

Ацеллбия® и Мабтера® распознают CD20-положительные клетки с одинаковой эффективностью

В.А. Мисюрин^{1,2}, А.В. Мисюрин^{1,2}, А.Е. Мисюрина^{2,3}, Ю.П. Финашутина^{1,2},
М.А. Барышникова¹, О.С. Бурова¹, С.К. Кравченко³

¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;

Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24;

²ООО «ГеноТехнология»; Россия, 117485, Москва, ул. Профсоюзная, 104;

³ФГБУ ГНЦ Минздрава России; Россия, 125167, Москва, Новый Зыковский пр-д, 4а

Контакты: Всеволод Андреевич Мисюрин vsevolod.misyurin@gmail.com

Проведено сравнение свойств ритуксимаба производства Hoffmann—La Roche, Швейцария (Мабтера®) и первого отечественного биоаналога компании Биокэд (Ацеллбия®). Сравнивали концентрации белка в препарате методом Бредфорда. Согласно результатам измерения, концентрация белка в препаратах одинаковая. Проводили электрофорез препаратов в денатурирующих условиях. Белок распался на фрагменты, эквивалентные по массе тяжелым и легким цепям иммуноглобулина. Наконец, проводили реакцию проточной цитометрии, где ритуксимаб использовался как первичное антитело для распознавания CD20-положительных клеток больных В-клеточным хроническим лимфоидным лейкозом. Результат показал, что как Мабтера®, так и Ацеллбия® распознают одинаковое количество клеток. Таким образом, комплекс представленных измеримых в условиях *in vitro* параметров продемонстрировал идентичность препаратов Мабтера® и Ацеллбия®.

Ключевые слова: Ацеллбия®, Мабтера®, лабораторная диагностика, чувствительность к моноклональным антителам

DOI: 10.17650/1818-8346-2015-10-4-56-59

Acellbia® and Mabtera® are recognize CD20-positive cells with equal efficiency

V.A. Misyurin^{1,2}, A.V. Misyurin^{1,2}, A.E. Misyurina^{2,3}, Yu.P. Finashutina^{1,2},
M.A. Baryshnikova¹, O.S. Burova¹, S.K. Kravchenko³

¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoye Shosse, Moscow, 115478, Russia;

²"GenoTechnology" LLC; 104 Profsoyuznaya St., Moscow, 117485, Russia;

³Hematology Research Center, Ministry of Health of Russia;

4a Novyy Zykovskiy Proezd, Moscow, 125167, Russia

In present study were compared characteristics of rituximab produced by Hoffmann—La Roche (Mabtera®) and first domestic bio-similar Acellbia® from Biocad Company. Concentration of protein was measured using Bradford's method. According to our results, protein concentration in formulations was the same. We electrophoresed formulations in denaturing conditions. Protein from formulations was denatured into fragments. Heavy and light chains of immunoglobulin were observed in gel. Finally, we performed flow cytometry where rituximab was used as primary antibody to detect CD20-positive B-cells of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. Both Mabtera® and Acellbia® recognized the same number of cells. Thus, assays performed *in vitro* submitted identity of Mabtera® and Acellbia® characteristics.

Key words: Acellbia®, Mabthera®, laboratory diagnostics, monoclonal antibodies sensitivity

В свое время внедрение ритуксимаба открыло новую эпоху эффективной иммунотерапии неходжкинских В-клеточных лимфом и В-клеточного хронического лимфолейкоза (В-ХЛЛ) [1]. В частности, ритуксимаб используется как компонент поддерживающей терапии у больных фолликулярной лимфомой и значительно увеличивает выживаемость без прогрессирования заболевания (53 % против 37 %) в течение 5 лет по сравнению с терапией только химиопрепаратами [2].

Создатели вектора ТСАЕ 8 и гибридомы НВ 11388 (депонированной в American Type Culture Collection) для продукции ритуксимаба сохранили за собой только авторское право и не возражают против использо-

вания созданной ими технологии [3]. Последний патент компании Biogen Idec Inc., защищающий процесс производства ритуксимаба на территории США, истек 7 апреля 2015 г. [4]. С этого момента любая компания может наладить производство ритуксимаба и распространять его под собственной маркой. Однако скопировать в точности производство биопрепарата очень непросто. Культура клеток яичника китайского хомячка, продуцирующая ритуксимаб, как и все живые организмы, чутко реагирует на стрессы. Это может отражаться в виде недокументированных изменений в структуре антитела, к примеру, в виде аберрантного гликозилирования. Из-за этих изменений свойства биопрепарата, в частности антитела, могут варьиро-

вать не только у разных производителей, но даже от партии к партии [5]. Следует обращать внимание на такую особенность при длительной поддерживающей терапии, например в случае фолликулярной лимфомы. Со временем запасы препарата из той партии, которой начали терапию, заканчиваются, либо заканчивается срок годности ритуксимаба.

В настоящее время на территории Европы и России ритуксимаб распространяется под маркой Мабтера® (Hoffmann–La Roche, Швейцария). В России появился биоаналог Ацеллбия® (Биокад, Россия), представляющий собой ритуксимаб, эквивалентный зарубежному. Фармакодинамика и фармакокинетика препаратов были одинаковыми. При сравнении препаратов в группах больных фолликулярной лимфомой и В-клеточной лимфомой маргинальной зоны выявлена их равная эффективность и безопасность. Применение Ацеллбии, так же как и Мабтеры, не сопровождалось развитием иммунной реакции против лекарства [6, 7]. Иными словами, результаты проведенных исследований доказали отсутствие различий по всем основным параметрам в прямом сравнении препарата Ацеллбия® с препаратом Мабтера®.

Тем не менее, несмотря на сходство как в показаниях, так и в эффективности, больные, получив препарат Мабтера® первым, отдают ему предпочтение и при последующих введениях, а к препарату Ацеллбия® относятся с осторожностью. Обобщая с практикующими врачами-гематологами, мы пришли к выводу о необходимости провести собственное сравнение препаратов Ацеллбия® и Мабтера® и доступно описать полученные результаты, чтобы подтвердить или опровергнуть опасения больных о неидентичности данных препаратов.

Мы сравнили между собой несколько серий препаратов Мабтера® (номера серий Н0108, Н0142, Н0684, Н0783 и Н0142) и Ацеллбия® (номера 69251014, 69080814, 69200914, 69020714). В первом эксперименте была измерена концентрация общего белка в препаратах методом Бредфорда. Согласно результатам (рис. 1), концентрация белка в различных сериях сопоставима ($p = 1,0$).

Второй эксперимент был выполнен в целях оценки стабильности рассматриваемых антител. Для этого провели электрофорез разведенных препаратов в денатурирующих условиях. Одновременно с терапевтическими антителами на гель нанесли пробу мышинных антител класса G. Белки, присутствующие в препаратах, разделились на 2 мажорные фракции, масса которых составила около 55 и около 25 кДа, что обычно наблюдается при денатурации антител на тяжелые и легкие цепи (рис. 2). Срок годности Мабтеры серии Н0108 к моменту выполнения экспериментов истек, но никаких отличий данной пробы от проб Мабтеры более новой серии Н0684 или Ацеллбии не выявлено. Таким образом, ритуксимаб, произведенный под марками Мабтера® и Ацеллбия®, одинаково стабилен.

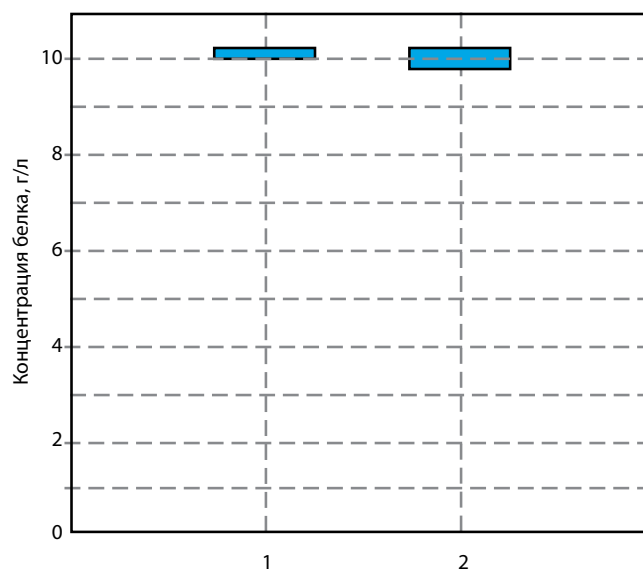


Рис. 1. Общая концентрация белка в препаратах Ацеллбия® (1) и Мабтера® (2), измеренная в различных сериях

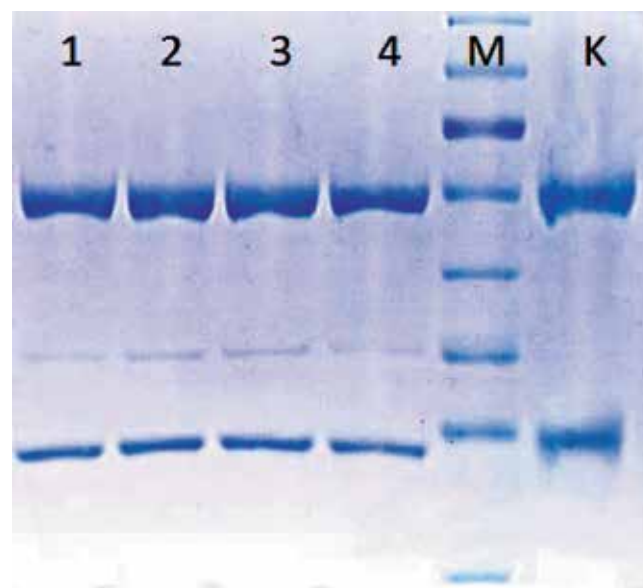


Рис. 2. Электрофорез препаратов Мабтера® и Ацеллбия®. 1 – Мабтера® (Н0108); 2 – Мабтера® (Н0142); 3 – Мабтера® (Н0684); 4 – Ацеллбия® (69251014); М – маркер молекулярных масс PageRuler™ 10–170 кДа; К – мышинные антитела класса G

Интересно, что во всех 4 сериях препаратов наблюдалось наличие минорной полосы (или бэнда), соответствовавшей массе чуть более 35 кДа. Согласно данным производителей, Ацеллбия® и Мабтера® содержат всего 1 белковый компонент — ритуксимаб, о наличии других белков не сообщается. Если белковые примеси отсутствуют, можно предположить, что мы наблюдали 3-доменный фрагмент тяжелой цепи ритуксимаба, полученный в результате денатурации данного антитела еще на стадии упаковки и сохранившийся в неизменном состоянии. Следует отметить, что этот бэнд уже был обнаружен и описан D. Nebija

и соавт. [5], однако его наличие никак не обсуждалось. В любом случае, этот фрагмент присутствует как в со-

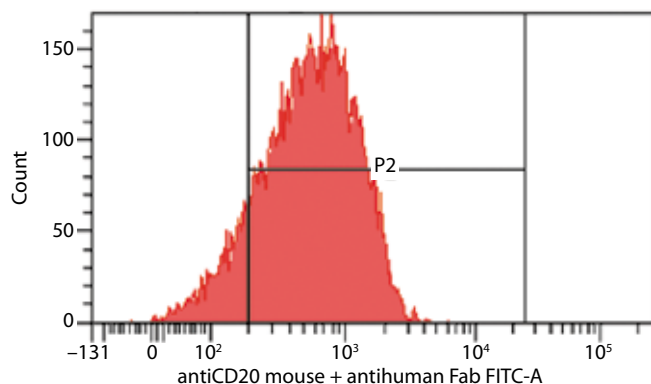
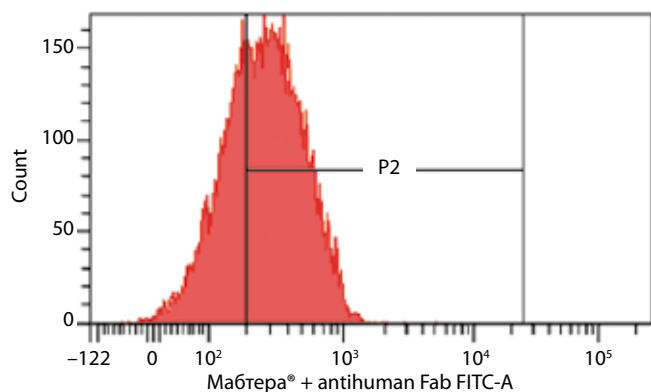
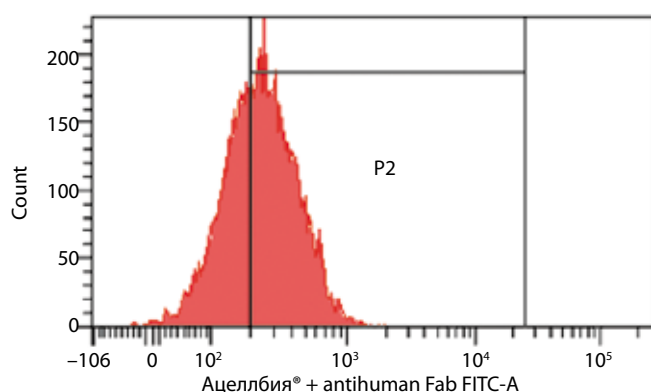
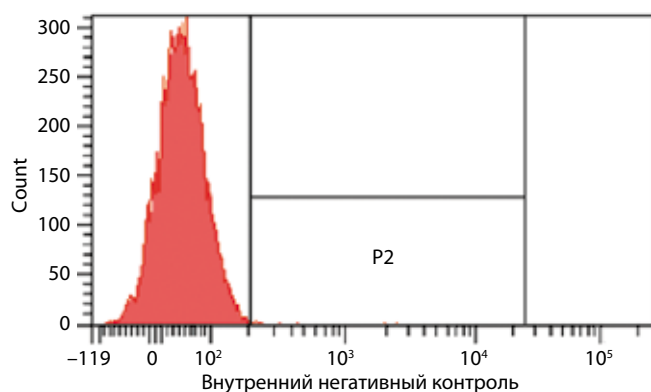


Рис. 3. Проточная цитометрия клеток крови больного В-ХЛЛ. Акцеллбия® связалась с поверхностью 57 % клеток; Мабтера® – 62 % клеток; мышиные анти-CD20-антитела – 86 % клеток

ставе препарата Мабтера®, так и Акцеллбия®, что снова подтверждает их сходство.

Наконец, был проведен эксперимент (реакция иммунофлуоресценции) по определению способности Мабтеры и Акцеллбии распознавать CD20-положительные клетки. В качестве субстрата использовалась кровь 2 больных В-ХЛЛ. Клетки инкубировали с антителами Акцеллбия® и Мабтера® серии H0684 и контрольными мышиными анти-CD20-антителами (НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России). В реакции использовали вторичные антитела, конъюгированные с красителем FITC. Результаты анализировали на проточном цитометре FACSCantoII. Данный эксперимент

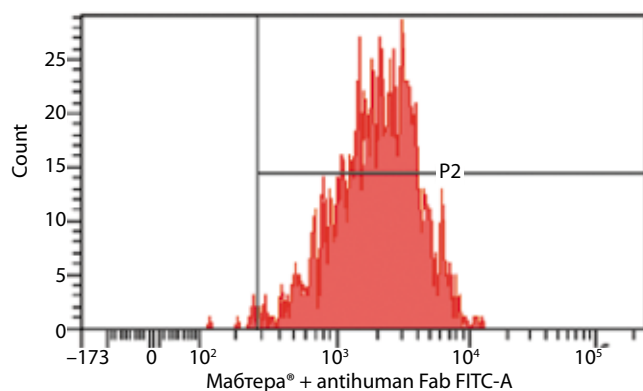
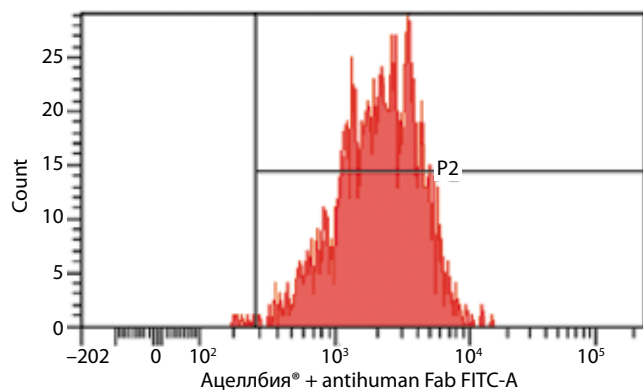
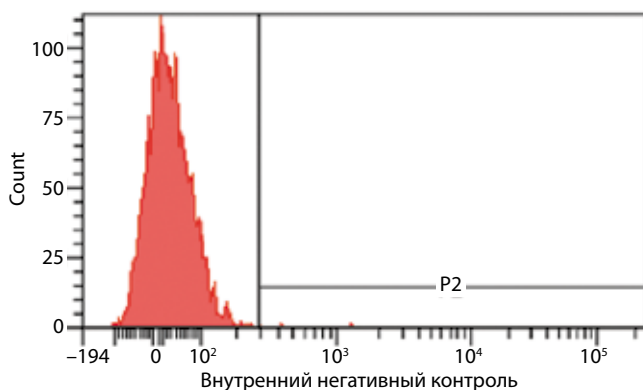


Рис. 4. Проточная цитометрия клеток крови больной В-ХЛЛ. Акцеллбия® связалась с поверхностью 99,3 % клеток; Мабтера® – 99,5 % клеток

позволил оценить эффективность связывания двух антител в условиях *in vitro* с клетками, полученными от одного больного. Такой подход невозможен при клинических испытаниях препаратов на больных, так как невозможно одновременно вводить больному оба препарата, которые сравнивают между собой.

Ацеллбия® и Мабтера® связались с одинаковым количеством клеток крови больного (рис. 3), распознав соответственно 57 и 62 % CD20-положительных клеток. Контрольные антитела распознали 86 % клеток. Это неудивительно, поскольку каждое антитело связывается с уникальным эпитопом CD20, и вероятность совпадения авидности у двух антител крайне низка.

Эффективность связывания Ацеллбии и Мабтеры проверили на клетках больной с диагнозом В-ХЛЛ. В дан-

ном случае антитела распознали 99,3 % (Ацеллбия®) и 99,5 % (Мабтера®) клеток, выделенных из крови пациентки (рис. 4). Связывание Ацеллбии и Мабтеры с одинаковым количеством клеток крови больных В-ХЛЛ в условиях *in vitro* не опровергает одинаковую клиническую эффективность применения данных препаратов.

Итак, мы установили сходство препаратов Ацеллбия® и Мабтера® по таким признакам, как концентрация белковой субстанции, стабильность антитела и возможное наличие примесей, а также способность антител связываться с CD20-положительными клетками. По всем перечисленным критериям препараты полностью идентичны.

Авторы подтверждают отсутствие скрытых конфликтов интересов.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Marcus R., Imrie K., Belch A. et al. CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood* 2005;105(4):1417–23.
2. Salles G., Mounier N., de Guibert S. et al. Rituximab combined with chemotherapy and interferon in follicular lymphoma patients: results of the GELA-GOELAMS FL2000 study. *Blood* 2008;112(13):4824–31.
3. <http://www.google.com/patents/US5736137>
4. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00073>
5. Nebija D., Kopelent-Frank H., Urban E. et al. Comparison of two-dimensional gel electrophoresis patterns and MALDI-TOF MS analysis of therapeutic recombinant monoclonal antibodies trastuzumab and rituximab. *J Pharm Biomed Anal* 2011;56(4):684–91.
6. Алексеев С.М., Капланов К.Д., Иванов Р.А., Черняева Е.В. Современный подход к разработке и исследованию биоаналогов на примере первого российского препарата моноклональных антител – Ацеллбия® (Ритуксимаб). Исследования и практика в медицине 2015;1(2):8–12. [Alekseev S.M., Kaplanov K.D., Ivanov R.A., Chernyaeva E.V. The modern approach to the development and study of biosimilars on the example of Russian first monoclonal antibody preparations – Atsellbiya® (Rituximab). *Issledovaniya i praktika v medicine = Research and Practice in Medicine* 2015;1(2):8–12. (In Russ.)].
7. Капланов К.Д., Зарицкий А.Ю., Алексеев С.М. и др. Начало эры применения биоаналогов моноклональных антител в онкологии: современные международные рекомендации и результаты исследования первого российского биоаналога ритуксимаба у больных В-клеточной неходжкинской лимфомой. Современная онкология 2014;16(2):38–44. [Kaplanov K.D., Zaritskiy A.Yu., Alekseev S.M. et al. The era of monoclonal antibodies biosimilars application in oncology: current international recommendations; results of the first Russian rituximab biosimilar study in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Sovremennaya onkologiya = Modern Oncology* 2014;16(2):38–44. (In Russ.)].