

Биоаналоговые (биоподобные) лекарственные препараты рекомбинантного гранулоцитарного-колониестимулирующего фактора. Оценка качества

Ж.И. Авдеева, А.А. Солдатов, Н.А. Алпатова, М.В. Киселевский, С.Л. Лысикова,
В.П. Бондарев, Н.В. Медуницын, В.Д. Мосягин, В.А. Меркулов, А.Н. Миронов

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Recombinant granulocyte colony stimulating factor biosimilars. Quality assessment.

Zh.I. Avdeeva, A.A. Soldatov, N.A. Alpatova, M.V. Kiselevsky, S.L. Lysikova,
V.P. Bondarev, N.V. Medunitsyn, V.D. Mosyagin, V.A. Merkulov, A.N. Mironov

Federal State Budgetary Institution
«Scientific Center on Expertise of Medical Application Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

В статье приведены общие принципы проведения научно обоснованных исследований по оценке качества разработанного препарата рекомбинантного гранулоцитарного-колониестимулирующего фактора (рЧГ-КСФ) и доказательства его подобия референтному (ранее зарегистрированному оригинальному препарату). Поскольку качество биотехнологических препаратов определяется процессом производства, при разработке биоаналогового (биоподобного) препарата основное внимание должно быть уделено вопросам процесса производства, начиная от подбора системы экспрессии, состава вспомогательных веществ препарата, методов выделения и очистки рекомбинантного белка. Рекомбинантный белок должен быть охарактеризован по показателям, спектр которых должен быть шире, чем оцениваемые показатели качества оригинального препарата, включенные в спецификацию субстанции или лекарственного препарата. Сравнительные исследования включают характеристику действующего вещества и оценку качества готового лекарственного препарата. Препаратом сравнения при разработке биоаналогового (биоподобного) препарата рЧГ-КСФ (филграстим), как правило, является Нейпоген®. В ряде аналитических методик используют стандартный образец ВОЗ – Международный стандарт рЧГ-КСФ NIBSC (код 09/136). Сравнительные исследования включают оценку состава; физико-химических свойств; первичной структуры и конформации белка; чистоты; качественного и количественного содержания родственных соединений и посторонних примесей, связанных с процессом; биологической активности. Действующее вещество (рекомбинантный белок), присутствующее в биоаналоговом (биоподобном) препарате, должно иметь высокую степень подобия действующему веществу референтного (оригинального) препарата. При выявлении значительных различий в показателях качества разработанного препарата, которые могут оказать воздействие на показатели его безопасности и (или) эффективности, препарат не может рассматриваться как биоаналоговый (биоподобный). Проведение исследований по оценке качества является первым этапом изучения препарата, результаты которого определяют необходимость проведения, объем и вид дальнейших доклинических и (или) клинических исследований. Положения, изложенные в статье, базируются на опыте оценки качества препаратов филграстима, одобренных СМР в странах Евросоюза как биоаналоговые (биоподобные) – «biosimilars», «biosimilar medical products».

Ключевые слова: рекомбинантный гранулоцитарный-колониестимулирующий фактор; филграстим; биоаналоговые (биоподобные) лекарственные препараты; референтный (оригинальный) препарат; действующее вещество; субстанция; сравнительные исследования; исследования доказательства подобия; оценка качества; оценка стабильности.

Библиографическое описание: Авдеева ЖИ, Солдатов АА, Алпатова НА, Киселевский МВ, Лысикова СЛ, Бондарев ВП, Медуницын НВ, Мосягин ВД, Меркулов ВА, Миронов АН. Биоаналоговые (биоподобные) лекарственные препараты рекомбинантного гранулоцитарного-колониестимулирующего фактора. Оценка качества. Биопрепараты 2015; (1): 4-14.

The article describes general principles of evidence-based quality assessment research of a recombinant granulocyte colony stimulating factor preparation (G-CSF) under development as well as a confirmation of its similarity to reference preparation (authorized original preparation). Since the quality of biotech preparations is determined by the manufacturing process, when developing a biosimilar one should focus on the manufacturing process details, starting from the selection of the expression system, the composition of excipients, on to the methods of isolation and purification of recombinant protein. Recombinant protein should be characterized in more details, than the quality parameters of the original preparation, included in the specification of the substance or the preparation. Comparative studies include characterization of the active substance and the assessment of the quality of the finished product. The reference preparation in the development of a biosimilar G-CSF

(filgrastim) is generally Neypogen®. A number of analytical techniques require the use of WHO – International Standard G-CSF NIBSC (code 09/136) reference standard. Comparative studies include the assessment of composition, physical and chemical properties, primary structure and protein conformation, purity, qualitative and quantitative content of related substances and impurities associated with the process; biological activity. The active substance (recombinant protein) in a biosimilar must confirm its similarity to the active substance in a reference (original) preparation. When detecting significant differences in the quality parameters of the developed preparation that can affect its efficacy and (or) safety, the preparation is not considered to be a biosimilar. Quality assessment study is the first stage of drug evaluation. Its results determine the need for further preclinical and (or) clinical trials, as well as their scope and type. The provisions stated in the present article are based on the experience of the quality assessment of filgrastim preparations, approved by the CHMP in the EU as «biosimilars», «biosimilar medical products».

Key words: recombinant granulocyte colony stimulating factor; filgrastim; biosimilars; reference (original) preparation; active substance; substance; comparative studies; confirmation of similarity; quality assessment; stability evaluation.

Bibliographic description: Avdeeva Zhl, Soldatov AA, Alpatova NA, Kiselevsky MV, Lysikova SL, Bondarev VP, Medunitsyn NV, Mosyagin VD, Merkulov VA, Mironov AN. Recombinant granulocyte colony stimulating factor biosimilars. Quality assessment. Biopreparation (Biopharmaceuticals) 2015; (1): 4-14.

1. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (структурные и функциональные особенности)

Цитокины относят к наиболее важной в функциональном отношении группе гуморальных факторов системы иммунитета, обеспечивающих механизмы реализации врожденного и приобретенного иммунитета, а также играющих существенную роль в процессах кроветворения, тканевом гомеостазе и межсистемном взаимодействии за счет передачи сигналов. Цитокины – это белки и полипептиды, которые продуцируются, главным образом, активированными клетками кроветворной и иммунной систем, обеспечивая межклеточные взаимодействия, развитие воспаления, проявления функций иммунной системы и процессов эмбриогенеза. Существует несколько классификаций цитокинов, основанных на разных принципах. Четкая структурная классификация цитокинов отсутствует. К цитокинам относят интерфероны, интерлейкины, хемокины, факторы некроза опухоли, колониестимулирующие факторы, факторы роста. Цитокины действуют по эстафетному принципу – воздействие цитокина на клетку через соответствующие рецепторы вызывает образование других цитокинов, формируя так называемый «цитокиновый каскад» [1–5].

Колониестимулирующие факторы (КСФ) – относятся к одной из подгрупп цитокинов, поддерживающих формирование клеток миелоидного и моноцитарного ряда, среди них выделяют гранулоцитарный-КСФ (Г-КСФ), макрофагальный-КСФ (М-КСФ) и гранулоцитарно-макрофагальный КСФ (ГМ-КСФ). В эту группу цитокинов могут быть отнесены также некоторые из интерлейкинов (ИЛ) – ИЛ-3, ИЛ-7 и ИЛ-11, проявляющих аналогичное биологическое действие. Данное положение свидетельствует об относительной условности классификации белков цитокинов. КСФ регулируют деление, дифференцировку костно-мозговых стволовых клеток и предшественников клеток крови. Кроме того, они могут стимулировать дифференцировку и функциональную активность некоторых клеток, локализующихся вне костного мозга. Все КСФ образуются клетками стромы костного мозга и некоторых других тканей, макрофагами, активированными Т-лимфоцитами и др. [1, 6, 7].

Биологические эффекты КСФ были изучены в 70-е годы XX века, однако более подробная характеристика белков КСФ на молекулярном уровне дана в 1990-е годы, когда стало возможным клонирование генов указанных ростовых факторов.

М-КСФ вырабатывается моноцитами, в меньшей степени эндотелиальными клетками и фибробластами, активи-

рует пролиферацию предшественников макрофагов в костном мозге.

ГМ-КСФ продуцируется макрофагами и Т-лимфоцитами, а также фибробластами и эндотелиоцитами, стимулирует деление и дифференцировку предшественников гранулоцитов и макрофагов, активирует функцию макрофагов и гранулоцитов, пролиферацию Т-клеток, участвует в стимуляции и дифференцировке кроветворных предшественников в антигенпрезентирующие дендритные клетки [1, 3, 5].

Эндогенный Г-КСФ человека является кислым гликопротеином, состоящим из одной полипептидной цепи из 174 аминокислот, его молекулярная масса составляет 19,6 кДа. Молекула Г-КСФ содержит свободную сульфгидрильную группу цистеина (в положении Cys¹⁷) и две внутримолекулярные дисульфидные связи в положениях Cys³⁶–Cys⁴² и Cys⁶⁴–Cys⁷⁴.

Эндогенный Г-КСФ человека не содержит сайтов N-гликолизирования, в отличие от эритропоэтина (ЭПО), который имеет сайты N-О-гликозирования (рис. 1). Единственная О-гликозильная группа у эндогенного Г-КСФ присоединена к остатку треонина (Thr¹³³) [8]. Углеводный остаток на Thr¹³³ составляет около 4% от общей молекулярной массы гликопротеина Г-КСФ, в то время как у ЭПО – до 40%.

Результатами исследования методом сайт-специфического мутагенеза показано, что свободный Cys не влияет на специфическую активность белка, в то же время модификация цистеинов, участвующих в формировании дисульфидных связей, приводит к снижению специфической биологической активности белка и нарушению вторичной и третичной структур молекулы Г-КСФ.

Г-КСФ в основном продуцируется моноцитами-макрофагами, а также фибробластами, эндотелиальными клетками и клетками стромы костного мозга, влияет на гранулоцитарный рост кроветворения, стимулирует деление и дифференцировку стволовых клеток, регулирует образование функционально активных нейтрофилов и их выход в кровь из костного мозга. Г-КСФ также способен несколько усиливать активность нейтрофилов и эозинофилов.

Как правило, в плазме крови присутствует около 10 пкг/мл эндогенного Г-КСФ, в некоторых случаях (инфекционные процессы, апластическая анемия, нейтропения и др.) его концентрация может быть выше – до 100 пкг/мл. Присутствие в плазме определенного уровня Г-КСФ объясняется его сигнальной функцией для поддержания в циркуляции стационарного уровня нейтрофилов.

Синтез Г-КСФ кодируется геном, локализованным на 17-й хромосоме. Г-КСФ человека синтезируется в двух изоформах. Белок типа А состоит из 177 аминокислотных

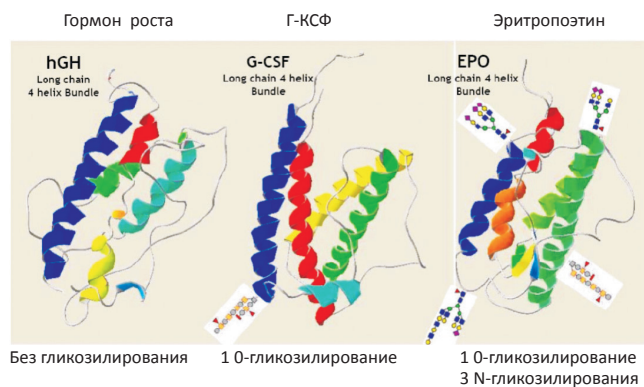


Рис. 1. Схема строения эндогенных белков.

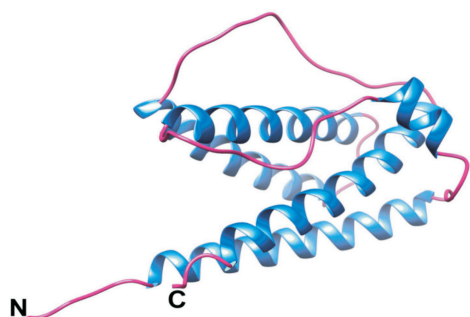


Рис. 2. Схема строения филграстима.

остатков, белок типа В представляет собой основную форму и состоит из 174 аминокислотных остатков. Изоформа типа А отличается от изоформы В тем, что она содержит три дополнительных остатка (Val-Ser-Gln), которые вставлены после Leu35. Белок типа В характеризуется большей биологической активностью и стабильностью и является основой для разработки лекарственных препаратов филграстима, в том числе, препарата Нейпоген®. Первичные структуры Г-КСФ человека и мыши гомологичны на 72,6%.

В клинической практике используются препараты Г-КСФ, полученные с помощью технологии рекомбинантной ДНК в системе клеток *Escherichia coli* (филграстим), или в системе клеток яичников китайских хомячков (CHO) (ленограстим).

Филграстим (рекомбинантный Г-КСФ человека, рГ-КСФ) представляет собой белок, состоящий из 175 аминокислот, молекулярная масса 18,8 кДа. Аминокислотная последовательность филграстима идентична эндогенному Г-КСФ человека, за исключением того, что рекомбинантный белок не гликозилированный. Он содержит дополнительный остаток метионина на N-конце, который отсутствует у эндогенного Г-КСФ, и который стабилизирует третичную структуру белка в бактериальной экспрессирующей системе. Филграстим не имеет O-связанного углеводного остатка, но содержит 5 остатков цистеина, как у эндогенного Г-КСФ, которые образуют 2 дисульфидных мостика, оставляя 1 свободный остаток цистеина (рис. 2).

Ленограстим (рГ-КСФ) в большей степени идентичен природному Г-КСФ, по сравнению с филграстимом, поскольку в структуру его молекулы внедрены углеводные цепи, сходные с таковыми молекулы эндогенного Г-КСФ. Значимость указанной модификации при клиническом использовании препаратов не установлена. Результаты сравнительных исследований биологических и физико-химических свойств интактного и гликозилированного рГ-КСФ (филграстима и ленограстима) в различных экспериментальных условиях свидетельствуют о том, что углевод-

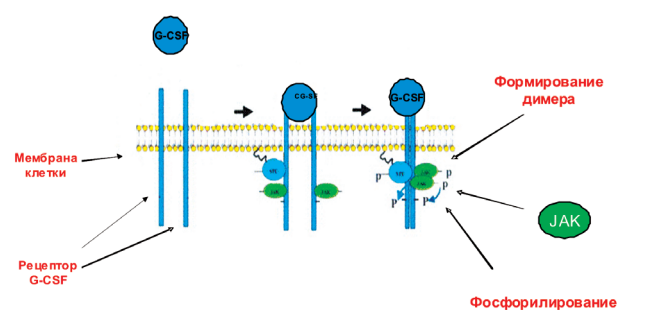


Рис. 3. Активация сигнального пути при взаимодействии Г-КСФ с соответствующим рецептором.

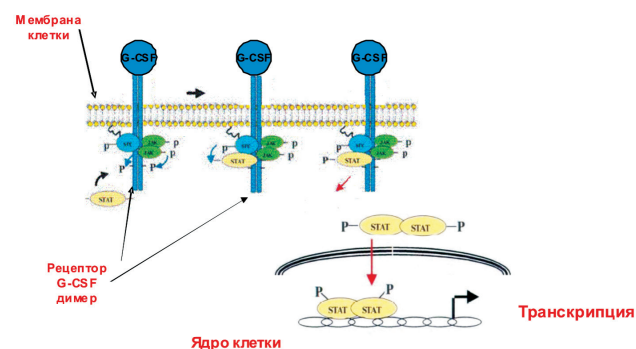


Рис. 4. Пути передачи информации от внеклеточных сигналов к промоторам генов-мишеней в ядре клетки.

ная цепочка не влияет на их биологические функции и связывание со специфическим рецептором [9]. В ряде исследований показано, что углеводный остаток существенно повышает физико-химическую стабильность молекулы рГ-КСФ, защищая цистеин-17-сульфгидрильную группу и предотвращая полимеризацию и/или конформационные изменения белка [10–13]. Молекулярный механизм стабилизирующего эффекта гликозилирования, по-видимому, состоит в том, что углеводный остаток уменьшает подвижность в молекуле белка в районе сайта гликолизирования [14].

По мнению ряда исследователей [15] клиренс гликозилированного Г-КСФ при длительном применении увеличивается. Результаты исследований активности гликозилированного препарата, оцениваемой в тестах *in vitro*, позволили предположить, что она на 25% выше, чем у филграстима. Однако авторы заключают, что это является результатом снижения периода его полураспада в культуральной среде [9–11, 16]. Безопасность и эффективность обоих препаратов была продемонстрирована в многочисленных исследованиях [17–20]. Проведенные клинические исследования свидетельствуют об идентичности клинической эффективности указанных препаратов филграстима и ленограстима [21–23].

Г-КСФ человека проявляет свою активность за счет связывания со специфическим трансмембранным рецептором, состоящим из двух цепей – α и β , экспрессируемым на различных гемопоэтических клетках, включая стволовые клетки, предшественники мультипотентных клеток, предшественники миелоидных клеток, нейтрофилов и моноцитов. Этот рецептор образует гомо-олигомерные комплексы для связывания лиганда. Выделяют семь мембрано-ассоциированных и одну растворимую изоформу рецептора Г-КСФ. Мембрано-ассоциированные изоформы формируются за счет альтернативного сплайсинга РНК, ведущего к различиям в последовательностях цитоплазматического участка рецептора, при этом внеклеточные лиганд-связывающие домены всех изоформ идентичны [24].

Трансмембранный рецептор используется для передачи информации внутрь клетки по сигнальному пути, ключевой молекулой которого является Янус киназа (Jak), которая ассоциирована с обеими цепями рецептора. При связывании Г-КСФ с рецептором, последний димеризуется, Jak активируется и фосфорилирует специфические тирозиновые аминокислотные остатки в составе рецептора, что дает возможность присоединиться к ним сигнальному белку-трансдуктору и активатору транскрипции (STAT). Jak/STAT система передает информацию от внеклеточных полипептидных сигналов, через трансмембранные рецепторы, непосредственно к промоторам генов-мишеней в ядре без участия вторичных мессенджеров. Механизмы реализации биологических функций Г-КСФ за счет специфического взаимодействия с соответствующим рецептором представлены на рисунках 3, 4. Jak/STAT – опосредованный путь передачи сигналов является основным, но не единственным, поскольку с рецептором связаны не только Jak-киназы, но и киназы, относящиеся к другим семействам. При их активации запускаются дополнительные сигнальные пути, приводящие к активации других транскрипционных факторов.

Эффекты Г-КСФ (рекомбинантного и эндогенного) опосредованы его взаимодействием с рецептором одного класса аффинности. При этом одни и те же механизмы действия лежат в основе проявления биологической активности при мобилизации зрелых нейтрофилов и выхода их в кровяное русло и при ускорении гранулопоэза.

Биологическое действие Г-КСФ:

- регулирует пролиферацию и дифференцировку клеток предшественников в костном мозге и высвобождение зрелых нейтрофилов в периферической крови;

- является регулятором гранулопоэза, действуя на разных стадиях развития миелоидной клетки;
- повышает эффекторные функции нормальных зрелых нейтрофилов, в том числе хемотаксис, фагоцитирующую активность, процессы окислительного метаболизма;
- стимулирует продукцию интерферона альфа, увеличивает способность нейтрофилов к антителозависимому лизису опухолевых клеток.

2. Лекарственные препараты филграстима

В клинической практике с 1990-х годов успешно применяются оригинальные препараты рекомбинантного Г-КСФ – негликозилированный рГГ-КСФ – филграстим (Нейпоген®, «Ф. Хоффман-Ля Рош Лтд.», Швейцария) и гликозилированный рГГ-КСФ – ленограстим (Граноцит®, «Авентис фарма», Франция).

Лекарственный препарат на основе филграстима внедрен в клиническую практику в США с 1991 г. Препарат ленограстима зарегистрирован в Европе и Японии в 1993 г. Наиболее широко в клинической практике используются препараты филграстима [25–28].

Препарат Нейпоген® (филграстим) раствор для подкожного введения (производство компании «Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд.» («F. Hoffmann-La Roche Ltd.»), Базель, Швейцария (Basel, Switzerland) зарегистрирован в России в 1999 г.

В таблицах 1, 2 приведен перечень зарегистрированных в РФ препаратов филграстима отечественного и зарубежного производства. Отечественные препараты были зарегистрированы не в соответствии с требованиями, предъявляемыми при регистрации к «биоаналоговым (биоподобным)» препаратам, в

Таблица 1. Отечественные препараты филграстима

№ п/п	Торговое наименование	Международное непатентованное наименование	Форма выпуска	Владелец РУ	Регистрационный номер	Дата государственной регистрации
1	Миеластра	Филграстим	Раствор для в/в и п/к введения	«Лэнс-Фарм» ООО, Россия	ЛС-002703	29.12.2006
2	Нейпомакс®	Филграстим	Раствор для в/в и п/к введения	«Фармстандарт-Уфимский витаминный завод» ОАО, Россия	ЛСР-004332/07	28.11.2007
3	Граноген®	Филграстим	Раствор для в/в и п/к введения	ООО «Фармапар», Россия	ЛСР-010390/08	23.12.2008
4	Нейтростим®	Филграстим	Раствор для в/в и п/к введения	«Вектор ВБ» ГНЦ ФГУН Роспотребнадз-ора, Россия	ЛСР-010185/08	15.12.2008
5	Лейкостим®	Филграстим	Раствор для в/в и п/к введения	ЗАО «Биокад», Россия	ЛС-002011	15.06.2009

Таблица 2. Зарубежные препараты филграстима, зарегистрированные в РФ

№ п/п	Торговое наименование	Международное непатентованное наименование	Форма выпуска	Владелец РУ	Регистрационный номер	Дата государственной регистрации
1	Лейцита	Филграстим	Раствор для в/в и п/к введения	АкВида ГмбХ, Германия	ЛСР-001783/08	17.03.2008
2	Грасальва	Филграстим	Раствор для в/в и п/к введения	«Тева Фармацевтические Предприятия Лтд.», Израиль	ЛСР-006476/08 ЛС-000970	13.08.2008 09.07.2010
3	Гранокрин	Филграстим	Раствор для п/к введения	«Харбинская Фарм. Биоинж. корпорация Ко., Лтд.», Китай	ЛСР-003499/09	2009
4	Филергим	Филграстим	Раствор для в/в и п/к введения	«Гедеон Рихтер» ОАО, Венгрия	ЛСР-002698/10	31.03.2010
5	Нейпоген®	Филграстим	Раствор для п/к введения	«Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд.», Швейцария	П N011221/02	09.06.2010
6	Нейпоген®	Филграстим	Раствор для в/в и п/к введения	«Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд.», Швейцария	П N011221/01	02.06.2010
7	Теваграстим	Филграстим	Раствор для в/в и п/к введения	«Тева Фармацевтические Предприятия Лтд.», Израиль; Лемери С.А. де С.В., Мексика	ЛСР-008796/10	26.08.2010
8	Иммуграст®	Филграстим	Раствор для в/в и п/к введения	«Д-р Редди`с Лабораторис Лтд.», Индия	ЛП-000368	24.02.2011
9	Зарсио®	Филграстим	Раствор для в/в и п/к введения	«Сандоз ГмбХ», Австрия	ЛП-001302	29.11.2011

связи с отсутствием в России нормативной базы, регламентирующей подход к регистрации данной группы препаратов.

В таблице 3 указаны препараты рекомбинантного Г-КСФ, одобренные CHMP для клинического использования в странах ЕС – 3 препарата лицензированы как оригинальные и 6 препаратов как «biosimilars» (в соответствии с положениями, изложенными в документе Article 10(4) of Directive 2001/83/EC с поправками). Препараты филграстима, одобренные FDA, представлены в таблице 4.

Оригинальные препараты, одобренные CHMP – Нейпоген® (филграстим), Граноцит® (ленограстим), Неуласта® (пегфилграстим). Препараты, одобренные FDA – Нейпоген® (филграстим), Неуласта® (пегфилграстим) и Тбо-филграстим. Следует отметить, что пегилированные препараты филграстима успешно применяются в клинике, однако положения о биоаналоговых (биоподобных) препаратах не касаются пегилированных препаратов и они при регистрации рассматриваются как оригинальные.

Лекарственные препараты филграстима выпускаются для внутривенного и подкожного введения. Показанием для назначения препаратов являются нейтропения после цитотоксической химиотерапии по поводу злокачественных заболеваний или после миелоаблативной терапии с последующей трансплантацией костного мозга; мобилизация клеток предшественников периферических клеток крови; тяжелая врожденная, циклическая или идиопатическая нейтропения; нейтропения, которая развилась на фоне ВИЧ-инфекции.

Противопоказаниями к применению препарата Нейпоген® являются гиперчувствительность к компонентам препарата, тяжелая врожденная нейтропения с цитогенетическими нарушениями (синдром Костмана), использование препарата с целью повышения доз цитотоксических химиотерапевтических препаратов выше рекомендованных, одновременное применение с цитотоксической химио- и лучевой терапией.

При использовании в онкологии применение препаратов филграстима значительно снижает частоту, тяжесть и продолжительность нейтропении и фебрильной нейтропении, уменьшает необходимость и длительность стационарного лечения у больных, получающих химиотерапию цитостатиками или миелоаблативную терапию [29, 31].

Антитела к рГ-КСФ, синтезированному в культуре клеток *E. coli* (филграстиму), при клиническом применении вырабатываются не часто, поэтому, согласно имеющемуся опыту, не оказывают существенного влияния на безопасность и эффективность препарата. Возможные факторы риска развития иммунного ответа, связанные с особенностями патологии и пациента, не известны. Однако присутствие высокомолекулярных примесей в препаратах филграстима, как и в любых дру-

гих биологических препаратах, повышает риск проявления потенциальной иммуногенности. В связи с этим особое внимание должно быть уделено характеристике примесей при оценке качества препарата. Исследование иммуногенности является одним из важных разделов проведения доклинических и клинических исследований биотехнологических препаратов, включая проведение сравнительных исследований биоаналогового (биоподобного) и референтного (оригинального) препаратов при доказательстве их подобия.

3. Особенности производства лекарственных препаратов Г-КСФ

Качество любого биологического препарата обеспечивается и гарантируется производственным процессом и контролем в процессе производства, организованным и охарактеризованным в соответствии с требованиями GMP. В связи с этим, разработка нового препарата филграстима должна включать выбор системы экспрессии, обоснование этапов технологического процесса, установление критических контрольных точек, обеспечение внутрипроизводственного контроля и контроля готового продукта, выбор состава вспомогательных веществ, выбор адекватных высокочувствительных аналитических методов исследования, установление допустимых пределов оцениваемых показателей, разработку спецификаций и т.д. Качественный и количественный состав препарата должны быть подобраны в оптимальном соотношении, должен быть выбран первичный упаковочный материал, совместимый с компонентами лекарственного препарата, проведены исследования долгосрочной стабильности. Результаты исследования стабильности должны подтвердить, что выбранный состав отвечает всем установленным требованиям, и качество конечного препарата соответствует установленным спецификациям. Требования к биотехнологическим препаратам изложены в отечественных и международных документах [33–38].

Вопросы производства и контроля при разработке биоаналогового (биоподобного) препарата решаются индивидуально для каждого препарата, при этом следует учитывать информацию и современные научные достижения по разработке любого биотехнологического препарата, а также сведения, касающиеся конкретной группы препаратов, в частности препаратов филграстима.

Необходимо учитывать, что процедуры, используемые на этапах технологического процесса, способны оказывать влияние на структуру белковой молекулы Г-КСФ, появление изоформ, а также качественное и количественное содержание родственных соединений и посторонних примесей, связанных с производственным процессом. К приме-

Таблица 3. Препараты рекомбинантного Г-КСФ, одобренные CHMP для клинического применения в странах ЕС

Оригинальные препараты

Препарат	ИНН	Дистрибьютор	Производитель	Клеточная линия
Neupogen®	Filgrastim	Amgen	Amgen	<i>E. coli</i>
Granocyte®	Lenograstim	Chugai Pharma	Chugai Pharma	CHO-Zellen
Neulasta®	Pegfilgrastim	Amgen	Amgen	<i>E. coli</i>

Биоподобные препараты

Препарат	ИНН	Дистрибьютор	Производитель	Клеточная линия	Референтный препарат
Filgrastim Hexal®	Filgrastim	Hexal	Sandoz	<i>E. coli</i>	Neupogen®
Zarzio®	Filgrastim	Sandoz	Sandoz	<i>E. coli</i>	Neupogen®
Biograstim®	Filgrastim	Ct Arzneimittel	SICOR Biotech	<i>E. coli</i>	Neupogen®
Filgrastim ratiopharm®	Filgrastim	Ratiopharm	SICOR Biotech	<i>E. coli</i>	Neupogen®
Ratiograstim®	Filgrastim	Ratiopharm	SICOR Biotech	<i>E. coli</i>	Neupogen®
Tevagrastim®	Filgrastim	Teva	SICOR Biotech	<i>E. coli</i>	Neupogen®

Таблица 4. Препараты филграстима, одобренные FDA

Торговое наименование	Активный компонент
NEULASTA	PEGFILGRASTIM
NEUPOGEN	FILGRASTIM
TBO-FILGRASTIM	TBO-FILGRASTIM

сям, связанным с процессом производства, относятся компоненты клетки-хозяина и клетки-продуцента, эндотоксины, компоненты культуральной среды, реагенты, используемые на этапах очистки целевого белка и др. Уровень их содержания в препарате Г-КСФ свидетельствует о степени его очистки в процессе производства.

Производство препаратов филграстима, получаемых с применением метода рекомбинантной ДНК на основе стабильно экспрессирующей конструкции, базируется на системе банков клеток, включающей Главный и Рабочий банки клеток. Результаты проведенных исследований должны подтвердить идентичность, чистоту, жизнеспособность и стабильность клеток при их использовании в процессе производства, а также генетическую стабильность экспрессирующей конструкции клетки-продуцента [37].

Этапы получения рекомбинантного метионинового Г-КСФ включают:

- культивирование штамма-продуцента *E. coli*;
- разрушение бактериальных клеток;
- высвобождение и солюбилизацию телец, содержащих филграстим и выделение целевого белка;
- этапы фильтрации и стадии хроматографической очистки с целью освобождения филграстима от других загрязняющих белков и примесей и получения очищенного действующего вещества.

С целью предупреждения контаминации посторонними агентами промежуточных продуктов и готового препарата и обеспечения вирусной безопасности должен оцениваться источник реагентов и материалов, используемых в процессе производства (в частности, содержание в них компонентов человеческого или животного происхождения). Используемые в процессе производства материалы биологического происхождения должны быть охарактеризованы и должны соответствовать требованиям микробиологической и вирусной безопасности [38].

В случае использования в процессе производства материалов биологического происхождения, таких как один или несколько компонентов культуральной среды, полисорбат-80 или других, для обеспечения вирусной безопасности в процесс производства включают дополнительные этапы обработки промежуточного продукта. Например, инкубация продукта при $pH \leq 1,0$ в течение не менее 6 ч, повышение температуры до $120^{\circ}C$ или другие способы, обеспечивающие инактивацию потенциальной вирусной контаминации. Используемые способы инактивации (удаления) вирусных контаминантов не должны влиять на биологическую активность препарата.

Производство готовой лекарственной формы препарата включает этап формулирования – смешивание действующего вещества с наполнителями (композиционный буфер и полисорбат-80) и корректировку pH; стерилизующую фильтрацию; внесение препарата в предварительно стерилизованные шприцы или флаконы.

При разработке производственного процесса должна быть проведена оценка соответствия оборудования и используемых материалов, определены критические точки производства. Стабильность и надежность разработанного процесса должна быть подтверждена результатами вали-

дации процесса, позволяющего получать продукт, соответствующий установленным спецификациям ЕФ [39].

При разработке биоаналоговых (биоподобных) препаратов филграстима необходимо учитывать, что препарат должен выпускаться только в жидкой лекарственной форме, поскольку лиофилизированный филграстим после растворения имеет тенденцию к образованию агрегатов. Особое внимание должно быть обращено на оптимальный выбор состава вспомогательных веществ. Состав биоаналогового (биоподобного) препарата может быть неидентичным составу референтного (оригинального) препарата.

Буферная система должна обеспечивать низкие значения pH, поскольку структура молекулы рГ-КСФ в этих условиях более стабильна. Оптимальные значения pH близки к 4,0–4,3; более высокие – способствуют образованию агрегатов. В зарегистрированных препаратах филграстима буферная система, поддерживающая требуемые значения pH, создается использованием 10 мМ глутаматного буфера (pH доводят раствором натрия гидроксида до 3,8–4,4) или ацетатного буфера.

Для белковых препаратов, предназначенных для подкожного введения, стандартными вспомогательными веществами являются сорбитол и полисорбат-80. Сорбитол стабилизирует белок, способствуя поддержанию рекомбинантного белка филграстима в наиболее компактном и нативном состоянии, предотвращает образование агрегатов, обеспечивает изотоничность раствора при концентрации 50 мг/мл (плотность раствора около 1,017 г/мл).

Важно отметить, что лекарственные препараты, содержащие сорбитол, не могут быть использованы для пациентов, имеющих врожденную непереносимость (отсутствие толерантности) к фруктозе. Это должно быть указано в инструкции по применению данных препаратов.

Полисорбат-80 защищает рекомбинантный белок филграстима от адсорбции на поверхностях первичной упаковки и агрегирования при механических стрессах. Оптимальная концентрация полисорбата-80 в препаратах филграстима составляет от 0,004 до 0,006%. Результаты исследований с помощью ОФ-ВЭЖХ показали, что повышение содержания в препарате полисорбата-80 сопровождается увеличением содержания окисленных форм филграстима. При исследовании методом электрофореза (SDS-PAAG) установлено, что при увеличении в препарате содержания полисорбата-80 до 0,01% и хранении его в течение двух лет при температуре $4^{\circ}C$, наблюдается образование агрегатов, сопровождающееся снижением содержания мономера филграстима. Увеличение содержания агрегатов и снижение мономера отмечено и при стрессовых условиях хранения ($40 \pm 2^{\circ}C$) (рис. 5).

Лекарственный препарат филграстима выпускают в виде раствора для инъекций (инфузий) в стеклянных шприцах одноразового использования (Нейпоген® – во флаконах).

Стекло шприца и резиновые пробки поршня могут быть обработаны силиконовым маслом или покрыты флуоротеком (Fluorotek®). Указанные вещества минимально влияют на химические и физические свойства компонентов препарата филграстима. Обработка стекла шприца и пробки поршня препятствует отрицательному влиянию взаимодействия компонентов препарата с материалом первичной упаковки, что может сопровождаться адсорбцией белка действующего вещества, формированием агрегатов и другими нежелательными явлениями в процессе хранения препарата.

В составе вспомогательных веществ или при разведении препарата филграстим должно быть исключено

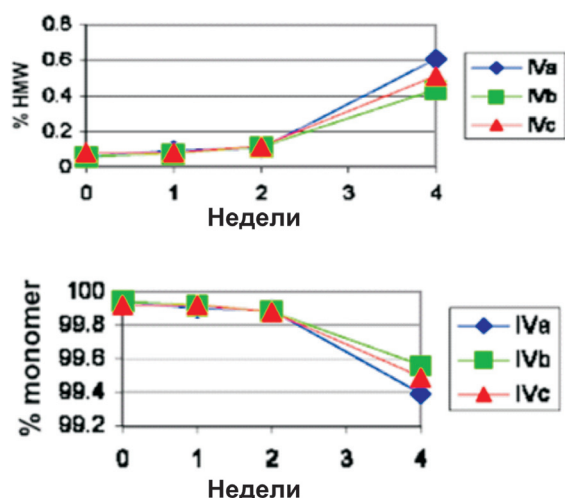


Рис. 5. Оценка стабильности 3 серий препарата филграстима в стрессовых условиях (при 400C) при повышенном содержании полисорбата-80 (0,008 %); HMW – агрегаты, monomer – мономеры.

использование хлорида натрия, так как данный компонент может индуцировать гидрофобные взаимодействия, способствуя формированию агрегатов.

Качество стекла шприцов должно соответствовать гидролитическому классу I (ЕФ). Состав каучука, из которого сделано устройство для защиты иглы и пробка поршня, качество наполнителей и реагентов, используемых для обработки материала первичной упаковки, должно соответствовать требованиям ЕФ.

Оценку совместимости действующего вещества со вспомогательными веществами, совместимости раствора лекарственного препарата с материалом первичной упаковки и стабильности состава препарата проводят в процессе его хранения в ускоренных (при температуре $25 \pm 2^\circ\text{C}$) и стрессовых условиях ($40 \pm 2^\circ\text{C}$) (согласно рекомендациям ICH) [40, 41].

Определяемые параметры – степень окисления, образование агрегатов, стабильность заряженных изоформ, степень абсорбции активного вещества к стенкам контейнера и др.

Исследования стабильности должны включать также оценку стабильности препаратов филграстима при условиях его клинического применения. Для приготовления раствора для инфузий препараты филграстима разводят 5% раствором декстрозы до концентрации не менее 5 мкг/мл, при разведении до 15 мкг/мл и ниже – добавляют альбумин (2 мг/мл).

Результаты исследования стабильности должны подтвердить, что при указанных условиях разведения компоненты препарата совместимы со стеклом и пластмассой системы для инфузий (поливинилхлоридом, полипропиленом и полиолефином – сополимер полипропилена и полиэтилена или др.).

4. Исследования по доказательству сходства/подобия физико-химических и биологических свойств разработанного биоаналогового (биоподобного) и референтного (оригинального) препаратов Г-КСФ

Основополагающие принципы разработки и порядок регистрации биоаналоговых (биоподобных) лекарственных препаратов, полученных с использованием методов биотехнологии и генной инженерии, изложены в соответствующих отечественных и международных документах [33, 42, 43]. Кроме

того, ЕМА разработаны требования к проведению доклинических и клинических исследований отдельных 9 групп биоаналоговых (биоподобных) лекарственных препаратов – филграстим, эритропоэтин, интерферон альфа и интерферон бета, соматотропин, фолликулостимулирующий гормон, инсулин, гепарин, моноклональные антитела. Также разработан документ по оценке качества биоаналоговых (биоподобных) биотехнологических лекарственных препаратов [44].

Согласно рекомендациям данных документов, для того чтобы препарат рчГ-КСФ был зарегистрирован как биоаналоговый (биоподобный), должны быть проведены сравнительные исследования по доказательству подобия (сходства) разработанного и референтного (оригинального) препаратов, начиная с этапа оценки качества действующего вещества и готовой лекарственной формы. Объем последующих сравнительных исследований на доклиническом и (или) клиническом этапах может быть сокращен при условии высокой степени сходства (подобия) исследуемых препаратов. Разработанный препарат может быть рассмотрен как биоподобный оригинальному препарату при условии доказательства его подобия (сходства) на всех этапах сравнительных исследований. В случае выявления различий, должны быть представлены обоснования и доказательства, что они не имеют клинической значимости, т.е. не влияют на профиль безопасности и эффективности [45].

Препаратом сравнения для препаратов филграстима, как правило, является оригинальный препарат Нейпоген®, который был зарегистрирован на основании полного досье (т.е. представления для регистрации результатов доклинических и клинических исследований, выполненных в полном объеме) и который имеет значительный положительный опыт клинического применения. В сравнительных исследованиях должно быть использовано несколько серий референтного (оригинального) препарата с учетом сроков с момента его выпуска.

Исследования поэтапного доказательства подобия начинают с оценки качества препаратов. Условно исследования качества биоаналогового (биоподобного) препарата рчГ-КСФ можно разделить на два этапа. Разрабатываемый препарат должен, прежде всего, соответствовать общим требованиям, предъявляемым к биотехнологическим препаратам. В частности, должно быть проведено определение содержания посторонних примесей, связанных с процессом производства – остаточное содержание белка клетки-хозяина; содержание ДНК клетки-продуцента; компонентов культуральной среды; реагентов, используемых в процессе производства и др. Также должна быть проведена оценка качества биоаналогового (биоподобного) препарата в объеме, установленном для референтного (оригинального) препарата Г-КСФ, и определено соответствие исследуемых показателей установленным спецификациям (требования ЕФ) (табл. 5).

Основной целью сравнительного этапа исследований является доказательство сходства (подобия) разработанного препарата с оригинальным, а также выявление потенциальных различий между исследуемыми препаратами. Сравнительные исследования должны быть проведены с использованием широкого набора современных аналитических методов. Выбор спектра аналитических методик определяется их специфичностью и чувствительностью, позволяющих выявить различия между исследуемыми препаратами. Оптимальным является использование для оценки каждого показателя методик, основывающихся на разных принципах, что позволяет получить взаимодополняющую информацию по оцениваемому параметру.

Исследования включают оценку сходства (подобия) структурных характеристик, физико-химических и биологических свойств, профилей чистоты, содержания родственных соединений и посторонних примесей, профилей стабильности препаратов в ускоренных и стрессовых условиях хранения.

Физико-химические свойства должны оцениваться с использованием комбинации различных аналитических методов. Следует оценивать не только первичную структуру белка, но и определить правильность его конформации, т.е. структуры белка более высокого порядка (вторичную, третичную, четвертичную). Должны быть охарактеризованы дисульфидные связи, проведена оценка вариабельности N-конца аминокислотной последовательности, определена молекулярная масса исследуемых белков.

Профили чистоты, состав и содержание примесей оценивают как качественно, так и количественно с помощью различных аналитических методов.

Биологические свойства оценивают с использованием методов в условиях *in vitro* и в экспериментах *in vivo* на животных.

Для доказательства сходства (подобия) действующего вещества разработанного и референтного (оригинального) препаратов Г-КСФ при проведении сравнительных исследований оценивают следующие параметры с использованием ряда аналитических методик, которые должны быть валидированы [46–48].

Характеристика белка/Физико-химические свойства:

- **Определение молекулярной массы (м.м.).**

- **Оценка первичной структуры** – определение аминокислотного состава и аминокислотной последовательности (например, пептидное картирование и идентифицирование пептидных фрагментов с помощью различных масс-спектрометрических методов и их комбинаций; возможно использование взаимодополняющих ферментативных или химических методов расщепления).

- **Оценка структур более высокого порядка:**

- круговой дихроизм (КД);
- спектроскопия в инфракрасной области с использованием преобразования Фурье (ПФ-ИК);
- аналитическое ультрацентрифугирование;
- флуоресцентные методы (флуоресцентный эмиссионный спектральный анализ);
- дифференциальная сканирующая калориметрия;
- аналитическое ультрацентрифугирование;
- рентгеновская кристаллография;
- ядерно-магнитная резонансная (ЯМР) спектроскопия;
- масс-спектрометрия (МС).

- **Подлинность:**

- обращенно-фазовая ВЭЖХ (ОФ-ВЭЖХ);
- электрофорез в ПААГ с SDS в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях (распределение по молекулярной массе, выявление родственных соединений и посторонних примесей, м.м. которых отличается от м.м. филграстима);
- эксклюзионная хроматография (SEC-HPLC) (выявление родственных соединений и примесей с м.м. большей, чем у филграстима);
- N-концевое секвенирование;
- пептидное картирование;
- изоэлектрическое фокусирование (выявление родственных соединений и посторонних примесей, отличающихся по заряду);
- масс-спектрометрия.

- **Иммунохимические свойства:**

- Вестерн-блоттинг.

- **Гидрофобные свойства:**

- ОФ-ВЭЖХ.

- **Концентрация филграстима:**

- эксклюзионная хроматография (SEC-HPLC) (Гель-фильтрационная ВЭЖХ).

- **Чистота** (определение содержания мономера и родственных соединений, окисленных форм, деамидированных форм, димеров, агрегатов);

- ОФ-ВЭЖХ (содержание мономера, окисленных форм);

- электрофорез в ПААГ с SDS в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях (выявление родственных соединений и посторонних примесей, м.м. которых отличается от м.м. филграстима);

- эксклюзионная хроматография (SEC-HPLC);

- гель-фильтрационная ВЭЖХ (содержание димеров, агрегатов);

- изоэлектрическое фокусирование (IEF) (выявление родственных соединений и примесей, отличающихся по заряду);

- ионообменная ВЭЖХ (ИО-ВЭЖХ) (содержание мономеров, димеров, деамидированных форм, заряженных изомеров).

- **Примеси, связанные с процессом производства:**

- белки клетки-хозяина – ИФА;
- ДНК клетки-производителя – полимеразная цепная реакция (ПЦР);
- бактериальные эндотоксины – LAL-тест;
- содержание реагентов, используемых на этапах производства.

- **Биологическая активность (методы *in vitro* и *in vivo*):**

- метод *in vitro* на культуре клеток линии NFS-60 (клетки миелоидного лейкоза мыши) с оценкой уровня их пролиферации под влиянием препарата;

- метод *in vivo* на мышах с индуцированной нейтропенией или на здоровых грызунах с оценкой степени стимуляции гранулопоэза под влиянием препарата.

- **Связывание с рецептором (специфичность и аффинность связывания):**

- метод поверхностного плазмонного резонанса (образовавшийся комплекс может быть проанализирован с помощью масс-спектрометрии);
- радиоизотопный метод.

Спектр используемых методик может различаться в зависимости от их доступности для производителя, особенностей препарата и технологии его изготовления.

Для характеристики оцениваемых показателей могут быть использованы и другие, не указанные методики, по мере их разработки на основе научного прогресса.

При анализе результатов сравнительных исследований и доказательстве подобия (сходства) физико-химических свойств биоаналогового (биоподобного) и референтного (оригинального) препаратов Г-КСФ допустимые пределы оцениваемых показателей не должны быть шире, чем диапазон вариабельности результатов исследования нескольких серий оригинального препарата, при условии, что отсутствует другое обоснование. При этом допустимые пределы оцениваемых показателей, устанавливаются отдельно от тех, которые указаны в ФС, вводятся в спецификацию при выпуске препарата и устанавливаются в соответствии с рекомендациями ICH Q6B [49].

При выявлении значимых различий между сравниваемыми препаратами по показателям качества они должны быть критически оценены при проведении и анализе результатов последующих доклинических и (или) клинических исследований.

Таблица. 5. Спецификации по ФС «Филграстим, раствор концентрированный»

Показатель	Метод	Норма
Подлинность	А. Метод ОФ-ВЭЖХ, биологический метод <i>in vivo</i> , биологический метод <i>in vitro</i> с использованием клеточной культуры Б. <u>Изофокусирование</u> (раздел «Примеси с зарядом, отличным от филграстима») В. <u>Эксклюзионная хроматография</u> (раздел «Примеси с м.м. большей, чем м.м. филграстима») Г. <u>Электрофорез в полиакриламидном геле</u> (раздел «Примеси с м.м., отличающейся от м.м. филграстима») Д. <u>Пептидное картирование</u> Селективный гидролиз пептидных связей	Соответствуют результатам со стандартным раствором Основная полоса на электрофореграмме испытуемого раствора должна соответствовать положению основной полосы стандартного раствора Основной пик на хроматограмме испытуемого раствора по времени удерживания должен соответствовать основному пику на хроматограмме стандартного раствора Основная полоса на электрофореграмме испытуемого раствора должна соответствовать положению основной полосы на электрофореграмме стандартного раствора Хроматографический профиль испытуемого раствора должен соответствовать хроматографическому профилю стандартного раствора
pH	Потенциометрический	От 3,8 до 4,2
Чистота - примеси с молекулярной массой большей, чем молекулярная масса филграстима - примеси с молекулярной массой, отличающейся от филграстима - примеси с зарядом, отличающимся от филграстима - родственные белки	А. ВЭЖХ («Эксклюзионная хроматография») Б. Электрофорез в ПААГ с SDS В. Изoeлектрическое фокусирование ВЭЖХ	Сумма пиков со временем удерживания меньшим, чем у основного пика, не более 2% На электрофореграмме испытуемого раствора не должны выявляться полосы с более интенсивным окрашиванием, чем основная полоса испытуемого раствора (2 %) Интенсивность полос всех примесей на электрофореграмме испытуемого раствора не должна превышать интенсивность основной полосы на электрофореграмме стандартного раствора (10%) Любая примесь: каждая примесь – не более 2% - <i>общее содержание примесей</i> : не более 3,5%
Количественное определение - белок	ВЭЖХ	Не менее 0,9 мг/мл
Специфическая активность	Биологический метод на культуре клеток (<i>in vitro</i>)	Не менее $1,0 \times 10^8$ МЕ/1 мг белка
Бактериальные эндотоксины	LAL-тест	Не более 2,0 ЕЗ/мг филграстима
Примечание. Эмпирическая формула: $C_{845}H_{1339}N_{223}O_{243}S_9$; Молекулярная масса: 18799 Да.		

Препарат не может рассматриваться как биоаналоговый (биоподобный) в случае установления значительных различий, которые имеют клиническую значимость, т.е. оказывают влияние на показатели безопасности и/или эффективности его применения.

Данные по оценке сопоставимости препаратов, полученных при изменении процесса производства, рассматриваются отдельно от сравнительных исследований по доказательству подобия разработанного и референтного препаратов. Исследования по сопоставимости препаратов проводят в соответствии с рекомендациями, изложенными в отечественных и зарубежных документах [32, 50–52]. В сравнительных исследованиях разрабатываемого препарата желательно использование препарата, изготовленного в соответствии с конечным производственным процессом и установленными показателями качества.

5. Оценка стабильности разработанного биоаналогового (биоподобного) и оригинального препаратов рГГ-КСФ

Срок годности вновь разработанного препарата рГГ-КСФ должен быть установлен в процессе оценки его стабильности в условиях реального времени.

При этом демонстрация сходства (подобия) разработанного и референтного (оригинального) препаратов включает сравнительные исследования по оценке стабильности препаратов в ускоренных ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) и стрессовых ($40 \pm 2^\circ\text{C}$) условиях хранения (согласно рекомендациям ICH) [40, 41]. В процессе ускоренного хранения препаратов рГГ-КСФ и в стрессовых условиях хранения возможно формирование димеров, высокомолекулярных соединений и изменение других оцениваемых показателей качества. Сравнение препаратов

в процессе хранения в указанных условиях позволяет оценить сходство (подобие) профилей деградации разработанного и оригинального препаратов рекомбинантного Г-КСФ.

Кроме традиционных исследований стабильности, при изучении качества препаратов рГГ-КСФ необходимо изучение фотостабильности, так как действующее вещество препарата относится к фотолabileм веществам. Лекарственный препарат филграстима должен храниться в условиях, защищенных от света.

Заключение

Таким образом, при разработке биоаналогового (биоподобного) препарата основное внимание, прежде всего, должно быть уделено вопросам процесса производства, начиная от подбора системы экспрессии, состава препарата, методов выделения и очистки рекомбинантного белка, поскольку качество биотехнологических препаратов определяется процессом производства. Рекомбинантный белок должен быть охарактеризован по показателям, спектр которых должен быть шире, чем оцениваемые показатели референтного препарата, включенные в спецификацию субстанции или лекарственного препарата. Для доказательства подобия (сходства) разрабатываемого препарата должны быть проведены сравнительные исследования с использованием широкого набора современных разнонаправленных аналитических методов исследования, позволяющих выявить различия между исследуемыми препаратами. Сравнительные исследования проводят на уровне действующего вещества и лекарственного препарата. Препаратом сравнения, как правило, является оригинальный препарат Нейпоген®. В ряде аналитических методик дополнительно используют также стандартный образец ВОЗ – международный стандарт рГГ-КСФ NIBSC

(код 09/136). Сравнительные исследования включают оценку состава, физико-химических свойств, первичной структуры белка и структур более высокого порядка, чистоты, наличия родственных соединений и посторонних примесей, связанных с процессом, биологической активности. Допустимые пределы оцениваемых показателей не должны быть шире, чем диапазон варируемости результатов оригинального препарата (если нет иного обоснования). При выявлении значительных различий в показателях качества разработанного препарата рЧГ-КСФ, которые могут воздействовать на показатели его безопасности и/или эффективности, препарат не может рассматриваться как биоаналоговый (биоподобный).

Литература:

1. Ярилин АА. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010.
2. Медуницын НВ. Вакцинология. М.: Трида-Х; 2010.
3. Кетлинский СА, Симбирцев АС. Цитокины. СПб: Фолиант; 2008.
4. Ковальчук ЛВ, Ганковская ЛВ, Мешкова РЯ. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2012.
5. The Cytokine Handbook V. 1, 4th Edition, ed. A.W. Thomson, London: Elsevier Science Ltd; 2003.
6. Querol S, Cancelas JA, Amat L, Capmany G, Garcia J. Effect of glycosylation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on expansion cultures of umbilical cord blood CD34⁺ cells. *Haematologica* 1999; 84: 493–8.
7. Nohynek GJ, Plard JP, Wells MY, Zerial A. Comparison of the potency of glycosylated and nonglycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factors in neutropenic and nonneutropenic CD rats. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1997; 39: 259–66.
8. Kubota N, Orita T, Hattori K, Oh-eda M, Ochi N, Yamazaki T. Structural characterization of natural and recombinant human granulocyte colony-stimulating factors. *J Biochem*. 1990; 107: 486–92.
9. Nissen C. Glycosylation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: implications for stability and potency. *Eur J Cancer*. 1994; 30A(3): 12–4.
10. Oh-eda M, Hasegawa M, Hattori K, Kuboniwa H, Kojima T, Orita T, et al. O-linked sugar chain of human granulocyte colony-stimulating factor protects it against polymerization and denaturation allowing it to retain its biological activity. *J Biol Chem*. 1990; 265: 11432–5.
11. Ono M. Physicochemical and biochemical characteristics of glycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (lenograstim). *Eur J Cancer* 1994; 30A(3): 7–11.
12. Wang C, Eufemi M, Turano C, Giartosio A. Influence of the carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins. *Biochemistry* 1996; 35: 7299–307.
13. Arakawa T, Prestrelski SJ, Narhi LO, Boone TC, Kenney WC. Cysteine 17 of recombinant human granulocyte colony stimulating factor is partially solvent-exposed. *J Protein Chem*. 1993; 12: 525–31.
14. Lu HS, Fausset P, Narhi L, Horan T, Shinagawa K, Shimamoto G, Boone T. Chemical modification and site-directed mutagenesis of methionine residues in recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. Effect on stability and biological activity. *Arch Biochem Biophys*. 1999; 362(1): 1–11.
15. Akizuki S, Mizorogi F, Inoue T, Sudo K, Ohnishi A. Pharmacokinetics and adverse events following 5-day repeated administration of lenograstim, a recombinant human granulocyte colony-stimulating factor, in healthy subjects. *Bone Marrow Transplant*. 2000; 26: 939–46.
16. Pedrazzoli P, Gibelli N, Pavesi L, Preti P, Piolini M, Bertolini F, et al. Effects of glycosylated and non-glycosylated G-CSFs, alone and in combination with other cytokines, on the growth of human progenitor cells. *Anticancer Res*. 1996; 16(4A): 1781–5.
17. Welte K, Gabrilove J, Bronchud MH, Platzer E, Morstyn G. Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years. *Blood*. 1996; 88: 1907–29.
18. Welte K, Reiter A, Mempel K, Pfetsch M, Schwab G, Schrappe M, Riehm H. A randomized phase-III study of the efficacy of granulocyte colony-stimulating factor in children with high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1996; 87: 3143–50.
19. Gisselbrecht G, Prentice HG, Bacigalupo A, Biron P, Milpied N, Rubie H, et al. Placebo-controlled phase III trial of lenograstim in bone-marrow transplantation. *Lancet*. 1994; 343: 696–700.
20. Seymour AM, de Campos E, Thatcher N, De Greve J, Cunningham D, Howell A, et al. A single-blind, randomised, vehicle-controlled dose-finding study of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (lenograstim) in patients undergoing chemotherapy for solid cancers and lymphoma. *Eur J Cancer*. 1995; 31A: 2157–63.
21. Högglund M, Smedmyr B, Bengtsson M, Tötterman TH, Cour-Chabernaud V, Yver A, Simonsson B. Mobilization of CD34⁺ cells by glycosylated and nonglycosylated G-CSF in healthy volunteers – a comparative study. *Eur J Haematol*. 1997; 59: 177–83.
22. Kim IH, Park SK, Suh OK, Oh JM. Comparison of lenograstim and filgrastim on haematological effects after autologous peripheral blood stem cell transplantation with high-dose chemotherapy. *Curr Med Res Opin*. 2003; 19(8): 753–9.
23. Watts MJ, Addison I, Long SG, Hartley S, Warrington S, Boyce M, Linch DC. Crossover study of the haematological effects and pharmacokinetics of glycosylated and non-glycosylated G-CSF in healthy volunteers. *Br J Haematol*. 1997; 98(2): 474–9.
24. Young D, Zhan H, Cheng Q, Hou J, Matthews D. Characterization of the receptor binding determinants of granulocyte colony stimulating factor. *Protein Sci*. 1997; 6(6): 1228–36.
25. Martino M, Console G, Irreza G, Callea I, Condemi A, Dattola A, et al. Harvesting peripheral blood progenitor cells from healthy donors: retrospective comparison of filgrastim and lenograstim. *J Clin Apher*. 2005; 20(3): 129–36.
26. Teramura M, Kimura A, Iwase S, Yonemura Y, Nakao S, Urabe A, et al. Treatment of severe aplastic anemia with antithymocyte globulin and cyclosporin

A with or without G-CSF in adults: a multicenter randomized study in Japan. *Blood* 2007; 110(6): 1756–61.

27. Cooper KL, Madan J, Whyte S, Stevenson MD, Akehurst RL. Granulocyte colony-stimulating factors for febrile neutropenia prophylaxis following chemotherapy: systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2011; 11: 404.
28. Aapro MS, Bohlius J, Cameron DA, Dal Lago L, Donnelly JP, Kearney N, et al. 2010 update of EORTC guidelines for the use of granulocyte-colony stimulating factor to reduce the incidence of chemotherapy-induced febrile neutropenia in adult patients with lymphoproliferative disorders and solid tumours. *Eur J Cancer*. 2011; 47: 8–32.
29. Aapro MS, Cameron DA, Pettengell R, Bohlius J, Crawford J, Ellis M, et al. EORTC guidelines for the use of granulocyte-colony stimulating factor to reduce the incidence of chemotherapy-induced febrile neutropenia in adult patients with lymphomas and solid tumours. *Eur J Cancer*. 2006; 42: 2433–53.
30. Clark OAC, Lyman G, Castro AA, et al. Colony stimulating factors for chemotherapy induced febrile neutropenia. [Review]. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. The Cochrane Collaboration. Published by John Wiley & Sons; 2008.
31. Johnston E, Crawford J, Blackwell S, Bjurström T, Lockbaum P, Roskos L, et al. Randomized, dose-escalation study of SD/01 compared with daily filgrastim in patients receiving chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2000; 18(13): 2522–8.
32. Мионов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Ч. 2. М.: Гриф и К; 2012.
33. Мионов АН, ред. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1. М.: Гриф и К; 2013.
34. Guidelines on the quality, safety, and efficacy of biotechnological protein products prepared by recombinant DNA technology. 2013. Replacement of Annex 3 of WHO Technical Report Series, № 814. WHO Expert Committee on Biological Standardization.
35. ICH S6 Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals. International Conference on Harmonisation; 1997.
36. ICH guideline S6 (R1) Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. EMA/CHMP/ICH/731268/1998.
37. ICH Q5D Derivation and Characterization of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products. International Conference on Harmonisation; 1997.
38. ICH Q5A Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin. International Conference on Harmonisation; 1997.
39. Европейская Фармакопея 7.0 (07/2010:2206). Филграстим, раствор концентрированный. 2010; 4037–40.
40. ICH Q5C Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products. International Conference on Harmonisation; 1995.
41. ICH Q1A (R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products. International Conference on Harmonisation; 2003.
42. Similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues. EMA/CHMP/BMWP/42832/2005.
43. Similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues. EMA/CHMP/BMWP/49348/2005.
44. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (revision 1) EMA/CHMP/BWP/247713/2012. London. 2014.
45. Guideline on similar medicinal products containing recombinant granulocyte colony stimulating factor. EMA/CHMP/BMWP/31329/2005.
46. ICH Q2A Validation of Analytical Procedures. International Conference on Harmonisation; 1994.
47. ICH Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. International Conference on Harmonisation; 1996.
48. Guideline on bioanalytical method validation. EMA/CHMP/EWP/192217/2009.
49. ICH Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products. International Conference on Harmonisation; 1999.
50. Guideline on Comparability of Medicinal Products Containing Biotechnology-Derived Proteins as Drug Substance: Non-clinical and Clinical Issues. CPMP/3097/02.
51. ICH topic Q5E, Step 5 Note for Guidance on Biotechnological/Biological Products Subject to changes in their Manufacturing Process. CHMP/ICH/5721/03. EMA. June 2005.
52. Guideline on Comparability of Biotechnology-Derived Medicinal Products after a Change in the Manufacturing Process. Non-Clinical and Clinical Issues. EMA/CPMP/BMWP/101695/2006. London. 19 July 2007.

References

1. Yarinlin AA. Immunology. Moscow: GEOTAR-Media; 2010 (in Russian).
2. Medunitsyn NV. Vaccinology. Moscow: Triada-X; 2010 (in Russian).
3. Ketlinsky SA, Simbirtsev AS. Cytokines. Saint Petersburg: Foliant; 2008 (in Russian).
4. Kovalchuk LV, Gankovskaya LV, Meshkova RYa. Clinical Immunology and Allergology with Basic Immunology. Moscow: GEOTAR-Media; 2012 (in Russian).
5. The Cytokine Handbook V. 1, 4th Edition, ed. A.W. Thomson, London: Elsevier Science Ltd; 2003.
6. Querol S, Cancelas JA, Amat L, Capmany G, Garcia J. Effect of glycosylation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on expansion cultures of umbilical cord blood CD34⁺ cells. *Haematologica* 1999; 84: 493–8.
7. Nohynek GJ, Plard JP, Wells MY, Zerial A. Comparison of the potency of glycosylated and nonglycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factors in neutropenic and nonneutropenic CD rats. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1997; 39: 259–66.
8. Kubota N, Orita T, Hattori K, Oh-eda M, Ochi N, Yamazaki T. Structural characterization of natural and recombinant human granulocyte colony-stimulating factors. *J Biochem*. 1990; 107: 486–92.
9. Nissen C. Glycosylation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: implications for stability and potency. *Eur J Cancer*. 1994; 30A(3): 12–4.
10. Oh-eda M, Hasegawa M, Hattori K, Kuboniwa H, Kojima T, Orita T, et al. O-linked sugar chain of human granulocyte colony-stimulating factor protects

- it against polymerization and denaturation allowing it to retain its biological activity. *J Biol Chem.* 1990; 265: 11432–5.
11. Ono M. Physicochemical and biochemical characteristics of glycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (lenograstim). *Eur J Cancer* 1994; 30A(3): 7–11.
 12. Wang C, Eufemi M, Turano C, Giartosio A. Influence of the carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins. *Biochemistry* 1996; 35: 7299–307.
 13. Arakawa T, Prestrelski SJ, Narhi LO, Boone TC, Kenney WC. Cysteine 17 of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor is partially solvent-exposed. *J Protein Chem.* 1993; 12: 525–31.
 14. Lu HS, Fausset P, Narhi L, Horan T, Shinagawa K, Shimamoto G, Boone T. Chemical modification and site-directed mutagenesis of methionine residues in recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. Effect on stability and biological activity. *Arch Biochem Biophys.* 1999; 362(1): 1–11.
 15. Akizuki S, Mizorogi F, Inoue T, Sudo K, Ohnishi A. Pharmacokinetics and adverse events following 5-day repeated administration of lenograstim, a recombinant human granulocyte colony-stimulating factor, in healthy subjects. *Bone Marrow Transplant.* 2000; 26: 939–46.
 16. Pedrazzoli P, Gibelli N, Pavesi L, Preti P, Piolini M, Bertolini F, et al. Effects of glycosylated and non-glycosylated G-CSFs, alone and in combination with other cytokines, on the growth of human progenitor cells. *Anticancer Res.* 1996; 16(4A): 1781–5.
 17. Welte K, Gabrilove J, Bronchud MH, Platzer E, Morstyn G. Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years. *Blood.* 1996; 88: 1907–29.
 18. Welte K, Reiter A, Mempel K, Pfetsch M, Schwab G, Schrappe M, Riehm H. A randomized phase-III study of the efficacy of granulocyte colony-stimulating factor in children with high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1996; 87: 3143–50.
 19. Gisselbrecht G, Prentice HG, Bacigalupo A, Biron P, Milpied N, Rubie H, et al. Placebo-controlled phase III trial of lenograstim in bone-marrow transplantation. *Lancet.* 1994; 343: 696–700.
 20. Seymour AM, de Campos E, Thatcher N, De Greve J, Cunningham D, Howell A, et al. A single-blind, randomised, vehicle-controlled dose-finding study of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (lenograstim) in patients undergoing chemotherapy for solid cancers and lymphoma. *Eur J Cancer.* 1995; 31A: 2157–63.
 21. Hoglund M, Smedmyr B, Bengtsson M et al. Mobilization of CD34+ cells by glycosylated and nonglycosylated G-CSF in healthy volunteers – a comparative study. *Eur J Haematol.* 1997; 59: 177–83.
 22. Kim IH, Park SK, Suh OK, Oh JM. Comparison of lenograstim and filgrastim on haematological effects after autologous peripheral blood stem cell transplantation with high-dose chemotherapy. *Curr Med Res Opin.* 2003; 19(8): 753–9.
 23. Watts MJ, Addison I, Long SG, Hartley S, Warrington S, Boyce M, Linch DC. Crossover study of the haematological effects and pharmacokinetics of glycosylated and non-glycosylated G-CSF in healthy volunteers. *Br J Haematol.* 1997; 98(2): 474–9.
 24. Young D, Zhan H, Cheng Q, Hou J, Matthews D. Characterization of the receptor binding determinants of granulocyte colony stimulating factor. *Protein Sci.* 1997; 6(6): 1228–36.
 25. Martino M, Console G, Irrera G, Callea I, Condemi A, Dattola A, et al. Harvesting peripheral blood progenitor cells from healthy donors: retrospective comparison of filgrastim and lenograstim. *J Clin Apher.* 2005; 20(3): 129–36.
 26. Teramura M, Kimura A, Iwase S, Yonemura Y, Nakao S, Urabe A, et al. Treatment of severe aplastic anemia with antithymocyte globulin and cyclosporin A with or without G-CSF in adults: a multicenter randomized study in Japan. *Blood.* 2007; 110(6): 1756–61.
 27. Cooper KL, Madan J, Whyte S, Stevenson MD, Akehurst RL. Granulocyte colony-stimulating factors for febrile neutropenia prophylaxis following chemotherapy: systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer.* 2011; 11: 404.
 28. Aapro MS, Bohlius J, Cameron DA, Dal Lago L, Donnelly JP, Kearney N, et al. 2010 update of EORTC guidelines for the use of granulocyte-colony stimulating factor to reduce the incidence of chemotherapy-induced febrile neutropenia in adult patients with lymphoproliferative disorders and solid tumours. *Eur J Cancer.* 2011; 47: 8–32.
 29. Aapro MS, Cameron DA, Pettengell R, Bohlius J, Crawford J, Ellis M, et al. EORTC guidelines for the use of granulocyte-colony stimulating factor to reduce the incidence of chemotherapy-induced febrile neutropenia in adult patients with lymphomas and solid tumours. *Eur J Cancer.* 2006; 42: 2433–53.
 30. Clark OAC, Lyman G, Castro AA, et al. Colony stimulating factors for chemotherapy induced febrile neutropenia. [Review]. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* The Cochrane Collaboration. Published by John Wiley & Sons; 2008.
 31. Johnston E, Crawford J, Blackwell S, Bjurstrom T, Lockbaum P, Roskos L, et al. Randomized, dose-escalation study of SD/01 compared with daily filgrastim in patients receiving chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2000; 18(13): 2522–8.
 32. Mironov AN, ed. Guidelines for preclinical studies of medicines (immunobiological medicines). Part 2. Moscow: Grif i K; 2012 (in Russian).
 33. Mironov AN, ed. Guidelines for expertise of medicines. V. 1. Moscow: Grif i K; 2013 (in Russian).
 34. Guidelines on the quality, safety, and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology, 2013. Replacement of Annex 3 of WHO Technical Report Series, no 814. WHO Expert Committee on biological Standardization.
 35. ICH S6 Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals. International Conference on Harmonisation; 1997.
 36. ICH guideline S6 (R1) Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. EMA/CHMP/ICH/731268/1998.
 37. ICH Q5D Derivation and Characterization of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products. International Conference on Harmonisation; 1997.
 38. CH Q5A Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin. International Conference on Harmonisation; 1997.
 39. Европейская Фармакопея 7.0 (07/2010:2206). Филграстим, раствор концентрированный. 2010; 4037–40.
 40. ICH Q5C Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products. International Conference on Harmonisation; 1995.
 41. ICH Q1A (R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products. International Conference on Harmonisation; 2003.
 42. Similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues. EMA/CHMP/BWP/42832/2005.
 43. Similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues. EMA/CHMP/BWP/49348/2005.
 44. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (revision 1) EMA/CHMP/BWP/247713/2012. London. 22 May 2014.
 45. Guideline on similar medicinal products containing recombinant granulocyte-colony stimulating factor. EMA/CHMP/BWP/31329/2005.
 46. ICH Q2A Validation of Analytical Procedures. International Conference on Harmonisation; 1994.
 47. ICH Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. International Conference on Harmonisation; 1996.
 48. Guideline on bioanalytical method validation. EMA/CHMP/EWP/192217/2009.
 49. ICH Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products. International Conference on Harmonisation; 1999.
 50. Guideline on Comparability of Medicinal Products Containing Biotechnology-Derived Proteins as Drug Substance: Non-clinical and Clinical Issues. CPMP/3097/02.
 51. ICH topic Q5E, Step 5 Note for Guidance on Biotechnological/Biological Products Subject to changes in their Manufacturing Process. CHMP/ICH/5721/03. EMA. June 2005.
 52. Guideline on Comparability of Biotechnology-Derived Medicinal Products after a Change in the Manufacturing Process. Non-Clinical and Clinical Issues. EMA/CPMP/BWP/101695/2006. London. 19 July 2007.

Authors:

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre on Expert Evaluation of Medical Application Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 8 Petrovsky Boulevard, Moscow, 127051, Russian Federation.

Avdeeva Zh.I. Chief expert of Office of expertise allergens, cytokines and other immunomodulators of Center for examination and control of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences, professor.

Soldatov AA. Chief expert of Office of expertise allergens, cytokines and other immunomodulators of Center for examination and control of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences.

Alpatova NA. Chief expert of Laboratory of immunology of Test Center of Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Candidate of Biological Sciences.

Lysikova SL. 1st category expert of Laboratory of immunology of Test Center of Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Candidate of Medical Sciences.

Bondarev VP. Director of Center for examination and control of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences, professor.

Medunitsyn NV. Department Director. Doctor of Medical Sciences, professor, academician of RAS.

Mosyagin VD. Head of Office of expertise allergens, cytokines and other immunomodulators of Center for examination and control of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences, professor.

Merkulov VA. First Deputy Director General. Doctor of Medical Sciences, professor.

Mironov AN. Director General. Doctor of Medical Sciences, professor.

Federal State Budgetary Scientific Institution «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», Russian Academy of Sciences, 23 Kashirskoe sh., Moscow, 115478, Russian Federation.

Kiselevsky MV. Head of the laboratory of cellular immunity. Doctor of Medical Sciences, professor.

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 126051, Москва, Петровский бульвар, 8.

Авдеева Жанна Ильдаровна. Главный эксперт Управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Солдатов Александр Алексеевич. Главный эксперт Управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук.

Алпатова Наталья Александровна. Главный эксперт лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Лысикова Светлана Леонидовна. Эксперт 1 категории лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Бондарев Владимир Петрович. Директор Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Медуницын Николай Васильевич. Руководитель научного направления, д-р мед. наук, профессор, академик РАН.

Мосягин Вячеслав Дмитриевич. Начальник управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Меркулов Вадим Анатольевич. Первый заместитель генерального директора, д-р мед. наук, профессор.

Миронов Александр Николаевич. Генеральный директор, д-р мед. наук, профессор.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАН. Российская Федерация, 115478, Москва, Каширское шоссе, 23.

Киселевский Михаил Валентинович. Заведующий лабораторией клеточного иммунитета, д-р мед. наук, профессор

Адрес для переписки: Авдеева Жанна Ильдаровна; Avdeeva@expmed.ru

Поступила 24.12.2015 г.
Принята 16.03.2015 г.