

Метрология, стандартизация, контроль

УДК 615.072: 615.1

Сравнительный анализ рекомбинантного моноклонального антитела экулизумаб, входящего в состав лекарственного препарата Солирис® , и его биоаналога PRK-001

© 2020 А. Д. АСКРЕТКОВ^{1,*}, М. А. ЖУЧЕНКО^{1,**}, Н. В. ОРЛОВА², Д. И. ЗЫБИН¹,
В. В. НИКОЛАЕВА¹, А. А. КЛИШИН², Н. В. ЛОБАНОВА², В. О. СОЛДАТОВ³,
Н. А. РОМАНОВА¹, Ю. А. СЕРЕГИН²

¹ООО «Фармапарк», Москва, 117246

²ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»,
(НИЦ «Курчатовский институт»–ГосНИИгенетика), Москва, 117545

³Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, 308015

*e-mail: askretkov.a.d@gmail.com,

**e-mail: maksim.zhuchenko@pharmapark.ru

Поступила в редакцию 05.12.2019 г.

После доработки 24.12.2019 г.

Принята к публикации 10.02.2020 г.

Солирис® (МНН – Экулизумаб) был одобрен регуляторными органами в 2007 г. как первое лекарственное средство для терапии орфанного заболевания – пароксизмальной ночной гемоглобинурии – и позднее для терапии атипичного гемолитико-уремического синдрома и миастении Гравис. Высокая стоимость лечения, недоступность терапии для ряда больных, а также истечение срока патентной защиты для Солириса® – эти факторы стали предпосылкой для создания биоаналогичных препаратов. Авторами проведены обширные сравнительные исследования биоподобия воспроизведенного лекарственного препарата PRK-001, разработанного ООО «Фармапарк», и оригинального – Солирис®, производства Alexion Pharmaceuticals. При сравнении физико-химических свойств препаратов выявлено их полное соответствие как по аминокислотной последовательности, так и по структурам высшего порядка. По посттрансляционным модификациям препараты не имели отличий. При оценке профиля примесей показано, что их содержание в обоих препаратах находится в сравнимых количествах и не превышает допустимых значений. Биологическая активность обоих препаратов в отношении мишени – белка C5 – и их эффекторные функции также были сходными. Эквивалентность препаратов на основании проведенных исследований позволяет заключить, что препарат PRK-001 является биоподобным оригинальному препарату Солирис®.

Ключевые слова: Экулизумаб, Солирис, пароксизмальная ночная гемоглобинурия, физико-химические свойства, посттрансляционные модификации, биоаналогичные препараты, биоподобие, лекарственный препарат

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-1-73-86

Список сокращений: ВЭЖХ-МС-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием; ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография со спектрофотометрическим детектированием; ИК – инфракрасная (спектроскопия); ИФА – иммуноферментный анализ; КД – спектроскопия кругового дихроизма; кИЭФ – капиллярное изоэлектрическое фокусирование; ЛП – лекарственный препарат; МАТ – моноклональные антитела; МС – масс-спектрометрия; ПНГ – пароксизмальная ночная гемоглобинурия; ППР – поверхностный плазмонный резонанс; ПЦР – полимеразная цепная реакция; УФ – ультрафиолетовая область спектра; ЯМР – ядерный магнитный резонанс; C5 (Complement component 5) – белок 5 системы комплемента человека; EC₅₀ (half maximal effective concentration) – 50%-ная эффективная концентрация; Glu-C (Endoproteinase Glu-C) – глутамилэндопроотеиназа; Lys-C (Endoproteinase Lys-C) – лизилэндопроотеиназа; МСТ (Mercury Cadmium Telluride detector) – инфракрасный детектор ртути-кадмий-теллур (HgCdTe); PBS (Phosphate buffered saline) – фосфатно-буферный раствор; PBST – фосфатно-буферный раствор с добавкой Tween-20.

На данный момент рекомбинантные моноклональные антитела (МАТ) получили широкое распространение в медицине благодаря высокой специфичности к мишени, эффективности и минимуму побочных эффектов в сравнении с классическими препаратами. Большинство препаратов МАТ находят применение в онкологии, где они показали высокую эффективность в сравнении с химиотерапией, несколько реже их применяют в иммунологии, трансплантологии, терапии инфекционных заболеваний и сердечно-сосудистых патологий [1]. Известен ряд препаратов МАТ для терапии орфанных (редких) заболеваний, например пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ), распространенность которой составляет около 16 случаев на 1 млн человек [2]. Механизм образования ПНГ заключается в гиперпопуляции красных кровяных клеток, у которых ввиду мутации отсутствуют трансмембранные белки CD55 и CD59. Эти белки в норме ингибируют сборку мембранатакующего комплекса системы комплемента на поверхности клетки и последующее ее разрушение системой комплемента. Их отсутствие в дефицитных по CD55 и CD59 красных кровяных клетках приводит к обширному лизису и, как следствие, значительному уменьшению числа красных кровяных клеток, к тромботическим явлениям, астении и т.д.

До выпуска первого таргетного лекарственного препарата (ЛП) для лечения ПНГ терапия этого заболевания сводилась к устранению симптомов путем периодического введения эритроцитарной массы для поддержания гемостаза на приемлемом уровне, применению кортикостероидов, препаратов железа и тромболитических средств [3]; при этом исход заболевания был неблагоприятным. В крайне тяжелых случаях проводили трансплантацию костного мозга, что значительно улучшало состояние больных, но имело неоправданно высокую частоту осложнений и летальных исходов [2, 4]. В 2007 г. на рынок был выпущен первый ЛП для терапии ПНГ – Солирис® (МНН – Экулизумаб), разработанный компанией Alexion Pharmaceutical (США) [5, 6]. Его применение привело к значительному увеличению продолжительности жизни пациентов и улучшению ее качества [6, 7]. Однако очень высокая стоимость лечения оригинальным препаратом (около 500 тыс. долл. США в год на одного пациента [8]) ограничивает его широкое применение. Естественно, встала задача разработки отечественных биоаналогов Солириса®, что позволило бы существенно снизить стоимость терапии, увеличить ее доступность, а также уменьшить зависимость от поставок оригинального препарата.

Экулизумаб представляет собой рекомбинантное гуманизованное моноклональное антитело – капша иммуноглобулин (IgG2/4), константные области которого взяты от IgG человека, а регионы, определяющие комплементарность, – мышино-го происхождения. Белок содержит две тяжелые цепи, состоящие из 448 аминокислот, и две легкие цепи – из 214 аминокислот, и имеет молекулярную массу около 148 кДа. Единственный сайт гликозилирования локализован на Asn298 тяжелой цепи. Механизм действия экулизумаба заключается в связывании с белком C5 системы комплемента, что предотвращает его расщепление на субъединицы C5a и C5b, последняя из которых необходима для образования мембранатакующего комплекса и лизиса клетки. Таким образом, блокирование белка C5 экулизумабом предотвращает разрушение дефицитных по белкам CD55 и CD59 красных кровяных клеток.

Компанией ООО «Фармапарк» (Россия) был разработан продуцент экулизумаба на основе клеточной линии яйцеклеток китайского хомячка, а также технология культивирования и очистки белка вплоть до готовой лекарственной формы. Разработанный процесс отличался от технологии выпуска оригинального ЛП (EP3124029A1, EP3167888A1), поэтому встала задача валидации отечественного препарата, что предусматривает проведение мультипараметрического сравнительного исследования двух препаратов: биоаналога и оригинала – для доказательства физико-химического и функционального подобия, сходной эффективности и безопасности нового ЛП (Biosimilar and Interchangeable Products, <https://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/TherapeuticBiologicApplications/Biosimilars/ucm580419.htm>). В соответствии с регуляторными требованиями, подтверждение биоподобия осуществляется в несколько этапов (Guideline on similar biological medicinal products, https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-rev1_en.pdf) [9, 10]:

- подтверждение физико-химического подобия (первичная/вторичная/третичная структура, посттрансляционные модификации, локализация дисульфидных связей, профиля примесей, чистоты препарата и др.);
- подтверждение подобия специфической биологической активности;
- доклинические исследования *in vivo*;
- клинические исследования.

Объем каждого этапа исследований сильно зависит от результатов предыдущего и, в общем случае, чем выше физико-химическое подобие

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕКОМБИНАНТНОГО МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА

препаратов, тем меньший объем исследований требуется на последующих этапах подтверждения биоподобия.

Таким образом, в данной работе проведена оценка физико-химического и биологического подобия двух препаратов: воспроизведенного, PRK-001 (ООО «Фармапарк»), и оригинального, Солирис® (Alexion Pharmaceuticals, США).

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Для сравнительного анализа были использованы три серии биоподобного ЛП PRK-001 и три серии оригинального Солирис®, концентрат раствора для приготовления инфузий (10 мг/мл), флакон 30 мл. Состав вспомогательных веществ (по-

лисорбат 80, натрия хлорид, натрия фосфаты), а также содержание действующего вещества в обоих препаратах было идентично.

Методы

Оценку биоподобия воспроизведенного и оригинального ЛП проводили методами, приведенными в табл. 1.

Определение молекулярной массы полноразмерного антитела

Измерение массы полноразмерных МАТ проводили на времяпролетном масс-спектрометре TIMS-TOF (Bruker, США), оснащенном источником электроспрейной ионизации и ячейкой ионной подвижности, в режиме положительных

Таблица 1

Методы, использованные для анализа биоподобия PRK-001 и Солириса®

Methods used for analysis of the biosimilarity of PRK-001 and Soliris®

Исследуемый параметр	Метод
Физико-химические показатели	
Первичная структура	МС нативного белка, ВЭЖХ-УФ – пептидное картирование, ВЭЖХ-МС-МС белка, обработанного ферментами
Вторичная структура	КД в дальней УФ-области, ИК
Третичная структура	ЯМР
Четвертичная структура	Динамическое светорассеяние
Характеристика посттрансляционных модификаций	МС для оценки образования пироглутамата, дезамидирования, окисления, сайтов N-гликозилирования и локализации дисульфидных связей
Определение свободных сульфгидрильных групп	Метод Элмана
Характеристика заряженных форм	кИЭФ
Примесь ДНК штамма-производителя	ИФА в системе Threshold (Molecular Devices, США)
Примесь белков штамма-производителя	ИФА
Примесь белка А	ИФА
Биологическая активность	
Связывания с белком С5 системы комплемента человека	ИФА
Константы взаимодействия с белком С5 системы комплемента человека	ППР
Специфическая антигемолитическая активность	Методика с применением модели сенсibilизированных куриных эритроцитов
Эффекторные свойства	ИФА – определение эффективности связывания с рецепторами: FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIIa, FcRn и C1q

Примечание: МС – масс-спектрометрия; ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография со спектрофотометрическим детектированием в УФ-области; ВЭЖХ-МС-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием; КД – спектроскопия кругового дихроизма; ИК – инфракрасная (спектроскопия); ЯМР – ядерный магнитный резонанс; кИЭФ – капиллярное изоэлектрическое фокусирование; ИФА – иммуноферментный анализ; ППР – поверхностный плазмонный резонанс.

Note: MS – mass spectrometry; HPLC-UV – high performance liquid chromatography with spectrophotometric detection in the UV region; HPLC-MS-MS – high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection; CD – spectroscopy of circular dichroism; IR – infrared (spectroscopy); NMR – nuclear magnetic resonance; cIEF – capillary isoelectric focusing; ELISA – enzyme immunoassay; SPR – surface plasmon resonance.

ионов при максимальном разрешении в диапазоне отношения массы к заряду (m/z) от 800 до 5000. Анализ результатов, включая деконволюцию, проводили с помощью программы Bruker Compass Data Analysis 5.0 SR1.

Пептидное картирование

Восстановленные дитиотреитолом (Sigma-Aldrich, США) и алкилированные йодацетамидом (Sigma-Aldrich) образцы белка подвергали протеолизу трипсином при 37 °С. Для анализа полученных пептидов использовали систему ВЭЖХ Dionex Ultimate 3000 (Dionex, Германия), оснащенную УФ-детектором. Анализ проводили на колонке YMC-Pack ODS-A 250 × 4,6 мм, с диаметром частиц 5 мкм (YMC, Япония) в градиентной системе вода/ацетонитрил с добавкой 0,1%-ной трифторуксусной кислоты. Детектирование осуществляли при длине волны 214 нм.

Анализ первичной структуры белка и посттрансляционных модификаций

Восстановленные дитиотреитолом алкилированные образцы МАТ подвергали протеолизу трипсином в комбинации с Glu-C или Lys-C (Sigma-Aldrich) при 37 °С. Полученные пептиды анализировали на колонке с сорбентом C18 в градиентной системе вода/ацетонитрил с добавкой 0,1%-ной муравьиной кислоты на нанопоточной системе ВЭЖХ Agilent 1100 (Agilent, США), соединенной с tandemным масс-спектрометром ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием Thermo Finnigan LTQ FT (Thermo Fisher Scientific, США).

Анализ результатов ВЭЖХ-МС-МС проводили с использованием программного обеспечения Qual Browser (Thermo Fisher Scientific), пептиды и их фрагменты идентифицировали по базе данных Peaks Studio (Bioinformatics Solutions Inc., США). Для поиска посттрансляционных модификаций использовали пакет программ StavroX.

Для определения сайтов гликозилирования белок дополнительно обрабатывали N-гликозидазой, а для локализации дисульфидных связей параллельно проводили протеолиз невосстановленного белка.

Анализ вторичной структуры белка методом КД в дальней УФ-области

Для определения вторичной структуры методом КД использовали спектрополяриметр J-810 (JASCO Inc., США), оснащенный Пельтье-контролируемым кюветодержателем. Сканирование проводили в кварцевой кювете ($l = 1$ мм) в пошаговом режиме в диапазоне длин волн 196–250 нм

с шагом 1 нм и спектральной шириной щели 2 нм. Каждый образец разводили до концентрации 0,1 мг/мл и проводили запись спектра в трех повторениях с вычитанием спектра буферного раствора. Вычитание/сглаживание спектров и вычисление молярной эллиптичности проводили в программах Spectra Analysis (JASCO Inc.) и OriginPro 9.0 (OriginLab Corp., США) соответственно. Для количественной оценки содержания элементов вторичной структуры в белке данные КД обрабатывали с использованием пакета программ CDPPro.

Анализ вторичной структуры белка методом ИК-спектроскопии Фурье

Использовали ИК-спектрометр Nicolet 6700 (Thermo Fisher Scientific), оснащенный приставкой Smart Proteus с кюветодержателем, контролируемым Пельтье-элементом. Исследование образцов проводили в кювете из кристаллического фторида кальция при температуре 20 °С в режиме пропускания, используя охлаждаемый жидким азотом детектор ртуть-кадмий-теллур (МСТ-детектор) в диапазоне волновых чисел от 650 см^{-1} до 4000 см^{-1} с разрешением 1 см^{-1} . Каждый образец с концентрацией белка 60 мг/мл анализировали в двух повторениях и вычитали спектр буферного раствора. Анализ области волновых чисел 1725–1481 см^{-1} на предмет содержания элементов вторичной структуры в белке проводили по алгоритму, предложенному Goormaghtigh и др. [11].

Анализ третичной структуры белка методом ЯМР

Измерение проводили на приборе AVANCE III 600 (Bruker, США) при 298 К. Образцы белка, очищенные от полисорбата-80, обрабатывали папином (Sigma-Aldrich) при 37 °С. После инкубации белок переводили в воду очищенную, содержащую добавку 10% дейтерированной воды, и записывали ЯМР-спектр.

Анализ четвертичной структуры белка методом светорассеяния

Измерение проводили на спектрометре динамического светорассеяния Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Великобритания), оснащенном гелий-неоновым лазером (632,8 нм). Для измерений использовали кюветы из полистирола (BrandTech, США), в которые помещали образцы с концентрацией белка 60 мг/мл. Измерение проводили при температуре 25 °С и угле рассеяния 173°. Построение автокорреляционной функции, нахождение характеристического времени релаксации τ_c и вычисление соответствующего коэффициента диффузии (D) белка проводили с использованием

пакета программ Malvern Software. Для белка использовали предустановленные значения: показатель преломления $n_d=1,450$, абсорбция $A=0,01$. Для оценки молекулярной массы белка по уравнению Марка-Хаувинка использовали эмпирические параметры: $K=7,67 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ и $a=0,428$. Вычисление гидродинамического диаметра (d) частиц проводили по уравнению Стокса-Эйнштейна в приближении сферических частиц.

Определение свободных сульфгидрильных групп

Для измерений использовали спектрофотометр Cary 100 (Varian Inc., США) оснащенный водяным термостатом LOIP LT-105. Образцы белка и плацебо разводили до концентрации 1,4 мг/мл в буфере, содержащем 100 мМ Na_2HPO_4 и 6 М гуанидина гидрохлорида (рН 8,0), и к 950 мкл полученного раствора добавляли 50 мкл реактива Элмана (10 мМ 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота) (Sigma-Aldrich)), перемешивали пипетированием и измеряли оптическое поглощение при 412 нм.

Характеристика заряженных форм

Для анализа заряженных форм использовали систему капиллярного электрофореза PA 800 Plus (Sciex, США). Образцы белка и фармалиты с диапазоном изоэлектрических точек 3–10 разводили гелем для изоэлектрического фокусирования, содержащим мочевины, маркеры и фармалиты с диапазоном изоэлектрических точек 3–10, до концентрации 0,1 мг/мл. Обработку данных проводили в программе Chromeleon 6.8 (Thermo Fisher Scientific).

Анализ примеси ДНК штамма-продуцента

Для анализа остаточной ДНК использовали систему Threshold (Molecular Devices, США) с соответствующим набором DNA Bulk Kit (Molecular Devices). Пробы подготавливали к анализу путем гидролиза протеиназой К в 0,5%-ном растворе додецилсульфата натрия при 50 °С. Далее разведенные в 10 раз образцы анализировали согласно инструкции производителя.

Анализ белков штамма-продуцента

Для анализа остаточных белков штамма-продуцента использовали набор CHO HCP ELISA Kit, 3G (Cygnum Technologies, США) для препарата PRK-001 и NS/0 HCP ELISA Kit (Cygnum Technologies) для препарата Солирис®. Анализ проводили в соответствии с инструкцией производителя.

Анализ примеси белка А

Для анализа остаточного белка А использовался набор Protein A ELISA Kit (Cygnum Techno-

logies). Анализ проводили в соответствии с инструкцией производителя.

Анализ связывания МАТ с белком С5 системы комплемента

Связывание препаратов с белком С5 оценивали методом ИФА. Для этого в 96-луночный планшет вносили по 100 мкл на лунку раствора белка С5 (Complement Technology, США) в концентрации 1,5 мкг/мл в (PBS) рН 7,4 и оставляли на 18 ч при температуре 4 °С. Удаляли раствор белка С5 из лунок планшета и пятикратно промывали 200 мкл PBS, содержащим 0,1% Tween-20 (PBST), вносили в каждую лунку по 300 мкл 1%-ного раствора бычьего сывороточного альбумина (BSA) в PBS и инкубировали 2 ч при 37 °С. В лунки планшета вносили по 100 мкл растворов МАТ в 1%-ном растворе BSA со специфической активностью в диапазоне 6,3–300 ЕС/мл и инкубировали в течение 2 ч при 37 °С, планшет пятикратно промывали PBST (200 мкл/лунка), затем вносили 100 мкл вторичных мышиных антител против Fc-фрагмента IgG4 человека, конъюгированных с пероксидазой хрена (Genway Biotech Inc, США), и инкубировали в течение 2 ч при 37 °С. После пятикратной промывки PBST вносили по 100 мкл раствора субстрата, 3,3',5,5'-тетраметилбензидина, в соответствующем буфере, содержащем пероксид водорода (Sigma-Aldrich), и после развития окраски реакцию останавливали при помощи 100 мкл 0,5 М раствора серной кислоты. Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм на планшетном ридере Tecan Infinite 200M (Tecan, Швейцария). Полученные данные обрабатывали с использованием программы Origin 9.0 (OriginLab Corporation).

Определение константы взаимодействия МАТ с белком С5 методом поверхностного плазмонного резонанса

Связывание Солириса® и PRK-001 с белком С5 системы комплемента человека анализировали методом ППП на спектрометре ProteOn XPR36 (Bio-Rad, США) при 25 °С. В качестве лиганда использовали белок С5 системы комплемента человека, конъюгированный через аминокислотные группы на микрочип ProteOn™ GLH. Анализ проводили на пяти концентрациях оригинального и воспроизведенного препаратов в диапазоне от 5 до 80 нМ, лиганд регенерировали 10 мМ раствором глицина (рН 3,3). Константы диссоциации рассчитывали с применением программ Bio-Rad ProteOn Manager (Bio-Rad).

Анализ специфической антигемолитической активности МАТ на модели сенсibilизированных куриных эритроцитов

Специфическую гемолитическую активность препаратов Солирис® и PRK-001 определяли по методике, описанной ранее [12].

Оценка эффекторных свойств МАТ методом ИФА

Для анализа связывания МАТ, входящих в состав Солириса® и PRK-001, с рецепторами экулизумаба: FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIIa, FcRn – в лунки 96-луночного планшета вносили по 50 мкл раствора соответствующего рецептора (SinoBiological, США) в концентрации 2 мкг/мл PBS, планшет инкубировали при 4 °С в течение ночи, промывали PBST и блокировали 1%-ным раствором BSA. Растворы обоих препаратов, а также комплексы МАТ-С5, полученные путем смешения растворов МАТ (1 мг/мл PBS) и белка С5 (1 мг/мл PBS) в объемном соотношении 1:1,5 и проинкубированных при 4 °С в течение ночи, вносили в лунки планшета и инкубировали в течение 1 ч при 32 °С. После трехкратной промывки PBST в планшет вносили мышинные антитела (100 мкл/лунка) к каппа-цепи МАТ человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (Southern Biotech, США), и инкубировали в течение 1 ч при 32 °С. Планшет промывали и вносили раствор субстрата (см. вышеописанную методику ИФА).

При анализе связывания МАТ с С1q планшет сенсibilизировали анти-С1q-антителами (Santa Cruz Biotechnology, США), после блокировки вносили 100 мкл/лунка раствора С1q (2 мкг/мл) и

инкубировали последовательно с МАТ и вторичными антителами, как описано выше. Полученные данные обрабатывали с помощью программы Origin 9.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение физико-химических свойств воспроизведенного и референтного ЛП

В результате проведенного в системе ВЭЖХ-МС-МС анализа пептидов МАТ, полученных протеолизом с использованием трипсина в комбинации с Lys-C и Glu-C, было получено 100%-ное покрытие аминокислотной последовательности как для легкой, так и для тяжелой цепей МАТ, содержащегося в образцах PRK-001 и Солирис®. Гетерогенности по N- и С-концевым последовательностям не выявлено. Анализ пептидов МАТ при помощи ВЭЖХ-УФ также показал полное совпадение, как по времени элюирования, так и по интенсивности пиков оригинального и воспроизведенного препаратов (рис. 1).

Измерение молекулярной массы полноразмерной молекулы МАТ в образцах проводили при помощи масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем. Выбор данного метода был обусловлен высокой точностью и большим объемом получаемой информации по сравнению с гель-электрофорезом, мультиугловым светорассеянием и гель-фильтрующей хроматографией [13]. Полученные спектры приведены на рис. 2. Результаты измерения показывают наличие основной протеоформы на фоне дополнительных четырех форм белка, присутствие которых обусловлено наличием лизиновых вариантов, а также гликозилированием МАТ.

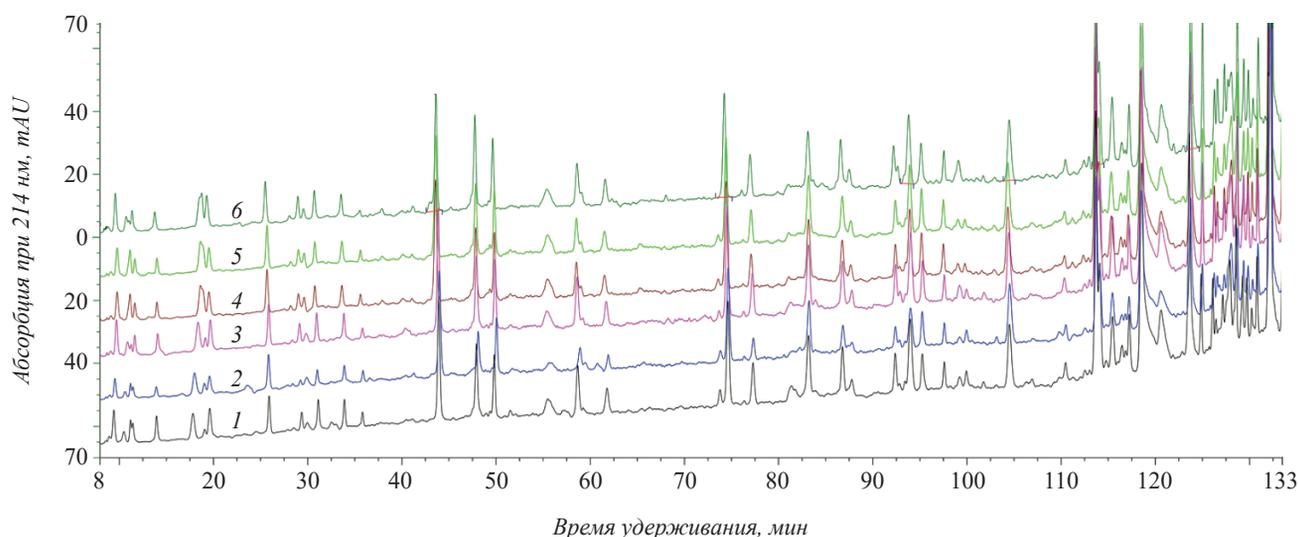


Рис. 1. Сравнение пептидных карт, полученных для трех серий препарата Солирис® (образцы 1–3) и трех серий препарата PRK-001 (образцы 4–6)

Fig. 1. Comparison of peptide maps for three lots of Soliris® (samples 1–3) and three lots of PRK-001 (samples 4–6)

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕКОМБИНАНТНОГО МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА

При расчете молекулярных масс целевых молекул получено одинаковое значение для обоих препаратов – 147,877 кДа. Таким образом, результаты МС-анализа подтвердили идентичность молекулярной массы МАТ PRK-001 таковой экулизумаба в препарате Солирис®.

Уровень дезамидирования остатка аспарагина (N298), локализованного на тяжелой цепи МАТ, после обработки N-гликозидазой исследуемых препаратов составлял 94–100%, в то время как в необработанных препаратах дезамидированию подвергалось не более 1% остатков N298, что говорит о наличии сайта N-гликозилирования в этом

положении и согласуется с данными, описанными для препарата Солирис® (WO2017044811A1). Других сайтов гликозилирования в исследованных молекулах МАТ не обнаружено.

В молекулах МАТ также идентифицированы сайты химических модификаций (окисления, дезамидирования, образования пироглутамата), они оказались одинаковы для всех исследованных образцов (табл. 2, рис. 3).

Поиск дисульфидных связей в препаратах проводили путем сравнения пептидов, полученных из образцов МАТ, подвергнутых алкилированию без восстановления и с восстановлением. Анализ

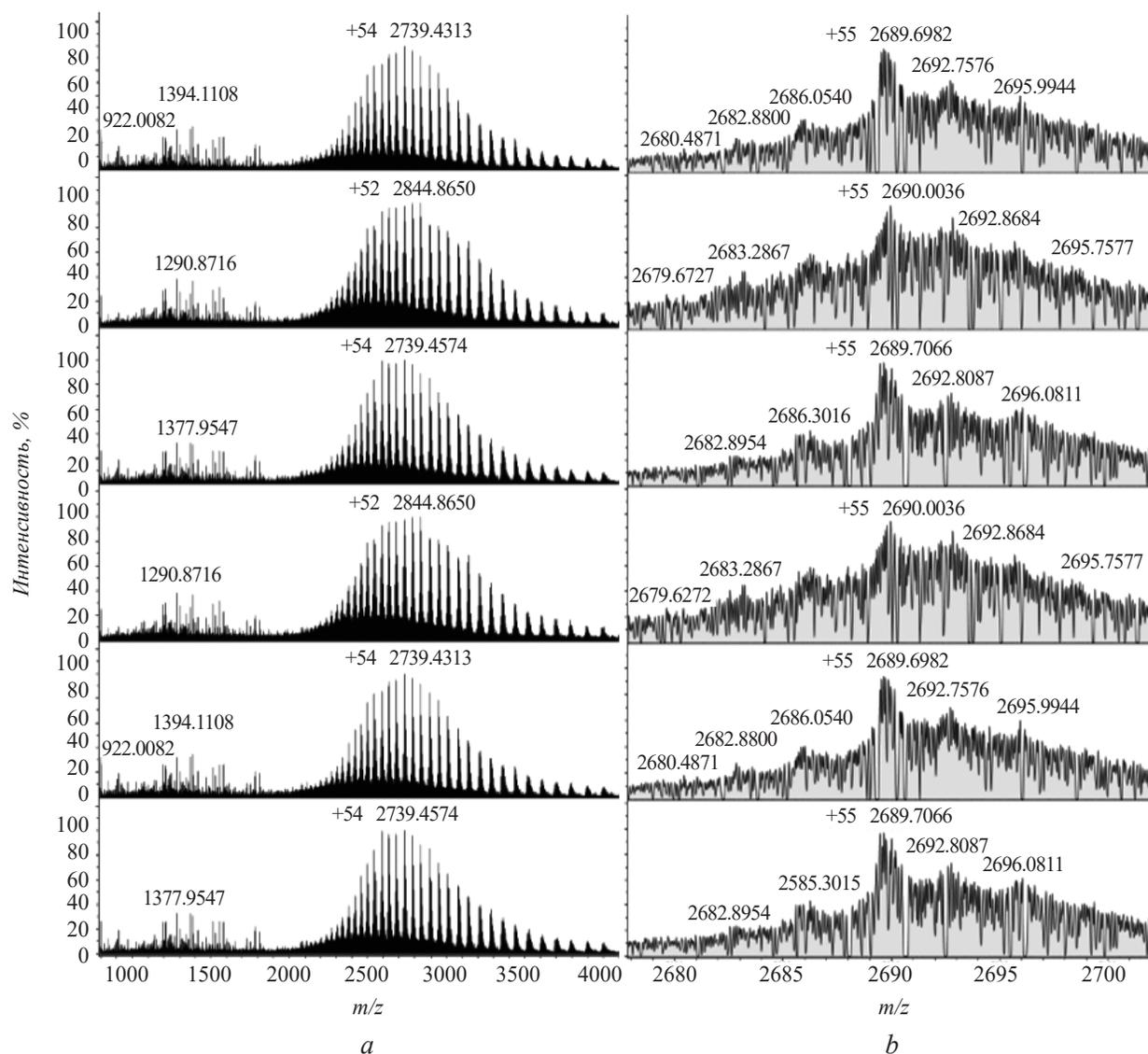


Рис. 2. Анализ МАТ масс-спектрометрией с ионизацией электрораспылением: полноразмерной молекулы (a) и характерного фрагмента масс-спектра (ионы с зарядом $z=+55$) в увеличенном масштабе (b). Образцы сверху вниз: PRK-001 (3 серии), Солирис® (3 серии). Указаны значения заряда ($z = +52 \dots +55$) и отношения массы к заряду для молекулярных ионов с максимальной интенсивностью

Fig. 2. ESI-MS analysis of MABs: full-sized molecule (a) and the characteristic fragment of the mass spectrum (ions with $z=+55$) on an enlarged scale (b). Samples (top-down): PRK 001 (3 lots), Soliris® (3 lots). The values of ion charge ($z = +52 \dots +55$) and mass to charge ratios for molecular ions with maximum intensity are indicated

ВЭЖХ-МС-МС полученных наборов пептидов показал точное положение всех дисульфидных связей, за исключением участка 224–231, в котором рядом находится четыре остатка Cys, в связи с чем он устойчив к протеолизу. Этот участок анализировали целиком. В результате исследования, как для воспроизведенного, так и для референтного ЛП, было подтверждено характерное для экулизумаба расположение внутренних дисульфидных связей: H22–H96, H149–H205, H262–H322, H368–H426 в тяжелой цепи и L23–L88, L134–L194 в легкой цепи, – причем разброс в их количестве между образцами был минимальным. Также во всех образцах идентифицирована одна дисульфидная связь, соединяющая тяжелую и легкую цепи – H262–L214. Во всех испытуемых образцах детектировали и другие дисульфидные связи между указанными выше остатками цистеина, например: H262–H262, H262–H426, H22–H426, H368–H368, H96–L134, H96–L194, – что, по-видимому, стало следствием случайных перестроек при хранении ЛП [14]. Таким образом, в результате проведенного исследования удалось показать одинаковое расположение дисульфидных связей в испытуемых образцах.

Проведенный анализ посттрансляционных модификаций позволяет заключить, что препара-

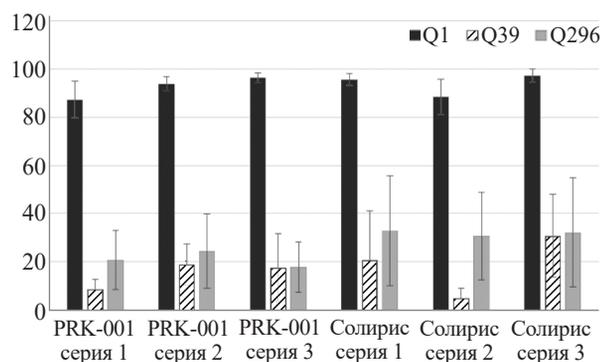


Рис. 3. Содержание пироглутамата в образцах препаратов Солирис® и PRK-001. Указаны данные по трем сайтам: Q1, Q39 и Q296.

Fig 3. Pyroglutamate content in Soliris® and PRK-001 samples. Data for three sites of modification, Q1, Q39 and Q296, are present.

раты PRK-001 и Солирис® схожи по типу и локализации модификаций аминокислотной цепи. Обнаружены две основные модификации, содержание которых во всех образцах близко к 100%: гликозилирование N298 и образование пироглутамата из N-концевого остатка Gln.

Для анализа вторичной структуры белков были использованы методы КД и ИК-Фурье спектроскопии, ввиду их относительной простоты,

Таблица 2

Модификации МАТ, идентифицированные в образцах препаратов Солирис® и PRK-001

Modifications identified in Soliris® and PRK-001 proteins

Аминокислота	Модификация	Присутствие в препарате	
		Солирис®	PRK-001
Тяжелая цепь			
N298	Гликозилирование	+	+
Q312	Дезамидирование	+	+
N316	То же	+	+
N385	» »	+	+
N390	» »	+	+
W278	Окисление	+	+
H311	То же	+	+
W314	» »	+	+
W382	» »	+	+
M81	» »	+	+
M253	» »	+	+
M359	» »	+	+
M429	» »	+	+
Q1	Пироглутамат	+	+
Q39	То же	+	+
Q296	» »	+	+
Легкая цепь			
M4	Окисление	+	+

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕКОМБИНАНТНОГО МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА

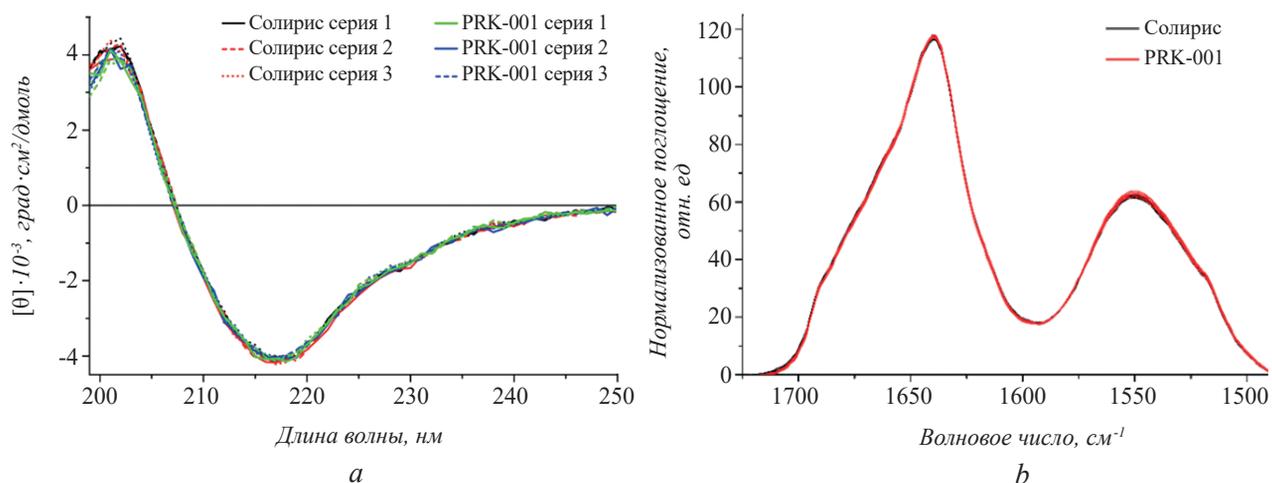


Рис. 4. Анализ вторичной структуры МАТ: *a* – метод КД с наложением спектров Солирис® и PRK-001 (по три серии); *b* – метод ИК-Фурье-спектроскопии (одна серия)

Fig.4. MAB secondary structure assessment by circular dichroism (*a*) with Soliris® (3 lots) and PRK-001 (3 lots) spectra overlay, and Fourier-transform infrared spectroscopy (one lot of Soliris and PRK-001) (*b*)

быстроты и в то же время информативности. Спектры КД в дальней УФ-области препаратов антител представлены на рис. 4а. На рис. 4b представлено сравнение ИК-спектров воспроизведенного и референтного ЛП. Анализ полученных спектров КД проведен с помощью программного обеспечения CDPго, данные ИК-Фурье спектров обработаны в соответствии с принципами, указанными в работе Goormaghtigh et al. [11]. Полученные результаты приведены в табл. 3. Сравнительный анализ препаратов антител на основе *t*-критерия Стьюдента показал, что вторичные структуры исследованных препаратов эквивалентны по результатам двух методов.

Для анализа третичной структуры белка был использован метод ¹H-ЯМР-спектроскопии ввиду его относительной простоты и возможности анализа нативного белка в растворе (рис. 5). Сигналы в сильнополюсной области, от 0 до -0,8 м.д., служат косвенным подтверждением глобулярной структуры белка, так как свидетельствуют о наличии

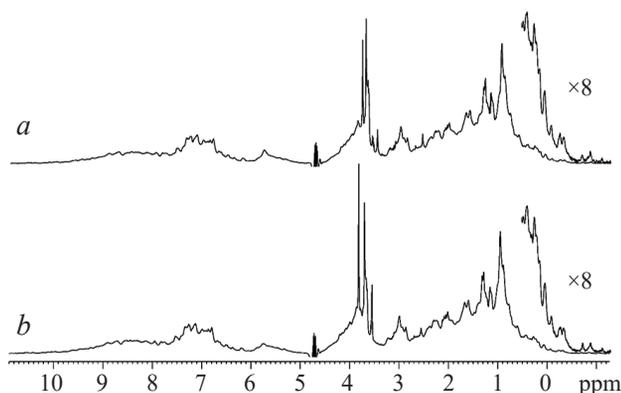


Рис. 5. Спектр ¹H-ЯМР образца Солириса® (*a*) и PRK-001 (*b*). Высокопольная (от 0,45 до -1,15 м.д.) часть спектра показана в 8-кратном увеличении. Интенсивные сигналы в области 4–3,5 м.д. относятся к компонентам буфера

Fig. 5. ¹H-NMR spectra for Soliris® (*a*) and PRK-001 (*b*). High magnetic field strength area (from 0,45 to -1,15 ppm) is shown in 8-fold magnification. Intensive signals in the region of 4,0–3,5 ppm refer to the buffer components

Таблица 3

Содержание элементов вторичной структуры (%), полученное методами КД и ИК-Фурье-спектроскопии
Secondary structure elements obtained by circular dichroism and Fourier-transform infrared spectroscopy methods

Элемент вторичной структуры	КД		ИК-Фурье-спектроскопия	
	Солирис®	PRK-001	Солирис®	PRK-001
α-спираль	2,7 ± 0,3	2,7 ± 0,2	5,1 ± 0,2	5,2 ± 0,2
β-структура	40,9 ± 0,4	40,8 ± 0,6	45,4 ± 0,4	45,5 ± 0,3
Поворот	23,0 ± 0,2	22,9 ± 0,5	11,1 ± 0,3	11,1 ± 0,2
Неупорядоченная структура	32,6 ± 0,6	31,1 ± 1,0	34,7 ± 0,8	35,0 ± 0,8

гидрофобного ядра, образованного гидрофобными звеньями аминокислот, внутри белка [15]. Наличие сигналов в сильнополюсной области показывает, что полипептидные цепи исследуемых белков обладают глобулярной структурой. Область спектра в диапазоне от 0,45 до -1,14 м.д. практически одинаковы для обоих препаратов, что позволяет заключить, что третичная структура исследованных белков идентична [16].

Количество свободных сульфгидрильных групп на молекулу белка, как определено методом Элмана, для препаратов PRK-001 и Солирис® составило $0,325 \pm 0,051$ и $0,195 \pm 0,080$ моль/моль соответственно. Таким образом, молекулы как оригинального, так и воспроизведенного ЛП содержат менее одной сульфгидрильной группы на молекулу (из 32 остатков цистеина в молекуле), что говорит о почти полном замыкании SH-групп в дисульфидные мостики.

Оценка четвертичной структуры МАТ проведена методом динамического светорассеяния ввиду возможности анализа белка в нативных условиях с одновременным детектированием димеризованных молекул и агрегатов [17]. Значение среднего гидродинамического диаметра препарата PRK-001 было несколько выше, чем препарата сравнения ($11,05 \pm 0,41$ нм против $10,78 \pm 1,03$ нм). Следует отметить, что эта разница не была статистически значимой и границы диапазона для PRK-001 находились внутри диапазона для референтного препарата.

Сравнение заряженных форм препаратов PRK-001 и Солирис® методом капиллярного изoeлектрического фокусирования показало близкие значения относительного содержания как основного пика, не содержащего C-концевых молекул лизина, так и щелочных и кислых форм. Содержание всех изоформ находилось в диапазоне рI 5,5–6,5. Данные приведены в табл. 4.

Анализ примесей

При получении рекомбинантных белков, в том числе потенциальных ЛП, используют сложные системы экспрессии в генетически модифициро-

ванных клетках бактерий, дрожжей или млекопитающих, поэтому в процессе производства образуется много примесей и продуктов жизнедеятельности клеток-продуцентов. Последующая хроматографическая очистка белка сводится к удалению большей части примесей, хотя возможность контаминации готового продукта не исключена. В связи с этим необходим серьезный контроль содержания примесей в составе ЛП с гарантией отсутствия их в токсических дозах. Наибольшее влияние на безопасность и переносимость препарата оказывают остаточная ДНК и остаточные белки штамма-продуцента (Решение № 89 от 03.11.16 «Об утверждении правил проведения исследования биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза», <http://docs.cntd.ru/document/456026116/>). Эти примеси содержатся в препарате в следовых количествах, поэтому для их обнаружения используют высокочувствительные методы – на основе ИФА или полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени.

Предельная удельная концентрация остаточной ДНК была рассчитана, исходя из рекомендованного значения 10 нг на дозу препарата (Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use, <https://www.fda.gov/media/76798/download>) [18] и максимальной дозы экулизумаба, равной 1200 мг, и составляла 8,3 пг/мг белка. На основании собственного опыта для определения содержания остаточной ДНК авторы выбрали систему Threshold. В результате проведенного анализа выявлено, что содержание ДНК штамма-продуцента, как в образцах воспроизведенного (PRK-001), так и референтного препарата (Солирис®), было ниже предела обнаружения системы, равного 1,6 пг/мг белка, т.е. гораздо ниже допустимого уровня, указанного выше.

Спецификациями ни российских, ни международных нормативных документов не предусмотрен контроль содержания остаточных белков клетки-хозяина ввиду зависимости биологической активности этой примеси от штамма-продуцента и технологии производства ЛП. Предельное

Таблица 4

Сравнение заряженных форм МАТ в препаратах Солирис® и PRK-001

Comparison of charged variants of the protein in Soliris® and PRK-001

Образец	Процентное содержание изоформ МАТ, %		
	щелочные	основная	кислые
Солирис®	$14,66 \pm 0,020$	$62,35 \pm 0,027$	$22,99 \pm 0,020$
PRK-001	$11,37 \pm 0,013$	$65,28 \pm 0,015$	$23,34 \pm 0,016$

Примечание: Результаты представлены как среднее \pm стандартное отклонение (SD) по трем сериям каждого препарата.

Note: The results are presented as mean \pm SD for three lots of the each drug.

удельное содержание остаточных белков было установлено на основании литературных данных как 100 нг/мг белка [19, 20]. Усредненное значение содержания белков клетки-хозяина для трех серий Солириса® составляло $2,4 \pm 1,1$ нг/мг белка, для PRK-001 – $1,5 \pm 0,3$ нг/мг белка, что в обоих случаях было гораздо ниже допустимого предела.

Согласно нормативным требованиям, необходимо проводить контроль содержания в продукте лигандов хроматографических сорбентов, если они могут частично элюироваться в процессе хроматографии. Так как при хроматографической очистке экулизумаба, как и многих МАТ, используется аффинный сорбент с конъюгированным рекомбинантным белком А, то необходим контроль остаточных количеств этого лиганда в препарате. Для данной примеси отсутствуют какие-либо известные нормы, поэтому их устанавливают в каждом конкретном случае на основании имеющихся научных данных. Для биоподобных ЛП хорошей практикой является установление норм содержания таких примесей на основании анализа большой выборки серий оригинального препарата и данных клинических исследований. На данный момент для воспроизведенного ЛП установлен следующий критерий: содержание в нем белка А не должно превышать его содержание в референтном препарате. По результатам ИФА, содержание белка А в референтном и воспроизведенном ЛП составляет $0,096 \pm 0,001$ и $0,126 \pm 0,02$ нг/мг белка соответственно, т.е. значимых различий между препаратами Солирис® и PRK-001 по удельному содержанию остаточного белка А не обнаружено.

Оценка биологической активности

Экулизумаб является регулятором активности системы комплемента человека и эффективным средством для лечения больных, имеющих дефицит GPI-связанных белков (CD55 и CD59) – на поверхности клеток крови [21]. Это МАТ обладает высокой аффинностью к C5-компоненту системы комплемента. Связанный с экулизумабом C5 не расщепляется до компонентов C5a и C5b, что предотвращает сборку мембранатакующего комплекса и разрушение клетки. Таким образом, с одной стороны, экулизумаб восстанавливает регуляцию активности комплемента в крови и предотвращает внутрисосудистый гемолиз у больных ПНГ. С другой стороны, дефицит терминального компонента комплемента сопровождается повышенной частотой развития инфекций, вызываемых инкапсулированными микроорганизмами, главным образом менингококками [22]; хотя экулизумаб поддерживает содержание ранних про-

дуктов активации комплемента, необходимых для опсонизации микроорганизмов и выведения иммунных комплексов.

Согласно ряду регламентирующих документов, сравнительное исследование общетоксических свойств биоаналогичного лекарственного средства необходимо проводить на релевантных видах животных (Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibody: non-clinical and clinical issues, https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-monoclonal-antibodies-non-clinical_en.pdf; ICH S6(R1) Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals, <https://www.ema.europa.eu/en/ich-s6-r1-preclinical-safety-evaluation-biotechnology-derived-pharmaceuticals>) [10, 23]. Ввиду высокой специфичности экулизумаба к человеческому C5 и отсутствию релевантных видов животных для проведения его доклинических испытаний разработчик оригинального препарата исследовал безопасность и эффективность ЛП на лабораторных грызунах, вводя ряд аминокислотных замен в молекулу экулизумаба с целью увеличения его аффинности к C5 грызунов. В данном случае этот подход не имел большого смысла, так как испытание уже проводилось на родственной экулизумабу молекуле.

С учетом вышесказанного была предложена следующая программа исследований, позволяющая в формате *in vitro* оценить первичные и вторичные фармакодинамические эффекты. Важнейшей биологической функцией антител является связывание с антигеном. Анализ связывания с антигеном проводили двумя методами: ИФА и ППР [10]. Так как экулизумаб имеет Fc-фрагмент от IgG4, его связывание с рецепторами FcγR должно быть существенно ниже, чем у иммуноглобулинов класса IgG1. Это было намеренно сделано разработчиком оригинального ЛП для уменьшения побочных эффектов. Связывание МАТ с FcRn сильно влияет на фармакокинетические параметры препарата, а связывание с C1q – на развитие комплементзависимой клеточной цитотоксичности. Связывание референтного и воспроизведенного препаратов с FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIIa, FcRn и C1q оценивали методом ИФА. Специфическую антигемолитическую активность МАТ оценивали в клеточном тесте с использованием нормальной сыворотки человека и куриных эритроцитов. Суть метода – в блокировании экулизумабом гемолиза эритроцитов в присутствии сыворотки, содержащей белки системы комплемента (табл. 5).

Сравнение значений равновесной константы диссоциации (K_d) комплекса МАТ с белком C5 для

Сравнительные данные по первичной и вторичной фармакодинамике препаратов Солирис® и PRK-001
Comparative data on the primary and secondary pharmacodynamics of Soliris® and PRK-001

Параметр		Метод	Солирис®	PRK-001
Активность, ЕС/мг белка		ИФА	979 412 ± 11 131	1 056 458 ± 37 691
$K_d \cdot 10^{10}$, М		ППР	4,64 ± 1,08	4,49 ± 0,55
Относительная антигемолитическая активность, %		Клеточный тест	100,0	100,99 ± 3,33
EC ₅₀ , мкг/мл	FcγRIa	–C5	1,491 ± 0,123	1,540 ± 0,040
		+C5	0,555 ± 0,072	0,561 ± 0,041
	FcγRIIa	–C5	1,947 ± 0,149	1,987 ± 0,192
		+C5	0,454 ± 0,060	0,422 ± 0,066
	FcγRIIIa	–C5	1,292 ± 0,930	1,273 ± 0,117
	+C5	0,323 ± 0,021	0,313 ± 0,043	
FcRn	–C5	ИФА	1,365 ± 0,133	1,28 ± 0,091
	+C5		0,551 ± 0,103	0,535 ± 0,061
C1q	–C5		0,597 ± 0,083	0,57 ± 0,080
	+C5		1,479 ± 0,089	1,405 ± 0,083

Примечание: K_d – константа диссоциации; антигемолитическую активность PRK-001 определяли относительно таковой для Солириса®; +C5 – комплекс МАТ-белок C5 (см. раздел «Условия эксперимента», подраздел «Оценка эффекторных свойств МАТ»); –C5 – свободное МАТ, не связанное с белком C5. Даны значения ± стандартное отклонение.

Note: K_d is the dissociation constant; antihemolytic activity of PRK-001 was determined relative to that for the reference drug, Soliris®; +C5 – antibody-C5 complex; –C5 – free antibody. The values ± standard deviation are given

препаратов Солирис® и PRK-001, проведенное с использованием *t*-критерия Стьюдента, показало отсутствие статистически значимых различий между ними. В экспериментах по моделированию гемолиза, исследованиях C5-связывающей активности, а также эффекторных свойств не выявлено статистически значимых различий между препаратами PRK-001 и Солирис®.

Таким образом, можно утверждать, что препараты PRK-001 и Солирис® биоподобны.

Разработка малых молекул биосимиляров, таких как инсулин, гормон роста, гранулоцит-колониестимулирующий фактор и др. – относительно несложная задача ввиду небольшого размера этих молекул и отсутствия посттрансляционных модификаций. В случае же с моноклональными антителами разработка биоподобного препарата сильно усложняется, во-первых, из-за высокомолекулярной многокомпонентной структуры антитела; во-вторых, из-за наличия посттрансляционных модификаций, в том числе гликозилирования; и, в-третьих, из-за мультифункциональности. Таким образом, при разработке биоподобного моноклонального антитела требуется привлечение множества методов, позволяющих с должной чувствительностью подтвердить полное подобие воспроизведенного препарата оригинальному [10].

В данной работе проведено сравнение двух препаратов на основе моноклонального антитела экулизумаб: PRK-001 (ООО «Фармапарк») в качестве воспроизведенного и Солирис® (Alexion Pharmaceuticals) в качестве референтного. В ходе работы проведено исследование их физико-химических и биологических свойств, а также оценен профиль примесей. Несмотря на различие продуцентов оригинального и биоподобного препаратов, выявлена их идентичность по исследованным параметрам, что свидетельствует об их подобии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведено сравнительное исследование препаратов моноклонального антитела экулизумаб: воспроизведенного, под обозначением PRK-001 (ООО «Фармапарк»), и референтного, под маркой Солирис® (Alexion Pharmaceuticals). Для подтверждения биоподобия этих двух препаратов использован комплекс методов, позволивший оценить их физико-химические характеристики, профиль примесей, а также биологическую активность. По результатам исследования воспроизведенный препарат – PRK-001 – можно считать подобным оригинальному – Солирис®.

ЛИТЕРАТУРА

1. Олефир Ю.В., Медуницын Н.В., Авдеева Ж.И., и др. Современные биологические/биотехнологические лекарственные препараты. Актуальные вопросы разработки и перспективы использования. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*, 2016, 16(2), 67–77.
2. Кулагин А.Д., Лисуков И.А., Птушкин В.В. и др. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению пароксизмальной ночной гемоглобинурии. *Онкогематология*, 2014, 9(2), 20–28. doi: 10.17650/1818-8346-2014-9-2-20-28
3. Wang X., Mathieu M., Brezski R.J. IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions. *Protein Cell*, 2017, 9(1), 63–73. doi: 10.1007/s13238-017-0473-8
4. Santarone S., Vacigalupo A., Risitano A. M., et al. Hematopoietic stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: long-term results of a retrospective study on behalf of the Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO). *Haematologica*. 2010, 95, 983–988. doi: 10.3324/haematol.2009.017269
5. Parker C., Omine M., Richards S., et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 2005, 106(12), 3699–3709. doi: 10.1182/blood-2005-04-1717
6. Rother R.P., Rollins S.A., Mojcik C.F., et al. Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nat. Biotechnol.*, 2007, 25(11), 1256–1264. doi: 10.1038/nbt1344
7. Mancuso S., Sucato G., Carlisi M., et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: when delay in diagnosis and long therapy occurs. *Hematol. Rep.*, 2018, 10(7523), 32–34. doi: 10.4081/hr.2018.7523
8. Coyle D., Cheung M.C., Evans G.A. Opportunity cost of funding drugs for rare diseases: the cost-effectiveness of eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Med. Decis. Making*, 2014, 34(8), 1016–1029. doi: 10.1177/0272989X14539731
9. Kirchhoff C.F., Wang X.M., Conlon H.D., et al. Biosimilars: key regulatory considerations and similarity assessment tools. *Biotechnol. Bioeng.*, 2017, 114(12), 2696–2705. doi: 10.1002/bit.26438
10. Руководство по экспертизе лекарственных средств, том IV [Под редакцией А.Н. Миронова]. М.: ПОЛИГРАФ-ПЛЮС, 2014, 172 с.
11. Goormaghtigh E., Gasper R., Benard A., et al. Protein secondary structure content in solution, films and tissues: redundancy and complementarity of the information content in circular dichroism, transmission and ATR FTIR spectra. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, 1794(9), 1332–1343. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.06.007
12. Прудникова Е.Ю., Порошин Г.Н., Кудина Н.К. и др. Разработка и валидация метода оценки специфической антигемолитической активности препарата экулизумаб (Солирис). *Фармация и фармакология*, 2016, 4(6), 54–71. doi: 10.19163/2307-9266-2016-4-6-54-71
13. Kükrcer B., Filipe V., van Duijn E., et al. Mass spectrometric analysis of intact human monoclonal antibody aggregates fractionated by size-exclusion chromatography. *Pharm. Res.*, 2010, 27(10), 2197–2204. doi: 10.1007/s11095-010-0224-5
14. Moritz B., Stracke J.O. Assessment of disulfide and hinge modifications in monoclonal antibodies. *Electrophoresis*, 2017, 38(6), 769–785. doi: 10.1002/elps.201600425
15. Japelj B., Ilc G., Marušič J., et al. Biosimilar structural comparability assessment by NMR: from small proteins to monoclonal antibodies. *Sci. Rep.*, 2016, 6(32201), 1–12. doi: 10.1038/srep32201
16. Wuthrich K. NMR of Proteins and Nucleic Acids. New York, USA: John Wiley & Sons Inc., 1986, 320 p.
17. Nobbmann U., Connah M., Fish B., et al. Dynamic light scattering as a relative tool for assessing the molecular integrity and stability of monoclonal antibodies. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 2007, 24(1), 117–128. doi: 10.1080/02648725.2007.1064809
18. Мыца Е.Д., Чертова Н.В., Эльберт Е.В. и др. Молекулярно-биологические методы контроля качества субстанций биологических лекарственных препаратов, полученных с использованием технологии рекомбинантной ДНК. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*, 2018, 18(2), 75–80. doi: 10.30895/2221-996X-2018-18-2-75-80
19. Champion K., Madden H., Dougherty J., Shacter E. Defining your product profile and maintaining control over it, Part 2. *BioProcess Int.*, 2005, 3(8), 52–57.
20. Hogwood C.E., Bracewell D.G., Smales C.M. Measurement and control of host cell proteins (HCPs) in CHO cell bioprocesses. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2014, 30, 153–160. doi: 10.1016/j.copbio.2014.06.017
21. Ruiz-Delgado G.J., Vázquez-Garza E., Méndez-Ramírez N., Gómez-Almaguer D. Abnormalities in the expression of CD55 and CD59 surface molecules on peripheral blood cells are not specific to paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology*, 2009, 14(1), 33–37. doi: 10.1179/102453309X385089
22. Reher D., Fuhrmann V., Kluge S., Nierhaus A. A rare case of septic shock due to *Neisseria meningitidis* serogroup B infection despite prior vaccination in a young adult with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria receiving eculizumab. *Vaccine*, 2018, 36 (19), 2507–2509. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.03.087
23. Martin P.L., Bugelski P.J. Concordance of preclinical and clinical pharmacology and toxicology of monoclonal antibodies and fusion proteins: soluble targets. *Br. J. Pharmacol.*, 2012, 166(3), 823–846. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01811.x

Analytical comparison of Soliris® and its biosimilar, PRK-001

A. D. ASKRETKOV^{1,*}, M. A. ZHUCHENKO^{1,**}, N. V. ORLOVA², D. I. ZYBIN¹, V. V. NIKOLAEVA¹,
A. A. KLISHIN², N. V. LOBANOVA², V. O. SOLDATOV³, N. A. ROMANOVA¹, Y. A. SEREGIN²

¹LLC «Pharmapark», Moscow, 117246 Russia

²State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National Research Center «Kurchatov Institute» (NRC «Kurchatov Institute» - GOSNIIGENETIKA), Moscow, 117545 Russia

³Belgorod State University, Belgorod, 308015 Russia

**e-mail*: askretkov.a.d@gmail.com,

***e-mail*: maksim.zhuchenko@pharmapark.ru

Received December 05, 2019

Revised December 24, 2019

Accepted February 10, 2020

Abstract—Soliris® (Eculizumab) was approved by regulatory authorities as the first drug for treatment of orphan disease, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, in 2007. Later its use was extended for treatment of atypical hemolytic-uremic syndrome and myasthenia gravis. The high cost, the unavailability of therapy for a number of patients, as well as the expiration of the patent protection period for Soliris®, these factors became the prerequisite for the development of biosimilar medicinal products. Here, comparative analysis of PRK-001 (LLC «Pharmapark») and reference drug product, Soliris® (Alexion Pharmaceuticals, USA), was carried out. Physicochemical biosimilarity assessment has shown complete comparability of both products in terms of protein sequence as well as higher order structures. Post-translation modifications as well as impurity profile were the same too. Neither biosimilar nor reference product had impurity amount exceeding threshold. Biological properties of the reference product and biosimilar were the same. Since the comparability of the both drugs has been proven, it can be assumed that PRK-001 is biosimilar of Soliris®.

Keywords: Eculizumab, Soliris, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, physicochemical comparison, post-translational modifications, biosimilar, drug product

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-1-73-86