

ФАРМАКОЛОГИЯ И ФАРМАЦИЯ PHARMACOLOGY AND PHARMACY

DOI: 10.29413/ABS.2019-4.1.14

Применение метода иммуноферментного анализа в исследовании сравнительной фармакокинетики препаратов инсулина гларгина

Шитов Л.Н.¹, Джурко Ю.А.¹, Драй Р.В.², Макаренко И.Е.², Хохлов А.Л.^{1,3}, Хозова Л.А.¹, Афонькина О.В.², Севастьянова Ю.А.², Василенко Н.А.¹, Абрамова А.А.¹

¹ ООО «Квинта-Аналитика Ярославль» (150045, г. Ярославль, Ленинградский пр-т, 52Г, Россия); ² ООО «ГЕРОФАРМ» (191119, г. Санкт-Петербург, ул. Звенигородская, 9, Россия); ³ ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России (150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5, Россия)

Автор, ответственный за переписку: Шитов Леонид Николаевич, e-mail: L.schitov@qayar.ru

Резюме

Цель исследования: адаптация методики ИФА для целей сравнительного фармакокинетического исследования препаратов инсулина гларгина, валидация методики и её практическая апробация в клиническом исследовании биосимилярности.

Материалы и методы. Измерения выполнены на автоматических иммуноферментных анализаторах Personal Lab (Adaltis S.r.l., Италия) с использованием тест-систем для измерения концентрации инсулина гларгина (Invitron Ltd., Великобритания); для коррекции на кросс-реактивность были измерены концентрации человеческого инсулина в исследуемых образцах; клиническая часть исследования выполнена на 42 пациентах мужского пола в возрасте 18–65 лет с сахарным диабетом 1-го типа. Дизайн исследования: двойное слепое рандомизированное двухпериодное крэм-исследование в перекрёстных группах с отмывочным периодом 7–14 дней. Сравнимые препараты: Инсулин Гларгин (гларгин), раствор для подкожного введения, 100 ЕД/мл (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия); Лантус® (гларгин), раствор для подкожного введения, 100 ЕД/мл («Санофи-Авентис Дойчланд ГмбХ», Германия).

Результаты. На этапе адаптации была осуществлена модификация методики, рекомендованной производителем тест-систем. Результаты выполненной валидации модифицированной методики по всем параметрам, установленным регуляторными требованиями (селективность, специфичность, точность калибровочного графика, правильность и прецизионность внутри испытания и между испытаниями, эффект переноса предыдущей пробы, допустимость разведения, стабильность растворов, стабильность в биологической матрице, параллелизм), удовлетворяли критериям приемлемости. По данным анализа биологических образцов, полученных в клинической части исследования, рассчитан основной фармакокинетический параметр инсулинов длительного действия – $AUC_{ins, 0-\tau}$; продемонстрирована биосимилярность сравниваемых препаратов (точечная оценка для отношения геометрических средних составила 99 %. 90%-й доверительный интервал для $AUC_{ins, 0-\tau}$ составил 81,02–120,62 %, что находится в рамках допустимого диапазона (80,00–125,00 %).

Ключевые слова: инсулин гларгин, иммуноферментный анализ, биосимиляры, валидация

Для цитирования: Шитов Л.Н., Джурко Ю.А., Драй Р.В., Макаренко И.Е., Хохлов А.Л., Хозова Л.А., Афонькина О.В., Севастьянова Ю.А., Василенко Н.А., Абрамова А.А. Применение метода иммуноферментного анализа в исследовании сравнительной фармакокинетики препаратов инсулина гларгина. *Acta biomedica scientifica*. 2019; 4(1): 93-101. doi: 10.29413/ABS.2019-4.1.14

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method Application in the Study of Comparative Pharmacokinetics of Insulin Glargine Preparations

Shitov L.N.¹, Dzhurko Yu.A.¹, Drai R.V.², Makarenko I.E.², Khokhlov A.L.^{1,3}, Khozova L.A.¹, Afonkina O.V.², Sevastyanova Yu.A.², Vasilenko N.A.¹, Abramova A.A.¹

¹ Quinta-Analytica Yaroslavl LLC (Leningradsky prospect 52G, Yaroslavl 150045, Russian Federation); ² GEROFARM LLC (ul. Zvenigorodskaya 9, Saint Petersburg 191119, Russian Federation); ³ Yaroslavl State Medical University (ul. Revolyutsionnaya 5, Yaroslavl 150000, Russian Federation)

Corresponding author: Leonid N. Shitov, e-mail: L.schitov@qayar.ru

Abstract

Aims: adaptation and validation of the ELISA method insulin glargine determination for the pharmacokinetic study, practical approval in the biosimilars clinical trial.

Materials and methods. Serum insulin glargine determination was measured using a commercial ELISA kit. All tests were run on a Personal LAB machine (Adaltis S.r.l., Rome, Italy) with test systems for measuring the concentration of insulin glargine (Invitron Ltd., United Kingdom); human insulin concentrations were measured in the samples from the

study for correction of cross-reactivity. Clinical part of this study included 42 male patients aged 18–65 with diabetes mellitus type 1. This was a double-blind, randomized, crossover clamp study with wash-out period of 7–14 days. Comparisons drugs: Insulin Glargine (glargine) solution for subcutaneous administration, 100 U/ml (GEROPHARM, Russia) and Lantus® (glargine) solution for subcutaneous administration, 100 U/ml (Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Germany). **Results.** At the stage of the method adaptation the modification of original manufacturer's method was performed; the full validation of modified analytical method for all parameters (selectivity, specificity, precision of calibration curves, intra- and inter-batch precision and accuracy, carry-over, dilution integrity, stability of solutions, stability in biologic matrix, parallelism) in accordance with regulatory authorities requirements has been done. The primary endpoint for long-acting insulins – $AUC_{ins,0-\tau}$ was calculated. Insulin Glargine and Lantus® are equivalent based on $AUC_{ins,0-\tau}$ data (point estimation for ratio of geometric means was 99 %, the confidence intervals for the ratio of the geometric mean for $AUC_{ins,0-\tau}$ was 81.02–120.62 %, that correspond to acceptance range 80.00–125.00 %).

Key words: insulin glargine, ELISA, biosimilar, validation

For citation: Shitov L.N., Dzhurko Yu.A., Drai R.V., Makarenko I.E., Khokhlov A.L., Khozova L.A., Afonkina O.V., Sevastyanova Yu.A., Vasilenko N.A., Abramova A.A. Enzyme-linked immunosorbent assay method application in the study of comparative pharmacokinetics of insulin glargin preparations. *Acta biomedica scientifica*. 2019; 4(1): 93–101. doi: 10.29413/ABS.2019-4.1.14

ОБОСНОВАНИЕ

Сахарный диабет представляет собой серьёзнейшую медицинскую и социально-экономическую проблему во всём мире. Данные заболеваемости сахарным диабетом демонстрируют его стремительную распространённость. Число больных в России в 2000 г. составляло 2,067 млн, а в 2010 г. было уже зарегистрировано 3,16 млн случаев [1].

Главным направлением лечения больных с инсулинозависимым сахарным диабетом является заместительная инсулинотерапия. За время своего существования препараты инсулина прошли эволюцию от природного инсулина, получаемого из поджелудочной железы домашних животных, до рекомбинантных препаратов и аналогов человеческого инсулина, к которым относится инсулин гларгин [2].

Инсулин гларгин отличается от человеческого инсулина добавлением двух остатков аргинина в конец В-цепи и заменой аспарагина на глицин в положении A21. Эти две модификации привели к созданию стабильной структуры, которая растворима в кислой среде при pH = 4.0 и образует микропреципитаты при введении в подкожную клетчатку с нейтральным значением pH, что замедляет всасывание. Добавление небольшого количества цинка стабилизирует образующиеся преципитаты, что приводит к дополнительному увеличению длительности действия препарата. В результате инсулин гларгин характеризуется замедленным поступлением в кровь без пиков концентрации в течение продолжительного времени и по своей фармакокинетике сходен с непрерывной подкожной инфузией инсулина [3].

Таким образом, инсулин гларгин явился первым аналогом человеческого инсулина 24-часового действия, не имеющим выраженного максимума уровня концентрации (пика) на фармакокинетической кривой. Кроме того, получены данные, свидетельствующие о снижении меж- и внутрииндивидуальной вариабельности всасывания инсулина гларгина по сравнению с традиционным пролонгированным инсулином НПХ (нейтральный протамин Хагедорна), что выражается в существенной стабилизации состояния у больных диабетом.

Оригинальный лекарственный препарат инсулина гларгина Лантус® («Санофи-Авентис Дойчланд ГмБХ», Германия) был выведен на рынок в 2000 г. [3]. За последние несколько лет прошли клинические исследования и были выведены биоаналоги данного инсулина. В Европейском союзе к настоящему времени зарегистрировано 2 биосимиляра инсулина гларгина – Lusduna и ABASAGLAR® [4, 5]. Также биосимиляры аналогов инсулина выводятся и на локальные рынки, в том числе и России.

Одним из условий доказательства биосимилярности препаратов является подтверждение эквивалентности их фармакокинетических профилей [5, 6, 7]. Для получения надёжных результатов оценки фармакокинетических параметров инсулина гларгина необходимо применение высокочувствительных, селективных и точных аналитических методов [7]. Поскольку инсулин является белком, применение ряда стандартных аналитических методов, традиционно используемых в фармакокинетических исследованиях, является затруднительным. В литературе описаны как методы, основанные на применении иммунохимии, так и методы с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). Методы ВЭЖХ-МС/МС являются наиболее селективными и специфичными [7], однако в рутинном варианте имеют недостаточный уровень чувствительности для исследований фармакокинетики инсулинов и применяются главным образом в токсикокинетических исследованиях для измерения высоких концентраций инсулина, достигающих токсических уровней [8, 9]. Более высокая чувствительность методов ВЭЖХ-МС/МС может быть достигнута за счёт предварительного избирательного выделения инсулина гларгина из исследуемых образцов методом иммуноаффинной хроматографии, однако такой подход является трудоёмким и дорогостоящим. В связи с этим в качестве методов выбора для целей исследования фармакокинетики инсулина гларгина рассматриваются методы на основе иммунохимии [10]. Применительно к рассматриваемой задаче в литературе описаны иммуноферментный и радиоиммунный анализ. Предпочтительным является использование метода иммуноферментного анализа (ИФА), являющегося более доступным и удобным в исполнении и безопасным для персонала лаборатории. В связи с изложенным разработка и валидация методов ИФА для определения инсулина гларгина в плазме крови является актуальной и перспективной задачей.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Адаптация методики ИФА для целей сравнительного фармакокинетического исследования препаратов инсулина гларгина, валидация методики и её практическая апробация в клиническом исследовании биосимилярности препаратов инсулина гларгина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование. Измерения выполнены на автоматических иммуноферментных анализаторах Personal Lab

(Adaltis S.r.l., Via Luigi Einaudi 7, 00012, Guidonia Montecelio (RM), Италия), состоящих из следующих модулей: блок идентификации образцов; блок пипетирования; блок инкубации; блок промывки; блок фотометрического детектирования (от 0 до 3,0 ед. оптической плотности (ОП), спектральный диапазон фотометра 400–700 нм, количество каналов считывания – 16).

Тест-системы. Использованы наборы реагентов для измерения концентрации инсулина гларгина методом ИФА (Invitron Ltd., Великобритания). Для измерения концентраций человеческого инсулина в целях последующей коррекции на кросс-реактивность (см. ниже) использовали наборы реагентов для измерения концентрации инсулина методом ИФА (Mercodia Insulin ELISA, Sweden, LOT 26196).

Стандартные образцы. В качестве стандартного образца определяемого вещества в представленном исследовании использовался Инсулин Гларгин (GLR), субстанция-порошок (28,6 МЕ/мл), серия 07-17 («Герофарм-БИО», Россия). Валидационные образцы готовили путём внесения в интактную плазму крови человека (K_2 EDTA в качестве антикоагулянта) рабочих растворов инсулина гларгина. Концентрации инсулина гларгина в калибровочных образцах составляли 7,50, 10,00, 13,00, 18,00, 24,00, 32,00 и 40,00 мкМЕ/мл; образцы контроля качества имели концентрации 15,00 (низкая концентрация), 20,00 (средняя концентрация) и 30,00 мкМЕ/мл (высокая концентрация).

В тесте на специфичность использовался Инсулин человеческий (INS), субстанция, серия RIN 09-16; 28,4 МЕ/мл («Герофарм-БИО», Россия).

Выполнение ИФА-измерения. Аликвоту образца объёмом 500 мкл вносили в полипропиленовую пробирку и помещали в штатив анализатора. Все измерения выполнялись в дублях. Аналитические процедуры выполнялись в соответствии с инструкцией к наборам реагентов и рекомендациями их производителя; они включали этапы, перечисленные ниже:

- внесение калибровочных образцов в полипропиленовые пробирки на 3,5 мл с их последующей установкой в штатив для стандартов;
- внесение образцов в полипропиленовые пробирки с их последующей установкой в штатив анализатора;
- внесение реагентов в ёмкости для реагентов с их последующими установками в штатив для реагентов;
- закрепление необходимого количества лунок в рамочном держателе;
- автоматический перенос алиquot образцов (100 мкл) в лунки планшетов;
- инкубирование при комнатной температуре (2 часа);
- трёхкратная промывка охлаждённым промывочным буферным раствором ($T = 2-8^\circ\text{C}$);
- внесение конъюгата (100 мкл) в лунки планшета;
- инкубирование при $T = 2-8^\circ\text{C}$ (16 часов);
- трёхкратная промывка охлаждённым промывочным буферным раствором ($T = 2-8^\circ\text{C}$);
- внесение раствора субстрата (100 мкл) в лунки планшета;
- инкубирование при комнатной температуре (30 минут);
- внесение стоп-раствора (100 мкл) в лунки планшета;

- измерение оптической плотности при длинах волн 450 нм, 620 нм, 405 нм.

Для расчёта концентраций инсулина гларгина в образцах использовалась калибровочная кривая, аппроксимированная функцией полинома четвёртой степени.

Валидация аналитической методики была выполнена в соответствии с Руководством Guideline on bioanalytical method validation EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 (принято 21.07.2011, вступило в действие 01.02.2012) и Правилами проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза (утверждены решением Совета Евразийской экономической комиссии № 85 от 03.11.2016 г.). Валидация включала следующие тесты: селективность, правильность, точность калибровочного графика, правильность и прецизионность внутри испытания и между испытаниями, эффект переноса предыдущей пробы, допустимость разведения, стабильность растворов, стабильность в биологической матрице, параллелизм.

Дизайн клинической части исследования

В качестве дизайна клинической части исследования было выбрано двойное слепое рандомизированное двухпериодное исследование в перекрёстных группах, длительность отмывочного периода составила от 7 до 14 дней.

Критерии соответствия

В исследование допускались только мужчины в возрасте 18–65 лет с ИМТ от 18,5 до 32 кг/м², имеющих установленный диагноз сахарный диабет 1-го типа. Обязательным критерием включения пациентов являлась стабильная терапия инсулином гларгином не менее 6 месяцев до включения в исследование, стабильная доза не менее 3 месяцев и не превышающая 1,2 МЕ/кг. HbA1C был $\leq 8,0\%$, C-пептид $\leq 0,3$ нмоль/л. Также у субъектов исследования должны были отсутствовать противопоказания к проведению клэмп-исследования, такие как труднодоступные вены верхних конечностей, случаи тяжёлых гипогликемий в анамнезе, отягощённый аллергологический анамнез.

Условия проведения, этическая экспертиза

Исследование было проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации, принципами надлежащей клинической практики и локальными регуляторными требованиями. Протокол исследования был одобрен Министерством Здравоохранения РФ (разрешение № 150 от 03.08.2016 г.), а также независимыми этическими комитетами при клинических центрах ФГБУ «НМИЦЭ» МЗ РФ, Москва (выписка № 18 от 11.10.2017 г.) и ФГБУ «НМИЦ имени В.А. Алмазова», Санкт-Петербург (выписка № 134 от 09.10.2017 г.).

Исследуемые препараты

Пациенты в качестве тестируемого препарата получали Инсулин Гларгин (гларгин), раствор для подкожного введения, 100 ЕД/мл (ООО «ЕРОФАРМ», Россия), в качестве препарата сравнения – Лантус® (гларгин), раствор для подкожного введения, 100 ЕД/мл («Санофи-Авентис Дойчланд ГмбХ», Германия). Препараты вводили подкожно в дозе 0,6 ЕД/кг однократно для каждого из периодов клэмпа.

Продолжительность исследования

Максимальная продолжительность исследования для пациента не превышала 54 дней. Отклонений от запланированных сроков проведения исследования выявлено не было.

Описание медицинского вмешательства

В соответствии с регуляторными требованиями [11, 12], для каждого пациента было выполнено два 24-часовых клэмп-исследования по стандартной методике [12]. Исследование проводили натошак, после 28-часового периода отмены инсулина гларгина. Потребность в инсулине в данный период обеспечивали инсулином короткого и ультракороткого действия.

Отбор проб для оценки фармакокинетических параметров проводили 44 раза: 3 точки до введения исследуемого препарата (–60, –30 и 0 минут), затем через 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0, 11,0, 12,0, 13,0, 14,0, 15,0, 17,0, 18,0, 19,0, 20,0, 21,0, 22,0, 23,0 и 24,0 часа после.

Основной исход исследования

Основной конечной точкой рассматриваемого исследования являлись значения фармакокинетического параметра $AUC_{ins,0-\tau}$ (площадь под кривой «концентрация – время» в интервале времени от 0 до конца периода наблюдения). Площадь под кривой «концентрация – время» (AUC , area under curve) рассчитывается при помощи метода трапеций по формуле:

$$AUC_{ins,0-\tau} = \sum_i \frac{(C_i + C_{i-1})(\tau_i - \tau_{i-1})}{2}$$

Статистический анализ данных

Анализ данных был произведён при помощи языка статистического программирования R (R Core Team, 2017).

Расчёт выборки проводился по общепризнанной методике [13], на основании литературных данных о межсубъектной вариабельности инсулина гларгина [14]. В соответствии с данным расчётом, размер выборки составил 42 пациента.

Статистический анализ полученных данных выполняли в предположении о лог-нормальном распределении параметра $AUC_{ins,0-\tau}$ (площадь под кривой «концентрация

– время» в интервале времени от 0 до конца периода наблюдения, в данном случае 24 часа).

В предположении о лог-нормальном распределении сравнение средних значений параметра для тестируемого препарата и препарата сравнения проведено на основе мультипликативной модели, а доверительный интервал построен для отношения соответствующих средних геометрических значений. После проведения логарифмического преобразования этот показатель анализировали с помощью дисперсионного анализа (ANOVA). Препараты считали эквивалентными, если 90%-й доверительный интервал для геометрических средних, вычисленных для индивидуальных отношений логарифмически преобразованных значений $AUC_{ins,0-\tau}$ находился в пределах 0,80–1,25 (80,00–125,00 %).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Адаптация тест-систем для применения в исследовании

В ходе предварительной апробации приобретённых наборов ИФА-реагентов производства Invitron Ltd. (Великобритания) было отмечено, что при использовании оригинальных методик, описанных в руководстве к наборам, наблюдаются неприемлемо низкие значения оптической плотности в целевом диапазоне концентраций инсулина гларгина, а также крайне малая величина угла наклона калибровочного графика (данная величина характеризует функцию отклика аналитической методики). Аналитические характеристики, наблюдаемые при использовании оригинальных методик, не позволяют получить приемлемые результаты измерения концентраций гларгина в целевом диапазоне из-за низкой чувствительности и точности.

В связи с этим на следующем этапе были выполнены модификации ряда параметров методики в целях выбора оптимальных условий, позволяющих достичь приемлемых аналитических характеристик.

Параметры оригинальных методик № 1 и № 2 и модифицированной методики

Таблица 1

Table 1

Parameters of original methods N 1 and N 2 and of modified method

Параметр	Оригинальная методика № 1	Оригинальная методика № 2	Модифицированная методика
Выдерживание содержимого набора при комнатной температуре		+	
Закрепление необходимого количества стрипов в держателе		+	
Объём вносимого в лунки буферного раствора	100 мкл	50 мкл	0 мкл
Объём вносимого в лунки анализируемого образца	25 мкл	50 мкл	100 мкл
Инкубация № 1	2 часа при T _{комн.} (18–22 °C)		
Промывка	3 раза, охлаждённым промывочным буфером (2–8°C) – 300 мкл каждый цикл		
Объём вносимого в лунки конъюгата		100 мкл	
Инкубация № 2	4 часа при T = 4 °C (2–8 °C)	16 часов при T = 4 °C (2–8 °C)	
Промывка	3 раза, охлаждённым промывочным буфером (2–8 °C)		
Внесение в лунки раствора субстрата		100 мкл	
Инкубация № 3	15 минут при T _{комн.} (18–22 °C)	30 минут при T _{комн.} (18–22 °C)	
Внесение в лунки стоп-раствора		100 мкл	
Измерение ОП	3 раза: 450 нм; 620 нм; 405 нм		

По результатам выполненных испытаний были изменены следующие параметры:

- объём вносимого в лунки буферного раствора;
- объём анализируемого образца;
- продолжительность инкубаций.

Было установлено, что существенного улучшения аналитических характеристик позволяют достигнуть следующие модификации:

- отсутствие внесения в лунки буферного раствора;
- увеличение объёма анализируемого образца до 100 мкл;
- увеличение продолжительности инкубации № 2 до 16 часов;
- увеличение продолжительности инкубации № 3 до 30 минут.

Параметры оригинальных и модифицированной методики представлены ниже в таблице 1. Сравнение калибровочных графиков, полученных при использовании оригинальной методики № 1 и модифицированной методики, представлено на рисунке 1.

Следует отметить, что достижение приемлемых аналитических характеристик оказалось возможным только при существенном увеличении времени анализа за счёт продолжительности инкубации № 2: 16 часов против 4 часов в оригинальных методиках.

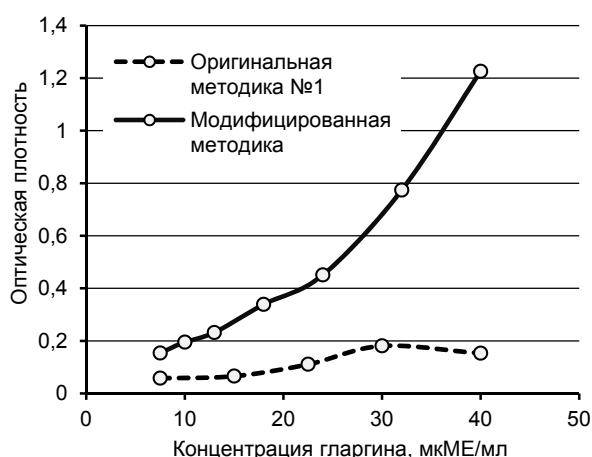


Рис. 1. Калибровочные кривые инсулина гларгина при использовании оригинальной и модифицированной методик.

Fig. 1. Calibration curves of insulin glargine; with the use of the original and modified methods.

Результаты валидации аналитической методики

Специфичность и селективность входят в число важнейших аналитических характеристик методики, отражающих её возможности в получении объективных результатов. Согласно Правилам проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза (утверждены решением Совета Евразийской экономической комиссии № 85 от 03.11.2016 г.), под **специфичностью** связывания с реактивами понимается их способность связываться исключительно с изучаемым анализируемым веществом, т. е. отсутствие перекрёстной реактивности к структурно родственными соединениям; под **селективностью** методики связывания лиганда понимается способность определять рассматриваемое анализируемое вещество в присутствии неродственных соединений в биологическом образце.

В связи с тем, что, согласно протоколу клинического исследования, на этапе отмены инсулина гларгина пациенты могли получать препараты человеческого инсулина короткого и ультракороткого действия, актуальной являлась оценка специфичности применяемых тест-систем в отношении человеческого инсулина. В рамках валидации аналитической методики была выполнена оценка кросс-реактивности используемых реактивов к человеческому инсулину в концентрации 100 мкМЕ/мл. Кросс-реактивность составила 8,51 %. Валидация процедуры коррекции результатов на кросс-реактивность была выполнена на наборе из 10 образцов плазмы из независимых источников с добавлением инсулина человеческого на уровне 100 мкМЕ/мл и инсулина гларгина на уровне нижнего предела количественного определения (НПКО) 7,5 мкМЕ/мл. Коррекция на кросс-реактивность позволила получить результаты измерения концентрации инсулина гларгина в присутствии инсулина человеческого, удовлетворяющие критериям приемлемости (относительная ошибка 8,58 %; CV 9,02 %). В связи с этим при выполнении анализа образцов, полученных в клинической части исследования, дополнительно выполняли измерения концентраций человеческого инсулина и использовали полученные значения для коррекции на кросс-реактивность.

Селективность испытывали посредством анализа 10 образцов плазмы из различных независимых источников, включая гиперлипидемический и гемолизированный образцы, с внесением инсулина гларгина на уровне НПКО; полученные результаты удовлетворяли критериям приемлемости (относительная ошибка 1,92 %; CV 16,17 %).

Калибровочная кривая в диапазоне 7,50–40,00 мкМЕ/мл описывалась функцией полинома четвёртой степени (в соответствии с действующими регуляторными требованиями, в иммунохимических методах для аппроксимации калибровки используются, как правило, нелинейные функции). Пример калибровочного графика представлен на рисунке 2.

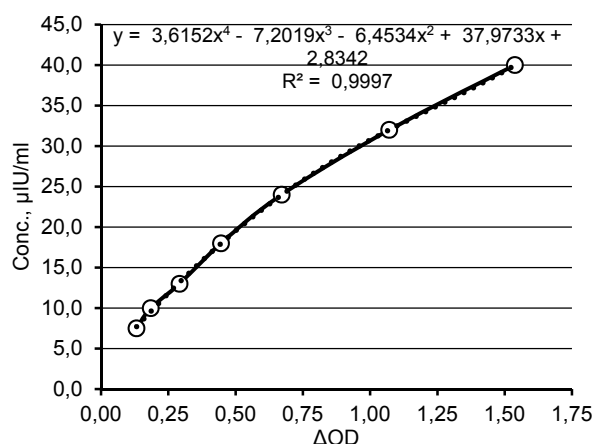


Рис. 2. Пример калибровочного графика инсулина гларгина.

Fig. 2. Example of insulin glargine calibration curve.

Правильность и прецизионность. Испытания правильности и прецизионности выполнены на образцах плазмы с внесением инсулина гларгина на уровне пяти разных концентраций; шесть независимых образцов плазмы с каждой из концентраций аналита были обработаны и измерены. В таблице 2 представлены результаты одного

из испытаний внутрисерийной правильности и прецизионности, в таблице 3 – результаты испытания межсерийной правильности и прецизионности (6 независимых испытаний, выполненных в разные дни). Результаты удовлетворяли критериям приемлемости (прецизионность на уровне $CV \leq 25,00\%$ и правильность $\pm 25\%$ для НПКО и ВПКО (верхний предел количественного определения); прецизионность на уровне $CV \leq 20,00\%$ и правильность $\pm 20\%$ для других концентраций).

Таблица 2
Результаты испытания внутрисерийной правильности и прецизионности

Results for intra-batch accuracy and precision tests

Концентрация (мкМЕ/мл)	7,50	15,00	20,00	30,00	40,00
1-я серия	8,29	16,09	18,96	32,82	49,36
2-я серия	8,31	13,76	21,49	28,20	36,04
3-я серия	7,07	14,39	21,76	27,61	36,17
4-я серия	7,09	17,28	19,40	30,31	42,77
5-я серия	6,95	15,76	19,28	33,08	39,30
6-я серия	6,31	13,06	21,46	28,78	35,63
Среднее	7,34	15,06	20,39	30,13	39,88
SD	0,80	1,59	1,30	2,36	5,39
CV, %	10,91	10,55	6,39	7,84	13,51
Отл. (RE), %	-2,19	0,37	1,96	0,44	-0,30
CV + RE	13,10	10,91	8,35	8,28	13,81

Таблица 3
Результаты испытания межсерийной правильности и прецизионности (данные шести независимых испытаний, выполненных в разные дни)

Results of inter-batch accuracy and precision tests (data from six independent assays performed in different days)

Концентрация (мкМЕ/мл)	7,50	15,00	20,00	30,00	40,00
Среднее	7,21	14,62	20,07	30,21	39,15
SD	1,63	1,94	2,32	2,49	5,37
CV (%)	22,62	13,29	11,55	8,23	13,72
Отл. (%)	-3,93	-2,55	0,37	0,70	-2,13
CV + RE	26,55	15,84	11,92	8,94	15,85

Результаты испытаний стабильности инсулина гларгина

Results of stability tests of insulin glargine

Испытания стабильности	Результаты (отличие от исходного/номинального значения)	Критерии приемлемости
Стабильность основного раствора при хранении в холодильнике (2–8 °C, 1 сутки)	5,78 %	Отличие от исходного значения $\pm 20\%$
Стабильность основного раствора при комнатной температуре (1 сутки)	8,82 %	Отличие от исходного значения $\pm 20\%$
Краткосрочная стабильность в плазме (1 сутки при комнатной температуре)	4,20 % (низкая концентрация) -1,60 % (высокая концентрация)	Отличие от номинального значения $\pm 20\%$
Стабильность в плазме при замораживании/размораживании (3 цикла с интервалом не менее 12 ч)	14,60 % (низкая концентрация) 2,62 % (высокая концентрация)	Отличие от номинального значения $\pm 20\%$
Долгосрочная стабильность в плазме при хранении в замороженном состоянии (не выше -20 °C; 57 дней)	9.02 % (низкая концентрация) 3.67 % (высокая концентрация)	Отличие от номинального значения $\pm 20\%$

Таблица 4

Table 4

Перенос предыдущей пробы (carry-over) отсутствовал.

Тест на допустимость разведения выполнен на случай необходимости анализа образцов с концентрацией инсулина гларгина, превышающей верхнюю границу калибровочного диапазона. Шесть образцов плазмы с добавлением инсулина гларгина в концентрации 60,00 мкМЕ/мл были разведены в 2 раза бланковой плазмой и проанализированы. Полученные результаты (относительная ошибка 4,04 %; CV 3,62 %) удовлетворяли критериям приемлемости.

Параллелизм между стандартной калибровочной кривой и серийно разведёнными реальными образцами оценивали с целью проверки возможности влияния на результаты измерений матричных эффектов или метаболитов, присутствующих в реальных образцах и обладающих различной степенью аффинности по отношению к реагентам используемой тест-системы. Данный тест был выполнен на реальном образце, полученном в ходе клинической части исследования. Из указанного образца были получены 4 разведения с использованием бланковой плазмы. Прецизионность (CV) между образцами в серии разведений составила 10,03 % (критерий приемлемости CV не выше 30 %).

Результаты испытаний **стабильности** представлены ниже в таблице 4. Все результаты удовлетворяли критериям приемлемости.

Объекты (участники) клинической части исследования

42 пациента с установленным диагнозом сахарный диабет 1-го типа были включены в исследование, 39 пациентов закончили исследование полностью без серьёзных отклонений от протокола. Ни один из пациентов не курил, средний возраст составил 31 год (20–51 год), масса тела 78 кг (69–106 кг), индекс массы тела 24,5 кг/м² (18,8–29,9 кг/м²).

Основные результаты исследования

По результатам анализа образцов, полученных в клинической части исследования, построены фармакокинетические профили сравниваемых препаратов (рис. 3), рассчитаны основные фармакокинетические параметры (табл. 5), выполнена оценка биосимиларности сравниваемых препаратов (табл. 6) по основному критерию ($AUC_{ins. 0-T}$).

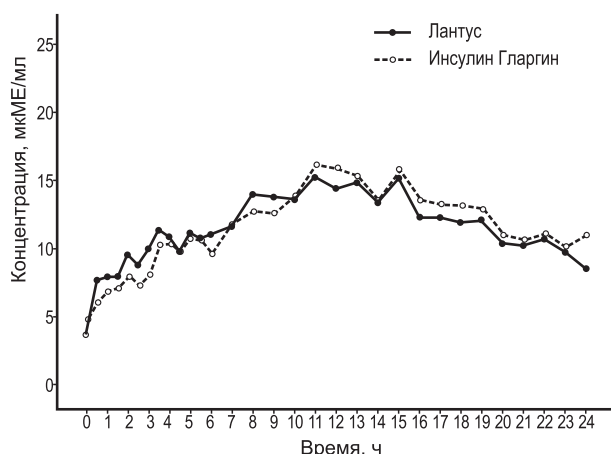


Рис. 3. Усреднённые фармакокинетические профили концентрации инсулина гларгина в плазме крови участников после подкожного введения тестируемого и референтного препаратов.

Fig. 3. Mean pharmacokinetic concentration profiles of insulin glargine in plasma of participants after subcutaneous administration of test and reference formulations.

Точечная оценка индивидуальных отношений основных фармакокинетических показателей $AUC_{ins,0-\tau}$ (T) / $AUC_{ins,0-\tau}$ (R) составила 99 %. 90%-й доверительный интервал для геометрических средних отношений составил 81,02–120,62 %, что находится в рамках допустимого диапазона (80,00–125,00 %). Таким образом, на основании полученных данных, препараты признаны биосимилярными.

Нежелательные явления

Статистически значимых различий по показателям нежелательных явлений между сравниваемыми препаратами не выявлено. Степень тяжести всех НЯ была расценена врачом-исследователем как лёгкая.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты выполненной валидации позволяют констатировать, что представленная методика иммуноферментного анализа для измерения концентрации инсулина гларгина в плазме крови человека по всем применимым критериям (селективность, специфичность, точность калибровочного графика, правильность и прецизионность, эффект переноса, допустимость разведения, стабильность, параллелизм) удовлетворяет современным требованиям, предъявляемым к исследованиям биоаналогов, отличается доступностью для биоаналитических

лабораторий и удобством исполнения. Модификация методики, осуществлённая в целях её адаптации к решению поставленной задачи, характеризуется новизной и даёт возможность добиться оптимальных аналитических характеристик без дополнительных материальных затрат. Методика успешно применена в рамках проведения аналитической части клинического исследования, в результате которого была продемонстрирована биосимилярность препарата Инсулин Гларгин (гларгин), раствор для подкожного введения, 100 ЕД/мл (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия) по отношению к препарату сравнения Лантус® (гларгин), раствор для подкожного введения, 100 ЕД/мл («Санофи-Авентис Дойчланд ГмбХ», Германия).

ЛИТЕРАТУРА

1. Дедов И.И., Шестакова М.В., Сунцов Ю.И., Петеркова В.А., Галстян Г.Р., Майоров А.Ю., и др. Результаты реализации подпрограммы «Сахарный диабет» Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с социально значимыми заболеваниями 2007–2012 годы». *Сахарный диабет*. 2013; 16(25): 1-48.
2. Доклиническая и клиническая разработка биоаналогичных (биоподобных) лекарственных препаратов, содержащих рекомбинантный инсулин и аналоги инсулина. В: Совет Евразийской экономической комиссии. *Об утверждении правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза. Решение № 89 от 3 ноября 2016 года*. URL: <http://docs.cntd.ru/document/456026116>.
3. Хохлов А.Л. (ред.). *Теоретические и практические основы проведения исследований воспроизведенных лекарственных препаратов*: монография. М.-Ярославль-Прага: ООО Фотолайф; 2017.
4. Chow SC, Cheng B, Cosmatos D. On power and sample size calculation for QT studies with recording replicates at given time point. *J Biopharmac Stat.* 2008; 18(3): 483-493. doi: 10.1080/10543400801995452
5. Davies M, Dahl D, Heise T, Kiljanski J, Mathieu C. Introduction of biosimilar insulins in Europe. *Diabet Med.* 2017; 34(10): 1340-1353. doi: 10.1111/dme.13400.
6. European Medical Agency. Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant human insulin and insulin analogues. Draft 2. 2014; 44(April): 1-12. URL: https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/second-draft-guideline-non-clinical-clinical-development-similar-biological-medicinal-products_en.pdf.
7. European Medicines Agency. *Abasaglar Insulin Glargine*. EPAR Summary for the public; 2014. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/002835/WC500175384.pdf.

Результаты оценки фармакокинетических показателей исследуемых препаратов

Таблица 5

Results of evaluation of pharmacokinetic parameters of studied formulations

Table 5

Параметр	N	Инсулин Гларгин	N	Лантус®	p-value	Отношение T/R [90% ДИ]	CV, %
$AUC_{ins,0-\tau}$	39	285,77 ± 169,81	39	282,83 ± 167,43	0,974	0,99 [81,02; 120,62]	54,87

Результаты статистической оценки биосимилярности сравниваемых препаратов

Таблица 6

Results of statistical evaluation of biosimilarity of compared formulations

Table 6

Параметр	Отношение геометрических средних T/R	90%-й доверительный интервал		Допустимые значения для 90% ДИ	CV _{intra}
		Верхняя граница	Нижняя граница		
$AUC_{ins,0-\tau}$	0,99	81,02 %	120,62 %	80,00–125,00 %	54,87 %

8. Heise T, Zijlstra E, Nosek L, Heckermann S, Plum-Mörschel L, Forst T. Euglycaemic glucose clamp: what it can and cannot do, and how to do it. *Diabet Obes Metabolism*. 2016; 18(10): 962-972. doi:10.1111/dom.12703
9. Li YX, Ke Y, Li J, Li Y, Li R, Chen X, et al. Quantitation of insulin analogue glargine and its two metabolites M1 and M2 on Triple Quad™ 6500 and Triple TOF™ 5600 LC-MS/MS systems in a dog toxicokinetics study. *J Anal Bioanal Tech*. 2013; S5: 004. doi: 10.4172/2155-9872.s5-004
10. Linnebjerg H, Lam EC, Seger ME, Coutant D, Chua L, Chong CL, et al. Comparison of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of LY2963016 insulin glargine and European Union- and US-approved versions of Lantus insulin glargine in healthy subjects: Three randomized euglycemic clamp studies. *Diabetes Care*. 2015; 38(12): 2226-2233. doi: 10.2337/dc14-2623
11. McKeage K, Goa KL. Insulin glargine. *Drugs*. 2001; 61(11): 1599-1624. doi: 10.2165/00003495-200161110-00007
12. Tibaldi JM. Evolution of insulin: from human to analog. *Am J Med*. 2014; 127 (10): S25-S38. doi: 10.1016/j.amjmed.2014.07.005
13. Van Soest R, Li Y. Quantitation of insulin glargine in human plasma with a combination of immunocapture-based target enrichment and trap-and-elute microflow LC-MS/MS. Drug Discovery and Development. USA, Redwood City, CA: SCIEX; 2016. URL: <https://scix.com/Documents/tech%20notes/Quantitation-of-Insulin-Glargine-in-Human-Plasma-v2.pdf>.
14. Xu Y, Prohn M, Cai X, Crutchlow M, Shankar SS, Bateman K, et al. Direct comparison of radioimmunoassay and LC-MS/MS for PK assessment of insulin glargine in clinical development. *Bioanalysis*. 2014; 6(24): 3311-3323. doi: 10.4155/bio.14.219

REFERENCES

1. Dedov II, Shestakova MV, Suntsov Yul, Peterkova VA, Galstyan GR, Mayorov AY, et al. The results of the realization of subprogramme "Diabetes mellitus" of the Federal Target Program «Prevention and control of socially significant diseases in 2007–2012». *Sakhar'nyy diabet*. 2013; 16(25): 1-48. (In Russ.)
2. Preclinical and clinical development of biosimilar medicinal agents containing recombinant insulin and insulin analogues. In: Sovet Evraziyskoy ekonomicheskoy komissii. *Ob utverzhdenii pravil provedeniya issledovaniy biologicheskikh lekarstvennykh sredstv Evraziyskogo ekonomicheskogo soyuza. Reshenie № 89 ot 3 noyabrya 2016 goda*. URL: <http://docs.cntd.ru/document/456026116>. (In Russ.)
3. Khokhlov AL. (ed.). *Theoretical and practical basics of conducting the researches of generic drugs*. M.-Yaroslavl-Praga: OOO Fotolayf; 2017. (In Russ.)

4. Chow SC, Cheng B, Cosmatos D. On power and sample size calculation for QT studies with recording replicates at given time point. *J Biopharm Stat*. 2008; 18(3): 483-493. doi: 10.1080/10543400801995452
5. Davies M, Dahl D, Heise T, Kiljanski J, Mathieu C. Introduction of biosimilar insulins in Europe. *Diabet Med*. 2017; 34(10): 1340-1353. doi: 10.1111/dme.13400
6. European Medical Agency. Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant human insulin and insulin analogues. Draft 2. 2014; 44(April): 1-12. URL: https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/second-draft-guideline-non-clinical-clinical-development-similar-biological-medicinal-products_en.pdf.
7. European Medicines Agency. *Abasaglar Insulin Glargine*. EPAR Summary for the public; 2014. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/002835/WC500175384.pdf.
8. Heise T, Zijlstra E, Nosek L, Heckermann S, Plum-Mörschel L, Forst T. Euglycaemic glucose clamp: what it can and cannot do, and how to do it. *Diabet Obes Metabolism*. 2016; 18(10): 962-972. doi:10.1111/dom.12703
9. Li YX, Ke Y, Li J, Li Y, Li R, Chen X, et al. Quantitation of insulin analogue glargine and its two metabolites M1 and M2 on Triple Quad™ 6500 and Triple TOF™ 5600 LC-MS/MS systems in a dog toxicokinetics study. *J Anal Bioanal Tech*. 2013; S5: 004. doi: 10.4172/2155-9872.s5-004
10. Linnebjerg H, Lam EC, Seger ME, Coutant D, Chua L, Chong CL, et al. Comparison of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of LY2963016 insulin glargine and European Union- and US-approved versions of Lantus insulin glargine in healthy subjects: Three randomized euglycemic clamp studies. *Diabetes Care*. 2015; 38(12): 2226-2233. doi: 10.2337/dc14-2623
11. McKeage K, Goa KL. Insulin glargine. *Drugs*. 2001; 61(11): 1599-1624. doi: 10.2165/00003495-200161110-00007
12. Tibaldi JM. Evolution of insulin: from human to analog. *Am J Med*. 2014; 127 (10): S25-S38. doi: 10.1016/j.amjmed.2014.07.005
13. Van Soest R, Li Y. Quantitation of insulin glargine in human plasma with a combination of immunocapture-based target enrichment and trap-and-elute microflow LC-MS/MS. Drug Discovery and Development. USA, Redwood City, CA: SCIEX; 2016. URL: <https://scix.com/Documents/tech%20notes/Quantitation-of-Insulin-Glargine-in-Human-Plasma-v2.pdf>.
14. Xu Y, Prohn M, Cai X, Crutchlow M, Shankar SS, Bateman K, et al. Direct comparison of radioimmunoassay and LC-MS/MS for PK assessment of insulin glargine in clinical development. *Bioanalysis*. 2014; 6(24): 3311-3323. doi: 10.4155/bio.14.219

Сведения об авторах

Шитов Леонид Николаевич – кандидат биологических наук, директор, ООО «Квинта-Аналитика Ярославль», e-mail: L.schitov@qayar.ru <https://orcid.org/0000-0002-3210-4264>

Джурко Юрий Александрович – кандидат фармацевтических наук, старший аналитик, ООО «Квинта-Аналитика Ярославль», e-mail: y.dzhurko@qayar.ru <https://orcid.org/0000-0002-5901-8120>, Scopus ID: 55457391600, SPIN-код: 5833-4057

Драй Роман Васильевич – кандидат медицинских наук, директор департамента клинических исследований, ООО «ГЕРОФАРМ», e-mail: roman.drai@geropharm.com <https://orcid.org/0000-0003-4594-6097>

Макаренко Игорь Евгеньевич – кандидат медицинских наук, медицинский научный советник, ООО «ГЕРОФАРМ», e-mail: igor.makarenko@geropharm.com <https://orcid.org/0000-0003-2308-0608>

Хохлов Александр Леонидович – доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, заведующий кафедрой клинической фармакологии, ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: al460935@yandex.ru <https://orcid.org/0000-0002-0032-0341>, Scopus ID: 7201745706

Хозова Лидия Александровна – аналитик, ООО «Квинта-Аналитика Ярославль», e-mail: L.khozova@qayar.ru <https://orcid.org/0000-0001-6746-6858>

Афонькина Елена Валерьевна – руководитель группы клинических операций, ООО «ГЕРОФАРМ», e-mail: Alena.Afonkina@geropharm.com <https://orcid.org/0000-0002-8880-530X>

Севастьянова Юлия Александровна – специалист по биомедицинской статистике, ООО «ГЕРОФАРМ», e-mail: Yuliya.Sevastyanova@geropharm.com <https://orcid.org/0000-0002-7305-1680>

Василенко Наталия Александровна – старший техник-лаборант, ООО «Квинта-Аналитика Ярославль», e-mail: n.vasilenko@qayar.ru <https://orcid.org/0000-0002-9342-3955>

Абрамова Анастасия Александровна – старший техник-лаборант, ООО «Квинта-Аналитика Ярославль», e-mail: a.manina@qayar.ru <https://orcid.org/0000-0002-4087-8921>

References

Leonid N. Shitov – Cand. Sc. (Biol.), Director, Quinta-Analytica Yaroslavl LLC, e-mail: L.schitov@qayar.ru <https://orcid.org/0000-0002-3210-4264>

Yuri A. Dzhurko – Cand. Sc. (Pharm.), Senior Analyst, Quinta-Analytica Yaroslavl LLC, e-mail: y.dzhurko@qayar.ru <https://orcid.org/0000-0002-5901-8120>, Scopus ID: 55457391600, SPIN-код: 5833-4057

Roman V. Drai – Cand. Sc. (Med.), Director of the Department of Clinical Trials, GEROFARM LLC, e-mail: roman.drai@geropharm.com <https://orcid.org/0000-0003-4594-6097>

Igor E. Makarenko – Cand. Sc. (Med.), Medical Scientific Advisor, GEROFARM LLC, e-mail: igor.makarenko@geropharm.com <https://orcid.org/0000-0003-2308-0608>

Aleksandr L. Khokhlov – Dr. Sc. (Med.), Professor, Corresponding Member of RAS, Head of the Department of Clinical Pharmacology, Yaroslavl State Medical University, e-mail: al460935@yandex.ru <https://orcid.org/0000-0002-0032-0341>, Scopus ID: 7201745706

Liliya A. Khozova – Analyst, Quinta-Analytica Yaroslavl LLC, e-mail: L.khozova@qayar.ru <https://orcid.org/0000-0001-6746-6858>

Olena V. Afonkina – Head of the Clinical Operations Group, GEROFARM LLC, e-mail: Alena.Afonkina@geropharm.com <https://orcid.org/0000-0002-8880-530X>

Yulia A. Sevastianova – Biomedical Statistics Specialist, GEROFARM LLC, e-mail: Yuliya.Sevastianova@geropharm.com <https://orcid.org/0000-0002-7305-1680>

Natalia A. Vasilenko – Senior Laboratory Technician, Quinta-Analytica Yaroslavl LLC, e-mail: n.vasilenko@qayar.ru <https://orcid.org/0000-0002-9342-3955>

Anastasia A. Abramova – Senior Laboratory Technician, Quinta-Analytica Yaroslavl LLC, e-mail: a.manina@qayar.ru <https://orcid.org/0000-0002-4087-8921>

Информация о вкладе авторов

Шитов Л.Н. – общая редакция и оформление статьи, руководство работой соавторов, объединение разделов, подготовленных соавторами, написание разделов «Резюме», «Заключение», а также «Результаты и обсуждение» в части аналитических аспектов.

Джурко Ю.А. – руководство написанием разделов, посвящённых аналитическим процедурам; предоставление сведений о методике измерения и об аналитическом оборудовании.

Драй Р.В. – руководство написанием разделов, посвящённых клиническим аспектам выполненного исследования; редактирование разделов «Материалы и методы» и «Результаты и обсуждение» в части клинических аспектов.

Макаренко И.Е. – написание раздела «Обоснование», раздела «Материалы и методы» в части клинических аспектов.

Хохлов А.Л. – научная редакция статьи.

Хозова Л.А. – написание раздела «Материалы и методы» в части аналитических аспектов, предоставление данных о результатах валидации и измерения концентраций в исследуемых биообразцах.

Афонкина О.В. – написание раздела «Результаты и обсуждение» в части клинических аспектов.

Севастьянова Ю.А. – написание разделов «Материалы и методы» и «Результаты и обсуждение» в части статистических аспектов, оформление таблицы с результатами статистической оценки.

Василенко Н.А. – оформление таблиц и графиков в аналитических разделах статьи, оформление списка литературы.

Абрамова А.А. – оформление таблиц и графиков в аналитических разделах статьи.