

УДК 604.2; 571.27; 615.076.7

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКОВ КЛЕТОК ХОЗЯИНА (СНО) МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА В БЕЛКЕ АДАЛИМУМАБ

П.М. Исайкина^{1*}, В.П. Долгова², А.Д. Аскретков¹, Н.В. Орлова^{2**}

Резюме. Наличие белков клеток хозяина (HCP) из СНО-клеток в конечном продукте чревато рядом негативных последствий, в связи с этим для получения продукта надлежащего качества необходимо обеспечивать тщательную очистку целевых белков от HCP. Таким образом, при разработке технологии получения готового белкового продукта стоит задача по снижению загрязнения HCP до минимальных уровней. Проведено сравнение наборов иммуноферментного анализа 2-го и 3-го поколения Cygnus technologies для количественной оценки белков клеток хозяина (СНО) в субстанции моноклонального антитела – адалимумаб. В ходе исследования было выяснено, что набор 2-го поколения не показывает истинный уровень белков клеток хозяина, занижая результат. В связи с этим возникает необходимость подтвердить валидность метода определения содержания белков клеток хозяина (СНО) набором 3-го поколения в субстанции адалимумаба по следующим аналитическим характеристикам: тест пригодности системы, специфичность, предел обнаружения, нижний предел измерения, верхний предел измерения, правильность, повторяемость, воспроизводимость, надежность.

Ключевые слова: адалимумаб, моноклональные антитела, иммуноферментный анализ (ELISA), белки клеток хозяина (СНО), валидация¹.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF OF HOST CELL PROTEINS (CHO) BY THE METHOD OF ENZYME IMMUNOASSAY IN THE PROTEIN ADALIMUMAB

P.M. Isaykina^{1*}, V.P. Dolgova², A.D. Ascretcov¹, N.S. Orlova^{2**}

Abstract. is necessary to ensure thorough purification of the target proteins, since the presence of host cell proteins (HCP) from CHO cells in the final product is fraught with a number of negative consequences. Thus, it is has to reduce the contamination of HCP to minimum levels. A comparison of the immunoenzymatic assays of the second and third generations of Cygnus technologies for the quantification of host cell proteins (CHO) in a monoclonal antibody adalimumab was done. It was found that a kit of the 2nd generation does not show the true level of the host cell proteins, underestimating the result. In this connection, it becomes necessary to confirm the validity of the method for determining the total quantity of host cell proteins (CHO) by a set of 3rd generation in adalimumab substance according to the following analytical characteristics: system suitability test, specificity, limit of detection, limit of quantitation, hook capacity, precision.

Keywords: adalimumab, monoclonal antibodies, enzyme immunoassay, host cell proteins (CHO), ELISA, validation.

1 – ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (Институт тонких химических технологий), 119571, Россия, г. Москва, проспект Вернадского, д. 86

2 ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» («ГосНИИгенетика»), 117545, Россия, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1

1 – Moscow Technological University (Institute of fine chemical technologies), 86/3, Vernadsky av., Moscow, 119571, Russia

2 – Scientific Center of Russian Federation Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, 1, 1st Dorozhnyi proezd, Moscow, 117545, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: isaykina94@yandex.ru

Тел.: +7 (495) 246 05 55, добавочный 8-01

** адресат для переписки:

E-mail: orlova.chemist@gmail.com

Тел.: +7 (495) 315 37 47

ВВЕДЕНИЕ

Адалимумаб представляет собой рекомбинантное моноклональное антитело, полученное путем экспрессии в клетках яичника китайского хомячка, причем пептидная последовательность

данного белка идентична иммуноглобулину G1 человека. Адалимумаб селективно связывается с фактором некроза опухоли (ФНО α) и нейтрализует его биологические функции за счет блокады взаимодействия с поверхностными клеточными рецепторами к ФНО α [1].

¹Список сокращений: ИФА (ELISA) – иммуноферментный анализ; СНО (Chinese hamster ovary) – клетки яичников китайского хомячка; RSD (Relative standard deviation) – относительное стандартное отклонение; ppm (parts per million) – частей на миллион, единица измерения концентрации (в нашем случае: 1 ppm = 1 нг/мл); FDA (Food and Drug Administration) – агентство министерства здравоохранения и социальных служб США, один из федеральных исполнительных департаментов; HCP (Host cell proteins) – белки клеток хозяина; АДМБ – адалимумаб.

Получение белка включает очистку белка из культуральной жидкости, содержащей много других белков, включая белки клеток хозяина, липиды и остатки клеток. Из-за наличия большого количества альбумина НСР имеют сходство с иммуноглобулином как по заряду, так и по свойствам [2]. Для очистки такого рода белков применяют аффинную хроматографию, основанную на взаимодействии антиген – антитело. В качестве сорбента зачастую используют сефарозную матрицу с пришитым к ней ковалентной связью белком А, так как иммуноглобулины G имеют высокое сродство к белку А [3]. Но часто НСР захватываются вместе с целевыми белками. Это обусловлено различными взаимодействиями моноклональных антител с белками клеток хозяина, а также сходством свойств целевого белка и некоторых видов НСР [4]. Хотя уровень белков клеток хозяина в лекарственных средствах не регламентирован ни одной из фармакопей, FDA рекомендует снизить их уровень от 1 до 100 ppm [5]. Многие биотехнологические компании используют этот диапазон в качестве ориентира для разработки процесса и спецификаций. Важно обеспечить адекватный мониторинг белков клеток хозяина на всех этапах очистки, а также при поиске оптимально методики очистки. Так как НСР индуцируют иммунные ответы у пациентов, влияют на эффективность связывания моноклональных антител путем блокирования эпитопного сайта антитела [6], кроме того, могут потенциально влиять на качество и стабильность продукта путем образования нежелательных вариантов продукта из-за ферментативной активности отдельных видов НСР, таких как протеаза и дисульфидредуктазы [7]. Точное измерение НСР имеет решающее значение для оценки качества продукта, определения технических характеристик продукта и для разработки или модификации производственного процесса. Поэтому на всех этапах очистки необходимо контролировать эффективность очистки моноклонального антитела от белков клеток хозяина.

Сложность измерения уровня белков клеток хозяина заключается в (1) низких уровнях остаточных НСР, которые находятся совместно с большим избытком белка-продукта; (2) НСР представлены в виде различных видов и анализ должен измерять все эти виды; (3) популяция видов НСР может изменяться во время процесса. В настоящее время существует ограниченное число аналитических методов для выявления, идентификации и количественного определения НСР. Целесообразно выбрать правильную технологию контроля для конкретного биопроцесса, также важно понимать преимущества и ограничения каждого метода, чтобы можно было разработать оптимальную стратегию для конкретного биопроцесса. Для мониторинга уровня НСР часто используют методы ИФА (ELISA) и вестерн-блоттинг. Также для разделения и визуализации используют электрофорез в полиакриламидном геле с различными способами окрашивания. Чувствительность электрофореза в полиакриламидном ге-

ле зависит от способа окраски [8]. Например, чувствительность кумасси синего находится в диапазоне 0,05–0,1 мг/полосу, тогда как окрашивание серебром и Сипро рубиновым могут иметь чувствительность 1–5 нг/полосу. Однако чувствительность окрашивания серебром зависит от сульфгидрильной и карбоксильной групп в белке, за счет этого серебро теряет свою чувствительность. С помощью Сипро оранжевого и рубинового можно определить белки клеток хозяина до пикограммов благодаря флуоресценции. Одним из главных недостатков всех методов окрашивания является отсутствие специфичности, то есть присутствие рекомбинантного белка в избытке может закрывать некоторые полосы НСР, находящиеся в меньшинстве. Также методы окраски требуют определенного уровня отношения сигнала к шуму, а огромный избыток основной полосы и ее деградированных форм может затруднить идентификации меньших объектов, таких как НСР, присутствующие в следовых количествах.

Вестерн-блоттинг является методом, в котором электрофоретически разделенные белки в геле переносят на мембрану с помощью электрического заряда, после чего белки могут быть детектированы с помощью меченых специфических антител. Этот метод является чувствительным и специфичным. Образцы, содержащие интересующий белок, сначала разделяются либо одномерными, либо двумерными гелями и переносятся на поливинилиденфторидную или нитроцеллюлозную мембрану. Мембрану сначала блокируют бычьим сывороточным альбумином или другими белками, которые будут занимать сайты связывания белка на мембране, первичные антитела, выращенные против НСР, инкубируются с мембраной и образуют комплексы с НСР на мембране. Комплекс НСР-антител может быть обнаружен либо путем непосредственной маркировки первичного антитела с помощью фермента, такого как пероксидаза хрена (HRP), или косвенно мечеными вторичными антителами, которые специфически распознают первичные [9]. Тем не менее следует отметить, что IgG, полученные из CHO или NS0, и НСР очень гомологичны. В связи с этим трудно устранить перекрестную реакцию вторичного антитела к человеческим IgG, делающую вестерн-блот нечувствительным и неспецифическим, поэтому вестерн-блоттинг является скорее качественным методом. Таким образом, данному методу не хватает специфичности и чувствительности для обнаружения белков клеток хозяина, к тому же он не позволяет точно количественно оценить содержание белков [10].

В настоящий момент метод иммуноферментного анализа ELISA повсеместно используется для количественной оценки НСР. Также следует отметить, что чувствительность ИФА 100-кратно превышает вестерн-блоттинг, поэтому НСР обычно количественно определяют с использованием иммунологических анализов, таких как последовательный двухсайтный иммуноферментный анализ (ELISA). Тем не менее разработка и проверка этих анализов представляют не-

которую сложность в основном из-за большого разнообразия возможных НСР в продуктах [11]. В данном анализе обычно используют поликлональные антитела, полученные иммунизацией животных типичными антигенами НСР. Эти антигены обычно собирают из культуральной жидкости и затем выращивают в таких же условиях, как и при получении целевого белка [12–14]. Поэтому часто используют коммерческие наборы для количественной оценки белков клеток хозяина с целью увеличения воспроизводимости метода, причем использование таких наборов делает метод менее времязатратным [15]. Однако в различных наборах антитела к белкам клеток хозяина СНО получают разными путями, например в наборе Cygnus #CM015 их получают из клеточного лизата, тогда как в наборе от того же производителя с каталожным номером #F550 антитела выделяют из кондиционированной культуральной жидкости. Это обуславливает видовое различие получаемых антител к белкам клеток хозяина в разных наборах. Поэтому под каждый продукт следует подбирать определенный набор и соответственно требуется валидация выбранного набора под конкретный целевой белок [16].

В связи с этим была поставлена задача протестировать коммерческие наборы для определения белков клеток хозяина для того, чтобы обеспечить достоверные результаты и сделать анализ менее времязатратным.

Цель работы заключается в оценке наборов разных поколений для количественной оценки содержания белков клеток хозяина в белке адалимумаб и последующей валидации процесса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Коммерческие наборы ELISA: Cygnus CHO НСР ELISA с каталожными номерами #CM015 и #F550.

Обрудование:

1. Планшетный спектрофотометр Tecan Infiniti 2000 Pro (Австрия).
2. Встряхиватель IKA Lab dancer (Германия).
3. Шейкер-инкубатор ELMi Sky Line ST-3L (Латвия).
4. Дозатор 8-канальный Eppendorf Research.
5. Дозаторы 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл, 5 мл Eppendorf Research.

Приготовление растворов

Образец субстанции адалимумаба разводили водой до концентрации 1; 0,5; 0,4; 0,25 мг/мл. Оригинальный препарат адалимумаба «Хумира» («Веттер Фар-



Встряхиватель IKA Lab dancer (Германия)

ма-Фертигунг ГмбХ и Ко.КГ», Германия, номер серии 50064XD02, срок годности 02.2017) доводили водой до концентрации 0,4 мг/мл.

Затем готовили спайк-образцы:

- 1) 520 мкл стандартного калибровочного образца 100 нг/мл + 120 мкл образца субстанции АДМБ с концентрацией 1 мг/мл;
- 2) 520 мкл стандартного калибровочного образца 100 нг/мл + 120 мкл образца «Хумиры» с концентрацией 1 мг/мл;
- 3) 520 мкл стандартного калибровочного образца 40 нг/мл + 120 мкл образца субстанции АДМБ с концентрацией 1 мг/мл;
- 4) 520 мкл стандартного калибровочного образца 40 нг/мл + 120 мкл образца «Хумиры» с концентрацией 1 мг/мл¹.

В наборе Cygnus #CM015 стандартные образцы представлены белками клеток хозяина СНО, полученными из культуральной жидкости с консервацией, в концентрациях: 0; 0,7; 2; 8; 25; 75; 200 нг/мл. В наборе Cygnus #F550 стандартные образцы: 0; 1; 3; 12; 40 и 100 нг/мл.

Буфер для отмывки [Wash Concentrate (20 X), #F004] разводили в 20 раз.

Принцип метода и проведение анализа

Образцы, содержащие белки СНО, реагируют с иммобилизованными антителами, которыми покрыты лунки в плашке. После промывки фермент пероксидазы хрена, меченной антителами к антиСНО, реагирует с последовательным формированием сэндвич-комплекса «антитело на твердой фазе – белок СНО – фермент, меченный антителом». Затем плашка с лунками промывается для удаления всех непрореагировавших компонентов. Далее добавляется субстрат тетраметилбензидин (ТМБ), который вступает в реакцию. Ко-

¹Для коммерческого набора Cygnus #CM015 спайк-образцы готовятся предварительным разбавлением водой стандартного образца 200 нг/мл до 100 нг/мл.

личество гидролизованного субстрата считывается на микропланшетном ридере и прямо пропорционально присутствующему в смеси количеству белков CHO.

Перед началом процедуры необходимо выдержать все реагенты при комнатной температуре в течение 15–30 мин.

Процедура на наборе Cugnus #F550:

Для каждого анализируемого образца необходимы две лунки. В каждую лунку планшета добавляли по 100 мкл конъюгата (Anti-CHO: HPR Conjugate, #F551). В лунку планшета добавляли по 50 мкл стандартов (CHO HCP Standards, #F553) и образцов согласно следующей схеме:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ст. 100 нг/мл	Ст. 100 нг/мл	Адалимуаб 0,25 нг/мл	Адалимуаб 0,25 нг/мл	*	*	*	*	*	*	*	*
B	Ст. 40 нг/мл	Ст. 40 нг/мл	«Хумира» 0,4 нг/мл	«Хумира» 0,4 нг/мл	*	*	*	*	*	*	*	*
C	Ст. 12 нг/мл	Ст. 12 нг/мл	Адалимуаб 0,4 нг/мл	Адалимуаб 0,4 нг/мл	*	*	*	*	*	*	*	*
D	Ст. 3 нг/мл	Ст. 3 нг/мл	Спайк-образец 1	Спайк-образец 1	*	*	*	*	*	*	*	*
E	Ст. 1 нг/мл	Ст. 1 нг/мл	Спайк-образец 2	Спайк-образец 2	*	*	*	*	*	*	*	*
F	Ст. 0 нг/мл	Ст. 0 нг/мл	Спайк-образец 3	Спайк-образец 3	*	*	*	*	*	*	*	*
G	Адалимуаб 1 нг/мл	Адалимуаб 1 нг/мл	Спайк-образец 4	Спайк-образец 4	*	*	*	*	*	*	*	*
H	Адалимуаб 0,5 нг/мл	Адалимуаб 0,5 нг/мл	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Инкубировали планшет на инкубаторе-шейкере в течение 120 мин со скоростью перемешивания 400 об/мин при температуре $+24\pm 4$ °С. Разводили концентрированный буфер для отмывки [Wash Concentrate (20 X), #F004] в 20 раз. Выливали все содержимое из планшета. В каждую лунку планшета добавляли 8-канальным дозатором по 300 мкл разведенного буфера для отмывки. Снова выливали все содержимое из планшета. Буфер не должен находиться в лунках дольше нескольких секунд. Повторяли промывку буфером еще 4 раза. В каждую лунку планшета 8-канальным дозатором добавляли по 100 мкл раствора субстрата (TMB Substrate, #F005). Недопустимо пересыхание лунок перед внесением субстрата. Затем инкубировали планшет в темноте без перемешивания в течение 30 мин при температуре $+24\pm 4$ °С. В каждую лунку планшета добавляли по 100 мкл раствора стоп-реагента (Stop solution #F006). Измеряли оптическую плотность в лунках планшета на анализаторе СФ при длине волны 450 нм. В качестве референсной длины волны использовали 650 нм.

Процедура на наборе Cugnus #CM015:

Для каждого анализируемого образца необходимы две лунки. Стандартный образец 200 нг/мл не предназначен для построения калибровочной кривой, его использовали для спайк-образцов или же для контроля самого набора. В лунку планшета добавляли по 100 мкл стандартов (CHO HCP Standards, #CM015) и образцов согласно следующей схеме:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ст. 75 нг/мл	Ст. 75 нг/мл	Адалимуаб 0,25 нг/мл	Адалимуаб 0,25 нг/мл	*	*	*	*	*	*	*	*
B	Ст. 25 нг/мл	Ст. 25 нг/мл	«Хумира» 0,4 нг/мл	«Хумира» 0,4 нг/мл	*	*	*	*	*	*	*	*
C	Ст. 8 нг/мл	Ст. 8 нг/мл	Адалимуаб 0,4 нг/мл	Адалимуаб 0,4 нг/мл	*	*	*	*	*	*	*	*
D	Ст. 2 нг/мл	Ст. 2 нг/мл	Спайк-образец 1	Спайк-образец 1	*	*	*	*	*	*	*	*
E	Ст. 0,7 нг/мл	Ст. 0,7 нг/мл	Спайк-образец 2	Спайк-образец 2	*	*	*	*	*	*	*	*
F	Ст. 0 нг/мл	Ст. 0 нг/мл	Спайк-образец 3	Спайк-образец 3	*	*	*	*	*	*	*	*
G	Адалимуаб 1 нг/мл	Адалимуаб 1 нг/мл	Спайк-образец 4	Спайк-образец 4	*	*	*	*	*	*	*	*
H	Адалимуаб 0,5 нг/мл	Адалимуаб 0,5 нг/мл	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Инкубировали планшет на инкубаторе-шейкере в течение 60 мин со скоростью перемешивания 180 об/мин при температуре +24±4 °С. Разводили концентрированный буфер для отмывки [Wash Concentrate (20 X), #F004] в 20 раз. Выливали все содержимое из планшета и просушивали планшет постукиваниями о бумажную салфетку. В каждую лунку планшета добавляли по 300 мкл разведенного буфера для отмывки. Выливали все содержимое из планшета. Переворачивали планшет вверх дном на салфетку бумажную и интенсивно стучали 1–2 раза. Буфер не должен находиться в лунках дольше нескольких секунд. Повторяли промывку буфером еще 1–2 раза. В каждую лунку планшета добавляли по 100 мкл конъюгата (Anti-CHO: HPR Conjugate, #F148). Инкубировали планшет на инкубаторе-шейкере в течение 120 мин со скоростью перемешивания 180 об/мин при температуре +24±4 °С. Выливали все содержимое из планшета и просушивали планшет способами, описанными ранее. В каждую лунку планшета добавляли по 300 мкл разведенного буфера для отмывки. Снова выливали все содержимое из планшета. Повторяли промывку буфером еще 4 раза. В каждую лунку планшета добавляли по 100 мкл раствора субстрата (TMB Substrate, #F005). Недопустимо пересыхание лунок перед внесением субстрата. Инкубировали планшет в темноте без перемешивания в течение 30 мин при температуре +24±4 °С. В каждую лунку планшета добавляли по 100 мкл раствора стоп-реагента (Stop solution #F006). Измеряли оптическую плотность в лунках планшета на анализаторе СФ при длине волны 450 нм. В качестве референсной длины волны использовали 650 нм. Строили калибровочный график и определяли содержание белков клеток хозяина в образцах с помощью MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основании полученных данных выяснено, что набор Cygnus #CM015 не может использоваться для определения НСР CHO для контроля очистки белка

адалимумаб, так как набор показывает заниженные содержания НСР, что говорит о плохом отклике системы. Результаты количественного определения для наборов второго и третьего поколения представлены в таблице 1.

Таким образом, исходя из полученных данных, целесообразно провести валидацию коммерческого набора Cygnus #F550.

Валидация методики количественного определения белков клеток хозяина на коммерческом наборе Cygnus #F550

Валидация проводилась с целью подтверждения адекватности метода определения содержания белков клеток хозяина (CHO) в субстанции адалимумаба по следующим аналитическим характеристикам: тест пригодности системы, специфичность, предел обнаружения, нижний предел измерения, верхний предел измерения, правильность, повторяемость, воспроизводимость, надежность [17]. При проведении валидационных испытаний используются образцы, указанные в таблице 2.

Тест пригодности системы

При проведении валидации использовались критерии приемлемости, рекомендованные производителем. Результаты представлены в таблице 3.

Вывод: Критерии приемлемости, установленные производителем, соблюдаются.

Нижний предел обнаружения

Предел обнаружения определен в инструкции производителя к набору как концентрация белков CHO, соответствующая сигналу с нулевым стандартом + 2 стандартных отклонения.

Таблица 1.

Результаты количественного определения НСР CHO коммерческими наборами

Образец	Расчетная концентрация НСР CHO, нг/мл		Концентрация НСР CHO, определенная Cygnus #F550		Концентрация НСР CHO, определенная Cygnus #CM015		Recovery = 100* Сэксп/Стеор Cygnus #F550	Recovery = 100* Сэксп/Стеор Cygnus #CM015
	Cygnus #F550	Cygnus #CM015	нг/мл	нг/мкг	нг/мл	нг/мкг		
Адалимумаб 1 мг/мл	–	–	81,914	0,082	6,589	0,007	–	–
Адалимумаб 0,5 мг/мл	–	–	43,037	0,086	2,491	0,005	–	–
Адалимумаб 0,4 мг/мл	–	–	33,603	0,084	2,786	0,007	–	–
Адалимумаб 0,25 мг/мл	--	–	20,589	0,082	1,498	0,006	–	–
«Хумира» 0,4 мг/мл	не более 0,2 нг/мкг белка		16,461	0,033	0,398	0,001	–	–
Спайк-образец 1	96,609	82,484	98,721	–	50,874	–	102,19	61,68
Спайк-образец 2	84,38	81,325	85,011	–	49,143	–	100,75	60,043
Спайк-образец 3	47,859	33,736	48,522	–	21,152	–	101,95	62,70
Спайк-образец 4	22,775	32,575	21,218	–	20,008	–	93,16	61,421

Таблица 2.

Образцы, используемые для валидации набора Cugnus #F550

№ п/п	ID образца	Принцип приготовления
1	Стандарт 100 нг/мл	Готовый стандарт из иммуноферментного набора для определения клеток хозяина CHO с содержанием клеток хозяина 100 нг/мл
2	Стандарт 40 нг/мл	Готовый стандарт из иммуноферментного набора для определения клеток хозяина CHO с содержанием клеток хозяина 40 нг/мл
3	Стандарт 12 нг/мл	Готовый стандарт из иммуноферментного набора для определения клеток хозяина CHO с содержанием клеток хозяина 12 нг/мл
4	Стандарт 3 нг/мл	Готовый стандарт из иммуноферментного набора для определения клеток хозяина CHO с содержанием клеток хозяина 3 нг/мл
5	Стандарт 1 нг/мл	Готовый стандарт из иммуноферментного набора для определения клеток хозяина CHO с содержанием клеток хозяина 1 нг/мл
6	Стандарт 0 нг/мл	Готовый стандарт из иммуноферментного набора для определения клеток хозяина CHO с содержанием клеток хозяина 0 нг/мл
7	SP1	Буферный раствор: 6,65 г маннитола; 0,653 г моногидрата лимонной кислоты; 0,174 г натрия цитрата дигидрата; 0,776 г натрия гидрофосфата дигидрата; 0,430 г натрия дигидрофосфата дигидрата; 3,083 г натрия хлорида; 0,55 мл полисорбата-80. рН – 4,9-5,2.
8	SP2	Готовый стандарт из иммуноферментного набора для определения клеток хозяина CHO с содержанием клеток хозяина 100 нг/мл
9	SP3	Образец SP2, разведенный образцом SP1 до концентрации 40 нг/мл по схеме: 200 мкл (SP2) + 300мкл (SP1)
10	SP4	Образец SP3, разведенный образцом SP1 до концентрации 12 нг/мл по схеме: 150 мкл (SP3) + 350мкл (SP1)
11	SP5	Образец SP4, разведенный образцом SP1 до концентрации 3 нг/мл по схеме: 100 мкл (SP4) + 300мкл (SP1)
12	SP6	Образец SP5, разведенный образцом SP1 до концентрации 1 нг/мл по схеме: 100 мкл (SP5) + 200мкл (SP1)
13	SP7	Образец субстанции АДМБ, разведенный буферным раствором в 70 раз (до концентрации АДМБ 1 мг/мл) по схеме: а) 50 мкл субстанции АДМБ + 450 мкл образца SP1 б) 100 мкл субстанции АДМБ (а) + 600 мкл образца SP1
14	SP8	Образец SP7, разведенный буферным раствором в 2 раза (до концентрации АДМБ 0,5 мг/мл) по схеме: 250 мкл образца SP7 + 250 мкл образца SP1
15	SP9	Образец SP8, разведенный буферным раствором в 2 раза (до концентрации АДМБ 0,25 мг/мл) по схеме: 250 мкл образца SP8 + 250 мкл образца SP1
16	SP10	Оригинальный препарат «Хумира» (с концентрацией АДМБ 0,4 мг/мл)
17	SP11	КЖ CHO DG44 пустых клеток белков CHO, разведенных с помощью образца SP1 до концентрации, белков CHO с=80 нг/мл
18	SP12	Образец SP11, разведенный до концентрации 60 нг/мл по белкам CHO образцом SP1 по схеме: 750 мкл образца SP11 + 250 мкл образца SP1
19	SP13	Образец SP12, разведенный до концентрации 30 нг/мл по белкам CHO образцом SP1 по схеме: 250 мкл образца SP12 + 250 мкл образца SP1

№ п/п	ID образца	Принцип приготовления
20	SP14	КЖ CHO DG44 пустых клеток белков CHO, разведенных с помощью воды очищенной до концентрации белков CHO с=80 нг/мл
21	SP15	Образец SP14, разведенный до концентрации 60 нг/мл по белкам CHO водой очищенной по схеме: 750 мкл образца SP14 + 250 мкл воды очищенной
22	SP16	Образец SP15, разведенный до концентрации 30 нг/мл по белкам CHO водой очищенной по схеме: 250 мкл образца SP15 + 250 мкл воды очищенной
23	SP17	Спайк-образец с концентрацией 97 нг/мл по белкам CHO, приготовленный по схеме: 520 мкл готового стандарта из иммуноферментного набора для определения клеток хозяина CHO с содержанием клеток хозяина 100 нг/мл + 120 мкл образца субстанции АДМБ с с=1 мг/мл
24	SP18	Спайк-образец с концентрацией 48,19 нг/мл по белкам CHO, приготовленный по схеме: 520 мкл готового стандарта из иммуноферментного набора для определения клеток хозяина CHO с содержанием клеток хозяина 40 нг/мл + 120 мкл образца субстанции АДМБ с с=1 мг/мл
25	SP19	Спайк-образец с концентрацией 25,43 нг/мл по белкам CHO, приготовленный по схеме: 520 мкл готового стандарта из иммуноферментного набора для определения клеток хозяина CHO с содержанием клеток хозяина 12 нг/мл + 120 мкл образца субстанции АДМБ с с=1 мг/мл
26	SP20	Спайк-образец с концентрацией 18,11 нг/мл по белкам CHO, приготовленный по схеме: 520 мкл готового стандарта из иммуноферментного набора для определения клеток хозяина CHO с содержанием клеток хозяина 3 нг/мл + 120 мкл образца субстанции АДМБ с=1 мг/мл
27	SP21	Субстанция АДМБ, разведенная до концентрации 0,4 мг/мл образцом SP1
28	SP22	Субстанция АДМБ, разведенная до концентрации 0,4 мг/мл водой очищенной

Таблица 3.

Результаты определения пригодности системы

Параметр	Спецификация	Результат	Удовлетворяет спецификации, Да/Нет
Оптическая плотность стандарта 100 нг/мл	≥1,000	1,035	ДА
Оптическая плотность стандарта 0 нг/мл	<0,300	0,0903	ДА

Для установления предела обнаружения проводят одну аналитическую сессию, в которой на одной плашке измеряют оптическую плотность 10 повторов 0 стандарта. Результаты приведены в таблице 4.

Таблица 4.

Нижний предел обнаружения

Наименование образца	OD _i	Среднее значение, $OD_0 = \frac{\sum OD_i}{10}$	Стандартное отклонение $SD_0 = \sqrt{\frac{\sum (OD_i - OD_0)^2}{9}}$	Предел обнаружения $OD = OD_0 + 2SD_0$
Стандарт 0 нг/мл	0,087	0,090	0,00608	0,097
	0,094			
	0,091			
	0,089			
	0,086			
	0,095			
	0,091			
	0,091			
	0,088			
	0,095			

Оптическая плотность предела обнаружения метода должна быть ниже оптической плотности стандарта 1 нг/мл.

Вывод: Оптическая плотность предела обнаружения составила 0,097 ед. О.П. Оптическая плотность стандарта 1 нг/мл составила 0,109 ед. О.П.

Оптическая плотность предела обнаружения ниже оптической плотности стандарта 1 нг/мл. Предел обнаружения метода установлен.

Нижний предел измерения

Нижний предел измерения определяется из оптических плотностей стандартов, наносимых для построения калибровки при проведении специфичности в 3 сессиях. Полученные данные сведены в таблицу 5.

Таблица 5.

Нижний предел измерения

Конц. станд., нг/мл	Сессия 1	Сессия 2	Сессия 3	Среднее значение, $OD_{cp} = \frac{\sum OD_i}{2}$	Стандартное отклонение, SD $SD = \sqrt{\frac{\sum (OD_i - OD_{cp})^2}{n-1}}$	RSD, % $RSD = \frac{SD}{OD_{cp}} \cdot 100\%$
100	1,035	1,080	1,190	1,102	0,080	7,238
40	0,416	0,510	0,490	0,471	0,048	10,273
12	0,181	0,260	0,230	0,204	0,025	12,130
3	0,125	0,130	0,120	0,125	0,005	4,000
1	0,109	0,100	0,096	0,102	0,007	6,549
0	0,091	0,088	0,083	0,087	0,004	4,628

Требование: Предел обнаружения – концентрация белков CHO, соответствующая сигналу с нулевым стандартом + 2 стандартных отклонения.

Согласно данным производителя, предел измерения составляет не менее 1 нг/мл, при этом RSD для данной концентрации должно быть не более 20%.

Вывод: По результатам 3 аналитических сессий наименьшей значимой концентрации стандарта, для которой RSD ≤ 20 %, является 1 нг/мл.

Верхний предел измерения (хук-эффект)

Верхним пределом измерения является концентрация 100 нг белков CHO / мл, выше которой начинает проявляться хук-эффект: если концентрация образца превышает верхний предел измерения, то при постановке анализа концентрация белков CHO в таком образце может получиться ниже верхнего стандарта 100 нг/мл. Чтобы избежать такого эффекта, образцы разбавляют.

Специфичность

Специфичность – это способность аналитической методики однозначно оценивать определяемое вещество в присутствии сопутствующих компонентов [17].

Специфичность определяли с помощью следующих образцов.

- Образец SP1 (матрикс) – подтверждение отсутствия влияния буферного раствора на результаты анализа. *Критерий приемлемости:* оптическая плотность ниже предела обнаружения.
- Образцы SP2-SP6 – приготовление калибровочных растворов самостоятельно из стокового (коммерческого) калибровочного раствора с концентрацией белков клетки CHO 100 нг/мл. Подтверждение отсутствия влияния альбумина на результаты анализа. *Критерий приемлемости:* Recovery для образцов SP2-SP6 и стандартов 40 нг/мл – 1 нг/мл соответственно менее 15%.
- SP7-SP9 – измерение белков клеток CHO в реальном образце субстанции адалимумаба. *Критерий приемлемости:* RSD для образцов менее 15%.
- SP10 – измерение белков клеток CHO в оригинальном препарате адалимумаба. *Критерий приемлемости:* содержание белков клеток-хозяина должно удовлетворять фармакопейной статье предприятия – не более 0,2 нг/мкг белка.
- SP11-SP13 – подтверждение специфичности набора относительно белков клеток CHO, использующихся при производстве адалимумаба (пробоподготовка проводится с использованием образца SP1). *Критерий приемлемости:* Recovery для групп образцов SP11-SP13 и SP14-SP16 менее 15%.

- SP14-SP16 – подтверждение специфичности набора относительно белков клеток CHO, используемых при производстве адалимумаба (пробоподготовка проводится с использованием воды очищенной). *Критерий приемлемости:* Recovery для групп образцов SP11-SP13 и SP14-SP16 менее 15%.
- SP21-SP22 – сравнение растворителей. Подтверждение отсутствия влияния растворителей на результаты анализа (необходимо для дальнейшего выбора раствора для разведения образцов в рутинных анализах). *Критерий приемлемости:* Recovery для образцов SP21-SP22¹ менее 15%.

Результаты расчетов представлены в таблицах 6–8.

Таблица 6.

Расчет Recovery для образцов SP2-SP6

Наименование образца	OD _{измер}	OD _{теор} ¹	Recovery, %
SP2	1,026	1,035	100,877
SP3	0,442	0,416	94,118
SP4	0,185	0,181	97,838
SP5	0,114	0,125	109,649
SP6	0,100	0,109	109,000

Примечание: ¹В качестве OD_{теор} взяты значения OD_{сред} полученные для калибровочных стандартов при постановке рассматриваемой сессии.

Таблица 7.

Расчет Recovery для образцов SP11-SP13 и SP14-SP16

Наименование образца	C _{измер} , нг/мл	C _{теор} , нг/мл	Recovery, %
SP11	81,583	80	98,060
SP12	65,749	60	91,256
SP13	29,860	30	100,469
SP14	99,700	80	80,241
SP15	92,918	60	64,573
SP16	48,310	30	62,099

Таблица 8.

Расчет Recovery для образцов SP21-22

Наименование образца	C _{измер}	C _{теор} ¹	Recovery, %
SP22	0,082	0,083	101,220

Примечание: ¹В качестве C_{теор} было взято значение концентрации, полученное для образца SP21 в нг/мкг.

Выводы:

Поскольку OD образца SP1 ниже предела обнаружения, то можно считать, что буфер не влияет на результаты анализа.

Recovery для образцов SP2-SP6 составляет 100±9,65% что входит в диапазон 100±15%, что подтверждает отсутствие влияния альбумина на результаты анализа.

При измерении белков клеток хозяина в субстанции адалимумаба (SP7-SP9) была установлена их концентрация 0,083 нг/мкг. Измерение проводилось для 3-х различных концентраций адалимумаба, полученное значение концентраций имеет RSD≤15%, что отвечает требованиям производителя тест-системы.

При измерении белков клеток хозяина в оригинальном препарате «Хумира» (SP10) была установлена их концентрация 0,033 нг/мкг.

Recovery для образцов SP11-SP13 составляет 100±8,74% что входит в диапазон 100±15%, что подтверждает специфичность набора относительно белков клеток CHO, используемых при производстве адалимумаба, при их пробоподготовке с использованием образца SP1 (буферного раствора).

Recovery для образцов SP14-SP16 составляет 100±37,9% что не входит в диапазон 100±15%, что показывает отсутствие специфичности набора относительно белков клеток CHO, используемых при производстве адалимумаба, при их пробоподготовке с использованием воды очищенной. Вода очищенная не подходит в качестве растворителя.

Recovery образцов SP21-SP22 составляет 100±1,22, то есть входит в диапазон 100±15%, что подтверждает отсутствие влияния вида растворителя на результаты анализа. Но при большом содержании клеток белка хозяина в образце вода не подходит в качестве растворителя. Следовательно, разводить образцы субстанции адалимумаба следует только буферным раствором.

Правильность

Правильность методики характеризуется отклонением среднего результата определений, выполненных с ее использованием, от значения, принимаемого за истинное [15].

Правильность считается установленной, если Recovery находится в диапазоне 80–120%. Полученные данные сведены в таблицу 9.

¹Полное описание образцов представлено в таблице 2.

Таблица 9.

Результаты определения правильности

Наименование образца	OD1	OD2	OD _{сред}	С клеток СНО, нг/мл	Recovery = 100* C _{эксп} /C _{теор}
SP17	0,983	0,962	0,973	97,721	100,743
SP18	0,487	0,500	0,493	49,522	102,764
SP19	0,299	0,275	0,287	25,194	99,072
SP20	0,255	0,235	0,245	19,886	109,807

Вывод. Правильность установлена, так как Recovery находится в диапазоне 99,072–109,807%, что соответствует установленным требованиям и находится в диапазоне 80–120%.

Точность: повторяемость

В соответствии с данными производителя, приведенными в инструкции производителя по валидации и в инструкции производителя по использованию набора, значение RSD увеличивается с уменьшением концентрации калибровочного стандарта. В соответствии с данными производителя наиболее критичными являются значения повторяемости для стандартов с меньшей концентрацией. Поэтому для установления повторяемости будут проведены испытания стандарта 3 нг/мл (нижняя концентрация из диапазона значений, исследованных производителем). Всего для установления повторяемости необходимо проведение 1 аналитической сессии: 20 повторов стандарта 3 нг/мл на одной плашке. Необходимое требование: RSD ≤15% для стандарта 3 нг/мл. Результаты измерений представлены в таблице 10.

Вывод. RSD для 20 повторов стандарта 3 нг/мл составило 9,448%, что не превышает установленные производителем тест-системы 15%.

Точность: промежуточная прецизионность

Для подтверждения данного значения проводится анализ субстанции адалимумаба (разными людьми) в трёх повторностях и анализ стандарта с концентрацией 3 нг/мл (разными людьми) также в трёх повторностях.

RSD рассчитывают для каждой группы (три повторности, выполненные одним человеком) и затем общее для трёх групп (три группы, выполненные разными людьми) как для образца субстанции, так и для образца стандарта.

Критерии приемлемости: RSD < 15%. Полученные данные и расчеты по ним представлены в таблице 11.

Вывод. Промежуточная прецизионность установлена, так как выполнен критерий приемлемости RSD ≤15%.

Таблица 10.

Подтверждение повторяемости

Наименование образца	OD _i	Среднее значение, $OD_3 = \frac{\sum OD_i}{20}$	Стандартное отклонение $SD_3 = \sqrt{\frac{\sum (OD_i - OD_3)^2}{19}}$	Относительное стандартное отклонение $RSD = \frac{SD_3 \times 100}{OD_3}$
Стандарт 3 нг/мл	0,138	0,127	0,012	9,448%
	0,113			
	0,118			
	0,110			
	0,166			
	0,111			
	0,118			
	0,132			
	0,124			
	0,126			
	0,130			
	0,128			
	0,121			
	0,130			
	0,133			
	0,133			
	0,122			
	0,120			
	0,131			
	0,128			

Таблица 11.

Точность: промежуточная прецизионность

Образец	OD 1	OD 2	OD 3	Среднее значение, $X_{cp} = \frac{\sum X_i}{3}$	Стандартное отклонение, SD $SD = \sqrt{\frac{\sum (X_i - X_{cp})^2}{n-1}}$	RSD, % $RSD = \frac{SD}{X_{cp}} \cdot 100\%$
SP10	0,217	0,232	0,224	0,224	0,0075	3,351
Стандарт 3 нг/мл	0,120	0,122	0,121	0,121	0,001	0,826

Установление надежности метода

Всего проведены 2 аналитические сессии на наборах с разным сроком годности. Анализ проводился для образца SP22. Результаты представлены в таблице 12. *Требование:* RSD полученных результатов между сессиями не должно составлять более 15%.

Вывод. Надежность метода установлена, так как RSD полученных результатов между сессиями составляет не более 15%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты валидационных испытаний методики определения остаточных белков клеток хозяина в субстанции адалимумаба методом иммуноферментного анализа показали соответствие показателей установленным требованиям и спецификациям, что позволяет считать методику валидной.

Таким образом, было показано, что набор от *Cygnus #F550* позволяет наиболее точно и адекватно оценивать количественное содержание белков клеток хозяина (CHO) в субстанции адалимумаба, в отличие от набора *Cygnus #CM015*. Также была продемонстрирована необходимость валидации коммерческих наборов ИФА и рассмотрены некоторые аспекты их валидации.

ЛИТЕРАТУРА

1. D. Ternant, E. Ducourau, P. Fuzibet et al. Pharmacokinetics and concentration–effect relationship of adalimumab in rheumatoid arthritis. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2015. № 79(2). P. 286–297.
2. V.N. Sisodiya, J. Lequieu, M. Rodriguez et al. Studying host cell protein interactions with monoclonal antibodies using high throughput protein A chromatography // *Biotechnology Journal*. 2012. № 7(10). P. 1233–1241.
3. D. Ren, M.R. Darlucio, J.H. Chou. Development of a multi-product leached protein A assay for bioprocess samples containing recombinant human monoclonal antibodies // *Journal of Immunological Methods*. 2011. V. 366. P. 20–27.
4. S.X. Gao, Y. Zhang, K. Stansberry-Perkins et al. Fragmentation of a highly purified monoclonal antibody attributed to residual CHO cell protease activity // *Biotechnol Bioeng.* 2011. № 108(4). P. 977–982.
5. Partnership for Public Service. The state of the FDA workforce. – Washington, DC: Author, retrieved, 2017.
6. Y.H. Kao, D.P. Hewitt, M. Trexler-Schmidt et al. Mechanism of antibody reduction in cell culture production processes // *Biotechnol Bioeng.* 2010. № 107(4). P. 622–632.
7. M. Trexler-Schmidt, S. Sargis, J. Chiu. Identification and prevention of antibody disulfide bond reduction during cell culture manufacturing // *Biotechnol Bioeng.* 2010. № 106(3). P. 452–461.
8. K. Champion, H. Madden, J. Dougherty et al. Defining your product profile and maintaining control over it, part 2 // *BioProcess Int.* 2005. № 3(8). P. 52–57.
9. D.P. Speicher. *Current protocols in protein science*, Chapter 10, Section II. Electrophoretic separation of proteins. – Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, 2008. P. 10.2.1–10.5.1.
10. X. Wang, A.K. Hunter, N.M. Mozier. *Host Cell Proteins in Biologics Development: Identification, Quantitation and Risk Assessment // Biotechnology and Bioengineering*. 2015. № 103(3). P. 446–458.
11. N. Kochanowsk, G. Siriez, L. Mukankurayija et al. Host cell protein platform assay development for therapeutic mAb bioprocessing using mammalian cells // *BioMed Central*. 2015. № 9(9). P. 21.
12. J. Zhu-Shimoni, C. Yu, J. Nishihara, R.M. Wong et al. Host cell protein testing by ELISAs and the use of orthogonal methods // *Biotechnol. Bioeng.* 2014. № 111(12). P. 2367–2379.
13. Э.Э. Досадина, М.А. Кульметьева, О.Э. Дубовикова и т.д. Синтез и исследование свойств комплекса протеиназ, иммобилизованных на полисахаридных носителях, для медицинского использования // *Бутлеровские сообщения*. 2016. Т. 46. № 6. С. 1–10.
14. А.Н. Агафонова, Ю.А. Лейкин. Получение и обнаружение антител различных модификаций // *Бутлеровские сообщения*. 2016. Т. 46. № 6. С. 24–27.
15. D. Ahluwalia, H. Dhillon, T. Slaney. Identification of a host cell protein impurity in therapeutic protein // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017. V. 141. P. 32–38.
16. Cygnus Technologies. URL: <https://cygnustechnologies.com> (дата обращения 10.09.2017).
17. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик // *Государственная Фармакопея РФ XIII изд.* Т. 1. – М. 2015.