

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1531>
УДК 615.275.4



Оригинальная статья / Research article

Опыт проведения валидации методики оценки нейтрализующих антител ромиплостима в плазме крови человека

А. Н. Афанасьева¹✉, В. Б. Сапарова^{1,2}, И. Е. Макаренко^{1,2}, Т. А. Сельменских¹,
Д. В. Куркин², А. Л. Хохлов³, Р. В. Драй¹

¹ Закрытое акционерное общество «Фарм-Холдинг». 198515, Россия, г. Санкт-Петербург, пос. Стрельна, ул. Связи, д. 34, лит. А

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО МГМСУ им. А. И. Евдокимова Минздрава России). 127473, Россия, г. Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 150000, Россия, г. Ярославль, ул. Революционная, д. 5

✉ Контактное лицо: Афанасьева Алина Николаевна. E-mail: Alina.Afanaseva@geropharm.com

ORCID: А. Н. Афанасьева – <https://orcid.org/0000-0002-1443-4294>; В. Б. Сапарова – <https://orcid.org/0000-0002-8445-1129>;
И. Е. Макаренко – <https://orcid.org/0000-0003-2308-0608>; Т. А. Сельменских – <https://orcid.org/0000-0001-7073-311X>;
Д. В. Куркин – <https://orcid.org/0000-0002-1116-3425>; А. Л. Хохлов – <https://orcid.org/0000-0002-0032-0341>;
Р. В. Драй – <https://orcid.org/0000-0003-4594-6097>.

Статья поступила: 25.08.2023

Статья принята в печать: 19.02.2024

Статья опубликована: 20.02.2024

Резюме

Введение. Ромиплостим представляет собой аналог пептида слитого белка тромбозина (ТПО), который увеличивает количество тромбоцитов за счет связывания и активации человеческого рецептора ТПО. Используется для лечения тромбоцитопении, связанной с хронической иммунной тромбоцитопенией. Для ромиплостима одной из возможных нежелательных реакций со стороны иммунной системы является иммуногенность – выработка противолечекарственных антител к препарату, в том числе нейтрализующих антител, которые могут влиять на эффективность и профиль безопасности препарата.

Цель. Валидировать методику определения нейтрализующих антител к ромиплостиму в плазме крови человека для дальнейшего проведения клинических исследований иммуногенности

Материалы и методы. В исследовании были использованы поликлональные антитела кролика к ромиплостиму, в качестве стандартного образца брали Энплейт® производства Amgen Europe, для оценки специфичности брали плацебо производства ООО «ГЕРОФАРМ», клеточная линия 32D-hTPOR clone 63 со стабильной экспрессией ТРО-рецептора человека и набор для определения хемилюминесценции CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay от Promega. Эксперимент проводили на клеточной линии 32D-hTPOR clone 63, которую рассевали в первый день и вносили раститровку концентраций нейтрализующих антител с константной концентрацией ромиплостима, затем на второй день детектировали хемилюминесценцию. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программного обеспечения Prism 9.

Результаты и обсуждение. Продемонстрированы показатели специфичности методики; в максимальной концентрации препарат отличается от плацебо в 309 раз по остаточному уровню жизнеспособности клеток. Линейность методики по коэффициенту детерминации 0,9969. Определена прецизионность методики: сходимость составила 1–9 %, внутрилабораторная прецизионность – 3–18 %. Коэффициент вариации селективности методики составил 22 %. Для параметра «правильность» определены значения «внесено/найденно» на уровне 90–101 %. Доказано отсутствие эффекта матрицы.

Заключение. Можно утверждать, что методика является линейной, специфичной, высокопрецизионной, правильной, селективной и с доказанным отсутствием эффекта матрицы, что позволяет применять ее для определения иммуногенности препаратов ромиплостим при проведении клинических исследований.

Ключевые слова: антитела к лекарственному препарату, биоаналог, исследования нейтрализующих антител, клинические испытания иммуногенности, валидация, определение жизнеспособности клеток, антитела к ромиплостиму

Конфликт интересов. Исследование *in vitro* было организовано ЗАО «Фарм-Холдинг», которое входит в группу компаний ООО «ГЕРОФАРМ».

Вклад авторов. А. Н. Афанасьева – написание и редактирование текста, анализ и интерпретация результатов исследования *in vitro*. В. Б. Сапарова – разработка дизайна исследования *in vitro*, анализ и интерпретация результатов исследования *in vitro*, редактирование текста. И. Е. Макаренко – критический пересмотр содержания статьи, анализ и интерпретация результатов исследования *in vitro*. Т. А. Сельменских – постановка экспериментов *in vitro*. Д. В. Куркин – интерпретация результатов исследования *in vitro*, утверждение текста. А. Л. Хохлов – интерпретация результатов исследования *in vitro*, утверждение текста. Р. В. Драй – утверждение окончательного варианта статьи для публикации.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке ООО «ГЕРОФАРМ». Спонсор не оказывал влияния на ход исследования и интерпретацию результатов.

Соответствие принципам этики. Исследования проведены на клеточной линии *in vitro*.

Для цитирования: Афанасьева А. Н., Сапарова В. Б., Макаренко И. Е., Сельменских Т. А., Куркин Д. В., Хохлов А. Л., Драй Р. В. Опыт проведения валидации методики оценки нейтрализующих антител ромиплостима в плазме крови человека. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):247–255. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1531>

© Афанасьева А. Н., Сапарова В. Б., Макаренко И. Е., Сельменских Т. А., Куркин Д. В., Хохлов А. Л., Драй Р. В., 2024

© Afanaseva A. N., Saparova V. B., Makarenko I. E., Selmenskikh T. A., Kurkin D. V., Hohlov A. L., Drai R. V., 2024

Experimental Validation a Method for Assessing Neutralizing Antibodies of Romiplostim in Human Plasma

Alina N. Afanaseva¹✉, Valeria B. Saparova^{1,2}, Igor E. Makarenko^{1,2},
Tatiana A. Selmenskikh¹, Denis V. Kurkin², Alexander L. Hohlov³, Roman V. Drai¹

¹ Closed Joint Stock Company "Pharm-Holding". 34A, Svyazi str., Strelina village, Saint-Petersburg, 198515, Russia

² Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "A. I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. 20/1, Delegatskaya str., Moscow, 127473, Russia

³ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Yaroslavl State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. 5, Revolyucionnaya str., Yaroslavl, 150000, Russia

✉ Corresponding author: Alina N. Afanaseva. E-mail: Alina.Afanaseva@geropharm.com

ORCID: Alina N. Afanaseva – <https://orcid.org/0000-0002-1443-4294>; Valeria B. Saparova – <https://orcid.org/0000-0002-8445-1129>;

Igor E. Makarenko – <https://orcid.org/0000-0003-2308-0608>; Tatiana A. Selmenskikh – <https://orcid.org/0000-0001-7073-311X>;

Denis V. Kurkin – <https://orcid.org/0000-0002-1116-3425>; Alexander L. Hohlov – <https://orcid.org/0000-0002-0032-0341>;

Roman V. Drai – <https://orcid.org/0000-0003-4594-6097>.

Received: 25.08.2023

Revised: 19.02.2024

Published: 20.02.2024

Abstract

Introduction. Romiplostim is an analogue of the fusion protein peptide of thrombopoietin (TPO), which increases platelet count by binding and activating the human thrombopoietin receptor (TPO-R). It is used to treat thrombocytopenia associated with chronic immune thrombocytopenia. For romiplostim, one of the possible adverse reactions from the immune system is immunogenicity: the production of anti-drug antibodies to the medicinal product, including neutralising antibodies, which may affect the efficacy and safety profile of the medicinal product.

Aim. Validate the procedure for determining neutralising antibodies to romiplostim in human plasma for further clinical studies of immunogenicity.

Materials and methods. The study used rabbit polyclonal antibodies to romiplostim, Nplate® produced by Amgen Europe as a standard sample; a placebo produced by LLC "GEROPHARM", a cell line 32D-hTPOR clone 63 with stable expression of human TPO receptor and a chemiluminescence assay kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay produced by Promega to assess specificity. The experiment was carried out on cell line 32D-hTPOR clone 63, which was seeded on the first day and the neutralizing antibody concentrations were titrated with a constant concentration of romiplostim, then the chemiluminescence was detected on the second day. Statistical processing of the results was carried out using Prism 9 software.

Result and discussion. The specificity of the procedure was demonstrated; at maximum concentration, the medicinal product differs from placebo by 309 times in the residual level of cell viability. The linearity of the procedure in terms of the coefficient determination is 0.9969. The precision of the procedure was determined: the repeatability was 1–9 %, the intermediate precision was 3–18 %. The coefficient of variation in selectivity of the procedure was 22 %. For the accuracy parameter, the values for recovery/spike were determined as 90–101 %. It was proven that there was no matrix effect.

Conclusion. It can be stated that the procedure is linear, specific, highly precise, correct, selective and with a proven absence of matrix effect, which allows it to be used to determine the immunogenicity of romiplostim medicinal products in clinical studies.

Keywords: anti-drug antibodies, biosimilar, neutralizing antibody studies, clinical studies of immunogenicity, validation, cell viability determination, antibodies to romiplostim

Conflict of interest. The *in vitro* study was organized by CJSC "Pharm-Holding", which is part of the LLC "GEROPHARM" group of companies.

Contribution of the authors. Alina N. Afanaseva – writing and editing the text, analysis and interpretation of *in vitro* study results. Valeria B. Saparova – development of *in vitro* study design, analysis and interpretation of *in vitro* study results, text editing. Igor E. Makarenko – critical revision of the content of the article, analysis and interpretation of the results of the *in vitro* study. Tatyana A. Selmenskikh – setting up *in vitro* experiments. Kurkin V. Denis – interpretation of *in vitro* study results, approval of the text. Alexander L. Khokhlov – interpretation of the results of the *in vitro* study, approval of the text. Roman V. Drai – approval of the final version of the article for publication.

Funding. The work was carried out with the financial support of LLC "GEROPHARM". The sponsor had no influence on the course of the study or interpretation of the results.

Compliance with the principles of ethics. The studies were carried out on a cell line *in vitro*.

For citation: Afanaseva A. N., Saparova V. B., Makarenko I. E., Selmenskikh T. A., Kurkin D. V., Hohlov A. L., Drai R. V. Experimental validation a method for assessing neutralizing antibodies of romiplostim in human plasma. *Drug development & registration*. 2024;13(1):247–255. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1531>

ВВЕДЕНИЕ

Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТП) – это состояние низкого количества тромбоцитов (тромбоцитопения) по неизвестной причине (идиопатическая). Поскольку большинство причин связано с антителами против тромбоцитов, она также известна как иммунная тромбоцитопеническая пур-

пура [1]. Этиология ИТП опосредована аутоантителами (обычно иммуноглобулином G) [2], и у пациентов с ИТП вырабатываются аутоантитела к белкам мембраны тромбоцитов [3]. ИТП – это заболевание, которое влияет на общее количество тромбоцитов в крови, а не на их функцию [1, 4]. Смертность от ИТП у взрослых лишь немного выше, чем в сопоставимой по возрасту популяции, и в основном об-

условлена осложнениями от кровотечений, как и у детей [5]. Большинство пациентов с ИТП чаще умирают от состояний, не связанных с ИТП, чем от осложнений ИТП или лечения [5].

В качестве терапии рекомендуется использовать агонисты рецепторов тромбопоэтина, например ромиплостим, который представляет собой слитый белок Fc-пептид для подкожного введения, содержащий два пептида из 14 аминокислот, стабилизированных путем связывания с Fc-доменом иммуноглобулина G, который связывается с рецептором ТПО и активирует его [6]. Аминокислотная последовательность ромиплостима не имеет гомологии последовательностей с эндогенным тромбопоэтином [7–9]. Он связывается так же, как эндогенный ТРО, и может вытеснять ТРО из связи с рецептором. Ромиплостим, аналогично ТРО, активирует внутриклеточные сигнальные пути, что приводит к устойчивому повышению количества тромбоцитов [7, 10–12].

Способность биологической терапии индуцировать нейтрализующие антитела (НА) в клинических исследованиях общепризнана, и ожидается, что она будет проявляться в некоторой степени даже для полностью человеческих белков [13]. Сами по себе НА могут оказывать значительное влияние на биодоступность, эффективность и безопасность белкового терапевтического средства, и, соответственно, тестирование на иммуногенность требуется до получения разрешения регулирующих органов. Важно использовать чувствительные, специфичные и валидированные методы для обнаружения НА. Принцип анализа нейтрализующей активности препарата основывается на том, что любой образец, содержащий НА, будет ингибировать биологическую активность, связанную с фиксированной концентрацией лекарственного средства, и это может быть достигнуто с помощью клеточного анализа, в котором используется линия, экспрессирующая рецептор [14]. Отмечено, что ромиплостим обладает меньшей иммуногенностью, чем рекомбинантный тромбопоэтин человека и рекомбинантный фактор роста мегакариоцитов человека, так как вырабатываемые в ответ на введение данных препаратов антитела нивелировали их клинический эффект [15], и существует необходимость также подтвердить это для биоаналога. Определение положительных результатов для пациентов принято рассчитывать по пороговому значению, для которого в ходе анализа 30 индивидуальных образцов интактной плазмы крови человека оценивается уровень НА. Эти образцы являются реактивными (часто называемыми потенциально положительными) на присутствие антител к лекарственному препарату; тем не менее некоторые из них могут быть неспецифичными из-за 1 % ложноположительных результатов, поэтому при использовании непараметрического подхода необходимо оценивать выбросы [16, 17].

Валидация биоаналитической методики – это экспериментальное доказательство того, что методика пригодна для решения предполагаемых задач.

Соблюдение принципов валидации обеспечивает надежность данных, получаемых в процессе разработки и экспертизы качества лекарственных препаратов на рынке как химических, так и биологических препаратов^{1, 2, 3}.

Цель

Валидировать методику определения нейтрализующих антител к ромиплостиму в плазме крови человека методом, основанным на использовании трансгенной клеточной системы с детекцией продукта по хемилюминесценции для дальнейшего проведения клинических исследований иммуногенности. В рамках валидации были поставлены задачи: определение оптимального значения концентрации ромиплостима для максимальной индукции люминесценции, оценка валидационных параметров (линейность, специфичность, правильность, селективность, эффект матрицы, сходимость и внутрилабораторная прецизионность) и заключение о применимости методики для клинических исследований иммуногенности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали поликлональные антитела кролика к ромиплостиму (ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России), в качестве стандартного образца брали Энплейт® (Nplate, лиофилизат для приготовления раствора 250 мкг, Amgen Europe, B.V., серия 1107017A, годен до 02.2024), для оценки специфичности брали плацебо (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия). Тест-система – это клеточная линия лимфобластов мыши *Mus musculus* со стабильной экспрессией ТРО-рецептора человека 32D-hTPOR cell line, clone 63 (далее 32D-hTPOR clone 63), которая способна к дозозависимой пролиферации под действием агонистов тромбопоэтинового рецептора. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 (кат. № 1.3.4, ООО «БиолоТ», Россия) + 2 мМ L-глутамин (кат. № Ф032, НПП «ПанЭко», Россия) с содержанием 1,5 г/л бикарбоната натрия (кат. № S5761 Sigma-Aldrich, США), 4,5 г/л глюкозы (кат. № 141341, PanReac AppliChem, Германия), 10 мМ ХЕПЕС (кат. № 1.2.6.1, ООО «БиолоТ», Россия) и 1 мМ пирувата

¹ ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик». Доступно по: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-1-0012-15-validatsiya-analiticheskikh-metodik/>. Ссылка активна на 25.08.2023.

² ICH Topic Q 2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology. EMA; 2006. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q2r1-validation-analytical-procedures-text-and-methodology-step-5-first-version_en.pdf. Accessed: 25.08.2023.

³ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411942/cncd_21112016_85. Ссылка активна на 25.08.2023.

натрия (кат. № 1.4.004, ООО «БиолоТ», Россия), далее RPMI Basal с добавлением 10%-й эмбриональной бычьей сыворотки FBS (кат. № FBS-11A, Capricorn Scientific GmbH, Германия) 5 нг/мл IL-3 (кат. № I4144, Sigma-Aldrich, США) и 0,3 мг/мл гигромицина В (кат. № Hyg-H, Capricorn Scientific GmbH, Германия).

В исследовании использовали среду без IL-3 и гигромицина В, так как эти растворы влияют на пролиферативную активность. Изначально готовили растворы Энплейта® и нейтрализующих антител кролика к ромиплостиму в среде RPMI Basal + 10 % FBS, где концентрация препарата была 1 нг/мл, а для антител брали раститровку концентраций от 1 до 5000 нг/мл. Клетки 32D-hTPOR clone 63 рассеивали в 96-луночные белые планшеты по 5000 клеток на лунку в среде RPMI Basal + 10 % FBS. Смесь препарата, антител и клеток инкубировали при 37 °C и 5 % CO₂ 24 ± 4 часа, остужали до комнатной температуры в течение 1 часа и снимали хемилюминесценцию с помощью набора CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (кат. № G7571, Promega) согласно инструкции производителя. Регистрировали люминесценцию на мультимодальном микропланшетном ридере CLARIOstar® (BMG LABTECH, Германия). Анализ данных проводился в интегрированном программном обеспечении MARS Data Analysis, а статистический анализ – в программе GraphPad Prism 9.3.1 (471), где нормировали данные в процентах относительно нулевого контроля, затем строили четырехпараметрическую кривую зависимости «доза – реакция» для подсчета величины IC₅₀ (концентрация полумаксимального ингибирования).

Валидационные параметры. Критерии валидации были подобраны согласно Государственной фармакопее Российской Федерации, рекомендациям Международного совета по гармонизации технических требований к лекарственным средствам для медицинского применения (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH) и ЕМА. Процедура валидации включала оценку специфичности, линейности, селективности, сходимости, внутрилабораторной прецизионности и определение эффекта матрицы методики. Для оценки специфичности рассматривали методику «Пролиферативная активность ромиплостима» [18], на основе которой была разработана методика нейтрализующих антител ромиплостима, поскольку действие нейтрализующих антител основано на снижении количества молекул ромиплостима в растворе, доступных для связывания с рецептором, данные применимы в рамках данной валидации. В специфичности оценивали сигнал при раститровке концентрации Энплейта® и аналогичной раститровке плацебо. Линейность методики определения концентрации НА к ромиплостиму в плазме крови человека устанавливали с учетом константной концентрации ромиплостима. Для этого были выполнены измерения при добавлении раститровки концентраций Энплейта® без внесения НА. Прецизионность методики оценивали по

сходимости и внутрилабораторной прецизионности, в которых оценивали коэффициент вариации (CV) для каждой точки концентрации НА с добавлением константной концентрации ромиплостима. Селективность методики оценивали для 6 образцов бланковой пулированной плазмы крови человека, где были внесены НА на уровне минимальной концентрации линейного диапазона методики. Правильность оценивали по результатам для образцов внутреннего контроля (ВКО) с внесенными концентрациями НА 75, 150 и 300 нг/мл. Эффект матрицы сравнивали для результатов, полученных при разведении калибровочных проб в культуральной среде и плазме крови человека.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методика оценки нейтрализующих антител к ромиплостиму применялась ранее на клинических образцах [19–21], где было показано, что нейтрализующие антитела к ромиплостиму развивались у малого количества пациентов. Однако в исследовании не было указаний о проведении валидации представленных методик, что необходимо при анализе клинических образцов. В данном исследовании мы провели валидацию и доказали применимость методики для оценки нейтрализующих антител к ромиплостиму в клинических исследованиях иммуногенности.

Линейность методики – это наличие линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации или количества определяемого вещества в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики. Для определения линейности методики НА к ромиплостиму в плазме крови человека необходимо определить константную концентрацию ромиплостима. Для этого были выполнены измерения при добавлении раститровки концентраций ромиплостима без внесения НА. Зависимость пролиферации клеток и уровня люминесценции от концентрации ромиплостима описывается 4-параметрической логистической функцией и имеет график сигмоидальной кривой с логарифмической обработкой. С учетом особенностей 4-параметрической кривой получение количественных значений концентраций, отношения откликов RFU (относительные единицы флуоресценции или ОЕФ) которых превышают верхнее допустимое значение (top, верхнее плато), а также концентраций, отношения откликов RFU которых меньше нижнего допустимого значения (bottom, нижнее плато), невозможно, поэтому количественному анализу был подвергнут линейный диапазон кривой. В качестве оптимальной была выбрана максимальная концентрация ромиплостима, лежащая в линейном диапазоне отклика и определяющаяся с достаточной правильностью. График зависимости ответа в RFU от концентрации ромиплостима в нг/мл и его основные характеристики представлены на рисунке 1.

Данное испытание было выполнено в ходе разработки и адаптации методики, при этом было проанализировано 11 концентраций ромиплостима в

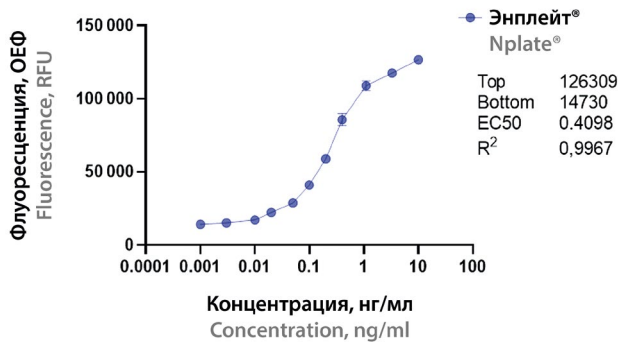


Рисунок 1. График зависимости концентрации ромиплостима и сигнала флуоресценции.

Top – верхнее плато сигнала; bottom – нижняя граница сигнала; EC_{50} – полумаксимальная эффективная концентрация; R^2 – коэффициент детерминации. Данные представлены в виде Mean $\pm$ SD

Figure 1. Graph of romiplostim concentration and fluorescence signal.

Top – upper limit of the signal; bottom – lower limit of the signal; EC_{50} – half-maximum effective concentration; R^2 – coefficient of determination. Data are presented as Mean $\pm$ SD

диапазоне 0,001–10 нг/мл, из них 5 в диапазоне концентраций 0,05–1 нг/мл попали в линейную область графика. Правильность определения для данных концентраций представлена в таблице 1.

Таблица 1. Зависимость отклика RFU от концентраций ромиплостима

Table 1. RFU response versus romiplostim concentrations

Внесено, нг/мл Added, ng/ml	Сигнал, ОЕФ Signal, RFU	Найдено, нг/мл Found, ng/ml	Открываемость, % Recovery, %
0	13 778	n/a	n/a
0,001	14 250	n/a	n/a
0,003	15 187	n/a	n/a
0,01	17 156	n/a	n/a
0,02	22 316	n/a	n/a
0,05	28 781	0,05	102
0,1	41 006	0,10	97
0,2	58 990	0,19	93
0,4	85 741	0,43	108
1,1	108 912	1,14	103
3,3	117 578	n/a	n/a
10	126 687	n/a	n/a

Примечание. n/a – значение не найдено. «Открываемость» – соотношение между полученным средним и истинным значениями, показатель правильности, который отражается в процентах.

Note. n/a – the value was not found. "Recovery" – this is the ratio between the obtained average and the true values, an indicator of correctness, which is reflected in percentage.

Представленные данные демонстрируют, что оптимальной концентрацией ромиплостима является 1 нг/мл, выбранной концентрации соответствует максимальный ответ в линейном диапазоне, правиль-

ность определения составила 103 %. Концентрация ромиплостима 1 нг/мл была использована во всех дальнейших экспериментах.

Для валидируемого метода определения концентрации нейтрализующих антител к ромиплостиму в плазме крови человека назначена нелинейная зависимость на всем диапазоне концентраций НА (1, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1250, 2500 и 5000 нг/мл). Экспериментальные данные моделируются функцией, являющейся нелинейной комбинацией параметров модели и зависящей от одной и более независимых переменных. Линейный диапазон методики – 25, 50, 100, 250, 500 и 1250 нг/мл.

На рисунке 2 представлены результаты в виде графика зависимости RFU от концентрации НА с константной концентрацией ромиплостима 1 нг/мл, приведен коэффициент детерминации.

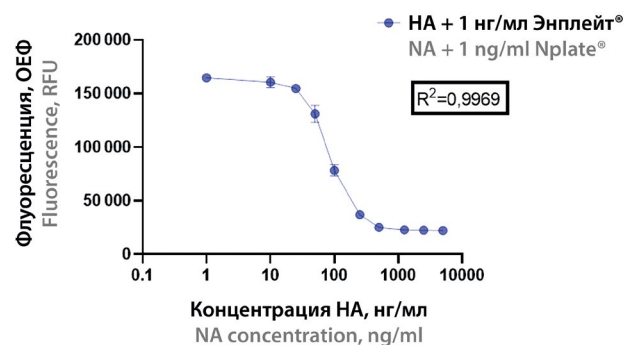


Рисунок 2. График зависимости концентрации НА с константной концентрацией ромиплостима 1 нг/мл и сигнала флуоресценции; R^2 – коэффициент детерминации. Данные представлены в виде Mean $\pm$ SD

Figure 2. Graph of the dependence of the concentration of NA with a constant concentration of romiplostim 1 ng/ml and the fluorescence signal; R^2 – coefficient of determination. Data are presented as Mean $\pm$ SD

С помощью метода наименьших квадратов была выбрана 4-параметрическая кривая как функция, наиболее близко описывающая зависимость результатов теста от концентрации антител. Для методики показано соответствие модели в диапазоне концентраций НА 1–5000 нг/мл.

Специфичность тест-системы, используемой в биоаналитической методике, определяется возможностью с ее помощью достоверно отличать действующее вещество от примесных соединений, продуктов его деградации и вспомогательных веществ. Параметр рассматривали для методики «Пролиферативная активность ромиплостима», на основе которой была разработана методика количественного определения нейтрализующих антител к ромиплостиму. Оценивали специфичность клеточного ответа на предъявление ромиплостима, поскольку действие нейтрализующих антител основано на снижении ко-

личества молекул ромиплостима в растворе, доступных для связывания с рецептором, данные применимы в рамках текущей валидации. В рамках проведенной валидации проанализировали ответ клеточной линии 32D-hTPOR clone 63 на стимуляцию растворами Энплейт® и плацебо ромиплостима (рисунок 3, таблица 2). Оценивали уровень пролиферативной активности клеточной линии в 11 концентрационных точках ромиплостима. Для плацебо использовали разведения, идентичные разведениям препарата каждой концентрации. Результаты нормализовали по шкале от 0 до 100 %, где за 0 % принимался уровень пролиферации клеток без внесения исследуемых объектов, а за 100 % – максимальный уровень пролиферации в ответ на стимуляцию Энплейтом®.

Согласно результатам значения для плацебо ромиплостима более чем в 309 раз отличаются от таковых для растворов, имеющих в составе лекарственное вещество (ромиплостим). Ответ тест-системы клеток линии 32D-hTPOR clone 63 специфичен по отношению к препарату ромиплостим.

Прецизионность характеризует степень близости независимых результатов индивидуальных испытаний, полученных в конкретных установленных условиях. Эта характеристика зависит от случайных факторов и выражается величиной стандартного отклонения – коэффициентом вариации (CV). Во всех экспериментах для стимуляции пролиферативной активности использовали ромиплостим в концентрации 1 нг/мл и разбавку концентраций нейтрализующих антител к ромиплостиму в диапазоне концентраций 1–5000 нг/мл. Сходимость (повторяемость) характеризует степень согласованности результатов измерений, полученных одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, в одной и той же лаборатории, одним и тем же исследователем, с использованием одного и того же оборудования, т. е. проведенных в идентичных условиях. В рамках проведенной валидации методики была оценена повторяемость по значениям RFU в эксперименте для десяти концентраций, каждая из которых в 4 повторях (таблица 3).

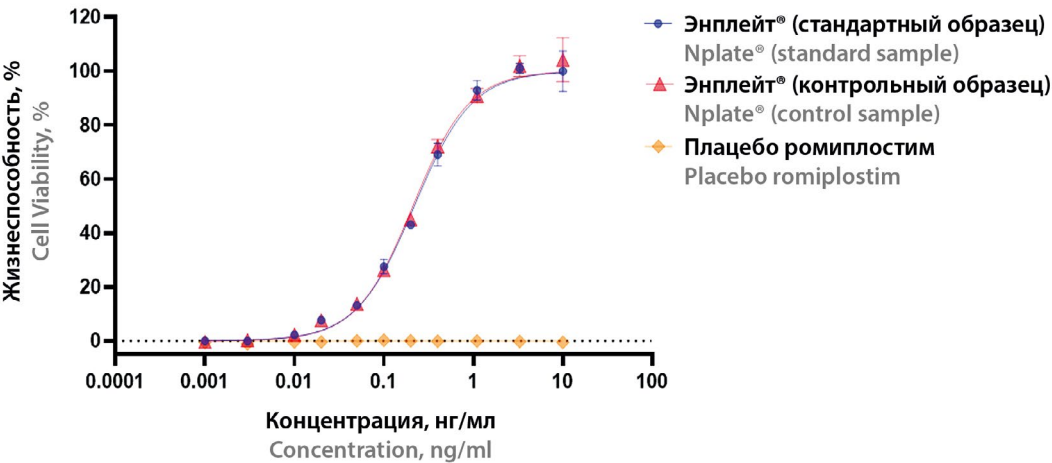


Рисунок 3. Специфичность ответа клеточной линии 32D-hTPOR clone 63. На графике представлена зависимость уровня пролиферации клеток 32D-hTPOR clone 63 от концентрации исследуемого объекта, данные представлены в виде Mean ± SD

Figure 3. The specificity of the response of the 32D-hTPOR clone 63 cell line. The graph shows the dependence of the level of proliferation of 32D-hTPOR clone 63 cells on the concentration of the test object, the data are presented as Mean ± SD

Таблица 2. Пролиферативная активность клеток 32D-hTPOR clone 63

Table 2. Proliferative activity of 32D-hTPOR clone 63 cells

	Концентрация исследуемого объекта, нг/мл Concentration of the object under study, ng/ml										
	0,001	0,003	0,01	0,02	0,05	0,1	0,2	0,4	1,1	3,3	10
	Пролиферативная активность, % (Mean, n = 8) Proliferative activity, % (Mean, n = 8)										
Энплейт® Nplate®	–0,2	0,1	2,3	7,6	13,4	26,9	44,1	70,6	91,9	101,5	102,1
Плацебо Placebo	–0,62	–1,16	–0,43	–0,42	0,02	0,27	0,02	–0,18	–0,11	–0,26	–0,58

Примечание. Представлены нормализованные данные уровня пролиферативной активности, %. Для каждой концентрации представлено среднее значение по 8 повторностям.

Note. Normalized data on the level of proliferative activity, % are presented. For each concentration, the mean value over 8 replicates is presented.

Таблица 3. Сходимость для методики определения концентрации нейтрализующих антител к ромиплостиму в плазме крови человека

Table 3. Repeatability for the method for determining the concentration of neutralizing antibodies to romiplostim in human plasma

Концентрация НА, нг/мл NA concentration, ng/ml	ОЕФ RFU			Среднее ОЕФ Mean RFU	CV, %
1	162225	169187	162600	164671	2
10	155937	159737	165950	160541	3
25	155737	154575	153800	154704	1
50	122250	138112	132737	131033	6
100	72150	81537	81087	78258	7
250	33987	36200	40662	36950	9
500	23812	24662	26837	25104	6
1250	22462	21687	23962	22704	5
2500	22137	21712	23312	22387	4
5000	20850	22762	22450	22021	5

Примечание. CV – коэффициент вариации; ОЕФ/RFU – относительные единицы флуоресценции

Note. CV – coefficient of variation; RFU – relative fluorescence units

Сходимость методики определения концентрации нейтрализующих антител к ромиплостиму в плазме крови человека по результатам испытания составила от 1 до 9 %. **Внутрилабораторная прецизионность (промежуточная)** оценивается в условиях работы одной лаборатории с изменением условий проведения эксперимента. В рамках валидации проанализировали внутрилабораторную прецизионность с изменением дня постановки эксперимента (таблица 4).

Таблица 4. Внутрилабораторная прецизионность (разные дни) для методики определения концентрации нейтрализующих антител к ромиплостиму в плазме крови человека

Table 4. Intralaboratory Precision (various days) for the method for determining the concentration of neutralizing antibodies to romiplostim in human plasma

ОЕФ RFU						Среднее ОЕФ Mean RFU	CV, %
17.11.2021-18.11.2021			08.12.2021-09.12.2021				
117281	118618	128993	162225	169187	162600	143151	17
112368	114193	122356	155937	159737	165950	138424	18
107731	111556	120631	155737	154575	153800	134005	17
98443	97793	110893	122250	138112	132737	116705	15
65781	68168	77918	72150	81537	81087	74440	9
29368	30418	37156	33987	36200	40662	34632	12
22793	23356	25731	23812	24662	26837	24532	6
20181	20718	21106	22462	21687	23962	21686	6
22306	21543	22231	22137	21712	23312	22207	3
22393	22006	22956	20850	22762	22450	22236	3

Примечание. CV – коэффициент вариации, ОЕФ/RFU – относительные единицы флуоресценции

Note. CV – coefficient of variation, RFU – relative fluorescence units

Внутрилабораторная прецизионность методики определения концентрации нейтрализующих антител к ромиплостиму в плазме крови человека составляет от 3 до 18 %.

Селективность – это способность биоаналитической методики определять и различать исследуемое анализируемое вещество и внутренний стандарт в присутствии компонентов, которые могут содержаться в образце. Для выполнения теста на селективность в 6 образцов бланковой пулированной плазмы человека были внесены НА на уровне минимальной концентрации линейного диапазона определения (75 нг/мл). Концентрацию определяли по калибровочной кривой, описанной НА (таблица 5).

Таблица 5. Селективность для методики определения концентрации нейтрализующих антител к ромиплостиму в плазме крови человека

Table 5. Selectivity for the method for determining the concentration of neutralizing antibodies to romiplostim in human plasma

№	Внесено, нг/мл Added, ng/ml	Найдено, нг/мл Found, ng/ml	CV, %
1	75	70,42	22
2		78,58	
3		109,2	
4		111,34	
5		93,89	
6		66,69	

Примечание. CV – коэффициент вариации.

Note. CV – coefficient of variation.

Селективность на уровне коэффициента вариации в 22 % и биоаналитическая методика определения концентрации нейтрализующих антител к ромиплостиму в плазме крови человека методом, осно-

ванным на использовании трансгенной клеточной системы с детекцией продукта по хемилюминесценции, является селективной.

Правильность методики характеризуется отклонением среднего результата определений, выполненных с ее использованием, от значения, принимаемого за истинное (номинальное). Правильность оценивали по результатам постановок анализа в дубликатах с использованием образцов ВКО с внесенной концентрацией НА 75, 150 и 300 нг/мл. (таблица 6).

Таблица 6. Правильность для методики определения концентрации нейтрализующих антител к ромиплостиму в плазме крови человека

Table 6. Accuracy for the method for determining the concentration of neutralizing antibodies to romiplostim in human plasma

Внесено, нг/мл Added, ng/ml	75	150	300
Найдено, нг/мл Found, ng/ml	70,4 78,6	160,7 173,7	309,2 359,9
Среднее, нг/мл Mean, ng/mL	74,5	167,2	334,6
Открываемость, % Recovery, %	101	90	90

Примечание. CV – коэффициент вариации, «Среднее» – среднее арифметическое, «Открываемость» – соотношение между полученным средним и истинным значениями, показатель правильности, который отражается в процентах.

Note. CV – coefficient of variation, Mean – arithmetic mean, Recovery – this is the ratio between the obtained average and the true values, an indicator of correctness, which is reflected in percent.

Значения, рассчитанные с помощью валидируемой методики, соответствуют номинальным на 90–101 %. Методика определения нейтрализующих антител к ромиплостиму в плазме крови человека позволяет правильно определять их концентрацию в анализируемом растворе.

Эффект матрицы – прямое или опосредованное влияние на результаты анализа, обусловленное наличием в биологическом образце других, отлич-

ных от целевого анализатора, веществ. При проведении валидационного теста сравнивали результаты, полученные при разведении калибровочных проб в культуральной среде и плазме крови человека. Для минимизации эффекта матрицы и стандартизации условий проведения анализа все анализируемые образцы разбавляли в культуральной среде в 40 раз. Результат оценивали по калибровочным кривым с ответом по первичным данным RFU и нормализованным данным (рисунок 4).

Согласно результатам плазма крови человека снижает клеточный ответ и соответствующую хемилюминесценцию на уровне верхнего плато даже при разведении в 40 раз, при этом профиль полученной кривой при нормализации данных не меняется. Поскольку дальнейшее разведение могло повлиять на точность и правильность полученных данных от целевых молекул, было принято решение исключить эффект матрицы разведением калибровочных образцов и образцов ВКО в RPMI Basal при постановке методики в пулированной плазме крови человека, как наиболее близкой матрице.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенной работы методика определения нейтрализующих антител к ромиплостиму была оценена по всем основным валидационным параметрам. В качестве матрицы использовали плазму крови человека, в качестве тест-системы – трансгенную клеточную линию 32D-hTPOR clone. Определение жизнеспособности клеток проводилось с детекцией продукта по хемилюминесценции. Были выбраны концентрации нейтрализующих антител от 1 до 5000 нг/мл и концентрация ромиплостима 1 нг/мл. Полученные значения линейности, специфичности, прецизионности, правильности, селективности и эффекта матрицы позволяют применять ее для определения иммуногенности препаратов ромиплостим при проведении клинических исследований.

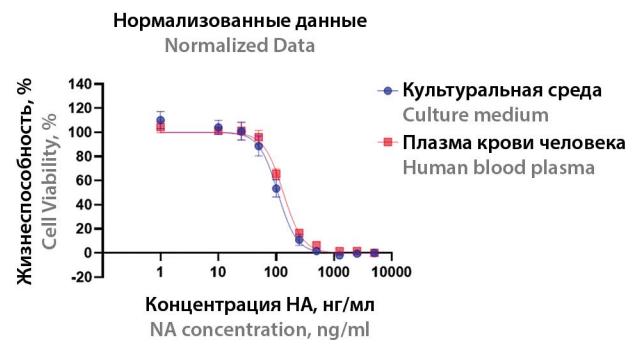
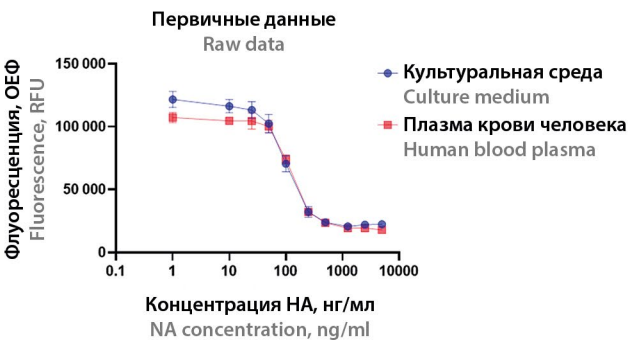


Рисунок 4. Эффект матрицы. На графике представлена зависимость уровня пролиферации клеток линии 32D-hTPOR clone 63 от концентрации НА при стабильной концентрации ромиплостима 1 нг/мл, данные представлены в виде Mean $\pm$ SD

Figure 4. Matrix effect. The graph shows the dependence of the level of proliferation of 32D-hTPOR clone 63 cells on the concentration of NA at a stable concentration of romiplostim 1 ng/ml, the data are presented as Mean $\pm$ SD

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Kayal L., Jayachandran S., Singh K. Idiopathic thrombocytopenic purpura. *Contemporary Clinical Dentistry*. 2014;5(3):410–414. DOI: 10.4103/0976-237X.137976.
- Provan D., Arnold D.M., Bussell J.B., Chong B.H., Cooper N., Gernsheimer T., Ghanima W., Godeau B., González-López T.J., Grainger J., Hou M., Kruse C., McDonald V., Michel M., Newland A.C., Pavord S., Rodeghiero F., Scully M., Tomiyama Y., Wong R.S., Zaja F., Kuter D.J. Updated international consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood Advances*. 2019;3(22):3780–3817. DOI: 10.1182/bloodadvances.2019000812.
- Zufferey A., Kapur R., Semple J. Pathogenesis and Therapeutic Mechanisms in Immune Thrombocytopenia (ITP). *Journal of Clinical Medicine*. 2017;6(2):16. DOI: 10.3390/jcm6020016.
- Pietras N.M., Pearson-Shaver A.L. Immune Thrombocytopenic Purpura. *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*; 2022.
- Neunert C., Noroozi N., Norman G., Buchanan G.R., Goy J., Nazi I., Kelton J.G., Arnold D.M. Severe bleeding events in adults and children with primary immune thrombocytopenia: a systematic review. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2015;13(3):457–464. DOI: 10.1111/jth.12813.
- Soff G.A., Miao Y., Bendheim G., Batista J., Mones J.V., Parameswaran R., Wilkins C.R., Devlin S.M., Abou-Alfa G.K., Cercek A., Kemeny N.E., Sarasohn D.M., Mantha S. Romiplostim Treatment of Chemotherapy-Induced Thrombocytopenia. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(31):2892–2898. DOI: 10.1200/JCO.18.01931.
- Bussell J.B., Soff G., Balduzzi A., Cooper N., Lawrence T., Semple J.W. A Review of Romiplostim Mechanism of Action and Clinical Applicability. *Drug Design, Development and Therapy*. 2021;15:2243–2268. DOI: 10.2147/DDDT.S299591.
- Kuter D.J. Romiplostim. In: Lyman G.H., Dale D.C., editors. Hematopoietic Growth Factors in Oncology. New York: Springer; 2011. P. 267–288. DOI: 10.1007/978-1-4419-7073-2_16.
- Yang A.S. Development of romiplostim: a novel engineered peptibody. *Seminars in Hematology*. 2015;52(1):12–15. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2014.10.007.
- Bussell J.B., Kuter D.J., George J.N., McMillan R., Aledort L.M., Conklin G.T., Lichtin A.E., Lyons R.M., Nieva J., Wasser J.S., Wiznitzer I., Kelly R., Chen C.-F., Nichol J.L. AMG 531, a thrombopoiesis-stimulating protein, for chronic ITP. *New England Journal of Medicine*. 2006;355(16):1672–1681. DOI: 10.1056/NEJMoa054626.
- Kuter D.J., Bussell J.B., Lyons R.M., Pullarkat V., Gernsheimer T.B., Senecal F.M., Aledort L.M., George J.N., Kessler C.M., Sanz M.A., Liebman H.A., Slovic F.T., de Wolf J.T.M., Bourgeois E., Guthrie T.H., Newland A., Wasser J.S., Hamburg S.I., Grande C., Lefrère F., Lichtin A.E., Tarantino M.D., Terebello H.R., Viallard J.-F., Cuevas F.J., Go R.S., Henry D.H., Redner R.L., Rice L., Schipperus M.R., Guo D.M., Nichol J.L. Efficacy of romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura: a double-blind randomised controlled trial. *The Lancet*. 2008;371(9610):395–403. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60203-2.
- Shirasugi Y., Ando K., Miyazaki K., Tomiyama Y., Okamoto S., Kurokawa M., Kirito K., Yonemura Y., Mori S., Usuki K., Iwato K., Hashino S., Wei H., Lizambri R. Romiplostim for the treatment of chronic immune thrombocytopenia in adult Japanese patients: a double-blind, randomized Phase III clinical trial. *International Journal of Hematology*. 2011;94(1):71–80. DOI: 10.1007/s12185-011-0886-8.
- Schellekens H. Immunogenicity of therapeutic proteins: Clinical implications and future prospects. *Clinical Therapeutics*. 2002;24(11):1720–1740. DOI: 10.1016/s0149-2918(02)80075-3.
- Civoli F., Kroenke M.A., Reynhardt K., Zhuang Y., Kaliyaperumal A., Gupta S. Development and optimization of neutralizing antibody assays to monitor clinical immunogenicity. *Bioanalysis*. 2012;4(22):2725–2735. DOI: 10.4155/bio.12.239.
- Chalmers S., Tarantino M.D. Romiplostim as a treatment for immune thrombocytopenia: a review. *Journal of Blood Medicine*. 2015;6:37–44. DOI: 10.2147/JBM.S47240.
- Shankar G., Devanarayan V., Amaravadi L., Barrett Y.C., Bowsher R., Finco-Kent D., Fiscella M., Gorovits B., Kirschner S., Moxness M., Parish T., Quarmby V., Smith H., Smith W., Zuckerman L.A., Koren E. Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008;48(5):1267–1281. DOI: 10.1016/j.jpba.2008.09.020.
- Shen M., Dai T. Statistical methods of screening cut point determination in immunogenicity studies. *Bioanalysis*. 2021;13(7):551–563. DOI: 10.4155/bio-2019-0296.
- Arefeva A.N., Makarenko I.E., Saporova V.B., Karal-oglu D.D., Afanaseva A.N., Dorotenko A.R., Kalatanova A.V., Kurkin D.V., Khokhlov A.L., Drai R.V. Comparability of biosimilar romiplostim with originator: Protein characterization, animal pharmacodynamics and pharmacokinetics. *Biologicals*. 2023;81:101666. DOI: 10.1016/j.biologicals.2023.101666.
- Jawa V., Hokom M., Hu Z., El-Abaadi N., Zhuang Y., Berger D., Gupta S., Swanson S.J., Chirmule N. Assessment of immunogenicity of romiplostim in clinical studies with ITP subjects. *Annals of Hematology*. 2010;89(1):75–85. DOI: 10.1007/s00277-010-0908-2.
- Mytych D.T., Park J.K., Kim J., Barger T.E., Boshier A., Jawa V., Kuter D.J. Assessment of romiplostim immunogenicity in adult patients in clinical trials and in a global postmarketing registry. *British Journal of Haematology*. 2020;190(6):923–932. DOI: 10.1111/bjh.16658.
- Fang Q., Huang F., Liang J., Chen Y., Li C., Zhang M., Wu X., Luo W. Safety of romiplostim and eltrombopag for children with immune thrombocytopenia: a pharmacovigilance study of the FDA adverse event reporting system database. *Expert Opinion on Drug Safety*. 2023;22(8):707–714. DOI: 10.1080/14740338.2023.2182288.