

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045148**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.30

(51) Int. Cl. **G01N 33/68** (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(21) Номер заявки
202190237

(22) Дата подачи заявки
2019.07.09

**(54) СПОСОБЫ УМЕНЬШЕНИЯ МЕШАЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ МИШЕНИ
ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА В ИММУНОЛОГИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ НА
АНТИТЕЛА К ЛЕКАРСТВЕННОМУ СРЕДСТВУ (ADA)**

(31) **62/696,016**

(32) **2018.07.10**

(33) **US**

(43) **2021.04.15**

(86) **PCT/US2019/040950**

(87) **WO 2020/014194 2020.01.16**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Оливейра Самнер Джайэн, Чэнь
Цзихуа (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) DAI S. et al.: "Development of a method that eliminates false-positive results due to nerve growth factor interference in the assessment of fulranumab immunogenicity", AAPS J., vol. 16, № 3, May 2014 (2014-05), pages 464-477, XP035314386, cited in the application, abstract, page 466, 467, column 2 - page 468, column 1, figure 1, page 470, column 2, page 474, 476, column 1, last paragraph - column 2, paragraph 1

LIAO K. et al.: "Inhibition of interleukin-5 induced false positive anti-drug antibody responses against mepolizumab through the use of a competitive blocking antibody", J. IMMUNOL. METH., vol. 441, 24 November 2016 (2016-11-24), pages 15-23, XP029894802, cited in the application, the whole document

US-A1-2015226758

US-AI-2019/145985

WO-A1-2019105916

J. CHEN et al.: "Mitigating target interference in bridging immunogenicity assay with target-blocking reagents and mild basic pH", BIOANALYSIS, 18 June 2019 (2019-06-18), pages 1-12, XP055621362, DOI: 10.4155/bio-2018-0187, the whole document

(57) В изобретении представлены способы уменьшения мешающего влияния мишени лекарственного средства в иммунологическом анализе на антитела к лекарственному средству (ADA), при этом иммунологический анализ на ADA включает один или более реагентов, блокирующих мишень, в условиях умеренно щелочного pH анализа.

B1

045148

045148 B1

Ссылка на родственные заявки

В данном изобретении испрашивается приоритет по предварительной заявке США № 62/696016, поданной 10 июля 2018 г. Полное содержание вышеуказанной заявки включено в данный документ посредством ссылки.

Уровень техники

Биотерапевтические средства (например, биологические агенты, такие как белки, пептиды, нуклеотиды и т.д.) очень хорошо зарекомендовали себя в клинической практике. Однако биотерапевтические средства, даже полностью человеческие терапевтические моноклональные антитела, могут вырабатывать антитела к лекарственным средствам (ADA), которые могут вызывать нежелательные эффекты, такие как потеря воздействия лекарственного средства, потеря эффективности, серьезные побочные эффекты и т.д. (Koren, E. et al., *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2002, 3(4):p. 349-60; Schellekens, H., *Clin. Ther.*, 2002, 24(11): p. 1720-40). Следовательно, оценка иммуногенности является важной частью тестирования безопасности биотерапевтических средств; издано несколько руководств по тестированию иммуногенности на различных этапах разработки лекарственных средств, в том числе рекомендации регулирующих органов (Shankar, G. et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2008, 48(5): p. 1267-81; Shankar, G. et al., *Nat. Biotechnol.*, 2007, 25(5): p. 555-61; Mire-Sluis, A.R. et al., *J. Immunol. Methods*, 2004, 289(1-2): p. 1-16; Swanson, S.J., J. Bussiere, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2012, 15(3): p. 337-47; European Medicines Agency, C.f.M.P.f.H.U., *Guideline on Immunogenicity Assessment of Biotechnology-Driven Therapeutic Proteins*, European Medicines Agency, London, UK, 2007; и US Department of Health and Human Services, U.F.C., CBER, *Guidance for Industry - Assay Development for Immunogenicity Testing of Therapeutic Proteins (Draft)*. US Department of Health and Human Services, Washington, DC, USA, 2009).

Сущность изобретения

Данное изобретение относится к способам уменьшения мешающего влияния мишени лекарственного средства в мостиковом иммунологическом анализе на антитела к лекарственному средству (ADA), используемом для определения наличия ADA к лекарственному средству в образце сыворотки. Данные способы включают приведение образца сыворотки в контакт с лекарственным средством для захвата, меченым первой меткой; лекарственным средством для обнаружения, меченым второй меткой; и реагентом, блокирующим мишень лекарственного средства. Затем на указанной стадии приведения в контакт следует инкубация лекарственного средства для захвата, лекарственного средства для обнаружения и реагента, блокирующего мишень лекарственного средства, что позволяет реагенту, блокирующему мишень лекарственного средства, взаимодействовать с мишенью лекарственного средства, присутствующей в образце, тем самым уменьшая мешающее влияние мишени лекарственного средства в мостиковом иммунологическом анализе ADA. После этого может быть проведен мостиковый иммунологический анализ на антитела к лекарственному средству (ADA).

В одном аспекте данного изобретения образец сыворотки представляет собой образец сыворотки человека, а в конкретном аспекте образец отобран у субъекта, которого лечат лекарственным средством.

В другом аспекте изобретения реагент, блокирующий мишень лекарственного средства, представляет собой связывающую молекулу, такую как, например, антитело. В одном варианте осуществления изобретения, в котором связывающая молекула представляет собой антитело, она может содержать константную область человека. Альтернативно, в другом варианте осуществления изобретения антитело, блокирующее мишень лекарственного средства, содержит константную область мыши.

В одном аспекте изобретения стадию инкубации проводят при комнатной температуре. В другом аспекте изобретения инкубацию проводят в условиях умеренно щелочного pH.

В одном аспекте изобретения лекарственное средство по данному изобретению представляет собой терапевтический белок, используемый для лечения людей, такой как терапевтическая связывающая молекула, например моноклональное антитело (например, полностью человеческое моноклональное антитело) или терапевтический слитый белок, такой как рецепторный белок, слитый с доменом Fc иммуноглобулина, например доменом Fc IgG1, предназначенный для лечения людей. В конкретном аспекте изобретения лекарственное средство представляет собой терапевтическое моноклональное антитело человека.

В одном аспекте данного изобретения мишень лекарственного средства представляет собой растворимый белок, такой как, например, лиганд рецептора. В конкретном аспекте изобретения реагент, блокирующий мишень лекарственного средства, включает участок рецептора, слитый с доменом Fc IgG. В дополнительном аспекте изобретения участок рецептора представляет собой внеклеточный участок рецептора. Домен Fc IgG может представлять собой домен Fc IgG мыши или домен Fc IgG человека.

В другом аспекте изобретения мишень лекарственного средства по данному изобретению представляет собой растворимую или выделяющуюся димерную или мультимерную мишень лекарственного средства. В конкретном аспекте изобретения мишень лекарственного средства представляет собой гомодимерную мишень лекарственного средства.

В одном аспекте изобретения лекарственное средство для захвата по данному изобретению прикреплено к твердой поверхности. В конкретном аспекте изобретения твердая поверхность представляет собой титрационный микропланшет. В другом аспекте изобретения твердая поверхность покрыта стрепта-

видином.

В одном аспекте изобретения первая метка выбрана из группы, состоящей из метки биотина, метки белка А, метки белка G и метки глутатионин-S-трансферазы (GST). В другом аспекте изобретения вторая метка выбрана из группы, состоящей из рутениевой метки, радиологической метки, фотолуминесцентной метки, хемилуминесцентной метки, флуоресцентной метки, электрохемилуминесцентной метки и ферментной метки.

Данный способ может дополнительно включать приведение образца сыворотки в контакт со вторым реагентом, блокирующим мишень лекарственного средства. Этот второй реагент, блокирующий мишень лекарственного средства, представляет собой связывающую молекулу, блокирующую мишень лекарственного средства, такую как, например, антитело. В одном аспекте изобретения второе антитело, блокирующее мишень лекарственного средства, содержит константную область человека. В качестве альтернативы, второе антитело, блокирующее мишень лекарственного средства, содержит константную область мыши.

В данном изобретении предложен способ уменьшения мешающего влияния мишени лекарственного средства в мостиковом иммунологическом анализе на антитела к лекарственному средству (ADA) для определения наличия ADA к лекарственному средству в образце сыворотки, включающий приведение образца сыворотки в контакт с лекарственным средством для захвата, меченым первой меткой; лекарственным средством для обнаружения, меченым второй меткой; первой связывающей молекулой, блокирующей мишень лекарственного средства; и второй связывающей молекулой, блокирующей мишень лекарственного средства, инкубацию в условиях умеренно щелочного pH лекарственного средства для захвата, лекарственного средства для обнаружения, первой связывающей молекулы, блокирующей мишень лекарственного средства, и второй связывающей молекулы, блокирующей мишень лекарственного средства, и обеспечение взаимодействия первой связывающей молекулы, блокирующей мишень лекарственного средства, и второй связывающей молекулы, блокирующей мишень лекарственного средства, с мишенью лекарственного средства, присутствующей в образце, тем самым уменьшая мешающее влияние мишени лекарственного средства в мостиковом иммунологическом анализе на ADA. В конкретном аспекте изобретения первая и вторая связывающие молекулы, блокирующие мишень лекарственного средства, представляют собой антитело.

В данном изобретении дополнительно предложен способ уменьшения мешающего влияния мишени лекарственного средства в мостиковом иммунологическом анализе на антитела к лекарственному средству (ADA) для определения наличия ADA к лекарственному средству в образце сыворотки, причем мишень лекарственного средства представляет собой растворимый белок, такой как, например, лиганд рецептора, а способ включает приведение образца сыворотки в контакт с лекарственным средством для захвата, меченым первой меткой; лекарственным средством для обнаружения, меченым второй меткой; одной или более связывающими молекулами, блокирующими мишень лекарственного средства (например, антитело), инкубацию в условиях умеренно щелочного pH анализа, при этом лекарственное средство для захвата, лекарственное средство для обнаружения и одна или более связывающих молекул, блокирующих мишень лекарственного средства, взаимодействуют с мишенью лекарственного средства, присутствующей в образце, тем самым уменьшая мешающее влияние мишени лекарственного средства в мостиковом иммунологическом анализе на ADA.

Данное изобретение проиллюстрировано следующими графическими материалами и подробным описанием, которые не ограничивают объем изобретения, описанного в формуле изобретения.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1A-1C иллюстрируют мешающее влияние растворимой димерной/мультимерной мишени в мостиковых анализах иммуногенности. (A) Положительные контроли или ADA в образцах сыворотки человека связывают в виде мостика биотинилированное лекарственное средство и лекарственное средство, меченое рутением, и дают истинно-положительный сигнал ADA. (B) Однако димерные/мультимерные мишени также могут связываться как с биотинилированным лекарственным средством, так и с лекарственным средством, меченым рутением, и давать опосредованный мишенью ложноположительный сигнал. (C) Антитела к мишени или другие реагенты, блокирующие мишень, могут предотвращать связывание димерной мишени с биотинилированным лекарственным средством и лекарственным средством, меченым рутением, устраняя опосредованный мишенью ложноположительный сигнал. Реагенты, обозначенные в (C), представляют лекарственное средство для захвата (1), лекарственное средство для обнаружения (2) и одну или более молекул, блокирующих мишень лекарственного средства (3).

Фиг. 2A-2C иллюстрируют влияние блокирующего мишень антитела HuAb1 и pH анализа на сигнал анализа. (A) Без антител, блокирующих мишень, диссоциация кислоты увеличивала фоновый сигнал анализа в образце сыворотки человека, не подвергнутому воздействию, возможно, за счет отщепления мишени от ее эндогенных связывающих белков. (B) Допустимый уровень мишени увеличивался при добавлении 100 мкг/мл HuAb1 при нейтральном pH (от приблизительно 3 до 150 нг/мл) и дополнительно увеличивался (приблизительно до 1,1 мкг/мл) для комбинации HuAb1 и умеренно щелочного pH. (C) Добавление 100 мкг/мл HuAb1 в основных условиях анализа (pH 8,3) значительно снизило опосредо-

ванный мишенью сигнал в образцах сыворотки человека, не подвергнутых воздействию.

Фиг. 3А-3D иллюстрируют, что сигнал ADA, полученный в результате анализа образцов из клинического исследования от различных субъектов, с использованием антитела HuAb1, блокирующего мишень, и pH анализа 8,3, коррелировал с уровнями мишени, но не соответствовал их фармакокинетическим профилям. (А) Концентрация мишени для каждого образца из клинического исследования. (В) Сигнал ADA с использованием 100 мкг/мл антитела HuAb1, блокирующего мишень, и при pH 8,3. (С) Профили концентрации лекарственного средства X для 3 испытуемых субъектов. (D) Добавление второго антитела к мишени (HuAb2 в концентрации 100 мкг/мл) в сочетании с HuAb1 (100 мкг/мл) и при умеренно щелочном pH эффективно снижало опосредованный мишенью фоновый сигнал в образцах из клинического исследования.

Фиг. 4А-4С иллюстрируют отношение сигнал/шум (полученный при анализе сигнала образца по сравнению с полученным при анализе фоновым сигналом) после дополнительной оптимизации анализа, с целью не только подавить мешающее влияние мишени, но и избежать возможных ложноположительных сигналов. (А) Комбинация HuSR и HuAb2 была так же эффективна, как комбинация HuAb1 и HuAb2, в уменьшении мешающего влияния мишени в образцах из клинического исследования. (В) и (С) Реагенты, блокирующие мишень, с Fc мыши (MsSR и MsAb2) по-прежнему эффективно уменьшают мешающее влияние мишени в образцах из клинического исследования.

Фиг. 5 иллюстрирует устранение мешающего влияния мишени в образцах из клинического исследования со 100 мкг/мл MsSR, 100 мкг/мл MsAb2 и при pH анализа 8,3. Только фоновый сигнал анализа был обнаружен в образцах из клинического исследования от 7 субъектов в 4 различные моменты времени (день 1, 29, 57 и 113).

Фиг. 6А, 6В иллюстрирует минимальное влияние умеренно щелочного pH анализа и реагентов, блокирующих мишень, на обнаружение поликлонального ADA в сыворотке иммунизированных кроликов и в образцах токсикологического исследования на крысах. (А) Умеренно щелочной pH 8,3 не оказал отрицательного влияния на обнаружение ADA в сыворотке кролика, иммунизированного лекарственным Fab. (В) Улучшенный формат анализа ослабляет опосредованные мишенью сигналы и позволяет обнаруживать сигналы ADA в реальных образцах токсикологического исследования на крысах.

Фиг. 7А, 7В иллюстрируют связывание мишени с лекарственным средством в отсутствие и в присутствии реагентов, блокирующих мишень, и при различных значениях pH анализа. (А) Кривые ассоциации и диссоциации связывания при различных условиях анализа. Сдвиг длины волны (Δ нм) прямо пропорционален изменению толщины конца биосенсора в результате связывания мишени с лекарственным средством. Ассоциация и диссоциация мишени и лекарственного средства показаны при pH 7,3 и 8,2, в присутствии MsAb2 и MsSR при pH 7,3 и в присутствии MsAb2 и MsSR при pH 8,2. Также показаны контрольные буферные растворы при pH 7,3 и 8,2. Связывание мишени с лекарственным средством частично ингибируется одним только pH 8,3. Хотя комбинация MsAb2 и MsSR при нейтральном pH анализа может значительно снизить связывание мишени с лекарственным средством, полное ингибирование связывания достигается с помощью комбинации MsAb2, MsSR и умеренно щелочного pH. (В) Сигналы, опосредованные мишенью, в образцах из клинического исследования были частично устранены одним лишь умеренно щелочным pH или присутствием MsAb2 и MsSR при нейтральном pH. Однако полное устранение мешающего влияния достигается комбинацией MsAb2, MsSR и pH 8,3.

Подробное описание сущности изобретения

Иммуногенность лекарственных препаратов, особенно терапевтических белков, является серьезной проблемой в клинических и доклинических исследованиях, поскольку она может привести к потенциально серьезным побочным эффектам, потере эффективности и изменениям воздействия лекарственного средства, затрудняя интерпретацию данных о токсичности, фармакокинетике (ФК) и фармакодинамике (ФД). Иммунологические анализы на антитела к лекарственному средству (ADA) для обнаружения и количественного определения ADA важны для определения иммуногенности биотерапевтических средств. Тем не менее, мишени лекарственного средства могут мешать иммунологическому анализу ADA и приводить к опосредованным мишенью ложноположительным результатам (см. фиг. 1В). Уровни мишени могут быть высокими на основе повышающей регуляции мишени и высвобождения мишени из комплексов мишень лекарственное средство и/или мишень: связывающий белок во время стадии кислотной диссоциации, обычно используемой в анализах на ADA для повышения допустимого уровня лекарственного средства в анализе.

ADA обычно тестируется с использованием многоуровневого подхода для обнаружения, подтверждения и титрования ADA. В скрининговом анализе обычно используется плавающая точка отсечения для идентификации образцов, потенциально положительных по ADA, в то время как в подтверждающем анализе используется подтверждающая точка отсечения, чтобы определить, может ли наблюдаемый положительный ответ в скрининговом анализе подавляться присутствием избыточного количества лекарственного средства (что подтверждает образец как положительный по ADA). Титрационная точка отсечения титра используется в титрационном анализе для оценки уровней ADA в положительных образцах. В анализах на ADA обычно используется мостиковый формат с применением лекарственных средств как реагентов для захвата и обнаружения. Эти анализы относительно просты в постановке и проведении,

обнаруживают ответы большинства изотипов, за исключением большинства IgG4, и обеспечивают отличную чувствительность. Они не зависят от вида и обладают высокой пропускной способностью. Однако растворимые или выделяющиеся димерные или мультимерные мишени лекарственных средств могут мешать анализу и приводить к опосредованным мишенью ложноположительным результатам. Например, повышенный уровень гомодимера ИЛ-5 в образцах после введения дозы от пациентов, получавших меполизумаб, способствовал наблюдаемому увеличению положительных случаев в анализе на ADA за счет опосредованных мишенью ложноположительных сигналов в мостиковом анализе на ADA (Liao, K. et al., *J. Immunol. Methods*, 2017, 441: p. 15-23). Присутствие NGF, гомодимера, также давало ложноположительные сигналы анализа в образцах от пациентов, получавших фулранумаб, за счет связывания в виде мостика фулранумаба, меченого биотином и рутением (Dai, S. et al., *AAPS J.*, 2014, 16(3): p. 464-77). Сообщалось, что CD20, присутствующий на фрагментах клеточной мембраны, также приводит к мешающему влиянию матрицы в анализе на ADA для офатумумаба (Chen, K. et al., *J. Immunol. Methods*, 2013, 394(1-2): p. 22-31). Кроме того, недавно сообщалось, что кислотная диссоциация димеризует мономерную мишень в образцах сыворотки, что также приводит к ложноположительным сигналам (Zoghbi, J. et al., *J. Immunol. Methods*, 2015, 426: p. 62-9).

Сообщалось о некоторых попытках ограничить мешающее влияние мишени. Например, предварительная обработка антителами, блокирующими мишень, или блокирование белками, связывающими мишень, а также иммунодеплеция мишени были использованы для уменьшения мешающего влияния растворимой мишени (Liao, K. et al., *J. Immunol. Methods*, 2017, 441: p. 15-23; Dai, S. et al., *AAPS J.*, 2014, 16(3): p. 464-77; Zhong, Z.D. et al., *J. Immunol. Methods*, 2010, 355(1-2): p. 21-8; Weeraratne, D.K. et al., *J. Immunol. Methods*, 2013, 396(1-2): p. 44-55; и Maria M.L.J., Wakshull E., Quarmby V., *AAPS National Biotechnology Conference*, Seattle, WA, USA, 2009). Сообщалось о других стратегиях, включая использование лектина агглютинина из проростков пшеницы (WGA) для блокирования мешающего влияния высокогликозилированного белка-мишени без влияния на обнаружение ADA (Carrasco-Triguero, M. et al., *Bioanalysis*, 2012, 4(16): p. 2013-26). Другой альтернативный формат анализа, в котором используется растворимый рецептор Fcγ I человека (hsFcγRI) для обнаружения области Fc ADA, также, как сообщается, снижает мешающее влияние растворимых мишеней, однако этот формат не дает возможность обнаружить все возможные изотипы ADA (Wessels, U. et al., *Bioanalysis*, 2016, 8(20): p. 2135-45). Недавно был опубликован официальный документ, в котором описывается ряд стратегий по уменьшению мешающего влияния мишеней лекарственного средства в анализах на ADA и нейтрализующие антитела (NAb) (Zhong, Z.D. et al., *AAPS J.*, 2017, 19(6): p. 1564-1575). Следовательно, важно разработать надежные способы тестирования, которые способны преодолеть мешающее влияние мишеней и обеспечить достоверные оценки иммуногенности как в доклинических, так и в клинических исследованиях.

В данном изобретении предложены способы уменьшения мешающего влияния мишени в иммунологических анализах на ADA для снижения количества ложноположительных результатов в иммунологических анализах на ADA, например, в мостиковых анализах иммуногенности. В частности, данное описание основано, по меньшей мере частично, на обнаружении того факта, что комбинация одного или более реагентов, блокирующих мишень, например антител или белков слияния рецепторов мишени и Fc IgG, в условиях умеренно щелочного pH анализа приводит к высоким допустимым уровням рекомбинантного белка-мишени и снижению количества ложноположительных результатов в исследуемых образцах с профилями ФК, которые не указывали на значительный ответ ADA. Соответственно способы, описанные в данном документе, обеспечивают уменьшение мешающего влияния мишени, когда только стандартные процедуры кислотной диссоциации и антитела, блокирующие мишень, являются неэффективными.

I. Определения.

Для более легкого понимания данного изобретения сначала даны определения некоторых терминов. Кроме того, следует отметить, что всякий раз, когда приводится значение или диапазон значений параметра, подразумевается, что значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также являются частью этого изобретения.

В нижеследующем описании в целях пояснения указаны конкретные числа, материалы и конфигурации, чтобы обеспечить полное понимание изобретения. Однако для специалиста в данной области техники будет очевидно, что изобретение может быть реализовано на практике без этих конкретных деталей. В некоторых случаях хорошо известные особенности могут быть опущены или упрощены, чтобы не затруднять понимание настоящего изобретения.

Единственное число используются в данном документе для обозначения одного или более чем одного (т.е. по меньшей мере одного) грамматического объекта в единственном числе. В качестве примера "элемент" означает один элемент или более одного элемента.

Термин "антитело" включает молекулу иммуноглобулина, состоящую из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, связанных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно обозначаемой в данном документе как HCVR или VH) и константной области тяжелой цепи (CH). Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной

области легкой цепи (сокращенно обозначаемой в данном документе как LCVR или VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена CL. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежающиеся более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных в направлении от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Термин "антиген", при использовании в данном документе, означает любое вещество, которое заставляет иммунную систему вырабатывать антитела или специфические клеточно-опосредованные иммунные ответы против него. Антиген, связанный с заболеванием, представляет собой любое вещество, связанное с каким-либо заболеванием, которое заставляет иммунную систему вырабатывать антитела или специфический опосредованный клетками ответ против него.

"Связывающий домен" (также называемый "связывающая область" или "связывающий фрагмент"), при использовании в данном документе, относится к молекуле или ее части (например, пептиду, олигопептиду, полипептиду, белку), которая обладает способностью специфически и нековалентно ассоциироваться, связываться или соединяться с мишенью. Связывающий домен включает любого встречающегося в природе, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного партнера связывания для биологической молекулы, молекулярного комплекса (т.е. комплекса, содержащего две или более биологические молекулы) или другой представляющей интерес мишени. Примеры связывающих доменов включают вариабельные области одноцепочечных иммуноглобулинов (например, scTCR, scFv), рецепторные эктодомены, лиганды (например, цитокины, хемокины) или синтетические полипептиды, выбранные по их специфической способности связываться с биологической молекулой, молекулярным комплексом или другой представляющей интерес мишенью.

"Связывающая молекула", как предполагается в данном документе, представляет собой молекулу, которая специфически взаимодействует с конкретной мишенью. Примеры таких связывающих молекул включают, но не ограничиваются ими, антитела (в том числе моноклональные антитела) и их фрагменты, сконструированные антитела, слитые белки и другие подобные антигенсвязывающие молекулы, хорошо известные специалистам в данной области техники. Дополнительно, термин "связывающая молекула", при использовании в данном документе, включает рецептор или рецептороподобную молекулу, которая может взаимодействовать с мишенью.

"Антитела к лекарственному средству" или "ADA" представляют собой антитела, которые могут быть направлены против любой области лекарственного средства, такой как, например, вариабельный домен, константные домены или гликоструктура лекарственного средства. Такие антитела к лекарственному средству могут возникать во время терапии антителами как иммуногенная реакция пациента (см. Pan, Y. et al., FASEB J., 9 (1995) 43-49). Большинство "антител к лекарственному средству" связываются с одной или более определяющими комплементарность областями лекарственного средства. Сродство антител к лекарственным средствам к их антигену лекарственного средства в целом ниже по сравнению с аффинностью лекарственного средства к его антигену-мишени.

Термин "мостиковый иммунологический анализ" или "мостиковый иммунологический анализ на ADA", при использовании в данном документе, обозначает иммунологический анализ сэндвич-типа, в котором двухвалентный ADA связывается двумя разными связывающими молекулами (т.е. лекарственным средством для захвата и лекарственным средством для обнаружения), каждая из которых связывается с разными неперекрывающимися или не мешающими друг другу эпитопами ADA. В этом анализе образуется сэндвич, содержащий антитело для захвата, ADA и антитело для обнаружения, и таким образом ADA соединяет в виде мостика два связывающихся с ним антитела (см. фиг. 1A). Антитело для захвата может быть прикреплено к твердой поверхности, например титрационному микропланшету или другой твердой поверхности. Мостиковый иммунологический анализ может представлять собой анализ с высокой пропускной способностью. В одном аспекте изобретения мостиковый иммунологический анализ на ADA, как описано в данном документе, включает два лекарственных антитела, "лекарственное средство для захвата" и "лекарственное средство для обнаружения". В одном варианте осуществления изобретения лекарственное средство для обнаружения и лекарственное средство для захвата содержат "одну и ту же" молекулу антитела, например, рекомбинантно полученную с использованием одного и того же вектора экспрессии и содержащую такую же аминокислотную последовательность.

pH представляет собой логарифмическую шкалу, используемую для определения кислотности или основности водного раствора. Он приблизительно представляет собой отрицательное значение десятичного логарифма молярной концентрации ионов водорода, измеряемой в молях на литр. Точнее он представляет собой отрицательное значение десятичного логарифма активности ионов водорода. Растворы с pH менее 7 являются кислыми, а растворы с pH более 7 - основными. Термин "умеренно щелочное значение pH", при использовании в данном документе в отношении условий анализа, относится к pH от около pH 7,5 до около pH 9,5. В одном аспекте изобретения умеренно щелочное значение pH включает pH от около pH 8,0 до около pH 9,0. В другом аспекте изобретения умеренно щелочное значение pH включает pH от около pH 8,5 до около pH 9,5. В другом аспекте изобретения умеренно щелочное значение

ние pH включает pH от около pH 7,5 до около pH 8,5. В другом аспекте изобретения умеренно щелочное значение pH включает pH, составляющее около 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3 или 8,4.

Термин "лекарственное средство", при использовании в данном документе, относится к терапевтическому белку или его терапевтически эффективной части, которые можно вводить индивиду для лечения заболевания. В одном аспекте изобретения лекарственное средство представляет собой терапевтический белок человека, такой как терапевтическое моноклональное антитело человека или терапевтический слитый белок человека, такой как рецепторный белок, слитый с доменом Fc иммуноглобулина, например доменом Fc IgG1. В другом аспекте изобретения лекарственное средство представляет собой гуманизованное терапевтическое моноклональное антитело. В другом аспекте изобретения лекарственное средство представляет собой химерное антитело. В еще одном аспекте изобретения лекарственное средство представляет собой антитело мыши. В одном аспекте изобретения терапевтическое лекарственное средство оценивается в клиническом исследовании.

Терапевтические средства, такие как лекарственные средства на основе антител, широко используются для лечения различных заболеваний, таких как онкологические заболевания, иммунологические заболевания, заболевания центральной нервной системы, сосудистые заболевания и инфекционные заболевания. Лекарственные средства на основе антител, которые включены в способы по изобретению, включают любые терапевтические антитела, одобренные регулирующим органом или в ходе клинических или доклинических испытаний. Лекарственные средства на основе антител, одобренные в США и ЕС по состоянию на 2018 г., включают, но не ограничиваются ими, безлотоксумаб, авелумаб, дупилумаб, дурвалумаб, окрелизумаб, бродалумаб, реслизумаб, оларатумаб, даратумумаб, элутузумаб, нецитумумаб, инфликсимаб, обилтоксаксимаб, атезолизумаб, секукинумаб, меполизумаб, ниволумаб, алирокумаб, ида-руцизумаб, эволокумаб, динутуксимаб, бевацизумаб, пембролизумаб, рамуцизумаб, ведолизумаб, сил-туксимаб, алемтузумаб, пертузумаб, инфликсимаб, обинутузумаб, брентуксимаб, раксибакумаб, белиму-маб, ипилимумаб, деносумаб, офатумумаб, бесилесомаб, тоцилизумаб, канакинумаб, голимумаб, устеки-нумаб, цертолизумаб пегол, катумаксомаб, экулизумаб, ранибизумаб, панитумумаб, натализумаб, кату-максомаб, бевацизумаб, омализумаб, цетуксимаб, эфализумаб, ибритумомаб труксетан, фанолесомаб, адалимумаб, тозигумомаб, алемтузумаб, трастузумаб, гемтузумаб озогамидин, инфликсимаб, паливизу-маб, нецитумумаб, базиликсимаб, ритуксимаб.

Лекарственное средство, используемое в способах по изобретению, также включает терапевтическое лекарственное средство, которое находится в разработке или проходит доклинические или клинические испытания, т.е. оценивается в клинических испытаниях.

Лекарственные средства на основе антител могут включать антитела, нацеленные на любой антиген, включая, например, ИЛ-4R, ИЛ-6R, ИЛ-33, PD-1, CD20 X CD3, LAG-3, ИЛ-33, Fel d 1, C5, ANGPTL-3, активин A, GDF8, PCSK9, VEGF, NGF или вирусный антиген, такой как вирус эболы или MERS-CoV.

Дополнительные терапевтические средства, которые можно использовать в способах по изобретению, включают, например, эвинакумаб, тревогрумаб, цемиплимаб, алирокумаб, афлиберцепт, фасину-маб, рилонасепт и сарилумаб.

Терапевтические средства также включают биоподобные варианты одобренных лекарственных средств, например антитела или терапевтические слитые белки. Например, разрабатываются биоаналоги афлиберцепта, включая ALT-L9 (Alteogen), M710 (Momenta/Mylan), FYB203 (Formycon (DE)/Santo Holding GmbH) и CHS-2020 (Coherus).

"Мишень лекарственного средства", при использовании в данном документе, относится к мишени лекарственного средства. Например, в одном варианте осуществления изобретения мишень лекарственного средства представляет собой димерную мишень. В другом варианте осуществления изобретения мишень лекарственного средства представляет собой гомодимерную мишень лекарственного средства. В другом варианте осуществления изобретения мишень лекарственного средства представляет собой мультимерную мишень лекарственного средства. В другом варианте осуществления изобретения мишень лекарственного средства представляет собой растворимую или выделяющуюся мишень лекарственного средства. Мишень лекарственного средства может мешать иммунологическому анализу на ADA и приводить к ложноположительным результатам анализа.

"Реагент, блокирующий мишень лекарственного средства", при использовании в данном документе, относится к любому реагенту, который способен связываться с мишенью лекарственного средства и/или блокировать ее в иммунологическом анализе, тем самым предотвращая связывание мишени лекарственного средства с лекарственным средством для захвата или лекарственным средством для обнаружения. В одном варианте осуществления изобретения реагент, блокирующий мишень лекарственного средства, представляет собой антитело, блокирующее мишень. Антитело, блокирующее мишень, может содержать константную область человека или константную область мыши. В другом варианте осуществления изобретения реагент, блокирующий мишень лекарственного средства, представляет собой слитый белок рецептора мишени и Fc IgG, причем слитый белок включает участок рецептора мишени, связанный или слитый с доменом Fc IgG. В одном аспекте изобретения участок рецептора мишени является внеклеточным участком рецептора. В конкретном аспекте изобретения домен Fc IgG представляет собой домен Fc IgG человека. В другом аспекте изобретения домен Fc IgG представляет собой домен Fc IgG мыши. Как

подробно описано в данном документе, иммунологический анализ на ADA, например мостиковый иммунологический анализ на ADA, может включать один или более реагентов, блокирующих мишень лекарственного средства, которые уменьшают мешающее влияние мишени лекарственного средства в иммунологическом анализе. Например, в одном варианте осуществления изобретения иммунологический анализ может включать один реагент, блокирующий мишень лекарственного средства. В другом варианте осуществления изобретения иммунологический анализ может включать два реагента, блокирующих мишень лекарственного средства. В одном варианте осуществления изобретения оба реагента, блокирующие мишень лекарственного средства, могут содержать антитела, блокирующие мишень лекарственного средства. В другом варианте осуществления изобретения анализ может включать одно или более антител, блокирующих мишень лекарственного средства, и один или более слитых белков рецептора мишени и Fc IgG.

При использовании в данном документе, агент или реагент (например, связывающая молекула, лекарственное средство для захвата, лекарственное средство для обнаружения, антитело к лекарственному средству (ADA), лекарственное средство, белок, фермент, антитело, фрагмент антитела или родственные молекулы), который модифицирован термином "меченый", включает любой агент, конъюгированный с другой молекулой или химическим агентом, который поддается экспериментальному обнаружению (например, "обнаруживаемая метка"). Химические агенты, подходящие в качестве меток для меченых агентов, включают, но не ограничиваются ими, рутений, радиологическую метку, фотолуминесцентную метку, хемилуминесцентную метку, флуоресцентную метку, электрохемилуминесцентную метку, ферментную метку, квантовые точки или метку оптического красителя. Другие метки включают, например, биотин, белок А, белок G, глутатионин-S-трансферазу (GST). Эти метки можно использовать для маркировки лекарственных антител для захвата, которые затем можно прикрепить к твердой поверхности.

При использовании в данном документе, термины "флуоресцентная метка" и "флуорофор" могут использоваться взаимозаменяемо и относиться к любому веществу, которое излучает электромагнитную энергию, например свет с определенной длиной волны (длиной волны излучения), когда вещество освещается излучением с другой длиной волны (длина волны возбуждения), и предназначены для охвата химической или биохимической молекулы или ее фрагментов, которые способны взаимодействовать или реагировать специфически с представляющим интерес аналитом в образце, чтобы обеспечить один или более оптических сигналов.

При использовании в данном документе, "допустимый уровень мишени" определяется как количество мишени, необходимое для генерации опосредованного мишенью ложноположительного сигнала в анализе (с сигналом анализа выше точки отсечения планшета).

Термин "образец" включает, но не ограничивается этим, любое количество вещества от живого или ранее живого организма. Такие живые организмы включают, но не ограничиваются ими, людей, мышей, обезьян, крыс, кроликов и других животных. В одном варианте осуществления изобретения такие образцы включают, но не ограничиваются ими, цельную кровь, сыворотку или плазму от субъекта. В одном варианте осуществления изобретения образец, например образец сыворотки, представляет собой образец, полученный от субъекта во время клинических или доклинических испытаний лекарственного средства. Например, образец можно получить от субъекта после введения лекарственного средства во время клинического испытания.

При использовании в данном документе, термин "субъект" относится к организму человека или отличному от человека организму. Таким образом, описанные в данном документе способы и комплексы слияния применимы к заболеваниям и патологическим состояниям как людей, так и животных. Субъектами могут быть "пациенты", т.е. живые люди или организмы, отличные от человека, получающие медицинскую помощь в связи с заболеванием или патологическим состоянием, или люди или организмы, отличные от человека, без определенного заболевания, которые обследуются на наличие признаков патологии или наличие/отсутствие определенного патологического состояния. Субъекты также включают участников клинических испытаний лекарственного средства, при этом субъекту вводили лекарственное средство для целей испытания.

Термин "домен Fc", или "Fc иммуноглобулина", или "Fc Ig" предназначен для обозначения "кристаллизующегося фрагмента" области тяжелой цепи иммуноглобулина. Как правило, домен Fc способен взаимодействовать со вторым доменом Fc с образованием димерного комплекса. Домен Fc может быть способен связывать рецепторы клеточной поверхности, называемые рецепторами Fc, и/или белки системы комплемента или может быть модифицирован для уменьшения или увеличения такой связывающей способности. Домен Fc может происходить из изоформ антител IgG, IgA, IgD, IgM или IgE (называемый в данном документе доменом Fc IgG, доменом Fc IgA, доменом Fc IgD, доменом Fc IgM и доменом Fc IgE, соответственно). Домен Fc может влиять на иммунную активность, включая опсонизацию, лизис клеток, дегрануляцию тучных клеток, базофилов и эозинофилов и другие процессы, зависящие от рецептора Fc; активацию пути комплемента; и стабильность белка *in vivo*.

Термин "полипептид" предназначен для обозначения любого полимера, содержащего любую из 20 природных аминокислот, независимо от его размера. Хотя термин "белок" часто используется в отношении относительно больших белков, а "пептид" часто используется в отношении небольших полипеп-

тидов, использование этих терминов в данной области часто перекрывается. Термин "полипептид" обычно относится к белкам, полипептидам и пептидам, если не указано иное. Пептиды, пригодные в соответствии с данным раскрытием, обычно составляют от около 0,1 до 100 кД или более до около 1000 кД, предпочтительно около 0,1, 0,2, 0,5, 1,2, 5, 10, 20, 30 и 50 кД, что оценено с помощью стандартных методов определения размера молекул, таких как центрифугирование или электрофорез в ДСН-полиакриламидном геле.

При использовании в данном документе, термин "растворимый" означает, что слитая молекула растворима, если она остается в водном растворе при температуре выше около 5-37°C и при нейтральном или близком к нему pH в присутствии низкой или нулевой концентрации анионного или неионогенного поверхностно-активного вещества. В этих условиях растворимый белок часто будет иметь низкое число седиментации, например, менее чем от около 10 до 50 единиц Сведберга. Упомянутые в данном документе водные растворы обычно содержат буферное соединение для установления pH, обычно в диапазоне pH около 5-9 и в диапазоне ионной силы от около 2 до 500 мМ. Иногда добавляют ингибитор протеазы или мягкое неионное поверхностно-активное вещество. Дополнительно, при желании может быть добавлен белок-носитель, такой как бычий сывороточный альбумин (BSA), до нескольких мг/мл. Примеры водных буферов включают стандартный фосфатно-солевой буфер, трис-буферизированный солевой раствор или другие хорошо известные буферы и составы клеточных сред.

Термин "твердая поверхность" означает нетекучее вещество и включает частицы (в том числе микрочастицы и шарики), изготовленные из таких материалов, как полимер, металл (парамагнитные, ферромагнитные частицы), стекло и керамика; гелеобразные вещества, такие как диоксид кремния, оксид алюминия и полимерные гели; капилляры, которые могут быть изготовлены из полимера, металла, стекла и/или керамики; цеолиты и другие пористые вещества; электроды; титрационные микропланшеты; твердые полоски; кюветы, пробирки или другие контейнеры для образцов спектрометра. Термин "выделенный" относится к композиции, соединению, веществу или молекуле, измененным человеком по сравнению с естественным состоянием. Например, композиция или вещество, встречающееся в природе, выделено, если они были изменены или удалены из исходной среды, или и то, и другое. Например, полинуклеотид или полипептид, естественно присутствующий в живом животном, не является выделенным, но тот же полинуклеотид или полипептид, отделенный от сосуществующих в его естественном состоянии веществ, является выделенным, при использовании указанного термина в данном документе.

II. Уменьшение мешающего влияния мишени.

Мостиковый иммунологический анализ на ADA для обнаружения ADA в образце, как подробно описано ниже, чувствителен к мешающему влиянию мишени лекарственного средства (ложноположительный сигнал ADA). В мостиковом иммунологическом анализе на ADA образец инкубируют с лекарственным средством для захвата (меченым или немеченым) и лекарственным средством для обнаружения, содержащим детектируемую метку. После инкубации образца образуется сэндвич, содержащий лекарственное средство для захвата, ADA и лекарственное средство для обнаружения, и таким образом ADA в виде мостика связывает два связывающихся с ним лекарственных средства, и связанный ADA может быть обнаружен (см. фиг. 1A). Истинно-положительный сигнал в мостиковом анализе на ADA возникает в результате двухвалентного связывания ADA с лекарственным средством для захвата и лекарственным средством для обнаружения с образованием мостика. Однако появляется ложноположительный результат, когда димерная или мультимерная мишень в виде мостика связывает лекарственное средство для захвата и лекарственное средство для обнаружения, тем самым образуется мостик с мишенью (см. фиг. 1B и, например, Liao, K. et al., *J. Immunol. Methods*, 2017, 441: p. 15-23).

Как показано в приведенном в данном документе примере, в данном изобретении предложены способы уменьшения мешающего влияния мишени лекарственного средства в мостиковом иммунологическом анализе на ADA, тем самым снижается количество ложноположительных результатов. Способы включают инкубацию образца по меньшей мере с одним реагентом, блокирующим мишень лекарственного средства, в условиях умеренно щелочного pH анализа.

В одном варианте осуществления в изобретении предложен способ уменьшения мешающего влияния мишени лекарственного средства в мостиковом иммунологическом анализе на ADA для определения наличия ADA к лекарственному средству в образце сыворотки. Этот способ включает приведение образца сыворотки в контакт с лекарственным средством для захвата, лекарственным средством для обнаружения и одним или более реагентами, блокирующими мишень лекарственного средства. Затем эти компоненты инкубируют в условиях умеренно щелочного pH анализа, позволяя реагенту, блокирующему мишень лекарственного средства, взаимодействовать с мишенью лекарственного средства, присутствующей в образце, тем самым уменьшая мешающее влияние мишени лекарственного средства в мостиковом иммунологическом анализе на ADA.

В одном аспекте изобретения способ дополнительно включает выполнение мостикового иммунологического анализа на ADA, как описано ниже.

В другом аспекте изобретения один или более реагентов, блокирующих мишень лекарственного средства, способны связываться с и/или блокировать мишень лекарственного средства в иммунологическом анализе, таким образом предотвращая связывание мишени лекарственного средства с лекарствен-

ным средством для захвата и/или лекарственным средством для обнаружения. В конкретном аспекте изобретения один или более реагентов, блокирующих мишень, представляют собой связывающую молекулу, блокирующую мишень, такую как антитело. В дополнительном аспекте изобретения антитело, блокирующее мишень, содержит константную область человека.

Если связывающая молекула, блокирующая мишень (например, антитело), и лекарственное средство (например, лекарственное антитело) имеют одинаковые константные области человека, ADA в образцах сыворотки, которые специфичны к области Fc лекарственного средства, могут связываться с антителом человека, блокирующим мишень, и потенциально затруднять обнаружение в анализе. Замена областей Ig человека антитела, блокирующего мишень, на области Ig мыши может привести к уменьшению мешающего влияния антитела, блокирующего мишень лекарственного средства, на обнаружение ADA. Таким образом, в одном аспекте изобретения антитело, блокирующее мишень, содержит константную область мыши.

Мостиковый иммунологический анализ на ADA может включать один или более реагентов, блокирующих мишень лекарственного средства. В одном аспекте изобретения иммунологический анализ включает два реагента, блокирующих мишень лекарственного средства. В конкретном аспекте изобретения два реагента, блокирующих мишень лекарственного средства, представляют собой антитела, блокирующие мишень лекарственного средства, например первое антитело, блокирующее мишень лекарственного средства, и второе антитело, блокирующее мишень лекарственного средства. В более конкретном аспекте изобретения первое и/или второе антитела, блокирующие мишень, содержат константные области человека. В другом конкретном аспекте изобретения первое и/или второе антитела, блокирующие мишень, содержат константные области мыши. В еще одном аспекте изобретения как первое, так и второе антитело, блокирующее мишень, содержат константные области человека. В еще одном аспекте изобретения как первое, так и второе антитело, блокирующее мишень, содержат константные области мыши. В другом аспекте изобретения первое антитело, блокирующее мишень, содержит константную область человека, а второе антитело, блокирующее мишень, содержит константную область мыши. В еще одном аспекте изобретения первое антитело, блокирующее мишень, содержит константную область мыши, а второе антитело, блокирующее мишень, содержит константную область человека.

В одном варианте осуществления в изобретении предложены способы уменьшения мешающего влияния мишени лекарственного средства в мостиковом иммунологическом анализе на ADA для определения наличия ADA к лекарственному средству в образце сыворотки, включающие приведение образца сыворотки в контакт с лекарственным средством для захвата, лекарственным средством для обнаружения, первым антителом, блокирующим мишень лекарственного средства, и вторым антителом, блокирующим мишень лекарственного средства. Эти компоненты инкубируют в условиях умеренно щелочного pH анализа, что позволяет первому антителу, блокирующему мишень лекарственного средства, и второму антителу, блокирующему мишень лекарственного средства, взаимодействовать с мишенью лекарственного средства, присутствующей в образце, тем самым уменьшая мешающее влияние мишени лекарственного средства в мостиковом иммунологическом анализе на ADA.

Как описано в данном документе, авторами изобретения было обнаружено, что антитела, блокирующие мишень, используемые в мостиковом иммунологическом анализе на ADA, могут иметь некоторые общие перестройки CDR VH с исследуемым лекарственным средством. Соответственно ADA, специфичные к этим областям перестройки VH, могут связываться с антителом, блокирующим мишень, в образце, что потенциально может затруднять их обнаружение в анализе. Для оптимизации обнаружения был сконструирован рецептор мишени, слитый с Fc IgG человека, и использован в способах по данному изобретению вместо одного из антител, блокирующих мишень.

В одном варианте осуществления изобретения один или более реагентов, блокирующих мишень лекарственного средства, используемых в способах по данному изобретению, содержат участок рецептора мишени, слитый с доменом Fc IgG (слитый белок рецептора мишени и Fc IgG). В одном аспекте изобретения участок рецептора мишени является внеклеточным участком рецептора. В другом аспекте изобретения слитый белок рецептора мишени и Fc IgG является растворимым. В конкретном аспекте изобретения домен Fc IgG слитого белка рецептора мишени и Fc IgG представляет собой домен Fc IgG человека.

Если слитый белок рецептора мишени и Fc IgG и лекарственное средство имеют области Fc IgG человека, ADA в образцах сыворотки, специфичные к области Fc лекарственного средства, могут связываться со слитым белком рецептора мишени и Fc IgG и потенциально затруднять обнаружение в анализе. Замена областей Fc Ig человека слитого белка рецептора мишени и Fc IgG областями Ig мыши может привести к снижению мешающего влияния слитого белка рецептора мишени и Fc IgG на обнаружение ADA. Следовательно, в другом аспекте изобретения домен Fc IgG слитого белка рецептора мишени и Fc IgG представляет собой домен Fc IgG мыши.

Анализ может включать одно или более антител, блокирующих мишень лекарственного средства, и один или более слитых белков рецептора мишени и Fc IgG. Кроме того, анализ может включать в себя антитело, блокирующее мишень, и слитый белок рецептора мишени и Fc IgG.

Соответственно в одном варианте осуществления в изобретении предложен способ уменьшения мешающего влияния мишени лекарственного средства в мостиковом иммунологическом анализе на ADA

для определения наличия ADA к лекарственному средству в образце сыворотки, причем мишень лекарственного средства представляет собой растворимый белок, такой как, например, лиганд рецептора, и способ включает приведение образца сыворотки в контакт с лекарственным средством для захвата, лекарственным средством для обнаружения, реагентом, блокирующим мишень лекарственного средства, содержащим внеклеточный участок рецептора, слитый с доменом Fc IgG, и антителом, блокирующим мишень лекарственного средства. Эти компоненты инкубируют в условиях умеренно щелочного pH анализа, позволяя реагенту, блокирующему мишень лекарственного средства, и антителу, блокирующему мишень лекарственного средства, взаимодействовать с мишенью лекарственного средства, присутствующей в образце, тем самым уменьшая мешающее влияние мишени лекарственного средства в мостиковом иммунологическом анализе на ADA.

В одном аспекте изобретения домен Fc IgG представляет собой домен Fc IgG мыши. В другом аспекте изобретения домен Fc IgG представляет собой домен Fc IgG человека. В еще одном аспекте изобретения антитело, блокирующее мишень лекарственного средства, включает константную область человека. В еще одном аспекте изобретения антитело, блокирующее мишень лекарственного средства содержит константную область мыши. В одном аспекте изобретения слитый белок рецептора мишени и Fc IgG содержит Fc IgG мыши, а антитело, блокирующее мишень, содержит константную область мыши.

В одном варианте осуществления изобретения каждый из реагентов, блокирующих мишень, имеет концентрацию в мостиковом иммунологическом анализе на ADA от около 10 мкг/мл до около 200 мкг/мл. В одном аспекте изобретения каждый из реагентов, блокирующих мишень, имеет концентрацию от около 20 мкг/мл до около 175 мкг/мл. В другом аспекте изобретения каждый из реагентов, блокирующих мишень, имеет концентрацию от около 30 мкг/мл до около 150 мкг/мл. В еще одном аспекте изобретения каждый из реагентов, блокирующих мишень, имеет концентрацию от около 40 мкг/мл до около 125 мкг/мл. В еще одном аспекте изобретения каждый из реагентов, блокирующих мишень, имеет концентрацию от около 50 мкг/мл до около 100 мкг/мл. В другом аспекте каждый из реагентов, блокирующих мишень, имеет концентрацию около 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 мкг/мл. В другом аспекте изобретения каждый из реагентов, блокирующих мишень, имеет концентрацию около 100 мкг/мл.

Описанные в данном документе способы уменьшения мешающего влияния мишени включают выполнение иммунологического анализа на ADA в условиях умеренно щелочного pH анализа. Умеренно щелочное значение pH включает диапазон значений pH немного выше нейтрального pH. В одном варианте осуществления изобретения умеренно щелочное значение pH относится к pH от около 7,5 до около 9,5. В одном аспекте изобретения умеренно щелочное значение pH включает pH от около pH 7,5 до около pH 8,5. В одном аспекте изобретения умеренно щелочное значение pH включает pH от около pH 8,5 до около pH 9,0. В одном аспекте изобретения умеренно щелочное значение pH включает pH от около pH 8,0 до около pH 9,0. В другом аспекте изобретения умеренно щелочное значение pH включает pH от около pH 8,5 до около pH 9,5.

III. Иммунологические анализы на ADA.

Иммунологические анализы хорошо известны специалисту в данной области техники. Способы проведения таких анализов, а также практическое применение и методики хорошо известны в данной области и описаны, например, в Colowick, S.P., Caplan, N.O. (eds.), "Methods in Enzymology", Academic Press, рассматривающие иммунологические методы обнаружения, особенно тома 70, 73, 74, 84, 92 и 121. Принципы различных иммунологических анализов описаны, например, Hage, D. S. (Anal. Chem. 71 (1999) 294R-304R); Lu, B. et al. (Analyst, 121 (1996) 29R-32R), который описывает ориентированную мобилизацию антител для использования в иммунологических анализах. Авидин-биотин-опосредованные иммунологические анализы описаны, например, в Wilchek, M., Bayer, E.A., Methods Enzymol., 184 (1990) 467-469.

Обычно используемый способ анализа на ADA представляет собой мостиковый иммунологический анализ (см., например, Liao, K. et al., J. Immunol. Methods, 2017, 441: p. 15-23; Dai, S. et al., AAPS J., 2014, 16(3): p. 464-77; и Zhong, Z.D. et al., AAPS J., 2017. 19(6): p. 1564-1575, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки). Мостиковый иммунологический анализ на ADA представляет собой иммуноанализ сэндвич-типа, в котором мультивалентный ADA связывается с двумя разными лекарственными антителами (лекарственным средством для захвата и лекарственным средством для обнаружения), каждое из которых связывается с различными неперекрывающимися или немешающими друг другу эпитопами ADA. В частности, в этом анализе образец инкубируют с лекарственным средством для захвата (меченым или немеченым) и лекарственным средством для обнаружения, содержащим детектируемую метку. После инкубации образца образуется сэндвич, содержащий лекарственное средство для захвата, ADA и лекарственное средство для обнаружения, и таким образом ADA в виде мостика связывает два связывающихся с ним лекарственных средства, и связанный ADA может быть обнаружен (см. фиг. 1A). В одном аспекте изобретения иммунологический анализ представляет собой анализ с высокой пропускной способностью.

Мостиковый иммунологический анализ на ADA дополнительно включает определение наличия или количества ADA. Следовательно, в данном раскрытии предложено лекарственное средство для обнаружения, конъюгированное с детектируемой меткой. Неограничивающие примеры детектируемых меток

для любого из способов изобретения включают рутений, радиологическую метку, фотоллюминесцентную метку, хемиллюминесцентную метку, флуоресцентную метку, флуорофор, гаптен, электрохемиллюминесцентную метку или ферментную метку. Детектируемая метка может быть измерена с помощью оборудования и устройств, известных специалистам в данной области техники.

Иллюстративные флуорофоры для применения в способах, представленных в данном документе, включают, например, зеленый флуоресцентный белок, синий флуоресцентный белок, красный флуоресцентный белок, флуоресцеин, флуоресцеин-5-изотиоцианат (FITC), цианиновые красители (Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7), красители Bodipy (Invitrogen) и/или красители Alexa Fluor (Invitrogen), дансил, дансилхлорид (DNS-Cl), 5-(йодацетамид)флуоресцеин (5-IAF), 6-акрилоил-2-диметиламинонафталин (акрилодан), 7-нитробензо-2-окса-1,3-диазол-4-илхлорид (NBD-Cl), этидия бромид, люцифер желтый, родаминовые красители (5-карбоксиродамина 6G гидрохлорид, Lissamine родамин-В-сульфонилхлорид, родамин-В-изотиоцианат (RITC (родамин-В-изотиоцианат), родамин 800); тетраметилродамин 5- (и 6-) изотиоцианат (TRITC)), техасский красный, сульфонилхлорид, нафталаминсульфоновые кислоты, включая, но не ограничиваясь ими, 1-анилинонафталин-8-сульфоновую кислоту (ANS) и 6-(п-толуидинил)нафталин-2-сульфоновую кислоту (TNS), антроилжирную кислоту, DPH, паринаровую кислоту, TMA-DPH, флуоренилжирную кислоту, флуоресцеин-фосфатидилэтаноламин, техасский красный-фосфатидилэтаноламин, пиренил-фосфатидилхолин, флуоренил-фосфотидилхолин, мероцианин 540, нафтилстирил, 3,3'-дипропилтиадикарбоцианин (diS-C3-(5)), 4-(п-дипентиламиностирил)-1-метилпиридиний (di-5-ASP), Cy-3-йодацетамид, Cy-5-N-гидроксисукцинимид, Cy-7-изотиоцианат, IR-125, триазоловый оранжевый, азур-В, нильский синий, фталоцианин Al, оксаксин 1,4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI), Hoechst 33342, ТОТО, акридиновый оранжевый, гомодимер этидия, N-(этоксикарбонилметил)-6-метоксихинолиний (MQAE), Fura-2, кальциевый зеленый, карбокси-SNARF-6, ВАРТА, кумарин, фитофлуоры, коронен и комплексы металл-лиганд.

Гаптены для применения в способах, представленных в данном документе, включают, например, дигоксигенин и биотин.

Ферменты для применения в способах, представленных в данном документе, включают, например, щелочную фосфатазу (AP), β-галактозидазу, пероксидазу хрена (HRP), пероксидазу соевых бобов (SBP), уреазу, β-лактамазу и глюкозооксидазу.

В одном варианте осуществления изобретения лекарственное средство для захвата конъюгировано с твердой поверхностью. В одном аспекте изобретения конъюгацию лекарственного средства для захвата с твердой поверхностью осуществляют через специфическую связывающую пару, причем лекарственное средство для захвата мечено или конъюгировано. В одном аспекте изобретения специфическая связывающая пара (первый компонент/второй компонент) выбрана из стрептавидина или авидина/биотина, биотина/нейтравидина, биотина/каптавидина, антитела/антигена (см., например, Hermanson, G.T. et al., Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996), эпитопа/антитела, белка А/иммуноглобулина, белка G/иммуноглобулина, белка L/иммуноглобулина, GST/глутатиона, His-тэга/никеля, FLAG/антитела M1, связывающего мальтозу белка/мальтозы, связывающего кальмодулин белка/кальмодулина, фермента/субстрата фермента, лектина/полисахарида, стероида/связывающего стероид белка, гормона/рецептора гормона и связывающих пар рецептор-лиганд. В одном аспекте изобретения лекарственное средство для захвата конъюгировано с биотином (как первым компонентом специфической связывающей пары). В этом случае конъюгация с твердой фазой осуществляется через иммобилизованный авидин или стрептавидин (см. фиг. 1А).

В некоторых вариантах осуществления изобретения белок, связывающий GlcNac, конъюгирован с первым членом связывающей пары (например, биотином, авидином, нейтравидином, каптавидом, антителом, антигеном, белком А, белком G, белком L, GST, His-тэгом, FLAG, MBP, связывающим кальмодулин белком, ферментом, рецептором или лигандом).

В одном варианте осуществления изобретения образец, тестируемый в иммунологическом анализе на ADA, представляет собой образец сыворотки. В одном аспекте изобретения образец сыворотки содержит от 1 до 20% сыворотки. В другом аспекте изобретения образец сыворотки содержит от около 1% до около 10% сыворотки. В еще одном варианте осуществления изобретения образец сыворотки содержит от около 10% до около 15% сыворотки. В еще одном варианте осуществления изобретения образец сыворотки содержит от около 10% до около 20% сыворотки. В конкретном аспекте изобретения образец сыворотки содержит около 1% сыворотки. В одном аспекте изобретения сыворотка представляет собой сыворотку человека.

В одном варианте осуществления изобретения мостиковый иммунологический анализ на ADA включает стадию кислотной диссоциации. В одном аспекте изобретения образец сыворотки разбавляют в 10 раз кислотой, например уксусной кислотой, и инкубируют при комнатной температуре перед инкубацией с лекарственным средством для захвата и лекарственным средством для обнаружения.

В одном варианте осуществления изобретения лекарственное средство для захвата и лекарственное средство для обнаружения имеют концентрацию в иммунологическом анализе от около 0,5 мкг/мл до

около 10 мкг/мл. В одном аспекте изобретения лекарственное средство для захвата и лекарственное средство для обнаружения имеют концентрацию от более 0,5 мкг/мл до менее 10 мкг/мл. В другом аспекте изобретения лекарственное средство для захвата и лекарственное средство для обнаружения имеют концентрацию от около 0,5 мкг/мл до около 5 мкг/мл. В еще одном аспекте изобретения лекарственное средство для захвата и лекарственное средство для обнаружения имеют концентрацию от около 0,5 мкг/мл до около 2,0 мкг/мл. В еще одном аспекте изобретения лекарственное средство для захвата и лекарственное средство для обнаружения имеют концентрацию от около 0,5 мкг/мл до около 1 мкг/мл. В предпочтительном аспекте изобретения лекарственное средство для захвата и лекарственное средство для обнаружения имеют концентрацию около 0,5 мкг/мл.

В одном варианте осуществления изобретения инкубацию образца, лекарственного средства для захвата и лекарственного средства для обнаружения проводят при комнатной температуре. В одном аспекте изобретения время инкубации образца, лекарственного средства для захвата и лекарственного средства для обнаружения составляет по меньшей мере 0,5 ч. В другом аспекте изобретения время инкубации составляет по меньшей мере 1 ч. В одном аспекте изобретения время инкубации составляет по меньшей мере 1,5 ч. В одном аспекте изобретения время инкубации составляет до 2 ч. В еще одном аспекте изобретения время инкубации составляет от 0,5 до 12 ч. В одном аспекте изобретения время инкубации составляет от 0,5 до 5 ч. В другом аспекте изобретения время инкубации составляет от 1 до 12 ч. В одном аспекте изобретения время инкубации составляет от 1 до 5 ч. В другом аспекте изобретения время инкубации составляет от 5 до 12 ч.

В одном варианте осуществления изобретения после инкубации образца, лекарственного средства для захвата и лекарственного средства для обнаружения образец переносят на меченую твердую поверхность, например, на твердую поверхность, меченную стрептавидином, и инкубируют дополнительно, чтобы лекарственное средство для захвата могло прикрепиться к твердой поверхности. В одном аспекте изобретения инкубацию проводят при комнатной температуре. В другом аспекте изобретения после инкубации образцы анализируют на связывание с ADA с использованием любого способа, известного в данной области техники для обнаружения меченых антител, причем лекарственное средство для обнаружения обнаруживают на основе обнаружения метки лекарственного средства, например рутения. Истинно-положительный сигнал в мостиковом анализе на ADA возникает в результате двухвалентного связывания ADA с лекарственным средством для захвата и лекарственным средством для обнаружения с образованием мостика.

Твердые поверхности для иммунологических анализов, описанных в данном документе, широко описаны в данной области техники (см., например, Butler, J.E., *Methods*, 22 (2000) 4-23, который включен в данный документ посредством ссылки). Компонент твердой поверхности в анализе отличается от инертных твердых поверхностей, с которыми подвергается анализу смесь может контактировать, тем, что "твердая поверхность" содержит по меньшей мере один фрагмент на своей поверхности, который предназначен для взаимодействия с лекарственным средством для захвата. Твердая поверхность может быть стационарным компонентом, таким как пробирка, полоска, кювета или титрационный микропланшет, или может быть нестационарным компонентом, например шариками и микрочастицами. Микрочастицы также можно использовать в качестве твердой фазы для однородных форматов поверхности. Могут быть использованы различные микрочастицы, которые позволяют нековалентно или ковалентно присоединять белки и другие вещества. Такие частицы включают полимерные частицы, такие как полистирол и поли(метилметакрилат); частицы золота, такие как наночастицы золота и коллоиды золота; и керамические частицы, такие как частицы кремнезема, стекла и оксидов металлов. См., например, Martin, C.R. et al., *Analytical Chemistry-News & Features*, 70 (1998) 322A-327A, который включен в данный документ посредством ссылки.

Данное изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые никоим образом не предназначены для ограничения. Полное содержание всех источников, патентов и опубликованных патентных заявок, процитированных в данном изобретении, а также графических материалов, настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Примеры

Пример. Уменьшение мешающего влияния мишени в мостиковом анализе иммуногенности с реагентами, блокирующими мишень, и при умеренно щелочном pH.

Материалы и способы

Материалы и реагенты.

Для функционального анализа лекарственного средства и анализа мишени, описанных в данном документе, все растворы, если не указано иное, были приготовлены в буфере для анализа (0,5% BSA, 0,05% твин-20, 1X ФСБ). Для описанного в данном документе анализа на ADA все растворы, если не указано иное, готовили в 1% BSA, 1X ФСБ. ФСБ был производства Life Technologies (Гранд-Айленд, Нью-Йорк). Основа Trizma, 1,5 M была производства Sigma (Сент-Луис, Миссури). Ледяная уксусная кислота была производства Thermo Fisher Scientific (Уолтем, Массачусетс). Буфер HBS-EP+(10X) был производства GE Life Science (Мальборо, Массачусетс). Сыворотка человека была приобретена в Bioreclamation (Хиксвил, Нью-Йорк). Покрытые стрептавидином микропланшеты были производства Meso Scale Discovery

(Роквилл, Мэриленд). Рекомбинантный человеческий белок-мишень был производства R&D System (Миннеаполис, Миннесота). Черные микролуночные планшеты, конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP) NeutrAvidin™ и пикохемиллюминесцентный субстрат для ELISA SuperSignal™ были производства Thermo Fisher Scientific (Рокфорд, Иллинойс). Конъюгированные с HRP антитела козы против IgG мыши, специфичные к фрагменту Fc, были приобретены в Jackson ImmunoResearch (Вест-Гроув, Пенсильвания). Биосенсоры АНС (захват Fc IgG человека) были производства Pall ForteBio (Фремонт, Калифорния). Полностью человеческое моноклональное лекарственное антитело, моноклональное антитело мыши к лекарственному средству, биотинилированное лекарственное средство, меченое рутением лекарственное средство и все человеческие и мышинные моноклональные антитела к мишени (обозначаемые в данном документе HuAb1, HuAb2 (человека) и MsAb2 (мышь)), растворимые рецепторные слитые белки человека и мыши (обозначаемые в данном документе HuSR и MsSR, соответственно) и биотинилированное моноклональное антитело человека к мишени (используемое в анализе на ADA и мишени) были получены в Regeneron Pharmaceuticals (Тарритаун, Нью-Йорк).

Определение pH.

Измерения pH проводили с использованием калиброванного измерительного прибора Metier Toledo (Колумбус, Огайо) с электродом InLab Expert Pro-ISM™. Смешанную сыворотку человека разводили в 10 раз 300 мМ уксусной кислотой. Затем подкисленные образцы были забуферены в 10 раз растворами трис-основания с различными концентрациями. Измерения pH проводили в конечных растворах для анализа, как показано в таблице ниже.

Условия pH, оцениваемые для обнаружения ADA к лекарственному средству

Раствор	pH
Смешанная сыворотка человека 1:10 в 300 мМ уксусной кислоте, затем 1:10 в мастер-микс	
70 мМ Трис	8,43
60 мМ Трис	8,30
50 мМ Трис	8,13
40 мМ Трис	7,83

Анализ на ADA.

Антитела к лекарственным средствам (ADA) в образцах сыворотки человека обнаруживали с помощью неколичественного мостикового иммуноанализа на ADA (фиг. 1A-1C). В этом мостиковом анализе на ADA используется моноклональное антитело мыши к лекарственному средству в качестве положительного контроля и биотинилированное лекарственное средство и лекарственное средство, меченое рутением, в качестве компонентов мостика (фиг. 1A). Образцы сыворотки подкисляли путем их 10-кратного разведения в 300 мМ уксусной кислоте и инкубировали при комнатной температуре (к. т.) в течение по меньшей мере 10 мин. Биотинилированное лекарственное средство и лекарственное средство, меченое рутением, (0,5 мкг/мл) готовили в буфере для анализа, содержащем 60 мМ трис-основания, перед добавлением к образцам сыворотки. Затем образцы сыворотки, обработанные кислотой, разводили в 10 раз раствором меченого лекарственного средства. После инкубации в течение около 60 мин при комнатной температуре образцы переносили в заблокированные (5% BSA) 96-луночные планшеты со стрептавидином (MSD) Multi-Array™ и инкубировали в течение около 60 мин при комнатной температуре. Планшет промывали и добавляли буфер для считывания, и планшеты считывали с использованием планшет-ридера MSD, такого как, например, SECTOR Imager 2400. Чтобы заблокировать опосредованное мишенью мешающее влияние (фиг. 1B), в раствор меченого лекарственного средства также были включены моноклональные антитела к мишени (100 мкг/мл) и/или растворимый рецепторный белок (100 мкг/мл) (фиг. 1C). Кроме того, раствор меченого лекарственного средства готовили в 60 мМ Трис для доведения pH до умеренно щелочного значения, что также минимизирует связывание мишени как с биотинилированным, так и с меченым рутением лекарственным средством.

Определение мишени.

В этой методике используется титрационный микропланшет, покрытый моноклональным антителом мыши к мишени (1 мкг/мл), а в качестве стандарта применяют рекомбинантный белок-мишень. Стандарты и контрольные образцы готовили в среде, хорошо известной специалистам в данной области техники, чтобы устранить мешающее влияние эндогенного белка-мишени из сыворотки человека. Стандарты, контроли и образцы разбавляли в 10 раз 300 мМ уксусной кислотой и инкубировали при комнатной температуре в течение около 30 мин. Образцы, обработанные кислотой, нейтрализовали (разведение 1:2) с помощью 300 мМ раствора трис-основания, в который добавлено моноклональное антитело к лекарственному средству (100 мкг/мл), чтобы минимизировать мешающее влияние лекарственного средства, перед добавлением в планшет. Белок-мишень, захваченный на планшете, выявляли с помощью другого биотинилированного моноклонального антитела человека к мишени (200 нг/мл), а затем NeutrAvidin™, конъюгированного с пероксидазой хрена (NeutrAvidin-HRP™) (100 нг/мл). Добавляли субстрат на основе люминола, специфичный к пероксидазе, для достижения интенсивности сигнала, которая пропорциональна общей концентрации мишени.

Функциональный анализ лекарственного средства.

В функциональном анализе лекарственного средства количественно определяют уровень лекарственного антитела, которое либо не связано с мишенью, либо имеет только одно плечо, связанное с мишенью. Таким образом оно все еще может связываться с молекулой-мишенью. В процедуре использовали титрационный микропланшет, покрытый мишенью (0,5 мкг/мл), и применяли лекарственное антитело в качестве стандарта. Лекарственное средство, захваченное на планшете, выявляли с использованием моноклональных антител мыши к IgG⁴ человека (250 нг/мл), а затем конъюгированных с пероксидазой хрена антител козы к IgG мыши, специфических к Fc (к IgG-HRP мыши) (100 нг/мл). Затем добавляли субстрат на основе люминола, специфичный к пероксидазе, для достижения интенсивности сигнала, которая пропорциональна концентрации функционального лекарственного средства.

Интерферометрия биослоя.

Связывание мишени с лекарственным антителом в отсутствие и в присутствии антитела мыши, блокирующего мишень, MsAb2 и растворимого слитого рецепторного белка мыши MsSR при pH 7,3 или 8,3 исследовали на системе Octet RED96 (Pall Forte Bio) при 30°C со скоростью встряхивания 1000 об/мин. Биосенсоры АНС предварительно уравнивали буфером для разведения, содержащим 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,02% (об./об.) азида натрия, 1 мг/мл BSA, pH 7,3, в течение 30 мин.

Стадию нанесения выполняли для концентрацией лекарственного средства 5 мкг/мл в том же буфере для разведения в течение 20 секунд (для достижения толщины ~0,5 нм) с последующей 60-секундной фоновой стадией в том же буфере для разведения перед тем, как биосенсоры были погружены в лунки, содержащие 200 мкл мишени в концентрации 60 нМ с или без 60 нМ MsAb2 и MsSR при pH 7,3. Эту же процедуру также проводили в среде с pH 8,3. Кривые ассоциации получали в течение в общем ~200 с с последующей фазой диссоциации в течение ~300 с.

Результаты и обсуждение.

Условия умеренно щелочного pH анализа с антителом, блокирующим мишень, HuAb1 повышают допустимые уровни мишени и снижают фоновые сигналы в образцах сыворотки человека, не подвергавшихся воздействию

Сообщенные уровни мишени в нормальной сыворотке человека составляют около 10 нг/мл. Мишень образует комплексы с лекарственным антителом и несколькими ингибирующими связывающими белками в кровотоке. Антитела к лекарственному средству измеряли с помощью мостикового анализа иммуногенности ADA с использованием стадии кислотной диссоциации (фиг. 1A-1C). Хотя кислотная обработка обычно увеличивает допустимые уровни лекарственного средства, она высвобождает мишень из комплекса с лекарственным средством и любыми белками, связывающими мишень, что приводит к высоким фоновым сигналам в образце сыворотки человека, не подвергавшейся воздействию (фиг. 2A). О подобных результатах сообщалось ранее, когда для диссоциации ADA и фулранумаба использовали предварительную обработку кислотой. Комплексы NGF-фулранумаб также диссоциировали с высвобождением свободного NGF, что мешало анализу на ADA и давало ложноположительные результаты (Dai, S. et al., AAPS J., 2014, 16(3): p. 464-77).

В анализе на ADA без антитела, блокирующего мишень, и при нейтральном pH анализа допустимый уровень мишени (определяемый как количество мишени, необходимое для получения сигнала анализа выше точки отсечения планшета), определяемый с использованием рекомбинантного белка-мишени, составляет около 3 нг/мл (фиг. 2B). Допустимый уровень мишени увеличивается до около 150 нг/мл в присутствии 100 мкг/мл антитела, блокирующего мишень, HuAb1 при нейтральном pH анализа. Интересно, что при pH анализа 8,3 и той же концентрации антитела человека, блокирующего мишень, HuAb1 допустимый уровень мишени увеличивался до около 1,1 мкг/мл (фиг. 2B). Допустимый уровень мишени еще выше, около 7,5 мкг/мл, когда pH анализа составляет 8,9. Значения чувствительности и допустимого предела лекарственного средства (DTL) в анализе были аналогичными как при нейтральном pH, так и при pH 8,3. Сигнал анализа в образцах сыворотки человека, не подвергнутой воздействию, также снижался до фонового уровня в присутствии 100 мкг/мл HuAb1 и при умеренно щелочном pH (фиг. 2C).

Умеренно щелочное значение pH в сочетании с двумя реагентами, блокирующими мишень, подавляет опосредованные мишенью фоновые сигналы в образцах из клинического исследования.

Для того чтобы проверить, может ли комбинация антитела человека, блокирующего мишень, HuAb1 и умеренно щелочного pH также ингибировать мешающее влияние мишени в образцах из клинического исследования, были проанализированы образцы из клинического исследования фазы I от трех субъектов (из исследования с однократным введением дозы лекарственного средства) в 4 различные моменты времени (дни 1, 29, 57 и 113). В образцах в 29 и 57 день наблюдалось 10-12-кратное увеличение уровней мишени (фиг. 3A), при этом уровни мишени были близки к исходному уровню в образцах в 113-й день, как измерено с помощью внутреннего анализа на мишень. Наивысшая концентрация мишени, наблюдаемая в этих образцах, составляла около 60 нг/мл, что намного ниже, чем допустимый уровень мишени в анализе на ADA. Однако, когда эти образцы были протестированы в анализе на ADA с использованием 100 мкг/мл антитела человека HuAb1, блокирующего мишень, при pH 8,3, положительные сигналы были обнаружены в образцах в 29 и 57 день, при этом сигналы анализа были близки к фоновым уровням в образцах в 113 день (фиг. 3B).

Эти субъекты получали однократную дозу лекарственного антитела, и их ФК профили не предполагали значительного ответа ADA (фиг. 3С). Кроме того, сигналы ADA в этих образцах, по-видимому, коррелируют с уровнями мишени в них. Впоследствии также была протестирована большая группа образцов после введения дозы, большинство из которых продемонстрировали положительные сигналы ADA. Следовательно, вероятно, что наличие повышенных уровней мишени отвечает за положительный сигнал в анализе, создавая опосредованный мишенью мостик с мечеными лекарственными средствами.

Для дальнейшего уменьшения очевидного мешающего влияния мишени, наблюдаемого в этих клинических образцах, второе антитело человека HuAb2, блокирующее мишень, было добавлено к HuAb1 в комбинации либо с нейтральным рН, либо с умеренно щелочным рН. Интересно, что опосредованный мишенью фоновый сигнал значительно снижался при использовании 100 мкг/мл антител, блокирующих мишень, HuAb1 и HuAb2, при нейтральном рН анализа, хотя и не до исходных уровней. Однако подгруппа образцов после введения дозы по-прежнему давала сигналы в анализе выше точки отсечения планшета. Когда эти образцы были исследованы снова с той же концентрацией антител, блокирующих мишень, HuAb1 и HuAb2, но при рН анализа 8,3, все они демонстрировали сигналы анализа ниже точки отсечения планшета (фиг. 3D).

На исходный формат анализа с щелочным рН и 100 мкг/мл антитела, блокирующего мишень, HuAb1, по-видимому, не влияет около 1,1 мкг/мл рекомбинантного белка-мишени (фиг. 2А). Однако в образцах из клинического исследования, которые содержали относительно низкие уровни белка-мишени (≤ 60 нг/мл), наблюдалось мешающее влияние мишени. Это указывает на то, что рекомбинантный белок-мишень может вести себя в анализе не так, как нативный белок, и/или что у пациентов могут экспрессироваться разные формы белка-мишени с различными связывающими свойствами по сравнению с рекомбинантным белком, что делает антитело, блокирующее мишень, HuAb1 менее эффективным в подавлении мешающего влияния мишени в образцах из клинических исследований. Это несоответствие результатов анализа на ADA между рекомбинантным и эндогенным белком-мишенью подчеркивает важность использования реальных исследуемых образцов для характеристики эффективности анализа.

Еще одним интересным открытием было влияние умеренно щелочного рН на допустимые уровни мишени. Комбинация HuAb1 и HuAb2 не подавляла полностью мешающее влияние мишени в этих образцах из клинического исследования в условиях нейтрального рН. Для полного устранения мешающего влияния мишени потребовались слегка щелочные условия вместе с двумя антителами, блокирующими мишень.

Комбинация рецептора мишени MsSR и антитела, блокирующего мишень, MsAb2, также уменьшает мешающее влияние мишени.

Блокирующее мишень антитело HuAb1 имеет некоторые общие перестановки в CDR VH с терапевтическим лекарственным антителом, поэтому любые ADA, специфичные к этим областям перестановки VH, могут связываться с HuAb1 в буфере для анализа, а не с мечеными лекарственными средствами, что потенциально может затруднить их обнаружение в анализе. Чтобы преодолеть эту возможную проблему, HuSR, который является рецептором мишени, слитым с Fc IgG человека, первоначально был использован для замены блокирующего мишень антитела HuAb1. Как показано на фиг. 4А, комбинация 100 мкг/мл HuAb2 и 100 мкг/мл HuSR может эффективно ингибировать опосредованные мишенью фоновые сигналы в образцах из клинического исследования фазы I. Фактически аналогичные допустимые уровни мишени были получены либо с комбинацией HuAb2/HuSR, либо с комбинацией HuAb1/HuAb2.

Дополнительно блокирующее мишень антитело HuAb2 имеет ту же константную область IgG4 человека, что и лекарственное антитело, а рецептор мишени HuSR содержит Fc IgG человека. Любые антитела к лекарственным средствам в образцах сыворотки пациентов, специфичные к области Fc лекарственного антитела, могут связываться с HuAb2 и HuSR, что также может потенциально затруднить их обнаружение в анализе. Для того чтобы преодолеть эту возможную проблему, домен Fc HuSR и всю константную область HuAb2 преобразовывали из человеческих в мышинные, чтобы дополнительно уменьшить их возможное мешающее влияние при обнаружении ADA. Комбинация MsAb2 (HuAb2 с константной областью мыши) и MsSR (HuSR с Fc мыши) по-прежнему эффективно уменьшала мешающее влияние мишеней в образцах из клинического исследования (фиг. 4В и 4С). Образцы из клинического исследования в 1, 29, 57 и 113 дни демонстрировали только фоновые сигналы в случае этого нового формата анализа, даже несмотря на то, что они содержали высокие уровни мишени в сыворотке (фиг. 5).

Умеренно щелочное значение рН и реагенты, блокирующие мишень, оказывают минимальное влияние на обнаружение ADA в реальных образцах крови кроликов и в образцах из токсикологического исследования на крысах.

Для того чтобы гарантировать, что умеренно щелочное значение рН и реагенты, блокирующие мишень, оказывают минимальное влияние на стабильность и/или обнаружение ADA, образцы крови кроликов, полученные в ближайшее время после иммунизации лекарственным Fab, были проанализированы с использованием данного формата анализа.

Образец крови 1 и образец крови 2 от двух кроликов, отобранные через около 30-40 дней после иммунизации, анализировали с использованием двух реагентов, блокирующих мишень, либо при нейтральном рН, либо при рН 8,3. Такая кровь кролика, отобранная в ближайшее время, обычно содержит поли-

клональные антитела к лекарственному средству с низкими аффинностями, на обнаружение которых могут в большей степени влиять более жесткие условия анализа. Как показано на фиг. 6А, значения среднего количества ADA были подобными для каждого условия анализа независимо от pH анализа, что указывает на то, что умеренно щелочное значение pH и добавление реагентов, блокирующих мишень, не оказали или оказали минимальное влияние на стабильность или обнаружение ADA в этих образцах.

Для того чтобы еще раз подтвердить, что формат с использованием двух реагентов, блокирующих мишень, при pH 8,3 позволяет обнаруживать ADA в образцах после введения дозы, были проанализированы образцы сыворотки крыс от 2 крыс в токсикологическом исследовании как на уровень мишени, так и на уровни ADA. Уровни мишени увеличились по меньшей мере в 10 раз в образцах в 28 и 85 день от крысы 1 и в около 10 раз в образце в 28 день от крысы 2 по сравнению с исходными образцами, однако в этих образцах не наблюдалось необычного повышения сигнала ADA в анализе, указывая на то, что мешающее влияние мишени было уменьшено. В то же время были обнаружены высокие уровни ADA у обоих животных, начиная с 85 дня, что указывает на то, что добавление двух реагентов, блокирующих мишень, и умеренно щелочное значение pH анализа не мешали обнаружению ADA (фиг. 6В).

Умеренно щелочное значение pH вместе с реагентами, блокирующими мишень, ингибируют связывание мишени с лекарственным средством.

Для того чтобы понять, почему умеренно щелочное значение pH и реагенты, блокирующие мишень, могут способствовать уменьшению мешающего влияния мишени в образцах из клинического исследования, были проведены эксперименты с использованием системы Octet для проверки связывания мишени с лекарственным средством при различных условиях pH, с реагентами, блокирующими мишень, или без них. Результаты показаны на фиг. 7А. Как видно из кривых ассоциации связывания, в отсутствие MsAb2 и MsSR ответ был немного ниже при pH 8,2 по сравнению с pH 7,3, что указывает на то, что на ассоциацию между мишенью и лекарственным средством незначительно влияет pH анализа. Однако наблюдалась более высокая скорость диссоциации при pH 8,2 по сравнению с pH 7,3, что указывает на то, что аффинность связывания между мишенью и лекарственным средством более слабая при pH 8,2. При pH 7,3 в присутствии MsAb2 и MsSR также наблюдалась более высокая скорость диссоциации, подобная только щелочному pH. Однако присутствие реагентов, блокирующих мишень, также значительно повлияло на ассоциацию мишени с лекарственным средством. Наконец, полное ингибирование связывания достигается комбинацией MsAb2 и MsSR при pH 8,2. pH-зависимые различия в связывании потенциально относятся либо к конформационному изменению мишени при умеренно щелочном pH, либо к лучшему связыванию реагентов, блокирующих мишень, с мишенью при pH 8,2, таким образом ингибируя ассоциацию мишени с лекарственным средством.

Эти данные о связывании дополнительно подтверждают данные анализа на ADA, которые показывают, что только щелочное значение pH может частично ингибировать опосредованный мишенью сигнал в образцах из клинического исследования. В то время как комбинация MsAb2 и MsSR при нейтральном pH значительно ингибирует опосредованный мишенью сигнал, полное ингибирование мешающего влияния мишени достигается только для комбинации MsAb2, MsSR и pH 8,3 (фиг. 7В).

Анализы связывания лиганда (LBA) являются очень чувствительными к мешающим молекулам, которые могут исказить результаты анализов, или давая искусственные сигналы, или блокируя желаемые взаимодействия при анализе. Мешающее влияние мишени является распространенной проблемой, и ее трудно преодолеть из-за ее специфичности к лекарственному средству и сильно изменчивых биологических свойств каждого белка-мишени. Мишень обычно образует прочные комплексы с лекарственным средством и ее связывающими белками в кровотоке, которые может быть трудно разрушить. Кроме того, уровни мишени могут увеличиваться до относительно высоких значений в кровотоке из-за образования комплексов мишень лекарственное средство и мишень:связывающий белок или за счет механизмов обратной связи, присущих биологическому пути. В мостиковых анализах на ADA присутствие димерных или мультимерных мишеней может привести к ложноположительным результатам и затруднить оценку иммуногенности. Это влияние может усиливаться за счет кислотной диссоциации, обычно используемой стратегии для повышения допустимого уровня лекарственного средства в анализах на ADA, которая также может потенциально разрушать комплексы, содержащие мишень, высвобождая мишень и приводя к опосредованным мишенью ложноположительным сигналам. Следовательно, при разработке анализа необходимо все тщательно рассмотреть, взвешивая пользу каждой стратегии и риск внесения в анализ возможного искажения. Основываясь на биологических свойствах, необходимо оценить подходы, специфичные к мишеням, чтобы уменьшить их мешающее влияние на анализ.

Для уменьшения мешающего влияния мишеней можно использовать предварительную обработку блокирующими мишень антителами (в виде отдельных антител или в комбинации), рецепторами, кофакторами, а также белками, связывающими мишень. Кроме того, можно также изменять pH анализа, чтобы уменьшить мешающее влияние мишени либо путем прямого воздействия на димерную или мультимерную мишень, либо путем изменения аффинности связывания лекарственного средства с мишенью. Кроме того, важно оценить эффективность выбранной стратегии/формата анализа для уменьшения мешающего влияния мишени путем тестирования реальных образцов после введения дозы, поскольку нативный белок-мишень в образцах сыворотки может вести себя иначе, чем его рекомбинантный вариант. Использо-

вание данных ФК и уровней мишени также может помочь отличить реальный ответ ADA от сигналов, опосредованных мишенью.

Для уменьшения мешающего влияния мишени можно использовать добавление реагентов, блокирующих мишень. Однако в случае терапевтических антител необходимо убедиться, что эти реагенты не имеют одинаковых последовательностей CDR с лекарственным средством (в случае антител к мишени) или не содержат константные последовательности IgG человека (в случае антител, рецепторов и связывающих белков), поскольку эти общие последовательности могут ухудшить обнаружение ADA, специфичных к этим последовательностям. Наконец, использование низкоаффинных ADA-положительных образцов, полученных от животных, с поликлональным ответом на лекарственное средство может представлять собой инструмент для подтверждения того, что ответы ADA с действительно низкой аффинностью, низким титром, на обнаружение которых с большей вероятностью повлияют модификации анализа, тем не менее могут быть обнаружены в окончательных условиях анализа.

В этом раскрытии мишень лекарственного средства представляет собой гомодимер, который образует множество неактивных комплексов со своими ингибирующими связывающими белками в кровотоке. В то время как кислотная диссоциация увеличивает допустимый предел лекарственного средства (DTL) в анализе на ADA, она высвобождает мишень, связанную с лекарственным средством, и мишень, связанную с ее ингибирующими связывающими белками. Высвобожденная мишень будет оказывать мешающее влияние в анализе на ADA. Кроме того, лечение мышей лекарственным средством повышает экспрессию мишени. Вестерн-блоттинг с использованием антител, специфичных к предшественникам и зрелой форме мишени, показал, что различные формы мишени активировались у мышей через 28 дней после инъекции лекарственного средства. Следовательно, необходим надежный анализ на ADA с максимально возможным допустимым уровнем мишени.

Путем включения антитела, блокирующего мишень, (HuAb1) и в условиях умеренно щелочного pH анализа (pH 8,3), авторы изобретения смогли получить высокие допустимые уровни рекомбинантного белка-мишени. Анализ был оптимизирован для добавления второго антитела, блокирующего мишень, HuAb2. Это значительно увеличило допустимый уровень мишени, и частота положительных результатов была значительно снижена в образцах из клинического исследования. Дальнейшая оптимизация анализа была произведена путем замены антитела к мишени HuAb1. Поскольку HuAb1 имеет некоторые общие последовательности области, определяющей комплементарность, (CDR) с лекарственным средством, оно потенциально может связывать ADA к лекарственному средству, тем самым ухудшая обнаружение ADA. Поэтому вместо HuAb1 использовали внешний участок рецептора мишени, слитого с Fc IgG человека (HuSR). В сочетании с HuAb2, HuSR смог заблокировать мешающее влияние мишени, как и комбинация HuAb1/HuAb2. Затем домены Fc HuSR и всю константную область HuAb2 преобразовывали от человеческих в мышиные (MsAb2 и MsSR) для дополнительного уменьшения возможного мешающего влияния на обнаружение ADA. Эксперименты по характеристике с использованием системы Octet показали, что связывание мишени с лекарственным средством ингибируется посредством только умеренно щелочного pH или только присутствием реагентов, блокирующих мишень. Однако полное ингибирование связывания достигается с помощью комбинации MsAb2, MsSR и умеренно щелочного pH. Анализ крови с низким титром ADA от иммунизированных кроликов и известных ADA-положительных образцов из доклинических исследований на крысах подтвердил возможность обнаруживать в анализе ADA-положительные образцы и минимальное влияние щелочного pH и реагентов, блокирующих мишень, на обнаружение ADA.

Эти результаты предоставляют альтернативные стратегии преодоления мешающего влияния мишени в мостиковых анализах иммуногенности, когда стандартные антитела, блокирующие мишень, неэффективны.

Эквиваленты.

Специалисты в данной области поймут или смогут установить, используя не более чем рутинное экспериментирование, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в данном документе. Подразумевается, что такие эквиваленты охвачены следующей формулой изобретения. Содержание всех источников, патентов и опубликованных патентных заявок, процитированных в данном изобретении, включено в данный документ посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ уменьшения мешающего влияния мишени лекарственного средства в мостиковом иммунологическом анализе на антитела к лекарственному средству (ADA) для определения наличия ADA к лекарственному средству в образце сыворотки, включающий
 - приведение образца сыворотки в контакт с
 - лекарственным средством для захвата, меченым первой меткой,
 - лекарственным средством для обнаружения, меченым второй меткой,
 - первым реагентом, блокирующим мишень лекарственного средства, содержащим внеклеточный участок рецептора, слитый с доменом Fc IgG, и
 - вторым реагентом, блокирующим мишень лекарственного средства, содержащим внеклеточный

участок рецептора, слитый с доменом Fc IgG, где первый реагент, блокирующий мишень лекарственного средства, и второй реагент, блокирующий мишень лекарственного средства, являются разными;

инкубацию образца сыворотки в условиях умеренно щелочного pH анализа pH 7,5-9,5 с лекарственным средством для захвата, лекарственным средством для обнаружения, первым реагентом, блокирующим мишень лекарственного средства, и вторым реагентом, блокирующим мишень лекарственного средства;

обеспечение связывания лекарственного средства для захвата и лекарственного средства для обнаружения с ADA и обеспечение связывания первого реагента, блокирующего мишень лекарственного средства, и второго реагента, блокирующего мишень лекарственного средства, с мишенью лекарственного средства, присутствующей в образце, с уменьшением тем самым мешающего влияния мишени лекарственного средства в мостиковом иммунологическом анализе на ADA.

2. Способ уменьшения мешающего влияния мишени лекарственного средства в мостиковом иммунологическом анализе на антитела к лекарственному средству (ADA) для определения наличия ADA к лекарственному средству в образце сыворотки, включающий

приведение образца сыворотки в контакт с

лекарственным средством для захвата, меченым первой меткой,

лекарственным средством для обнаружения, меченым второй меткой,

первым антителом, блокирующим мишень лекарственного средства, и

вторым антителом, блокирующим мишень лекарственного средства, где первое антитело, блокирующее мишень лекарственного средства, и второе антитело, блокирующее мишень лекарственного средства, являются разными;

инкубацию образца сыворотки с лекарственным средством для захвата, лекарственным средством для обнаружения, первым антителом, блокирующим мишень лекарственного средства, и вторым антителом, блокирующим мишень лекарственного средства, в условиях умеренно щелочного pH анализа pH 7,5-9,5;

обеспечение связывания лекарственного средства для захвата и лекарственного средства для обнаружения с ADA и обеспечение связывания первого антитела, блокирующего мишень лекарственного средства, и второго антитела, блокирующего мишень лекарственного средства, с мишенью лекарственного средства, присутствующей в образце, с уменьшением тем самым мешающего влияния мишени лекарственного средства в мостиковом иммунологическом анализе на ADA.

3. Способ уменьшения мешающего влияния мишени лекарственного средства в мостиковом иммунологическом анализе на антитела к лекарственному средству (ADA) для определения наличия ADA к лекарственному средству в образце сыворотки, причем мишень лекарственного средства представляет собой растворимый белок, при этом способ включает

приведение образца сыворотки в контакт с

лекарственным средством для захвата, меченым первой меткой,

лекарственным средством для обнаружения, меченым второй меткой,

реагентом, блокирующим мишень лекарственного средства, содержащим внеклеточный участок рецептора, слитый с доменом Fc IgG, и

антителом, блокирующим мишень лекарственного средства;

инкубацию образца сыворотки с лекарственным средством для захвата, лекарственным средством для обнаружения, реагентом, блокирующим мишень лекарственного средства, и антителом, блокирующим мишень лекарственного средства, в условиях умеренно щелочного pH анализа pH 7,5-9,5;

обеспечение связывания лекарственного средства для захвата и лекарственного средства для обнаружения с ADA и обеспечение связывания реагента, блокирующего мишень лекарственного средства, и антитела, блокирующего мишень лекарственного средства, с мишенью лекарственного средства, присутствующей в образце, с уменьшением тем самым мешающего влияния мишени лекарственного средства в мостиковом иммунологическом анализе на ADA.

4. Способ по любому из пп.1-3, дополнительно включающий выполнение мостикового иммунологического анализа на антитела к лекарственному средству (ADA).

5. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что мишень лекарственного средства представляет собой растворимый белок, такой как, например, лиганд.

6. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой терапевтическое моноклональное антитело человека или гуманизированное терапевтическое моноклональное антитело, предпочтительно где человеческое или гуманизированное терапевтическое моноклональное антитело оценивают в клиническом испытании.

7. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что мишень лекарственного средства представляет собой растворимую или выделяющуюся мультимерную мишень лекарственного средства или гомодимерную мишень лекарственного средства.

8. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что умеренно щелочное значение pH анализа включает значения pH от около 8,3 до около 8,9, предпочтительно где умеренно щелочное значение pH анализа включает значение pH около 8,3 или 8,9.

9. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что образец сыворотки представляет собой образец сыворотки человека, предпочтительно где образец сыворотки получен от субъекта, которого лечат лекарственным средством.

10. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что инкубацию проводят при комнатной температуре.

11. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что мостиковый иммунологический анализ на антитела к лекарственному средству (ADA) представляет собой анализ с высокой пропускной способностью.

12. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что лекарственное средство для захвата прикреплено к твердой поверхности, предпочтительно где твердая поверхность представляет собой титрационный микропланшет, предпочтительно где твердая поверхность покрыта стрептавидином.

13. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что первая метка выбрана из группы, состоящей из метки биотина, метки белка А, метки белка G и метки глутатионин-S-трансферазы (GST), и тем, что вторая метка выбрана из группы, состоящей из рутениевой метки, радиологической метки, фотоллюминесцентной метки, хемилюминесцентной метки, флуоресцентной метки, электрохемилюминесцентной метки и ферментной метки.

Обнаружение ADA (истинно-положительный)



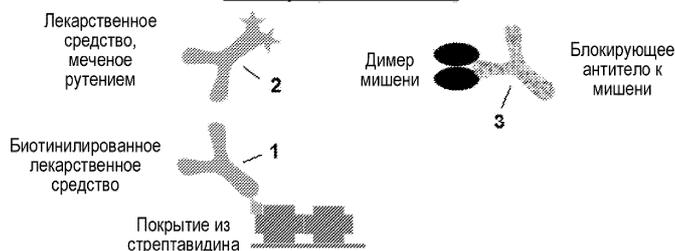
Фиг. 1А

Мешающее влияние мишени (ложно-положительный)



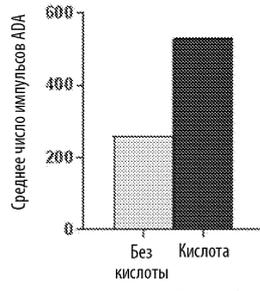
Фиг. 1В

Блокирование мишени



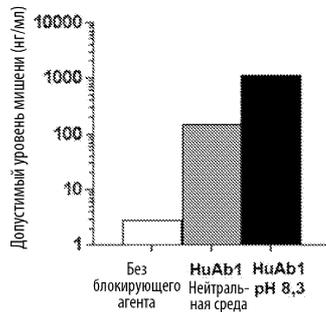
Фиг. 1С

Сигнал ADA увеличивался при обработке кислотой



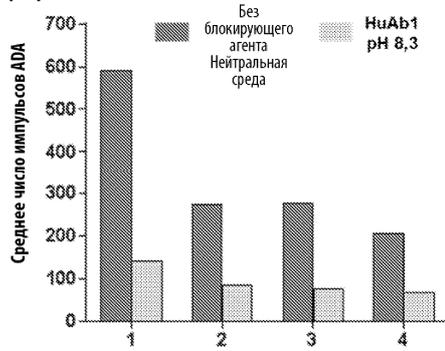
Фиг. 2А

Допустимый уровень мишени увеличивался в присутствии NuAb1 и при pH 8,3



Фиг. 2В

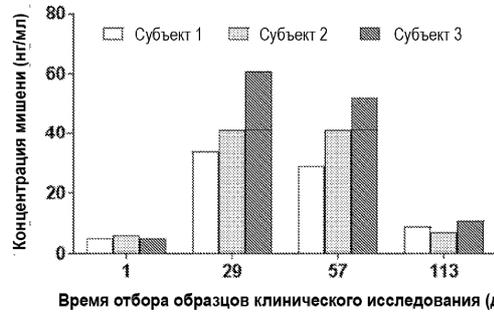
Снижение опосредованного мишенью, фонового сигнала в присутствии NuAb1 и при pH 8,3



Образцы сыворотки человека, не подвергнутые воздействию

Фиг. 2С

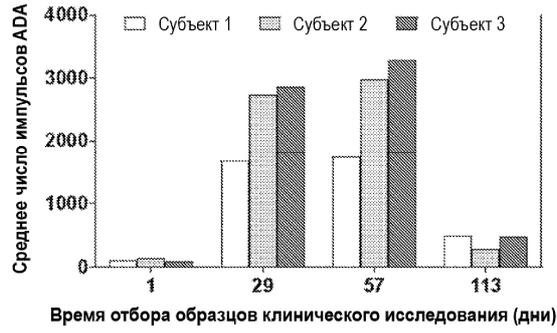
Концентрация мишени в образцах из клинического исследования



Время отбора образцов клинического исследования (дни)

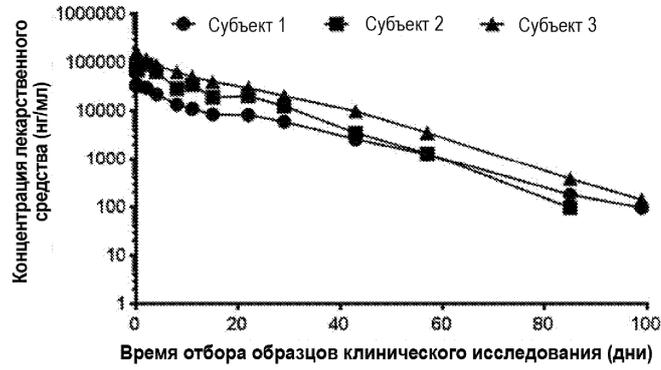
Фиг. 3А

Сигнал ADA в образцах из клинического исследования



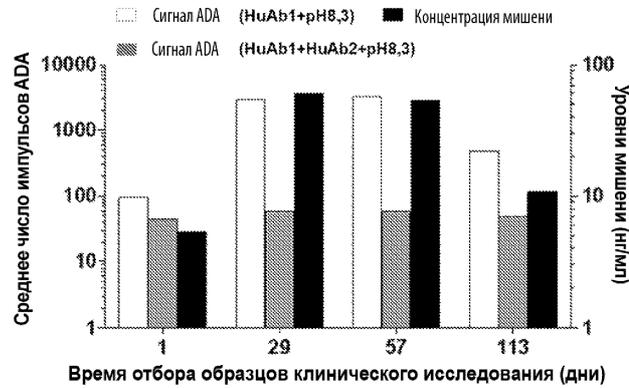
Фиг. 3В

Концентрация лекарственного средства X в образцах из клинического исследования



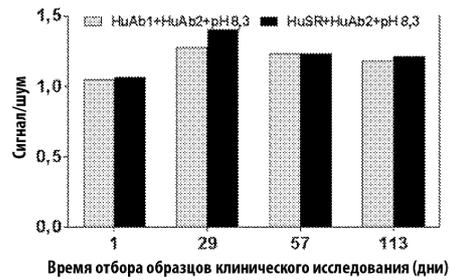
Фиг. 3С

Дополнительное антитело к мишени HuAb2 снижало фоновый сигнал в образцах из клинического исследования



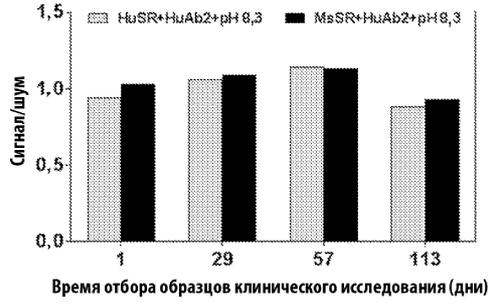
Фиг. 3Д

Сигнал: фоновый



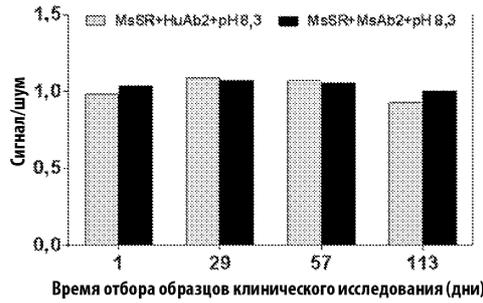
Фиг. 4А

Сигнал: фоновый



Фиг. 4В

Сигнал: фоновый



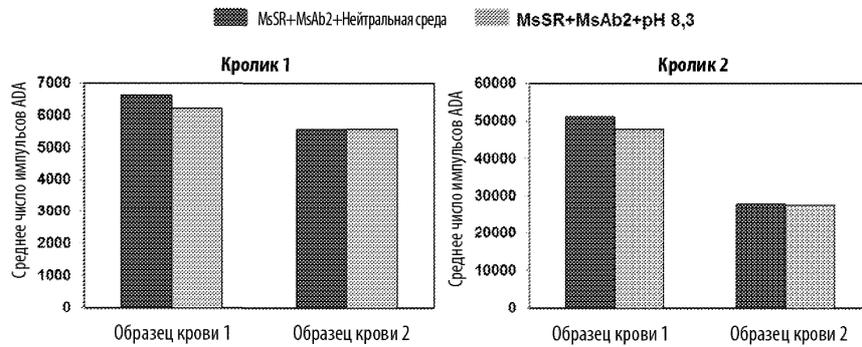
Фиг. 4С

Сигнал ADA в образцах из клинического исследования в присутствии MsAb2, MsSR и при pH 8,3



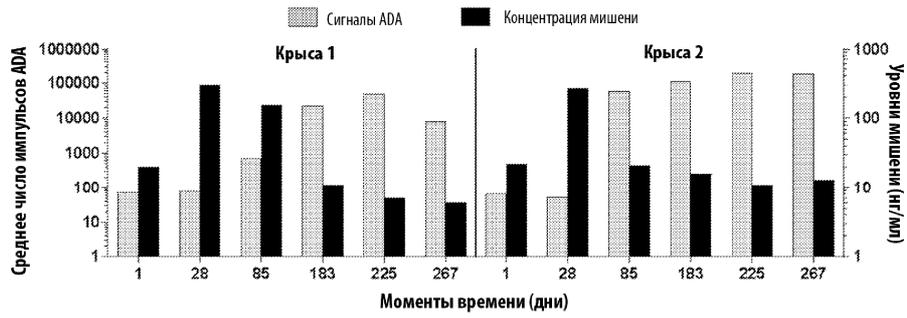
Фиг. 5

Минимальное влияние умеренно основного pH и реагентов, блокирующих мишень, на обнаружение ADA в реальных образцах крови кроликов



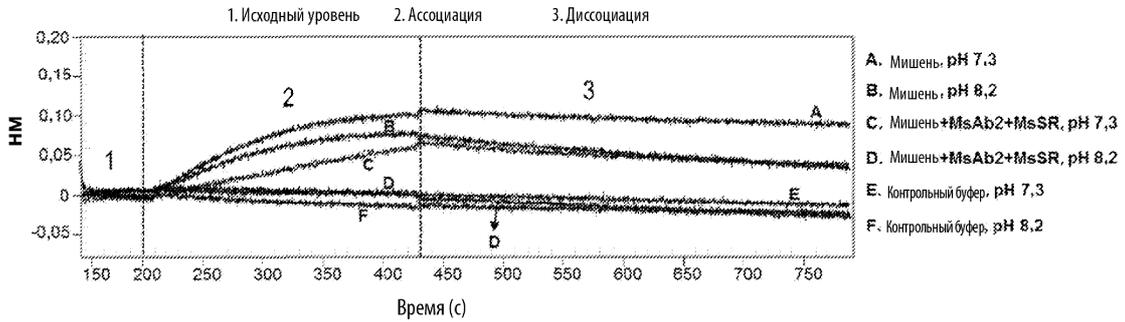
Фиг. 6А

Обнаружение сигнала ADA в реальных образцах из токсикологического исследования на крысах



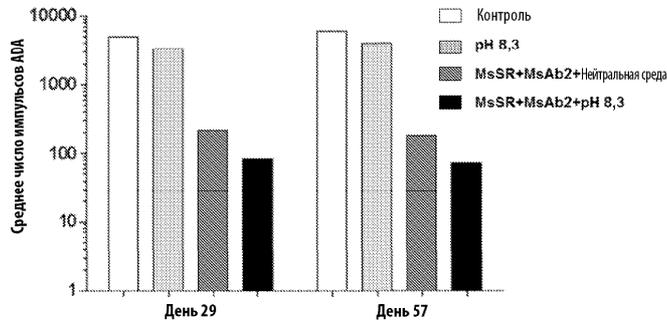
Фиг. 6В

Влияние pH на связывание мишени с лекарственным средством в отсутствие и в присутствии MsAb2 и MsSR



Фиг. 7А

Влияние pH на сигнал ADA, наблюдаемый для образцов из клинического исследования, в отсутствие и в присутствии MsAb2 и MsSR



Фиг. 7В