

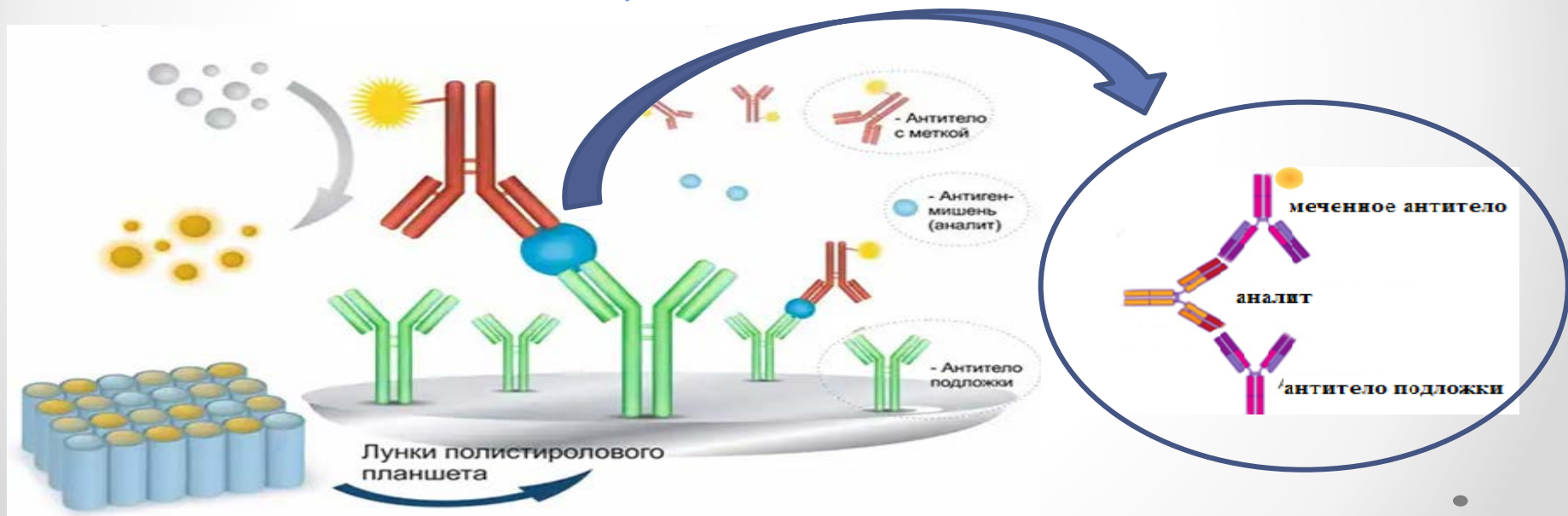


# Реализация мостикового ИФА для оценки кинетики моноклональных антител на примере пембролизумаба

Научный сотрудник лаборатории  
иммуноферментного анализа Барыбина Т.Н.

[www.doclinika.ru](http://www.doclinika.ru)

- **Мостиковый иммуноферментный анализ (ELISA)** - это разновидность сэндвич-ИФА, который обычно используется для обнаружения терапевтических белков - антител (MAb) или антилекарственных антител к терапевтическим белкам



# Преимущества и недостатки мостикового ИФА

(+) возможность обнаружения антител независимо от их изотипа или вида происхождения

(+) высокая специфичность анализа за счёт связывания по двум активным центрам

(-) фоновые показатели выше, чем у других видов ИФА

# Определение пембролизумаба методом ИФА

- Иммунотерапия моноклональными антителами - стандарт лечения растущего числа типов опухолей, поэтому важно точное и чувствительное определение концентрации антител
- Фармакокинетические исследования могут помочь оптимизировать терапию против PD-1. Поэтому важно точное и чувствительное определение концентрации антител.

# Характеристика метода\*

- В основе метода лежит специфический захват пембролизумала (RPH-075) с последующим ферментативным спектрофотометрическим обнаружением анти-IgG4 в сочетании с пероксидазой хрена (HRP)
- Нижний предел количественного определения в сыворотке крови и ЦСЖ- 2 нг/мл
- Метод прошел валидацию и показал долговременную стабильность образца >1 года
- Метод является надежным, относительно недорогим и может использоваться в сыворотке и ЦСЖ у пациентов, получавших пембролизумаб
- \*Источник: 1. Patton, A., Mullenix, M. C., Swanson, S. J., & Koren, E. (2005). An acid dissociation bridging ELISA for detection of antibodies directed against therapeutic proteins in the presence of antigen. *Journal of Immunological Methods*, 304(1-2), 189–195.
- 2. Jani, M., Isaacs, J. D., Morgan, A. W., Wilson, A. G., Plant, D., Hyrich, K. L., ... Barton, A. (2016). Detection of anti-drug antibodies using a bridging ELISA compared with radioimmunoassay in adalimumab-treated rheumatoid arthritis patients with random drug levels. *Rheumatology*, 55(11), 2050–2055.

# Разработка методики ИФА количественного определения пембролизумаба в биоматериале яванских макак

- для количественного определения пембролизумаба применяли метод мостикового ИФА (PK Bridging ELISA for Use with Anti-Pembrolizumab Antibodies) с использованием коммерчески доступных антител в соответствии со протоколом производителя комплекта антител
- Методика валидирована по следующим параметрам: селективность, нижний предел количественного определения (НПКО), калибровочный диапазон, правильность (точность) и прецизионность, стабильность анализа

# Схема протокола определения пембролизумаба методом МОСТИКОВОГО ИФА

(Pharmacokinetic (PK) Bridging ELISA: for Use with Anti-Pembrolizumab Monoclonal Antibodies HCA296 and HCA297P)

- Иммунизация планшета первичными антителами (HCA296)

- Блокировка неспецифических сайтов связывания

- Приготовление калибровочных растворов и анализируемых образцов

- Внесение образцов в лунки планшета
- Инкубирование

- Внесение в лунки планшета раствора детектирующих антител (HCA297P)
- Инкубирование

- Добавление в лунки раствора субстрата
- Инкубирование

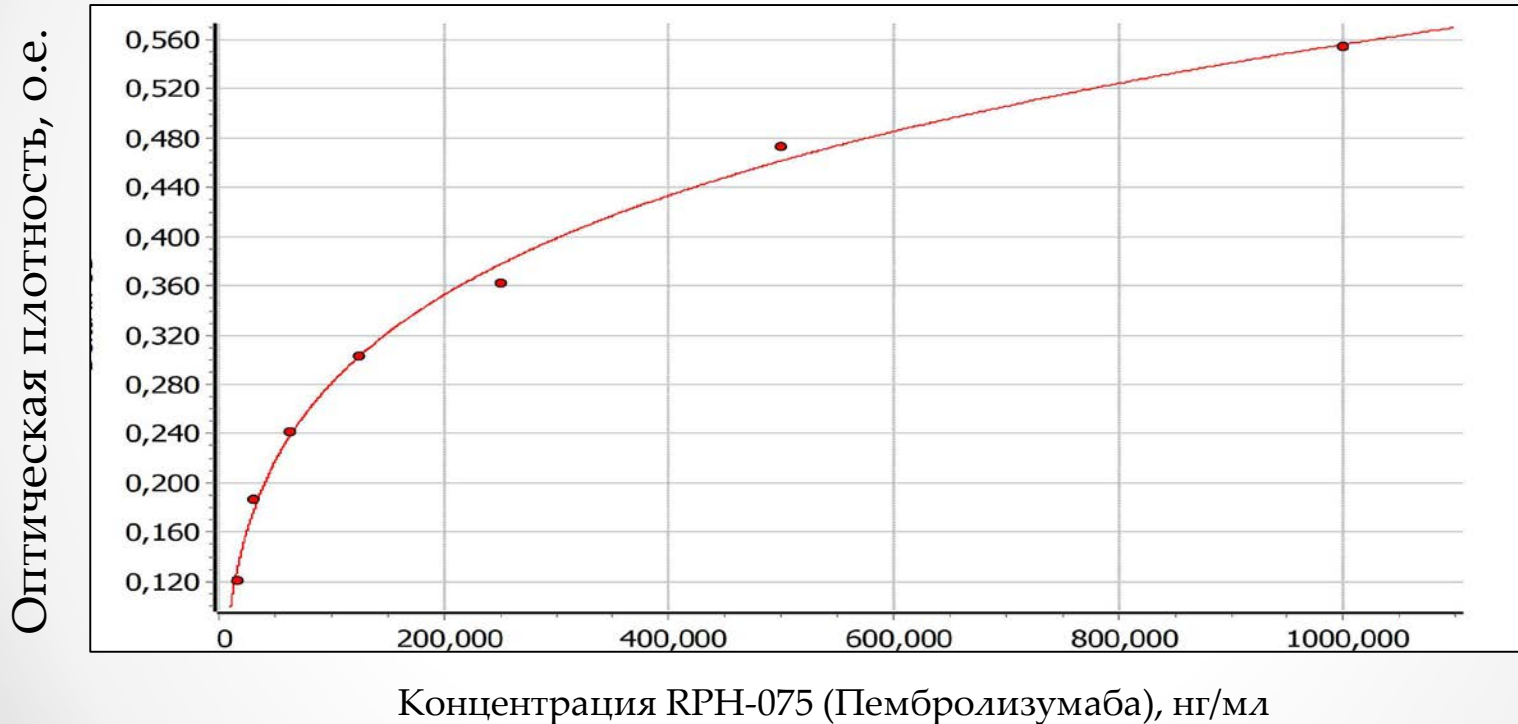
- Остановка реакции
- Измерение оптической плотности (OD 450nm)

# Полученные валидационные параметры

Валидационный параметр	Уровень концентрации	Критерий приемлемости	Результат
Селективность	Бланк-сыворотка (n=10), НПКО	Правильность должна находиться в пределах $\pm 25$ % от номинальной концентрации в, по меньшей мере, 80 % изученных биологических образцов.	79,5 -122,0% для 85% биологических образцов
Нижний предел количественного определения	НПКО	Точность – 75-125% Прецизионность – не менее 25%	15,6 нг/мл (78 нг/мл с учётом минимального разведения 97,2 14,5
Калибровочный диапазон	Калибровочные стандарты не менее, чем шести концентраций, не менее 3 серий	Коэффициент корреляции (r), Отклонения экспериментально рассчитанных значений концентраций от номинальных не более 20 % (25 % для НПКО) для не менее, чем 75% стандартов	15,6-1000 нг/мл r=0,9978-0,9988 отклонения менее 20% (25% для НПКО) для 79-100% стандартов
Минимально необходимое разведение образцов	-	-	В 5 раз



Пример типичной калибровочной зависимости оптической плотности от концентрации RPH-075 (Пембролизумаба) в сыворотке крови, полученной в ходе валидации методики



# Валидационные параметры

Валидационный параметр	Уровень концентрации	Критерий приемлемости	Результат
Правильность в одном цикле // между циклами, %	ВПКО	80-120	85,7– 114,6 //95,0
	Верхний КК	80-120	83,7– 118,5//93,3
	Средний КК	80-120	82,4 – 115,1//101,4
	Низкий КК	80-120	83,8 – 114,1//100,4
	НПКО	75-125	75,9 – 120,2//94,9
Прецизионность в одном цикле, %	ВПКО	<20	7,6– 10,4//9,1
	Верхний КК	<20	10,0 – 11,5//11,1
	Средний КК	<20	5,4 – 11,3//9,7
	Низкий КК	<20	6,4– 9,2//8,2
	НПКО	<25	9,2 – 14,6//13,9
Долгосрочная стабильность анализа в сыворотке крови, хранящейся в условиях заморозки ниже $-70\pm 10^{\circ}\text{C}$	-	80-120	84,8 -105,1%

# Оценка влияния матрицы

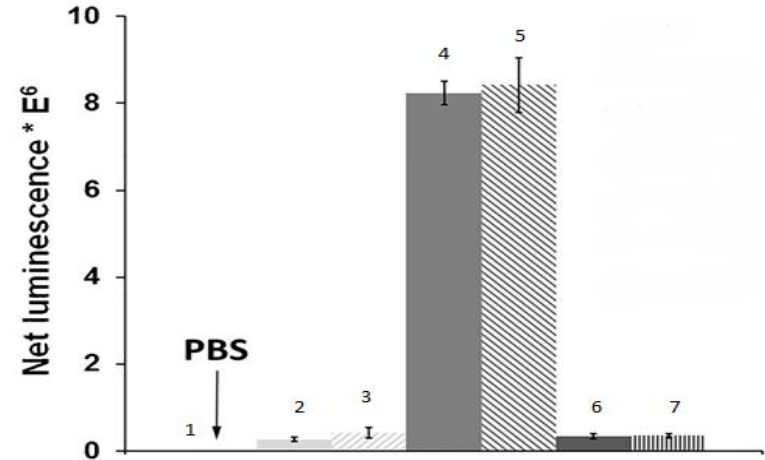
Уменьшения влияния матрицы и снижения фонового сигнала:

-Разведение проб, калибровочных образцов и контролей производили в 10% растворе сыворотки крови человека в промывочном буферном растворе (0,01М фосфатно-солевом буферном растворе с 0,1% полисорбата 20 (PBS-T))

- Блокировка планшета в 5% растворе бычьего сывороточного альбумина в PBST

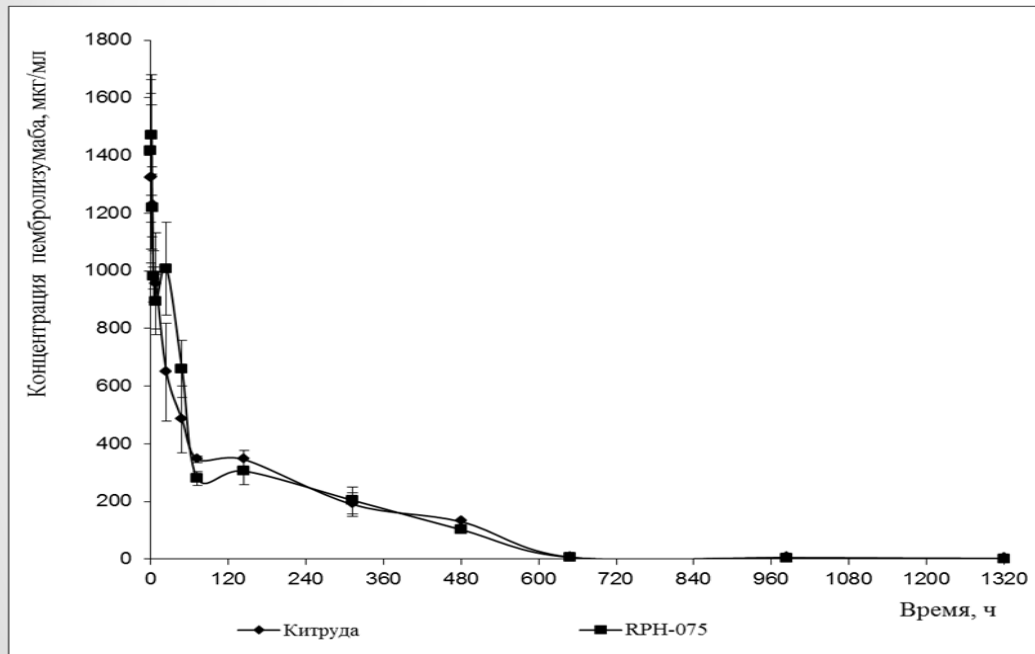
• Фоновый сигнал после 3-х часовой инкубации с 300 мкл блокирующего раствора:

- 1 - PBS (контроль);
- 2 - 2% бычий сывороточный альбумин(BSA);
- 3 - 5% бычий сывороточный альбумин(BSA);
- 4 - 2% обезжиренное сухое молоко;
- 5 - 5% обезжиренное сухое молоко;
- 6 - 40% телячья фетальная сыворотка(FCS);
- 7- 100% телячья фетальная сыворотка(FCS).



\*Источник: Pluim, D., Ros, W., van Bussel, M. T. J., Brandsma, D., Beijnen, J. H., & Schellens, J. H. M. (2019). Enzyme linked immunosorbent assay for the quantification of nivolumab and pembrolizumab in human serum and cerebrospinal fluid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 164, 128–134

# Использование разработанной методики для изучения фармакокинетики исследуемых образцов



Кривые «концентрация-время» пембролизумаба в сыворотке крови яванских макак после однократного внутривенного введения тестируемого препарата RPH-075 (Пембролизумаб) дозе 30 мг/кг и препарата сравнения Китруда® в дозе 30 мг/кг в линейных координатах (n=4, M±SEM)

## Средние значения основных фармакокинетических параметров пембролизумаба при однократном внутривенном введении обезьянам в дозе 30 мг/кг ( $X_{ср.} \pm SD$ )

Объект	$C_{max}$ , мкг/мл	$AUC_{0-1320}$ , ч×мкг/мл	$V_{SS}$ , мл/кг	MRT, ч	$T_{1/2}$ , ч	Cl, мл/кг×ч
РН-075 [Т]	1567 ±405	156903 ±47703	36,4 ±8,8	191 ±62	324 ±169	0,20 ±0,07
Китруда [R]	1541 ±415	156879 ±36461	42,7 ±8,4	218 ±18	350 ±133	0,20 ±0,05
Препарат Китруда®*	1265 ±73	152976 ±18408	54,8 ±5,7	нет данных	255 ±10	0,15 ±0,00

\*Источник: EMA assessment report for Keytruda. International Nonproprietary Name pembrolizumab. – URL: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/keytruda-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/keytruda-epar-public-assessment-report_en.pdf) (дата обращения: 11.2022)

Выражаем благодарность группе компаний «Р-Фарм» за  
финансовую поддержку научно-исследовательской  
работы