



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.02

(21) Номер заявки
202092454

(22) Дата подачи заявки
2019.04.10

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

(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИЛ-33

(31) 62/655,887

(32) 2018.04.11

(33) US

(43) 2021.01.15

(86) PCT/US2019/026699

(87) WO 2019/199910 2019.10.17

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Партридж Майкл, Оливейра Самнер
Джайэн, Зилстра Джошуа (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) EUNSOM KIM ET AL.: "Development of an interleukin (IL)-33 sandwich ELISA kit specific for mature IL-33", JOURNAL OF IMMUNOASSAY AND IMMUNOCHEMISTRY, vol. 37, no. 6, 19 April 2016 (2016-04-19), pages 585-596, XP055600611, US ISSN: 1532-1819, DOI: 10.1080/15321819.2016.1179645, page 592, last paragraph - page 594, paragraph 1

M. E. KETELAAR ET AL.: "The challenge of measuring IL-33 in serum using commercial ELISA: lessons from asthma", CLINICAL & EXPERIMENTAL ALLERGY: JOURNAL OF THE BRITISH SOCIETY FOR ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 46, no. 6, 26 May 2016 (2016-05-26), pages 884-887, XP055600338, UK ISSN: 0954-7894, DOI: 10.1111/cea.12718, the whole document

UFFE NYGAARD ET AL.: "Measuring serum concentrations of interleukin-33 in atopic dermatitis is associated with potential false positive results", SPRINGERPLUS, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 5, no. 1, 13 January 2016 (2016-01-13), pages 1-4, XP021231657, DOI: 10.1186/S40064-016-1673-Z, the whole document

ELODIE RIVIERE ET AL.: "Pitfalls for detecting interleukin-33 by ELISA in the serum of patients with primary Sjogren syndrome: comparison of different kits", ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES, vol. 75,

no. 3, 10 March 2016 (2016-03-10), pages 633-635, XP055600341, GB ISSN: 0003-4967, DOI: 10.1136/annrheumdis-2015-208557 the, whole document

JULIE DOUCET ET AL.: "Development and Validation of an ELISA at Acidic pH for the Quantitative Determination of IL-13 in Human Plasma and Serum", DISEASE MARKERS, vol. 77, no. 8, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 1627-474, XP055272313, GB ISSN: 0278-0240, DOI: 10.1155/2013/290670, the whole document

VERCH THORSTEN ET AL.: "Pharmacokinetic immunoassay methods in the presence of soluble target", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 361, no. 1, 7 August 2010 (2010-08-07), pages 75-81, XP029816809, ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/J.JIM.2010.07.014, abstract

LOFGREN JAMES A. ET AL.: "Comparing ELISA and surface plasmon resonance for assessing clinical immunogenicity of panitumumab", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, INC, US, vol. 178, no. 11, 1 June 2007 (2007-06-01), pages 7467-7472, XP002473717, ISSN: 0022-1767, abstract

WO-A1-2012085228

MARTIN SCHWICKART ET AL.: "Interference in immunoassays to support therapeutic antibody development in preclinical and clinical studies", BIOANALYSIS, vol. 6, no. 14, 1 July 2014 (2014-07-01), pages 1939-1951, XP055163431, ISSN: 1757-6180, DOI: 10.4155/bio.14.127, page 1943, left-hand column, paragraph 2

ZOGHBI JAD ET AL.: "A breakthrough novel method to resolve the drug and target interference problem in immunogenicity assays", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 426 1 November 2015 (2015-11-01), pages 62-69, XP002785311, DOI: 10.1016/J.JIM.2015.08.002, Retrieved from the Internet: URL:https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022175915300302?via%3Dihub[retrieved on 2015-08-06], the whole document

DAI SHENG ET AL.: "Development of a Method That Eliminates False-Positive Results due to Nerve Growth Factor Interference in the Assessment of Fulranumab Immunogenicity", THE AAPS JOURNAL, SPRINGER US, BOSTON, vol. 16, no. 3, 5 March 2014 (2014-03-05), pages 464-477, XP035314386, DOI: 10.1208/S12248-014-9581-Z[retrieved on 2014-03-05], page 468, right-hand column, paragraph 2

(57) В изобретении предложены способы и композиции для обнаружения и количественного определения цитокинов. В описанных анализах по сравнению с коммерчески доступными анализами и/или контрольными анализами уменьшена интерференция. Взаимодействие может быть цитокинзависимым, цитокиннезависимым или и тем, и другим. В одном варианте

осуществления предложен иммуноанализ IL-33, в котором снижена интерференция, вызываемая эндогенными растворимыми связывающими IL-33 молекулами, присутствующими в образце. Примеры растворимых связывающих IL-33 молекул включают, но не ограничиваются ими, антитела против IL-33, растворимый рецептор ST2 и компоненты сыворотки. В некоторых вариантах осуществления к образцу добавляют блокирующий агент для уменьшения, ингибирования или блокирования комплексов IL-33 в образце от преобразования после кислотной диссоциации комплексов IL-33 в образце. В одном варианте осуществления блокирующий агент и реагент для обнаружения не конкурируют за связывание с IL-33.

044802 B1

044802 B1

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/655887, поданной 11 апреля 2018 г. и которая включена посредством ссылки в полном объеме.

Область техники изобретения

Аспекты изобретения, как правило, связаны с иммуноанализами для обнаружения и количественного определения цитокинов, включая, но не ограничиваясь этим, интерлейкин-33 (IL-33).

Уровень техники

Интерлейкин-33 (IL-33) представляет собой цитокин, который активируется в ответ на повреждающие сигналы или повреждающие факторы, такие как сигаретный дым. Он высвобождается барьерными тканями при некрозе и вызывает иммунный ответ на присутствие поврежденной ткани. Этот сигнал "оповещения" усиливает воспалительные ответы как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Опубликованные данные демонстрируют, что коммерческие наборы для обнаружения растворимого IL-33 дают ненадежные результаты, вероятно, из-за интерференции со стороны эндогенных связывающих партнеров, таких как растворимый рецептор ST2 (Nygaard, U., et al., SpringerPlus, 5:33 (2016); Ketelaar, M.E., Clin Exp Allergy, 46(6):884-7 (2016); Rivière, E. et al., Ann Rheum Dis, 75(3):633-5 (2016)).

На эффективность анализов связывания с лигандом в сложных матрицах, таких как сыворотка, могут влиять специфические эндогенные компоненты, которые интерферируют с образцом (Zhong, Z. D., et al., AAPS J, 19: 1564 (2017)). Интерференция в иммуноанализе может привести к неверной интерпретации результатов для пациента лабораторией и неправильному курсу лечения, назначенному врачом (Tate, J., et al., Clin Biochem Rev. 2004, 25(2): 105-120).

Попытки разработать более эффективные иммуноанализы предпринимались и другими учеными. Doucet, J. et al. сообщили об улучшенном анализе IL-13, который включал стадию кислотной диссоциации (Doucet, J. et al., Disease Markers, 35(5):465-474 (2013)). Иммуноанализ, описанный Doucet, специфичен для IL-13 и не обнаруживает IL-33. Кроме того, в иммуноанализе Doucet нет необходимости нейтрализовать образец перед обнаружением и не используется блокирующий агент для предотвращения преобразования цитокинового комплекса во время анализа.

Следовательно, существует необходимость в новых анализах и способах обнаружения IL-33.

Сущность изобретения

Предложены способы и композиции для обнаружения и количественного определения цитокинов. В описанных анализах по сравнению с коммерчески доступными анализами и/или контрольными анализами уменьшена интерференция. Взаимодействие может быть цитокин-зависимым, цитокин-независимым или и тем, и другим. В одном варианте осуществления предложен иммуноанализ IL-33, в котором снижена интерференция, вызываемая эндогенными растворимыми связывающими IL-33 молекулами, присутствующими в образце. Примеры растворимых связывающих IL-33 молекул включают, но не ограничиваются ими, антитела против IL-33, растворимый рецептор ST2 и компоненты сыворотки. В некоторых вариантах осуществления к образцу добавляют блокирующий агент для уменьшения, ингибирования или блокирования комплексов IL-33 в образце от преобразования после кислотной диссоциации комплексов IL-33 в образце. В одном варианте осуществления блокирующий агент и реагент для обнаружения не конкурируют за связывание с IL-33.

В другом варианте осуществления предложены способы определения концентрации общего IL-33 в образцах сыворотки человека с использованием электрохемилюминесцентного иммуноанализа. Анализ включает предварительную кислотную обработку образцов сыворотки для диссоциации комплексов растворимый лиганд: лекарственное средство, присутствующих в образцах, и улучшения обнаружения IL-33 в присутствии лекарственного средства, обеспечивая, таким образом, количественное определение уровня общего IL-33. В данном варианте осуществления в процедуре используется покрытый стрептавидином планшет с биотинилированным антителом против человеческого IL-33 в качестве реагента для захвата и с использованием рекомбинантного IL-33 в качестве стандарта. Стандарты, контроли и образцы разбавляют уксусной кислотой и нейтрализуют с использованием раствора Трис-основания, содержащего реагент для обнаружения, например меченное рутением антитело против человеческого IL-33. Антитело, которое связывается с антителом против IL-33, и антитело против рецептора ST2 также добавляют к Трис раствору, чтобы минимизировать интерференцию со стороны лекарственного средства (т.е. антитела, которое связывает антитела к IL-33) или эндогенного растворимого рецептора ST2. Затем в планшет добавляют нейтрализованные стандарты, контроли и образцы. IL-33, захваченный на планшете, измеряется по хемилюминесцентному сигналу, генерируемому рутениевой меткой, когда на планшет подается напряжение от устройства для планшет-ридеров. Результирующий электрохемилюминесцентный сигнал (т. е. интенсивность) пропорционален количеству IL-33, присутствующего в образцах сыворотки.

В одном варианте осуществления способ имеет чувствительность 12,5 пг/мл и нечувствительность к ST2 >50 нг/мл.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлена иллюстративная схема анализа согласно одному варианту осуществления изобретения. \star^1 - рутениевая метка, ' - биотин, \square - стрептавидин;

На фиг. 2А представлен линейный график зависимости процента извлечения от концентрации растворимого человеческого ST2 (нг/мл). (■) С-AD с кислотной обработкой; (●) С-AD без кислотной обработки; (□) С-А-D с кислотной обработкой; (○) С-А-D без кислотной обработки. На фиг. 2В представлена гистограмма, демонстрирующая обнаружение эндогенного IL-33 в сыворотке от трех индивидуумов (индивидуум 1, индивидуум 2 и индивидуум 3), проанализированных в указанных условиях: С-А-D без кислотной обработки, С-AD без кислотной обработки, С-А-D с кислотной обработкой и С-AD с кислотной обработкой;

На фиг. 3 представлена гистограмма, демонстрирующая специфичность эндогенного IL-33 в сыворотке от индивидуума 1 и индивидуума 3 с использованием модифицированного анализа, добавления рекомбинантного ST2 и добавления моноклонального антитела против IL-33;

На фиг. 4 представлен график концентрации IL-33 (пг/мл) для индивидуума 1 и индивидуума 3 после нескольких измерений, демонстрирующий, что анализ является точным.

На фиг. 5 представлен линейный график, демонстрирующий нечувствительность способа обнаружения IL-33 в присутствии мкАт против IL-33, анализируемого в указанных условиях: С-AD с кислотной обработкой и С-А-D с кислотной обработкой;

На фиг. 6 представлен график для эндогенного IL-33 (пг/мл) в сыворотке здоровых индивидуумов и индивидуумов с астмой, ХОБЛ и атопическим дерматитом. Образцы от 25 индивидуумов из 4 различных популяций были приобретены у коммерческого продавца и были проверены на наличие эндогенного IL-33 с использованием анализа С-AD с обработкой кислотой;

На фиг. 7А и 7В представлены графики, демонстрирующие человеческий IL-33 (пг/мл) от обработанных и контрольных мышей.

Подробное описание сущности изобретения

I. Определения

Следует понимать, что это описание не ограничивается описанными в данном документе композициями и способами, а также описанными экспериментальными условиями, поскольку таковые могут варьироваться. Следует также понимать, что употребляемая в данном документе терминология применяется только для описания определенных вариантов осуществления и не имеет ограничительного характера, поскольку объем данного описания ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все используемые в данном документе технические и научные термины имеют общепринятые значения, понятные специалисту в области техники, к которой принадлежит данное описание. Хотя любые композиции, способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, можно использовать на практике или при тестировании данного изобретения. Все упомянутые публикации полностью включены в данный документ посредством ссылки.

Используемый в данном документе термин "связывающая молекула" предназначен для обозначения молекул, которые специфически взаимодействуют с конкретной мишенью и связываются с ней. Мишень может содержать биологическую или малую (химическую) молекулу. Целевая молекула может определять антиген или антигенный фрагмент. Примеры связывающей молекулы включают, но не ограничиваются ими, антитела (включая моноклональные антитела, биспецифические антитела, а также фрагменты антител), слитые белки и другие антигенсвязывающие молекулы, известные специалистам в данной области техники.

Используемый в данном документе термин "антитело" является примером связывающей молекулы и относится к иммуноглобулину, который, как правило, содержит четыре полипептидных цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена: C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи включает один домен (C_{L1}). Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на гиперпеременные области, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от N-конца до C-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Термин "антигенсвязывающая часть" антитела (или просто "часть антитела" или "фрагмент антитела"), используемый в данном документе, относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, чIL-33). Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином "антигенсвязывающая часть" антитела, включают (i) фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, содержащий домены V_L , V_H , C_{L1} и C_{H1} ; (ii) фрагмент $F(ab')_2$, двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента $F(ab)'$, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент F_c , содержащий домены V_H и C_{H1} ; (iv) фрагмент F_v , содержащий домены V_L и V_H одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb (Ward, E.S., et al., Nature 241:544-546 (1989)), который содержит домен V_H ; и (vi) CDR. Кроме того, хотя два домена фрагмента F_v , V_L и V_H , кодируются отдельными генами, они могут быть соединены с помощью рекомбинантных способов син-

тетическим линкером, который позволяет им образовывать единую непрерывную цепь, в которой пара областей V_L и V_H образуют одновалентные молекулы (известные как одноцепочечный Fv (scFv); см., например, Bird, R.E., et al., Science 242:423-426 (1988); и Huston, J.S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988)). Также предполагается, что такие одноцепочечные антитела также охватываются термином "антигенсвязывающая часть" антитела. Также охватываются другие формы одноцепочечных антител, например диатела (см., например, Holliger, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)).

"CDR" или определяющая комплементарность область представляет собой гипервариабельную область, перемежающуюся внутри областей более консервативными областями, называемыми "каркасными областями" (FR). FR могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем.

Термин "эпитоп" представляет собой антигенную детерминанту, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в вариабельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп образуется пространственно соединенными аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, образуемый смежными аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может содержать фрагменты сахаридов, фосфорильные группы или сульфонильные группы на антигене.

Термин "интерференция в анализе" относится к эндогенным компонентам в анализе, которые блокируют или ингибируют обнаружение аналита, такого как IL-33 или антитело против IL-33. Вещества, которые изменяют измеряемую концентрацию аналита или изменяют связывание антител, потенциально могут привести к интерференции в иммуноанализе. Интерференция в анализе может быть зависимой или независимой от аналита. Независимая от аналитов интерференция относится к общей интерференции гемолиза, липемии и эффектов антикоагулянта и хранения образцов, и не зависит от концентрации аналита. Зависимая от аналита интерференция в иммуноанализах относится к взаимодействию компонентов в образце с одним или более реагентными антителами. Они включают соединения с химическими различиями, но структурным сходством, которые перекрестно реагируют с антителом. Интерферирующие, эндогенные вещества, которые являются естественными, полиреактивными антителами или аутоантителами (гетерофилами), человеческими антителами против животных или антителами против лекарственных средств (ADA) вместе с другими неожиданными связывающими белками, уникальными для человека, могут мешать реакции между аналитом и реагентными антителами в иммуноанализе. Интерференция может быть вызвана растворимыми связывающими мишенями аналита, эндогенными лигандами аналита, включая, но не ограничиваясь этим, растворимые рецепторы аналита, растворимые лиганды аналита, слушленные рецепторы аналита или сывороточные факторы, такие как ревматоидный фактор и биотин. Интерференция может быть вызвана антителами к аналиту.

Термин "ST2" относится к рецептору IL-33, который также называется рецептором интерлейкина-1, подобным белку 1 (IL-1RL1). ST2 может быть мембраносвязанным или растворимым.

Термин "иммуноанализ" относится к анализу обнаружения, который включает связывающий фрагмент, который иммуноспецифически связывается прямо или косвенно с аналитом. Как правило, связывающий фрагмент представляет собой антитело. Антитело может быть помечено обнаруживаемой меткой.

Термин "комплекс IL-33" относится к нековалентной ассоциации IL-33 с компонентом крови, плазмы или сыворотки. Как правило, комплекс IL-33 содержит IL-33, нековалентно связанный с белком, например, белковым лекарственным препаратом, антителом против лекарственного средства, лигандом IL-33 или их комбинацией.

II. Анализы обнаружения и количественного определения IL-33 и способы их применения

Предложены анализы и способы для обнаружения и количественного определения IL-33. Описанные анализы и способы могут использоваться для обнаружения и количественного определения IL-33 в образце. В одном варианте осуществления образец получают от субъекта, которого лечили или который подлежит лечению антагонистом IL-33 или IL-33.

В описанных анализах по сравнению с коммерчески доступными анализами и/или контрольными анализами уменьшена интерференция. Интерференция может быть зависимой от IL-33, независимой от IL-33 или и такой, и другой. В одном варианте осуществления способ снижает или ингибирует интерференцию в анализе, вызванную эндогенными растворимыми молекулами, связывающими IL-33, присутствующими в образце. Примеры растворимых связывающих IL-33 молекул включают, но не ограничиваются ими, антитела против IL-33, растворимый ST2 и компоненты сыворотки. В некоторых вариантах осуществления к образцу добавляют блокирующий агент для уменьшения, ингибирования или блокирования комплексов IL-33 в образце от преобразования после кислотной денатурации комплексов IL-33 в образце. В одном варианте осуществления блокирующий агент и реагент для обнаружения не конкурируют за связывание с IL-33.

В одном варианте осуществления способ имеет чувствительность 12,5 пг/мл и нечувствительность к

ST2 >50 нг/мл.

А. Интерлейкин-33

В одном варианте осуществления IL-33, или "человеческий интерлейкин-33", или "человеческий IL-33" относится к 270-аминокислотному, полноразмерному, непроцессированному IL-33 (см., например, учетный номер UniProtKB 095760 и публикацию патентной заявки США № 20180155436, обе из которых полностью включены в данный документ посредством ссылки), или его биологически активному фрагменту, а также любой форме IL-33, которая образуется в результате процессинга в клетке. Термин также включает встречающиеся в природе варианты IL-33, например, сплайс-варианты (см., например, Hong, et. al., (2011), J. Biol. Chem. 286(22):20078-20086), или аллельные варианты, или любую другую изоформу IL-33, такую как окисленные или восстановленные формы IL-33, описанные в WO 2016/156440. Активность IL-33, которая может быть нейтрализована, ингибирована, блокирована, устранена, ослаблена, снижена или нарушена с помощью антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или ловушки IL-33, включает, но не ограничивается этим, ингибирование опосредованного рецептором IL-33 сигналинга, или ингибирование опосредованного IL-33 воспаления.

В. Способы обнаружения IL-33

В одном варианте осуществления предложен способ обнаружения IL-33 в образце путем подкисления образца до pH, достаточного для диссоциации комплексов IL-33 в образце, и нейтрализации подкисленного образца с помощью забуференного основного раствора. Реагенты для захвата и обнаружения также добавляют в образец для обнаружения IL-33. В некоторых вариантах осуществления к образцу добавляют блокирующий агент для ингибирования, уменьшения или блокирования связывания компонентов в образце с IL-33.

В другом варианте осуществления предложен способ уменьшения интерференции в анализе путем подкисления образца до pH, достаточного для диссоциации IL-33 от комплексов IL-33 в образце, и последующей нейтрализации подкисленного образца с помощью забуференного основного раствора, содержащего реагент для обнаружения. Необязательно, блокирующий агент, который препятствует преобразованию комплексов IL-33 в образце, может быть добавлен к образцу на отдельной стадии или может присутствовать в забуференном основном растворе. Способ включает добавление реагента для захвата к образцу и обнаружение агента для обнаружения, при этом количество обнаруженного реагента для обнаружения коррелирует с количеством IL-33 в образце. Агент для захвата может быть добавлен на отдельной стадии или может присутствовать на стадии подкисления или в забуференном основном растворе. Как правило, комплексы IL-33, присутствующие в образце, содержат IL-33, нековалентно связанный с растворимым ST2.

В другом варианте осуществления предложен способ количественного определения интерлейкина-33 в образце сыворотки путем подкисления образца сыворотки до pH, достаточного для диссоциации комплексов IL-33 в образце, и последующей нейтрализации подкисленного образца забуференным основным раствором, содержащим (а) антитело против человеческого IL-33, меченное обнаруживаемой меткой, и необязательно (б) антитело против человеческого ST2. Способ включает добавление образца к покрытой стрептавидином твердой подложке, содержащей биотинилированное антитело против человеческого IL-33, и обнаружение обнаруживаемой метки на покрытой авидином твердой подложке, причем количество обнаруживаемой метки коррелирует с количеством IL-33 в образце.

В другом варианте осуществления а предложен способ определения концентрации общего IL-33 в образцах сыворотки человека с использованием электрохемилюминесцентного иммуноанализа. Анализ включает предварительную кислотную обработку образцов сыворотки для диссоциации комплексов растворимый лиганд: лекарственное средство, присутствующих в образцах, и улучшения обнаружения IL-33 в присутствии лекарственного средства, обеспечивая, таким образом, количественное определение уровня общего IL-33. Комплексы лиганд: лекарственное средство включают, но не ограничиваются ими, IL-33, нековалентно связанный с антителом против IL-33. Иллюстративное антитело против IL-33 описано в патентах США №№ 10000564 и 9453072, которые полностью включены в данное описание посредством ссылки. В данном варианте осуществления в процедуре используется покрытый стрептавидином планшет с биотинилированным антителом против человеческого IL-33 в качестве реагента для захвата и с использованием рекомбинантного IL-33 в качестве стандарта. Стандарты, контроли и образцы разбавляют уксусной кислотой и нейтрализуют с использованием раствора Трис-основания, содержащего реагент для обнаружения, например, меченное рутением антитело против человеческого IL-33. Антитело, которое связывается с антителом против IL-33, и антитело против рецептора ST2 также добавляют к Трис раствору, чтобы минимизировать интерференцию со стороны лекарственного средства или эндогенного растворимого рецептора ST2. Затем в планшет добавляют нейтрализованные стандарты, контроли и образцы. IL-33, захваченный на планшете, измеряется по хемилюминесцентному сигналу, генерируемому рутениевой меткой, когда на планшет подается напряжение от устройства для планшет-ридеров. Результирующий электрохемилюминесцентный сигнал (т.е. интенсивность) пропорционален количеству IL-33, присутствующего в образцах сыворотки.

В одном варианте осуществления количество метки, обнаруженной в образце, сравнивается с эталонным стандартом, откалиброванным с известными концентрациями IL-33 и соответствующими коли-

чествами обнаруженной метки для этих концентраций. Количество IL-33 в образце можно определить путем сравнения количества обнаруженной метки в образце с эталонным стандартом и сопоставления количества обнаруженной метки с концентрацией, указанной в эталонном стандарте для этого количества обнаруженной метки.

1. Биологические образцы

Образец, используемый в описанных способах, как правило, представляет собой биологический образец, такой как биологическая жидкость, содержащая определяемый аналит, например, IL-33 или его комплекс. Биологические жидкости включают, но не ограничиваются ими, кровь, плазму, сыворотку и слюну. В предпочтительном варианте осуществления биологический образец представляет собой биологический образец человека.

В некоторых вариантах осуществления образец получают от субъекта, имеющего или подозреваемого в наличии воспалительного состояния, заболевания или расстройства. Типичные воспалительные состояния, заболевания и расстройства включают, но не ограничиваются ими, болезнь Крона, колит, язвенный колит, атопический дерматит, астму, аллергический ринит, аллергический конъюнктивит, эозинофильный эзофагит, полипы носовой полости или их комбинацию.

Обнаруживаемый аналит, как правило, представляет собой компонент сыворотки, взятой у субъекта, предпочтительно у человека. Типичные аналиты, которые должны быть обнаружены и/или количественно определены в образце, включают, но не ограничиваются ими, цитокины, белковые лекарственные препараты и их метаболиты или фрагменты.

Типичные цитокины включают интерлейкины. Интерлейкины включают IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34, IL-35, и IL-36. В одном варианте осуществления аналит представляет собой IL-33.

Типичные белковые лекарственные препараты включают, но не ограничиваются ими, рекомбинантные белки, антитела и слитые белки. Антитела могут быть полиреактивными антителами или аутоантителами (гетерофилами), человеческими антителами против клеток животных или антителами против лекарственных препаратов. В одном варианте осуществления белковый лекарственный препарат представляет собой антитело против IL-33.

2. Лиганды IL-33

Лиганды IL-33 представляют собой молекулы, которые нековалентно связываются с IL-33 и включают, но не ограничиваются ими, эндогенные компоненты в образце, такие как антитела или растворимые связывающие мишени аналита, эндогенные лиганды IL-33, включая, но не ограничиваясь ими, растворимые рецепторы IL-33, растворимые лиганды IL-33 и спущенные рецепторы аналита. В одном варианте осуществления лиганд IL-33 представляет собой растворимый рецептор ST2 или аксессуарный белок растворимого корцептора IL-1 (IL-1RAcP).

ST2 (также известный как IL-1RL1, DER4, T1 и FIT-1) является членом суперсемейства Толл-подобных рецепторов/рецепторов IL-1. Члены этого суперсемейства определяются общим внутриклеточным доменом, доменом Толл-подобного рецептора/рецептора IL-1 (TIR). Этот домен, состоящий из ~160 аминокислот, состоит из центрального пятицепочечного β -листа, окруженного пятью α -спиралями, расположенными на цитозольном конце белка. Суперсемейство Толл-подобных рецепторов/рецепторов IL-1 можно разделить на три подсемейства на основе их внеклеточных доменов: подсемейство белков, подобных рецептору IL-1, подсемейство Толл-рецепторов и семейство, состоящее из их адаптерных белков.

3. Кислотная денатурация комплексов IL-33

Образец в описанных способах можно подкислять от 1 до 60 минут. В одном варианте осуществления образец подкисляют в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 или 60 мин.

Кислоты, которые можно использовать на стадии подкисления, включают, но не ограничиваются ими, уксусную кислоту, соляную кислоту и серную кислоту.

pH, достаточный для диссоциации комплексов IL-33, может быть равен от 3,0 до 5,0. В одном варианте осуществления pH равен 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9 или 5,0.

В одном варианте осуществления к образцу может быть добавлен денатурирующий агент для диссоциации комплексов IL-33, включая, но не ограничиваясь ими, мочевины.

4. Блокирующий агент

Блокирующий агент, используемый в описанных способах, представляет собой агент, который уменьшает или предотвращает преобразование комплексов IL-33 в образце после того, как комплексы IL-33 были диссоциированы на стадии подкисления. Когда образец берут у субъекта, например, человека, образец, как правило, содержит комплексы IL-33, подлежащие обнаружению или количественной оценке. Блокирующим агентом может быть антитело, которое иммуноспецифически связывается с компонентом комплекса IL-33, отличным от IL-33. В одном варианте осуществления блокирующий агент

представляет собой антитело против ST2.

В одном варианте блокирующий агент представляет собой антитело, которое связывается с лекарственным препаратом к IL-33, например, антитело, которое связывается с антителом против IL-33.

5. Реагент для обнаружения

Реагент для обнаружения, используемый в описанных способах, может быть антагонистом или ингибитором IL-33, например, антителом против IL-33, предпочтительно антителом против человеческого IL-33 или ловушкой IL-33. Антитело может быть моноклональным, поликлональным или гуманизированным.

В некоторых вариантах осуществления реагент для обнаружения помечен обнаруживаемой меткой. Обнаруживаемые метки известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются ими, частицу редкого переходного металла, флуорофор, хромофор, квантовую точку, наночастицы благородных металлов, радиоактивный фрагмент, фермент, биотиновую/авидиновую метку и хемиллюминесцентную метку. В одном варианте осуществления обнаруживаемая метка представляет собой рутений.

а. Антагонисты анти-IL-33

В некоторых вариантах осуществления антагонисты или ингибиторы IL-33, которые можно использовать в описанных анализах и способах, представляют собой антитела против IL-33 или антигенсвязывающие фрагменты антител, которые специфически связывают человеческий IL-33. В одном варианте осуществления описанные в данном документе антитела против IL-33 для применения в описанных способах и анализах раскрыты в патентах США №№ 10000564 и 9453072, которые полностью включены посредством ссылки.

Антитела против IL-33, используемые в описанных анализах и способах, специфически связываются с IL-33. Термин "специфически связывается" и т.п. означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который относительно стабилен в физиологических условиях. Способы определения того, связывается ли антитело специфически с антигеном, хорошо известны в данной области техники и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т.п. Например, антитело, которое "специфически связывает" IL-33, как используется в данном документе, включает антитела, которые связываются с IL-33 или его биологически активной частью с K_D менее чем около 1000 нМ, менее чем около 500 нМ, менее чем около 300 нМ, менее чем около 200 нМ, менее чем около 100 нМ, менее чем около 90 нМ, менее чем около 80 нМ, менее чем около 70 нМ, менее чем около 60 нМ, менее чем около 50 нМ, менее чем около 40 нМ, менее чем около 30 нМ, менее чем около 20 нМ, менее чем около 10 нМ, менее чем около 5 нМ, менее чем около 4 нМ, менее чем около 3 нМ, менее чем около 2 нМ, менее чем около 1 нМ или менее чем около 0,5 нМ, как измерено методом поверхностного плазмонного резонанса. Однако выделенное антитело, которое специфически связывает человеческий IL-33, может обладать перекрестной реактивностью с другими антигенами, такими как молекулы IL-33 из других (не относящихся к человеку) видов.

В некоторых вариантах осуществления антагонист IL-33 представляет собой антитело против IL-33 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), вариабельную область легкой цепи (LCVR) и/или определяющие комплементарность области (CDR), содержащие любую из аминокислотных последовательностей антител против IL-33, как изложено в патентах США №№ 10000564 и 9453072. В некоторых вариантах осуществления антагонист IL-33 представляет собой антитело против IL-33, имеющее характеристики связывания эталонного антитела, описанные в патентах США №№ 10000564 и 9453072.

Другие антитела против IL-33 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые могут быть использованы в описанных в данном документе способах, раскрыты в EP1725261 и патенте США № 9970944, патенте США № 8187596, WO2011031600, WO2015099175 и патенте США № 9758578, WO2015106080 и патенте США № 10059764 (ANB020), US2016/0168242, WO2016/077381 и патенте США № 10093730, WO2016/077366 и US2018/0171405 или WO2016/156440 и US2018/0207265, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

б. Ловушки IL-33

В некоторых вариантах осуществления антагонисты или ингибиторы IL-33, которые можно использовать в раскрытых способах и анализах, представляют собой ловушки IL-33 на основе рецепторов. Иллюстративные ловушки IL-33 включают по меньшей мере один связывающий IL-33 домен, содержащий связывающую IL-33 часть белка рецептора IL-33, например, ST2. В определенных вариантах осуществления ловушка IL-33 дополнительно включает внеклеточную часть корецептора IL-33, например акцессорный белок рецептора IL-1, или IL-1RAcP. Ловушка IL-33 может также содержать по меньшей мере один мультимеризующий компонент, который соединяет различные компоненты ловушки друг с другом.

В одном варианте осуществления описанные в данном документе ловушки IL-33 для применения в описанных способах и анализах раскрыты в патенте США № 9637535 и WO2014/152195, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки.

Как правило, ловушка IL-33 содержит первый связывающий IL-33 домен (D1), присоединенный к мультимеризующему домену (M). В определенных вариантах осуществления антагонисты IL-33 содержат второй связывающий IL-33 домен (D2), присоединенный к D1 и/или M. Согласно определенным ва-

риантам осуществления D1 содержит связывающую IL-33 часть белка ST2. Связывающая IL-33 часть белка ST2 может содержать или состоять из всего или части внеклеточного домена белка ST2. В определенных вариантах осуществления белок ST2 представляет собой белок ST2 человека. "Человеческий белок ST2" в контексте данного описания относится к белку ST2, представленному в аминокислотах 1-556 под номером доступа NP_057316.3, который полностью включен посредством ссылки. Согласно определенным вариантам осуществления D2 содержит внеклеточную часть белка IL-1RAcP.

Отдельные компоненты ловушек IL-33 могут быть расположены относительно друг друга различными способами, что приводит к образованию функциональных молекул-антагонистов, способных связывать IL-33. Например, D1 и/или D2 могут быть присоединены к N-концу M. В других вариантах осуществления D1 и/или D2 присоединены к C-концу M. В еще других вариантах осуществления D1 присоединен к N-концу D2, и D2 присоединен к N-концу M, что приводит к слиянию в ряд от N- к C-концу молекулы антагониста, представленной формулой D1-D2-M.

В определенных вариантах осуществления антагонисты IL-33 имеют два мультимеризующих домена, M1 и M2, причем M1 и M2 идентичны друг другу. Например, M1 может быть доменом Fc, имеющим конкретную аминокислотную последовательность, а M2 представляет собой домен Fc с той же аминокислотной последовательностью, что и M1.

с. Другие антагонисты IL-33

Другие агенты, которые могут действовать как антагонисты IL-33 и которые можно использовать в описанных способах и анализах, включают иммуноадгезины, пептитела, растворимый ST2 или их производные; антитела против рецептора IL-33 (например, антитела против ST2, например, AMG-282 (Amgen) или STLM15 (Janssen), или любые антитела против ST2, описанные в WO 2012/113813 и патенте США № 9309319, WO 2013/173761 и патенте США № 9982054, WO 2013/165894 и патенте США № 9951137, патенте США № 8444987 или патенте США № 7452980, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки. Другие антагонисты IL-33 для применения в описанных способах и анализах включают белки ST2-Fc, такие как те, что описаны в WO 2013/173761 и патенте США № 9982054 или WO 2013/165894 и патенте США № 9951137, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки.

6. Реагент для захвата

В одном варианте осуществления реагент для захвата, используемый в раскрытых способах и анализах, представляет собой антагонист IL-33, как описано выше, например, антитело, предпочтительно антитело против IL-33, предпочтительно антитело против человеческого IL-33. Иллюстративное антитело против IL-33 описано в патенте США № 10000564, который полностью включен посредством ссылки. Другие антитела против IL-33, которые можно использовать, описаны выше. В одном варианте осуществления реагент для захвата является биотинилированным.

В некоторых вариантах осуществления реагент для захвата закреплен на твердой подложке или связан с ней. Твердая подложка может представлять собой микропланшет, например, покрытый стрептавидином микропланшет.

В некоторых вариантах осуществления реагент для захвата представляет собой антагонисты IL-33, описанные выше.

С. Сопутствующая диагностика

В одном варианте осуществления описанные способы и анализы для обнаружения и количественного определения IL-33 используются в качестве сопутствующего диагностического способа в комбинации с лечением, предназначенным для снижения уровней циркулирующего IL-33 у субъекта, подлежащего лечению, или для повышения уровней циркулирующего IL-33 у субъекта, который подлежит лечению. Лечение может включать введение антагониста IL-33 или введение IL-33. Иллюстративные антагонисты IL-33 представляют собой антагонисты, описанные выше, и включают, но не ограничиваются ими, антитела против IL-33, слитые белки против IL-33, растворимые рецепторы-ловушки ST или их комбинации.

В одном варианте осуществления предложен способ мониторинга лечения связанного с IL-33 заболевания у субъекта, получающего лечение, включая введение антагониста IL-33, как описано выше, или введение IL-33. Типичные заболевания, расстройства или патологии, лечатся ингибитором IL-33 или IL-33, включают, помимо прочего, астму, эозинофильную или неэозинофильную астму, атопический дерматит, хроническое обструктивное заболевание легких (ХОБЛ), воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, колит, язвенный колит, рассеянный склероз, артрит, аллергический ринит, атопический дерматит, эозинофильный эзофагит, псориаз, полипы носовой полости, болезнь Альцгеймера, атеросклероз, инфаркт миокарда, ишемический инсульт, и фиброзные заболевания, включая, но не ограничиваясь ими, болезнь Дюпюитрена, адгезивную болезнь, периартикулярный фиброз, келоидные или гипертрофические рубцы, эндометриоз, спайки брюшной полости, периневральфиброз, болезнь Леддерхоза, болезнь Пейрони, околосухожильные рубцовые сращения и периартикулярный фиброз.

Описанные в данном документе способы и анализы могут быть использованы для оценки, обнаружения или количественной оценки уровней циркулирующего IL-33 у субъекта до и после лечения субъекта одной или более фармацевтическими композициями, содержащими антагонист IL-33, как описано

выше (например, в частности, с фармацевтическим препаратом, связанным с механизмом действия, включающим IL-33), с противовоспалительной терапией или посредством иммуноабсорбционной терапии, или когда IL-33 оценивается после такого лечения, и концентрация или количество IL-33 сравнивается с заранее определенным уровнем или с уровнем, измеренным у субъекта до лечения. Неблагоприятная концентрация или количество IL-33, наблюдаемое после лечения, подтверждает, что субъект не получит пользы от дальнейшего или продолженного лечения, тогда как благоприятная концентрация или количество IL-33, наблюдаемое после лечения, подтверждает, что субъект получит пользу от дальнейшего или продолженного лечения.

В одном варианте осуществления неблагоприятная концентрация IL-33, обнаруженная при помощи описанных способов и анализов в образце от субъекта, получающего лечение, включающее ингибитор IL-33, представляет собой уровень IL-33, такой же или более высокий, чем уровень, измеренный у субъекта до лечения. В одном варианте осуществления благоприятная концентрация IL-33, обнаруженная при помощи описанных способов и анализов в образце от субъекта, получающего лечение, включающее ингибитор IL-33, представляет собой уровень IL-33, который ниже, чем уровень измеренного IL-33 в образце от субъекта до лечения.

В другом варианте осуществления неблагоприятная концентрация IL-33, обнаруженная с использованием описанных способов и анализов в образце от субъекта, получающего лечение, включающее IL-33, представляет собой уровень, который ниже, чем уровень IL-33, измеренный в образце от субъекта до лечения. В другом варианте осуществления благоприятная концентрация IL-33, обнаруженная с использованием описанных способов и анализов в образце от субъекта, получающего лечение, включающее IL-33, представляет собой уровень IL-33, который выше, чем уровень IL-33, измеренный в образце от субъекта до лечения.

Подтверждение циркулирующих уровней IL-33 помогает в проведении клинических исследований и обеспечении улучшенной медицинской помощи пациентам.

III. Наборы

Также предложен набор для анализа тестируемого образца на наличие, количество или концентрацию IL-33 (или его фрагмента) в тестируемом образце. Набор содержит по меньшей мере один компонент для анализа тестируемого образца на IL-33 (или его фрагмент) и инструкции по анализу тестируемого образца на IL-33 (или его фрагмент).

В одном варианте осуществления набор содержит реагент для обнаружения, как описано выше, реагент для захвата, как описано выше, твердую подложку, другие реагенты и письменные инструкции для проведения анализа. Реагент для обнаружения и реагент для захвата могут быть одинаковыми или разными антагонистами IL-33, описанными выше, такими как моноклональное антитело (или его фрагмент, вариант или фрагмент его варианта), слитый белок, ловушка IL-33 или апатамер, необязательно иммобилизованный на твердой фазе.

Реагент для обнаружения, как правило, помечен обнаруживаемой меткой, например, хемилюминесцентной меткой. Реагент для обнаружения может включать обнаруживаемую метку, как описано в данном документе, такую как флуорофор, радиоактивный фрагмент, фермент, биотиновую/авидиновую метку, хромофор, хемилюминесцентную метку или т.п., или набор может содержать реагенты для проведения обнаруживаемого мечения. Антитела, калибраторы и/или контроли могут быть предоставлены в отдельных контейнерах или предварительно распределены в подходящем формате для анализа, например, в микропланшетах для титрования. В одном варианте осуществления реагент для обнаружения IL-33 помечен рутением.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит реагент для захвата, меченный биотином, и покрытую стрептавидином твердую подложку, например, микропланшет для титрования или электрохемилюминесцентную платформу. В некоторых вариантах осуществления реагент для захвата и микропланшет для титрования или платформа для электрохемилюминесценции предоставляются в отдельных контейнерах. В других вариантах осуществления набор содержит платформу для микротитрования или электрохемилюминесценции, покрытую реагентом для захвата. Набор также содержит растворы кислот и буферы, как описано выше, для обработки образцов.

Набор может содержать калибратор или контроль, например, выделенный или очищенный IL-33. Набор может содержать по меньшей мере один контейнер (например, пробирку, микропланшеты для титрования, или полоски, или платформу для электрохемилюминесценции) для проведения анализа и/или буфер, такой как буфер для анализа или промывочный буфер, любой из которых может быть обеспечен как концентрированный раствор, раствор субстрата для обнаруживаемой метки (например, ферментативной метки) или стоп-раствор. Предпочтительно набор содержит все компоненты, т.е. реагенты, стандарты, буферы, разбавители и т.д., которые необходимы для проведения анализа. Инструкции могут быть в бумажной или машиночитаемой форме.

Необязательно, в набор входят компоненты для контроля качества (например, панели чувствительности, калибраторы и положительные контроли). Приготовление реагентов для контроля качества хорошо известно в данной области техники и описано на вкладышах для различных иммунодиагностических продуктов. Элементы панели чувствительности необязательно используются для установления характе-

ристик анализа и, кроме того, необязательно являются полезными индикаторами целостности реагентов набора для иммуноанализа и стандартизации анализов.

Набор также может необязательно содержать другие реагенты, необходимые для проведения диагностического анализа или облегчения оценок контроля качества, такие как буферы, соли, ферменты, кофакторы ферментов, субстраты ферментов, реагенты для обнаружения и тому подобное. Другие компоненты, такие как буферы и растворы для выделения и/или обработки исследуемого образца (например, реагенты для предварительной обработки), также могут быть включены в набор. Набор может дополнительно содержать один или более других контролей. Один или более компонентов набора могут быть лиофилизированы, и в этом случае набор может дополнительно содержать реагенты, подходящие для восстановления лиофилизированных компонентов.

Различные компоненты набора необязательно предоставлены в подходящих контейнерах, если это необходимо, например, в микропланшете для титрования. Набор может дополнительно содержать контейнеры для удержания или хранения образца (например, контейнер или картридж для образца мочи). При необходимости, набор необязательно может также содержать реакционные сосуды, сосуды для смешивания и другие компоненты, которые облегчают приготовление реагентов или тестируемого образца. Набор также может содержать один или более инструментов для помощи в получении исследуемого образца, например, шприц, пипетку, пинцет, мерную ложку и т.п.

Примеры

Пример I. Формат анализа

На фиг. 1 представлена схема иллюстративного анализа для обнаружения IL-33. Данный способ количественного определения IL-33 представляет собой сэндвич-иммуноанализ на платформе для электрохемилюминесценции. В этой процедуре используется микропланшет, покрытый стрептавидином, и биотинилированное антитело против IL-33 в качестве реагента для захвата. Способ включает предварительную кислотную обработку образцов сыворотки для диссоциации комплексов растворимый лиганд: связывающие партнеры, присутствующие в образцах, и улучшения обнаружения IL-33 в присутствии партнеров по связыванию, например, терапевтическое лекарственное средство против IL-33 и/или растворимый ST2, что позволяет количественно измерить уровни общего IL-33. Подкисленные образцы затем нейтрализовали в основном растворе, содержащем меченое антитело для обнаружения IL-33, которое в одном варианте осуществления может конкурировать с растворимым рецептором ST2 и лекарственным средством за связывание с IL-33.

Иллюстративные кислоты, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются ими, уксусную кислоту, серную кислоту и соляную кислоту. Образец можно нейтрализовать с помощью забуференного основного раствора, например, Трис раствора.

Иллюстративное антитело к IL-33, которое можно использовать, описано в патенте США № 10000564, который полностью включен посредством ссылки. Другие антитела против IL-33, которые можно использовать в описанных способах, включают, но не ограничиваются ими, антитела, описанные в патенте США № 9758578 и публикации заявки на патент США 2018/0037644.

В одном варианте осуществления стандарты, контроли и образцы разбавляют уксусной кислотой и нейтрализуют с использованием раствора Трис-основания, содержащего реагент для обнаружения, например, меченое рутением антитело против человеческого IL-33. Антитело против IL-33 и антитело против ST2 также добавляют к Трис раствору, чтобы минимизировать интерференцию со стороны лекарственного средства или эндогенных связывающих партнеров. Затем в планшет добавляют нейтрализованные стандарты, контроли и образцы. IL-33, захваченный на планшете, измеряется по хемилюминесцентному сигналу, генерируемому рутениевой меткой, когда на планшет подается напряжение от устройства для планшет-ридеров. Результирующий электрохемилюминесцентный сигнал (т. е. интенсивность) пропорционален количеству IL-33, присутствующего в образцах сыворотки.

Пример II. Минимизация интерференции эндогенных связывающих партнеров

Материалы и способы

Нечувствительность к рекомбинантному человеческому ST2 определяли с использованием 4 различных условий анализа (описанных ниже), причем первая стадия (захват) для всех условий заключалась в добавлении биотинилированного мкАт против IL-33 в планшет со стрептавидином.

Для анализа, выполняемого постадийно (захват-аналит-обнаружение, C-A-D), образцы (содержащие аналит, IL-33) сначала разводили в кислотном растворе и оставляли для инкубации. После промывки планшета подкисленные образцы затем дополнительно разбавляли основным нейтрализующим буфером перед добавлением в планшет для анализа. После инкубации образца планшет для анализа промывали и добавляли раствор меченых детектирующих мкАт. После инкубации с реагентом для обнаружения планшет промывали, добавляли буфер и проводили считывание планшета. Этот анализ также проводили без стадии подкисления, когда образцы разбавляли в буфере для анализа перед добавлением образца в планшет для анализа.

Для анализа, выполняемого с одновременным добавлением анализируемого вещества и детектора (C-AD), образцы сначала разбавляли кислым раствором и инкубировали. После промывки планшета подкисленные образцы затем дополнительно разбавляли в основном нейтрализующем буфере, содержащем

меченые детектирующие мкАт, перед добавлением в планшет для анализа. После инкубации образца планшет промывали, добавляли буфер и проводили считывание планшета. Этот анализ также выполняли без стадии подкисления, когда образцы сначала разбавляли в буфере для анализа перед последующим разведением в буфере для анализа, содержащем меченые детектирующие мкАт, перед добавлением образца в планшет для анализа.

Рекомбинантный IL-33 в концентрации 36 пг/мл тестировали в 4 различных условиях анализа, как описано выше, в присутствии возрастающих концентраций рекомбинантного растворимого ST2, как показано на фиг. 2А.

Результаты

Кислотная обработка необходима для обнаружения рекомбинантного человеческого IL-33 в присутствии рекомбинантного ST2. Добавление стадии кислотной обработки в анализ С-А-Д повышает нечувствительность к ST2 до ~ 12 нг/мл, а нечувствительность к ST2 может быть повышена до >50 нг/мл с помощью формата анализа С-А-Д с кислотной обработкой (фиг. 2А). Кислотная обработка также необходима для улучшения обнаружения эндогенного IL-33 в сыворотке крови человека. Обнаружение эндогенного IL-33 улучшается при использовании формата анализа С-А-Д по сравнению с форматом анализа С-А-Д из-за уменьшения интерференции в анализе со стороны эндогенных связывающих партнеров (фиг. 2В).

Пример III. Точность и специфичность: эндогенный IL-33

Материалы и способы

Специфичность анализа к IL-33 была подтверждена путем анализа 2 различных отдельных образцов сыворотки в анализе С-А-Д с кислотной обработкой, как описано в примере II, протестированных с добавлением и без добавления избытка рекомбинантного человеческого ST2 или 200 мкг/мл антитела к IL-33 в основном нейтрализующем растворе, содержащем реагент для обнаружения.

Два индивидуума проходили тестирование с использованием анализа С-А-Д с кислотной обработкой, как описано в примере II. Данные представляют собой 4 отдельных повторных определения, выполненных в течение 5 отдельных дней.

Результаты

Анализ специфичен для эндогенного IL-33, так как добавление связывающих партнеров, например, рекомбинантного ST2 или мкАт против IL-33 в нейтрализующий раствор ингибирует обнаружение IL-33. На фиг. 3 представлена гистограмма, демонстрирующая специфичность эндогенного IL-33.

Анализ демонстрирует приемлемую точность с процентным коэффициентом вариации (% CV) 7,1 и 12,3 индивидуумов 1 и 3, соответственно. На фиг. 4 представлен график, демонстрирующий точность количественного определения эндогенного IL-33 в сыворотке крови человека.

Пример IV. Обнаружение IL-33 в присутствии мкАт против IL-33 (нечувствительность к мкАт против IL-33)

Материалы и способы

На фиг. 5 представлен линейный график, демонстрирующий нечувствительность способа обнаружения IL-33 в присутствии мкАт против IL-33. Рекомбинантный IL-33 в концентрации 90 пг/мл тестировали в способе С-А-Д с кислотной обработкой, описанной в Примере II, в присутствии возрастающих концентраций мкАт против IL-33, как показано на фиг. 5. Анализ был модифицирован добавлением избытка мкАт против лекарственного средства и мкАт против ST2 в нейтрализующий раствор.

Результаты

Кислотная обработка важна для обнаружения человеческого IL-33 в присутствии мкАт против IL-33. Добавление реагента для обнаружения в нейтрализующий раствор наряду с добавлением мкАт против лекарственного средства и мкАт против ST2 повышает нечувствительность к мкАт против IL-33 в анализе до >500 мкг/мл.

Пример V. Уровни эндогенного IL-33 у нормальных и больных индивидуумов

Материалы и способы

Образцы от 25 индивидуумов из 4 различных популяций были приобретены у коммерческого производителя и были проверены на наличие эндогенного IL-33 с использованием анализа С-А-Д с обработкой кислотой, как описано в примере II.

Результаты

На фиг. 6 представлен график для эндогенного IL-33 (пг/мл) в сыворотке здоровых индивидуумов и индивидуумов с астмой, ХОБЛ и атопическим дерматитом. У всех испытуемых концентрация IL-33 была ниже 31 пг/мл.

Пример VI. Данные по гуманизированным мышам

Материалы и способы

Гуманизированных по IL-33 мышей подвергали воздействию клещом домашней пыли (КДП) в течение 15 недель в качестве модели респираторного заболевания человека. Иллюстративная гуманизованная по IL-33 мышь описана в публикации патента США № 20170311580, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. Образцы тестировали в модифицированной версии анализа

C-AD с кислотной обработкой, как описано в примере IV.

Результаты

На фиг. 7А и 7В показан человеческий IL-33 (пг/мл) от обработанных и контрольных мышей. Обработанные физиологическим раствором, КДП и изотипическими контролями показали аналогичные уровни человеческого IL-33 в конце обработки. У мышей, которым вводили моноклональное антитело против IL-33, наблюдалось заметное повышение уровней IL-33 в сыворотке.

Был разработан общий анализ человеческого IL-33, чувствительность которого в чистой сыворотке составляет 12,5 пг/мл. В совокупности данные демонстрируют, что стадия кислотной обработки важна для удаления эндогенных связывающих IL-33 партнеров. Добавление детектирующего антитела к нейтрализующему раствору улучшает нечувствительность к рекомбинантному/эндогенному ST2. Анализ продемонстрировал специфичность к эндогенному человеческому IL-33. У мышей, получавших КДП, которым вводили дозу антитела против IL-33, наблюдалось повышение уровня человеческого IL-33 из-за связанной мишени, исходя из периода полужизни лекарственного средства, в то время как у изотопических и КДП контролей сохранялся исходный уровень.

Хотя в вышеприведенном описании это изобретение было описано применительно к некоторым его вариантам осуществления и многие детали были выдвинуты с целью иллюстрации, специалистам в данной области техники будет очевидно, что изобретение допускает дополнительные варианты осуществления и что некоторые из подробностей, описанных в данном документе, могут значительно варьироваться без отклонения от основных принципов изобретения.

Все ссылки, цитируемые в данном документе, включены посредством ссылки во всей их полноте. Данное изобретение может быть осуществлено в других конкретных формах без отклонения от сущности или его существенных атрибутов, и, соответственно, следует сделать ссылку на прилагаемую формулу изобретения, а не на предшествующее описание, как указание объема изобретения

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ уменьшения интерференции в анализе IL-33, включающий следующие стадии: подкисление образца до pH, достаточного для диссоциации IL-33 из комплексов IL-33 в образце; последующая нейтрализация подкисленного образца забуференным основным раствором, содержащим реагент для обнаружения и блокирующий агент, который ингибирует образование комплекса IL-33; добавление в образец реагента для захвата и обнаружение реагента для обнаружения, где количество обнаруженного реагента для обнаружения коррелирует с количеством IL-33 в образце.
2. Способ по п.1, где образец содержит кровь, сыворотку или плазму.
3. Способ по п.2, где образец взят у субъекта, которому вводили лекарственный препарат к IL-33.
4. Способ по п.3, где лекарственный препарат к IL-33 содержит антитело против IL-33.
5. Способ по любому из пп.1-4, где комплекс IL-33 содержит IL-33, нековалентно связанный с белком.
6. Способ по п.5, где белок представляет собой эндогенный сывороточный белок.
7. Способ по п.5, где белок представляет собой ST2 или его фрагмент, связывающий IL-33.
8. Способ по п.5, где белок представляет собой антитело против IL-33 или его фрагмент, связывающий IL-33.
9. Способ по любому из пп.1-8, где образец подкисляют до pH от 3 до 5.
10. Способ по любому из пп.1-9, где образец подкисляют в течение 5-60 мин.
11. Способ по любому из пп.1-10, где реагент для обнаружения содержит антитело против IL-33, конъюгированное с обнаруживаемой меткой.
12. Способ по любому из пп.1-11, где реагент для обнаружения содержит обнаруживаемый агент, выбранный из группы, состоящей из частицы редкого переходного металла, флуорофора, хромофора, квантовой точки и наночастиц благородных металлов.
13. Способ по любому из пп.1-12, где реагент для обнаружения метят рутением.
14. Способ по любому из пп.1-13, где реагент для захвата конъюгируют с твердой подложкой.
15. Способ по любому из пп.1-14, где реагент для захвата является биотинилированным.
16. Способ по любому из пп.1-15, где образец подкисляют уксусной кислотой.
17. Способ по любому из пп.1-16, где забуференный основной раствор содержит блокирующий агент и блокирующий агент представляет собой антитело.
18. Способ по любому из пп.1-17, где забуференный основной раствор содержит блокирующий агент и блокирующий агент представляет собой антитело против ST2.
19. Способ по любому из пп.1-18, где реагент для захвата добавляют к образцу на стадии подкисления.
20. Способ по любому из пп.1-19, где блокирующий агент добавляют к образцу после стадии нейтрализации.
21. Способ по любому из пп.1-20, где реагент для захвата и блокирующий агент добавляют к образ-

цу после стадии нейтрализации.

22. Способ по любому из пп.1-21, где способ имеет чувствительность 12,5 пг/мл.

23. Способ по любому из пп.1-22, где способ имеет нечувствительность к ST2 >50 нг/мл.

24. Способ по любому из пп.1-23, где образец получают от субъекта, у которого диагностировано или подозревается воспалительное заболевание или расстройство.

25. Способ по любому из пп.1-24, где образец получают от субъекта, у которого диагностирована или подозревается астма, хроническое обструктивное заболевание легких или атопический дерматит.

26. Способ по п.14, где твердая подложка представляет собой платформу для электрохемилюминесценции.

27. Способ по любому из пп.1-26, где количество IL-33 определяют путем корреляции количества обнаруженного реагента для обнаружения с заранее определенным эталонным стандартом.

28. Способ количественного определения интерлейкина-33 в образце сыворотки, включающий следующие стадии:

подкисление образца сыворотки до pH, достаточного для диссоциации комплексов IL-33 в образце;

нейтрализация подкисленного образца забуференным основным раствором, содержащим: (а) антитело против человеческого IL-33, меченное обнаруживаемой меткой, и (b) антитело против человеческого ST2;

добавление образца к покрытой авидином твердой подложке, содержащей биотинилированное антитело против человеческого IL-33; и

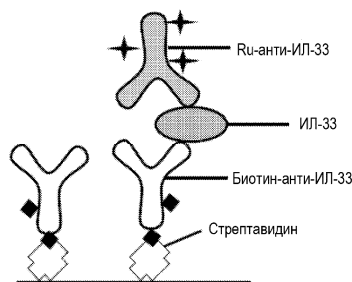
обнаружение обнаруживаемой метки на покрытой авидином твердой подложке, где количество обнаруживаемой метки коррелирует с количеством IL-33 в образце.

29. Способ по п.28, где твердая подложка представляет собой покрытую стрептавидином платформу для электрохемилюминесценции.

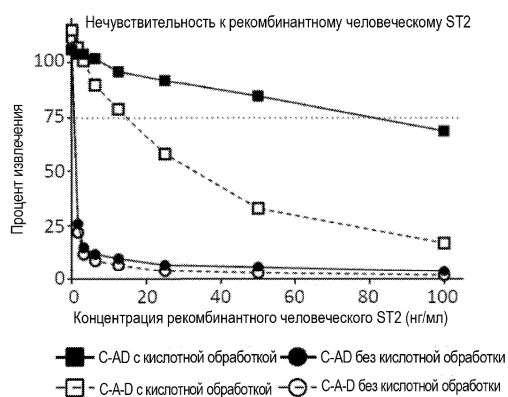
30. Способ по любому из пп.28 или 29, где обнаруживаемая метка представляет собой рутений.

31. Способ по любому из пп.28-30, где антитело против человеческого ST2 присутствует в количестве, достаточном для снижения связывания ST2 с IL-33 в образце.

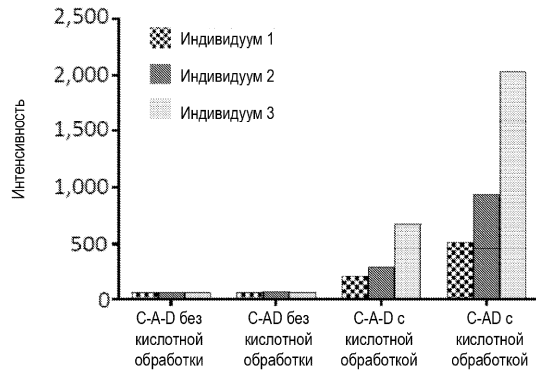
32. Способ по любому из пп.28-30, где способ имеет чувствительность 12,5 пг/мл и нечувствительность к ST2 >50 нг/мл.



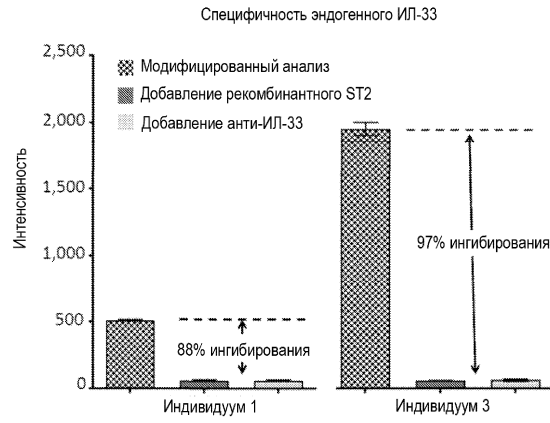
Фиг. 1



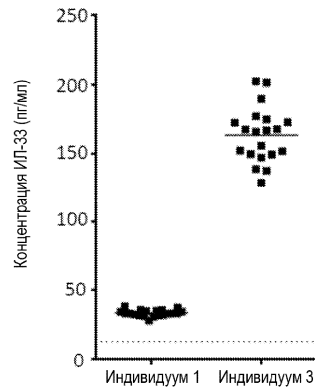
Фиг. 2А



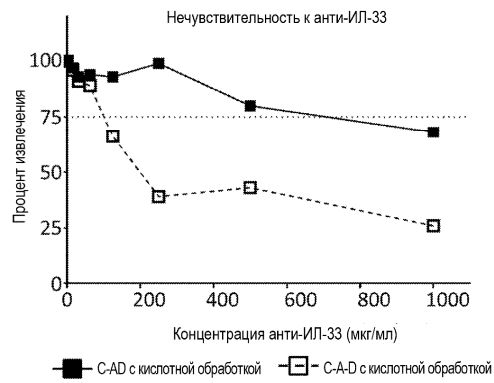
Фиг. 2В



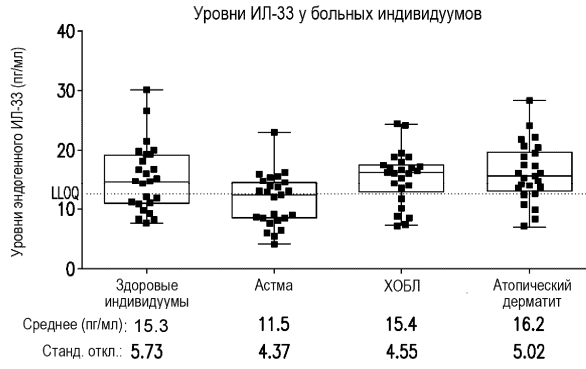
Фиг. 3



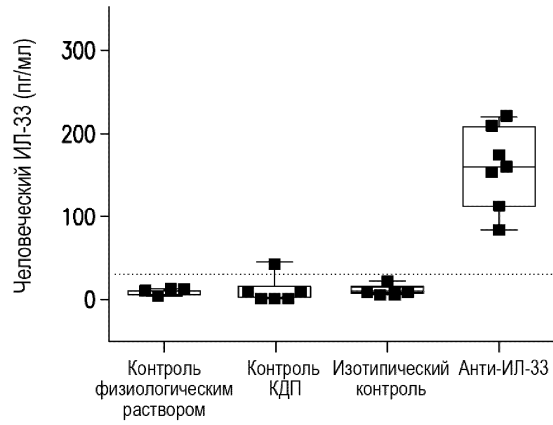
Фиг. 4



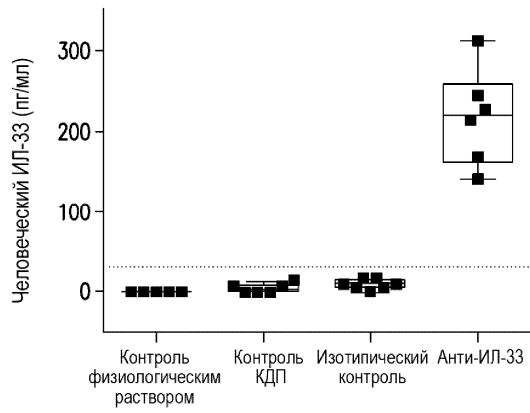
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7А



Фиг. 7В

