

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202000052** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.06.30

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

(22) Дата подачи заявки
2019.12.17

(54) СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИЛЕКАРСТВЕННЫХ АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

(96) 2019/EA/0104 (BY) 2019.12.17

(74) Представитель:
Волкова М.В. (BY)

(71)(72) Заявитель и изобретатель:
**ВОЛКОВА МАРГАРИТА
ВАСИЛЬЕВНА; КУНДЕР ЕЛЕНА
ВЛАДИМИРОВНА; ГЕНЕРАЛОВ
ИГОРЬ ИВАНОВИЧ (BY)**

(57) Изобретение относится к медицине, а именно к лабораторной диагностике, и может быть использовано для выявления антилекарственных антител в сыворотке крови пациента. Задача, решаемая изобретением, заключается в упрощении лабораторной диагностики, направленной на выявление антилекарственных антител. Поставленную задачу решает способ выявления антилекарственных антител в сыворотке крови, заключающийся в том, что сыворотку крови пациента, получающего лечение биологическим лекарственным средством и пуловую сыворотку крови пациентов, не получающих лечение биологическим лекарственным средством, разводят физиологическим раствором в соотношении 1:10 и вносят в лунки планшета с исследуемым адсорбированным биологическим лекарственным средством, инкубируют в течение 2 ч при 37°C, промывают, проводят элюцию глициновым буфером рН 2,8, затем полученные элюенты приводят к нейтральному рН и переносят в лунки с адсорбированными антителами к иммуноглобулинам класса G, определяют концентрацию иммуноглобулинов в элюентах и рассчитывают показатель П наличия антилекарственных антител в сыворотке крови пациента, получающего лечение биологическим лекарственным средством, по формуле

$$П = \frac{C_1}{C_2 + 0,1 \times C_2}$$

где C₁ - концентрация иммуноглобулинов в элюенте сыворотки крови пациента, получающего лечение биологическим лекарственным средством; C₂ - концентрация иммуноглобулинов в элюенте пуловой сыворотки крови пациентов, не получающих лечение биологическим лекарственным средством, и при значении П более 1,0 констатируют наличие антилекарственных антител в сыворотке крови, а при значении П равном 1,0 или менее - их отсутствие.

A1

202000052

202000052

A1

Способ выявления антилекарственных антител в сыворотке крови

Изобретение относится к медицине, а именно к лабораторной диагностике, и может быть использовано для выявления антилекарственных антител (АЛА) в сыворотке крови пациента.

В клинической практике, при применении биологических лекарственных средств, которые представляют собой крупные белковые молекулы, в организме пациента к ним могут вырабатывать антитела, которые связывают лекарственное средство, чем значительно снижают его эффективность. Этот феномен носит название – иммуногенность лекарственного средства. Своевременное обнаружение АЛА позволяет установить причину вторичной неэффективности лекарственного средства и скорректировать терапию путем смены неэффективного препарата на препарат с другой молекулярной структурой, который будет эффективен.

Современные методы, направленные на обнаружение высокоспецифичных антител, представляют собой модификации иммуноферментного анализа (ИФА).

Известен способ определения АЛА методом сэндвич-ИФА [1], который основан на иммобилизации Fab и Fab2 фрагментов лекарственного средства в лунке планшета, к которому добавляют сыворотку крови, АЛА из сыворотки крови связываются с Fab фрагментом лекарственного средства, планшет промывают, добавляют меченный ферментом конъюгат – иммуноглобулины к Fc-фрагменту антител и оценивают результаты.

Способ прост в использовании, но его недостатком является высокая доля ложноположительных результатов при недостаточной отмывке планшета и способности «липких» Fc-фрагментов антител перекрестно реагировать с иммобилизованными фрагментами лекарственных средств.

Известен способ бриджинг-ИФА [2], который основан на бивалентности или мультивалентности иммуноглобулинов, заключающийся в том, что молекулы лекарственного средства адсорбируют в лунках планшета, к ним добавляют сыворотку крови, при этом АЛА из сыворотки крови связываются с лекарственным средством, планшет промывают, добавляют меченное ферментом лекарственное средство и оценивают результаты. АЛА в данном способе выступают к качестве «моста» между адсорбированным и добавленным лекарственным средством.

Способ является простым в исполнении и высокочувствительным. Недостатками способа является риск получения ложноотрицательного результата из-за перекрестного связывания Fc-фрагментов лекарственного средства с ревматоидным фактором, анти-аллотипическими и/или низко-аффинными антителами, включая гетерофильные антитела в сыворотке пациента. Способ также не позволяет определить подкласс иммуноглобулинов IgG4, который доминирует

после пролонгированной иммунизации, вследствие того, что антитела этого подкласса являются моновалентными и не способны образовать «мост» в бриджинг-ИФА.

Источник информации, близкий к заявляемому способу, не обнаружен.

Задача, решаемая изобретением, заключается в упрощении лабораторной диагностики, направленной на выявление АЛА.

Поставленную задачу решает способ выявления антилекарственных антител в сыворотке крови, заключающийся в том, что сыворотку крови пациента, получающего лечение биологическим лекарственным средством и пуловую сыворотку крови пациентов, не получающих лечение биологическим лекарственным средством, разводят физиологическим раствором в соотношении 1:10 и вносят в лунки планшета с исследуемым адсорбированным биологическим лекарственным средством, инкубируют в течение 2 часов при 37 °С, промывают, проводят элюцию глициновым буфером рН 2,8, затем полученные элюенты приводят к нейтральному рН и переносят в лунки с адсорбированными антителами к иммуноглобулинам класса G, определяют концентрацию иммуноглобулинов в элюентах и рассчитывают показатель П наличия антилекарственных антител в сыворотке крови пациента, получающего лечение биологическим лекарственным средством, по формуле:

$$П = \frac{C_1}{C_2 + 0,1 \times C_2}$$

где C_1 – концентрация иммуноглобулинов в элюенте сыворотки крови пациента, получающего лечение биологическим лекарственным средством;

C_2 - концентрация иммуноглобулинов в элюенте пуловой сыворотки крови пациентов, не получающих лечение биологическим лекарственным средством, и при значении П более 1,0 констатируют наличие антилекарственных антител в сыворотке крови, а при значении П равном 1,0 или менее – их отсутствие.

Способ осуществляют следующим образом.

Предварительно проводят адсорбцию биологического лекарственного средства на дно лунки планшета, для чего его разводят карбонатно-бикарбонатным буфером рН 9,6 до концентрации 0,1 мг/мл, вносят по 100 мкл раствора в лунки полистирольного планшета и инкубируют в течение 12 часов при температуре 4 °С, промывают планшет 3 раза промывочным буфером и вносят в каждую лунку по 100 мкл блокирующего буферного раствора рН 7,4, содержащего 1% бычьего сывороточного альбумина. Инкубируют планшет в течение 12 часов при температуре 4 °С.

Сыворотку крови пациента, получающего лечение биологическим лекарственным средством, разводят 1:10 физиологическим раствором. Исследование проводят в дублях. По 100 мкл разведенной сыворотки крови

пациента, получающего лечение биологическим лекарственным средством, и контрольной сыворотки (пуловая сыворотка минимум 3 пациентов, которые не получали лечение биологическим лекарственным средством), вносят в лунки планшета с исследуемым адсорбированным биологическим лекарственным средством и инкубируют в течение 2 часов при 37 °С. При наличии АЛА, происходит их связывание с исследуемым адсорбированным биологическим лекарственным средством. Промывают лунки 3 раза промывочным буферным раствором рН 7,4, содержащим 0,1 М Твин для удаления не связавшихся молекул, проводят элюцию связавшихся антител путем добавления 100 мкл глицинового буфера рН 2,8, в течение 5 мин, переносят полученные элюенты в чистые лунки и нейтрализуют их путем добавления 100 мкл ТРИС-буферного раствора рН 9,0. Оценивают концентрацию АЛА в элюентах методом иммуноферментного анализа. Для этого полученные элюенты и калибровочные образцы, не содержащие и содержащие раствор иммуноглобулина G человека в концентрациях 1,4-24 мг/мл, вносят в лунки с адсорбированными антителами к иммуноглобулинам класса G, инкубируют в течение 1 часа, лунки промывают 3 раза промывочным буфером. В каждую лунку вносят 100 мкл раствора конъюгата, содержащего антитела к Fc фрагменту иммуноглобулинов класса G, меченные пероксидазой хрена, и инкубируют в течение 30 минут, промывают 3 раза промывочным буфером, добавляют раствор субстрата, содержащий тетраметилбензидин, инкубируют в течение 15-20 минут и добавляют раствор серной кислоты. В течение 5 минут измеряют оптическую плотность лунок планшета на спектрофотометре при длине волны 450 нм.

Концентрацию АЛА рассчитывают исходя из калибровочной кривой, построенной по оптической плотности калибровочных растворов и рассчитывают показатель П наличия АЛА в сыворотке крови пациента, получающего лечение биологическим лекарственным средством, по формуле:

$$П = \frac{C_1}{C_2 + 0,1 \times C_2} \quad ,$$

где C_1 – концентрация иммуноглобулинов в элюенте сыворотки крови пациента, получающего лечение биологическим лекарственным средством;

C_2 - концентрация иммуноглобулинов в элюенте пуловой сыворотки крови пациентов, не получающих лечение биологическим лекарственным средством, и при значении П более 1,0 констатируют наличие АЛА в сыворотке крови, а при значении П равном 1,0 или менее – их отсутствие.

Пример.

В экспериментах использовали сыворотку крови, полученную от 15 пациентов с ревматоидным артритом (РА), которые получали лечение биологическим лекарственным средством – инфликсимабом в течение минимум 3-

х месяцев. Для приготовления контрольного образца использовали пуловую сыворотки крови, приготовленную путем объединения и перемешивания по 1 мл сыворотки крови 5 пациентов с РА, которые прежде не получали лечение инфликсимабом. Полученные результаты (концентрация иммуноглобулинов G у обследованных лиц, результат теста) представлены в таблице.

Таблица.

Образец	Концентрация иммуноглобулинов G, мг/мл	Результат	
		Количественный	Качественный
Пациент 1	7,86	0,88	отрицательный
Пациент 2	6,34	0,72	отрицательный
Пациент 3	7,14	0,81	отрицательный
Пациент 4	4,39	0,50	отрицательный
Пациент 5	14,25	1,61	положительный
Пациент 6	7,05	0,80	отрицательный
Пациент 7	8,74	0,98	отрицательный
Пациент 8	8,48	0,95	отрицательный
Пациент 9	7,89	0,89	отрицательный
Пациент 10	18,72	2,11	положительный
Пациент 11	5,61	0,63	отрицательный
Пациент 12	20,54	2,32	положительный
Пациент 13	23,70	2,68	положительный
Пациент 14	22,74	2,57	положительный
Пациент 15	7,54	0,85	отрицательный
Контрольный образец	8,04	0,91	отрицательный

АЛА обнаружены у 5 (33,33%) пациентов, которые получали лечение инфликсимабом. При сопоставлении наличия АЛА и потери эффективности лечения, между этими показателями установлена значимая зависимость ($p < 0,05$, точный критерий Фишера).

Наличие АЛА при воспалительных заболеваниях суставов может быть предиктором потери эффекта от лечения.

Способ найдет применение в деятельности врачей –специалистов, которые используют в своей практике биологические лекарственные средства как средство молекулярно-биологической диагностики эффективности лечения.

Источники информации:

1. Bendtzen K. Anti-TNF-alpha biotherapies: perspectives for evidence-based personalized medicine, *Immunotherapy*, 2012, 4: 1167-1179.
2. Svenson M., Geborec P., Saxne T., Bendtzen K. Monitoring patients treated with anti-TNF-alpha biopharmaceuticals – assessing serum infliximab and anti-infliximab antibodies, *Rheumatology*, 2007, 46:1828-1834

Формула изобретения

Способ выявления антилекарственных антител в сыворотке крови, заключающийся в том, что сыворотку крови пациента, получающего лечение биологическим лекарственным средством и пуловую сыворотку крови пациентов, не получающих лечение биологическим лекарственным средством, разводят физиологическим раствором в соотношении 1:10 и вносят в лунки планшета с исследуемым адсорбированным биологическим лекарственным средством, инкубируют в течение 2 часов при 37 °С, промывают, проводят элюцию глициновым буфером рН 2,8, затем полученные элюенты приводят к нейтральному рН и переносят в лунки с адсорбированными антителами к иммуноглобулинам класса G, определяют концентрацию иммуноглобулинов в элюентах и рассчитывают показатель П наличия антилекарственных антител в сыворотке крови пациента, получающего лечение биологическим лекарственным средством, по формуле:

$$П = \frac{C_1}{C_2 + 0,1 \times C_2}$$

где C_1 – концентрация иммуноглобулинов в элюенте сыворотки крови пациента, получающего лечение биологическим лекарственным средством;

C_2 - концентрация иммуноглобулинов в элюенте пуловой сыворотки крови пациентов, не получающих лечение биологическим лекарственным средством, и при значении П более 1,0 констатируют наличие антилекарственных антител в сыворотке крови, а при значении П равном 1,0 или менее – их отсутствие.

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202000052

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

G01N 33/543, 33/53, 33/48, C12Q 1/00

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	US 2019/0145985 A1 (BIOAGILYTIХ LABS , LLC) 16.05.2019, формула, [0010], [0019], [0049], [0052], [0055], [0056], [0060], [0075], [0088]-[0090]	1
Y	BIVI N. и др. Investigation of pre-existing reactivity to biotherapeutics can uncover potential immunogenic epitopes and predict immunogenicity risk. Mabs, 17.05.2019, V. 11(5), с. 861-869, <doi: https://doi.org/10.1080/19420862.2019.1612699 >, с. 862	1
A	US 2018/0088140 A1 (GENZYME CORPORATION) 29.03.2018, формула	1

последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

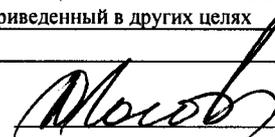
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **25/09/2020**

Уполномоченное лицо:

Начальник Управления экспертизы



Д.Ю. Рогожин