

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Методические рекомендации
«Оценка качества лечебно-профилактических бактериофагов
по показателям «Подлинность» и «Специфическая активность»

Методические рекомендации рассмотрены, одобрены и рекомендованы к утверждению на заседании секции № 3 Ученого совета ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (протокол № 5 от 01 октября 2021 г.)

Методические рекомендации утверждены и введены в действие приказом ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 392 от 15.11.2021 г.

Москва 2021 г

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Ответственный исполнитель:

Начальник лаборатории бактериофагов и
препаратов нормофлоры с коллекцией
микроорганизмов Испытательного
центра экспертизы качества МИБП
канд. биол. наук

01.09.2021 Д.С. Давыдов

Исполнители:

Начальник Испытательного центра
экспертизы качества МИБП
д-р мед. наук, профессор

01.09.2021 А.А. Мовсесянц

Ведущий эксперт лаборатории
бактериофагов и препаратов
нормофлоры с коллекцией
микроорганизмов Испытательного
центра экспертизы качества МИБП
канд. биол. наук

01.09.2021 Р.Л. Парфенюк

Эксперт 2 категории лаборатории
бактериофагов и препаратов
нормофлоры с коллекцией
микроорганизмов Испытательного
центра экспертизы качества МИБП

01.09.2021 З.В. Дурманова

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	621
ТЕРМИНЫ, ОПРЕДЕЛЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	622
ВВЕДЕНИЕ	623
ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ	625
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	626
1 Методики определения специфической активности бактериофагов	626
1.1 Оборудование и материалы	626
1.2. Образцы и растворы.....	626
1.3 Питательные среды	626
1.4 Условия культивирования.....	627
1.5. Порядок проведения титрования.....	627
1.6. Учет результатов	629
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	631
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	632

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

- Федеральный закон от 12 апреля 2010 г №61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».
- Санитарные правила и нормы СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»– ГОСТ Р 8.563-2009 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений.
- ГОСТ Р 52537-2006 Производство лекарственных средств. Система обеспечения качества. Общие требования.
- Государственная Фармакопея РФ, ОФС 1.7.1.0002.15 «Бактериофаги».
- Руководство по экспертизе лекарственных средств. т. III. – Москва, 2013.

ТЕРМИНЫ, ОПРЕДЕЛЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

Бактериофаги	-	вирусы, вызывающие гибель соответствующих им видов бактерий за счет внутриклеточного размножения и разрушения бактериальной клетки, которое сопровождается выходом зрелых фаговых частиц, способных к заражению новых бактериальных клеток. Комплексы поликлональных вирулентных вирусов бактерий входят в состав лечебно-профилактических препаратов бактериофагов
Контрольные штаммы	-	штаммы бактерий, полученные от производителя лекарственного средства, используемые для проведения испытаний лечебно-профилактических бактериофагов по показателю «Специфическая активность»
ПБА	-	патогенные биологические агенты
Титр бактериофага	-	количество активных фаговых частиц в единице объема исследуемого материала
БЛП	-	Биологические лекарственные препараты
ГФ РФ	-	Государственная Фармакопея Российской Федерации
ОФС	-	Общая Фармакопейная статья
ФСО	-	Фармакопейный стандартный образец
МЕ	-	Международная единица мутности

ВВЕДЕНИЕ

Лечебно-профилактические бактериофаги – это лекарственные средства, содержащие комплексы поликлональных вирулентных вирусов бактерий, которые вызывают гибель соответствующих им видов бактерий за счет внутриклеточного размножения и разрушения бактериальной клетки, сопровождающегося выходом зрелых фаговых частиц, способных к заражению новых бактериальных клеток.

Основными показателями качества лечебно-профилактических препаратов бактериофагов являются «Подлинность» и «Специфическая активность».

Литическая активность бактериофага определяется количеством активных фаговых частиц в единице объема препарата (титр), для подсчета которых проводят титрование на плотных и жидких питательных средах.

В ГФ РФ, ОФС «Бактериофаги» предусмотрены два основных метода определения специфической активности: метод Аппельмана - титрование фагов в жидких средах и метод агаровых слоев по Грациа или двухслойный метод – титрование фагов на плотных средах.

В основе методов лежит последовательное десятикратное разведение препарата бактериофага в бульоне, с последующим внесением в каждое разведение одинакового объема бактериальной взвеси контрольного штамма.

Специфическую активность по методу Аппельмана определяют по предельному разведению исходного препарата бактериофага, способному вызвать лизис чувствительных бактерий в жидкой среде.

Специфическая активность по методу Грациа выражается в количестве активных фаговых частиц в единице объема образца, обладающих литической активностью и способных образовывать негативные колонии на чувствительных бактериях при совместном культивировании.

Дополнительным методом исследования может служить капельный метод или спот-тест. Данный метод состоит в нанесении одной капли из соответствующего разведения образца бактериофага на агаровую чашку с

газоном чувствительной культуры. Специфическая активность бактериофага выражается в степени лизиса бактериального штамма.

Подлинность препарата подтверждается результатами определения специфической активности бактериофагов. Бактериофаг является облигатным паразитом, который поражает клетки определенных, гомологичных видов бактерий. Наличие бактериофага определяется его литическим действием в отношении гомологичного бактериального штамма, которое проявляется в виде лизиса бактериальной культуры в жидкой среде или образованием пятен лизиса (негативных колоний) на бактериальном газоне на плотной питательной среде.

Настоящие методические рекомендации устанавливают порядок и условия определения специфической активности препаратов бактериофагов. Предназначены для экспертов и специалистов, осуществляющих лабораторную фармацевтическую экспертизу в рамках государственной регистрации и введения в гражданский оборот, а также разработчиков БЛП и специалистов, осуществляющих доклинические исследования БЛП.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. Используют оборудование, прошедшее метрологическую поверку.
2. Испытания проводят с соблюдением правил асептики.
3. Испытания проводят на контрольных штаммах микроорганизмов III-IV группы патогенности, которые предусмотрены нормативной документацией для каждого наименования лекарственного средства.
4. Для обеспечения безопасности проведения работ с ПБА III-IV группы должны выполняться общие требования к условиям работы с использованием ПБА, установленные СанПиН 3.3686-21.
5. Показатели специфической активности бактериофагов, количество используемых контрольных штаммов, условия и время инкубирования образцов указывают в фармакопейной статье на препарат.
6. Определение специфической активности бактериофагов проводят в строгом соответствии с установленными рекомендациями для каждого метода. Любые изменения, связанные с особенностями взаимодействия фаг-бактерия должны быть указаны в фармакопейной статье на препарат.
7. Методику воспроизводят в соответствии с описанием в разделе 1.5.
8. Оценку результатов проводят в соответствии с разделом 1.6.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 Методики определения специфической активности бактериофагов

1.1 Оборудование и материалы

- Бокс (шкаф) биологической безопасности II –го класса
- Термостат (инкубатор)
- Баня водяная
- Пробирки стеклянные, вместимостью 20 мл с ватно-марлевыми пробками

пробками

- Пипетки градуированные, объемом 1 мл, класса А
- Петли бактериологические.
- Пипетки пастеровские

1.2. Образцы и растворы

- ФСО ГФ РФ Стандартный образец мутности бактериальных взвесей:
ФСО 3.2.00085 (ОСО 42-28-85) (10 МЕ)
ФСО 3.2.00086 (ОСО 42-28-86) (5 МЕ)
- 70 % раствор этилового спирта
- 6 % раствор перекиси водорода
- 0,9 % стерильный физиологический раствор NaCl

1.3 Питательные среды (рекомендованы ОФС.1.7.1.0002.15 «Бактериофаги», ГФ РФ)

- питательный бульон для культивирования микроорганизмов (МПБ) или аналогичный или бульон Хоттингера или мясо-гидролизный бульон;
- мясопептонный агар (МПА) 1,5% или агар Хоттингера 1,5 %;
- 0,7 % МПА или 0,7 % агар Хоттингера.

Возможно использование необходимых добавок в зависимости от специфических потребностей бактерий-мишеней.

1.4 Условия культивирования

Инкубация в термостате при температуре 37 ± 1 °С.

Результаты учитывают через 18 ± 1 ч. Возможно изменение длительности инкубации в зависимости от видовых особенностей роста бактериальной мишени фагового препарата, о чем указывают в фармакопейной статье.

1.5. Порядок проведения титрования

1. Метод Аппельмана (титрование фагов на жидких средах)

В пробирках, содержащих по 4,5 мл питательного бульона, готовят ряд последовательных десятикратных разведений препарата бактериофага от 10^{-1} до $10^{-6} - 10^{-9}$ (в зависимости от показателей специфической активности, заложенных в фармакопейную статью на конкретный фаговый препарат) с обязательной сменой пипеток при каждом разведении. Для приготовления первого разведения (10^{-1}) добавляют 0,5 мл образца препарата к 4,5 мл бульона. В качестве контроля используют пробирку с 4,5 мл бульона без фага. После этого во все пробирки с полученными разведениями бактериофага пипеткой вносят по 0,03 мл взвеси суточной агаровой культуры бактерий, содержащей 10^9 микробных клеток в 1 мл по ФСО мутности (10 ME). По окончании титрования пробирки помещают в термостат.

2. Метод агаровых слоев по Грациа (титрование фагов двухслойным методом на плотных средах)

Подготовительные работы

- 0,7 % агар разливают по 2,5 мл в стеклянные пробирки.

Перед использованием агар растапливают и охлаждают до 45 °С

- 1,5 % агар разливают в чашки Петри по 20 ± 2 мл. Поверхность, на которой разливают чашки, должна быть горизонтальной, чтобы слой агара был ровным.

Перед использованием чашки подсушивают в перевернутом виде с прикрытой крышкой при температуре 37 ± 1 °С в течение 30-60 мин.

Готовят десятикратные последовательные разведения образца препарата бактериофага в питательном бульоне от 10^{-1} до 10^{-8} (10^{-9} или выше, в зависимости от специфической направленности бактериофага), с обязательной сменой пипеток при каждом разведении. Затем 1 мл разведенного фага помещают в пробирку с растопленным 0,7 % агаром и добавляют 0,1-0,2 мл 18 часовой бульонной культуры контрольного штамма. Содержимое пробирки быстро перемешивают, вращая пробирку между ладонями, чтобы не произошло застывания агара и выливают вторым слоем на поверхность 1,5% агара в чашки Петри. После застывания верхнего слоя агара чашки помещают в термостат.

Для посева выбирают такие разведения фагов, которые давали бы на одной чашке от 50-100 до 250-300 негативных колоний. (В зависимости от специфической направленности бактериофага порядок применяемых разведений может быть – 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7} или 10^{-6} 10^{-7} 10^{-8} или другие). Следует параллельно засеивать не менее двух чашек фагом из одного и того же разведения.

Объем бульонной культуры, вносимой в пробирки с 0,7% агаром, а так же количество 0,7% агара в пробирке может быть изменено в зависимости от культуральных особенностей бактериального штамма и особенностей взаимодействия фаг-бактерия.

3. Капельный метод (спот-тест)

Перед проведением испытания чашки с питательным агаром необходимо хорошо подсушить, так как капли конденсата искажают результаты. Бактериальную суспензию суточной агаровой культуры контрольного штамма ФСО (5 ME) равномерно наносят на поверхность агара. Излишек жидкости удаляют пастеровской пипеткой и подсушивают чашку в течение 20-30 минут. Дно чашки Петри расчерчивают на сектора, соответственно количеству используемых разведений. Например: б/р, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Более высокие разведения использовать нецелесообразно. На поверхность агара с впитавшейся культурой наносят по 1 капле из

каждого разведения. Используют пастеровскую пипетку с тонко оттянутым концом или шприц, объемом 1-3 мл. Объем капли может составлять $0,01 \pm 0,005$ мл. Каждое разведение наносится новой пипеткой. Возможно использование одной пипетки, если вносить её из большего разведения в меньшее.

После подсыхания капель фагов, чашки инкубируют в термостате.

1.6. Учет результатов

1. Метод Аппельмана

Оценивают результаты визуально, предварительно встряхнув каждую пробирку с разведением. Определяют пробирку с наибольшим разведением бактериофага, в которой произошел полный лизис соответствующей бактериальной культуры.

Активность бактериофага выражается отрицательным десятичным логарифмом, указывающим последнее разведение бактериофага в жидкой питательной среде, в которой рост бактериальной культуры визуально не наблюдается.

2. Метод агаровых слоев по Грациа

Подсчитывают количество негативных колоний (прозрачные пятна лизиса на сплошном газоне бактериального роста) на параллельных чашках одного разведения, средний результат умножают на показатель разведения. Затем вычисляют среднее значение взятого числа разведений.

Число негативных колоний, образовавшихся в результате инкубации на сплошном слое бактерий прямо пропорционально количеству внесенного в чашку фага.

Титр рассчитывают по формуле (1):

$$n = y / vx, \quad (1)$$

где

y – число образовавшихся негативных колоний;

v – объем суспензии фага (в мл), нанесенной на чашку с агаром;

x – разведение нанесенной суспензии;

n – титр суспензии, выраженный в числе бляшкообразующих единиц (БОЕ) на 1 мл.

3. Капельный метод (спот-тест)

Учитывают степень лизиса бактериальной культуры в месте нанесения капли образца.

Степень лизиса культуры определяют по следующей схеме:

++++ - сливной (полный) лизис;

+++ - полусливной лизис (незначительный бактериальный рост в зоне лизиса)

++ - наличие в месте нанесения капли фага свыше 50 колоний фага (пятен лизиса)

+ - свыше 10 колоний фага;

± - до 10 колоний фага;

– - полное отсутствие лизиса.

При последовательном разведении препарата бактериофага степень лизиса на секторах чашки, как правило снижается в такой же последовательности: +++++, +++, ++, +, ±, -.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные методы титрования позволяют определить подлинность лечебно-производственных бактериофагов, так как бактериофаги обладают специфичностью и лизируют гомологичные им виды бактерий при значительном разведении исходного образца (10^{-4} и выше).

Титрование препаратов бактериофагов методами Аппельмана и Грациа позволяет определить специфическую активность бактериофагов, входящих в готовые лекарственные формы и установить титр бактериофага, то есть число активных единиц бактериофага, содержащихся в 1 мл препарата.

Активность бактериофага, установленную методом Аппельмана, обозначают отрицательной степенью десяти, где степень указывает последнее разведение бактериофага, в котором рост контрольного штамма визуально не наблюдается.

Методом агаровых слоев по Грациа устанавливают количество фаговых частиц в единице объема (1 мл), способных образовывать негативные колонии на гомологичных чувствительных штаммах. Считается наиболее точным методом титрования бактериофагов.

Специфическая активность в капельном методе (спот-тест) выражается в степени лизиса чувствительного бактериального штамма при нанесении образца препарата бактериофага и его разведений.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Руководство по экспертизе лекарственных средств: в 4 т. Т.3. глава 4/ составители: О.С. Дарбеева, К.А. Мирошников, Л.М. Майская, А.Н. Миронов, Ю.И. Обухов, Д.С. Давыдов, З.В. Дурманова. – Москва: ООО «ПОЛИГРАФ-ПЛЮС», 2013. – 343 с. – Текст непосредственный
2. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издание: в 4 т. Т. 2: ОФС 1.7.1.0002.15 «Бактериофаги». – Москва, 2018. – Режим доступа: Федеральная электронная медицинская библиотека. – Текст: электронный.
3. Нормативные правовые акты в сфере обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза: в 5 т. Т.3. Разработка и проведение исследований биологических лекарственных средств. – Москва: Ремедиум, 2017. – 360 с. – Текст непосредственный.
4. Санитарные правила и нормы СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»: утверждены постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 №4. Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов. – Официальный интернет-портал правовой информации www.pravo.gov.ru, 18.02.2021. – Текст: электронный
5. ГОСТ Р 8.563-2009. Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений = State system for ensuring the uniformity of measurements. Procedures of measurements: национальный стандарт Российской Федерации: издание официальное: утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 15 декабря 2009 г №1253-ст: введен впервые : дата введения 2010-04-15 / разработан ФГУП «ВНИИМС». – Москва : Стандартинформ, 2019. – 15 с. – Текст непосредственный.
6. ГОСТ Р 52537-2006. Производство лекарственных средств. Система обеспечения качества. Общие требования = Manufacturing of medicinal product. Quality assurance system. general requirements: национальный стандарт

Российской Федерации: издание официальное: утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 21 апреля 2006 г №73-ст: введен впервые : дата введения 2007-01-01 / разработан ООО АСИНКОМ – Москва: Стандартиформ, 2006. – 46 с. – Текст: непосредственный.

7. Бактериофаги: биология и практическое применение/ под ред. Элизабет Каттер и Александра Сулаквелидзе. – Москва: Научный мир, 2012.– 636 с. – Текст: непосредственный.

8. Гольдфарб, Д.М. Бактериофагия: монография/ Д.М. Гольдфарб. – Москва: Государственное издательство медицинской литературы МЕДГИЗ, 1961. – 298 с. – Текст: непосредственный.

9. Практическое пособие по бактериофагии: учебное пособие / И.М. Габрилович, В.С. Полупанов, С.Б. Стефанов, Н.В. Батурицкая, А.А. Кукулянский, Н.И. Анисимова, С.И. Лукельева; под общ. ред. И.М. Габриловича. – Минск: Издательство «Вышэйшая школа», 1968, – 178 с. – Текст: непосредственный

10. Лурия, С. Общая вирусология / С. Лурия, Дж. Дарнелл, – Москва: Издательство «МИР», 1970. – 423 с. – Текст: непосредственный.

11. Методика определения фагочувствительности штаммов, выделенных от больных к препаратам бактериофагов/ Л.М. Майская, О.С. Дарбеева, Р.Л. Парфенюк [и др.]. – Текст: непосредственный // Биопрепараты. – 2003. – №2 (10). – С. 22-23.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Методические рекомендации «Оценка иммуногенности биотерапевтических препаратов в странах ЕАЭС»

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Методические рекомендации
«Оценка иммуногенности биотерапевтических препаратов в странах
ЕАЭС»

Методические рекомендации рассмотрены, одобрены и рекомендованы к утверждению на заседании секции № 3 Ученого совета ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (протокол № 4 от 28 июня 2021 г.)

Методические рекомендации утверждены и введены в действие приказом ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 392 от 15.11.2021 г

Москва, 2021

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Настоящие методические рекомендации не являются нормативным правовым актом.

Данный документ основывается на подходах Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения к рассматриваемой проблеме и содержит разъяснения по практическим вопросам соблюдения требований законодательства Российской Федерации в сфере проведения экспертизы биотерапевтических препаратов.

Методические рекомендации содержат перечень вопросов, подлежащих рассмотрению в плане междисциплинарной оценки иммуногенности биотерапевтических препаратов, которые должны быть включены в регистрационное досье. Рассматриваемые положения отражают обоснованность подхода по оценке риска, относительно иммуногенности, и подтверждают, что объем и тип исследований иммуногенности до регистрации препарата и пострегистрационных исследований, включенных в План управления рисками (ПУР), составлены с учетом риска иммуногенности и серьезности ее потенциальных или наблюдаемых клинических последствий.

В документе, на основе анализа опыта применения зарегистрированных препаратов и современных научных достижений, приведены, в частности, более конкретные рекомендации по оценке иммуногенности и комплексному анализу клинической значимости проявлений иммуногенности. Оценка иммуногенности должна основываться на комплексном анализе иммунологических, фармакокинетических, фармакодинамических показателей, а также данных клинической эффективности и безопасности препарата.

Рекомендации данного документа, включающие общие концепции изучения иммуногенности, могут быть адаптированы к каждой отдельной программе разработки препарата в индивидуальном порядке.

Отклонение от положений методических рекомендаций при условии соблюдения законодательства Российской Федерации не влечет за собой наступления административной или иной ответственности.

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Ответственный исполнитель:

Главный эксперт Управления экспертизы и контроля аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов, д-р мед. наук, проф.

01.06.2021 Ж.И. Авдеева

Исполнители:

Директор Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, проф.

01.06.2021 В.П. Бондарев

Начальник Управления экспертизы и контроля аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов, д-р мед. наук, проф.

01.06.2021 В.Д. Мосягин

Начальник Управления экспертизы противовирусных МИБП, д-р мед. наук

01.06.2021 А.А. Солдатов

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ.....	641
ТЕРМИНЫ, ОПРЕДЕЛЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	643
ВВЕДЕНИЕ.....	644
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	646
1 Область применения.....	646
2 Правовая основа.....	646
3 Факторы, влияющие на развитие иммунного ответа на терапевтический белок	646
3.1 Факторы, зависящие от пациента или опосредованные заболеванием	646
3.2 Факторы, опосредованные лекарственным препаратом	649
4 Возможные клинические последствия иммуногенности.....	653
4.1 Влияние на эффективность.....	653
4.2 Влияние на безопасность	655
5 Доклиническая оценка иммуногенности и ее последствий	657
6. Разработка методов обнаружения и определения иммунного ответа у человека.....	659
6.1 Стратегия изучения и методы оценки антител	660
6.2 Контрольные образцы и реагенты	668
6.3 Валидация методов и интерпретация результатов	671
6.4 Методы для оценки сравнительной иммуногенности	673
6.5 Оценка иммуногенности конъюгированных белков и слитых белков («fusion proteins»).....	674
6.6 Характеристика антител к терапевтическому белку.....	675
7 Иммуногенность и клиническая разработка.....	675
7.1 Обоснование режима отбора образцов и оценки кинетики формирования антител.....	676
7.2 Влияние на фармакокинетику	678

7.3 Влияние иммуногенности на безопасность и эффективность.....	678
7.4 Методологические аспекты оценки сопоставимости иммуногенного потенциала как элемента сравнительных исследований	679
7.5 Управление иммуногенностью	681
8 Фармаконадзор	682
9 Резюме программы иммуногенности	685
Приложение 1	690

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

- Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ (ред. от 13.07.2020) «Об обращении лекарственных средств».
- Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1. М.: Гриф и К; 2012.
- Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том IV. М.: ПОЛИГРАФ-ПЛЮС. 2014. 172 с.
- Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2013.
- Guidelines for good clinical practice (GCP) for trials on pharmaceutical product. WHO Technical Report Series, No. 850, 1995. Annex 3.
- ICH Q5E Note for Guidance on Biotechnological/Biological Products Subject to Changes in their Manufacturing Process (CPMP/ICH/5721/03)2004).
- ICH S6(R1) guideline. Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. Geneva, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2011.
- ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Geneva, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Current Step 4 version. 2005
- Guideline on bioanalytical method validation, EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2*). 2011.
- Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (revision 1), EMA/CHMP/BWP/247713/2012.
- Guideline on Comparability of biotechnology-derived medicinal products after a change in the manufacturing process - non-clinical and clinical issues (EMA/CHMP/BMWP/101695/2006).
- Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза (Решение Совета Евразийской экономической комиссии № 89 от 03.11.2016).

– Правила надлежащей практики фармаконадзора Евразийского экономического союза (Решение Совета Евразийской экономической комиссии № 87 от 03.11.2016).

ТЕРМИНЫ, ОПРЕДЕЛЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ГКГ	-	Главный комплекс гистосовместимости
ДНК	-	дезоксирибонуклеиновая кислота
ЕАЭС	-	Евразийский экономический союз
ИФА	-	иммуноферментный анализ
МкАТ	-	моноклональные антитела
ПЭГ	-	полиэтиленгликоль
ПУР	-	План управления рисками
BSA	-	Бычий сывороточный альбумин
CLB	-	Competitive Ligand Binding method (метод конкурентного связывания с лигандом)
ELISA	-	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (иммуноферменты анализ)
EMA	-	Европейское Медицинское Агентство
Ig	-	иммуноглобулин
IgG	-	иммуноглобулин класса G
IgG4	-	иммуноглобулин класса G подкласса 4
IgM	-	иммуноглобулин класса M
IgE	-	иммуноглобулин класса E
GCP	-	Надлежащая клиническая практика

ВВЕДЕНИЕ

Терапевтические белки распознаются иммунной системой человека. Вслед за распознаванием часто формируется иммунный ответ на терапевтические белки. Этот потенциально опасный иммунный ответ является комплексным и, помимо образования антител к лекарственному препарату, включает активацию Т-клеток и ответ врожденной системы иммунитета.

Последствия иммунного ответа на терапевтический белок варьируют от кратковременного транзиторного появления антител без каких-либо клинически значимых проявлений до тяжелых, угрожающих жизни состояний. Потенциальные клинически значимые последствия развития нежелательного иммунного ответа включают снижение эффективности терапевтического белка, тяжелые острые иммунные реакции, такие как анафилаксия; для терапевтических белков, применяемых в качестве заместительной терапии, перекрестная реактивность с эндогенным белком аналогом.

На иммуногенность терапевтических белков может влиять множество факторов. Их можно разделить на зависящие от пациента, опосредованные заболеванием или лекарственным препаратом. Зависящие от пациента факторы могут предрасполагать к развитию иммунного ответа у субъекта, к ним относятся: генетические особенности (наследственная предрасположенность), предсуществующий иммунитет, иммунный статус, включая терапию иммуномодулирующими препаратами. К факторам, связанным с лечением, относятся режим дозирования и путь введения препарата. Факторы, опосредованные лекарственным препаратом, которые влияют на вероятность развития иммунного ответа, включают характеристики препарата, обусловленные производственным процессом, составом препарата и его стабильностью.

В зависимости от иммуногенного потенциала препаратов, содержащих терапевтический белок, и (или) частоты распространенности заболевания,

объем данных по изучению иммуногенности до регистрации может быть ограничен. Контролируемые клинические испытания обычно не позволяют полностью оценить редкие нежелательные реакции эффекты или медленно развивающиеся иммунные реакции. После регистрации может потребоваться дальнейшая систематическая оценка иммуногенности, которую необходимо предусмотреть в ПУР.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 Область применения

Общие принципы, изложенные в настоящих Методических рекомендациях, преимущественно касаются вопросов, связанных с установлением факта развития нежелательного иммунного ответа на очищенный терапевтический белок у пациентов, и способов систематической его оценки. Рекомендации данного документа распространяются на белки и полипептиды, их производные, а также препараты, в которых указанные вещества являются компонентами, например, конъюгаты. Данные белки и полипептиды, главным образом, получают, используя рекомбинантные или нерекомбинантные системы экспрессии. В настоящих Методических рекомендациях для их обозначения используется термин «терапевтический белок».

Эти Методические рекомендации не распространяются на факторы свертывания крови, вакцины или препараты гетерогенных иммуноглобулинов и человеческих иммуноглобулинов, выделенных из плазмы.

2 Правовая основа

Это руководство следует рассматривать в сочетании с руководством «Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического Союза» и другими соответствующими руководствами Союза.

3 Факторы, влияющие на развитие иммунного ответа на терапевтический белок

3.1 Факторы, зависящие от пациента или опосредованные заболеванием

- Генетические факторы, модулирующие иммунный ответ

Генетические факторы могут влиять на иммунные реакции, развивающиеся в ответ на терапевтический белок, и могут быть причиной межиндивидуальной вариабельности ответа. Генетические различия на уровне молекул Главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) и Т-клеточного рецептора могут модифицировать процесс распознавания антигена, тогда как генетические особенности на уровне модулирующих факторов, таких как цитокины и рецепторы цитокинов, могут влиять на длительность и интенсивность иммунного ответа.

- Генетические факторы, обусловленные дефектом генов

В случае, когда терапевтический белок применяется в качестве препарата замещения эндогенного белка для пациента, у которого выявляется полная или частичная недостаточность эндогенного белка, или он является носителем модифицированной формы природного аналога, физиологический (неизмененный) антиген препарата может восприниматься как нео-антиген и иммунная система пациента будет распознавать терапевтический белок как чужеродный.

- Факторы, связанные с возрастом

Данные по оценке иммуногенности, полученные в одной возрастной группе, не всегда могут быть экстраполированы на пациентов других возрастных групп, поскольку иммунный ответ на терапевтические белки может зависеть от возраста пациента. В педиатрической популяции отмечается различный уровень созревания иммунной системы в зависимости от возраста, и можно ожидать развитие различных иммунных реакций на биологический препарат.

Если препарат предназначен для педиатрической популяции, клинические исследования обычно проводят с участием пациентов соответствующей возрастной группы или групп. Если препарат предназначен для пожилых людей, 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. Пациенты с активированной иммунной системой (например, страдающие аллергией, аутоиммунными воспалительными заболеваниями, хроническими инфекциями) могут быть более склонны к развитию иммунного ответа на терапевтические белки.

При других состояниях (например, при истощении вследствие дефицита питания, прогрессировании онкологического заболевания, поздних стадиях и распространенности ВИЧ-инфекции, органной недостаточности) развитие иммунного ответа на введение терапевтического белка менее вероятно вследствие нарушения функции иммунной системы.

В отношении некоторых препаратов известно, что возможность развития гуморального иммунного ответа может различаться в зависимости от терапевтических показаний к применению или стадии заболевания. Гуморальный ответ на препарат также может быть изменен на фоне развития вирусной инфекции у пациента.

- Сопутствующая терапия

Сопутствующая терапия может либо снижать, либо повышать риск развития иммунного ответа на терапевтический белок. Как правило, иммунная реакция на терапевтический белок снижается при одновременном применении иммунодепрессантов. Поскольку иммунный ответ на терапевтический препарат является результатом взаимодействия многих факторов, например, предшествующего или сопутствующего облучения (радиационной терапии) или уровня экспозиции препарата, выводы о потенциальном влиянии одновременного применения иммуномодулирующих препаратов не являются однозначными. Следует также учитывать предварительно проведенное лечение, которое может влиять на иммунные реакции на терапевтический белок и оказывать влияние на иммунную систему. Если клинические исследования препарата с новой активной

субстанцией были выполнены в комбинации с иммунодепрессантами, при утверждении показаний к использованию белкового препарата в виде монотерапии должны быть представлены новые адекватные клинические данные о профиле иммуногенности препарата при его назначении в отсутствие терапии иммунодепрессантами.

- Факторы, связанные с терапией

На развитие иммунного ответа на терапевтический белок могут влиять режим дозирования, доза и путь введения. Препараты, вводимые внутривенно, могут быть менее иммуногенными, чем препараты, вводимые подкожно или внутримышечно. Ингаляционное, внутрикожное, а также внутриглазное введение может усиливать иммунные реакции, развивающиеся в ответ на терапевтический белок.

При краткосрочном лечении, как правило, вероятность развития нежелательного иммунного ответа ниже, чем при долгосрочном. Повторное назначение препарата после длительного перерыва может привести к усилению иммунного ответа.

- Предсуществующие антитела

Предсуществующие антитела представляют собой эндогенные антитела, которые являются специфичными перекрестно-реагирующими, направленными к эпитомам белков или гликанов, способными взаимодействовать с эпитопами терапевтических белков. Предсуществующие антитела могут формироваться в результате лечения препаратами на основе аналогичных или родственных белков, но также могут выявляться у ранее не леченных пациентов. Точное происхождение таких антител чаще всего неизвестно.

3.2 Факторы, опосредованные лекарственным препаратом

Важные факторы, влияющие на иммуногенность терапевтических белков, включают происхождение (например, чужеродное или человеческое)

и природу активной фармацевтической субстанции (эндогенные белки, посттрансляционные модификации); значительные модификации терапевтического белка (например, пегилирование и слитые белки («fusion proteins»)); родственные примеси, связанные с продуктом (например, продукты деградации, родственные соединения, агрегаты); примеси, связанные с процессом производства (белки, липиды или ДНК клеток-хозяина, микробные контаминанты); состав (вспомогательные вещества) и взаимодействие лекарственного препарата и (или) вспомогательных веществ с материалом первичной упаковки (например, контейнеры, пробки).

- Структура белка и посттрансляционные модификации

Иммунологическая толерантность к эндогенным белкам переменна; как правило, толерантность слабее при низком уровне содержания белка (низкодозовая толерантность), чем при большом его содержании. Например, уровни цитокинов и факторов роста являются низкими, и поэтому выявление аутоантител к цитокинам и факторам роста у здоровых людей не является редкостью.

Терапевтические белки - аналоги эндогенных белков человека могут вызывать развитие иммунного ответа из-за изменений в аминокислотной последовательности или изменений в структуре белка по сравнению с эндогенным белком, что является результатом посттрансляционных модификаций или других изменений на любом этапе процесса производства фармацевтической субстанции и (или) лекарственного препарата, при хранении или его применении.

T-клеточные эпитопы представляют собой короткие линейные пептиды, за счет модификации могут возникать различия в аминокислотной последовательности между эндогенным и терапевтическим белком. В связи с этим, исследования по идентификации потенциальных T-клеточных эпитопов могут быть полезны для выбора новых белков или пептидов с целью разработки на их основе лекарственного препарата.

Особенности гликозилирования могут влиять как на физико-химические, так и на биологические свойства белка. Присутствие или отсутствие олигосахаридных групп, а также структура углеводных фрагментов могут оказывать как прямое, так и косвенное влияние на иммуногенность терапевтических белков; гликаны сами по себе могут индуцировать иммунный ответ (например, гликаны нечеловеческого происхождения), или их присутствие может влиять на конформацию белка таким образом, что белок становится иммуногенным.

Химически модифицированные белки представляют собой новые фармацевтические субстанции, способные инициировать иммунный ответ, например, были выявлены индуцированные специфические антитела, направленные против полиэтиленгликолевой части пегилированных (ПЭГ) белков, включая преисшествующие антитела против ПЭГ. Однако пегилирование и гликозилирование могут также снижать иммуногенность терапевтического белка, путем экранирования иммуногенных эпитопов, сохраняя при этом нативную конформацию белка.

Не-аналоговые терапевтические белки, такие как слитые белки (белки слияния или «fusion proteins»), могут содержать нео-эпитопы из-за введения чужеродных пептидных последовательностей, например, в линкерах (участках соединения). Белки слияния («fusion proteins»), состоящие из чужеродного и собственного белка, также как химерные белки, требуют особого внимания и настороженности из-за потенциального присутствия чужеродного фрагмента, способного провоцировать формирование иммунного ответа на собственный белок (распространение эпитопа, «epitope-spreading»). В таких случаях рекомендуется проводить идентификацию антигенного компонента слитого белка («fusion protein»), что важно в плане оценки риска иммуногенности.

- Состав и упаковка

Состав вспомогательных веществ, помимо безопасности для пациента, подбирается с целью наилучшего поддержания нативной конформации

терапевтического белка. Выбор оптимального и стабильного состава зависит от понимания физической и химической природы фармацевтической субстанции (действующего вещества), самих вспомогательных веществ и их взаимодействия в комбинации друг с другом и с материалом первичной упаковки (например, выщелачивание и примеси из контейнеров и закупорочных материалов, зависящих от производственного процесса их получения; материал из вольфрама). Состав, происхождение вспомогательных веществ и материалов первичной упаковки могут влиять на иммуногенность терапевтических белков. Это следует учитывать при внесении изменений в формулирование (первичную упаковку) лекарственного препарата.

Условия клинического применения (например, разведение в инфузионных растворах и использование инфузионного оборудования, произведенного из различных материалов) также могут влиять на качество препарата и оказывать негативное воздействие, способствующее проявлению иммуногенности препарата.

- Агрегация и образование аддуктов

Денатурация и агрегация терапевтического белка потенциально могут вызвать иммунный ответ. Агрегация и образование аддуктов белков могут приводить к оголению/появлению новых эпитопов или образованию поливалентных эпитопов, которые способны стимулировать иммунную систему. Кроме того, агрегация может усилить специфический иммунный ответ на белок и вызвать образование индуцированных антител. Процесс очистки, состав и условия хранения, среди прочих факторов, могут приводить к образованию агрегатов или аддуктов. Результаты доклинических исследований *in vivo* свидетельствуют о том, что удаление агрегатов (присутствующих в виде видимых или невидимых частиц) способствует снижению иммуногенности.

Агрегаты с более высокой молекулярной массой более склонны к индукции иммунного ответа, чем агрегаты с более низкой молекулярной

массой. Кроме того, повторяющиеся упорядоченные эпитопы (поливалентные эпитопы), которые часто формируются при образовании белковых агрегатов (например, вирус-подобные частицы), могут непосредственно активировать В-клетки. Обширное перекрестное сшивание рецепторов В-клеток структурами более высокого порядка может активировать В-клетки и стимулировать продукцию антител не только к агрегированной, но и к мономерной форме белка.

- **Примеси**

Выделяют ряд потенциальных примесей, присутствующих в фармацевтической субстанции и лекарственном препарате терапевтических белков, которые потенциально могут выполнять роль адъювантов или индуцируют иммунный ответ на себя. Такими адъювантами в активной субстанции могут быть производственные примеси, например, белки клеток-хозяина, липиды или ДНК клеток-хозяина, микробные белки и другие контаминирующие агенты производственного процесса. Риск иммуногенности на белки клетки-хозяина зависит от источника (клеточной линии) получения терапевтического белка.

4 Возможные клинические последствия иммуногенности

Цель исследования иммуногенности терапевтических белков заключается в установлении ее клинической значимости; т.е. определении влияния нежелательного иммунного ответа на фармакокинетику, фармакодинамику, эффективность и безопасность. Факторы, которые определяют способность антител к терапевтическим белкам вызывать клинические последствия, включают распознаваемый эпитоп, аффинность, класс иммуноглобулина специфических антител. Кроме того, влияние на клинический результат может оказывать способность иммунных комплексов активировать комплемент.

4.1 Влияние на эффективность

Антитела могут оказывать влияние на эффективность терапевтического белка либо путем воздействия на фармакодинамическое взаимодействие между терапевтическим белком и его мишенью, либо путем изменения его фармакокинетического профиля.

Связывание терапевтического белка с соответствующими рецепторами может быть подавлено в том случае, когда антитела связываются с активным сайтом (или расположенными вблизи него сайтами) антигена терапевтического белка, а также, если вызывают конформационные изменения. Такие антитела обычно определяют как нейтрализующие антитела.

Антитела могут изменять экспозицию (воздействие) терапевтического белка путем увеличения или уменьшения клиренса терапевтического белка. Когда воздействие препарата снижается из-за увеличения клиренса или увеличивается, такие антитела обычно обозначают как «элиминирующие (очищающие)» или «сохраняющие» антитела, соответственно. Антитела, индуцированные введением терапевтического белка, могут обладать как нейтрализующими, так и элиминирующими (очищающими) или сохраняющими (задерживающими выведение из организма лекарственного препарата) свойствами.

Предполагается, что антитела, не влияющие на клиренс (не-элиминирующие) и не-нейтрализующие, будут, как правило, оказывать меньшее влияние на клинические последствия, связанные с эффективностью препарата. Эффекты индуцированных антител на клинические последствия терапевтических белков могут варьировать от отсутствия влияния до полной потери их эффективности.

Предварительное применение подобных или родственных белковых препаратов, приводящее к формированию иммунных реакций (предсуществующая реактивность), может модифицировать ответ на новый терапевтический белок (повлиять на фармакокинетику, эффективность или безопасность).

Последствия формирования таких антител могут быть серьезными, например, для пациентов, получающих препараты в качестве заместительной терапии, это относится к препаратам факторов свертывания крови или препаратам фермент-заместительной терапии, поскольку предсуществующие антитела могут перекрестно реагировать с вновь введенным белковым лекарственным препаратом, устраняя его эффект. Поэтому следует учитывать потенциальную перекрестную реактивность терапевтического белка с предсуществующими антителами.

4.2 Влияние на безопасность

Наиболее выраженные неблагоприятные последствия клинического применения терапевтических белков, как правило, связаны с их фармакологическими эффектами. Однако иммунные реакции в ряде случаев также могут приводить к неблагоприятным последствиям. При этом иммуноопосредованные нежелательные реакции могут быть как острыми, так и замедленными.

Менее серьезные иммуноопосредованные нежелательные реакции включают инъекционные и инфузионные реакции. Следует отметить, что неаллергические (не связанные с формированием IgE-антител) инфузионные реакции обычно наблюдаются во время первых инфузий и могут быть смягчены предварительным назначением соответствующих препаратов, т.е. проведением премедикации.

- Гиперактивные (острые реакции)

Острые связанные с инфузией реакции, т.е. острые инфузионные реакции, включая анафилактические (анафилактоидные реакции (тип I)), могут развиваться в течение нескольких секунд или через несколько часов после инфузии.

Все острые инфузионные реакции потенциально связаны с формированием иммунного ответа. В то время как некоторые из них являются аллергическими по своей природе (анафилактические) и обычно

опосредуются иммуноглобулином Е (IgE); другие (анафилактоидные) не являются истинными аллергическими реакциями, но клинические проявления у них могут быть одинаковыми. Острые реакции могут сопровождаться выраженной гипотензией, бронхоспазмом, отеком гортани или глотки, затруднением дыхания и (или) крапивницей. Предсуществующий иммунитет может изменить безопасность терапевтического белка, например, приводить к увеличению частоты и (или) тяжести реакций гиперчувствительности.

- Отсроченные реакции (реакции замедленного типа)

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 или при многократной замене препаратов, относящихся к одной группе. Такие реакции замедленной гиперчувствительности 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.

- Аутоиммунные реакции: перекрестная реактивность с эндогенными аналогами

Опасным для жизни клиническим последствием образования антител против терапевтического белка является их перекрестная реактивность с эндогенным белком, когда этот белок играет ключевую роль в физиологических функциях и не имеет избыточной продукции для выполнения этой роли. Например, антитела, перекрестно реагирующие с эндогенным эритропоэтином, были причиной развития истинной красноклеточной аплазии у пациентов с почечной недостаточностью, получавших препарат эпоэтина альфа. Необходимо отметить, что антитела,

индуцированные введением препаратов, созданных на основе новых конструкций (например, слитых белков («fusion proteins»), содержащих физиологически функциональные молекулы), следует исследовать на перекрестную реактивность с соответствующими эндогенными белками.

5 Доклиническая оценка иммуногенности и ее последствий

Терапевтические белки в большинстве случаев проявляют видовую специфичность, т.е. белки человека распознаются организмом животного как чужеродные белки. В связи с этим прогностическая значимость доклинических исследований на животных по оценке иммуногенности терапевтического белка считается низкой. Проведение доклинических исследований *in vitro* или *in vivo*, направленных на прогнозирование иммуногенности у человека, обычно не требуется

Тем не менее, постоянное внимание следует уделять возможности появления новых технологий (новые модели *in silico*, *in vitro* и *in vivo*), которые могут быть использованы в качестве инструментов во время разработки препарата или для первой оценки риска иммуногенности при клиническом исследовании. Методы *in vitro*, основанные на использовании клеток врожденной и адаптивной системы иммунитета, могут быть полезны для выявления клеточно-опосредованного иммунного ответа.

Проблемы иммуногенности могут возникать из-за присутствия в препарате примесей или контаминантов. Предпочтительно полагаться на процессы очистки для удаления примесей и контаминантов, а не на разработку программы доклинических исследований для их идентификации и характеристики. Ожидается, что при проведении клинических исследований, в которых оценивается иммуногенность, будут получены материалы, достаточно убедительные для лекарственного препарата, предназначенного для регистрации.

Изучение формирования антител к лекарственному препарату в исследованиях на животных может быть проведено в рамках исследований

хронической токсичности, для интерпретации результатов этих исследований необходимо использовать рекомендации, изложенные в документе ICH S6 (R1) и руководстве «Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического Союза». В случае, когда изучение и характеристика индуцированных антител не является частью протокола исследования, взятые образцы крови следует хранить для последующей оценки, результаты которой могут быть необходимы для интерпретации результатов проведенных доклинических исследований. Используемые методики должны быть валидированы. При исследовании токсичности, где в образцах обычно присутствуют высокие концентрации терапевтического белка, необходимо учитывать интерференцию терапевтического белка на уровне определяемых антител. Как правило, нет необходимости в оценке иммуногенности при проведении исследования токсичности одной дозы (острая токсичность). Однако для однократной дозы при фармакокинетическом исследовании оценка антител может быть актуальной.

Иммунный ответ на терапевтический белок, являющийся аналогом эндогенного белка, может привести к появлению перекрестно реагирующих антител, направленных против эндогенного белка, в тех случаях, когда синтез последнего сохраняется. Как правило, если риски безопасности могут быть предсказуемы на основании существующих знаний о биологических функциях эндогенного белка, исследования на животных для подтверждения этих рисков не требуются. При отсутствии достаточных знаний, но при наличии имеющихся теоретических предпосылок, указывающих на возможный риск в отношении безопасности применения препарата, для получения информации о возможных последствиях нежелательного иммунного ответа необходимо проведение исследований с иммунизацией животных терапевтическим белком или гомологичным белком соответствующего вида животных. Данные, полученные на животных

моделях, о последствиях индукции иммунного ответа на эндогенный белок или их отсутствии, следует отразить в сводном резюме по иммуногенности.

Нежелательная иммуногенность биологических лекарственных препаратов может проявляться как в виде гуморального, так и клеточного иммунного ответа. При формировании клеточного иммунного ответа фармакодинамические или побочные эффекты (или ожидаемые эффекты) опосредуются иммунными клетками; о развитии клеточного ответа могут свидетельствовать реакции гиперчувствительности замедленного типа или формирование цитотоксических Т-клеток.

При разработке биоподобных биологических лекарственных препаратов (биоаналогичных, «biosimilars») сравнение ответа по формированию антител на биоподобный и референтный (оригинальный) препараты на модели животных, как части сравнительных исследований по доказательству их подобия, не имеет существенного значения, что связано с низкой прогностической значимостью потенциальной иммуногенности препаратов для человека. Однако, при исследовании токсичности или фармакокинетических исследованиях оценка формирования антител важна в плане адекватной интерпретации результатов исследований.

6 Разработка методов обнаружения и определения иммунного ответа у человека

Разработка стратегии комплексного анализа, соответствующей предполагаемому плану лечения, имеет решающее значение для выяснения клинической значимости данных, полученных по оценке иммуногенности. Аналитические методы и методологию оценки иммунного ответа следует выбрать и (или) разработать до этапа клинической разработки препарата. Основное внимание исследователей, как правило, направлено на выявление антител и их характеристику, поскольку это имеет большое значение для определения клинической значимости в плане безопасности и эффективности применения лекарственного препарата. Вместе с тем, клеточно-

опосредованный иммунный ответ также может играть большую роль, заявитель должен рассматривать необходимость его оценки в индивидуальном порядке, где это применимо.

Несмотря на то, что методы будут уточнены в ходе разработки препарата и аналитическая пригодность переоценена в соответствии с использованием методики, заявитель должен предоставить всю необходимую информацию и полные данные по валидации методик, используемых для оценки иммуногенности, при подаче документов для регистрации лекарственного препарата.

6.1 Стратегия изучения и методы оценки антител

Общая стратегия изучения гуморального иммунного ответа предусматривает необходимость использования чувствительных и валидированных методов оценки иммуногенности. Как правило, при проведении исследований следует использовать поэтапный подход. Такой подход включает методы скрининга для идентификации образцов (пациентов) с наличием исследуемых антител и последующий этап подтверждения наличия антител, определения их специфичности и использование ряда функциональных методов для оценки нейтрализующей способности выявленных антител.

Любое отклонение от этой концепции должно быть надлежащим образом обосновано. Все ключевые методики, используемые для скрининга, подтверждения, определения нейтрализующих антител должны быть валидированы для предполагаемого дальнейшего использования. В некоторых случаях может потребоваться тестирование образцов для оценки перекрестной реактивности с другими препаратами на основе одного и того же белка или эндогенного белка, если это имеет значение для оценки влияния на клиническую эффективность и безопасность.

При выборе методик необходимо учитывать быстро развивающиеся технологии совершенствования аналитических методик, используемых для

оценки и характеристики антител. Кроме того, необходимо предусмотреть другие аналитические методы, ненаправленные на выявление антител, (например, методы для определения уровня остаточного содержания препарата и оценки его клинической значимости) такие как, методы определения имеющих значимость биомаркеров или фармакокинетических параметров, которые позволят оценить и охарактеризовать влияние индуцированных антител (если таковые выявлены) на клинические эффекты (Приложение 1).

Если установлена индукция антител у пациентов, следует провести оценку кинетики формирования антител и ее продолжительность, а также оценить степень выраженности гуморального ответа, поскольку он может коррелировать с клиническими проявлениями последствий наличия антител. В таких случаях образцы сыворотки или плазмы следует охарактеризовать в отношении уровня антител (титр), нейтрализующей способности и, возможно, других характеристик, определяемых в каждом конкретном случае в соответствии со свойствами биологического препарата, особенностями терапии пациентов, целью исследования, клиническими симптомами и другими возможными факторами. Последующая характеристика антител, если требуется, должна включать, определение класса и подкласса антител (изотип), их аффинность и специфичность; методики, используемые для оценки указанных характеристик, должны быть аттестованы и соответствовать их назначению.

- Методы для скрининга

Использование скрининговых методов является первым шагом в оценке иммуногенности. Методы должны быть чувствительными и способными обнаруживать все клинически значимые антитела (включая классы IgM, IgG и подклассы IgG), индуцированные введением лекарственного препарата, у всех серопозитивных пациентов (т.е. во всех серопозитивных образцах). Уровень ложноположительных результатов

должен быть низким (желательно не более 5%), при этом ложноотрицательных результатов быть не должно.

Скрининг проводится с использованием иммунологических методов, которые базируются на разнообразных способах и системах обнаружения. Все методы скрининга направлены на выявление взаимодействия между антигенами и антителами (связывание), но основываются на разных научно-технических принципах (ортогональные методы). Выполнение методик должно характеризоваться достаточно высокой производительностью и выполнение соответствующих процедур желательно автоматизировать, при этом следует учитывать, что каждая методика имеет свои особенности и соответствующие ограничения (Приложение 1).

Методы должны быть разработаны, подобраны, оптимизированы и валидированы в соответствии с предполагаемым их использованием. При выборе скрининговых методик следует учитывать все методологические проблемы и мешающие факторы, которые могут повлиять на результаты тестирования. Например, метод ELISA, основанный на прямом связывании с антигеном, который непосредственно иммобилизован на поверхности пластиковых лунок, часто является самым простым для выполнения методом, однако он характеризуется высокой частотой выявления ложноположительных результатов. Кроме того, для такого типа методов характерна высокая частота ложноотрицательных результатов при тестировании образцов, содержащих низкоаффинные антитела. Во избежание вышеуказанных проблем необходимо рассматривать возможность использования других подходящих видов анализа, например, таких как модифицированный метод иммуноферментного анализа/ИФА («binding assays»); электрохемилюминесценция или поверхностный плазмонный резонанс, с учетом их ограничений. При использовании некоторых скрининговых методик возможно маскирование эпитопов, что приводит к получению ложноотрицательных результатов. Данная проблема может быть преодолена, например, путем маркировки детектирующих реагентов с использованием

процедур, которые предотвращают маскирование определенного эпитопа(ов).

Реагенты, используемые при выполнении анализа (например, блокирующие реагенты), следует тщательно изучить. Блокирующие реагенты, такие как бычий сывороточный альбумин (BSA) и молоко, содержат нечеловеческие гликаны, которые иногда могут присутствовать в составе белковых препаратов, полученных с использованием клеток животных, отличных от человека. Таким образом, индуцированные антитела, направленные к этим гликанам, при выполнении методики могут не выявляться.

Образцы (обычно сыворотка или плазма) содержат вещества, которые могут мешать проведению анализа, оказывая матриксные эффекты, которые приводят к ложноположительным или отрицательным результатам и (или) некорректному определению уровня содержания антител. Примерами таких факторов могут быть компоненты комплемента или рецепторы комплемента, маннозосвязывающий белок, Fc рецепторы, растворимые молекулы-мишени и ревматоидный фактор. Влияние таких матриксных компонентов на результаты анализа следует рассматривать и оценивать при проведении валидации методики. Чтобы ослабить потенциальное влияние эффекта матрикса, необходимо выполнить корректирующие меры и обосновать выбранный подход, с учетом наличия ограничений соответствующих методов. Кроме того, остаточное содержание терапевтического белка (лекарственного препарата), присутствующего в крови пациента, может образовывать комплексы с индуцированными антителами и вследствие этого снижать поддающуюся обнаружению концентрацию антител. Эта интерференция может различным образом влиять на методику, в зависимости от ее разновидности, формата и типа, а также характеристики антител. Вопросы, связанные с указанными обстоятельствами, следует решать во время валидации методики. Если такое влияние присутствия остаточного содержания лекарственного препарата выявляется, его можно

преодолеть / разрешить, используя различные методические приемы, например, путем диссоциации иммунных комплексов с помощью кислоты, удалением избыточного количества лекарственного препарата путем твердофазной абсорбции, использованием длительного периода инкубации и (или) использованием метода, позволяющего проводить анализ образцов при его высоких разведениях. В некоторых случаях можно удалить из образца остаточное содержание лекарственного препарата или антиген-мишень, используя лектины или ксеногенные антитела. Такие подходы должны быть валидированы в отношении их эффективности и должно быть показано, что они не оказывают негативного влияния на конечные результаты анализа. В некоторых случаях интерференция остаточного содержания терапевтического белка может быть преодолена путем отбора проб для оценки 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 влиять на схему лечения пациента. В любом случае заявитель должен продемонстрировать, что на чувствительность методики по выявлению антител в образцах не влияет определенный уровень терапевтического препарата, который выше уровня содержания в тестируемых образцах на наличие антител. Из-за технических ограничений не всегда есть возможность разработать полностью нечувствительные методики к присутствию терапевтического белка. Следует использовать наилучший из возможных вариантов анализа, выбранный подход должен быть надлежащим образом обоснован.

- Методы, подтверждающие наличия антител

Подтверждающие анализы предназначены для подтверждения положительных результатов и исключения всех ложноположительных образцов, отобранных в результате скрининга. При выборе метода следует учитывать ограничения и характеристики методов скрининга. Общим подходом для подтверждения наличия антител является добавление

избыточного количества антигена в образец с последующим сравнением результатов анализа образцов, с добавлением и без добавления антигена, и результатами скринингового анализа. Данная процедура должна приводить к ингибированию первоначального связывания антител с антигеном и снижению частоты положительных сигналов от истинно положительных образцов.

Антитела, присутствующие в подтвержденных положительных образцах, должны быть исследованы на их количественное содержание (титр) и специфичность к терапевтическому белку. Известно, что антитела могут быть индуцированы также другими веществами, присутствующими в лекарственном препарате, такими как родственные соединения и посторонние примеси, т.е. компонентами, связанными с продуктом или связанными с процессом производства (например, белки клетки-хозяина). В таких случаях предполагается, что методы по выявлению антител, направленных против этих примесей, также будут разработаны и валидированы для тестирования образцов пациентов, однако уровень примесей следует свести к минимуму, чтобы избежать возможности развития на них иммунного ответа.

- Методы оценки нейтрализующей способности антител

Нейтрализующую способность антител, присутствующих в положительных образцах, необходимо оценивать как часть изучения иммуногенности, поскольку это часто коррелирует со снижением клинического ответа на биологический препарат. Отклонение от этой концепции требует серьезного обоснования. В таких случаях желательно обратиться за консультацией в регуляторный орган. Нейтрализующие антитела ингибируют биологическую активность терапевтического белка путем связывания с эпитопом(ами) внутри или вблизи активного сайта(ов) молекулы или вызывают конформационные изменения. Поскольку нейтрализующие антитела могут непосредственно вызывать клинические эффекты, для их обнаружения требуются специфичные и чувствительные

методы *in vitro*. В основном используются два типа методов по определению нейтрализующей активности антител - методы на основе использования культуры клеток и методы без их использования (не-клеточные методики).

Рекомендуется использовать метод, который хорошо реагирует на биологический продукт и является толерантным к остаточному содержанию терапевтического белка. Биологические методы, используемые для тестирования специфической биологической активности терапевтического белка, часто могут быть адаптированы для оценки нейтрализующих антител. Однако, эти методы могут потребовать совершенствования и доработки, для того чтобы оптимизировать условия оценки выявления нейтрализующей способности антител.

Понимание механизма действия, мишени и эффекторного пути терапевтического воздействия лекарственного препарата имеет решающее значение при выборе принципа метода для анализа нейтрализующих антител. Следует также учитывать клинические последствия, связанные с влиянием риска формирования нейтрализующих антител. Для лекарственных препаратов-агонистов часто используются методы, основанные на использовании клеточных культур; в то время как для лекарственных препаратов на основе гуморальных мишеней молекул-антагонистов чаще предполагается использовать метод конкурентного связывания с лигандом (CLB) без использования клеток. Для препаратов, которые проявляют свою активность только посредством прямого связывания с другими молекулами, например, некоторые препараты моноклональных антител (МкАТ), более адекватным может быть метод CLB или другие альтернативные методы. Однако при выборе использования указанных методов следует доказать, что они объективно отражают потенциальную нейтрализующую способность антител. Для терапевтических препаратов МкАТ - антагонистов, клиническая эффективность которых обусловлена эффекторными функциями антител, рекомендуется использовать методы на основе клеточных культур,

поскольку механизм действия препарата не может быть адекватно отражен при анализе бесклеточным методом CLB.

При оценке нейтрализующей способности антител, как правило, выбирают одну концентрацию биологического лекарственного препарата и проводят разведения каждого исследуемого образца, определяя ингибирующее действие разведений образца на анализируемый ответ, зависимое от снижения концентрации антител. Это позволяет определить эффект нейтрализующей дозы и рассчитать нейтрализующую способность («титр») для каждого исследуемого образца.

Что касается скрининга, во время валидации метода следует показать, что нейтрализация действительно связана с действием антител и не связана с другими ингибирующими компонентами, потенциально присутствующими в матриксе образца. С этой целью для оценки проявления специфичности антител могут быть рассмотрены такие подходы, как истощение антител или использование альтернативных стимулов (если результаты анализа зависят от воздействия множественных стимулов). Следует отметить, что нейтрализующая активность не обязательно коррелирует со связыванием антител, т.е. образцы, содержащие значительное или высокое количество связывающих антител, могут не нейтрализовать биологическую активность, тогда как образцы, содержащие более низкие количества связывающих антител, могут нейтрализовать определенное (в зависимости от образца) количество препарата. Это может зависеть от конкретного препарата, однако оно должно быть определено путем проведения специальных исследований.

- Стратегия оценки иммуногенности - дизайн и интерпретация

План исследования иммуногенности должен быть тщательно разработан, чтобы обеспечить выполнение всех необходимых процедур до начала клинической оценки. План проведения исследований должен включать вопросы, отражающие выбор, оценку и характеристику методов, определение соответствующих точек отбора образцов, включая исходные образцы для определения предсуществующих антител, адекватные объемы

проб, условия обработки и хранения образцов, а также выбор статистических методов анализа полученных данных.

Эти положения относятся к методам, используемым для оценки и характеристики антител, и к методам, используемым для оценки клинических реакций, если установлено, что они вызваны антителами, индуцированными введением терапевтического белка. Многие из этих положений должны быть разработаны конкретно для каждого случая с учетом лекарственного препарата, пациентов и ожидаемых клинических проявлений.

6.2 Контрольные образцы и реагенты

Идентификация и (или) разработка соответствующих положительных и отрицательных контролей имеет решающее значение, поскольку они необходимы для проведения валидации метода. Также их использование тесно связано с интерпретацией результатов анализа и дифференциацией между серопозитивными и серонегативными образцами, т.е. определением положительных и отрицательных образцов по наличию антител. Данные о характеристиках всех контролей, отражающих их свойства и адекватность возможности предполагаемого использования, должны быть предоставлены в регистрационном досье. Это особенно важно для положительного контроля, который во многих случаях является антителами животных, при этом следует учитывать, что их способность связываться с разными эпитопами, например, в случае биоподобных (биоаналогичных, биосимиляров / «biosimilars») препаратов может отличаться.

В идеале, положительный контроль антител является образцом сыворотки, полученной от человека, которая содержит значительную концентрацию антител, объем сыворотки должен быть достаточным для дальнейшего использования. Однако достаточное количество сыворотки человека часто недоступно, для того, чтобы использовать ее в качестве положительного контрольного образца. В таких случаях можно использовать

рекомбинантные антитела человека, специфичные к белку, если они имеются, или использовать в качестве референтного образца сыворотку животных, полученную при их иммунизации лекарственным препаратом. Эти требования также применимы и к биоподобным (биоаналогичным) препаратам. Однако в связи с видовыми различиями использование антител животных имеет больше ограничений, чем использование антител человека, например, при выполнении иммунохимических методик. Кроме того, если методика предусматривает использование реагента, специфичного к иммуноглобулину человека, он не будет адекватно взаимодействовать с антителами, иного происхождения, т.е. антителами, отличными от человека, и результаты таких исследований могут отличаться от результатов, полученных при определении антител человека, содержащихся в образцах плазмы человека.

В силу гетерогенности структуры, специфичности и авидности иммуноглобулинов, содержащихся в стандартах образцах и пробах, калибровка (градуировка) иммунологических методов является трудной задачей. Это обуславливает сложность, или даже невозможность, прямого сравнения испытуемых образцов и стандартных материалов, особенно по их массе. В связи с этим калибровку таких методов необходимо осуществлять, используя хорошо описанные и обоснованные подходы. Например, следует оценить такой вариант как представление данных иммуноферментного анализа в виде титра на основе стандартной процедуры расчета этой величины. Однако чувствительность методики и данные экспериментов, полученных методом добавок, должны быть представлены в количественных значениях. Положительные контроли антител для методов оценки нейтрализации должны обладать значительной нейтрализующей активностью, однако может быть рациональным включение в исследование препарата не-нейтрализующих антител, по крайней мере, в валидационных исследованиях, если такие антитела имеются. Нейтрализующую способность антител в каждом образце трудно определить в единицах массы и обычно

определяют порог нейтрализующей активности антител. Такие пороговые значения (близкие к минимальному пределу обнаружения) должны быть надлежащим образом обоснованы и валидированы для обеспечения обнаружения всех положительных образцов с наличием нейтрализующих антител. Для учета результатов могут быть использованы значения разбавления образца или титра, требуемого для нейтрализации биологической активности препарата.

Как для скрининговых методов, так и для методов определения нейтрализующей активности антител желательно использовать набор стандартных материалов, содержащих различные количества антител (контроли низкого, среднего и высокого содержания антител), которые можно использовать для установления характеристик и валидации аналитических методик и которые могут служить показателями их пригодности. По возможности, набор стандартных материалов должен включать один или несколько препаратов с низким содержанием антител (близким к минимальному пределу обнаружения) и препаратов антител с низкой авидностью.

Отрицательные контроли необходимы для установления базовых показателей анализа, а также для характеристики и валидации методики. Исходные параметры аналитической методики у здоровых субъектов, как правило, довольно легко можно определить путем оценки результатов анализа образцов, полученных от достаточного числа таких субъектов, и обработки 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 пациентов с тем же заболеванием, не участвующих в данном исследовании. В целом, методы должны быть валидированы с использованием того же матрикса, что и анализируемые образцы.

В образцах некоторых субъектов (пациентов) могут содержаться антитела, сформированные еще до начала лечения (предсуществующие антитела), или другие вещества, которые могут давать значимые ложноположительные результаты, поэтому для обеспечения правильности интерпретации результатов исследования образцов, полученных после лечения, в отношении выявления антител, индуцированных введением лекарственного препарата, необходим скрининг пациентов.

Реагенты, используемые при выполнении методик, должны быть квалифицированы (аттестованы) и установлены критерии приемлемости, по крайней мере, для тех, которые наиболее важны. Они должны быть охарактеризованы и их следует хранить в надлежащих условиях (в лиофилизированном виде или замороженном состоянии при соответствующей температуре).

6.3 Валидация методов и интерпретация результатов

Методики, используемые для определения антител и нейтрализующих антител, содержащихся в образцах, полученных от пациентов, должны быть валидированы в отношении их соответствия, материалы по валидации должны быть включены в регистрационное досье. В то время как разработка и валидация методов являются непрерывающимся процессом на протяжении всей разработки препарата, данные по оценке иммуногенности в клинических исследованиях, которые должны быть включены в регистрационное досье, должны были быть получены с использованием валидированных методов. Валидационные исследования должны быть проведены для того, чтобы подтвердить, что используемые аналитические методики позволяют выявлять линейные, зависящие от концентрации ответы соответствующих аналитов, а также характеризуются соответствующей точностью, прецизионностью, чувствительностью, специфичностью и робастностью (устойчивостью, надежностью).

Важное значение имеет включение данных в отношении предельных разведений образцов, позволяющих достоверно оценить результат. Во избежание межлабораторной вариабельности для выполнения анализов предпочтительным является использование централизованной лаборатории в рамках проведения клинических исследований, как предрегистрационных, так и после регистрации препарата. Валидационные исследования должны быть проведены для подтверждения того, что эффект матрикса, обусловленный реактивами или веществами, содержащимися в образцах или интерференцией за счет присутствия лекарственного препарата, не влияет негативным образом на результаты выполненных исследований. Это можно осуществить путем проведения исследований «восстановления» и наблюдая за влиянием таких веществ, содержащихся в матриксе, на ответ, полученный в их отсутствие. Подобное исследование должно быть проведено в отношении всего диапазона разведений проб, используемых в анализах, и в некоторых случаях, по меньшей мере, в отношении предельных разведений, которые можно достоверно оценить.

Крайне важно установить четкие критерии для определения параметров, позволяющих считать образцы положительными или отрицательными, а также условия подтверждения положительных результатов. Установленный подход должен быть обоснован полученными данными. Общим способом определения порога принятия результата как положительного при выполнении иммунологических методов является установление исходных параметров с использованием результатов оценки контрольных образцов здоровых лиц или пациентов, о чем сообщалось выше. Для определения значения такого порога рекомендуется использовать статистические методы. Может быть использован статистический подход для установления отсекаемых значений (cut-off), если это оправдано. Допускается также использование реальных данных (например, удвоенное значение, установленное при изучении исходных параметров) для определения результата, который будет принят в качестве минимального

положительного значения. Для положительных образцов необходимо определить титр антител с использованием стандартного подхода и установить наибольшее разведение образца, при котором отмечается положительный результат. Другой вариант – провести учет результатов в единицах массы, используя положительный контроль антител, но такой подход имеет определенные ограничения, которые обсуждены выше.

6.4 Методы для оценки сравнительной иммуногенности

При разработке биоподобных (биоаналогичных, «bisimilars») препаратов всегда должны быть проведены сравнительные исследования иммуногенности; реже такие исследования требуются при внесении изменений в процесс производства биотехнологического препарата. Рекомендации по проведению указанных исследований приведены в отечественных и международных документах, включая «Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского Экономического Союза».

Тестирование на иммуногенность биоподобного (биоаналогичного) и оригинального (референтного) препаратов должно проводиться в рамках осуществления доказательства биоподобия с использованием одного и того же формата методов анализа, т.е. должны быть использованы методики, базирующиеся на одинаковых принципах, и одинаковом режиме отбора образцов. Предпочтительно, чтобы используемые методики обладали способностью выявлять антитела, направленные против всех эпитопов молекулы, как биоподобного так и референтного препаратов. Если для биоподобного и референтного препарата используются разные методики, требуется валидация методов для анализа двух антигенов с целью исключения любого влияния на результаты потенциальных различий методик в отношении их чувствительности и толерантности к присутствию лекарственного препарата в исследуемых образцах. Демонстрация сходной частоты формирования антител и высокая степень соответствия между

результатами анализа являются хорошим доказательством сопоставимости иммуногенного потенциала препаратов.

Также допустимо, что Заявитель может использовать одну методику, в которой биоподобная молекула используется в качестве антигена. В принципе, такой формат анализа позволяет обнаруживать все антитела к биоподобному препарату, но не обязательно в таком случае выявляются все антитела, направленные к референтному препарату. Вывод о том, что биоподобный препарат является более иммуногенным, должен инициировать исследование основной причины выявленных различий, включая методологические вопросы.

Независимо от подхода, используемого для оценки иммуногенности биоподобного препарата по сравнению с референтным, рекомендуется, чтобы методики были перекрестно валидированы с использованием обоих антигенов, положительных контролей с наличием антител, а также желательно включить в исследование клинические образцы для демонстрации сходства свойств препаратов.

Те же соображения относительно методологии анализа применимы и в тех случаях, когда требуются сравнительные исследования иммуногенности при оценке сопоставимости свойств двух вариантов терапевтического белка, полученных до и после внесения изменений в процесс производства данного препарата.

6.5 Оценка иммуногенности конъюгированных белков и слитых белков («fusion proteins»)

Предполагается, что в ответ на новые биотерапевтические молекулы, такие как сконструированные слитые белки («fusion proteins») и химически конъюгированные белки может наблюдаться формирование антител с различной специфичностью и вариабельной аффинностью к различным эпитопам, которые способны вызывать различные клинические последствия. Оценка такого гуморального ответа, в частности, характеристика

специфичности индуцированных антител является сложной задачей и может потребовать использования нескольких методик для определения иммунного ответа на различные фрагменты молекулы действующего вещества. Одним из вариантов анализа специфичности антител к индивидуальным фрагментам может быть использование стратегии, основанной на принципе конкурентного ингибирования при проведении подтверждающего анализа. Например, для пэгилированного белка последовательность оценки его иммуногенности будет включать скрининговый анализ с использованием пэгилированного терапевтического препарата, затем в подтверждающем анализе при тестировании положительных образцов будет использован цельный терапевтический препарат, не-пэгилированный белок и фрагмент ПЭГ.

6.6 Характеристика антител к терапевтическому белку

Обычно требуется оценка частоты выявления и титров антител, длительность их персистенции и нейтрализующая способность. При определенных обстоятельствах, например, в случае развития анафилактикоидных реакций, целесообразно провести дополнительную характеристику гуморального ответа, и проследить последующую динамику развития иммунного ответа. В таких случаях может быть необходимым определение изотипа и подклассов IgG или функциональной активности Т-клеток. При подозрении на развитие аутоиммунных реакций желательно изучить перекрестную реактивность индуцированных антител с соответствующими эндогенными белками.

7 Иммуногенность и клиническая разработка

Оценка иммуногенности должна быть частью клинических исследований фармакокинетики, фармакодинамики, безопасности и эффективности биологического лекарственного препарата, ориентированного на группы пациентов, которые ранее не подвергались воздействию препарата. Целью

исследований иммуногенности является определение и характеристика иммунного ответа на препарат и исследование корреляций между формированием антител, с одной стороны, и параметров фармакокинетики, показателей фармакодинамики, а также эффективности и безопасности, с другой стороны. Таким образом, оценка иммуногенности должна быть включена в планирование основных клинических исследований, включая синхронизацию отбора образцов для определения антител и выбор соответствующих биомаркеров, если таковые имеются, также как оценка эффективности и безопасности. Проведение специальных клинических исследований иммуногенности, как правило, не требуется.

7.1 Обоснование режима отбора образцов и оценки кинетики формирования антител

Определение иммуногенности у пациентов должно проводиться систематически путем регулярного повторного отбора образцов, в случае развития симптомов, свидетельствующих о подозрении на развитие нежелательного иммунного ответа, проводят забор дополнительных образцов.

Отдельные факторы, связанные с препаратом, потенциально влияют на развитие иммунного ответа на терапевтический белок (см. Раздел). 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 (например, период полувыведения) и влияние присутствия остаточного содержания лекарственного препарата в образцах на результаты анализа по выявлению антител (т.е. должна быть оценена лекарственная толерантность методик, используемых для выявления антител). До начала терапии всегда должны быть взяты исходные образцы.

Заявители должны использовать общепринятую терминологию для описания кинетики гуморального ответа и потенциальных побочных

реакций, обусловленных развитием нежелательного иммунного ответа, с учетом опыта применения подобных препаратов и рекомендаций соответствующих руководств и научных публикаций.. Во время лечения образцы следует брать до очередного введения препарата, поскольку остаточное содержание действующего вещества в плазме может исказить результаты анализа.

Частота отбора образцов, а также сроки и объем проводимых анализов должны быть обоснованы, они зависят от степени риска иммуногенности, установленного в отношении конкретного лекарственного препарата (как описано в резюме программы иммуногенности). Соблюдение режима отбора образцов позволяет выделить пациентов, у которых определяется временный, транзиторный положительный ответ, от пациентов, которые характеризуются формированием стойкого гуморального ответа. Период отбора образцов после окончания лечения должен быть достаточно длительным для того, чтобы можно было сделать вывод о стойкости иммунного ответа, вызванного терапевтическим белком, и выявить иммунные реакции, которые были подавлены самим терапевтическим белком. Сроки отбора образцов после окончания лечения определяются периодом полувыведения белка и лекарственной толерантностью методики по определению антител.

Более частый отбор образцов обычно практикуется на ранних этапах лечения, когда у пациентов обычно наблюдается самый высокий риск выработки антител. Длительное наблюдение за иммуногенностью с менее частым отбором образцов дает дополнительную информацию о развитии и последствиях проявления иммуногенности. Для препаратов, предназначенных для длительного непрерывного лечения, на предрегистрационном этапе необходимо получить данные по оценке иммуногенности в течение одного года, представление данных за более короткий период наблюдения возможно только при наличии соответствующего обоснования.

Иммуногенность, ассоциированная с прерывистой схемой лечения, должна рассматриваться в отношении оценки риска с учетом опыта

применения других аналогичных препаратов, рисков, связанных с потенциальной иммуногенностью, бустерного эффекта и сохранения или появления антител после воздействия препарата.

Если предусмотрены разные пути введения лекарственного препарата, на этапе подачи заявления о его регистрации заявитель должен обосновать подход к оценке иммуногенности при всех путях его введения (см. Резюме по программе иммуногенности).

Риск побочных иммуно-опосредованных эффектов, т.е. побочных реакций, обусловленных проявлением нежелательной иммуногенности, должен быть кратко описан в соответствующих разделах инструкции по применению препарата (Краткая характеристика препарата - SmPC), с учетом того факта, что сравнение результатов, полученных из разных источников и (или) на основании использования разных методов анализа является ненадежным. Целесообразность и возможность регулярного мониторинга иммуногенности, включая необходимость определения концентрации лекарственного препарата, должны быть также включены в инструкции по применению препарата, если это применимо.

7.2 Влияние на фармакокинетику

Формирование антител может влиять на параметры фармакокинетики препарата, особенно на стадию его элиминации. Не-нейтрализующие, «связывающие» антитела иногда также могут изменять, а не просто снижать эффективность препарата, например, за счет увеличения периода полувыведения. Изменение параметров фармакокинетики может быть ранним признаком формирования антител. В связи с этим, Заявителям рекомендуется включать во все исследования фармакокинетики многократного введения препарата дополнительный забор образцов для оценки, как фармакокинетических параметров, так и иммуногенности.

7.3 Влияние иммуногенности на безопасность и эффективность

Присутствие антител может иметь или не иметь клиническую значимость, т.е. их наличие может вызывать или не вызывать клинические последствия. Крайне важно, чтобы клиническая разработка препарата основывалась на анализе потенциальных рисков и возможностей их обнаружения и смягчения клинических последствий. Планирование анализа иммуно-опосредованных побочных реакций должно основываться на анализе рисков, включая предыдущий опыт применения той же группы лекарственных препаратов, наличие потенциально иммуногенных структур в белке, а также популяции пациентов. У пациентов с предрасполагающими антителами лекарственный препарат может проявлять отличающуюся эффективность и иметь иной профиль безопасности; такие пациенты должны быть выделены в отдельную подгруппу, если это возможно, и их образцы проанализированы отдельно. При планировании исследований должны быть определены комплексы симптомов, которые могут быть ассоциированы с острой или замедленной гиперчувствительностью и аутоиммунной реактивностью, а также с потерей эффективности. Потенциальные иммунологические нежелательные реакции следует рассматривать в ПУР.

При установлении наличия антител целесообразно, кроме титра и нейтрализующей способности, оценить дополнительные характеристики антител, например такие, как класс иммуноглобулинов в случае развития реакций гиперчувствительности немедленного типа. Также может быть проведено дальнейшее изучение типичных клинически значимых антител, определен «пороговый» уровень антител, за пределами которого антитела оказывают существенное влияние на эффективность и (или) безопасность.

7.4 Методологические аспекты оценки сопоставимости иммуногенного потенциала как элемента сравнительных исследований

Прямые сравнительные исследования иммуногенности необходимы при разработке биоподобных препаратов, а также могут потребоваться в случае внесения существенных изменений в процесс производства

конкретного препарата, когда проводят исследования по сопоставимости продуктов, полученных до и после внесения изменений.

При изменении процесса производства зарегистрированного лекарственного препарата требуется поэтапное проведение исследований сопоставимости. Если результаты первичных физико-химических и биологических исследований указывают на различия между лекарственными препаратами, полученными до и после внесения изменений в процесс производства, необходимо рассмотреть вопрос о возможных последствиях внесенных изменений на показатели безопасности и эффективности, включая влияние на иммуногенность. При необходимости проведения исследований иммуногенности характер этих исследований должен быть определен на основании анализа выявленных различий, пути введения, кривой зависимости доза-ответ, терапевтического окна и возможного влияния на клиническую картину заболевания, а также опыта, ранее накопленного при разработке данного лекарственного препарата и для лекарственных препаратов этого класса. Оценку иммуногенности, как части клинического исследования при изучении сопоставимости, предпочтительно проводить путем прямого сравнения лекарственных препаратов, полученных до и после внесения изменений в процесс производства. В обоих случаях, при разработке биоподобных (биоаналогичных) препаратов и при внесении существенных изменений в производственный процесс, целевая популяция при проведении клинических исследований эффективности, безопасности и иммуногенности должна быть чувствительной в отношении возможности выявления различий в иммуногенности препаратов и их влияния на клинические показатели, а также быть репрезентативной относительно популяции, для которой препарат предназначен. В случае высокого риска применения препарата образцы должны анализироваться на постоянной основе (на протяжении всего клинического исследования).

Исследование иммуногенности и оценка их результатов должны проводиться в комплексе с исследованиями фармакокинетики, безопасности и эффективности.

Различия в иммуногенности будут подвергать сомнению сопоставимость биоподобного и референтного препаратов, а также новых и старых версий ранее зарегистрированного препарата, кроме того, потребуется тщательный анализ основных причин выявленных различий. Минимальные различия в иммуногенности без корреляции на качественном уровне и без отрицательного воздействия на клиническую эффективность (снижение или потеря эффективности) и безопасность могут быть приемлемыми. Оценка клинической значимости наблюдаемых различий в иммуногенности может вызвать определенные сложности из-за ограниченного размера выборки и продолжительности наблюдения. Если клиническая значимость наблюдаемых различий является неопределенной, например, из-за низкой частоты потенциально серьезных неблагоприятных воздействий или медленного развития иммунного ответа, может потребоваться специальная стратегия управления рисками и обновление ПУР.

7.5 Управление иммуногенностью

Развитие нежелательных иммунных реакций на терапевтический белок нельзя полностью исключить, несмотря на усилия Заявителей по выбору соединений с низким иммуногенным потенциалом. В связи с этим Заявитель должен, если это применимо, изучить возможности снижения неблагоприятного воздействия иммуногенности, наблюдаемого на этапа клинической разработки препарата.

В некоторых случаях применение иммуносупрессивных или противовоспалительных лекарственных препаратов, в качестве сопутствующей терапии, может значительно предотвращать или снижать иммуно-опосредованные нежелательные реакции.

В ряде случаев, как, например, при применении препаратов коагуляционных факторов, может быть предпринята попытка восстановления иммунологической толерантности (индукция иммунологической толерантности – ИИТ) к препарату посредством использования толерогенных схем, например, путем введения больших доз терапевтического белка. Такие терапевтические схемы ИИТ должны быть обоснованы результатами клинических исследований и отражены в соответствующих документах. Заявитель должен включить в инструкцию по применению препарата рекомендации для лечащего врача о том, каким образом можно смягчить последствия проявлений иммуногенности препарата.

8 Фармаконадзор

В состав регистрационного досье должен быть включен ПУР в соответствии с правом Союза в сфере обращения лекарственных средств, рекомендациями по фармаконадзору, включая Правила надлежащей практики фармаконадзора. Вопросы иммуногенности должны быть отражены в разделе спецификации безопасности ПУР терапевтических белков, и в случае необходимости должен быть рассмотрен вопрос о проведении дополнительных мероприятий в рамках фармаконадзора. Что касается внесения изменений в производственный процесс, последствия этого изменения в отношении иммуногенного потенциала, возможно, придется решать в рамках выполнения ПУР. Следует еще раз подчеркнуть, что оценка иммуногенности требует междисциплинарного подхода, для обеспечения лучшего решения вопросов необходимо обязательное совместное участие специалистов по качеству, доклиническим и клиническим исследованиям.

Объем данных по иммуногенности, которые могут и должны быть получены в ходе программы клинической разработки терапевтического белка до его регистрации, зависит от частоты развития иммунного ответа и связанных с ним рисков, обусловленных как иммуногенным потенциалом

белка в популяции(-ях), получающих данный препарат, так и частотой встречаемости заболевания. В связи с этим, наличие данных об иммуногенности на момент регистрации препарата может быть ограничено. Сведения, полученные для данной группы препаратов и (или) референтного препарата (в случае разработки биоподобного препарата), должны быть представлены в полном объеме в соответствующих разделах резюме по клинической безопасности. На основе всех имеющихся данных должно быть сделано заключение о том, может ли препарат представлять значимый потенциальный риск в отношении иммуногенности.

Если сделано такое заключение, иммуногенность должна быть отражена в ПУР как потенциальный или идентифицированный риск или как раздел, требующий получения дополнительной информации. Иммуногенность препарата всегда связана с клинической значимостью. Если оценка не вызывает какой-либо особой озабоченности или неуверенности, то включение исследований иммуногенности, в отношении определения потенциального риска или получения недостающей информации, не требуется.

В рамках плана фармаконадзора в ПУР необходимо отразить необходимость проведения дополнительных мероприятий фармаконадзора. В случае, если дополнительные исследования иммуногенности необходимы, следует разработать наиболее подходящий дизайн программы в соответствии с целью исследования. В настоящее время выявление антител и определение минимального уровня антител не являются рутинными в клинической практике. Поэтому, чтобы получить дополнительные данные по частоте выявления, титру и минимальному уровню антител, могут потребоваться дополнительные клинические исследования или продолжение текущих клинических исследований в пострегистрационном периоде. Такие клинические исследования также могут потребоваться при разработке биоподобного (биоаналогичного) препарата, если дополнительные данные по

иммуногенности необходимо получить при проведении сравнительных исследований в пострегистрационном периоде.

Последующее наблюдение за пациентами, получавшими терапевтический белок во время обычной клинической практики, например, с помощью реестров пациентов, а также сбор спонтанно сообщаемых подозрительных побочных реакций показали, что указанные действия являются ценным инструментом для сбора данных о безопасности таких препаратов. Указанные мероприятия фармаконадзора могут быть также использованы для идентификации нежелательных реакций, обусловленных иммуногенностью, таких как реакция, связанная с инфузией, или истинная красноклеточная аплазия при применении препаратов эритропоэтинов. Основываясь на данные этих источников, важно сделать заключение о потенциальном нежелательном иммунном ответе, учитывая признаки/симптоматику, свидетельствующие о нарушении безопасности и (или) потере эффективности, включая изменения соответствующих биомаркеров; все эти вопросы должны быть отражены в ПУР.

Если иммуногенность включена в раздел технических требований безопасности ПУР, должна быть обсуждена необходимость в проведении дополнительных мероприятий с целью минимизации рисков, в случае необходимости, указанные действия должны быть описаны в соответствующем разделе. Рутинные действия с целью минимизации рисков, связанных с иммуногенностью, также должны быть отражены в инструкции по применению препарата, включая сведения о том, как выявлять и определять минимальный уровень антител, как предотвращать формирование антител и связанные с ним нежелательные реакции.

Для терапевтических белков очень важны вопросы, связанные с идентификацией препарата и номера его серии, которая предположительно вызвала нежелательную реакцию, а также прослеживаемость препарата на фармацевтическом рынке. Это особенно важно для нежелательных реакций, связанных с проявлением иммуногенности, независимо от того, были ли они

выявлены в рамках обычного фармаконадзора и (или) дополнительных мероприятий по фармаконадзору. Кроме того, должны быть предприняты меры по оптимизации прослеживаемости препарата на фармацевтическом рынке, в частности, сбора сведений о брендовом наименовании и номере серии.

9 Резюме программы иммуногенности

Как планирование, так и оценка исследований иммуногенности биологического препарата требует междисциплинарного подхода. Данные, имеющие отношение к оценке иммуногенности, распределяются по различным разделам материалов регистрационного досье, представляемого для регистрации препарата. В связи с этим рекомендуется, чтобы Заявитель включил в документы комплексное резюме по иммуногенности, в том числе обоснование выбранной программы изучения иммуногенности. Резюме должно быть кратким и содержать ссылки на соответствующие главы приложения.

Резюме с оценкой риска может отражать исследования на протяжении всего жизненного цикла лекарственного препарата и может быть использовано для обоснования исследований на различных этапах разработки препарата.

В ряде случаев оценка риска может свидетельствовать о низком риске побочных реакций, обусловленных проявлением нежелательной иммуногенности. Тем не менее, предполагается, что иммуногенность должна изучаться с помощью использования валидированных методов в соответствии со схемой, приведенной в Приложении 1 данного документа. Отклонение от этой схемы, например, отсутствие тестирования на нейтрализующие свойства антител в случае клинических испытаний однократных доз терапевтических белков с низким риском, должно быть обосновано. На основании оценки рисков решается вопрос о необходимости изучения дополнительных характеристик иммунного ответа (например,

изотипирование антител и картирование эпитопов), а также определяется частота отбора образцов, время проведения анализа и выбор целевой популяции.

Резюме должно включать следующие разделы, если применимо.

Анализ факторов риска

1. Предыдущий опыт применения препарата (препаратов данной группы)

a. имеет ли препарат эндогенный аналог

b. имеются ли модели животных, которые позволяют оценить потенциальные последствия иммуногенности (например, элиминация эндогенного белка)

c. известны ли сведения об антигенных участках молекулы

d. попытки снизить проявления иммуногенности препарата до и во время проведения клинических исследований.

2. Вопросы, связанные с физико-химическими и структурными характеристиками препарата

a. существуют ли в молекуле действующего вещества препарата новые потенциально иммуногенные структуры, например, последовательности, чужеродные для организма человека

b. экспрессирующая конструкция и посттрансляционный профиль, например, отличный от человека профиль гликозилирования (гликаны)

c. стабильность и примеси, например, наличие агрегатов (видимые и невидимые частицы)

d. состав и упаковка, например, присутствие потенциальных примесей и возможность выщелачивания.

3. Вызывает ли путь и (или) способ введения настороженность, беспокойство.

4. Факторы, связанные с пациентом или обусловленные заболеванием

a. Статус иммунологической толерантности

- склонность к аутоиммунным реакциям

- отсутствие иммунологической толерантности, например, дефекты генов, кодирующих эндогенные белки

- сопутствующая иммуномодулирующая терапия

b. Предсуществующий иммунитет

- «естественные» антитела

- антитела, индуцированные ранее проведенной терапией препаратами, содержащими родственные субстанции.

Программа оценки риска, связанного с иммуногенностью

5. Стратегия анализа или методология исследования

a. Обоснование выбора методов анализа

- скрининг, подтверждение положительных результатов, определение титров антител

- определение нейтрализующей активности

- другие характеристики антител, например, определение класса и подкласса иммуноглобулинов.

b. Специфичность и чувствительность выбранных методов для конкретного препарата

- выбор положительного контроля(ей)

- определение порогового значения, свидетельствующего о наличии антител (т.е. порогового значения для сероположительных образцов)

c. Толерантность методики к присутствию препарата и других мишеней, т.е. отсутствие влияния на чувствительность методики остаточного содержания в исследуемом образце лекарственного препарата и других антигенов-мишеней

d. Эффект матрикса в различных популяциях т.е. искажение результатов за счет интерференции матрикса

6. Дизайн программы оценки иммуногенности при проведении клинических исследований

a. Отбор образцов для тестирования на иммуногенность

b. Обоснование продолжительности наблюдения

- в период проведения терапии
- без терапии, после окончания терапии.

c. Фармакокинетика

- возможное искажение результатов анализа при выявлении антител, т.е. интерференция за счет присутствия в образцах определенной концентрации препарата

- пороговый уровень содержания лекарственного препарата в отношении толерантности методики по выявлению антител к его присутствию в исследуемом образце

d. Исследование фармакодинамики, эффективности и безопасности

- программа исследования должна быть нацелена на вопросы, связанные с выявлением частоты, продолжительности выявления и клинической значимости потенциальных антител

- реакции гиперчувствительности, аутоиммунные реакции, снижение эффективности препарата

1. Определения (термины) и комплексы симптомов¹

2. Оценка корреляции клинических последствий с наличием антител

7. Как оценка риска влияет на программу изучения иммуногенности

Результаты оценки иммуногенности

¹ Заявитель должен использовать терминологию и определения для характеристики типа гуморального ответа например таких как:

- Kang P. and Saif M. Infusion-Related and с формированием антител (стойкий, транзиторный) и потенциально иммуноопосредованных симптомов в соответствии с определениями, приведенными в научных публикациях Hypersensitivity Reactions of Monoclonal Antibodies Used to Treat Colorectal Cancer—Identification, Prevention, and Management. *Journal of Supportive Oncology*. 2007; 5: 451–457)

- Rup B. et al. Standardizing terms, definitions and concepts for describing and interpreting unwanted immunogenicity of biopharmaceuticals: recommendations of the Innovative Medicines Initiative ABIRISK consortium *Clinical and Experimental Immunology*. 2015; 181: 385–400

- Shankar G. et al. Assessment and Reporting of the Clinical Immunogenicity of Therapeutic Proteins and Peptides - Harmonized Terminology and Tactical Recommendations. *The AAPS Journal*. 2014;16: 658-673

8. Оценка иммуногенности в клинических исследованиях (оценка сравнительной иммуногенности в случае внесения изменений в процесс производства и при разработке биоподобного препарата)

a. Сравнительная оценка частота выявления антител, включая нейтрализующие антитела

b. Сравнительная оценка титров и продолжительности / стойкости выявления антител

c. Дальнейшая характеристика антител, если она необходима, например, определение класса иммуноглобулинов, перекрестная реактивность с соответствующими терапевтическими или эндогенными белками

d. Сравнительная оценка воздействия антител на фармакокинетику, фармакодинамику, эффективность и безопасность

e. Воздействие предсуществующих антител на фармакокинетику, фармакодинамику, эффективность и безопасность.

Выводы о риске(ах), связанных с иммуногенностью

9. Влияние иммуногенности на соотношение польза - риск

10. Подходы к управлению рисками

a. Идентификация групп риска

b. Существует ли безопасный уровень или тип проявления иммуногенности

c. Премедикация, сопутствующая терапия

d. Де-иммунизация (т.е. толерогенная терапия или ИИТ)

e. Способы выявления и смягчения / минимизации рисков

11. Как связать нежелательные реакции с проявлением иммуногенности в пострегистрационном периоде (ПУР)

Приложение 1

Пример стратегии (методологии) оценки иммуногенности

Таблица 1А – Часто используемые скрининговые методы

Методы / Тип анализа	Преимущества / Достоинства	Недостатки
1	2	3
Прямой / Непрямой ELISA	<ul style="list-style-type: none"> - высокая производительность - недорогой - простота в использовании и высокая степень автоматизации - высокая толерантность к белку препарата в жидкой фазе - доступность реагентов и оборудования 	<ul style="list-style-type: none"> - возможно неспецифическое связывание - потенциально высокие фоновые значения - иммобилизация антигена может изменять конформацию антигена и привести к маскировке эпитопов - могут не выявляться низкоаффинные антитела - низкая толерантность к белку препарата при твердофазном варианте - требуются видоспецифичные вторичные реагенты
Модифицированный метод ИФА / Bridging ELISA	<ul style="list-style-type: none"> - высокая производительность - недорогой - простота в использовании и высокая степень автоматизации - низкий уровень фоновых значений - высокая специфичность (за счет двойного связывания) - могут быть использованы межвидовые перекрестно-реагирующие реагенты - доступность реагентов и оборудования 	<ul style="list-style-type: none"> - метка антигена может изменять его свойства - могут не выявляться низкоаффинные антитела - высокая чувствительность к интерференции терапевтическим препаратом, сывороточными компонентами (например, антитела к Ig человека, мультивалентные мишени) - могут не выявляться антитела IgG4 и IgM
Электрохемилюминесценция (с прямым / непрямым связыванием)	<ul style="list-style-type: none"> - высокая производительность - большой динамический диапазон - минимальное влияние матрицы 	<ul style="list-style-type: none"> - могут потребоваться два конъюгата антигена (в непрямо тесте) - метка антигена может изменять его свойства - чувствительность

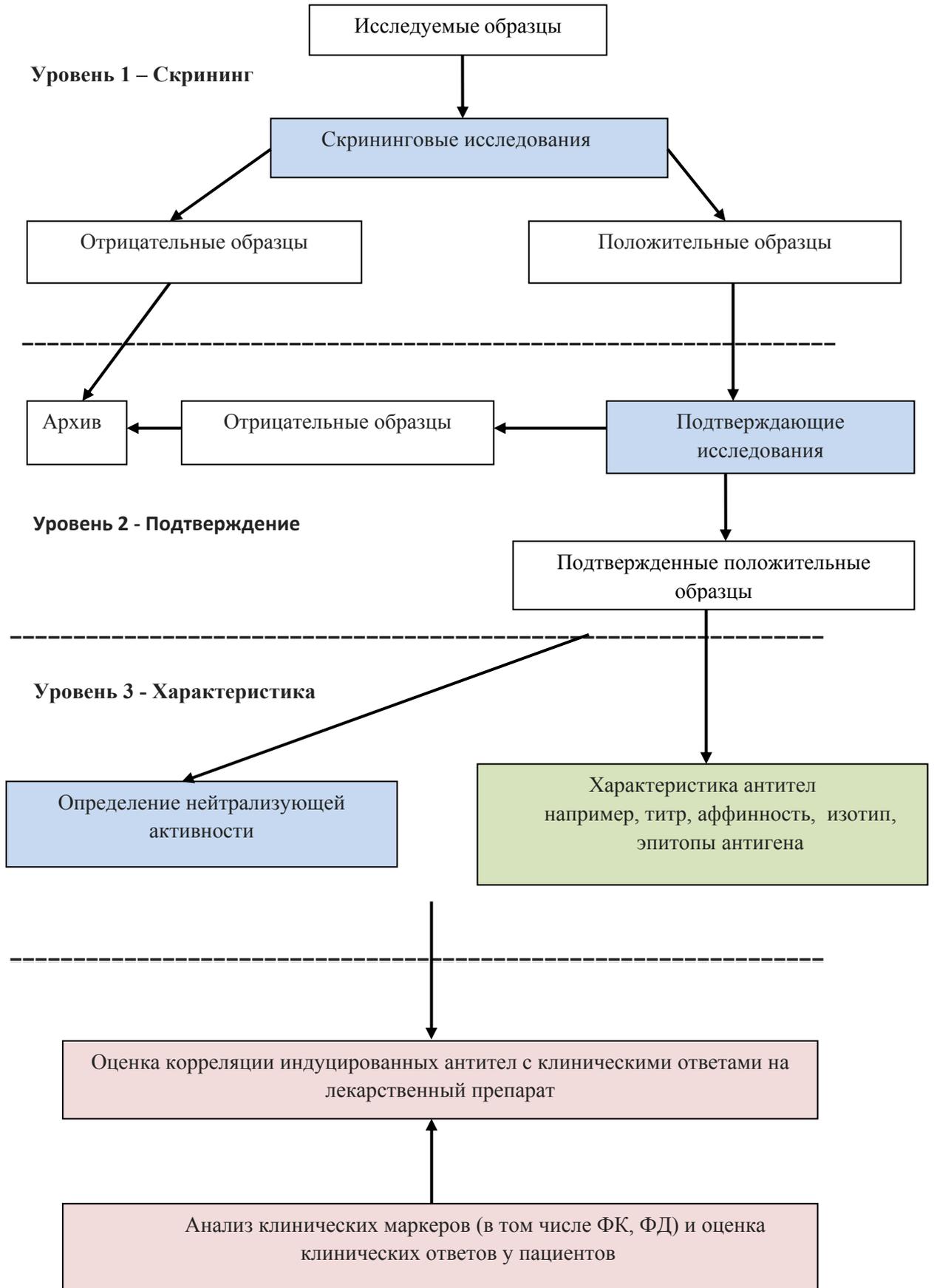
Продолжение таблицы 1А

1	2	3
	<ul style="list-style-type: none"> - высокая толерантность к белку препарата - сигнал обнаружения постоянный в период сохранения активности конъюгата TAG 	<ul style="list-style-type: none"> к интерференции терапевтическим препаратом, сывороточными компонентами (например, антитела к Ig человека, мультивалентные мишени) - могут не выявлять антитела подкласса IgG4 - требуется специальное оборудование и реагенты
<p>Метод радиоиммунопреципитации</p>	<ul style="list-style-type: none"> - средняя производительность - высокая чувствительность - может быть строго специфичным - недорогой 	<ul style="list-style-type: none"> - может быть изотип специфичным - могут не выявляться низкоаффинные антитела - требует использования радиоактивно меченного антигена - распад радиометки может влиять на стабильность антигена
<p>Поверхностный плазмонный резонанс</p>	<ul style="list-style-type: none"> - средняя производительность - определяет специфичность, изотип, относительную аффинность связывания - выявляет низкоаффинные и высокоаффинные антитела - высокая толерантность к белку препарата - не требуются реагенты для выявления антител 	<ul style="list-style-type: none"> - иммобилизация антигена может изменить терапевтический белок - стадия регенерации может вызвать деградацию антигена - чувствительность может быть ниже, по сравнению с методиками связывания - высокая стоимость - требуется специальное оборудование и реагенты

Таблица 1Б – Методы определения нейтрализующей активности антител

Методы / Тип анализа	Преимущества / Достоинства	Недостатки
<p>Биологические методы с использованием клеточных культур</p>	<ul style="list-style-type: none"> - определяет функциональные свойства, отражающие механизм действия препарата - результаты могут коррелировать с клиническим ответом 	<ul style="list-style-type: none"> - относительно трудоемкий - может иметь сложный дизайн - высокая частота вариабельности - подвержен влиянию сывороточных матриксных эффектов и других факторов интерференции - чувствительность к интерференции за счет препарата - валидация может быть трудновыполнимой, за счет использования клеточных линий, реагентов и др.
<p>Метод конкурентного связывания лигандов (CLB)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - быстрый - простой дизайн - относительно легко выполнимый - не требует использования клеточных культур - простота разработки и валидации 	<ul style="list-style-type: none"> - метка антигена может изменить его свойства - чувствительность к интерференции за счет препарата - не позволяет оценить истинную функциональную активность - может не коррелировать с клиническим ответом

Пример стратегии оценки иммуногенности



ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Методические рекомендации «Оценка эффективности и безопасности плазменных и рекомбинантных препаратов IX фактора свертывания крови в странах ЕАЭС»