



Оригинальная статья / Research article

## Оценка биоаналогичности и иммуногенности препаратов «Трастузумаб» (ООО «Мабскейл», Россия) и «Герцептин®» (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Швейцария) в рамках двойного слепого рандомизированного сравнительного клинического исследования I фазы с участием здоровых добровольцев

М. А. Колганова<sup>1,2</sup>✉, Е. Е. Бекетов<sup>3,1</sup>, В. В. Писарев<sup>4</sup>, А. В. Иванов<sup>4</sup>,  
С. В. Васильев<sup>5</sup>, И. Е. Шохин<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Общество с ограниченной ответственностью «Мабскейл», 445043, Россия, Самарская область, г.о. Тольятти, Территория ОЭЗ ППТ Шоссе № 4, здание 5А

<sup>2</sup> ООО «Центр фармацевтической аналитики», 117149, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8

<sup>3</sup> Медицинский радиологический научный центр им. А. Ф. Цыба - филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации (МРНЦ им. А. Ф. Цыба - филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России), 249036, Россия, Калужская область, г. Обнинск, ул. Королева, д. 4

<sup>4</sup> Общество с ограниченной ответственностью «Научно-производственный центр Пробиотек», 111024, Россия, г. Москва, ул. 5-я Кабельная, д. 2-Б, стр. 1, офис 3-1

<sup>5</sup> ООО «ЭЮЦ Клиник», 109147, Россия, г. Москва, ул. Таганская, д. 3

✉ Контактное лицо: Колганова Мария А. E-mail: [m.kolganova@mabscale.ru](mailto:m.kolganova@mabscale.ru)

ORCID: М. А. Колганова – <https://orcid.org/0000-0003-4568-1172>; Е. Е. Бекетов – <https://orcid.org/0000-0002-2485-6482>;

В. В. Писарев – <https://orcid.org/0000-0003-3212-4369>; А. В. Иванов – <https://orcid.org/0000-0002-1676-7754>;

С. В. Васильев – <https://orcid.org/0000-0002-3485-4050>; И. Е. Шохин – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Статья поступила: 14.07.2023

Статья принята в печать: 22.08.2023

Статья опубликована: 25.08.2023

### Резюме

**Введение.** Трастузумаб – первый препарат моноклональных антител, направленный на открытый в середине 80-х гг. прошлого столетия продукт экспрессии онкогена *neu* – рецептор эпидермального фактора роста 2 типа, HER2. Трастузумаб почти сразу стал препаратом выбора для комбинированной терапии пациенток с метастатическим HER2-позитивным раком молочной железы (РМЖ) и позволил значительно улучшить прогноз по данному подтипу РМЖ, в некоторых случаях до 90 % увеличив пятилетнюю выживаемость для пациенток. Разработка препаратов-биоаналогов трастузумаба до сих пор остается актуальной задачей по всему миру, включая Россию, учитывая даже тот факт, что более 10 биоаналогов уже находятся на различных этапах разработки или регистрации.

**Цель.** Целью работы было проведение аналитической части двойного слепого рандомизированного сравнительного клинического исследования фармакокинетики и безопасности препаратов трастузумаба с участием здоровых добровольцев с дальнейшей оценкой биоаналогичности препаратов «Трастузумаб» (ООО «Мабскейл», Россия) и «Герцептин®» (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Швейцария).

**Материалы и методы.** В исследовании принимали участие 92 здоровых добровольца, соответствующие всем критериям включения/исключения. Количественное определение трастузумаба и полуколичественное определение антител к трастузумабу в образцах сыворотки крови добровольцев проводилось методом иммуноферментного анализа с фотометрическим детектированием. Для выполнения аналитической части исследования были валидированы две независимые методики.

**Результаты и обсуждение.** Методика количественного определения трастузумаба в сыворотке крови была валидирована по следующим параметрам: селективность, определение калибровочного диапазона и регрессионной модели, правильность и прецизионность, минимально необходимое разведение, линейность разведения образцов и стабильность. Методика полуколичественного определения антител к трастузумабу была валидирована по следующим параметрам: предел исключения, селективность, чувствительность, «хук»-эффект, толерантность к присутствию лекарственного препарата, прецизионность и стабильность (краткосрочная и долгосрочная). Валидированные методики были применены на практике для проведения аналитической части исследования фармакокинетики и иммуногенности препаратов трастузумаба с дальнейшим расчетом фармакокинетических параметров и доверительных интервалов для оценки биоаналогичности сравниваемых препаратов.

**Заключение.** По результатам исследования была доказана биоаналогичность исследуемого препарата и препарата сравнения, а также в ходе оценки иммуногенности не было выявлено анти-лекарственных антител к трастузумабу в образцах сыворотки крови добровольцев.

**Ключевые слова:** трастузумаб; фармакокинетика; иммуногенность; биоаналоги; ИФА

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Вклад авторов.** А. В. Иванов, В. В. Писарев и М. А. Колганова участвовали в разработке и валидации методики. С. В. Васильев проводил статистическую обработку полученных результатов. М. А. Колганова, А. В. Иванов и Е. Е. Бекетов отвечали за написание текста статьи. И. Е. Шохин отвечал за методологию исследования и рецензирование текста статьи. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

**Для цитирования:** Колганова М. А., Бекетов Е. Е., Писарев В. В., Иванов А. В., Васильев С. В., Шохин И. Е. Оценка биоаналогичности и иммуногенности препаратов «Трастузумаб» (ООО «Мабскейл», Россия) и «Герцептин®» (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Швейцария) в рамках двойного слепого рандомизированного сравнительного клинического исследования I фазы с участием здоровых добровольцев. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2023;12(3):240–249. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-240-249>

# A Double-blind Randomized Comparative Phase I Study to Assess Biosimilarity and Immunogenicity of "Trastuzumab" (LLC "Mabscale", Russia) and Herceptin® (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland) in Healthy Volunteers

Maria A. Kolganova<sup>1, 2</sup>✉, Evgeny E. Beketov<sup>3, 1</sup>, Vladimir V. Pisarev<sup>4</sup>,  
Andrei V. Ivanov<sup>4</sup>, Sergey V. Vasiliev<sup>5</sup>, Igor E. Shokhin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> LLC "Mabscale". 5, Territory of the SEZ PPT Highway No. 4, Tolyatti, Samara region, 445043, Russia

<sup>2</sup> LLC "Center for Pharmaceutical Analytics". 8, Simferopolsky Boulevard, Moscow, 117149, Russia

<sup>3</sup> A. Tsyb MRRC – branch of NMRRС of the Ministry of Health of the Russian Federation. 4, Koroleva str., Obninsk, Kaluga region, 249036, Russia

<sup>4</sup> LLC "Scientific and Production Center Probiotech". Office 3–1, 2-B/1, 5th Kabel'naya str., Moscow, 111024, Russia

<sup>5</sup> LLC "ELC Clinic". 3, Taganskaya str., Moscow, 109147, Russia

✉ **Corresponding author:** Maria A. Kolganova. E-mail: m.kolganova@mabscale.ru

**ORCID:** Maria A. Kolganova – <https://orcid.org/0000-0003-4568-1172>; Evgeny E. Beketov – <https://orcid.org/0000-0002-2485-6482>;

Vladimir V. Pisarev – <https://orcid.org/0000-0003-3212-4369>; Andrei V. Ivanov – <https://orcid.org/0000-0002-1676-7754>;

Sergey V. Vasiliev – <https://orcid.org/0000-0002-3485-4050>; Igor E. Shokhin – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

**Received:** 14.07.2023

**Revised:** 22.08.2023

**Published:** 25.08.2023

## Abstract

**Introduction.** Trastuzumab is the first drug based on the monoclonal antibodies' technology targeted to the neu oncogene expression product discovered in the middle 80-s – human epidermal growth receptor, HER2. After being approved trastuzumab had become the drug of choice for combine therapy of metastatic breast cancer (BC). This therapy had also allowed to improve patients' 5-year survival rate dramatically, almost up to 90 % in some cases. Despite the fact that more than 10 biosimilars of trastuzumab are now in the pipeline around the world, including Russia, the development and registration of trastuzumab biosimilars still remain relevant.

**Aim.** Aim of the study was to conduct the analytical part of the double-blind randomized comparative clinical trial for trastuzumab pharmacokinetics and safety assessment in healthy volunteers with subsequent biosimilarity evaluation of "Trastuzumab" (LLC "Mabscale", Russia) and Herceptin® (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland).

**Materials and methods.** 92 healthy volunteers, who fulfilled the inclusion/exclusion criteria, were enrolled to the study. Trastuzumab quantitation and anti-trastuzumab antibodies detection was performed using ELISA method with photometric detection. To support the clinical trial two different independent bioanalytical methods were validated.

**Results and discussion.** Trastuzumab quantitation method in human blood serum was validated for selectivity, calibration curve and regression model, sensitivity (LLOQ), accuracy and precision, MRD, dilution linearity and stability. The method for anti-trastuzumab antibodies detection, that was previously described by the authors, was validated for cut-point, selectivity, sensitivity, prozone effect, drug tolerance, precision and stability (short-term and long-term). The validated methods were successfully applied to the study samples assay to perform the analytical part of the comparative study for trastuzumab pharmacokinetics and immunogenicity assessment. The obtained drug concentrations were used for PK-parameters and confidence interval calculations to estimate the biosimilarity of test and reference drug.

**Conclusion.** The study results showed that test and reference drug are biosimilar, and moreover immunogenicity assessment showed no anti-trastuzumab antibodies in any samples of healthy volunteers.

**Keywords:** trastuzumab; pharmacokinetics; immunogenicity; biosimilars; ELISA

**Conflict of interest.** The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**Contribution of the authors.** Andrei V. Ivanov, Vladimir V. Pisarev and Maria A. Kolganova participated in the development and validation of the analytical method. Sergey V. Vasiliev was responsible for statistical data analysis. Maria A. Kolganova, Andrei V. Ivanov and Evgeny E. Beketov have prepared paper draft. Igor E. Shokhin was responsible for study methodology and article text review and editing. All authors participated in the discussion of the results and article review.

**For citation:** Kolganova M. A., Beketov E. E., Pisarev V. V., Ivanov A. V., Vasiliev S. V., Shokhin I. E. A double-blind randomized comparative phase I study to assess biosimilarity and immunogenicity of Trastuzumab (LLC "Mabscale", Russia) and Herceptin® (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland) in healthy volunteers. *Drug development & registration*. 2023;12(3):240–249. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-240-249>

## ВВЕДЕНИЕ

До внедрения в медицинскую практику таргетной терапии злокачественных заболеваний одним из наиболее неблагоприятных вариантов рака молочной железы (РМЖ) считался HER2+. Перспективность терапии с HER2/*neu* в качестве мишени была показана еще в середине 80-х годов прошлого столетия. Так в работе Д. Дрэбин с соавт. [1] эффект свя-

зывания мишени с использованием культуры клеток крысиной нейробластомы В104 был показан для моноклональных IgG2a антител, специфичных к крысиному антигену, закодированному в онкогене *neu*. В проведенном эксперименте клетки крысиной нейробластомы, содержали активированный ген *neu*, выявленный и идентифицированный несколькими годами ранее в результате направленного химиче-

ского канцерогенеза [2, 3]. Человеческий гомолог продукта экспрессии гена *neu* крысы, изначально названный p185 (по массе полученной молекулы – 180 кДа), позже получил обозначение HER2 (human epidermal growth factor receptor 2).

Использование в качестве мишени человеческого рецептора эпидермального фактора роста 2 типа (HER2/*neu*) лежит в основе таргетной биологической терапии – одного из наиболее эффективных методов лечения для пациенток с РМЖ, и в особенности в случае HER2+ молекулярного подтипа опухоли. На долю последнего, без учета люминального подтипа, приходится до 20% от всех случаев РМЖ [4]. Более того, в настоящее время благодаря существующим методам лечения заболевания, и в том числе лечению препаратами моноклональных антител в составе комбинированной терапии, удаётся обеспечивать высокий уровень 5-летней выживаемости пациентов: в зависимости от своевременности диагностики он достигает 90% и более [5].

С момента открытия HER2 в качестве мишени в клиническую практику вошло уже несколько различных препаратов моноклональных антител. Среди них, например, трастузумаб, пертузумаб и маргетуксимаб. Пертузумаб отличается от двух других специфичностью в отношении антигена, а точнее субдомена HER2, который он распознает в организме [6]. Пионером в этом списке является трастузумаб, впервые одобренный под торговым наименованием Герцептин®, данные клиническим исследованиям которого были опубликованы в 1996 году [7] и позже в 1998 году [8], после чего препарат был одобрен FDA для клинического применения. После выхода на рынок трастузумаб стал стандартным средством лечения HER+ РМЖ как в адьювантной, так и в неoadьювантной видах терапии. Кроме того, сравнительно недавно использование трастузумаба было расширено за счет применения его конъюгатов с цитотоксическими агентами, такими как, например, эмтанзин и дерукстефан, которые вместе с ингибиторами тирозинкиназы – нератинибом и тукатинибом обеспечили дальнейшее развитие таргетной терапии РМЖ [6].

На сегодняшний день активно продолжается развитие препаратов-биоаналогов [9]. К настоящему моменту для трастузумаба известны биоаналоги [10, 11] под следующими торговыми наименованиями (в хронологическом порядке): Огиври (трастузумаб-dkst, MYL-14010), Герзума (трастузумаб-pkrb, СТ-Р6) [12], Канджинти (трастузумаб-anns, ABP 980) [13], Онтрузант (трастузумаб-dttb, SB3) и Тразимера (трастузумаб-pkrb, PF-05280014). Еще не менее 9 биоаналогов находятся на стадии клинических исследований. Что касается России – препарат трастузумаб входит в Перечень стратегически значимых лекарственных средств, производство которых должно быть обеспечено на территории Российской Федерации. Однако, единственный на сегодняшний день разработанный в России биоаналог трастузумаба – это препарат Гертикад®,

производства компании «Биокад». Поэтому разработка и регистрация препаратов-биоаналогов трастузумаба все ещё остается актуальной задачей.

Очевидно, что выходу на рынок каждого нового биоаналога предшествует несколько этапов клинических исследований, для аналитического сопровождения которых требуются валидированные биоаналитические методики, позволяющие провести оценку фармакокинетики и безопасности (в частности, оценку иммуногенности) исследуемого препарата в сравнении с оригинальным. Настоящее исследование было в том числе направлено на разработку и валидацию методики количественного определения препарата трастузумаб в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА), который является общепринятым для этих целей подходом. В данный момент существуют различные варианты ИФА-методик, включая применение синтетических пептидов, имитирующих HER2-специфический эпитоп трастузумаба, с использованием в качестве субстрата и фермента *p*-нитрофенилфосфата и щелочной фосфатазы соответственно (взамен тетраметилбензидина и пероксидазы хрена) [14], или классический «сэндвич»-ИФА, с покрытием антителами к трастузумабу или рекомбинантным HER2 [15]. При этом аналитический диапазон методики, в зависимости от поставленных задач, может составлять от 1,6 нг/мл [16] до 200 мкг/мл [17] трастузумаба.

Среди перспективных подходов также стоит отметить применение готовых коммерческих ИФА-наборов. Такие тест-системы теоретически могут снизить влияние на методику внешних факторов (например, серии реактивов, расходных материалов и стандартных образцов), повышающих вариабельность результатов анализа, а также упростить процесс проведения многоцентровых исследований с использованием валидированных методик сразу на нескольких площадках.

**Целью настоящего исследования** было проведение аналитической части двойного слепого рандомизированного сравнительного клинического исследования фармакокинетики и безопасности препаратов трастузумаба с участием здоровых добровольцев с дальнейшей оценкой биоаналогичности препаратов «Трастузумаб» (ООО «Мабскейл», Россия) и Герцептин® (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Швейцария).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Дизайн и участники клинического исследования

Клиническое исследование биоаналогичности фазы I было проведено в строгом соответствии с принципами Хельсинкской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации, а также требованиями надлежащей клинической практики (РКИ № 611 от 23.10.2019, выдано Министерством здравоохранения Российской Федерации). Исследование проводилось на ба-

зе аккредитованного клинического центра «Научный клинический центр открытого акционерного общества «Российские железные дороги», проведение было одобрено локальным этическим комитетом клинического центра. В исследовании принимали участие здоровые добровольцы (N = 100, 92 участника, 8 дублеров), мужчины в возрасте от 18 до 45 лет, соответствующие критериям включения/невключения в исследование. В ходе исследования 92 добровольца были рандомизированы в две группы в соотношении 1:1 (по 46 человек в каждой группе), и получали однократную внутривенную инфузию исследуемого препарата («Трастузумаб», 440 мг/20 мл, производства ООО «Мабскейл», Россия) или препарата сравнения (Герцептин®, 440 мг/20 мл, производства F. Hoffmann-La Roche Ltd., Швейцария) в дозе 6 мг/кг.

Первичной задачей исследования было продемонстрировать фармакокинетическую эквивалентность (биоаналогичность) двух препаратов, дополнительно оценивали их безопасность, в том числе иммуногенность. Для установления эквивалентности (биоаналогичности) сравниваемых препаратов использовали подход, основанный на оценке параметрических, двусторонних 90%-х доверительных интервалов для отношений средних геометрических значений фармакокинетических параметров:  $AUC_{0-\infty}$ ,  $AUC_{0-t}$  и  $Stax$  для исследуемого препарата и препарата сравнения. Выбранные пределы границ эквивалентности (границы 90%-го доверительного интервала), согласно протоколу, составили 80–125 %.

### **Определение концентрации трастузумаба в образцах добровольцев**

У каждого добровольца образцы крови для оценки фармакокинетики препаратов трастузумаба забирали до введения, а также через 90 минут (по окончании инфузии), и через 3, 6, 12, 24, 72, 120, 168, 336, 504, 672, 744, 1008, 1248, 1440 и 1704 часа после инфузии одного из препаратов (исследуемого или препарата сравнения). Из взятых образцов крови получали сыворотку крови, в составе которой далее проводили количественное определение трастузумаба методом ИФА.

### **Валидация методики количественного определения трастузумаба**

Методика количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека представлена в варианте непрямого иммуноферментного анализа. В таком варианте ИФА в подготовленные планшеты, покрытые рекомбинантным белком HER2, вносили образцы, разбавленные буферным раствором в соответствии с минимально необходимым разведением, после отмывки не связавшихся компонентов в лунки добавляли конъюгат козьих антител к Fc-фрагменту IgG человека с пероксидазой, а затем вносили субстрат – тетраметилбензидин. После остановки

реакции стоп-раствором желтое окрашивание (оптическая плотность) в лунках было пропорционально количеству трастузумаба в образцах. Измерение оптической плотности проводили с помощью планшетного фотометра, количественное определение трастузумаба проводили методом построения калибровочной кривой. Последовательность этапов методики, а также применявшееся оборудование и реактивы приведены в таблице 1.

Описанная методика была реализована в рамках готовой, коммерчески-доступной тест-системы «ИФА-Трастузумаб», производства компании ООО «Научно-производственный центр Пробиотек» (партия № 01, годен до 01.06.2021), которая представляла собой подготовленный набор реактивов и материалов, который позволил оперативно и с высокой производительностью провести анализ исследуемых образцов, снизив при этом возможную вариабельность результатов по сравнению с вновь разработанными (*in-house*) биоаналитическими методиками. Подобные тест-системы – один из вариантов выбора при проведении клинических и доклинических исследований [15]. Как и любая биоаналитическая методика, ИФА-методика, лежащая в основе тест-системы, была предварительно валидирована в соответствии с требованиями Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза<sup>1</sup> по следующим параметрам: селективность, определение калибровочного диапазона, определение регрессионной модели, прецизионность и правильность внутри одной аналитической серии и между аналитическими сериями, определение минимального необходимого разведения, возможность определения образца с концентрациями аналита выше аналитического диапазона и стабильность. Успешная валидация методики позволила использовать тест-систему для анализа образцов добровольцев, после чего рассчитанные концентрации трастузумаба в сыворотке крови использовались для дальнейшего расчета и анализа параметров фармакокинетики препаратов.

### **Расчет фармакокинетических параметров**

Расчет ФК-параметров с использованием концентраций трастузумаба в сыворотке крови добровольцев после однократной инфузии проводился в программе PK Solution 2.0, статистическая обработка данных проводилась в программе STATISTICA®. В качестве основного критерия оценки фармакокинетики препаратов трастузумаба для каждого добровольца рассчитывали значение  $AUC_{(0-\infty)}$  – площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-вре-

<sup>1</sup>Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза: [https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411942/cncd\\_21112016\\_85](https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411942/cncd_21112016_85). Ссылка активна на 28.07.2023.



Таблица 1. Этапы проведения методики с описанием использованного оборудования и реактивов

Table 1. Method stages with the equipment and reagents used

№	Наименование этапа Stage name	Оборудование и реактивы Equipment and reagents	Особенности проведения. Все реакции проходят при комнатной температуре (18–25 °C) Conduction Features. All reactions take place at room temperature (18–25 °C)
1	Промывка планшета Washing the plate	Промывочный раствор 0,025 % Tween-20 в PBS (PBST) Wash solution 0.025 % Tween-20 in PBS (PBST)	250 мкл в каждую лунку, встряхнуть на шейкере и удалить 250 µl per well, shake on a shaker and discard
2	Подготовка образцов Sample preparation	Разбавитель 0,1 % Tween-20 и 0,1 % БСА в PBS Diluent 0.1 % Tween-20 and 0.1 % BSA in PBS	Разбавить в 5000 раз в 2 этапа: 10 мкл образца на 990 мкл разбавителя, затем 20 мкл полученного раствора на 980 мкл разбавителя Dilute 5000 times in 2 steps: 10 µl of sample per 990 µl of diluent, then 20 µl of the resulting solution per 980 µl of diluent
3	Внесение образцов Sample addition	Внести по 100 мкл образцов, калибраторов и контролей в лунки планшета Dispense 100 µl of samples, calibrators and controls into wells of the plate	Инкубация 30 минут на горизонтальном шейкере при 170 об/мин Incubation 30 minutes on a horizontal shaker at 170 rpm
4	Промывка планшета Washing the plate	250 мкл PBST, автоматический промыватель планшетов 250 µl PBST, automatic plate washer	Удалить содержимое, промыть трижды Remove contents, rinse three times
5	Конъюгат вторичных антител с меткой Labeled Secondary Antibody Conjugate	Внести по 100 мкл свежеприготовленного конъюгата антител в разведении 1:20 000 Add 100 µl of freshly prepared antibody conjugate at a dilution of 1:20 000	Инкубация 30 минут на горизонтальном шейкере при 170 об/мин Incubation 30 minutes on a horizontal shaker at 170 rpm
6	Промывка планшета Washing the plate	250 мкл PBST, автоматический промыватель планшетов 250 µl PBST, automatic plate washer	Удалить содержимое, промыть трижды Remove contents, rinse three times
7	ТМБ-субстрат TMB-substrate	Внести по 100 мкл субстратного раствора ТМБ Add 100 µl of TMB substrate solution	Инкубация 15 мин в темноте Incubation 15 min in the dark
8	Остановка реакции Reaction stop	Внести по 100 мкл стоп-реагента Add 100 µl of Stop Reagent	Инкубация 1 мин на горизонтальном шейкере при 170 об/мин Incubation 1 min on a horizontal shaker at 170 rpm
9	Измерение оптической плотности Optical density measurement	Пакет ScanIt software for Microplate reader v. 5.0.0.42 ScanIt software for Microplate reader v. 5.0.0.42	Длина волны 450 нм Wavelength 450 nm
10	Интерпретация результатов Interpretation of results	Программа Origin Pro 2015 Origin Pro 2015 Program	Построение калибровочной кривой и расчет концентрации трастузумаба Calibration curve plotting and calculation and calculation of trastuzumab concentration

мя», начиная с нулевого значения времени до бесконечности. Значение  $AUC_{(0-\infty)}$  рассчитывали по формуле:

$$AUC_{(0-\infty)} = AUC_{(0-t)} + \frac{C_{last}}{k_{el}}$$

где  $C_{last}$  – расчетное (моделируемое) значение концентрации действующего вещества в последней пробе;  $k_{el}$  – константа элиминации. Дополнительно рассчитывались параметры: максимальная концентрация ( $C_{max}$ ), время достижения максимальной концентрации ( $t_{max}$ ), период полувыведения ( $t_{1/2}$ ). Кроме того, было проведено вычисление относительной биодоступности трастузумаба после применения исследуемого препарата по сравнению с применением препарата сравнения, а также показатель относительной степени всасывания по формулам:

$$f = (AUC_{(0-\infty)T}) / (AUC_{(0-\infty)R});$$

$$f = (AUC_{(0-t)T}) / (AUC_{(0-t)R}) \text{ и } f' = (C_{max}T) / (C_{max}R)$$

где  $T$  и  $R$  – это исследуемый препарат и препарат сравнения, соответственно.

Статистический анализ основных параметров фармакокинетики  $C_{max}$ ,  $AUC_{(0-t)}$ ,  $AUC_{(0-\infty)}$  проводился в предположении об их лог-нормальном распределении и мультипликативной модели влияния факторов препарат (*formulation*) и участник исследования (*subject*). В связи с тем, что добровольцы госпитализировались не в один день, дополнительно в модели дисперсионного анализа (ANOVA) был учтен фактор «группа одновременно госпитализируемых добровольцев» (*group*). При этом фактор *subject* рассматривался как случайный, а факторы *formulation* и *group* – как фиксированные эффекты:

Модель в ANOVA: *formulation + group (formulation)*.

В интересах проведения дисперсионного анализа основные параметры фармакокинетики  $C_{\max}$ ,  $AUC_{(0-t)}$ ,  $AUC_{(0-\infty)}$  были прологарифмированы (для всех показателей использовался натуральный логарифм), после чего с полученными значениями логарифмов оперировали как с выборкой нормально распределенных случайных величин. По результатам ANOVA рассчитывались: остаточные вариации, точечные оценки и их 90%-е доверительные интервалы для различия («тестируемый ЛП» минус «референтный ЛП») логарифмически преобразованных основных фармакокинетических параметров  $C_{\max}$ ,  $AUC_{(0-t)}$ ,  $AUC_{(0-\infty)}$ . Полученные в логарифмической шкале доверительные интервалы были подвергнуты обратному преобразованию для того, чтобы построить искомые доверительные интервалы для отношения средних геометрических в исходных (не преобразованных) единицах измерения.

### Оценка иммуногенности

Одной из задач клинического исследования была сравнительная оценка безопасности исследуемого препарата и препарата сравнения, а также оценка иммуногенности препаратов, а именно: определение связывающих анти-лекарственных антител (АЛА) к трастузумабу. Для оценки иммуногенности у каждого добровольца образцы крови для оценки иммуногенности препаратов трастузумаба забирали до введения, а также через 336, 744, 1248 и 1704 часа после начала введения препарата. Из взятых образцов крови получали сыворотку крови, в составе которой далее проводили полуколичественное определение АЛА к трастузумабу методом ИФА. Полуколичественное определение связывающих АЛА к трастузумабу методом ИФА проводили с помощью предварительно валидированной методики, основанной на методе твердофазного мостикового ИФА с дополнительным этапом кислотной диссоциации для образцов и биотин-стрептавидиновым детектированием [18]. Методика была разработана и валидирована в соответствии с требованиями нормативной документации<sup>1,2</sup>,

<sup>1</sup> Guidance for Industry: Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products – Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER); Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), January 2019. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/immunogenicity-testing-therapeutic-protein-products-developing-and-validating-assays-anti-drug>. Accessed: 28.07.2023.

<sup>2</sup> Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза, утвержденные решением Совета Евразийской Экономической Комиссии №89, от 3 ноября 2016 г. Доступно по: <http://pharmacopoeia.ru/wp-content/uploads/2016/11/8903111.pdf>. Ссылка активна на 28.07.2023.

что позволило применить ее для анализа образцов сыворотки крови добровольцев в ходе проведения клинического исследования.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Валидация методики количественного определения трастузумаба в сыворотке крови здоровых добровольцев

Методика, лежащая в основе тест-системы «ИФА-Трастузумаб» была валидирована в соответствии с требованиями Приложения 6 к Правилам проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза.

**Селективность** методики обеспечивалась использованием на покрытии планшета непосредственной мишени трастузумаба – рекомбинантного человеческого рецептора фактора роста 2 типа (HER2). Для проверки селективности методики были проведены эксперименты по анализу содержания трастузумаба в концентрации 3 мкг/мл, в составе 10 индивидуальных образцов сыворотки крови человека, включая гемолизованные и гиперлипидемические образцы. Каждый образец анализировали в трех повторях. Методика была признана селективной, так как отклонение рассчитанной концентрации образцов контроля качества от теоретической величины не превышало 19 % при допустимых 25 %, а среднее значение отклонения концентраций от теоретической величины находилось в диапазоне 75–125 % от теоретического значения для каждого изученного образца матрицы. Полученные отклонения были достигнуты во всех измерениях (100 %) при критерии приемлемости не менее 80 % проанализированных образцов.

**Аналитический диапазон** методики составил от 3 до 300 мкг/мл трастузумаба в сыворотке крови. Для всесторонней оценки методики использовали 8 калибровочных образцов трастузумаба в интактной сыворотке с концентрацией 0, 3, 6, 30, 90, 160, 250, 300 мкг/мл и 5 образцов для контроля качества концентрации 3, 8,5, 150, 225, 300 мкг/мл. Нижний предел количественного определения (НПКО) был определен на уровне 3 мкг/мл трастузумаба в сыворотке крови, так как оптическая плотность данного образца контроля качества была как минимум в 5 раз больше показаний интактной сыворотки крови. Значения концентрации трастузумаба в образце НПКО были дискретными и воспроизводимыми, с прецизионностью между сериями 8,7 %, не превышающей 25 %, и правильностью 96,3 %, входящей в допустимый диапазон 75–125 %.

**Регрессионная модель** зависимости оптической плотности от концентрации трастузумаба строилась с использованием 8 калибровочных образцов и описывалась уравнением 4PL-логистической зависимости вида:

$$y = D + \frac{A - D}{1 - \left(\frac{x}{C}\right)^b},$$

где  $y$  – оптическая плотность,  $x$  – концентрация аналита,  $A$ ,  $b$ ,  $C$ ,  $D$  – параметры уравнения. В шести независимых циклах для полученных калибровочных кривых абсолютное значение относительной погрешности обратных пересчитанных концентраций калибровочных образцов не превышало 22,0 % для образцов на уровне верхнего и нижнего пределов количественного определения (образцы 3 и 300 мкг/мл) и 9,5 % для остальных пяти образцов внутри аналитического диапазона.

**Правильность и прецизионность** значений концентрации трастузумаба в образцах контроля качества на всех пяти уровнях концентраций была рассчитана как внутри одной аналитической серии, так и между 6 независимыми сериями. Правильность оценивалась путем расчета относительной погрешности (RE, %) для рассчитанных значений концентрации трастузумаба, а прецизионность – путем расчета коэффициента вариации (CV, %). Дополнительно рассчитывали значения общей ошибки (TE, %) для образцов контроля качества на каждом уровне концентраций трастузумаба. Полученные данные о правильности и прецизионности методики внутри одной серии представлены в таблице 2, а между аналитическими сериями – в таблице 3.

**Таблица 2. Значения правильности и прецизионности определения трастузумаба внутри одной аналитической серии**

**Table 2. Within-run method accuracy and precision**

Номинальная концентрация, мкг/мл Nominal concentration, ug/mL	Среднее значение рассчитанной концентрации, мкг/мл Mean measured concentration, ug/mL	Стандартное отклонение, SD Standard deviation, SD	Коэффициент вариации, % Coefficient of variation, CV, %	Относительная погрешность, % Relative error, RE, %	Общая ошибка, % Total error, TE, %
3,0	3,02	0,09	3,0	0,7	3,7
8,5	7,90	0,26	3,3	-7,1	10,4
150	135,02	2,36	1,7	-10,0	11,7
225	207,32	8,96	4,3	-7,9	12,2
300	259,78	6,81	2,6	-13,4	16,0

Все полученные данные соответствовали критериям приемлемости: отклонение среднего значения концентрации образцов контроля качества от номинальной величины (правильность) не превышало 20 %, коэффициент вариации рассчитанных значений концентрации образцов контроля качества на каждом уровне (прецизионность) не превышал 25 % для наибольшего и наименьшего значений концент-

рации и 20 % для остальных, общая ошибка не превышала 40 % для крайних точек аналитического диапазона и 30 % для остальных.

**Таблица 3. Значения правильности и прецизионности методики между 6 независимыми аналитическими сериями**

**Table 3. Between-run method accuracy and precision for 6 independent analytical runs**

Номинальная концентрация, мкг/мл Nominal concentration, ug/mL	Среднее значение рассчитанной концентрации, мкг/мл Mean measured concentration, ug/mL	Стандартное отклонение, SD Standard deviation, SD	Коэффициент вариации, % Coefficient of variation, CV, %	Относительная погрешность, % Relative error, RE, %	Общая ошибка, % Total error, TE, %
3,0	2,89	0,25	8,7	-3,7	12,4
8,5	8,13	0,50	6,2	-4,4	10,6
150	134,74	8,68	6,4	-10,2	16,6
225	210,47	14,81	7,0	-6,5	13,5
300	268,21	20,66	7,7	-10,6	18,3

В качестве **минимально необходимого разведения** в методике было выбрано разведение образцов в 5000 раз (0,02 % сыворотка крови). Данное значение было получено в результате экспериментов с разведением образца трастузумаба с концентрацией 3 мкг/мл в сыворотке крови в 10, 100, 1000 и 5000 раз. Выбранное разведение позволило снизить фоновый сигнал, вызванный неспецифическим связыванием компонентов биологической матрицы, а также одновременно обеспечить концентрацию в образцах сыворотки крови добровольцев, попадающую в валидированный аналитический диапазон методики. В результате отклонение среднего значения концентрации образца контроля качества от теоретической величины не превысило допустимые 25 %.

Для определения возможности разведения образцов с концентрацией анализируемого вещества выше калибровочного диапазона были проведены эксперименты по возможности линейного разведения образцов дополнительно к минимально необходимому разведению. Образцы контроля качества с концентрацией трастузумаба 600 мкг/мл, последовательно разбавляли интактной сывороткой для получения образцов с концентрацией 300 и 150 мкг/мл. Каждый из данных образцов анализировали в трех повторностях в одной серии. В ходе валидации прецизионность (коэффициент вариации, CV, %) в серии разведений образца с концентрацией трастузумаба 600 мкг/мл в 2 раза до концентрации 300 мкг/мл не превышала 1,3 %, в 4 раза до концентрации 150 мкг/мл – 3,3 %, при этом правильность (относительная погрешность, RE, %) для тех же разведений составила -10,4 % и -3,9 %, соответственно. Полученные значения соответствовали критериям приемлемости, при которых отклонение от теоретической величины не должно превышать 25 %.

**Стабильность** трастузумаба в составе биологической матрицы (сыворотки крови) при применении методики была доказана для различных условий, аналогичных условиям обращения с исследуемыми образцами добровольцев. В ходе валидации методики была доказана: краткосрочная («настолярная») стабильность образцов трастузумаба в сыворотке крови в течение 6 часов при комнатной температуре, стабильность образцов трастузумаба в сыворотке крови после 3 последовательных циклов замораживания (12 часов)-оттаивания, а также долгосрочная стабильность при хранении в условиях низкотемпературной заморозки при температуре не выше минус 35 °С в течение 171 дня. Во всех экспериментах исследовались два образца для контроля качества концентрацией 8,5 и 225 мкг/мл. Сводная информация о данных полученных при оценке различных видов стабильности, приведена в таблице 4.

**Таблица 4.** Стабильность трастузумаба в сыворотке крови при хранении в различных условиях

**Table 4.** Trastuzumab stability in human blood serum in different conditions

Номинальная концентрация, мкг/мл Nominal concentration, ug/mL	Среднее значение рассчитанной концентрации, мкг/мл Mean measured concentration, ug/mL	Коэффициент вариации, % Coefficient of variation, CV, %	Относительная погрешность, % Relative error, RE, %
Краткосрочная («настолярная») стабильность Bench-top stability			
8,5	8,29	3,0	-2,5
225,0	223,94	2,1	-0,5
Стабильность при замораживании-размораживании (3 цикла) Freeze-thaw stability (3 cycles)			
8,5	7,53	7,7	-11,4
225,0	213,33	3,5	-5,2
Долгосрочная стабильность при температуре не выше -35 °С Long-term stability at temperatures not exceeding -35 °C			
8,5	7,52	12,6	-11,5
225,0	206,86	5,7	-8,1

Полученные значения относительной погрешности для усредненных значений концентрации модельных образцов контроля качества не превышали 20 %, что соответствовало критериям приемлемости и позволило сделать вывод о стабильности трастузумаба в составе биологической матрицы и возможности применения методики для оценки его концентраций в изученных условиях.

Успешная валидация биоаналитической методики, лежащей в основе тест-системы «ИФА-Трастузумаб» позволила использовать данную тест-систему для анализа образцов добровольцев-участников клинического исследования. Полученные значения концентрации трастузумаба в образцах добровольцев были далее использованы для построения индивидуальных фармакокинетических профилей препара-

тов, а также для расчета фармакокинетических параметров, с дальнейшей статистической оценкой биоаналогичности препаратов Герцептин® и «Трастузумаб».

### Оценка биоаналогичности препаратов

С использованием данных о концентрациях трастузумаба в образцах добровольцев были построены индивидуальные фармакокинетические профили препарата сравнения и исследуемого препарата, приведенные на рисунке 1.

Также для каждого добровольца были рассчитаны индивидуальные значения ФК-параметров трастузумаба, необходимые для проверки эквивалентности сравниваемых препаратов. Основные параметры для исследуемого препарата и препарата сравнения представлены в таблице 5.

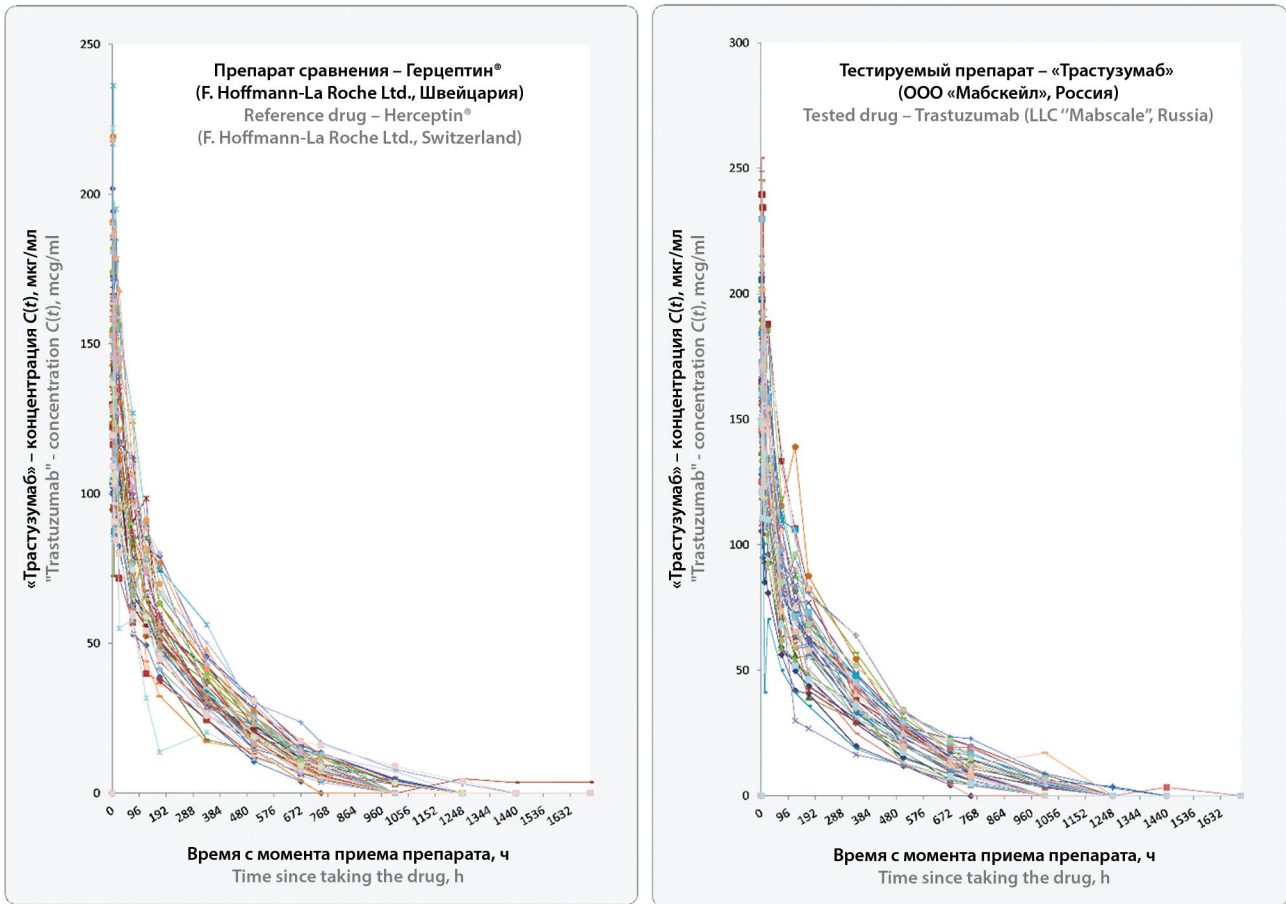
**Таблица 5.** Фармакокинетические параметры исследуемого препарата и препарата сравнения

**Table 5.** PK-parameters for test and reference drug

Параметр (средние значения) PK-parameter (mean)	Исследуемый препарат: «Трастузумаб» (ООО «Мабскейл», Россия) Investigational drug: Trastuzumab (ООО Mabscale, Russia)
AUC <sub>(0-t)<sup>t</sup></sub> мкг · ч/мл AUC <sub>(0-t)<sup>t</sup></sub> mcg · h/ml	35365
AUC <sub>(0-∞)<sup>t</sup></sub> мкг · ч/мл AUC <sub>(0-∞)<sup>t</sup></sub> mcg · h/ml	35511
C <sub>max<sup>t</sup></sub> мкг/мл C <sub>max<sup>t</sup></sub> mcg/ml	179
t <sub>max<sup>t</sup></sub> ч t <sub>max<sup>t</sup></sub> h	3,14
t <sub>1/2<sup>t</sup></sub> сут. t <sub>1/2<sup>t</sup></sub> days	8,4
Параметр (средние значения) PK-parameter (mean)	Препарат сравнения: Герцептин®, (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Швейцария) Reference drug: Herceptin®, (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland)
AUC <sub>(0-t)<sup>t</sup></sub> мкг · ч/мл AUC <sub>(0-t)<sup>t</sup></sub> mcg · h/ml	31156
AUC <sub>(0-∞)<sup>t</sup></sub> мкг · ч/мл AUC <sub>(0-∞)<sup>t</sup></sub> mcg · h/ml	31280
C <sub>max<sup>t</sup></sub> мкг/мл C <sub>max<sup>t</sup></sub> mcg/ml	162
t <sub>max<sup>t</sup></sub> ч t <sub>max<sup>t</sup></sub> h	2,65
t <sub>1/2<sup>t</sup></sub> сут. t <sub>1/2<sup>t</sup></sub> days	8,3

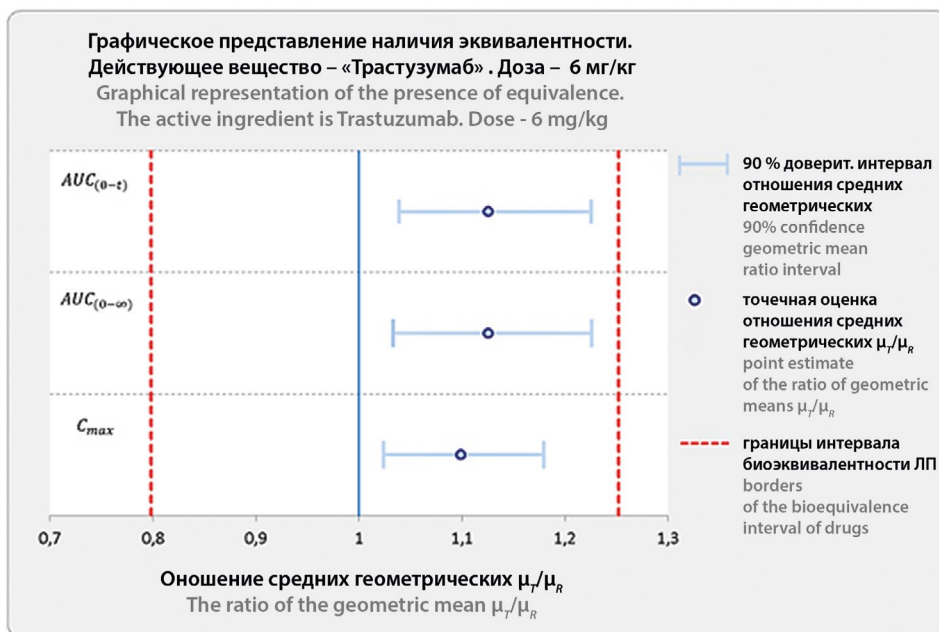
Значения двухсторонних 90%-х доверительных интервалов, рассчитанные с использованием средних геометрических значений параметров AUC<sub>(0-∞)<sup>t</sup></sub>, AUC<sub>(0-t)<sup>t</sup></sub> и C<sub>max<sup>t</sup></sub> составили 103,32 % – 122,60 %, 103,38 % – 122,55 % и 102,39 % – 117,96 %, соответственно. Полученные доверительные интервалы лежали в границах, установленных протоколом исследования 80 % – 125 %, что позволило сделать вывод о фармакокинетической эквивалентности (биоаналогичности) исследуемого препарата и препарата сравнения (рисунок 2).





**Рисунок 1.** Индивидуальные для каждого добровольца фармакокинетические профили препарата сравнения (Герцептин®) и исследуемого препарата («Трастузумаб»)

**Figure 1.** Individual for each volunteer PK-profiles of reference (Herceptin®) and test drug (Trastuzumab)



**Рисунок 2.** Графическое представление эквивалентности исследуемого препарата и препарата сравнения

**Figure 2.** The biosimilarity of test and reference drugs

## Оценка иммуногенности

В ходе оценки иммуногенности трастузумаба было проведено 11 циклов в формате скрининга, после чего 32 образца из 440 проанализированных были признаны «потенциально положительными» на наличие связывающих антител к трастузумабу. Выявленные при скрининге образцы сыворотки крови добровольцев были дополнительно проанализированы в ходе 3 циклов в формате подтверждающего анализа, при этом ни у одного из добровольцев не было подтверждено наличие антител в образцах, что совпадает с литературными данными, свидетельствующими о сравнительно низкой иммуногенности трастузумаба [19, 20].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Была проведена оценка фармакокинетики и иммуногенности препаратов «Трастузумаб» (ООО «Маб-скейл») и Герцептин® (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Швейцария) после однократной внутривенной инфузии здоровым добровольцам. Для проведения аналитической части клинического исследования использовали две валидированные методики: количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека методом ИФА (реализована в составе готовой тест-системы «ИФА-Трастузумаб») и полуколичественного определения анти-лекарственных антител к трастузумабу методом ИФА в сочетании с кислотной диссоциацией образцов. Валидированные методики были успешно применены для анализа исследуемых образцов добровольцев из клинического исследования биоаналогичности. Рассчитанные фармакокинетические параметры, а также параметры относительной биодоступности и относительной степени всасывания трастузумаба после введения исследуемого препарата и препарата сравнения позволили сделать вывод о биоаналогичности сравниваемых препаратов. В ходе исследования иммуногенности анти-лекарственных антител к трастузумабу ни у одного из добровольцев выявлено не было.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Drebin J. A., Link V. C., Weinberg R. A., Greene M. I. Inhibition of tumor growth by a monoclonal antibody reactive with an oncogene-encoded tumor antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1986;83(23):9129–9133. DOI: 10.1073/pnas.83.23.9129.
- Coussens L., Yang-Feng T. L., Liao Y. C., Chen E., Gray A., McGrath J., Peter H., Seeburg P. H., Libermann T. A., Schlessinger J., Francke U., Levinson A., Ullrich A. Tyrosine Kinase Receptor with Extensive Homology to EGF Receptor Shares Chromosomal Location with neu Oncogene. *Science*. 1985;230(4730):1132–1139. DOI: 10.1126/science.2999974.
- Shih C., Padhy L. C., Murray M., Weinberg R. A. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature*. 1981;290(5803):261–264. DOI: 10.1038/290261a0.
- Beňáčka R., Szabóová D., Guľašová Z., Hertelyová Z., Radoňák J. Classic and New Markers in Diagnostics and Classification of Breast Cancer. *Cancers*. 2022;14(21):5444. DOI: 10.3390/cancers14215444.
- Swain S. M., Shastry M., Hamilton E. Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2023;22(2):101–126. DOI:10.1038/s41573-022-00579-0.
- Schlam I., Swain S. M. HER2-positive breast cancer and tyrosine kinase inhibitors: the time is now. *NPJ Breast Cancer*. 2021;7(1):56. DOI: 10.1038/s41523-021-00265-1.
- Baselga J., Tripathy D., Mendelsohn J., Baughman S., Benz C. C., Dantis L., Sklarin N. T., Seidman A. D., Hudis C. A., Moore J., Rosen P. P., Twaddell T., Henderson I. C., Norton L. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 1996;14(3):737–744. DOI: 10.1200/JCO.1996.14.3.737.
- Pegram M. D., Lipton A., Hayes D. F., Weber B. L., Baselga J. M., Tripathy D., Baly D., Baughman S. A., Twaddell T., Glaspy J. A., Slamon D. J. Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *Journal of Clinical Oncology*. 1998;16(8):2659–2671. DOI: 10.1200/JCO.1998.16.8.2659.
- Joshi D., Khurshed R., Gupta S., Wadhwa D., Singh T. G., Sharma S., Porwal S., Gauniyal S., Vishwas S., Goyal S., Gupta G., Eri R. D., Williams K. A., Dua K., Singh S. K. Biosimilars in Oncology: Latest Trends and Regulatory Status. *Pharmaceutics*. 2022;14(12):2721. DOI: 10.3390/pharmaceutics14122721.
- Triantafyllidi E., Triantafyllidis J. K. Systematic Review on the Use of Biosimilars of Trastuzumab in HER2+ Breast Cancer. *Biomedicines*. 2022;10(8):2045. DOI: 10.3390/biomedicines10082045.
- Thill M. Biosimilar Trastuzumab in Clinical Trials: Differences or Not? *Breast Care (Basel)*. 2019;14(1):17–22. DOI: 10.1159/000496503.
- Sim S. H., Kim J. E., Kim M. H., Park Y. H., Kim J. H., Suh K. J., Koh S.-J., Park K. H., Kang M. J., Ahn M. S., Lee K. E., Kim H.-J., Ahn H. K., Kim H. J., Park K. U., Byun J. H., Park J. H., Lee G.-W., Lee K. S., Sohn J., Jung K. H., Park I. H. Phase II study to investigate the efficacy of trastuzumab biosimilar (Herzuma®) plus treatment of physician's choice (TPC) in patients with heavily pretreated HER-2+ metastatic breast cancer (KCSG BR 18-14/KM10B). *Breast*. 2022;65:172–178. DOI: 10.1016/j.breast.2022.08.002.
- Jagiello-Gruszfeld A. I., Lemanska I., Brewczynska E., Pogoda K., Dubianski R., Sienkiewicz R., Szombara E., Jagielska B., Nowecki Z. Trastuzumab biosimilar (Kanjinti) in breast cancer patients: One-center retrospective observational study. *Journal of Clinical Oncology*. 2021;39(15\_suppl):e13015–e13015 DOI: 10.1200/JCO.2021.39.15\_suppl.e13015.
- Cardinali B., Lunardi G., Millo E., Armirotti A., Damonte G., Profumo A., Gori S., Iacono G., Levaggi A., Del Mastro L. Trastuzumab quantification in serum: a new, rapid, robust ELISA assay based on a mimetic peptide that specifically recognizes trastuzumab. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2014;406:4557–4561. DOI: 10.1007/s00216-014-7842-4.
- Pisarev V. V., Ivanov A. V. Validation of ELISA Test-system for Trastuzumab (Herceptin, Hertikad) quantitative determination in biological fluids. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2023;(1):58–64. (In Russ.) doi: 10.37489/2587-7836-2023-1-58-64.
- Damen C. W., de Groot E. R., Heij M., Boss D. S., Schellens J. H., Rosing H., Beijnen J. H., Aarden L. A. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of trastuzumab in human serum and plasma. *Analytical Biochemistry*. 2009;391(2):114–120. DOI: 10.1016/j.ab.2009.05.030.
- Maple L., Lathrop R., Bozich S., Harman W., Tacey R., Kelley M., Danilkovitch-Miagkova A. Development and validation of ELISA for Herceptin detection in human serum. *Journal of Immunological Methods*. 2004;295(1–2):169–182. DOI: 10.1016/j.jim.2004.09.012.
- Eliseeva O. A., Kolganova M. A., Shokhin I. E., Dementev S. P., Vlasov A. M., Zamyatnin A. A., Dubovik N. S., Savchenko A. Yu., Dozmorova N. V., Luzhanin V. G. Development and Validation of the ELISA Method for Anti-trastuzumab Antibodies Determination in Human Serum. *Drug development & registration*. 2022;11(4):120–127. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-120-127.
- Kilany L. A. A., Gaber A. A. S., Aboulwafa M. M., Zedan H. H. Trastuzumab immunogenicity development in patients' sera and in laboratory animals. *BMC Immunology*. 2021;22:15. DOI: 10.1186/s12865-021-00405-z.
- Xu B., Zhang Q., Sun T., Li W., Teng Y., Hu X., Bondarenko I., Adamchuk H., Zhang L., Trukhin D., Wang S., Zheng H., Tong Z., Shparyk Ya., Wang Q., and HLX02-BC01 Investigators. Efficacy, Safety, and Immunogenicity of HLX02 Compared with Reference Trastuzumab in Patients with Recurrent or Metastatic HER2-Positive Breast Cancer: A Randomized Phase III Equivalence Trial. *BioDrugs*. 2021;35:337–350. DOI: 10.1007/s40259-021-00475-w.