



Оригинальная статья / Research article

Разработка и валидация методики на основе функционального клеточного теста для определения нейтрализующих антител к адалимумабу в сыворотке крови человека

М. А. Никифорова¹✉, И. А. Валуев¹, А. В. Петров^{2, 1}, Е. Е. Бекетов¹, И. Е. Шохин³

¹ Общество с ограниченной ответственностью «Мабскейл». 445043, Россия, Самарская область, г.о. Тольятти, территория ОЭЗ ППТ, шоссе № 4, здание 5А

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тольяттинский государственный университет». 445020, Россия, Самарская область, г. Тольятти, ул. Белорусская, д. 14

³ Общество с ограниченной ответственностью «Центр фармацевтической аналитики» (ООО «ЦФА»), 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8

✉ Контактное лицо: Никифорова Мария А. E-mail: m.nikiforova@mabscale.ru

ORCID: М. А. Никифорова – <https://orcid.org/0000-0001-5823-6508>; И. А. Валуев – <https://orcid.org/0009-0004-2577-5766>;

А. В. Петров – <https://orcid.org/0009-0009-6214-8119>; Е. Е. Бекетов – <https://orcid.org/0000-0002-2485-6482>;

И. Е. Шохин – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Статья поступила: 01.11.2023

Статья принята в печать: 20.02.2024

Статья опубликована: 20.02.2024

Резюме

Введение. Адалимумаб – рекомбинантное, полностью гуманизированное моноклональное антитело, которое связывается с высокой степенью родства и специфичностью с растворимой и мембранной формами фактора некроза опухоли (TNFα) и используется для лечения ряда аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит и другие наиболее распространенные воспалительные артропатии (анкилозирующий спондилит, псориатический артрит). Несмотря на доказанную эффективность лечения адалимумабом, у части пациентов с течением времени происходит снижение клинической эффективности и возникает риск нежелательных явлений. Одним из объяснений данного эффекта является образование антилекарственных антител (ADA) к препарату, в том числе и нейтрализующих антител (NAb). В настоящее время при разработке новых препаратов и препаратов-биоаналогов неотъемлемой частью клинических испытаний стала оценка и характеристика нейтрализующих антител.

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

Материалы и методы. Определение нейтрализующих антител к адалимумабу основано на использовании клеточной линии L-929, чувствительной к индукции апоптоза посредством TNFα; нейтрализующие антитела связываются с адалимумабом, блокируя его взаимодействие с TNFα, что приводит к TNFα-опосредованной цитотоксичности. Измерение цитотоксичности проводили с помощью резазурина, ароматического соединения, представляющего собой окислительно-восстановительный индикатор.

Результаты и обсуждение. Разработанная методика была валидирована по показателям: пределу исключения, селективности, чувствительности, прецизионности, специфичности и стабильности (краткосрочной и долгосрочной). Важной частью разработки методики определения нейтрализующих антител является подбор концентраций TNFα (4 нг/мл) и адалимумаба (250 нг/мл), а также определение минимального необходимого разведения образца: данный параметр составил 1:20. По итогам валидации был выбран «плавающий» предел исключения с поправочным коэффициентом (фактор нормализации) равным 0,86. Чувствительность разработанной методики составила 108,9 нг/мл нейтрализующих антител к адалимумабу.

Заключение. Полученные при валидации методики результаты позволяют применять методику определения нейтрализующих антител к адалимумабу в сыворотке крови человека в исследовании иммуногенности препаратов адалимумаба, в том числе при проведении клинических исследований биоэквивалентности.

Ключевые слова: адалимумаб, нейтрализующие антитела, антилекарственные антитела, иммуногенность, TNFα, клеточная линия L-929

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

Вклад авторов. М. А. Никифорова и И. А. Валуев участвовали в разработке и валидации методики. М. А. Никифорова, И. А. Валуев и Е. Е. Бекетов отвечали за написание текста статьи. А. В. Петров отвечал за общий дизайн исследования. И. Е. Шохин отвечал за рецензирование текста статьи. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Никифорова М. А., Валуев И. А., Петров А. В., Бекетов Е. Е., Шохин И. Е. Разработка и валидация методики на основе функционального клеточного теста для определения нейтрализующих антител к адалимумабу в сыворотке крови человека. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):208–215. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1632>

Development and Validation of the Cell-based Functional Method for Neutralizing Anti-adalimumab Antibodies Detection in Human Serum

Maria A. Nikiforova¹✉, Igor A. Valouev¹, Alexander V. Petrov^{2, 1}, Evgeny E. Beketov¹, Igor E. Shokhin³

¹ LLC "Mabscale". Samara region, city. 5A, highway No. 4, territory of SEZ PPT, Togliatti, 445043, Russia

² Togliatti State University. 14, Belorusskaya str., Tolyatti, Samara region, 445020, Russia

³ LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA"). 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117246, Russia

✉ Corresponding author: Maria A. Nikiforova. E-mail: m.nikiforova@mabscale.ru

© Никифорова М. А., Валуев И. А., Петров А. В., Бекетов Е. Е., Шохин И. Е., 2024

© Nikiforova M. A., Valouev I. A., Petrov A. V., Beketov E. E., Shokhin I. E., 2024

ORCID: Maria A. Nikiforova – <https://orcid.org/0000-0001-5823-6508>; Igor A. Valouev – <https://orcid.org/0009-0004-2577-5766>;
Alexander V. Petrov – <https://orcid.org/0009-0009-6214-8119>; Evgeny E. Beketov – <https://orcid.org/0000-0002-2485-6482>;
Igor E. Shokhin – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Received: 01.11.2023 Revised: 20.02.2024 Published: 20.02.2024

Abstract

Introduction. Adalimumab, a fully humanized monoclonal antibody, is a tumor necrosis factor (TNF α) inactivator that is used against a number of autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis and other most common inflammatory arthropathies (ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis). Despite the proven efficacy of adalimumab treatment, there is a risk of adverse events, tied up with the formation of anti-drug antibodies, including neutralizing antibodies. Currently, the evaluation and characterization of neutralizing antibodies has become an important part of clinical trials in the development of new drugs and biosimilars.

Aim. The aim of this study is to develop and validate the cell-based functional method for neutralizing anti-adalimumab antibodies determination in human serum.

Materials and methods. For determination of neutralizing anti-adalimumab antibodies, the cell line L-929 has been employed. L-929 is a cell line sensitive to the TNF α -mediated apoptosis; the neutralizing antibodies interact with adalimumab that leads to TNF α -mediated cytotoxicity. Cytotoxicity was measured using resazurin, an aromatic compound that is a redox indicator.

Results and discussion. The developed method was validated for cut point, selectivity, sensitivity, precision, specificity and stability (short- and long-term). An important part of a method development for determining neutralizing antibodies is the selection of concentrations of TNF α (4 ng/ml) and adalimumab (250 ng/ml), as well as determining the minimum required dilution – this parameter is established as 1:20. Cut point was chosen as a «floating» cut point, and a correction factor (normalization factor) was determined equal to 0,86. The sensitivity of the developed method was estimated at 108,9 ng/ml of neutralizing anti-adalimumab antibodies.

Conclusion. The obtained results can be applied for determining anti-adalimumab neutralizing antibodies in the assessment of the adalimumab immunogenicity, including clinical trials.

Keywords: adalimumab, neutralizing antibodies, anti-drug antibodies, immunogenicity, TNF α , L-929 cell line

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. Maria A. Nikiforova and Igor A. Valouev participated in the analytical method development and validation. Maria A. Nikiforova, Igor A. Valouev and Evgeny E. Beketov wrote the paper and are responsible for paper draft preparation. Alexander V. Petrov is responsible for the overall study design. Igor E. Shokhin was responsible for article text review. All authors participated in the discussion of the results and article review.

For citation: Nikiforova M. A., Valouev I. A., Petrov A. V., Beketov E. E., Shokhin I. E. Development and validation of the cell-based functional method for neutralizing anti-adalimumab antibodies detection in human serum. *Drug development & registration*. 2024;13(1):208–215. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1632>

ВВЕДЕНИЕ

Адалимуаб – рекомбинантное, полностью гуманизованное моноклональное антитело (IgG1), связывается с высокой степенью сродства с TNF α и блокирует его взаимодействие с поверхностными клеточными рецепторами TNF α p55 и p75. Адалимуаб был одобрен FDA еще в 2002 году для лечения ревматоидного артрита (РА) [1]. РА является системным хроническим воспалительным аутоиммунным заболеванием, которое приводит к прогрессирующему повреждению суставов и затрагивает около 1% европейской популяции [2, 3]. С течением заболевания у большинства пациентов развиваются характерные поражения мелких суставов рук и ног, возникает эрозия и деструкция суставных хрящей, костей. Адалимуаб доказал свою эффективность в лечении РА, особенно на ранних стадиях заболевания [4, 5].

В настоящее время адалимуаб также одобрен для лечения взрослых пациентов с хроническим бляшечным псориазом средней и тяжелой степени, ко-

торым показана системная терапия или фототерапия. Ряд исследований показывает высокую эффективность адалимуаба при лечении псориаза [6, 7].

Псориаз является распространенным хроническим неинфекционным заболеванием кожи, самой распространенной формой псориаза является бляшечный псориаз, и на его долю приходится более 80% случаев [8]. До сих пор однозначно не выяснены причины возникновения бляшечного псориаза, одной из основных версий считается наследственный фактор [9]. Тем не менее данное заболевание представляет собой серьезную глобальную проблему, поскольку по всему миру не менее 100 миллионов человек страдают от него [10].

Несмотря на эффективность лечения адалимуабом, у части пациентов с течением времени происходит снижение или даже потеря клинической эффективности (клинического ответа) и возникает риск нежелательных явлений [11]. Одним из объяснений данного эффекта является образование антилекарственных антител (ADA) к терапевтическим

антителам, что и приводит к потере эффективности лечения [12]. По данным разных исследований, для адалимумаба частота появления ADA колеблется от 10 до 60 % [13].

Причина, по которой полностью гуманизованное антитело адалимумаб проявляет иммуногенность, объясняется структурой гипервариабельных регионов – определяющих комплементарность регионов (CDR – complementary determining regions). Длина петли CDR-H3 у иммуногенных АТ немного короче по сравнению с неиммуногенными АТ, и таким образом данная структура способствует связыванию антиидиотипических антител (ADA) с АТ [14].

Образующиеся ADA могут обладать нейтрализующей активностью (нейтрализующие антилекарственные антитела – NAb), они блокируют антигенсвязывающую способность терапевтической молекулы. NAb имеют большую клиническую значимость, поскольку их образование может поставить под угрозу продолжение терапии. В настоящее время при разработке новых препаратов и препаратов-биоаналогов, в том числе и адалимумаба, неотъемлемой частью клинических испытаний стала оценка и характеристика NAb. Для биотехнологических препаратов, для которых показан высокий риск развития иммуногенности, оценку NAb рекомендуют проводить с использованием методик на основе клеточных тестов [15].

Целью данной работы была разработка и валидация методики определения нейтрализующих антител к адалимумабу в сыворотке крови человека на основе функционального клеточного теста для оценки иммуногенности препарата-биоаналога адалимумаба.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При разработке и валидации методики использовали оригинальный препарат Хумира® и его биоаналог:

- *исследуемый препарат*: адалимумаб; раствор для подкожного введения; 40 мг / 0,8 мл.
- *препарат сравнения*: Хумира®; раствор для подкожного введения; 40 мг / 0,8 мл.

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

Для приготовления калибровочных и контрольных (положительных) образцов использовали антиидиотипические, нейтрализующие моноклональные антитела к адалимумабу подкласса IgG1 (human anti-adalimumab antibodies), с концентрацией белка 0,5 мг/мл (Bio-Rad, США).

Реактивы

При проведении валидации методики определения антител к адалимумабу в сыворотке крови человека использовали следующие реактивы: антитела к

адалимумабу, обладающие нейтрализующей активностью (HCA204, Bio-Rad, США); среда RPMI-1640 (C363п, НПП «ПанЭко», Россия); фетальная телячья сыворотка (ФТС, SV3016003, HyClone, США); рекомбинантный TNF α человека (300-01A, PeproTech, США); актиномицин D (A9415, Sigma-Aldrich, США); ДМСО (D2650, Sigma-Aldrich, США) и натриевая соль резазурина (B21187, Thermo Fisher Scientific, США).

Оборудование

Для культивирования клеточной линии L-929 (ЦКП КККП, Институт цитологии РАН) и проведения анализа использовали: бокс микробиологической безопасности БМБ-II-«Ламинар-С»-1,5 (ЗАО «Ламинарные системы», Россия), микроскоп лабораторный инвертированный BI-200 (ООО «БиОптик», Россия) и CO₂-инкубатор MCO-170AC (PHCbi, Япония). Для определения флуоресценции в лунках планшета использовали спектрофотометр SpectraMax® M5 (Molecular Devices, США).

Методика определения нейтрализующих антител к адалимумабу в сыворотке крови человека

В основе методики лежит определение специфической активности терапевтического антитела адалимумаб, которая основана на оценке ингибирования проапоптотического влияния цитокина TNF α на клетки линии L-929 под действием адалимумаба. Клетки данной линии экспрессируют на поверхности рецепторов к TNF α [16], активация которых инициирует апоптотическую гибель клеток. Для обнаружения нейтрализующих АТ против адалимумаба необходим дополнительный этап, при котором образец сыворотки человека предварительно инкубируют с добавлением адалимумаба в фиксированной концентрации. Нейтрализующие антитела, конкурируя с TNF α за адалимумаб, способствуют проявлению TNF α -опосредованной цитотоксичности.

Культивирование клеток L-929 проводили в среде RPMI-1640 с добавлением 10 % ФТС в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С и содержании CO₂ 5 %. Для определения нейтрализующих антител в лунки 96-луночного планшета высевали клетки с плотностью 300 000 кл/мл за 18–24 часа до проведения анализа.

Образцы (контрольные/исследуемые) инкубировали в присутствии фиксированной концентрации адалимумаба (250 нг/мл) в течение 60–90 минут при 25 °С (500–600 rpm) с последующим добавлением раствора TNF α (4 нг/мл) и инкубацией в течение 60–90 минут при 25 °С (500–600 rpm) перед добавлением к подготовленным (добавляли актиномицин D) клеткам L-929 в 96-луночном планшете. Далее планшет инкубировали в течение 16–20 часов в CO₂-инкубаторе, для оценки цитотоксичности в лунки план-

шета добавляли раствор резазурина (0,15 мкг/мл). Параметры детекции флуоресценции: возбуждение при длине волны 545 нм, детекция при длине волны 600 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

На первом этапе разработки методики осуществляли подбор концентрации TNF α , которая приводит к гибели 90–95 % клеток. Далее проводили эксперимент с серийными разведениями адалимумаба в присутствии фиксированной концентрации TNF α , добавляя к TNF α -чувствительным клеткам L-929, и выбирали такую концентрацию, при которой будет наблюдаться клеточный ответ ≥ 50 % (ED₅₀). Важно использовать самую низкую концентрацию адалимумаба, которая не будет приводить к сильному клеточному ответу и будет обеспечивать адекватную чувствительность методики. По итогам экспериментов были выбраны следующие концентрации: для TNF α – 4 нг/мл, адалимумаба – 250 нг/мл.

Следующим этапом была оценка влияния матрицы (сыворотки) и соответственно определение минимального допустимого разведения (MRD, minimum required dilution) образца. Данный параметр должен быть подобран таким образом, чтобы сыворотка не влияла на клеточную линию и на результаты анализа. Для этого готовили положительные контроли в индивидуальных интактных образцах сыворотки человека, которые последовательно разводили в среде RPMI-1640. По результатам разработки в дальнейшей работе использовали 5%-й раствор сыворотки человека в среде RPMI-1640, следовательно, MRD составило 1:20.

Валидация методики

Валидацию методики определения нейтрализующих антител к адалимумабу проводили руководствуясь рекомендациями Guidance for Industry: Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products – Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection (FDA)¹; Immunogenicity Assays – Design and Validation of Immunoassays to Detect Anti-Drug Antibodies (USP)² и Правилами проведения исследований биологических лекарственных

средств Евразийского экономического союза^{3,4} по параметрам: пределу исключения, селективности, чувствительности, прецизионности, специфичности и стабильности.

Предел исключения (cut point)

Для определения предела исключения было исследовано 64 индивидуальных интактных образца сыворотки крови человека, которые были проанализированы двумя аналитиками, в 6 независимых аналитических циклах. В каждом аналитическом цикле анализировали 16 образцов в трех повторах. Расчет предела исключения проводили путем нормализации данных (пересчет на % жизнеспособных клеток) из относительных единиц флуоресценции (RFU – relative fluorescence units), формула приведена ниже:

$$V = \frac{S - \text{TNF}}{\text{NC} - \text{TNF}} \cdot 100,$$

где V – жизнеспособность клеток, %; S – RFU образца; TNF – RFU контроля TNF α (минимальное значение RFU, в лунках только TNF α); NC – RFU отрицательного контроля NC (максимальное значение RFU, в лунках 5%-й раствор сыворотки человека в RPMI-1640).

Для выбора типа предела исключения (фиксированный, плавающий или динамический) провели дисперсионный анализ средних (ANOVA) и оценку однородности дисперсий (тест Брауна – Форсайта) для всех аналитических циклов, проведенных каждым аналитиком, и для всех аналитических циклов суммарно. Результаты представлены в таблице 1.

Для оценки однородности средних значений и дисперсий между аналитиками применяли t-критерий (критерий Стьюдента) и F-критерий соответственно. Результаты анализа данных представлены в таблице 2.

Статистическая обработка показала однородность дисперсий между аналитиками и отсутствие однородности средних значений. Результат проведенного анализа, показывающий неоднородность средних значений и однородность дисперсий между аналитическими циклами и аналитиками, позволяет выбрать «плавающий» тип предела исключения с поправочным коэффициентом – фактором нормализации, значение которого составило 0,86. Поправоч-

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/media/119788/download>. Accessed: 01.11.2023.

² Pharmacopeia US. United States Pharmacopeia. General Chapter, <1106> Immunogenicity assays—design and validation of immunoassays to detect anti-drug antibodies. Rockville, MD: United States Pharmacopeia 2022. Available at: https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M99825_02_01.html. Accessed: 01.11.2023.

³ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза». Доступно по: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411954/cncd_21112016_89. Ссылка активна на 01.11.2023.

⁴ 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 01.11.2023.

ный коэффициент определяли как 1 процентиль усредненных по всем 6 циклам нормализованных значений (% жизнеспособных клеток). При дальнейшем проведении анализа для каждого аналитического цикла предел исключения определяли по формуле:

$$CUTOFF = CPF \cdot \overline{RFU}_{NC},$$

где *CUTOFF* – плавающий предел исключения для данного аналитического цикла; \overline{RFU}_{NC} – среднее значение RFU отрицательного контроля NC в аналитическом цикле; *CPF* – фактор нормализации.

Таблица 1. Оценка данных на однородность средних и дисперсий значений нормализованных данных между аналитическими циклами

Table 1. Data for means and variances homogeneity for normalized data values between analytical runs

Параметр Parameter	Аналитик 1 Analyst 1			Аналитик 2 Analyst 2		
	Цикл 1 Run 1	Цикл 2 Run 2	Цикл 3 Run 3	Цикл 1 Run 1	Цикл 2 Run 2	Цикл 3 Run 3
Дисперсионный анализ (ANOVA) Analysis of variance (ANOVA)						
F	6,274			8,643		
P-value	0,0023			0,0003		
Различия значимы (<i>P</i> < 0,05) Differences are significant (<i>P</i> < 0,05)	Да Yes			Да Yes		
F	24,37					
P-value	<0,0001					
Различия значимы (<i>P</i> < 0,05) Differences are significant (<i>P</i> < 0,05)	Да Yes					
Статистика критерия Брауна – Форсайта Brown – Forsythe test statistics						
F	0,6588			0,1017		
P-value (значимость) P-value (significance)	0,5186			0,9034		
Различия значимы (<i>P</i> < 0,05) Differences are significant (<i>P</i> < 0,05)	Нет No			Нет No		
F	0,4834					
P-value (значимость) P-value (significance)	0,7887					
Различия значимы (<i>P</i> < 0,05) Differences are significant (<i>P</i> < 0,05)	Нет No					

Образцы, у которых значения RFU ниже рассчитанного предела исключения, классифицируются как «положительные».

Чувствительность методики

Для определения чувствительности использовали калибровочные стандарты четырех уровней концентраций антител к адалимумабу: 200, 150, 125, 80 нг/мл. Анализ образцов проводили два аналитика в 12 аналитических циклах. Каждый цикл включал в себя три серии разведений, образцы положительных

и отрицательного контролей. Чувствительность рассчитывали путем определения точки пересечения значения предела исключения для каждого аналитического цикла с кривой линейной регрессии зависимости RFU от логарифма концентрации антител. Среднее значение чувствительности получали усреднением по всем 12 аналитическим циклам. Полученные результаты представлены в таблице 3.

Таблица 2. Оценка однородности средних и дисперсий значений нормализованных данных между аналитиками

Table 2. Data for means and variances homogeneity for normalized data values between analysts

Параметр Parameter	Оценка однородности средних Estimation of means homogeneity	Оценка однородности дисперсий Estimation of variances homogeneity
P-value (значимость) P-value (significance)	<0,0001	0,4446
Различия значимы (<i>P</i> < 0,05) Differences are significant (<i>P</i> < 0,05)	Да Yes	Нет No

Верхними граничными значениями чувствительности для методик определения нейтрализующих антител рекомендуется считать 0,5–2 мкг/мл¹. Полученное значение чувствительности соответствует данному критерию. Для дальнейшей валидации были выбраны следующие концентрации контролей: НРС – 300 нг/мл, МРС – 200 нг/мл, LPC – 150 нг/мл.

Селективность

Селективность методики представляет собой способность методики определять нейтрализующие антитела к адалимумабу в сыворотке крови в присутствии неродственных соединений (компонентов матрицы, сыворотки) как сигнал, находящийся ниже предела исключения. Селективность исследовали на 14 индивидуальных (включая гемолизованные) образцах интактной сыворотки крови человека с добавлением контрольных антител к адалимумабу на уровне LPC, МРС и НРС. Для каждого образца оценивали уровень сигнала относительно предела исключения.

Согласно полученным данным, значения относительных единиц флуоресценции для более 80 % образцов, содержащих нейтрализующие антитела к адалимумабу на уровне концентраций НРС, МРС и LPC, находятся ниже предела исключения. Для НРС и МРС 100 % образцов (14/14) имели отклик ниже предела исключения, а для LPC – 92,9 % (13/14).

¹ Pharmacopeia US. United States Pharmacopeia. General Chapter. <1106> Immunogenicity assays—design and validation of immunoassays to detect anti-drug antibodies. Rockville, MD: United States Pharmacopeia; 2022. Available at: https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M99825_02_01.html. Accessed: 01.11.2023.

Таблица 3. Оценка чувствительности методики

Table 3. Sensitivity calculations

Калибровочные стандарты, нг/мл Calibration Standards, ng/ml	Циклы, RFU Run No, RFU											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
200	12350	14086	11837	14978	14048	12314	5975	5042	5196	6642	6973	5584
150	13919	16071	13965	16263	14676	14181	8926	6600	8073	8817	8257	7592
125	14211	16828	14659	16258	15195	14158	9660	8381	7807	9147	9391	8891
80	14960	18115	15543	17637	15823	14271	11388	9345	9176	10951	9461	9331
NC	16378	18378	15609	19688	17627	16687	13286	11797	12288	10820	10878	9938
Предел исключения Exclusion limit	14085	15805	13424	16932	15159	14351	11426	10145	10568	9305	9355	8547
Чувствительность в каждом цикле, нг/мл Sensitivity in each cycle, ng/ml	128,26	152,76	157,40	108,19	123,87	99,71	84,10	63,79	43,55	126,88	100,71	117,18
Среднее значение чувствительности, нг/мл Average sensitivity value, ng/ml									108,87			

Прецизионность

Функциональные клеточные тесты определения нейтрализующей активности отличаются сложностью используемых тест-систем (клеточные культуры), различиями в методологии, наличием большого количества этапов в ходе постановки методики, полуквантитативным представлением данных, в связи с этим отсутствуют обобщенные критерии приемлемости для оценки прецизионности, пригодные для всех клеточных тестов¹.

Соответственно для оценки прецизионности² рекомендуется использовать подход, основанный на оценке минимально значимого отношения (MSR, minimum significant ratio). Минимально значимое отношение представляет собой наименьшую разницу между значениями титра, которая является статистически значимой ($P < 0,05$). Критерий приемлемости для оценки прецизионности в этом случае формулируется таким образом: наибольшая разница между титрами внутри цикла и между циклами не должна превышать MSR.

Для расчета MSR использовали значения RFU калибровочных стандартов с концентрацией антител к адалимумабу 300, 200, 150 и 125 нг/мл. Проводили 12 аналитических циклов согласно методике в течение нескольких дней. Образцы наносили в трех повторах. Рассчитывали значения RFU для стандартов 300, 200 и 150 нг/мл, нормированные на значения RFU для стандарта 125 нг/мл (титры). Получен-

¹ Pharmacopeia US. United States Pharmacopeia. General Chapter. <1106> Immunogenicity assays—design and validation of immunoassays to detect anti-drug antibodies. Rockville, MD: United States Pharmacopeia; 2022. Available at: https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M99825_02_01.html. Accessed: 01.11.2023.

² Там же.

ные титры переводили в логарифмическую шкалу (log 10) и рассчитывали стандартные отклонения для каждого цикла и между циклами. MSR рассчитывали по следующей формуле:

$$MSR = 10^{t \cdot \sqrt{2SD}}$$

где MSR – минимально значимое отношение; t – критическое значение распределения Стьюдента, соответствующее 5 % уровню значимости. Для числа степеней свободы 11 (количество циклов минус 1); SD – сумма стандартных отклонений для значений внутри цикла и между циклами в логарифмической шкале.

Полученные результаты для прецизионности приведены в таблице 4.

Таблица 4. Прецизионность внутри цикла и между циклами

Table 4. Intra- and inter-day precision

Калибровочные стандарты, нг/мл Calibration Standards, ng/ml	Наибольшая разность между титрами внутри цикла (прецизионность внутри цикла) Largest difference between titers within a run (intra-run precision)	Наибольшая разность между средними титрами для каждого цикла (прецизионность между циклами) Largest difference between average titers for each cycle (precision between cycles)	Критерий приемлемости (\leq MSR) Acceptance criteria (\leq MSR)
300	0,86	3,36	$\leq 4,14$
200	0,38	2,18	$\leq 3,15$
150	0,35	0,30	$\leq 1,77$

Согласно полученным данным, наибольшая разность между титрами нигде не превысила MSR, что соответствует критерию приемлемости [15, 17].

Специфичность

Специфичность характеризует способность биоаналитической методики однозначно определять анализируемое вещество в присутствии родственных соединений (эндогенных или экзогенных) в биологическом образце (отсутствие перекрестного связывания). Методика основана на связывании адалимумаба с нейтрализующими антителами, специфичными к данному терапевтическому белку. Для исследования возможности перекрестного связывания были выбраны антитела человека к бевацизумабу и деносумабу. Специфичность метода исследовали с использованием образцов НРС и LPC и добавлением антител к бевацизумабу или деносумабу на уровне НРС. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5. Результаты исследования специфичности методики

Table 5. Method specificity

Образец, № Sample, №	Состав образца Sample composition	RE (abs),%
1	НРС + антибевацизумаб HPC + anti-bevacizumab	0,81
2	НРС + антиденосумаб HPC + anti-denosumab	14,07
3	LPC + антибевацизумаб LPC + anti-bevacizumab	10,01
4	LPC + антиденосумаб LPC + anti-denosumab	8,29
Критерии приемлемости Eligibility Criteria		≤25 %

Согласно полученным данным, абсолютная величина относительной погрешности значений относительных единиц флуоресценции, содержащих структурно родственные молекулы, не превышает 25 % от RFU контрольных образцов.

Стабильность

При исследовании стабильности нейтрализующих антител к адалимумабу в образцах была установлена краткосрочная стабильность при комнатной температуре исходных образцов, стабильность до пяти циклов замораживания – размораживания и долгосрочная стабильность в течение 101 суток при температуре –80 и –36 °С. Для изучения стабильности использовали образцы с концентрацией на уровне LPC, MPC и НРС.

Для изучения долгосрочной стабильности в условиях естественного хранения образцы хранили при –80 и –36 °С и затем для каждого образца определяли относительную погрешность (RE, %) RFU от контрольных свежеприготовленных образцов. Для оценки стабильности при замораживании – размораживании образцы размораживали и выдерживали 1 час при комнатной температуре, затем подвергали повторным замораживаниям при –80 °С, между циклами замораживания – размораживания проходило не

менее 12 часов. Для изучения краткосрочной стабильности исходные образцы выдерживали при комнатной температуре не менее 6 часов. Каждый образец анализировали в трех повторах. Полученные результаты представлены в таблице 6.

Таблица 6. Результаты исследования стабильности в образцах сыворотки крови человека

Table 6. Results of stability study in samples human serum

Стабильность при замораживании – размораживании Sample freeze-thaw stability (F/T), RE (abs), %			
Образец Sample	1	3	5
HPC_F/T	24,79	7,96	11,74
MPC_F/T	10,36	7,07	3,09
LPC_F/T	3,60	2,23	7,65
Краткосрочная («настоянная») стабильность Sample bench-top stability (BTS)			
Образец Sample	RE (abs), %		
HPC_BTS	12,40		
MPC_BTS	4,36		
LPC_BTS	7,74		
Долгосрочная стабильность Sample long-term stability (LTS), RE (abs), %			
Образец Sample	–36 °С		–80 °С
HPC_LTS	9,43		20,74
MPC_LTS	9,81		7,84
LPC_LTS	10,81		9,28
Критерии приемлемости Eligibility Criteria		≤25 %	

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Была разработана и валидирована методика определения нейтрализующих антител к адалимумабу в сыворотке крови человека на основе функционального клеточного теста. Определение проводили с использованием TNFα-чувствительной клеточной линии L-929; нейтрализующие антитела связываются с адалимумабом, блокируя его взаимодействие с TNFα, что приводит к TNFα-опосредованной цитотоксичности. Цитотоксичность оценивали с помощью резазурина. Чувствительность методики составила 108,9 нг/мл нейтрализующих антител к адалимумабу. Предел определения был выбран «плавающим» с поправочным коэффициентом (фактор нормализации) равным 0,86. Таким образом, доказана возможность использования методики для определения нейтрализующих антител к адалимумабу в сыворотке крови человека в том числе, в исследовании иммуногенности при проведении клинических исследований и исследований биоэквивалентности.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Lu R.-M., Hwang Y.-C., Liu I.-J., Lee C.-C., Tsai H.-Z., Li H.-J., Wu H.-C. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Journal of biomedical science*. 2020;27(1):1. DOI: 10.1186/s12929-019-0592-z.

2. Tobón G. J., Youinou P., Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *Journal of autoimmunity*. 2010;35(1):10–14. DOI: 10.1016/j.jaut.2009.12.009.
3. Zen M., Salmaso L., Barbiellini Amidei C., Giollo A., Fedeli U., Bellio S., Arru F., Gennaio I., Saia M., Doria A. AB1628 the incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in Italy in the last decade. *Annals of the rheumatic diseases*. 2023;82(1):2048–2048. DOI: 10.1136/annrheumdis-2023-eular.1432.
4. Kukar M., Petryna O., Eftimiou P. Biological targets in the treatment of rheumatoid arthritis: a comprehensive review of current and in-development biological disease modifying anti-rheumatic drugs. *Biologics: targets & therapy*. 2009;3:443–457.
5. Rein P., Mueller R. B. Treatment with Biologicals in Rheumatoid Arthritis: An Overview. *Rheumatology and therapy*. 2017;4:247–261. DOI: 10.1007/s40744-017-0073-3.
6. Leonardi C., Langley R. G., Papp K., Tying S. K., Wasel N., Vender R., Unnebrink K., Gupta S. R., Valdecantos W. C., Bagel J. Adalimumab for treatment of moderate to severe chronic plaque psoriasis of the hands and feet: efficacy and safety results from REACH, a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Archives of dermatology*. 2011;147(4):429–436. DOI: 10.1001/archdermatol.2010.384.
7. Sator P. Safety and tolerability of adalimumab for the treatment of psoriasis: a review summarizing 15 years of real-life experience. *Therapeutic advances in chronic disease*. 2018;9(8):147–158. DOI: 10.1177/2040622318772705.
8. Mantovani L., Medaglia M., Piacentini P., Tricca M., Vena G. A., Voza A., Castellino G., Rocca A. Burden of Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis and New Therapeutic Approaches (Secukinumab): An Italian Perspective. *Dermatology and therapy*. 2016;6:151–167. DOI: 10.1007/s13555-016-0114-9.
9. Badri T., Kumar P., Oakley A.M. Plaque Psoriasis. *StatPearls*. 2022. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430879/> Accessed: 01.11.2023.
10. Bu J., Ding R., Zhou L., Chen X., Shen E. Epidemiology of Psoriasis and Comorbid Diseases: A Narrative Review. *Frontiers in immunology*. 2022;13:880201. DOI: 10.3389/fimmu.2022.880201.
11. Mansouri Y., Goldenberg G. Biologic safety in psoriasis: review of long-term safety data. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*. 2015;8(2):30–42.
12. Doevendans E., Schellekens H. Immunogenicity of Innovative and Biosimilar Monoclonal Antibodies. *Antibodies*. 2019;8(1). DOI: 10.3390/antib8010021.
13. Gehin J. E., Goll G. L., Brun M. K., Jani M., Bolstad N., Syversen S. W. Assessing Immunogenicity of Biologic Drugs in Inflammatory Joint Diseases: Progress Towards Personalized Medicine. *BioDrugs*. 2022;36(6):731–748. DOI: 10.1007/s40259-022-00559-1.
14. Liang S., Zhang C. Prediction of immunogenicity for humanized and full human therapeutic antibodies. *PLOS ONE*. 2020;15(8):e0238150. DOI: 10.1371/journal.pone.0238150.
15. Myler H., Pedras-Vasconcelos J., Lester T., Civoli F., Xu W., Wu B., Vainshtein I., Luo L., Hassanein M., Liu S., Ramaswamy S. S., Mora J., Pennucci J., McCush F., Lavelle A., Jani D., Ambakhutwala A., Baltrukonis D., Barker B., Carmean R., Chung S., Dai S., DeWall S., Dholakiya S. L., Dodge R., Finco D., Yan H., Hays A., Hu Z., Inzano C., Kamen L., Lai C. H., Meyer E., Nelson R., Paudel A., Phillips K., Poupart M. E., Qu Q., Abhari M.R., Ryding J., Sheldon C., Spriggs F., Warrino D., Wu Y., Yang L., Pasas-Farmer S. Neutralizing Antibody Validation Testing and Reporting Harmonization. *The AAPS Journal*. 2023;25:69. DOI: 10.1208/s12248-023-00830-5.
16. Flick D. A., Gifford G. E. Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *Journal of immunological methods*. 1984;68(1–2):167–175. DOI: 10.1016/0022-1759(84)90147-9.
17. Jani D., Marsden R., Gunsior M., Hay L. S., Ward B., Cowan K. J., Azadeh M., Barker B., Cao L., Closson K. R., Coble K., Dholakiya S. L., Dusseault J., Hays A., Herl C., Hodsdon M. E., Irvin S. C., Kirshner S., Kolaitis G., Kulagina N., Kumar S., Lai C. H., Lipari F., Liu S., Merdek K. D., Moldovan I. R., Mozaffari R., Pan L., Place C., Snoeck V., Manning M. S., Stocker D., Tary-Lehmann M., Turner A., Vainshtein I., Verthelyi D., Williams W. T., Yan H., Yan W., Yang L., Yang L., Zemo J., Zhong Z. D. Anti-drug Antibody Sample Testing and Reporting Harmonization. *The AAPS Journal*. 2022;24:113. DOI: 10.1208/s12248-022-00762-6.