

УДК 615.275.4



ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ БИОАНАЛОГА РОМИПЛОСТИМА

А.Н. Афанасьева¹, В.Б. Сапарова^{1,2}, Д.Д. Карал-оглы³, Е.И. Мухаметзянова³,
Д.В. Куркин⁴, А.В. Калатанова¹, И.Е. Макаренко^{1,2}, А.Л. Хохлов⁵, И.А. Луговик¹

¹ Закрытое акционерное общество «Фарм-Холдинг»,
198515, Россия, г. Санкт-Петербург, пос. Стрельна, ул. Связи, д. 34-А

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
127473, Россия, г. Москва, ул. Делегатская, д. 20/1

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт медицинской приматологии»,
354376, Россия, г. Сочи, с. Весёлое, ул. Мира, стр. 177

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1

⁵ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Ярославский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
150000, Россия, Ярославская область, г. Ярославль, ул. Революционная, д. 5

E-mail: Alina.Afanaseva@geropharm.com

Получена 04.07.2022

После рецензирования 20.08.2022

Принята к печати 26.08.2022

Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура – это хроническое аутоиммунное гематологическое заболевание, обусловленное повышенным разрушением тромбоцитов и ассоциированной тромбоцитопенией, для лечения которого применяется импортный препарат ромиплостим. Создание биоаналога данного препарата может способствовать снижению стоимости терапии и доступности большему числу пациентов к лечению.

Цель. Сравнение показателей безопасности референтного препарата и его биоаналога в условиях *in vivo* и *in vitro*.

Материалы и методы. В *in vitro* исследовании сформирована модель «комплемент-зависимой цитотоксичности», индуцированного комплементом, на клеточной линии 32D hTPOR clone 63, с последующим измерением жизнеспособности клеток набором CellTiter Glo®. *In vivo* часть исследования была проведена на макаках яванских (*Macaca fascicularis*). В ходе эксперимента оценивали клиническое состояние, смертность, аппетит животных, массу тела, температуру тела, частоту дыхательных движений, также смотрели клинические показатели крови и мочи животных, дополнительно измерялись показатели гемостаза.

Результаты. В эксперименте *in vitro* оригинальный препарат ромиплостим и его биоаналог GP40141 сравнивали по значениям EC₅₀, которые не показали комплемент-зависимой цитотоксичности. По результатам *in vivo* не было зафиксировано отклонений в клиническом статусе животных и потреблении ими корма, летальности в группах не зафиксировано. По всем исследуемым показателям (масса и температура тела, частота дыхательных движений, клинический анализ мочи, клинический и биохимический анализы крови, коагуляционный гемостаз) GP40141 и ромиплостим, при введении их в дозах эквивалентных 10 ТД, оказывали сопоставимые эффекты.

Заключение. При сравнении показателей безопасности *in vitro* и *in vivo* оригинальный препарат ромиплостим и его биоаналог GP40141 показали аналогичные результаты.

Ключевые слова: ромиплостим; биоаналог GP40141; Энплейт®; комплемент-зависимая цитотоксичность; исследования безопасности препаратов; *in vivo*; *in vitro*; идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура; токсикологический профиль; тромбопоэтиновый рецептор; TPO-R

Список сокращений: ИТП – идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура; TPO – тромбопоэтин; TPO-R – тромбопоэтиновый рецептор; КЗЦ – комплемент-зависимая цитотоксичность; СК – система комплемента;

Для цитирования: А.Н. Афанасьева, В.Б. Сапарова, Д.Д. Карал-оглы, Е.И. Мухаметзянова, Д.В. Куркин, А.В. Калатанова, И.Е. Макаренко, А.Л. Хохлов, И.А. Луговик. Исследование безопасности биоаналога ромиплостима. *Фармация и фармакология*. 2022;10(4):354-370. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-354-370

© А.Н. Афанасьева, В.Б. Сапарова, Д.Д. Карал-оглы, Е.И. Мухаметзянова, Д.В. Куркин, А.В. Калатанова, И.Е. Макаренко, А.Л. Хохлов, И.А. Луговик, 2022

For citation: A.N. Afanasyeva, V.B. Saparova, D.D. Karal-ogly, E.I. Mukhametzyanova, D.V. Kurkin, A.V. Kalatanova, I.E. Makarenko, A.L. Khokhlov, I.A. Lugovik. Safety study of romiplostim biosimilar. *Pharmacy & Pharmacology*. 2022;10(4):354-370. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-354-370

КП – классический путь; БА – биологическая активность; СО – стандартный образец; ВКО – внутренний контрольный образец; ОИ – объект испытания; EC_{50} – полумаксимальная эффективная концентрация; IC_{50} – концентрация полумаксимального ингибирования; МАТ – моноклональные антитела; ЛП – лекарственный препарат; ЧДД – частота дыхательных движений; плотность – удельный вес; pH – водородный показатель; TP – общий белок; GLU – глюкоза; BIL – билирубин (в моче); UBG – уробилиноген; KET – кетоновые тела; RBC – количество эритроцитов; MCV – средний объем эритроцита; Hgb – гемоглобин; MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците; MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците; Hct – гематокрит; Plt – количество тромбоцитов; PCT – тромбокрит; MPV – средний объем тромбоцитов; PDW – относительная ширина распределения тромбоцитов по объему; WBC – лейкоциты; MON – моноциты; LYM – лимфоциты; NE – нейтрофилы; EO – эозинофилы; BA – базофилы; АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время; ПВ – протромбиновое время; ALP – щелочная фосфатаза; ALT – аланинаминотрансфераза; AST – аспартатаминотрансфераза; LDH – лактатдегидрогеназа; TB – общий билирубин (крови); UREA – мочевины; CRE – креатинин; CHOL – холестерин; TG – триглицериды; ; ALB – альбумин; GLB – глобулин; ALB/GLB – альбумин/глобулиновое соотношение; Mean – среднее статистическое; SD – стандартное отклонение; Т-тест – t-критерий Стьюдента; Me – медиана; Q1 – 1 квартиль; Q3 – 3 квартиль; U-критерий – U-критерий Манна-Уитни.

SAFETY STUDY OF ROMIPLOSTIM BIOSIMILAR

A.N. Afanasyeva¹, V.B. Saparova^{1,2}, D.D. Karal-ogly³, E.I. Mukhametzhanova³,
D.V. Kurkin⁴, A.V. Kalatanova¹, I.E. Makarenko^{1,2}, A.L. Khokhlov⁵, I.A. Lugovik¹

¹ Closed Joint-Stock Company “Farm-Holding”,

Bld. A, 34, Svyaz Str., Strelina Vil., St. Petersburg, Russia, 198515

² A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry,

Bld. 1, 20, Delegatskaya Str., Moscow, Russia, 127473

³ Scientific Research Institute of Medical Primatology,

Bld. 177, Mir Str., Vesoloye Vil., Sochi, Russia, 354376

⁴ Volgograd State Medical University,

1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russia, 400131

⁵ Yaroslavl State Medical University,

5, Revolutsionnaya Str., Yaroslavl, Russia, 150000

E-mail: Alina.Afanaseva@geropharm.com

Received 04 July 2022

After peer review 20 Aug 2022

Accepted 26 Aug 2022

Idiopathic thrombocytopenic purpura is a chronic autoimmune hematological disease caused by an increased destruction of platelets and associated thrombocytopenia, for the treatment of which the imported drug romiplostim is used. Creation of the drug biosimilar provides a reduction in the cost of therapy and an access for the treatment to more patients.

The aim of the study was to compare the safety indicators of the reference drug and its biosimilar *in vivo* and *in vitro*.

Materials and methods. In the *in vitro* study, a model of “complement-dependent cytotoxicity” induced by the complement was formed on the 32D hTPOR clone 63-cell line, followed by a cell viability measurement with the CellTiter Glo® kit. An *in vivo* part of the study was carried out on Javanese macaque monkeys (*Macaca fascicularis*). During the experiment, the clinical condition, mortality, appetite of the animals, their body weight, body temperature, respiratory rate were assessed, the clinical parameters of blood and urine of the animals were also monitored, and the hemostasis indicators were additionally measured.

Results. In the *in vitro* experiment, the original drug romiplostim and its biosimilar GP40141 were compared in terms of EC_{50} values. The indicators did not show complement-dependent cytotoxicity. According to the *in vivo* results, no deviations were recorded in the clinical status of the animals and their feed intake, and no lethality was fixed out in the groups either. For all the parameters studied (body weight and temperature, respiratory rate, clinical urinalysis, clinical and biochemical blood tests, coagulation hemostasis), GP40141 and romiplostim, when administered at the doses equivalent to 10 toxic doses (TDs), had comparable effects.

Conclusion. In the comparison of safety performance both *in vitro* and *in vivo*, the original drug romiplostim and its biosimilar GP40141 showed similar results.

Keywords: romiplostim; biosimilar GP40141; Nplate®; complement-dependent cytotoxicity; drug safety studies; *in vivo*; *in vitro*; idiopathic thrombocytopenic purpura; toxicological profile; thrombopoietin receptor; TPO-R

Abbreviations: ITP – idiopathic thrombocytopenic purpura; TPO – thrombopoietin; TPO-R – thrombopoietin receptor; CDC – complement-dependent cytotoxicity; CS – complement system; CP – classical pathway; BA – biological activity; RS – reference standard; ICS – internal control sample; TO – test object; EC_{50} – half maximal effective concentration; IC_{50} – half-maximal inhibitory concentration; MABs – monoclonal antibodies; MP – medicinal preparation; RR – respiratory rate; Density – specific density; pH – pH value; TP – Total protein; GLU – glucose; BIL – bilirubin (in urine); UBG – urobilinogen; KET – ketone bodies; RBC – red blood cell count; MCV – mean cell volume; Hgb – hemoglobin; MCH – mean cell hemoglobin; MCHC – mean

corpuscular hemoglobin concentration; HCT – hematocrit; PLT CNT – platelet count; PCT – plateletcrit; MPV – mean platelet volume; PDW – platelet distribution width; WBCs – white blood cells/leucocytes; MON – monocytes; LYM – lymphocytes; NEU – neutrophils; EOS – eosinophils; BA – basophils; APTT – activated partial thromboplastin time; PT – prothrombin time; AP – alkaline phosphatase; ALT – alanine transaminase; AspAT – aspartate aminotransferase; LDH – lactate dehydrogenase; TB – total bilirubin (blood); UREA – urea; CRE – creatinine; CHOL – cholesterol; TG – triglycerides; alb – albumine; GLB – globulin; ALB/GLB – albumin/globulin ratio; SM – statistical mean; SD – standard deviation; t-test – Student's t-test; Me – median; Q1 – quartile 1; Q3 – quartile 3; U-test – Mann-Whitney U-test.

ВВЕДЕНИЕ

Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТП) – это тяжелое заболевание, которое характеризуется тромбоцитопенией ($<100 \times 10^9/\text{л}$) и требует для поддержания свёртываемости крови стимуляторов тромбопоэза [1–3]. В настоящее время на территории Российской Федерации (РФ) зарегистрировано всего 2 препарата, относящихся к этой группе – Энплейт® (Nplate, AMGEN EUROPE, B.V.)¹ и Револейд® (Revolade, NOVARTIS PHARMA, AG)². Действующее вещество препарата Энплейт® – ромиплостим – было многократно проверено на эффективность и показало свою терапевтическую активность при лечении идиопатической тромбоцитопенической пурпуры. Это позволило пациентам получать современную терапию, улучшающую качество жизни [1, 4–6]. Однако этот препарат производится за пределами РФ, что повышает его стоимость для потребителя, а при создании биоаналога используются более новые технологии, что в конечном счёте влияет на стоимость их производства [7]. Поскольку при ИТП приём стимуляторов тромбопоэза требуется постоянно [3, 8], их наличие и экономическая доступность являются жизненно важными для пациентов. Создание биоаналога ромиплостима позволит повысить доступность лечения на территории РФ.

Ромиплостим (Рис. 1) представляет собой пептидное антитело, содержащее четыре связывающих TPO-R (тромбопоэтиновый рецептор, MPL) домена с высокой аффинностью к TPO-R и один домен IgG1 Fc-носителя, которое не имеет гомологии последовательностей с эндогенным тромбопоэтином (TPO) [9–11]. Ромиплостим связывается и активирует TPO-R на предшественниках мегакариоцитов в костном мозге. Он связывается так же, как эндогенный TPO, и может вытеснять TPO из связи с рецептором. Ромиплостим, аналогично TPO, активирует многие из тех же путей, что приводит к устойчивому повышению количества тромбоцитов [9, 12–15]. Гораздо меньше известно об эффектах, опосредованных Fc-областью молекулы ромиплостима. Например, одним из

возможных вариантов может быть комплемент-зависимая цитотоксичность (КЗЦ), поскольку этот механизм реализован в моноклональных антителах (МАТ) посредством связывания Fc-фрагмента для активации системы комплемента [16–18].

Известно, что система комплемента (СК) является неотъемлемой частью как врожденной, так и адаптивной иммунной системы. Этот комплекс состоит из группы белков плазмы, которые взаимодействуют каскадным образом [19]. СК может быть активирована тремя разными путями, один из которых – классический путь (КП) обычно активируется антителами. Он опосредует специфические иммунные реакции и функционирует как часть адаптивного иммунитета. КП запускается тогда, когда молекула комплемента C1q связывается с Fc-частями антигена. Связывание с антителом вызывает конформационные изменения в молекуле C1q, приводящие к активации двух протеаз C1r и дальнейшему распаду двух молекул C1s (другая сериновая протеаза). Комплекс C1 теперь связывается с C2 и C4 и расщепляет их. Продукт C4b ковалентно связывается с клеточной поверхностью и образует комплексы C4bC2. Активированные C1s далее расщепляют C4bC2 и генерируют C4bC2a, которая представляет собой конвертазу C3/C5 КП. Затем, если активация комплемента не ограничена, она переходит к образованию мембранно-атакующего комплекса (МАК) и лизису клетки-мишени [19].

Общепризнано, что (МАТ) могут опосредовать эффекты, которые невозможно полностью выявить с помощью исследований *in vitro*, что обуславливает целесообразность проведения исследований биозеквивалентности на животных³.

ЦЕЛЬ. Изучение *in vitro* и *in vivo* безопасности биоаналога ромиплостима GP40141 в сравнении с референтным препаратом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

In vitro определение

комплемент-зависимой цитотоксичности

КЗЦ для препаратов ромиплостима оценивали в сравнении с показательным методом КЗЦ для препарата ритуксимаб. Этот препарат

¹ Государственный реестр Лекарственных средств Российской Федерации. Энплейт®. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=e7a25c3e-1caa-44c0-81fe-5967882a071a.

² Государственный реестр Лекарственных средств Российской Федерации. Револейд®. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=e021350c-54ad-4b52-b1fe-28b4e4fd0f9e.

³ Решение ЕЭК от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза». 2016. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_207925/.

представляет собой химерное MAT, специфически связывающееся с антигеном CD20 на поверхности нормальных и злокачественных В-лимфоцитов и инициирующее иммунологические реакции, которые опосредуют лизис В-клеток. Один из рабочих механизмов препарата идёт через КЗЦ [20]. В тесте КЗЦ для ромиплостима в качестве тест-системы использовали клеточную линию лимфобластов мыши (*Mus musculus*) со стабильной экспрессией TPO рецептора человека 32D hTPOR clone 63 (Selvita Group). Эффект комплемент-зависимой цитотоксичности сравнивался для оригинального препарата ромиплостима (AMGEN, Нидерланды) и его биоаналога GP40141 (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия). Концентрацию комплемента подбирали исходя из отсутствия токсичности самого комплемента на клетки, в результате выбрали разбавление 1:14.

В первый день эксперимента проводили рассев клеток и внесение объектов испытания (ОИ) с комплементом сыворотки крови кролика (Cedarlane, CL3441-S50). Для ОИ были подобраны концентрации, которые используются для оценки специфической биологической активности (БА) на клеточной линии 32D-hTPOR clone (63: 10; 3,3; 1,1; 0,4; 0,1; 0,04; 0,005; 0,002; 0,001; 0,0002 нг/мл). Данные концентрации добавлялись в среду для анализа RPMI Basal, состоящей из RPMI 1640 (Биолот, 1.3.4.), 1 mM ХЕПЕС (Биолот, 1.2.6.1.), 10 mM пирувата натрия (Биолот, 1.4.004.), до 1,5 г/л бикарбоната натрия (Sigma-Aldrich, S5761), до 4,5 г/л глюкозы безводной (PanReas AppliChem, 141341), пенициллин-стрептомицин (Биолот, 1.3.18.), к которой добавляли 10% эмбриональной бычьей сыворотки FBS (Capricorn, FBS-11A). После приготовления ОИ подготавливали комплемент сыворотки крови кролика с разбавлением 1:14 и рассевали линию в лунки 96-луночного белого планшета (Corning, 3917) в концентрации 5000 клеток/лунка, подсчёт клеток проводили с помощью счётчика клеток Countess II FL (ThermoFisher Scientific, США). Добавляли к клеткам в разные лунки ОИ с комплементом и ОИ без комплемента. Инкубировали 24±4 ч при 37°C и 5% диоксидом углерода. Затем остужали планшет до комнатной температуры в течение 1 ч и вносили в каждую лунку реагент CellTiter-Glo (Promega, G7571) в эквивалентном соотношении с культуральной жидкостью. Клетки лизировали механически на орбитальном шейкере в течение 2 мин также при комнатной температуре. Затем инкубировали планшеты в течение 10 мин для стабилизации люминесцентного сигнала, после чего регистрировали люминесценцию на мультимодальном микропланшетном ридере CLARIOstar (BMG Labtech, Германия). Настройки на приборе включали Presets Ultra Glo, время интегрирования – 0,4 сек на 1 лунку.

В тесте КЗЦ для ритуксимаба в качестве

тест-системы использовали клеточную линию В-лимфобластов человека WIL2-S. В качестве ОИ использовали стандартный образец (СО) ритуксимаба (Mabxiense, Испания) и внутренний контрольный образец ритуксимаба (ВКО). В первый день эксперимента аналогично с КЗЦ для ромиплостима, проводили рассев клеток и внесение ОИ с комплементом сыворотки крови кролика. Для КЗЦ ритуксимаба концентрация комплемента была подобрана в соотношении 1:7, в которой отсутствовала токсичность самого комплемента. Для ОИ были подобраны концентрации 5000, 2000, 800, 320, 128, 51, 20, 8, 3, 1,3, и 0,5 нг/мл, разбавление которых проводили в аналогичной с КЗЦ для ромиплостима среде анализа. После приготовления ОИ подготавливали комплемент сыворотки крови кролика и рассевали линию в лунки 96-луночного черного планшета (Corning, 3603, США) в концентрации 10000 клеток/лунка. Инкубировали планшет при 37°C и 5% диоксиде углерода в течение 2 ч, а затем добавляли alamarBlue™ Cell Viability Reagent (Thermo Fisher Scientific, DAL1100, США) и снова ставили инкубировать до 24 часов. По истечении времени регистрировали флуоресценцию на мультимодальном микропланшетном ридере CLARIOstar. Анализ данных для двух тестов проводился в интегрированном программном обеспечении MARS Data Analysis, а статистический анализ в программе GraphPad Prism 9.3.1.471, где нормировали данные в процентах относительно нулевого контроля, затем строили четырехпараметрическую кривую зависимости доза-реакция для подсчета величины EC₅₀ (полумаксимальная эффективная концентрация).

In vivo исследование безопасности

Исследование проводилось на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт приматологии» (г. Сочи, Россия) в строгом соответствии со стандартами Rus-LASA^{4,5} [20]. Проведение исследования было одобрено независимым локальным этическим комитетом (выписка из протокола № 61 от 09.02.2021).

В качестве тест системы были использованы клинически здоровые макаки яванские (*Macaca fascicularis*). ОИ филогенетически достаточно близки человеку и, при этом, в рамках доклинических исследований безопасности оригинального препарата у них не отмечалось образования нейтрализующих антител к ромиплостиму, в отличие от крыс, мышей и макак-резусов в исследованиях аналогичной продолжительности, что позволяет в

⁴ ГОСТ 33218-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за нечеловекообразными приматами, 2014.

⁵ ГОСТ 33215-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур, 2014.

наибольшей степени предсказать риски, связанные с первичной фармакодинамикой у людей⁶. Все это позволило рассматривать данных животных как наиболее релевантных для сравнительного исследования безопасности.

В соответствии с решением Совета ЕЭК 8,9 при формировании экспериментальных групп необходимо придерживаться гибкого подхода – допустимо использовать животных только одного пола и только одну дозу препаратов – что позволяет в полной мере следовать принципу Reduce (сокращение числа используемых животных) из основополагающих принципов гуманности 3R⁷. Однако применение подобных способов сокращения количества животных требует обоснования. Животные одного пола были использованы в силу того, что токсикологический профиль оригинального препарата ромиплостим не различался между самцами и самками в рамках многочисленных токсикологических экспериментов, что указывает на отсутствие специфических токсических проявлений, связанных с полом⁸. Из этого следует, что введение животных двух полов не приведет к получению дополнительной информации о безопасности вещества и противоречит биоэтическому принципу Reduce. Следующим шагом к сокращению количества животных стало упразднение контрольной группы. Согласно Решению Директивы ЕС 89, допустимо проводить исследование с измененным дизайном (используя лишь одну дозу биоаналогичного (биоподобного) лекарственного препарата (ЛП) и оригинального (референтного) ЛП. Для того, чтобы сравнивать динамику показателей животных, проводилось снятие всех основных лабораторных и функциональных показателей до начала дозирования для того, чтобы исходные данные животных выступали некоторым контролем последующих точек измерения.

В связи с этим, для эксперимента отобрали 12 половозрелых самцов массой 2,65–3,95 кг. Животных делили на группы по уровню тромбоцитов, который был измерен за 7 дней до введения препаратов, после чего, для устранения предпочтений исследователя, экспериментальные группы были составлены путем рандомизации животных из сформированных групп. Животные были разделены на 2 группы, по 6 самцов в каждой. Группа 1 получала биоаналог GP40141, группа 2 – оригинальный препарат ромиплостим (табл. 1).

При подборе доз в рамках исследований

безопасности критически важной точкой является выбор дозировки и кратности введения объекта испытаний и контрольного образца, так как, с одной стороны, они должны позволить в полной мере оценить потенциальные неблагоприятные последствия и этим самым обезопасить участников клинических исследований, а, с другой стороны, не быть излишними, не допуская напрасных страданий животных в рамках исследований^{9,10,11}. В связи с этим, в качестве разумного компромисса, была выбрана дозировка 100 мкг/кг, так как она позволяет значительно (в 10 раз) превысить терапевтическую дозу для клинического применения¹² и использовалась в более ранних исследованиях безопасности оригинального препарата ромиплостим¹³. Данная доза была напрямую экстраполирована из клинической практики на животных, коэффициент пересчета доз не применялся.

Препараты вводили многократно, на протяжении 28 дней с кратностью 1 раз в 72 ч, так как данная кратность введения повторяет дизайн исследования оригинального препарата ромиплостим и позволяет добиться стабильной системной экспозиции в плазме животных¹⁴. Содержимое флакона с объектами испытания и СО представляло собой порошок, разведенный в 0,72 мл стерильной водой для инъекций с целью получения концентрации 250 мкг/0,5 мл (500 мкг/мл) сразу после приготовления. Препараты конкретному животному вводились в одно и то же место на протяжении всего исследования (28 дней).

Кормление и содержание животных осуществлялось в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. На протяжении всего эксперимента животные содержались в индивидуальных клетках, на которых указывались инвентарный номер животного, группа и пол. Клетки были оборудованы центральным водопроводом. Температура окружающего воздуха была 21–28°C, относительная влажность 40–70%, естественная продолжительность светового дня (г. Сочи). Рацион животных состоял из гранулированного корма, яиц, сухофруктов, свежих фруктов и хлеба. Кормление осуществляли в три этапа: 8–9 ч гранулированная кормовая смесь; 11–12 ч сочные корма, рисовая каша

⁶ CHMP assessment report for Nplate. Procedure No. EMEA/H/C/942. EMEA/654269/2008. 2022. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/nplate-epar-public-assessment-report_en.pdf.

⁷ Директива Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, использующихся для научных целей. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ%3AL%3A2010%3A276%3A0033%3A0079%3Aen%3APDF>

⁸ Решение ЕЭК от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

⁹ Там же.

¹⁰ Product monograph including patient medication information Nplate® romiplostim for injection. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.amgen.ca/-/media/Themes/CorporateAffairs/amgen-ca/amgen-ca/documents/products/en/nplate_pm.pdf.

¹¹ CHMP assessment report for Nplate. Procedure No. EMEA/H/C/942. EMEA/654269/2008, 2022.

¹² Решение ЕЭК от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

¹³ Там же.

¹⁴ Там же.

и печенью; 14–15 ч гранулированная кормовая смесь. Вода предоставлялась *ad libitum* и соответствовала требованиям СанПиН 2.1.4.1074-01, ГН 2.1.5.1315-03, ГН 2.1.5.2280-07^{15,16,17}.

В ходе исследования ежедневно оценивались смертность, внешний вид (кожа, шерсть, глаза, нос, дыхание, стул, слизистые оболочки, положение тела, поведение и координация) и потребление корма. Масса, температура тела, частота дыхательных движений (ЧДД) оценивались в 0, 15 и 29 суток вместе с отбором проб мочи и крови животных.

Отбор проб мочи осуществляли с поддона клетки в пробирки. Анализировали следующие показатели: цвет, прозрачность, удельный вес (плотность), водородный показатель pH, белок (UP), глюкоза (GLU), билирубин (BIL), кетоновые тела (KET), эритроциты (ERY), лейкоциты (LEY), уробилиноген (UBG). Анализ проводили на анализаторе DocUReader 2 PRO с использованием тест-полосок этой же фирмы.

Отбор проб крови для клинического анализа осуществляли в капиллярные пробирки Microvette Sarstedt, 200 мкл, с КЗ-ЭДТА. В образцах крови экспериментальных животных определяли следующие показатели: гемоглобин (Hgb), количество эритроцитов (RBC), количество лейкоцитов (WBC), лейкоцитарную формулу (LYM), моноциты (MON), нейтрофилы (NE), эозинофилы (EO), базофилы (BA), количество тромбоцитов (Plt), гематокрит (Hct), средний объем эритроцита (MCV), среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), тромбокрит (PCT), средний объем тромбоцитов (MPV), относительная ширина распределения тромбоцитов по объему (PDW). Анализ проводился на автоматическом гематологическом анализаторе МЕК 7300К (ООО «ЭКО-МЕД-С М», Россия). Для анализа использовались реагенты для гематологического анализатора фирмы Nihon Kohden (Firenze S.r.l. Италия). Подсчет количества клеток производился методом объемного сопротивления; концентрация гемоглобина определялась спектрофотометрическим методом; гематокрит, тромбокрит, ширина распределения эритроцитов и тромбоцитов вычислялись по гистограммам.

Для определения биохимических показателей за 18 ч до отбора проб крови животных лишали корма, сохраняя свободный доступ к воде. Взятие крови осуществляли в пробирки для получения

сыворотки с активатором сгустка и гелем VACUETTE (5 или 8 мл) из левой паховой вены. Из крови получали сыворотку обычным методом: инкубация при комнатной температуре 30 мин, центрифугирование – при 3500 об/мин. Оценивали следующие параметры: аланинаминотрансфераза (ALT), аспартатаминотрансфераза (AST), коэффициент де Ритиса, общий белок (TP), альбумин (ALB), глобулин (GLB), соотношение альбумин/глобулин (ALB/GLB), щелочная фосфатаза (ALP), билирубин общий (TB), общий холестерин (CHOL), креатинин (CRE), глюкоза (GLU), лактатдегидрогеназа (LDH), триглицериды (TG), натрий (Na⁺), калий (K⁺), мочевины (UREA). Биохимический анализ крови проводился на биохимическом анализаторе BioLit-8020 (URIT Medical Electronic Group Co., Ltd, Китай). Для анализа использовались реагенты производства фирмы DAC, Молдова. Используемый метод измерения – колориметрия (кинетика, конечная точка).

Для проведения коагулометрического анализа кровь отбирали в вакуумные пробирки S-Monovette® (Германия) с поршнем объемом 1,4 мл. Для исследования влияния на свертывающую систему крови анализировали активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ), фибриноген. Анализ на коагуляционный гемостаз проводился на коагулометре TS 4000 Plus (Россия). Метод определения ПВ-клоттинговый, основан на определении времени свертывания цитратной плазмы крови под действием смеси тромбопластина и ионов кальция. Метод определения АЧТВ: к исследуемой плазме крови последовательно добавляют реагент, представляющий собой водный раствор эллаговой кислоты в комплексе с соевыми фосфолипидами, и кальций хлористый. В процессе измерения АЧТВ регистрировали время от момента добавления ионов кальция до момента образования сгустка. Фибриноген определяли методом Клаусса.

Статистическая обработка результатов анализа

Статистическая обработка данных *in vivo* части проводилась с помощью пакетов программного обеспечения R версии 3.5.2. Для всех данных была применена описательная статистика: данные проверяли на соответствие закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk's W-test). В случае нормального распределения рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение, которые вместе со значением n (количество наблюдений) представлены в итоговых таблицах. В случае несоответствия данных закону нормального распределения рассчитывали медиану и квартильный размах. При выявлении межгрупповых отличий в данных с признаками нормального распределения использовали t-критерий Стьюдента, а в данных с признаками ненормального распределения U-критерий Манна-Уитни.

¹⁵ СанПиН 2.1.4.1074-01. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/901798042>

¹⁶ ГН 2.1.5.1315-03 Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4294815/4294815336.pdf>

¹⁷ ГН 2.1.5.2280-07 Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://pravo.gov.ru>.

Таблица 1 – Схема распределения экспериментальных животных по группам

№ группы	Животные		Объект испытаний/ контрольный образец	Способ введения	Доза, мкг/кг	Продолжительность введения
	Пол	Количество в группе				
1	♂	6	GP40141	подкожно	100	28 дней,
2	♂	6	Ромиплостим		100	1 раз в 72 часа

Примечание. ♂ – мужской пол.

Таблица 2 – Показатели относительной активности КЗЦ для ромиплостима

Образец	EC ₅₀ , нг/мл	R ²	Относительная активность, %
GP40141 (нг/мл) + комплемент (1:14)	0,128	0,995	72%
GP40141 (нг/мл)	0,093	0,989	n/a
Ромиплостим (нг/мл) + комплемент (1:14)	0,084	0,994	87%
Ромиплостим (нг/мл)	0,073	0,992	n/a
Образец	IC ₅₀ , нг/мл	R ²	Относительная активность, %
Ритуксимаб RM-RX-03 + комплемент (1:7)	125,6	0,951	n/a
Ритуксимаб RM-RX-02 + комплемент (1:7)	121,7	0,948	n/a

Примечание: n/a – не применимо, R² – коэффициент детерминации, EC₅₀ – полумаксимальная эффективная концентрация, IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования. Подсчёт EC₅₀ и IC₅₀ проводился по 11 концентрационным точкам в 3-х повторностях.

Таблица 3 – Динамика изменения среднего веса (г) экспериментальных животных по группам, n=6

Группа	Параметр	День измерений		
		0	15	29
GP40141 (группа 1)	Mean±SD	3483±397,1	3525±248,5	3600±249,0
	T-тест, р Фон /День	n/a	0,83	0,56
Ромиплостим (группа 2)	Mean±SD	3150±405,0	3116,7±469,8	3158±453,2
	T-тест, р Фон /День	n/a	0,90	0,97
	T-тест, р, гр. 1/гр. 2	0,07	0,06	0,05

Примечание: Mean – среднее статистическое, SD – стандартное отклонение, T-тест – t-критерий Стьюдента.

Таблица 4 – Динамика изменения средней температуры тела экспериментальных животных по группам, n=6

Группа	Параметр	День измерений		
		0	15	29
GP40141 (группа 1)	Mean±SD	38,68±0,24	38,80±0,18	38,63±0,26
	T-тест, р Фон/День	n/a	0,36	0,74
Ромиплостим (группа 2)	Mean±SD	38,68±0,35	38,60±0,27	38,50±0,36
	T-тест, р Фон/День	n/a	0,79	0,39
	T-тест, р, гр. 1/гр. 2	1,0	0,24	0,48

Примечание: Mean – среднее статистическое, SD – стандартное отклонение, T-тест – t-критерий Стьюдента.

Таблица 5 – Динамика изменения средней ЧДД/мин экспериментальных животных по группам, n=6

Группа	Параметр	День измерений		
		0	15	29
GP40141 (группа 1)	Mean±SD	39,00±4,10	34,83±4,83	32,17±2,48
	T-тест, р Фон/День	n/a	0,14	0,006
Ромиплостим (группа 2)	Mean±SD	34,17±2,71	33,50±3,02	32,83±2,14
	T-тест, р Фон/День	n/a	0,70	0,37
	T-тест, р, гр. 1/гр. 2	0,04	0,58	0,63

Примечание: Mean – среднее статистическое, SD – стандартное отклонение, T-тест – t-критерий Стьюдента.

Таблица 6 – Динамика показателей общего анализа мочи, n=6

Гр.	Дата	Параметр	Показатели							
			Плотность, г/мл	pH	UP, мг/дл	GLU, мл/дл	LEY, кл/мкл	BIL, мл/дл	UBG, мг/дл	KET, мг/дл
GP40141 (группа 1)	Фон	Me (Q ₁ ; Q ₃)	1 (1;1)	8,0 (7,0; 8,6)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)
	15 дней	Me (Q ₁ ; Q ₃)	1 (1;1)	9,0 (8,9; 9,0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)
	29 дней	Me (Q ₁ ; Q ₃)	1 (1;1)	8,25 (7,5; 8,5)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)
		Критерий Фридмана, p	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Ромиплостим (группа 2)	Фон	Me (Q ₁ ; Q ₃)	1 (1;1)	8,0 (7,4; 9,0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)
	15 дней	Me (Q ₁ ; Q ₃)	1 (1;1)	8,5 (8,4; 9,0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)
		U-критерий, p 1 гр./2 гр.	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	29 дней	Me (Q ₁ ; Q ₃)	1 (1;1)	8,25 (6,9; 8,6)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)
		Критерий Фридмана, p	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
		U-критерий, p 1 гр./2 гр.	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Примечание: Me – медиана; Q₁ – 1 квартиль; Q₃ – 3 квартиль; U-критерий – U-критерий Манна-Уитни; TP – Общий белок; GLU – глюкоза; LEY – лейкоциты; BIL – билирубин; UBG – уробилиноген; KET – кетоновые тела.

Таблица 7 – Частота проявления эритроцитов в моче (5–10 клеток/мкл), по результатам общего анализа мочи, n=6

День измерений	GP40141 (группа 1)	Ромиплостим (группа 2)	Точный критерий Фишера (межгрупповой анализ), p
Фон	1/6	1/6	>0,05
15 сутки	1	1/6	>0,05
29 сутки	1	1	>0,05
Точный критерий Фишера (внутригрупповой анализ), фон/15 сутки, p	>0,05	>0,05	–
Точный критерий Фишера (внутригрупповой анализ), фон/29 сутки, p	>0,05	>0,05	–

Таблица 8 – Внутрिलाбораторные нормы для показателей общего анализа мочи

Показатель, единица измерений	Диапазон значений
Удельный вес (плотность), г/мл	1,0–1,030
Водородный показатель (pH)	5–9
Общий белок (TP), мг/дл	0–15
Глюкоза (GLU), мл/дл	0–40
Эритроциты (ERY), кл/мкл	0–10
Лейкоциты (LEY), кл/мкл	0–20
Билирубин (BIL), мл/дл	0–0,5
Уробилиноген (UBG), мг/дл	0–1,8
Кетоновые тела (KET), мг/дл	0–50

Таблица 9 – Гематологические показатели экспериментальных животных по группам, n=6

Гр.	Дата	Параметр	Показатели									
			RBC, 10 ¹² /л	MCV, фл	Hgb, г/л	MCH, пг	MCHC, г/л	Hct, %	Plt, ×10 ⁹ /л	PCT, %	MPV, фл	PDW, %
GR40141 (группа 1)	Фон	Mean±SD	6,6±0,56	63,7±4,55	126±4,4	19,3±1,70	303±6,9	41,5±1,24	309±68,0	0,2±0,04	8,0±0,75	16,5±0,36
		Mean±SD	6,1±0,62	63,8±4,86	115±2,1	18,9±1,73	297±7,7	38,7±1,57	757±183,2	0,5±0,09	7,0±0,66	17,8±0,74
	15 дней	T-тест, р	0,24	0,97	0,0003	0,71	0,21	0,006	0,0002	<0,0001	0,03	0,003
		Фон/15 дней										
	29 дней	Mean±SD	5,8±0,28	62,7±4,83	109±7,0	19,0±1,70	303±7,1	36,2±2,06	717±153,6	0,5±0,07	6,4±0,66	17,3±0,72
		T-тест, р	0,01	0,74	0,0007	0,73	0,84	0,0003	0,0001	0,0001	0,002	0,04
Ромиплостим (группа 2)	Фон	Mean±SD	6,6±0,53	63,2±2,45	123±4,4	18,8±1,02	298±6,7	41,4±2,24	308±99,5	0,2±0,06	7,7±0,75	16,9±0,93
		Mean±SD	6,4±0,57	63,0±2,93	120±7,6	18,7±1,22	297±8,5	40,4±2,91	818±249,5	0,6±0,16	7,0±0,39	17,8±0,85
	15 дней	T-тест, р	0,65	0,93	0,35	0,90	0,82	0,51	0,0009	0,0006	0,09	0,11
		Фон/15 дней										
	29 дней	T-тест, р	0,41	0,82	0,18	0,79	0,86	0,24	0,64	0,54	0,96	0,94
		гр.1/гр.2										
Ромиплостим (группа 2)	Фон	Mean±SD	5,6±0,48	62,3±2,71	105±5,3	18,7±1,24	300±10,5	35,0±2,62	661±194,3	0,5±0,12	7,0±0,42	17,5±0,98
		Mean±SD										
	15 дней	T-тест, р	0,009	0,56	<0,0001	0,92	0,66	0,001	0,003	0,002	0,08	0,34
		Фон/15 дней										
	29 дней	T-тест, р	0,03	0,66	0,003	0,98	0,56	0,007	0,25	0,19	0,89	0,52
		Фон/29 дней										
Ромиплостим (группа 2)	Фон	Mean±SD	0,50	0,84	0,22	0,78	0,66	0,39	0,59	0,91	0,08	0,69
		Mean±SD										
	15 дней	T-тест, р										
		Фон/15 дней										
	29 дней	T-тест, р										
		Фон/29 дней										

Примечание: Mean – среднее статистическое; SD – стандартное отклонение; T-тест – t-критерий Стьюдента; RBC – количество эритроцитов; MCV – средний объем эритроцитов; Hgb – гемоглобин; MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците; MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците; Hct – гематокрит; Plt – количество тромбоцитов; PCT – тромбокрит; MPV – средний объем тромбоцитов; PDW – относительная ширина распределения тромбоцитов по объему.

Таблица 10 – Лейкоцитарная формула экспериментальных животных по группам, n=6

Гр	Дата	Параметр	WBC, $\times 10^9$ /л	MON, %	LYM, %	NE, %	EO, %	BA, %
ГР40141 (группа 1)	Фон	Mean $\pm$ SD	9,5 $\pm$ 2,91	4,2 $\pm$ 1,13	34,4 $\pm$ 6,42	59,0 $\pm$ 6,89	1,9 $\pm$ 1,38	0,6 $\pm$ 0,41
		Mean $\pm$ SD	11,0 $\pm$ 2,53	4,4 $\pm$ 0,83	33,7 $\pm$ 6,00	59,0 $\pm$ 6,66	2,4 $\pm$ 1,41	0,6 $\pm$ 0,27
		T-тест, р Фон/15 дней	0,34	0,82	0,85	0,98	0,59	1,00
	15 дней	Mean $\pm$ SD	11,8 $\pm$ 2,65	4,7 $\pm$ 1,84	30,1 $\pm$ 5,87	63,0 $\pm$ 4,33	1,4 $\pm$ 0,67	0,8 $\pm$ 0,32
		T-тест, р Фон/29 дней	0,17	0,57	0,25	0,25	0,47	0,41
		T-тест, р 15/29 дней	0,60	0,65	0,32	0,25	0,18	0,31
Ромиплостим (группа 2)	Фон	Mean $\pm$ SD	9,2 $\pm$ 1,73	4,2 $\pm$ 1,06	35,4 $\pm$ 8,41	58,0 $\pm$ 7,60	1,6 $\pm$ 1,28	0,8 $\pm$ 0,27
		Mean $\pm$ SD	11,3 $\pm$ 2,25	3,9 $\pm$ 0,99	32,1 $\pm$ 10,08	61,9 $\pm$ 11,38	1,5 $\pm$ 0,96	0,6 $\pm$ 0,37
		T-тест, р Фон/15 дней	0,10	0,62	0,55	0,50	0,88	0,39
	15 дней	T-тест, р, гр. 1/гр. 2	0,87	0,43	0,75	0,61	0,26	0,93
		Mean $\pm$ SD	14,2 $\pm$ 5,53	5,2 $\pm$ 1,47	24,5 $\pm$ 14,08	67,4 $\pm$ 15,58	2,0 $\pm$ 2,87	0,9 $\pm$ 0,29
		T-тест, р Фон/29 дней	0,06	0,21	0,13	0,21	0,75	0,43
		T-тест, р 15/29 дней	0,26	0,11	0,31	0,50	0,68	0,15
	29 дней	T-тест, р, гр. 1/гр. 2	0,37	0,64	0,39	0,52	0,63	0,58

Примечание: Mean – среднее статистическое; SD – стандартное отклонение; T-тест – t-критерий Стьюдента; WBC – лейкоциты; MON – моноциты; LYM – лимфоциты; NE – нейтрофилы; EO – эозинофилы; BA – базофилы.

Таблица 11 – Биохимические параметры крови животных (часть 1), n=6

Гр.	Дата	Параметр	Показатели							
			GLU ммоль/л	ALP Ед/л	ALT Ед/л	AST Ед/л	КдР	LDH Ед/л	TB ммоль/л	UREA ммоль/л
ГР40141 (группа 1)	Фон	Mean $\pm$ SD	4,0 $\pm$ 0,96	1064 $\pm$ 322,3	26,7 $\pm$ 5,99	37,0 $\pm$ 8,85	0,8 $\pm$ 0,29	579 $\pm$ 197,3	4,7 $\pm$ 1,30	6,1 $\pm$ 0,37
		Mean $\pm$ SD	4,3 $\pm$ 0,55	1238 $\pm$ 141,3	31,2 $\pm$ 4,49	45,7 $\pm$ 12,31	0,7 $\pm$ 0,16	651 $\pm$ 165,2	7,5 $\pm$ 2,99	6,2 $\pm$ 0,37
		T-тест, р Фон/15 дней	0,54	0,053	0,17	0,19	0,90	0,51	0,06	0,60
	15 дней	Mean $\pm$ SD	4,5 $\pm$ 1,64	1142 $\pm$ 365,3	28,5 $\pm$ 5,82	41,2 $\pm$ 16,74	0,8 $\pm$ 0,19	543 $\pm$ 314,0	4,6 $\pm$ 1,93	6,2 $\pm$ 0,57
		T-тест, р Фон/29 дней	0,48	0,71	0,60	0,60	1,00	0,82	0,96	0,68
		T-тест, р 15/29 дней	0,70	0,15	0,40	0,61	0,87	0,47	0,07	1,00
Ромиплостим (группа 2)	Фон	Mean $\pm$ SD	5,7 $\pm$ 1,29	1294 $\pm$ 245,9	29,2 $\pm$ 9,93	39,0 $\pm$ 17,33	0,8 $\pm$ 0,15	693 $\pm$ 96,4	4,9 $\pm$ 1,11	8,8 $\pm$ 1,13
		Mean $\pm$ SD	4,0 $\pm$ 1,39	1363 $\pm$ 133,1	31,3 $\pm$ 7,94	36,0 $\pm$ 10,26	0,9 $\pm$ 0,12	675 $\pm$ 83,7	6,9 $\pm$ 1,31	8,8 $\pm$ 0,97
		T-тест, р Фон/15 дней	0,06	0,56	0,69	0,72	0,31	0,73	0,02	0,98
	15 дней	T-тест, р, гр. 1/гр. 2	0,67	0,75	0,97	0,17	0,14	0,76	0,64	0,0001
		Mean $\pm$ SD	4,7 $\pm$ 1,24	1322 $\pm$ 159,0	35,5 $\pm$ 12,60	37,5 $\pm$ 15,14	1,0 $\pm$ 0,23	699 $\pm$ 141,5	5,1 $\pm$ 1,35	9,0 $\pm$ 1,16
		T-тест, р Фон/29 дней	0,22	0,82	0,36	0,88	0,08	0,93	0,73	0,77
		T-тест, р 15/29 дней	0,37	0,64	0,51	0,84	0,23	0,72	0,04	0,77
	29 дней	T-тест, р, гр. 1/гр. 2	0,85	0,29	0,24	0,70	0,06	0,29	0,61	0,0003

Примечание: Mean – среднее статистическое; SD – стандартное отклонение; T-тест – t-критерий Стьюдента; GLU – глюкоза; ALP – щелочная фосфатаза; ALT – аланинаминотрансфераза; AST – аспартатаминотрансфераза; LDH – лактатдегидрогеназа; TB – общий белок; UREA – мочевины; КдР – коэффициент де Ритиса.

Таблица 12 – Биохимические параметры крови животных (часть 2), n=6

Гр.	Дата	Параметр	Показатели								
			CRE ммоль/л	CHOL ммоль/л	TG ммоль/л	TP г/л	ALB г/л	GLB г/л	ALB/ GLB	K ⁺ ммоль/л	Na ⁺ ммоль/л
ГР40141 (группа 1)	Фон	Mean±SD	144±25,2	3,5±1,18	0,4±0,09	71,7±15,00	41,7±9,14	30,0±7,4	1,4±0,29	4,2±0,90	118±2,4
		Mean±SD	164±18,9	3,9±0,81	0,5±0,23	79,2±11,58	49,2±3,87	30,0±12,8	2,1±1,41	5,2±0,86	115±2,7
		Т-тест, р Фон/15 дней	0,16	0,47	0,18	0,36	0,09	1,00	0,26	0,07	0,07
	15 дней	Mean±SD	138±28,6	5,1±0,71	0,5±0,26	70,8±10,63	40,3±6,80	30,5±3,94	1,32±0,09	4,23±1,04	116±10,3
		Т-тест, р Фон/29 дней	0,71	0,34	0,25	0,91	0,78	0,89	0,41	0,89	0,63
		Т-тест, р 15/29 дней	0,10	0,35	0,95	0,22	0,02	0,93	0,19	0,12	0,85
Ромиплостим (группа 2)	Фон	Mean±SD	143±9,5	4,1±0,84	0,3±0,18	83,0±4,29	45,2±1,72	37,8±3,92	1,2±0,13	4,7±0,50	144±9,6
	15 дней	Mean±SD	148±16,6	4,6±1,02	0,5±0,14	84,5±5,28	47,3±3,67	37,2±5,42	1,3±0,29	5,2±0,71	150±5,1
		Т-тест, р Фон/15 дней	0,54	0,42	0,11	0,60	0,22	0,81	0,45	0,15	0,22
		Т-тест, р, гр. 1/гр. 2	0,14	0,23	0,92	0,33	0,42	0,23	0,19	0,91	<0,0001
	29 дней	Mean±SD	140±9,3	3,9±0,38	0,4±0,32	84,5±5,54	46,5±3,83	38,0±3,95	1,2±0,17	4,9±0,55	148±4,1
		Т-тест, р Фон/29 дней	0,59	0,61	0,70	0,61	0,46	0,94	0,73	0,40	0,39
		Т-тест, р 15/29 дней	0,33	0,17	0,49	1,00	0,71	0,77	0,62	0,46	0,47
		Т-тест, р, гр. 1/гр. 2	0,93	0,35	0,55	0,02	0,08	0,01	0,31	0,17	<0,0001

Примечание: Mean – среднее статистическое; SD – стандартное отклонение; Т-тест – t-критерий Стьюдента; CRE – креатинин; CHOL – холестерин; TG – триглицериды; TP – общий билирубин; ALB – альбумин; GLB – глобулин; ALB/ GLB – альбумин/глобулиновое соотношение.

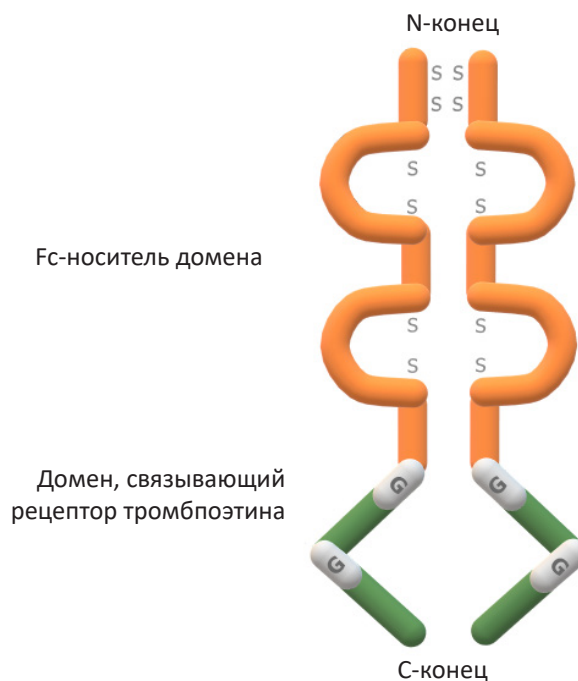


Рисунок 1 – Химическая структура ромиплостима

Примечание: ромиплостим представляет собой рекомбинантный белок, состоящий из домена рецептора Fc на N-конце, слитого с доменом связывания рецептора тромбоцитина на C-конце.

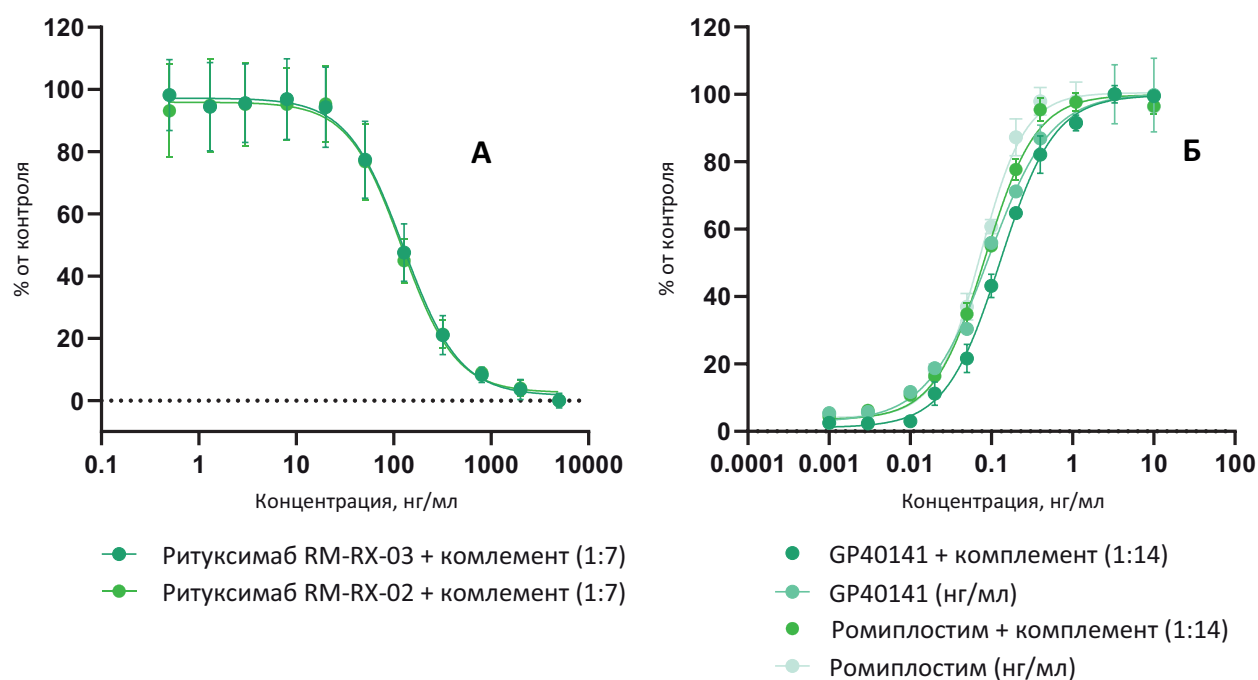


Рисунок 2 – Графики комплемент-зависимой цитотоксичности

Примечание: А – КЗЦ ритуксимаб, Б – КЗЦ ромиплостим.

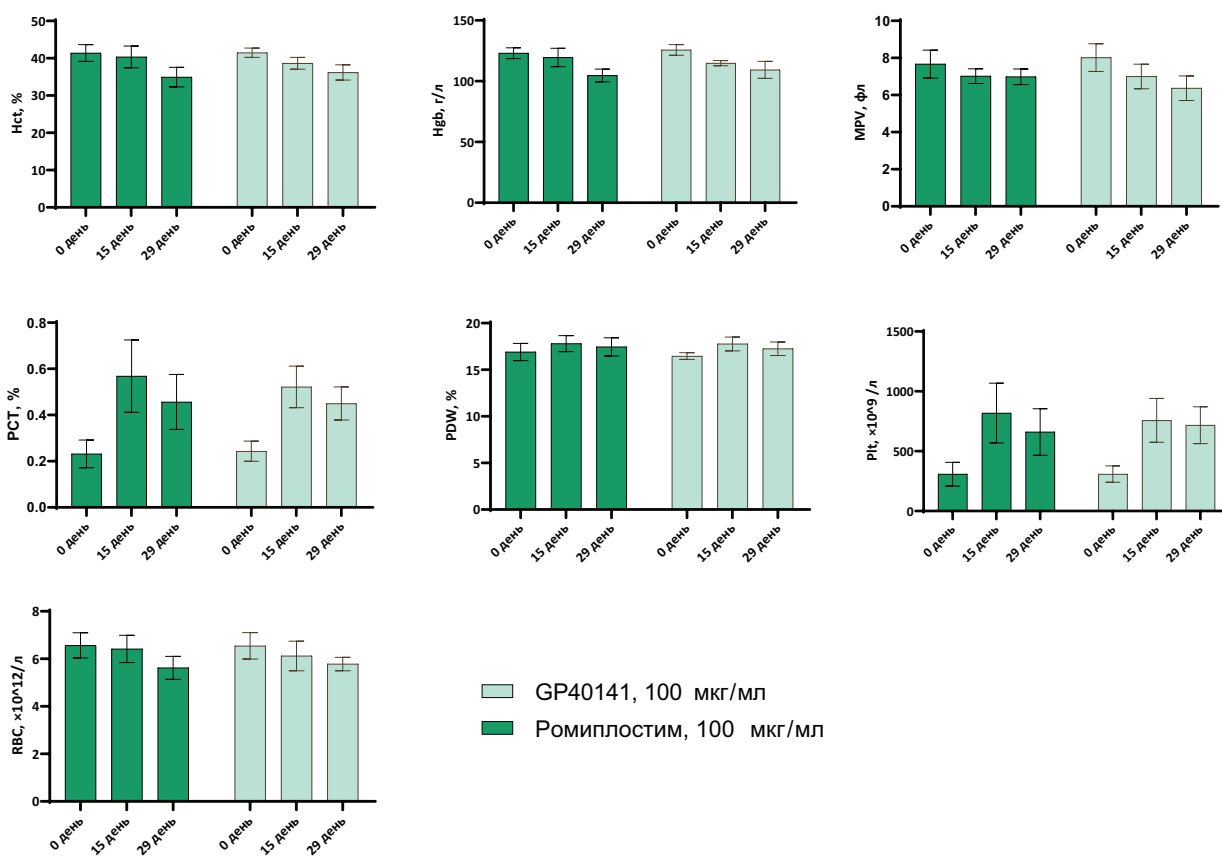


Рисунок 3 – Показатели гематологического анализа

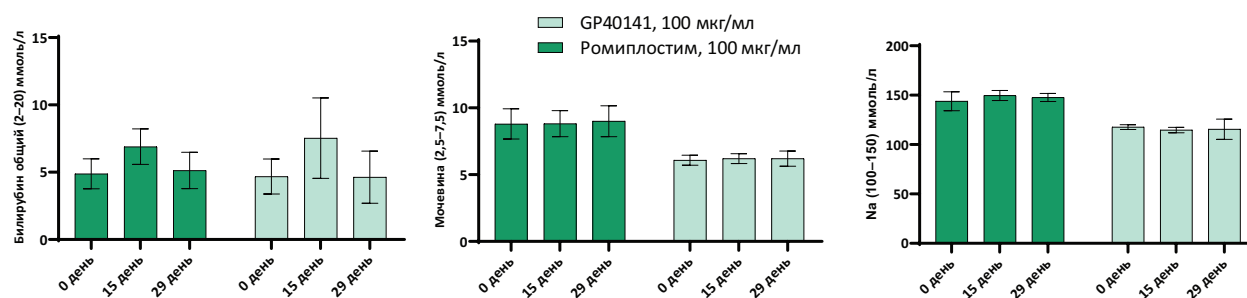


Рисунок 4 – Показатели биохимического анализа крови

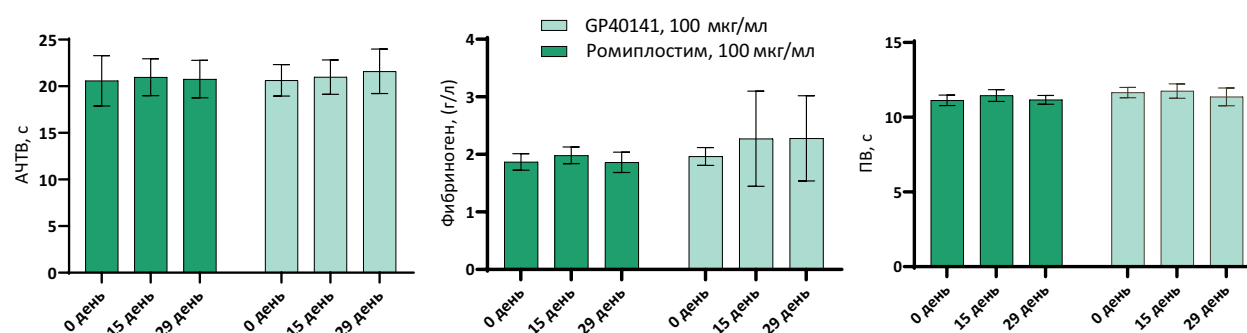


Рисунок 5 – Показатели коагуляционного гемостаза

В случаях где применимо, при межгрупповых и внутригрупповых сравнениях сопоставлялись показатели, полученные для животных в различные сроки проведения эксперимента. Для оценки внутригрупповой динамики в данных с признаками нормального распределения использовали t-критерий Стьюдента, а в данных с признаками ненормального распределения – критерий Фридмана. Для анализа частот проявления некоторых параметров (уровень эритроцитов в моче) применялся точный критерий Фишера.

Результаты сравнения считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Графическое представление данных проводилось в программе GraphPad Prism 9.3.1.471.

РЕЗУЛЬТАТЫ

In vitro комплемент-зависимая цитотоксичность

Для оценки КЗЦ были проанализированы серии 1107017А оригинального препарата ромиплостим и его биоаналога GP40141, данные представлены на рисунке 2 и в таблице 2. Тест КЗЦ ритуксимаб рассматривался как эталонный пример комплемент-зависимой цитотоксичности (Рис. 2А). Для теста КЗЦ ромиплостима рассчитывали EC_{50} относительно контроля без внесения ОИ и комплемента. С этой целью в программе GraphPad Prism 9 сначала нормировали значения, а затем строили кривую логарифмической реакции, которая имеет симметричную сигмоидальную форму, её также называют четырехпараметрической кривой

доза-реакцией. Аналогичным образом рассчитывали и для КЗЦ ритуксимаб.

Основной механизм действия ритуксимаба реализуется через комплемент-зависимую цитотоксичность [21–24]. На рисунке 2А показана дозозависимость этого действия, где с увеличением концентрации ритуксимаба уменьшается сигнал жизнеспособных клеток. В отличие от ритуксимаба, для ромиплостима (рис. 2Б), наоборот, с увеличением концентрации препарата увеличивается сигнал жизнеспособных клеток, что является следствием его прямого биологического действия – связывание с рецепторами тромбопоэтина и индуцирование пролиферации клеток. Чтобы отличить пролиферацию от КЗЦ дополнительно смотрели образцы с и без комплемента между которыми нет различий и нет явного снижения сигнала для образцов в присутствии комплемента.

Для полученных значений EC_{50} рассчитывали относительную активность, сравнивая показатели для препарата без комплемента относительно препарата с комплементом в процентах. Для оригинального препарата ромиплостим и GP40141 получали схожие значения в 87% и 72%, которые можно считать незначительными из-за отсутствия снижения сигнала жизнеспособности клеток при стимуляции препарата совместно с комплементом.

In vivo исследование безопасности

Результаты сравнительной безопасности оригинального препарата ромиплостим и его

бионаналага GP40141 на 12 самцах яванских макак представлены в таблицах 3–5 и рисунках 3–5.

Влияние на общее состояние животных

На протяжении всего срока эксперимента отклонений в клиническом статусе животных и потреблении ими корма ни в одной из экспериментальных групп выявлено не было, летальности в группах не зафиксировано.

Влияние на динамику массы тела

Данные массы тела экспериментальных животных и статистической обработки представлены в таблице 3.

По результатам статистической обработки не выявлено достоверных отличий между средним весом экспериментальных животных до начала эксперимента с последующими днями наблюдения внутри групп (15-й и 29-й дни). Межгрупповые различия на 29-й день обусловлены тем, что один из самцов продемонстрировал выраженное увеличение массы тела (11%), что привело к уменьшению SD и возникновению статистически значимых различий между группами при отсутствии разницы в динамике прироста массы тела. Данные отличия не связаны с действием препаратов, а обусловлено индивидуальной динамикой роста данного животного.

Влияние на температуру тела

Значения температуры тела и результаты статистической обработки приведены в таблице 4.

Температура тела экспериментальных животных в исследованных временных точках оставалась в пределах нормы и значимо не изменялась относительно фоновых значений.

Влияние на ЧДД

ЧДД измеряли путем подсчета дыхательных движений животных до введения препарата, а также на 15-й и 29-й дни. Результаты статистической обработки приведены в таблице 5.

Из результатов статистической обработки следует, что у обезьян обеих групп фоновые значения ЧДД были выше, чем в последующие дни: динамика изменений была одинаковой. Достоверное отличие в первой группе, относительно исходных значений через 29 дней после введения объекта испытаний, обусловлено высокими фоновыми значениями у некоторых (2 из 6) животных. Достоверное отличие в фоновых значениях между группами обезьян также является следствием большой вариабельности ЧДД у обезьян 1 группы. Учитывая это, можно говорить о том, что препараты оказали соотносимое действие на показатель ЧДД у животных.

Влияние на показатели общего анализа мочи

Анализ проводили в динамике – до начала введения объектов, на 15-й и на 29-й дни. У всех животных на протяжении всего эксперимента моча была желтая и прозрачная. Основные результаты клинического анализа мочи представлены в таблице 6.

В таблице 7 отдельно представлены результаты по показателям эритроцитов в моче животных. Это связано с тем, что на протяжении эксперимента у некоторых животных было зафиксировано количество эритроцитов, равное 5–10 клеток/мкл. Для сравнения был применен точный критерий Фишера. По результатам сравнения было выявлено, что отличий в динамике групп или между группами на схожих временных точках не отмечалось.

Также на протяжении всего эксперимента показатели мочи не выходили за пределы внутрилабораторных норм (табл. 8). Все это позволяет заключить, что исследуемые препараты не повлияли на показатели мочи животных.

Влияние на показатели клинического анализа крови

Анализ проводили в динамике – до начала введения объектов, на 15-й и на 29-й дни. Результаты клинического анализа представлены в таблицах 9 и 10. Данные показателей клинического анализа крови, по которым наблюдались межгрупповые отличия, представлены на рисунке 3.

Ни по одному показателю клинического анализа крови группы не различались между собой. Однако при анализе различий динамики внутри групп наблюдалось увеличение количества тромбоцитов (Plt), тромбокрита (PCT), а также снижение количества эритроцитов (RBC), уровня гемоглобина (Hgb) и гематокрита (Hct) в обеих группах. В первой группе эти показатели значимо отличались в 15-й и 29-й день от фона ($p < 0,05$), в группе 2 они отличались в 29-й день относительно фона и 15-го дня ($p < 0,05$). Также отмечалось увеличение индекса распределения тромбоцитов (PDW) в группе 1 и аналогичная тенденция в группе 2, а также снижение среднего объема тромбоцитов (MPV) внутри групп на 15-й и 29-й дни относительно исходных значений (Рис. 6). Так как данные показатели имели аналогичную динамику (относительно исходных значений) в группах, получавших GP40141 и ромиплостим, с высокой степенью вероятности, можно утверждать, что они оказывали сопоставимые эффекты на гематологические показатели. Подобные изменения отмечались при исследованиях оригинального препарата и, наиболее вероятно, связаны с его первичной фармакодинамикой^{18,19}.

¹⁸ CHMP assessment report for Nplate. Procedure No. EMEA/H/C/942. EMEA/654269/2008.

¹⁹ Product monograph including patient medication information Nplate® romiplostim for injection.

Влияние на показатели биохимического анализа крови

Анализ проводили в динамике – до начала введения объектов, на 15-й и на 29-й дни. Данные показателей биохимического анализа крови по всем показателям представлены в таблицах 11 и 12, а показатели, по которым наблюдались межгрупповые отличия, представлены на рисунке 4.

Оценка внутригрупповой динамики показала только увеличение уровня билирубина на 15-й день, по сравнению с исходными значениями в обеих группах ($p < 0,05$). При оценке межгрупповой динамики отмечалось, что на протяжении всего эксперимента группы 1 и 2 не различались между собой ни по одному показателю, кроме содержания мочевины и натрия в крови ($p < 0,05$).

Влияние на свёртывающую систему крови

В динамике – на 0, 15 и 29-й дни – у экспериментальных животных производили забор крови для оценки параметров коагуляционного гемостаза. Данные полученных результатов представлены на рисунке 5.

Введение оригинального препарата ромиплостим и GP40141 не приводило к изменениям показателей коагуляционного гемостаза, не было выявлено достоверных отличий ни между группами обезьян, ни между фоновыми значениями и результатами на 15-й и 29-й день после введения объектов.

ОБСУЖДЕНИЕ

КЗЦ для оригинального препарата ромиплостим так же, как и для его аналога GP40141, не была отмечена для линии 32D hTPOR clone 63. Основной механизм действия ромиплостима связан с активацией сигнальных путей, которые способствуют жизнеспособности клеток, их росту, эндомитозу мегакариоцитов, созреванию мегакариоцитов и, что важно, продукции тромбоцитов [9]. Fc-область молекулы ромиплостим не связывается специфически с белками комплемента и соответственно не вызывает иммунной реакции.

Согласно результатам *in vivo* исследования оригинальный препарат ромиплостим и его биоаналог GP40141 можно считать сопоставимыми по профилю безопасности. За время исследования не было зафиксировано отклонений в клиническом статусе животных, летальность в группах также не отмечена. Масса тела и ЧДД имели схожую динамику на протяжении всего эксперимента. Также не отмечалось различий по показателям коагуляционного гемостаза и общего анализа мочи, динамика по данным показателям была аналогичной.

Значения большинства показателей клинического анализа крови оставались стабильными по сравнению с исходными значениями. Исключением являлось увеличение количества тромбоцитов и тромбокрита, а также снижение уровня эритроцитов, гемоглобина и гематокрита, межгрупповых отличий, при этом, не отмечалось ни по одному из показателей. Анализ биохимических показателей крови выявил только увеличение уровня билирубина на 15-й день, по сравнению с исходными значениями в обеих группах, а при оценке межгрупповой динамики отмечалось, что на протяжении всего эксперимента группы 1 и 2 не различались между собой ни по одному показателю, кроме содержания мочевины и натрия в крови. Учитывая, что отличия наблюдались в каждой точке измерения (до введения, 15-й и 29-й день), при этом динамика показателей не отличалась между группами, можно сказать, что эти различия обусловлены не действием препаратов, а отображают изначальную разницу в группах. Все это указывает на то, что исследуемые препараты оказали сопоставимое влияние на биохимические показатели крови.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнение профилей безопасности для оригинального препарата ромиплостим и его биоаналога GP40141 как *in vitro*, так и *in vivo*, показало схожие результаты. Для *in vitro* в тесте КЗЦ препараты при добавлении комплемента показали пролиферативную активность, гибели клеток не наблюдалось. На основании данных, полученных в результате *in vivo* исследования, можно заключить, что GP40141 (объект испытаний) и ромиплостим (СО) переносились животными удовлетворительно, не было отмечено отклонений в потреблении пищи, не было зафиксировано отклонений в клиническом статусе и летальных случаев. Введение объекта испытаний и стандартного объекта не приводило к значительному изменению веса и температуры тела экспериментальных животных по сравнению с исходными значениями. Также не отмечалось отличий по показателям мочи и параметрам гемостаза на протяжении всего исследования. Выявленные изменения по гематологическим параметрам носили однонаправленный характер в обеих группах и были связаны с первичной фармакодинамикой GP40141 (объект испытаний) и ромиплостима (СО). Изменения в биохимических параметрах крови также носили однонаправленный характер в обеих группах. По результатам проведенного *in vivo* исследования можно заключить, что токсикологический профиль для препаратов схож и они являются сопоставимыми по профилю безопасности.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке ООО «ГЕРОФАРМ».

Спонсор не оказывал влияние на выбор материала для публикации, анализ и интерпретацию данных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Исследование *in vitro* и *in vivo* было организовано ЗАО «Фарм-Холдинг» входит в группу компаний ООО «ГЕРОФАРМ». *In vitro* исследование проводилось в ЗАО «Фарм-Холдинг» по договору финансирования ООО «ГЕРОФАРМ». *In vivo* исследование проводилось в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» по договору финансирования ООО «ГЕРОФАРМ».

Производителем препарата GP40141 биоаналога ромиплостима является ООО «ГЕРОФАРМ».

ВКЛАД АВТОРОВ

А.Н. Афанасьева – написание и редактирование текста, анализ и интерпретация результатов исследования *in vitro*, проведение исследования *in vitro*; В.Б. Сапарова – разработка дизайна исследования *in vitro*, анализ и интерпретация результатов исследования *in vitro*, редактирование текста; Д.Д. Карал-Оглы – проведение исследования *in vivo*, редактирование текста; Е.И. Мухаметзянова – проведение исследования *in vivo*;

Д.В. Куркин – интерпретация результатов исследования *in vitro* и *in vivo*, утверждение текста;

А.В. Калатанова – разработка дизайна исследования *in vivo*, интерпретация результатов *in vivo*;

И.Е. Макаренко – разработка дизайна исследования, критический пересмотр содержания статьи, утверждение окончательного варианта статьи для публикации; А.Л. Хохлов – интерпретация результатов исследования *in vitro* и *in vivo*, утверждение текста; И.А. Луговик – разработка дизайна исследования *in vivo*, написание и редактирование текста *in vivo*.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Kuter D.J., Newland A., Chong B.H., Rodeghiero F., Romero M.T., Pabinger I., Chen Y., Wang K., Mehta B., Eisen M. Romiplostim in adult patients with newly diagnosed or persistent immune thrombocytopenia (ITP) for up to 1 year and in those with chronic ITP for more than 1 year: a subgroup analysis of integrated data from completed romiplostim studies // Br. J. Haematol. – 2019. – Vol. 185, No. 3. – P. 503–513. DOI: 10.1111/bjh.15803
- Biocchi S., Podda G.M., Manzoni M., Casazza G., Cattaneo M. Thrombopoietin receptor agonists for the treatment of primary immune thrombocytopenia: a meta-analysis and systematic review // Platelets. – 2021. – Vol. 32, No. 2. – P. 216–226. DOI: 10.1080/09537104.2020.1745168
- Pietras N.M., Pearson-Shaver A.L. Immune Thrombocytopenic Purpura. 2022 May 10. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. – 2022.
- Newland A., Godeau B., Priego V., Viallard J.F., López Fernández M.F., Orejudos A., Eisen M. Remission and platelet responses with romiplostim in primary immune thrombocytopenia: final results from a phase 2 study // Br. J. Haematol. – 2016. – Vol. 172, No. 2. – P. 262–273. DOI: 10.1111/bjh.13827
- Pasquet M., Aladjidi N., Guiton C., Courcoux M.F., Munzer M., Auvrignon A., Lutz P., Ducassou S., Leroy G., Munzer C., Leverger G.; Centre de Référence National des Cytopénies Auto-immunes de l'Enfant (CEREVANCE). Romiplostim in children with chronic immune thrombocytopenia (ITP): the French experience // Br. J. Haematol. – 2014. – Vol. 164, No. 2. – P. 266–271. DOI: 10.1111/bjh.12609
- Vishnu P., Aboulafia D.M. Long-term safety and efficacy of romiplostim for treatment of immune thrombocytopenia // J. Blood Med. – 2016. – Vol. 7. – P. 99–106. DOI: 10.2147/JBM.S80646.
- Wolff-Holz E., Tiitso K., Vleminckx C., Weise M. Evolution of the EU Biosimilar Framework: Past and Future // BioDrugs. – 2019. – Vol. 33, No. 6. – P. 621–634. DOI: 10.1007/s40259-019-00377-y
- Сунцова Е.В., Чиквина И.И., Садовская М.Н., Коцкая Н.Н., Хачатрян Л.А., Байдильдина Д.Д., Калинина И.И., Петрова У.Н., Пшонкин А.В., Лутфуллин И.Я., Лемазуна Е.Н., Осипова И.В., Галеева А.В., Наумова О.С., Фисюн И.В., Быкова Г.В., Казарян Г.Р., Масчан А.А., Новичкова Г.А. Применение ромиплостима при впервые выявленной иммунной тромбоцитопении у детей // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2020. – Т. 19, № 1. – С. 18–26. DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-18-26
- Bussel J.B., Soff G., Balduzzi A., Cooper N., Lawrence T., Semple J.W. A Review of Romiplostim Mechanism of Action and Clinical Applicability // Drug Des. Devel. Ther. – 2021. – Vol. 15. – P. 2243–2268. DOI: 10.2147/DDDT.S299591
- Yang A.S. Development of romiplostim: a novel engineered peptide // Semin. Hematol. – 2015. – Vol. 52, No. 1. – P. 12–15. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2014.10.007
- Kuter D.J. Romiplostim // Cancer Treat. Res. – 2011. – Vol. 157. P. 267–288. DOI: 10.1007/978-1-4419-7073-2_16.
- Bussel J.B., Kuter D.J., George J.N., McMillan R., Aledort L.M., Conklin G.T., Lichtin A.E., Lyons R.M., Nieva J., Wasser J.S., Wiznitzer I., Kelly R., Chen C.F., Nichol J.L. AMG 531, a thrombopoiesis-stimulating protein, for chronic ITP // N. Engl. J. Med. – 2006. – Vol. 355, No. 16. – P. 1672–1681. DOI: 10.1056/NEJMoa054626. Erratum in: N Engl J Med. – 2006. – Vol. 355, No. 19. – Art. No. 2054.
- Kuter D.J., Bussel J.B., Lyons R.M., Pullarkat V., Gernsheimer T.B., Senecal F.M., Aledort L.M., George J.N., Kessler C.M., Sanz M.A., Liebman H.A., Slovic F.T., de Wolf J.T., Bourgeois E., Guthrie T.H. Jr., Newland A., Wasser J.S., Hamburg S.I., Grande C., Lefrère F., Lichtin A.E., Tarantino M.D., Terebello H.R., Viallard J.F., Cuevas F.J., Go R.S., Henry D.H., Redner R.L., Rice L., Schipperus M.R., Guo D.M., Nichol J.L. Efficacy of romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura: a double-blind randomised controlled trial // Lancet. – 2008. – Vol. 371, No. 9610. – P. 395–403. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60203-2
- Kuter D.J., Rummel M., Boccia R., Macik B.G., Pabinger I., Selleslag D., Rodeghiero F., Chong B.H., Wang X., Berger D.P. Romiplostim or standard of care in patients with immune thrombocytopenia // N. Engl. J. Med. – 2010. – Vol. 363, No. 20. – P. 1889–1899. DOI: 10.1056/NEJMoa1002625
- Shirasugi Y., Ando K., Miyazaki K., Tomiyama Y., Okamoto S., Kurokawa M., Kirito K., Yonemura Y., Mori S., Usuki K.,

- Iwato K., Hashino S., Wei H., Lizambri R. Romiplostim for the treatment of chronic immune thrombocytopenia in adult Japanese patients: a double-blind, randomized Phase III clinical trial // *Int. J. Hematol.* – 2011. – Vol. 94, No. 1. – P. 71–80. DOI: 10.1007/s12185-011-0886-8.
16. Beck A., Reichert J.M. Therapeutic Fc-fusion proteins and peptides as successful alternatives to antibodies // *MAbs.* 2011. – Vol. 3, No. 5. – P. 415–416. DOI: 10.4161/mabs.3.5.17334
17. Czajkowsky D.M., Hu J., Shao Z., Pleass R.J. Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives // *EMBO Mol. Med.* – 2012. – Vol. 4, No. 10. – P. 1015–1028. DOI: 10.1002/emmm.201201379
18. Lee C.H., Delidakis G. Engineering IgG1 Fc Domains That Activate the Complement System // *Methods Mol. Biol.* – 2022. – Vol. 2421. – P. 187–200. DOI: 10.1007/978-1-0716-1944-5_13
19. Sommarhem A. Resistance mechanisms of non-Hodgkin lymphomas against Rituximab treatment. Helsinki: University of Helsinki, 2007.
20. Amoroso A., Hafsi S., Militello L., Russo A.E., Souza Z., Mazzarino M.C., Stivala F., Libra M. Understanding rituximab function and resistance: implications for tailored therapy // *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*. – 2011. – Vol. 16, No. 2. – P. 770–782. DOI: 10.2741/3719
21. Cerny T., Borisch B., Introna M., Johnson P., Rose A.L. Mechanism of action of rituximab // *Anticancer Drugs.* – 2002. – Vol. 13 (Suppl 2). – P. 3–10. DOI: 10.1097/00001813-200211002-00002
22. Pescovitz M.D. Rituximab, an anti-cd20 monoclonal antibody: history and mechanism of action // *Am. J. Transplant.* – 2006. – Vol. 6(5 Pt 1). – P. 859–866. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2006.01288.x
23. Winkler M.T., Bushey R.T., Gottlin E.B., Campa M.J., Guadalupe E.S., Volkheimer A.D., Weinberg J.B., Patz E.F. Jr. Enhanced CDC of B cell chronic lymphocytic leukemia cells mediated by rituximab combined with a novel anti-complement factor H antibody. // *PLoS One.* – 2017. – Vol. 12, No. 6. – e0179841. DOI: 10.1371/journal.pone.0179841
24. Pawluczko A.W., Beurskens F.J., Beum P.V., Lindorfer M.A., van de Winkel J.G., Parren P.W., Taylor R.P. Binding of submaximal C1q promotes complement-dependent cytotoxicity (CDC) of B cells opsonized with anti-CD20 mAbs ofatumumab (OFA) or rituximab (RTX): considerably higher levels of CDC are induced by OFA than by RTX // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 183, No. 1. – P. 749–758. DOI: 10.4049/jimmunol.0900632

АВТОРЫ

Афанасьева Алина Николаевна – младший научный сотрудник, ЗАО «Фарм-Холдинг». ORCID ID: 0000-0002-1443-4294. E-mail: Alina.Afanaseva@geropharm.com

Сапарова Валерия Бяшимовна – руководитель лаборатории фармакологии, ЗАО «Фарм-Холдинг»; научный сотрудник ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-8445-1129. E-mail: Valeriya.Saparova@geropharm.com

Карал-Оглы Джина Джинаровна – кандидат биологических наук, заместитель директора по науке, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии». ORCID ID: 0000-0003-3606-1668. E-mail: karal_5@mail.ru

Мухаметзянова Евгения Ильдаровна – научный сотрудник, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии». ORCID ID: 0000-0002-1238-7594. E-mail: evg.m89@mail.ru.

Куркин Денис Владимирович – доктор фармацевтических наук, доцент, профессор кафедры клинической фармакологии и интенсивной терапии

ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, первый заместитель директора НЦИЛС ВолгГМУ. ORCID ID: 0000-0002-1116-3425. E-mail: strannik986@mail.ru

Калатанова Анна Вячеславовна – научный сотрудник, ЗАО «Фарм-Холдинг». ORCID ID: 0000-0003-2623-6014. E-mail: Anna.Kalatanova@geropharm.com

Макаренко Игорь Евгеньевич – кандидат медицинских наук, руководитель медицинского департамента, ЗАО «Фарм-Холдинг»; научный сотрудник ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России. ORCID ID: 0000-0003-2308-0608. E-mail: Igor.Makarenko@geropharm.com

Хохлов Александр Леонидович – академик РАН, профессор, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой клинической фармакологии и этики применения лекарств ЮНЕСКО, ректор, ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-0032-0341. E-mail: al460935@yandex.ru

Луговик Илья Алексеевич – научный сотрудник, ЗАО «Фарм-Холдинг». ORCID ID: 0000-0003-3840-5049. E-mail: Ilia.Lugovik@geropharm.com