

Разработка и валидация методики определения концентрации антитела человека, блокирующего связывание PD-1 с лигандами, в сыворотке крови яванского макака методом биослойной интерферометрии

К. В. Ульянова, А. А. Казаров, М. С. Пантюшенко, А. А. Оленев, И. В. Лягоскин, В. М. Симонов*

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

Целью некоторых видов иммунотерапии злокачественных опухолей является восстановление способности Т-клеток распознавать и уничтожать опухолевые клетки. Сверхэкспрессия лиганда запрограммированной клеточной смерти (PD-L1) распространена во многих опухолях человека и связана с плохим прогнозом для пациента. Разработка моноклональных антител, специфичных к PD-L1 или PD-1, является перспективным направлением в иммунотерапии злокачественных новообразований. Однако прежде чем лекарственный препарат на основе терапевтического антитела появится на фармацевтическом рынке, необходимо убедиться в его безопасности и эффективности, то есть провести доклинические и клинические исследования в полном объеме. **Цель работы:** разработать и валидировать биоаналитическую методику, позволяющую без внесения дополнительных меток определить концентрацию моноклонального антитела, специфичного к PD-1 человека, в сыворотке крови биологической тест-системы в ходе проведения доклинических исследований. **Материалы и методы:** в работе использовали антиген в виде димера внеклеточного домена рецептора PD-1, ковалентно связанного с Fc-фрагментом иммуноглобулина человека (R&D Systems, США). Антиген иммобилизовали на биосенсоры Dip and Read™ Protein A (Fortebio, США). Терапевтическое моноклональное анти-PD-1 антитело GNR-051 произведено в ООО «МБЦ «Генериум» (Россия). Используемые в качестве матрицы образцы сыворотки крови здоровых яванских макаков получены в ФГБНУ «НИИ МП» (г. Сочи, Россия). Оценку связывания проводили с помощью интерферометра Octet® QKe (Fortebio, США) в режиме наблюдения в реальном времени дозозависимой скорости формирования комплекса антиген–антитело. **Результаты:** представлены экспериментальные данные по разработке и валидации методики определения концентрации препарата моноклонального терапевтического антитела, связывающегося с клеточным рецептором PD-1, в сыворотке крови яванского макака в диапазоне концентраций антитела 2–2500 мкг/мл. Проведена оценка устойчивости параметров градуировочной кривой, оценка правильности и прецизионности между опытами и внутри опыта, оценка линейности разведения, исследована специфичность и селективность методики. **Выводы:** разработана и валидирована методика определения концентрации препарата моноклонального терапевтического антитела на основе биослойной интерферометрии. Показано соответствие методики требованиям нормативных документов ЕврАзЭС по основным валидационным характеристикам: аналитическому диапазону, правильности, прецизионности и селективности.

Ключевые слова: моноклональное антитело; клеточный рецептор PD-1; лиганд запрограммированной клеточной смерти (PD-L1); биослойная интерферометрия; валидация биоаналитической методики

Для цитирования: Ульянова КВ, Казаров АА, Пантюшенко МС, Оленев АА, Лягоскин ИВ, Симонов ВМ. Разработка и валидация методики определения концентрации антитела человека, блокирующего связывание PD-1 с лигандами, в сыворотке крови яванского макака методом биослойной интерферометрии. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020;20(4):257–267. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-257-267>

* **Контактное лицо:** Симонов Владимир Михайлович; simonov@ibcgenerium.ru

Development and Validation of a Biolayer Interferometry Method for Determination of Human Anti-PD-1 Monoclonal Antibody Concentration in Cynomolgus Serum

K. V. Ulyanova, A. A. Kazarov, M. S. Pantyushenko, A. A. Olenev, I. V. Lyagoskin, V. M. Simonov*

International Biotechnology Center “Generium”, 14 Vladimirskaya St., Volginsky town, Petushinskiy District, Vladimir Oblast 601125, Russian Federation

Some types of immunotherapy of malignant tumours are aimed at restoration of T-cells' ability to recognize and eliminate cancer. Programmed cell death ligand-1 (PD-L1) overexpression is characteristic of many human tumours and is associated with poor prognosis for patients. The development of monoclonal antibodies (mAbs) specific for PD-L1 or PD-1 is a promising area of immunotherapy of malignant tumours. However, before a therapeutic antibody-based product enters the market, it is necessary to ensure its safety and efficacy, i.e. perform a full scope of preclinical and clinical studies. **The aim of the study** was to develop and validate a bioanalytical method that does not require additional labeling and that could be used for determination of mAbs specific for human PD-L1 in the blood serum of a biological test system during preclinical studies. **Materials and methods:** an antigen in the

form of a dimer of PD-1 extra-cellular domain covalently bonded to the Fc-fragment of human IgG (R&D Systems, USA) was used in the study. The antigen was immobilised on Dip and Read™ Protein A biosensors (Fortebio, USA). The therapeutic anti-PD-1 antibody GNR-051 was developed and produced by IBC “Generium” (Russia). The healthy cynomolgus monkey serum samples used as matrix were obtained from the Research Institute of Medical Primatology (Sochi, Russia). The assessment of binding was performed using Octet® QKe interferometer (Fortebio, USA) by real-time analysis of the dose-dependent rate of the antigen-antibody complex formation. **Results:** the paper presents experimental data on the development and validation of the test method for determination of the therapeutic PD-1-binding mAb concentration in cynomolgus monkey serum in the antibody concentration range from 2 to 2500 µg/mL. The authors assessed the calibration curve reliability, between-run and within-run precision and accuracy, dilution linearity, specificity and selectivity of the test method. **Conclusions:** the authors developed and validated the biolayer interferometry-based method for determination of therapeutic mAbs concentration. The method was shown to comply with the Eurasian Economic Union’s regulatory requirements in terms of the main validation parameters: analytical range, accuracy, precision, and selectivity.

Key words: monoclonal antibody; PD-1 cell receptor; programmed cell death ligand-1 (PD-L1); biolayer interferometry; bioanalytical method validation

For citation: Ulyanova KV, Kazarov AA, Pantyushenko MS, Olenev AA, Lyagoskin IV, Simonov VM. Development and validation of a biolayer interferometry method for determination of human anti-PD-1 monoclonal antibody concentration in cynomolgus serum. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(4):257–267. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-257-267>

* **Corresponding author:** Vladimir M. Simonov; simonov@ibcgenerium.ru

Развитие злокачественных новообразований часто влечет за собой различные иммунные нарушения, в том числе клеточную иммунную дисфункцию, дефицит презентации антигена и дефекты продукции цитокинов. Поэтому восстановление функций иммунной системы представляется одним из перспективных методов терапии онкологических заболеваний. Иммуноterapia является специфическим подходом к элиминации опухолевых клеток путем регуляции активности иммунной системы пациента [1]. На сегодня все большее внимание уделяется изучению клинической эффективности не только терапии вакцинами, но и иммунотерапевтическими моноклональными антителами, специфичными к белкам контрольных точек иммунной системы (Immune checkpoint proteins): CTLA-4, PD-1 и PD-L1. Эти белки контролируют баланс специфической иммунной системы, в том числе обеспечивая защиту клеток собственного организма от гуморальных и клеточных аутоиммунных реакций [2].

Одно из ключевых звеньев системы контрольных точек представлено клеточным рецептором PD-1 (Programmed cell death protein 1) на поверхности Т-лимфоцитов и его лигандами — PD-L1 и PD-L2, в норме экспрессированными на поверхности макрофагов и дендритных клеток. Гиперэкспрессия PD-L1 опухолевыми клетками защищает их, подавляя активность Т-лимфоцитов. Соответственно, избирательное ингибирование взаимодействия PD-1/PD-L1 в микроокружении опухоли снимает эту защиту, делая опухолевые клетки уязвимыми к цитотоксическим реакциям [3, 4].

Первыми одобренными Food and Drug Administration (FDA) терапевтическими антителами, блокирующими связывание рецептора PD-1 с лигандами PD-L1/PD-L2, были ниволумаб, пембролизумаб и атезолизумаб. Эти антитела показали высокую эффективность для лечения многих видов опухолей [4, 5]. Таким образом, разработка нового эффективного терапевтического антитела, модулирующего иммунный ответ, предоставляет дополнительные возможности в лечении широкого спектра онкологических заболеваний. Молекула GNR-051, представляющая собой полностью человеческое моноклональное антитело, специфичное к PD-1, является инновационным проектом ООО «МБЦ «Генериум».

¹ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза. Утверждены Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85. Приложение № 6. Требования к валидации биоаналитических методик испытаний и анализу исследуемых биологических образцов.

Для оценки параметров фармакокинетики, которая проводится в ходе доклинических исследований эффективности и безопасности лекарственного препарата, необходимо определение концентрации препарата в крови или другом биологическом материале организма с использованием валидированной биоаналитической методики¹. Для количественного определения терапевтических антител обычно применяют иммунохимические методы, разработку которых выполняют с учетом структурных и функциональных особенностей антитела и антигена, а также свойств биологической матрицы (то есть совокупности веществ, присутствующих в биологическом образце, помимо определяемого антитела).

Цель работы — разработать и валидировать биоаналитическую методику, позволяющую без внесения дополнительных меток определить концентрацию моноклонального антитела, специфичного к PD-1 человека, в сыворотке крови биологической тест-системы в ходе проведения доклинических исследований.

Материалы и методы

Материалы

Для разработки и валидации методики использовали антиген (кат. № 1086-PD, R&D Systems, США) в виде димера внеклеточного домена рецептора PD-1 человека, ковалентно связанного с Fc-фрагментом иммуноглобулина человека. Антиген иммобилизовали на коммерчески доступные биосенсоры Dip and Read™ Protein A (Fortebio, США). GNR-051 — моноклональное полностью человеческое антитело подкласса IgG2, специфичное к PD-1 человека (является инновационным проектом ООО «МБЦ «Генериум»). Сыворотка крови, используемая в исследовании, была получена из образцов крови, отобранных у 10 здоровых яванских макаков (самцы и самки в возрасте 1,5–3 года) (Cynomolgus monkey — англ., *Macaca fascicularis* — лат.) в испытательном центре ФГБНУ «НИИ МП» (г. Сочи, Россия). Образцы сыворотки крови были однократно заморожены и хранились при температуре не выше минус 70 °С до начала проведения анализов.

Для оценки специфичности методики был использован коммерчески доступный лекарственный препарат Пропион® (раствор для подкожного введения, 60 мг/мл (Amgen Manufacturing Limited, Нидерланды), имеющий в своем составе

моноклональное человеческое антитело деносумаб подкласса IgG2, близкое по структуре к GNR-051, но специфичное к другому антигену² [6].

Методы

Метод биослойной интерферометрии. Метод определения концентрации GNR-051 основан на непосредственном интерферометрическом измерении в реальном времени кинетики специфического взаимодействия антигена PD-1, иммобилизованного на биосенсоре, с антителом GNR-051 в исследуемом образце сыворотки крови яванского макака. Испытания выполняли с использованием интерферометра Octet® QKe (ForteBio, США), определяли дозозависимую скорость увеличения специфического биослоя (нм) на рабочей поверхности сенсора. Используемый антиген содержит внеклеточный домен PD-1 человека, а GNR-051, обладая специфичностью только к PD-1, не связывается с другими белками сыворотки крови. В составе антигена также имеется С-концевая последовательность, аналогичная Fc-фрагменту IgG человека и обеспечивающая его обратимую иммобилизацию на поверхности биосенсоров, содержащих белок А. Все модельные и градуировочные образцы готовили на основе пулированной, неразведенной сыворотки крови яванского макака, содержащей антитело, специфичное к рецептору PD-1, в известных концентрациях.

На первом этапе биосенсоры инкубировали в растворе антигена, контролируя в режиме реального времени уровень его связывания с биосенсорами до уровня 2,5 нм. После насыщения биосенсоры инкубировали с модельными образцами и градуировочными растворами. Измерения для каждого градуировочного раствора осуществляли в двух повторностях. В ходе инкубации для каждого образца в реальном времени регистрировали скорость образования на рабочей поверхности биосенсора комплексов антиген–антитело как увеличение регистрируемого биослоя.

По результатам анализа градуировочных растворов (рис. 1) определяли зависимость начальной скорости образования комплексов (Y) от концентрации GNR-051 (X), выраженную нелинейной 4-параметрической логистической функцией вида по формуле (1):

$$Y = \frac{A + (Y_0 - A)(1 + 10^{(\lg EC_{50} - \lg X_0)P})}{1 + 10^{(\lg EC_{50} - \lg X_0)P}}, \quad (1)$$

где A — нижняя асимптота, Y_0 — усредненный минимальный сигнал, $\lg X_0$ — десятичный логарифм концентрации GNR-051, соответствующей значению Y_0 , $\lg EC_{50}$ — десятичный логарифм концентрации GNR-051, соответствующей 50% от максимального сигнала, P — угловой коэффициент 4-параметрической логистической функции.

На основании градуировочной функции (рис. 2) вычисляли концентрацию GNR-051 в модельных образцах. Все расчеты выполняли в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения Octet® Software, v. 10.0 (ForteBio, США).

² Denosumab. DrugBank Online. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB06643>

³ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза. Утверждены Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85. Приложение № 6. Требования к валидации биоаналитических методик испытаний и анализу исследуемых биологических образцов.

⁴ Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза. Утверждены Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85. Приложение № 6. Требования к валидации биоаналитических методик испытаний и анализу исследуемых биологических образцов.

Guideline on bioanalytical method validation (EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2). EMA; 2011.

Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services. CDER/FDA, CVM/FDA; 2018.

⁵ Универсальная мера зависимости, численно равная доле дисперсии зависимой переменной, которая объясняется рассматриваемой моделью зависимости.

Приготовление модельных и градуировочных растворов.

Семь градуировочных растворов готовили путем внесения GNR-051 в неразведенную пулированную сыворотку крови яванского макака до конечной концентрации GNR-051 1000, 333,3, 111,1, 37,0, 12,4, 4,1, 1,4 мкг/мл. Непосредственно перед анализом растворы разбавляли в 10 раз фосфатно-солевым буферным раствором (pH 7,4).

Для оценки правильности разрабатываемой методики готовили одиннадцать модельных образцов путем внесения GNR-051 (от 2 до 2500 мкг/мл) в неразведенную пулированную сыворотку крови яванского макака. Образец GNR-051 с концентрацией 2500 мкг/мл испытывали в разведениях 1:20 и 1:40, остальные образцы — в разведениях 1:10 и 1:20.

Результаты и обсуждение

Разработанная нами методика основана на специфическом взаимодействии иммобилизованного антигена и терапевтического антитела в образце сыворотки крови яванского макака. В качестве антигена использован внеклеточный домен рецептора PD-1, ковалентно связанный с Fc-фрагментом иммуноглобулина человека, что затрудняло применение классического сэндвич-ИФА, в котором для детекции используются вторичные антитела, специфичные к Fc-фрагменту терапевтического антитела. В связи с этим для детекции был использован подход на основе биослойной интерферометрии, который позволяет непосредственно регистрировать кинетику образования комплекса антитела с антигеном и не требует использования вторичных антител или внесения дополнительных меток на исследуемые белки.

Процедура валидации методики определения концентрации GNR-051 в сыворотке крови яванского макака на основе биослойной интерферометрии соответствовала требованиям и рекомендациям нормативных документов Евразийского экономического союза³, а также международных регуляторных органов (EMA, FDA)⁴, относящихся к валидации биоаналитических методов связывания лиганда (ligand-binding assay). На основании тех же требований устанавливались критерии приемлемости для валидационных характеристик: устойчивости параметров градуировочной кривой, аналитического диапазона, правильности и прецизионности между опытами и внутри опыта, линейности разведений, специфичности и селективности.

Оценку устойчивости параметров градуировочной кривой (calibration curve reliability) проводили в 6 независимых опытах (№ 1–6) с использованием 7 градуировочных растворов (раздел «Материалы и методы»), каждый из которых анализировали в двух повторностях. В каждом опыте для градуировочной функции оценивали автоматически вычисленный с помощью программного обеспечения (Octet® Software, v. 10.0) коэффициент детерминации⁵ (R^2 , должен быть не менее 0,99). Для каждого измерения градуировочных растворов проводили обратный расчет концентрации с использованием градуировочной функции, после чего вычисляли коэффициент выявления (%R) как процентное отношение установленного значения

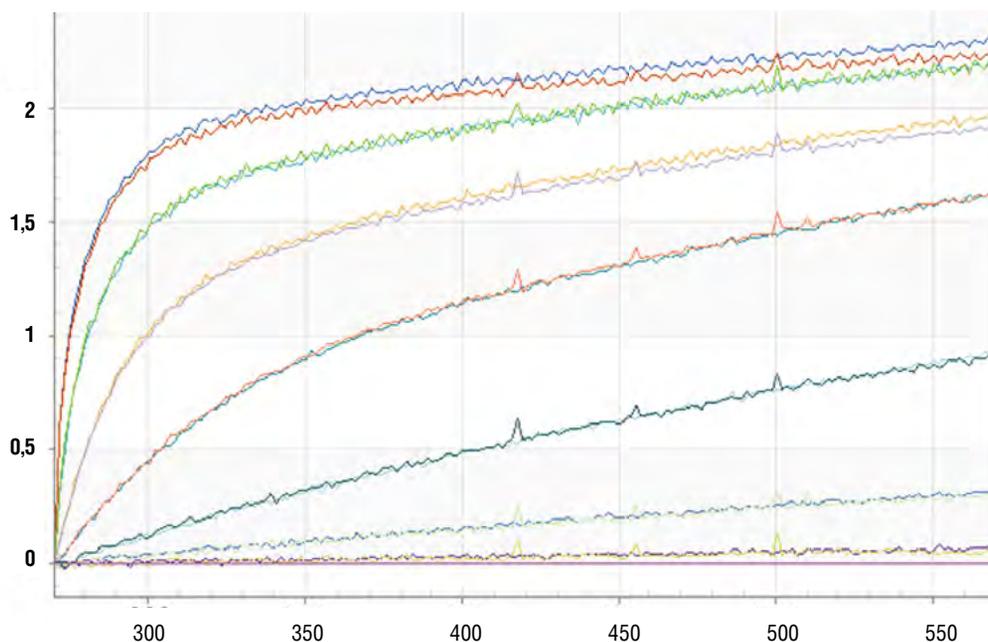


Рис. 1. Сенсограммы градуировочных растворов. По оси абсцисс — время, с; по оси ординат — толщина биосля, сформированного комплексом антиген–антитело на поверхности сенсора, нм.

Fig. 1. Sensorgrams of calibration solutions. X-axis—time, s; Y-axis—thickness of the biolayer formed by the antigen-antibody complex on the biosensor surface, nm.

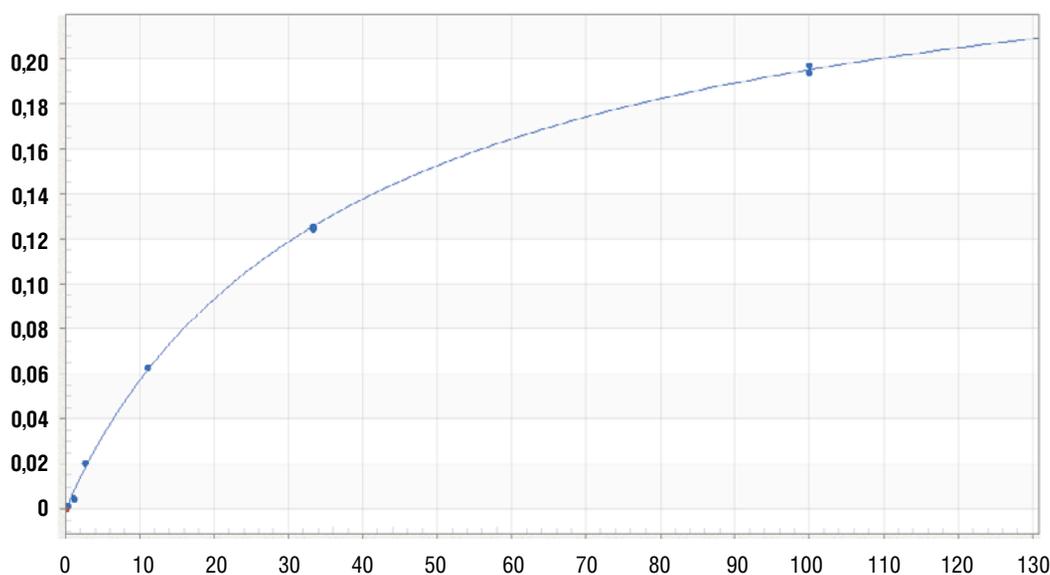


Рис. 2. График градуировочной функции. По оси абсцисс — концентрация GNR-051 в 10% пулированной сыворотке крови, мкг/мл; по оси ординат — начальная скорость формирования комплекса антиген–антитело, нм/с.

Fig. 2. Calibration function curve. X-axis—GNR-051 concentration in 10% pooled serum, µg/mL; Y-axis—initial antigen-to-antibody binding rate, nm/s.

концентрации GNR-051 («найдено») к реальному значению для данного раствора («введено»), а также коэффициент вариации (%CV) между повторностями каждого градуировочного раствора как отношение стандартного отклонения к среднему значению установленной концентрации.

Для значений %R заданы следующие критерии приемлемости: для градуировочных растворов с крайними значениями концентрации (после разведения в 10 раз 0,14 и 100 мкг/мл) — 75–125%, для остальных градуировочных растворов — 80–120%. Значение %CV между повторностями каждого градуи-

ровочного раствора должно составлять менее 20%. В каждом опыте установленные критерии должны соблюдаться, по меньшей мере, для 12 из 14 измерений (75% измерений).

Во всех опытах получены удовлетворительные результаты, что позволяет считать параметры градуировочной функции устойчивыми (табл. 1, 2). Градуировочная функция, полученная в опыте № 3 и обладающая наилучшими характеристиками (наибольшее значение R^2 и соответствие %R и %CV установленным критериям для всех 14 измерений), была использована при обработке результатов во всех последующих опытах.

Таблица 1. Результаты оценки устойчивости параметров градуировочной функции в процессе валидации методики определения концентрации антитела, специфичного к рецептору PD-1 человека

Table 1. Assessment of calibration curve reliability performed during validation of the test method for determination of antibodies specific for human PD-1 receptor

Параметры градуировочной функции Calibration function parameters	Значения параметров в опыте №... Values obtained in run No....					
	1	2	3	4	5	6
R^2	0,9977	0,9995	0,9999	0,9998	0,9998	0,9966
$\lg X_0$	-0,8626	-0,8626	-0,8626	-0,8626	-0,8626	-0,8626
Y_0	0,0070	0,0070	0,0071	0,0069	0,0072	0,0067
A	0,0063	0,0062	0,0064	0,0062	0,0068	0,0058
$\lg EC_{50}$	1,6521	1,7037	1,6846	1,7038	1,4717	1,7705
P	1,0827	1,0626	1,0547	1,0723	0,8236	1,0221

Примечание. R^2 — коэффициент детерминации; $\lg X_0$ — логарифм концентрации GNR-051, соответствующей значению Y_0 ; Y_0 — усредненный минимальный сигнал; A — нижняя асимптота; $\lg EC_{50}$ — логарифм концентрации GNR-051, соответствующей 50% от максимального сигнала; P — угловой коэффициент (соответствует тангенсу угла наклона графика функции в точке, соответствующей 50% от максимального сигнала).
Note. R^2 —determination coefficient; $\lg X_0$ —logarithm of GNR-051 concentration corresponding to Y_0 value; Y_0 —averaged minimal signal; A —lower asymptote; $\lg EC_{50}$ —logarithm of GNR-051 concentration corresponding to 50% of the maximum signal; P —slope coefficient (equal to the slope of the curve at the point corresponding to 50% of the maximum signal).

Таблица 2. Результаты статистического анализа обратного расчета концентраций антитела GNR-051 в процессе валидации методики определения концентрации антитела, специфичного к рецептору PD-1 человека

Table 2. Statistical analysis of back-calculation of GNR-051 concentration performed during validation of the test method for determination of antibodies specific for human PD-1 receptor

Калибровочный раствор Calibration solution	Интервал %R в опыте №... %R range in run No...					
	1	2	3	4	5	6
С концентрацией 0,14 и 100 мкг/мл Concentrations of 0.14 and 100 µg/mL	92,5–108,2	94,9–105,1	97,5–102,9	94,6–105,4	96,4–103,6	96,4–103,6
С концентрацией 0,41–33,3 мкг/мл Concentrations of 0.41–33.3 µg/mL	82,4–115,0	<i>91,9–127,7</i>	88,0–119,7	83,2–104,4	80,7–106,2	<i>83,8–122,9</i>
Интервал %CV %CV range						
С концентрацией 0,14 и 100 мкг/мл Concentrations of 0.14 and 100 µg/mL	7,7–9,4	3,0–9,6	2,2–3,7	1,4–7,0	0,7–4,9	1,0–9,5
С концентрацией 0,41–33,3 мкг/мл Concentrations of 0.41–33.3 µg/mL	0,0–3,2	0,6–3,4	0,5–4,0	0,0–12,9	0,0–5,7	0,9–5,2
Сколько измерений соответствуют критериям? The number of measurements that meet the criteria	14/14	12/14	14/14	14/14	14/14	12/14

Примечание. %R — коэффициент выявления, %CV — коэффициент вариации. Курсивом выделены значения, не попадающие в критерии приемлемости.

Note. %R—recovery coefficient; %CV—coefficient of variation. Values that do not fall within the acceptance criteria are italicized.

Оценку правильности между опытами (between-run accuracy) выполняли в 6 независимых опытах (№ 7–12) с использованием 11 модельных образцов (раздел «Материалы и методы»), каждый из которых испытывали в двух разведениях, по два измерения на каждое разведение. Для каждого образца вычисляли коэффициент выявления (%R) как выраженное в процентах отношение усредненного экспериментально установленного значения концентрации GNR-051 («найден») к истинному значению для данного раствора («введено») и оценивали его соответствие установленным критериям приемлемости: для образцов с концентрацией GNR-051 2500 и 2 мкг/мл — 75–125%, для остальных образцов — 80–120%. Для всех образцов результаты удовлетворяли установленным критериям, что позволяет считать правильность методики подтвержденной (табл. 3).

Оценку прецизионности между опытами (between-run precision) проводили в опытах № 7–12. Для каждого модельного образца с внесением GNR-051 в концентрациях от 2 до 2500 мкг/мл по результатам 6 опытов вычисляли коэффициент вариации (%CV) между опытами как отношение стандартного отклонения к среднему значению установленной концентрации GNR-051.

По результатам проведенных опытов значения %CV удовлетворяли установленным критериям (для модельных образцов с крайними значениями концентрации — менее 25%, для остальных — менее 20%), что позволяет считать прецизионность между опытами приемлемой (табл. 3).

Оценку линейности разведения (dilution linearity) проводили в опытах № 7–12, так как при использовании методики предполагается разведение испытуемых образцов в 10, 20 и 40 раз. Модельный образец с внесением GNR-051 в концентрации до 2500 мкг/мл испытывали в разведениях в 20 и 40 раз, что соответствует 5 и 2,5% сыворотке крови яванского макака. Остальные образцы испытывали в разведениях в 10 и 20 раз, что соответствует 10 и 5% сыворотке. В каждом опыте для каждого разведения отдельно вычисляли установленную концентрацию с учетом кратности разведения, усредненную по двум измерениям. Для каждого образца вычисляли среднее по двум разведениям значение установленной концентрации GNR-051, стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариации (%CV) между разведениями.

Полученные результаты удовлетворяли установленным критериям для %CV между разведениями (для образцов GNR-

Таблица 3. Результаты оценки правильности и прецизионности между опытами в процессе валидации методики определения концентрации антитела, специфичного к рецептору PD-1 человека
Table 3. Results of between-run accuracy and precision assessment obtained during validation of the test method for determination of antibodies specific for human PD-1 receptor

Концентрация внесенного GNR-051, мкг/мл Concentration of GNR-051 used as a spike, µg/mL	Номер опыта Run	Установленное значение концентрации GNR-051, мкг/мл Measured GNR-051 concentration, µg/mL	Среднее значение установленной концентрации по опытам, мкг/мл Mean GNR-051 concentration for the runs, µg/mL	%R	SD	%CV
2500	7	2142,2	2203,3	88,1	87,5	4,0
	8	2245,8				
	9	2319,5				
	10	2251,6				
	11	2179,3				
	12	2075,6				
1000	7	1004,5	1008,6	100,9	13,5	1,3
	8	1001,7				
	9	988,7				
	10	1017,4				
	11	1011,8				
	12	1027,5				
500	7	520,0	520,9	104,2	11,5	2,2
	8	513,7				
	9	542,3				
	10	508,5				
	11	521,0				
	12	519,9				
250	7	251,9	260,7	104,3	6,2	2,4
	8	256,7				
	9	268,9				
	10	258				
	11	264,5				
	12	264,1				
125	7	125,7	128,7	103,0	1,8	1,4
	8	128,5				
	9	130,3				
	10	129,7				
	11	127,6				
	12	130,2				
62,5	7	62,2	62,5	100,0	1,9	3,0
	8	62,0				
	9	63,6				
	10	62,3				
	11	65,3				
	12	59,6				
31,3	7	30,9	30,6	97,8	1,7	5,6
	8	30,4				
	9	32,1				
	10	30				
	11	32,5				
	12	27,7				

Продолжение таблицы 3
Table 3 (continued)

Концентрация внесенного GNR-051, мкг/мл Concentration of GNR-051 used as a spike, µg/mL	Номер опыта Run	Установленное значение концентрации GNR-051, мкг/мл Measured GNR-051 concentration, µg/mL	Среднее значение установленной концентрации по опытам, мкг/мл Mean GNR-051 concentration for the runs, µg/mL	%R	SD	%CV
15,6	7	14	13,8	88,5	1,1	7,8
	8	13,4				
	9	14,1				
	10	13,3				
	11	15,6				
	12	12,4				
7,8	7	6,6	6,6	84,6	0,6	8,8
	8	6,3				
	9	6,5				
	10	6,3				
	11	7,8				
	12	6,3				
3,9	7	3,1	3,3	84,6	0,3	8,8
	8	3,9				
	9	3,2				
	10	3,2				
	11	3,2				
	12	3,3				
2,0	7	2,2	1,9	95,0	0,2	13,0
	8	2,1				
	9	2,0				
	10	1,9				
	11	1,8				
	12	1,5				

Примечание. %R — коэффициент выявления, SD — стандартное отклонение, %CV — коэффициент вариации.
Note. %R—recovery coefficient, SD—standard deviation, %CV—coefficient of variation.

051 с крайними значениями концентрации — менее 25%, для остальных — менее 20%), что позволяет считать линейность разведения приемлемой при разведении образцов в 10–40 раз (табл. 4).

Оценку правильности и прецизионности внутри опыта (*within-run accuracy and precision*) проводили в опыте № 13. Готовили 7 модельных образцов с внесением GNR-051 в концентрации от 7,8 до 500 мкг/мл по той же схеме, что и в опытах № 7–12, однако каждый образец испытывали в 4 независимых повторностях. Каждая повторность включала анализ в двух разведениях (в 10 и 20 раз), по 2 измерения на каждое разведение. В каждой повторности результат усредняли по разведениям и измерениям. Для каждого образца GNR-051 вычисляли среднее по повторностям значение концентрации, стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариации (%CV) между повторностями, а также коэффициент выявления (%R). Результаты удовлетворяли установленным критериям для %CV между повторностями (должен быть менее 20%) и для %R (не должен выходить за пределы 80–120%), что позволяет считать правильность и прецизионность внутри опыта приемлемыми (табл. 5).

Специфичность (*specificity*) методики как способность аналитической методики различать аналит и родственные ему соединения исследовали в опыте № 14. Для этого готовили и ис-

пытывали модельные образцы с внесением препарата Пролиа® до концентрации 62,5–500 мкг/мл, аналогично образцам из опытов № 7–12. Этот препарат содержит полностью человеческое моноклональное антитело деносуаба, схожее по структуре с GNR-051, но отличающееся по биологической активности и специфическим участкам аминокислотной последовательности⁶ [6].

В результате анализа во всех образцах, независимо от концентрации деносуаба, получили значение концентрации GNR-051 ниже предела обнаружения (данные не представлены). Результаты, полученные в опыте № 14, а именно — отсутствие значимого сигнала (достоверно превышающего фоновое значение) в образцах, содержащих вещество, структурно родственное GNR-051, свидетельствует о специфичности валидируемой методики.

Селективность (*selectivity*) методики как способность определять аналит с достаточной точностью в присутствии компонентов матрицы биологического образца оценивали в опыте № 15. Для этого готовили и испытывали модельные образцы на основе индивидуальной сыворотки крови яванского макака, взятые от 10 здоровых животных (№ 1–10 — источник биологической матрицы, табл. 6), к каждому из которых добавляли GNR-051 в концентрациях 15,6 и 125 мкг/мл. Для каждого уровня концентрации «внесенного» GNR-051 вычисляли среднее

⁶ Denosumab. DrugBank Online. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB06643>

Таблица 4. Результаты оценки линейности разведений в процессе валидации методики определения концентрации антитела, специфичного к рецептору PD-1 человека

Table 4. Results of dilution linearity assessment obtained during validation of the test method for determination of antibodies specific for human PD-1 receptor

Концентрация внесенного GNR-051, мкг/мл Concentration of GNR-051 used as a spike, µg/mL	Номер опыта Run	Установленное значение концентрации GNR-051, мкг/мл при разведении... GNR-051 concentration, µg/mL, at dilution...			Среднее по разведениям установленное значение концентрации GNR-051, мкг/мл Mean GNR-051 concentration for the dilutions, µg/mL	SD	%CV
		1:10	1:20	1:40			
2500	7	–	2137,0	2147,4	2142,2	7,35	0,3
	8	–	2151,0	2340,7	2245,8	63,14	6,3
	9	–	2294,1	2344,6	2319,5	35,57	1,5
	10	–	2076,5	2426,7	2251,6	247,63	11,0
	11	–	2129,8	2228,8	2179,3	70,00	3,2
	12	–	2130,0	2021,3	2075,6	76,86	3,7
1000	7	981,5	1027,4	–	1004,5	32,46	3,2
	8	957,1	1046,4	–	1001,7	63,14	6,3
	9	1018,5	959,0	–	988,7	42,07	4,3
	10	979,4	1055,5	–	1017,4	53,81	5,3
	11	999,9	1023,7	–	1011,8	16,83	1,7
	12	1054,5	1000,6	–	519,9	21,64	4,2
500	7	514,6	525,4	–	520,0	7,64	1,5
	8	490,8	536,7	–	513,7	32,46	6,3
	9	533,4	551,1	–	542,3	12,52	2,3
	10	477,8	539,3	–	508,5	43,49	8,6
	11	521,6	520,5	–	521,0	0,78	0,1
	12	504,6	535,2	–	519,9	21,64	4,2
250	7	241,9	262,0	–	251,9	14,21	5,6
	8	245,8	267,5	–	256,7	15,34	6,0
	9	268,6	269,2	–	268,9	0,42	0,2
	10	251,8	264,2	–	258,0	8,77	3,4
	11	266,5	262,4	–	264,5	2,90	1,1
	12	256,6	271,7	–	264,1	10,68	4,0
125	7	124,5	127,0	–	127,7	1,77	1,4
	8	127,6	129,4	–	128,5	1,27	1,0
	9	130,0	130,7	–	130,3	0,49	0,4
	10	130,3	128,7	–	129,7	1,41	1,1
	11	126,0	129,3	–	127,6	2,33	1,8
	12	133,4	127,0	–	130,2	4,53	3,5
62,5	7	63,4	60,9	–	62,2	1,77	2,8
	8	64,5	59,5	–	62,0	3,54	5,7
	9	65,6	61,7	–	63,6	2,76	4,3
	10	64,9	59,8	–	62,3	3,61	5,8
	11	65,0	65,7	–	65,3	0,49	0,8
	12	63,7	55,5	–	59,6	5,80	9,7
31,3	7	30,9	31,0	–	30,9	0,07	0,2
	8	30,8	30,0	–	30,4	0,57	1,9
	9	31,2	32,9	–	32,1	1,20	3,7
	10	30,4	29,7	–	30,0	0,49	1,6
	11	32,9	32,2	–	32,5	0,49	1,5
	12	28,4	27,0	–	27,7	0,99	3,6
15,6	7	14,9	13,2	–	14	1,20	8,6
	8	14,2	12,5	–	13,4	1,20	9,0
	9	15,2	12,9	–	14,1	1,63	11,5
	10	14,2	12,4	–	13,3	1,27	9,6
	11	15,5	15,8	–	15,6	0,21	1,4
	12	13,1	11,6	–	12,4	1,06	8,6

Продолжение таблицы 4
Table 4 (continued)

Концентрация внесенного GNR-051, мкг/мл Concentration of GNR-051 used as a spike, µg/mL	Номер опыта Run	Установленное значение концентрации GNR-051, мкг/мл при разведении... GNR-051 concentration, µg/mL, at dilution...			Среднее по разведениям установленное значение концентрации GNR-051, мкг/мл Mean GNR-051 concentration for the dilutions, µg/mL	SD	%CV
		1:10	1:20	1:40			
7,8	7	6,5	6,8	–	6,6	0,21	3,2
	8	6,2	6,4	–	6,3	0,14	2,2
	9	6,5	6,5	–	6,5	0,00	0,0
	10	6,1	6,5	–	6,3	0,28	4,5
	11	7,9	7,7	–	7,8	0,14	1,8
	12	6,1	6,5	–	6,3	0,28	4,5
3,9	7	3	3,2	–	3,1	0,14	4,6
	8	3,9	3,8	–	3,9	0,07	1,8
	9	3,1	3,3	–	3,2	0,14	4,4
	10	3,2	3,3	–	3,2	0,07	2,2
	11	3,1	3,2	–	3,2	0,07	2,2
	12	3,2	3,4	–	3,3	0,14	4,3
2,0	7	1,9	2,4	–	2,2	0,35	16,1
	8	2,0	2,1	–	2,1	0,07	3,4
	9	2,1	2,0	–	2,0	0,07	3,5
	10	2,0	1,9	–	1,9	0,07	3,7
	11	1,9	1,8	–	1,8	0,07	3,9
	12	1,7	1,4	–	1,5	0,21	14,1

Примечание. SD — стандартное отклонение, %CV — коэффициент вариации.

«—» измерение не было проведено.

Note. SD—standard deviation, %CV—coefficient of variation.

– not measured.

Таблица 5. Результаты оценки правильности и прецизионности внутри опыта в процессе валидации методики определения концентрации антитела, специфичного к рецептору PD-1 человека

Table 5. Results of within-run accuracy and precision assessment obtained during validation of the test method for determination of antibodies specific for human PD-1 receptor

Концентрация внесенного GNR-051, мкг/мл Concentration of GNR-051 used as a spike, µg/mL	Установленное значение концентрации GNR-051 в повторности, мкг/мл GNR-051 concentration, µg/mL, measured in replicate				Среднее по повторностям установленное значение концентрации GNR-051, мкг/мл Mean GNR-051 concentration for the replicates, µg/mL	%CV	%R
	1	2	3	4			
500	487,9	513,6	510,4	480,6	498,1	3,3	99,6
250	242,1	240,8	249,5	241,3	243,4	1,7	97,4
125	118,3	119,9	123,6	123,6	121,4	2,2	97,1
62,5	57,2	58,2	60,6	62,6	59,7	4,1	95,4
31,3	27,3	29,2	29,8	30,7	29,3	4,9	93,5
15,6	14,2	13,4	13,9	14,9	14,1	4,4	90,4
7,8	6,19	6,16	6,83	6,94	6,5	6,3	83,7

Примечание. %CV — коэффициент вариации, %R — коэффициент выявления.

Note. %CV—coefficient of variation, %R—recovery coefficient.

«найденное» значение по образцам, стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариации (%CV) между образцами; для каждого образца вычисляли коэффициент выявления (%R).

Полученные результаты соответствуют установленным критериям (%CV между образцами для каждого уровня концентрации должен быть менее 25%, %R должен находиться в диапазоне 75–125% не менее чем для 8 образцов на каждом уровне концентрации), что позволяет считать методику селективной, а эффект матрицы — приемлемым (табл. 6).

Заключение

Проведенная валидация методики определения концентрации антитела человека, блокирующего связывание PD-1

с лигандами в сыворотке крови яванского макака, методом биослойной интерферометрии, включающая оценку ключевых валидационных характеристик, подтверждает ее пригодность для получения достоверных и воспроизводимых результатов определения концентрации GNR-051 в диапазоне 2–2500 мкг/мл.

Подтверждена устойчивость параметров градуировочной кривой (во всех опытах R^2 не ниже 0,996; при обратном расчете концентрации %R находился в допустимом интервале 80–125% для 12 или более измерений из 14; %CV не превысил 12,9%).

Подтверждены правильность и прецизионность между опытами (%R в диапазоне 84,6–104,3%, %CV не превысил 13,0%) и внутри опыта (%R в диапазоне 83,7–99,6%, %CV не превысил 6,3%).

Таблица 6. Результаты оценки селективности методики определения концентрации антитела, специфичного к рецептору PD-1 человека

Table 6. The results of evaluating the selectivity of the test method for determination of antibodies specific for human PD-1 receptor

Источник биологической матрицы Source of biological matrix	Модельный образец с внесенной концентрацией GNR-051 15,6 мкг/мл Model sample spiked with 15.6 µg/mL GNR-051		Модельный образец с внесенной концентрацией GNR-051 125 мкг/мл Model sample spiked with 125 µg/mL GNR-051	
	установленное значение концентрации GNR-051, мкг/мл measured GNR-051 concentration, µg/mL	%R	установленное значение концентрации GNR-051, мкг/мл measured GNR-051 concentration, µg/mL	%R
1	15,9	101,9	130,6	104,5
2	16,4	105,1	128,2	102,6
3	16,9	108,3	128,6	102,9
4	16,0	102,6	132,7	106,2
5	16,1	103,2	133,5	106,8
6	16,3	104,5	133,0	106,4
7	16,6	106,4	135,8	108,6
8	15,8	101,3	132,4	105,9
9	15,6	100,0	133,1	106,5
10	16,5	105,8	126,5	101,2
Среднее установленное значение концентрации GNR-051, мкг/мл Mean GNR-051 concentration, µg/mL	16,2	103,9	131,4	105,2
SD	0,40	—	2,88	—
%CV	2,48	—	2,19	—

Примечание. %R — коэффициент выявления, SD — стандартное отклонение, %CV — коэффициент вариации. «—» неприменимо.

Note. %R—recovery coefficient, SD—standard deviation, %CV—coefficient of variation. — not applicable.

Линейность разведений была показана во всем диапазоне использованных концентраций (%CV между разведениями не превысил 16,1%).

Показана специфичность (в отношении структурно-родственного антитела с другой специфичностью) и селективность разработанной методики в отношении компонентов матрицы биологических образцов (%CV между индивидуальными матрицами не превышало 2,5%).

Вклад авторов. **К. В. Ульянова** — выполнение экспериментальных работ (приготовление модельных и градуировочных образцов и растворов, проведение интерферометрических измерений), интерпретация результатов исследования (оценка правильности, прецизионности, линейности разведения, специфичности и селективности), подготовка рукописи; **А. А. Казаров** — статистическая обработка данных (оценка устойчивости параметров градуировочной кривой, вычисление значений среднего арифметического, коэффициента выявления, стандартного отклонения и коэффициента вариации на всех этапах валидации метода), доработка рукописи; **М. С. Пантюшенко** — выполнение экспериментальных работ (приготовление модельных и градуировочных образцов и растворов, проведение интерферометрических измерений), доработка рукописи; **А. А. Оленев** — выполнение экспериментальных работ (приготовление модельных и градуировочных образцов и растворов, проведение интерферометрических измерений), интерпретация результатов исследования (оценка правильности, прецизионности, линейности разведения, специфичности и селективности), доработка рукописи; **И. В. Лягоскин** — написание текста и критический пересмотр его содержания; **В. М. Симонов** — идея, планирование исследования, интерпретация результатов исследования (оценка устойчивости параметров градуировочной кривой, правильности, прецизионности, линейности разведения, специфичности и селективности), подготовка рукописи.

ровочной кривой, правильности, прецизионности, линейности разведения, специфичности и селективности), подготовка рукописи.

Authors' contributions. **Kseniya V. Ulyanova**—experimental work (preparation of model and calibration samples and solutions, carrying out interferometric measurements), interpretation of the study results (assessment of accuracy, precision, dilution linearity, specificity, and selectivity), writing of the paper; **Aleksandr A. Kazarov**—statistical processing of data (assessment of calibration curve reliability, calculation of mean values, recovery coefficients, standard deviations, and coefficients of variation at all stages of the method validation), revision of the paper; **Marina S. Pantyushenko**—experimental work (preparation of model and calibration samples and solutions, carrying out interferometric measurements), revision of the paper; **Aleksandr A. Olenev**—experimental work (preparation of model and calibration samples and solutions, carrying out interferometric measurements), interpretation of the study results (assessment of accuracy, precision, dilution linearity, specificity, and selectivity), revision of the paper; **Ivan V. Lyagoskin**—writing and revising of the text; **Vladimir M. Simonov**—elaboration of the study idea, planning the study, interpretation of the study results (assessment of calibration curve reliability, accuracy, precision, dilution linearity, specificity, and selectivity), writing of the paper.

Благодарности. Авторы выражают благодарность коллективу ООО «МБЦ «Генериум» за предоставление материалов для проведения экспериментов.

Acknowledgements. The authors are grateful to all employees of IBC "Generium" for providing materials for the experiments.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

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

Литература/References

1. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252–64. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>
2. Wu Y, Chen W, Xu ZP, Gu W. PD-L1 distribution and perspective for cancer immunotherapy — blockade, knockdown, or inhibition. *Front Immunol*. 2019;10:2022. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02022>
3. Deng R, Bumbaca D, Pastuskovas CV, Boswell CA, West D, Cowan KJ, et al. Preclinical pharmacokinetics, pharmacodynamics, tissue distribution, and tumor penetration of anti-PD-L1 monoclonal antibody, an immune checkpoint inhibitor. *MAbs*. 2016; 8(3):593–603. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1136043>
4. Xiaomo Wu, Zhongkai Gu, Yang Chen, Borui Chen, Wei Chen, Liqiang Weng, Xiaolong Liu. Application of PD-1 blockade in cancer immunotherapy. *Comput Struct Biotechnol J*. 2019;17:661–74. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.03.006>
5. Лепик КВ. Ингибиторы иммунных контрольных точек в терапии лимфом. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика*. 2018;11(4):303–12. [Lepik KV. Immune checkpoint inhibitors in the treatment of lymphomas. *Klinicheskaya onkologematologiya. Fundamental'nyye issledovaniya i klinicheskaya praktika = Clinical Oncohematology. Basic Research and Clinical Practice*. 2018;11(4):303–12 (In Russ.)]
6. Rizzoli R, Yasothan U, Kirkpatrick P. Denosumab. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(8):591–2. <https://doi.org/10.1038/nrd3244>

Об авторах / Authors

Ульянова Ксения Владимировна. *Kseniya V. Ulyanova.* ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3793-7978>

Казаров Александр Александрович. *Aleksandr A. Kazarov.* ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0682-6113>

Пантюшенко Марина Семеновна, канд. биол. наук. *Marina S. Pantyushenko,* Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2766-2560>

Оленев Александр Андреевич. *Aleksandr A. Olenev.* ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2926-0952>

Лягоскин Иван Владимирович, канд. биол. наук. *Ivan V. Lyagoskin,* Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9058-1106>

Симонов Владимир Михайлович. *Vladimir M. Simonov.* ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0879-5595>

Поступила 18.08.2020

После доработки 16.10.2020

Принята к публикации 04.12.2020

Received 18 August 2020

Revised 16 October 2020

Accepted 4 December 2020