

В. В. Писарев\*, А. В. Иванов

## ВАЛИДАЦИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ТВЕРДОФАЗНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОЦЕНКИ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ЭТАНЕРЦЕПТА У ПАЦИЕНТОВ

ООО “Научно-производственный центр Пробиотек”, Россия, 119992, Москва, Ленинские Горы, д. 1, стр. 75В.

\* e-mail: vladimir.pisarev@probiotech.ru

Для оценки персонализированной фармакокинетики конкурентного ингибитора связывания фактора некроза опухоли (ФНО) этанерцепта с клеточными поверхностными рецепторами была разработана тест-система на основе твердофазного ИФА для количественного определения этанерцепта в биологических жидкостях пациентов. Целью настоящего исследования стала валидация данной тест-системы. В результате определены следующие характеристики представленной тест-системы: четырехпараметрическая калибровочная зависимость от 8 калибраторов концентрацией 0,04 – 10,0 мкг/мл, нижний предел определения 0,04 мкг/мл, прецизионность между сериями 12,5%, внутри серии 10,3%, правильность между сериями 96,7 – 101,6%, внутри серии 96,0 – 102,9%, краткосрочная стабильность – 6 ч при комнатной температуре, долгосрочная стабильность – 109 дней при –20°C, стабильность при трех циклах замораживания–оттаивания. Полученные характеристики позволяют применять тест-систему для анализа уровня этанерцепта в биологических жидкостях, так как она отвечает международным стандартам по валидации биоаналитических методов.

**Ключевые слова:** этанерцепт; ИФА; валидация; фармакокинетика.

В настоящее время все большее распространение имеют аутоиммунные заболевания, обусловленные избытком цитокина фактора некроза опухоли (ФНО, Tumor necrosis factor, TNF) [1]. К данной группе нозологий относятся ревматоидный артрит (РА) [2], анкилозирующий спондилоартрит или болезнь Бехтерева [3], псориаз [4] и ряд схожих аутоиммунных патологий. Разработка терапевтического лечения данных аутоиммунных заболеваний представляет одну из наиболее сложных задач современной медицинской науки. Результатом развития знаний о природе аутоиммунных заболеваний стало появление обширного класса болезнь-модифицирующих антиревматических препаратов (БМАРП) [5]. Однако с помощью БМАРП первого поколения, таких как метотрексат, часто не удавалось достичь или поддерживать адекватный ответ организма, а лечение часто вынужденно прерывалось из-за побочных эффектов и токсичности [6].

Прогресс в понимании патофизиологии аутоиммунных заболеваний, в первую очередь РА, привел к разработке биологических БМАРП, которые избирательно нацелены на провоспалительные цитокины, такие как ФНО. Особенностью ФНО является выполнение в организме как провоспалительных, так и иммунорегуляторных функций. Причиной данного дуализма является конкурентное взаимодействие лиганда с двумя рецепторами, TNFR I и II, которые активируют различные сигнальные пути. Нарушение регуляции продукции ФНО при РА опосредует синовиальную пролиферацию и продуцирует другие провоспалительные цитокины, простагландины и металлопротеиназы [7]. Результатом исследований данного направления иммунологии и фармакологии стало появление в 1998 году этанерцепта (препарат под торговой маркой

Энбрел®), первого специфического антицитокинового препарата для лечения РА. Уникальные фармакологические свойства этанерцепта, такие как димерная структура и сочетание продуктов гена *TNF* и Fc-фрагмента человеческого IgG, позволили добиться значительного прогресса в терапии РА и ряда других аутоиммунных патологий по сравнению с другими БМАРП при значительно большем уровне безопасности для пациента [8].

Основными фармакокинетическими характеристиками этанерцепта являются абсолютная биодоступность в пределах 76 %, достижение максимальной концентрации в крови через 48 ч после однократной подкожной инъекции и достаточно медленное выведение из организма [9]. После однократного подкожного введения 25 мг препарата средняя максимальная концентрация этанерцепта в плазме крови была  $1,65 \pm 0,66$  мкг/мл, площадь под кривой “концентрация–время” (*AUC*) –  $235 \pm 96,6$  мкг · ч/мл. Период полувыведения ( $T_{1/2}$ ) составляет около 70 ч. У пациентов с РА клиренс равен приблизительно 0,066 л/ч, что несколько ниже его значения 0,11 л/ч у здоровых добровольцев [9]. Фармакокинетические характеристики этанерцепта у пациентов с РА, анкилозирующим спондилоартритом и псориазом сходны. Для успешного клинического применения этанерцепта необходимо четко представлять индивидуальные показатели динамики концентрации препарата в крови, так как она сильно зависит от множества параметров, включая экспрессию ряда генов, например, *TNF* и рецепторов ФНО. Одним из наиболее практичных способов количественной оценки уровня этанерцепта в крови пациента является применение метода иммуноферментного анализа (ИФА, enzyme-linked immunosorbent assay,

ELISA). Метод ИФА был успешно применен за рубежом для оценки фармакодинамики этанерцепта как у здоровых доноров [10], так и у пациентов с различными нозологиями [11, 12]. По сравнению с другими методами, например, иммунохемилюминисценцией и масс-спектрометрией, ИФА обладает неоспоримыми преимуществами: невысокой стоимостью относительно зарубежных аналогов, возможностью быстро наладить массовое производство, оптимизированными под конкретную задачу техническими характеристиками, возможностью применения в практически любой клинико-диагностической лаборатории без специальной подготовки персонала и дорогостоящего оборудования. Несмотря на наличие западных разработок [13], в настоящее время стоит актуальная задача создания отечественной тест-системы на основе ИФА для определения концентраций этанерцепта. Данная задача успешно выполнена в ООО «Научно-производственный центр Пробиотек», в результате представлена тест-система на основе твердофазного «сэндвич»-ИФА. Ранее подобный подход был успешно реализован в аналогичных тест-системах для определения ритуксимаба [14] и трастузумаба [15].

Целью настоящего исследования являлся всесторонний анализ пригодности представленной тест-системы для клинического использования (валидация) и оценка ее характеристик соответствию международным стандартам [16].

### *Экспериментальная часть*

Представленная тест-система выполнена по классической для коммерческого набора для ИФА схеме. Она включает полистероловый 96-луночный планшет с сенсibilизированными идиотипическими моноклональными антителами к этанерцепту, флакон с калибровочным раствором этанерцепта концентрацией 500 мкг/мл объемом 2 мл, пробирку с 20× раствором вторичного конъюгата козжих поликлональных антител против Fc-фрагмента IgG человека с пероксидазой хрена (A0170, Sigma-Aldrich, США) объемом 0,7 мл, флакон с 20× концентратом промывочного раствора (фосфатно-солевой буферный раствор с добавлением Твин-20 (Oleon N C, Бельгия), pH 7,0 ± 0,5) объемом 15 мл, флакон с раствором субстрата на основе 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) с добавлением перекиси водорода, готовый для использования, объемом 14 мл, флакон со стоп-реагентом (1 М серная кислота) объемом 15 мл, пленку для заклеивания планшета, техническую документацию.

Выполнение анализа проводилось в следующей последовательности: в каждую лунку планшета добавляли по 100 мкл калибраторов или образцов для контроля качества, разбавленных в 400 раз буфером для разбавления (ФСБ с добавлением 0,1 % бычьего сывороточного альбумина и 0,1 % Твин 20), планшет заклеивали адгезивной пленкой и инкубировали 1 ч при комнатной температуре на шейкере 250 об/мин, после чего промывали 3 раза по 250 мкл промывочного буфера для каждой лунки, вносили по 100 мкл предварительно разбавленного конъюгата, заклеивали, инкубировали 30 мин при 250 об/мин, промывали ана-

логично первому разу, добавляли 100 мкл раствора ТМБ, заклеивали, инкубировали 30 мин в темноте, добавляли 100 мкл стоп-раствора, интенсивно встряхивали и проводили измерение оптической плотности.

Валидацию проводили с использованием микропланшетного фотометра Multyscan FC (Dynex Technologies Inc., США) при длине волны 450 нм. Построение графиков для расчета концентрации этанерцепта в зависимости от оптической плотности калибраторов и вычисление регрессионной модели выполняли с помощью пакета анализа OriginPro (Origin Labs, США). Статистическую обработку результатов, вычисление правильности и прецизионности осуществляли с применением Excel 2010 (Microsoft, США).

Использованные для приготовления образцов для контроля качества и бланковых сывороток образцы крови людей были получены от ГКУЗ Тверской области «Станция переливания крови» Министерства здравоохранения Тверской области. Все измерения с применением биоматериалов человека проводились в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации 1975 года. Данное исследование было проведено в соответствии с Протоколом клинического исследования № СТ-210222-RAPSK (Версия: 2.0 от 27.06.2022), РКИ № 464 от 28 июля 2022 г.

Все доноры заполнили и подписали информированное согласие на участие в данном исследовательском проекте и на публикацию результатов.

В качестве образца этанерцепта использовался препарат Энбрел, лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения 25 мг/мл, производства Пфайзер МФГ, Бельгия.

### *Результаты и их обсуждение*

Линейность метода оценивали по анализу 8 калибровочных стандартов, из которых 7 ненулевых, в бланковой человеческой сыворотке с использованием алгоритма подбора ответа на основе четырехпараметрической логистической регрессии зависимости оптической плотности (optical density, OD) от концентрации этанерцепта. Концентрация стандартов-калибраторов составила 0, 0,04, 0,08, 0,4, 2, 5, 8 и 10 мкг/мл.

Логическая регрессия по 4 параметрам составила

$$y = 2,62975 + (0,07751 - 2,62975)/(1 + (x/5,41417)^{0,88737}),$$

где  $y$  – оптическая плотность в условных единицах,  $x$  – концентрация этанерцепта, мкг/мл.

Выявленный средний коэффициент корреляции по 8 стандартным кривым составил  $r = 0,99985$ . Типичная кривая с усреднением по 8 измерениям представлена на рисунке. При обратном расчете концентраций калибровочных стандартов отклонения от теоретических значений находились в пределах допустимых 20 % от их номинальной концентрации и составили от  $2,79 \pm 1,56$  % до  $7,92 \pm 3,25$  %. Регрессионная модель представляет собой логарифмическую функцию

$$y = 0,7473 \ln(x) - 0,0023$$

при величине достоверной аппроксимации  $R^2 = 0,9703$ .

Для дальнейших валидационных экспериментов были приготовлены 5 образцов для контроля качества путем разбавления базового сток-раствора этанерцепта концентрацией 50 мг/мл до концентраций 0,04, 0,1, 4, 7,5 и 10 мкг/мл.

Для проверки селективности методики были проанализированы в трех повторах 10 разных образцов бланковой плазмы, включая гемолизованные и гиперлипидемические образцы, с добавлением этанерцепта до уровня концентрации 0,04 мкг/мл. В результате максимальное среднее отклонение рассчитанной концентрации образца контроля качества от теоретической величины составило 9,2 %, что не превысило допустимые 25 %. Для каждого исследованного образца матрицы среднее значение отклонения концентраций от теоретической величины находилось в диапазоне 75 – 125 % от теоретического значения.

Нижний предел количественного определения тест-системы был определен как 0,040 мкг/мл. Данное значение характеризуется значениями OD, превышающими OD нулевого стандарта более чем в 5 раз, поддается определению и было дискретным и воспроизводимым с прецизионностью 10,3 %, не превышающей 25 %, и правильностью 90,7 %, входящей в диапазон 75 – 125 %.

Прецизионность и правильность методики внутри одной аналитической серии оценивали по результатам параллельных анализов всех 5 образцов контроля качества в составе одной аналитической серии, каждого в трех повторах. Всего было проанализировано 9 серий, результаты представлены в табл. 1.

Прецизионность и правильность метода между аналитическими сериями также оценивали по результатам параллельных анализов 5 образцов контроля качества, выполненных в 9 аналитических сериях в трех повторах для каждого исследуемого образца. Усредненные результаты представлены в табл. 1.

Стабильность тест-системы определяли в серии экспериментов по краткосрочной стабильности, включавшие хранение компонентов при комнатной температуре в течении 6 ч, 3 цикла замораживания–оттаивания при температуре -20 °С и долгосрочной

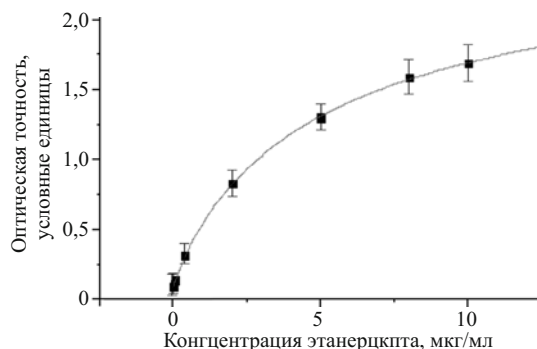


График зависимости оптической плотности (OD) от концентрации этанерцепта в калибровочных стандартах.

стабильности при -20 °С в течение 109 дней. Исследовали по 2 образца для контроля качества концентрациями 0,1 и 7,5 мкг/мл. Результаты представлены в табл. 2.

Тест на линейность разбавления включал 3 серии экспериментов с разбавлением образца для контроля качества в 200, 400 и 800 раз. Применяли бланковую сыворотку пациента. При этом в результате измерений коэффициент вариации не превышал 19,5 %, а правильность (% отклонения от теоретического значения) находилась в пределах 85,0 – 118,5 %, что укладывается в диапазон 75 – 125 % и полностью соответствует критериям валидации.

Выявленные параметры испытуемой тест-системы на основе ИФА практически полностью совпали с параметрами зарубежных разработок, ранее успешно использованных для оценки фармакодинамики этанерцепта [10 – 12]. Так, прецизионность для образцов контроля качества не превышает 7 % в работе [11] и составляет усредненно 6,76 % в настоящем исследовании. Параметры селективности и стабильности также полностью сопоставимы.

Подтвержденные характеристики представленной тест-системы позволяют использовать ее для персонализированной оценки фармакокинетики этанерцепта, что особенно важно для лечения РА, анкилозирующего спондилоартрита, псориаза и других аутоиммунных заболеваний.

Таблица 1

Результаты определения прецизионности и правильности методики внутри одной и между аналитическими сериями

Аналитические характеристики		Образцы для контроля качества, концентрация, мкг/мл				
		0,04	0,1	4	7,5	10
Среднее значение, правильность и прецизионность	Между аналитическими сериями	Среднее значение				
		0,04	0,099	3,87	7,62	10,12
		Прецизионность (Коэффициент вариации, %)				
		12,5	10,2	8,1	5,1	7,5
		Правильность (% среднего значения от теоретического)				
		100,0	98,8	96,7	101,6	101,2
Среднее значение, правильность и прецизионность	Внутри одной аналитической серии	Среднее значение				
		0,039	0,096	4,092	7,72	9,84
		Прецизионность (Коэффициент вариации, %)				
		10,3	3,1	3,7	0,5	6,6
		Правильность (% среднего значения от теоретического)				
		97,5	96,0	102,3	102,9	98,4

Таблица 2

## Результаты определения стабильности тест-системы

Аналитические характеристики	Образцы для контроля качества	
	0,1 мкг/мл	7,5 мкг/мл
Краткосрочная стабильность при комнатной температуре в течение 6 ч		
серия 1	0,097	6,966
серия 2	0,093	6,948
серия 3	0,091	8,471
Среднее значение	0,094	7,462
Стандартное отклонение	0,003	0,874
Коэффициент вариации (Прецизионность), %	3,2	11,7
% от теоретического (Правильность)	94,0	99,5
Три цикла замораживания – оттаивания при –20 °С		
серия 1	0,111	6,871
серия 2	0,069	7,930
серия 3	0,108	7,699
Среднее значение	0,096	7,5
Стандартное отклонение	0,023	0,557
Коэффициент вариации (Прецизионность), %	24,0	7,4
% от теоретического (Правильность)	96,0	100
Долгосрочная стабильность при –20°С в течение 109 дней		
серия 1	0,098	6,763
серия 2	0,100	6,410
серия 3	0,103	8,648
Среднее значение	0,1	7,107
Стандартное отклонение	0,003	0,919
Коэффициент вариации (Прецизионность), %	3	12,9
% от теоретического (Правильность)	100	94,8

## Финансирование

Работа выполнена за счет средств ООО “Научно-производственный центр Пробиотек”.

## Вклад авторов

В. В. Писарев – концепция исследования, проведение экспериментов и общее руководство, А. В. Иванов – анализ данных и написание текста статьи.

## Благодарности

Авторы выражают благодарность коллективу лаборатории биоаналитической химии ООО “Научно-производственный центр Пробиотек” за выполнение практических задач по валидации метода.

## Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов, требующих раскрытия в данной статье.

## ЛИТЕРАТУРА

1. E. Varfolomeev, D. Vucic, *Cytokine*, **101**, 26 – 32 (2018).
2. J. S. Smolen, D. Aletaha, and I. B. McInnes, *Lancet*, **388**(10055), 2023 – 2038 (2016).
3. Y. Xiong, M. Cai, Y. Xu, et al., *Front. Immunol.*, **17**(13), 996103 (2022).
4. R. Parisi, I. Y. Iskandar, E. Kontopantelis, et al., *BMJ*, **28**(369), m1590 (2020).
5. J. S. Smolen, R. Landewij, J. Bijlsma, et al., *Ann. Rheum. Dis.*, **76**(6), 960 – 977 (2017).
6. J. M. Cash and J. H. Klippel, *N. Engl. J. Med.*, **330**(19), 1368 – 1375 (1994).
7. D. L. Scott, F. Wolfe, T. W. Huizinga, *Lancet*, **376**(9746), 1094 – 1108 (2010).
8. K. J. Aaltonen, L. M. Virkki, A. Malmivaara, et al., *PLoS One*, **7**(1), e30275 (2012).
9. R. A. Levy, R. Guzman, G. Castaceda-Hernández, et al., *Immunotherapy*, **8**(12), 1427 – 1436 (2016).
10. J. M. Korth-Bradley, A. S. Rubin, R. K. Hanna, et al., *Ann. Pharmacother.*, **34**(2), 161 – 164 (2000).
11. O. Soran, A. M. Feldman, V. M. Schneider, et al., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **51**(2), 191 – 192 (2001).
12. B. R. Don, G. Spin, I. Nestorov, *J. Pharm. Pharmacol.*, **57**(11), 1407 – 1413 (2005).
13. L. Wang, X. Wang, Y. Li, and Z. Cheng, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1008**, 219 – 224 (2016).
14. В. В. Писарев, М. М. Уляшова, Г. Н. Гильдеева, *Вед. Науч. центра экспертизы средств мед. прим.*, **9**(2), 131 – 139 (2019).
15. В. В. Писарев, А. В. Иванов, *Фармакокинетика и фармакодинамика*, № 1, 58 – 64 (2023).
16. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Guideline, Bioanalytical Method Validation M10 (2019); [www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-2b\\_en.pdf](http://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-2b_en.pdf)

Поступила 11.04.23

## VALIDATION OF THE ELISA ASSAY BASED TEST SYSTEM FOR ASSESSING ETANERCEPT PHARMACOKINETICS IN PATIENTS

V. V. Pisarev\* and A. V. Ivanov

Scientific and Production Center Probiotek LLC, Moscow, 119992 Russia

\* e-mail: vladimir.pisarev@probiotek.ru

Etanercept is a competitive inhibitor of tumor necrosis factor (TNF) binding to cell surface receptors. To assess the personalized pharmacodynamics of etanercept it is necessary to develop available domestic test systems for determining the level of the drug in blood of patients. A test system based on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) has been developed at the Scientific and Production Center Probiotek LLC for the quantitative determination of etanercept in biological fluids. Validation of the developed test system is the goal of this study. The following characteristics of the test system were determined: the four-parameter calibration dependence on eight calibrators with an etanercept concentration of 0.04 – 10.0 µg/ml, the lower detection limit (0.04 µg/ml), a precision between and within a series (12.5% and 10.3%, respectively), the accuracy between series (96.7 – 101.6%), the accuracy within series (96.0 – 102.9%), the short-term stability for 6 hours at room temperature, the long-term stability for 109 days at a temperature of –20°C, the stability at three cycles of freezing/melting. The characteristics obtained provide the possibility of using the developed test system for the determination of the etanercept level in biological fluids as it meets all international standards for the validation of bioanalytical methods.

**Keywords:** etanercept; ELISA; validation; pharmacokinetics.