



**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2024.06.06**

**(21)** Номер заявки  
**202192816**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2020.05.12**

**(51)** Int. Cl. **G01N 33/543** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**G01N 33/94** (2006.01)

**(54) УЛУЧШЕННЫЕ АНАЛИЗЫ КОНКУРЕНТНОГО СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДОВ**

**(31)** **62/846,872; 62/859,914**

**(32)** **2019.05.13; 2019.06.11**

**(33)** **US**

**(43)** **2022.02.18**

**(86)** **PCT/US2020/032476**

**(87)** **WO 2020/231992 2020.11.19**

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

**(72)** Изобретатель:  
**Партридж Майкл А., Самнер Джане  
Оливейра, Караюсуф Элиф Кабуллоглу  
(US)**

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

**(56)** XIANG YUHONG ET AL.: "Approaches to Resolve False Reporting in Neutralizing Antibody Assays Caused by Reagent Leaching from Affinity Capture Elution Solid Phase", THE AAPS JOURNAL, SPRINGER INTERNATIONAL PUBLISHING, CHAM, vol. 21, no. 1, 6 November 2018 (2018-11-06), pages 1-13, XP036665449, DOI: 10.1208/S12248-018-0274-X, chapters "CLB MSD-Based NAb Assay Procedure" and "CLB MSD-Based NAb Assay Procedure with Sample Pretreatment"

WEIFENG XU ET AL.: "Development and validation of a functional cell-based neutralizing antibody assay for ipilimumab", BIOANALYSIS, vol. 10, no. 16, 1 August 2018 (2018-08-01), pages 1273-1287, XP055631588, London, UK ISSN: 1757-6180, DOI:10.4155/bio-2018-0109, chapters "Bead extraction & acid dissociation procedure" and "Bioassay for detecting neutralizing activity"

KELLEY MARIAN ET AL.: "Theoretical Considerations and Practical Approaches to Address the Effect of Anti-drug Antibody (ADA) on Quantification of Biotherapeutics in Circulation", AAPS JOURNAL, AMERICAN ASSOCIATION OF PHARMACEUTICAL

SCIENTISTS, US, vol. 15, no. 3, 1 July 2013 (2013-07-01), pages 646-658, XP009195125, ISSN: 1550-7416, DOI: 10.1208/S12248-013-9468-4, figure 4; table 1

WEIFENG XU ET AL.: "Bead-extraction and heat-dissociation (BEHD): A novel way to overcome drug and matrix interference in immunogenicity testing", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS., vol. 462, 1 November 2018 (2018-11-01), pages 34-41, XP055631595, NL ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/j.jim.2018.08.003

JIANG H ET AL.: "Innovative use of LC-MS/MS for simultaneous quantitation of neutralizing antibody, residual drug, and human immunoglobulin G in immunogenicity assay development", ANALYTICAL CHEMISTRY 20140304 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY USA, vol. 86, no. 5, 4 March 2014 (2014-03-04), pages 2673-2680, XP002769863, DOI: 10.1021/AC5001465

SMITH ET AL.: "Detection of antibodies against therapeutic proteins in the presence of residual therapeutic protein using a solid-phase extraction with acid dissociation (SPEAD) sample treatment prior to ELISA", REGULATORY TOXICOLOGY AND PHARMACOLOGY, ACADEMIC PRESS, NEW YORK, NY, US, vol. 49, no. 3, 13 November 2007 (2007-11-13), pages 230-237, XP022343220, ISSN: 0273-2300, DOI: 10.1016/J.YRTPH.2007.07.005

NIU HONGMEI ET AL.: "A biotin-drug extraction and acid dissociation (BEAD) procedure to eliminate matrix and drug interference in a protein complex anti-drug antibody (ADA) isotype specific assay", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 446, 5 April 2017 (2017-04-05), pages 30-36, XP085033531, ISSN: 0022-1759, DOI:10.1016/J.JIM.2017.04.002

WEIFENG XU ET AL.: "Development and characterization of a pre-treatment procedure to eliminate human monoclonal antibody therapeutic drug and matrix interference in cell-based functional neutralizing antibody assays", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS., vol. 416, 1 January 2015 (2015-01-01), pages 94-104, XP055631591, NL, ISSN: 0022-1759, DOI:10.1016/j.jim.2014.11.005

WO-A1-2019105916

**(57)** В изобретении предлагаются улучшенные анализы для обнаружения и необязательно количественной оценки антител к лекарственному средству (ADA) в образце. Раскрытые анализы включают формат анализа захвата белкового лекарственного средства и формат анализа захвата мишени белкового лекарственного средства, каждый из которых имеет определенные преимущества по сравнению с существующими анализами. В некоторых вариантах осуществления

анализы разработаны таким образом, что комплексы лекарственное средство:антитело к лекарственному средству вымываются перед добавлением в покрытый мишенью планшет. Помеха со стороны мишени потенциально может быть устранена или сведена к минимуму с помощью конкурирующего реагента, блокирующего мишень, на стадии инкубации образца. В иллюстративном формате анализа захвата мишени используется умеренно кислотный подход для сведения к минимуму помехи со стороны свободной мишени.

047133 B1

047133 B1

---

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

Согласно настоящей заявке испрашивается преимущество и приоритет в соответствии с предварительной заявкой на патент США № 62/846872, поданной 13 мая 2019 г., и предварительной заявкой на патент США № 62/859914, поданной 11 июня 2019 г., обе из которых включены посредством ссылки в полном объеме.

### Область изобретения

Аспекты настоящего изобретения в целом направлены на анализы для обнаружения взаимодействий с лекарственными средствами, в частности, на анализы для обнаружения антител к лекарственному средству в образцах.

### Предпосылки изобретения

Введение биологических препаратов пациенту может вызвать нежелательный иммуногенный ответ у пациента, который может приводить к образованию антител к лекарственному средству (ADA) (Mige-Sluis, A.R., et al, *J Immunol Methods*, 289(1): 1-16 (2004)). Нейтрализующие антитела (NAb) представляют собой подмножество ADA, которые ингибируют связывание лекарственного средства с его мишенью, делая лекарственное средство биологически неактивным. По определению NAb нейтрализуют действие препарата, потенциально снижая клиническую активность. Кроме того, если лекарственное средство представляет собой биологический аналог эндогенного белка, NAb могут перекрестно реагировать с эндогенным аналогом лекарственного средства, что может иметь критические последствия для безопасности лекарственного средства (Finco, D., et al., *J Pharm Biomed Anal*, 54(2):351-358 (2011); Hu, J., et al, *J Immunol Methods*, 419: 1-8 (2015)).

Обнаружение иммуногенного ответа включает многоуровневый подход, при котором образец сначала тестируется на присутствие ADA, обычно с использованием иммуноферментного анализа (Mige-Sluis, A.R., et al, *J Immunol Methods*, 289(1): 1-16 (2004)). Дальнейшая характеристика ответа ADA может включать анализ титра для определения относительного количества ADA и анализ для определения того, является ли ответ антител нейтрализующим (Wu, B., et al, *AAPS Journal*, 18(6): 1335-1350 (2016); Shankar, G, et al, *J Pharm Biomed Anal* 48(5): 1267-1281 (2008); Gupta, S., et al, *J Pharm Biomed Anal*, 55(5):878-888 (2011)).

Анализы NAb обычно очень чувствительны к присутствию лекарственного средства в образце (Xu, W., et al, *J Immunol Methods*, 462:34-41 (2018); Xu, W., et al, *J Immunol Methods*, 416:94-104 (2015); Xiang, Y., et al, *AAPS Journal*, 21(1):4 (2019); Sloan, J.H., et al, *Bioanalysis*, 8(20):2157-2168 (2016)). Переносимость лекарственного средства в анализах NAb обычно ниже, чем в анализах ADA, которые первоначально определяют иммуногенный ответ, и часто ниже, чем минимальные концентрации лекарственного средства у пациентов. Следовательно, некоторые ответы нейтрализующих антител могут не обнаруживаться в анализе NAb в связи с помехой со стороны лекарственного средства в образце.

Сообщалось о ряде подходов к улучшению переносимости лекарственных средств (DT) в анализах ADA, включая кислотную обработку для диссоциации комплексов лекарственное средство: ADA, способствующую улучшению обнаружения лекарственного средства, или длительные инкубации образцов, которые позволяют меченым лекарственным средствам в способе вытеснять комплексы свободное лекарственное средство:ADA (Sloan, J.H., et al, *Bioanalysis*, 8(20):2157-2168 (2016); Patton, A., et al, *J Immunol Methods*, 304(1-2): 189-195 (2005); Butterfield, A.M., *Bioanalysis*, 2(12), 1961-1969 (2010)).

Сообщалось также о нескольких способах твердофазной экстракции или осаждения, которые улучшают DT в анализах ADA. В широком смысле эти способы можно разделить на две группы: способы, которые извлекают ADA из образца, и способы, которые приводят к деплеции лекарственного средства из образца (Zoghbi, J., et al, *J Immunol Methods*, 426:62-69 (2015); Smith, H.W., et al, *Regul Toxicol Pharmacol*, 49(3):230-237 (2007); Niu, H., *J Immunol Methods*, 446, 30-36 (2017); Muram, T.M., et al, *J Invest Dermatol*, 136(7): 1513-1515 (2016); Chen, Y.Q., *J Immunol Methods*, 431:45-51 (2016); Bourdage, J.S., et al, *J Immunol Methods*, 327(1-2):10-17 (2007)). Подобные подходы также применялись для улучшения DT в анализах NAb (Xu, W. et al, *J Immunol Methods*, 462:34-41 (2018); Xu, W., et al, *J Immunol Methods*, 416:94-104 (2015); Xiang, Y., et al, *AAPS J*, 21(1):4, (2018); Xiang, Y., et al, *AAPSJ*, 21(3):46 (2019)). В одном случае способ элюирования с аффинным захватом был применен для выделения и обнаружения ADA, а конкурентное ингибирование со свободной мишенью было применено для идентификации NAb (Sloan, J.H., et al., *Bioanalysis*, 8(20):2157-2168 (2016)).

Анализы конкурентного связывания лигандов (CLB) хорошо воспроизводимы и относительно просты в выполнении. Они по меньшей мере сопоставимы, а в некоторых случаях превосходят клеточные анализы в отношении чувствительности, вариабельности анализа и влияния матрикса (Finco, D., et al, *J Pharm Biomed Anal*, 54(2):351-358 (2011)).

Следовательно, целью настоящего изобретения является предоставление анализов, которые улучшают переносимость лекарственных средств по сравнению с существующими анализами.

Другой целью настоящего изобретения является предоставление улучшенных анализов, которые позволяют избегать проблемы предшествующей терапии белковым лекарственным средством или устранять ее.

### Краткое описание сущности изобретения

Предлагаются улучшенные анализы для обнаружения и необязательно количественной оценки антител к лекарственному средству (ADA), включая нейтрализующие антитела (NAb), в образце. Было обнаружено, что тщательный выбор реагентов для анализа снижает, уменьшает или устраняет проблему предшествующей терапии в существующих анализах. Анализы NAb CLB были разработаны для программ по двум лекарственным средствам. Способы были оптимизированы в отношении чувствительности и ДТ и включали стадию кислотной диссоциации. В некоторых вариантах осуществления анализы характеризовались уровнями ДТ, которые были существенно ниже минимальных уровней лекарственного средства. Раскрытые анализы включают формат анализа захвата лекарственного средства и формат анализа захвата мишени лекарственного средства, каждый из которых имеет определенные преимущества по сравнению с существующими анализами. В некоторых вариантах осуществления анализы захвата мишени разработаны таким образом, что свободное лекарственное средство вымывается перед добавлением меченой мишени, что позволяет избежать проблем предшествующей терапии, приводящей к ложно-положительному результату. В других вариантах осуществления анализы разработаны таким образом, что комплексы лекарственное средство:антитело к лекарственному средству вымываются перед добавлением в покрытый мишенью планшет. Помеха со стороны мишени потенциально может быть устранена или сведена к минимуму с помощью конкурирующего реагента, блокирующего мишень, на стадии инкубации образца. В иллюстративном формате анализа захвата мишени используется умеренно кислотный подход для сведения к минимуму помехи со стороны свободной мишени.

В одном варианте осуществления представлен способ захвата лекарственного средства для обнаружения антител к лекарственному средству, например NAb, по отношению к лекарственному средству в образце. Лекарственное средство может представлять собой малую молекулу или белковое лекарственное средство.

Типичные белковые лекарственные средства включают, но не ограничиваясь ими, антитела, слитые белки и терапевтические белки. Один способ включает стадии инкубации образца в кислых условиях в течение определенного периода времени для получения подкисленного образца. В определенных вариантах осуществления образец получают от субъекта, например субъекта-человека, до введения, после введения лекарственного средства или во время лечения им. Подкисленный образец может иметь значение pH от 2,0 до 4,0. В некоторых вариантах осуществления кислотная обработка способствует диссоциации комплексов, включая, но не ограничиваясь ими, комплексы NAb:лекарственное средство и комплексы лекарственное средство:мишень. Мишень лекарственного средства добавляется к подкисленному образцу, и значение pH подкисленного образца повышается до нейтрального значения pH, например, приблизительно 7,0, так что добавленная мишень может связываться с лекарственным средством в образце. В одном варианте осуществления добавленная мишень находится в pH-буфере, таком как буфер Tris, при добавлении к подкисленному образцу. В некоторых вариантах осуществления мишень метят селективируемой меткой, которая способствует физическому удалению комплексов, образованных в образце, которые содержат меченую мишень. Типичные селективируемые метки включают, но не ограничиваясь ими, массовые метки, магнитные гранулы, белковые метки и металлические частицы и более подробно обсуждаются ниже. Комплексы, образующиеся в образце, которые содержат меченую мишень, физически удаляются из образца для получения деплетированного образца. Комплексы, содержащие меченую мишень, включают комплексы мишень:лекарственное средство. Удаление комплексов мишень:лекарственное средство снижает концентрацию лекарственного средства в деплетированном образце. Когда мишень метят магнитными гранулами, эффект магнетизма используется для физического удаления комплексов мишень:лекарственное средство для получения деплетированного образца. Деплетированный образец инкубируют с реагентом, блокирующим мишень, и меченым лекарственным средством, например, биотинилированным лекарственным средством, для получения образца для анализа. Иллюстративные средства, блокирующие мишень, включают, но, не ограничиваясь ими, антитела или их антигенсвязывающий фрагмент, рецепторные молекулы и растворимые рецепторы. В некоторых вариантах осуществления реагент, блокирующий мишень, представляет собой антитело, которое специфически связывает мишень и предупреждает или ингибирует связывание мишени с лекарственным средством. Затем образец для анализа инкубируют на твердой подложке, покрытой авидином или стрептавидином. В некоторых вариантах осуществления твердую подложку промывают после инкубации с образцом для анализа для удаления несвязанных реагентов. Способ дополнительно включает добавление меченой мишени лекарственного средства к твердой подложке. Мишень обычно метят детективируемой меткой, такой как флуорофор, хемилюминесцентный зонд, электрохемилюминесцентный зонд, квантовая точка, редкоземельный переходный металл, частицы металлического золота, частицы металлического серебра или их комбинацией. В одном варианте осуществления метка представляет собой рутений. Твердую подложку необязательно промывают для удаления несвязанной меченой мишени. Детективируемый сигнал от меченой мишени, связанной с биотинилированным лекарственным средством, связанным с твердой подложкой, детектируется и необязательно оценивается количественно. Сниженное количество сигнала от твердой подложки по

сравнению с контрольным образцом указывает на присутствие в образце антител к лекарственному средству. В некоторых вариантах осуществления антитела к лекарственному средству включают нейтрализующие антитела, которые специфически связываются с белковым лекарственным средством и ингибируют или блокируют связывание лекарственного средства мишенью.

В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство представляет собой моноклональное антитело, биспецифическое антитело, фрагмент Fab, фрагмент  $F(ab')_2$ , моноспецифический фрагмент  $F(ab')_2$ , биспецифический  $F(ab')_2$ , триспецифический  $F(ab')_2$ , моновалентное антитело, фрагмент scFv, диатело, биспецифическое диатело, триспецифическое диатело, scFv-Fc, минитело, IgNAR, v-NAR, hcIgG или vHh.

В некоторых вариантах осуществления магнитная метка представляет собой парамагнитную метку или суперпарамагнитную метку. Магнитная метка может представлять собой металлическую частицу, металлическую микрочастицу, металлическую наночастицу, металлическую гранулу, магнитный полимер, однородную сферическую гранулу из полистирола или суперпарамагнитную сферическую полимерную частицу. В некоторых вариантах осуществления для разделения используют гранулы агарозы/сефарозы и эффект гравитации или центрифугирование.

В некоторых вариантах осуществления анализа захвата лекарственного средства переносимость лекарственного средства в деплетированном образце по меньшей мере в 3-20 раз или в 10 раз больше, чем в недеплетированном образце. В других вариантах осуществления анализа захвата лекарственного средства анализ положительно идентифицирует NAb в образцах, взятых от субъекта, через по меньшей мере 29 дней после введения лекарственного средства. В другом варианте осуществления анализ положительно идентифицирует NAb в образцах, взятых через 85 дней после введения лекарственного средства.

Следует понимать, что способы, раскрываемые в данном документе, необязательно включают стадии инкубации или промывки, на которых планшет для образцов, планшет для анализа или образец встряхивают, например, вращают, для того, чтобы способствовать удалению несвязанных реагентов.

В еще одном варианте осуществления предложен способ захвата мишени для обнаружения антител к лекарственному средству по отношению к лекарственному средству в образце. Способ включает стадии инкубации образца в кислых условиях в течение определенного периода времени для получения подкисленного образца. Кислотная обработка индуцирует или способствует диссоциации комплексов лекарственное средство:NAb и комплексов лекарственное средство:мишень. В некоторых вариантах осуществления подкисленный образец имеет значение pH приблизительно 2,0-4,0. Затем подкисленный образец объединяют с pH-буферным раствором, содержащим меченые антитела к лекарственному средству, специфичные для белкового лекарственного средства, для получения комплексов антитело:белковое лекарственное средство. На этой стадии значение pH образца составляет приблизительно 4,0-5,5 для сведения к минимуму помехи со стороны свободной мишени. В некоторых вариантах осуществления меченое антитело к лекарственному средству метят селективной меткой, которая способствует физическому отделению комплексов, содержащих меченое антитело к лекарственному средству, от образца. Меченое антитело к лекарственному средству может представлять собой неблокирующее антиидиотипическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Способ захвата мишени включает удаление комплексов неблокирующее антитело:лекарственное средство из образца с помощью селективируемой метки для получения деплетированного образца. Обычно селективируемая метка представляет собой магнитную метку, используемую для удаления комплексов неблокирующее антиидиотипическое антитело:лекарственное средство с помощью магнита или эффекта магнетизма. В других вариантах осуществления селективируемая метка может представлять собой массовые метки или гранулы агарозы, и для отделения комплексов неблокирующее антитело:лекарственное средство от образца можно использовать эффект гравитации или центрифугирование. Способ захвата мишени включает инкубацию деплетированного образца с меченым лекарственным средством при значении pH приблизительно 7,0 для получения образца для анализа. Меченое лекарственное средство будет связываться с NAb, присутствующим в образце. В некоторых вариантах осуществления часть меченого лекарственного средства остается несвязанной. Меченое лекарственное средство обычно имеет детектируемую метку. Обнаруживаемая метка в способе захвата мишени может представлять собой флуорофор, хемилюминесцентный зонд, электрохемилюминесцентный зонд, квантовую точку, редкоземельный переходный металл, частицы золота, частицы серебра или их комбинацию. Способ захвата мишени включает инкубацию образца для анализа на твердой подложке, покрытой мишенью, при этом меченое лекарственное средство специфически связывает покрытую мишенью твердую подложку. Способ захвата мишени необязательно включает промывание твердой подложки после инкубации с образцом для анализа для удаления несвязанного меченого лекарственного средства. Способ захвата мишени также включает стадию измерения детектируемого сигнала от меченого лекарственного средства, связанного с покрытой мишенью твердой подложкой, при этом сниженное количество сигнала по сравнению с контрольным образцом указывает на присутствие антител к лекарственному средству в образце.

В некоторых вариантах осуществления способа захвата мишени антитела к лекарственному средству включают нейтрализующие антитела, которые специфически связываются с белковым

лекарственным средством. Белковое лекарственное средство может представлять собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело, биспецифическое антитело, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, моноспецифический фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, биспецифический F(ab')<sub>2</sub>, триспецифический F(ab')<sub>2</sub>, моновалентное антитело, фрагмент scFv, диатело, биспецифическое диатело, триспецифическое диатело, scFv-Fc, минитело, IgNAR, v-NAR, hcIgG или vHh.

Как и в случае способа захвата лекарственного средства, селективируемая метка в способе захвата мишени может представлять собой магнитную метку. Магнитная метка может представлять собой парамагнитную метку или суперпарамагнитную метку.

В некоторых вариантах осуществления магнитная метка представляет собой металлическую частицу, металлическую микрочастицу, металлическую наночастицу, металлическую гранулу, магнитный полимер, однородную сферическую гранулу из полистирола или суперпарамагнитную сферическую полимерную частицу. В некоторых вариантах осуществления селективируемая метка может представлять собой массовые метки или гранулы агарозы/сефарозы и для отделения комплексов лекарственного средства от образца можно использовать эффект гравитации или центрифугирование.

В некоторых вариантах осуществления способа захвата мишени лекарственное средство метят рутением с возможностью обнаружения.

Некоторые варианты осуществления анализа захвата мишени характеризуются переносимостью лекарственного средства, которая по меньшей мере в 10 раз выше в деплетированном образце по сравнению с недеплетированным образцом. В еще одних вариантах осуществления способа захвата мишени способ положительно идентифицирует NAb в образцах, взятых от субъекта, через по меньшей мере 29 дней или через по меньшей мере 85 дней после введения белкового лекарственного средства.

В другом варианте осуществления представлен способ идентификации основного белкового лекарственного средства, включая стадии введения одного или более кандидатов в белковые лекарственные средства одному или более субъектам, осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, на одном или более образцах, полученных от одного или более субъектов, и выбора кандидата в белковые лекарственные средства, которые практически не приводят к образованию ADA, которые снижают эффективность лекарственного средства.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1A представлена иллюстрация иллюстративного варианта осуществления анализа захвата лекарственным средством конкурентным лигандом, демонстрирующая положительный и отрицательный анализы. На фиг. 1B представлена иллюстрация иллюстративного варианта осуществления анализа конкурентного захвата лиганда мишенью, демонстрирующая положительный и отрицательный анализы.

На фиг. 2A представлена гистограмма сигнала анализа (импульсы) для анализа NAb для лекарственного средства A в формате захвата лекарственного средства, при этом предпринимали попытку обогащения NAb с контролем (без гранул) и комплексом биотин-лекарственное средство (био-лекарственное средство), связанным с покрытыми стрептавидином гранулами (SA-гранулы). На фиг. 2B представлена гистограмма сигнала анализа (импульсы) для анализа NAb для лекарственного средства A в формате захвата лекарственного средства, при этом предпринимали попытку удаления лекарственного средства с помощью контроля (без гранул) и связанных с мишенью гранул. На фиг. 2C представлена гистограмма сигнала анализа (импульсы) для анализа NAb для лекарственного средства B в формате захвата мишени, при этом предпринимали попытку удаления лекарственного средства с помощью контроля, связанных с антиидиотипическим антителом гранул и связанных с мишенью гранул.

На фиг. 3A представлена гистограмма, изображающая сигнал анализа (импульсы) для анализа NAb для лекарственного средства A в формате захвата лекарственного средства, при этом предпринимали попытку удаления лекарственного средства с помощью (слева направо для каждой группы из трех) контроля (пустая полоса), комплекса мишень-гранулы с mAb к мишени (левая заштрихованная полоса) и связанных с мишенью гранул без mAb к мишени (правая заштрихованная полоса). На фиг. 3B представлена гистограмма, изображающая сигнал (импульсы) анализа для анализа NAb для лекарственного средства B в формате захвата мишени, при этом предпринимали попытки удаления лекарственного средства с помощью (слева направо для каждой группы из трех) контроля (пустая полоса), связанных с неблокирующими антиидиотипическими антителами гранулам (заштрихованная полоса слева) и связанных с мишенью гранул (заштрихованная полоса справа). На фиг. 3C представлен линейный график % ингибирования в анализе NAb для лекарственного средства B в формате захвата мишени с помощью блокирующего антитела (верхний график; заштрихованный кружок) и неблокирующих mAb (нижний график; заштрихованный кружок) (нг/мл).

На фиг. 4A представлен линейный график % ингибирования в зависимости от лекарственного средства (пг/мл) в анализе NAb для лекарственного средства B в формате захвата мишени с помощью контроля (верхняя кривая; незаштрихованный кружок) и деплетированных образцов лекарственного средства (нижняя кривая; заштрихованный кружок), демонстрирующий помеху со стороны лекарственного средства в NAb-отрицательном образце. На фиг. 4B представлен линейный график % ингибирования в зависимости от лекарственного средства (пг/мл) в анализе NAb для лекарственного

средства В в формате захвата мишени с помощью контроля (кривая с увеличивающимся наклоном; незаштрихованный кружок) и деплетированных образцов лекарственного средства (кривая с уменьшающимся наклоном; заштрихованный кружок), демонстрирующий переносимость лекарственного средства для NAb-положительного образца. На фиг. 4С представлен линейный график % ингибирования в зависимости от лекарственного средства (нг/мл) в анализе NAb для лекарственного средства А в формате захвата мишени с помощью лекарственного средства (нижняя кривая; незаштрихованный кружок) и деплетированных образцов лекарственного средства (верхняя кривая; заштрихованный кружок), демонстрирующий переносимость лекарственного средства для NAb-положительного образца. На фиг. 4D представлен линейный график относительных световых единиц (RLU) в зависимости от лекарственного средства А (мг/мл) в иммуноанализе для обнаружения лекарственного средства в образцах, содержащих указанную концентрацию лекарственного средства А для контроля (верхний график; незаштрихованный кружок) и после деплеции лекарственного средства (нижний график; заштрихованный кружок).

На фиг. 5А представлена диаграмма рассеяния процента ингибирования в зависимости от лекарственного средства (нг/мл) для ADA-положительных образцов для контроля. На фиг. 5В представлена диаграмма рассеяния процента ингибирования в зависимости от лекарственного средства (нг/мл) для ADA-положительных образцов после деплеции лекарственного средства.

На фиг. 6А представлена диаграмма рассеяния процента ингибирования в зависимости от временной точки (дни) для контроля (кружки) и деплетированного лекарственного средства (треугольники) для всех образцов на фиг. 5А. На фиг. 6В представлена диаграмма рассеяния процента ингибирования в зависимости от временной точки (дни) для контроля (кружки) и деплетированного лекарственного средства (треугольники), которое является NAb-отрицательным после деплеции лекарственного средства. На фиг. 6С представлена диаграмма рассеяния процента ингибирования в зависимости от временной точки (дни) для контроля (кружки) и деплетированного лекарственного средства (треугольники), которое является NAb-положительным после деплеции лекарственного средства.

На фиг. 7А представлена схема иллюстративного анализа захвата лекарственного средства. На фиг. 7В представлена схема иллюстративного анализа захвата мишени.

### **Подробное описание сущности изобретения**

#### **I. Определения**

Использование терминов в единственном числе в контексте описания настоящего изобретения (особенно в контексте формулы изобретения) подразумевает включение единственного и множественного числа, если в данном документе не указано иное или явно не противоречит контексту.

Предполагается, что перечисление диапазонов значений в данном документе будет использоваться только в виде сокращенного способа отдельного упоминания каждого отдельного значения, входящего в диапазон, если в данном документе не указано иное, и каждое отдельное значение включено в описание так, как если бы оно было отдельно упомянуто в данном документе.

Использование термина "приблизительно" предназначено для описания значений выше или ниже указанного значения в диапазоне примерно  $\pm 10\%$ ; в других вариантах осуществления значения могут находиться в диапазоне значений выше или ниже указанного значения в диапазоне примерно  $\pm 5\%$ ; в других вариантах осуществления значения могут находиться в диапазоне значений выше или ниже указанного значения в диапазоне примерно  $\pm 2\%$ ; в других вариантах осуществления значения могут находиться в диапазоне значений выше или ниже указанного значения в диапазоне примерно  $\pm 1\%$ . Предшествующие диапазоны предназначены для пояснения из контекста, и никаких дополнительных ограничений не предполагается. Все способы, описанные в данном документе, можно выполнять в любом подходящем порядке, если не указано иное или иным образом не находится в противоречии с контекстом. Применение любых и всех примеров или иллюстративного стиля (например, "такой как"), представленное в данном документе, предусматривает лишь более эффективное описание настоящего изобретения и не ограничивает объем настоящего изобретения, если не указано иное. Никакой стиль в настоящем описании не следует воспринимать как указывающий на какой-либо не заявленный элемент в качестве необходимого для целей практического осуществления настоящего изобретения.

"Белок" относится к молекуле, содержащей два или более аминокислотных остатка, соединенных друг с другом пептидной связью. Термин "белок" включает полипептиды и пептиды, а также может включать модификации, такие как гликозилирование, присоединение липидов, сульфатирование, гамма-карбоксихлирование остатков глутаминовой кислоты, алкилирование, гидроксильное и ADP-рибозилирование. Белки могут представлять научный или коммерческий интерес, включая лекарственные средства на основе белков, а белки включают, среди прочего, ферменты, лиганды, рецепторы, антитела и химерные или гибридные белки. Белки продуцируются различными типами рекомбинантных клеток с использованием хорошо известных способов культивирования клеток и обычно вводятся в клетку с помощью методик генной инженерии (например, таких как последовательность, кодирующая химерный белок, или кодон-оптимизированная последовательность,

лишенная интронов последовательность и т.д.), где он может находиться в виде эписомы или быть интегрирован в геном клетки.

Предполагается, что используемый в данном документе термин "антитело" обозначает молекулу иммуноглобулина, которая имеет сайт распознавания антигена "варибельной области". Предполагается, что термин "варибельная область" разграничивает такой домен иммуноглобулина от доменов, которые повсеместно являются общими для антител (таких как Fc-домен антител). Варибельная область содержит "гиперварибельную область", остатки которой отвечают за связывание с антигеном. Гиперварибельная область содержит аминокислотные остатки из "области, определяющей комплементарность" или "CDR" (т.е. обычно остатки в положениях примерно 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в варибельном домене легкой цепи и остатки в положениях примерно 27-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в варибельном домене тяжелой цепи; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)), и/или такие остатки из "гиперварибельной петли" (т.е. остатки в положениях 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в варибельном домене легкой цепи и 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в варибельном домене тяжелой цепи; Chothia and Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917). Остатки "каркасной области" или "FR" представляют собой такие остатки варибельного домена, которые отличаются от остатков гиперварибельной области, определенной в данном документе. Термин антитело включает моноклональные антитела, мультиспецифичные антитела, человеческие антитела, гуманизированные антитела, синтетические антитела, химерные антитела, камелизованные антитела (см., например, Muyldermans et al., 2001, *Trends Biochem. Sci.* 26:230; Nuttall et al., 2000, *Cur. Pharm. Biotech.* 1:253; Reichmann and Muyldermans, 1999, *J. Immunol. Meth.* 231:25; международные публикации №№ WO 94/04678 и WO 94/25591; патент США № 6005079), одноцепочечные Fv (scFv) (см., например, Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)), одноцепочечные антитела, связанные дисульфидными связями Fv (sdFv), интраантитела и антиидиотипические (антитела к Id) антитела (в том числе, например, антитела к Id и антитела к антителам к Id, раскрываемые в данном документе). В частности, такие антитела включают молекулы иммуноглобулинов любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса.

Используемый в данном документе термин "антигенсвязывающий фрагмент" антитела относится к одной или более частям антитела, которые содержат области, определяющие комплементарность ("CDR"), и необязательно каркасные остатки, которые включают сайт распознавания антигена "варибельной области", и проявляют способность иммуноспецифично связываться с антигеном. Такие фрагменты включают Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, одноцепочечный фрагмент (ScFv) и их мутантные формы, встречающиеся в природе варианты и слитые белки, включающие сайт распознавания антигена "варибельной области" антитела и гетерологический белок (например, токсин, сайт распознавания антигена для другого антигена, фермент, рецептор или лиганд рецептора и т.д.).

Термин "антитело к лекарственному средству", также обозначаемое "ADA", относится к антителу, которое препятствует активности лекарственного средства.

Термин "нейтрализующее антитело" или "NAb" относится к подгруппе антител к лекарственному средству, которые ингибируют связывание лекарственного средства с его мишенью, тем самым делая лекарственное средство частично или полностью биологически неактивным. Нейтрализующие антитела к лекарственному средству (NAb) имеют потенциально важные последствия как для эффективности, так и для безопасности биологического препарата.

Термины "индивидуум", "субъект" и "пациент" используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к млекопитающему, в том числе, но не ограничиваясь ими, человеку, грызунам, таким как мыши и крысы, и другим лабораторным животным.

## II. Улучшенные анализы конкурентного связывания лигандов

Предлагаются улучшенные анализы для обнаружения и необязательно количественной оценки антител к лекарственному средству (ADA) в образце. Раскрытые анализы включают формат анализа захвата лекарственного средства и формат анализа захвата мишени лекарственного средства. Идентификация ADA, продуцируемых в ответ на введение пациенту биологических препаратов, важна для удовлетворения нормативных требований, связанных с производством и продажей биологических препаратов, и для выявления потенциальных проблем с дозировкой, которые могут возникнуть в связи с продуцированием ADA в организме субъекта.

В некоторых вариантах осуществления способы обнаружения и/или количественной оценки ADA в образце основаны на удалении свободного лекарственного средства из образца. В одном варианте осуществления формата захвата лекарственного средства свободное лекарственное средство не вызывает ложно-положительных результатов, поскольку оно вымывается перед добавлением меченой мишени. В одном варианте осуществления формата захвата лекарственного средства помеха со стороны мишени сводится к минимуму с помощью конкурирующего реагента, блокирующего мишень, на стадии инкубации образца. В формате анализа захвата мишени использовался умеренно кислотный подход для сведения к минимуму помехи со стороны свободной мишени.

В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок.

Раскрываемые анализы решают проблему предшествующей терапии на основе стадий экстракции/очистки твердой фазы, которая может являться помехой для последующей процедуры анализа.

Это представляет особую проблему для анализов с помощью NAb конкурентного связывания лигандов (CLB) в связи с низкой концентрацией меченого лекарственного средства, применяемого в этих способах (Hu, J., et al., *J Immunol Methods*. 419: 1-8 (2015); Wu, B.W., et al., *Competitive Ligand-Binding Assays for the Detection of Neutralizing Antibodies*. In: *Detection and Quantification of Antibodies to Biopharmaceuticals: Practical and Applied Considerations*, Michael G. Tovey (Eds). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. (2011)). Проблему предшествующей терапии снижали в раскрываемых способах анализа за счет использования белков, специфичных для лекарственного средства, в процедуре деплеции лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления специфические для лекарственного средства белки были выбраны на том основании, что они не будут создавать помеху в последующем анализе NAb. В одном варианте осуществления используется связанная с гранулами мишень с добавлением реагента, блокирующего мишень, в анализе NAb. В другом варианте осуществления используются связанные с неблокирующим антителом к лекарственному средству гранулы. Переносимость лекарственных средств (DT) улучшалась по меньшей мере на более чем в 10 раз в обоих анализах NAb CLB после включения стадии деплеции лекарственного средства.

В дополнение к демонстрации улучшения DT с положительным контролем моноклональным антителом, описанным в Примерах, были также исследованы образцы клинического исследования ADA-положительного лекарственного средства А с терапевтическими уровнями более 500 нг/мл со стадией деплеции лекарственного средства и без нее. При исследовании на стадии деплеции лекарственного средства эти образцы демонстрировали заметное увеличение NAb-положительности, что указывает на то, что анализы со слабой DT могут занижать частоту встречаемости NAb. Таким образом, раскрываемые способы анализа также способствуют решению проблемы заниженной частоты встречаемости NAb с помощью обычных анализов.

#### А. Белковые лекарственные средства

В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство представляет собой белковое лекарственное средство. Белковые лекарственные средства, подходящие для раскрываемых анализов, включают, но не ограничиваясь ими, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты (также обозначаемые белковыми лекарственными средствами на основе антител). В некоторых вариантах осуществления белковое лекарственное средство на основе антитела может представлять собой моноклональное антитело, поликлональное антитело, биспецифическое антитело, триспецифическое антитело или их антигенсвязывающие фрагменты. Иллюстративные фрагменты антител включают, но не ограничиваясь ими, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, моноспецифический фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, биспецифический F(ab')<sub>2</sub>, триспецифический F(ab')<sub>2</sub>, моновалентное антитело, фрагмент scFv, диатело, биспецифическое диатело, триспецифическое диатело, scFv-Fc, минитело, IgNAR, v-NAR, hcIgG или vHh.

В некоторых вариантах осуществления белковый лекарственный препарат (белок, представляющий интерес) представляет собой антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело, моноклональное антитело, мультиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, диатело, триатело или тетратело, фрагмент Fab или фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, антитело IgD, антитело IgE, антитело IgM, антитело IgG, антитело IgG1, антитело IgG2, антитело IgG3 или антитело IgG4. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG1. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG2. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG4. В одном варианте осуществления антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG4. В одном варианте осуществления антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1. В одном варианте осуществления антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1/IgG4.

В некоторых вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из антитела к белку программируемой клеточной смерти 1 (например, антитела к PD1, как описано в публикации заявки на патент США № 9987500), антитела к лиганду белка программируемой клеточной смерти 1 (например, антитела к PD-L1, как описано в публикации заявки на патент США № 9938345), антитела к DLL4, антитела к ангиопоэтину 2 (например, антитела к ANG2, как описано в патенте США № 9402898), антитела к ангиопоэтинподобному белку 3 (например, антитела к AngPt13, как описано в патенте США № 9018356), антитела к рецептору тромбоцитарного фактора роста (например, антитела к PDGFR, как описано в патенте США № 9265827), антитела к Erb3, антитела к рецептору пролактина (например, антитела к PRLR, как описано в патенте США № 9302015), антитела к комплекменту 5 (например, антитела к C5, как описано в патенте США № 9795121), антитела к TNF, антитела к рецептору эпидермального фактора роста (например, антитела к EGFR, как описано в патенте США № 9132192 или антитела к EGFRvIII, как описано в патенте США № 9475875), антитела к пропротеиновой конвертазе

субтилизин/кексин 9 (например, антитела к PCSK9, как описано в патенте США № 8062640 или патенте США № 9540449), антитела к фактору роста и дифференцировки 8 (например, антитела к GDF8, также известного как антитело к миостатину, как описано в патентах США №№ 8871209 или 9260515), антитела к рецептору глюкагона (например, антитела к GCGR, как описано в патентах США № 9657099), антитела к VEGF, антитела к IL1R, антитела к рецептору интерлейкина 4 (например, антитела к IL4R, как описано в публикации заявки на патент США № US 2014/0271681A1 (в настоящее время прекратившей действие) или патентах США №№ 8735095 или 8945559), антитела к рецептору интерлейкина 6 (например, антитела к IL6R, как описано в патентах США №№ 7582298, 8043617 или 9173880), антитела к IL1, антитела к IL2, антитела к IL3, антитела к IL4, антитела к IL5, антитела к IL6, антитела к IL7, антитела к интерлейкину 33 (например, антитела к IL33, как описано в патентах США №№ 9453072 или 9637535), антитела к респираторно-синцитальному вирусу (например, антитела к RSV, как описано в патенте США № 9447173), антитела к кластеру дифференцировки 3 (например, антитела к CD3, как описано в патенте США № 9657102, публикации заявки на патент № US 20150266966A1 и заявке на патент США № 62/222605), антитела к кластеру дифференцировки 20 (например, антитела к CD20, как описано в патенте США № 9657102, публикации заявки № US 20150266966A1 и патенте США № 7879984), антитела к CD19, антитела к CD28, антитела к кластеру дифференцировки 48 (например, антитела к CD48, как описано в патенте США № 9228014), антитела к Fel d1 (например, как описано в патенте США № 9079948), антитела к вирусу ближневосточного респираторного синдрома (например, антитела к MERS, как описано в патенте США № 9718872), антитела к вирусу Эбола (например, как описано в патенте США № 9771414), антитела к вирусу Зика, антитела к гену активации лимфоцитов 3 (например, антитела к LAG3, или антитела к CD223), антитела к фактору роста нервов (например, антитела к NGF, как описано в публикации на патент США № US 2016/0017029 (в настоящее время прекратившей действие) и патентах США №№ 8309088 и 9353176) и антитела к активину А. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления биспецифическое антитело выбрано из группы, состоящей из биспецифического антитела к CD3/CD20 (как описано в патентах США № 9657102, публикации заявки № US 20150266966A1), биспецифического антитела к CD3/муцину 16 (например, биспецифического антитела к CD3/Muc16) и биспецифического антитела к CD3/простатическому специфическому мембранному антигену (например, биспецифического антитела к CD3/PSMA).

В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, выбран из группы, состоящей из абциксимаба, адалимумаба, адалимумаб-атто, адотрастуумаба, алемтуумаба, алирокумаба, атезолизумаба, авелумаба, базиликсимаба, белиумаба, бенрализумаба, бевацизумаба, безлтоксумаба, блинатумомаба, брентуксимаба, ведотина, бродалумаба, канакинумаба, капромаба, пендетида, цертолизумаба пегол, цемипламаба, цетуксимаба, деносумаба, динутуксимаба, дупилумаба, дурвалумаба, экулизумаба, элотуумаба, эмицизумаба-kxwh, эмтансинеалирокумаба, эвинакумаба, эволокумаба, фасинумаба, голимумаба, гуселкумаба, ибритумомаба тиуксетана, идаруцизумаба, инфликсимаба, инфликсимаба-абда, инфликсимаба-duyb, ипилимумаба, иксекизумаба, меполизумаба, нецитумаба, несвакумаба, ниволумаба, обилтоксаксимаба, обинутуумаба, окрелизумаба, офатумаба, оларатумаба, омализумаба, панитумолумаба, пембролизумаба, пертузумаба, рамуцирумаба, ранибизумаба, раксобакумаба, реслизумаба, ринукумаба, ритуксимаба, сарилумаба, секукинумаба, силтуксимаба, тоцилизумаба, трастуумаба, тревогрумаба, устекинумаба и ведолизумаба.

В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, представляет собой рекомбинантный белок, который содержит Fc-фрагмент и другой домен (например, Fc-слитый белок). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления Fc-слитый белок представляет собой рецепторный Fc-слитый белок, который содержит один или более доменов рецептора, связанного с Fc-фрагментом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления Fc-фрагмент содержит шарнирный участок, сопровождаемый CH2- и CH3-доменом IgG. В некоторых вариантах осуществления рецепторный Fc-слитый белок содержит две или более различающиеся цепи рецептора, которые связываются либо с одним лигандом, либо с несколькими лигандами. Например, Fc-слитый белок представляет собой белок TRAP, такой как, например, белок-ловушка для IL-1 (например, рилонцепт, который содержит связывающий лиганд RAcP участок IL-1, слитый с внеклеточным участком IL-1R1, слитым с Fc hIgG1; см. патент США № 6927004, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме), или белок-ловушка для VEGF (например, афлиберцепт, который содержит домен 2 Ig Flt1 рецептора VEGF, слитого с доменом 3 Ig Flk1 рецептора VEGF, слитого с Fc hIgG1; см. патенты США №№ 7087411 и 7279159). В других вариантах осуществления Fc-слитый белок представляет собой ScFv-Fc-слитый белок, который содержит один или более из антигенсвязывающих доменов, таких как варибельный фрагмент тяжелой цепи и варибельный фрагмент легкой цепи антитела, связанного с Fc-фрагментом.

#### В. Анализ захвата лекарственных средств

На фиг. 7А изображен типичный анализ захвата лекарственного средства. Анализ 100 начинается со стадии 101, на которой образец получают от субъекта до или после введения лекарственного средства или во время лечения лекарственным средством. В этом примере лекарственное средство представляет собой антитело. На стадии 101 представлен образец, содержащий лекарственное средство, связанное с

мишенью, свободные нейтрализующие антитела и нейтрализующие антитела, связанные с антигеном к белковому лекарственному средству. На стадии 102 образец подкисляют для отделения нейтрализующих антител от белкового лекарственного средства и необязательно для отделения мишени от белкового лекарственного средства.

Образец подкисляют до значения pH менее приблизительно 5,0, обычно от приблизительно 2,0 до приблизительно 4,0. В одном варианте осуществления образец подкисляют кислотой, например, уксусной кислотой. После подкисления образец затем инкубируют при нейтральном значении pH, обычно приблизительно 7,0, с мишенью, связанной с селективируемой меткой, как показано на стадии 103. Значение pH на стадии 103 может быть доведено до значения pH, которое позволяет меченой мишени связываться с лекарственным средством. В некоторых вариантах осуществления значение pH выбирается таким образом, чтобы NAb не связывали лекарственное средство, но меченая мишень могла связывать лекарственное средство.

В одном варианте осуществления выбираемая метка представляет собой магнитную метку, массовую метку или гранулы на основе агарозы/сефарозы. Магнитная метка может представлять собой парамагнитную метку или суперпарамагнитную метку. В некоторых вариантах осуществления магнитная метка представляет собой металлическую частицу, металлическую микрочастицу, металлическую наночастицу, металлическую гранулу, магнитный полимер, однородную сферическую гранулу из полистирола или суперпарамагнитную сферическую полимерную частицу.

Этот способ включает физическое удаление меченых комплексов мишень:белковое лекарственное средство с помощью воздействия на образец магнита или магнитного поля и выделения супернатанта, который не содержит меченых комплексов мишень:лекарственное средство, для получения деплетированного образца. Деплетированный образец представлен на стадии 104 и содержит нейтрализующие антитела, необязательно свободную мишень и необязательно свободную мишень, связанную с селективируемой меткой. На стадии 105 биотинилированное лекарственное средство и реагент, блокирующий мишень, например, антитело, которое связывает свободную мишень и мишень, меченную селективируемым маркером, добавляют к образцу для получения образца для анализа. На стадии 106 образец для анализа затем инкубируют на покрытой авидином или стрептавидином твердой подложке, например, покрытом авидином микротитровальном планшете. Планшет необязательно промывают для удаления комплексов, которые не связываются с покрытым авидином планшетом.

Меченую мишень затем добавляют к твердой подложке. Мишень обычно метят детектируемой меткой, включая флуорофор, хемилюминесцентный зонд, электрохемилюминесцентный зонд, квантовую точку, редкоземельный переходный металл, частицы металлического золота, частицы металлического серебра или их комбинацию. Примеры флуорофоров включают, но не ограничиваясь ими, красители Alexa Fluor, метки Atto, красители CF, флуоресцеиновые флуорофоры, флуоресцентный красный, флуоресцентный оранжевый, родамин и производные, а также белки Phycobilin. В одном варианте осуществления мишень метят рутением. Затем от сигнал микротитровального планшета детектируется и необязательно оценивается количественно. На стадии 107 показано, что сильный сигнал обнаруживается в отсутствие NAb. На стадии 108 показан ослабленный сигнал в присутствии NAb.

Следует понимать, что стадии инкубации способа могут сопровождаться одним или более стадиями промывки для удаления несвязанных реагентов.

В одном варианте осуществления представлен способ захвата лекарственного средства для обнаружения антител к лекарственному средству в образце, включая стадии инкубации образца в кислых условиях в течение определенного периода времени для получения подкисленного образца, а затем объединение подкисленного образца с pH-буферным раствором, содержащим мишень лекарственного средства. Мишень лекарственного средства связывается с лекарственным средством с образованием комплексов мишень:лекарственное средство. В одном варианте осуществления лекарственное средство представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок. В некоторых вариантах осуществления мишень лекарственного средства метят селективируемой меткой, например магнитными гранулами. В этом варианте осуществления способ включает применение эффекта магнетизма для удаления комплексов мишень:лекарственное средство для получения деплетированного образца. Деплетированный образец инкубируют с антителом, блокирующим мишень, или его антигенсвязывающим фрагментом и меченым лекарственным средством для получения образца для анализа. Реагент, блокирующий мишень, обычно представляет собой антитело, которое специфически связывает мишень и предупреждает или ингибирует связывание мишени с белковым лекарственным средством. Лекарственное средство метят материалом, который позволяет меченому лекарственному средству связываться с твердой подложкой. Иллюстративной меткой является биотин. Затем образец для анализа инкубируют на покрытой авидином твердой подложке. В некоторых вариантах осуществления твердую подложку промывают после инкубации с образцом для анализа для удаления несвязанных реагентов. Способ дополнительно включает добавление меченой мишени белкового лекарственного средства к твердой подложке. Мишень обычно метят детектируемой меткой, например рутением. Твердую подложку необязательно промывают для удаления несвязанной меченой мишени. Детектируемый сигнал от меченой мишени, связанной с биотинилированным лекарственным средством,

связанным с твердой подложкой, детектируется и необязательно оценивается количественно. Сниженное количество сигнала от твердой подложки по сравнению с контрольным образцом указывает на присутствие в образце антител к лекарственному средству. В некоторых вариантах осуществления антитела к лекарственному средству включают нейтрализующие антитела, которые специфически связываются с белковым лекарственным средством.

В некоторых вариантах осуществления белковое лекарственное средство представляет собой моноклональное антитело, биспецифическое антитело, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, моноспецифический фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, биспецифический F(ab')<sub>2</sub>, триспецифический F(ab')<sub>2</sub>, моновалентное антитело, фрагмент scFv, диатело, биспецифическое диатело, триспецифическое диатело, scFv-Fc, минитело, IgNAR, v-NAR, hcIgG или vhH.

#### С. Анализ захвата мишени

В другом варианте осуществления представлен анализ захвата мишени. На фиг. 7В представлен иллюстративный пример анализа захвата мишени. Анализ 200 начинается со стадии 201, на которой образец получают от субъекта до или после введения лекарственного средства или во время лечения лекарственным средством. В этом примере лекарственное средство представляет собой антитело. На стадии 201 представлен образец, содержащий лекарственное средство, связанное с мишенью, свободные нейтрализующие антитела, нейтрализующие антитела, связанные с лекарственным средством, и необязательно свободная мишень. В этом варианте осуществления образец подкисляют для отделения нейтрализующих антител от белкового лекарственного средства и для отделения мишени от белкового лекарственного средства, тем самым получая подкисленный образец, как представлено на стадии 202.

Подкисленный образец подкисляют до значения pH для того, чтобы способствовать диссоциации лекарственного средства с мишенью и лекарственного средства с NAb. В одном варианте осуществления значение pH снижается до менее чем приблизительно 5,0, обычно до приблизительно 2,0-4,0, даже более обычно до приблизительно 3,0-3,5. В некоторых вариантах осуществления образец подкисляют кислотой, например, уксусной кислотой. После подкисления образец затем инкубируют с неблокирующим антителом к лекарственному средству, связанным с селективируемой меткой, представленной на стадии 203, с эффективным количеством буфера, например, Tris-буфера, для повышения значения pH до значения pH, которое способствует связыванию неблокирующего антитела к лекарственному средству, связанного с селективируемой меткой, с лекарственным средством в образце. В одном варианте осуществления значение pH повышается от приблизительно 4,0 до приблизительно 5,5 или от 4,5 до 5,0. Неблокирующее антитело к лекарственному средству, связанное с селективируемой меткой, связывается с лекарственным средством в этих условиях, а мишень очень слабо связывается с лекарственным средством в этих условиях.

В одном варианте осуществления селективируемая метка представляет собой магнитную метку. Магнитная метка может представлять собой парамагнитную метку или суперпарамагнитную метку. В некоторых вариантах осуществления магнитная метка представляет собой металлическую частицу, металлическую микрочастицу, металлическую наночастицу, металлическую гранулу, магнитный полимер, однородную сферическую гранулу из полистирола или суперпарамагнитную сферическую полимерную частицу. Селективируемая метка может представлять собой массовые метки или гранулами агарозы/сефарозы, и для отделения комплексов, содержащих селективируемую метку, от образца можно использовать эффект гравитации или центрифугирование.

Этот вариант осуществления способа захвата мишени включает физическое удаление меченых комплексов лекарственное средство:антитело к лекарственному средству из образца с использованием селективируемого маркера. В одном варианте осуществления селективируемый маркер представляет собой магнитную метку, и комплексы лекарственное средство:антитело к лекарственному средству физически удаляют путем воздействия на образец магнита или магнитного поля и выделения супернатанта, не содержащего комплексы белковое лекарственное средство:антитело к белковому лекарственному средству, для получения деплетированного образца, содержащего нейтрализующие антитела, как представлено на стадии 204.

На стадии 205 меченое лекарственное средство добавляют к образцу в условиях нейтрального значения pH для получения образца для анализа. В некоторых вариантах осуществления значение pH деплетированного образца повышается до значения pH приблизительно 7,0 путем добавления основания или буфера, например основного Tris-буфера. Буфер и меченое лекарственное средство можно добавлять одновременно или последовательно. Меченое лекарственное средство можно метить детективируемой меткой, включая, но без ограничения ими, флуорофор, хемилюминесцентный зонд, электрохемилюминесцентный зонд, квантовую точку, радиоизотоп, редкоземельный переходный металл, частицы металлического золота, частицы металлического серебра или их комбинацию. Примеры флуорофоров включают, но не ограничиваясь ими, красители Alexa Fluor, метки Atto, красители CF, флуоресцеиновые флуорофоры, флуоресцентный красный, флуоресцентный оранжевый, родамин и производные, а также белки Phycobilin. В одном варианте осуществления метка представляет собой рутений.

Образец для анализа, имеющий значение рН приблизительно 7,0, инкубируют на покрытой мишенью твердой подложке. В одном варианте осуществления твердая подложка покрыта авидином или стрептавидином. Биотинилированная мишень связывается с покрытым авидином или стрептавидином планшетом. Образец для анализа инкубируют на твердой подложке для обеспечения связывания образца с планшетом. Планшет необязательно промывают для удаления несвязанных реагентов, а оставшийся сигнал обнаруживают и необязательно оценивают количественно. На стадии 206 представлено связывание меченого лекарственного средства с мишенью, связанной с твердой подложкой и генерирующей сильный сигнал. На стадии 207 представлено, как меченое лекарственное средство связывается с помощью NAb, препятствуя связыванию меченого лекарственного средства с твердой подложкой, что приводит к снижению сигнала. Сниженный сигнал коррелирует с присутствием NAb в необработанном образце.

В еще одном варианте осуществления представлен способ захвата мишени для обнаружения антител к лекарственному средству, связанных с лекарственным средством в образце, который включает стадии инкубации образца в кислых условиях в течение периода времени для получения подкисленного образца, например, при значении рН от 2,0 до 4,0. Затем подкисленный образец объединяют с рН-буферным раствором, содержащим меченые антитела к лекарственному средству, специфичные для белкового лекарственного средства, для получения комплексов антитело:белковое лекарственное средство и повышения значения рН до приблизительно 4,0-5,5, обычно до 4,5-5,0. В некоторых вариантах осуществления неблокирующее антиидиотипическое mAb метят селективируемой меткой. Меченое антитело к лекарственному средству может представлять собой неблокирующее антиидиотипическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Способ захвата мишени включает физическое удаление комплексов антитело:белковое лекарственное средство из образца с помощью селективируемой метки для получения деплетированного образца. Обычно селективируемая метка представляет собой магнитную метку, используемую для удаления комплексов лекарственное средство:антитело к лекарственному средству с помощью магнита. Способ захвата мишени включает инкубацию деплетированного образца с меченым лекарственным средством при значении рН приблизительно 7,0 для получения образца для анализа. Меченое лекарственное средство обычно имеет детектируемую метку. Детектируемая метка в способе захвата мишени может представлять собой флуорофор, хемилюминесцентный зонд, электрохемилюминесцентный зонд, квантовую точку, редкоземельный переходный металл, радиоизотоп, частицы золота, частицы серебра или их комбинацию. Способ захвата мишени включает инкубацию образца для анализа на покрытой мишенью твердой подложке, при этом меченое лекарственное средство специфически связывает покрытую мишенью твердую подложку. Способ захвата мишени необязательно включает промывание твердой подложки после инкубации с образцом для анализа для удаления несвязанных меченых реагентов. Способ захвата мишени также включает стадию измерения детектируемого сигнала от меченого лекарственного средства, связанного с покрытой мишенью твердой подложкой, при этом сниженное количество сигнала по сравнению с контрольным образцом указывает на присутствие антител к лекарственному средству в образце.

В некоторых вариантах осуществления способа захвата мишени антитела к лекарственному средству включают нейтрализующие антитела, которые специфически связываются с белковым лекарственным средством. Лекарственное средство может представлять собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело, биспецифическое антитело, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, моноспецифический фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, биспецифический F(ab')<sub>2</sub>, триспецифический F(ab')<sub>2</sub>, моновалентное антитело, фрагмент scFv, диатело, биспецифическое диатело, триспецифическое диатело, scFv-Fc, минитело, IgNAR, v-NAR, hcIgG или vhH.

В некоторых вариантах осуществления способа захвата мишени белковое лекарственное средство метят рутением.

Некоторые варианты осуществления анализа захвата мишени характеризуются переносимостью лекарственного средства, которая по меньшей мере в 10 раз выше в деплетированном образце по сравнению с недеплетированным образцом. В еще одних вариантах осуществления способа захвата мишени способ положительно идентифицирует NAb в образцах, взятых от субъекта, через по меньшей мере 29 дней после введения белкового лекарственного средства.

#### Примеры

Пример 1. Анализы конкурентного связывания лигандов NAb: форматы и переносимость лекарственного средства

#### Материалы и способы

#### Материалы и реагенты

Все растворы, если не указано иное, готовили в буфере для анализа (1% BSA в IX PBS). Буфер для считывания T (4X) получали от Meso Scale Discovery (MSD, Гейтерсбург, Мэриленд). Ледяную уксусную кислоту (17,4 М) получали от Thermo Fisher Scientific (Уолтем, Массачусетс). Сыворотку крови человека и обезьяны получали от BioIVT (Вестбери, Нью-Йорк). Лекарственные средства на основе полностью

человеческих моноклональных антител, полностью человеческое конкурирующее антитело к мишени А, рекомбинантные человеческие мишени, моноклональные нейтрализующие антитела к лекарственному средству, используемые в качестве положительных контролей, и моноклональные антитела к человеческим антителам получали с участием Regeneron (Тэrrитаун, Нью-Йорк). Мечение антител и мишеней биотином с помощью EZ-link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Fisher Scientific) и сложного эфира рутения NHS (MSD) выполняли в соответствии с инструкциями производителя. Набор для связывания антител DyNAbeads™ получали от Thermo Fisher Scientific. Белковые реагенты, специфичные для лекарственного средства, связывали с магнитными гранулами DyNAbeads® в соответствии с инструкциями производителя (30 мкг белка/1 мг гранул). 96-луночные планшеты Multi-array® High Bind Avidin получали от MSD. Основание Trizma (1,5 М) получали от Sigma (Сент-Луис, Миссури). Раствор для промывки получали от KPL Inc.

#### **Оборудование**

Устройство для промывки микропланшетов (ELx405) получали от BioTek Instruments (Уинусики, Вермонт), а шейкер для микропланшетов от VWR (Раднор, Пенсильвания). Считывающее устройство QuickPlex SQ 120 получали от MSD, а приложение SoftMax® Pro получали от Molecular Devices (Саннивейл, Калифорния).

#### **Процедура деплеции связанного с магнитными гранулами лекарственного средства**

Образцы разбавляли 1:5 в 300 мМ уксусной кислоте и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре (КТ). 30 мг связанных с лекарственным средством белков DyNAbeads® ресуспендировали в 500 мМ раствора Tris (достаточном для одного планшета образцов/QC, -0,6 мг гранул/образец).

Подкисленные образцы затем разбавляли 1:2 (общее конечное разведение 1:20) в 1% BSA, 500 мМ раствора Tris, содержащем связанные с белком DyNAbeads® (1 ч, 700 об./мин). Образцы помещали напротив магнита, гранулы оставляли собираться на стенках пробирки/лунки, а супернатант переносили в отдельную пробирку/планшет.

#### **Процедура конкурентного анализа связывания лигандов NAb**

Объединенную человеческую сыворотку использовали в качестве отрицательного контроля (NC). Планшеты для микротитрования промывали и блокировали 5% BSA в течение 1 ч при КТ. Анализ комплекса REGN-лекарственное средство А настраивали в формате захвата лекарственного средства, анализ комплекса REGN-лекарственное средство В настраивали в формате захвата мишени (фиг. 1) (Wu, B.W., et al., GG, Shankar G: Competitive Ligand-Binding Assays for the Detection of Neutralizing Antibodies. In: Detection and Quantification of Antibodies to Biopharmaceuticals: Practical and Applied Considerations, M. G. Tovey (Ed). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. (2011)). В обеих конфигурациях меченое лекарственное средство (биотин или рутений) инкубировали с образцом сыворотки крови (с деплецией лекарственного средства или без нее) в растворе перед добавлением в покрытый авидином планшет для анализа. В формате захвата лекарственного средства меченую рутением мишень добавляли на следующей стадии, тогда как в формате захвата мишени биотинилированную мишень сначала предварительно связывали с покрытым стрептавидином микропланшетом.

#### **Формат захвата лекарственного средства**

Образцы и контрольные образцы (с деплецией лекарственного средства или без нее) инкубировали с 10 нг/мл аналитического буферного раствора Bio-REGN-A, содержащего 50 пг/мл антитела, блокирующего мишень, в планшете для образцов в течение 90 мин при КТ при встряхивании (400 об./мин). Затем планшеты для анализа промывали и добавляли подкисленные/нейтрализованные образцы и QC (50 мкл, 2 ч КТ). Меченую рутением рекомбинантную мишень добавляли в планшет для анализа в концентрации 2 пг/мл в аналитическом буфере в течение 1 ч при КТ при встряхивании (50 мкл, 400 об./мин).

#### **Формат захвата мишени**

Биотинилированную рекомбинантную мишень добавляли в планшет для анализа в концентрации 2 пг/мл в аналитическом буфере в течение 1 ч при КТ при встряхивании (50 мкл, 400 об./мин) и промывали. Образцы и QC (с деплецией лекарственного средства или без нее) инкубировали с лекарственным средством, меченным рутением, в концентрации 20 нг/мл в буфере для анализа в течение 2 ч при КТ при встряхивании (50 мкл, 400 об./мин). Затем раствор добавляли в планшет для анализа (50 мкл, 400 об./мин).

В обоих форматах после последней инкубации планшеты промывали и инкубировали с 150 мкл буфера для считывания 2X в течение 0-10 мин и считывали на считывающем устройстве QuickPlex SQ 120. Значения импульсов импортировали в программное обеспечение SoftMax® Pro и границу разделения, специфическую для планшета, рассчитывали на основе сигнала отрицательного контроля.

#### **Расчеты переносимости лекарственного средства и определение границы разделения**

Значения переносимости лекарственного средства (DT) и помехи со стороны лекарственного средства рассчитывали в SoftMax Pro с использованием регрессионной модели 4PL. Границы разделения определяли с помощью статистического анализа данных из образцов сыворотки крови больных, не подвергавшихся воздействию лекарственного средства, от больных индивидуумов, исследуемых в

анализе NAb. Статистические способы, применяемые для анализа, были основаны на отраслевых практиках (Shankar, G., et al., *J Pharm Biomed Anal*, 48(5): 1267-1281 (2008); Gupta, S., et al., *J Immunol Methods*, 321(1-2):1-18 (2007)).

#### **ELISA концентрации лекарственного средства А**

В образцы сыворотки крови обезьян добавляли лекарственное средство А в указанной концентрации, а затем подвергали процедуре деплеции лекарственного средства или, в качестве контроля, тем же стадиям обработки, но без добавления связанных с мишенью гранул. Затем полученные супернатанты образцов сыворотки крови подкисляли (300 мМ уксусной кислоты) и нейтрализовали перед добавлением в микропланшет, покрытый mAb, специфическими к Ig человека, каппа легкой цепи. Уровни лекарственного средства А определяли с помощью биотинилированного mAb, специфического к Fc человека, и сигнала анализа, генерируемого NeutrAvidin-HRP.

#### **Результаты**

Анализы NAb CLB для двух разных лекарственных средств mAb разрабатывали и оптимизировали для ряда различных параметров, включая формат, чувствительность и DT. Для лекарственного средства А разрабатывали способ захвата лекарственного средства, а для лекарственного средства В разрабатывали способ захвата мишени (фиг. 1А-1В).

Формат анализа NAb CLB с захватом лекарственного средства обычно является предпочтительным, поскольку свободное лекарственное средство не будет генерировать ложно-положительный ответ в отсутствие NAb, а помеха со стороны мишени может быть сведена к минимуму с помощью добавления белка, связывающего мишень. Однако рекомбинантная мишень для лекарственного средства В, меченная рутением, прикреплялась к планшету даже в отсутствие комплекса биотин-лекарственное средство, поэтому выбирали формат захвата мишени. В обоих форматах в отсутствие NAb меченое лекарственное средство связывается с меченой мишенью, генерируя сигнал в анализе. В присутствии NAb связывание меченой мишени с меченым лекарственным средством ингибируется, что приводит к снижению сигнала анализа. Таким образом, сигнал анализа обратно пропорционален количеству NAb в образце (Wu, B.W., et al., *Competitive Ligand-Binding Assays for the Detection of Neutralizing Antibodies*. In: *Detection and Quantification of Antibodies to Biopharmaceuticals: Practical and Applied Considerations*, Michael G. Tovey (Eds). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. (2011)).

В обоих форматах анализа NAb присутствие свободного лекарственного средства в образце может конкурировать с меченым лекарственным средством за связывание с NAb, а в формате захвата мишени также генерировать ложно-положительный ответ в отсутствие NAb. По этим причинам DT представляла собой критическую переменную, требующую оптимизации. Анализ для программ обеих лекарственных средств включали стадию кислотной диссоциации для улучшения DT. Однако DT для каждого способа все еще была существенно ниже минимальных концентраций лекарственного средства у пациентов (не показано). В одном варианте осуществления DT для каждого способа составляла до 20 раз ниже минимальных концентраций лекарственного средства. Таким образом, способы экстракции/очистки твердой фазы оценивали для дальнейшего улучшения анализа DT.

Образцы для клинического исследования лекарственного средства А отбирали только на основании ADA-положительности и концентрации лекарственного средства, без учета временной точки отбора образца. В образцах, сгруппированных по временным точкам отбора образца, NAb-положительность была временной по своей природе, при этом 72% NAb-положительных образцов появлялись через 85 дней или позже после исходного введения. В отличие от этого, 85% NAb-отрицательных образцов наблюдали во временные точки менее чем через 30 дней после исходного введения. Без добавления стадии деплеции лекарственного средства это наблюдение было бы невозможно в образцах, содержащих лекарственное средство. Это согласуется с выводами о том, что ответы ADA на биологические препараты и факторы замещения созревают в течение курса лечения, при этом ответы NAb имеют более высокую долю IgG4, чем обнаруживается в нормальной сыворотке крови, а ответ IgG4 возникает в более поздние временные точки (Van Schouwenburg, P.A., et al., *J Clinical Immunol*, 32(5):1000-1006 (2012); Montalva, S.A., et al., *Official J World Federation Hemophilia*, 21(5):686-692 (2015); Hofbauer, C.J., et al., *Blood*, 125(7): 1180-1188 (2015); Barger, T.E., et al., *European Renal Assoc*, 27(2):688-693 (2012)).

Пример II. Эффект предшествующей терапии связанного с гранулами белка по отношению к стадии анализа NAb

#### **Материалы и способы**

См. Пример I.

#### **Результаты**

В исходных экспериментах использовали комплекс биотин-лекарственное средство, связанное с гранулой стрептавидина, для экстракции ADA (и NAb) из образца. Однако в анализах NAb CLB для достижения максимальной чувствительности необходимы низкие концентрации меченого лекарственного средства (Hu, J. et al., *J Immunol Methods*, 419: 1-8 (2015); Wu, B.W., et al., *Competitive Ligand-Binding Assays for the Detection of Neutralizing Antibodies*. In: *Detection and Quantification of Antibodies to Biopharmaceuticals: Practical and Applied Considerations*, Michael G. Tovey (Eds). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. (2011)). Таким образом, любой комплекс биотин-лекарственное средство,

перенесенный со стадии обогащения на стадию анализа, мог создавать помеху. Данные на фиг. 2А демонстрируют, что биотинилированное лекарственное средство, используемое на стадии обогащения NAb, переносят на стадию анализа NAb, что приводит к ~5-кратному увеличению сигнала анализа. Фактически, даже в отсутствие добавленного комплекса биотин-лекарственное средство в анализе NAb, переноса комплекса биотин-лекарственное средство со стадии обогащения было достаточно для генерации значительного сигнала анализа (не показано).

В качестве альтернативы удалению NAb из образца также исследовали способ подход на основе удаления лекарственного средства. Однако, как и в случае с подходом обогащения комплекса биотин-лекарственное средство NAb, влияние предшествующей терапии со стороны белка, используемого для захвата лекарственного средства, также могло потенциально создавать помеху на стадии анализа NAb. Данные на фиг. 2В и 2С демонстрируют, что при применении либо мишени, либо блокирующего антиидиотипического антитела для захвата лекарственного средства эти белки переносятся и подавляют сигнал в последующем анализе NAb.

Пример III. Сведение к минимуму помехи со стороны белка при захвате лекарственного средства

#### **Материалы и способы**

См. пример I.

#### **Результаты**

Попытки уменьшить количество связанного белка или увеличить количество стадий промывки не смогли в достаточной степени свести к минимуму влияние этих белков после того, как их переносили в анализ NAb. Для уменьшения помехи в результате переноса для каждого из анализов NAb разрабатывали другой подход.

При использовании мишени в качестве реагента захвата на стадии удаления лекарственного средства, белок переносился и подавлял сигнал анализа NAb (фиг. 2В, 2С и 3А). Однако в формате анализа захвата лекарственного средства добавление антитела к мишени решает проблему, возникающую в результате предшествующей терапии белком. В присутствии mAb к мишени положительный и отрицательный контрольные образцы подвергали стадии удаления лекарственного средства с помощью связанных с мишенью гранул, генерирующих сигнал анализа, почти идентичный контрольным образцам без стадии удаления лекарственного средства (фиг. 3А).

В формате анализа NAb захвата мишени добавление реагента к мишени было невозможно, поскольку он мог связываться с реагентом захвата и ингибировать сигнал анализа. Несмотря на то, что было показано, что антиидиотипическое антитело, блокирующее мишень, создает помеху для анализа (фиг. 2С), возможно, что можно использовать неблокирующее лекарственное антитело к mAb. Следовательно, неблокирующее антиидиотипическое антитело (фиг. 3С) было связано с гранулами для захвата лекарственного средства. В этом формате анализа положительные и отрицательные контрольные образцы, подвергнутые стадии удаления лекарственного средства, имели сигнал анализа, аналогичный контрольным образцам без стадии удаления лекарственного средства (фиг. 3В).

Пример IV. Деpletion лекарственного средства магнитными гранулами

#### **Материалы и способы**

См. пример I.

#### **Результаты**

Снижение помехи со стороны белка, перенесенного со стадии гранулы, было ключевым критерием при выборе конкретного реагента для удаления лекарственного средства. Для проверки эффективности удаления лекарственного средства с помощью белка, связанного с гранулами, проводили две серии экспериментов; помехи лекарственного средства в NAb-отрицательном образце и DT в NAb-положительном образце. Для исследования влияния помехи со стороны лекарственного средства в анализе захвата мишени для лекарственного средства В, лекарственное средство добавляли в NAb-отрицательный образец и исследовали в анализе со стадией depletion лекарственного средства и без нее. Добавление стадии удаления лекарственного средства с гранулами, связанными с антиидиотипическим mAb, увеличивало концентрацию лекарственного средства, необходимую для создания ложноположительного ответа, почти в 50 раз по сравнению с контролем (от 2 до 93 пг/мл, фиг. 4А).

Для исследования DT в образцы, содержащие мышинные моноклональные положительные контрольные антитела (250 нг/мл), добавляли возрастающие концентрации лекарственного средства и исследовали в обоих анализах со стадией depletion лекарственного средства и без нее. В формате анализа захвата мишени для лекарственного средства В добавление стадии удаления лекарственного средства с использованием гранул, связанных с антиидиотипическим mAb, приводило к 10-кратному увеличению DT по сравнению с контролем (от 153 нг/мл до 1,55 пг/мл, фиг. 4В). В формате захвата лекарственного средства для лекарственного средства А с добавлением стадии удаления лекарственного средства с использованием связанных с мишенью гранул имело место 20-кратное увеличение DT по сравнению с контролем (от 0,5 до 9,7 пг/мл, фиг. 4С). Эти эксперименты продемонстрировали, что в обоих анализах DT была существенно улучшена за счет включения стадии depletion лекарственного средства.

Для примерного определения того, сколько лекарственного средства удаляли на стадии деплеции лекарственного средства, в образцы сыворотки крови обезьяны добавляли лекарственное средство А и подвергали процедуре деплеции лекарственного средства. Затем образцы анализировали с помощью сэндвич-иммуноанализа с использованием моноклональных антител к антителам человека в качестве реагентов для захвата и обнаружения. В качестве контроля дублированные образцы с добавлением лекарственного средства А подвергали тем же стадиям обработки, включающим подкисление и нейтрализацию, но без добавления связанных с мишенью гранул. Как представлено на фиг. 4D, образцы с деплетированным лекарственным средством А, имели очень слабый сигнал анализа по сравнению с контрольными образцами. Для количественной оценки количества удаленного терапевтического средства концентрации лекарственного средства А в деплетированных образцах интерполировали по кривой регрессии, построенной на основе контрольных образцов. Этот анализ продемонстрировал, что примерно 99% лекарственного средства удаляли на стадии деплеции (например, 12,5 пг/мл лекарственного средства, добавленного в образец, 120 нг/мл, определяемого после деплеции). Аналогичные уровни деплеции также получали с помощью процедуры деплеции лекарственного средства В (не показано).

Пример V. Анализ NAb ADA-положительных клинических образцов с деплецией лекарственного средства или без нее

#### Материалы и способы

Данные демонстрируют, что стадия предварительной обработки, включающая деплецию лекарственного средства, улучшила DT на основе мышинных моноклональных антител к лекарственному средству, используемых в качестве положительного контроля. Для подтверждения этого вывода с помощью человеческих антител к лекарственному средству, 25 образцов на основе клинических испытаний с лекарственным средством А (многократные дозы) выбирали для исследования в анализе NAb с захватом лекарственного средства со стадией деплеции лекарственного средства и без нее.

#### Результаты

Все образцы были ADA-положительными, и во всех обнаруживали уровни лекарственного средства от 500 до 15000 нг/мл. Терапевтические концентрации во всех этих образцах были больше, чем DT по способу без стадии деплеции лекарственного средства. Реакция ADA на лекарственное средство А была в целом довольно низкой (не показано), и только ADA-положительные образцы, в которых обнаруживали лекарственное средство, имели ответ с низким титром (либо минимальное разведение, либо на одно разведение выше).

Из 25 образцов, исследованных без стадии деплеции лекарственного средства, только два были NAb-положительными с % ингибирования, превышающим границу разделения (фиг. 5A). В отличие от этого, после предварительной стадии экстракции гранул двенадцать образцов были NAb-положительными (фиг. 5B). В отобранных ADA-отрицательных образцах исходного уровня наблюдали лишь очень незначительные изменения в % ингибирования со стадией удаления гранул лекарственного средства или без нее (не показано). Среднее изменение % ингибирования, когда образцы анализировали со стадией деплеции лекарственного средства или без нее, составляло +24% для NAb-положительных образцов (фиг. 5B). В отличие от этого не было существенного изменения % ингибирования для образцов, которые были NAb-отрицательными, при исследовании со стадией истощения лекарственного средства или без нее (-2,7%, фиг. 5B). Это отчетливо указывало на то, что удаление лекарственного средства влияло на результат NAb только для подгруппы образцов. Важно отметить, что с включением стадии деплеции лекарственного средства NAb обнаруживали, когда концентрации лекарственного средства в образцах составляли до 10 пг/мл, что выше, чем минимальные уровни лекарственного средства в исследовании.

Из 25 ADA-положительных образцов, NAb-положительные образцы встречаются преимущественно в более поздние временные точки (фиг. 6A-6C). Из 13 NAb-отрицательных образцов 11 (85%) идентифицировали в двух самых ранних исследуемых временных точках, в день 15 и 29 после исходного введения. В отличие от этого, ни один из NAb-положительных образцов не идентифицировали в день 15, самую раннюю исследуемую временную точку, и только 3 из 11 NAb-положительных образцов идентифицировали в следующую исследуемую временную точку, день 29. Восемь из 11 NAb-положительных ответов (72%) происходили во временные точки позже дня 85.

Несмотря на то, что в вышеприведенном описании настоящее изобретение было описано в отношении некоторых его вариантов осуществления, и многие детали были представлены с целью иллюстрации, для специалистов в данной области техники будет очевидно, что настоящее изобретение допускает дополнительные варианты осуществления и что некоторые детали, описанные в данном документе, могут быть значительно изменены без отступления от основных принципов настоящего изобретения.

Все ссылки, цитируемые в данном документе, включены посредством ссылки в полном объеме. Настоящее изобретение может быть воплощено в других конкретных формах, без отклонения от его сущности или существенных характеристик, и, соответственно, следует делать ссылку на прилагаемую формулу изобретения, а не на предшествующее описание, как указание объема настоящего изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ обнаружения антител к белковому лекарственному средству в образце, включающий инкубацию образца в кислых условиях в течение определенного периода времени для образования подкисленного образца;

объединение подкисленного образца с рН-буферным раствором, содержащим мишень лекарственного средства, для получения комплексов мишень:лекарственное средство, при этом мишень лекарственного средства метят селективируемой меткой;

удаление комплексов мишень:лекарственное средство из образца с помощью селективируемой метки для получения деплетированного образца;

инкубацию деплетированного образца с реагентом, блокирующим мишень, или его антигенсвязывающим фрагментом и биотинилированным лекарственным средством для получения образца для анализа;

инкубацию образца для анализа на покрытой авидином твердой подложке;

добавление указанной меченой мишени лекарственного средства к твердой подложке и

измерение детектируемого сигнала от меченой мишени, связанной с биотинилированным лекарственным средством, связанным с твердой подложкой, при этом сниженное количество сигнала от твердой подложки по сравнению с контрольным образцом указывает на присутствие антител к лекарственному средству в образце.

2. Способ по п.1, где указанные антитела к лекарственному средству содержат нейтрализующие антитела, которые специфически связываются с лекарственным средством.

3. Способ по п.1 или 2, где указанное лекарственное средство представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или слитый белок.

4. Способ по п.3, где указанное антитело представляет собой моноклональное антитело, биспецифическое антитело, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, моноспецифический фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, биспецифический F(ab')<sub>2</sub>, триспецифический F(ab')<sub>2</sub>, моновалентное антитело, фрагмент scFv, диатело, биспецифическое диатело, триспецифическое диатело, scFv-Fc, мини-тело, IgNAR, v-NAR, hIgG или vH.

5. Способ по п.1, где кислые условия включают значение рН от приблизительно 2,0 до приблизительно 4,0.

6. Способ по п.1, где кислые условия включают значение рН от приблизительно 1 до 3.

7. Способ по п.1, где указанная селективируемая метка содержит магнитную метку.

8. Способ по п.7, где указанная магнитная метка представляет собой парамагнитную метку или суперпарамагнитную метку.

9. Способ по п.7 или 8, где указанная магнитная метка представляет собой металлическую частицу, металлическую микрочастицу, металлическую наночастицу, металлическую гранулу, магнитный полимер, однородную сферическую гранулу из полистирола или суперпарамагнитную сферическую полимерную частицу.

10. Способ по п.1, где указанный антигенсвязывающий фрагмент реагента, блокирующего мишень, специфически связывается с мишенью белкового лекарственного средства.

11. Способ по п.1, где переносимость лекарственного средства по данному способу по меньшей мере в 10 раз выше в деплетированном образце по сравнению с недеплетированным образцом.

12. Способ по п.1, где указанный способ положительно идентифицирует нейтрализующие антитела (NAb) в образцах, содержащих лекарственное средство, взятых от субъекта, через по меньшей мере 29 дней после введения белкового лекарственного средства.

13. Способ по п.1, где образец встряхивают во время стадий инкубации или промывки.

14. Способ по п.1, где указанную меченую мишень обычно метят флуорофором, хемилюминесцентным зондом, электрохемилюминесцентным зондом, квантовой точкой, редкоземельным переходным металлом, частицами металлического золота, частицами металлического серебра или их комбинацией.

15. Способ по п.14, где указанная метка содержит рутений.

16. Способ по п.1, дополнительно включающий промывание твердой подложки после инкубации с образцом для анализа.

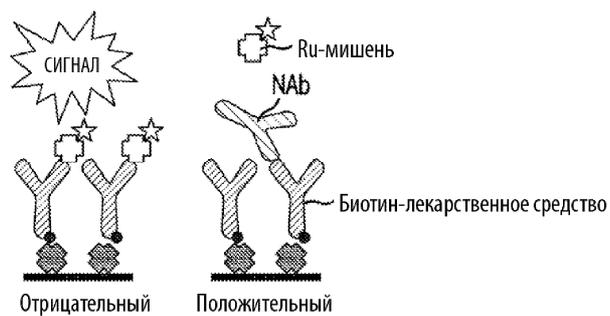
17. Способ по п.1, дополнительно включающий промывание твердой подложки для удаления несвязанной меченой мишени.

18. Способ идентификации основного белкового лекарственного средства, включающий

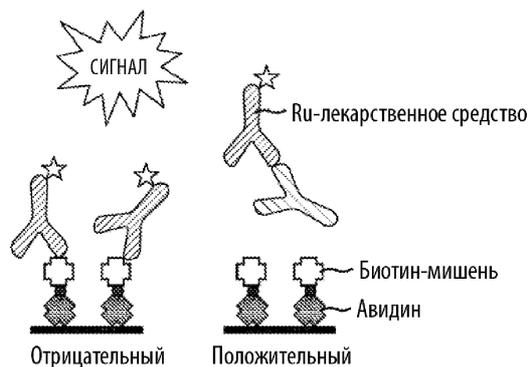
введение субъекту одного или более кандидатов в лекарственные средства;

осуществление способа по п.1 в отношении образца, полученного от субъекта; и

выбор, на основании положительности антител к лекарственному средству (ADA) и концентрации лекарственного средства в отношении детектируемого сигнала от меченой мишени, связанной с биотинилированным лекарственным средством, связанным с твердой подложкой, кандидата в белковые лекарственные средства, который приводит к более высокой доле обнаруживаемого сигнала от твердой подложки по сравнению с контрольным образцом, что, таким образом, указывает на более низкое присутствие ADA.



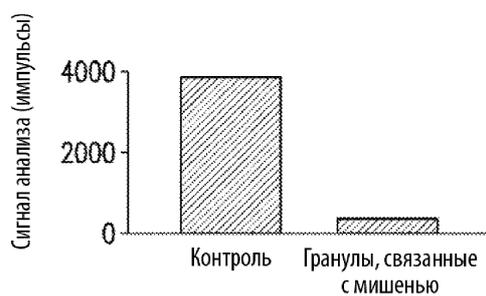
Фиг. 1А



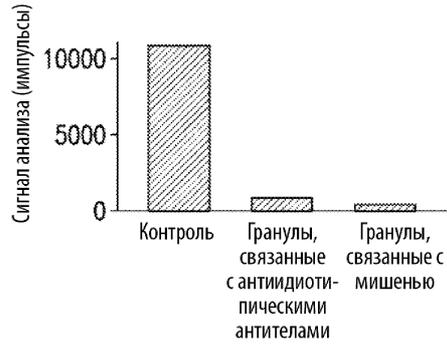
Фиг. 1В



Фиг. 2А



Фиг. 2В



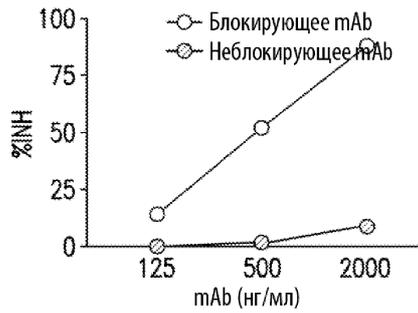
Фиг. 2С



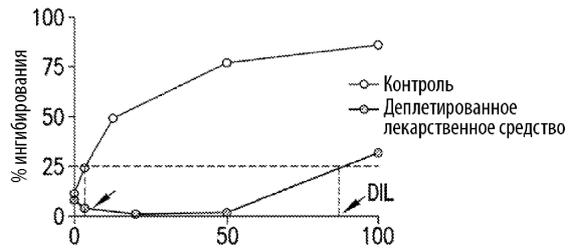
Фиг. 3А



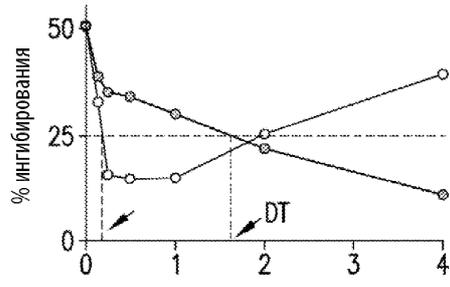
Фиг. 3В



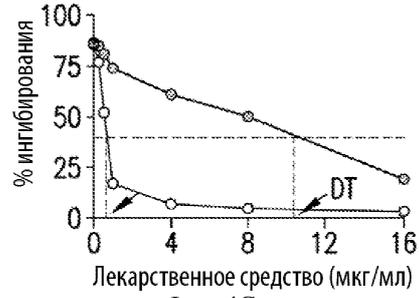
Фиг. 3С



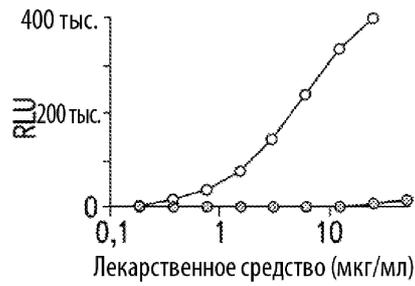
Фиг. 4А



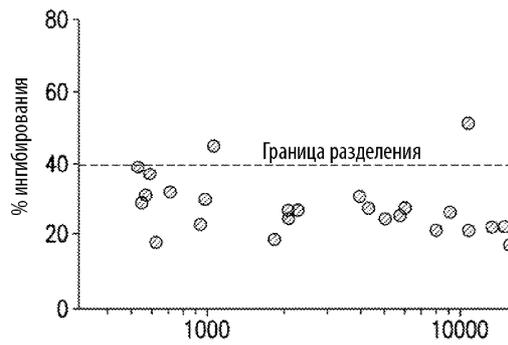
Фиг. 4В



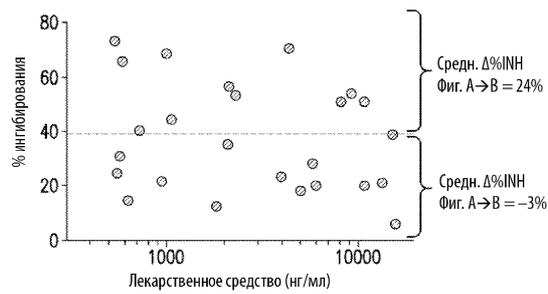
Фиг. 4С



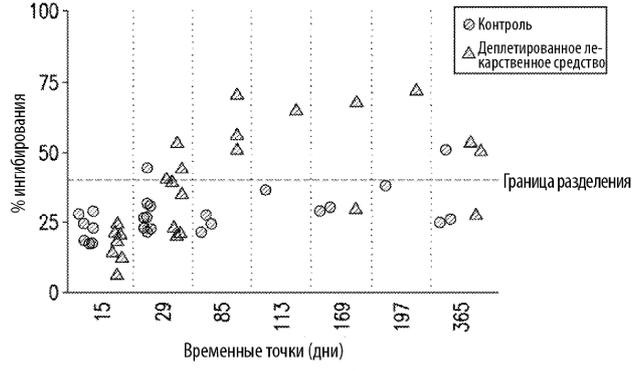
Фиг. 4D



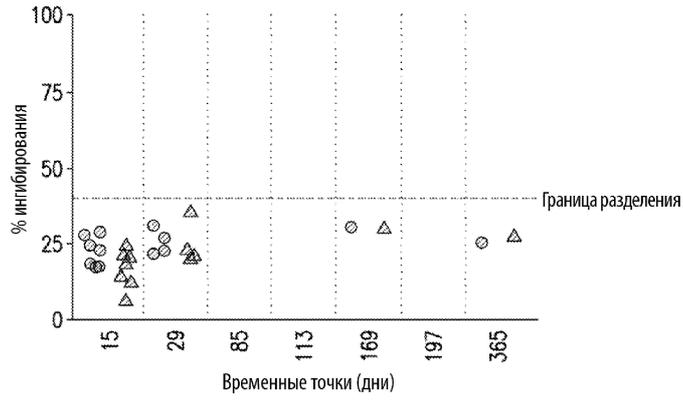
Фиг. 5А



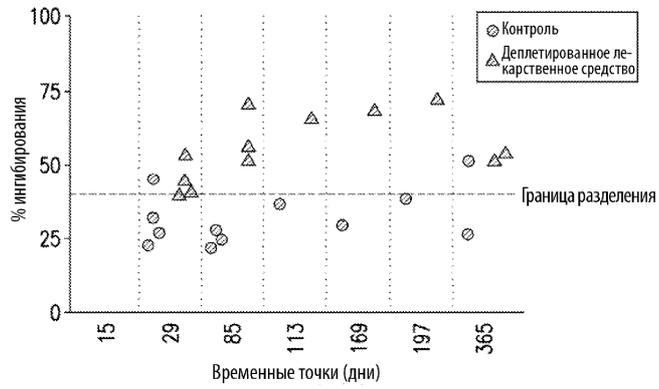
Фиг. 5В



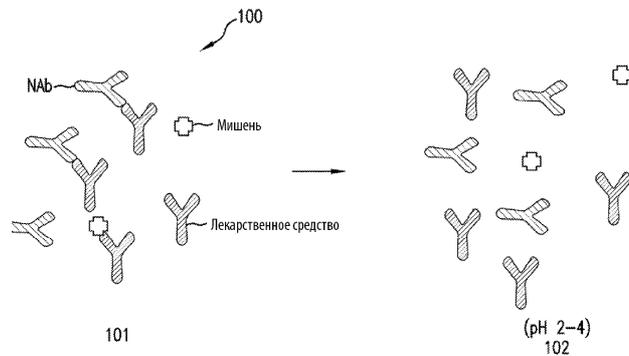
Фиг. 6А



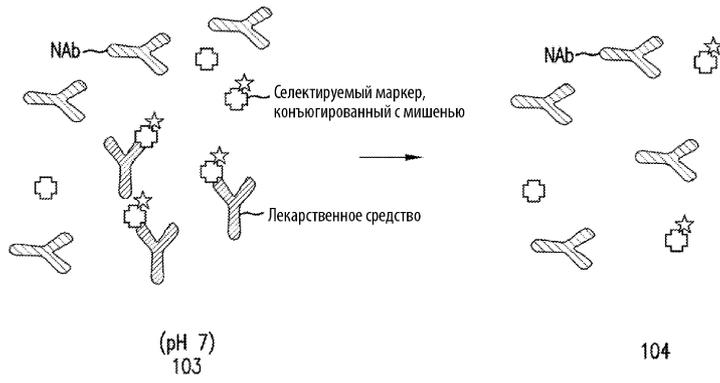
Фиг. 6В



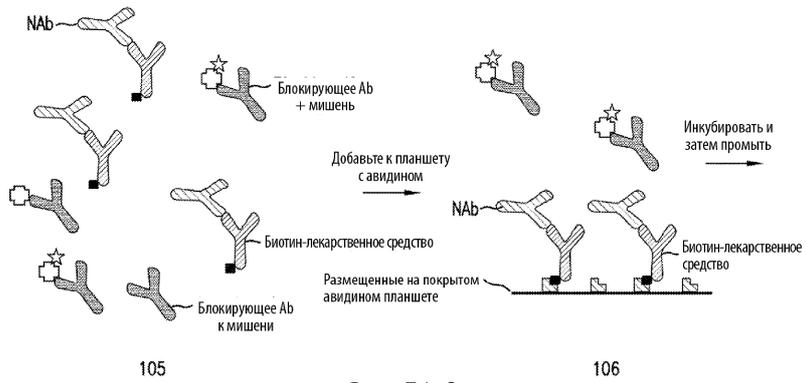
Фиг. 6С



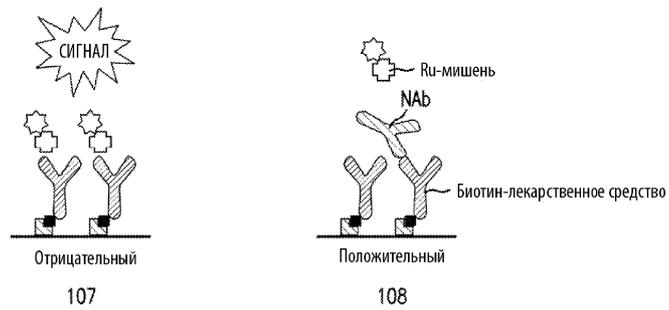
Фиг. 7А



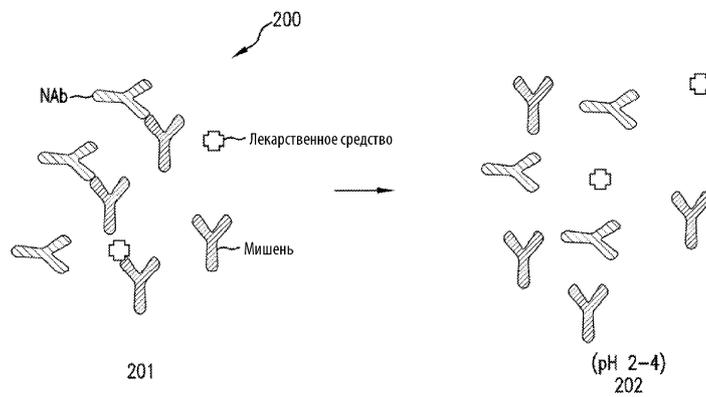
Фиг. 7А-1



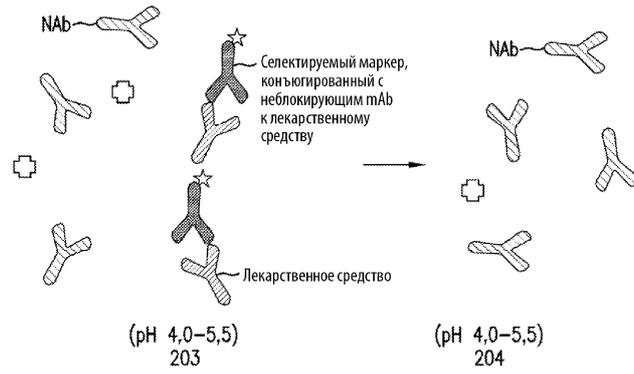
Фиг. 7А-2



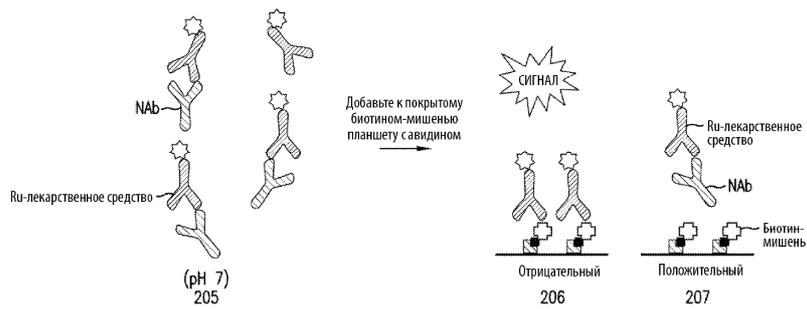
Фиг. 7А-3



Фиг 7В



Фиг. 7B-1



Фиг. 7B-2