



(10) 授权公告号 CN 112384808 B

(45) 授权公告日 2024.10.11

(21) 申请号 201980046236.X

(22) 申请日 2019.07.09

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112384808 A

(43) 申请公布日 2021.02.19

(30) 优先权数据
62/696,016 2018.07.10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.01.08

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/040950 2019.07.09

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/014194 EN 2020.01.16

(73) 专利权人 里珍纳龙药品有限公司
地址 美国纽约州

(72) 发明人 G·奥里弗拉·萨姆纳 陈继华

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256
专利代理师 陈文平 袁元

(51) Int.Cl.
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(56) 对比文件
JP 1989054356 A, 1989.03.01
Dai S等. Development of a method that eliminates false-positive results due to nerve growth factor interference in the assessment of fulranumab immunogenicity. AAPS J. 2014, 第16卷(第03期), 第464-477页.

审查员 张华

权利要求书3页 说明书18页 附图11页

(54) 发明名称

用于减轻抗药物抗体(ADA)免疫测定中的药物靶标干扰的方法

(57) 摘要

本公开提供了用于减轻抗药物抗体(ADA)免疫测定中的药物靶标干扰的方法,其中所述ADA免疫测定包括在温和的碱性pH测定条件下的一种或多种靶标阻断试剂。

1. 一种用于减轻用于确定血清样品中针对药物的抗药物抗体 (ADA) 的存在的ADA桥接免疫测定中的药物靶标干扰的方法,所述方法包括:

使所述血清样品与以下接触:

用第一标记标记的捕获药物;

用第二标记标记的检测药物;

第一药物靶标阻断试剂;以及

第二药物靶标阻断试剂;

在温和的碱性pH测定条件下,将所述血清样品与所述捕获药物、所述检测药物、所述第一药物靶标阻断试剂和所述第二药物靶标阻断试剂一起温育,

以及使所述第一药物靶标阻断试剂和所述第二药物靶标阻断试剂与所述样品中存在的所述药物靶标结合,

由此减轻所述ADA桥接免疫测定中的所述药物靶标的所述干扰,

其中温和的碱性pH是介于pH 7.5到pH 9.5之间,

并且其中所述第一药物靶标阻断试剂和所述第二药物靶标阻断试剂选自药物靶标阻断抗体和包括与IgG Fc结构域融合的受体的细胞外部分的药物靶标阻断试剂,

其中所述方法不是用于疾病的诊断的方法。

2. 根据权利要求1所述的方法,其进一步包括执行所述抗药物抗体 (ADA) 桥接免疫测定。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一药物靶标阻断试剂是药物靶标阻断抗体。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述药物靶标是可溶性蛋白质。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述第一药物靶标阻断试剂包括与IgG Fc结构域融合的受体的一部分。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述受体的所述部分是所述受体的细胞外部分。

7. 根据权利要求5所述的方法,其中所述IgG Fc结构域是小鼠IgG Fc结构域。

8. 根据权利要求5所述的方法,其中所述IgG Fc结构域是人IgG Fc结构域。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第二药物靶标阻断试剂是药物靶标阻断抗体。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述第二药物靶标阻断抗体包括小鼠恒定区。

11. 根据权利要求1所述的方法,其中所述药物是人治疗性单克隆抗体。

12. 根据权利要求1所述的方法,其中所述药物是人源化治疗性单克隆抗体。

13. 根据权利要求11或12所述的方法,其中所述人或人源化治疗性单克隆抗体正在临床试验中进行评估。

14. 根据权利要求1所述的方法,其中所述药物靶标是可溶性或脱落的多聚体药物靶标。

15. 根据权利要求1所述的方法,其中所述药物靶标是同源二聚体药物靶标。

16. 根据权利要求1所述的方法,其中所述温和的碱性pH测定条件包括pH介于8.3到8.9之间的条件。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述温和的碱性pH测定条件包括pH为8.3的条件。

18. 根据权利要求16所述的方法,其中所述温和的碱性pH测定条件包括pH为8.9的条

件。

19. 根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述血清样品是人血清样品。

20. 根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述血清样品来自正在用所述药物治疗的受试者。

21. 根据权利要求1所述的方法,其中所述温育在室温下进行。

22. 根据权利要求1所述的方法,其中所述抗药物抗体(ADA)桥接免疫测定是高通量测定。

23. 根据权利要求1所述的方法,其中所述捕获药物附着于固体表面。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述固体表面是微量滴定板。

25. 根据权利要求23所述的方法,其中所述固体表面涂覆有链霉亲和素。

26. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一标记选自由以下组成的组:生物素标记、蛋白A标记、蛋白G标记和谷胱甘肽S-转移酶(GST)标记。

27. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第二标记选自由以下组成的组:放射标记、光致发光标记、化学发光标记、荧光标记、电化学发光标记和酶标记。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中所述放射标记是钷标记。

29. 根据权利要求4所述的方法,其中所述可溶性蛋白质是配体-受体。

30. 一种用于减轻用于确定血清样品中针对药物的抗药物抗体(ADA)的存在的ADA桥接免疫测定中的药物靶标干扰的方法,所述方法包括:

使所述血清样品与以下接触:

用第一标记标记的捕获药物;

用第二标记标记的检测药物;

第一药物靶标阻断抗体;以及

第二药物靶标阻断抗体,

在温和的碱性pH测定条件下温育所述捕获药物、所述检测药物、所述第一药物靶标阻断抗体和所述第二药物靶标阻断抗体,

以及使所述第一药物靶标阻断抗体和所述第二药物靶标阻断抗体与所述样品中存在的所述药物靶标结合,

由此减轻所述ADA桥接免疫测定中的所述药物靶标的所述干扰,

其中温和的碱性pH是介于pH 7.5到pH 9.5之间,

其中所述方法不是用于疾病的诊断的方法。

31. 一种用于减轻用于确定血清样品中针对药物的抗药物抗体(ADA)的存在的ADA桥接免疫测定中的药物靶标干扰的方法,其中所述药物靶标是可溶性蛋白质,所述方法包括:

使所述血清样品与以下接触:

用第一标记标记的捕获药物;

用第二标记标记的检测药物;

药物靶标阻断试剂,所述药物靶标阻断试剂包括与IgG Fc结构域融合的受体的细胞外部分;以及

药物靶标阻断抗体,

在温和的碱性pH测定条件下温育所述捕获药物、所述检测药物、所述药物靶标阻断试

剂和所述药物靶标阻断抗体，

以及使所述药物靶标阻断试剂和所述药物靶标阻断抗体与所述样品中存在的所述药物靶标结合，

由此减轻所述ADA桥接免疫测定中的所述药物靶标的所述干扰，

其中温和的碱性pH是介于pH 7.5到pH 9.5之间，

其中所述方法不是用于疾病的诊断的方法。

用于减轻抗药物抗体 (ADA) 免疫测定中的药物靶标干扰的方法

[0001] 对相关申请的引用

[0002] 本申请要求于2018年7月10日提交的序列号为62/696,016的美国临时申请的优先权。前述申请的全部内容通过引用并入本文。

背景技术

[0003] 在临床实践中,生物治疗剂(例如蛋白质、肽、核苷酸等生物制剂)已被证明非常成功。然而,生物治疗剂,甚至全人治疗性单克隆抗体,都有产生抗药物抗体(ADA)的可能性,这些抗体可引起不希望的效应,如药物暴露的丧失、功效的丧失和严重的不良事件等(Koren,E.等人,《当前药物生物技术(Curr Pharm Biotechnol)》,2002,3(4):第349-60页;Schellekens,H.,《临床治疗学(Clin Ther)》,2002,24(11):第1720-40页)。因此,免疫原性评估是生物治疗药物安全性测试的重要组成部分,针对药物开发各个阶段的免疫原性测试提出了一些建议,包含来自监管机构的建议(Shankar,G.等人,《药物和生物医学分析杂志(J Pharm Biomed Anal)》,2008,48(5):第1267-81页;Shankar,G.等人,《自然生物技术(Nat Biotechnol)》,2007,25(5):第555-61页;Mire-Sluis,A.R.等人,《免疫学方法杂志(J Immunol Methods)》,2004,289(1-2):第1-16页;Swanson,S.J.和J.Bussiere,《微生物学最新观点(Curr Opin Microbiol)》,2012,15(3):第337-47页;欧洲药品管理局(European Medicines Agency),C.f.M.P.f.H.U,《生物技术驱动的治疗性蛋白质免疫原性评估指南(Guideline on Immunogenicity Assessment of Biotechnology-Driven Therapeutic Proteins)》,欧洲药品管理局,伦敦,英国,2007;以及美国卫生和公众服务部(U.F.C.),CBER,《行业指南—治疗性蛋白质免疫原性测试的测定开发(草案)(Guidance for Industry--Assay Development for Immunogenicity Testing of Therapeutic Proteins(Draft))》,美国卫生与公众服务部,华盛顿州哥伦比亚特区,美国,2009)。

发明内容

[0004] 本发明涉及用于减轻用于测定血清样品中针对药物的抗体(ADA)的存在的ADA桥接免疫测定中的药物靶标干扰的方法。本方法包括:使所述血清样品与以下接触:用第一标记标记的捕获药物;用第二标记标记的检测药物;以及药物靶标阻断试剂。所述接触步骤之后是温育所述捕获药物、所述检测药物和所述药物靶标阻断试剂,使所述药物靶标阻断试剂与所述样品中存在的药物靶标相互作用,由此减轻所述ADA桥接免疫测定中的所述药物靶标的所述干扰。随后执行抗药物抗体(ADA)桥接免疫测定。

[0005] 在本发明的一个方面,所述血清样品是人血清样品,在特定方面,所述样品来自正在用所述药物治疗的受试者。

[0006] 在另一个方面,所述药物靶标阻断试剂是结合分子(例如抗体)。在一个实施例中,在所述结合分子是抗体的情况下,其可以包括人恒定区。可替代地,在另一个实施例中,所述药物靶标阻断抗体包括小鼠恒定区。

[0007] 在一个方面,温育步骤在室温下进行。在另一个方面,温育在温和的碱性pH条件下进行。

[0008] 在一个方面,本发明的药物是用于治疗人类的治疗性蛋白质,例如治疗性结合分子(如单克隆抗体(例如,全人类单克隆抗体))或治疗性融合蛋白质(如融合到免疫球蛋白Fc结构域(例如,设计用于治疗人类的IgG1 Fc结构域)的受体蛋白质)。在一个特定方面,所述药物是治疗性人单克隆抗体。

[0009] 在本发明的一个方面,所述药物靶标是可溶性蛋白质,例如配体-受体。在一个特定的方面,所述药物靶标阻断试剂包括与IgG Fc结构域融合的受体的一部分。在另一个方面,所述受体的所述部分是所述受体的细胞外部分。所述IgG Fc结构域可以是小鼠IgG Fc结构域或人IgG Fc结构域。

[0010] 在另一个方面,本发明的药物靶标是可溶性或脱落的二聚体或多聚体药物靶标。在一个特定的方面,所述药物靶标是同源二聚体药物靶标。

[0011] 在一个方面,本发明的捕获药物附着于固体表面。在一个特定方面,所述固体表面是微量滴定板。在另一个方面,所述固体表面涂覆有链霉亲和素。

[0012] 在一个方面,第一标记选自由以下组成的组:生物素标记、蛋白A标记、蛋白G标记和谷胱甘肽S-转移酶(GST)标记。在另一个方面,所述第二标记选自由以下组成的组:钉标记、放射标记、光致发光标记、化学发光标记、荧光标记、电化学发光标记和酶标记。

[0013] 本发明的方法可进一步包括使所述血清样品与第二药物靶标阻断试剂接触。这种第二药物靶标阻断试剂是药物靶标阻断结合分子,例如抗体。在一个方面,所述第二药物靶标阻断抗体包括人恒定区。可替代地,所述第二药物靶标阻断抗体包括小鼠恒定区。

[0014] 本发明提供了一种用于减轻用于确定血清样品中针对药物的抗药物抗体(ADA)的存在的ADA桥接免疫测定中的药物靶标干扰的方法,所述方法包括:使所述血清样品与以下接触:用第一标记标记的捕获药物;用第二标记标记的检测药物;第一药物靶标阻断结合分子;以及第二药物靶标阻断结合分子,在温和的碱性pH测定条件下温育所述捕获药物、所述检测药物、所述第一药物靶标阻断结合分子和所述第二药物靶标阻断结合分子,并允许所述第一药物靶标阻断结合分子和所述第二药物靶标阻断结合分子与所述样品中存在的药物靶标相互作用,由此减轻所述ADA桥接免疫测定中的所述药物靶标的所述干扰。在一个特定方面,所述第一和第二药物靶标阻断结合分子是抗体。

[0015] 本发明进一步提供了一种用于减轻用于确定血清样品中针对药物的抗药物抗体(ADA)的存在的ADA桥接免疫测定中的药物靶标干扰的方法,其中所述药物靶标是可溶性蛋白质(例如配体-受体),所述方法包括:使所述血清样品与以下接触:用第一标记标记的捕获药物;用第二标记标记的检测药物;一种或多种药物靶标阻断结合分子(例如,抗体),包括在温和的碱性pH测定条件下温育,其中所述捕获药物、所述检测药物和所述一种或多种药物靶标阻断结合分子与样品中存在的药物靶标相互作用,由此减轻所述ADA桥接免疫测定中的所述药物靶标的所述干扰。

[0016] 本发明由以下附图和详细描述来说明,这些附图和详细描述不限制权利要求中描述的本发明的范围。

附图说明

[0017] 图1A-C描绘了桥接免疫原性测定中可溶性二聚体/多聚体靶标的干扰。(A) 人血清样品中的阳性对照或ADA桥接生物素化药物和钷化药物,并产生真正的阳性腺苷脱氨酶信号。(B) 然而,二聚体/多聚体靶标也可以与生物素化药物和钷化药物结合,并产生靶标介导的假阳性信号。(C) 抗靶标抗体或其它靶标阻断试剂可以防止二聚体靶与生物素化药物和钷化药物结合,从而消除靶标介导的假阳性信号。(C) 中标记的试剂代表捕获药物(1)、检测药物(2)和一种或多种药物靶标阻断分子(3)。

[0018] 图2A-C描绘了靶标阻断抗体HuAb1和测定pH对测定信号的影响。(A) 在没有靶标阻断抗体的情况下,酸解离可能通过从内源性结合蛋白中释放靶标来增加原始人类血清样品中的背景测定信号。(B) 在中性pH(约3ng/mL至150ng/mL)下,加入100 μ g/mL的HuAb1后,靶标耐受水平有所提高,而在HuAb1和温和碱性pH的组合下,靶标耐受水平进一步提高(约1.1 μ g/mL)。(C) 在碱性测定条件(pH为8.3)下加入100 μ g/mL的HuAb1后,未经处理的人血清样品中靶标介导的信号大大降低。

[0019] 图3A-3D描绘了从使用靶标阻断抗体HuAb1和测定pH 8.3对来自不同受试者的临床研究样品进行的分析中获得的ADA信号与靶标水平相关,但是与这些受试者的药代动力学曲线不一致。(A) 每个临床样品的靶标浓度。(B) 使用100 μ g/mL的靶标阻断抗体HuAb1和pH 8.3的ADA信号。(C) 3名受试者的药物X浓度曲线。(D) 在将HuAb1(100 μ g/mL)和温和的碱性pH组合的情况下加入第二种抗靶标抗体(100 μ g/mL的HuAb2)有效降低了临床样品中靶标介导的背景信号。

[0020] 图4A-4C描绘了不仅抑制靶标干扰、还避免可能的假阴性信号的进一步测定优化后的信噪比(样品的测定信号相对于测定背景信号)。(A) 在减轻临床研究样品中的靶标干扰方面,HuSR和HuAb2组合与HuAb1和HuAb2组合一样有效。具有小鼠Fc的(B)和(C)靶标阻断试剂(MsSR和MsAb2)仍然能够有效地减轻临床研究样品中的靶标干扰。

[0021] 图5描绘了使用100 μ g/mL MsSR、100 μ g/mL MsAb2和测定pH 8.3消除临床研究样品中的靶标干扰。在4个不同时间点(第1、29、57和113天),在7名受试者的临床研究样品中仅检测到背景测定信号。

[0022] 图6A-6B描绘了温和的碱性测定pH和靶标阻断试剂对经免疫兔血清和大鼠毒理学样品中多克隆ADA检测的最小影响。(A) 温和的碱性pH 8.3对经药物Fab免疫兔血清中ADA的检测没有负面影响。(B) 改进的测定格式减轻了靶标介导的信号,并在大鼠毒理学样品中检测到真正的ADA信号。

[0023] 图7A-7B描绘了在不存在和存在靶标阻断试剂的情况下以及使用不同的测定pH时靶标与药物的结合。(A) 不同测定条件下的结合缔合和解离曲线。由于靶标与药物的结合,波长偏移(Δ nm)与生物传感器尖端的厚度变化成正比。在pH为7.3和pH为8.2、在pH为7.3时存在MsAb2和MsSR的情况下以及在pH为8.2存在MsAb2和MsSR的情况下,显示了靶标与药物的缔合和解离。还示出了pH 7.3和pH 8.2时的缓冲液对照。靶标与药物的结合仅被pH 8.3部分抑制。虽然MsAb2和MsSR与中性测定pH的组合可以大大降低靶标与药物的结合,但MsAb2、MsSR和温和碱性pH的组合可以完全抑制结合。(B) 临床样品中靶标介导的信号仅被温和碱性pH部分抑制或被中性pH值下MsAb2和MsSR的存在抑制。然而,MsAb2、MsSR和pH 8.3的组合可以完全抑制靶标干扰。

具体实施方式

[0024] 药物产品、特别是治疗性蛋白质的免疫原性,是临床和临床前研究中的一个主要问题,因为它可能导致可能的严重副作用、疗效损失和药物暴露的变化,从而使毒性、药代动力学(PK)和药效学(PD)数据的解释复杂化。用于检测和定量抗抗体药物(Anti-antibody drug, ADA)的ADA免疫测定在确定生物治疗药物的免疫原性方面很重要。然而,药物靶标会干扰ADA免疫测定,并且导致靶标介导的假阳性结果(见图1B)。基于靶标上调和酸解离步骤(通常用于ADA测定以提高分析药物耐受性)中靶标:药物和/或靶标:结合蛋白复合物的释放,靶标水平可以很高。

[0025] ADA通常采用多层方法(multi-tiered approach)进行检测,以检测、确认和滴定ADA。筛选测定通常采用浮动切点来识别可能对ADA呈阳性的样品,而确认测定使用确认切点来确定筛选测定中观察到的阳性响应是否可被过量药物抑制(确认样品对ADA呈阳性)。滴定度测定中使用滴定度切点来评估阳性样品中ADA的水平。ADA测定通常使用桥接形式,使用药物作为捕获试剂和检测试剂。这些测定相对容易设置和进行,检测大多数同种型响应(除大多数IgG4之外),并提供极好的灵敏度。这些测定不是物质特异性的,是高通量的。然而,可溶性或脱落的二聚体药物靶标或多聚体药物靶标会干扰测定并导致靶标介导的假阳性结果。例如,通过在ADA桥接测定中产生靶标介导的假阳性信号,来自经美泊利单抗(Mepolizumab)治疗的患者的给药后样品中升高的IL-5同型二聚体有助于观察到的ADA测定阳性的增加(Liao, K.等人,《免疫学方法杂志(J Immunol Methods)》,2017, 441:第15-23页)。NGF(一种同型二聚体)的存在也通过桥接生物素和钆标记的富拉单抗(Fulranumab)在来自服用富拉单抗的患者的样品中产生假阳性测定信号(Dai, S.等人,《美国药学科学家协会期刊(AAPS J)》,2014, 16(3):第464-77页)。据报道,细胞膜片段上存在的CD20也可在奥法木单抗(Ofatumumab)的ADA测定中引起基质干扰(Chen, K.等人,《免疫学方法杂志》,2013, 394(1-2):第22-31页)。此外,最近有报道称酸解离会使血清样品中的单体靶标二聚化,从而导致假阳性信号(Zoghbi, J.等人,《免疫学方法杂志》,2015, 426:第62-9页)。

[0026] 据报道,某些方法试图限制靶标干扰。例如,使用靶标阻断抗体进行预处理或用靶标结合蛋白进行阻断以及靶标免疫耗竭已被用于减轻可溶性靶标干扰(Liao, K.等人,《免疫学方法杂志》,2017, 441:第15-23页;Dai, S.等人,《美国药学科学家协会期刊》,2014, 16(3):第464-77页;Zhong, Z. D.等人,《免疫学方法杂志》,2010, 355(1-2):第21-8页;Weeraratne, D. K.等人,《免疫学方法杂志》,2013, 396(1-2):第44-55页;以及Maria M. L. J.、Wakshull E.、Quarmby V., AAPS全国生物技术大会,西雅图市,华盛顿州,美国,2009)。其它策略也有报道,包含在不影响ADA的检测的情况下使用小麦胚芽凝集素(WGA)来阻断来自高度糖基化靶蛋白的干扰(Carrasco-Triguero, M.等人,《生物分析(Bioanalysis)》,2012, 4(16):第2013-26页)。另一种使用人可溶性Fc γ 受体I(hsFc γ RI)检测腺苷脱氨酶Fc区的替代测定方法也被报道可减轻可溶性靶标干扰,但这种方法可能无法检测所有可能的ADA同种型(Wessels, U.等人,《生物分析》,2016, 8(20):第2135-45页)。最近发表了一份白皮书,描述了在ADA和中和抗体(NAb)测定中减轻药物靶标干扰的多种策略(Zhong, Z. D.等人,《美国药学科学家协会期刊》,2017, 19(6):第1564-1575页)。因此,在非临床研究和临床研究中,开发能够克服靶标干扰并提供有效免疫原性评估的可靠测试方法非常重要。

[0027] 本发明提供了用于减少ADA免疫测定(例如,桥接免疫原性测定)中的假阳性结果

的用于减轻ADA免疫测定中的靶标干扰的方法。具体而言,本公开至少部分基于以下发现,即一种或多种靶标阻断试剂(例如抗体或靶受体IgG Fc融合蛋白)与温和的碱性pH测定条件的组合,导致对重组靶蛋白的高耐受性和研究样品中假阳性结果水平的降低,所述研究样品的PK曲线不指示显著的ADA响应。因此,本文描述的方法提供了在标准酸解离程序和仅靶标阻断抗体无效的情况下用于减轻靶标干扰的方法。

[0028] I. 定义

[0029] 为了更容易理解本发明,首先定义某些术语。此外,应该注意的是,每当引用参数的值或值的范围时,意图是所引用的值中间的值和范围也是本发明的一部分。

[0030] 在以下描述中,出于解释的目的,阐述了具体的数字、材料和配置,以便提供对本发明的透彻理解。然而,对于本领域普通技术人员来说,很明显,本发明可以在没有这些具体细节的情况下实践。在某些情况下,众所周知的特征可以省去或简化,以免模糊本发明。

[0031] 冠词“一个/一种(a/an)”在本文中指代冠词的一个/种或多于一个/种(即,至少一个/种)语法宾语。举例来说,“要素”意指一个/种要素或多于一个/种要素。

[0032] 术语“抗体”包含由四条多肽链、两条重(H)链和两条轻(L)链组成的免疫球蛋白分子,它们通过二硫键相互连接。每个重链包含重链可变区(在此缩写为HCVR或VH)和重链恒定区(CH)。重链恒定区包含三个结构域CH1、CH2和CH3。每个轻链包含轻链可变区(在此缩写为LCVR或VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域CL。VH区和VL区可以进一步细分为被称作互补决定区(CDR)的超变区,所述超变区散布有更保守的被称作框架区(FR)的区。每个VH和VL由按照以下顺序从氨基末端到羧基末端布置的三个CDR和四个FR构成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0033] 如本文所用,术语“抗原”是指使免疫系统产生抗体或针对其的特异性细胞介导的免疫响应的任何物质。疾病相关抗原是与导致免疫系统产生抗体或针对其的特异性细胞介导的响应的任何疾病相关的任何物质。

[0034] 本文所用的“结合结构域”(也称为“结合区”或“结合部分”)是指具有与靶标特异性和非共价缔合、联合或组合的能力的分子或其部分(例如肽、寡肽、多肽、蛋白质)。结合结构域包含生物分子、分子复合物(即包括两个或多个生物分子的复合物)或其它关注的靶标的任何天然存在的、合成的、半合成的或重组产生的结合配偶体。示例性结合结构域包含单链免疫球蛋白可变区(例如,scTCR、scFv)、受体外域、配体(例如,细胞因子、趋化因子)或合成多肽,这些结构域是根据其与生物分子、分子复合物或其它关注的靶标特异性结合的能力而选择的。

[0035] 本文所理解的“结合分子”是与特定靶标特异性相互作用的分子。此类结合分子的实例包含但不限于抗体(包含单克隆抗体)及其片段、经工程化的抗体、融合蛋白和本领域技术人员熟知的其它类似抗原结合分子。此外,本文使用的术语结合分子包括能与靶标相互作用的受体或受体样分子。

[0036] “抗药物抗体”或“ADA”为抗体,其可以针对药物的任何区域,例如药物的可变结构域、恒定结构域或糖结构。此类抗药物抗体可在抗体治疗期间作为患者的免疫原性反应出现(参见Pan, Y. 等人,《美国实验生物学联合会会志(FASEB J.)》,9(1995)43-49)。大多数“抗药物抗体”与药物的一个或多个互补决定区结合。与药物对其靶抗原的亲合力相比,抗药物抗体对其药物抗原的亲合力通常较低。

[0037] 本文使用的术语“桥接免疫测定”或“ADA桥接免疫测定”是指夹层型免疫测定法，其中二价ADA被两种不同的结合分子（即捕获药物和检测药物）结合，每种结合分子都与ADA的不同的不重叠或不干扰的表位结合。在这一测定中，形成了包括捕获抗体、ADA和检测抗体的夹层，因此ADA桥接与其结合的两种抗体（见图1A）。捕获抗体可以附着到固体表面，如微量滴定板或其它固体表面。桥接免疫测定可以是高通量测定。在一方面，本文所述的ADA桥接免疫测定包括两种抗体药物，即“捕获药物”和“检测药物”。在一个实施例中，检测药物和捕获药物包括“相同的”抗体分子，例如，用相同的表达载体重组产生并包括相同的氨基酸序列。

[0038] pH是一个用于指定水溶液的酸度或碱度的对数标度。它大约是氢离子摩尔浓度以10为底的对数的负值，以每升摩尔数为单位。更准确地说，它是氢离子活性以10为底的对数的负值。pH值小于7的溶液是酸性的，而pH值大于7的溶液是碱性的。如本文关于测定条件所使用的术语“温和的碱性pH”是指介于约pH 7.5到约pH 9.5之间的pH。在一个方面，温和的碱性pH包含介于约pH 8.0到约pH 9.0之间的pH。在另一个方面，温和的碱性pH包含介于约pH 8.5至约pH 9.5之间的pH。在另一个方面，温和的碱性pH包含介于约pH 7.5至约pH 8.5之间的pH。在另一个方面，温和的碱性pH包含介于约pH 7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3或8.4之间的pH。

[0039] 如本文所用，术语“药物”是指可向个体施用用于治疗疾病的治疗性蛋白质或其治疗有效部分。在一个方面，所述药物是人治疗性蛋白，如人治疗性单克隆抗体或人治疗性融合蛋白（如与免疫球蛋白Fc结构域（例如，IgG1 Fc结构域）融合的受体蛋白）。在另一个方面，所述药物是人源化治疗性单克隆抗体。在另一个方面，所述药物是嵌合抗体。在又一个方面，所述药物是小鼠抗体。在一方面，所述治疗性药物正在临床试验中进行评估。

[0040] 治疗性药物（如抗体药物）被广泛用于治疗各种疾病，如肿瘤疾病、免疫性疾病、中枢神经系统疾病、血管疾病和感染性疾病。包含在本发明方法中的抗体药物包含由监管机构批准的或在临床或临床前试验中的任何治疗性抗体。截至2018年，美国和欧盟批准的抗体药物包含但不限于：贝洛托单抗（bezlotoxumab）、阿维鲁单抗（avelumab）、度匹鲁单抗（dupilumab）、度伐鲁单抗（durvalumab）、奥美珠单抗（ocrelizumab）、布罗达单抗（brodalumab）、瑞替珠单抗（reslizumab）、奥拉单抗（olaratumab）、达雷妥尤单抗（daratumumab）、埃罗妥珠单抗（elotuzumab）、耐昔妥珠单抗（necitumumab）、英利昔单抗（infliximab）、奥托昔单抗（obiltoxaximab）、阿特珠单抗（atezolizumab）、苏金单抗（secukinumab）、美泊利单抗、纳武单抗（nivolumab）、阿利库单抗（alirocumab）、依达赛珠单抗（idarucizumab）、依伏库单抗（evolocumab）、地努图希单抗（dinutuximab）、贝伐珠单抗（bevacizumab）、派姆单抗（pembrolizumab）、雷莫芦单抗（ramucirumab）、维多珠单抗（vedolizumab）、司妥昔单抗（siltuximab）、阿仑单抗（alemtuzumab）、帕妥珠单抗（pertuzumab）、英利昔单抗（infliximab）、奥滨尤妥珠单抗（obinutuzumab）、本妥昔单抗（brentuximab）、瑞西巴库单抗（raxibacumab）、贝利木单抗（belimumab）、伊匹单抗（ipilimumab）、地诺单抗（denosumab）、奥法木单抗、贝索单抗（besilesomab）、托珠单抗（tocilizumab）、康纳单抗（canakinumab）、戈利木单抗（golimumab）、优特克单抗（ustekinumab）、赛妥珠单抗（certolizumab pegol）、卡妥索单抗（catumaxomab）、依库鲁单抗（eculizumab）、兰尼单抗（ranibizumab）、帕尼单抗（panitumumab）、那他珠单抗

(natalizumab)、卡妥索单抗(catumaxomab)、bevacizumab(贝伐珠单抗)、奥马珠单抗(omalizumab)、西妥昔单抗(cetuximab)、依法珠单抗(efalizumab)、替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan)、法索单抗(fanolesomab)、阿达木单抗(adalimumab)、托西莫单抗(tositumomab)、阿仑单抗(alemtuzumab)、曲妥珠单抗(trastuzumab)、吉妥珠单抗(gemtuzumab ozogamicin)、英利昔单抗(infliximab)、帕利珠单抗(palivizumab)、耐昔妥珠单抗(necitumumab)、巴利昔单抗(basiliximab)、利妥昔单抗(rituximab)。

[0041] 本发明方法中使用的药物还包含正在开发或正在进行临床前或临床试验的治疗性药物(即,正在临床试验中进行评估的治疗药物)。

[0042] 抗体药物可以包含靶向任何抗原的抗体,包含例如IL-4R、IL-6R、IL-33、PD-1、CD20 X CD3、LAG-3、IL-33、Fcl d 1、C5、ANGPTL-3、ACTIVIN A、GDF8、PCSK9、VEGF、NGF或病毒抗原(如埃博拉病毒(ebolavirus)或中东呼吸综合征冠状病毒(mers-cov))。

[0043] 可用于本发明方法的其它治疗性药物包含例如依维那库单抗(evinacumab)、曲弗单抗(trevogrumab)、西米普利单抗(cemiplimab)、阿利库单抗、阿柏西普(aflibercept)、法西奴单抗(fasinumab)、利纳西普(rilonacept)和萨瑞鲁单抗(sarilumab)。

[0044] 治疗性药物还包含已批准药物的生物仿制药,例如抗体或治疗融合蛋白。例如,开发中的阿柏西普生物仿制药,包含ALT-L9(Alteogen)、M710(Momenta/Mylan)、FYB203(Formycon(DE)/Santo Holding GmbH)和CHS-2020(Coherus)。

[0045] 如本文所用,“药物靶标”是指药物的靶标。例如,在一个实施例中,所述药物靶标是二聚靶标。在一个实施例中,所述药物靶标是同源二聚体药物靶标。在另一个实施例中,所述药物靶标是多聚体药物靶标。在另一个实施例中,所述药物靶标是可溶性或脱落的药物靶标。药物靶标会干扰ADA免疫测定,并导致假阳性测定结果。

[0046] 如本文所用,“药物靶标阻断试剂”是指能够在免疫测定中与药物靶标结合和/或阻断药物靶标、由此防止药物靶标与捕获药物或检测药物结合的任何试剂。在一个实施例中,药物靶标阻断试剂是抗靶标阻断抗体。抗靶标阻断抗体可以包括人恒定区或小鼠恒定区。在另一个实施例中,药物靶标阻断试剂是靶受体IgG Fc融合蛋白,其中所述融合蛋白包括与IgG Fc结构域连接或融合的靶受体的一部分。在一个方面,所述靶受体的所述部分是受体的细胞外部分。在一个特定的方面,所述IgG Fc结构域是人IgG Fc结构域。在一个特定的方面,所述IgG Fc结构域是小鼠IgG Fc结构域。如本文详细描述,ADA免疫测定(例如,ADA桥接免疫测定)可以包括一种或多种减轻免疫测定中药物靶标干扰的药物靶标阻断试剂。例如,在一个实施例中,免疫测定可以包括一种药物靶标阻断试剂。在另一个实施例中,免疫测定可以包括两种药物靶标阻断试剂。在一个实施例中,两种药物靶标阻断试剂都可以包括药物靶标阻断抗体。在另一个实施例中,所述测定可以包括一种或多种药物靶标阻断抗体和一种或多种靶标受体IgG Fc融合蛋白。

[0047] 如本文所用,由术语“标记的”修饰的实体或试剂(例如,结合分子、捕获药物、检测药物、抗药物抗体(ADA)、药物、蛋白质、酶、抗体、抗体片段或相关物质)包含与另一种可凭经验检测的分子或化学实体(例如,“可检测的标记”)缀合的任何实体。适合作为被标记的实体的标记的化学物质包含但不限于钆、放射标记、光致发光标记、化学发光标记、荧光标记、电化学发光标记、酶标记、量子点或光学染料标记。其它标记包含例如生物素、蛋白A、蛋白G、谷胱甘肽S-转移酶(GST)。这些标记可用于标记捕获药物抗体,然后将所述药物抗体附

着在固体表面。

[0048] 如本文所用,术语“荧光标记”和“荧光团”可以互换使用,是指当物质被不同波长(激发波长)的辐射照射时,发射电磁能量(如特定波长(发射波长)的光)的任何物质,并且旨在涵盖能够与样品中关注的分析物特异性相互作用或反应以提供一个或多个光学信号的化学或生物化学分子或其片段。

[0049] 如本文所用,“靶标耐受水平”被定义为在测定中产生靶标介导的假阳性信号(测定信号高于板切割点)所需的靶标量。

[0050] 术语“样品”包含但不限于来自存活的生物或曾经存活的生物的任何数量的物质。这种生物包含但不限于人类、小鼠、猴子、大鼠、兔和其它动物。在一个实施例中,此类样品包含但不限于来自受试者的全血、血清或血浆。在一个实施例中,样品(例如,血清样品)是在药物的临床或临床前测试期间从受试者获得的样品。例如,所述样品可以在临床试验期间药物施用后从受试者获得。

[0051] 本文使用的术语“受试者”指人类或非人类生物体。因此,本文描述的方法和融合复合物适用于人类和兽医疾病和病状。受试者可以是“患者”,即正在接受疾病或病状医疗护理的活人或非人类生物,或者正在接受病理体征或特定病状存在/不存在调查的没有明确疾病的人或非人类生物。受试者还包含药物的临床试验的参与者,其中受试者已经出于试验目的而被施用了所述药物。

[0052] 术语“Fc结构域”或“免疫球蛋白Fc”或“Ig Fc”是指免疫球蛋白重链“片段可结晶”区域。通常,Fc结构域能够与第二个Fc结构域相互作用形成二聚体复合物。Fc结构域可能能够结合被称为Fc受体的细胞表面受体和/或补体系统的蛋白质,或者可以被修饰以减少或增加这些结合活性。Fc结构域可以衍生自IgG、IgA、IgD、IgM或IgE抗体同种型(本文分别称为IgG Fc结构域、IgA Fc结构域、IgD Fc结构域、IgM Fc结构域和IgE Fc结构域)。Fc结构域可能影响免疫活性,包含调理作用、细胞裂解、肥大细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞的脱颗粒以及其它Fc受体依赖性过程;补体途径的活化;和蛋白质在体内的稳定性。

[0053] 术语“多肽”是指包括20种天然氨基酸中的任何一种的任何聚合物(无论其大小如何)。虽然术语“蛋白质”经常用于指相对大的蛋白质,而“肽”经常用于指小的多肽,但是这些术语在本领域中的使用经常重叠。除非另有说明,术语“多肽”通常指蛋白质、多肽和肽。如通过标准分子大小测定技术(如离心或SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳)所判断的,根据本公开内容有用的肽通常为约0.1到100KD或更大至约1000KD,优选介于约0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、30与50KD之间。

[0054] 本文所用的术语“可溶的”是指融合分子如果在高于约5-37°C的温度和中性或接近中性的pH下,在存在低浓度或无浓度的阴离子或非离子去污剂的情况下保持在水溶液中,则是可溶的。在这些条件下,可溶性蛋白质通常具有低沉降值,例如,小于约10到50个斯韦德贝里单位。本文所指的水性溶液通常具有用于建立通常处于约5-9的pH范围内的pH并且介于约2mM与500mM的范围之间的离子强度的缓冲化合物。有时加入蛋白酶抑制剂或温和的非离子洗涤剂。此外,如果需要,可以加入载体蛋白,如几mg/mL的牛血清白蛋白(BSA)。示例性的水性缓冲液包含标准磷酸盐缓冲盐水、tris缓冲盐水或其它众所周知的缓冲液和细胞培养基调配物。

[0055] 术语“固体表面”是指非流体物质,包括由如以下的材料制成的颗粒(包含微粒和

珠粒): 聚合物、金属(顺磁性、铁磁性颗粒)、玻璃和陶瓷; 凝胶物质, 如二氧化硅、氧化铝和聚合物凝胶; 毛细管, 其可以由聚合物、金属、玻璃和/或陶瓷制成; 沸石和其它多孔物质; 电极; 微量滴定板; 实心条; 比色皿、试管或其它光谱仪样品容器。

[0056] 术语“分离的”是指由人的手从自然状态改变的成分、化合物、物质或分子。例如, 如果自然存在的组合物或物质已被更改或从其原始环境中移除或者两者, 则将其分离。例如, 天然存在于活体动物中的多核苷酸或多肽没有被分离出来, 但是分离了与天然状态的共存材料隔离的相同多核苷酸或多肽, 与本文所用的这一术语一致。

[0057] II. 减轻靶标干扰

[0058] 如下所述, 用于检测样品中ADA的ADA桥接免疫测定易受药物靶标干扰(假阳性ADA)的影响。在ADA桥接免疫测定中, 样品与捕获药物(被标记的或未被标记的)和包括可检测标记的检测药物一起温育。样品温育后, 形成包括捕获药物、ADA和检测药物的夹层, 因此腺苷脱氨酶桥接两种与其结合的药物, 并且结合的ADA可以被检测到(见图1A)。ADA桥接测定中的真正阳性信号是由ADA与捕获药物和检测药物的二价结合产生的, 从而形成桥。然而, 当二聚体或多聚体靶标桥接捕获药物和检测药物, 由此与靶标形成桥时, 就会出现假阳性结果(参见图1B以及例如Liao, K. 等人, 《免疫方法杂志(J Immunol Methods)》, 2017, 441: 第15-23页)。

[0059] 如本文提供的实例中所示, 本发明提供了用于减轻ADA桥接免疫测定中的药物靶标干扰、由此减少假阳性结果的方法。所述方法包括在温和的碱性pH测定条件下将样品与至少一种药物靶标阻断试剂一起温育。

[0060] 在一个实施例中, 本发明提供了一种用于减轻用于确定血清样品中针对药物的ADA的存在的ADA桥接免疫测定中的药物靶标干扰的方法。这一方法包括使所述血清样品与捕获药物、检测药物和一种或多种药物靶标阻断试剂接触。接下来, 将这些组分在温和的碱性pH测定条件下温育, 使药物靶标阻断试剂与样品中存在的药物靶标相互作用, 由此减轻ADA桥接免疫测定中的药物靶标的干扰。

[0061] 在一个方面, 这一方法进一步包括执行ADA桥接免疫测定, 如下所述。

[0062] 在另一方面, 所述一种或多种药物靶标阻断试剂能够在免疫测定中与药物靶标结合和/或阻断药物靶标, 从而防止药物靶标与捕获药物和/或检测药物的结合。在一个特定方面, 所述一种或多种药物靶标阻断试剂是靶标阻断结合分子, 如抗体。在仍另一个方面, 靶标阻断抗体包括人恒定区。

[0063] 当靶标阻断结合分子(如抗体)和药物(如抗体药物)具有相同的人恒定区时, 血清样品中对药物Fc区具有特异性的ADA可能与靶标阻断人抗体结合, 并可能影响测定中的检测。用小鼠Ig区替换靶标阻断抗体的人Ig区可以减少药物靶标阻断抗体对ADA检测的干扰。因此, 在一个方面, 靶标阻断抗体包括小鼠恒定区。

[0064] ADA桥接免疫测定可以包括一种或多种药物靶标阻断试剂。在一个方面, 所述免疫测定包括两种药物靶标阻断试剂。在一个特定方面, 所述两种药物靶标阻断试剂是药物靶标阻断抗体, 例如, 第一种药物靶标阻断抗体和第二种药物靶标阻断抗体。在一个更具体的方面, 所述第一和/或第二靶标阻断抗体包括人恒定区。在另一个特定的方面, 所述第一和/或第二靶标阻断抗体包括小鼠恒定区。在又另一个方面, 所述第一和第二靶标阻断抗体都包括人恒定区。在又另一个方面, 所述第一和第二靶标阻断抗体都包括小鼠恒定区。在另一

个方面,所述第一靶标阻断抗体包括人恒定区,并且所述第二靶标阻断抗体包括小鼠恒定区。在又一个方面,所述第一靶标阻断抗体包括小鼠恒定区,所述第二靶标阻断抗体包括人恒定区。

[0065] 在一个实施例中,本发明提供了用于减轻用于确定血清样品中针对药物的ADA的存在的ADA桥接免疫测定中的药物靶标干扰的方法,所述方法包括使血清样品与捕获药物、检测药物、第一药物靶标阻断抗体和第二药物靶标阻断抗体接触。将这些组分在温和的碱性pH测定条件下温育,从而使第一种药物靶标阻断抗体和第二种药物靶标阻断抗体与样品中存在的药物靶标相互作用,由此减轻ADA桥接免疫测定中的药物靶标的干扰。

[0066] 如本文所述,发明人发现用于ADA桥接免疫测定的靶标阻断抗体可能与被测药物有一些共同的CDR_{VH}重排。因此,对这些VH重排区域具有特异性的ADA可能与样品中的靶标阻断抗体结合,从而可能影响其在测定中的检测。为了优化检测,与人IgG₁ Fc融合的靶受体被工程化并在本发明的方法中用于代替靶标阻断抗体之一。

[0067] 在一个实施例中,在本发明的方法中使用的一种或多种药物靶标阻断试剂包括与IgG₁ Fc结构域融合的靶受体的一部分(靶受体IgG₁ Fc融合蛋白)。在一个方面,所述靶受体的所述部分是受体的细胞外部分。在另一个方面,靶受体IgG₁ Fc融合蛋白是可溶的。在一个特定的方面,靶受体IgG₁ Fc融合蛋白的IgG₁ Fc结构域是人IgG₁ Fc结构域。

[0068] 当靶受体IgG₁ Fc融合蛋白和药物具有人IgG₁ Fc区时,血清样品中对药物Fc区具有特异性的ADA可能与靶受体IgG₁ Fc融合蛋白结合,并且可能影响测定中的检测。用小鼠Ig₁区替换靶受体IgG₁ Fc融合蛋白的人Ig₁ Fc区可以减少靶受体IgG₁ Fc融合蛋白对ADA检测的干扰。因此,在另一个方面,靶受体IgG₁ Fc融合蛋白的IgG₁ Fc结构域是小鼠IgG₁ Fc结构域。

[0069] 所述测定可以包括一种或多种药物靶标阻断抗体和一种或多种靶标受体IgG₁ Fc融合蛋白。此外,所述测定可以包括靶标阻断抗体和靶受体IgG₁ Fc融合蛋白。

[0070] 因此,在一个实施例中,本发明提供了一种用于减轻用于确定血清样品中针对药物的ADA的存在的ADA桥接免疫测定中的药物靶标干扰的方法,其中药物靶标是可溶性蛋白质,例如配体-受体,并且这一方法包括使血清样品与以下接触:捕获药物;检测药物;药物靶标阻断试剂,所述药物靶标阻断试剂包括与IgG₁ Fc结构域融合的受体的细胞外部分;以及药物靶标阻断抗体。将这些组分在温和的碱性pH测定条件下温育,使药物靶标阻断试剂和药物靶标阻断抗体与样品中存在的药物靶标相互作用,由此减轻ADA桥接免疫测定中的药物靶标的干扰。

[0071] 在一个方面,IgG₁ Fc结构域是小鼠IgG₁ Fc结构域。在另一个方面,IgG₁ Fc结构域是人IgG₁ Fc结构域。在又一个方面,药物靶标阻断抗体包括人恒定区。在仍另一个方面,药物靶标阻断抗体包括小鼠恒定区。在一个方面,靶受体IgG₁ Fc融合蛋白包括小鼠IgG₁ Fc,并且靶标阻断抗体包括小鼠恒定区。

[0072] 在一个实施例中,每个靶标阻断试剂在ADA桥接免疫测定中的浓度为约10 μ g/mL到约200 μ g/mL。在一个方面,靶标阻断试剂各自的浓度为约20 μ g/mL到约175 μ g/mL。在另一个方面,靶标阻断试剂各自的浓度为约30 μ g/mL到约150 μ g/mL。在仍另一个方面,靶标阻断试剂各自的浓度为约40 μ g/mL到约125 μ g/mL。在又一个方面,靶标阻断试剂各自的浓度为约50 μ g/mL到约100 μ g/mL。在另一个方面,靶标阻断试剂各自的浓度为约50、60、70、75、80、85、90、95或100 μ g/mL。在另一个方面,靶标阻断试剂各自的浓度为约100 μ g/mL。

[0073] 本文描述的用于减轻靶标干扰的方法包括在温和的碱性pH测定条件下执行ADA免疫测定。温和的碱性pH包含略高于中性pH的pH值范围。在一个实施例中,温和的碱性pH包含介于约pH 7.5到约pH 9.5之间的pH。在一个方面,温和的碱性pH包含介于约pH 7.5到约pH 8.5之间的pH。在一个方面,温和的碱性pH包含介于约pH 8.5到约pH 9.0之间的pH。在一个方面,温和的碱性pH包含介于约pH 8.0到约pH 9.0之间的pH。在另一个方面,温和的碱性pH包含介于约pH 8.5至约pH 9.5之间的pH。

[0074] III. ADA免疫测定

[0075] 免疫测定是技术人员熟知的。进行这种测定的方法以及实际应用和程序在本领域中是众所周知的,并在例如Colowick, S.P.和Caplan, N.O. (编辑), “酶学方法 (Methods in Enzymology)” (学术出版社, 其涉及免疫学检测方法, 特别是第70、73、74、84、92和121卷) 中有所描述。例如Hage, D.S. (《分析化学 (Anal. Chem.)》, 71 (1999) 294R-304R) 和Lu, B. 等人 (《分析师 (Analyst)》, 121 (1996) 29R-32R) 描述了不同免疫测定的原理, 这些文献描述了用于免疫测定的抗体的定向固定。例如Wilchek, M.和Bayer, E.A. 在《酶学方法 (Methods Enzymol.)》, 184 (1990) 467-469中对亲和素-生物素介导的免疫测定法进行了描述。

[0076] 一种常用的ADA测定方法是桥接免疫测定 (参见例如Liao, K. 等人, 《免疫学方法杂志》, 2017, 441: 第15-23页; Dai, S. 等人, 《美国药学科学家协会期刊》, 2014, 16 (3) : 第464-77页; 以及Zhong, Z.D. 等人, 《(美国药学科学家协会期刊)》, 2017, 19 (6) : 第1564-1575页, 其所述文献的内容通过引用并入本文)。ADA桥接免疫测定是一种夹层型免疫测定法, 其中多价腺苷脱氨酶由两种不同的抗体药物 (捕获药物和检测药物) 结合, 每种药物都与ADA的不同的不重叠或不干扰的表位结合。特别地, 在这一测定中, 将样品与捕获药物 (被标记的或未被标记的) 和包括可检测标记的检测药物一起温育。样品温育后, 形成包括捕获药物、ADA和检测药物的夹层, 因此腺苷脱氨酶桥接两种与其结合的药物, 并且结合的ADA可以被检测到 (见图1A)。在一个方面, 免疫测定是高通量测定。

[0077] ADA桥接免疫测定进一步包括确定ADA的存在或量。因此, 本公开提供了与可检测标记缀合的检测药物。用于本发明任何方法的可检测标记的非限制性实例包含钡、放射标记、光致发光标记、化学发光标记、荧光标记、荧光团、半抗原、电化学发光标记或酶标记。可检测标记可以使用本领域技术人员已知的仪器和装置来测量。

[0078] 用于本文提供的方法中的代表性荧光团包含例如绿色荧光蛋白、蓝色荧光蛋白、红色荧光蛋白、荧光素、荧光素5-异硫氰酸酯 (FITC)、花青染料 (Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7)、Bodipy染料 (英杰公司 (Invitrogen)) 和/或Alexa Fluor染料 (英杰公司)、丹磺酰、丹磺酰氯 (DNS-C1)、5-(碘乙酰胺基) 荧光素 (5-IAF)、6-丙烯酰基-2-二甲基氨基-苯二烯 (丙烯酰二烯)、7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-重氮基-4-酰氯 (NBD-C1)、溴化乙锭、荧光黄、罗丹明染料 (5-羧基罗丹明6G盐酸盐、赖三胺罗丹明B磺酰氯、罗丹明B-异硫氰酸酯 (RITC (罗丹明B-异硫氰酸酯)、罗丹明800); 四甲基罗丹明5-(和6-) 异硫氰酸酯 (TRITC)、德克萨斯红、磺酰氯、萘胺磺酸 (包含但不限于1-苯胺基萘-8-磺酸 (ANS) 和6-(对甲苯胺基) 萘-e-2-磺酸 (TNS))、葱酰基脂肪酸、DPH、肝素酸、TMA-DPH、苄基脂肪酸、荧光素-磷脂酰乙醇胺、德克萨斯红-磷脂酰乙醇胺、苈基-磷酰胆碱、苈基-磷酰胆碱、部花青素540、萘基苯乙烯基、3,3'-二丙基硫代二碳花青 (diS-C3-(5))、4-(对二戊基氨基苯乙烯基)-1-甲基吡啶鎓 (二-5-ASP)、Cy-3碘乙酰胺、Cy-5-N-羟基琥珀酰亚胺、Cy-7-异硫氰酸酯、IR-125、噻唑橙、Azure

B、尼罗蓝、铝酞菁、氧杂辛烷1,4',6-二脒基-2-苯基吡啶。(DAPI)、Hoechst 33342、TOTO、吖啶橙、乙锭同二聚体、N(乙氧羰基甲基)-6-甲氧基喹啉鎓(MQAE)、Fura-2、Calcium Green、羧基SNARF-6、BAPTA、香豆素、植物荧光素、晕苯和金属配体络合物。

[0079] 本文提供的方法中使用的半抗原包含例如地高辛和生物素。

[0080] 用于本文提供的方法的酶包含例如碱性磷酸酶(AP)、 β -半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶(HRP)、大豆过氧化物酶(SBP)、脲酶、 β -内酰胺酶和葡萄糖氧化酶。

[0081] 在一个实施例中,捕获药物与固体表面缀合。在一个方面,捕获药物与固体表面的缀合是通过特异性结合对进行的,其中捕获药物被标记或缀合。在一个方面,特异性结合对(第一组分/第二组分)选自以下:链霉亲和素或亲和素/生物素、生物素/中性亲和素、生物素/captavidin、抗体/抗原(参见,例如Hermanson,G.T.等人,《生物缀合技术(biocognate technologies)》,学术出版社(Academic Press),1996)、表位/抗体、蛋白A/免疫球蛋白、蛋白G/免疫球蛋白、蛋白L/免疫球蛋白、GST/谷胱甘肽、多聚组氨酸标签/镍、FLAG/M1抗体、麦芽糖结合蛋白/麦芽糖、钙调蛋白结合蛋白/钙调素、钙调素结合蛋白/钙调素、酶/酶底物、凝集素/多糖、类固醇/类固醇结合蛋白、激素/激素受体和受体-配体结合对。在一个方面,捕获药物与生物素缀合(作为特异性结合对的第一组分)。在这种情况下,与固相的缀合是通过固定的亲和素或链霉亲和素进行的(见图1A)。

[0082] 在一些实施例中,GlcNac结合蛋白与结合对的第一个成员(例如,生物素、抗生物素蛋白、中性亲和素、captavidin、抗体、抗原、蛋白A、蛋白G、蛋白L、GST、His-Tag、FLAG、MBP、钙调素结合蛋白、酶、受体或配体)缀合。

[0083] 在一个实施例中,在ADA免疫测定中测试的样品是血清样品。在一个方面,血清样品包括1%到20%的血清。在一个方面,血清样品包括约1%到约10%的血清。在另一个方面,血清样品包括约10%到约15%的血清。在又一个实施例中,血清样品包括约10%到约20%的血清。在仍另一个实施例中,血清样品包括约15%到约20%的血清。在一个特定方面,血清样品包括包含约1%的血清。在一个方面,血清是人血清。

[0084] 在一个实施例中,ADA桥接免疫测定包括酸解离步骤。在一个方面,将血清样品在酸(例如乙酸)中稀释10倍,并在与捕获药物和检测药物温育之前在室温下温育。

[0085] 在一个实施例中,捕获药物和检测药物在免疫测定中的浓度为约0.5 μ g/mL到约10 μ g/mL。在一个方面,捕获药物和检测药物的浓度大于0.5 μ g/mL而小于10 μ g/mL。在另一个方面,捕获药物和检测药物的浓度为约0.5 μ g/mL到约5 μ g/mL。在又一个方面,捕获药物和检测药物的浓度为约0.5 μ g/mL到约2.0 μ g/mL。在仍另一个方面,捕获药物和检测药物的浓度为约0.5 μ g/mL到约1 μ g/mL。在一个优选的方面,捕获药物和检测药物的浓度约为0.5 μ g/mL。

[0086] 在一个实施例中,样品、捕获药物和检测药物的温育在室温下进行。在一个方面,样品、捕获药物和检测药物的温育时间至少为0.5小时。在另一个方面,温育时间为至少1小时。在一个方面,温育时间为至少1.5小时。在一个方面,温育时间长达2小时。在又一个方面,温育时间介于0.5小时与12小时之间。在一个方面,温育时间介于0.5小时与5小时之间。在另一个方面,温育时间介于1小时与12小时之间。在一个方面,温育时间介于1小时与5小时之间。在另一个方面,温育时间介于5小时与12小时之间。

[0087] 在一个实施例中,在温育样品、捕获药物和检测药物后,将样品转移到被标记的固体表面(例如,用链霉亲和素标记的固体表面),并进一步温育,使得捕获药物可以附着到固

体表面。在一个方面,温育在室温下进行。在另一个方面,温育后,使用本领域已知的用于检测被标记抗体的任何方法分析样品与ADA的结合,其中检测药物基于药物标记(例如,钆)的检测。ADA桥接测定中的真正阳性信号是由ADA与捕获药物和检测药物的二价结合产生的,从而形成桥。

[0088] 用于本文所述免疫测定的固体表面在现有技术中有广泛的描述(例如,参见Butler, J.E., 《方法(Methods)》, 22 (2000) 4-23, 其通过引用并入本文)。测定的固体表面组分与测定可能接触的惰性固体表面的区别在于“固体表面”在其表面上含有至少一个待与捕获药物相互作用的部分。固体表面可以是固定组分,如管、条、吸收池或微量滴定板,或者可以是非固定组分,如珠粒和微粒。微粒也可以用作均匀表面形式的固相。可以使用允许蛋白质和其它物质非共价或共价附着的各种微粒。这种颗粒包含:聚合物颗粒,如聚苯乙烯和聚(甲基丙烯酸甲酯);金颗粒,如金纳米颗粒和金胶体;以及陶瓷颗粒,如二氧化硅、玻璃和金属氧化物颗粒。参见例如Martin, C.R.等人,《分析化学—新闻和特征 (Analytical Chemistry-News&Features)》, 70 (1998) 322A-327A, 其通过引用并入本文。

[0089] 本发明通过以下实例进一步说明,这些实施例不以任何方式进行限制。在本申请中引用的所有参考文献、专利和公开的专利申请的全部内容以及附图特此通过引用并入本文。

[0090] 实例

[0091] 实例1:用靶标阻断试剂和温和的碱性pH在桥接免疫原性测定中减轻靶标干扰

[0092] 材料和方法

[0093] 材料和试剂

[0094] 对于本文所述的功能性药物测定和靶标测定,除非另有说明,所有溶液均是在测定缓冲液(0.5% BSA、0.05% Tween-20、1X PBS)中制备的。对于本文所述的ADA测定,除非另有说明,所有溶液均是在1% BSA、1X PBS中制备的。PBS来自纽约州大岛生命技术公司(Technologies, Grand Island, NY)。1.5M Trizma盐基来自密苏里州圣路易斯西格玛公司(Sigma, St Louis, MO)。冰醋酸来自马萨诸塞州沃尔瑟姆赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)。HBS-EP+ (10X)缓冲液来自马萨诸塞州马尔伯勒通用电气生命科学公司(GE Life Science, Marlborough, MA)。人血清来自纽约州希克斯维尔Bioreclamation公司(Bioreclamation, Hicksville, NY)。用链霉亲和素涂覆的微孔板来自马里兰州洛克维尔Meso Scale Discovery公司(Meso Scale Discovery, Rockville, Maryland)。重组人靶蛋白来自明尼苏达州明尼阿波利斯R&D系统公司(R&D System, Minneapolis, MN)。黑色微孔板、辣根过氧化物酶(HRP)缀合的NeutrAvidin™和SuperSignal ELISA Pico Chemiluminescent Substrate™来自伊利诺伊州罗克福德赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL)。HRP缀合的山羊抗小鼠IgG(即Fc片段特异性抗体)来自宾夕法尼亚州西格罗夫杰克逊免疫研究公司(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)。AHC生物传感器(抗人IgG Fc捕获)来自加利福尼亚州弗里蒙特Pall ForteBio公司(Pall ForteBio, Fremont, CA)。完全人单克隆抗体药物、小鼠抗-药物单克隆抗体、生物素化药物、钆化药物和所有人和小鼠抗靶标单克隆抗体(本文称为HuAb1、HuAb2(人)和MsAb2(小鼠))、可溶性人和小鼠受体融合蛋白(本文分别称为HuSR和MsSR)和生物素化人抗靶标单克隆抗体(用于ADA和靶标测定)由纽约州柏油村再生元制药公司(Regeneron

Pharmaceuticals, Tarrytown, NY) 生产。

[0095] pH测定

[0096] 使用配有InLab Expert Pro-ISM™电极的经过校准的Metler Toledo仪表(俄亥俄州哥伦布市(Columbus, Ohio))进行pH测量。将合并的人血清在300mM乙酸中稀释10倍。将酸化的样品然后用不同浓度的Tris-碱溶液缓冲10倍。如下表1所示,对最终测定溶液进行了pH测量。

[0097] 表1. 所评估的用于检测抗药ADA的pH条件

溶液	pH
合并的人血清 1:10 溶于 300 mM 乙酸, 然后 1:10 溶于主混合物	
[0098] 70 mM Tris	8.43
60 mM Tris	8.30
50 mM Tris	8.13
40 mM Tris	7.83

[0099] ADA测定

[0100] 用非定量抗药物抗体(ADA)桥接免疫测定检测人血清样品中的ADA(图1A-C)。这一ADA桥接测定采用小鼠抗药物单克隆抗体作为阳性对照,并且采用生物素化药物和钆化药物作为桥接组分(图1A)。通过在300mM乙酸中将血清样品稀释10倍来酸化血清样品,然后在室温(RT)下温育至少10分钟。生物素化药物和钆化药物(0.5µg/mL)是在加入血清样品之前在含有60mM Tris-碱的测定缓冲液中制备的。然后在被标记的药物溶液中将酸处理的血清样品稀释10倍。在室温下温育约60分钟后,将样品转移到封闭的(5% BSA)链霉亲和素Multi-Array™96孔板(MSD)中,并在室温下温育约60分钟。将板洗涤并加入读取缓冲液,使用MSD板读取器(例如,SECTOR成像仪2400)读取板。为了阻断靶标介导的干扰(图1B),被标记的药物溶液中还包含抗靶标单克隆抗体(100µg/mL)和/或可溶性受体蛋白(100µg/mL)(图1C)。此外,被标记的药物溶液是在60mM Tris中制备的,以将pH调节到温和的碱性条件,这也将靶标与生物素化药物和钆化药物两者的结合最小化。

[0101] 靶标测定

[0102] 此程序使用涂覆有小鼠抗靶标单克隆抗体(1µg/mL)的微量滴定板,并使用重组靶蛋白作为标准品。标准品和QC是在本领域技术人员熟知的培养基中制备的,以避免来自人血清的内源性靶蛋白的干扰。将标准品、对照品和样品在300mM乙酸中稀释10倍,并在室温下温育约30分钟。用300mM加有抗-药物单克隆抗体(100µg/mL)的Tris碱溶液中和(1:2稀释度)酸处理的样品,以最大程度的减少药物干扰,然后添加到板中。使用不同的生物素化人抗靶标单克隆抗体(200ng/mL)和随后的NeutrAvidin™(100ng/mL)(与辣根过氧化物酶(NeutrAvidin-HRP™)缀合)检测板上捕获的靶蛋白。加入对过氧化物酶具有特异性的基于鲁米诺的底物,以获得与总靶标浓度成比例的信号强度。

[0103] 功能性药物测定

[0104] 功能性药物测定对未结合到靶标上或只有一个臂结合到靶标上的抗体药物的水平进行定量。因此,它仍然能够与靶标分子结合。此程序使用涂覆有靶标(0.5µg/mL)的微量滴定板,并使用抗体药物作为标准品。用小鼠抗人IgG4单克隆抗体(250ng/mL)检测板上捕

获的药物,然后用辣根过氧化物酶缀合的山羊抗小鼠IgG (Fc特异性) (抗-小鼠IgG-HRP) (100ng/mL) 进行检测。然后加入对过氧化物酶具有特异性的基于鲁米诺的底物,以获得与功能药物浓度成比例的信号强度。

[0105] 生物层干涉测量法

[0106] 在30°C下在Octet RED96系统 (Pall Forte Bio) 上以1000rpm的摇动速度研究了pH为7.3或8.3时在存在或不存在小鼠靶标阻断抗体MsAb2和可溶性小鼠受体融合蛋白MsSR的情况下靶标与抗体药物的结合。将AHC生物传感器用pH为7.3的稀释缓冲液预平衡30分钟,所述缓冲液含有10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA、0.02% (v/v) 叠氮化钠、1mg/mL BSA。

[0107] 在相同的稀释缓冲液中以5 μ g/mL的药物浓度进行加载步骤20秒(以达到约0.5nm的厚度),然后在相同的稀释缓冲液中进行60秒的基线步骤,然后在存在或不存在60nM pH为7.3的MsAb2和MsSR的情况下将生物传感器浸入含有200 μ L浓度为60nM的靶标的孔中。同样的程序也在pH为8.3的环境下进行。收集缔合曲线共约200秒,然后收集约300秒的解离阶段。

[0108] 结果和讨论

[0109] 温和的碱性pH测定条件和靶标阻断抗体HuAb1的组合可提高靶标耐受水平,并降低人类未经处理的样品中的背景信号

[0110] 据报道,正常人血清中的靶标水平约为10ng/mL。靶标在循环中与抗体药物和几种抑制性结合蛋白形成复合物。用采用酸解离步骤的桥接ADA免疫原性测定法对抗药物抗体进行了测定(图1A-1C)。虽然酸处理通常会提高药物耐受性水平,但它会释放与药物和任何靶标结合蛋白复合的靶标,从而在未经处理的人类血清样品中产生高背景信号(图2A)。以前也报道了在使用酸预处理来解离ADA和富拉单抗时类似的发现。NGF-富拉单抗复合物也发生了解离以释放游离NGF,这对ADA测定产生了干扰并产生了假阳性结果(Dai, S.等人,《美国药科学家协会期刊》,2014,16(3):第464-77页)。

[0111] 在ADA测定中,在没有靶标阻断抗体和中性测定pH下,使用重组靶蛋白测定的靶标耐受水平(定义为获得高于板切割点的试验信号所需的靶量)约为3ng/mL(图2B)。在中性测定pH下,当存在100 μ g/mL的靶标阻断抗体HuAb1时,靶标耐受水平增加至约150ng/mL。值得注意的是,在测定pH为8.3且人靶标阻断抗体HuAb1浓度相同的情况下,靶标耐受水平增加至约1.1 μ g/mL(图2B)。当测定pH为8.9时,靶标耐受水平甚至更高,约为7.5 μ g/mL。在中性pH条件或pH为8.3的条件下,测定的灵敏度值和药物耐受极限(DTL)值相似。用100 μ g/mL的HuAb1和温和的碱性pH,未经处理的人血清样品中的测定信号也降低到背景水平(图2C)。

[0112] 温和的碱性pH与两种靶标阻断试剂组合抑制临床研究样品中靶标介导的背景信号

[0113] 为了测试人靶标阻断抗体HuAb1和温和的碱性pH条件的组合是否也能抑制临床研究样品中的靶标干扰,在4个不同的时间点(第1、29、57和113天)测试了来自使用药物进行的单剂量研究中的三名受试者的I期临床样品。如通过内部靶标测定所测量的,在第29天和第57天的样品中,观察到靶标水平增加了10到12倍(图3A),并且在第113天的样品中,靶标水平接近基线。在这些样品中观察到的最高靶标浓度约为60ng/mL,远低于ADA测定中的靶标耐受水平。然而,当这些样品在ADA测定中在8.3的pH下用100 μ g/mL的人靶标阻断抗体

HuAb1测试时,在第29天和第57天的样品中检测到阳性信号,并且在第113天的样品中测定信号接近背景水平(图3B)。

[0114] 这些受试者接受了单剂量的抗体药物,并且他们的PK曲线并未显示出明显的ADA响应(图3C)。此外,这些样品中的ADA信号似乎与其靶标水平相关。随后,还对一大组给药后样品进行了测试,其中大多数显示出阳性ADA信号。因此,通过与被标记的药物建立靶标介导的桥,升高的靶标水平的存在可能是测定中的阳性信号的原因。

[0115] 为了进一步减轻在这些临床样品中观察到的明显的靶标干扰,将第二种人靶标阻断抗体HuAb2与中性pH或温和的碱性pH组合添加到HuAb1中。值得注意的是,当100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的靶标阻断抗体HuAb1和HuAb2与中性测定pH结合时,靶标介导的背景信号显著降低,尽管没有降低到基线水平。然而,给药后样品的一个子集仍然产生了高于板切割点的测定信号。当用相同浓度的靶标阻断抗体HuAb1和HuAb2再次检查这些样品时(但是测定pH为8.3),这些样品都具有低于板切割点的测定信号(图3D)。

[0116] 使用碱性pH和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的靶标阻断抗体HuAb1的最初的测定形式,似乎能够耐受约1.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的重组靶标蛋白(图2A)。然而,在靶标蛋白水平相对较低($\leq 60\text{ng}/\text{mL}$)的临床样品中,观察到靶标干扰。这表明重组靶蛋白在测定中的表现可能与天然蛋白不相似,和/或可能在患者体内表达与重组蛋白相比具有不同的结合特性的不同形式的靶蛋白,使得靶标阻断抗体HuAb1在抑制临床样品中的靶标干扰方面不太有效。重组靶蛋白和内源性靶蛋白在ADA测定中的差异结果强调了使用实际研究样品来表征测定性能的重要性。

[0117] 另一个值得注意的发现是温和的碱性pH对靶标耐受水平的影响。在中性pH条件下,HuAb1和HuAb2的组合不能完全抑制这些临床样品中的靶标干扰。要完全消除靶标干扰,需要轻微的碱性条件以及两种靶标阻断抗体。

[0118] 靶受体MsSR和靶标阻断抗体MsAb2的组合也能够减轻靶标干扰

[0119] 靶标阻断抗体HuAb1与治疗性抗体药物有一些共同的CDR_{VH}重排,因此,任何对这些VH重排区域具有特异性的ADA都可能与检测缓冲液中的HuAb1结合,而不是与被标记的药物结合,从而可能会影响其在测定中的检测。为了克服这个可能的问题,最初使用一种具有人IgG Fc融合蛋白的靶受体—HuSR来代替靶标阻断抗体HuAb1。如图4A所示,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的HuAb2和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的HuSR的组合能够有效地抑制I期临床样品中靶标介导的背景信号。事实上,用HuAb2/HuSR或HuAb1/HuAb2组合获得了相似的靶标耐受水平。

[0120] 此外,靶标阻断抗体HuAb2具有与抗体药物相同的人IgG4恒定区,并且靶受体HuSR具有人IgG Fc。患者血清样品中对抗体药物的Fc区具有特异性的任何抗药物抗体都可能与HuAb2和HuSR结合,这也可能会影响其在测定中的检测。为了克服这个可能的问题,HuSR的Fc结构域和HuAb2的整个恒定区从人转化为小鼠,以进一步减少其在ADA检测中可能的干扰。MsAb2(含小鼠恒定区的HuAb2)和MsSR(含小鼠Fc的HuSR)的组合仍然有效地减轻了临床样品中的靶标干扰(图4B和图4C)。第1天、第29天、第57天和第113天的临床样品在这种新的测定形式下仅显示背景信号,即使其在血清中存在高水平的靶标(图5)。

[0121] 温和的碱性pH和靶标阻断试剂对兔出血和大鼠毒理学样品中实际ADA的测定影响最小

[0122] 为了确保温和的碱性pH和靶标阻断试剂对ADA的稳定性和/或检测的影响最小,用当前的测定形式分析了用药物Fab免疫的兔的早期出血。

[0123] 用两种靶标阻断试剂在中性pH或8.3的pH下测定了免疫后约30到40天收集的两只兔的出血1和出血2。这些早期兔出血通常对低亲和力药物具有多克隆抗体响应,低亲和力药物的检测可能会受到更严格的测定条件的更大影响。如图6A所示,无论测定的pH如何,在每种测定条件下,ADA平均计数值都是相似的,这表明温和的碱性pH和靶标阻断试剂的添加对这些样品中ADA的稳定性或检测具有最小或没有影响。

[0124] 为了进一步证实在pH 8.3下使用两种靶标阻断试剂的形式可以检测给药后样品中的ADA,在毒理学研究中对来自2只大鼠的大鼠血清样品进行了靶标水平和ADA水平分析。与基线样品相比,来自大鼠1的第28天和85天样品的靶标水平增加了至少10倍,来自大鼠2的第28天样品的靶标水平增加了约10倍,然而,在这些样品中没有观察到ADA测定信号的异常升高,这表明靶标干扰被减轻。同时,从第85天开始,在两只动物中检测到高水平的ADA,这表明添加两种靶标阻断试剂和稍微碱性的pH测定条件并未干扰ADA的检测(图6B)。

[0125] 温和的碱性pH与靶标阻断试剂一起抑制靶标与药物的结合

[0126] 为了理解为什么温和的碱性pH值和靶标阻断试剂有助于减轻临床样品中的靶标干扰,进行了Octet实验,以测试在不同的pH值条件下在有或没有靶标阻断试剂时靶标与药物的结合。结果如图7A所示。从结合缔合曲线可以看出,在没有MsAb2和MsSR的情况下,与pH为7.3时相比,pH为8.2时的响应稍低,这表明靶标和药物之间的缔合受到测定pH的轻微影响。然而,与pH为7.3时相比,在pH为8.2时观察到更快的解离速率,这表明靶标和药物之间的结合亲和力在pH为8.2时较弱。在pH 7.3时,在MsAb2和MsSR的存在下,也观察到更快的解离速率,其类似于单独的碱性pH。然而,靶标阻断试剂的存在也显著影响了靶标与药物的结合。最后,在8.2的pH下MsAb2和MsSR的组合实现了对所述结合的完全抑制。这种依赖于pH的结合差异可能是由于在温和的碱性pH下靶标构象的变化,或者是由于在pH为8.2时靶标阻断试剂与靶标的结合更好,从而抑制了靶标与药物的缔合。

[0127] 这些结合数据进一步支持表明仅碱性pH就能部分抑制临床样品中的靶标介导的信号。虽然中性pH下MsAb2和MsSR的组合显著抑制靶标介导的信号,但只有MsAb2、MsSR和pH 8.3的组合才能完全抑制靶标干扰(图7B)。

[0128] 配体结合测定(LBAs)容易受到可以通过产生人工信号或阻断所需的试验相互作用来干扰试验结果的干扰分子的影响。靶标干扰是一个常见的问题,由于其对药物的特异性和每种靶蛋白的高度可变的生物学特性,很难克服。靶标通常与药物及其结合蛋白在循环中形成紧密的复合物,这种复合物可能难以破坏。此外,由于靶标:药物和靶标:结合蛋白复合物的形成或通过生物途径固有的反馈机制,靶水平可以在循环中增加到相对高的水平。在ADA桥接测定中,二聚体或多聚体靶标的存在会导致假阳性结果,并干扰免疫原性的评估。酸解离会加剧这种影响,酸解离是ADA测定中增加药物耐受性的常用策略,其也可以潜在破坏含靶复合物,释放靶标并导致靶标介导的假阳性信号。因此,在测定开发过程中必须进行仔细的考虑,权衡每种对抗将潜在人为因素引入测定的风险的策略的优势。基于生物学,需要对特定于靶标的方法进行评估,以减轻其在测定中的干扰。

[0129] 可以使用靶标阻断抗体(单个抗体或组合形式的抗体)、受体、辅助因子以及靶结合蛋白进行预处理,以减轻靶标干扰。此外,还可以通过直接影响二聚体或多聚体靶标或改变药物与靶标的结合亲和力来改变测定的pH,以减轻靶标干扰。此外,重要的是评估根据测试实际给药后样品选择的靶标减轻策略/测定形式的功效,因为血清样品中的天然靶蛋白

可能与其重组形式不同。使用PK数据和靶标水平也有助于区分真正的ADA响应和靶标介导的信号。

[0130] 靶标阻断试剂的添加可用于减轻靶标干扰。然而,在抗体治疗的情况下,必须确保这些试剂不与药物共有相似的CDR序列(在抗靶标抗体的情况下)或含有人IgG恒定序列(在抗体、受体和结合蛋白的情况下),因为这些共有的序列可能降低对这些序列具有特异性的ADA的检测率。最后,使用对药物有多克隆响应的低亲和力ADA阳性动物样品可有助于确保在最终测定条件下仍可检测到真正的低亲和力、低滴定度ADA响应,所述ADA反应的检测更有可能受到测定方法修改的影响。

[0131] 在本公开中,药物靶标是在循环中与其抑制性结合蛋白形成多个非活性复合物的同型二聚体。当酸解离增加ADA测定的药物耐受极限(DTL)时,它将释放与药物结合的靶标和与其抑制性结合蛋白结合的靶标。所释放的靶标将导致ADA测定中的靶标干扰。此外,用药物治疗小鼠将靶标表达上调。用对前体和靶的成熟形式具有特异性的抗体进行的蛋白质印迹分析显示,在注射药物后28天,不同形式的靶标在小鼠中被上调。因此,需要一种具有尽可能多的靶标耐受性的强有力的ADA测定法。

[0132] 通过包含靶标阻断抗体(HuAb1)和温和的碱性pH测定条件(pH8.3),发明人能够获得对重组靶蛋白的高耐受水平。对这种测定进行了优化以添加第二靶标阻断抗体HuAb2。这显著提高了靶标耐受性,并且在临床研究样品中阳性率大大降低。通过替换HuAb1抗靶标抗体,在这一测定中进行了进一步的优化。由于HuAb1与这种药物共有一些互补决定区(CDR)序列,因此它可能与抗药物ADA结合,从而使ADA的检测率降低。因此,用与人IgG Fc(HuSR)融合的靶受体的外部部分代替HuAb1。通过与HuAb2组合,HuSR能够阻断靶标干扰,HuAb1/HuAb2组合也一样。随后,HuSR的Fc结构域和HuAb2的整个恒定区从人转化为小鼠(MsAb2和MsSR),以进一步减少ADA检测中可能的干扰。使用Octet系统的表征实验表明,靶标与药物的结合被温和的碱性pH或单独存在的抗靶标阻断试剂抑制。然而,对结合的完全抑制是通过组合MsAb2、MsSR和温和的碱性pH而实现的。对来自经免疫兔的低滴定度ADA阳性出血和来自大鼠的非临床研究的已知ADA阳性样品的分析证实了这一测定检测ADA阳性样品的能力,以及碱性pH和靶标阻断试剂对ADA检测的最小影响。

[0133] 这些发现提供了克服标准靶标阻断抗体无效时桥接免疫原性测定中的靶标干扰的替代策略。

[0134] 等效形式

[0135] 本领域技术人员将认识到或仅使用常规实验就能够确定本文所述的本发明的具体实施例的许多等效形式。此类等效形式旨在由以下权利要求书涵盖。贯穿本申请引用的所有参考文献、专利和公开的专利申请的内容通过引用并入本文。

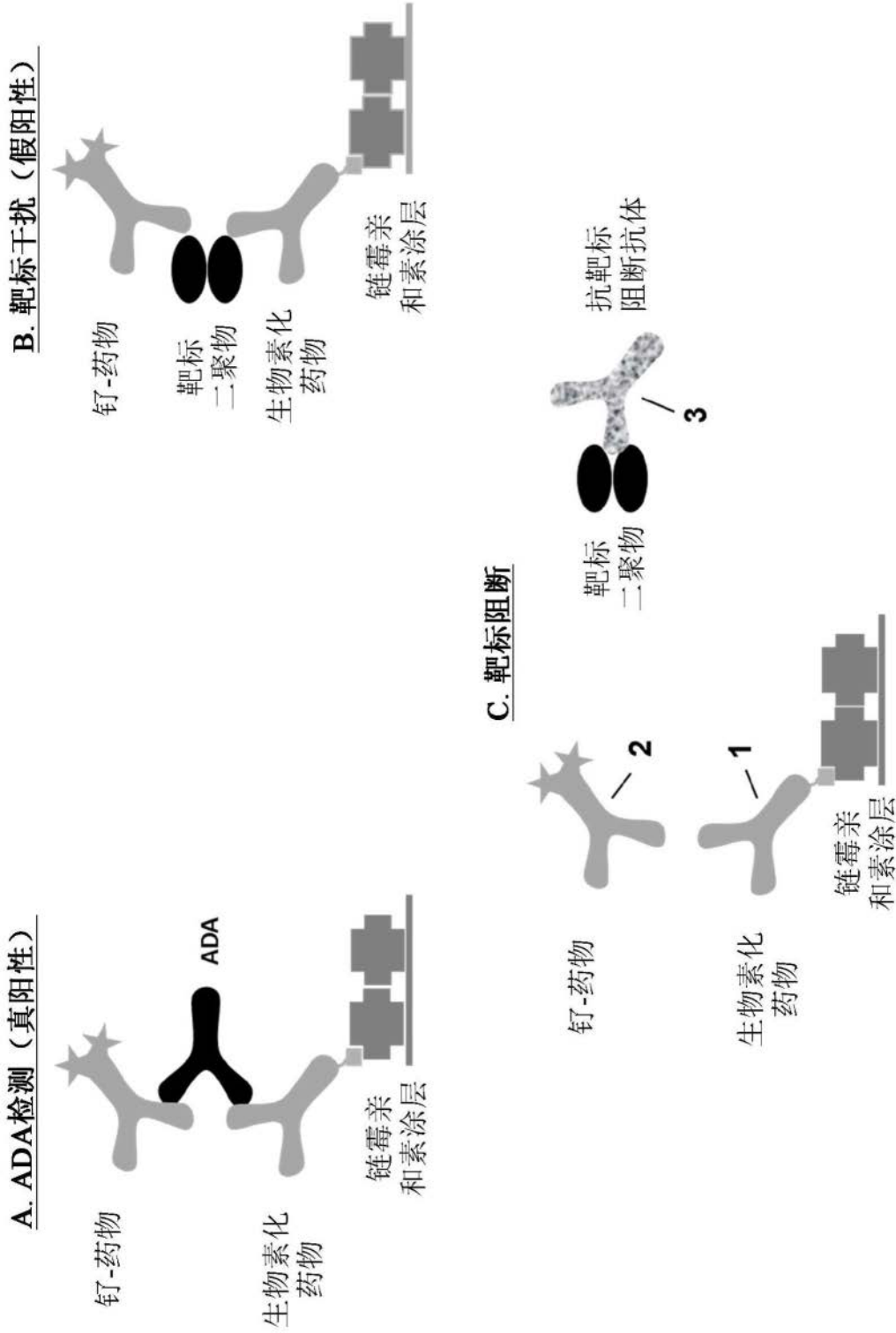
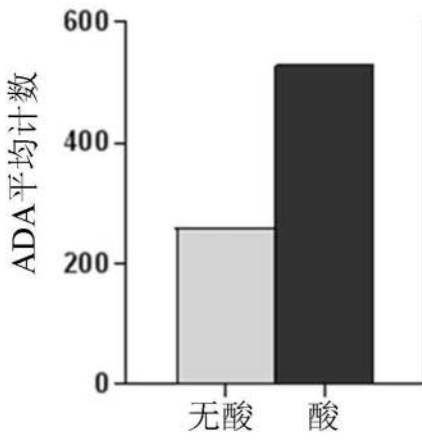
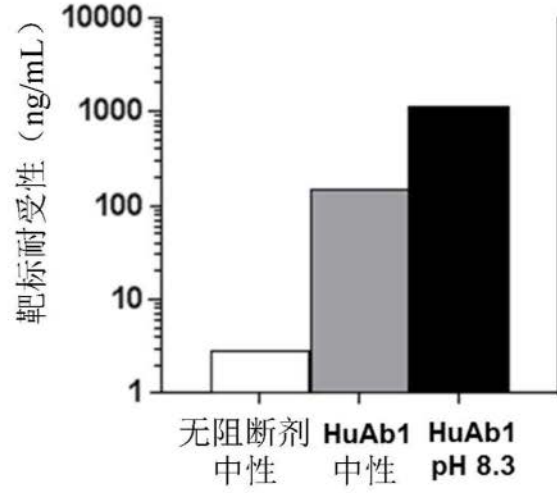


图1

A) 使用酸处理增加的ADA信号



B) 使用HuAb1和pH 8.3改进的靶标耐受性水平



C) 使用HuAb1和pH 8.3降低靶标介导的背景信号

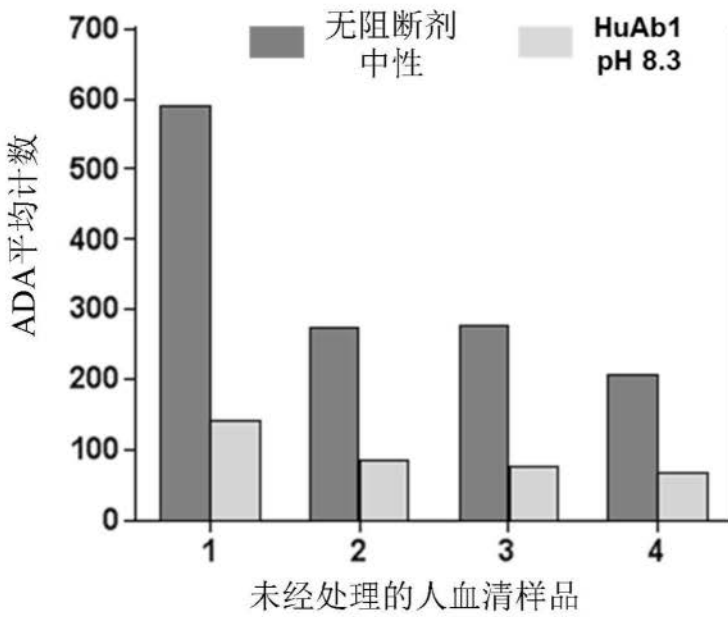
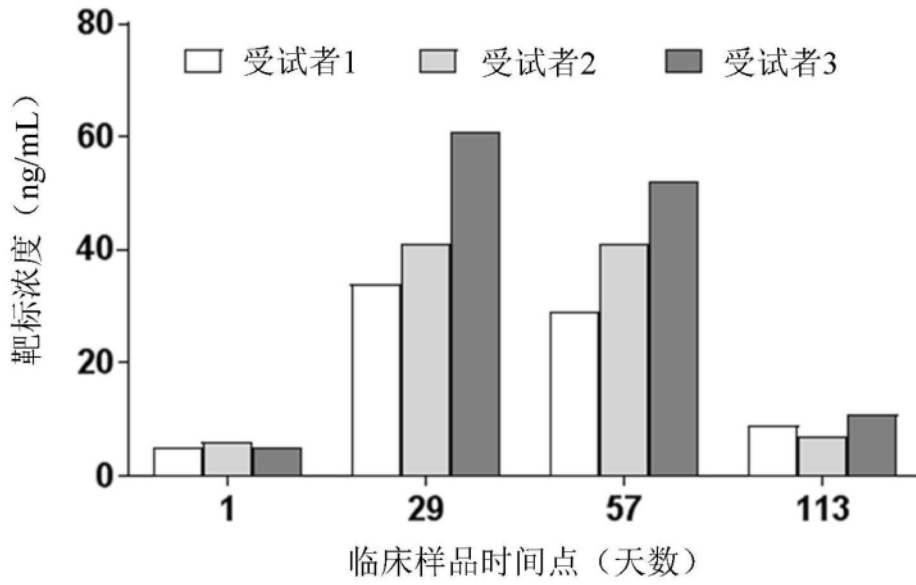
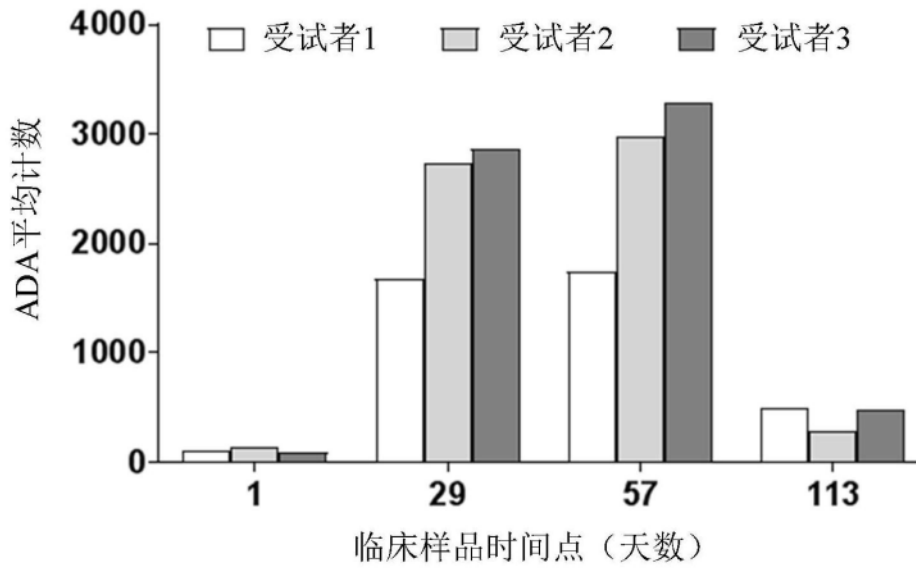


图2

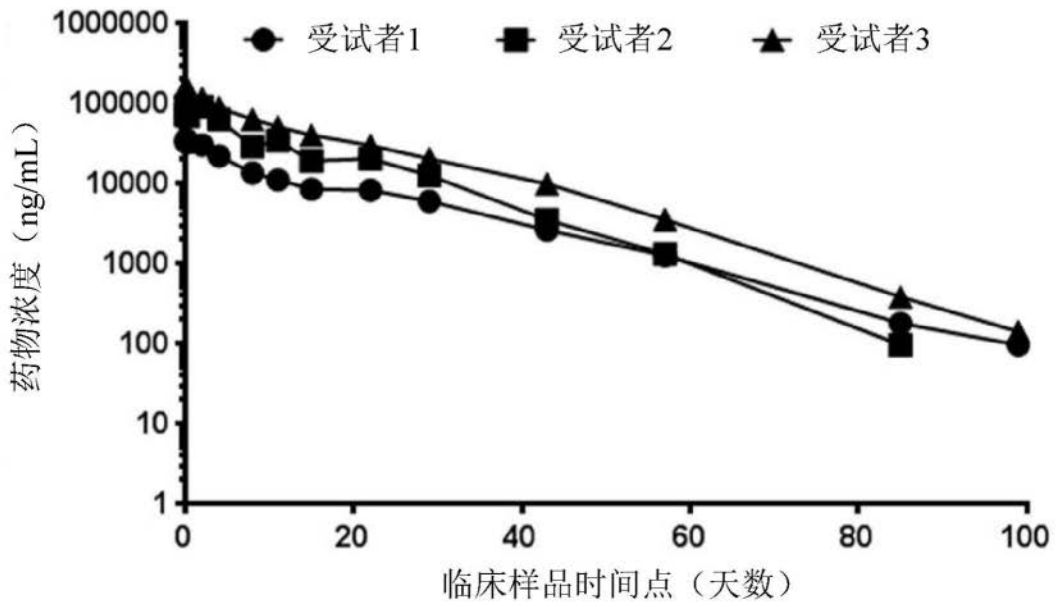
A) 临床样品中的靶标浓度



B) 临床样品中的ADA信号



C) 临床样品中的药物X浓度



D) 另外的抗靶标抗体HuAb2降低临床样品中的背景信号

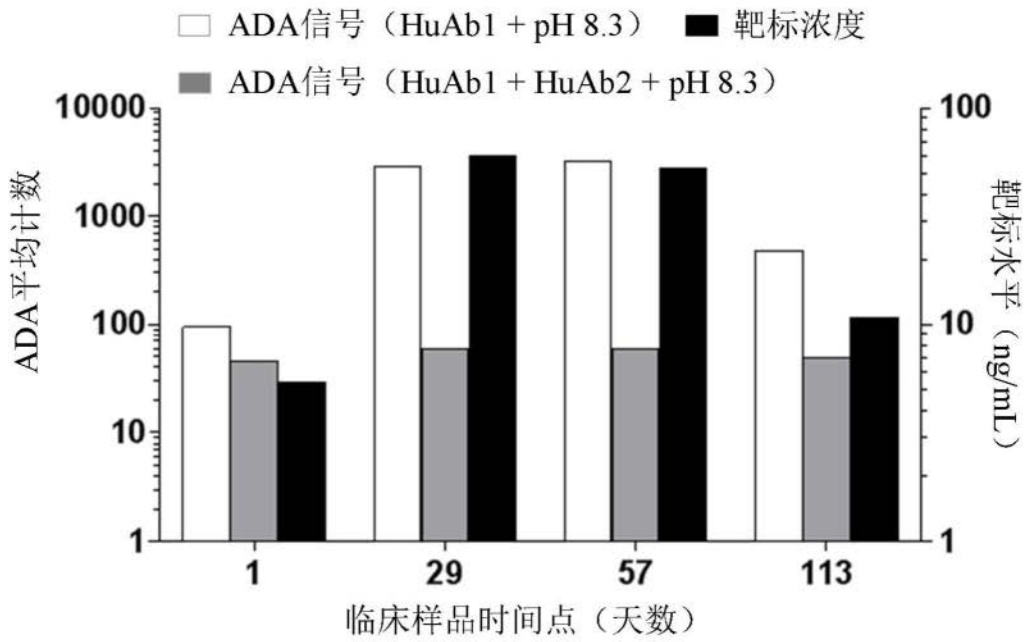
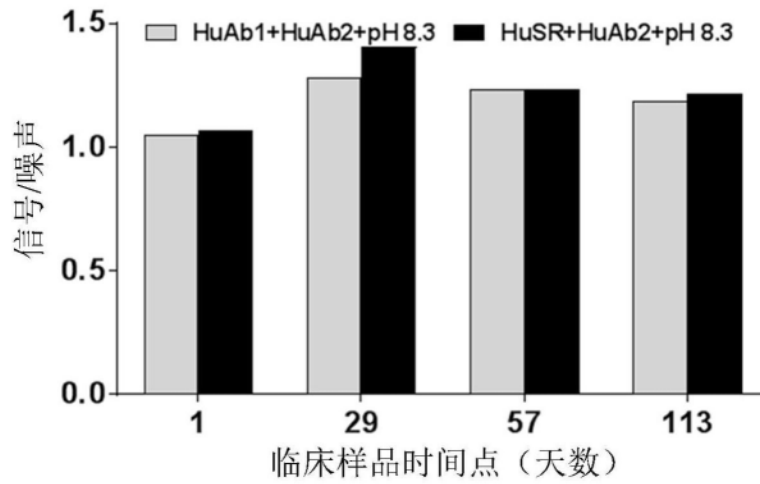
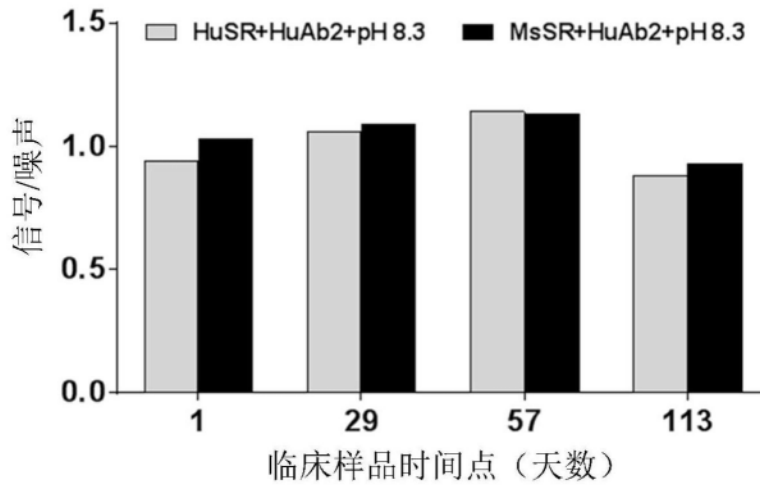


图3

A) 信号: 背景



B) 信号: 背景



C) 信号: 背景

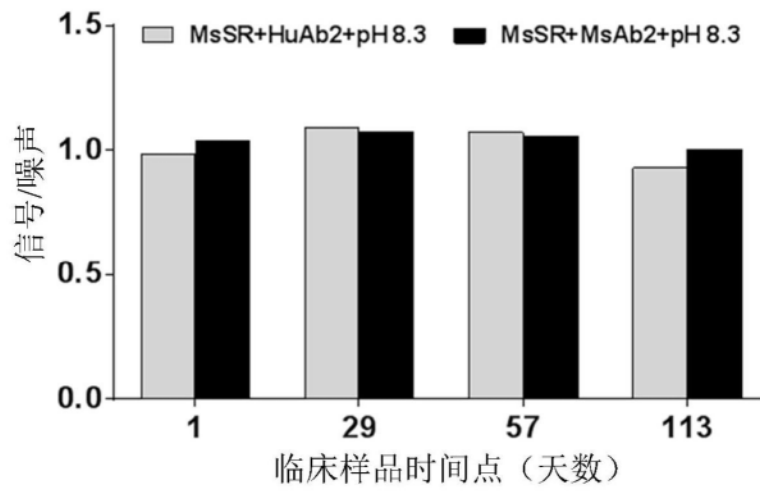


图4

使用MsAb2、MsSR和pH 8.3时临床样品中的ADA信号

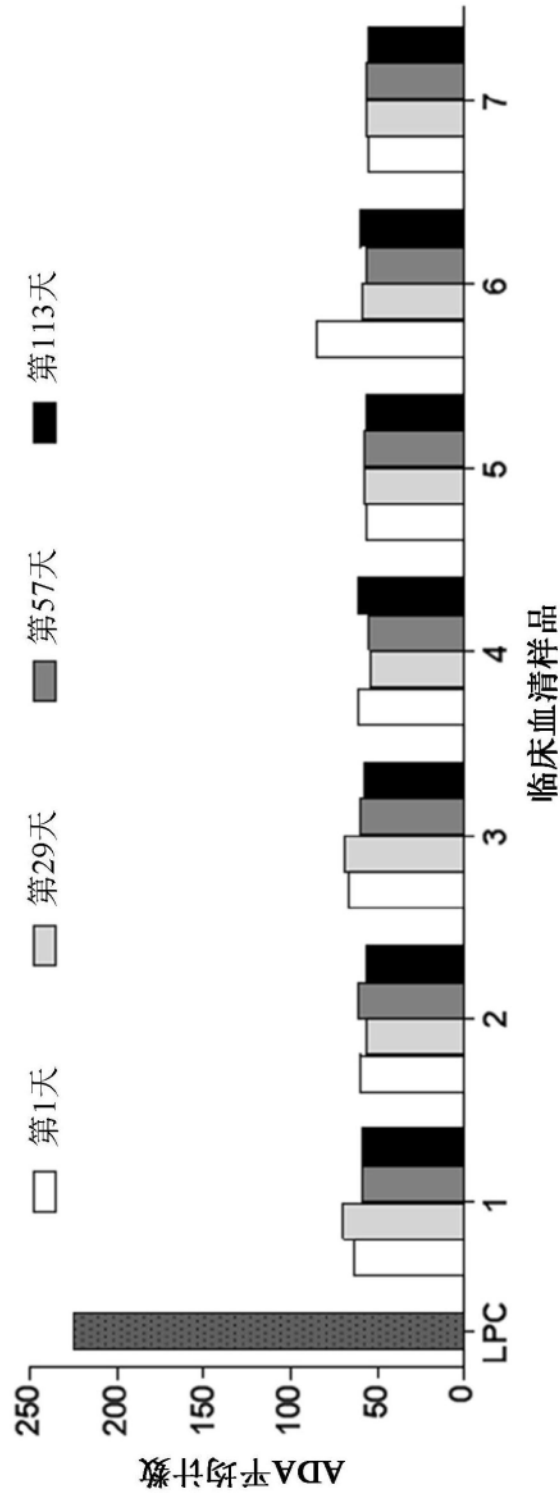
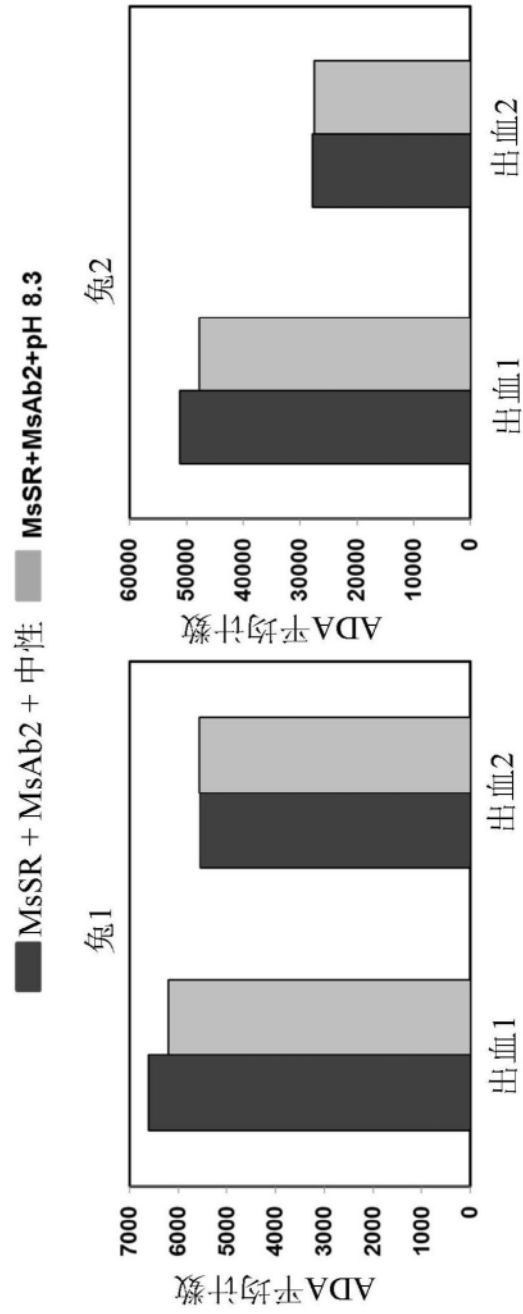


图5

A) 通过温和的碱性pH和靶标阻断试剂对兔出血的真实ADA检测影响最小



B) 大鼠毒理学样品中的真实ADA信号检测

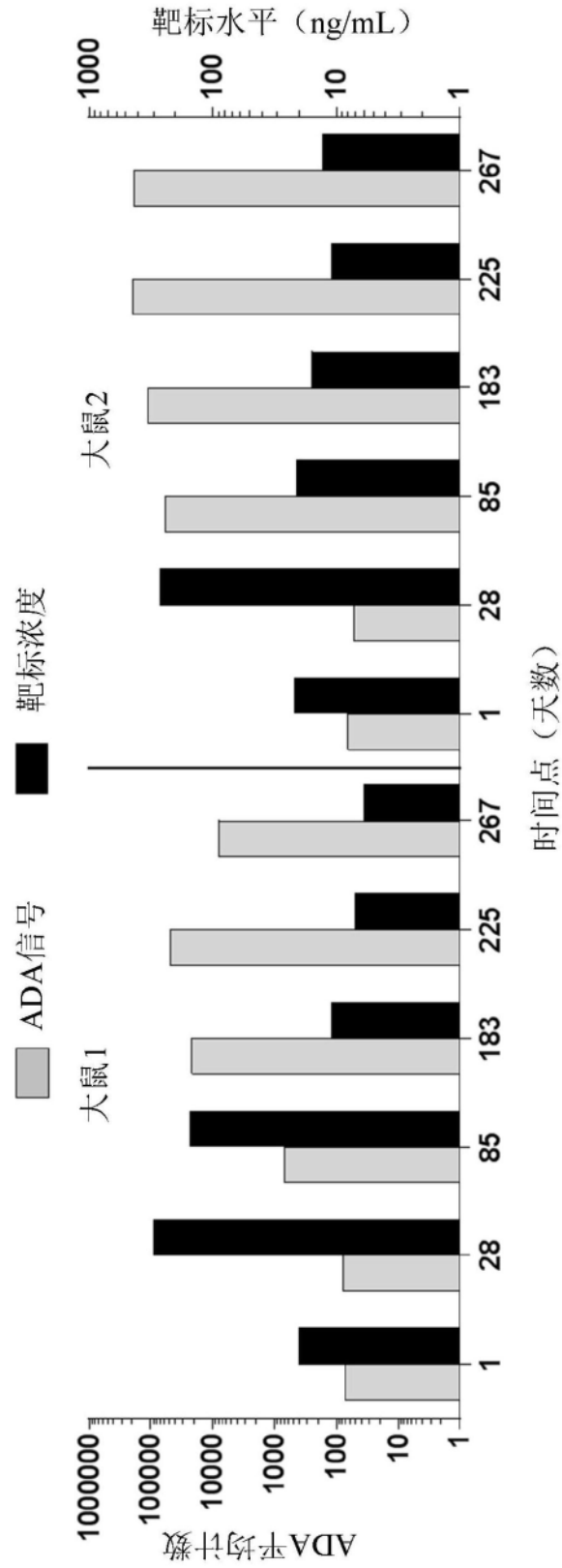
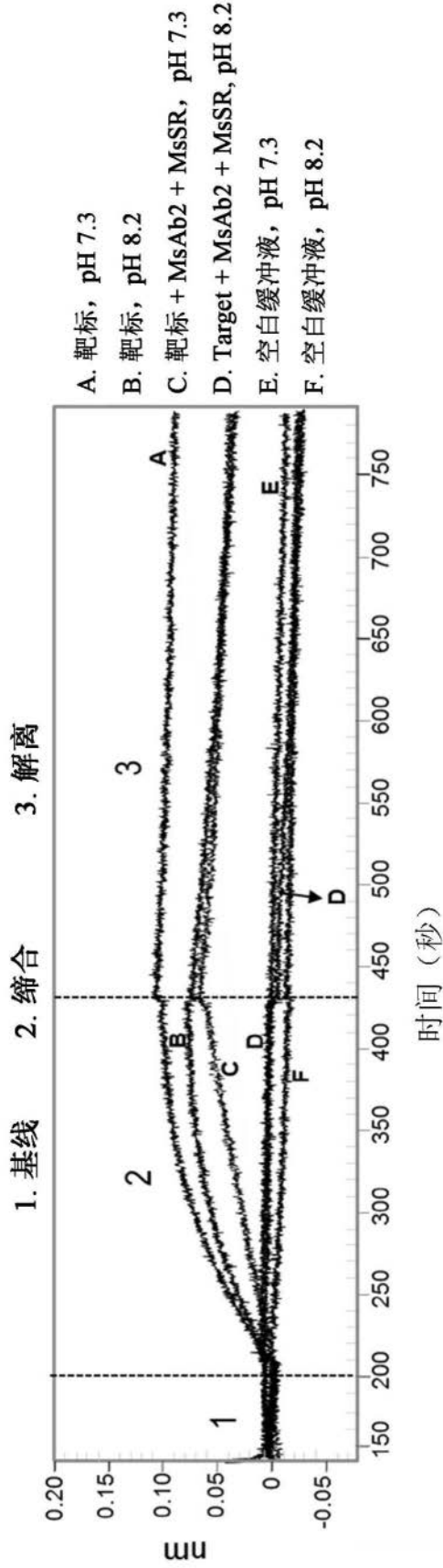


图6

A) 在存在和不存在MsAb2和MsSR的情况下pH对靶标与药物的结合的影响



B) 在不存在或存在MsAb2和MsSR的情况下从临床样品中观察到的pH对ADA信号的影响

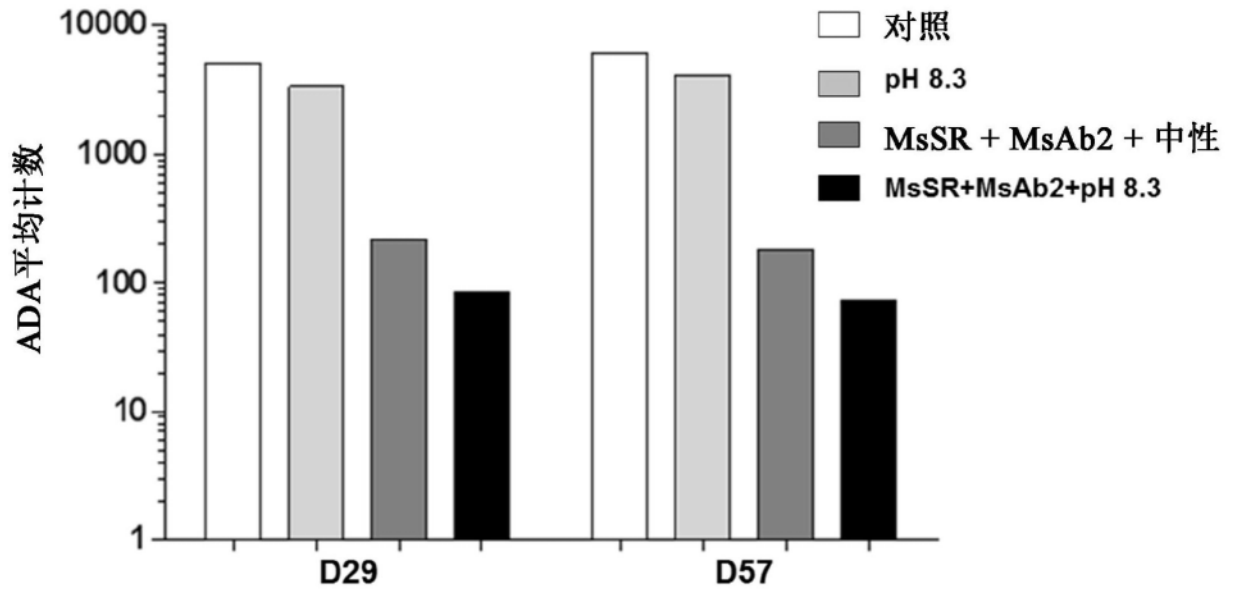


图7