

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293157 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.22(51) Int. Cl. G01N 33/564 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2021.04.30

(54) АНАЛИЗ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ К ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМ БЕЛКАМ

(31) 63/018,821; 63/041,768; 63/172,488

(32) 2020.05.01; 2020.06.19; 2021.04.08

(33) US

(86) PCT/US2021/030099

(87) WO 2021/222711 2021.11.04

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

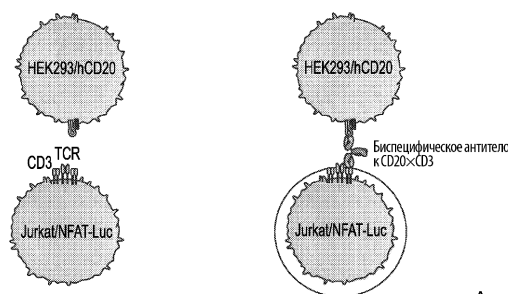
(72) Изобретатель:

Партридж Майкл, Ирвин Сьюзан,
Раджадхиакша Манодж, Херманн
Айнур (US)

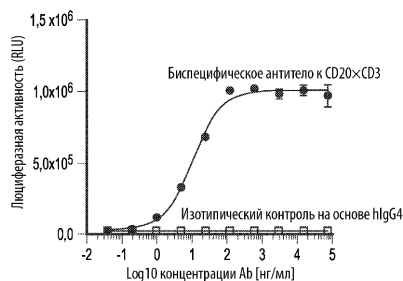
(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

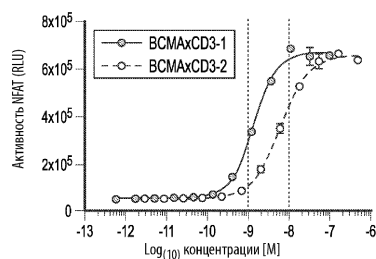
(57) Изобретение в целом относится к способам тестирования в отношении присутствия нейтрализующих антител (NAb) к терапевтическим белкам. В частности, настоящее изобретение относится к применению средств, смягчающих действие конкурирующих лекарственных средств, в анализах связывания лигандов или клеточных анализах для обнаружения нейтрализующих антител к терапевтическим белкам.



A



B



C

A1

202293157

202293157

A1

АНАЛИЗ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ К ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМ БЕЛКАМ ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Настоящая заявка испрашивает приоритет и преимущество предварительной заявки на патент США № 63/018821, поданной 1 мая 2020 г., предварительной заявки на патент США № 63/041768, поданной 19 июня 2020 г., и предварительной заявки на патент США № 63/172488, поданной 8 апреля 2021 г., каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[2] Настоящая заявка относится к способам анализа, модулям и наборам для проведения диагностических анализов для обнаружения нейтрализующих антител к терапевтическим белкам.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

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

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

[5] Анализы NAb могут подвергаться интерференции, которая препятствует точному количественному определению нейтрализации терапевтического белка. Например, если эндогенная лекарственная мишень является растворимой, она может присутствовать в образце субъекта и конкурентно связываться с терапевтическим средством, создавая ложно-положительный сигнал NAb. В образце субъекта также может присутствовать остаточное лекарственное средство от предыдущих введений

терапевтического средства, которое может конкурентно связываться с NAb и создавать ложно-отрицательный сигнал NAb. Для устранения этих источников интерференции были разработаны различные методики для получения точного количественного определения NAb (Xu, W., et al., J Immunol Methods, 462:34-41 (2018); Xu, W., et al., J Immunol Methods, 416:94-104 (2015); Xiang, Y., et al., AAPS Journal, 21(1):4 (2019); Sloan, J.H., et al., Bioanalysis, 8(20):2157-2168 (2016)).

[6] Дополнительным источником потенциальной интерференции, который еще не охарактеризован, является интерференция остаточного лекарственного средства, отличного от тестируемого терапевтического белка, которое конкурентно связывается с той же лекарственной мишенью, что и терапевтическое средство, что может создавать ложно-положительный сигнал NAb. Таким образом, в настоящее время не разработана и стратегия по уменьшению этого типа интерференции.

[7] Таким образом, будет понятно, что существует потребность в способах обнаружения и смягчения интерференции от конкурирующих лекарственных средств в анализах связывания лигандов или клеточных анализах для обнаружения нейтрализующих антител к терапевтическим белкам.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[8] В настоящем изобретении представлен способ обнаружения нейтрализующего средства к терапевтическому белку в образце. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления способ включает (a) приведение указанного образца, содержащего указанное нейтрализующее средство и конкурирующее лекарственное средство в контакт с (i) указанным терапевтическим белком, (ii) мишенью указанного терапевтического белка и (iii) смягчающим средством; (b) измерение связывания указанного терапевтического белка с указанной мишенью; и (c) сравнение результата (b) с контрольным измерением для обнаружения указанного нейтрализующего средства.

[9] В одном аспекте указанное контрольное измерение получают путем измерения связывания указанного терапевтического белка с указанной мишенью в отсутствие нейтрализующего средства. В другом аспекте указанное нейтрализующее средство представляет собой нейтрализующее антитело.

[10] В одном аспекте указанный терапевтический белок представляет собой антитело, растворимый рецептор, конъюгат антитело-лекарственное средство или фермент. В конкретном аспекте указанный терапевтический белок представляет собой моноклональное антитело. В еще одном конкретном аспекте указанное моноклональное антитело представляет собой антитело к PD-1, антитело к TNF, антитело к PD-L1, антитело к EGFR, антитело к CD20, антитело к CD38 или антитело к LAG3.

[11] В одном аспекте указанный терапевтический белок представляет собой биспецифическое антитело. В конкретном аспекте указанное биспецифическое антитело представляет собой антитело к CD20xCD3, антитело к BCMAxCD3, антитело к EGFRxCD28 или антитело к CD38xCD28.

[12] В одном аспекте указанный терапевтический белок иммобилизован на твердой

подложке. В другом аспекте указанный терапевтический белок метят для обнаружения. В конкретном аспекте указанную метку можно обнаружить с помощью флуоресценции, хемилюминесценции, электрохемилюминесценции, радиоактивности или аффинной очистки. В еще одном конкретном аспекте указанная метка содержит рутений.

[13] В одном аспекте указанная мишень представляет собой антиген, рецептор, лиганд или ферментативный субстрат. В другом аспекте указанная мишень представляет собой белок клеточной поверхности. В еще одном аспекте указанная мишень представляет собой рекомбинантный белок. В еще одном аспекте указанная мишень экспрессируется клеткой. В конкретном аспекте указанная клетка представляет собой клетку HEK293, клетку MOLP-8, клетку Jurkat или их модифицированную версию.

[14] В одном аспекте указанная мишень иммобилизована на твердой подложке. В другом аспекте указанную мишень метят для обнаружения. В конкретном аспекте указанную метку можно обнаружить с помощью флуоресценции, хемилюминесценции, электрохемилюминесценции, радиоактивности или аффинной очистки. В другом аспекте указанная мишень представляет собой ферментативный субстрат. В еще одном аспекте указанная мишень представляет собой CD20, CD3, BCMA, PD-1, EGFR, CD28, CD38, TNF, PD-L1 или LAG3. В еще одном аспекте указанный способ дополнительно включает вторую мишень.

[15] В одном аспекте указанное конкурирующее лекарственное средство представляет собой моноклональное антитело. В конкретном аспекте указанным конкурирующим лекарственным средством является ритуксимаб, пембролизумаб, ниволумаб, окрелизумаб, обинутумаб, офатумаб, ибритумаб, тиуксетан, тозитумаб, ублитуксимаб, цетуксимаб, даратумаб или адалимумаб. В другом аспекте указанное конкурирующее лекарственное средство представляет собой биспецифическое антитело.

[16] В одном аспекте указанное смягчающее средство представляет собой моноклональное антитело. В другом аспекте указанный способ включает использование двух, трех, четырех или более смягчающих средств.

[17] В одном аспекте связывание указанного терапевтического белка с указанной мишенью измеряют с помощью измерения фосфорилирования рецептора, фосфорилирования нижестоящих белков в пути передачи сигнала, высвобождения цитокинов, пролиферации клеток, гибели клеток или продуцирования вторичного белка. В другом аспекте связывание указанного терапевтического белка с указанной мишенью измеряют с помощью экспрессии репортерного гена. В конкретном аспекте указанный репортерный ген представляет собой люциферазу.

[18] В одном аспекте указанный способ дополнительно включает стадию предварительной обработки, заключающуюся в приведении указанного образца в контакт с указанным смягчающим средством перед приведением указанного образца в контакт с указанным терапевтическим белком или указанной мишенью.

[19] В настоящем изобретении также представлен набор для осуществления

способа по настоящему изобретению. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления набор содержит терапевтический белок, мишень указанного терапевтического белка, нейтрализующее средство к указанному терапевтическому белку, конкурирующее лекарственное средство и смягчающее средство.

[20] В одном аспекте указанный набор дополнительно содержит клетки, которые экспрессируют указанную мишень. В конкретном аспекте указанный набор дополнительно содержит клетки, которые продуцируют измеримую активность или сигнал в ответ на связывание указанного терапевтического белка с указанной мишенью. В другом конкретном аспекте указанная активность представляет собой экспрессию люциферазы.

[21] В одном аспекте указанная мишень иммобилизована на твердой подложке. В другом аспекте указанный набор дополнительно содержит метку, прикрепленную к указанному терапевтическому белку. В конкретном аспекте указанная метка содержит рутений.

[22] Эти и другие аспекты настоящего изобретения будут лучше оценены и поняты при рассмотрении в сочетании со следующим описанием и сопровождающими графическими материалами. Следующее описание, хотя и указывает на различные варианты осуществления и их многочисленные конкретные детали, дано в качестве иллюстрации, а не ограничения. Многие замены, модификации, добавления или перегруппировки могут быть выполнены в рамках объема настоящего изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[23] На фиг. 1А изображена схема анализа клеточного нейтрализующего антитела (NAb) в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления. На фиг. 1В изображено повышение активности люциферазы при возрастающих концентрациях биспецифического лекарственного антитела к CD20хCD3, в то время как антитело отрицательного контроля не индуцирует сигнал люциферазы в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления. На фиг. 1С изображено повышение активности люциферазы при возрастающих концентрациях двух биспецифических лекарственных антител к ВСМАхCD3 в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

[24] На фиг. 2А изображена диаграмма клеточного анализа NAb с добавлением нейтрализующих антител к каждому фрагменту терапевтического антитела в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления. На фиг. 2В изображено снижение активности люциферазы при возрастающих концентрациях суррогатных нейтрализующих антител либо к фрагменту CD20, либо к фрагменту CD3 биспецифического лекарственного антитела к CD20хCD3 в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

[25] На фиг. 2С изображено снижение активности люциферазы при возрастающих концентрациях суррогатных нейтрализующих антител к фрагменту ВСМА биспецифического лекарственного антитела к ВСМАхCD3 в соответствии с

иллюстративным вариантом осуществления. На фиг. 2D изображено снижение активности люциферазы при возрастающих концентрациях суррогатных нейтрализующих антител к фрагменту CD3 биспецифического лекарственного антитела к ВСМАхCD3 в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления. На фиг. 2E изображено отсутствие изменений в активности люциферазы при добавлении изотипических контрольных антител в анализ NAb для биспецифического лекарственного антитела к ВСМАхCD3 в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

[26] На фиг. 2F изображено снижение активности люциферазы при возрастающих концентрациях суррогатных нейтрализующих антител к фрагменту ВСМА второго биспецифического лекарственного антитела к ВСМАхCD3 в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления. На фиг. 2G изображено снижение активности люциферазы при возрастающих концентрациях суррогатных нейтрализующих антител к фрагменту CD3 второго биспецифического лекарственного антитела к ВСМАхCD3 в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления. На фиг. 2H изображено отсутствие изменений в активности люциферазы при добавлении изотипических контрольных антител в анализ NAb для второго биспецифического лекарственного антитела к ВСМАхCD3 в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

[27] На фиг. 3A изображено снижение активности люциферазы в анализе NAb для биспецифического лекарственного антитела к CD20хCD3 с добавлением конкурирующих антител к лекарственной мишени CD20 в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления. На фиг. 3B изображено снижение активности люциферазы в анализе NAb для биспецифического лекарственного антитела к CD20хCD3 с добавлением конкурирующих антител к лекарственной мишени CD3 в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления. На фиг. 3C и фиг. 3D изображено снижение активности люциферазы в анализе NAb для биспецифического лекарственного антитела к ВСМАхCD3 с добавлением конкурирующих антител к лекарственным мишеням ВСМА или CD3 в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления. На фиг. 3E и фиг. 3F изображено снижение активности люциферазы в анализе NAb для второго биспецифического лекарственного антитела к ВСМАхCD3 с добавлением конкурирующих антител к лекарственным мишеням ВСМА или CD3 в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

[28] На фиг. 4A изображено повышено активности люциферазы в анализе NAb при возрастающих концентрациях терапевтического антитела в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления. Добавление наивной сыворотки человека не влияло на активность люциферазы. На фиг. 4B проиллюстрировано количественную оценку сигнала в анализе NAb путем сравнения активности люциферазы в присутствии контрольного лекарственного средства с активностью люциферазы в присутствии экспериментального образца в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

[29] На фиг. 5 изображены результаты клеточного анализа NAb из 60 клинических

образцов лиц, ранее не получавших лекарственные средства, в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

[30] На фиг. 6 изображена корреляция между концентрацией ритуксимаба в клинических образцах и сигналом в анализе NAb в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

[31] На фиг. 7А изображена диаграмма клеточного анализа NAb при добавлении ритуксимаба в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления. На фиг. 7В изображена схема анализа NAb при добавлении ритуксимаба и смягчающих антител к ритуксимабу в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления. На фиг. 7С показано восстановление активности люциферазы в анализе NAb при добавлении смягчающих антител к ритуксимабу в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

[32] На фиг. 8 изображено снижение ложно-положительного сигнала в анализе NAb в клинических образцах лиц, ранее не получавших лекарственные средства, с добавлением смягчающих антител к ритуксимабу в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

[33] На фиг. 9А изображена схема анализа связывания NAb захватывающего мишень лиганда в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления. На фиг. 9В изображена схема анализа связывания NAb захватывающего мишень лиганда при добавлении NAb к фрагменту терапевтического белка в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления. На фиг. 9С изображена схема анализа связывания NAb захватывающего лекарственное средство лиганда в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

[34] На фиг. 10А изображена схема анализа связывания NAb лиганда при добавлении конкурирующего лекарственного средства в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления. На фиг. 10В изображено повышение ингибирования ложно-положительного сигнала в анализе связывания NAb лиганда при возрастающих концентрациях конкурирующих лекарственных средств в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

[35] На фиг. 11А изображена схема анализа связывания NAb лиганда при добавлении конкурирующего лекарственного средства и смягчающих антител к конкурирующему лекарственному средству в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления. На фиг. 11В изображено устранение ложно-положительного сигнала в анализе NAb при добавлении смягчающих антител к конкурирующим лекарственным средствам в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[36] Терапевтические белки представляют собой важный класс лекарственных средств, используемых для лечения различных заболеваний человека. Однако терапевтические белки могут вызывать иммунный ответ у получающих дозу реципиентов, приводя к образованию антител к лекарственному средству (ADA). Нейтрализующие

антитела (NAb) представляют собой субпопуляцию ADA, которые потенциально могут влиять на безопасность пациентов и опосредовать потерю эффективности лекарственных средств путем блокирования биологической активности терапевтического белка. Таким образом, характеристика и мониторинг NAb является важным аспектом оценки иммуногенности, требующим чувствительных и надежных способов, отражающих терапевтический механизм действия (Wu, B., et al., *AAPS Journal*, 18(6):1335-1350 (2016)).

[37] Ожидается, что с помощью анализов NAb будут надежно обнаруживаться NAb с адекватной чувствительностью, специфичностью, селективностью и точностью. Как клеточные, так и неклеточные анализы являются вариантами оценки NAb. В общем, в анализе NAb представлена мишень для терапевтического белка и механизм вывода сигнала в ответ на связывание терапевтического белка с его мишенью, что позволяет количественно оценить связывание. Если в совместно инкубируемом образце присутствуют NAb, они будут ингибировать связывание терапевтического белка с мишенью, приводя к уменьшению выходного сигнала и позволяя количественно оценивать NAb в образце.

[38] Матрица образца может включать интерферирующие средства, препятствующие точной количественной оценке NAb, например, путем прямого взаимодействия с NAb, терапевтическим белком или мишенью. Компонент матрицы, который может нарушать взаимодействие с NAb и оккупировать их, включает, например, остаточное лекарственное средство от предыдущего введения терапевтического белка. Другой компонент, который может нарушать взаимодействие с терапевтическим белком и оккупировать его, включает, например, растворимую лекарственную мишень. Эти интерферирующие средства были охарактеризованы в предшествующем уровне техники, и были разработаны способы борьбы с этими источниками интерференции с получением точной количественной оценки Nab (Xu, W., et al., *J Immunol Methods*, 462:34-41 (2018); Xu, W., et al., *J Immunol Methods*, 416:94-104 (2015); Xiang, Y., et al., *AAPS Journal*, 21(1):4 (2019); Sloan, J.H., et al., *Bioanalysis*, 8(20):2157-2168 (2016)).

[39] Однако другое возможное интерферирующее средство, которое еще не было охарактеризовано или не рассмотрено, представляет собой остаточное конкурирующее лекарственное средство в образце субъекта, отличное от тестируемого терапевтического белка, который может взаимодействовать с мишенью терапевтического белка и оккупировать ее, что приводит к ложно-положительной количественной оценке NAb.

[40] Для решения задач точного измерения нейтрализующих антител к терапевтическому белку в данном документе описаны способы и наборы для применения смягчающих средств к конкурирующему лекарственному средству для предупреждения интерференции в анализе нейтрализующих антител. Также в данном документе раскрыто обнаружение интерференции в анализах NAb от лекарственных средств, которые конкурентно связываются с мишенью терапевтического белка. Эта интерференция может приводить к снижению сигнала или активности связывания терапевтического белка в анализе NAb и ложно-положительному сигналу в анализе NAb. Для преодоления этой

интерференции можно использовать смягчающие средства, которые снижают связывание конкурирующего лекарственного средства с мишенью, позволяя терапевтическому белку связываться со своей мишенью и восстанавливая точный сигнал в анализе NAb.

[41] Влияние остаточных конкурирующих лекарственных средств представляет собой серьезную проблему для точной оценки NAb при тестировании терапевтического белка для клинического применения, как показано, например, в примерах 5 и 6. Новые терапевтические средства могут быть протестированы после того, как пациентам уже назначена первая линия терапии, которая может конкурентно взаимодействовать с одной и той же мишенью. В этих случаях необходимо обнаружить и смягчить влияние конкурирующих лекарственных средств. Например, в таблице 1 приведены многочисленные кандидаты в лекарственные средства с общими мишенями антигена созревания В-клеток (BCMA) или CD3. Другие терапевтические мишени, для которых может существовать множество конкурирующих лекарственных средств, включают, например: рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), на который могут воздействовать лекарственные средства или кандидаты в лекарственные средства, такие как цетуксимаб; CD28; CD38, на который могут воздействовать лекарственные средства или кандидаты в лекарственные средства, такие как даратумумаб; ген 3 активации лимфоцитов (LAG3); белок запрограммированной клеточной смерти 1 (PD-1), на который могут воздействовать лекарственные средства или кандидаты в лекарственные средства, такие как цемиплимаб, пембролизумаб или ниволумаб; лиганд белка запрограммированной клеточной смерти 1 (PD-L1); фактор некроза опухоли (TNF), на который могут воздействовать лекарственные средства или кандидаты в лекарственные средства, такие как адалимумаб; или CD20, на который могут воздействовать лекарственные средства или кандидаты в лекарственные средства, такие как ритуксимаб, окрелизумаб, обинутузумаб, офатумумаб, ибритумомаб тиуксетан, тозитумомаб или ублитуксимаб. В настоящем изобретении описан способ, который является подходящим для смягчения интерференции, влияющей на анализ NAb со стороны этих и других лекарственных средств и кандидатов в лекарственные средства.

Таблица 1. Примеры кандидатов в лекарственные средства с общими мишенями

Название кандидата в лекарственное средство	Мишень	Компания
белантамаб мафодотин	BCMA	Glaxo Group, Seattle Genetics
JNJ-68284528	BCMA	Janssen Biotech
JNJ-64007957	BCMA, CD3	Genmab, Janssen Biotech
LCAR-B38M	BCMA	Nanjing Legend Bio
SEA-BCMA	BCMA	Seattle Genetics

AMG 420	BCMA, CD3	Amgen, Boehringer, Micromet
AMG 224	BCMA	Amgen
bb2121	BCMA	Bluebird, Celgene
U.Penn., CAR, направленный против BCMA	BCMA	U.Penn.
MEDI2228	BCMA	Medimmune
TNB-383B	BCMA, CD3	Abbvie, TencioBio
CC-93269	BCMA, CD3	Celgene, Engmab
AMG 701	BCMA, CD3	Amgen
Pregene Bio, CAR, направленный против BCMA	BCMA	Pregene Bio
BsAb A	BCMA, CD3	Regeneron
HPN217	BCMA, CD3, сывороточный альбумин	Abbvie, Harpoon
CT053	BCMA	Carsgen
CC-99712	BCMA	Celgene
BsAb B	BCMA, CD3	Regeneron

[42] Если не описано иное, все технические и научные выражения, используемые в данном документе, имеют то же самое значение, как обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой настоящее изобретение принадлежит. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, могут быть использованы на практике или при тестировании, в данном документе описаны конкретные способы и материалы.

[43] Форму единственного числа следует понимать как означающую «по меньшей мере один», а термины «приблизительно» и «примерно» следует понимать как допускающие стандартные вариации, как их понимают специалисты в данной области техники, и при этом указаны диапазоны, включены конечные точки. Используемые в данном документе термины «включать», «включает» и «включающий» не имеют ограничительного характера и понимаются как означающие «содержать», «содержит» и «содержащий» соответственно.

[44] Используемый в данном документе термин «белок» или «белок,

представляющий интерес» может включать любой полимер аминокислоты, имеющий ковалентно связанные амидные связи. Белки содержат одну или несколько полимерных цепей аминокислот, широко известных в данной области техники как «полипептиды». «Полипептид» относится к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков, родственных природных структурных вариантов и их синтетических неприродных аналогов, связанных пептидными связями, родственных природных структурных вариантов и их синтетических неприродных аналогов. «Синтетические пептиды или полипептиды» относится к не встречающимся в природе пептидам или полипептидам. Синтетические пептиды или полипептиды могут быть синтезированы, например, с использованием автоматического синтезатора полипептидов. Специалистам в данной области техники известны различные методы твердофазного синтеза пептидов. Белок может содержать один или несколько полипептидов для образования одной функционирующей биомолекулы. Белок может включать фрагменты антител, нанотела, химеры рекомбинантных антител, цитокины, хемокины, пептидные гормоны и т.п. Белки, представляющие интерес, могут включать любые биотерапевтические белки, рекомбинантные белки, используемые в исследованиях или терапии, белки-ловушки и другие химерные слитые белки рецептор-Fc, белки, антитела, моноклональные антитела, поликлональные антитела, человеческие антитела и биспецифические антитела. Белки могут быть получены с использованием рекомбинантных клеточных систем продуцирования, таких как бакуловирусная система насекомых, дрожжевые системы (например, *Pichia* sp.), системы млекопитающих (например, клетки CHO и производные CHO, такие как клетки CHO-K1). Недавний обзор, посвященный биотерапевтическим белкам и их получению, см. в Ghaderi et al., “Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation” (Darius Ghaderi et al., Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation, 28 BIOTECHNOLOGY AND GENETIC ENGINEERING REVIEWS 147-176 (2012), все идеи которого включены в данный документ). Белки можно классифицировать на основе состава и растворимости и, таким образом, они могут включать простые белки, такие как глобулярные белки и волокнистые белки; конъюгированные белки, такие как нуклеопротеины, гликопротеины, мукопротеины, хромопротеины, фосфопротеины, металлопротеины и липопротеины; и производные белки, такие как первичные производные белки и вторичные производные белки.

[45] В некоторых иллюстративных вариантах осуществления белок, представляющий интерес, может представлять собой рекомбинантный белок, антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, слитый белок, scFv и их комбинации.

[46] Используемый в данном документе термин «рекомбинантный белок» относится к белку, полученному в результате транскрипции и трансляции гена, переносимого рекомбинантным вектором экспрессии, который был введен в подходящую клетку-хозяина. В определенных иллюстративных вариантах осуществления

рекомбинантный белок может представлять собой антитело, например, химерное, гуманизированное или полностью человеческое антитело. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления рекомбинантный белок может представлять собой антитело изотипа, выбранного из группы, состоящей из: IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA1, IgA2, IgD или IgE. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления молекула антитела представляет собой полноразмерное антитело (например, иммуноглобулин IgG1 или IgG4) или в качестве альтернативы антитело может представлять собой фрагмент (например, фрагмент Fc или фрагмент Fab).

[47] Термин «антитело», используемый в данном документе, включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (обозначаемую в данном документе как LCVR или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (CL1). Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения FR антитела к big-ET-1 (или его антигенсвязывающий участок) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR. Используемый в данном документе термин «антитело» также включает антигенсвязывающие фрагменты полных молекул антител. Термины «антигенсвязывающий участок» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т.п., используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полных молекул антител с использованием любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или методики рекомбинантной геной инженерии, включающие манипуляцию с ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антитела, и ее экспрессию. Такая ДНК известна и/или легкодоступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фаг-антитело) или может быть синтезирована. ДНК можно

секвенировать и манипулировать с ней химическим путем или с использованием методик молекулярной биологии, например, для расположения одного или нескольких переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или делеции аминокислот и т.д.

[48] Используемый в данном документе термин «фрагмент антитела» включает часть интактного антитела, такую как, например, антигенсвязывающая или переменная область антитела. Примеры фрагментов антител включают без ограничения фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')₂, фрагмент scFv, фрагмент Fv, димер dsFv, фрагмент dAb, фрагмент Fd', фрагмент Fd и выделенная область, определяющая комплементарность (CDR), а также триател, тетрател, 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 с помощью пептидного линкера. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления фрагмент антитела содержит достаточную аминокислотную последовательность исходного антитела, фрагментом которого он является, и который связывается с тем же антигеном, что и исходное антитело; в некоторых иллюстративных вариантах осуществления фрагмент связывается с антигеном с аффинностью, сопоставимой с аффинностью исходного антитела, и/или конкурирует с исходным антителом за связывание с антигеном. Фрагмент антитела может быть получен любым способом. Например, фрагмент антитела может быть получен ферментативным или химическим путем посредством фрагментации интактного антитела и/или он может быть получен рекомбинантным путем из гена, кодирующего частичную последовательность антитела. В качестве альтернативы или в качестве дополнения фрагмент антитела может быть полностью или частично получен синтетическим путем. Фрагмент антитела может необязательно содержать фрагмент одноцепочечного антитела. В качестве альтернативы или в качестве дополнения фрагмент антитела может содержать несколько цепей, которые связаны друг с другом, например, с помощью дисульфидных связей. Фрагмент антитела может необязательно содержать мультимолекулярный комплекс. Функциональный фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере приблизительно 50 аминокислот, а более типично содержит по меньшей мере приблизительно 200 аминокислот.

[49] Термин «биспецифическое антитело» включает антитело, способное избирательно связывать два или более эпитопов. Биспецифические антитела обычно содержат две разные тяжелые цепи, причем каждая тяжелая цепь специфически связывается с другим эпитопом, либо с двумя разными молекулами (например, антигенами), либо с одной и той же молекулой (например, с одним и тем же антигеном). Если биспецифическое антитело способно селективно связывать два разных эпитопа

(первый эпитоп и второй эпитоп), аффинность первой тяжелой цепи к первому эпитопу обычно будет по меньшей мере на один, два, три или четыре порядка ниже, чем аффинность первой тяжелой цепи ко второму эпитопу и наоборот. Эпитопы, распознаваемые биспецифическим антителом, могут находиться на одной и той же или на другой мишени (например, на одном и том же или другом белке). Биспецифические антитела можно получить, например, путем объединения тяжелых цепей, распознающих разные эпитопы одного и того же антигена. Например, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие переменные последовательности тяжелой цепи, которые распознают разные эпитопы одного и того же антигена, могут быть слиты с последовательностями нуклеиновых кислот, кодирующими разные константные области тяжелой цепи, и такие последовательности могут быть экспрессированы в клетке, которая экспрессирует легкую цепь иммуноглобулина.

[50] Типичное биспецифическое антитело имеет две тяжелые цепи, каждая из которых имеет три CDR тяжелой цепи, за которыми следуют домен CH1, шарнир, домен CH2 и домен CH3, а также легкую цепь иммуноглобулина, которая либо не придает антигенсвязывающей специфичности, но может связываться с каждой тяжелой цепью, или которая может связываться с каждой тяжелой цепью и которая может связывать один или несколько эпитопов, связанных с антигенсвязывающими областями тяжелой цепи, или которая может связываться с каждой тяжелой цепью и обеспечивать связывание одного или обоих из тяжелых цепей с одним или обоими эпитопами. BsAb можно разделить на два основных класса: те, которые несут Fc-область (IgG-подобные), и те, у которых отсутствует Fc-область, при этом последние обычно меньше, чем IgG и IgG-подобные биспецифические молекулы, содержащие Fc. IgG-подобные bsAb могут иметь различные форматы, такие как без ограничения триомаб, IgG с выступами во впадинах (kih IgG), crossMab, orth-Fab IgG, Ig с двумя переменными доменами (DVD-Ig), Fab «два в одном» или двойного действия (DAF), IgG-одноцепочечные Fv (IgG-scFv) или κλ-тела. Различные отличные от IgG-подобных молекул форматов включают tandemные scFv, формат диатела, одноцепочечное диатело, tandemные диатела (TandAbs), молекулу переориентирующегося антитела с двойной аффинностью (DART), DART-Fc, нанотела или антитела, получаемые с помощью метода dock-and-lock (DNL) (Gaowei Fan, Zujian Wang & Mingju Hao, Bispecific antibodies and their applications, 8 JOURNAL OF HEMATOLOGY & ONCOLOGY 130; Dafne Müller & Roland E. Kontermann, Bispecific Antibodies, HANDBOOK OF THERAPEUTIC ANTIBODIES 265-310 (2014), полные идеи которого включены в данный документ).

[51] Используемый в данном документе термин «мультиспецифическое антитело» относится к антителу, характеризующемуся специфичностью связывания по меньшей мере с двумя различными антигенами. Хотя такие молекулы обычно связывают только два антигена (т.е. биспецифические антитела, bsAb), антитела с дополнительными специфичностями, такие как триспецифические антитела и триспецифические КИТ, также могут быть обработаны с помощью системы и способом, раскрытых в данном документе.

[52] Используемый в данном документе термин «моноклональное антитело» не ограничивается антителами, полученными с помощью технологии гибридомы. Моноклональное антитело может быть получено из одного клона, включая любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, любым доступным или известным в данной области техники способом. Моноклональные антитела, подходящие для целей настоящего изобретения, могут быть получены с использованием широкого спектра методик, известных в данной области техники, в том числе использование технологий гибридомы, рекомбинантных технологий и технологий фагового дисплея или их комбинации.

[53] В некоторых иллюстративных вариантах осуществления белок, представляющий интерес, может быть получен из клеток млекопитающих. Клетки млекопитающих могут иметь человеческое или отличное от человеческого происхождение и могут включать первичные эпителиальные клетки (например, кератиноциты, эпителиальные клетки шейки матки, бронхиальные эпителиальные клетки, эпителиальные клетки трахеи, эпителиальные клетки почек и эпителиальные клетки сетчатки), подтвержденные клеточные линии и их штаммы (например, эмбриональные клетки почки 293, клетки ВНК, клетки эпителия шейки матки HeLa и клетки сетчатки PER-C6, клетки MDBK (NBL-1), клетки 911, клетки CRFK, клетки MDCK, клетки CHO, клетки BeWo, клетки Chang, клетки Detroit 562, клетки HeLa 229, клетки HeLa S3, клетки Нер-2, клетки KB, клетки LSI80, клетки LS174T, клетки NCI-H-548, клетки RPMI2650, клетки SW-13, клетки T24, клетки WI-28 VA13, клетки 2RA, клетки WISH, клетки BS-C-1, клетки LLC-MK2, клетки клона М-3, клетки 1-10, клетки RAG, клетки TCMK-1, клетки Y-1, клетки LLC-PK₁, клетки PK(15), клетки GH₁, клетки GH₃, клетки L2, клетки LLC-RC 256, клетки MHiCi, клетки XC, клетки MDOK, клетки VSW и TH-1, клетки B1, клетки BSC-1, клетки RAf, клетки RK, клетки PK-15 или их производные), клетки фибробластов из любой ткани или органа (в том числе помимо прочего сердца, печени, почек, толстой кишки, кишечника, пищевода, желудка, нервной ткани (головной мозг, спинной мозг), легких, сосудистой ткани (артерии, вены, капилляры), лимфоидной ткани (лимфатические железы, аденоиды, миндалины, костный мозг и кровь), селезенки, а также фибробласты и фибробластоподобные клеточные линии (например, клетки CHO, клетки TRG-2, клетки IMR-33, клетки Don, клетки GHK-21, клетки, характерные для цитруллинемии, клетки Dempsey, клетки Detroit 551, клетки Detroit 510, клетки Detroit 525, клетки Detroit 529, клетки Detroit 532, клетки Detroit 539, клетки Detroit 548, клетки Detroit 573, клетки HEL 299, клетки IMR-90, клетки MRC-5, клетки WI-38, клетки WI-26, клетки Midi, клетки CHO, клетки CV-1, клетки COS-1, клетки COS-3, клетки COS-7, клетки Vero, клетки DBS-FrhL-2, клетки BALB/3T3, клетки F9, клетки SV-T2, клетки M-MSV-BALB/3T3, клетки K-BALB, клетки BLO-11, клетки NOR-10, клетки C3H/10T1/2, клетки HSDMiC3, клетки KLN205, клетки McCoy, L-клетки мыши, клетки штамма 2071 (L-клетки мыши), клетки штамма L-M (L-клетки мыши), клетки L-MTK' (L-клетки мыши), клетки клонов NCTC 2472 и 2555, клетки SCC-PSA1, клетки Swiss/3T3, клетки индийского мунджака, клетки

SIRC, клетки Cn и клетки Jensen, Sp2/0, NS0, клетки NS1 или их производные).

[54] Используемый в данном документе термин «терапевтический белок» относится к любому белку, который можно вводить субъекту для лечения заболевания или нарушения. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления терапевтический белок может быть направлен на лечение рака. Терапевтический белок может представлять собой любой белок с фармакологическим эффектом, например, антитело, растворимый рецептор, конъюгат антитело-лекарственное средство или фермент. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления терапевтический белок может представлять собой биспецифическое антитело к CD20хCD3. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления терапевтический белок может представлять собой биспецифическое антитело к BCMAхCD3. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления терапевтический белок может представлять собой моноклональное антитело к белку запрограммированной клеточной смерти 1 (PD-1), такому как цемиплимаб. В других вариантах осуществления терапевтический белок может представлять собой биспецифическое антитело к EGFRхCD28, биспецифическое антитело к CD38хCD28, моноклональное антитело к TNF, моноклональное антитело к PD-L1, моноклональное антитело к EGFR, моноклональное антитело к CD20, моноклональное антитело к CD38 или моноклональное антитело к LAG3.

[55] Используемый в данном документе термин «мишень» относится к любой молекуле, которая может специфически взаимодействовать с терапевтическим белком для достижения фармакологического эффекта. Например, мишенью антитела может быть антиген, против которого оно направлено; мишенью лиганда может быть рецептор, с которым он преимущественно связывается, и наоборот; мишенью фермента может быть субстрат, с которым он преимущественно связывается; и так далее. Один терапевтический белок может иметь более одной мишени. Различные мишени являются подходящими для применения в способе по настоящему изобретению в соответствии с конкретным применением. Мишень может, например, присутствовать на клеточной поверхности, может быть растворимой, может быть цитозольной или может быть иммобилизована на твердой поверхности. Мишень может представлять собой рекомбинантный белок. В некоторых примерах осуществления мишень может представлять собой CD20, CD3, BCMA, PD-1, EGFR, CD28, CD38, TNF, PD-L1 или LAG3.

[56] Используемый в данном документе термин «антитела к лекарственному средству» или «ADA» относится к антителам, продуцируемым иммунной системой субъекта, которые нацелены на эпитопы на терапевтическом белке. Подмножество ADA представляют собой «нейтрализующие антитела» или «NAb», которые могут связываться с терапевтическим белком таким образом, что ингибируют или нейтрализуют его фармакологическую активность. NAb могут влиять на клиническую эффективность терапевтического белка, поэтому их необходимо контролировать при введении терапевтического белка субъекту.

[57] Используемый в данном документе термин «нейтрализующее средство»

относится к молекуле, которая может взаимодействовать с терапевтическим белком таким образом, что ингибирует или нейтрализует его фармакологическую активность. Нейтрализующее средство может представлять собой, например, олигонуклеотид, такой как аптамер, или белок, такой как антитело. Нейтрализующие средства могут возникать из различных источников, например, путем химического синтеза, путем рекомбинантного получения или из иммунной системы субъекта. Для простоты нейтрализующие антитела (NAb), продуцируемые иммунной системой субъекта, являются основным нейтрализующим средством, обсуждаемым в данном документе, но следует понимать, что способы по настоящему изобретению могут быть применены для обнаружения любого нейтрализующего средства.

[58] NAb можно контролировать с помощью различных анализов. Анализы NAb можно разделить на клеточные и неклеточные. Выбор клеточного анализа по сравнению с неклеточным анализом зависит от терапевтического белка, мишени и рассматриваемого применения, и специалист в данной области техники сможет выбрать анализ в соответствии со своими потребностями.

[59] Клеточные анализы включают по меньшей мере один тип клеток. Терапевтический белок может связываться с мишенью таким образом, что воздействуют на клеточные явления, что затем можно измерить как результат связывания терапевтического белка. Применимые клеточные явления, которые приводят к измеримому сигналу или активности, могут включать, например, фосфорилирование рецепторов, фосфорилирование нижестоящих белков в пути передачи сигнала, высвобождение цитокинов, пролиферацию клеток, гибель клеток, продуцирование вторичного белка или любую другую клеточную активность. В качестве дополнения или в качестве альтернативы можно использовать репортерный ген, который экспрессируется в ответ на клеточные явления, вызванные связыванием терапевтического белка с мишенью; например, флуоресцентного белка, такого как люцифераза, зеленого флуоресцентного белка (GFP) или любого его варианта.

[60] Измерение сигнала, генерируемого посредством связывания терапевтического белка с мишенью, и измерение ингибирования этого сигнала NAb можно назвать «прямым» клеточным анализом. И наоборот, в «непрямом» клеточном анализе связывание терапевтического белка с мишенью ингибирует измеримый сигнал, и восстановление этого сигнала используется для обнаружения NAb. Для простоты обсуждение будет ограничено прямыми клеточными анализами, хотя способы, описанные в данном документе, могут в равной степени применяться к непрямые клеточным анализам.

[61] В данном документе раскрыты клеточные анализы NAb, включающие два типа клеток, которые вызывают измеримые клеточные явления при связывании с терапевтическим биспецифическим антителом. Каждый тип клеток может представлять на своей клеточной поверхности мишень, которая представляет собой антиген, распознаваемый одним фрагментом биспецифического антитела. Одновременное связывание обеих мишеней связывает две клетки и вызывает последующие клеточные

явления, которые можно измерить как показатель связывания терапевтического белка. Примеры клеток, используемых для клеточных анализов NAb, включают клетки HEK293/hCD20, экспрессирующие CD20 человека, клетки MOLP-8, эндогенно экспрессирующие BCMA, и клетки Jurkat/NFAT-Luc. Клетки Jurkat/NFAT-Luc экспрессируют CD3 и Т-клеточный рецептор (TCR) на своей клеточной поверхности. Когда биспецифическое антитело, например, биспецифическое антитело к CD20хCD3 или биспецифическое антитело к BCMAхCD3, связывает эту клетку с второй клеткой, TCR инициирует путь передачи сигнала, приводящий к экспрессии репортера люциферазы, генерируя измеримый сигнал. Этот сигнал может быть ослаблен присутствием в анализе NAb или конкурирующих лекарственных средств, как описано далее в примерах.

[62] Следует понимать, что многие типы клеток могут быть использованы в клеточном анализе по настоящему изобретению в соответствии с тестируемым терапевтическим белком и мишенью, при условии, что клетка экспрессирует или может быть модифицирована для экспрессии мишени и/или может реагировать на связывание терапевтического белка и мишени путем получения измеримого сигнала или активности. Неограничивающие примеры клеток, которые можно использовать в способе по настоящему изобретению, включают клетки HEK293, клетки HEK293/hCD20, клетки HEK293/MfBCMA, клетки HEK293/hBCMA, клетки NCI-H929, клетки MOLP-8, клетки Jurkat, клетки Jurkat/NFAT-Luc, клетки Jurkat/NFAT-Luc/MfCD3 и их модифицированные варианты.

[63] Неклеточные анализы могут обнаруживать присутствие NAb в отсутствие клеток. Один тип неклеточного анализа называется анализом конкурентного связывания лиганда (CLB). Анализы CLB или, как упоминается в данном документе, анализы связывания лиганда измеряют связывание терапевтического белка с мишенью, которая может представлять собой, например, очищенный рекомбинантный белок или нативную мишень, ассоциированную с подготовленной клеточной мембраной. Мишень может быть иммобилизована на твердой подложке, такой как микропланшет или гранулы, что позволяет захватывать меченый терапевтический белок, и обнаружение этой метки можно использовать для измерения связывания. NAb в образце будут блокировать связывание терапевтического белка с мишенью, уменьшая сигнал. В качестве альтернативы, терапевтический белок может быть иммобилизован на твердой поверхности, в то время как растворимая мишень помечена, с использованием тех же принципов, применяемых в ином отношении. Метка может обнаруживаться и/или давать сигнал или активность, например, с помощью флуоресценции, хемилюминесценции, электрохемилюминесценции, радиоактивности или аффинной очистки.

[64] Измерение сигнала, генерируемого посредством связывания терапевтического белка с мишенью, и измерение ингибирования этого сигнала NAb можно назвать «прямым» анализом связывания. И наоборот, в «непрямом» анализе связывания связывание терапевтического белка с мишенью ингибирует измеримый сигнал, и восстановление этого сигнала используется для обнаружения NAb. Для простоты

обсуждение будет ограничено прямыми анализами связывания, хотя способы, описанные в данном документе, могут в равной степени применяться к непрямым анализам связывания.

[65] В данном документе раскрыты лиганд-связывающие анализы NAb, включающие биотинилированную мишень, например, PD-1, иммобилизованную на покрытом авидином микропланшете и совместно инкубированную с рутенилированным терапевтическим белком, например, цемиплимабом. Связывание меченого цемиплимаба с иммобилизованным PD-1 позволяет обнаружить сигнал, который можно использовать для измерения этого связывания. Присутствие NAb или конкурирующих лекарственных средств в анализе может уменьшить этот сигнал, как дополнительно обсуждается в примерах.

[66] Второй тип неклеточного анализа называется анализом активности ферментов. Анализы на основе активности ферментов измеряют способность лекарственного средства-фермента катализировать реакцию, биологически соответствующую его механизму действия, путем превращения подходящего субстрата в продукт. Ферментативную активность можно измерить путем непосредственного измерения связывания фермента с его субстратом или путем измерения количества продуцируемого продукта. На присутствие NAb или конкурирующих лекарственных средств в анализе может указывать снижение связывания или снижение продуцирования продукта. Таким образом, способы, раскрытые в данном документе, также применимы для точной количественной оценки NAb в анализе на основе ферментативной активности.

[67] Для обнаружения присутствия NAb в образце, анализ NAb должен включать экспериментальное условие и контрольное условие. Экспериментальное условие включает образец, который тестируется в отношении наличия NAb. Контрольное условие может представлять собой, например, отрицательное контрольное условие, которое, как известно, не включает NAb. Сигнал или активность генерируются в анализе NAb как мера связывания терапевтического белка с мишенью, и снижение указанного сигнала в экспериментальном условии по сравнению с контрольным условием является мерой нейтрализации терапевтического белка и, следовательно, присутствие NAb в экспериментальном условии, как изображено, например, на фиг. 4В.

[68] И, наоборот, может быть известно, что условие положительного контроля включает NAb или другое нейтрализующее средство, и его можно использовать, например, для валидации анализа NAb или для калибровки его сигнала.

[69] Изменение сигнала между экспериментальным условием и контрольным условием также может быть вызвано интерференцией интерферирующего средства. В данном документе раскрыт способ снижения указанной интерференции, позволяющий точно определить присутствие NAb в образце.

[70] Используемый в данном документе термин «интерферирующее средство» относится к любой молекуле, присутствующей в анализе NAb или матрице образца, которая может нарушать точное измерение NAb. Интерференция может быть вызвана

ассоциацией с NAb, терапевтическим белком, терапевтическим белком-мишенью или любым компонентом анализа NAb. Примеры интерферирующих средств могут включать растворимую мишень терапевтического белка, белок с последовательностью, сходной с терапевтическим белком, который, таким образом, является мишенью для того же NAb, или остаточное лекарственное средство от предыдущего введения терапевтического белка.

[71] Конкретным классом интерферирующих средств может быть «конкурирующее лекарственное средство», присутствующее в матрице образца, которое не является терапевтическим белком, но способно конкурентно связываться с компонентом анализа NAb, таким как терапевтический белок-мишень. Конкурирующим лекарственным средством может быть остаточное лекарственное средство, ранее введенное субъекту. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления конкурирующее лекарственное средство может конкурентно связываться с терапевтическими мишенями, в том числе, например, CD20, CD3, BCMA, PD-1, EGFR, CD28, CD38, TNF, PD-L1 или LAG3. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления конкурирующим лекарственным средством может быть любое из лекарственных средств или кандидатов в лекарственные средства, приведенных в таблице 1. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления конкурирующим лекарственным средством может являться ритуксимаб, пембролизумаб, ниволумаб, окрелизумаб, обинутузумаб, офатумумаб, ибритумомаб, тиуксетан, тозитумомаб, ублитуксимаб, цетуксимаб, даратумумаб или адалимумаб.

[72] Используемый в данном документе термин «смягчающее средство» относится к любой молекуле, которая может связываться с интерферирующим средством, чтобы уменьшить или предупредить интерференцию в анализе NAb и обеспечить точное обнаружение NAb в образце. Любая молекула, которая может специфически взаимодействовать с интерферирующим средством и предупреждать его взаимодействие с NAb, терапевтическими белками, мишенями или другими компонентами анализа NAb, может представлять собой подходящее смягчающее средство. Смягчающее средство может представлять собой, например, олигонуклеотид, такой как аптамер, или белок, такой как антитело. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления смягчающее средство может представлять собой блокирующее антитело к конкурирующему лекарственному средству, такое как блокирующее антитело к ритуксимабу, блокирующее антитело к пембролизумабу или блокирующее антитело к ниволумабу.

[73] Также в данном документе раскрыты наборы для осуществления способа по настоящему изобретению. Наборы по настоящему изобретению позволяют пользователю точно определить присутствие NAb в образце за счет снижения влияния конкурирующих лекарственных средств. Наборы по настоящему изобретению могут включать, например, терапевтический белок, мишень указанного терапевтического белка, смягчающее средство, средство получения сигнала или активности в качестве меры связывания между указанным терапевтическим белком и указанной мишенью, а также инструкции по применению набора. Они могут также включать нейтрализующие средства, которые

можно использовать в качестве положительного контроля. Они могут дополнительно включать конкурирующие лекарственные средства, которые можно использовать в качестве положительного контроля.

[74] Наборы могут быть предназначены для клеточных или неклеточных анализов NAb или и для того и другого. Наборы, предназначенные для клеточных анализов NAb, могут включать клетки, подходящие для экспрессии мишени и для получения сигнала или активности в качестве меры связывания терапевтического белка с указанной мишенью, например, клетки HEK293/hCD20, клетки Jurkat/NFAT-Luc, клетки MOLP-8 или любые другие клетки, способные экспрессировать мишень и/или способные отвечать на связывание терапевтического белка с мишенью, приводя к образованию измеримого сигнала или активности. Подходящей мишенью в наборе, предназначенном для анализа NAb на клеточной основе, может быть, например, CD20, CD3, BCMA, EGFR, CD28, CD38 или их комбинация. Подходящим терапевтическим белком может быть, например, биспецифическое антитело к CD20xCD3, биспецифическое антитело к BCMAxCD3, биспецифическое антитело к EGFRxCD28 или биспецифическое антитело к CD38xCD28.

[75] Наборы, предназначенные для неклеточных анализов NAb, могут содержать твердую подложку, например, микропланшет или гранулу, способные ю связываться с целевым и/или терапевтическим белком, например, путем покрытия авидином. Они могут дополнительно содержать целевой и/или терапевтический белок, способный связываться с указанной твердой подложкой, например, путем конъюгации с биотином. Они могут дополнительно содержать меченый белок-мишень и/или терапевтический белок, например, белок-мишень и/или терапевтический белок, меченный рутением. Подходящей мишенью в наборе, направленном на неклеточный анализ NAb, может быть, например, PD-1, TNF, PD-L1, EGFR, CD20, CD38 или LAG3. Подходящим терапевтическим белком может быть, например, цемиплимаб или моноклональное антитело, направленное против любой из вышеупомянутых мишеней.

[76] Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается каким-либо из вышеупомянутых терапевтических белков, мишеней, нейтрализующих средств, клеточных анализов, типов клеток, неклеточных анализов, репортеров, меток, интерферирующих средств, конкурирующих лекарственных средств или смягчающих средств, и любой(ые) терапевтический(ие) белок(ки), мишень(и), нейтрализующее(ие) средство(а), клеточный(ые) анализ(ы), тип(ы) клеток, неклеточный(ые) анализ(ы), репортер(ы), метка(ки), интерферирующее(ие) средств(а), конкурирующее(ие) лекарственное(ые) средство(а) или смягчающее(ие) средств(а) могут быть выбраны любым подходящим способом.

[77] Настоящее изобретение будет более полно понято со ссылкой на следующие примеры. Однако их не следует рассматривать как ограничивающие объем настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

[78] **Материалы и методы.** В настоящем изобретении, когда его осуществляет

специалист в данной области техники, могут использоваться традиционные методики в области фармацевтической химии, иммунологии, молекулярной биологии, клеточной биологии, технологии рекомбинантной ДНК и методики анализа, как описано, например, в Sambrook et al. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3rd ed. 2001; Ausubel et al. "Short Protocols in Molecular Biology", 5th ed. 1995; "Methods in Enzymology", Academic Press, Inc.; MacPherson, Hames and Taylor (eds.). "PCR 2: A practical approach", 1995; "Harlow and Lane (eds.) "Antibodies, a Laboratory Manual" 1988; Freshney (ed.) "Culture of Animal Cells", 4th ed. 2000; "Methods in Molecular Biology" vol. 149 ("The ELISA Guidebook" by John Crowther) Humana Press 2001, and later editions of these treatises (e.g., "Molecular Cloning" by Michael Green (4th Ed. 2012) и "Culture of Animal Cells" by Freshney (7th Ed., 2015), а также современных электронных версиях.

[79] Реагенты для осуществления способов по настоящему изобретению и аспекты наборов по настоящему изобретению включают биотинилированный PD-1 (мишени); антитела к ритуксимабу α -Ritux Ab1, α -Ritux Ab2 и α -Ritux Ab3, антитела к пембролизумаба и антитела к ниволумаба (смягчающие средства); антитела к CD3, антитела к CD20, антитела к BCMA, антитела к PD-1, ритуксимаб, пембролизумаб и ниволумаб (конкурирующие лекарственные средства); и биспецифическое антитело к CD20хCD3, биспецифическое антитело к BCMAхCD3 и цемиплимаб (терапевтические белки); см., например, патенты США №№ 9657102 и 10550193, все идеи которых включены в данный документ посредством ссылки. Антитела отрицательного контроля, например, hIgG1, hIgG4, доступны из нескольких коммерческих источников.

[80] Клетки, подходящие для осуществления способов по настоящему изобретению, и аспекты наборов по настоящему изобретению включают клетки HEK293/hCD20, MOLP-8, Jurkat/NFAT-Luc и Jurkat/NFAT-Luc/MfCD3, все из которых доступны из нескольких коммерческих источников.

[81] Анализы люциферазы проводят в соответствии с рекомендациями производителя; см., например, Promega и ThermoFisher.

Пример 1. Схема клеточного анализа для обнаружения нейтрализующих антител (NAb) к терапевтическому белку

[82] В этом примере показана экспериментальная схема клеточных анализов нейтрализующих антител (NAb) по настоящему изобретению для оценки потенциальных терапевтических белков. Вкратце, были получены иммортализованные В-клетки человека, сконструированные для экспрессии антигена CD20 человека на клеточной поверхности (обозначены HEK293/hCD20). Эти клетки представляют собой «клетки-мишени» анализа, которые имитируют раковые клетки человека, экспрессирующие CD20. Кроме того, иммортализованные Т-клетки человека, экспрессирующие Т-клеточный рецептор (TCR) и антиген клеточной поверхности CD3, получали и конструировали для экспрессии репортерного гена (люциферазы) под контролем промотора, индуцируемого TCR/CD3 (ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT)). Эти клетки Jurkat/NFAT-Luc представляют собой «репортерные клетки» анализа, которые имитируют иммунные

клетки пациента, способные задействовать и потенциально уничтожить экспрессирующую CD20 раковую клетку посредством клеточно-опосредованного ответа цитотоксичности при связывании с лекарственным антителом, таким как биспецифическое антитело к CD20хCD3, как изображено на фиг. 1А.

[83] Добавление антител, которые связывают CD20 и CD3 (биспецифическое лекарственное антитело к CD20хCD3), опосредуя кластеризацию Т-клеточного рецептора (TCR) на репортерной клетке, приводит к экспрессии репортерного гена люциферазы и обеспечивает устойчивый зависимый от дозы сигнал люциферазы, как изображено на фиг. 1В. Добавление контрольного антитела изотипа hIgG4 не приводило к активности люциферазы, как изображено незаштрихованными квадратами на фиг. 1В.

[84] Другой клеточный анализ NAb разрабатывали с использованием клеток Jurkat/NFAT-Luc в качестве репортерных клеток, как описано выше, в комбинации с клетками MOLP-8 в качестве клеток-мишеней. MOLP-8 представляет собой клеточную линию множественной миеломы, которая эндогенно экспрессирует антиген созревания В-клеток белка клеточной поверхности (BCMA). Биспецифические антитела к BCMAхCD3 могут связывать репортерные клетки и клетки-мишени, опосредуя кластеризацию TCR на репортерной клетке, что приводит к экспрессии репортерного гена люциферазы и зависимому от дозы сигналу люциферазы, как изображено на фиг. 1С. Тестировали два антитела к BCMAхCD3, при этом пунктирные линии обозначали концентрацию, используемую в последующих анализах.

[85] Эти результаты показывают, что клеточные анализы по настоящему изобретению обеспечивают надежную кривую доза-ответ и предсказуемо реагируют на положительные и отрицательные контроли.

Пример 2. Обнаружение NAb к терапевтическому белку с использованием клеточного анализа NAb

[86] Этот пример демонстрирует дальнейшее подтверждение концепции экспериментальной схемы анализа NAb по настоящему изобретению. В клеточном анализе NAb NAb к терапевтическому белку ингибируют связывание терапевтического белка с его клетками-мишенями и/или репортерными клетками и за счет этого устраняют репортерный сигнал. Снижение репортерного сигнала или активности в анализе NAb является мерой присутствия NAb в образце.

[87] Например, на фиг. 2А проиллюстрировано действие NAb к биспецифическому антителу к CD20хCD3, где связывание NAb с фрагментом к CD20 или фрагментом CD3 биспецифического антитела прерывает связывание с CD20 или CD3 соответственно, устраняя активность люциферазы. Для дальнейшей валидации этого клеточного анализа NAb к анализу NAb добавляли суррогатные NAb, нацеленные либо на фрагмент к CD20, либо на фрагмент к CD3 биспецифического антитела к лекарственному средству к CD20хCD3. Добавление NAb вызывало зависимое от дозы снижение активности люциферазы, как показано на фиг. 2В.

[88] Эффективность этого клеточного анализа NAb дополнительно валидировали

для использования с двумя биспецифическими лекарственными антителами к ВСМАхCD3. К анализу NAb добавляли суррогатные NAb, нацеленные либо на фрагмент к ВСМА, либо на фрагмент к CD3 двух биспецифических антител к лекарственному средству к ВСМАхCD3. Добавление NAb вызывало зависящее от дозы снижение активности люциферазы, как показано на фиг. 2C, 2D, 2F и 2G. Добавление контролей изотипа не влияло на активность люциферазы, как показано на фиг. 2E и 2H.

[89] Эти результаты показывают, что анализ по настоящему изобретению надежно измеряет присутствие нейтрализующих антител к терапевтическому белку зависимым от дозы образом.

Пример 3. Интерференция конкурирующего лекарственного средства в клеточном анализе NAb

[90] Анализы NAb могут давать ложно-положительные или ложно-отрицательные результаты в связи с интерференцией компонентов матрицы. Одним из потенциальных источников интерференции является второе лекарственное средство, которое конкурентно связывается с мишенью тестируемого терапевтического белка. В качестве подтверждения концепции интерференции этого типа проводили анализы NAb для биспецифического лекарственного антитела к CD20хCD3 при добавлении конкурирующих антител либо к CD20, либо к CD3, как изображено на фиг. 3A и фиг. 3B. Добавление конкурирующего лекарственного средства вызывало зависящее от дозы снижение активности люциферазы, имитирующее снижение активности люциферазы, вызванное суррогатными NAb, и поэтому приводило к ложно-положительному результату.

[91] Интерференцию от конкурирующих лекарственных средств также наблюдали в анализах NAb для двух биспецифических лекарственных антител к ВСМАхCD3. Добавление двухвалентных родительских антител к ВСМА или CD3 вызывало снижение сигнала люциферазы в обоих анализах, как изображено на фиг. 3C и 3E. Добавление различных кандидатов в антитела к ВСМА также вызывало снижение сигнала люциферазы в обоих анализах, как изображено на фиг. 3D и 3F.

[92] Эти результаты демонстрируют доказательство концепции того, что присутствие конкурирующего второго лекарственного средства может давать ложно-положительный результат в клеточном анализе NAb.

Пример 4. Добавление сыворотки человека к клеточному анализу NAb

[93] Как обсуждалось выше, на анализы NAb могут влиять компоненты матрицы. Для тестирования устойчивости анализа NAb по настоящему изобретению к потенциальной интерференции, анализ NAb для биспецифического лекарственного антитела к CD20хCD3 проводили с добавлением сыворотки крови человека, ранее не получавшего лекарственное средство, как изображено на фиг. 4A. На активность люциферазы не влияло добавление сыворотки крови человека, что демонстрирует устойчивость анализа NAb по настоящему изобретению к помехам от компонентов сыворотки крови человека и, следовательно, пригодность для клинического применения.

[94] На фиг. 4B продемонстрировано простое представление «сигнала анализа

NAb». Относительное присутствие NAb в образце количественно оценивают путем деления активности люциферазы, индуцированной с контролем на основе лекарственного средства, на активность люциферазы, индуцированной в экспериментальном образце. Активность люциферазы снижается зависимым от дозы образом в присутствии NAb, что приводит к более высокому сигналу анализа NAb.

Пример 5. Интерференция клеточного анализа NAb в клинических образцах

[95] Анализ NAb по настоящему изобретению использовали для тестирования 60 образцов человека, ранее не получавших лекарственное средство, из клинического испытания в отношении присутствия NAb к биспецифическому антителу к лекарственному средству к CD20хCD3, как изображено на фиг. 5. Хотя тестируемые пациенты не подвергались воздействию антител к лекарственному средству, многие образцы показали ложно-положительный результат в отношении NAb.

[96] Как обсуждалось в примере 3, одним возможным источником ложно-положительного сигнала в анализе NAb является конкурирующее второе лекарственное средство. Многие пациенты в этом клиническом испытании ранее получали средство терапии к CD20. Чтобы оценить, может ли конкурирующее лекарственное средство к CD20 быть ответственным за ложно-положительные результаты анализа NAb, подгруппу из 17 образцов человека тестировали в отношении наличия ритуксимаба, антитела к CD20, с использованием коммерчески доступного ELISA. Присутствие ритуксимаба коррелировало с ложно-положительным сигналом анализа NAb, как изображено на фиг. 6.

[97] Эти результаты показывают, что влияние остаточного конкурирующего лекарственного средства может привести к ложно-положительным результатам анализа NAb в клиническом применении, и его необходимо учитывать для точного обнаружения NAb к терапевтическому белку.

Пример 6. Смягчение влияния конкурирующего лекарственного средства в клеточном анализе NAb

[98] Как описано выше, присутствие конкурирующего лекарственного средства может нарушать связывание терапевтического белка с его мишенью в анализе NAb, что приводит к снижению репортерной активности и ложно-положительному сигналу анализа NAb. Это проиллюстрировано на фиг. 7А, на примере биспецифического антитела к CD20хCD3 в качестве терапевтического белка и ритуксимаба, антитела к CD20, в качестве конкурирующего лекарственного средства. Для точного обнаружения NAb к терапевтическому белку в присутствии конкурирующего лекарственного средства необходимо снизить связывание конкурирующего лекарственного средства с общей мишенью. Это проиллюстрировано на фиг. 7В, на примере антитела к ритуксимабу в качестве смягчающего средства, предупреждающего влияние конкурирующего лекарственного средства и обеспечивающего точное обнаружение NAb к терапевтическому белку.

[99] Блокирующие антитела к ритуксимабу тестировали в отношении их способности смягчать интерференцию в анализе NAb по настоящему изобретению.

Антитела к ритуксимабу коинкубировали в сыворотке крови, содержащей ритуксимаб, и добавляли к анализу NAb, как изображено на фиг. 7С. Добавление антител к ритуксимабу восстанавливало активность люциферазы, устраняя ложно-положительный сигнал анализа NAb, вызванный ритуксимабом.

[100] Эти результаты демонстрируют, что использование смягчающего средства к конкурирующему лекарственному средству может устранить ложно-положительный сигнал анализа NAb и обеспечить точное обнаружение NAb к терапевтическому белку.

Пример 7. Смягчение влияния конкурирующего лекарственного средства в клеточном анализе NAb в клинических образцах

[101] Как изображено в примере 5, многие образцы людей, ранее не получавших лекарственные средства, из клинических испытаний давали ложно-положительный сигнал анализа NAb при тестировании в отношении NAb к биспецифическому антителу к CD20хCD3, потенциально связанному с присутствием конкурирующего лекарственного антитела к CD20 ритуксимаба. Для снижения влияния ритуксимаба, анализы NAb проводили с использованием клинических образцов с добавлением блокирующих антител к ритуксимабу, как изображено на фиг. 8. Образец № 1 представляет собой контрольный образец с низким сигналом анализа NAb. Образцы № 2 и № 3 демонстрировали высокий ложно-положительный сигнал анализа NAb. Добавление антител к ритуксимабу устраняло ложно-положительный сигнал анализа NAb.

[102] Эти результаты подтверждают, что остаточное конкурирующее лекарственное средство в клинических образцах, в данном случае ритуксимаб, может нарушать анализ NAb и делать результаты анализа NAb неточными. Они также демонстрируют, что смягчающие средства к конкурирующему лекарственному средству могут устранить ложно-положительный сигнал анализа NAb в клиническом применении. Использование смягчающих средств к конкурирующему лекарственному средству позволяет точно обнаруживать NAb к тестируемому терапевтическому белку.

Пример 8. Схема анализа связывания лиганда для обнаружения NAb к терапевтическому белку

[103] В этом примере показана экспериментальная схема анализа связывания лиганда с NAb по настоящему изобретению для оценки кандидата в терапевтические белки. Иллюстративный вариант осуществления настоящего изобретения включает анализ связывания NAb захватывающего мишень лиганда. Вкратце, образцы инкубируют с биотинилированной мишенью и переносят на микропланшет, покрытый авидином. На следующей стадии в микропланшет добавляют рутенированное лекарственное средство. В отсутствие NAb меченное рутением лекарственное средство связывается с иммобилизованной биотином-мишенью, генерируя сигнал в анализе, как изображено на фиг. 9А. В присутствии NAb лекарственное средство, меченное рутением, не может связываться с биотином-мишенью, что приводит к ингибированию сигнала анализа, как изображено на фиг. 9В.

[104] Дополнительные анализы связывания NAb с лигандом могут быть

подходящими для оценки NAb в отношении терапевтического белка. Например, вместо схемы захвата мишени анализ связывания лиганда может быть разработан для захвата лекарственного средства: терапевтический белок, представляющий интерес, иммобилизуется, а мишень метят для генерации сигнала анализа. На фиг. 9C проиллюстрирована схема анализа связывания лиганда с биотинилированным лекарственным средством, иммобилизованным на покрытом авидином микропланшете, рутенилированной мишенью, генерирующей сигнал анализа, и NAb к иммобилизованному лекарственному средству, блокирующим связывание с мишенью и тем самым ингибирующим сигнал анализа.

Пример 9. Интерференция конкурирующего лекарственного средства в анализе связывания лиганда NAb

[105] Подобно клеточному анализу NAb, описанному выше, анализ связывания лиганда NAb может давать ложно-положительные или ложно-отрицательные результаты в связи с интерференцией компонентов матрицы. Одним из потенциальных источников интерференции является второе лекарственное средство, которое конкурентно связывается с мишенью тестируемого терапевтического белка, как изображено на фиг. 10A. Например, лекарственные антитела цемиплимаб, пембролизумаб и ниволумаб имеют одну и ту же лекарственную мишень, PD-1. Если клинический образец тестируют в отношении NAb по сравнению с цемиплимабом, используя связывание рутенилированного цемиплимаба с биотинилированным PD-1 для получения сигнала, любой остаточный пембролизумаб, ниволумаб или немеченый цемиплимаб в клиническом образце будет конкурентно связываться с мишенью, подавляя сигнал анализа и вызывая ложно-положительный результат в отношении присутствия NAb.

[106] В качестве подтверждения концепции, возрастающие концентрации цемиплимаба, пембролизумаба или ниволумаба добавляли к анализу захвата NAb мишени в отношении NAb к цемиплимабу, как изображено на фиг. 10B. Концентрации цемиплимаба, пембролизумаба или ниволумаба выше 125 нг/мл ингибировали сигнал от рутенилированного цемиплимаба, вызывая ложно-положительный сигнал анализа NAb.

[107] Эти результаты демонстрируют, что присутствие конкурирующего лекарственного средства может привести к ложно-положительному сигналу анализа связывания лиганда NAb, и его необходимо учитывать для точного обнаружения NAb к терапевтическому белку.

Пример 10. Смягчение конкурирующего лекарственного средства в анализе связывания лиганда NAb

[108] Как описано выше, присутствие конкурирующего лекарственного средства может нарушать связывание терапевтического белка с его мишенью в анализе связывания лиганда NAb, что приводит к снижению сигнала и ложно-положительному сигналу анализа NAb. Для точного обнаружения NAb к терапевтическому белку в присутствии конкурирующего лекарственного средства необходимо снизить связывание конкурирующего лекарственного средства с общей мишенью. Это проиллюстрировано на

фиг. 11А, на примере антитела к пембролизумабу или ниволумабу в качестве смягчающего средства, предупреждающего влияние конкурирующего лекарственного средства и обеспечивающего точное обнаружение NAb к терапевтическому белку.

[109] Блокирующие антитела к пембролизумабу и ниволумабу тестировали в отношении их способности смягчать интерференцию в анализе NAb по настоящему изобретению. Антитела к пембролизумабу или ниволумабу коинкубировали в образцах, содержащих пембролизумаб или ниволумаб соответственно, и добавляли в анализ связывания лиганда с NAb, как изображено на фиг. 11В. Добавление смягчающих средств к конкурирующим лекарственным средствам устраняло ложно-положительный сигнал анализа NAb, вызванный конкурентным связыванием с мишенью.

[110] Эти результаты демонстрируют, что использование смягчающего средства к конкурирующему лекарственному средству может устранить ложно-положительный сигнал анализа NAb в анализе связывания лиганда и обеспечить точное обнаружение NAb к терапевтическому белку.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ обнаружения нейтрализующего средства к терапевтическому белку в образец, включающий:

(а) приведение указанного образца, содержащего указанное нейтрализующее средство и конкурирующее лекарственное средство, в контакт с указанным терапевтическим белком, мишенью указанного терапевтического белка и смягчающим средством;

(b) измерение связывания указанного терапевтического белка с указанной мишенью; и

(с) сравнение результата (b) с контрольным измерением для обнаружения указанного нейтрализующего средства.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанное контрольное измерение включает измерение связывания указанного терапевтического белка с указанной мишенью в отсутствие нейтрализующего средства.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанное нейтрализующее средство представляет собой нейтрализующее антитело.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный терапевтический белок выбран из группы, состоящей из антитела, растворимого рецептора, конъюгата антитело-лекарственное средство и фермента.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный терапевтический белок представляет собой моноклональное антитело.

6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что указанное моноклональное антитело выбрано из группы, состоящей из антитела к PD-1, антитела к TNF, антитела к PD-L1, антитела к EGFR, антитела к CD20, антитела к CD38 и антитела к LAG3.

7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный терапевтический белок представляет собой биспецифическое антитело.

8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что указанное биспецифическое антитело выбрано из группы, состоящей из антитела к CD20хCD3, антитела к BCMAхCD3, антитела к EGFRхCD28 и антитела к CD38хCD28.

9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный терапевтический белок иммобилизован на твердой подложке.

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный терапевтический белок помечен для обнаружения.

11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что указанную метку можно обнаружить с помощью флуоресценции, хемилюминесценции, электрохемилюминесценции, радиоактивности или аффинной очистки.

12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что указанная метка содержит рутений.

13. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная мишень представляет собой антиген, рецептор, лиганд или ферментативный субстрат.

14. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная мишень представляет собой

белок клеточной поверхности.

15. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная мишень представляет собой рекомбинантный белок.

16. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная мишень экспрессируется клеткой.

17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что указанная клетка представляет собой клетку HEK293, клетку MOLP-8, клетку Jurkat или их модифицированную версию.

18. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная мишень иммобилизована на твердой подложке.

19. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная мишень помечена для обнаружения.

20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что указанную метку можно обнаружить с помощью флуоресценции, хемилюминесценции, электрохемилюминесценции, радиоактивности или аффинной очистки.

21. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная мишень представляет собой ферментативный субстрат.

22. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная мишень представляет собой CD20, CD3, BCMA, PD-1, EGFR, CD28, CD38, TNF, PD-L1 или LAG3.

23. Способ по п. 1, дополнительно включающий вторую мишень.

24. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанное конкурирующее лекарственное средство представляет собой моноклональное антитело.

25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что указанным конкурирующим лекарственным средством является ритуксимаб, пембролизумаб, ниволумаб, окрелизумаб, обинутумаб, офатумаб, ибритумаб тиуксетан, тозитумаб, ублитуксимаб, цетуксимаб, даратумаб или адалимумаб.

26. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанное конкурирующее лекарственное средство представляет собой биспецифическое антитело.

27. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанное смягчающее средство представляет собой моноклональное антитело.

28. Способ по п. 1, включающий использование двух, трех, четырех или более смягчающих средств.

29. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанное связывание указанного терапевтического белка с указанной мишенью измеряют с помощью измерения фосфорилирования рецептора, фосфорилирования нижестоящих белков в пути передачи сигнала, высвобождения цитокинов, пролиферации клеток, гибели клеток или продуцирования вторичного белка.

30. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанное связывание указанного терапевтического белка с указанной мишенью измеряют с помощью экспрессии репортерного гена.

31. Способ по п. 30, отличающийся тем, что указанный репортерный ген

представляет собой люциферазу.

32. Способ по п. 1, дополнительно включающий стадию предварительной обработки, заключающуюся в приведении указанного образца в контакт с указанным смягчающим средством перед приведением указанного образца в контакт с указанным терапевтическим белком или указанной мишенью.

33. Набор, состоящий из:

- (a) терапевтического белка;
- (b) мишени указанного терапевтического белка;
- (c) нейтрализующее средство к указанному терапевтическому белку;
- (d) конкурирующее лекарственное средство; и
- (e) смягчающее средство.

34. Набор по п. 33, дополнительно содержащий клетки, которые экспрессируют указанную мишень.

35. Набор по п. 34, дополнительно содержащий клетки, которые продуцируют измеримую активность или сигнал в ответ на связывание указанного терапевтического белка с указанной мишенью.

36. Набор по п. 35, отличающийся тем, что указанная активность представляет собой экспрессию люциферазы.

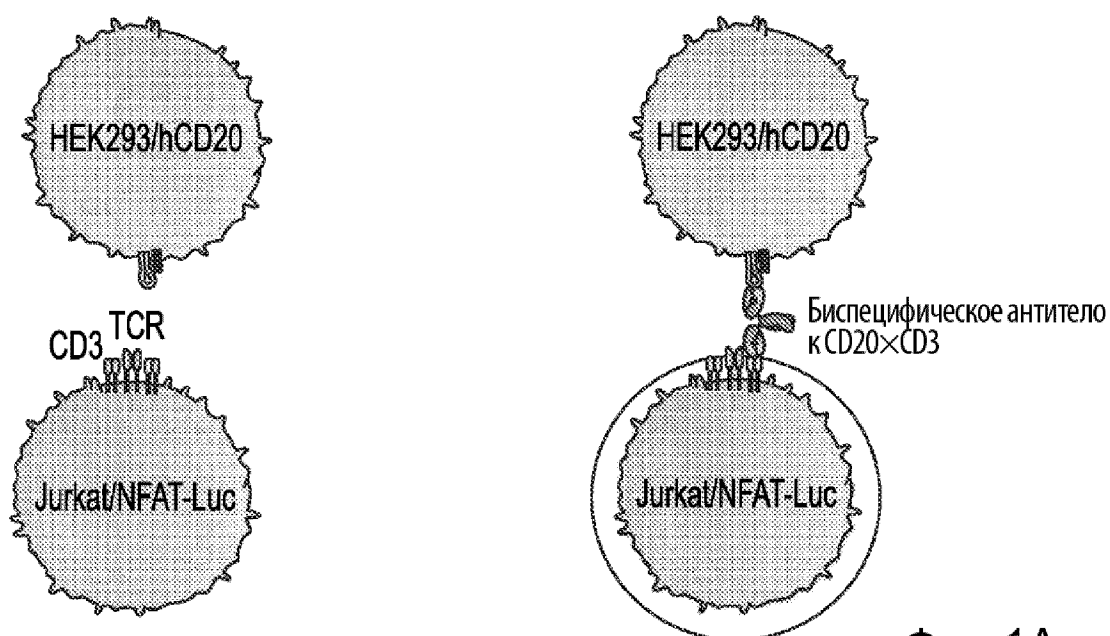
37. Набор по п. 33, отличающийся тем, что указанная мишень иммобилизована на твердой подложке.

38. Набор по п. 33, дополнительно содержащий метку, прикрепленную к указанному терапевтическому белку.

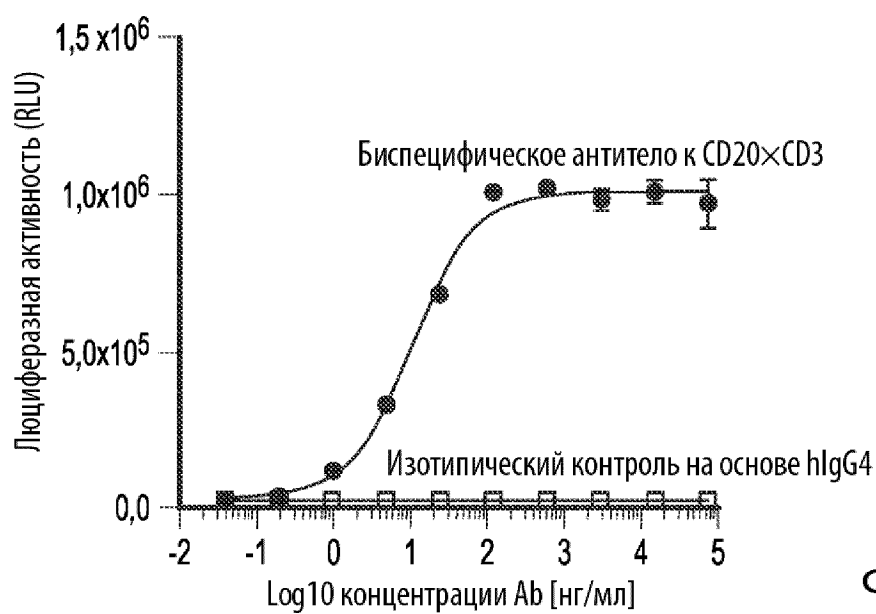
39. Набор по п. 38, отличающийся тем, что указанная метка содержит рутений.

По доверенности

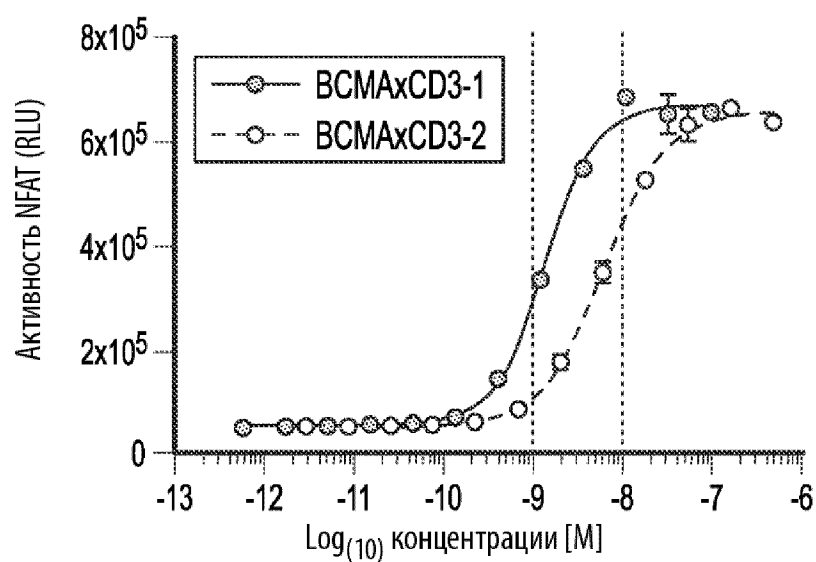
1/16



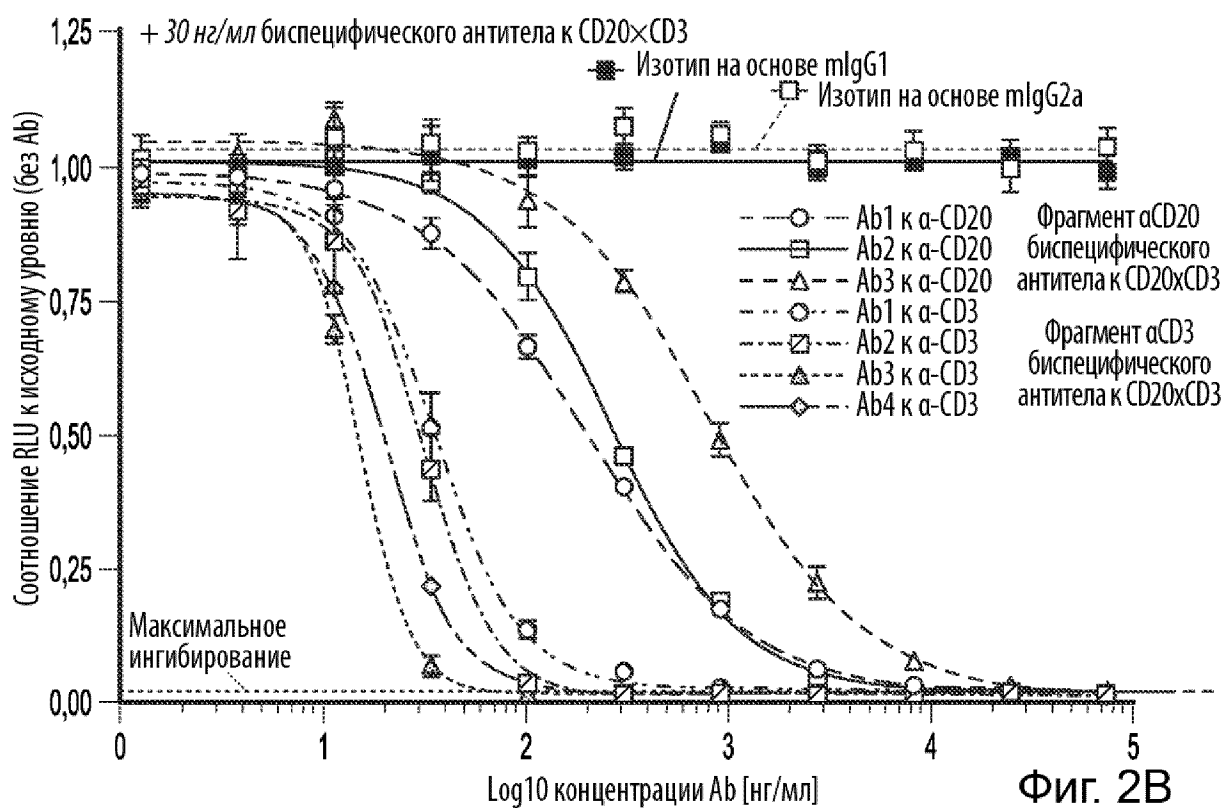
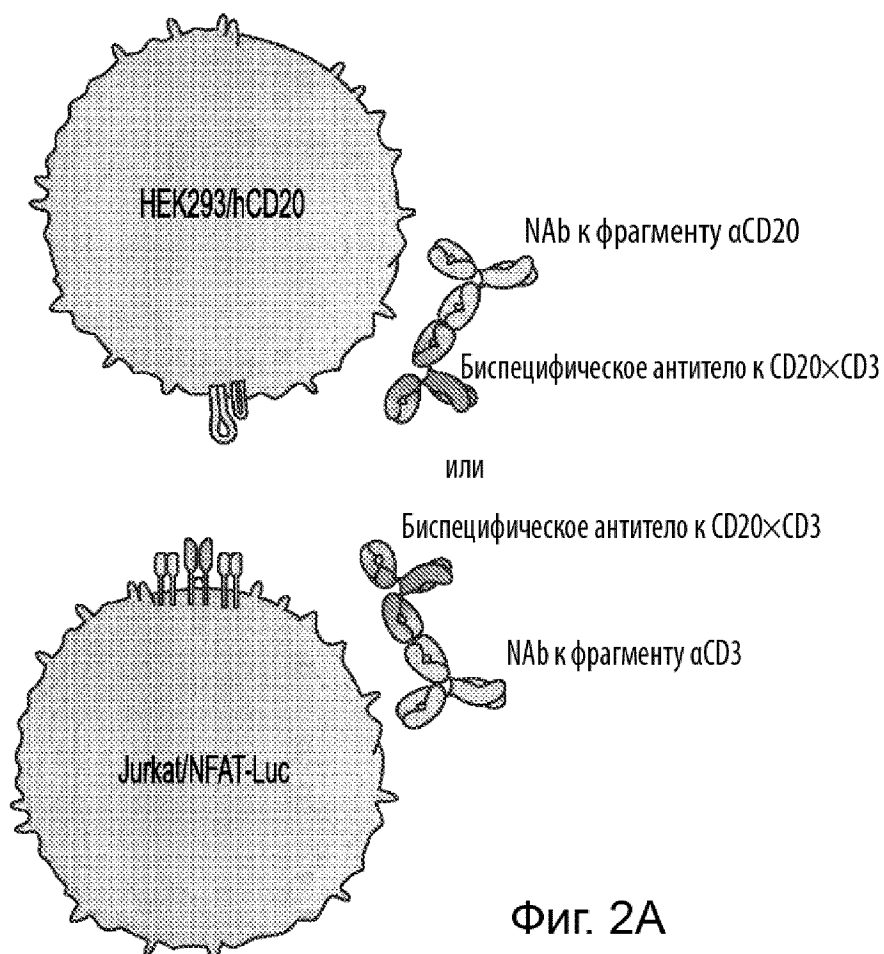
Фиг. 1А

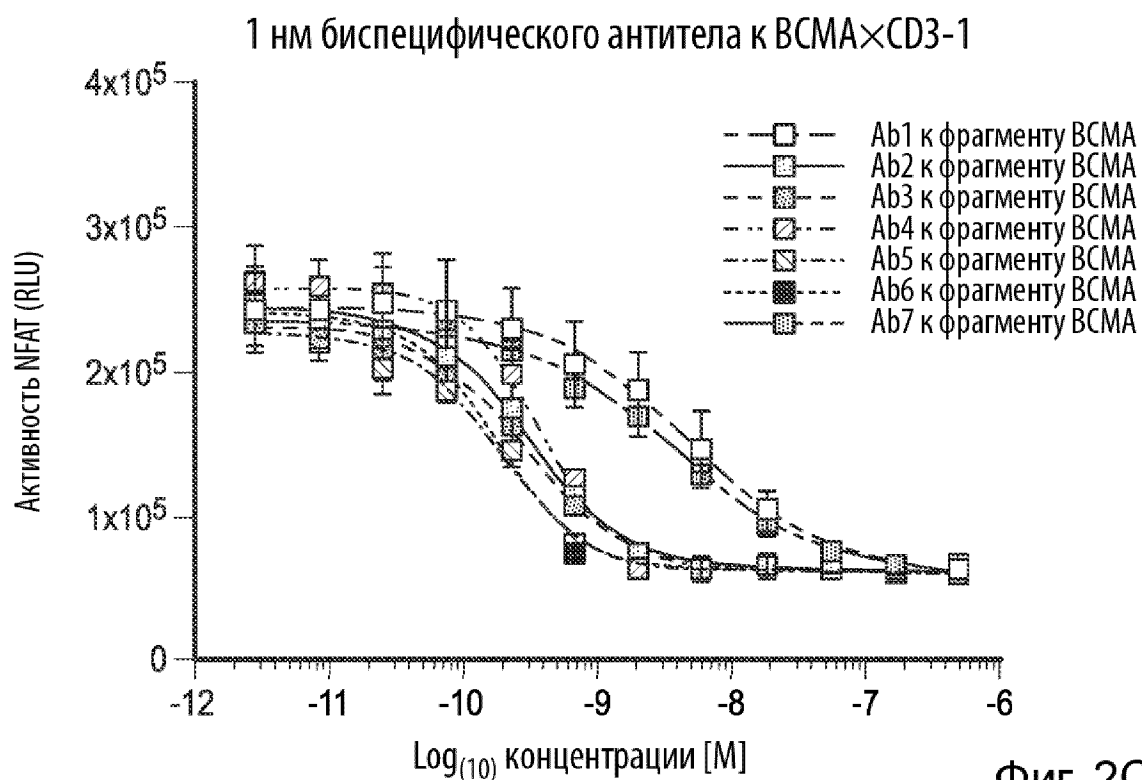


Фиг. 1В

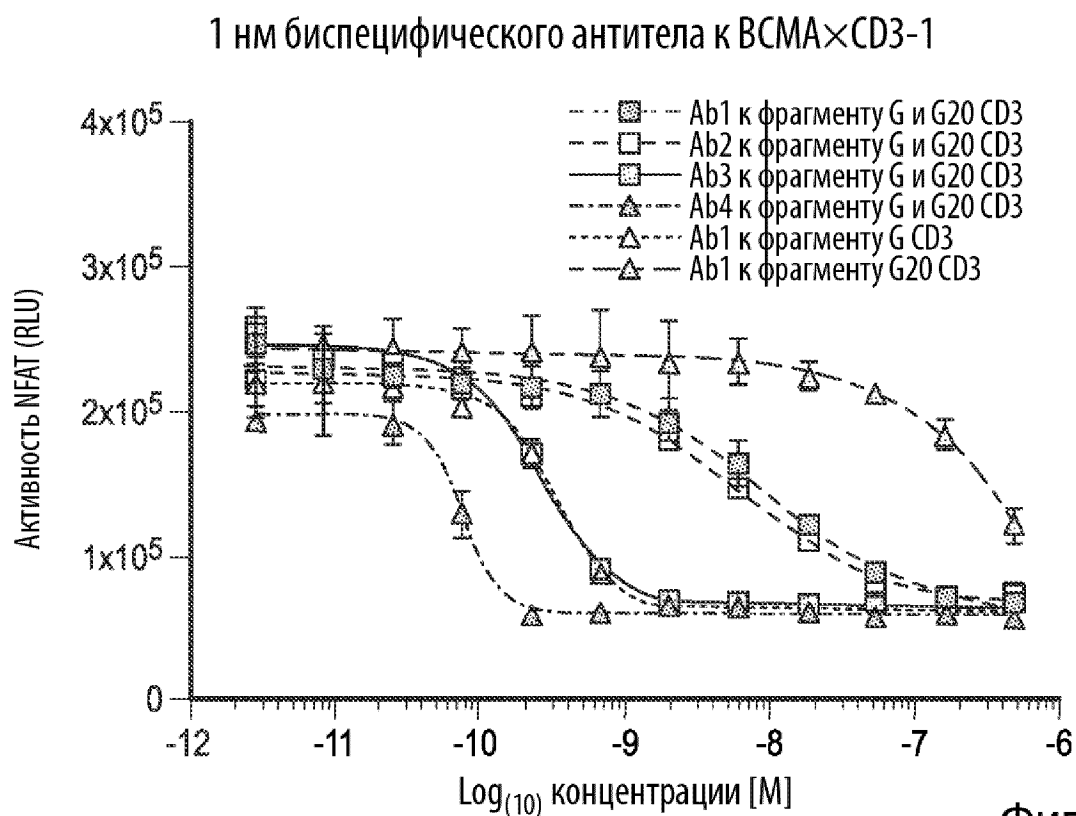


Фиг. 1С



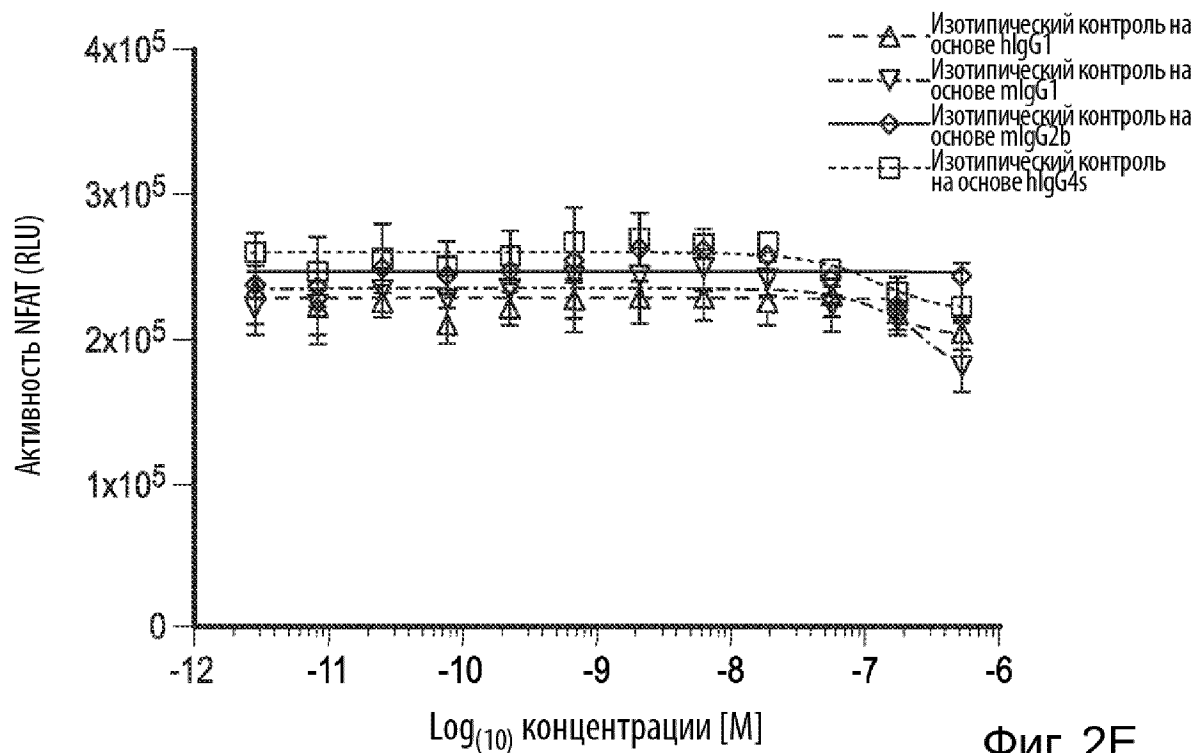


Фиг. 2С

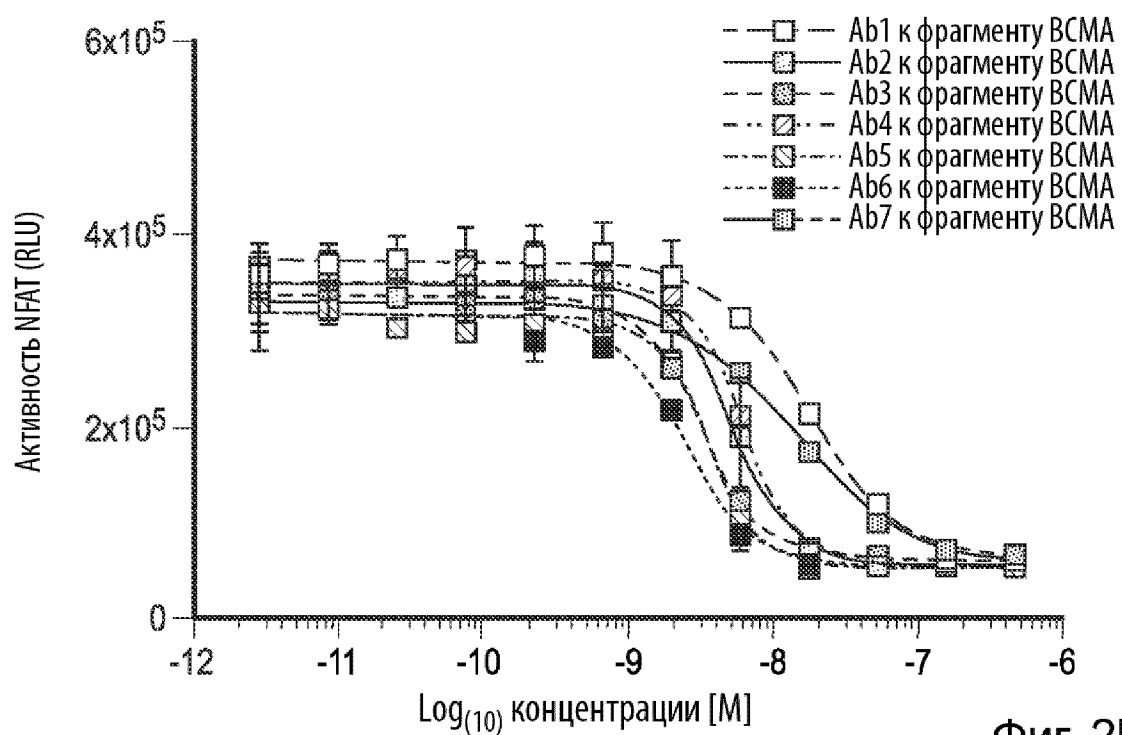


Фиг. 2D

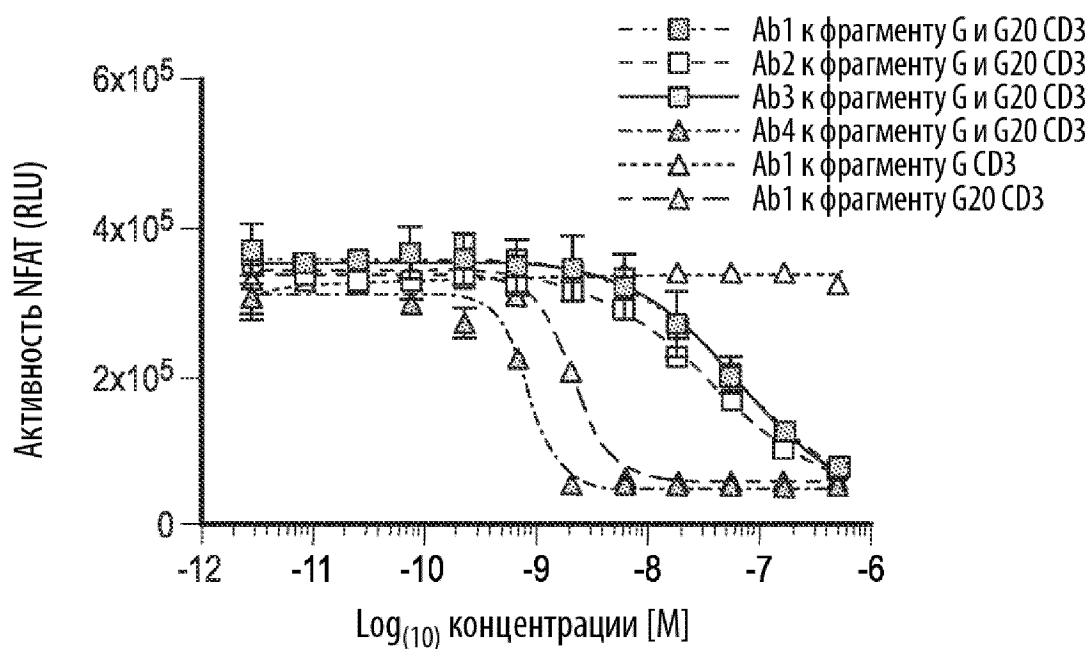
1 нм биспецифического антитела к ВСМА×CD3-1



10 нм биспецифического антитела к ВСМА×CD3-2

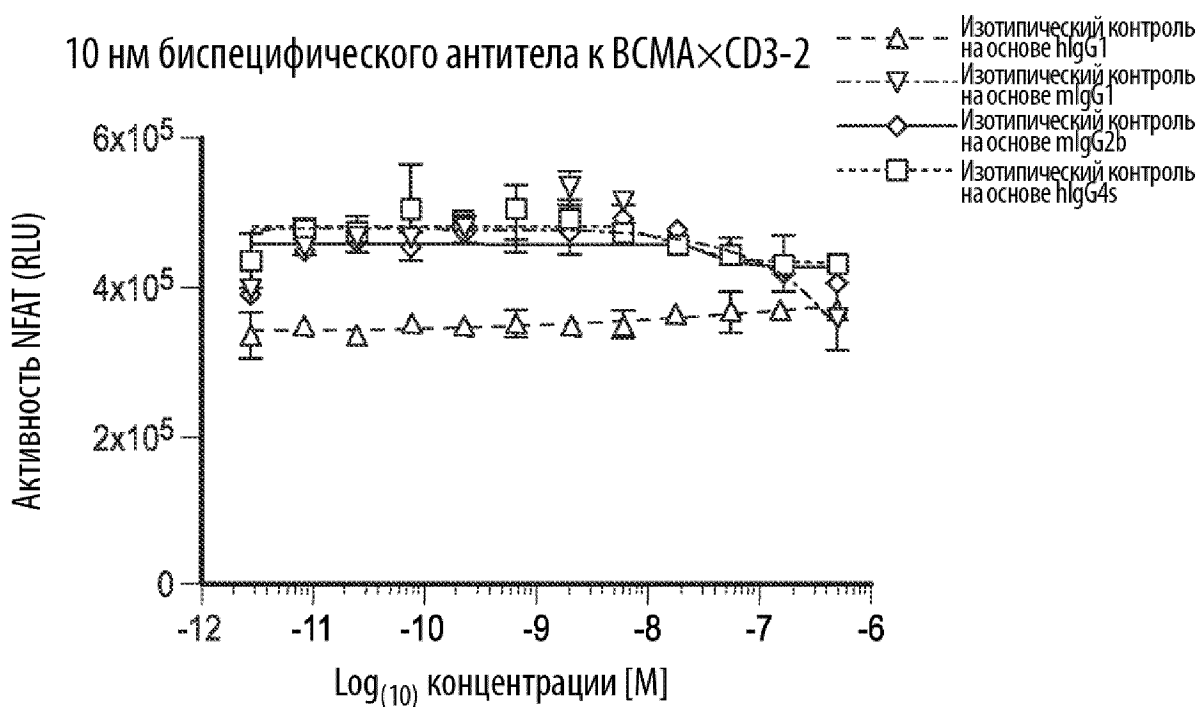


10 нм биспецифического антитела к ВСМА×CD3-2

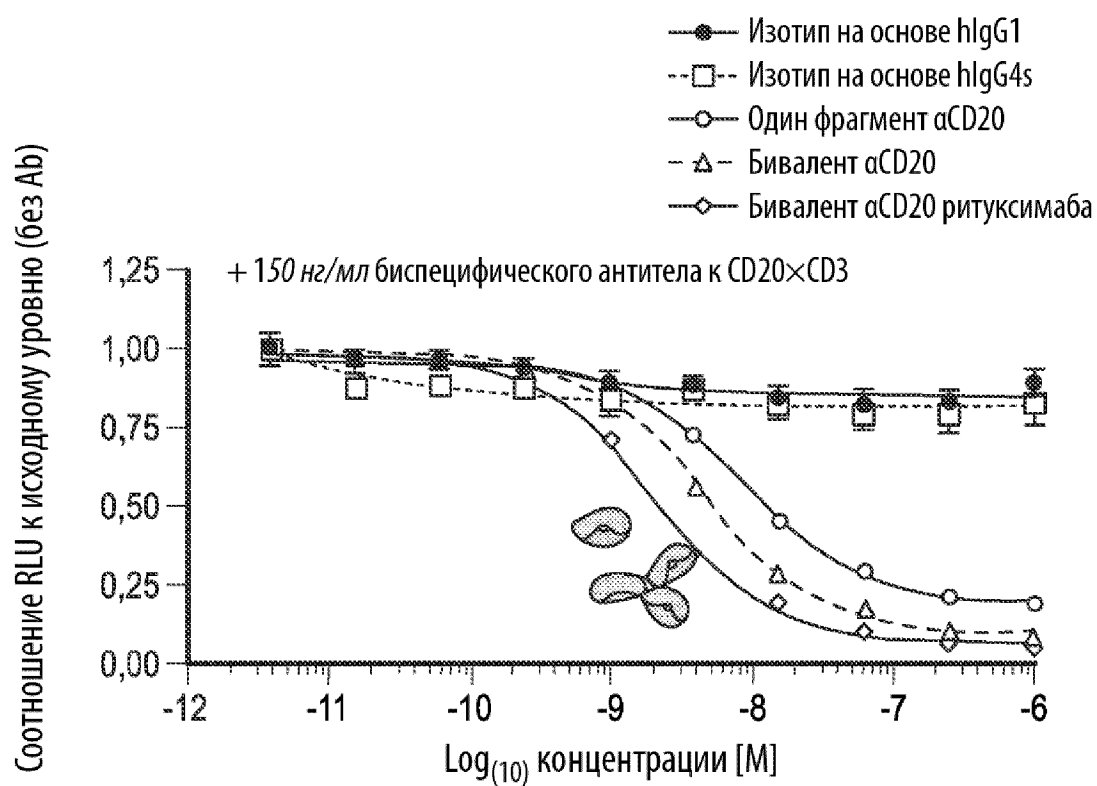


Фиг. 2G

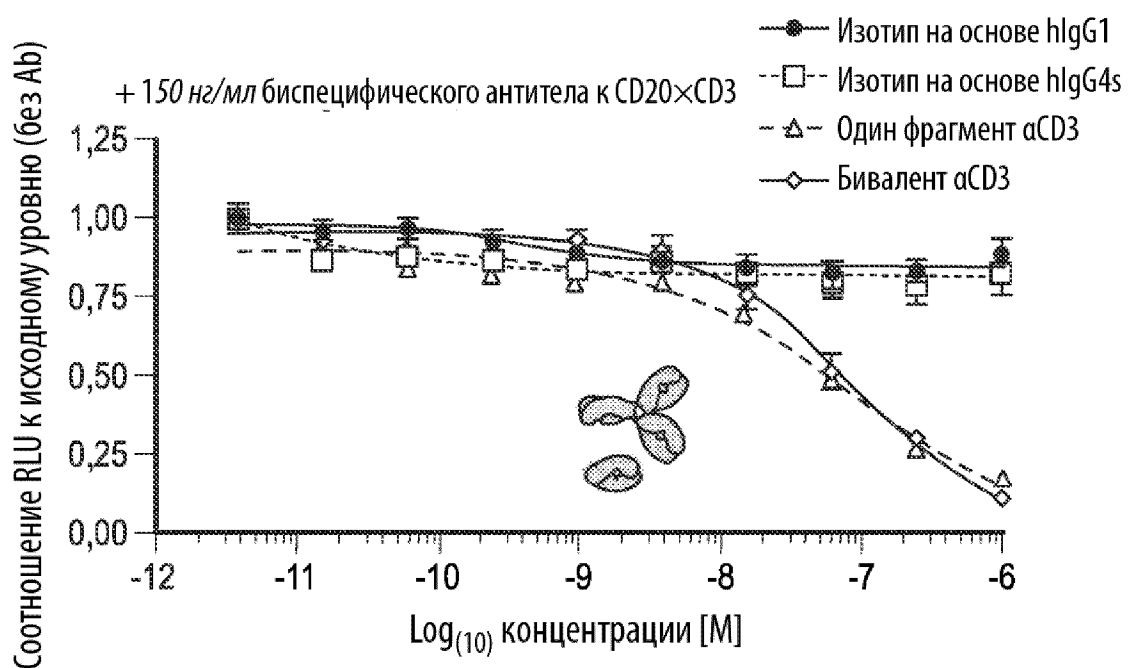
10 нм биспецифического антитела к ВСМА×CD3-2



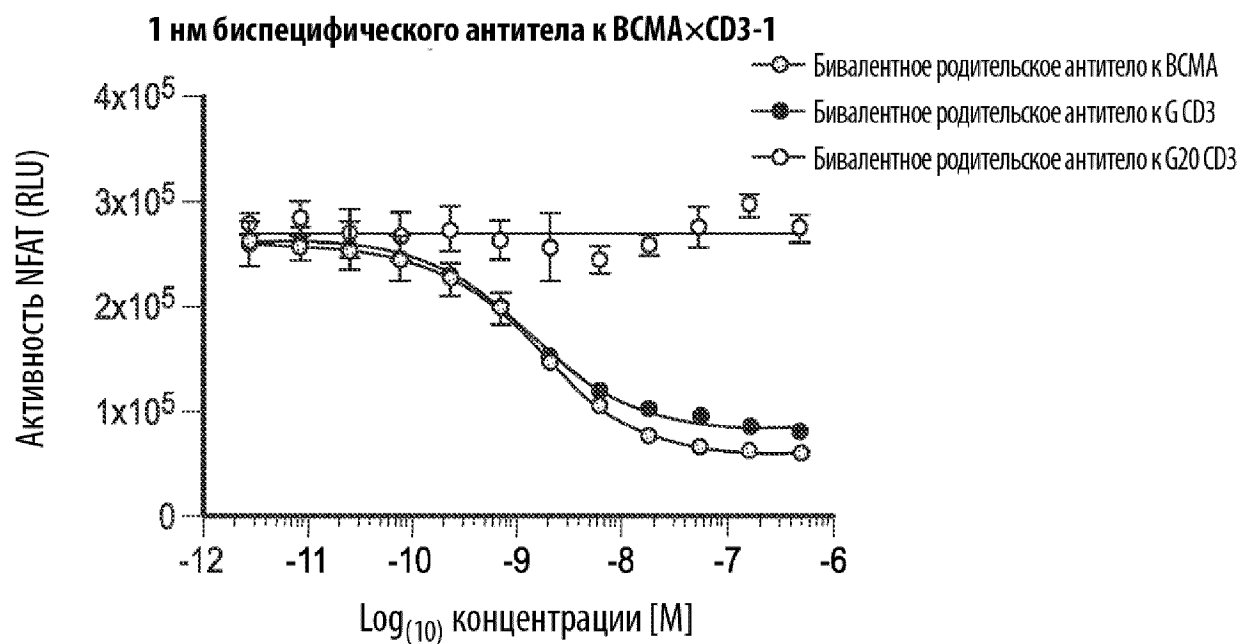
Фиг. 2H



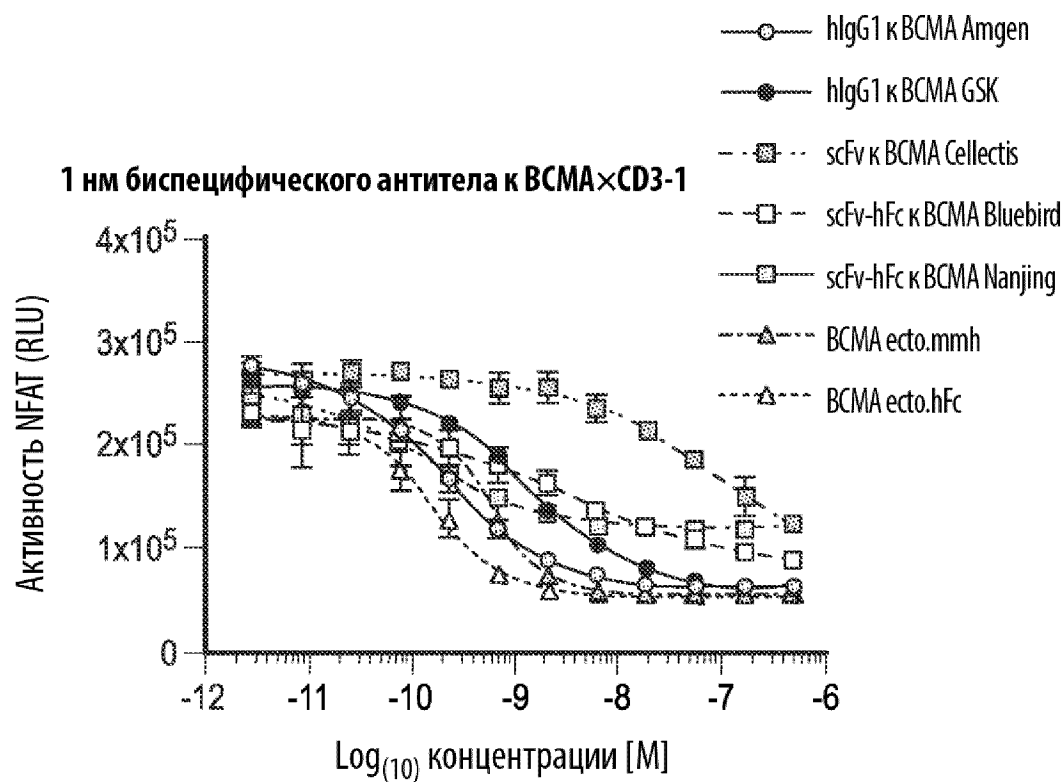
Фиг. 3А



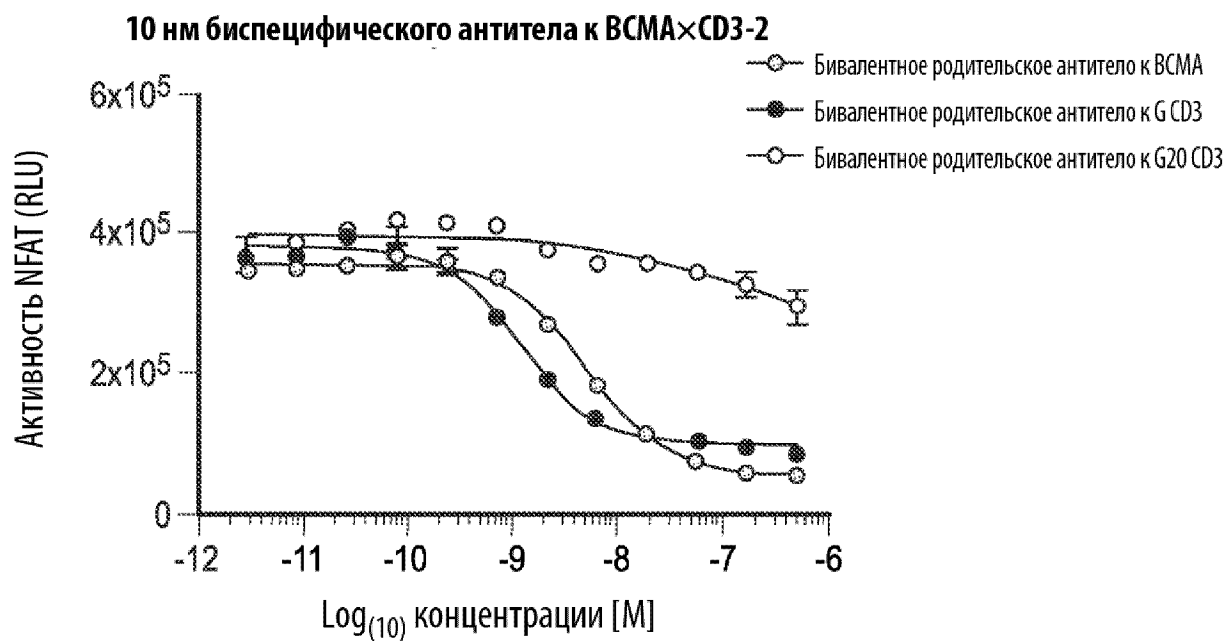
Фиг. 3В



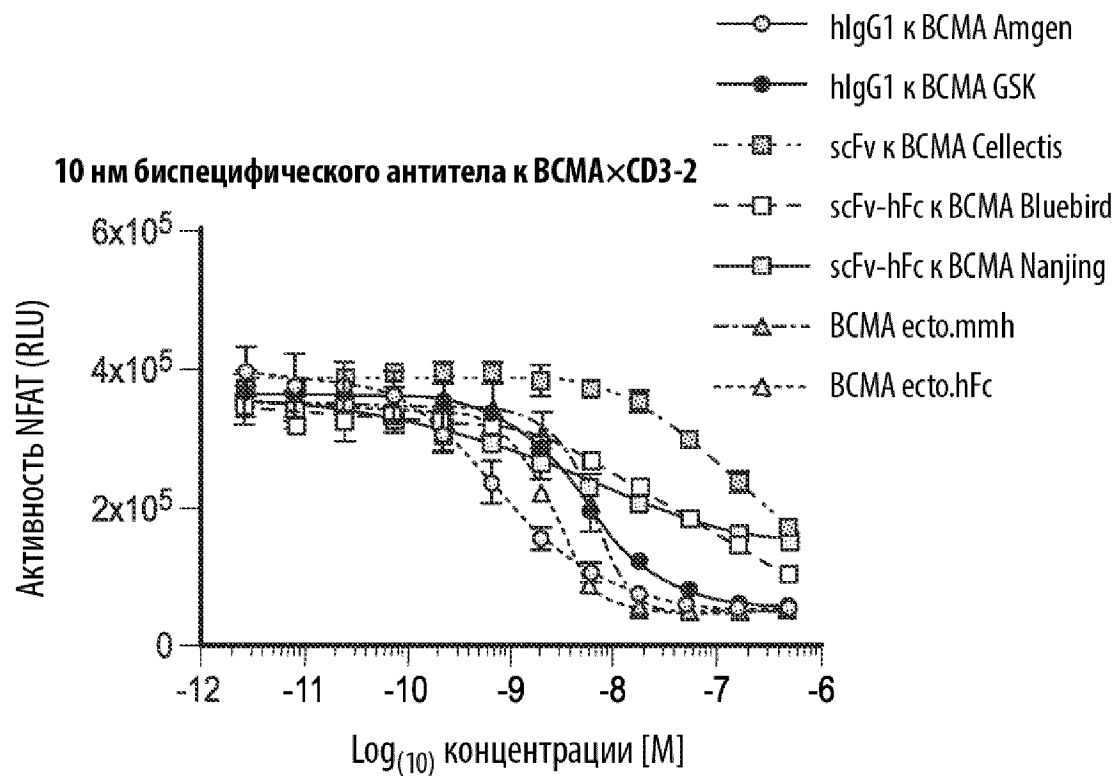
Фиг. 3С



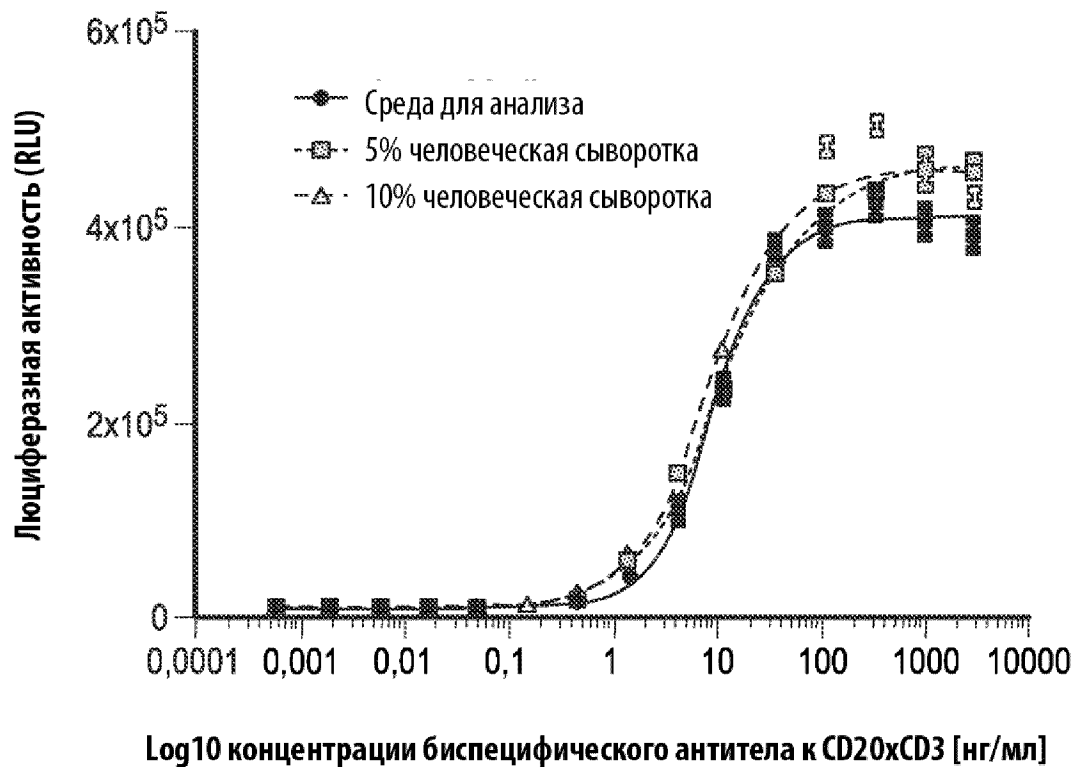
Фиг. 3D



Фиг. 3Е

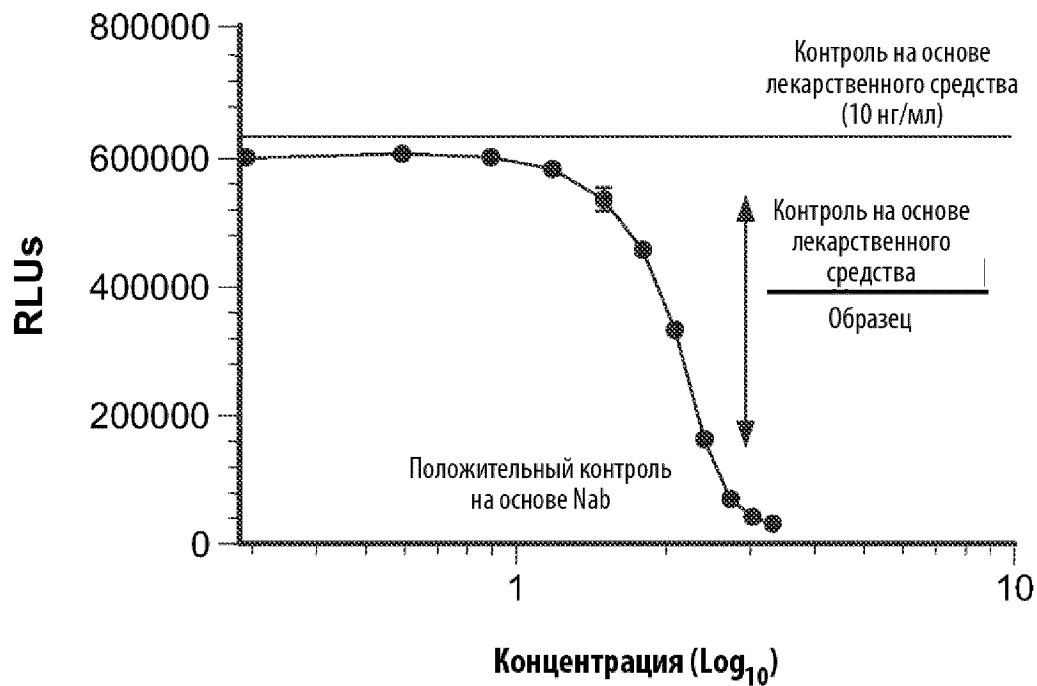


Фиг. 3F

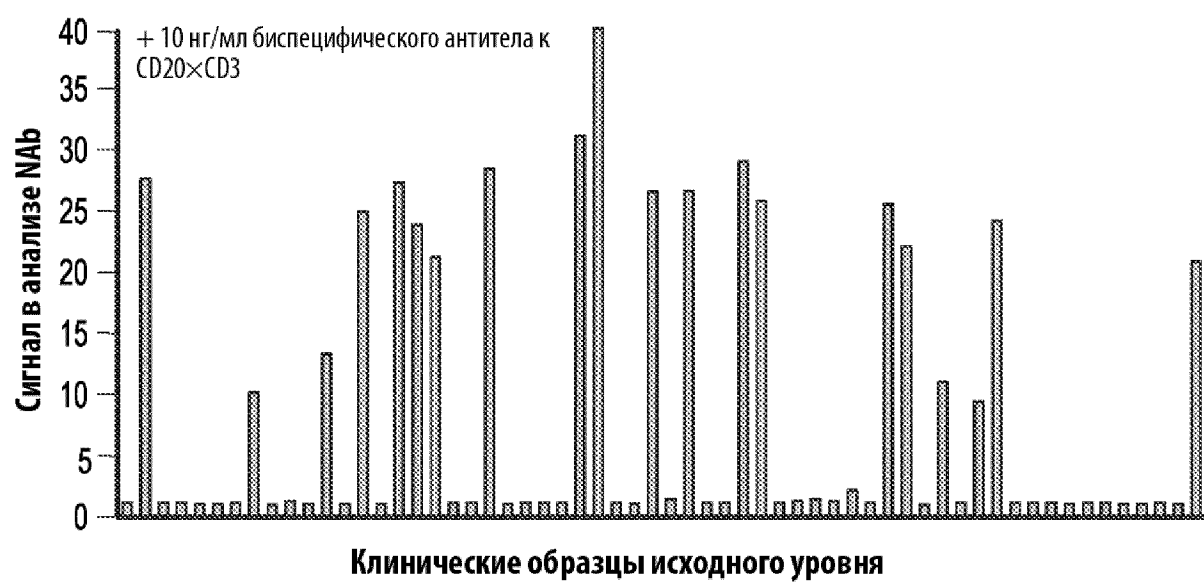


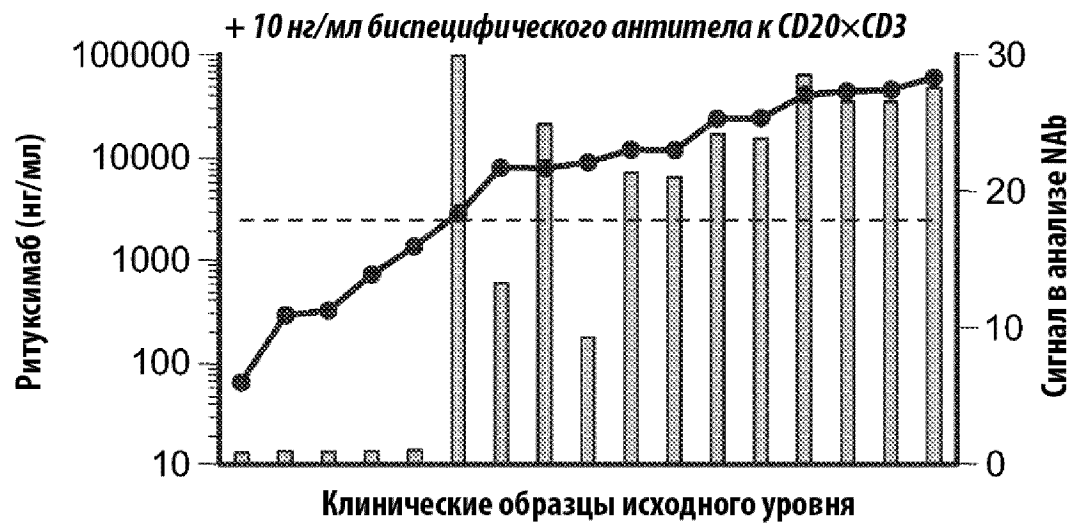
Фиг. 4А

Расчет DC/образец



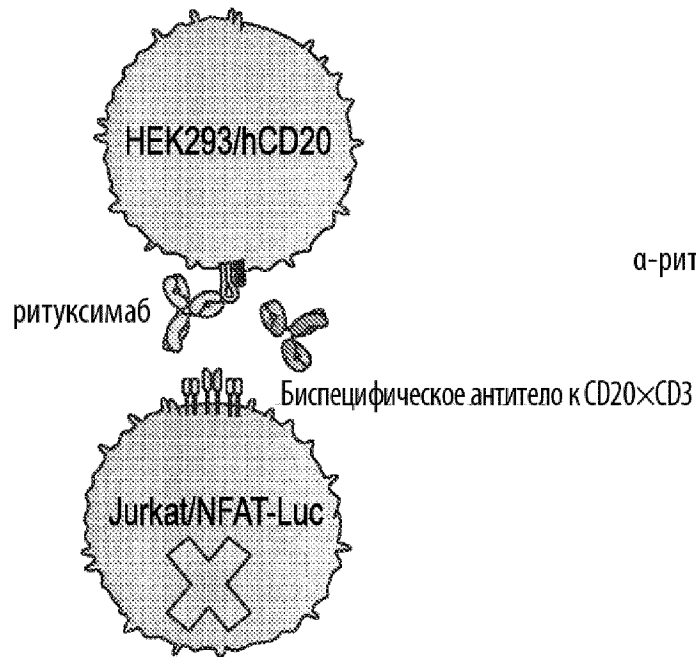
Фиг. 4В





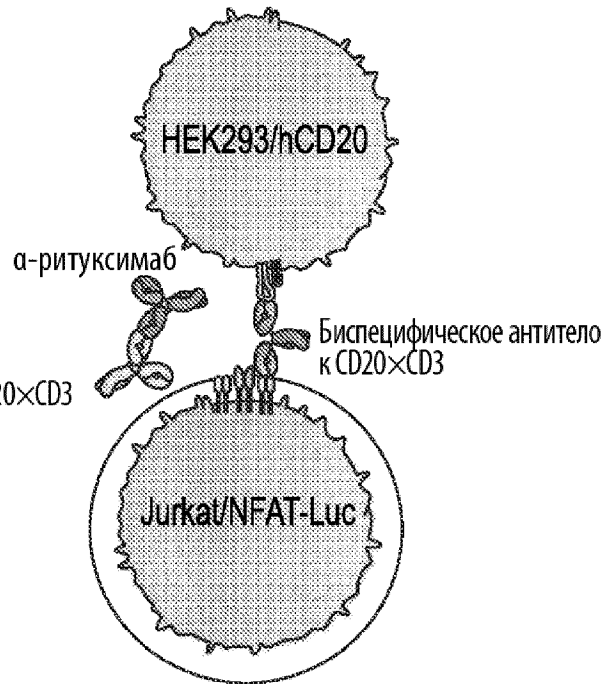
Фиг. 6

Ложно-положительный сигнал NAb

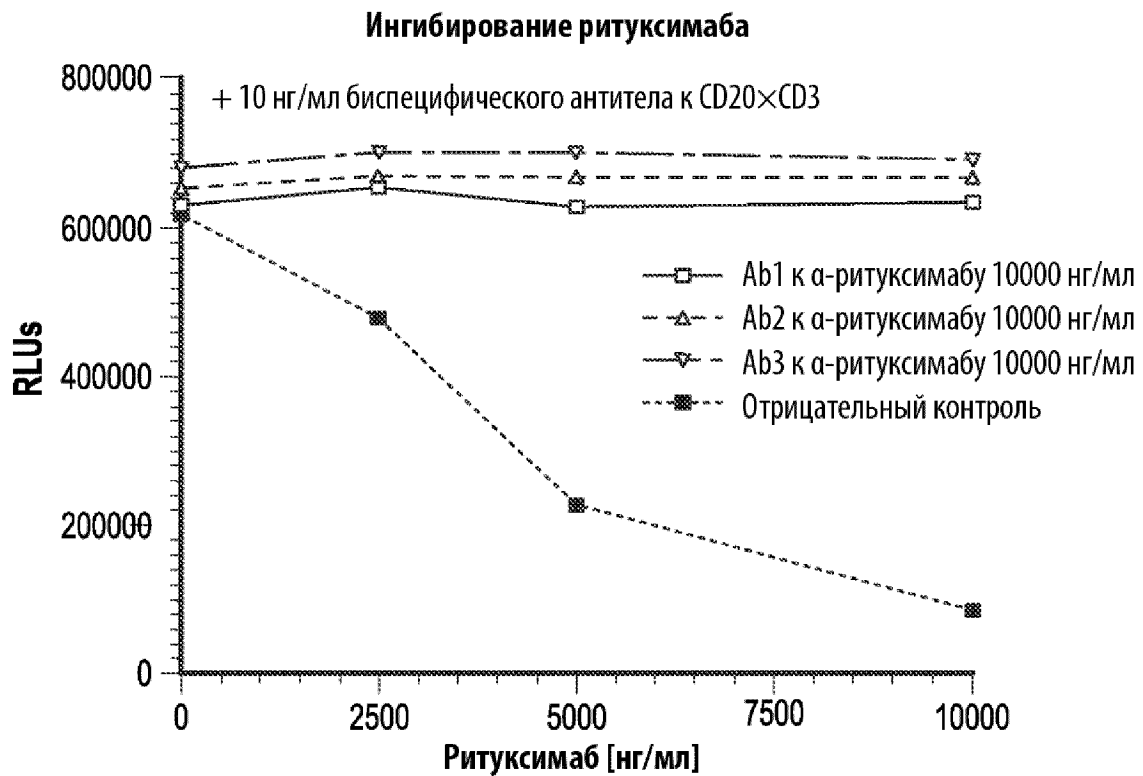


Фиг. 7А

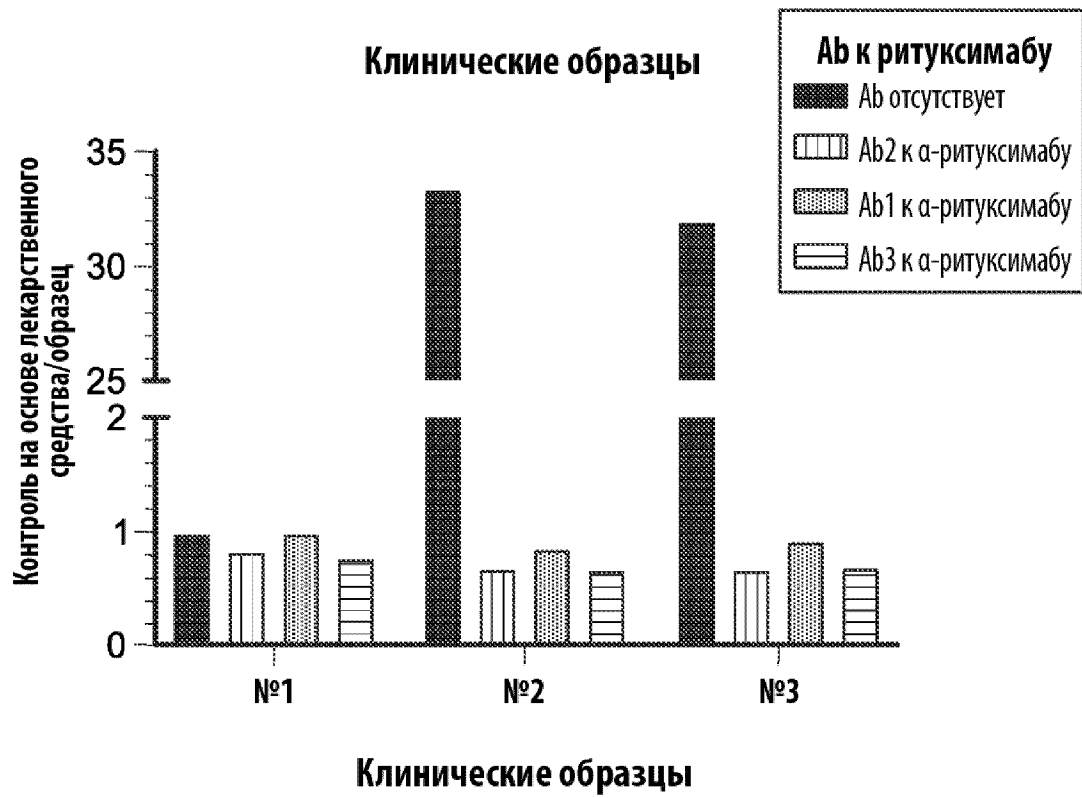
Сигнал NAb отсутствует



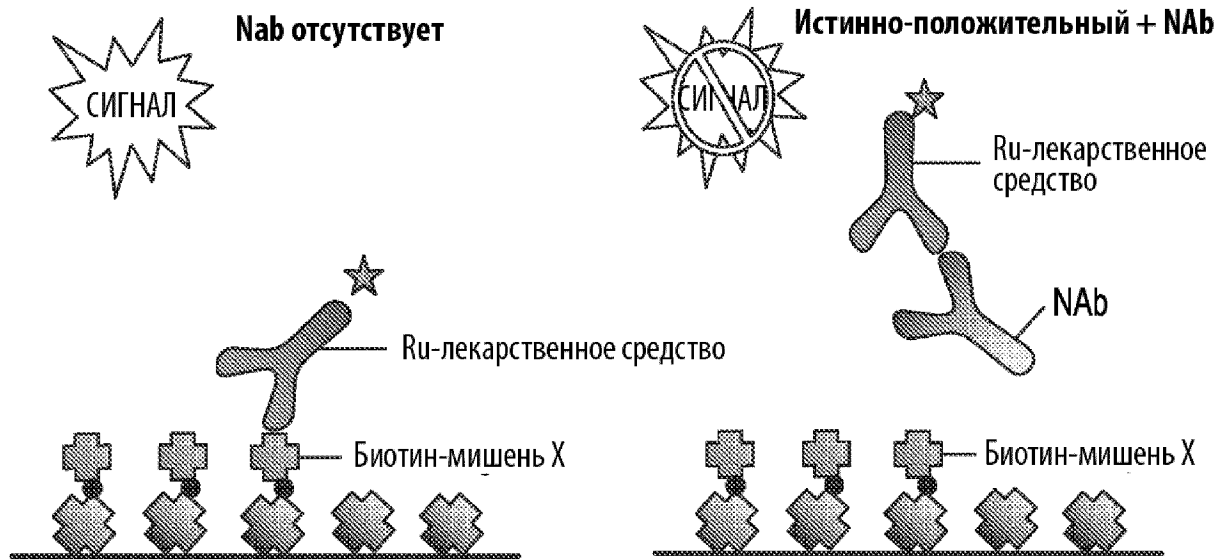
Фиг. 7В



Фиг. 7С

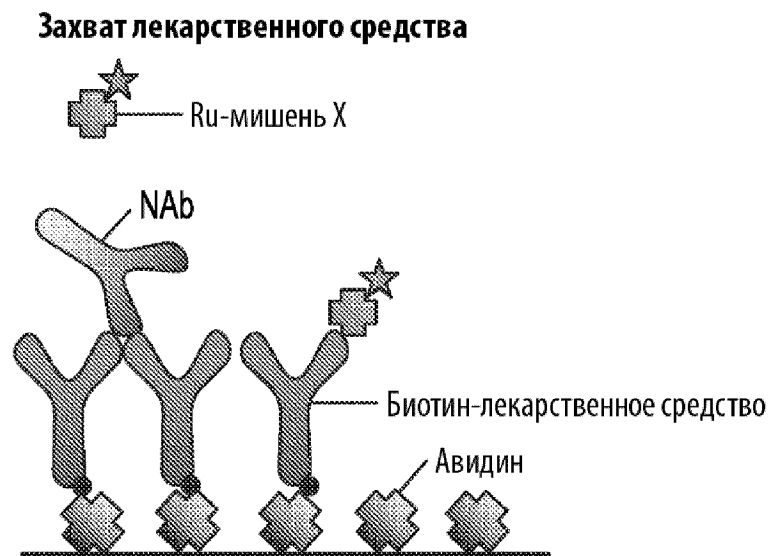


Фиг. 8

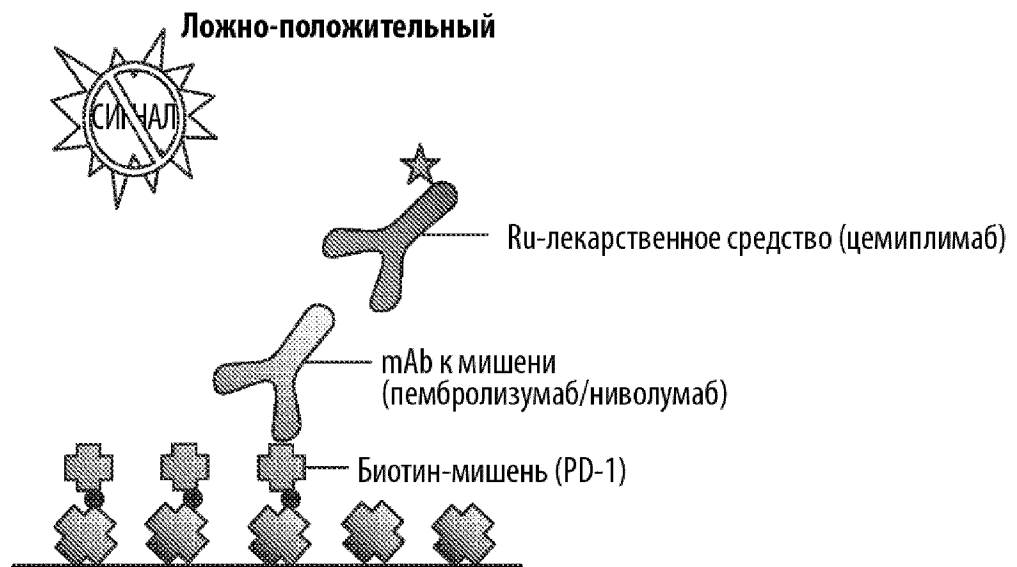


Фиг. 9А

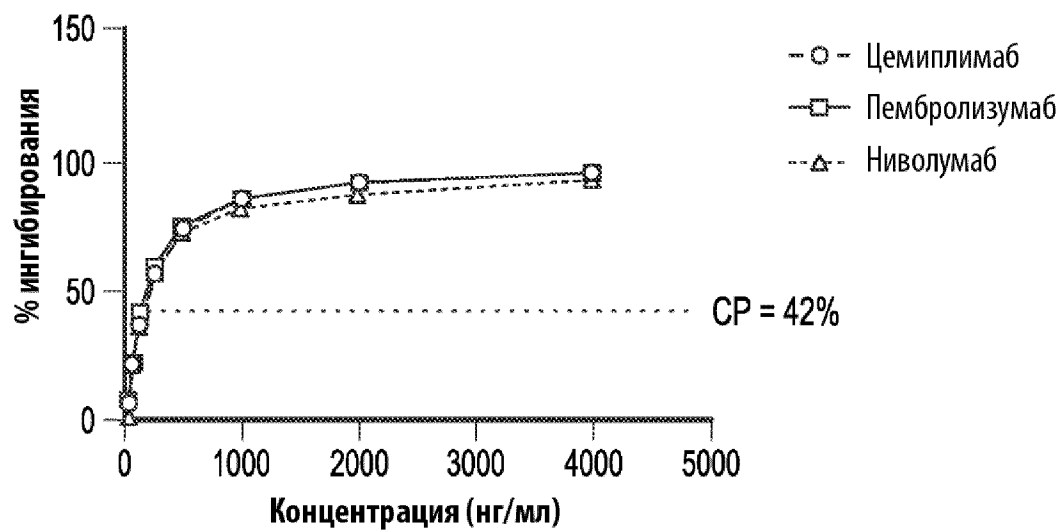
Фиг. 9В



Фиг. 9С

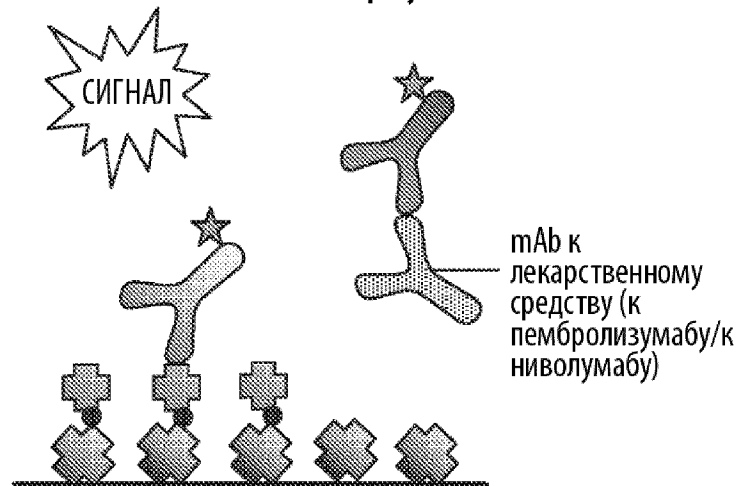


Фиг. 10А

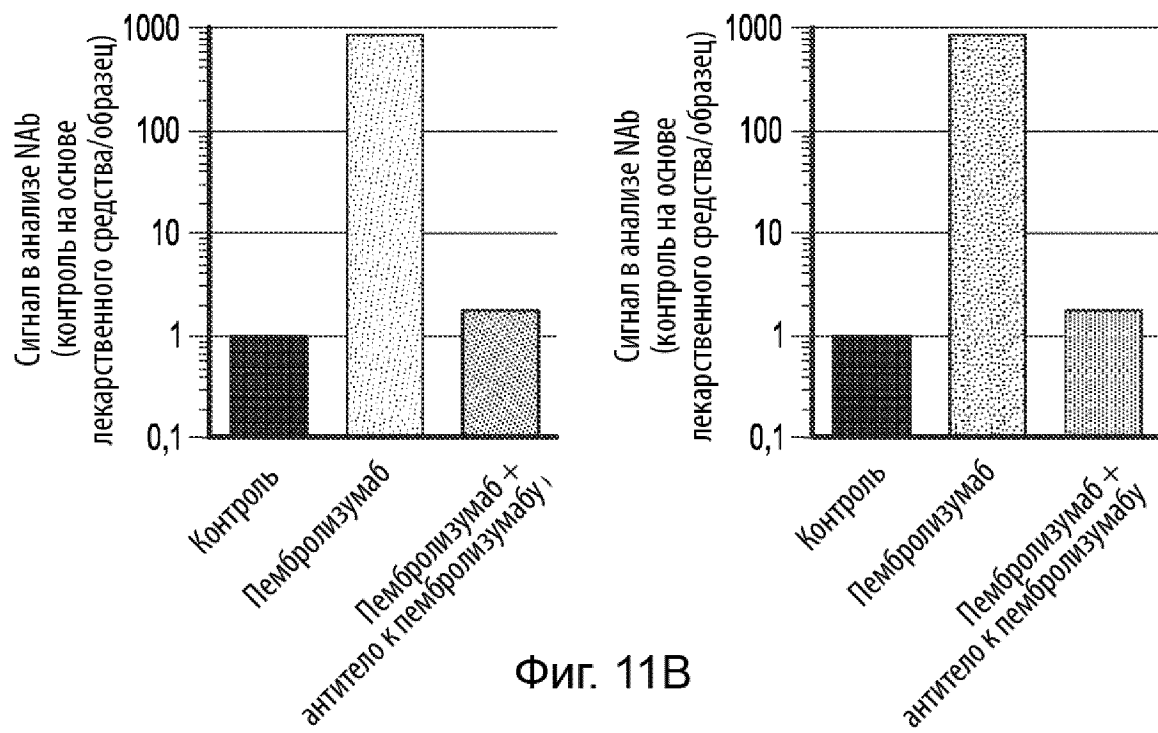


Фиг. 10В

Снижение ложно-положительного результата



Фиг. 11А



Фиг. 11В