



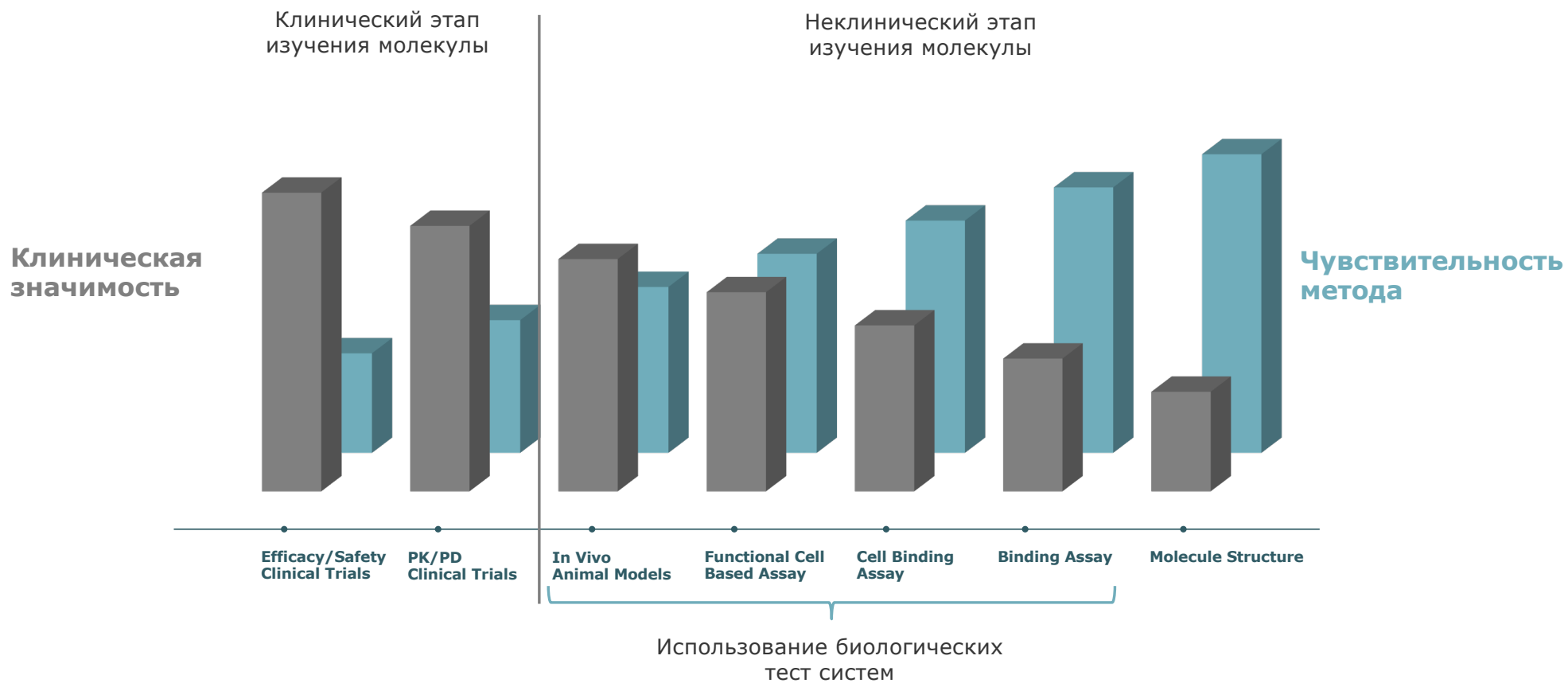
Особенности биостатистических методов в доклинических исследованиях

Артем Доротенко

Медицинский научный советник
отдела ранних фаз клинических исследований

 **ГЕРОФАРМ**

Используемые подходы при изучении препаратов

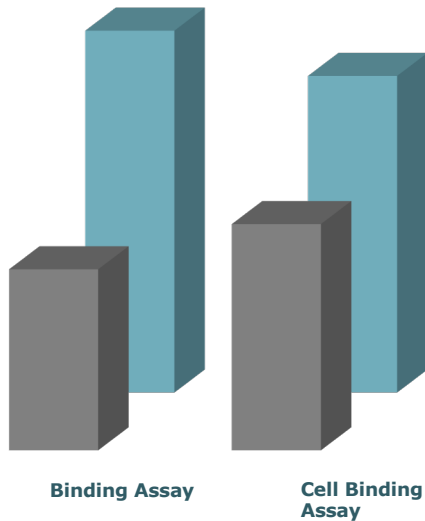


Неклинические этапы изучения *in vitro/in vivo*

На примере воспроизведенных препаратов

Связывание с мишенью

- Изучение кинетики ЛРВ *in vitro*
- BLI, SPR, замещение радиоактивной метки и пр.



Биологическая активность

- Функциональные тесты на клеточных линиях *in vitro*
- Фотометрические, люминесцентные и пр. методы детекции



ФК/ФД *in vivo*

- Изучение специфических эффектов на моделях *in vivo*
- ФК – аналитические методики
ФД – инструментальные и лабораторные тесты



Неклинические этапы изучения in vitro

Подход к обработке данных

Возможные уровни значимости in vitro^{1,2} (количественные методы)

Уровень 1. Высокий уровень ●

Наиболее значимые параметры в ключе последующего влияния на клиническую значимость

Уровень 2. Средний уровень ●

Параметр в слабой или умеренной степени, способен повлиять на клиническую значимость

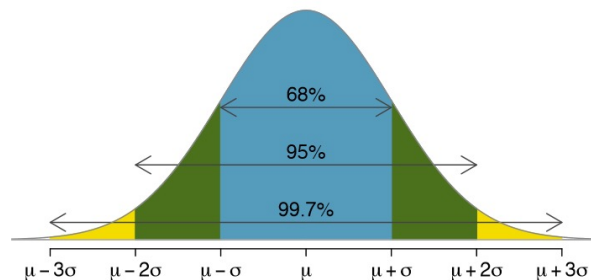
Предлагаемый способ оценки эквивалентности^{1,2}

1 Границы подобия

A) Mean of RLD +/- $k \cdot \sigma_{RLD}$ ($k = 1,5-2$) ●

B) Mean of RLD +/- $k \cdot \sigma_{RLD}$ ($k = 3$) ●

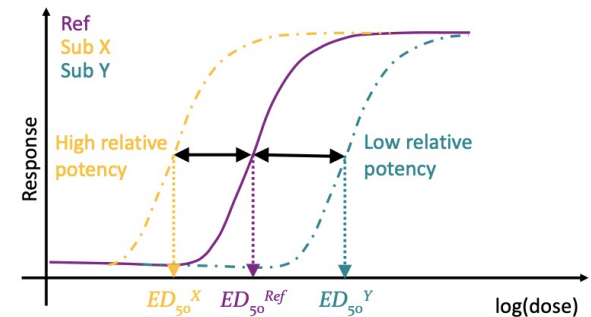
C) CI90% ●



2 Относительная активность

A) $EC_{50_{TP}}/EC_{50_{RLD}} = 0,8-1,25$ или $IC_{50_{TP}}/IC_{50_{RLD}} = 0,8-1,25\%$ ●

NB!
Тест применим при условии доказательства параллелизма кривых



¹ doi:10.1208/s12248-016-9968-0

² https://www.ema.europa.eu/en/documents/presentation/presentation-analytical-similarity-assessment-s-c-chow-fda_en.pdf



Связывание с мишенью (binding assays)

Связывание с мишенью

На примере изучения ЛРВ инсулинов

Взаимодействие с IR-A/IR-B

Тест-система: изолированный инсулиновый рецептор А и В (IR-A/IR-B)

Методика детекции: BLI (Octet RED 96)

Тестируемый препарат: GP40041

Референтный препарат: Протафан НМ Пенфилл

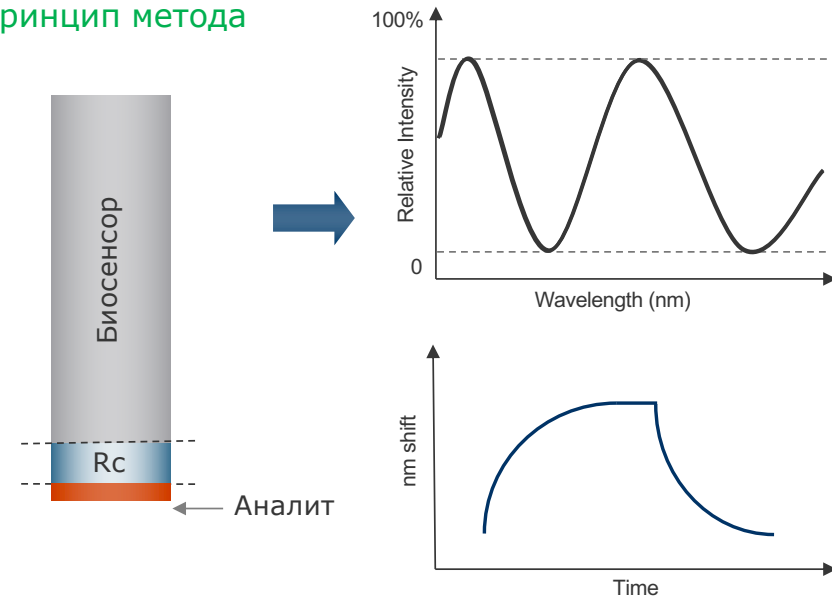
Первичный параметр: K_D – константа аффинности

Вторичные параметры: k_{on} – константа ассоциации
 k_{off} – константа диссоциации

Критерии приемлемости теста:

- присутствие специфического связывания для образцов оригинального препарата
- $\text{mean } R^2 > 0.8$ для образцов оригинального препарата

Принцип метода



Характеристика метода/платформы

Чувствительность: высокая

Вариабельность: высокая

Клиническая значимость: средняя¹

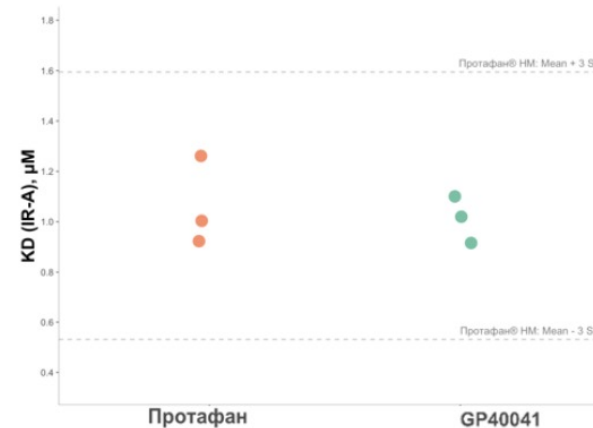
¹ doi:10.1208/s12248-016-9968-0

Связывание с мишенью

Подтверждение аналогичности

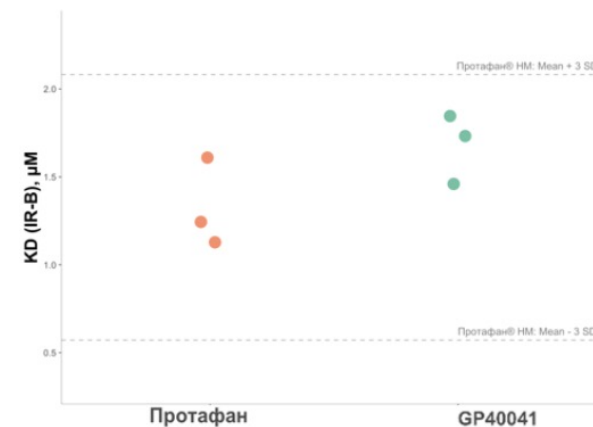
IR-A

Sensor Type	Sample ID	Loading Sample ID	Loading Conc. (µg/ml)	KD (M)	ka (1/Ms)	kdis (1/s)
SA	Protafan JR7W927	IR-A biot	25	1,00E-06	9,80E+04	9,84E-02
SA	Protafan JR70B38	IR-A biot	25	9,23E-07	1,03E+05	9,53E-02
SA	Protafan KR73K24	IR-A biot	25	1,26E-06	7,92E+04	1,00E-01
SA	Rinsulin NPH 70320	IR-A biot	25	1,10E-06	7,40E+04	8,15E-02
SA	Rinsulin NPH 50320	IR-A biot	25	9,15E-07	9,93E+04	9,09E-02
SA	Rinsulin NPH 60320	IR-A biot	25	1,02E-06	9,67E+04	9,85E-02



IR-B

Sensor Type	Sample ID	Loading Sample ID	Loading Conc. (µg/ml)	KD (M)	ka (1/Ms)	kdis (1/s)
SA	Protafan JR7W927	IR-B biot	25	1,61E-06	5,99E+04	9,64E-02
SA	Protafan JR70B38	IR-B biot	25	1,24E-06	6,15E+04	7,65E-02
SA	Protafan KR73K24	IR-B biot	25	1,13E-06	7,17E+04	8,09E-02
SA	Rinsulin NPH 70320	IR-B biot	25	1,73E-06	3,25E+04	5,63E-02
SA	Rinsulin NPH 50320	IR-B biot	25	1,85E-06	7,54E+04	1,39E-01
SA	Rinsulin NPH 60320	IR-B biot	25	1,46E-06	9,96E+04	1,45E-01





Биологическая активность (functional assays)

Биологическая активность

На примере изучения биоаналогов моноклональных антител

Комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC)

Принцип метода

Тест-система: В-лимфоциты человека линии WIL2-S

Методика детекции: флуоресценция

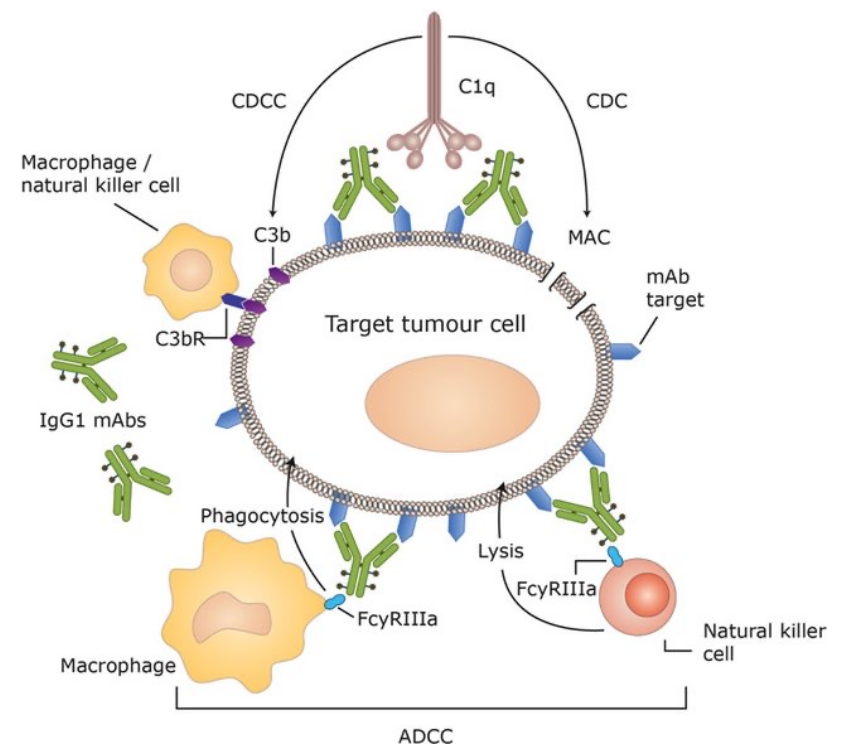
Тестируемый препарат: биоаналог mAb

Референтный препарат: оригинальный mAb

Первичный параметр: IC_{50} – концентрация полумаксимального ингибирования

Критерии приемлемости теста:

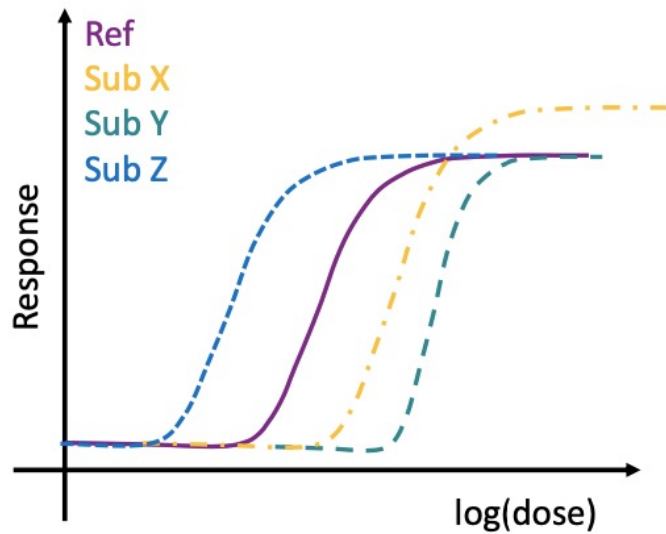
- показан параллелизм кривых «доза-ответ» стандартного образца и внутреннего контроля (F-test, 95%)¹
- значение относительной активности стандартного образца должно быть в пределах 80-125% от значений внутреннего контроля



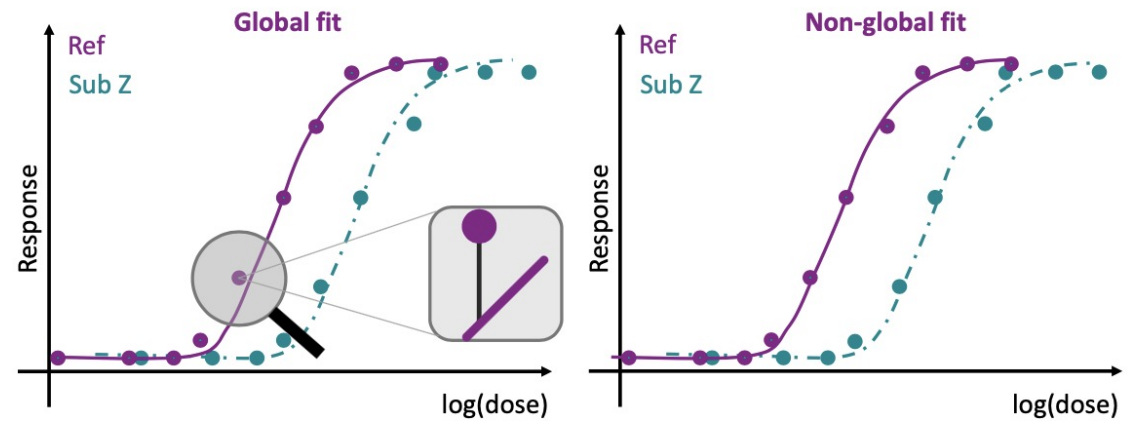
¹ European Pharmacopoeia guidelines (Council of Europe 2011, Finney 1964)

Биологическая активность

Подход к обработке данных – анализ параллельных линий (PLA)



Parallelism				
	Ref	X	Y	Z
Ref	✓	✗	✗	✓



F-тест для оценки параллелизма:

- Оценивает схожесть форм кривых за счет сравнения SSE
- сравнение SSE при режиме построения кривых «доза-эффект» global и non-global fit

Биологическая активность

Подтверждение аналогичности

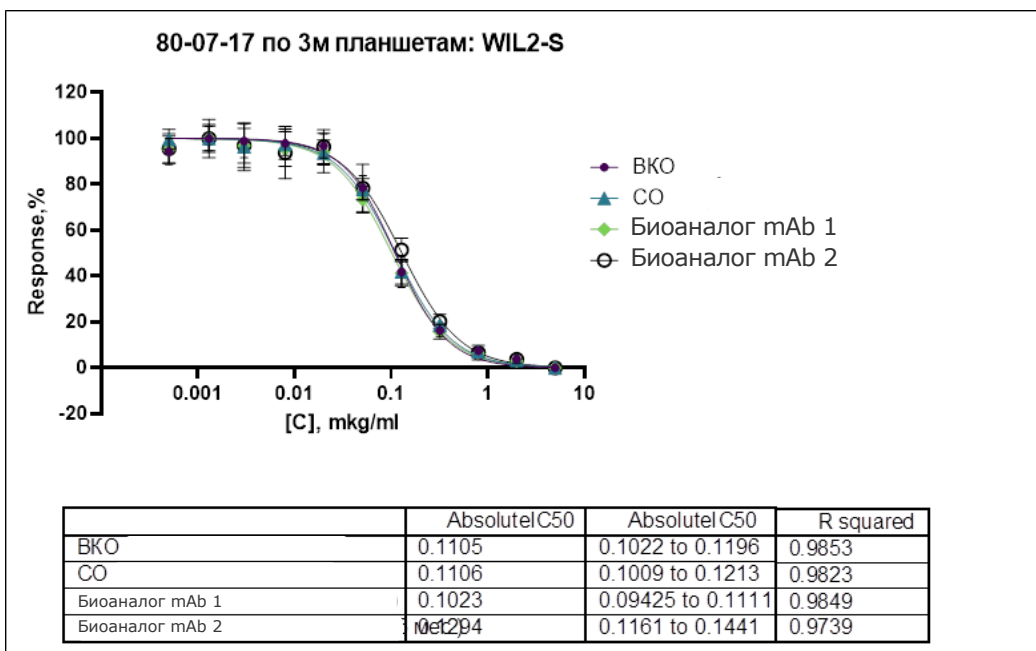


Plate	Standard	Internal control		
		Абс.	Отн.	F-крит. (95%)
1	0,114	0,118	97%	OK
2	0,112	0,106	106%	OK
3	0,102	0,096	106%	NO
Mean	0,109	0,107	103%	OK



Plate	Абс.	TP ₁	
		Отн.	F-крит. (95%)
1	0,101	113%	OK
2	0,102	110%	OK
3	0,095	107%	NO
Mean	0,099	110%	OK



Plate	Абс.	TP ₂	
		Отн.	F-крит. (95%)
1	0,124	92%	OK
2	0,119	95%	OK
3	0,104	98%	NO
Mean	0,116	95%	OK



**Фармакокинетика и фармакодинамика
in vivo
(PK/PD in vivo models)**

PK/PD in vivo

Статистические аспекты планирования исследования эквивалентности

Планирование исследования

Конечные точки

- литературный поиск валидной фармакодинамической переменной для референтного препарата
- определение типа переменной, ее вариабельности
- метод оценки, его характеристики (прецизионность, устойчивость и др.)

Расчет выборки по имеющимся данным

Запланированный до старта исследования план анализа данных

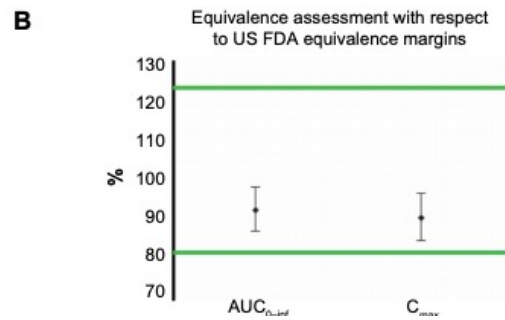
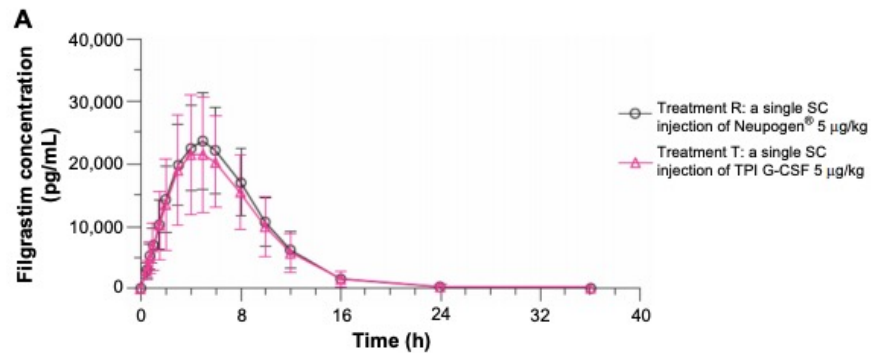
- выбор метода оценки эквивалентности исследуемых молекул
- наиболее распространенным для in vivo исследований является оценка CI90% для обозначенных конечных точек
- Допустимые границы эквивалентности должны быть обоснованы заранее



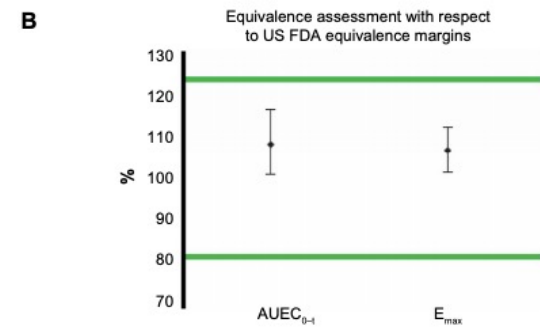
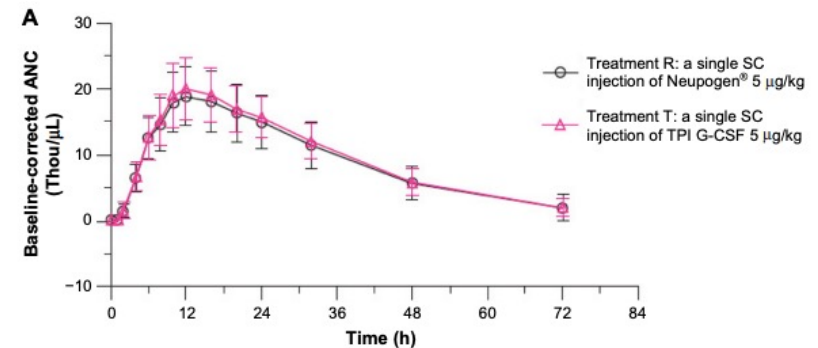
PK/PD in vivo

Статистические аспекты планирования исследования эквивалентности

ФК



ФД



¹ doi:10.2147/bs.s86638

Спасибо за
внимание!

