

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины  
имени А.М. Никифорова» МЧС России

*На правах рукописи*

**НАЗАРОВ ВЛАДИМИР ДМИТРИЕВИЧ**

**«ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ИММУНОГЕННОСТИ  
ДЛЯ ИНДИВИДУАЛИЗАЦИИ ТЕРАПИИ  
ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫМИ БИОЛОГИЧЕСКИМИ ПРЕПАРАТАМИ»**

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук профессор  
Эмануэль Владимир Леонидович

Санкт-Петербург – 2019

## Оглавление

<b>Введение .....</b>	<b>5</b>
Актуальность темы исследования .....	5
Степень разработанности темы .....	7
Цель исследования .....	9
Задачи исследования .....	9
Научная новизна работы.....	10
Теоретическая и практическая значимость .....	10
Положения, выносимые на защиту .....	11
Методология и методы исследования.....	12
Степень достоверности и апробация результатов .....	13
Внедрение результатов исследования в практику .....	13
Личный вклад автора .....	13
Публикация результатов исследования .....	14
Структура и объем диссертации .....	14
<b>Глава 1. Иммуногенность генно-инженерных биологических препаратов (обзор литературы).....</b>	<b>15</b>
1.1. Определение генно-инженерных биологических препаратов.....	15
1.2. Понятие иммуногенности и причины повышенного иммунного ответа на генно-инженерные биологические препараты .....	19
1.3. Следствия повышенной иммуногенности биологических лекарственных средств. Связывающие и нейтрализующие антитела.....	27
1.4. Подходы к выявлению связывающих и нейтрализующих антител против генно-инженерных биологических препаратов .....	36
<b>Глава 2. Методология и методы исследования .....</b>	<b>41</b>
2.1. Группы обследуемых лиц.....	41
2.1.1. Образцы, использовавшиеся для стандартизации методов детекции связывающих и нейтрализующих антител к препаратам интерферона-бета.. .....	41
2.1.2. Исследование распространенности связывающих и нейтрализующих антител к препаратам интерферона-бета у пациентов с рассеянным склерозом ..	41

2.1.3. Исследование распространенности связывающих антител к рекомбинантным формам эритропоэтина .....	42
2.1.4. Исследование распространенности связывающих антител к препаратам инфликсимаба, адалимумаба и тоцилизумаба, а также концентрации препаратов у пациентов с ревматоидным артритом .....	43
2.2. Лабораторные методы исследования .....	45
2.2.1. Метод дот-блота для выявления связывающих антител.....	45
2.2.2. Метод для выявления нейтрализующих антител к интерферону-бета, основанный на репортерной клеточной линии HL-116 .....	47
2.2.3. Исследование связывающих и нейтрализующих антител к препаратам интерферона-бета .....	50
2.2.4. Исследование связывающих антител к рекомбинантным формам эритропоэтина.....	51
2.2.5. Исследование распространенности связывающих антител к препаратам инфликсимаба, адалимумаба и тоцилизумаба, а также измерение концентрации препаратов.....	51
2.3. Статистические методы обработки данных .....	52
<b>Глава 3. Результаты исследования.....</b>	<b>53</b>
3.1. Протокол верификации теста определения нейтрализующих антител к препаратам интерферона-бета, измеряемых с помощью гена-репортера люциферазы в клеточной линии HL-116 .....	53
3.1.1. Оценка аналитических характеристик тест-системы.....	54
3.1.2. Оценка робастности тестовой системы.....	57
3.1.3. Оценка стабильности растворов.....	57
3.1.4. Оценка возможности интерференции различных аутоантител при измерении титра нейтрализующих антител к препаратам интерферона-бета .....	57
3.1.5. Оценка аналитической точности с помощью исследования смещения (В) .....	59
3.1.6. Верификация границ нормы .....	59
3.1.7. Итоги экспериментов по верификации метода.....	59
3.2. Определение референтных значений для связывающих антител к генно-инженерным биологическим препаратам и подтверждение специфичности реакции связывания антител, измеренных методом дот-блота.....	61

3.3. Связь связывающих и нейтрализующих антител к препаратам интерферона-бета.....	62
3.4. Влияние связывающих антител к рекомбинантным формам эритропоэтина на клинический ответ от проводимой анти-анемической терапии у пациентов с хронической болезнью почек 5 стадии, находящихся на гемодиализе.....	67
3.5. Влияние антител к моноклональным терапевтическим иммуноглобулинам, используемым для лечения ревматоидного артрита, на концентрацию целевого препарата в сыворотке крови пациентов и фармакологическую эффективность генно-инженерных биологических препаратов .....	69
<b>Глава 4. Обсуждение результатов.....</b>	<b>78</b>
<b>Заключение.....</b>	<b>91</b>
<b>Выводы.....</b>	<b>92</b>
<b>Практические рекомендации.....</b>	<b>94</b>
<b>Перспективы дальнейшей разработки темы .....</b>	<b>95</b>
<b>Список сокращений.....</b>	<b>96</b>
<b>Список литературы .....</b>	<b>97</b>

## Введение

### Актуальность темы исследования

Актуальной проблемой клинической лабораторной диагностики является оптимизация и совершенствование лабораторных подходов персонализации терапии генно-инженерными биологическими препаратами.

Генно-инженерные биологические препараты (ГИБП) представляют собой вещества, содержащие активные компоненты, искусственно синтезированные при помощи различных методов биоинженерии [80]. На сегодняшний день ГИБП активно используются во многих областях медицины, прежде всего, для лечения хронических заболеваний. Развитие методов генетики и биотехнологий привело к повышению доступности и широкому распространению ГИБП. Терапевтические белки и полипептиды занимают одну из главенствующих позиций на рынке фармакологических средств, и, во многих случаях, являются единственной альтернативой симптоматическому лечению пациентов с аутоиммунными, онкологическими и генетическими заболеваниями [2], [58]. Ограничением широкого использования биологической терапии является не только ее высокая стоимость, но и проблема иммунных ответов человеческого организма на сложные биологические субстанции. В отличие от низкомолекулярных препаратов, ГИБП обладают уникальной характеристикой – иммуногенностью [53]. Иммуногенностью называют склонность ГИБП вызывать иммунный ответ в отношении молекул биопрепарата, а также родственных белков организма. Любой белковый агент, даже максимально похожий на свой природный аналог, при длительном введении в организм человека будет вызывать иммунный ответ, который может повлиять не только на фармакодинамику и фармакокинетику лекарства, но и на состояние организма в целом [117]. Кроме этого, отличия в первичной аминокислотной последовательности препарата от природного аналога, посттрансляционные изменения, преципитация молекул препарата, а также вещества-примеси, в том числе остатки экспрессионных линий и штаммов-продуцентов, могут быть причиной повышенной иммуногенности ГИБП. Вещества-стабилизаторы, особенности хранения, пути введения и состояние

организма пациента также могут влиять на уровень иммуногенности препарата. Одним из главных следствий иммуногенности ГИБП является появление антител, способных изменять фармакологические свойства препаратов или же ингибировать их биологическую и фармакологическую активность [62]. Кроме этого, одним из последствий повышенной иммуногенности ГИБП является острая реакция на лекарственное средство, проявляющаяся анафилактическим шоком, синдромом цитокинового выброса или инфузионной реакцией [60].

Все антитела, синтезирующиеся против ГИБП, делят на несколько групп в зависимости от времени их появления, влияния на активность ГИБП и типа паратопа. Прежде всего, принято выделять связывающие антитела (САТ) и нейтрализующие антитела (НАТ). Так, САТ представляют собой совокупность всех иммуноглобулинов, способных связываться с ГИБП, и паратопа которых могут быть специфичны к любому участку белковой молекулы [112]. Клиническая значимость САТ остается неясной. Со временем происходит замещение пула САТ на высокоаффинные НАТ, которые способны нарушать взаимодействие ГИБП со своим лигандом или рецептором, и, таким образом, снижать терапевтическую и фармакологическую активность.

Исследования для оценки иммуногенности биотехнологических препаратов и их биоаналогов перед выходом на рынок рекомендуются рядом международных организаций, в том числе FDA и EMEA [84], [48]. В клинической практике выявление повышенной иммуногенности позволяет своевременно установить причину снижения терапевтической эффективности лекарства, оптимизировать назначение дорогостоящих биопрепаратов и индивидуализировать терапию.

Все методы, используемые для определения антител к ГИБП, делятся на следующие типы: скрининговые методы для определения САТ и методы для определения НАТ. К количественным методам, направленным на выявление САТ, относятся иммуноферментный анализ, иммуноблот и дот-блот.

Изменение биологической активности терапевтических белков и титр НАТ оценивается с помощью клеточных линий, обладающих природной способностью связывать молекулы ГИБП, или генетически-модифицированных клеток, которые могут детектировать связывание молекул ГИБП в функциональном биотесте.

### **Степень разработанности темы**

Наиболее показательным примером отрицательного влияния иммунного ответа на терапевтическую активность ГИБП является синтез САТ и НАТ к препаратам интерферона-бета (ИФН-бета), которые используются в качестве первой линии болезнь-модифицирующей терапии рецидивирующе-ремиттирующей формы рассеянного склероза (РС). Феномен образования антител к ИФН-бета был описан еще при первом клиническом исследовании препарата BETASERON®. В ходе этого исследования антитела к данному ГИБП были обнаружены у 45 % пациентов, принимавших ИФН-бета в дозе 8 миллионов МЕ, хотя в настоящее время пациенты получают значительно большие дозы [8]. В среднем, от 40 до 80 % пациентов, получающих терапию ИФН-бета более 1 года, имеют САТ, но только у некоторых пациентов САТ в последствии трансформируются в НАТ. Клиническая значимость НАТ долгое время подвергалась сомнению, что было связано с отсроченным негативным эффектом НАТ, который можно наблюдать только после 18 месяцев терапии, а также разными критериями НАТ-позитивности. Кроме этого, исследователи не могли прийти к консенсусу о рутинном использовании методов выявления НАТ в клинической практике, интерпретации результатов тестов, использованию типа тест-системы для детекции НАТ, а также подходу к терапии у НАТ-положительных пациентов. На данный момент, рядом рандомизированных проспективных, нерандомизированных проспективных, а также ретроспективных исследований было доказано негативное влияние НАТ на частоту обострений заболевания. У НАТ-позитивных пациентов регистрировалась статистически значимо большая частота обострений в год, чем у пациентов без НАТ, а также уровень МРТ активности (количество очагов и их общий объем) и скорость

прогрессии РС (уровень EDSS) [34]. Референтные значения для концентраций НАТ к препаратам ИФН-бета, методы их детекции, клиническое использование титров НАТ и подходы к ведению пациентов, положительных на НАТ к ИФН-бета, были изложены после окончания исследования NABINMS (Neutralizing Antibodies on Interferon-Beta in Multiple Sclerosis) в виде единых рекомендаций для практического использования [86].

Нужно отметить, что до сих пор не выяснена клиническая и лабораторная значимость САТ к ИФН-бета.

Серьезным последствием иммуногенности ГИБП является возможность связывания синтезирующихся к ним антител с эндогенными белками, что приводит к полному блоку их биологической функции. Примером является развитие парциальной красноклеточной аплазии у пациентов, получавших препараты рекомбинантного эритропоэтина (рЭПО) для лечения анемии, вызванной хронической болезнью почек (ХБП). Кроме этого, при лечении препаратами рЭПО до 67 % пациентов характеризуются синтезом САТ против препарата, клиническая значимость которых не до конца ясна. Исследования влияния САТ на развитие вторичной резистентности к проводимой терапии рЭПО позволят персонализировать терапию данной группы пациентов.

Моноклональные антитела (МКА) представляют собой относительно новую группу ГИБП, которая активно используется в большинстве направлений медицины. При длительной терапии данными препаратами часто наблюдается нежелательный синтез антител, распространённость которых сильно варьируется в зависимости от типа моноклонального иммуноглобулина. Так, при лечении химерным МКА инфликсимабом (ИНФЛ), содержащим участки ксеногенного белка, через 6 недель антитела к препарату обнаруживаются примерно у 33 % пациентов [59]. Количество положительных пациентов с антителами к данному ГИБП увеличивается до 67 % через 14 недель и до 78 % через 28 недель. В случае с полностью гуманизированным ингибитором фактора некроза опухоли альфа (ФНО $\alpha$ ) адалимумабом (АДА) частота образования антител к 24 месяцу терапии достигает 49 % процентов [77]. На данный момент нет консенсуса о влиянии



антител к МКА на их клиническую активность, кроме этого, не существует рекомендаций о изменении плана терапии при обнаружении антител к ИНФ и АДА.

Данные об уровне иммуногенности тоцилизумаба (ТОЦ) очень скудны, и развернутых исследований, которые затрагивали бы эту тему, до сих пор не было проведено.

Таким образом, оптимизация лабораторных методов исследования иммуногенности ГИБП, оценка влияния антител к белковым терапевтическим препаратам на их клиническую эффективность, а также изучение клинического значения результатов лабораторного обследования являются актуальными темами для данного исследования.

**Цель исследования:** разработать лабораторные методы для оценки иммуногенности генно-инженерных биологических лекарственных препаратов для персонализации терапии аутоиммунных заболеваний.

#### **Задачи исследования**

1. Разработать методику дот-блота для определения связывающих антител к различным белковым препаратам.
2. Установить аналитические характеристики и провести апробацию метода выявления нейтрализующих антител к препаратам интерферона-бета, который основан на феномене активации интерфероном-бета трансфицированной клеточной линии HL-116.
3. Определить уровень иммуногенности препаратов интерферона-бета и исследовать распространённость связывающих и нейтрализующих антител с помощью разработанных лабораторных методов.
4. Исследовать уровень иммуногенности препаратов эритропоэтина и различных форм моноклональных антител и определить влияние связывающих антител на терапевтический ответ у данных пациентов для персонализации их терапии.

5. Определить основную причину снижения фармакологической активности генно-инженерных биологических препаратов на основе проведенных исследований.

### **Научная новизна исследования**

В ходе выполнения поставленных задач был стандартизирован биотест детекции нейтрализующих антител к ИФН-бета, в основе которого лежит репортерная биопрепарат-чувствительная генно-модифицированная клеточная линия HL-116. Кроме этого, был создан протокол культивирования, а также протокол верификации с уточнением целевых аналитических и клинико-диагностических параметров. Был создан алгоритм расчета фармакологической активности и уровня нейтрализации антителами исследуемого препарата, основанный на методе полиномиальной регрессии с дополнительным расчетом поправочного коэффициента Kawade.

Была разработана методика определения САТ, основанная на механизме дот-блота, которая позволяет выявлять интерферирующие иммуноглобулины к любому из существующих ГИБП. Был показан высокий уровень сходимости разработанных тест-систем с существующими коммерческими наборами по выявлению антител против ГИБП. Было показано значимое влияние антител к препаратам рЭПО на клинический ответ у пациентов с терминальной стадией болезни почек. Была показана взаимосвязь между титром препарата моноклональных иммуноглобулинов и уровнем синтезирующихся против них антител у пациентов с ревматоидным артритом. Было показано влияние уровня препарата моноклонального иммуноглобулина и концентрации антител, синтезирующихся против них, на клинический эффект проводимой терапии у пациентов с ревматоидным артритом.

### **Теоретическая и практическая значимость**

В ходе исследований были разработаны и стандартизированы лабораторные системы по выявлению САТ и НАТ к ГИБП. Проведенная

верификация методов детекции антител к ГИБП, анализируемых с помощью репортерной тест-системы и дот-блота, показала высокую внутрилабораторную воспроизводимость, аналитическую точность и сопоставимость с другими классическими методами выявления антител. Данные лабораторные подходы дают возможность детектировать интерферирующие связывающие антитела к любому существующему ГИБП, что в свою очередь позволяет персонализировать подходы к лечению пациентов. Была показана возможность предсказания нейтрализующей активности антител против препаратов ИФН-бета с помощью теста дот-блота, выявляющего связывающий пул антител. Было продемонстрировано, что наличие антител к препаратам рЭПО связано со сниженной терапевтической активностью используемого лекарственного средства у пациентов с хронической болезнью почек. Было показано, что САТ к ингибитору ФНО $\alpha$  (ИНФЛ) снижают уровень определяемого препарата в сыворотке крови, а также снижают фармакологическую активность лекарственного средства.

Кроме этого, было установлено, что концентрация ИНФЛ, измеренная перед последующим введением препарата, связана с уровнем выраженности клинического ответа у пациентов с ревматоидным артритом. Также было убедительно показано, что антитела к ТОЦ способны снижать клинический ответ проводимой терапии и уменьшать противовоспалительные характеристики препарата.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Наиболее оптимальным лабораторным методом оценки иммуногенности и исследования концентрации связывающих и нейтрализующих антител к генно-инженерным биологическим препаратам является система дот-блота и трансфицированные клеточные линии, несущие стабильный трансфект гена люциферазы.

2. Иммуногенность генно-инженерных биологических лекарственных препаратов опосредована синтезом связывающих и нейтрализующих антител,

которые появляются при длительной терапии препаратами и способны снижать биологическую и фармакологическую активность лекарственных средств и концентрация которых должна быть оценена с помощью лабораторных тестов для персонализации терапии аутоиммунных заболеваний.

3. В основе механизма снижения фармакологической активности генно-инженерных биологических лекарственных средств лежит нарушение связывания белковой молекулы препарата со своим рецептором или целевым антигеном, а также изменение фармакокинетических свойств молекулы лекарства, опосредованное синтезом антител против препарата и повышением скорости клиренса препарата.

### **Методология и методы исследования**

Методологической основой диссертационного исследования послужили работы зарубежных и отечественных ученых, посвященных проблеме исследования иммуногенности генно-инженерных лекарственных средств, влияния антител на фармакологическую и клиническую активность препарата, персонализации терапии, а также разработке методов определения уровня иммуногенности биопрепаратов. Объектом диссертационного исследования являлись практические аспекты клинической лабораторной диагностики и методы оценки иммуногенности генно-инженерных лекарственных средств. Предмет исследования – антитела, синтезирующиеся против генно-инженерных биологических препаратов, а также их влияние на клинический ответ при лечении генно-инженерными биологическими препаратами.

Методы диссертационного исследования включали: сбор клинического материала и анализ клинических и лабораторных данных пациентов, разработка методов определения связывающих и нейтрализующих антител. В анализе данных использовались современные подходы статистической обработки данных. Все лабораторные эксперименты проводились с использованием современного оборудования.

### **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

Степень достоверности результатов исследований обеспечена глубоким анализом литературных источников, посвященных данной проблеме, репрезентативной выборкой пациентов и участников контрольной группы (249), использованием официальных стандартов соответствия клинико-лабораторных характеристик разрабатываемых тестов, высокой статистической значимостью полученных результатов. Сформированные группы пациентов были репрезентативны по количеству для решения поставленной цели и задач.

Результаты работы представлены и обсуждены на конгрессе «Дни ревматологии в Санкт-Петербурге» (г. Санкт-Петербург, 2018 г.); на третьем Всероссийском конгрессе «Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания» (г. Москва, 2018 г.); на конференции «Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания» (г. Москва, 2016 г.). Проект «Разработка и валидация лабораторного теста по определению нейтрализующих антител к препаратам интерферона- $\beta$ » был поддержан Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере.

### **Внедрение результатов исследования в практику**

Разработанные методы детекции САТ и НАТ используются в исследовательских и учебных целях в лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний НМЦ по молекулярной медицине ПСПбГМУ имени академика И.П.Павлова при мониторинговании терапии моноклональными иммуноглобулинами у пациентов с ревматоидным артритом, выявлении НАТ к препаратам ИФН-бета у пациентов с РС, определении концентрации САТ к препаратам рЭПО у пациентов с терминальной стадией хронической болезни почек. Планируется получение регистрационного удостоверения на созданные тесты.

### **Личный вклад автора в исследование**

Автор диссертации лично участвовал в планировании и организации проведенных работ и экспериментов, разработал проект исследования,

апробировал и стандартизировал системы определения САТ и НАТ и создал протоколы детекции данных биомаркеров. Автор лично выполнил исследования концентрации САТ и НАТ с помощью разработанных методов дот-блота и биочувствительных трансфицированных клеточных линий и коммерческих тестовых систем.

### **Публикации результатов исследования**

По материалам диссертации опубликовано 11 оригинальных научных работ в зарубежных и отечественных журналах, включая 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для опубликования основных результатов диссертационных исследований, и 7 статей в рецензируемых научных изданиях, включенных в глобальные индексы цитирования SCOPUS и Web of Science.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 110 страницах машинописного текста, содержит 15 таблиц, иллюстрирована 18 рисунками и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и списка литературы (включает 3 отечественных и 117 зарубежных источника).

## **Глава 1. Иммуногенность генно-инженерных биологических препаратов (обзор литературы)**

### **1.1. Определение генно-инженерных биологических препаратов**

По определению Европейского медицинского агентства (European Medicine Agency – ЕМЕА) ГИБП - это вещества, которые содержат один или более активных компонентов, синтезированных или выделенных из биологических источников, в том числе при помощи одного или нескольких перечисленных биотехнологических методов: технология рекомбинантной ДНК; контролируемая экспрессия генов, кодирующих выработку биологически активных белков; методы гибридом и моноклональных антител [48]. Рынок ГИБП стремительно растет с каждым годом. С развитием биотехнологий в общем, и прикладной генетики в частности, создание максимально приближенных по структуре к нативным белкам и модифицированных ГИБП становится все более достижимой задачей. Однако любой белковый агент, даже максимально похожий на свой природный аналог, при длительном введении в организм человека будет вызывать иммунный ответ, который может повлиять не только на фармакодинамику и фармакокинетику лекарства, но и на состояния организма в целом [1]. В соответствии со стандартами лицензирования новых ГИБП ЕМЕА, определение иммуногенности разрабатываемого препарата является одним из обязательных этапов клинических исследований [48]. Иммуногенностью ГИБП называют склонность терапевтических белков вызывать иммунный ответ как в отношении лекарственной молекулы, так и родственных белков организма, или стимулировать клинические иммунологические побочные эффекты.

Современное понятие биологической терапии («biologics») и ГИБП сформировалось в начале 20-го века в США после издания указа по контролю над биологическими препаратами в 1902 году. Его внедрение связано с необходимостью стандартизировать и контролировать терапевтические, профилактические и диагностические биологические вещества после инцидента с применением инфицированной *Clostridium tetani* антидифтерийной сыворотки, что привело к смерти 13 детей в 1901 году [65]. Долгое время именно вакцины и

терапевтические анти-сыворотки являлись основой ГИБП. Все изменилось, когда в 1921 году Фредерик Бантинг провел первую в мире экстракцию и очистку бычьего инсулина и использовал его для лечения сахарного диабета I типа [115]. До этого времени, диагноз «сахарный диабет I типа» был фактически смертным приговором для пациентов. Животный инсулин сохранил миллионы жизней и стал примером для внедрения заместительной терапии при заболеваниях, характеризующихся недостаточным синтезом собственных белков организма, таких как соматотропин, эритропоэтин, факторов свертывания VIII и IX, а также различных ферментов. Основными методами получения животных и человеческих белков были химическая экстракция, преципитация, ультрацентрифугирование и эксклюзионная хроматография. И хотя качество получаемых белков было достаточно высоким, исследователи столкнулись с рядом проблем, которые невозможно было решить, используя только имеющиеся технологии. Основными недостатками данных методик являлось зависимость от большого объема материала животных, высокая стоимость процедуры, возможность заражения полученных белков инфекционными агентами и загрязнения другими белковыми веществами, а также выраженная иммунная реакция на животные белки у пациентов. Многие проблемы биологических препаратов были решены после того, как Каичи Итакура (Keiichi Itakura) в 1977 году впервые синтезировал соматостатин в экспрессионном векторе *E.coli*, используя новую методику рекомбинации ДНК, предложенную Когеном и его коллегами [44]. Данная система (с помощью генетически модифицированной бактериальной линии кишечной палочки (*Escherichia coli*) и искусственно созданной плазмиды) позволяла синтезировать любой белок организма человека, нуклеотидная последовательность которого была известна, в очень короткие сроки и в очень больших объемах. Это позволило не только полностью отойти от животных аналогов и сделать белковые препараты более доступными, но и модифицировать молекулы для повышения их эффективности. В 1980 году компания Genentech получила патент от Национального Института Здоровья (National Institute of Health) на широкомасштабное производство трех



биологических препаратов – рекомбинантного инсулина (выпущен в 1982 году), рекомбинантного соматотропина (выпущен в 1985 году) и рекомбинантного соматостатина. Это событие стало началом новой эры в производстве биологических лекарственных препаратов. Несмотря на большое количество преимуществ использования рекомбинантных бактериальных линий *E.coli*, в последствии обнаружилось, что они обладают серьезными недостатками, сильно влияющими на качество получаемого продукта. Являясь прокариотами, *E.coli* не имеют возможности проводить посттрансляционную модификацию белковых молекул - N- и O- гликозилирование, ацилирование жирных кислот, фосфорилирование и образование дисульфидных связей, что часто требуется для правильной вторичной, третичной и четвертичной структуры природного белка [62]. Несомненно, это сильно влияет на биоактивность белка, его структуру, растворимость, стабильность, время полужизни, резистентность к протеазной активности и его иммуногенность. Кроме этого, в белке, синтезированном в прокариотической клетке, сохраняется терминальная аминокислота метионин, присутствие которой также отрицательно влияет на его стабильность и иммуногенность [23]. Отсутствие некоторых шаперонов в *E.coli*, наличие высокой активности протеаз в цитоплазме, также отрицательно влияет на конечную структуру молекулы. Использование эукариотических экспрессионных систем позволило устранить некоторые недостатки клеточных линий *E.coli*. Использование дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в качестве экспрессионного вектора не только дало возможность сохранить все преимущества прокариотических клеток (быстрый рост, способность продуцировать большое количество белка за небольшой промежуток времени, низкая цена, простота культивирования), но и устранило проблемы с организацией вторичной, третичной и четвертичной структуры белка, хотя посттрансляционные модификации ( N- и O- паттерн гликозилирования, гамма- карбоксилирование) не были идентичными с человеческими [118]. Белки, получаемые при использовании экспрессионной системы *Insect cells Spodoptera frugiperda 21 / Autographa californica baculovirus*, точно совпадают по структуре с белками человека, но,

несмотря на это, клетки *Spodoptera frugiperda* лишены возможности проводить сиамирование и гамма-карбоксилирование, что в некоторых случаях отрицательно влияет на биоактивность и иммуногенность получаемой молекулы [81]. Кроме этого, производительность данной системы намного ниже, чем у *E.coli* и *Saccharomyces cerevisiae*, так как клеточная линия, зараженная бакуловирусом, через несколько циклов деления умирает. Использование клеток яичка китайского хомячка (СНО) со стабильным трансфектом гена белка позволило достичь максимального соответствия синтезируемой молекулы ее человеческого аналогу. Хотя в связи с отсутствием в данных клетках некоторых сиалотрансфераз, характерных для человеческих клеток, небольшие различия в профиле гликозилирования все же имеются. Многообещающим является использование модифицированных человеческих клеточных линий (PerC.6 клеточная линия), которые не только полностью воспроизводят профиль посттрансляционных изменений нативных человеческих белков, но и обладают продуктивностью, сравнимой с прокариотическими линиями [73].

Важным этапом развития ГИБП было создание Сезаром Мильштейном и Георгом Келлером в 1977 году гибридной технологии для синтеза МКА [78]. Путем слияния В-клеток иммунизированной мыши с раковыми клетками миеломы и последующей селекцией требуемого клона гибридомы, появилась возможность синтезировать неограниченное количество моноклональных антител к требуемой белковой молекуле за очень небольшой промежуток времени. Возможность избирательно воздействовать на определенные клетки в организме, несущие специфический белковый маркер, изменило понимание таргетной терапии. Первый препарат МКА *муромонаб* (анти-CD3), использовавшийся при отторжении трансплантата почки, печени, сердца или костного мозга, был выпущен в 1986 году и синтезирован с использованием гибридной технологии в асците мышей [91]. Основной проблемой, с которой столкнулись исследователи и врачи того времени, была выраженная иммунная реакция организма на мышинные антитела. Она проявлялась образованием антител к чужеродному белку, которые блокировали терапевтический эффект ГИБП (анти-мышинные

антитела). Использование методов рекомбинантной ДНК для «гуманизации» белков и создание химерных, гуманизированных или полностью человеческих антител позволило частично решить проблему иммуногенности, но возможность блокирования их функции антителами организма больного до сих пор остается острой проблемой использования МКА [37]. На сегодняшний день МКА активно применяются в таких областях медицины, как неврология, гематология, онкология, ревматология, дерматология, гастроэнтерология, кардиология. На данный момент FDA одобрило 44 препарата МКА, но, надо отметить, что более 200 МКА находятся в стадии клинических исследований и более 600 на доклинической стадии разработки. Учитывая увеличение доли занимаемого терапевтическими белками фармакологического рынка, а также большое количество создаваемых биоаналогов, интерес к проблеме иммуногенности ГИБП растет.

## **1.2. Понятие иммуногенности и причины повышенного иммунного ответа на генно-инженерные биологические препараты**

ГИБП представляют собой лекарственные средства, главным действующим веществом которых является фармакологическая субстанция, синтезированная с помощью или выделенная из биологических источников [53]. К ГИБП относятся рекомбинантные фузионные белки, моноклональные антитела, а также белковые лекарственные средства, полностью или частично идентичные природным молекулам [22]. Специфической характеристикой ГИБП является иммуногенность, что отличает их от низкомолекулярных лекарственных средств. Иммуногенностью называют склонность ГИБП вызывать иммунный ответ в отношении молекул биопрепарата, а также родственных белков организма [106]. В ряде случаев иммуногенность является основным достоинством ГИБП; так, у рекомбинантных компонентных вакцин высокая иммуногенность субстанции определяет ее терапевтическую эффективность [69]. С другой стороны, иммуногенность тормозит развитие целых направлений в терапии с помощью ГИБП. Например, в случае с аденовирусными векторами, которые представляют перспективный метод доставки генетического материала при генотерапии,

обнаружено, что предсуществующие антитела к капсиду аденовируса, а также антитела, образующиеся в ходе терапии, способны полностью ингибировать терапевтический эффект препарата. Это не только значительно снижает возможность клинического использования данных препаратов, но и является значимой задержкой для использования генотерапии в целом [5].

Препараты группы ГИБП относят к наиболее эффективным и наиболее дорогостоящим лекарственным средствам, используемым в настоящее время. Проблема иммуногенности особенно остро касается ГИБП, поскольку любой белковый агент, даже максимально похожий на свой природный аналог, при длительном введении в организм человека будет вызывать иммунный ответ, который может повлиять не только на фармакодинамику и фармакокинетику лекарства, но и вызвать серьезные побочные эффекты [17].

Существует ряд причин, значительно повышающих иммуногенность белковых лекарственных средств. К ним относятся: различия в белковой структуре препарата и природного аналога, посттрансляционные модификации белка, формулировка лекарственного средства, наличие белковых агрегатов, частота, доза и путь введения препарата, состояние организма в целом, активность иммунной системы и особенности иммуногенетики [7], [32], [33]. Основные причины повышенной иммуногенности представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Причины повышенной иммуногенности генно-инженерных биологических препаратов.

Причины	Механизм	Примеры и ссылки
Различия в первичной структуре белкового препарата и эндогенного белка, примеси экзогенных белков	Появление чужеродных белков активировывает иммунитет	Очищенный инсулин, моноклональные иммуноглобулины, стрептокиназа, фактор роста
	Контаминация белками экспрессионной линии	Очищенный инсулин

*Продолжение таблицы 1.*

Отсутствие или различие в посттрансляционных модификациях	Обнажение скрытых иммунодоминантных неэпитопов молекул	Фактор роста, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
	Сниженная структурная стабильность белковой молекулы и пониженная растворимость	Моноклональные иммуноглобулины, ИФН-бета
Формулировка и состав буфера	Альбумин и наночастицы кремния повышают склонность к образованию агрегатов	ИФН-бета, моноклональные иммуноглобулины
Образование высокомолекулярных агрегатов	Перекрестное связывание рецепторов В и Т лимфоцитов и их гиперактивация; адьювантный эффект агрегатов белка	ИФН-бета, фактор роста, ИФН-альфа, моноклональные иммуноглобулины
Путь введения	Большое количество антигенпрезентирующих клеток в кожных покровах	Очищенный инсулин, ИФН-бета
Генетическая предрасположенность	Определяет уровень активации иммунного ответа на введение экзогенного агента	ИФН-бета, очищенный инсулин

*Примечания:* ИФН-бета – интерферон-бета

Иммунный ответ на вводимый белковый препарат является комплексным процессом, затрагивающим как врожденный, так и адаптивный иммунный ответ. Для описания последовательности этапов развития иммунного ответа используется так называемая «модель опасности», разработанная в 1994 году Полли Матзингер (Polly Matzinger) [74]. В соответствии с данной теорией, клетки врожденного иммунитета, в основном антиген-представляющие клетки, например дендритные клетки, клетки моноцитарного ряда, играют ведущую роль на

первичных этапах развития иммунного ответа и активируются в результате повреждения других клеток, что ведет к индукции рецепторов для дисстресс-ассоциированных молекулярных паттернов, синтезу провоспалительных цитокинов. Используя теорию Полли Матзингер, можно сказать, что на иммуногенность влияют структурные особенности самого лекарственного средства и условия его хранения, а также факторы, относящиеся к организму, в который вводится препарат.

Различия в первичной структуре белкового препарата и эндогенного белка считаются наиболее важной причиной повышенного иммунного ответа организма на экзогенный агент. Даже изменение в одну аминокислоту в белковой структуре ГИБП может привести к выраженному иммунному ответу [39].

В клинической практике нашли широкое применение две формы препарата рекомбинантного человеческого ИФН-бета. Так, ИФН-бета-1a синтезируется в клетках яичника хомячка и практически полностью идентичен по структуре человеческому интерферону. В то же время, рекомбинантный ИФН-бета-1b синтезируется в бактериальной клеточной линии *E.coli*. В препарате ИФН-бета-1b отсутствует аминокислота метионин на N-конце молекулы, что связано с особенностями трансляционного аппарата прокариотических линий [23]. Кроме этого, в аминокислотной последовательности ИФН-бета-1b произведена намеренная замена цистеина в 17 позиции на серин, что увеличивает стабильность белковой структуры препарата [31]. Было показано, что препараты ИФН-бета-1b имеют более высокий уровень иммуногенности по сравнению с ИФН-бета-1a, что связывают с отличием первичной структуры препарата от молекулы эндогенного интерферона [12].

До 1980 года препараты инсулина получались путем экстракции белка из сыворотки крови свиней и коров, и являлись по своей сути ксеногенными агентами. При их введении у многих пациентов развивалась выраженная аллергическая реакция, а при длительном использовании их терапевтическая активность снижалась [120].

С начала 90-х годов для синтеза биологических препаратов стали использоваться методы генной инженерии, основанные на использовании прокариотических клеточных линий, а позже эукариотических клеток высших животных [54]. На современном этапе развития биотехнологий производства ГИБП причиной повышенной иммуногенности препаратов в связи с отличием структуры препарата от нативных белков может быть использование прокариотических клеточных систем для синтеза ГИБП (препараты инсулина, интерферона), направленная замена аминокислот в структуре препарата, признанная улучшить его фармакокинетические свойства (например рЭПО, ИФН, МКА), клонирование с использованием мышинных генов (терапевтические моноклональные антитела), появление неозепитопов в ходе слияния нескольких белков [117].

Важной проблемой для устранения причины выраженного иммунного ответа организма на ГИБП является разница в посттрансляционных изменениях типов клеточных линий, используемых для синтеза белка, и человеческого организма. Широко используемые для синтеза белков прокариотические клеточные линии *E.coli* не содержат некоторых систем посттрансляционных изменений (гликозилирование, ацилирование, фосфорилирование), а гликопротеины дрожжевых клеток насыщены манозными остатками, которые активируют TLR-2 и TLR-4 рецепторы врожденного иммунитета [46]. Хотя использование клеточных линий млекопитающих значительно повышает сходство посттрансляционных изменений ГИБП и их природного аналога, присутствие даже небольшой разницы в паттерне модификаций может привести к повышению иммуногенности препарата. Формулировки препарата ИФН-бета-1b (Betaseron®) имеют меньшую фармакологическую активность по сравнению с ИФН-бета-1a (Avonex, Rebif) [76]. Считается, что уровень фармакологической активности ИФН-бета-1b составляет 10% от активности ИФН-бета-1a. Рядом исследований было показано, что ИФН-бета-1b чаще вызывает образование антител, что связывают с отсутствием гликозилирования молекулы белка. Так, частота появления нейтрализующих антител к препаратам ИФН-бета-1b

составляет 28-47 %, в то время как антитела к препаратам ИФН-бета-1а встречаются значительно реже – в 2-21 % случаев [97].

Модификации влияют на структуру белка, на его функциональную способность и фармакологическую активность, а также на склонность образовывать мультикомплексные агрегаты. В ходе синтеза белки потенциально могут быть подвергнуты более 100 различным посттрансляционным изменениям, но наиболее характерными для ГИБП являются гликозилирование, протеолитический процессинг и образование дисульфидных мостиков, а также, хотя и значительно реже, карбоксилирование, гидроксильное, амидирование. И хотя для лицензирования ГИБП не требуется полное соответствие посттрансляционного паттерна препарата природному человеческому аналогу, клинические исследования должны показать, что препарат в отсутствие модификаций обладает приемлемой эффективностью и безопасностью. Для некоторых ГИБП (гонадотропные гормоны, эритропоэтин, инсулин) такие модификации как гликозилирование или образование дисульфидных мостиков являются основополагающими для их нормальной биологической и терапевтической активности [46].

Большое влияние на уровень иммуногенности оказывает химический состав растворов, в которых хранится препарат, форма хранения белковой субстанции, наличие белковых и низкомолекулярных примесей в составе буфера, химический состав поверхностей, которые соприкасаются с растворами препарата (Polysorbate 80, силиконовое масло, выщелачиватели), а также наличие в растворе альбумина в качестве эксипиента. Любой дополнительный компонент в составе ГИБП может играть роль адъюванта и увеличивать иммунный ответ организма на белок. Было показано, что препараты ИФН-альфа, имеющие в своем составе альбумин, обладают большей иммуногенностью и меньшей биологической активностью, чем препараты, в которых используются такие стабилизаторы, как аргинин или Tween 20 [14].



Важной причиной повышенного иммунного ответа на ряд ГИБП является образование высокомолекулярных агрегатов, которые в свою очередь появляются в результате измененных условий раствора, наличия эксипиентов в формулировке, подкожного пути введения и отсутствия посттрансляционных изменений [9]. Данный факт иллюстрируется случаями развития парциальной клеточной аплазии у пациентов, получавших подкожно препарат «Эпоетин альфа» (EPREX/ERYPO®). Уровень заболеваемости у пациентов, принимавших препарат, равнялся 18/100000 в год. Среди всех прочих теорий, предложенных компанией Ortho Biotech (мицеллы, выщелачивание буфера резиновой пробкой и другие), образование иммуногенных агрегатов препарата является наиболее правдоподобной и экспериментально подтвержденной причиной развития анемии [104].

Одним из механизмов, обуславливающих адьювантное действие агрегатов, является перекрестное связывание большого количества рецепторов В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов повторяющимися эпитопами белковых молекул в составе агрегатов, что приводит к повышенной активации клеток иммунной системы. В ряде научных работ была продемонстрирована значимая связь между склонностью ГИБП образовывать агрегаты и повышенной иммуногенностью препарата, что вело, в свою очередь, к снижению клинической активности препарата. В формулировках ИФН-бета-1a, использующих в качестве стабилизатора альбумин, кроме молекулы ГИБП массой 18–24 kD присутствует большое количество дополнительных белковых агрегатов различной молекулярной массы. Отсутствие гликозилирования и других посттрансляционных модификаций оказывает огромное влияние на склонность образовывать агрегаты. Это было показано в случае рекомбинатных форм ИФН-бета [117]. Так, около 98 % молекул ИФН-бета-1a в растворе представляют собой мономерные единицы. В то же время, негликозилированный ИФН-бета-1b, синтезированный в бактериальной клеточной линии, в растворе представляет собой суспензию агрегатов с молекулярной массой 600 kDa [9]. Было показано, что направленное удаление остатков моносахаридов на поверхности молекул

ИФН-бета-1а уменьшает порог денатурации ГИБП. Следствием этого было снижение фармакологической и биологической активности препарата в связи с образованием нерастворимых молекул и агрегатов, образованных в результате образования дисульфидных мостиков.

Путь введения препарата также влияет на уровень иммунного ответа организма на ГИБП. В связи с большим количеством резидентных антиген-представляющих клеток в коже, а также благодаря благоприятным условиям образования белковых агрегатов, препараты с подкожным путем введения более иммуногены и более предрасположены к образованию против них нейтрализующих антител, чем препараты с внутривенным или внутримышечным введением [62]. Частота и доза введения лекарства также играют определенную роль в развитии иммунного ответа к ГИБП, но данные факторы не являются независимыми и не могут быть рассмотрены без учета особенностей ГИБП, пути введения и состояния пациента. Так, подкожные формы препарата ИФН-бета-1а в два раза чаще вызывают образование нейтрализующих антител, чем средства с внутримышечным введением (5-38 % и 2-14 % соответственно) [76].

Особенности организма также играют большую роль в развитие иммунитета к ГИБП. Иммунный статус, сопутствующее заболевание, получаемая терапия, уровень толерантности к чужеродным агентам и генотип пациента определяют силу и скорость нежелательного иммунного ответа на биологическую терапию. Рядом исследований была показана связь между HLA-DRB1 генотипом пациента и риском образования у него нейтрализующих антител к препаратам ИФН-бета [40]. И хотя точно предсказывать риск повышенного иммунного ответа на ГИБП в соответствие с генотипом и иммунным статусом пациента на данный момент времени невозможно, данная проблема в свете развития понятия персонализированной медицины является актуальной.

Нужно также отметить, что уровень толерантности организма к эндогенным белкам синтезирующихся в низких концентрациях (соматотропин, эритропоэтин и т.д.) значительно ниже, что обусловлено уровнем толерантности В-лимфоцитов, чем к белкам производящихся в избытке, таким как альбумин, фибриноген, IgG1.

Это также объясняет предрасположенность некоторых ГИБП вызывать активный гуморальный ответ.

### 1.3. Следствия повышенной иммуногенности биологических лекарственных средств. Связывающие и нейтрализующие антитела

Следствием высокой иммуногенности ГИБП является появление антител, способных изменять фармакологические свойства препаратов или же ингибировать их биологическую и фармакологическую активность, что приводит к снижению клинического эффекта на проводимую терапию. Кроме этого антитела могут перекрестно реагировать и ингибировать функцию эндогенного белка. Также нужно отметить возможность серьезных аллергических побочных эффектов, связанных с высокой иммуногенностью ГИБП. Основные последствия повышенной иммуногенности ГИБП представлены в таблице 2.

Таблица 2

Последствия повышенной иммуногенности ГИБП

Последствия	Механизм	Пример
Изменение фармакокинетики ГИБП	Ускорение клиренса белкового агента ретикулоэндотелиальной системой	Моноклональные иммуноглобулины
	Невозможность проникновения комплекса антиген-антитело через эндотелий капилляров	Инсулин
Изменение фармакодинамики ГИБП.	Нейтрализация активности ГИБП при блокировании доменов связывания препаратов антителами	Фактор свертывания VIII, ИФН-альфа, ИФН-бета, МКА
Нейтрализация активности эндогенного белка	Перекрестное ингибирование активности эндогенного белка синтезирующимися антителами	Эритропоэтин
Аллергические реакции и другие побочные эффекты	Местные реакции и анафилактический шок, вызванные гиперактивацией тучных клеток и базофилов	Все белковые препараты теоретически способны вызвать аллергическую реакцию

*Примечание:* ГИБП-генно-инженерные биологические препараты, ИФН-альфа – интерферона-альфа, ИФН-бета – интерферон-бета, МКА – моноклональные антитела

Основным, важнейшим и единственно детектируемым проявлением иммуногенности ГИБП является синтез антител к белковому препарату. В зависимости от времени появления, типа паратопа и последствий связывания с ГИБП все антитела делят на две группы: САТ и НАТ [3]. САТ представляют собой совокупность всех иммуноглобулинов, способных связываться с ГИБП. Их паратопы могут быть специфичны к любому участку белковой молекулы. Диагностическая значимость САТ к ГИБП варьируется между разными терапевтическими белками и их синтез может быть как проявлением положительного эффекта лекарства (глатирамер ацетат), так и маркером серьезной иммуногенности белкового агента, что в свою очередь может привести к нарушению фармакодинамики и фармакокинетики ГИБП непосредственно из-за связывания САТ [13]. Для ряда биологических препаратов, таких как ИНФЛ, фактор свертывания VIII, натализумаб, САТ имеют подтвержденное негативное влияние на клинический эффект проводимого лечения [116]. Со временем происходит замещение пула САТ на высокоаффинные НАТ, которые способны нарушать взаимодействие ГИБП со своим лигандом или рецептором и, таким образом, снижать терапевтическую и фармакологическую активность. Нужно также отметить, что НАТ появляются только через относительно длительный срок лечения.

Антитела, синтезирующиеся против терапевтических белков, могут блокировать или уменьшать терапевтический эффект препарата. В соответствии с рядом международных рекомендаций нейтрализующие или ингибирующие антитела должны быть определены в ходе лечения такими препаратами, как ИФН-бета и фактор свертывания VIII. Несмотря на отсутствие официальных клинических рекомендаций по детекции антител к другим ГИБП, практически к любому биопрепарату могут образовываться антитела, уменьшающие его активность. При этом любой новый разрабатываемый биологический препарат, а

также биоаналоги существующих, на уровне клинических исследований должен проходить исследование на иммуногенность [117]. С точки зрения клинических проявлений, уменьшение или полное отсутствие эффекта от терапии приведет к ухудшению состояния больного, обострению заболевания и прогрессирующей инвалидизации.

Наиболее показательным примером является негативное влияние НАТ на клинический ответ в ходе длительной терапии препаратами ИФН-бета у пациентов с рецидивирующе-реммитирующей формой РС [12]. Так, РС представляет собой аутоиммунное заболевание, характеризующееся эпизодами демиелинизации и параллельно продолжающейся нейродегенерацией центральной нервной системы. Высокая социальная значимость данного заболевания объясняется его высокой распространённостью (в России около 200 тысяч человек болеет РС), а также тем, что чаще всего оно возникает у молодых людей работоспособного возраста [63]. На данный момент существует ряд препаратов, которые позволяют снизить количество обострений и замедлить нейродегенерацию. Препаратом первой линии терапии РС являются ИФН-бета. В соответствии с исследованиями САТ к ИФН-бета могут наблюдаться до 80 % пациентов с РС, получающих данный тип терапии.

Появление НАТ к ИФН-бета представляет собой следствие дальнейшего развития иммунного ответа против чужеродного белка. НАТ к ИФН-бета обнаруживаются у 2-36 % пациентов, получающих терапию ИФН-бета. Несмотря на это, распространённость НАТ очень сильно зависит от выборки пациентов, формы используемого ИФН-бета и метода исследования НАТ. Клинически значимые концентрации НАТ появляются через 1 год терапии [23]. Европейская Ассоциация Неврологических Сообществ рекомендует проводить тестирование на НАТ к ИФН-бета в первые 24 месяца терапии, повторять тест через 3-6 месяца у пациентов положительных на НАТ и прекращать терапию препаратами ИФН-бета у пациентов с высокими титрами НАТ, сохраняющимися более 3-6 месяцев [86]. Антитела, нейтрализующие действие препаратов ИФН-бета, приводят не только к значительному ухудшению состояния больного, принимающего ГИБП со

сниженным или полностью отсутствующим терапевтическим эффектом, но и к значительным экономическим потерям. Стоимость годового курса препаратов ИФН-бета на одного пациента составляет от 315 до 525 тысяч рублей без учета косвенных затрат, включающих работу с больным и развивающуюся инвалидизацию пациента. Так как используя клинические и визуализационные методы сложно выявить снижение терапевтической активности препаратов ИФН-бета, единственным подходом является определение титра НАТ с помощью лабораторного теста. Влияние НАТ на фармакологическую активность препаратов ИФН-бета было показано при первых клинических исследованиях Betaferon® в 1996 году [8]. Ряд больших контролируемых рандомизированных фармакологических исследований (North American SPMS IFN- beta -1b, Danish National IFN- beta, SPECTRIMS, PRISMS-4, IFN-beta MS Study Group) показали отрицательное влияние нейтрализующих антител на частоту рецидивов, уровень МРТ активности, а также увеличение скорости прогрессии заболевания у пациентов с РС [7], [56], [36], [43] .

Одним из лекарственных средств, используемых при терапии ремиттирующе-рецидивирующей формы РС в качестве монотерапии, является *натализумаб* (Natalizumab) – рекомбинантное гуманизированное моноклональное антитело, связывающееся с  $\alpha 4$ -интегрином и блокирующее миграцию лейкоцитов через гематоэнцефалический барьер. В ходе двух слепых, рандомизированных, плацебо-контролируемых исследований (AFFIRM и SENTINEL) применения натализумаба у пациентов с РС, выяснилось, что у 9-12 % больных имеются антитела к данному препарату [87], [96]. Считается, что антитела, синтезируемые к натализумабу, являются анти-идиотипическими и связываются с гипервариабельными участками молекулы натализумаба. Кроме этого в ходе исследования было доказано, что антитела к данному ГИБП значительно снижают уровень сатурации  $\alpha 4$ -интегрин натализумабом на клеточной линии K562 со стабильным трансфектом гена  $\alpha 4$ -интегрин. Концентрация биопрепарата также была значительно снижена у пациентов с антителами к натализумабу. У пациентов со стабильно высоким уровнем антител было доказано статистически

значимое снижение эффективности проводимой терапии (повышенное число рецидивов, количество новых очагов и их объем, ухудшение показателей EDSS). Количество новых разрабатываемых моноклональных антител экспоненциально растет с каждым годом. В большую пятерку на рынке МКА на данный момент входят бевацизумаб, трастузумаб, адалимумаб, инфликсимаб и ритуксимаб. И, несмотря на новые генетические подходы «гуманизации» МКА, проблема иммуногенности для них также актуальна, как и для других белковых молекул.

Хорошо описанным и доказанным феноменом является изменение скорости клиренса и снижение активности химерных и гуманизированных моноклональных терапевтических иммуноглобулинов, блокирующих действие фактора некроза опухоли альфа (анти-ФНО $\alpha$ ), синтезирующимися против них эндогенными антителами. На сегодняшний день ингибиторы ФНО $\alpha$  являются главными болезнь-модифицирующими препаратами для лечения ряда ревматологических, дерматологических и гастроэнтерологических заболеваний [66]. Так, ИНФЛ представляет собой химерное МКА, в котором переменный Fab' фрагмент является мышинным белком, а константный Fc фрагмент – человеческим. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) одобрило использование ИНФЛ для лечения следующих заболеваний: болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, псориатический артрит, анкилозирующий спондилит (болезнь Бехтерева) и ревматоидный артрит (РА). Учитывая общую широкую распространенность нозологий и их хронический характер течения, серьезную инвалидизацию пациентов, отсутствие альтернативы действенного лечения кроме ИНФЛ при тяжелых случаях и относительно высокую стоимость курса МКА, оценка терапевтической активности данного препарата является не только клинической, но и социально значимой задачей.

АДА и голимумаб в свою очередь являются полностью гуманизированными IgG1 иммуноглобулинами [16]. Этанерцепт представляет собой белок слияния рецептора ФНО $\alpha$  и Fc-фрагмента IgG1, а цертолизумаб пегол – гуманизированный Fab' фрагмент, прикрепленный к полиэтиленгликолю [103],

[25]. Было показано, что интерлейкин-6 играет одну из ключевых ролей в патогенезе РА, активируя ответ острой фазы, продукцию цитокинов, активацию остеокластов, вызывая синовит и эрозию суставов. В 2010 году был лицензирован новый ГИБП тоцилизумаб (ТОЦ), представляющий собой гуманизированное МКА, специфически связывающее мембранную и растворимую форму рецептора интерлейкина-6 и, таким образом, препятствующее связыванию данного цитокина со своим рецептором. Как и другие лицензированные ГИБП, ТОЦ показал высокую эффективность в снижении уровня воспалительной активности РА, а также замедлении скорости развития эрозий суставов [94].

Частота образования антител к ингибиторам ФНОа зависит от вида рассматриваемого препарата. Так, при лечении химерным МКА ИНФЛ, содержащим участки ксеногенного белка, через 6 недель антитела к препарату обнаруживаются примерно у 33 % пациентов [59]. Количество пациентов с наличием антител к данному ГИБП увеличивается до 67 % через 14 недель и до 78 % через 28 недель. Нужно отметить, что данные о встречаемости антител к ИНФЛ сильно варьируются (от 6 % до 61 %), что может быть связано с индивидуальными особенностями пациентов исследуемой группы, используемой методикой для детекции антител, а также с длительностью проводимой терапии. В случае с полностью гуманизированным ингибитором ФНОа АДА частота образования антител к 24 месяцу терапии достигает 49 % процентов [77]. В исследовании, оценивающем выявляемость антител к АДА в более короткие сроки терапии (4-28 недель), количество пациентов, положительных на антитела, варьировало от 0,04 % до 80 %. Большинство исследований антител к голимумабу проводились на выборке пациентов, получавших данный ГИБП в течение короткого времени, поэтому их частота варьируется от 0 до 7 % [55]. Встречаемость антител к цертулизумаб пеголу составляет от 3 до 25 % [45]. Этанерцепт в исследованиях оказался менее иммуногенным, чем иммуноглобулиновые ингибиторы ФНОа. Частота антител к этанерцепту варьируется от 0 до 5,6 % [41]. Данных о распространённости антител к ТОЦ



крайне мало, но в клинических исследованиях распространенность САТ составляла 0-3 % [15].

Влияние антител к препаратам МКА на скорость клиренса лекарственного средства является комплексным и динамичным процессом. При связывании антител с ГИБП образуются димерные или тетрамерные комплексы, которые ускоряют захват МКА клетками ретикулоэндотелиальной системы и увеличивают скорость выведения препарата. У пациентов с болезнью Крона, получающих ИНФЛ, концентрация антител к МКА обратно коррелировала с концентрацией ИНФЛ, измеренной на 4 неделе после введения. Другое исследование показало, что антитела к ИНФЛ на 34 % снижают время полужизни, и в 2,7 раза увеличивают скорость клиренса препарата [113]. Пациенты, получавшие АДА, демонстрировали низкий уровень минимальной сывороточной концентрации препарата в течение всего периода наблюдения при наличии антител к данному ГИБП. Кроме этого, была найдена сильная отрицательная корреляция между титром антител к АДА и сывороточной концентрацией препарата ( $r=-0,411$ ) [75]. В клинических исследованиях цертулизумаб пегола PRECiSE-2 и PRECiSE-4 определялось снижение сывороточной концентрации препарата у пациентов, положительных на антитела к данному анти-ФНОа [111].

Кроме ускорения клиренса МКА, антитела могут прямо нейтрализовать действие ГИБП, препятствуя связыванию МКА с терапевтической мишенью, и снижать его фармакологическую активность. Рядом исследований было показано, что большая часть антител, образующихся к ИНФЛ, направлены к вариабельному участку иммуноглобулина и нейтрализуют его способность связываться с ФНОа. В случае с АДА было обнаружено, что до 98 % пула антител, синтезирующихся к нему, могут ингибировать биологическую активность препарата [101]. Более или менее сопоставимых данных о нейтрализующей активности антител к голимумабу получено не было.

Наиболее важным следствием повышенной скорости клиренса и пониженной биологической активности МКА, вызываемой синтезирующимися антителами, является снижение клинического ответа на проводимую терапию и

повышение частоты нежелательных побочных эффектов. Рядом исследований было показано, что в группе пациентов с РА со сниженным ответом на терапию ИНФЛ определяется статистически значимое повышение титра антител к препарату по сравнению с группой с адекватным клиническим ответом ( $p=0.05$  на 6 месяце,  $p=0.02$  на 12 месяце и  $0.003$  на 48 месяце терапии) [108]. Кроме этого, концентрация антител к ИНФЛ обратно коррелировала с длительностью ремиссии РА, а также наличие антител к биопрепарату сопровождалось более частыми эпизодами аллергических реакций на препарат. Схожие данные были получены при исследовании влияния антител на клинический ответ при терапии АДА. Антитела к данному ГИБП значительно снижали фармакологическую активность лекарственного средства и их концентрация обратно коррелировала с клиническим ответом на терапию ( $r=-0.606$ ,  $p<0,05$ ) [108]. В случае с цертулизумабом было обнаружено, что антитела снижают клинический ответ проводимой терапии РА.

Образование НАТ к ГИБП является серьезной проблемой в случае заместительной терапии при некоторых генетических заболеваниях. Гемофилия типа А характеризуется врожденной недостаточностью или полным отсутствием фактора свертывания VIII. Единственный тип лечения доступный на сегодняшний день это пожизненное принятие препаратов фактора свертывания VIII. К сожалению, у 10-35 % пациентов, принимающих данную терапию, синтезируются антитела, блокирующие гемостатический эффект фактора VIII. Это приводит не только к повышенному риску развития серьезных повторяющихся эпизодов неконтролируемой геморрагии, но и значительно усложняет ведение данных больных и увеличивает цену лечения [67]. Риск смертельных исходов от кровотечения у пациентов, имеющих антител к ФVIII, повышается в 3,5 раза по сравнению с пациентами без антител к ГИБП. У тяжелых пациентов с уровнем остаточной плазменной активности ФVIII менее 1 % риск образования антител значительно выше, что делает проблему ингибирования фактора VIII еще более актуальной. И хотя сделать косвенный вывод о появлении ингибирующих антител к препаратам ФVIII можно по клиническим данным, когда геморрагический

синдром пациента становится невозможно контролировать привычными дозами препарата, единственный способ доказать их наличие - это провести лабораторный анализ. Определить концентрацию антител к фактору VIII можно с помощью методов ИФА или иммуноблотинга. Имея высокую чувствительность, данные методы детектируют все возможные к ГИБП антитела, но неспособны дифференцировать между ингибирующими и связывающими антителами. В соответствии с рекомендациями Международного общества по изучению тромбозов и гемостаза уровень ингибирования фактора VIII измеряется с помощью функционального исследования Nijmegen-Bethesda [27]. Хотя в международных указаниях нет рекомендаций по рутинному использованию тестов по контролю концентрации антител к фактору VIII и уровню их ингибирующей активности, некоторые авторы сходятся во мнении о разумности их проведения в первые 50 дней лечения и далее ежегодно [52]. Измерение антител к фактору VIII позволит снизить риск развития серьезных осложнений у пациента при отсутствии терапевтического эффекта ГИБП и вовремя начать альтернативные методы лечения.

Серьезным последствием повышенной иммуногенности ГИБП является возможность связывания антител с эндогенными белками, что приводит к полному подавлению их биологической функции. Примером такого состояния является антител-индуцированная парциальная красноклеточная аплазия (АИПКА), развивающаяся у пациентов на фоне терапии препаратами рЭПО для лечения анемии, вызванной хронической почечной недостаточностью. Пик заболеваемости пришелся на 1999-2002 год и связан с особенностями в составе подкожного эпоитина-альфа (EPREX, OrthoBiotech). Считается, что причиной резкого повышения частоты развития АИПКА является использование компанией непокрытых резиновых пробок, которые напрямую соприкасались с раствором препарата. Полисорбат 80, использовавшийся в качестве стабилизатора раствора, выщелачивал компоненты резиновой пробки шприца, которые, в свою очередь, значительно повышали иммуногенность эпоитина-альфа [104].

Анемия при хронической болезни почек является одним из самых распространённых симптомов данной патологии. Снижение концентрации гемоглобина связано с феноменом относительного дефицита эндогенного ЭПО, синтезирующего тканями почек. Основным препаратом, который используется для лечения этого состояния с 1989 года, является рекомбинантный человеческий ЭПО, который на сегодняшний день широко применяется и имеет несколько структурных аналогов. Нужно отметить, что у части пациентов (10-34 % пациентов), длительное время получающих рЭПО, может наблюдаться развитие резистентности к данным препаратам, которая будет проявляться необходимостью использования повышенных доз ГИБП для достижения целевых значений гемоглобина и последующим отсутствием ответа на терапию. Одной из причин развития вторичной резистентности у данных пациентов могут быть нейтрализующие антитела, которые обнаруживаются у от 38,9 до 67 % пациентов [18].

#### **1.4. Подходы к выявлению связывающих и нейтрализующих антител против генно-инженерных биологических препаратов**

Искусственно синтезированные биологические лекарственные препараты активно используются в неврологии, ревматологии, гематологии, эндокринологии, онкологии, пульмонологии. При таких заболеваниях, как гемофилия, сахарный диабет 1 типа, болезнь Гоше, анемия на фоне хронической почечной недостаточности единственно возможным патогенетическим подходом лечения является использование терапевтических белков. При многих заболеваниях (РС, РА, злокачественных новообразованиях лимфоидной ткани) искусственные белки являются главными болезнь-модифицирующими препаратами первой линии терапии. В связи с расширением области использования ГИБП и понимания механизмов иммунной системы человека, а также развития персонализированной медицины, исследование воздействия антител на эффективность лечения ГИБП привлекает все большее внимание.

Важным аспектом исследований НАТ к ГИБП является появление препаратов - биоаналогов (биодженериков). В отличие от оригинальных препаратов молекулы биоаналогов могут значительно отличаться от оригинального препарата по своим свойствам [100]. В отличие от простых молекул, химическую структуру которых можно легко предсказать и проанализировать, ГИБП имеют более сложное строение, и существенные изменения методов их синтеза могут приводить к развитию повышенной иммуногенности и другим побочным эффектам. Возможность мониторинга НАТ обеспечивает важную функцию биобезопасности появления новых ГИБП. В соответствии с федеральной программой обеспечения дорогостоящими препаратами больных редкими заболеваниями, утвержденной распоряжением Правительства Российской Федерации от 31.12.2008 № 2053-р, больные, имеющие такие заболевания, как гемофилия, муковисцидоз, гипопитарный нанизм, болезнь Гоше, злокачественные новообразования лимфоидной, кроветворной и родственных им тканей, РС, а также после трансплантации органов и (или) тканей, получают лечение из списка включенных препаратов бесплатно. Надо отметить, что в лечении всех перечисленных нозологий в той или иной мере используются ГИБП, при этом для РС, гемофилии, болезни Гоше, гипопитарного нанизма, муковисцидоза и некоторых форм злокачественных новообразований лимфоидной, кроветворной и родственных им тканей терапевтические белки являются препаратами первой линии. Рутинное исследование САТ и НАТ позволит повысить уровень медицинского обслуживания, своевременную смену препарата и исключить развитие тяжелой инвалидности больного или даже его смерти в связи с отсутствием терапевтического эффекта ГИБП.

Для определения САТ существует множество разнообразных подходов: прямые и непрямые, конкурентные и неконкурентные тесты с использованием радиолигандов, ферментных, флюоресцентных, хемифлюоресцентных и электрохимических люминесцентных систем детекции [107], [48]. Иммуноферментный анализ (ИФА) с использованием перечисленных технологий

является одним из подходов к определению САТ к ГИБП. Применяя различные типы ИФА, можно добиться высокой чувствительности и воспроизводимости теста, но существует ряд недостатков, которые негативно влияют на результаты метода. Иммуобилизованные на подкладке антигены могут изменять свою конформацию и, таким образом, скрывать некоторые эпитопы ГИБП. Кроме этого, недостатками ИФА являются относительно небольшая площадь абсорбции белка, а наиболее чувствительные типы ИФА (непрямые «сэндвич» ИФА) сложны для производства и стандартизации. Кроме того, отмечаются сложности при детекции низкоаффинных антител и антител IgG4. Иммуоблоттинг и дот-блот представляется более приемлемым подходом для определения САТ в связи с высокой чувствительностью метода и его относительной простотой, возможностью использования хемилюминесценции, что значительно повышает детектирующую способность системы, стабильностью конформации иммобилизованного белка и большой площадью абсорбции белка [117].

В качестве несущей поверхности при дот-блоте используется пористая нитроцеллюлозная мембрана, на которую сорбируется генно-инженерный препарат путем его инкубации в фосфатно-солевом буфере (ФСБ). После ряда отмывок, нанесения исследуемой сыворотки и вторых анти-Fc антител к человеческому иммуноглобулину производится детекция связавшихся САТ с целевым антигеном с помощью хромогенной реакции, и подсчет САТ с помощью денситометрии. И хотя в некоторых случаях определение САТ является необходимым и важным этапом выявления иммуногенности терапевтического белка, для доказательства снижения или отсутствия терапевтического эффекта препарата, обусловленного синтезом НАТ, требуются другие лабораторные тесты. Биологическая активность терапевтических белков может быть исследована с помощью клеточных линий, обладающих природной способностью связывать молекул ГИБП, или генетически-модифицированными для связывания и детекции молекул ГИБП с помощью репортерной системы [117]. Такие клеточные системы, основанные на функциональных свойствах ГИБП или механизме их действия, называют биотестами. Так как данные методы непосредственно характеризуют

клеточный ответ на белковый агент, они являются идеальным подходом к биологической оценке нейтрализующего действия синтезирующихся антител против терапевтических белков. Детекция антител основывается на факте, что любой образец, содержащий НАТ, будет снижать или полностью устранять ответ клеток тест системы, индуцированный известной концентрацией ГИБП [114]. Измерение уровня синтеза интерферон-зависимого белка МхА или его РНК в ИФН-чувствительных клеточных линиях, а также детекция нейтрализации противовирусного эффекта интерферона в клеточной линии, зараженной вирусом, являются основными подходами к определению уровня НАТ к препаратам ИФН-бета [105], [72].

С развитием технологий рекомбинантной ДНК в биотестах часто используют генно-модифицированные клеточные линии со стабильным трансфектом гена фермента или другого репортерного белка, транскрипция которого контролируется промотором, активируемого исследуемым ГИБП. Главное достоинство данных тест-систем - прямая оценка непосредственного эффекта связывания молекул ГИБП с рецептором. Одним из примеров может служить трансфицированная клеточная линия HL-116, в которой стабильный трансфект гена люциферазы расположен под контролем регулятора интерферонового ответа (IRE) [20]. При связывании ИФН-бета со своим рецептором происходит активация IRE и синтез белка люциферазы. Количество синтезируемого референтного белка подсчитывается с помощью добавления субстрата (люциферина) и измерения люминесцентного сигнала (импульсов в секунду). Данная система позволяет с высокой воспроизводимостью определять НАТ к препаратам ИФН-бета [80]. Кроме этого, репортерные системы с геном люциферазы нашли применение и в детекции нейтрализующих антител к моноклональным иммуноглобулинам против фактора некроза опухоли - инфликсимаба, адалимумаба, этанерцепта.

В соответствии с вызываемым эффектом все терапевтические белки можно разделить на агонисты и антагонисты. В основе фармакологического эффекта препаратов агонистов (цитокины, факторы роста, гормоны) лежит специфическое

связывание с рецептором на поверхности клеток. В то же время, препараты антагонисты (МКА или растворимые рецепторы) блокируют связывание лигандов со своими рецепторами. Таким образом, формат и дизайн биотеста на НАТ варьируется в зависимости от типа ГИБП и его механизма действия *in vivo*. Для определения уровня биологической активности ГИБП с активностью агонистов используется прямой тест выявления НАТ. В него входят чувствительная к действию ГИБП клеточная линия, терапевтический белок, положительный контроль на присутствие НАТ, образцы для тестирования [64]. Серию пошаговых разведений исследуемого образца смешивают с ГИБП одинаковой концентрации для каждого разведения и инкубируют с чувствительной клеточной линией. Параллельно измеряют ответ клеточной линии на стандартное разведение исследуемого препарата и включают положительные и отрицательные контроли. Нейтрализацию оценивают, измеряя уровень ингибирования исследуемым образцом ответа клеточной линии на ГИБП, а стандартную кривую используют для расчета титра антител. Описанный подход для детекции НАТ позволяют полуколичественно определить титр антител, используя идеологию, предложенную Каваде (Kawade) [51]. В соответствии с данным подходом, первым этапом является расчет разведения препарата, при котором его биологическая активность будет равной 1LU/мл. Для полуколичественного определения НАТ создают серию пошаговых разведений образца и инкубируют с ГИБП в концентрации, равной 10 LU/мл.

Концентрация антител равняется уровню разведения образца, при котором он уменьшает биологическую активность препарата с 10 LU/мл до 1 LU/мл. Кроме этого в каждую постановку включается дополнительная кривая разведения ГИБП, с помощью которой рассчитывается фактор поправки, используемый в связи с вариацией биоактивности ГИБП от теста к тесту. Использование метода Каваде позволяет стандартизовать применение биотестов для детекции нейтрализующего действия ГИБП.



## Глава 2. Методология и методы исследования

### 2.1. Группы обследуемых лиц

#### 2.1.1. *Образцы, использовавшиеся для стандартизации методов детекции связывающих и нейтрализующих антител к препаратам интерферона-бета*

Для верификации и стандартизации методик определения НАТ и САТ к препаратам ИФН-бета были собраны следующие сыворотки, составившие группу верификации:

- 4 сыворотки пациентов с ревматоидным артритом, положительных на ревматоидный фактор (РФ);
- контрольный образец с антителами к двуспиральной ДНК (концентрация 1:320);
- контрольный образец с антителами к гладким мышцам (концентрация 1:160);
- контрольный образец с антинуклеарным фактором (концентрация 1:500);
- два контрольных образца нейтрализующих антител к ИФН-бета, полученных на основе козьих сывороток (титр НАТ в образце №1 – 1:320, титр НАТ в образце № 2 – 1:20);
- контрольный отрицательный образец НАТ к препаратам ИФН-бета.

Также, в исследовании участвовали 40 доноров крови, которые никогда не получали ИФН-бета и не имели аутоиммунных заболеваний, и 15 пациентов с рассеянным склерозом, которые не получали препараты ИФН-бета.

#### 2.1.2. *Исследование распространенности связывающих и нейтрализующих антител к препаратам интерферона-бета у пациентов с рассеянным склерозом*

В исследовании распространенности САТ и НАТ к препаратам ИФН-бета у пациентов с РС участвовали 33 больных, получавших терапию препаратами ИФН-бета более 1 года.

Критериями включения в исследование были: диагноз РС, установленный на основании критериев McDonald (2005 г., 2010 г.) в случае развития второго обострения или при появлении новых или контрастных очагов при динамическом

МРТ, терапия препаратами первой линии терапии ИФН-бета длительностью более 1 года.

### *2.1.3. Исследование распространенности связывающих антител к рекомбинантным формам эритропоэтина*

В исследовании распространенности САТ к рЭПО участвовали 37 пациентов с ХБП 5 стадии, проходящих диализное лечение на базе научно-исследовательского института нефрологии ПСПбГМУ имени академика И.П. Павлова. Критериями включения в исследование были: 5 стадия ХБП, прохождение лечения гемодиализом более 2 лет, получение препаратов рЭПО более 1,5 лет. Критериями исключения из исследования были: IgA-ассоциированная нефропатия как причина ХБП.

Данное исследование было одобрено локальным этическим комитетом, и всеми пациентами было подписано добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

В ходе исследования были собраны следующие клинические и лабораторные данные: длительность проводимой терапии рЭПО, среднее количество красных кровяных телец (за 1 год), среднее значение гемоглобина (за 1 год), среднее количество тромбоцитов (за 1 год), среднее количество ретикулоцитов (за 1 год), средняя концентрация С-реактивного белка (за 1 год), среднее количество ферритина (за 1 год), концентрация антител к рЭПО. Под резистентностью к проводимой терапии понималось значение среднегодовой концентрации гемоглобина  $< 110$  г/л ( $Hb < 110$  г/л). В соответствии с формой ответа на терапию рЭПО все пациенты были разделены на две группы: сниженный ответ на терапию (СОТ) – 21 пациент; нормальный ответ на терапию (НОТ) – 16 пациентов. В контрольную группу пациентов вошли здоровые доноры, никогда не получавших препараты рЭПО ( $n=35$ ). Эпидемиологические, лабораторные и клинические данные пациентов представлены в таблице 3.

Сравнительный анализ клинических показателей в группах пациентов с нормальным и сниженным ответом на рЭПО

Параметры	Исследуемые группы		P
	СОТ (n = 21)	НОТ (n = 16)	
Гемоглобин, г/л	99 ± 6	115 ± 4,4	< 0,001
Длительность терапии гемодиализом (месяцы)	46 (24; 88)	56,5 (48,5; 140,5)	НД
Средняя доза ЭПО за год (МЕ)	9330 ± 4322	6000 (5104; 7211)	0,0167
Среднее количество эритроцитов в анализе крови в течении года ( $\times 10^{12}/л$ )	3,32 ± 0,35	3,74 ± 0,31	< 0,001
Среднее количество тромбоцитов в анализе крови в течении года ( $\times 10^9/л$ )	238 ± 94	219 ± 45	НД
Среднее количество ретикулоцитов в анализе крови в течении года (%)	1,5 (1,225; 1,675)	1,4 (1,2; 1,6)	НД
Средний уровень ферритина в анализе крови в течении года (мкг/л)	322,1 (66,5; 499,4)	200,6 (74,55; 332,5)	НД
Средний уровень СРБ в анализе крови в течении года ( мг/л)	5,6 (2,95; 11,95)	5,45 (3,35; 15,55)	НД

*Примечание:* рЭПО – рекомбинантный эритропоэтин, СОТ – сниженный ответ на терапию, НОТ – нормальный ответ на терапию, СРБ – С-реактивный белок

**2.1.4. Исследование распространенности связывающих антител к препаратам инфликсимаба, адалимумаба и тоцилизумаба, а также концентрации препаратов у пациентов с ревматоидным артритом**

В исследовании участвовали 81 пациент, принимающие ГИБП в городском антицитокиновом центре Санкт-Петербурга более 1 года. У всех пациентов было получено согласие на забор биологического материала и использование личных данных.

У всех пациентов в течении 2,5 лет терапии ГИБП раз в полгода производился забор сыворотки крови непосредственно перед следующим введением препарата (точки 0-2,5). Кроме этого, производился сбор следующих клинических и лабораторных данных: уровень DAS28 при начале терапии ГИБП и при последнем осмотре, изменение уровня DAS28 (DAS28 при первичном осмотре – DAS28 при последнем осмотре), уровень С-реактивного белка, лейкоцитов, тромбоцитов, РФ и циркулирующих иммунных комплексов при последнем осмотре.

В зависимости от получаемого препарата все пациенты были разделены на следующие подгруппы: пациенты, принимающие ИНФЛ (П-ИНФЛ) n=48; пациенты, принимающие АДА (П-АДА) n=18; пациенты, принимающие ТОЦ (П-ТОЦ) n=17.

Критериями включения в группу П-ИНФЛ были: пациенты мужского и женского пола в возрасте от 25 до 70 лет с критериально подтвержденным РА (критерии ACR/EULAR 2010 года), получающие ИНФЛ + метотрексат или монотерапию ИНФЛ в течение 2 лет и более, серопозитивные по РФ и с антителами к циклическому цитриуллиновому протеину.

Критериями включения в группу П-АДА были: пациенты мужского и женского пола в возрасте от 25 до 70 лет с критериально подтвержденным РА (критерии ACR/EULAR 2010 года), получающие монотерапию АДА в течение 2 лет и более, серопозитивные по РФ и с антителами к циклическому цитрулиновому протеину.

Критериями включения в группу П-ТОЦ были: пациенты мужского и женского пола в возрасте от 25 до 70 лет с критериально подтвержденным РА (критерии ACR/EULAR 2010 года) получающие ТОЦ + метотрексат или монотерапию ТОЦ в течение 2 лет и более, серопозитивные по РФ и с антителами к циклическому цитриуллиновому протеину.

Критериями исключения из групп П-ИНФЛ, П-АДА, П-ТОЦ являлись прием другого ингибитора ФНО до начала терапии, прием другого ГИБП, тяжелые сопутствующие заболевания: ИБС с нестабильной стенокардией,

хроническая сердечная недостаточность III-IV степени по NYHA, декомпенсированный сахарный диабет, тяжелая патология печени, почек (ХБП 3-4 стадии), неспецифический язвенный колит, онкологические заболевания, ожирение 4 степени.

В группе П-ТОЦ 8 пациентов получали комбинированную с метотрексатом терапию ТОЦ, а 9 пациентов получало монотерапию ТОЦ. В группе П-АДА все пациенты получали монотерапию АДА. В группе П-ИНФЛ 28 пациентов получало комбинированную с метотрексатом терапию ИНФЛ, а 20 пациентов – монотерапию ИНФЛ.

Доза ИНФЛ в группе П-ИНФЛ у 1 пациента составляла 400 мг/кг, у 35 пациентов – 200 мг/кг и у 12 пациентов – 300 мг/кг. Доза ТОЦ в группе П-ТОЦ у 10 пациентов составляла 400 мг/кг, у 5 пациентов – 600 мг/кг, у 1 пациента – 200 мг/кг и у 1 пациента – 300 мг/кг. В группе П-АДА все пациенты получали 40 мг подкожно 1 раз в 2 недели.

## **2.2 Лабораторные методы исследования**

### **2.2.1. Метод дот-блота для выявления связывающих антител**

Для определения концентрации САТ к ГИБП была разработана методика, основанная на принципе дот-блота. Для этого на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0,45 мкм (GE HealthCare, Life Technologies) наносился ГИБП, разбавленный ФСБ, в течение 6 часов. После этого несвязывавшийся ГИБП отмывался в ФСБ, и мембрана блокировалась в буфере, содержащем 1% Tween 20 и 0,5% альбумин человека, что препятствовало неспецифическому связыванию антител. После этого на поверхность влажной мембраны наносились сыворотки пациентов, у которых требовалось исследование концентрации САТ. После 2 часов инкубации и связывания САТ с целевым антигеном проводилась отмывка мембран в ФСБ от белков сыворотки. Для определения наличия связавшихся с ГИБП САТ к мембране добавлялись анти-Fc античеловеческие антитела, меченные с щелочной фосфатазой (Life Technologies, США). После инкубации в течение 1 часа и отмывки не связавшихся антител с помощью ФСБ проводилось

выявление связавшихся вторых антител с помощью хромогенной реакции с использованием BCIP-NCT (Life Technologies, США). После этого проводилась денситометрия окрашенных мембран. Принцип метода и характерные результаты приведены на рисунке 1.

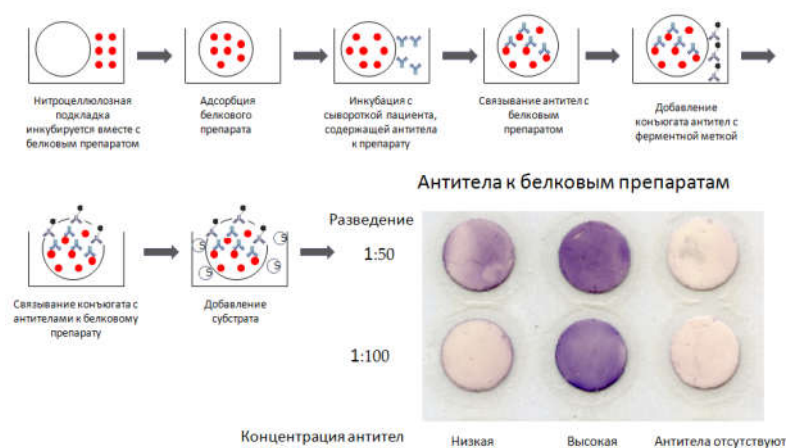
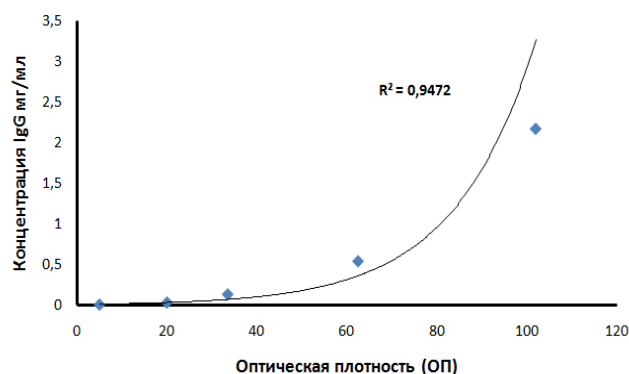


Рисунок 1. Этапы детекции связывающих антител с помощью дот-блота

Расчет концентрации САТ проводился с использованием кривой разведения человеческого IgG в соответствии с протоколом, описанным выше. Кривая разведения строилась при каждой постановке. После проведения реакции, денситометрии и расчета оптической плотности (ОП) на основе полученной кривой разведения IgG создавалась формула расчета концентрации САТ для каждого пациента (экспоненциальная кривая графика разведения иммуноглобулинов ( $y=0,0115e^{0,0554x}$ )). Пример графика приведен на рисунке 2.



*Примечание:* ОП-оптическая плотность, IgG – иммуноглобулин класса G

Рисунок 2. Кривая пошагового разведения IgG

Для верификации референтных значений и уровня разведения САТ к ИФН-бета проводилось измерение концентрации антител к ИФН-бета в группе доноров (40 пациентов). Для этого концентрация САТ была измерена в серии пошаговых разведений сывороток доноров (разведения от 1:10 до 1:200).

Для подтверждения специфичности связывания САТ с ИФН-бета проводилась реакция ингибирования антител избытком антигена путем добавления различных концентраций ИФН-бета (100 мкг/мл, 10 мкг/мл, 1 мкг/мл) к сыворотке, имеющей известный высокий титр САТ.

### *2.2.2. Метод для выявления нейтрализующих антител к интерферону-бета, основанный на репортерной клеточной линии HL-116*

Для исследования концентрации НАТ к ИФН-бета была проведена стандартизация и верификация теста, основанного на чувствительной к ИФН-бета трансфицированной клеточной линии HL-116, несущей стабильный трансфект гена люциферазы под контролем регулятора интерферонового ответа IRE. Для определения аналитических характеристик тест-системы использовались сыворотки из группы верификации. Все расчеты проводились на основе метода, предложенного Y.Kawade [51].

Клеточная линия HL-116 представляет собой модифицированную линию фибросаркомы человека HT-1080 (ATCC). Связывание ИФН-бета с рецептором на поверхности клеток вызывает активации промотора IRE, который индуцирует транскрипцию мРНК гена люциферазы и синтез белка фермента люциферазы, расщепляющего люминесцентный субстрат - люциферин.

Клеточная линия HL-116 выращивалась в стандартных условиях при +37 °C и 5 % CO<sub>2</sub> в питательной среде Дульбекко с двойной модификацией среды Игла («Биолот», Россия), с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (10-%, «Биолот», Россия), антибиотиков/антимикотиков для предотвращения зарастания среды и химического селектора трансфицированных клеток гипоксантин-аминоптерин-тимидин.

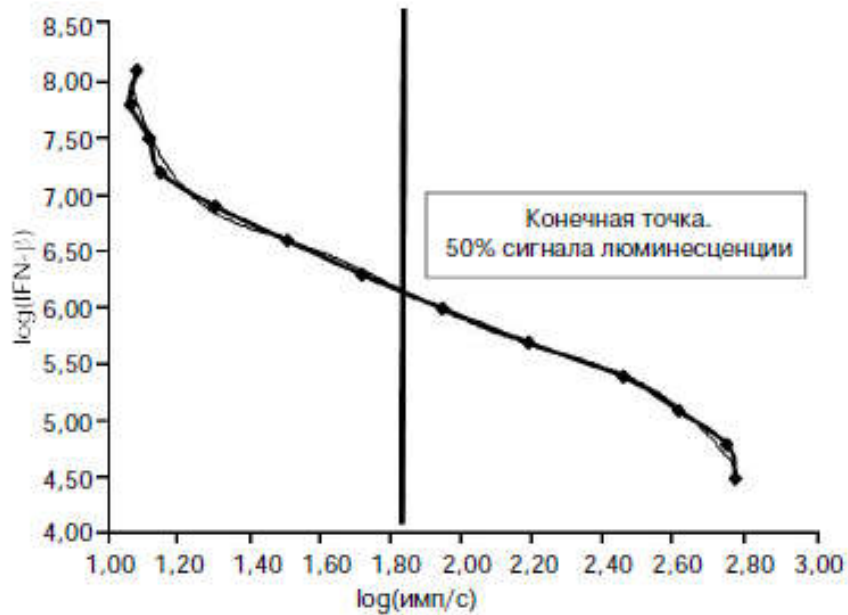
Клеточная линия выращивалась в 75 см<sup>2</sup> планшетах и по достижению монослоя пересевалась в 96-луночный планшет с адгезивным покрытием для клеточных культур («ThermoScientific», США). Культивация в планшете проводилась еще 1 сутки в тех же условиях среды и в той же питательной среде.

Первично, для точного исследования титра НАТ требовался расчет концентрации ИФН-бета-1а, который будет равен 1 лабораторной единице (ЛЕ/мл). Для этого проводилось построение стандартной кривой разведения препарата с шагом x2 (разведение проводилось в культуральной жидкости) в диапазоне от 200 МЕ/мл до 0,025 МЕ/мл. Известно, что 1 ЛЕ/мл препарата ИФН-бета-1а соответствует 2 МЕ/мл, поэтому для удобства первично проводились дополнительные разведения.

После достижения монослоя клеточной линией в 96-луночном планшете проводилась инкубация разведенного препарата с клетками HL-116 в течение 5 часов. После этого в каждую лунку с разведённым препаратом добавляли субстрат люциферазы люциферин (набор реактивов Steady Glo Luciferase Kit («Promega», США)), который позволяет определить концентрацию синтезированной люциферазы. После этого клетки лизировали гипоосмолярным раствором и проводили исследование люминесцентного сигнала с помощью люминометра серии LM-01T («Immunotech», Чехия) с программным обеспечением LIANA. После проведения измерений строилась кривая разведения ИФН-бета-1а, на которой на оси абсцисс находился логарифм детектируемого сигнала (имп/с), а на оси ординат – логарифм разведений ИФН-бета-1а.

После построения кривой с помощью уравнения полиномиальной регрессии была рассчитана 1 ЛЕ/мл препарата ИФН-бета-1а, которая равнялась 50 % люминесцентного сигнала на кривой. Данная кривая изображена на рисунке 3.





*Примечание:* ИФН-бета-1а – интерферон бета 1а, имп/с – импульсов в секунду

Рисунок 3. Кривая пошагового разведения ИФН-бета-1а в диапазоне 200–0,05 МЕ/мл. По оси абсцисс - логарифм детектируемого сигнала (имп/с), а на оси ординат – логарифм разведений ИФН-бета-1а. Вертикальная линия отмечает 1 ЛЕ/мл ИФН-бета-1а.

После построения кривой разведения и расчета 1 ЛЕ/мл ИФН-бета-1а проводилось определение НАТ к препаратам ИФН-бета. Сначала проводили скрининг для выявления НАТ. Для этого исследуемые сыворотки инкубировались в разведении 1:10 в течение 1 часа со стандартным препаратом ИФН-бета-1а в концентрации 10 ЛЕ/мл, которая вычислялась с помощью стандартной кривой, построенной ранее. После этого проводилась инкубация раствора исследуемой сыворотки с ИФН-бета-1а в 96-луночном планшете с клеточной линией HL-116. Исследование люминесценции проводилось по стандартному протоколу. Титр НАТ определялся с использованием стандартной кривой разведения.

Для нормализации результатов и нивелирования погрешностей пипетирования и других случайных факторов в каждой постановке рассчитывался поправочный фактор (N). С клеточной линией в каждой постановке дополнительно инкубировались разведения ИФН-бета-1а от 10 ЛЕ/мл до 0,08

ЛЕ/мл (поправочная кривая) и рассчитывался уровень разведения препарата, требуемого для достижения 1 ЛЕ/мл. Уровень разведения ИФН-бета-1а в стандартной кривой, требуемый для достижения 1 ЛЕ/мл, делился на уровень, полученный в поправочной кривой. Полученный результат являлся поправочным фактором исследования.

Если после всех расчетов концентрация НАТ к ИФН-бета не достигала титра 1:10, то образец считался отрицательным на НАТ. Если титр НАТ был больше 1:10, то дополнительно проводилось определение конечного титра реакции путем разведение сыворотки от 1:20 до 1:2560. Расчет конечного титра проводился путем сопоставления стандартной кривой и разведения ИФН-бета с учетом поправочного фактора N.

В качестве нормальных значений НАТ к препаратам ИФН-бета использовались международные рекомендации. Титр НАТ менее 20 ЛЕ/мл считается отрицательным, титр от 20 ЛЕ/мл до 100 ЛЕ/мл считается низким/промежуточным, титр НАТ более 100 ЛЕ/мл считается высоким. В ходе разработки системы был создан протокол стандартизации и верификации, в который был определен ряд лабораторных аналитических характеристик: воспроизводимость, интерференция другими антителами, аналитическая точность, диапазон измерений и граница нормы.

### *2.2.3. Исследование связывающих и нейтрализующих антител к препаратам интерферона-бета*

В группе пациентов с РС концентрация САТ и НАТ были измерены с помощью разработанных лабораторных методов, основанных на дот-блоте и трансфицированных клеточных линиях, а также с помощью коммерческого ИФА набора компании BÜHLMANN Laboratories AG (Швейцария).

### *2.2.4. Исследование связывающих антител к рекомбинантным формам эритропоэтина*

В собранной группе пациентов с ХБП концентрация САТ была измерена с помощью разработанного лабораторного метода, основанного на методе дот-блота с использованием в качестве целевого антигена препарат рЭПО-бета (Roche, Швейцария). Для верификации референтных значений и уровня разведения САТ к рЭПО проводилось измерение концентрации антител к рЭПО в группе доноров (35 пациентов). Для этого концентрация САТ была измерена в серии пошаговых разведений сывороток доноров (разведения от 1:10 до 1:200).

*2.2.5. Исследование распространенности связывающих антител к препаратам инфликсимаба, адалимумаба и тоцилизумаба, а также измерение концентрации препаратов*

Измерение концентрации ИНФЛ и АДА в сыворотке крови пациентов производилось с помощью непрямого неконкурентного варианта ИФА (Matriks Biotek, Турция), при котором выявляются все виды ГИБП, связывающие ФНО-альфа. Концентрация ТОЦ измерялась с помощью ИФА набора (ImmunoGuide, Турция), основанного на специфических анти-ТОЦ моноклональных антителах, адсорбированных на дне лунки. Концентрация антител к ИНФЛ (Matriks Biotek, Турция), АДА (Matriks Biotek, Турция) и ТОЦ (ImmunoGuide, Турция) определялась с помощью непрямого неконкурентного варианта ИФА метода, основанного на реакции связывания анти-ГИБП антител с адсорбированными на дне лунки препаратами. Все манипуляции и измерения были проведены в соответствии с инструкцией производителя.

У пациентов из группы П-ИНФЛ и П-АДА была измерена концентрация препарата ИНФЛ и АДА в крови и концентрация антител к данным препаратам в нулевой, первой и последней точках наблюдения. У пациентов из группы П-ТОЦ была измерена концентрация препарата и антител к нему во всех точках наблюдения. Пациенты никогда ранее не принимали другие виды ГИБП.

Для подтверждения специфичности связывания антител к ГИБП был проведен тест нейтрализации антител. Пошаговые разведения препаратов ИНФЛ, АДА и ТОЦ в концентрации 100 мгк/мл, 10 мгк/мл, 1 мгк/мл инкубировались с

положительными контролями содержащих известную концентрацию антител к соответствующим препаратам. После этого образцы были исследованы на наличие антител методом ИФА.

### **2.3. Статистические методы обработки данных**

Все статистические расчеты проводились с использованием программы Graphpad Prism 6.0.

Перед проведением всех статистических операций все выборки проверялись на нормальность распределения. Количественные данные с нормальным распределением представлялись в виде среднеарифметических значений со значением стандартного отклонения. Сравнение выборок с нормальным распределением проводилось с помощью параметрического метода Т-теста Стьюдента. Выборки с ненормальным распределением представлялись в виде медиан с интерквартильной шириной. Сравнение выборок ненормальным распределением осуществлялось с помощью непараметрического теста Манна-Уитни. Для изучения связи между количественными данными, подчиняющихся нормальному распределению, использовался корреляционный тест Пирсона. Для изучения связи между выборками, у которых хотя бы одна выборка не соответствует нормальному распределению, использовался метод ранговой корреляции по Спирмену. Положительное значение коэффициента  $r$  соответствовало прямой корреляции показателей, отрицательное значение коэффициента  $r$  - обратной корреляции показателей. Уровень значимости ( $p$ ) проводимого статистического анализа для всех тестов был равен 0,05.

## **Глава 3. Результаты исследования**

### **3.1. Протокол верификации теста определения нейтрализующих антител к препаратам интерферона-бета, измеряемых с помощью гена-репортера люциферазы в клеточной линии HL-116**

РС представляет собой тяжелое инвалидизирующее заболевание, которое характеризуется аутоиммунным интратекальным воспалением и прогрессирующей смертью нейронов. Препараты ИФН-бета являются лекарственными средствами первой линии терапии. Однако, как и при лечении другими ГИБП, длительная терапия данными препаратами сопряжена с синтезом САТ и НАТ, которые могут снижать эффективность проводимой терапии. Внедрение в практику врача невролога методики, позволяющей точно определять концентрацию НАТ, позволит повысить уровень медицинской помощи больным РС.

Для исследования концентрации НАТ к ИФН-бета в данном исследовании использовалась чувствительная к ИФН-бета трансфицированная клеточная линия HL-116, несущая стабильный трансфект гена люциферазы под контролем регулятора интерферонового ответа IRE. Связывание ИФН-бета с рецептором на поверхности клеток вызывает активацию промотора IRE, транскрипцию мРНК гена люциферазы и синтез фермента люциферазы. Количество синтезируемой люциферазы подсчитывается с помощью добавления субстрата (люциферина) и измерения люминесцентного сигнала (импульсов в секунду - ИВС).

Для клинического использования метода выявления НАТ к препаратам ИФН-бета, измеряемых с помощью гена-репортера люциферазы в клеточной линии HL-116, в образцах сыворотки крови были предъявлены следующие целевые значения в соответствии с приказом Министра здравоохранения Российской Федерации от 26 мая 2003 года № 220 «Об утверждении отраслевого стандарта «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов»:

#### ***Контроль воспроизводимости метода:***

1. Внутрипостановочный коэффициент вариации (CV) – не более 5 %.

2. Межпостановочный CV – не более 15 %.
3. Случайная аналитическая погрешность CV.

При расчете базового уровня математически ожидаемого значения случайной аналитической погрешности исходят из того, что предельно допустимая аналитическая погрешность, характеризуемая коэффициентом вариации  $CV_a < 0,5 * CV_i$ , где  $CV_a$  – межпостановочная погрешность,  $CV_i$  – биологическая вариация. Биологическая вариация серологических тестов должна быть не более 20 %, параметр  $CV_a$  - менее 10 %.

4. Интерферирующие субстанции: ревматоидный фактор – нет интерференции, антинуклеарные антитела – нет интерференции.

***Аналитическая точность:***

1. Смещение (аналитическая систематическая погрешность) - параметр В (Bias);  $B = (X - A3) / A3 \times 100\%$ , где X среднее значение 20 повторов контрольного образца, A3 – паспортное значение контрольного образца.

Параметр смещения (В%) должен быть менее 10 % для иммунометрических тестов.

***Диапазон измерений:***

1. Минимальная детектируемая концентрация (МДК): менее 0,5 референтной границы.
2. Линейность метода: показатель R более 0,95.
3. Диапазон значений измерений: от МДК до предельного разведения.

***Верификация границ нормы:***

Измерение 40 образцов клинически здоровых доноров крови, не получавших терапии препаратами ИФН-бета:  $M \pm 3SD$  (стандартное отклонение) менее референтного значения тест системы, определенного производителем.

***3.1.1. Оценка аналитических характеристик тест-системы***

Внутрипостановочная воспроизводимость оценивалась в одной серии из 5 измерений 2-х контрольных образцов (контроль + и контроль -). Результаты измерений приведены в таблице 4 .

Внутрипостановочная воспроизводимость положительного и отрицательного образцов

Образцы	ИВС	LogИВС	Среднее	SD	CV%
Контроль-	156	2.193	2.201	0.018	0.81%
Контроль-	152	2.181			
Контроль-	167	2.222			
Контроль-	162	2.209			
Контроль+	13	1.113	1.058	0.050	4.6%
Контроль+	10	1.000			
Контроль+	12	1.079			
Контроль+	11	1.041			

*Примечание:* ИВС – импульсов в секунду, LogИВС – логарифм количества импульсов в секунду, SD-standard deviation, CV%-coefficient of variation

Межпостановочная воспроизводимость была вычислена при измерениях 2-х контрольных образцов (контроль + и контроль -), полученных в 5 различных постановках. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5

Повторные измерения контрольных образцов в нескольких сериях измерений

Постановка	Образцы	ИВС	LogИВС	Среднее значение	SD	CV%
1	Контроль-	160	2.204	2.190	0.016	0.74%
	Контроль+	11	1.041			
2	Контроль-	147	2.167			
	Контроль+	12	1.079			
3	Контроль-	155	2.190			
	Контроль+	10	1.000			
4	Контроль-	158	2.198			
	Контроль+	13	1.113			
Итого	Контроль-	158	2.198	1.058	0.655	6.2%
	Контроль+	13	1.113			

*Примечание:* ИВС – импульсов в секунду, LogИВС – логарифм количества импульсов в секунду, SD-standard deviation, CV%-coefficient of variation

Линейность оценивалась в серии разведений с шагом 2 в буфере для разведения одного положительного контрольного образца. Результаты представлены в таблице 6 и на рисунке 4.

## Серийные измерения контрольного положительного образца

Разведение сыворотки	Log разведения сыворотки	LogИВС
1:40	1.602	1.041
1:80	1.903	1.079
1:160	2.204	1.230
1:320	2.505	1.447
1:640	2.806	1.614
1:1280	3.107	1.770
1:2560	3.408	1.851

*Примечание:* LogИВС – логарифм количества импульсов в секунду

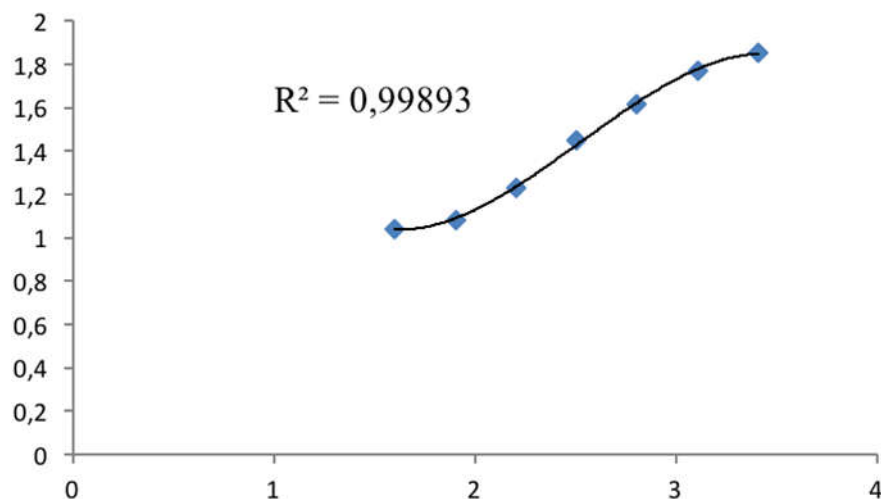


Рисунок 4. Серийные измерения концентрации НАТ в контрольном образце обеспечивают линейность ( $R^2 = 0,99$ ) в широком диапазоне разведений (1:40-1:2560 и выше)

Оценка минимальной чувствительности тест системы проводилась путем серии измерений из 5 повторов бланка с оценкой среднего значения и + 3 стандартных отклонений от среднего. Результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7

## Оценка минимальной чувствительности тест системы

Образец	ИВС	LogИВС
Бланк	9	0.9542



Бланк	8	0.903
Бланк	10	1.000
Бланк	9	0.954
Бланк	11	1.041
Среднее значение		0.953
Стандартное отклонение		0.034
Минимальная чувствительность тест системы, LogИВС		1.056

*Примечание:* ИВС – импульсов в секунду, LogИВС – логарифм количества импульсов в секунду

### ***3.1.2. Оценка робастности тестовой системы.***

Тест-система позволяет в короткие сроки (2 дня) проводить скрининговое измерение НАТ максимум в 40 сыворотках. Для определения точного количества титра НАТ требуется дополнительные 2 дня, при этом максимум количества сывороток, участвующих в одной серии, составляет 8 штук. Изменения в протоколе методики приводят к значительным погрешностям результатов измерения.

### ***3.1.3. Оценка стабильности растворов***

Буферные растворы люциферазы стабильны только в условиях, приведенных производителем. При попадании прямых солнечных лучей на раствор в течение часа люциферазный буфер теряет свои свойства. Хранение растворов при температуре выше – 20 С<sup>0</sup> приводит к потере их свойств.

### ***3.1.4. Оценка возможности интерференции различных аутоантител при измерении титра нейтрализующих антител к препаратам интерферона-бета***

При каждой постановке определялось количество ИВС для концентрации ИНФ равной 1 Лабораторной единице (далее ЛЕ). Значение ИВС для 1 ЛЕ ИФН-бета рассчитывается по формуле  $1 \text{ ЛЕ} = ((\text{LogMaxИВС} - \text{LogMinИВС})/2) + \text{LogMinИВС}$ . Сыворотки, в которых значение LogИВС превышало значение LogИВС 1 ЛЕ, считались отрицательными на НАТ.

Сыворотки же со значением LogИВС меньше, чем LogИВС 1 ЛЕ, считались положительными на НАТ.

Было проведено исследование уровня НАТ у пациентов с ревматоидным артритом и высоким титром РФ. У пациентов с ревматоидным артритом ни в одном из образцов не было обнаружено НАТ к ИФН-бета. Результаты представлены в таблице 8.

Таблица 8

Результаты измерения НАТ в группе больных ревматоидным артритом с высокими титрами ревматоидного фактора

NN	LogИВС 1 ЛЕ	ИВС	LogИВС	Результат скрининга
1	1.555	285.5	2.455	НАТ-
2		97.5	1.989	НАТ-
3		106.5	2.027	НАТ-
4		139.2	2.143	НАТ-

*Примечание:* NN-номер образца, ЛЕ-лабораторные единицы, ИВС – импульсов в секунду, LogИВС – логарифм количества импульсов в секунду

В аттестованных контрольных образцах, содержащих аутоантитела (антитела к гладким мышцам, антинуклеарные антитела, антитела к двуспиральной ДНК), не было обнаружено НАТ к ИФН-бета. Результаты представлены в таблице 9.

Таблица 9

Результаты измерения НАТ в контрольных образцах, содержащих аттестованные значения ревматоидного фактора и аутоантител

NN донор	LogИВС 1 Л.Е.	ИВС	LogИВС	Результат скрининга
1. Liquichek Anti-nDNA Control	1.555	195.4	2.23	НАТ-
2. Liquichek Anti-Smooth Muscle Control		235.2	2.347	НАТ-
3. Liquichek ANA Controls		1.5	2.027	НАТ-

*Примечание:* NN-номер образца, ЛЕ-лабораторные единицы, ИВС – импульсов в секунду, НАТ – нейтрализующие антитела, LogИВС – логарифм количества импульсов в секунду

### **3.1.5. Оценка аналитической точности с помощью исследования смещения (В)**

Для оценки аналитической точности была выполнена серия экспериментов измерения положительного контрольного образца. Результаты представлены в таблице 10.

Таблица 10

#### Оценка аналитической точности тест-системы

Образцы	Число повторов	Титр НАТ среднее значение	Ошибка среднего	В %
Контрольный образец 1000	20	1022,2	61.32	2,22

*Примечание:* НАТ-нейтрализующие антитела, В% - процент смещения

### **3.1.6. Верификация границ нормы**

При измерении титра НАТ в скрининговом тесте у 40 клинически здоровых доноров крови во всех 40 образцах антител к ИФН-бета не обнаруживалось. Кроме этого, НАТ к ИФН-бета не обнаруживались у 15 пациентов с РС, никогда не получавших препараты данной группы.

### **3.1.7. Итоги экспериментов по верификации метода**

Проведенная верификация метода позволила нам определить параметры теста «Нейтрализующие антитела к препаратам ИФН-бета, измеряемые с помощью репортерной тест системы на клеточной линии HL-116». Результаты представлены в таблице 11.

Таблица 11

Результаты верификации тест системы на клеточной линии HL-116 для определения НАТ к препаратам ИФН-бета

Критерии верификации	Требование	Результат	Заключение
Внутрипостановочное CV	не более 5 %	0,81 %-4,6 %	Удовлетворительно
Межпостановочное CV	не более 15 %	0,74 %-6,2 %	Удовлетворительно
Случайная аналитическая погрешность CV	не более 10 %	6,2 %	Удовлетворительно
Отсутствие интерференции с интерферирующими субстанциями	Антинуклеарные антитела	Нет интерференции	Удовлетворительно
	Ревматоидный фактор	Нет интерференции	Удовлетворительно
	Антитела к гладким мышам	Нет интерференции	Удовлетворительно
	Антитела к дсДНК	Нет интерференции	Удовлетворительно
Аналитическая точность	Параметр смещения В % менее 10 %	2,2 %	Удовлетворительно
Минимальная детектируемая концентрация (МДК)	Менее 0,5 референтной границы	МДК = 1.05604 TRU при референтной границе менее 20 TRU	Удовлетворительно
Линейность метода	показатель $R^2$ более 0,8	$R= 0,9989$	Удовлетворительно
Диапазон значений измерений:	от МДК до предельного разведения	От 1,056 TRU до 2560 TRU и выше	Удовлетворительно
Верификация границ нормы	Показатель не обнаружен в 20 сыворотках крови доноров	Все сыворотки доноров крови НАТ отрицательны	Удовлетворительно

*Примечание:* CV%-coefficient of variation, НАТ-нейтрализующие антитела, ИФН-бета – интерферон-бета

При оценке внутрилабораторных аналитических характеристик внутри одной лаборатории была показана высокая воспроизводимость метода (коэффициент вариации не превысил порога в 15 %).

Коэффициент корреляции 3 серий по 8 разведений одного образца составляет 0,99. Коэффициент вариации (CV%) концентрации антител против ИФН в калибровочных стандартах не превышает 10 %.

Исследование минимального предела детекции с помощью повторных измерений бланка культуральной среды (бессывороточная DMEM) позволяет определить предел детекции равный 1,056 единицы титра Kawade.

При исследовании 4-ех образцов с высокой концентрацией РФ нами было установлено отсутствие интерференции между ревматоидным фактором (вне зависимости от его концентрации) и результатов выявления НАТ в исследуемых образцах. Все результаты были отрицательными.

### **3.2 Определение референтных значений для связывающих антител к генно-инженерным биологическим препаратам и подтверждение специфичности реакции связывания антител, измеренного методом дот-блота**

Для верификации референтных значений и уровня разведения САТ к ИФН-бета и рЭПО проводилось измерение концентрации антител к ИФН-бета в группе доноров ИФН (40 пациентов) и концентрации САТ к рЭПО в группе доноров рЭПО (35 пациентов). Для этого концентрация САТ была измерена в серии пошаговых разведений сывороток доноров (разведения от 1:10 до 1:200). В каждую постановку была включен

а кривая разведения человеческого IgG для расчета концентрации САТ. Было установлено, что референтное значение концентрации САТ против ИФН-бета составляет 20,08 мкг/мл (95 CI%  $\pm$  0,43), а для рЭПО - 20,27 мкг/мл (95 CI%  $\pm$  0,43).

Для подтверждения специфичности связывания САТ с ИФН-бета методов дот-блота проводилась реакция ингибирования антител избытком антигена путем добавления различных концентраций ИФН-бета (100 мкг/мл, 10 мкг/мл, 1 мкг/мл)

к сыворотке, имеющей известный высокий титр САТ. Было показано, что увеличение концентрации ИФН-бета ингибировало связывание САТ с нитроцеллюлозной мембраной, что характеризовалось снижением оптической плотности. Это указывает на высокую специфичность реакции по определению САТ к ИФН-бета. Данные приведены в таблице 12.

Таблица 12

Нейтрализация связывающихся антител к препаратам ИФН-бета избытком антигена.

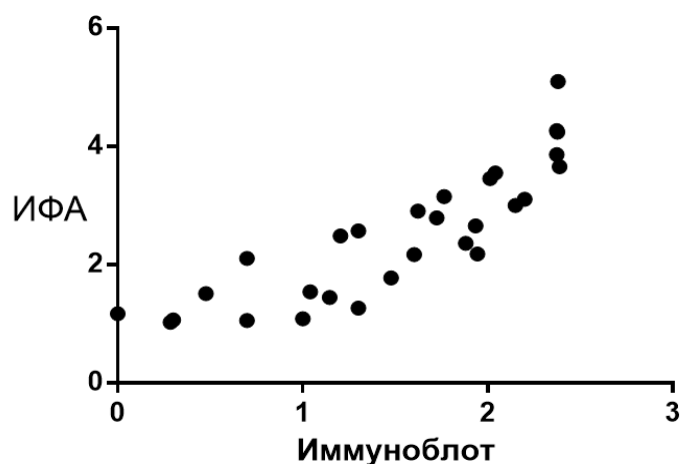
Концентрация препарата в буфере для инкубации	Контроль «-»	Образец 1	Образец 2	Образец 3
«-» ИФН-бета	1,17 ОП	105 ОП	98 ОП	58 ОП
1 мкг/мл ИФН-бета	1,44 ОП	90 ОП	90 ОП	58 ОП
10 мкг/мл ИФН-бета	1,09 ОП	58 ОП	20 ОП	37 ОП
100 мкг/мл ИФН-бета	1,23 ОП	30 ОП	3,9 ОП	6 ОП

*Примечание:* ИФН-бета -интерферон-бета, ОП – оптические единицы

В группе пациентов с РС, не получавших препараты ИФН-бета, исследование САТ к ИФН-бета с помощью метода дот-блота и метода ИФА дало отрицательный результат во всех исследованных сыворотках.

### **3.3. Связь связывающих и нейтрализующих антител к препаратам интерферона-бета**

В соответствии с задачами исследования у 33 пациентов с РС, которые проходили лечение препаратами ИФН-бета, была определена концентрация САТ с помощью разработанной тест-системы дот-блота и ИФА теста. Концентрация САТ выше пороговых значений, исследованная с помощью метода дот-блота, была обнаружена у 19 пациентов из группы (57,6 %). В то же время, при использовании ИФА метода, у 20 пациентов (60,7 %) обнаруживались положительные концентрации САТ. Была также обнаружена высокая корреляция полученных значений концентраций САТ, исследованных с помощью дот-блота и ИФА ( $r=0,9159$ ,  $p<0,0001$ ). Данные приведены на рисунке 5.



*Примечание:* ИФА - иммуноферментный анализ

Рисунок 5. Корреляция значений концентрации связывающих антител, измеренных методов иммуноферментного анализа (на оси абсцисс - пг/мл) и дот-блота (на оси ординат - ОП) ( $r=0,9159$ ,  $p<0,0001$ ).

У всех 33 пациентов, получавших препараты ИФН-бета, был исследован титр НАТ с использованием стандартизированной тест-системы, основанной на клеточной линии HL-116. После проведения скрининга на НАТ к ИФН-бета положительный титр антител был обнаружен в 11 из 33 образцов (33,3 %). В каждой постановке определялось количество импульсов в секунду (ИВС) для концентрации ИФН-бета, равной 1 Лабораторной единице (далее ЛЕ). Значение ИВС для 1 ЛЕ ИФН-бета рассчитывается по формуле  $1 \text{ ЛЕ} = ((\text{LogMaxИВС} - \text{LogMinИВС})/2) + \text{LogMinИВС}$ . Сыворотки, в которых значение  $\text{LogИВС}$  превышало значение  $\text{LogИВС}$  1 ЛЕ, считались отрицательными в отношении присутствия НАТ. Сыворотки же со значением  $\text{LogИВС}$  меньше, чем  $\text{LogИВС}$  1 ЛЕ, считались положительными на НАТ. Результаты представлены в таблице 13.

Таблица 13

Результаты скрининга сывороток пациентов группы РС на наличие НАТ и определение титра НАТ в положительных образцах

NN донор	LogИВС 1 ЛЕ	ИВС	LogИВС	Результат скрининга
1065	1.911737	153.5	2.1861	НАТ-
1956		207	2.316	НАТ-
2668		229	2.3598	НАТ-
1787		174.5	2.2418	НАТ-
2298		231	2.3636	НАТ-
1071		261	2.4166	НАТ-
1784	1.492038517	122.5	2.0881	НАТ-
2259		160.5	2.2055	НАТ-
1982		159.5	2.2028	НАТ-
1056		157	2.1959	НАТ-
1967		9	0.9542	НАТ+
2777		33.5	1.525	НАТ-
1699	1.548455007	8	0.9031	НАТ+
1679		9.5	0.9777	НАТ+
1166		75	1.8751	НАТ-
1688		107	2.0294	НАТ-
1769		30.5	1.4843	НАТ+
2106		37.5	1.574	НАТ-
1832		33.5	1.525	НАТ+
1034		134	2.1271	НАТ-
1048	1.59376036	91	1.959	НАТ-
2146		74.5	1.8722	НАТ-
2050		97.5	1.989	НАТ-
2067		94	1.9731	НАТ-
2298		117.5	2.07	НАТ-
1536		11	1.0414	НАТ+
2002		106.5	2.0273	НАТ-
1436		19.5	1.29	НАТ+
1759		39.5	1.5966	НАТ-
2156		11	1.0414	НАТ+
1652		9	0.9542	НАТ+
2033		15	1.1761	НАТ+
2067		11	1.0414	НАТ+

*Примечание:* НАТ-нейтрализующие антитела, РС-рассеянный склероз, NN-номер образца, ЛЕ-лабораторные единицы, ИВС – импульсов в секунду, НАТ – нейтрализующие антитела, LogИВС – логарифм количества импульсов в секунду

Из-за ошибки многократных разведений концентрированного препарата ИФН-бета, а также вариаций в биологическом ответе клеточной линии на ИФН-



бета, для коррекции полученных титров использовался фактор Kawade. Значение данного фактора рассчитывается по формуле

$$n = (\text{Разведение ИФН-бета } 1 \text{ ЛЕ/мл}) / (\text{Разведение ИФН-бета}).$$

Значение «Разведение ИФН-бета 1 ЛЕ/мл» рассчитывается при разведении ИФН-бета 20 ЛЕ/мл с шагом  $\times 2$  и равно значению логарифма разведения при логарифме ИВС равном 50 %.

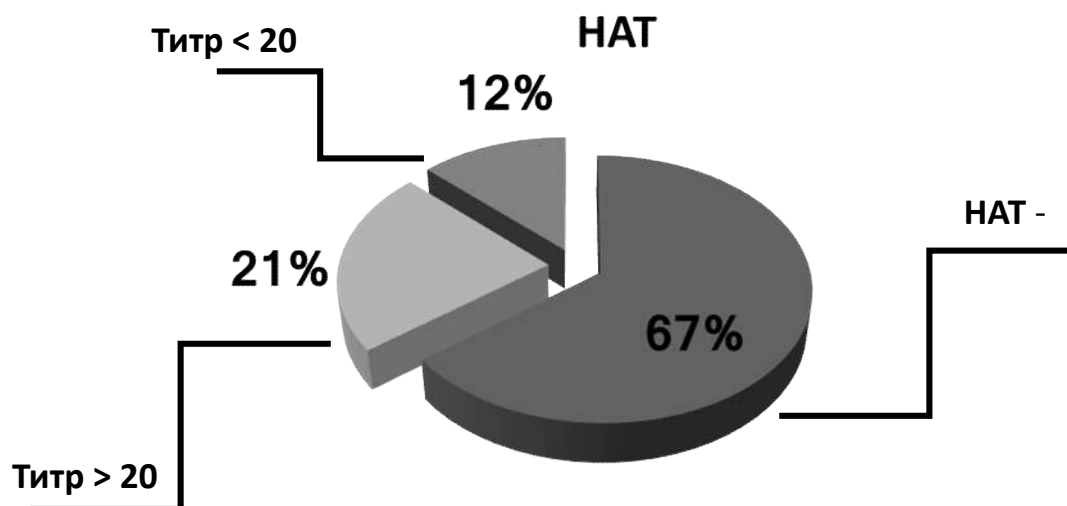
У пациентов, результаты которых были положительными на НАТ после скрининга, проводилось исследование точного титра НАТ. Так, из 11 обследованных пациентов у 7 были обнаружены клинически значимые титры НАТ (более 20 МЕ/мл). При этом у 4 пациентов титр НАТ был более 100 МЕ/мл. Данные приведены в таблице 14 и на рисунке 6.

Таблица 14

Результаты измерения конечных титров НАТ в положительных образцах при скрининге

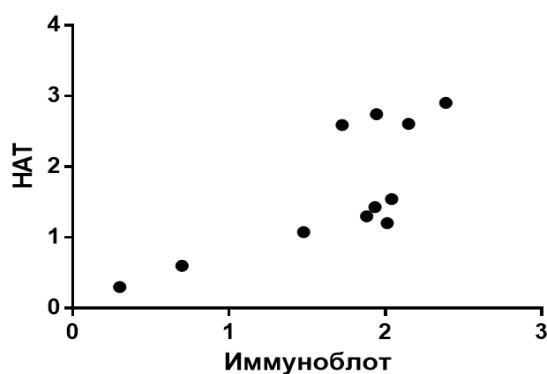
Номер образца	Титр НАТ	Фактор Кавада	Истинный Титр
2156	28.99	9.581	27.642
1652	834	9.581	803.420
1536	407.347	9.646	391.333
1679	580.295	9.646	557.483
1967	589.556	7.234	407.580
1769	30.172	7.234	20.860
1832	41.973	6.576	26.005
2033	2.356	6.576	1.264
1436	4.892	6.576	2.840
2067	2.111	6.576	1.015
1699	7.972	6.576	4.593

*Примечание:* НАТ-нейтрализующие антитела



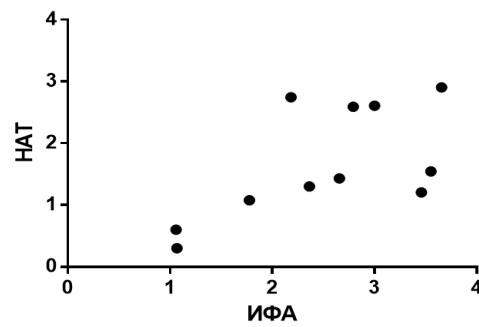
*Примечание:* НАТ-нейтрализующие антитела, ИФН-бета – интерферон-бета  
 Рисунок 6. Распространенность НАТ к препаратам ИФН-бета

Дополнительно, было показано, что у всех пациентов, у которых определялись клинически значимые значения НАТ, обнаруживались положительные концентрации САТ к препаратам ИФН-бета. Кроме этого, титры НАТ прямо коррелировали с концентрацией САТ, измеренной с помощью метода дот-блота ( $r=0,7909$ ,  $p=0,0055$ ), и с концентрацией САТ, измеренной с помощью ИФА ( $r=0,6636$ ,  $p=0,0306$ ). Данные приведены на рисунках 7 и 8.



*Примечание:* САТ - связывающиеся антитела; НАТ - нейтрализующие антитела

Рисунок 7. Связь нейтрализующих антител (на оси абсцисс - ЛЕ/мл) и связывающихся антител, измеренных методом дот-блота (на оси ординат - ОП)

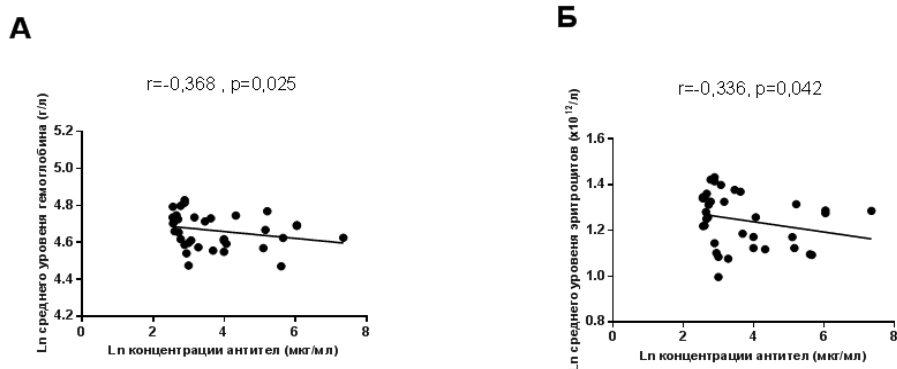


*Примечание:* НАТ - нейтрализующие антитела; ИФА - иммуноферментный анализ

Рисунок 8. Связь нейтрализующих антител (на оси абсцисс - ЛЕ/мл) и связывающихся антител, измеренных методом иммуноферментного анализа (на оси ординат - пг/мл)

### **3.4. Влияние связывающихся антител к рекомбинантным формам эритропоэтина на клинический ответ от проводимой анти-анемической терапии у пациентов с хронической болезнью почек 5 стадии, находящихся на гемодиализе**

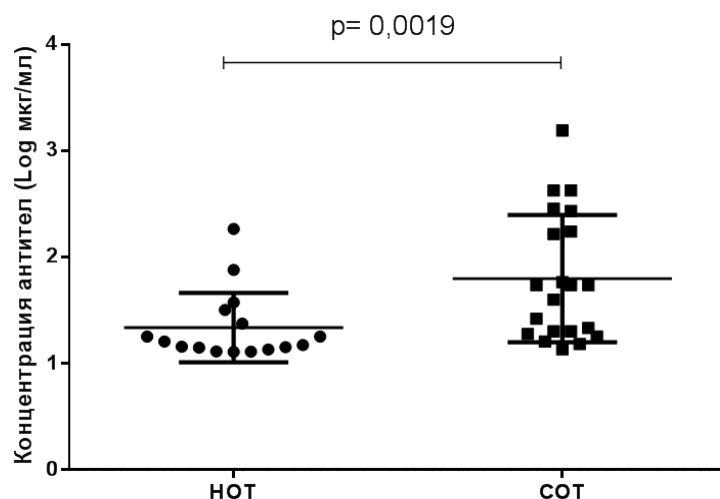
Распространённость САТ к препаратам рЭПО в группе из 37 пациентов с ХБП составила 54,05 % (20 пациентов). Кроме этого, была показана обратная зависимость между концентрацией САТ и уровнем гемоглобина за 12 месяцев ( $r=-0,368$ ,  $p=0,025$ ) и эритроцитов за 12 месяцев ( $r=-0,336$ ,  $p=0,042$ ). Результаты приведены на рисунке 9.



*Примечание:* рЭПО – рекомбинантный эритропоэтин; Ln – натуральный логарифм

Рисунок 9. Корреляция концентрации антител к рЭПО, среднего уровня гемоглобина (А) и эритроцитов за год (Б)

Было показано, что концентрация антител к препаратам рЭПО и среднегодовая доза применяемого рЭПО была статистически значимо выше в группе СОТ по сравнению с группой НОТ. Нужно отметить, что пол, возраст, концентрация ферритина и С-реактивного белка была сопоставимо в обеих группах. Результаты приведены на рисунке 10.



*Примечание:* СОТ - сниженный ответ на терапию ( $Hb < 110$  г/л); НОТ – нормальный ответ на терапию ( $Hb \geq 110$  г/л)

Рисунок 10. Концентрация антител к препаратам рЭПО у пациентов группы СОТ и НОТ

Полученные данные могут говорить о возможной роли антител к препаратам рЭПО в снижении терапевтической активности гемопоз-стимулирующих препаратов у пациентов с ХБП.

### **3.5. Влияние антител к моноклональным терапевтическим иммуноглобулинам, использующимся для лечения ревматоидного артрита, на концентрацию целевого препарата в сыворотке крови пациентов и фармакологическую эффективность генно-инженерных биологических препаратов**

Ревматоидный артрит (РА) представляет собой хроническое системное воспалительное заболевание, в главную очередь характеризующееся симметричным поражением периферических суставов. Клинические проявления и тяжесть протекания РА сильно варьируются от пациента к пациенту, и, без должного лечения, хронический воспалительный процесс приводит к необратимым деформациям суставов. В 1998 году был лицензирован белок слияния этанерцепт, а в 1999 году - моноклональное антитело ИНФЛ. Оба эти препарата ингибируют связывание фактора некроза опухоли альфа со своим рецептором. ФНО-альфа представляет собой провоспалительный растворимый белок молекулярной массой 17кДа. Он участвует в патогенезе РА, а его концентрация значительно повышена в синовиальной жидкости у пациентов. На данный момент существует 5 анти-ФНО-альфа ГИБП, одобренных для клинического использования: ИНФЛ, этанерцепт, АДА, голимумаб и цертолизумаб. ИНФЛ представляет собой химерное моноклональное антитело, в котором переменный Fab' фрагмент является мышинным белком, а константный Fc фрагмент – человеческим. АДА в свою очередь является полностью гуманизированным IgG1 иммуноглобулином. По данным ряда рандомизированных мультицентровых плацебо контролируемых исследований монотерапия ИНФЛ или АДА, а также комбинированная терапия данных лекарственных средств с метотрексатом не только снижает количество

припухших и болезненных суставов, но и уменьшает скорость прогрессии радиологически значимых деформирующих изменений при РА [66].

Было показано, что интерлейкин-6 играет одну из ключевых ролей в патогенезе РА, активируя ответ острой фазы, продукцию цитокинов, активацию остеокластов, вызывая синовит и эрозию суставов. В 2010 году для клинического использования был одобрен ТОЦ, представляющий собой гуманизированное моноклональное антитело, специфически связывающее мембранную и растворимую форму рецептора интерлейкина-6 и, таким образом, препятствующее связыванию данного цитокина со своим рецептором. Как и другие ГИБП, ТОЦ показал высокую эффективность в снижении уровня воспалительной активности РА, а также приводил к замедлению скорости развития эрозий суставной кости [91].

Со времени первых клинических исследований ГИБП было обнаружено, что 30-40% пациентов резистентны к проводимой терапии с самого начала [57]. Данные больные имеют так называемую первичную резистентность (ПР), при которой ответ на лечение ГИБП не наблюдался с момента начала терапии в течение первых 12 недель.

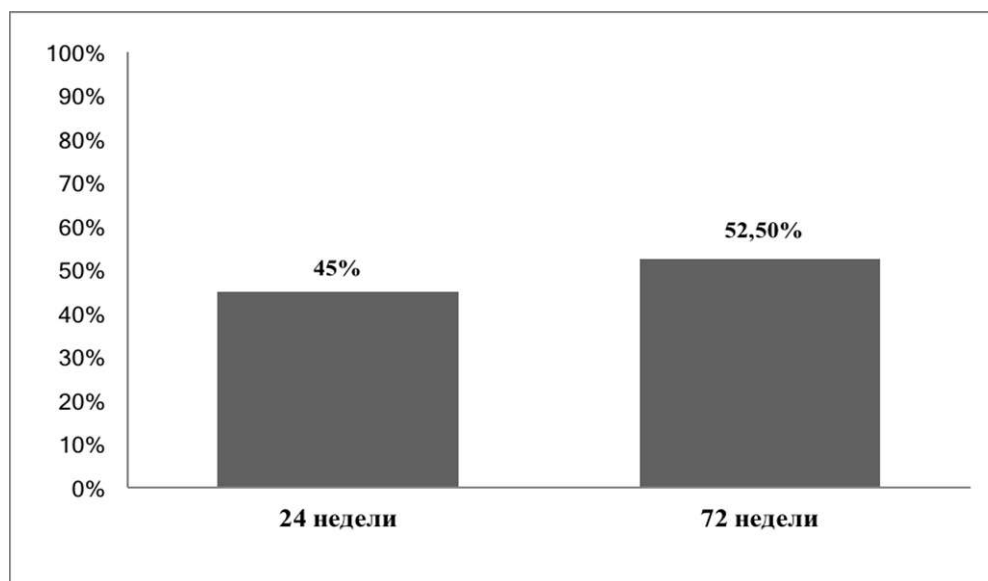
По мере увеличения длительности терапии у пациентов может развиваться так называемая вторичная резистентность к проводимой терапии. Вторичной резистентностью (ВР) называют снижение терапевтической активности препарата, что ведет к рецидиву заболевания и ухудшению его течения. Как правило, ВР возникает после периода хорошего клинического ответа. Нужно отметить, что ВР наблюдается в среднем у 30% пациентов, длительно получающих ГИБП, и, кроме этого, коррелирует с длительностью проводимого лечения [32]. Развитие ВР объясняют снижением сывороточной концентрации ГИБП в связи с усиленной деградацией белковой молекулы ретикулоэндотелиальной системой, а также в связи с иммуногенностью препарата.

Для исследования влияния повышенной иммуногенности препаратов МКА (на примере ИНФЛ, АДА и ТОЦ) на развитие ВК была проведена оценка

концентрации ГИБП и антител к ним у пациентов с РА, получавших биологическую терапию.

У всех пациентов во всех исследованных группах концентрация ГИБП и концентрация антител к препаратам не определялись в точке 0.

У пациентов в группе П-ИНФЛ распространённость антител на 24 неделе терапии составила 45 %, а на 72 неделе – 52,5 %. Данные приведены на рисунке 11.



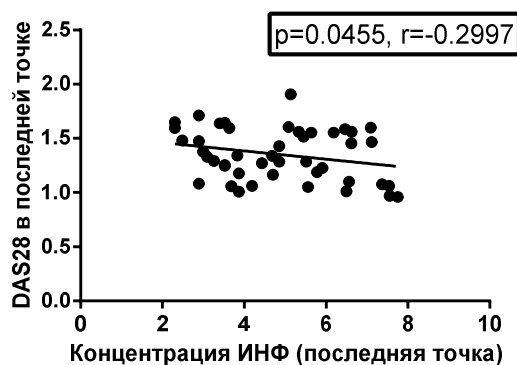
*Примечание:* ИНФЛ-инфликсимаб

Рисунок 11. Распространённость антител к ИНФЛ на сроках 24 недели и 72 недели от момента начала биологической терапии

У пациентов в группе П-АДА антитела на 24 и 72 неделе не определялись. У пациентов в группе П-ТОЦ распространённость антител в последней точке исследования составила 70,5 %.

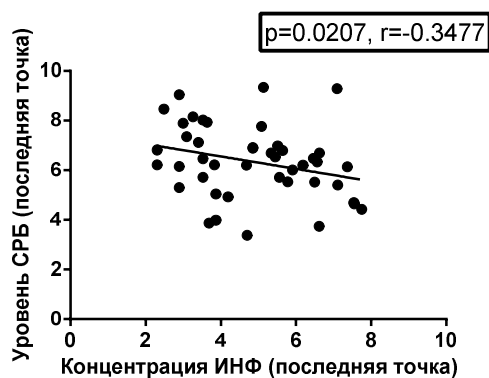
В группе пациентов П-ИНФЛ и П-ТОЦ была исследована взаимосвязь между концентрацией ИНФЛ и анти-ИНФЛ и лабораторными и клиническими показателями пациентов. Исследовались уровень DAS28 в начале терапии ГИБП и при последнем осмотре, изменение уровня DAS28 (DAS28 при первичном осмотре – DAS28 при последнем осмотре), уровень С-реактивного белка, лейкоцитов, тромбоцитов, РФ и циркулирующих иммунных комплексов при последнем осмотре. В группе П-ИНФЛ была обнаружена обратная корреляция

между уровнем ИНФЛ в последней точке и DAS28 в последней точке исследования ( $r = -0.2997$ ,  $p = 0,0455$ ), уровнем СРБ ( $r = -0.3477$ ,  $p = 0,0207$ ) и уровнем лейкоцитов ( $r = -0.3356$ ,  $p = 0,0242$ ). Со всеми остальными показателями статистически значимой корреляции анти-ИНФЛ получено не было. Результаты приведены на рисунках 12, 13, 14.



*Примечание:* ИНФ-инфликсимаб; DAS28-disease activity score 28

Рисунок 12. Корреляция уровня инфликсимаба в последней точке исследования и уровня DAS28



*Примечание:* ИНФ-инфликсимаб; СРБ-С-реактивный белок

Рисунок 13. Корреляция уровня инфликсимаба в последней точке исследования и уровня СРБ





*Примечание:* ИНФЛ-инфликсимаб

Рисунок 14. Корреляция уровня инфликсимаба в последней точке исследования и уровня лейкоцитов

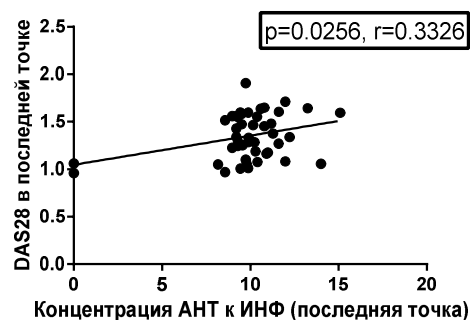
Полученные результаты указывают, что повышенная концентрация доступного препарата ИНФЛ в сыворотке крови пациентов ассоциирована с высоким уровнем ответа на проводимую терапию у пациентов с ревматоидным артритом.

Дополнительно была обнаружена прямая корреляция уровня анти-ИНФЛ с уровнем DAS28 в последней точке исследования ( $r=0.3326, p=0,0256$ ) с уровнем лейкоцитов ( $r=0.2983, p=0,0465$ ). Была показана обратная корреляция уровня анти-ИНФЛ в последней точке и концентрации ИНФЛ в последней точке наблюдения ( $r=-0.4732, p=0,0009$ ). Со всеми остальными показателями статистически значимой корреляции уровня анти-ИНФЛ получено не было. Результаты приведены на рисунке 15.

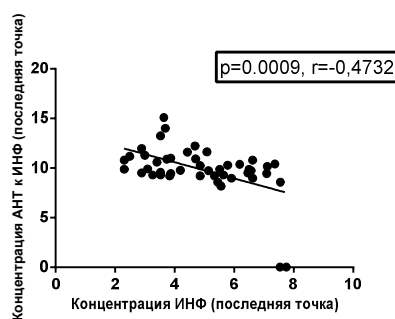
А.



Б.



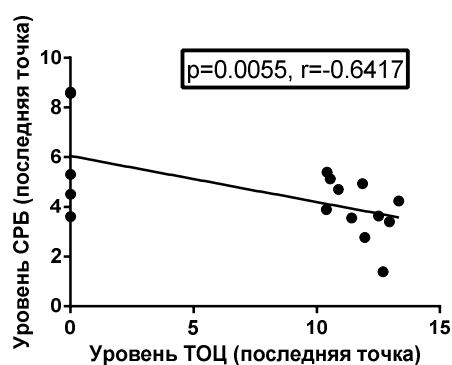
В.



*Примечание:* ИНФЛ-инфликсимаб; АНТ-антитела; DAS28-disease activity score 28.  
Рисунок 15. Корреляция антител к инфликсимабу и уровня DAS28 (А), уровня лейкоцитов (Б) и концентрации препарата (В)

Таким образом, синтезирующиеся антитела против ИНФЛ не только уменьшают концентрацию препарата в крови, но и значительно уменьшают его противовоспалительные свойства и уменьшают ответ на проводимую терапию.

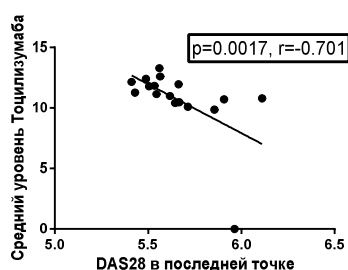
В группе П-ТОЦ была обнаружена обратная корреляция уровня ТОЦ в последней точке исследования и уровня СРБ ( $r = -0.6417, p=0,0055$ ). Была также показана обратная корреляция среднего уровня ТОЦ за все время исследования и уровнем DAS28 в последней точке ( $r = -0.701, p=0,0017$ ) и уровнем СРБ ( $r = -0.6548, p=0,0043$ ). Со всеми остальными показателями статистически значимой корреляции уровня анти-ТОЦ и ТОЦ получено не было. Результаты приведены на рисунках 16 и 17.



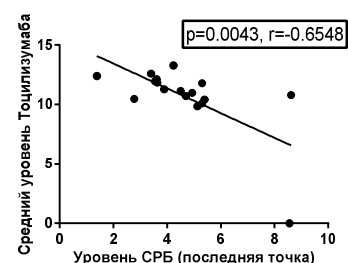
*Примечание:* ТОЦ-тоцилизумаб; СРБ-С-реактивный белок

Рисунок 16. Корреляция уровня тоцилизумаба в последней точке и уровня СРБ

А.



Б.



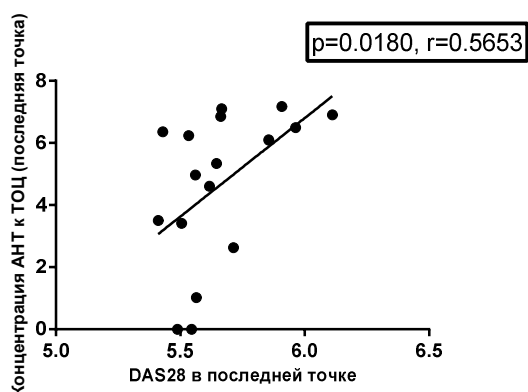
*Примечание:* DAS28- disease activity score 28; СРБ-С-реактивный белок

Рисунок 17. Корреляция среднего уровня тоцилизумаба и уровня DAS28 (А) и уровня СРБ (Б)

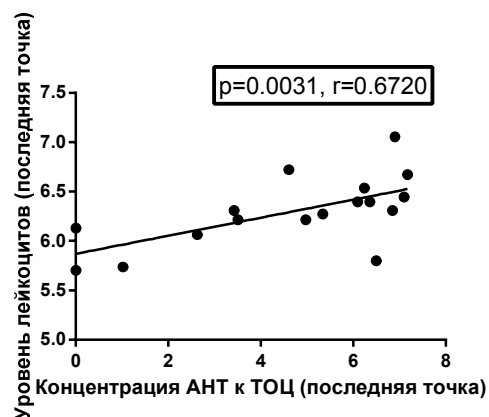
Полученные данные указывают, что измерение концентрации ТОЦ, проводимое непосредственно перед следующим введением препарата, позволяет оценить и предсказать клинический ответ на проводимое лечение.

В группе П-ТОЦ была обнаружена прямая корреляция уровня анти-ТОЦ с уровнем DAS28 в последней точке исследования ( $r=0.5653$ ,  $p=0,0180$ ) и с уровнем лейкоцитов ( $r=0.6720$ ,  $p=0,0031$ ). Результаты приведены на рисунке 18.

А.



Б.



*Примечание:* АНТ-антитела; ТОЦ-тоцилизумаб; DAS28-disease activity score 28  
Рисунок 18. Корреляция антител к тоцилизумабу и DAS28 и уровня лейкоцитов

Полученные данные указывают, что синтезирующиеся против ТОЦ антитела не только ингибируют противовоспалительную активность препарата, но и снижают это терапевтическую эффективность.

Связи между дозой вводимого препарата и уровнем синтезирующихся антител к ИНФЛ и ТОЦ обнаружено не было. Не было обнаружено разницы между уровнем антител к ИНФЛ и ТОЦ, концентрации ТОЦ и ИНФЛ у пациентов, находящихся на монотерапии ГИБП и биологической терапии в комбинации с метотрексатом.

Для подтверждения специфичности связывания САТ с ГИБП проводилась реакция ингибирования антител избытком антигена путем добавления различных концентраций ГИБП (100 мкг/мл, 10 мкг/мл, 1 мкг/мл) к сыворотке, имеющей известный высокий титр САТ. Было показано, что увеличение концентрации моноклонального препарата ингибировало связывание САТ с молекулой препарата на подложке ИФА-планшета, что характеризовалось снижением оптической плотности. Это указывает на высокую специфичность реакции по определению САТ к ГИБП. Результаты приведены в таблице 15.

## Реакция нейтрализации для препаратов ИНФЛ, АДА и ТОЦ

Концентрация препарата, мкг/мл	Инфликсимаб	Адалимумаб	Тоцилизумаб
	Активность хромогенной реакции		
0	+++	+++	+++
1	+++	+++	++
10	+	+	+
100	Реакция отсутствовала	Реакция отсутствовала	Реакция отсутствовала

*Примечание:* ИНФЛ-инфликсимаб, АДА-адалимумаб, ТОЦ-тоцилизумаб

#### Глава 4. Обсуждение результатов исследования

На сегодняшний день терапия ГИБП активно используется во многих областях и направлениях медицины. Большинство из этих препаратов применяются для лечения хронических болезней, при которых требуется постоянное введение лекарственного средства в течение всей жизни. Высокая иммуногенность этих препаратов и синтез к ним НАТ ведет к развитию у пациентов ВР к проводимой терапии в связи с ингибированием терапевтической и клинической активности ГИБП.

Создание и внедрение в практику рекомбинантных форм ИФН-бета полностью изменило подходы лечения РС - тяжелого и инвалидизирующего неврологического заболевания. Безопасность и эффективность терапии ИФН-бета у пациентов с РС была доказана рядом проспективных и ретроспективных клинических исследований [89], [90]. Данные препараты позволяют достичь ремиссии у многих пациентов с РС, и, на сегодняшний момент, они включены в рекомендации в качестве одно из препаратов первой линии терапии.

Вторичная резистентность, появляющаяся у некоторых пациентов через 1-2 года проводимого лечения препаратами ИФН-бета, является серьезной проблемой. Считается, что синтез ингибирующих антител к ИФН-бета является одной из главных причин ускользания терапевтического эффекта лекарственных средств данной группы [4]. Как и в случаях с другими ГИБП, САТ появляются на относительно ранних этапах лечения и наблюдаются примерно у 80% пациентов [95]. Не до конца понятен клинический эффект САТ к ИФН-бета, однако рядом авторов было показано, что отсутствие САТ исключает наличие пула антител, которые могут нейтрализовать активность ИФН-бета. Наибольший клинический интерес представляют НАТ к ИФН-бета. Распространенность НАТ к ИФН-бета варьируется от 2 до 35,4 % в различных исследованиях. Значимость влияния НАТ на клиническую активность ИФН-бета подчеркивается изданием международных рекомендаций, созданных по окончании трехлетнего исследования NABINMS (Neutralizing Antibodies on Interferon-Beta in Multiple Sclerosis) [86]. В данных рекомендациях уточняются референтные границы НАТ для различных форм

ИФН-бета, предлагаются различные лабораторные методы измерения НАТ, алгоритмы ведения пациентов с высокими титрами НАТ.

Существуют различные подходы к выявлению НАТ к ГИБП, однако использование клеточных систем позволяет определить прямое влияние антител на активность препарата. Создание трансфицированных клеточных линий с репортерными генами, позволяющие прямо оценить связывание исследуемой молекулы со своим рецептором, значительно упростило исследование биологической активности различных ГИБП. На данный момент, генно-модифицированные линии эукариотических клеток являются наиболее предпочтительным методом исследования влияния НАТ на эффективность ГИБП *in vitro* в связи с быстротой получения результата, относительной простотой выполнения и верификации эффекта, высокими значениями лабораторных аналитических характеристик.

В теории, высоко аффинные антитела способны полностью ингибировать активность фиксированного количества ГИБП. В связи с этим, остаточная активность НАТ прямо зависит от начальной концентрации ГИБП. Однако в экспериментах было показано, что *in vivo* наблюдается пропорциональный вариант влияния синтезирующихся антитела на ГИБП, который характеризуется нейтрализацией антителами только части от общей активности ГИБП.

Исследовательской группой Kawade et al. в качестве единицы измерения нейтрализующей активности синтезирующихся к ГИБП антител было предложено десятикратное снижение биоактивности молекулы препарата с 10 ЛЕ/мл до 1 ЛЕ/мл [51]. В стандартизованной в данном исследовании методике титр НАТ был равен максимальному уровню разведения исследуемой сыворотки, воздействующей на одинаковую концентрацию ГИБП, которая бы снижала активность препарата до 1 ЛЕ/мл. Для расчета титра использовался комплексный математический алгоритм и рассчитывался поправочный фактор.

В ходе работы была выполнена верификация лабораторных аналитических характеристик метода оценки концентрации НАТ к препаратам ИФН-бета,

основанного на трансфицированной клеточной линии HL-116. Было доказано, что данная тестовая система может применяться в рутинной лабораторной практике.

При оценке внутрилабораторных аналитических характеристик внутри одной лаборатории была показана высокая воспроизводимость метода (коэффициент вариации не превысил порога в 15 %). Все результаты аналитических характеристик теста не превысили порога в 15 % и соответствуют отечественным критериям (приказ Министра здравоохранения Российской Федерации от 26 мая 2003 года № 220 «Об утверждении отраслевого стандарта «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов»). Данный метод исследования НАТ может быть использован наряду с другими иммунологическими маркерами для мониторинга терапии ИФН-бета пациентов с РС.

При исследовании распространённости НАТ к ИФН-бета в группе пациентов с РС было показано, что у 33 % пациентов наблюдаются клинически значимые титры НАТ, а у 36 % из этих пациентов концентрация НАТ превышает 100 МЕ/мл. Полученные данные соответствуют ряду проспективных и ретроспективных исследований, проведенных ранее. Так, распространённость НАТ к препаратам ИФН-бета в исследованиях PRISM и SPECTRIMS составила 15 % и 22 % соответственно [93], [94].

При использовании разработанной нами системы дот-блота для определения САТ распространённость САТ к ИФН-бета в исследуемой группе составила 57,6 %. При использовании метода ИФА повышенные концентрации САТ к ИФН-бета детектировались у 60,6 % пациентов. Кроме этого, был показан высокий уровень корреляции значений концентраций САТ при использовании метода дот-блотинга и ИФА ( $r=0,9159$ ,  $p<0,0001$ ). Распространённость САТ к препаратам ИФН-бета сопоставима с данными, полученными другими исследовательскими группами. Группой Gneiss et.al. (2006 год) было показано, что у 45-66 % пациентов, получавших ИФН-бета-1a, обнаруживаются САТ [33]. В то же время, группа исследователей Aarskog et.al. (2009 год) обнаружила, что САТ



синтезируются у 45,9-67 % пациентов на терапии ИФН-бета-1а [4]. Вариабельность полученных результатов распространенности САТ можно объяснить различными критериями включения пациентов в группы, гетерогенностью состава группы, разными методами детекции САТ, а также временем забора сыворотки у пациентов для проведения анализа.

Одним из важнейших полученных результатов данного исследования является доказательство возможности скрининга наличия клинически значимого титра НАТ к ИФН-бета с помощью САТ. У всех пациентов, у которых титр НАТ превышал уровень в 20 ЛЕ/мл, обнаруживались САТ с использованием метода дот-блота и метода ИФА. Кроме этого, у положительных пациентов на НАТ к ИФН-бета обнаруживалась высокая корреляция их значений с концентрацией САТ, измеренной с помощью дот-блотинга ( $r=0,7909$ ,  $p=0,0055$ ), что дает возможность предсказывать с помощью САТ титр НАТ. Эти данные не противоречат результатам исследований, полученных рядом зарубежных авторов. В то же время, отсутствие САТ позволяет полностью исключить наличие ингибирующей активности антител. Кроме этого, была показана прогностическая значимость САТ. Высокий титр САТ на третьем месяце терапии предсказывает конверсию пула антител к ИФН-бета на НАТ на второй год терапии [23].

Другим широко используемым ГИБП со свойствами агониста является эритропоэтин, который используется для лечения анемии, возникающей на фоне терминальной стадии ХБП. Синтез антител к препаратам рЭПО представляет собой комплексный процесс, включающий вовлечение сегментов врожденного и адаптивного иммунного ответа. Как в случае и других ГИБП, в основе синтеза антител к рЭПО лежат структурные различия препарата и эндогенного аналога, посттрансляционные модификации ГИБП, формулировка лекарственного средства и характеристики буфера, наличие загрязняющих примесей (частицы силикона, кремния, мицеллы, белки экспрессионной линии), подкожное введение и образование высокомолекулярных агрегатов [98].

Распространенность антител к препаратам рЭПО в изученной нами группе пациентов с ХБП сопоставима с данными полученными рядом других авторов.

Доля пациентов, положительных в отношении сывороточных уровней анти-рЭПО, в опубликованных работах варьировалась от 38,9 % до 67 % [18], [28]. В некоторых исследованиях, однако, подчеркивается, что, используя методики радиоиммунного анализа, распространенность антител к рЭПО составляет 1,11 % в выборке. Возможно, эта разница связана не только с методом исследования САТ, но и гетерогенностью групп пациентов и этиологией ХБП [6].

Нами предполагается, что полученные данные о более высокой концентрации анти-рЭПО в группе пациентов СOT и обратной связи между их концентрацией и средними значениями гемоглобина и эритроцитов могут косвенно указывать на влияние этих иммуноглобулинов на терапевтическую активность стимулирующих гемопоэз препаратов. Теоретически, связывающие антитела могут изменять фармакокинетику препаратов рЭПО, ускоряя клиренс лекарственного средства и его разрушение клетками моноцитарного ростка, что было ранее показано для других ГИБП, таких как МКА. Редким, но жизнеугрожающим осложнением терапии рЭПО, является парциальная красноклеточная аплазия костного мозга (ПККА), которая вызывается нейтрализующими анти-рЭПО, нарушающими связывание рЭПО и эндогенного эриритропоэтина со своим рецептором. Не исключено, что общий пул выявляемых связывающих антител может содержать небольшое количество иммуноглобулинов с нейтрализующей активностью, недостаточного для развития ПККА, но приводящего к снижению эффективности терапии рЭПО и необходимости повышения доз последнего.

У пациентов группы СOT средняя доза препаратов была значительно выше, чем у пациентов с нормальным уровнем гемоглобина ( $p=0,0059$ ), что также может влиять на уровень продукции анти-ЭПО антител в связи с большей нагрузкой антигеном. С другой стороны, данный факт позволяет предположить снижение костномозгового ответа на рЭПО, что могло быть вызвано анти-рЭПО.

Полученные нами данные о взаимосвязи между высокими концентрациями антител к рЭПО и лабораторными показателями тяжести анемии подтверждают наблюдения Howman и Kulkarni (2007), которые обнаружили, что концентрация

антител к препаратам рЭПО обратно коррелирует с уровнем гемоглобина и эритроцитов ( $r=-0,341$ ,  $r=-0,280$  соответственно) [42]. Несмотря на это, существует ряд работ, которые не смогли найти статистически значимых различий между уровнем анти-рЭПО антител у пациентов с нормальным и сниженным ответом на терапию. Это может быть связано как с используемой системой, детектирующей анти-рЭПО, так и выборкой пациентов.

Таким образом, полученные данные указывают на значительную частоту выявления анти-рЭПО и их ассоциацию со снижением терапевтической эффективности препаратов рЭПО.

При другом аутоиммунном заболевании, таком как РА, используется принципиально другой подход к терапии. Вместо рецепторных агонистов, таких как ИФН-бета, при РА используются ГИБП, подавляющие функции иммунной системы, которые основаны как на гуманизированных антителах, так и связывающих свойствах растворимых рецепторов.

Несмотря на то, что рутинное использование ГИБП уменьшило распространённость деформирующих осложнений мелких суставов у пациентов с РА, а также снизило число пациентов с ПР на ГИБП, белковая природа данных препаратов является основной причиной развития ВР к биологической терапии, которая наблюдается у большого числа пациентов при длительном лечении [102], [110].

В ряде клинических исследований АДА и ИНФЛ показали высокую эффективность у пациентов с РА, резистентных к классической терапии метотрексатом, и у пациентов с ранним РА. Несмотря на то, что не было проведено прямых сравнений эффективности этих препаратов, в соответствие с результатами мета-анализа, приблизительно у 60 % пациентов, принимавших ИНФЛ или АДА, отмечалось 20-процентное снижение клинической активности (ACR20) [19]. Около 20 % пациентов РА не имели клинического эффекта от проводимой терапии вообще [61]. Во всех исследованиях не больше 20 % всех пациентов достигали 70-процентного клинического ответа, а у части больных не выявлялось ответа на терапию вообще [119]. Несмотря на первичные результаты

клинических исследований, пост-маркетинговые наблюдения эффективности МКА при РА показали меньший процент клинических ответов, что может быть связано с более тяжелыми случаями РА, с нарушением режима приема препарата, а также более длительными сроками лечения. Кроме этого, было показано, что большое количество пациентов с РА прекращают принимать препараты из-за неэффективности или побочных эффектов [92]. Так, в когорте пациентов из Испании (n=488) с РА 12 % пациентов прекратили прием препаратов на 12-ом месяце лечения, 28 % - на 24-ом месяце, 35 %- на 48-ом месяце. Нужно также отметить, что у половины пациентов причиной окончания приема МКА была неэффективность терапии. В соответствии с последними данными, до 54 % пациентов, принимающих ИНФЛ по поводу РА, заканчивают терапию в первый год лечения [79].

Первичной резистентностью (ПР) называют отсутствие клинического ответа на терапию с момента ее начала. Для ПР нет четких критериев, но считается, что отсутствие клинического ответа в течение первых 14 недель после инициации терапии является признаком ПР [83]. Точный механизм развития ПР неизвестен [26]. Было показано, что мужчины и люди с повышенным индексом массы тела имеют ускоренный клиренс МКА. Другими факторами, влияющими на развитие ПР, являются анамнез курения, длительность заболевания, высокий уровень ряда цитокинов. Кроме этого, высокий уровень воспалительной активности также может сказаться на развитии ПР, что объясняется недостаточным количеством препарата, требуемого для блокирования всех молекул таргетных провоспалительных цитокинов [38].

Вторичная резистентность (ВР) развивается после периода хорошего клинического ответа. Несмотря на то, что не существует четких критериев ВР, разумным является подтверждение данного состояния при рецидиве симптоматики после успешной индукции ремиссии. ВР может развиваться как после нескольких недель, так и после нескольких лет успешной терапии [11]. Распространенность данного состояния при лечении МКА пациентов с РА сложно определить в связи с отсутствием четких критериев. Однако в среднем у 37 %

пациентов, прошедших успешную индукцию ремиссии препаратами МКА, впоследствии наблюдается снижение клинической эффективности терапии [32]. Считается, что ВР развивается при недостаточной концентрации активного препарата, причиной чего является его деградация, элиминация или ингибирования антителами. Деградация и элиминация МКА происходит с помощью ретикуло-эндотелиальной системы (РЭС). Рецептор Брамбелла активно экспрессируется на клетках РЭС. Данный рецептор участвует в поддержании гомеостаза между альбумином и иммуноглобулинами в сыворотке крови. Период полужизни иммуноглобулинов обратно пропорционален их концентрации. Система насыщается при их высоком уровне. При высоких концентрациях эндогенных иммуноглобулинов, наблюдаемых при активном воспалении при аутоиммунных заболеваниях, период полужизни экзогенных МКА уменьшается [82]. Это, в свою очередь, приводит к развитию ВР. Но наиболее значимым фактором, влияющим на развитие ВР, является иммуногенность ГИБП.

Ряд исследователей пытались обнаружить клинические маркеры прогноза эффективности терапии МКА у пациентов с РА. Клинический ответ наблюдается намного чаще у пациентов, принимающих дополнительно с МКА базисную терапию метотрексатом или другими цитостатиками. В исследованиях TEMPO и PREMIER комбинация МКА и метотрексата показала большую клиническую эффективность, чем использование монотерапии [109]. Также, было показано, что более ранний возраст начала терапии, отсутствие анамнеза курения, использование НПВС и низкий уровень ВАШ предсказывают хороший клинический ответ на терапию. Кроме этого, пациенты, получающие повышенные дозы МКА, имеют лучший клинический ответ [90].

Одним из предикторов хорошего клинического ответа являются полиморфизмы генов, прямо или косвенно участвующие в гуморальном и клеточном иммунном ответе. Одним из первых генетических маркеров, который предположительно способен предсказывать клинический ответ на терапию МКА, был «общий эпитоп» (ОЭ) - участок HLA, располагающийся на 6p21 хромосоме. В одном из первых исследований не было обнаружено связи между аллелями

DRB1 локуса и клинического ответа на терапию МКА у 78 испанских пациентов. Тем не менее, отмечается, что гаплотип D6S273\_4/BAT2\_2/TNFA11;b4 встречается намного чаще у пациентов с хорошим клиническим ответом [71]. В то же время, в исследовании 457 пациентов с РА из США было показано, что носительство двух аллелей «ОЭ» чаще встречается у пациентов с хорошим клиническим ответом на МКА [41].

Полиморфизмы гена ФНО-альфа также являлись кандидатами в биомаркеры предсказания клинического ответа на терапию анти-ФНО-альфа. Исследование с 58 пациентами с РА продемонстрировало связь между комбинацией генотипов генов TNFR2 и TNF и хорошим клиническим ответом на терапию МКА. Полиморфизмы TNFR2 676T и TNF -857C, 489G чаще обнаруживались в когорте пациентов с хорошим клиническим ответом. В исследовании генетических маркеров прогноза ответа на терапию ИНФЛ у пациентов с РА (n=1050) было показано, что генотип TNF -308 предсказывал плохой клинический ответ на терапию, а генотип -238 AA – хороший клинический ответ [10].

Иммунологические биомаркеры показали большую клиническую значимость в предсказании ответа на терапию, чем генетические и клинические маркеры. Так, в исследовании 103 пациентов с РА уровень синовиальной экспрессии ФНО-альфа был значимым предиктором ответа на терапию ИНФЛ, что было показано путем измерения уровня DAS28 на 4 месяце терапии (p = 0.011) [24]. Однако ряд исследований не смог подтвердить данные находки, что связывают с разными подходами измерения анализа и невозможность детекции всех активных связанных и свободных форм ФНО-альфа. Учитывая это, в исследовании 42 пациентов с РА было показано, что высокая биоактивность ФНО-альфа предсказывает хороший клинический ответ на МКА [70].

Рядом исследований было показано, что наличие РФ, а также антител к ЦЦП у пациентов с РА предсказывает плохой клинический ответ на терапию МКА. Однако существуют противоположные данные о том, что уровень РФ (p =

0.02) и анти-ЦЦП ( $p = 0.08$ ) у пациентов с хорошим ответом на МКА был значительно выше, чем у резистентных к терапии пациентов [68].

Также, была показана клиническая значимость в прогнозировании ответа на терапию МКА у следующих биомаркеров: COMP, RANKL и OPG. Однако требуются увеличение числа наблюдений для подтверждения первичных исследований по данным анализам [21].

Основной причиной резистентности называют уменьшение сывороточного уровня препарата и ингибирование его терапевтической активности. Антитела против ГИБП синтезируются к наиболее чужеродному участку молекулы моноклонального иммуноглобулина – вариабельному региону Fab-фрагмента, связывающего целевые молекулы. Было показано, что до 95% всего пула антител, синтезирующегося против молекул ИНФЛ у пациентов с РА, специфичны к данному участку ГИБП. Это, в свою очередь, приводит не только к повышенной скорости элиминации препарата РЭС, но и снижению биологической активности ГИБП в связи с блоком связывания терапевтического иммуноглобулина с таргетной молекулой [93].

В случае с ГИБП, используемых при лечении РА, было показано, что пул антител, синтезирующихся к ИНФЛ, АДА и ТОЦ, в основном состоит из НАТ [101], [99]. Максимальный клинический эффект ИНФЛ достигается при сохранении сывороточной концентрации препарата на уровне не менее чем 1,1 мг/мл, измеренного непосредственно перед последующим введением следующей дозы [85]. Формируя иммунные комплексы, НАТ не только ингибирует связывание препарата с ФНО-альфа, но и ускоряет клиренс ГИБП.

Распространенность антител к ИНФЛ, АДА и ТОЦ сильно варьирует в различных исследованиях, но большинство авторов подтверждают, что длительность терапии напрямую коррелирует с процентом выявления анти-ГИБП антител. В данной работе распространенность антител к ИНФЛ на 24 неделе терапии составила 45 %, а на 72 неделе – 52,5 %. Полученные данные сопоставимы с результатами исследований ряда авторов [59]. Такая высокая распространённость антител к ИНФЛ объясняется химерностью белковой

молекулы и наличием мышинового ксеногенного участка, который ответственен за повышение уровня иммуногенности препарата. Так, у пациентов, получавших полностью гуманизированный препарат АДА, антитела не определялись, что, также сопоставимо с рядом зарубежных работ [47]. В данном исследовании у 70,5 % пациентов, принимавших препарат ТОЦ, была обнаружена повышенная концентрация анти-ТОЦ антител после 2 лет терапии. Нужно отметить, что данные цифры значительно отличаются от ранее опубликованных данных о низком уровне иммуногенности ТОЦ (до 2 %), что может объясняться не только выборкой пациентов, но и различными подходами детекции антител [15]. Учитывая наличие нейтрализации положительного контроля антител избытком препарата в буфере для инкубации, можно сделать вывод о специфичности детекции антител к препаратам терапевтических иммуноглобулинов использованной тестовой системы.

Большинство тест систем, измеряющих уровень терапевтических иммуноглобулинов, основано на специфическом связывании находящегося в сыворотке препарата с таргетной молекулой, адсорбированной на дне лунки ИФА планшета. Другим распространенным вариантом является адсорбция на дне ИФА планшета моноклональных антител, специфичных к вариабельному участку исследуемого иммуноглобулина. Таким образом, в связи с особенностями измерения сывороточный уровень ГИБП отражает не только концентрацию препарата, но и биологическую доступностью функционально значимого региона белковой молекулы. Синтезирующиеся против ГИБП антитела блокируют данный регион, что проявляется «понижением» концентрации препарата. Высокие концентрации препарата в свою очередь полностью насыщают титр анти-ГИБП антител, что приводит к «отсутствию» ингибирующих антител. В данной работе была показана обратная зависимость между уровнем ИНФЛ и концентрацией анти-ИНФЛ антител ( $r = -0.4732$ ,  $p = 0.0009$ ), что полностью соответствует представлению о роли данных биомаркеров, а также ряду международных исследований [89]. Нужно отметить, что в данном исследовании не была показана связь между сывороточным уровнем ТОЦ и анти-ТОЦ антителами, что,



возможно, объясняется разными подходами выявления этих маркеров и небольшим количеством пациентом в исследованной выборке.

Для оценки уровня активности и ответа на терапию используется ряд шкал, наиболее значимой из которых является DAS28-СРБ, учитывающая количества припухших и болезненных суставов, концентрацию С-реактивного белка, а также общую оценку состояния здоровья по визуальной аналоговой шкале. В данном исследовании была показана прямая зависимость между концентрацией антител к ИНФЛ в последней точке и уровнем DAS28-СРБ в последней точке, а также обратная зависимость между уровнем ИНФЛ и DAS28-СРБ в последней точке. Полученные данные указывают на влияние синтезирующихся антител не только на уровень ИНФЛ, но и на клинический ответ пациентов с РА на терапию ИНФЛ. Помимо этого, нами были получены статистически значимые корреляции между уровнем анти-ИНФЛ антител, ИНФЛ и маркерами воспалительной активности, такими как уровень лейкоцитов и концентрация СРБ, что также подтверждает идею о влиянии антител против ИНФЛ на противовоспалительную активность ИНФЛ. Нужно отметить, что полученные данные сопоставимы с исследованиями, проведенными рядом зарубежных авторов, показавших, что антитела против ИНФЛ значительно снижали фармакологическую активность лекарственного средства и их концентрация обратно коррелировала с клиническим ответом на терапию ( $r=-0.606$ ,  $p<0,05$ ).

В данном исследовании было убедительно показано, что антитела к ТОЦ способны снижать клинический ответ проводимой терапии и уменьшать противовоспалительные характеристики препарата. Уровень анти-ТОЦ антител прямо коррелировал с уровнем DAS28-СРБ в последней точке и уровнем лейкоцитов. Также было показано, что концентрация препарата ТОЦ, которая остается в сыворотке пациента непосредственно перед следующей инъекцией, является одним из маркеров мониторинга эффективности терапии. Это подтверждается высокими значениями корреляции среднего уровня ТОЦ и уровнем DAS28-СРБ в последней точке и концентрацией СРБ в последней точке ( $r= -0.701$ ,  $p=0,0017$  и  $r= -0.6548$ ,  $p=0.0043$  соответственно). В данном случае

более высокая скорость элиминации препарата может объясняться синтезирующимися антителами к ТОЦ.

Полученные данные указывают на значительное влияние сывороточного уровня ТОЦ и ИНФЛ, а также концентрации антител к этим препаратам на терапевтический эффект проводимой терапии РА. Рутинное исследование данных биомаркеров поможет не только персонализировать подходы к терапии пациентов с РА, но и характеризовать причины резистентности к данным ГИБП.

Учитывая растущее количество биологических препаратов, иммуногенность ГИБП представляет собой одну из самых актуальных проблем современной фармакологии. Синтезирующиеся к ним антитела являются одним из главных следствий феномена иммуногенности. В ходе проведенных исследований было показано, что синтез антител наблюдается уже через 1 год лечения такими препаратами, как ИФН-бета, рЭПО, ИНФЛ и ТОЦ, при этом наблюдается их динамическое увеличение со временем проводимой терапии. Кроме этого, было доказано, что данные антитела способны прямо ингибировать действие ГИБП агонистов, а также снижать сывороточную концентрацию МКА. Это, в свою очередь, приводит к снижению терапевтической активности препаратов ИНФЛ, ТОЦ, рЭПО и ИФН-бета. Разработанные и стандартизированные методы детекции САТ и НАТ к препаратам ИФН-бета, рЭПО и МКА позволяют контролировать появление ингибирующих антител и предсказывать развитие резистентности к проводимой терапии. Их использование в клинической практике снизит риск развития необратимых последствий отсутствия ответа на лечения тяжелых инвалидизирующих заболеваний.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Препараты ГИБП применяются во многих областях медицины, и развитие резистентности, вызванной синтезом ингибирующих фармакологическую активность антител, является значимой клинической проблемой. Разработанные в ходе исследования методики выявления САТ и НАТ не только показали высокую аналитическую точность, но также корреляцию с доступными коммерческими системами выявления САТ. Кроме этого, методика дот-блоттинга позволяет создавать детектирующие САТ систем для многих ГИБП, что является очень актуальным, учитывая появления все новых препаратов ГИБП для лечения различных заболеваний. Верификация метода детекции титра НАТ, основанного на трансфицированной клеточной линии HL-116, позволяет мониторировать терапию наиболее распространённого препарата для лечения РС. Учитывая высокий риск инвалидизации при наличии резистентности к терапии ИФН-бета, выявление НАТ позволяет персонализировать терапию и вовремя заменить препарат. Кроме этого, метод дот-блоттинга для выявления САТ к ИФН-бета позволяет проводить первичный скрининг на наличие нейтрализующей активности у пула антител.

Синтез антител против ГИБП является комплексным и динамичным процесс, с индивидуальными особенностями для каждого из препаратов, которые зависят от свойств молекулы, ее фармакодинамики и фармакокинетики, а также особенностей организма пациента. Было показано, что САТ и НАТ являются не только маркером резистентности к терапии ГИБП, но и непосредственной этиологической причиной сниженной фармакологической активности препарата на поздних этапах лечения.

В случае с препаратами ИФН-бета НАТ и САТ блокируют способность препарата связываться со своим рецептором. В случае с МКА САТ не только увеличивают клиренс препарата, но и снижают сывороточную концентрацию биоактивных молекул МКА.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан метод дот-блота, с помощью которого возможно детектировать антитела против широкого спектра генно-инженерных биологических препаратов.

2. Система определения нейтрализующих антител к препаратам интерферона-бета с помощью трансфицированных клеточных линий HL-116 соответствует лабораторным аналитическим характеристикам, что позволяет использовать ее в клинической практике.

3. Метод дот-блота обладает достаточной чувствительностью для выявления нейтрализующих антител в пуле связывающих антител и может применяться в качестве первичного теста у пациентов, получающих препараты интерферона-бета. Распространенность связывающих антител к препаратам интерферона-бета составила 57,6 %, а распространённость нейтрализующих антител – 33,3 %.

4. У пациентов в группе, принимавших препарат инфликсимаб, распространённость антител на 24 неделе терапии составила 45 %, а на 72 неделе – 52,5 %. Это доказывает, что синтез связывающих антител к препаратам моноклональных антител является динамическим процессом, и распространённость антител к генно-инженерным биологическим препаратам увеличивается с длительностью лечения.

5. Распространённость антител к рекомбинантным формам эритропоэтина составила 54,05 %. Концентрация антител к препаратам эритропоэтина была значительно выше в группе со сниженным ответом на терапию по сравнению с группой пациентов, у которых наблюдался нормальный ответ на терапию ( $p=0,0019$ ).

6. Высокая концентрация сывороточного уровня препарата моноклонального антитела ассоциирована с хорошим клиническим ответом на проводимую терапию. Синтез антител к препаратам моноклонального антитела влияет на сывороточную концентрацию активного генно-инженерного биологического препарата в сыворотке пациентов с ревматоидным артритом.

7. Антитела против генно-инженерных биологических препаратов снижают фармакологическую активность препаратов моноклональных антител и рекомбинантных форм эритропоэтина и вызывают вторичную резистентность к проводимой терапии.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты проведенного исследования позволяют сформулировать практические рекомендации для врачей клинической лабораторной диагностики, ревматологов, неврологов, нефрологов.

1. Рекомендуется использовать тест дот-блота в качестве первичного скрининга на связывающие антитела к интерферону-бета и рекомбинантным формам эритропоэтина у пациентов с рассеянным склерозом и хронической болезнью почек, проходящих терапию данными белковыми препаратами, у которых подозревается резистентность к проводимой терапии.
2. У пациентов с рассеянным склерозом, проходящих терапию препаратами интерферона-бета более 18 месяцев и у которых наблюдается появление новых контрастных очагов или клинический рецидив заболевания, а также положительных на связывающие антител к интерферону-бета, рекомендуется определение титра нейтрализующих антител с использованием трансфицированной клеточной линии HL-116. При титре нейтрализующих антител выше 100 МЕ/мл рекомендовано сменить терапию препаратами интерферона-бета-1a на другие препараты первой линии лечения.
3. У пациентов с ревматоидным артритом, проходящих терапию тоцилизумабом и инфликсимабом, рекомендуется проводить измерение концентрации сывороточного уровня используемого препарата перед каждым последующим его введением. При обнаружении пониженной концентрации моноклональных антител (менее 1 мкг/мл) рекомендуется изменить протокол введение препарата и провести исследование антител к препаратам моноклональных антител для определения этиологии снижения титра препарата.
4. У пациентов с хронической болезнью почек 5 стадии, проходящих терапию препаратами рекомбинантного эритропоэтина, при снижении концентрации среднегодового уровня гемоглобина менее 110 г/л рекомендуется проведение скрининга на наличие связывающих антител к рекомбинантным формам эритропоэтина для подтверждения этиологии резистентности к препаратам индукторам гемопоеза.

## **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

Перспективой дальнейшего изучения темы является проведение проспективного исследования влияния НАТ на терапевтическую активность препаратов ИНФ-бета у пациентов с РРРС, исследование возможности перекрестного реагирования САТ к инфликсимабу с адалимумабом, расширения группы обследуемых лиц. Кроме этого, планируется разработать и верифицировать систему детекции НАТ к препаратам группы ингибиторов фактора некроза опухоли альфа, основанной на трансфицированных клеточных линиях.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ТЕРМИНОВ

Гены репортеры – гены, которые присоединяют к регуляторным последовательностям других генов для исследования проявлений генов в культурах клеток.

Антитела гуманизированные – антитела животного происхождения, или моноклональные антитела (мышинные, крысиные), гетерологичные консервативные сегменты которых (Fc-фрагменты) заменены с помощью методов генной инженерии на гомологичные фрагменты, т.е. на Fc-фрагменты антител человека.

ГИБП – генно-инженерные биологические препараты

САТ – связывающие антитела

НАТ – нейтрализующие антитела

ИНФ-бета – интерферон-бета

МРТ – магнитно-резонансная томография

РС – рассеянный склероз

РРС – ремиттирующий-рецидивирующий рассеянный склероз

ФНО-альфа – фактор некроза опухоли альфа

ХБП – хроническая болезнь почек

МКА – моноклональные антитела

ИФА – иммуно-ферментный анализ

ИНФ-альфа – интерферон-альфа

ЦНС – центральная нервная система

РА – ревматоидный артрит

ТОЦ – тоцилизумаб

ИНФЛ – инфликсимаб

АДА – адалимумаб

АИПКА – антител-индуцированная парциальная красноклеточная аплазия

ФVIII – фактор свертывания VIII

НМ – нитроцеллюлозная мембрана

ЦЦП – циклический цитруллинированный пептид



### Список литературы

1. Авдеева Ж.И. Безопасность лекарственных препаратов моноклональных антител, связанная с проявлением их иммуногенности / М. Н. В. Авдеева Ж.И., Алпатова Н.А., Солдатов А.А., Бондарев В.П., Мосягин В.Д // Иммунология – 2015. – Т. 36 – № 4 – 247–256с.
2. Алпатова Н.А. Проблемы, связанные с проявлением иммуногенности лекарственных препаратов моноклональных антител при клиническом использовании / Н.А. Алпатова, Ж.И. Авдеева, А.А. Солдатов, Н.В. Медуницын, А.Н. Миронов // Иммунология – 2014. – Т. 1 – 28–32с.
3. Коротаева Т.В. Иммуногенность, вызванная генно-инженерными биологическими препаратами при лечении псориаза и псориатического артрита : взгляд на проблему / Коротаева Т.В. // Современная ревматология – 2015. – Т.9 – №4 – 13-19с.
4. Aarskog N.K. Antibodies against interferon-beta in multiple sclerosis. / N. K. Aarskog, T. Marøy, K.-M. Myhr, C. A. Vedeler // J. Neuroimmunol. – 2009. – Т. 212 – № 1–2 – 148–50с.
5. Ahi Y.S. Adenoviral vector immunity: its implications and circumvention strategies. / Y. S. Ahi, D. S. Bangari, S. K. Mittal // Curr. Gene Ther. – 2011. – Т. 11 – № 4 – 307–320с.
6. Alves M.T. Resistance of dialyzed patients to erythropoietin / M. T. Alves, S. S. Vilaça, M. das G. Carvalho, A. P. Fernandes, L. M. S. A. Dusse, K. B. Gomes // Rev. Bras. Hematol. Hemoter. – 2015. – Т. 37 – № 3 – 190–197с.
7. Andersen O. Multicentre, randomised, double blind, placebo controlled, phase III study of weekly, low dose, subcutaneous interferon beta-1a in secondary progressive multiple sclerosis / O. Andersen, I. Elovaara, M. Färkkilä, H. J. Hansen, S. I. Mellgren, K. M. Myhr, M. Sandberg-Wollheim, P. Soelberg Sørensen // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry – 2004. – Т. 75 – № 5 – 706–710с.
8. Arnason B.G.W. Long-term experience with interferon beta-1b (Betaferon®) in multiple sclerosis / B. G. W. Arnason // J. Neurol. – 2005. – Т. 252 – № 3 – 28–33с.
9. Beers M.M.C. van On the role of aggregates in the immunogenicity of recombinant

human interferon beta in patients with multiple sclerosis. / M. M. C. van Beers, W. Jiskoot, H. Schellekens // *J. Interferon Cytokine Res.* – 2010. – T. 30 – № 10 – 767–775c.

10. Bek S. Systematic review and meta-analysis: pharmacogenetics of anti-TNF treatment response in rheumatoid arthritis. / S. Bek, A. B. Bojesen, J. V Nielsen, J. Sode, S. Bank, U. Vogel, V. Andersen // *Pharmacogenomics J.* – 2017. – T. 17 – № 5 – 403–411c.

11. Ben-Horin S. Review article: Loss of response to anti-TNF treatments in Crohn's disease / S. Ben-Horin, Y. Chowers // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 2011. – T. 33 – № 9 – 987–995c.

12. Bertolotto A. Immunogenicity of interferon beta: differences among products. / A. Bertolotto, F. Deisenhammer, P. Gallo, P. Sölberg Sørensen // *J. Neurol.* – 2004. – T. 251 Suppl – № S2 – II15-II24c.

13. Bompreszi R. Glatiramer acetate-specific antibody titres in patients with relapsing / remitting multiple sclerosis and in experimental autoimmune encephalomyelitis. / R. Bompreszi, R. Schaefer, V. Reese, A. Misra, T. L. Vollmer, M. Kala // *Scand. J. Immunol.* – 2011. – T. 74 – № 3 – 219–226c.

14. Braun A. Protein aggregates seem to play a key role among the parameters influencing the antigenicity of interferon alpha (IFN- $\alpha$ ) in normal and transgenic mice / A. Braun, L. Kwee, M. A. Labow, J. Alsenz // *Pharm. Res.* – 1997. – T. 14 – № 10 – 1472–1478c.

15. Burmester G.R. Low immunogenicity of tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis / G. R. Burmester, E. Choy, A. Kivitz, A. Ogata, M. Bao, A. Nomura, S. Lacey, J. Pei, W. Reiss, A. Pethoe-Schramm, N. L. Mallalieu, T. Wallace, M. Michalska, H. Birnboeck, K. Stubenrauch, M. C. Genovese // *Ann. Rheum. Dis.* – 2017. – T. 76 – № 6 – 1078–1085c.

16. Burmester G.R. Adalimumab: Long-term safety in 23 458 patients from global clinical trials in rheumatoid arthritis, juvenile idiopathic arthritis, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, psoriasis and Crohn's disease / G. R. Burmester, R. Panaccione, K. B. Gordon, M. J. McIlraith, A. P. M. Lacerda // *Ann. Rheum. Dis.* –

2013. – T. 72 – № 4 – 517–524c.

17. Büttel I.C. Taking immunogenicity assessment of therapeutic proteins to the next level / I. C. Büttel, P. Chamberlain, Y. Chowes, F. Ehmann, A. Greinacher, R. Jefferis, D. Kramer, H. Kropshofer, P. Lloyd, A. Lubiniecki, R. Krause, A. Mire-Sluis, T. Platts-Mills, J. A. Ragheb, B. M. Reipert, H. Schellekens, R. Seitz, P. Stas, M. Subramanyam, R. Thorpe, J. H. Trouvin, M. Weise, J. Windisch, C. K. Schneider // *Biologicals* – 2011. – T. 39 – № 2 – 100–109c.

18. Castelli G. Detection of anti-erythropoietin antibodies in haemodialysis patients treated with recombinant human-erythropoietin. / G. Castelli, A. Famularo, C. Semino, A. M. Machi, A. Ceci, G. Cannella, G. Melioli // *Pharmacol. Res.* – 2000. – T. 41 – № 3 – 313–8c.

19. Chen Y.F. A systematic review of the effectiveness of adalimumab, etanercept and infliximab for the treatment of rheumatoid arthritis in adults and an economic evaluation of their cost-effectiveness / Y. F. Chen, P. Jobanputra, P. Barton, S. Jowett, S. Bryan, W. Clark, A. Fry-Smith, A. Burls // *Health Technol. Assess. (Rockv)*. – 2006. – T. 10 – № 42 – 221–229c.

20. Creeke P.I. Clinical testing for neutralizing antibodies to interferon- $\beta$  in multiple sclerosis / P. I. Creeke, R. A. Farrell // *Ther. Adv. Neurol. Disord.* – 2013. – T. 6 – № 1 – 3–17c.

21. Crnkic M. Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) decreases in rheumatoid arthritis patients treated with infliximab or etanercept. / M. Crnkic, B. Månsson, L. Larsson, P. Geborek, D. Heinegård, T. Saxne // *Arthritis Res. Ther.* – 2003. – T. 5 – № 4 – R181-5c.

22. Declerck P.J. Biologicals and biosimilars: a review of the science and its implications / P. J. Declerck // *Generics Biosimilars Initiat. J.* – 2012. – T. 1 – № 1 – 13–16c.

23. Deisenhammer F. Interferon-Beta: Neutralizing Antibodies, Binding Antibodies, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, and Clinical Outcomes / F. Deisenhammer // *J. Interf. Cytokine Res.* – 2014. – T. 34 – № 12 – 938–945c.

24. Dennis G. Synovial phenotypes in rheumatoid arthritis correlate with response to

- biologic therapeutics. / G. Dennis, C. T. J. Holweg, S. K. Kummerfeld, D. F. Choy, A. F. Setiadi, J. A. Hackney, P. M. Haverty, H. Gilbert, W. Y. Lin, L. Diehl, S. Fischer, A. Song, D. Musselman, M. Klearman, C. Gabay, A. Kavanaugh, J. Endres, D. A. Fox, F. Martin, M. J. Townsend // *Arthritis Res. Ther.* – 2014. – T. 16 – № 2 – R90c.
25. Dhillon S. Certolizumab pegol: A review of its use in patients with axial spondyloarthritis or psoriatic arthritis / S. Dhillon // *Drugs* – 2014. – T. 74 – № 9 – 999–1016c.
26. Ding N.S. Systematic review: Predicting and optimising response to anti-TNF therapy in Crohn's disease - Algorithm for practical management / N. S. Ding, A. Hart, P. De Cruz // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 2016. – T. 43 – № 1 – 30–51c.
27. Duncan E. Nijmegen-Bethesda assay to measure factor VIII inhibitors. / E. Duncan, M. Collecutt, A. Street // *Methods Mol. Biol.* – 2013. – T. 992 – 321–33c.
28. El-Din M.M. Detection of circulating antierythropoietin antibodies in patients with end stage renal disease on regular hemodialysis / M. M. El-Din, F. M. Attia, S. M. Labib, W. Omar // *Int. J. Lab. Hematol.* – 2010. – T. 32 – № 3 – 336–343c.
29. Francis G. Randomized controlled trial of interferon-beta-1a in secondary progressive MS: Clinical results / G. Francis // *Neurology* – 2001. – T. 56 – № 11 – 1496–1504c.
30. Galetta S.L. The controlled high risk Avonex multiple sclerosis trial (CHAMPS Study) / S. L. Galetta // *J Neuroophthalmol* – 2001. – T. 21 – № 4 – 292–295c.
31. Giovannoni G. Neutralising antibodies to interferon beta during the treatment of multiple sclerosis / G. Giovannoni, F. E. Munschauer, F. Deisenhammer // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* – 2002. – T. 73 – № 5 – 465–469c.
32. Gisbert J.P. Loss of response and requirement of infliximab dose intensification in Crohn's disease: A review / J. P. Gisbert, J. Panés // *Am. J. Gastroenterol.* – 2009. – T. 104 – № 3 – 760–767c.
33. Gneiss C. Differing immunogenic potentials of interferon beta preparations in multiple sclerosis patients / C. Gneiss, P. Tripp, F. Reichartseder, R. Egg, R. Ehling, A. Lutterotti, M. Khalil, B. Kuenz, I. Mayringer, M. Reindl, T. Berger, F. Deisenhammer // *Mult Scler* – 2006. – T. 12 – № 6 – 731–737c.

34. Govindappa K. Development of interferon beta-neutralising antibodies in multiple sclerosis - A systematic review and meta-analysis / K. Govindappa, J. Sathish, K. Park, J. Kirkham, M. Pirmohamed // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* – 2015. – T. 71 – № 11 – 1287–1298c.
35. Groot A.S. De Immunogenicity of protein therapeutics / A. S. De Groot, D. W. Scott // *Trends Immunol.* – 2007. – T. 1 – № 4 – 314–322c.
36. Group S.S. Randomized controlled trial of interferon- beta-1a in secondary progressive MS: Clinical results. / S. S. Group // *Neurology* – 2001. – T. 56 – 1496–504c.
37. Harding F.A. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies / F. A. Harding, M. M. Stickler, J. Razo, R. DuBridge // *MAbs* – 2010. – T. 2 – № 3 – 256–265c.
38. Hazlewood G.S. Comparative effectiveness of immunosuppressants and biologics for inducing and maintaining remission in Crohn's disease: A network meta-analysis / G. S. Hazlewood, A. Rezaie, M. Borman, R. Panaccione, S. Ghosh, C. H. Seow, E. Kuenzig, G. Tomlinson, C. A. Siegel, G. Y. Melmed, G. G. Kaplan // *Gastroenterology* – 2015. – T. 148 – № 2 – 344–354c.
39. Hermeling S. Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins. / S. Hermeling, D. J. A. Crommelin, H. Schellekens, W. Jiskoot // *Pharm. Res.* – 2004. – T. 21 – № 6 – 897–903c.
40. Hoffmann S. HLA-DRB1\*0401 and HLA-DRB1\*0408 are strongly associated with the development of antibodies against interferon-beta therapy in multiple sclerosis. / S. Hoffmann, S. Cepok, V. Grummel, K. Lehmann-Horn, J. Hackermüller, J. Hackermueller, P. F. Stadler, H.-P. Hartung, A. Berthele, F. Deisenhammer, R. Wassmuth, R. Wasmuth, B. Hemmer // *Am. J. Hum. Genet.* – 2008. – T. 83 – № 2 – 219–27c.
41. Hoshino M. Influence of antibodies against infliximab and etanercept on the treatment effectiveness of these agents in Japanese patients with rheumatoid arthritis / M. Hoshino, T. Yoshio, S. Onishi, S. Minota // *Mod. Rheumatol.* – 2012. – T. 22 – № 4 – 532–540c.

42. Howman R. Antibody-mediated acquired pure red cell aplasia (PRCA) after treatment with darbepoetin / R. Howman, H. Kulkarni // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2007. – T. 22 – № 5 – 1462–1464c.
43. Hughes R. PRISMS-4: Long-term efficacy of interferon- $\beta$ -1a in relapsing MS / R. Hughes, G. Francis // *Neurology* – 2001. – T. 56 – № 12 – 1628–1636c.
44. Itakura K. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. / K. Itakura, T. Hirose, R. Crea, A. D. Riggs, H. L. Heyneker, F. Bolivar, H. W. Boyer // *Science* – 1977. – T. 198 – № 4321 – 1056–63c.
45. Jani M. High frequency of antidrug antibodies and association of random drug levels with efficacy in certolizumab pegol-treated patients with rheumatoid arthritis: Results from the BRAGGSS cohort / M. Jani, J. D. Isaacs, A. W. Morgan, G. Koduri // *Ann. Rheum. Dis.* – 2017. – T. 76 – № 1 – 208–213c.
46. Jefferis R. Posttranslational Modifications and the Immunogenicity of Biotherapeutics. / R. Jefferis // *J. Immunol. Res.* – 2016. – T. 2016 – 5358272c.
47. Kalden J.R. Immunogenicity and loss of response to TNF inhibitors: Implications for rheumatoid arthritis treatment / J. R. Kalden, H. Schulze-Koops // *Nat. Rev. Rheumatol.* – 2017. – T. 13 – № 12 – 707–718c.
48. Kaliyaperumal A. Immunogenicity assessment of therapeutic proteins and peptides. / A. Kaliyaperumal, S. Jing // *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2009. – T. 10 – № 4 – 352–8c.
49. Kappos L. Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes. / L. Kappos, C. H. Polman, M. S. Freedman, G. Edan, H. P. Hartung, D. H. Miller, X. Montalban, F. Barkhof, L. Bauer, P. Jakobs, C. Pohl, R. Sandbrink // *Neurology* – 2006. – T. 67 – № 7 – 1242–9c.
50. Kappos L. Long-term subcutaneous interferon beta-1a therapy in patients with relapsing-remitting MS / L. Kappos, A. Traboulsee, C. Constantinescu, J. P. Erlinna, F. Forrestal, P. Jongen, J. Pollard, M. Sandberg-Wollheim, C. Sindic, B. Stubinski, B. Uitdehaag, D. Li // *Neurology* – 2006. – T. 67 – № 6 – 944–953c.
51. Kawade Y. Neutralization of the biological activity of cytokines and other protein effectors by antibody: Theoretical formulation of antibody titration curves in relation to

antibody affinity / Y. Kawade, N. Finter, S. E. Grossberg // *J. Immunol. Methods* – 2003. – T. 278 – № 1–2 – 127–144c.

52. Kempton C.L. How we treat a hemophilia A patient with a factor VIII inhibitor / C. L. Kempton, G. C. White // *Blood* – 2009. – T. 113 – № 1 – 11–17c.

53. Kijanka G., Jiskoot W., Schellekens H. B. V. Effect of treatment regimen on the immunogenicity of human interferon Beta in immune tolerant mice. / B. V. Kijanka G., Jiskoot W., Schellekens H. // *Pharm Res.* – 2013. – T. 30 – № 6 – 1553–60c.

54. Kim J.Y. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: Current state and further potential / J. Y. Kim, Y. G. Kim, G. M. Lee // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2012. – T. 93 – № 3 – 917–930c.

55. Kneepkens E.L. Golimumab trough levels, antidrug antibodies and clinical response in patients with rheumatoid arthritis treated in daily clinical practice. / E. L. Kneepkens, C. Plasencia, C. L. Krieckaert, D. Pascual-Salcedo, D. van der Kleij, M. T. Nurmohamed, M. T. López-Casla, R. Wieringa, T. Rispen, G. Wolbink // *Ann. Rheum. Dis.* – 2014. – T. 73 – № 12 – 2217–9c.

56. Koch-Henriksen N. The Danish National Project of interferon-beta treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis / N. Koch-Henriksen, P. S. Sørensen // *Mult. Scler.* – 2000. – T. 6 – № 3 – 172–175c.

57. Kopylov U. Predicting durable response or resistance to antitumor necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease / U. Kopylov, E. Seidman // *Therap. Adv. Gastroenterol.* – 2016. – T. 9 – № 4 – 513–526c.

58. Kourbeti I.S. Biological therapies of autoimmune diseases. / I. S. Kourbeti, D. T. Boumpas // *Curr. Drug Targets. Inflamm. Allergy* – 2005. – T. 4 – № 1 – 41–6c.

59. Krintel S.B. The frequency of anti-infliximab antibodies in patients with rheumatoid arthritis treated in routine care and the associations with adverse drug reactions and treatment failure / S. B. Krintel, V. P. Grunert, M. L. Hetland, J. S. Johansen, M. Rothfuss, G. Palermo, L. Essioux, U. Klause // *Rheumatol. (United Kingdom)* – 2013. – T. 52 – № 7 – 1245–1253c.

60. Krishna M. Immunogenicity to Biotherapeutics - The Role of Anti-drug Immune Complexes. / M. Krishna, S. G. Nadler // *Front. Immunol.* – 2016. – T. 7 – 21c.

61. Kristensen L.E. The LUNDEX, a new index of drug efficacy in clinical practice: Results of a five-year observational study of treatment with infliximab and etanercept among rheumatoid arthritis patients in Southern Sweden / L. E. Kristensen, T. Saxne, P. Geborek // *Arthritis Rheum.* – 2006. – T. 54 – № 2 – 600–606c.
62. Kuriakose A. Immunogenicity of Biotherapeutics: Causes and Association with Posttranslational Modifications. / A. Kuriakose, N. Chirmule, P. Nair // *J. Immunol. Res.* – 2016. – T. 2016 – 1298473c.
63. Kurtzke J.F. Epidemiology and etiology of multiple sclerosis / J. F. Kurtzke // *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* – 2005. – T. 16 – № 2 – 327–349c.
64. Lallemand C. Reporter gene assay for the quantification of the activity and neutralizing antibody response to TNF $\alpha$  antagonists / C. Lallemand, N. Kavrochorianou, C. Steenholdt, K. Bendtzen, M. A. Ainsworth, J. F. Meritet, B. Blanchard, P. Lebon, P. Taylor, P. Charles, S. Alzabin, M. G. Tovey // *J. Immunol. Methods* – 2011. – T. 373 – № 1–2 – 229–239c.
65. Lilienfeld D.E. The first pharmacoepidemiologic investigations: national drug safety policy in the United States, 1901-1902. / D. E. Lilienfeld // *Perspect. Biol. Med.* – 2008. – T. 51 – № 2 – 188–198c.
66. Lis K. Tumor necrosis factor inhibitors - State of knowledge / K. Lis, O. Kuzawińska, E. Bałkowiec-Iskra // *Arch. Med. Sci.* – 2014. – T. 10 – № 6 – 1175–1185c.
67. Lusher J.M. Inhibitor antibodies to factor VIII and factor IX: Management / J. M. Lusher // *Semin. Thromb. Hemost.* – 2000. – T. 26 – № 2 – 179–188c.
68. Lv Q. The status of rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide antibody are not associated with the effect of anti-TNF $\alpha$  agent treatment in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis. / Q. Lv, Y. Yin, X. Li, G. Shan, X. Wu, D. Liang, Y. Li, X. Zhang // *PLoS One* – 2014. – T. 9 – № 2 – e89442c.
69. Mahanty S. Immunogenicity of infectious pathogens and vaccine antigens / S. Mahanty, A. Prigent, O. Garraud // *BMC Immunol.* – 2015. – T. 16 – № 31 – 1–6c.
70. Marotte H. Circulating tumour necrosis factor- $\alpha$  bioactivity in rheumatoid arthritis patients treated with infliximab: link to clinical response / H. Marotte, W.



- Maslinski, P. Miossec // *Arthritis Res Ther* – 2004. – T. 7 – № 1 – 149–155c.
71. Martinez A. Association of the major histocompatibility complex with response to infliximab therapy in rheumatoid arthritis patients. / A. Martinez, M. Salido, G. Bonilla, D. Pascual-Salcedo, M. Fernandez-Arquero, S. de Miguel, A. Balsa, E. G. de la Concha, B. Fernandez-Gutierrez // *Arthritis Rheum.* – 2004. – T. 50 – № 4 – 1077–82c.
72. Matas E. MxA mRNA expression as a biomarker of interferon beta response in multiple sclerosis patients. / E. Matas, L. Bau, M. Martínez-Iniesta, L. Romero-Pinel, M. A. Mañé-Martínez, Á. Cobo-Calvo, S. Martínez-Yélamos // *J. Neuroimmunol.* – 2016. – T. 291 – 73–7c.
73. Matasci M. Recombinant therapeutic protein production in cultivated mammalian cells: current status and future prospects / M. Matasci, D. L. Hacker, L. Baldi, F. M. Wurm // *Drug Discov. Today Technol.* – 2009. – T. 5 – № 2–3 – 37–42c.
74. Matzinger P. The evolution of the danger theory / P. Matzinger // *Expert Rev. Clin. Immunol.* – 2012. – T. 8 – № 4 – 311–317c.
75. Mazor Y. Adalimumab drug and antibody levels as predictors of clinical and laboratory response in patients with Crohn's disease / Y. Mazor, R. Almog, U. Kopylov, D. Ben Hur, A. Blatt, A. Dahan, M. Waterman, S. Ben-Horin, Y. Chowers // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 2014. – T. 40 – № 6 – 620–628c.
76. Meager A. An assessment of biological potency and molecular characteristics of different innovator and noninnovator interferon-beta products. / A. Meager, C. Dolman, P. Dilger, C. Bird, G. Giovannoni, H. Schellekens, R. Thorpe, M. Wadhwa // *J. Interferon Cytokine Res.* – 2011. – T. 31 – № 4 – 383–392c.
77. Menting S.P. Extent and consequences of antibody formation against adalimumab in patients with psoriasis one-year follow-up / S. P. Menting, P. P. M. Van Lümig, A. C. Q. De Vries, J. M. P. A. Van Den Reek, D. Van Der Kleij, E. M. G. J. De Jong, P. I. Spuls, L. L. A. Lecluse // *JAMA Dermatology* – 2014. – T. 150 – № 2 – 130–136c.
78. Milstein C. The hybridoma revolution: An offshoot of basic research / C. Milstein // *BioEssays* – 1999. – T. 21 – № 11 – 966–973c.
79. Molnár T. Frequency and predictors of loss of response to infliximab or adalimumab in Crohn's disease after one-year treatment period - a single center experience. / T.

Molnár, K. Farkas, T. Nyári, Z. Szepes, F. Nagy, T. Wittmann // *J. Gastrointestin. Liver Dis.* – 2012. – T. 21 – № 3 – 265–9c.

80. Moroncini G., Calogera G., Benfaremo D. G.A. Biologics in Inflammatory Immune-mediated Systemic Diseases. / G. A. Moroncini G., Calogera G., Benfaremo D. // *Curr Pharm Biotechnol.* – 2017. – T. 18 – № 12 – 1008–1016c.

81. Oers M.M. Van Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: From dark horse to mainstream technology / M. M. Van Oers, G. P. Pijlman, J. M. Vlak // *J. Gen. Virol.* – 2015. – T. 96 – № 1 – 6–23c.

82. Ordás I. Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms. / I. Ordás, D. R. Mould, B. G. Feagan, W. J. Sandborn // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2012. – T. 91 – № 4 – 635–46c.

83. Panaccione R. Optimal use of biologics in the management of Crohn's disease / R. Panaccione, S. Ghosh // *Therap. Adv. Gastroenterol.* – 2010. - T.3 - №3 - 179-189c.

84. Parenky A. New FDA draft guidance on immunogenicity. / A. Parenky, H. Myler, L. Amaravadi, K. Bechtold-Peters, A. Rosenberg, S. Kirshner, V. Quarmby // *AAPS J.* – 2014. – T. 16 – № 3 – 499–503c.

85. Plasencia C. Effect of Infliximab Dose Increase in Rheumatoid Arthritis at Different Trough Concentrations: A Cohort Study in Clinical Practice Conditions. / C. Plasencia, T. Jurado, A. Villalba, D. Peitedado, M. T. L. Casla, L. Nuño, M. G. Bonilla, A. Martínez-Feito, E. Martín-Mola, D. Pascual-Salcedo, A. Balsa // *Front. Med.* – 2015. – T. 2 – 71c.

86. Polman C.H. Recommendations for clinical use of data on neutralising antibodies to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. / C. H. Polman, A. Bertolotto, F. Deisenhammer, G. Giovannoni, H.-P. Hartung, B. Hemmer, J. Killestein, H. F. McFarland, J. Oger, A. R. Pachner, J. Petkau, A. T. Reder, S. C. Reingold, H. Schellekens, P. S. Sørensen // *Lancet. Neurol.* – 2010. – T. 9 – № 7 – 740–50c.

87. Polman C.H. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. / C. H. Polman, P. W. O'Connor, E. Havrdova, M. Hutchinson, L. Kappos, D. H. Miller, J. T. Phillips, F. D. Lublin, G. Giovannoni, A. Wajgt, M. Toal, F. Lynn, M. A. Panzara, A. W. Sandroch, AFFIRM Investigators // *N. Engl. J. Med.* –

2006. – T. 354 – № 9 – 899–910c.

88. Prabhakar S.S. Antibodies to recombinant human erythropoietin causing pure red cell aplasia / S. S. Prabhakar, T. Muhlfelder // *Clin Nephrol* – 1997. – T. 47 – № 5 – 331–335c.

89. Radstake T.R.D.J. Formation of antibodies against infliximab and adalimumab strongly correlates with functional drug levels and clinical responses in rheumatoid arthritis / T. R. D. J. Radstake, M. Svenson, A. M. Eijsbouts, F. H. J. Van Den Hoogen, C. Enevold, P. L. C. M. Van Riel, K. Bendtzen // *Ann. Rheum. Dis.* – 2009. – T. 68 – № 11 – 1739–1745c.

90. Rahman M.U. Double-blinded infliximab dose escalation in patients with rheumatoid arthritis / M. U. Rahman, I. Strusberg, P. Geusens, A. Berman, D. Yocum, D. Baker, C. Wagner, J. Han, R. Westhovens // *Ann. Rheum. Dis.* – 2007. – T. 66 – № 9 – 1233–1238c.

91. Reichert J.M. Marketed therapeutic antibodies compendium / J. M. Reichert // *MAbs* – 2012. – T. 4 – № 3 – 413–415c.

92. Roda G. Loss of Response to Anti-TNFs: Definition, Epidemiology, and Management / G. Roda, B. Jharap, N. Neeraj, J. F. Colombel // *Clin Transl Gastroenterol* – 2016. – T. 7 – e135c.

93. Rojas J.R. Formation, Distribution, and Elimination of Infliximab and Anti-Infliximab Immune Complexes in Cynomolgus Monkeys / J. R. Rojas // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2004. – T. 313 – № 2 – 578–585c.

94. Rosman Z. Biologic therapy for autoimmune diseases: An update / Z. Rosman, Y. Shoenfeld, G. Zandman-Goddard // *BMC Med.* – 2013. – T. 11 – № 88.

95. Ross C. Measuring and evaluating interferon b-induced antibodies in patients with multiple sclerosis / C. Ross, K. M. Clemmesen, P. S. Sorensen, N. Koch-Henriksen, K. Bendtzen // *Mult. Scler.* – 2006. – T. 12 – № 1 – 39–46c.

96. Rudick R.A. Natalizumab plus Interferon Beta-1a for Relapsing Multiple Sclerosis / R. A. Rudick, W. H. Stuart, P. A. Calabresi, C. Confavreux, S. L. Galetta, E.-W. Radue, F. D. Lublin, B. Weinstock-Guttman, D. R. Wynn, F. Lynn, M. A. Panzara, A. W. Sandrock // *N. Engl. J. Med.* – 2006. – T. 354 – № 9 – 911–923c.

97. Runkel L. Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon-beta (IFN-beta). // *Pharm. Res.* – 1998. – T. 15. – № 4. – 641–649c.
98. Schellekens H. Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals. / H. Schellekens // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2002. – T. 1 – № 6 – 457–62c.
99. Schie K.A. van The antibody response against human and chimeric anti-TNF therapeutic antibodies primarily targets the TNF binding region. / K. A. van Schie, M. H. Hart, E. R. de Groot, S. Kruithof, L. A. Aarden, G. J. Wolbink, T. Rispens // *Ann. Rheum. Dis.* – 2015. – T. 74 – № 1 – 311–4c.
100. Schiestl M. A biosimilar industry view on the implementation of the WHO guidelines on evaluating similar biotherapeutic products / M. Schiestl // *Biologicals* – 2011. – T. 39 – № 5 – 297–299c.
101. Schouwenburg P.A. van Adalimumab elicits a restricted anti-idiotypic antibody response in autoimmune patients resulting in functional neutralisation. / P. A. van Schouwenburg, L. A. van de Stadt, R. N. de Jong, E. E. L. van Buren, S. Kruithof, E. de Groot, M. Hart, S. M. van Ham, T. Rispens, L. Aarden, G. J. Wolbink, D. Wouters // *Ann. Rheum. Dis.* – 2013. – T. 72 – № 1 – 104–109c.
102. Scott D.L. Biologics-based therapy for the treatment of rheumatoid arthritis / D.L.Scott // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2012. – T.91 – №1 – 30-43c.
103. Scott L.J. Etanercept: a review of its use in autoimmune inflammatory diseases / L. J. Scott // *Drugs* – 2014. – T. 74 – № 12 – 1379–1410c.
104. Seidl A. Tungsten-induced denaturation and aggregation of epoetin alfa during primary packaging as a cause of immunogenicity / A. Seidl, O. Hainzl, M. Richter, R. Fischer, S. Böhm, B. Deutel, M. Hartinger, J. Windisch, N. Casadevall, G. M. London, I. Macdougall // *Pharm. Res.* – 2012. – T. 29 – № 6 – 1454–1467c.
105. Serana F. MxA mRNA quantification and disability progression in interferon beta-treated multiple sclerosis patients / F. Serana, L. Imberti, M. P. Amato, G. Comi, C. Gasperini, A. Ghezzi, V. Martinelli, L. Provinciali, M. R. Rottoli, S. Sotgiu, S. Stecchi, M. Vecchio, M. Zaffaroni, C. Cordioli, R. Capra // *PLoS One* – 2014. – T. 9 – № 4 – e94794c.

106. Shankar G. Assessment and reporting of the clinical immunogenicity of therapeutic proteins and peptides-harmonized terminology and tactical recommendations. / G. Shankar, S. Arkin, L. Cocea, V. Devanarayan, S. Kirshner, A. Kromminga, V. Quarmby, S. Richards, C. K. Schneider, M. Subramanyam, S. Swanson, D. Verthelyi, S. Yim, American Association of Pharmaceutical Scientists // *AAPS J.* – 2014. – T. 16 – № 4 – 658–73c.
107. Shankar G. Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products / G. Shankar, V. Devanarayan, L. Amaravadi, Y. C. Barrett, R. Bowsher, D. Finco-Kent, M. Fiscella, B. Gorovits, S. Kirschner, M. Moxness, T. Parish, V. Quarmby, H. Smith, W. Smith, L. A. Zuckerman, E. Koren // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2008. – T. 48 – № 5 – 1267–1281c.
108. Silva-Ferreira F. A Systematic Review on Infliximab and Adalimumab Drug Monitoring: Levels, Clinical Outcomes and Assays / F. Silva-Ferreira, J. Afonso, P. Pinto-Lopes, F. Magro // *Inflamm. Bowel Dis.* – 2016. – T. 20 – № 10 – 1722–1728.c.
109. Smolen J.S. Infliximab: 12 years of experience / J. S. Smolen, P. Emery // *Arthritis Res. Ther.* – 2011. – T. 13 – № 1 – 2c.
110. Smolen J.S. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs / J. S. Smolen, R. Landewé, F. C. Breedveld, M. Dougados, P. Emery, C. Gaujoux-Viala, S. Gorter, R. Knevel, J. Nam, M. Schoels, D. Aletaha, M. Buch, L. Gossec, T. Huizinga, J. W. J. W. Bijlsma, G. Burmester, B. Combe, M. Cutolo, C. Gabay, J. Gomez-Reino, M. Kouloumas, T. K. Kvien, E. Martin-Mola, I. McInnes, K. Pavelka, P. Van Riel, M. Scholte, D. L. Scott, T. Sokka, G. Valesini, R. Van Vollenhoven, K. L. Winthrop, J. Wong, A. Zink, D. Van Der Heijde // *Ann. Rheum. Dis.* – 2010. – T. 70 – №8 – 1519c.
111. Stein A.C. Incidence and predictors of clinical response, re-induction dose, and maintenance dose escalation with certolizumab pegol in Crohn's disease / A. C. Stein, D. T. Rubin, S. B. Hanauer, R. D. Cohen // *Inflamm. Bowel Dis.* – 2014. – T. 20 – № 10 – 1722–1728c.
112. Tatarewicz S.M. Strategic characterization of anti-drug antibody responses for the assessment of clinical relevance and impact. / S. M. Tatarewicz, D. T. Mytych, M. S.

Manning, S. J. Swanson, M. S. Moxness, N. Chirmule // *Bioanalysis* – 2014. – T. 6 – № 11 – 1509–23c.

113. Ternant D. Infliximab pharmacokinetics in inflammatory bowel disease patients / D. Ternant, A. Aubourg, C. Magdelaine-Beuzelin, D. Degenne, H. Watier, L. Picon, G. Paintaud // *Ther. Drug Monit.* – 2008. – T. 30 – № 4 – 523–529c.

114. Thorpe R. Current methods for detecting antibodies against erythropoietin and other recombinant proteins. / R. Thorpe, S. J. Swanson // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 2005. – T. 12 – № 1 – 28–39c.

115. Vecchio I. The Discovery of Insulin: An Important Milestone in the History of Medicine. / I. Vecchio, C. Tornali, N. L. Bragazzi, M. Martini // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. – 2018. – T. 9 – 613c.

116. Vennegoor A. Clinical relevance of serum natalizumab concentration and anti-natalizumab antibodies in multiple sclerosis / A. Vennegoor, T. Rispens, E. M. M. Strijbis, A. Seewann, B. M. J. Uitdehaag, L. J. Balk, F. Barkhof, C. H. Polman, G. Wolbink, J. Killestein // *Mult. Scler. J.* – 2013. – T. 19 – № 5 – 593–600c.

117. Wadhwa M. Immunogenicity assessment of biotherapeutic products: An overview of assays and their utility. / M. Wadhwa, I. Knezevic, H.-N. Kang, R. Thorpe // *Biologicals* – 2015. – T. 43 – № 5 – 298–306c.

118. Walker R.S.K. Applications of yeast synthetic biology geared towards the production of biopharmaceuticals / R. S. K. Walker, I. S. Pretorius // *Genes (Basel)*. – 2018. – T. 9 – № 7 – 340c.

119. Wiens A. Meta-analysis of the efficacy and safety of adalimumab, etanercept, and infliximab for the treatment of rheumatoid arthritis / A. Wiens, R. Venson, C. J. Correr, M. F. Otuki, R. Pontarolo // *Pharmacotherapy* – 2010. – T. 30 – № 4 – 339–353c.

120. Wilson R.M. Immunogenicity of highly purified bovine insulin: a comparison with conventional bovine and highly purified human insulins / R. M. Wilson, C. A. Douglas, R. B. Tattersall, W. G. Reeves // *Diabetologia* – 1985. – T. 28 – № 9 – 667–670c.