

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202292629 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2022.11.10

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

(22) Дата подачи заявки  
2021.03.16

(54) УСТРАНЕНИЕ ПОМЕХ ОТ МИШЕНИ В АНАЛИЗЕ С АНТИТЕЛОМ ПРОТИВ  
ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА

(31) 62/990,681

(72) Изобретатель:

(32) 2020.03.17

Чэнь Цзихуа, Кендра Кимберли,  
Торри Альберт, Самнер Оливейра  
Джайэн (US)

(33) US

(86) PCT/US2021/022623

(87) WO 2021/188587 2021.09.23

(71) Заявитель:

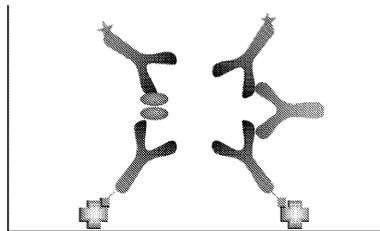
(74) Представитель:

РИДЖЕНЕРОН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

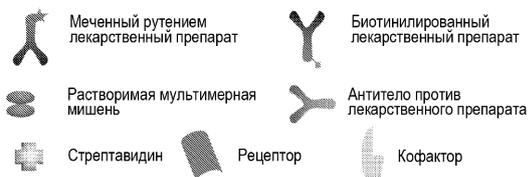
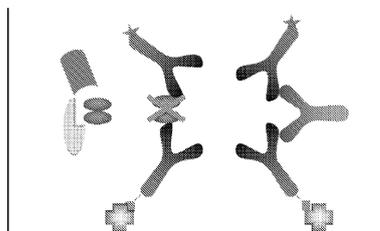
Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении представлены способы и системы для выявления, количественного определения или характеристики антител против лекарственных препаратов, которые индуцируются введением фармацевтических продуктов. Указанные способы и системы включают в себя применение партнера по связыванию мишени и (или) кофактора для улучшения выявления антител против лекарственных препаратов в образцах сыворотки крови в присутствии растворимых мишеней на основе конкурентного связывания с мишенью. Указанные способы и системы также включают в себя применение иммунодеплеции для улучшения указанного выявления.

Без рецептора, без кофактора, pH ~7,0



С рецептором и кофактором, pH ~6,0



A1

202292629

202292629

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575714EA/019

### УСТРАНЕНИЕ ПОМЕХ ОТ МИШЕНИ В АНАЛИЗЕ С АНТИТЕЛОМ ПРОТИВ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Данное изобретение в целом относится к способам и системам для характеристики, идентификации и (или) измерения антител против лекарственных препаратов, которые индуцируются введением фармацевтических продуктов. Указанные способы и системы основаны на конкурентном связывании лиганда.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Существуют опасения, касающиеся эффективности лекарственных препаратов и безопасности пациентов из-за присутствия антител, которые индуцируются при введении фармацевтических продуктов, например, из-за индукции антител против лекарственных препаратов (АПЛП, англ. «ADA»), поскольку АПЛП могут способствовать некоторым клиническим последствиям, таким как снижение эффективности лекарственных препаратов, перекрестная реактивность с эндогенными белками или изменение фармакокинетики терапевтических белков. FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов США) рекомендует применять подход, основанный на оценке риска, для оценки и смягчения иммунных ответов, ассоциированных с неблагоприятными иммунологическими реакциями, которые связаны с терапевтическими белковыми продуктами и которые влияют на их безопасность и эффективность (Guidance for Industry: Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products, August 2014, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration)

Были проанализированы данные о назначении 121 одобренного FDA биологического агента и проведенный FDA обзор их клинической фармакологии для оценки и представления данных об иммуногенности, включительно с моноклональными антителами, ферментными продуктами, цитокинами, факторами роста и токсинами. Наиболее высокая частота сообщений была связана со случаями иммуногенности. Клиническое значение АПЛП было неизвестно. В целом, наблюдалось поразительное соответствие между увеличением системного клиренса препаратов и снижением эффективности, связанным с АПЛП (Wang et al., Evaluating and Reporting the Immunogenicity Impacts for Biological Products-a Clinical Pharmacology Perspective. The AAPS Journal. 2016; 18 (2): 395-403)

Биологическая сложность иммунных реакций создает сложности при оценке влияния АПЛП на фармакокинетику, поскольку фармакокинетическая экспозиция может быть более чувствительной, чем конечные точки эффективности, при оценке эффектов АПЛП. Следует понимать, что существует потребность в способах и системах для характеристики, идентификации и (или) измерения АПЛП, например, для улучшения способов и систем выявления АПЛП. Эти способы и системы могут предоставить ценную

информацию о влиянии иммуногенности в клинической фармакологии, касающуюся фармакокинетики, эффективности и безопасности при введении лекарственных препаратов, например, при введении биологических агентов.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Биологические агенты, такие как моноклональные антитела, представляют собой терапевтические белки, имеющие клиническое применение при широком спектре патологических состояний, таких как онкологические заболевания, сердечно-сосудистые заболевания, инфекционные заболевания или аутоиммунные нарушения. Случаи иммуногенности белковых фармацевтических продуктов привели к увеличению спроса на характеризацию наличия антител, которые индуцируются введением белковых фармацевтических продуктов, например, антител против лекарственных препаратов (АПЛП). Данные о характеристиках и измерениях АПЛП могут обеспечить понимание иммуногенности фармацевтических продуктов для повышения безопасности лекарственных препаратов.

Иллюстративные варианты осуществления данного изобретения удовлетворяют вышеуказанный спрос путем предоставления способов и систем для характеристики, идентификации и (или) измерения АПЛП, которые индуцируются введением фармацевтических продуктов. В данном изобретении представлен способ идентификации антитела против лекарственного препарата в образце, включающий в себя: приведение указанного образца в контакт с первым меченым лекарственным препаратом, приведение указанного образца в контакт со вторым меченым лекарственным препаратом, приведение указанного образца в контакт с партнером по связыванию мишени и выявление присутствия комплекса, который содержит указанный первый меченый лекарственный препарат, указанное антитело против лекарственного препарата и указанный второй меченый лекарственный препарат; при этом указанный образец содержит указанное антитело против лекарственного препарата и указанную мишень, при этом указанная мишень является партнером по связыванию указанного лекарственного препарата.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанный способ идентификации антитела против лекарственного препарата в образце дополнительно включает в себя приведение указанного образца в контакт с кофактором для усиления связывания между указанной мишенью и указанным партнером по связыванию указанной мишени. В некоторых аспектах данного изобретения указанный способ идентификации антитела против лекарственного препарата в образце выполняют в слабощелочных рН-условиях анализа.

В некоторых аспектах данного изобретения указанный способ идентификации антитела против лекарственного препарата в образце дополнительно включает в себя удаление мишени с использованием антитела против мишени, при этом указанное антитело против мишени прикреплено к твердой подложке.

В некоторых аспектах данного изобретения указанный первый меченый лекарственный препарат или указанный второй меченый лекарственный препарат

указанного способа представляет собой меченный рутением лекарственный препарат или биотинилированный лекарственный препарат. В некоторых аспектах данного изобретения указанный партнер по связыванию указанной мишени в указанном способе представляет собой естественный партнер по связыванию или рецептор мишени, при этом указанная мишень представляет собой растворимую мультимерную мишень.

В некоторых аспектах данного изобретения указанные слабокислые рН-условия анализа в указанном способе находятся в диапазоне от рН около 4,5 до рН около 6,5, представляют собой рН около 6,0 или рН около 5,0.

В некоторых аспектах данного изобретения указанный лекарственный препарат указанного способа представляет собой химическое соединение, нуклеиновую кислоту, токсин, пептид, белок, слитый белок, антитело, фрагмент антитела, область Fab антитела, продукт конъюгации антитела и лекарственного препарата или фармацевтический продукт. В некоторых аспектах данного изобретения указанный лекарственный препарат указанного способа представляет собой антитело и указанный образец представляет собой образец сыворотки крови.

В данном изобретении, по меньшей мере частично, представлена система для идентификации антитела против лекарственного препарата в образце, включающая в себя: первый меченый лекарственный препарат, второй меченый лекарственный препарат, партнера по связыванию мишени и систему анализа для выявления присутствия комплекса, который содержит указанный первый меченый лекарственный препарат, указанное антитело против лекарственного препарата и указанный второй меченый лекарственный препарат; при этом указанный образец содержит указанное антитело против лекарственного препарата и мишень, и при этом указанная мишень представляет собой партнера по связыванию указанного лекарственного препарата.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанная система дополнительно включает в себя кофактор, который может усиливать связывание между указанной мишенью и указанным партнером по связыванию указанной мишени. В некоторых аспектах данного изобретения указанный образец указанной системы обрабатывают раствором, имеющим слабокислый рН. В некоторых аспектах данного изобретения указанная система дополнительно включает в себя антитело против мишени, при этом указанное антитело против мишени прикреплено к твердой подложке.

В некоторых аспектах данного изобретения указанный первый меченый лекарственный препарат или указанный второй меченый лекарственный препарат указанной системы представляет собой меченый рутением лекарственный препарат или биотинилированный лекарственный препарат. В некоторых других аспектах данного изобретения указанный партнер по связыванию указанной мишени в указанном способе представляет собой естественный партнер по связыванию или рецептор мишени, при этом указанная мишень представляет собой растворимую мультимерную мишень.

В некоторых аспектах данного изобретения указанные слабокислые рН-условия анализа в указанной системе находятся в диапазоне от рН около 4,5 до рН около 6,5, представляют собой рН около 6,0 или рН около 5,0.

В некоторых аспектах данного изобретения указанный лекарственный препарат указанной системы представляет собой химическое соединение, нуклеиновую кислоту, токсин, пептид, белок, слитый белок, антитело, фрагмент антитела, область Fab антитела, продукт конъюгации антитела и лекарственного препарата или фармацевтический продукт. В других аспектах данного изобретения указанный лекарственный препарат указанной системы представляет собой антитело и указанный образец представляет собой образец сыворотки крови.

Эти и другие аспекты данного изобретения будут лучше оценены и поняты при рассмотрении вместе с нижеследующим описанием и прилагаемыми графическими материалами. Нижеследующее описание, хотя и указывает на различные варианты осуществления данного изобретения и их многочисленные конкретные детали, предоставляется в качестве иллюстрации, а не ограничения. В рамках объема данного изобретения могут выполняться множество замен, модификаций, дополнений или перестановок.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

На фиг. 1 представлено наличие сигналов, опосредованных мишенью, вследствие присутствия растворимой мультимерной мишени в образцах сыворотки крови, поскольку данный мультимерный белок-мишень может связываться с меченым рутением лекарственным препаратом и с биотинилированным лекарственным препаратом одновременно в нейтральных рН-условиях анализа для проведения мостиковых анализов АПЛП согласно иллюстративному варианту осуществления данного изобретения. Включение в указанный мостиковый АПЛП-анализ естественного партнера по связыванию лекарственного препарата-мишени и кофактора в слабокислых рН-условиях анализа может устранить опосредованные мишенью сигналы согласно иллюстративному варианту осуществления данного изобретения.

На фиг. 2А представлен скрининг ряда антител против мишени, например, Ат1-Ат9, при 100 мкг/мл по сравнению с контролем («контроль») для устранения помех от мишени в образце «наивной» сыворотки крови примата согласно иллюстративному варианту осуществления данного изобретения.

На фиг. 2В представлено применение коммерчески доступного поликлонального антитела против мишени для устранения помех от мишени в образце «наивной» сыворотки крови примата согласно иллюстративному варианту осуществления данного изобретения.

На фиг. 3 представлено включение в мостиковый АПЛП-анализ рецептора мишени для улучшения выявления АПЛП путем устранения сигналов, опосредованных мишенью, согласно иллюстративному варианту осуществления данного изобретения.

На фиг. 4А представлено включение в мостиковый АПЛП-анализ рецептора мишени и кофактора для улучшения выявления АПЛП путем устранения сигналов, опосредованных мишенью, согласно иллюстративному варианту осуществления данного изобретения. Различные концентрации белка-кофактора добавляли к раствору, содержащему 50 мкг/мл растворимого рецептора мишени, для проведения мостикового АПЛП-анализа согласно иллюстративному варианту осуществления данного изобретения.

На фиг. 4В показано, что в восьми образцах «наивной» сыворотки крови приматов (контроль) был выявлен широкий диапазон опосредованных мишенью сигналов анализа в отсутствие каких-либо белков-блокаторов. Присутствие рецептора мишени (50 мкг/мл) и кофактора (50 мкг/мл) привело к эффективному устранению сигналов анализа, опосредованных мишенью, во всех образцах сыворотки крови приматов, согласно иллюстративному варианту осуществления данного изобретения.

На фиг. 5 представлена оптимизация рН-условий анализа для устранения помех от мишени при проведении мостиковых АПЛП-анализов в четырех схемах эксперимента. Указанные четыре схемы эксперимента представляли собой: (1) четыре образца «наивной» сыворотки приматов при нейтральном рН (контроль); (2) четыре образца «наивной» сыворотки приматов с 50 мкг/мл рецептора и 50 мкг/мл кофактора при нейтральном рН; (3) четыре образца «наивной» сыворотки приматов при слабокислом рН (около рН 6,0); и (4) четыре образца «наивной» сыворотки приматов с 50 мкг/мл рецептора и 50 мкг/мл кофактора при рН около 6,0, согласно иллюстративному варианту осуществления данного изобретения.

На фиг. 6А представлено определение уровня переносимости мишени с использованием рекомбинантного белка-мишени при различных рН-условиях анализа, когда АПЛП-анализ проводили с использованием 50 мкг/мл как рецепторных, так и кофакторных белков, согласно иллюстративному варианту осуществления данного изобретения.

На фиг. 6В представлено выявление сигналов АПЛП при различных рН-условиях анализа с использованием ранних образцов крови кроликов, иммунизированных МАТ-У Fab, согласно иллюстративному варианту осуществления данного изобретения.

На фиг. 7А представлены концентрации лекарственного препарата в образцах сыворотки крови двух приматов, которым ввели одну дозу лекарственного препарата, например, МАТ-У (моноклональное антитело У; англ. «МAB-Y»), согласно иллюстративному варианту осуществления данного изобретения. НПКО обозначает нижний предел количественного определения.

На фиг. 7В представлены концентрации мишени и сигналы АПЛП в образцах, полученных в 0-е, 28-е и 52-е сутки, с различными экспериментальными условиями, включительно с включением в мостиковый АПЛП-анализ рецептора мишени, кофактора и слабокислых рН-условий анализа для улучшения выявления АПЛП при использовании образцов приматов после введения дозы, согласно иллюстративному варианту осуществления данного изобретения.

На фиг. 8 представлены концентрации лекарственного препарата в образцах сыворотки крови трех субъектов, которым ввели одну дозу МАТ-У, согласно иллюстративному варианту осуществления данного изобретения. НПКО обозначает нижний предел количественного определения.

На фиг. 9 представлены концентрации мишени и сигналы АПЛП в образцах, полученных в 0-е, 29-е и 64-е сутки, с различными экспериментальными условиями, включительно с включением в мостиковый АПЛП-анализ рецептора мишени, кофактора и слабокислых рН-условий анализа для улучшения выявления АПЛП, согласно иллюстративному варианту осуществления данного изобретения.

На фиг. 10А представлена иммунодеплегия белка-мишени с помощью магнитных гранул, конъюгированных с МАТ-А (моноклональное антитело А; англ. «МАВ-А»), в нейтральных рН-условиях анализа для устранения опосредованного мишенью сигнала в образцах «наивной» сыворотки крови человека, не содержащих лекарственных препаратов, согласно иллюстративному варианту осуществления данного изобретения.

На фиг. 10В представлена иммунодеплегия белка-мишени с помощью магнитных гранул, конъюгированных с МАТ-А, в нейтральных рН-условиях анализа для устранения опосредованного мишенью сигнала в образцах сыворотки крови базового уровня, согласно иллюстративному варианту осуществления данного изобретения.

На фиг. 11 представлены сигналы АПЛП-анализа в образцах, полученных в 1-е, 15-е, 29-е и 57-е сутки от четырех приматов, измеренные при различных экспериментальных условиях, например, без блокаторов в нейтральных рН-условиях анализа, с 100 мкг/мл МАТ-А в нейтральных рН-условиях анализа, без блокаторов в слабокислых рН-условиях анализа (рН ~ 6,0) и с 100 мкг/мл МАТ-А в слабокислых рН-условиях анализа (рН ~ 6,0), согласно иллюстративному варианту осуществления данного изобретения.

На фиг. 12 представлены концентрации мишени и сигнал АПЛП-анализа в образцах, полученных в 1-е, 15-е, 29-е и 57-е сутки, до и после иммунодеплеции магнитными гранулами, конъюгированными с МАТ-А, в слабокислых рН-условиях анализа, согласно иллюстративному варианту осуществления данного изобретения.

На фиг. 13 представлена иммунодеплегия с помощью магнитных гранул, конъюгированных с МАТ-А, в образцах базового уровня и в образцах после введения дозы в различных рН-условиях анализа, согласно иллюстративному варианту осуществления данного изобретения.

На фиг. 14 представлено выявление истинных сигналов АПЛП в образцах, полученных в 1-е, 15-е, 29-е и 57-е сутки от АПЛП-положительного субъекта, с применением АПЛП-способа с конкурентным блокатором, включающего в себя растворимый рецептор (50 мкг/мл) и кофактор (50 мкг/мл) в слабокислых рН-условиях анализа, и с применением модифицированного способа с иммунодеплецией, согласно иллюстративному варианту осуществления данного изобретения.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Растущие опасения, связанные с эффективностью лекарственных препаратов и безопасностью пациентов из-за случаев иммуногенности белковых фармацевтических продуктов, привели к повышению спроса на характеристику антител против лекарственных препаратов (АПЛП). Спрос на характеристику АПЛП обусловлен, например, необходимостью понимания влияния АПЛП на снижение эффективности лекарственных препаратов, перекрестную реактивность с эндогенными белками или изменение фармакокинетики фармацевтических продуктов. Данные о характеристиках АПЛП могут предоставить ценную информацию об иммуногенности фармацевтических продуктов и, следовательно, повысить безопасность при введении лекарственных препаратов.

Введение биологических агентов, таких как моноклональные антитела, может индуцировать иммунные реакции у субъектов-животных и пациентов-людей, такие как выработка антител против лекарственных препаратов (АПЛП). Реакции иммуногенности, индуцированные терапевтическими белками, могут варьировать от короткоживущих АПЛП, не имеющих клинического значения, до образования стойких АПЛП с высоким титром, которые могут привести к снижению экспозиции лекарственного препарата, отсутствию или потере эффективности и нежелательным явлениям, таким как реакция гиперчувствительности, анафилаксия и реакции в месте инъекции (Koren et al., Recommendations on risk-based strategies for detection and characterization of antibodies against biotechnology products. *J Immunol Methods*, 2008. 333 (1-2): p. 1-9). Сообщалось о случаях, связанных с нейтрализующей активностью АПЛП, таких как влияние иммуногенности на показатели клинической фармакологии, связанные с фармакокинетикой, эффективностью и безопасностью. Образование АПЛП во время медикаментозного лечения может привести к снижению концентрации лекарственного препарата в организме пациента, что может способствовать снижению эффективности. В организме пациента могут присутствовать различные АПЛП, которые способны связываться с различными сайтами молекул лекарственных препаратов, такие как нейтрализующие или ненейтрализующие АПЛП. Нейтрализующие АПЛП способны связываться с активным сайтом молекулы лекарственного препарата, таким как сайт связывания в молекуле лекарственного препарата для связывания с мишенью лекарственного препарата, или с переменными областями лекарственного препарата-антитела. Когда нейтрализующее АПЛП связывается с активным сайтом лекарственного препарата, это приводит к тому, что лекарственный препарат становится неактивным. Нейтрализующее АПЛП может обладать способностью связываться с неактивным сайтом молекулы лекарственного препарата, таким как константная область или каркас молекулы лекарственного препарата-антитела. Несмотря на то, что лекарственный препарат может оставаться активным при связывании ненейтрализующими АПЛП, присутствие ненейтрализующих АПЛП может способствовать определенным изменениям показателей клинической фармакологии.

Иммуногенность относится к возможности терапевтического продукта генерировать иммунные ответы на себя и на родственные белки, например, индуцирование нежелательных клинических явлений, связанных с иммунной реактивностью. Важная информация об иммуногенности включает в себя индукцию связывающих антител, индукцию нейтрализующих антител, измененную фармакокинетику, сниженную эффективность и проблемы с безопасностью. Однако клиническое значение АПЛП оставалось неизвестным. Кроме того, ограниченные доступные данные могут препятствовать определению эффекта АПЛП. АПЛП могут ассоциироваться с взаимосвязью увеличения системного клиренса фармацевтических продуктов и снижения эффективности. Некоторые лекарственные продукты имели АПЛП, поддерживающие лекарственный препарат, что приводило к снижению клиренса, возможно, вследствие образования комплекса АПЛП - лекарственный препарат, например, связывания АПЛП с лекарственным препаратом. (Wang et al., Evaluating and Reporting the Immunogenicity Impacts for Biological Products-a Clinical Pharmacology Perspective. The AAPS Journal. 2016; 18 (2): 395-403)

Следовательно, оценка иммуногенности может потребоваться регулируемыми органами как часть характеристики безопасности продукта, а частота встречаемости АПЛП и нейтрализующих антител (НАТ) являются частью информации о назначении (US Department of Health and Human Services, U.F.C., CBER, Guidance for Industry - Assay Development for Immunogenicity Testing of Therapeutic Proteins (Draft). US Department of Health and Human Services, Washington, DC, USA, 2009; European Medicines Agency, C.f.M.P.f.H.U., Guideline on Immunogenicity Assessment of Biotechnology-Driven Therapeutic Proteins. European Medicines Agency, London, UK, 2007). Следовательно, точное выявление АПЛП является важным аспектом любых программ разработки биологических лекарственных препаратов (Mire-Sluis, et al., Recommendations for the design and optimization of immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products. J Immunol Methods, 2004. 289 (1-2): p. 1-16; Shankar, G., et al., Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. J Pharm Biomed Anal, 2008. 48 (5): p. 1267-81).

Анализы для идентификации или измерения АПЛП, как правило, представляют собой мостиковые иммуноанализы, включающие в себя биотинилированный лекарственный препарат (био-препарат) и меченный рутением лекарственный препарат (ру-препарат) в качестве мостиковых компонентов, например, образование комплекса АПЛП - лекарственный препарат, содержащего биотинилированный лекарственный препарат, АПЛП и меченный рутением лекарственный препарат. Мостиковые АПЛП-анализы обеспечивают высокую пропускную способность и чувствительность, а также способность выявлять большинство изоформ антител АПЛП. Однако мостиковый АПЛП-анализ может быть восприимчив к ряду помех. Присутствие определенных молекул в образцах может вызвать помехи, например, присутствие свободных лекарственных препаратов, растворимых лекарственных препаратов-мишеней и других матричных

белков в образцах сыворотки крови. Растворимые лекарственные препараты-мишени могут представлять собой димерные или мультимерные пептиды или белки. В частности, сложности возникают в преодолении помех, создаваемых растворимой димерной или мультимерной мишенью, вследствие высокоспецифичного связывания между мишенью и лекарственным препаратом. Это становится еще более сложным, если учесть высокую вариативность биологических свойств каждого белка-мишени (Zhong, et al., Drug Target Interference in Immunogenicity Assays: Recommendations and Mitigation Strategies. AAPS J, 2017. 19 (6): p. 1564-1575.)

Включение специфичных антител против мишени в мостиковые АПЛП-анализы применялось для устранения помех от мишени путем блокирования сигналов-помех (Liao, K., et al., Inhibition of interleukin-5 induced false positive anti-drug antibody responses against mepolizumab through the use of a competitive blocking antibody. J Immunol Methods, 2017. 441: p. 15-23.; Zhong, et al., Identification and inhibition of drug target interference in immunogenicity assays. J Immunol Methods, et al., 2010. 355 (1-2): p. 21-8). Однако подходящее блокирующее антитело может быть недоступно для многих лекарственных препаратов - моноклональных антител. Подходящее блокирующее антитело должно обладать способностью конкурентно связываться с мишенью, не влияя на взаимодействия связывания между АПЛП и мечеными молекулами лекарственного препарата. Другие стратегии устранения помех от мишени включают в себя использование мишень-связывающих белков, иммунодеплеции мишени и определенного типа лектинов для ингибирования помех со стороны сильно гликозилированных белков-мишеней (Carrasco-Triguero, et al., Overcoming soluble target interference in an anti-therapeutic antibody screening assay for an antibody-drug conjugate therapeutic. Bioanalysis, 2012. 4 (16): p. 2013-26.).

Корректировка условий pH в мостиковых АПЛП-анализах посредством предварительной обработки кислотой или инкубации образца в слабокислых или основных условиях pH является дополнительной стратегией для нарушения или усиления различных взаимодействий, вносимых лекарственным препаратом, АПЛП, лекарственным препаратом-мишенью или мечеными молекулами лекарственного препарата. Необходимо тщательно оценивать конкретные pH-условия для каждого отдельного АПЛП-анализа, поскольку изменения pH-условий также могут привести к непреднамеренным последствиям, таким как высвобождение свободных лекарственных препаратов из комплексов мишень - лекарственный препарат или димеризация мономерных лекарственных препаратов-мишеней, что может усилить ложноположительные сигналы (Dai, et al., Development of a method that eliminates false-positive results due to nerve growth factor interference in the assessment of fulranumab immunogenicity. AAPS J, 2014. 16 (3): p. 464-77; Zoghbi, et al., A breakthrough novel method to resolve the drug and target interference problem in immunogenicity assays. J Immunol Methods, 2015. 426: p. 62-9)

Присутствие лекарственного препарата-мишени в исследуемых образцах может представлять проблему для разработки надежных мостиковых АПЛП-анализов, поскольку лекарственные препараты-мишени, особенно димерные или мультимерные белки-

мишени, могут образовывать мостиковые комплексы между молекулами захвата и выявления, что приводит к ложноположительному АПЛП-сигналу. Добавление либо отдельного антитела против мишени, либо смеси таких антител является распространенным подходом к устранению сигналов-помех от мишени. Такие антитела обычно обеспечивают высокую специфичность и аффинность к мишени и относительно легко вырабатываются в больших количествах. Однако антитела против мишени должны соответствовать определенным критериям, чтобы быть эффективными. Чтобы избежать перекрестной реактивности между этими антителами и АПЛП, антитела против мишени не должны иметь последовательностей CDR или каркаса, сходных или перекрывающихся с таковыми из молекулы лекарственного препарата. В дополнение к этому, антитела-блокаторы не должны содержать последовательность константной области IgG человека, поскольку эти последовательности могут конкурировать с АПЛП-выявлением аналогичных последовательностей на меченых молекулах лекарственных препаратов, что приводит к ложноотрицательным результатам АПЛП-анализа.

В данном изобретении представлены способы и системы, соответствующие вышеуказанным требованиям путем обеспечения способов и систем для характеристики, идентификации и измерения АПЛП, которые индуцируются введением фармацевтических продуктов. В частности, способы и системы согласно данному изобретению обеспечивают улучшение для устранения помех от мишени путем включения в мостиковый АПЛП-анализ естественного партнера по связыванию лекарственного препарата-мишени, такого как рецептор лекарственного препарата-мишени. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения кофактор связывания лекарственного препарата-мишени включается в мостиковый АПЛП-анализ для устранения помех от мишени, при этом указанный кофактор связывания лекарственного препарата-мишени может способствовать связыванию между указанным лекарственным препаратом-мишенью и указанным естественным партнером по связыванию. В некоторых аспектах данного изобретения указанный естественный партнер по связыванию лекарственного препарата-мишени представляет собой рецептор мишени, который обладает высокой аффинностью к указанному лекарственному препарату-мишени и может конкурировать с указанным лекарственным препаратом за связывание с мишенью. В некоторых аспектах данного изобретения указанный рецептор мишени и указанный кофактор включены в мостиковый АПЛП-анализ для улучшения выявления АПЛП. Как естественный партнер по связыванию указанной мишени, указанный рецептор обладает высокой аффинностью к указанной мишени и может превзойти указанный лекарственный препарат в конкурентном связывании с указанной мишенью. В эндогенных условиях молекулы кофакторов помогают поддерживать структуру многих рецепторных белков и улучшают связывание рецептора с его мишенью.

В данном изобретении представлены связывающие мишень белки, такие как растворимый рецептор мишени, с их необходимым (-и) кофактором (-ами) или без них, для ингибирования помех от мишени. Указанные белки являются естественными

партнерами по связыванию с мишенью и, как правило, проявляют высокую аффинность к мишени. Основываясь на характеристиках гликозилирования растворимого белка-мишени и гликан-связывающей специфичности лектинов, определенные лектины также можно применять для устранения помех от мишени - от высокогликозилированных белков-мишеней (Carrasco-Triguero, M., et al., Overcoming soluble target interference in an anti-therapeutic antibody screening assay for an antibody-drug conjugate therapeutic. *Bioanalysis*, 2012. 4 (16): p. 2013-26).

В данном изобретении также представлена стратегия изменения рН-условий анализа для устранения помех от мишени, либо путем непосредственного воздействия на образование димерного или мультимерного белка-мишени, либо путем изменения аффинности связывания лекарственного препарата с мишенью. В данном изобретении представлено, что слабокислые рН-условия анализа сами по себе могут по меньшей мере частично ослабить опосредованный мишенью сигнал, вероятно, путем снижения связывания мишени с мечеными лекарственными препаратами.

В одном аспекте данного изобретения представлены способы и системы для устранения помех от мишени путем включения естественного партнера по связыванию лекарственного препарата-мишени и кофактора в мостиковый АПЛП-анализ в слабокислых рН-условиях анализа. В некоторых аспектах данного изобретения в присутствии рецептора и белков-кофакторов в слабокислых рН-условиях проведения мостиковых АПЛП-анализов лекарственный препарат-мишень больше не может соединять меченые лекарственные препараты (например, меченный рутением лекарственный препарат и биотинилированный лекарственный препарат) вследствие наличия двух различных активностей, поскольку эти активности являются синергическими. Например, как показано на фиг. 1, вследствие присутствия растворимой мультимерной мишени в образцах сыворотки крови, данный мультимерный белок-мишень может связываться с меченым рутением лекарственным препаратом и с биотинилированным лекарственным препаратом одновременно (например, био-МАТ-У и ру-МАТ-У) в нейтральных рН-условиях проведения мостиковых АПЛП-анализов, что может приводить к опосредованным мишенью сигналам. В присутствии белков рецептора мишени и кофактора в слабокислых рН-условиях проведения мостиковых АПЛП-анализов опосредованные мишенью сигналы можно устранить, поскольку лекарственный препарат-мишень может образовывать комплекс с рецептором лекарственного препарата и кофактором, как показано на фиг. 1. Применение слабокислых рН-условий проведения мостиковых АПЛП-анализов обеспечивает преимущества снижения связывания между доступными лекарственными препаратами- мишенями и мечеными лекарственными препаратами. Такие конкурентные блокаторы, например, рецептор и (или) кофактор, синергически ингибируют помехи от мишени и повышают уровни переносимости мишени, особенно когда анализ проводят в слабокислых условиях.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения лекарственный препарат-мишень представляет собой мультимерный белок, который

присутствует в сыворотке крови, указанный лекарственный препарат-мишень может генерировать опосредованный мишенью ложноположительный сигнал, который может создавать помехи количественному определению АПЛП. Например, АПЛП против МАТ-У (например, лекарственный препарат) в образцах сыворотки крови можно выявить с помощью ру-МАТ-У (меченное рутением МАТ-У; англ. «Ru-MAV-Y») и био-МАТ-У (биотинилированное МАТ-У; англ. «Bio-MAV-Y») путем образования комплекса, содержащего ру-МАТ-У, АПЛП и био-МАТ-У, например, используя АПЛП для соединения ру-МАТ-У и био-МАТ-У. Однако, поскольку мишень для МАТ-У представляет собой мультимерный белок, который экспрессируется на разных уровнях в образцах «наивной» сыворотки крови примата и человека, мишень в сыворотке крови может образовывать комплекс с ру-МАТ-У и био-МАТ-У, например, используя мишень для соединения ру-МАТ-У и био-МАТ-У, что способствует ложноположительному сигналу, опосредованному мишенью. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения применяют антитело против мишени для устранения помех ложноположительного сигнала, вызванных мостиковыми эффектами лекарственного препарата-мишени, путем удаления указанного лекарственного препарата-мишени посредством иммунодеплеции. Иммунодеплецию белка-мишени можно выполнять с помощью магнитных гранул, конъюгированных с антителом против мишени, что эффективно снижает опосредованный мишенью сигнал в сочетании со слабокислыми рН-условиями анализа. Такие способы позволяют выявлять истинный сигнал АПЛП в образцах сыворотки крови примата и человека после введения дозы препарата.

В данном изобретении представлены два различных подхода к устранению помех от мультимерных мишеней в образцах сыворотки крови примата и человека, включая конкуренцию растворимых белков рецептора мишени и кофактора за связывание с мишенью и иммунодеплецию с использованием магнитных гранул, конъюгированных с антителами против мишени. Для обоих подходов слабокислые условия анализа (например, рН ~6,0) могут избирательно ингибировать связывание мишени с мечеными молекулами лекарственного препарата или усиливать связывание мишени с антителом против мишени. Комбинация белков рецептора мишени и кофактора в слабокислых рН-условиях анализа может значительно снизить опосредованные мишенью сигналы в образцах сыворотки крови примата и в образцах человека для клинических исследований после введения дозы до фоновых уровней. Иммунодеплеция в слабокислых условиях анализа может обеспечить более чем 50-кратное снижение уровней мишени и устранить помехи от мишени в образцах для клинических исследований при сохранении истинно положительного определения АПЛП.

В одном аспекте данного изобретения представлены способы и системы для характеристики, идентификации и (или) измерения антитела против лекарственного препарата в образце. Они удовлетворяют давно существующие потребности в характеристике антител, индуцированных введением лекарственных препаратов или фармацевтических продуктов, которые могут применяться для изучения доклинической

или клинической токсикологии и фармакокинетики. Указанные способы и системы можно применять в доклинических токсикологических или фармакокинетических исследованиях для мониторинга АПЛП с течением времени после введения фармацевтических продуктов.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в контексте данного документа, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. Несмотря на то, что при воплощении на практике или при испытании могут применяться любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, предпочтительные способы и материалы представлены в данном документе. Все публикации, указанные в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки.

Термин в единственном числе следует понимать как означающий «по меньшей мере один»; термины «около» и «приблизительно» следует понимать как допускающие стандартные вариации, как их понимают рядовые специалисты в данной области техники; для всех указанных в данном документе диапазонов в их объем включаются крайние точки указанных диапазонов.

При употреблении в контексте данного документа термины «включают в себя», «включает в себя» и «включающий (-ая, -ее, -ие) в себя» не имеют ограничительного характера и понимаются как «содержат», «содержит» и «содержащий (-ая, -ее, -ие)», соответственно.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения представлен способ идентификации антитела против лекарственного препарата в образце, включающий в себя: приведение указанного образца в контакт с первым меченым лекарственным препаратом, приведение указанного образца в контакт со вторым меченым лекарственным препаратом, приведение указанного образца в контакт со связывающим партнером мишени и выявление присутствия комплекса, который содержит первый меченый лекарственный препарат, антитело против лекарственного препарата и второй меченый лекарственный препарат; при этом указанный образец содержит указанное антитело против лекарственного препарата и указанную мишень, при этом указанная мишень является партнером по связыванию лекарственного препарата. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанный лекарственный препарат указанного способа представляет собой химическое соединение, нуклеиновую кислоту, токсин, пептид, белок, слитый белок, антитело, фрагмент антитела, область Fab антитела, продукт конъюгации антитела и лекарственного препарата или фармацевтический продукт.

При употреблении в контексте данного документа термин «пептид» или «белок» включает в себя любой полимер из аминокислот, содержащий ковалентные амидные связи. Белки включают в себя одну или большее число полимерных цепей аминокислот, как правило известных в данной области техники как «пептиды» или «полипептиды».

Белок может содержать один или большее число полипептидов с образованием единой функционирующей биомолекулы. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, белок клетки-хозяина или их комбинации.

При употреблении в контексте данного документа термин «фармацевтический продукт» включает в себя активный ингредиент, который может быть полностью или частично биологическим по своей природе, или который обладает фармацевтической активностью. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанный фармацевтический продукт может содержать лекарственный препарат, пептид, белок, слитый белок, антитело, фрагмент антитела, область Fab антитела, продукт конъюгации антитела и лекарственного препарата, продукт конъюгации пептида и лекарственного препарата, область Fc антитела, ферментный продукт, цитокин, фактор роста, фармацевтический продукт, токсин, нуклеиновую кислоту, ДНК, РНК, химическое соединение, клетку, ткань, антиген, вакцину или любой фармацевтический ингредиент, который может обладать способностью индуцировать антитела у субъекта. В некоторых других иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения фармацевтический продукт может содержать рекомбинантную, сконструированную, модифицированную, мутантную или усеченную версию пептида, белка, слитого белка, антитела, антигена, вакцины, продукта конъюгации пептида и лекарственного препарата, продукта конъюгации антитела и лекарственного препарата, продукта конъюгации белка и лекарственного препарата или их комбинации.

При употреблении в контексте данного документа «фрагмент антитела» включает в себя часть интактного антитела, такую как, например, антигенсвязывающая или переменная область антитела. Примеры фрагментов антител включают в себя, но не ограничиваются ими, фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, фрагмент Fc, фрагмент scFv, фрагмент Fv, диатело dsFv, фрагмент dAb, фрагмент Fd', фрагмент Fd и выделенную область, определяющую комплементарность (CDR), а также триатела, тетратела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Фрагменты Fv представляют собой комбинацию переменных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, а белки ScFv представляют собой рекомбинантные одноцепочечные полипептидные молекулы, в которых переменные области легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина соединены пептидным линкером. Фрагмент антитела можно получить различными способами. Например, фрагмент антитела можно получить ферментативным или химическим путем посредством фрагментации интактного антитела и (или) его можно получить рекомбинантным путем из гена, кодирующего частичную последовательность антитела. В качестве альтернативы или дополнения, фрагмент антитела можно полностью или частично получить синтетическим путем. Фрагмент антитела может необязательно включать в себя одноцепочечный фрагмент антитела. В качестве альтернативы или

дополнения, фрагмент антитела может включать в себя несколько цепей, которые связаны вместе, например, дисульфидными связями. Фрагмент антитела может необязательно включать в себя мультимолекулярный комплекс.

При употреблении в контексте данного документа термин «продукт конъюгации антитела и лекарственного препарата», или «ПКАЛП», может относиться к антителу, присоединенному к биологически активному (-ым) лекарственному (-ым) препарату (-ам) посредством линкера (-ов) с лабильной (-ыми) связью (-ями). ПКАЛП может содержать несколько молекул биологически активного лекарственного препарата (или полезной нагрузки), которые могут быть ковалентно связаны с боковыми цепями аминокислотных остатков антитела (Siler Panowski et al., Site-specific antibody drug conjugates for cancer therapy, 6 mAbs 34-45 (2013)). Антитело, применяемое для ПКАЛП, может обладать способностью связывания с достаточной аффинностью для селективного накопления и длительного удержания в участке-мишени. Большинство ПКАЛП могут иметь значения  $K_d$  в наномолярном диапазоне. Полезная нагрузка может иметь показатель активности в наномолярном/пикомолярном диапазоне и может обладать способностью достигать внутриклеточных концентраций, достигаемых после распределения ПКАЛП в ткани-мишени. Наконец, линкер, который образует связь между полезной нагрузкой и антителом, может быть достаточно стабильным в системе кровообращения, чтобы использовать фармакокинетические свойства фрагмента антитела (например, длительный период полужизни) и позволять полезной нагрузке оставаться присоединенной к антителу по мере того, как оно распределяется в тканях, но также должен обеспечивать эффективное высвобождение биологически активного лекарственного препарата, как только ПКАЛП проникнет внутрь клеток-мишеней. Указанный линкер может включать в себя линкеры, которые не расщепляются при внутриклеточной переработке, и линкеры, которые расщепляются, когда ПКАЛП достигает участка-мишени. В случае нерасщепляемых линкеров биологически активный лекарственный препарат, высвобождаемый внутри клетки, включает в себя полезную нагрузку и все элементы линкера, все еще присоединенные к аминокислотному остатку антитела, как правило, к остатку лизина или цистеина, после полного протеолитического разложения ПКАЛП внутри лизосомы. Расщепляемые линкеры представляют собой линкеры, структура которых включает в себя сайт расщепления между полезной нагрузкой и аминокислотным сайтом присоединения антитела. Механизмы расщепления могут включать в себя гидролиз кислото-лабильных связей в кислотных внутриклеточных компартментах, ферментативное расщепление амидных или сложноэфирных связей внутриклеточной протеазой или эстеразой и восстановительное расщепление дисульфидных связей восстановительной средой внутри клеток.

При употреблении в контексте данного документа термин «антитело» относится к иммуноглобулиновым молекулам, состоящим из четырех полипептидных цепей - двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь имеет переменную область тяжелой цепи (HCVR или VH) и

константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь имеет переменную область легкой цепи и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (CL). Области VH и VL могут далее подразделяться на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), со вставками более консервативных областей, называемых каркасными областями (FR). Каждая VH и VL может состоять из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин «антитело» включает в себя ссылку как на гликозилированные, так и на негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин «антитело» включает в себя, но не ограничивается ими, антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии данного антитела. IgG включает в себя подмножество антител.

#### **Иллюстративные варианты осуществления данного изобретения**

В вариантах осуществления данного изобретения, представленных в данном документе, представлены способы и системы для идентификации антитела против лекарственного препарата в образце.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения представлен способ идентификации антитела против лекарственного препарата в образце, включающий в себя: приведение указанного образца в контакт с первым меченым лекарственным препаратом, приведение указанного образца в контакт со вторым меченым лекарственным препаратом, приведение указанного образца в контакт со связывающим партнером мишени и выявление присутствия комплекса, который содержит первый меченый лекарственный препарат, антитело против лекарственного препарата и второй меченый лекарственный препарат; при этом указанный образец содержит указанное антитело против лекарственного препарата и указанную мишень, при этом указанная мишень является партнером по связыванию лекарственного препарата. В некоторых аспектах данного изобретения указанный способ идентификации антитела против лекарственного препарата в образце выполняют в условиях слабокислого экспериментального pH.

В некоторых аспектах указанный слабый экспериментальный pH указанного способа находится в диапазоне около pH 4,5-6,5, около pH 3-6,9, около pH 4-6,5, около pH 4,5-6,5, около pH 5-6,5, около pH 5,5-6,5, около pH 5,9-6,2, около pH 5,0 или, предпочтительно, около pH 6,0.

В некоторых аспектах данного изобретения указанный способ идентификации антитела против лекарственного препарата в образце дополнительно включает в себя удаление мишени с использованием антитела против мишени, при этом указанное антитело против мишени прикреплено к твердой подложке.

В некоторых аспектах указанная твердая подложка в указанных способе или системе согласно данному изобретению может представлять собой гранулы, магнитные гранулы, хроматографические смолы, полимер или хроматографическую матрицу.

Следует понимать, что указанная система не ограничивается каким-либо из вышеуказанных фармацевтических продуктов, пептидов, белков, антител, антител против лекарственных препаратов, белковых комплексов или фармацевтических продуктов.

Последовательная маркировка этапов способа цифрами и (или) буквами в данном документе не предназначена для ограничения указанного способа или любых его вариантов осуществления конкретным указанным порядком. В данном документе цитируются различные публикации, включая патенты, заявки на патенты, опубликованные заявки на патенты, номера доступа, технические статьи и научные статьи. Каждая из этих цитируемых ссылок включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме для всех целей. Данное описание будет более полно понято со ссылкой на нижеследующие примеры, которые предоставлены для более подробного описания данного изобретения. Они предназначены для иллюстрации и их не следует рассматривать как ограничивающие объем данного изобретения.

## **ПРИМЕРЫ**

### **Приготовление реагентов**

Растворы, которые использовали для анализа общего уровня лекарственного препарата и анализа общего уровня мишени, готовили в буфере-разбавителе для анализа (БРА: 0,5% БСА, 0,05% Твин-20, 1X ФСБ). Растворы, которые использовали в АПЛП-анализе, готовили в 1% БСА, 1X ФСБ. (БРА - буфер-разбавитель для анализа; БСА - бычий сывороточный альбумин; ФСБ - фосфатно-солевой буфер). ФСБ был приобретен у Gibco (г. Гранд-Айленд, штат Нью-Йорк, США). Реактив Trizma base в концентрации 1,5 М был приобретен у Sigma (г. Сент-Луис, штат Миссури, США). Ледяная уксусная кислота была приобретена у Thermo Fisher Scientific (г. Уолтем, штат Массачусетс, США). Сыворотка крови человека и сыворотка крови примата были приобретены у Bioreclamation (г. Вестбери, штат Нью-Йорк, США). Микропланшеты, покрытые стрептавидином, были приобретены у Meso Scale Discovery (г. Роквилл, штат Мэриленд, США). Набор Dynabeads для связывания антител был приобретен у Thermo Fisher Scientific (г. Вильнюс, Литва). Рекомбинантный белок-мишень человека, моноклональное антитело крысы против мишени, биотинилированное поликлональное антитело овцы против мишени и конъюгированный с пероксидазой хрена стрептавидин были приобретены у R&D Systems (г. Миннеаполис, штат Миннесота, США). Растворимый рецептор мишени и кофакторные белки были приобретены у Sigma (г. Сент-Луис, штат Миссури, США). Черные планшеты с микролунками, конъюгированный с пероксидазой хрена реактив NeutrAvidin и хемилюминесцентный субстрат SuperSignal ELISA Pico были приобретены у Thermo Fisher Scientific (г. Рокфорд, штат Иллинойс, США). МАТ-У - это лекарственный препарат, представляющий собой полностью человеческое моноклональное антитело.

### **Способы**

### 1. Определение pH

Определение pH выполняли с помощью калиброванного pH-метра Mettler Toledo (г. Колумбус, штат Огайо, США) с электродом InLab Expert Pro-ISM. Объединенную сыворотку человека разводили в 10 раз в 300 мМ уксусной кислоте. Подкисленные образцы затем разбавляли в 5 раз различными концентрациями растворов Трис-основания с добавлением 50 мкг/мл рецептора и 50 мкг/мл кофактора. Измерения pH проводили для конечных анализируемых растворов, как показано в таблице 1.

Таблица 1. Оценка условий pH для выявления АПЛП против МАТ-У

Раствор	pH
75 мМ Трис	7,4
60 мМ Трис	6,5
50 мМ Трис	6,0
40 мМ Трис	5,5
30 мМ Трис	5,0

### 2. Связывание магнитных гранул с антителом против мишени

Чтобы осуществить деплецию белка-мишени, например, белка-мишени, который может распознаваться лекарственным препаратом-антителом, антитело против мишени связывали с магнитными гранулами для проведения иммунодеплеции. Антитело против мишени МАТ-А соединяли с Dynabeads в соответствии с инструкциями производителя. Соответствующие количества Dynabeads промывали в 1 мл раствора С1 из указанного набора реагентов и затем повторно суспендировали с соответствующим объемом антитела против мишени МАТ-А, разведенного в растворе С1. Затем к данной смеси добавляли эквивалентный объем раствора С2 с последующей инкубацией при температуре 37°C в течение 16-24 часов. Связавшиеся гранулы последовательно промывали буферами НВ, LB и SB из указанного набора реагентов. Затем связавшиеся гранулы повторно суспендировали с буфером SB и инкубировали при комнатной температуре в течение около 15 минут. Надосадочную жидкость удаляли. Конъюгированные с МАТ-А Dynabeads повторно суспендировали в буфере SB в концентрации 10 мг/мл и хранили при температуре 4°C до использования.

### 3. Мостиковые анализы с АПЛП

Были разработаны иммуноанализы для выявления присутствия АПЛП в образцах сыворотки крови. Присутствие АПЛП, таких как антитела против МАТ-У, в образцах сыворотки крови примата и человека выявляли с помощью мостикового иммуноанализа, например, мостикового АПЛП-анализа. В качестве положительного контроля использовали моноклональное антитело мыши против лекарственного препарата, такое как антитело мыши против МАТ-У. Биотинилированный лекарственный препарат (био-препарат) и меченный рутением лекарственный препарат (ру-препарат), такие как биотинилированный МАТ-У (био-МАТ-У) и меченный рутением МАТ-У (ру-МАТ-У), использовали в качестве компонентов для создания мостикового комплекса, например,

мостикового комплекса, содержащего АПЛП, био-препарат и ру-препарат (например, мостиковый комплекс, содержащий антитело против МАТ-У, био-МАТ-У и ру-МАТ-У).

Образцы сыворотки крови, содержащие антитела против МАТ-У, подкисляли уксусной кислотой перед проведением мостикового АПЛП-анализа, например, путем 10-кратного разведения в 300 мМ уксусной кислоте с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение не менее 10 минут. Для выполнения мостикового АПЛП-анализа, имеющего нейтральный рН, био-МАТ-У (1,0 мкг/мл) и ру-МАТ-У (1,0 мкг/мл) готовили в буфере для анализа, содержащем 75 мМ Трис-основания, перед добавлением их в образец сыворотки крови.

Обработанные кислотой образцы сыворотки крови разбавляли в 5 раз в растворе меченого лекарственного препарата, например, растворе, содержащем био-МАТ-У и (или) ру-МАТ-У, и затем образцы инкубировали в течение около 60 мин при комнатной температуре. После инкубации образцы переносили в заблокированные (5% БСА) 96-луночные планшеты Streptavidin Multi-Array® (от MSD, т. е. Meso Scale Discovery, LLC) и инкубировали в течение около 60 минут при комнатной температуре. Планшеты промывали. В планшеты добавляли буфер для считывания и выполняли считывание планшетов на анализаторе планшетов MSD.

#### **4. Анализы на общий уровень лекарственного препарата**

Были разработаны способы анализа для выявления присутствия лекарственных препаратов в образцах сыворотки крови. Чтобы проанализировать наличие лекарственных препаратов в образце сыворотки крови примата, например, общий уровень лекарственных препаратов в образце сыворотки крови, микротитровальный планшет покрывали антителом мыши против IgG4 человека (2 мкг/мл). МАТ-У использовали в качестве стандарта в анализе на общий уровень лекарственного препарата. Подкисление уксусной кислотой использовали для диссоциации растворимых комплексов мишень - лекарственный препарат. Образцы сыворотки крови примата, стандарты и контрольные образцы обрабатывали 30 мМ уксусной кислотой для диссоциации растворимых комплексов мишень - лекарственный препарат, присутствующих в образцах сыворотки крови. В дополнение к этому применяли обработку подкислением для улучшения выявления лекарственных препаратов в присутствии растворимых мишеней в сыворотке крови. После захвата МАТ-У на микротитровальном планшете МАТ-У выявляли с использованием биотинилированного Ig мыши против человека, который представлял собой моноклональное антитело, специфичное в отношении легкой цепи каппа (100 нг/мл) в комбинации с конъюгированной с нейтравидином пероксидазой хрена (NeutrAvidin-HRP, 50 нг/мл). Все инкубации проводили при комнатной температуре в течение около 60 минут. Затем использовали специфичный в отношении пероксидазы субстрат на основе люминола для генерации сигнала выявления. Получали интенсивность сигнала, которая была пропорциональна концентрации общего МАТ-У. Планшет считывали на микропланшетном люминометре.

Чтобы проанализировать наличие лекарственных препаратов в образце сыворотки крови человека, например, общий уровень лекарственных препаратов в образце сыворотки крови, микротитровальный планшет покрывали моноклональным антителом мыши против МАТ-У (2 мкг/мл). МАТ-У использовали в качестве стандарта в анализе на общий уровень лекарственного препарата. Подкисление уксусной кислотой использовали для диссоциации растворимых комплексов мишень - лекарственный препарат. Образцы сыворотки крови человека обрабатывали 30 мМ уксусной кислотой для диссоциации растворимых комплексов мишень - лекарственный препарат, присутствующих в образцах сыворотки крови. После захвата МАТ-У на микротитровальном планшете МАТ-У выявляли с использованием другого биотинилированного моноклонального антитела мыши, специфичного в отношении МАТ-У (100 нг/мл) в комбинации с конъюгированной с нейтривином пероксидазой хрена (NeutrAvidin-HRP, 50 нг/мл). Все инкубации проводили при комнатной температуре в течение около 60 минут. Затем использовали специфичный в отношении пероксидазы субстрат на основе люминола для генерации сигнала выявления. Получали интенсивность сигнала, которая была пропорциональна концентрации общего МАТ-У. Планшет считывали на микропланшетном люминометре.

#### **5. Анализы на общий уровень мишени**

Были разработаны способы анализа для выявления присутствия белков-мишеней в образцах сыворотки крови. Чтобы проанализировать наличие белков-мишеней в образцах сыворотки крови человека, например, общий уровень белков-мишеней в образце сыворотки крови, микротитровальный планшет покрывали моноклональным антителом крысы против соответствующей мишени (4 мкг/мл). В качестве стандарта использовали рекомбинантный белок-мишень. Подкисление уксусной кислотой использовали для диссоциации растворимых комплексов мишень - лекарственный препарат. Образцы сыворотки крови, стандарты и контрольные образцы разводили в соотношении 1:10 в 300 мМ уксусной кислоте для диссоциации растворимых комплексов мишень - лекарственный препарат, которые могли присутствовать в образцах сыворотки крови, после чего проводили нейтрализацию разведением 1:5 в 75 мМ растворе Трис. Затем нейтрализованные стандарты, контрольные образцы и образцы сыворотки крови добавляли в микротитровальный планшет. Белки-мишени, захваченные на планшете, выявляли с помощью биотинилированного поликлонального антитела овцы против соответствующей мишени (100 нг/мл) в комбинации со стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена (streptavidin-HRP, разведение 1:200 в БРА). Все инкубации проводили при комнатной температуре в течение около 60 минут. Впоследствии добавляли субстрат на основе люминола, который был специфическим субстратом для пероксидазы, для генерации сигнала выявления. Получали интенсивность сигнала, которая была пропорциональна концентрации общих мишеней. Планшет считывали на микропланшетном люминометре.

#### **6. Иммунодеплегция белков-мишеней**

Были разработаны два способа, например, способы А и В, для иммунодеплеции белков-мишеней в образцах сыворотки крови. В способе А для иммунодеплеции белков-мишеней образцы сыворотки крови разбавляли в 10 раз в 300 мМ уксусной кислоте и инкубировали при комнатной температуре по меньшей мере 10 минут. Подкисленные образцы затем нейтрализовали разведением 1:3 в 150 мМ растворе Трис. Магнитные гранулы, конъюгированные с антителом против мишени МАТ-А, промывали один раз в 1X ФСБ и затем повторно суспендировали с нейтрализованными образцами сыворотки крови. После инкубации при комнатной температуре в течение около 60 мин надосадочную жидкость собирали и затем смешивали с раствором, содержащем 2 мкг/мл био-МАТ-У и 2 мкг/мл ру-МАТ-У. После инкубации при комнатной температуре в течение около 60 мин образцы переносили в блокированные (5% БСА) 96-луночные планшеты Streptavidin Multi-Array® (от MSD) и далее инкубировали в течение около 60 мин при комнатной температуре. Планшеты промывали, добавляли буфер для считывания. Планшеты считывали на планшетном анализаторе MSD.

В способе В для иммунодеплеции белков-мишеней образцы сыворотки крови разбавляли в 10 раз в 30 мМ уксусной кислоте и затем инкубировали с магнитными гранулами, конъюгированными с антителом против мишени МАТ-А в течение около 30 мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость собирали и затем разбавляли в 3 раза в 10 мМ растворе Трис, содержащем 1 мкг/мл био-МАТ-У и 1 мкг/мл ру-МАТ-У. После инкубации при комнатной температуре в течение около 60 мин образцы переносили в блокированные (5% БСА) 96-луночные планшеты Streptavidin Multi-Array® (от MSD) и далее инкубировали в течение около 60 мин при комнатной температуре. Планшеты промывали, добавляли буфер для считывания. Планшеты считывали на планшетном анализаторе MSD.

### **Пример 1. Применение антител против мишени для улучшения выявления АПЛП**

Когда лекарственный препарат-мишень представляет собой мультимерный белок, который присутствует в сыворотке крови, указанный лекарственный препарат-мишень может генерировать опосредованный мишенью ложноположительный сигнал, который может создавать помехи выявлению АПЛП. АПЛП против МАТ-У в образцах сыворотки крови можно выявлять с помощью ру-МАТ-У и био-МАТ-У путем образования комплекса, содержащего ру-МАТ-У, АПЛП и био-МАТ-У, например, используя АПЛП для соединения ру-МАТ-У и био-МАТ-У. Однако, поскольку мишень для МАТ-У (например, лекарственный препарата) представляет собой мультимерный белок, который экспрессируется на разных уровнях в образцах «наивной» сыворотки крови примата и человека, мишень в сыворотке крови может образовывать комплекс с ру-МАТ-У и био-МАТ-У, например, используя мишень для соединения ру-МАТ-У и био-МАТ-У, что способствует ложноположительному сигналу, опосредованному мишенью. Антитела против мишени использовали для устранения помех ложноположительного сигнала, вызванных мостиковыми эффектами лекарственного препарата-мишени.

Антитела против мишени часто используются для устранения помех от мишени в мостиковых АПЛП-анализах (Liao, et al., Inhibition of interleukin-5 induced false positive anti-drug antibody responses against mepolizumab through the use of a competitive blocking antibody. *J Immunol Methods*, 2017. 441: p. 15-23; Zhong, et al., Identification and inhibition of drug target interference in immunogenicity assays. *J Immunol Methods*, 2010. 355 (1-2): p. 21-8; Dai, et al.; Weeraratne, et al., Development of a biosensor-based immunogenicity assay capable of blocking soluble drug target interference. *J Immunol Methods*, 2013. 396 (1-2): p. 44-55; Maria, et al., A novel strategy for elimination of soluble-ligand interference in immunogenicity assays. *AAPS National Biotechnology Conference*. Seattle, WA, USA, 2009). Выполняли скрининг ряда антител против мишени, например, Ат1-Ат9, при 100 мкг/мл по сравнению с контролем («контроль») для устранения помех от мишени в образце «наивной» сыворотки крови примата, как показано на фиг. 2А. Среди антител против мишени, исследованных в данном скрининге, только одно антитело против мишени, например, Ат4, было способно частично подавлять ложноположительный сигнал, опосредованный мишенью, как показано на фиг. 2А. Два из протестированных антител, например, Ат8 и Ат9, фактически потенцировали (усиливали) ложноположительный сигнал, опосредованный мишенью. Также оценивали различные комбинации указанных антител, но они не смогли в достаточной степени ингибировать помехи от мишени в образцах сыворотки крови примата (данные не показаны).

Далее проводили несколько раундов иммунизации для получения большего количества антител против мишени. Однако ни одно из антител против мишени, исследованных в данном скрининге, не смогло достаточно конкурировать с МАТ-У. Для устранения помех от мишени использовали одно коммерчески доступное поликлональное антитело против мишени. Это поликлональное антитело против мишени проявляло определенные эффекты для устранения помех от мишени дозозависимым образом, как показано на фиг. 2В. Однако поликлональные антитела могут проявлять вариабельность от партии к партии, что может оказать негативное влияние на разработку анализа в отношении устранения помех от мишени.

### **Пример 2. Применение рецептора мишени для улучшения выявления АПЛП**

Рецептор мишени включали в мостиковый АПЛП-анализ для улучшения количественного определения АПЛП за счет устранения сигналов, опосредованных мишенью. Растворимый рецептор мишени (например, 50 мкг/мл) включали в раствор меченого лекарственного препарата. Раствор меченого лекарственного препарата готовили в 50мМ растворе Трис для приведения рН-условий анализа к слабокислоте состоянию с рН около 6,0. Слабокислая среда также может свести к минимуму связывание мишени как с био-МАТ-У, так и с ру-МАТ-У. Результаты показали, что добавление растворимого рецептора мишени может значительно снизить опосредованный мишенью сигнал в образцах «наивной» сыворотки крови примата. Растворимый рецептор мишени проявил способность ослаблять опосредованный мишенью сигнал зависимым от дозы образом, как показано на фиг. 3. По оси У указано среднее число считываний АПЛП, а по

оси X - концентрации рецептора мишени в мкг/мл, как показано на фиг. 3. Растворимый рецептор мишени эффективно блокировал помехи от мишени в образце «наивной» сыворотки крови примата при 100 мкг/мл.

### **Пример 3. Применение рецептора мишени и кофактора для улучшения выявления АПЛП**

Рецептор мишени и кофактор включали в мостиковый АПЛП-анализ для улучшения выявления АПЛП за счет устранения сигналов, опосредованных мишенью. Растворимый рецептор мишени (например, 50 мкг/мл) и белок-кофактор (например, 50 мкг/мл) включали в раствор меченого лекарственного препарата. Раствор меченого лекарственного препарата готовили в 50мМ растворе Трис для приведения рН-условий анализа к слабокислому состоянию с рН около 6,0. Слабокислая среда также может свести к минимуму связывание мишени как с био-МАТ-У, так и с ру-МАТ-У. Различные концентрации белка кофактора добавляли к раствору, содержащему 50 мкг/мл растворимого рецептора мишени, для выполнения мостикового АПЛП-анализа, как показано на фиг. 4А. По оси Y указано среднее число считываний АПЛП, а по оси X - концентрации рецептора мишени и (или) кофактора в мкг/мл, как показано на фиг. 4А. Результаты показали, что комбинация растворимого рецептора мишени и белков-кофакторов может значительно снизить опосредованный мишенью сигнал в образцах «наивной» сыворотки крови примата. Указанные два белка, например, рецептор мишени и кофактор, функционировали вместе синергическим образом, эффективно снижая фоновый сигнал в образце «наивной» сыворотки крови примата. Результаты показали, что комбинация 50 мкг/мл рецептора и 50 мкг/мл кофактора была наиболее эффективной, как показано на фиг. 4А.

В восьми образцах «наивной» сыворотки крови приматов выявили широкий диапазон опосредованных мишенью сигналов анализа в отсутствие каких-либо белков-блокаторов, как показано на фиг. 4В (контроль), что, вероятно, может отражать естественную изменчивость эндогенных уровней мишени. Присутствие рецептора мишени и кофактора, например, комбинации 50 мкг/мл рецептора и 50 мкг/мл кофактора, показало эффективное устранение опосредованных мишенью сигналов анализа во всех образцах сыворотки крови приматов, как показано на фиг. 4В. Однако в одном образце сыворотки крови сигнал все еще составлял около 400 средних считываний.

### **Пример 4. Оптимизация рН-условий анализа для устранения помех от мишени**

Аффинность связывания МАТ-У с его мишенью было значительно снижено в кислых условиях (около рН 6,0) по сравнению с нейтральным рН. Чтобы проверить, могут ли слабокислые рН-условия анализа ингибировать опосредованный мишенью сигнал в мостиковом АПЛП-анализе, осуществили четыре схемы эксперимента для оптимизации рН-условий анализа. Указанные четыре схемы эксперимента представляли собой: (1) четыре образца «наивной» сыворотки приматов без каких-либо блокаторов при нейтральном рН (контроль); (2) четыре образца «наивной» сыворотки приматов с 50

мкг/мл рецептора и 50 мкг/мл кофактора при нейтральном рН; (3) четыре образца «наивной» сыворотки приматов без каких-либо блокаторов при слабнокислом рН около рН 6,0; и (4) четыре образца «наивной» сыворотки приматов с 50 мкг/мл рецептора и 50 мкг/мл кофактора при рН около рН 6,0.

Результаты показали, что высокий фоновый сигнал от образцов «наивной» сыворотки крови приматов частично подавлялся одним только слабнокислым рН (рН ~6,0), как показано на фиг. 5. Результаты оптимизации рН показали, что слабнокислый рН-уровень анализа может ингибировать помехи от мишени в образцах сыворотки крови приматов. Комбинация белков рецептора и кофактора проявила способность значительно снижать опосредованный мишенью сигнал при обоих рН-условиях, например, при нейтральном рН и при слабнокислом рН. В частности, комбинация рецептора, кофактора и слабнокислых условий анализа (рН ~6,0) обеспечивала синергические эффекты для полного подавления опосредованного мишенью сигнала, как показано на фиг. 5.

Уровень переносимости мишени определяли с использованием рекомбинантного белка-мишени при различных условиях экспериментального рН, когда АПЛП-анализ проводили с использованием 50 мкг/мл как рецепторных, так и кофакторных белков. Уровень переносимости мишени определяли как количество мишени, необходимое для получения сигнала анализа выше фонового уровня планшета. Определили, что уровень переносимости мишени составлял около 94 нг/мл, когда АПЛП-анализ проводили с использованием 50 мкг/мл как рецепторных, так и кофакторных белков в нейтральных рН-условиях анализа, как показано на фиг. 6А. Уровень переносимости мишени увеличился до около 380 нг/мл при той же концентрации рецептора и кофактора, когда рН анализа составлял около 6,5. Уровень переносимости мишени был еще выше, около 5,0 мкг/мл, когда рН анализа составлял около 6,0. Данные результаты указывают на то, что слабнокислые рН-условия анализа могут значительно улучшить устранение сигналов, опосредованных мишенью.

Чтобы убедиться, что слабнокислый рН оказывает минимальное влияние на стабильность и (или) выявление истинного сигнала АПЛП, анализировали ранние образцы крови кроликов, иммунизированных МАТ-У Fab, в различных рН-условиях анализа. Образец крови 1 получали через около 30 суток после иммунизации, и индуцированный ответ антител в данном образце, как правило, состоял из низкоаффинного поликлонального АПЛП, на выявление которого могут оказывать большее влияние строгие условия анализа. Как показано на фиг. 6В, среднее число считываний АПЛП было одинаковым при каждом экспериментальном условии независимо от рН-условий анализа. Данные результаты указывают на то, что слабнокислый рН оказывал минимальное влияние или вовсе не оказывал влияние на стабильность и (или) выявление истинного АПЛП в указанных образцах. Данные результаты указывают на то, что слабнокислый рН улучшил уровни переносимости мишени и оказал минимальное влияние на истинное выявление АПЛП.

### **Пример 5. Комбинация рецептора мишени, кофактора и слабых рН-условий анализа**

Комбинацию рецептора мишени, кофактора и слабых рН-условий анализа включили в мостиковый АПЛП-анализ для улучшения выявления АПЛП за счет устранения сигналов, опосредованных мишенью. Образцы приматов, полученные после введения дозы, которые обычно содержат более высокие уровни белка-мишени, использовали в мостиковых АПЛП-анализах. Образцы сыворотки крови от двух приматов, полученные в 0-е, 28-е и 52-е сутки после введения одной дозы препарата (например, МАТ-У), исследовали с помощью мостикового АПЛП-анализа. Концентрации лекарственного препарата в образцах сыворотки крови указывали на профили фармакокинетики (ФК) данного лекарственного препарата у двух указанных приматов, как показано на фиг. 7А (НПКО обозначает нижний предел количественного определения). Примат 1 демонстрировал линейный профиль ФК. Примат 2 демонстрировал значительное снижение уровней лекарственного препарата, например, ускоренный клиренс препарата, начиная с 21-х суток, что может указывать на значительный АПЛП-ответ у примата 2.

Измеряли концентрации мишени и АПЛП в образцах сыворотки приматов. На фиг. 7В представлены концентрации мишени и сигналы АПЛП в образцах, полученных в 0-е, 28-е и 52-е сутки, при различных условиях анализа с использованием образцов от приматов после введения дозы согласно иллюстративному варианту осуществления данного изобретения. По сравнению с базовым уровнем уровни мишени увеличились в около 10-15 раз в образцах, полученных в 28-е сутки от обоих приматов, и концентрация мишени оставалась высокой в образце, полученном в 52-е сутки от примата 1. Когда мостиковый АПЛП-анализ проводили с использованием образцов после введения дозы в контрольных условиях без присутствия каких-либо конкурентных блокаторов в нейтральных рН-условиях анализа, от этих образцов сыворотки крови получали сильный сигнал анализа, как показано на фиг. 7В. Добавление молекул рецептора и кофактора в мостиковые АПЛП-анализы в нейтральных рН-условиях анализа частично ингибировало сигнал анализа в этих образцах. В образцах базового уровня снижение сигнала было более заметным. Однако, поскольку среднее число считываний АПЛП оставалось намного выше фонового уровня планшета для всех образцов в указанных условиях, было трудно отличить истинный сигнал АПЛП от ложноположительного сигнала, опосредованного мишенью.

Когда образцы сыворотки крови приматов тестировали в мостиковом АПЛП-анализе в присутствии 50 мкг/мл рецептора и 50 мкг/мл кофактора в слабых рН-условиях анализа (например, около рН 6,0), для всех образцов от примата 1 выявили низкий фоновый сигнал, как показано на фиг. 7В. Для примата 2 наблюдалось приблизительно 2-кратное и 200-кратное повышение сигнала АПЛП для образцов, полученных на 28-е и 52-е сутки, соответственно, по сравнению с базовым уровнем, как показано на фиг. 7В. Данные результаты указывают на то, что комбинация растворимого

рецептора, кофактора и слабокислых рН-условий анализа может устранить помехи от мишени и выявить истинные АПЛП в образцах сыворотки крови приматов после введения дозы. Данные результаты также показали, что образцы сыворотки крови примата 1 не содержали АПЛП и что в образцах сыворотки крови примата 2 был выявлен АПЛП-ответ, что подтверждает профили концентрации препарата у двух указанных приматов, как показано на фиг. 7А.

Образцы для клинического исследования (сутки 0, 29 и 64) от трех субъектов из клинического испытания фазы I также тестировали с использованием мостикового АПЛП-анализа путем включения комбинации рецептора мишени, кофактора и слабокислых рН-условий анализа для улучшения выявления АПЛП за счет устранения сигналов, опосредованных мишенью. В указанных образцах для клинического исследования измеряли концентрации лекарственного препарата. Измеряли концентрации лекарственного препарата в образцах сыворотки крови трех субъектов, которым ввели одну дозу МАТ-У, что показано на фиг. 8. НПКО обозначает нижний предел количественного определения. Профили ФК данных образцов не свидетельствовали о значительных ответах АПЛП. Однако высокий сигнал в данном анализе наблюдался для всех образцов, как показано на фиг. 9, когда данные образцы исследовали в мостиковом анализе АПЛП без присутствия каких-либо молекул-блокаторов в нейтральных рН-условиях анализа. На фиг. 9 представлены концентрации мишени и сигналы АПЛП в образцах, полученных в 0-е, 29-е и 64-е сутки, с различными экспериментальными условиями, включительно с включением в мостиковый АПЛП-анализ рецептора мишени, кофактора и слабокислых рН-условий анализа для улучшения выявления АПЛП, согласно иллюстративному варианту осуществления данного изобретения.

Данные сигналы анализа, по-видимому, коррелировали с уровнями мишени в указанных образцах. Концентрации мишени увеличились в образцах после введения дозы у всех трех субъектов. Высокий уровень сигналов, опосредованных мишенью, выявили во всех образцах, в которых отсутствовали блокаторы, в нейтральных рН-условиях анализа. Когда указанные образцы для клинического исследования повторно протестировали в присутствии растворимого рецептора (50 мкг/мл) и кофактора (50 мкг/мл) в слабокислых рН-условиях анализа (около рН 6,0), выявили только фоновый сигнал, как показано на фиг. 9. Затем тестировали большой набор образцов для клинического исследования (образцы, полученные в 0-е, 29-е и 64-е сутки от 11 субъектов), и все образцы продемонстрировали только фоновый сигнал (данные не показаны). Данные результаты указывают на то, что формат анализа с включением двух конкурирующих белков-блокаторов (например, рецептора мишени и кофактора) в слабокислых условиях анализа может эффективно устранять помехи от мишени в образцах сыворотки крови человека после введения дозы. Данные результаты также подтвердили профили фармакокинетики, которые не предполагали положительного АПЛП-ответа.

**Пример 6. Иммунодеплеция белков-мишеней в нейтральных рН-условиях анализа**

Иммунодеплецию применяли для удаления различных белков-мишеней из образцов сыворотки крови для подавления опосредованного мишенью сигнала анализа (Dai, et al.). Подобный подход исследовали для удаления мультимерного белка-мишени из образцов сыворотки крови человека. Для проведения иммунодеплеции применяли МАТ-А - антитело против мишени, которое не смогло конкурировать с препаратом МАТ-У за связывание с мишенью в нейтральных рН-условиях анализа. Вместо этого МАТ-А может усиливать опосредованный мишенью сигнал в образцах сыворотки крови человека (данные не показаны).

Другой подход к выполнению иммунодеплеции реализовывали с использованием магнитных гранул, конъюгированных с МАТ-А, которые смогли успешно удалить белок-мишень из пяти образцов «наивной» сыворотки крови человека, тем самым подавляя опосредованный мишенью сигнал, как показано на фиг. 10А. Сигналы, опосредованные мишенью, устраняли в образцах «наивной» сыворотки крови человека, не содержащих лекарственных препаратов, путем иммунодеплеции белка-мишени магнитными гранулами, конъюгированными с МАТ-А, в нейтральных рН-условиях анализа. Однако в одном образце сыворотки крови сигнал все еще составлял около 450 средних считываний после удаления мишени. Магнитные гранулы, конъюгированные с МАТ-А, также применяли для удаления белка-мишени из образцов для клинического исследования, например, образцов, полученных в 1-е, 15-е, 29-е и 57-е сутки от двух субъектов, которым ввели одну дозу МАТ-У. Данные результаты указывают на то, что только в образцах базового уровня произошло снижение до фонового уровня сигнала. Значительный уровень опосредованного мишенью сигнала все еще выявлялся в образцах после введения дозы, как показано на фиг. 10В. Эти образцы после введения дозы содержали высокие концентрации лекарственного препарата МАТ-У. Поскольку МАТ-А не конкурирует с МАТ-У за связывание с мишенью в нейтральных рН-условиях анализа, гранулы, связанные с антителом против мишени, могут быть не способны полностью удалить белок-мишень из образцов сыворотки крови в присутствии высоких концентраций МАТ-У. В образцах после введения дозы, когда лекарственный препарат все еще присутствовал в высокой концентрации, опосредованный мишенью сигнал анализа не был подавлен полностью. Данные результаты указывают на то, что иммунодеплеции магнитными гранулами, конъюгированными с МАТ-А, в нейтральных рН-условиях анализа было недостаточно для устранения помех от мишени в образцах сыворотки крови человека после введения дозы.

#### **Пример 7. Иммунодеплеция белков-мишеней в слабокислых рН-условиях анализа**

Антитело против мишени (МАТ-А) и лекарственный препарат МАТ-У демонстрируют близкие значения  $K_D$  в нейтральных рН-условиях анализа, хотя  $t_{1/2}$  для МАТ-А немного выше, чем для МАТ-У, как показано в таблице 2. Однако при рН ~6,0 антитело против мишени демонстрирует гораздо лучшее связывание с мишенью и гораздо более длительный  $t_{1/2}$  (таблица 2). Чтобы проверить, может ли МАТ-А конкурировать с

МАТ-У за связывание с мишенью при слабокислом рН (рН ~6,0), образцы для клинического исследования, полученные в 1-е, 15-е, 29-е и 57-е сутки, исследовали с МАТ-А или без него в нейтральных или слабокислых (рН ~6,0) рН-условиях анализа. В нейтральных рН-условиях анализа добавление МАТ-А не привело к ингибированию опосредованного мишенью сигнала. Вместо этого указанное антитело немного усилило наблюдаемый помехи от мишени в исследуемых образцах, как показано на фиг. 11. В слабокислых рН-условиях анализа сигнал анализа снизился, особенно в образцах базового уровня. Когда к слабокислому раствору для анализа добавляли МАТ-А, наблюдалось ингибирование опосредованного мишенью сигнала для образцов после введения дозы, даже для тех образцов, в которых МАТ-У все еще присутствовал в высоких концентрациях, как показано на фиг. 11. На фиг. 11 представлены сигналы АПЛП-анализа в образцах, полученных в 1-е, 15-е, 29-е и 57-е сутки, без блокаторов в нейтральных рН-условиях анализа, с 100 мкг/мл МАТ-А в нейтральных рН-условиях анализа, без блокаторов в слабокислых рН-условиях анализа (рН ~ 6,0) и с 100 мкг/мл МАТ-А в слабокислых рН-условиях анализа (рН ~ 6,0). Данные результаты указывают на то, что МАТ-А может конкурировать с МАТ-У в слабокислых рН-условиях анализа.

Таблица 2. Значения  $K_D$  и  $t_{1/2}$  для МАТ-У и МАТ-А.

Антитело	рН ~7,0 25°C		рН ~6,0 25°C	
	$K_D$ (М)	$t_{1/2}$ (мин)	$K_D$ (М)	$t_{1/2}$
МАТ-У	6.70E-10	28,8	6.75E-08	2,3
МАТ-А	6.80E-10	62,1	6.49E-10	48,2

По сравнению с образцами базового уровня концентрация мишени в образцах, полученных в 15-е, 29-е и 57-е сутки, увеличилась в около 3-5 раз, прежде чем вернуться к базовым уровням в 183-е сутки, как показано на фиг. 12. На фиг. 12 представлены концентрации мишени и сигнал АПЛП-анализа в образцах, полученных в 1-е, 15-е, 29-е и 57-е сутки, до и после иммунодеплеции магнитными гранулами, конъюгированными с МАТ-А, в слабокислых рН-условиях анализа, согласно иллюстративному варианту осуществления данного изобретения. Для обеспечения того, что указанный модифицированный способ иммунодеплеции способен удалять белки-мишени в указанных образцах, измеряли концентрации мишени до и после проведения иммунодеплеции. До проведения иммунодеплеции уровни мишени варьировали от 150 нг/мл до 750 нг/мл, тогда как концентрации мишени после иммунодеплеции составляли всего лишь от 2 до 5 нг/мл. Данные результаты указывают на то, что белок-мишень был эффективно удален, как показано на фиг. 12. Когда образцы для клинического исследования протестировали в модифицированном АПЛП-анализе с иммунодеплецией, выявили только фоновый сигнал (около 200 средних считываний), по сравнению со средним числом считываний, составляющим от 1500 до 2300, наблюдаемым без иммунодеплеции, как показано на фиг. 12. Данные результаты указывают на то, что МАТ-

А может эффективно конкурировать с МАТ-У за связывание с мишенью, когда рН анализа составляет около 5,0, и, следовательно, может полностью истощать белок-мишень в проанализированных образцах для клинического исследования, как показано на фиг. 13. Выполняли иммунодеплецию мультимерного белка-мишени из образцов для клинического исследования с помощью магнитных гранул, конъюгированных с МАТ-А, в слабокислых рН-условиях анализа.

Результаты показали, что иммунодеплегия магнитными гранулами, конъюгированными с МАТ-А, в слабокислых условиях анализа может устранить помехи от мишени в образцах сыворотки крови человека после введения дозы. Как показано на фиг. 13, в образцах базового уровня магнитные гранулы, конъюгированные с МАТ-А, были способны эффективно удалять белок-мишень. Для образцов после введения дозы, даже несмотря на то, что МАТ-У присутствовал в высокой концентрации, обработка 300 мМ уксусной кислотой привела к диссоциации комплексов мишень - лекарственный препарат. После нейтрализации и добавления магнитных гранул, конъюгированных с МАТ-А, некоторые белки-мишени смогли связаться с МАТ-А на гранулах, а часть из них была смогла реассоциироваться с МАТ-У, поскольку МАТ-А не могло конкурировать с МАТ-У в нейтральных рН-условиях анализа. Следовательно, в надосадочной жидкости все еще оставалось достаточное количество вновь образованных комплексов мишень - лекарственный препарат, которые способны генерировать опосредованный мишенью сигнал. Для тех же образцов после введения дозы кислотная обработка 30 мМ уксусной кислотой привела к диссоциации комплексов мишень - лекарственный препарат. Когда подкисленные образцы инкубировали с магнитными гранулами, конъюгированными с МАТ-А, в указанных кислых условиях, свободный белок-мишень был способен предпочтительно связываться с МАТ-А на гранулах, а не с МАТ-У в надосадочной жидкости, поскольку МАТ-А обладал гораздо лучшей аффинностью к связыванию с мишенью, когда рН анализа был между 5 и 6, и с гораздо большим  $t_{1/2}$ , по сравнению с МАТ-У. Следовательно, в надосадочной жидкости присутствовал только несвязанный МАТ-У.

Тестировали образцы, полученные в 1-е, 15-е, 29-е и 57-е сутки от АПЛП-положительного субъекта, с использованием способа АПЛП-анализа с конкурентным блокатором, например, с конкурентным блокатором - растворимым рецептором (50 мкг/мл) и кофактором (50 мкг/мл) при слабокислом рН. С помощью АПЛП-анализа с конкурентным блокатором выявили, что сигнал АПЛП увеличился в около 8 раз в образце, полученном в 15-е сутки, по сравнению с образцом, полученном в 1-е сутки, и в около 3 раз в образце, полученном в 29-е сутки, как показано на фиг. 14. При применении способа с иммунодеплецией аналогичные повышения сигнала АПЛП наблюдались для образцов, полученных в 15-е и 29-е сутки. Данные результаты указывают на то, что данный способ также позволяет выявлять истинный сигнал АПЛП, как показано на фиг. 14. Для образца, полученного в 57-е сутки, сигнал анализа оставался на фоновом уровне, несмотря на то, что концентрация мишени в сыворотке крови составляла около 450 нг/мл.

Данные результаты также указывают на то, что оба способа могут успешно ингибировать сигналы-помехи от мишени. Данные результаты указывают на то, что модифицированный способ с иммунодеплецией может выявлять истинные АПЛП-ответы.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ идентификации антитела против лекарственного препарата в образце, включающий в себя:

    приведение указанного образца в контакт с первым меченым лекарственным препаратом,

    приведение указанного образца в контакт со вторым меченым лекарственным препаратом,

    приведение указанного образца в контакт с партнером по связыванию мишени и выявление присутствия комплекса, который содержит указанный первый меченый лекарственный препарат, указанное антитело против лекарственного препарата и указанный второй меченый лекарственный препарат;

    при этом указанный образец содержит указанное антитело против лекарственного препарата и указанную мишень, и

    при этом указанная мишень является партнером по связыванию указанного лекарственного препарата.

2. Способ по п. 1, дополнительно включающий в себя приведение указанного образца в контакт с кофактором для усиления связывания между указанной мишенью и указанным партнером по связыванию указанной мишени.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный способ выполняют в слабощелочных рН-условиях анализа.

4. Способ по п. 1, дополнительно включающий в себя удаление указанной мишени с помощью антитела против мишени.

5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что указанное антитело против мишени прикреплено к твердой подложке.

6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный первый меченый лекарственный препарат представляет собой меченый рутением лекарственный препарат или биотинилированный лекарственный препарат.

7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный второй меченый лекарственный препарат представляет собой меченый рутением лекарственный препарат или биотинилированный лекарственный препарат.

8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный партнер по связыванию указанной мишени представляет собой естественный партнер по связыванию.

9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный партнер по связыванию указанной мишени представляет собой рецептор указанной мишени.

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная мишень представляет собой растворимую мультимерную мишень.

11. Способ по п. 3, отличающийся тем, что указанные слабощелочные рН-условия анализа находятся в диапазоне от рН около 4,5 до рН около 6,5

12. Способ по п. 3, отличающийся тем, что указанные слабощелочные рН-условия анализа представляют собой рН около 6,0.

13. Способ по п. 3, отличающийся тем, что указанные слабокислые рН-условия анализа представляют собой рН около 5,0.

14. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный лекарственный препарат представляет собой химическое соединение, нуклеиновую кислоту, токсин, пептид, белок, слитый белок, антитело, фрагмент антитела, область Fab антитела, продукт конъюгации антитела и лекарственного препарата или фармацевтический продукт.

15. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный лекарственный препарат представляет собой антитело.

16. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный образец представляет собой образец сыворотки крови.

17. Система для идентификации антитела против лекарственного препарата в образце, включающая в себя:

первый меченый лекарственный препарат,

второй меченый лекарственный препарат,

партнера по связыванию мишени и

систему анализа для выявления присутствия комплекса, который содержит указанный первый меченый лекарственный препарат, указанное антитело против лекарственного препарата и указанный второй меченый лекарственный препарат;

при этом указанный образец содержит указанное антитело против лекарственного препарата и указанную мишень, и

при этом указанная мишень является партнером по связыванию указанного лекарственного препарата.

18. Система по п. 17, дополнительно включающая в себя кофактор, который может усиливать связывание между указанной мишенью и указанным партнером по связыванию указанной мишени.

19. Способ по п. 17, отличающийся тем, что указанный образец обрабатывают раствором, имеющим слабокислый рН.

20. Система по п. 17, дополнительно содержащая антитело против мишени.

21. Система по п. 20, отличающаяся тем, что указанное антитело против мишени прикреплено к твердой подложке.

22. Система по п. 17, отличающаяся тем, что указанный первый меченый лекарственный препарат представляет собой меченный рутением лекарственный препарат или биотинилированный лекарственный препарат.

23. Система по п. 17, отличающаяся тем, что указанный второй меченый лекарственный препарат представляет собой меченный рутением лекарственный препарат или биотинилированный лекарственный препарат.

24. Система по п. 17, отличающаяся тем, что указанный партнер по связыванию указанной мишени представляет собой естественный партнер по связыванию.

25. Система по п. 17, отличающаяся тем, что указанный партнер по связыванию указанной мишени представляет собой рецептор указанной мишени.

26. Система по п. 17, отличающаяся тем, что указанная мишень представляет собой растворимую мультимерную мишень.

27. Система по п. 19, отличающаяся тем, что указанные слабокислые рН-условия анализа находятся в диапазоне от рН около 4,5 до рН около 6,5.

28. Система по п. 19, отличающаяся тем, что указанные слабокислые рН-условия анализа представляют собой рН около 6,0.

29. Система по п. 19, отличающаяся тем, что указанные слабокислые рН-условия анализа представляют собой рН около 5,0.

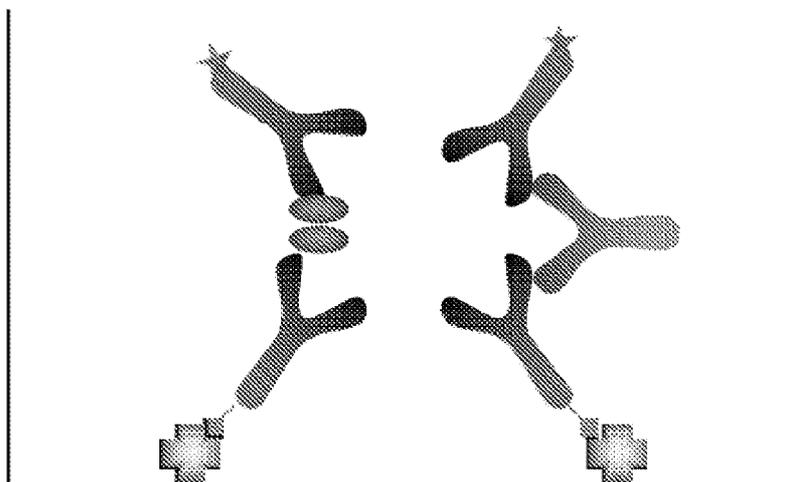
30. Система по п. 17, отличающаяся тем, что указанный лекарственный препарат представляет собой химическое соединение, нуклеиновую кислоту, токсин, пептид, белок, слитый белок, антитело, фрагмент антитела, область Fab антитела, продукт конъюгации антитела и лекарственного препарата или фармацевтический продукт.

31. Система по п. 1, отличающаяся тем, что указанный лекарственный препарат представляет собой антитело.

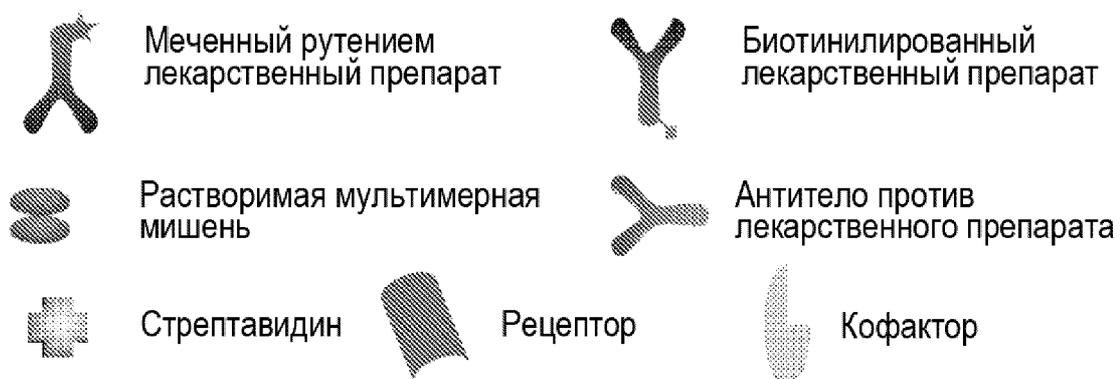
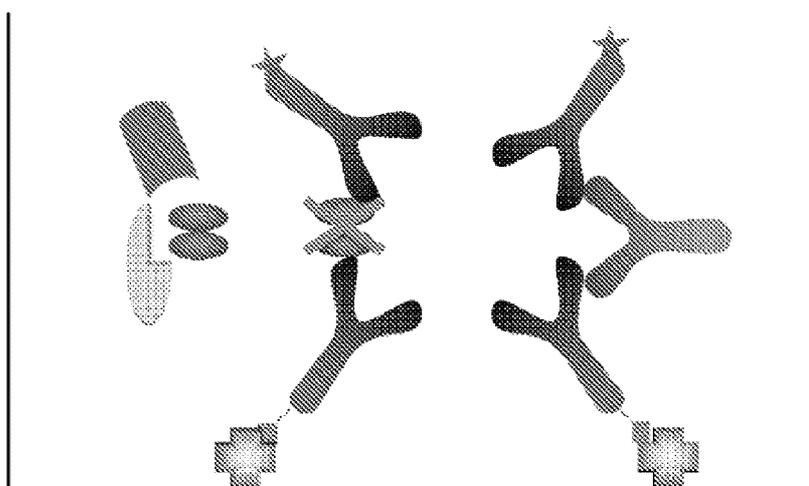
32. Система по п. 1, отличающаяся тем, что указанный образец представляет собой образец сыворотки крови.

По доверенности

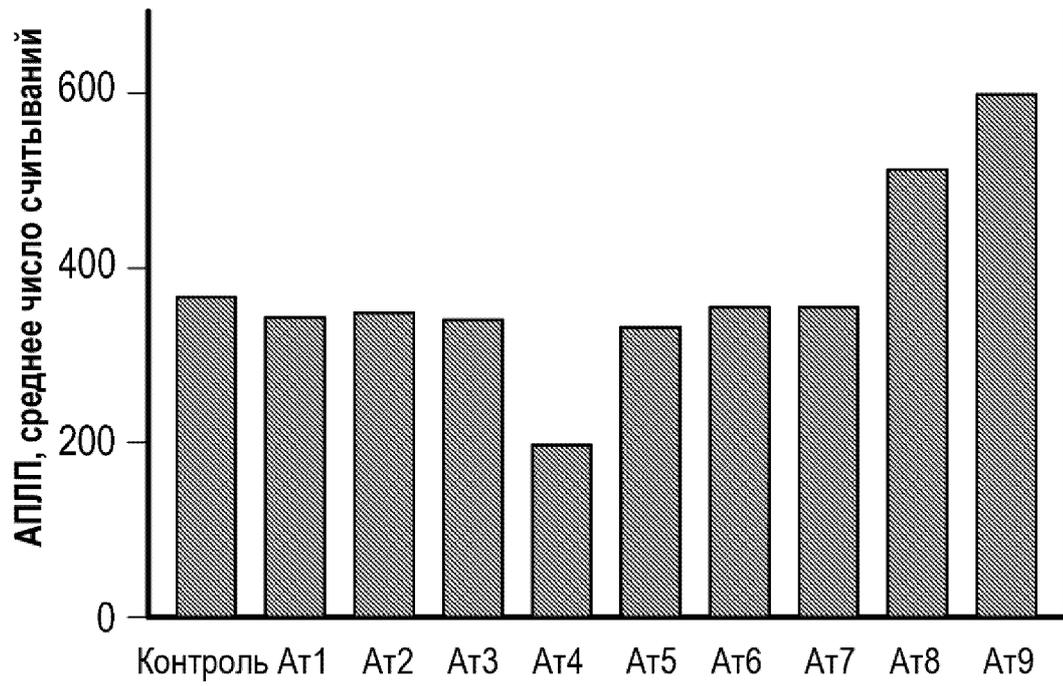
Без рецептора, без кофактора, pH ~7,0



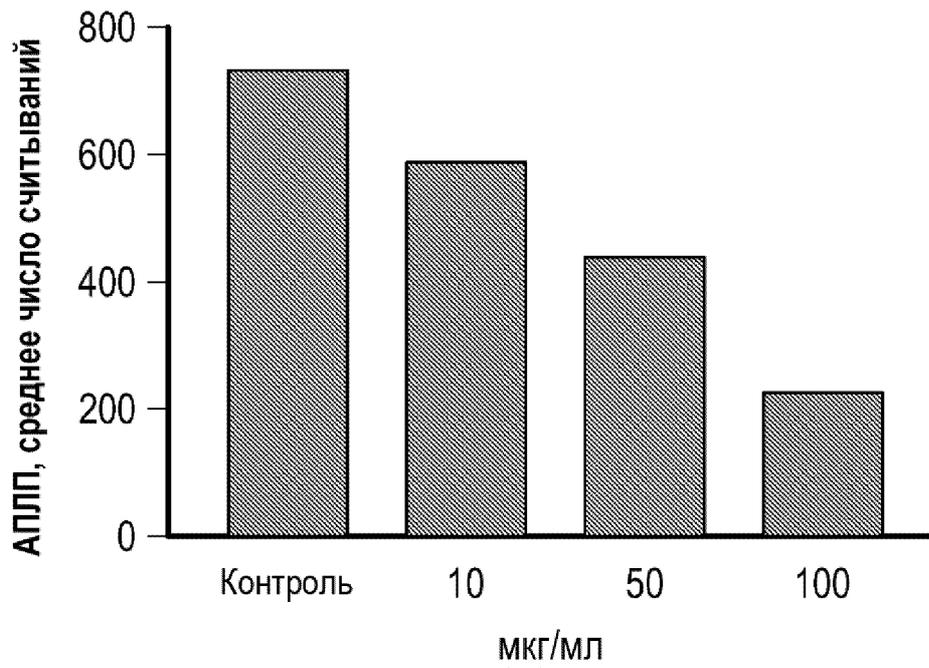
С рецептором и кофактором, pH ~6,0



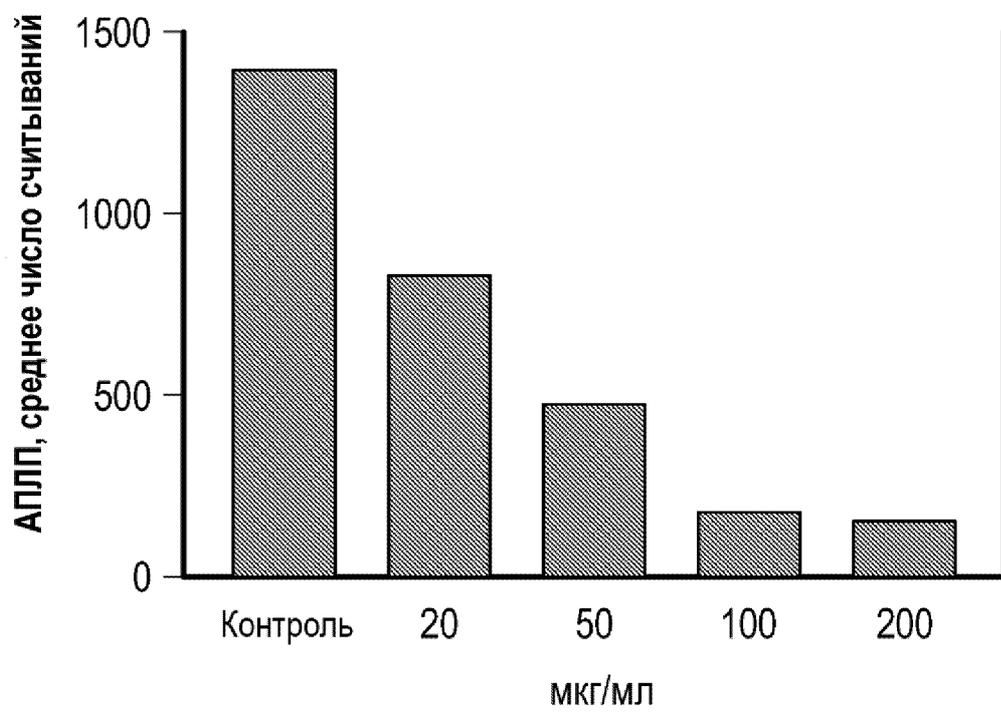
Фиг. 1



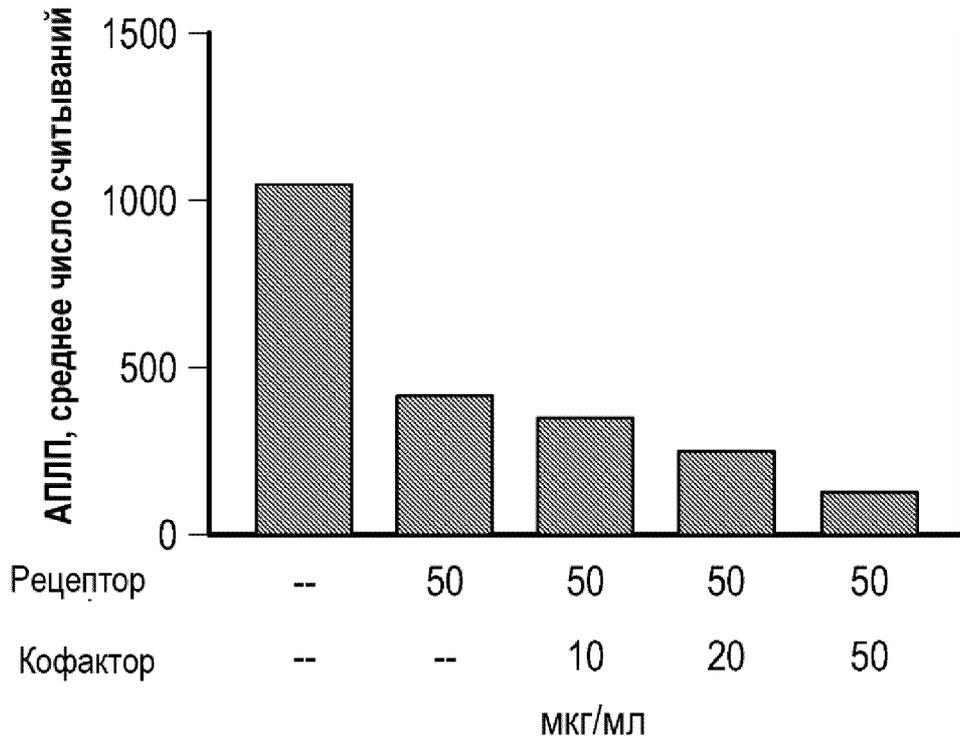
Фиг. 2А



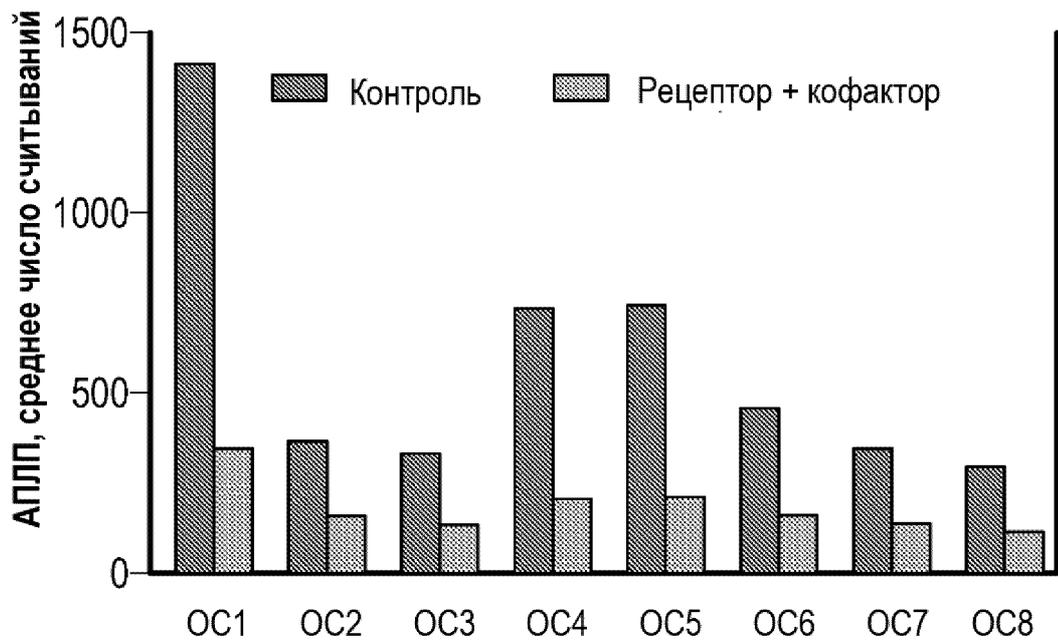
Фиг. 2В



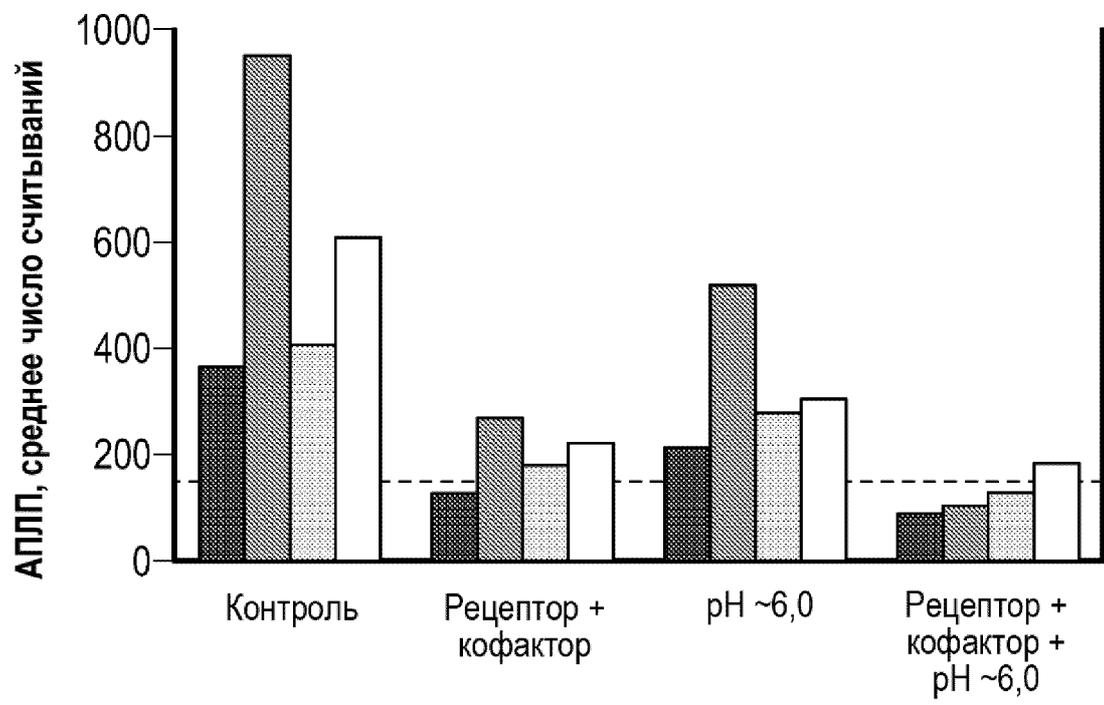
Фиг. 3



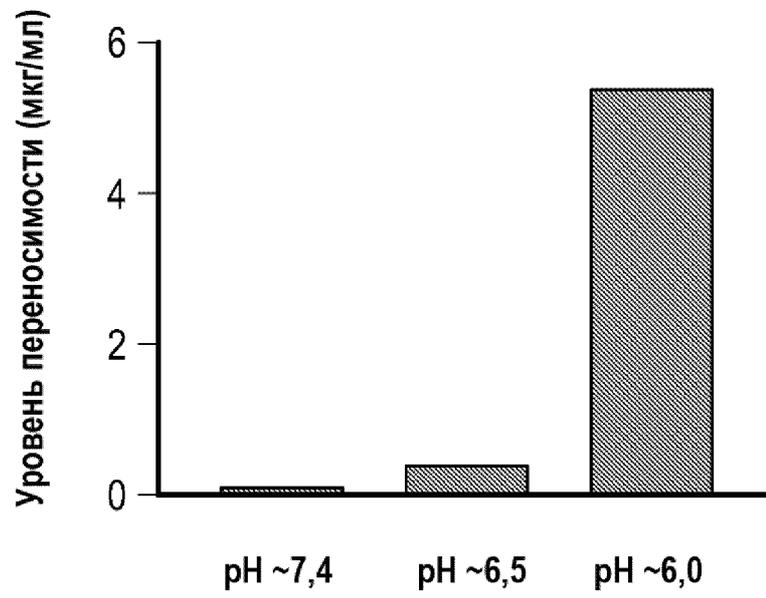
Фиг. 4А



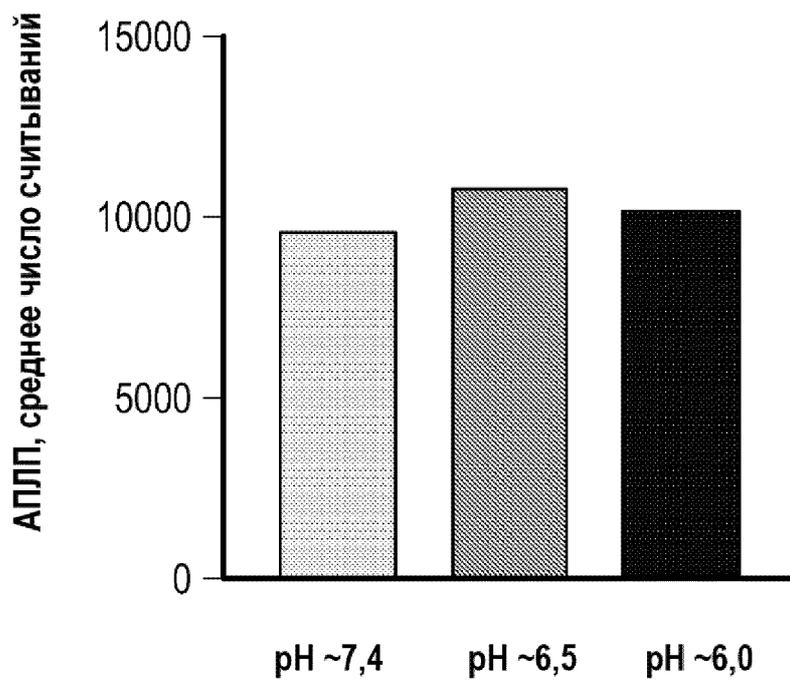
Фиг. 4В



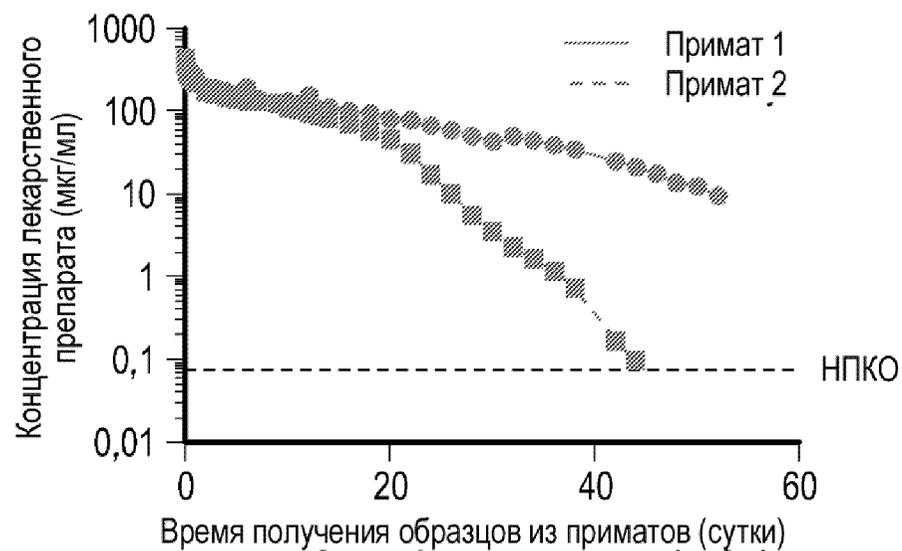
Фиг. 5



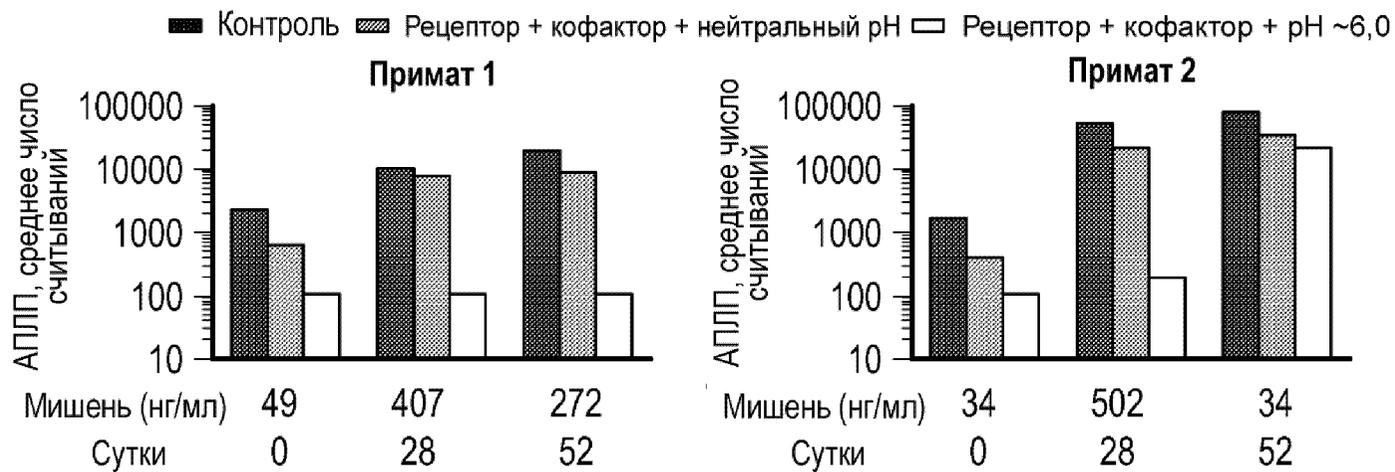
Фиг. 6А



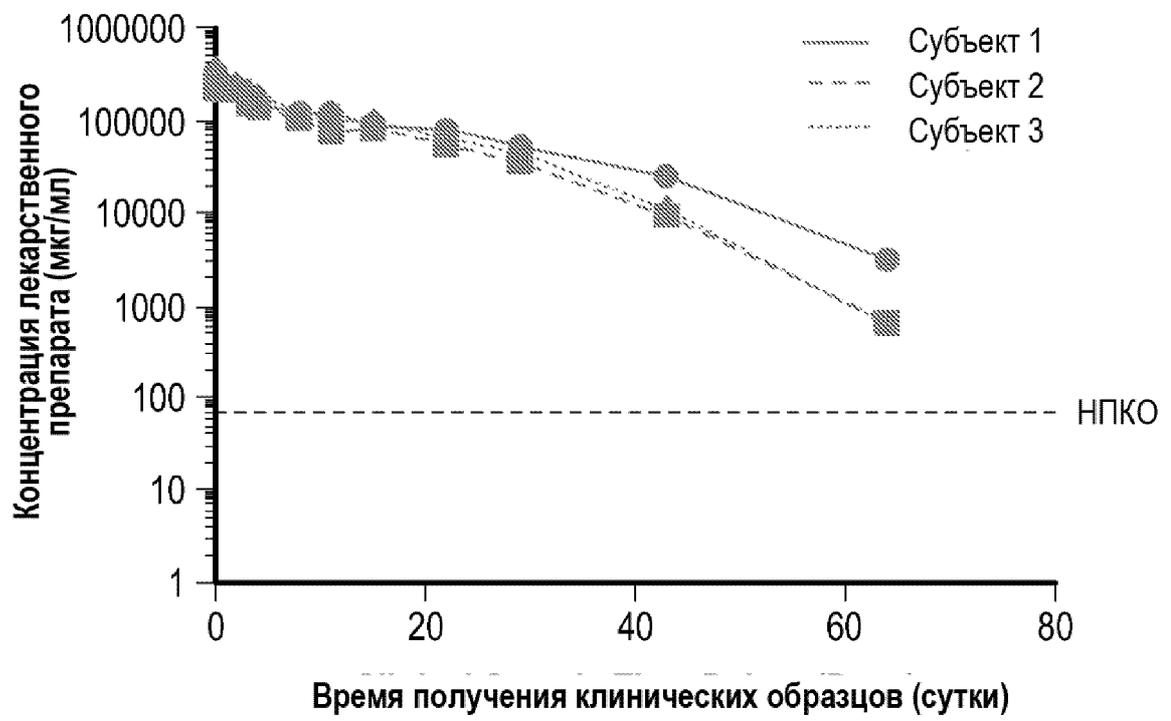
Фиг. 6В



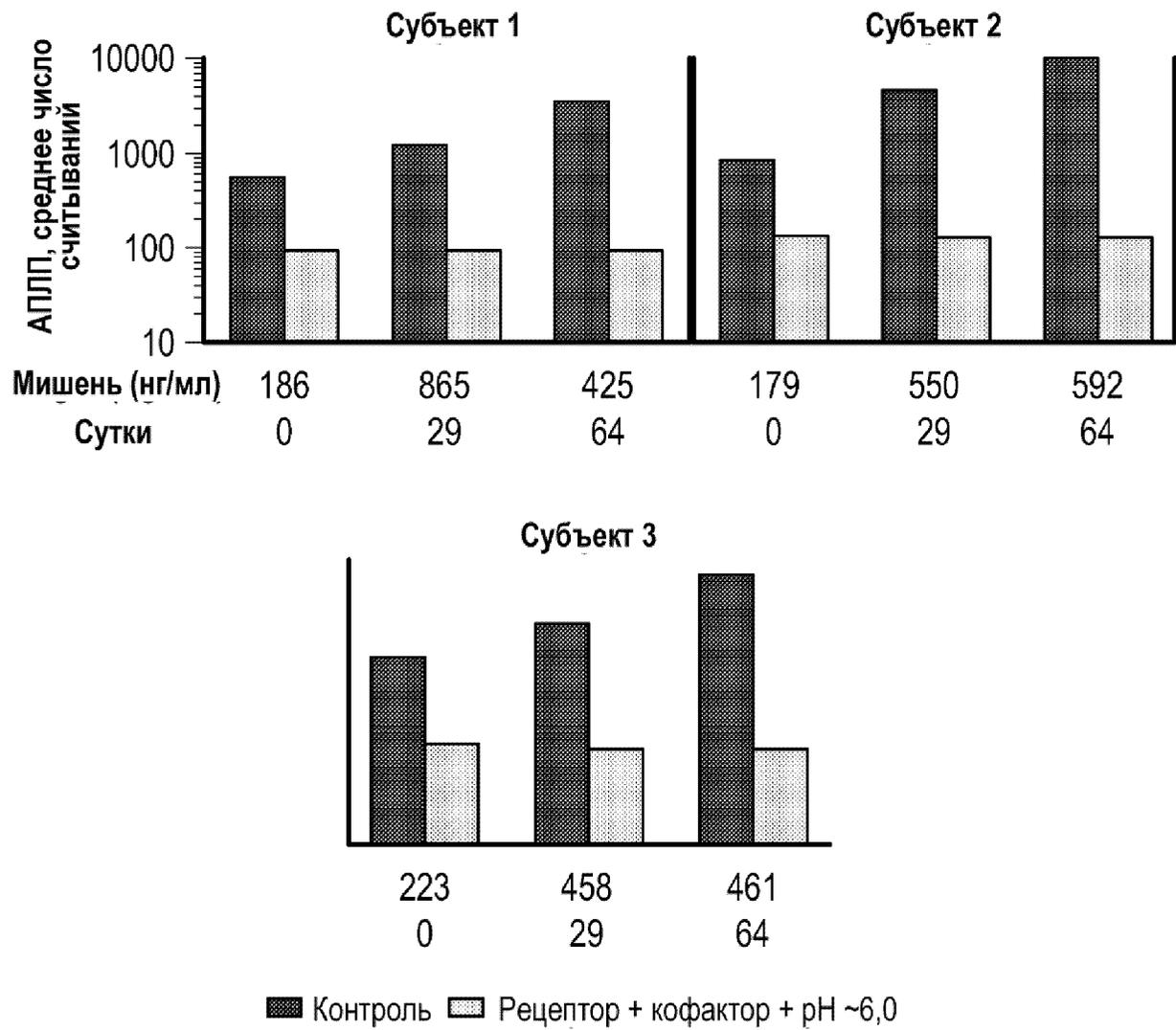
Фиг. 7А



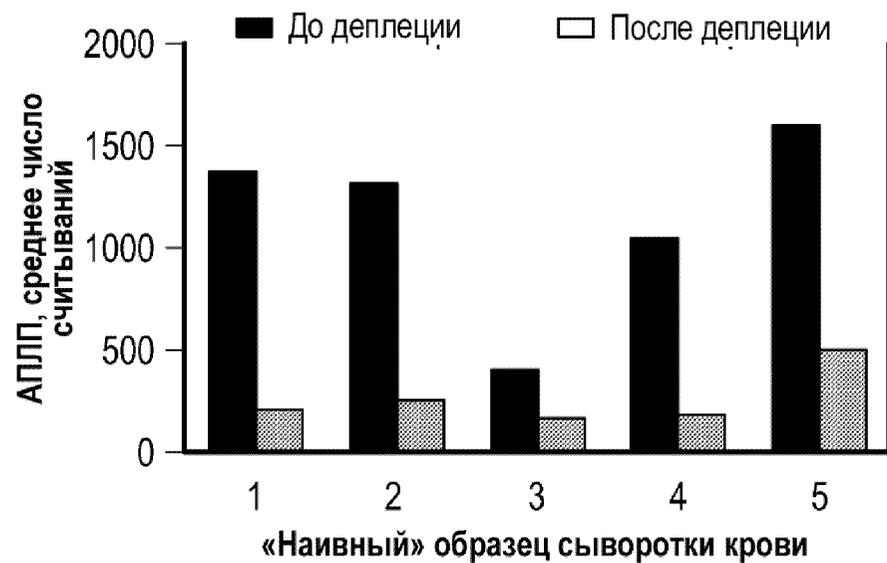
Фиг. 7В



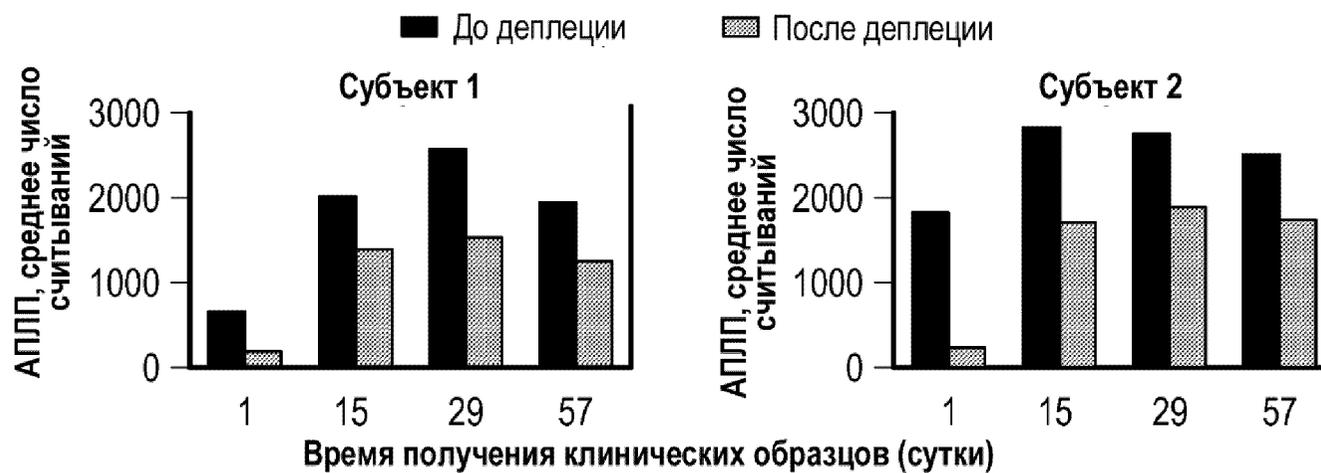
Фиг. 8



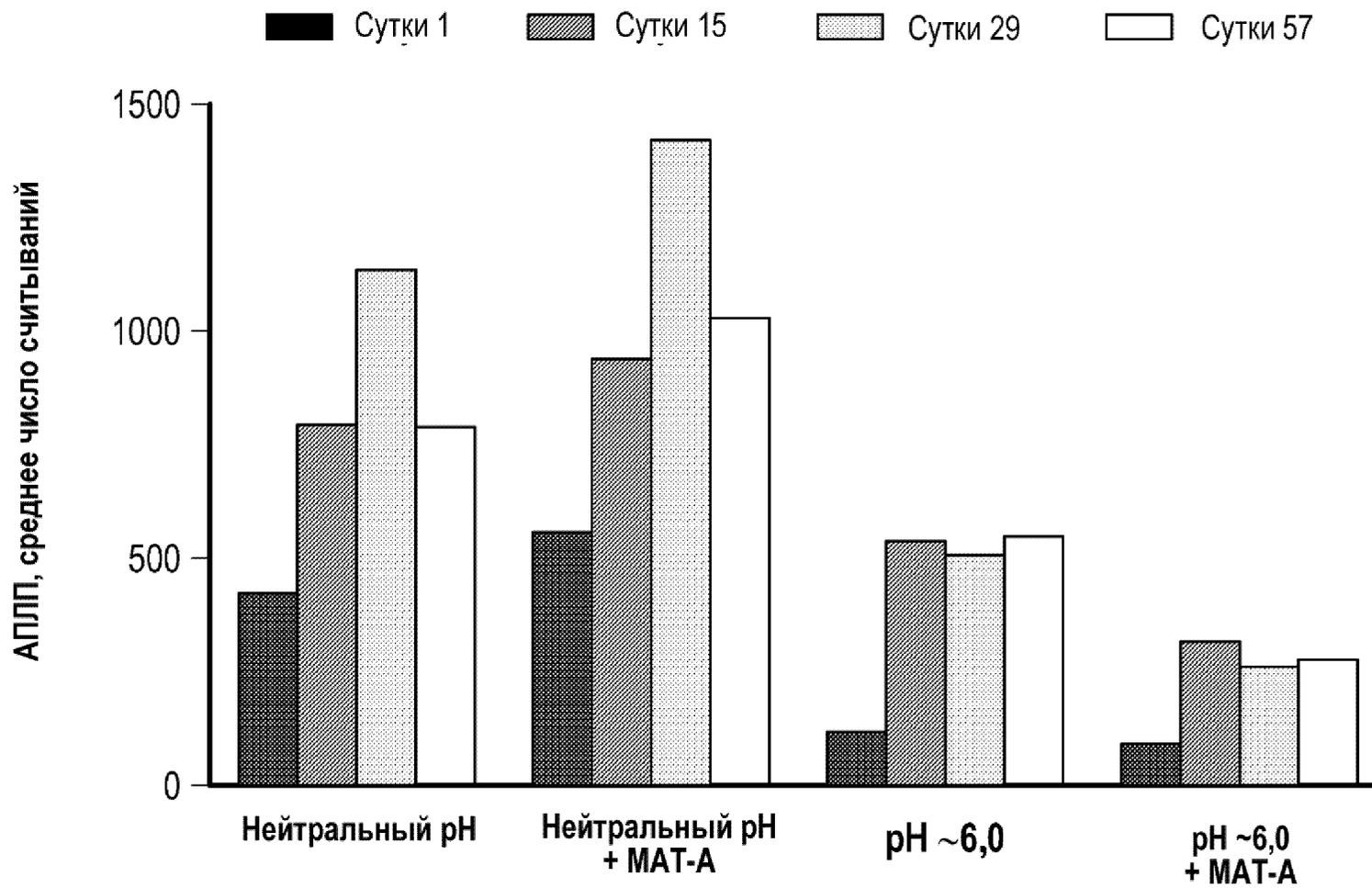
Фиг. 9



Фиг. 10А

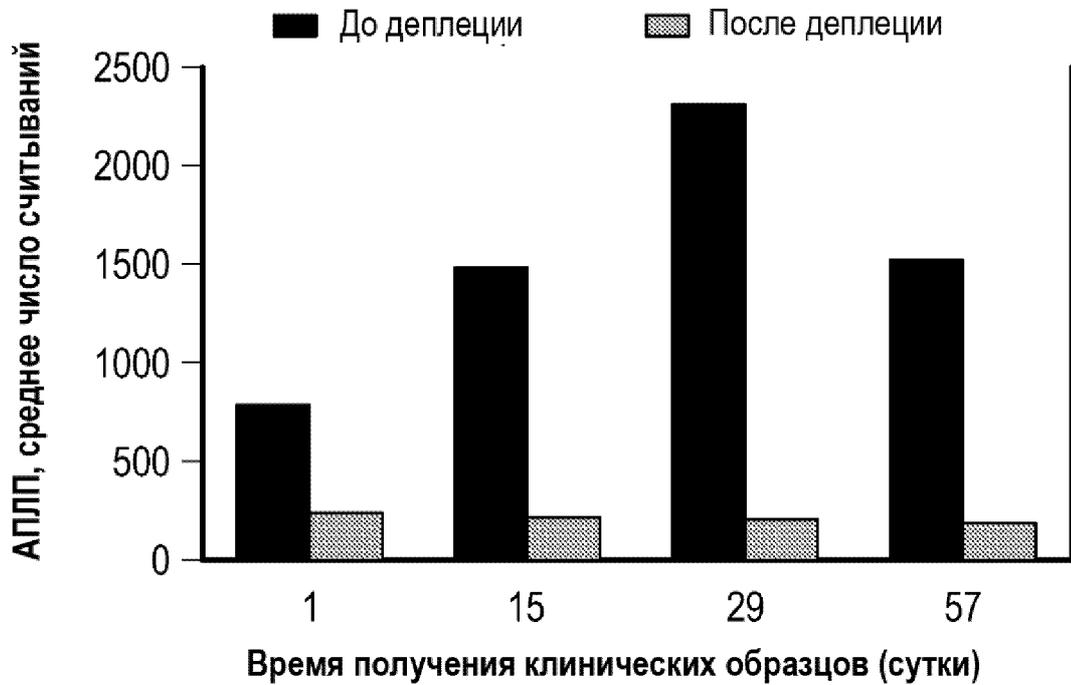
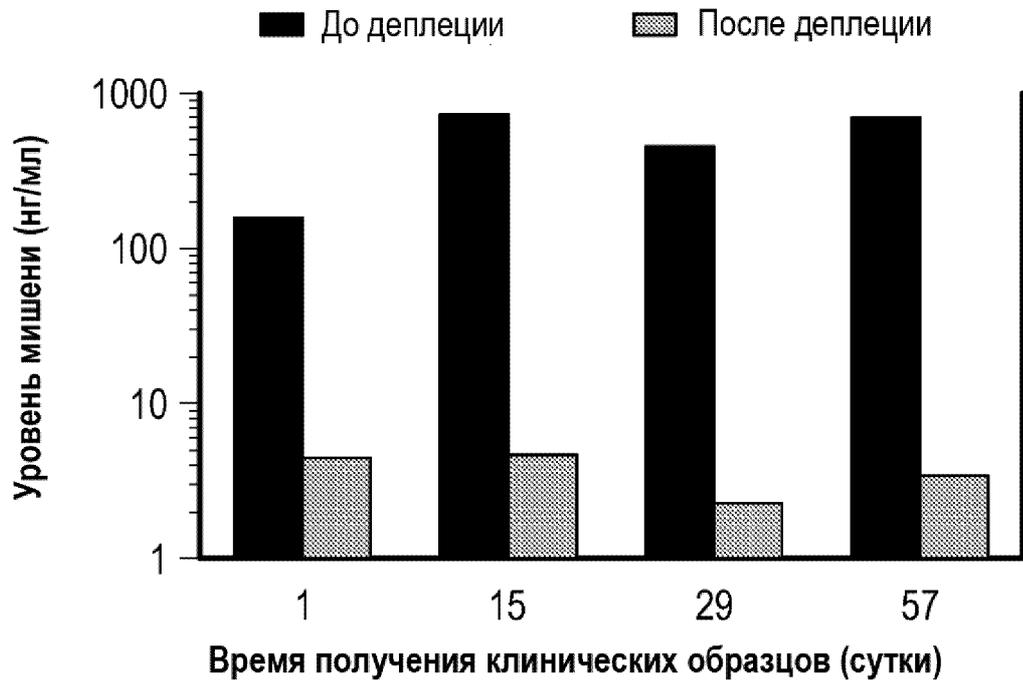


Фиг. 10В

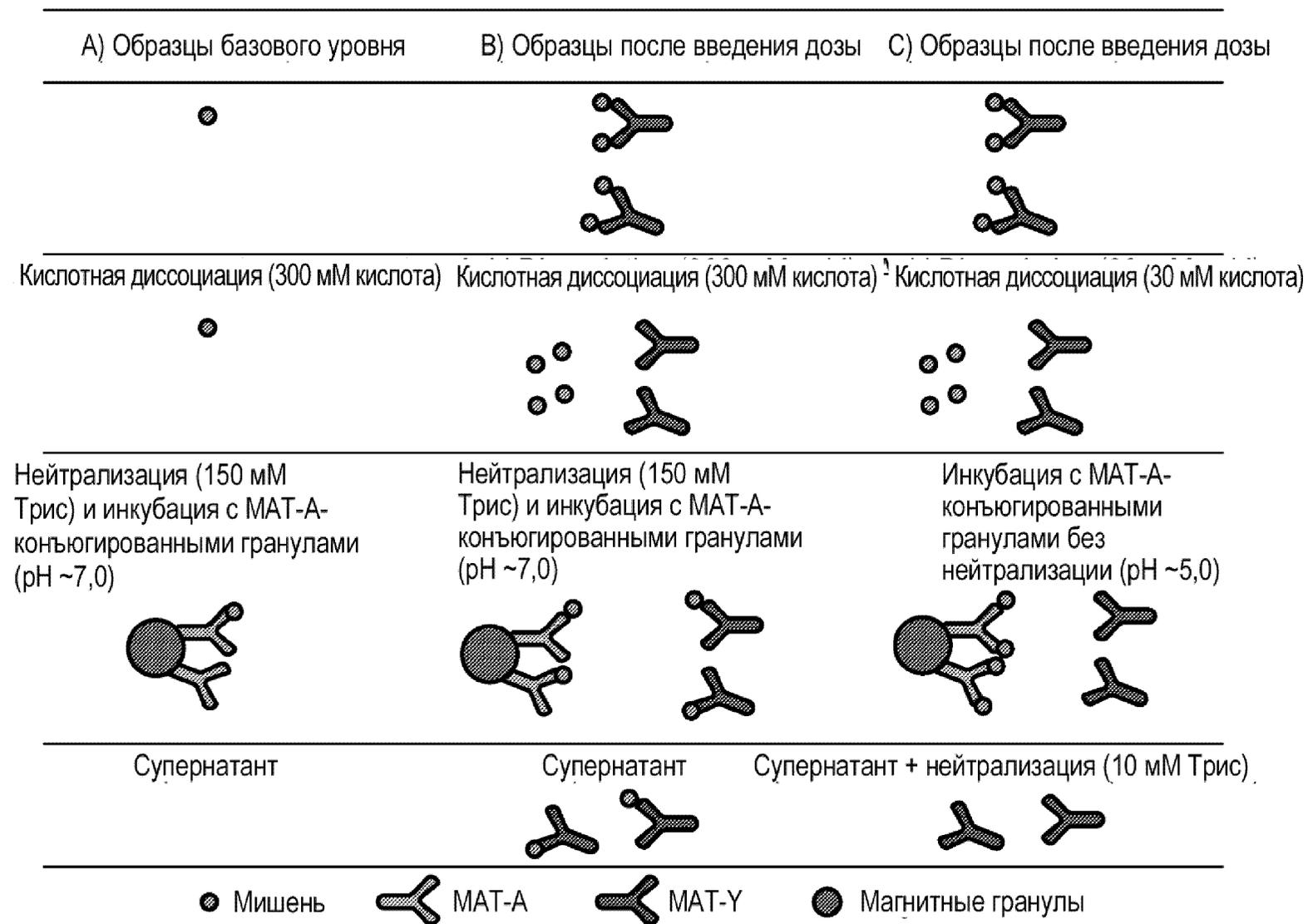


Фиг. 11

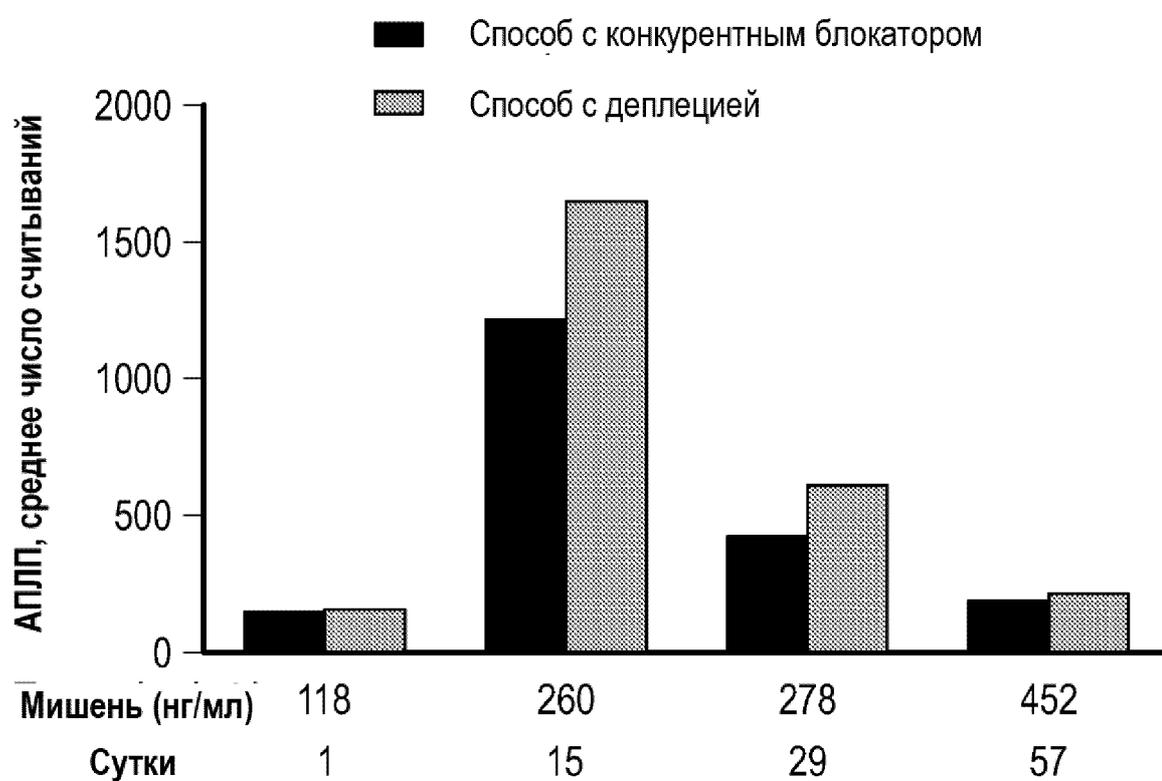
12/14



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14