



ЭКСПЕРТНАЯ ЗОНА

14.02.03. Общественное
здоровье и здравоохранение

14.04.03. Организация
фармацевтического дела



<https://doi.org/10.21518/1561-5936-2021-2-8-24>

Биоаналоги: воспроизведение клинического профиля с помощью современных биотехнологий

Р.Р. Ниязов, к.м.н., М.А. Драницына, А.Н. Васильев, д.биол.н., Е.В. Гавришина, к.м.н.

Центр научного консультирования, Россия, Москва

Биоаналог является биологическим лекарственным препаратом, который содержит версию действующего вещества ранее разрешенного оригинального биопрепарата. Подход к разработке биоаналогов кардинально отличается от разработки оригинального биопрепарата, поскольку основные усилия направлены на максимально точное воспроизведение действующего вещества оригинального биопрепарата. Концепция биоаналогичности признает невозможность полного воспроизведения оригинального биопрепарата и тем самым допускает определенные различия, если они не влияют на клинический профиль. Для установления биоаналогичности необходим обширный комплекс аналитических испытаний, и обнаруженные структурные различия далее оцениваются в функциональных испытаниях. Дальнейшие (до)клинические исследования нужны, чтобы доказать, что применение биоаналога приводит к такому же клиническому результату, как и применение оригинального биопрепарата, а не для того, чтобы заново подтвердить безопасность и эффективность.

Ключевые слова: биоаналог, биосимиляр, биотехнология, вариабельность, сопоставимость

Biosimilars: reproduction of the clinical profile using modern biotechnology

Ravil R. Niyazov, Cand. Sci. (Med.), Margarita A. Dranitsyna, Andrey N. Vasiliev, Dr. Sci. (Biol.), Elena V. Gavrishina, Cand. Sci. (Med.)
Center of Scientific Advice, Russia, Moscow

A biosimilar is a biological medicinal product whose active substance is a version of an active substance of the previously authorised biological medicinal product. The approach taken to develop biosimilar products is fundamentally different from the one used for a new biological medicinal product because the main efforts are directed towards reproducing the original active substance to the greatest possible extent. The biosimilarity concept recognises that it is impossible to reproduce the original biopharmaceutical in full. Thus, it allows for certain differences if they do not cause a significant negative impact from the clinical point of view. To show biosimilarity, an extensive analytical testing program should be implemented where all detected differences are then evaluated in the functional assays. The subsequent non-clinical or clinical tests are needed to demonstrate that the biosimilar delivers the same clinical effect as the reference biological product, but not to prove, yet again, the safety and efficacy of the biological active substance per se by reproducing the development program of the reference biologic.

Keywords: biosimilar, biotechnology, variability, comparability

ЭВОЛЮЦИЯ БИОТЕХНОЛОГИЙ И КОНЦЕПЦИЯ «ПРЕПАРАТ ЕСТЬ ПРОЦЕСС»

В 1982 г. в США было выдано разрешение на продажу генно-инженерного инсулина для лечения пациентов с сахарным диабетом, что ознаменовало начало новой биотехнологической эры в фармацевтике, поскольку это был первый «одобренный» лекарственный препарат, полученный исключительно с помощью биотехнологического синтеза [1].

По сравнению с использованием сырья животного происхождения биотехнологическое производство высокомолекулярных соединений, прежде всего белков, обладает рядом преимуществ, таких как:

- высокая стандартизация получаемого продукта: однородность белкового состава, низкое содержание примесей, стабильная биологическая активность;
- значительно больший выход производственных процессов: возможность отказаться от использования вытяжек и экстрактов из сельскохозяйственных животных;
- возможность производить практически любые сложные белковые соединения;
- максимально возможное снижение рисков микробной, вирусной и прионной контаминации, которая характерна для препаратов, получаемых из экстрактов и вытяжек

животных, и, следовательно, нивелирование рисков соответствующих нежелательных реакций.

Генная инженерия и достижения в области современной биообработки позволили не только воспроизводить природные белки или модифицировать их, оптимизируя свойства под конкретные терапевтические нужды, но и создавать новые белки, не существующие в природе, обладающие при этом высоким терапевтическим потенциалом, прежде всего моноклональные антитела и их фрагменты, белки слияния, конъюгаты «антитело – лекарство», биспецифичные антитела, а также белковые соединения с использованием аминокислот, не встречающихся в природе, и т.д. Современные достижения в этой области позволяют не только превращать клетки-продуценты в «фабрики» по производству требуемых белков, являющихся чужеродными для таких клеток-продуцентов, но, что еще более важно, превращать клетки в фабрики по производству таких же клеток («фабрики» производят «фабрики») [2]. Вместе с тем такое производство требует больших усилий, поскольку как сами клетки, так и получаемые из них белковые продукты очень требовательны к условиям наработки, производства, дальнейшей очистки, получения дозированных препаратов, их хранения, транспортировки,

приготовления препаратов для введения пациенту и собственно введения в организм человека [3].

Биотехнологическое производство белковых лекарственных препаратов очень быстро привело к осознанию того, насколько сильно дизайн и исполнение каждой стадии получения белка влияют на итоговые характеристики желаемого продукта, его безопасность и эффективность.

Так, для получения генно-инженерного полностью человеческого моноклонального антитела чаще всего используют культуру клеток яичника китайского хомячка (СНО). Клетки СНО генетически модифицируют (трансдуцируют) с использованием гена моноклонального антитела, полученного, например, с помощью технологии фагового дисплея при поиске реактивных антител против разрабатываемой мишени заболевания. После успешной трансдукции из полученного пула клеток выбирают одну клетку, которая обладает наиболее привлекательными свойствами с точки зрения генетической стабильности и дальнейшего производства и клонируют ее для создания системы банков клеток.

После получения банка клеток всякий раз для производства серии моноклонального антитела ампулу из банка клеток (как правило, рабочего) вводят в производственный

РИСУНОК 1. Генетическая разработка: генетическая модификация клеток СНО с целью создания банка клеток, способных синтезировать требуемое моноклональное антитело

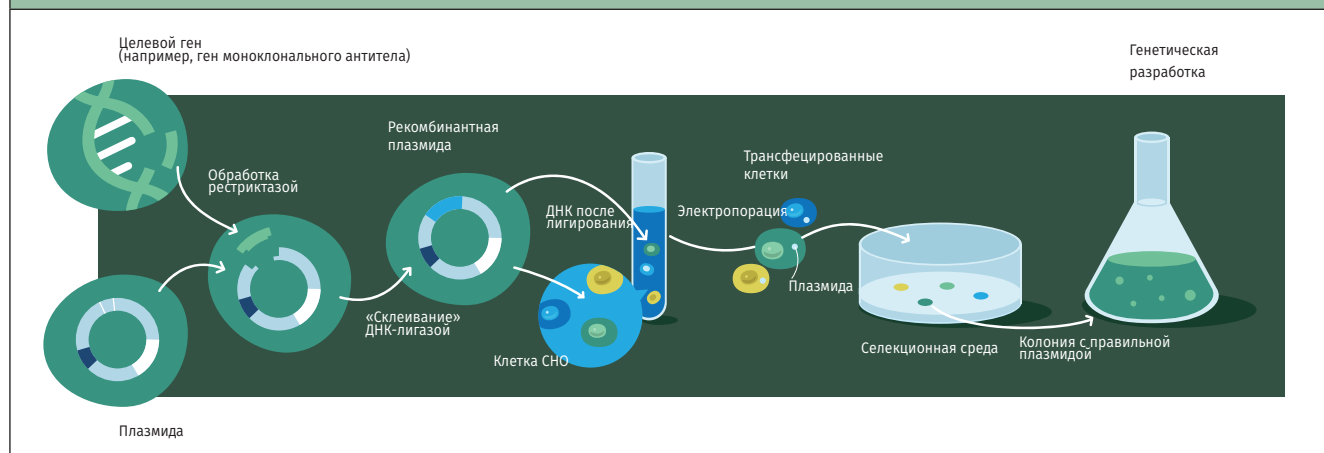


РИСУНОК 2. Вышестоящий процесс. Предусматривает наращивание клеток СНО для биосинтеза моноклонального антитела в больших объемах в производственном биореакторе

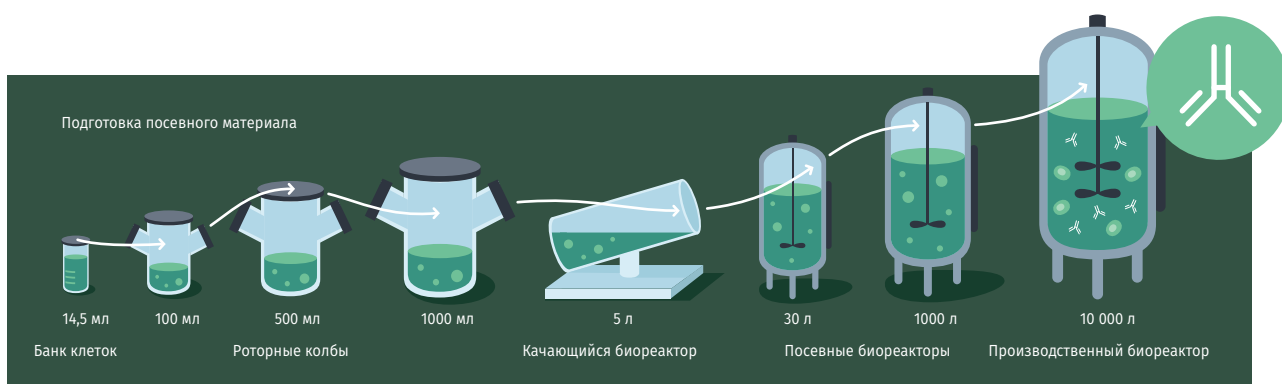
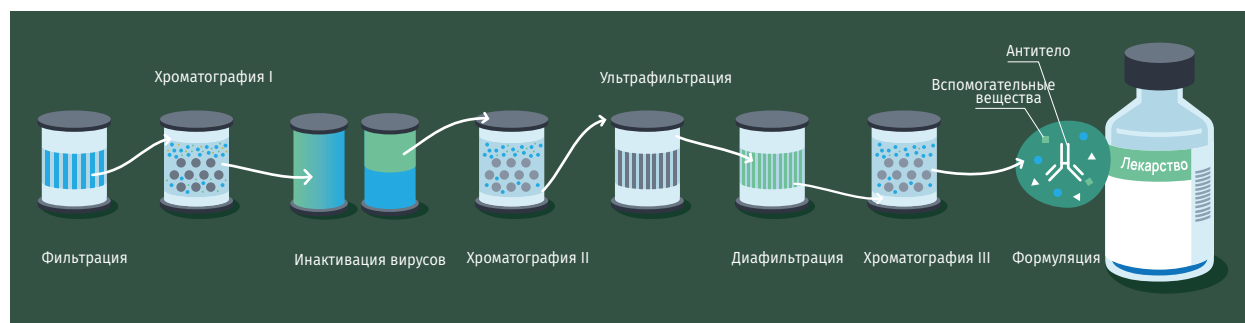


РИСУНОК 3. Нижестоящий процесс. Предусматривает выделение молекулы моноклонального антитела и его очистку вплоть до приготовления раствора для введения



цикл. Это означает, что клетки многократно наращивают до образования достаточной биомассы. После получения достаточного количества продуцента при помощи физического или химического воздействия клетки переводят в фазу активного биосинтеза моноклонального антитела. Биосинтез происходит в промышленном биореакторе. Моноклональные антитела секретируются в реакторную жидкость.

После завершения биосинтеза (суммарно стадии наращивания и биосинтеза называют вышестоящим процессом) переходят к осветлению клеточной культуры. Сначала с помощью различных методов удаляют клетки и клеточные осколки, а также, насколько возможно, ДНК и собственные белки продуцента и другие макромолекулярные комплексы. Далее фильтрат подвергают многостадийной очистке с помощью

различных методов, в первую очередь хроматографических. Кроме того, фильтрат, содержащий моноклональные антитела, подвергают воздействию химических факторов для инактивации вирусов. Химическая инактивация вирусов в совокупности с методами очистки позволяет максимально удалить любые вирусы, которые могли присутствовать на этапе наращивания. В конце полученный раствор моноклонального антитела подвергают заключительной очистке и фильтрации в щадящих условиях, чтобы максимально избавиться от всех возможных остаточных производственных примесей (ДНК, других белков СНО, липидов, компонентов питательных сред и компонентов, использованных на стадиях очистки) и молекулярных примесей (молекул моноклонального антитела с неправильной конформацией, чрезмерно

окисленных или восстановленных форм, укороченных форм, фрагментов, неполных комплексов и т.д.). Кроме того, на заключительных стадиях продукт подвергают концентрированию, т.е. удалению излишков воды, чтобы отдельные дозы препарата можно было расфасовать в небольшие контейнеры, удобные для хранения, дозирования и введения. Наконец, после получения продукта возможна его модификация с целью присоединения к нему низкомолекулярных соединений (например, для получения конъюгатов «антитело – лекарство») или полимеров для модификации фармакокинетики. Весь процесс от ввода в производство рабочего банка клеток и до получения готового продукта может занимать 1–2 мес. Приведенное описание позволяет в целом представить сложность биотехнологических процессов.

Каждая из стадий биотехнологического производства – получение и наращивание культуры клеток, биосинтез, осветление культуры, а также очистка, концентрирование и глянецвание фильтрата – может быть выполнена с использованием различных подходов и во множестве вариаций со своими достоинствами и недостатками с точки зрения производительности, скорости выполнения, влияния на характеристики продукта, экономичности, а также совместимости с технологиями на предыдущих и последующих стадиях. Условия реализации технологии, например используемые питательные среды, режимы наращивания и биосинтеза, фильтрации и хроматографирования, финишной очистки и концентрирования, могут существенно влиять на качество получаемого белка, остаточные производственные и молекулярные примеси, стабильность при хранении и биологическую активность моноклональных антител [4]. Эту закономерность можно экстраполировать на биотехнологическое производство любых других белков, причем степень влияния процесса производства на его результат тем выше, чем сложнее молекула [5]. То есть получение моноклональных антител и ферментов гораздо сильнее подвержено влиянию технологий производства, чем получение белков меньшего размера (например, инсулина или гормона роста) [6].

Опыт, накопленный в этой сфере за последние 40 лет, позволил лучше понять, каким образом конкретные технологии, используемые в производстве исходные и сырьевые материалы, различные добавки, условия выполнения отдельных стадий влияют на характеристики получаемого белка [7]. Вместе с тем столь высокая сложность всего комплекса мероприятий по получению белков с использованием биотехнологий пока не позволяет обнаружить и в полной мере контролировать все существующие зависимости между процессом производства

и характеристиками получаемого белкового препарата.

В связи с этим (чтобы дополнительно подчеркнуть критическую важность условий процесса биотехнологического производства) в отрасли сформировалось видение, согласно которому процесс есть продукт (*process is the biologic*) [8]: характеристики получаемого белкового продукта (его качество), определяющие профиль безопасности и эффективности, неотделимы от условий и параметров его производства. Такое понимание имеет конкретное практическое следствие: если условия процесса производства сильно влияют на качество получаемого продукта, то и изменение таких условий потенциально влечет за собой получение продукта с другими характеристиками, а по сути, нового продукта [9]. Сложность белковых молекул, обусловленная их размерами и микрорегетерогенностью структуры, не позволяет до конца прогнозировать то, каким образом изменение, даже несущественное с точки зрения молекулярного строения белка или незначительное с точки зрения изменения профиля сопутствующих примесей, может повлиять на биологические и клинические характеристики такого нового белкового препарата (например, на биологическую активность, иммуногенность, профиль токсичности, период полувыведения). Поэтому для оценки изменений профиля безопасности и эффективности и подтверждения отсутствия неприемлемых отклонений в результате изменений процесса требуется сравнить продукт, полученный с помощью модифицированной технологии производства, с продуктом, полученным посредством неизменного процесса, в отношении которого были проведены опорные доклинические и клинические исследования, доказывающие его приемлемую безопасность и эффективность [10]. Иными словами, необходимо удостовериться, что изменение биотехнологического процесса не привело к получению нового белкового

лекарственного препарата, не изученного ранее и требующего изучения в рамках новой масштабной программы доклинической и клинической разработки. Такое сравнение, как правило, предусматривает оценку двух препаратов (нового и полученного в рамках неизменного процесса) не только с точки зрения целевой белковой молекулы и сопоставимости примесей и агрегатов, но и с точки зрения биологической активности, потенциально не ограничиваясь *in vitro*-биологическими тестами с обоснованной необходимостью проведения исследований на животных или на людях [11].

Модернизация технологий является неотъемлемой частью производства любых лекарственных препаратов и их компонентов (т.е. действующих веществ, вспомогательных веществ, элементов упаковки), а также производственного оборудования (биореакторов, фильтров, хроматографических систем для препаративной хроматографии) и сырьевых материалов, например питательных сред, пеногасителей, буферов, элюентов и т.д. Необходимость изменений может диктоваться как научно-техническим прогрессом, так и экономическими соображениями, например уходом с рынка поставщиков материалов, желанием оптимизировать производство для экономии на издержках [12]. Иногда изменения вносятся по требованию регуляторов, например в случае запрета использования материалов, получаемых от крупного рогатого скота, при культивировании клеток из-за риска прионных заболеваний. Как отмечено выше, в биотехнологическом производстве такие изменения играют особую важную роль ввиду их потенциального влияния на характеристики получаемого продукта. На сегодняшний день благодаря накопленному опыту производители научились модифицировать процессы без существенного влияния на профиль качества, безопасности и эффективности. Это возможно только в том случае, если производитель досконально знает

свой процесс производства и имеет полный контроль над ним [13].

В целом внесение изменений достаточно распространено и может происходить на разных стадиях процесса производства. Очевидно, что чем раньше в технологической цепочке находится подвергаемая модификации стадия производства, тем выше шанс, что изменение будет иметь последствия для качества препарата, а значит, может оказаться значимым для профиля безопасности или эффективности, включая иммуногенность. Например, изменение условий культивирования (продолжительности или питательной среды) несет гораздо больший риск для показателей качества препарата, чем изменение условий препаративной хроматографии, используемой для очистки белка (средний риск), тогда как изменение поставщика первичной упаковки (например, ампулы) будет нести еще меньший риск [10]. Во многих случаях специалисты отрасли научились прогнозировать, как те или иные изменения, типичные для биотехнологического производства, будут сказываться на характеристиках конечного продукта. Так или иначе, любое вносимое изменение требует проведения многоуровневых сравнительных испытаний, объем которых диктуется как степенью потенциального риска повлиять на характеристики препарата, так и результатами более ранних программ сравнительных испытаний.

Для успешного внесения изменений, т.е. такой модификации процесса, после которой не произойдет неприемлемого изменения показателей качества и ухудшения профиля безопасности и эффективности лекарственного препарата, необходимо хорошее знание и понимание процесса производства, влияния условий производства и характеристик, используемых в производстве материалов, на качество получаемого продукта. В ряде случаев понимание закономерностей и стандартизация биотехнологических производств достигли таких высот,

что стало возможно, при соблюдении соответствующих условий, отделение процесса производства от получаемого продукта. По этой причине в настоящее время произошел сдвиг от парадигмы «процесс есть продукт» в сторону представления, согласно которому «биопроцесс может влиять на биопрепарат» (the biologic process may impact the biologic product) [8].

Прогресс в области аналитических и биоаналитических технологий делает возможным моделирование и тонкий контроль биотехнологических процессов, внесение в них изменений без существенного негативного влияния на результат [14, 15]. Аналитические технологии представляют собой методы анализа, позволяющие на молекулярном и надмолекулярном уровне охарактеризовать структурные или функциональные свойства изучаемых продуктов в экспериментах без использования живых организмов (животных или людей), т.е. *in vitro* или *ex vivo*. Биоаналитические методы направлены на оценку структурных и функциональных свойств изучаемых веществ в биологических средах (например, в крови, лимфе, спинномозговой жидкости) или в тканях животных или людей в рамках доклинических или клинических исследований (т.е. в условиях *in vivo*). Использование и тех и других методов критично для понимания, происходит ли изменение структурных или функциональных свойств под влиянием изменений, вносимых на различных стадиях процесса производства. Современные технологии анализа, если применяются комплексно, позволяют выявить практически любые различия в структуре или функциональной активности изучаемых белковых молекул или их производных (например, гликопротеинов, каковыми являются все антитела) как при сравнении препаратов, произведенных до и после внесения изменений в процесс производства, так и препаратов, получаемых разными производителями [16]. Важным

условием при этом является выбор правильного комплекса аналитических и функциональных испытаний, основанных на высокостандартизованных методиках и позволяющих максимально подробно охарактеризовать биологическую молекулу [17]. При этом современный аналитический опыт свидетельствует, что не все структурные изменения влияют на функциональную активность и общие биологические свойства молекулы (например, фармакокинетику, иммуногенность) [18–21]. Аналитические методы позволяют уловить и с высокой точностью количественно измерить наличие веществ, близких по структуре к желаемому белку, но все же отличающихся от него незначительными структурными характеристиками, если рассматривать с точки зрения всей молекулы [16]. Такие вещества называются родственными вариантами: родственными по отношению к желаемому продукту, являющемуся целью производства. Родственные варианты (вещества) могут обладать похожей на желаемый продукт или сильно отличающейся активностью либо токсичностью [22]. Под влиянием изменений процесса производства может происходить изменение как качественного, так и количественного профиля родственных вариантов. Вместе с тем из-за отсутствия полного механистического понимания того, как обнаруживаемые структурные различия (которые неизбежны) влияют на показатели клинической эффективности и безопасности, нередко при изменении процесса производства возникает необходимость оценки клинической значимости любых различий в профиле родственных вариантов, чтобы подтвердить, что не произошло дрейфа клинических характеристик, которые были установлены в опорных (регистрационных) клинических исследованиях оригинального биофармацевтика [10].

Все более широкое применение находят принципы обратной инженерии для проектирования новых

процессов получения терапевтических белков на основе исключительно характеристик конечного продукта, которое, однако, базируется на глубоком понимании зависимости определенных характеристик качества получаемого продукта от вариаций условий производства [23]. Это позволило в отсутствие знаний о процессе производства оригинального продукта получать терапевтические белки, которые по своим клиническим характеристикам не отличаются от оригинальных биопрепаратов [24]. Одинаковые или сходные клинические характеристики оригинального и копируемого биопрепаратов означают достижение эквивалентного клинического ответа, не позволяющего отличить применение биопрепарата, полученного с помощью оригинального процесса производства, от биопрепарата, полученного с помощью нового процесса производства, созданного в отсутствие полных знаний об оригинальном процессе [25].

ГЕНЕРИКИ¹ И БИОАНАЛОГИ/БИОСИМИЛЯРЫ

Инновации являются основным двигателем медицины, однако только доступность медицинской помощи позволяет ощутимо влиять на здоровье людей с помощью достижений фармакологии и биотехнологии. Поэтому тиражирование достижений медицинской науки (при условии справедливой защиты разработчиков инновационных лекарств), делающее их доступными для людей независимо от достатка, не менее значимо для здравоохранения [26]. В фармацевтической сфере копирование оригинальных разработок идет в двух направлениях:

1) создание воспроизведенных лекарственных препаратов, представляющих собой копии оригинальных лекарственных препаратов, содержащих низкомолекулярные действующие вещества (т.е. генериков), и 2) разработка аналогичных биологических лекарственных

препаратов, представляющих собой версии оригинальных препаратов, содержащих действующие вещества биологического или биотехнологического происхождения (т.е. биоаналогов).

Постоянное удорожание медицинской помощи вынуждает искать возможности для экономии средств, затрачиваемых на лекарства, без ущерба для их эффективности и безопасности. По этой причине копирование оригинальных разработок играет важную роль в обеспечении доступности фармакотерапии [27]. Например, благодаря применению воспроизведенных препаратов в 2019 г. в США было сэкономлено около 300 млрд долл. [28]. При этом экономия, полученная за счет назначения биоаналогов, не превысила 1 млрд долл., тогда как оценочная недополученная экономия составила около 10 млрд долл. за период 2016–2019 гг., т.е. с момента выхода первого биоаналога на рынок США [29]. Воспроизведенные лекарства в Европейском союзе также являются источником существенной экономии: их использование в 2016 г. позволило сэкономить около 100 млрд евро [30]. Применение неоригинальных лекарств (копий) имеет большое значение и для российского здравоохранения. Причинами относительно скромных объемов сэкономленных средств в отношении биоаналогов являются более позднее их появление на рынке, большие инвестиции в разработку и большая себестоимость. Принципиально важным аспектом создания неоригинальных лекарств (копий) является необходимость сохранения профиля безопасности и эффективности оригинального лекарственного препарата без воспроизведения программы его разработки в полном объеме [31]. В этом случае цель состоит в максимальном воспроизведении лекарства как результата процесса производства с помощью некоторого нового процесса, созданного без полного знания условий производства оригинального препарата [32]. Таким

образом, задача состоит в том, чтобы доказать сопоставимость «материальных» свойств копии и оригинального лекарства и их компонентов, а также их поведения в организме. Успешное подтверждение сопоставимости обосновывает экстраполяцию профиля безопасности и эффективности оригинального препарата без необходимости повторения длительной и дорогостоящей программы доклинических и клинических исследований.

Сокращение объема доклинических и клинических исследований при разработке копий оригинальных лекарств продиктовано не только экономическими соображениями, но и этическими мотивами, поскольку неприемлемо подвергать животных и людей испытаниям, если новые данные не будут иметь дополнительной ценности для медицинской науки и общества. Дублирование экспериментов приводит к необоснованной отсрочке предоставления доступа на рынок более экономичным лекарствам, при этом пациенты подвергаются неоправданному риску в клинических исследованиях в тех случаях, когда они избыточны [33, 34].

Различия лекарственных препаратов, содержащих низкомолекулярные действующие вещества, получаемые путем химического синтеза (и приравненные к ним), и биопрепаратов, т.е. лекарственных препаратов, содержащих высокомолекулярные действующие вещества (гетерополимеры), получаемые из биологических источников (как правило, белки и гликопротеины), обуславливают существование двух выше-названных направлений в копировании оригинальных разработок и, соответственно, двух разных подходов к созданию копий, опирающихся на единые принципы, но достаточно отличающихся друг от друга, чтобы рассматривать их отдельно [24, 31, 32, 35].

Биопрепараты, разработанные с целью повторения оригинальных биопрепаратов, сначала именовались как follow-on, т.е. последующие

¹ Понятия «воспроизведенный лекарственный препарат» и «генерик» являются синонимами.

биопрепараты. Термин был введен, чтобы четко обозначить отсутствие идентичности между оригинальным и повторенным биопрепаратами [36]. Отсутствие полной идентичности объясняется отсутствием идентичности биотехнологического процесса производства и его влиянием на характеристики получаемого продукта. В этом состоит принципиальное отличие «последующих» биопрепаратов от воспроизведенных лекарств, содержащих низкомолекулярные вещества, поскольку последние – результат химического синтеза и потому являются высокохарактеризованными изолированными молекулярными сущностями [37, 38].

Однако термин follow-on не стал широкоупотребимым, потому что сам по себе не подразумевал сходства копируемого биопрепарата с оригинальным биопрепаратом [36]. Позже законодательством Европейского союза было введено понятие similar biological medicinal product или сокращенно biosimilar [35]. После того как термин был принят и в США в 2010 г. [39], он прижился и стал общепринятым для категории биопрепаратов, получаемых с помощью обратной инженерии с целью воспроизведения клинических характеристик оригинального биопрепарата. В русскоязычной среде слово similar стали переводить как «аналогичный», «подобный» и даже «аналоговый», в результате возникли термины «биоаналог» и «биоподобие», кроме того, используется и простая транслитерация – биосимиляр. Таким образом, какой-либо единый консенсусный вариант перевода пока не выработан. Авторы настоящей работы предпочитают использовать слово «биоаналог» в силу его благозвучия, признавая определенные недостатки в его использовании и отсутствие принципиальных отличий от других вариантов перевода англоязычного слова biosimilar. Именно этот термин и будет использоваться далее в статье.

Термин «биоаналог» призван подчеркнуть, что действующее вещество повторенных биопрепаратов, как правило, не является точной копией действующего вещества оригинала, что имеет место в случае воспроизведенных лекарственных препаратов – генериков (generic (англ.) – не имеющий отличительных особенностей с точки зрения качества или применения). Европейское определение биоаналога разъясняет суть отличий биоаналога и генерика. В соответствии с руководством по аналогичным биологическим лекарственным препаратам ЕМА (European Medicines Agency – Европейское агентство по лекарствам), биоаналог – это биологический лекарственный препарат, который содержит версию действующего вещества ранее разрешенного в Европейской экономической зоне оригинального биологического лекарственного препарата (референтного лекарственного препарата) [35]. Таким образом, действующее вещество биоаналога – это априори вариант/версия действующего вещества оригинального биопрепарата, а не точная копия последнего. В отношении биоаналога необходимо установить аналогичность референтному лекарственному препарату с точки зрения характеристик качества, биологической активности, безопасности и эффективности на основании комплекса всесторонних испытаний на сопоставимость. В таком контексте сразу привлекает внимание определение воспроизведенного препарата, которое также представлено в законодательстве Евросоюза: под воспроизведенным лекарственным препаратом понимается лекарственный препарат с одинаковым качественным и количественным составом действующих веществ и имеющий ту же лекарственную форму, что и референтный лекарственный препарат, и биоэквивалентность которого референтному лекарственному препарату подтверждена с помощью соответствующих исследований биодоступности [40]. Принимая

во внимание особенности биотехнологических процессов, в т. ч. сильное влияние используемых в производстве материалов и параметров производства, а также сложность биологических молекул, законодательство Евросоюза в отношении биоаналогов делает соответствующую оговорку, противопоставляя их воспроизведенным препаратам: «если биологический лекарственный препарат, аналогичный референтному биологическому лекарственному препарату, не соответствует условиям определения воспроизведенных лекарственных препаратов в силу, в частности, различий, связанных с сырьевыми материалами или процессами производства, между биологическим лекарственным препаратом и референтным биологическим лекарственным препаратом, в отношении таких различий необходимо предоставить соответствующие результаты доклинических испытаний и клинических исследований» [40]. То есть постулируется недостаточность только лишь классических исследований биодоступности для обоснования сопоставимой эффективности и получения разрешения на продажу биоаналога. Такая регламентация находит отражение в законодательстве Российской Федерации и документах, составляющих право Евразийского экономического союза в области обращения лекарств для медицинского применения, закрепляющих дифференциальные подходы к подтверждению безопасности, эффективности и качества воспроизведенных препаратов и биоаналогов с целью их выведения на рынок и внедрения в клиническую практику [41–43]. Поэтому целесообразно детально рассмотреть, в чем состоят различия между воспроизведенными препаратами и биоаналогами, которые влекут необходимость применения разных подходов.

Говоря о сходствах и различиях между подходами, необходимо учитывать, что суть разработки как воспроизведенных препаратов, так и биоаналогов – копирование

оригинального лекарства. В ряде случаев оригинальный препарат содержит низкомолекулярное действующее вещество, получаемое из природных источников, но настолько хорошо очищенное и стандартизованное, что по качеству его можно приравнять к веществам, получаемым путем химического синтеза, а соответствующий воспроизведенный препарат будет расценен как генерик, а не биоаналог [24]. Некоторые относительно простые вещества, например антибиотики, витамины или аминокислоты, получают путем биосинтеза (ферментации), но простота их молекулярного строения, надежные технологии их очистки и стандартизации позволяют рассматривать их с регуляторных позиций так, словно они получены путем химического синтеза, поэтому лекарственные препараты, содержащие такие простые действующие вещества, пусть и получаемые с помощью биосинтеза, и копирующие некоторый оригинальный препарат, рассматриваются в качестве воспроизведенных (генериков) с соответствующими научно-техническими требованиями к их регистрации.

КОПИРОВАНИЕ И ОБРАТНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ЛЕКАРСТВ

Копирование оригинальных разработок связано с решением двух задач:

- копированием действующего вещества и
- копированием технологии его доставки.

Под технологией доставки в данном случае подразумевается лекарственная форма, например таблетка, капсула, раствор для инъекций для внутривенного или подкожного введения и т. д. За исключением растворов для внутривенного введения любая форма дозирования должна быть сконструирована и произведена так, чтобы обеспечивать доставку действующего вещества к определенному биологическому барьеру, вблизи которого действующее вещество должно перейти в раствор (если

вводится в нерастворенном состоянии) и через который должно абсорбироваться и попасть в системный кровоток [44]. Например, задачами такой лекарственной формы, как таблетки для приема внутрь, являются:

- доставка заключенного в таблетку действующего вещества к месту абсорбции (кишечник);
- обеспечение высвобождения частиц действующего вещества из таблетки (распад таблетки);
- обеспечение перехода действующего вещества из твердого состояния в виде частиц в растворенное состояние в кишечном соке;
- обеспечение абсорбции растворенного в кишечном соке действующего вещества через кишечный эпителий в системный кровоток.

Если речь идет о лекарстве системного действия, представленного в виде суспензии для подкожного введения, то частицы действующего вещества должны сначала раствориться в интерстициальной жидкости, а затем проникнуть в кровоток, чтобы после этого достичь органа-мишени. У раствора для подкожного введения стадия растворения отсутствует, но все равно необходимо обеспечить попадание действующего вещества из межклеточного пространства в кровоток в достаточном количестве и с достаточной скоростью.

Создание копии лекарственного препарата, ранее разрешенного для медицинского применения, основано на обратной инженерии. Обратная инженерия подразумевает создание процесса производства копии по результатам изучения и анализа характеристик копируемого оригинального лекарственного препарата, т. е. имеет место в некотором смысле инверсия порядка разработки. На основании этих знаний разрабатывается процесс производства копии, который позволял бы получать препарат с заданными характеристиками, эквивалентными характеристикам оригинального препарата, которые удалось выяснить с помощью методов обратной инженерии. Современные

аналитические и биоаналитические технологии позволяют достаточно подробно «разложить» даже очень сложные по строению лекарственные препараты для установления тех характеристик, которые являются ключевыми для достижения требуемого клинического профиля, и в дальнейшем проверить, были ли воспроизведены эти характеристики с помощью нового процесса производства [45, 46].

При создании генериков проблемы с воспроизведением низкомолекулярного действующего вещества, как правило, не возникают. Его производителем обычно является крупный химико-фармацевтический концерн, нередко расположенный в Китае или Индии, который в больших масштабах производит действующее вещество и поставляет его производителям воспроизведенных лекарственных препаратов по всему миру. Возможность однозначной идентификации низкомолекулярных веществ с помощью относительно простых методов позволяет добиться идентичности производимого действующего вещества не только от серии к серии, что является обязательным, но и идентичности действующему веществу, производимому его первоначальным разработчиком. Хотя в случае воспроизведения низкомолекулярных действующих веществ и могут возникать проблемы, связанные, например, с образованием химических примесей или недостаточным удалением агрессивных токсичных реагентов (катализаторов, растворителей и т. д.), затруднений непосредственно в воспроизведении, как правило, не возникает. Более того, разработчик генерика не обязан обеспечивать профиль примесей, который был бы эквивалентен оригинальному препарату, главное – соблюдать единые правила по обеспечению химической чистоты лекарственных препаратов, содержащих низкомолекулярные действующие вещества [47, 48]. Эти требования действуют

в отношении всех разработчиков и подлежат неукоснительному соблюдению.

Главной задачей, решаемой разработчиками воспроизведенных лекарственных препаратов, является обеспечение такой биодоступности действующего вещества, которая была бы эквивалентна биодоступности, обеспечиваемой с помощью оригинального препарата. Другими словами, усилия разработчика направлены на создание такой технологии доставки (т.е. таких характеристик лекарственной формы), которая позволяла бы добиться сопоставимой биодоступности. Поскольку согласно фундаментальному предположению биоэквивалентности одно и то же действующее вещество после попадания в кровоток ведет себя одинаково, независимо от того, из какого лекарственного препарата (генерика или оригинального) оно было высвобождено, то никакие дальнейшие действия и сравнения для обеспечения эквивалентности поведения лекарства в организме уже не требуются.

Воспроизведение лекарственных форм (лекарственных форм и формуляций) при разных путях введения требует учета свойств соответствующих биологических барьеров, которые необходимо преодолеть действующему веществу. Для перорально применяемых лекарств такими барьерами будут слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта (ротовая полость, желудок, кишечник), для ингаляционных препаратов – дыхательный эпителий, для трансдермальных препаратов – кожа и т.д. И хотя полной идентичности в показателях биодоступности добиться невозможно (ведь даже производитель оригинального препарата не способен добиться полностью идентичной биодоступности своего препарата от серии к серии), можно достигнуть такого уровня сопоставимости, когда остающиеся различия не значимы для достижения клинического эффекта, который присущ оригинальному препарату [49].

Таким образом, суть разработки воспроизведенного препарата, помимо выполнения общих требований, предъявляемых к качеству любого лекарственного препарата, сводится к оценке того, насколько успешно была воспроизведена технология доставки (лекарственная форма в сочетании в некоторых случаях с устройством для доставки, например ингалятором, шприцем-ручкой и др.). Обычно это делается в рамках серии фармацевтических (*in vitro*) экспериментов и одним или нескольких исследованиях биоэквивалентности (*in vivo*) на людях. В ряде случаев в силу того, что в некоторых областях понимание зависимости между свойствами лекарственной формы и биодоступностью достигло достаточной глубины, проведения клинических исследований не требуется, поскольку подтвердить необходимую степень сопоставимости биодоступности оригинального и воспроизведенного лекарственных препаратов можно по результатам одних лишь фармацевтических испытаний [50].

В ходе разработки биоаналогов ситуация противоположная. Во-первых, подавляющее большинство из них вводятся либо внутривенно, либо подкожно/внутримышечно, что делает создание технологии доставки второстепенной задачей, поскольку при внутривенном введении действующее вещество не будет проходить никаких биологических барьеров перед попаданием в кровоток и, следовательно, будет на 100% биодоступно, а в случае иного парентерального введения действующее вещество все равно вводится в растворенном состоянии, а значит, лекарственная форма не сильно влияет на биодоступность, поэтому усилия по обеспечению эквивалентной абсорбции не столь велики, как в случае создания перорально вводимых препаратов [51]. Вместе с тем воспроизведение самого высокомолекулярного биологического действующего вещества – нетривиальная задача, и именно на этом сосредоточены основные усилия

разработчиков биоаналогов [16, 52]. Условия процесса производства могут влиять на характеристики био-препарата, представляющего собой практически неразделимую смесь молекулярных вариантов желаемого белка или гликопротеина. Поскольку разработчик биоаналога не знает всех тонкостей процесса производства оригинального препарата, позволившего его создателю получить биопрепарат (т.е. эталонную смесь молекулярных вариантов желаемого продукта) с характеристиками, подтвердившими безопасность и эффективность в клинических исследованиях, то его основные усилия направлены на создание такого процесса производства, который позволял бы получать молекулярную композицию, максимально воспроизводящую характеристики биомолекулярной смеси оригинального препарата.

Как отмечалось ранее, полностью воспроизвести молекулярные характеристики желаемого продукта от серии к серии не способен даже сам разработчик оригинального биопрепарата [22]. Кроме того, известно, что те или иные молекулярные различия по-разному могут влиять на итоговый клинический профиль биопрепарата, на котором в значительной степени отражаются особенности фармакокинетики, фармакодинамики/биологической активности и иммуногенности [53]. Поскольку достижение идентичности невозможно и не требуется, теоретически и практически приемлемо создание такого процесса производства (даже без точного знания всех условий производства оригинального биопрепарата), который позволит получать композицию родственных молекулярных вариантов желаемого белка, по своим клиническим свойствам несущественно отличающуюся от таковой у оригинального биопрепарата [35]. Это стало возможным благодаря созданию хорошо контролируемых процессов и аналитических технологий, позволяющих уловить малейшие различия между сравниваемыми

биопрепаратами, а также благодаря достижению понимания того, какие именно условия процесса производства могут приводить к таким различиям, и возможности оценки того, насколько существенны структурно-функциональные различия для сопоставимости клинических эффектов двух биологических лекарственных препаратов [54]. Другими словами, технологии и знания достигли такого уровня, когда стало возможным отделить биотехнологический процесс от качества получаемого продукта, и это позволяет воссоздавать процесс производства с помощью обратной инженерии, опираясь на профиль качества воспроизводимого биопрепарата [8]. Однако по-прежнему приходится говорить о версии биопрепарата, а не о его копии.

Следует также отметить различия в полезности публично доступных стандартов (фармакопейных монографий и референтных стандартов) для разработки генериков и биоаналогов. Фармакопейные стандарты приемлемы для низкомолекулярных действующих веществ (активных фармацевтических ингредиентов, АФИ) именно потому, что результат производства полностью отделим от получаемого продукта. Следовательно, можно сформулировать требования безотносительно к условиям производства. Фармакопейные стандарты для лекарственных препаратов (т.е. технологий доставки действующего вещества), содержащих низкомолекулярные действующие вещества, применимы только в общем виде. При этом возможны отступления на основании результатов собственной фармацевтической разработки, если они подкреплены данными исследований биодоступности и биоэквивалентности конкретного воспроизведенного препарата. Фармакопейная стандартизация биологических действующих веществ возможна лишь в ограниченном масштабе. Как правило, можно стандартизовать только наиболее критичные показатели, например биологическую активность [55],

в целом же приходится ориентироваться на референтный биопрепарат. Как было отмечено ранее, сложность готовой лекарственной формы биопрепарата мала по сравнению со сложностью обеспечения качества действующего вещества, поэтому к ней применимы общие требования, предъявляемые к инъекционным/инфузионным препаратам. Главным образом необходимо обеспечить стерильность, отсутствие включений и агрегатов, стабильность pH и т.д. Легкость обеспечения однородности свойств низкомолекулярного действующего вещества вытекает из простоты его структуры, когда даже самая незначительная модификация структуры молекулы сказывается на его физико-химических свойствах и легко обнаруживается с помощью простых методов, широко используемых в фармацевтическом анализе. Например, даже простое восстановление кетонной группы до гидроксильной будет легко обнаружено с помощью хроматографии, масс-спектрометрии или даже гораздо более простой потенциометрии. Тогда как каждая молекула биологического действующего вещества может подвергнуться модификации практически на любом этапе биосинтеза (будь то трансляция, гликозилирование или образование структур высокого порядка), а также при последующей очистке или хранении, в результате чего и образуется смесь вариантных соединений. Каждое из изменений может быть незначительным и оставаться незамеченным без глубокого анализа с применением множества аналитических технологий, основанных на разных принципах обнаружения.

Наконец, важно отметить, что современные знания и опыт позволяют «скопировать» практически любой белковый терапевтический препарат, невзирая на сложность строения молекулы. Однако разработчик биоаналога, чтобы оставаться конкурентоспособным на рынке, также вынужден учитывать экономические ограничения: инвестиции в разработку

и производство серий должны быть экономически оправданы [56]. Поскольку оригинальный препарат и биоаналог в сущности – один и тот же лекарственный препарат с клинической точки зрения, основная конкуренция является ценовой, а не технологической. Следовательно, удешевление процесса производства – залог рыночного успеха. Но для того чтобы избежать вывода на рынок биоаналогов, неприемлемо отличающихся по профилю безопасности и эффективности от оригинального биопрепарата, были установлены регуляторные стандарты разработки биоаналогов. Речь о них пойдет в следующем разделе.

РЕГУЛЯТОРНЫЕ СТАНДАРТЫ: КОНЦЕПЦИЯ ПЕРЕВЕРнуТОЙ ПИРАМИДЫ

Регуляторная наука представляет собой комплекс научных дисциплин, применяющихся при оценке качества, безопасности и эффективности лекарственных препаратов и создающих основу для принятия регуляторных решений на протяжении всего жизненного цикла лекарства. Она охватывает фундаментальные и прикладные медицинские и социальные науки, а также вносит вклад в разработку регуляторных стандартов и инструментов [57].

Законодательные и научные требования и подходы к разработке и выведению на рынок биоаналогичного лекарства, представленные в форме регуляторных стандартов, предполагают, что в основе концепции биоаналогичности лежит обратная инженерия оригинального биопрепарата с последующим многоуровневым подтверждением сопоставимости критичных характеристик действующего вещества биоаналога и оригинального биопрепарата [24, 38]. В контексте подтверждения биоаналогичности оригинальный биопрепарат обозначают как референтный (т.е. эталонный). Разработка оригинального препарата есть исключаяющий отбор, а процессом изысканий движет желание создать некоторое новое вещество,

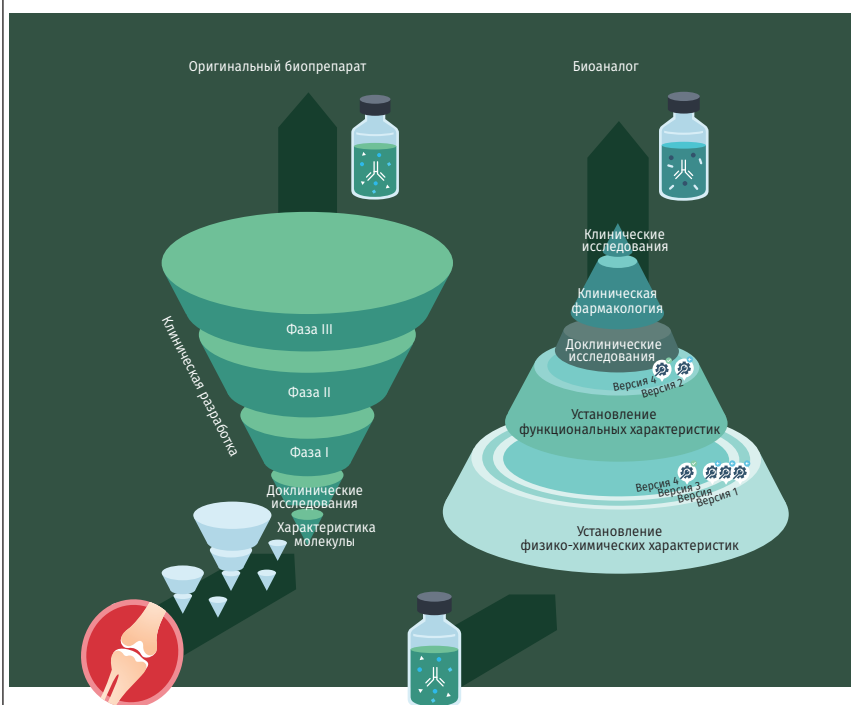
ТАБЛИЦА. Сравнение подходов к разработке оригинального и биоаналогичного препаратов		
Аспект разработки	Оригинальный препарат	Биоаналогичный препарат
Основная цель	Создание нового вещества с требуемым клиническим профилем	Копирование известного вещества с требуемым клиническим профилем
Основной принцип	Исключающий отбор кандидатных соединений	Итеративное подтверждение сопоставимости
Аналитические испытания	Установление характеристик действующего вещества и технологии его доставки является вторичным по отношению к остальным этапам разработки	Обнаружение структурных различий между оригиналом и версией играет основополагающую роль
Функциональные испытания	Обнаружение желаемых характеристик кандидатных соединений в отношении целевой мишени	Косвенное обнаружение различий, не охарактеризованных в аналитических испытаниях, и подтверждение функциональной сопоставимости
Исследования на животных	Предварительное подтверждение желаемых функциональных характеристик кандидата и оценка безопасности для инициации и продолжения исследований на людях	Сравнение оригинального биопрепарата и его версии в условиях <i>in vivo</i> при наличии релевантных моделей и только при невозможности получения данных <i>in vitro</i>
Исследования на людях	Оценка взаимного влияния организма человека и кандидатного препарата, поиск и подтверждение клинической пользы и условий ее проявления. Играют опорную роль и являются кульминацией разработки	Сравнения клинических показателей, непосредственно связанных с обнаруженными различиями, и подтверждение сопоставимости клинических профилей оригинального биопрепарата и версии. Играют менее значимую роль по сравнению с аналитическими и функциональными испытаниями

которое будет обладать требуемыми клиническими свойствами. На основе сформулированной потребности в новом лекарстве начинается процесс исключительного отбора веществ с желаемыми характеристиками из библиотеки потенциальных соединений, способных связываться с мишенью. Чтобы обнаружить наличие желаемых характеристик и отсутствие нежелательных свойств, отбор вначале осуществляется при помощи *in vitro*-методов на отдельных рецепторах, мембранах, затем на живых клетках, культурах клеток и тканей и завершается *in vivo*-исследованиями на животных и на людях [58, 59]. Получение неудовлетворительных результатов на любом этапе такого отбора приводит к исключению соответствующего кандидатного соединения из разработки и продолжению отбора только из числа молекул, выдержавших очередное испытание. На поздних этапах процесса в рамках клинических исследований выявляют, каким образом дошедшие до этого этапа кандидаты (обычно

1–3 из многих тысяч или миллионов) влияют на организм человека, как организм человека влияет на их характеристики, в т. ч. в зависимости от возраста, массы тела, сопутствующих заболеваний, пола и других факторов, как соотносятся полезные и нежелательные свойства, определяют условия, в которых полезные свойства оправдывают возникающие риски, и лишь в самом конце происходит окончательное подтверждение безопасности и эффективности для целевых групп пациентов в условиях, максимально приближенных к реальной клинической практике. Именно эти последние масштабные клинические исследования (составляющие фазу 3-й клинической разработки) являются опорным доказательством безопасности и эффективности, однако правильно спланировать и провести эти исследования без всей предыдущей многолетней программы доклинических и клинических исследований и фармацевтических испытаний невозможно [40, 60].

Создание и настройка процесса производства, а также установление характеристик действующего вещества и технологии его доставки, проводимые параллельно с доклинической и клинической разработкой, несмотря на неоспоримую важность, находятся как бы на втором плане, поскольку следуют за процессом отбора с помощью функциональных/биологических испытаний и обслуживают его [61]. Основная задача установления характеристик биопрепарата в процессе отбора состоит в том, чтобы выявить и понять влияние тех из них, которые важны для обеспечения требуемых свойств, а впоследствии контролировать их наличие (или отсутствие). В этом же ключе происходит разработка процесса производства, а именно определение, подбор и выработка стратегии контроля тех условий производства, которые важны для получения препарата с требуемыми характеристиками [22, 62]. В итоге к концу программы клинических исследований – в случае ее успешности – удается

РИСУНОК 4. Схематически изображены процессы разработки оригинального моноклонального антитела и его биоаналога



Отправной точкой разработки оригинального биопрепарата (левые пирамиды) является лечимое заболевание. Небольшие незаконченные пирамиды символизируют «кубитые» молекулы-кандидаты. Расширение пирамиды основанием кверху отражает объем ресурсов, затрачиваемых на соответствующий этап разработки. Отправной точкой разработки биоаналога является оригинальный биопрепарат. Пирамида (правая) одна, однако она имеет несколько концентрических колец, символизирующих версии процесса производства. Результат каждой версии оценивается последовательно на разных этапах. Перевернутая пирамида отражает объем ресурсов, затрачиваемых на каждом этапе. Ввиду особой важности исследования клинической фармакологии выведены в самостоятельную категорию.

накопить знания о характеристиках биопрепарата и процессе его производства, воспроизведение и контроль которых позволят в будущем получать препарат с требуемыми клиническими свойствами [62].

В рамках такой программы на отдельного кандидата приходится относительно немного аналитических исследований по установлению физико-химических и биологических свойств, тогда как объем доклинических и клинических исследований намного больше и направлен на всестороннее определение профиля влияния испытуемого кандидата на организм человека и влияния организма человека на него.

Логика разработки биоаналога является в некотором смысле инвертированной по отношению к той, которая использовалась для разработки оригинала. Поскольку цель состоит не в поиске, а копировании, то не требуются масштабные доклинические и клинические исследования для повторного подтверждения безопасности и эффективности. Однако нужны обширные аналитические исследования, чтобы разгадать молекулярный профиль оригинального биопрепарата и постараться повторить его [24, 63]. Поскольку без знания всех деталей технологии производства воспроизведение молекулярной композиции действующего

вещества оригинального препарата с первого раза невозможно, возникает необходимость многократно повторять комплекс аналитических исследований в отношении итеративно дорабатываемых кандидатов, прежде чем будет выбран наиболее приемлемый из них, который будет передан на последующие этапы для подтверждения сопоставимости на функциональном и клиническом уровнях [64]. Другими словами, разработчик биоаналога с помощью обширного комплекса аналитических исследований сопоставимости пытается устранить разрыв между собственным знанием и знанием разработчика оригинального препарата, которому известны многие тонкости, основные зависимости между переменными в ходе процесса, а также условиями производства и получаемым в итоге биопрепаратом. Таким образом, доклинические и клинические исследования в разработке биоаналога нужны, чтобы доказать, что версия оригинального биопрепарата позволяет добиваться такого же клинического результата, а не для того, чтобы заново подтвердить безопасность и эффективность, воспроизведя программу доклинической и клинической разработки оригинального биопрепарата [65, 66]. Любые последующие исследования нужны только для устранения остаточной неопределенности в отношении биоаналогичности [24], которая максимальна в самом начале перед аналитическими исследованиями сопоставимости и должна сокращаться при переходе на каждый последующий этап разработки. Таким образом, необходимо доказать, что остающиеся различия незначимы с клинической точки зрения, для чего прибегают к итеративному подходу, реализуя его пошагово:

1) аналитические испытания, направленные на оценку и сравнение физико-химических свойств биомолекулярной композиции, позволяют выявить структурные различия;

2) функциональные испытания позволяют косвенно выявить структурные различия и оценить их значимость для биологической активности [67].

Если на основании экспертных знаний и данных научной литературы результаты, полученные с помощью первых двух этапов, сочтены свидетельствующими о несовместимости обнаруженных различий с концепцией биоаналогичности, то, как правило, принимается решение о доработке процесса производства². Это потребует возвращения к шагу 1 после того, как будет получен доработанный прототип;

3) исследования на животных могут позволить получить данные для сравнения оригинального препарата и биоаналога в условиях *in vivo* только в том случае, если существуют подходящие модели, и если информацию невозможно было сгенерировать на предыдущих этапах [52];

4) исследования на людях (клинические): (а) для сравнения показателей, непосредственно связанных с обнаруженными различиями, и (b) для вспомогательного подтверждения сопоставимости клинических профилей при помощи оценки клинических конечных точек, характеризующих эффективность и безопасность.

Показателями, непосредственно связанными с обнаруженными различиями, являются фармакокинетика, фармакодинамика и иммуногенность. Структурные различия могут приводить к различиям в фармакологических параметрах между сравниваемыми препаратами. Это происходит в тех случаях, когда оцениваемые структурные различия значимы для рецепторных взаимодействий, определяющих такие фармакологические параметры. При этом совокупная эффективность и безопасность являются производными от фармакодинамики, фармакокинетики и иммуногенности [24], а оценка клинического

профиля позволяет лишь косвенно и с гораздо меньшей чувствительностью сопоставить два биопрепарата и установить клинически значимые различия между ними.

Таким образом, первый шаг и в какой-то мере второй направлены на поиск и выявление структурных различий, а также их качественную и количественную характеристику [16]. В значительной степени второй шаг, третий и четвертый направлены на оценку того, насколько обнаруженные различия значимы [66]. Каждый последующий шаг требует проведения меньшего числа исследований, поскольку предшествующие изыскания позволяют уменьшить неопределенность. В результате образуется перевернутая пирамида, в основе которой лежат масштабные аналитические и функциональные испытания, а вершину составляют всего несколько или даже одно клиническое исследование.

Следует особо отметить, что обратная инженерия строится на базовом научном принципе, согласно которому структура определяет активность. Активность, в свою очередь, определяет эффективность и безопасность. Подход обратной инженерии основан на понимании зависимости активности любого вещества в организме человека от его структуры (т.е. структурно-функциональной зависимости). Следовательно, если оригинальный биопрепарат – это комплекс структур, определяемых на различных уровнях (аминокислотная последовательность, заряд, полярность, пространственное строение и т.д.) и обладающих требуемой биологической активностью (т.е. показателями безопасности и эффективности), то как можно более полное воспроизведение такого комплекса структур позволит повторить клинический профиль [68, 69]. Поэтому возникает необходимость выполнения обширного комплекса аналитических испытаний, что позволит практически полностью установить и сравнить структурные свойства

двух белковых препаратов, получаемых с помощью разных процессов производства. При этом структурные различия между биоаналогом и референтным препаратом, которые неминуемо обнаруживаются, далее оцениваются в функциональных испытаниях, т.е. таких экспериментах, в которых проверяется, как испытуемые объекты иницируют или блокируют череду биохимических процессов в результате взаимодействия со своей мишенью на различных биологических системах: например, на уровне связи с изолированным или расположенным на поверхности клетки рецептором, степени активации сигнальных путей, характеристик клеточного ответа на взаимодействие с рецептором по силе и продолжительности и т.д. Кроме того, сравнение функциональной активности на таких *in vitro*-биосистемах позволяет компенсировать ограничения некоторых аналитических испытаний, которые могут не до конца улавливать имеющиеся различия в т.н. структурах высоких порядков (например, третичной). В этом случае сопоставимость по функциональной активности, для которой наличие правильной конформации имеет большое значение, позволяет косвенно подтвердить сходство (аналогичность) пространственной организации сравниваемых препаратов.

Важно отметить, что хотя концепция биоаналогичности и признает невозможность полного воспроизведения оригинального биопрепарата и тем самым допускает определенные различия, главным критерием допустимости которых является отсутствие значимого с медицинской точки зрения влияния на итоговый клинический профиль, надлежащая практика разработки не позволяет игнорировать выраженные различия, обнаруживаемые уже на этапе установления аналитических или функциональных характеристик, в надежде на то, что во время клинических исследований эти различия окажутся

² Может быть принято решение о прекращении разработки.

незначимыми или пограничными. Таким образом, решение о продолжении разработки и переходе к следующей стадии при обнаружении различий (т.е. игнорирование таковых) должно быть полностью информированным и научно обоснованным: должно быть доказано, что структурные или функциональные различия, включая фармакокинетику, фармакодинамику, токсичность и иммуногенность, действительно не значимы для клинического профиля, какими бы незначительными сами по себе с молекулярной точки зрения они ни казались.

ВАЖНОСТЬ РОДСТВЕННЫХ И ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ПРИМЕСЕЙ

В достижении высокого качества биоаналога, сопоставимого с качеством референтного препарата, большую роль играет обеспечение чистоты: профиль примесей биоаналога должен быть не хуже профиля примесей оригинала. Этот вопрос целесообразно рассматривать с двух позиций: наличия родственных примесей и производственных примесей.

Примесь – это любой компонент, содержащийся в лекарственном веществе или лекарственном препарате, не являющийся желаемым продуктом, родственным веществом или вспомогательным веществом, в т.ч. буферным компонентом [22]. При этом родственные примеси – это молекулярные варианты желаемого продукта (например, прекурсоры, определенные продукты деградации, образующиеся во время производства и (или) хранения), не обладающие свойствами, сопоставимыми с таковыми у желаемого продукта в части активности, эффективности и безопасности. Производственные примеси – примеси, образующиеся в процессе производства; могут брать начало из клеточных субстратов (например, белки клетки-хозяина, ДНК клетки-хозяина), клеточной культуры (например, индукторы, антибиотики или компоненты питательной

среды) или нижестоящей обработки (например, реагенты для обработки или вымываемые из колонки вещества) [22]. Таким образом, родственные примеси – это модифицированные варианты желаемой молекулы действующего вещества, которые не обладают такой же активностью или могут быть токсичны (иммуногенны). Производственные примеси – это вещества, не связанные структурно с самой желаемой биомолекулой, а являющиеся компонентами процесса производства.

Минимизация производственных примесей является задачей для обеспечения качества любого лекарства. В большинстве случаев выработаны общие критерии того, до какой степени лекарственный препарат должен быть очищен от производственных примесей. Например, содержание ДНК клетки-хозяина в одной дозе биопрепарата не должно превышать 10 нанограммов [69]. Минимизация содержания белков клетки-хозяина – неотъемлемый элемент обеспечения низкой иммуногенности, отсутствия агрегатов и преждевременной деградации белка. По этой причине требования, предъявляемые к разработчикам как оригинальных биопрепаратов, так и биоаналогов в отношении производственных примесей, в целом едины [70].

В отношении родственных примесей подходы оригинаторов и разработчиков биоаналогов отличаются. Первые стараются максимально избавиться от родственных примесей: степень усилий определяется производственными возможностями, с одной стороны, и требованиями клинической безопасности и эффективности – с другой. При этом у разработчика оригинального препарата нет какой-то конкретной цели по достижению некоторого определенного профиля чистоты в отношении родственных примесей, тогда как разработчик биоаналога обязан обеспечить максимальную похожесть профиля родственных примесей биоаналога с таковыми у оригинатора. В конечном счете

именно в этом и состоит основная задача разработчика биоаналога. Поскольку задача полного воспроизведения действующего вещества референтного препарата с помощью вариантного процесса, как правило, невыполнима, необходимо стремиться к минимальным различиям. Для этого, как уже отмечалось, при помощи пошаговых испытаний необходимо доказать, что остающиеся различия незначимы с клинической точки зрения.

СВЯЗЬ ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА С ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИМ ПРОЦЕССОМ

Поскольку особенности процесса производства могут влиять на результат (т.е. на биопрепарат) в такой степени, что его модификация может привести к получению препарата с характеристиками, отсутствующими у препарата, получаемого при помощи неизменного процесса, то на этапе разработки очень важно обеспечить четкую прослеживаемую связь между непрерывно подвергающимся модификации процессом производства и испытаниями и исследованиями, в которых изучаются образцы препарата, полученные с помощью разных версий производственного процесса [10, 62]. Регуляторным стандартом для биоаналога является проведение всей совокупности исследований перевернутой пирамиды с использованием препарата, полученного с помощью одной и той же версии процесса производства. Такая версия должна быть окончательной версией процесса производства, с помощью которого биоаналог будет производиться для нужд рынка [35, 43]. Это означает, что процесс должен быть доведен до конечного промышленного масштаба (хотя с помощью него допускается производство серий меньшего размера для удовлетворения более скромных нужд исследовательского процесса), валидирован и не должен подвергаться никаким изменениям на всем протяжении программы испытаний

и исследований для подтверждения биоаналогичности и принятия последующего регуляторного решения. Вместе с тем это не значит, что весь комплекс исследований должен быть выполнен на одной и той же серии биоаналога. Наоборот, очень важно оценить вариабельность процесса производства, т.е. понять, отклонения каких входных параметров и условий процесса приводят к различиям в показателях качества от серии к серии [16]. Дополнительно анализ множества серий позволяет оценить аналитическую вариабельность, т.е. то, в какой мере погрешность в измерениях влияет на отклонения результатов измерений [72].

Очевидно, что прежде чем решить, какая именно версия процесса производства станет окончательной, необходимо провести многочисленные циклы «доработка – испытания», чтобы добиться производства препарата с требуемыми характеристиками и начать дорогостоящий процесс опорных сравнительных испытаний, результаты которых станут

обоснованием для одобрения биоаналога для продажи [64]. Решение о признании некоторой версии процесса производства окончательной всегда сопровождается риском того, что позднее обнаружатся критические различия, которые вынудят компанию доработать процесс и начать комплекс исследований сопоставимости заново. В любом случае прослеживаемая связь испытуемого объекта (т.е. кандидатного биоаналога), изучаемого в конкретном исследовании, с версией процесса производства, с помощью которой он был получен, строго контролируется во время регистрационной экспертизы, и в случае отсутствия/неполной прослеживаемости производителю может быть отказано в выдаче разрешения на продажу [73].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подход к разработке биоаналогов коренным образом отличается от разработки оригинального биологического препарата, поскольку основные усилия направлены на максимально точное

воспроизведение действующего вещества оригинала, что позволит экстраполировать профиль безопасности и эффективности последнего без повторения программы его разработки в полном объеме. Современные технологии позволяют «скопировать» практически любой белковый терапевтический препарат, однако разработчик вынужден учитывать экономические ограничения, выполняя при этом в полной мере требования регуляторных стандартов в отношении данной группы лекарственных препаратов, включая прослеживаемость модификаций процесса производства (в ходе итераций разработки версии препарата) и их связи с результатами испытаний на сопоставимость разных уровней. Глубокое понимание современных подходов, соблюдение регуляторных требований и критическая оценка имеющегося опыта необходимы для рациональной с точки зрения материальных и временных ресурсов разработки биоаналогичного лекарственного препарата.



ИСТОЧНИКИ

1. U.S. Food and Drug Administration. Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs – Humulin R. *Official website of the U.S. Food and Drug Administration*. 28 October 1982. Available at: <https://accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&AppNo=018780>.
2. Davy A.M., Kildegaard H.F., Andersen M.R. Cell Factory Engineering. *Cell Syst*. 2017;4(3):262–275. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.02.010>.
3. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products, Q5D. *Official Website of the ICH*. 16 July 1997. Available at: https://database.ich.org/sites/default/files/Q5D_Guideline.pdf.
4. European Medicines Agency. Development, production, characterisation and specifications for monoclonal antibodies and related products. *Official website of European Medicines Agency*. 4 August 2016. Available at: https://ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-development-production-characterisation-specification-mono-clonal-antibodies-related_en.pdf.
5. Co-ordination Group for Mutual Recognition and Decentralised procedures – Human (CMDh). CMDh Questions & Answers on Biologicals, CMDh/269/2012, Rev. 2. *Heads of Medicines Agencies (HMA)*. February 2020. Available at: https://hma.eu/fileadmin/dateien/Human_Medicines/CMDh_h_/Questions_Answers/CMDh_269_2012_Rev._2_2020_02_clean_Q_A_on_biologicals.pdf.
6. Dübel S. (ed.). *Handbook of Therapeutic Antibodies: Technologies, Emerging Developments and Approved Therapeutics*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag; 2010.
7. Günter J. Brief Review of the Biopharmaceutical and Vaccine Industry. In: Lindskog E., Łacki K., Galliher P. (eds.). *Biopharmaceutical Processing Development, Design, and Implementation of Manufacturing Processes*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Ltd; 2018.
8. Geigert J. Chapter 2 Biopharmaceuticals Are Not Chemical Drugs. In: *The Challenge of CMC Regulatory Compliance for Biopharmaceuticals*. 2nd ed. Carlsbad, CA: Springer International Publishing; 2019.
9. Geigert J. Chapter 14, Demonstrating Product Comparability After Process Changes. In: *The Challenge of CMC Regulatory Compliance for Biopharmaceuticals*. 3rd ed. Cham, Switzerland: Springer Nature Switzerland AG; 2019.
10. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Comparability of Biotechnological/Biological Products Subject To Changes In Their Manufacturing Process (Q5E). *Official Website of the ICH*. 18 November 2004. Available at: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q5E%20Guideline.pdf>.
11. European Medicines Agency. Comparability of biotechnology-derived medicinal products after a change in the manufacturing process – non-clinical and clinical issues. *Official Website of European Medicines Agency*. 19 July 2007. Available at: https://ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-comparability-biotechnology-derived-medicinal-products-after-change-manufacturing-process_en.pdf.
12. Vezér B., Buzás Z., Sebeszta M., Zrubka Z. Authorized manufacturing changes for therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) in European Public Assessment Report (EPAR) documents. *Curr Med Res Opin*. 2016;32(5):829–834. <https://doi.org/10.1185/03007995.2016.1145579>.
13. Tebbey P.W., Varga A., Naill M., Clewell J., Venema J. Consistency of quality attributes for the glycosylated monoclonal antibody Humira® (adalimumab). *MAbs*. 2015;7(5):805–811. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1073429>.
14. Zhang Z., Pan H., Chen X. Mass spectrometry for structural characterization of therapeutic antibodies. *Mass Spectrom Rev*. 2009;28(1):147–176. [https://doi.org/10.1002/1522-2675\(200901\)28:1<147::AID-MSB147>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1522-2675(200901)28:1<147::AID-MSB147>3.0.CO;2-1).

doi.org/10.1002/mas.20190.

15. Woodcock J., Griffin J., Behrman R. et al. The FDA's assessment of follow-on protein products: a historical perspective. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(6):437-442. <https://doi.org/10.1038/nrd2307>.
16. U.S. Food and Drug Administration. Quality Considerations in Demonstrating Biosimilarity of a Therapeutic Protein Product to a Reference Product, Guidance for Industry. *Official Website of the U.S. Food and Drug Administration.* 30 April 2015. Available at: <https://fda.gov/media/135612/download>.
17. Gabrielson J.P., Kendrick B.S., Young J.A. Universal Qualification of Analytical Procedures for Characterization and Control of Biologics. *J Pharm Sci.* 2020;109(8):2413-2425. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.05.012>.
18. Hickey J.M., Toprani V.M., Kaur K. et al. Analytical Comparability Assessments of 5 Recombinant CRM₁₉₇ Proteins From Different Manufacturers and Expression Systems. *J Pharm Sci.* 2018;107(7):1806-1819. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.03.002>.
19. Zhang E., Xie L., Qin P. et al. Quality by Design-Based Assessment for Analytical Similarity of Adalimumab Biosimilar HLX03 to Humira®. *AAPS J.* 2020;22(3):69. <https://doi.org/10.1208/s12248-020-00454-z>.
20. Jassem S., Wang W., Sweet H. et al. Functional and Nonclinical Similarity of ABP 980, a Biosimilar of Trastuzumab. *Pharm Res.* 2019;36(12):177. <https://doi.org/10.1007/s11095-019-2702-8>.
21. Halim L.A., Márquez M., Maas-Bakker R.F., Castañeda-Hernández G., Jiskoot W., Schellekens H. Quality Comparison of Biosimilar and Copy Filgrastim Products with the Innovator Product. *Pharm Res.* 2018;35(11):226. <https://doi.org/10.1007/s11095-018-2491-5>.
22. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products, Q6B. *Official Website of the ICH.* 10 March 1999. Available at: https://database.ich.org/sites/default/files/Q6B_Guideline.pdf.
23. Saleem R., Cantin G., Wikström M. et al. Analytical and Functional Similarity Assessment of ABP 710, a Biosimilar to Infliximab Reference Product. *Pharm Res.* 2020;37(6):114. <https://doi.org/10.1007/s11095-020-02816-w>.
24. U.S. Food and Drug Administration. Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product; Guidance for Industry. *Official Website of the U.S. Food and Drug Administration.* 28 April 2015. Available at: <https://fda.gov/media/82647/download>.
25. Considerations in Demonstrating Interchangeability With a Reference Product, Guidance for Industry. *Official Website of the U.S. Food and Drug Administration.* 10 May 2019. Available at: <https://fda.gov/media/124907/download>.
26. Evans D.B., Hsu J., Boerma T. Universal health coverage and universal access. *Bull World Health Organ.* 2013;91(8):546-546A. <https://doi.org/10.2471/BLT.13.125450>.
27. Frazier K.C. Affording Medicines for Today's Patients and Sustaining Innovation for Tomorrow. *JAMA.* 2020;323(9):831-833. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.0167>.
28. Association for Accessible Medicines. 2019 Generic Drug & Biosimilars Access & Savings in the U.S. Report: The Case for Competition. *Official website of the Association for Accessible Medicines.* 2019. Available at: <https://accessiblemeds.org/sites/default/files/2019-09/AAM-2019-Generic-Biosimilars-Access-and-Savings-US-Report-WEB.pdf>.
29. U.S. Food and Drug Administration. Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs - Summary review for Zarxio, BLA 125553. *Official website of the U.S. Food and Drug Administration.* U.S. Food and Drug Administration, 6 March 2015. Available at: <https://accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&AppNo=125553>.
30. Medicines for Europe. Infographic: Key Figures on Generic Medicines. *Official website of the Medicines for Europe.* Medicines for Europe, 22 February 2006. Available at: <https://medicinesforeurope.com/generic-medicines/whats-new/?t=infographics>.
31. European Medicines Agency. Guideline on the investigation of bioequivalence (Rev.1). *Official Website of European Medicines Agency.* 20 January 2010. Available at: https://ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-bioequivalence-rev1_en.pdf.
32. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability; WHO Technical Report Series. *Official website of the World Health Organisation.* June 2017. Available at: http://academy.gmp-compliance.org/guidemgr/files/who_trsl003_annex6.pdf.
33. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Choice of Control Group and Related Issues in Clinical Trials (E10). *Official Website of the ICH.* 20 July 2000. Available at: https://database.ich.org/sites/default/files/E10_Guideline.pdf.
34. European Parliament, Council. Recital 6 of Directive 2001/20/EC of the European Parliament and of the Council of 4 April 2001. *EUR-Lex.* 7 August 2009. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1591199062581&uri=CELEX:32001L0020>.
35. European Medicines Agency. Guideline on similar biological medicinal products (Rev.1). *Official Website of European Medicines Agency.* 23 October 2014. Available at: https://ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-rev1_en.pdf.
36. Health Canada. Guidance Document: Information and Submission Requirements for Biosimilar Biologic Drugs. *Official website of the Government of Canada.* 14 November 2016. Available at: <https://canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/biologics-radiopharmaceuticals-genetic-therapies/applications-submissions/guidance-documents/information-submission-requirements-biosimilar-biologic-drugs-1.html>.
37. European Medicines Agency. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues (EMA/CHMP/BMWP/42832/2005). *Official Website of European Medicines Agency.* 22 February 2006. Available at: https://ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/similar-biological-medicinal-products-containing-biotechnology-derived-proteins-active_en-1.pdf.
38. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Guidelines on evaluation of similar Biotherapeutic Products (SBPs), Annex 2, Technical Report Series No. 977, 2009. *Official website of the World Health Organisation.* 2013. Available at: https://who.int/biologicals/publications/trs/areas/biological_therapeutics/TRS_977_Annex_2.pdf?ua=1.
39. U.S. Congress. U.S. Code, Title 42, Section 262. Regulation of biological products. *Legal Information Institute, Cornell Law School.* 23 March 2010. Available at: <https://law.cornell.edu/uscode/text/42/262>.
40. European Parliament, Council. Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use. *EUR-Lex.* 26 July 2019. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1591447794819&uri=CELEX:02001L0083-20190726>.
41. 41.Федеральный закон от 12 апреля 2010 г. №61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» с изменениями на 3 апреля 2020 г. Консорциум «Кодекс: электронный фонд правовой и нормативно-технической информации». 3 апреля 2020 г. Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/902209774#>.
42. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. №78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения» (с изменениями на 30 января 2020 года). Консорциум «Кодекс: электронный фонд правовой и нормативно-технической информации». 30 января 2020 г. Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/456026097>.
43. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. №89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза». Совет Евразийской экономической комиссии. 3 ноября 2016 г. Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/456026116>.
44. Ниязов Р.Р., Рождественский Д.А., Васильев А.Н., Гавришина Е.В., Драницына М.А., Куличев Д.А. Регуляторные аспекты регистрации воспроизведенных и гибридных лекарственных препаратов в Евразийском экономическом союзе. *Ремедиум.* 2018;(7-8):6-19. <https://doi.org/10.21518/1561-5936-2018-7-8-6-19>.
45. Marini J.C., Anderson M., Cai X.Y. et al. Systematic verification of bio-

- analytical similarity between a biosimilar and a reference biotherapeutic: committee recommendations for the development and validation of a single ligand-binding assay to support pharmacokinetic assessments. *AAPS J.* 2014;16(6):1149–1158. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9669-5>.
46. Obianom O.N., Thway T.M., Schriber S.J. et al. Retrospective Analysis of Bioanalytical Method Validation Approaches in Biosimilar Biological Product Development. *AAPS J.* 2019;21(6):105. <https://doi.org/10.1208/s12248-019-0376-0>.
47. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Impurities in New Drug Products, Q3B(R2). *Official Website of the ICH.* 25 October 2006. Available at: https://database.ich.org/sites/default/files/Q3A_R2__Guideline.pdf.
48. Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk, M7(R1). *Official Website of the ICH.* 31 March 2017. Available at: https://database.ich.org/sites/default/files/M7_R1_Guideline.pdf.
49. U.S. Food and Drug Administration. Bioequivalence Studies With Pharmacokinetic Endpoints for Drugs Submitted Under an Abbreviated New Drug Application; Guidance for Industry. *Official Website of the U.S. Food and Drug Administration.* 5 December 2013. Available at: <https://fda.gov/media/87219/download>.
50. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Biopharmaceutics classification system-based biowaivers, M9. *Official Website of the ICH.* 20 November 2019. Available at: https://database.ich.org/sites/default/files/M9_Guideline_Step4_2019_1116.pdf.
51. Gervasi V., Dall Agnol R., Cullen S., McCoy T., Vucen S., Crean A. Parenteral protein formulations: An overview of approved products within the European Union. *Eur J Pharm Biopharm.* 2018;131:8–24. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.07.011>.
52. European Medicines Agency. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (revision 1). *Official Website of European Medicines Agency.* 22 May 2014. Available at: https://ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-biotechnology-derived-proteins-active_en-0.pdf.
53. Inflectra: European Public Assessment Report – Scientific Discussion. *Official Website of European Medicines Agency.* 4 October 2013. Available at: https://ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/inflectra-epar-public-assessment-report_en.pdf.
54. Misra S.K., Orlando R., Weinberger S.R., Sharp J.S. Compensated Hydroxyl Radical Protein Footprinting Measures Buffer and Excipient Effects on Conformation and Aggregation in an Adalimumab Biosimilar. *AAPS J.* 2019;21(5):87. <https://doi.org/10.1208/s12248-019-0358-2>.
55. Cowper B., Hockley J., Partridge K., Ferguson J., Rigsby P., Burns C. The first World Health Organization International Standard for in vitro biological activity of darbepoetin. *Biologicals.* 2020;63:33–38. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.12.004>.
56. Aranha H. Disposable systems, one more manufacturing option. *BioProcess Int.* 2004;10:6–16.
57. European Medicines Agency. EMA Regulatory Science to 2025: Strategic reflection (draft). *Official website of European Medicines Agency.* 2019. Available at: https://ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/ema-regulatory-science-2025-strategic-reflection_en.pdf.
58. Cook D., Brown D., Alexander R. et al. Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline: a five-dimensional framework. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(6):419–431. <https://doi.org/10.1038/nrd4309>.
59. Morgan P., Brown D.G., Iennard S. et al. Impact of a five-dimensional framework on R&D productivity at AstraZeneca. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17(3):167–181. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.244>.
60. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). General Considerations for Clinical Trials, E8. *Official Website of the ICH.* 17 July 1997. Available at: https://database.ich.org/sites/default/files/E8_Guideline.pdf.
61. Hughes J.P., Rees S., Kalindjian S.B., Philpott K.L. Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol.* 2011;162(6):1239–1249. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x>.
62. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Development and manufacture of drug substances (chemical entities and biotechnological/biological entities), Q11. *Official Website of the ICH.* 1 May 2012. Available at: https://database.ich.org/sites/default/files/Q11_Guideline.pdf.
63. European Medicines Agency. Similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues, Revision 1. *Official Website of European Medicines Agency.* 18 December 2014. Available at: https://ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-biotechnology-derived-proteins-active_en-2.pdf.
64. Visser J., Feuerstein I., Stangler T., Schmiederer T., Fritsch C., Schiestl M. Physicochemical and functional comparability between the proposed biosimilar rituximab GP2013 and originator rituximab. *BioDrugs.* 2013;27(5):495–507. <https://doi.org/10.1007/s40259-013-0036-3>.
65. Dougherty M.K., Zineh I., Christl L. Perspectives on the Current State of the Biosimilar Regulatory Pathway in the United States. *Clin Pharmacol Ther.* 2018;103(1):36–38. <https://doi.org/10.1002/cpt.909>.
66. U.S. Food and Drug Administration. Clinical Pharmacology Data to Support a Demonstration of Biosimilarity to a Reference Product: Guidance Document. *Official Website of the U.S. Food and Drug Administration.* 29 December 2016. Available at: <https://fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/clinical-pharmacology-data-support-demonstration-biosimilarity-reference-product>.
67. Ghezlou M., Mokhtari F., Kalbasi A. et al. Aggregate Forms of Recombinant Human Erythropoietin With Different Charge Profile Substantially Impact Biological Activities. *J Pharm Sci.* 2020;109(1):277–283. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.05.036>.
68. Nupur N., Chhabra N., Dash R., Rathore A.S. Assessment of structural and functional similarity of biosimilar products: Rituximab as a case study. *MAbs.* 2018;10(1):143–158. <https://doi.org/10.1080/19420862.2017.1402996>.
69. Bansal R., Dash R., Rathore A.S. Impact of mAb Aggregation on Its Biological Activity: Rituximab as a Case Study. *J Pharm Sci.* 2020;109(9):2684–2698. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.05.015>.
70. World Health Organisation. Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals; Revised 1996, TRS No 878, Annex 1. *World Health Organisation.* 1996. Available at: https://who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/cells/WHO_TRS_878_AIAnimalcells.pdf?ua=1.
71. European Medicines Agency. DNA and host cell protein impurities, routine testing versus validation studies. *Official Website of European Medicines Agency.* 10 June 1997. Available at: https://ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/position-statement-dna-host-cell-proteins-hcp-impurities-routine-testing-versus-validation-studies_en.pdf.
72. U.S. Food and Drug Administration. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics; Guidance for Industry. *Official Website of the U.S. Food and Drug Administration.* 27 July 2015. Available at: <https://fda.gov/media/87801/download>.
73. European Medicines Agency. Solumarv : European Public Assessment Report – Scientific Discussion. *Official Website of European Medicines Agency.* 19 November 2015. Available at: https://ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/solumarv-epar-public-assessment-report_en.pdf.