

На правах рукописи

НАЗАРОВ
Владимир Дмитриевич

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

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург - 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России

Научный руководитель:

Эмануэль Владимир Леонидович – доктор медицинских наук профессор

Официальные оппоненты:

Мазуров Вадим Иванович - доктор медицинских наук, профессор, академик Российской академии наук, заслуженный деятель науки РФ, ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра терапии и ревматологии им. Э.Э. Эйхвальда, заведующий;

Назаров Петр Григорьевич – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», отдел иммунологии, руководитель.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М.Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Защита состоится « 4 » июня 2019 г. в 15 часов на заседании диссертационного совета Д 205.001.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России (194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д.4/2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197374, Санкт-Петербург, ул. Оптиков д. 54 и на сайте <https://nrserm.ru>.

Автореферат разослан «_____» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат медицинских наук

Санников Максим Валерьевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность 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 [Алпатова Н.А., 2014]. 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 [Kourbeti I. et al., 2006]. 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 [Алпатова Н.А., 2014]. 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 [Wadhwa M. et al., 2015]. 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 [Kuriakose A. et al., 2016].

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 [Tatarewicz S.M. et al., 2014]. 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 [Parenky A. et al., 2014; Agency E.M. et al., 2015]. В клинической практике выявление повышенной иммуногенности позволяет своевременно установить причину снижения терапевтической эффективности лекарства, оптимизировать назначение дорогостоящих биопрепаратов и индивидуализировать терапию.

Все методы, использующиеся 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 научной 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 болезнью-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 [Arnason V.G.W. et al., 2005]. 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) [Govindappa K. Et al., 2015].

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, распространенность 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 [Krintel S.V. et al., 2013]. 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 α) адалимумабом (АДА) частота образования антител к 24 месяцу терапии достигает 49 % процентов [Menting S.P. et al., 2014]. 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 ИНФ-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 α (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 ее фармакокинетических свойств, 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 клиничко-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- β » 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 НМИЦ по молекулярной медицине ПСПбГМУ имени академика И.П.Павлова при мониторинге 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 по специальности 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).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Пациенты и методы исследования

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 (РА), 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.

В исследовании распространенности САТ и НАТ к препаратам ИФН-бета у пациентов с РС участвовали 33 больных, наблюдающихся в Санкт-Петербургском Городском центре рассеянного склероза и аутоиммунных заболеваний более года.

В исследовании распространенности САТ к рЭПО участвовали 37 пациентов с ХБП 5 стадии, проходящих диализное лечение на базе научно-исследовательского института нефрологии ПСПбГМУ имени акад. И.П. Павлова. 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-бета. 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 вошли здоровые доноры, никогда не получавшие препараты рЭПО ($n=35$).

В исследовании участвовали 81 пациент, принимавшие ГИБП в городском антицитотоксическом центре Санкт-Петербурга более 1 года.

У всех пациентов в течение 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) $n=17$. В группе П-ТОЦ 8 пациентов получали комбинированную с метотрексатом терапию ТОЦ, а 9 пациентов получали монотерапию ТОЦ. В группе П-АДА все пациенты получали монотерапию АДА. В группе П-ИНФЛ 28 пациентов получали комбинированную с метотрексатом терапию ИНФЛ, а 20 пациентов – монотерапию ИНФЛ.

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 в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), в течение 6 часов. После этого, несвязывавшийся ГИБП

отмывался в ФСБ, и мембрана блокировалась в буфере, содержащем 1% Tween 20 и 0,5% альбумина человека, что препятствовало неспецифическому связыванию антител. После этого на поверхность влажной мембраны наносились сыворотки пациентов. После 2 часов инкубации и связывания САТ с целевым антигеном проводилась очистка мембран в ФСБ от белков сыворотки. Для определения наличия связавшихся с ГИБП САТ к мембране добавлялись анти-Fc античеловеческие антитела с щелочной фосфатазой (Life Technologies, США). После инкубации в течение 1 часа и отмывки несвязавшихся антител с помощью ФСБ проводилась окраска 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.

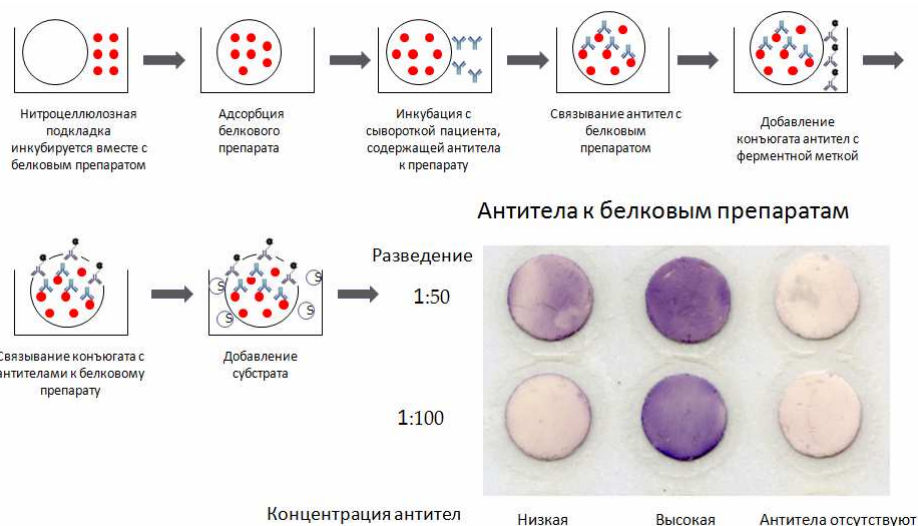


Рисунок 1. Этапы детекции связывающих антител с помощью дот-блота.

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 ($y=0,0115e0,0554x$)).

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.

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 интерфероновой ответа IRE. Для установки аналитических характеристик тест-системы использовались сыворотки из группы верификации. Все расчеты проводились на основе метода, предложенного Kawade [Kawade Y. et al., 2003].

Клеточная линия HL-116 представляет собой модифицированную линию фибросаркомы человека HT-1080 (ATCC). Связывание ИФН-бета с рецептором на

поверхности клеток вызывает активацию промотора IRE, транскрипцию мРНК гена люциферазы и синтез белка люциферазы.

Клеточная линия HL-116 выращивалась в стандартных условиях при +37 °C и 5% CO₂ 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 см² планшетах и по достижению монослоя пересевалась в 96-луночный планшет с адгезивным покрытием для клеточных культур («Thermo Scientific», США). Культивация в планшете проводилась еще 1 сутки в тех же условиях среды, что и в той же питательной среде.

Первично, для точного исследования титра НАТ требовался расчет концентрации ИНФ-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 ИНФ-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 лизирующим раствором и проводили исследование люминесцентного сигнала с помощью люминометра серии LM-01T («Immunotech», Чехия) с программным обеспечением LIANA. После проведения измерений строилась кривая разведения ИНФ-бета-1а, на которой на оси абсцисс находился логарифм детектируемого сигнала (имп/с), а на оси ординат – логарифм разведений ИНФ-бета-1а.

После построения кривой с помощью уравнения полиномиальной регрессии была рассчитана 1 ЛЕ/мл препарата ИНФ-бета-1а, которая равнялась 50% люминесцентного сигнала на кривой.

После построения кривой разведения и расчета 1 ЛЕ/мл ИНФ-бета-1а проводилось определение НАТ к препаратам ИНФ-бета. Первично проводился скрининг на наличие НАТ. Для этого исследуемые сыворотки инкубировались в разведении 1:10 в течение 1 часа со стандартным препаратом ИНФ-бета-1а в концентрации 10 ЛЕ/мл, которая вычислялась с помощью стандартной кривой, построенной ранее. После этого проводилась инкубация раствора исследуемой сыворотки с ИНФ-бета-1а в 96-луночном планшете с клеточной линией HL-116. Исследование люминесценции проводилось по описанному ранее протоколу. После этого 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). Для этого с клеточной линией в каждой постановке дополнительно инкубировались разведения ИНФ-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 ИНФ-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 ИНФ-бета не достигала титра 1:10, то образец считался отрицательным на НАТ. Если титр НАТ был больше 1:10, то дополнительно проводилось подтверждение реакции путем разведение сыворотки от 1:20 до 1:2560. Расчет конечного титра проводился путем сопоставления стандартной кривой и разведения ИНФ-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 включен ряд лабораторных аналитических характеристик: воспроизводимость, интерференция другими антителами, аналитическая точность, диапазон измерений и граница нормы.

В собранной 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).

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 (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).

Измерение концентрации ИНФЛ и АДА 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 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; 10; 1 мгк/мл инкубировались с положительными контролями на наличие антител к соответствующим препаратам. После этого образцы были исследованы на наличие антител методом ИФА.

Все статистические расчеты проводились с использованием программы Graphpad Prism 6.0. Уровень значимости (p) проводимого статистического анализа для всех тестов был равен 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

Для клинического использования технологии выявления НАТ к препаратам ИФН-бета, измеряемых с помощью гена-репортера люциферазы в клеточной линии HL-116, в образцах сыворотки крови была проведена верификация, в протокол которой были включены результаты исследования воспроизводимости метода, его аналитической

точности, диапазон измерений, интерференция другими антителами и граница нормы (таблица 1).

Таблица 1

Результаты верификации тест системы на клеточной линии HL-116 для определения нейтрализующих антител к препаратам интерферона-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

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

Наблюдается высокая зависимость между значениями скорости счета калибровочных стандартов антител против ИФН и их концентрацией. 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 (DMEM без сыворотки) позволяет определить предел детекции равный 1,056 единицы титра Kawade.

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

Определение референтного уровня 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 включена 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 методом 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 табл. 2.

Таблица 2

Нейтрализация связывающихся антител к препаратам интерферона-бета избытком антигена

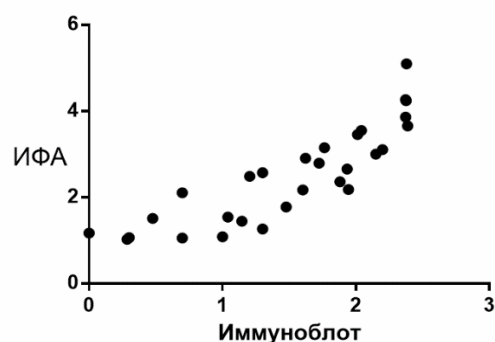
Концентрация препарата в буфере для инкубации	Контроль «-»	Образец 1	Образец 2	Образец 3
«-» ИФН-бета	1,17 ОП	105 ОП	98 ОП	58 ОП
1 мкг/мл ИФН-бета	1,44 ОП	90 ОП	90 ОП	58 ОП
10 мкг/мл ИФН-бета	1,09 ОП	58 ОП	20 ОП	37 ОП
100 мкг/мл ИФН-бета	1,23 ОП	30 ОП	3,9 ОП	6 ОП

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.

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. Повышенная концентрация САТ, 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 2.



ИФА- иммуноферментный анализ.

Рисунок 2. Корреляция значений концентрации связывающих антител, измеренных методами 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 у 11 из 33 образцов (33,3%).

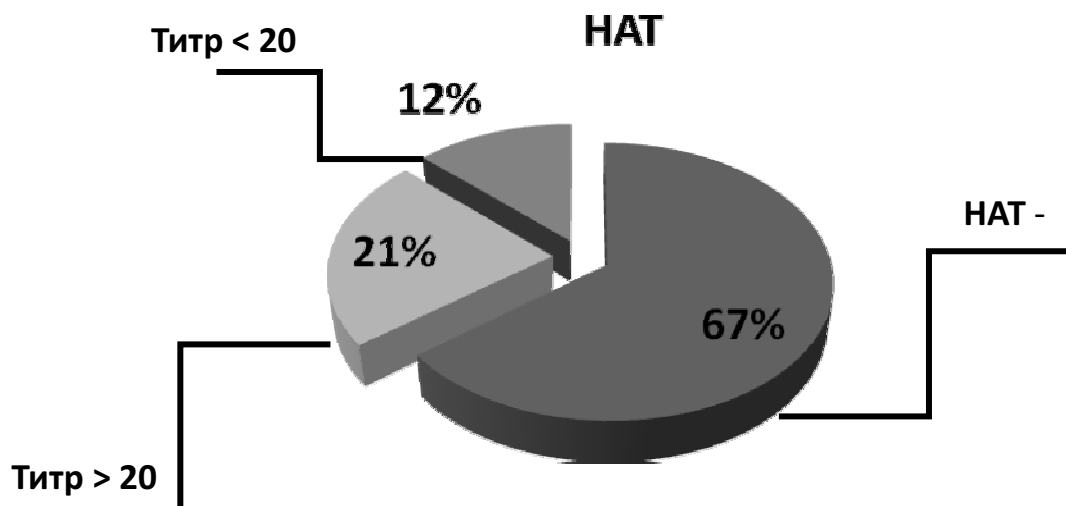
У пациентов, которые были положительные на НАТ после скрининга, проводилось исследование точного титра НАТ. Так, из 11 обследованных пациентов у 7 были обнаружены клинически значимые титры НАТ (более 20 МЕ/мл). При этом у 4 пациентов титр НАТ был более 100 МЕ/мл. Данные приведены в таблице 3 и на рисунке 3.

Таблица 3

Результаты измерения конечных титров нейтрализующих антител 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	2,84-
2067	2,111	6.576	1,015
1699	7,972	6.576	4,593

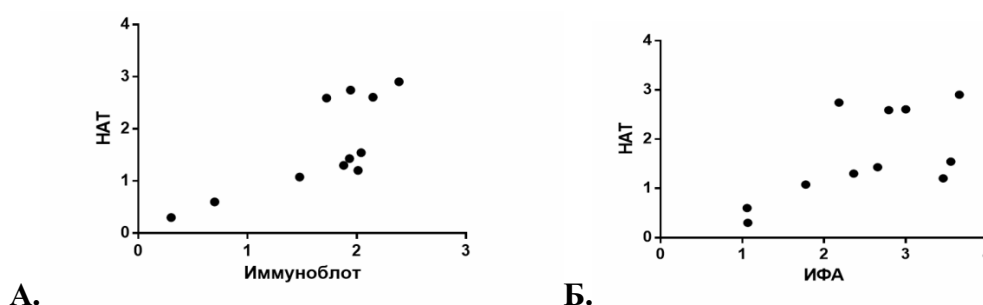
Примечание: НАТ-нейтрализующие антитела



Примечание: НАТ-нейтрализующие антитела, ИФН-бета – интерферон-бета.

Рисунок 3. Распространенность нейтрализующих антител к препаратам интерферона-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 пропорционально 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 рисунке 4 А и Б.



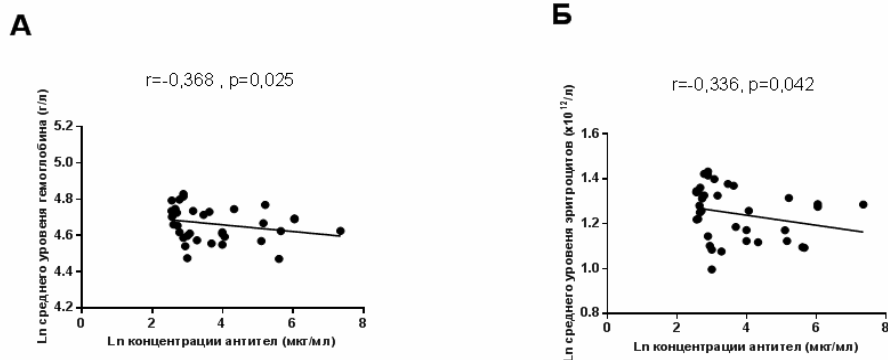
Примечание: САТ - связывающиеся антитела; НАТ - нейтрализующие антитела.

Рисунок 4. А. Корреляция значений нейтрализующих антител (на оси абсцисс - ЛЕ/мл) и связывающихся антител, измеренных методом дот-блота (на оси ординат - ОП) ($r=0.7909$, $p= 0.0055$). Б. Корреляция значений нейтрализующих антител (на оси абсцисс - ЛЕ/мл) и связывающихся антител, измеренных методом иммуноферментного анализа (на оси ординат - пг/мл) ($r=0.6636$, $p=0.0306$).

У всех пациентов, имеющих клинически значимые титры НАТ, были обнаружены САТ, измеренные как методом дот-блота, так и ИФА.

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

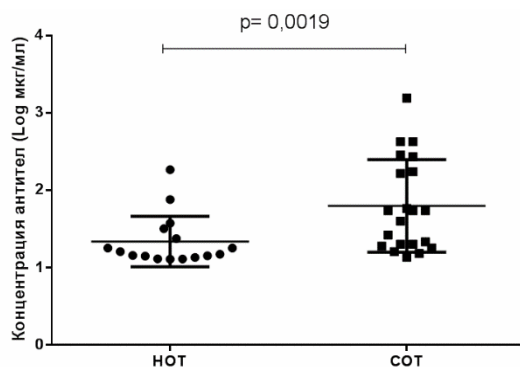
Распространённость САТ к препаратам рЭПО в группе из 37 пациентов с ХБП составила 54,05% (20 пациентов). Кроме этого, была показана обратно пропорциональная связь между концентрацией САТ и уровнем гемоглобина за 12 месяцев ($r=-0,368$, $p=0,025$) и эритроцитов за 12 месяцев ($r=-0,336$, $p=0,042$). Данные изображены на рисунке 5.



Примечание: рЭПО – рекомбинантный эритропоэтин; Lp – натуральный логарифм

Рисунок 5. Взаимосвязи концентрации антител к рекомбинантному эритропоэтину, 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 были сопоставимы в обеих группах. Данные изображены на рисунке 6.



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

Рисунок 6. Концентрация антител к препаратам рекомбинантного эритропоэтина у пациентов группы со сниженным и нормальным ответом на терапию.

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

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

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

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 4.

Таблица 4

Реакция нейтрализации для препаратов инфликсимаба, адалимумаба и тоцилизумаба.

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

У пациентов в группе П-ИНФЛ распространённость антител на 24 неделе терапии составила 45%, а на 72 неделе – 52,5%. Данные приведены на рисунке 7.

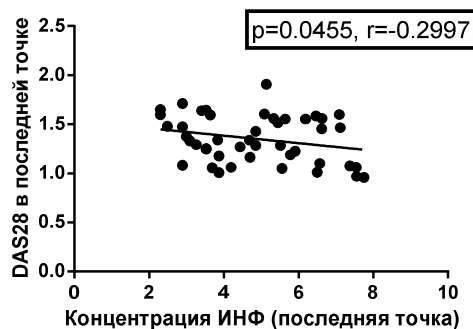


Примечание: ИНФЛ-инфликсимаб.

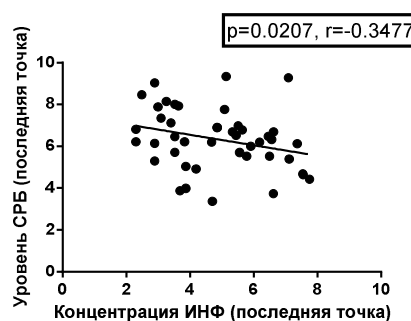
Рисунок 7. Распространённость антител к инфликсимабу на 24 недели и на 72 недели

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, анти-ИНФЛ и лабораторными, клиническими показателями пациентов: 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, ревматоидного фактора 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 ($r = -0.3356$, $p = 0,0242$). Данные приведены на рисунке 8. Со всеми остальными показателями статистически значимой корреляции анти-ИНФЛ получено не было.

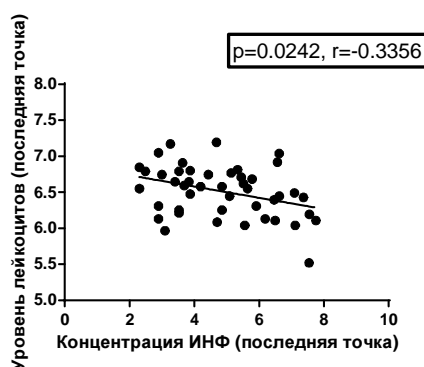


А.



Б.

Продолжение рисунка 8.

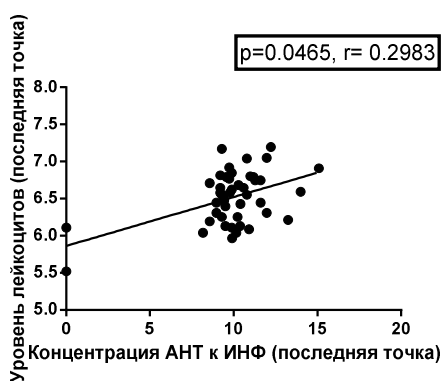


В.

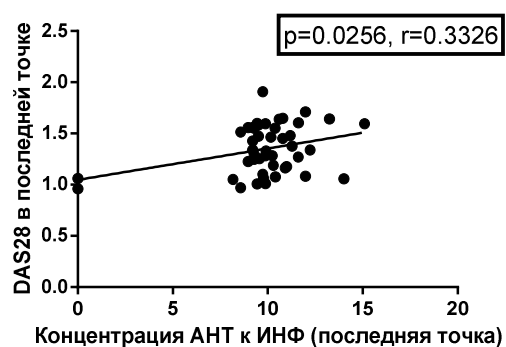
Примечание: ИНФЛ-инфликсимаб; DAS28-disease activity score 28; СРБ-С-реактивный белок.
Рисунок 8. А. Корреляция уровня инфликсимаба в последней точке исследования и уровня DAS28. Б. Корреляция уровня инфликсимаба в последней точке исследования и уровня С-реактивного белка. В. Корреляция уровня инфликсимаба в последней точке исследования и уровня лейкоцитов

Полученные результаты указывают, что повышенная концентрация доступного препарата ИНФЛ в сыворотке крови пациентов является маркером хорошего ответа на проводимую терапию у пациентов с РА.

Дополнительно была обнаружена прямая корреляция уровня анти-ИНФЛ с уровнем DAS28 в последней точке исследования ($r=0.3326, p=0,0256$) и с уровнем лейкоцитов ($r=0.2983, p=0,0465$). Также была показана обратная корреляция уровня анти-ИНФЛ в последней точке и концентрации ИНФЛ в последней точке ($r= -0.4732, p=0,0009$). Данные изображены на рисунке 9. Со всеми остальными показателями статистически значимой корреляции уровня анти-ИНФЛ получено не было.

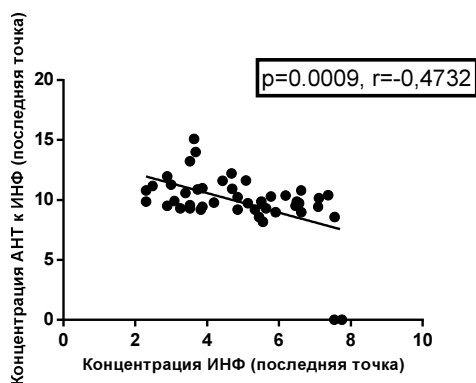


А.



Б.

Продолжение рисунка 9.

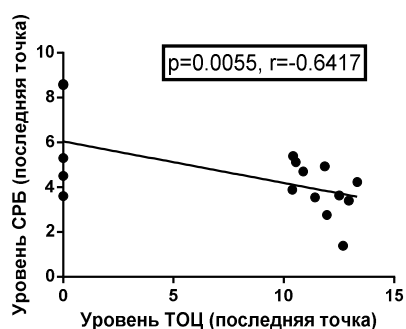


В.

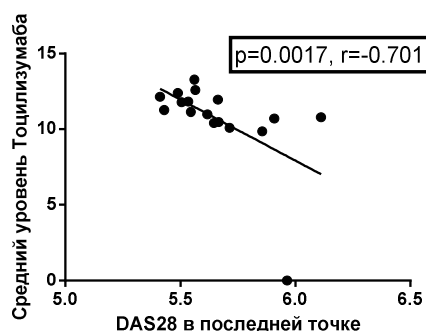
Примечание: ИНФЛ-инфликсимаб; АНТ-антитела; DAS28-disease activity score 28.
Рисунок 9. Корреляция антител к инфликсимабу и уровня DAS28 (А), уровня лейкоцитов (Б) и концентрации препарата (В).

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

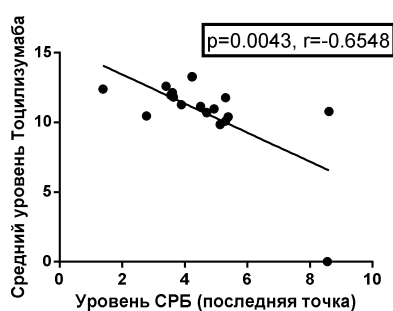
В группе П-ТОЦ была обнаружена обратная корреляция уровня ТОЦ в последней точке исследования и уровня СРБ ($r = -0.6417$, $p = 0,0055$). Была также показана обратная корреляция среднего уровня ТОЦ за все время исследования и уровнем DAS28 в последней точке ($r = -0.701$, $p = 0,0017$) и уровнем СРБ ($r = -0.6548$, $p = 0,0043$). Со всем остальными показателями статистически значимой корреляции уровня анти-ТОЦ и ТОЦ получено не было. Результаты приведены на рисунках 10.



А.



Б.

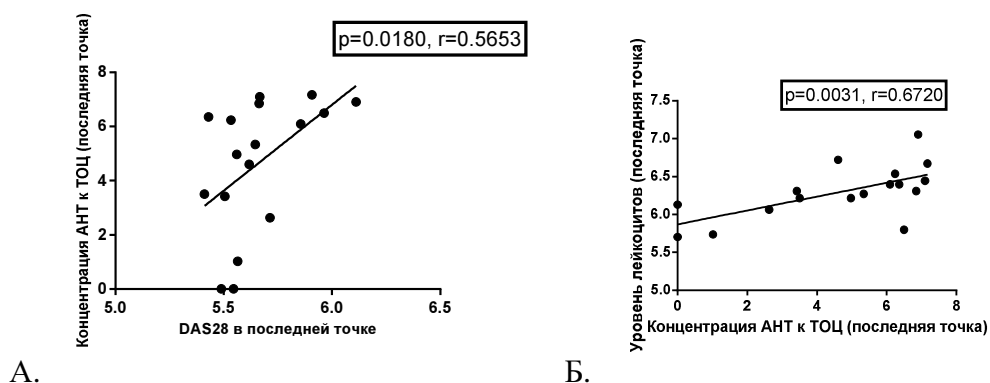


В.

Примечание: ТОЦ-тоцилизумаб; СРБ-С-реактивный белок; DAS28-disease activity score 28;
Рисунок 10. А. Корреляция уровня тоцилизумаба в последней точке и уровня С-реактивного белка. Б. Корреляция среднего уровня тоцилизумаба и уровня DAS28. В. Корреляция среднего уровня тоцилизумаба и уровня С-реактивного белка

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 ($r=0.6720$, $p=0,0031$). Данные приведены на рисунке 11.



Примечание: АНТ-антитела; ТОЦ-тоцилизумаб; DAS28-disease activity score 28.

Рисунок 11. Корреляция антител к тоцилизумабу и DAS28 (А) и уровня лейкоцитов (Б)

Полученные данные указывают, что синтезирующиеся против ТОЦ антитела не только ингибируют противовоспалительную активность препарата, но и снижают его 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, концентрацией ТОЦ и ИНФЛ у пациентов, находящихся на монотерапии ГИБП и комбинированной с метотрексатом терапии.

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 эритропозтина 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 эритропозтина 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 эритропозтина, при снижении концентрации среднегодового уровня гемоглобина менее 110 г/л рекомендуется проведение скрининга на наличие связывающих антител к рекомбинантным формам эритропозтина для подтверждения этиологии резистентности к препаратам индукторам гемопоэза.

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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ для опубликования основных результатов диссертационных исследований по специальности диссертации:

1. Назаров В.Д. Диагностическая информативность показателей интрацеребрального синтеза свободных легких цепей иммуноглобулинов при рассеянном склерозе / Назаров В.Д., Лапин С.В., Суркова Е.А., Евдошенко Е.П., Макшаков Г.С., Тотолян А.А. // *Медицинская иммунология*. – 2015. – №3(17). – Стр. 235-244.
2. Назаров В.Д. Методы определения связывающих и нейтрализующих антител к препаратам интерферона-бета / Назаров В.Д., Лапин С.В., Суркова Е.А., Макшаков Г.С., Мазинг А.В., Евдошенко Е.П., Тотолян А.А. // *Клиническая лабораторная диагностика*. - 2016. - №10(61). – С. 710-714.
3. Назаров В.Д. Циркулирующие антитела к эритропоэтину связаны со снижением эффективности лечения анемии рекомбинатными эритропоэтинами у пациентов на гемодиализе / Назаров В.Д., Лапин С.В., Добронравов В.А., Смирнов К.А., Майер Д.А., Мужецкая Т.О., Тотолян А.А. // *Медицинская иммунология*. - 2018. - №1(20). С. 129-134.

Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень SCOPUS и Web of Science:

4. Назаров В.Д. Проблема иммуногенности генно-инженерных лекарственных препаратов интерферона-бета / Назаров В.Д., Лапин С.В., Мазинг А.В., Евдошенко Е.П., Тотолян А.А. // *Биохимия*. – 2016. - №11(81). - С. 1658 – 1664.
5. Назаров В.Д. Роль определения свободных легких цепей иммуноглобулинов в диагностике дебюта рассеянного склероза / Назаров В.Д., Макшаков Г.С., Мазинг А.В., Суркова Е.А., Краснов В.С., Шумилина М.В., Тотолян Н.А., Евдошенко Е.П., Лапин С.В., Эмануэль В.Л., Скоромец А.А. // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски*. - 2017. - №2(117). - С.60-65.
6. Макшаков Г.С. Связь интрацеребральной продукции свободных легких цепей иммуноглобулинов с прогрессированием рассеянного склероза / Макшаков Г.С., Назаров В.Д., Тотолян Н.А., Лапин С.В., Мазинг А.В., Эмануэль В.Л., Краснов В.С., Шумилина М.В., Скоромец А.А., Евдошенко Е.П. // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски*. - 2017. - №10(117). С. 4-10.
7. Vimentin as antigenic target in autoimmunity: A comprehensive review / Aram Musaelyana, Sergey Lapina, Vladimir Nazarova, Olga Tkachenkoa, Boris Gilburdb,c,Alexandra Mazinga, Lilia Mikhailovad, Yehuda Shoenfeld // *Autoimmunity Reviews*. - 2018. - №9. - P. 926-934.
8. Concentrations of immunoglobulin free light chains in cerebrospinal fluid predict increased level of brain atrophy in multiple sclerosis / Vladimir Nazarov, Gleb Makshakov, Ivan Kalinin, Sergey Lapin, Elena Surkova, Liya Mikhailova, Boris Gilburd, Alexander Skoromets, Evgeniy Evdoshenko // *Immunology research*. - 2019. doi: 10.1007/s12026-018-9058-8.
9. Diagnostic and Prognostic Value of the Cerebrospinal Fluid Concentration of Immunoglobulin Free Light Chains in Clinically Isolated Syndrome with Conversion to Multiple Sclerosis / Makshakov G, Nazarov V, Kochetova O, Surkova E, Lapin S, Evdoshenko E // *PLoS One*. - 2015. - №11. doi:10.1371/journal.pone.0143375.
10. Neurofilament light chain and oligoclonal bands are prognostic biomarkers in radiologically isolated syndrome / Matute-Blanch C, Villar LM, Álvarez-Cermeño JC, Rejdak K, Evdoshenko E, Makshakov G, Nazarov V, Lapin S, Midaglia L, Vidal-Jordana A, Drulovic J,

García-Merino A, Sánchez-López AJ, Havrdova E, Saiz A, Llufriu S, Alvarez-Lafuente R, Schroeder I, Zettl UK, Galimberti D, Ramió-Torrentà L, Robles R, Quintana E, Hegen H, Deisenhammer F, Ríos J, Tintoré M, Sánchez A, Montalban X, Comabella M. // Brain. - 2018. - №4. - P.1085-1093.

Другие статьи и публикации:

11. The Role of Assay of Free Immunoglobulin Light Chains in the Diagnosis of the Onset of Multiple Sclerosis / V. D. Nazarov, G. S. Makshakov, A. V. Mazing, E. A. Surkova, V. S. Krasnov, M. V. Shumilina, N. A. Totolyan, E. P. Evdoshenko, S. V. Lapin, V. L. Emanuel', A. A. Skoromets // Neuroscience and Behavioral Physiology. - 2018. - №6(48). – P.680-685.

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 (мышьиные, 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

РРРС – 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