

Тест-система для определения наличия связывающих антител к интерферону бета-1а для клинического применения

Е. А. Кузьмина, Т. Ю. Остроухова, А. В. Грачев, Е. Л. Морозова

Закрытое акционерное общество «БИОКАД», п. Любучаны, Чеховский район, Московская обл., Россия

Поступила 01.06.2016. Принята к публикации 18.08.2016.

Разработана тест-система для определения наличия связывающих антител к интерферону бета 1а (САт к ИФН бета-1а) в сыворотке крови человека с использованием метода твердофазного иммуноферментного анализа. С целью описания характеристик тест-системы проведены валидационные мероприятия, включающие исследование чувствительности, селективности, специфичности, прецизионности и точности, робастности, стабильности, пригодности тест-системы. Показана применимость данной тест-системы для использования в рамках клинических исследований – оценка иммуногенности препаратов интерферона бета-1а (пегилированных и непегилированных форм).

Ключевые слова: интерферон бета 1а; иммуногенность; твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА); связывающие антитела (САт); антитела к препарату; рассеянный склероз; биоаналитические методы исследования; клинические исследования.

Библиографическое описание: Кузьмина ЕА, Остроухова ТЮ, Грачев АВ, Морозова ЕЛ. Тест-система для определения наличия связывающих антител к интерферону бета-1а для клинического применения. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16 (3): 182–188.

В течение многих лет в терапии рассеянного склероза широко используются препараты интерферонов бета (ИФН бета): интерферона бета-1а и интерферона бета-1b [1, 2]. Рекомбинантный ИФН бета-1а, продуцируемый клетками млекопитающих, имеет структуру и профиль гликозилирования подобный эндогенному ИФН бета-1а [3]. Однако интерфероны бета, используемые в терапии, могут индуцировать выработку связывающих и нейтрализующих антител, способных изменять фармакокинетические параметры препарата и, таким образом, снижать клиническую эффективность терапии у больных рассеянным склерозом [4, 5]. Важным диагностическим маркером определения потери биологической активности является определение уровня связывающих антител совместно с определением наличия антител с нейтрализующей активностью и определением уровня белка МхА [6]. Таким образом, определение САт к ИФН бета-1а является неотъемлемой частью оценки иммуногенности в ходе клинических исследований препаратов ИФН бета-1а. Впервые в 2003 г. был описан метод твердофазного иммуноферментного анализа для обнаружения связывающих антител к интерферона бета для использования в качестве скринингового анализа с целью снижения количества образцов, требующих тестирования для выявления клинически значимых антител с нейтрализующей активностью [7, 8]. Большинство описанных авторами методов определения связывающих антител к ИФН бета-1а основаны на применении методов иммуноферментного анализа или его модификации с использованием коммерческих меченных пероксидазой хрена антител к человеческого IgG [4, 7–9]. Преимущественно, данные о чувствительности тест-систем представлены в виде значений, преобразованных из известных калибровочных стандартов в условные единицы [7, 8], либо данные отсутствуют вовсе [4].

В связи с тем, что авторами многих статей не представлены данные о чувствительности, специфичности тест-систем и влиянии избытка препарата в анализируемых пробах на детекцию САт к интерферону бета-1а, це-

люю нашей работы была разработка собственной специфичной и чувствительной тест-системы, которую можно использовать в ходе клинических исследований препаратов пегилированных и непегилированных форм интерферона бета-1а. Для комплексной оценки разработанной тест-системы для определения связывающих антител к ИФН бета-1а в рамках клинических исследований. Решались задачи по изучению характеристик тест-системы и проведению валидационных мероприятий: исследование чувствительности, селективности, специфичности, прецизионности и точности, робастности, стабильности, пригодности. Данная тест-система разработана для скринингового анализа и может быть использована как основа для разработки и проведения подтверждающего анализа.

Материалы и методы

В каждую лунку 96-луночного планшета 3590 («Corning», «Costar», США) вносили по 100 мкл раствора стрептавидина (Streptavidin (Streptomyces avidinii), MBS634860, «MyBioSource», США) в концентрации 2 мкг/мл приготовленного на 50 мМ карбонатном буфере (pH 9,6). Планшет покрывали пленкой (676050, «Greiner Bio-one», Австрия) и инкубировали при температуре (6±2) °C в течение 16–18 ч. После окончания инкубации трижды отмывали планшет, внося в каждую лунку не менее 300 мкл 100 мМ Трис-НСl буфера (pH 7,2–7,4).

Для блокирования неспецифических участков связывания вносили по 300 мкл 100 мМ Трис-НСl буфера + 1 % бычьего сывороточного альбумина (БСА, 0332 – 100G, «Amresco», США) в каждую лунку планшета. Планшет покрывали пленкой и инкубировали в термошейкере (PST-60HL-4, «Biosan», Латвия) при температуре (37±2) °C в течение 1 ч. После блокирования неспецифических участков связывания трижды отмывали планшет, внося в каждую лунку не менее 300 мкл 100 мМ Трис-НСl буфера.

После внесения в каждую лунку 100 мкл раствора пегилированного интерферона бета-1а, конъюгированного с биотином (ЗАО «Биокад», Россия) приготовленного на бу-

ферном растворе для разведения (100 мМ Трис-НСl буфер + 0,1 % БСА) в концентрации 1 мкг/мл, планшет покрывали защитной пленкой и в течение 2 часов инкубировали в термошейкере при температуре $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ при 350 об/мин. После окончания инкубации трижды отмывали планшет, внося в каждую лунку не менее 300 мкл 100 мМ Трис-НСl буфера.

С целью снижения матричного эффекта при планируемом применении данной тест-системы для оценки иммуногенности препаратов ИФН бета-1а в ходе клинических исследований, калибровочные стандарты готовили на пуловой сыворотке десяти здоровых доноров (ЗАО «Биокад», Россия), разведенной буферным раствором для разведения в 5 раз. Оценку наличия антител к ИФН бета-1а в сыворотке крови здоровых доноров проводили путем анализа индивидуальных образцов сыворотки пациентов против калибровочной кривой.

В качестве калибровочных стандартов в данной тест-системе были использованы поликлональные аффинно-очищенные антитела, специфичные к эпитопам интерферона бета-1а, полученные при иммунизации кроликов (самцов) породы Шиншилла (приобретенных в питомнике КРОЛИНФО) препаратом интерферон бета-1а (ЗАО «Биокад») и очищенные по протоколу, описанному Ohta с соавт. [10]. Все манипуляции с животными выполняли согласно национальному стандарту РФ ГОСТР 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики».

Калибровочные стандарты готовили на пуловой сыворотке здоровых доноров (ЗАО «Биокад», Россия), разведенной буферным раствором для разведения в 5 раз, титруя раствор поликлональных аффинно-очищенных антител кролика, специфичных к эпитопам интерферона бета-1а (ЗАО «Биокад», Россия), начиная с концентрации 375 нг/мл (конечная концентрация после кислотной диссоциации) шагом в 2 в 7 флаконов. 8-й флакон, наполненный разведенной в 5 раз пуловой сывороткой здоровых доноров, используют в качестве отрицательного контроля.

Известно, что определению наличия антител, связывающих интерферон бета-1а в сыворотке крови, могут препятствовать комплексы интерферона бета-1а с этими же антителами. Для количественного определения связывающих антител в присутствии избытка интерферона бета-1а используют метод кислотной диссоциации [11, 12]. Инкубация разведенной сыворотки крови в соотношении 1:10 с 300 мМ уксусной кислотой (рН 2,5) способствует диссоциации комплексов антиген-антитело и образованию свободных антител в растворе. При последующей нейтрализации до рН 7,2–7,4 связывающие антитела формируют более стабильные комплексы с интерфероном бета-1а, иммобилизованном на планшете [13], это позволяет определять наличие связывающих антител в сыворотке крови в присутствии избытка препарата.

В связи с этим, после приготовления калибровочных стандартов, контроли качества и исследуемые образцы разводили в 10 раз 300 мМ раствором уксусной кислоты (рН 2,5), тщательно перемешивали. Кислотная диссоциация комплексов в полученных растворах происходила в течение 30 мин при температуре $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$.

Во все лунки микропланшета вносили по 30 мкл 1 М раствора Трис (рН 9,5). Калибровочные стандарты, контроли качества и исследуемые образцы после кислотной диссоциации, вносили по 100 мкл в лунку: калибровочные образцы вносили в лунки планшета в трех повторностях; исследуемые образцы и образцы контролей качества в двух повторностях. Покрывали планшет пленкой и инку-

бировали в термошейкере в течение 30 мин при температуре $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ при 350 об/мин. После окончания инкубации трижды отмывали планшет, внося в каждую лунку не менее 300 мкл 100 мМ Трис-НСl буфера.

Затем в каждую лунку планшета вносили по 100 мкл раствора ИФН бета-1а, конъюгированного с дигоксигенином (ЗАО «Биокад»), приготовленного на буферном растворе для разведения в концентрации 2 мкг/мл. Покрывали планшет пленкой и инкубировали в термошейкере в течение 30 мин при температуре $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ при 350 об/мин. После окончания инкубации трижды отмывали планшет, внося в каждую лунку не менее 300 мкл 100 мМ Трис-НСl буфера.

Вносили в каждую лунку планшета по 100 мкл рабочего раствора 1:10000 моноклональных мышиных антител против дигоксигенина, меченных пероксидазой хрена (ab6212, «Abcam», США), приготовленного на буферном растворе для разведения. Покрывали планшет пленкой и инкубировали в течение 30 мин в термошейкере при температуре $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ при 350 об/мин. После окончания инкубации пять раз отмывали планшет, внося в каждую лунку не менее 300 мкл 100 мМ Трис-НСl буфера.

Добавляли в каждую лунку планшета по 100 мкл готового раствора ТМБ (TMB Core +, BUF062A, «AbD Serotec», США). После появления фона в лунках с минимальной концентрацией (через 5–7 мин), во все лунки вносили по 50 мкл 1 N раствора серной кислоты.

Измеряли оптическую плотность в каждой лунке при 450 нм на микропланшетном спектрофотометре Sunrise (160-39-400, «Tecan», Австрия). На основании результатов анализа калибровочных стандартов с помощью программного обеспечения Magellan5 (для Sunrise Tecan) строили калибровочные кривые, описывающие зависимость оптической плотности от концентрации связывающих антител к ИФН-бета-1а. Зависимость описывали с помощью логарифмической логистической модели с пятью параметрами (5PL). Рассчитывали концентрацию САт к ИФН-бета-1а и отклонение от заданных значений в калибровочных стандартах и контролях качества.

Результаты и обсуждение

С целью подтверждения пригодности, а также выявления характеристик разработанной тест-системы для определения связывающих антител к интерферону бета-1а (в том числе и для клинического применения) были проведены валидационные мероприятия, включающие в себя следующие испытания: калибровочная кривая (диапазон), чувствительность, специфичность (селективность, эффект матрицы, интерференция препаратом), прецизионность (внутри цикла, между циклами), робастность, стабильность растворов, проверка пригодности системы.

В данной тест-системе стандарты имеют концентрацию в диапазоне от 5,86 до 375 нг/мл, при этом зависимость оптической плотности от концентрации связывающих антител к ИФН бета-1а, представленная на рисунке 1, описывается с использованием логистической модели 5L (пятипараметрическое уравнение). Для испытания калибровочной кривой (диапазона) проводили сравнение значения оптических плотностей калибровочных стандартов (табл. 1), рассчитанных концентраций САт к ИФН бета-1а в них и отклонение среднего значения найденной концентрации САт к ИФН-бета-1а в них от заданной (формула (1), табл. 2) и параметров уравнений (табл. 3) трех калибро-

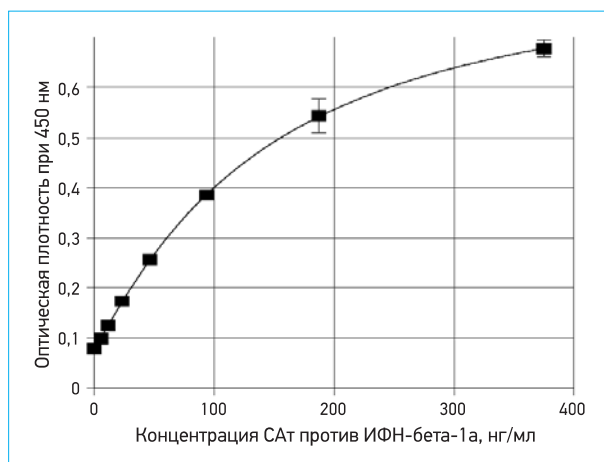


Рис. 1. График, описывающий зависимость оптической плотности от концентрации связывающих антител к ИФН-бета-1а в калибровочных стандартах (получен с использованием программного обеспечения Magellan5 для Sunrise Tecan).

вочных кривых, полученных во время проведения анализа в разные дни.

$$U_M, \% = \left| \frac{D_{(\text{найденно})} - D_{(\text{задано})}}{D_{(\text{задано})}} \cdot 100 \right|, \quad (1)$$

где $U_M, \%$ — отклонение среднего значения найденной концентрации от заданной (в процентах); $D_{(\text{задано})}$ — заданная концентрация САТ к ИФН-бета-1а в модельном растворе (после инкубации с 300 мМ раствором уксусной кислоты), нг/мл; $D_{(\text{найденно})}$ — найденная концентрация САТ к ИФН-бета-1а в модельном растворе (после инкубации с 300 мМ раствором уксусной кислоты), нг/мл.

Для оценки чувствительности тест-системы анализировали модельные растворы с концентрацией, равной пределу количественного определения (ПКО) тест-систе-

Таблица 1. Результаты анализа отрицательного раствора и калибровочных стандартов для построения зависимости оптической плотности от концентрации САТ к ИФН-бета-1а (калибровочные кривые, полученные в трех отдельных циклах)

Концентрация САТ к ИФН-бета-1а в калибровочном стандарте (задано), нг/мл	Оптическая плотность при 450 нм					
	Цикл			Среднее	SD*	RSD**, %
	1	2	3			
375	0,678	0,634	0,627	0,646	0,028	4,31
187,5	0,543	0,484	0,487	0,505	0,033	6,58
93,75	0,385	0,323	0,350	0,353	0,031	8,86
46,88	0,256	0,237	0,254	0,249	0,010	4,08
23,44	0,174	0,175	0,175	0,175	0,001	0,44
11,72	0,124	0,144	0,138	0,135	0,010	7,37
5,86	0,098	0,123	0,109	0,110	0,013	11,41
Бланковый раствор (отрицательный контроль)	0,078	0,101	0,087	0,089	0,011	12,70

Примечание. SD* — стандартное отклонение, RSD** — относительное стандартное отклонение.

мы (5,86 нг/мл, табл. 4) и в 2 раза меньше (2,93 нг/мл, табл. 5), определяли отклонение среднего значения найденной концентрации САТ к ИФН-бета-1а в каждом модельном растворе от заданной (формула (1)). На основе полученных результатов нами был сделан вывод о том, что при концентрации связывающих антител в растворе в

Таблица 2. Рассчитанная концентрация САТ к ИФН-бета-1а в калибровочных стандартах (калибровочные кривые, полученные в трех отдельных циклах)

Концентрация САТ к ИФН-бета-1а в калибровочном стандарте (задано), нг/мл	Концентрация САТ к ИФН-бета-1а, нг/мл						
	Цикл			Среднее	SD*	RSD**, %	U***, %
	1	2	3				
375	376,4	371,6	377,7	371,92	3,20	0,86	0,82
187,5	190,1	196,4	188,3	195,70	4,23	2,16	4,37
93,75	93,2	86,8	92,3	87,63	3,48	3,97	6,53
46,88	46,7	48,9	48,8	48,08	1,21	2,52	4,34
23,44	24,0	24,1	22,6	23,97	0,84	3,49	2,26
11,72	11,7	12,3	12,4	12,86	0,39	3,01	9,73
5,86	5,4	5,9	5,1	6,11	0,41	6,78	4,27
Бланковый раствор (отрицательный контроль)	0,9	0,8	0,5	0,73 ¹	0,19	35,45	—

Примечание. SD* — стандартное отклонение, RSD** — относительное стандартное отклонение, U*** — отклонение среднего значения найденной концентрации от заданной.

¹ Значение ниже предела количественного определения данной тест-системы (5,86 нг/мл).

Таблица 3. Параметры уравнений калибровочных кривых, полученные в трех отдельных циклах

Параметр уравнения	1 цикл	2 цикл	3 цикл	Среднее
A	0,077555	0,077285	0,085485	0,080
B	1,0884	1,0843	0,96679	1,046
C	204,82	207,2	156,7	189,573
D	0,83299	0,8319	1,0554	0,907
E	1,4765	1,4938	0,67995	1,217
Коэффициент, R ²	0,99998	0,9994	0,99988	1,000

Таблица 4. Рассчитанная концентрация для модельных растворов с концентрацией САТ к ИФН-бета-1а 5,86 нг/мл

Повтор	Концентрация САТ к ИФН-бета-1а, нг/мл					
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6
1	4,57	6,52	5,79	4,82	4,57	4,57
2	6,76	6,76	7,01	5,55	5,31	5,06
3	5,06	7,01	5,55	5,31	6,04	4,57
Среднее	5,47	6,76	6,12	5,23	5,31	4,74
SD*	1,15	0,24	0,78	0,37	0,73	0,28
RSD**, %	21,05	3,58	12,75	7,14	13,80	5,97
U***, %	6,7	15,4	4,4	10,8	9,4	19,1

Примечание. SD* — стандартное отклонение, RSD** — относительное стандартное отклонение, U*** — отклонение среднего значения найденной концентрации от заданной.

концентрации, равной или более 5,86 нг/мл, они надежно детектируются.

Селективность данной тест-системы была исследована с использованием неспецифичных поликлональных кроличьих антител к гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (ГКСФ) (Ab9691, «Абсам», США) в сравнении с отрицательным контролем качества (табл. 6).

После испытания эффект матрицы (интерференции компонентами матрицы), которое показало наличие матричного эффекта (при исследовании сыворотки крови человека), нами был сделан вывод, что степень разведения пуловой сыворотки для приготовления калибровочных стандартов должна соответствовать степени разведения анализируемых биообразцов, это позволит точно определять наличие связывающих антител к ИФН бета-1а в присутствии компонентов матрицы.

Во время валидационных мероприятий было также проведено изучение влияния интерференции препаратами интерферонов бета-1а: Тебериф® (ЗАО «Биокад», Россия), Ребиф® («Мерк Сероно», Италия), Авонекс® («Пьер Фабр Медикамент Продакшн», Франция) различных производителей на определения наличия САт к интерферону бета-1а. По результатам данного испытания было выявлено, что ингибирование сигнала и недостоверное определение наличия связывающих антител к ИФН-бета-1а в образце может быть связано с присутствием в сыворотке крови препарата:

- Тебериф® (ЗАО «Биокад», Россия) в концентрации выше 39 нг/мл;
- Ребиф® («Мерк Сероно», Италия) в концентрации выше 39 нг/мл;
- Авонекс® («Пьер Фабр Медикамент Продакшн», Франция) в концентрации выше 78,2 нг/мл.

Испытание «точность и прецизионность внутри цикла и между циклами» проводили два аналитика в три разных дня (шесть независимых определений), при этом готовили серии растворов пяти различных концентраций в пределах калибровочного диапазона, «точность» оценивали как отклонение от среднего значения заданной концентрации (формула (1)), а прецизионность как коэффициент вариации (формула (2)).

$$CV, \% = \left| \frac{SD}{Mean} \cdot 100 \right|, \quad (2)$$

где CV — среднее значение коэффициента вариации, в процентах; SD — стандартное отклонение для анализируемых растворов; $Mean$ — среднее значение (найденно) концентрации для анализируемых растворов. Согласно полученным нами данным был сделан вывод, что прецизионность и точность результатов внутри цикла и между циклами при выполнении анализа в одних и тех же условиях соответствуют значениям в установленных пределах, что позволяет использовать данную методику для определения САт к ИФН-бета-1а в сыворотке крови.

Во время проведения испытания «робастность» оценивали влияние внесения незначительных изменений в параметры методики, которые были выбраны, как критические [14]:

- изменение объема вносимого ИФН бета-1а, конъюгированного с дигоксигенином (согласно методике 100 мкл), отклонение от методики составляло 10 % от вносимого объема;
- изменение объема вносимого конъюгата (мышинных антител против дигоксигенина, меченных пероксида-

зой хрена) (согласно методике 100 мкл), отклонение от методики составляло 10 % от вносимого объема;

- изменение времени инкубации с конъюгатом (мышинных антител против дигоксигенина, меченных пероксидазой хрена) (согласно методике 30 мин), отклонение от методики составляло 10 мин от исходного времени инкубации.

Таблица 5. Рассчитанная концентрация для модельных растворов с концентрацией САт к ИФН-бета-1а 2,93 нг/мл

Повтор	Концентрация САт к ИФН-бета-1а (найденно), нг/мл					
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6
1	4,02	6,89	4,02	2,44	3,49	2,97
2	4,02	4,80	4,28	4,54	3,49	3,76
3	4,28	5,33	3,76	4,80	4,02	3,49
Среднее	4,11	5,67	4,02	3,93	3,67	3,41
SD*	0,15	1,09	0,26	1,30	0,30	0,40
RSD**, %	3,68	19,15	6,52	32,99	8,25	11,79
U***, %	40,27	93,52	1,09	34,13	25,25	16,38

Примечание. SD* — стандартное отклонение, RSD** — относительное стандартное отклонение, U*** — отклонение среднего значения найденной концентрации от заданной.

Таблица 6. Полученные значения оптической плотности и рассчитанная концентрация САт к ИФН бета-1а в растворах поликлональных кроличьих антител к ГКСФ с концентрацией 375 нг/мл и 5,86 нг/мл в сравнении с отрицательным контролем

Оптическая плотность при 450 нм			
Повтор	Отрицательный контроль	Поликлональные кроличьи антитела к гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, 375 нг/мл	Поликлональные кроличьи антитела к гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, 5,86 нг/мл
1	0,072	0,072	0,070
2	0,075	0,078	0,075
3	0,074	0,076	0,071
Среднее	0,074	0,075	0,072
SD*	0,002	0,003	0,003
RSD**, %	2,07	4,06	3,67
Концентрация САт к ИФН-бета-1а, нг/мл			
Повтор	Отрицательный контроль	Поликлональные кроличьи антитела к гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, 375 нг/мл	Поликлональные кроличьи антитела к гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, 5,86 нг/мл
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
Среднее	0	0	0
SD*	0	0	0
RSD**, %	—	—	—

Примечание. SD* — стандартное отклонение, RSD** — относительное стандартное отклонение.

Таблица 7. Результаты определения оптической плотности и рассчитанные концентрации САТ к ИФН-бета-1а (нг/мл) для модельных растворов при оценке влияния процедуры замораживания/размораживания на стабильность растворов

#	Оптическая плотность при 450 нм											
	Исходная методика			1 цикл заморозки/разморозки			2 цикл заморозки/разморозки			3 цикл заморозки/разморозки		
	250 нг/мл	5,86 нг/мл	0 нг/мл	250 нг/мл	5,86 нг/мл	0 нг/мл	250 нг/мл	5,86 нг/мл	0 нг/мл	250 нг/мл	5,86 нг/мл	0 нг/мл
Среднее значение по проанализированным растворам	0,921	0,141	0,090	0,74	0,13	0,09	0,55	0,11	0,09	0,75	0,15	0,12
SD*	0,027	0,005	0,001	0,01	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
RSD**, %	2,91	3,60	1,28	1,78	0,27	1,54	3,84	1,85	3,99	0,05	0,46	1,17

#	Концентрация САТ к ИФН-бета-1а (найденно), нг/мл											
	Исходная методика			1 цикл заморозки/разморозки			2 цикл заморозки/разморозки			3 цикл заморозки/разморозки		
	250 нг/мл	5,86 нг/мл	0 нг/мл	250 нг/мл	5,86 нг/мл	0 нг/мл	250 нг/мл	5,86 нг/мл	0 нг/мл	250 нг/мл	5,86 нг/мл	0 нг/мл
Среднее значение по проанализированным растворам	220,45	5,42	0	216,48	5,07	0	260,23	6,44	0	190,98	6,55	0
SD*	21,94	0,61	0	13,21	0,05	—	26,65	0,5	—	0,49	0,16	—
RSD**, %	9,95	11,22	—	6,1	1,04	—	10,24	7,83	—	0,26	2,4	—
U***, %	11,82	7,51	—	13,41	13,48	—	4,1	9,9	—	23,61	11,77	—
Разница по сравнению с исходной методикой, %*	—	—	—	-1,8	-6,5	—	18	18,8	—	-13,4	20,8 ¹	—

Примечание. SD* — стандартное отклонение, RSD** — относительное стандартное отклонение, U*** — отклонение среднего значения найденной концентрации от заданной.

¹ Если разница по сравнению с исходной методикой превышает ± 20 % для растворов хотя бы одной концентрации, то такой цикл заморозки/разморозки не рекомендуется.

Было установлено, что незначительное изменение объема вносимого ИФН бета-1а, конъюгированного диоксигенином или изменение времени инкубации с конъюгатом (мышинными антителами против диоксигенина, меченными пероксидазой хрена (ПХ)) не оказывает значительного влияния на качество определения САТ к ИФН бета-1а. При этом было обнаружено, что тест-система чувствительна к изменению объема вносимого конъюгата (мышинных антител против диоксигенина, меченных ПХ).

При оценке стабильности растворов в испытании «Стабильность при замораживании/размораживании» было выявлено, что два цикла замораживания/размораживания испытуемых растворов не оказывают существенного влияния на определяемую в них концентрацию САТ к ИФН бета-1а, однако не рекомендуется подвергать анализу образцы после более двух циклов заморозки/разморозки (табл. 7).

Оценка пригодности тест-системы проводилась на основании соблюдения следующих критериев [14, 15]:

- должна была наблюдаться функциональная зависимость оптической плотности калибровочных стандартов от концентрации САТ к ИФН-бета-1а в них, описываемая пятипараметрическим уравнением;
- коэффициент корреляции для графика зависимости оптической плотности калибровочного стандарта от концентрации САТ к ИФН-бета-1а в них был не менее 0,95;
- относительное стандартное отклонение найденной концентрации САТ к ИФН-бета-1а в калибровочных стандартах с концентрацией 5,86 и 375 нг/мл было не более 25 %;
- относительное стандартное отклонение найденной концентрации САТ к ИФН-бета-1а в калибровочных стандартах с концентрацией в диапазоне от 5,86 до 375 нг/мл было не более 20 %;

- отклонение найденной концентрации САТ к ИФН-бета-1а в калибровочных стандартах с концентрацией 5,86 и 375 нг/мл от заданной было не более 25 %;

- отклонение найденной концентрации САТ к ИФН-бета-1а в калибровочных стандартах с концентрацией в диапазоне от 5,86 и 375 нг/мл от заданной было не более 20 %;

- относительное стандартное отклонение оптической плотности анализируемых растворов было не более 15 %;
- отклонение найденной концентрации САТ к ИФН-бета-1а для растворов высокого положительного контроля (ВПК) от заданного значения концентрации было не более 20 %, а для низкого положительного контроля (НПК) от заданного значения концентрации было не более 25 %;

- раствор отрицательного контроля не содержал САТ к ИФН-бета-1а. Значение оптической плотности раствора отрицательного контроля было достоверно ниже оптической плотности низкого положительного контроля.

Выводы

Проведенные валидационные мероприятия подтверждают, что методика иммуноферментного анализа для определения наличия связывающих антител к интерферону бета-1а в сыворотке крови человека обладает известной высокой чувствительностью и специфичностью и позволяет детектировать связывающие антитела к интерферону бета-1а в концентрации, равной или более 5,86 нг/мл даже в присутствии препаратов интерферона бета-1а в концентрации 39 нг/мл. Полученные результаты позволяют использовать данную тест-систему для оценки иммуногенности (проведения скринингового и подтверждающего анализа) в рамках клинических исследований препаратов интерферона бета-1а.

Литература

1. Barnard JG, Babcock K, Carpenter JF. Characterization and quantitation of aggregates and particles in interferon- β products: potential links between product quality attributes and immunogenicity. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2013; **102**(3): 915–28.
2. Mastrangeli R, Rossi M, Mascia M, Palinsky W, Datola A, Terlizze M, Bierau H. In vitro biological characterization of IFN- β -1a major glycoforms. *Glycobiology* 2015; **25**(1): 21–9.
3. Ahn SH, Lee HW, Kim YS, Kim JK, Han KH, Chon CY, Moon YM. Recombinant interferon-Beta-1alpha plus ribavirin for the treatment of chronic HCV infection: a prospective, randomized, comparative pilot study. *Gut Liver* 2009; **3**(1): 20–5.
4. Zare N, Zarkesh-Esfahani SH, Gharagozloo M, Shaygannejad V. Antibodies to interferon beta in patients with multiple sclerosis receiving CinnoVex, rebif, and betaferon. *Journal of Korean Medical Science* 2013; **28**(12): 1801–6.
5. Gneiss C, Tripp P, Reichartseder F, Egg R, Ehling R, Lutterotti A, Khalil M, Kuenz B, Mayringer I, Reindl M, Berger T, Deisenhammer F. Differing immunogenic potentials of interferon beta preparations in multiple sclerosis patients. *Journal of Multiple Sclerosis* 2006; **12**(6): 731–7.
6. Cakal B, Uygungoglu U, Saip S, Altintas A, Siva A, Badur S. BAB and MxA as functional biomarkers in routine clinical laboratories for the determination of anti-IFN-beta antibodies and their bioactivity levels in multiple sclerosis patients. *Journal Immunoassay Immunochem* 2014; **35**(4): 398–411.
7. Pachner AR. An improved ELISA for screening for neutralizing anti-IFN-beta antibodies in MS patients. *Neurology* 2003; **61**(10): 1444–6.
8. Lapu Nixon M, Matud J, Yeh C, Prince HE. Evaluation of a multiplex bead-based screening assay for detection of binding antibodies to interferon-beta. *Journal of Neuroimmunology* 2009; **210**(1–2): 104–7.
9. White JT, Crossman M, Richter K, Berman M, Goyal J, Subramanyam M. Immunogenicity evaluation strategy for a second-generation therapeutic, PEG-IFN- β -1a. *Bioanalysis* 2015; **7**(21): 2801–11.
10. Ohta M, Ohta K, Ma J, Takeuchi J, Saida T, Nishimura M, Itoh N. Clinical and Analytical Evaluation of an Enzyme Immunoassay for Myelin Basic Protein in Cerebrospinal Fluid. *Clinical Chemistry* 2000; **46**(9): 1326–30.
11. Zoghbi J, Xu J, Grabert R, Theobald V, Richards S. A breakthrough novel method to resolve the drug and target interference problem in immunogenicity assays. *Journal of Immunological Methods* 2015; **426**: 62–9.
12. Schmidt E, Hennig K, Mengede C, Zillikens D, Kromminga A. Immunogenicity of rituximab in patients with severe pemphigus. *Clinical Immunology* 2009; **132**(3): 334–41.
13. Patton A, Mullenix MC, Swanson SJ, Koren E. An acid dissociation bridging ELISA for detection of antibodies directed against therapeutic proteins in the presence of antigen. *Journal of Immunological Methods* 2005; **304**: 189–95.
14. Shankar G, Devanarayan V, Amaravadi L, Barrett YC, Bowsher R, Finco-Kent D, Fiscella M, Gorovits B, Kirschner S, Moxness M, Parish T, Quarmby V, Smith H, Smith W, Zuckerman LA, Koren E. Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2008; **48**(5): 1267–81.
15. Guidance for Industry Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM338856.pdf>.

Об авторах

Закрытое акционерное общество «БИОКАД» (ЗАО «БИОКАД»). Российская Федерация, 142380, Московская обл., Чеховский район, п. Любучаны.

Кузьмина Екатерина Андреевна. Старший научный сотрудник лаборатории иммунологических методов отдела доклинических испытаний лекарственных средств.

Остроухова Татьяна Юрьевна. Руководитель лаборатории иммунологических методов отдела доклинических испытаний лекарственных средств, канд. биол. наук.

Грачев Александр Валерьевич. Старший научный сотрудник отдела иммунохимии.

Морозова Елена Леонидовна. Руководитель отдела доклинических испытаний лекарственных средств.

Адрес для переписки: Кузьмина Екатерина Андреевна; biocad@biocad.ru

Test system for the detection of binding antibodies to interferon beta-1a for clinical use

E. A. Kuzminova, T. Yu. Ostroukhova, A. V. Grachev, E. L. Morozova

CJSC «BIOCAD», Luybuchany, Chekhov district, Moscow region, Russia

Test system for determining the presence of binding antibodies to interferon beta-1a (BAB to IFN beta-1a) in serum using ELISA has been developed. The validation included sensitivity, selectivity, specificity, precision and accuracy, robustness, stability, suitability of the test system studies. The applicability of the mentioned test system has been approved for the use in clinical studies for the evaluation of interferon beta-1a immunogenicity (pegylated and non-pegylated forms).

Key words: interferon beta-1a; immunogenicity; enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); binding antibodies (BAB); anti-drug antibodies (ADAs); multiple sclerosis (MS); bioanalytical methods; clinical studies.

For citation: Kuzminova EA, Ostroukhova TY, Grachev AV, Morozova EL. Test system for detection binding antibodies to interferon beta-1a for clinical use. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; **16** (3): 182–188.

References

1. Barnard JG, Babcock K, Carpenter JF. Characterization and quantitation of aggregates and particles in interferon- β products: potential links between product quality attributes and immunogenicity. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2013; **102**(3): 915–28.
2. Mastrangeli R, Rossi M, Mascia M, Palinsky W, Datola A, Terlizze M, Bierau H. In vitro biological characterization of IFN- β -1a major glycoforms. *Glycobiology* 2015; **25**(1): 21–9.
3. Ahn SH, Lee HW, Kim YS, Kim JK, Han KH, Chon CY, Moon YM. Recombinant interferon-Beta-1alpha plus ribavirin for the treat-

- ment of chronic HCV infection: a prospective, randomized, comparative pilot study. *Gut Liver* 2009; **3**(1): 20–5.
4. Zare N, Zarkesh-Esfahani SH, Gharagozloo M, Shaygannejad V. Antibodies to interferon beta in patients with multiple sclerosis receiving CinnoVex, rebif, and betaferon. *Journal of Korean Medical Science* 2013; **28**(12): 1801–6.
 5. Gneiss C, Tripp P, Reichartseder F, Egg R, Ehling R, Lutterotti A, Khalil M, Kuenz B, Mayringer I, Reindl M, Berger T, Deisenhammer F. Differing immunogenic potentials of interferon beta preparations in multiple sclerosis patients. *Journal of Multiple Sclerosis* 2006; **12**(6): 731–7.
 6. Cakal B, Uygunglu U, Saip S, Altintas A, Siva A, Badur S. BAb and MxA as functional biomarkers in routine clinical laboratories for the determination of anti-IFN-beta antibodies and their bioactivity levels in multiple sclerosis patients. *Journal Immunoassay Immunochem* 2014; **35**(4): 398–411.
 7. Pachner AR. An improved ELISA for screening for neutralizing anti-IFN-beta antibodies in MS patients. *Neurology* 2003; **61**(10): 1444–6.
 8. Lapū Nixon M, Matud J, Yeh C, Prince HE. Evaluation of a multiplex bead-based screening assay for detection of binding antibodies to interferon-beta. *Journal of Neuroimmunology* 2009; **210**(1–2): 104–7.
 9. White JT, Crossman M, Richter K, Berman M, Goyal J, Subramanyam M. Immunogenicity evaluation strategy for a second-generation therapeutic, PEG-IFN- β -1a. *Bioanalysis* 2015; **7**(21): 2801–11.
 10. Ohta M, Ohta K, Ma J, Takeuchi J, Saida T, Nishimura M, Itoh N. Clinical and Analytical Evaluation of an Enzyme Immunoassay for Myelin Basic Protein in Cerebrospinal Fluid. *Clinical Chemistry* 2000; **46**(9): 1326–30.
 11. Zoghbi J, Xu J, Grabert R, Theobald V, Richards S. A breakthrough novel method to resolve the drug and target interference problem in immunogenicity assays. *Journal of Immunological Methods* 2015; **426**: 62–9.
 12. Schmidt E, Hennig K, Mengede C, Zillikens D, Kromminga A. Immunogenicity of rituximab in patients with severe pemphigus. *Clinical Immunology* 2009; **132**(3): 334–41.
 13. Patton A, Mullenix MC, Swanson SJ, Koren E. An acid dissociation bridging ELISA for detection of antibodies directed against therapeutic proteins in the presence of antigen. *Journal of Immunological Methods* 2005; **304**: 189–95.
 14. Shankar G, Devanarayan V, Amaravadi L, Barrett YC, Bowsher R, Finco-Kent D, Fiscella M, Gorovits B, Kirschner S, Moxness M, Parrish T, Quarmby V, Smith H, Smith W, Zuckerman LA, Koren E. Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2008; **48**(5): 1267–81.
 15. Guidance for Industry Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM338856.pdf>.

Authors

Closed joint-stock company «BIOCAD» (CJSC «BIOCAD»), Lyubuchany village, Chekhov district, Moscow region 143280, Russian Federation.
 Kuzminova EA. Senior researcher of the laboratory of immunological methods of the Department of preclinical trials drug products.
 Ostroukhova TY. Head of the laboratory of immunological methods of the Department of preclinical trials of drug products. Candidate of Biological Sciences.
 Grachev AV. Senior researcher of the Department of immunochemistry.
 Morozova EL. Head of the Department of preclinical trials of drug products.