

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.038, 615.072

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1507>



Валидация тест-системы на основе метода иммуноферментного анализа для определения концентрации бевацизумаба в биологических жидкостях

В. В. Писарев✉, А. В. Иванов✉✉

Общество с ограниченной ответственностью «Научно-производственный центр Пробиотек». 111024, Россия, г. Москва, ул. 5-я Кабельная, д. 2-Б, стр. 1, офис 3–1

✉ Контактное лицо: Писарев Владимир Викторович. E-mail: vladimir.pisarev@probiotech.ru

✉✉ Контактное лицо: Иванов Андрей Владимирович. E-mail: gostyatin@gmail.com

ORCID: В. В. Писарев – <https://orcid.org/0000-0003-3212-4369>; А. В. Иванов – <https://orcid.org/0000-0002-1676-7754>.

Статья поступила: 09.06.2023

Статья принята в печать: 22.04.2024

Статья опубликована: 26.04.2024

Резюме

Введение. Одной из причин развития множества заболеваний, в первую очередь злокачественных, является повышенная экспрессия фактора роста эндотелия сосудов (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF). Бевацизумаб является препаратом для нейтрализации биологической активности VEGF и представляет собой рекомбинантные гуманизированные антитела. Его применение снижает васкуляризацию в очагах повышенной экспрессии VEGF, что замедляет опухолевый рост, а также способствует восстановлению зрения при ряде офтальмологических заболеваний. Для определения концентрации бевацизумаба в биологических жидкостях человека представлена тест-система на основе иммуноферментного анализа (ИФА).

Цель. Целью работы является валидация данной тест-системы.

Материалы и методы. Бланковые сыворотки добровольцев, раствор бевацизумаба, иммуноферментный анализ, твердофазный «сэндвич»-ИФА-набор, микропланшетный фотометр.

Результаты и обсуждение. Определены следующие характеристики тест-системы: нижний предел количественного определения – 2,0 мкг/мл, верхний калибровочный диапазон – до 200 мкг/мл, правильность и прецизионность внутри одной серии и между сериями не превышает 20 %, а общая ошибка метода – 30 %, краткосрочная стабильность для образцов при комнатной температуре – 6 часов, долгосрочная стабильность – 14 дней при –20 °С, возможность трехкратного замораживания/оттаивания образцов, возможность определения образцов с концентрацией выше верхнего калибратора после разбавления в 2 раза.

Заключение. Полученные результаты полностью соответствуют международным критериям приемлемости и позволяют использовать тест-систему ИФА производства ООО «НПЦ Пробиотек» для применения в области клинической лабораторной диагностики.

Ключевые слова: бевацизумаб, ИФА, валидация, лабораторная диагностика

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

Вклад авторов. В. В. Писарев – организационная часть исследования, планирование и проведение экспериментов и общее руководство. А. В. Иванов – анализ данных, обсуждение результатов и написание текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена за счет средств ООО «Научно-производственный центр Пробиотек».

Для цитирования: Писарев В. В., Иванов А. В. Валидация тест-системы на основе метода иммуноферментного анализа для определения концентрации бевацизумаба в биологических жидкостях. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2024;13(2):181–189. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1507>

Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay test-system for bevacizumab concentration determining in biological fluids

Vladimir V. Pisarev✉, Andrei V. Ivanov✉✉

LLC "Probiotech". office 3–1, building 1, 2-B, 5th Kabelnaya str., Moscow, 111024, Russia

✉ Corresponding author: Vladimir V. Pisarev. E-mail: vladimir.pisarev@probiotech.ru

✉✉ Corresponding author: Andrei V. Ivanov. E-mail: gostyatin@gmail.com

ORCID: Vladimir V. Pisarev – <https://orcid.org/0000-0003-3212-4369>; Andrei V. Ivanov – <https://orcid.org/0000-0002-1676-7754>.

Received: 09.06.2023

Accepted: 22.04.2024

Published: 26.04.2024

Abstract

Introduction. One of the reasons for the development of many diseases primarily malignant is the increased expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Bevacizumab is a drug that neutralizes the biological activity of VEGF. The molecular structure of bevacizumab is a recombinant humanized antibody. Its use reduces vascularization in the foci of increased VEGF expression which slows down tumor growth and also helps restore vision in a number of ophthalmic diseases. To determine the concentration of bevacizumab in human biological fluids a test system based on Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) is presented.

© Писарев В. В., Иванов А. В., 2024

© Pisarev V. V., Ivanov A. V., 2024

Aim. Aim of this study is the validation of this test system.

Materials and methods. blank sera of volunteers, bevacizumab solution, enzyme-linked immunosorbent assay, solid-phase sandwich ELISA kit, microplate photometer.

Results and discussion. The following characteristics of the test system were determined: the lower limit of quantification is 2.0 mcg/ml, the upper calibration range is up to 200 mcg/ml, the accuracy and precision within one series and between series does not exceed 20 %, and the total error of the method – 30 %, short-term stability for samples at room temperature – 6 hours, long-term stability – 14 days at –20 °C, the ability to freeze/thaw of samples is up to three times, the ability to determine samples with a concentration above the upper calibrator after diluting in 2 times.

Conclusion. The results obtained fully comply with international acceptance criteria and allow the use of the ELISA test system manufactured by LLC "Probiotek" for use in the field of clinical laboratory diagnostics.

Keywords: bevacizumab, ELISA, validation, laboratory diagnostics

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. Vladimir V. Pisarev – organizational part of the study, planning and conducting experiments and general management. Andrei V. Ivanov – data analysis, result discussion and writing the text.

Funding. The work was carried out at the expense of LLC "Probiotek".

For citation: Pisarev V. V., Ivanov A. V. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay test-system for bevacizumab concentration determining in biological fluids. *Drug development & registration*. 2024;13(2):181–189. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1507>

ВВЕДЕНИЕ

Для развития процессов злокачественного перерождения клеток и прогресса большей части онкологических заболеваний требуется воздействие сразу нескольких факторов. Одним из наиболее важных факторов риска для роста и метастазирования опухолей является локальное нарушение регуляции ангиогенеза, вызванное чрезмерной активностью фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС, Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF). В норме экспрессия VEGF обеспечивает рост сосудов во время эмбрионального развития, во время роста организма и восстановления кровоснабжения тканей при травмах [1]. Первоначальными причинами канцерогенеза, как правило, являются сочетанные наследственные и соматические мутации в генах, регулирующих процессы клеточной пролиферации и дифференцировки. Но возникающая солидная опухоль не может достигать значительных размеров и тем более метастазировать без притока питательных веществ и снабжения кислородом, обеспечиваемых растущей сосудистой сетью. При дальнейшей малигнизации клетки опухоли приобретают способность вызывать рост сосудов, активируя экспрессию ряда факторов роста, в том числе VEGF. Избыточная экспрессия VEGF наблюдается при случаях множественной миеломы [2], раке почки [3], раке груди [4], раке кожи и плоскоклеточной карциноме [5], колоректальном раке [6], аденокарциномах [7]. Также при нарушениях регуляции экспрессии VEGF возможно развитие ряда сосудистых и офтальмоло-

гических заболеваний, например неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации, неоваскулярной глаукомы и диабетической ретинопатии [8].

VEGF представляет собой целое семейство белков [9]. Наибольшее клиническое значение имеет молекула VEGF-A, влияющая на рост кровеносных сосудов [10]. Именно VEGF-A наиболее изучен; так, выявлено, что имеется четыре изоформы: VEGF121, VEGF145, VEGF165 и VEGF189 [11–13]. Среди других членов семейства VEGF-C и VEGF-D активно участвуют в лимфангиогенезе [14]. Биологическая роль VEGF-B еще до конца не определена. Еще один представитель семейства VEGF, PlGF, обеспечивает плацентарный рост, может образовывать функциональные гетеродимеры с VEGF-A и также играет роль в ангиогенезе [10, 15]. Наконец, VEGF-E кодируется парапоксвирусом Orf и играет важную роль в развитии вирусной инфекции и ассоциированной патологии [10]. Биология VEGF является уникальной иллюстрацией того, как фундаментальные открытия, сделанные в лабораториях, за относительно короткий промежуток времени – менее чем за 15 лет – повлияли на терапевтические разработки и привели к значительным успехам в практической медицине [10]. Таргетная терапия, нацеленная на VEGF и связанные с ним регуляторные пути, широко используется при лечении заболеваний сетчатки глаз и в онкологии. Применение таких препаратов, как бевацизумаб, ранибизумаб, афлиберцепт, пегаптаниб (Bevacizumab, Ranibizumab, Aflibercept, Pegaptanib), способствует восстановлению зрения при ряде неоваскулярных офтальмоло-

гических заболеваний, хотя макромолекулярные свойства этих препаратов, сильная гидрофильность и плохая проницаемость гемато-офтальмического барьера ограничивают их эффективность [16]. Комбинирование ингибиторов VEGF с классическими химиотерапевтическими препаратами и агентами, нацеленными на другие молекулы или пути, участвующие в формировании и разрастании кровеносных сосудов, согласно данным ряда клинических испытаний, увеличивает продолжительность жизни пациентов и повышает эффективность противоопухолевой терапии [17]. Еще в начале 1990-х было продемонстрировано, что возможно подавление роста опухоли *in vivo* с помощью моноклональных антител против VEGF и блокирования VEGF-индуцированного ангиогенеза [18]. В дальнейшем этот подход привел к разработке препарата бевацизумаба.

Бевацизумаб прошел все фазы клинических испытаний в 2003–2005 годах и в 2004 году был одобрен в США для лечения рака и неоваскулярных офтальмологических заболеваний во многом благодаря работам Наполеона Феррара в корпорации Genentech (США) [16, 19]. С тех пор география применения препарата расширилась, и он успешно применяется в ряде европейских стран и США [16]. Препарат представляет собой гиперхимерные гуманизированные антитела класса IgG1, селективно связывающие VEGF, что ингибирует его взаимодействие с рецепторами Flt-1 и KDR на поверхности эндотелиальных клеток. Молекула состоит из двух тяжелых и двух легких цепей и имеет молекулярную массу 149 кДа [20]. При клиническом применении бевацизумаба отмечается множество эффектов кросс-взаимодействий как с молекулами-участниками регуляторных путей организма, так и с другими химиопрепаратами при комбинированной терапии. В зависимости от концентраций препарата такие взаимодействия могут как усиливать, так и угнетать фармакологический эффект. Именно поэтому чрезвычайную важность приобретает возможность точной оценки содержания бевацизумаба в биологических жидкостях пациента.

Для обнаружения и определения количества бевацизумаба в организме человека разработаны и применены на практике тест-системы, основанные на методах высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), ВЭЖХ и масс-спектрометрии LC-MS/MS и Proximity Extension Assay [21]. Данные методы требуют дорогостоящего оборудования и расходных материалов, с которыми может работать только высококвалифицированный персонал. Как правило, это возможно только в крупных исследовательских центрах. Метод иммуоферментного анализа (ИФА) также применяется для количественной оценки концентрации бевацизумаба в биологических жидкостях и обладает рядом преимуществ. Основными достоинствами метода ИФА является его высокая чувствительность и селективность в сочетании с относительно невысокой стоимостью, возможностью быстро наладить массовое производство тест-систем, воз-

можностью применения практически в любой клинико-диагностической лаборатории без специальной подготовки персонала и дорогостоящего оборудования. Так, в исследовании [22] продемонстрирована возможность использования метода непрямого ИФА для оценки долгосрочной стабильности препаратов на основе моноклональных анти-VEGF-антител, в том числе и бевацизумаба. Данный метод является чувствительным, точным и селективным, что позволяет ему стать важным инструментом для количественного определения биологической активности таких лекарственных средств. В исследовании [23] продемонстрирована не только возможность использования метода ИФА для оценки концентрации препарата в крови, но и определена зависимость чувствительности метода от содержания свободного, частично конъюгированного с VEGF и полностью связанного бевацизумаба. Выявлено увеличение отношения между концентрациями свободного VEGF и комплексов VEGF-бевацизумаб от 100 до 1000 раз при изменении количества препарата от 12,5 до 125 нг/мл.

В связи с возрастающим опытом клинического применения бевацизумаба и необходимостью определения его концентраций в крови пациентов в рамках рутинной практики клинической лабораторной диагностики стоит задача создания отечественной тест-системы для определения концентрации данного препарата в биологических жидкостях методом ИФА. Данная задача успешно решена в ООО «Пробиотек», в результате разработана тест-система на основе твердофазного «сэндвич»-ИФА. Ранее подобный подход был успешно применен для разработки аналогичных тест-систем для определения трастузумаба [24] и этанерцепта [25].

Целью настоящего исследования является валидация данной тест-системы, демонстрация ее аналитических возможностей и соответствия международным стандартам^{1,2}.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ИФА

Аналитический метод представляет собой классический твердофазный «сэндвич»-ИФА с мостиковым конъюгированием с использованием антиидиотипических моноклональных антител захвата, кото-

¹ International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Guideline, Bioanalytical Method Validation M10 (2019). Available at: www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-2b_en.pdf. Accessed: 09.06.2023.

² Guideline on bioanalytical method validation. 21 July 2011. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf. Accessed: 09.06.2023.

рые специфически распознают гипервариабельные участки области связывания VEGF (complementarity determining regions, CDR) бевацизумаба (рисунок 1). Данные первичные антитела предварительно сорбированы на дно каждой лунки классического 96-луночного полистиролового планшета (ООО «НПЦ Пробиотек», Россия). На первом этапе анализа в лунки добавляется по 100 мкл калибраторов, бланковых образцов, образцов для контроля качества, разбавленных в 1000 раз исследуемых образцов сыворотки. После инкубации при встряхивании со скоростью 170 об/мин на шейкере Multi-3D (АО «Вектор-Бест», Россия) в течение 60 мин при комнатной температуре и трехкратной промывки промывочным раствором 0,025%-м Tween-20 (ЗАО «НВО Иммунотех», Россия) в 0,01 М PBS бевацизумаб из аналитических образцов остается в связанном с первичными антителами состоянии. Второй этап включает добавление в каждую лунку планшета 100 мкл вторичных моноклональных антител против бевацизумаба (1:50000), не направленных против CDR-области связывания VEGF и меченных пероксидазой хрена (кат. № 77332, Sigma-Aldrich, США), в реакционном буфере 0,01 М ФСБ и 1%-го бычьего сывороточного альбумина (50-109-0661, Proliant Biologicals, LLC, США). После инкубации при встряхивании со скоростью 170 об/мин на шейкере Multi-3D в течение 60 мин при комнатной температуре и трехкратной промывки в течение 30 мин при комнатной температуре промывочным раствором следует добавление 100 мкл раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и инкубация в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре. Реакция останавливалась добавлением 100 мкл стоп-раствора, содержащего 1 М серную кислоту (ЗАО «НВО Иммунотех»).



Рисунок 1. Схема метода:

ИФА с первичными антителами на подложке и вторичными антителами, связанными с детектирующим реагентом. Так как молекула-мишень бевацизумаб сама представляет собой антитело, используется антиидиотипический захват

Figure 1. Method scheme:

ELISA with primary antibodies on a plate and secondary antibodies associated with a detection reagent. Since the target molecule of bevacizumab is itself an antibody, anti-idiotypic capture is used

Детекция проводится с помощью микропланшетного фотометра Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 450 нм в течение 5 мин после остановки реакции.

Исследования с применением биоматериалов человека проводились в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации 1975 года. Образцы крови людей, примененные для приготовления сывороток для образцов контроля качества и бланковых сывороток, были предоставлены ГКУЗ Тверской области «Станция переливания крови» Министерства здравоохранения Тверской области. Все доноры заполнили и подписали информированное согласие на участие в данном исследовательском проекте и на публикацию результатов.

Построение графиков для расчета концентрации бевацизумаба в зависимости от оптической плотности калибраторов и вычисление регрессионной модели выполнялись с помощью пакета анализа OriginPro 2015 (OriginLab Corporation, США). Статистическая обработка результатов, вычисление правильности и прецизионности выполнялись с применением Excel 2010 (Microsoft Corporation, США).

Использовались формулы:

среднее значение

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i,$$

стандартное отклонение

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2},$$

коэффициент вариации

$$(\text{Прецизионность}) = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \%,$$

% от теоретического

(Правильность) =

$$= \frac{\text{Полученное значение} - \text{Номинальное значение}}{\text{Номинальное значение}} \times 100 \%.$$

Общая ошибка =

$$|\text{прецизионность}| + |\text{правильность}| (\%).$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Процедура валидации включает шесть основных этапов:

- 1) выбор калибровочного диапазона;
- 2) оценка селективности;
- 3) определение регрессионного уравнения;
- 4) тест на стабильность;
- 5) определение прецизионности и правильности между аналитическими сериями и внутри одной аналитической серии;

б) тест на необходимость разбавления и возможность анализа образца с концентрацией выше калибровочного диапазона после разведения.

В качестве стокового раствора для приготовления калибровочных образцов и образцов для контроля качества применялся раствор бевацизумаба 1 мг/мл в бланковой сыворотке. Из него было приготовлено всего 8 калибраторов с концентрацией бевацизумаба 0, 2, 4, 20, 65, 110, 160, 200 мкг/мл и 5 образцов для контроля качества с концентрацией 2, 5, 5, 100, 150, 200 мкг/мл.

Калибраторы использовались для построения градуировочного графика в каждом аналитическом цикле, измерения проводились в дублях. Данные концентрации калибраторов и образцов для контроля качества были выбраны исходя из максимальных терапевтических значений бевацизумаба в крови человека, достигаемых при внутривенном введении доз от 1 до 10 мг/кг веса пациента 1 раз в неделю в течение 2–3 недель [26, 27]. В качестве нижнего ненулевого калибратора и нижнего предела количественного определения было выбрано значение концентрации бевацизумаба 2 мкг/мл, так как измеренные значения поддавались определению, были дискретными и воспроизводимыми с прецизионностью 1,6 %, не превышающей 25 %, и правильностью 95,0 %, входящей в диапазон 75–125 %. Верхний предел определен как 200 мкг/мл, так как при дальнейшем возрастании концентрации происходит выход на плато показаний оптической плотности. Дальнейшее увеличение концентрации не приводит к пропорциональному росту оптической плотности, в то время как при измерении концентраций бевацизумаба от 50 до 200 мкг/мл значения оптической плотности находятся в пределах 1,5–3,5 AU, что является оптимальным при использовании нелинейной регрессионной модели [28].

Для определения селективности методики были проведены исследования 10 образцов бланковой сыворотки с концентрацией бевацизумаба 2 мкг/мл, в трех повторах каждый. Образцы сыворотки были различного качества, в том числе гемолизированные и гиперлипидемические. Результаты данной серии экспериментов представлены в таблице 1. Усредненные значения концентраций после пересчета образцов для оценки селективности по калибровочной кривой, за исключением образца № 9 (10 % исследованных), находились в диапазоне 75–125 % от теоретического значения. Данный результат полностью удовлетворяет критериям приемлемости методики по селективности.

Одним из основных параметров тест-системы на основе ИФА является возможность определения концентрации аналитов на основе регрессионной модели, построенной на основе определения оптической плотности калибраторов. При использовании семи ненулевых калибраторов регрессионная модель представляет собой четырехпараметрическую зависимость, описываемую уравнением:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2.$$

где y – оптическая плотность; x – концентрация аналита; A_1, A_2, x_0, p – параметры уравнения.

Таблица 1. Значения измерений теста на селективность образца бевацизумаба с концентрацией 2 мкг/мл в сыворотках различного качества

Table 1. The values of the measurements of the selection of the bevacizumab sample with a concentration of 2 µg/ml in serums of various quality

Образец матрицы Matrix Sample	Концентрация Concentration	% от теоретической % from theoretic	Среднее, % Mean, %
1	1,89	94,5	90,4
	1,76	88,2	
	1,77	88,4	
2	2,06	103,1	97,8
	2,00	100,0	
	1,81	90,4	
3	1,95	97,7	100,7
	1,88	93,8	
	2,21	110,6	
4	2,25	112,7	102,3
	1,79	89,7	
	2,09	104,3	
5	2,51	125,3	122,0
	2,43	121,5	
	2,39	119,3	
6	2,49	124,5	115,4
	2,35	117,7	
	2,08	104,0	
7	2,34	116,9	105,0
	1,75	87,3	
	2,21	110,7	
8	2,01	100,3	98,4
	1,83	91,6	
	2,07	103,4	
9	2,58	128,8	125,4
	2,47	123,4	
	2,48	124,0	
10	2,39	119,4	114,9
	2,28	113,9	
	2,23	111,6	
Соответствует критерию Meets the criterion	9	90,0	

При использовании данного уравнения коэффициент детерминации R_2 для всех шести проведенных постановок превышал 0,99, а рассчитанные обратные значения концентраций калибраторов не отличались от теоретических значений более чем на 4 %, что значительно меньше допустимых 20 %. Параметры регрессионного уравнения для шести постановок приведены в таблице 2, а калибровочный график – на рисунке 2.

Таблица 2. Параметры регрессионной модели

Table 2. Regression model parameters

№ постановки Run number	Параметры уравнения Equation Parameters				Коэффициент детерминации R_2 Determination coefficient
	A_1	A_2	x_0	p	
1	0,05054	429 916	1119 262	0,95327	0,99972
2	0,05158	426 948	10594 232	0,97095	0,99991
3	0,05954	429 373	7493 888	104 263	0,99984
4	0,0574	417 897	7232 252	104 623	0,99989
5	0,04718	535 776	22083 661	0,94489	0,99973
6	0,05124	530 012	15557 753	0,92443	0,99961

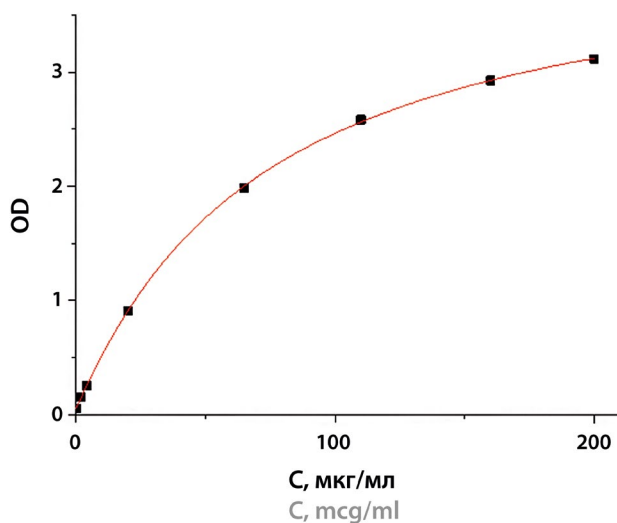


Рисунок 2. График зависимости оптической плотности от концентрации калибровочных стандартов бевацизумаба.

По оси абсцисс: C – концентрация бевацизумаба, мкг/мл.

По оси ординат: OD – оптическая плотность, условные единицы

Figure 2. The dependence of the optical density on the concentration of calibration standards of bevacizumab.

X-axis: C – bevacizumab concentration, mcg/ml.

Y-axis: OD – Optical Density, Arbitrary Units

Для подтверждения стабильности использования тест-системы при различных условиях хранения бевацизумаба в составе биологической матрицы были проведены серии экспериментов на краткосрочную стабильность, долгосрочную стабильность и множественное замораживание – оттаивание. Краткосрочная стабильность исследовалась после хранения образцов для контроля качества с концентрацией бевацизумаба 5,5 и 150 мкг/мл при комнатной температуре в течение 6 часов. Долгосрочная стабильность исследовалась после заморозки образцов для контроля качества с теми же концентрациями и хранения их при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 14 суток. Стабильность при множественном замораживании – оттаивании определялась на образцах бевацизумаба тех же

концентраций после трех циклов замораживания до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ и последующего полного оттаивания. Результаты данных серий тестов представлены в таблице 3. Во всех случаях отклонения от номинального значения не превышали 16,2 %, что соответствует критериям приемлемости 20 % и подтверждает возможность использования рассматриваемой тест-системы для оценки концентраций бевацизумаба в биологических жидкостях при различных условиях их хранения.

Прецизионность и правильность метода с подсчетом общей ошибки внутри одной аналитической серии оценивались по результатам параллельных измерений пяти образцов контроля качества с концентрацией бевацизумаба 2, 5,5, 100, 150, 200 мкг/мл, каждого в трех повторах, на одном 96-луночном полистироловом планшете. Прецизионность и правильность метода между аналитическими сериями также оценивались по результатам параллельных анализов пяти образцов контроля качества, выполненных в шести аналитических сериях, в трех повторах для каждого исследуемого образца. Усредненные результаты испытаний представлены в таблице 4. Полученные средние концентрации аналитов отличались от номинального значения не более чем на 8,9 %. Внутрисерийная прецизионность (повторяемость) не превышала 13,4 %, а межсерийная (воспроизводимость) – 3,4 %. Общая ошибка не превышала 22,3 %. Данные значения с запасом укладываются в критерии приемлемости валидационных параметров, при которых средние значения измерений концентраций должны находиться в диапазоне $\pm 20\text{ }%$ от номинальных значений, прецизионность – не превышать 20 %, а общая ошибка метода – 30 %.

Оценку необходимого разбавления с целью устранения влияния матрицы проводили с использованием образца контроля качества с концентрацией 2,0 мкг/мл, приготовленного на сыворотке крови человека, с последующим разбавлением в 500 и 1000 раз. Для расчета концентрации данных образцов использовали калибровочную кривую, полученную при анализе семи ненулевых калибровочных стандартов. Результаты представлены в таблице 5. Отклонение среднего значения концентрации образца контроля качества от теоретической величины составило 4,5 % при разбавлении в 500 раз и 13,5 % при разбавлении в 1000 раз, что не превысило допустимые 25 %.

Для проверки возможности применения тест-системы для оценки образцов в диапазоне концентраций, превышающих верхний калибровочный уровень после разбавления, был проведен отдельный тест. Специально подготовленный образец контроля качества с концентрацией 380,00 мкг/мл был разбавлен бланковой сывороткой в два раза и проанализирован в 6 повторах. В результате отклонение среднего значения концентрации образца контроля качества от теоретической величины с учетом разбавления составило 18,6 %, что не превысило допустимые 20 % (таблица 5).

Таблица 3. Данные тестов на краткосрочную стабильность, долгосрочную стабильность и множественное замораживание – оттаивание

Table 3. Data from short-term stability, long-term stability, and multiple freeze-thaw tests

Аналитические характеристики Analytical characteristics	Образцы для контроля качества Quality control samples	
	5,5 мкг/мл 5.5 µg/ml	150 мкг/мл 150 µg/ml
Краткосрочная стабильность при комнатной температуре в течение 6 часов Short term stability at RT for 6 hours		
Серия 1 Series 1	6,22	140,96
Серия 2 Series 2	6,68	147,38
Серия 3 Series 3	6,26	139,42
Среднее значение Mean	6,39	142,59
Стандартное отклонение Standard deviation	0,25	4,22
Коэффициент вариации (прецизионность), % CV, %	3,9	3,0
% от теоретического (правильность) Accuracy	116,2	95,1
Три цикла замораживания – оттаивания при -20 °C Three freeze-thaw cycles at -20 °C		
Серия 1 Series 1	6,35	135,24

Серия 2 Series 2	5,78	132,74
Серия 3 Series 3	5,96	130,06
Среднее значение Mean	6,03	132,68
Стандартное отклонение Standard deviation	0,29	2,59
Коэффициент вариации (прецизионность), % CV, %	4,8	2,0
% от теоретического (правильность) Accuracy	109,6	88,5
Долгосрочная стабильность при -20 °C в течение 14 суток Long-term stability at -20 °C for 14 days		
Серия 1 Series 1	6,18	140,76
Серия 2 Series 2	6,48	145,79
Серия 3 Series 3	6,32	141,35
Среднее значение Mean	6,33	142,63
Стандартное отклонение Standard deviation	0,15	2,75
Коэффициент вариации (прецизионность), % CV, %	2,4	1,9
% от теоретического (правильность) Accuracy	114,5	95,1

Таблица 4. Результаты исследований на прецизионность, правильность и общую ошибку определения концентраций бевацизумаба

Table 4. Results of studies on precision, accuracy and overall error in determining bevacizumab concentrations

Аналитические характеристики Analytical characteristics	Образцы для контроля качества Quality control samples				
	2,0 мкг/мл 2.0 µg/ml	5,5 мкг/мл 5.5 µg/ml	100 мкг/мл 100 µg/ml	150 мкг/мл 150 µg/ml	200 мкг/мл 200 µg/ml
Среднее значение, стандартное отклонение, правильность, прецизионность и общая ошибка Mean, standard deviation, accuracy, precision and total error	Среднее значение Mean				
	1,92	5,35	95,5	143,3	182,16
	Стандартное отклонение Standard deviation				
	0,14	0,33	5,03	12,47	24,42
	Прецизионность (коэффициент вариации, %) CV, %				
	7,3	6,2	5,3	8,7	13,4
	Правильность (% среднего значения от теоретического) Accuracy				
	96,0	97,3	95,5	95,5	91,1
	Общая ошибка Total error				
	11,3	8,9	9,8	13,2	22,3
Среднее значение, стандартное отклонение, правильность, прецизионность и общая ошибка Mean, standard deviation, accuracy, precision and total error	Среднее значение Mean				
	1,9	5,23	95,87	139,14	179,01
	Стандартное отклонение Standard deviation				
	0,03	0,18	0,94	3,6	2,7
	Прецизионность (коэффициент вариации, %) CV, %				
	1,6	3,4	1,0	2,6	1,5
	Правильность (% среднего значения от теоретического) Accuracy				
	95,0	95,1	95,9	92,8	89,5
	Общая ошибка Total Error				
	6,58	8,35	5,11	9,83	12,0

Таблица 5. Результаты исследований на линейность разбавления и возможности разведения образца с концентрацией выше калибровочного диапазона

Table 5. Results of studies on dilution linearity and the possibility of diluting a sample with a concentration above the calibration range

Тест Test	Необходимое разбавление Dilution required		Оценка образца, превышающего верхний калибратор Sample exceeding the upper calibrator evaluation
	2,00 мкг/мл 2.00 µg/ml	2,00 мкг/мл 2.00 µg/ml	
Концентрация образца для контроля качества Quality control sample concentration	2,00 мкг/мл 2.00 µg/ml	2,00 мкг/мл 2.00 µg/ml	380 мкг/мл 380 µg/ml
Разбавление Dilution	в 500 раз 500 times	в 1000 раз 1000 times	в 2 раза 2 times
Число повторов Run number	3	3	6
Среднее значение Mean	2,09	1,73	154,6
Стандартное отклонение Standard deviation	0,09	0,09	6,86
Коэффициент вариации (прецизионность), % CV, %	4,3	5,2	4,4
% от теоретического (правильность) Accuracy	104,5	86,5	81,4

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований выявлено, что тест-система для определения концентрации бевацизумаба в биологических жидкостях на основе твердофазного ИФА, разработанная в ООО «НПЦ Пробиотек», соответствует отечественным и международным критериям приемлемости и параметрам валидации¹. Тест-система показала себя высокоэффективной и удобной в использовании, продемонстрировала высокую чувствительность и селективность. Прецизионность и точность результатов анализа с учетом критериев приемлемости достигается во всем исследованном интервале концентраций аналита – от 2,00 до 200,00 мкг/мл. Подтверждена возможность использования тест-системы для анализа гемолизных сывороток и образцов, хранящихся при комнатной температуре и после заморозки. Проведенная валидация демонстрирует

¹ ГОСТ ISO/IEC 17025-2019 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий» (п. 7.2. Выбор, верификация и валидация методов). Доступно по: <https://docs.cntd.ru/document/1200166732>. Ссылка активна на 09.06.2023.

возможность широкого использования тест-системы для оценки уровня бевацизумаба в крови пациентов в практике клинической лабораторной диагностики.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Apte R. S., Chen D. S., Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*. 2019;176(6):1248–1264. DOI: 10.1016/j.cell.2019.01.021.
2. Vincent L., Jin D. K., Karajannis M. A., Shido K., Hooper A. T., Rashbaum W. K., Pytowski B., Wu Y., Hicklin D. J., Zhu Z., Bohlen P., Niesvizky R., Rafii S. Fetal stromal-dependent paracrine and intracrine vascular endothelial growth factor-A/vascular endothelial growth factor receptor-1 signaling promotes proliferation and motility of human primary myeloma cells. *Cancer Research*. 2005;65(8):3185–3192. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3598.
3. Cao Y., Guangqi E., Wang E., Pal K., Dutta S. K., Bar-Sagi D., Mukhopadhyay D. VEGF exerts an angiogenesis-independent function in cancer cells to promote their malignant progression. *Cancer Research*. 2012;72(16):3912–3918. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-4058.
4. Lee T.-H., Seng S., Sekine M., Hinton C., Fu Y., Avraham H. K., Avraham S. Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. *PLoS Medicine*. 2007;4(6):e186. DOI: 10.1371/journal.pmed.0040186.
5. Lichtenberger B. M., Tan P. K., Niederleithner H., Ferrara N., Petzelbauer P., Sibilia M. Autocrine VEGF signaling synergizes with EGFR in tumor cells to promote epithelial cancer development. *Cell*. 2010;140(2):268–279. DOI: 10.1016/j.cell.2009.12.046.
6. Bhattacharya R., Ye X.-C., Wang R., Ling X., McManus M., Fan F., Boulbes D., Ellis L. M. Intracrine VEGF Signaling Mediates the Activity of Prosurvival Pathways in Human Colorectal Cancer Cells. *Cancer Research*. 2016;76(10):3014–3024. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1605.
7. Chen T. T., Filvaroff E., Peng J., Marsters S., Jubb A., Koepfen H., Merchant M., Ashkenazi A. MET Suppresses Epithelial VEGFR2 via Intracrine VEGF-induced Endoplasmic Reticulum-associated Degradation. *EBioMedicine*. 2015;2(5):406–420. DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.03.021.
8. Fogli S., Del Re M., Rofi E., Posarelli C., Figus M., Danesi R. Clinical pharmacology of intravitreal anti-VEGF drugs. *Eye (Lond)*. 2018;32(6):1010–1020. DOI: 10.1038/s41433-018-0021-7.
9. Wiszniak S., Schwarz Q. Exploring the Intracrine Functions of VEGF-A. *Biomolecules*. 2021;11(1):128. DOI: 10.3390/biom11010128.
10. Melincovici C. S., Boşca A. B., Şuşman S., Mărginean M., Mişu C., Istrate M., Moldovan I. M., Roman A. L., Mişu C. M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 2018;59(2):455–467.
11. Kazemi-Lomedasht F., Behdani M., Pooshang Bagheri K., Habibi Anbouhi M., Abolhassani M., Khanahmad H., Shahbazzadeh D., Mirzahoseini H. Expression and purification of functional human vascular endothelial growth factor-A 121; the most important angiogenesis factor. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2014;4(4):323–328. DOI: 10.5681/apb.2014.047.
12. Azimi-Nezhad M. Vascular endothelial growth factor from embryonic status to cardiovascular pathology. *Reports of Biochemistry and Molecular Biology*. 2014;2(2):59–69.
13. Liu H., Tang L. Mechano-regulation of alternative splicing. *Current Genomics*. 2013;14(1):49–55. DOI: 10.2174/138920213804999156.
14. Kinashi H., Ito Y., Sun T., Katsuno T., Takei Y. Roles of the TGF-β-VEGF-C Pathway in Fibrosis-Related Lymphangiogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(9):2487. DOI: 10.3390/ijms19092487.

15. Lecarpentier E., Tsatsaris V. Angiogenic balance (sFlt-1/PlGF) and preeclampsia. *Annales d'Endocrinologie*. 2016;77(2):97–100. DOI: 10.1016/j.ando.2016.04.007.
16. Cao Y., Langer R., Ferrara N. Targeting angiogenesis in oncology, ophthalmology and beyond. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2023;22(6):476–495. DOI: 10.1038/s41573-023-00671-z.
17. Halmos B., Burke T., Kalyvas C., Vandormael K., Frederickson A., Piperdi B. Pembrolizumab+chemotherapy versus atezolizumab+chemotherapy+/-bevacizumab for the first-line treatment of non-squamous NSCLC: A matching-adjusted indirect comparison. *Lung Cancer*. 2021;155:175–182. DOI: 10.1016/j.lungcan.2021.03.020.
18. Kim K. J., Li B., Winer J., Armanini M., Gillett N., Phillips H. S., Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth *in vivo*. *Nature*. 1993;362(6423):841–844. DOI: 10.1038/362841a0.
19. Ferrara N., Adamis A.P. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2016;15(6):385–403. DOI: 10.1038/nrd.2015.17.
20. Ellis L. M., Bevacizumab. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005;Suppl:S8–S9. DOI: 10.1038/nrd1727.
21. Di Filippo L. D., Dos Santos K. C., Hanck-Silva G., de Lima F. T., Daflon Gremião M. P., Chorilli M. A Critical Review of Biological Properties, Delivery Systems and Analytical/Bioanalytical Methods for Determination of Bevacizumab. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2021;51(5):445–453. DOI: 10.1080/10408347.2020.1743641.
22. Surez I., Salmern-Garca A., Cabeza J., Capitn-Vallvey L. F., Navas N. Development and Use of Specific ELISA Methods for Quantifying the Biological Activity of Bevacizumab, Cetuximab and Trastuzumab in Stability Studies. *Journal of Chromatography B*. 2016;1032:155–142. DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.05.045.
23. Kamerud J., Abrams M., Klover J. An ELISA for the Quantitative Determination of Free and Partially Bound Bevacizumab in Human Serum. *Eurofins Bioanalytical Service*. T2047. Available at: https://www.eurofins.com/media/12142677/eurofins-bioanalytical-services_2016-aaps-nbc_beva-poster-10may16_web.pdf. Accessed: 09.06.2023.
24. Pisarev V. V., Ivanov A. V. Validation of ELISA Test-system for Trastuzumab (Herceptin, Hertikad) quantitative determination in biological fluids. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2023;(1):58–64. (In Russ.) DOI: 10.37489/2587-7836-2023-1-58-64.
25. Pisarev V. V., Ivanov A. V. Validation of a test system based on solid-phase ELISA to assess the pharmacokinetics of etanercept. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. Available at: <https://www.probiotech.ru/images/articles/ELISA%20etanercept%20Probiotech%202023.pdf>. Accessed: 09.06.2023.
26. Han K., Peyret T., Quartino A., Gosselin N. H., Gururangan S., Casanova M., Merks J. H. M., Massimino M., Grill J., Daw N. C., Navid F., Jin J., Allison D. E. Bevacizumab dosing strategy in paediatric cancer patients based on population pharmacokinetic analysis with external validation. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2016;81(1):148–160. DOI: 10.1111/bcp.12778.
27. Han K., Peyret T., Marchand M., Quartino A., Gosselin N. H., Girish S., Allison D. E., Jin J. Population pharmacokinetics of bevacizumab in cancer patients with external validation. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2016;78(2):341–351. DOI: 10.1007/s00280-016-3079-6.
28. Findlay J. W. A., Dillard R. F. Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays. *The AAPS Journal*. 2007;9(2):29. DOI: 10.1208/aapsj0902029.