



Оригинальная статья / Research article

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

М. А. Колганова<sup>1</sup>✉, О. С. Сагимбаева<sup>1</sup>, Ю. С. Борисова<sup>1</sup>, Е. Е. Бекетов<sup>1,3</sup>, И. Е. Шохин<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8

<sup>3</sup> Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 249036, Россия, Калужская область, г. Обнинск, ул. Маршала Жукова, д. 10

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

ORCID: М. А. Колганова – <https://orcid.org/0000-0003-4568-1172>; О. С. Сагимбаева – <https://orcid.org/0009-0003-2645-4799>;

Ю. С. Борисова – <https://orcid.org/0009-0004-7990-8528>; Е. Е. Бекетов – <https://orcid.org/0000-0002-2485-6482>; И. Е. Шохин – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Статья поступила: 11.04.2023

Статья принята в печать: 18.05.2023

Статья опубликована: 25.05.2023

### Резюме

**Введение.** «Трастузумаб» – препарат специфической анти-HER2 терапии одного из самых распространенных типов онкологических заболеваний – рака молочной железы. Несмотря на то, что препарат давно представлен на фармацевтическом рынке, дальнейшее совершенствование связанных с ним аналитических методик остается актуальным в первую очередь в свете разработки и исследования действия биоаналогов. Для трастузумаба одной из возможных нежелательных реакций со стороны иммунной системы является иммуногенность – выработка противолекарственных антител к препарату, в том числе нейтрализующих антител, которые могут влиять на эффективность и профиль безопасности препарата.

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

**Материалы и методы.** Определение нейтрализующих антител к трастузумабу проводилось с помощью метода конкурентного иммуноферментного анализа, с использованием фотометрического детектирования в видимом диапазоне спектра.

**Результаты и обсуждение.** Разработанная методика была валидирована по показателям: предел исключения, чувствительность, селективность, специфичность, прецизионность и стабильность (краткосрочная и долгосрочная). Для снижения интерференции компонентов биологической матрицы в анализе на этапе разработки было определено значение минимального необходимого разбавления (1:200). Рассчитанное значение предела исключения составило 14,62 %. Чувствительность разработанной методики составила 1985,2 нг/мл нейтрализующих антител к трастузумабу.

**Заключение.** Полученные при валидации методики результаты позволяют применять методику определения нейтрализующих антител к трастузумабу в сыворотке крови человека оценки иммуногенности препаратов трастузумаба при проведении клинических исследований биоаналогичности.

**Ключевые слова:** «Трастузумаб», нейтрализующие антитела, противолекарственные антитела, иммуногенность, биоаналоги

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

**Вклад авторов.** О. С. Сагимбаева, Ю. С. Борисова и М. А. Колганова участвовали в разработке и валидации методики. М. А. Колганова 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., Сагимбаева О. С., Борисова Ю. С., Бекетов Е. Е., Шохин И. Е. Разработка и валидация методики определения нейтрализующих антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):190–197. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-190-197>

## Development and Validation of the ELISA Method for Neutralizing Anti-trastuzumab Antibodies Detection in Human Blood Serum

Maria A. Kolganova<sup>1</sup>✉, Olesya S. Sagimbaeva<sup>1</sup>, Julia S. Borisova<sup>1</sup>, Evgeny E. Beketov<sup>1,3</sup>,  
Igor E. Shokhin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> LLC "Mabscale", 5A, Shosse No. 4, Special of industrial and production economic zone, Togliatti Urban District, Samara Region, 445043, Russia

<sup>2</sup> LLC "CPHA", 8, Simferopolskiy bulv., Moscow, 117638, Russia

<sup>3</sup> Medical Radiological Research Center named after A.F. Tsyba – branch of the Federal State Budgetary Institution "NMITs Radiology", 10, Marshal Zhukov str., Obninsk, Kaluga Region, 249036, Russia

✉ Corresponding author: Maria A. Kolganova. E-mail: [m.kolganova@mabscale.ru](mailto:m.kolganova@mabscale.ru)

ORCID: Maria A. Kolganova – <https://orcid.org/0000-0003-4568-1172>; Olesya S. Sagimbaeva – <https://orcid.org/0009-0003-2645-4799>;

Julia S. Borisova – <https://orcid.org/0009-0004-7990-8528>; Evgeny E. Beketov – <https://orcid.org/0000-0002-2485-6482>; Igor E. Shokhin – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Received: 11.04.2023

Revised: 18.05.2023

Published: 25.05.2023

© Колганова М. А., Сагимбаева О. С., Борисова Ю. С., Бекетов Е. Е., Шохин И. Е., 2023

© Kolganova M. A., Sagimbaeva O. S., Borisova Ju. S., Beketov E. E., Shokhin I. E., 2023

## Abstract

**Introduction.** Trastuzumab is the first known anti-HER2 agent, which revolutionized the treatment of one of the most common cancer types – breast cancer. Despite trastuzumab being approved long time ago, further improvement of related analytical methods remains relevant primarily due to the emergence of new biosimilars. For instance, immunogenicity – adverse reaction which is usually associated with biological drugs, can still be relevant for trastuzumab. Anti-drug antibodies, including neutralizing antibodies, caused by trastuzumab therapy, can affect drug effectiveness and safety profile.

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

**Materials and methods.** The neutralizing anti-trastuzumab antibody determination was carried out by the competitive ELISA method, using spectrophotometric detection in the visible range of the spectrum.

**Results and discussion.** The developed method was validated for cut-point, selectivity, sensitivity, specificity, 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 0.5 % serum. The calculated value for cut-point was 14.62 %. The sensitivity of the developed method was estimated at 1985.2 ng/mL of neutralizing anti-trastuzumab antibodies.

**Conclusion.** The obtained results allowed us to apply the developed ELISA method for the neutralizing anti-trastuzumab antibodies determination in human blood serum during trastuzumab immunogenicity assessment in bioequivalence clinical trials.

**Keywords:** trastuzumab, neutralizing antibodies, anti-drug antibodies, immunogenicity, biosimilars

**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.** Olesya S. Sagimbaeva, Julia S. Borisova, and Maria A Kolganova participated in the development and validation of the analytical method. Maria A Kolganova and Evgeny E Beketov were responsible for paper draft preparation. 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., Sagimbaeva O. S., Borisova Ju. S., Beketov E. E., Shokhin I. E. Development and validation of the ELISA method for neutralizing anti-trastuzumab antibodies detection in human blood serum. *Drug development & registration*. 2023;12(2):190–197. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-190-197>

## ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания – одна из наиболее распространенных причин смертности во всем мире. В 2020 году смертность от различных типов рака составила более 10 миллионов случаев. При этом наиболее распространенными видами рака являются: рак молочной железы (РМЖ), легких, колоректальный рак и опухоли предстательной железы<sup>1</sup>. Именно РМЖ ежегодно занимает лидирующие позиции по заболеваемости и смертности среди всех онкологических заболеваний, и в частности среди онкозаболеваний у женщин. Так, по оценкам за один только 2020 год на долю РМЖ пришлось 12,5 % всех выявляемых случаев рака в мире. Из них, в структуре онкологических заболеваний у женщин, РМЖ занимает 25,8 %, если говорить о ситуации в мире<sup>2</sup> или 21,7 % если говорить о ситуации с выявлением новых случаев РМЖ в России [1]. При этом стоит отметить, что летальность данного типа рака на первом году с момента установления диагноза и начала лечения одна из самых низких среди всех злокачественных новообразований. Более того, за последние 10 лет она существенно сократилась с 8,7 % в 2011 году до 5,2 % в 2020 году [2].

К стандартным методам терапии онкологических заболеваний на сегодняшний день можно отнести хирургическое лечение, а именно: удаление опухоли или пораженного органа целиком (например, в случае РМЖ – радикальная мастэктомия), химиотерапию, лучевую терапию, гормональную терапию, а также такие инновационные методы, как иммунотерапия (например, препараты нацеленные на PD-1 или PDL-1), таргетная биологическая терапия (например, рекомбинантные фьюжн-белки, моноклональные антитела) и генная терапия. Зачастую самые лучшие прогнозы для пациентов дает именно сочетание нескольких видов лечения, например хирургическое вмешательство совместно с биологической или химиотерапией в адъювантных и неoadъювантных условиях. Сочетание биологической терапии и хирургического вмешательства часто применяется как терапия 1 линии при выявлении РМЖ [3,4].

Препарат «Трастузумаб» представляет собой гуманизированные моноклональные IgG1 антитела, содержащие мышинные CDR-фрагменты, слитые с константными участками легких и тяжелых цепей человеческого иммуноглобулина класса G. «Трастузумаб» стал одним из первых препаратов, направленных непосредственно на HER2/neu (точнее, на его IV вне-

<sup>1</sup> WHO fact sheet "Cancer". Available at: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>. Accessed: 10.04.2023.

<sup>2</sup> Global cancer statistics for the most common cancers in the world. Available at: <https://www.wcrf.org/cancer-trends/worldwide-cancer-data>. Accessed: 10.04.2023.

клеточный домен) – человеческий рецептор эпидермального фактора роста 2 типа, ассоциированный, в первую очередь, с одним из наиболее неблагоприятных для пациентов типов РМЖ: HER2-позитивным метастатическим РМЖ. Данный тип обычно ассоциирован с высоким риском метастазирования, и в том числе может приводить к метастазированию опухоли в головной мозг [5]. Внедрение трастузумаба в клиническую практику позволило существенно снизить летальность РМЖ HER2-позитивного подтипа. Другим показанием к применению трастузумаба в составе комбинированной терапии позже стала распространенная аденокарцинома желудка или пищеводно-желудочного перехода, также сопровождающаяся опухолевой гиперэкспрессией HER2. Более того, «Трастузумаб», как первый препарат, направленный на рецептор HER2, стал отправной точкой для создания препаратов-конъюгатов «моноклональное антитело-химиотерапевтический агент», а также би- или триспецифических антител или фьюжн-белков, направленных одновременно на различные субдомены HER2 (например, применение сочетанной терапии трастузумабом и пертузумабом) или сразу на несколько различных рецепторов-мишеней [6]. Например, в настоящее время в Российской Федерации уже зарегистрированы такие лекарственные препараты, как «Трастузумаб эмтанзин» и «Трастузумаб дерукстекан», в составе которых трастузумаб не только воздействует на HER2, но и выступает в роли системы таргетной доставки химиотерапевтических агентов в опухолевые клетки. Что касается би- и триспецифических препаратов таргетной терапии, разработки таких препаратов активно ведутся сразу в нескольких странах [7–10].

Одной из причин разработки новых препаратов на основе трастузумаба стало не только стремление увеличить эффективность терапии, но и часто встречающаяся резистентность к трастузумабу, которая может развиваться у пациентов при длительном применении препарата. Причинами такой резистентности могут служить различные мутации гена ERBB2, его транскрипционные и посттрансляционные изменения, или (в меньшей степени) иммуногенность препарата, и, в частности, антитела к трастузумабу, обладающие нейтрализующей активностью [11]. Несмотря на то, что «Трастузумаб» является достаточно низкоиммуногенным препаратом, нейтрализующие антитела могут связываться с ним в активном центре, тем самым предотвращая связывание трастузумаба с HER2 и снижая эффективность терапии. Противоположные антитела могут не только снижать эффективность лечения, но и влиять на профиль безопасности препарата [12].

Еще одной немаловажной проблемой является средняя стоимость биологической терапии, в частности терапии трастузумабом. Учитывая, что в среднем равновесная концентрация трастузумаба в организме достигается после 25 недель терапии (при мно-

гократном введении по схеме 1 раз в 3 недели), а общее время терапии может составлять вплоть до 1 года, стоимость такой длительной терапии для пациента по сравнению с другими видами лечения может быть выше на 300 % [13]. Таким образом, разработка новых биоаналогов трастузумаба, выход на рынок которых будет способствовать увеличению конкуренции, и, как следствие, снижению стоимости лечения трастузумабом [14], представляется перспективной задачей. В этом свете актуальным представляется разработка новых биоаналитических методик, которые можно использовать в ходе клинических исследований биоаналогов трастузумаба для получения данных о его фармакокинетике и иммуногенности.

**Целью данной работы** была разработка и валидация методики определения нейтрализующих антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА) для оценки иммуногенности препарата-биоаналога трастузумаба.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Так как методика была разработана в рамках клинического исследования биоаналогичности препаратов трастузумаба, в качестве исследуемого препарата и препарата сравнения выступали оригинальный препарат Герцептин® и его биоаналог:

- *исследуемый препарат:* «Трастузумаб». Лиофилизат для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий. 440 мг / 20 мл (ООО «Мабскейл», Россия).
- *препарат сравнения:* Герцептин®. Лиофилизат для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий. 440 мг / 20 мл (F. Hoffmann-La Roche, Ltd., Швейцария).

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

## Реактивы

В ходе валидации методики определения антител к трастузумабу в сыворотке крови человека использовали следующие реактивы: набор реагентов для иммуноферментного определения трастузумаба в сыворотке крови (ООО «НПЦ Пробиотек», Россия, партия 02, 03); антитела к трастузумабу, обладающие нейтрализующей активностью (Bio-Rad Laboratories, Inc., США, HCA177); бычий сывороточный альбумин (класса «pure», Sigma-Aldrich, США, A9647); полисорбат-20 (pure, pharma grade, PanReac, Испания, 142312); различные соли калия и натрия, а именно: калия хлорид (х.ч., ООО «Альдоса», Россия), натрия хлорид (х.ч., ООО «Альдоса», Россия), калия дигидрофосфат (ч.д.а., ООО «РусХим», Россия), натрия гидрофосфат (pure, pharma grade, PanReac, Испания, 141677).

## Оборудование

В ходе разработке и валидации методики для определения оптической плотности образцов в лунках ИФА-планшета использовали фотометр Stat Fax 3200 (Awareness Technology, США). В качестве вспомогательного оборудования использовали: промыватель планшетов «Аквamarin» (BioSan, Латвия), термошейкер планшетный (BioSan, Латвия), встряхиватель Reax top (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Германия), весы аналитические OHAUS Pioneer PA-214C (OHAUS Corporation, США), одноканальные и многоканальные дозаторы различного объема (Thermo Fisher Scientific, США), pH-метр-милливольтметр (ООО «НПО «Аквилон», Россия) и мерную посуду (колбы, цилиндры) различной вместимости (Shott Duran, Германия). Воду очищенную 1 типа получали с помощью системы водоподготовки Аквалаб AL-1 (АО «НПК Медиа-на-Фильтр», Россия). Хранение реактивов и образцов осуществляли при температуре от +2 °C до +8 °C в холодильнике фармацевтическом ХФ-400-2 (АО «ПО-ЗиС», Россия) и не выше минус 35 °C в морозильнике медицинском ММ-180 (АО «ПОЗИС», Россия).

## Методика определения нейтрализующих антител к трастузумабу в сыворотке крови человека

Методика определения нейтрализующих антител основана на способности антител к трастузумабу ингибировать связывание препарата с мишенью (HER2). В ходе определения антител, обладающих нейтрализующей активностью, использовали набор реагентов для иммуноферментного определения трастузумаба в сыворотке крови, в состав которого входит планшет, покрытый рецептором HER2 и детектирующий реагент: козы поликлональные антитела к человеческому Fc-фрагменту антител класса G, меченные пероксидазой хрена.

Согласно методике, образцы (контрольные/исследуемые), содержащие антитела к трастузумабу, инкубировали с раствором трастузумаба (25 нг/мл), таким образом, чтобы для образцов сыворотки крови одновременно достигалось требуемое минимально необходимое разведение (MRD – minimal required dilution). Кроме контрольных и исследуемых образцов в каждый цикл включали калибровочные образцы с известной концентрацией трастузумаба, отдельно приготовленные согласно инструкции к набору реагентов. После инкубации по 100 мкл смеси образцов вносили в лунки планшета, покрытого HER2, и инкубировали в течение 1 часа (250 об/мин) при комнатной температуре (КТ). По окончании инкубации планшет промывали и вносили в лунки по 100 мкл конъюгата, инкубировали 30 минут (250 об/мин) при КТ. После инкубации и промывки планшета во все лунки вносили по 100 мкл субстрата, и по истечении 15 минут инкубации при КТ останавливали реакцию. Измерение оптической плотности проводили при тестовой длине волны 450 нм и референсной длине волны 630 нм.

Для каждого цикла строили калибровочную кривую зависимости концентрации трастузумаба от оптической плотности калибровочных образцов. Затем для каждого образца рассчитывали концентрацию трастузумаба, а также абсолютное значение относительной погрешности (RE, %), которая характеризовала насколько антитела к трастузумабу, нейтрализующие препарат в смеси, ингибировали его связывание с мишенью относительно добавленной (номинальной) концентрации 25 нг/мл.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Разработка методики

В ходе разработки методики основная задача состояла в том, чтобы внести изменения в рекомендуемый инструкцией к ИФА-набору алгоритм проведения анализа, что позволило бы использовать набор, изначально предназначенный для количественного определения трастузумаба, для целей определения нейтрализующих антител к препарату. Был проведен подбор оптимального значения MRD для методики: наилучший результат показало использование концентрации сыворотки крови в 0,2 %; MRD составило 1:200. Также на этапе разработки была подобрана процедура предварительной инкубации исследуемых образцов с трастузумабом и выбрана оптимальная концентрация рабочего раствора трастузумаба (25 нг/мл). Одним из этапов разработки были эксперименты по добавлению в анализ кислотной диссоциации образцов, как меры увеличения толерантности методики к свободному трастузумабу в исследуемых образцах. Однако добавление в анализ кислотной диссоциации, даже в мягких условиях, негативно сказывалось на получаемых результатах. Вследствие этого для данной методики пришлось отказаться от кислотной диссоциации, тем самым снизив устойчивость разработанной методики к присутствию трастузумаба.

### Валидация методики

Валидацию методики определения нейтрализующих 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 Detection<sup>1</sup> и Правилами проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского

<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: 12.04.2022.



экономического союза<sup>1</sup> по параметрам: предел исключения, чувствительность, селективность, специфичность, прецизионность и стабильность.

### Предел исключения (cut-point)

Предел исключения определяли в ходе анализа 30 индивидуальных образцов интактной сыворотки крови человека, которые были проанализированы двумя аналитиками в течение 2 дней. Помимо образцов интактной сыворотки крови, каждый цикл включал образцы положительного контроля (РС – positive control; 20 000 нг/мл и 5000 нг/мл антител к трастузумабу) и образцы отрицательного контроля (NC – negative control; пулированная сыворотка крови человека). Для определения предела исключения была проведена статистическая обработка полученных результатов: относительная погрешность, E, %, для 30 образцов, для 2 аналитиков, 2 дня (итого N = 120). По результатам статистического анализа для использования был выбран фиксированный предел исключения, значение которого составило 14,62%. При дальнейшем проведении анализа значение относительной погрешности образцов, E, % (т.е. отклонение фактической концентрации трастузумаба в образце от номинальной, добавленной в ходе выполнения анализа – 25 нг/мл), взятое по модулю, сравнивали с рассчитанным значением предела исключения. Образцы, для которых значение относительной погрешности больше либо равно пределу исключения, классифицируются как «положительные».

### Чувствительность методики

Определение чувствительности методики проводили в ходе 2 циклов совместно с установлением концентраций образцов РС [на верхнем и нижнем уровнях: НРС (high positive control) и LPC (low positive control) соответственно). Анализировали образцы РС, содержащие антитела к трастузумабу в концентрации от 1000 до 30 000 нг/мл. Каждый цикл включал в себя три серии разведений, образцы РС и NC.

Для определения чувствительности анализа и расчета концентрации LPC были использованы номинальные значения концентраций стандартных образцов, значение относительной погрешности которых было выше, чем значение предела исключения. Значения концентрации антител (нг/мл) переводили в log-форму, а затем рассчитывали чувствительность и концентрацию LPC методики по формуле:

$$\text{Чувствительность, нг/мл} = \log(C_{\text{mean}}) + t_{\text{df}} \times \text{SD.}$$

<sup>1</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 12.04.2022.

где  $C_{\text{mean}}$  – средняя концентрация;  $t_{\text{df}}$  – односторонний t-критерий Стьюдента, соответствующий уровню значимости 0,05 для определения чувствительности или 0,01 для определения концентрации LPC; SD – стандартное отклонение выборки.

Перевод полученного значения в арифметическую шкалу из логарифмической позволил получить численное значение чувствительности методики (1985,2 нг/мл). Подробная информация о расчете чувствительности методики и LPC приведена в таблице 1.

Таблица 1. Расчет чувствительности методики и концентрации LPC

Table 1. Sensitivity and LPC concentration calculations

Серия разведений, № Dilution series, No.	Концентрация стандарта, RE, % которого выше, чем предел исключения, нг/мл Standard concentration with RE, % value above cut-point, ng/mL	Концентрация стандарта, RE, % которого выше, чем предел исключения, log Standard concentration. with RE, % value above cut-point, ng/mL (log)
1	1000	3,000
2	1000	3,000
3	1000	3,000
4	2000	3,301
5	1000	3,000
6	1000	3,000
Среднее (log) Average (log)		3,050
SD (log)		0,123
Чувствительность (log) Sensitivity (log)		3,298
Чувствительность, нг/мл Sensitivity, ng/ml		1985,2
LPC (log)		3,464
LPC, нг/мл LPC, ng/ml		2908,8

По результатам чувствительность методики составила 1985,2 нг/мл нейтрализующих антител к трастузумабу, а рассчитанная концентрация LPC – 2908,8 нг/мл. Для удобства и точности приготовления контрольных образцов практическая концентрация LPC была выбрана на уровне 2909,1 нг/мл антител к трастузумабу. Концентрация НРС была выбрана как верхняя точка в линейном диапазоне при построении калибровочной кривой и составила 20 000 нг/мл антител к трастузумабу.

### Селективность

Селективность методики оценивали в ходе двух циклов с использованием 10 индивидуальных образцов интактной сыворотки крови человека, включая гемолизные образцы. Каждый из циклов включал в себя по пять индивидуальных образцов интактной сыворотки крови человека, без добавления и с добавлением нейтрализующих антител к трастузумабу до уровней НРС и LPC. Селективность методики оцени-

Таблица 2. Прецизионность внутри цикла

Table 2. Intra-day precision

Образец Sample	Набор образцов РС № PC samples set No.						Среднее Mean	CV, %
	1	2	3	4	5	6		
HPC	98,60	97,52	98,52	98,36	98,91	97,86	98,30	0,52
LPC	29,91	33,49	22,28	26,73	24,45	29,91	27,79	14,76

Таблица 3. Прецизионность между циклами

Table 3. Inter-day precision

Образец Sample	Цикл № Run No.						Среднее Mean	CV, %
	1	2	3	4	5	6		
HPC	98,30	92,36	93,68	98,64	98,15	98,52	96,61	2,91
LPC	27,79	29,83	23,05	31,39	32,42	27,50	28,66	11,73

валились путем сравнения RE, % образцов со значением предела исключения. Селективность методики была подтверждена, так как 90 % индивидуальных образцов (9/10) интактной сыворотки крови человека имели отклик ниже предела исключения, при этом 100 % образцов положительного контроля (HPC, LPC) были «положительными» по результатам сравнения рассчитанного значения RE, % со значением предела исключения.

### Прецизионность

Для оценки прецизионности использовали образцы HPC 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 (HPC, LPC и NC), первый цикл для первого аналитика включал в себя 6 наборов контролей для оценки прецизионности внутри цикла. Данные, полученные в ходе всех шести циклов, использовались для оценки прецизионности между циклами. Количественно прецизионность методики внутри и между циклами выражалась путем расчета коэффициента вариации (CV) для первого цикла и для всех шести циклов соответственно. Прецизионность рассчитывали с использованием значений RE, % для образцов положительного контроля (HPC, LPC). Полученные результаты приведены в таблице 2 (внутри цикла) и в таблице 3 (между циклами).

Рассчитанные значения CV не превышали 20 %, что соответствует требованиям нормативной документации<sup>1</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: 12.04.2022.

### Специфичность

В ходе валидации оценивалась специфичность методики в присутствии препаратов сопутствующей химиотерапии: «Доксорубин», «Паклитаксел, и «Циклофосфамид». Для приготовления образцов оценки специфичности готовили образцы интерферирующих соединений (в сыворотке крови) и образцы HPC и LPC (в сыворотке крови) в двукратной концентрации. После чего образцы смешивали 1:1 для получения образцов для оценки специфичности с требуемыми концентрациями компонентов. Всего было протестировано по 4 концентрации для каждого из препаратов на уровнях HPC и LPC. Концентрации препаратов в лунках планшета (после всех разведений) составили 50, 25, 15 и 10 нг/мл соответственно. Для контроля специфичности методики также анализировали образцы NC с добавлением интерферирующих соединений.

Методика была признана специфичной в отношении препаратов сопутствующей химиотерапии, поскольку в образцах NC не наблюдалось результатов, превышающих предел исключения, тогда как образцы положительного контроля и на уровне HPC, и на уровне LPC демонстрировали значения RE, % выше предела исключения.

### Стабильность

В ходе валидации методики оценивалась: краткосрочная стабильность (bench-top stability, BTS: образцы РС перед анализом хранили 20 часов при КТ, 18–25 °С); стабильность при замораживании-размораживании (freeze-thaw stability, F/T: 3 цикла, каждая заморозка не менее 12 часов); а также долгосрочная стабильность (long-term stability, LTS: хранение в условиях низкотемпературной заморозки от минус 50 °С до минус 35 °С, оценка через 30 дней). Циклы по оценке различных видов стабильности помимо непосредственно образцов для оценки стабильности (по 3 набора образцов РС для каждого вида) вклю-

Таблица 4. Рассчитанные для образцов оценки стабильности значения коэффициентов вариации

Table 4. 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_BTS20	96,03	96,54	97,95	96,84	0,997	1,03
LPC_BTS20	24,99	34,59	35,05	31,54	5,685	18,02
Стабильность при заморозке-разморозке Sample freeze-thaw stability (FT)						
Образец Sample	1	2	3	Среднее Mean	S.D.	CV, %
HPC_FT3	97,22	98,46	96,40	97,36	1,033	1,06
LPC_FT3	29,05	29,60	21,35	26,67	4,612	17,29
Долгосрочная стабильность Sample long-term stability (LTS)						
Образец Sample	1	2	3	Среднее Mean	S.D.	CV, %
HPC_LTS30	98,77	98,43	98,64	98,62	0,171	0,17
LPC_LTS30	24,41	24,29	26,47	25,06	1,222	4,88

чали в себя два набора свежеприготовленных образцов РС – для контроля пригодности системы. Стабильность образцов оценивали путем расчета 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 4.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Была разработана и валидирована методика определения нейтрализующих антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом ИФА. Определение проводилось методом конкурентного ИФА с использованием фотометрического детектирования в видимом диапазоне спектра. Чувствительность методики и концентрация LPC были определены на уровне 1985,2 нг/мл и 2909,1 нг/мл нейтрализующих антител к трастузумабу соответственно. Полученные значения предела исключения и чувствительности валидированной методики позволяют применять ее для определения иммуногенности препаратов трастузумаба при проведении клинических исследований, в том числе исследований биоаналогичности.

## ЛИТЕРАТУРА

- Каприн А. Д., Старинский В. В., Шахзадова А. О. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2021. 252 с.
- Каприн А. Д., Старинский В. В., Шахзадова А. О. Состояние онкологической помощи населению России в 2020 году. М.: МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2021. 239 с.
- Duan S., Vuxton I. L. O. Evolution of Medical Approaches and Prominent Therapies in Breast Cancer. *Cancers*. 2022;14(10):2450. DOI: 10.3390/cancers14102450.
- Tarantino P., Morganti S., Curigliano G. Biologic therapy for advanced breast cancer: recent advances and future directions. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2020;20(9):1009–1024. DOI: 10.1080/14712598.2020.1752176.
- Семиглазова Т. Ю., Шарашенидзе С. М., Керимова С. Н., Клименко В. В., Мальгин А. Ю., Дашян Г. А., Палтуев Р. М., Семиглазов В. В., Криворотько П. В., Новиков С. Н., Семиглазов В. Ф. Современные подходы к лечению больных HER2-положительным раком молочной железы с метастазами в головном мозге. *Опухоли женской репродуктивной системы*. 2021;17(1):27–34. DOI: 10.17650/1994-4098-2021-17-1-27-34.
- Liu X., Fang Y., Li Y., Li Y., Qi L., Wang X. Pertuzumab combined with trastuzumab compared to trastuzumab in the treatment of HER2-positive breast cancer: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Frontiers in Oncology*. 2022;12:894861. DOI: 10.3389/fonc.2022.894861.
- Mohammadi M., Jeddi-Tehrani M., Golsaz-Shirazi F., Arjmand M., Bahadori T., Judaki M. A., Shiravi F., Zare H. A., Haghighat F. N., Mobini M., Amiri M. M., Shokri F. A Novel Anti-HER2 Bispecific Antibody with Potent Tumor Inhibitory Effects In Vitro and In Vivo. *Frontiers in Immunology*. 2021;11:600883. DOI: 10.3389/fimmu.2020.600883.
- Li B., Meng Y., Zheng L., Zhang X., Tong Q., Tan W., Hu S., Li H., Chen Y., Song J., Zhang G., Zhao L., Zhang D., Hou S., Qian W., Guo Y. Bispecific antibody to ErbB2 overcomes trastuzumab resistance through comprehensive blockade of ErbB2 heterodimerization. *Cancer Research*. 2013;73(21):6471–6483. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0657.
- Komarova, T. V., Sheshukova, E. V., Kosobokova, E. N., Kosorukov V. S., Shindyapina A. V., Lipskerov F. A., Shpudeiko P. S., Byalik T. E., Dorokhovet Y. L. The biological activity of bispecific trastuzumab/pertuzumab plant biosimilars may be drastically boosted by disulfiram increasing formaldehyde accumulation in cancer cells. *Scientific Reports*. 2019;9:16168. DOI: 10.1038/s41598-019-52507-9.
- Volk A. L., Mebrahtu A., Ko B. K., Lundqvist M., Karlander M., Lee H. J., Frejd F. Y., Kim K. T., Lee J. S., Rockberg J. Bispecific Antibody Molecule Inhibits Tumor Cell Proliferation More Efficiently Than the Two-Molecule Combination. *Drugs in R&D*. 2021;21(2):157–168. DOI: 10.1007/s40268-021-00339-2.
- Wang Z. H., Zheng Z. Q., Jia S. C., Liu S. N., Xiao X. F., Chen G. Y., Liang W. Q., Lu X. F. Trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer: Mechanisms, emerging biomarkers and targeting agents. *Frontiers in Oncology*. 2022;12:1006429. DOI: 10.3389/fonc.2022.1006429.
- 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(1):15. DOI: 10.1186/s12865-021-00405-z.
- da Luz F. A. C., da Costa Marinho E., Nascimento C. P., de Andrade Marques L., Delfino P. F. R., Antonioli R. M., Silva M. J. B., de Araújo R. A. The benefits of trastuzumab in the treatment of HER2+ breast cancer as a function of exposure time. *Ecancermedicalscience*. 2022;16:1347. DOI: 10.3332/ecancer.2022.1347.

14. Barbier, L., Declerck, P., Simoens, S., Neven P., Vulto A., Huys I. The arrival of biosimilar monoclonal antibodies in oncology: clinical studies for trastuzumab biosimilars. *British Journal of Cancer* 2019;121:199–210. DOI: 10.1038/s41416-019-0480-z.

## REFERENCES

- Kaprin A. D., Starinskij V. V., Shahzadova A. O. Malignant neoplasms in Russia in 2020 (morbidity and mortality). Moscow: MNIOI named after P. A. Herzen – branch of the Federal State Budgetary Institution "NMITs Radiology" of the Ministry of Health of Russia; 2021. 252 p. (In Russ.)
- Kaprin A. D., Starinskij V. V., Shahzadova A. O. The State of Oncological Care for the Population of Russia in 2020. Moscow: MNIOI named after P. A. Herzen – branch of the Federal State Budgetary Institution "NMITs Radiology" of the Ministry of Health of Russia; 2021. 239 p. (In Russ.)
- Duan S., Buxton I. L. O. Evolution of Medical Approaches and Prominent Therapies in Breast Cancer. *Cancers*. 2022;14(10):2450. DOI: 10.3390/cancers14102450.
- Tarantino P., Morganti S., Curigliano G. Biologic therapy for advanced breast cancer: recent advances and future directions. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2020;20(9):1009–1024. DOI: 10.1080/14712598.2020.1752176.
- Semiglazova T. Yu., Sharashenidze S. M., Kerimova S. N., Klimenko V. V., Malygin A. Yu., Dashyan G. A., Paltuev R. M., Semiglazov V. V., Krivorotko P. V., Novikov S. N., Semiglazov V. F. Current approaches to the treatment of HER2-positive breast cancer with brain metastases. *Tumors of female reproductive system*. 2021;17(1):27–34. (In Russ.) DOI: 10.17650/1994-4098-2021-17-1-27-34.
- Liu X., Fang Y., Li Y., Li Y., Qi L., Wang X. Pertuzumab combined with trastuzumab compared to trastuzumab in the treatment of HER2-positive breast cancer: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Frontiers in Oncology*. 2022;12:894861. DOI: 10.3389/fonc.2022.894861.
- Mohammadi M., Jeddi-Tehrani M., Golsaz-Shirazi F., Arjmand M., Bahadori T., Judaki M. A., Shiravi F., Zare H. A., Haghighat F. N., Mobini M., Amiri M. M., Shokri F. A Novel Anti-HER2 Bispecific Antibody with Potent Tumor Inhibitory Effects In Vitro and In Vivo. *Frontiers in Immunology*. 2021;11:600883. DOI: 10.3389/fimmu.2020.600883.
- Li B., Meng Y., Zheng L., Zhang X., Tong Q., Tan W., Hu S., Li H., Chen Y., Song J., Zhang G., Zhao L., Zhang D., Hou S., Qian W., Guo Y. Bispecific antibody to ErbB2 overcomes trastuzumab resistance through comprehensive blockade of ErbB2 heterodimerization. *Cancer Research*. 2013;73(21):6471–6483. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0657.
- Komarova, T. V., Sheshukova, E. V., Kosobokova, E. N. Kosorukov V. S., Shindyapina A. V., Lipskerov F. A., Shpudeiko P. S., Byalik T. E., Dorokhovet Y. L. The biological activity of bispecific trastuzumab/pertuzumab plant biosimilars may be drastically boosted by disulfiram increasing formaldehyde accumulation in cancer cells. *Scientific Reports*. 2019;9:16168. DOI: 10.1038/s41598-019-52507-9.
- Volk A. L., Mebrahtu A., Ko B. K., Lundqvist M., Karlander M., Lee H. J., Freijd F. Y., Kim K. T., Lee J. S., Rockberg J. Bispecific Antibody Molecule Inhibits Tumor Cell Proliferation More Efficiently Than the Two-Molecule Combination. *Drugs in R&D*. 2021;21(2):157–168. DOI: 10.1007/s40268-021-00339-2.
- Wang Z. H., Zheng Z. Q., Jia S. C., Liu S. N., Xiao X. F., Chen G. Y., Liang W. Q., Lu X. F. Trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer: Mechanisms, emerging biomarkers and targeting agents. *Frontiers in Oncology*. 2022;12:1006429. DOI: 10.3389/fonc.2022.1006429.
- 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(1):15. DOI: 10.1186/s12865-021-00405-z.
- da Luz F. A. C., da Costa Marinho E., Nascimento C. P., de Andrade Marques L., Delfino P. F. R., Antonioli R. M., Silva M. J. B., de Araújo R. A. The benefits of trastuzumab in the treatment of HER2+ breast cancer as a function of exposure time. *Ecancermedicalscience*. 2022;16:1347. DOI: 10.3332/ecancer.2022.1347.
- Barbier, L., Declerck, P., Simoens, S., Neven P., Vulto A., Huys I. The arrival of biosimilar monoclonal antibodies in oncology: clinical studies for trastuzumab biosimilars. *British Journal of Cancer* 2019;121:199–210. DOI: 10.1038/s41416-019-0480-z.