

Разработка и валидация методики определения концентрации экулизумаба в плазме крови человека с применением технологии биослойной интерферометрии

В. М. Симонов¹, М. С. Пантюшенко¹, А. А. Казаров¹, О. А. Маркова², Г. Н. Порошин¹

¹ Общество с ограниченной ответственностью

«Международный биотехнологический центр «Генериум»,

601125, Российская Федерация, Владимирская область, пос. Вольгинский, ул. Владимирская, 14

² АО «Генериум», 123317, г. Москва, ул. Тестовская, д. 10, оф. 214

Статья поступила 03.08.2017 г. Принята к публикации 04.08.2017 г.

Разработана и валидирована методика определения концентрации препарата моноклонального терапевтического антитела экулизумаб в плазме крови человека в диапазоне концентраций 3–250 мкг/мл. Методика основана на взаимодействии иммобилизованного Fab-фрагмента антитела, специфичного к экулизумабу в образце плазмы крови. Методика использует принцип биослойной интерферометрии, позволяющий без внесения дополнительных меток оценить концентрацию анализируемого вещества. Результаты валидации методики сопоставлялись с результатами валидации альтернативной методики на основе иммуноферментного анализа. По итогам исследования показано преимущество методики на основе биослойной интерферометрии по основным метрологическим характеристикам — аналитическому диапазону, правильности, прецизионности и селективности.

Ключевые слова: моноклональное антитело; экулизумаб; биослойная интерферометрия; валидация.

Библиографическое описание: Симонов ВМ, Пантюшенко МС, Казаров АА, Маркова ОА, Порошин ГН. Разработка и валидация методики определения концентрации экулизумаба в плазме крови человека с применением технологии биослойной интерферометрии. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2017; 17(3): 158–164.

Экулизумаб представляет собой гуманизированное моноклональное антитело к компоненту комплемента C5 человека и применяется для терапии ультра-орфанного заболевания — пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ, PNH — Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria). Причиной ПНГ является соматическая мутация гена PIG-A [1]. Поэтому, несмотря на высокую эффективность, терапия экулизумабом не позволяет достичь полного излечения ПНГ. Тем не менее, как в клинических исследованиях, так и при последующем использовании препарата было показано, что применение экулизумаба для пациентов с ПНГ приводит к значительному уменьшению частоты клинических проявлений заболевания и повышению качества и продолжительности жизни пациентов [2]. В Российской Федерации терапия ПНГ экулизумабом применяется недостаточно широко в связи с крайне высокой стоимостью единственного зарегистрированного препарата экулизумаба — Солирис®. Улучшение ситуации возможно при выводе на отечественный фармацевтический рынок экономически доступного биоаналога, не уступающего оригинальному препарату в эффективности и безопасности. Для доказательства соответствия критериям эффективности и безопасности необходима оценка параметров фармакокинетики оригинального и воспроизведенного (биоаналогичного) препаратов. Основным способом оценки параметров фармакокинетики являются методы определения концентрации препаратов в биологической среде организма человека — крови или полученной из нее плазмы.

В данной публикации представлены результаты разработки и валидации методики оценки концентрации экулизумаба в плазме крови человека на основе биослойной интерферометрии. Поскольку ранее был разработан и ва-

лидирована аналогичная методика на основе иммуноферментного анализа, то становится возможным сделать сравнительный анализ преимуществ и недостатков этих двух подходов.

Материалы и методы

Материалы

Для разработки и валидации методов были использованы: растворы препарата Солирис® (концентрат экулизумаба для приготовления раствора для инфузий 10,0 мг/мл, производство «Alexion Pharma International Sarl», серия P0003703); оптические биосенсоры Dip and Read™ Anti-Penta-HIS (HIS1K), Pall ForteBio (лот 6090046); деплетированная по компоненту C5 системы комплемента сыворотка крови человека, Quidel (кат. № A501); Fab-фрагмент антитела, специфичного к экулизумабу с C-концевым гексагистидиновым тагом (далее анти-экулизумаб Fab-фрагмент); C5 Protein (компонент C5 комплемента человека), Quidel (кат. № A403); мышинные моноклональные антитела к иммуноглобулинам человека IgG4, конъюгированные с пероксидазой хрена, «Abscam» (кат. № ab98817); препарат Пролиа® (раствор деносумаба для подкожного введения, 60 мг/мл, «Amgen Manufacturing Limited», серия 0010262911); плазма крови человека 10 здоровых доноров.

Метод иммуноферментного анализа. Метод определения концентрации экулизумаба основан на специфическом взаимодействии препарата, содержащегося в образце, и предварительно сорбированного на 96-луночном микропланшете MaxiSorp с высокосорбирующей поверхностью («Nunc») компонента C5 комплемента человека с образованием комплекса, который детектируется с помощью мышинных моноклональных антител, конъюгирован-

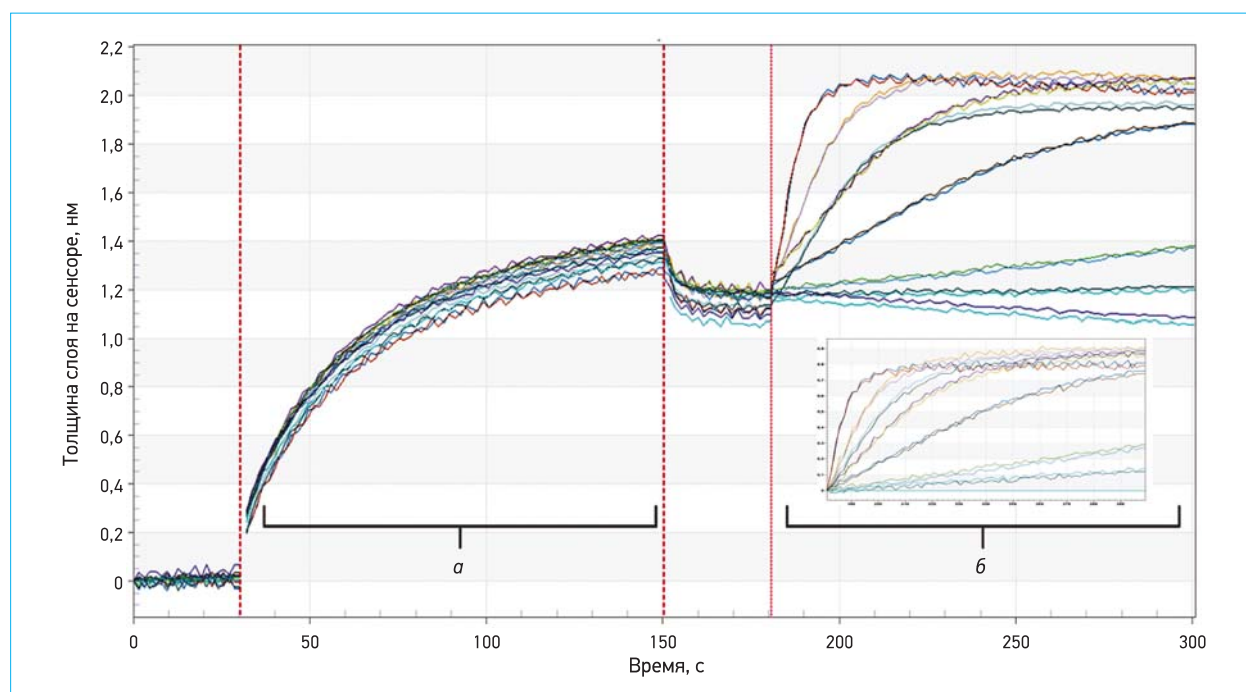


Рис. 1. Сенсограммы (а) иммобилизации на сенсорах анти-экулизумаб Fab-фрагмента и (б) доз-зависимого накопления комплекса на сенсорах.

ных с пероксидазой хрена, к иммуноглобулинам человека изотипа IgG4. После иммобилизации на микропланшете компонента C5 комплемента человека и блокирования несвязавшихся сайтов (использовали фосфатно-солевой буферный раствор («Эко-сервис»), содержащий 1 %-ный бычий сывороточный альбумин («Sigma»)), в лунки микропланшета вносили образцы стандарта и испытуемые образцы.

Для приготовления градуировочных растворов препарат экулизумаб разбавляли фосфатно-солевым буферным раствором, содержащим 0,1 % деплетированной по компоненту C5 системы комплемента сыворотки крови человека, в концентрации от 0,078 до 10 нг/мл. Испытуемые образцы плазмы крови человека разбавляли тем же буферным раствором с кратностью 1/1000 или более.

После инкубирования и промывки сформировавшийся в лунках комплекс C5–экулизумаб детектировали путем добавления вторичных антител (мышинных моноклональных антител к иммуноглобулинам человека IgG4, конъюгированных с пероксидазой хрена). Далее для визуализации комплекса C5–экулизумаб–вторичное антитело добавляли раствор тетраметилбензидина (хромогенный субстрат пероксидазы хрена). После развития окраски ферментативную реакцию останавливали путем добавления 0,5 М раствора серной кислоты. Оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм регистрировали с помощью микропланшетного спектрофотометра xMark («Bio-Rad»).

Вычисляли концентрацию экулизумаба в испытуемых образцах с использованием калибровочной кривой зависимости оптической плотности (Y) от логарифма концентрации препарата экулизумаба (X), аппроксимированной 4-параметрической логистической функцией:

$$Y = \frac{(a - d)}{1 + (x / c)^b} + d, \quad (1)$$

где a — нижняя асимптота, b — угловой коэффициент, c — точка перегиба и d — верхняя асимптота. Все расчеты выполняли в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения Microplate Manager, v. 6.0 («Bio-Rad»).

Метод биослойной интерферометрии. Метод определения концентрации экулизумаба основан на интерферометрическом измерении [3, 4] кинетики специфического взаимодействия анти-экулизумаб Fab-фрагмента, иммобилизованного на биосенсоре, с экулизумабом в исследуемом образце плазмы. Испытания выполняли с использованием интерферометра Octet® QKe System («Pall ForteBio»). Используемый анти-экулизумаб Fab-фрагмент обладает специфичностью только к экулизумабу и не связывается с другими белками в плазме крови человека. В составе анти-экулизумаб Fab-фрагмента имеется C-концевая гексагистидиновая последовательность, обеспечивающая обратимую иммобилизацию его на поверхности биосенсоров. Биосенсоры сначала инкубировали в растворе анти-экулизумаб Fab-фрагмента, контролируя уровень насыщения (рис. 1, а). После достижения насыщения биосенсоры инкубировали с модельными образцами плазмы в 10- и 20-кратном разведении, а также с растворами стандартов, содержащими антитело экулизумаб в концентрации от 0,47 до 30 мкг/мл. В ходе инкубации для каждого образца регистрировали скорость образования комплексов анти-экулизумаб Fab-фрагмент–экулизумаб» (рис. 1, б).

По результатам анализа калибровочных растворов определяли зависимость скорости образования комплексов (Y) от концентрации экулизумаба (X), выраженную линейной функцией вида:

$$Y = kX + b, \quad (2)$$

где k — угловой коэффициент, b — свободный член.

На основании калибровочной функции (рис. 2) вычисляли концентрацию экулизумаба в испытуемых образцах.

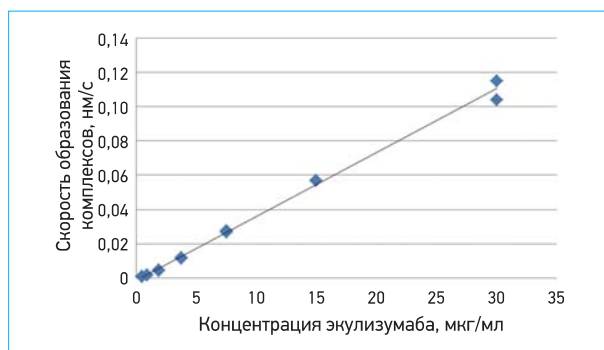


Рис. 2. Градуировочная кривая зависимости сигнала (скорости образования комплексов) от концентрации экулизумаба при использовании методики на основе биослойной интерферометрии.

Все расчеты выполняли в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения Octet® Software, v.9.0 («ForteBio»).

Результаты и обсуждение

Валидацию методики определения концентрации экулизумаба в плазме крови человека на основе биослойной интерферометрии, в том числе, установку критериев приемлемости, проводили в соответствии с требованиями нормативных документов Евразийского экономического союза и Европейского союза, относящихся к валидации биоаналитических методик испытаний [5, 6]. В ходе валидации оценивали следующие метрологические характеристики: устойчивость параметров градуировочной функции, правильность, прецизионность между попытками и внутри опыта, линейность разведений, специфичность и селективность (эффект матрицы). По результатам оценки указанных характеристик определяли аналитический диапазон методики и минимально необходимое разведение испытуемых образцов. По итогам валидации сопоставляли характеристики методики на основе биослойной интерферометрии с ранее оцененными характеристиками аналогичной методики на основе иммуноферментного анализа (ИФА).

Для оценки устойчивости параметров градуировочной функции при валидации методики по оценке концентрации экулизумаба методом биослойной интерферометрии готовили и тестировали 7 градуировочных растворов. Растворы содержали экулизумаб в диапазоне концентраций 0,47–30 мкг/мл в фосфатно-солевом буферном растворе с добавлением 10 %-ной C5-деплетированной сыворотки крови человека (по 2 измерения каждого раствора, всего 14 измерений) в 6 независимых опытах (№ 1–6). В каждом опыте для градуировочной функции оценивали коэффициент детерминации (R^2 , должен быть не менее

0,98). Для каждого измерения градуировочных растворов проводили обратный расчет концентрации с использованием градуировочной функции, после чего вычисляли коэффициент восстановления (%R) как процентное отношение найденного значения концентрации экулизумаба («найденно») к истинному значению для данного раствора («введено»). Для %R нормативами по валидации заданы следующие критерии оценки: для градуировочных растворов с крайними значениями концентрации экулизумаба — 75–125 %, для остальных градуировочных растворов — 80–120 %. В каждом опыте установленные критерии должны соблюдаться, по меньшей мере, для 11 из 14 измерений. Во всех опытах получены удовлетворительные результаты, что позволяет считать параметры градуировочной функции устойчивыми (табл. 1). Градуировочная функция, полученная в опыте № 6 и обладающая наилучшими характеристиками (наибольшее значение R^2 и соответствие %R установленному критерию для 14 измерений), была использована при обработке результатов во всех последующих опытах.

Для оценки правильности методики готовили и тестировали 7 образцов экулизумаба с концентрацией от 3 до 250 мкг/мл в 100 %-ной C5-деплетированной сыворотке крови человека в 6 независимых опытах (№ 7–12). Каждый образец испытывали в разведениях 1/10 и 1/20, по 2 измерения на каждое разведение, усредняя результат по разведениям и измерениям. Для каждого образца по результатам каждого опыта вычисляли коэффициент восстановления (%R) и оценивали его соответствие установленным критериям: для образцов с крайними значениями концентрации экулизумаба — 75–125 %, для остальных — 80–120 %. Во всех опытах результаты удовлетворяют установленным критериям для %R (для образцов с крайними значениями концентрации экулизумаба — 75–125 %, для остальных — 80–120 %), что позволяет считать методику правильной (табл. 2).

Оценку прецизионности между опытами проводили в опытах № 7–12. Для каждого образца экулизумаба с концентрацией от 3 до 250 мкг/мл по результатам 6 опытов вычисляли среднее значение найденной концентрации экулизумаба, стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариации (%CV). Во всех опытах результаты удовлетворяют установленным критериям для %CV между опытами (для образцов с крайними значениями концентрации экулизумаба — менее 25 %, для остальных — менее 20 %), что позволяет считать прецизионность между опытами приемлемой (табл. 2).

Оценку прецизионности внутри опыта проводили в опыте № 13. Готовили 7 образцов экулизумаба по той же схеме, что и в опытах № 7–12, однако каждый образец тестировали в 6 независимых повторностях — по 2 разведения на каждую повторность и по 2 измерения на каждое разведение. В каждой повторности результат усредняли

Таблица 1. Результаты оценки устойчивости параметров градуировочной функции

№ опыта	1	2	3	4	5	6
R^2 (коэффициент детерминации)	0,9936	0,9914	0,9936	0,9904	0,9933	0,9951
k (угловой коэффициент)	0,00407	0,00382	0,00446	0,00386	0,00335	0,00349
b (свободный член)	0,00236	0,00282	0,00066	0,00137	-0,00093	-0,00110
Количество измерений градуировочных растворов, для которых %R (коэффициент восстановления) удовлетворяет установленному критерию	13	14	13	13	12	14

по разведениям и измерениям. Для каждого образца вычисляли среднее по повторностям значение найденной концентрации экулизумаба, стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариации ($\%CV$). Результаты удовлетворяют установленным критериям для $\%CV$ между повторно-

стями (для образцов с крайними значениями концентрации экулизумаба — менее 25 %, для остальных — менее 20 %), что позволяет считать прецизионность внутри опыта приемлемой (табл. 3).

Так как методика предполагает разведение испытуемых образцов в 10 и 20 раз, проводили оценку линейности разведения в опытах № 7–12. В каждом опыте для каждо-

Таблица 2. Результаты оценки правильности и прецизионности между опытами

Введено препарата, мкг/мл	№ опыта	Найдено препарата, мкг/мл	%R (коэффициент восстановления), %	Среднее	SD	%CV, %
250	7	290,5	116,2	288,5	12,1	4,2
	8	295,0	118,0			
	9	299,6	119,8			
	10	295,6	118,2			
	11	284,1	113,6			
	12	266,2	106,5			
120	7	133,0	110,9	134,8	2,8	2,1
	8	135,4	112,8			
	9	136,7	113,9			
	10	134,7	112,2			
	11	138,3	115,3			
	12	130,5	108,7			
50	7	43,1	86,2	47,3	4,2	9,0
	8	43,7	87,5			
	9	52,1	104,3			
	10	47,1	94,3			
	11	44,8	89,6			
	12	52,8	105,5			
20	7	19,8	98,8	20,8	1,2	5,8
	8	20,4	102,0			
	9	21,4	106,9			
	10	20,9	104,6			
	11	19,7	98,5			
	12	22,9	114,6			
9	7	9,1	101,1	9,4	0,5	4,9
	8	9,1	100,6			
	9	9,7	107,8			
	10	9,4	104,9			
	11	9,2	101,9			
	12	10,3	114,1			
6	7	6,3	104,8	6,4	0,2	3,0
	8	6,4	107,3			
	9	6,3	105,5			
	10	6,5	107,6			
	11	6,2	103,8			
	12	6,8	112,7			
3	7	3,1	101,9	2,9	0,2	6,1
	8	2,9	97,8			
	9	2,8	92,2			
	10	3,0	98,5			
	11	2,6	87,7			
	12	3,1	103,3			

Таблица 3. Результаты оценки прецизионности внутри опыта

Введено препарата, мкг/мл	№ повторности	Найдено препарата, мкг/мл	Среднее	SD	%CV, %
250	1	258,7	249,9	7,6	3,0
	2	245,0			
	3	246,1			
	4	236,5			
	5	232,7			
	6	233,3			
120	1	119,3	114,5	6,1	5,3
	2	116,4			
	3	107,7			
	4	108,0			
	5	103,4			
	6	107,5			
50	1	48,3	46,1	2,8	6,0
	2	46,9			
	3	43,0			
	4	43,1			
	5	46,4			
	6	45,1			
20	1	18,8	18,0	0,8	4,6
	2	18,1			
	3	17,2			
	4	16,8			
	5	16,6			
	6	17,3			
9	1	9,7	9,25	0,53	5,7
	2	9,5			
	3	8,7			
	4	10,1			
	5	9,2			
	6	9,1			
6	1	6,9	6,60	0,26	3,9
	2	6,4			
	3	6,6			
	4	6,2			
	5	6,8			
	6	6,3			
3	1	3,3	3,08	0,16	5,3
	2	3,0			
	3	3,0			
	4	3,1			
	5	3,0			
	6	2,9			

Таблица 4. Результаты оценки линейности разведений

Введено препарата, мкг/мл	№ опыта	Найдено препарата, мкг/мл			SD	%CV, %
Разведение образца:		1/10	1/20	Среднее		
250	7	277,6	303,5	290,5	18,3	6,3
	8	279,2	310,8	295,0	22,4	7,6
	9	288,8	310,3	299,6	15,2	5,1
	10	283,2	308,0	295,6	17,6	5,9
	11	256,7	311,5	284,1	38,7	13,6
	12	228,9	303,5	266,2	52,8	19,8
120	7	128,1	138,0	133,0	7,0	5,2
	8	134,9	135,9	135,4	0,7	0,5
	9	131,3	142,1	136,7	7,6	5,6
	10	126,3	143,1	134,7	11,8	8,8
	11	134,7	142,0	138,3	5,2	3,8
	12	121,2	139,7	130,5	13,1	10,0
50	7	45,8	40,4	43,1	3,9	8,9
	8	46,8	40,7	43,7	4,3	9,9
	9	58,4	45,9	52,1	8,8	16,9
	10	52,0	42,3	47,1	6,8	14,5
	11	48,5	41,1	44,8	5,2	11,7
	12	57,7	47,8	52,8	7,0	13,3
20	7	17,4	22,1	19,8	3,3	16,8
	8	18,0	22,9	20,4	3,5	17,0
	9	20,1	22,7	21,4	1,9	8,8
	10	18,4	23,5	20,9	3,6	17,1
	11	17,8	21,7	19,7	2,8	14,0
	12	21,7	24,2	22,9	1,7	7,6
9	7	8,3	9,9	9,1	1,1	11,7
	8	8,1	10,0	9,1	1,3	14,8
	9	9,0	10,5	9,7	1,1	10,9
	10	8,6	10,3	9,4	1,2	12,2
	11	8,4	10,0	9,2	1,2	12,7
	12	9,6	10,9	10,3	0,9	8,7
6	7	6,0	6,6	6,3	0,4	6,6
	8	5,7	7,2	6,4	1,0	15,7
	9	6,0	6,7	6,3	0,5	7,7
	10	5,9	7,1	6,5	0,8	13,0
	11	5,8	6,7	6,2	0,6	9,7
	12	6,4	7,1	6,8	0,5	7,1
3	7	2,6	3,5	3,1	0,6	19,5
	8	2,6	3,3	2,9	0,5	18,6
	9	2,5	3,0	2,8	0,4	13,6
	10	2,6	3,3	3,0	0,5	16,0
	11	2,3	3,0	2,6	0,5	19,4
	12	2,7	3,5	3,1	0,6	18,4

го разведения отдельно определяли найденную концентрацию с учетом кратности разведения, усредненную по двум измерениям. Для каждого образца вычисляли среднее по двум разведениям значение найденной концентрации экулизумаба, стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариации (%CV). Результаты удовлетворяют установленным критериям для %CV между разведениями (для образцов с крайними значениями концентрации экулизумаба — менее 25 %, для остальных — менее 20 %), что позволяет считать линейность разведения приемлемой (табл. 4).

Специфичность методики как способность используемых реактивов связываться исключительно с анализируемым веществом, оценивали в опыте № 14 по двум различным аспектам:

а) отсутствие значимого фоновых сигнала в образцах, не содержащих экулизумаб, но содержащих все остальные компоненты матрицы. Для этого тестировали индивидуальные образцы плазмы крови, взятые у 10 здоровых доноров, и во всех случаях получали нулевое значение концентрации экулизумаба (табл. 6);

б) отсутствие значимого сигнала в образцах, содержащих вещество, структурно родственное экулизумабу. Для этого готовили и испытывали образцы 100 %-ной С5-деплетированной сыворотке крови человека с добавлением препарата Пролиа® в концентрации от 3 до 250 мкг/мл. В качестве действующего вещества этот препарат содержит полностью человеческое моноклональное антитело деносуаба, в наибольшей степени среди доступных препаратов схожее с экулизумабом по структуре, но отличающееся по специфическим участкам аминокислотной последовательности. Деносуаба относится к изотипу IgG2, в то время как экулизумаб содержит участки аминокислотной последовательности, характерные для изотипов IgG2 и IgG4. В результате анализа во всех образцах, вне зависимости от концентрации деносуаба, получили нулевое значение концентрации экулизумаба (данные не приведены).

Результаты, полученные в опыте № 14 (отсутствие значимого сигнала в образцах, не содержащих экулизумаб, но содержащих все остальные компоненты матрицы, а также в образцах, содержащих вещество, структурно родственное экулизумабу), в совокупности свидетельствуют о специфичности валидируемой методики.

Селективность методики как способность определять анализируемое вещество в присутствии неродственных соединений в биологическом образце, т.е. естественных компонентов биологической матрицы, оценивали в опыте № 15. Готовили и испытывали индивидуальные образцы плазмы крови, взятые у 10 здоровых доноров, к каждому из которых добавляли экулизумаб до концентрации

Таблица 5. Сравнение основных метрологических характеристик методов определения концентрации экулизумаба в плазме крови человека на основе иммуноферментного анализа (ИФА) и биослойной интерферометрии

Характеристика	Оцениваемый показатель	Метод ИФА	Метод биослойной интерферометрии
Правильность	%R (коэффициент восстановления), %	78,7–104,8	86,2–119,8
Прецизионность между опытами	%CV (коэффициент вариации), %	3,1–27,1	2,1–9,0
Прецизионность внутри опыта	%CV (коэффициент вариации), %	2,8–12,7	3,0–6,0
Селективность (эффект матрицы)	%CV (коэффициент вариации), %	13,6–22,2	3,5–6,0
Аналитический диапазон	Концентрация, мкг/мл	20–250	3–250
Минимально необходимое разведение образцов	Кратность разбавления, раз	1/1000	1/10

Таблица 6. Результаты оценки специфичности и селективности (эффекта матрицы)

Введено препарата, мкг/мл	0	120	250
Номер донора	Найдено препарата, мкг/мл		
01	0	126,0	214,3
02	0	126,0	255,8
03	0	126,0	226,8
04	0	129,4	236,8
05	0	130,4	232,8
06	0	126,6	237,7
07	0	120,3	244,0
08	0	117,1	208,1
09	0	130,1	238,0
10	0	121,5	238,7
Среднее	—	125,3	233,3
SD	—	4,4	13,9
%CV, %	—	3,5	6,0

120 или 250 мкг/мл. Для каждого уровня концентрации внесенного экулизумаба вычисляли среднее найденное значение по образцам, стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариации (%CV). Значение %CV рассматривали как показатель эффекта матрицы. Полученные результаты удовлетворяют установленным критериям (%CV менее 20 % между образцами с одинаковым уровнем концентрации внесенного экулизумаба), что позволяет считать методику селективной, а эффект матрицы — приемлемым (табл. 5).

Выводы

Проведенная валидация методики, основанной на биослойной интерферометрии, включающая оценку требуемых метрологических характеристик (правильности, прецизионности между опытами и внутри опыта, линейности разведений, специфичности и селективности) подтверждает возможность ее применения для достоверного определения концентрации экулизумаба в образцах плазмы крови человека в диапазоне 3–250 мкг/мл. В таблице 6 приведены сравнительные данные по основным метрологическим характеристикам методики на основе биослойной интерферометрии и альтернативной методики на основе иммуноферментного анализа, для которой ранее была выполнена валидация.

Об авторах

Общество с ограниченной ответственностью «Международный биотехнологический центр «Генериум», 601125, Российская Федерация, Владимирская область, пос. Вольгинский, ул. Владимирская, 14.

Симонов Владимир Михайлович. Научный сотрудник отдела молекулярной и клеточной биологии.

Пантюшенко Мария Семеновна. Научный сотрудник отдела аналитических методов.

Казаров Александр Александрович. Начальник лаборатории иммунохимии отдела аналитических методов.

Порошин Григорий Николаевич. Научный сотрудник отдела аналитических методов.

Акционерное общество «Генериум». 123317, Российская Федерация, Москва, ул. Тестовская, д. 10, оф. 214.

Маркова Оксана Анатольевна. Руководитель научной клинической группы управления клинических исследований.

Адрес для переписки: Порошин Григорий Николаевич; poroshin@ibcgenerium.ru

Основными преимуществами методики на основе биослойной интерферометрии являются более широкий аналитический диапазон (нижний предел количественного определения составляет 3 мкг/мл против 20 мкг/мл для альтернативной методики), лучшая правильность, прецизионность и селективность. При использовании биослойной интерферометрии минимально необходимое разведение образцов — 1/10 (для альтернативной методики — 1/1000), что существенно упрощает процедуру и минимизирует погрешность получаемых результатов, хотя и несколько увеличивает количество биоматериала, требуемое для анализа. Наконец, методика на основе биослойной интерферометрии обеспечивает заметно более высокую производительность, что позволяет выполнить анализ образцов за меньшее время. Так, анализ 20 образцов в одном опыте (включая обработку полученных результатов) при использовании методики на основе биослойной интерферометрии занимает 1,5–2 ч, при использовании методики на основе иммуноферментного анализа — 6–8 часов. Среди недостатков биослойной интерферометрии — относительно высокая стоимость оборудования и достаточно строгие требования к квалификации исполнителей анализа. Тем не менее, очевидно, что методики на основе этой технологии могут найти применение в доклинических и клинических исследованиях биотерапевтических лекарственных препаратов.

Литература

1. Young N, Maciejewski J. Genetic and environmental effects in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: this little PIG-A goes «Why? Why? Why?». *J Clin Investigation* 2000, 106: 637–41.
2. Al-Ani F, Chin-Yee I, Lazo-Langner A. Eculizumab in the management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: patient selection and special considerations. *Therapeutics Clinical Risk Management* 2016, 12: 1161–70.
3. Abdiche Y, Malashock D, Pinkerton A, Pons J. Determining kinetics and affinities of protein interactions using a parallel real-time label-free biosensor, the Octet. *Anal Biochem*. 2008, 377: 209–17.
4. Do T, Ho F, Heidecker B, Witte K, Chang L, Lerner L. A rapid method for determining dynamic binding capacity of resins for the purification of proteins. *Protein Expression Purification* 2008, 60: 147–50.
5. Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза. Утверждены Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85 / Приложение № 6. Требования к валидации биоаналитических методик испытаний и анализу исследуемых биологических образцов.
6. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2. Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use, 2011.

Development and validation of a method for determination of Eculizumab concentration in human plasma by biolayer interferometry

V. M. Simonov¹, M. S. Pantushenko¹, A. A. Kazarov¹, O. A. Markova², G. N. Poroshin¹

¹ Limited Liability Company «International Biotechnology Center «Generium», Vladimirskaia street 14, Volginsky 601125, Vladimir region, Russian Federation

² Joint-stock company «Generium», Testovskaya street 10, office 214, Moscow 123317, Russian Federation

The article describes a new method for measurement of monoclonal antibody Eculizumab concentration in human plasma in a range of 3–250 µg/mL. In this method we used an antibody Fab fragment, capable of binding to eculizumab specifically in human plasma. The method uses the biolayer interferometry for determination of Eculizumab concentration without additional tag in the analyzing substances. This method was comparatively validated along with the traditional ELISA. Comparative validation demonstrated that the biolayer interferometry based method has an advantage to the ELISA in such important statistical criteria as an analytical range, accuracy, precision, specificity and selectivity (matrix effect).

Key words: monoclonal antibody; Eculizumab; biolayer interferometry; validation.

For citation: Simonov VM, Pantushenko MS, Kazarov AA, Markova OA, Poroshin GN. Development and validation of a method for determination of Eculizumab concentration in human plasma by biolayer interferometry. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(3): 158–164.

References

1. Young N, Maciejewski J. Genetic and environmental effects in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: this little PIG-A goes «Why? Why?». *J Clin Investigation* 2000, 106: 637–41.
2. Al-Ani F, Chin-Yee I, Lazo-Langner A. Eculizumab in the management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: patient selection and special considerations. *Therapeutics Clinical Risk Management* 2016, 12: 1161–70.
3. Abdiche Y, Malashock D, Pinkerton A, Pons J. Determining kinetics and affinities of protein interactions using a parallel real-time label-free biosensor, the Octet. *Anal Biochem.* 2008, 377: 209–17.
4. Do T, Ho F, Heidecker B, Witte K, Chang L, Lerner L. A rapid method for determining dynamic binding capacity of resins for the purification of proteins. *Protein Expression Purification* 2008, 60: 147–50.
5. Rules for conducting bioequivalence studies of medicinal products within the framework of the Eurasian Economic Union. Approved by the Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission of November 3, 2016.
6. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2. Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use, 2011.

Authors

Limited Liability Company «International Biotechnology Center «Generium», Vladimirskaia street 14, Volginsky 601125, Vladimir region, Russian Federation. Simonov V. M. Staff scientist of molecular and cellular biology department.

Pantushenko M. S. Staff scientist of department of analytical methods.

Kazarov A. A. Head of immunochemistry laboratory of department of analytical methods.

Poroshin G. N. Staff scientist of department of analytical methods.

Joint-stock company «Generium», Testovskaya street 10, office 214, Moscow 123317, Russian Federation.

Markova O. A. Head of scientific clinical group of clinical study department.

Contact e-mail: Poroshin Grigory Nikolaevich; poroshin@ibcgenerium.ru