



Оригинальная статья/Research article

Разработка и валидация методики определения нейтрализующих антител к инсулину (гларгин) в плазме крови человека

Н. Б. Абраменко^{1,2,3*}, П. И. Внукова^{3,4}, Е. С. Головина³, И. Е. Макаренко⁵, А. А. Мосикян⁵,
А. Г. Никифорова³, П. В. Гремякова³, В. И. Казей³

1 – ФГБУН институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, 119991, Россия, г. Москва, Ленинский проспект, д. 47

2 – ФГБУН институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН, 119071, Россия, Москва, Ленинский просп. д. 33

3 – ООО «Экзактэ Лабс», 117246, Россия, Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 2

4 – Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии-МВА имени К. И. Скрябина, 109472, Россия, Москва, ул. Академика Скрябина, д. 23

5 – ООО «ГЕРОФАРМ», 191119, Россия, Санкт-Петербург, ул. Звенигородская, д. 9

*Контактное лицо: Абраменко Наталья Борисовна. E-mail: n.abramenko@exactelabs.com

Статья получена: 20.05.2019. Статья принята к печати: 02.07.2019

Резюме

Введение. Проведение исследования иммуногенности терапевтических белков, таких как аналоги человеческого инсулина, является одним из актуальных и востребованных направлений в медицине и фармацевтике. Определение возможности выработки нейтрализующих антител к инсулину, уменьшающих терапевтический эффект принимаемого препарата у пациентов, является важным этапом для понимания фармакологического профиля лекарственного препарата. Применение клеточных методов анализа на антитела позволяет проводить определение нейтрализующих антител к инсулину.

Цель. Адаптация и валидация методики оценки иммуногенности инсулина в плазме крови человека.

Материалы и методы. В основе метода лежит использование клеточной линии *iLite™ Insulin Assay Ready Cells* [1], в геном которой встроены репортёрный ген люциферазы светлячка (Firefly) под контролем инсулинозависимого промотора. При увеличении концентрации инсулина экспрессия люциферазы светлячка (Firefly) увеличивается, что позволяет использовать данную клеточную линию для оценки количества нейтрализующих инсулин антител. Для нормализации по количеству клеток и учёта влияния матричного эффекта исследуемых образцов используется второй репортёрный ген люциферазы Renilla, который экспрессируется под контролем конститутивного промотора. Активность обеих люцифераз измеряли с помощью набора реагентов *DualGlo Luciferase Assay System (Promega)* [2].

Результаты и обсуждения. Были установлены оптимальные концентрация инсулина и степень разбавления плазмы/сыворотки для определения нейтрализующих антител к инсулину. Показана долгосрочная стабильность нейтрализующих антител к инсулину в плазме крови человека более 3-х месяцев. Описанная методика была применена при сравнительном исследовании безопасности и иммуногенности аналогов инсулина (Гларгин).

Заключение. Разработана и валидирована методика определения антител к инсулину в K₂EDTA плазме крови человека с помощью тест-системы на основе клеточной линии *iLite™ Insulin Assay Ready Cells*; в основе метода лежит оценка связывания альфа цепи инсулина с высокоаффинным гетеродимерным рецептором CD220.

Ключевые слова: нейтрализующие антитела, инсулин Гларгин, клеточные методы, валидация.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Е. С. Головина разработала методику определения антител к инсулину. Н. Б. Абраменко, П. И. Внукова и Е. С. Головина провели валидацию методики, выполнили определение нейтрализующих антител к инсулину в образцах, обработку данных. Н. Б. Абраменко, Е. С. Головина, П. В. Гремякова, А. Г. Никифорова, И. Е. Макаренко, А. А. Мосикян и В. И. Казей проводили интерпретацию результатов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Абраменко Н. Б., Внукова П. И., Головина Е. С., Макаренко И. Е., Мосикян А. А., Никифорова А. Г., Гремякова П. В., Казей В. И. Разработка и валидация методики определения нейтрализующих антител к инсулину (гларгин) в плазме крови человека. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(3): 70–78.

Development and Validation of Approach for the Detection of Neutralizing Antibodies Against Insulin (Glargine) in Human Blood Plasma

Natalia B. Abramenko^{1,2,3*}, Polina I. Vnukova^{3,4}, Elena S. Golovina³, Igor E. Makarenko⁵,
Anna A. Mosikian⁵, Aiyuna G. Nikiforova³, Polina V. Gremyakova³, Vasily I. Kazey³

1 – N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry Russian Academy of Sciences, 47, Leninsky av., Moscow, 119991, Russia

2 – N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, 33, Leninsky av., Moscow, 119071, Russia

3 – LLC «Exacte Labs», 20/2, Nauchny Proezd, Moscow, 117246, Russia

4 – K.I. Scriabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, 23, Academician Scriabin str., Moscow, 109472, Russia

5 – LLC «GEROFARM», 9, Zvenigorodskaya str., Saint Petersburg, 191119, Russia

*Corresponding author: Natalia B. Abramenko. E-mail: n.abramenko@exactelabs.com

Received: 20.05.2019. Accepted: 02.07.2019

Abstract

Introduction. Immunogenicity identification of therapeutic proteins, such as human insulin analogues, is one of the most relevant and significant area in medicine and pharmaceuticals. Determination the possibility of producing neutralizing antibodies to insulin reducing the therapeutic effect of the drug, is an important step to understand the pharmacological profile of the drug. Applying of cell-based methods one allows to determinate neutralizing antibodies to insulin.

Aim. Development and validation methods for detection of neutralizing antibodies against insulin in human plasma.

Materials and methods. The method is based on the use of the *iLite™ Insulin Assay Ready Cells* [1], in the genome of which the firefly luciferase reporter gene is introduced under the control of an insulin-dependent promoter. As the insulin concentration increases, the firefly luciferase expression (Firefly) increases, allowing one to use this cell line to estimate the number of neutralizing antibodies against insulin. For normalization by the number of cells and considering the matrix effect of studied samples, the second reporter gene luciferase Renilla is used, which is expressed under the control of a constitutive promoter. The activity of both luciferases was measured using the *DualGlo Luciferase Assay System (Promega)* assay [2].

© Абраменко Н. Б., Внукова П. И., Головина Е. С., Макаренко И. Е., Мосикян А. А., Никифорова А. Г., Гремякова П. В., Казей В. И., 2019

© Abramenko N. B., Vnukova P. I., Golovina E. S., Makarenko I. E., Mosikian A. A., Nikiforova A. G., Gremyakova P. V., Kazey V. I., 2019

Results and discussion. Optimal insulin concentration and plasma/serum dilution were determined to identify neutralizing antibodies to insulin. The long-term stability of neutralizing antibodies to insulin were shown in human plasma for more than 3 months. The developed method was applied in a comparative research of the safety and immunogenicity of insulin analogues (Glargine).

Method for the determination of antibodies to insulin was.

Conclusion. A method for determination of neutralizing antibodies to insulin in human K_2 EDTA plasma was developed and validated using *iLite™ Insulin Assay Ready Cells* system; based on the binding of the insulin alpha chain to the high-affinity heterodimeric CD220 receptor.

Keywords: neutralizing antibodies, insulin glargine, cell-based methods, validation.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Elena S. Golovina developed a methodology for the antibodies' determination. Natalia B. Abramenko, Polina I. Vnukova and Elena S. Golovina carried out the validation of the method and performed the determination of neutralizing antibodies to insulin in the samples and data processing of experiments. Natalia B. Abramenko, Elena S. Golovina, Polina V. Gremyakova, Aiyyna G. Nikiforova, Igor E. Makarenko, Anna A. Mosikian and Vasily I. Kazey participated in data interpretation. All authors participated in the discussion of the results and wrote the manuscript.

For citation: Abramenko N. B., Vnukova P. I., Golovina E. S., Makarenko I. E., Mosikian A. A., Nikiforova A. G., Gremyakova P. V., Kazey V. I. Development and validation of approach for the detection of neutralizing antibodies against insulin (glargine) in human blood plasma. *Drug development & registration*. 2019; 8(3): 70–78.

ВВЕДЕНИЕ

Для предотвращения и замедления прогрессирующего диабета и связанных с ним осложнений важно проведение гликемического контроля. Инсулинотерапия является одним из самых эффективных решений контроля гликемического уровня у больных сахарным диабетом (СД). Рациональное и своевременное использование препаратов инсулина, генно-инженерных или аналогов инсулина позволяет достичь стойкой компенсации углеводного обмена, и тем самым предотвратить или замедлить прогрессирование осложнений СД 2 типа, а также повысить качество жизни пациентов [3]. Непременным условием эффективности инсулинотерапии при СД 1 типа служит адекватное введение препаратов инсулина, максимально приближенное к ритму секреции эндогенного инсулина. Однако, смоделировать близкие к физиологическим соотношения уровня гликемии и инсулинемии достаточно трудно [4].

За время своего существования препараты инсулина прошли эволюцию от природного инсулина, добываемого из поджелудочной железы домашних животных, до рекомбинантных препаратов и аналогов человеческого инсулина, к которым относится инсулин гларгин.

Инсулин гларгин отличается от человеческого инсулина добавлением двух остатков аргинина в конец В-цепи и заменой аспарагина на глицин в положении A21. Эти две модификации привели к созданию стабильной структуры, которая растворима в кислой среде при pH 4 и образует микропреципитаты при введении в подкожную клетчатку с нейтральным значением pH, что замедляет скорость всасывания. Добавление небольшого количества цинка стабилизирует образующиеся преципитаты, что приводит к дополнительному увеличению длительности действия препарата. В результате инсулин гларгин характеризуется замедленным поступлением в кровь без пиков концентрации в течение продолжительного времени и по своей фармакокинетике сходен с непрерывной подкожной инфузией инсулина [5].

Оригинальный лекарственный препарат инсулина гларгин, Лантус® («Санofi-Авентис Дойчланд ГмБХ», Германия), был выведен на рынок в 2000 г. [6]. За

последние несколько лет прошли клинические исследования и были выведены биоаналоги данного инсулина. В Европейском союзе к настоящему времени зарегистрировано 2 биосимиляра инсулина гларгин – Lusduna и ABASAGLAR® [6, 7]. Также биосимиляры аналогов инсулина выводятся и на локальные рынки, в том числе и России.

Использование терапевтических белков в качестве лекарственных препаратов, таких как препараты инсулина, связано с определенными рисками возникновения иммунного ответа в организме человека (иммуногенностью лекарства). Для доказательства безопасности применения таких препаратов проводят сравнительное исследование иммуногенности. Одним из нежелательных иммунных эффектов на применение лекарства является выработка нейтрализующих антител (НАТ) к препарату. Нейтрализующие антитела связывают лекарственный препарат, в таком случае препарат при попадании в организм не оказывает ожидаемого терапевтического эффекта. Определение образования НАТ к препарату имеет важное значение при исследовании иммуногенности терапевтических белков. Одним из наиболее чувствительных методов определения НАТ являются методики с использованием специальных клеточных линий.

В данной статье приведены результаты разработки и валидации методики оценки иммуногенности инсулинов в плазме крови человека. В рамках разработки и валидации метода была проведена адаптация методики по следующим показателям:

- установлен ответ клеточной линии *iLite™ Insulin Assay Ready Cells* на стимуляцию инсулином, подобрана оптимальная концентрация инсулина для определения НАТ к инсулину;
- проанализировано влияние степени разбавления K_2 EDTA плазмы человека на уровень сигнала клеток к инсулину, установлена оптимальная степень разбавления плазмы для проведения анализа;
- показан нейтрализующий эффект референсных антител к инсулину;
- проведено сравнение ответа клеток на инсулин и нейтрализующие референсные антитела к инсулину при двух разных разведениях суспензии клеток;

- проанализирована долгосрочная стабильность нейтрализующих антител в K₂ EDTA плазме крови человека более 3-х месяцев при хранении образцов при температуре ниже –65 °С.

Методика была применена при сравнительном исследовании безопасности и иммуногенности аналогов инсулина Гларгин тестируемого препарат: РинГлар®, раствор для подкожного введения, 100 ЕД/мл (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия) и препарат сравнения – Лантус®, раствор для подкожного введения, 100 ЕД/мл («Санофи-Авентис Дойчланд ГмБХ», Германия).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Для разработки и адаптации метода использовали антитела Anti-Insulin antibody ab7842, производства «Abcam»; клеточная линия iLite™ Insulin Assay Ready Cells BM3060, «Euro Diagnostica», набор реактивов «Promega», Dual-Glo Luciferase Assay System, 100 ml, E2940, деионизованная вода, сопротивление 18 МОм · см, среда RPMI-1640 с глутамином, ПанЭко, кат. № С310п, сыворотка, НуClone, кат. № K052/SV30160.03; пенициллин/стрептомицин, ПанЭко, кат. № A065; инсулин, Sigma-Aldrich, кат. № I9278; плазма и сыворотка крови человека 6 доноров.

Тестируемый препарат: РинГлар®, раствор для подкожного введения, 100 ЕД/мл (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия).

Препарат сравнения: Лантус®, раствор для подкожного введения, 100 ЕД/мл («Санофи-Авентис Дойчланд ГмБХ», Германия).

Клиническое исследование было проведено как многоцентровое, открытое, рандомизированное сравнительное исследование не худшей иммуногенности препаратов РинГлар®, раствор для подкожного введения, 100 ЕД/мл (ООО «ГЕРОФАРМ») и инсулина Лантус® СолоСтар®, раствор для подкожного введения, 100 ЕД/мл («Санофи-Авентис Дойчланд ГмБХ») у больных сахарным диабетом 1 типа. При этом исследование было заслепленным для аналитической лаборатории. На этикетках биологических образцов отсутствовала любая информация, позволяющая идентифицировать получаемый исследуемый препарат.

Основанием для проведения исследования являлось разрешение на клиническое исследования МЗ РФ № 282 от 14 июня 2018г и одобрение центрального этического комитета (выписка из протокола № 168 от 24 апреля 2018г).

Также, проведение исследования было одобрено в каждом клиническом центре независимыми этическими комитетами. Все пациенты до начала любых процедур исследования подписали форму информированного согласия на участие в исследовании.

Описание метода

Метод основан на использовании клеточной линии iLite™ Insulin Assay Ready Cells. Специфический ответ данной клеточной линии на инсулин выражается в экспрессии люциферазы светлячка (*Firefly*). Если в

исследуемом образце K₂ EDTA плазмы крови человека присутствуют нейтрализующие антитела к инсулину, то они связывают инсулин и наблюдается снижение экспрессии люциферазы *Firefly*, которое выражается в снижении люминесцентного сигнала в присутствии субстрата люциферазы *Firefly*. Для нормализации по количеству клеток и учёта влияния матричного эффекта исследуемых образцов использовали второй репортёрный ген люциферазы *Renilla*, который экспрессируется под контролем конститутивного промотора и сигнал которой пропорционален количеству клеток.

В качестве контроля тест-системы использовали антитела к инсулину *Anti-Insulin antibody ab7842*, которые обладают нейтрализующей активностью в отношении инсулина. Наличие нейтрализующих антител к инсулину в плазме человека определяли по соотношению сигналов двух люцифераз *Firefly/Renilla*.

Для проведения экспериментов использовали протоколы, предлагаемые производителями клеточной линии [8, 9]. В лунках белых 96-луночных планшетов *Nunclon™ Delta Surface* смешивали растворы референсных антител и инсулина, затем инкубировали 30 минут в CO₂ инкубаторе при температуре 37 °С и 5% CO₂. После инкубации НАТ с инсулином вносили в каждую лунку раствор рабочей суспензии клеток и перемешивали пипетированием. После добавления клеток планшеты инкубировали в течение 5 часов в CO₂ инкубаторе при температуре 37 °С и 5% CO₂. После инкубации с клетками добавляли в каждую лунку рабочий раствор *Dual-Glo Luciferase Reagent* (субстрат люциферазы *Firefly*), перемешивали и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 10 минут (сигнал устойчив в течение 2 часов после внесения субстрата [2]). Измеряли люминесцентный сигнал при всех длинах волн при помощи мультипланшетного ридера *SpectraMax M5*. В конце добавляли в каждую лунку рабочей раствор *Dual-Glo Luciferase Stop&GloR Reagent* (субстрат люциферазы *Renilla*), перемешивали и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 20 минут (сигнал устойчив в течение 4-х часов после внесения субстрата [2]). Измеряли люминесцентный сигнал в каждой лунке планшета при всех длинах волн при помощи мультипланшетного ридера *SpectraMax M5*.

Приготовление калибровочных образцов и образцов контроля качества (КК)

При проведении эксперимента готовили серийное разведение НАТ к инсулину. Серийные разведения референсных антител были приготовлены в диапазоне концентраций 80000 нг/мл – 110 нг/мл из исходного раствора 200 мкг/мл, с шагом разведения 3. Концентрационные кривые готовили при конечной концентрации инсулина 500 нг/мл с использованием 7 концентраций референсных антител (80000 нг/мл, 26666 нг/мл, 8888 нг/мл, 2963 нг/мл, 988 нг/мл, 329 нг/мл, 110 нг/мл и 0 нг/мл). Растворы референсных антител в разбавленной K₂EDTA плазме крови человека смешивали с 20 мкл 4-кратного раствора инсулина (2 мкг/мл). После инкубации добавляли к смесям суспензию клеток *iLite™ Insulin Assay Ready Cells*.

При проведении эксперимента проводилось измерение сигналов люминесценции субстратов *Firefly* и *Renilla* в контрольных образцах в четырех повторах: сигнал в пулированной плазме здоровых добровольцев (N=6) в присутствии инсулина (0% ингибирования) и без добавления инсулина (100% ингибирования). Аналитическая серия считалась приемлемой, если нейтрализующие антитела были обнаружены в положительных образцах КК (клетки без инсулина) и отсутствовали в отрицательных образцах КК. Сходимость полуэффективной концентрации (EC₅₀) для одной ампулы клеток использовали в качестве критерия приемлемости между несколькими аналитическими сериями.

Приготовление образцов

Перед началом анализа замороженные образцы размораживали при комнатной температуре и перемешивали на вортексе. Рабочие растворы анализируемых образцов готовили смешиванием 10 мкл плазмы каждого образца с 90 мкл среды RPMI с антибиотиком (пенициллин/стрептомицин).

Растворы разбавленной K₂ ЭДТА плазме крови пациента смешивали с 20 мкл 4-кратного раствора инсулина (2 мкг/мл). После инкубации добавляли к смесям суспензию клеток *iLite™ Insulin Assay Ready Cells*. Определение нейтрализующего действия антител к инсулину (в присутствии 500 нг/мл инсулина) в тестируемых образцах проводилось только по калибровочной кривой, полученной в данной аналитической серии. При расчетах концентрации нейтрализующих антител к инсулину в плазме не учитывались выпадающие значение отношений сигналов люминесценции субстратов *Firefly* и *Renilla* с учетом относительного коэффициента отклика [2, п. 6].

Пороговым значением концентрации антител («cut point») для определения наличия антител к инсулину было выбрано 4-кратное значение концентрации антител в пулированной плазме здоровых добровольцев (N=6) [11]. Образцы с концентрацией антител выше или равной этого значения считали содержащими нейтрализующие антитела к инсулину. В качестве иммунологического маркера (титра антител) сложилось превышение в 4 и более раз концентрации антител в отрицательных контрольных образцах [11].

Статистический анализ данных

Статистический анализ проводили с применением языка программирования для статистической обработки данных R версии 3.5.0. Сравнение результатов измерений анализа на иммуногенность проводился с помощью точного критерия Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Валидацию методики проводили в соответствии с требованиями нормативных документов [10]. В ходе валидации оценивали следующие метрологические характеристики: ответ клеточной линии на стимуляцию в зависимости от концентрации инсулина и в зависимости от степени разбавления плазмы крови

человека; ответ клеточной линии на стимуляцию инсулином (500 нг/мл) в зависимости от концентрации НАТ; валидировано разбавление клеток в два раза по сравнению с рекомендациями производителя; установлена долгосрочная стабильность НАТ в плазме крови человека >3 месяцев при хранении –65 °С.

Ответ клеточной линии к инсулину и выбор концентрации инсулина. Было проведено 2 независимых эксперимента на одной виале клеток в среде RPMI + 9% FBS¹ и цельной плазме крови человека (рисунок 1).

Из приведённых результатов видно, что инсулин человека в растворителе индуцирует экспрессию люциферазы *Firefly* с полумаксимальной эффективной концентрацией (EC₅₀) 114,3 нг/мл и 104,9 нг/мл. С учетом нормирования сигнала на экспрессию люциферазы *Renilla* значение EC₅₀ составляет 122,8 нг/мл и 99,79 нг/мл. В неразбавленной K₂EDTA плазме крови человека активации экспрессии люциферазы *Firefly* не наблюдается. Максимальная активация экспрессии люциферазы *Firefly* достигается при концентрации инсулина 500 нг/мл и выше, данная концентрация была выбрана для экспериментов на определение наличия НАТ к инсулину.

Нейтрализующий эффект референсных антител. Концентрационные кривые по референсным антителам *Abcam (Ab7842)* строили при конечной концентрации инсулина 500 нг/мл с использованием 7 концентраций референсных антител к инсулину. Растворы референсных антител в растворителе или K₂EDTA плазме крови человека смешивали с 4-кратным раствором инсулина (2 мкг/мл). После инкубации в течение 30 минут в CO₂ инкубаторе при температуре 37 °С и 5% CO₂ добавляли к смесям суспензию клеток *iLite™ Insulin Assay Ready Cells*. Было проведены две независимые серии эксперимента на одной виале клеток в среде RPMI + 9% FBS и цельной плазме крови человека (рисунок 2).

Из приведённых данных видно, что референсные антитела к инсулину нейтрализуют активацию экспрессии люциферазы *Firefly*. Сигнал экспрессии люциферазы *Firefly* и соотношение сигналов люминесценции двух люцифераз *Firefly/Renilla* находятся в обратной концентрационной зависимости в отношении НАТ к инсулину. В неразбавленной K₂EDTA плазме крови человека активации экспрессии люциферазы *Firefly* не наблюдается и нейтрализующее действие антител невозможно идентифицировать.

Степень разбавления плазмы. Так как в неразбавленной K₂EDTA плазме крови человека инсулин не активирует экспрессию люциферазы *Firefly* в клетках линии *iLite™ Insulin Assay Ready Cells* были протестированы серии разбавлений K₂EDTA плазмы и сыворотки здорового добровольца. Неразбавленные плазма/сыворотка и разбавления плазмы/сыворотки в 2,5 раза, в 5 раз и в 10 раз были протестированы для трёх концентрациях инсулина: 1) 500 нг/мл (максимальная активация экспрессии люциферазы *Firefly*), 2) 125 нг/мл (полумаксимальная активация экспрессии люциферазы *Firefly*); 3) 16 нг/мл (низкая активация экспрессии лю-

¹FBS – сыворотка (fetal bovine serum).

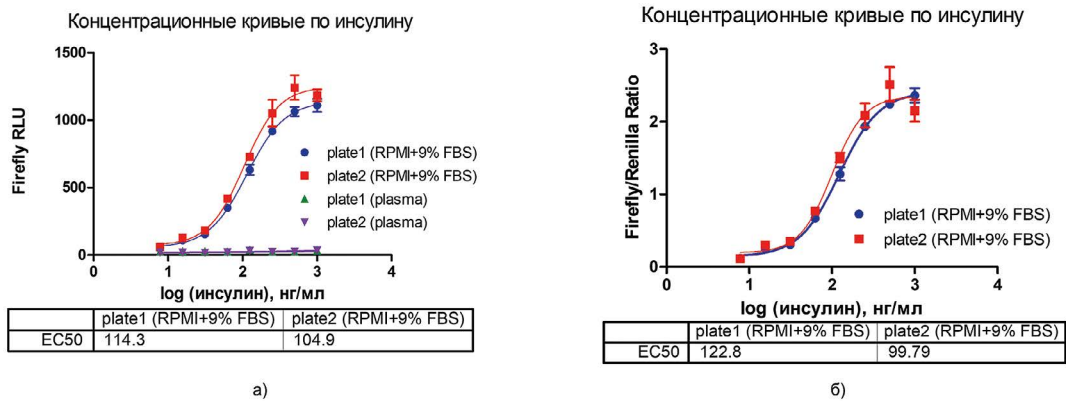


Рисунок 1. А – концентрационные кривые по инсулину в разных растворителях (расчёт по люминесценции Firefly); б – концентрационные кривые по инсулину в разных растворителях (расчёт по отношению люминесценции Firefly/Renilla)

Figure 1. А – concentration curves of insulin in different solvents (luminescence of Firefly); б – concentration curves of insulin in different solvents (Firefly / Renilla luminescence ratio)

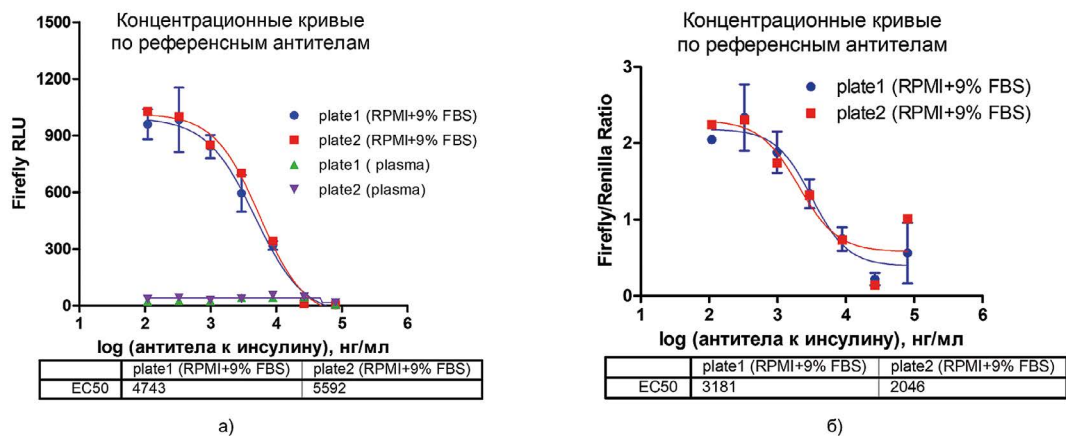


Рисунок 2. А – Концентрационные кривые по референсным антителам (расчёт по люминесценции Firefly); б – Концентрационные кривые по референсным антителам (расчёт по отношению люминесценции Firefly/Renilla)

Figure 2. А – Concentration curves of reference antibodies (Firefly luminescence); б – Concentration curves for reference antibodies (Firefly / Renilla luminescence ratio)

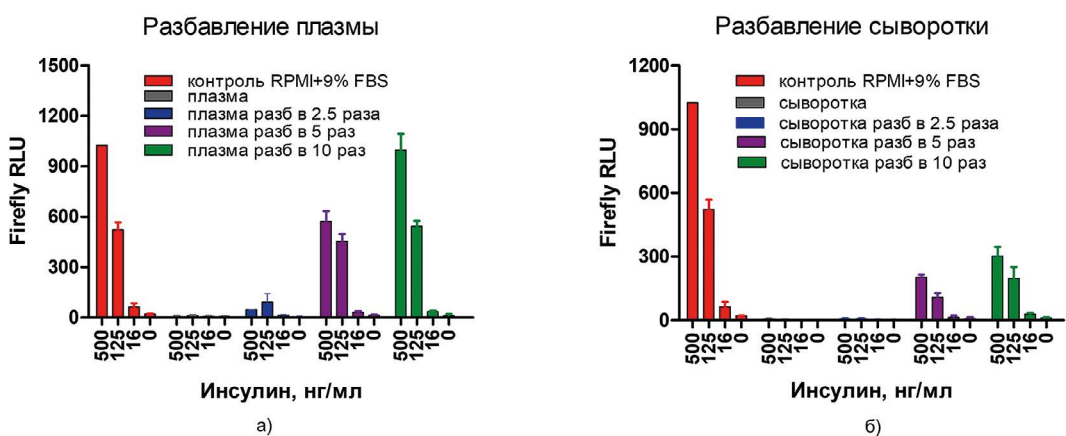


Рисунок 3. А – Активация экспрессии люциферазы Firefly в разных разбавлениях контрольной K₂ EDTA плазмы (расчёт по люминесценции Firefly); б – Активация экспрессии люциферазы Firefly в разных разбавлениях контрольной сыворотки (расчёт по люминесценции Firefly)

Figure 3. А – Firefly luciferase expression in different dilutions of the control K₂ EDTA plasma (Firefly luminescence); б – Firefly luciferase expression in different dilutions of control serum (Firefly luminescence)

циферазы *Firefly*). Для контроля специфичности сигнала для каждого разбавления сыворотки и плазмы был протестирован контрольный образец без добавления инсулина к клеткам. Для контроля всей модельной системы использовали активацию экспрессии люциферазы *Firefly* в растворителе (среда RPMI 1640 + 9% FBS) с теми же концентрациями инсулина. Результаты экспериментов представлены на рисунке 3.

Из приведённых результатов видно, что в неразбавленной плазме и сыворотке инсулин человека в растворителе не индуцирует экспрессию люциферазы *Firefly*, а при увеличении степени разбавления плазмы и сыворотки наблюдается увеличение активирующей способности инсулина. При разбавлении контрольной K_2 EDTA плазмы в 10 раз активирующая способность

инсулина сопоставима с активирующей способностью в растворителе (среда RPMI 1640 + 9% FBS).

Разбавление суспензии клеток. Для определения зависимости чувствительности метода от разбавления клеток были протестированы два разбавления клеток линии *iLite™ Insulin Assay Ready Cells*: 1) разбавление, рекомендованное производителем клеток; 2) разбавление в 2 раза больше, рекомендованного производителем клеток. Для обоих разбавлений клеток были получены концентрационные кривые по инсулину и референсным НАТ. Результаты экспериментов представлены на рисунках 4–5.

Из приведённых данных можно сделать вывод, что увеличение разбавления клеток линии *iLite™ Insulin Assay Ready Cells* в 2 раза по сравнению с разбавлением, рекомендованным производителем не приводит

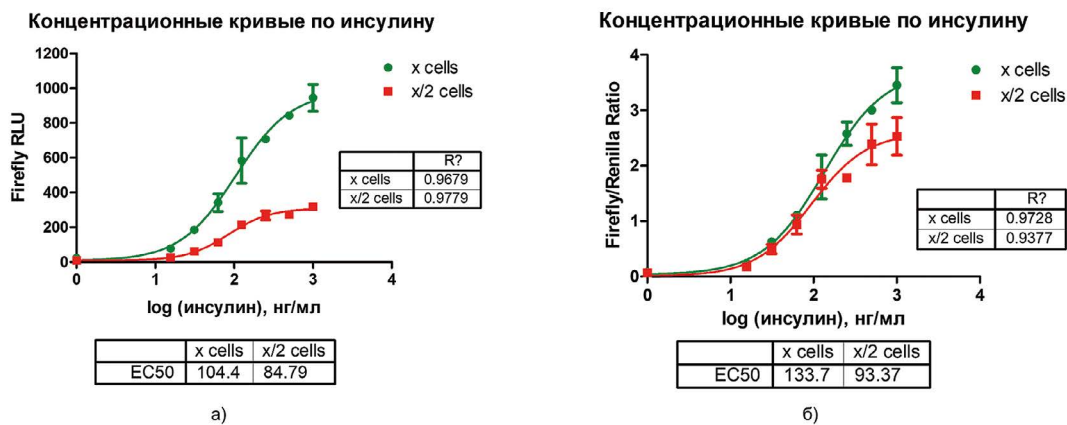


Рисунок 4. А – Активация инсулином экспрессии люциферазы *Firefly* в разных разбавлениях клеток (расчёт по люминесценции *Firefly*); б – Активация инсулином экспрессии люциферазы *Firefly* в разных разбавлениях клеток (расчёт по отношению люминесценции *Firefly*/*Renilla*)

Figure 4. А – *Firefly* luciferase expression in different cell dilutions (*Firefly* luminescence); б – *Firefly* luciferase expression in different cell dilutions (*Firefly*/*Renilla* luminescence ratio)

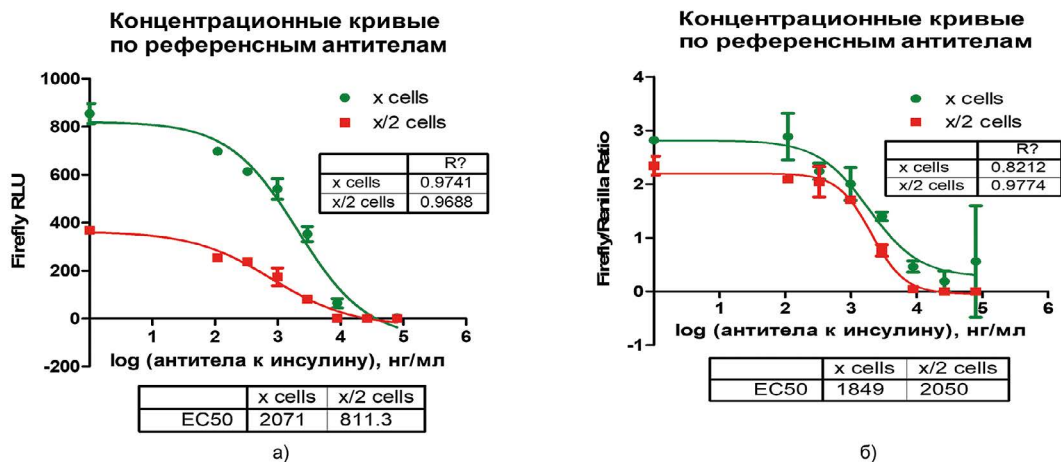


Рисунок 5. А – Ингибирование референсными антителами экспрессии люциферазы *Firefly* в разных разбавлениях клеток (расчёт по люминесценции *Firefly*); б – Ингибирование референсными антителами экспрессии люциферазы *Firefly* в разных разбавлениях клеток (расчёт по отношению люминесценции *Firefly*/*Renilla*)

Figure 5. А – Inhibition of the expression of *Firefly* luciferase by reference antibodies at different cell dilutions (*Firefly* luminescence); б – Inhibition of *Firefly* luciferase expression by reference antibodies at different cell dilutions (*Firefly* / *Renilla* luminescence ratio)

к уменьшению чувствительности метода. Таким образом, это разбавление клеток можно использовать при тестировании образцов.

Долгосрочная стабильность. Для определения долгосрочной стабильности нейтрализующих антител в плазме крови человека более 3-х месяцев были проанализированы образцы с известной концентрацией НАТ [образцы контроля качества (КК)] в день приготовления и спустя 76 и 112 дней после заморозки (2,5 и >3,5 месяца соответственно). В качестве образцов КК использовали образцы с высокой и средней концентраций НАТ (HQC и MQC соответственно). Длительное хранение образцов проводилось при температуре ниже -65 °С. Результаты анализа долгосрочной стабильности образцов приведены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Результаты определения долгосрочной стабильности нейтрализующих антител в образцах КК спустя 2,5 месяца

Table 1. Long-term stability of neutralizing antibodies in samples of quality control samples after 2.5 months

Образец КК	Соотношение сигналов FireFly/Renilla	Номинальная концентрация	Определённая концентрация (антител), нг/мл	Точность, %	Наличие антител
MQC	1,18	1000	1021,41	102,14%	+
HQC	0,63	5000	5281,64	105,63%	+

Так как в экспериментах использовались разные ампулы клеток, точность определения для разных аналитических серий устанавливали по соотношению сигналов люциферазы *FireFly/Renilla* в образцах КК.

Таблица 2. Результаты определения долгосрочной стабильности нейтрализующих антител в образцах КК спустя >3,5 месяцев

Table 2. Long-term stability of neutralizing antibodies in samples of quality control samples after >3,5 months

Образец КК	Соотношение сигналов FireFly/Renilla первое измерение	Соотношение сигналов FireFly/Renilla второе измерение	Точность, %
MQC	1,18	1,12	94,85
HQC	0,63	0,63	100,32

Таким образом было показано, что при анализе образцов плазмы крови человека допустимо хранение образцов при температуре ниже -65 °С сроком более 3-х месяцев. Результаты для образцов на долгосрочную стабильность удовлетворяют принятым критериям валидации.

Определение нейтрализующих антител к инсулину в образцах. После валидации метод был опробован при анализе реальных проб на определение НАТ в К₂ EDTA плазмы больных СД 1 типа в рамках сравнительного исследования иммуногенности препаратов Рин-Глар®, раствор для подкожного введения, 100 ЕД/мл (ООО «ГЕРОФАРМ») и инсулина Лантус®, раствор для подкожного введения, 100 ЕД/мл («Санофи-Авентис Дойчланд ГмбХ»).

Анализ реальных проб были разделены на аналитические серии. Каждая серия включала в себя образцы калибровочной кривой для референсных антител в двух повторах, 4 положительных образца КК (клетки без инсулина) и 4 образца отрицательных КК (клетки с инсулином) и тестируемые образцы для определения НАТ к инсулину. Количественную оценку активности референсных нейтрализующих антител *Abcam (Ab7842)* проводили при конечной концентрации инсулина 500 нг/мл с использованием 7 концентраций референсных антител (80000 нг/мл, 26666 нг/мл, 8888 нг/мл, 2963 нг/мл, 988 нг/мл, 329 нг/мл, 110 нг/мл и 0 нг/мл). Результаты анализа образцов КК для каждой аналитической серии представлены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3. Среднее значения отношения сигналов люциферазы Firefly/Renilla для положительных и отрицательных контролей, полуэффективная концентрация и пороговое значение титра антител аналитической серии определения нейтрализующих антител к инсулину в плазме крови пациентов

Table 3. The average value of the of Firefly/Renilla luciferase ratio for positive and negative controls, the semi-effective concentration and the cut points value of the antibody titer of an analytical series for the determination of neutralizing antibodies to insulin in the blood plasma of patients

Аналитическая серия	Параметр аналитической серии	Среднее значение соотношения сигналов FireFly/Renilla	Средняя концентрация (антител), нг/мл	Наличие антител к инсулину ¹
1 ампула клеток: кол-во клеток 3,8 · 10⁵ мл; 96% живых клеток				
№ 1	Cells	0,27	55456,74	+
	Cells + Insulin	1,88	911,23	нет
	Cut point	3644,91 нг/мл		
	EC50	3292 нг/мл		
№ 2	Cells	0,22	ULOQ	+
	Cells + Insulin	2,33	442,55	нет
	Cut point	1770,22 нг/мл		
	EC50	2887 нг/мл		
2 ампула клеток: кол-во клеток 3,0 · 10⁵ мл; 88% живых клеток				
№ 4	Cells	0,38	1681,19	+
	Cells + Insulin	1,95	107,48	нет
	Cut point	500,05 нг/мл		
	EC50	1540 нг/мл		
3 ампула клеток: кол-во клеток 2,3 · 10⁵ мл; 96% живых клеток				
№ 5	Cells	0,13	55867,55	+
	Cells + Insulin	1,75	159,80	нет
	Cut point	639,19 нг/мл		
	EC50	1159 нг/мл		
№ 6	Cells	0,21	17796,04	+
	Cells + Insulin	2,01	202,08	нет
	Cut point	808,31 нг/мл		
	EC50	1035 нг/мл		
№ 7	Cells	0,12	102257,16	+
	Cells + Insulin	1,95	167,74	нет
	Cut point	670,95 нг/мл		
	EC50	844,4 нг/мл		

Приложение. ¹Данные представлены для 4-х повторов образцов КК.

Cells – положительный контроль.
Cells+Insulin – отрицательный контроль.
Cut point – пороговое значение.

Note. ¹Data are presented for 4 repeats of samples of KK.
Cells – positive control.
Cells + Insulin – negative control.
Cut point – the threshold value.

Пороговым значением концентрации антител («cut points») для определения наличия антител к инсулину было выбрано четырех кратное увеличение концентрации НАТ по сравнению с концентрацией НАТ в пулированной плазме здоровых добровольцев (N=6) [11]. Маркером титра антител служило превышение в 4 раза и более концентрации антител в отрицательных контрольных образцах – клетки с инсулином.

Для контроля качества получаемых результатов в процессе анализа проб пациентов использовали показатели наличия и отсутствия НАТ к инсулину в образцах КК и по сходимости отношения средних сигналов люцифераз *Firefly* и *Renilla* в отрицательных образцах КК [12] и в первой точке калибровочной кривой (бланк), которые анализировали вместе с тестируемыми образцами в каждой аналитической серии.

Таблица 4. Средние значения отношения сигналов люцифераз *Firefly/Renilla* для отрицательных контролей и первой точки калибровочной кривой

Table 4. Average values of the *Firefly / Renilla* luciferase ratio for negative controls and the first calibration curve points

Аналитическая серия	Параметр	Среднее значение соотношения сигналов	Точность (K1/Cells+Insulin), %
№ 1	K1	1,87	99,63
	Cells+Insulin	1,88	
№ 2	K1	2,01	86,19
	Cells+Insulin	2,33	
№ 4	K1	1,77	90,89
	Cells+Insulin	1,95	
№ 5	K1	1,86	106,27
	Cells+Insulin	1,75	
№ 6	K1	2,30	114,56
	Cells+Insulin	2,01	
№ 7	K1	2,12	108,93
	Cells+Insulin	1,95	

Приложение. В таблице приведены округленные значения. Критерий приемлемости для точности 100±20%.
Cells+Insulin – отрицательный контроль.
K1 – первая точка калибровочной кривой (бланк).

Note. The table shows rounded values. Acceptance criterion for accuracy is 100±20%.
Cells + Insulin – negative control.
K1 – the first point of the calibration curve (blank).

Полученные результаты определения наличия НАТ к инсулину для образцов КК свидетельствует о приемлемости данного аналитического метода для анализа проб пациентов, а также о достоверности полученных результатов определения НАТ к инсулину в образцах плазмы крови человека. Поступившие в лабораторию образцы плазмы крови пациентов были разделены на аналитические серии. Концентрации в

реальных пробах рассчитывали по кривым, полученным в результате анализа калибровочных образцов в текущей серии.

Оценку иммуногенности проводили по частоте возникновения иммунного ответа (на основании определения концентрации НАТ к инсулину). Результаты тестирования проб пациентов на определение возникновения иммунного ответа представлены в таблице 5.

Таблица 5. Частота появления НАТ у больных СД 1 типа

Table 5. The frequency of occurrence of NAT in patients with type 1 diabetes

Визит	Появление НАТ к инсулину	РинГлар® (N=90)	Лантус® СолоСтар® (N=90)	p-value ¹
		n (%) ²	n (%)	
Визит 1	Да	26 (28,89%)	27 (30,00%)	1,000
	Нет	63 (70,00%)	62 (68,89%)	
Визит 9	Да	23 (25,56%)	24 (26,67%)	1,000
	Нет	65 (72,22%)	66 (73,33%)	

Примечание. ¹Точный критерий Фишера.

²Количество проанализированных образцов для 1 и 9 визита отличается, в связи с исключением пациентов в 9 визите в исследовании (поэтому сумма % не равна 100).

Note. ¹Exact Fisher criterion.

²The number of samples analyzed for visits 1 and 9 is different, due to the exclusion of patients at visit 9 in the study (therefore, the sum % is not equal to 100).

Общее количество образцов на исследование иммуногенности составило 356 шт. Нейтрализующие антитела к инсулину были идентифицированы у 53 и 47 при первом визите и девятом визите соответственно, у остальных пациентов НАТ к инсулину не было обнаружено.

Статистически значимых отличий частоты обнаружения НАТ между группами при первом и последнем визите (9 визит) не выявлено. По результатам определения наличия НАТ к инсулину у больных СД 1 наблюдаемая частота возникновения иммунного ответа одинакова для групп, принимающих разные препараты как до начала исследования, так и спустя 26 недель от начала исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведения работ по разработке и валидации биоаналитического метода определения НАТ к инсулину в тест-системе на основе клеточной линии *iLite™* Insulin Assay Ready Cells был продемонстрирован нейтрализующий эффект референсных антител к инсулину. Показано, что стимуляция инсулином данной клеточной линии активирует экспрессию люциферазы *Firefly*. Наблюдаемый активирующий эффект инсулина в данной тест-системе нейтрализуется референсными антителами к инсулину.

В процессе валидации показано, что в присутствии неразбавленной K₂ EDTA плазмы и сыворотки человека активирующий эффект инсулина в данной тест-системе

ме не наблюдается. При разбавлении K_2 EDTA плазмы и сыворотки человека инсулин проявляет активирующие свойства в данной тест-системе и активирующий эффект инсулина зависит от степени разбавления плазмы и сыворотки. Показано, что в разбавленной в 10 раз K_2 EDTA плазме активирующий эффект инсулина равен активирующему эффекту в растворителе и это разбавление может использоваться для тестирования образцов. Также проведено сравнение ответа клеток на инсулин и нейтрализующие референсные антитела к инсулину при двух разных разведениях клеток. Было показано, что разбавление клеток линии *iLiteTM* Insulin Assay Ready Cells в 2 раза по сравнению с рекомендованным производителем клеток разбавлением не приводит к снижению чувствительности метода и может использоваться для тестирования образцов. По результатам валидации продемонстрирована долгосрочная стабильность НАТ в K_2 EDTA плазме крови человека более 3-х месяцев при хранении образцов при температуре ниже -65 °С. Полученные результаты показывают, что данная методика может использоваться при исследовании иммуногенности лекарственных препаратов, содержащих инсулин.

По результатам определения наличия НАТ к инсулину у больных СД 1 типа от начала исследования до 26 недель была продемонстрировано идентичная иммуногенность тестируемого препарата РинГлар (ООО «ГЕРОФАРМ») по сравнению с инсулином Лантус («Санофи-Авентис Дойчланд ГмбХ»).

ЛИТЕРАТУРА

1. *iLiteTM* Insulin Assay Ready Cells (REF: BM3060), Product specification (Euro Diagnostica AB, Doc No: E-165-GB01). Available at: <https://www.eurodiagnostica.com/downloadFile.php?fileName=upload/files/fileLibrary/BM3060%20Product%20Specification%20iLite%20Insulin%20Assay%20Ready%20Cells%20LABEL-DOC-0362%20v1%200.pdf>.
2. Dual-Glo^R Luciferase Assay System Technical Manual (Promega) Available at: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/dual-luciferase-reporter-assay-system-protocol.pdf?la=en>.
3. Аметов А. С., Карпова Е. В. Современный взгляд на инсулинотерапию у больных сахарным диабетом 2 типа в ежедневной клинической практике врача-эндокринолога. *Эндокринология*. 2008; 495: 71–5.
4. Авакова К. А. Оптимизация методов современной инсулинотерапии при лечении сахарного диабета. *Автореф дисс. канд. мед. наук*. 2009.
5. McKeage K., Goa K. L. Insulin glargine. *Drugs*. 2001; 61(11): 1599–1624. <https://doi.org/10.2165/00003495-200161110-00007>.
6. Davies M., Dahl D., Heise T., Kiljanski J., Mathieu C. Introduction of biosimilar insulins in Europe. *Diabetic Medicine*. 2017; 34(10): 1340–1353. <https://doi.org/10.1111/dme.13400>.
7. European Medicines Agency. Abasaglar Insulin Glargine. EPAR Summary for the Public, 2014. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Summary_for_the_public/human/002835/WC500175384.pdf.
8. Determination of anti-Insulin neutralizing antibodies using *iLiteTM* Insulin Assay Ready Cells, Application note (Euro Diagnostica AB, Doc No: E-183-GB00). Available at: <https://www.eurodiagnostica.com/downloadFile.php?fileName=upload/files/fileLibrary/Application%20note%20-%20Determination%20of%20anti-insulin%20neutralizing%20antibodies%20LABEL-DOC-0390%20v1%200.pdf>.
9. Quantification of Insulin using *iLiteTM* Insulin Assay Ready Cells, Application note (Euro Diagnostica AB, Doc No: E-182-GB00). Available at: <https://www.eurodiagnostica.com/downloadFile.php?fileName=upload/files/fileLibrary/Application%20note%20-%20Quantification%20of%20Insulin%20LABEL-DOC-0389%20v1%200.pdf>.
10. FDA/CDER/CBER. Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products – Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection Guidance for Industry. FDA. 2019.
11. Home P., Derwahl K.-M., Ziemer M., Wernicke-Panten K., Pierre S., Kirchheim Y., Garg S. K. Anti-Insulin Antibodies and Adverse Events with Biosimilar Insulin Lispro Compared with Humalog Insulin Lispro in People with Diabetes. *Diabetes Technol. Ther.* 2018; 20: 160–170. <https://doi.org/10.1089/dia.2017.0373>.
12. Chatterjee S., Vashishta L., Waichale V. S., Nayak V. G., Melarkode R., Donnelly C. M., Sengupta N. Development and validation of a cell-based assay for the detection of neutralizing antibodies against recombinant insulins. *J. Immunol. Methods*. 2017; 452: 53–62. doi:10.1016/j.jim.2017.09.004.

REFERENCES

1. Dual-Glo^R Luciferase Assay System Technical Manual (Promega) Available at: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/dual-luciferase-reporter-assay-system-protocol.pdf?la=en>.
2. *iLiteTM* Insulin Assay Ready Cells (REF: BM3060), Product specification (Euro Diagnostica AB, Doc No: E-165-GB01). Available at: <https://www.eurodiagnostica.com/downloadFile.php?fileName=upload/files/fileLibrary/BM3060%20Product%20Specification%20iLite%20Insulin%20Assay%20Ready%20Cells%20LABEL-DOC-0362%20v1%200.pdf>.
3. Ametov A. S., Karpova E. V. A modern view on insulin therapy in patients with type 2 diabetes in the daily clinical practice of an endocrinologist. *Endokrinologiya*. 2008; 495: 71–5 (in Russ.).
4. Avakova K. A. Optimization of methods of modern insulin therapy in the treatment of diabetes. PhD thesis. 2009 (in Russ.).
5. McKeage K., Goa K. L. Insulin glargine. *Drugs*. 2001; 61(11): 1599–1624. <https://doi.org/10.2165/00003495-200161110-00007>.
6. Davies M., Dahl D., Heise T., Kiljanski J., Mathieu C. Introduction of biosimilar insulins in Europe. *Diabetic Medicine*. 2017; 34(10): 1340–1353. <https://doi.org/10.1111/dme.13400>.
7. European Medicines Agency. Abasaglar Insulin Glargine. EPAR Summary for the Public, 2014. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Summary_for_the_public/human/002835/WC500175384.pdf.
8. Determination of anti-Insulin neutralizing antibodies using *iLiteTM* Insulin Assay Ready Cells, Application note (Euro Diagnostica AB, Doc No: E-183-GB00). Available at: <https://www.eurodiagnostica.com/downloadFile.php?fileName=upload/files/fileLibrary/Application%20note%20-%20Determination%20of%20anti-insulin%20neutralizing%20antibodies%20LABEL-DOC-0390%20v1%200.pdf>.
9. Quantification of Insulin using *iLiteTM* Insulin Assay Ready Cells, Application note (Euro Diagnostica AB, Doc No: E-182-GB00). Available at: <https://www.eurodiagnostica.com/downloadFile.php?fileName=upload/files/fileLibrary/Application%20note%20-%20Quantification%20of%20Insulin%20LABEL-DOC-0389%20v1%200.pdf>.
10. FDA/CDER/CBER. Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products – Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection Guidance for Industry. FDA. 2019.
11. Home P., Derwahl K.-M., Ziemer M., Wernicke-Panten K., Pierre S., Kirchheim Y., Garg S. K. Anti-Insulin Antibodies and Adverse Events with Biosimilar Insulin Lispro Compared with Humalog Insulin Lispro in People with Diabetes. *Diabetes Technol. Ther.* 2018; 20: 160–170. <https://doi.org/10.1089/dia.2017.0373>.
12. Chatterjee S., Vashishta L., Waichale V. S., Nayak V. G., Melarkode R., Donnelly C. M., Sengupta N. Development and validation of a cell-based assay for the detection of neutralizing antibodies against recombinant insulins. *J. Immunol. Methods*. 2017; 452: 53–62. doi:10.1016/j.jim.2017.09.004.