

DOI: 10.30906/2073-8099-2023-15-2-29-39

С. Г. Аббасова^{1,2}, О. М. Стрижакова¹, И. В. Лягоскин¹, А. П. Васильев¹,
О. М. Лисицына¹, М. С. Пантюшенко¹, К. В. Ульянова¹, В. М. Симонов¹,
А. Ф. Габдрахманова¹, И. А. Кирик¹, Г. Н. Порошин¹, Р. А. Хамитов¹

СОПОСТАВИМОСТЬ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ РАЗРАБАТЫВАЕМОГО БИОАНАЛОГИЧНОГО ПРЕПАРАТА GNR-069 И РЕФЕРЕНТНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ЭНПЛЕЙТ® *IN VITRO*

Поступила в редакцию 28.02.2023. Принята к печати 10.04.2023.

Анализ сопоставимости функциональных свойств разрабатываемого биоаналогичного продукта и референтного препарата является необходимым этапом разработки на стадии неклинических исследований. Представлены результаты сравнительного исследования и приведены доказательства сопоставимости основных функциональных свойств разрабатываемого биоаналогичного препарата GNR-069 на основе ромиплостима (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия) и референтного препарата Энплейт® (Amgen Inc., США). Выводы о сопоставимости критических функциональных свойств препаратов основаны на определении границ диапазонов качества, рассчитанных по показателям исследованных серий референтного препарата.

Ключевые слова: GNR-069, Энплейт®, ромиплостим, биоаналог, референтный препарат.

Необходимым этапом разработки на стадии неклинических исследований является анализ сопоставимости основных функциональных биологических свойств разрабатываемого биоаналога и референтного препарата с помощью большого набора методов, включающих ортогональные подходы изучения свойств биологических макромолекул [1 – 4]. Российская компания АО «ГЕНЕРИУМ» разрабатывает препарат GNR-069 на основе ромиплостима как биоаналог референтного лекарственного препарата Энплейт® (Amgen Inc., США).

Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТП, или первичная иммунная тромбоцитопения) — аутоиммунное заболевание, характеризующееся низким содержанием тромбоцитов вследствие их повышенной деструкции фагоцитозом, комплемент-опосредованным или Т-клеточным лизисом, обусловленным образованием к ним антител. При ИТП страдают также мегакариоциты и их предшественники, поскольку аутоантитела связываются с ними в ко-

стном мозге и ингибируют процесс созревания [5 – 7]. ИТП относится к редким или орфанным заболеваниям: заболеваемость в мире составляет 1,6 – 3,9 случаев на 100 тыс. населения в год, распространенность колеблется от 4,5 до 20 случаев на 100 тыс. населения. Болезнь встречается как у детей, так и у взрослых, но чаще заболевают люди от 20 до 40 лет. Девушки и женщины страдают ИТП в несколько раз чаще, чем юноши и мужчины. В 1-й линии терапии ИТП используют кортикостероиды и внутривенное введение человеческих иммуноглобулинов. В тяжёлых случаях во 2-й линии терапии применяют хирургическую спленэктомию. Терапию агонистами рецепторов тромбопоэтина (ТРО), в частности, препаратом Энплейт®, назначают при отсутствии эффективности терапии 1-й линии и при отказе или невозможности проведения спленэктомии [8].

ТРО является основным гормоном, регулирующим тромбопоэз у человека и животных, который при связывании с рецептором (ТРО-R, или белок миелопролиферативной лейкемии, c-Mpl) запускает каскад внутриклеточных событий, приводящих к пролиферации и дифференцировке предшественников мегакариоцитов, созреванию мегакариоцитов и производст-

¹ АО «ГЕНЕРИУМ», 601125 Россия, Владимирская область, Петушинский район, пос. Вольгинский, ул. Владимирская, 14.

² abbasova@ibcgenerium.ru

ву тромбоцитов [9, 10]. ТРО быстро выводится из кровотока при связывании со зрелыми тромбоцитами, поэтому его концентрация обратно пропорциональна общему количеству тромбоцитов [11, 12]. Применение рекомбинантного ТРО для лечения тромбоцитопении не нашло применения в клинической практике из-за образования нейтрализующих антител, перекрёстно реагирующих с эндогенным ТРО, что приводило к ещё более тяжёлым формам заболевания [13]. В связи с этим были разработаны препараты-агонисты ТРО-R 2-го поколения на основе пептидов-миметиков ТРО, не имеющих с ним структурной гомологии, что исключало возможность образования нейтрализующих антител к эндогенному гормону [13 – 17].

Ромиплостим состоит из Fc-фрагмента человеческого иммуноглобулина IgG1, слитого на C-конце с 2 идентичными пептидами-миметиками ТРО, соединёнными между собой полиглициновым линкером. Ромиплостим несёт 4 центра связывания ТРО-R, что обеспечивает аффинность связывания, сравнимую с показателем природного ТРО, а Fc-фрагмент увеличивает период полувыведения молекулы из кровотока до 120 – 140 ч за счёт взаимодействия с рецептором FcRn [12, 18, 19].

Цель работы — анализ сопоставимости функциональных свойств нескольких опытно-промышленных серий разрабатываемого и коммерческих серий референтного препаратов в сравнительном исследовании *in vitro*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили опытно-промышленные серии тестируемого препарата (ТП) GNR-069 (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия) и коммерческие серии референтного препарата (РП) Энплейт® (Amgen Inc., США). Доказательство сопоставимости критических атрибутов качества в силу ограниченного количества сравниваемых серий разрабатываемого биоаналога GNR-069 и РП Энплейт® основывалось на расчёте диапазонов качества РП в соответствии с современными рекомендациями международных регуляторов [4, 20]. РП Энплейт® — порошок для приготовления раствора для подкожного введения, 250 мкг. В работе использовали следующие серии: 1096816А, дата выпуска 02.2018 г., годен до 02.2023 г.; 1098195А, дата выпуска 10.2017 г., годен до 10.2022 г.; 1100215А, дата выпуска 10.2017 г., годен до 10.2022 г.; 1069332А, дата выпуска 02.2015 г., годен до 02.2020 г.

ТП GNR-069 — порошок для приготовления раствора для подкожного введения, 250 мкг.

В работе использовали следующие серии: 0010690419, дата выпуска 04.2019 г., годен до 05.2024 г.; 0020690419, дата выпуска 04.2019 г., годен до 05.2024 г.; 0030690519, дата выпуска 05.2019 г., годен до 06.2024 г.

Для подготовки серий препаратов к исследованиям к содержимому флаконов прибавляли по 0,72 мл воды и осторожно перемешивали до полного растворения, концентрация ромиплостима во флаконах после восстановления лиофилизата составляла около 0,5 мг/мл.

Для получения клеточной линии Ва/Ф3-ТроR-2С7 клетки мышинной линии Ва/Ф3 трансфицировали с помощью электропорации плазмидой, несущей ген *ТроR* человека и ген устойчивости к пуромицину. После селекции и стабилизации тотального пула клеток в селективной среде RPMI-1640, содержащей 10 % (v/v) ФБС (GE Healthcare, кат. № SV30160), 10 нг/мл мышинового IL-3 (R&D, кат. № 403-ML-025/CF), 2 мМ L-глутамин и 0,75 мкг/мл пуромицина (Sigma-Aldrich, кат. № P7255), клонировали методом лимитирующих разведений. После отбора клонов получали линию клеток Ва/Ф3-ТроR-2С7. Экспрессию ТРО-R человека на поверхности клеток подтверждали с помощью проточной цитометрии.

Для выделения тромбоцитов человека гепаринизированную кровь условно здоровых доноров центрифугировали при 200g в течение 20 мин при 20 °С, отбирали обогащённую тромбоцитами плазму, разбавляли в 2 раза PBS (pH 7,2) и центрифугировали в течение 20 мин при 100g при температуре 20 °С без торможения. Супернатант центрифугировали при 800g в течение 20 мин при 20 °С без торможения. Осажденные тромбоциты осторожно суспендировали в среде ADCF-Mab (HyClone®, кат. № SH30349.02) и использовали свежеприготовленными.

Для анализа ромиплостим-индуцированной пролиферации клеток линии Ва/Ф3-ТроR-2С7 клетки трижды отмывали от ростовой среды, готовили суспензию ($3 \cdot 10^4$ кл/мл) в среде для тестирования DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, кат. № D8900-10X1L), содержащей 2 мМ L-глутамин и 0,75 мкг/мл пуромицина, и вносили по 100 мкл в лунки 96-луночного плоскодонного планшета. Разведения серий ТП GNR-069 и РП Энплейт® в среде для тестирования в диапазоне от 4000 до 78 732 000 раз (концентрации ромиплостима в диапазоне от 525 до 0,026 пМ) вносили в трипликатах по 100 мкл на лунку. Серию РП 1098195А использовали в качестве стандартного образца (СО), для каждого планшета делали отдельную серию разведений СО. План-

шеты инкубировали при 37 °С в атмосфере 5,0 % CO₂ и влажности около 95% (стандартные условия). Через 72 ч вносили по 30 мкл ХТТ-реагента (AppliChem GmbH, кат. № А8088.1000) и инкубировали дополнительно в течение 24 ч. Оптическую плотность (ОП) измеряли на планшетном спектрофотометре Tecan Infinite M200 (Tecan Austria GmbH) при длине волны 492 нм (референсная длина волны — 690 нм). Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 6.0 (США), аппроксимируя зависимость значений ОП от десятичного логарифма разведений 4-параметрической функцией «доза – ответ». Относительную активность (RSA, %) тестируемых серий (ИО) GNR-069 и РП Энплейт® вычисляли по формуле:

$$RSA, \% = 100 \% \cdot \frac{EC_{50}(CO)}{EC_{50}(ИО)}$$

Ромиплостим-индуцированное фосфорилирование тирозинкиназы JAK2 в тромбоцитах человека. Суспензии тромбоцитов от 3 доноров вносили по 100 мкл в лунки 96-луночных круглодонных планшетов. Серии ТП GNR-069 и РП Энплейт® разводили средой ADCF-Mab (HyClone, кат. № SH30349.02) от 2100 до 8 601 600 раз (концентрации ромиплостима в диапазоне от 1000 до 0,24 пМ) и вносили в 2 повторностях по 100 мкл в лунки с тромбоцитами. Планшеты инкубировали при 20 °С в течение 15 мин, затем вносили раствор 10 % (v/v) тригона X-100 (Sigma-Aldrich, кат. № X100 – 500ML) по 30 мкл в лунку и далее инкубировали на льду в течение 30 мин. Концентрацию фосфорилированной тирозинкиназы JAK2 в лизатах тромбоцитов определяли с помощью набора Invitrogen JAK2 (Phospho) [pY1007/pY1008] (Human ELISA Kit). Измеряли ОП на планшетном спектрофотометре Tecan Infinite M200 при длине волны 450 нм. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 6.0, аппроксимируя зависимость значений ОП от десятичного логарифма разведений 4-параметрической функцией «доза – ответ».

Конкурентный анализ связывания ромиплостима с экстраклеточной частью TPO-R в присутствии TPO. Рекомбинантный экстраклеточный домен TPO-R человека в концентрации 0,5 мкг/мл в карбонат-бикарбонатном буферном растворе (КББР), рН 9,6, вносили в лунки ИФА планшета по 100 мкл и инкубировали при 2 – 8 °С в течение 16 – 18 ч. Остаточные центры связывания блокировали 1 % (w/v) раствором бычьего сывороточного альбумина

(БСА) в PBS, содержащем 0,05 % (v/v) Tween 20 (БСА-PBST). После отмывки вносили по 50 мкл образцов ромиплостима в PBST в концентрации 0,025 мкг/мл и по 50 мкл разведений рекомбинантного TPO (R&D Systems, кат. № 288-TP) в PBST в диапазоне концентраций от 0,11 нг/мл до 20 мкг/мл. Серию РП 1100215А использовали в качестве СО, для каждого планшета делали отдельную серию разведений СО. Планшеты инкубировали при 2 – 8 °С в течение 16 – 18 ч. Комплекс ромиплостима и TPO-R выявляли с помощью поликлональных антител против иммуноглобулинов G человека, конъюгированных с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, кат. № А8667) и субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (НПО «Биотест Системы», Россия, кат. № ТМВ-100). Измеряли ОП на планшетном спектрофотометре Tecan Infinite M200 при длине волны 450 нм. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 6.0, аппроксимируя зависимость значений ОП от десятичного логарифма концентраций TPO 4-параметрической функцией. RSA ИО ТП GNR-069 и РП Энплейт® вычисляли по формуле:

$$RSA, \% = 100 \% \cdot \frac{IC_{50}(CO)}{IC_{50}(ИО)}$$

Кинетические характеристики взаимодействия ромиплостима с рекомбинантным экстраклеточным доменом TPO-R определяли методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) на приборе Biacore 8k, Cytiva. На поверхности сенсора CM5 (GE, кат. № BR100530) в рабочих ячейках задействованных каналов ковалентно иммобилизовали антитела к иммуноглобулинам человека (Human Antibody Capture Kit, GE, кат. № BR100839). ИО ромиплостима в буферном растворе HBS-EP+, рН 7,4 (GE, кат. № BR100669) в концентрации 30 нмоль/л подавали только в рабочие ячейки, затем во все ячейки подавали TPO-R в возрастающих концентрациях от 1,56 до 100 нМ (скорость подачи 30 мкл/мин, время контакта каждого раствора 90 с) без промежуточных регенераций. Время диссоциации составляло 60 с при 37 °С. Для каждой исследуемой серии проводили по 3 независимых измерения. Константы скоростей реакций ассоциации и диссоциации и равновесные константы диссоциации (KD) вычисляли с помощью установленного программного обеспечения Biacore Insight Evaluation 3.0.12 в модели Лэнгмюра (1 к 1).

KD комплексов ромиплостима с рекомбинантными Fcγ рецепторами человека — FcγRn,

CD16, CD32 и CD64 — определяли методом ППР на приборе Biacore 8k, Cytiva. На поверхность сенсора CM5 (GE, кат № BR100530) ковалентно иммобилизовали антитела против гексагистидинового последовательности (GE, кат № 29234602). Fcγ рецепторы специфично и обратимо иммобилизовали на поверхности ячейки № 2; ячейку № 1 использовали для контроля специфичности взаимодействия. Ромиплостим подавали в обе ячейки каналов в возрастающих концентрациях. Измеряли в 2 повторностях при 30 °С в режиме многоциклового анализа с полной регенерацией и последующей иммобилизацией Fcγ рецепторов после каждого цикла. Условия проведения анализа представлены в табл. 1. KD вычисляли с помощью установленного программного обеспечения Biacore Insight Evaluation 3.0.12 как концентрации ромиплостима, соответствующие половине максимального сигнала (RU).

Связывание с C1q. Серийные разведения образцов ромиплостима в КББП сорбировали в лунках ИФА планшетов в диапазоне разведений от 5 до 5120 раз (диапазон концентраций от 1800 до 2 нМ) в 2 повторностях в течение 18 ч при 2 – 8 °С. После отмывки блокировали остаточные центры связывания раствором БСА-PBST, вносили компонент системы комплекта человека C1q (QUDEL, Port A400) в PBST в концентрации 2,8 мкг/мл и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С и постоянном перемешивании. После отмывки инкубировали с конъюгатом антител к белку C1q с пероксидазой хрена (Abscam, ab 46191), а затем с субстратом (3,3',5,5'-тетраметилбензидин). Измеряли ОП на спектрофотометре xMark (Bio-Rad) при длине волны 450 нм. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения

GraphPad Prism 6.0, аппроксимируя зависимость значений ОП от логарифма концентраций ромиплостима 4-параметрической функцией.

Антителозависимая цитотоксичность. Подготовка эффекторных клеток (ЭК). Фракцию мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) условно здоровых доноров выделяли на градиенте фиколла ($\rho=1,077$ г/см³) (ПанЭко, кат. № 17-06) и освобождали от моноцитов инкубацией в полной ростовой среде DMEM/F/12 с 10 % (v/v) ФБС, 2 мМ L-глутамин, 100 Ед/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина в течение 4 ч в стандартных условиях. Далее суспензии МКПК в концентрации $2 \cdot 10^6$ кл/мл инкубировали в ростовой среде, содержащей рекомбинантный IL-2 человека (Gibco, кат. № PHC0023) в концентрации 5 нг/мл, в течение 48 ч в стандартных условиях. После отмывки ресуспендировали МКПК в среде ADCF-Mab ($4 \cdot 10^6$ кл/мл) и вносили по 50 мкл на лунку.

Подготовка клеток-мишеней (КМ). Клетки Ва/F3-ТроR-2C7 и CD20-позитивной человеческой линии Raji (ATCC®, кат. № CCL-86™) инкубировали в 100 нМ раствора кальцеина (Molecular Probes, кат. № C3100MP) в течение 40 мин в стандартных условиях. Затем клетки трижды отмывали от свободного кальцеина, доводили плотность до 2×10^5 кл/мл средой ADCF-Mab, добавляли 1/100 объема 100X раствора пробенецида (Thermo Fisher Scientific, кат. № P36400) и вносили по 100 мкл на лунку.

Подготовка разведений серий ТП и РП и ритуксимаба. Серии изучаемых препаратов последовательно разводили средой ADCF-Mab (диапазон разведений от 714 до 520506 раз, диапазон концентраций от 3000 до 4 пМ). Гото-

Таблица 1. Условия экспериментов по определению KD комплексов ромиплостима и Fcγ рецепторов человека

Fcγ рецептор	Компания-производитель, кат. №	Концентрация рецептора, нМ	Время ассоциации / диссоциации, с	Концентрация ромиплостима, нМ					
				1	2	3	4	5	6
FcRn, pH 6,0	Sino Biologicals, ST009-H08H-50	109	90 / 180	4,1	12,4	37,0	111,1	333,3	1000,0
FcγRIIIa (CD16a)	ACROBIOSYSTEMS, CD8-H5222	500	90/120	58,0	174,1	522,2	1566,7	4700,0	—
FcγRIIIb (CD16b)	ACROBIOSYSTEMS, CDB-H5222	500	90/120	58,0	174,1	522,2	1566,7	4700,0	—
FcγRI (CD64a)	Sino Biologicals, 10256-H27H-B-50	220	120/600	2,5	7,4	22,2	66,7	200,0	—
FcγRIIa (CD32a)	ACROBIOSYSTEMS, CDA-H5221	500	60 / 60	111,1	333,3	1000,0	3000,0	9000,0	—
FcγRIIb (CD32b/c)	ACROBIOSYSTEMS, CDB-H5228	500	60 / 60	111,1	333,3	1000,0	3000,0	9000,0	—

вили серийные разведения ритуксимаба (АО «ГЕНЕРИУМ») в среде ADCF-Mab (диапазон концентраций от 3000 до 0,07 пМ). Каждое разведение препаратов и ритуксимаба вносили в трипликатах по 50 мкл в лунки 96-луночного плоскодонного планшета. Контроли теста: 1) КМ и ЭК (MFI_{min} — выход кальцеина из КМ, обусловленный цитолизом ЭК); 2) КМ, ЭК и тритон X-100 (MFI_{max} — контроль полного лизиса). Планшеты инкубировали в стандартных условиях в течение 3 ч, в контрольные лунки полного лизиса вносили по 20 мкл 10 % (v/v) раствора тритона X-100 и продолжали инкубацию в течение 1 ч. Затем планшеты центрифугировали в течение 5 мин при 1300 об/мин и переносили по 120 мкл супернатанта в планшеты из непрозрачного белого пластика. Флуоресценцию измеряли на планшетном спектрофотометре Tecan Infinite M200 при длинах волн возбуждения 488 нм и эмиссии 518 нм. Эффективность лизиса рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ лизиса КМ} = 100\% \cdot \frac{\text{MFI}_{\text{exp}} - \text{MFI}_{\text{min}}}{\text{MFI}_{\text{max}} - \text{MFI}_{\text{min}}},$$

где MFI_{exp} — сигнал флуоресценции в экспериментальной лунке.

Обработывали данные с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 6.0 с использованием 4-параметрической логистической функции «доза – ответ».

Комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC). Разведения образцов ромиплостима и ритуксимаба в полной ростовой среде в диапазоне молярных концентраций от 200 до

0,0128 нМ вносили в лунки 96-луночных плоскодонных планшетов в трипликатах по 50 мкл. Затем вносили по 50 мкл суспензий КМ Ва/Ф3-ТроR-2С7 или WIL2-S (ATCC®, кат. № CRL-8885™) с плотностью $2 \cdot 10^6$ кл/мл в полной ростовой среде и инкубировали в течение 30 мин в стандартных условиях. Затем вносили по 100 мкл полной ростовой среды, содержащей 10 % (v/v) нормального комплемента сыворотки человека и реагент PrestoBlue (Life Technologies, кат. № A-13261) и инкубировали в течение 24 ч в стандартных условиях. Интенсивность флуоресценции измеряли на планшетном спектрофотометре Tecan Infinite M200 при длинах волн возбуждения 560 нм и эмиссии 590 нм. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 6.0 с использованием 4-параметрической логистической функции «доза – ответ».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подходы к доказательству схожести свойств ТП и РП, содержащие в качестве действующего вещества рекомбинантный белок, отличаются от подходов, используемых для доказательства биоэквивалентности малых терапевтических молекул [1, 2, 4]. Белковые биополимеры обладают сложной структурой и несут множественные посттрансляционные модификации, поэтому воспроизведенные рекомбинантные белки не являются точной копией и могут отличаться от референтного продукта. Современные руководства по изучению сопоставимости рекомендуют ранжировать изучаемые свойства по кри-

Таблица 2. Атрибуты качества ромиплостима, степень их влияния на эффективность и безопасность

Изучаемое свойство	Метод исследования	Влияние	
		на эффективность	на безопасность
Антигенсвязывающие свойства			
Индукция пролиферации клеток линии Ва/Ф3-ТроR-2С7, экспрессирующих ТроR человека	Биотест	Очень высокое	Низкое
Индукция активации тирозинкиназы JAK2 в тромбоцитах человека	Биотест и ИФА	Умеренное	Низкое
Конкуренция с ТРО за связывание с ТроR человека	ИФА	Высокое	Низкое
Кинетические параметры взаимодействия с рекомбинантным ТРО-R	ППР	Очень высокое	Высокое
Fc-опосредованные свойства			
Кинетические параметры взаимодействия с Fcγ рецепторами человека	ППР	Низкое	Высокое
Связывание с компонентом системы комплемента человека C1q	ИФА	Низкое	Умеренное
ADCC	Биотест	Низкое	Умеренное
CDC	Биотест	Низкое	Умеренное

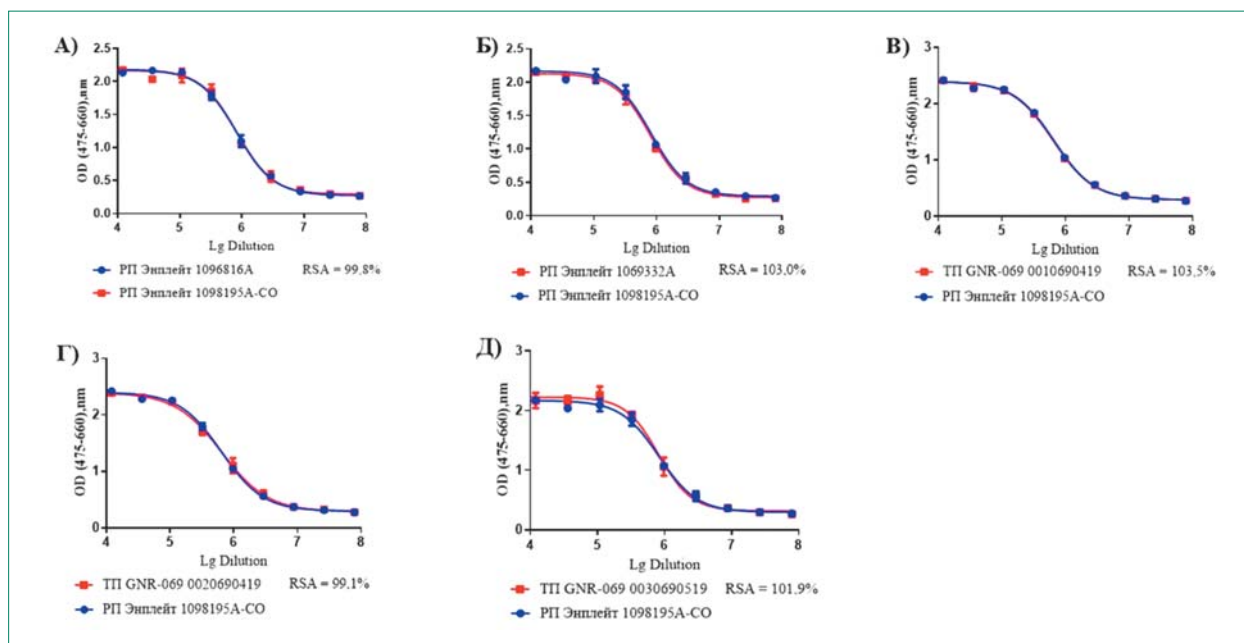


Рис. 1. Графики зависимости ОП от логарифма разведений серий РП Энплейт® и ТП GNR-069 в тесте ромиплостим-индуцированной пролиферации мышинных клеток Ва/Ф3-ТроR-2С7, экспрессирующих рецептор ТРО человека. График анализа серии РП Энплейт 1096816А (А), серии РП Энплейт 1069332А (Б); серии ТП GNR-069 0010690419 (В); серии ТП GNR-069 0020690419 (Г); серии ТП GNR-069 0030690519 (Д).

тичности их влияния на эффективность и безопасность при клиническом применении и в соответствии с этим использовать разные подходы для доказательства сопоставимости свойств разрабатываемого биотехнологического биоаналога и РП.

В табл. 2 представлены антигенсвязывающие и Fc-опосредованные функциональные свойства ромиплостима, которые были изучены в сравнительном исследовании 2 препаратов. Для строгой оценки сопоставимости атрибутов качества препарата, оказывающих первостепенное влияние на эффективность и безопасность, рекомендован тест эквивалентности [4]. Однако для его обоснованного применения требуется не менее 6 серий каждого препарата в силу очень низкой статистической мощности такого подхода при анализе меньшего количества сравниваемых серий [20].

В силу ограниченного количества серий ТП и РП доказательство сопоставимости свойств основывали на другом рекомендованном подходе – диапазоне качества (ДК) РП [4]. Границы ДК определяют как среднее значение показателей серий РП +/- несколько (X) стандартных отклонений (SD). Значение множителя X определяется критичностью исследуемых свойств – чем выше критичность, тем меньше должно быть значение X. Значение X определяется исследователем и должно быть научно обосновано. Для атрибутов качества, оказывающих уме-

ренное влияние на эффективность и безопасность, значение множителя X определяли как 3, а для расчёта границ ДК критичных атрибутов качества значение X определили как 2. Сопоставимость свойств считали доказанной, если соответствующие показатели серий ТП GNR-069 входили в границы ДК РП Энплейт®.

Все полученные значения показателей ДК РП Энплейт® логарифмировали и вычисляли границы ДК, после чего границы ДК снова выражали в исходных обозначениях анализируемых показателей. Результаты сравнительного исследования активности серий изучаемых препаратов в индукции пролиферации клеток Ва/Ф3-ТроR-2С7 представлены на рис. 1 и в табл. 3. Для оценки сопоставимости пролиферативной активности использовали значения относительной пролиферативной активности (RSA, %), а не значения полумаксимального эффективного разведения (EC_{50}), поскольку анализ выполняли на нескольких планшетах, а значение EC_{50} может варьировать между планшетами даже для одного и того же образца и в условиях одного аналитического цикла в силу вариабельности, вносимой, прежде всего, пробоподготовкой и выполнением остальных стадий анализа.

Изучаемые препараты были сопоставимы по способности вызывать пролиферацию клеток, экспрессирующих ТРО-R, в тесте *in vitro*, релевантно отражающем механизм действия

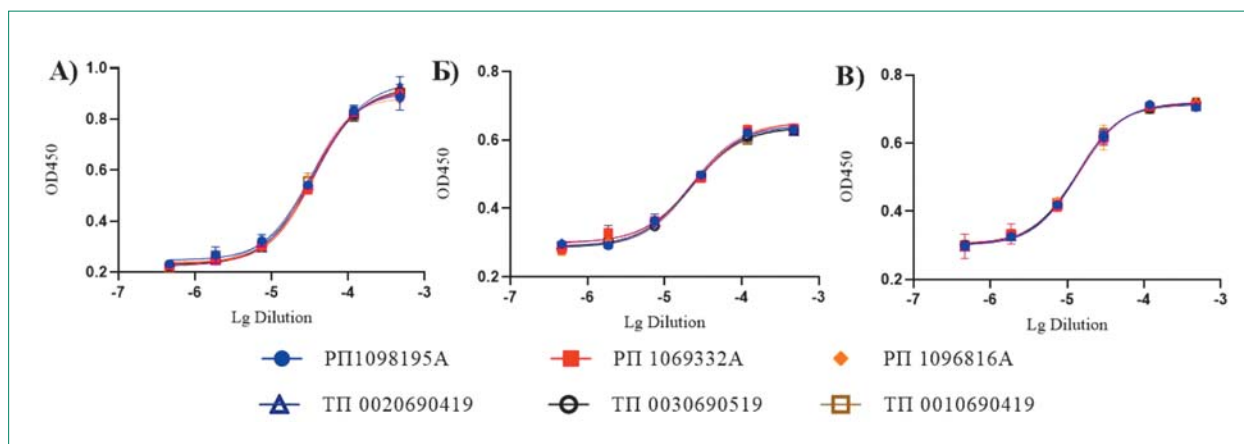


Рис. 2. Графики зависимости ОП от логарифма разведений серий РП Энплейт® и ТП GNR-069 в тесте ромиплостим-индуцированного фосфорилирования тирозинкиназы JAK2 в тромбоцитах условно здоровых доноров № 1 (А), № 2 (Б) и № 3 (В).

препаратов-агонистов рецептора ТРО при клиническом применении.

Ромиплостим после связывания с ТРО-R на мегакариоцитах и их предшественниках может запускать несколько путей передачи сигнала — через активацию тирозинкиназы JAK2 и транскрипционного фактора STAT5 (основной), а также через активацию киназ ERK1/2 и АКТ [12]. Способность изучаемых препаратов запускать фосфорилирование тирозинкиназы JAK2 изучали *ex vivo* с использованием нативных тромбоцитов человека (рис. 2, табл. 4). Для сравнительного анализа использовали значения EC₅₀, поскольку анализ с тромбоцитами каждого донора выполняли на одном планшете. Все серии ТП GNR-069 входили в границы ДК РП на тромбоцитах каждого из 3 доноров.

Поскольку внутриклеточный каскад передачи сигнала после связывания ромиплостима, как и эндогенного ТРО, обусловлен конформа-

Таблица 3. Значения RSA для серий РП Энплейт® и ТП GNR-069 в тесте индукции пролиферации клеток Ва/F3-ТроR-2C7; расчёт границ ДК

Серия	RSA, %	lg RSA
РП Энплейт®:		
1096816A	99	1,996
1098195A-CO	100	2,000
1069332A	102	1,964
ТП GNR-069:		
0010690419	100	2,000
0020690419	100	2,000
0030690519	106	2,025
Среднее по сер. Энплейт®	1,986	
SD	0,020	
ДК (среднее ± 2SD), lg	1,947 – 2,026	
RSA		
ДК, RSA, %	88 – 106	

Таблица 4. Значения EC₅₀ серий ТП GNR-069 и РП Энплейт® в тесте ромиплостим-индуцированного фосфорилирования JAK2 в тромбоцитах доноров; расчёт границ ДК

Препарат, серия	EC ₅₀	lgEC ₅₀
<i>Донор № 1</i>		
GNR-069:		
0010690419	3,303·10 ⁻⁵	-4,48
0020690419	3,644·10 ⁻⁵	-4,45
0030690519	3,578·10 ⁻⁵	-4,51
Энплейт®:		
1098195A	3,326·10 ⁻⁵	-4,48
1069332A	3,583·10 ⁻⁵	-4,44
1096816A	3,122·10 ⁻⁵	-4,45
Среднее по сер. Энплейт®	—	-4,48
SD	—	0,03
ДК (среднее ± 3SD)	(2,715 – 4,105)·10⁻⁵	
<i>Донор № 2</i>		
GNR-069:		
0010690419	2,217·10 ⁻⁵	-4,66
0020690419	2,293·10 ⁻⁵	-4,61
0030690519	2,205·10 ⁻⁵	-4,65
Энплейт®:		
1098195A	2,163·10 ⁻⁵	-4,65
1069332A	2,438·10 ⁻⁵	-4,64
1096816A	2,263·10 ⁻⁵	-4,66
Среднее по сер. Энплейт®	—	-4,64
SD	—	0,03
ДК (среднее ± 3SD)	(1,906 – 2,739)·10⁻⁵	
<i>Донор № 3</i>		
GNR-069:		
0010690419	1,296·10 ⁻⁵	-4,87
0020690419	1,323·10 ⁻⁵	-4,85
0030690519	1,402·10 ⁻⁵	-4,88
Энплейт®:		
1098195A	1,343·10 ⁻⁵	-4,89
1069332A	1,416·10 ⁻⁵	-4,88
1096816A	1,305·10 ⁻⁵	-4,85
Среднее по сер. Энплейт®	—	-4,87
SD	—	0,02
ДК (среднее ± 3SD)	(1,196 – 1,533)·10⁻⁵	

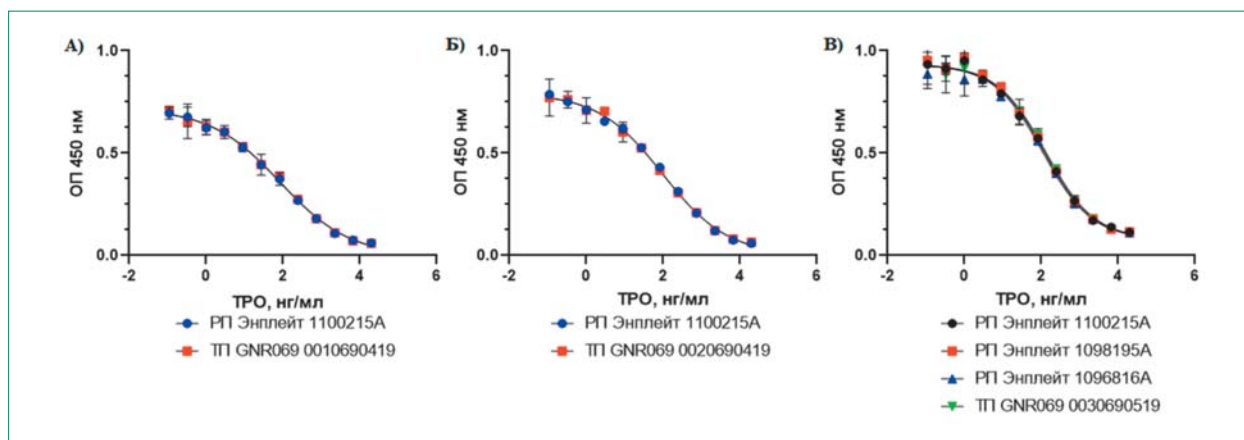


Рис. 3. Графики зависимости ОП от логарифма концентрации рекомбинантного ТРО человека при связывании ромиплостима с рекомбинантным экстраклеточным доменом рецептора ТРО человека в присутствии рекомбинантного ТРО человека в конкурентном ИФА: А) планшет № 1; Б) планшет № 2; В) планшет № 3.

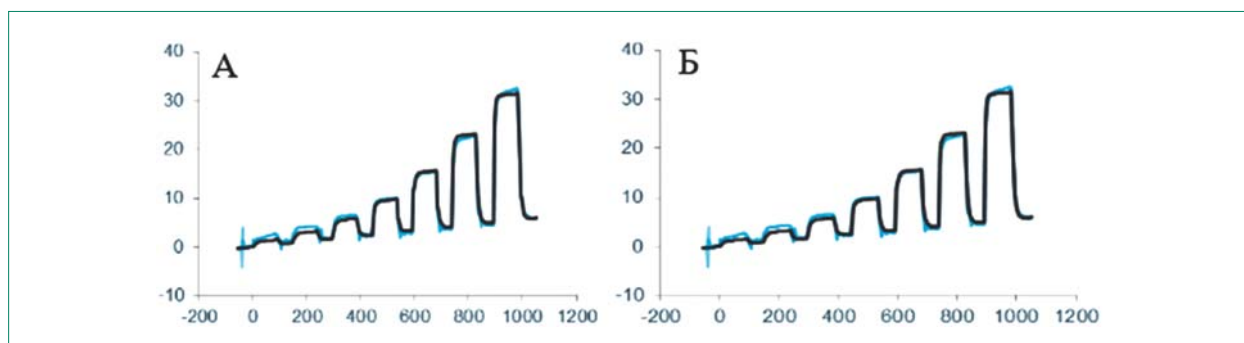


Рис. 4. Сенсограммы дозозависимого формирования комплекса ромиплостима и экстраклеточной части ТРО-R при 37 °С и рН 7,4 в одноцикловой постановке: А) для сер. Энплейт® 1096816А; Б) для сер. ТП GNR-069 0010690419. По оси ординат — величина сигнала (RU), по оси абсцисс — время, с. Голубым цветом обозначены экспериментальные сенсограммы, черным — математическое моделирование в модели Лэнгмюра (1 к 1).

ционными изменениями рецептора, то, следовательно, эпитоп, с которым связывается ромиплостим, совпадает или очень близко расположен к эпитопу связывания нативного лиганда

Таблица 5. Значения RSA серий ТП GNR-069 и РП Энплейт® в конкурентном связывании с экстраклеточной частью ТРО-R в присутствии рекомбинантного ТРО; расчёт границ ДК

Серия	RSA, %	Lg-RSA	ДК, RSA, %
РП Энплейт®:			
1096816А	108	2,033	84 – 118
1098195А	91	1,959	
1100215А	100	2,000	
Среднее по сер. Энплейт®	1,997		
SD	0,037		
ДК (среднее ±2SD), Lg-RSA	1,923 – 2,072		
ТП GNR-069:			
0010690419	95	1,978	
0020690419	101	2,004	
0030690519	90	1,954	

[12]. Эффективность связывания ромиплостима с рекомбинантным человеческим экстраклеточным доменом ТРО-R в присутствии серийных разведений рекомбинантного ТРО человека определяли твердофазным ИФА. Данные и расчёт границ ДК представлены на рис. 3 и в табл. 5. Значения RSA всех серий ТП GNR-069 входили в границы ДК РП Энплейт®.

Механизмы действия и выведения ТРО и ромиплостима из кровотока через связывание с тромбоцитами аналогичны, поэтому кинетические параметры взаимодействия ромиплостима с рецептором ТРО критичным образом определяют как эффективность, так и безопасность ромиплостима при одобренном режиме дозирования пациентов с ИТП. Взаимодействие ромиплостима из серий ТП GNR-069 и РП Энплейт® с экстраклеточной частью ТРО-R изучали методом ППР, позволяющим оценить параметры связывания без модификации исследуемых белков. Типичный набор полученных сенсограмм представлен на рис. 4. Константы скоростей реакций ассоциации и диссоциации сравнивае-

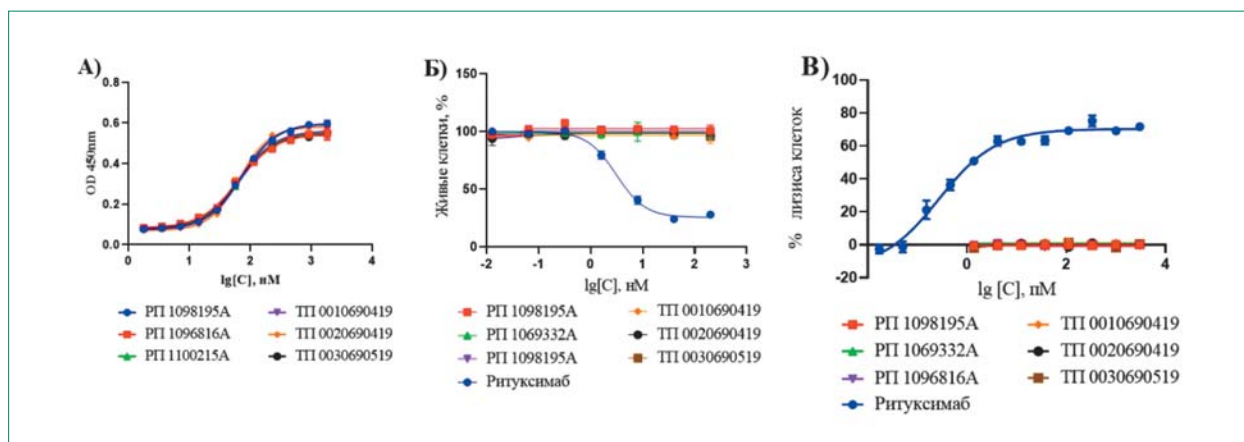


Рис. 5. Графики зависимости ОП от логарифма концентраций ромиплостима. Fc-опосредованные свойства ромиплостима из серий ТП GNR-069 и РП Энплейт®: А — связывание с компонентом СК человека C1q; Б — CDC ромиплостима в отношении клеток линии Ва/Ф3-ТроR-2С7, экспрессирующих рецептор ТРО, в присутствии нормального комплемента сыворотки человека отсутствовала. Ритуксимаб в тех же условиях вызывал цитоллиз человеческих CD20-позитивных КМ WIL2-S; В — ADCC ромиплостима в отношении клеток линии Ва/Ф3-ТроR-2С7 при инкубации с эффекторными клетками донора 1, при инкубации с эффекторными клетками двух других доноров ADCC активность ромиплостима также отсутствовала.

мых серий в модели Лэнгмюра (1 к 1) представлены в табл. 6. Все параметры связывания серий ТП GNR-069 входили в границы ДК РП Энплейт®.

В структуру ромиплостима входит Fc-фрагмент антитела человека подкласса IgG1, что обеспечивает взаимодействие ромиплостима с неонатальным рецептором FcRn и другими Fcγ рецепторами. Основные функции FcRn заключаются в переносе антител класса IgG от матери к плоду через плаценту и рециклинге IgG. FcRn с высокой аффинностью связывается с Fc-фрагментом IgG в эндоцитозных вакуолях при кислом pH и переносит IgG на внешнюю мембрану клетки, где при повышении pH высвобождает IgG во внеклеточное пространство из-за снижения аффинности, обеспечивая их

рециклинг [21]. Параметры взаимодействия ромиплостима с FcRn будут оказывать критическое влияние на сопоставимость фармакокинетических параметров ТП GNR-069 и РП Энплейт®.

Мишенью ромиплостима является мембраноассоциированный рецептор, поэтому связывание Fc-фрагмента ромиплостима с активирующим FcγRIIIa (CD16a) рецептором потенциально может вызывать антителозависимую цитотоксичность (ADCC), а также вызывать активацию системы комплемента (СК) через связывание с белком C1q. Параметры взаимодействия с Fcγ рецепторами и C1q было важно оценить с точки зрения их влияния на безопасность разрабатываемого продукта.

Таблица 6. Кинетические параметры формирования и диссоциации комплекса ромиплостима и экстраклеточной части ТРО-R при 37 °C и pH 7,4, границы ДК

Серия	Ka (10 ⁶ *1/Ms)	lgKa	kd (1/s)	lgkd	KD, M	lgKD
РП Энплейт®:						
1096816A	2,00	0,30	0,13	-0,89	6,72·10 ⁻⁸	-7,173
1098195A	2,38	0,38	0,13	-0,89	5,54·10 ⁻⁸	-7,256
1100215A	1,68	0,23	0,14	-0,85	8,13·10 ⁻⁸	-7,090
ТП GNR-069:						
0010690419	2,07	0,32	0,13	-0,89	6,33·10 ⁻⁸	-7,199
0020690419	1,96	0,29	0,13	-0,89	6,73·10 ⁻⁸	-7,172
0030690519	2,03	0,31	0,13	-0,89	6,57·10 ⁻⁸	-7,182
Среднее по сер. Энплейт®	—	0,30	—	-0,88	—	-7,173
SD	—	0,08	—	0,02	—	0,083
ДК (среднее ± 2SD)	1,41 – 2,83		0,12 – 0,15		(4,58 – 9,85) · 10⁻⁸	

Таблица 7. KD комплексов ромиплостима с Fcγ рецепторами человека; границы ДК

Fc рецептор человека	KD, моль/л					
	РП Энплейт®			ТП GNR-069		
	1096816A	1098195A	1100215A	0010690419	0020690419	0030690519
FcRn	3,77·10 ⁻⁸	3,14·10 ⁻⁸	3,26·10 ⁻⁸	3,27·10 ⁻⁸	3,60·10 ⁻⁸	3,49·10 ⁻⁸
DK (среднее ± 2SD)	(2,79 – 4,10)·10 ⁻⁸					
FcγRIIIa (CD16a V158)	3,34·10 ⁻⁶	3,63·10 ⁻⁶	3,18·10 ⁻⁶	3,02·10 ⁻⁶	3,37·10 ⁻⁶	3,11·10 ⁻⁶
DK (среднее ± 2SD)	(2,96 – 3,86)·10 ⁻⁶					
FcγRIIb (CD16b)	4,07·10 ⁻⁶	3,82·10 ⁻⁶	4,43·10 ⁻⁶	3,70·10 ⁻⁶	4,43·10 ⁻⁶	3,61·10 ⁻⁶
DK (среднее ± 2SD)	(3,53 – 4,76)·10 ⁻⁶					
FcγRIIa (CD32a-H167)	1,32·10 ⁻⁵	1,57·10 ⁻⁵	1,20·10 ⁻⁵	1,12·10 ⁻⁵	1,60·10 ⁻⁵	1,47·10 ⁻⁵
DK (среднее ± 2SD)	(1,03 – 1,78)·10 ⁻⁵					
FcγRIIb/c (CD32b/c)	1,98·10 ⁻⁵	1,42·10 ⁻⁵	1,69·10 ⁻⁵	2,12·10 ⁻⁵	2,11·10 ⁻⁵	1,57·10 ⁻⁵
DK (среднее ± 2SD)	(1,21 – 2,34)·10 ⁻⁵					
FcγRI (CD64a)	1,95·10 ⁻⁸	1,82·10 ⁻⁸	2,06·10 ⁻⁸	2,13·10 ⁻⁸	1,96·10 ⁻⁸	1,97·10 ⁻⁸
DK (среднее ± 2SD)	(1,71 – 2,20)·10 ⁻⁸					

KD серий ТП GNR-069 и РП Энплейт® с FcRn и другими рекомбинантными Fcγ рецепторами человека представлены в табл. 7, эффективность взаимодействия с C1q — в табл. 8. Все показатели серий ТП GNR-069 входили в границы ДК при анализе взаимодействия с Fcγ рецепторами человека и компонентом СК C1q, что является убедительным основанием для предположения, что препараты будут обладать сходным с РП профилем фармакокинетики и безопасности *in vivo*.

Результаты сравнительного изучения взаимодействия с C1q, ADCC и CDC ромиплостима из серий изучаемых препаратов в отношении клеток Ва/ФЗ-ТроR-2C7, экспрессирующих рецептор ТРО человека, и связывания с компонентом СК человека C1q представлены на

Таблица 8. Значения EC₅₀ серий ТП GNR-069 и РП Энплейт® в тесте связывания с белком системы комплемента человека C1q; расчёт границ ДК

Препарат	Серия	EC ₅₀ , нМ	lgEC ₅₀
РП Энплейт®	1096816A	64,93	1,81
	1098195A	68,36	1,83
	1069332A	64,21	1,81
Среднее по сер. Энплейт®		1,82	
SD		0,01	
DK (среднее ± 3SD)		59,17 – 76,78	
ТП GNR-069	0010690419	59,33	1,77
	0020690419	61,05	1,79
	0030690519	62,07	1,79

рис. 5. Ромиплостим-индуцированной ADCC и CDC в отношении клеток, экспрессирующих ТРО-R, в экспериментальных условиях *in vitro*, при тестировании концентраций ромиплостима, заведомо превышающих его возможные максимальные концентрации в организме при рекомендованном режиме введения, ни для одного из сравниваемых препаратов не наблюдали. Эффективность используемых тест-систем подтверждена мощной ADCC и CDC ритуксимаба в отношении CD20-позитивных человеческих клеток в тех же условиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Доказательство сопоставимости параметров основных биологических функциональных свойств опытно-промышленных серий ТП GNR-069 и коммерческих серий РП Энплейт®, полученных в сравнительном исследовании *in vitro*, базировалось на определении границ ДК серий РП с учётом оценки их критичности для эффективности и безопасности при клиническом применении и ограниченного количества сравниваемых серий.

Полученные результаты дают возможность предположить, что показатели фармакодинамики, фармакокинетики и безопасности в сравнительном клиническом исследовании 3-й фазы, которую в настоящее время проводит компания АО «ГЕНЕРИУМ», также окажутся сопоставимыми, что даст возможность зарегистрировать препарат GNR-069 как биоаналог препарата Энплейт®.

СПИСОК ССЫЛОК

1. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85 «Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».
2. Миронов А. Н., Меркулов В. А., Лутцева А. И., Ваганова О. А., Бендрьшев А. А., Ефремова Т. А., Кириченко Е. В., Швец С. В., Иванайнен Е. В. / Вестник. НЦ экспертизы средств мед. примен. 2015. № 1. С. 4 – 10.
3. Ниязов Р. Р., Драницына М. А., Васильев А. Н., Гавришина Е. В. / Сахарный диабет. 2020. Т. 23. № 16. С. 548 – 560.
4. FDA. 2019. Development of Therapeutic Protein Biosimilars: Comparative Analytical Assessment and Other Quality-Related Considerations. Guidance for Industry (Draft Guidance).
5. Cines D. B., Cuker A., Semple J. W. / Presse Med. 2014. V. 43. № 4. P. e49 – e59.
6. Olsson B., Andersson P. O., Jernas M., et. al. / Nat. Med. 2003. V. 9. № 9. P. 1123 – 1124.
7. Zauli G., Vitale M., Falcieri E., et. al. / Blood. 1997. V. 90. P. 2234 – 2243.
8. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (первичной иммунной тромбоцитопении) у взрослых (ред. 2018 г.).
9. Drachman J. G., Griffin J. D., Kaushansky K. Ф. / J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 4979 – 4982.
10. Kuter D. J., Beeler D. L., Rosenberg R. D. / Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 1994. V. 91. P. 11104 – 11108.
11. Broudy V. C., Lin N. L., Sabath D. F., et. al. / Blood. 1997. V. 89. P. 1896 – 904.
12. Bussel J. B., Soff G., Balduzzi A., et. al. / Drug Design, Develop. Ther. 2021. V. 15. P. 2243 – 2268.
13. Wörmann B. / Transfus. Med. Hemother. 2013. V. 40. P. 319 – 325.
14. Basciano P. A., Bussel J. B. / Curr. Opin. Hematol. 2012. V. 19. P. 392 – 398.
15. Broudy V. C., Lin N. L. / Cytokine. 2004. V. 25. P. 52 – 60.
16. Kuter D. J. / Br. Haematol. 2022. V. 196. № 6. P. 1311 – 1328.
17. Cwirla S. E., Balasubramanian P., Duffin D. J., et al. / Science. 1997. V. 276. № 5319. P. 1696 – 1699.
18. Liming L. / Protein Cell. 2018. V. 9. № 1. P. 15 – 32.
19. Molineux G. / Ann. NY Acad. Sci. 2011. V. 1222. P. 55 – 63.
20. Tsong Yi., Dong X., and Shen M. / J. Biopharm. Stat. 2016. V. 27. № 2. P. 1 – 9.
21. Pyzik M., Rath T., Lencer W. I., Baker K., and Blumberg R. S. FcRn: / J. Immunol. 2015. V. 194. № 10. P. 4595 – 4603.

IN VITRO COMPARABILITY STUDY OF THE FUNCTIONAL PROPERTIES OF THE BIOSIMILAR DRUG GNR-069 UNDER DEVELOPMENT AND THE REFERENCE DRUG NPLATE®

S. G. Abbasova^{1,2}, O. M. Strizhakova¹, I. V. Lyagoskin¹, A. P. Vasilyev¹, O. M. Lisitsyna¹, M. S. Pantyushenko¹, K. V. Ulyanova¹, V. M. Simonov¹, A. F. Gabdrachmanova¹, I. A. Kirik¹, G. N. Poroshin¹, R. A. Khamitov¹

¹ Joint Stock Company «GENERIUM», 601125 Russia, Vladimir Region, Volginsky, Vladimirkaya str., 14

² abbasova@ibcgenerium.ru

The comparability study of the functional properties of the developed biosimilar product and the reference drug is a necessary step in the development at the stage of non-clinical studies. The paper presents the results of a comparative study and provides evidence of the comparability of the main functional properties of the developed biosimilar drug GNR-069 based on romiplostim (JSC GENERIUM, Russia) and the reference drug Nplate® (Amgen Inc., USA). Conclusions about the comparability of the properties of GNR 069 and Nplate® were based on the margins of quality ranges calculated from the parameters of reference product batches.

Keywords: GNR-069, Enplate, romiplostim, biosimilar, reference drug.