

R U 2 5 7 1 4 8 9 C 2

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) RU (11) 2 571 489<sup>(13)</sup> C2

(51) МПК  
G01N 33/50 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012121710/15, 26.10.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
26.10.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
26.10.2009 US 61/255,048;  
19.11.2009 US 61/262,877;  
15.04.2010 US 61/324,635;  
17.05.2010 US 61/345,567;  
03.06.2010 US 61/351,269;  
04.10.2010 US 61/389,672;  
15.10.2010 US 61/393,581

(43) Дата публикации заявки: 10.12.2013 Бюл. № 34

(45) Опубликовано: 20.12.2015 Бюл. № 35

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: US2009035216 A1, 05.02.2009.  
RU2260422 C2, 20.09.2005. МУРТАЗИНА Н.Р.  
и др. Иммунохимическое определение  
сульфаметазина в речной воде и  
лекарственных препаратах. Хими-  
терапевтический журнал. Т. 39. 8, 2005, С. 93-  
97. Найдено в Интернет, найдено на (см.  
прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 28.05.2012

(86) Заявка РСТ:  
US 2010/054125 (26.10.2010)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2011/056590 (12.05.2011)

Адрес для переписки:  
109012, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО  
"Союзпатент", Е.В.Воробьевой

(72) Автор(ы):

СИНГХ Шарат (US),  
ВАН Шуй Лун (US),  
ОРМУНД Линда (US)

(73) Патентообладатель(и):  
НЕСТЕК С.А. (CH)

R U 2 5 7 1 4 8 9 C 2

(54) СПОСОБЫ ВЫЯВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ И АУТОАНТИТЕЛ ПРОТИВ TNF

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к способам  
детектирования и измерения наличия или уровня  
лекарственных препаратов против TNF $\alpha$  и  
автоантител в образцах и включает сравнение

количества меченого комплекса и количества  
свободного меченого TNF $\alpha$  или лекарственного  
средства против TNF $\alpha$  со стандартной кривой.  
Группа изобретений применяется для

оптимизации лечения и мониторинга пациентов, получающих лекарственные препараты против TNF $\alpha$ , для выявления наличия или уровня

автоантител (например, НАСА и/или НАНА) против препарата. 2 н. и 18 з.п. ф-лы, 25 ил., 5 табл., 12 пр.

(30) (продолжение):

17.05.2010 61/345,567 US;  
03.06.2010 61/351,269 US;  
04.10.2010 61/389,672 US;  
15.10.2010 61/393,581 US

(56) (продолжение):

RUSSIAN FEDERATION



(19) RU (11) 2 571 489<sup>(13)</sup> C2

(51) Int. Cl.  
G01N 33/50 (2006.01)

FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2012121710/15, 26.10.2010

(24) Effective date for property rights:  
26.10.2010

Priority:

(30) Convention priority:  
26.10.2009 US 61/255,048;  
19.11.2009 US 61/262,877;  
15.04.2010 US 61/324,635;  
17.05.2010 US 61/345,567;  
03.06.2010 US 61/351,269;  
04.10.2010 US 61/389,672;  
15.10.2010 US 61/393,581

(43) Application published: 10.12.2013 Bull. № 34

(45) Date of publication: 20.12.2015 Bull. № 35

(85) Commencement of national phase: 28.05.2012

(86) PCT application:  
US 2010/054125 (26.10.2010)

(87) PCT publication:  
WO 2011/056590 (12.05.2011)

Mail address:

109012, Moskva, ul. Il'inka, 5/2, OOO "Sojuzpatent",  
E.Vorob'evoj

(54) METHOD OF DETECTING ANTI-TNF PREPARATIONS AND AUTOANTIBODIES

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceutics.

SUBSTANCE: group of inventions relates to methods of detecting and measurement of presence or level of anti-TNF $\alpha$  medications and autoantibodies in samples and includes comparison of quantity of labelled complex and quantity of free labelled TNF $\alpha$  or anti-TNF $\alpha$  medication with standard curve.

(72) Inventor(s):  
SINGKh Sharat (US),  
VAN Shuj Lun (US),  
ORMUND Linda (US)

(73) Proprietor(s):  
NESTEK S.A. (CH)

R 2 5 7 1 4 8 9 C 2

R U 2 5 7 1 4 8 9 C 2

EFFECT: group of inventions are applied for optimisation of treatment and monitoring of patients, obtaining anti-TNF $\alpha$  medications, for detection of presence or level of autoantibodies (for instance, HACA and/or HAHA) against preparation.

20 cl, 25 dwg, 5 tbl, 12 ex

(30) Convention priority:  
17.05.2010 61/345,567 US;  
03.06.2010 61/351,269 US;  
04.10.2010 61/389,672 US;  
15.10.2010 61/393,581 US

Настоящая заявка претендует на приоритет от Предварительной заявки на патент США №. 61/255,048, поданной 26 октября 2009 г., Предварительной заявки на патент США №. 61/262,877, поданной 19 ноября 2009 г., Предварительной заявки на патент США №. 61/324,635, поданной 15 апреля 2010 г., Предварительной заявки на патент США №. 61/345,567, поданной 17 мая 2010 г., Предварительной заявки на патент США №. 61/351,269, поданной 3 июня 2010 г., Предварительной заявки на патент США №. 61/389,672, поданной 4 октября 2010 г., и Предварительной заявки на патент США №. 61/393,581, поданной 15 октября 2010 г., содержание которых включено путем ссылки во всей полноте на все случаи.

10 Уровень техники

Аутоиммунные заболевания представляют значительную и широко распространенную медицинскую проблему. Например, аутоиммунным заболеванием является ревматоидный артрит (RA), затрагивающий более двух миллионов людей в США. RA вызывает хроническое воспаление суставов и обычно является

15 прогрессирующим заболеванием, которое может вызвать разрушение суставов и функциональную нетрудоспособность. Причина ревматоидного артрита неизвестна, хотя генетическая предрасположенность, инфекционные агенты и факторы окружающей среды - все были вовлечены в этиологию заболевания. При активном RA симптомы могут включать усталость, отсутствие аппетита, небольшую лихорадку, боль в мышцах 20 и суставах и тугоподвижность. Также во время вспышек болезни суставы часто краснеют, набухают, становятся болезненными вследствие воспаления синовиальной оболочки. Более того, поскольку RA является системным заболеванием, воспаление может задевать не только суставы, но и другие органы и участки тела, включая железы глаз и рта, выстилку легких, перикард и кровеносные сосуды.

25 Традиционные способы лечения RA и других воспалительных заболеваний включают быстродействующие препараты первого ряда и действующие медленнее препараты второго ряда. Препараты первого ряда уменьшают боль и воспаление. Примерами таких препаратов первого ряда являются аспирин, напроксен, ибупрофен, этодолак и другие нестероидные противовоспалительные средства (NSAIDs), а также

30 кортикоステроиды, принимаемые внутрь или в виде инъекций непосредственно в ткани и суставы. Препараты второго ряда способствуют ослаблению болезни и предотвращают прогрессирующее разрушение суставов, их также называют модифицирующими противоревматическими препаратами или DMARDs. Примерами препаратов второго ряда являются золото, гидрохлорохин, азулфидин и такие

35 иммуносупрессорные средства, как метотрексат, азатиоприн, циклофосфамид, хлорамбуцил и циклоспорин. Однако многие из этих препаратов могут иметь вредные побочные эффекты. Поэтому ведутся поиски других способов лечения ревматоидного артрита и других аутоиммунных заболеваний.

Фактор некроза опухолей альфа (TNF- $\alpha$ ) - это цитокин, вырабатываемый различными 40 типами клеток, включая моноциты и макрофаги, который изначально был идентифицирован по его способности индуцировать некроз определенных опухолей у мышей. Впоследствии было показано, что фактор, именуемый кахектином и связанный с кахексией (истощением), идентичен TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  вовлекается в патофизиологию целого ряда других заболеваний человека, включая шок, сепсис, инфекции, 45 аутоиммунные заболевания, RA, болезнь Крона, отторжение трансплантатов и реакцию "трансплантат против хозяина".

Вследствие пагубной роли TNF- $\alpha$  человека (hTNF- $\alpha$ ) в ряде заболеваний человека разрабатывались стратегии лечения, призванные ингибиовать или противодействовать

активности hTNF- $\alpha$ . В частности, велись поиски антител, связывающих и нейтрализующих hTNF- $\alpha$  в качестве средства ингибирования активности hTNF- $\alpha$ . Первыми из таких антител были моноклональные антитела (mAbs) мыши, секретируемые гибридомами, полученными из лимфоцитов мышей, иммунизированных hTNF- $\alpha$  (например, см. U.S. Pat. No. 5,231,024 to Moeller et al.). Хотя эти мышиные антитела против hTNF- $\alpha$  часто проявляли высокое сродство к hTNF- $\alpha$  и были способны нейтрализовать активность hTNF- $\alpha$ , их применение *in vivo* было ограничено из-за проблем, связанных с введением мышиных антител людям, таких как короткое время полужизни в сыворотке, неспособность запускать некоторые эффекторные функции человека и индуцирование нежелательной иммунной реакции против мышиных антител у человека (реакция "человека против антител мыши" (НАМА)).

Совсем недавно стали применять биологические подходы к лечению таких аутоиммунных заболеваний, как ревматоидный артрит. Например, для лечения ревматоидного артрита были одобрены FDA четыре ингибитора TNF $\alpha$ : REMICADE<sup>TM</sup> (инflixимаб) - химерное mAb против TNF $\alpha$ , ENBREL<sup>TM</sup> (этанерцепт) - слитый белок TNFR-Fc Ig, HUMIRA<sup>TM</sup> (адалимумаб) - человеческое mAb против TNF $\alpha$  и CIMZIA<sup>®</sup> (цертолизумаб-пегол) - ПЭГилированный Fab-фрагмент. CIMZIA<sup>®</sup> также применяется для лечения болезни Крона (CD) в умеренной и тяжелой форме. Хотя такие биологические способы лечения оказались успешными при лечении ревматоидного артрита и других аутоиммунных заболеваний типа CD, однако не все субъекты, подвергавшиеся лечению, реагировали или хорошо реагировали на такое лечение. Более того, применение ингибиторов TNF $\alpha$  может индуцировать иммунную реакцию на лекарство и приводить к образованию аутоантител, таких как человеческие против химерных антител (НАСА), человеческие против гуманизированных антител (НАНА) и человеческие против антител мыши (НАМА). Такие иммунные реакции типа НАСА, НАЛА или НАМА могут быть связаны с реакциями гиперчувствительности и тяжелыми изменениями фармакокинетики и биораспределения иммунотерапевтического ингибитора TNF $\alpha$ , которые препятствуют дальнейшему лечению этим препаратом. Таким образом, в данной области существует потребность в методах детектирования наличия биопрепарата против TNF $\alpha$  и/или аутоантител к нему в образцах пациентов для мониторинга терапии ингибиторами TNF $\alpha$  и принятия решений по лечению. Настоящее изобретение удовлетворяет эту потребность, а также обеспечивает и другие преимущества.

#### Сущность изобретения

TNF $\alpha$  вовлечен в воспалительные заболевания, аутоиммунные заболевания, вирусные, бактериальные и паразитические инфекции, раковые заболевания и/или нейродегенеративные заболевания и является полезной мишенью для специфической биологической терапии при таких заболеваниях, как ревматоидный артрит и болезнь Крона. Ингибиторы TNF $\alpha$ , как-то антитела против TNF $\alpha$ , представляют собой важный класс терапевтических средств. Нужны методы детектирования наличия биопрепарата против TNF $\alpha$  и/или аутоантител к нему.

Поэтому в одном воплощении настоящим изобретением предусмотрен способ детектирования наличия или уровня препарата против TNF $\alpha$  в образце, который включает:

(а) контактирование меченого TNF $\alpha$  с образцом, содержащим или предположительно содержащим препарат против TNF $\alpha$ , с образованием меченого комплекса (т.е. иммунокомплекса или коньюгата) с препаратом против TNF $\alpha$  (при этом меченный TNF $\alpha$  и препарат против TNF $\alpha$  не связаны ковалентно друг с другом);

(b) подвергание меченого комплекса эксклюзионной хроматографии для отделения меченого комплекса (например, от свободного меченого TNF $\alpha$ ); и  
 (c) детектирование меченого комплекса,

таким образом детектируется наличие или уровень препарата против TNF $\alpha$ . В

5 определенных случаях способы применимы для измерения уровня REMICADE<sup>TM</sup> (инфликсимаба), ENBREL<sup>TM</sup> (этанерцепта), HUMIRA<sup>TM</sup> (адалимумаба) и CIMZIA<sup>®</sup> (цертолизумаба-пегола) в образце, например, от субъекта, получающего лечение препаратом против TNF $\alpha$ .

В другом воплощении настоящим изобретением предусмотрен способ детектирования

10 наличия или уровня аутоантител к препаратау против TNF $\alpha$  в образце, который включает:

(a) контактирование меченого препарата против TNF $\alpha$  с образцом, содержащим или предположительно содержащим аутоантитела к препаратау против TNF $\alpha$ , с образованием меченого комплекса (т.е. иммунокомплекса или коньюгата) с аутоантителом (при этом меченный препарат против TNF $\alpha$  и аутоантитело не связаны ковалентно друг с другом);

15 (b) подвергание меченого комплекса эксклюзионной хроматографии для отделения меченого комплекса (например, от свободного меченого препарата против TNF $\alpha$ ); и

(c) детектирование меченого комплекса, таким образом детектируя наличие или уровень аутоантител.

В определенных случаях способы применимы для измерения уровня аутоантител,

20 включая, без ограничения, человеческие против химерных антител (НАСА), человеческие против гуманизированных антител (НАНА) и человеческие против антител мыши (НАМА) в образце, например, от субъекта, получающего лечение препаратом против TNF $\alpha$ .

В следующем воплощении настоящим изобретением предусмотрен способ

25 детектирования наличия или уровня аутоантител к препаратау против TNF $\alpha$  в образце, который включает:

(a) контактирование меченого препарата против TNF $\alpha$  и меченого TNF $\alpha$  с образцом, содержащим или предположительно содержащим аутоантитела к препаратау против TNF $\alpha$ , с образованием первого меченого комплекса (т.е. иммунокомплекса или

30 коньюгата) между меченым препаратау против TNF $\alpha$ , меченым TNF $\alpha$  и аутоантителом (при этом компоненты первого меченого комплекса не связаны ковалентно друг с другом) и второго меченого комплекса (т.е. иммунокомплекса или коньюгата) между меченым препаратау против TNF $\alpha$  и аутоантителом (при этом компоненты второго меченого комплекса не связаны ковалентно друг с другом), причем меченный препаратау

35 против TNF $\alpha$  и меченный TNF $\alpha$  содержат разные метки;

(b) подвергание первого меченого комплекса и второго меченого комплекса эксклюзионной хроматографии для отделения первого меченого комплекса и второго меченого комплекса (например, друг от друга и от свободного меченого TNF $\alpha$  и свободного меченого препарата против TNF $\alpha$ ); и

40 (c) детектирование первого меченого комплекса и второго меченого комплекса, таким образом детектируя наличие или уровень не-нейтрализующей формы аутоантител (при этом аутоантитело не мешает связыванию между препаратау против TNF $\alpha$  и TNF $\alpha$ ), если присутствует и первый меченный комплекс, и второй меченный комплекс, и детектируется наличие или уровень нейтрализующей формы аутоантител (при этом

45 аутоантитело мешает связыванию между препаратау против TNF $\alpha$  и TNF $\alpha$ ), если присутствует только второй меченный комплекс.

В определенных случаях способы применимы для измерения уровня аутоантител, включая, без ограничения, человеческие против химерных антител (НАСА), человеческие

против гуманизированных антител (НАНА) и человеческие против антител мыши (НАМА) в образце, например, от субъекта, получающего лечение препаратом против TNF $\alpha$ .

В родственном воплощении настоящим изобретением предусмотрен способ

5 детектирования наличия или уровня аутоантител к препарату против TNF $\alpha$  в образце, который включает;

(а) контактирование меченого препарата против TNF $\alpha$  с образцом, содержащим или предположительно содержащим аутоантитела к препарату против TNF $\alpha$ , с образованием первого меченого комплекса (т.е. иммунокомплекса или конъюгата) между меченым

10 препаратом против TNF $\alpha$  и аутоантителом (при этом меченый препарат против TNF $\alpha$  и аутоантитело не связаны ковалентно друг с другом);

(б) подвергание первого меченого комплекса первой эксклюзионной хромато-графии для отделения первого меченого комплекса (например, от свободного меченого препарата против TNF $\alpha$ );

15 (с) детектирование первого меченого комплекса, таким образом детектируется наличие или уровень аутоантител;

(д) контактирование меченого TNF $\alpha$  с первым меченым комплексом с образованием второго меченого комплекса (т.е. иммунокомплекса или конъюгата) между меченым

20 препаратом против TNF $\alpha$  и меченым TNF $\alpha$  (при этом меченый препарат против TNF $\alpha$  и меченый TNF $\alpha$  не связаны ковалентно друг с другом), причем меченый препарат против TNF $\alpha$  и меченый TNF $\alpha$  содержат разные метки;

(е) подвергание второго меченого комплекса второй эксклюзионной хромато-графии для отделения второго меченого комплекса (например, от свободного меченого TNF $\alpha$ ); и

25 (ф) детектирование второго меченого комплекса, таким образом детектируя наличие или уровень нейтрализующей формы аутоантител (при этом аутоантитело мешает связыванию между препаратом против TNF $\alpha$  и TNF $\alpha$ ).

В определенных случаях способы применимы для измерения уровня аутоантител, включая, без ограничения, человеческие против химерных антител (НАСА), человеческие 30 против гуманизированных антител (НАНА) и человеческие против антител мыши (НАМА) в образце, например, от субъекта, получающего лечение препаратом против TNF $\alpha$ .

В следующем воплощении настоящим изобретением предусмотрен способ определения эффективного количества препарата против TNF $\alpha$  у субъекта, получающего 35 лечение препаратом против TNF $\alpha$ , который включает:

(а) измерение уровня препарата против TNF $\alpha$  в первом образце от субъекта, включающем:

(i) контактирование первого образца с некоторым количеством меченого TNF $\alpha$  с образованием первого комплекса, содержащего меченый TNF $\alpha$  и препарат против 40 TNF $\alpha$ ; и

(ii) детектирование первого комплекса методом эксклюзионной хроматографии, таким образом измеряя уровень препарата против TNF $\alpha$ ;

(b) измерение уровня аутоантител к препаратуре против TNF $\alpha$  во втором образце от субъекта, включающем:

45 (i) контактирование второго образца с некоторым количеством меченого препарата против TNF $\alpha$  с образованием второго комплекса, содержащего меченый препарат против TNF $\alpha$  и аутоантитело; и

(ii) детектирование второго комплекса методом эксклюзионной хроматографии,

таким образом измеряя уровень аутоантител;

(с) вычитание уровня аутоантител, измеренного на стадии (b), из уровня препарата против TNF $\alpha$ , измеренного на стадии (a), таким образом определяя эффективное количество препарата против TNF $\alpha$ .

5 В следующем воплощении настоящим изобретением предусмотрен способ оптимизации терапевтического количества препарата против TNF $\alpha$  у субъекта, получающего лечение препаратом против TNF $\alpha$ , который включает:

(а) определение эффективного количества препарата против TNF $\alpha$  в соответствии со способом настоящего изобретения;

10 (б) сравнение эффективного количества препарата против TNF $\alpha$  с уровнем препарата против TNF $\alpha$ ; и

(с) определение последующей дозы препарата против TNF $\alpha$  для субъекта, исходя из сравнения на стадии (b), таким образом оптимизируя терапевтическое количество препарата против TNF $\alpha$ .

15 В следующем воплощении настоящим изобретением предусмотрен способ оптимизации лечения и/или снижения токсичности препарата против TNF $\alpha$  у субъекта, получающего лечение препаратом против TNF $\alpha$ , который включает:

(а) измерение уровня препарата против TNF $\alpha$  в первом образце от субъекта;

20 (б) измерение уровня аутоантител к препаратуре против TNF $\alpha$  во втором образце от субъекта; и

(с) определение последующего курса лечения для субъекта, исходя из уровня препарата против TNF $\alpha$  и уровня аутоантител, таким образом оптимизируется лечение и/или снижается токсичность препарата против TNF $\alpha$ .

В следующем воплощении настоящим изобретением предусмотрен способ

25 определения наличия или уровня препарата против TNF $\alpha$  относительно внутреннего контроля в образце, содержащем или предположительно содержащем препарат против TNF $\alpha$ , который включает:

(а) контактирование некоторого количества меченого TNF $\alpha$  и некоторого количества внутреннего контроля с образцом с образованием комплекса меченого TNF $\alpha$  и препарата

30 против TNF $\alpha$ ;

(б) детектирование меченого TNF $\alpha$  и меченого внутреннего контроля методом эксклюзионной хроматографии;

(с) интегрирование площади под кривой для пика меченого TNF $\alpha$  на графике интенсивности сигнала в зависимости от времени элюирования при эксклюзионной хроматографии;

(д) интегрирование площади под кривой для пика меченого внутреннего контроля на графике интенсивности сигнала в зависимости от времени элюирования при эксклюзионной хроматографии;

35 (е) определение первого соотношения путем деления количества меченого TNF $\alpha$  на количество меченого внутреннего контроля;

(ф) определение второго соотношения путем деления результата интегрирования из стадии (с) на результат интегрирования из стадии (d); и

(г) сравнение первого соотношения, определенного на стадии (e), со вторым соотношением, определенным на стадии (f), при этом определяется наличие или уровень препарата против TNF $\alpha$  относительно внутреннего контроля.

45 В следующем воплощении настоящим изобретением предусмотрен способ оптимизации терапевтического количества препарата против TNF $\alpha$  у субъекта, получающего лечение препаратом против TNF $\alpha$ , который включает: определение

последующей дозы препарата против TNF $\alpha$  для субъекта, исходя из сравнения соотношения меченого TNF $\alpha$  к меченому внутреннему контролю на стадии (e) предыдущего параграфа с соотношением меченого TNF $\alpha$  к меченому внутреннему контролю на стадии (f) предыдущего параграфа, таким образом оптимизируется

5 терапевтическое количество препарата против TNF $\alpha$ .

В некоторых воплощениях настоящим изобретением предусмотрен способ определения наличия или уровня аутоантител к препаратау против TNF $\alpha$  относительно внутреннего контроля в образце, содержащем или предположительно содержащем аутоантитела, который включает:

- 10 (a) контактирование некоторого количества меченого препарата против TNF $\alpha$  и некоторого количества внутреннего контроля с образцом с образованием комплекса меченого препарата против TNF $\alpha$  и аутоантитела;
- 15 (b) детектирование меченого препарата против TNF $\alpha$  и меченого внутреннего контроля методом эксклюзионной хроматографии;
- (c) интегрирование площади под кривой для пика меченого препарата против TNF $\alpha$  на графике интенсивности сигнала в зависимости от времени элюирования при эксклюзионной хроматографии;
- (d) интегрирование площади под кривой для пика меченого внутреннего контроля на графике интенсивности сигнала в зависимости от времени элюирования при
- 20 эксклюзионной хроматографии;
- (e) определение первого соотношения путем деления количества меченого препарата против TNF $\alpha$  на количество меченого внутреннего контроля;
- (f) определение второго соотношения путем деления результата интегрирования из стадии (c) на результат интегрирования из стадии (d); и
- 25 (g) сравнение первого соотношения, определенного на стадии (e), со вторым соотношением, определенным на стадии (f), таким образом определяя наличие или уровень аутоантител относительно внутреннего контроля.

В следующем воплощении настоящим изобретением предусмотрен набор для измерения наличия или уровня препарата против TNF $\alpha$  и наличия или уровня

30 аутоантител к препаратау против TNF $\alpha$  в образце, который включает:

- (a) первый измерительный субстрат, содержащий некоторое количество меченого TNF $\alpha$ ;
- (b) второй измерительный субстрат, содержащий некоторое количество меченого препарата против TNF $\alpha$ ;
- 35 (c) необязательно третий измерительный субстрат, содержащий некоторое количество меченого TNF $\alpha$  и некоторое количество меченого внутреннего контроля;
- (d) необязательно четвертый измерительный субстрат, содержащий некоторое количество меченого препарата против TNF $\alpha$  и некоторое количество меченого внутреннего контроля;
- 40 (e) необязательно средство для экстрагирования образца от субъекта; и
- (f) необязательно брошюру с инструкциями по применению набора. Другие цели, особенности и преимущества настоящего изобретения станут понятными специалистам из следующего подробного описания и фигур.

Краткое описание фигур

45 На фиг.1 представлено типичное воплощение способов определения по настоящему изобретению, в котором для детектирования связывания между TNF $\alpha$ -Alexa<sub>647</sub> и HUMIRA<sup>TM</sup> применяется метод эксклюзионной хроматографии HPLC.

На фиг.2 представлены графики "доза-ответ" для связывания HUMIRA<sup>TM</sup> с TNF $\alpha$ -

Alexa<sub>647</sub>.

На фиг.3 представлен текущий способ на основе ELISA для измерения уровня НАСА, известный как мостиковый метод (bridging assay).

На фиг.4 представлена типичная схема способов детектирования аутоантител по настоящему изобретению для измерения концентраций НАСА/НАНА, вырабатываемых против REMICADE™.

На фиг.5 представлен анализ типа "доза-ответ" для связывания антитела против IgG человека с REMICADE™-Alexa<sub>647</sub>.

На фиг.6 представлен второй анализ типа "доза-ответ" для связывания антитела против IgG человека с REMICADE™-Alexa<sub>647</sub>.

На фиг.7 представлены графики "доза-ответ" для связывания антитела против IgG человека с REMICADE™-Alexa<sub>647</sub>.

На фиг.8 представлено образование иммунокомплекса REMICADE™-Alexa<sub>647</sub> в нормальной сыворотке человека и НАСА-положительной сыворотке.

На фиг.9 представлена сводка по измерению НАСА в образцах сыворотки от 20 пациентов, которые проводились мостиковым методом или же анализом изменения подвижности по настоящему изобретению.

На фиг.10 представлена сводка и сравнение текущих способов измерения концентрации НАСА в сыворотке с новым способом определения НАСА по настоящему изобретению.

На фиг.11 представлены профили SE-HPLC меченого флуорофором (Fl) IFX при инкубации с нормальной (NHS) или НАСА-положительной (HPS) сывороткой.

Добавление в инкубационную смесь возрастающих количеств НАСА-положительной сыворотки вызывало дозозависимое смещение пика IFX-F1 в область элюатов с более высокой молекулярной массой C1 и C2.

На фиг.12 представлены графики "доза-ответ" для связанного и свободного IFX-F1, составленные в присутствии возрастающих разведений НАСА-положительной сыворотки определенный анализом изменения подвижности. (A) Возрастающие разведения НАСА-положительной сыворотки инкубировали с 37,5 нг IFX-F1. Чем большее разведение (меньше НАСА), тем больше свободного IFX-F1 обнаруживается при анализе методом SE-HPLC. (B) Возрастающие разведения НАСА-положительной сыворотки инкубировали с 37,5 нг IFX-F1. Чем большее разведение (меньше НАСА), тем меньше связанного с НАСА IFX-F1 обнаруживается при анализе методом SE-HPLC.

На фиг.13 представлены профили SE-HPLC TNF $\alpha$ -F1 при инкубации с нормальной (NHS) сывороткой или сывороткой с добавлением IFX. Добавление в инкубационную смесь возрастающих количеств сыворотки с добавлением IFX вызывало дозозависимое смещение пика флуоресцентного TNF $\alpha$  в область элюатов с более высокой молекулярной массой.

На фиг.14 представлены графики "доза-ответ" для связанного и свободного TNF $\alpha$ , составленные в присутствии возрастающих разведений сыворотки с добавлением IFX определенный анализом изменения подвижности. Повышение концентрации IFX, добавленного в инкубационную смесь, вызывает снижение содержания свободного TNF $\alpha$  и повышение содержания связанного TNF $\alpha$ .

На фиг.15 представлено измерение относительного уровня НАСА и концентрации IFX в анализе изменения подвижности у больных IBD, получавших IFX в различные моменты времени.

На фиг.16 представлено лечение пациентов - измерение уровня НАСА и концентрации

IFX в сыворотке больных IBD, получавших IFX в различные моменты времени.

На фиг.17 представлены типичные воплощения методов определения по настоящему изобретению для детектирования присутствия (A) не-нейтрализующих или (B) нейтрализующих аутоантител типа НАСА.

На фиг.18 представлено альтернативное воплощение методов определения по настоящему изобретению для детектирования присутствия нейтрализующих аутоантител типа НАСА.

На фиг.19 представлены профили изменения подвижности F1-меченого ADL при инкубации с нормальной сывороткой человека (NHS) в присутствии различного количества антител против IgG человека. Добавление в инкубационную смесь возрастающих количеств антител против IgG человека вызывало дозозависимое смещение пика F1-ADL (FA) в область элюатов с более высокой молекулярной массой C1 и C2, тогда как пик внутреннего контроля (1C) не изменялся.

На фиг.20 представлен график влияния антител против IgG человека на изменение подвижности (сдвиг) свободного F1-ADL. Возрастающие количества антител против IgG человека инкубировали с 37,5 нг F1-ADL и внутренним контролем. Чем больше антител добавляли в реакционную смесь, тем больше снижалось соотношение между свободным F1-ADL и внутренним контролем.

На фиг.21 представлены профили изменения подвижности F1-меченого TNF- $\alpha$  при инкубации с нормальной сывороткой человека (NHS) в присутствии различного количества ADL. Ex=494 нм, Et=519 нм. Добавление в инкубационную смесь возрастающих количеств ADL вызывало дозозависимое смещение пика свободного TNF-F1 (FT) в область элюатов с более высокой молекулярной массой, тогда как пик внутреннего контроля (1C) не изменялся.

На фиг.22 представлен график влияния ADL на изменение подвижности свободного TNF- $\alpha$ -F1. Возрастающие количества ADL инкубировали со 100 нг TNF- $\alpha$ -F1 и внутренним контролем. Чем больше ADL добавляли в реакционную смесь, тем больше снижалось соотношение между свободным TNF- $\alpha$ -F1 и внутренним контролем.

На фиг.23 представлены профили изменения подвижности F1-меченого REMICADE (IFX) при инкубации с нормальной сывороткой (NHS) или объединенной сывороткой НАСА-положительных пациентов.

На фиг.24 представлены профили изменения подвижности F1-меченого HLJMIRA (ADL) при инкубации с нормальной сывороткой (NHS) или антителом мыши против IgGI человека.

На фиг.25 представлены профили изменения подвижности F1-меченого HUMIRA (ADL) при инкубации с нормальной сывороткой (NHS) или объединенной сывороткой НАНА-положительных пациентов.

#### Раскрытие сущности изобретения

##### I. Введение

Настоящее изобретение частично основывается на открытии того, что гомогенный анализ изменения (сдвига) подвижности методом эксклюзионной хроматографии особенно предпочтителен для измерения присутствия или уровня ингибиторов TNF $\alpha$ , а также аутоантител (например, НАСА, НАНА и др.), вырабатываемых против них. В частности, настоящим изобретением предусмотрены способы определения типа "смешать и измерить", которые не требуют никаких стадий отмывания. При этом образовавшие комплекс и некомплексированные белковые препараты легко отделяются друг от друга. Кроме того, при использовании способов настоящего изобретения сводятся к минимуму любые возможные помехи со стороны свободного препарата.

Напротив, типичный метод ELISA для измерения уровня НАСА или НАНА не может выполняться, пока ингибитор TNF $\alpha$  не будет удален из организма, что может занять до 3 месяцев. Более того, настоящее изобретение в общем приложимо к широкому спектру белковых препаратов наряду с антителами против TNF $\alpha$ . Способы настоящего изобретения также дают преимущество в том, что они не требуют прикрепления антигенов к твердой поверхности, устраниют неспецифическое связывание посторонних IgG, детектируют антитела со слабым сродством и проявляют повышенную чувствительность и специфичность перед доступными в настоящее время методами детектирования типа ферментного иммуноанализа.

Важность измерения концентрации биопрепараторов против TNF $\alpha$  в сыворотке, равно как и других иммунотерапевтических препаратов иллюстрируется тем, что FDA требует проводить фармакокинетические исследования и исследования на толерантность (например, иммунный ответ) во время клинических испытаний. Настоящее изобретение также находит применение при мониторинге пациентов, принимающих эти лекарства, чтобы удостовериться, что они получают правильную дозу, что препарат не выводится из организма слишком быстро и что они не развивается иммунный ответ против препарата. Более того, настоящее изобретение применимо для назначения перехода на другие лекарства вследствие несостоительности первоначального препарата.

## II. Определения

В настоящем изобретении следующие термины имеют приданые им значения, если не указано иначе.

Термины "препарат против TNF- $\alpha$ " или "ингибитор TNF- $\alpha$ " в настоящем изобретении охватывают вещества, включая белки, антитела, фрагменты антител, слитые белки (например, слитые белки Ig или слитые белки Fc), мультивалентные связывающие белки (например, DVD-Ig), небольшие молекулы-антагонисты TNF- $\alpha$  и подобные им природные или искусственные молекулы и/или их рекомбинантные и/или сконструированные формы, которые, прямо или косвенно, ингибируют активность TNF- $\alpha$ , как-то ингибируют взаимодействие TNF- $\alpha$  с рецептором TNF- $\alpha$  на клеточной поверхности, ингибируют вырабатывание белка TNF- $\alpha$ , ингибируют экспрессию гена TNF- $\alpha$ , ингибируют секрецию TNF- $\alpha$  из клеток, ингибируют сигнализацию через receptor TNF- $\alpha$  или любые другие образом приводят к снижению активности TNF- $\alpha$  у субъекта. Термин "препарат против TNF- $\alpha$ " или "ингибитор TNF- $\alpha$ " предпочтительно включает вещества, которые ухудшают активность TNF- $\alpha$ . Примеры ингибиторов TNF- $\alpha$  включают этанерцепт (ENBREL<sup>TM</sup>, Amgen), инфликсимаб (REMICADE<sup>TM</sup>, Johnson and Johnson), моноклональное антитело человека против TNF адалимумаб (D2E7/HUMIRA<sup>TM</sup>, Abbott Laboratories), цертолизумаб-пегол (CIMZIA<sup>®</sup>, UCB, Inc.), CDP 571 (Celltech) и CDP 870 (Celltech), а также другие соединения, ингибирующие активность TNF- $\alpha$  таким образом, что при введении субъекту, страдающему или подвергающемуся риску возникновения заболевания, при котором активность TNF- $\alpha$  вредна (например, RA), происходит лечение заболевания.

Термин "прогнозирование восприимчивости к ингибитору TNF- $\alpha$ " в настоящем изобретении обозначает способность оценить вероятность того, что лечение субъекта ингибитором TNF- $\alpha$  будет или не будет эффективным (например, принесет ощутимую пользу) для субъекта. В частности, такая способность оценить вероятность того, что лечение будет или не будет эффективным, как правило, применяется после того, как лечение началось и показатель эффективности (например, показатель ощутимой пользы) наблюдался у субъекта. Особенно предпочтительными ингибиторами TNF- $\alpha$  являются биологические препараты, одобренные FDA для применения на людях при лечении

вызванных TNF- $\alpha$  заболеваний, таких, например, как ревматоидный артрит или воспалительный колит (IBD), и к таким препаратам относятся адалимумаб (HUMIRA<sup>TM</sup>), инфликсимаб (REMICADE<sup>TM</sup>), этанерсепт (ENBREL<sup>TM</sup>) и цертолизумаб-пегол (CIMZIA<sup>®</sup>, UCB, Inc.).

5 Термин "эксклюзионная хроматография" (SEC) служит для обозначения метода хроматографии, при котором молекулы в растворе разделяются на основе их размера и/или гидродинамического объема. Он применяется к большим молекулам или макромолекулярным комплексам типа белков и их коньюгатов. Как правило, если для пропускания образца через колонку используется водный раствор, то метод называется  
10 гель-фильтрационная хроматография.

15 Термины "комплекс", "иммунокомплекс", "коньюгат" и "иммуноконьюгат" охватывают, без ограничения, TNF- $\alpha$ , связанный (например, нековалентно) с препаратом против TNF- $\alpha$ , препарат против TNF- $\alpha$ , связанный (например, нековалентно) с аутоантителом к препарату против TNF- $\alpha$ , и препарат против TNF- $\alpha$ , связанный (например, нековалентно) и с TNF- $\alpha$ , и с аутоантителом к препарату против TNF- $\alpha$ .

20 В настоящем изобретении то, что определяется термином "меченные", включает любые частицы, молекулы, белки, ферменты, антитела, фрагменты антител, цитокины и им подобные, коньюгированные с другой молекулой или химической частицей, которая поддается детектированию. Химические вещества, пригодные в качестве метки для  
25 меченых частиц, включают, без ограничения, флуоресцентные красители, например, красители Alexa Fluor<sup>®</sup> типа Alexa Fluor<sup>®</sup> 647, квантовые точки, оптические красители, люминесцентные красители и радионуклиды, например, I.

25 Термин "эффективное количество" включает дозу лекарства, способную оказать терапевтический эффект у нуждающегося в этом субъекта, а также биодоступное количество субстанции. Термин "биодоступный" означает ту долю введенной дозы лекарства, которая доступна для терапевтической активности. Например, эффективным количеством препарата, применимого для лечения тех заболеваний, в патофизиологии которых вовлечен TNF- $\alpha$ , например, без ограничения, шока, сепсиса, инфекций, аутоиммунных заболеваний, RA, болезни Крона, отторжения трансплантатов и реакции  
30 "трансплантат против хозяина", может быть такое количество, которое способно предотвращать или ослаблять один или несколько симптомов, связанных с ними.

35 Выражение "площадь под кривой" является математическим термином, который применяется для описания интегрирования части двухмерного графика. Например, на графике интенсивности сигнала в зависимости от времени выхода из колонки при  
40 эксклюзионной хроматографии различные пики на графике соответствуют определенным молекулам. Интегрирование этих пиков охватывает площадь, ограниченную минимальным значением на оси у, например, основанием двухмерного графика, и самим двухмерным графиком. Интегрирование пика равным образом описывается вычислительной формулой: площадь под кривой =  $\int_a^b f(x)dx$ , где  $f(x)$   
45 - функция, описывающая двухмерный график, а переменные "a" и "b" означают границы интегрируемого пика на оси x.

45 Выражение "детектирование флуоресцентной метки" включает средство детектирования флуоресцентной метки. Средства детектирования включают, без ограничения, спектрометры, флуориметры, фотометры, детектирующие устройства, обычно встроенные в прибор для хроматографии, в том числе эксклюзионной или высокоэффективной жидкостной хроматографии, к примеру, установку Agilent-1200 HPLC System.

Скобки "[]" указывают на то, что выражение в скобках относится к концентрации.

Выражение "оптимизация терапии" включает оптимизацию дозы (например, эффективного количества или уровня) и/или типа индивидуальной терапии. Например, оптимизация дозы препарата против TNF- $\alpha$  включает увеличение или уменьшение

5 количества препарата против TNF- $\alpha$ , впоследствии вводимого пациенту. В некоторых случаях оптимизация типа препарата против TNF- $\alpha$  включает замену одного вводимого препарата против TNF- $\alpha$  на другой препарат (например, другой препарат против TNF- $\alpha$ ).

В некоторых других случаях оптимизация терапии включает совместное введение

10 дозы препарата против TNF- $\alpha$  (например, в большей, меньшей или той же самой дозе, что и предыдущая доза) в комбинации с иммуносупрессорным препаратом.

Термин "совместное введение" означает введение более чем одного активного агента с тем, что продолжительность физиологического эффекта одного активного агента накладывается на физиологический эффект второго активного агента.

15 Термин "субъект", "пациент" или "индивиду" обычно относится к людям, но также и к другим животным, включая, например, других приматов, грызунов, собак, кошек, лошадей, овец, свиней и др.

Термин "курс лечения" включает любые терапевтические подходы, предпринимаемые 20 для ослабления или предотвращения одного или нескольких симптомов, связанных с вызванным TNF- $\alpha$  заболеванием. Термин охватывает назначение любого соединения, препарата, процедуры и/или режима, полезных для улучшения здоровья индивида с вызванным TNF- $\alpha$  заболеванием, и включает любые описанные здесь терапевтические средства. Специалистам должно быть известно, что можно изменить сам курс лечения или дозу при текущем курсе лечения (например, увеличить или уменьшить), исходя из 25 присутствия или уровня концентрации препарата против TNF- $\alpha$  и/или аутоантител к препаратуре против TNF- $\alpha$ .

Термин "иммунодепрессивный препарат" или "иммунодепрессивное средство" 30 охватывает любые субстанции, способные давать иммунодепрессивный эффект, например, предотвращение или уменьшение иммунного ответа, как-то при облучении или введении таких лекарств, как антиметаболиты, антилимфоцитарная сыворотка, антитела и т.д. Примеры подходящих иммунодепрессивных препаратов включают, без ограничения, тиопуриновые препараты типа азатиоприна (AZA) и его метаболитов, антиметаболиты типа метотрексата (MTX); сиролимус (рапамицин); темсиролимус; эверолимус; такролимус (FK-506); FK-778; антилимфоцитарные глобулиновые антитела, 35 антитимо-цитарные глобулиновые антитела, антитела против CD3, антитела против CD4 и конъюгаты типа антитело-токсин; циклоспорин; микофенолат; мизорибин монофосфат; скопарон; глатирамер ацетат; их метаболиты; их фармацевтически приемлемые соли; их производные; их пролекарственные формы; и их комбинации.

Термин "тиопуриновый препарат" охватывает азатиоприн (AZA), 6-меркаптопурин 40 (6-MP) и любые их метаболиты, обладающие терапевтической эффективностью, в том числе 6-тиогуанин (6-TG), 6-метилмеркаптопурин-рибозид, 6-тиоинозиновые нуклеотиды (например, 6-тиоинозин монофосфат, 6-тиоинозин дифосфат, 6-тиоинозин трифосфат), 6-тиогуаниновые нуклеотиды (например, 6-тиогуанозин монофосфат, 6-тиогуанозин дифосфат, 6-тиогуанозин трифосфат), 6-тиоксантозиновые нуклеотиды (например, 6-45 6-тиоксантозин монофосфат, 6-тиоксантозин дифосфат, 6-тиоксантозин трифосфат), их производные, их аналоги и их комбинации.

Термин "образец" охватывает любые биологические образцы, взятые у субъекта.

Подходящими для применения в настоящем изобретении образцами являются, без

ограничения, цельная кровь, плазма, сыворотка, слюна, моча, кал, слезы и другие жидкости организма, образцы тканей (например, биоптаты) и их клеточные экстракты (например, экстракт эритроцитов). В предпочтительном воплощении образец представлен образцом сыворотки. Специалистам должно быть известно, что образцы, 5 как-то образцы сыворотки, можно разводить перед анализом. В некоторых случаях термин "образец" включает, без ограничения, кровь, ткань организма, сыворотку крови, лимфу, ткань лимфатических узлов, ткань селезенки, костный мозг или обогащенную иммуноглобулином фракцию из одной или нескольких этих тканей. В некоторых других случаях термин "образец" включает сыворотку крови или обогащенную 10 иммуноглобулином фракцию, полученную из сыворотки крови или самой крови. В некоторых случаях термин "образец" включает жидкость организма.

### III. Описание воплощений

Стадии способов настоящего изобретения необязательно проводятся в том порядке, в котором они представлены. Рядовым специалистам должно быть понятно, что рамки 15 настоящего изобретения охватывают и другой порядок стадий способов настоящего изобретения.

В одном воплощении настоящим изобретением предусмотрен способ детектирования наличия или уровня препарата против TNF- $\alpha$  в образце, который включает:

- (а) контактирование меченого TNF $\alpha$  с образцом, содержащим или предположительно 20 содержащим препарат против TNF $\alpha$ , с образованием меченого комплекса с препаратом против TNF $\alpha$ ;
- (б) подвергание меченого комплекса эксклюзионной хроматографии для отделения меченого комплекса; и
- (с) детектирование меченого комплекса, таким образом детектируется препарат 25 против TNF $\alpha$ .

В определенных случаях способы особенно применимы для следующих антител против TNF $\alpha$ : REMICADE<sup>TM</sup> (инфликсимаб), ENBREL<sup>TM</sup> (этанерцепт), HUMIRA<sup>TM</sup> (адалимумаб) и CIMZIA<sup>®</sup> (цертолизумаб-пегол).

Фактор некроза опухолей альфа (TNF $\alpha$ ) - это цитокин, участвующий в системном воспалении, который является представителем группы цитокинов, стимулирующих 30 реакции острой фазы. Главная роль TNF $\alpha$  состоит в регулировании иммунных клеток. TNF $\alpha$  также способен индуцировать апоптотическую гибель клеток, вызывать воспаление и ингибировать онкогенез и вирусную репликацию. TNF в основном образуется в виде трансмембранного белка II типа длиной в 212 аминокислот, 35 скомпонованного в виде стабильных гомотримеров.

Термин "TNF- $\alpha$ " в настоящем изобретении служит для обозначения цитокина человека, существующего в виде секреируемой формы в 17 кД и мембраносвязанной формы в 26 кД, биологически активная форма которого состоит из тримера связанных нековалентно молекул в 17 кД. Структура TNF- $\alpha$  описана более подробно, к примеру, 40 в Jones et al. (1989) Nature, 338:225-228. Термин TNF- $\alpha$  охватывает TNF- $\alpha$  человека, реком-бинарный TNF- $\alpha$  человека (rhTNF- $\alpha$ ) или белок, по меньшей мере на 80% идентичный TNF- $\alpha$  человека. TNF $\alpha$  человека состоит из цитоплазматического домена из 35 аминокислот (а.к.), трансмембранного сегмента из 21 а.к. и внеклеточного домена (ECD) из 177 а.к. (Pennica D. et al. (1984) Nature 312:724). В пределах ECD аминокислотная 45 последовательность TNF $\alpha$  на 97% идентична TNF $\alpha$  макаки резус и на 71-92% TNF $\alpha$  быка, собаки, хлопковой крысы, лошади, кошки, мыши, свиньи и крысы. TNF $\alpha$  можно получить стандартными методами рекомбинантной экспрессии или приобрести коммерческим путем (R & D Systems, кат. №210-TA, Minneapolis, Minn.).

В некоторых воплощениях "TNF- $\alpha$ " является "антигеном", то есть молекулой или частью молекулы, способной связываться антителом против TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  может иметь один или более одного эпитопа. В некоторых случаях TNF- $\alpha$  будет реагировать, очень избирательным образом, с антителом против TNF- $\alpha$ . Предпочтительные антигены, с 5 которыми связываются антитела, фрагменты и участки антител против TNF настоящего изобретения, включают по меньшей мере 5 аминокислот SEQ ID NO. 1. В некоторых случаях TNF- $\alpha$  имеет достаточную длину, чтобы содержать эпитоп TNF- $\alpha$ , способный связываться с антителами против TNF- $\alpha$ , их фрагментами и участками.

В некоторых воплощениях длина TNF- $\alpha$ , содержащего эпитоп достаточной длины

10 для связывания с антителом против TNF- $\alpha$ , его фрагментами и участками, составляет по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220 аминокислот. В одном воплощении используется TNF- $\alpha$ , который включает остатки 77-233 SEQ ID NO 1.

15 В некоторых случаях по меньшей мере одна аминокислота в растворимой части TNF- $\alpha$  подвергается мечению, а именно, из остатков 77-233 SEQ ID NO 1. В некоторых случаях применяется аминореактивное производное флуорофора. В большинстве случаев аминореактивная группа представлена ацетилирующим реагентом, образующим карбоксамиды, сульфонамиды или тиомочевину при реакции с аминами. Практически 20 все белки содержат остатки лизина, а большинство содержит свободные амины на N-конце, которые могут использоваться в качестве точки для присоединения метки. В предпочтительном воплощении метится остаток 77, причем используется TNF- $\alpha$ , включающий остатки 77-233 SEQ ID NO 1. В других воплощениях метятся многие первичные амины, а TNF- $\alpha$  метится неоднократно.

25 В некоторых случаях часть TNF- $\alpha$  не подвергается мечению, а именно те части, которые распознаются антителами, их фрагментами и участками. Иными словами, некоторые части антигенов TNF- $\alpha$  составляют топографический или трехмерный эпитоп TNF, который распознается и/или связывается с активностью против TNF, антителами или их фрагментами и вариабельными участками. Эти части предпочтительно свободны 30 для связывания и поэтому не подвергаются мечению. Они включают остатки 136-157 и 164-185 SEQ ID NO:1:

Tyr-Ser-Gln-Val-Leu-Phe-Lys-Gly-Gln-Gly-Cys-Pro-Ser-Thr-His-Val-Leu-Leu-Thr-His-Thr-Ile; и

35 Tyr-Gln-Thr-Lys-Val-Asn-Leu-Leu-Ser-Ala-Ile-Lys-Ser-Pro-Cys-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly.

TNF $\alpha$  или препарат против TNF $\alpha$  лекарство может быть помечен целым рядом детектируемых групп. Предпочтительно TNF $\alpha$  или препарат против TNF $\alpha$  метится флуорофором или флуоресцентным красителем. Типичными флуорофорами, пригодными для применения в настоящем изобретении, являются флуорофоры, перечисленные в 40 каталоге Molecular Probes, включенном в виде ссылки (см. R. Haugland, The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 10th Edition, Molecular Probes, Inc. (2005)). Такими типичными флуорофорами являются, без ограничения, красители Alexa Fluor®, как-то Alexa Fluor® 350, Alexa Fluor® 405, Alexa Fluor® 430, Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 514, Alexa Fluor® 532, Alexa Fluor® 546, Alexa Fluor® 555, Alexa Fluor® 568, 45 Alexa Fluor® 594, Alexa Fluor® 610, Alexa Fluor® 633, Alexa Fluor® 635, Alexa Fluor® 647, Alexa Fluor® 660, Alexa Fluor® 680, Alexa Fluor® 700, Alexa Fluor® 750 и/или Alexa Fluor® 790, а также и другие флуорофоры, такие, к примеру, как дансилхлорид (DNS-C1), 5-(йодацетамидо)флуоресцеин (5-IAF), флуоресцеин-5-изотиоцианат (FITC), тетраметил-

родамин-5- и 6-изотиоцианат (TRITC), 6-акрилоил-2-диметиламинонафталин (акрилодан), 7-нитробензо-2-окса-1,3-диазол-4-илхлорид (NBD-C1), этидийбромид, люцифер желтый, 5-карбоксиродамин-бО гидрохлорид, лиссамин-родамин В сульфонилхлорид, Texas Red™ сульфонилхлорид, BODIPY™, нафталаминсульфоновые кислоты (например, 1-анилино- нафталин-8-сульфоновая кислота (ANS), 6-(иара-толуидинил)нафталин-2-сульфоновая кислота (TNS) и др.), антреол-жирная кислота, DPH, паринаровая кислота, TMA-DPH, флуоренил-жирная кислота, флуоресцеин-фосфатидилэтаноламин, Texas Red-фосфатидил-этаноламин, пиренил-фосфатидилхолин, флуоренил-фосфатидилхолин, мероцианин 540, 1-(3-сульфонатопропил)-4-[ $\beta$ -[2[(ди-н-бутиламино)-6-нафтил]винил]

5 пиридиний бетаин (нафтилстирил), 3,3'-дипропилтиадикарбоцианин (ди-S-C<sub>3</sub>-(5)), 4-(и-дипентил-аминостирил)-1-метилпиридиний (ди-5-ASP), Cy-3-йодацетамид, Cy-5-N-гидрокси-сукциниimid, Cy-7-изотиоцианат, родамин 800, IR-125, тиазолоранж, азур B, нильский голубой, Al-фталоцианин, оксаксин-1,4',6-диамино-2-фенилиндол (DAPI), Hoechst 33342, TOTO, акридиноранж, этидий гомодимер, K-(этоксикарбонилметил)-6-метоксихинолин (MQAE), Fura-2, Calcium Green, карбокси-3NAPP-б, BAPTA, кумарин, фитофлуоры, Coronene, комплексы металл-лиганд, IRDye® 700DX, IRDye® 700, IRDye 800RS, IRDye® 800CW, IRDye® 800, Cy5, Cy5.5, Cy7, DY676, DY680, DY682, DY780 и их смеси. Дополнительными подходящими флуорофорами являются кофакторы ферментов, лантаниды, зеленый флуоресцентный белок, желтый флуоресцентный белок, красный

10 флуоресцентный белок и их мутанты и производные. В одном воплощении изобретения второй член специфической связывающей пары содержит прикрепленную к нему детектируемую группу.

Как правило, флуоресцентная группа представлена флуорофором, выбранным из категории красителей, включающих полиметины, фталоцианины, цианины, ксантины, 25 флуорены, родамины, кумарины, флуоресцеины и BODIPY™.

В одном воплощении флуоресцентная группа представлена ближним инфракрасным (NIR) флуорофором, излучающим в диапазоне от 650 до 900 нм. Применение технологии ближней инфракрасной флуоресценции предпочтительно в биологических способах измерения, так как она в значительной степени исключает или снижает фон от 30 аутофлуоресценции биосубстратов. Другим преимуществом технологии ближней ИК флуоресценции является то, что рассеянный свет от источника возбуждения значительно снижается, поскольку интенсивность рассеяния обратно пропорциональна четвертой степени длины волны. Низкая фоновая флуоресценция и низкое рассеивание приводят к высокому отношению сигнал-шум, что необходимо для высокочувствительного 35 детектирования. Более того, окно оптической прозрачности в ближней ИК области (от 650 нм до 900 нм) в биологических тканях делает флуоресценцию БИК ценной технологией для методов интраскопии *in vivo* и субклеточного детектирования, требующих прохождения света через биологические компоненты. В некоторых аспектах этого воплощения флуоресцентная группа предпочтительно выбирается из группы, состоящей из IRDye® 700DX, IRDye® 700, IRDye® 800RS, IRDye® 800CW, IRDye® 800, Alexa Fluor® 660, Alexa Fluor® 680, Alexa Fluor® 700, Alexa Fluor® 750, Alexa Fluor® 790, Cy5, Cy5.5, Cy7, DY676, DY680, DY682 и DY780. В некоторых воплощениях ближняя инфракрасная группа представлена IRDye® 800CW, IRDye® 800, IRDye® 700DX, IRDye® 700 или DYNAMIC DY676.

45 Флуоресцентное мечение осуществляется с помощью химически реакционного производного флуорофора. Распространенные реакционные группы включают аминореактивные производные изотиоцианата, как-то FITC и TRITC (производные флуоресцеина и родамина), аминореактивные сукциниimidловые эфиры, как-то NHS-флуоресцеин и

реагирующие с сульфидрилами активированные малеимидом флуорофоры типа флуоресцеин-5-малеимида, многие из которых коммерчески доступны. При реакции любого из этих реакционных красителей с TNF $\alpha$  или препаратом против TNF $\alpha$  образуется стабильная ковалентная связь между флуорофором и TNF $\alpha$  или препаратом против TNF $\alpha$ .

5 В некоторых случаях после реакции флуоресцентного мечения зачастую нужно удалить все непрореагировавшие флуорофоры из меченой молекулы-мишени. Часто это осуществляется методом эксклюзионной хроматографии, воспользовавшись различиями по размеру между флуорофором и меченым белком.

10 Реакционные флуоресцентные красители доступны из многих источников. Их можно получить с различными реакционными группами для присоединения к различным функциональным группам в молекуле мишени. Они также доступны в наборах для мечения, содержащих все компоненты для выполнения реакции введения метки. В одном предпочтительном аспекте применяется C2-малеимид Alexa Fluor 647 фирмы Invitrogen 15 (кат.№A-20347).

Специфическое иммунологическое связывание антитела против TNF $\alpha$  с TNF $\alpha$  или антитела против препарата (ADA) с препаратом против TNF $\alpha$  можно детектировать 20 прямо или косвенно. Прямые метки включают флуоресцентные или люминесцентные теги, металлы, красители, радионуклиды и др., присоединенные к антителу. В некоторых случаях для определения уровня концентрации антител против TNF $\alpha$  или ADA в образце, соответственно, может применяться TNF $\alpha$  или антитело против TNF $\alpha$ , меченное йодом-125 (I). В других случаях для чувствительного нерадиоактивного детектирования уровня концентрации антител против TNF $\alpha$  или ADA в образце, соответственно, подходит специфичный к антителам против TNF $\alpha$  или ADA хемилюминесцентный метод с 25 использованием хемилюминесцентного TNF $\alpha$  или антитела против TNF $\alpha$ . В определенных случаях для определения уровня концентрации антител против TNF $\alpha$  или ADA в образце, соответственно, также подходит TNF $\alpha$  или антитело против TNF $\alpha$ , меченное флуоро-хромом. Примеры флуорохромов включают, без ограничения, 30 красители Alexa Fluor, DAPI, флуоресцеин, Hoechst 33258, R-фикацианин, B-фикаэритрин, R-фикаэритрин, родамин, техасский красный и лиссамин. Вторичные антитела, соединенные с флуоро-хромами, можно приобрести коммерческим путем, например, козий F(ab') $_2$  против конъюгата IgG человека с FITC фирмы Tago Immunologicals (Burlingame, CA).

Непрямые метки включают различные ферменты, хорошо известные в данной 35 области, как-то пероксидаза хрена (HRP), щелочная фосфатаза (AP), р-галактозидаза, уреаза и др. Детектирующая система с пероксидазой хрена может применяться, к примеру, с хромогенным субстратом тетраметилбензидином (TMB), который дает растворимый продукт в присутствии перекиси водорода, детектируемый при 450 нм. Детектирующая система со щелочной фосфатазой может применяться, к примеру, с 40 хромогенным субстратом и-нитрофенил фосфатом, который дает растворимый продукт, хорошо детектируемый при 405 нм. Аналогичным образом детектирующая система с  $\beta$ -галактозидазой может применяться вместе с хромогенным субстратом о-нитрофенил- $\beta$ -D-галактопиранозидом (ONPG), который дает растворимый продукт, детектируемый при 410 нм. Детектирующая система с уреазой может применяться вместе с таким 45 субстратом, как мочевина-бромокрезол пурпурный (Sigma Immunochemicals; St. Louis, MO). Применимые вторичные антитела, соединенные с ферментом, можно приобрести из ряда коммерческих источников, например, козий F(ab') $_2$  против конъюгата IgG человека со щелочной фосфатазой можно приобрести у фирмы Jackson ImmunoResearch

(West Grove, PA).

Сигнал от прямой или непрямой метки можно анализировать, к примеру, при помощи спектрофотометра для детектирования окраски хромогенного субстрата; радиационного счетчика для детектирования радиации типа гамма-счетчика для определения  $^{125}\text{I}$ ; или флуориметра для детектирования флуоресценции в присутствии света определенной длины волны. Для детектирования связанных с ферментом антител можно провести количественный анализ количества антитела против TNF $\alpha$  или уровня ADA при помощи спектрофотометра типа EMAX Microplate Reader (Molecular Devices; Menlo Park, CA) в соответствии с инструкциями производителя. При желании, способы определения по настоящему изобретению можно автоматизировать или роботизировать, при этом можно одновременно детектировать сигналы от нескольких образцов.

В некоторых воплощениях применяется эксклюзионная хроматография. Лежащий в основе SEC принцип состоит в том, что частицы различных размеров будут проходить (фильтроваться) через неподвижную фазу с различной скоростью. Это приводит к разделению раствора частиц по размеру. При условии, что все частицы наносятся одновременно или почти одновременно, частицы одного размера будут элюироваться вместе. Каждая эксклюзионная колонка имеет свой диапазон молекулярных масс, которые можно разделить. Предел исключения задает молекулярную массу на верхнем конце этого диапазона и находится там, где молекулы слишком большие и не могут застревать в неподвижной фазе. Предел проникновения задает молекулярную массу на нижнем конце диапазона разделения и находится там, где молекулы достаточно малого размера могут полностью проникать в поры неподвижной фазы, а все молекулы с меньшей молекулярной массой столь малы, что они элюируются как одна полоса.

В некоторых аспектах элюент собирают в постоянных объемах или фракциях. Чем более близки частицы по размеру, тем вероятнее они попадут в одну и ту же фракцию и не будут детектироваться по отдельности. Предпочтительно собранные фракции проверяют спектроскопическими методами для определения концентрации элюируемых частиц. Как правило, спектроскопические методы определения, применимые в настоящем изобретении, включают, без ограничения, флуориметрию, показатель преломления (RI) и ультрафиолет (UV). В некоторых случаях объем элюирования уменьшается с почти линейной зависимостью от логарифма молекулярного гидродинамического объема (т.е. более тяжелые частицы выходят первыми).

В некоторых аспектах способы применимы при детектировании количества препаратов против TNF $\alpha$ , таких, например, как антитела, включая REMICADE<sup>TM</sup> (инфликсимаб) - химерное mAb против ТКР $\alpha$ , ENBREL<sup>TM</sup> (этанерцепт) - слитый белок TNFR-FcIg, HUMIRA<sup>TM</sup> (адалимумаб) - человеческое mAb против TNF $\alpha$  и CIMZIA<sup>®</sup> (цертолизумаб-пегол) - ПЭГилированный Fab-фрагмент.

В некоторых случаях после выявления препарата против TNF $\alpha$  (например, антитела против TNF $\alpha$ ) проводится измерение препарата против TNF $\alpha$  по стандартной кривой.

В другом воплощении настоящим изобретением предусмотрен способ детектирования наличия или уровня аутоантител к препаратуре против TNF $\alpha$  в образце, который включает:

(а) контактирование меченого препарата против TNF $\alpha$  с образованием меченого комплекса с аутоантителом;

(б) подвергание меченого комплекса эксклюзионной хроматографии для отделения меченого комплекса; и

(с) детектирование наличия или уровня меченого комплекса, таким образом детектируя аутоантитело.

В определенных случаях аутоантитела включают человеческие против химерных

антител (НАСА), человеческие против гуманизированных антител (НАНА) и человеческие против антител мыши (НАМА).

В следующем воплощении настоящим изобретением предусмотрен способ детектирования наличия или уровня аутоантител к препаратору против TNF $\alpha$  в образце, 5 который включает:

(а) контактирование меченого препарата против TNF $\alpha$  и меченого TNF $\alpha$  с образцом, содержащим или предположительно содержащим аутоантитела к препаратору против TNF $\alpha$ , с образованием первого меченого комплекса между меченым препаратором против TNF $\alpha$ , меченым TNF $\alpha$  и аутоантителом и второго меченого комплекса между меченым 10 препаратором против TNF $\alpha$  и аутоантителом, причем меченный препарат против TNF $\alpha$  и меченный TNF $\alpha$  содержат разные метки;

(б) подвергание первого меченого комплекса и второго меченого комплекса эксклюзионной хроматографии для отделения первого меченого комплекса и второго меченого комплекса); и

15 (с) детектирование первого меченого комплекса и второго меченого комплекса, при этом детектируется не-нейтрализующая форма аутоантител, если присутствует и первый меченный комплекс, и второй меченный комплекс, и детектируется нейтрализующая форма аутоантител, если присутствует только второй меченный комплекс.

В определенных случаях аутоантитела включают человеческие против химерных 20 антител (НАСА), человеческие против гуманизированных антител (НАНА) и человеческие против антител мыши (НАМА).

В родственном воплощении настоящим изобретением предусмотрен способ детектирования наличия или уровня аутоантител к препаратору против TNF $\alpha$  в образце, который включает:

25 (а) контактирование меченого препарата против TNF $\alpha$  с образцом, содержащим или предположительно содержащим аутоантитела к препаратору против TNF $\alpha$ , с образованием первого меченого комплекса между меченым препаратором против TNF $\alpha$  и аутоантителом;

(б) подвергание первого меченого комплекса первой эксклюзионной хроматографии для отделения первого меченого комплекса;

30 (с) детектирование первого меченого комплекса, при этом детектируется наличие или уровень аутоантител;

(д) контактирование меченого TNF $\alpha$  с первым меченым комплексом с образованием второго меченого комплекса между меченым препаратором против TNF $\alpha$  и меченым TNF $\alpha$ , причем меченный препарат против TNF $\alpha$  и меченный TNF $\alpha$  содержат разные метки;

35 (е) подвергание второго меченого комплекса второй эксклюзионной хроматографии для отделения второго меченого комплекса; и

(ф) детектирование второго меченого комплекса, при этом детектируется наличие или уровень нейтрализующей формы аутоантитела.

В определенных случаях аутоантитела включают человеческие против химерных 40 антител (НАСА), человеческие против гуманизированных антител (НАНА) и человеческие против антител мыши (НАМА).

В других воплощениях описанные здесь способы определения могут применяться для предсказания реакции на ингибиторы TNF $\alpha$ , в особенности на антитела против TNF $\alpha$ , у субъекта с аутоиммунным заболеванием (например, ревматоидным артритом, 45 болезнью Крона и т.п.). В этом способе путем определения у субъекта правильной или терапевтической дозы антитела против TNF $\alpha$ , например, уровня терапевтической концентрации, можно предсказать, будет ли индивид реагировать на лечение.

В следующем воплощении настоящим изобретением предусмотрены способы

мониторинга аутоиммунного заболевания у субъекта с аутоиммунным заболеванием, при этом способ включает определение у субъекта правильной или терапевтической дозы антитела против TNF $\alpha$ , например, уровня терапевтической концентрации, в зависимости от времени. Таким образом можно предсказать, будет ли индивид

5 реагировать на лечение в данный промежуток времени.

В следующем воплощении настоящим изобретением предусмотрен способ определения эффективного количества препарата против TNF $\alpha$  у субъекта, получающего лечение препаратом против TNF $\alpha$ , который включает:

(a) измерение уровня препарата против TNF $\alpha$  в первом образце от субъекта,

10 включающее:

(i) контактирование первого образца с некоторым количеством меченого TNF $\alpha$  с образованием первого комплекса, содержащего меченный TNF $\alpha$  и препарат против TNF $\alpha$ ; и

(ii) детектирование первого комплекса методом эксклюзионной хроматографии,

15 таким образом, измеряя уровень препарата против TNF $\alpha$ ;

(b) измерение уровня аутоантител к препарату против TNF $\alpha$  во втором образце от субъекта, включающее:

(i) контактирование второго образца с некоторым количеством меченого препарата против TNF $\alpha$  с образованием второго комплекса, содержащего меченный препарат

20 против TNF $\alpha$  и аутоантитело; и

(ii) детектирование второго комплекса методом эксклюзионной хроматографии, таким образом, измеряя уровень аутоантител;

(c) вычитание уровня аутоантител, измеренного на стадии (b), из уровня препарата против TNF $\alpha$ , измеренного на стадии (a), таким образом, определяя эффективное

25 количество препарата против TNF $\alpha$ .

В родственном воплощении настоящим изобретением дополнительно предусмотрено, что детектирование на стадии (a)(ii) включает:

(1) интегрирование площади под кривой для пика меченого TNF $\alpha$  на первом графике интенсивности сигнала в зависимости от времени элюирования при эксклюзионной

30 хроматографии;

(2) интегрирование площади под кривой для пика первого комплекса на первом графике;

(3) определение соотношения путем деления результата интегрирования из стадии

(2) на результат интегрирования из стадии (1); и

35 (4) умножение количества меченого TNF $\alpha$  на соотношение из стадии (3). В

родственном воплощении настоящим изобретением дополнительно предусмотрено, что детектирование на стадии (b)(ii) включает:

(1) интегрирование площади под кривой для пика меченого препарата против TNF $\alpha$  на втором графике интенсивности сигнала в зависимости от времени элюирования при

40 эксклюзионной хроматографии;

(2) интегрирование площади под кривой для пика второго комплекса на втором графике;

(3) определение соотношения путем деления результата интегрирования из стадии

(2) на результат интегрирования из стадии (1); и

45 (4) умножение количества меченого препарата против TNF $\alpha$  на соотношение из стадии (3).

В родственном воплощении настоящим изобретением дополнительно предусмотрено, что и первый, и второй образец являются образцами сыворотки. В другом родственном

воплощении настоящим изобретением дополнительно предусмотрено, что и первый, и второй образец берут у субъекта во время лечения препаратом против TNF $\alpha$ . В следующем родственном воплощении настоящим изобретением дополнительно предусмотрено, что детектирование на стадии (a)(ii) и/или стадии (b)(ii) включает

5 детектирование флуоресцентной метки.

В следующем воплощении настоящим изобретением предусмотрен способ оптимизации терапевтического количества препарата против TNF $\alpha$  у субъекта, получающего лечение препаратом против TNF $\alpha$ , который включает:

(a) определение эффективного количества препарата против TNF $\alpha$  в соответствии

10 со способом настоящего изобретения;

(b) сравнение эффективного количества препарата против TNF $\alpha$  с уровнем препарата против TNF $\alpha$ ; и

(c) определение последующей дозы препарата против TNF $\alpha$  для субъекта, исходя из сравнения на стадии (b), таким образом, оптимизируя терапевтическое количество

15 препарата против TNF $\alpha$ .

В родственном воплощении настоящим изобретением дополнительно предусмотрено повышение последующей дозы препарата против TNF $\alpha$ , если эффективное количество препарата против TNF $\alpha$  меньше, чем уровень препарата против TNF $\alpha$ . В родственном воплощении настоящим изобретением предусмотрено, что последующая доза препарата

20 против TNF $\alpha$  повышается таким образом, чтобы эффективное количество препарата против TNF $\alpha$  было примерно равным уровню препарата против TNF $\alpha$ .

В некоторых других воплощениях настоящим изобретением дополнительно предусмотрено, что препарат против TNF $\alpha$  выбирается из группы, состоящей из REMICADE<sup>TM</sup> (инфликсимаб), ENBREL<sup>TM</sup> (этанерцепт), HUMIRA<sup>TM</sup> (адалимумаб),

25 CIMZIA<sup>®</sup> (пертолизумаб-пегол) и их комбинаций.

В некоторых воплощениях препаратом против TNF $\alpha$  является инфликсимаб (REMICADE<sup>TM</sup>). В некоторых других воплощениях препаратом против TNF $\alpha$  является адалимумаб (HUMERA<sup>TM</sup>). В других воплощениях препаратом против TNF $\alpha$  является этанерцепт (ENBREL<sup>TM</sup>). В некоторых других воплощениях препаратом против TNF $\alpha$

30 является CIMZIA<sup>®</sup> (цертолизумаб-пегол). В других воплощениях меченный TNF $\alpha$  представляет собой меченный флуорофором TNF $\alpha$ . В некоторых других воплощениях детектируемый препарат против TNF $\alpha$  определяется количественно. В других воплощениях меченный комплекс элюируется первым, а за ним следует свободный меченный TNF $\alpha$ . В некоторых других воплощениях меченный комплекс элюируется

35 первым, а за ним следует свободное меченое антитело против TNF $\alpha$ . В некоторых воплощениях эксклюзионная хроматография представлена высокоэффективной жидкостной эксклюзионной хроматографией (SE-HPLC). В некоторых других воплощениях аутоантитела выбираются из числа человеческих против антител мыши (HAMA), человеческих против химерных антител (HACA), человеческих против

40 гуманизированных антител (HANA) и их комбинаций. В некоторых воплощениях детектируемые аутоантитела определяются количественно.

В следующем воплощении настоящим изобретением предусмотрен способ оптимизации лечения и/или снижения токсичности препарата против TNF $\alpha$  у субъекта, получающего лечение препаратом против TNF $\alpha$ , который включает:

45 (a) измерение уровня препарата против TNF $\alpha$  в первом образце от субъекта;

(b) измерение уровня аутоантител к препарату против TNF $\alpha$  во втором образце от субъекта; и

(c) определение последующего курса лечения для субъекта, исходя из уровня

препарата против TNF $\alpha$  и уровня аутоантител, таким образом, оптимизируя лечение и/или снижая токсичность препарата против TNF $\alpha$ .

В родственном воплощении последующий курс лечения включает введение

иммунодепрессивного средства вместе с препаратом против TNF $\alpha$ , если уровень

5 препарата против TNF $\alpha$  высокий, а уровень аутоантител - низкий. В другом родственном воплощении последующий курс лечения включает повышение уровня препарата против TNF $\alpha$  и совместное введение иммунодепрессивного средства, если уровень препарата против TNF $\alpha$  средний, а уровень аутоантител - низкий. В другом родственном

10 воплощении последующий курс лечения включает введение другого препарата против TNF $\alpha$ , если уровень препарата против TNF $\alpha$  средний и уровень аутоантител средний. В следующем родственном воплощении последующий курс лечения включает введение другого препарата против TNF $\alpha$ , если уровень препарата против TNF $\alpha$  низкий, а уровень аутоантител - высокий. В другом родственном воплощении вместо инфликсимаба (REMICADE<sup>TM</sup>) вводится адалимумаб (HUMIRA<sup>TM</sup>).

15 В некоторых воплощениях выражение "высокий уровень препарата против TNF $\alpha$ " означает уровень препарата от 10 до 100 нг/10 мкл, от 10 до 70 нг/10 мкл или от 10 до 50 нг/10 мкл. В других воплощениях выражение "высокий уровень препарата против TNF $\alpha$ " означает уровень препарата больше, чем 10,20, 30,40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 нг/10 мкл.

20 В некоторых воплощениях выражение "средний уровень препарата против TNF $\alpha$ " означает уровень препарата от 5,0 до 50 нг/10 мкл, от 5,0 до 30 нг/10 мкл, от 5,0 до 20 нг/10 мкл или от 5,0 до 10 нг/10 мкл. В других воплощениях выражение "средний уровень препарата против TNF $\alpha$ " означает уровень препарата в 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 нг/10 мкл.

25 В некоторых воплощениях выражение "низкий уровень препарата против TNF $\alpha$ " означает уровень препарата от 0 до 10 нг/10 мкл, от 0 до 8 нг/10 мкл или от 0 до 5 нг/10 мкл. В других воплощениях выражение "низкий уровень препарата против TNF $\alpha$ " означает уровень препарата меньше, чем 10, 9,0, 8,0, 7,0, 6,0, 5,0, 4,0, 3,0, 2,0, 1,0 или 0,5 нг/10 мкл.

30 Акроним "ADA" означает "антитела против препарата".

В некоторых воплощениях выражение "высокий уровень антител против препарата" означает уровень антител против препарата от 3,0 до 100 нг/10 мкл, от 3,0 до 50 нг/10 мкл, от 10 до 100 нг/10 мкл, от 10 до 50 нг/10 мкл или от 20 до 50 нг/10 мкл. В некоторых других воплощениях выражение "высокий уровень антител против препарата" означает

35 уровень антител больше, чем 10,20, 30,40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 нг/10 мкл.

В некоторых воплощениях выражение "средний уровень антител против препарата" означает уровень антител против препарата от 0,5 до 20 нг/10 мкл, от 0,5 до 10 нг/10 мкл, от 2,0 до 20 нг/10 мкл, от 2,0 до 10 нг/10 мкл, от 2,0 до 5,0 нг/10 мкл или от 2,0 до 5,0 нг/10 мкл.

40 В некоторых воплощениях выражение "низкий уровень антител против препарата" означает уровень антител против препарата от 0,0 до 5,0 нг/10 мкл, от 0,1 до 5,0 нг/10 мкл, от 0,0 до 2,0 нг/10 мкл, от 0,1 до 2,0 нг/10 мкл или от 0,5 до 2,0 нг/10 мкл. В других воплощениях выражение "низкий уровень антител против препарата" означает уровень антител меньше, чем 5,0, 4,0, 3,0,2,0, 1,0 или 0,5 нг/10 мкл.

45 В некоторых воплощениях способы настоящего изобретения дополнительно предусматривают, что препарат против TNF $\alpha$  измеряется способом, включающим:

(i) контактирование первого образца с некоторым количеством меченого TNF $\alpha$  с образованием первого комплекса, содержащего меченный TNF $\alpha$  и препарат против

TNF $\alpha$ ; и

(ii) детектирование первого комплекса методом эксклюзионной хроматографии, таким образом измеряя уровень препарата против TNF $\alpha$ .

В некоторых воплощениях способы настоящего изобретения дополнительно

5 предусматривают, что аутоантитела измеряются способом, включающим:

(i) контактирование второго образца с некоторым количеством меченого препарата против TNF $\alpha$  с образованием второго комплекса, содержащего меченный препарат против TNF $\alpha$  и аутоантитело; и

10 (ii) детектирование второго комплекса методом эксклюзионной хроматографии, таким образом измеряя уровень аутоантител.

В родственном воплощении способы настоящего изобретения дополнительно предусматривают, что препарат против TNF $\alpha$  выбирается из группы, состоящей из REMICADE<sup>TM</sup> (инфликсимаб), ENBREL<sup>TM</sup> (этанерцепт), HUMIRA<sup>TM</sup> (адалимумаб), CIMZIA<sup>®</sup> (цертолизумаб-пегол) и их комбинаций. В родственном воплощении способы

15 настоящего изобретения дополнительно предусматривают, что препаратом против TNF $\alpha$  является инфликсимаб (REMICADE<sup>TM</sup>). В некоторых других воплощениях препаратом против TNF $\alpha$  является адалимумаб (HUMIRA<sup>TM</sup>). В некоторых других воплощениях препаратом против TNF $\alpha$  является этанерцепт (ENBREL<sup>TM</sup>). В другом родственном воплощении способы настоящего изобретения дополнительно

20 предусматривают, что препаратом против TNF $\alpha$  является CIMZIA<sup>®</sup> (цертолизумаб-пегол). В другом родственном воплощении способы настоящего изобретения дополнительно предусматривают, что измеряемый препарат против TNF $\alpha$  определяется количественно. В другом родственном воплощении способы настоящего изобретения дополнительно предусматривают, что и первый, и второй образец представлены

25 сывороткой. В другом родственном воплощении способы настоящего изобретения дополнительно предусматривают, что и первый, и второй образец берут у субъекта во время лечения препаратом против TNF $\alpha$ . В другом родственном воплощении способы настоящего изобретения дополнительно предусматривают, что аутоантитело выбирается из числа человеческих против антител мыши (HAMA), человеческих против химерных

30 антител (HACA), человеческих против гуманизированных антител (HANA) и их комбинаций. В другом родственном воплощении способы настоящего изобретения дополнительно предусматривают, что детектируемые аутоантитела определяются количественно.

В некоторых воплощениях настоящим изобретением предусмотрен способ

35 определения наличия или уровня препарата против TNF $\alpha$  относительно внутреннего контроля в образце, содержащем или предположительно содержащем препарат против TNF $\alpha$ , который включает:

(a) контактирование некоторого количества меченого TNF $\alpha$  и некоторого количества внутреннего контроля с образцом с образованием комплекса меченого TNF $\alpha$  и препарата

40 против TNF $\alpha$ ;

(b) детектирование меченого TNF $\alpha$  и меченого внутреннего контроля методом эксклюзионной хроматографии;

45 (c) интегрирование площади под кривой для пика меченого TNF $\alpha$  на графике интенсивности сигнала в зависимости от времени элюирования при эксклюзионной хроматографии;

(d) интегрирование площади под кривой для пика меченого внутреннего контроля на графике интенсивности сигнала в зависимости от времени элюирования при эксклюзионной хроматографии;

(e) определение первого соотношения путем деления количества меченого TNF $\alpha$  на количество меченого внутреннего контроля;

(f) определение второго соотношения путем деления результата интегрирования из стадии (c) на результат интегрирования из стадии (d); и

5 (g) сравнение первого соотношения, определенного на стадии (e), со вторым соотношением, определенным на стадии (f), таким образом определяется наличие или уровень препарата против TNF $\alpha$  относительно внутреннего контроля.

В родственном воплощении настоящим изобретением дополнительно предусмотрено, что первое соотношение, определенное на стадии (e), составляет от 80:1 до 100:1. В

10 другом родственном воплощении настоящим изобретением дополнительно предусмотрено, что первое соотношение, определенное на стадии (e), составляет около 100:1. В родственном воплощении настоящим изобретением также предусмотрено, что меченный внутренний контроль представлен Biocytin-Alexa 488. В некоторых воплощениях количество меченого внутреннего контроля (например, Biocytin-Alexa 488) составляет

15 от 1 до 25 нг на 100 мкл анализируемого образца. В некоторых других воплощениях количество меченого внутреннего контроля (например, Biocytin-Alexa 488) составляет от 5 до 25 нг на 100 мкл, от 5 до 20 нг на 100 мкл, от 1 до 20 нг на 100 мкл, от 1 до 10 нг на 100 мкл или от 1 до 5 нг на 100 мкл анализируемого образца. В следующих воплощениях количество меченого внутреннего контроля (например, Biocytin-Alexa 488) составляет 1, 5, 10, 15, 20 или 25 нг на 100 мкл анализируемого образца.

20 В некоторых воплощениях настоящим изобретением предусмотрен способ оптимизации терапевтического количества препарата против TNF $\alpha$  у субъекта, получающего лечение препаратом против TNF $\alpha$ , который включает: определение последующей дозы препарата против TNF $\alpha$  для субъекта, исходя из сравнения первого 25 и второго соотношений в соответствии со способами настоящего изобретения, при этом оптимизируется терапевтическое количество препарата против TNF $\alpha$ . В родственном воплощении настоящим изобретением также предусмотрено, что способ дополнительно включает:

25 повышение последующей дозы препарата против TNF $\alpha$ , если первое соотношение составляет около 100:1, а второе соотношение меньше чем 95:1, при этом оптимизируется терапевтическое количество препарата против TNF $\alpha$ . В другом родственном воплощении настоящим изобретением дополнительно предусмотрено, что препарат против TNF $\alpha$  выбирается из группы, состоящей из REMICADE<sup>TM</sup> (инфликсимаб), ENBREL<sup>TM</sup> (этанерцепт), HUMIRA<sup>TM</sup> (адалимумаб), CIMZIA<sup>®</sup> (цертолизумаб-пегол) и их комбинаций.

30 В родственном воплощении настоящим изобретением дополнительно предусмотрено, что препаратом против TNF $\alpha$  является инфликсимаб (REMICADE<sup>TM</sup>). В родственном воплощении настоящим изобретением дополнительно предусмотрено, что препаратом против TNF $\alpha$  является адалимумаб (HUMIRA<sup>TM</sup>). В родственном воплощении настоящим изобретением дополнительно предусмотрено, что препаратом против TNF $\alpha$  является

35 этанерцепт (ENBREL<sup>TM</sup>). В родственном воплощении настоящим изобретением дополнительно предусмотрено, что препаратом против TNF $\alpha$  является CIMZIA<sup>®</sup> (цертолизумаб-пегол). В родственном воплощении настоящим изобретением дополнительно предусмотрено, что меченный TNF $\alpha$  представляет собой меченный флуорофором TNF $\alpha$ . В родственном воплощении настоящим изобретением также

40 предусмотрено, что детектируемый препарат против TNF $\alpha$  определяется количественно. В родственном воплощении настоящим изобретением дополнительно предусмотрено, что меченный комплекс элюируется первым, а за ним следует свободный меченный TNF $\alpha$ . В родственном воплощении настоящим изобретением дополнительно предусмотрено,

что образец представлен сывороткой. В родственном воплощении настоящим изобретением также предусмотрено, что образец берут у субъекта, получающего лечение препаратом против TNF $\alpha$ . В родственном воплощении настоящим изобретением дополнительно предусмотрено, что эксклюзионная хроматография представлена

5 высокоэффективной жидкостной эксклюзионной хроматографией (SE-HPLC).

В некоторых воплощениях настоящим изобретением предусмотрен способ определения наличия или уровня аутоантител к препарату против TNF $\alpha$  относительно внутреннего контроля в образце, содержащем или предположительно содержащем аутоантитела, который включает:

- 10 (a) контактирование некоторого количества меченого препарата против TNF $\alpha$  и некоторого количества внутреннего контроля с образцом с образованием комплекса меченого препарата против TNF $\alpha$  и аутоантитела;
- 15 (b) детектирование меченого препарата против TNF $\alpha$  и меченого внутреннего контроля методом эксклюзионной хроматографии;
- (c) интегрирование площади под кривой для пика меченого препарата против TNF $\alpha$  на графике интенсивности сигнала в зависимости от времени элюирования при эксклюзионной хроматографии;
- (d) интегрирование площади под кривой для пика меченого внутреннего контроля на графике интенсивности сигнала в зависимости от времени элюирования при
- 20 эксклюзионной хроматографии;
- (e) определение первого соотношения путем деления количества меченого препарата против TNF $\alpha$  на количество меченого внутреннего контроля;
- (f) определение второго соотношения путем деления результата интегрирования из стадии (c) на результат интегрирования из стадии (d); и
- 25 (g) сравнение первого соотношения, определенного на стадии (e), со вторым соотношением, определенным на стадии (f), таким образом определяя наличие или уровень аутоантител относительно внутреннего контроля.

В родственном воплощении первое соотношение, определенное на стадии (e), составляет от 80:1 до 100:1. В другом родственном воплощении первое соотношение, определенное на стадии (e), составляет около 100:1. В родственном воплощении меченый внутренний контроль представлен Biocytin-Alexa 488. В некоторых воплощениях количество меченого внутреннего контроля (например, Biocytin-Alexa 488) составляет от 50 до 200 пг на 100 мкл анализируемого образца. В некоторых других воплощениях количество меченого внутреннего контроля (например, Biocytin-Alexa 488) составляет от 100 до 200 пг на 100 мкл, от 150 до 200 пг на 100 мкл, от 50 до 150 пг на 100 мкл или от 50 до 100 пг на 100 мкл анализируемого образца. В следующих воплощениях количество меченого внутреннего контроля (например, Biocytin-Alexa 488) составляет 50, 75, 100, 125, 150, 175 или 200 пг на 100 мкл анализируемого образца.

В родственном воплощении препарат против TNF $\alpha$  выбирается из группы, состоящей из REMICADE<sup>TM</sup> (инфликсимаб), ENBREL<sup>TM</sup> (этанерцепт), HUMIRA<sup>TM</sup> (адалимумаб), CIMZIA<sup>®</sup> (цертолизумаб-пегол) и их комбинаций. В родственном воплощении препаратом против TNF $\alpha$  является инфликсимаб (REMICADE<sup>TM</sup>). В родственном воплощении препаратом против TNF $\alpha$  является адалимумаб (HUMIRA<sup>TM</sup>). В родственном воплощении препаратом против TNF $\alpha$  является этанерцепт (ENBREL<sup>TM</sup>). В родственном воплощении препаратом против TNF $\alpha$  является CIMZIA (цертолизумаб-пегол). В родственном воплощении детектируемый препарат против TNF $\alpha$  определяется количественно. В родственном воплощении меченый комплекс элюируется первым, а за ним следует свободное меченое антитело против TNF $\alpha$ . В родственном воплощении

образец представлен сывороткой. В родственном воплощении образец берут у субъекта, получающего лечение препаратом против TNF $\alpha$ . В родственном воплощении эксклюзионная хроматография представлена высокоеффективной жидкостной эксклюзионной хроматографией (SE-HPLC). В родственном воплощении аутоантитела

5 выбираются из группы, состоящей из человеческих против антител мыши (HAMA), человеческих против химерных антител (HACA), человеческих против гуманизированных антител (HANA) и их комбинаций. В родственном воплощении детектируемые аутоантитела определяются количественно.

В родственном воплощении способы настоящего изобретения дополнительно

10 предусматривают определение последующего курса лечения. Последующий курс лечения включает введение иммунодепрессивного средства вместе с препаратом против TNF $\alpha$ , если уровень препарата против TNF $\alpha$  высокий, а уровень аутоантител - низкий. В другом родственном воплощении последующий курс лечения включает повышение уровня препарата против TNF $\alpha$  и совместное введение иммунодепрессивного средства, если

15 уровень препарата против TNF $\alpha$  средний, а уровень аутоантител - низкий. В другом родственном воплощении последующий курс лечения включает введение другого препарата против TNF $\alpha$ , если уровень препарата против TNF $\alpha$  средний и уровень аутоантител средний. В следующем родственном воплощении последующий курс лечения включает введение другого препарата против TNF $\alpha$ , если уровень препарата

20 против TNF $\alpha$  низкий, а уровень аутоантител - высокий. В другом родственном воплощении вместо инфликсимаба (REMICADE<sup>TM</sup>) вводится адалимумаб (HUMIRA<sup>TM</sup>).

В некоторых воплощениях настоящим изобретением предусмотрен набор для измерения наличия или уровня препарата против TNF $\alpha$  и наличия или уровня аутоантител к препаратуре против TNF $\alpha$  в образце, который включает:

25 (a) первый измерительный субстрат, содержащий некоторое количество меченого TNF $\alpha$ ;

(b) второй измерительный субстрат, содержащий некоторое количество меченого препарата против TNF $\alpha$ ;

(c) необязательно третий измерительный субстрат, содержащий некоторое количество меченого TNF $\alpha$  и некоторое количество меченого внутреннего контроля;

30 (d) необязательно четвертый измерительный субстрат, содержащий некоторое количество меченого препарата против TNF $\alpha$  и некоторое количество меченого внутреннего контроля;

(e) необязательно средство для экстрагирования образца от субъекта; и

35 (f) необязательно брошюру с инструкциями по применению набора. В родственном воплощении субстрат включает какой-либо материал, на который можно наносить химикаты настоящего изобретения и который включает, без ограничения, нитроцеллюлозу, силикагель, субстраты для тонкослойной хроматографии, деревянные палочки, целлюлозу, хлопок, полиэтилен, их комбинации и др. В другом родственном

40 воплощении химикаты настоящего изобретения могут наноситься на вышеприведенные материалы в виде упорядоченного множества или матрицы.

В родственном воплощении набор дополнительно включает средство для детектирования меченого TNF $\alpha$ , меченого препарата против TNF $\alpha$  и/или меченого внутреннего контроля. В родственном воплощении набор дополнительно включает

45 средство для детектирования, включая, без ограничения, детектирование флуоресцентной метки, детектирование УФ излучения или обработку йодом. В родственном воплощении набор дополнительно включает прибор для эксклюзионной высокоеффективной жидкостной хроматографии (SE-HPLC). В родственном воплощении первый, второй,

третий и четвертый измерительный субстрат выбираются из нитроцеллюлозы, силикагеля и среды для эксклюзионной хроматографии. В родственном воплощении препарат против TNF $\alpha$  выбирается из группы, состоящей из REMICADE<sup>TM</sup> (инфликсимаб), ENBREL<sup>TM</sup> (этанерцепт), HUMIRA<sup>TM</sup> (адалимумаб), CIMZIA<sup>®</sup> (цертолизумаб-пегол) и 5 их комбинаций. В родственном воплощении меченный TNF $\alpha$  представляет собой меченный флуорофором TNF $\alpha$ . В родственном воплощении образец представлен сывороткой. В родственном воплощении образец берут у субъекта, получающего лечение препаратом против TNF $\alpha$ . В родственном воплощении аутоантитела выбираются из группы, состоящей из человеческих против антител мыши (НАМА), человеческих против 10 химерных антител (НАСА), человеческих против гуманизированных антител (НАНА) и их комбинаций.

IV. Физиологические диапазоны и уровни препаратов, относящихся к настоящему изобретению

Терапевтически эффективный уровень REMICADE<sup>TM</sup> у пациентов, получающих

15 REMICADE<sup>TM</sup>, находится в пределах от 1 до 10 мг REMICADE<sup>TM</sup> на кг веса тела пациента. В некоторых воплощениях терапевтически эффективный уровень REMICADE<sup>TM</sup> находится в пределах от 3 до 8 мг REMICADE<sup>TM</sup> на кг веса тела пациента. В некоторых воплощениях терапевтически эффективный уровень REMICADE<sup>TM</sup> составляет около 5 мг REMICADE<sup>TM</sup> на кг веса тела пациента.

20 Типичная доза REMICADE<sup>TM</sup> (инфликсимаб) находится в пределах от 0,05 мкг до 80 мкг на мл. В некоторых воплощениях доза REMICADE<sup>TM</sup> находится в пределах от 0,05 мкг до 50 мкг на мл. В некоторых других воплощениях доза REMICADE<sup>TM</sup> составляет от 0,05 мкг до 30 мкг на мл. В некоторых воплощениях доза REMICADE<sup>TM</sup> составляет около 30 мкг на мл. В некоторых других воплощениях доза REMICADE<sup>TM</sup> составляет 25 около 50 мкг на мл.

Терапевтически эффективный уровень HUMIRA<sup>TM</sup> у пациентов, получающих HUMIRA<sup>TM</sup>, находится в пределах от 0,1 до 10 мг HUMIRA<sup>TM</sup> на кг веса тела пациента. В некоторых воплощениях терапевтически эффективный уровень HUMIRA<sup>TM</sup> находится в пределах от 0,1 до 8 мг HUMIRA<sup>TM</sup> на кг веса тела пациента. В некоторых других 30 воплощениях терапевтически эффективный уровень HUMIRA<sup>TM</sup> составляет около 1 мг HUMIRA<sup>TM</sup> на кг веса тела пациента. В некоторых воплощениях терапевтически эффективный уровень HUMIRA<sup>TM</sup> составляет около 0,8 мг HUMIRA<sup>TM</sup> на кг веса тела пациента.

Типичная доза HUMIRA<sup>TM</sup> находится в пределах от 0,05 мкг до 150 мкг на мл. В 35 некоторых воплощениях доза HUMIRA<sup>TM</sup> находится в пределах от 0,05 мкг до 100 мкг на мл. В некоторых других воплощениях доза HUMIRA<sup>TM</sup> составляет от 0,05 мкг до 50 мкг на мл. В некоторых воплощениях доза HUMIRA<sup>TM</sup> составляет около 30 мкг на мл. В некоторых других воплощениях доза HUMIRA<sup>TM</sup> составляет около 32 мкг на мл. В некоторых других воплощениях доза HUMIRA<sup>TM</sup> составляет около 50 мкг на мл.

40 V. Типичные заболевания и терапевтические антитела для их лечения В некоторых воплощениях настоящего изобретения могут применяться терапевтические моноклональные антитела. В табл.1 представлен типичный список терапевтических моноклональных антител, которые либо уже утверждены, либо находятся в разработке. Исчерпывающий список лекарств на основе моноклональных антител, находящихся 45 на клинических испытаниях, и утвержденных препаратов, приведен в Отчете PhRMA за 2006 г., озаглавленном '418 Biotechnology Medicines in Testing Promise to Bolster the Arsenal Against Disease'.

Особенно предпочтительными терапевтическими антителами являются, без

ограничения, моноклональные антитела против TNF $\alpha$ , такие, например, как (1) Remicade<sup>TM</sup> (инфликсимаб) - химерное моноклональное антитело мыши-человека против TNF $\alpha$  типа IgG1-каппа, (2) Enbrel<sup>TM</sup> (этанерцепт) - слитый белок рецептора-2 TNF человека и IgG1 человека и (3) Humira<sup>TM</sup> (адалимумаб) - полностью человеческое моноклональное 5 антитело против TNF $\alpha$  типа IgG1-каппа. Еще две конструкции антител против TNF $\alpha$  оказались перспективными в клинических испытаниях фазы III на пациентах с такими же заболеваниями: (4) Cimzia<sup>TM</sup> CDP870 (цертолизумаб-пегол) -ПЭГилированный Fab-фрагмент гуманизированного моноклонального антитела против TNF $\alpha$  и (5) CINTO 148 10 (голимлумаб) - полностью человеческое моноклональное антитело против TNF $\alpha$  типа IgG1-каппа.

Предпочтительным классом терапевтических антител являются одноцепочечные моноклональные антитела против TNF $\alpha$ , применяемые при лечении разнообразных аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, подростковый идиопатический артрит, анкилозирующий спондилит (болезнь Бехтерева), 15 воспалительные заболевания кишечника (болезнь Крона и язвенный колит), тяжелый псориаз, хроническийuveит, тяжелый саркоидоз и грануломатоз Вегенера.

Наряду с применимостью при определении биодоступности/концентрации антител против TNF $\alpha$ , настоящее изобретение также подходит для применения при определении биодоступности/концентрации любых применяемых терапевтических антител внутри 20 организма, например, для терапевтических или диагностических целей. В приведенной ниже табл.1 также представлен список медицинских показателей, коррелирующих с различными терапевтическими моноклональными антителами, применяемыми *in vivo*.

В других воплощениях способы настоящего изобретения подходят для применения при определении наличия или уровня концентрации аутоантител к терапевтическим 25 антителам.

Таким образом, настоящее изобретение может применяться в способах оптимизации терапии, если лечение (или диагностика) включает введение субъекту терапевтических антител. Способы могут применяться для оптимизации лечения (или диагностики) одного или нескольких приведенных здесь заболеваний, включая одно или несколько 30 из следующих:

инфекционные заболевания, как-то респираторно-синцитиальный вирус (RSV), HIV, сибирская язва, кандидоз, стафилококковые инфекции, гепатит С;

автоиммунные заболевания, как-то ревматоидный артрит, болезнь Крона, В-клеточная неходжкинская лимфома, рассеянный склероз, SLE, анкилозирующий 35 спондилит, волчанка, псориатический артрит, эритема;

воспалительные заболевания, как-то ревматоидный артрит (RA), подростковый идиопатический артрит, анкилозирующий спондилит (болезнь Бехтерева), воспалительные заболевания кишечника (болезнь Крона и язвенный колит), тяжелый 40 псориаз, хроническийuveит, саркоидоз, грануломатоз Вегенера и другие заболевания с воспалением в качестве главного признака;

заболевания крови, как-то сепсис, септический шок, пароксизмальная ночная гемоглобинурия и гемолитический уремический синдром;

рак, как-то колоректальный рак, неходжкинская лимфома, В-клеточная хроническая лимфоцитарная лейкемия, анапластическая крупноклеточная лимфома, 45 плоскоклеточный рак головы и шеи, суперэкспрессирующий HER2 метастатический рак молочной железы, острая миелоидная лейкемия, рак простаты (например, аденокарцинома), мелкоклеточный рак легких, рак щитовидной железы, злокачественная меланома, твердые опухоли, рак молочной железы, ранняя стадия НЕК2-

- положительного рака молочной железы, неплоскоклеточный рак легких (NSCLC), AML, волосковоклеточная лейкемия, нейробластома, рак почек, рак мозга, миелома, множественная миелома, метастазы в костях, рак поджелудочной железы, SCLC, NSCLC, рак головы и шеи, гематологические и твердые опухоли, запущенные твердые опухоли,
- 5 желудочно-кишечный рак, рак поджелудочной железы, кожная Т-клеточная лимфома, некожная Т-клеточная лимфома, CLL, рак яичников, простаты, почечноклеточный рак, опухоли, экспрессирующие мезотелин, глиобластома, метастатический рак поджелудочной железы, гематологические злокачественности, кожная анапластическая крупноклеточная лимфома, AML, миелодиспластические синдромы;
- 10 сердечно-сосудистые заболевания, как-то атеросклероз, острый инфаркт миокарда, сердечно-легочный шунт, стенокардия;
- метаболические заболевания, как-то диабет типа сахарного диабета I типа;
- заболевания пищеварительной системы, как-то болезнь Крона, болезнь C.difficile, язвенный колит;
- 15 глазные заболевания, как-тоuveit;
- генетические заболевания, как-то пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH);
- неврологические заболевания, как-то боли при остеоартрите и болезнь Альцгеймера;
- заболевания дыхательных путей, как-то респираторные заболевания, астма,
- хронические застойные легочные заболевания (COPD), носовой полипоз,
- 20 педиатрическая астма;
- кожные заболевания, как-то псориаз, в том числе хронический умеренный и тяжелый чешуйчатый псориаз;
- отторжение трансплантатов, как-то острое отторжение почечных трансплантатов,
- против отторжения трансплантатов сердца и печени, профилактика отторжения
- 25 почечных трансплантатов, профилактика острого отторжения почечных трансплантатов;
- другие заболевания, как-то диагностика аппендицита, воспаление почек,
- постклиматический остеопороз (поражение костей), гиперэозинофильный синдром,
- эозинофильный эзофагит и аллергия на арахис.
- 30 В одном воплощении заболевание выбирается из одной или нескольких вышеуказанных групп конкретных заболеваний.

Таблица 1.

## Терапевтические и диагностические моноклональные антитела

Название препарата	Фирма	Назначение/показание
Инфекционные заболевания		
Synagis® (паливизумаб)	MedImmune	профилактика респира-торно-синцитиального вируса (RSV)
MAb против HIV-1	Polymun Scientific Vienna, Austria	лечение ВИЧ-инфекции
MAb CCR5	Human Genome Sciences Rockville, MD	ВИЧ-инфекция
Cytolin® (mAb против CD8)	CytoDyn Santa Fe, NM	ВИЧ-инфекция
NM01	SRD Pharmaceuticals Los Angeles, CA	ВИЧ-инфекция
PRO 140	Progenies Pharmaceuticals Tarrytown, NY	ВИЧ-инфекция
TNX	Tanox MAb	ВИЧ-инфекция II фазы
ABthrax™ (раксибакумаб)	Human Genome Sciences	сибирская язва
Anthim™ (ETI-204) (орфанный препарат)	Elusys Therapeutics	сибирская язва
MAb против hsp90	NeuTec Pharma	Кандидоз
MAb против staph	MedImmune	профилактика стафилококковых инфекций
Aurexis (тефебазумаб)	Inhibitex	профилактика и лечение бактеремии S. aureus
Бавитуксимаб	Peregrine Pharmaceuticals	лечение гепатита C
MDX-1303	Medarex PharmAthene	сибирская язва

Название препарата	Фирма	Назначение/показание
Numax™ (мотавизумаб)	MedImmune	RSV
Tarvacin™ (бавитуксимаб)	Peregrine Pharmaceuticals	гепатит С
XTL 6865	XTL Biopharmaceuticals	гепатит С
Аутоиммунные заболевания		
Humira® (адалимумаб)	Abbott Laboratories	ревматоидный артрит
Remicade™ (инфликсимаб)	Centocor	болезнь Крона, ревматоидный артрит
Rituxan® (ритуксимаб)	Genentech Biogen Idee	В-клеточная неходжкин-ская лимфома, рецидивы после лечения ритуксаном; ревматоидный артрит
Tysabri® (натализумаб)	Biogen Idee	множественный склероз
ART 874	Abbott Laboratories	множественный склероз
Actemra	Roche	ревматоидный артрит
AME527	Applied Molecular	ревматоидный артрит
AMG108	Amgen	ревматоидный артрит
AMG714	Amgen	ревматоидный артрит
MAb против CD 16	MacroGenics	иммунологическая тромбоцитопения
CNTO 1275	Centocor Horsham, PA	множественный склероз
Даклизумаб (mAb против CD25)	PDL BioPharma Fremont, CA; Biogen Idee Cambridge, MA	множественный склероз (также см. респираторные)
AMG162 (деносумаб)	Amgen Thousand Oaks, CA	ревматоидный артрит
ETI-201	Elusys Therapeutics Pine Brook, NJ	SLE
Голимумаб	Centocor Horsham, PA	ревматоидный артрит
HuMax-CD20 (офтатумумаб)	Genmab Princeton, NJ	ревматоидный артрит
Humira® (адалимумаб)	Abbott Laboratories	анкилозирующий спондилит; детский ревматоидный артрит
HuZAF™ (фонтолизумаб)	PDL BioPharma Fremont, CA; Biogen Idee Cambridge, MA	ревматоидный артрит
IMMU-106 (hCD20)	Immunomedics Morris Plains, NJ	аутоиммунные заболевания
LymphoStat-B™ (белимумаб)	Human Genome Sciences Rockville, MD	ревматоидный артрит, SLE

Название препарата	Фирма	Назначение/показание
MEDI-545 (MDX-1103)	Medarex Princeton, NJ; MedImmune Gaithersburg, MD	Волчанка
MLN 1202	Millennium Pharmaceuticals Cambridge, MA	множественный склероз
R1594 (окрелизумаб) (2-й против CD20)	Genentech South San Francisco, CA; Biogen Idee Cambridge, MA; Roche Nutley, NJ	ревматоидный артрит
OKT3-gamma-I	Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development Raritan, NJ	псориатический артрит
Rituxan® (ритуксимаб)	Genentech South San Francisco, CA; Biogen Idee Cambridge, MA	ревматоидный артрит (неподдающийся лечению DMARD), волчанка, первичный прогрессирующий множественный склероз, SLE (также см. рак), ремиттирующий множественный склероз
TRX1 (анти-C04)	TolerRx Cambridge, MA	кожная красная волчанка
Заболевания крови		
ReoPro®	Centocor	против тромбоцитов: предотвращает тромбы
Абциксимаб	Eli Lilly	(PTCA), стенокардия (PTCA)
Уртоксазумаб	Teijin Pharma	гемолитическая уремия
Афелимомаб	Abbot Laboratories	сепсис, септический шок
Экулизумаб	Alexion Pharmaceuticals	пароксизмальная ночная гемоглобинурия
Раковые заболевания		
Avastin™ (бевацизумаб)	Genentech	метастатический колоректальный рак
Bevaxag® (тоситумомаб, <sup>131</sup> I-тоситумомаб)	GlaxoSmithKline	неходжкинская лимфома
Campath® (алемтузумаб)	Berlex Laboratories Genzyme	В-клеточная хроническая лимфоцитарная лейкемия
Erbitux™ (цетуксимаб)	Bristol-Myers Squibb Medarex	колоректальный рак, плоскоклеточный рак головы и шеи
Herceptm® (трастузумаб)	Genentech	лечение суперэкспрес-сирующего HER2 метастатического рака молочной железы

Название препарата	Фирма	Назначение/показание
--------------------	-------	----------------------

	Mylotarg™ (гемтузумаб, озогамицин)	Wyeth	острая миелоидная лейкемия
	OncoScint® CR/OV (сатумомаб, пендетид)	CYTOGEN	Выявление, определение стадии и мониторинг колоректального рака
	ProstaScint® (капромаб, пентетат)®	CYTOGEN	выявление и мониторинг аденокарциномы простаты
5	Rituxan (ритиксимаб)	Genentech Biogen Idee	В-клеточная неходжкин-ская лимфома, рецидивы после лечения ритуксном
	Verluma® (нолетумомаб)	DuPont Pharmaceuticals	выявление мелкоклеточного рака легких
	Zevalin™ (ибритумомаб, тууксантан)	IDFC Pharmaceuticals	неходжкинская лимфома
	1311huA33	Life Science Pharmaceuticals Greenwich, CT	колоректальный рак
	1D09C3	GPC Biotech Waltham, MA	рефрактерная В-клеточная лимфома
10	AGS PSCA MAb	Agensys, Santa Monica, CA; Merck, Whitehouse Station, NJ	рак простаты
	AMG102	Amgen, Thousand Oaks, CA	Рак
	AMG479	Amgen, Thousand Oaks, CA	Рак
	AMG623	Amgen Thousand Oaks, CA	В-клеточная хроническая лимфоцитарная лейкемия (CLL) (также см. аутоиммунные)
	AMG655	Amgen, Thousand Oaks, CA	Рак
15	AMG706	Amgen Thousand Oaks, CA	устойчивый к иматинибу GIST, запущенный рак щитовидной железы
	AMG706	Amgen Thousand Oaks, CA	устойчивый к иматинибу GIST, запущенный рак щитовидной железы
	MAb анти-CB23	Biogen Idee Cambridge, MA	CLL
	MAb анти-C080	Biogen Idee Cambridge, MA	неходжкинская В-клеточная лимфома
	антидиотипическая противораковая вакцина	Viventia Biotech Toronto, Ontario	злокачественная меланома
20	MAb против лимфотоксина бета-рецепторов	Biogen Idee Cambridge, MA	твердые опухоли
	MAb против PEM	Somanta Pharmaceuticals Irvine, CA	Рак
	против иммунотоксина Tac(Fv)-PE38	National Cancer Institute Bethesda, MD	лейкемия, лимфома

Название препарата	Фирма	Назначение/показание
Avastin® (бевацизумаб)	Genentech South San Francisco, CA	рецидивы метастатического колоректального рака, первичный рак молочной железы, неплоскоклеточный рак легких (NSCLC)
AVE 9633 (нагруженное майтансином mAb против CD33)	Sanofi Aventis Bridgewater, NJ	AML
Бавитуксимаб	Peregrine Pharmaceuticals Tustin, CA	твердые опухоли (также см. инфекционные)
CAT 3888	Cambridge Antibody Technology	волосатоклеточная лейкемия
Химерные mAb	National Cancer Institute	нейробластома
CNTO 328	Centocor	рак почек
Cotara™	Peregrine Pharmaceuticals	рак мозга
Биватузумаб	Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals Ridgefield, CT	Рак
CP-751,871 CS 1008	Pfizer Daiichi Sankyo Pharma Development Parsippany, NJ	множественная миелома
BrevaRex™ иммунотерапия на основе антител	ViRex Edmonton, Alberta	рак молочной железы, множественная миелома
Деносумаб	Amgen	остеопороз при гормональной абляционной терапии рака молочной железы или простаты, увеличение срока жизни без костных метастазов (также см. аутоиммунные, другие)
Экромексимаб	Kyowa Hakko USA	злокачественная меланома
EMD 273063	EMD Lexigen	твердые опухоли, злокачественная меланома, нейробластома, SCLC
Эрбитукс™	Bristol Myers Squibb	рак головы/шеи, поджелудочной железы, NSCLC, колоректальный рак
GMK	Progenies Pharmaceuticals	профилактика рецидива после хирургического удаления первичной меланомы у пациентов с высоким риском
Campath® (алемтузумаб)	National Cancer Institute Bethesda, MD; Berlex Laboratories Montville, NJ	лейкемия, лимфома

Название препарата	Фирма	Назначение/показание
Herceptin® (трастузумаб)	Genentech South San Francisco, CA	ранняя стадия HER2-положительного рака молочной железы, метастатический HER2-положи-

		тельный рак молочной железы - в комбинации с Taxotere®
5	HGS-ETR1	Human Genome Sciences Rockville, MD
	HGS ETR2 (мапатумумаб)	Human Genome Sciences Rockville, MD
	HGS-TR2J	Human Genome Sciences Rockville, MD
	HuC242-DM4	ImmunoGen Cambridge, MA
	HuMax-CD4 (занолимумаб)	Genmab Princeton, NJ; Serono Rockland, MA
	HuMax CD20 (офтатумумаб)	Genmab Princeton, NJ
	HuMax-EGFr	Genmab Princeton, NJ
10	huN901-DMI	ImmunoGen Cambridge, MA
	MDX (ипилимумаб)	Bristol-Myers Squibb Medarex, Princeton
	КонъюгатM195-висмут213	Actinium Pharmaceuticals Florham Park, NJ
15	M200 (волоциксимаб)	PDL BioPharma, Fremont, CA Biogen Idee, Cambridge, MA
	MAbHeFi-1	National Cancer Institute Bethesda, MD
	MDX-060 (иратумумаб)	Medarex Princeton, NJ
	MDX-070	Medarex, Princeton, NJ
	MDX-214	Medarex, Princeton, NJ

20

Название препарата	Фирма	Назначение/показание
MEDI-507 сиплизумаб MEDI-522	MedImmune Gaithersburg, MD; National Cancer Institute Bethesda, MD; MedImmune Gaithersburg, MD	T-клеточная лимфома, меланома, рак простаты, твердые опухоли
MORAb 003	Morphotek Exton, PA	рак яичников
MORAb 009	Morphotek Exton, PA	мезотелин-экспрессирующие опухоли
Нейрадиаб	Bradmer Pharmaceuticals Louisville, KY	gliобластома
Нимотузумаб (орфанный препарат) Окрелизумаб (2-й анти-CB20) (R1594)	YM Biosciences Mississauga, Ontario; Genentech South San Francisco, CA; Biogen Idee, Cambridge, MA; Roche, Nutley, NJ	метастатический рак поджелудочной железы, NSCLC, гематологические злокачественности (также см. аутоиммунные)
Omnitarg™ (пертузумаб)	Genentech South San Francisco, CA	рак яичников
OvaRex® (ореговомаб)	ViRexx MAb Edmonton, Alberta	рак яичников
PAM 4	Merck Whitehouse Station, NJ	рак поджелудочной железы
Панитумумаб (rHuMAb EGFr)	Abgenix	колоректальный рак
Poleukin® PSMA	Chiron, Emeryville, CA; Progenies Pharmaceuticals Tarrytown, NY	неоджкинская лимфома, рак простаты
R1550RadioTheraCIM	Roche, Nutley, NJ YM BioSciences Mississauga, Ontario	метастатический рак молочной железы глиома
RAV12	Raven Biotechnologies South San Francisco, CA	Рак
Renearex® G250	Wilex Miulich, Germany	рак почек
Rituxan® (ритуксимаб)	Genentech South San Francisco, CA Biogen Idee Cambridge, MA	вводное лечение хронической неоджкинской лимфомы (также см. аутоиммунные) рефракторная CLL
SGN30 (орфанный препарат)	Seattle Genetics Bothell, WA	кожная анапластическая крупноклеточная лимфома, системная анапластическая крупноклеточная лимфома, болезнь Ходжкина
SGN-33 (линтузумаб) SGN-40	Seattle Genetics Bothell, WA	AML, миелодисплас-тические синдромы, CLL, множественная миелома, неоджкинская лимфома

40

Название препарата	Фирма	Назначение/показание
Сибротуртунаб	Life Science Pharmaceuticals Greenwich, CT	колоректальный рак, рак головы и шеи, рак легких
45 Tarvacin™ (бавитуксимаб)	Peregrine Pharmaceuticals Tustin, CA	тврдые опухоли (также см. инфекционные)
Тицилимумаб	Pfizer New York, NY	метастатическая меланома, рак простаты
TNX-650 Zevalin™ ибритумомаб. тиуксантан	Tanox, Houston, TX National Cancer Institute Bethesda, MD Biogen	болезнь Ходжкина, лейкемия, лимфома, неоджкинская лимфома
Сердечно-сосудистые заболевания		

5	MLN 1202	Millennium Pharmaceuticals Cambridge, MA	атеросклероз (также см. аутоиммунные)
	Пекселизумаб	Alexion Pharmaceuticals Cheshire, CT; Procter & Gamble Pharmaceuticals, Mason, OH	острый инфаркт миокарда, сердечно-легочный шунт
	Диабет и родственные ему заболевания		
	МАb анти-CB3	MacroGenics, Rockville, MD	сахарный диабет 1-го типа
	ОКТ3-гамма-1	Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development	сахарный диабет 1-го типа
	TRX4 (анти-CB3)	TolerRx Cambridge, MA	сахарный диабет 1-го типа
	Заболевания пищеварительной системы		
	Remicade™ (инфликсимаб)	Centocor	болезнь Крона
	ABT874	Abbott Laboratories Abbott Park, IL	болезнь Крона (также см. аутоиммунные)
	CNTO 1275	Centocor Horsham, PA	болезнь Крона, фаза II (также см. аутоиммунные, кожные)
10	Humira® (адалимумаб) MDX-066 (CDA-1)	Abbott Laboratories Abbott Park, IL; Medarex Princeton, NJ	болезнь Крона, фаза III (также см. аутоиммунные, кожные) болезнь C.difficile
	MDX-1100	Millennium Pharmaceuticals Cambridge, MA	язвенный колит
	Nuvion® (висилизумаб)	PDT BioPharma Fremont, CA	рефракторный к стероидам язвенный колит, болезнь Крона
	Tysabri® (натализумаб)	Biogen Idee Cambridge, MA	болезнь Крона
	Глазные заболевания		
	Голимумаб	Centocor Horsham, PA	uveit (также см. аутоиммунные)
	Генетические заболевания		

	Название препарата	Фирма	Назначение/показание
20	Soliris™ (экулизумаб) (орфанный препарат)	Alexion Pharmaceuticals Cheshire, CT	пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH)
Неврологические заболевания			
	RN624	Rinat Neuroscience South San Francisco, CA	боли при остеоартрите
	RN1219	Rinat Neuroscience South San Francisco, CA	болезнь Альцгеймера
Респираторные заболевания			
25	ABN912	Novartis Pharmaceuticals East Hanover, NJ	астма, хронические застойные легочные заболевания (COPD)
	ABX-IL8	Amgen Thousand Oaks, CA	COPD
	AMG317	Amgen Thousand Oaks, CA	Астма
	Даклизумаб (mAb анти-CB25)	Protein Design Labs Fremont, CA; Roche, Nutley, NJ	астма (также см. аутоиммунные)
30	MEDI-528 (mAb анти-TB-9)	MedImmune Gaithersburg, MD	Астма
	Меполизумаб (mAb анти-TB5)	G 1 axoSmithKline Philadelphia, PA Rsch. Triangle Park, NC	астма и носовой полипоз (также см. другие)
	TNX-832	Tanox Houston, TX	респираторные заболевания
	Xolair® омализумаб	Genentech South San Francisco, CA; Novartis Pharmaceuticals	педиатрическая астма (также см. другие)
	Кожные заболевания		
35	Raptiva® эфализумаб CNT01275	Genentech XOMA Centocor	хронический умеренный и тяжелый чешуйчатый псориаз (также см. аутоиммунные, пищеварительные)
	Humira® (адалимумаб)	Abbott Laboratories	псориаз (также см. аутоиммунные, пищеварительные)
	TRX4	TolerRx	псориаз (также см. диабет)
Трансплантация			
40	Orthoclone OKT® 3 (муромонаб-СО3)	Ortho Biotech	острое отторжение почечных трансплантатов, против отторжения трансплантатов сердца и печени
	Simulect® басиликсимаб	Novartis Pharmaceuticals	профилактика отторжения почечных трансплантатов

	Название препарата	Фирма	Назначение/показание
45	Zenapax® даклизумаб ОКТ3-гамма-1	Roche Protein Design Labs Johnson & Johnson	профилактика острого отторжения почечных трансплантатов, против отторжения трансплантатов сердца и печени (также см. аутоиммунные, диабет)
Другие			
	NeuroSpec™ технечий 99 т фанолесомаб	Palatin Technologies	диагностика аппендицита
	CR 0002	CuraGen	воспаление почек

Деносумаб (AMG 162)	Amgen	постклиматический остеопороз (также см. аутоиммунные и раковые)
Меполизумаб (тАЬ анти-1b5)	GlaxoSmithKline	гиперэозинофильный синдром, эозинофильный эзофагит (также см. респираторные)
Xolair® (омализумаб)	Genentech Tanox	аллергия на арахис (также см. респираторные)

5 VI. Лечение и терапевтический мониторинг

После постановки диагноза или прогноза для субъекта, получающего лечение препаратом против TNF $\alpha$ , или предсказания вероятной реакции на препарат против TNF $\alpha$  у индивида с диагнозом заболевания, в патофизиологии которого играет роль TNF $\alpha$ , в том числе шока, сепсиса, инфекций, аутоиммунных заболеваний, RA, болезни 10 Кроны, отторжения трансплантата и реакции "трансплантат против хозяина", в соответствии с описанными здесь способами, настоящее изобретение может дополнительно включать рекомендацию курса лечения на основании диагноза, прогноза или предсказания. В некоторых случаях настоящее изобретение может также включать назначение индивиду терапевтически эффективного количества препарата против TNF $\alpha$ , 15 применимого для лечения одного или нескольких симптомов, связанных с тем заболеванием, в патофизиологии которого играет роль TNF $\alpha$ . Для лечебного применения препарат против TNF $\alpha$  может вводиться сам по себе или в комбинации с одним или несколькими другими препаратами против TNF $\alpha$  и/или одним или несколькими препаратами, уменьшающими побочные эффекты, связанные с препаратом против 20 TNF $\alpha$  (например, иммунодепрессивными средствами). Примеры препаратов против TNF $\alpha$  уже описаны здесь и включают, без ограничения, REMICADE™ (инфликсимаб), ENBREL™ (этанерцепт), HUMIRA™ (адалимумаб), CIMZIA® (цертолизумаб-пегол), биологические препараты, традиционные лекарства и их комбинации. При этом 25 настоящее изобретение преимущественно позволяет клиницистам практиковать "индивидуализированное лечение", направляя решения по лечению и способствуя выбору и оптимизации терапии для препаратов против TNF $\alpha$  так, чтобы правильное лекарство досталось нужному пациенту в правильное время.

Препараты против TNF $\alpha$  можно вводить с подходящим фармацевтическим 30 эксципиентом по необходимости и любым общепринятым способом введения. Так, введение может осуществляться, к примеру, внутривенно, топически, подкожно, чрескожно, трансдермально, внутримышечно, перорально, буккально, подъязычно, гингивально, интрапалатально, внутрисуставно, парентерально, внутриартериально, интрадермально, интравентрикулярно, интракраниально, внутрибрюшинно, интраперитонально, интраназально, ректально, вагинально или путем ингаляции. "Совместное 35 введение" означает, что препарат против TNF $\alpha$  вводится одновременно, непосредственно до или сразу после введения второго препарата (например, другого препарата против TNF $\alpha$  или препарата, применяемого для снижения побочных эффектов препарата против TNF $\alpha$ ).

Терапевтически эффективное количество препарата против TNF $\alpha$  можно вводить 40 неоднократно, например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и больше раз, или же доза может вводиться непрерывным вливанием. Доза может иметь вид твердого, полутвердого вещества, лиофилизированного порошка или в жидком виде, как-то, к примеру, таблетки, пилюли, гранулы, капсулы, порошки, растворы, суппозитории, эмульсии, свечи, удерживающие клизмы, кремы, мази, лосьоны, гели, аэрозоли, пены и т.п., 45 предпочтительно в виде стандартных дозовых форм, пригодных для простого введения точных доз.

В настоящем изобретении термин "стандартная дозовая форма" охватывает физически дискретные единицы, применимые как единичные дозы для людей и других

млекопитающих, причем каждая единица содержит заданное количество препарата против TNF $\alpha$ , рассчитанное на получение желательного начала действия, толерантности и/или терапевтических эффектов вместе с подходящим фармацевтическим эксципиентом (например, ампулой). Кроме того, можно приготовить более концентрированные

5 формы, из которых затем можно получить более разбавленные дозовые единицы. При этом более концентрированные дозовые формы должны содержать существенно большее количества препарата против TNF $\alpha$ , например, по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 раз или больше.

Способы приготовления таких дозовых форм известны специалистам (например,

10 см. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)). Дозовые формы обычно включают традиционный фармацевтический носитель или эксципиент и могут дополнительно содержать другие лекарственные средства, носители, адьюванты, разбавители, усилители проникновения в ткани, солюбилизаторы и др. Подходящие эксципиенты могут быть подобраны к определенной дозовой форме и 15 способу применения хорошо известными методами (например, см. Remington's Pharmaceutical Sciences, supra).

Примерами подходящих эксципиентов являются, без ограничения, лактоза, декстроза, сахароза, сорбит, маннит, крахмал, гуммиарабик, фосфат кальция, альгинаты, трагакант, желатин, силикат кальция, микрокристаллическая целлюлоза, поливинил-пирролидон,

20 целлюлоза, вода, физраствор, сироп, метилцеллюлоза, этилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза и полиакрилаты типа карбополов, например, Carbopol 941, Carbopol 980, Carbopol 981 и т.п. Дозовые формы могут дополнительно включать смазывающие вещества, как-то тальк, стеарат магния и вазелиновое масло; смачивающие вещества; эмульгирующие вещества; супендирующие вещества; консерванты, как-то 25 метил-, этил- и пропилгидроксибензоаты (т.е. парабены); pH-регулирующие вещества, как-то неорганические и органические кислоты и основания; подсластители; и ароматизаторы. Дозовые формы также могут включать биоразрушимые полимерные шарики, декстран и аддукты циклодекстрина.

При пероральном введении терапевтически эффективная доза может иметь вид

30 таблеток, капсул, эмульсий, супензий, растворов, сиропов, аэрозолей, леденцов, порошков и форм с замедленным высвобождением. Подходящими эксципиентами для перорального введения являются фармацевтического уровня маннитол, лактоза, крахмал, стеарат магния, натриевый сахарин, тальк, целлюлоза, глюкоза, желатин, сахароза, карбонат магния и др.

35 В некоторых воплощениях терапевтически эффективная доза имеет вид пилюль, таблеток или капсул, поэтому дозовая форма может содержать, наряду с препаратом против TNF $\alpha$ , любое из следующего: разбавитель, как-то лактоза, сахароза, двухзамещенный фосфат кальция и др.; разрыхлитель, как-то крахмал или его производные;

40 смазывающее вещество, как-то стеарат магния и др.; и связывающее вещество, как-то крахмал, гуммиарабик, поливинилпирролидон, желатин, целлюлоза и ее производные. Препарат против TNF $\alpha$  также может быть составлен в виде свечей и заключен, к примеру, в носитель из полиэтиленгликоля (ПЭГ).

45 Жидкие дозовые формы могут быть приготовлены растворением или диспергированием препарата против TNF $\alpha$  и необязательно одного или нескольких фармацевтически приемлемых адьювантов в носителе, таком, к примеру, как водный солевой раствор (например, 0,9% масс.хлорида натрия), водный раствор декстрозы, глицерин, этанол и др. с образованием раствора или супензии, например, для перорального, топического или внутривенного введения. Препарат против TNF $\alpha$  также

может быть составлен в виде удерживающей клизмы.

При топическом введении терапевтически эффективная доза может иметь вид эмульсий, лосьонов, гелей, пены, кремов, желе, растворов, суспензий, мазей и трансдермальных пластырей. При введении путем ингаляции препарат против TNF $\alpha$  может 5 вводиться в виде сухого порошка или в жидким виде через распылитель. При парентеральном введении терапевтически эффективная доза может иметь вид стерильных растворов для инъекций и стерильных расфасованных порошков. Предпочтительно растворы для инъекций составляются при pH от 4,5 до 7,5.

Терапевтически эффективная доза также может быть представлена в

10 лиофилизированном виде. Такие дозовые формы могут включать буфер, например, бикарбонат, для реконструкции перед введением, или же буфер может входить в лиофилизированную дозовую форму для реконструкции, например, с водой.

Лиофилизированная дозовая форма может дополнительно включать подходящее сосудосуживающее средство, например, адреналин. Лиофилизированная дозовая форма

15 может быть представлена в шприце, необязательно в упаковке с буфером для реконструкции с тем, чтобы реконструированную дозовую форму можно было немедленно ввести субъекту.

При терапевтическом применении для лечения заболеваний, в патофизиологии которых играет роль TNF $\alpha$ , препарат против TNF $\alpha$  может вводиться в первоначальной

20 дозе от 0,001 мг/кг до 1000 мг/кг в сутки. Диапазон суточных доз, которые могут применяться, составляет от 0,01 мг/кг до 500 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 200 мг/кг, от 1 мг/кг до 100 мг/кг или от 10 мг/кг до 50 мг/кг. Дозировка, однако, может варьировать в зависимости от индивидуальных требований, тяжести заболевания или симптомов и применяемого препарата против TNF $\alpha$ . Например, дозировка может определяться

25 опытным путем с учетом типа и тяжести заболевания и/или симптомов в соответствии с описанными здесь способами. Вводимая индивиду доза, в контексте настоящего изобретения, должна быть достаточной для того, чтобы вызвать положительный терапевтический ответ у индивида со временем. Величина дозы также может определяться наличием, природой и продолжительностью неблагоприятных побочных

30 эффектов, сопровождающих введение данного препарата против TNF $\alpha$  у индивида. Определение правильной дозировки для конкретной ситуации входит в компетенцию врача. Обычно лечение начинают с малых доз, которые меньше оптимальной дозы препарата против TNF $\alpha$ . Затем дозировку увеличивают небольшими шагами до достижения оптимального эффекта при данных обстоятельствах. Для удобства общую

35 суточную дозу можно разделить и вводить порциями в течения суток, если нужно.

В настоящем изобретении термин "препарата против TNF $\alpha$ " охватывает все фармацевтически приемлемые формы препарата, применимые для лечения одного или нескольких симптомов, связанных с заболеваниями, в патофизиологии которых играет роль TNF- $\alpha$ . Например, препараты против TNF $\alpha$  могут иметь вид рацемической или

40 изомерной смеси, твердого комплекса, связанного с ионообменной смолой, и т.п. Кроме того, препараты против TNF $\alpha$  могут быть в сольватированном виде. Термин также включает все фармацевтически приемлемые соли, производные и аналоги описанных препаратов против TNF $\alpha$ , а также их комбинации. Например, фармацевтически приемлемые соли препаратов против TNF $\alpha$  включают, без ограничения, формы солей

45 тартрата, сукцината, битартрата, дигидрохлорида, салицилата, гемисукцината, цитрата, малеата, гидрохлорида, карбамата, сульфата, нитрата и бензоата, а также их комбинации. Любые формы препаратов против TNF $\alpha$  подходят для применения в способах настоящего изобретения, например, фармацевтически приемлемые соли

препаратов против TNF $\alpha$ , свободные основания препаратов против TNF $\alpha$  или их смеси. Примеры подходящих препаратов против TNF $\alpha$  включают, без ограничения, биологические препараты, традиционные лекарства и их комбинации.

Терапевтические средства включают, например, антитела против цитокинов и

- 5 хемокинов, как-то антитела к а-фактору некроза опухолей (TNF $\alpha$ ). Неограничивающие примеры антител против TNF $\alpha$  включают: химерные моноклональные антитела типа инфликсимаб (Remicade $^{\wedge}$  (Centocor, Inc.; Horsham, PA), которое является химерным моноклональным антителом типа IgGI против TNF $\alpha$ ; гуманизированные моноклональные антитела типа CDP571 и ПЭГилированного CDP870; полностью
- 10 человеческие моноклональные антитела типа адалимумаб (Humira $^{\circ}$ ) (Abbott Laboratories; Abbott Park, IL); слитые белки p75 типа этанерцепт (Enbrel $^{\circ}$ ) (Amgen; Thousand Oaks, CA; Wyeth Pharmaceuticals Inc.; Collegeville, PA), небольшие молекулы (например, ингибиторы MAP-киназы); и их комбинации. См. Ghosh, Novartis Found. Symp., 263:193-205 (2004).

Другие биологические средства включают, например, антитела против клеточной

- 15 адгезии типа натализумаб (Tysabri $^{\circ}$ ) (Elan Pharmaceuticals, Inc.; Dublin, Ireland; Biogen Idee; Cambridge, MA), которое является гуманизированным моноклональным антителом против молекулы клеточной адгезии - а4-интегрина, и MLN-02 (Millennium Pharmaceuticals; Cambridge, MA), которое является гуманизированным моноклональным антителом типа IgGI против а4p7-интегрина; анти-Т-клеточные средства; антитела
- 20 против CD3 типа висилизумаб (Nuvion $^{\circ}$ ) (PDL BioPharma; Incline Village, NV), которое является гуманизированным моноклональным антителом типа IgG2M3 против CD3; антитела против CD4 типа приликсимаб (cM-T412) (Centocor, Inc.; Horsham, PA), которое является химерным моноклинальным антителом против CD4; антитела против а-рецептора IL-2 (CD25) типа даклизумаб (Zenapax $^{\circ}$ ) (PDL BioPharma; Incline Village, NV; Roche; Nutley, NJ), которое является гуманизированным моноклональным антителом
- 25 типа IgGI против CD25, и басиликсимаб (Simulect $^{\circ}$ ) (Novartis; Basel, Швейцария), которое является химерным моноклональным антителом типа IgGI против CD25; и их комбинации.

Для оценки эффективности определенного терапевтического режима можно проверять

- 30 индивида через периодические промежутки времени после получения диагностической, прогностической и/или предиктивной информации из образцов от пациента. Например, может изменяться наличие или уровень концентрации терапевтических антител и/или аутоантител против терапевтических антител, исходя из терапевтического эффекта при лечении терапевтическим антителом. В некоторых воплощениях пациента можно
- 35 проверять для оценки реакции и понимания эффектов определенных лекарств или лечения с индивидуальным подходом. Кроме того, пациенты могут не реагировать на лекарство, но уровень антител может изменяться, свидетельствуя о том, что эти пациенты принадлежат к особой популяции (не поддающихся), которых можно определить по уровню антител у них. Этим пациентам можно прервать текущий курс лечения и
- 40 назначить альтернативное лечение.

Индивида также можно проверять через периодические промежутки времени для

оценки концентрации или уровня различных антител. Уровень антител в различные моменты времени, а также скорость изменения уровня антител со временем имеет значение. В некоторых случаях скорость возрастания одного или нескольких антител

- 45 (например, антител к антителам против TNF $\alpha$ ) у индивида выше порогового уровня указывает на то, что у индивида значительно повышен риск возникновения осложнений или риск побочных эффектов. Информация, полученная при серийном тестировании в виде скорости изменений маркера (т.е. изменения уровня антител за определенное

время), может быть связана с тяжестью заболевания, риском осложнений заболевания и/или риском побочных эффектов.

Способы настоящего изобретения также предусматривают идентификацию первичных невосприимчивых или слабо восприимчивых пациентов, например, при лечении

5 терапевтическим моноклональным антителом. Эти первичные невосприимчивые или слабо восприимчивые пациенты, к примеру, могут обладать врожденным или приобретенным иммунитетом к терапевтическому средству. Если терапевтическое средство является диагностическим антителом, то идентификация невосприимчивых или слабо восприимчивых пациентов может способствовать выбору подходящего

10 терапевтического средства для каждого индивидуального пациента.

Способы изобретения могут применяться, к примеру, для идентификации пациентов с вторичной невосприимчивостью. Вторичная невосприимчивость может быть бессимптомной, т.е. единственным симптомом является то, что лечение становится менее эффективным или даже не эффективным. В некоторых случаях способы

15 настоящего изобретения применимы для идентификации вторичной невосприимчивости еще до того, как пациент или медицинский работник заметит, что лечение стало менее эффективным. Для того чтобы обеспечить правильную концентрацию *in vivo*, может применяться более высокая дозировка при лечении или может быть выбрано альтернативное лечение либо то и другое. Возникновение вторичной невосприимчивости

20 может быть особенно катастрофичным, если терапевтическое средство является диагностическим средством. Радиоактивно меченные моноклональные антитела обычно применяются при мониторинге таких заболеваний, как рак и некоторые инфекционные болезни, когда важно определить величину и/или локализацию заболевания/воздушителя, например, при установлении наличия и/или уровня вторичных метастазов. Если

25 возникновение невосприимчивости (первичной либо вторичной) останется незамеченным, то пациент получит "добрь", т.е. ложно отрицательный результат, который может привести к прекращению лечения, а позднее к рецидиву заболевания, часто в более тяжелой и возможно неизлечимой форме.

Следующая категория невосприимчивости - это возникновение (например, вторичное)

30 невосприимчивости, связанной с неблагоприятными побочными эффектами. Развитие иммунного ответа хозяина у субъекта может сопровождаться вредными или неприятными побочными эффектами. Они могут быть вызваны возникновением антител, распознающих человеческие или гуманизированные терапевтические средства, но не способных отличить их от других иммуноглобулинов хозяина. Поэтому способы

35 настоящего изобретения подходят для идентификации субъектов, обладающих врожденным или приобретенным иммунитетом к терапевтическому средству, которые, к примеру, могут быть подвержены неблагоприятным побочным эффектам, связанным с невосприимчивостью.

Способы настоящего изобретения подходят для выбора и выполнения режимов

40 лечения, включающих введение моноклональных терапевтических средств пациентам. Соответственно, описанные здесь способы определения концентрации или биодоступности терапевтических антител могут быть включены в способ лечения заболевания или нарушения. При мониторинге иммунологического статуса пациента способами настоящего изобретения во время курса лечения можно настроить выбор и/или применение терапевтического средства на обеспечение максимальной терапевтической пользы пациенту и в то же время обеспечить рентабельное применение дорогостоящих терапевтических средств.

Способы настоящего изобретения могут применяться для определения того, нужно

ли изменить пациенту режим дозировки терапевтического средства (например, терапевтического антитела) или назначить альтернативную фармакотерапию.

Способы настоящего изобретения могут дополнительно включать периодическую оценку концентрации в сыворотке или биодоступности терапевтического средства

5 (например, терапевтического антитела) у пациента.

Способы настоящего изобретения также предусматривают определение того, возникли у субъекта иммунитет к терапевтическому средству типа терапевтического антитела.

Настоящим изобретением также предусмотрен способ определения того, что

10 невосприимчивость к лечению у пациента обусловлена образованием иммуноглобулинов пациента против терапевтического антитела, такого, например, как антитело против TNF $\alpha$ .

Настоящим изобретением также предусмотрен способ выбора надлежащего препарата для лечения пациентов, страдающих таким заболеванием, которое излечимо

15 с помощью терапевтического антитела.

Настоящим изобретением также предусмотрен прогностический способ для определения вероятности того, что у пациента возникнет вторичная невосприимчивость к терапевтическому антителу.

### ПРИМЕРЫ

20 Настоящее изобретение будет описано более подробно на конкретных примерах. Следующие примеры приводятся для раскрытия изобретения, но никоим образом не для его ограничения. Специалисты смогут легко распознать целый ряд некритических параметров, которые можно изменять или модифицировать, получая практически те же результаты.

25 Пример 1. Новый анализ изменения подвижности для измерения уровня биопрепаратов против TNF $\alpha$

В этом примере приведен новый гомогенный способ измерения концентрации препарата против TNF $\alpha$  в образцах от пациентов (например, сыворотке) с использованием эксклюзионной хроматографии для детектирования связывания

30 препарата против TNF $\alpha$  с флуоресцентно меченным TNF $\alpha$ . Этот способ выгоден, так как в нем не нужны стадии отмывания, применяются флуорофоры, позволяющие детектировать в видимой области спектра и/или по флуоресценции, что уменьшает фон и помехи со стороны сыворотки, повышается способность детектировать препараты против TNF $\alpha$  у пациентов с низким титром благодаря высокой чувствительности

35 детектирования флуоресцентной метки, и он проводится как реакция в жидкой фазе, тем самым уменьшается возможность любых изменений эпитопа при прикреплении к твердой поверхности типа планшета для ELISA.

В одном типичном воплощении TNF $\alpha$  метят флуорофором (например, Alexa647), при этом флуорофор можно детектировать и в видимой области спектра, и по

40 флуоресценции. Меченный TNF $\alpha$  инкубируют с сывороткой человека в жидкофазной реакции с тем, чтобы он связался с препаратом против TNF $\alpha$ , присутствующим в сыворотке. Меченный TNF $\alpha$  также можно инкубировать с известными количествами препарата против TNF $\alpha$  в жидкофазной реакции для получения стандартной кривой. После инкубации образцы наносят прямо на колонку для эксклюзионной

45 хроматографии. Связывание препарата против TNF $\alpha$  с меченым TNF $\alpha$  приводит к смещению пика влево по сравнению с самим меченым TNF $\alpha$ . Концентрацию препарата против TNF $\alpha$ , присутствующего в образце сыворотки, можно затем сравнить со стандартной кривой и контролями.

На фиг.1 представлен пример способа настоящего изобретения, при этом для детектирования связывания между TNF $\alpha$ -Alexa<sub>647</sub> и HUMIRA<sup>TM</sup> (адалимумаб) применяется метод эксклюзионной HPLC. Как видно из фиг.1, связывание HUMIRA<sup>TM</sup> с TNF $\alpha$ -Alexa<sub>647</sub> приводит к смещению пика TNF $\alpha$ -Alexa<sub>647</sub> влево.

На фиг.2 представлены кривые "доза-ответ" для связывания HUMIRA<sup>TM</sup> с TNF $\alpha$ -Alexa<sub>647</sub>. В частности, из фиг.2А видно, что HUMIRA<sup>TM</sup> дозозависимым образом усиливает сдвиг TNF $\alpha$ -Alexa<sub>647</sub> при анализе методом эксклюзионной хроматографии. Из фиг.2В видно, что присутствие 1% сыворотки человека не оказывает значительного влияния на изменение подвижности TNF $\alpha$ -Alexa<sub>647</sub> при анализе методом эксклюзионной хроматографии. Из фиг.2С видно, что присутствие объединенной RF-положительной сыворотки не оказывает значительного влияния на изменение подвижности TNF $\alpha$ -Alexa<sub>647</sub> при анализе методом эксклюзионной хроматографии.

Этот пример демонстрирует применимость настоящего изобретения при мониторинге пациентов, получающих препарат против TNF $\alpha$  типа HUMIRA<sup>TM</sup>, так как оно (1) помогает определить подходящую дозировку препарата; (2) дает оценку фармакокинетики препарата, например, чтобы установить, не выводится ли лекарство из организма слишком быстро; и (3) способствует принятию решений по лечению, например, не стоит ли перейти с текущего препарата против TNF $\alpha$  на другой ингибитор TNF $\alpha$  или на другой тип терапии.

**Пример 2. Новый анализ изменения подвижности для измерения уровня НАСА и НАНА**

В этом примере приведен новый гомогенный способ измерения концентрации аутоантител (например, НАСА и/или НАНА) в образцах от пациентов (например, сыворотке) с использованием эксклюзионной хроматографии для детектирования связывания этих аутоантител с флуоресцентно меченным TNF $\alpha$ . Этот способ выгоден, так как в нем не нужны стадии отмывания, при которых удаляются НАСА и НАНА с низким сродством, применяются флуорофоры, позволяющие детектировать в видимой области спектра и/или по флуоресценции, что уменьшает фон и помехи со стороны сыворотки, повышается способность детектировать НАСА и НАНА у пациентов с низким титром благодаря высокой чувствительности детектирования флуоресцентной метки, и он проводится как реакция в жидкой фазе, тем самым уменьшается возможность любых изменений эпитопа при прикреплении к твердой поверхности типа планшета для ELISA.

Клиническая применимость измерения аутоантител (например, НАСА, НАНА и т.п.), вырабатываемых против ингибиторов TNF $\alpha$ , иллюстрируется тем, что НАСА выявлялись у 53%, 21% и 7% больных ревматоидным артритом, получавших 1 мг/кг, 3 мг/кг и 10 мг/кг инфликсимаба. При комбинированном инфликсимабе с метотрексатом частота антител снижалась до 15%, 7% и 0%, что свидетельствует о том, что сопутствующая иммунодепрессивная терапия эффективно снижает реакцию на препарат, но также указывает на то, что высокая доза препарата против TNF $\alpha$  может привести к толерантности. При болезни Крона сообщалось о значительно большей частоте; после пятого вливания у 61% больных были НАСА. Клиническая реакция сокращалась при наличии НАСА. См. Rutgeerts, N. Engl. J. Med., 348:601-608 (2003). Ретроспективное исследование инфликсимаба и уровня НАСА при измерении в течение 3-летнего периода с 2005 до 2008 г. у 155 пациентов показало, что НАСА выявляются у 22,6% (n=35) пациентов с хроническим воспалением кишечника. См. Afif et al., "Clinical utility of measuring infliximab and human anti-chimeric antibody levels in patients with inflammatory

"bowel disease"; paper presented at Digestive Disease Week; May 30-June 3, 2009, Chicago, IL. Авторы пришли к выводу, что изменение лечения на основании одних лишь клинических симптомов может привести к несоответствующему лечению.

Гомогенный анализ изменения подвижности имеет преимущества перед текущими

- 5 методами типа мостикового метода, приведенного на фиг.3 для измерения концентраций аутоантител (например, НАСА и/или НАНА) в образцах пациентов, потому что способ изобретения способен измерять концентрацию аутоантител типа НАСА без неспецифического связывания и помех со стороны твердой фазы на планшетах для ELISA, без помех со стороны препарата против TNF $\alpha$  (например, в мостиковом методе 10 измерения НАСА должны проводиться при минимальном уровне препарата против TNF $\alpha$ ) и без какой-либо зависимости от мультивалентности антител (например, антитела типа IgG4 не выявляются мостиковым методом, так как антитела типа IgG4 15 биспецифичны и не могут перекрестье связываться с одним и тем же антигеном). Итак, настоящее изобретение имеет следующие преимущества перед современными методами: 20 не требуется фиксирование антигенов на твердой поверхности (избегается денатурация); устраняется эффект IgG4; преодолевается проблема минимального уровня терапевтических антител; детектируются антитела со слабым сродством; устраняется неспецифическое связывание посторонних IgGs; и повышается чувствительность и 25 специфичность детектирования.

- 20 В одном типичном примере препарат против TNF $\alpha$  (например, REMICADE<sup>TM</sup>) метится флуорофором (например, A1exab47), при этом флуорофор можно детектировать и в видимой области спектра, и по флуоресценции. Меченный препарат против TNF $\alpha$  инкубируют с сывороткой человека в жидкофазной реакции с тем, чтобы он связался с НАСА и НАНА, присутствующими в сыворотке. Меченный препарат против TNF $\alpha$  25 также можно инкубировать с известными количествами антител против IgG в жидкофазной реакции для получения стандартной кривой. После инкубации образцы наносят прямо на колонку для эксклюзионной хроматографии. Связывание аутоантител с меченым препаратом против TNF $\alpha$  приводит к смещению пика влево по сравнению с самим меченым препаратом. Концентрацию НАСА и НАНА, присутствующих в 30 образце сыворотки, можно затем сравнить со стандартной кривой и контролями. На фиг.4 приведена типичная схема метода определения аутоантител по настоящему изобретению для измерения концентраций НАСА/НАНА, вырабатываемых против REMICADE<sup>TM</sup>. В определенных случаях высокий уровень НАСА/НАНА указывает на то, что из текущей терапии с помощью REMICADE<sup>TM</sup> следует перейти на другой препарат 35 против TNF $\alpha$  типа HUMIRA<sup>TM</sup>.

Принцип этого метода основывается на изменении подвижности комплекса связанный с антителом меченного A1exab47 REMICADE<sup>TM</sup> по сравнению со свободным меченым A1exab47 REMICADE<sup>TM</sup> при эксклюзионной высокоеффективной жидкостной хроматографии (SE-HPLC) вследствие повышения молекулярной массы комплекса.

- 40 Хроматографию в этом примере проводили на установке Agilent-1200 HPLC System, используя колонку Bio-Sep 300x7,8 мм SEC-3000 (Phenomenex) с диапазоном фракционирования молекулярных масс 5 000-700 ОOO и подвижной фазой из 1 xPBS, pH 7,4, при скорости потока 0,5 мл/мин с УФ-детектированием при 650 нм. Перед Agilent-1200 HPLC System с колонкой Bio-Sep 300x7,8 мм SEC-3000 находилась аналитическая 45 предколонка Bio-Sep 75x7,8 мм SEC-3000. При каждом анализе на колонку наносили образец объемом 100 мкл.

Комплекс связанный с антителом меченного A1exab47 REMICADE<sup>TM</sup> образуется при инкубации известного количества антител и меченного A1exab47 REMICADE<sup>TM</sup> в

элюиращем буфере IxPBS, pH 7,3, при комнатной температуре в течение 1 часа перед анализом методом SE-HPLC.

На фиг.5 представлен анализ "доза-ответ" связывания антитела против IgG человека с REMICADE™-Alexa<sub>647</sub> при детектировании методом эксклюзионной хроматографии

5 по настоящему изобретению. Связывание антитела против IgG с REMICADE™-Alexa<sub>647</sub> вызывало сдвиг пика REMICADE™-Alexa<sub>647</sub> влево. На фиг.6 представлен второй анализ "доза-ответ" связывания антитела против IgG человека с REMICADE™-Alexa<sub>647</sub> при

10 детектировании методом эксклюзионной хроматографии по настоящему изобретению. Более высокие дозы антитела против IgG вызывали дозозависимое увеличение

образования комплексов аH™-IgG/REMICADE™-Alexa<sub>647</sub>, о чем свидетельствует сдвиг

15 пика REMICADE™-Alexa<sub>647</sub> влево. На фиг.7 представлены кривые "доза-ответ" для

связывания антитела против IgG с REMICADE™-Alexa<sub>647</sub>.

На фиг.8 представлено образование иммунокомплекса REMICADE™-Alexa<sub>647</sub> в

20 нормальной сыворотке человека и в НАСА-положительной сыворотке при детектировании методом эксклюзионной хроматографии по настоящему изобретению при введении 100 мкл образца. Как видно из фиг.8, связывание НАСА, присутствующих в образце от пациента, с REMICADE™-Alexa<sub>647</sub> приводило к сдвигу пика REMICADE™-

25 A1ехаб47 влево. Таким образом, метод эксклюзионной хроматографии по настоящему изобретению особенно выгоден, так как им можно измерять НАСА в присутствии REMICADE™, его можно применять в то время, когда пациент проходит курс лечения, в нем измеряется и слабое, и сильное связывание НАСА, он является методом типа

30 "смешать и измерить" и его можно распространить на другие подходы, в которых применяется меченный REMICADE™ для уравновешения с НАСА и REMICADE™.

На фиг.9 представлена сводка по измерению НАСА в образцах сыворотки от 20 пациентов, которые проводились мостиковым методом или же анализом изменения подвижности по настоящему изобретению. Это сравнительное исследование показало, что настоящий метод обладает большей чувствительностью по сравнению с текущими

35 методами, так как 3 образца, отрицательные по НАСА при измерении мостиковым методом, в действительности оказались положительными по НАСА при измерении анализом изменения подвижности по настоящему изобретению (см. пациенты № SK 07070305, SK 07070595 и SK 07110035).

Таким образом, этот пример свидетельствует о применимости настоящего

40 изобретения при мониторинге пациентов, получающих препарат против TNF $\alpha$  (например, REMICADE™), для детектирования наличия или уровня аутоантител (например, НАСА и/или НАНА) против препарата, поскольку такие иммунные ответы могут быть связаны с реакциями гиперчувствительности и сильными изменениями фармакокинетики и биораспределения препарата против TNF $\alpha$ , что не позволяет продолжать лечение этим препаратом.

В заключение, примеры 1 и 2 свидетельствуют, что TNF $\alpha$  и антитела против TNF $\alpha$  можно эффективно пометить A1ехаб47. При инкубации комплекса меченный TNF $\alpha$ -Alexa<sub>647</sub> с антителами против TNF $\alpha$  время удержания комплекса меченный TNF $\alpha$ /препарата

45 против TNF $\alpha$  смешалось, а количество препарата против TNF $\alpha$ , вызывающего смещение, можно количественно оценить методом HPLC. Более того, при инкубации меченого препарата против TNF $\alpha$  с антителом против IgG человека время удержания комплекса меченный препарат против TNF $\alpha$ /антитело против IgG смешалось, а количество антитела против IgG, вызывающего это смещение, можно количественно оценить методом HPLC.

Кроме того, низкое содержание сыворотки в системе определения, как оказалось, почти не влияет на анализ методом HPLC. Наконец, можно составить стандартную кривую для препарата против TNF $\alpha$  и определения НАСА/НАНА и использовать ее для количественного определения уровня препарата против TNF $\alpha$  НАСА/НАНА в

- 5 сыворотке от пациентов. Преимущественно, настоящим изобретением в некоторых аспектах предусмотрен анализ изменения подвижности, как-то гомогенный метод типа "смешать и измерить", разработанный для измерения и препарата, и антител против препарата. Были составлены стандартные кривые для биопрепараторов против TNF $\alpha$  - REMICADE<sup>TM</sup> и HUMIRA, а также для антител НАСА против REMICADE<sup>TM</sup>. В формате 10 анализа изменения подвижности, в отличие от ELISA, не нужно фиксировать антигены на твердой поверхности и на него не влияет неспецифическое связывание посторонних IgGs. Этот формат определения является простым, но очень чувствительным, и может применяться для детектирования всех биологических препаратов против TNF $\alpha$  (например, Remicade, Humira, Enbrel и Cimzia), а также нейтрализующих антител (против 15 REMICADE<sup>TM</sup>) в сыворотке пациентов.

Пример 3. Измерение уровня антител человека против химерных антител (НАСА) и инфликсимаба (IFX) в сыворотке пациентов новым анализом изменения подвижности

#### Резюме

Введение. Инфликсимаб (IFX) - это химерное терапевтическое антитело против TNF $\alpha$ ,

- 20 в отношении которого было показано, что оно эффективно при лечении таких аутоиммунных заболеваний, как ревматоидный артрит (RA) и хроническое воспаление кишечника (IBD). Однако антитела против IFX обнаруживались у некоторых пациентов, получавших IFX, при детектировании антител человека против химерных антител (НАСА), которые могут снижать эффективность препарата или оказывать вредное 25 действие. Мониторинг уровней НАСА и IFX у индивидуальных пациентов помогает оптимизировать дозировку и лечение с помощью IFX. Текущие способы детектирования НАСА основываются на твердофазных методах, которые имеют ограничения в том, что присутствие IFX в кровотоке может маскировать наличие НАСА, поэтому измерения можно проводить только через 8 недель после приема дозы IFX. Более того, эта задержка 30 по времени еще больше ограничивает определение вследствие быстрого выведения высокомолекулярных иммунных комплексов из кровотока. Чтобы преодолеть эти недостатки, мы разработали и проверили новый способ измерения уровня IFX и НАСА в сыворотке пациентов, получавших IFX.

Методы. Для измерения уровня НАСА и IFX в сыворотке пациентов, получавших

- 35 IFX, разработали новый нерадиоактивный, жидкофазный анализ изменения подвижности при эксклюзионной (SE)-HPLC. Можно разделить иммунокомплекс (например, TNFo/IFX или IFX/НАСА), свободный TNF $\alpha$  или IFX и рассчитать соотношение связанный/свободный с высокой чувствительностью. Концентрации IFX или НАСА в сыворотке определяли по стандартным кривым, составленным при инкубации с различными 40 концентрациями IFX или объединенной НАСА-положительной сыворотки. С помощью этого нового метода измеряли уровень IFX и НАСА в сыворотке, взятой у больных IBD, получавших IFX, у которых произошли рецидивы, и сравнивали с результатами, полученными традиционным "мостиковым" методом (Bridge) ELISA.

Результаты. Составляли кривые "доза-ответ" новым методом определения с высокой

- 45 чувствительностью. Продемонстрировано детектирование НАСА в присутствии избытка IFX. Из 117 образцов сыворотки от пациентов, получавших IFX, в 65 образцах уровень IFX оказался выше предела обнаружения, а среднее значение составило  $11,0 \pm 6,9$  мг/мл. По уровню НАСА 33 образца (28,2%) оказались положительными, тогда как методом

Bridge ELISA детектировалось только 24 положительных образца. Мы также идентифицировали 9 ложно-отрицательных и 9 ложно-положительных результатов из образцов, определяемых методом Bridge ELISA. Уровень НАСА оказался повышенным у 11 пациентов во время курса лечения IFX, тогда как уровень IFX оказался значительно пониженным.

Заключение. Разработан новый, нерадиоактивный, жидкофазный анализ изменения подвижности для измерения уровня IFX и НАСА в сыворотке пациентов, получавших IFX. Метод обладает высокой чувствительностью и точностью, а полученные результаты воспроизводимы. Этот новый способ определения может применяться с выгодой для измерения уровня НАСА и IFX у пациентов во время лечения.

### Введение

Фактор некроза опухолей альфа (TNF $\alpha$ ) играет ключевую роль в патогенезе таких аутоиммунных заболеваний, как болезнь Крона (CD) и ревматоидный артрит (RA).

Хорошо известно, что блокирование TNF $\alpha$  терапевтическими антителами, такими как инфликсимаб (химерное моноклональное антитело человека-мыши типа IgGlK) или адалимумаб (полностью человеческое моноклональное антитело) снижают активность заболевания при CD и RA. Однако около 30-40% пациентов невосприимчивы к лечению антителами против TNF $\alpha$ , а некоторым пациентам требуются более высокие дозы или повышение частоты дозирования вследствие недостаточной восприимчивости. Различия

по биодоступности и фармакокинетике лекарств у индивидуальных пациентов могут вносить вклад в несостоятельность лечения. Иммуногенность препаратов, вследствие которой у пациентов возникают НАСА/НАНА, может приводить к целому ряду отрицательных реакций, от мягкого аллергического ответа до анафилактического шока.

Эти проблемы сейчас признаны многими исследователями, агентствами по контролю за лекарствами, страховыми медицинскими компаниями и производителями лекарств. Более того, многие пациенты со вторичной невосприимчивостью к одному препарату против TNF $\alpha$  выигрывают от перехода на другие препараты против TNF $\alpha$ , что свидетельствует о роли нейтрализующих антител, направленных конкретно против белка, используемого для лечения (Radstake et al., Ann. Rheum. Dis., 68(11): 1739-45 (2009)).

Поэтому оправдан мониторинг пациентов на уровень препарата и НАСА/НАНА с тем, чтобы введение препарата было приспособлено к индивидуальному пациенту, а продолжительное лечение осуществлялось эффективно и экономично совсем или почти без риска для пациентов (Bendtzen et al., Scand. J. Gastroenterol., 44(7):774-81 (2009)).

Для оценки уровня препаратов и НАСА/НАНА в кровотоке применялось несколько методов ферментного иммуноанализа. На фиг.10 представлена сводка по существующим методам измерения НАСА в сравнении с новым методом определения НАСА по настоящему изобретению. Одно из ограничений существующих методик состоит в том, что уровень антител трудно измерить, когда в кровотоке имеется заметное количество лекарства. В отличие от существующих твердофазных методов детектирования НАСА, в которых измерения можно проводить только через 8 недель после принятия дозы IFX, Новый нерадиоактивный, жидкофазный метод эксклюзионной (SE)-HPLC по настоящему изобретению способен измерять уровни НАСА и IFX в сыворотке от пациентов во время лечения с помощью IFX.

Имеются следующие обоснования для измерения концентраций биологических препаратов против TNF $\alpha$  и антител к биологическим препаратам против TNF $\alpha$  в сыворотке пациентов: (1) для фармакокинетических исследований при клинических испытаниях; (2) при клинических испытаниях FDA может потребовать проводить мониторинг иммунного ответа пациентов на биологический препарат; (3) чтобы

отслеживать реакцию пациента на биологический препарат путем измерения НАСА или НАЛА для регулирования дозировки препарата для каждого пациента; и (4) в качестве руководства для перехода на другой биологический препарат, если не срабатывает первоначальный препарат.

5      Методы

Анализ методом SE-HPLC уровня инфликсимаба (IFX) в сыворотке пациентов.

Рекомбинантный TNF $\alpha$  человека метили флуорофором ("F1", к примеру, Alexa Fluor® 488) в соответствии с инструкциями производителя. Меченый TNF $\alpha$  инкубировали с различными количествами IFX или сыворотки пациента 1 час при комнатной

10 температуре. Образцы объемом 100 мкл анализировали методом эксклюзионной хроматографии на установке для HPLC. Для мониторинга свободного TNF $\alpha$ -F1 и связанного иммуноком-плекса TNF $\alpha$ -F1 по времени удержания использовали флуоресцентное детектирование (FLD). Уровень IFX в сыворотке рассчитывали по стандартной кривой.

15     Анализ методом SE-HPLC уровня НАСА в сыворотке пациентов. Очищенный IFX метили F1. Меченый IFX инкубировали с различными разведениями объединенной НАСА-положительной сыворотки или с разведенной сывороткой пациента 1 час при комнатной температуре. Образцы объемом 100 мкл анализировали методом эксклюзионной хроматографии на установке для HPLC. Для мониторинга свободного 20 TNF $\alpha$ -F1 и связанного иммунокомплекса TNF $\alpha$ -F1 по времени удержания использовали FLD. Для определения уровня НАСА измеряли соотношение связанного и свободного IFX- F1.

Методика определения изменения подвижности для измерения НАСА в сыворотке.

Принцип этого определения основывается на изменении подвижности комплекса 25 связанного с НАСА F1-меченого инфликсимаба (IFX) по сравнению со свободным F1-меченым IFX методом эксклюзионной высокоеффективной жидкостной хроматографии (SE-HPLC) вследствие повышения молекулярной массы комплекса. Хроматографию проводили на установке Agilent-1200 HPLC System, используя колонку Bio-Sep 300x7,8 мм SEC-3000 (Phenomenex) с диапазоном фракционирования молекулярных масс 5 000-30 700000 и подвижной фазой из iXpBS, pH 7,3, при скорости потока 0,5 мл/мин с УФ-детектированием при 650 нм. Перед Agilent-1200 HPLC System с колонкой Bio-Sep 300x7,8 мм SEC-3000 находилась аналитическая предколонка Bio-Sep 75x7,8 мм SEC- 3000. При каждом анализе на колонку наносили образец объемом 100 мкл. Комплекс связанного с НАСА F1-меченого IFX образуется при инкубировании сыворотки от получавших 35 IFX пациентов с F1-меченым IFX в элюириющем буфере IxPBS, pH 7,3, при комнатной температуре в течение 1 часа перед анализом методом SE-HPLC.

Результаты

На фиг.11 представлено отделение комплекса связанного с НАСА IFX-F1 от свободного IFX-F1 вследствие изменения подвижности высокомолекулярного комплекса.

40     Как видно из частей end, время удержания пика флуоресценции смещается с 21,8 мин до 15,5-19,0 мин. Чем больше НАСА в реакционной смеси, тем меньше свободного IFX-F1 остается на хроматограмме и тем больше образуется иммунокомплекса. На фиг.12 представлены кривые "доза-ответ" для сдвига пика флуоресценции, вызванного добавлением НАСА. Используя НАСА положительный образец, мы смогли 45 детектировать сдвиг пика при разведении сыворотки 1:1000.

На фиг.13 представлено отделение комплекса связанного с IFX TNF $\alpha$ -F1 от свободного TNF $\alpha$ -F1 вследствие изменения подвижности высокомолекулярного комплекса. Как видно из частей end, время удержания пика флуоресценции смещается

с 24 мин до 13-19,5 мин. Чем больше IFX в реакционной смеси, тем меньше свободного TNFa-F1 остается на хроматограмме и тем больше образуется иммунокомплекса. На фиг.14 представлены кривые "доза-ответ" для сдвига пика TNFa-F1, вызванного добавлением IFX. Исходя из добавленного количества IFX, предел обнаружения IFX

5 Составляет 10 нг/мл сыворотки.

Новый анализ изменения подвижности по настоящему изобретению проверяли тестированием образцов сыворотки от НАСА-положительных и отрицательных пациентов при измерении "мостиковым" методом (табл.2). Используя этот метод измерения, мы проанализировали образцы сыворотки от 50 здоровых субъектов и 117 10 больных IBD, получавших IFX. Во всех образцах 50 здоровых субъектов уровень IFX был ниже предела обнаружения, тогда как в образцах 65 больных средняя концентрация IFX составила 11,0 мкг/мл. В табл.3 представлены уровни НАСА в сыворотке здоровых контролей и больных IBD, получавших IFX, при измерении "мостиковым" методом и анализом изменения подвижности. "Мостиковым" методом выявляется меньше НАСА- 15 положительных больных, чем анализом изменения подвижности, и больше ложно-отрицательных, а также больше ложно-положительных.

Таблица 2. Корреляция относительных уровней НАСА в сыворотке от сильно положительных и отрицательных пациентов при определении "мостиковым" методом и методом SE-HPLC

	"Мостиковым" методом	Анализ изменения подвижности посредством HPLC	Корреляция
Положительные	82	81	99%
Отрицательные	12	12	100%

20 Таблица 3. Анализ образцов пациентов на уровень НАСА в сыворотке "мостиковым" методом (отсечение 1,69 мкг/мл) и анализом изменения подвижности посредством HPLC (отсечение 0,19 по соотношению связанного и свободного IFX)

	Субъекты (n)	НАСА-положит.		"Мостиковым" методом	
		мостиковым методом	методом HPLC	ложно-отриц.	ложно-полож.
Здоровый контроль	50	н/п	0	н/п	н/п
Больные, получавшие IFX	117	24 (20,5%)	33 (28,2%)	9 (высокий IFX)	9

25 Ложно-отрицательные результаты вызваны тем, что сыворотка пациентов содержит высокий уровень IFX, который мешает определению НАСА Мостиковым методом, но не влияет на метод SE-HPLC. Ложно-положительные результаты вызваны тем, что сыворотка пациентов содержит высокий уровень неспецифических веществ, которые мешают определению Мостиковым методом.

30 На фиг.15 представлено соотношение между уровнем НАСА и концентрацией IFX у больных IBD во время курса лечения IFX. НАСА выявляются уже при V 10 (30 недель) и продолжают возрастать у некоторых пациентов во время лечения IFX. На фиг.16 35 показано, что НАСА можно детектировать в присутствии IFX методом настоящего изобретения. Повышение уровня НАСА в сыворотке связано с уменьшением детектируемого уровня IFX (например, уменьшением биодоступности). Таким образом, раннее выявление НАСА во время лечения IFX может направить врача и/или пациента на переход на другой препарат против TNFa или увеличение дозы IFX.

40 45 Заключение

Биологические препараты против TNFa можно легко пометить флуорфором ("F1") и использовать анализ изменения подвижности для измерения НАСА/НАНА в формате гомогенного определения без фиксирования антигенов на твердой поверхности и

многократного отмывания и инкубирования, как в типичном методе ELISA. Инкубация F1-меченого IFX с НАСА-положительной сывороткой приводит к образованию иммунного комплекса, который при SE-HPLC элюируется в другом положении, чем свободный F1-меченный IFX, при этом можно определить количество НАСА. Присутствие 5 других компонентов сыворотки почти не оказывает влияния на анализ изменения подвижности.

На определение в формате изменения в подвижности, в отличие от ELISA, не влияет неспецифическое связывание посторонних IgG и при этом детектируется изотип IgG4. Образцы здоровой сыворотки не вызывают изменения в подвижности F1-меченого IPX, 10 а у 28,2% больных, получавших IFX, методом настоящего изобретения обнаружены НАСА. Таким образом, описанный здесь формат определения очень чувствителен и может применяться для детектирования всех биологических препаратов (например, Remicade, Humira, Enbrel и Cimzia), а также антител к ним (например, против Remicade, против Humira, против Enbrel и против Cimzia) в сыворотке пациентов. Отметим, что 15 поскольку НАСА можно детектировать в присутствии IFX анализом изменения подвижности по изобретению, то раннее выявление НАСА во время лечения IFX может направить врача и/или пациента на переход на другой препарат против TNF $\alpha$  или увеличение последующей дозы IFX.

Мы разработали новый нерадиоактивный, жидкофазный метод SE-HPLC для 20 измерения уровня IFX и НАСА в образцах сыворотки, полученных от пациентов, получающих IFX. Новый метод обладает высокой чувствительностью и точностью, а результаты хорошо воспроизводятся, что делает его пригодным для регулярного тестирования большого количества образцов сыворотки человека. Новый формат определения, в отличие от ELISA, устраниет фиксирование антигенов на твердой 25 поверхности и на него не влияет неспецифическое связывание посторонних IgG. Эти преимущества описанного здесь формат определения уменьшают количество ложно-отрицательных и ложно-положительных результатов тестирования. По преимуществу, формат определения по настоящему изобретению является очень чувствительным и может применяться для детектирования всех биологических препаратов, а также антител 30 к ним, присутствующих в сыворотке, во время лечения пациента.

Пример 4. Различие между нейтрализующими и не-нейтрализующими антителами человека против химерных антител (НАСА) в сыворотке пациентов новым анализом изменения подвижности

В этом примере приведены новые гомогенные способы измерения концентрации 35 аутоантител (например, НАСА) в образцах - (например, сыворотке) от пациентов и определения того, являются они нейтрализующими или не-нейтрализующими аутоантителами, с использованием эксклюзационной хроматографии для детектирования связывания этих аутоантител с флуоресцентно меченным препаратом против TNF $\alpha$  в присутствии флуоресцентно меченого TNF $\alpha$ . Этот способ выгоден, так как в нем не 40 нужны стадии отмывания, при которых удаляются НАСА с низким сродством, применяются особые флуорофоры, позволяющие детектировать в видимой области спектра и/или по флуоресценции, что уменьшает фон и помехи со стороны сыворотки, повышается способность детектировать нейтрализующие и не-нейтрализующие НАСА 45 у пациентов с низким титром благодаря высокой чувствительности детектирования флуоресцентной метки и он проводится как реакция в жидкой фазе, тем самым уменьшается возможность любых изменений эпитопа при прикреплении к твердой поверхности типа планшета для ELISA.

В одном типичном воплощении препарат против TNF $\alpha$  (например, REMICADE<sup>TM</sup>)

метится флуорофором "F1" (см., например, фиг.17А), причем флуорофор может детектироваться в видимой области спектра и/или по флуоресценции. Аналогичным образом TNF $\alpha$  метится флуорофором "F2" (см., например, фиг.17А), причем флуорофор может детектироваться в видимой области спектра и/или по флуоресценции, а "F1" и "F2" являются различными флуорофорами. Меченный препарат против TNF $\alpha$  инкубируют с сывороткой человека в жидкофазной реакции и туда же добавляют меченный TNF $\alpha$  с тем, чтобы образовались комплексы (т.е. иммунокомплексы) между меченым препаратом против TNF $\alpha$ , меченым TNF $\alpha$  и/или НАСА, присутствующими в сыворотке. После инкубации образцы наносят прямо на эксклюзионную колонку. Связывание и аутоантитела (например, НАСА), и меченого TNF $\alpha$  с меченым препаратом против TNF $\alpha$  приводят к сдвигу пика влево (например, "Иммунокомплекс 1" на фиг.17А) по сравнению с двойным комплексом между аутоантителом и меченым препаратом против TNF $\alpha$  (например, "Иммунокомплекс 2" на фиг.17А), самим меченым препаратом или самим меченым TNF $\alpha$ . Присутствие этого тройного комплекса аутоантитела (например, НАСА), меченого TNF $\alpha$  и меченого препарата против TNF $\alpha$  указывает на то, что аутоантитело, присутствующее в образце сыворотки, является не-нейтрализующей формой аутоантител (например, НАСА), так что оно не мешает связыванию между препаратом против TNF $\alpha$  и TNF $\alpha$ . В одном определенном воплощении, представленном на фиг.17А, если в сыворотке присутствует не-нейтрализующее аутоантитело, то будет наблюдаваться изменения в подвижности и для F1-REMICADE<sup>TM</sup>, и для F2-TNF $\alpha$ , приводя к увеличению пиков иммунокомплекса 1 и иммунокомплекса 2 и к уменьшению пиков свободного F1-REMICADE<sup>TM</sup> и свободного F2-TNF $\alpha$ . Однако присутствие двойного комплекса между аутоантителом (например, НАСА) и меченым препаратом против TNF $\alpha$  (например, "Иммунокомплекс 2" на фиг.17В) в отсутствие тройного комплекса аутоантитела (например, НАСА), меченого TNF $\alpha$  и меченого препарата против TNF $\alpha$  указывает на то, что аутоантитело, присутствующее в образце сыворотки, является нейтрализующей формой аутоантител (например, НАСА), так что оно мешает связыванию между препаратом против TNF $\alpha$  и TNF $\alpha$ . В одном определенном воплощении, представленном на фиг.17В, если в сыворотке присутствует нейтрализующее НАСА, то будет наблюдаться изменение подвижности для F1-REMICADE<sup>TM</sup>, что приводит к увеличению пика иммунокомплекса 2 и к уменьшению пика F1-REMICADE<sup>TM</sup> без изменения пика свободного F2-TNF $\alpha$ . В некоторых случаях присутствие нейтрализующих НАСА указывает на то, что следует перейти с текущего лечения REMICADE<sup>TM</sup> на другой препарат против TNF $\alpha$  типа HUMIRA<sup>TM</sup>.

В альтернативном воплощении меченный препарат против TNF $\alpha$  сначала инкубируют с сывороткой человека в жидкофазной реакции с тем, чтобы образовались комплексы (т.е. иммунокомплексы) между меченым препаратом против TNF $\alpha$  и НАСА, присутствующими в сыворотке. После инкубации образцы наносят прямо на первую эксклюзионную колонку. Связывание аутоантител (например, НАСА) с меченым препаратом против TNF $\alpha$  приводит к смещению пика (например, "Иммунокомплекс 2" на фиг.18) влево по сравнению с самим меченым препаратом. Затем в реакционную смесь добавляют меченный TNF $\alpha$ , чтобы определить, может ли он вытеснять, т.е. конкурировать с аутоантителом (например, НАСА) за связывание с меченым препаратом против TNF $\alpha$ , при этом образуются комплексы (т.е. иммунокомплексы) между меченым препаратом против TNF $\alpha$  и меченым TNF $\alpha$ . После инкубации образцы наносят прямо на вторую эксклюзионную колонку. Связывание меченного препарата против TNF $\alpha$  с меченым TNF $\alpha$  приводит к сдвигу пика (например, "Иммунокомплекс 3" на фиг.18) влево по сравнению с самим меченым TNF $\alpha$ . Нарушение связывания между

автоантителом (например, НАСА) и меченым препаратом против TNF $\alpha$  при добавлении меченого TNF $\alpha$  указывает на то, что автоантитело, присутствующее в сыворотке, является нейтрализующей формой автоантител (например, НАСА), так что автоантитело мешает связыванию между препаратом против TNF $\alpha$  и TNF $\alpha$ . В некоторых случаях 5 присутствие нейтрализующих НАСА указывает на то, что следует перейти с текущего лечения REMICADE<sup>TM</sup> на другой препарат против TNF $\alpha$  типа HUMIRA<sup>TM</sup>.

Пример 5. Анализ антител человека против лекарств (ADA) к адалиумабу в сыворотке пациентов новым гомогенным анализом изменения подвижности

Введение и цель. Моноклональные антитела против TNF- $\alpha$  типа инфликсимаб (IFX),

адалиумаб (HUMIRA<sup>TM</sup>) и цертолизумаб оказались эффективными при лечении 10 хронического воспаления кишечника (IBD) и других воспалительных заболеваний. Антитела против лекарств (ADA) могут снижать эффективность лекарств и/или вызывать 15 неблагоприятные эффекты. Однако ADAs были обнаружены не только у пациентов, принимавших химерное антитело инфликсимаб, но также у пациентов, принимавших гуманизированное антитело адалиумаб. Мониторинг уровней ADA и лекарств у 20 индивидуальных пациентов может способствовать оптимизации лечения и дозировки для пациентов. Мы разработали нерадиоактивный жидкотекущий гомогенный анализ изменения подвижности для точного измерения в сыворотке пациентов как НАСА (человеческих против химерных антител), так и IFX. Этот метод измерения преодолевает 25 главное ограничение существующих твердофазных методов детектирования НАСА, а именно: неспособность точно детектировать НАСА в присутствии IFX в кровотоке. В настоящем исследовании испытывали этот новый метод измерения уровней ADA и лекарств в сыворотке у пациентов, получавших гуманизированное лекарственное 30 антитело - адалиумаб.

25 Методы. Анализ изменения подвижности основывается на смещении времени удержания свободного антигена по сравнению с иммунокомплексом антиген-антитело при эксклюзионной хроматографии. Меченный флуорофором адалиумаб или TNF- $\alpha$  и внутренний контроль смешивали с образцами сыворотки для измерения изменения подвижности свободного адалиумаба и TNF- $\alpha$  в присутствии ADA или препарата.

30 Изменение соотношения свободного адалиумаба или TNF- $\alpha$  к внутреннему контролю является показателем образования иммунокомплекса. Концентрации ADA или адалиумаба в сыворотке определяли по стандартным кривым, составленным при инкубации с различными концентрациями антител против IgG человека или очищенного адалиумаба. Используя анализ изменения подвижности, измеряли уровни адалиумаба 35 и ADA в сыворотке больных IBD, получавших адалиумаб и потерявшим восприимчивость к нему.

Результаты. Составляли кривые "доза-ответ" по антителам против IgG человека для измерения изменения подвижности меченого адалиумаба. Предел обнаружения данного метода составил 1 нг антител против IgG человека. Сыворотки от 50 здоровых контролей 40 протестировали на ADA, и во всех образцах уровень ADA был ниже предела обнаружения (т.е. не было изменения в подвижности у свободного меченого адалиумаба). Детектирование ADA также проявлялось в присутствии добавленного извне адалиумаба. Для измерения концентрации препарата у пациентов, получавших адалиумаб, строили стандартную кривую при различных количествах адалиумаба 45 на изменение подвижности меченого TNF- $\alpha$ , и предел обнаружения адалиумаба составил 10 нг.

Выводы. Нерадиоактивный жидкотекущий гомогенный анализ изменения подвижности по настоящему изобретению применяли для измерения уровней ADA и адалиумаба в

сыворотке пациентов, получавших адалимумаб. Метод оказался воспроизведимым с высокой чувствительностью и точностью и может применяться для определения уровней ADA в образцах сыворотки пациентов, получающих адалимумаб.

Пример 6. Анализ антител против лекарств (ADA) к адалимумабу в сыворотке

5 пациентов новым собственным анализом изменения подвижности

#### Резюме

Введение. Препараты против TNF $\alpha$  типа инфликсимаб (IFX) и адалимумаб (ADL) оказались эффективными при лечении хронического воспаления кишечника (IBD).

Однако возникновение ADA у больных, получающих лечение, может снижать

10 эффективность лекарств и/или вызывать неблагоприятные эффекты. Действительно, ADAs были обнаружены не только у пациентов, получавших IFX, но также у пациентов, получавших ADL. Мониторинг уровней ADA и лекарств у индивидуальных пациентов может способствовать оптимизации лечения и дозировки для пациентов. Мы разработали собственный анализ изменения подвижности для точного измерения в сыворотке

15 пациентов как НАСА (человеческих против химерных антител), так и IFX. Этот метод преодолевает главное ограничение существующих твердофазных методов детектирования НАСА, а именно: неспособность точно детектировать НАСА в присутствии IFX в кровотоке. В настоящем исследовании испытывали этот новый метод измерения уровней ADA и лекарств в сыворотке у пациентов, получавших полностью

20 человеческое лекарственное антитело - ADL.

Методы. Анализ изменения подвижности основывается на смещении времени удержания иммунокомплекса антиген-антитело свободного антигена по сравнению со свободным антигеном при эксклюзионной хроматографии. Меченый флуорофором ADL или TNF- $\alpha$  и внутренний контроль смешивали с образцами сыворотки для измерения 25 изменения подвижности свободного ADL и TNF- $\alpha$  в присутствии ADA или препарата. Изменение соотношения свободного ADL или TNF- $\alpha$  к внутреннему контролю является показателем образования иммунокомплекса. Концентрации ADA или ADL в сыворотке определяли по стандартным кривым, составленным при инкубации с различными 30 концентрациями антител против IgG человека или очищенного ADL. Используя этот метод, измеряли уровни ADL и ADA в сыворотке, полученной от больных IBD, получавших ADL.

Результаты. Составляли кривые "доза-ответ" по антителам против IgG человека для измерения изменения подвижности меченого ADL. Предел обнаружения данного метода составил 10 нг антител против IgG человека. Сыворотки от 100 здоровых контролей 35 протестировали на ADA, и во всех образцах уровень ADA был ниже предела обнаружения (не было изменения подвижности у свободного меченого ADA). Детектирование ADA проявлялось у пяти из 114 образцов больных IBD, получавших ADL. Для измерения концентрации препарата у пациентов, получавших ADL, строили стандартную кривую при различных количествах ADL на изменение подвижности 40 меченого TNF- $\alpha$  с пределом обнаружения в 10 нг.

Выводы. Мы применили свой собственный нерадиоактивный жидкофазный гомогенный анализ изменения подвижности для измерения уровней ADA и ADL в сыворотке пациентов, получавших ADL. Метод оказался воспроизведимым с высокой чувствительностью и точностью и может применяться для определения уровней ADA 45 в образцах сыворотки пациентов, получающих ADL.

#### Введение

Биопрепараты  $\alpha$ -фактора некроза опухолей (TNF $\alpha$ ) типа инфликсимаб (IFX), этанерцепт, адалимумаб (ADL) и цертолизумаб-пегол, как оказалось, снижают

активность ряда иммунологических заболеваний, включая болезнь Крона (CD) и ревматоидный артрит (RA). Однако некоторые пациенты не поддаются терапии против TNF- $\alpha$ , тогда как другим нужны более высокие или более частые дозировки вследствие недостаточной восприимчивости или развития реакции на введение.

Иммуногенность терапевтических антител, которая вызывает появление у пациентов антител против лекарств, может способствовать несостоительности лечения и реакции на введение. Химерные антитела, подобные IFX, могут обладать большей способностью индуцировать образование антител, чем полностью гуманизированные антитела типа ADL. Распространенность антител к IFX (HACA) у больных RA колеблется от 12% до 44% и она обратно пропорциональна уровню IFX в сыворотке пациентов и реакции на лечение. Хотя предполагается, что полностью гуманизированный ADL будет менее иммуногенным, чем мышные или химерные антитела, однако в нескольких исследованиях сообщалось о появлении антител человека против гуманизированных антител (НАНА), причем распространенность появления антител составляет от 1% до 87% у больных RA и CD (Aikawa et al. Immunogenicity of anti-TNF-alpha agents in autoimmune diseases. Clin. Rev. Allergy Immunol., 38(2-3):82-9 (2010)).

Многие пациенты со вторичной невосприимчивостью к одному препарату против TNF $\alpha$  могут выиграть от перехода на другой препарат против TNF $\alpha$  или повышения дозы и/или частоты дозирования. Поэтому оправдан мониторинг пациентов на уровень препарата и антител против препарата (ADA) с тем, чтобы введение препарата было приспособлено к индивидуальному пациенту. Такой подход позволяет регулировать дозировку, если нужно, или прекращать прием лекарства, если имеются ADA (Bendtzen et al. Individual medicine in inflammatory bowel disease: monitoring bioavailability, pharmacokinetics and immunogenicity of anti-tumour necrosis factor-alpha antibodies. Scand. J. Gastroenterol., 44(7):774-81 (2009); Afif et al. Clinical utility of measuring infliximab and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease. Am. J. Gastroenterol., 105(5): 1133-9 (2010)).

Для измерения HACA и НАНА был разработан целый ряд методов. Одно из ограничений существующих методик состоит в том, что уровень ADA невозможно надежно измерить, если в кровотоке будет высокий уровень лекарства.

Мы разработали собственный нерадиоактивный жидкостный анализ изменения подвижности для измерения уровней ADA и ADL в сыворотке пациентов, получающих ADL, на который не влияет присутствие лекарства в сыворотке.

### Методы

Меченым флуорофором (F1) ADL инкубировали с сывороткой пациентов для образования иммунокомплекса. В каждую пробу включали F1-меченым небольшой пептид в качестве внутреннего контроля. При составлении стандартной кривой для определения уровня ADA в сыворотке использовали различные количества антител против IgG человека. Свободный F1-меченым ADL отделяли от связанного с антителом комплекса по молекулярной массе методом эксклюзационной хроматографии. Для экстраполяции концентрации НАНА из стандартной кривой использовали соотношение свободного F1-меченого ADL к внутреннему контролю для каждого образца. Аналогичная методика использовалась для измерения уровня ADL в образцах сыворотки пациентов с F1-меченым TNF- $\alpha$ .

### Результаты

На фиг.19 представлено отделение комплекса связанного с антителом против IgG человека F1-ADL от свободного F1-ADL вследствие изменения подвижности высокомолекулярного комплекса. Как видно из частей с-г, время удержания пика

флуоресценции смещается с 10,1 мин до 7,3-9,5 мин. Чем больше антител против IgG человека добавлено в реакционную смесь, тем меньше свободного ADL остается на хроматограмме и тем больше образуется иммунокомплекса (h-c). Время удержания для внутреннего контроля составляло 13,5 мин.

- 5 На фиг.20 представлена кривая "доза-ответ" для сдвига пика флуоресценции, вызванного добавлением антител против IgG человека. Повышение концентрации антител против IgG человека вызывает уменьшение отношения свободного ADL к внутреннему контролю вследствие образования иммунокомплекса. Чувствительность метода для антител против IgG человека составляет 10 нг/мл. Внутренний контроль
- 10 "F1-BioCyt" соответствует конъюгату Alexa Fluor® 488-биоцитин (BioCyt), в котором зеленый флуоресцентный флуорофор Alexa Fluor® 488 конъюгирован с биотином и фиксируемым альдегидом первичным амином (лизина) (Invitrogen Corp.; Carlsbad, CA).

- 15 На фиг.21 представлено отделение комплекса связанных с ADL TNF- $\alpha$ -F1 от свободного TNF- $\alpha$ -F1 вследствие изменения подвижности высокомолекулярного комплекса. Как видно из частей с и], время удержания пика флуоресценции смещается с 11,9 мин до 6,5-10,5 мин. Чем больше добавлено ADL в реакционную смесь, тем меньший пик свободного TNF- $\alpha$ -F1 остается на хроматограмме и тем больше образуется иммуно-

комплекса.

- 20 На фиг.22 представлены кривые "доза-ответ" для сдвига пика TNF- $\alpha$ -F1, вызванного добавлением ADL. Исходя из добавленного ADL, предел обнаружения ADL в сыворотке составляет 10 нг/мл.

- 25 В табл.4 представлен анализ образцов сыворотки от 100 здоровых субъектов и 114 больных IBD, получавших ADL, на уровне ADA и ADL анализом изменения подвижности по настоящему изобретению. Во всех образцах от 100 здоровых субъектов уровень ADA был ниже предела обнаружения (нет изменения подвижности у свободного F1-ADL), тогда как в 5 из 114 образцов больных концентрация ADA составляла от 0,012 до  $>20$  мкг/мл. Средний уровень ADL в образцах сыворотки от 100 здоровых субъектов составлял  $0,76 \pm 1,0$  мкг/мл (размах от 0 до 9,4 мкг/мл). Средний уровень ADL в образцах 30 сыворотки от 114 больных, получавших ADL, составлял  $10,8 \pm 17,8$  мкг/мл (размах от 0 до 139 мкг/мл). В 4 из пяти ADA-положительных образцов ADL не обнаруживался.

Таблица 4.

Уровни ADA и ADL в сыворотке пациентов при измерении анализом изменения подвижности

	Субъекты (n)	Пол(м/ж)	Возраст (лет) (среднее)	ADA-полож.	Уровень ADL(мкг/мл)
Здоровый контроль	100	38/62	18-62(37,1)	0	$0,76 \pm 1,0$
Больные IBD, получавшие ADL	114	51/63	20-69 (39,9)	5 (4,3%)	$10,80 \pm 17,80$

- 35 В табл.5 представлен дальнейший анализ образцов сыворотки от 100 здоровых субъектов и 114 больных IBD, получавших ADL. В частности, в 4 из 42 образцов больных с 0-4 мкг/мл ADL средняя концентрация ADA составляла от 0,012 до  $>20$  мкг/мл. В 4 из четырех ADA-положительных образцов ADL не обнаруживался. При детектировании ADA 114 больных IBD, получавших ADL, разделили на две категории: 0-4 мкг/мл ADL и  $>4$  мкг/мл ADL. Пациентов с уровнем ADL более 4 мкг/мл можно тестировать при большем количестве ADL-F1, учитывая конкуренцию циркулирующего ADL с ADL-F1.

45 Таблица 5.

Уровни ADA и ADL в сыворотке пациентов при измерении анализом изменения подвижности

	Субъекты (n)	Пол(м/ж)	Возраст (среднее)	Уровень ADL (мкг/мл)	ADA-ПОЛОЖИТ.
Здоровый контроль	100	38/62	18-62(37,1)	$0,76 \pm 1,00$	0

Больные IBD, получавшие ADL	114	51/63	20-69 (39,9)	10,80±17,80	ADL 0-4мкг/мл: 4 из 42 (9,52%)
--------------------------------	-----	-------	--------------	-------------	-----------------------------------

### Заключение

Для измерения НАСА/IFX использовали анализ изменения подвижности в формате 5 гомогенного определения без фиксирования антигенов на твердой поверхности и без многократного отмывания и инкубирования, как в типичном методе ELISA. Этот метод может применяться для измерения ADA и препаратов против TNF $\alpha$ . Чувствительность метода (в диапазоне мкг/мл) при измерении ADA и ADL в сыворотке пациентов выше 10 по сравнению с методами ELISA (в диапазоне мг/мл). Образцы сыворотки здорового контроля не вызывали изменения подвижности F1-меченого ADL, а у 4,3% пациентов, 15 получавших ADL, этим методом были обнаружены ADA. В частности, при таком определении ADA обнаруживались у 9,52% пациентов с 0,4 мкг/мл ADL. Будет проведена дальнейшая оценка нормальных образцов и образцов пациентов с более высокими 20 концентрациями ADL-F1. Хотя образцы сыворотки здорового контроля вызывали изменение подвижности F1-меченого TNF- $\alpha$ , что могло быть вызвано присутствием 15 растворимого свободного рецептора TNF- $\alpha$ , однако среднее значение ADL у пациентов, получавших ADL, было значительно выше (10,8 против 0,76 мкг/мл). Раннее выявление ADA и мониторинг уровня препарата ADL во время лечения пациента ADL позволит врачам оптимизировать дозировку ADL или перейти на другой препарат против TNF $\alpha$ , 20 если нужно, и тем самым оптимизировать процесс лечения заболеваний пациентов.

Пример 7. Определение уровня/концентрации REMICADE<sup>TM</sup> и антител человека против препарата

В этом примере описан способ определения уровня препаратов против TNF $\alpha$  25 например, REMICADE<sup>TM</sup> (инфликсимаб) в образцах сыворотки, а также определения уровня антител человека против препарата, например, антител человека против 25 химерных антител (НАСА) к REMICADE<sup>TM</sup> (инфликсимаб).

Стадия 1. Определение уровня/концентрации REMICADE<sup>TM</sup> (инфликсимаб) в образцах

В одном типичном воплощении TNF $\alpha$  метят флуорофором (например, Alexa<sub>647</sub>), 30 причем флуорофор можно детектировать в видимой области спектра и/или по флуоресценции. Меченный TNF $\alpha$  инкубируют с сывороткой человека в жидкофазной реакции, чтобы связался присутствующий в сыворотке препарат против TNF $\alpha$ . Меченный TNF $\alpha$  также можно инкубировать с известными количествами препарата против TNF $\alpha$  35 в жидкофазной реакции, чтобы составить стандартную кривую. После инкубации образцы наносят прямо на эксклюзионную колонку. Связывание препарата против TNF $\alpha$  с меченым TNF $\alpha$  приводит к сдвигу пика влево по сравнению с самим меченым TNF $\alpha$ . Концентрацию препарата против TNF $\alpha$  в образце сыворотки можно затем 45 сравнить со стандартной кривой и с контролями.

Определение уровня REMICADE<sup>TM</sup> (инфликсимаб) в сыворотке пациентов методом SE-HPLC. Рекомбинантный TNF $\alpha$  человека метили флуорофором Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 40 согласно инструкциям производителя. Меченный TNF $\alpha$  инкубировали с различными количествами REMICADE<sup>TM</sup> или сыворотки пациента в течение 1 часа при комнатной температуре. Образцы объемом 100 мкл анализировали методом эксклюзионной хроматографии на установке для HPLC. Для мониторинга свободного меченного TNF $\alpha$  и связанного с иммунокомплексом меченного TNF $\alpha$  по времени удержания использовали 45 детектирование флуоресцентной метки. Уровень REMICADE<sup>TM</sup> в сыворотке рассчитывали по стандартной кривой.

Следующие уравнения имеют отношение к этому определению:

уравнение I: меченный TNF $\alpha$ +REMICADE<sup>TM</sup>→(меченный-TNF $\alpha$ ·REMICADE<sup>TM</sup>)<sub>комплекс</sub>

уравнение II:  $[REMICADE^{\text{TM}}]_{\text{в отсут.меченого TNF}\alpha} = [(\text{меченный-TNF}\alpha \cdot REMICADE^{\text{TM}})_{\text{комплекс}}]$

уравнение III:  $[REMICADE \text{ меченный-TNF}\alpha \cdot REMICADE^{\text{TM}}]_{\text{комплекс}} / [\text{меченный-TNF}\alpha] \times [\text{меченный-TNF}\alpha]$ .

На стадии 1 известное количество меченого TNF $\alpha$  приводится в контакт с содержащим REMICADE<sup>TM</sup> образцом сыворотки. Меченный TNF $\alpha$  и REMICADE<sup>TM</sup> образуют комплекс (меченный-TNF $\alpha$ ·REMICADE<sup>TM</sup>), см. уравнение I. Поскольку почти весь REMICADE<sup>TM</sup> образует комплекс с меченым TNF $\alpha$ , концентрация REMICADE<sup>TM</sup> перед добавлением меченого TNF $\alpha$  равна измеренной концентрации комплекса меченный-TNF $\alpha$ ·REMICADE<sup>TM</sup>, см. уравнение II. Уровень концентрации REMICADE<sup>TM</sup> вычисляют умножением отношения  $[(\text{меченный-TNF}\alpha \cdot REMICADE^{\text{TM}})_{\text{комплекс}}] / [\text{меченный-TNF}\alpha]$  на  $[\text{меченный-TNF}\alpha]$ , см. уравнение III. Отношение  $[(\text{меченный-TNF}\alpha \cdot REMICADE^{\text{TM}})_{\text{комплекс}}] / [\text{меченный-TNF}\alpha]$  получают интегрированием площади под кривой для пика комплекса (меченный-TNF $\alpha$ -REMICADE<sup>TM</sup>) на графике интенсивности сигнала в зависимости от времени элюирования при эксклюзионной HPLC и делением этого числа на результат интегрирования площади под кривой для пика меченого TNF $\alpha$  на графике. Концентрация [меченный-TNF $\alpha$ ] известна a priori.

Стадия 2. Определение уровня антител человека против химерных антител (HACA)

В одном типичном воплощении препарат против TNF $\alpha$ , например, REMICADE<sup>TM</sup>, метят флуорофором (например, Alexa<sub>647</sub>), причем флуорофор можно детектировать в видимой области спектра и/или по флуоресценции. Меченный препарат против TNF $\alpha$  инкубируют с сывороткой человека в жидкофазной реакции, чтобы связались присутствующие в сыворотке HACA. Меченный препарат против TNF $\alpha$  также можно инкубировать с известными количествами антител против IgG или объединенной положительной сыворотки пациентов в жидкофазной реакции, чтобы составить стандартную кривую. После инкубации образцы наносят прямо на эксклюзионную колонку. Связывание аутоантител с меченым препаратом против TNF $\alpha$  приводит к сдвигу пика влево по сравнению с самим меченным препаратом. Концентрацию HACA в образце сыворотки можно затем сравнить со стандартной кривой и с контролями.

Определение уровня HACA в сыворотке пациентов методом SE-HPLC. Очищенный REMICADE<sup>TM</sup> метили флуорофором. Меченный REMICADE<sup>TM</sup> инкубировали с различными разведениями объединенной HACA-положительной сыворотки или разведенной сыворотки пациентов в течение 1 часа при комнатной температуре. Образцы объемом 100 мкл анализировали методом эксклюзионной хроматографии на установке для HPLC. Для мониторинга свободного меченого REMICADE<sup>TM</sup> и связанного с иммунокомплексом меченого REMICADE<sup>TM</sup> по времени удержания использовали детектирование флуорес-центной метки. Для определения уровня HACA использовали соотношение связанного и свободного меченого REMICADE<sup>TM</sup>, как описано ниже.

Методика определения изменения подвижности для измерения HACA в сыворотке. Принцип этого определения основывается на изменении подвижности комплекса антитела против лекарства, например, HACA, с A1exab47-меченым REMICADE<sup>TM</sup> по сравнению со свободным A1exab47-меченым REMICADE<sup>TM</sup> методом эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-HPLC) вследствие повышения молекулярной массы комплекса. Хроматографию проводили на установке Agilent-1200 HPLC System, используя колонку Bio-Sep 300×7,8 мм SEC-3000 (Phenomenex) с диапазоном фракционирования молекулярных масс 5 000-700000 и подвижной фазой из IxPBS, pH 7,3, при скорости потока 0,5-1,0 мл/мин с детектированием флуоресцентной метки,

например, УФ-детекти-рованием при 650 нм. Перед Agilent-1200 HPLC System с колонкой Bio-Sep 300×7,8 мм SEC-3000 находилась аналитическая предколонка Bio-Sep 75×7,8 мм SEC-3000. При каждом анализе на колонку наносили образец объемом 100 мкл.

Комплекс между HACA и меченным REMICADE™ образуется при инкубировании 5 сыворотки от получавших REMICADE™ пациентов с меченным REMICADE™ в элюирующем буфере 1×PBS, pH 7,3, при комнатной температуре в течение 1 часа перед анализом методом SE-HPLC. Следующие уравнения имеют отношение к этому определению:

уравнение IV: REMICADE™+меченный-REMICADE™+HACA→( REMICADE™.

10 HACA)<sub>комплекс</sub>+(меченный-REMICADE™.HACA)<sub>комплекс</sub>

уравнение V: [REMICADE™]/[REMICADE™.HACA<sub>комплекс</sub>]-[меченный-REMICADE™]  
/[меченный-REMICADE™.HACАкомплекс]

уравнение VI: [HACA]=[REMICADE™.HACA<sub>комплекс</sub>]+[меченный-REMICADE™.

15 HACA<sub>комплекс</sub>]

уравнение VII: [REMICADE™.HACA<sub>комплекс</sub>]=[REMICADE™]×[меченный-  
REMICADE™.HACA<sub>комплекс</sub>]/[меченный-REMICADE™]

уравнение VIII: [меченный-REMICADE™.HACA<sub>комплекс</sub>]=[меченный-REMICADE™]×  
[меченный-REMICADE™.HACA<sub>комплекс</sub>]/[меченный-REMICADE™]

уравнение IX: [REMICADE™]<sub>эффективное-количество</sub>=[REMICADE™]-[HACA]

Определение уровня/концентрации антител человека к препарату против TNF $\alpha$ .

например, HACA. В образец сыворотки добавляют меченный REMICADE™ известной концентрации. HACA образуют комплекс либо с REMICADE™, либо с меченным

25 REMICADE™, см. уравнение IV. Концентрация [REMICADE™] определяется на вышеприведенной стадии 1. Отношение [меченный-REMICADE™.HACA<sub>комплекс</sub>] к [меченный-REMICADE™] получается интегрированием площади под кривой для комплекса меченный-REMICADE™.HACA и делением этого числа на результат интегрирования площади под кривой для свободного меченого REMICADE™.

30 Отношение [REMICADE™] к [REMICADE™.HACA<sub>комплекс</sub>] равно отношению [меченный-REMICADE™] к [меченный-REMICADE™.HACA<sub>комплекс</sub>], см. уравнение V. Поскольку HACA уравновешиваются и образуют комплекс и с REMICADE™, и с меченным REMICADE™, то общее количество HACA равняется сумме количества комплекса

35 REMICADE™\*HACA и комплекса меченный- REMICADE™.HACA, см. уравнение VI. Поскольку отношение [REMICADE™] к [REMICADE™.HACA<sub>комплекс</sub>] равно отношению [меченный-REMICADE™] к [меченный-REMICADE™.HACA<sub>комплекс</sub>], то концентрации [REMICADE™.HACA<sub>комплекс</sub>] и [меченный-REMICADE™.HACАкомплекс], соответственно, определяются умножением отношения [меченный-REMICADE™.

40 HACA<sub>комплекс</sub>] на концентрацию/количество REMICADE™, определенные на стадии 1, и на концентрацию/количество меченого REMICADE™, известные a priori, см. уравнения VII и VIII. Следовательно, общее количество HACA равняется сумме (1)

45 [REMICADE™] из стадии 1, умноженной на отношение [меченный-REMICADE™.HACA<sub>комплекс</sub>]/[меченный-РЕМ1САДЕ™], и (2) [меченный-REMICADE™], известной a priori, умноженной на отношение [меченный- REMICADE™.HACA<sub>комплекс</sub>]/[меченный-REMICADE™].

Определение эффективной концентрации/уровня REMICADE™. Поскольку HACA

образуют комплекс с REMICADE™, то эффективное количество наличного REMICADE™ в образце сыворотки составляет количество REMICADE™, измеренное на стадии 1, минус количество НАСА, измеренное на стадии 2, см. уравнение IX.

Типичные вычисления. У пациента JAG на момент VI 0 [REMICADE™] составляла

- 5 7,5 мкг/мл, см. фиг.16 с.Этот результат был получен при прохождении стадии 1 с помощью уравнений I-III. 7,5 мкг/мл равняется 30 нг/4 мкл. Поскольку при измерении на стадии 2 использовалось 4 мкл образца, то в анализируемом образце было в общей сложности 30,0 нг REMICADE™. Отношение [меченный-REMICADE™.НАСА<sub>комплекс</sub>]/[меченный-REMICADE™] у пациента JAG на момент VI 0 составляло 0,25, см. фиг.16b.
- 10 Добавленный в образец [меченный-REMICADE™] составлял 37,5 нг/100мкл. Поскольку при измерении на стадии 2 использовали 100 мкл меченого REMICADE™, то в анализируемом образце было в общей сложности 37,5 нг меченого REMICADE™. По уравнению VII общее количество комплекса REMICADE™.НАСА составило 30 нг, умноженные на 0,25, что равняется 7,5 нг комплекса REMICADE™-НАСА. По уравнению
- 15 VIII общее количество комплекса REMICADE™.НАСА<sub>комплекс</sub> составило 37,5 нг, умноженные на 0,25, что равняется 9,4 нг комплекса меченный-REMICADE™.НАСА. По уравнению VI общее количество НАСА равняется сумме 9,4 нг и 7,5 нг, что равно 16,9 нг НАСА. Эти 16,9 нг НАСА находились в 4 мкл образца. Концентрация [НАСА] составляла 16,9 нг/4 мкл, что равно 4,23 мкг/мл. По уравнению DC эффективное количество REMICADE™ равняется 7,5 мкг/мл REMICADE™ при определении на стадии 1 минус 4,23 мкг/мл НАСА при определении на стадии 2. При таком типичном вычислении эффективная концентрация [REMICADE™] составила 3,27 мкг/мл.

Пример 8. Определение уровня/концентрации HUMIRA™ и антител человека против препарата

25 В этом примере описан способ определения уровня HUMIRA™ в образцах сыворотки, а также определения уровня антител человека против человеческих антител (НАА).

Стадия 1. Определение уровня/концентрации HUMIRA™ в образцах

В одном типичном воплощении TNF $\alpha$  метят флуорофором (например, Alexa47), причем флуорофор можно детектировать в видимой области спектра и/или по флуоресценции. Меченный TNF $\alpha$  инкубируют с сывороткой человека в жидкофазной реакции, чтобы связался присутствующий в сыворотке препарат против TNF $\alpha$ . Меченный TNF $\alpha$  также можно инкубировать с известными количествами препарата против TNF $\alpha$  в жидкофазной реакции, чтобы составить стандартную кривую. После инкубации образцы наносят прямо на эксклюзионную колонку. Связывание препарата против TNF $\alpha$  с меченым TNF $\alpha$  приводит к сдвигу пика влево по сравнению с самим меченым TNF $\alpha$ . Концентрацию препарата против TNF $\alpha$  в образце сыворотки можно затем сравнить со стандартной кривой и с контролями.

Определение уровня HUMIRA™ в сыворотке пациентов методом SE-HPLC.

Рекомбинантный TNF $\alpha$  человека метили флуорофором Alexa Fluor® 488 согласно 40 инструкциям производителя. Меченный TNF $\alpha$  инкубировали с различными количествами HUMIRA™ или сыворотки пациента в течение 1 часа при комнатной температуре. Образцы объемом 100 мкл анализировали методом эксклюзионной хроматографии на установке для HPLC. Для мониторинга свободного меченого TNF $\alpha$  и связанного с иммунокомплексом меченого TNF $\alpha$  по времени удержания использовали детектирование 45 флуоресцентной метки. Уровень HUMIRA™ в сыворотке рассчитывали по стандартной кривой.

Следующие уравнения имеют отношение к этому определению:

уравнение X: меченный TNF $\alpha$ +HUMIRA<sup>TM</sup>→(меченный-TNF $\alpha$ ·HUMIRA<sup>TM</sup>)<sub>комплекс</sub>

уравнение XI: HUMIRA<sup>TM</sup>→[(меченный-TNF $\alpha$ ·HUMIRA<sup>TM</sup>)<sub>комплекс</sub>]

уравнение XII: [HUMIRA<sup>TM</sup>]=[(HUMIRA<sup>TM</sup>→(меченный-TNF $\alpha$ ·HUMIRA<sup>TM</sup>)<sub>комплекс</sub>)]/[  
5 [меченный-TNF $\alpha$ ]×[меченный-TNF $\alpha$ ].

На стадии 1 известное количество меченого TNF $\alpha$  приводится в контакт с содержащим HUMIRA<sup>TM</sup> образцом сыворотки. Меченный TNF $\alpha$  и HUMIRA<sup>TM</sup> образуют комплекс (меченный-TNF $\alpha$ ·HUMIRA<sup>TM</sup>), см. уравнение X. Поскольку почти весь HUMIRA<sup>TM</sup> образует комплекс с меченым TNF $\alpha$ , концентрация HUMIRA<sup>TM</sup> перед добавлением меченого 10 TNF $\alpha$  равна измеренной концентрации комплекса меченный-TNF $\alpha$ -HUMIRA<sup>TM</sup>, см. уравнение XI. Концентрацию HUMIRA<sup>TM</sup> вычисляют умножением отношения [(меченный-TNF $\alpha$ ·HUMIRA<sup>TM</sup>)<sub>комплекс</sub>]/[меченный-TNF $\alpha$ ] на [меченный-TNF $\alpha$ ], см. уравнение XII.

15 Отношение [(меченный-TNF $\alpha$ ·HUMIRA<sup>TM</sup>)<sub>комплекс</sub>]/[меченный-TNF $\alpha$ ] получают интегрированием площади под кривой для меченого TNF $\alpha$  и площади под кривой для комплекса (меченный-TNF $\alpha$ -HUMIRA<sup>TM</sup>) и делением результата интегрирования для комплекса (меченный-TNF $\alpha$ -HUMIRA<sup>TM</sup>) на результат интегрирования для меченого TNF $\alpha$ . Концентрация [меченный-TNF $\alpha$ ] известна a priori.

Стадия 2. Определение уровня антител человека против человеческих антител, например, НАНА

20 В одном типичном воплощении препарат против TNF $\alpha$ , например, HUMIRA<sup>TM</sup>, метят флуорофором (например, Alexa<sub>647</sub>), причем флуорофор можно детектировать в видимой области спектра и/или по флуоресценции. Меченный препарат против TNF $\alpha$  инкубируют с сывороткой человека в жидкофазной реакции, чтобы связались присутствующие в сыворотке НАНА. Меченный препарат против TNF $\alpha$  также можно инкубировать с известными количествами антител против IgG или объединенной положительной 25 сыворотки пациентов в жидкофазной реакции, чтобы составить стандартную кривую. После инкубации образцы наносят прямо на эксклюзионную колонку. Связывание аутоантител с меченым препаратом против TNF $\alpha$  приводит к сдвигу пика влево по сравнению с самим меченым препаратом. Концентрацию НАНА в образце сыворотки 30 можно затем сравнить со стандартной кривой и с контролями.

Определение уровня НАНА в сыворотке пациентов методом SE-HPLC. Очищенный HUMIRA<sup>TM</sup> метили флуорофором. Меченный HUMIRA<sup>TM</sup> инкубировали с различными разведениями объединенной НАНА-положительной сыворотки или разведенной сыворотки пациентов в течение 1 часа при комнатной температуре. Образцы объемом 35 100 мкл анализировали методом эксклюзионной хроматографии на установке для HPLC. Для мониторинга свободного меченого HUMIRA<sup>TM</sup> и связанного с иммунокомплексом меченого HUMIRA<sup>TM</sup> по времени удержания использовали детектирование флуорес-центной метки. Для определения уровня НАНА использовали соотношение связанного и свободного меченого HUMIRA<sup>TM</sup>, как описано ниже.

40 Методика определения изменения подвижности для измерения НАНА в сыворотке. Принцип этого определения основывается на изменении подвижности комплекса антитела, например, НАНА, с Alexa<sub>647</sub>-меченым HUMIRA<sup>TM</sup> по сравнению со свободным Alexa<sub>647</sub>-меченым HUMIRA<sup>TM</sup> методом эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-HPLC) вследствие повышения молекулярной массы 45 комплекса. Хроматографию проводили на установке Agilent-1200 HPLC System, используя колонку Bio-Sep 300x7,8 мм SEC-3000 (Phenomenex) с диапазоном фракционирования молекулярных масс 5 000-700000 и подвижной фазой из 1×PBS, pH 7,3, при скорости потока 0,5-1,0 мл/мин с детектированием флуоресцентной метки,

например, УФ-детектированием при 650 нм. Перед Agilent-1200 HPLC System с колонкой Bio-Sep 300×7,8 мм SEC-3000 находилась аналитическая предколонка Bio-Sep 75×7,8 мм SEC-3000. При каждом анализе на колонку наносили образец объемом 100 мкл.

Комплекс между НАНА и меченным HUMIRA™ образуется при инкубировании

5 сыворотки от получавших HUMIRA™ пациентов с меченным HUMIRA™ в элюирующем буфере IxpBS, pH 7,3, при комнатной температуре в течение 1 часа перед анализом методом SE-HPLC.

Следующие уравнения имеют отношение к этому определению:

уравнение XIII:  $HUMIRA^{TM} + \text{меченный-}HUMIRA^{TM} + \text{НАНА} \rightarrow (\text{HUMIRA}^{TM})$ .

10  $\text{НАНА}_{\text{комплекс}} + (\text{меченный-}HUMIRA^{TM} \cdot \text{НАНА})_{\text{комплекс}}$

уравнение XIV:  $[\text{HUMIRA}^{TM}] / [\text{HUMIRA}^{TM} \cdot \text{НАНА}_{\text{комплекс}}] = [\text{меченный-}HUMIRA^{TM}] / [\text{меченный-}HUMIRA^{TM} \cdot \text{НАНА}_{\text{комплекс}}]$

уравнение XV:  $[\text{НАНА}] = [\text{HUMIRA}^{TM} \cdot \text{НАНА}_{\text{комплекс}}] + [\text{меченный-}HUMIRA^{TM}]$ .

15  $\text{НАНА}_{\text{комплекс}}$

уравнение XVI:  $[\text{HUMIRA}^{TM} \cdot \text{НАНА}_{\text{комплекс}}] = [\text{HUMIRA}^{TM}] \times [\text{меченный-}HUMIRA^{TM}]$ .  
 $\text{НАНА}_{\text{комплекс}}] / [\text{меченный-}HUMIRA^{TM}]$

уравнение XVII:  $[\text{меченный-}HUMIRA^{TM} \cdot \text{НАНА}_{\text{комплекс}}] = [\text{меченный-}HUMIRA^{TM}] \times$   
20  $[\text{меченный-}HUMIRA^{TM} \cdot \text{НАНА}_{\text{комплекс}}] / [\text{меченный-}HUMIRA^{TM}]$

уравнение XVIII:  $[\text{HUMIRA}^{TM}]_{\text{эффективное-количество}} = [\text{HUMIRA}^{TM}] - [\text{НАНА}]$

Вычисления для стадии 2. В образец сыворотки добавляют меченный HUMIRA™ известной концентрации. НАНА образуют комплекс либо с HUMIRA™, либо с меченным HUMIRA™, см. уравнение XIII. Концентрация  $[\text{HUMIRA}^{TM}]$  определяется на

25 вышеупомянутой стадии 1. Отношение  $[\text{меченный-}HUMIRA^{TM} \cdot \text{НАНА}_{\text{комплекс}}] / [\text{меченный-}HUMIRA^{TM}]$  получается интегрированием площади под кривой для комплекса меченный-HUMIRA™·НАНА и площади под кривой для меченого HUMIRA™ и делением результата интегрирования для комплекса меченный-HUMIRA™·НАНА на результат интегрирования для меченого HUMIRA™. Отношение  $[\text{HUMIRA}^{TM}]$  к  $[\text{HUMIRA}^{TM}]$ .  
30  $\text{НАНА}_{\text{комплекс}}$  равно отношению  $[\text{меченный-}HUMIRA^{TM}]$  к  $[\text{меченный-}HUMIRA^{TM}]$ .

$\text{НАНА}_{\text{комплекс}}]$ ; см. уравнение XIV. Поскольку НАНА уравновешиваются и образуют комплекс и с HUMIRA™, и с меченным HUMIRA™, то общее количество НАНА равняется сумме количества комплекса HUMIRA™·НАНА и комплекса меченный-HUMIRA™.

35 НАНА, см. уравнение XV. Поскольку отношение  $[\text{HUMIRA}^{TM}]$  к  $[\text{HUMIRA}^{TM}]$ .  
 $\text{НАНА}_{\text{комплекс}}$  равно отношению  $[\text{меченный-}HUMIRA^{TM}]$  к  $[\text{меченный-}HUMIRA^{TM}]$ .  
 $\text{НАНА}_{\text{комплекс}}$ , то концентрации  $[\text{HUMIRA}^{TM} \cdot \text{НАНА}_{\text{комплекс}}]$  и  $[\text{меченный-}HUMIRA^{TM} \cdot \text{НАНА}_{\text{комплекс}}]$ , соответственно, определяются умножением отношения  $[\text{меченный-}HUMIRA^{TM} \cdot \text{НАНА}_{\text{комплекс}}] / [\text{меченный-}HUMIRA^{TM}]$  на концентрацию  $[\text{HUMIRA}^{TM}]$ ,

40 определенную на стадии 1, и концентрацию  $[\text{меченный-}HUMIRA^{TM}]$ , известную a priori, см. уравнения XVI и XVII. Поскольку НАНА образуют комплекс с HUMIRA™, то эффективное количество наличного HUMIRA™ в образце сыворотки составляет количество HUMIRA™, измеренное на стадии 1, минус количество НАНА, измеренное на стадии 2, см. уравнение XVIII.

45 Типичные вычисления. У пациента SL 03246013 концентрация  $[\text{HUMIRA}^{TM}]$  составляла 16,9 мкг/мл, см. фиг.25. Этот результат был получен при прохождении стадии 1 с помощью уравнений X-XII. 16,9 мкг/мл равняется 67,6 нг/4 мкл. Поскольку при

измерении на стадии 2 использовалось 4 мкл образца, то в анализируемом образце было в общей сложности 67,6 нг HUMIRA™. Отношение [меченный-HUMIRA™.НАНА<sub>комплекс</sub>]/[меченный-HUMIRA™] у пациента SL03246013 составляло 0,055, см. фиг.25. Добавленный в образец [меченный-HUMIRA™] составлял 37,5 нг/ЮОмкл. Поскольку при измерении на стадии 2 использовали 100 мкл меченого HUMIRA™, то в анализируемом образце было в общей сложности 37,5 нг меченого HUMIRA™. По уравнению XVI общее количество комплекса HUMIRA™.НАНА составило 67,6 нг, умноженные на 0,055, что равняется 3,71 нг комплекса HUMIRA™.НАНА. По уравнению XVII общее количество комплекса меченный-НЦМ1РА™.НАНА составило 37,5 нг, умноженные на 0,055, что равняется 2,06 нг комплекса меченный-НЦМ1КА™.НАНА. По уравнению XV общее количество НАНА равняется сумме 3,71 нг и 2,06 нг, что равно 5,77 нг НАНА. Эти 5,77 нг НАНА находились в 4 мкл образца. Концентрация [НАНА] составляла 5,77 нг/4 мкл, что равно 1,44 мкг/мл. По уравнению XVIII эффективное количество HUMIRA™ равняется 16,9 мкг/мл HUMIRA™ при определении на стадии 1 минус 1,44 мкг/мл НАНА при определении на стадии 2. При таком типичном вычислении эффективная концентрация [HUMIRA™] составила 15,46 мкг/мл.

Пример 9. Определение количества комплекса НАСА или НАНА с REMICADE™ или меченым REMICADE™, HUMIRA™ или меченым HUMIRA™

В этом примере описан способ определения количества комплекса НАСА или НАНА с REMICADE™ или меченым REMICADE™, HUMIRA™ или меченым HUMIRA™ относительно внутреннего стандарта.

При использовании внутреннего контроля, например, Biocytin-Alexa 488, можно идентифицировать и должным образом проанализировать артефакты от сыворотки и вариации от одного эксперимента к другому. Количество внутреннего контроля, например, Biocytin-Alexa 488, составляет от 50 до 200 пг на подлежащих анализу 100 мкл.

Меченым флуорофором (Fl) HUMIRA™ инкубировали с сывороткой пациентов для образования иммунокомплекса. В качестве внутреннего контроля в каждую реакцию включали F1-меченым небольшой пептид, например, Biocytin-Alexa 488. В одном случае для составления стандартной кривой для определения уровня НАНА в сыворотке использовали различные количества антител против IgG человека. В другом случае для составления стандартной кривой для определения уровня НАНА в сыворотке использовали оттитрованную объединенную положительную сыворотку пациентов, которую калибровали по очищенным НАНА. В еще одном случае для получения стандартной кривой для определения уровня НАНА в сыворотке применяли способ, описанный в примере 7. Свободный меченый HUMIRA отделяли от связанного с антителом комплекса по молекулярной массе методом эксклюзионной хроматографии. Для экстраполяции концентрации НАНА по стандартной кривой использовали соотношение свободного меченого HUMIRA к внутреннему контролю для каждого образца. Аналогичная методика применялась для измерения уровня HUMIRA в образцах сыворотки пациентов с меченым TNF-α.

Исходное соотношение меченого препарата, т.е. меченого REMICADE™ или меченого HUMIRA к внутреннему контролю равнялось 100. Как видно из фиг.23 и 24, когда соотношение меченого препарата к внутреннему контролю падает ниже 95, меченый препарат считается комплексированным со связывающим соединением против препарата, например, НАСА или НАНА. Соотношение [меченый препарат] / [внутренний контроль] получали интегрированием площади под кривой для меченого препарата и для внутреннего контроля и последующим делением результата

интегрирования для меченого препарата на результат интегрирования для внутреннего контроля.

Пример 10. Определение соотношения между комплексированными препаратами против TNF $\alpha$  и некомплексированными препаратами против TNF $\alpha$

5 Соотношение между комплексированным препаратом против TNF $\alpha$  и некомплексированным препаратом против TNF $\alpha$  получали интегрированием площади под кривой для комплексированного препарата против TNF $\alpha$  и некомплексированного препарата против TNF $\alpha$  и последующим делением результата интегрирования для комплексированного препарата против TNF $\alpha$  на результат интегрирования для некомплексированного препарата против TNF $\alpha$ .

10 В одном воплощении некомплексированный препарат против TNF $\alpha$  представлен REMICADE<sup>TM</sup> на уровне от 0 нг до 100 нг в образце. Количество меченого REMICADE<sup>TM</sup> составляет около 37,5 нг.

15 При использовании внутреннего контроля, например, Biocytin-Alexa 488, можно идентифицировать и должным образом проанализировать артефакты от сыворотки и вариации от одного эксперимента к другому. Количество внутреннего контроля, например, Biocytin-Alexa 488, составляет от 50 до 200 пг на подлежащих анализу 100 мкл.

20 Соотношение меченого препарата против TNF $\alpha$ , например, REMICADE<sup>TM</sup> или HUMIRA<sup>TM</sup> к меченному внутреннему контролю получали интегрированием площади под кривой для меченого препарата против TNF $\alpha$  и меченого внутреннего контроля и последующим делением результата интегрирования для меченого препарата против TNF $\alpha$  на результат интегрирования для меченого внутреннего контроля.

25 Соотношение [(меченный-препарат-против-TNF $\alpha$ -автоантитело)<sub>комплекс</sub>]/[внутренний контроль] получали интегрированием площади под кривой для пика комплекса (меченный-препарат-против-TNF $\alpha$ -автоантитело) на графике интенсивности сигнала в зависимости от времени элюирования при эксклюзионной HPLC и делением этого числа на результат интегрирования площади под кривой для пика внутреннего контроля на графике. В некоторых воплощениях меченым препаратом против TNF $\alpha$  является меченный REMICADE<sup>TM</sup>. В некоторых других воплощениях меченым препаратом против TNF $\alpha$  является меченный HUMIRA<sup>TM</sup>.

30 Пример 11. Определение соотношения между свободным и комплексированным меченым TNF $\alpha$

35 В этом примере описан способ определения количества комплекса меченого TNF $\alpha$  с REMICADE<sup>TM</sup> или HUMIRA<sup>TM</sup> относительно внутреннего стандарта.

40 При использовании внутреннего контроля, например, Biocytin-Alexa 488, можно идентифицировать и должным образом проанализировать артефакты от сыворотки и вариации от одного эксперимента к другому. Количество внутреннего контроля, например, Biocytin-Alexa 488, составляет от 1 до 25 нг на подлежащих анализу 100 мкл.

45 В одном воплощении уровень некомплексированного меченого TNF $\alpha$  составляет от 50 нг до 150 нг в образце. В некоторых случаях количество меченого TNF $\alpha$  составляет около 100,0 нг.

50 Меченный флуорофором (F1) TNF $\alpha$  инкубировали с сывороткой пациентов для образования иммунокомплекса. В качестве внутреннего контроля в каждую реакцию включали F1-меченный небольшой пептид, например, Biocytin-Alexa 488. Стандартную кривую составляли добавлением известных концентраций очищенного препарата против TNF $\alpha$ , а затем по кривой экстраполировали концентрации в единицах мкг/мл.

Исходное соотношение меченого TNF $\alpha$  к внутреннему контролю равнялось 100.

Когда соотношение меченого препарата к внутреннему контролю падает ниже 95, меченный TNF $\alpha$  считается комплексированным с препаратом против TNF $\alpha$ , например, REMICADE<sup>TM</sup> или HUMIRA<sup>TM</sup>. Соотношение [меченный TNF $\alpha$ ]/[внутренний контроль] получали интегрированием площади под кривой для меченого TNF $\alpha$  и для внутреннего контроля и последующим делением результата интегрирования для меченого TNF $\alpha$  на результат интегрирования для внутреннего контроля.

Пример 12. Оптимизация лечения препаратом против TNF $\alpha$  измерением уровня препарата против TNF $\alpha$  и/или антител против препарата (ADA)

В этом примере описаны способы оптимизации лечения препаратом против TNF $\alpha$ ,

10 снижения токсичности, связанной с лечением препаратом против TNF $\alpha$ , и/или мониторинга эффективности терапевтического лечения препаратом против TNF $\alpha$  путем измерения количества (например, уровня концентрации) препарата против TNF $\alpha$  (например, уровня свободных терапевтических антител против TNF $\alpha$ ) и/или антител против препарата (ADA) (например, уровня аутоантител к препаратуре против TNF $\alpha$ ) в 15 образцах от субъектов, получающих лечение препаратом против TNF $\alpha$ . Соответственно, изложенные в данном примере способы дают информацию, полезную для принятия решений по лечению, например, решения о том, когда или как регулировать или модифицировать (например, повысить или понизить) последующую дозировку препарата против TNF $\alpha$ , когда или как комбинировать препарат против TNF $\alpha$  (например, при 20 повышенной, пониженной или такой же дозировке) с одним или несколькими иммунодепрессивными средствами, такими как метотрексат (МТХ) или азатиоприн, и/или когда или как изменить текущий курс терапии (например, перейти на другой препарат против TNF $\alpha$ ).

Исключительно в целях иллюстрации, следующие сценарии дают представление о 25 том, как способы настоящего изобретения по преимуществу обеспечивают оптимизацию терапии и минимизацию или снижение токсичности (например, побочных эффектов), исходя из уровня препарата против TNF $\alpha$  (например, уровня свободных терапевтических антител против TNF $\alpha$ ) и/или ADA (например, уровня аутоантител к препаратуре против TNF $\alpha$ ) в образце от субъекта, получающего лечение препаратом против TNF $\alpha$ . Уровни 30 препарата против TNF $\alpha$  и ADA можно измерить с помощью новых описанных здесь способов.

Сценарий №1. Высокий уровень препарата против TNF $\alpha$  при низком уровне антител против препарата (ADA)

Уровень препарата =10-50 нг/10 мкл; уровень ADA=0,1-2 нг/10 мкл. Образцы 35 пациентов с таким профилем включают образцы пациентов ВАВ и JAA на момент 10-го посещения ("V10"). См. фиг.16b.

Пациентам, получающим лечение препаратом против TNF $\alpha$  и имеющим данный профиль, следует назначать иммунодепрессивные препараты типа азатиоприна (AZA) вместе с препаратом против TNF $\alpha$  (например, инфликсимабом).

Сценарий №2. Средний уровень препарата против TNF $\alpha$  при низком уровне ADA

Уровень препарата=5-20 нг/10 мкл; уровень ADA=0,1-2 нг/10 мкл. Образцы пациентов с таким профилем включают образцы от пациентов DGO, JAG и JJH на момент V10. См. фиг.16b.

Пациентам, получающим лечение препаратом против TNF $\alpha$  и имеющим данный 45 профиль, следует назначать иммунодепрессивные препараты типа азатиоприна (AZA) вместе с более высокой дозой препарата против TNF $\alpha$  (например, инфликсимаба). Специалистам в данной области должны быть известны подходящие более высокие или более низкие дозы, на которые следует перевести текущий курс лечения с тем, чтобы

оптимизировать лекарственную терапию, например, последующая доза должна быть по меньшей мере в 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или 100 раз выше или ниже, чем текущая доза.

Сценарий №3. Средний уровень препарата против TNF $\alpha$  при среднем уровне ADA

5 Уровень препарата=5-20 нг/10 мкл; уровень ADA=0,5-10 нг/10 мкл. Образцы пациентов с таким профилем включают образцы пациента JMM на момент 10-го посещения ("V10") и пациента J-L на момент 14-го посещения ("V14"). См. фиг.16b.

Пациентам, получающим лечение препаратом против TNF $\alpha$  и имеющим данный профиль, следует назначать другой препарат. В качестве неограничивающего примера:

10 пациентов на лечении инфликсимабом (IFX) со средним уровнем IFX и ADA (т.е. НАСА) следует перевести на лечение адалиумабом (HUMIRA<sup>TM</sup>).

Сценарий №4. Низкий уровень препарата против TNF $\alpha$  при высоком уровне ADA

Уровень препарата=0-5 нг/10 мкл; уровень ADA=3,0-50 нг/10 мкл. Образцы пациентов с таким профилем включают образцы всех пациентов на момент V14 на фиг.16b.

15 Пациентам, получающим лечение препаратом против TNF $\alpha$  и имеющим данный профиль, следует назначать другой препарат. В качестве неограничивающего примера: пациентов на лечении инфликсимабом (IFX) с низким уровнем IFX при высоком уровне ADA (т.е. НАСА) следует перевести на лечение адалиумабом (HUMIRA<sup>TM</sup>).

Хотя вышеупомянутое изобретение было описано весьма подробно на иллюстрациях

20 и примерах в целях ясности и понимания, специалистам должно быть понятно, что можно производить определенные изменения и модификации в рамках прилагаемой формулы изобретения. Кроме того, все приведенные здесь ссылки включены путем ссылки во всей полноте в такой же степени, как если бы каждая отдельная ссылка была отдельно включена путем ссылки.

#### 25 Формула изобретения

1. Способ определения наличия или уровня лекарственного средства против TNF $\alpha$  в образце, который включает:

30 (а) контактирование меченого TNF $\alpha$  с образцом, содержащим лекарственное средство против TNF $\alpha$ , с образованием меченого комплекса с лекарственным средством против TNF $\alpha$ ;

(б) подвергание меченого комплекса эксклюзационной хроматографии для отделения меченого комплекса от свободного меченого TNF $\alpha$  и для определения количества меченого комплекса и количества свободного меченого TNF $\alpha$ ; и

35 (с) сравнение количества меченого комплекса и количества свободного меченого TNF $\alpha$ , определенных на стадии (б), со стандартной кривой для известных количеств лекарственного средства против TNF $\alpha$ , таким образом определяя наличие или уровень лекарственного средства против TNF $\alpha$ .

40 2. Способ по п.1, в котором стандартную кривую получают при инкубировании меченого TNF $\alpha$  с известными количествами лекарственного средства против TNF $\alpha$ .

3. Способ по п.1, в котором образец представлен сывороткой.

45 4. Способ по п.1, в котором лекарственное средство против TNF $\alpha$  выбирается из группы, состоящей из REMICADE<sup>TM</sup> (инфликсимаб), ENBREL<sup>TM</sup> (этанерцепт), HUMIRA<sup>TM</sup> (адалиумаб), CIMZIA<sup>®</sup> (цертолизумаб-пегол) и их комбинаций.

5. Способ по п.1, в котором эксклюзационная хроматография представлена эксклюзационной высокоэффективной жидкостной хроматографией (SE-HPLC).

45 6. Способ по п.1, в котором меченный TNF $\alpha$  представляет собой меченный флуорофором TNF $\alpha$ .

7. Способ по п.6, в котором флуорофор представляет собой краситель Alexa Fluor®.

8. Способ по п.1, в котором меченный комплекс элюируется первым, а за ним следует свободный меченный TNF $\alpha$ .

9. Способ по п.1, в котором образец берут у субъекта, получающего лечение

5 лекарственным средством против TNF $\alpha$ .

10. Способ определения наличия или уровня аутоантител к лекарственному средству против TNF $\alpha$  в образце, который включает:

(а) контактирование меченого лекарственного средства против TNF $\alpha$  с образцом с образованием меченого комплекса с аутоантителом;

10 (б) подвергание меченого комплекса эксклюзионной хроматографии для отделения меченого комплекса от свободного меченого лекарственного средства против TNF $\alpha$  и для определения количества меченого комплекса и количества свободного меченого лекарственного средства против TNF $\alpha$  и

15 (с) сравнение количества меченого комплекса и количества свободного меченого лекарственного средства против TNF $\alpha$ , определенных на стадии (б), со стандартной кривой для известных количеств аутоантител, таким образом определяя наличие или уровень аутоантител.

11. Способ по п.10, в котором стандартную кривую получают при инкубировании меченого лекарственного средства против TNF $\alpha$  с сывороткой, содержащей

20 аутоантитела.

12. Способ по п.10, в котором образец представлен сывороткой.

13. Способ по п.10, в котором лекарственное средство против TNF $\alpha$  выбирается из группы, состоящей из REMICADE™ (инфликсимаб), ENBREL™ (этанерцепт), HUMIRA™ (адалимумаб), CIMZIA® (пертолизумаб-пегол) и их комбинаций.

25 14. Способ по п.10, в котором аутоантитела выбираются из группы, состоящей из человеческих против антител мыши (НАМА), человеческих против химерных антител (НАСА), человеческих против гуманизированных антител (НАНА) и их комбинаций

15. Способ по п.10, в котором эксклюзионная хроматография представлена эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографией (SE-HPLC).

30 16. Способ по п.10, в котором меченое лекарственное средство против TNF $\alpha$  представляет собой меченое флуорофором лекарственное средство против TNF $\alpha$ .

17. Способ по п.16, в котором флуорофор представляет собой краситель Alexa Fluor®.

18. Способ по п.10, в котором меченный комплекс элюируется первым, а за ним следует свободное меченое лекарственное средство против TNF $\alpha$ .

35 19. Способ по п.10, в котором образец берут у субъекта, получающего лечение лекарственным средством против TNF $\alpha$ .

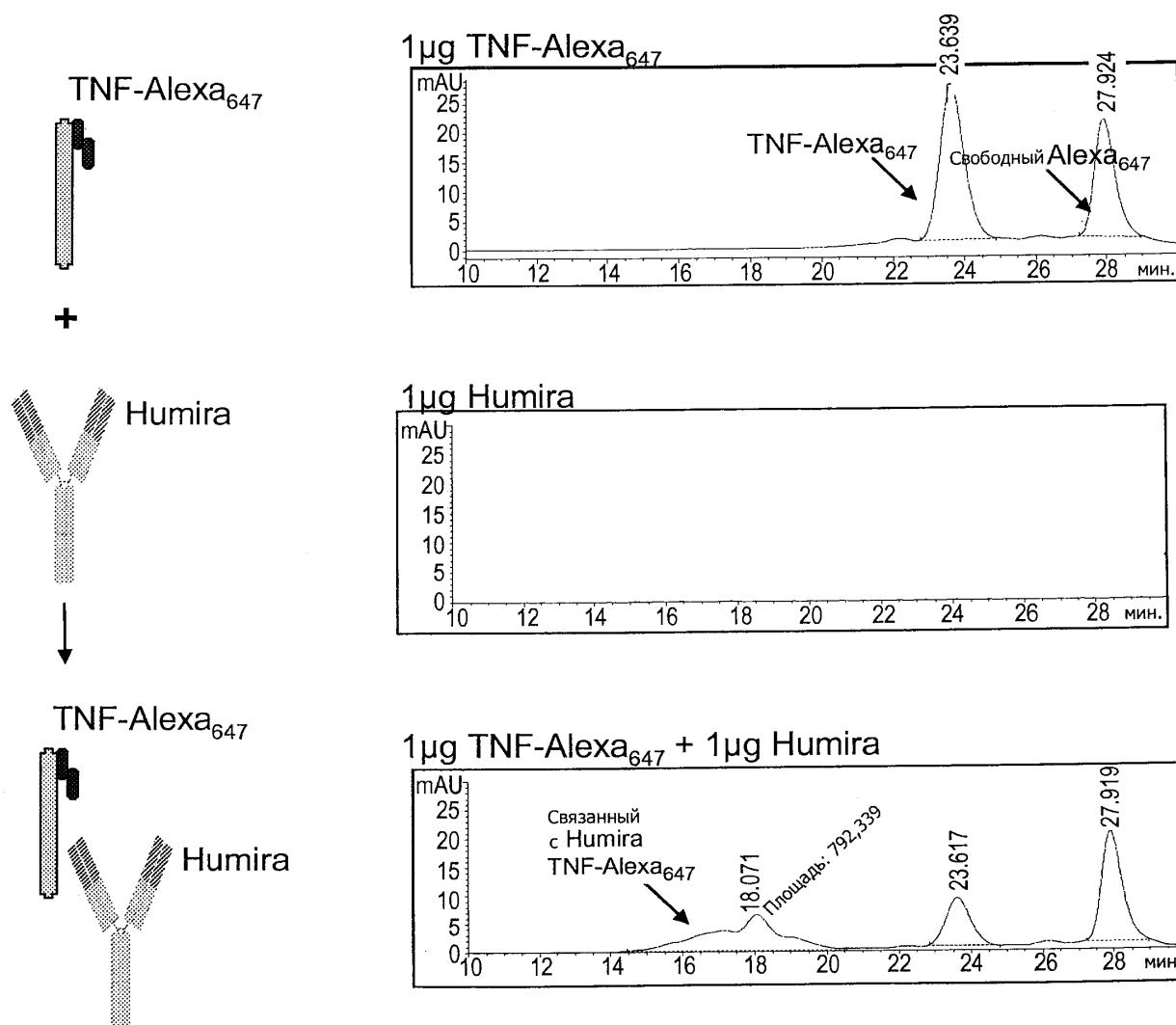
20. Способ по п.10, в котором определяется соотношение свободного меченого лекарственного средства против TNF $\alpha$  к внутреннему контролю, которое используется для определения уровня аутоантител на основе стандартной кривой.

40

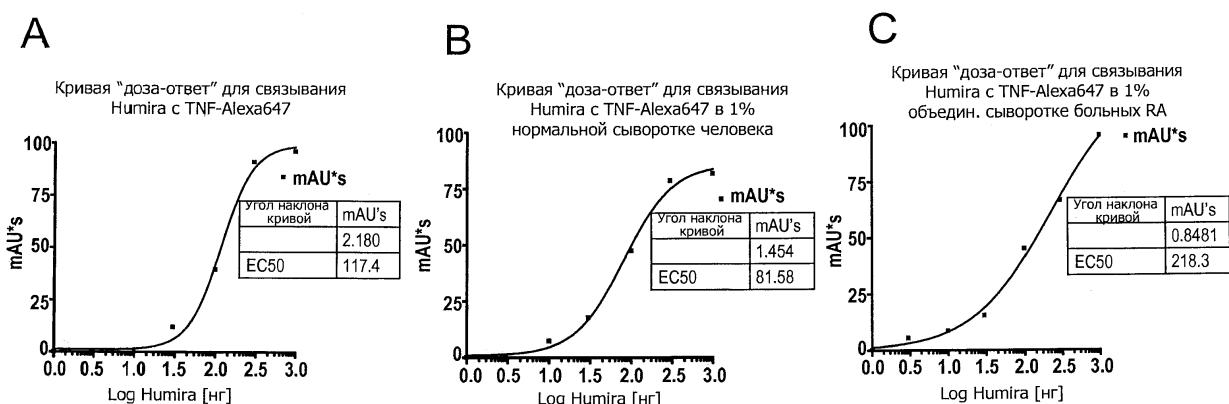
45

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<170> PatentIn version 3.3  
 <210> 1  
 <211> 233  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (77)..(233)  
 <223> soluble form of TNF-alpha  
 <400> 1  
 Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala  
 1 5 10 15  
 Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe  
 20 25 30  
 Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe  
 35 40 45  
 Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro  
 50 55 60  
 Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro  
 85 90 95  
 Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu  
 100 105 110  
 Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser  
 115 120 125  
 Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly  
 130 135 140  
 Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala  
 145 150 155 160  
 Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro  
 165 170 175  
 Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu  
 180 185 190  
 Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu  
 195 200 205  
 Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly  
 210 215 220  
 Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu  
 225 230

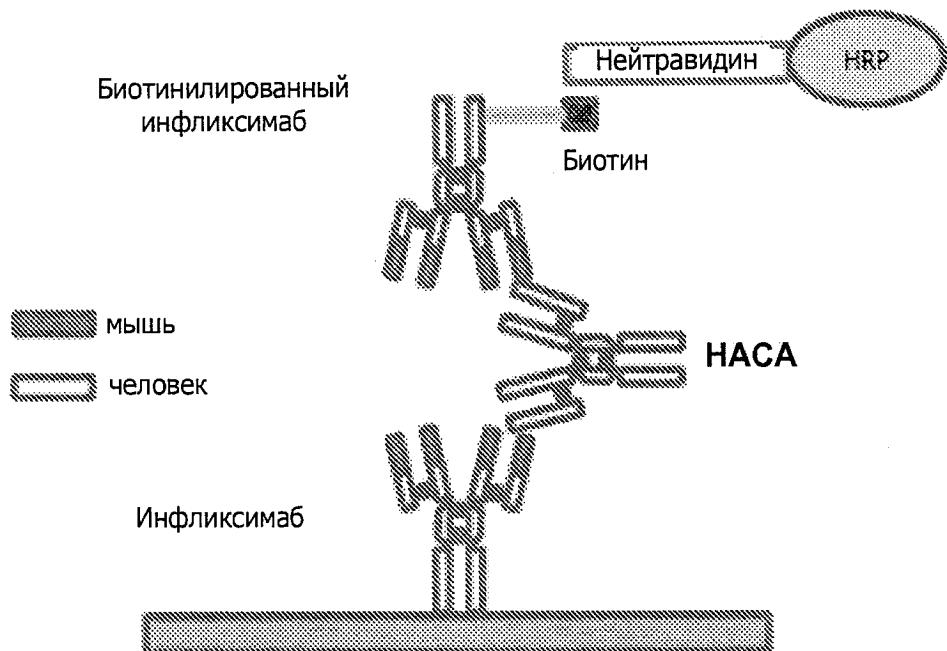


ФИГ. 1



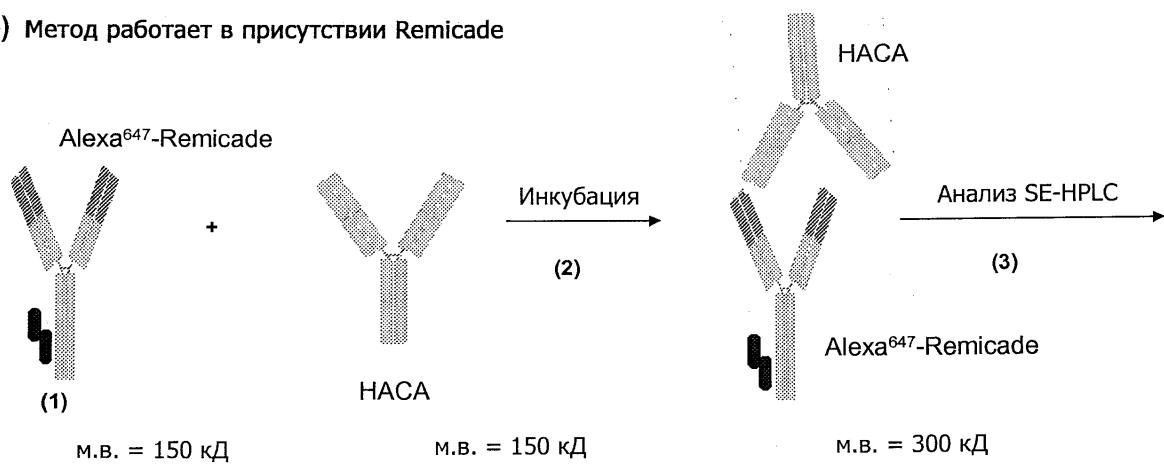
ФИГ. 2

“Мостиковый” метод:

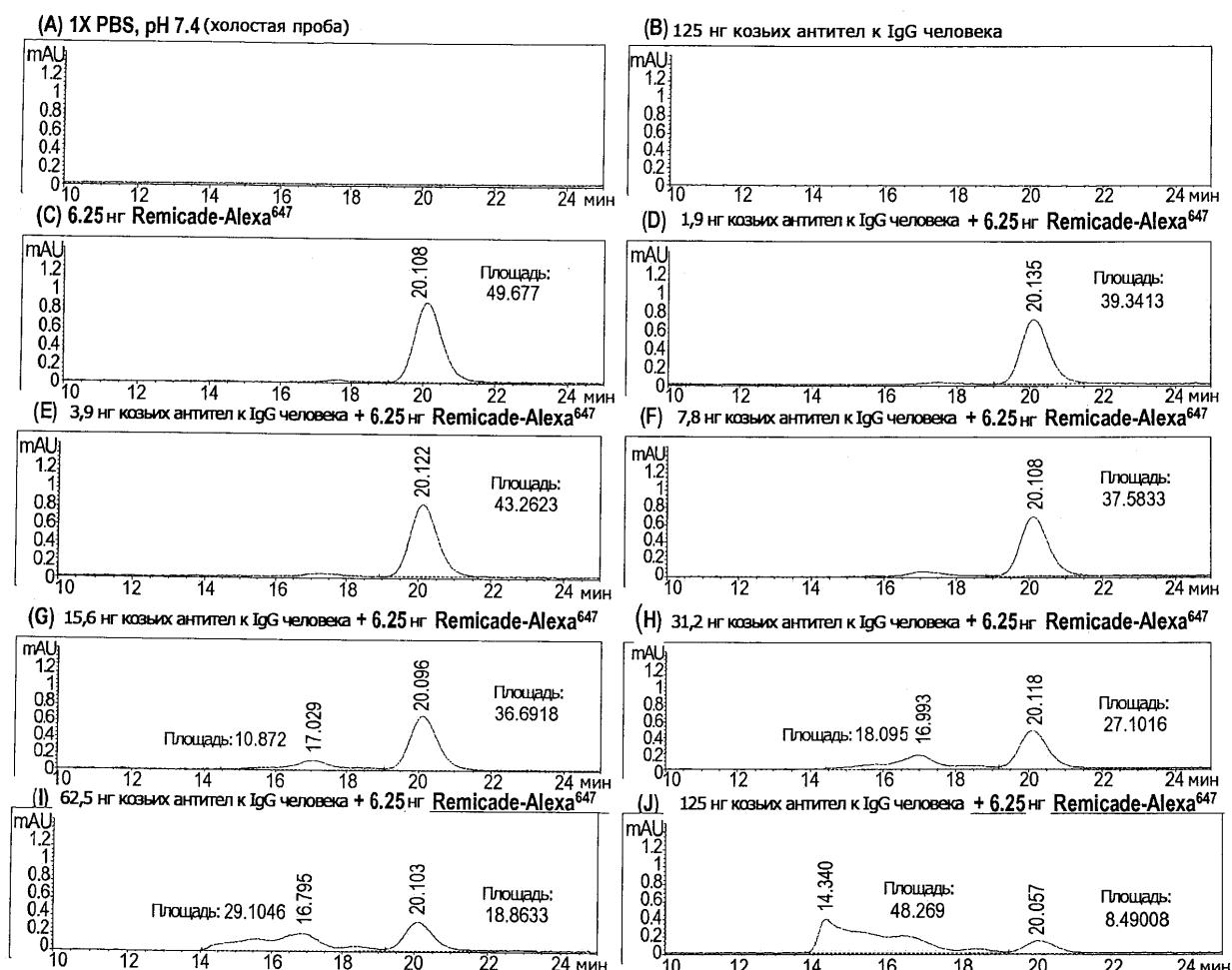


ФИГ. 3

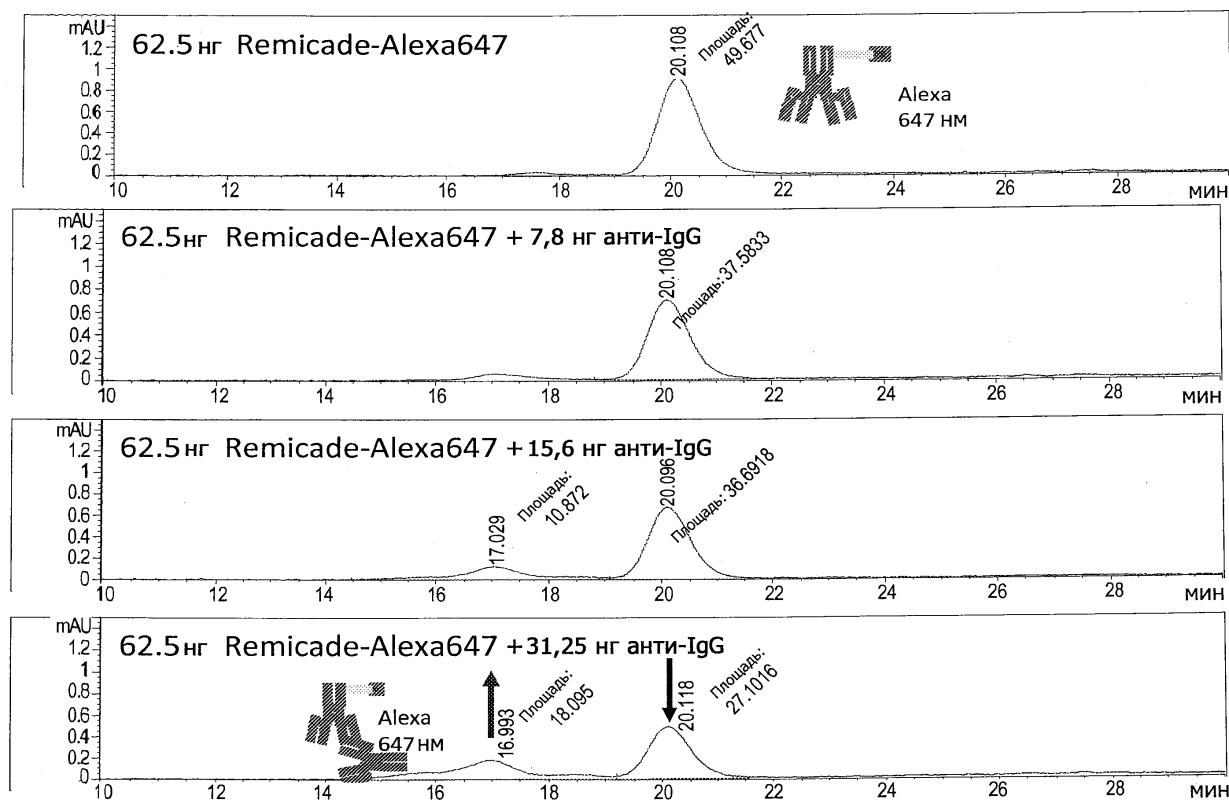
- (1) Получение Alexa<sub>647</sub>-меченого Remicade
- (2) Инкубация с сывороткой пациентов (HACA) для образования комплекса
- (3) Колич. определение комплекса методом SE-HPLC
- (4) Метод работает в присутствии Remicade



ФИГ. 4



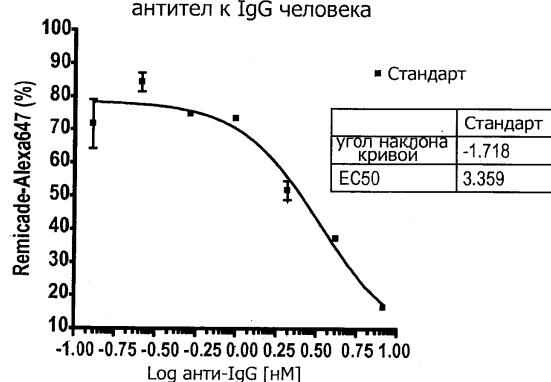
ФИГ. 5



Фиг. 6

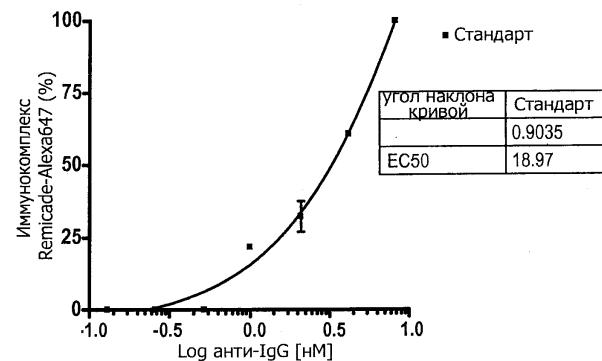
A.

Кривая “доза-ответ” для свободного Remicade-Alexa647 после инкубации при различных концентрациях антител к IgG человека



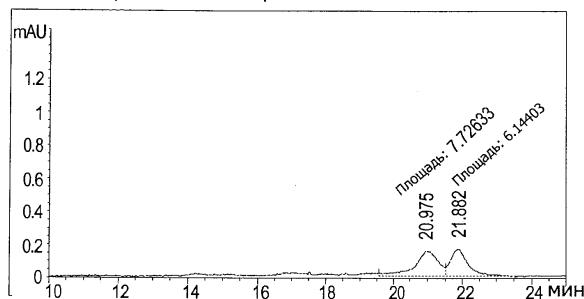
B.

Кривая “доза-ответ” для комплекса Remicade-Alexa647 при различных концентрациях антител к IgG человека

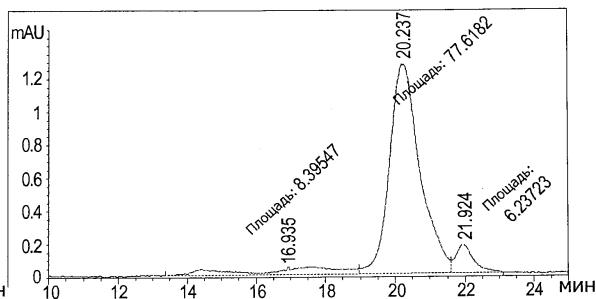


Фиг. 7

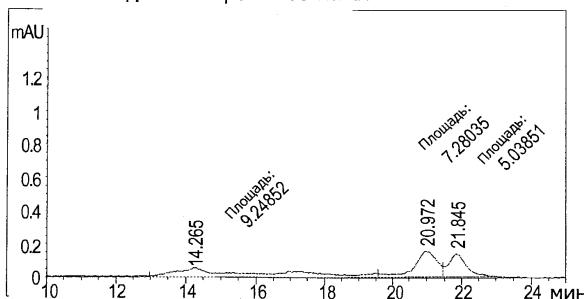
A. 4% нормальной сыворотки человека



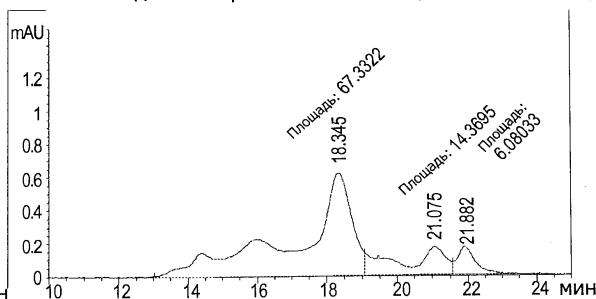
B. 4% нормальной сыворотки человека + 4,2 нМ Remicade-Alexa



C. 4% объедин. сыворотки больных



D. 4% объедин. сыворотки больных + 4,2 нМ Remicade-Alexa



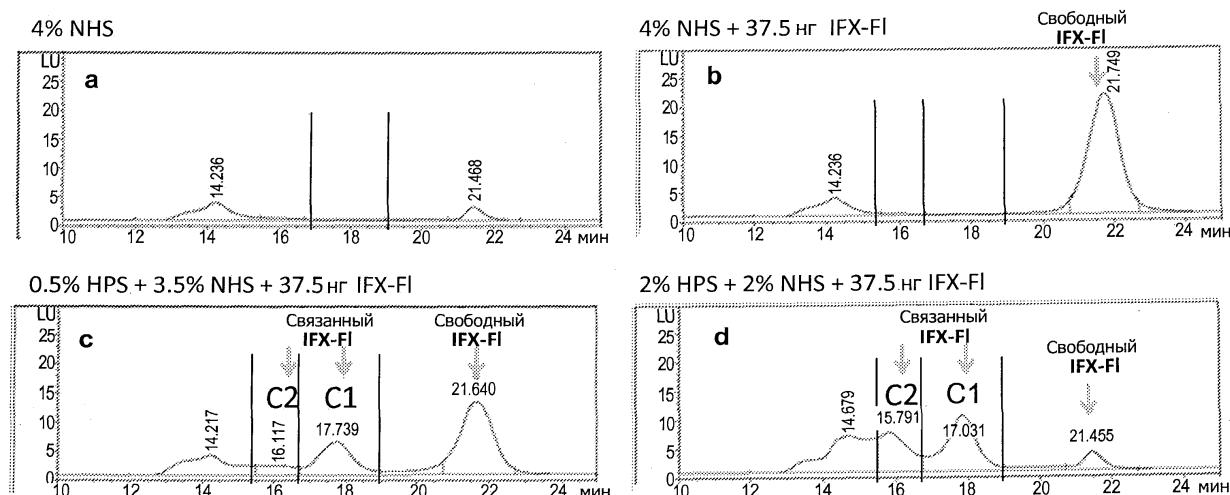
Фиг. 8

№ доступа	"Мостиковый" ELISA		Определение изменения подвижности (4% сыворотки)		
	Колич. результат	Качест. результат	НАСА-сдвиг	Площадь НАСА/площадь Remicade-Alexa	Remicade (нМ)
SK07010477	22.26	+	+	0.78	3.33
SK07060083	1.41	-	-	0.1	4.06
SK07070083	1.41	-	-	0.1	8.81
SK07070305	1.41	-	-	0.46	7.34
SK07070595	1.41	-	-	0.25	8.35
SK07071213	2.48	+	+	0.16	5.30
SK07081127	22.07	+	+	0.28	3.00
SK07110035	1.41	-	-	0.18	>66.7
SK07141447	2.62	+	+	0.42	2.43
SK07171059	10.11	+	+	18.02	2.59
SK07171095	10.03	+	+	0.24	2.24
SK07210210	9.26	+	+	0.8	<0.67
SK07231216	25.58	+	+	Полный сдвиг	1.34
SK07310149	2.74	+	+	0.21	<0.67
SK08040168	22.21	+	+	Полный сдвиг	<0.67
SK08051035	9.72	+	+	8.7	1.89
SK08070307	2.49	+	+	0.23	3.14
SK08120222	9.2	+	+	0.25	<0.67
SK08260093	23.15	+	+	0.48	1.04
SK08260783	2.67	+	+	0.25	3.30
62.5 нг Remicade - 647				0.12	
100 нг TNF - 647					<0.67

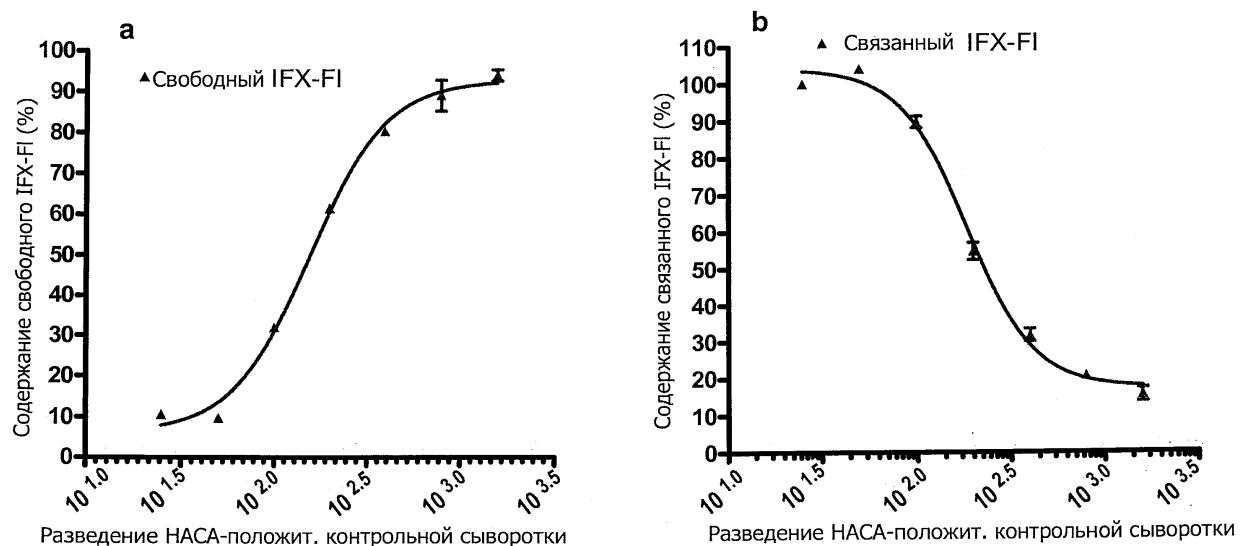
Фиг. 9

	НАСА "мостиковым" методом	Однородный "мостиковый" ELISA на основе биотина и DIG	НАСА методом наст. изобретения
Формат анализа			
Неспецифические помехи	сильные	сильные	низкие
Чувствительность	низкая	средняя	сильная
Вероятность ложно-полож. и ложно-отрицат.	сильная	сильная	низкая
Выявление НАСА типа IgG4	нет	нет	да
Идентификация изотипа IgG	нет	нет	да
Допустимость препарата в образце	плохая	плохая	хорошая

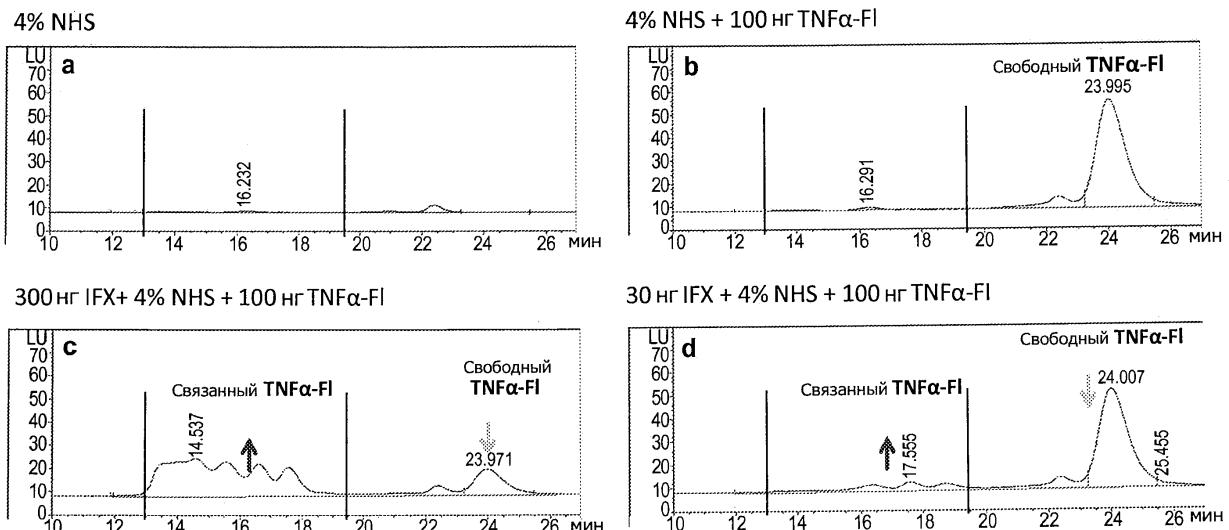
Фиг. 10



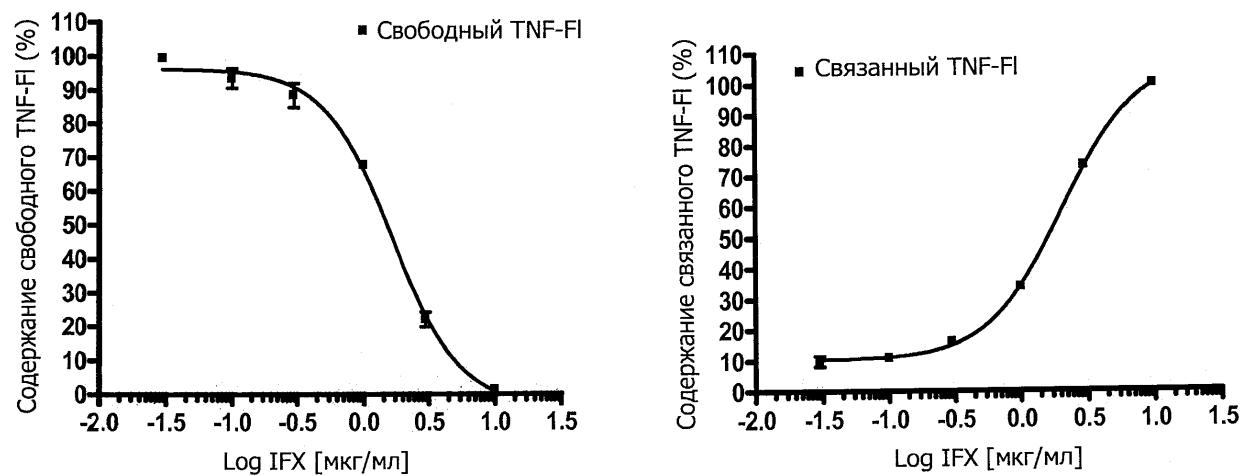
Фиг. 11



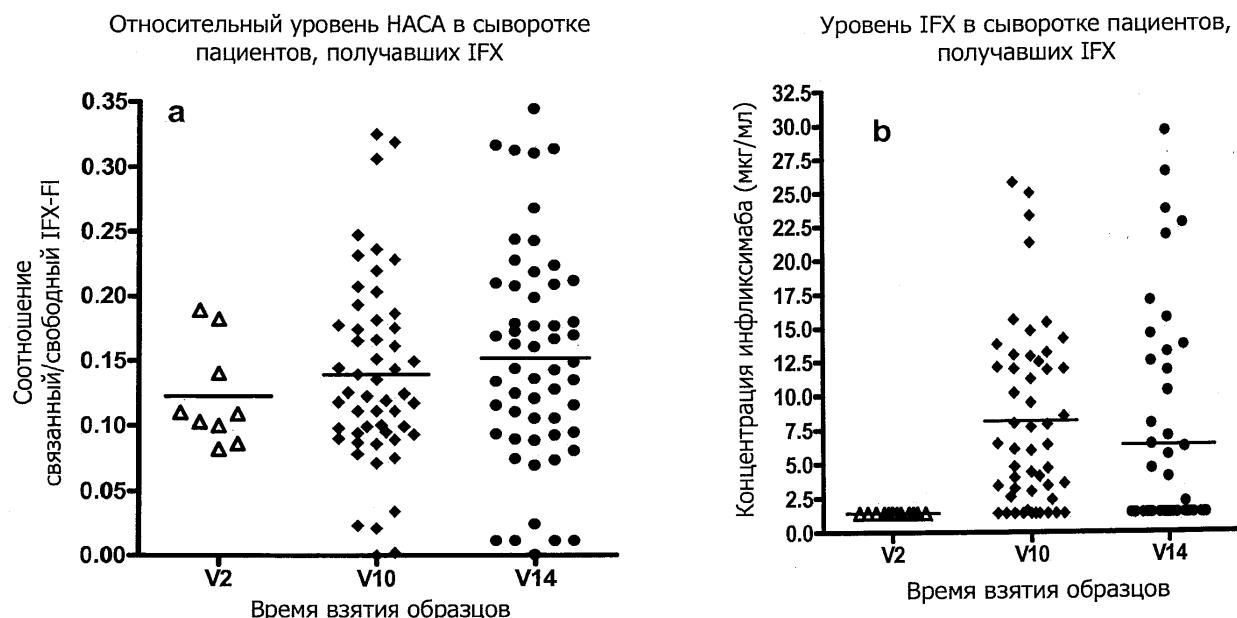
Фиг. 12



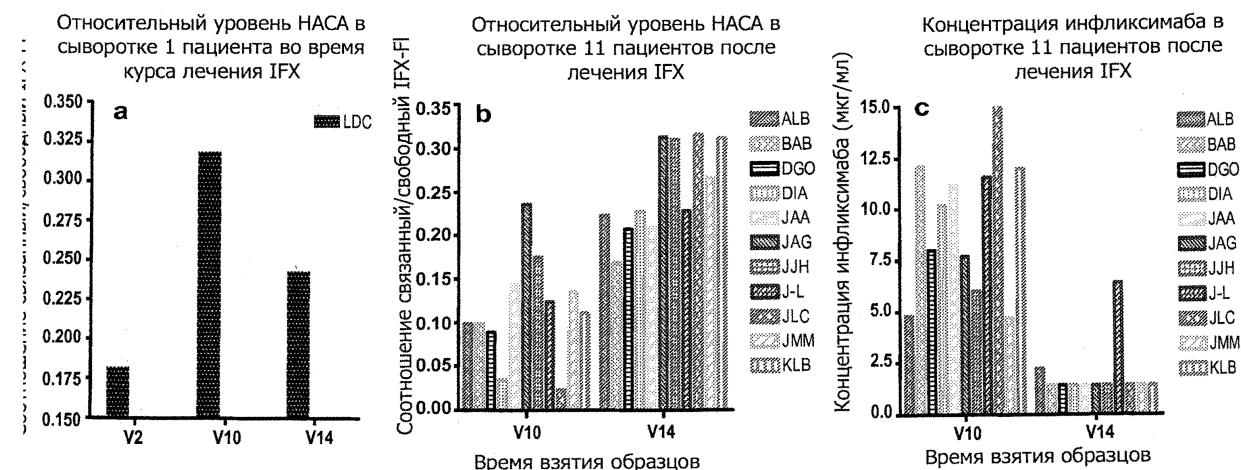
Фиг. 13



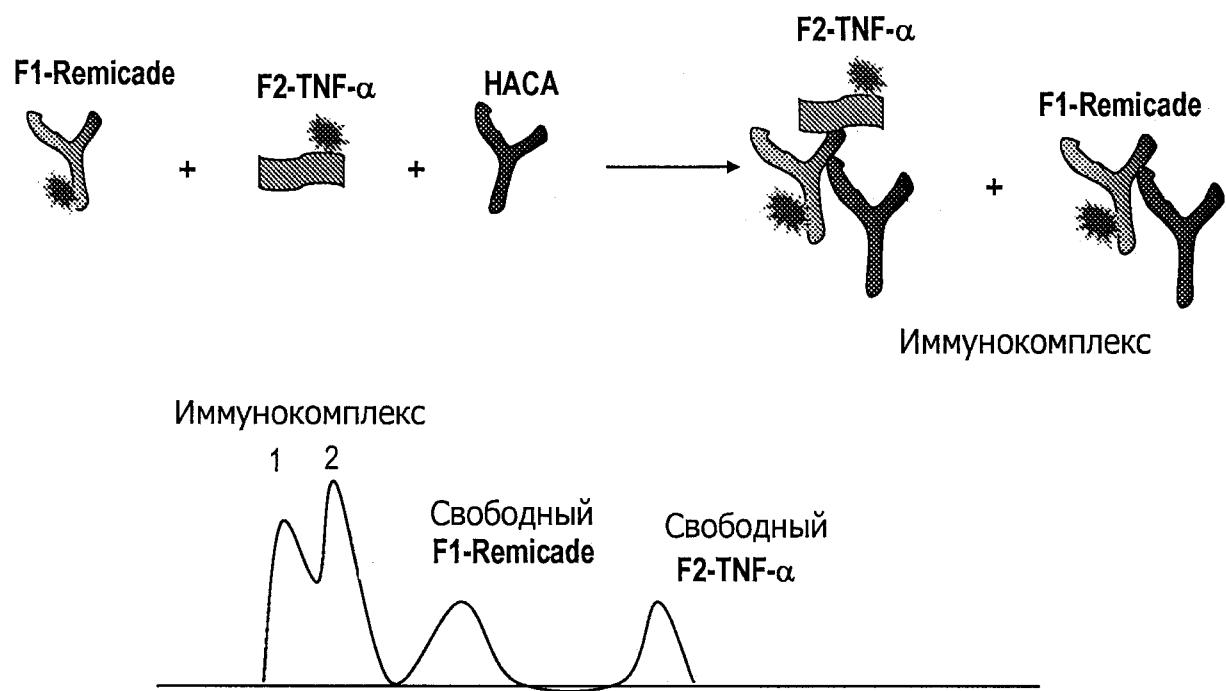
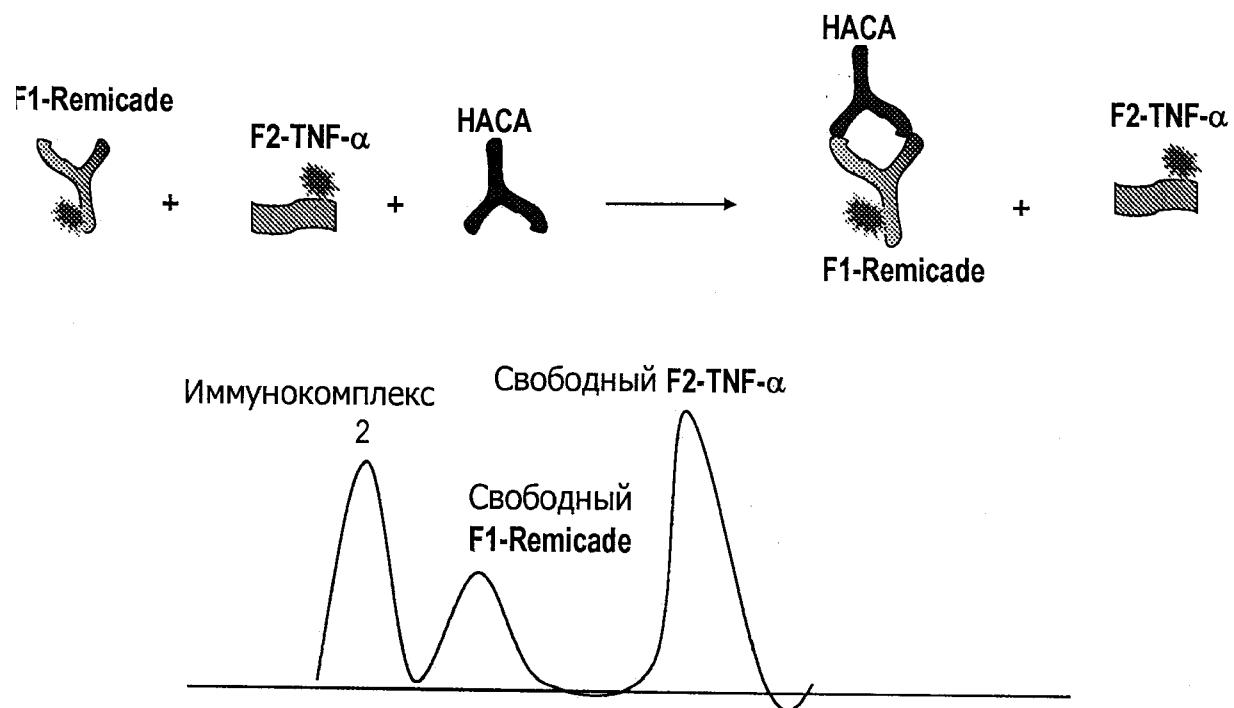
Фиг. 14



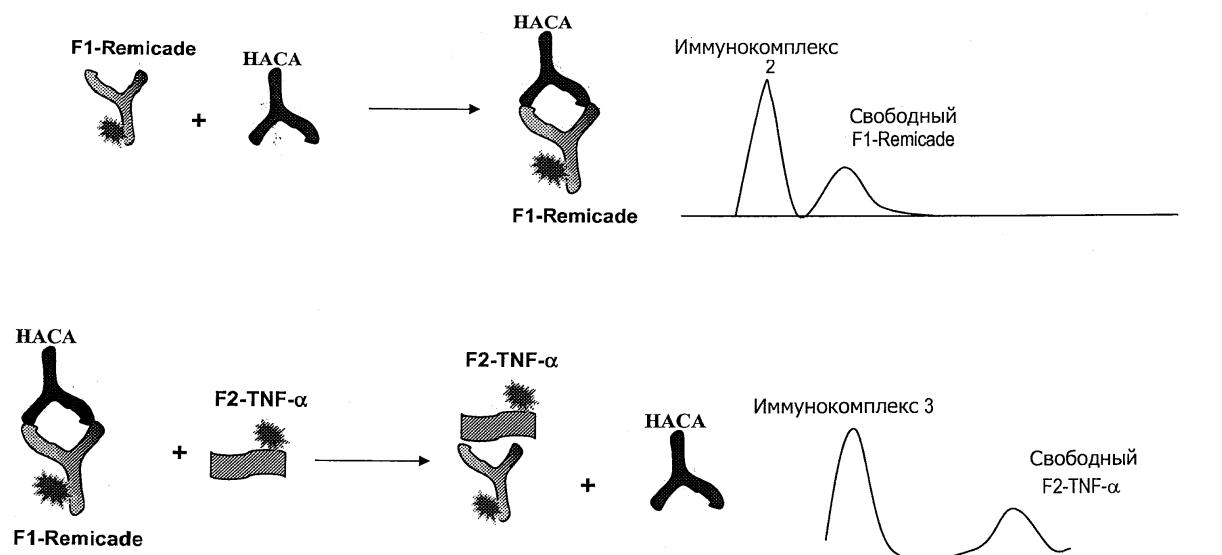
Фиг. 15



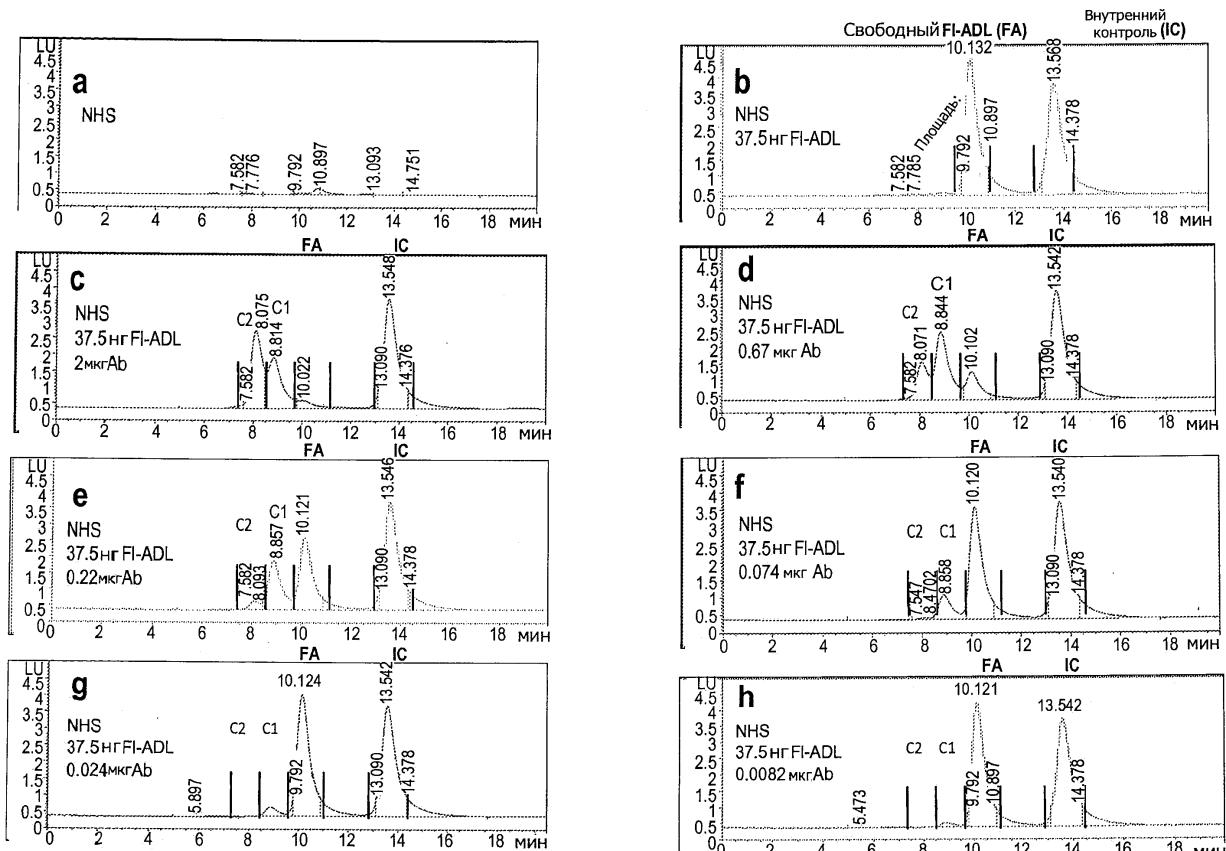
Фиг. 16

**A.** Определение не-нейтрализующих антител НАСА**B.** Определение нейтрализующих антител НАСА

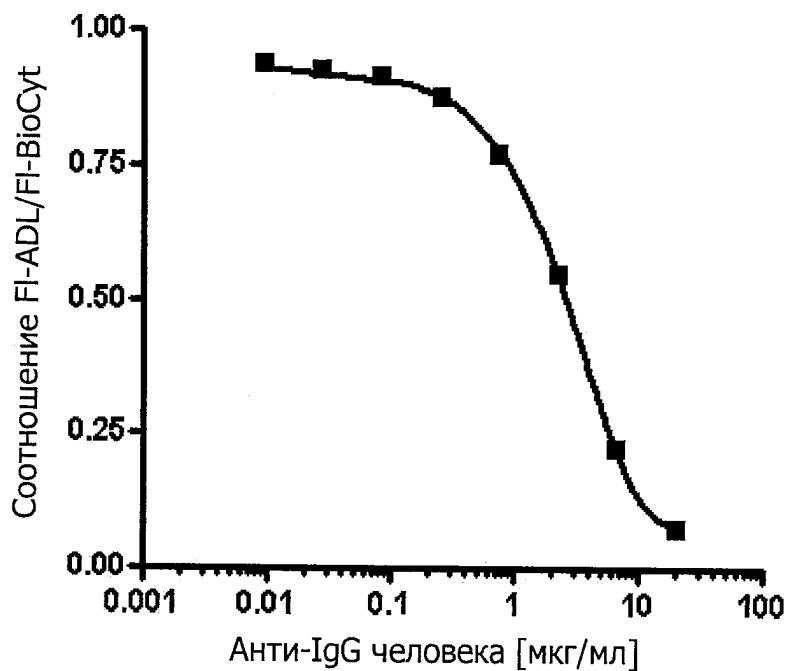
Фиг.17



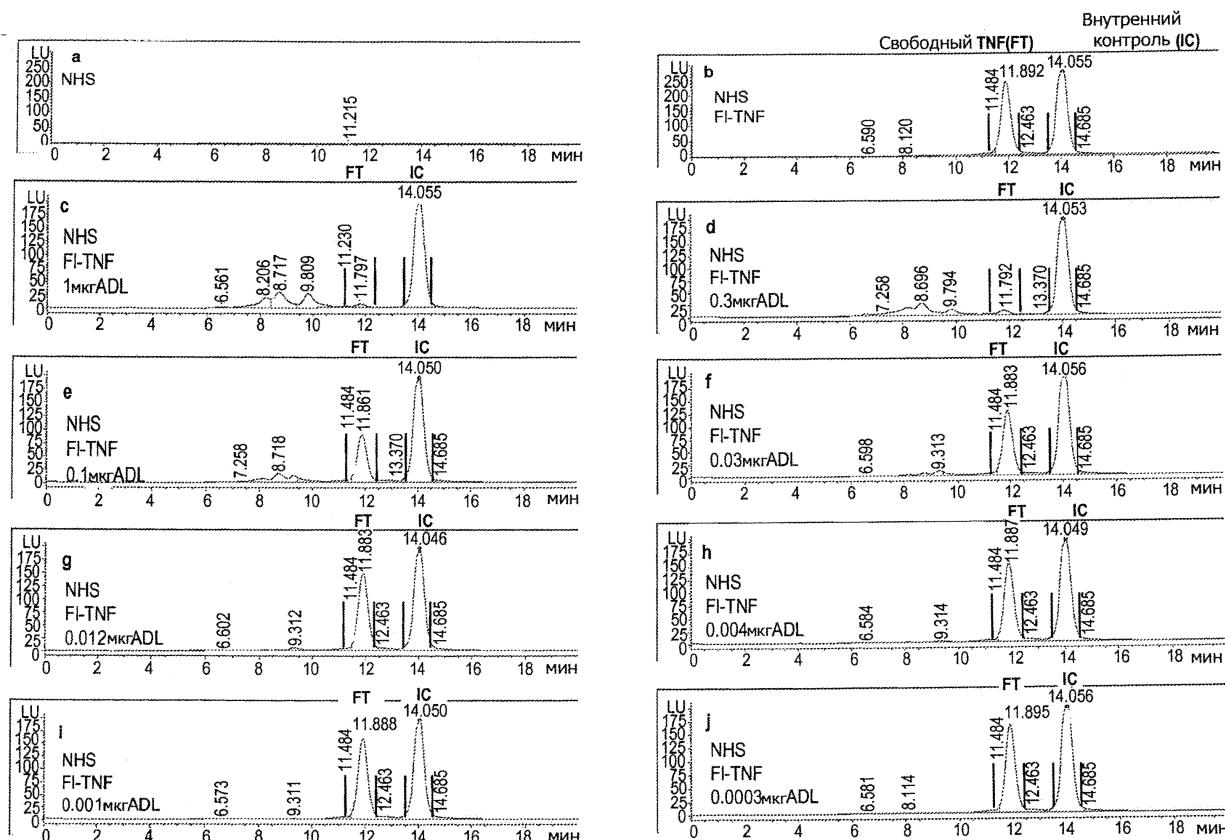
Фиг. 18



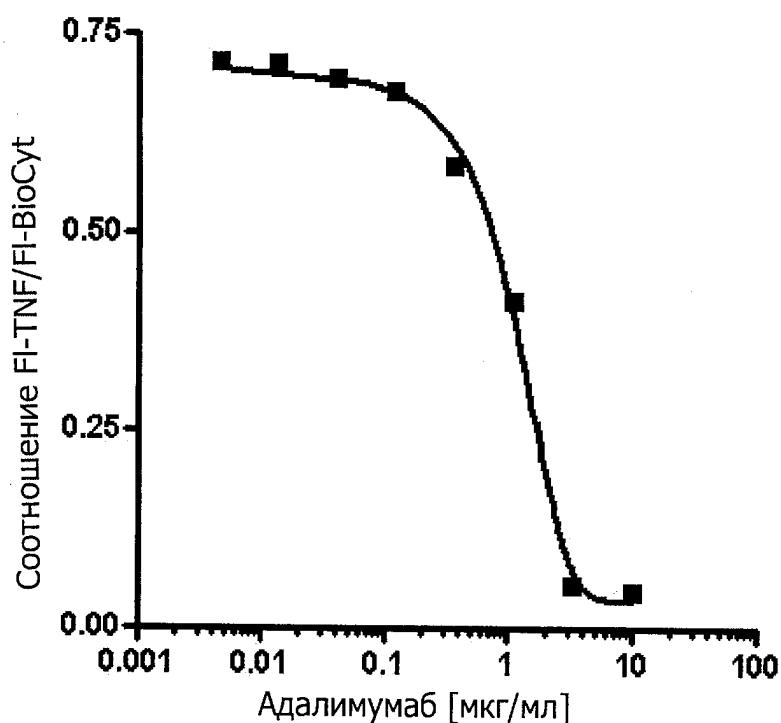
Фиг. 19



ФИГ. 20

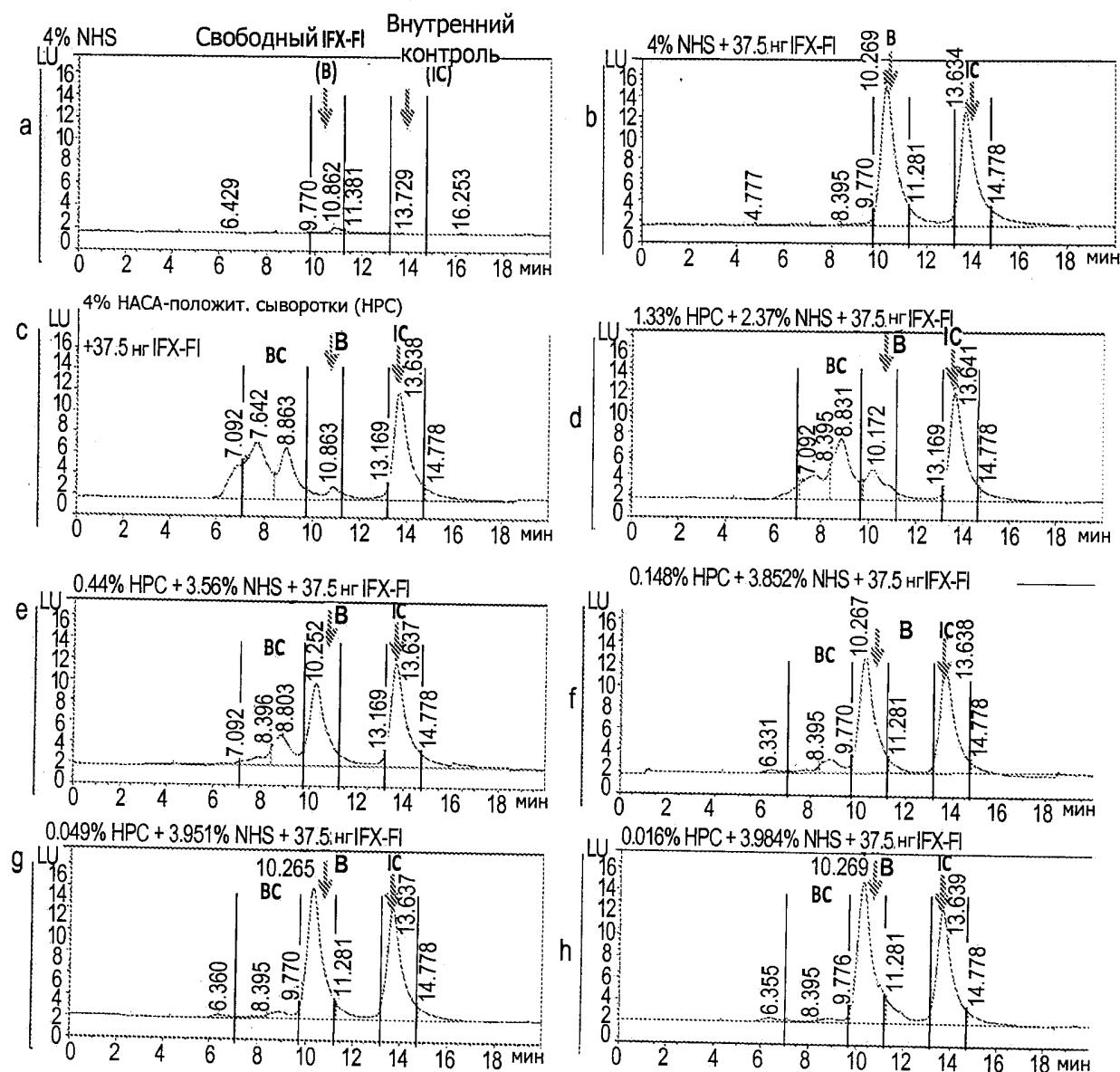


ФИГ. 21

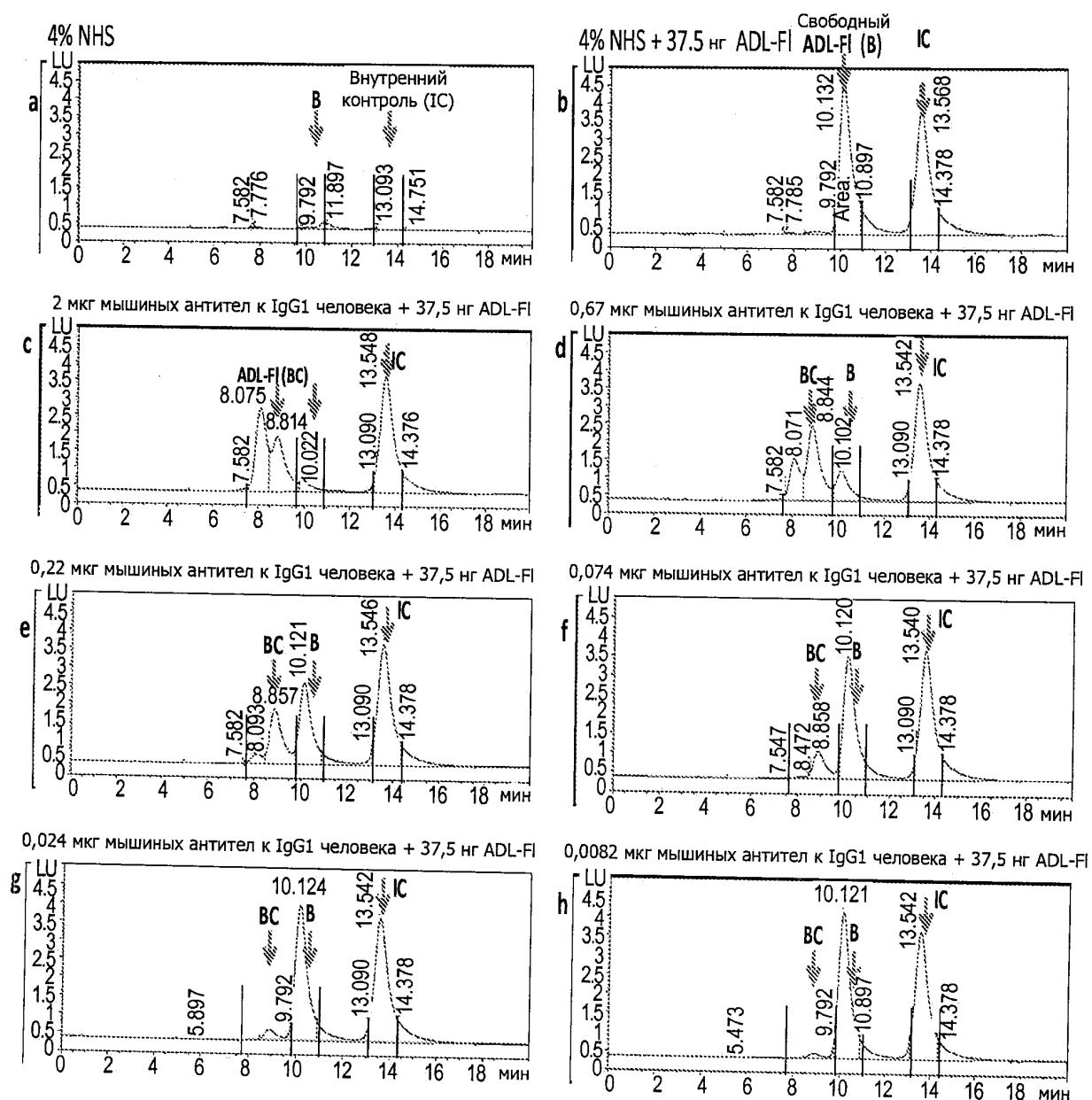


Угол наклона кривой	-1.813
EC50	1.213

ФИГ. 22

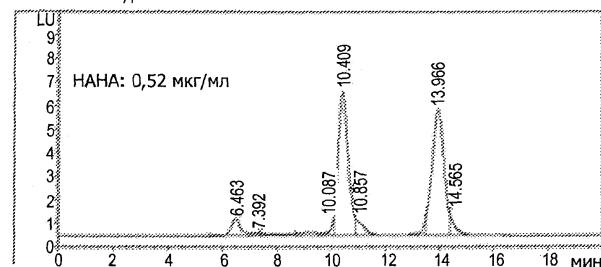


ФИГ. 23

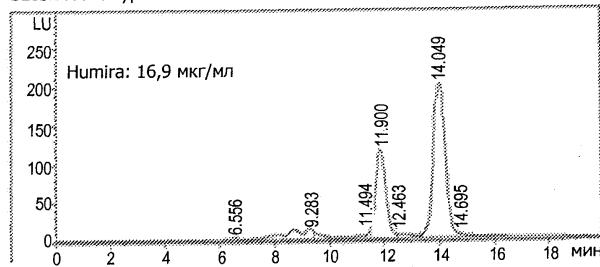


Фиг. 24

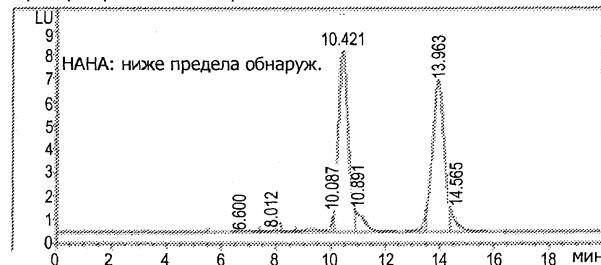
SL03246013: уровень НАНА



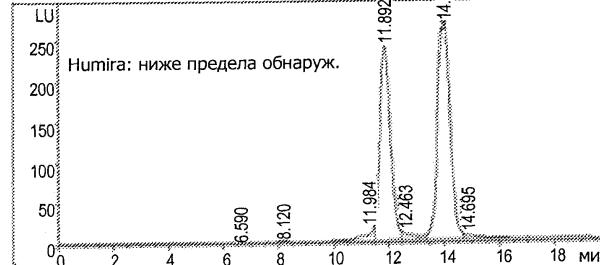
SL03246013: уровень Humira



Пример нормальной сыворотки



Пример нормальной сыворотки



Фиг. 25