



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103399145 A

(43) 申请公布日 2013. 11. 20

(21) 申请号 201310328694. 7

(22) 申请日 2008. 12. 12

(30) 优先权数据

07024353. 0 2007. 12. 15 EP

08002450. 8 2008. 02. 11 EP

(62) 分案原申请数据

200880119997. 5 2008. 12. 12

(71) 申请人 霍夫曼 - 拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 凯 - 贡纳尔 · 施图本劳赫

马库斯 · 扎达克

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 吴小明 王旭

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

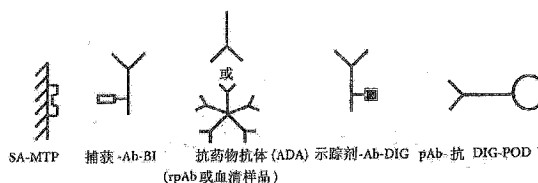
权利要求书5页 说明书23页 附图1页

(54) 发明名称

区分测定

(57) 摘要

本发明包括使用包括捕获药物抗体和示踪药物抗体的免疫测定来确定样品中针对药物抗体的抗体的方法,其中所述方法包括:提供 i) 捕获药物抗体,其为与固相缀合的药物抗体, ii) 示踪药物抗体,其为与可检测的标记物缀合的药物抗体,使所述捕获药物抗体分别与 i) 所述样品, ii) 向其中加入了处于单体形式的所述药物抗体的所述样品, iii) 向其中加入了处于寡聚形式的所述药物抗体的所述样品相接触,和通过在 i) 中的阳性免疫测定和在 ii) 和 iii) 中的阴性免疫测定来确定所述样品中的针对所述药物抗体的抗体。



1. 利用免疫测定来确定样品中针对药物抗体的抗体(抗药物抗体, ADA)的方法, 其中所述方法包括以下步骤:

a) 提供

a-i) 捕获药物抗体, 其为与固相缀合的所述药物抗体,

a-ii) 示踪药物抗体, 其为与可检测的标记物缀合的所述药物抗体,

b) 使所述捕获药物抗体分别与下列接触

b-i) 所述样品,

b-ii) 已经向其中加入了处于单体形式的所述药物抗体的所述样品,

b-iii) 已经向其中加入了处于寡聚形式的所述药物抗体的所述样品,

c) 通过 b-i) 中的阳性免疫测定以及 b-ii) 和 b-iii) 中的阴性免疫测定来确定所述样品中的针对所述药物抗体的抗体。

2. 利用免疫测定来确定样品中存在的抗体是特异性抗药物抗体或非特异性抗药物抗体的方法, 其中所述方法包括以下步骤:

a) 提供

a-i) 捕获药物抗体, 其为与固相缀合的所述药物抗体,

a-ii) 示踪药物抗体, 其为与可检测的标记物缀合的所述药物抗体,

b) 使所述捕获药物抗体分别与下列接触

b-i) 所述样品,

b-ii) 已经向其中加入了处于单体形式的所述药物抗体的所述样品,

b-iii) 已经向其中加入了处于寡聚形式的所述药物抗体的所述样品,

b-iv) 已经向其中加入了处于单体形式的人免疫球蛋白 G 的所述样品,

b-v) 已经向其中加入了处于寡聚形式的人免疫球蛋白 G 的所述样品,

c) 通过 b-i) 和 b-iv) 和 b-v) 中的阳性免疫测定以及 b-ii) 和 b-iii) 中的阴性免疫测定来确定所述样品中存在的抗体是特异性抗药物抗体, 或

通过 b-i) 和 b-ii) 和 b-iv) 中的阳性免疫测定和 b-iii) 和 b-v) 中的阴性免疫测定来确定所述样品中存在的抗体是非特异性抗药物抗体。

3. 利用免疫测定在样品中将针对人源化抗炎药物抗体的抗药物抗体与抗人 IgG 抗体相区分的方法, 其中所述方法包括以下步骤:

a) 提供

a-i) 捕获药物抗体, 其为与固相缀合的所述药物抗体,

a-ii) 示踪药物抗体, 其为与可检测的标记物缀合的所述药物抗体,

b) 使所述捕获药物抗体分别与下列接触

b-i) 所述样品,

b-ii) 已经向其中加入了处于单体形式的所述药物抗体的所述样品,

b-iii) 已经向其中加入了处于寡聚形式的所述药物抗体的所述样品,

b-iv) 已经向其中加入了处于单体形式的人免疫球蛋白 G 的所述样品,

b-v) 已经向其中加入了处于寡聚形式的人免疫球蛋白 G 的所述样品,

c) 通过 b-i) 和 b-iv) 和 b-v) 中的阳性免疫测定以及 b-ii) 和 b-iii) 中的阴性免疫测定来确定针对人源化抗炎药物抗体的抗药物抗体, 或

通过 b-i) 和 b-ii) 和 b-iv) 中的阳性免疫测定以及 b-iii) 和 b-v) 中的阴性免疫测定来确定所述样品中存在的抗体是抗人 IgG 抗体。

4. 利用免疫测定来确定样品中的抗药物抗体是单体形式还是寡聚形式的方法,其中所述方法包括以下步骤:

a) 提供

a-i) 捕获药物抗体,其为与固相缀合的所述药物抗体,

a-ii) 示踪药物抗体,其为与可检测的标记物缀合的所述药物抗体,

b) 使所述捕获药物抗体分别与下列接触

b-i) 所述样品,

b-ii) 已经向其中加入了处于单体形式的所述药物抗体的所述样品,

b-iii) 已经向其中加入了处于寡聚形式的所述药物抗体的所述样品,

b-iv) 已经向其中加入了处于单体形式的人免疫球蛋白 G 的所述样品,

b-v) 已经向其中加入了处于寡聚形式的人免疫球蛋白 G 的所述样品,

c) 通过 b-i) 中的阳性免疫测定和以下测定来确定所述样品中的抗药物抗体是单体形式:

α) b-ii) 和 b-iii) 中的阴性免疫测定,或

β) b-ii), b-iii), b-iv), 和 b-v) 中的阴性免疫测定,

或

通过 b-i) 中的阳性免疫测定和以下测定来确定所述样品中的抗药物抗体是寡聚形式:

α) b-iii) 中的阴性免疫测定,或

β) b-iii) 和 b-v) 中的阴性免疫测定,

其中所有其他没有列出的免疫测定为阳性。

5. 利用免疫测定来确定样品中存在寡聚抗药物抗体的方法,其中所述方法包括以下步骤:

a) 提供

a-i) 捕获药物抗体,其为与固相缀合的所述药物抗体,

a-ii) 示踪药物抗体,其为与可检测的标记物缀合的所述药物抗体,

b) 使所述捕获药物抗体分别与下列接触

b-i) 所述样品,

b-ii) 已经向其中加入了处于单体形式的所述药物抗体的所述样品,

b-iii) 已经向其中加入了处于寡聚形式的所述药物抗体的所述样品,

b-iv) 已经向其中加入了处于单体形式的人免疫球蛋白 G 的所述样品,

b-v) 已经向其中加入了处于寡聚形式的人免疫球蛋白 G 的所述样品,

c) 通过 b-i) 和 b-iii) 和 b-v) 中的阳性免疫测定以及 b-ii) 和 b-iv) 中的阴性免疫测定来确定样品中的抗药物抗体是寡聚形式。

6. 利用免疫测定来确定样品中确定的抗药物抗体的种类的方法,其中所述方法包括以下步骤:

a) 提供

a-i) 捕获药物抗体,其为与固相缀合的所述药物抗体,
a-ii) 示踪药物抗体,其为与可检测的标记物缀合的所述药物抗体,
b) 使所述捕获药物抗体分别与下列接触
b-i) 所述样品,
b-ii) 已经向其中加入了处于单体形式的所述药物抗体的所述样品,
b-iii) 已经向其中加入了处于寡聚形式的所述药物抗体的所述样品,
b-iv) 已经向其中加入了处于单体形式的人免疫球蛋白 G 的所述样品,
b-v) 已经向其中加入了处于寡聚形式的人免疫球蛋白 G 的所述样品,
c) 通过 b-i) 和 b-iv) 和 b-v) 中的阳性免疫测定以及 b-ii) 和 b-iii) 中的阴性免疫测定来确定抗药物抗体的种类是单体的和药物抗体特异性抗药物抗体,或
通过 b-i) 和 b-ii) 和 b-iv) 和 b-v) 中的阳性免疫测定和 b-iii) 中的阴性免疫测定来确定抗药物抗体的种类是寡聚的和药物抗体特异性抗药物抗体,或
通过 b-i) 和 b-ii) 和 b-iv) 中的阳性免疫测定和 b-iii) 和 b-v) 中的阴性免疫测定来确定抗药物抗体的种类是寡聚的和非药物抗体特异性抗体,或
通过 b-i) 中的阳性免疫测定以及 b-ii) 和 b-iii) 和 b-iv) 和 b-v) 中的阴性免疫测定来确定抗药物抗体的种类是单体的和非药物抗体特异性抗体。

7. 利用免疫测定来确定样品中存在单体抗药物抗体的方法,其中所述方法包括以下步骤:

a) 提供
a-i) 捕获药物抗体,其为与固相缀合的所述药物抗体,
a-ii) 示踪药物抗体,其为与可检测的标记物缀合的所述药物抗体,
b) 使所述捕获药物抗体分别与下列接触
b-i) 所述样品,
b-ii) 已经向其中加入了处于单体形式的所述药物抗体的所述样品,
b-iii) 已经向其中加入了处于寡聚形式的所述药物抗体的所述样品,
b-iv) 已经向其中加入了处于单体形式的人免疫球蛋白 G 的所述样品,
b-v) 已经向其中加入了处于寡聚形式的人免疫球蛋白 G 的所述样品,
c) 通过 b-i) 和 b-ii) 和 b-iv) 中的阳性免疫测定和 b-iii) 和 b-v) 中的阴性免疫测定来确定所述样品中的抗药物抗体是单体形式。

8. 利用免疫测定来确定样品中存在的针对药物抗体的抗体的种类的方法,其中所述方法包括以下步骤:

a) 提供
a-i) 捕获药物抗体,其为与固相缀合的所述药物抗体,
a-ii) 示踪药物抗体,其为与可检测的标记物缀合的所述药物抗体,
b) 使所述捕获药物抗体分别与下列接触
b-i) 所述样品,
b-ii) 已经向其中加入了处于单体形式的所述药物抗体的所述样品,
b-iii) 已经向其中加入了处于寡聚形式的所述药物抗体的所述样品,
b-iv) 已经向其中加入了处于单体形式的人免疫球蛋白 G 的所述样品,

b-v) 已经向其中加入了处于寡聚形式的人免疫球蛋白 G 的所述样品,

c) 通过 b-i) 和 b-iv) 和 b-v) 中的阳性免疫测定和 b-ii) 和 b-iii) 中的阴性免疫测定来确定所述样品中存在的抗体是特异性、单体抗药物抗体, 或

通过 b-i) 和 b-ii) 和 b-iv) 和 b-v) 中的阳性免疫测定和 b-iii) 中的阴性免疫测定来确定所述样品中存在的抗体是特异性、寡聚抗药物抗体, 或

通过 b-i) 和 b-ii) 和 b-iv) 中的阳性免疫测定和 b-iii) 和 b-v) 中的阴性免疫测定来确定所述样品中存在的抗体是非特异性、寡聚抗人 IgG 抗体, 或

通过 b-i) 和 b-ii) 和 b-iii) 和 b-iv) 和 b-v) 中的阳性免疫测定来确定所述样品中存在的抗体是非特异性抗体, 或

通过 b-i) 中的阳性免疫测定和 b-ii) 和 b-iii) 和 b-iv) 和 b-v) 中的阴性免疫测定来确定所述样品中存在的抗体是非特异性、单体抗人 IgG 抗体。

9. 按照前述权利要求中任一项的方法, 其特征在于所述免疫测定是包括捕获药物抗体和示踪药物抗体的双抗原桥连免疫测定。

10. 按照前述权利要求中任一项的方法, 其特征在于所述药物抗体是用于治疗炎症疾病的抗体。

11. 按照权利要求 10 的方法, 其特征在于所述用于治疗炎症疾病的抗体是用于治疗类风湿性关节炎或骨关节炎的抗体。

12. 按照权利要求 10 的方法, 其特征在于所述用于治疗炎症疾病的抗体是抗 IL-6 受体、或抗 IGF-1 受体、或 IL-13 受体 1 α 的抗体。

13. 按照前述权利要求中任一项的方法, 其特征在于所述捕获药物抗体是所述药物抗体的混合物, 其包括至少两种在不同抗体位点处与所述固相缀合的所述抗体, 且所述示踪药物抗体是所述药物抗体的混合物, 其包括至少两种在不同抗体位点处与所述可检测的标记物缀合的所述抗体。

14. 按照前述权利要求中任一项的方法, 其特征在于所述药物抗体与其缀合配偶体的缀合是通过经由所述药物抗体的氨基酸主链的 N 端和 / 或 ϵ -氨基(赖氨酸), 不同赖氨酸的 ϵ -氨基, 羧基-, 巯基-, 羟基-和 / 或酚官能团, 和 / 或所述药物抗体的糖结构的糖醇基团的化学键合来进行。

15. 按照前述权利要求中任一项的方法, 其特征在于所述捕获药物抗体混合物或所述示踪药物抗体混合物包括经由氨基与其缀合配偶体缀合的药物抗体和经由糖结构与其缀合配偶体缀合的药物抗体。

16. 按照前述权利要求中任一项的方法, 其特征在于所述捕获药物抗体与所述固相的缀合是通过被动吸附或经由特异性结合对来进行。

17. 按照权利要求 16 的方法, 其特征在于所述特异性结合对选自链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白 / 生物素, 或抗体 / 抗原, 或凝集素 / 多糖, 或类固醇 / 类固醇结合蛋白, 或激素 / 激素受体, 或酶 / 底物, 或 IgG / 蛋白 A 和 / 或 G。

18. 按照前述权利要求中任一项的方法, 其特征在于所述捕获药物抗体与生物素缀合且与所述固相的缀合是经由固定化的抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白进行。

19. 按照前述权利要求中任一项的方法, 其特征在于所述方法在步骤 b) 后包括另外的步骤 ba):

ba)使在步骤 b)中与所述样品接触的所述捕获药物抗体与所述示踪药物抗体接触和检测所述可检测的标记物。

20. 按照前述权利要求中任一项的方法,其特征在于所述示踪药物抗体是经由特异性结合对与可检测的标记物缀合。

21. 按照权利要求 20 的方法,其特征在于所述示踪药物抗体与洋地黄毒苷缀合,且与所述可检测的标记物的连接是经由抗洋地黄毒苷的抗体来进行。

22. 按照前述权利要求中任一项的方法,其特征在于所述捕获药物抗体与示踪药物抗体的比率为 1:10 ~ 50:1。

23. 用于确定样品中的针对药物抗体的抗药物抗体的试剂盒,其包括:

- a) 链霉抗生物素蛋白包被的微量滴定板,
- b) 用于使药物抗体与生物素缀合的试剂,
- c) 用于使所述药物抗体与洋地黄毒苷缀合的试剂,
- d) 与抗洋地黄毒苷抗体缀合的辣根过氧化物酶,
- e) 用于寡聚化所述药物抗体的试剂,
- f) 处于单体形式的人免疫球蛋白 G, 和
- g) 处于寡聚形式的人免疫球蛋白 G。

区分测定

[0001] 本申请是申请日为 2008 年 12 月 12 日、题为“区分测定”的中国专利申请 No. 200880119997.5 的分案申请。

[0002] 本发明包括用于区分样品中特异性和非特异性抗药物抗体的存在的方法,以及用于使用该方法的试剂盒。

[0003] 发明背景

[0004] 使用单克隆抗体的标准固相免疫测定涉及在吸附在固相上的抗体(捕获抗体)、抗原、和针对所述抗原的另一个表位的与可检测标记物例如酶缀合的抗体(示踪抗体)之间形成复合物。由此,形成夹心结构:固相-捕获抗体-抗原-示踪抗体。在由该夹心结构催化的反应中,与抗体缀合的酶的活性与温育培养基中的抗原浓度成比例。标准夹心法也称为双抗原桥连免疫测定,因为捕获和示踪抗体结合同一抗原的不同表位。Hoesel, W., 等, J. Immunol. Methods (免疫方法杂志) 294(2004) 101-110, 报告了抗-rhEPO 双抗原桥连测定,其中使用与氨基和与碳水化合物基团偶联的固定化 rhEPO 的混合物。免疫测定诸如双抗原桥连 ELISA 是研究患者对抗体药物的免疫原性应答中的常用测定类型。Mire-Sluis, A. R., 等, J. Immunol. Methods (免疫方法杂志) 289(2004) 1-16, 总结了对于设计和最优化免疫测定的建议,所述免疫测定是利用抗生物技术产品的宿主抗体的检测。根据 Mire-Sluis 等,公知的抗药物抗体测定形式表现出相当多的缺点。抗药物抗体测定记述在,例如, W02005/045058 和 W090/006515 中。抗特应抗体测定记述在,例如, US5, 219, 730, W087/00 2778, EP0139389, 和 EP0170302 中。Wadhwa, M., 等, J. Immunol. Methods (免疫方法杂志) 278(2003) 1-17, 报告了用于检测、测量和表征由治疗性生物制剂诱导的有害抗体的策略。不同免疫测定的原则由,例如, Hage, D. S., Anal. Chem. (分析化学) 71(1999) 294R-304R 记述。Lu, B., 等, Analyst. (分析家) 121(1996) 29R-32R, 报告了抗体的定向固定化以用于免疫测定。抗生物素蛋白-生物素-介导的免疫测定由,例如, Wilchek, M., 和 Bayer, E. A., Methods Enzymol. (酶学方法) 184(1990) 467-469 报告。ELISA 与表面等离子共振的比较由 Lofgren, J. A., 等, J. Immunol. (免疫学杂志) 178(2007) 7467-7472 报告。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明的第一方面是利用包括捕获药物抗体和示踪药物抗体的免疫测定来确定样品中针对药物抗体的抗体(抗药物抗体, ADA)的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0007] a) 提供

[0008] a-i) 所述捕获药物抗体,其为与固相缀合的所述药物抗体,

[0009] a-ii) 所述示踪药物抗体,其为与可检测的标记物缀合的所述药物抗体,

[0010] b) 使所述捕获药物抗体分别与下列接触

[0011] b-i) 所述样品,

[0012] b-ii) 在免疫测定前已经向其中加入了处于单体形式的所述药物抗体的所述样品,

[0013] b-iii) 在免疫测定前已经向其中加入了处于寡聚形式的所述药物抗体的所述样品,

[0014] c)通过 b-i)中的阳性免疫测定以及 b-ii)和 b-iii)中的阴性免疫测定来确定所述样品中的针对所述药物抗体的抗体。

[0015] 本发明的另一方面是利用包括捕获药物抗体和示踪药物抗体的双抗原桥连免疫测定来确定样品中存在的抗体是特异性抗药物抗体或非特异性抗药物抗体的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0016] a) 提供

[0017] a-i) 所述捕获药物抗体,其为与固相缀合的所述药物抗体,

[0018] a-ii) 所述示踪药物抗体,其为与可检测的标记物缀合的所述药物抗体,

[0019] b) 使所述捕获药物抗体分别与下列接触

[0020] b-i) 所述样品,

[0021] b-ii) 已经向其中加入了处于单体形式的所述药物抗体的所述样品,

[0022] b-iii) 已经向其中加入了处于寡聚形式的所述药物抗体的所述样品,

[0023] b-iv) 已经向其中加入了处于单体形式的人免疫球蛋白 G 的所述样品,

[0024] b-v) 已经向其中加入了处于寡聚形式的人免疫球蛋白 G 的所述样品,

[0025] c) 通过 b-i) 和 b-iv) 和 b-v) 中的阳性免疫测定以及 b-ii) 和 b-iii) 中的阴性免疫测定来确定所述样品中存在的抗体是特异性抗药物抗体,或

[0026] 通过 b-i) 和 b-ii) 和 b-iv) 中的阳性免疫测定和 b-iii) 和 b-v) 中的阴性免疫测定来确定所述样品中存在的抗体是非特异性抗药物抗体。

[0027] 本发明的第三方面是使用免疫测定在样品中将针对人源化抗炎药物抗体的抗药物抗体与抗人 IgG 抗体相区分的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0028] a) 提供

[0029] a-i) 捕获药物抗体,其为与固相缀合的所述药物抗体,

[0030] a-ii) 示踪药物抗体,其为与可检测的标记物缀合的所述药物抗体,

[0031] b) 使所述捕获药物抗体分别与下列接触

[0032] b-i) 所述样品,

[0033] b-ii) 已经向其中加入了处于单体形式的所述药物抗体的所述样品,

[0034] b-iii) 已经向其中加入了处于寡聚形式的所述药物抗体的所述样品,

[0035] b-iv) 已经向其中加入了处于单体形式的人免疫球蛋白 G 的所述样品,

[0036] b-v) 已经向其中加入了处于寡聚形式的人免疫球蛋白 G 的所述样品,

[0037] c) 通过 b-i) 和 b-iv) 和 b-v) 中的阳性免疫测定以及 b-ii) 和 b-iii) 中的阴性免疫测定来确定针对人源化抗炎药物抗体的抗药物抗体,或

[0038] 通过 b-i) 和 b-ii) 和 b-iv) 中的阳性免疫测定和 b-iii) 和 b-v) 中的阴性免疫测定来确定所述样品中存在的抗体是抗人 IgG 抗体。

[0039] 本发明还有的另一方面是使用免疫测定来确定样品中的抗药物抗体是单体形式还是寡聚形式的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0040] a) 提供

[0041] a-i) 捕获药物抗体,其为与固相缀合的所述药物抗体,

[0042] a-ii) 示踪药物抗体,其为与可检测的标记物缀合的所述药物抗体,

[0043] b) 使所述捕获药物抗体分别与下列接触

- [0044] b-i) 所述样品,
- [0045] b-ii) 已经向其中加入了处于单体形式的所述药物抗体的所述样品,
- [0046] b-iii) 已经向其中加入了处于寡聚形式的所述药物抗体的所述样品,
- [0047] b-iv) 已经向其中加入了处于单体形式的人免疫球蛋白 G 的所述样品,
- [0048] b-v) 已经向其中加入了处于寡聚形式的人免疫球蛋白 G 的所述样品,
- [0049] c) 通过 b-i) 中的阳性免疫测定和以下各项来确定所述样品中的抗药物抗体是单体形式:
- [0050] α) b-ii) 和 b-iii) 中的阴性免疫测定, 或
- [0051] β) b-ii), b-iii), b-iv), 和 b-v) 中的阴性免疫测定,
- [0052] 或
- [0053] 通过 b-i) 中的阳性免疫测定和以下各项来确定所述样品中的抗药物抗体是寡聚形式:
- [0054] α) b-iii) 中的阴性免疫测定, 或
- [0055] β) b-iii) 和 b-v) 中的阴性免疫测定,
- [0056] 其中所有其他没有列出的免疫测定为阳性。
- [0057] 本发明的另一方面是使用免疫测定来确定样品中存在寡聚抗药物抗体的方法, 其中所述方法包括以下步骤:
- [0058] a) 提供
- [0059] a-i) 捕获药物抗体, 其为与固相缀合的所述药物抗体,
- [0060] a-ii) 示踪药物抗体, 其为与可检测的标记物缀合的所述药物抗体,
- [0061] b) 使所述捕获药物抗体分别与下列接触
- [0062] b-i) 所述样品,
- [0063] b-ii) 已经向其中加入了处于单体形式的所述药物抗体的所述样品,
- [0064] b-iii) 已经向其中加入了处于寡聚形式的所述药物抗体的所述样品,
- [0065] b-iv) 已经向其中加入了处于单体形式的人免疫球蛋白 G 的所述样品,
- [0066] b-v) 已经向其中加入了处于寡聚形式的人免疫球蛋白 G 的所述样品,
- [0067] c) 通过 b-i) 和 b-iii) 和 b-v) 中的阳性免疫测定和 b-ii) 和 b-iv) 中的阴性免疫测定来确定样品中的抗药物抗体是寡聚形式。
- [0068] 本发明的另一方面是使用免疫测定来确定样品中确定的抗药物抗体的种类的方法, 其中所述方法包括以下步骤:
- [0069] a) 提供
- [0070] a-i) 捕获药物抗体, 其为与固相缀合的所述药物抗体,
- [0071] a-ii) 示踪药物抗体, 其为与可检测的标记物缀合的所述药物抗体,
- [0072] b) 使所述捕获药物抗体分别与下列接触
- [0073] b-i) 所述样品,
- [0074] b-ii) 已经向其中加入了处于单体形式的所述药物抗体的所述样品,
- [0075] b-iii) 已经向其中加入了处于寡聚形式的所述药物抗体的所述样品,
- [0076] b-iv) 已经向其中加入了处于单体形式的人免疫球蛋白 G 的所述样品,
- [0077] b-v) 已经向其中加入了处于寡聚形式的人免疫球蛋白 G 的所述样品,

[0078] c) 通过 b-i) 和 b-iv) 和 b-v) 中的阳性免疫测定以及 b-ii) 和 b-iii) 中的阴性免疫测定来确定抗药物抗体的种类是单体和药物抗体特异性抗药物抗体, 或

[0079] 通过 b-i) 和 b-ii) 和 b-iv) 和 b-v) 中的阳性免疫测定和 b-iii) 中的阴性免疫测定来确定抗药物抗体的种类是寡聚和药物抗体特异性抗药物抗体, 或

[0080] 通过 b-i) 和 b-ii) 和 b-iv) 中的阳性免疫测定和 b-iii) 和 b-v) 中的阴性免疫测定来确定抗药物抗体的种类是寡聚和非药物抗体特异性抗体, 或

[0081] 通过 b-i) 中的阳性免疫测定以及 b-ii) 和 b-iii) 和 b-iv) 和 b-v) 中的阴性免疫测定来确定抗药物抗体的种类是单体和非药物抗体特异性抗体。

[0082] 在一个实施方案中, 抗药物抗体的种类根据下表来确定:

	药物抗体特异性的, 单体反应	药物抗体特异性的, 寡聚反应	药物抗体非特异性的, 寡聚反应	药物抗体非特异性的, 单体反应	药物抗体非特异性的反应
[0083] 未参加 (unspiked) 的样品 b-i)	+	+	+	+	+
b-ii)	-	+	+	-	+
b-iii)	-	-	-	-	+
b-iv)	+	+	+	-	+

	药物抗体特异性的, 单体反应	药物抗体特异性的, 寡聚反应	药物抗体非特异性的, 寡聚反应	药物抗体非特异性的, 单体反应	药物抗体非特异性的反应
[0084] b-v)	+	+	-	-	+

[0085] 本发明的最后一方面是使用免疫测定来确定样品中存在单体抗药物抗体的方法, 其中所述方法包括以下步骤:

[0086] a) 提供

[0087] a-i) 捕获药物抗体, 其为与固相缀合的所述药物抗体,

[0088] a-ii) 示踪药物抗体, 其为与可检测的标记物缀合的所述药物抗体,

[0089] b) 使所述捕获药物抗体分别与下列接触

[0090] b-i) 所述样品,

[0091] b-ii) 已经向其中加入了处于单体形式的所述药物抗体的所述样品,

[0092] b-iii) 已经向其中加入了处于寡聚形式的所述药物抗体的所述样品,
[0093] b-iv) 已经向其中加入了处于单体形式的人免疫球蛋白 G 的所述样品,
[0094] b-v) 已经向其中加入了处于寡聚形式的人免疫球蛋白 G 的所述样品,
[0095] c) 通过 b-i) 和 b-ii) 和 b-iv) 中的阳性免疫测定和 b-iii) 和 b-v) 中的阴性免疫测定来确定所述样品中的抗药物抗体是单体形式。

[0096] 在本发明方面的一个实施方案中,所述免疫测定是双抗原桥连免疫测定,其包括捕获药物抗体和示踪药物抗体。本发明方面的另一个实施方案是所述药物抗体是用于治疗炎性疾病的抗体。在一个实施方案中,所述用于治疗炎性疾病的抗体是用于治疗类风湿性关节炎或骨关节炎的抗体。在另一个实施方案中,所述用于治疗炎性疾病的抗体是抗 IL-6 受体,或抗 IGF-1 受体,或 IL-13 受体 1 α 的抗体。本发明方面的一个实施方案包括所述捕获药物抗体是所述药物抗体的混合物,其包括至少两种在不同抗体位点处与所述固相缀合的所述抗体,且示踪药物抗体是所述药物抗体的混合物,其包括至少两种在不同抗体位点处与所述可检测的标记物缀合的所述抗体。另一个实施方案是所述药物抗体与其缀合配偶体的缀合是通过经由药物抗体的氨基酸主链的 N 端和 / 或 ϵ -氨基(赖氨酸),不同赖氨酸的 ϵ -氨基,羧基-,巯基-,羟基-和 / 或酚官能团,和 / 或药物抗体的糖结构的糖醇基团的化学键合来进行。在本发明方面的一个实施方案中,捕获药物抗体混合物或示踪药物抗体混合物包括经由氨基与它们的缀合配偶体缀合的药物抗体和经由糖结构与它们的缀合配偶体缀合的药物抗体。在另一个实施方案中,捕获药物抗体与固相的缀合是通过被动吸附,或经由特异性结合对来进行。在本发明的一个实施方案中,所述特异性结合对(第一成分 / 第二成分)选自链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白 / 生物素,或抗体 / 抗原(参见,例如, Hermanson, G. T., 等, Bioconjugate Techniques (生物缀合技术), Academic Press (学术出版社), 1996), 或凝集素 / 多糖, 或类固醇 / 类固醇结合蛋白, 或激素 / 激素受体, 或酶 / 底物, 或 IgG / 蛋白 A 和 / 或 G。在一个实施方案中,捕获药物抗体与生物素缀合且与固相的缀合经由固定化的抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白进行。在本发明方面的一个实施方案中,所述方法在步骤 b) 后包括另外的步骤 ba): 使在步骤 b) 中与所述样品接触的所述捕获药物抗体与所述示踪药物抗体接触和检测所述可检测的标记物。在本发明方面的另一个实施方案中,示踪药物抗体经由特异性结合对与可检测的标记物缀合。在一个实施方案中,所述示踪药物抗体与洋地黄毒苷缀合且与可检测的标记物的连接是经由抗洋地黄毒苷的抗体来进行。本发明方面的另一个实施方案是捕获药物抗体与示踪药物抗体的比率为 1:10 ~ 50:1 (比率意指抗体分子比,而不考虑缀合物的分子量,缀合物的分子量可以不同)。

[0097] 本发明的另一方面是用于确定样品中的针对药物抗体的抗药物抗体的试剂盒,其包括:

- [0098] a) 链霉抗生物素蛋白包被的微量滴定板,
- [0099] b) 用于使药物抗体与生物素缀合的试剂,
- [0100] c) 用于使所述药物抗体与洋地黄毒苷缀合的试剂,
- [0101] d) 与抗洋地黄毒苷抗体缀合的辣根过氧化物酶,
- [0102] e) 用于寡聚化所述药物抗体的试剂,
- [0103] f) 处于单体形式的人免疫球蛋白 G, 和

[0104] g) 处于寡聚形式的人免疫球蛋白 G。

[0105] 本发明的另一方面是利用包括捕获药物抗体和示踪药物抗体的双抗原桥连免疫测定来确定样品中存在的针对药物抗体的抗体(抗药物抗体)的类型的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0106] a) 提供

[0107] a-i) 所述捕获药物抗体,其为与固相缀合的所述药物抗体,

[0108] a-ii) 所述示踪药物抗体,其为与可检测的标记物缀合的所述药物抗体,

[0109] b) 使所述捕获药物抗体分别与下列接触

[0110] b-i) 所述样品,

[0111] b-ii) 已经向其中加入了处于单体形式的所述药物抗体的所述样品,

[0112] b-iii) 已经向其中加入了处于寡聚形式的所述药物抗体的所述样品,

[0113] b-iv) 已经向其中加入了处于单体形式的人免疫球蛋白 G 的所述样品,

[0114] b-v) 已经向其中加入了处于寡聚形式的人免疫球蛋白 G 的所述样品,

[0115] c) 通过 b-i) 和 b-iv) 和 b-v) 中的阳性免疫测定和 b-ii) 和 b-iii) 中的阴性免疫测定来确定所述样品中存在的抗体是特异性、单体抗药物抗体,或

[0116] 通过 b-i) 和 b-ii) 和 b-iv) 和 b-v) 中的阳性免疫测定和 b-iii) 中的阴性免疫测定来确定所述样品中存在的抗体是特异性、寡聚抗药物抗体,或

[0117] 通过 b-i) 和 b-ii) 和 b-iv) 中的阳性免疫测定和 b-iii) 和 b-v) 中的阴性免疫测定来确定所述样品中存在的抗体是非特异性的、寡聚抗人 IgG 抗体,或

[0118] 通过 b-i) 和 b-ii) 和 b-iii) 和 b-iv) 和 b-v) 中的阳性免疫测定来确定所述样品中存在的抗体是非特异性抗体,或

[0119] 通过 b-i) 中的阳性免疫测定和 b-ii) 和 b-iii) 和 b-iv) 和 b-v) 中的阴性免疫测定来确定所述样品中存在的抗体是非特异性的、单体抗人 IgG 抗体。

[0120] 发明详述

[0121] 本发明报告利用包括捕获药物抗体和示踪药物抗体的免疫测定来确定样品中针对药物抗体的抗体的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0122] a) 提供

[0123] a-i) 所述捕获药物抗体,其为与固相缀合的所述药物抗体,

[0124] a-ii) 所述示踪药物抗体,其为与可检测的标记物缀合的所述药物抗体,

[0125] b) 使所述捕获药物抗体分别与下列接触

[0126] b-i) 所述样品,

[0127] b-ii) 已经向其中加入了处于单体形式的所述药物抗体的所述样品,

[0128] b-iii) 已经向其中加入了处于寡聚形式的所述药物抗体的所述样品,

[0129] c) 通过 b-i) 中的阳性免疫测定以及 b-ii) 和 b-iii) 中的阴性免疫测定来确定所述样品中的针对所述药物抗体的抗体。

[0130] 按照本发明的术语“药物抗体”表示能够施用于个体以使得在给药后怀疑所述个体的样品包含所述药物抗体的抗体。在按照本发明进行的一种测定中,药物抗体、捕获药物抗体和示踪药物抗体包括“相同”抗体分子,例如用相同的表达载体重组产生并包含相同氨基酸序列的抗体分子。药物抗体(治疗性单克隆抗体)广泛用于治疗多种疾病诸如肿瘤

疾病(例如血液恶性肿瘤和实体恶性肿瘤,包括非-霍奇金淋巴瘤、乳腺癌、和结肠直肠癌)或炎性疾病。这样的抗体由,例如, Levene, A. P., 等, *Journal of the Royal Society of Medicine* (皇家医学学会杂志)98 (2005) 145-152; Groner, B., 等, *Curr. Mol. Meth.* (当前分子方法学) 4 (2004) 539-547; 和 Harris, M., *Lancet Oncol.* 5 (2004) 292-302 报告。示范性抗体是,例如,抗 CD20, CD22, HLA-DR, CD33, CD52, EGFR, G250, GD3, HER2, PSMA, CD56, VEGF, VEGF2, CEA, Levis Y 抗原, IL-6 受体, IGF-1 受体, 或 IL-13 受体 1 α 的抗体。在一个实施方案中,所述药物抗体是有效用于治疗炎性疾病的抗体,即抗炎抗体,诸如抗 IL-6 受体抗体,或抗 IGF-1 受体抗体,或抗 IL-13 受体 1 α 抗体。

[0131] 一种实例(优选单克隆)抗体是抗 IL-6 受体的抗体 (mAb IL-6R)。这样的抗体,例如,由 Mihara, 等, *Clin. Immunol.* (临床免疫学) 98 (2001) 319-326; Nishimoto, N., 等, *Blood* (血液) 106 (2005) 2627-2632, 在临床试验 NCT00046774 中,或在 W02004/096274 中报告。

[0132] 一种实例(优选单克隆)抗体是抗 IGF-1 受体的抗体 (mAb IGF-1R)。这样的抗体,例如,在 W02004/087756 中或在 W02005/005635 中报告。

[0133] 一种实例(优选单克隆)抗体是抗 IL-13 受体 α 的抗体(以下也表示为 mAb IL-13Ra1 或 mAb IL-13R)。抗 IL-13Ra1 的抗体从,例如, W096/29417, W097/15663, W003/080 675, Graber, P., 等, *Eur. J. Immunol.* (欧洲免疫学杂志) 28 (1998) 4286-4298; Poudrier, J., 等, *J. Immunol.* (免疫学杂志) 163 (1999) 1153-1161; Poudrier, J., 等, *Eur. J. Immunol.* (欧洲免疫学杂志) 30 (2000) 3157-3164; Aikawa, M., 等, *Cytokine* (细胞因子) 13 (2001) 75-84 已知,且可商购自,例如,美国的 R&D 系统公司(R&D Systems Inc. USA)。其他示范性抗 IL-13Ra1 抗体在 W02006/072564 中报告。

[0134] 术语“抗药物抗体”用于本申请中表示这样的抗体,其针对并结合药物抗体的抗原区。该抗原区可以是药物抗体的可变区, CDR, 恒定区, 或糖结构。在一个实施方案中,所述抗药物抗体针对所述药物抗体的 CDR 区或所述药物抗体在非人细胞,诸如 CHO 细胞、HEK 细胞、Sp2/0 细胞或 BHK 细胞中的重组产生的所述药物抗体的二级修饰。一般地,抗药物抗体针对药物抗体的抗原区,其由施用了该药物抗体的动物的免疫系统所识别。上述抗体称为“特异性抗药物抗体”。将药物抗体设计为包括尽可能少的抗原区。例如,意欲在人中使用的药物抗体在应用于人患者前进行人源化,从而最小化针对药物抗体的免疫反应的产生。该免疫反应应该处于抗药物抗体的形式,其针对该人源化药物抗体的非人部分,诸如例如可变区中的互补决定区(参见例如 Pan, Y., 等, *FASEB J.* 9 (1995) 43-49)。

[0135] 术语“抗人 IgG 抗体”表示针对抗体 G 类的人或人源化抗体的任何抗原区的人抗体。这样的抗人 IgG 抗体是“非特异性抗药物抗体”的实例。术语“非特异性抗药物抗体”在本申请中表示结合药物抗体但也结合许多其他抗体,诸如内源性人抗体的抗体,这归因于不决定药物抗体特异性的与共同抗原位点的结合。

[0136] 抗体,作为蛋白质,包括许多反应结构部分,诸如,例如,氨基(赖氨酸, α -氨基), 硫醇基(胱氨酸, 半胱氨酸, 和甲硫氨酸), 羧基(天冬氨酸, 谷氨酸)和糖-醇基。这些可以用于偶联结合配偶体,如表面、蛋白、多聚体(诸如例如 PEG、纤维素或聚苯乙烯)、酶或许多结合对(参见例如 Aslam M., 和 Dent, A., *Bioconjugation* MacMillan Ref. Ltd. (1999) 50-100)。

[0137] 蛋白的最常见反应基团之一是氨基酸赖氨酸的脂肪族 ϵ -胺。通常,几乎所有抗体包含丰富的赖氨酸。赖氨酸胺是相当好的高于 pH8.0 的亲核试剂 ($pK_a=9.18$),且因此与多种试剂容易并完全地反应以形成稳定的键。抗体中的另一种常见反应基是来自含硫氨基酸胱氨酸及其还原产物半胱氨酸(cysteine)(或半胱氨酸)的硫醇残基。半胱氨酸包含自由的硫醇基,其比胺更亲核且通常是蛋白质中最具反应性的官能团。硫醇通常在中性 pH 下具有反应性,且因此可以在存在胺的条件下选择性偶联其他分子。由于自由的巯基是相对反应性的,具有这些基团的蛋白通常以其氧化形式如二巯基或二硫键存在。除胱氨酸和半胱氨酸外,一些蛋白还具有氨基酸甲硫氨酸,其在硫醚键中包含硫。文献报告了若干硫醇盐交联试剂诸如 Traut 试剂(2-亚氨基硫烷盐酸盐(2-iminothiolane)),琥珀酰亚胺基(乙酰基硫代)乙酸酯(SATA),或磺基琥珀酰亚胺基 6-[3-(2-吡啶基二硫代)丙酰胺基]己酸酯(磺基-LC-SPDP)用于提供通过反应性氨基引入多个巯基的有效途径的应用。反应性酯,特别是 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯,是修饰胺基团的最常用试剂之一。在水性环境中反应的最佳 pH 是 pH8.0-9.0。异硫氰酸盐(或酯)是胺-修饰试剂并与蛋白形成硫脲键。它们在水溶液(最佳处于 pH9.0-9.5)中与蛋白胺反应。醛在适度水性条件下与脂肪族和芳香族胺、肼和酰肼反应形成亚胺中间体(Schiff 碱)。Schiff 碱可以使用中度或强还原剂(诸如硼氢化钠或氰基硼氢化钠)来选择性还原,以得到稳定的烷基胺键。已经用于修饰胺的其他试剂是酸酐。例如,二亚乙基三胺五乙酸酐(DTPA)是双功能螯合剂,其包含两个胺-反应性酐基。其可以与蛋白的 N 端和 ϵ -胺基反应形成酰胺键。酐环打开,以形成能够与配位复合物中的金属紧密结合的多价金属螯合臂。

[0138] 抗体中的另一个常见反应基是羧基(天冬氨酸,谷氨酸)。蛋白在天冬氨酸和谷氨酸的 C 端位置处和侧链中含有羧基。为了缀合,羧基通常通过使用水溶性碳二亚胺被转化为反应性酯,并与亲核试剂诸如胺、酰肼或肼反应。包含胺的试剂应该是弱碱性的,从而在该蛋白上存在其他胺的条件下与活化的羧酸选择性反应。蛋白交联可以在 pH 上升到高于 8.0 时发生。

[0139] 高碘酸钠可以用于将糖结构部分中糖醇部分氧化为醛。每个醛基可以与胺、酰肼或肼反应,如关于羧酸所述的。由于糖结构部分主要存在于抗体的可结晶片段(Fc)区,所以缀合可以通过远离抗原结合位点的糖的定点修饰来完成。

[0140] 硫醇反应性试剂是应该偶联蛋白上的硫醇基,从而形成硫醚偶联产物的那些。这些试剂在略酸性到中性 pH 下迅速反应并因此可以在存在胺基的条件下选择性反应。卤代乙酰基衍生物,例如碘乙酰胺,形成硫醚键并是用于硫醇修饰的试剂。在抗体中,反应发生在半胱氨酸基团处,所述半胱氨酸是本身存在的或由抗体不同位置处的胱氨酸二硫化物还原获得的。其他有用试剂是马来酰亚胺。马来酰亚胺与硫醇反应性试剂的反应与碘乙酰胺基本相同。马来酰亚胺在略酸性到中性 pH 下迅速反应。

[0141] 胺、酰肼和肼是醛和羧酸反应性试剂(形成酰胺、脎、烷基胺键)。胺、酰肼和肼可以在羧基由水溶性碳二亚胺活化后,偶联至蛋白的羧酸。包含胺的试剂必须是弱碱性的,以使得其在赖氨酸的更高碱性的 ϵ -胺的存在下与碳二亚胺活化的蛋白选择性反应,以形成稳定的酰胺键。在与醛基的反应中,形成 Schiff 碱中间体,所述醛基可以通过高碘酸盐氧化抗体上的碳水化合物残基而在抗体上产生,所述 Schiff 碱中间体可以经由使用氰基硼氢化钠(中度且选择性)或硼氢化钠(强)水溶性还原剂还原该中间体而被还原为烷基胺。

[0142] 术语“样品”用于本申请中表示,但不仅限于,来自有生命物体或以前有生命的物体的任意量物质。所述有生命物体包括,但不仅限于,人、小鼠、猴、大鼠、兔、和其他动物。所述物质包括,但不仅限于,来自个体的全血、血清或血浆,其是临床常规程序中样品的最广泛使用来源。

[0143] 术语“固相”用于本申请中表示非流体物质,且包括由材料诸如聚合物、金属(顺磁性的或铁磁性粒子)、玻璃和陶瓷制成的粒子(包括微粒子或珠);凝胶物质诸如硅、矾土、和聚合物凝胶;毛细管,其可以由聚合物、金属、玻璃和/或陶瓷制成;沸石和其他多孔物质;电极;微量滴定板;固体条带;和试管、管或其他分光计样品容器。测定的固相成分与该测定可以接触的惰性固体表面不同,因为“固相”在其表面上包含至少一个意欲与捕获药物抗体相互作用的结构部分。固相可以是固定的成分,诸如管、条带、试管或微量滴定板,或可以是非固定成分,诸如珠和微粒子。微粒子也可以用作均相测定形式的固相。可以使用多种容许蛋白质和其他物质非共价或共价连接的微粒子。所述粒子包括聚合物粒子,诸如聚苯乙烯和聚(甲基丙烯酸甲酯);金粒子,诸如金纳米粒子和金胶体;和陶瓷粒子,诸如硅,玻璃和金属氧化物粒子。参见例如 Martin, C. R., 等, *Analytical Chemistry-News&Features* (分析化学-新闻 & 特辑) (1998) 322A-327A, 通过参考将其引入本文。用于按照本发明的免疫测定的固体支持物广泛记述在现有技术(参见,例如, Butler, J. E., *Methods* (方法) 22 (2000) 4-23) 中。

[0144] 发色团(荧光或发光基团和染料)、酶、NMR-活性基团或金属粒子、半抗原,例如洋地黄毒苷,是可检测标记物的实例。可检测标记物还可以是光可激活的交联基团,例如叠氮基或 azirine 基。可以通过电化学发光检测的金属螯合物也是可检测的信号发射基团,特别优选钆螯合物,例如钆(二吡啶基)₃²⁺螯合物。合适的钆标记基团记述在,例如, EP0580979, W090/005301, W090/11511, 和 W092/14138 中。

[0145] 待确定其中的抗体的样品通常不止包含所讨论中的抗体。因此,不能避免通过免疫测定的测定法导致阳性免疫测定,尽管该样品不包含所述待确定的抗体。为了使用所述测定,这样的阳性免疫测定必须排除或至少减少至可以接受的量,例如低于全部阳性免疫测定的 5%。

[0146] 现在已经惊讶地发现:待通过用于确定针对药物抗体的抗体(抗药物抗, ADA)的方法来分析的样品的阳性免疫测定可以通过使待分析样品掺加药物抗体和非特异性抗体并通过确定关于这些掺加样品的方法的结果来确定。

[0147] 术语“掺加”用于本申请中表示向待分析的样品中添加增补物质,该增补物质可以是或可以不是所述样品中已经存在的。所述物质的增补具有这样的效果,即所述物质以超过所述样品中被讨论的抗药物抗体的浓度的浓度存在于所述样品中。在一个实施方案中,所述增补物质是抗体,在另一个实施方案中,其是所述药物抗体或 Fc 部分特异性抗体,诸如抗人 IgG 抗体。

[0148] 术语“抗体”用于本文中时涵盖抗体结构的多种形式,包括完整抗体和抗体片段。在一个实施方案中,按照本发明的方法中的药物抗体是人抗体,人源化抗体,嵌合抗体,或 T 细胞抗原缺失(depleted)抗体(参见例如 W098/33523, W098/52976, 或 W000/34317)。抗体的遗传工程例如由 Morrison, S. L., 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (美国国家科学院学报) 81 (1984) 6851-6855; US5, 202, 238 和 US5, 204, 244; Riechmann, L.,

等, Nature (自然) 332(1988) 323-327; Neuberger, M. S., 等, Nature (自然) 314(1985) 268-270; Lonberg, N., Nat. Biotechnol. (自然生物技术) 23(2005) 1117-1125 报道。

[0149] “抗体片段”表示完整抗体的片段,所述片段保持结合与完整抗体结合的抗原相同的抗原的能力。“完整抗体”是由两条多肽轻链和两条多肽重链组成的抗体,其中每条多肽链包括可变区和恒定区。“抗体缀合物”表示抗体与其他多肽的缀合物。抗原的结合不通过与其他多肽的缀合而减少。“抗原片段”包括全长抗体的一部分,优选其可变结构域或至少其抗原结合部分。抗体片段的实例是单链抗体分子(scFv), Fab, F(ab)₂ 片段等,条件是它们保持抗体的结合特征。ScFv 抗体,例如,在 Huston, J. S., Methods in Enzymol. (酶学方法) 203(1991) 46-88 中报告。Huston 还报告了用于连接本发明的多肽的连接体和方法。

[0150] 抗体的“Fc 部分”不直接参与结合抗原,但表现出多种效应子功能。根据重链恒定区的氨基酸序列,抗体(免疫球蛋白)分为以下类型:IgA, IgD, IgE, IgG, 和 IgM。这些类型中的一些进一步分为亚型(同种型),即 IgG 分为 IgG1, IgG2, IgG3, 和 IgG4, 或 IgA 分为 IgA1 和 IgA2。根据抗体所属的免疫球蛋白类型,免疫球蛋白的重链恒定区分别称为 α (IgA), δ (IgD), ε (IgE), γ (IgG), 和 μ (IgM)。按照本发明的方法中的药物抗体属于一个关于 IgG 类型的实施方案。“抗体的 Fc 部分”是技术人员公知的术语且基于抗体的木瓜蛋白酶裂解而定义。

[0151] 术语“抗体”用于本文中时指由一种或多种基本由抗体基因编码的多肽组成的蛋白。组成抗体的不同多肽根据其重量称为多肽轻链和多肽重链。识别的抗体基因包括不同的恒定区基因以及无数抗体可变区基因。抗体可以以多种形式存在,包括,例如,单条重链和轻链, Fv, Fab, 和 F(ab)₂ 以及单链(scFv) (例如 Huston, J. S., 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(1988) 5879-5883; Bird, R. E., 等, Science (科学) 242(1988) 423-426; 一般地, Hood, L., 等, Immunology (免疫学), Benjamin N. Y., 第 2 版(1984); Hunkapiller, T., 和 Hood, L., Nature (自然) 323(1986) 15-16)。

[0152] 抗体通常包括 2 条多肽轻链和 2 条多肽重链。每条多肽重链和多肽轻链包含可变区(多肽链的氨基端部分),所述可变区包含能够与抗原相互作用的结合结构域。每个多肽重链和多肽轻链包含恒定区(多肽链的羧基端部分)。重链的恒定区介导抗体 i) 与携带 Fc γ 受体(Fc γ R) 的细胞,诸如吞噬细胞,或 ii) 与携带新生 Fc 受体(FcRn) (也称为 Brambell 受体) 的细胞的结合。抗体轻链或重链的可变结构域又包括不同区段,即 4 个构架区(FR) 和 3 个高变区(CDR)。

[0153] 非人(例如啮齿动物)抗体的“人源化”形式是包括源自非人抗体和源自人抗体的部分序列的抗体。对于大多数部分,人源化抗体源自人抗体(受体抗体),其中来自高变区的残基被来自非人物种(供体抗体),诸如小鼠、大鼠、兔、或非人灵长类动物的具有所需特异性和亲和力的残基替代。(参见例如 Morrison, S. L., 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (美国国家科学院学报) 81(1984) 6851-6855; US5, 202, 238; US5, 204, 244)。在一些实例中,人抗体的构架区(FR) 残基被相应的非人残基替换。此外,人源化抗体可以包括其他修饰,例如受体抗体中或供体抗体中未发现的氨基酸残基。这样的修饰导致所述受体或供体抗体的变体,其与相应的母体序列同源但不相同。进一步进行这些修饰以改善抗体的表现。一般地,人源化抗体应该包括基本全部的至少一个,或典型地两个可变结构域,其中全部或基本

全部的高变环与非人供体抗体的那些相对应,且全部或基本全部 FR 是人受体抗体的那些。人源化抗体任选还应该包括抗体恒定区的至少一部分,典型地人抗体的至少一部分。用于人源化非人抗体的方法已经记述在现有技术中。优选地,人源化抗体具有由非人来源引入其中的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常称为“输入”残基,其典型地来自“输入”可变结构域。人源化可以基本按照 Winter 及其同事的方法通过用高变区序列替代非人抗体的相应序列进行。因此,所述“人源化”抗体是这样的抗体,其中基本小于完整人可变结构域被来自非人物种的相应序列替代。实践上,人源化抗体典型地是人抗体,其中一些高变区残基和可能一些构架区残基被来自啮齿动物或非人灵长类动物抗体的类似位点替代。

[0154] 术语“单克隆抗体”用于本文中时,指获自基本上同质的抗体群体的抗体,即组成所述群体的各个抗体除可能天然存在微小量的突变以外是相同的。单克隆抗体是高度特异性的,其针对单个抗原位点。此外,与包含针对不同抗原位点(决定簇或表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物相反,每种单克隆抗体对抗原上的单一抗原表位。除它们的特异性外,单克隆抗体由于它们可以由其他抗体无污染地合成而非常有利。修饰语“单克隆”表示抗体获自基本上同质的抗体群体的特征,但不应该被解释为需要通过任何特殊方法生成该抗体。

[0155] 术语“处于单体形式的抗体”用于本申请中时,表示所述抗体不与相同特异性的其他抗体分子共价或非共价结合。例如,抗 IGF-1R 抗体处于单体形式,如果它不与第二抗 IGF-1R 抗体结合。这不排除所述抗体可以与其他抗体诸如例如抗 IL-6R 抗体共价或非共价结合。

[0156] 术语“处于寡聚形式的抗体”用于本申请中时,表示所述抗体与相同特异性的其他抗体分子共价或非共价结合。在一个实施方案中,“处于寡聚形式的抗体”与相同特异性的一个或多个其他抗体分子共价结合。例如,抗 IGF-1R 抗体处于寡聚形式,如果其与至少第二抗 IGF-1R 抗体结合。

[0157] 术语“相同特异性”用于本申请中时,表示两个抗体结合相同靶分子,即相同抗原。这不排除两个抗体结合所述抗原的不同表位。在一个实施方案中,包含在处于寡聚形式的抗体中的抗体结合相同抗原且结合相同表位。在另一个实施方案中,所述处于寡聚形式的抗体中的抗体是相同的单克隆抗体。

[0158] 本发明的第一方面是利用包括捕获药物抗体和示踪药物抗体的免疫测定来确定样品中针对药物抗体的抗体的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0159] a) 提供

[0160] a-i) 所述捕获药物抗体,其为与固相缀合的所述药物抗体,

[0161] a-ii) 所述示踪药物抗体,其为与可检测的标记物缀合的所述药物抗体,

[0162] b) 使所述捕获药物抗体分别与下列接触

[0163] b-i) 所述样品,

[0164] b-ii) 在免疫测定前已经向其中加入了处于单体形式的所述药物抗体的所述样品,

[0165] b-iii) 在免疫测定前已经向其中加入了处于寡聚形式的所述药物抗体的所述样品,

[0166] c)通过 b-i)中的阳性免疫测定以及 b-ii)和 b-iii)中的阴性免疫测定来确定所述样品中的针对所述药物抗体的抗体。

[0167] 如果样品包含除被讨论抗药物抗体以外的抗体,所述抗体可以干扰用于检测所述抗药物抗体的免疫测定且因此导致阳性免疫测定,则该方法是特别有效的。在一个实施方案中,本发明的方法有效用于确定用于抗炎治疗的药物抗体的抗药物抗体。术语“用于抗炎治疗的药物抗体”用于本申请中时,表示所述药物抗体针对介导炎症的细胞表面受体。这样的受体是例如 IL-6 受体,或 IGF-1 受体,或 IL-13a 受体 1。如果分析来自用该抗炎药物抗体处理的受试者的样品,则必须确定,该方法的阳性结果是基于样品的抗药物抗体还是除抗药物抗体以外的抗体。所述情形的一个实例是来自具有自身免疫疾病诸如风湿病的受试者的样品,且由此来自所述受试者的样品包含所谓的“风湿因子”。术语“风湿因子”用于本申请中时,表示结合人 IgG、更准确地结合人 IgG 的 Fc 部分的抗体。在大多数情形中,这些“风湿因子”是低聚结合分子。

[0168] 因此,惊讶地发现所述抗人 IgG 抗体的干扰可以通过对待分析样品参加处于单体或寡聚形式的确定的抗体,和进行使用所述参加的样品确定抗药物抗体的方法来确定,且基于使用不同样品进行的方法的结果来确定该免疫测定是否为阳性。

[0169] 本发明的另一方面是利用包括捕获药物抗体和示踪药物抗体的双抗原桥连免疫测定来确定样品中存在的抗体是抗药物抗体还是抗人 IgG 抗体,即样品中存在的抗体是特异性抗药物抗体还是非特异性抗药物抗体的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0170] a) 提供

[0171] a-i) 所述捕获药物抗体,其为与固相缀合的所述药物抗体,

[0172] a-ii) 所述示踪药物抗体,其为与可检测的标记物缀合的所述药物抗体,

[0173] b) 使所述捕获药物抗体分别与下列接触

[0174] b-i) 所述样品,

[0175] b-ii) 在免疫测定前已经向其中加入了处于单体形式的所述药物抗体的所述样品,

[0176] b-iii) 在免疫测定前已经向其中加入了处于寡聚形式的所述药物抗体的所述样品,

[0177] b-iv) 所述样品,在免疫测定前已经向其中加入了处于单体形式的人 IgG,

[0178] b-v) 所述样品,在免疫测定前已经向其中加入了处于寡聚形式的人 IgG,

[0179] c) 通过 b-i) 和 b-iv) 和 b-v) 中的阳性免疫测定以及 b-ii) 和 b-iii) 中的阴性免疫测定来确定所述样品中存在的抗体是抗药物抗体,或

[0180] 通过 b-i) 和 b-ii) 和 b-iv) 中的阳性免疫测定和 b-iii) 和 b-v) 中的阴性免疫测定来确定所述样品中存在的抗体是抗人 IgG 抗体。

[0181] 在本申请中可交换使用的术语“阳性免疫测定”和“阳性免疫测定结果”,表示在使用所述未增补样品进行的免疫测定情形中,使用所述未增补样品进行的免疫测定产生充分高于所述免疫测定背景水平的信号。在一个实施方案中,所述背景水平是通过测定来自在所述免疫测定中未施用所述药物抗体的不同个体的许多样品获得的平均信号加该平均值标准偏差的三倍,即 95% 置信区间。同样地,在本申请中可交换使用的术语“阴性免疫测定”和“阴性免疫测定结果”,表示在所述免疫测定背景水平内的信号,即在所述免疫测定中

不使用任何抗体的样品获得的信号的标准偏差的三倍以内。

[0182] 在本申请中可交换使用的术语“阳性免疫测定”和“阳性免疫测定结果”，表示在使用所述增补的样品进行的免疫测定用于本申请的情形中，使用所述增补的样品进行的免疫测定在一个实施方案中产生所述在使用未增补样品进行的免疫测定情形中的信号的 50% 以上的相对信号，在另一个实施方案中产生 65% 以上的相对信号，在再一个实施方案中产生 80% 以上的相对信号。术语“阴性免疫测定”，表示在使用所述增补的样品进行免疫测定用于本申请的情形中，使用所述增补的样品进行的免疫测定在一个实施方案中产生小于在使用所述未增补样品进行的免疫测定情形中的所述信号的 50%，在另一个实施方案中小于所述信号的 65%，在再一个实施方案中小于所述信号的 80% 的相对信号。

[0183] 按照本发明的免疫测定包括处于以下顺序的下列步骤：

[0184] a) 使与固相缀合的捕获药物抗体与所述未掺加或掺加的样品相接触，

[0185] b) 使所述已经与样品相接触的、与固相缀合的捕获药物抗体与示踪药物抗体相接触，

[0186] c) 通过检测与所述示踪药物抗体缀合的可检测标记物，检测示踪药物抗体。

[0187] 任选地，步骤 a) 和 b)，即 b) 和 c) 之间可以包括洗涤步骤。

[0188] “阳性免疫测定”和“阳性免疫测定结果”在

[0189] a) 样品中含有的抗药物抗体通过捕获药物抗体与固相结合，

[0190] b) 示踪药物抗体结合 a) 的复合物，和

[0191] c) 直接或在其他结合配偶体的帮助下检测示踪药物抗体的可检测标记物

[0192] 时获得。

[0193] 在“阴性免疫测定”和“阴性免疫测定结果”的情形中，没有达到一个或多个以上列出的标准。

[0194] 本发明的第三方面是用于将在样品中针对人源化抗炎药物抗体的抗药物抗体与抗人 IgG 抗体区分开，即将特异性抗药物抗体与非特异性抗药物抗体相区分的方法，其中所述方法包括以下步骤：

[0195] a) 提供

[0196] a-i) 捕获药物抗体，其为与固相缀合的所述药物抗体，

[0197] a-ii) 示踪药物抗体，其为与可检测的标记物缀合的所述药物抗体，

[0198] b) 使所述捕获药物抗体分别与下列接触

[0199] b-i) 所述样品，

[0200] b-ii) 在免疫测定前已经向其中加入了处于单体形式的所述药物抗体的所述样品，

[0201] b-iii) 在免疫测定前已经向其中加入了处于寡聚形式的所述药物抗体的所述样品，

[0202] b-iv) 所述样品，在免疫测定前已经向其中加入了处于单体形式的人免疫球蛋白 G，

[0203] b-v) 所述样品，在免疫测定前已经向其中加入了处于寡聚形式的人免疫球蛋白 G，

[0204] c) 通过 b-i) 和 b-iv) 和 b-v) 中的阳性免疫测定以及 b-ii) 和 b-iii) 中的阴性免疫测定来确定针对人源化抗炎药物抗体的抗药物抗体，或

[0205] 通过 b-i) 和 b-ii) 和 b-iv) 中的阳性免疫测定和 b-iii) 和 b-v) 中的阴性免疫测定来确定所述样品中存在的抗体是抗人 IgG 抗体。

[0206] 本发明的还有的另一方面是用于确定样品中的抗药物抗体是单体形式还是寡聚形式,其中所述方法包括以下步骤:

[0207] a) 提供

[0208] a-i) 捕获药物抗体,其为与固相缀合的所述药物抗体,

[0209] a-ii) 示踪药物抗体,其为与可检测的标记物缀合的所述药物抗体,

[0210] b) 使所述捕获药物抗体分别与下列接触

[0211] b-i) 所述样品,

[0212] b-ii) 在免疫测定前已经向其中加入了处于单体形式的所述药物抗体的所述样品,

[0213] b-iii) 在免疫测定前已经向其中加入了处于寡聚形式的所述药物抗体的所述样品,

[0214] b-iv) 所述样品,在免疫测定前已经向其中加入了处于单体形式的人免疫球蛋白 G,

[0215] b-v) 所述样品,在免疫测定前已经向其中加入了处于寡聚形式的人免疫球蛋白 G,

[0216] c) 通过 b-i) 以及 b-ii) 和 b-iv) 中的阳性免疫测定以及 b-iii) 和 b-v) 中的阴性免疫测定来确定所述样品中的抗药物抗体是单体形式;或

[0217] 通过 b-i) 和 b-iii) 和 b-v) 中的阳性免疫和测定以及 b-ii) 和 b-iv) 中的阴性免疫测定来确定所述样品中的抗药物抗体是寡聚形式。

[0218] 本发明的另一方面是用于确定样品中存在寡聚抗药物抗体的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0219] a) 提供

[0220] a-i) 捕获药物抗体,其为与固相缀合的所述药物抗体,

[0221] a-ii) 示踪药物抗体,其为与可检测的标记物缀合的所述药物抗体,

[0222] b) 使所述捕获药物抗体分别与下列接触

[0223] b-i) 所述样品,

[0224] b-ii) 在免疫测定前已经向其中加入了处于单体形式的所述药物抗体的所述样品,

[0225] b-iii) 在免疫测定前已经向其中加入了处于寡聚形式的所述药物抗体的所述样品,

[0226] b-iv) 所述样品,在免疫测定前已经向其中加入了处于单体形式的人免疫球蛋白 G,

[0227] b-v) 所述样品,在免疫测定前已经向其中加入了处于寡聚形式的人免疫球蛋白 G,

[0228] c) 通过 b-i) 和 b-iii) 和 b-v) 中的阳性免疫测定和 b-ii) 和 b-iv) 中的阴性免疫测定来确定样品中的抗药物抗体是寡聚形式。

[0229] 本发明的另一方面是用于确定样品中存在单体抗药物抗体的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0230] a) 提供

- [0231] a-i) 捕获药物抗体, 其为与固相缀合的所述药物抗体,
- [0232] a-ii) 示踪药物抗体, 其为与可检测的标记物缀合的所述药物抗体,
- [0233] b) 使所述捕获药物抗体分别与下列接触
- [0234] b-i) 所述样品,
- [0235] b-ii) 在免疫测定前已经向其中加入了处于单体形式的所述药物抗体的所述样品,
- [0236] b-iii) 在免疫测定前已经向其中加入了处于寡聚形式的所述药物抗体的所述样品,
- [0237] b-iv) 所述样品, 在免疫测定前已经向其中加入了处于单体形式的人免疫球蛋白 G,
- [0238] b-v) 所述样品, 在免疫测定前已经向其中加入了处于寡聚形式的人免疫球蛋白 G,
- [0239] c) 通过 b-i) 和 b-ii) 和 b-iv) 中的阳性免疫测定和 b-iii) 和 b-v) 中的阴性免疫测定来确定所述样品中的抗药物抗体是单体形式。
- [0240] 现在已经意外地发现了在使用处于单体和处于寡聚形式的所述药物抗体以及使用处于单体和处于寡聚形式的人 IgG 增补所述样品的条件下, 可以由其获得测定结果模式, 可以进行结果类型的确定, 其记述在以下方案中:

	特异性, 单体反应	特异性, 寡聚反应	非特异性, 寡聚反应	非特异性, 单体反应
[0241] 样品, b-i)	+	+	+	+
b-ii)	-	+	+	-
b-iii)	-	-	-	-
b-iv)	+	+	+	-
b-v)	+	+	-	-

[0242] 因此, 使用按照本发明的方法, 可以对特异性和非特异性以及单体和寡聚免疫测定反应或结果进行分类。

[0243] 因此, 本发明作为另一方面包括利用包括捕获药物抗体和示踪药物抗体的免疫测定来确定阳性结果的方法, 所述阳性结果是针对药物抗体的抗体的测定的阳性结果, 其中所述方法包括以下步骤:

- [0244] a) 提供
- [0245] a-i) 捕获药物抗体, 其为与固相缀合的所述药物抗体,
- [0246] a-ii) 示踪药物抗体, 其为与可检测的标记物缀合的所述药物抗体,
- [0247] b) 使所述捕获药物抗体分别与下列接触
- [0248] b-i) 所述样品,
- [0249] b-ii) 在免疫测定前已经向其中加入了处于单体形式的所述药物抗体的所述样品,
- [0250] b-iii) 在免疫测定前已经向其中加入了处于寡聚形式的所述药物抗体的所述样

品,

[0251] b-iv) 所述样品,在免疫测定前已经向其中加入了处于单体形式的人免疫球蛋白 G,

[0252] b-v) 所述样品,在免疫测定前已经向其中加入了处于寡聚形式的人免疫球蛋白 G,

[0253] c) 通过 b-i) 和 b-iii) 和 b-v) 中的阳性免疫测定和 b-ii) 和 b-iv) 中的阴性免疫测定来确定样品中针对药物的抗体的确定的阳性结果。

[0254] 本发明该方面的一个实施方案是所述免疫测定是使用捕获药物抗体和示踪药物抗体的双抗原桥连免疫测定。本发明该方面的另一个实施方案是所述药物抗体是用于治疗炎性疾病的抗体。在一个实施方案中,所述用于治疗炎性疾病的抗体是用于治疗类风湿性关节炎或骨关节炎的抗体。在另一个实施方案中,所述用于治疗炎性疾病的抗体是抗 IL-6 受体,或抗 IGF-1 受体,或 IL-13 受体 1 α 的抗体。本发明该方面的一个实施方案包括所述捕获药物抗体是所述药物抗体的混合物,其包括至少两种在不同抗体位点处与所述固相缀合的所述抗体,且示踪药物抗体是所述药物抗体的混合物,其包括至少两种在不同抗体位点处与所述可检测的标记物缀合的所述抗体。另一个实施方案是所述药物抗体与其缀合配偶体的缀合是通过经由药物抗体的氨基酸主链的 N 端和 / 或 ϵ -氨基(赖氨酸),不同赖氨酸的 ϵ -氨基,羧基-,巯基-,羟基-和 / 或酚官能团,和 / 或药物抗体的糖结构的糖醇基团的化学键合来进行。在本发明方面的实施方案中,捕获药物抗体混合物或示踪药物抗体混合物包括经由氨基或经由糖结构与其缀合配偶体缀合的药物抗体。在另一个实施方案中,捕获药物抗体与固相的缀合通过被动吸附,或经由特异性结合对进行。在本发明的一个实施方案中,所述特异性结合对(第一成分 / 第二成分)是链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白 / 生物素,或抗体 / 抗原(参见,例如, Hermanson, G. T., 等, Bioconjugate Techniques (生物缀合技术), Academic Press (学术出版社), 1996), 或凝集素 / 多糖, 或类固醇 / 类固醇结合蛋白, 或激素 / 激素受体, 或酶 / 底物, 或 IgG / 蛋白 A 和 / 或 G。在一个实施方案中,捕获药物抗体与生物素缀合且与固相的缀合经由固定化的抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白进行。在本发明方面的另一个实施方案中,示踪药物抗体经由特异性结合对与可检测的标记物缀合。在一个实施方案中,所述示踪药物抗体与洋地黄毒苷缀合且与可检测的标记物的连接经由抗洋地黄毒苷的抗体进行。在本发明该方面的另一个实施方案中,捕获药物抗体与示踪药物抗体的比率为 1:10 ~ 50:1(比率意指抗体分子比,而不考虑缀合物的分子量,缀合物的分子量可以不同)。

[0255] 本发明的另一方面是用于确定针对施用的药物抗体,特别是治疗性抗体的免疫系统响应类型的方法。使用该方法,可以区分检测的抗药物抗体是否是以下各项之一:

[0256] i) 特异性、单体抗药物抗体,或

[0257] ii) 特异性、寡聚抗药物抗体,或

[0258] iii) 非特异性、寡聚抗人 IgG 抗体,或

[0259] iv) 非特异性、单体抗人 IgG 抗体,或

[0260] v) 非特异性抗体。

[0261] 因此,本发明包括使用包括捕获药物抗体和示踪药物抗体的双抗原桥连免疫测定来确定样品中存在针对药物抗体的抗体(抗药物抗体)的类型的方法,其中所述方法包括以下步骤:

- [0262] a) 提供
- [0263] a-i) 所述捕获药物抗体, 其为与固相缀合的所述药物抗体,
- [0264] a-ii) 所述示踪药物抗体, 其为与可检测的标记物缀合的所述药物抗体,
- [0265] b) 使所述捕获药物抗体分别与下列接触
- [0266] b-i) 所述样品,
- [0267] b-ii) 在免疫测定前已经向其中加入了处于单体形式的所述药物抗体的所述样品,
- [0268] b-iii) 在免疫测定前已经向其中加入了处于寡聚形式的所述药物抗体的所述样品,
- [0269] b-iv) 所述样品, 在免疫测定前已经向其中加入了处于单体形式的人免疫球蛋白 G,
- [0270] b-v) 所述样品, 在免疫测定前已经向其中加入了处于寡聚形式的人免疫球蛋白 G,
- [0271] c) 通过 b-i) 和 b-iv) 和 b-v) 中的阳性免疫测定以及 b-ii) 和 b-iii) 中的阴性免疫测定来确定所述样品中存在的抗体是特异性的、单体抗药物抗体, 或
- [0272] 通过 b-i) 和 b-ii) 和 b-iv) 和 b-v) 中的阳性免疫测定和 b-iii) 中的阴性免疫测定来确定所述样品中存在的抗体是特异性的、寡聚抗药物抗体, 或
- [0273] 通过 b-i) 和 b-ii) 和 b-iv) 中的阳性免疫测定和 b-iii) 和 b-v) 中的阴性免疫测定来确定所述样品中存在的抗体是非特异性的、寡聚抗人 IgG 抗体, 或
- [0274] 通过 b-i) 和 b-ii) 和 b-iii) 和 b-iv) 和 b-v) 中的阳性免疫测定来确定所述样品中存在的抗体是非特异性抗体, 或
- [0275] 通过 b-i) 中的阳性免疫测定以及 b-ii) 和 b-iii) 和 b-iv) 和 b-v) 中的阴性免疫测定来确定所述样品中存在的抗体是非特异性抗人 IgG 抗体。
- [0276] 提供以下实施例、参考文献和附图来帮助理解本发明, 本发明的真正范围由后附权利要求限定。应当理解在不偏离本发明实质的条件下可以在所述程序中进行变化。

附图说明

- [0277] 图 1. 用于检测抗药物抗体的桥连测定:
- [0278] 生物素化的药物抗体(捕获-BI)与链霉抗生物素蛋白包被的微量滴定板(SA-MTP)结合;抗药物抗体使捕获药物抗体(捕获-BI;BI=生物素化的)与洋地黄毒苷-标记的示踪药物抗体(示踪剂-DIG;DIG=洋地黄毒苷化(digoxigenylated))桥连;固定化的复合物通过多克隆抗洋地黄毒苷辣根过氧化物酶缀合物(DIG-pAb-POD)检测;多克隆兔抗药物抗体(rpAb)用作标准样。

实施例

- [0279] 实施例 1
- [0280] 用 D-生物素酰(biotinoyl)-氨基己酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯生物素化抗体 mAb IL-6R
- [0281] 针对缓冲液(100mM 磷酸钾缓冲液(以下表示为 K-PO₄), pH8.5)透析了抗 IL-6 受体抗体(mAb IL-6R)。随后,将该溶液调节到蛋白质浓度为 10mg/ml。将 D-生物素酰-氨基

己酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯溶解在 DMSO 中并以 1:5 的摩尔比加入到该抗体溶液中。60 分钟后,通过加入 L-赖氨酸终止反应。过剩的标记试剂通过针对增补了 150mM NaCl 的 25mM K-PO₄, pH7.5 透析去除。

[0282] 实施例 2

[0283] 在用柠康酸酐处理后用 D-生物素酰-氨基己酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯生物素化 mAb IL-6R

[0284] 针对 100mM K-PO₄, pH8.4 透析了 mAb IL-6R。随后将该溶液调节到蛋白质浓度为 20mg/ml。将柠康酸酐溶解在 DMSO 中并以 1:5 的摩尔比加入到该抗体溶液中。120 分钟后,通过用 100mM K-PO₄, pH8.4 平衡的 **Sephadex®** G25 柱上层析来终止反应。将抗体溶液调节到蛋白浓度为约 4mg/ml。将 D-生物素酰-氨基己酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯溶解在 DMSO 中并以 1:5 的摩尔比加入到抗体溶液中。该反应在 60 分钟后,通过加入 L-赖氨酸来终止。过剩的标记试剂通过针对 200mM 乙酸钠缓冲液, pH5.0 透析去除。通过在 **Sephadex®** G25 柱上层析,将抗体溶液转移到增补了 150mM NaCl 的 25mM K-PO₄, pH7.2 中。

[0285] 实施例 3

[0286] 用生物素酰肼生物素化 mAb IL-6R

[0287] 针对 100mM 乙酸钠缓冲液, pH5.5 透析了 mAb IL-6R。随后将该溶液调节到蛋白质浓度为 20mg/ml。将高碘酸钠溶解在 100mM 乙酸钠缓冲液, pH5.5 中并加入到抗体溶液中以达到最终浓度 10mM。该反应在 30 分钟后,通过用 100mM 乙酸钠缓冲液, pH5.5 平衡的 **Sephadex®** G25 柱上层析来终止。将抗体溶液调节到蛋白浓度为约 5mg/ml。将生物素酰肼溶解在 DMSO 中并以 1:5 的摩尔比加入到抗体溶液中。该反应在 120 分钟后,通过加入硼氢化钠达到最终浓度为 15mM 来终止。30 分钟后,通过针对增补了 150mM NaCl 的 25mM K-PO₄, pH7.2 来透析抗体溶液。

[0288] 实施例 4

[0289] 用洋地黄毒苷 3-O-甲基羰基-ε-氨基己酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯将 mAb IL-6R 洋地黄毒苷化

[0290] 针对洋地黄毒苷化缓冲液 (100mM K-PO₄, pH8.5) 透析了 mAb IL-6R。随后,将该溶液调节到蛋白质浓度为 10mg/ml。将洋地黄毒苷 3-O-甲基羰基-ε-氨基己酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯溶解在 DMSO 中并以 1:5 的摩尔比加入到抗体溶液中。60 分钟后,通过加入 L-赖氨酸终止反应。过剩的标记试剂通过针对增补了 150mM NaCl 的 25mM K-PO₄, pH7.5 透析去除。

[0291] 实施例 5

[0292] 在用柠康酸酐处理后,用洋地黄毒苷 3-O-甲基羰基-ε-氨基己酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯将 mAb IL-6R 洋地黄毒苷化

[0293] 针对 100mM K-PO₄, pH8.4 透析了 mAb IL-6R。随后将该溶液调节到蛋白质浓度为 20mg/ml。将柠康酸酐溶解在 DMSO 中并以 1:5 的摩尔比加入到抗体溶液中。该反应在 120 分钟后,通过用 100mM K-PO₄, pH8.4 平衡的 **Sephadex®** G25 柱上层析来终止。将抗体溶液调节到蛋白浓度为约 4mg/ml。将洋地黄毒苷 3-O-甲基羰基-ε-氨基己酸-N-羟基琥珀酰

亚胺酯溶解在 DMSO 中并以 1:5 的摩尔比加入到抗体溶液中。该反应在 60 分钟后,通过加入 L-赖氨酸来终止。过剩的标记试剂通过针对 200mM 乙酸钠缓冲液, pH5.0 透析去除。通过在 **Sephadex®** G25 柱上层析,将抗体溶液转移到增补了 150mM NaCl 的 25mM K-PO₄, pH7.2 中。

[0294] 实施例 6

[0295] 用洋地黄毒苷-X-酰肼将 mAb IL-6R 洋地黄毒苷化

[0296] 针对 100mM 乙酸钠缓冲液, pH5.5 透析了 mAb IL-6R。随后将该溶液调节到蛋白质浓度为 20mg/ml。将高碘酸钠溶解在 100mM 乙酸钠缓冲液, pH5.5 中并加入到抗体溶液中以达到最终浓度 10mM。该反应在 30 分钟后,通过在用 100mM 乙酸钠缓冲液, pH5.5 平衡的 **Sephadex®** G25 柱上层析来终止。将抗体溶液调节到蛋白浓度为约 5mg/ml。将洋地黄毒苷-X-酰肼溶解在 DMSO 中并以 1:50 的摩尔比加入到抗体溶液中。该反应在 120 分钟后,通过加入硼氢化钠达到最终浓度 15mM 来终止。30 分钟后,通过针对增补了 150mM NaCl 的 25mM K-PO₄, pH7.2 来透析该抗体溶液。

[0297] 实施例 7

[0298] a) 产生处于寡聚形式的药物抗体

[0299] 重组药物抗体 (IgG), 例如抗 IL-6R 抗体, 抗 IGF-1R 抗体, 或抗 IL-13R 抗体, 针对增补了 100mM NaCl 的 150mM 磷酸钾缓冲液, pH8.4 透析, 并随后将抗体溶液浓缩到抗体浓度为 55mg/ml。

[0300] 将辛二酸二琥珀酰亚胺酯 (DSS) 溶解在 DMSO 中并以 1:7 (IgG:DSS) 的摩尔比加入到所述抗体溶液中。使该混合物在 25° C 和 pH8.4 下搅拌温育, 并用分析凝胶过滤层析法 (例如使用 TSK4000 柱) 分析该反应。聚合通常在 60 分钟后, 通过加入赖氨酸达到终浓度 10mM 来终止。在 25° C 温育 45 分钟后, 聚合的药物抗体通过凝胶过滤 (例如使用 Sephacryl S400 柱) 分离, 以除去低分子量级分。

[0301] b) 产生处于寡聚形式的人 IgG

[0302] 将通过离子交换层析法从人血清中纯化的人 IgG 针对含有 100mM NaCl 的 150mM 磷酸钾缓冲液, pH8.4 透析, 并将蛋白溶液浓缩到蛋白浓度为 75mg/ml。将辛二酸二琥珀酰亚胺酯 (DSS) 溶解在 DMSO 中并以 1:5 (IgG:DSS) 的摩尔比加入到所述抗体溶液中。使该混合物在 25° C 和 pH8.4 下搅拌温育, 并用分析凝胶过滤柱 (例如使用 TSK4000 柱) 分析该反应。聚合通常在 60 分钟后, 通过加入赖氨酸达到终浓度 10mM 来终止。在 25° C 温育 45 分钟后, 寡聚人 IgG 通过凝胶过滤 (例如使用 Sephacryl S400 柱) 分离, 以除去低分子量级分。

[0303] 实施例 8

[0304] 测定原理

[0305] ELISA 利用链霉抗生物素蛋白微量滴定板 (SA-MTP) 上的固定化的药物抗体 (捕获-BI) 来捕获包含抗药物抗体 (ADA) 的样品。捕获的 ADA 通过洋地黄毒苷化的药物抗体 (示踪剂-DIG) 检测。ADA 和示踪剂-DIG 的结合复合物通过过氧化物酶缀合的多克隆抗 DIG 抗体与其底物 ABTS (2, 2'-连氨基-二(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)) 反应和随后的光度计读数来检测。光密度 (OD) 在 405nm 处测量 (以 490nm 作为参考波长)。为了确定标准曲线, 用确定浓度的抗药物抗体溶液代替样品。最高标准浓度已经达到 OD 值 1.8-2.2AU。

[0306] 在第一步中,通过以 1:20 的稀释度检测所有样品来筛选所有样品,以确定对于抗药物抗体(ADA)的阳性或阴性(筛选测定;是/否答案)。阳性/阴性分界点是利用测定反应的 95% 置信区间,即来自空白血清样品的多重分析的光密度(OD)来确定。

[0307] 在第二步中,所有阳性样品通过使用最多四个另外的区分步骤再次检测,从而表征反应(例如药物特异性):

[0308] i) 未掺加的样品

[0309] ii) 对样品掺加 1 μ g/ml 处于单体形式的药物抗体

[0310] iii) 对样品掺加 1 μ g/ml 处于寡聚形式的药物抗体

[0311] iv) 对样品掺加 1 μ g/ml 处于单体形式的人 IgG

[0312] v) 对样品掺加 1 μ g/ml 处于寡聚形式的人 IgG

[0313] 在上述区分步骤中,如上(筛选测定)所述再次进行 ELISA,但是样品在应用于微量滴定板前分别用如上所述的溶液 ii)-v)温育,以实现所述四个区分步骤。掺加的物质与捕获 -BI 竞争结合样品的物质(例如 ADA)。未掺加的样品的测定信号必须在测定的动力学范围内,否则必须进一步稀释该样品。该最终样品稀释也必须用在所有区分步骤中。如果由于存在掺加的试剂(ii)-v))导致的吸光度的减小小于 20%,则该检测结果被认为是“阳性”(阳性免疫测定)。如果吸光度的减小是 20% 以上,则该检测结果被认为是“阴性”(阴性免疫测定)。换言之,如果信号恢复大于 80%,则该检测结果被认为是“阳性”(阳性免疫测定),且如果信号恢复小于 80%,则该检测结果被认为是“阴性”(阴性免疫测定)。

[0314] 实施例 9

[0315] 用于检测抗 IL-6R- 抗体的抗体的 ELISA

[0316] 该测定按照实施例 8 进行。例外是:该样品(掺加的或未掺加的)用所述药物 -DIG 预温育 1 小时。结果显示在下表 1 中。

[0317] 表 1:检测抗 IL-6R- 抗体的抗体的 ELISA 的结果

[0318]

	药物抗体 非特异性, 寡聚反应	药物抗体 非特异性 反应	药物抗体 非特异性, 寡聚反应	药物抗体 特异性, 单体反应	药物抗体 特异性, 单体反应	药物抗体 非特异性, 单体反应
未掺加的样品	+	+	+	+	+	+
掺加的样品 中恢复的信号	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
ii) 处于单体形式的抗 IL-6R 抗体	96.5 +	95.1 +	93.2 +	27.9 -	2.88 -	63.3 -
iii) 处于寡聚形式的抗 IL-6R 抗体	41.1 -	92.0 +	12.2 -	15.3 -	BLQ -	12.1 -
	药物抗体 非特异性, 寡聚反应	药物抗体 非特异性 反应	药物抗体 非特异性, 寡聚反应	药物抗体 特异性, 单体反应	药物抗体 特异性, 单体反应	药物抗体 非特异性, 单体反应
iv) 处于单体形式的人 IgG 抗体	91.9 +	103.9 +	88.9 +	90.8 +	107.0 +	73.0 -
v) 处于寡聚形式的人 IgG 抗体	41.9 -	98.3 +	14.9 -	93.7 +	100.0 +	22.5 -

[0319] BLQ= 低于量化范围

[0320] 实施例 10

[0321] 用于检测抗 IGF-1R 抗体的抗体的 ELISA

[0322] 该测定按照实施例 8 进行。结果显示在下表 2 中。

[0323] 表 2 :用于检测抗 IGF-1R 抗体的抗体的 ELISA 的结果

[0324]

	药物抗体非特异性反应	药物抗体特异性, 寡聚反应(IgM)	药物抗体特异性, 单体反应 (IgG)
未掺加的样品	+	+	+
掺加的样品中恢复的信号	[%]	[%]	[%]
ii) 处于单体形式的抗 IGF-1R 抗体	91.4 +	89.5 +	0.90 -
iii) 处于寡聚形式的抗 IGF-1R 抗体	82.7 +	62.4 -	0.32 -
iv) 处于单体形式的人 IgG 抗体	109.1 +	94.4 +	95.2 +
v) 处于寡聚形式的人 IgG 抗体	111.2 +	96.1 +	97.4 +

[0325] 实施例 11

[0326] 用于检测抗 IL-13R- 抗体的抗体的 ELISA

[0327] 该测定按照实施例 8 进行。例外是：这是利用电-化学发光作为检测方法的测定。这意味着代替洋地黄毒苷化药物抗体和过氧化物酶缀合的抗 DIG 抗体, 使用钆标记的药物抗体作为示踪剂 -DIG。结果显示在下表 3 中。

[0328] 表 3 :用于检测抗 IL-13R- 抗体的抗体的 ELISA 的结果

[0329]

	药物抗体非特异性的, 单体反应	药物抗体非特异性的, 单体反应	药物抗体特异性的, 单体反应
未掺入的样品	+	+	+
信号恢复	[%]	[%]	[%]
b-ii) 处于单体形式的抗 IL-13Ra1 抗体	3.96 -	10.87 -	0.08 -
b-iii) 处于寡聚形式的抗 IL-13Ra1 抗体	BLQ -	BLQ -	0.20 -
b-iv) 处于单体形式的人 IgG 抗体	BLQ -	0.61 -	90.84 +
b-v) 处于寡聚形式的人 IgG 抗体	BLQ -	BLQ -	85.35 +

[0330] BLQ= 低于量化范围。

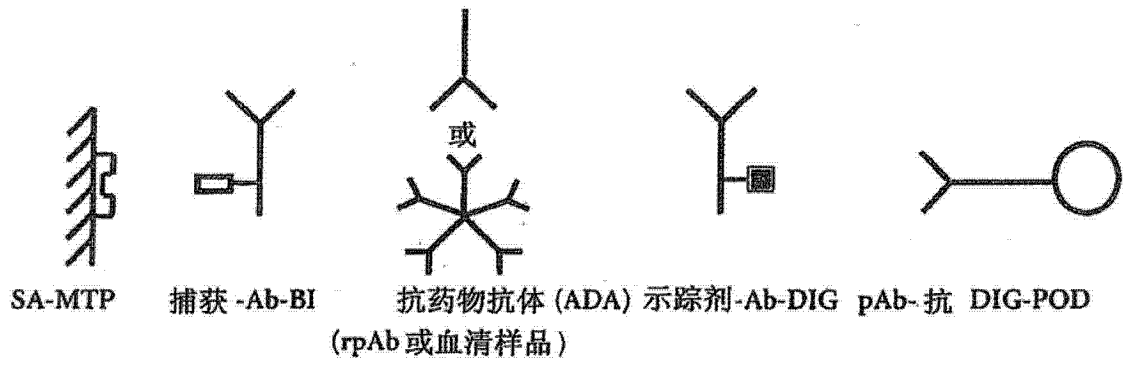


图 1

专利名称(译)	区分测定		
公开(公告)号	CN103399145A	公开(公告)日	2013-11-20
申请号	CN201310328694.7	申请日	2008-12-12
申请(专利权)人(译)	霍夫曼-拉罗奇有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	霍夫曼-拉罗奇有限公司		
[标]发明人	凯贡纳尔·施图本劳赫 马库斯·扎达克		
发明人	凯-贡纳尔·施图本劳赫 马库斯·扎达克		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N33/94		
代理人(译)	吴小明 王旭		
优先权	2007024353 2007-12-15 EP 2008002450 2008-02-11 EP		
其他公开文献	CN103399145B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明包括使用包括捕获药物抗体和示踪药物抗体的免疫测定来确定样品中针对药物抗体的抗体的方法，其中所述方法包括：提供i) 捕获药物抗体，其为与固相缀合的药物抗体，ii) 示踪药物抗体，其为与可检测的标记物缀合的药物抗体，使所述捕获药物抗体分别与i) 所述样品，ii) 向其中加入了处于单体形式的所述药物抗体的所述样品，iii) 向其中加入了处于寡聚形式的所述药物抗体的所述样品相接触，和通过在i) 中的阳性免疫测定和在ii) 和iii) 中的阴性免疫测定来确定所述样品中的针对所述药物抗体的抗体。

