиген (например, адсорбция, характеристики связывания) должны быть идентифицированы и проверены. Если используется более одного адъюванта при объединении их в комплекс, то должна быть представлена информация о каждом адъюванте и проведены исследования по оценке совместимости вводимых в комбинацию (комплекс) адъюванта(ов) и антигена(ов).

Если конечная вакцина содержит более одной комбинации адъювант-антиген, требуется выполнение анализов, соответствующих природе адъювантов (идентичных или нет), в том числе анализа нежелательных эффектов между различными комбинациями адъювант-антиген.

Процесс производства комплекса (комбинации) адъювант–антиген должен быть детально описан.

Промежуточный продукт может быть получен в процессе формирования комплекса (комбинации) адъюванта и антигена, до сведения компонентов. В другом случае, сведение компонентов происходит одновременно на этапе объединения адъюванта и антигена (конечный балк). Альтернативный процесс включает одновременное объединение адъюванта и антигена и розлив готового продукта (filling – final product)

Любой наполнитель или растворитель, добавленный к комплексу (комбинации) адъювант-антиген во время приготовления конечного балка (формулирование), не должен оказывать негативного влияния на активность вакцины или ассоциацию (связывание) антигена(ов) с адъювантом(ами).

В каждом конкретном случае, характеристика, рутинный контроль и изучение стабильности промежуточного продукта, конечного балка и готового продукта (когда приемлемо), должны быть выполнены, как описано ниже. Изготовитель вакцин должен ясно определить и обосновать испытания, которые выполняются на каждой стадии.

3.2.2. Характеристика

Комплекс адъювант - антиген должен быть соответствующим образом охарактеризован. Характеристика комплекса может включать соотношение и последовательность объединения антигена с адъювантом, целостность антигена в ассоциации с адъювантом, влияние адъюванта на возможность определения антигена и степень возможности диссоциации комплекса антигена с адъювантом (стабильность). Другие параметры могут включать химические и физические характеристики (например, размер частиц, вязкость).

3.2.3. Обычные (рутинные) исследования

Тесты для рутинной оценки комплекса адъювант-антиген должны быть определены (идентифицированы), описаны и валидированы. Такие тесты должны быть основаны на параметрах, полученных во время полной характеристики комплекса адъювант-антиген.

3.2.4. Стабильность

Долгосрочная стабильность комплекса адъювант-антиген должна быть исследована с оценкой соответствующих физических и

биохимических свойств. Важными параметрами являются степень диссоциации комплекса антиген - адъювант и его целостность.

3.2.5. Несколько антигенов в комбинации с адъювантом

Если в готовый препарат вакцины включают антиген(ы) в дополнение к антигену, существующему в комбинированной вакцине с адъювантом, необходимо изучить эффект адъюванта на этот дополнительный антиген(ы), используя соответствующие для этого антигена исследования. Точно так же любые эффекты дополнительного антигена(ов) следует оценить в отношении его воздействия на комплекс адъювант-антиген.

Если в состав конечного продукта вакцины включают более одного комплекса антиген-адъювант, исследования проводят в соответствии с происхождением адъюванта (является ли он идентичным тому, который присутствует в вакцине) для того, чтобы исключить побочные эффекты, обусловленные взаимодействием между различными комплексами адъювант-антиген.

3.3. Конечный продукт.

Готовый препарат вакцины должен исследоваться по таким показателям как активность, подлинность и стабильность. Данные исследования должны проводиться в соответствии с требованиями Фармакопеи Союза, а также настоящей Главы. Методики для тестирования препарата и изучения стабильности должны быть определены и валидированы.

Взаимодействие адъюванта(ов) с антигеном(ами) может влиять на результаты некоторых стандартных тестов, в случае их использования для исследования на стадии готового продукта или сформулированного конечного балка.

Альтернативные методы исследования должны быть разработаны отдельно, они будут отличаться от методов исследования, проводимых на более ранних стадиях, когда воздействие адъювантов на антиген(ы) отсутствует.

4. Доклинические исследования

4.1. Свойства адъюванта

Механизм проявления действия адъювантов:

– физическое воздействие на механизмы представления вакцинного антигена;

– оптимизация проявлений антигенной активности;

– доставка антигена в клетки, отвечающие за инициацию иммунного ответа и координирующие взаимодействие важных компонентов иммунной системы - антигенпрезентирующие клетки;

– воздействие на специфические антигенпрезентирующие клетки (дендритные клетки, клетки Лангерганса, макрофаги и другие), которое проявляется стимулированием Toll-подобных рецепторов за счет аналогов липида А или за счет усиливающего иммунный ответ соединения олигодеоксинуклеотида (ODNs) CpG;

– усиление или модулирование иммунного ответа, обусловленное, например, внутриклеточным транспортированием и процессированием антигена(ов), ассоциацией с молекулами MHC класса I или II, экспансией Т-лимфоцитов, с продукцией различных цитокинов.

Должно быть дано объяснение механизма действия адъювантов. Повышение интенсивности иммунного ответа на комплекс адъювант-антигена должно быть показано в исследованиях на соответствующей модели животных. Следует установить, воздействует ли адъювант на

клетки системы врожденного иммунитета. Кроме того, необходимо выяснить степень активации гуморального и клеточного звена иммунного ответа при использовании адъюванта вместе с антигеном. Данные, полученные при использовании комбинации адъюванта с другими антигенами, могут служить основой для выяснения механизма действия адъюванта. Идеально подходящая модель животных должна продемонстрировать защиту иммунизированных животных при введении смертельной дозы патогенных микроорганизмов (при инфекционной патологии). Если такая модель отсутствует, следует использовать в экспериментах тот вид животных, у которых индуцированный иммунный ответ будет подобен ожидаемому иммунному ответу у человека. В качестве уточняющей информации могут быть использованы сведения научной литературы.

4.2. Фармакокинетика

Фармакокинетические, т.е. исследования с определением концентрации антигена в сыворотке крови, не требуются. В некоторых случаях, фармакокинетические исследования могут иметь значение для понимания механизма действия адъюванта.

4.3. Изучение токсичности адъювантов

Методология, используемая для изучения токсичности адъювантов, должна соответствовать методологии изучения вакцины. Вакцины с адъювантами могут назначаться при использовании в медицинской практике с интервалом от несколько недель, до нескольких лет. Обычно, адъюванты вводятся в небольшом количестве несколько раз за весь период жизни.

Адъювант исследуется в соответствии с его использованием в составе вакцины и стратегия тестирования должна отражать это использование.

Адъюванты могут использоваться с различными антигенами, часто они не обладают видовой специфичностью.

Адъюванты могут быть связаны с различными антигенами и должны быть изучена на двух видах животных, если нет других указаний (на грызунах и негрызунах).

Адъюванты, принадлежащие к различным биологическим классам, могут проявлять высокий уровень видовой специфичности (например, некоторые цитокины), поэтому исследовать их более чем на одном виде животных не имеет смысла. Однако, другие адъюванты (например, масляные эмульсии) проявляют меньшую специфичность и принципы токсикологических исследований базируются на общих требованиях для изучения токсичности, т.е. исследования проводят как минимум на двух видах животных. Результаты, полученные при исследовании на одном виде животных, будут подтверждены результатами исследования на другом виде животных.

Выбор вида животных зависит прежде всего от выбора антигена, для которого предназначен адъювант. Идеальным является вид животных, на которых уже проводили исследования.

4.3.1. Местная переносимость

Местно раздражающее действие адъюванта должно быть изучено в зависимости от пути его введения. Например:

- для орального и внутриносового пути введения должна быть изучена местная и общая толерантность;
- для инъекционных вакцин особое внимание должно быть уделено возможности индукции поздней грануломатозной реакции, например, при использовании частиц или минерального масла.

4.3.2. Индукция гиперчувствительности и анафилактической реакции

Сами адъюванты могут проявлять иммуногенные свойства, поэтому следует оценивать возможность развития гиперчувствительности на соответствующих моделях (например, в тестах пассивной кожной анафилаксии [PCA] и активной системной анафилаксии [ASA]). Адъюванты могут индуцировать повышение уровня специфического иммуноглобулина класса E (IgE) к антигену вакцины, поэтому следует оценить возможность индукции реакций гиперчувствительности и анафилаксии на антиген при использовании адъюванта.

4.3.3. Пирогенность

Адъюванты должны быть проверены относительно их возможных пирогенного эффекта. Альтернативные тесты in vitro для оценки пирогенности субстанций могут быть использованы при условии их валидации.

4.3.4. Системная токсичность

Адъюванты различных классов могут быть систематизированы по их способности вызывать токсические эффекты в различных органах. Система введения препарата должна быть разработана в соответствии с назначаемыми дозами, включая интервал при повторном введении, который предполагается при клиническом использовании.

При проведении токсикологических исследований должны проводиться патоморфологические и гистологические исследования следующих органов и тканей:

– сердце, легкие, мозг, печень, почки, репродуктивные органы и др.;

– кожа (при подкожном пути введения);

– органы иммунной системы: селезенка, тимус, костный мозг, лимфатические узлы (локальные и отдаленные от места введения).

Полное обследование органов рекомендуется в случае использования новых адъювантов, которые не изучались на этапе доклинических испытаний и не имеют опыта клинического применения.

Токсичность, главным образом, вызвана иммуностимулирующим эффектом адъюванта, но так же нельзя исключать его прямое токсическое воздействие на другие органы, не являющиеся органом-мишенью. Диапазон доз может оставаться относительно низким, соответствуя дозам при его клиническом использовании, не достигая максимально переносимой дозы.

4.3.5. Репродуктивная токсичность

В соответствии с программами вакцинации вакцина с адъювантом может быть предназначена также для женщин детородного возраста, поэтому важно изучить ее репродуктивную токсичность. Более того, вакцина может назначаться беременным женщинам для предупреждения инфекционного заболевания плода путем обеспечения пассивной иммунизации. Исследование репродуктивной токсичности должно быть выполнено с адъювантом, предназначенным для использования в данном типе вакцин. Программа исследования должна быть составлена с учетом предполагаемой схемы применения вакцины. Иммунный ответ на бустерную дозу может отличаться от первичного ответа, в связи с этим первую дозу вакцины вводят до наступления беременности, а последующие бустерные дозы – во время беременности.

4.3.6. Генотоксичность

Адъюванты могут быть биологического или синтетического происхождения. В соответствии с требованиями Главы 5.3 настоящих

Правил для биотехнологических продуктов общие требования исследования генотоксичности адъювантов биологического происхождения не всегда соответствуют тем, которые должны быть проведены для адъювантов иного происхождения. Для синтетических адъювантов исследования должны быть выполнены по стандартной схеме, любые отклонения должны быть научно обоснованы.

4.3.7. Канцерогенность

Поскольку адъюванты предназначены для введения лишь несколько раз в жизни в низких дозах, риск прямой индукции опухолей этими соединениями незначителен. Кроме того, действие адъювантов направлено на стимуляцию иммунной системы; они не являются иммунодепрессантами общего действия, что снижает риск спонтанного образования лимфоидных опухолей. Таким образом, исследования канцерогенности не требуются.

4.3.8. Комбинация адъювантов

Использование субстанций с иммуномодулирующими свойствами, совместно с адъювантами, оптимизирующими процесс презентации антигена, может сопровождаться повышением активности адъюванта. Соответствующие исследования токсичности должны быть выполнены для обеспечения безопасности использования комбинации адъювантов, в дополнение к исследованиям по каждому индивидуальному компоненту. Исследования токсичности с отдельными компонентами должны быть выполнены и включены в предварительные исследования. Исследование конечной комбинации должно быть выполнено в соответствии с требованиями GLP.

4.4. Токсичность адъюванта в сочетании с антигеном

Доклинические аспекты изучения безопасности комбинации адъюванта с предполагаемым антигеном должны проводиться в

соответствии с требованиями соответствующих рекомендаций Союза. Особое внимание следует уделять аспектам, изложенным в последующих подразделах.

4.4.1. Местная переносимость

Инъекции антигенов в сочетании с адъювантами могут вызывать более выраженные местные реакции, чем реакции после применения только одного адъюванта. Следует изучить оптимальное соотношение дозы адъюванта и антигена с точки зрения пользы и риска

4.4.2. Изучение токсичности многократного введения (хронической токсичности)

Схема дозирования при исследовании хронической токсичности должна быть составлена в соответствии со схемой клинического применения. Чтобы установить безопасность схемы многократного введения (при котором увеличивается интенсивность иммунного ответа) количество введений при исследовании токсичности должно быть больше, чем планируется при вакцинации человека.

4.4.3. Характеристика иммунного ответа

Минимальные требования к проведению исследований иммуногенности на доклиническом этапе включают необходимость изучения следующих аспектов:

– оценка соотношения «доза-эффект» путем исследования эффекта комбинации различных доз адъюванта с различными дозами антигена вакцины;

– сравнительные исследования для установления эффекта нового адъюванта в сравнении только с антигеном вакцины или адъюванта с уже известным адъювантом.

Тип и интенсивность иммунного ответа (гуморальный или клеточный) определяют эффективность вакцины.

Тип иммунного ответа, формирующийся на один и тот же антиген вакцины, может отличаться в экспериментах на животных и у человека. Поэтому вопрос об экстраполяции данных, полученных в исследованиях на животных, требует специального рассмотрения и должен решаться с большой осторожностью. С другой стороны, до начала клинических исследований следует представить обоснованность концепции, полученную в ходе доклинических исследований.

Если возможно, дальнейшие исследования должны быть направлены на более детальное изучение механизмов иммунологического действия нового адъюванта на соответствующих моделях животных (см. п.4.1).

Рациональный выбор комбинации адъювантов должен базироваться на экспериментальных данных.

5. Клинические исследования

5.1. Введение

Включение адъюванта в состав вакцины должно быть обосновано. В обосновании необходимо представить доказательства повышения иммунного ответа без увеличения местных и системных побочных реакций.

При проведении клинических исследований необходимо показать, что количества адъюванта, включаемого в вакцину, вызывает усиление иммунного ответа на антиген(ы) вакцины, что повышает эффективность вакцинации, а также повышает уровень безопасности применения препарата. Включение адъюванта в состав комбинированной вакцины должно усилить иммунный ответ, хотя бы на один антиген, без развития

отрицательного влияния на иммунный ответ на другие антигены вакцины. Особое внимание следует обратить на возможность развития и повышение частоты и (или) тяжести побочных реакций в результате включения адъюванта в вакцину. Поэтому связанный с адъювантом риск не должен превышать потенциальную пользу применения препарата в результате повышения иммунного ответа.

В данном разделе рассматриваются следующие вопросы:

– проведение клинических исследований при включении новых адъювантов в новые препараты, которые не зарегистрированы и (или) зарегистрированные профилактические вакцины;

– клинические исследования проводятся при внесении любых изменений (удаление, добавление и (или) замена) содержания адъюванта в зарегистрированных вакцинах.

Общие принципы, упомянутые в этом разделе, применяются как для вакцин, содержащих один антиген, так и для комбинированных вакцин, вне зависимости от пути введения. Оценка некоторых особенностей характеристики иммунного ответа проводится в процессе изучения безопасности и эффективности препарата. Следует обратить внимание, что термин известный адъювант относится к вакцинам любого состава – к зарегистрированным вакцинам, содержащим один или несколько антигенов.

Особенности различных программ исследований связаны со следующими положениями:

1. Новые вакцины

Включение одного или нескольких новых или известного адъюванта в новую вакцину для повышения иммунного ответа на один или несколько антигенов, проявляющее в усилении эффективности вакцинации.

2. Внесение изменений в ранее зарегистрированные вакцины.

Изменения в зарегистрированные вакцины вносятся для усиления или регулирования иммунного ответа и (или) для повышения безопасности их применения. В некоторых случаях включение адъюванта в вакцину проводится с целью снижения необходимого количества антигена без изменений антигенных свойств вакцины (например, вакцина против пандемического гриппа). Изменения вносятся:

– при включении в препарат одного или нескольких новых или известных адъювантов;

– при повышении количества адъюванта;

– при снижении количества или удаления из препарата одного или нескольких адъювантов (без их замены);

– при замене одного или нескольких адъювантов на новые или известные адъюванты.

5.2. Предварительные исследования

Если в качестве адъюванта используется новое вещество или разработан новый состав, то необходимо в предварительных исследованиях установить эффективность адъюванта и влияние на тип иммунного ответа на антиген (антигены), которые предполагается включить в этот комплекс. Если планируется использовать в вакцине более одного адъюванта, то необходимо проведение исследований для оценки влияния комбинации адъювантов на иммунный ответ на антиген. Кроме того, при создании комбинированных вакцин, в которых содержится более одного из элементов комплекса адъювант – антиген, необходимо изучение активности каждого адъюванта по отношению к введенным антигенам.

5.2.1. Влияние адъювантов на иммунный ответ

Исследование по оценке влияния адъюванта на иммунный ответ должно включать изучение иммунного ответа при введении антигена без адъюванта, который должен содержаться в готовой вакцине, и антигена с адъювантом (или адъювантами). При разработке комбинированных вакцин достаточно исследований, в которых следует провести сравнение иммунного ответа на комбинацию антигенов без адъюванта и комбинация антигенов вместе с каждым из адъювантов. В процессе проведения данных ограниченных предварительных исследований особое внимание следует уделять изучению безопасности.

Обычно подобные исследования проводятся на небольшой популяции здоровых лиц. В случае, если вакцина предназначена для введения новорожденным, маленьким детям или лицам старческого возраста, она должна быть изучена в соответствующей возрастной популяции, при отсутствии принципиальных противопоказаний для проведения таких исследований, после проведения исследований в популяции взрослых пациентов.

Исследование должны включать комплексную оценку всех возможных потенциальных последствий влияния адъюванта на иммунный ответ на все антигены, которые включены в состав разрабатываемой вакцины. Кроме того, необходимо изучение иммуногенных свойств самого адъюванта. Набор тестов при изучении иммуногенности зависит от происхождения и особенностей строения изучаемых антигенов и адъювантов. Дополнительно следует учитывать результаты изучения иммуногенности на экспериментальных моделях при изучении механизма действия адъювантов.

При оценки гуморального звена иммунитета необходимо не только определение уровня антител, но и характеристика антител

(нейтрализующие, опсонирующие или бактерицидные антитела), исследования проводятся с использованием международного стандарта (стандарт ВОЗ или его эквивалент). При характеристики антител, которые вырабатываются в ответ на введение вакцины, необходимо определить к какому классу и подклассу принадлежат антитела, определить свойства иммуноглобулинов класса А (IgA) (циркулирующие в крови или секреторные) и охарактеризовать другие свойства антител, например, авидность.

Оценка клеточного звена иммунитета проводится по определению антиген специфического Т-клеточного ответа, который включает характеристику Th1, Th2, Т-регуляторных клеток и определение уровня соответствующих цитокинов. Спектр исследуемых показателей должен быть обоснован и может быть не ограничен указанными исследованиями. Диапазон проводимых анализов с обоснованием каждого исследования следует привести в регистрационном досье.

При использовании нового адъюванта, вначале необходимо изучить безопасность применения адъюванта с антигеном на доклиническом этапе. Аналогичные материалы по доклиническому изучению должны быть представлены, если изменяется доза (на более высокую дозу) или новый путь введения адъюванта, который ранее не применялся. В том случае, если имеется потенциальная угроза кумуляции адъюванта в организме, необходима оценка фармакокинетических показателей в клинических исследованиях. Необходимость в проведении клинических испытаний только адъювантов должна быть обсуждена с представителями национальных уполномоченных органов.

5.2.2. Исследование подбора дозы

Необходимо представить убедительные доказательства (достаточное количество данных), что представленное соотношение

количества адъюванта и антигена, выбранное для дальнейшего исследования, является оптимальным для развития иммунного ответа на антиген с минимальным риском развития нежелательных явлений. Основная цель при составлении большинства комбинаций адъювант – антиген является использование как можно меньшего количества одного или обоих компонентов, чтобы достигнуть необходимого удовлетворительного иммунного ответа с минимальным уровнем нежелательных явлений. Предварительное количественное содержание адъюванта и антигена в комбинированном препарате определяется на основании исследований, представленных в разделе 5.2.1., которые могут проводиться одновременно с исследованием по подбору доз.

Объем исследований по подбору дозы зависит от свойств предполагаемого готового препарата. Например, если предполагается использование адъюванта в дозах, которые применяются, как минимум в одном зарегистрированном препарате, то основное внимание при исследовании должно быть направлено на характеристику применения разных доз антигена. Однако, если планируется включение адъюванта в состав препарата(ов), доза антигена или комбинации антигенов в котором(ых) используется в одном или нескольких зарегистрированных препаратах, то основное внимание должно быть уделено характеристике количества адъюванта. В случае использования в препарате нового адъюванта и (или) нового антигена (отдельно или в комбинации) необходимо проведение более широких исследований по подбору доз.

Оптимальным является проведение исследований в популяции лиц, которым показана вакцинация данными антигенами (целевая популяция). Однако в том случае, если трудно подобрать необходимую популяцию, исследования подбора дозы может быть проведено в популяции, для которых отсутствуют показания к назначению вакцины. В том случае, если

исследование подбора дозы не позволяет установить одну дозу комбинации антиген-адъювант и не для одного препарата, то возможно будет необходимым проведение подтверждающих исследований для ряда параметров. При этом желательны исследования по характеристике иммунного ответа на подобранную комбинацию антиген-адъювант, по крайней мере, на субъектах, включенных в подтверждающие исследования.

5.3. Подтверждающие испытания

5.3.1. Общие выводы

Клинические исследования, в основном, являются рандомизированными, двойными слепыми и контролируемыми. Дизайн исследований зависит от свойств композиции антиген – адъювант. При модификациях, которые касаются изменения содержания антигена в зарегистрированных вакцинах, должна проводиться оценка иммунного ответа, для подтверждения протективной направленности иммунного ответа.

Необходимо представление данных изучения иммуногенности, если при проведении исследований не было получено подтверждения протективной направленности иммунного ответа.

Эти исследования должны быть проведены в популяции пациентов, для лечения или профилактики которых препараты разработаны. Если данные исследования должны включать широкий возрастной диапазон пациентов, необходимо отдельно проводить исследования в группах, различающихся по возрастному составу. Например, если установлено усиление иммунного ответа на введение антигена в отдельной возрастной группе, необходимо проводить изучение иммуногенности в различных по возрастному составу группах пациентов.

5.3.2. Возможные варианты программы исследования

5.3.2.1. Новые вакцины с новым или известным адъювантом

Для новой вакцины применяются требования, которые не рассматриваются подробно в настоящих Правилах.

Новые вакцины – вакцины, содержащие антигены, не описанные в Фармакопее Союза или нормативных документах ВОЗ, вакцины, в которых использован новый конъюгат для известного антигена, или любая новая комбинация известных и (или) новых вакцин.

5.3.2.2. Изменение содержания адъюванта в зарегистрированной вакцине

Необходимо проведение, как минимум, одного подтверждающего исследования для обоснования изменений содержания адъюванта. Дизайн исследования зависит от того с какой целью осуществляется изменение.

Дизайн исследований при внесении изменений для повышения эффективности препарата.

Если основной целью является повышение иммунного ответа на один или несколько антигенов, или прямое влияние иммунного ответа на предполагаемый конечный эффект, программа исследования должна быть разработана для доказательства превосходства измененного препарата над существующим зарегистрированным препаратом. В процессе проведения исследований комбинированных препаратов должно быть доказано превосходство иммунного ответа модифицированного препарата, по крайней мере, к одному из антигенов. Вторичной целью данных исследований должна быть демонстрация того, что ответ на другие антигены, которые входят в состав модифицированного препарата иммунный ответ не хуже. Демонстрация доказательства «не меньшей активности» по отношению к другим антигенам может быть использована только в том случае, если предварительно доказано превосходство по показателям эффективности.

Если предполагается использование адъюванта в большей дозе, чем в ранее зарегистрированном препарате, или изменение способа введения, необходимы дополнительные исследования по оценке безопасности. Необходимость проведения таких исследований должна быть обсуждена со специалистами национального регуляторного органа до подачи заявления для регистрации модифицированного препарата.

Дизайн исследований при внесении изменений для повышения безопасности препарата.

Если основной целью разработки вакцины является повышение безопасности, в программу клинических испытаний необходимо включить исследования, которые должны доказать, что иммунный ответ на антиген(ы) модифицированной вакцины не меньшей эффективности, чем ответ на каждый антиген зарегистрированной вакцины. Критерии для оценки не меньшей эффективности должны быть обосновано при характеристике свойств антигена. Следует ожидать, что результаты данного исследования позволят обосновать улучшение показателей безопасности.

Данные по безопасности должны свидетельствовать о достоверном повышении ответной реакции, учитывая особенности адъюванта и антигена. В некоторых случаях может быть целесообразным, в основном обратить внимание на возможность развития иммунно-опосредованных реакций. В любом случае отношение риск – польза при применении модифицированных препаратов, должно таким же благоприятным, как и для зарегистрированного препарата.

Пострегистрационные наблюдения должны проводиться во всех случаях внесения изменений в состав зарегистрированной вакцины, содержащей адъювант.

5.3.3. Статистическая обработка результатов исследования

Оцениваемые показатели и методы, используемые для проведения статистического анализа, должны быть представлены в протоколе клинических исследований. Объем выборки должен быть достаточным, для достоверного обоснования результатов исследований. Необходимо заранее представить и обосновать применение критериев “не меньшей активности” и обосновать значение допустимого предела при применении критериев “не меньшей активности”. При планировании клинических испытаний необходимо учесть возможные проблемы, связанные с объемом выборки. При составлении программы исследований могут быть использованы рекомендации.

ГЛАВА 17. КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУНОТЕРАПИИ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ БОЛЕЗНЕЙ

1. Введение

Настоящая Глава содержит указания для подготовки программы исследования эффективности и безопасности препаратов аллергенов (препаратов, на основе экстрактов аллергенов, рекомбинантных аллергенов, модифицированных аллергенов и др.), разработанных для специфической иммунотерапии аллергических заболеваний (например, длительное лечение и коррекция аллергических заболеваний, таких как риноконъюнктивит и аллергия на яды насекомых).

Во всем мире наблюдается увеличение количества аллергических заболеваний, таких как аллергический ринит (риноконъюнктивит), аллергической астмы, пищевой аллергии, обусловленное факторами окружающей среды, генетической предрасположенностью и естественным развитием аллергических иммунных реакций. Контакт организма с аллергенами окружающей среды, главным образом из пыльцы растений, клещей, перхоти животных, грибов, яд насекомых и продуктов питания, может привести к развитию иммуноглобулин Е (IgE)-зависимой сенсибилизации и при повторном контакте с аллергенами могут появиться симптомы заболевания.

Кроме, основанного на фармакотерапии, симптоматического лечения, важную роль играют длительные мероприятия, такие как профилактика и иммуномодулирующая терапия. Специфическая иммунотерапия препаратами аллергенов основана на многократном введении больным аллергенов, для активации иммуномодулирующих механизмов для устойчивого снижения симптомов аллергии и

потребности в лекарственных средствах и повышении качества жизни в период контакта с естественными аллергенами. Специфическая иммунотерапия аллергии, вызванной ингаляционными аллергенами, приводит к изменению (модификации), обусловленных заболеванием эффектов. IgE-зависимая пищевая аллергия является причиной развитие тяжелой анафилаксии, в том числе с летальным исходом, при этом ее лечение пока отсутствует.

Механизмы клинической эффективности специфической иммунотерапии до конца не изучены, установлено, что иммунотерапия изменяет течение аллергического процесса. Например, под влиянием специфической иммунотерапии происходит повышение уровня аллерген-специфичных «блокирующих» IgG (IgG_4 и IgA) антител и снижение или подавление синтеза аллерген-специфического IgE антител. При этом наблюдается изменение состава и активности эффекторных клеток, в том числе тучных клеток, эозинофилов и базофилов. Данные эффекты обусловлены изменениями ответа на аллерген Т-лимфоцитов. При преобладании активности «Th2-типа» иммунного ответа, который сопровождается увеличением синтеза интерлейкина-4 (IL) и IL-5 при аллергии, под влиянием иммунотерапии происходит сдвиг в сторону повышения активности «Th1-типа» ответа и синтеза интерферона-гамма и IL-2. Это вызывает стимуляцию «Т-регуляторных» клеток и увеличение синтеза IL-10 и TGF-бета.

Данные изменения под влиянием специфической иммунотерапии приводят к подавлению, индуцированного аллергеном, Т-клеточного ответа (в коже и легких) и подавлению на длительный срок симптомов заболевания, которые могут развиться после прекращения специфической иммунотерапии. Тем не менее, до сих пор механизм специфической иммунотерапии изучен не полностью, и в настоящее время, ни одно, из

указанных выше изменений системы иммунитета, не может быть использовано для прогнозирования клинического исхода. В тоже время данные изменения системы иммунитета коррелируют с клиническими показателями и должны учитываться при клиническом анализе.

В настоящее время для изучения новых препаратов для специфической иммунотерапии используется большое количество различных схем проведения клинических исследований, которые различаются между собой по исследуемым дозам, продолжительности исследования, критериям включения, конечным точкам, методам анализа результатов и контролю параметров окружающей среды.

В настоящей Главе представлены рекомендации для разработки плана изучения препаратов, предназначенных для специфической иммунотерапии, совершенствования подходов для оценки и сравнения результатов.

В настоящей Главе представлены требования для проведения клинического изучения специфической иммунотерапии при любой локализации аллергического процесса (например, в области носа, верхних и нижних дыхательных путей, глаз, системная реакция), с использованием аллергенов, полученных из любого сырья (например, пыльца, клещи, шерсть животных, грибы, яд насекомых, продукты питания), любых аллергенных препаратов (например, экстракты, очищенные аллергены, модифицированные аллергены, адсорбированный аллергены) и для всех способов введения препарата (например, подкожного, подъязычного). Данные методические рекомендации не распространяется на заболевания атопическая экзема (дерматит) или астма, при которых аллерген не является причиной развития болезни.

2. Сфера применения

Настоящая препарат-специфичная Глава содержит доклинические и клинические требования к исследованию лекарственных препаратов, для специфической иммунотерапии аллергических заболеваний.

3. Связь с другими главами

В Главах 13 и 14 содержатся общие указания по разработке биологических лекарственных препаратов.

4. Основные указания

4.1 Характеристика и выбор пациентов

4.1.1 Диагностика

В исследование должны быть включены больные, которые имеют подробный аллергологический анамнез заболевания.

Диагноз IgE-опосредованных заболеваний устанавливается на основе критериев представленных в международных рекомендациях, в анамнезе должна быть информация о сезонном обострении сезонных аллергического ринита (риноконъюнктивита) или аллергической астмы не менее двух лет подряд и один год обострения, если аллергическое заболевание вызвано круглогодичным аллергеном. Анамнез больных с инсектной аллергией должен содержать подробное описание симптомов аллергии после укуса перепончатокрылых, согласно классификации.

4.1.2 Выбор пациенты

У больных аллергическими заболеваниями дыхательных путей может определяться разное количество аллергенов, которые вызвали сенсибилизацию. Очень мало больных, у которых определяется сенсибилизация к одному аллергену (моносенсибилизация), в основном определяется полисенсибилизация к нескольким аллергенам одного

вида или полисенсибилизация к нескольким аллергенам разного вида. В связи с этим очень сложно подобрать группу больных, у которых определяется моносенсибилизация. Поэтому в исследование необходимо включать больных, у которых определяется ограниченное (минимальное) количество аллергенов, которые вызвали сенсибилизацию. При этом необходимо документально указать причинные аллергены и представить оценку других аллергенов, к которым сенсибилизирован пациент. Определение аллергенов проводится в кожных тестах и при определении аллерген-специфических IgE антител (с использованием методов количественного определения IgE, которые должны быть валидированы). Все определения аллергенов должны быть документально подтверждены. Кроме того, необходимо определение аллергенов, иммунотерапия против которых не будет проводиться, но они могут повлиять на результаты исследований. Данные исследования необходимы при иммунотерапии сезонных аллергического ринита (риноконъюнктивита), вызванных пыльцой или грибами и круглогодичного аллергического ринита (риноконъюнктивита), вызванных клещами или шерстью животных. При наличии у больного сенсибилизации к сезонным и круглогодичным аллергенам могут возникнуть дополнительные трудности. Прежде всего, следует учесть, что не все аллергены, которые вызвали сенсибилизацию, имеют клиническое значение. Для получения объективных результатов изучения иммунотерапии рекомендуется не включать в одно исследование больных, у которых определяется клинически значимая сенсибилизация к аллергенам разных сезонов года, и больных, у которых временные периоды обострений могут накладываться друг на друга. Так же, не рекомендуется включать больных, у которых

определяется сенсибилизация к круглогодичным аллергенам, и, у которых может развиться обострение в период активности сезонного изучаемого аллергена. При изучении круглогодичных аллергенов, в исследование могут быть включены больные, у которых отсутствует сенсибилизация к другим круглогодичным аллергенам, которая имеет клиническое значение. При изучении круглогодичных аллергенов среди больных, у которых определяется клинически значимая сенсибилизация к сезонным аллергенам, оценка эффективности не должна проводиться в период, который соответствует активности сезонного аллергена.

У больных аллергией к ингаляционным аллергенам, которые планируется включить в исследование, до начала исследования должен определяться минимальный уровень соответствующих симптомов заболевания. Оптимальным является характеристика симптомов при проведении оценки исходного состояния больного, а не представление в баллах симптомов, которые были раньше. В исследование не допускается включение больных, которые получали иммунотерапию с использованием изучаемого аллергена или прекрестнореагирующего аллергена (или любого аллергена, для которого имеются основания для невключения) в течение последних 5 лет.

Больные с высоким риском развития анафилактических реакций на укус насекомых, которых планируется включить в исследование иммунотерапии инсектными аллергенами, должны быть обследованы на мастоцитоз. В связи с высоким риском развития анафилактических реакций на укус насекомых, при изучении иммунотерапии аллергеном из яда насекомых, необходимо учитывать наличие мастоцитоза при оценке эффективности и безопасности.

Выбор критериев включения осуществляется с учетом возраста, пола, особенности и тяжести заболевания, сопутствующих заболеваний,

предыдущей иммунотерапии и др. К критериям исключения могут быть отнесены такие факторы, как необходимость приема препаратов, наличие других заболеваний и др. Выбор данных критериев должен быть обоснован и указан в протоколе исследования, чтобы была возможность оценить достоверность результатов.

4.1.3 Сопутствующие заболевания

Очень часто у одного больного встречается ринит (риноконъюнктивит) и астма. При изучении эффективности специфической иммунотерапии ринита (риноконъюнктивита), в исследование могут быть включены больные с сопутствующей астмой, для получения данных о безопасности иммунотерапии и оценке влияния препарата на астму. Несмотря на это отдельно проводится оценка эффективности у больных с астмой и особенности терапии астмы должны быть соблюдены.

4.2 Лекарственные средства, не являющиеся аллергенами

4.2.1 Совместная терапия

Все препараты, которые принимают больные (в том числе и без рекомендаций врача), должны быть указаны в соответствующих документах, при этом необходимо определить препараты, которые могут повлиять на результаты исследования, и исключить их прием. Кроме того, необходимо определить какие препараты рекомендуется назначать для неотложной терапии (см. раздел препараты неотложной помощи).

4.2.2 Препараты неотложной терапии

При проведении клинических исследований должны быть предусмотрены препараты неотложной терапии. Критерии для назначения больному препаратов неотложной терапии (в зависимости от симптома (ов) и (или) тяжести симптома (ов)) необходимо указать в протоколе исследования. Если у больного астматический статус контролируется

препаратами, то они должны рассматриваться как средства неотложной терапии. Каждый случай применения препарата неотложной терапии должен быть занесен в дневник пациента. Не рекомендуется переходить на прием сильнодействующего препарата после окончания лечения, предпочтительным является применение препаратов неотложной терапии с коротким фармакодинамическим эффектом. При оценке эффективности необходимо учитывать, что препараты неотложной терапии могут оказывать влияние на результаты исследования.

4.3 Клинические исследования

4.3.1 Предварительные исследования

I фаза классической схемы клинических исследований на здоровых добровольцах не подходит для оценки аллергенов для специфической иммунотерапии, так как не позволяет оценить эффективность и безопасность препарата на этом этапе. Лица, у которых отсутствует гиперчувствительность, не могут реагировать, как сенсибилизированные больные и у них не определяются риски, которые наблюдаются у больных аллергией. Таким образом, изучение аллергенных препаратов проводится только в популяции больных аллергией, а оценка местнораздражающего действия препарата возможна с участием здоровых добровольцев. Для получения предварительных данных о безопасности и переносимости максимальной переносимой дозы и выбора подходящей схемы повышения дозы препарата (эскалации), необходимо изучение разных доз препарата. Необходимость достижения поддерживающей дозы зависит от схемы повышения дозы, что должно быть продемонстрировано в соответствующих исследованиях.

4.3.2 Исследования выбора дозы

После определения диапазона переносимых доз, необходимо провести изучение зависимости «доза-эффект». Данные исследования могут быть выполнены при проведении нескольких краткосрочных неконтролируемых исследований (например, 2-4 месяца). В качестве первичных конечных точек могут быть использованы провокационные тесты (например, конъюнктивальный, назальный или бронхиальной провокации или определение экспозиции аллергена в камере) и клинические показатели. Лабораторные показатели, имеющие клиническое значение при проведении длительных исследований, такие как специфические антитела, Т-клеточный ответ, цитокины, не могут быть использованы для оценки терапевтической дозы, так как на данном этапе исследования они ещё не определяются и не коррелируют с клиническим ответом на введение препарата.

4.3.3 Исследование фармакокинетики и фармакодинамики

Оценку фармакокинетических свойств препаратов для специфической иммунотерапии провести невозможно, так как в плазме нельзя определить концентрацию действующего вещества данных препаратов.

Для аллергенных препаратов невозможно проведение обычных исследований фармакодинамики. Однако чтобы продемонстрировать влияние специфической иммунотерапии на систему иммунитета, можно оценить динамику показателей иммунитета (например, изменение уровня аллерген-специфических IgG, Т-клеточного ответа и (или) синтеза цитокинов) и (или) оценка ответа органа (ткани) (например, провокационные тесты). Данные исследования могут быть выполнены в рамках дальнейших исследований препаратов.

4.3.4 Подтверждающие исследования

Дизайн исследования

Подтверждающие исследования препаратов для иммунотерапии проводят в рандомизированных, плацебо контролируемых, двойных, слепых исследованиях. Применение критериев «не меньшей эффективности» не позволяет объективно оценить результаты исследований, так как ответы на применение аллергенов колеблются в широком диапазоне и могут быть непредсказуемыми.

В связи с этим рекомендуется проведение сравнительных исследований с плацебо объектом сравнения. Учитывая, что при проведении специфической иммунотерапии часто встречаются местные побочные реакции, клинические исследования, с использованием препарата плацебо с гистамином, должны быть слепыми.

Однако при иммунотерапии аллергии на укус насекомых использование плацебо в контрольной группе является неэтичным. В данном случае в качестве контроля может использоваться зарегистрированный препарат для лечения инсектной аллергии. При этом, необходимо проведение слепого исследования, которое необходимо проводить с использованием одинаковых схем и путей введения изучаемого и контрольного препаратов или использовать другой дизайн исследования (например, исследование с двойной маскировкой). В тех особых случаях, когда приходится использовать проведение исследований «не меньшей эффективности», основное внимание необходимо уделить выбору чувствительных методов оценки сенсибилизации. Для этого рекомендуется обратиться в регуляторные органы для обсуждения дизайна исследования.

В клинические исследования специфической иммунотерапии должны быть включены только те больные, которые имеют хотя бы минимальный уровень симптомов (в соответствующий период времени) перед началом исследования. На данной стадии можно учитывать

симптомы, которые отмечались ранее (которые базируются только на памяти больного), но их не рекомендуется использовать в дальнейшем при учете результатов или в сравнительных исследованиях. Преимущественным является другой подход, связанный с основным периодом исследования, что позволяет оценить симптомы заболевания и воздействие препарата. При этом необходимо учитывать, что аллергены, особенно пыльцевые, могут воздействовать непредсказуемо или с широкими вариациями, что снижает информативность результатов, полученных от вышеуказанных двух подходов. Для включения больного с необходимым минимальным уровнем симптомов можно использовать провокационные тесты с титрованием.

При исследовании сезонной аллергии обязательным является указание в протоколе того уровня пыльцы в атмосфере, при котором возможно начало оценки симптомов заболевания, и основного периода наблюдения.

При проведении клинических исследований круглогодичных аллергенов необходимо минимизировать различия в уровне аллергенов, которые определяются внутри помещений. Поэтому, если планируется проведение санитарных мероприятий, то они должны быть закончены до начала клинического исследования и оценку симптомов заболевания необходимо проводить после окончания санитарных мероприятий. В процессе проведения исследований никакие санитарные мероприятия не проводятся. Кроме того, вариации уровня домашних аллергенов конкретных больных, особенно в период оценки симптомов, рекомендуется отразить в документации.

Продолжительность исследования

Основной целью специфической иммунотерапии является получение стойкого эффекта, вызванного изменениями в системе

иммунитета, что может быть доказано в долгосрочных исследованиях. Тем не менее, достоверные результаты эффективности специфической иммунотерапии при аллергическом рините (риноконъюнктивита) могут быть получены после оценки за один сезон пыления растений или за один или два контрольных периода для круглогодичной аллергии. В зависимости от продолжительности изучения эффективности возможны следующие варианты исследований:

1. Оценка лечения аллергических симптомов: Краткосрочные клинические исследования, чтобы показать эффективность в первый сезон пыления растений после начала специфической иммунотерапии или показать эффективность круглогодичной аллергии после нескольких месяцев лечения.

2. Оценка достижения устойчивого клинического эффекта: Обеспечение значительной и клинически значимой устойчивой эффективности в течение двух-трех лет лечения.

3. Оценка долгосрочной эффективности и изменение эффектов, вызываемых заболеванием: Подтверждение достоверной и клинически значимой эффективности, определяемое годами, после лечения.

4. Лечение аллергии: Подтверждение отсутствия аллергических симптомов, определяемое годами, после лечения.

На основании данных условий разрабатываются отдельные конкретные исследования.

Кроме того, долгосрочные исследования могут быть запланированы, как дополнение для изучения предотвращения: развития астмы и увеличения спектра аллергенов, которые стали причиной сенсибилизации. Если в исследовании запланированы более чем одна цель, необходимо особое внимание уделить методологической стороне составления программы исследования (например, многоцелевое

исследование). При этом не рекомендуется использование данных промежуточных исследований, так как они могут оказать влияние на результаты продолжающегося исследования.

Оценка конечных точек проводится в каждый сезон для сезонного аллергена, а для круглогодичного аллергена несколько раз в течение лечения, или в конце наблюдения. Повышение эффективности в процессе лечения будет свидетельствовать в пользу препарата, но еще не является окончательным выводом, так как эффективность зависит от экспозиции аллергена, которая может быть разной в разные годы. При этом высокая эффективность в первый год лечения может привести к тому, что в следующий год не будет отмечено увеличение эффективности и непрерывное лечение может быть необходимо для получения долгосрочного стойкого эффекта. В связи с этим для оценки эффективности, особенно в периоды (годы) с низким уровнем аллергена и, соответственно, низкой (или даже нулевой) эффективностью, можно использовать провокационные тесты. При этом если концентрация аллергена, которая необходима для развития симптомов аллергии, со временем увеличивается, то это может свидетельствовать об эффективности иммунотерапии. Однако подобные тесты не могут использоваться в качестве суррогатных маркеров эффективности.

Для оценки лечения инсектной аллергии необходимо обосновать период проведения иммунотерапии. При этом необходимо учесть необходимость долгосрочной оценки эффективности.

Конечные точки

Клинически значимые различия первичных конечных точек между исследуемой и контрольной группами должны быть описаны и обоснованы заявителем. Выбор конечных точек при проведении подтверждающих клинических исследований зависит от изучаемой патологии:

Аллергический ринит (риноконъюнктивит):

Первичная конечная точка:

Применение препаратов неотложной терапии для купирования симптомов аллергии. Таким образом, первичная конечная точка должна отражать тяжесть симптомов и применение препаратов неотложной терапии. Оценка пациентом выраженности симптомов часто используется в качестве первичного критерия эффективности при клинических исследованиях с аллергическим ринитом (риноконъюнктивитом) с аллергической астмой или без астмы. Данная оценка должна проводиться больным ежедневно в течение периода, установленного изучения эффективности. Несмотря на то, что четырехбальная шкала для оценки симптомов не валидирована, она используется для оценки симптомов аллергии:

0 - отсутствуют симптомы (без явных симптомов (признаков) аллергии);

1 - легкие симптомы (присутствуют симптомы (признаки) слабой выраженности, которые легко переносятся);

2 - умеренные симптомы (присутствуют симптомы (признаки), которые доставляют беспокойство больному, но терпимы);

3 - тяжелые симптомы (присутствуют симптомов (признаки), которые тяжело переносятся, являются помехами в повседневной жизнедеятельности и (или) сна).

Характерными симптомами аллергического риноконъюнктивита являются: зуд в носу, чихание, насморк, заложенность носа, зуд глаз, ощущение песка в глазах, покраснение и слёзотечение. Кроме того, отсутствует применение лекарственных средств. Препараты неотложной терапии, оказывают различное влияние на выраженность и длительность симптомов аллергии, могут влиять на различные органы и

системы, что требует клинического обоснования, с учетом облечения симптомов (уровня и длительности эффекта) и вида симптомов.

Возможны различные подходы для того, чтобы одновременно учесть применение шкалы для оценки симптомов и приём препаратов неотложной терапии, которые должны быть обоснованны. До сих пор отсутствует система для оценки эффективности, которая позволила бы уравновесить выраженность симптомов заболевания и прием лекарственных средств. Необходимо поощрять инициативы, направленные на разработку сбалансированной и валидированной системы оценки эффективности.

Одним из подходов решения данной проблемы является объединение показателей: характеризующих симптомы аллергии и используемых для учета приема лекарственных средств. Влияние каждого фактора должно быть обосновано. Все исследования с использованием данного комбинированного подхода должны опираться на данные полученные у больных, ответивших на лечение (например, больные у которых оценка с использованием комбинированного показателя была ниже уровня, определенного для учета ответа). Альтернативный подход включает объединение шкалы для учета симптомов и применение препаратов неотложной терапии, в качестве показателя используется количество дней без развития симптомов и приема препаратов неотложной терапии.

При необходимости и клинической обоснованности могут быть использованы другие конечные точки. В случае если имеются ограничения для оценки эффективности в определенный период времени, который определен для оценки первичной конечной точки, это необходимо отразить в протоколе.

Вне зависимости от выбора критерия для оценки эффективности, показатель первичной конечной точки должен быть выражен в единицах и иметь клиническую значимость. Для оценки эффективности представление только статистически достоверных результатов не всегда бывает достаточным.

Вторичные конечные точки:

В качестве вторичных конечных точек могут быть использованы: частота симптомов аллергии, частота приёма препаратов, индивидуальная оценка симптомов, оценка качества жизни с помощью опросников (HRQoL), выраженность симптомов аллергии по визуальной шкале (VAS), количество дней без симптомов, оценка пациентом и врачом улучшения общего состояния больного.

Использование результатов провокационных тестов (кожа, глаза, нос, бронхи, стимуляция аллергеном в камере) и данных объективного исследования (например, определение уровня аллерген-специфических IgE и IgG антител, цитокинов и других маркеров воспаления) позволяет получить дополнительную информацию, но не может использоваться в качестве суррогатных маркеров эффективности и заменить качественную и количественную оценку клинических симптомов аллергии. При проведении провокационных тестов учет результатов рекомендуется проводить с использованием объективных методов оценки (например, риноманометрии). Перспективным показателем оценки эффективности является провокационный тест в аллергенных камерах, однако результаты изучения провокационного теста должны быть подтверждены при сопоставлении с результатами клинической оценки симптомов при естественной экспозиции аллергена. Кроме того, провокационные тесты должны быть подтверждены оценкой клинических симптомов в период до цветения растения и в сезон

цветения (влияние воспаления), исследования в этот период могут соответствовать первичной конечной точке. Тем не менее, провокационные тесты с проведением экспозиции в аллергенной камере могут быть важным показателем, особенно при проведении долгосрочных исследований в течение нескольких лет иммунотерапии поллиноза, в которых оценить количество и тяжесть симптомов сложно из-за низкого уровня концентрации пыльцы в атмосфере.

Оценка профилактической эффективности специфической иммунотерапии бронхиальной астмы и появлений сенсибилизации к новым аллергенам может быть проведена с использованием кожного прик-теста.

Аллергия к укусам насекомых

Эффективность иммунотерапии инсектной аллергии учитывается в контролируемом провокационном тесте с аллергеном яда насекомых. Оценка результатов поводится согласно принятой системы классификации.

Вопросы методологии

При составлении плана проведения клинических исследований специфической иммунотерапии необходимо руководствоваться соответствующими международными рекомендациями (ICH) и рекомендациями Союза.

Для того чтобы избежать внесения в протокол изменений, особое внимание при подготовке программы исследований следует уделить методам оценки результатов. При отсутствии данного раздела невозможно будет определить достоверность изменения показателей при последующих определениях. Особое внимание следует уделить обработке результатов при наличии пропущенных значений и оценки результатов включающих много показателей при анализе показателей

первичных и вторичных конечных точек. Необходимо указать методы оценки результатов в подобных случаях.

В исследованиях, в которых определенную роль играет окружающая среда (например, сезонный риноконъюнктивит), должны быть описаны методы оценки экспозиции аллергенов, которые также необходимо отразить в разделе, посвященном оценке результатов.

4.3.5 Пищевая аллергия

Проведение клинических исследований специфической иммунотерапии IgE-опосредованной пищевой аллергии имеет ряд ограничений.

Золотым стандартом диагностики и оценки эффективности лечения пищевой аллергии является проведение двойного слепого плацебо контролируемого пищевого теста (DBPCFC). В связи с тем, что при применении пищевых аллергенов высока вероятность развития аллергических реакций и имеется небольшой опыт проведения специфической иммунотерапии данной аллергии, для проведения клинических испытаний специфической иммунотерапии необходимо проведение консультаций с регуляторными центрами, с учетом конкретных условий исследования.

4.3.6 Очищенные аллергены (нативные, рекомбинантные, синтетические пептиды)

К очищенным аллергенам относятся все очищенные аллергены. Вне зависимости от происхождения – экстракты или полученные с использованием технологии рекомбинантной ДНК. Кроме того, химически синтезированные пептиды, строение которых соответствует аллергену, также относятся к очищенным аллергенным компонентам. Если проводится исследование очищенных аллергенов, необходимо учитывать дополнительные проблемы.

Исходные материалы для получения аллергенов могут содержать несколько соответствующих аллергенов. В зависимости от степени сенсибилизирующей способности аллергены делятся на главные (≥50% связывания аллерген-специфичных IgE) и малые (<50% связывания аллерген-специфичных IgE). При этом следует отметить, что не все аллергены, которые имеются в исходном материале, известны. Пациенты, у которых установлена сенсибилизация к индивидуальному набору аллергенов, должны рассматриваться индивидуально. Использование для специфической иммунотерапии аллергенных экстрактов, которые содержат широкий спектр аллергенов, повышает вероятность того, что для лечения используется весь спектр аллергенов, которые связаны с его аллергией, даже если и не все аллергены имеют отношение к его индивидуальной аллергии. Однако, использования для иммунотерапии очищенных аллергенов, которые содержат меньшее количество аллергенов, относительно экстракта, позволяет адекватно подобрать соответствующие аллергены и их дозы, для достижения клинического эффекта. Поэтому заявитель должен обосновать выбор аллергенов и критерии отбора больных для участия в исследовании (например, оценка индивидуальной картины сенсибилизации).

4.3.7 Перекрестно-реагирующие аллергены

Основные понятия о перекрестно-реагирующих аллергенах («аллергенные семейства» или «гомологичные ряды (группы)») могут быть использованы для оценки эффективности. Таким образом, для одного «гомологичного ряда» достаточно доказать эффективность аллергена, который выбран в качестве «представителя ряда». В тоже время это предполагает невозможность экстраполировать результаты изучения эффективности на другие «гомологичные ряды». В случаях, если положения «гомологичного ряда» распространяются на аллергены,

который не входит в состав этого ряда, заявитель обязан представить обоснование, для включения данного аллергена в состав группы. Применение концепции «гомологичных рядов» к очищенным аллергенам (нативным, рекомбинантным, синтетическим) необходимо обосновать в каждом конкретном случае.

4.3.8 Аллергены, не обладающие перекрестной реактивностью

При использовании для клинических исследований различных комбинаций аллергенов, которые получены из различных материалов, не обладающих перекрестной реактивностью (смеси экстрактов аллергенов), или различных типов аллергенов (например, очищенных аллергенов (природных, искусственных, полученных с использованием генно-инженерных технологий) заявителю необходимо обратиться за научной консультацией в регуляторный орган.

4.3.9 Исследования сопоставимости

При внесении изменений в производственный процесс, которые могут повлиять на аллергенную активность препарата, необходимо проведение исследования сопоставимости. В зависимости от характера вносимых изменений, сопоставимость препаратов до и после внесения изменений, может быть подтверждена при сравнительном изучении *in vitro* физико-химических и биологических свойств по показателям: состав аллергенов, активность и биологическая активность. При этом может возникнуть необходимость оценки биологической активности с использованием кожного тестирования или, даже, проведение исследований переносимости и эффективности. Для этого необходимо учитывать требования соответствующих нормативных требований. В зависимости от каждого конкретного случая, заявителем должно быть представлено обоснование проведения данных исследований, с учетом научных рекомендаций ведущих центров.

4.3.10 Различные пути введения

Приведенные выше рекомендации распространяются на все пути введения. Это не допускает экстраполяции результатов исследования одного пути введения на другой, соответствующие клинические исследования должны быть проведены для каждого пути введения. Для сравнительной оценки различных путей введения проведение двойных слепых плацебо контролируемых исследований, как правило, не требуется.

4.4 Изучение эффективности иммунотерапии при клинических исследованиях с участием детей

В связи с тем, что специфическая иммунотерапия используется для лечения детей, необходимо изучение эффективность и безопасность применения аллергенных препаратов при их применении у детей. При проведении данных исследований необходимо соблюдение всех действующих нормативных требований для проведения исследований в детской популяции (например, рекомендаций Союза и т.д.). Проведение клинических исследований с участием детей, особенно очень маленьких, имеет ряд проблем, например, оценка симптомов и использование препаратов неотложной терапии, безопасность и положительная оценка результатов исследования. Поэтому оценку эффективности необходимо проводить при проведении специальных исследований среди детей, а не в совместных исследованиях с участием взрослых и детей. Допускается проведение совместных исследований с участием подростков и взрослых.

Проведение клинических исследований проводится на основании данных рекомендаций. Детям, которые самостоятельно не в состоянии оценить своё состояние, должны помощь родители при оценке симптомов и принятии решения для приёма препаратов. Если при

проведении исследований в качестве вторичной конечной точки проводится оценка качества жизни для этого необходимо использовать специальные опросники для оценки качества жизни детей больных аллергическим риноконъюнктивитом или астмой.

4.5 Изучение безопасности

При проведении клинических исследований должны быть соблюдены все нормативные требования для оценки безопасности. При выявлении нежелательного явления необходимо определить его тяжесть (легкая, средней тяжести и тяжелое), провести анализ для определения его связи с изучаемым препаратом и все материалы внести в соответствующие документы. Описание нежелательных явлений необходимо проводить с использованием унифицированных кодов и терминологии. Серьезные нежелательные явления, особенно связанные с лечением, необходимо описывать очень подробно. Отдельно необходимо представить информацию об ожидаемых аллергических побочных явлениях. Ожидаемые аллергические нежелательные явления в зависимости от времени появления симптомов могут быть немедленного и замедленного типа (к немедленным относятся реакции, которые развиваются в течение первых 30 минут после введения препарата). В зависимости от локализации они могут быть в виде местных и системных реакций (к местным относятся реакции, которые развиваются в месте введения, а к системным, реакции которые развиваются в местах, удаленных от места введения). Для характеристики системных аллергических реакций может быть использована классификация тяжести системных эффектов Европейской академии аллергологии и клинической иммунологии (EAACI). Среди других параметров безопасности необходимо

учитывать клинические показатели жизненно-важных органов, клинический и биохимический анализ крови и анализ мочи.

Определения

Адсорбированные аллергены – аллергены или экстракты аллергенов, которые адсорбированы на твердом носителе (например, гидроксид алюминия, тирозин) для создания эффекта депонирования.

Аллерген – лекарственное средство, содержащее аллергены или производные аллергенов для лечения аллергических заболеваний.

Аллерген – это молекула, которая способна индуцировать синтез IgE антител и (или) развитие аллергической реакции I типа.

Главные и минорные аллергены – аллергены, которые связывают как минимум 50 % (главные аллергены), или менее 50 % (минорные аллергены), аллерген-специфических иммуноглобулин Е (IgE) антител. Содержащихся в сыворотке больных аллергией.

Гомологичные ряды – аллергенные экстракты, полученные из различных видов пыльцы растений, принадлежащих к разным родам или семействам различных родов или различных семейств, и готовые формы препаратов, полученных из данных экстрактов, которые могут быть сгруппированы в гомологичные группы в зависимости от состава, физико-химических и биохимических свойств исходного материала, перекрестной-реактивности, структурной гомологии аллергенов, состава готовой формы препарата и производственного процесса и готовой формы.

Модифицированные аллергены или аллергоиды – химически модифицированные аллергены для снижения IgE-зависимой реактивности.

Очищенные аллергены – аллергены, содержащие в своем составе все очищенные аллергены, вне зависимости от происхождения (экстракты или полученные с использованием технологии рекомбинантной ДНК)

Схема эскалации дозы – схема, основанная на введении постоянно увеличивающихся доз аллергена до достижения безопасной поддерживающей дозы.

Экстракт аллергена – это экстракт из исходного сырья природного происхождения, который содержит смесь аллергенов и других молекул, которые не вызывают аллергическую реакцию.

ГЛАВА 18. ПРОИЗВОДСТВО, КАЧЕСТВО, ДОКЛИНИЧЕСКИЕ, КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ БАКТЕРИОФАГОВ

1. Производство бактериофагов

1.1 Введение

Бактериофаги являются вирусами бактерий, их естественными врагами и регуляторами популяции. Бактериофаги чрезвычайно широко представлены в природе во всех ареалах обитания бактерий, с оценкой общей численности в Биосфере до 10^{30-32} частиц. По типу взаимодействия с бактериями они различаются на умеренные и вирулентные (литические). Умеренные фаги способны к интеграции в геном бактерии в виде профага, либо могут размножаться, не вызывая гибели бактерий. В медицине их используют только в диагностических целях, например, для внутривидового типирования бактерий. Вирулентные фаги, проникая внутрь бактериальной клетки, немедленно переключают ее метаболизм на воспроизведение новых фагов, которое завершается лизисом бактерии. Литический процесс повторяется с новыми и новыми бактериальными клетками. Именно вирулентные (литические) бактериофаги обладают наибольшим терапевтическим потенциалом, поскольку только они способны к уничтожению клеток бактерий-хозяев. На этом принципе основано использование фагов при лечении и профилактике гнойно-воспалительных инфекций бактериальной природы, коррекции дисбиотических состояний. Эти препараты представляют собой стерильные очищенные фильтраты фаголизатов соответствующих видов бактерий. Они освобождены от продуктов жизнедеятельности бактерий, эндо- и экзотоксинов,

продуктов фаголизиса бактериальных клеток, белковых и антигенных комплексов питательных сред.

Благодаря строгой специфичности действия бактериофаги, в отличие от антибиотиков, не угнетают нормальную микрофлору макроорганизма, не подавляют его механизмы иммунной защиты и не обладают токсическим действием. На литическую активность бактериофагов не влияет наличие резистентности бактерий к антибиотикам. Главным условием клинической эффективности при назначении препаратов бактериофагов является фагочувствительность бактериального возбудителя.

Организация производства лечебно-профилактических препаратов бактериофагов, как и других иммунобиологических лекарственных средств, осуществляется согласно действующим государственным санитарным правилам, с учетом требований системы обеспечения качества GMP. Вместе с тем имеются определенные особенности в комплектации и размещении производственных помещений.

Для работы со штаммами бактерий, выделенных из разных источников (патологического материала и объектов внешней среды), и для выделения фагов из патологического материала и объектов внешней среды (почва, водоемы, сточные воды и т.д.) необходимы изолированные от производства боксированные помещения для проведения микробиологических исследований.

Обязательными начальными этапами работы являются:

– выделение чистых культур перспективных штаммов бактерий (т.е. кандидатов в производственные штаммы бактерий);

– выделение вирулентных бактериофагов с широким спектром антибактериальной активности для пополнения коллекции маточных фагов.

В производственной зоне должны быть предусмотрены раздельные микробиологические боксы для работы с производственными бактериальными штаммами и маточными фагами.

При производстве фаговых препаратов проводят валидацию технологического процесса, технологического оборудования, сырья и методов контроля. Все исходные материалы и сырье, используемые при производстве, должны иметь документы, подтверждающие их качество. Вспомогательные вещества, входящие в состав препаратов с лечебно-профилактическими бактериофагами, должны быть разрешены к медицинскому применению и использоваться в дозах, не вызывающих токсические, аллергические или иные нежелательные реакции у человека.

Питательные среды. Производственные питательные среды не должны содержать антибиотиков и компонентов, вызывающих аллергические или иные нежелательные реакции у человека. Питательные среды должны обладать хорошими ростовыми свойствами и быть стерильными. Сырье, реактивы и реагенты, используемые при производстве питательных сред, должны быть пригодны для соответствующих целей и их качество подтверждено документально.

1.2 Требования к производственным штаммам

Производственные штаммы бактерий – продуценты бактериофагов, выделяют от больных гнойно-септическими или кишечными инфекциями и получают из бактериологических диагностических лабораторий, расположенных в регионах реализации и потребления лечебно-профилактических бактериофагов. Коллекция производственных штаммов бактерий, используемых в производстве бактериофагов, должна ежегодно обновляться свежевыделенными штаммами от больных не менее, чем на одну треть.

Производственные штаммы бактерий должны обладать типичными для каждого вида морфологическими, культуральными, биохимическими и серологическими свойствами, не продуцировать энтеротоксины и не содержать умеренных бактериофагов. Оценку наличия индуцируемых профагов проводят обработкой бактерий индукторами (ультрафиолетовое излучение, митомицин С, налидиксовая кислота) с последующим контролем появления бляшек лизиса, вызванной активацией умеренных бактериофагов, содержащихся в геноме бактерии.

Производственные штаммы бактерий должны лизироваться маточными фагами в титрах по методу Аппельмана не менее, чем на 1-2 порядка выше показателей специфической активности конечного продукта. При этом стабильность лизиса должна сохраняться после 48 ч инкубирования при температуре 37 ^{o}C. Температурный режим и время инкубации зависят от специфических особенностей бактерий и их фагов.

Производственные штаммы бактерий хранят в специальных изолированных помещениях в лиофилизированном состоянии в ампулах при температуре 2–8 ^{o} С в течение 10 лет или в бактериологических пробирках с 0,4–0,7 % агаризованной питательной средой (на основе гидролизата Хоттингера, МПБ или других питательных сред в зависимости от специфических потребностей бактерий) под стерильным вазелиновым маслом, при температуре 2–8 ^{o} С при регулярном пересеве каждые 2–3 мес.

В качестве контрольных бактериальных штаммов не должны использоваться производственные штаммы бактерий, используемые для наработки соответствующих бактериофагов.

Маточные бактериофаги. Для получения фаговых препаратов используются только вирулентные бактериофаги. Их выделяют из природных источников – клинического материала, сточных вод, почвы, пассируя на штаммах целевых видов бактерий – свежевыделенных и производственных. Подбирают высоко активные расы (штаммы) фагов к слаболизирующимся и фагорезистентным штаммам бактерий. Пополнение производственных фаговых рас различными штаммами из природных источников позволяет преодолевать первичную фагоустойчивость возбудителей. Маточные бактериофаги должны включать вирулентные фаги с широким диапазоном действия по отношению к штаммам соответствующего вида бактерий, обладать высокой активностью, стабильностью лизиса, специфической направленностью антимикробного действия и высокой урожайностью. Характеристика кандидатных фаговых рас (штаммов) при отборе может быть дополнена электронно-микроскопическим изучением их морфологии и другими современными молекулярно-биологическими методами (полногеномное секвенирование с последующим биоинформационным анализом). Хранение производственной коллекции бактериофагов осуществляется в жидком состоянии при температуре от 2 до 8 ^{o}C в течение 5 лет с ежегодным пересевом на бактериальных штаммах или в лиофилизированном состоянии.

Расширение диапазона действия препаратов в отношении циркулирующих бактериальных возбудителей может быть достигнуто путем подбора фаговых рас из коллекции предприятия или из природных источников. Это обеспечивает возможность выпуска производственных серий бактериофагов целевого назначения. Например, при вспышке или очаге инфекции, обусловленной фагоустойчивым возбудителем, передача на производство

эпидемически значимого бактериального штамма позволит адаптировать препарат к конкретным эпидемиологическим условиям путем подбора к этому бактериальному штамму активных фаговых рас из коллекции производителя и последующего использования их при изготовлении препарата.

1.3 Основные этапы производства

Производственный процесс включает следующие основные этапы: работа с бактериальными возбудителями гнойно-септических и кишечных инфекций, подбор к ним вирулентных штаммов бактериофагов, отбор бактерий – продуцентов бактериофагов, получение маточных бактериофагов, культивирование производственных штаммов бактерий – продуцентов и маточных бактериофагов с целью получения биомассы бактериофагов и приготовление препаратов бактериофагов. Дополнительными методами очистки (ультрафильтрацией, афинной хроматографией и т.д.) должно быть обеспечено освобождение фаголизитов от продуктов жизнедеятельности бактерий, эндо и экзотоксинов, продуктов фаголизиса бактериальных клеток.

После завершения процесса фаголизиса бактериальной взвеси осуществляют стерилизующую фильтрацию фаголизатов. Затем очищают от бактериальных метаболитов и токсинов, компонентов питательной среды, далее фаголизаты подвергают концентрированию, полученные концентраты стерилизуют.

После концентрирования из фаголизатов готовят:

- жидкие препараты доводят до финального титра буферными растворами pH 6,0-8,0, стерилизуют и разливают в стерильные флаконы, укупоривают герметично и стерильно.

- получают лиофилизированную биомассу, используемую для получения таблеток, суппозиториев, мазей, линиментов и др.

1.4 Контроль качества в процессе производства

В процессе производства бактериофагов на разных этапах получают промежуточные продукты, которые должны соответствовать определенному уровню качества.

При подготовке производственных штаммов бактерий – контроль посевных культур бактериальных штаммов-продуцентов проводится:

а) на чистоту,

б) типичность биологических свойств,

в) на отсутствие легко индуцируемых профагов;

При подготовке маточных бактериофагов – контроль маточных бактериофагов проводится:

а) на содержание фаговых частиц в 1 мл, определяемое методом агаровых слоев по Грациа;

б) на специфическую активность, определяемую титрованием в жидкой питательной среде по методу Аппельмана на посевных бактериальных штаммах;

в) на стабильность лизиса (сохранность полученных результатов лизиса по методу Аппельмана) в течение 48 ч инкубации при температуре (37±1) ^{o}C. Температурный режим и время инкубации зависят от специфических особенностей бактерий и их фагов;

г) на стерильность.

По мере завершения очистки фаголизатов, концентрирования, стерилизующей фильтрации проводится определение показателей: pH, стерильность, специфическая активность по методу Аппельмана.

Для получения жидкого препарата после финальной стадии бактериофаг разливают по флаконам и укупоривают.

Для получения других лекарственных форм препаратов бактериофагов:

1) в концентрированный бактериофаг добавляют стабилизаторы и лиофилизируют. Сухую массу бактериофага контролируют в тестах на: а) специфическую активность и б) микробиологическую чистоту;

2) после добавления наполнителей осуществляются технологические процессы, соответствующие заданной лекарственной форме (таблетки, капсулы, суппозитории, линименты, мази).

3) готовый продукт контролируют по всем показателям, соответствующим лекарственной форме.

К специфическим методам исследования, используемым для характеристики лечебно-профилактических бактериофагов, относятся методы Аппельмана и Грациа.

1.5 Транспортирование и хранение

Транспортирование при температуре от 2 до 8 °С, допускается при температуре от 9 до 25 ^{o}С в пределах одного месяца.

Хранение в сухом, защищенном от света и недоступном для детей месте, при температуре от 2 до 8 °С в течение 1-2 лет. Однако, возможно расширение температурного режима хранения до 25°С при подтверждении активности препарата в течение заявленного срока годности.

2. Доклинические исследования лечебно-профилактических бактериофагов

Оценка возможности использования новых фаговых препаратов в лечебных целях должна проводиться с учетом современного знания о биологии, генетике и экологии бактериальных вирусов. В отчетах по доклиническим испытаниям лечебно-профилактических препаратов

бактериофагов должны быть представлены результаты изучения биологических свойств препарата (в том числе биологических свойств фаговых штаммов, включенных в его состав), результаты изучения эффективности фагового препарата при лечении экспериментальной бактериальной инфекции, безопасности (острой и хронической токсичности, аллергизирующих свойств).

2.1. Биологические свойства лечебно-профилактических бактериофагов

При конструировании препаратов используют вирулентные фаги природного происхождения. Исходной субстанцией лечебно-профилактических бактериофагов являются стерильные фильтраты фаголизатов соответствующих видов бактерий. Дополнительными методами очистки должно быть обеспечено их освобождение от продуктов жизнедеятельности бактерий, эндо и экзотоксинов, продуктов фаголизиса бактериальных клеток. Далее, очищенные концентрированные фаголизаты подлежат соответствующим технологическим процедурам в зависимости от вида конечного препарата (моно- или комбинированный) и его лекарственной формы. В состав препарата должны входить несколько штаммов (не менее 2-3) вирулентных фагов, биологические свойства каждого из них должны быть охарактеризованы.

2.1.1. Характеристика биологических свойств фаговых штаммов, включенных в состав лечебно-профилактического препарата бактериофагов

Бактериофаги должны иметь строго литический инфекционный цикл. Наиболее полной характеристикой, позволяющей всесторонне оценить наличие генов перехода в лизогенный цикл, факторов

вирулентности и токсинов, является определение полной последовательности генома бактериофага.

Экспериментальными признаками такой классификации могут служить определение морфологии вирусной частицы с помощью электронной микроскопии негативного контрастирования и ПЦР-типирование по наиболее консервативным генам, характерным для данной группы бактериофагов.

Каждый из фаговых штаммов, используемых в препарате, должен:

1) демонстрировать высокую специфическую литическую активность, выявляемую титрованием в жидкой питательной среде по методу Аппельмана;

2) иметь высокую концентрацию (количество бляшкообразующих единиц в 1 мл), определяемую методом агаровых слоев по Грациа;

3) обладать широким диапазоном литического действия на представительной коллекции бактериальных штаммов, музейных и изолированных от больных;

4) быть изучен с помощью молекулярно-генетических методов (полногеномного секвенирования) для определения его полной нуклеотидной последовательности ДНК с последующим биоинформационным анализом.

5) быть морфологически охарактеризован с помощью электронной микроскопии негативного контрастирования, что позволяет соотнести *de novo* выделенный бактериофаг с известными группами фагов, которые заведомо относятся к литическим и пригодным для терапевтического применения.

Другими характеристиками, которые должны быть определены для каждого фагового штамма, являются:

- частота генерации фагоустойчивых форм;

- длительность латентного периода в ходе инфекции;

- урожайность и величина выхода фаговых частиц из одной инфицированной бактериальной клетки.

Кроме того, должна быть представлена характеристика бактериального штамма, на котором проводится культивирование бактериофага. Штамм не должен содержать легко индуцируемых профагов, загрязняющих препарат. Оценку наличия индуцируемых профагов проводят обработкой бактерий индукторами (ультрафиолетовое излучение, митомицин С, налидиксовая кислота) с последующим контролем появления бляшек лизиса, вызванной активацией умеренных бактериофагов, содержащихся в геноме бактерии.

2.1.2. Характеристика основных биологических свойств лечебно-профилактических препаратов бактериофагов

Представленные материалы на препарат в целом, помимо характеристик на отдельные фаги, должны содержать следующую информацию:

1) специфическая литическая активность, определяемая по методу Аппельмана с использованием соответствующих бактериальных тест-штаммов (контрольных штаммов). Тест-штаммы (не менее 10), типичные по своим морфологическим, культуральным, биохимическим свойствам, не должны быть использованы при изготовлении препарата. Активность бактериофага по Аппельману выражается отрицательной степенью десяти, где степень указывает последнее разведение бактериофага в жидкой питательной среде, в котором рост бактериальной культуры визуально не наблюдается;

2) диапазон действия изучаемого препарата в отношении соответствующих ему видов бактериальных возбудителей инфекций,

выделенных от больных (не менее 70 % фагочувствительных штаммов), циркулирующих в современных условиях на различных территориях страны (не менее 3-х регионов);

3) стабильность препарата. Активность препаратов бактериофагов должна сохраняться в течение всего заявленного срока годности при регламентированной температуре хранения. Определение стабильности препарата (способность сохранять литическую активность бактериофага) проводят по методу Аппельмана.

При проведении исследования антимикробного действия бактериофагов необходимо обеспечение ряда условий, гарантирующих достоверность результатов, а именно:

- питательные среды для культивирования бактерий, на которых изучается антимикробное действие бактериофага, должны отвечать требованиям стандартности и воспроизводимости результатов;

- стандартность бактериальной нагрузки (посевной дозы) штаммов – мишеней для изучаемого бактериофага.

2.2. Определение эффективности

Эффективность фаговой терапии должна быть установлена на соответствующей модели экспериментальной инфекции. Изучение защитного действия фагового препарата проводится в отношении бактериального возбудителя, против которого разработан изучаемый препарат.

Экспериментальные животные

При изучении терапевтической эффективности используют различные виды животных: белые мыши и крысы, морские свинки, кролики. На первых этапах целесообразно использование белых мышей. В исследованиях *in vivo* на животных подтверждается антибактериальный эффект, выявленный в исследованиях *in vitro*.

Модели экспериментальной инфекции

Наиболее распространенной моделью является генерализованная инфекция (экспериментальный сепсис) белых мышей (массой 18-20 г, не менее 10 особей в каждой группе). Заражающая доза для каждого вида бактерий, устанавливается в предварительных опытах.

Способы заражения – внутривенное, внутрибрюшинное, подкожное или внутримышечное (два последних варианта при использовании высоковирулентных возбудителей).

Выбор других моделей экспериментальной инфекции зависит от специфики возбудителя, его тропности к тем или иным системам организма. Возможно моделирование хронической септикопиемии, пневмонии, пиелонефрита, менингита и менингоэнцефалита, других локализованных инфекционных процессов.

Порядок проведения исследования

После выявления эффективности препарата *in vivo* на этапе первичного скрининга, проводят исследования терапевтической эффективности по сравнению с антибактериальными препаратами (антибиотиками) той же направленности, что и изучаемый препарат. При оптимальной дозе введения определяется связь эффективности препарата с тяжестью инфекции (при различных инфицирующих дозах 1 LD_{50}, 2-4 LD_{50}, 10 LD_{50}, 100 LD_{50} и более в зависимости от возбудителя).

В зависимости от цели исследования проводится оценка:

- профилактической эффективности препарата – введение препарата за 1, 3, 6, 12, 24, и 48 ч до заражения;

- терапевтической эффективности препарата - введение препарата через 1, 3, 6, 12, 24, или 48 ч после заражения.

Исследования проводятся при различной кратности введения (однократно или повторно, в зависимости от модели). Традиционная модель фаготерапии – ежедневное внутрибрюшинное введение препарата с определенным содержанием фаговых частиц в вводимой дозе в течение 10-12 суток. В процессе исследования определяют минимальную эффективную дозу с учетом предполагаемой терапевтической дозы для человека в перерасчете на килограмм массы.

Каждое отдельное исследование включает два контроля:

- контроль гибели животных без лечения;

- контроль эффективности лечения (в сравнении с известным антимикробным препаратом – антибиотиком аналогичной направленности).

В качестве препарата сравнения можно использовать питательную среду, на которой приготовлен изучаемый препарат бактериофага.

Длительность наблюдения за животными зависит от особенности течения инфекции при конкретной нозологической форме.

Оценка эффективности

Оценка эффективности препарата бактериофага проводится по следующим показателям:

- сравнительная выживаемость и сроки гибели животных в контрольной и опытной группах;

- динамика освобождения от возбудителя в контрольной и опытной группах: в процессе лечения и по окончании проводят посев крови, органов с определением числа бактерий на 1 г;

- клиническим проявлениям (температура тела, изменение веса, состояние шерстяного покрова, поведенческие реакции);

- клинико-лабораторным показателям (клинический анализ крови, показатели анализа спинномозговой жидкости и др.);

- патоморфологические изменения органов и тканей в процессе лечения и по его окончании.

Результаты обрабатывают адекватными статистическими методами.

2.3. Безопасность

Препараты бактериофагов должны отвечать всем требованиям безопасности и не иметь бактериальных или иных токсических загрязнений. Современные технологии изготовления фаговых препаратов предусматривают высокую степень очистки от продуктов жизнедеятельности бактерий, эндо- и экзотоксинов, продуктов фаголизиса бактериальных клеток. Подтверждением этому могут быть исследования препаратов по определению бактериальных эндотоксинов, энтеротоксинов и др. в соответствии с особенностями изучаемого препарата.

Методы очистки препаратов должны быть подробно описаны, обоснованы и включены в отчеты по результатам доклинических исследований.

Подтверждение безопасности препаратов бактериофагов включает изучение токсичности (острой и хронической), местного и аллергизирующего действия.

Исследование токсичности

Определение токсичности фаговых препаратов проводят на белых мышах массой 18-20 г, каждая группа должна включать не менее 10 животных. Необходимость проведения гистологических исследований зависит от способности бактериальных штаммов, используемых при производстве бактериофагов, к токсинообразованию.

Оценка токсичности при однократном введении

Исследование острой токсичности проводится при однократном внутрибрюшинном введении фага в дозе, многократно превышающей максимальную разовую для человека в пересчете на единицу массы тела (100—200 раз). Максимальный объем – не более 1 мл. Срок наблюдения - не менее 7 суток после введения препарата. Животные не должны терять в весе, должны отсутствовать признаки заболевания и инфильтраты в месте введения препарата. В периферической крови опытных животных после введения бактериофага должны отсутствовать значительные изменения картины крови при сравнении с данными в контрольной группы. Необходимо проведение гистологических исследований внутренних органов животных.

Оценка токсичности при многократном введении

Изучение токсичности при многократном введении проводится при ежедневном внутрибрюшинном введении фага в течение 20 дней в дозе, максимально эквивалентной разовой дозе для человека в пересчете на единицу массы тела.

Наблюдения за животными проводят в течение всего периода введения и последующих 7 сут с ежедневной регистрацией массы тела животных, а также возможных клинических симптомов интоксикации. При исследовании периферической крови опытных животных после введения бактериофага не должны обнаруживаться значительные изменения в содержании лейкоцитов по сравнению с контрольной группой. Необходимо проведение гистологических исследований внутренних органов животных (не менее, чем по 5 особей) сразу после курса фаготерапии и после 7-дневного восстановительного периода

Определение местного действия бактериофага осуществляется в случае использования препаратов внутримышечно в дозе, предлагаемой

для применения. Оценку проводят на основании данных осмотра на протяжении всего срока введения препарата и последующих 7 сут.

Оценка аллергизирующих свойств

Большинство бактериофагов при первичном применении являются «нео-антигенами» для организма животных и человека, т.е. заранее имеющихся против них антител в организме нет. Экспериментально показано, что при однократном приеме фильтрата фаголизата иммунный ответ на присутствие фагов в организме незначителен и не влияет на терапевтический эффект фага. Отечественными исследователями доказано, что введение очищенных фаговых препаратов в терапевтических дозах в течение 15-20 дней не стимулирует образования антифаговых антител. Вместе с тем имеются данные, что при более длительном применении фага стимуляция адаптивной иммунной системы потенциально вероятна.

Изучение аллергизирующих свойств новых препаратов бактериофагов проводится в соответствии с традиционными методами исследования препаратов МИБП по определению гиперчувствительности немедленного типа (ГНТ) и гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ).

Фармакокинетика фаговых препаратов

Бактериофаги не подвергаются какому-либо специфическому метаболизму в макроорганизме. Результаты изучения особенностей циркуляции фаговых частиц при моделировании инфекционного процесса могут использоваться в качестве дополнительных данных по исследованию нового препарата.

3. Клинические исследования лечебно-профилактических бактериофагов

Поскольку фаговые препараты обладают строгой специфичностью действия, клинические испытания должны предусматривать только этиотропную антибактериальную терапию или профилактирование развития инфекций, обусловленных видами бактерий, соответствующими изучаемому препарату. В этой связи, клиническим наблюдениям обязательно предшествует работа по выявлению и сбору бактериальных возбудителей и определению их чувствительности к изучаемому фаговому препарату. На основании полученных результатов авторами может быть расширен диапазон действия препарата за счет его адаптации к устойчивым штаммам.

При организации клинических испытаний необходимо учитывать фагочувствительность штаммов, являющихся возбудителями инфекции, подлежащей лечению. При этом должна быть обеспечена полноценная материальная база для микробиологических исследований.

В настоящее время наибольшую социальную значимость приобрели гнойно-септические заболевания, связанные с пребыванием в стационарах. Все больше видов условно-патогенных бактерий становятся патогенными для ослабленных больных в госпитальных условиях. Для этих штаммов характерны множественная устойчивость к антибиотикам и нарастание вирулентности. Поэтому выбор клинической базы должен основываться на анализе этиологической структуры бактериальных инфекций. Эпидемиологически значимые штаммы, изолированные от больных, из смывов с медицинского оборудования или с объектов больничной среды, подлежат изучению на чувствительность к исследуемому фаговому препарату. Оптимальной моделью для клинических испытаний лечебно-профилактических

бактериофагов являются госпитальные инфекции. Изучаемый препарат бактериофагов должен лизировать возбудителей целевых инфекций.

Целью клинических исследований новых лечебно-профилактических препаратов бактериофагов является изучение их эффективности при различных нозологических формах бактериальных инфекций, а также их безопасность и переносимость пациентами с инфекцией различной локализации и степени тяжести.

В этой связи подлежат решению следующие задачи:

1. Определение клинической эффективности фагового препарата.

2. Определение микробиологической эффективности фагового препарата.

3. Определение безопасности и переносимости фагового препарата пациентами с различными проявлениями инфекции соответствующей этиологии при различной локализации и степени тяжести.

4. Отработка наиболее оптимальных доз, рациональных схем и длительности применения нового фагового препарата при различных нозоформах и степени тяжести изучаемой инфекции.

5. Сопоставление клинической и микробиологической эффективности и переносимости фагового препарата с антимикробными препаратами, применяемыми при терапии различных нозологических форм данной инфекции.

6. Отработка показаний к назначению исследуемого препарата и рекомендаций по его использованию в медицинской практике.

В качестве групп сравнения должны вестись наблюдения за больными с аналогичными заболеваниями соответствующей этиологии, нозоформами и степенью тяжести, получающими традиционную антимикробную терапию.

Дизайн исследования (методология)

Основанием для начала проведения клинических исследований (КИ) являются результаты отчета по доклиническому изучению нового фагового препарата, проведенные *in vitro* и на животных.

При планировании и составлении протокола КИ необходимы четкое описание методов выделения и идентификации возбудителей инфекции, оценка клинической значимости выделенных микроорганизмов, их количественная оценка с критериями интерпретации по результатам терапии, описание методов определения чувствительности бактерий к бактериофагам.

При планировании КИ нового фагового препарата необходимо предусмотреть следующее:

- основные (первичные) и второстепенные (вторичные) критерии клинической эффективности при каждой нозологической форме наблюдаемой инфекции;
- вид исследования (проспективное, двойное слепое, рандомизированное исследование в параллельных группах);
- рандомизация пациентов с указанием параметров, например, по тяжести, длительности заболевания, предшествующей антимикробной терапии;
- дозировка и режим введения, продолжительность курса;
- возможность сочетанного применения с базисной антибиотикотерапией, в первую очередь при выявлении нескольких видов бактериальных возбудителей (микстинфекция);
- условия отмены исследуемого препарата или прерывания клинических исследований.

Критерии включения пациентов в клинические исследования

Лечебно-профилактические бактериофаги являются антибактериальными препаратами узко специфической направленности,

подавляющими только целевых (гомологичных) возбудителей. Обязательным условием проведения испытаний является фагочувствительность бактериальных штаммов, вызвавших развитие инфекции.

Поскольку антибактериальное действие бактериофагов в отличие от антибиотиков развивается постепенно, для испытания фаговых препаратов в виде монотерапии целесообразно включение больных с нетяжелыми проявлениями изучаемой инфекции. При определенных условиях (по клиническим показаниям) у части наблюдаемых возможно совместное назначение бактериофагов и антибиотиков (в качестве базисной антибиотикотерапии). При этом аналогичная базисная антибиотикотерапия должна проводится в группе сравнения.

В клинические исследования включаются больные:

а) у которых выявленный возбудитель чувствителен к изучаемому препарату,

б) не получавшие антимикробные препараты по поводу данного заболевания или сопутствующих заболеваний,

в) начавшие получать антимикробную терапию (не более одной дозы) до включения в исследование через 2-3 дня по прошествии (кроме антибиотиков с коротким курсом – менее 3 суток).

Критериями невключения для клинических исследований новых фаговых препаратов являются анамнестические данные о серьезных неблагоприятных лекарственных реакциях, в том числе какие-либо аллергические проявления, а также тяжелые сопутствующие соматические заболевания. Беременность и лактация не являются противопоказаниями, поскольку бактериофаги являются вирусами бактерий и по определению не обладают тропизмом к клеткам других организмов. Накопленный в течение длительного временного периода

успешный опыт использования лечебно-профилактических бактериофагов при лечении гнойно-воспалительных заболеваний у беременных и кормящих (лактирующих) женщин свидетельствует о безвредности этих препаратов для данной категории пациентов.

Первую фазу клинических исследований проводят для определения реактогенности и безопасности нового лечебно-профилактического фагового препарата для человека, как правило, на здоровых добровольцах, однако может быть получено разрешение на ограниченные исследования у пациентов с нетяжелыми проявлениями инфекции, вызванной бактериальным возбудителем, гомологичным фаговому препарату.

В ходе клинических испытаний первой фазы должны контролироваться клинические и лабораторные данные для выявления нежелательных реакций (НР). В число обследований, как правило, должны входить развернутый клинический анализ крови, клинический анализ мочи. Кроме того, необходима микробиологическая диагностика инфекционного заболевания с количественной характеристикой и определением фагочувствительности возбудителя, предваряющая назначение препарата. Включение пациента в группу наблюдения возможно лишь при выявлении чувствительности бактериального штамма к изучаемому препарату.

После завершения клинических испытаний первой фазы и подтверждения безопасности нового фагового препарата следует продолжение клинических испытаний второй фазы.

Вторую фазу клинических испытаний проводят в виде контролируемых наблюдений за больными с нетяжелыми проявлениями инфекции, вызванной бактериальным возбудителем, чувствительным к изучаемому фаговому препарату. При формировании групп следует

учитывать, чтобы у пациентов не было серьезных сопутствующих заболеваний. Изучение эффективности препарата проводят в сопоставлении со стандартными антибактериальными препаратами для лечения данной инфекции. В качестве препаратов сравнения используют антибиотики.

В ходе проведения клинических испытаний второй фазы отрабатываются дозировка и продолжительность курса в зависимости от нозологической формы или от степени тяжести. При этом должны контролироваться клинические и лабораторные данные, в том числе развернутый клинический анализ крови, клинический анализ мочи. Кроме того, необходима микробиологическая диагностика инфекционного заболевания с количественной характеристикой и определением чувствительности возбудителя к исследуемому фаговому препарату и антибиотикам. Эти исследования проводят перед началом и по окончании наблюдения.

Проводится анализ состояния пациентов в течение 3-4 недель после завершения курса фаготерапии и базисной антимикробной терапии в основной и контрольной группах для определения окончательного (отдаленного) клинического и микробиологического исхода лечения и выявления отдаленных НР. Следует обратить особое внимание на возможность формирования устойчивости возбудителей к антимикробным препаратам (в первую очередь антибиотиков, так как для фаговых препаратов это маловероятно).

Третью фазу клинических испытаний проводят после успешно прошедших КИ второй фазы, в виде расширенных контролируемых наблюдений, главной целью которых служит оценка эффективности и безопасности нового фагового препарата в условиях, максимально приближенных к клинической практике.

Наблюдению подлежат большие группы пациентов (от нескольких сот). В протоколе необходимо указать, какие действия следует предпринять в случае неэффективности фаготерапии, а именно определенные диагностические исследования, коррекция антибактериальной терапии или раскрытия кода рандомизации, если это необходимо в сложившейся клинической ситуации.

Четвертую фазу клинических испытаний проводят после регистрации препарата. По своей организации они подобны КИ третьей фазы и проводятся для оценки клинической эффективности препарата или решения отдельных аспектов (например, фармакоэкономические преимущества определенных аспектов фаготерапии) на большой и разнородной популяции пациентов.

Все клинические исследования, в том числе КИ третьей и четвертой фазы, предполагают наблюдения за больными с различными проявлениями инфекции, вызванной бактериальным возбудителем, чувствительным к изучаемому фаговому препарату.

Критерии определения эффективности лечебно-профилактических бактериофагов

При клинических испытаниях оценивается как лечебная, так и микробиологическая эффективность препарата, поэтому в протоколе необходимо подробно изложить принципы оценки результатов.

Лечебная эффективность предполагает три категории:

1. Эффективность – полное исчезновение всех субъективных и объективных клинических признаков заболевания; уменьшение клинических проявлений или отсутствие прогрессирования по данным объективных исследований.

2. Неэффективность – ухудшение состояния, нарастание всех субъективных и объективных клинических признаков заболевания, появление новых симптомов, летальный исход.

3. Невозможно оценить – выход из исследования по каким-либо причинам, в том числе летальный исход во время проведения исследований, не относящихся к данному заболеванию.

Обязательно используются показатели лабораторных исследований.

Определение микробиологической эффективности

Микробиологическая эффективность оценивается после завершения курса фаготерапии и через 3-4 недели после проведения курса лечения при последующем наблюдении за пациентом. Возможны следующие оценки результатов терапии:

1. Элиминация возбудителя – прекращение высева (выявления) возбудителя из очага первичной локализации инфекции.

2. Снижение уровня присутствия возбудителя в биологическом материале из очага первичной локализации инфекции. Значительное снижение – на 2-3 порядка и более – свидетельствует о наличии микробиологической эффективности.

3. Смена возбудителя или суперинфекция.

4. Колонизация – обнаружение новых микроорганизмов, отличающихся от первоначального возбудителя, в местах первичной локализации инфекции или в других биотопах при отсутствии признаков активного инфекционного процесса.

При наличии микст-инфекции, вызванной двумя или несколькими бактериальными агентами, микробиологическая эффективность оценивают по каждому виду отдельно.

По остальным позициям («Оценка безопасности», «Нежелательные реакции», «Методы анализа и представленных данных») анализ материала проводится согласно требованиям правил надлежащей клинической практики Союза.