

Валидация тест-системы на основе твердофазного ИФА для оценки фармакокинетики этанерцепта.

В.В. Писарев, А.В Иванов

Общество с ограниченной ответственностью «Научно-производственный центр Пробиотек»

Ленинские Горы, д.1, стр. 75В, Москва, 119992, Российская Федерация

vladimir.pisarev@probiotech.ru

+7-916-577-73-58

Резюме

Для лечения аутоиммунных заболеваний, характеризующихся чрезмерной выработкой фактора некроза опухоли (ФНО), таких как ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилоартрит и псориаз в последнее время препаратом выбора становится этанерцепт – конкурентный ингибитор связывания ФНО с клеточными поверхностными рецепторами. Для оценки персонализированной фармакодинамики этанерцепта необходима разработка доступных отечественных тест-систем определения уровня препарата в крови пациентов. В ООО «Научно-производственный центр Пробиотек» разработана тест-система на основе твердофазного ИФА для количественного определения этанерцепта в биологических жидкостях. Целью настоящего исследования стала валидация данной тест-системы.

В результате определены следующие характеристики представленной тест-системы: четырёхпараметрическая калибровочная зависимость от восьми 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 часов при комнатной температуре, долгосрочная стабильность – 109 дней при -20°C, стабильность при трёх циклах замораживания-оттаивания. Полученные характеристики позволяют применять тест-систему для анализа уровня этанерцепта в биологических жидкостях, так как она отвечает всем международным стандартам по валидации биоаналитических методов.

Ключевые слова: этанерцепт, ИФА, валидация, фармакокинетика

Введение

В настоящее время все большее распространение среди людей, особенно жителей урбанизированной среды, принимают 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), применение которых позволило облегчить страдания миллионов людей. 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 часов 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·час/мл. Период полувыведения ($T_{1/2}$) составляет около 70 часов. У пациентов с РА клиренс равен приблизительно 0,066 л/час, что несколько ниже его значения 0,11 л/час у здоровых добровольцев (9). Фармакокинетические характеристики этанерцепта у пациентов с РА, анкилозирующим спондилоартритом и псориазом сходны. Для успешного клинического применения этанерцепта необходимо чётко 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). 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 (10), 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 (11) и трастузумаба (12).

Целью настоящего исследования являлся всесторонний анализ пригодности представленной тест-системы для клинического использования (валидация) и оценка её характеристик соответствии международным стандартам (13).

Материалы и методы

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 500мкг/мл объёмом 2 мл, пробирку с 20х раствором вторичного конъюгата козьих поликлональных антител против Fc фрагмента IgG человека с пероксидазой хрена (A0170, Sigma-Aldrich, США) объёмом 0,7 мл, флакон с 20х концентратом промывочного раствора (фосфатно-солевой буферный раствор с добавлением Твин-20 (Oleon N C, Бельгия), рН 7,0±0,5) объёмом 15 мл, флакон с раствором субстрата на основе 3-3'-5-5'-тетраметилбензидина (ТМБ) с добавлением перекиси водорода, готовый для использования объёмом 14 мл, флакон со стоп-реагентом (1М серная кислота) объёмом 15 мл, плёнку для заклеивания планшета, техническую документацию.

Выполнение анализа проводилось в следующей последовательности: в каждую лунку планшета добавлялось 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 час 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 минут при 250 об/мин, промывали аналогично первому разу, добавляли 100 мкл раствора ТМБ, заклеивали, инкубировали 30 минут в темноте, добавляли 100 мкл стоп-раствора, интенсивно встряхивали и проводили измерение оптической плотности.

Валидация проводилась с использованием микропланшетного фотометра Multiscan FC (Dy nex Technologies Inc., США) при длине волны 450 нм. Построение графиков для расчета концентрации этанерцепта в зависимости от оптической плотности калибраторов и вычисление регрессионной модели выполнялись с помощью пакета анализа OriginPro (Origin Labs, США). Статистическая обработка результатов, вычисление правильности и прецизионности выполнялись 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. Все доноры заполнили и подписали информированное согласие на участие в данном исследовательском проекте и на публикацию результатов.

Результаты и обсуждение

Линейность метода оценивалась по анализу восьми калибровочных стандартов, из которых семь 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 четырем параметрам составила

$$y=2.62975+(0.07751-2.62975)/(1+(x/5.41417)^{0.88737})$$

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

Выявленный средний коэффициент корреляции по восьми стандартным кривым составил $r=0.99985$. Типичная кривая с усреднением по восьми измерениям представлена на рис. 1. При обратном расчёте концентраций калибровочных стандартов отклонения от теоретических значений находились в пределах допустимых 20% от их номинальной

концентрации и составило 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 $R^2 = 0,9703$

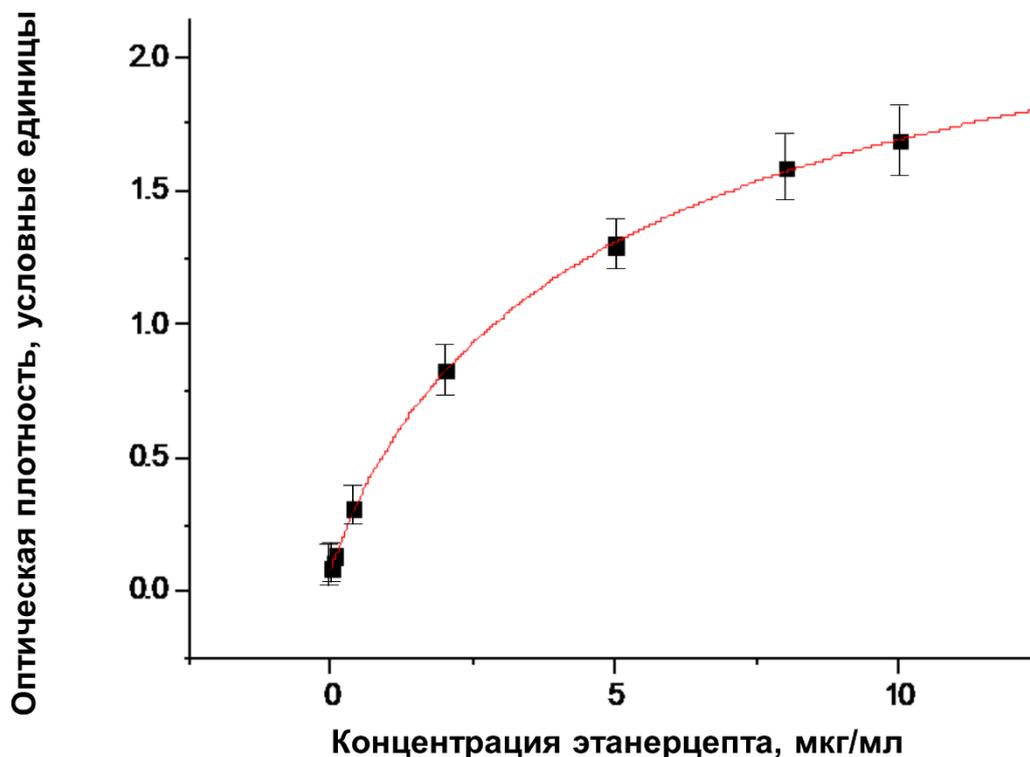


Рис.1. График зависимости оптической плотности (OD) от концентрации этанерцепта в калибровочных стандартах.

Для дальнейших валидационных экспериментов были приготовлены пять образцов для контроля качества путём 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 трёх 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 определён как 0,040 мкг/мл. Данное значение характеризуется значениями OD, превышающими OD нулевого стандарта более чем в 5 раз, поддаётся 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 метода внутри одной аналитической серии оценивались по результатам параллельных анализов всех пяти образцов контроля качества в составе одной аналитической серии, каждого в трёх повторах. Всего было проанализировано 9 серий, результаты представлены в Таблице 1.

Прецизионность и правильность метода между аналитическими сериями также оценивалась по результатам параллельных анализов пяти образцов контроля качества, выполненных в девяти аналитических сериях в трёх повторах для каждого исследуемого образца. Усредненные результаты представлены в Таблице 1.

| Аналитические характеристики | | Образцы для контроля качества | | | | |
|---|----------------------------------|--|---------------|-------------|---------------|--------------|
| | | 0,04 мкг/мл | 0,1 мкг/мл | 4 мкг/мл | 7,5 мкг/мл | 10 мкг/мл |
| 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 |

Стабильность тест-системы определялась в серии экспериментов по краткосрочной стабильности, включавшие хранение компонентов при комнатной температуре в течение 6 часов, 3 цикла замораживания-оттаивания при температуре -20°C и долгосрочной стабильности при -20°C в течение 109 дней. Исследовалось по два образца для контроля качества концентрациями 0,1 и 7,5 мкг/мл. Результаты представлены в Таблице 2.

| Аналитические характеристики | Образцы для контроля качества | |
|--|-------------------------------|------------|
| | 0,1 мкг/мл | 7,5 мкг/мл |
| Краткосрочная стабильность при комнатной температуре в течение 6 часов | | |
| 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°C | | |
| 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°C 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 |

Тест на линейность разбавления включал три серии экспериментов с разбавлением образца для контроля качества в 200, 400 и 800 раз. Применялась бланковая сыворотка 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.

Выводы

Тест-система для количественной оценки уровня этанерцепта в биологических жидкостях методом твердофазного ИФА, разработанная в ООО «Научно-производственный центр Пробиотек», отвечает всем международным требованиям, предъявляемым для биоаналитических методов. На образцах сыворотки крови

добровольцев продемонстрирована высокая чувствительность, специфичность, воспроизводимость и стабильность результатов измерения уровня этанерцепта.

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

Конфликт интересов.

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

Conflict of interests.

The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Validation of a test system based on solid-phase ELISA to assess the pharmacokinetics of etanercept.

V.V. Pisarev, A.V. Ivanov

Scientific and Production Center Probiotech LLC,

1/75B Leninskie Gory, Moscow 119992, Russian Federation

Abstract

Etanercept is a competitive inhibitor of tumor necrosis factor (TNF) binding to cell surface receptors. It has recently become the drug of choice for the treatment of autoimmune diseases characterized by excessive production of TNF such as rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis and psoriasis. To assess the personalized pharmacodynamics of etanercept it is necessary to develop available domestic-made test systems for determining the level of the drug in the blood of patients. Scientific and Production Center Probiotech LLC has developed a test system based on solid-phase ELISA for the quantitative determination of etanercept in biological fluids. The purpose of this study was the validation of this test system. As a result the following characteristics of the test system presented were determined: a four-parameter calibration dependence on eight calibrators with a etanercept concentration of 0.04-10.0 µg/ml, a lower detection limit of 0.04 µg/ml, a precision between series of 12.5%, a precision within a serie of 10.3%, accuracy between series 96.7-101.6%, accuracy within serie 96.0-102.9%, short-term stability - 6 hours at room temperature, long-term stability - 109 days at -20 °C, stability at three cycles of freezing/melting. The obtained characteristics have made it possible to use the presented test system for the etanercept level in biological fluids definition since it meets all international standards for the validation of bioanalytical methods.

Keywords: etanercept, ELISA, validation, pharmacokinetics

Литература

1. Varfolomeev E, Vucic D. Intracellular regulation of TNF activity in health and disease. *Cytokine*. 2018;101:26-32. doi: 10.1016/j.cyto.2016.08.035.
2. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2016;22;388(10055):2023-2038. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30173-8.
3. Xiong Y, Cai M, Xu Y, Dong P, Chen H, He W, Zhang J. Joint together: The etiology and pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Front Immunol*. 2022;17;13:996103. doi: 10.3389/fimmu.2022.996103.

4. Parisi R, Iskandar IYK, Kontopantelis E, Augustin M, Griffiths CEM, Ashcroft DM; Global Psoriasis Atlas. National, regional, and worldwide epidemiology of psoriasis: systematic analysis and modelling study. *BMJ*. 2020;28;369:m1590. doi: 10.1136/bmj.m1590.
5. Smolen JS, Landewé R, Bijlsma J, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(6):960-977. doi: 10.1136/annrheumdis-2016-210715.
6. Cash JM, Klippel JH. Second-line drug therapy for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 1994, 12;330(19):1368-75. doi: 10.1056/NEJM199405123301908.
7. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2010, 25;376(9746):1094-108. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60826-4.
8. Aaltonen KJ, Virkki LM, Malmivaara A, Konttinen YT, Nordström DC, Blom M. Systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of existing TNF blocking agents in treatment of rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 2012;7(1):e30275. doi: 10.1371/journal.pone.0030275.
9. Levy RA, Guzman R, Castañeda-Hernández G, Martinez-Vazquez M, Damian G, Cara C. Biology of anti-TNF agents in immune-mediated inflammatory diseases: therapeutic implications. *Immunotherapy*. 2016;8(12):1427-1436. doi: 10.2217/imt-2016-0067.
10. Wang L, Wang X, Li Y, Cheng Z. Development of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the measurement of biologically active etanercept in patients with ankylosing spondylitis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2016,1;1008:219-224. doi: 10.1016/j.jchromb.2015.12.001
11. Писарев В.В., Уляшова М.М., Гильдеева Г.Н. Валидация иммуноферментной тест-системы для доклинических исследований фармакокинетики ритуксимаба. // Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения – 2019.– 9(2). - 131-139.
12. Писарев В.В., Иванов А.В. Валидация тест-системы для количественного определения концентрации трастузумаба в биологических жидкостях методом твердофазного иммуноферментного анализа. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023, №1, в печати.
13. 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