

<https://doi.org/10.17816/mechnikov33825>

ВЛИЯНИЕ МАРКЕРОВ ИММУНОГЕННОСТИ ТОЦИЛИЗУМАБА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛЕЧЕНИЯ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

В.Д. Назаров¹, С.В. Лапин¹, К.В. Туленко², Р.Р. Самигуллина², В.И. Мазуров²

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург;

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет» им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург

Для цитирования: Назаров В.Д., Лапин С.В., Туленко К.В., и др. Влияние маркеров иммуногенности тоцилизумаба на эффективность лечения ревматоидного артрита // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. – 2020. – Т. 12. – № 1. – С. 31–36. <https://doi.org/10.17816/mechnikov33825>

Поступила: 17.01.2020

Одобрена: 19.02.2020

Принята: 16.03.2020

♦ **Цель исследования** — оценить влияние маркеров иммуногенности тоцилизумаба на эффективность лечения пациентов с ревматоидным артритом.

Материалы и методы. В исследование были включены 17 пациентов с критерияльно подтвержденным ревматоидным артритом, получавших генно-инженерную терапию тоцилизумабом в сочетании с метотрексатом или в варианте монотерапии. У всех пациентов в течение 2,5 года лечения тоцилизумабом раз в полгода производили забор крови непосредственно перед следующим введением данного препарата. Концентрацию антител к тоцилизумабу и уровень препарата определяли с помощью иммуноферментного анализа. Активность ревматоидного артрита оценивали по индексу DAS28. Наряду с этим определяли содержание С-реактивного белка, лейкоцитов, тромбоцитов, ревматоидного фактора и циркулирующих иммунных комплексов.

Результаты. Была выявлена прямая корреляционная связь между уровнем антител к тоцилизумабу с DAS28 (в последней точке исследования) и количеством лейкоцитов. При этом уровень в крови тоцилизумаба обратно зависел от уровня DAS28.

Заключение. Полученные данные указывают на значительное влияние сывороточного уровня препарата, а концентрации антител к нему — на терапевтический эффект терапии ревматоидного артрита. Представленные биомаркеры могут помочь при прогнозировании эффективности терапии ревматоидного артрита, а также способствовать выявлению причин резистентности к тоцилизумабу.

♦ **Ключевые слова:** тоцилизумаб; иммуногенность; ревматоидный артрит.

THE INFLUENCE OF TOCILIZUMAB IMMUNOGENICITY MARKERS ON THE EFFECTIVENESS OF TREATING RHEUMATOID ARTHRITIS

V.D. Nazarov¹, S.V. Lapin¹, K.V. Tulenko², R.R. Samigullina², V.I. Mazurov²

¹ First Pavlov State Medical University of Saint Petersburg, Saint Petersburg, Russia;

² North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia

For citation: Nazarov VD, Lapin SV, Tulenko KV, et al. The influence of tocilizumab immunogenicity markers on the effectiveness of treating rheumatoid arthritis. *Herald of North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov*. 2020;12(1):31-36. <https://doi.org/10.17816/mechnikov33825>

Received: January 17, 2020

Revised: February 19, 2020

Accepted: March 16, 2020

♦ **Purpose.** The study assesses the impact of tocilizumab immunogenicity markers on clinical response to conducted treatment in patients with rheumatoid arthritis.

Materials and methods. A total of 17 patients with the confirmed diagnosis of RA receiving tocilizumab therapy for more than 1 year were enrolled into the study. Blood serum samples were collected once every six months before every drug injection during 2.5 years of treatment. The concentration of antibodies to tocilizumab and level of tocilizumab was determined using the ELISA. Additionally, DAS28 values were measured at the first and the last patient visit during the

course of study, whereas levels of C-reactive protein (CRP), white blood cells, platelets, rheumatoid factor, and circulating immune complexes were only measured at the last examination.

Results. Positive correlations between the antibodies to tocilizumab and the last point DAS28 values were found, as well as a negative correlation of tocilizumab level and the level of DAS28.

Conclusions. The data obtained indicate a significant effect of serum levels of tocilizumab, as well as of the concentration of antibodies to tocilizumab on the effectiveness of RA treatment. A routine study of these biomarkers might be useful for individualizing treatment approaches for RA patients and determining the causes of tocilizumab resistance.

♦ **Keywords:** tocilizumab; immunogenicity; rheumatoid arthritis.

Ревматоидный артрит (РА) представляет собой хроническое системное аутоиммунное заболевание, характеризующееся симметричным поражением периферических суставов, ведущим к их деструкции и анкилозированию, а также вовлечением в патологический процесс различных органов и тканей. В настоящее время РА является важной проблемой внутренней медицины в связи с его высокой распространенностью (от 0,5 до 1 %) в популяции, частым развитием у лиц трудоспособного возраста и достаточно быстро наступающей инвалидностью [1]. Значимый прогресс в понимании патогенеза этого заболевания привел к разработке и внедрению в клиническую практику генно-инженерных биологических препаратов (ГИБП), которые способны блокировать цитокины, вовлеченные в развитие РА. Важную роль в патогенезе РА играет интерлейкин-6 (ИЛ-6), который стимулирует синтез белков острой фазы и провоспалительных цитокинов, а также участвует в активации остеокластов, что вызывает формирование эрозивного процесса в суставах.

При проведении первых клинических исследований с целью оценки эффективности и безопасности различных ГИБП было установлено, что у 30–40 % пациентов с РА уже на начальных этапах терапии формируется резистентность к ГИБП. Эти пациенты обладали первичной резистентностью к ГИБП, которая выявлялась в течение первых 12 нед. терапии. Причины первичной резистентности до сих пор до конца не известны, но удалось выяснить, что уровень ответа на ГИБП в первые 12 нед. лечения обратно коррелирует с индексом массы тела, длительностью заболевания, курением, а также со степенью активности РА [2, 3].

Со временем у пациентов с РА может возникать так называемая вторичная резистентность к ГИБП, которая формируется на фоне достаточно высокой эффективности проводимой терапии биологическими препаратами и сопровождается нарастанием активности РА и прогрессирующим деструктивным процессом

в суставах. Следует отметить, что вторичная резистентность наблюдается в среднем у 30 % пациентов с РА, длительно получающих лечение ГИБП. Большинство исследователей связывают развитие вторичной резистентности со снижением сывороточной концентрации ГИБП в связи с усиленной деградацией белковых молекул ретикулоэндотелиальной системой, а также с образованием антител к ГИБП, способных нейтрализовать биологические эффекты этой группы препаратов [4]. Чаще всего паратопом нейтрализующих антител являются эпитопы связывания ГИБП со своим лигандом. Формируя иммунные комплексы, нейтрализующие антитела не только ингибируют связывание препарата с таргетной молекулой, но и ускоряют клиренс ГИБП [5]. Наряду с нейтрализующими антителами у пациентов, получающих ГИБП, могут вырабатываться связывающие антитела, которые могут синтезироваться к любому участку молекулы ГИБП [6].

В 2010 г. был лицензирован препарат тоцилизумаб (ТОЦ) — ингибитор рецептора ИЛ-6, представляющий собой моноклональное антитело, специфически связывающее мембранную и растворимую форму рецептора ИЛ-6. Как и другие ГИБП, ТОЦ показал высокую эффективность в снижении степени воспалительной активности РА, а также замедлении прогрессирования эрозивного процесса в суставах [7].

Цель данной работы заключалась в изучении влияния иммуногенности ТОЦ на эффективность лечения пациентов с РА.

Материалы и методы

В исследование были включены 17 пациентов с подтвержденным диагнозом РА согласно критериям ACR/EULAR (от англ. American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism) 2010 г. и принимавших препарат ТОЦ в течение 2,5 года в центре терапии генно-инженерными биологическими препаратами клиники им. Э.Э. Эйхвальда. Следует отметить, что 8 пациентам этой группы была назначена

комбинированная терапия ТОЦ с метотрексатом, а 9 больным РА — монотерапия ТОЦ. Десять пациентов получали ТОЦ в дозе 400 мг внутривенно раз в месяц, 5 обследованных — в дозе 600 мг и 2 пациента — в дозе 360 мг.

Все пациенты дали согласие на забор биологического материала и использование личных данных [8].

Исходно, а также через 6 и 18 мес. перед очередным введением ГИБП производили забор крови для определения уровня ТОЦ и антител к нему, а также содержания в сыворотке крови С-реактивного белка (СРБ), лейкоцитов, тромбоцитов, ревматоидного фактора и циркулирующих иммунных комплексов. Кроме этого перед началом и завершением исследования оценивали индекс активности РА по DAS28. Точка 0 использована в качестве группы контроля.

Концентрацию антител к ТОЦ (ImmunoGuide, Турция) определяли с помощью непрямого неконкурентного варианта иммуноферментного анализа (ИФА), основанного на реакции связывания анти-ГИБП-антител с адсорбированными на дне лунки препаратами. Все манипуляции и измерения осуществляли в соответствии с инструкцией производителя.

Для подтверждения специфичности связывания антител к ГИБП был проведен тест нейтрализации антител. Пошаговые разведения препарата ТОЦ в концентрации 100, 10 и 1 мкг/мл инкубировали с положительным контролем на наличие антител к данному препарату. Это позволило проанализировать ингибирование реакции излишком антигена ГИБП. После этого образцы были исследованы на наличие антител к ТОЦ методом ИФА.

Для статистической обработки использовали программу GraphpadPrism 6.0. В зависимости от типа нормального распределения применяли параметрические или непараметрические методы оценки выборок. Связь между двумя переменными исследовали с помощью метода ранговой корреляции по Спирмену. Уровень значимости для всех статистических тестов принимали менее 0,05.

Результаты

Для подтверждения специфичности связывания антител с ТОЦ была проведена реакция нейтрализации. Высокие концентрации ТОЦ (100 мкг/мл), инкубированные с положительными образцами, вызывали связывание антител с препаратом, что в свою очередь приводило к ингибированию хромогенной реакции при проведении ИФА. С увеличением концентрации ТОЦ уменьшалась активность хромогенной реакции, а при максимальной концентрации она полностью отсутствовала. Результаты исследования приведены в таблице.

Реакция нейтрализации для тоцилизумаба Reaction of neutralization for tocilizumab

Концентрация препарата, мкг/мл	Тоцилизумаб
	активность хромогенной реакции (индекс плотности сигнала)
0	121
1	50
10	12
100	Реакция отсутствовала

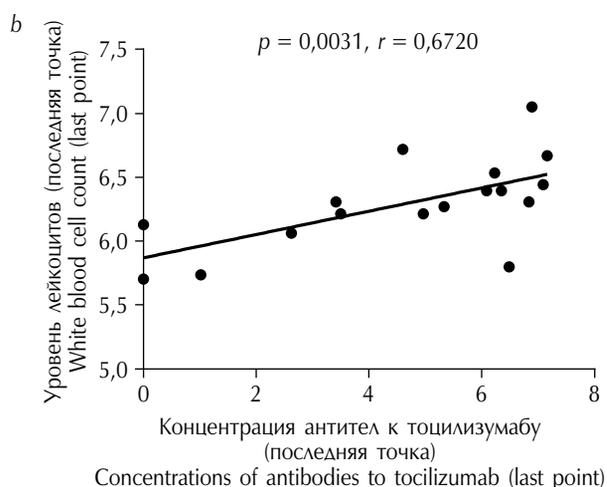
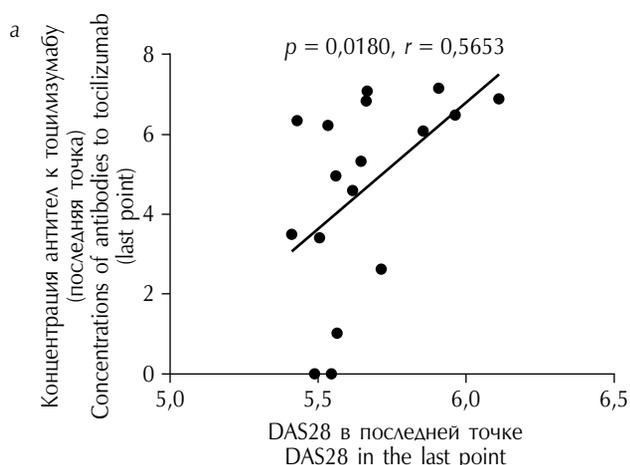


Рис. 1. Корреляция между концентрацией антител к тоцилизумабу с DAS28 (a) и количеством лейкоцитов (b)

Fig. 1. Correlation between concentration of anti-tocilizumab antibodies with DAS28 (a) and number of leucocytes (b)

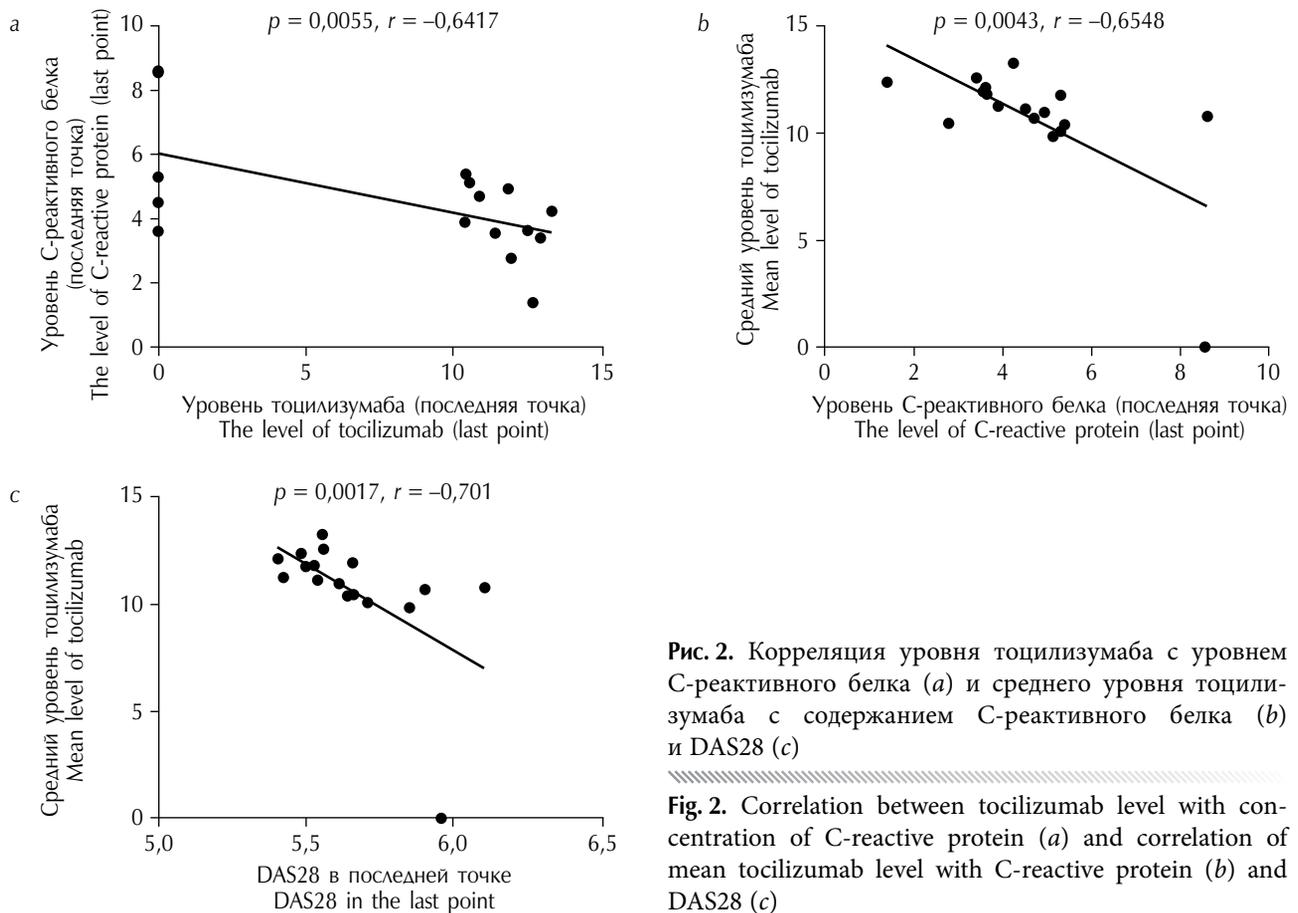


Рис. 2. Корреляция уровня тоцилизумаба с уровнем С-реактивного белка (а) и среднего уровня тоцилизумаба с содержанием С-реактивного белка (б) и DAS28 (с)

Fig. 2. Correlation between tocilizumab level with concentration of C-reactive protein (a) and correlation of mean tocilizumab level with C-reactive protein (b) and DAS28 (c)

Результаты исследования свидетельствовали, что в последней точке наблюдения антитела к ТОЦ определялись у большинства пациентов с РА (в 70,5 % случаев). Именно поэтому представлялось важным установить взаимосвязи между концентрацией ТОЦ и уровнями антител к нему, а также лабораторными показателями и активностью РА согласно индексам DAS28 в начале терапии и на последнем визите. Оказалось, что у обследованной группы пациентов существует прямая корреляционная зависимость между уровнем анти-ТОЦ и индексом DAS28 в последней точке исследования ($r = 0,5653, p = 0,0180$), а также количеством лейкоцитов ($r = 0,6720, p = 0,0031$). Обратная корреляционная связь установлена между уровнем ТОЦ в крови у пациентов с РА в последней точке исследования и показателями СРБ ($r = -0,6417, p = 0,0055$). Кроме того, была выявлена обратная корреляция между средним уровнем ТОЦ за все время исследования и индексом DAS28 в последней точке ($r = 0,701, p = 0,0017$), а также показателями СРБ ($r = -0,6548, p = 0,0043$). Результаты представлены на рис. 1, 2.

Следует отметить, что в данном исследовании не удалось выявить взаимосвязей между

ГИБП и уровнем антител к ТОЦ. Не менее интересным оказалось и то, что содержание ТОЦ в крови обследованных, а также уровень антител к ним существенно не различались в группах пациентов с РА, находившихся на комбинированной терапии с метотрексатом или получавших монотерапию ТОЦ.

Обсуждение

Генно-инженерные биологические препараты, используемые в ревматологии на протяжении последних 20 лет, позволили не только значительно чаще достигать ремиссии РА, улучшить качество жизни пациентов, но и снизить частоту инвалидности у пациентов трудоспособного возраста. Однако нередко на фоне терапии ГИБП у больных РА возникает вторичная резистентность, в результате снижается эффективность лечения и приходится переводить пациента на другие ГИБП или синтетические таргетные препараты. Основной причиной вторичной резистентности к ГИБП является уменьшение сывороточного уровня препарата или формирование к нему нейтрализующих антител. Антитела против ГИБП синтезируются

к чужеродному участку молекулы моноклонального иммуноглобулина — варибельному региону Fab-фрагмента, связывающего целевые молекулы. Это, в свою очередь, приводит не только к повышенной скорости элиминации препарата ретикуло-эндотелиальной системой, но и к снижению биологической активности ГИБП в связи с блоком связывания терапевтического иммуноглобулина с таргетной молекулой [5]. С другой стороны, максимальный клинический эффект ГИБП сохраняется при высоком уровне в сыворотке крови, который определяют непосредственно перед введением очередной дозы препарата.

В настоящем исследовании у 70,5 % пациентов, принимавших ТОЦ, была обнаружена повышенная концентрация анти-ТОЦ-антител после 2,5 года терапии. Вместе с тем приведенные материалы исследования существенно отличаются от ранее опубликованных данных, свидетельствующих о низком уровне иммуногенности ТОЦ (до 2 %), что можно объяснить не только неоднородной выборкой пациентов, но и использованием неравнозначных методов определения антител к ТОЦ [9]. Так, большинство тест-систем для определения уровня терапевтических иммуноглобулинов основано на специфическом связывании находящегося в сыворотке препарата с таргетной молекулой, адсорбированной на дне лунки ИФА-планшета. Другие методы включают этапы адсорбции на дне ИФА-планшета моноклональных антител, специфичных к варибельному участку исследуемого иммуноглобулина. Таким образом, в связи с методическими особенностями сывороточный уровень ГИБП отражает не только концентрацию препарата, но и биологическую доступность функционально значимого региона белковой молекулы. Синтезирующиеся против ГИБП антитела блокируют данный регион, что проявляется снижением концентрации ГИБП. Высокие его концентрации в свою очередь полностью насыщают титр анти-ГИБП-антител, что также может сказываться на результатах исследования.

В проведенном исследовании было показано, что уровень анти-ТОЦ-антител напрямую коррелировал с показателями DAS28-CRP и количеством лейкоцитов в последней точке. Для реальной клинической практики представляется важным, что уровень ТОЦ, оцениваемый непосредственно перед следующей инъекцией препарата, может стать одним из маркеров мониторинга эффективности лечения РА. Это подтверждается высокими значениями

корреляции среднего уровня ТОЦ и показателями DAS28 и СРБ, а также концентрацией СРБ в последней точке ($r = -0,701$, $p = 0,0017$ и $r = -0,6548$, $p = 0,0043$ соответственно). Более того, высокая скорость элиминации ТОЦ может быть объяснена синтезом нейтрализующих антител на данный препарат.

Таким образом, полученные данные дают основание считать, что повышение активности РА у обследованной группы пациентов в последней точке исследования зависело от снижения концентрации ТОЦ в сыворотке крови и повышения уровня антител к данному ГИБП. Более того, можно полагать, что снижение эффективности лечения РА напрямую зависит от низкого уровня ТОЦ перед очередным введением данного препарата и высоким содержанием сформировавшихся антител к ТОЦ. Использование этих двух маркеров в реальной клинической практике поможет не только персонализировать подходы к терапии РА, но и выявлять причины резистентности к данному ГИБП.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2016;388(10055):2023-2038. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30173-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30173-8).
2. Hazlewood GS, Rezaie A, Borman M, et al. Comparative effectiveness of immunosuppressants and biologics for inducing and maintaining remission in Crohn's disease: a network meta-analysis. *Gastroenterology*. 2015;148(2):344-354.e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.10.011>.
3. Ding NS, Hart A, De Cruz P. Systematic review: predicting and optimising response to anti-TNF therapy in Crohn's disease – algorithm for practical management. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016;43(1):30-51. <https://doi.org/10.1111/apt.13445>.
4. Kaliyaperumal A, Jing S. Immunogenicity assessment of therapeutic proteins and peptides. *Curr Pharm Biotechnol*. 2009;10(4):352-358. <https://doi.org/10.2174/138920109788488860>.
5. Kalden JR, Schulze-Koops H. Immunogenicity and loss of response to TNF inhibitors: implications for rheumatoid arthritis treatment. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(12):707-718. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2017.187>.
6. Deisenhammer F. Interferon-beta: neutralizing antibodies, binding antibodies, pharmacokinetics and pharmacodynamics, and clinical outcomes. *J Interferon Cytokine Res*. 2014;34(12):938-945. <https://doi.org/10.1089/jir.2012.0135>.

7. Biggioggero M, Crotti C, Becciolini A, Favalli EG. Tocilizumab in the treatment of rheumatoid arthritis: an evidence-based review and patient selection. *Drug Des Devel Ther.* 2019;13:57-70. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S150580>.
8. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010;62(9):2569-2581. <https://doi.org/10.1002/art.27584>.
9. Burmester GR, Choy E, Kivitz A, et al. Low immunogenicity of tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(6):1078-1085. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-210297>.

◆ **Адрес автора для переписки** (*Information about the author*)

Владимир Дмитриевич Назаров / Vladimir D. Nazarov

Тел. / Tel.: 88129945324

E-mail: nazarov19932@mail.ru