

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392733** (13) **A2**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.12.29

(22) Дата подачи заявки
2017.09.12

(51) Int. Cl. *A61K 38/22* (2006.01)
C07K 14/72 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
G01N 33/567 (2006.01)
G01N 33/74 (2006.01)

(54) **СПОСОБЫ ДЕТЕКЦИИ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ К ЛЕПТИНУ**

(31) 62/393,632

(32) 2016.09.12

(33) US

(62) 201990720; 2017.09.12

(71) Заявитель:
АМРИТ ФАРМАСЬЮТИКАЛС ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Сейлстад Джеффри (US)

(74) Представитель:
**Костюшенкова М.Ю., Строкова О.В.,
Джермакян Р.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Угрюмов В.М. (RU)**

(57) В настоящем документе предусмотрены способы детекции нейтрализующих антител к лептинам, в том числе метрелептину, а также выявления субъектов, имеющих такие нейтрализующие антитела.

A2

202392733

202392733

A2

СПОСОБЫ ДЕТЕКЦИИ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ К ЛЕПТИНУ

ОПИСАНИЕ

Ссылка на связанные заявки

[0001] Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет перед предварительной заявкой с серийным номером 62/393632, поданной 12 марта 2016 года, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

[0002] Настоящее раскрытие относится к способам детекции нейтрализующих антител к лептину и наборам, которые могут быть использованы для осуществления таких способов. Такие способы и наборы могут быть использованы для детекции нейтрализующих антител к лептину в образце или для выявления субъектов, имеющих нейтрализующие антитела к лептину в крови, сыворотке крови или плазме крови.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

[0003] Метрелептин представляет собой аналог лептина, показанный в качестве вспомогательного средства к диете или в качестве заместительной терапии для лечения осложнений вследствие лептиновой недостаточности у субъектов с врожденной или приобретенной генерализованной липодистрофией. Врожденная генерализованная липодистрофия представляет собой редкое патологическое состояние, характеризующееся почти полным отсутствием жировой ткани в организме и очень мускулистым внешним видом. Жировая ткань присутствует во многих частях тела, в том числе под кожей, и окружает внутренние органы. Она запасает жир в качестве источника энергии и также выполняет функцию амортизации и изоляции тела. Недостаток жировой ткани приводит к запасу жира в других частях тела, таких как печень и мышцы, что приводит к серьезным проблемам со здоровьем. Приобретенная генерализованная липодистрофия представляет собой редкой патологическое состояние, которое возникает в детстве или юности, характеризующееся потерей жировой ткани, затрагивающей значительную площадь тела, в частности, лица, верхних конечностей и нижних конечностей.

[0004] Помимо этого, метрелептин изучают в качестве лекарственного средства для лечения других показаний, в том числе частичной липодистрофии, гипоталамической аменореи, неалкогольного стеатогепатоза и других различных гиполептинемических дисметаболических расстройств.

[0005] Метрелептин, как правило, вводят с помощью ежедневной подкожной инъекции. В связи с таким повторным введением существует риск того, что у субъектов будут образовываться антитела к метрелептину. Эти антитела могут нейтрализовать метрелептин, делая лечение неэффективным. Более того, они могут нейтрализовать эндогенный лептин, усугубляя заболевание субъектов, которые уже страдают от лептиновой недостаточности. По этой причине в данной области техники существует потребность в способе надежной детекции нейтрализующих антител у субъектов.

Краткое описание настоящего изобретения

[0006] Настоящее изобретение относится к детекции нейтрализующих антител к лептину.

[0007] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу детекции нейтрализующих антител к лептину в образце, предусматривающему: (a) инактивацию лептина в образце; (b) добавление известного количества меченого лептина к образцу; (c) приведение в контакт образца, содержащего меченый лептин из (b) с субстратом, способным связывать меченый лептин; (d) промывание субстрата с удалением несвязанного меченого лептина; и (e) измерение сигнала метки, образуемого связанным с субстратом меченым лептином.

[0008] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу выявления субъекта, имеющего нейтрализующие антитела к лептину в крови, сыворотке крови или плазме крови от субъекта, предусматривающему (a) инактивацию лептина, присутствующего в образце крови, сыворотке крови или плазме крови субъекта; (b) добавление известного количества меченого лептина к образцу; (c) приведение в контакт меченого лептина из (b) с субстратом, способным связывать меченый лептин; (d) промывание субстрата с удалением несвязанного меченого лептина; (e) измерение сигнала метки, образуемого связанным меченым лептином; (f) измерение положительного контрольного сигнала, при этом

положительный контрольный сигнал образуется в результате завершения этапов (a) - (e), и дополнительно предусматривающему добавление известного количества антитела к лептину на этапе (b); и (g) сравнение сигнала из (e) с сигналом из (f), при этом в случае, если уровень сигнала, измеряемый на этапе (e) равен или меньше, чем уровень сигнала, измеряемого на этапе (f), то субъект считается положительным в отношении нейтрализующих антител к лептину.

[0009] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу выявления субъектов, имеющих нейтрализующие антитела к лептину в крови, сыворотке крови или плазме крови от субъекта, предусматривающему: (a) инактивацию лептина, присутствующего в крови, сыворотке крови или плазме крови субъекта; (b) добавление известного количества меченого лептина к образцу; (c) приведение в контакт образца, содержащего меченый лептин из (b) с субстратом, способным связывать мечены лептин; (d) промывание субстрата с удалением несвязанного меченого лептина; (e) измерение сигнала метки, образуемого связанным меченым лептином; (f) измерение отрицательного контрольного сигнала, при этом указанный отрицательный контрольный сигнал образуется в результате завершения этапов (a) - (e), при этом образец крови, сыворотки крови или плазмы крови не содержит нейтрализующие антитела к лептину; и (g) сравнение процентной разницы сигнала из (e) и сигнала из (f) с границей разделения, при этом в случае, если процентная разница сигнала из (e) и сигнала из (f) больше, чем граница разделения, то субъект считается положительным в отношении нейтрализующих антител к лептину. В некоторых вариантах осуществления граница разделения находится между приблизительно 5% и приблизительно 40%, или между приблизительно 5% и приблизительно 30%, или между приблизительно 5% и 15%.

[0010] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу, который включает определение у субъекта изменения в присутствии нейтрализующих антител к лептину в крови, сыворотке крови или плазме крови от субъекта с течением времени. В некоторых вариантах осуществления этот способ может быть использован у субъекта, получающего лечение лептином, в котором присутствие нейтрализующих антител в крови, сыворотке крови или плазме крови субъекта может быть определено перед лечением лептином (предварительное лечение) и затем во время или после лечения лептином. Данный способ предусматривает: (1a) инактивацию лептина, присутствующего в первом образце

крови, сыворотки крови или плазмы субъекта; (1b) добавление известного количества меченого лептина к первому образцу; (1c) приведение в контакт первого образца, содержащего меченый лептин из (1b) с субстратом, способным связываться с меченым лептином; (1d) промывание субстрата с удалением несвязанного меченого лептина; (1e) измерение сигнала метки, образуемого связанным меченым лептином; (2a) инактивацию лептина, присутствующего во втором образце крови, сыворотки крови или плазмы крови субъекта; (2b) добавление известного количества меченого лептина ко второму образцу; (2c) приведение в контакт второго образца, содержащего меченый лептин из (2b) с субстратом, способным связывать меченый лептин; (2d) промывание субстрата с удалением несвязанного меченого лептина; (2e) измерение сигнала метки, образуемого связанным меченым лептином; (3) сравнение сигнала метки из (2e) с сигналом метки из (1e). В некоторых вариантах осуществления в результате сравнения может определяться процентная разница между сигналом метки из (2e) и сигналом метки из (1e). В определенных вариантах осуществления процентную разницу можно сравнивать с границей разделения. Граница разделения может находиться между приблизительно 55% и приблизительно 95%, или между приблизительно 60% и приблизительно 90%, например, составлять приблизительно 65%, или приблизительно 85%, или приблизительно 80%.

[0011] В определенных вариантах осуществления лептин можно метить пероксидазой хрена или рутения трис-бипиридином.

[0012] В некоторых вариантах осуществления инактивация лептина может осуществляться в результате нагревания образца.

[0013] В определенных вариантах осуществления субстрат, способный связывать меченый лептин, может содержать (i) покрытую матрицу и (ii) меченый лептиновый рецептор, связанный с матрицей из (i). Покрытая матрица может представлять собой покрытую стрептавидином матрицу. Лептиновый рецептор можно метить биотином.

[0014] В некоторых вариантах осуществления субстрат, способный связывать меченый лептин, может представлять собой (i) покрытую матрицу, (ii) антитело, связанное с матрицей из (i), и (iii) меченый лептиновый рецептор, связанный с антителом из (ii). Покрытая матрица может представлять собой матрицу, покрытую стрептавидином. Лептиновый рецептор можно метить меткой, подходящей для аффинной очистки; например,

лептиновый рецептор можно метить с помощью гексагистидиновой метки. Антитело может иметь подходящую аффинность к метке лептинового рецептора; например, антитело может представлять собой антитело к гексагистидину. Помимо этого антитело можно метить меткой, подходящей для того, чтобы связываться с покрытой матрицей, такой как биотин.

[0015] Способы по настоящему изобретению могут дополнительно предусматривать этап снижения значения рН инактивированного образца (а) в результате добавления кислого раствора, и при этом меченый лептин, добавленный в (b), дополнительно содержит основной раствор, достаточный для нейтрализации значения рН образца после добавления. Кислый раствор может представлять собой раствор уксусной кислоты, такой как 0,8% раствор уксусной кислоты. Основной раствор может представлять собой буфер, такой как 0,125 М Там-буфер.

[0016] В некоторых вариантах осуществления меченый лептин, добавленный на этапе (b), может представлять собой рекомбинантный человеческий лептин. В определенных вариантах осуществления меченый лептин, добавленный на этапе (b), может представлять собой метрелептин.

[0017] В некоторых вариантах осуществления детектируемый сигнал образуется на этапе (e) в случае, если концентрация меченого лептина, такого как метрелептин, в образце на этапе (b) составляет от приблизительно 90 нг/мл до приблизительно 120 нг/мл, или от приблизительно 100 нг/мл до приблизительно 110 нг/мл, например, приблизительно 101 нг/мл или приблизительно 109 нг/мл.

[0018] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу определения восприимчивости субъекта, имеющего связанное с лептином нарушение, к лечению лептином, предусматривающему определение количества нейтрализующих антител к лептину у субъекта, при этом количество антител указывает на невосприимчивость субъекта к терапии лептином. Способы могут предусматривать этап, перечисленный выше. Связанное с лептином нарушение может представлять собой врожденную генерализованную липодистрофию, приобретенную генерализованную липодистрофию, частичную липодистрофию, гипоталамическую аменорею, неалкогольный стеатогепатоз и гиполептинемическое дисметаболическое расстройство.

[0019] В другом аспекте настоящее изобретение относится к набору, который может быть использован для детекции нейтрализующих антител к лептину в образце. Набор может содержать (a) меченый лептин и (b) субстрат, способный связывать меченый лептин.

[0020] В определенных вариантах осуществления лептин в наборе можно метить пероксидазой хрена или рутения трис-бипиридином.

[0021] В некоторых вариантах осуществления субстрат в наборе может содержать (i) покрытую матрицу и (ii) меченый лептиновый рецептор, связанный с матрицей из (i). Покрытая матрица может представлять собой матрицу, покрытую стрептавидином. Лептиновый рецептор можно метить биотином. Покрытая матрица и меченый лептиновый рецептор могут находиться совместно в виде одного компонента в наборе или могут представлять собой отдельные компоненты.

[0022] В некоторых вариантах осуществления субстрат в наборе может представлять собой (i) покрытую матрицу, (ii) антитело, связанное с матрицей из (i), и (iii) меченый лептиновый рецептор, связанный с антителом из (ii). Покрытая матрица может представлять собой матрицу, покрытую стрептавидином. Лептиновый рецептор можно метить с помощью метки, подходящей для аффинной очистки; например, лептиновый рецептор можно метить с помощью гексагистидиновой метки. Антитело может иметь подходящую аффинность к метке лептинового рецептора; например, антитело может представлять собой антитело к гексагистидину. Помимо этого антитело можно метить меткой, подходящей для того, чтобы связываться с покрытой матрицей, такой как биотин. Покрытая матрица, антитело и меченый лептиновый рецептор могут находиться совместно в виде одного компонента в наборе или в виде отдельных компонентов.

[0023] В определенных вариантах осуществления набор дополнительно может содержать положительный контроль и/или отрицательный контроль.

[0024] В некоторых вариантах осуществления набор может дополнительно содержать подкисляющий реагент; например, уксусную кислоту.

[0025] В определенных вариантах осуществления набор может дополнительно содержать основной раствор; например, буфер, такой как Там-буфер.

Краткое описание чертежей

[0026] Настоящее раскрытие будет дополнительно объяснено с отсылкой на прилагаемые чертежи. Представленные чертежи не обязательно требуют масштабирования, при этом основная идея, как правило, акцентируется на иллюстрации принципов настоящего раскрытия, а некоторые характеристики могут быть преувеличены для того, чтобы продемонстрировать детали определенных компонентов. Помимо этого, любые измерения, описания и т.п., представленные в чертежах или описанные ниже, предполагают иллюстративный, а не ограничивающий характер. Таким образом, конкретные структурные и функциональные детали, раскрываемые в настоящем документе, не должны восприниматься как ограничивающие, а просто иметь иллюстративную основу для объяснения специалисту в данной области техники как использовать способы и наборы, описываемые в настоящем документе.

[0027] На Фиг. 1А-1В представлен иллюстративный анализ связывания с рецептором в случае лептина и метрелептина, который включает в себя субстрат, способный связывать меченый лептин, содержащий (i) покрытую матрицу и (ii) меченый лептиновый рецептор, связанный с матрицей (i), в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения. На Фиг. 1А представлены различные компоненты, используемые в анализе, и на Фиг. 1В представлено применение анализа.

[0028] На Фиг. 2 представлен иллюстративный лист данных для представления результатов анализа связывания с рецептором в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения.

[0029] На Фиг. 3А-3В представлен иллюстративный анализ связывания с рецептором в случае лептина и метрелептина, который включает в себя субстрат, способный связывать меченый лептин, содержащий (i) покрытую матрицу, (ii) меченое антитело, связанное с матрицей из (i), и (iii) меченый лептиновый рецептор, связанный с антителом из (ii), в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения. На Фиг. 3А представлены различные компоненты, используемые в анализе, и на Фиг. 3В представлено применение анализа.

[0030] На Фиг. 4 представлен иллюстративный анализ связывания с рецептором в случае метрелептина, который включает положительные и отрицательные контроли, в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения.

[0031] На Фиг. 5 представлен этап кислотной диссоциации для применения в иллюстративном анализе связывания с рецептором в случае метрелептина, в соответствии с настоящим изобретением.

[0032] На Фиг. 6 представлена таблица, которая представляет сигнал, % ингибирования, а также категорийные данные, собранные в результате анализа образцов от 17 субъектов, некоторые из которых были здоровыми и некоторых из которых были больными и ранее получали лечение лептином.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Способы детекции нейтрализующих антител к лептину

[0033] В настоящем документе описаны способы детекции нейтрализующих антител к лептину в образце. Иллюстративные способы предусматривают этапы (a) инактивации лептина в образце; (b) добавления известного количества меченого лептина к образцу; (c) приведения в контакт образца, содержащего меченый лептин из (b) с субстратом, способным связывать меченый лептин; (d) промывания субстрата с удалением несвязанного меченого лептина; и (e) измерения сигнала метки, образуемого связанным с субстратом меченым лептином.

[0034] Термин «способ» и «анализ» используются в настоящем документе взаимозаменяемо.

[0035] Предполагается, что способы, предусмотренные в настоящем документе, могут быть использованы для детекции нейтрализующих антител к лептину любого вида, в том числе встречающимся в природе человеческим, мышинным, крысиным лептинам и лептинам других гетерологичных видов, а рекомбинантно продуцируемого зрелого лептина. Например, лептин представляет собой полипептидный продукт, например, гена ob, описанного в международной публикации № WO 96/05309 и патенте США № 6309853, каждое из которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Способы настоящего изобретения могут также быть использованы для детекции

нейтрализующих антител к биологически активным фрагментам, агонистам, аналогам агонистов, вариантам, слитым белкам лептина, химерному лептину и другим их производным, таким как таковые, раскрытые в патенте США № 5521283, патенте США № 5532336, патенте США № 5552522, патенте США № 5552523, патенте США № 5552524, патенте США № 5554727, патенте США № 5559208, патенте США № 5580954, патенте США № 5594101, патенте США № 5691309, патенте США № 5756461, патенте США № 5851995, патенте США № 5935810, патенте США № 6001968, патенте США № 6309853, патенте США № 6309853, патенте США № 6350730, патенте США № 6420339, патенте США № 6429290, патенте США № 6541033, патенте США № 6936439, патенте США № 7112659, патенте США № 7183254, патенте США № 7208577, патенте США № 8080254, патенте США № 8394765, публикации США № 2016/0083446, публикации согласно PCT № WO 00/09165, публикации согласно PCT № WO 00/20872, публикации согласно PCT № WO 00/21574, публикации согласно PCT № WO 00/47741, публикации согласно PCT № WO 04/39832, публикации согласно PCT № WO 09/64298, публикации согласно PCT № WO 96/05309, публикации согласно PCT № WO 96/22308, публикации согласно PCT № WO 96/23517, публикации согласно PCT № WO 96/40912, публикации согласно PCT № WO 97/02004, публикации согласно PCT № WO 97/06816, публикации согласно PCT № WO 97/18833, публикации согласно PCT № WO 97/38014, публикации согласно PCT № WO 98/08512, публикации согласно PCT № WO 98/12224, публикации согласно PCT № WO 98/28427, публикации согласно PCT № WO 98/46257, публикации согласно PCT № WO 98/55139, публикации согласно PCT № WO 2012/050925, публикации согласно PCT № WO 2012/050930 и публикации согласно PCT № WO 2013/009539; все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте и для всех целей. В определенных вариантах осуществления способы настоящего изобретения могут быть использованы для детекции нейтрализующих антител к метрелептину.

[0036] Предполагаемые способы инактивации лептина включают в себя инактивацию нагреванием, а также обработку химическими ингибиторами лептина, в том числе химическими ядами лептина, при условии, что ингибиторы или яды могут быть инактивированы перед добавлением меченого лептина.

[0037] Предполагается, что меченый лептин может представлять собой любую форму лептина, аналог лептина, химеру лептина или слитый белок или его производное, в том числе

таковые соединения, перечисленные выше. Предполагается, что меченый лептин можно метить любой меткой, способной приводить к образованию удобным образом количественно определяемого сигнала. Метки могут представлять собой флуоресцентные метки, в том числе флуоресцентные метки с временным разрешением. Примеры могут включать в себя пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и рутения трис-бипиридин, среди других меток, известных в данной области техники. Специалисту в данной области техники будет понятно, что способ детекции сигнала метки, образуемого связанным с субстратом меченым лептином, будет зависеть от природы метки.

[0038] Предполагается, что субстрат, используемый для приведения в контакт с содержащим образец меченым лептином, может содержать (i) покрытую матрицу; и (ii) меченый лептиновый рецептор, связанный с матрицей. В некоторых вариантах осуществления покрытая матрица представляет собой покрытую стрептавидином матрицу. В определенных вариантах осуществления лептиновый рецептор метят биотином. Например, лептиновый рецептор может быть связан с матрицей с помощью биотина. Подразумевается, что покрытая матрица может быть связана с более чем одним меченым лептиновым рецептором. В определенных вариантах осуществления аналог лептинового рецептора может быть связан с матрицей.

[0039] В альтернативном случае предполагается, что субстрат может содержать: (i) покрытую матрицу; (ii) антитело, связанное с матрицей; и (iii) меченый лептиновый рецептор, связанный с антителом. В некоторых вариантах осуществления покрытая матрица представляет собой покрытую стрептавидином матрицу. В определенных вариантах осуществления лептиновый рецептор можно метить любой меткой, подходящей для аффинной очистки. Например, метка может представлять собой гексагистидиновую метку. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое может называться «иммобилизованное антитело к лептиновому рецептору», представляет собой любое антитело с подходящей аффинностью к метке лептинового рецептора. Например, иммобилизованное антитело к лептиновому рецептору может представлять собой антитело к гексагистидину, в случае, если лептиновый рецептор имеет гексагистидиновую метку. Иммобилизованное антитело к лептиновому рецептору можно также метить меткой, подходящей для связывания с матрицей, например, биотином. В определенных вариантах осуществления аналог лептинового рецептора может быть связан с матрицей.

[0040] Матрица, используемая в настоящем документе, может представлять собой твердую подложку, с которым связан меченый лептиновый рецептор или антитело. Матрица может быть подходящей для измерения сигнала, образуемого меченым лептином. Примеры матрицы включают в себя без ограничения лунки планшета, такого как микротитровальный планшет, и гранулы. В определенных вариантах осуществления матрица может представлять собой многолуночный планшет Meso Scale Discovery (MSD).

[0041] В определенных вариантах осуществления образец, используемый в способах настоящего изобретения для детекции нейтрализующих антител к лептину, может быть выбран из крови, сыворотки крови или плазмы крови субъекта. Субъект может представлять собой млекопитающее, такое как человек.

[0042] В одном аспекте настоящего изобретения способы, предполагаемые в настоящем документе, могут быть использованы для выявления субъектов, имеющих нейтрализующие антитела, например, в крови, сыворотке крови или плазме крови. Предполагается, что индивидуумы, имеющие нейтрализующие антитела к лептину или аналогу лептина, могут быть выявлены. Индивидуумы, которые являются положительными в отношении нейтрализующих антител, могут быть выявлены в результате сравнения сигнала, образуемого меченым лептином, с положительными и/или отрицательными контрольными данными. В случае, если контроль представляет собой положительный контроль, предполагается, что в случае, если сигнал меньше или равен положительному контрольному сигналу, то образец может рассматриваться в качестве положительного в отношении нейтрализующих антител. В случае, если контроль представляет собой отрицательный контроль, то будет рассчитана процентная разница между сигналом образца и контрольным сигналом, процентную разницу будут сравнивать с границей разделения и в случае, если она больше, чем граница разделения, то субъекту ставят диагноз наличия нейтрализующих антител к исследуемому лептину.

[0043] Варианты осуществления способа, включающего отрицательный контроль, показаны на Фиг. 1А-1В и 3А-3В. На этих фигурах показано, как может возникать связывание между меченым лептином/метрелептином и лептиновым рецепторами, и/или между нейтрализующими антителами к лептину/к метрелептину и лептиновыми рецепторами, с образованием процентной разницы сигнала, которая меньше, чем граница разделения, или равна или больше, чем граница разделения.

[0044] Граница разделения может находиться между приблизительно 5% и приблизительно 40%, или между приблизительно 10% и приблизительно 30%, или составлять приблизительно 20%. Например, граница разделения может составлять приблизительно 5%, или приблизительно 6%, или приблизительно 7%, или приблизительно 8%, или приблизительно 9%, или приблизительно 10%, или приблизительно 11%, или приблизительно 12%, или приблизительно 13%, или приблизительно 14%, или приблизительно 15%, или приблизительно 16%, или приблизительно 17%, или приблизительно 18%, или приблизительно 19%, или приблизительно 20%, или приблизительно 21%, или приблизительно 22%, или приблизительно 23%, или приблизительно 24%, или приблизительно 25%, или приблизительно 26%, или приблизительно 27%, или приблизительно 28%, или приблизительно 29%, или приблизительно 30%, или приблизительно 31%, или приблизительно 32%, или приблизительно 33%, или приблизительно 34%, или приблизительно 35%, или приблизительно 36%, или приблизительно 37%, или приблизительно 38%, или приблизительно 39% или приблизительно 40%.

[0045] В определенных вариантах осуществления граница разделения может отличаться в случае, если субъект имеет нормальный уровень лептина, или в случае, если субъект имеет лептиновую недостаточность. В определенных вариантах осуществления субъект имеет лептиновую недостаточность, в случае, если он/она имеет концентрацию в сыворотке, которая составляет приблизительно 16 нг/мл или ниже для женщины и приблизительно 7 нг/мл или ниже для мужчины; концентрацию в сыворотке, которая составляет приблизительно 8 нг/мл или ниже для женщины и приблизительно 5 нг/мл или ниже для мужчины; или приблизительно 5 нг/мл или ниже для женщины и приблизительно 3 нг/мл или ниже для мужчины. В противном случае субъект имеет лептиновую недостаточность в случае, если он/она имеет концентрацию в сыворотке в пределах 15-го перцентиля, или 10-го перцентиля, или 8-го перцентиля, или второго перцентиля, или первого перцентиля в соответствии с NHANES III. В альтернативном случае субъект имеет лептиновую недостаточность в случае, если он/она имеет концентрацию в сыворотке, которая находится в пределах определенного перцентиля, скорректированного на ВМІ, пол и/или другие факторы, такие как концентрация в сыворотке в пределах 10-го перцентиля, или 5-го

процентиля, или 3-го процентиля, или 2-го процентиля в соответствии с NHANES III, скорректированного на BMI.

[0046] В определенных вариантах осуществления, в случае, если субъект не имеет лептиновой недостаточности, граница разделения будет находиться между приблизительно 5% и приблизительно 40%, или между приблизительно 5% и приблизительно 30%, или в некоторых вариантах осуществления между приблизительно 5% и приблизительно 15%, например, составлять приблизительно 10,2% в случае, если выявляются нейтрализующие антитела к лептину (например, если субъект получал лечение лептином), или составлять приблизительно 7,89% в случае, если выявляются нейтрализующие антитела к метрелептину (например, если субъект получал лечение метрелептином). В определенных вариантах осуществления, в случае, если субъект имеет лептиновую недостаточность, граница разделения будет находиться между приблизительно 5% и приблизительно 40%, или между приблизительно 5% и приблизительно 30%, или в некоторых вариантах осуществления между приблизительно 5% и приблизительно 15%, например, составлять приблизительно 10,2% в случае, если выявляются нейтрализующие антитела к лептину (например, если субъект получал лечение лептином), или составлять приблизительно 9,66% в случае, если выявляются нейтрализующие антитела к метрелептину (например, если субъект получал лечение метрелептином).

[0047] На Фиг. 2 представлен иллюстративный лист данных для применения в соответствии со способами настоящего изобретения.

[0048] В одном аспекте способы, предполагаемые в настоящем документе, могут быть использованы для определения у субъекта изменения в присутствии нейтрализующих антител к лептину в крови, сыворотке крови или плазме крови от субъекта с течением времени. Например, способы могут быть использованы у субъекта, получающего лечение лептином, в целях определения изменения в наличии нейтрализующих антител в крови, сыворотке крови или плазме крови субъекта, перед лечением лептином и затем во время или после лечения лептином. Примеры видов лечения лептином известны в данной области техники. Способ может предусматривать: (1a) инактивацию лептина, присутствующего в первом образце крови, сыворотки крови или плазмы субъекта; (1b) добавление известного количества меченого лептина к первому образцу; (1c) приведение в контакт первого образца, содержащего меченый лептин из (1b) с субстратом, способным связываться с меченым

лептином; (1d) промывание субстрата с удалением несвязанного меченого лептина; (1e) измерение сигнала метки, образуемого связанным меченым лептином; (2a) инактивацию лептина, присутствующего во втором образце крови, сыворотки крови или плазмы крови субъекта; (2b) добавление известного количества меченого лептина ко второму образцу; (2c) приведение в контакт второго образца, содержащего меченый лептин из (2b) с субстратом, способным связывать меченый лептин; (2d) промывание субстрата с удалением несвязанного меченого лептина; (2e) измерение сигнала метки, образуемого связанным меченым лептином; (3) сравнение сигнала метки из (2e) с сигналом метки из (1e). В некоторых вариантах осуществления в результате сравнения может определяться процентная разница между сигналом метки из (2e) и сигналом метки из (1e). В определенных вариантах осуществления процентную разницу можно сравнивать с границей разделения. Граница разделения может находиться между приблизительно 55% и приблизительно 95%, или между приблизительно 60% и приблизительно 90%. Примеры могут включать в себя приблизительно 60%, или приблизительно 61%, или приблизительно 62%, или приблизительно 63%, или приблизительно 64%, или приблизительно 65%, или приблизительно 66%, или приблизительно 67%, или приблизительно 68%, или приблизительно 69%, или приблизительно 70%, или приблизительно 71%, или приблизительно 72%, или приблизительно 73%, или приблизительно 74%, или приблизительно 75%, или приблизительно 76%, или приблизительно 77%, или приблизительно 78%, или приблизительно 79%, или приблизительно 80%, или приблизительно 81%, или приблизительно 82%, или приблизительно 83%, или приблизительно 84%, или приблизительно 85%, или приблизительно 86%, или приблизительно 87%, или приблизительно 88%, или приблизительно 89% или приблизительно 90%. В определенных вариантах осуществления граница разделения может быть использована для определения того, необходимо ли субъекту продолжать лечение или будет ли субъект восприимчив к лечению. Например, в случае, если процентная разница равна или меньше границы разделения, то можно определить, что субъект должен прекратить лечение или что субъект будет невосприимчив к лечению.

[0049] Предполагаемые способы могут дополнительно предусматривать этап диссоциации, в целях диссоциации любых нейтрализующих антител в образце из любого лептина, который может присутствовать в образце. Указанный этап диссоциации может

осуществляться в результате снижения значения рН образца после нейтрализации лептина. Подходящие реагенты для подкисления образца будут полностью очевидны специалисту в данной области техники, например, может быть использована уксусная кислота, например, раствор с содержанием от приблизительно 0,5% до приблизительно 1% уксусной кислоты, или приблизительно 0,8% раствор уксусной кислоты. Другие подходящие реагенты, которые могут быть использованы для подкисления образца, известны специалисту в данной области техники. После подкисления образца, который диссоциирует любые нейтрализующие антитела из лептинов, которые могут присутствовать в образце, меченый лептин может быть добавлен совместно с основным раствором, достаточным для нейтрализации значения рН образца. Предполагается, что раствор, содержащий меченый лептин, может представлять собой буфер, такой, чтобы при добавлении его к образцу, значение рН образца повышалось до примерно 7, например, 7,4, обеспечивая связывание любых нейтрализующих антител, присутствующих в образце, с меченым лептином. Подходящие буферы включают в себя Там-буфер от приблизительно 0,1 М до приблизительно 0,15 М, или от приблизительно 0,12 М до приблизительно 0,14 М, или приблизительно 0,124 М или 0,125 М. Другие подходящие буферы, которые могут возвращать значение рН образца к состоянию около нейтральности, известны специалисту в данной области техники.

[0050] Сигналы, образуемые метками, могут быть измерены с помощью способов, известных в данной области техники. Например, подходящие устройства, которые могут измерять сигналы, известны специалисту в данной области техники.

[0051] Предполагается, что определение того, имеет или не имеет субъект нейтрализующие антитела к лептину, может быть использовано для прогноза того, будет ли субъект восприимчив к лечению лептином, например, предполагается, что субъект с высокими уровнями нейтрализующих антител будет невосприимчив к лечению лептином.

Наборы

[0052] В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен набор, содержащий компоненты для осуществления способов настоящего изобретения. Такой набор может содержать меченый лептин и субстрат, способный связывать меченый лептин, как описано выше, для применения в способах настоящего изобретения. Например, в некоторых

вариантах осуществления лептин можно метить пероксидазой хрена, щелочной фосфатазой или рутения трис-бипиридином. В определенных вариантах осуществления лептин представляет собой метрелептин.

[0053] В определенных вариантах осуществления субстрат может представлять собой покрытую матрицу, как описано выше, такую как покрытую стрептавидином матрицу, и меченый лептиновый рецептор. Лептиновый рецептор можно метить биотином. В некоторых вариантах осуществления покрытая матрица и меченый лептиновый рецептор могут храниться в наборе по отдельности. В других вариантах осуществления меченый лептиновый рецептор может быть связан с матрицей.

[0054] В некоторых вариантах осуществления субстрат может представлять собой покрытую матрицу, такую как покрытую стрептавидином матрицу; антитело; и меченый лептиновый рецептор. Лептиновый рецептор можно метить любой меткой, подходящей для аффинной очистки, такой как гексагистидиновой меткой. В некоторых вариантах осуществления антитело, т.е., иммобилизованное антитело к лептиновому рецептору, представляет собой любое антитело с подходящей аффинностью к метке лептинового рецептора. Например, иммобилизованное антитело к лептиновому рецептору может представлять собой антитело к гексагистидину, в случае, если лептиновый рецептор имеет гексагистидиновую метку. Иммобилизованное антитело к лептиновому рецептору можно также метить меткой, подходящей для связывания с матрицей, такой как, биотином. В некоторых вариантах осуществления антитело может быть связано с матрицей, и/или меченый лептиновый рецептор может быть связан с антителом. В других вариантах осуществления покрытая матрица и меченый лептиновый рецептор находятся в наборе по отдельности.

[0055] В определенных вариантах осуществления набор дополнительно содержит положительный контроль, такой как антитело к лептину или антитело к метрелептину.

[0056] В определенных вариантах осуществления набор дополнительно содержит отрицательный контроль.

[0057] В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит один или несколько подкисляющих реагентов. Например, подкисляющий реагент может

представлять собой уксусную кислоту, такую как раствор от приблизительно 0,5% до приблизительно 1% уксусной кислоты, или приблизительно 8% раствор уксусной кислоты.

[0058] В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит основной раствор, такой как буфер. Соответствующие буферы включают в себя Там-буфер от приблизительно 0,1 М до приблизительно 0,15 М, или от приблизительно 0,12 М до приблизительно 0,14 М, или приблизительно 0,124 М или 0,125 М.

[0059] В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит инструкции для работы с компонентами набора.

Примеры

[0060] Следующие примеры никоим образом не предусматривают ограничение объема настоящего изобретения, а представлены для иллюстрации аспектов раскрываемых способов. Многие другие варианты осуществления настоящего изобретения будут очевидны специалисту в данной области техники.

Пример 1

[0061] Рассматриваемые образцы можно исследовать следующим образом в целях определения уровня нейтрализующих антител, которые они содержат (см. также Фиг. 4).

1. Покрытые стрептавидином планшеты блокировали с помощью Superblock в течение 1 часа.

2. Рассматриваемые образцы инактивировали нагреванием.

3. Лептин или метрелептин, меченые рутения (Ru) сульфOMETКОЙ, добавляли к каждому образцу. Образцы положительного контроля готовили путем добавления лептина или метрелептина, меченого Ru сульфOMETКОЙ, и положительного контрольного антитела к лептину muLEP13-11.03. Образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов.

4. Планшеты со стрептавидином промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS). Меченое биотином антитело к гексагистидину, разбавленное в

PBS, добавляли к планшетам и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа.

5. Планшеты промывали PBS и разведенный меченый гептагистицином белок лептинового рецептора добавляли к планшетам и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение одного часа.

6. Планшеты промывали PBS, исследуемые и контрольные образцы (из этапа 2, приведенного выше) добавляли к планшетам и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа.

7. Планшеты промывали PBS и считывали на ридере MSD ESL.

[0062] Измеряли максимальный сигнал для лунок отрицательного контроля, содержащих лептин и метрелептин, но не нейтрализующее антитело. Процентное ингибирование рассчитывали путем вычитания разницы между максимальным сигналом и измеряемым сигналом для каждого образца и деления этого числа на максимальный сигнал. Процентное ингибирование затем сравнивали с границей разделения, как описано в Примере 3.

Пример 2

[0063] Необязательный этап кислотной диссоциации можно осуществлять в результате модификации процедуры, описанной в Примере 1, следующим образом (см. также Фиг. 5).

1. После инактивации нагреванием образцы инкубировали в 0,8% растворе уксусной кислоты при комнатной температуре в течение одного часа с диссоциацией любых связанных антител в образце.

2. Лептин или метрелептин, меченые сульфометкой, разводили в 0,124 М растворе Там-буфера, который нейтрализует уксусный образец при добавлении, способствуя связыванию антител.

[0064] Было определено, что чувствительность анализа связывания с рецептором, описанного выше, составляла 109 нг/мл в случае антител к метрелептину и 101 нг/мл в случае антител к лептину. Предел детекции в случае сопоставимого клеточного анализа с нейтрализующими антителами составлял 251 нг/мл.

Пример 3

[0065] Границы разделения рассчитывали на основе процентного ингибирования сигнала от лептина и метрелептина у больных субъектов, которые имели предшествующее лечение метрелептином, и здоровых субъектов, не получавших лечения. Граница разделения в случае ингибирования связывания с лептином у здоровых и ранее получавших лечение больных субъектов составляла 10,18% ингибирования. Граница разделения в случае ингибирования связывания с метрелептином у больных субъектов, которые ранее получали лечение, составляла 9,66% ингибирования, а у нормальных субъектов она составляла 7,89% ингибирования. Все границы разделения устанавливали таким образом, чтобы они давали 1% доли ложных распознаваний сигнала. Данные о границах разделения представлены на Фиг. 6.

Лептин		Метрелептин	
Максимальный сигнал от лептина, НК	Граница разделения	Максимальный сигнал от метрелептина, НК	Границы разделения
5911	Определенный во время валидации (10,2 как для патологического состояния, так и для нормы) 1% доли ложных распознаваний сигнала	2203,5	Определенные во время валидации (9,66 , патологическое состояние, 7,89 , норма) 1% доли ложных распознаваний сигнала

Таблица 1. Обобщение границ разделения в случае лептина и метрелептина как для нормальных, так и для больных субъектов.

Пример 4

[0066] Образцы от 17 пациентов исследовали в отношении ингибирования сигнала от лептина и метрелептина в соответствии со способами, описанными выше. Данные представлены на Фиг. 6 и в Табл. 2-4.

[0067] Два контрольных моноклональных нейтрализующих антитела к лептину использовали в концентрациях как 156 нг/мл (положительный контроль (низкая)) или 5000 нг/мл (положительный контроль (высокая)). Контрольные данные представлены на Фиг. 6 и в Табл. 3. Ингибирование обоими антителами было в значительной степени однородным, что указывало на надежность анализа.

[0068] Образцы с ингибированием более, чем граница разделения, относили к положительной категории, в то время как таковые с ингибированием ниже границы разделения относили к отрицательной категории. См. Фиг. 6 и Табл. 4.

		Лептин		Метрелептин	
		Максимальный сигнал от лептина, ОК	Граница разделения	Максимальный сигнал от метрелептина, ОК	Границы разделения
		5911	Определенный во время валидации (10,18 как для патологического состояния, так и для нормы) 1% доли ложных распознаваний сигнала	2203,5	Определенные во время валидации (9,66, патологическое состояние, 7,89, норма) 1% доли ложных распознаваний сигнала
ID образца	Источник	Сигнал	% ингибирования	Сигнал	% ингибирования
Образец 1	Предварительное лечение	5745,0	2,81	2138,0	2,97
Образец 2		5548,0	6,14	2104,5	4,49
Образец 3		5027,5	14,95	1878,5	14,75
Образец 4		2150,0	63,63	724,0	67,14
Образец 5		599,5	89,86	211,5	90,40
Образец 6		5585,5	5,51	2154,0	2,25
Образец 7		481,5	91,85	205,5	90,67
Образец 8		6085,5	-2,95	2319,0	-5,24
Образец 9	Нормальное состояние без болезни	5833,5	1,31	2261,0	-2,61
Образец 10		5530,5	6,44	2206,0	-0,11
Образец 11		5856,0	0,93	2342,0	-6,29
Образец 12		5669,5	4,09	2284,5	-3,68
Образец 13		5833,0	1,32	2304,5	-4,58
Образец 14		6382,0	-7,97	2283,5	-3,63

Образец 15		6225,0	-5,31	2249,5	-2,09
Образец 16		5715,5	3,31	2225,0	-0,98
Образец 17		5995,5	-1,43	2334,0	-5,92

Таблица 2 Данные о сигналах и процент ингибирования связывания с лептином и метрелептином, полученный из образцов от 17 пациентов.

		Лептин		Метрелептин		
		Максимальный сигнал от лептина, ОК	Граница разделения	Максимальный сигнал от метрелептина, ОК	Границы разделения	
		5911	Определенный во время валидации (10,18 как для патологического состояния, так и для нормы) 1% доли ложных распознаваний сигнала	2203,5	Определенные во время валидации (9,66, патологическое состояние, 7,89, норма) 1% доли ложных распознаваний сигнала	
ID образца	Источник = моноклональные антитела		Сигнал	% ингибирования	Сигнал	% ингибирования
	156 нг/мл					
Положительный контроль (низкая)	1		1804,0	30,52	622,0	28,23
	2		1847,2	31,25	639,7	29,03
Положительный контроль (высокая)	1		5770,3	97,62	2177,9	98,84
	2		5755,5	97,37	2177,3	98,81

Таблица 3 Данные о сигналах и процент ингибирования связывания с лептином и метрелептином высокими и низкими дозами моноклональных нейтрализующих антител к лептину положительного контроля.

ID образца	Источник	Лептин Метрелептин		Результаты Лептин		Результаты Метрелептин		
		Максимальный сигнал от лептина, ОК	Максимальный сигнал от метрелептина, ОК	Категория	% ингибирования	Категория	% ингибирования	
		5911	2203,5					
		Сигнал	Сигнал					
1	Предварительное лечение	5745,0	2138,0	Отрицательная	-	Отрицательная	-	
2		5548,0	2104,5	Отрицательная	-	Отрицательная	-	
3		5027,5	1878,5	Положительная	15,0	Положительная	14,8	
4		2150,0	724,0	Положительная	63,6	Положительная	67,1	
5		599,5	211,5	Положительная	89,9	Положительная	90,4	
6		5585,5	2154,0	Отрицательная	-	Отрицательная	-	
7		481,5	205,5	Положительная	91,9	Положительная	90,7	
8		6085,5	2319,0	Отрицательная	-	Отрицательная	-	
9	Нормальное состояние без болезни	5833,5	2261,0	Отрицательная	-	Отрицательная	-	
10		5530,5	2206,0	Отрицательная	-	Отрицательная	-	
11		5856,0	2342,0	Отрицательная	-	Отрицательная	-	
12		5669,5	2284,5	Отрицательная	-	Отрицательная	-	
13		5833,0	2304,5	Отрицательная	-	Отрицательная	-	
14		6382,0	2283,5	Отрицательная	-	Отрицательная	-	
15		6225,0	2249,5	Отрицательная	-	Отрицательная	-	
16		5715,5	2225,0	Отрицательная	-	Отрицательная	-	
17		5995,5	2334,0	Отрицательная	-	Отрицательная	-	
Положит	156	1	1804,0	622,0		30,5		28,2

ельный контроль (низкая)	нг/мл				Положительная		Положительная	
		2	1847,2	639,7	Положительная	31,3	Положительная	29,0
Положительный контроль (высокая)	5000 нг/мл	1	5770,3	2177,9	Положительная	97,6	Положительная	98,8
		2	5755,5	2177,3	Положительная	97,4	Положительная	98,8

Таблица 4 Данные о сигналах и процент ингибирования связывания с лептином и метрелептином, а также диагностированная категория (положительная или отрицательная в случае нейтрализующих антител к лептину) для образцов от 17 пациентов.

Включение в описание изобретения сведений путем ссылки

[0069] Во всем настоящем раскрытии были сделаны ссылки и цитаты на другие документы, такие как патенты, патентные заявки, патентные публикации, журналы, книги, периодические издания, исследования, веб-контенты. Все такие документы включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

Эквиваленты

[0070] Различные модификации настоящего изобретения и многие дополнительные его варианты осуществления, помимо таковых, представленных и описанных в настоящем документе, будут очевидны специалистам в данной области из полного содержания этого документа, в том числе ссылок на научную и патентную литературу, цитируемую в настоящем документе. Рассматриваемый материал содержит важную информацию, иллюстрацию и руководство, которые могут быть адаптированы для осуществления на практике настоящего изобретения в его различных вариантах осуществления и их эквивалентах.

[0071] Вышеизложенное описание представлено для четкости понимания и исходя из него не следует понимать никаких излишних ограничений, поскольку модификации в пределах объема настоящего изобретения могут быть очевидными специалистам в данной области техники.

[0072] Во всем настоящем описании и последующей формуле изобретения, если контекст не требует иного, выражение «содержать» и его варианты, такие как «содержит» и «содержащий» следует понимать как включение указанного целого числа или этапа или группы целых чисел или этапов, но не исключения любого другого целого числа или этапа или группы целых чисел или этапов.

[0073] Во всем настоящем описании, если композиции описаны как содержащие компоненты или вещества, предполагается, что композиции могут также состоять по сути из или состоять из любой комбинации упоминаемых компонентов или веществ, если не описано иное. Аналогичным образом, в случае, если способы описаны как включающие определенные этапы, предполагается, что способы также состоят по сути из или состоят из любой комбинации упоминаемых этапов, если не описано иное. Настоящее изобретение, иллюстративным образом раскрытое в настоящем документе, подходящим образом можно применять на практике в отсутствие любого элемента или этапа, который специально не раскрыт в настоящем документе.

[0074] Практическое применение способа, раскрытого в настоящем документе, и его отдельных этапов, может осуществляться вручную и/или с помощью автоматизации, обеспечиваемой электронным оборудованием. Несмотря на то, что способы были описаны с ссылкой на определенные варианты осуществления, специалист в данной области техники легко поймет, что могут быть использованы другие пути осуществления действий, связанных со способами. Например, порядок различных этапов может быть изменен без отклонения от объема или идеи способа, если не описано иное. Помимо этого, некоторые из отдельных этапов, можно комбинировать, не предусматривать или дополнительно подразделять на дополнительные этапы.

[0075] В частных аспектах настоящее изобретение может относиться к следующим вариантам:

Вариант 1. Способ детекции нейтрализующих антител к лептину в образце, предусматривающий этапы:

- (a) инактивации лептина, присутствующего в образце;
- (b) добавления известного количества меченого лептина к образцу;

- (c) приведение в контакт образца, содержащего меченый лептин из (b) с субстратом, способным связывать меченый лептин;
- (d) промывания субстрата с удалением несвязанного меченого лептина; и
- (e) измерения сигнала метки, образуемого связанным с субстратом меченым лептином.

Вариант 2. Способ выявления субъектов, имеющих нейтрализующие антитела к лептину в крови, сыворотке крови или плазме крови от субъекта, предусматривающий этапы:

- (a) инактивации лептина, присутствующего в образце крови, сыворотки крови или плазмы субъекта;
- (b) добавления известного количества меченого лептина к образцу;
- (c) приведение в контакт образца, содержащего меченый лептин из (b) с субстратом, способным связывать меченый лептин;
- (d) промывания субстрата с удалением несвязанного меченого лептина;
- (e) измерения сигнала метки, образуемого связанным меченым лептином;
- (f) измерения положительного контрольного сигнала, образуемого в результате завершения этапов (a) – (e), и дополнительно предусматривающее добавление известного количества антитела к лептину на этапе (b); и
- (g) сравнение сигнала из (e) с сигналом из (f), при этом в случае, если сигнал, измеряемый на этапе (e) равен или меньше, чем сигнал, измеряемый на этапе (f), то субъект считается положительным в отношении нейтрализующих антител к лептину.

Вариант 3. Способ выявления субъектов, имеющих нейтрализующие антитела к лептину в крови, сыворотке крови или плазме крови от субъекта, предусматривающий этапы:

- (a) инактивации лептина, присутствующего в образце крови, сыворотки крови или плазмы;
- (b) добавления известного количества меченого лептина к образцу;
- (c) приведение в контакт образца, содержащего меченый лептин из (b) с субстратом, способным связывать меченый лептин;
- (d) промывания субстрата с удалением несвязанного меченого лептина;

- (e) измерения сигнала метки, образуемого связанным меченым лептином;
- (f) измерения отрицательного контрольного сигнала, образуемого в результате завершения этапов (a) – (e), при этом образец крови, сыворотки крови или плазмы крови не содержит нейтрализующие антитела к лептину; и
- (g) сравнения процентной разницы сигнала из (e) и сигнала из (f) с границей разделения, при этом в случае, если процентная разница сигнала из (e) и сигнала из (f) больше, чем граница разделения, то субъект считается положительным в отношении нейтрализующих антител к лептину.

Вариант 4. Способ согласно варианту 3, где граница разделения составляет от приблизительно 5% до приблизительно 40%.

Вариант 5. Способ согласно варианту 4, где граница разделения составляет от приблизительно 10% до приблизительно 30%.

Вариант 6. Способ согласно варианту 5, где субъект имеет лептиновую недостаточность и граница разделения составляет от приблизительно 9% до приблизительно 10%.

Вариант 7. Способ согласно варианту 6, где граница разделения составляет приблизительно 9,66%.

Вариант 8. Способ согласно варианту 4, где субъект представляет собой здорового субъекта и граница разделения составляет от приблизительно 7% до приблизительно 8%.

Вариант 9. Способ согласно варианту 8, где граница разделения составляет приблизительно 7,89%.

Вариант 10. Способ согласно любому из предыдущих вариантов, где лептин является меченым пероксидазой хрена или рутения трис-бипиридином.

Вариант 11. Способ согласно любому из предыдущих вариантов, где этап инактивации (a) осуществляют в результате нагревания образца.

Вариант 12. Способ согласно любому из предыдущих вариантов, где указанный субстрат, способный связывать меченый лептин, содержит:

- i. покрытую матрицу;

ii. меченый лептиновый рецептор, связанный с матрицей из (i).

Вариант 13. Способ согласно варианту 12, где покрытая матрица представляет собой покрытую стрептавидином матрицу.

Вариант 14. Способ согласно варианту 12 или 13, где лептиновый рецептор метят биотином.

Вариант 15. Способ согласно любому из вариантов 1-11, где указанный субстрат, способный связывать меченый лептин, содержит:

i. покрытую матрицу;

ii. антитело, связанное с матрицей из (i); и

iii. меченый лептиновый рецептор, связанный с антителом из (i).

Вариант 16. Способ согласно варианту 15, где покрытая матрица представляет собой покрытую стрептавидином матрицу.

Вариант 17. Способ согласно варианту 15 или 16, где лептиновый рецептор метят меткой, подходящей для аффинной очистки.

Вариант 18. Способ согласно варианту 16, где лептиновый рецептор метят гексагистидиновой меткой.

Вариант 19. Способ согласно любому из вариантов 15-18, где антитело имеет подходящую аффинность к метке лептинового рецептора.

Вариант 20. Способ согласно варианту 19, где антитело представляет собой антитело к гексагистидину.

Вариант 21. Способ согласно любому из вариантов 15-20, где антитело является меченым меткой, подходящей для того, чтобы связываться с покрытой матрицей.

Вариант 22. Способ согласно варианту 21, где метка представляет собой биотин.

Вариант 23. Способ согласно любому из предыдущих вариантов, дополнительно предусматривающий этап снижения значения рН инактивированного образца (a) путем добавления кислого раствора, и при этом меченый лептин, добавленный в (b), дополнительно содержит основной раствор, достаточный для нейтрализации значения рН образца после добавления.

Вариант 24. Способ согласно варианту 23, где кислый раствор представляет собой раствор уксусной кислоты.

Вариант 25. Способ согласно варианту 24, где кислый раствор представляет собой 0,8% раствор уксусной кислоты.

Вариант 26. Способ согласно любому из вариантов 23-25, где основной раствор представляет собой буфер.

Вариант 27. Способ согласно варианту 26, где основной раствор представляет собой 0,125 М Там-буфер.

Вариант 28. Способ по любому из предыдущих способов, где меченый лептин, добавленный на этапе (b), представляет собой рекомбинантный человеческий лептин.

Вариант 29. Способ согласно варианту 28, где детектируемый сигнал образуется на этапе (e) в случае, если концентрация меченого метрелептина в образце на этапе (b) составляет 101 нг/мл.

Вариант 30. Способ согласно любому из вариантов 1-27, где меченый лептин, добавляемый на этапе (b), представляет собой меченый метрелептин.

Вариант 31. Способ согласно варианту 30, где детектируемый сигнал образуется на этапе (e) в случае, если концентрация меченого метрелептина в образце на этапе (b) составляет 109 нг/мл.

Вариант 32. Способ определения восприимчивости субъекта, имеющего связанное с лептином нарушение, к лечению лептином, предусматривающий определение количества нейтрализующих антител к лептину у субъекта, при этом количество антител указывает на невосприимчивость субъекта к терапии лептином.

Вариант 33. Способ согласно варианту 32, где связанное с лептином нарушение выбирают из группы, состоящей из врожденной генерализованной липодистрофии, приобретенной генерализованной липодистрофии, частичной липодистрофии, гипоталамической аменореи, неалкогольного стеатогепатоза и гиполептинемического дисметаболического расстройства.

Вариант 34. Способ согласно варианту 32, где лептин представляет собой метрелептин.

Вариант 35. Набор для применения в детекции нейтрализующих антител к лептину в образце, содержащий (а) меченый лептин и (б) субстрат, способный связывать меченый лептин.

Вариант 36. Набор согласно варианту 35, где лептин является меченым пероксидазой хрена или рутения трис-бипиридином.

Вариант 37. Набор согласно варианту 35 или 36, где субстрат, способный связывать меченый лептин, содержит:

- i. покрытую матрицу;
- ii. меченый лептиновый рецептор, связанный с матрицей из (i).

Вариант 38. Набор согласно варианту 37, где покрытая матрица представляет собой покрытую стрептавидином матрицу.

Вариант 39. Набор согласно варианту 37 или 38, где лептиновый рецептор является меченым биотином.

Вариант 40. Набор согласно варианту 35 или 36, где субстрат, способный связывать меченый лептин, содержит:

- i. покрытую матрицу;
- ii. антитело, связанное с матрицей из (i); и
- iii. меченый лептиновый рецептор, связанный с антителом из (ii).

Вариант 41. Набор согласно варианту 40, где покрытая матрица представляет собой покрытую стрептавидином матрицу.

Вариант 42. Набор согласно варианту 41 или 42, где лептиновый рецептор является меченым меткой, подходящей для аффинной очистки.

Вариант 43. Набор согласно варианту 42, где лептиновый рецептор является меченым гексагистидиновой меткой.

Вариант 44. Набор согласно любому из вариантов 40-43, где антитело имеет подходящую аффинность к метке лептинового рецептора.

Вариант 45. Набор согласно варианту 44, где антитело представляет собой антитело к гексагистидину.

Вариант 46. Набор согласно любому из вариантов 40-45, где антитело является меченым меткой, подходящей для того, чтобы связываться с покрытой матрицей.

Вариант 47. Набор согласно варианту 46, где метка представляет собой биотин.

Вариант 48. Набор согласно любому из вариантов 35-47, дополнительно содержащий положительный контроль.

Вариант 49. Набор согласно любому из вариантов 35-48, дополнительно содержащий отрицательный контроль.

Вариант 50. Набор согласно любому из вариантов 35-49, дополнительно содержащий подкисляющий реагент.

Вариант 51. Набор согласно варианту 50, где подкисляющий реагент представляет собой уксусную кислоту.

Вариант 52. Набор согласно любому из вариантов 35-51, дополнительно содержащий основной раствор.

Вариант 53. Набор согласно варианту 52, где основной раствор представляет собой буфер.

Вариант 54. Набор согласно варианту 53, где буфер представляет собой Tris-буфер.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ детекции нейтрализующих антител к метрелептину в образце, предусматривающий этапы:

- (a) инактивации лептина, присутствующего в образце;
- (b) добавления известного количества меченого метрелептина к образцу;
- (c) приведения в контакт образца, содержащего меченый метрелептин из (b) с субстратом, способным связывать меченый метрелептин, причем указанный субстрат, способный связывать меченый метрелептин, содержит (i) покрытую матрицу, антитело, связанное с указанной покрытой матрицей, и меченый лептиновый рецептор, связанный с указанным антителом, или (ii) покрытую матрицу, связанную с меченым лептиновым рецептором;
- (d) промывания субстрата с удалением несвязанного меченого метрелептина; и
- (e) измерения сигнала метки, образуемого связанным с субстратом меченым метрелептином.

2. Способ выявления субъектов, имеющих нейтрализующие антитела к метрелептину в образце от субъекта, предусматривающий этапы:

- (a) инактивации лептина, присутствующего в указанном образце, причем указанный образец представляет собой кровь, сыворотку крови или плазму субъекта;
- (b) добавления известного количества меченого метрелептина к образцу;
- (c) приведение в контакт образца, содержащего меченый метрелептин из (b) с субстратом, способным связывать меченый метрелептин, причем субстрат, способный связывать меченый метрелептин, содержит (i) покрытую матрицу, антитело, связанное с указанной покрытой матрицей, и меченый лептиновый рецептор, связанный с указанным антителом, или (ii) покрытую матрицу, связанную с меченым лептиновым рецептором;
- (d) промывания субстрата для удаления несвязанного меченого метрелептина;
- (e) измерения сигнала метки, образуемого связанным меченым метрелептином;
- (f) измерения положительного контрольного сигнала, образуемого в результате завершения этапов (a) – (e), и дополнительно предусматривающее добавление известного количества антитела к лептину на этапе (b); и

(g) сравнение сигнала из (e) с сигналом из (f), при этом в случае, если уровень сигнала, измеряемого на этапе (e) равен или меньше, чем уровень сигнала, измеряемого на этапе (f), то субъект считается положительным в отношении нейтрализующих антител к лептину.

3. Способ выявления субъектов, имеющих нейтрализующие антитела к метрелептину в образце от субъекта, предусматривающий этапы:

(a) инактивации лептина, присутствующего в указанном образце, причем указанный образец представляет собой кровь, сыворотку крови или плазму;

(b) добавления известного количества меченого метрелептина к образцу;

(c) приведение в контакт образца, содержащего меченый метрелептин из (b) с субстратом, способным связывать меченый метрелептин, причем субстрат, способный связывать меченый метрелептин, содержит (i) покрытую матрицу, антитело, связанное с указанной покрытой матрицей, и меченый лептиновый рецептор, связанный с указанным антителом, или (ii) покрытую матрицу, связанную с меченым лептиновым рецептором;

(d) промывания субстрата для удаления несвязанного меченого метрелептина;

(e) измерения сигнала метки, образуемого связанным меченым метрелептином;

(f) измерения отрицательного контрольного сигнала, образуемого в результате завершения этапов (a) – (e), при этом образец крови, сыворотки крови или плазмы крови не содержит нейтрализующие антитела к лептину; и

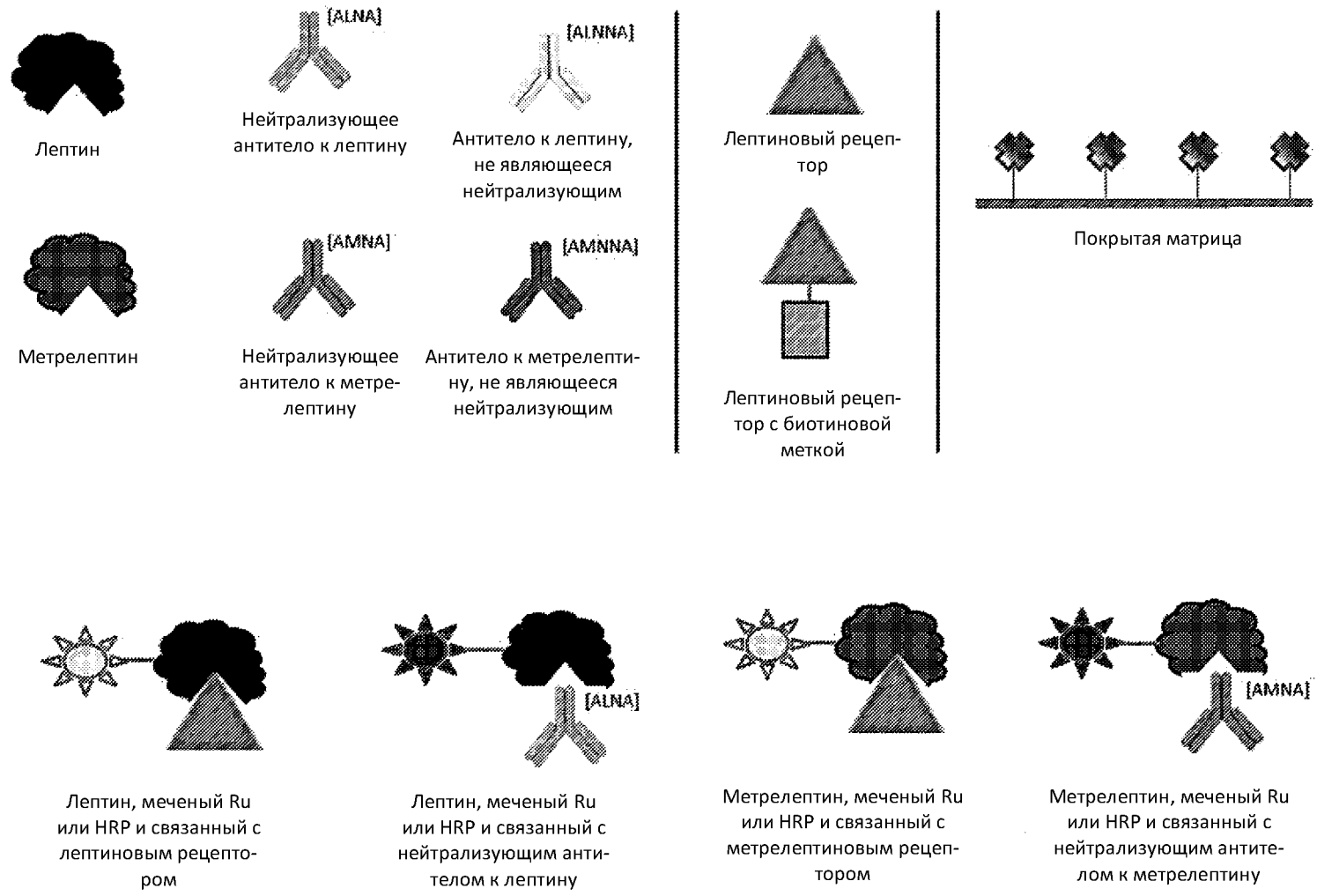
(g) сравнения процентной разницы сигнала из (e) и сигнала из (f) с границей разделения, при этом в случае, если процентная разница сигнала из (e) и сигнала из (f) больше, чем граница разделения, то субъект считается положительным в отношении нейтрализующих антител к лептину.

4. Способ по п.3, где граница разделения составляет от приблизительно 5% до приблизительно 40%.

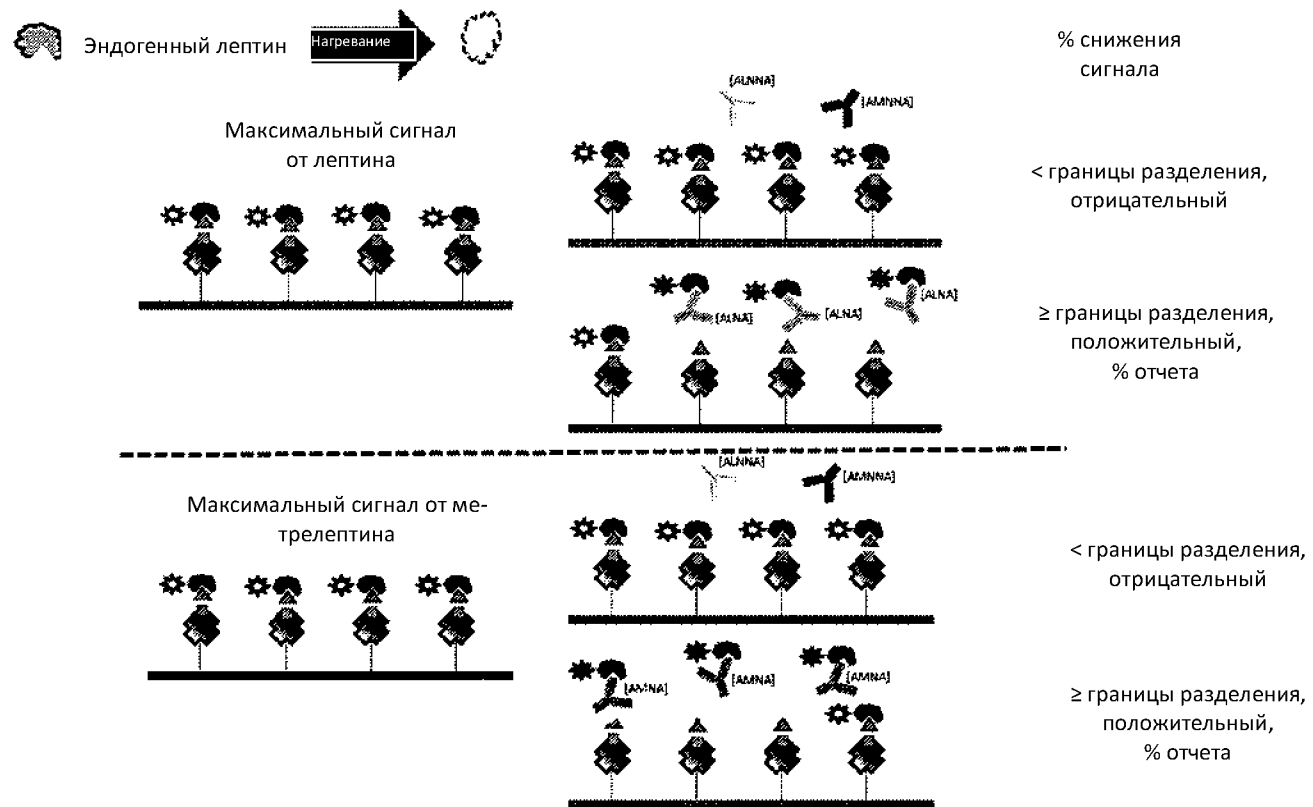
5. Способ по любому из пп.1-4, где метрелептин является меченым пероксидазой хрена или рутения трис-бипиридином.

6. Способ по любому из пп.1-5, включающий инактивацию лептина, присутствующего в образце, путем нагревания образца.

7. Способ по любому из пп.1-6, где указанный субстрат, способный связывать меченый метрелептин, содержит покрытую матрицу и меченый лептиновый рецептор, связанный с покрытой матрицей.
8. Способ по п. 7, где лептиновый рецептор метят биотином.
9. Способ по любому из пп.1-6, где указанный субстрат, способный связывать меченый метрелептин, содержит покрытую матрицу, антитело, связанное с покрытой матрицей, и меченый лептиновый рецептор, связанный с антителом.
10. Способ по любому из пп.1-9, где покрытая матрица представляет собой покрытую стрептавидином матрицу.
11. Способ по п. 9, где лептиновый рецептор метят гистидиновой меткой.
12. Способ по п. 11, где антитело представляет собой антитело к гистидиновой метке.
13. Способ по п. 11, где гистидиновая метка представляет собой гексагистидиновую метку или гептагистидиновую метку.
14. Способ по п. 11, где антитело представляет собой антитело к гексагистидиновой метке.
15. Способ по п. 11, где антитело представляет собой антитело к гептагистидиновой метке.
16. Способ по любому из пп.9-15, где антитело метят меткой, способной связываться с покрытой матрицей.
17. Способ по любому из пп.1-16, включающий суспендирование образца в кислотном растворе после этапа (а) и перед этапом (b).
18. Способ по п. 17, включающий обеспечение меченого метрелептина в основном растворе.
19. Способ по п. 17, где кислотный раствор включает уксусную кислоту.



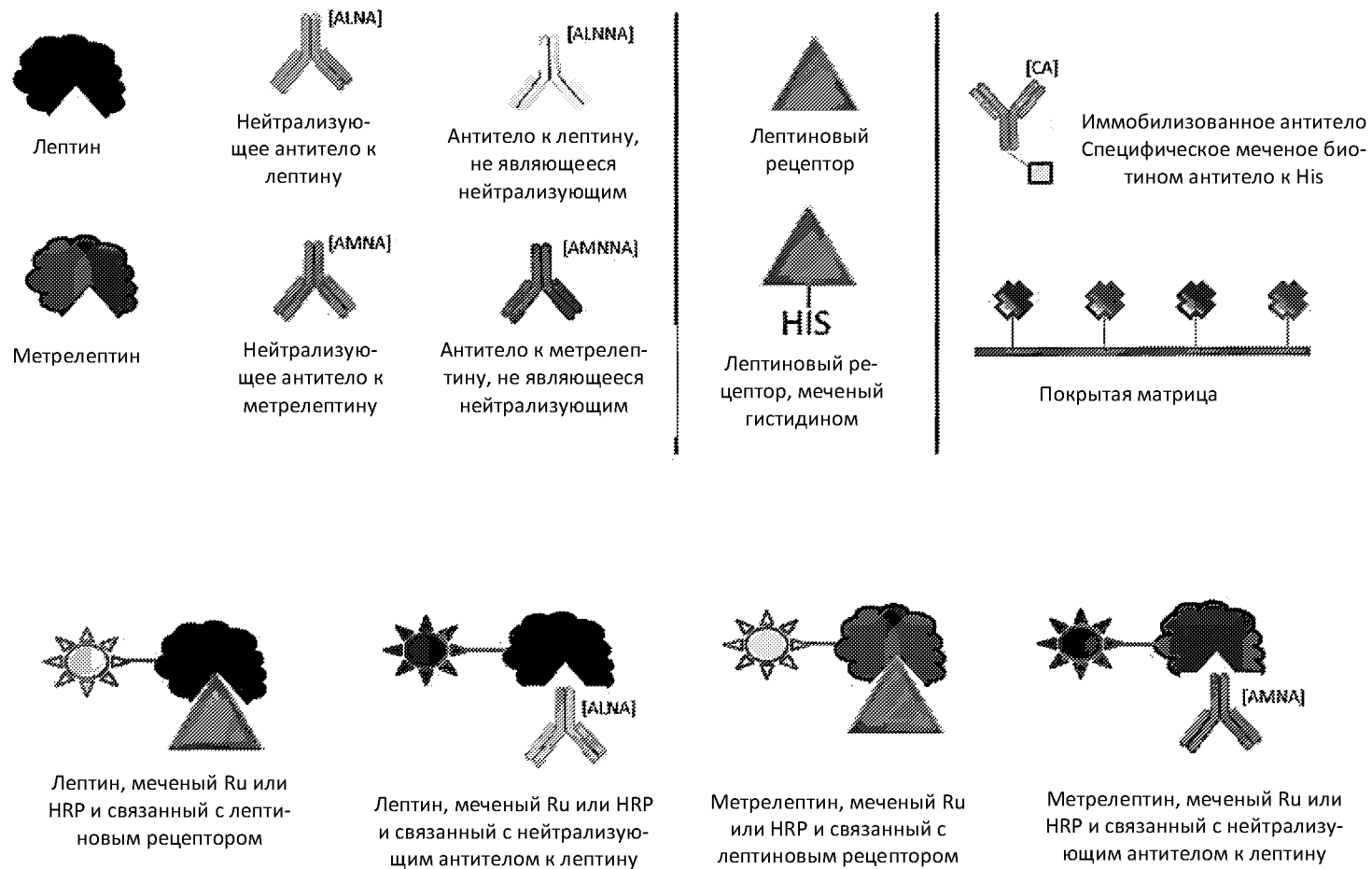
Фиг. 1А



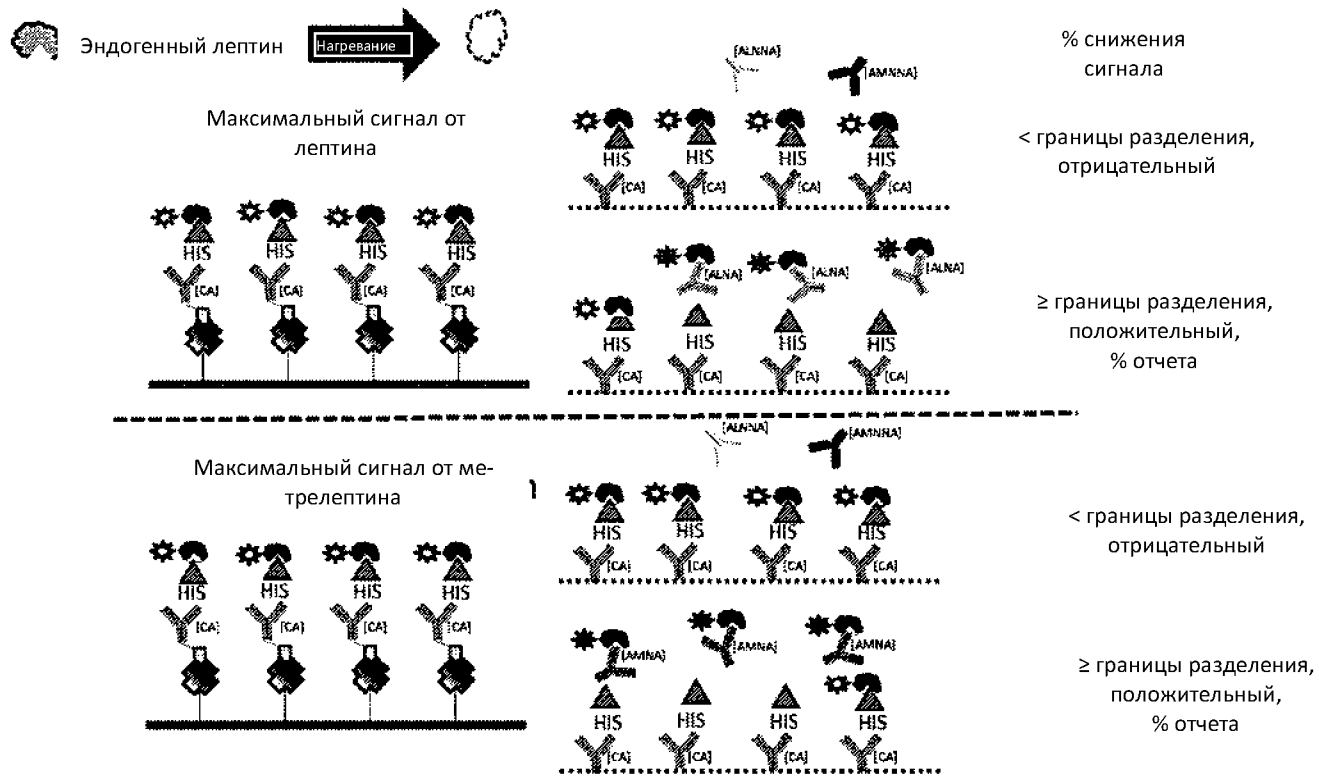
Фиг. 1В

		Лептин		Метрелептин		Результаты					
ID образца		Источник	Сигнал от лептина		Сигнал от метрелептина		Лептин		Метрелептин		Примечания
Максимальный сигнал	НК	Объединенные отрицательные образцы	20000,0		20000,0						Может представлять собой RFU или абс. в зависимости от конечного формата анализа, сигнал может варьировать в диапазоне от 5000 до 500000 (82000 метрелептин, 91000 лептин)
Граница разделения		Верхняя граница неспецифического ингибирования		Определенный во время валидации (возможно, от 10 до 30%, например, 22%)		Определенный во время валидации (возможно, от 10 до 30%, например, 30%)	Категория	% ингибирования	Категория	% ингибирования	Граница разделения определяется статистически при валидации точки, в которой находится нижняя граница сигнала (установлен 0,1% или 1% доли ложных распознаваний сигнала)
	Образец 1		19000,0		18000,0		Отриц.	-	Отриц.	-	Образцы, подлежащие исследованию, необходимо определять, все образцы, подвергнутые скринингу/подтвержденные в группе, которые исследовали в анализе NAb
	Образец 2		10000,0		18000,0		Полож.	50	Отриц.	-	
	Образец 3		22000,0		5000,0		Отриц.	-	Полож.	75	
	Образец 4		3000,0		5000,0		Полож.	85	Полож.	75	
	Образец 5		21000,0		22000,0		Отриц.	-	Отриц.	-	
	Образец 6		10000,0		10000,0		Полож.	50	Полож.	50	
	Образец 7		18000,0		18000,0		Отриц.	-	Отриц.	-	
	Образец 8		5000,0		20000,0		Полож.	75	Отриц.	-	
	Образец 9		19000,0		18500,0		Отриц.	-	Отриц.	-	
Положительный контроль (низкая)			10000,0		10000,0		Полож.	50	Полож.	50	Низкая и высокая означает концентрацию антител в случае существующих нейтрализующих антител, пределы будут установлены при валидации
Положительный контроль (высокая)			1000,0		1000,0		Полож.	95	Полож.	95	

Фиг. 2

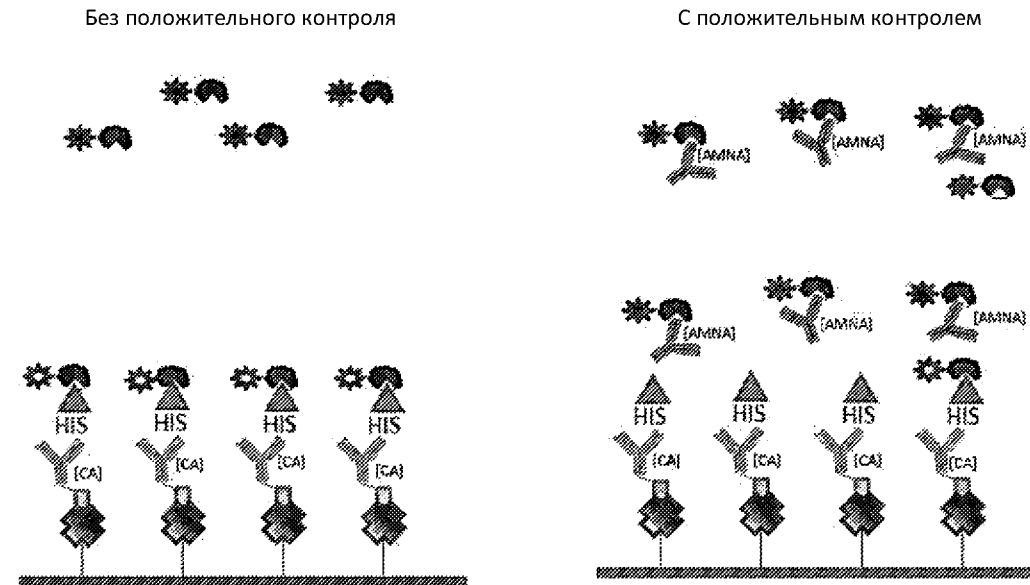


Фиг. 3А



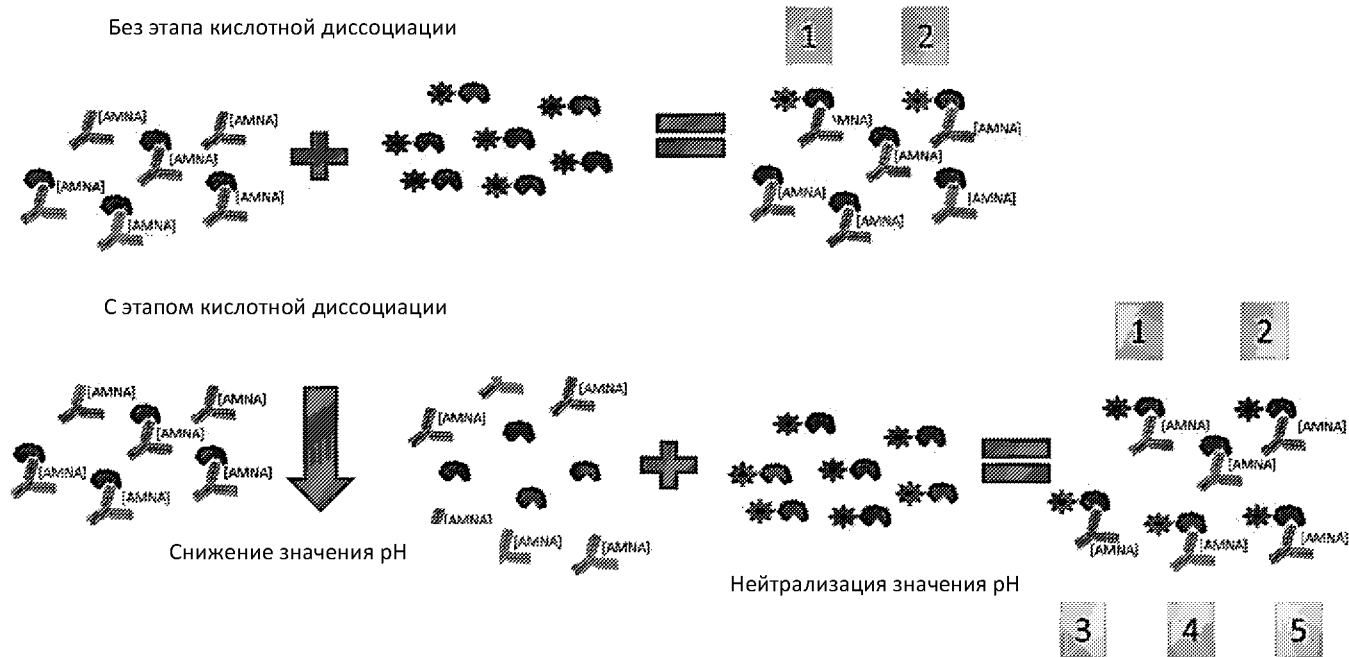
Фиг. 3В

1. Блокировать планшет со стрептавидином Superblock в течение 1 часа.
2. Преинкубировать образец, представленный антителом ПК + метрелептином с сульфометкой в течение 2 часов при RT.
3. Промыть планшет со стрептавидином и добавить разведенное антитело к His в PBS. Инкубировать в течение 1 часа при RT.
4. Промыть планшет и добавить разведенный меченый His рецептор. Инкубировать в течение 1 часа при RT.
5. Промыть планшет и добавить метрелептин с сульфометкой + раствор Ab из этапа 2. Инкубировать в течение 1 часа при RT.
6. Промыть планшет и считать на MSD.



Фиг. 4

1. Описанная процедура остается той же самой с дополнительным этапом предварительной обработки. Он называется перенос в планшет и в нем происходит следующее.
2. Обработанные нагреванием образцы (ПК, ОК и образцы) инкубируют в кислом растворе, таком как 0,8% раствор уксусной кислоты, в течение часа.
3. Это приводит к диссоциации антител, связанных с лептином или метрелептином.
4. Меченый лептин или метрелептин добавляют в буферный раствор (0,125 M Там-буфер), в момент добавления меченое вещество имеет больше шансов связаться с антителом. Таким образом, анализ является более устойчивым к лекарственным препаратам.



Фиг. 5

ID образца	Источник	Лептин		Метрелептин		Результаты Лептин		Результаты Метрелептин		
		Максимальный сигнал от лептина, ОК	Граница разделения	Максимальный сигнал от метрелептина, ОК	Граница разделения	Категория	% ингибирования	Категория	% ингибирования	
		5911	Определенный во время валидации (10,18 как для патологического состояния, так и для нормы) 1% доли ложных распознаваний сигнала	2203,5	Определенные во время валидации (9,66, патологическое состояние, 7,89, норма) 1% доли ложных распознаваний сигнала					
Сигнал	% ингибирования	Сигнал	% ингибирования	Категория	% ингибирования	Категория	% ингибирования			
Образец 1	Предварительное лечение	5745,0	2,81	2138,0	2,97	Отриц.	-	Отриц.	-	
Образец 2		5548,0	6,14	2104,5	4,49	Отрицат.	-	Отриц.	-	
Образец 3		5027,5	14,95	1878,5	14,75	Полож.	15,0	Полож.	14,8	
Образец 4		2150,0	63,63	724,0	67,14	Полож.	63,6	Полож.	67,1	
Образец 5		599,5	89,86	211,5	90,40	Полож.	89,9	Полож.	90,4	
Образец 6		5585,5	5,51	2154,0	2,25	Отриц.	-	Отриц.	-	
Образец 7		481,5	91,85	205,5	90,67	Полож.	91,9	Полож.	90,7	
Образец 8		6085,5	-2,95	2319,0	-5,24	Отриц.	-	Отриц.	-	
Образец 9	Нормальное состояние без болезни	5833,5	1,31	2261,0	-2,61	Отриц.	-	Отриц.	-	
Образец 10		5530,5	6,44	2206,0	-0,11	Отриц.	-	Отриц.	-	
Образец 11		5856,0	0,93	2342,0	-6,29	Отриц.	-	Отриц.	-	
Образец 12		5669,5	4,09	2284,5	-3,68	Отриц.	-	Отриц.	-	
Образец 13		5833,0	1,32	2304,5	-4,58	Отриц.	-	Отриц.	-	
Образец 14		6382,0	-7,97	2283,5	-3,63	Отриц.	-	Отриц.	-	
Образец 15		6225,0	-5,31	2249,5	-2,09	Отриц.	-	Отриц.	-	
Образец 16		5715,5	3,31	2225,0	-0,98	Отриц.	-	Отриц.	-	
Образец 17		5995,5	-1,43	2334,0	-5,92	Отриц.	-	Отриц.	-	
Положительный контроль (низкая)	156 нг/мл	1	1804,0	30,52	622,0	28,23	Полож.	30,5	Полож.	28,2
		2	1847,2	31,25	639,7	29,03	Полож.	31,3	Полож.	29,0
Положительный контроль (высокая)	5000 нг/мл	1	5770,3	97,62	2177,9	98,84	Полож.	97,6	Полож.	98,8
		2	5755,5	97,37	2177,3	98,81	Полож.	97,4	Полож.	98,8

Фиг. 6