



Оригинальная статья / Research article

Разработка и валидация методики определения антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа

О. А. Елисеева^{1,3✉}, М. А. Колганова¹, И. Е. Шохин¹, С. П. Дементьев², А. М. Власов²,
А. А. Замятнин², Н. С. Дубовик³, А. Ю. Савченко³, Н. В. Дозморова⁴, В. Г. Лужанин⁴

¹ ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3

² ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

³ ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (НИЯУ МИФИ), 115409, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 31

⁴ ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России), 614990, Россия, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2

✉ Контактное лицо: Елисеева Ольга А. E-mail: o.eliseeva@cpha.ru

ORCID: О. А. Елисеева – <https://orcid.org/0000-0003-2683-6300>; М. А. Колганова – <https://orcid.org/0000-0003-4568-1172>;

И. Е. Шохин – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>; С. П. Дементьев – <https://orcid.org/0000-0003-3411-7293>;

А. М. Власов – <https://orcid.org/0000-0002-0742-1575>; А. А. Замятнин – <https://orcid.org/0000-0002-3046-4565>;

Н. С. Дубовик – <https://orcid.org/0000-0002-6171-2496>; А. Ю. Савченко – <https://orcid.org/0000-0003-2734-5036>;

Н. В. Дозморова – <https://orcid.org/0000-0001-8768-860X>; В. Г. Лужанин – <https://orcid.org/0000-0002-6312-2027>.

Статья поступила: 14.10.2022

Статья принята в печать: 15.12.2022

Статья опубликована: 27.12.2022

Резюме

Введение. Одним из широко используемых специфических препаратов моноклональных антител с anti-HER₂ (human epidermal growth factor receptor 2) активностью является трастузумаб – это высокоэффективное средство для «удаления» гиперэкспрессированных единиц рецептора HER₂ с поверхности клеток и снижения его онкогенности. Как и для других биологических лекарственных препаратов, для трастузумаба одной из возможных нежелательных реакций со стороны иммунной системы является иммуногенность – выработка противолечекарственных антител к препарату.

Цель. Разработка и валидация методики полуколичественного определения антител к трастузумабу в сыворотке крови человека.

Материалы и методы. Полуколичественное определение антител проводилось методом иммуноферментного анализа в сочетании с техникой АСЕ, с использованием спектрофотометрического детектирования в видимом диапазоне спектра.

Результаты и обсуждения. Разработанная методика была валидирована по показателям: предел исключения, селективность, чувствительность, «хук»-эффект, толерантность к присутствию лекарственного препарата, прецизионность и стабильность (краткосрочная и долгосрочная). Для снижения интерференции компонентов биологической матрицы в анализе на этапе разработки было определено значение минимального необходимого разбавления (1:10). Рассчитанные значения предела исключения для этапа скрининга (фактор нормализации) и подтверждающего анализа составили 0,004 и 34,59 %, соответственно. Чувствительность разработанной методики составила 99,5 нг/мл антител к трастузумабу.

Заключение. Полученные при валидации методики результаты позволяют применять методику полуколичественного определения антител к трастузумабу в сыворотке крови человека для проведения аналитической части исследований безопасности препаратов трастузумаба.

Ключевые слова: трастузумаб, иммуногенность, биоаналоги, иммуноферментный анализ

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

Вклад авторов. О. А. Елисеева и М. А. Колганова участвовали в разработке и валидации методики и отвечали за написание текста статьи. А. М. Власов, С. П. Дементьев и Н. С. Дубовик отвечали за интерпретацию результатов и представление данных. И. Е. Шохин и А. Ю. Савченко отвечали за методологию исследования и рецензирование текста статьи. А. А. Замятнин, Н. В. Дозморова и В. Г. Лужанин руководили проведением исследования. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Елисеева О. А., Колганова М. А., Шохин И. Е., Дементьев С. П., Власов А. М., Замятнин А. А., Дубовик Н. С., Савченко А. Ю., Дозморова Н. В., Лужанин В. Г. Разработка и валидация методики определения антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4–1):120–127. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-120-127](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-120-127)

Development and Validation of the ELISA Method for Anti-trastuzumab Antibodies Determination in Human Serum

Olga A. Eliseeva^{1,3✉}, Maria A. Kolganova¹, Igor E. Shokhin¹, Sergey P. Dementyev²,
Alexander M. Vlasov², Andrey A. Zamyatnin², Natalia S. Dubovik³, Alla Yu. Savchenko³,
Natalia V. Dozmorova⁴, Vladimir G. Luzhanin⁴

© Елисеева О. А., Колганова М. А., Шохин И. Е., Дементьев С. П., Власов А. М., Замятнин А. А., Дубовик Н. С., Савченко А. Ю., Дозморова Н. В., Лужанин В. Г., 2022

© Eliseeva O. A., Kolganova M. A., Shokhin I. E., Dementyev S. P., Vlasov A. M., Zamyatnin A. A., Dubovik N. S., Savchenko A. Yu., Dozmorova N. V., Luzhanin V. G., 2022

¹ LLC "CPHA", 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

² I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

³ National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), 31, Kashirskoe highway, Moscow, 115409, Russia

⁴ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Perm State Pharmaceutical Academy" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2, Polevaya str., Perm, 614990, Russia

✉ **Corresponding author:** Olga A. Eliseeva. **E-mail:** o.eliseeva@cpha.ru

ORCID: Olga A. Eliseeva – <https://orcid.org/0000-0003-2683-6300>; Maria A. Kolganova – <https://orcid.org/0000-0003-4568-1172>;
Igor E. Shokhin – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>; Sergey P. Demytyev – <https://orcid.org/0000-0003-3411-7293>;
Alexander M. Vlasov – <https://orcid.org/0000-0002-0742-1575>; Andrey A. Zamyatnin – <https://orcid.org/0000-0002-3046-4565>;
Natalia S. Dubovik – <https://orcid.org/0000-0002-6171-2496>; Alla Yu. Savchenko – <https://orcid.org/0000-0003-2734-5036>;
Natalia V. Dozmorova – <https://orcid.org/0000-0001-8768-860X>; Vladimir G. Luzhanin – <https://orcid.org/0000-0002-6312-2027>.

Received: 14.10.2022 **Revised:** 15.12.2022 **Published:** 27.12.2022

Abstract

Introduction. One of the widely used specific anti-HER₂ (human epidermal growth factor receptor 2) MAb drugs is trastuzumab. Trastuzumab is highly effective for malignant HER₂ hyperexpression reduction, which results in HER₂ oncogenicity decrease. As any other biotherapeutics trastuzumab can cause immunological adverse reactions, e.g. immunogenicity or anti-drug antibodies (ADAs) production.

Aim. The aim of this study was to develop and validate the analytical method for anti-trastuzumab antibodies determination in human blood serum.

Materials and methods. The semi-quantitative anti-trastuzumab antibody determination was carried out by the ELISA method combined with ACE technique, using spectrophotometric detection in the visible range of the spectrum.

Results and discussion. The developed method was validated for cut point, selectivity, sensitivity, "hook" effect, drug tolerance, precision and stability (short-term and long-term). To decrease the background noise from non-specific binding of sera components, the minimum required dilution value was determined at 10 % serum. The calculated values for screening cut point (normalization factor) and confirmatory cut point were 0.004 and 34.59 %, respectively. The sensitivity of the developed method was estimated at 99.5 ng/mL of anti-trastuzumab antibodies.

Conclusion. The obtained results allow us to use the developed ACE ELISA method for the determination of anti-trastuzumab antibodies in human serum during trastuzumab safety clinical trials.

Keywords: trastuzumab, 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. Olga A. Eliseeva and Maria A. Kolganova participated in the development and validation of the analytical method, and were responsible for paper draft preparation. Alexander M. Vlasov, Sergey P. Demytyev and Natalia S. Dubovik were responsible for data processing and preparation. Igor E. Shokhin and Alla Yu. Savchenko were responsible for study methodology and article text review and editing. Andrey A. Zamyatnin, Natalia V. Dozmorova, Vladimir G. Luzhanin – project supervision and administration. All authors participated in the discussion of the results and article review.

Funding. The study was carried out with the financial support of the Perm Scientific and Educational Center "Rational Subsoil Use", 2022.

For citation: Eliseeva O. A., Kolganova M. A., Shokhin I. E., Demytyev 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(4–1):120–127. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-120-127](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-120-127)

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее распространённых видов рака у женщин является рак молочной железы (РМЖ). Данное заболевание встречается примерно у каждой двенадцатой женщины в мире. Согласно статистическим данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 2020 г. во всем мире было зарегистрировано свыше 2,2 миллиона случаев РМЖ¹. В России за 2020 г. зарегистрировали более 69 тысяч случаев рака молочной железы, при этом РМЖ занимал лидирующие позиции в структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями женского населения, составляя 21,7 % от всех случаев злокачественных новообразований у женщин [1]. Между тем, именно ранняя диагностика РМЖ зачастую во многом

определяет исход болезни – при выявлении заболевания на ранней стадии, лечение становится более эффективным и повышает выживаемость пациентов. Всего выделяют четыре основных молекулярных подтипа рака молочной железы: люминальный А, люминальный Б, HER₂-позитивный и тройной негативный РМЖ. Терапия первой линии для рака молочной железы обычно включает в себя лучевую и химиотерапию, хирургическое вмешательство для эрадикации опухоли, а также таргетные противораковые лекарственные препараты.

В настоящее время таргетная терапия используется все чаще и включает в себя использование биологических, и в том числе биотехнологических лекарственных препаратов, например, препаратов на основе технологии моноклональных антител (МкАТ). Одним из таких препаратов является трастузумаб. В качестве первого терапевтического МкАТ, нацеленного на рецептор HER₂, трастузумаб произвел революцию в лечении HER₂-позитивного рака молочной

¹ WHO fact sheet "Cancer". Available at: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>. Accessed: 16.11.2021

железы, а впоследствии и некоторых других типов рака, связанных с гиперэкспрессией рецептора HER₂ [2]. Трастузумаб – это гуманизированные МкАТ подкласса IgG₁, получаемые по рекомбинантной технологии и содержащие мышинные CDR-фрагменты, слитые с фрагментами человеческих антител [3]. В случае HER₂-позитивного РМЖ число единиц рецептора на поверхности клеток увеличивается в сотни раз, тогда как в норме число рецепторов HER₂ на поверхности эпителиальных клеток составляет около 20 тысяч [4, 5]. При гиперэкспрессии рецепторы HER₂ на мембране нарушают нормальный клеточный цикл и позволяют раковым клеткам бесконтрольно делиться, в результате чего у пациентов снижается эффективность химиотерапии и уменьшается безрецидивная и общая выживаемость [6, 7]. Ингибируя гиперэкспрессию рецептора HER₂ на поверхности опухолевых клеток, трастузумаб снижает онкогенность рецептора.

На данный момент трастузумаб является «золотым стандартом», одобренным FDA, для лечения HER₂-позитивного РМЖ [8]. При этом препарат обладает довольно высокой стоимостью (около 30 тысяч евро за 12-месячное лечение в адъювантных условиях и около 42 тысяч евро за средний период лечения 18,5 месяцев при метастатическом раке молочной железы для пациента весом примерно 67 кг), что является существенной нагрузкой для бюджетов системы здравоохранения и может ограничить доступ к препарату для некоторых пациентов [9]. Одним из вариантов решения данной проблемы может стать разработка и регистрация биоаналоговых лекарственных препаратов.

Терапия биологическими препаратами, в том числе препаратами-биоаналогами, несет в себе не только потенциальную пользу для пациентов, но и существенные риски. Биологические лекарственные средства могут вызывать нежелательные явления, и в том числе спровоцировать иммунный ответ организма – выработку противолечательных антител (anti-drug antibodies, ADA). Выработка ADA может влиять на эффективность препарата, изменяя его фармакокинетику и/или фармакодинамику, а также на его безопасность и переносимость. В данном случае комплексный анализ данных об иммуногенности может иметь решающее значение для понимания природы возможных побочных реакций. Поэтому анализ иммуногенности биологических препаратов – это не только важный аспект доказательств биоаналогичности, закрепленный в нормативной документации, но и инструмент для обоснования клинических решений. Таким образом, еще на этапе клинических исследований необходимо разрабатывать и валидировать надежные методики анализа иммуногенности [10].

Целью данной работы являлась разработка и валидация методики полуколичественного определения антител к трастузумабу в сыворотке крови чело-

века методом иммуноферментного анализа (ИФА) для целей сравнительной оценки иммуногенности препарата-биоаналога трастузумаба.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве стандартного образца (положительный контроль антител к трастузумабу) при разработке и валидации методики использовали антиидиотипические, нейтрализующие моноклональные антитела к трастузумабу подкласса IgG₁ (human anti-trastuzumab antibodies), с концентрацией белка 0,5 мг/мл (Bio-Rad, США). Стандартный образец хранили в морозильнике при температуре -40 ± 10 °С.

В качестве препарата сравнения и исследуемого препарата в исследовании выступали оригинальный препарат Герцептин® и его биоаналог:

- *исследуемый препарат*: Трастузумаб; лиофилизат для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий; 440 мг/20 мл;
- *препарат сравнения*: Герцептин® (МНН: Трастузумаб); лиофилизат для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий; 440 мг/20 мл.

Образцы исследуемого препарата и препарата сравнения хранили в холодильнике фармацевтическом при температуре 2–8 °С.

Оборудование

В ходе разработки и валидации методики для определения оптической плотности образцов в лунках ИФА-планшета использовали планшетный иммуноферментный анализатор STAT FAX 3200 (Awareness Technology, Inc., США). В качестве вспомогательного оборудования использовали: автоматический промыватель планшетов «Акварин» (ЗАО «Вектор-Бест-Европа», Россия), термощейкер для планшетов (BioSan, Латвия), встряхиватель типа Вортек Reax Top (Heidolph Instruments GmbH, Германия), весы аналитические Pioneer PA 214C (OHAUS Corporation, США), одноканальные и многоканальные дозаторы различного объема (АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия), рН-метр-милливольтметр (ООО «НПО Аквилон», Россия) и колбы мерные класса А, цилиндры мерные различной вместимости (Shott Duran, Германия). Воду очищенную 1 типа получали с помощью системы водоподготовки «Аквалаб» AL-1 (Россия). Хранение реактивов и образцов осуществляли в холодильнике фармацевтическом ХФ-400-2 (АО «ПОЗИС», Россия) и морозильнике микропроцессорном для хранения замороженной плазмы крови и других биологических материалов ММ-180/20/35 «POZIS» (АО «ПОЗИС», Россия).

Реактивы

В ходе валидации методики определения антител к трастузумабу в сыворотке крови человека использовали следующие реактивы: антитела к трастузума-

бу (положительный контроль) human anti-trastuzumab, 0,5 мг/мл (HCA177, Bio-Rad, США); вода очищенная тип 1; бычий сывороточный альбумин (БСА, рН = 7,0, ≥98 % pure, A9647, Sigma-Aldrich, США); набор для биотинилирования антител (ООО «Силекс», Россия); конъюгат стрептавидин-пероксидаза, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ)-субстрат (ООО «ИМТЕК», Россия); калия хлорид (х.ч.), натрия хлорид (х.ч.), калия дигидрофосфат (ч.д.а.), натрия карбонат (ч.) (ООО «Компонент-Реактив», Россия); натрия гидрофосфат (pure, pharma grade), натрия гидрокарбонат (pure, pharma grade) твин-20 (pure, pharma grade, PanReac, Испания); глицин (pure EP USP, ≥98,5 %, ООО «Диаэм», Россия), трис-(гидроксиметил)-аминометан (≥99,0 %, T1378, Sigma-Aldrich, США); серная кислота концентрированная (ООО «ХИММЕД СИНТЕЗ», Россия); планшеты 96-луночные, прозрачные, плоскодонные, высокое связывание Costar® (2592, Corning Inc., США).

Методика полуколичественного определения антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом ИФА

Полуколичественное определение антител к трастузумабу в сыворотке крови человека проводили с помощью планшетного иммуноферментного анализатора STAT FAX 3200 (Awareness Technology, Inc., США). Краткая схема анализа приведена в таблице 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

В ходе разработки методики определяли оптимальную концентрацию покрытия планшета трастузумабом, проводили оценку применимости условий кислотной диссоциации образцов, как способа улучшения толерантности методики к присутствию в образцах трастузумаба, подбирали состав, рН и рабочий объем буфера для нейтрализации в лунках планшета, а также устанавливали оптимальные условия инкубации планшета на разных этапах анализа (длительность, число оборотов шейкера, температура). Кроме того, в ходе разработки методики определяли оптимальные разведения первичного (биотинилированный трастузумаб) и вторичного (конъюгат стрептавидин: пероксидаза) детектирующих реактивов, анализируя получаемые в каждом случае соотношения «сигнал-шум» относительно образцов отрицательного контроля (пулированная интактная сыворотка крови человека). Финальным этапом разработки методики стал выбор минимального необходимого разведения (MRD) образцов сыворотки, позволяющего уменьшить интерференцию компонентов сыворотки, но сохранить при этом требуемые значения чувствительности методики. В методике использовали 10 % сыворотку крови, то есть MRD составило 1 : 10.

Таблица 1. Краткая схема анализа

Table 1. Brief assay scheme

№ этапа Step No.	Содержание этапа анализа Assay procedures
1	Покрывание планшета (100 мкл/лунка, 40 мкг/мл трастузумаба в карбонатном буфере) Plate coating (100 µl/well, 40 µg/ml trastuzumab in carbonate buffer)
2	Кислотная диссоциация образцов (образцы, разбавленные в соответствии с MRD в глициновом буфере, 37 °C, 20 минут, 500 rpm) Acid dissociation of samples (samples diluted according to MRD in glycine buffer, 37°C, 20 minutes, 500 rpm)
3	Промывка планшета (3 раза, промывочный буфер с твином-20) Plate washes (3 times, wash buffer with Tween-20)
4	Внесение образцов (по 100 мкл/лунка, в дублях, предварительное внесение в лунки буфера для нейтрализации на основе триса, рН = 9,5. В случае подтверждающего анализа в буфер для нейтрализации добавляли трастузумаб, 2 мг/мл) Introduction of sample (100 µl/well, in duplicate, wells pre-sprayed with Tris-based neutralization buffer, pH = 9.5. Trastuzumab, 2 mg/ml, added to neutralization buffer for confirmatory assay)
5	Промывка планшета (3 раза, промывочный буфер с твином-20) Plate washes (3 times, wash buffer with Tween-20)
6	Элюирование и иммобилизация антител (глициновый буфер, 37 °C, 20 минут, 500 rpm; перенос в новый планшет инкубация 60 мин, 37 °C, 500 rpm) Elution and immobilization of antibodies (glycine buffer, 37 °C, 20 minutes, 500 rpm; transfer to a new plate, incubation 60 minutes, 37 °C, 500 rpm)
7	Промывка планшета (3 раза, промывочный буфер с твином-20) Plate washes (3 times, wash buffer with Tween-20)
8	Блокирование планшета (250 мкл/лунка, 1 % раствор БСА, инкубация 60 минут, 37 °C, 500 rpm) Plate blocking (250 µl/well, 1 % BSA solution, incubation 60 minutes, 37 °C, 500 rpm)
9	Промывка планшета (3 раза, промывочный буфер с твином-20) Plate washes (3 times, wash buffer with Tween-20)
10	Первичный детектирующий реагент, биотинилированный трастузумаб (100 мкл/лунка, инкубация 60 минут, 37 °C, 500 rpm) Primary detection reagent, biotinylated trastuzumab (100 µl/well, incubation 60 minutes, 37 °C, 500 rpm)
11	Промывка планшета (3 раза, промывочный буфер с твином-20) Plate washes (3 times, wash buffer with Tween-20)
12	Вторичный детектирующий реагент конъюгат стрептавидин: пероксидаза (100 мкл/лунка, инкубация 60 минут, 37 °C, 500 rpm) Secondary detection reagent streptavidin:peroxidase conjugate (100 µl/well, incubation 60 minutes, 37 °C, 500 rpm)
13	Промывка планшета (3 раза, промывочный буфер с твином-20) Plate washes (3 times, wash buffer with Tween-20)
14	Внесение ТМБ-субстрата (100 мкл/лунка, инкубация 30 минут, 300 rpm) Introduction of TMB-substrate (100 µl/well, incubation 30 minutes, 300 rpm)
15	Внесение стоп-реагента (100 мкл/лунка), измерение оптической плотности (450 нм/630 нм) Introduction of Stop Reagent (100 µl/well), Optical Density Measurement (450 nm/630 nm)

Валидация методики

Валидацию методики полуколичественного определения антител к трастузумабу проводили в соответствии с руководством FDA: Guidance for Industry: Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products – Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection¹ и Правилами проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза² по следующим параметрам:

Предел исключения (cut point)

Предел исключения определяли в ходе анализа 50 индивидуальных образцов интактной сыворотки крови человека, которые были проанализированы двумя аналитиками, в течение 5 дней, одновременно в формате скрининга и подтверждающего анализа. Помимо индивидуальных образцов интактной сыворотки крови, каждый цикл включал образцы положительного контроля (PC-1 и PC-2 с концентрациями антител к трастузумабу 1000 нг/мл и 500 нг/мл, соответственно) для контроля пригодности циклов, а также образцы отрицательного контроля (NC – пулированная интактная сыворотка крови человека). Полученные в ходе анализа значения оптической плотности (для этапа скрининга) и % ингибирования (для подтверждающего анализа) подвергали статистической обработке с целью расчета значений предела исключения (cut-point) методики. Статистическую обработку данных проводили с использованием ПО IBM SPSS Statistics.

Предел исключения для этапа скрининга

Для определения предела исключения для этапа скрининга все полученные значения оптической плотности (ОП) подвергали проверке на нормальное распределение (тест Шапиро-Уилка), после чего проводили log-преобразование данных и исключали выбросы с помощью метода Тьюки. После повторной проверки на нормальное распределение проводили расчет валидационного cut point непараметрическим методом.

¹ 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: 12.12.2022

² 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 12.12.2022.

раметрическим методом. На втором этапе проводили оценку гомогенности дисперсий (статистика Ливиня) и сравнение средних (ANOVA) между циклами и между аналитиками. На основании полученных данных для дальнейшего использования в анализе был выбран плавающий предел исключения для этапа скрининга (floating screening cut-point). Возможность использования плавающего предела исключения и фактора нормализации была подтверждена с использованием корреляции Пирсона, значение корреляции составило 0,891 (>0,7). Для дальнейших расчетов предела исключения каждого конкретного цикла (PSCP – plate-specific cut-point) был рассчитан фактор нормализации (NF), который составил 0,004. В ходе дальнейшего анализа PSCP рассчитывали как сумму среднего значения ОП образцов отрицательного контроля и фактора нормализации.

Предел исключения для подтверждающего анализа

Для определения предела исключения для подтверждающего анализа использовали значения % ингибирования, рассчитанные для 50 индивидуальных образцов интактной сыворотки крови человека, проанализированные в формате подтверждающего анализа (с добавлением трастузумаба, 2 мг/мл). Значения % ингибирования проверяли на нормальное распределение (тест Шапиро – Уилка), после чего проводили log-преобразование данных и исключение выбросов по методу Тьюки. После повторной проверки на нормальное распределение (тест Шапиро – Уилка) предел исключения для подтверждающего анализа рассчитывали непараметрическим методом. Для использования в анализе был выбран фиксированный предел исключения для подтверждающего анализа, значение cut-point составило 34,59 %.

Чувствительность методики

Определение чувствительности методики проводили в ходе 2 циклов, совместно с установлением концентраций образцов положительного контроля (на верхнем и нижнем уровнях – HPC и LPC, соответственно). Анализировали образцы положительного контроля, содержащие антитела к трастузумабу в различных концентрациях (от 25000 нг/мл до 31,25 нг/мл). Каждый цикл включал в себя три серии разведений (стандарты 1–10, таблица 2), образцы положительного контроля (PC-1 – 1000 нг/мл и PC-2 – 500 нг/мл) и образцы отрицательного контроля (NC).

Для определения чувствительности анализа и концентрации LPC были использованы номинальные значения концентрации стандартных образцов, усредненная оптическая плотность которых была выше, чем значение соответствующего PSCP. Значения концентрации (нг/мл) переводили в log-фор-

му, а затем рассчитывали чувствительность методики. Перевод полученного значения в оригинальную шкалу из log-формы позволил получить численное значение чувствительности методики, которое составило 99,5 нг/мл. Параллельно с определением чувствительности были рассчитаны концентрации контрольных образцов. Концентрацию LPC определяли по алгоритму, аналогичному расчету чувствительности методики. Теоретическая концентрация образца LPC составила 128,9 нг/мл. Для удобства и точности приготовления контрольных образцов, практическая концентрации LPC составила 129 нг/мл антител к трастузумабу. Концентрация НРС была выбрана как верхняя точка в линейном диапазоне при построении калибровочной кривой и составила 2580 нг/мл антител к трастузумабу.

Таблица 2. Концентрации стандартных образцов для определения чувствительности методики

Table 2. The concentrations of standard samples during sensitivity runs

№ стандарта Standard No.	Концентрация антител к трастузумабу, нг/мл Anti-trastuzumab Ab concentration, ng/ml
1	25000
2	10000
3	5000
4	2500
5	100
6	500
7	250
8	100
9	62,5
10	31,25

«Хук»-эффект

Включение в циклы оценки чувствительности образцов с высокой концентрацией антител к трастузумабу позволило оценить потенциальное наличие «хук»-эффекта в методике. Рассчитанное для всех стандартных образцов значения соотношения «сигнал/шум» (относительно соответствующего PSCP) позволило показать отсутствие «хук»-эффекта, так как не наблюдалось снижения оптической плотности стандартных образцов с увеличением концентрации антител к трастузумабу.

Селективность

Селективность методики оценивали с использованием 10 индивидуальных образцов интактной сыворотки крови человека, включая гемолизные и хи-

лезные образцы, с добавлением и без добавления антител к трастузумабу до уровней НРС и LPC. Анализ проводили как в формате скрининга, так и в формате подтверждающего анализа. Селективность методики была подтверждена, так как 100 % индивидуальных образцов (10/10) интактной сыворотки крови человека имели отклик ниже PSCP, а также при этом 100 % образцов положительного контроля (НРС, LPC) были «истинно положительными» по результатам скрининга и подтверждающего анализа.

Толерантность методики к присутствию лекарственного препарата

Оценка толерантности методики к присутствию интерферирующего биологического препарата в образцах (drug tolerance) – один из ключевых моментов валидации методики оценки иммуногенности. Для оценки толерантности методики к присутствию лекарственного в формате скрининга были проанализированы 25 образцов, содержащие антитела к трастузумабу и сам препарат в различных концентрациях. Была проведена сравнительная оценка для исследуемого препарата и препарата сравнения. Образцы содержащие антитела к трастузумабу и образцы трастузумаба были приготовлены в двукратной концентрации с использованием 100 % биологической матрицы (интактной пулированной сыворотки крови человека), а затем смешивались в соотношении 1:1 для получения образцов для оценки толерантности методики к трастузумабу.

Количественно толерантность методики к лекарственному препарату выражалась максимальной концентрацией препарата, при которой на различных уровнях концентрации антител к трастузумабу сохранялся сигнал выше PSCP. Для данной методики значение толерантности методики к присутствию лекарственного препарата для трастузумаба составило 50 мкг/мл (на уровне 500 нг/мл антител к трастузумабу), для Герцептина® составило 50 мкг/мл (на уровне 1000 нг/мл антител к трастузумабу).

Прецизионность

Прецизионность методики оценивали как для скрининга, так и для подтверждающего анализа. Для оценки использовали образцы НРС и LPC, которые были проанализированы в ходе 6 циклов, двумя аналитиками, в течение трех дней. Каждый цикл включал в себя по три набора контрольных образцов (НРС, LPC и NC), первый цикл для первого аналитика включал в себя 6 наборов контролей для оценки прецизионности внутри цикла (intra-day). Данные, полученные в ходе всех шести циклов, использовались для оценки прецизионности между циклами (inter-day). Количественно прецизионность методики внутри и между циклами выражалась путем расчета коэф-

фициента вариации (CV, %) для первого цикла и для всех шести циклов, соответственно. Прецизионность для формата скрининга оценивалась с использованием средних значений ОП для образцов положительного контроля (НРС, LPC). Прецизионность для подтверждающего анализа оценивалась с использованием рассчитанных значений % ингибирования сигнала. Полученные результаты приведены в таблице 3 (внутри цикла) и таблице 4 (между циклами).

Рассчитанные значения коэффициента вариации (CV, %) не превышали 20 %, что соответствует требованиям нормативной документации [14].

Стабильность

В ходе валидации методики оценивалась: краткосрочная стабильность (образцы положительного контроля перед анализом хранили 24 часа при комнатной температуре, 18–25 °С), стабильность при заморозке-разморозке (3 цикла, каждая заморозка не менее 12 часов при температуре -40 ± 10 °С), а так-

же долгосрочная стабильность (хранение в условиях низкотемпературной заморозки при температуре -40 ± 10 °С) в течение 137 дней. Циклы по оценке стабильности помимо исследуемых образцов для оценки стабильности (по 3 набора образцов положительного контроля НРС и LPC для каждого вида стабильности) включал в себя два набора свежеприготовленных образцов положительного контроля – для расчета PSCP и контроля пригодности аналитических циклов. Стабильность образцов оценивали путем расчета коэффициента вариации (CV, %) между тремя наборами образцов для каждого вида стабильности. Образцы были признаны стабильными, так как коэффициенты вариации не превышали 20 %. Полученные результаты приведены в таблице 5.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Была разработана и валидирована методика полуколичественного определения антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом ИФА.

Таблица 3. Прецизионность внутри цикла

Table 3. Intra-day precision

Образец Sample	Набор образцов положительного контроля № PC samples set No.						Среднее Mean	CV, %
	1	2	3	4	5	6		
Формат анализа: скрининг Screening assay format								
HPC	1,071	1,151	1,401	1,345	1,428	1,176	1,262	11,76
LPC	0,049	0,044	0,054	0,044	0,041	0,047	0,046	9,86
Формат анализа: подтверждающий Confirmatory assay format								
HPC	98,459	98,566	98,858	98,773	98,985	98,682	98,720	0,19
LPC	63,918	59,091	69,159	62,069	60,494	66,667	63,566	6,00

Таблица 4. Прецизионность между циклами

Table 4. Inter-day precision

Скрининг (Цикл №) Screening (Run No.)									
Образец Sample	1	2	3	4	5	6	Среднее Mean	S.D.	CV, %
HPC	1,262	1,055	0,989	1,110	1,097	1,135	1,108	0,091	8,23
LPC	0,046	0,038	0,034	0,040	0,041	0,037	0,039	0,004	10,52
Подтверждающий анализ (Цикл №) Confirmatory assay (Run No.)									
Образец Sample	1	2	3	4	5	6	Среднее Mean	S.D.	CV, %
HPC	98,720	98,502	98,667	98,755	98,566	98,567	98,629	0,099	0,10
LPC	63,566	59,494	64,185	65,123	67,429	61,268	63,511	2,813	4,43

Таблица 5. Рассчитанные для образцов оценки стабильности значения коэффициентов вариации

Table 5. The CV, % values calculated for sample stability assessment

Краткосрочная («насто́льная») стабильность Sample bench-top stability (BTS)						
Образец Sample	1	2	3	Среднее Mean	S.D.	CV, %
HPC_BTS24	1,360	1,254	0,952	1,188	0,211	17,79
LPC_BTS24	0,038	0,036	0,030	0,034	0,004	12,72
Стабильность при заморозке-разморозке Sample freeze-thaw stability (F/T)						
Образец Sample	1	2	3	Среднее Mean	S.D.	CV, %
HPC_F/T	1,050	1,195	0,929	1,058	0,133	12,59
LPC_F/T	0,042	0,035	0,030	0,035	0,006	17,00
Долгосрочная стабильность Sample long-term stability (LTS)						
Образец Sample	1	2	3	Среднее Mean	S.D.	CV, %
HPC_LTS	1,262	0,973	1,089	1,108	0,146	13,15
LPC_LTS	0,030	0,035	0,032	0,032	0,003	7,78

Полуколичественное определение проводилось методом ИФА в сочетании с техникой АСЕ и использованием спектрофотометрического детектирования в видимом диапазоне спектра. Чувствительность методики и концентрация LPC были определены на уровне 99,5 нг/мл и 129 нг/мл антител к трастузумабу, соответственно. Для этапа скрининга был выбран плавающий предел исключения со значением фактора нормализации 0,004, а для этапа подтверждающего анализа фиксированный предел исключения – 34,59 %. Толерантность методики к присутствию исходного биологического препарата была показана вплоть до концентрации 50 мкг/мл (для трастузумаба на уровне 500 нг/мл антител, для Герцептина® на уровне 1000 нг/мл антител). Полученные значения пределов исключения, чувствительности и толерантности методики к лекарственному препарату позволяют применять валидированную методику для проведения аналитической части исследований безопасности препаратов трастузумаба.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Kaprin A. D., Starinskij V. V., Shahzadova A. O. Malignant neoplasms in Russia in 2020 (morbidity and mortality). Moscow: MNIОI im. P. A. Gercena – filial FGBU «NMIC radiologii» Minzdrava Rossii; 2021. 252 p.
- Kreutzfeldt J., Rozeboom B., Dey N., De P. The trastuzumab era: current and upcoming targeted HER₂₊ breast cancer therapies. *Am J Cancer Res.* 2020;10(4):1045–1067.
- Akbari V., Chou C., Abedi D. New insights into affinity proteins for HER2-targeted therapy: Beyond trastuzumab. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Cancer.* 2020;1874(2):188448. DOI: 10.1016/j.bbcan.2020.188448.
- Gonzalez-Conchas G. A., Rodriguez-Romo L., Hernandez-Barajas D., Gonzalez-Guerrero J. F., Rodriguez-Fernandez I. A., Verdines-Perez A., Templeton A. J., Ocana A., Seruga B., Tannock I. F., Amir E., Vera-Badillo F. E. Epidermal growth factor receptor overexpression and outcomes in early breast cancer: A systematic review and a meta-analysis. *Cancer treatment reviews.* 2018;62:1–8. DOI: 10.1016/j.ctrv.2017.10.008.
- Oberg H. H., Janitschke L., Sulaj V., Weimer J., Gonnermann D., Hedemann N., Wesch D. Bispecific antibodies enhance tumor-infiltrating T cell cytotoxicity against autologous HER-2-expressing high-grade ovarian tumors. *Journal of leukocyte biology.* 2020;107(6):1081–1095. DOI: 10.1002/JLB.5MA1119-265R.
- Gaibar M., Beltrán L., Romero-Lorca A., Fernández-Santander A., Novillo A. Somatic mutations in HER2 and implications for current treatment paradigms in HER2-positive breast cancer. *Journal of Oncology.* 2020;2020:1–13. DOI: 10.1155/2020/6375956.
- Tang Z., Jun Ya., Lv Ya., Li Yu., Zhang Z., Tao M., Chen X., He J., Zhang L., Wang Q.-L. Aptamer conjugated and doxorubicin-loaded grapefruit-derived nanovectors for targeted therapy against HER2+ breast cancer. *Journal of Drug Targeting.* 2020;28(2):186–194. DOI: 10.1080/1061186X.2019.1624970.
- Barbier L., Declerck P., Simoen S., Neven P., Vulto A. G., Huys I. The arrival of biosimilar monoclonal antibodies in oncology: clinical studies for trastuzumab biosimilars. *Br J Cancer.* 2019;(121):199–210. DOI: 10.1038/s41416-019-0480-z.
- Sauna Z. E., Lagassé D., Pedras-Vasconcelos J., Golding B., Rosenberg A. S. Evaluating and mitigating the immunogenicity of therapeutic proteins. *Trends in biotechnology.* 2018;36(10):1068–1084. DOI: 10.1016/j.tibtech.2018.05.008.