

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2019-8-3-91-100
УДК 615.12; 615.038



Оригинальная статья/Research article

Сравнительное исследование фармакокинетики и иммуногенности препарата-биоаналога бевацизумаба (RPH-001, АО «Р-Фарм», Россия) и оригинального биотехнологического препарата Авастин® (Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд., Швейцария) в параллельных группах при однократном внутривенном введении у здоровых добровольцев

М. А. Колганова^{1*}, Н. С. Багаева¹, Ю. В. Медведев^{1,2}, И. Е. Шохин¹, А. В. Демчинская³, Т. Н. Палкина³, Д. А. Салазанов³, Г. Е. Коноплева³, М. С. Шереметьева³, Ш. З. Арчуадзе³, Я. В. Лавровский⁴, А. Ю. Савченко⁵, М. Ю. Самсонов³

1 – ООО «Центр Фармацевтической Аналитики», 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20 стр. 3
2 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8
3 – АО «Р-Фарм», 119421, Россия, Ленинский проспект, д. 111В
4 – R-Pharm Overseas Inc., La Jolla, Калифорния, США
5 – ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, 143442, Россия, Московская область, Красногорский район, пос. Светлые Горы, владение 1

*Контактное лицо: Колганова М. А. E-mail: m.kolganova@cpha.ru

Статья получена: 11.07.2019. Статья принята к печати: 30.08.2019

Резюме

Введение. Бевацизумаб – биотехнологический лекарственный препарат, представляющий собой моноклональные IgG1 антитела, которые связываются и ингибируют активность фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Бевацизумаб входит в состав таргетной терапии разных солидных опухолей и рекомендован к применению как в качестве монотерапии, так и в составе комплексной химиотерапии. Было проведено клиническое исследование I фазы для оценки фармакокинетики и иммуногенности препаратов бевацизумаба. В исследование были включены 80 здоровых мужчин-добровольцев.

Цель. Сравнительная оценка фармакокинетики и иммуногенности (безопасности) оригинального биотехнологического лекарственного препарата Авастин® (производитель: Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд., Швейцария) и препарата-биоаналога RPH-001 (производитель АО «Р-Фарм», Россия) при однократном внутривенном введении здоровым добровольцам.

Материалы и методы. Количественное определение бевацизумаба и полуколичественное определение антител к бевацизумабу в сыворотке крови здоровых добровольцев проводилось методом иммуноферментного анализа с фотометрическим детектированием. Для выполнения аналитической части исследования были валидированы две независимые методики.

Результаты и обсуждение. Методика количественного определения бевацизумаба в сыворотке крови была валидирована по следующим валидационным параметрам: селективность и специфичность, калибровочная кривая, чувствительность, точность и прецизионность, минимально необходимое разведение, возможность разведения образцов и стабильность. Методика полуколичественного определения антител к бевацизумабу в сыворотке крови была валидирована по следующим валидационным параметрам: предел исключения (cut-point) с расчетом фактора нормализации, селективность, чувствительность, прецизионность, толерантность к лекарственному препарату, тест на разведение, эффект матрицы (при выраженном гемолизе) и стабильность. Валидированные методики были применены на практике для проведения аналитической части исследования фармакокинетики и иммуногенности препаратов бевацизумаба.

Заключение. По результатам фармакокинетического анализа тестовый и референтный препарат были признаны биоэквивалентными. Анализ иммуногенности не выявил антител к бевацизумабу ни у одного из добровольцев.

Ключевые слова: бевацизумаб, иммуногенность, фармакокинетика, препараты-биоаналоги, биоэквивалентность, иммуноферментный анализ.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. А. В. Демчинская, Т. Н. Палкина, Д. А. Салазанов, Г. Е. Коноплева, М. С. Шереметьева, Ш. З. Арчуадзе, Я. В. Лавровский, М. Ю. Самсонов организовывали клинический этап исследования, А. Ю. Савченко, Ю. В. Медведев, М. А. Колганова, И. Е. Шохин организовывали и выполняли аналитический этап исследования, Н. С. Багаева проводила статистическую обработку данных. Все авторы участвовали в обсуждении результатов исследования.

Для цитирования: Колганова М. А., Багаева Н. С., Медведев Ю. В., Шохин И. Е., Демчинская А. В., Палкина Т. Н., Салазанов Д. А., Коноплева Г. Е., Шереметьева М. С., Арчуадзе Ш. З., Лавровский Я. В., Савченко А. Ю., Самсонов М. Ю. Сравнительное исследование фармакокинетики и иммуногенности препарата-биоаналога бевацизумаба (RPH-001, АО «Р-Фарм», Россия) и оригинального биотехнологического препарата Авастин® (Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд., Швейцария) в параллельных группах при однократном внутривенном введении у здоровых добровольцев. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2019; 8(3): 91–100.

A Comparative Parallel Study of Pharmacokinetics and Immunogenicity Following Single Intravenous Administration of Bevacizumab Biosimilar RPH-001 (Manufactured by R-Pharm Group, Russia) and Avastin® (Manufactured by F. Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland) in Healthy Male Volunteers

Maria A. Kolganova^{1*}, Natalia S. Bagaeva¹, Yuri V. Medvedev^{1,2}, Igor E. Shohin¹, Anna V. Demchinskaya³, Tatyana N. Palkina³, Dmitry A. Salazanov³, Galina E. Konopleva³, Marina S. Sheremeteva³, Shorena Z. Archuadze³, Yan V. Lavrovsky⁴, Alla Yu. Savchenko⁵, Mikhail Yu. Samsonov³

© Колганова М. А., Багаева Н. С., Медведев Ю. В., Шохин И. Е., Демчинская А. В., Палкина Т. Н., Салазанов Д. А., Коноплева Г. Е., Шереметьева М. С., Арчуадзе Ш. З., Лавровский Я. В., Савченко А. Ю., Самсонов М. Ю., 2019

© Kolganova M. A., Bagaeva N. S., Medvedev Yu. V., Shohin I. E., Demchinskaya A. V., Palkina T. N., Salazanov D. A., Konopleva G. E., Sheremeteva M. S., Archuadze Sh. Z., Lavrovsky Y. V., Savchenko A. Yu., Samsonov M. Yu., 2019

1 – LLC «CPHA», 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia
2 – I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia
3 – JSC «R-Pharm», 111B, Leninsky avenue, 119421, Russia
4 – R-Pharm Overseas Inc, La Jolla, California, USA
5 – Scientific Center for Biomedical Sciences, vl. 1, pos. Svetlye Gory, Krasnogorsk r-n, Moscow reg., 143442, Russia
*Corresponding author: M. A. Kolganova. E-mail: m.kolganova@cpha.ru

Received: 11.07.2019. Accepted: 30.08.2019

Abstract

Introduction. Bevacizumab is a monoclonal IgG1 antibody that binds to and inhibits the biologic activity of human vascular endothelial growth factor (VEGF). Bevacizumab is used as a targeted mono- or combination therapy for different solid tumors. Phase I clinical trial was performed to assess pharmacokinetics (PK) and immunogenicity of bevacizumab drugs. For this study 80 healthy male volunteers were recruited and randomized to either Avastin or RPH-001 group.

Aim. To assess and compare pharmacokinetics and immunogenicity (safety) following single intravenous administration of Avastin® (manufactured by F. Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland) and bevacizumab biosimilar RPH-001 (manufactured by R-Pharm Group, Russia).

Materials and methods. Bevacizumab quantitation and quasi-quantitative anti-bevacizumab antibodies detection in human blood serum were carried out using photometric ELISA. Two different methods were successfully validated.

Results and discussion. Bevacizumab quantitation method was validated for selectivity and specificity, calibration curve, sensitivity, accuracy and precision, minimal required dilution, dilution linearity and stability. The anti-bevacizumab antibodies detection method was validated for cut-point (with normalization factor calculation), selectivity, sensitivity, precision, drug tolerance, dilution linearity, matrix effect (in case of serum hemolysis), and stability. The validated methods were successfully applied to pharmacokinetic and immunogenicity assessment of bevacizumab drugs.

Conclusion. The results of the PK-study showed that test and reference bevacizumab drugs were equivalent. Immunogenicity study did not show any evidence of anti-bevacizumab antibodies in blood serum samples.

Keywords: bevacizumab, immunogenicity, pharmacokinetics, biosimilars, bioequivalence, enzyme-linked immunosorbent assay.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Anna V. Demchinskaya, Dmitry A. Salazanov, Galina E. Konopleva, Marina S. Sheremeteva, Shorena Z. Archuadze, Yan V. Lavrovskiy, Mikhail Y. Samsonov have organized a clinical part of the study; Alla Y. Savchenko, Maria A. Kolganova, Yuri V. Medvedev, Igor E. Shohin have organized and performed analytical part of the study, Natalia S. Bagaeva has conducted a statistical data processing. All authors have participated in study results discussion.

For citation: Kolganova M. A., Bagaeva N. S., Medvedev Yu. V., Shohin I. E., Demchinskaya A. V., Palkina T. N., Salazanov D. A., Konopleva G. E., Sheremeteva M. S., Archuadze Sh. Z., Lavrovskiy Y. V., Savchenko A. Yu., Samsonov M. Yu. A comparative parallel study of pharmacokinetics and immunogenicity following single intravenous administration of bevacizumab biosimilar RPH-001 (manufactured by R-Pharm Group, Russia) and Avastin® (manufactured by F. Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland) in healthy male volunteers. *Drug development & registration*. 2019; 8(3): 91–100.

ВВЕДЕНИЕ

Согласно официальной статистике Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) онкологические заболевания – вторая по распространенности причина смертности в мире. В 2018 году от различных онкологических заболеваний умерли 9,6 млн человек по всему миру. Самые распространённые виды рака по оценкам ВОЗ – это рак лёгких и рак молочной железы (примерно по 2,09 млн зарегистрированных случаев смерти за 2018 год), колоректальный рак (примерно 1,8 млн зарегистрированных случаев смерти за 2018 год) и рак предстательной железы (1,28 млн зарегистрированных случаев смерти за 2018 год) [1]. При такой высокой распространённости и смертности открытым остается вопрос ранней диагностики онкологических заболеваний и дальнейшего лечения после постановки диагноза. На современном этапе помимо консервативных стратегий лечения рака (хирургическое лечение, лучевая и химиотерапия, гормональная терапия, иммунотерапия) все чаще используют инновационные методы, такие как, например, таргетная терапия. В состав таргетной терапии входят биологические лекарственные препараты моноклональных антител, которые позволяют селективно воздействовать на раковые клетки, не вызывая при этом повреждение собственных здоровых клеток организма [2, 3].

Бевацизумаб – биотехнологический лекарственный препарат, представляющий собой рекомбинантные гуманизированные моноклональные IgG1 антитела, которые связываются и ингибируют активность фактора роста эндотелия сосудов (human vascular endothelial growth factor, VEGF). Связывание бевацизумаба с VEGF препятствует взаимодействию последнего с рецепторами на поверхности клеток (Flt-1 и KDR), вследствие чего происходит ингибирование пролиферации клеток эндотелия и нарушается процесс ангиогенеза. В структуре бевацизумаба выделяют человеческие каркасные участки иммуноглобулина с определяющими комплементарность участками гиперхимерных мышинных антител, которые связываются с VEGF. Получение бевацизумаба проводят в системе экспрессии, представленной клетками яичников китайского хомячка, в присутствии гентамицина. Молекулярная масса бевацизумаба составляет примерно 149 кД [4].

Целью работы являлась сравнительная оценка фармакокинетики и иммуногенности (безопасности) оригинального биотехнологического лекарственного препарата Авастин® (производитель: Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд., Швейцария) и препарата-биоаналога RPH-001 (производитель АО «Р-Фарм», Россия) при однократном внутривенном введении здоровым добровольцам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клиническое исследование I фазы по протоколу: «Двойное слепое рандомизированное сравнительное, в параллельных группах, клиническое исследование фармакокинетики и безопасности препаратов RPH-001 (АО «Р-Фарм», Россия) и Авастин® (Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд., Швейцария) при однократном внутривенном введении у здоровых добровольцев» (РКИ № 250, 29.05.2018) [5] проводилось в одном клиническом центре на территории Российской Федерации. В исследование были включены 80 здоровых добровольцев мужского пола. Объектами исследования были:

- *тестовый препарат*: RPH-001 (МНН: бевацизумаб), производитель АО «Р-Фарм», Россия; однократное внутривенное введение в дозе 5 мг/кг;
- *референтный препарат*: Авастин® (МНН: бевацизумаб), производитель Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд., Швейцария; однократное внутривенное введение в дозе 5 мг/кг.

Для достижения поставленных целей на аналитическом этапе исследования были валидированы две методики: для фармакокинетического определения бевацизумаба в сыворотке крови добровольцев (ФК-методика) и для полуколичественного определения антител к бевацизумабу в сыворотке крови добровольцев (Anti-drug antibody, ADA-методика).

Оборудование

При валидации обеих методик для определения оптической плотности образцов в лунках ИФА-планшета использовали планшетный иммуноферментный анализатор STAT FAX 3200 (Awareness Technology Inc., США). Для промывания ИФА-планшетов использовали промыватель планшетов автоматический двухканальный (ПП2-428, Иммедтех, Россия). Для инкубации внесенных образцов в лунках планшета использовали термошейкер для планшетов (Biosan, ЕС). Кроме того, в процессе пробоподготовки образцов и внесения образцов в лунки планшета использовали вспомогательное оборудование: одноканальные и многоканальные дозаторы различного объема (Thermo Scientific, Россия), вортекс-шейкер (Heidolph Reax Top, Германия), высокоскоростную мини-центрифугу Microspin 12 (Biosan, ЕС), систему водоподготовки «АКВАЛАБ» УВОИ-«МФ»-1812» (Медиана-фильтр, Россия), холодильник фармацевтический ХФ-400-2 (АО «Производственное объединение «Завод имени Серго») и морозильник микропроцессорный для хранения замороженной плазмы крови и других биологических материалов MM-180/20/35 «Позис» (Позис, Россия).

Реактивы

Во время валидации методики количественного определения бевацизумаба в сыворотке крови добровольцев применялись следующие реактивы: вода очищенная, натрия гидрофосфат (PanReas AppliChem,

Германия, класс «pure, pharma grade»), калия дигидрофосфат, (Компонент-Реактив, Россия, класс «ч.д.а.»), бычий сывороточный альбумин (Диаэм, Россия), твин-20 (PanReas AppliChem, Германия, класс «pure, pharma grade»); натрия хлорид (Компонент-Реактив, Россия, класс «ч.»), и в том числе реактивы и материалы, входящие в состав иммуноферментной тест-системы для количественного определения бевацизумаба в биологических жидкостях (ООО «НПЦ Пробиотек», Россия): планшет 96-луночный, калибровочная проба (200 нг/мл бевацизумаба), фосфатно-солевой буферный раствор (20x), конъюгат антител IgG человека с пероксидазой хрена, раствор субстрата (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, ТМБ), стоп-реагент.

Во время валидации методики полуколичественного определения антител к бевацизумабу в сыворотке крови добровольцев применялись следующие реактивы: вода очищенная, и в том числе реактивы и материалы, входящие в состав иммуноферментной тест-системы Bevacizumab (Avastin®) – ADA, производства Somru® BioScience, Канада (Cat#: SB-06-041, Lot#: 5-08-20C): Coated Microtiter Plate, Positive Control Concentrate, Control Diluent, Biotinylated reagent (3,200X), Detection Reagent (20,000X), Wash Buffer (20X), Assay Buffer, TMB Substrate, TMB Stop Solution.

Методика количественного определения бевацизумаба в сыворотке крови

Согласно инструкции к набору определение концентрации бевацизумаба в сыворотке крови добровольцев, а также при валидации методики, проводилось методом иммуноферментного анализа (ИФА) по следующей схеме:

- ✓ Разбавляли все образцы в 1000 раз с помощью раствора Разбавителя, состоящего из фосфатного буферного раствора, бычьего сывороточного альбумина и твина-20. Разбавленные образцы готовили непосредственно перед анализом.
- ✓ В лунки планшета вносили 100 мкл соответствующих образцов (калибровочных образцов, образцов контроля качества, образцов интактной сыворотки крови, исследуемых образцов).
- ✓ Планшет заклеивали пленкой и инкубировали в течение 60 минут на шейкере при температуре 25 °С с частотой встряхивания 170 об/мин.
- ✓ После окончания инкубации пленку удаляли, промывали лунки 3 раза промывочным раствором, внося по 250 мкл в каждую лунку в процессе каждого цикла промывки и выдерживая в течение 2 минут. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удаляли, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
- ✓ Во все лунки вносили по 100 мкл рабочего раствора конъюгата. Планшет заклеивали пленкой и инкубировали в течение 30 мин на шейкере при температуре 25 °С с частотой встряхивания 170 об/мин.

- ✓ После окончания инкубации пленку удаляли, промывали лунки 3 раза промывочным раствором, внося по 250 мкл в каждую лунку в процессе каждого цикла промывки и выдерживая в течение 2 минут. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удаляли, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
- ✓ Во все лунки вносили по 100 мкл раствора ТМБ. Планшет заклеивали пленкой и инкубировали в течение 15 мин при температуре 25 °С в защищенном от света месте.
- ✓ После окончания инкубации пленку удаляли и во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и ТМБ, вносили по 100 мкл стоп-реагента. Планшет заклеивали пленкой и перемешивали в течение 1 минуты на шейкере при температуре 25 °С и с частотой встряхивания 170 об/мин.
- ✓ По окончании перемешивания пленку удаляли и измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм и референсной длине волны 630 нм.

Методика полуколичественного определения антител к бевацизумабу в сыворотке крови

Согласно инструкции к набору определение антител к бевацизумабу в сыворотке крови добровольцев (этап скрининга образцов), а также при валидации методики, проводилось методом иммуноферментного анализа (ИФА) по следующей схеме:

- ✓ Разбавляли все контрольные и исследуемые образцы в 10 раз с помощью раствора Assay buffer.
- ✓ Вносили в соответствующие лунки по 100 мкл образцов. Внесение проводили в течение времени не более 10 минут.
- ✓ Планшет заклеивали пленкой и инкубировали в течение 60 минут на шейкере при комнатной температуре с частотой встряхивания 300 об/мин.
- ✓ После окончания инкубации пленку удаляли, промывали лунки 3 раза промывочным раствором, внося по 300 мкл в каждую лунку в процессе каждого цикла промывки. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удаляли, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
- ✓ Во все лунки вносили по 100 мкл приготовленного раствора Biotinylated Reagent. Планшет заклеивали пленкой и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре с частотой встряхивания 300 об/мин.
- ✓ После окончания инкубации пленку удаляли, промывали лунки 3 раза промывочным раствором, внося по 300 мкл в каждую лунку в процессе каждого цикла промывки. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удаляли, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
- ✓ Во все лунки вносили по 100 мкл приготовленного раствора Detection Reagent. Планшет заклеивали пленкой и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре с частотой встряхивания 300 об/мин.

- ✓ После окончания инкубации пленку удаляли, промывали лунки 3 раза промывочным раствором, внося по 300 мкл в каждую лунку в процессе каждого цикла промывки. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удаляли, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
- ✓ Во все лунки вносили по 100 мкл субстрата (ТМБ substrate). Планшет заклеивали пленкой и инкубировали в течение 10–15 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте.
- ✓ После окончания инкубации пленку удаляли и во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и субстрат, вносили по 100 мкл стоп-реагента (ТМБ stop solution) и слегка перемешивали.
- ✓ Измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм и референсной длине волны 630 нм.

Статистический анализ полученных данных

На основании полученных результатов измерения концентрации бевацизумаба в плазме крови добровольцев с помощью программы R Statistics 3.4.3 (Package «bear» 2.8.3-2) были определены и вычислены следующие фармакокинетические параметры бевацизумаба:

C_{\max} – максимальная концентрация в плазме, достигаемая на основе экспериментальных данных, полученных непосредственно по кривой соотношения концентрации в плазме и времени. Данные по C_{\max} представлены по виду принимаемого препарата (RPH-001 и Авастин®).

t_{\max} – время достижения максимальной концентрации (C_{\max}).

AUC_{0-t} – суммарная площадь под кривой концентрации препарата от момента его попадания в организм до t -часа. Площадь рассчитывается с помощью метода трапеции (linear-up/log-down) по формуле (фаза элиминации):

$$AUC_{0-t} = \sum_{p=1}^t \frac{(C_{p-1} - C_p)}{\ln(C_{p-1}) - \ln(C_p)} (t_p - t_{p-1}),$$

где C_p – концентрация вещества в крови в момент времени t_p ; $AUC_{0-\infty}$ – площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-время», рассчитанная от нуля до бесконечности.

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + \frac{C_t}{k_{el}},$$

где $C_{\max}/AUC_{0-t} - C_{\max}$ – скорректированная на степень всасывания; $rAUC$ – экстраполированная часть площади, рассчитанная по формуле:

$$rAUC = \frac{(AUC_{0-\infty} - AUC_{0-t})}{AUC_{0-\infty}},$$

где λ_z – константа скорости элиминации, оцениваемая по угловому коэффициенту линии регрессии, рассчитанного по методу наименьших квадратов, натураль-

ной логарифмической активности по отношению ко времени получения последних значений активности (не менее трех) выше нижнего предела количественного определения; V_z – кажущийся объем распределения; $T_{1/2}$ – период полувыведения определяли по формуле:

$$T_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_{el}}$$

Для каждого из вышеперечисленных показателей вычислены следующие значения описательной статистики: арифметическое среднее, геометрическое среднее, медиана, стандартное отклонение, коэффициент вариации, минимум, максимум.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Валидация методики количественного определения бевацизумаба в сыворотке крови проводилась на основании Руководства по экспертизе лекарственных средств Том I [6] и «Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза», 2016 [7] по следующим валидационным параметрам:

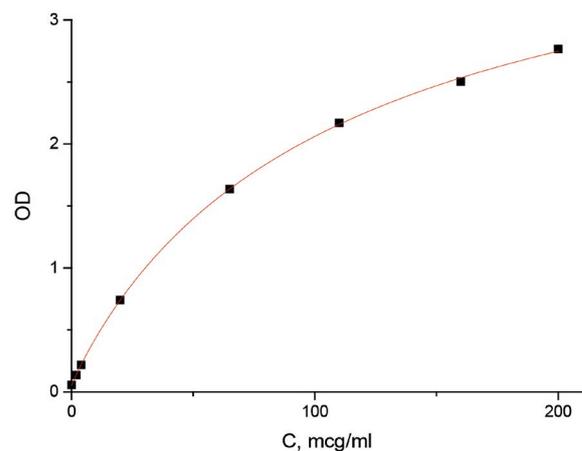
- Селективность и специфичность.** Селективность оценивалась с использованием 10 образцов интактной сыворотки крови и образцов сыворотки с добавлением бевацизумаба до уровня НПКО (2 мкг/мл), каждый из которых анализировали в трех повторах. Для оценки селективности методики рассчитывались значения относительной погрешности для каждого из образцов. Полученные значения соответствовали требованиям нормативной документации (относительная погрешность не менее 80% образцов с содержанием бевацизумаба на уровне НПКО составила не более $\pm 25\%$). Специфичность методики обеспечивалась использованием в ИФА-наборе антител с высокой специфичностью к бевацизумабу, а также специфических блокирующих реагентов, исключающих возможность получения ложноположительных результатов в сыворотке крови.
- Калибровочная кривая и чувствительность.** Построение калибровочных кривых осуществляли в ПО «Origin Pro 8.0» на основании данных, полученных при анализе 1 образца интактной сыворотки крови (0 мкг/мл бевацизумаба) и 7 калибровочных образцов с ненулевой концентрацией, содержащих известные количества бевацизумаба – 2, 4, 20, 65, 110, 160 и 200 мкг/мл. Валидированный аналитический диапазон методики составил 2–200 мкг/мл. Анализ проводили для 6 независимых повторностей. Для каждого из калибровочных образцов рассчитывали отклонение от номинального значения концентрации (относительная погрешность, E, %). Относительная погрешность соответствовала нормам нормативной документации и составила не более 14,5%

для нижнего диапазона линейности, не более 2,02% для верхнего диапазона и не более 5,75% для остальных точек. Чувствительность методики составила 2 мкг/мл (НПКО). Нижний предел количественного определения был выбран на основании данных точности и прецизионности методики. Значения концентраций стандартного образца на уровне НПКО были дискретными и воспроизводимыми со значениями прецизионности (RSD, %) и точности (E, %), не превышающими $\pm 25\%$. Калибровочная зависимость отношения оптической плотности образцов от концентрации бевацизумаба описывалась уравнением вида:

$$y = A2 + \frac{A1 - A2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p}, \quad (1)$$

где $A1$, $A2$, x_0 , p – параметры уравнения; y – оптическая плотность образца; x – концентрация бевацизумаба в образце.

Пример одного из 6 полученных калибровочных графиков приведен на рисунке 1.



A1	A2	x_0	p	R ²	Date	Val#
0,05054	4,29916	111,9262	0,95327	0,99972	10.10.2018	1

Рисунок 1. Калибровочный график № 1 зависимости отношения оптической плотности от концентрации бевацизумаба в калибровочных образцах

Figure 1. Calibration curve № 1 Optic density (OD) versus bevacizumab concentration of the calibration standards

- Точность и прецизионность.** Оценивали с использованием пяти образцов контроля качества, с известными концентрациями бевацизумаба (2; 5,5; 100; 150 и 200 мкг/мл). Анализ проводили для 6 последовательностей по 3 повтора для каждого уровня концентраций. Исследование проводили в течение 1-го цикла (точность и прецизионность внутри цикла) и 2–6 циклов (точность и прецизионность между циклов). Для полученных значений концентраций

были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %), относительной погрешности (E, %) и общей ошибки, приведенные в таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Точность и прецизионность методики внутри цикла

Table 1. Accuracy and precision intra-day

Введено (мкг/мл)	Найдено (мкг/мл) посл. 1	Найдено (мкг/мл), среднее значение (n=3)	RSD, % (n=3)	ε, %	Общая ошибка, %
2,00	1,92	1,90	1,33	-5,17	6,49
	1,87				
	1,90				
5,50	5,02	5,23	3,47	-4,97	8,44
	5,30				
	5,36				
100,00	96,45	95,87	0,98	-4,13	5,11
	96,38				
	94,79				
150,00	135,31	139,14	2,59	-7,24	9,83
	139,64				
	142,46				
200,00	182,08	179,01	1,51	-10,50	12,00
	176,99				
	177,96				

Таблица 2. Точность и прецизионность методики между циклами

Table 2. Accuracy and precision inter-day

№ цикла	концентрация образцов контроля качества				
	2,00	5,50	100,00	150,00	200,00
1	1,92	5,02	96,45	135,31	182,08
	1,87	5,30	96,38	139,64	176,99
	1,90	5,36	94,79	142,46	177,96
2	1,91	5,01	92,64	134,73	175,21
	1,89	5,35	94,19	139,07	173,39
	1,89	5,28	90,3	137,33	170,64
3	2,09	5,55	95,91	135,54	179,23
	2,06	5,65	100,18	160,66	182,22
	2,11	5,94	103,14	160,17	249,61
4	2,06	5,73	101,57	156,78	189,72
	2,07	5,90	106,09	176,15	241,68
	2,08	5,57	98,38	140,18	183,52
5	1,66	4,88	95,16	142,95	167,07
	1,79	5,02	95,79	126,61	174,14
	1,75	5,15	89,39	128,78	159,53
6	1,71	4,90	87,31	143,96	165,51
	1,92	5,48	89,78	140,71	162,49
	1,85	5,28	91,46	138,37	167,83
среднее значение (n=18)	1,92	5,35	95,5	143,3	182,16
S.D. (n=18)	0,14	0,33	5,03	12,47	24,42
RSD, % (n=18)	7,15	6,08	5,27	8,70	13,40
ε, %	-4,08	-2,66	4,51	-4,47	-8,92
Общая ошибка, %	11,23	8,73	9,77	13,17	22,33

Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относительной погрешности (точность) соответствовали нормам (не более 25% для верхнего и нижнего диапазона линейности, не более 20% для остальных точек).

4. *Минимально необходимое разведение.* Оценку минимального необходимого разведения образцов с целью устранения влияния матрицы проводили с использованием образца контроля качества с концентрацией бевацизумаба 2,00 мкг/мл, который был приготовлен на сыворотке крови человека, с последующим разбавлением в 500 и в 1000 раз. Для каждого разведения анализировали образцы в трех повторках. Выбор оптимального разведения осуществляли на основании расчета относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (E, %) для полученных данных. Оптимальным было признано разведение 1:1000.
5. *Возможность разведения образцов.* Подтверждалась при анализе образцов с концентрацией, превышающей верхний калибровочный уровень (образец бевацизумаба с концентрацией 380 мкг/мл, который при анализе разбавляли в 2 раза с помощью интактной сыворотки крови). Анализ проводили для 6 повторностей образцов. Для полученных результатов рассчитывали значения относительного стандартного отклонения и относительной погрешности после пересчета с учетом фактора разведения. Полученные значения относительного стандартного отклонения и относительной погрешности соответствовали нормам НД (не превышали $\pm 20\%$), что свидетельствует о возможности разведения образцов в случае, если это необходимо (например, если значения для исследуемых образцов превышают верхний калибровочный уровень 200 мкг/мл).
6. *Стабильность образцов.* При валидации методики оценивали краткосрочную стабильность (хранение в течение 6 часов при комнатной температуре), стабильность после 3 циклов заморозки-разморозки (каждый цикл в течение 12 часов), а также долгосрочную стабильность (хранение в условиях низкотемпературной заморозки в течение 104 и 250 дней). Для оценки стабильности использовали образцы контроля качества с концентрациями бевацизумаба 5,50 и 150,00 мкг/мл. Стабильность образцов оценивалась путем расчета относительной погрешности для полученных значений концентрации бевацизумаба в образцах. Для всех видов стабильности значения относительной погрешности не превышали допустимых пределов ($\pm 20\%$ от номинального значения концентрации бевацизумаба в образце).
Валидация методики определения антител к бевацизумабу в сыворотке крови проводилась на основании FDA Guidance for Industry Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products – Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection, January 2019 [8] по следующим валидационным параметрам:

1. *Предел исключения (cut-point) для этапа скрининга образцов.* Предел исключения методики определяли на основании данных анализа 50 образцов интактной сыворотки крови здоровых добровольцев. Анализ проводился в течение 3 дней, двумя аналитиками. Всего было выполнено 6 циклов. В каждый цикл помимо образцов интактной сыворотки крови включались контрольные образцы High Positive Control и Low Positive Control (HPC, LPC), а также не менее 3 образцов Negative control (NC) в дублях (общее число – 6 образцов). Для полученных результатов (N=300) проводили статистическую обработку с использованием ПО Microsoft Excel и IBM SPSS Statistics. Определение предела исключения проводили в соответствии с алгоритмами, описанными в статье Shankar et al., 2008 [9] и в Руководстве FDA [8].

На первом этапе была проведена проверка полученных данных на нормальное распределение с помощью теста Шапиро-Уилка. Данные соответствовали ненормальному распределению, поэтому была проведена процедура исключения выбросов и логарифмическое преобразование значений. Выбросами были признаны значения, которые не входили в диапазон

$$[Q1 - (1,5IQR)]; [Q3 + (1,5IQR)],$$

где Q1 – первый квартиль; Q3 – третий квартиль; IQR – межквартильный размах. Во всех 6 циклах были исключены 2 значения (биологические выбросы), в цикле 4 был также дополнительно исключено 1 значение (аналитический выброс). После исключения выбросов проводили логарифмическое преобразование данных и повторную проверку преобразованных значений на нормальное распределение, которая также показала ненормальное распределение. На основании полученных результатов для определения предела исключения был выбран непараметрический метод с применением 95-го перцентиля. Данные для определения cut-point в каждом цикле с использованием 95-го перцентиля приведены в таблице 3.

Таблица 3. 95-й перцентиль (предел исключения) для общих данных и для каждого цикла

Table 3. 95th percentile (cut-point) for pooled data and for each analytical cycle

Исследуемые значения		95-й перцентиль
Общие данные (до исключения выбросов)		0,019
Общие данные (после логарифмической трансформации и исключения выбросов)		-1,9208
Аналитик 1	Цикл 1	0,012
	Цикл 2	0,013
	Цикл 3	0,014
Аналитик 2	Цикл 1	0,013
	Цикл 2	0,014
	Цикл 3	0,014

На втором этапе проводилась оценка однородности дисперсий и средних значений между всеми циклами и между аналитиками. Оценка однородности

средних проводилась с использованием ANOVA, оценка однородности дисперсий проводилась с использованием Levene's-теста. Дисперсии и средние значения между циклами и между аналитиками были признаны однородными. На основании однородности дисперсий и средних значений в исследовании допустимо использование фиксированного предела исключения (fixed cut-point), а также в случае необходимости – плавающего предела исключения (floating cut-point). Значение фиксированного предела исключения составило 0,013 ОЕ. Для дальнейшего использования при проведении аналитической части исследования нами был выбран плавающий предел исключения. Для его определения требуется фактор нормализации (NF), который рассчитывали по формуле:

$$NF = \text{Фикс. предел исключения} - \text{Ср. знач. оптич. плотности 6 NC.}$$

При проведении аналитической части исследования плавающий предел исключения рассчитывали для каждого цикла как среднее значение оптической плотности 6 образцов Negative Control плюс значение фактора нормализации. Значения рассчитанного предела исключения и фактора нормализации (общее и по каждому из 6 циклов) приведены в таблице 4.

Таблица 4. Рассчитанные значения фиксированного предела исключения и фактора нормализации (NF)

Table 4. The calculated values of fixed cut-point and normalization factor (NF)

№ цикла	Аналитик	Предел исключения, ОЕ	Ср.знач. ОП 6 образцов Negative Control	Фактор нормализации, ОЕ
1	1	0,012	0,007	0,005
2	1	0,013	0,007	0,006
3	1	0,014	0,008	0,006
1	2	0,013	0,008	0,005
2	2	0,014	0,008	0,006
3	2	0,014	0,008	0,006
Аналитик 1		0,013	0,007	0,006
Аналитик 2		0,014	0,008	0,006
Ср. значение (циклы 1-6)		0,013	0,008	0,006

2. *Селективность.* Для определения селективности использовались образцы интактной сыворотки крови здоровых добровольцев. Данные образцы подвергались анализу в формате скрининга, и среди них не было выявлено «потенциально положительных» образцов. Значения ОП исследованных образцов не превышали значения ранее определенного предела исключения для этапа скрининга, что показывает достаточную селективность валидируемой методики.

3. **Чувствительность.** Чувствительность методики (предел детектирования) была определена производителем иммуноферментной тест-системы Bevacizumab (Avastin®) ADA и, согласно Product Specifications Data Sheet, составила 63 нг/мл в сыворотке крови человека.
4. **Прецизионность.** Для оценки прецизионности методики на этапе скрининга проводили анализ образцов High Positive Control и Low Positive Control (по 6 образцов каждого контроля). Анализ проводили для 3 последовательностей. Исследование проводили в течение 1-й последовательности (внутри цикла), 2-й и 3-й последовательности (между циклов). Исследование проводилось двумя аналитиками, всего для оценки прецизионности было выполнено 6 циклов. Для полученных значений оптической плотности были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %). Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) как внутри цикла (intra day), так и между циклами (inter day) соответствовали нормам (не более 20% на уровне LPC и 15% на уровне NPC).
5. **Тест на разведение.** Тест на разведение проводили путем разведения образца High Positive Control раствором Assay buffer до получения отклика ниже, чем ранее установленный предел исключения (screening cut-point). Всего было приготовлено 3 независимые серии разведений по 5 образцов (разведения 1:25, 1:50, 1:100, 1:250, 1:400). Оптическая плотность образца с разведением 1:400 во всех сериях была ниже установленного предела исключения.
6. **Эффект матрицы (при выраженном гемолизе).** Для оценки возможного влияния матрицы (сыворотки крови) в случае выраженного гемолиза образцов на результаты определения антител к бевацизумабу проводили исследование образцов интактной гемолизной сыворотки крови с добавлением NPC и LPC. Анализ проводился по схеме скрининга образцов, все образцы были признаны «положительными» на основании сравнения с пределом исключения для этапа скрининга. Одновременно проводился анализ образцов интактной гемолизной сыворотки крови без добавления NPC и LPC. На основе сравнения полученных значений оптической плотности образцов интактной гемолизной сыворотки крови без добавления контрольных образцов с пределом исключения, образцы интактной гемолизной сыворотки крови были признаны «отрицательными». Полученные результаты свидетельствуют о возможности детектирования антител к бевацизумабу в случае незначительного гемолиза исследуемых образцов сыворотки.
7. **Толерантность (устойчивость) методики к присутствию ЛП (Drug tolerance).** Толерантность разработанной методики к присутствию исходного биотех-

нологического препарата в образцах была заранее определена производителем иммуноферментной тест-системы Bevacizumab (Avastin®) ADA и, согласно Product Specifications Data Sheet, составила 4,3 мкг/мл. Это означает, что производитель гарантирует отсутствие ложноотрицательных результатов анализа в случае присутствия в образцах сыворотки крови бевацизумаба в концентрации до 4,3 мкг/мл.

8. **Стабильность образцов.** При валидации методики оценивали краткосрочную стабильность (хранение в течение 24 часов при комнатной температуре), стабильность после 2 циклов заморозки-разморозки (каждый цикл в течение 12 часов), а также долгосрочную стабильность (хранение в условиях низкотемпературной заморозки в течение 134 и 259 дней). Для оценки стабильности использовали образцы положительного контроля на двух уровнях High Positive Control и Low Positive Control. Стабильность образцов оценивалась путем расчета относительного стандартного отклонения для полученных значений оптической плотности в образцах. Для всех изученных видов стабильности значения относительного стандартного отклонения не превышали допустимых пределов ($\pm 20\%$).

Применение валидированных методик для проведения аналитической части исследования фармакокинетической эквивалентности и безопасности препаратов бевацизумаба.

Валидированные методики были успешно применены на практике для проведения аналитической части клинического исследования по протоколу: «Двойное слепое рандомизированное сравнительное, в параллельных группах, клиническое исследование фармакокинетики и безопасности препаратов RPH-001 (АО «Р-Фарм», Россия) и Авастин® (Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд., Швейцария) при однократном внутривенном введении у здоровых добровольцев».

В ходе проведения сравнительного исследования фармакокинетики препаратов бевацизумаба было выполнено 18 аналитических циклов, в каждый из которых были включены калибровочные образцы и исследуемые образцы от добровольцев (в дублях). Для каждого аналитического цикла на основании средних значений ОП калибровочных образцов для двух повторов строили калибровочный график. Калибровочная зависимость отношения оптической плотности и концентрации описывалась уравнением 4PL-функции вида:

$$y = A2 + \frac{A1 - A2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p},$$

откуда

$$x = x_0 \cdot \left(\frac{A1 - A2}{y - A2} - 1\right)^{\frac{1}{p}}. \quad (2)$$

Определение значений концентрации бевацизумаба в образцах от добровольцев проводилось непосредственно по калибровочному графику с использованием уравнения 2. Для полученных значений концентраций бевацизумаба были рассчитаны основные фармакокинетические параметры, а также построены фармакокинетические профили (после исключения добровольцев, которые по каким-либо причинам были из исследования), приведенные на рисунке 2.

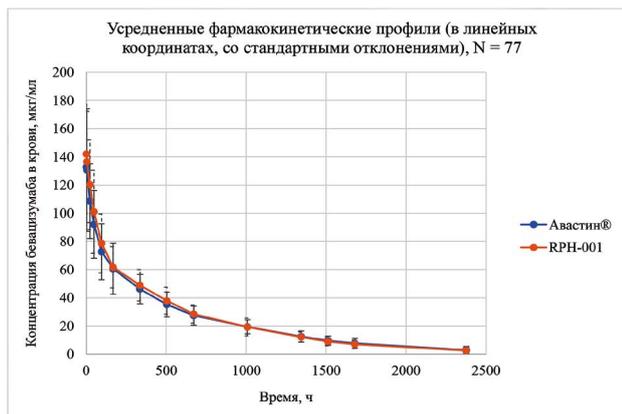


Рисунок 2. Фармакокинетические профили тестового препарата (RPH-001) и референтного препарата (Авастин®)

Figure 2. PK-profiles for test drug (RPH-001) and reference drug (Avastin®)

Индивидуальные профили изменения значений концентраций бевацизумаба в сыворотке крови во времени, зарегистрированные после приема препаратов RPH-001 (Т) и Авастин® (R), характеризовались максимальной концентрацией лекарственного вещества (C_{max} , наибольшее из измеренных значений) и временем ее достижения (t_{max}), площадью под кривой «концентрация – время» в пределах от нуля до момента отбора последней пробы крови (AUC_{0-t}), рассчитанной методом трапеций, площадью под кривой «концентрация – время» в пределах от нуля до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$), а также периодом полувыведения бевацизумаба из организма ($t_{1/2}$).

Максимальная концентрация бевацизумаба после приема добровольцами препарата RPH-001 и препарата Авастин® составила $C_{max}=151,29\pm 33,11$ мкг/мл и $C_{max}=147,38\pm 36,08$ мкг/мл, соответственно. Время достижения максимальной концентрации бевацизумаба составило $t_{max}=6,44\pm 8,27$ ч. для препарата RPH-001 и $t_{max}=5,54\pm 8,98$ ч. для препарата Авастин®. Бевацизумаб элиминировался из крови со средним значением $t_{1/2}=518,51\pm 109,85$ ч. для тестового препарата и $561,66\pm 142,91$ ч. для референтного препарата. Значения AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$ бевацизумаба после приема препарата RPH-001 составили $55790,18\pm 11927,37$ мкг · ч/мл и $58901,99\pm 12528,88$ мкг · ч/мл, соответственно. Значения AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$ бевацизумаба после приема препа-

рата Авастин® составили $54564,50\pm 11205,10$ мкг · ч/мл и $58706,93\pm 12819,40$ мкг · ч/мл, соответственно.

Доверительные интервалы для отношения средних значений C_{max} и AUC_{0-t} бевацизумаба составили 94,63–112,76% и 94,21–110,43%, соответственно. Полученные доверительные интервалы лежат в пределах, установленных Протоколом (80,00–125,00)% для AUC_{0-t} и (75,00–133,00)% для C_{max} , что позволяет сделать вывод о биоэквивалентности исследуемых препаратов.

В ходе проведения исследования иммуногенности (безопасности) препаратов бевацизумаба было выполнено 12 аналитических циклов. В состав каждого аналитического цикла были включены контрольные образцы, образцы интактной сыворотки крови человека (для определения предела исключения конкретного цикла) и исследуемые образцы сыворотки от добровольцев. Для каждого аналитического цикла плавающий предел исключения определяли на основании 6 значений ОП для образцов интактной сыворотки крови человека с прибавлением рассчитанного на этапе валидации методики фактора нормализации (NF=0,006 о.е.). Расчет плавающего предела исключения проводили по следующей формуле:

$$\text{Cut-point} = \text{Ср.знач. (ОПblank)} + \text{NF},$$

где Cut-point – предел исключения (для этапа скрининга); Ср.знач. (ОП blank) – среднее значение ОП 6 образцов интактной сыворотки крови; NF – фактор нормализации (рассчитанный на этапе валидации методики).

Исходя из полученных результатов ни у одного из здоровых добровольцев, которым были введены препараты бевацизумаба не было выявлено антител к бевацизумабу (все пробы по результатам скрининга были признаны «отрицательными» на наличие антител к бевацизумабу). Полученные результаты соответствовали ожиданиям, поскольку а) в исследование были включены здоровые добровольцы, б) проводилось однократное дозирование, в) Авастин® не характеризуется высокой иммуногенностью. Так, в клинических исследованиях препарата Авастин®, применяемого в качестве адъювантной терапии солидных опухолей, антитела к бевацизумабу были выявлены только у 0,6% (14/2233) пациентов [10].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Была проведена сравнительная оценка фармакокинетики и безопасности оригинального биотехнологического лекарственного препарата Авастин® (производитель: Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд., Швейцария) и препарата-биоаналога RPH-001 (производитель АО «Р-Фарм», Россия) при однократном внутривенном введении здоровым добровольцам. Для проведения исследования были валидированы две методики: методика количественного определения бевацизумаба в сыворотке крови человека (ФК-мето-

дика) и методика полуколичественного определения антител к бевацизумабу в сыворотке крови (ADA-методика). ФК-методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: селективность и специфичность, калибровочная кривая, чувствительность, точность и прецизионность, минимально необходимое разведение, возможность разведения образцов и стабильность. ADA-методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: предел исключения (cut-point) с расчетом фактора нормализации, селективность, чувствительность, прецизионность, толерантность к лекарственному препарату, тест на разведение, эффект матрицы (при выраженном гемолизе) и стабильность. Валидированные методики были успешно применены для проведения аналитической части исследования. По результатам проведения сравнительного исследования фармакокинетики препаратов бевацизумаба, тестовый (RPH-001) и референтный (Авастин®) препараты были признаны биоэквивалентными. По результатам проведения анализа иммуногенности все пробы добровольцев были признаны «отрицательными» на наличие антител к бевацизумабу.

ЛИТЕРАТУРА

1. WHO fact sheet «Cancer». 12.09.2018. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
2. Имянитов Е. Н. Общие представления о таргетной терапии. *Практическая онкология*. 2010; 11(3): 123–130.
3. Феоктистова П. С., Загинайко А. В., Симанович Е. Э., Жаркова О. В., Миронова Е. Б., Карасева В. В., Хайленко В. А. Таргетная терапия метастатического колоректального рака. *Онкология. Журнал им. П. А. Герцена*. 2013; 2(3): 31–35.
4. Drug Bank: bevacizumab. Accession Number: DB00112. Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00112>.
5. Государственный реестр лекарственных средств. Available at: <https://grls.rosminzdrav.ru/CIPermissionMini.aspx?CIStatementGUID=f33b36db-9d61-43bf-aaaf-ab6ff4697ff9&CIPermGUID=A0624183-5D1D-4E5C-9704-CDBF9EB6D3D7>.
6. Руководство по экспертизе лекарственных средств / Под ред. проф. А. Н. Миронова. Том I. – М.: *Гриф и К*. 2013: 328.
7. Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных средств Евразийского экономического союза. 2016.
8. FDA Guidance for Industry Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products – Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection. 2019; 1.
9. Shankar G., Devanarayan V., Amaravadi L., Barrett Y. C., Bowsher R., Finco-Kent D., Fiscella M., Gorovits B., Kirschner S., Moxness M., Parish T., Quarmby V., Smith H., Smith W., Zuckerman L. A., Koren E. Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. *J Pharm Biomed Anal*. 2008; 48(5): 1267–81.
10. Genentech Inc. Avastin® (bevacizumab) prescribing information. 2004 (last update 06. 2019). Available at: https://www.gene.com/download/pdf/avastin_prescribing.pdf.
3. Feoktistova P. S., Zaginayko A. V., Simanovich E. E., Zharkova O. V., Mironova E. B., Karaseva V. V., Khaylenko V. A. Targeted therapy of metastatic colorectal cancer. *P. A. Herzen Journal of Oncology*. 2013; 2(3): 31–35 (in Russ.).
4. Drug Bank: bevacizumab. Accession Number: DB00112. Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00112>.
5. State register of medicines. Available at: <https://grls.rosminzdrav.ru/CIPermissionMini.aspx?CIStatementGUID=f33b36db-9d61-43bf-aaaf-ab6ff4697ff9&CIPermGUID=A0624183-5D1D-4E5C-9704-CDBF9EB6D3D7> (in Russ.).
6. Mironov A. N. (edit.) Guideline on expertise of medicines. Vol. I. – М.: *Гриф и К*. 2013: 328 (in Russ.).
7. Rules for conducting bioequivalence studies of drug products on the territory of EAEU. 2016 (in Russ.).
8. FDA Guidance for Industry Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products – Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection. 2019; 1.
9. Shankar G., Devanarayan V., Amaravadi L., Barrett Y. C., Bowsher R., Finco-Kent D., Fiscella M., Gorovits B., Kirschner S., Moxness M., Parish T., Quarmby V., Smith H., Smith W., Zuckerman L. A., Koren E. Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. *J Pharm Biomed Anal*. 2008; 48(5): 1267–81.
10. Genentech Inc. Avastin® (bevacizumab) prescribing information. 2004 (last update 06. 2019). Available at: https://www.gene.com/download/pdf/avastin_prescribing.pdf.

REFERENCES

1. WHO fact sheet «Cancer». 12.09.2018. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
2. Imyaninov E. N. General principles of targeted therapy. *Practical Oncology*. 2010; 11(3): 123–130 (in Russ.).