

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ К ПЕМБРОЛИЗУМАБУ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ ИНГИБИРОВАНИЯ СВЯЗЫВАНИЯ ПЕМБРОЛИЗУМАБА С ЕГО МИШЕНЬЮ PD-1 МЕТОДОМ ИФА

Кудряшова А.М.¹, Гребенкин Д.Ю.², Самсонов М.Ю.³, Филон О.В.³, Разживина В.А.³, Чернобровкин М.Г.⁴, Борисова О.В.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

² ООО «Экзактэ Лабс», Москва, Россия

³ АО «Р-Фарм», Москва, Россия

⁴ ООО «Рисерч лаб», Москва, Россия

Резюме. Гуманизированные моноклональные антитела могут вызывать нежелательный гуморальный иммунный ответ у пациентов — образование антител к терапевтическому белковому препарату. Нейтрализующие антилекарственные антитела являются одним из основных факторов, влияющих на безопасность и эффективность проводимой терапии. При невозможности использовать тесты для определения нейтрализующих антител на основе клеточных культур альтернативой могут служить методы конкурентного связывания лекарственного средства и его лиганда. Пембролизумаб относится к противоопухолевым препаратам широкого спектра и представляет собой гуманизированное IgG4 каппа-антитело к рецептору запрограммированной клеточной смерти-1 (PD-1), которое блокирует взаимодействие рецептора с его лигандами PD-L1 и PD-L2. В связи со сложностью проведения анализа применение культурального клеточного теста для пембролизумаба невозможно, так как высок риск получения недостоверных результатов. Цель — разработка и валидация методики определения нейтрализующих антител к пембролизумабу в сыворотке крови человека на основе ингибирования связывания пембролизумаба с его мишенью PD-1. В исследовании был использован экспериментальный препарат пембролизумаб RPH-075 (АО «Р-Фарм», Россия). В качестве положительного контрольного образца на нейтрализующие антитела использовали Anti-Pembrolizumab антитела KRIBIOLISATM Anti-Pembrolizumab (KEYTRUDA®) ELISA, Индия). Определение антител проводи-

Адрес для переписки:

Кудряшова Александра Михайловна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»
115088, Россия, Москва, ул. 1-я Дубровская, 15.
Тел.: 8 (495) 674-54-97.
E-mail: 2238250@rambler.ru

Address for correspondence:

Alexandra M. Kudryashova
I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera
15 1st Dubrovskaya St
Moscow
115088 Russian Federation
Phone: +7 (495) 674-54-97.
E-mail: 2238250@rambler.ru

Образец цитирования:

А.М. Кудряшова, Д.Ю. Гребенкин, М.Ю. Самсонов, О.В. Филон, В.А. Разживина, М.Г. Чернобровкин, О.В. Борисова «Разработка и валидация методики определения нейтрализующих антител к пембролизумабу в сыворотке крови человека на основе ингибирования связывания пембролизумаба с его мишенью PD-1 методом ИФА» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 6. С. 1423-1434.
doi: 10.15789/1563-0625-DAV-3188

© Кудряшова А.М. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.M. Kudryashova, D. Yu. Grebenkin, M. Yu. Samsonov, O. V. Filon, V. A. Razzhivina, M. G. Chernobrovkin, O. V. Borisova "Development and validation of an ELISA-based method for determining neutralizing antibodies to pembrolizumab in human serum based on inhibition of the drug binding to its PD-1 target", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 6, pp. 1423-1434.
doi: 10.15789/1563-0625-DAV-3188

© Kudryashova A.M. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-DAV-3188

ли методом ИФА с применением кислотной диссоциации иммунного комплекса и с использованием техники ACE (Affinity capture elution). Была разработана и валидирована методика выявления нейтрализующих антител к пембролизумабу, основанная на ингибировании пембролизумаба с его мишенью PD-1 в сочетании с техникой ACE. Разработанная методика была валидирована по показателям: селективность, чувствительность, специфичность, «хук»-эффект, толерантность к присутствию лекарственного препарата, прецизионность. Благодаря применению подходов предварительной обработки образцов (кислотная диссоциация, техника ACE) для анализа нейтрализующих антител, была достигнута чувствительность 100 нг/мл в присутствии циркулирующего пембролизумаба 40 мкг/мл. Также в данной работе был обоснован метод расчета предела исключения, чувствительности и селективности на основании ROC-анализа и плавающего предела исключения (PSCP) через средние арифметические значения оптической плотности NC и LPC в каждом индивидуальном аналитическом планшете. Разработанная методика определения нейтрализующих антител к пембролизумабу может быть использована для оценки нежелательной иммуногенности препарата пембролизумаба на стадии клинических испытаний.

Ключевые слова: ИФА, пембролизумаб, иммуногенность, нейтрализующие антитела, PD-1, клинические исследования, лекарственная толерантность, валидация

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN ELISA-BASED METHOD FOR DETERMINING NEUTRALIZING ANTIBODIES TO PEMBROLIZUMAB IN HUMAN SERUM BASED ON INHIBITION OF THE DRUG BINDING TO ITS PD-1 TARGET

Kudryashova A.M.^a, Grebenkin D.Yu.^b, Samsonov M.Yu.^c, Filon O.V.^c, Razzhivina V.A.^c, Chernobrovkin M.G.^d, Borisova O.V.^a

^a I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

^b Exakte Labs LLC, Moscow, Russian Federation

^c R-Pharm JSC, Moscow, Russian Federation

^d Research Lab LLC, Moscow, Russian Federation

Abstract. Monoclonal antibodies (mAbs) are potentially able to trigger undesired humoral immune responses in the patients and develop ADA (anti-drug antibody) to the protein drugs. Neutralizing anti-drug antibodies are among the main factors affecting safety and effectiveness of the therapy. If it is impossible to apply cell-based tests to determine neutralizing antibodies, competitive ligand binding assay may be used as an alternative. Pembrolizumab (Pembro) is a broad-spectrum antitumor drug, being a humanized IgG4 kappa antibody to the programmed cell death receptor-1 (PD-1) that blocks interaction of this receptor with its ligands PD-L1 and PD-L2. Due to some technical issues, cell culture test is not feasible for Pembro, due to high risk of obtaining unreliable results. The aim of our study was to develop and validate a method for detection of neutralizing antibodies to Pembro in human serum based on inhibition of pembrolizumab binding to its PD-1 target. The experimental drug pembrolizumab RPH-075 (R-Pharm) was used in the study. Anti-Pembrolizumab antibodies KRIBIOLISATM Anti-Pembrolizumab (KEYTRUDA®) ELISA, India) were used as a positive control sample for neutralizing antibodies. Determination of antibodies was carried out by ELISA technique using acid dissociation of the immune complex and the Affinity capture elution (ACE) technique. The ELISA method was validated by the following characteristics: selectivity, sensitivity, specificity, “hook” effect, drug tolerance, precision. Due to the use of sample pretreatment approaches (ACE technique) for analysis of neutralizing antibodies, a sensitivity level of 100 ng/mL was achieved in the presence of pembrolizumab at 40 µg/mL. In this paper, a method was substantiated by calculating the cutoff point, sensitivity, and selectivity based on ROC analysis and floating exclusion limit (PSCP) through the average values of optical density NC and LPC in each individual analytical cycle. The developed method for determining neutralizing antibodies to pembrolizumab may be used to assess the undesirable immunogenicity of pembrolizumab at the stage of clinical trials.

Keywords: ELISA, pembrolizumab, immunogenicity, neutralizing antibodies, PD-1, clinical trials, drug tolerance, validation

Введение

Большой сегмент фармацевтического рынка на сегодняшний день представлен гуманизированными моноклональными антителами (МАТ), которые могут вызывать нежелательный гуморальный иммунный ответ у пациентов — образование антител к терапевтическому белковому препарату. Такие антитела оказывают влияние на фармакокинетику, фармакодинамику, безопасность и эффективность биотерапевтического препарата. Соответственно, тестирование на иммуногенность является неотъемлемой частью процесса разработки лекарственных средств. Как правило, для мониторинга иммуногенности в отношении терапевтических МАТ используется многоуровневый подход, включающий этапы скрининга, подтверждения, титра и нейтрализующей активности. Нейтрализующие антилекарственные антитела (НАТ) являются одним из основных факторов, влияющих на безопасность и эффективность проводимой терапии, и поэтому их оценка имеет особое значение при тестировании на иммуногенность. Методы выявления нейтрализующих антител обычно основаны на их способности блокировать взаимодействие терапевтического препарата с мишенью, и «золотым стандартом» в определении нейтрализующей активности являются тесты на основе клеточных линий, экспрессирующих соответствующую мишень и максимально точно имитирующих механизм действия антител в живом организме [7, 20, 22].

Методы для определения нейтрализующих антител *in vitro*, основанные на ингибировании взаимодействия лекарственного средства и его лиганда, также могут быть применимы, например, когда существуют ограничения в использовании подходящей клеточной линии, интерференции с компонентами анализируемой матрицы, интерференции с препаратами сопутствующей терапии [9, 22]. При невозможности использовать тест-системы на основе клеточных культур альтернативой могут служить методы конкурентного связывания лиганда или другие методы, для которых доказана релевантность в отношении установления нейтрализующей активности [1, 6].

Одной из важных проблем при разработке методик для выявления антител к терапевтическим МАТ, в том числе нейтрализующих, является наличие высоких концентраций циркулирующего лекарственного средства. Данное явление часто наблюдается для препаратов с длительным периодом полувыведения, к которым, в большинстве случаев, относятся и терапевтические антитела. В присутствии циркулирующего лекарственного средства нейтрализующие антитела могут существовать в виде иммунных комплексов и по этой

причине не иметь возможности взаимодействовать с компонентами тест-системы, используемой в анализе, что может приводить к ложноотрицательным результатам [12].

В данной работе разработана и валидирована методика определения нейтрализующей активности антител к пембролизумабу, основанная на способности нейтрализующих антител блокировать взаимодействие пембролизумаба с рецептором PD-1, тем самым опосредовано показывая потерю функциональных характеристик препарата.

Использование культурального клеточного теста для данного препарата невозможно в связи со сложностью проведения анализа и, как следствие, с риском получения недостоверных результатов.

Пембролизумаб относится к противоопухолевым препаратам широкого спектра, так называемым регуляторам иммунного синапса или блокаторам иммунных чекпойнтов. Пембролизумаб представляет собой гуманизированное IgG4 каппа-антитело к рецептору запрограммированной клеточной смерти-1 (PD-1) которое блокирует взаимодействие между рецептором PD-1 и его лигандами PD-L1 и PD-L2. Терапия препаратами нацеленных против рецептора PD-1, включая препараты пембролизумаба, может проводиться в течение длительных периодов времени и достигать до 2 лет [18], что в свою очередь может способствовать индукции нейтрализующих антител. Кроме того, в отличие от моноклональных терапевтических антител, нацеленных на угнетение активации В-клеток, например, против CD19 или CD20, нацеленность пембролизумаба на PD-1, экспрессия которого высока на фолликулярных Т-хелперах, опосредованно увеличивает выработку В-клетками антител в лимфатических узлах, что может прямо или косвенно влиять на гуморальные иммунные реакции, приводящие к индукции антител к данному препарату [2, 10]. Биоаналитические подходы к выявлению связывающих и нейтрализующих антител подробно описаны в научных публикациях [3, 11, 19, 24, 26].

В данной работе для повышения лекарственной толерантности была разработана и валидирована методика, основанная на ингибировании связывания препарата пембролизумаба с его мишенью PD-1 с применением кислотной диссоциации иммунного комплекса и с использованием техники ACE (Affinity capture elution) [4, 5].

Материалы и методы

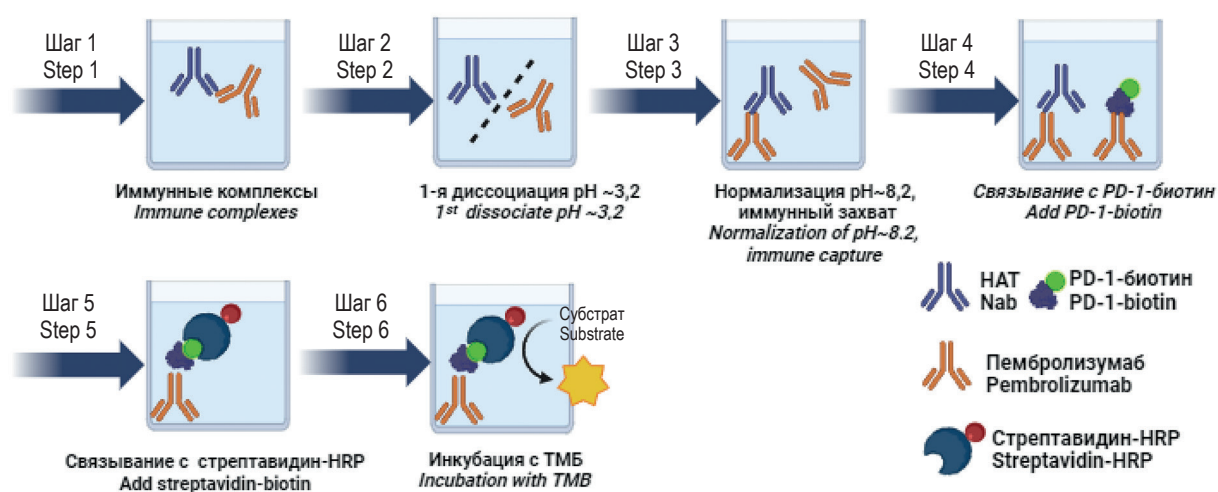
В исследовании был использован препарат RPH-075 (АО «Р-Фарм», Россия), содержащий пембролизумаб в концентрации 25 мг/мл. В ка-

честве положительного контрольного образца на нейтрализующие антитела использовали Anti-Pembrolizumab, антитела к пембролизумабу лиофилизированные, концентрат, 1 мкг/мл (Реагент Набора для определения KRIBIOLISATM Anti-Pembrolizumab (KEYTRUDA®) ELISA, Индия). Эукариотический рекомбинантный белок PD-1, (Cloud-Clone Corp., Китай). Для иммунохимического анализа использовали планшеты 96-луночные, прозрачные, плоскодонные, высокое связывание Costar® (2592, Corning Inc., США). Получение конъюгата пембролизумаба с пероксидазой хрена осуществляли по методу На-

кане [14]. Для биотинилирования PD-1 использовали набор (ООО «Силекс», Россия).

Для проведения теста на устойчивость методики к присутствию лекарственного препарата готовили модельные образцы путем добавления к пулливированной сыворотке крови здоровых доноров препарата пембролизумаба (до 40 мкг/мл, что соответствовало ожидаемой концентрации препарата в исследуемых образцах) и контрольных антител к пембролизумабу, препятствующих его связыванию с мишенью. Перед проведением анализа полученные модельные образцы оставляли инкубироваться при комнатной температу-

А (A)



Б (B)

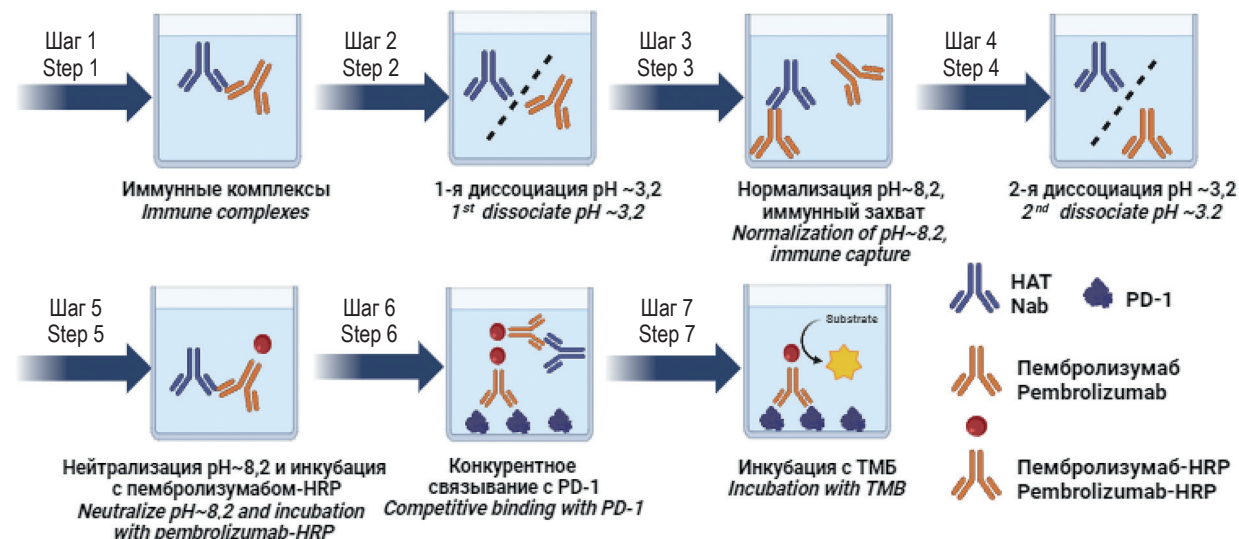


Рисунок 1. Этапы определения нейтрализующей активности антител к пембролизумабу в сыворотке крови человека иммуноферментным методом через иммобилизованный пембролизумаб (А) и с использованием техники ACE (Б)

Figure 1. Determination of the neutralizing activity of antibodies to pembrolizumab in human blood serum by ELISA with immobilized pembrolizumab (A) and using ACE technique (B)

ре по меньшей мере в течение 60 минут для образования иммунных комплексов.

Методика определения нейтрализующей активности антител к пембролизумабу в сыворотке крови человека иммуноферментным методом с иммобилизованным пембролизумабом (методика 1). Этапы проведения анализа схематически представлены на рисунке 1А.

Пембролизумаб сорбировали в 0,02 М фосфатном буфере (рН 7,2) в концентрации 0,75 мкг/мл. Планшеты выдерживали в течение 19–22 часов при температуре 4–8 °С и блокировали раствором 0,09%-ного казеината в 0,02 М фосфатном буферном растворе рН 7,2, содержащем 0,05% Твин 20. Далее во все лунки с иммуносорбентом вносили по 60 мкл 600 мМ уксусной кислоты и по 10 мкл анализируемых образцов и инкубировали при температуре 37 °С в течение 30 минут и перемешивании 700 об/мин. Далее во все лунки вносили по 30 мкл 1М трис-буфера и инкубировали при температуре 37 °С в течение 60 минут и перемешивании 700 об/мин. После во все лунки вносили по 100 мкл РD-1, конъюгированного с биотином в концентрации 250 нг/мл, и инкубировали при температуре 37 °С в течение 30 минут и перемешивании 700 об/мин. Затем во все лунки вносили по 100 мкл стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена, и инкубировали при температуре 37 °С в течение 30 минут и перемешивании 700 об/мин. Далее отмывали несвязавшиеся реагенты и вносили по 100 мкл 33 мМ цитратного буферного раствора рН 4,0, содержащего 0,01% перекиси водорода и 0,5 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Через 15 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2N серной кислоты, измеряли оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм.

Методика определения нейтрализующей активности антител к пембролизумабу в сыворотке крови человека иммуноферментным методом с использованием техники ACE (Acid capture elution) (методика 2).

Техника ACE включает в себя следующие этапы, схематически представленные на рисунке 1Б.

Иммуносорбент № 1. Пембролизумаб сорбировали в 0,02 М фосфатном буфере (рН 7,2) в концентрации 40 мкг/мл. Далее планшеты блокировали согласно методике 1.

Иммуносорбент № 2. РD-1 сорбировали в карбонатном буфере (рН 9,6) в концентрации 100 нг/мл. Далее планшеты блокировали согласно методике 1.

Во все лунки с иммуносорбентом № 1 вносили по 80 мкл 600 мМ уксусной кислоты и по 20 мкл анализируемых образцов и инкубировали при температуре 37 °С в течение 30 минут и перемешивании 700 об/мин. Далее во все лунки вносили

по 40 мкл 1М трис-буфера и инкубировали при температуре 37 °С в течение 90 минут и перемешивании 700 об/мин. После проводили отмывание несвязавшихся компонентов и вносили по 110 мкл 300 мМ уксусной кислоты, далее инкубировали при температуре 37 °С и перемешивании 700 об/мин в течение 30 минут. Далее в планшеты для предварительного разведения вносили по 30 мкл 1М трис-буфера и по 100 мкл диссоциированных образцов из иммуносорбента № 1. Следом вносили по 25 мкл рабочего конъюгата, пембролизумаба конъюгированного с пероксидазой хрена и инкубировали при температуре 37 °С и перемешивании 700 об/мин в течение 30 минут.

После инкубации с конъюгатом переносили по 100 мкл во все лунки иммуносорбента № 2 и инкубировали при температуре 37 °С в течение 30 минут при перемешивании 700 об/мин. После отмывания несвязавшихся компонентов визуализацию результатов анализа и замер проводили, как описано выше.

При наличии нейтрализующих антител в образце пембролизумаб, конъюгированный с пероксидазой хрена, не взаимодействует или взаимодействует ограниченно с РD-1 на планшете.

Статистическая обработка результатов

Полученные данные анализировали с помощью программных обеспечений SPSS Statistics (IBM) и Microsoft Office Excel 2019.

Результаты

Основной задачей разработки методики по определению НАТ к пембролизумабу являлась чувствительность не менее 100 нг/мл в присутствии данного препарата на уровне до 40 мкг/мл (что соответствовало ожидаемой концентрации препарата в исследуемых образцах). Поскольку при разработке и валидации методики отсутствовали клинические образцы, содержащие нейтрализующие антитела к пембролизумабу, оценка была сделана с использованием суррогатных нейтрализующих антител из коммерческого набора, с подтвержденной способностью препятствовать связыванию пембролизумаба с мишенью.

В данной работе на стадии разработки для определения нейтрализующих антител к пембролизумабу сравнивали две методики с разным способом ингибирования связывания пембролизумаба с РD-1. Схематично методики представлены на рисунке 1.

В сравниваемых методиках для дифференциации отрицательных образцов от положительных использовали индекс позитивности (ИП), т. е. отношение $ОП_{образца} / ОП_{PSCP}$, $ОП_{PSCP}$ (plate-specific cut point-PSCP, предел исключения, порогового значения ОП, рассчитываемого для каждого планшета), рассчитывали по формуле:

$$ОП_{PSCP} = (ОП_{NC \text{ средн.}} + ОП_{100 \text{ нг/мл}}) / 2,$$

где ОП_{NC средн.} — среднее арифметическое значение ОП контрольной пулированной сыворотки крови, не содержащей антитела к лекарственному препарату (NC), в 4 повторах; ОП_{100 нг/мл} — среднее арифметическое значение ОП контрольной пулированной сыворотки крови, нагруженной 100 нг/мл коммерческих антител к лекарственному препарату в 4 повторах. Чувствительность ≤ 100 нг/мл принималась как приемлемая.

Образцы с ИП ≤ 1 считались содержащими НАТ к пембролизумабу, а с ИП > 1 — не содержащими НАТ к пембролизумабу.

Влияние циркулирующего пембролизумаба оценивали как в холостой контрольной пробе (пулированная сыворотка крови человека 10 здоровых доноров, не содержащая антитела к пембролизумабу), так и в контрольной пробе, нагруженной коммерческими нейтрализующими антителами к пембролизумабу на уровне 100 нг/мл.

При оценке методики, соответствующей схеме 1.1, не было выполнено требование по необходимой чувствительности методики 100 нг/мл. При изучении показателей чувствительности и лекарственной толерантности положительный результат был получен только в образце, содержащем 1000 нг/мл НАТ в присутствии 40 мкг/мл пембролизумаба (рис. 2).

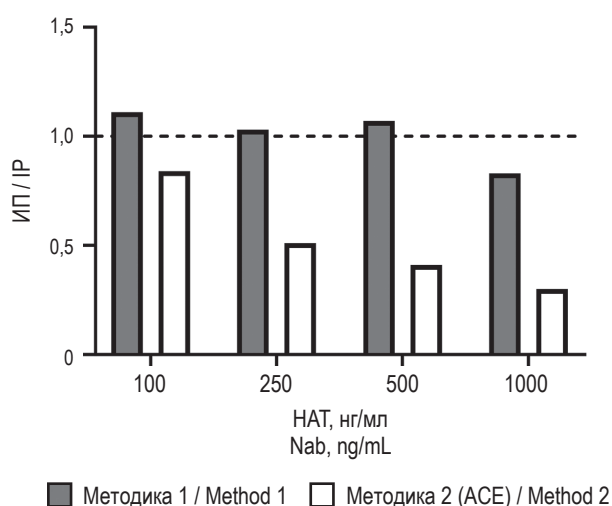


Рисунок 2. Оценка чувствительности методик в присутствии свободного пембролизумаба 40 мкг/мл
Примечание. ИП — индекс позитивности.

Figure 1. Assessment of the sensitivity of the techniques in the presence of free pembrolizumab 40 µg/mL

Note. IP is an index of positivity.

В свою очередь, результаты данного исследования показали, что при использовании предварительной обработки образцов методом ACE были получены результаты, соответствующие критериям приемлемости для данной методики. Все холостые образцы на всех уровнях тестируемого циркулирующего лекарственного препарата были правильно классифицированы как отрицательные (ИП > 1). В то время как образцы, содержащие НАТ на уровне 100 нг/мл, были определены как положительные при концентрации пембролизумаба 40 мкг/мл (рис. 1). Таким образом, для дальнейшей валидации при определении НАТ к пембролизумабу была выбрана методика с использованием техники ACE.

Предел исключения, чувствительность, специфичность

При валидации методики проведено сравнение расчета ОП_{PSCP} по формуле (1) и при помощи ROC-анализа, где ОП_{PSCP} определяли, как значение ОП, в котором специфичность и чувствительность равны 100%, что указывает на способность методики однозначно классифицировать образцы на положительные и отрицательные. При этом в каждом аналитическом цикле (проведении анализа в индивидуальном планшете) используется плавающий предел исключения ОП_{PSCP}.

Для валидации тест-системы были проанализировали 60 образцов сывороток крови человека параллельно в виде холостых образцов и в виде образцов, нагруженных коммерческими антителами к пембролизумабу (Krishgen BioSystems) до концентрации 100 нг/мл. Анализ выполняли в рамках трех валидационных серий, каждая из которых включала 20 пар образцов, исходных и с добавкой. Результаты сравнения двух подходов к определению ОП_{PSCP} представлены в таблице 1.

Устойчивость методики к присутствию лекарственного препарата

Для оценки возможности методики получать устойчивые результаты и детектировать антитела в присутствии биологического препарата была проведена оценка ее толерантности к присутствию лекарственного препарата (drug tolerance). Для этого были проанализированы образцы на двух уровнях концентраций антител к пембролизумабу 250 нг/мл (MPC) и 100 нг/мл (LPC) с добавлением и без добавления лекарственного препарата до уровня концентрации 20 мкг/мл и 40 мкг/мл в образце. Для интерпретации полученных данных рассчитали относительное отклонение значений ОП для образцов с добавлением и без добавления препарата. Критерием приемлемости является сохранение аналитического отклика положительных образцов ниже ОП_{PSCP}.

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРЕДЕЛА ИСКЛЮЧЕНИЯ ПРИ ПОМОЩИ РОС-АНАЛИЗА И ПО ФОРМУЛЕ (1), МЕТОДА РАСЧЕТА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ В РАСЧЕТЕ ОП_{РСП} СРЕДНЕГО АРИФМЕТИЧЕСКОГО ЗНАЧЕНИЯ ОП ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ И ОП ЭТИХ ЖЕ ОБРАЗЦОВ, НАГРУЖЕННЫХ АНТИТЕЛАМИ К ПЕМБРОЛИЗУМАБУ ДО КОНЦЕНТРАЦИИ 100 НГ/МЛ

TABLE 1. THE RESULTS OF DETERMINING THE EXCLUSION LIMIT USING ROC ANALYSIS AND FORMULA (1), A CALCULATION METHOD USING THE ARITHMETIC MEAN OF THE OD OF NEGATIVE SAMPLES AND OD OF THE SAME SAMPLES LOADED WITH ANTIBODIES TO PEMBROLIZUMAB UP TO A CONCENTRATION OF 100 NG/ML

Наименование параметра Parameter	1-й цикл анализа Cycle 1 of analysis n = 20	2-й цикл анализа Cycle 2 of analysis n = 20	3-й цикл анализа Cycle 3 of analysis n = 20
Чувствительность, 95% ДИ Sensitivity, 95% DI	100% (83,89-100,0%)	100% (83,89-100,0%)	100 % (83,89-100,0%)
Специфичность, 95% ДИ Specificity, 95% CI	100 % (83,89-100,0%)	100% (83,89-100,0%)	100% (83,89-100,0%)
ОП_{РСП} рассчитанный по ROC-кривой ОП _{РСП} calculated from the ROC curve	1,923	1,692	1,924
ОП_{РСП} рассчитанный по формуле (1) ОП _{РСП} calculated according to the formula (1)	1,924	1,709	1,953
p-value	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Результаты представлены в таблице 2 и показывают, что все образцы, содержащие антитела к пембролизумабу в концентрации 100 и 250 нг/мл, в присутствии пембролизумаба до 40 мкг/мл определялись как содержащие нейтрализующие антитела к лекарственному препарату, что соответствует необходимому уровню толерантности.

Прецизионность

Для оценки прецизионности использовали образцы трех уровней концентраций 500 нг/мл (НРС), 250 нг/мл (МРС), 100 нг/мл (ЛРС) и NC.

Для оценки использовали шесть независимых контрольных образцов каждого уровня концентрации. Для интерпретации полученных данных рассчитали коэффициент вариации (КВ), % значений ОП для образцов каждого уровня концентрации в аналитическом цикле.

Использовали следующие критерии приемлемости: значения ОП для контрольных образцов в подтверждающем тесте соответствовали: ОП_{НРС} < ОП_{МРС} < ОП_{ЛРС} < РСР < NC. КВ не должен превышать 20% для положительных образ-

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ УСТОЙЧИВОСТИ К ЛЕКАРСТВЕННОМУ ПРЕПАРАТУ

TABLE 2. THE RESULTS OF DRUG TOLERANCE

Образец Sample	Оптическая плотность Optical density OD _{РСП} / ОП _{РСП} = 2,0259				Среднее Mean	СО SD	КВ, % CV, %
	ОП1	ОП2	ОП3	ОП4			
LPC	1,376	1,235	1,261	1,380	1,313	0,08	5,8
MPC	0,805	0,753	0,764	0,742	0,766	0,03	3,6
LPC + AT, 20 µg/mL	1,359	1,517	1,471	1,660	1,501	0,12	8,3
LPC + AT, 40 µg/mL	1,890	1,674	1,537	1,683	1,696	0,15	8,6
MPC + AT, 20 µg/mL	0,827	0,998	0,987	0,812	0,906	0,10	11,1
MPC + AT, 40 µg/mL	1,033	1,033	0,984	1,082	1,033	0,04	3,9
NC	2,232	2,243	2,238	2,297	2,252	0,03	1,3

Примечание. СО – стандартное отклонение, КВ – коэффициент вариации. Контроли LPC-100 нг/мл, MPC-250 нг/мл содержат антитела к пембролизумабу в присутствии пембролизумаба 20 мкг/мл (+20 мкг/мл) и 40 мкг/мл (+40 мкг/мл).

Note. SD, standard deviation; CV, coefficient of variation. Control LPS-100 ng/mL MP-250 ng/mL contain antibodies to pembrolizumab in the presence of pembrolizumab 20 µg/mL (+20 µg/mL) and 40 µg/mL (+40 µg/mL).

ТАБЛИЦА 3. ПРЕЦИЗИОННОСТЬ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ АНТИТЕЛ К ПЕМБРОЛИЗУМАБУ В ХОДЕ ШЕСТИ СЕРИЙ

TABLE 3. THE PRECISION OF THE METHOD FOR DETERMINING THE NEUTRALIZING ACTIVITY OF ANTIBODIES TO PEMBROLIZUMAB DURING SIX SERIES

Образец Sample	Оптическая плотность Optical density								КВ, % CV, %
	1	2	3	4	5	6	Среднее Mean	СО SD	
НРС	0,697	0,730	0,540	0,489	0,575	0,644	0,612	0,094	15,3
МРС	0,910	0,901	0,707	0,868	0,875	0,924	0,864	0,080	9,2
ЛРС	1,493	1,490	1,258	1,188	1,406	1,503	1,390	0,136	9,8
НС	2,376	2,414	2,298	2,240	2,333	2,424	2,347	0,071	3,0
РСП	1,935	1,952	1,778	1,714	1,869	1,963	1,869	0,093	5,0

Примечание. СО – стандартное отклонение, КВ – коэффициент вариации.

Note. SD, standard deviation; CV, coefficient of variation.

цов. КВ внутри каждого из 6 циклов для каждого контрольного образца не превышал 8%, данные по воспроизводимости между циклами представлены в таблице 3.

Специфичность

Специфичность – это способность однозначно оценивать определяемое вещество и не давать перекрестной реактивности со структурно родственными соединениями. Так как пембролизумаб является гуманизированным МАТ, включающим гиперварибельным участком иммуноглобулина мыши, то в качестве его структурно родственного соединения были выбраны другие лекарственные препараты – олокизумаб и трастузумаб. Для оценки специфичности использовали образцы пембролизумаба (100 нг/мл) и НС в вариантах без добавки или с добавкой ан-

тител к олокизумабу (на уровне 1000 нг/мл). По результатам анализа усредненное значение ОП должно быть ниже РСП для ЛРС и выше РСП для интактной сыворотки.

«Хук»-эффект и линейность отклика

Наблюдалось снижение ОП градуировочных образцов с увеличением концентрации антител к пембролизумабу (обратная зависимость, см. рис. 3), что позволило доказать отсутствие «хук»-эффекта до концентрации 1000 нг/мл. В данном исследовании верхняя точка проверки диапазона была ограничена концентрацией образца положительного контроля, используемой ИФА тест-системы.

Обсуждение

Решение Коллегии ЕЭК № 89 [1] допускает при невозможности (недоступности) нейтрализующих методов количественного определения на основе клеток использовать методы конкурентного связывания с лигандом или другие альтернативы. Однако при их использовании необходимо обосновать, что данные методы отражают нейтрализующую способность (активность) исследуемых антител [7, 8]. Для такого обоснования можно учесть точку зрения Руководства FDA [6], которое в вопросах обоснования не клеточного подхода ссылается на работу [17], в которой описываются его следующие научные обоснования: исследуемый препарат блокирует белок-мишень (особенно если препарат представляет собой моноклональное антитело); для реализации действия препарат не должен попадать внутрь клетки. Действительно, препарат пембролизумаб соответствует данным условиям: он является МАТ, блокирующим PD-1; механизм действия пембролизумаба реализуется на поверхности клеток

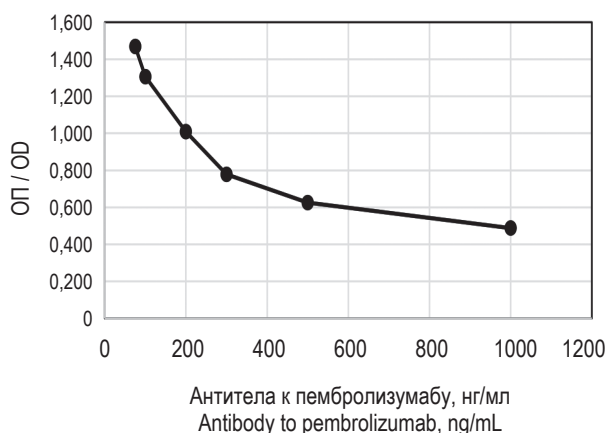


Рисунок 3. Зависимость ОП от концентрации антител к пембролизумабу (обратная зависимость)

Figure 3. The dependence of OD on the concentration of antibodies to pembrolizumab (the inverse relationship)

Т-лимфоцитов, на которых располагаются рецепторы PD-1. В любом из указанных тестов серьезной проблемой является циркулирующее лекарственное средство, при этом его присутствие даже в минимальных количествах может значительно повлиять на результаты анализа, вызывая ложноположительные или ложноотрицательные результаты.

Наличие циркулирующих МАТ приводит к тому, что нейтрализующие антитела в формате анализа связывания с иммобилизованным препаратом вступают в иммунный комплекс с препаратом в образце, тем самым препятствуя их обнаружению и приводя к ложноотрицательному результату. Высокие концентрации циркулирующего лекарственного средства также могут связываться с мишенью, используемой в анализе, что будет конкурировать с лекарственным средством, используемым в качестве детекторного реагента в анализе, и подавлять сигнал, приводя к ложноположительному результату. Такие затруднения могут повлиять на интерпретацию результатов анализа, что приведет к серьезным последствиям как для безопасности пациентов, так и для производителей данных препаратов в случае ложноположительной иммуногенности препарата. В научных публикациях описаны различные подходы для устранения влияния циркулирующего лекарственного средства на результат анализа [15, 16, 21, 23, 24, 25].

В нашем исследовании мы предложили подход для определения нейтрализующих антител к пембролизумабу, позволяющий решить проблему вмешательства циркулирующего терапевтического моноклонального антитела (до 40 мкг/мл), присутствовавшего в анализируемых образцах. На первом этапе проводили кислотную диссоциацию иммунного комплекса, далее применяли технику ACE и проводили анализ конкурентного связывания PD-1 с пембролизумабом, конъюгированным с пероксидазой хрена.

Свою роль играет и то, что для определения иммуногенности как связывающих, так и нейтрализующих антител нет эталонного стандарта, который мог бы достоверно оценивать иммуногенность к данному препарату. Поэтому при разработке анализов, в том числе на нейтрализующие антитела, на данный момент используют суррогатные контроли, которые могут обладать не такой иммуногенностью, как нейтрализующие антитела, продуцируемые против препарата у пациентов. Тем не менее мировая практика при изучении иммуногенности использует данные контроли при невозможности использования другого варианта [13, 21]. При этом при разработке на нейтрализующие антитела главным критерием методики является демонстрация потери функциональной активности препарата, и суррогатные контроли в этом случае достоверно имитируют данный механизм.

Выводы

Была разработана и валидирована методика выявления нейтрализующих антител к пембролизумабу, основанная на ингибировании пембролизумаба с его мишенью PD-1 в сочетании с техникой ACE.

Благодаря применению подходов, описанных в данной работе к предварительной обработке образцов для анализа нейтрализующих антител, была достигнута лекарственная толерантность при рекомендованной чувствительности 100 нг/мл в присутствии циркулирующего пембролизумаба 40 мкг/мл.

Был обоснован метод расчета предела исключения, чувствительности и селективности на основании ROC-анализа и плавающего предела исключения (PSCP) через средние арифметические значения ОП NC и LPC в каждом индивидуальном аналитическом планшете.

Список литературы / References

1. Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза» [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://normativ.kontur.ru/document?moduleId=1&documentId=491692> (дата обращения: 15.01.2025). [Decision of the EEC Council dated 03.11.2016 No. 89 "On approval of the Rules for Conducting Research on Biological Medicinal Products of the Eurasian Economic Union" [Electronic resource]. Available at: <https://normativ.kontur.ru/document?moduleId=1&documentId=491692> (date of access: January 15, 2025).
2. Baxi S., Yang A., Gennarelli R.L., Khan N., Wang Z., Boyce L., Deborah K. Immune-related adverse events for anti-PD-1 and anti-PD-L1 drugs: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 2018, Vol. 360, k793. doi: 10.1136/bmj.k793.
3. Butterfield A.M., Chain J.S., Ackermann B.L., Konrad R.J. Comparison of assay formats for drug-tolerant immunogenicity testing. *Bioanalysis*, 2010, 2 no. 12, pp. 1961-1969.

4. Bourdage J.S., Cook C.A., Farrington D.L., Chain J.S., Konrad R.J. An Affinity Capture Elution (ACE) assay for detection of anti-drug antibody to monoclonal antibody therapeutics in the presence of high levels of drug. *J. Immunol. Methods*, 2007, Vol. 327, no. 1-2, pp. 10-17.
5. Chen Y.Q., Pottanat T.G., Carter Q.L., Troutt J.S., Konrad R.J., Sloan J.H. Affinity capture elution bridging assay: a novel immunoassay format for detection of anti-therapeutic protein antibodies. *J. Immunol. Methods*, 2016, Vol. 431, pp. 45-51.
6. FDA: Guidance for Industry: Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products – Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Biologics Evaluation and Research (CBER) January. 2019. Available at: <https://www.fda.gov/media/119788/download>.
7. Gupta S., Indelicato S.R., Jethwa V., Kawabata T., Kelley M., Mire-Sluis A.R., Richards S.M., Rup B., Shores E., Swanson S.J., Wakshull E. Recommendations for the design, optimization, and qualification of cell-based assays used for the detection of neutralizing antibody responses elicited to biological therapeutics. *J. Immunol. Methods*, 2007, Vol. 321, no. 1-2, pp. 10-18.
8. Gunn G.R. 3rd, Sealey D.C.F., Jamali F., Meibohm B., Ghosh S., Shankar G. From the bench to clinical practice: understanding the challenges and uncertainties in immunogenicity testing for biopharmaceuticals. *Clin. Exp. Immunol.*, 2016, Vol. 184, no. 2, pp. 137-146.
9. Hu J., Wala I., Han H., Nagatani J., Barger T., Civoli F., Kaliyaperumal A., Zhuang Y., Shalini Gupta S. Comparison of cell-based and non-cell based assay platforms for the detection of clinically relevant anti-drug neutralizing antibodies for immunogenicity assessment of therapeutic proteins. *J. Immunol. Methods*, 2015, Vol. 321, no. 1-2, pp. 1-18.
10. Khoja L., Day D., Wei-Wu Chen T., Siu L.L., Hansen AR. Tumour- and class-specific patterns of immune-related adverse events of immune checkpoint inhibitors: a systematic review. *Ann. Oncol.*, 2017, Vol. 28, no. 10, pp. 2377-2385.
11. Knezevic I., Kang H.N., Thorpe R. Immunogenicity assessment of monoclonal antibody products: a simulated case study correlating antibody induction with clinical outcomes. *Biologicals*, 2015, Vol. 43, no. 5, pp. 5307-5317.
12. Krishna M., Nadler S.G. Immunogenicity to biotherapeutics – the role of anti-drug immune complexes. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, 21. doi: 10.3389/fimmu.2016.00021.
13. Mora J., Palmer R., Wagner L., Wu B., Partridge M. 2023 White Paper on Recent Issues in Bioanalysis: ISR for ADA Assays, the Rise of dPCR vs qPCR, International Reference Standards for Vaccine Assays, Anti-AAV TAB Post-Dose Assessment, NanoString Validation, ELISpot as Gold Standard (Part 3 – Recommendations on Gene Therapy, Cell Therapy, Vaccines Immunogenicity & Technologies; Biotherapeutics Immunogenicity & Risk Assessment; ADA/NAb Assay/Reporting Harmonization). *Bioanalysis*, 2024, Vol. 16, no. 7, pp. 77-119.
14. Nakane P.K., Kawaoi A.J. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.*, 1974, Vol. 22, no. 2, pp. 1084-1091.
15. Nath N., Flemming R., Godat B., Urh M. Development of NanoLuc bridging immunoassay for detection of anti-drug antibodies. *J. Immunol. Methods*, 2017, Vol. 450, pp. 17-26.
16. Niu H., Klem T., Yang J., Qiu Y., Pan L. A biotin-drug extraction and acid dissociation (BEAD) procedure to eliminate matrix and drug interference in a protein complex anti-drug antibody (ADA) isotype specific assay. *J. Immunol. Methods*, 2017, Vol. 446, pp. 30-36.
17. Richards S., Amaravadi L., Pillutla R., Birnboeck H., Torri A., Kyra J., Cowan K.J., Papadimitriou A., Garofolo F., Satterwhite C., Piccoli S., Wu B., Krinos-Fiorotti C., Allinson J., Berisha F., Cocea L., Croft S., Fraser S., Galliccia F., Gorovits B., Gupta S., Gupta V., Haidar S., Hottenstein C., Ishii-Watabe A., Jani D., Kadavil J., Kamerud J., Kramer D., Litwin V., Santos G.M.L., Nelson R., Ni Y., Pedras-Vasconcelos J., Qiu Y., Paul Rhyne P., Safavi A., Saito Y., Savoie N., Kara Scheibner K., Schick E., Siguenza P. Y., Smeraglia J., Staack R.F., Subramanyam M., Sumner G., Thway T., Uhlinger D., Ullmann M., Vitaliti M., Welink J., Whiting C.C., Xue L., Zeng R. White Paper on recent issues in bioanalysis: focus on biomarker assay validation (BAV):(Part 3–LBA, biomarkers and immunogenicity). *Bioanalysis*, 2016, Vol. 8, no. 23, pp. 2475-2496.
18. Sasson S.C., Wilkins L.E., Watson R.A., Jolly C., Brain O., Klenerman P., Olsson-Brown A., Fairfax B. Identification of neutralising pembrolizumab anti-drug antibodies in patients with melanoma. *Sci. Rep.*, 2021, Vol. 11, no. 1, 19253. doi: 10.1038/s41598-021-98700-7.
19. Shankar G., Arkin S., Cocea L., Devanarayan V., Kirshner S., Kromminga A., Quarmby V., Richards S., Schneider C. K., Subramanyam M., Swanson S., Verthelyi D., Yim S. American Association of Pharmaceutical Scientists Assessment and reporting of the clinical immunogenicity of therapeutic proteins and peptides-harmonized terminology and tactical recommendations. *AAPS J.*, 2014, Vol. 16, no. 4, pp. 658-673.
20. Wadhwa M., Knezevic I., Kang H.N., Thorpe R. Immunogenicity assessment of biotherapeutic products: an overview of assays and their utility. *Biologicals*, 2015, Vol. 43, no. 5, pp. 298-306.
21. Weiner J.A., Natarajan H., Calum J., McIntosh C., Yang E.S., Choe M., Papia C.L., Axelrod K.S., Gabriela Kovacicova G., Pegu A., Ackerman M.E. Selection of positive controls and their impact on anti-drug antibody assay performance. *J. Immunol. Methods*, 2024, Vol. 528, 113657. doi: 10.1016/j.jim.2024.113657.

22. Wu B., Chung S., Jiang X.-R., McNally J., Pedras-Vasconcelos J., Pillutla R., White J.T., Xu Y., Gupta S. Strategies to determine assay. format for the assessment of neutralizing antibody responses to biotherapeutics. *AAPS J.*, 2016, Vol. 18, no. 6, pp. 1335-1350.
23. Wu B.W., Gunn G.R. III, Shankar G. Competitive Ligand-Binding Assays for the Detection of Neutralizing Antibodies. Detection and quantification of antibodies to biopharmaceuticals: practical and applied considerations. In: Tovey M.G. (ed.). *Detection and Quantification of Antibodies to Biopharmaceuticals*. Wiley, 2011, pp. 175-192.
24. Wu B., Schnarr M., Devlin J.L., Brown S., Yang T.-Y. Approaches to improve drug tolerance and target tolerance in the assessment of neutralizing anti-drug antibodies. *Bioanalysis*, 2019, Vol. 11, no. 22, pp. 2061-2074.
25. Xiang Y., Parng C., Olson K., Seletskaya E., Gorovits B., Jani D., Caiazza T., Joyce A., Donley J. Neutralizing Antibody Assay Development with High Drug and Target Tolerance to Support Clinical Development of an Anti-TFPI Therapeutic Monoclonal Antibody. *AAPS J.*, 2019, Vol. 21 no. 3, 46. doi: 10.1208/s12248-019-0320-3.
26. Zoghbi J., Xu Y., Grabert R., Theobald V., Richards S. A breakthrough novel method to resolve the drug and target interference problem in immunogenicity assays. *J. Immunol. Methods*, 2015, Vol. 426, pp. 62-69.

Авторы:

Кудряшова А.М. — научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Гребенкин Д.Ю. — к.фарм.н., заведующий лабораторией исследований биотехнологических препаратов ООО «Экзактэ Лабс», Москва, Россия

Самсонов М.Ю. — к.м.н., директор медицинского департамента АО «Р-Фарм», Москва, Россия

Authors:

Kudryashova A.M., Researcher, Laboratory of Medical Biotechnology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Grebenkin D.Yu., PhD (Pharmacy), Head, Laboratory for Research of Biotechnological Drugs, Exakte Labs LLC, Moscow, Russian Federation

Samsonov M.Yu., PhD (Medicine), Director, Medical Department, R-Pharm JSC, Moscow, Russian Federation

Филон О.В. — директор департамента доклинической и клинической разработки АО «Р-Фарм», Москва, Россия

Filon O.V., Director, Department of Preclinical and Clinical Development, R-Pharm JSC, Moscow, Russian Federation

Разживина В.А. — к.б.н., руководитель отдела клинических исследований АО «Р-Фарм», Москва, Россия

Razzhivina V.A., PhD (Biology), Head, Clinical Research Department, R-Pharm JSC, Moscow, Russian Federation

Чернобровкин М.Г. — к.х.н., заведующий лабораторией ООО «Рисерч лаб», Москва, Россия

Chernobrovkin M.G., PhD (Chemistry), Head of the Laboratory, Research Lab LLC, Moscow, Russian Federation

Борисова О.В. — к.х.н., заведующая лабораторией медицинской биотехнологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Borisova O.V., PhD (Chemistry), Head, Laboratory of Medical Biotechnology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Поступила 06.02.2025

Отправлена на доработку 06.03.2025

Принята к печати 23.03.2025

Received 06.02.2025

Revision received 06.03.2025

Accepted 23.03.2025