

ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИТЕЛ К ЭРИТРОПОЭТИНУ У ПАЦИЕНТОВ, ПРОХОДЯЩИХ ТЕРАПИЮ ПРЕПАРАТАМИ РЕКОМБИНАНТНОГО ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ЭРИТРОПОЭТИНА

**Кудряшова А.М.¹, Нестеренко Л.Н.¹, Генералова Г.А.²,
Абасеева Т.Ю.², Михайлова Н.А.¹, Борисова О.В.¹**

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

² Центр гравитационной хирургии крови и гемодиализа «ГБУЗ «Детская городская клиническая больница святого Владимира Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

Резюме. Целью исследования является характеристика антител к эритропоэтину в сыворотках крови пациентов, проходящих терапию препаратами эритропоэтина.

Проанализированы 106 сывороток крови пациентов, получавших препараты эритропоэтина. Для сравнительного анализа были исследованы 134 сыворотки пациентов, не получавших препараты ЭПО. Исследование проводили методом твердофазного ИФА при пассивной иммобилизации рчЭПО и иммунохимической через стептавидин-биотиновое взаимодействие. Выявление антител к эритропоэтину проводили с использованием мышинных моноклональных антител к IgG, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека, конъюгированных с пероксидазой хрена, а при количественном определении – конъюгата протеина-А с пероксидазой. В качестве калибровочного стандарта применяли поликлональные антитела кролика к ЭПО человека с известной концентрацией. Для построения калибровочного графика были выбраны шесть калибровочных образцов в диапазоне концентрацией 16-1000 нг/мл. Предел обнаружения составил 12 нг/мл, а предел количественного обнаружения – 31 нг/мл.

При иммунохимической иммобилизации частота выявления суммарных IgG-антител увеличилась в 3,2 раза, IgG1 – в 1,1 раз, IgG2 – в 1,25 раза, IgG3 – в 1,5 раза, IgG4 – в 1,7 раза. У большинства пациентов были обнаружены антитела со смешанным изотипом, в 3-х образцах были детектированы только IgG1- или IgG4-антитела к ЭПО. В выборке из 106 образцов IgM-антитела не определялись, суммарные IgG-антитела были выявлены в 36,8% случаев, в 34% образцов их наличие было подтверждено выявлением антител хотя бы одного из подклассов. IgG1-антитела были выявлены в 83,3%, IgG4 – в 80,6% образцов, в которых присутствовали суммарные IgG-антитела. Во всех случаях антитела IgG2 и/или IgG3 подклассов были обнаружены в присутствии IgG1- или IgG4-антител. Концентрация антител составила 3,2-35,5 мкг/мл у 28 пациентов, у 8 пациентов уровень антител был более 50 мкг/мл, у 3-х находился ниже предела количественного обнаружения. Только в 6 образцах были выявлены антитела с индексом avidности более 50%.

Иммунохимическая иммобилизация антигена привела к повышению чувствительности при определении специфических антител всех подклассов. IgG-антитела были выявлены более чем в трети

Адрес для переписки:

Кудряшова Александра Михайловна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»
115088, Россия, Москва, ул. 1-я Дубровская, 15.
Тел.: 8 (495) 674-54-97.
E-mail: 2238250@rambler.ru

Address for correspondence:

Kudryashova Alexandra M.
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera
115088, Russian Federation, Moscow,
1st Dubrovskaya str., 15.
Phone: 7 (495) 674-54-97.
E-mail: 2238250@rambler.ru

Образец цитирования:

А.М. Кудряшова, Л.Н. Нестеренко, Г.А. Генералова,
Т.Ю. Абасеева, Н.А. Михайлова, О.В. Борисова
«Характеристика антител к эритропоэтину
у пациентов, проходящих терапию препаратами
рекомбинантного человеческого эритропоэтина»
// Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 1.
С. 143-152. doi: 10.15789/1563-0625-COE-1879
© Кудряшова А.М. и соавт., 2020

For citation:

A.M. Kudryashova, L.N. Nesterenko, G.A. Generalova,
T.Yu. Abaseeva, N.A. Mikhailova, O.V. Borisova
“Characteristics of erythropoietin antibodies in patients treated
with recombinant human erythropoietin”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020, Vol. 22, no. 1,
pp. 143-152.
doi: 10.15789/1563-0625-COE-1879
DOI: 10.15789/1563-0625-COE-1879

сывороток крови пациентов, получавших препараты ЭПО, преимущественно определялись низкоавидные антитела IgG1- и IgG4-подклассов.

Ключевые слова: эритропоэтин, твердофазный ИФА, антитела, иммуногенность, авидность, сыворотки крови человека

CHARACTERISTICS OF ERYTHROPOIETIN ANTIBODIES IN PATIENTS TREATED WITH RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN

Kudryashova A.M.^a, Nesterenko L.N.^a, Generalova G.A.^b,
Abaseeva T.Yu.^b, Mikhailova N.A.^a, Borisova O.V.^a

^a I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

^b Center of Gravitational Surgery of Blood and Hemodialysis, Children's City Clinical Hospital of St. Vladimir, Moscow Department of Health, Moscow, Russian Federation

Abstract. Our aim was to characterize anti-EPO antibodies in serum samples of the patients treated with erythropoietin. 106 serum samples from the patients treated with erythropoietin (EPO) were collected and assayed. 134 serum samples of patients who did not receive EPO were taken for comparative analysis. The anti-EPO antibody detection was performed in ELISA test with rhEPO, by passive capture on ELISA plates, using streptavidin-biotin immunochemical system. Mouse monoclonal antibodies to human IgG, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 conjugated to horseradish peroxidase were used to detect anti-EPO antibodies, and protein-A peroxidase conjugate was used for quantitative assays. Rabbit anti-human EPO polyclonal antibodies at known concentrations were used as a calibration standard. Six calibration samples at the concentration range of 16-1000 ng/ml were used to plot calibration curves. The lower detection limit was 12 ng/mL, and the quantitative detection limit was 31 ng/ml. Immunochemical capturing led to increasing of total IgG antibody detection by 3.2 times, IgG1 – by 1.1 times, IgG2 – by 1.25 times, IgG3 – by 1.5 times, IgG4 – by 1.7 times. Antibodies of mixed isotype were found in most patients. IgG1 or IgG4 antibodies to EPO were determined only in 3 samples. Specific IgM was not detectable among 106 sera samples, whereas total IgG antibodies were detected in 36.8 % of cases. In 34% of sera, their presence was confirmed by detection of at least one of the subclasses. IgG1 antibody was detected in 83.3%; IgG4, in 80.6% of the samples positive for total IgG antibodies. In all cases, IgG2 and/or IgG3 were detected in presence of IgG1 or IgG4 antibodies. The antibody concentration was 3.2 to 35.5 µg/mL in sera from 28 patients, in 8 cases the level of antibodies was > 50 µg/ml, however, being below the limit of quantitative detection in 3 patients. Only 6 samples contained antibodies with avidity index of > 50%. Immunochemical capturing of the antigen led to increased sensitivity for detecting all subclasses of specific antibodies. The specific IgG antibodies to EPO were found in more than 1/3 of serum samples from the patients treated with erythropoietin. Low-avidity antibodies of IgG1 and IgG4 subclasses were determined in most cases.

Keywords: erythropoietin, antibodies, ELISA, immunogenicity, avidity, human serum

Введение

Терапия препаратами эритропоэтина проводится при хронической почечной недостаточности, онкозаболеваниях, при трансплантации органов и эритропоэтиндефицитных анемиях. Серьезной проблемой такой терапии является выработка антител, приводящая к изменению фармакокинетического профиля и снижению эффективности лечения. При длительном приеме препаратов эритропоэтина может происходить выработка нейтрализующих антител, способных перекрестно реагировать с эндогенным

эритропоэтином, что приводит к редкому, но тяжелому осложнению – полной аплазии красного костного мозга (ПАККМ) [7, 14, 15, 16, 17].

Основными факторами, влияющими на возникновение специфических антител, являются подкожный путь введения препаратов, продолжительность лечения, различия в структуре нативного и рекомбинантного эритропоэтина, а также компоненты, входящие в состав лекарственных форм [4, 6, 20].

Выявление антител к терапевтическим препаратам белковой природы предполагает

многоуровневый подход, включающий метод выявления суммарных антител к препарату, характеристику выявленных антител в отношении их изотипов, концентрации и авидности [3, 10]. Определение IgM- и IgG-классов антител, а также индекса авидности может свидетельствовать о стадии процесса образования специфических антител. Также определение различных IgG-изотипов может служить дополнительным тестом, подтверждающим специфичность определения суммарных IgG-антител. Наличие антител к эритропоэтину разных IgG-подклассов описано как у пациентов без ПАККМ, так и при развитии этого заболевания. IgG4-антитела обычно генерируются при длительном приеме препаратов эритропоэтина. Установлено, что у всех пациентов с ПАККМ прежде всего выявляются IgG4- и IgG1-антитела к эритропоэтину [2, 3]. Возможно, что увеличение концентрации IgG4-антител может ассоциироваться с развитием ПАККМ [22].

Наиболее часто для определения антител используется твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) как метод, обладающий высокой чувствительностью, доступностью и высокой пропускной способностью [2, 9]. Задачей настоящего исследования являлась разработка методов определения антител к эритропоэтину методом твердофазного иммуноферментного анализа и их использование для характеристики специфических антител у группы пациентов, проходящих терапию препаратами рекомбинантного эритропоэтина.

Материалы и методы

В работе исследованы 106 сывороток крови пациентов, проходивших терапию препаратами эритропоэтина. Для сравнительного анализа исследованы 134 сыворотки пациентов, не получавших препараты ЭПО.

Эритропоэтин рекомбинантный человеческий (рчЭПО, Shandong Kexing Bioproducts). Реактивы: 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, компоненты буферных растворов (Sigma, Fluka, Helicon). Конъюгат белка А с пероксидазой хрена (ООО Имтек), антитела мышинные моноклональные к IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 человека (ОАО Биалекса), антитела к эритропоэтину кроличьи поликлональные (Sigma), антитела мышинные моноклональные к IgG и IgM человека, стрептавидин (ООО «Сорбент»). Растворы готовили на деионизированной воде (Milli-Q System, Millipore, США). Для ИФА метода использовали прозрачные 96-луночные планшеты для иммунологических исследований (Costar).

Инкубацию планшетов проводили на термостатируемом планшетном встряхивателе (ELMI

SkyLine) при режиме 700 об/мин и температуре 37 °С. После всех инкубаций проводили отмывку планшетов на планшетном промывателе (StatFax). Оптическую плотность измеряли на аппарате BioRad Model 680.

Получение препарата биотинилированного человеческого рекомбинантного эритропоэтина (Би-чрЭПО) проводили с использованием EZ-LinkSulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Thermo Scientific) при 20-кратном избытке биотина в соответствии с инструкцией производителя. Избыток непрореагировавшего биотинового реагента удаляли на AmiconUltra 0,5 ml 3K (Millipore). Получение конъюгатов мышинных моноклональных антител к IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 человека с пероксидазой хрена осуществляли по методу Накане [18].

При иммунохимической иммобилизации в 96-луночные планшеты вносили стрептавидин в 0,1 М карбонатно-бикарбонатном буфере pH 9,6 в концентрации 2 мкг/мл. Планшеты выдерживали в течение 19-22 часов при температуре (4-8) °С, затем на 1 час вносили 0,02 М фосфатный буферный раствор pH 7,2, содержащий 5% сахарозы, 0,09% казеината натрия, 0,05% Твин 20. В лунки планшета с иммобилизованным стрептавидином вносили по 100 мкл Би-рЭПО в концентрации 0,5 мкг/мл и инкубировали в течение 45 минут, затем отмывали 7 раз ФСБ-Т.

В методе с пассивной иммобилизацией чрЭПО на первой стадии вносили в лунки планшета по 100 мкл чрЭПО в концентрации 5 мкг/мл в 0,1 М карбонатно-бикарбонатном буфере (КББ), pH 9,6. Планшеты выдерживали в течение 19-22 часов при температуре (4-8) °С, затем на 1 час вносили 0,02 М фосфатный буферный раствор pH 7,2, содержащий 5% сахарозы, 0,09% казеината натрия, 0,05% Твин 20.

Последующие стадии были аналогичны для обоих методов. Образцы сывороток вносили в разведении 1/50 и после инкубирования в течение 45 минут и отмывки вносили по 100 мкл конъюгатов с пероксидазой, соответственно, белка А или моноклональных антител мыши к IgG или IgM человека. Повторяли этап инкубирования и вносили по 100 мкл 33 мМ цитратного буферного раствора pH 4,0, содержащего 0,01% перекиси водорода и 0,5 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Через 15 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2N серной кислоты, измеряли оптическую плотность (ОП) при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 680 нм.

Для выявления подклассов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 после аналогичного внесения образцов добавляли по 100 мкл конъюгата моноклональных антител мыши с пероксидазой хрена к соответствующему подклассу и инкубировали в течение

30 минут. Далее анализ проводили, как описано выше.

Определение индекса avidности (ИА) проводили путем анализа каждого из образцов в двух лунках. После стадии инкубации с образцами сывороток в одну из лунок вносили 150 мкл денатурирующего раствора на основе 8 М мочевины, в другую – 150 мкл 0,02 М фосфатного буферного раствора pH 7,2, содержащего 0,05% Твин 20. Выдерживали 10 мин при комнатной температуре. Далее анализ проводили, как описано выше. Индекс avidности рассчитывали по формуле: $IA = (OP_{др} / OP_{фсб}) \times 100\%$, где $OP_{др}$ и $OP_{фсб}$ – оптические плотности в лунках, обработанных денатурирующим раствором и буфером соответственно.

Оптимизация условий проведения иммуноферментного анализа

В каждом случае проводили подбор параметров ИФА с целью достижения максимальной чувствительности и специфичности. Чувствительность для всех методов выявления антител характеризовали индексом позитивности (ИП), то есть отношением $OP_{образца} / OP_{порог}$, где $OP_{порог} = OP_{ср.к} + 3\sigma$, где $OP_{ср.к}$ – среднее арифметическое значение регистрируемого сигнала для выборки сывороток крови пациентов, никогда не получавших препараты эритропоэтина. Образец рассматривали как содержащий антитела при $OP_{образца} / OP_{порог} > 1$. Предел количественного обнаружения определяли по калибровочному графику как $OP_{порог} = OP_{ср.к} + 10\sigma$. Критерий Вилкоксона использовали для сравнения результатов, полученных для разных условий эксперимента. Величина $p \leq 0,05$ рассматривалась как статистически значимая. Полученные данные анализировали с помощью программного

обеспечения OriginPro 9.1 (64-bit) SR3 b87 (Origin Lab Corporation) и программного обеспечения Microsoft Office Excel 2013.

Результаты

Ранее было показано, что при выявлении антител к эритропоэтину в сыворотках крови экспериментальных животных после введения препаратов эритропоэтина более высокая чувствительность наблюдалась в методе с использованием иммунохимической иммобилизации по сравнению с пассивной. [1]. В связи с этим схемы иммуноферментного метода, использовавшиеся в данной работе, включали выявление антител к ЭПО (IgG, IgM, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4) через стрептавидин-биотиновое взаимодействие и при пассивной иммобилизации чрЭПО [6]. При иммунохимической иммобилизации на первой стадии проводили связывание биотинилированного чрЭПО с иммобилизованным на поверхности планшета стрептавидином. Далее вносили исследуемые образцы, затем соответствующие конъюгаты моноклональных антител с пероксидазой. При наличии в исследуемых образцах антител к ЭПО происходило образование иммунных комплексов, и после внесения субстратной буферной смеси результаты ферментативной реакции оценивали спектрофотометрически. На основании анализа 134 образцов сывороток доноров, не получавших препараты ЭПО, установлен порог отсеечения для определения индекса позитивности в каждом варианте ИФА.

В анализируемых образцах IgM-антитела не были выявлены, результаты по тестированию суммарных IgG-антител, а также антител подклассов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 в сыворотках крови пациентов, проходящих терапию пре-

ТАБЛИЦА 1. СРАВНЕНИЕ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ЭПО В СЫВОРОТКАХ ПАЦИЕНТОВ, ПОЛУЧАВШИХ ПРЕПАРАТЫ ЭПО, В ИФА С РАЗНЫМИ СПОСОБАМИ ИММОБИЛИЗАЦИИ рчЭПО НА ПЛАНШЕТЕ

TABLE 1. COMPARISON OF ANTI-EPO ANTIBODIES DETECTION IN SERUM SAMPLES OF PATIENTS TREATED WITH ERYTHROPOIETIN IN ELISA EMPLOYING rhEPO CAPTURING ON THE ELISA PLATES BY DIFFERENT WAYS

Метод иммобилизации рчЭПО Method of immobilization rhEPO	Количество образцов, содержащих АТ к ЭПО Number of samples containing anti-EPO antibody				
	IgG суммарные IgG total	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Пассивная Passive	12	27	8	20	17
Иммунохимическая Immunochemical	39	30	10	30	29
р-значение p-value	< 0,001	0,05	0,05	< 0,001	< 0,001

Примечание. Достигнутый уровень значимости p указывается для критерия Вилкоксона в каждой группе.

Note. The achieved significance level p is indicated for the Wilcoxon test in each group.

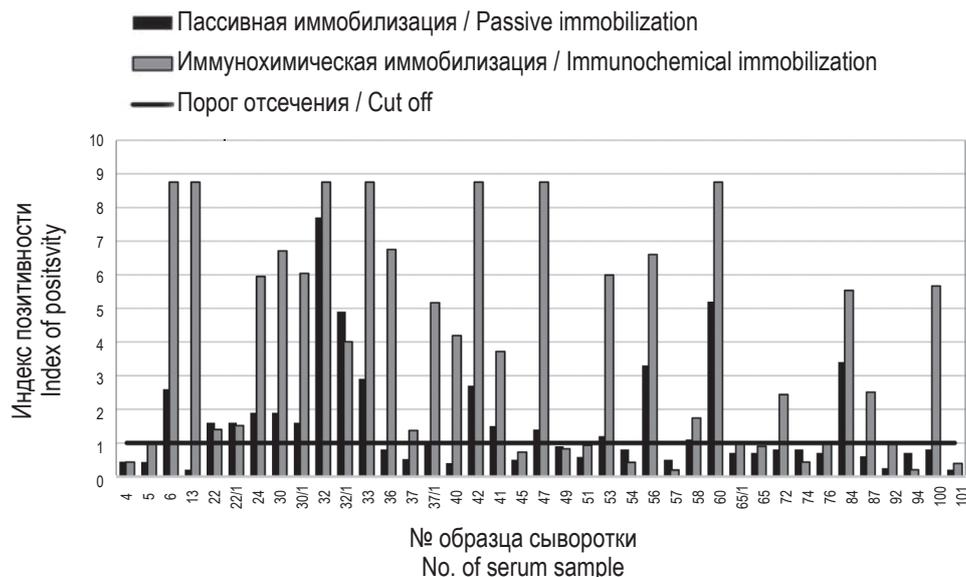


Рисунок 1. Результаты выявления IgG4-антител к эритропоэтину в ИФА с разными способами иммобилизации рчЭПО на планшете

Figure 1. Result obtained for anti-EPO IgG4 antibodies detection in ELISA employing rhEPO capturing on the ELISA plates by different ways

паратами эритропоэтина, свидетельствуют, что при иммунохимической иммобилизации чрЭПО достигнута более высокая чувствительность, однако этот эффект проявлялся в разной степени (табл. 1). В качестве примера приведены результаты определения IgG4-антител на рисунке 1. В целом суммарные IgG-антитела выявлены в 39 из 106 образцов, то есть в 36,8%, в 36 образцах наличие суммарных антител подтвердилось выявлением антител разных подклассов.

Для количественного определения суммарных IgG были использованы поликлональные антитела кролика к ЭПО и конъюгат белка А с пероксидазой. Содержание антител в исследуемых образцах определяли по калибровочному графику, построенному на основании концентрации калибровочных образцов и соответствующим им значениям ОП. Для построения калибровочного графика были выбраны шесть калибровочных образцов с концентрацией 16, 31, 62, 125, 250, 500, 1000 нг/мл. Измерение каждого калибровочного образца проводили в 4 повторях и коэффициент вариации каждого образца составил 1,4-6,6% и для нижнего калибратора 9,6%. Предел обнаружения составил 12 нг/мл, а предел количественного обнаружения 31 нг/мл. Пример калибровочного графика представлен на рисунке 2. Для оценки правильности аналитической методики использовали тест на линейность при разведении и метод добавок. В методе добавок анализировали как тестируемые сыворотки, так и их смеси с калибровочными образцами в равных объемах, далее определяли содержание антител

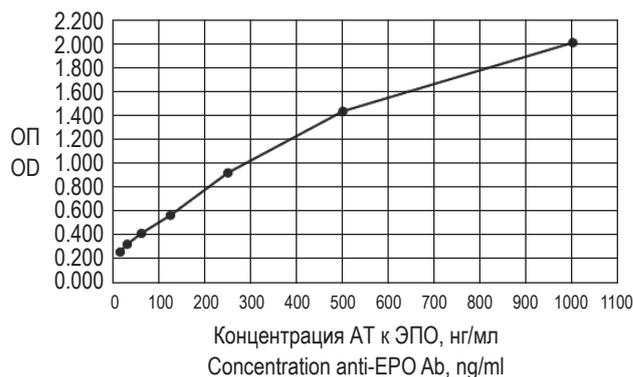


Рисунок 2. Пример калибровочного графика для определения анти-ЭПО антител

Примечание. В качестве стандарта использовались поликлональные антитела кролика к ЭПО человека.

Figure 2. Standard curve of an anti-EPO ELISA

Note. Rabbit polyclonal anti-EPO antibody was used as standards.

по калибровочному графику и сравнивали полученные значения с расчетными. Процент отклонения экспериментальных данных от расчетных составил не более 18% для двух методов. Оценку воспроизводимости проводили при определении содержания антител к ЭПО в исследуемых образцах сывороток в трех независимых экспериментах, при этом коэффициент вариации не превышал 12%.

У 28 пациентов антитела выявлены в концентрации от 3,2-35,5 мкг/мл, при этом у 8 пациентов уровень антител был более чем 50 мкг/мл и у 3 находился ниже предела количественного обнаружения.

ТАБЛИЦА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА СЫВОРОТОК КРОВИ ПАЦИЕНТОВ, ПРОХОДЯЩИХ ТЕРАПИЮ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМИ ПРЕПАРАТАМИ ЭРИТРОПОЭТИНА

TABLE 2. CHARACTERISTICS OF SERUM SAMPLES OF PATIENTS TREATED WITH ERYTHROPOIETIN

№	ИП* IP*	АТ к ЭПО, мкг/мл anti-EPO Ab, µg/ml	ИА** IA**	Содержание подклассов IgG Contents of IgG subclasses
4	2,3	< ПКО*** < LLOQ***	–	IgG1, IgG3
5	2,1	5,6	24	IgG1, IgG3, IgG4
6	2,2	> 50	51	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4
13	1,9	6,7	52	IgG1, IgG3, IgG4
22	2,9	26,2	25	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4
22/1	2,1	19,7	24	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4
24	5,8	> 50	64	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4
30	7,6	> 50	44	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4
30/1	7,4	23,9	43	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4
32	7,1	> 50	54	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4
32/1	3,9	> 50	52	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4
33	2,9	15,0	39	IgG4
36	3,5	> 50	30	IgG1, IgG3, IgG4
37	1,8	13,4	34	IgG3, IgG4
37/1	3,0	17,9	16	IgG1, IgG3, IgG4
40	2,6	6,4	30	IgG3, IgG4
41	7,5	11,1	42	IgG1, IgG3, IgG4
42	2,1	27,8	28	IgG1, IgG3, IgG4
45	2,3	3,2	–	–
47	3,0	24,0	29	IgG1, IgG4
49	4,2	13,3	31	IgG1, IgG3
51	1,5	< ПКО < LLOQ	–	–
53	2,9	12,7	30	IgG1, IgG3, IgG4
54	6,6	33,3	13	IgG1, IgG3
56	6,8	35,5	25	IgG1, IgG3, IgG4
57	3,3	9,1	41	IgG1
58	1,2	4,7	41	IgG1, IgG3, IgG4
60	5,2	> 50	18	IgG4
65	1,8	7,6	30	IgG3, IgG4
65/1	1,5	5,9	24	IgG2, IgG3, IgG4
72	3,1	8,5	32	IgG1, IgG3, IgG4
74	4,1	10,8	32	IgG1, IgG3
76	2,1	6,3	–	IgG1, IgG3
84	11,8	> 50	56	IgG1, IgG4
87	2,8	18,3	37	IgG1, IgG3, IgG4
92	1,9	8,0	23	IgG1, IgG3, IgG4
94	2,1	15,7	48	IgG1, IgG3
100	1,5	7,9	19	IgG1, IgG2, IgG4
101	1,3	< ПКО < LLOQ	–	–

Примечание. * – результаты получены в методе с иммунохимической иммобилизацией эритропоэтина. ** – индекс avidности рассчитывался при ОП ≥ 0,4. *** – предел количественного обнаружения.

Note. *, the results were obtained in the method with immunochemical immobilization of EPO. **, the avidity index was calculated at OD ≥ 0.4. ***, the lower limit of quantification.

Характеристика сывороток пациентов, у которых были выявлены суммарные IgG-антитела к эритропоэтину, включающая оценку их количественного содержания, индексы авидности и изотипы, представлена в таблице 2.

Обсуждение

Полученные результаты показали, что выбор метода иммобилизации чрЭПО влияет на чувствительность выявления антител к ЭПО в сыворотках крови пациентов, получавших терапевтические препараты ЭПО. Эффект метода иммобилизации проявлялся в разной степени, наиболее выраженный эффект наблюдался при выявлении суммарных IgG-, IgG3- и IgG4-антител к эритропоэтину (табл. 1). В целом индекс позитивности изменялся в широком диапазоне: от уменьшения (в единичных случаях) до увеличения в 43 раза.

Сравнение двух аналогичных подходов при проведении иммуноферментного анализа в формате, когда для захвата и детекции антител к эритропоэтину использовали антиген, было проведено в работах [9, 21]. Более высокая чувствительность была достигнута также при применении планшетов с иммобилизованным стрептавидином для связывания биотинилированного эритропоэтина, при этом разница в количестве выявленных антител отличалась для различных образцов сывороток крови пациентов, проходящих терапию препаратами рекомбинантного эритропоэтина и в отдельных случаях превышала два порядка.

Разница в чувствительности методов вероятно определяется конформацией иммобилизованного антигена и характером антител в анализируемом образце. Пассивная сорбция может приводить к изменению конформации чрЭПО и, соответственно, к недоступности ряда эпитопов для связывания со специфическими антителами к конформационным эпитопам. По литературным данным, в большинстве образцов сывороток крови пациентов с полной аплазией красного костного мозга обнаружены антитела к нативным эпитопам эритропоэтина и лишь в единичных случаях — к денатурированной форме ЭПО [5]. Можно предположить, что такой характер синтеза наблюдается не только для нейтрализующих антител, что делает использование метода с иммунохимической иммобилизацией антигена предпочтительным.

В настоящем исследовании суммарные IgG-антитела были выявлены в 36,8% образцов сывороток крови пациентов, получавших препараты ЭПО, что согласуется с литературными данными, где частота выявления была в пределах от 6 до 67% [3, 8, 19].

При количественном определении суммарных IgG-антител для приготовления калибровочных образцов использовали поликлональные антитела кролика к ЭПО с известной концентрацией. При оценке правильности и воспроизводимости такой методики в тестах на линейность при разведении, методе добавок и при определении коэффициента вариации были получены результаты, являющиеся приемлемыми в соответствии с рядом нормативных документов [11, 12, 13]. Однако следует отметить, что наблюдалась низкая корреляция между результатами выявления антител с использованием антивидового конъюгата и конъюгата белка А с пероксидазой.

По результатам работы, у 28 пациентов антитела были выявлены в концентрациях от 3,2 до 35,5 мкг/мл, при этом у 8 пациентов уровень антител был более чем 50 мкг/мл. При отсутствии доступных стандартных образцов, содержащих антитела человека, поликлональные антитела кролика к ЭПО использовали для количественного определения в ряде работ, где антитела к эритропоэтину были выявлены до концентрации 7 мкг/мл и 30 мкг/мл соответственно [9, 15]. При этом во всех исследованиях источником стандартных образцов служили поликлональные антитела кролика к ЭПО человека из разных источников, что затрудняет сравнение результатов.

Определение индекса авидности показало, что только у 6 пациентов были выявлены антитела с индексом авидности более 50%, которые можно рассматривать как высокоавидные, при этом у 5 из них выявленное содержание антител к ЭПО превышало 50 мкг/мл.

У большинства пациентов были обнаружены антитела различных изотипов, в 3-х образцах детектированы только IgG1- или IgG4-антитела к ЭПО. Превалирование антител IgG1-подкласса (в 83,3% образцов) коррелирует с описанными данными [3], IgG4-антитела были выявлены в 80,6% случаев. Все подклассы IgG-антител были обнаружены у 8 пациентов. У трех пациентов наличие суммарных IgG-антител не было подтверждено выявлением антител хотя бы одного из подклассов, что может свидетельствовать как о более высокой чувствительности метода выявления суммарных IgG-антител, так и о ложнопозитивном результате. Анализ данных по исследуемой выборке показывает, что во всех случаях антитела IgG2- и/или IgG3-подклассов выявлялись в присутствии IgG1- или IgG4-антител, что позволяет использовать выявление антител IgG1- или IgG4-подклассов для подтверждения специфичности выявления суммарных IgG-антител к ЭПО.

Список литературы / References

1. Кудряшова А.М., Борисова О.В., Михайлова Н.А., Лоншаков Д.В., Катлинский А.В. Влияние методов иммобилизации эритропоэтина на чувствительность выявления специфических IgG к ЕПВ в сыворотках крови экспериментальных животных // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунологии, 2017. №. 6. С. 49-55. [Kudryashova A.M., Borisova O.V., Mikhailova N.A., Lonshakov D.V., Katlinsky A.V. Effect of methods of immobilization of erythropoietin on the sensitivity for the detection of specific IgG to EPO in experimental animals sera. *Zhurnal mikrobiologii epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2017, no. 6, pp. 49-55. (In Russ.)]
2. Barger T.E., Kuck A.J., Chirmule N., Swanson S.J., Mytych D.T. Detection of anti-ESA antibodies in human samples from PRCA and non-PRCA patients: an immunoassay platform comparison. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2012, Vol. 27, pp. 688-693.
3. Barger T.E., Wrona D., Goletz T.J., Mytych D.T. A detailed examination of the antibody prevalence and characteristics of anti-ESA antibodies. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2012, Vol. 27, no. 10, pp. 3892-3899.
4. Bennett C.L., Luminari S., Nissenson A.R., Tallman M.S., Klinge S.A., McWilliams N., McKoy J.M., Kim B., Lyons E.A., Trifilio S.M., Raisch D.W., Evens A.M., Kuzel T.M., Schumock G.T., Belknap S.M., Locatelli F., Rossert J., Casadevall N. Pure red-cell aplasia and epoetin therapy. *N. Engl. J. Med.*, 2004, Vol. 351, no. 14, pp. 1403-1408.
5. Casadevall N. Antibodies against rHuEPO: native and recombinant. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2002, Vol. 17, no. 5, pp. 42-47.
6. Casadevall N., Eckardt K.U., Rossert J. Epoetin-induced autoimmune pure red cell aplasia. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2005, Vol. 16, no.1, pp. 67-69.
7. Casadevall N., Nataf J., Viron B., Kolta A., Kiladjian J.J., Martin-Dupont P., Michaud P., Papo T., Ugo V., Teyssandier I., Varet B., Mayeux P. Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N. Engl. J. Med.*, 2002, Vol. 346, no. 7, pp. 469-475.
8. El-Din M., Attia F., Labib S., Omar W. Detection of circulating antierythropoietin antibodies in patients with end stage renal disease on regular hemodialysis. *Int. J. Lab. Hematol.*, 2010, Vol. 32, no. 3, pp. 336-343.
9. Gross J., Moller R., Henke W. Detection of anti-EPO antibodies in human sera by a bridging ELISA is much more sensitive when coating biotinylated rhEPO to streptavidin rather than using direct coating of rhEPO. *J. Immunol. Methods*, 2006, Vol. 313, no. 1-2, pp. 176-182.
10. Guideline on immunogenicity assessment of therapeutic proteins. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2017. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-immunogenicity-assessment-therapeutic-proteins-revision-1_en.pdf.
11. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products of Human Use (CHMP), 2009. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-validation-bioanalytical-methods_en.pdf.
12. Guideline Validation of analytical procedures (Q2 R1), ICH harmonised tripartite guideline, 2005. Available at: https://database.ich.org/sites/default/files/Q2_R1_Guideline.pdf.
13. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 2013. Available at: <http://academy.gmp-compliance.org/guidemgr/files/UCM368107.PDF>.
14. Herrington W., Wieser C., Rosenkranz A.R. Pure red cell aplasia after treatment of renal anaemia with epoetin theta. *Clin. Kidney J.*, 2013, Vol. 6, no. 5, pp. 539-542.
15. Hoesel W., Gross J., Moller R., Kanne B., Wessner A., Müller G., Müller A., Gromnica-Ihle E., Fromme M., Bischoff S., Haselbeck A. Development and evaluation of a new ELISA for the detection and quantification of antierythropoietin antibodies in human sera. *J. Immunol. Methods*, 2004, Vol. 294, no. 1-2, pp. 101-110.
16. Macdougall I.C., Casadevall N., Locatelli F., Combe C., London G.M., di Paolo S., Kribben A., Fliser D., Messner H., McNeil J., Stevens P., Santoro A., de Francisco A.L., Percheson P., Potamianou A., Foucher A., Fife D., Mérit V., Vercammen E. Incidence of erythropoietin antibody-mediated pure red cell aplasia: the Prospective Immunogenicity Surveillance Registry (PRIMS). *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2015, Vol. 30, no. 3, pp. 451-460.
17. Macdougall I.C., Roger S.D., de Francisco A., Goldsmith D.J., Schellekens H., Ebberts H., Jelkmann W., London G., Casadevall N., Hörl W.H., Kemeny D.M., Pollock C. Antibody-mediated pure red cell aplasia in chronic kidney disease patients receiving erythropoiesis stimulating agents: new insights. *Kidney Int.*, 2012, Vol. 81, no. 8, pp. 727-732.
18. Nakane P.K., Kawaoi A.J. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *Histochem. Cytochem.*, 1974, Vol. 22, no. 2, pp. 1084-1091.

19. Öztürk S., Gümüş A., Memili V., Düz M.E., Cebeci E., Koldaş M., Kazancıoğlu R. Antierythropoietin Antibodies in hemodialysis patients treated with recombinant erythropoietin. *Turk. Neph. Dial. Transpl.*, 2014, Vol. 23, no. 2, pp. 125-130.
20. Seidl A., Hainzl O., Richter M., Fischer R., Böhm S., Deutel B., Hartinger M., Windisch J., Casadevall N., London G.M., Macdougall I. Tungsten-induced denaturation and aggregation of epoetin alfa during primary packaging as a cause of immunogenicity. *Pharm. Res.*, 2012, Vol. 29, no. 6, pp. 1454-1467.
21. Shin S.K., Ha S.K., Lee K.W., Yoo T.H., Yun S.R., Yoon S.H., Kim S.J., Lee S.K., Heo T.H. Application of a bridging ELISA for detection of anti-erythropoietin binding antibodies and a cell-based bioassay for neutralizing antibodies in human sera. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2010, Vol. 52, no. 2, pp. 289-293.
22. Weeraratne D.K., Kuck A.J., Chirmule N., Mytych D.T. Measurement of anti-erythropoiesis-stimulating agent IgG4 antibody as an indicator of antibody-mediated pure red cell aplasia. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2013, Vol. 20, no. 1, pp. 46-51.

Авторы:

Кудряшова А.М. — научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Нестеренко Л.Н. — к.х.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клонирования вирусных геномов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Генералова Г.А. — педиатр-нефролог, Центр гравитационной хирургии крови и гемодиализа «ГБУЗ «Детская городская клиническая больница святого Владимира Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

Authors:

Kudryashova A.M., Research Associate, Laboratory of Medical Biotechnology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Nesterenko L.N., PhD (Chemistry), Leading Research Associate, Viral Genome Cloning Laboratory, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Generalova G.A., Pediatrician-Nephrologist, Centre of Gravitational Surgery of Blood and Hemodialysis, Children's City Clinical Hospital of St. Vladimir, Moscow Department of Health, Moscow, Russian Federation

Абасеева Т.Ю. — педиатр-нефролог, Центр гравитационной хирургии крови и гемодиализа «ГБУЗ «Детская городская клиническая больница святого Владимира Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

Михайлова Н.А. — д.м.н., профессор, заведующая лабораторией протективных антигенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Борисова О.В. — к.х.н., заведующая лабораторией медицинской биотехнологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Abaseeva T. Yu., Pediatrician-Nephrologist, Center of Gravitational Surgery of Blood and Hemodialysis, Children's City Clinical Hospital of St. Vladimir, Moscow Department of Health, Moscow, Russian Federation

Mikhailova N.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Protective Antigens, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Borisova O.V., PhD (Chemistry), Head, Laboratory of Medical Biotechnology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Поступила 23.10.2019
Отправлена на доработку 20.11.2019
Принята к печати 03.12.2019

Received 23.10.2019
Revision received 20.11.2019
Accepted 03.12.2019