

УДК 571.27

## ПРОБЛЕМА ИММУНОГЕННОСТИ ГЕНО-ИНЖЕНЕРНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ИНТЕРФЕРОНА-БЕТА

© 2016 В.Д. Назаров<sup>1\*</sup>, С.В. Лапин<sup>1</sup>, А.В. Мазинг<sup>1</sup>,  
Е.П. Евдошенко<sup>2</sup>, А.А. Тоголян<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Минздрава России, 197022 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: nazarov19932@mail.ru

<sup>2</sup> СПбГБУЗ «Городская клиническая больница №31», 197110 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: e.evdoshenko@gmail.com

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 197101 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: pasteur@pasteurorg.ru

Поступила в редакцию 13.06.16

После доработки 29.08.16

Рассеянный склероз – тяжелое аутоиммунное заболевание с воспалительным компонентом, которое пока не поддается излечению. Одним из применяемых подходов, позволяющих замедлить развитие заболевания, является неспецифическая терапия препаратами на основе рекомбинантного интерферона-бета (IFN-β). Серьезную проблему представляет синтез иммунной системой пациента нейтрализующих антител (НАТ) к генно-инженерным лекарственным препаратам, которые снижают их терапевтическую и биологическую активность. Поскольку прямое измерение противовирусной активности IFN-β является сложным в практическом исполнении, используют чувствительные к препарату клеточные линии, которые также позволяют определять и уровни НАТ. Данная работа посвящена стандартизации и валидации репортерной клеточной системы измерения титра НАТ к препаратам IFN-β человека. Представлены результаты апробации предложенной методологии на 33 пациентах с рассеянным склерозом.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** рассеянный склероз, иммуногенность, интерферон-бета, нейтрализующие антитела, титр.

Генно-инженерные биологические препараты (ГИБП) представляют собой белки, получаемые с помощью технологии рекомбинантной ДНК. К ГИБП относятся рекомбинантные белки и моноклональные антитела, модифицированные методами генной инженерии [1, 2]. В отличие от низкомолекулярных лекарственных препаратов, ГИБП обладают иммуногенностью, которая проявляется как в отношении молекул биопрепарата, так и против родственных белков организма [3]. В некоторых случаях она является основным достоинством ГИБП. Так, у рекомбинантных компонентных вакцин высокая иммуногенность субстанции определяет ее тера-

певтическую эффективность [4]. Однако в некоторых случаях повышенная иммуногенность тормозит развитие новых направлений использования ГИБП. Данная проблема стала особо актуальной в связи с расширением перечня препаратов, которые широко используются в современной медицине. Среди множества факторов, определяющих иммуногенность того или иного белка, выделяют различия в первичной последовательности, а также в посттрансляционных модификациях, отличающих белковый биопрепарат и эндогенный белок. Кроме того, на иммуногенность влияют способ введения ГИБП, наличие примесей, длительность хранения и стабильность раствора, а также генетические особенности, определяющие индивидуальный иммунный ответ [5].

Одним из первых ГИБП, разрешенных для медицинского применения еще в 1993 г., был препарат рекомбинантного IFN-β человека для

Принятые сокращения: ГИБП – генно-инженерные биологические препараты; IFN-β – интерферон-бета; РС – рассеянный склероз; НАТ – нейтрализующие антитела; РФ – ревматоидный фактор; ЛЕ – лабораторная единица.

\* Адресат для корреспонденции.

лечения рассеянного склероза (РС) [6]. Точный механизм терапевтического действия IFN- $\beta$  до сих пор остается неясным, но введение препаратов этого белка при РС снижает проницаемость гематоэнцефалического барьера, подавляет миграцию клеток иммунной системы, модифицирует продукцию цитокинов и Т-клеточный ответ. При повторном подкожном введении препараты IFN- $\beta$  индуцируют значимый гуморальный иммунный ответ [7].

Считается, что образование высокомолекулярных агрегатов при хранении является важнейшей причиной повышенного иммунного ответа на ГИБП. За счет высокой плотности повторяющихся Т- и В-клеточных эпитопов и индукции вторичного воспаления при подкожном введении агрегаты белка обладают выраженными адьювантными свойствами [8]. Во многих исследованиях показана прямая корреляция между образованием белковых агрегатов, повышенной иммуногенностью и сниженной биологической активностью ГИБП [3, 8, 9]. Посттрансляционное гликозилирование молекул оказывает значительное влияние на растворимость, фармакокинетику препарата и склонность к формированию агрегатов. Было показано, что 98% гликозилированных молекул IFN- $\beta$ -1a в растворе находятся в виде мономера, в то время как 60% негликозилированного IFN- $\beta$ -1b состоит из объемных растворимых агрегатов с молекулярной массой 600 кДа [8]. Искусственное дегликозилирование молекул IFN- $\beta$ -1a увеличивает их чувствительность к денатурации и снижает биологическую активность из-за образования нерастворимых агрегатов, связанных друг с другом дисульфидными связями [9]. Взаимосвязь между высокой иммуногенностью и белковыми агрегатами препаратов была установлена также для рекомбинантного фактора роста, VIII фактора свертывания, моноклональных иммуноглобулинов, IFN- $\alpha$  [3].

Антитела, синтезирующиеся против ГИБП, условно разделяют на связывающие и нейтрализующие. Пул исходных связывающих антител, возникающих на ранних этапах терапии IFN- $\beta$ , на фоне продолжающейся иммунизации препаратом в ходе терапии постепенно замещается на нейтрализующие антитела (НАТ), которые блокируют домены молекул IFN- $\beta$ , ответственные за его связывание с рецепторами клеток. Это значительно снижает или полностью ингибирует терапевтическую и биологическую активность препарата. Распространенность НАТ к IFN- $\beta$  сильно варьирует в зависимости от лекарственной формы используемого препарата, методики определения и времени детекции антител и составляет 2–36% [8]. Значимые титры

НАТ появляются через 9–18 месяцев терапии. Отрицательный эффект, оказываемый антителами на терапевтическую эффективность IFN- $\beta$ , был обнаружен еще во время первых исследований препарата Бетаферона в 1996 г. и сегодня считается доказанным фактом [10].

Основным свойством НАТ является подавление биологической активности IFN- $\beta$ . Классическим подходом к определению биоактивности интерферонов является тест на ингибирование цитопатического эффекта вируса в клеточной культуре. Концентрация IFN- $\beta$ , равная 1 ЛЕ/мл, соответствует максимальному разведению, которое защищает 50% клеток линии от цитодеструктивного действия вируса. Однако из-за сложности выполнения в рутинных лабораторных условиях этот тест не нашел широкого распространения, хотя до сих пор считается «золотым стандартом» [11].

Перспективным подходом к разработке биотеста для определения НАТ к IFN- $\beta$  является репортерная трансгенная тест-система, основанная на клеточной линии HL-116 фибросаркомы человека, несущей стабильный трансген люциферазы, экспрессия которого контролируется регуляторной областью генов интерферонного ответа. Когда IFN- $\beta$  связывается со своим рецептором, активируется каскад событий, приводящих к транскрипции репортерного гена, и синтезу определенного количества люциферазы. Измеряя ее уровень, можно косвенно определить и уровень биологической активности IFN- $\beta$ , а также концентрацию НАТ [12, 13]. Мы использовали данную линию для разработки метода определения НАТ к IFN- $\beta$  у больных РС.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании принимали участие 33 больных РС, получавших терапию IFN- $\beta$ -1a в течение года и более в Санкт-Петербургском Городском центре рассеянного склероза и аутоиммунных заболеваний. Исследование было одобрено этическим комитетом Городской клинической больницы № 31. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Для валидации и стандартизации методик были использованы сыворотки крови пяти больных другими аутоиммунными заболеваниями: критерияльно-подтвержденным ревматоидным артритом со значениями ревматоидного фактора (РФ) от 60 до 2000 МЕ/мл, положительные контрольные образцы, содержащие антитела к двуспиральной ДНК (аттестованное значение 1 : 320), гладким мышцам (аттестованное зна-

чение 1 : 160), антинуклеарный фактор (аттестованное значение 1 : 500), десять доноров крови, не получавших препараты IFN- $\beta$  и не имеющих аутоиммунных заболеваний, а также два контрольных образца НАТ, полученных на основе козьей сыворотки, содержащих антитела к интерферону человека с высоким (1 : 320) и низким титром (1 : 20), а также отрицательный образец (0 TRU) на основе козьей сыворотки.

Для определения титра НАТ к IFN- $\beta$  использовали клеточную линию фибросаркомы человека HT-1080 (АТСС) клон HL-116, несущую стабильный трансген люциферазы, экспрессия которого контролируется регуляторной областью генов интерферонового ответа [13]. Клеточная линия HL-116, а также контрольные образцы антител к интерферону были любезно предоставлены профессором G. Giovannoni (Лондон, Великобритания). Культуры клеточных линий выращивали на среде DMEM («Биолот», Россия), содержащей 10%-ную эмбриональную телячью сыворотку («Биолот», Россия), 1% антибиотика/антимикотика, а также селективную среду (гипоксантин-аминоптерин-тимидин). После достижения 80% монослоя клеток, культуру пересаживали в 96-луночный адгезионный планшет для клеточных культур («Thermo Scientific», США) и культивировали еще сутки. Концентрация клеток в каждой лунке составляла  $4 \times 10^4$  клеток.

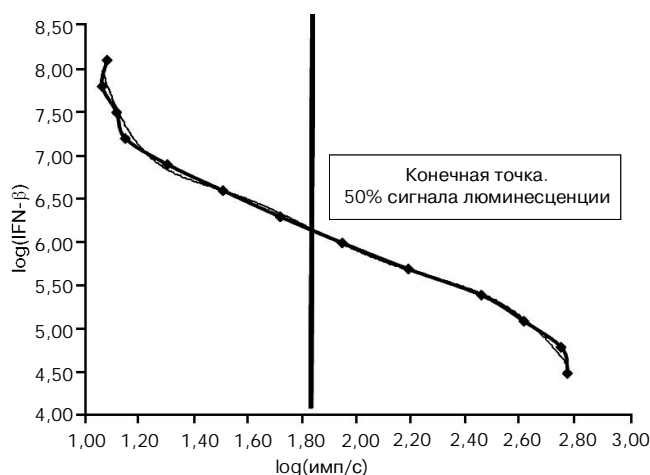
Для расчета концентрации терапевтического препарата IFN- $\beta$ -1a («Авонекс», Россия), равной одной лабораторной единице (ЛЕ/мл), строили стандартную кривую двукратных разведений препарата в культуральной жидкости в диапазоне концентраций 200–0,05 МЕ/мл. Известно, что 10 ЛЕ/мл IFN-бета-1a («Авонекс», Россия) соответствует 20 МЕ/мл. В связи с высокой концентрацией IFN- $\beta$  раствор первоначально был разведен до 1000 МЕ/мл (соответствует 500 ЛЕ/мл), а далее до 200 МЕ/мл (соответствует 100 ЛЕ/мл). Каждое разведение IFN- $\beta$  инкубировали в культуре клеток в течение 5 ч, после чего добавляли субстрат люциферазы (люциферин), клетки лизировали и проводили измерение люминесцентного сигнала (в импульсах в секунду). Для детекции уровня люциферазы использовали наборы реактивов Steady Glo Luciferase Kit («Promega», США). Для измерения уровня люминесценции использовали микропланшетный люцинометр LM-01T с термостатом («Immunotech», Чехия) с программным обеспечением LIANA. После проведения измерений строили стандартную кривую разведений. Оси абсцисс соответствовал логарифм полученного люминесцентного сигнала (имп/с), а оси ординат – логарифм значений разведения IFN- $\beta$ .

Используя уравнение полиномиальной регрессии, была рассчитана конечная точка теста, равная 1 лабораторной единице/мл (ЛЕ/мл) и соответствующая 50% полученного люминесцентного сигнала разведений стандартной кривой (рис. 1).

Для определения НАТ к IFN- $\beta$  в исследуемые сыворотки в серийных разведениях 1 : 20–1 : 2560 инкубировали в течение 1 ч с IFN- $\beta$ -1a в концентрации 10 ЛЕ/мл, вычисленной на основании стандартной кривой. После этого смесь сыворотки и интерферона инкубировали с клеточной культурой в лунках 96-луночного планшета в течение 5 ч, после чего добавляли люциферин, переносили лизат клеточной культуры в планшеты для люцинометрии и проводили измерение люминесцентного сигнала. Все исследования проводили в двойных повторах, и результаты усредняли.

В каждом опыте создавали стандартную кривую разведений IFN- $\beta$  в диапазоне концентраций 10–0,08 ЛЕ/мл для расчета точного значения 1 ЛЕ/мл и внесения поправок. Поправочный фактор (N) рассчитывали путем деления уровня разведения IFN- $\beta$ , требуемого для достижения конечной точки, равной 1 ЛЕ/мл, в стандартной кривой и уровня разведения IFN- $\beta$ , требуемого для достижения конечной точки, в поправочной кривой. Это позволяет скорректировать возможную ошибку разведений IFN- $\beta$  и нормализовать влияние случайных факторов при культивировании клеток.

Конечный титр сыворотки рассчитывали путем определения точки на графике разведений



**Рис. 1.** Стандартная кривая двукратных разведений IFN- $\beta$ -1a в диапазоне концентраций 200–0,05 МЕ/мл. По оси абсцисс отложен логарифм полученного люминесцентного сигнала  $\log(\text{имп/с})$ , а по оси ординат – логарифм значений разведения IFN- $\beta$   $\log(\text{IFN-}\beta)$ . Вертикальной линией отмечена конечная точка, равная 1 ЛЕ/мл

сыворотки и разведения IFN- $\beta$ , соответствующей 1 ЛЕ/мл.

После этого поправочный фактор использовали для определения нейтрализующего титра НАТ по формуле:

$$T = \frac{F \times (N - 1)}{9},$$

где T – скорректированный титр НАТ, F – разведение сыворотки, снизившее биологический ответ до 1 ЛЕ/мл, N – поправочный фактор [14].

В исследовании использовались референтные значения титров НАТ к IFN- $\beta$ , описанные в международных рекомендациях. Отрицательными образцами считались пробы пациентов с титром НАТ <20, низкие/промежуточные значения титров лежали в диапазоне 20–100, титры НАТ >100 считались высокими показателями [10]. Была проведена валидация и стандартизация методики: определена воспроизводимость метода, пределы детекции, влияние других антител на биологическую активность IFN- $\beta$ . После этого был проведен скрининг 10 доноров и 33 пациентов на наличие НАТ, а в дальнейшем рассчитан точный титр антител.

Для статистической обработки использовали программу Graphpad Prism 6.0. Для изучения связи между двумя переменными использовался метод ранговой корреляции по Спирмену. Уровень значимости для всех статистических тестов принимали менее 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведенная валидация теста на НАТ к препаратам IFN- $\beta$ , измеряемым с помощью репортерной тест-системы на клеточной линии HL-116, позволила определить воспроизводимость метода. Результаты исследований приведены в табл. 1.

Для оценки аналитической точности была выполнена серия экспериментов с положительным контрольным образцом (значение титра НАТ 1000). Стандартное отклонение составило 61,32 (табл. 2).

Исследование минимального предела детекции с помощью пяти повторных измерений культуральной среды (бессывороточная DMEM), не содержащей IFN, позволило определить предел детекции равный 1,056 (табл. 3).

Для исследования возможной интерференции с другими аутоантителами, которые часто образуются у пациентов с аутоиммунными заболеваниями, нами были исследованы пять образцов от больных с ревматоидным артритом с высокими значениями РФ (60–2000 МЕ/мл), а также образцы сыворотки крови, содержащие

**Таблица 1.** Результаты исследования воспроизводимости тестовой системы

Валидационный критерий	Среднее значение, log(имп/с)	Коэффициент вариации, %
Внутрипостановочная воспроизводимость 5 отрицательных образцов (CV)	2,05 ± 0,047	2
Внутрипостановочная воспроизводимость 5 положительных образцов (CV)	1,04 ± 0,033	3
Межпостановочная воспроизводимость 5 отрицательных образцов (CV)	1,45 ± 0,105	7
Межпостановочная воспроизводимость 5 положительных образцов (CV)	0,99 ± 0,041	4

антитела к двуспиральной ДНК (аттестованное значение 1 : 320), гладким мышцам (аттестованное значение 1 : 160), антинуклеарный фактор (аттестованное значение 1 : 500). Не было выявлено влияния на биологическую активность IFN- $\beta$  РФ вне зависимости от его концентрации, а также антинуклеарных антител, антител к гладким мышцам или к двуспиральной ДНК.

После валидации метода была проведена его апробация на выборке, содержащей 33 образца больных РС, получавших терапию IFN- $\beta$ -1а более года, а также 10 образцов сывороток крови здоровых доноров. Как и ожидалось, у всех 10 доноров НАТ к IFN- $\beta$  отсутствовали. С помощью скрининг-теста нами обнаружены НАТ к препаратам IFN- $\beta$  в 11 из 33 образцов (33,3%). Среди исследованных 11 образцов, положительных по результатам скрининга, в 7 выявлено клинически значимое повышение титра НАТ

**Таблица 2.** Повторные измерения контрольных образцов в одной серии

Образцы	Число повторов	Титр НАТ, среднее значение	Стандартное отклонение
Контрольный образец, титр НАТ 1000	20	1022,2	61,32

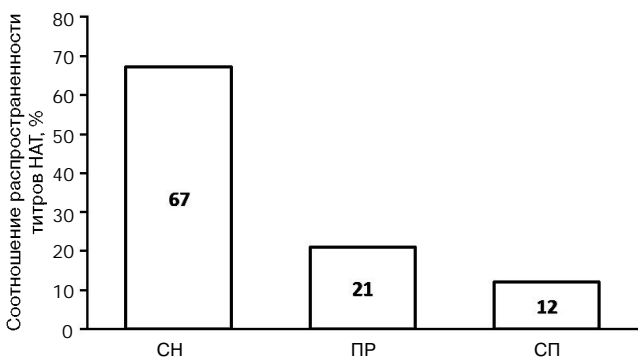
**Таблица 3.** Оценка минимальной чувствительности тест-системы

Показатель	log(имп/с)
Среднее значение пяти измерений бланка	0,953
Стандартное отклонение	0,034
Минимальная чувствительность тест-системы	1,056
Предел чувствительности	1,056

(>20) и в 4 – очень высокое содержание НАТ. Результаты приведены на рис. 2.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Терапия на основе ГИБП используется во многих областях медицины, прежде всего для лечения хронических заболеваний. Во многих случаях терапия биопрепаратами является единственной альтернативой симптоматическому лечению пациентов, предотвращая их раннюю инвалидизацию и смертность. Проблема высокой иммуногенности белковых лекарственных средств и ингибирование терапевтической активности синтезирующимися против них НАТ все острее встает в связи с повсеместным использованием данных препаратов и персонализированной направленности современной медицины. Использование клеточных систем для детекции НАТ к таким ГИБП как IFN- $\beta$  позволяет прямо оценить влияние пула антител на фармакологическую и терапевтическую актив-



**Рис. 2.** Диаграмма распространенности НАТ к препаратам IFN- $\beta$ . СН – серонегативные пациенты, имеющие титр НАТ < 20; ПР – пациенты с пограничной реакцией, имеющие титр НАТ 20-100; СП – серопозитивные пациенты с очень высокими титрами НАТ >100

ность дорогостоящего препарата. Репортерные клеточные линии являются многообещающей тестовой системой оценки биологической активности ГИБП *in vitro*. В отличие от традиционных цитопатических тестов, использование для оценки иммуногенности ГИБП генетически-модифицированных клеточных линий позволяет прямо оценить влияние пула антител на биологическую и фармакологическую активность дорогостоящего препарата. Преимуществами таких биотестов является простота и быстрота культивирования, воспроизводимость биологических ответов, отсутствие необходимости работы с культурами вирусов, что делает репортерные клеточные системы перспективной тестовой платформой как для оценки биологической активности ГИБП *in vitro*, так и для выявления НАТ.

Теоретически предполагается, что при высокой аффинности антитела полностью нейтрализуют фиксированное количество биомолекул, поэтому остаточная активность зависит от исходной концентрации вещества. Однако экспериментальные данные показывают, что для большинства встречающихся антител к ГИБП преобладает пропорциональный вариант нейтрализации, когда низкоаффинными антителами нейтрализуется только определенная часть от общей активности биомолекул. В качестве единицы меры нейтрализации было предложено 10-кратное снижение активности биомолекулы, пропорциональное снижению активности от 10 до 1 ЛЕ/мл. Используемая в данном исследовании методика подразумевает титрование активности антител при неизменной концентрации ГИБП для определения разведения НАТ, снижающих эффект биопрепарата до 1 ЛЕ/мл. Для расчета нейтрализующего титра также вводится поправочный коэффициент разведения сыворотки, приводящий к снижению активности до 1 ЛЕ/мл, определяемый как  $(n-1)/9$ , где  $n$  – исходная концентрация биопрепарата в системе. Подробный обзор по расчету титра нейтрализации опубликован Каваде с соавт. [14].

Проведенная валидация метода детекции НАТ к препаратам IFN- $\beta$ , анализируемым с помощью репортерной тест-системы на клеточной линии HL-116, позволила определить основные аналитические параметры теста и доказать возможность его использования в рутинной лабораторной практике. При оценке аналитических характеристик разработанный биотест продемонстрировал высокую внутрилабораторную воспроизводимость, при анализе в одной лаборатории одних и тех же положительных и отрицательных проб с полным повторением процедуры приготовления образцов и выполнения

всех измерений в разных сериях. Коэффициент вариации CV% ни в одной из серий измерений не превысил критического для иммунометрических тестов порога в 15%, а все результаты валидации соответствуют международным и отечественным валидационным критериям [15].

При проведении клинической апробации валидированной тест-системы было показано, что у 33,3% пациентов обнаруживаются НАТ, при этом у 12% пациентов были выявлены очень высокие титры антител, что соответствует данным, полученным в ходе ряда рандомизированных проспективных, нерандомизированных проспективных, а также ретроспективных исследований [16, 17]. Данные, полученные в настоящей работе, соответствуют результатам ранних клинических исследований препаратов IFN- $\beta$ -1a, а также работам других исследовате-

лей [18, 19]. Так, группы PRISM и SPECTRIMS показали, что у 15–22% пациентов, длительно получающих IFN- $\beta$ -1a, обнаруживаются НАТ [18].

В ходе исследования нам удалось валидировать и стандартизировать методику определения НАТ к препаратам IFN- $\beta$  в соответствии с отечественными и международными рекомендациями. Совместно с другими иммунологическими показателями она может быть использована при лабораторном мониторинге больных с РС, а также применяться для разработки и совершенствования новых отечественных ГИБП.

### Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (соглашение № 16-15-00118).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rader, R. (2008) Redefining biopharmaceutical, *Nat. Biotechnol.*, 26, 743–751.
- Baumann, A. (2006) Early development of therapeutic biologics – pharmacokinetics, *Curr. Drug Metab.*, 7, 15–21.
- Wadhwa, M., Knezevic, I., Kang, H.N., and Thorpe, R. (2015) Immunogenicity assessment of biotherapeutic products: an overview of assays and their utility, *Biologicals*, 43, 298–306.
- WHO. Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations (2004) *WHO Tech Rep.*, 924, 35–102.
- van Beers, M.M.C., and Bardor, M. (2012) Minimizing immunogenicity of biopharmaceuticals by controlling critical quality attributes of proteins, *Biotechnol. J.*, 7, 1473–1484.
- Назаров В.Д., Лапин С.В., Суркова Е.А., Евдошенко Е.П., Макшаков Г.С., Тотолян А.А. (2015) Диагностическая информативность показателей интратекального синтеза свободных легких цепей иммуноглобулинов при рассеянном склерозе, *Медицинская иммунология*, 17, 235–244.
- Nikfar, S., Rahimi, R., and Abdollahi, M. (2010) A meta-analysis of the efficacy and tolerability of interferon- $\beta$  in multiple sclerosis, overall and by drug and disease type, *Clin. Ther.*, 32, 1871–1888.
- Govindappa, K., Sathish, J., Park, K., Kirkham, J., and Pirmohamed, M. (2015) Development of interferon beta-neutralising antibodies in multiple sclerosis – a systematic review and meta-analysis, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 71, 1287–1298.
- van Beers, M.M., Jiskoot, W., and Schellekens, H. (2010) On the role of aggregates in the immunogenicity of recombinant human interferon beta in patients with multiple sclerosis, *J. Interf. Cytokine Res.*, 30, 767–775.
- Polman, C.H., Bertolotto, A., Deisenhammer, F., Giovannoni, G., Hartung, H.P., Hemmer, B., Killestein, J., McFarland, H.F., Oger, J., Pachner, A.R., Petkau, J., Reder, A.T., Reingold, S.C., Schellekens, H., and Sorensen, P.S. (2010) Recommendations for clinical use of data on neutralising antibodies to interferon-beta therapy in multiple sclerosis, *Lancet Neurol.*, 9, 740–750.
- WHO Expert Committee on Biological Standardization. Thirty-fifth report (1985) *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.*, 725, 1–140.
- Deisenhammer, F. (2014) Interferon-Beta: neutralizing antibodies, binding antibodies, pharmacokinetics and pharmacodynamics, and clinical outcomes, *J. Interferon Cytokine Res.*, 34, 938–945.
- Lam, R., Farrell, R., Aziz, T., Gibbs, E., Giovannoni, G., Grossberg, S., and Oger, J. (2008) Validating parameters of a luciferase reporter gene assay to measure neutralizing antibodies to IFN $\beta$  in multiple sclerosis patients, *J. Immunol. Methods*, 336, 113–118.
- Kawade, Y., Finter, N., and Grossberg, S.E. (2003) Neutralization of the biological activity of cytokines and other protein effectors by antibody: theoretical formulation of antibody titration curves in relation to antibody affinity, *J. Immunol. Methods*, 278, 127–144.
- Meager, A., Dolman, C., Dilger, P., Bird, C., Giovannoni, G., Schellekens, H., Thorpe, R., and Wadhwa, M. (2011) An assessment of biological potency and molecular characteristics of different innovator and noninnovator interferon-beta products, *J. Interferon Cytokine Res.*, 31, 383–392.
- Gneiss, C., Tripp, P., Reichartseder, F., Egg, R., Ehling, R., Lutterotti, A., Khalil, M., Kuenz, B., Mayringer, I., Reindl, M., Berger, T., and Deisenhammer, F. (2006) Differing immunogenic potentials of interferon beta preparations in multiple sclerosis patients, *Mult. Scler.*, 12, 731–737.
- Ross, C., Clemmesen, K.M., Sorensen, P.S., Koch-Henriksen, N., and Bendtzen, K. (2006) Measuring and evaluating interferon  $\beta$ -induced antibodies in patients with multiple sclerosis, *Mult. Scler.*, 12, 39–46.
- Manfredonia, F., Pasquali, L., Dardano, A., Iudice, A., Murri, L., and Monzani, F. (2008) Review of the clinical evidence for interferon  $\beta$  1a (Rebif) in the treatment of multiple sclerosis, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, 4, 321–336.
- The IFNB Multiple Sclerosis Study Group (1993) Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Neurology*, 43, 655–661.

IMMUNOGENICITY OF HUMAN  
RECOMBINANT INTERFERON-BETAV. D. Nazarov<sup>1\*</sup>, S. V. Lapin<sup>1</sup>, A. V. Mazing<sup>1</sup>,  
E. P. Evdoshenko<sup>2</sup>, and A. A. Totolian<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Center for Molecular Medicine, Pavlov First Saint Petersburg  
State Medical University, Saint Petersburg 197022,  
Russia; E-mail: Nazarov19932@mail.ru

<sup>2</sup> Municipal Clinical Hospital No. 31, Saint Petersburg  
197110, Russia; E-mail: e.evdoshenko@gmail.com

<sup>3</sup> Saint Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology  
and Microbiology (St. Petersburg Pasteur Institute),  
Saint Petersburg 197101, Russia;  
E-mail: pasteur@pasteurorg.ru

Received June 13, 2016

Revision received August 29, 2016

Biological medications based on genetically modified self-proteins are widely used in modern medicine although they possess a characteristic called immunogenicity. Immunogenicity is the propensity of the therapeutic protein product to induce immune responses against itself and related proteins or to induce immunologically related adverse clinical events. The consequence of increased immunogenicity of biological induction of synthesis of neutralizing antibodies is that it can change pharmacokinetics and pharmacodynamics of the agent, and finally decrease clinical effectiveness of the therapy. Multiple sclerosis is example of a disease where biologicals became the first line therapy. The most commonly used drug for treatment of multiple sclerosis is interferon-beta. Interferon-beta can induce synthesis of neutralizing antibodies that decrease biological and pharmacological activity of the drug. Biological activity of interferon-beta and titer of neutralizing antibodies can be measured with cell lines that are sensitive to interferon-beta. In that article, we present results of standardization and validation of a reporter cell line test system for measuring the titer of neutralizing antibodies to interferon-beta drugs. Also, we present data on the prevalence of neutralizing antibodies to interferon-beta in an approbation cohort of patients with multiple sclerosis.

*Key words:* multiple sclerosis, immunogenicity, interferon-beta, neutralizing antibodies, titer