

Валидация иммуноферментной тест-системы для доклинических исследований фармакокинетики ритуксимаба

В. В. Писарев^{1*}, М. М. Уляшова¹, Г. Н. Гильдеева²

¹Общество с ограниченной ответственностью «Научно-производственный центр Пробиотек», Ленинские Горы, д. 1, стр. 75В, Москва, 119992, Российская Федерация

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

Резюме. Неотъемлемой частью доклинических фармакокинетических исследований является разработка биоаналитической методики определения лекарственного средства в биологической жидкости. **Цель работы:** оценка пригодности тест-системы на основе твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) (ООО «Научно-производственный центр Пробиотек») для количественного определения ритуксимаба в сыворотке крови лабораторных животных после внутривенного введения ритуксимаба в количестве, соответствующем терапевтической дозе у человека. **Материалы и методы:** определение ритуксимаба проводили по «сэндвич»-схеме твердофазного ИФА в две стадии с последующей детекцией на основе пероксидазы хрена. Регистрация результатов ИФА проводилась с помощью микропланшетного фотометра при длине волны 450 нм. **Результаты:** в ходе работы установлены предел обнаружения (0,24 нг/мл) и нижний предел количественного определения (1,00 нг/мл) ритуксимаба в сыворотке крови кроликов, доказана высокая селективность определения аналита в многокомпонентной биологической матрице. Найденные средние значения концентрации ритуксимаба не отклонялись от номинальных значений более чем на 14 % во всем диапазоне применения методики, внутри- и межсерийная прецизионность тест-системы не превышала 7,4 %, общая ошибка метода — 20,1 %. Продemonстрированная линейность разведения позволяет применять данную тест-систему для анализа биологических образцов в широком диапазоне концентраций ритуксимаба. Стабильность аналита в сыворотке крови кроликов подтверждена при хранении образцов в течение 6 ч при комнатной температуре, 50 дней при –35 °С и после 3 циклов замораживания-оттаивания. Валидированная тест-система была успешно апробирована в ходе определения концентрации ритуксимаба в биологических образцах, полученных в рамках исследования фармакокинетики ритуксимаба у кроликов, во всем интервале определяемых концентраций подтверждена достоверность результатов анализа, продемонстрирован параллелизм между калибровочным графиком и результатами анализа серийно разведенных образцов сыворотки крови кроликов с максимальной концентрацией ритуксимаба. **Выводы:** изученная иммуноферментная тест-система пригодна для количественного определения ритуксимаба в сыворотке крови лабораторных животных, поскольку по всем валидационным параметрам соответствует критериям приемлемости, предъявляемым международными стандартами по валидации биоаналитических методов.

Ключевые слова: ритуксимаб; биоаналог; фармакокинетика; твердофазный иммуноферментный анализ; валидация; доклинические исследования

Для цитирования: Писарев ВВ, Уляшова ММ, Гильдеева ГН. Валидация иммуноферментной тест-системы для доклинических исследований фармакокинетики ритуксимаба. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2019;9(2):131–139. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-2-131-139>

Контактное лицо: Писарев Владимир Викторович; info@probiotech.ru

Validation of Enzyme Immunoassay for Preclinical Pharmacokinetic Trials of Rituximab

V. V. Pisarev^{1*}, M. M. Ulyashova¹, G. N. Gildeeva²

¹Scientific and Production Center Probiotech LLC, 1/75B Leninskie Gory, Moscow 119992, Russian Federation

²I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

Abstract. An integral part of preclinical pharmacokinetic studies is the development of a bioanalytical method for determination of the drug in a biological fluid. **The aim** of the research was to assess the suitability of the test system based on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantitative determination of rituximab in the blood serum of laboratory animals after intravenous administration of rituximab at a dose corresponding to the therapeutic dose in humans. The test system was developed by the Scientific and Production Center Probiotech. **Materials and methods:** the determination of rituximab in biological samples was carried out using a two-stage sandwich-type ELISA, followed by detection based on horseradish peroxidase. The ELISA results were recorded using a microplate photometer at a wavelength of 450 nm. **Results:** the experiments helped to establish the detection limit (0.24 ng/mL) and the lower limit of quantitation (1.00 ng/mL) of rituximab in rabbit blood serum, they also demonstrated high selectivity of analyte determination in a multicomponent biological matrix. The mean rituximab concentration was within 14 % of the nominal value in the entire working range of the method. The within-run and between-run precision of the assay did not exceed 7.4 %, the total error of the method did not exceed 20.1 %. The linearity of dilution makes it possible to use the assay

for the analysis of biological samples with a wide range of rituximab concentrations. The stability of the analyte in the rabbit blood serum was confirmed by storing samples for 6 hours at room temperature, for 50 days at -35°C , and after 3 freeze-thaw cycles. The validated immunoassay was successfully used to determine the rituximab concentration in biological samples obtained in the rituximab pharmacokinetic trial in rabbits. The accuracy of the results was confirmed for the entire range of the determined concentrations; parallelism was demonstrated between the calibration curve and the results of analysis of serially diluted rabbit serum samples with the maximum concentration of rituximab. **Conclusions:** the proposed enzyme immunoassay test system can be used for quantitative determination of rituximab in the blood serum of laboratory animals, as it meets acceptance criteria for all validation parameters described in the international guidelines on validation of bioanalytical methods.

Key words: rituximab; biosimilar; pharmacokinetics; enzyme-linked immunosorbent assay; validation; preclinical trials

For citation: Pisarev VV, Ulyashova MM, Gildeeva GN. Validation of enzyme immunoassay for preclinical pharmacokinetic trials of rituximab. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2019;9(2):131–139. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-2-131-139>

*Corresponding author: Vladimir V. Pisarev; info@probiotech.ru

Первым анти-В-клеточным препаратом, разрешенным к применению в клинической практике, стал ритуксимаб — рекомбинантные химерные моноклональные антитела к поверхностным рецепторам В-лимфоцитов — CD20. По структуре ритуксимаб относится к IgG1 κ-иммуноглобулинам, его молекула содержит мышиные вариабельные фрагменты легких и тяжелых цепей и человеческий постоянный Fc-сегмент [1, 2]. Препарат применяется в медицине с 1997 г. для лечения В-клеточных неходжкинских лимфом [3], а в последние годы — широкого круга аутоиммунных заболеваний [4, 5]. Связываясь с трансмембранным белком CD20, ритуксимаб инициирует иммунологические реакции, опосредующие лизис В-клеток. Среди них выделяют антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность с участием моноцитов, макрофагов или естественных клеток-киллеров и цитотоксичность, связанную с активацией системы комплемента. Показано также, что ритуксимаб непосредственно стимулирует апоптоз CD20+ В-клеток. Выявленного подавления функции костного мозга при этом не происходит, так как CD20-белок не продуцируется в стволовых клетках [1, 6].

Высокая стоимость оригинального препарата ритуксимаба создает острую потребность в его более доступных биоаналогах. Согласно международным рекомендациям неотъемлемой частью программы разработки биоаналогов являются доклинические и клинические фармакокинетические исследования, направленные на подтверждение биоподобия оригинальному препарату с позиций ключевых фармакокинетических параметров¹. Обязательным этапом таких исследований является разработка биоаналитической методики определения лекарственного средства в биологической жидкости — чаще всего плазме или сыворотке крови.

Большая часть публикаций, описывающих методы определения ритуксимаба в биологических жидкостях, основана на твердофазном иммунофер-

ментном анализе (ИФА). Чувствительность и калибровочные диапазоны этих методов в зависимости от типа используемых реагентов сильно варьируют от мкг-диапазона при использовании специфических пептидов [7] или поликлональных антител [8, 9] до нанограммового диапазона при использовании CD20+ лимфобластоидных клеток [10] или высокоспецифичных моноклональных антител [11, 12]. Все имеющиеся на отечественном рынке коммерческие наборы — только иностранного производства. Их пределы количественного определения варьируют от пяти до нескольких сот нг/мл, что в большинстве случаев является достаточным для изучения фармакокинетики ритуксимаба у пациентов после введения препарата в терапевтической дозе (375 мг/м² поверхности тела). Однако фармакокинетические исследования ритуксимаба у здоровых людей проводят на дозах препарата на порядки ниже терапевтической (1 мг/м² поверхности тела и ниже) [13], и в этом случае требуются аналитические методы с уже гораздо более высокой чувствительностью.

Компанией ООО «Научно-производственный центр Пробиотек» разработана тест-система на основе «сэндвич»-варианта твердофазного ИФА для количественного определения ритуксимаба в биологических жидкостях. За счет использования моноклональных антител, высокоспецифичных к вариабельным фрагментам ритуксимаба, тест-система демонстрирует высокую селективность определения аналита на фоне эндогенных компонентов в сыворотке крови лабораторных животных и человека. Преимуществами разработанной тест-системы являются высокая чувствительность, а также стоимость применения, как минимум в 3 раза меньшая, чем в случае импортных наборов ИФА.

Цель работы — оценка пригодности разработанной ИФА тест-системы для количественного определения ритуксимаба в сыворотке крови кроликов после внутривенного введения препарата, содержащего ритуксимаб, в дозе, соответствующей терапевтиче-

¹ Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues (EMA/CHMP/BMWP/42832/2005 Rev1).

Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies — non-clinical and clinical issues (EMA/CHMP/BMWP/403543/2010).

Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs). World Health Organization.

ской дозе у человека. Для достижения поставленной цели необходимо было провести полную валидацию тест-системы и оценить все валидационные параметры на соответствие критериям приемлемости, предъявляемым международными стандартами².

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ИФА тест-система для определения ритуксимаба в сыворотке крови (ООО «Научно-производственный центр Пробиотек») включала 96-луночный полистирольный планшет с иммобилизованными на поверхности лунок идиотипическими крысинными моноклональными антителами против ритуксимаба (клон MB2A4, Bio-Rad Laboratories, Inc., США), стандартный раствор ритуксимаба с концентрацией 10 мг/мл (приготовленный на основе препарата Мабтера® концентрат для приготовления раствора для инфузий 500 мг/50 мл («Рош Диагностика ГмбХ», Германия)), раствор конъюгата козьих поликлональных антител против Fc фрагмента IgG человека с пероксидазой хрена (A0170, Sigma-Aldrich, США), субстратный раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ), стоп-реагент, а также отмывочный буферный раствор (0,01 М фосфатно-солевой буфер с 0,05 % Твин-20) и реакционный буферный раствор (0,01 М фосфатно-солевой буфер с 1 % бычьего сывороточного альбумина).

Эксперименты на животных проводились с соблюдением правовых и этических норм обращения с животными в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

Образцы сыворотки крови были получены от 7 кроликов-самцов породы «Советская шиншилла» до и после однократного введения в краевую вену уха препарата Мабтера® концентрат для приготовления раствора для инфузий 500 мг/50 мл («Рош Диагностика ГмбХ», Германия) в дозе 32 мг/кг, что соответствует терапевтической дозе человека. Образцы крови у испытуемых животных отбирали до введения и в течение 28 дней после введения препарата. Образцы крови инкубировали в течение 20 мин при температуре 37 °С для образования сгустка и центрифугировали в течение 15 мин при 1500 g. Далее образцы сыворотки крови переносили в пластиковые пробирки и замораживали при температуре –35 °С до момента проведения анализа.

Процедура валидации ИФА тест-системы включала 6 аналитических серий. В составе каждой аналитической серии были проанализированы калибровочные стандарты для построения градуировочной зависимости, а также необходимое количество бланковых (интактных) образцов сыворотки

крови кроликов и образцов для контроля качества с определенной концентрацией ритуксимаба.

Каждый образец анализировался в трех повторях. Калибровочные стандарты готовили путем добавления стандартного раствора ритуксимаба к реакционному буферу до необходимой концентрации. Образцы для контроля качества готовили аналогично, но в качестве матрицы использовали пул 7 различных бланковых сывороток крови кроликов.

На первой стадии анализа в лунки планшета помещали 100 мкл калибровочного стандарта, образца для контроля качества, бланкового образца сыворотки крови или образца сыворотки кролика с неизвестной концентрацией ритуксимаба с предварительным разведением реакционным буферным раствором в требуемое количество раз. Содержимое лунок перемешивали в течение 2 мин, после чего планшет инкубировали в течение 1 ч. Инкубацию на всех стадиях анализа проводили в защищенном от света месте при температуре 18–25 °С. Далее планшет отмывали три раза отмывочным раствором (300 мкл/лунку). На второй стадии в каждую лунку планшета вносили 100 мкл рабочего раствора конъюгата и инкубировали в течение 30 мин, после чего планшет снова отмывали трижды отмывочным раствором (300 мкл/лунку). Далее в лунки планшета вносили по 100 мкл субстратного раствора ТМБ, инкубировали 15 мин, после чего добавляли по 100 мкл стоп-реагента. Содержимое лунок перемешивали и измеряли оптическую плотность (ОП) при длине волны 450 нм с помощью микропланшетного фотометра MRX (DYNEX Technologies, Inc., США).

Процедура валидации включала определение калибровочного диапазона, выбор регрессионного уравнения, оценку селективности, внутри- и межсерийной правильности и прецизионности, линейности разведения, стабильности биологических образцов, а также параллелизма. Отдельных исследований специфичности не проводилось, поскольку использованные для изготовления ИФА тест-системы моноклональные антитела высокоспецифичны относительно ритуксимаба и не распознают другие CD20 антитела (доказано производителем моноклональных антител).

Регрессионный анализ калибровочной зависимости, расчет коэффициентов детерминации R^2 и статистический анализ данных проводили в Microsoft Excel 2010.

При оценке параметров валидации рассчитывали среднее значение, стандартное отклонение, прецизионность (характеризовалась коэффициентом вариации), правильность (характеризовалась относительной величиной систематической погрешности) по формулам:

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

Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза. Приложение № 6 «Требования к валидации биоаналитических методик испытаний и анализу исследуемых биологических образцов (2016)».

$$\text{среднее значение } (\bar{x}) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (1)$$

$$\text{стандартное отклонение } (SD) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (2)$$

$$\text{прецизионность} = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \% \quad (3)$$

$$\text{правильность} = \frac{\text{Полученное значение} - \text{Номинальное значение}}{\text{Номинальное значение}} \times 100 \% \quad (4)$$

Общая ошибка метода рассчитывалась как сумма модулей значений правильности и прецизионности, выраженных в процентах³.

Предел обнаружения определялся как значение концентрации ритуксимаба, соответствующее среднему значению бланкового образца матрицы + 3SD. Нижний предел количественного определения рассчитывался как значение концентрации ритуксимаба, соответствующее среднему значению бланкового образца матрицы + 10SD.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для выбора интервала ИФА тест-системы для количественного определения ритуксимаба были проанализированы растворы ритуксимаба в реакционном буфере с концентрацией 1–1000 нг/мл. По полученным данным построили график зависимости оптической плотности от значений концентрации ритуксимаба. Из данных, представленных на рисунке 1а, видно, что при концентрации ритуксимаба 250–1000 нг/мл значения оптической плотности (ОП) находятся в области плато, т.е. дальнейшее увеличение концентрации не приводит к пропорциональному возрастанию ОП. Кроме того, для

твёрдофазного ИФА рекомендуется, чтобы максимальное значение ОП не превышало 2,0 усл. ед. [14]. С учетом этого требования значения концентрации ритуксимаба выше 100 нг/мл не могут войти в область диапазона калибровочной кривой. Таким образом, калибровочный график (рис. 1б) состоял из 9 ненулевых калибровочных стандартов, охватывающих диапазон концентраций 1–100 нг/мл, а также нулевого образца, участвующего в определении регрессионного уравнения. Наилучшей регрессионной моделью в диапазоне концентраций 1–100 нг/мл оказалась квадратичная зависимость. Для всех 6 валидационных серий коэффициент детерминации R^2 для калибровочного графика превышал 0,99. По графикам был проведен обратный расчет концентраций калибровочных стандартов. Отклонения рассчитанных значений концентраций всех калибровочных стандартов от теоретических значений находились в диапазоне от –10,3 до 5,3 % и не выходили за допустимые ± 20 %.

Для нахождения предела обнаружения (ПО) и нижнего предела количественного определения (НПКО) был проанализирован образец бланковой сыворотки крови в 10 повторях. По результатам анализа

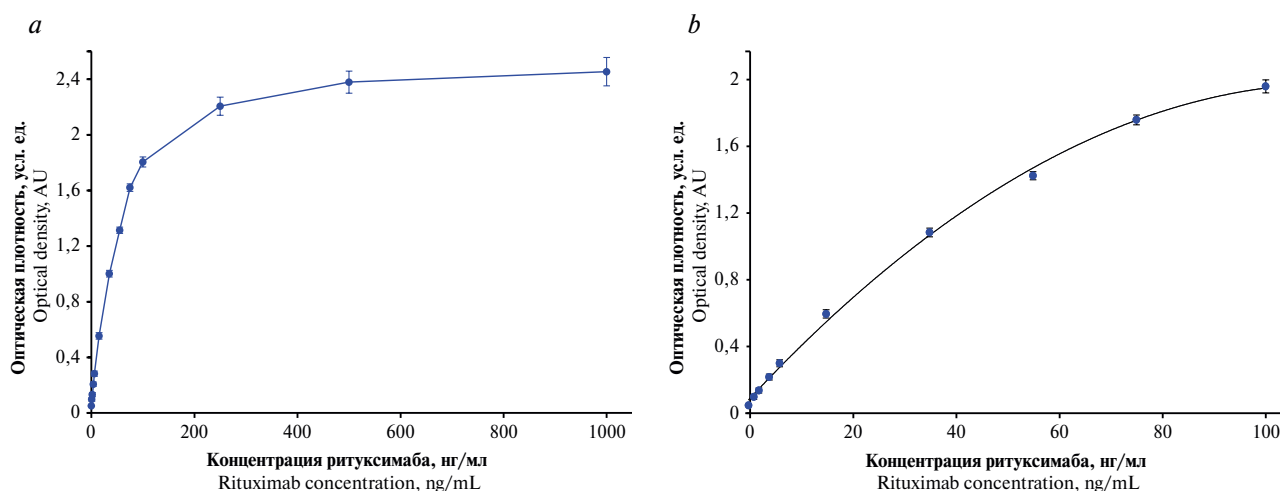


Рис. 1. График зависимости оптической плотности от концентрации ритуксимаба в калибровочных стандартах: а — для диапазона концентраций 1–1000 нг/мл, б — для диапазона концентраций 1–100 нг/мл (уравнение регрессии: $y = -0,0001x^2 + 0,0305x + 0,082$, $R^2 = 0,9986$)

Fig. 1. Plot of optical density versus rituximab concentration in calibration standards: а — for the concentration range of 1–1000 ng/mL, б — for the concentration range of 1–100 ng/mL (regression equation: $y = -0,0001x^2 + 0,0305x + 0,082$, $R^2 = 0,9986$)

³ Guideline on bioanalytical method validation (EMA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2**).

для данного образца были рассчитаны среднее значение ОП и его стандартное отклонение. Предел обнаружения метода, вычисленный как значение, которое выше среднего значения бланковой матрицы на 3 стандартных отклонения, составил 0,24 нг/мл. Для НПКО применялся уровень 10 стандартных отклонений, его значение составило 1,00 нг/мл. Показания образца для контроля качества с концентрацией 1 нг/мл, приготовленного на основе бланковой сыворотки крови, поддавались определению с прецизионностью 11,6 % и правильностью 19,1 %, не превышающих по модулю допустимые 25 %.

При оценке селективности с целью определения степени влияния эндогенных компонентов матрицы на результат количественного определения были проанализированы 10 различных образцов бланковой сыворотки крови кроликов, включая гиперлипидемические и гемолизированные образцы, в которые был добавлен ритуксимаб до конечной концентрации 1 нг/мл и 15 нг/мл. Методика была признана селективной, поскольку соответствует критерию приемлемости — полученные значения концентрации ритуксимаба во всех 10 образцах сы-

воротки крови не отклонялись от номинального значения более чем на 25 % на уровне НПКО (1 нг/мл) и более чем на 20 % на уровне 15 нг/мл.

После внутривенного введения ритуксимаба человеку или лабораторным животным в терапевтической дозе значения максимальных концентраций ритуксимаба находятся в диапазоне 10–600 мкг/мл [15–18], поэтому для проведения валидации были приготовлены образцы для контроля качества с концентрацией ритуксимаба 10, 30, 75, 275, 375 и 650 мкг/мл. Для попадания в калибровочный диапазон тест-системы образцы для контроля качества разводились реакционным буферным раствором, как минимум, в 5000 раз. Дополнительным преимуществом такого разведения было практически полное устранение эффекта матрицы.

Внутри- и межсерийные прецизионность и правильность, а также общая ошибка метода были оценены с использованием 5 образцов для контроля качества с концентрациями ритуксимаба в диапазоне 10–375 мкг/мл. После разведения в 5000 раз образцы анализировали в составе 6 аналитических серий, каждый в трех повторях.

Таблица 1. Внутри- и межсерийная прецизионность, правильность и общая ошибка методики определения ритуксимаба в сыворотке крови кроликов

Table 1. Within-run and between-run precision, accuracy and total error of the method of rituximab determination in the blood serum of rabbits

Аналитические характеристики Analytical characteristics	Образцы для контроля качества Quality control samples				
	10,00 мкг/мл µg/mL	30,00 мкг/мл µg/mL	75,00 мкг/мл µg/mL	275,00 мкг/мл µg/mL	375,00 мкг/мл µg/mL
Внутри аналитической серии (1 серия, 3 повтора для каждого образца) Within analytical run (1 run, each sample in 3 replicates)					
Среднее значение, мкг/мл Mean, µg/mL	8,61	29,71	70,70	269,55	378,66
Стандартное отклонение, мкг/мл Standard deviation, µg/mL	0,53	0,51	0,42	1,45	12,30
Прецизионность, % Precision, %	6,2	1,7	0,6	0,5	3,2
Правильность, % Accuracy, %	–13,9	–1,0	–5,7	–2,0	1,0
Общая ошибка, % Total error, %	20,1	2,7	6,3	2,5	4,2
Между аналитическими сериями (6 серий, 3 повтора для каждого образца) Between analytical runs (6 runs, each sample in 3 replicates)					
Среднее значение, мкг/мл Mean, µg/mL	8,76	30,60	75,23	256,27	356,63
Стандартное отклонение, мкг/мл Standard deviation, µg/mL	0,65	1,44	2,67	7,85	15,57
Прецизионность, % Precision, %	7,4	4,7	3,5	3,1	4,4
Правильность, % Accuracy, %	–12,4	2,0	0,3	–6,8	–4,9
Общая ошибка, % Total error, %	19,8	6,7	3,8	9,9	9,3

Полученные значения прецизионности, правильности и общей ошибки методики внутри и между аналитическими сериями представлены в таблице 1. Средние значения концентрации аналита отклонялись от номинального значения не более чем на 14 % для всех образцов для контроля качества как внутри, так и между аналитическими сериями. Внутрисерийная прецизионность (повторяемость) не превышала 6,2 %, а межсерийная (воспроизводимость) — 7,4 %. Общая ошибка не выходила за пределы 20,1 %. Таким образом, полученные значения валидационных параметров соответствуют

критериям приемлемости: в отношении правильности средние значения концентрации должны укладываться в ± 20 % от номинального значения, прецизионность не должна превышать 20 %, а общая ошибка метода — 30 %.

Из-за узкого диапазона калибровочной кривой при валидации методов ИФА, как правило, оценивают линейность разведения. Для исследования линейности разведения был использован образец для контроля качества с концентрацией 650 мкг/мл. Данный образец разводили сначала в 5000 раз, а затем последовательно еще в 2, 4, 8 и 16 раз ре-

Таблица 2. Стабильность ритуксимаба в сыворотке крови кроликов при различных условиях хранения

Table 2. Stability of rituximab in the rabbit serum under various storage conditions

Аналитические характеристики Analytical characteristics	Образцы для контроля качества Quality control samples			
	10,00 мкг/мл µg/mL	30,00 мкг/мл µg/mL	275,00 мкг/мл µg/mL	650,00 мкг/мл µg/mL
Свежеприготовленные образцы / Freshly prepared samples				
Среднее значение, мкг/мл Mean, µg/mL	9,11	30,70	256,88	632,04
Стандартное отклонение, мкг/мл Standard deviation, µg/mL	0,82	0,80	10,70	21,54
Прецизионность, % Precision, %	9,0	2,6	4,2	3,4
Правильность, % Accuracy, %	−8,9	2,3	−6,6	−2,8
Краткосрочная стабильность (в течение 6 ч при комнатной температуре) Short-term stability (storage for 6 hours at room temperature)				
Среднее значение, мкг/мл Mean, µg/mL	8,62	28,81	251,10	616,65
Стандартное отклонение, мкг/мл Standard deviation, µg/mL	0,41	1,18	4,84	15,96
Прецизионность, % Precision, %	4,8	4,1	1,9	2,6
Правильность, % Accuracy, %	−13,8	−4,0	−8,7	−5,1
Долгосрочная стабильность (в течение 50 дней при температуре −35 °C) Long-term stability (storage for 50 days at −35 °C)				
Среднее значение, мкг/мл Mean, µg/mL	8,72	30,75	257,97	632,97
Стандартное отклонение, мкг/мл Standard deviation, µg/mL	0,58	0,37	3,43	15,96
Прецизионность, % Precision, %	6,7	1,2	1,3	2,5
Правильность, % Accuracy, %	−12,8	2,5	−6,2	−2,6
Стабильность после 3 циклов замораживания при температуре −35 °C (12 ч) и последующего оттаивания Stability after 3 freezing cycles at −35 °C (12 hours) and subsequent thawing				
Среднее значение, мкг/мл Mean, µg/mL	8,77	26,66	233,67	594,02
Стандартное отклонение, мкг/мл Standard deviation, µg/mL	0,76	2,07	1,22	18,45
Прецизионность, % Precision, %	8,7	7,8	0,5	3,1
Правильность, % Accuracy, %	−12,4	−11,1	−15,0	−8,6

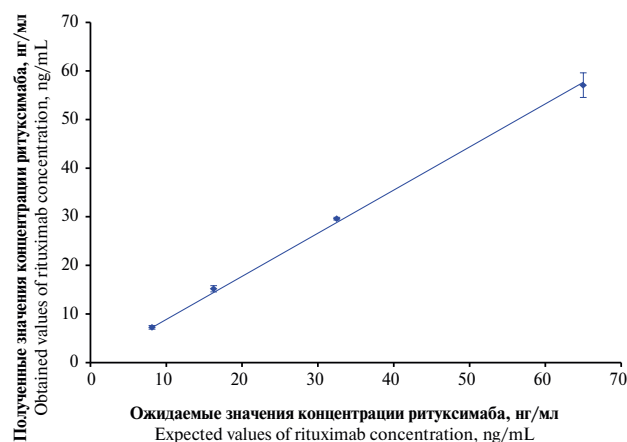


Рис. 2. Линейность разведения контрольного образца сыворотки крови кролика, содержащего ритуксимаб в концентрации 650 мкг/мл (уравнение линейной регрессии: $y = 0,8871x$, $R^2 = 0,9989$)

Fig. 2. Linearity of the dilution of the rabbit serum control sample containing 650 µg/mL of rituximab (linear regression equation: $y = 0,8871x$, $R^2 = 0,9989$)

акционным буферным раствором. На рисунке 2 представлена зависимость полученных значений концентрации ритуксимаба в разбавленных образцах от ожидаемых значений. Данная зависимость носит линейный характер с коэффициентом детерминации, превышающим 0,99. Обратно рассчитанная концентрация ритуксимаба для каждого разведения не отклонялась более чем на 13 % от номинальной концентрации после пересчета на разведение, а прецизионность конечных концентраций по всем разведениям не превышала 6 %.

Исследование стабильности ритуксимаба в сыворотке крови кроликов охватывало краткосрочную стабильность в течение 6 ч при комнатной температуре, долгосрочную стабильность при температуре -35°C в течение 50 дней, а также стабильность после 3 циклов замораживания при -35°C на 12 ч и последующего оттаивания. Все типы стабильности оценивались на образцах для контроля качества с концентрацией ритуксимаба 10, 30, 275 и 650 мкг/мл. Согласно полученным результатам (табл. 2), среднее значение концентрации ритуксимаба на каждом уровне отклонялось от номинальной концентрации не более чем на 15 %, что соответствует критерию приемлемости (в пределах $\pm 20\%$ от номинального значения) и подтверждает стабильность ритуксимаба в вышеперечисленных условиях хранения.

Валидированный метод был применен для определения концентрации ритуксимаба в 84 биологических образцах, полученных в рамках исследования фармакокинетики ритуксимаба у кроликов. Достоверность результатов анализа была подтверждена с использованием образцов для контроля качества во всем интервале определяемых концентраций:

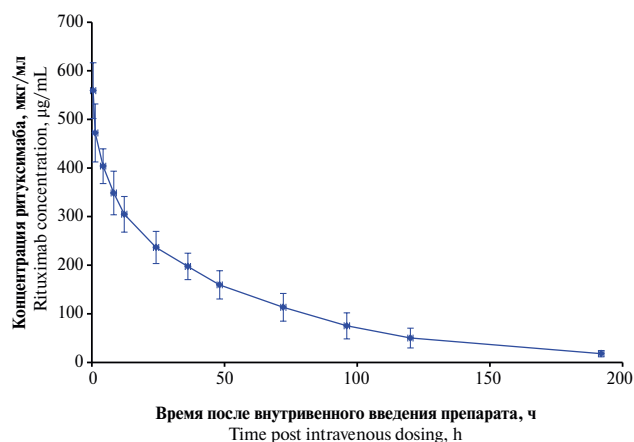


Рис. 3. Усредненный фармакокинетический профиль ритуксимаба в сыворотке крови кроликов ($n = 7$) после внутривенного введения препарата Мабтера® в дозе 32 мг/кг

Fig. 3. Mean pharmacokinetic profile of rituximab in the rabbit serum ($n = 7$) after intravenous administration of Mabthera® at a dose of 32 mg/kg

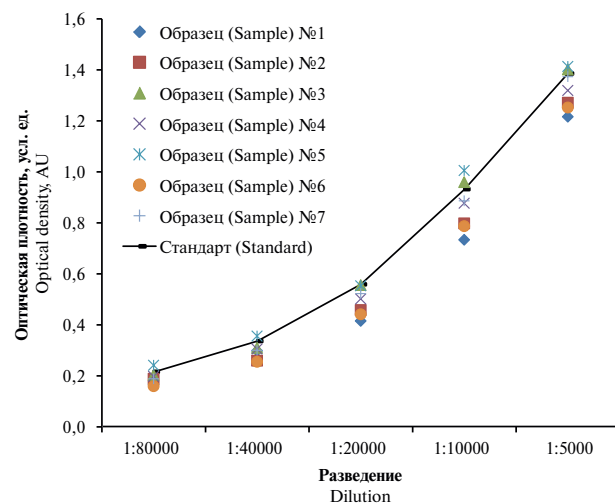


Рис. 4. Параллелизм между калибровочным графиком и серийно разведенными образцами сыворотки крови разных кроликов с концентрацией ритуксимаба, близкой к C_{max}

Fig. 4. Parallelism between the calibration standard curve and serially diluted serum samples of different rabbits with rituximab concentration close to C_{max}

значение правильности для используемых образцов для контроля качества по всем аналитическим сериям не выходило за пределы $\pm 10\%$, максимальный коэффициент вариации составил 7,6 %. В качестве отрицательного контроля в составе каждой аналитической серии анализировался образец бланковой сыворотки крови в трех повторях. Во всех аналитических сериях среднее значение ОП для данного образца +10 стандартных отклонений не превышало значение ОП для стандартного образца с концентрацией 1 нг/мл (НПКО). Полученный усредненный фармакокинетический профиль ритуксимаба в сыворотке крови 7 кроликов после однократного

Таблица 3. Параллелизм серийно разведенных образцов сыворотки крови 7 разных кроликов с концентрацией ритуксимаба, близкой к C_{\max} **Table 3.** Parallelism of serially diluted serum samples of 7 different rabbits with rituximab concentration close to C_{\max}

Разведение Dilution	Исследуемые образцы Test samples						
	1	2	3	4	5	6	7
	Значения концентрации ритуксимаба в исследуемых образцах (пересчитанные с учетом разведения), мкг/мл Rituximab concentrations in the test samples (recalculated for dilution), µg/mL						
1:5000	285,20	309,75	387,35	334,10	397,40	300,90	366,75
1:10 000	269,20	302,10	391,30	345,30	419,30	296,40	349,30
1:20 000	251,60	287,60	372,40	324,20	369,80	273,20	342,60
1:40 000	314,40	253,60	331,60	325,60	406,80	247,60	317,60
1:80 000	222,40	291,20	336,00	320,80	452,00	204,80	291,20
Среднее значение, мкг/мл Mean, µg/mL	268,56	288,85	363,73	330,00	409,06	264,58	333,49
Стандартное отклонение, мкг/мл Standard deviation, µg/mL	34,63	21,58	28,26	9,86	30,13	39,59	29,50
Прецизионность, % Precision, %	12,9	7,5	7,8	3,0	7,4	15,0	8,8

внутривенного введения препарата Мабтера® в дозе 32 мг/кг представлен на рисунке 3 и соответствует данным литературы [15–18].

На 7 образцах сыворотки крови разных кроликов с концентрацией ритуксимаба, близкой к максимальной концентрации (C_{\max}), был дополнительно оценен параллелизм между калибровочным графиком и серийно разведенными исследуемыми образцами для обнаружения возможного матричного эффекта. Образцы сыворотки крови кроликов разводили в 5000, 10 000, 20 000, 40 000 и 80 000 раз. Как видно из данных, представленных на рисунке 4, полученные значения ОП для всех разведений исследуемых образцов лежат параллельно калибровочному графику. Значения концентрации ритуксимаба в исследуемых образцах, пересчитанные с учетом разведения, и рассчитанные статистические параметры представлены в таблице 3. Прецизионность между полученными значениями концентрации ритуксимаба в каждой серии разведений не превышала 15 %, что соответствует критерию приемлемости (не выше 30 %).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя полученные результаты, следует отметить, что иммуноферментная тест-система, разработанная ООО «Научно-производственный центр Пробиотек», пригодна для количественного определения ритуксимаба в сыворотке крови лабораторных животных, поскольку по всем валидационным параметрам соответствует критериям приемлемости, предъявляемым международными стандартами по валидации биоаналитических методов⁴. Тест-система обеспечивает высокую селективность определения аналита относительно эндогенных компонентов матрицы. Высокая чувствительность метода и доказанная линейность разведения позволяют проводить анализ биологических образцов в широком диапазоне концентраций ритуксимаба и использовать тест-систему для исследований фармакокинетики у лабораторных животных.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.
Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Pescovitz MD. Rituximab, an anti-CD20 monoclonal antibody: history and mechanism of action. *Am J Transplant.* 2006;6(5 Pt 1):859–66. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01288.x>
2. Vital EM, Kay J, Emery P. Rituximab biosimilars. *Expert Opin Biol Ther.* 2013;13(7):1049–62. <https://doi.org/10.1517/14712598.2013.787064>
3. Seyfizadeh N, Seyfizadeh N, Hasenkamp J, Huerta-Yepez S. A molecular perspective on rituximab: A monoclonal antibody for B cell non Hodgkin lymphoma and other affections. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;97:275–90. <https://doi.org/10.1016/j.critrev-onc.2015.09.001>

⁴ Guideline on bioanalytical method validation (EMA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2**).

Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза. Приложение № 6 «Требования к валидации биоаналитических методик испытаний и анализу исследуемых биологических образцов (2016)».

4. Roshique KK, Ravindran V. Efficacy and safety of a biosimilar rituximab in biologic naïve patients with active rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2015;34(7):1289–92. <https://doi.org/10.1007/s10067-015-2980-4>
5. Gurcan HM, Keskin DB, Stern JN, Nitzberg MA, Shekhani H, Ahmed AR. A review of the current use of rituximab in autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol*. 2009;9(1):10–25. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.10.004>
6. Weiner GJ. Rituximab: mechanism of action. *Semin Hematol*. 2010;47(2):115–23. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2010.01.011>
7. Blasco H, Lalmanach G, Godat E, Maurel MC, Canepa S, Belghazi M, et al. Evaluation of a peptide ELISA for the detection of rituximab in serum. *J Immunol Methods*. 2007;325(1–2):127–39. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2007.06.011>
8. Beum PV, Kennedy AD, Taylor RP. Three new assays for rituximab based on its immunological activity or antigenic properties: Analyses of sera and plasmas of RTX-treated patients with chronic lymphocytic leukemia and other B cell lymphomas. *J Immunol Methods*. 2004;289(1–2):97–109. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.03.012>
9. Berinstein NL, Grillo-Lopez, White CA, Bence-Bruckler I, Maloney D, Czuczman M, et al. Association of serum Rituximab (IDEC-C2B8) concentration and anti-tumor response in the treatment of recurrent low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*. 1998;9:995–1001. <https://doi.org/10.1023/A:1008416911099>
10. Hong K, Presta LG, Lu Y, Penn A, Adams C, Chuntharapai A, et al. Simple quantitative live cell and anti-idiotypic antibody based ELISA for humanized antibody directed to cell surface protein CD20. *J Immunol Methods*. 2004;294(1–2):189–97. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.09.003>
11. Cragg MS, Bayne MB, Tutt AL, French RR, Beers S, Glennie MJ, et al. A new anti-idiotypic antibody capable of binding rituximab on the surface of lymphoma cells. *Blood*. 2004;104(8):2540–2. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-05-1733>
12. Hampson G, Ward TH, Cummings J, Bayne M, Tutt AL, Cragg MS, et al. Validation of an ELISA for the determination of rituximab pharmacokinetics in clinical trials subjects. *J Immunol Methods*. 2010;360(1–2):30–8. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.05.009>
13. Schoergenhofer C, Schwameis M, Firas C, Bartko J, Derhaschnig U, Mader RM, et al. Single, very low rituximab doses in healthy volunteers — a pilot and a randomized trial: Implications for dosing and biosimilarity testing. *Sci Rep*. 2018;8(1):124. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17934-6>
14. Crowther JR. The ELISA guidebook. *Methods Mol Biol*. 2000;149:1–413. PMID: 11028258
15. Cartron G, Blasco H, Piantaud G, Watier H, Le Guellec C. Pharmacokinetics of rituximab and its clinical use: thought for the best use? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007;62(1):43–52. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2006.09.004>
16. Yoo DH, Suh C-H, Shim SC, Jeka S, Cons-Molina FF, Hrycaj P, et al. A multicentre randomised controlled trial to compare the pharmacokinetics, efficacy and safety of CT-P10 and innovator rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(3):566–70. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-209540>
17. Ryan AM, Sokolowski SA, Ng C, Shirai N, Collinge M, Shen AC, et al. Comparative nonclinical assessments of the proposed biosimilar PF-05280586 and Rituximab (MabThera®). *Toxicol Pathol*. 2014;42(7):1069–81. <https://doi.org/10.1177/0192623313520351>
18. da Silva A, Kronthaler U, Koppenburg V, Fink M, Meyer I, Papandrikopoulou A, et al. Target-directed development and preclinical characterization of the proposed biosimilar rituximab GP2013. *Leuk Lymphoma*. 2014;55(7):1609–17. <https://doi.org/10.3109/10428194.2013.843090>

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Писарев Владимир Викторович, канд. хим. наук. Vladimir V. Pisarev, Cand. Sci. (Chem.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-3212-4369>

Уляшова Мария Морисовна, канд. хим. наук. Maria M. Ulyashova, Cand. Sci. (Chem.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-3837-4759>

Гильдеева Гэлия Нязифовна, д-р фарм. наук, проф. Gelia N. Gildeeva, Dr. Sci. (Pharm.), Professor. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-2537-2850>

Статья поступила 21.12.2018

После доработки 19.02.2019

Принята к печати 24.05.2019

Article was received 21 December 2018

Revised 19 February 2019

Accepted for publication 24 May 2019