



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103502815 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 23

(21) 申请号 201280018741. 1

(22) 申请日 2012. 02. 16

(30) 优先权数据

61/444, 097 2011. 02. 17 US

61/484, 594 2011. 05. 10 US

61/496, 501 2011. 06. 13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 10. 16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/025437 2012. 02. 16

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2012/154253 EN 2012. 11. 15

(73) 专利权人 雀巢产品技术援助有限公司

地址 瑞士沃韦

(72) 发明人 S·辛格 S·L·王 L·奥尔穆德

S·豪恩施泰因

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 陈迎春 黄革生

(51) Int. Cl.

G01N 33/564(2006. 01)

G01N 33/94(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2009035216 A1, 2009. 02. 05,

US 2006003384 A1, 2006. 01. 05,

CN 102695955 A, 2012. 09. 26,

Aarede L et al. Immunogenicity of anti-tumor necrosis factor antibodies—toward improved methods of anti-antibody measurement. 《Current Opinion in Immunology》. 2008, 第 20 卷 (第 4 期),

Smith et al. Detection of antibodies against therapeutic proteins in the presence of residual therapeutic protein using a solid-phase extraction with acid dissociation (SPEAD) sample treatment prior to ELISA. 《Regulatory Toxicology and Pharmacology》. 2005, 第 304 卷 (第 1-2 期),

审查员 李进进

权利要求书2页 说明书71页 附图40页

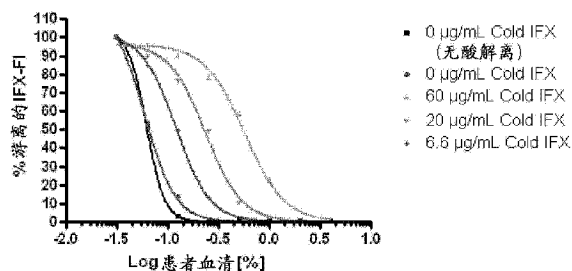
(54) 发明名称

检测针对抗-TNF α 药物的自身抗体的测定法

(57) 摘要

本发明提供了用于在样品中检测和测量针对抗-TNF α 药物治疗的自身抗体的存在和水平的测定法。可以将本发明用于优化治疗和监测正在接受抗-TNF α 药物治疗的患者,以检测针对药物的自身抗体的存在或水平。本发明还提供了用于在正在接受用于治疗 TNF α -介导的疾病或病症的抗-TNF α 药物的受试者中选择治疗、优化治疗和/或降低毒性的方法。

HACA 测定法
在酸解离下的 IFX 干扰



1. 用于检测样品中针对抗-TNF α 药物的自身抗体的存在或水平, 而不会受样品中抗-TNF α 药物干扰的非诊断方法, 所述方法包括:

(a) 将样品与酸接触, 以解离所述自身抗体和所述抗-TNF α 药物预先形成的复合物, 其中所述样品具有或者疑似具有针对所述抗-TNF α 药物的自身抗体;

(b) 解离所述预先形成的复合物后, 将所述样品与标记的抗-TNF α 药物接触;

(c) 中和所述样品中的酸, 以形成所述标记的抗-TNF α 药物和所述自身抗体的标记的复合物;

(d) 将所述标记的复合物进行大小排阻层析, 以分离所述标记的复合物; 和

(e) 检测所述标记的复合物, 从而检测所述自身抗体的存在或水平, 而不受所述样品中所述抗-TNF α 药物的干扰。

2. 权利要求1的非诊断方法, 其中所述抗-TNF α 药物选自英利昔单抗、依他西特、阿达木单抗、培舍珠单抗、戈利木单抗及其组合。

3. 权利要求1的非诊断方法, 其中针对所述抗-TNF α 药物的所述自身抗体选自人抗-嵌合抗体(HACA)、人抗-人源化抗体(HAHA) 和人抗-小鼠抗体(HAMA) 及其组合。

4. 权利要求1的非诊断方法, 其中所述酸包括有机酸、无机酸或其组合。

5. 权利要求4的非诊断方法, 其中有机酸包括柠檬酸。

6. 权利要求1的方法, 其中所述样品与0.1M-5M浓度的酸接触。

7. 权利要求1的非诊断方法, 其中所述酸通过将一种或多种中和剂加入到样品中来中和。

8. 权利要求1的非诊断方法, 其中步骤(b) 还包括将标记的内部对照与所述样品接触。

9. 权利要求1的非诊断方法, 其中所述自身抗体的所述存在或水平在高水平的所述抗-TNF α 药物存在的情况下检测, 其中所述高水平的所述抗-TNF α 药物对应于大于或等于10 μ g/mL 的抗-TNF α 药物水平。

10. 权利要求9的非诊断方法, 其中所述高水平的所述抗-TNF α 药物对应于10至100 μ g/mL 的抗-TNF α 药物水平。

11. 权利要求1的非诊断方法, 其中所述大小排阻层析是大小排阻-高效液相层析(SE-HPLC)。

12. 权利要求1的非诊断方法, 其中所述样品是血清。

13. 权利要求1的非诊断方法, 其中所述样品获自正在接受用所述抗-TNF α 药物的治疗的受试者。

14. 权利要求1的非诊断方法, 其中所述复合物首先洗脱, 然后是游离的标记的抗-TNF α 药物。

15. 权利要求1-14中任一项的非诊断方法, 其中所述抗-TNF α 药物用荧光团或荧光染料标记。

16. 用于检测样品中针对抗-TNF α 药物的自身抗体的存在或水平, 而不会受样品中抗-TNF α 药物干扰的试剂盒的用途, 所述试剂盒用于在正在接受用抗-TNF α 药物的疗程的受试者中, 优化治疗和/或降低抗-TNF α 药物的毒性, 包括:

(a) 在来自所述受试者的样品中检测针对所述抗-TNF α 药物的自身抗体的存在或水平, 而不受样品中所述抗-TNF α 药物的干扰, 该检测包括:

(i) 将所述样品与酸接触,以解离所述自身抗体与所述抗-TNF α 药物预先形成的复合物,其中所述样品具有或者疑似具有针对所述抗-TNF α 药物的自身抗体;

(ii) 解离所述预先形成的复合物后,将所述样品与标记的抗-TNF α 药物接触;

(iii) 中和所述样品中的所述酸,以形成标记的抗-TNF α 药物和所述自身抗体的标记的复合物;

(iv) 将所述标记的复合物进行大小排阻层析,以分离所述标记的复合物;和

(v) 检测所述标记的复合物,从而检测所述自身抗体的存在或水平,而不受所述样品中所述抗-TNF α 药物的干扰;和

(b) 基于所述自身抗体的存在或水平,测定用于所述受试者的所述疗程的后续剂量或者确定是否应当将不同的疗程施用给受试者,

从而优化治疗和/或降低针对所述抗-TNF α 药物的毒性。

17. 权利要求 16 的用途,其中所述试剂盒包含一种或多种以下组分:酸或酸的混合物、标记的抗-TNF α 药物、标记的内部对照、中和剂或其混合物、用于检测的工具、大小排阻-高效液相层析设备和/或使用试剂盒的说明。

18. 权利要求 17 的用途,其中所述标记的抗-TNF α 药物是标记的抗-TNF α 抗体,所述用于检测的工具是荧光检测器。

19. 权利要求 16 的用途,其中所述抗-TNF α 药物选自英利昔单抗、依他西特、阿达木单抗、培舍珠单抗、戈利木单抗及其组合。

20. 权利要求 16 的用途,其中针对所述抗-TNF α 药物的所述自身抗体选自人抗-嵌合抗体(HACA)、人抗-人源化抗体(HAHA)和人抗-小鼠抗体(HAMA)及其组合。

21. 权利要求 16 的用途,其中基于所述自身抗体的存在或水平,增加、减少或维持所述疗程的所述后续剂量。

22. 权利要求 21 的用途,其中当所述样品中检测到高水平的所述自身抗体时,减少所述疗程的所述后续剂量。

23. 权利要求 16 的用途,其中所述不同的疗程包括不同的抗-TNF α 药物。

24. 权利要求 16 的用途,其中所述不同的疗程包括所述疗程以及免疫抑制剂。

25. 权利要求 16 的用途,其中所述不同的疗程包括转变成非抗-TNF α 药物的疗程。

26. 权利要求 23-25 中任一项的用途,其中当所述样品中检测到高水平的所述自身抗体时,施用所述不同的疗程。

27. 权利要求 16 的用途,其中所述酸包括有机酸、无机酸或其组合。

28. 权利要求 16 的用途,其中所述自身抗体的存在或水平在高水平的所述抗-TNF α 药物存在的情况检测。

29. 权利要求 16 的用途,其中所述大小排阻层析是大小排阻-高效液相层析(SE-HPLC)。

30. 权利要求 16-25、27-29 中任一项的用途,其中所述样品是血清。

检测针对抗-TNF α 药物的自身抗体的测定法

[0001] 相关申请的交互引用

[0002] 本申请要求 2011 年 2 月 17 日提交的美国临时申请号 61/444,097、2011 年 5 月 10 日提交的美国临时申请号 61/484,594 和 2011 年 6 月 13 日提交的美国临时申请号 61/496,501 的优先权,所述申请的公开在此处为了各种目的以其整体引入作为参考。

[0003] 发明背景

[0004] 自身免疫疾病是重要的且普遍的医学问题。例如,在美国,类风湿性关节炎(RA)是影响两百万以上人群的自身免疫疾病。RA 引起关节的慢性炎症,并通常是渐进性疾病,其可能造成关节破坏和功能性病废。尽管遗传素质、感染物和环境因素都涉及该疾病的病因学,但类风湿性关节炎的原因仍是未知的。在活性 RA 中,症状包括疲乏、缺乏食欲、低热、肌肉和关节疼痛以及僵硬。并且,在疾病突然发作期间,由于滑膜的炎症,关节通常变成红色、肿胀、疼痛和敏感。此外,由于 RA 是全身疾病,炎症可能会影响关节外的其他器官和身体部位,包括眼和口的腺体、肺内壁、心包膜和血管。

[0005] 处理 RA 和其他自身免疫疾病的常规治疗包括快速作用的“一线药物”和慢速作用的“二线药物”。一线药物降低疼痛和炎症。此类一线药物的实例包括口服给予或直接注射到组织和关节的阿司匹林、萘普生、布洛芬、依托度酸和其他非甾族抗炎药物(NSAID),以及皮质类固醇。二线药物促进疾病缓解和防治渐进性关节破坏,并且也称为修饰疾病的抗风湿性药物或 DMARD。二线药物的实例包括 gold、水基氯喹(Hydrochloroquine)、柳氮磺胺吡啶和免疫抑制剂,如氨甲蝶呤、硫唑嘌呤、环磷酰胺、苯丁酸氮芥和环孢霉素。然而,许多这些药物都具有有害的副作用。因此,已经探寻了类风湿性关节炎和其他自身免疫疾病的其他治疗。

[0006] 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 是由众多细胞类型,包括单核细胞和巨噬细胞产生的细胞因子,其最初基于其能诱导某些小鼠肿瘤坏死的能力而鉴定。随后,一种称为恶液质素的因子(与恶病质相关)显示出与 TNF- α 相同。TNF- α 涉及多种其他人类疾病和病症的病理生理学,包括休克、败血病、感染、自身免疫疾病、RA、克罗恩病、移植排斥和移植物抗宿主病。

[0007] 由于人 TNF- α (hTNF- α) 在多种人类疾病中的有害作用,所以已经设计了治疗策略,以抑制或者抵消 hTNF- α 活性。具体而言,已经探寻了与 hTNF- α 结合并中和其的抗体,作为抑制 hTNF- α 活性的方法。一些最早的此类抗体是小鼠单克隆抗体(mAb),其由制备自用 hTNF- α 免疫的小鼠的淋巴细胞的杂交瘤分泌(参见,例如 Moeller 等人的美国专利号 No. 5,231,024)。尽管这些小鼠抗 hTNF- α 抗体通常对 hTNF- α 表现出高亲和力,并且能中和 hTNF- α 活性,但由于与将小鼠抗体施用给人相关的问题,其体内用途受到了限制,所述问题例如短的血清半衰期、不能引发某些人效应子功能,以及在人中引起针对小鼠抗体的不想要的免疫应答(“人抗小鼠抗体”(HAMA)反应)。

[0008] 最近,已经将生物治疗用于自身免疫疾病如类风湿性关节炎的治疗。例如,FDA 已经批准将 4 种 TNF α 抑制剂:REMICADE™ (英利昔单抗)、嵌合的抗-TNF α mAb、ENBREL™ (依他西特)、TNFR-Ig Fc 融合蛋白质、HUMIRA™ (阿达木单抗)、人抗-TNF α mAb 和 **CIMZIA®**

(培舍珠单抗(certolizumab pegol))、聚乙二醇化 Fab 片段用于治疗类风湿性关节炎。还将 **CIMZIA**[®] 用于治疗中度至重度克罗恩病(CD)。尽管已经显示,此类生物学治疗在治疗类风湿性关节炎和其他自身免疫疾病如 CD 中是成功的,但并非全部经治疗的受试者都应答或者良好应答该治疗。此外,TNF α 抑制剂的施用可能诱导对药物的免疫应答,并导致产生自身抗体如人抗嵌合抗体(HACA)、人抗人源化抗体(HAHA)和人抗小鼠抗体(HAMA)。此类 HACA、HAHA 或 HAMA 免疫应答与超敏反应和免疫治疗性 TNF α 抑制剂的药物动力学和体内分解的急剧改变相关,这阻碍了该药物的进一步治疗。因此,本领域存在在患者样品中检测针对抗-TNF α 生物制品的自身抗体的存在之测定法的需求,以监测 TNF α 抑制剂治疗并指导治疗决定。本发明满足了该需求,并还提供了相关的优点。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明提供了用于在样品中检测和测量针对抗-TNF α 药物治疗的自身抗体的存在和水平的测定法。本发明可以用于优化治疗和监测正在接受抗-TNF α 药物治疗的患者,以检测针对药物的自身抗体(例如, HACA 和 / 或 HAHA) 的存在或水平。本发明还提供了用于在正在接受用于治疗 TNF α - 介导的疾病或病症的抗-TNF α 药物的受试者中选择治疗、优化治疗和 / 或降低毒性的方法。

[0011] 在一个方面,本发明提供了用于在样品中检测针对抗-TNF α 药物的自身抗体的存在或水平,而不会受样品中抗-TNF α 药物干扰的方法,该方法包括:

[0012] (a) 将样品与酸接触,以解离自身抗体和抗-TNF α 药物预先形成的复合物,其中样品具有或者疑似具有针对抗-TNF α 药物的自身抗体;

[0013] (b) 解离预先形成的复合物后,将样品与标记的抗-TNF α 药物接触;

[0014] (c) 中和样品中的酸,以形成标记的抗-TNF α 药物和自身抗体的标记的复合物(即,免疫复合物或缀合物)(即,其中标记的抗-TNF α 药物与抗体不是相互共价连接的);

[0015] (d) 将标记的复合物进行大小排阻层析,以分离标记的复合物(例如,从游离的标记的抗-TNF α 药物中);和

[0016] (e) 检测标记的复合物,从而检测自身抗体的存在或水平,而不受样品中抗-TNF α 药物的干扰。

[0017] 在一些实施方案中,抗-TNF α 药物选自 REMICADE[™] (英利昔单抗)、ENBREL[™] (依他西特)、HUMIRA[™] (阿达木单抗)、**CIMZIA**[®] (培舍珠单抗)、**SIMPONI**[®] (戈利木单抗; CNT0 148) 及其组合。

[0018] 在其他实施方案中,抗-TNF α 药物自身抗体包括但不限于,人抗嵌合抗体(HACA)、人抗人源化抗体(HAHA) 和人抗小鼠抗体(HAMA) 及其组合。

[0019] 在某些备选的实施方案中,同时进行步骤 (a) 和 (b),例如,同时将样品与酸和标记的抗-TNF α 药物接触。在某些其他的备选实施方案中,在步骤 (a) 之前进行步骤 (b),例如,首先与标记的抗-TNF α 药物接触,并然后与酸接触。在其他实施方案中,同时进行步骤 (b) 和 (c),例如同时将样品与标记的抗-TNF α 药物接触和中和(例如,同时将样品与一种或多种中和剂接触)。

[0020] 在具体的实施方案中,将样品与一定量的酸接触,所述一定量的酸足以解离自身抗体和抗-TNF α 药物预先形成的复合物,以使标记的抗-TNF α 药物、未标记的抗-TNF α

药物和针对抗-TNF α 药物的自身抗体可以平衡,并在其间形成复合物。

[0021] 在另一方面,本发明提供了用于在接受了采用抗-TNF α 药物的疗程的受试者中优化治疗和/或降低抗-TNF α 药物的毒性的方法,该方法包括:

[0022] (a) 在来自受试者的样品中检测针对抗-TNF α 药物的自身抗体的存在或水平,而不受样品中抗-TNF α 药物的干扰,该方法包括:

[0023] (i) 将样品与酸接触,以解离自身抗体和抗-TNF α 药物预先形成的复合物,其中样品具有或者疑似具有针对抗-TNF α 药物的自身抗体;

[0024] (ii) 解离预先形成的复合物后,将样品与标记的抗-TNF α 药物接触;

[0025] (iii) 中和样品中的酸,以形成标记的抗-TNF α 药物和自身抗体的标记的复合物(即,免疫复合物或缀合物)(即,其中标记的抗-TNF α 药物与自身抗体不是相互共价连接的);

[0026] (iv) 将标记的复合物进行大小排阻层析,以分离标记的复合物(例如,从游离的标记的抗-TNF α 药物中);和

[0027] (v) 检测标记的复合物(例如,从而检测自身抗体的存在或水平,而不受样品中抗-TNF α 药物的干扰);和

[0028] (b) 基于自身抗体的存在或水平确定用于受试者的疗程的后续剂量,或者确定是否应当将不同的疗程施用给受试者,

[0029] 从而优化治疗和/或降低抗-TNF α 药物的毒性。

[0030] 用于检测抗-TNF α 药物和抗药物抗体的方法还描述于 PCT 公开号 WO 2011/056590 中,所述公开的内容出于全部目的在此处以其整体引入作为参考。

[0031] 在其他方面,本发明提供了选择疗程(例如,选择合适的抗-TNF α 药物)的方法,用于在受试者中治疗 TNF α 介导的疾病或病症,该方法包括:

[0032] (a) 分析获自受试者的样品,以测定样品中一种或多种标志物的存在、水平或基因型;

[0033] (b) 将统计学算法应用于在步骤(a)中测定的一种或多种标志物的存在、水平或基因型,以产生疾病活性/严重程度指数;和

[0034] (c) 基于疾病活性/严重程度指数,给受试者选择合适的疗程(例如,抗-TNF α 治疗)。

[0035] 在相关方面,本发明提供了在接受了用于治疗 TNF α 介导的疾病或病症的疗程的受试者中优化治疗和/或降低毒性的方法,该方法包括:

[0036] (a) 分析获自受试者的样品,以测定样品中一种或多种标志物的存在、水平或基因型;

[0037] (b) 将统计学算法应用于在步骤(a)中测定的一种或多种标志物的存在、水平或基因型,以产生疾病活性/严重程度指数;和

[0038] (c) 基于疾病活性/严重程度指数,确定用于受试者的疗程的后续剂量或者确定是否应当将不同的疗程施用给受试者。

[0039] 在具体的实施方案中,本发明方法包括检测、测量或测定一个或多个以下种类的生物标志物中一个或多个特定标志物的存在、水平(浓度(例如,总浓度)和/或活性(例如,磷酸化))或基因型:

- [0040] (1) 炎症标志物
[0041] (2) 生长因子
[0042] (3) 血清学(例如,免疫标志物)
[0043] (4) 细胞因子和趋化因子
[0044] (5) 氧化应激的标志物
[0045] (6) 细胞表面受体(例如, CD64 等)
[0046] (7) 信号通路
[0047] (8) 其他标志物(例如,遗传标志物如炎症通路基因)。

[0048] 在其他实施方案中,还可以在患者样品(例如,来自抗-TNF 药物治疗的患者的血清样品)中检测、测量或测定一种或两种以下标志物的存在和 / 或水平:(9) 抗-TNF 药物水平(例如,游离的抗-TNF α 治疗抗体的水平);和 / 或 (10) 抗-药物抗体(ADA)水平(例如,针对抗-TNF 药物的自身抗体的水平)。

[0049] 在具体的实施方案中,可以将单一的统计学算法或者两种或两种以上统计学算法的组合应用于在样品中检测、测量或测定的标志物的存在、浓度水平、活化水平或基因型,从而产生疾病活性 / 严重程度指数。

[0050] 在某些实例中,样品是使用本领域已知的技术,通过分离 PBMC 和 / 或 PMN 细胞获得的。在其他实施方案中,样品是例如来自炎症位点的活检组织,如胃肠道或滑膜组织的一部分。

[0051] 因此,在一些方面,本发明方法提供了可用于指导正在接受或者将要接受抗-TNF α 药物治疗的患者的治疗决定之信息的方法,例如通过为初始治疗选择合适的抗-TNF α 治疗、通过测定何时或者如何调整或修改(例如,增加或减少)抗-TNF α 药物的后续剂量、通过测定何时或者如何将抗-TNF α 药物(例如,以最初的、增加的、减少的或者相同的剂量)与一种或多种免疫抑制剂如氨甲蝶呤(MTX)和 / 或硫唑嘌呤(AZA)组合和 / 或通过测定何时或者如何改变当前的疗程(例如,转变成靶向不同机制的不同抗-TNF α 药物或药物,如抑制 IL-6 受体的单克隆抗体)。

[0052] 对于本领域技术人员而言,从以下详述和附图中,本发明的其他目的、特征和优点是显而易见的。

[0053] 附图简述

[0054] 图 1 显示了本发明测定法的示例性实施方案,其中将大小排阻 HPLC 用于检测 TNF α -Alexa₆₄₇与 HUMIRA™之间的结合。

[0055] 图 2 显示了 HUMIRA™与 TNF α -Alexa₆₄₇结合的剂量应答曲线。

[0056] 图 3 显示了用于测量 HACA 水平的现有的基于 ELISA 的方法(已知为桥连测定法)。

[0057] 图 4 显示了用于测量针对 REMICADE™产生的 HACA/HAHA 的浓度的本发明自身抗体检测测定法的示例性概述。

[0058] 图 5 显示了与 REMICADE™-Alexa₆₄₇结合的抗-人 IgG 抗体的剂量应答分析。

[0059] 图 6 显示了与 REMICADE™-Alexa₆₄₇结合的抗-人 IgG 抗体的第二次剂量应答分析。

[0060] 图 7 显示了与 REMICADE™-Alexa₆₄₇结合的抗-人 IgG 抗体的剂量应答曲线。

[0061] 图 8 显示了正常人血清和 HACA 阳性血清中 REMICADE™-Alexa₆₄₇免疫复合物的形成。

[0062] 图 9 提供了来自使用桥连测定法或本发明迁移率变动分析(mobility shift assay)进行的 20 例患者血清样品的 HACA 测量的总结。

[0063] 图 10 提供了用于测量 HACA 的血清浓度的当前方法与本发明新 HACA 测定法的总结和比较。

[0064] 图 11 显示了用正常(NHS)或 HACA 阳性(HPS)血清孵育荧光团(F1)标记的 IFX 的 SE-HPLC 谱。将增加量的 HACA 阳性血清加入到孵育的混合物中, IFX-F1 峰剂量依赖性移动至更高分子量洗脱位置, C1 和 C2。

[0065] 图 12 显示了如通过迁移率变动分析所测定, 用增加稀释度的 HACA 阳性血清产生的结合的和游离的 IFX-F1 的剂量应答曲线。(A) 用 37.5ng 的 IFX-F1 孵育增加稀释度的 HACA 阳性血清。稀释度越高(HACA 越少), 在 SE-HPLC 分析中发现的游离的 IFX-F1 越多。(B) 用 37.5ng 的 IFX-F1 孵育增加稀释度的 HACA 阳性血清。稀释度越高(HACA 越少), 在 SE-HPLC 分析中发现的结合 HACA 的 IFX-F1 越少。

[0066] 图 13 显示了用正常(NHS)或掺入 IFX (IFX-spiked) 的血清孵育 TNF α -F1 的 SE-HPLC 谱。将增加量的掺入 IFX 的血清加入到孵育混合物中, 荧光 TNF α 峰剂量依赖性移动至更高分子量洗脱位置。

[0067] 图 14 显示了如通过迁移率变动分析所测定, 用增加稀释度的掺入 IFX 的血清产生的结合的和游离的 TNF α 的剂量应答曲线。将增加浓度的 IFX 加入到孵育混合物中减少了游离的 TNF α 的百分比, 但增加了结合的 TNF α 的百分比。

[0068] 图 15 显示了通过迁移率变动分析, 在不同时间点在用 IFX 治疗的 IBD 患者中, 相对 HACA 水平和 IFX 浓度的测量。

[0069] 图 16 显示了在不同时间点, 用 IFX 治疗的 IBD 患者的血清中, HACA 水平和 IFX 浓度的患者处理 - 测量。

[0070] 图 17 显示了检测 (A) 非中和性的或 (B) 中和性自身抗体如 HACA 的存在的本发明测定法的示例性实施方案。

[0071] 图 18 显示了检测中和性自身抗体如 HACA 的存在的本发明测定法的备选实施方案。

[0072] 图 19 显示了在不同量的抗-人 IgG 存在的情况下, 用正常人血清(NHS)孵育 F1-标记的 ADL 的迁移率变动谱。将增加量的抗-人 IgG 加入到孵育混合物中, 游离的 F1-ADL 峰(FA) 剂量依赖性移动至更高分子量洗脱位置, C1 和 C2, 而内部对照(IC) 没有改变。

[0073] 图 20 显示了抗-人 IgG 对游离的 F1-ADL 变动的剂量应答曲线。用 37.5ng 的 F1-ADL 和内部对照孵育增加量的抗-人 IgG。加入到反应混合物中的抗体越多, 游离的 F1-ADL 与内部对照的比率越低。

[0074] 图 21 显示了在不同量的 ADL 存在的情况下, 用正常人血清(NHS)孵育 F1-标记的 TNF- α 的迁移率变动谱。Ex=494nm ;Em=519nm。将增加量的 ADL 加入到孵育混合物中, 游离的 TNF-F1 峰(FT) 剂量依赖性移动至更高分子量洗脱位置, 而内部对照(IC) 峰没有改变。

[0075] 图 22 显示了 ADL 关于游离的 TNF- α -F1 移动的剂量应答曲线。用 100ng 的 TNF- α -F1 和内部对照孵育增加量的 ADL。加入到反应混合物中的抗体 ADL 越多, 游离的 TNF- α -F1 与内部对照的比率越低。

[0076] 图 23 显示了用正常(NHS)或合并的 HACA 阳性患者血清孵育 F1-标记的 Remicade

(IFX) 的迁移率变动谱。

[0077] 图 24 显示了用正常(NHS)或小鼠抗-人 IgG1 抗体孵育 F1- 标记的 HUMIRA (ADL) 的迁移率变动谱。

[0078] 图 25 显示了用正常(NHS)或合并的 HACA 阳性患者血清孵育 F1- 标记的 HUMIRA (ADL) 的迁移率变动谱。

[0079] 图 26 显示了酸解离步骤的作用的说明。“A”表示标记的 -Remicade,“B”表示 HACA,“C”表示 Remicade。

[0080] 图 27 显示了在没有进行酸解离步骤的情况下,作为 Log 患者血清百分比的函数的游离的标记的 - 英利昔单抗的百分比。

[0081] 图 28 显示了在进行酸解离步骤的情况下,作为 Log 患者血清百分比的函数的游离的标记的 - 英利昔单抗的百分比。

[0082] 图 29 显示了作为患者病例 1 的时间的函数的用英利昔单抗治疗的患者中的血清 IFX 水平。

[0083] 图 30 显示了作为患者病例 3 的时间的函数的用英利昔单抗治疗的患者中的血清 IFX 水平。

[0084] 图 31 显示了作为患者病例 3 的时间的函数的用英利昔单抗治疗的患者中的血清 TNF α 水平。

[0085] 图 32 显示了患者病例 1 (A);患者病例 2 (B、C) 和患者病例 4 (D) 的 F1- 标记的 -IFX 的迁移率变动谱。

[0086] 图 33 显示了患者病例 5 (A);患者病例 6 (B、C) 和患者病例 7 (D、E) 的 F1- 标记的 -IFX 的迁移率变动谱。

[0087] 图 34 显示了不同患者血清组的细胞因子水平。

[0088] 图 35 显示了使用具有不同值的增益设定(gain settings)的荧光检测器,通过迁移率变动分析分析含 TNF-Alexa488 和 Remicade 的样品。

[0089] 图 36 显示了在 HPLC 移动相(1X PBS, 含 0.1%BSA 的水)中,获得的正常人血清(上图)和 TNF-Alexa488 (下图)的等吸光(isoabsorbance)图。激发光波长在 Y- 轴上作图,并且发射光波长在 X- 轴上作图。

[0090] 图 37 显示了用指定设定检测的正常人血清(左)和 25ngTNF-Alexa488(右)的 HPLC 分析。来自正常人血清的荧光的背景水平大大降低。

[0091] 图 38 显示了通过 HPLC 分析含固定量的 TNF-Alexa488 的样品和用不同量的 Remicade 滴定产生的标准曲线。

[0092] 图 39 显示了通过迁移率变动分析和 ELISA 在临床样品中进行英利昔单抗测定的比较。深灰点为 HACA 阳性样品,并且浅灰点为 HACA 阴性样品。短划线表示各种方法的定量下限。

[0093] 图 40 显示了通过迁移率变动分析和 ELISA 在临床样品中进行 HACA 测定的比较。

[0094] 图 41 显示了如通过迁移率变动分析和 ELISA 所测定的 HACA 阳性临床样品的累积数。

[0095] 发明详述

[0096] 1. 简介

[0097] 本发明部分基于下述发现：使用大小排阻层析的均相迁移率变动分析(homogeneous mobility shift assay)和能够平衡免疫复合物的酸解离对于测量针对抗-TNF α 药物产生的自身抗体(例如, HACA、HAHA 等)的存在或水平是特别有利的。该自身抗体也已知为抗-药物抗体或 ADA。结果, 可以测量针对给有需要的受试者施用的抗-TNF α 药物的自身抗体的存在或水平, 而基本上不受也在受试者样品中存在的已施用的抗-TNF α 药物的干扰。具体而言, 将受试者的样品与一定量的酸孵育, 所述一定量的酸足以在抗-TNF α 药物存在的情况下提供自身抗体的存在或水平的测量, 而基本上不受高抗-TNF α 药物水平的干扰。

[0098] 样品中高抗-TNF α 药物水平(例如, 高英利昔单抗水平)会干扰抗-药物抗体水平(例如, HACA 水平)的测量。在某些高药物条件下, 样品中存在的抗-药物抗体与也存在于样品中的非标记药物复合。当标记药物(例如标记的英利昔单抗)与样品接触时, 样品中存在的抗-药物抗体会在动力学上捕获(trapped from)并与标记的药物形成复合物。因此, 抗-药物抗体与未标记药物预先形成的复合物会干扰抗-药物抗体的测量, 这取决于存在的抗-药物抗体与标记药物之间复合物的形成。本文中所述的酸解离步骤允许样品中存在的抗-药物抗体与未标记的药物解离, 并与标记的和未标记的药物二者重新形成复合物。通过抗-药物抗体与未标记的药物解离, 样品中存在的抗-药物抗体可以在标记的药物和未标记的药物之间平衡。

[0099] 如图 27 中所示, 当在没有酸解离步骤的情况下进行迁移率改变测定时, 高水平的抗-TNF α 药物(例如, 英利昔单抗)会干扰抗-药物抗体(例如, 针对英利昔单抗或 ATI 的抗体)的检测。然而, 图 28 显示, 允许平衡和重新形成免疫复合物的酸解离, 以及均相液相结合动力学显著增加了抗-TNF α 药物的耐受性, 使得可以在高水平的抗-TNF α 药物(例如, 多达或者至少约 60 μ g/mL)存在的情况下测量抗-药物抗体。同样地, 本发明测定法特别地优于当前可得到的方法, 因为它们能在用抗-TNF α 药物治疗期间的任何时间(例如, 不考虑例如血液样品的样品中抗-TNF α 药物的低、中等或者高水平)检测和测量抗-药物抗体, 从而克服了本领域方法的最大局限, 即需要在药物的波谷浓度收集样品。

[0100] 在某些方面, 本发明是有利的, 因为其通过提供对于指导正在接受或者将要接受抗-TNF α 药物治疗的那些患者的治疗决定有用的信息, 部分地解决并克服了与抗-TNF α 药物(例如英利昔单抗)的施用相关的当前局限。具体而言, 发现可将本发明方法用于为初始治疗选择合适的抗-TNF α 治疗、用于测定何时或者如何调整或修改(例如, 增加或减少)抗-TNF α 药物的后续剂量, 以优化治疗有效性和/或降低毒性、用于测定何时或者如何将抗-TNF α 药物(例如, 以最初的、增加的、减少的或者相同的剂量)与一种或多种免疫抑制剂如氨甲蝶呤(MTX)或硫唑嘌呤(AZA)组合、和/或用于测定何时或者如何改变当前的疗程(例如, 转变成不同抗-TNF α 药物或靶向不同机制的药物)。

[0101] 因此, 通过指导治疗决定, 可将本发明特别地用于改进患者治疗的以下方法:

[0102] 1. 克罗恩病预测: 治疗最可能受益于该治疗的患者

[0103] 2. 抗治疗性抗体检测(ATM)+ 基于生物标记物的疾病活性指数

[0104] 3. ATM 分层

[0105] 4. 具有药物动力学模型的 ATM

[0106] 5. 监测应答以及预测复发的风险:

[0107] a. 避免在具有低复发风险的患者中的慢性维持治疗

[0108] b. 粘膜愈合的标志物

[0109] c. 治疗选择: 是否将抗-TNF 药物治疗与免疫抑制剂如 MTX 或 AZA 组合

[0110] 6. 针对患者选择生物制品。

[0111] II. 定义

[0112] 如本文中所用, 除非特定说明, 以下术语具有其所属的含义。

[0113] 如本文中所用, 术语“抗-TNF α 药物”或“TNF α 抑制剂”意图包括这些药剂, 包含蛋白质、抗体、抗体片段、融合蛋白质 (例如, Ig 融合蛋白质或 Fc 融合蛋白质)、多价结合蛋白质 (例如, DVD Ig)、小分子 TNF α 拮抗剂和类似的天然或非天然存在的分子, 和 / 或其重组和 / 或改造形式, 所述药剂直接或间接抑制 TNF α 活性, 例如通过抑制 TNF α 与 TNF α 的细胞表面受体之间的相互作用、抑制 TNF α 蛋白质产生、抑制 TNF α 基因表达、抑制 TNF α 从细胞中分泌、抑制 TNF α 受体信号或者任何其他导致 TNF α 活性在受试者中降低的方式。术语“抗-TNF α 药物”或“TNF α 抑制剂”优选地包括干扰 TNF α 活性的药剂。抗-TNF α 药物的实例包括但不限于, 英利昔单抗 (REMICADE™, Johnson and Johnson)、人抗-TNF 单克隆抗体阿达木单抗 (D2E7/HUMIRA™, Abbott Laboratories)、依他西特 (ENBREL™, Amgen)、培舍珠单抗 (**CIMZIA**®, UCB, Inc.)、戈利木单抗 (**SIMPONI**®; CNT0 148)、CDP 571 (Celltech)、CDP 870 (Celltech), 以及抑制 TNF α 活性的其他化合物, 使得当施用给罹患或者处于罹患其中 TNF α 活性是有害的疾病 (例如, RA) 的患者时, 可以治疗该疾病。

[0114] 术语“TNF α ”意图包括以 17kDa 分泌形式和 26kDa 膜结合形式存在的人细胞因子, 其生物学活性形式由非共价结合的 17kDa 分子的三聚体组成。TNF α 的结构该描述于, 例如 Jones 等人, Nature, 338:225-228 (1989) 中。术语 TNF α 意图包括人 TNF α 、重组人 TNF α (rhTNF- α) 或与人 TNF α 蛋白质具有至少约 80% 同一性的 TNF α 。人 TNF α 由 35 个氨基酸 (aa) 的胞质结构域、21 个氨基酸的跨膜区段, 以及 177 个氨基酸胞外结构域 (ECD) 组成 (Pennica, D. 等人 (1984) Nature 312:724)。在 ECD 内, 人 TNF α 与恒河猴 TNF α 共有 97% 的氨基酸序列同一性, 并且与牛、犬、棉鼠、马、猫、小鼠、猪和大鼠 TNF α 共有 71%-92% 的氨基酸序列同一性。可以通过标准重组表达方法或商业购买 (R&D Systems, 货号 210-TA, Minneapolis, Minn.) 制备 TNF α 。

[0115] 在某些实施方案中, “TNF α ”是抗原, 其包括能被抗-TNF- α 药物结合的分子或者该分子的一部分。TNF- α 具有一个或一个以上的表位。在某些实例中, TNF- α 以高选择性与抗-TNF α 抗体反应。与抗体、抗-TNF α 抗体的片段和区域结合的优选抗原包含人 TNF α 的至少 5 个氨基酸。在某些实例中, TNF α 是具有足够长度以具有 TNF α 的表位, 其能结合抗-TNF α 抗体、其片段和区域。

[0116] 术语“预测对抗-TNF α 药物的应答性”意图指评估用抗-TNF α 药物治疗受试者是否在受试者中有效 (例如, 给受试者提供可测量的益处) 的可能性的能力。具体而言, 评估治疗是否有效的可能性的该能力在治疗开始后实施, 并且已经在受试者中观察到了有效性的指示剂 (例如, 可测量益处的指示剂)。特别优选的抗-TNF α 药物是 FDA 批准的用于在人类中治疗 TNF α 介导的疾病或病症的生物制剂, 并且包括本文中所述的那些抗-TNF α 药物。

[0117] 术语“大小排阻层析”或“SEC”包括这样的层析方法, 其中基于分子的大小和 / 或流体力学体积, 分离溶液中的分子。将其应用于大分子或大分子复合物 (例如蛋白质及其缀

合物)。通常,当将水溶液用于运输穿过柱子的样品时,该方法已知为凝胶过滤层析。

[0118] 术语“复合物”、“免疫复合物”、“缀合物”和“免疫缀合物”包括但不限于,与抗-TNF α 药物结合的(例如,通过非共价方式)TNF α 、与针对抗-TNF α 药物的自身抗体结合的(例如,通过非共价方式)抗-TNF α 药物,以及与 TNF α 和针对抗-TNF α 药物的自身抗体结合的(例如,通过非共价方式)抗-TNF α 药物。

[0119] 如本文中所用,受术语“标记的”修饰的实体包括与在经验上可检测到的另一分子或化学实体缀合的任何实体、分子、蛋白质、酶、抗体、抗体片段、细胞因子或相关种类。适合作为用于标记实体的标签的化学种类包括但不限于,荧光染料,例如 Alexa **Fluor**[®] 染料如 Alexa **Fluor**[®] 647、量子点(quantum dot)、光学染料、发光染料和放射性核素如 ¹²⁵I。

[0120] 术语“有效量”包括能在有需要的受试者中实现治疗作用的药物的剂量,以及药物的生物可利用量。术语“生物可利用的”包括治疗活性可利用的药物的施用剂量部分。例如,用于治疗病理生理学中涉及 TNF- α 的疾病和病症的药物的有效量可以是能预防或缓解一种或多种与其相关的症状的量。

[0121] 短语“荧光标记检测”包括检测荧光标记的工具。用于检测的工具包括但不限于,分光光度计、荧光光度计、光度计和通常与层析设备,例如但不限于大小排阻-高效液相层析(例如但不限于 Agilent-1200HPLC 系统)结合的检测装置。

[0122] 短语“优化的治疗”包括优化特定治疗的剂量(例如,有效量或水平)和/或类型。例如,优化抗-TNF α 药物的剂量包括增加或减少的随后施用给受试者的抗-TNF α 药物的量。在某些实例中,优化的抗-TNF α 药物的类型包括将施用的抗-TNF α 药物从一种药物转变成不同的药物(例如,不同的抗-TNF α 药物)。在其他实例中,优化的治疗包括将一定剂量的抗-TNF α 药物(例如,以增加的、减少的或者与以前的剂量相同的剂量)与免疫抑制剂药物组合共同施用。

[0123] 术语“共同施用”包括施用一种以上的活性剂,以使一种活性剂的生理作用的持续时间与第二种活性剂的生理作用重叠。

[0124] 术语“受试者”、“患者”或“个体”通常指人类,但也指其他动物,包括例如,其他灵长类动物、啮齿类动物、犬、猫、马、绵羊、猪等。

[0125] 术语“疗程”包括用于缓解或预防与 TNF α 介导的疾病或病症相关的一种或多种症状的治疗方法。该术语包括施用用于改善患 TNF α 介导的疾病或病症的个体之健康的任何化合物、药物、方法和/或方案,并包括本文中所述的任意治疗剂。本领域技术人员应当理解,使用本发明方法,基于 TNF α 、抗-TNF α 药物和/或抗-药物抗体的存在或浓度水平,可以改变(例如,增加或减少)疗程或者当前疗程的剂量。

[0126] 术语“免疫抑制药物”或“免疫抑制剂”包括能产生免疫抑制作用(例如防止或减少免疫应答)的任何物质,例如通过辐射或者通过使用药物,如抗代谢物、抗淋巴细胞血清、抗体等。免疫抑制药物的实例包括但不限于,巯基嘌呤药物如硫唑嘌呤(AZA)及其代谢物;抗代谢物如氨甲蝶呤(MTX);西罗莫司(纳巴霉素);坦西莫司;依维莫司;他克莫司(FK-506);FK-778;抗-淋巴细胞球蛋白抗体、抗-胸腺细胞球蛋白抗体、抗-CD3 抗体、抗-CD4 抗体和抗体-毒素缀合物;环孢菌素;麦考酚酯(mycophenolate);咪唑立宾单磷酸盐(mizoribine monophosphate);蒿属香豆素;格拉默醋酸盐(glatiramer acetate);其代谢物;其可药物

盐 ; 其衍生物 ; 其前体药物 ; 及其组合。

[0127] 术语“巯基嘌呤药物”包括硫唑嘌呤(AZA)、6- 巯基嘌呤(6-MP) 或者具有治疗作用的其任意代谢物, 并且包括但不限于, 6- 硫鸟嘌呤(6-TG)、6- 甲基巯基嘌呤核苷、6- 硫代肌苷核苷酸(例如, 6- 硫代肌苷单磷酸盐(thioinosine monophosphate)、6- 硫代肌苷二磷酸盐(6-thioinosine diphosphate)、6- 硫代肌苷三磷酸盐(6-thioinosine triphosphate))、6- 硫鸟嘌呤核苷酸(例如, 6- 硫鸟嘌呤单磷酸盐、6- 硫鸟嘌呤二磷酸盐、6- 硫鸟嘌呤三磷酸盐)、6- 硫黄苷(thioxanthosine) 核苷酸(例如, 6- 硫黄苷单磷酸盐、6- 硫黄苷二磷酸盐、6- 硫黄苷三磷酸盐), 其衍生物、其类似物及其组合。

[0128] 术语“样品”包括获自个体的任何生物样本。样品包括但不限于, 全血、血浆、血清、红细胞、白血细胞(例如, 外周血单核细胞(PBMC)、多形核(PMV) 细胞)、导管灌洗液、乳头吸出物、淋巴液(例如, 淋巴结弥散性肿瘤细胞)、骨髓吸出物、唾液、尿液、粪便(即, 大便)、痰、支气管灌洗液、泪液、细针吸出物(例如, 通过随机的乳晕细针吸出获取)、任意其他的体液、组织样品如炎症位点的活检样本(例如, 穿刺活检样本)、其细胞提取物, 以及来源于一种或多种这些体液或组织的免疫球蛋白富集组分。在一些实施方案中, 样品是全血、其分级组分, 如血浆、血清或细胞沉淀, 或者其免疫球蛋白富集组分。本领域技术人员应当理解, 可以在分析前稀释样品, 如血清样品。在某些实施方案中, 使用本领域已知的任何技术, 可以通过分离 PBMC 和 / 或 PMN 细胞获得样品。在某些其他实施方案中, 样品是例如来自炎症位点(如胃肠道或滑膜组织的一部分) 的组织活检样本。

[0129] 本发明方法的步骤不需要必须以它们所显示的特定顺序进行。本领域技术人员应当理解, 本发明方法的步骤的其他顺序包括在本发明范围内。

[0130] 括号, “[]”表示括号内种类以其浓度提及。

[0131] III. 实施方案的描述

[0132] 本发明提供了用于检测和测量样品中针对抗 -TNF α 药物的自身抗体的存在或水平的测定法。本发明可以用于优化治疗和监测正在抗 -TNF α 药物治疗的患者, 以检测针对药物的自身抗体(例如, HACA 和 / 或 HAHA) 的存在或水平。本发明还提供了用于在正在接受用于治疗 TNF α - 介导的疾病或病症的抗 -TNF α 药物的受试者中选择治疗、优化治疗和 / 或降低毒性的方法。

[0133] 在一个方面, 本发明提供了用于在样品中检测针对抗 -TNF α 药物的自身抗体的存在或水平, 而不会受样品中抗 -TNF α 药物干扰的方法, 该方法包括:

[0134] (a) 将样品与酸接触, 以解离自身抗体和抗 -TNF α 药物预先形成的复合物, 其中样品具有或者疑似具有针对抗 -TNF α 药物的自身抗体;

[0135] (b) 解离预先形成的复合物后, 将样品与标记的抗 -TNF α 药物接触;

[0136] (c) 中和样品中的酸, 以形成标记的抗 -TNF α 药物和自身抗体的标记的复合物(即, 免疫复合物或缀合物)(即, 其中标记的抗 -TNF α 药物与自身抗体相互不是共价连接的);

[0137] (d) 将标记的复合物进行大小排阻层析, 以分离标记的复合物(例如, 从游离的标记的抗 -TNF α 药物中); 和

[0138] (e) 检测标记的复合物, 从而检测自身抗体的存在或水平, 而不受样品中抗 -TNF α 药物的干扰。

[0139] 不被任何特定的理论所束缚,认为酸解离改变了自身抗体(也称为抗-药物抗体或 ADA)与抗-TNF α 药物之间的 K_d 。具体而言,在理论上,酸解离破坏了 ADA 与抗-TNF α 药物之间的键。这些键包括但不限于,氢键、静电键、范德华力和 / 或疏水键。酸的添加增加了 pH,并因此增加了氢离子浓度。氢离子现在可以与以前提及的非共价相互作用竞争。这种竞争降低了 ADA 与抗-TNF α 药物之间的 K_d 。

[0140] 在一些实施方案中,抗-TNF α 药物选自 REMICADE™(英利昔单抗),ENBREL™(依他西特),HUMIRA™(阿达木单抗),**CIMZIA**®(培舍珠单抗),**SIMPONI**®(戈利木单抗;CNT0 148)及其组合。

[0141] 在其他实施方案中,抗-TNF α 药物自身抗体包括但不限于,人抗-嵌合抗体(HACA)、人抗-人源化抗体(HAHA)、和人抗-小鼠抗体(HAMA)及其组合。

[0142] 在某些备选的实施方案中,同时进行步骤(a)和(b),例如同时将样品与酸和标记的抗-TNF α 药物接触。在某些其他的备选实施方案中,在步骤(a)之前进行步骤(b),例如,首先将样品与标记的抗-TNF α 药物接触,并随后与酸接触。在其他实施方案中,同时进行步骤(b)和(c),例如,同时将样品与标记的抗-TNF α 药物接触并中和(例如,通过将样品与一种或多种中和剂接触)。

[0143] 在具体的实施方案中,将样品与一定量的酸接触,所述一定量的酸足以解离自身抗体与抗-TNF α 药物预先形成的复合物,使得标记的抗-TNF α 药物、未标记的抗-TNF α 药物和针对抗-TNF α 药物的自身抗体可以平衡,并在其间形成复合物。

[0144] 在优选的实施方案中,本发明方法包括检测自身抗体的存在或水平,而基本不会受也存在于样品中的抗-TNF α 药物的干扰。在此类实施方案中,样品可以与一定量的酸接触,所述一定量的酸足以允许在高水平的抗-TNF α 药物存在的情况下检测和 / 或测量自身抗体。

[0145] 在一些实施方案中,短语“高水平的抗-TNF α 药物”包括约 10-约 100 $\mu\text{g/mL}$ 、约 20-约 80 $\mu\text{g/mL}$ 、约 30-约 70 $\mu\text{g/mL}$ 或约 40-约 80 $\mu\text{g/mL}$ 的药物水平。在其他实施方案中,短语“高水平的抗-TNF α 药物”包括大于或等于约 10、20、30、40、50、60、70、80、90 或 100 $\mu\text{g/mL}$ 的药物水平。

[0146] 在一些实施方案中,酸包括有机酸。在其他实施方案中,酸包括无机酸。在其他实施方案中,酸包括有机酸和无机酸的混合物。有机酸的非限制性实例包括柠檬酸、异柠檬酸、谷氨酸、乙酸、乳酸、甲酸、草酸、尿酸、三氟乙酸、苯磺酸、氨基甲磺酸、樟脑磺酸(camphor-10-sulfonic acid)、氯乙酸、溴乙酸、碘乙酸、丙酸、丁酸、甘油酸、丁二酸、苹果酸、天冬氨酸及其组合。无机酸的非限制性实例包括盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、硼酸、氢氟酸、氢溴酸及其组合。

[0147] 在某些实施方案中,一定量的酸相当于约 0.01M-约 10M、约 0.1M-约 5M、约 0.1M-约 2M、约 0.2M-约 1M 或约 0.25M-约 0.75M 的酸或酸混合物的浓度。在其他实施方案中,一定量的酸相当于大于或等于约 0.01M、0.05M、0.1M、0.2M、0.3M、0.4M、0.5M、0.6M、0.7M、0.8M、0.9M、1M、2M、3M、4M、5M、6M、7M、8M、9M 或 10M 的酸或酸混合物的浓度。酸的 pH 可以例如为,约 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 或 6.5。

[0148] 在一些实施方案中,将样品与酸接触一定量的时间,所述一定量的时间足以解离自身抗体与抗-TNF α 药物预先形成的复合物。在某些实例中,将样品与酸接触(例如,孵

育) 约 0.1 小时 - 约 24 小时、约 0.2 小时 - 约 16 小时、约 0.5 小时 - 约 10 小时、约 0.5 小时 - 约 5 小时或约 0.5 小时 - 约 2 小时。在其他实例中, 将样品与酸接触(例如, 孵育) 大于或等于约 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、7、8、9 或 10 小时。在 4℃、室温或者在 37℃, 将样品与酸接触。

[0149] 在某些实施方案中, 中和酸的步骤包括升高样品的 pH, 以允许标记的抗-TNF α 药物与针对抗-TNF α 药物的自身抗体之间的复合物, 以及未标记的抗-TNF α 药物与自身抗体之间的复合物形成。在一些实施方案中, 通过加入一种或多种中和剂, 例如如强碱、弱碱、缓冲溶液及其组合来中和酸。本领域技术人员应当理解, 中和反应并非必须意为得到 7 的 pH。在一些实例中, 酸中和导致样品是碱性的。在其他实例中, 酸中和导致样品是酸性的(但高于添加中和剂之前样品的 pH)。在具体的实施方案中, 中和剂包含缓冲液, 如 pH 为约 7.3 的磷酸盐缓冲盐水(例如, 10×PBS)。

[0150] 在一些实施方案中, 步骤 (b) 还包括将内部对照与样品以及标记的抗-TNF α 药物接触(例如, 在预先形成的复合物解离之前、期间或者之后)。在某些实例中, 内部对照包含标记的内部对照, 例如如 Biocytin-Alexa488。在某些其他实例中, 标记的内部对照的量为每 100 μ L 分析样品约 1ng- 约 25ng、约 5ng- 约 25ng、约 5ng- 约 20ng、约 1ng- 约 20ng、约 1ng- 约 10ng 或约 1ng- 约 5ng。在其他实例中, 标记的内部对照的量为大于或等于每 100 μ L 分析样品约 1ng、5ng、10ng、15ng、20ng 或 25ng 或以上。

[0151] 作为本发明方法的一个非限制性实例, 可以将样品如血清样品(例如, 来自正在接受用抗-TNF α 药物如 Remicade (IFX) 的受试者的血清) 与 0.5M 柠檬酸, pH3.0 室温孵育 1 小时。(未标记的) 抗-TNF α 药物与针对抗-TNF α 药物的自身抗体(例如, 抗-药物抗体如抗-IFX 抗体(ATI)) 之间预先形成的复合物解离后, 可以加入标记的抗-TNF α 药物(例如, IFX-Alexa488) 和内部对照, 并反应混合物和(例如, 立即) 用中和剂如 10×PBS, pH7.3 中和。中和后, 可以室温孵育反应混合物另一小时(例如, 在平板摇床上), 以允许平衡, 以及完成标记的或未标记的抗-TNF α 药物与抗-药物抗体之间免疫复合物的再形成。然后, 过滤样品, 并通过如本文中所述的 SEC-HPLC 分析。

[0152] 在具体的实施方案中, 本发明方法(例如, 包括酸解离, 然后均相液相结合动力学) 显著地增加了 IFX 药物耐受性, 使得可以在多达约 60 μ g/mL 的 IFX 存在的情况下测量 ATI。参见, 实施例 14 和图 27-28。换言之, 本发明方法可以在高水平的抗-TNF α 药物(例如, IFX) 存在的情况下, 检测针对抗-TNF α 药物如 ATI 的自身抗体, 以及针对其他抗-TNF α 药物的自身抗体的存在或水平, 而基本上不受其干扰。

[0153] 在另一方面, 本发明提供了用于在正在接受用抗-TNF α 药物的疗程的受试者中, 优化治疗和 / 或降低抗-TNF α 药物的毒性的方法, 该方法包括:

[0154] (a) 在来自受试者的样品中检测针对抗-TNF α 药物的自身抗体的存在或水平, 而不受样品中抗-TNF α 药物的干扰, 该方法包括:

[0155] (i) 将样品与酸接触, 以解离自身抗体和抗-TNF α 药物预先形成的复合物, 其中样品具有或者疑似具有针对抗-TNF α 药物的自身抗体;

[0156] (ii) 解离预先形成的复合物后, 将样品与标记的抗-TNF α 药物接触;

[0157] (iii) 中和样品中的酸, 以形成标记的抗-TNF α 药物和自身抗体的标记的复合物(即, 免疫复合物或缀合物)(即, 其中标记的抗-TNF α 药物与自身抗体不是相互共价连接

的)；

[0158] (iv) 将标记的复合物进行大小排阻层析，以分离标记的复合物(例如，从无标记的抗-TNF α 药物中)；和

[0159] (v) 检测标记的复合物(例如，从而检测自身抗体的存在或水平，而不受样品中抗-TNF α 药物的干扰)；和

[0160] (b) 基于自身抗体的存在或水平，确定用于受试者的疗程的后续剂量或者确定是否应当将不同的疗程施用给受试者，

[0161] 从而优化治疗和 / 或降低抗-TNF α 药物的毒性。

[0162] 在某些实施方案中，基于自身抗体的存在或水平，增加、减少或维持疗程的后续剂量。作为非限制性实例，当在样品中检测到高水平的自身抗体时，减少疗程的后续剂量。在其他实施方案中，不同的疗程包含不同的抗-TNF α 药物、与免疫抑制剂一起的当前疗程或者转变成非抗-TNF α 药物(例如，不连续的使用抗-TNF α 治疗抗体)的疗程。作为非限制性实例，当在样品中检测到高水平的自身抗体时，施用不同的疗程。

[0163] 在某些备选的实施方案中，同时进行步骤(i)和(ii)，例如同时将样品与酸和标记的抗-TNF α 药物接触。在某些其他备选的实施方案中，在步骤(i)之前进行步骤(ii)，例如，首先将样品与标记的抗-TNF α 药物接触，并随后与酸接触。在其他实施方案中，同时进行步骤(ii)和(iii)，例如，同时将样品与标记的抗-TNF α 药物接触，并中和(例如，通过将样品与一种或多种中和剂接触)。

[0164] 可以用任意的多种可检测基团(group)标记抗-TNF α 药物。在优选的实施方案中，用荧光团或荧光染料标记抗-TNF α 药物。荧光团或荧光染料的非限制性实例包括那些在 Molecular Probes Catalogue 中所列出的荧光团或荧光染料，所述文献在此处引入作为参考(参见，R. Haugland, The Handbook-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 第10版, Molecular probes, Inc. (2005))。此类示例性荧光团或荧光染料包括但不限于，Alexa **Fluor**[®] 染料如 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、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 和 / 或 Alexa **Fluor**[®] 790，并且其他荧光团包括但不限于，丹磺酰氯(DNS-Cl)、5-(碘乙酰胺)荧光素(fluorescein) (5-IAF)、荧光素 5-异硫氰酸盐 9 (FITC)、四甲基若丹明 5-(和 6-) 异硫氰酸盐(TRITC)、6-丙烯酰基-2-甲氨基萘(acrylodan)、7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑 4-基氯(NBD-Cl)、溴化乙锭、荧光黄、5-羧基罗丹明 6G 氢氯化物、丽丝胺若丹明 B 磺酰氯、Texas Red[™]磺酰氯、BODIPY[™]、萘胺磺酸(naphthalamine sulfonic acid)(例如，1-苯胺基萘-8-磺酸(ANS)、6-(p-甲苯胺基)萘-e-2-磺酸(6-(p-toluidinyl)naphthalen-e-2-sulfonic acid, TNS)等)、蒽脂肪酸(Anthroyl fatty acid)、DPH、十八碳四烯酸、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、苾基-磷脂酰胆碱、苾基-磷脂酰胆碱(Fluorenyl-phosphotidylcholine)、部花青 540, 1-(3-磺酸根丙基)-4-[β -[2[(二正丁氨基)-6萘基]乙烯基]吡啶内铵盐(Merocyanine 540, 1-(3-sulfonatopropyl)-4-[β -[2[(di-n-butylamino)-6naphthyl[vinyl]pyridinium betaine)](Naphthyl Styryl)、3, 3'-二丙基噻二羧花青(diS-C3-(5))、4-(p-二戊氨苯乙烯基)-1-甲基吡啶(di-5-ASP)、Cy-3 碘代乙酰胺(Iodo Acetamide)、Cy-5-N-羟琥珀酰亚胺、Cy-7-异硫氰酸盐、罗丹明 800、IR-125、噻唑橙、Azure B、Nile Blue、Al 酞菁、Oxaxinel、4', 6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)、Hoechst33342、TOTO、吖啶橙、乙锭二聚体(Ethidium Homodimer)、N(乙氧基羰甲基)-6-甲氧基喹啉鎓(MQAE)、Fura-2、Calcium Green、Carboxy SNARF-6、BAPTA、香豆素、phytofluors、晕苯、金属-配体复合物、**IRDye**[®] 700DX、**IRDye**[®] 700、**IRDye**[®] 800RS、**IRDye**[®] 800CW、**IRDye**[®] 800、Cy5、Cy5.5、Cy7、DY676、DY680、DY682、DY780 及其混合物。其他合适的荧光团包括, 酶-辅因子; 镧系元素; 绿色荧光蛋白质、黄色荧光蛋白质、红色荧光蛋白质或其突变体或衍生物。在本发明的一个实施方案中, 特异性结合对的第二个成员具有与其连接的可检测基团。

[0165] 通常, 荧光基团选自包含聚甲炔、phthalocyanines、菁、咕吨、苾、罗丹明、香豆素、荧光素和 BODIPY[™] 的染料。

[0166] 在一个实施方案中, 荧光基团是在约 650-约 900nm 之间发射的近红外(NIR)荧光团。近红外荧光技术的使用在生物学测定中是有利的, 因为其基本上消除或者降低了来自生物底物的自身荧光的背景。近红外荧光技术的另一益处是极大地降低了来自激发源的散射光, 因为散射强度与波长四次方成反比。低背景荧光和低散射导致了高信噪比, 这对于高敏感性检测是必要的。此外, 在生物学组织中近红外区(650nm-900nm)的光学透明窗使得 NIR 荧光成为了体内成像和亚细胞检测的有价值技术, 所述体内成像和亚细胞检测需要光穿过生物组分传播。在该实施方案的方面内, 荧光基团优选地选自 **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 和 DY780。在某些实施方案中, 近红外基团为 **IRDye**[®] 800CW、**IRDye**[®] 800、**IRDye**[®] 700DX、**IRDye**[®] 700 或 Dynamic DY676。

[0167] 使用荧光团的化学活性衍生物, 可以实现荧光标记。常见的活性基团包括胺基活性异硫氰酸盐衍生物如 FITC 和 TRITC (荧光素和罗丹明的衍生物)、胺基活性琥珀酰亚胺基酯如 NHS-荧光素, 以及巯基活性马来酰亚胺活性荧光体如荧光素-5-马来酰亚胺, 其中许多都是市售的。任何这些活性染料与抗-TNF α 药物的反应都会导致在荧光团和抗-TNF α 药物之间形成稳定的共价键。

[0168] 在某些实例中, 荧光标记反应后, 通常需要从标记的靶分子中去除任何没有反应的荧光团。这通常通过大小排阻层析, 利用荧光团与标记蛋白质之间的大小差异实现。

[0169] 可以从许多来源得到活性荧光染料。它们可以使用用于与靶分子内多个功能基团连接的不同活性基团获得。它们还可以在含有实施标记反应的全部组分的标记试剂盒中得

到。在一个优选的方面,使用的 Alexa **Fluor**[®] 647C2 马来酰亚胺来自 Invitrogen (货号 A-20347)。

[0170] 可以直接地或间接地检测抗-药物抗体(ADA)与抗-TNF α 药物的特异性免疫结合。直接标记包括与抗体连接的荧光标签或发光标签、金属、染料、放射性核素等。在某些实例中,可以将用碘-125(¹²⁵I)标记的抗-TNF α 药物用于测定样品中 ADA 的浓度水平。在其他实例中,使用样品中对 ADA 特异的化学发光抗-TNF α 药物的化学发光测定法适合于 ADA 浓度水平的敏感性、非放射性检测。在具体的实例中,用荧光色素标记的抗-TNF α 药物也适合于样品中 ADA 的浓度水平的测定。荧光色素的实例包括但不限于, Alexa **Fluor**[®] 染料、DAPI、荧光素、Hoechst33258、R-藻青蛋白、B-藻红蛋白、R-藻红蛋白、罗丹明、德克萨斯红和丽丝胺。与荧光色素连接的第二抗体可以商业地获得,例如可获自 Tago Immunologicals (Burlingame, CA) 的山羊 F(ab')₂ 抗-人 IgG-FITC。

[0171] 间接标记包括本领域已知的多种酶,例如辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(AP)、 β -半乳糖苷酶、脲酶等。辣根过氧化物酶检测系统可以例如与显色底物四甲基联苯胺(TMB)一起使用,其在过氧化氢存在的情况下产生了可在 450nm 检测到的可溶性产物。碱性磷酸酶检测系统可以与显色底物磷酸对硝基苯酯一起使用,例如其产生了可容易地在 405nm 检测到的可溶性产物。类似地, β -半乳糖苷酶检测系统可以与显色底物邻硝基苯 β -D-半乳糖苷(ONPG)一起使用,其产生了可在 410nm 检测的可溶性产物。脲酶检测系统可以与底物如尿素-溴甲酚紫(Sigma Immunochemicals ;St. Louis, MO)一起使用。与酶连接的有用的第二抗体可以从许多商业来源获得,例如山羊 F(ab')₂ 抗-人 IgG-碱性磷酸酶可以购自 Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA.)。

[0172] 可以例如使用检测来自显色底物的颜色的分光光度计;检测放射如用于检测 ¹²⁵I 的 γ 计数器的放射线计数器;或者在一定波长的光存在的情况下检测荧光的荧光计,分析来自直接或间接标记的信号。为了检测酶连接的抗体,可以根据厂商说明,使用分光光度计如 EMAX 微板读取器(Molecular Devices ;Menlo Park, CA) 进行 ADA 水平的定量分析。根据需要,可以自动地或者由机器人进行本发明的测定法,并且可以同时检测来自多个样品的信号。

[0173] 在某些实施方案中,使用大小排阻层析。SEC 的根本原理是不同大小的颗粒以不同速率洗脱(过滤)穿过固定相。这导致颗粒的溶液基于大小的分离。条件是同时或者几乎同时上样全部颗粒,相同大小的颗粒一起洗脱。每一大小排阻柱具有可以分离的分子量范围。排阻界限定义了该范围上端的分子量,并且在该界限的那些分子由于太大而不能被捕集在固定相中。渗透界限定义了分离范围的下端,并且在该界限的那些分子由于大小足够小而可以完全渗透进入固定相的孔中,并且低于该分子量的全部分子都如此的小,以致它们洗脱为单一的条带。

[0174] 在某些方面,以恒定的体积或组分收集洗脱物。大小越类似的颗粒,更可能在同一组分中,并且不可能分别检测到。优选地,通过光谱技术检测收集的组分,以测定洗脱的颗粒的浓度。通常,用于本发明的光谱检测技术包括但不限于,荧光测定术、屈光指数(RI)和紫外线(UV)。在某些实例中,洗脱体积大体上与分子流体动力学体积的对数呈线性降低(即,越重的部分最先洗脱)。

[0175] 本发明还提供了用于在样品中检测针对抗-TNF α 药物的自身抗体的存在或水平的试剂盒。在具体的实施方案中,试剂盒包含一种或多种以下组分:酸(或酸的混合物)、标记的抗-TNF α 药物(例如,标记的抗-TNF α 抗体)、标记的内部对照、中和剂(或其混合物)、用于检测的工具(例如,荧光检测器)、大小排阻-高效液相层析(SE-HPLC)设备和/或使用试剂盒的说明。

[0176] 在其他方面,本发明提供了用于在受试者中选择治疗 TNF α -介导的疾病或病症的疗程(例如,选择合适的抗-TNF α 药物)的方法,该方法包括:

[0177] (a) 分析获自受试者的样品,以测定样品中一种或多种标志物的存在、水平或基因型;

[0178] (b) 将统计学算法应用于步骤(a)中测定的一种或多种标志物的存在、水平或基因型,以产生疾病活性/严重程度指数;和

[0179] (c) 基于疾病活性/严重程度指数,给受试者选择合适的疗程(例如,抗-TNF α 治疗)。

[0180] 在相关的方面,本发明提供了在正在接受治疗 TNF α -介导的疾病或病症的疗程的受试者中优化治疗和/或降低毒性的方法,该方法包括:

[0181] (a) 分析获自受试者的样品,以测定样品中一种或多种标志物的存在、水平或基因型;

[0182] (b) 将统计学算法应用于步骤(a)中测定的一种或多种标志物的存在、水平或基因型,以产生疾病活性/严重程度指数;和

[0183] (c) 基于疾病活性/严重程度指数,确定用于受试者的疗程的后续剂量或者确定是否应当将不同的疗程施用给受试者。

[0184] 在一些实施方案中,疗程包括抗-TNF α 抗体。在某些实例中,抗-TNF α 抗体是选自 REMICADE™ (英利昔单抗)、ENBREL™ (依他西特)、HUMIRA™ (阿达木单抗)、**CIMZIA**® (培舍珠单抗)、**SIMPONI**® (戈利木单抗;CNT0148) 及其组合的成员。在其他实施方案中,疗程包括与免疫抑制剂一起的抗-TNF α 抗体。

[0185] 在某些实施方案中,一种或多种标志物的水平包括全部水平、活性水平或其组合。在具体的实例中,一种或多种标志物是选自炎症标志物、生长因子、血清学标志物、细胞因子和/或趋化因子、氧应激的标志物、细胞表面受体、信号通路标志物、遗传标志物、抗-TNF α 抗体、抗-药物抗体(ADA)及其组合的成员。

[0186] 在一些实例中,炎症标志物是选自 CRP、SAA、VCAM、ICAM、钙防卫蛋白、乳铁蛋白、IL-8、Rantes、TNF α 、IL-6、IL-1 β 、S100A12、M2-丙酮酸激酶(PK)、IFN、IL-2、TGF、IL-13、IL-15、IL-12 及其组合的成员。在其他实例中,生长因子是选自 GM-CSF、VEGF、EGF、角化细胞生长因子(KGF;FGF7)及其组合的成员。又在其他实例中,血清学标志物是选自抗-嗜中性白细胞抗体、抗-微生物抗体、抗-酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 抗体及其组合的成员。在其他实例中,细胞因子是选自 TNF α 、IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 、IL-10 及其组合的成员。在其他实例中,细胞表面受体是 CD64。又在其他实例中,信号通路标志物是信号转导分子。在其他实例中,遗传标志物是炎症通路基因中的突变体。

[0187] 在某些实施方案中,步骤(a)包括在样品中测定至少 2 种、3 种、4 种、5 种、6 种、7 种、8 种、9 种、10 种、15 种、20 种、30 种、40 种、50 种或 50 种以上标志物的存在、水平和/或

基因型。在某些实例中,样品选自血清、血浆、全血、粪便、外周血单核细胞(PBMC)、多形核(PMN)细胞和活检组织样本。

[0188] 在其他实施方案中,统计学算法包括学习统计学分类系统(learning statistical classifier system)。在一些实例中,学习统计学分类系统选自随机森林、分类和回归树、提升树、神经网络、支持向量机、一般卡方自动交叉检验模型、相互作用树、multiadaptive regression spline、机器学习分类器及其组合。在某些实例中,统计学算法包括单一的学习统计学分类系统。在某些其他实例中,统计学算法包括至少两种学习统计学分类系统的组合。在一些实例中,串联应用至少两种学习统计学分类系统。适合用于本发明的统计学算法和分析的非限制性实例描述于 2011 年 10 月 18 日提交的国际申请号 PCT/US2011/056777 中,所述申请的公开出于全部目的在此处以其整体引入作为参考。

[0189] 在一些实施方案中,方法还包括将步骤(c)的选择或测定结果发送给临床医师。在其他实施方案中,步骤(c)包括为受试者选择最初的疗程。

[0190] 在其他实施方案中,步骤(b)还包括将统计学算法应用于在疗程期间的较早时间测定的一种或多种标志物的存在、水平或基因型,以产生较早的疾病活性/严重程度指数。在一些实例中,将较早的疾病活性/严重程度指数与步骤(b)中产生的疾病活性/严重程度指数比较,以确定疗程的后续剂量或者确定是否应当施用不同的疗程。在某些实施方案中,基于步骤(b)中产生的疾病活性/严重程度指数,疗程的后续剂量是增加的、减少的或者维持的。在一些实例中,不同的疗程包含不同的抗-TNF α 抗体。在一些实例中,不同的疗程包含与免疫抑制剂一起使用的当前疗程。

[0191] 在本文中和 PCT 申请号 W0 2011/056590 中描述了用于检测抗-TNF α 抗体和抗-药物抗体(ADA)的方法,所述申请的公开在本文中以其整体引入作为参考。在具体的实施方案中,根据本发明方法测定抗-药物抗体的存在和方法,包括在将样品与标记的抗-TNF α 药物接触之前、期间和/或之后,将样品与酸接触的酸解离步骤。

[0192] 在另一方面,本发明提供了用于在受试者中预测 TNF α 介导的疾病或病症的进程的方法,该方法包括:

[0193] (a) 分析获自受试者的样品,以测定样品中一种或多种标志物的存在、水平或基因型;

[0194] (b) 将统计学算法应用于步骤(a)中测定的一种或多种标志物的存在、水平或基因型,以产生疾病活性/严重程度指数,和

[0195] (c) 基于步骤(b)中产生的疾病活性/严重程度指数,预测 TNF α 介导的疾病或病症的进程。

[0196] 在一些实施方案中,步骤(b)还包括将统计学算法应用于在较早时间测定的一种或多种标志物的存在、水平或基因型,以产生较早的疾病活性/严重程度指数。在某些实例中,将较早的疾病活性/严重程度指数与步骤(b)中产生的疾病活性/严重程度指数比较,以预测 TNF α 介导的疾病或病症的进程。

[0197] 一旦根据本文中所述的方法已经测定了正在接受抗-TNF α 药物的受试者的诊断或预后,或者已经在诊断患疾病和病症(其中 TNF α 涉及了生理病理学,例如但不限于,休克、败血症、感染、自身免疫疾病、RA、克罗恩病、移植排斥和移植物抗宿主病)的受试者中预测了针对抗-TNF α 药物的应答的可能性,那么本发明还包括基于诊断、预后或预测,推荐

疗程。在某些实例中,本发明还包括给受试者施用治疗有效量的抗-TNF α 药物,用于治疗与 TNF α -介导的疾病和病症相关的一种或多种症状。对于治疗性应用,可以将抗-TNF α 药物单独施用或者与一种或多种其他抗-TNF α 药物和/或降低与抗-TNF α 药物相关的副作用的一种或多种药物(例如,免疫抑制剂)组合地共同施用。因此,本发明通过指导治疗决定和告知治疗选择,以及优化抗-TNF α 药物,能有利地使临床医师实践“个体化医学”,以使在正确的时间,将正确的药物给予正确的患者。

[0198] IV. 疾病活性/严重程度指数

[0199] 在某些方面,本发明提供了一种或多种(例如,2种、3种、4种、5种、6种、7种或7种以上)生物标志物的基于算法的分析,以改进选定治疗的正确性、优化治疗、降低毒性和/或监测针对抗-TNF α 药物治疗的治疗性治疗的有效性。

[0200] 作为非限制性实例,在一个实施方案中的疾病活性/严重程度指数包括检测、测量或测定一个或多个以下种类的生物标志物中一种或多种特定生物标志物的存在、水平(浓度(例如,总浓度))和/或活性(例如,磷酸化)或基因型:

[0201] (1) 炎症标志物

[0202] (2) 生长因子

[0203] (3) 血清学(例如,免疫标志物)

[0204] (4) 细胞因子和趋化因子

[0205] (5) 氧化应激的标志物

[0206] (6) 细胞表面受体(例如,CD64等)

[0207] (7) 信号通路

[0208] (8) 其他标志物(例如,遗传标志物如炎症通路基因)。

[0209] 在其他实施方案中,可以在患者样品(例如,来自抗-TNF α 药物治疗的患者的血清样品)中检测、测量或测定一种或两种以下标志物的存在和/或水平:(9) 抗-TNF α 药物水平(例如,游离的抗-TNF α 治疗抗体的水平);和/或(10) 抗-药物抗体(ADA)水平(例如,针对抗-TNF α 药物的自身抗体的水平)。

[0210] 然后,可以将本文中所述的单一统计学算法或者两种或两种以上统计学算法的组合应用于在样品中检测、测量或测定的标志物的存在、浓度水平、活化水平或基因型,从而选择治疗、优化治疗、降低毒性或者监测用抗-TNF α 药物的治疗性治疗的有效性。因此,发现通过测定患者免疫状态,可将本发明方法用于确定患者处理。

[0211] 了解疾病的临床进程能使医师为他们的炎症疾病患者(例如,IBD(例如,克罗恩病)、类风湿性关节炎(RA)等)制定更好的告知处理决定,并可以在未来帮助指导新的药物研发。本文中所述的用于疾病活性/严重程度指数的理想生物标志物应当能鉴定处于疾病风险的个体,并且应当是疾病特异性的。此外,生物标志物应当能检测疾病活性,并监测治疗的有效性;以及应当具有针对疾病复发或再现的预测价值。然而,现在预测疾病进程已经超出了仅仅预测疾病复发,但也许更重要地包括了含有手术的疾病并发症的预测。本发明是特别有利的,因为其提供了疾病活性和/或严重程度的指示物,并且能在那些症状缓解的患者中预测复发的风险。此外,对于患者处理以及制定治疗决定,本发明生物标志物和疾病活性/严重程度指数具有极大的应用,并且可以帮助或辅助给那些最可能受益于它的患者指导正确的治疗,并且在那些具有复发低风险的患者中避免了慢性维持治疗的花费和可

能毒性。

[0212] A. 炎症标志物

[0213] 尽管通常使用白血细胞计数,通过非损伤性试验,依据炎症活性来测量炎症疾病的疾病进程,但该方法具有低特异性,并且显示出与疾病活性有限的相关性。

[0214] 因此,在某些实施方案中,可以特别地将多种炎症标志物(包括生物化学标志物、血清学标志物、蛋白质标志物、遗传标志物),以及其他临床或艾柯图像(echographic)特征用于本发明方法,用于选择治疗、优化治疗、降低毒性和/或监测用一种或多种治疗剂如生物制品(例如,抗-TNF α 药物)治疗性治疗的有效性。在某些方面,本文中所述的方法使用将算法(例如,统计学分析)应用于测定的一种或多种炎症标志物(例如,单独的或者与来自其他种类的生物标志物组合的)的存在、浓度水平和/或基因型,以帮助或辅助预测疾病进程、选择合适的抗-TNF α 药物治疗、优化抗-TNF α 药物治疗、降低与抗-TNF α 药物治疗相关的毒性或者监测用抗-TNF α 药物治疗性治疗的有效性。

[0215] 适合用于本发明的炎症标志物的非限制性实例包括生物化学、血清学和蛋白质标志物,例如如,细胞因子、趋化因子、急性期蛋白质、细胞粘附分子、S100 蛋白质和/或其他炎症标志物。

[0216] 1. 细胞因子和趋化因子

[0217] 在本发明中,样品中至少一种细胞因子或趋化因子的存在或水平的测定是特别有用的。如本文中所用,术语“细胞因子”包括由免疫细胞分泌的任何多种多肽或蛋白质,其调节许多免疫系统功能,并包括小细胞因子如趋化因子。术语“细胞因子”还包括脂肪细胞因子,其包含由脂肪细胞分泌的一组细胞因子,其功能为例如调节体重、血细胞生成、血管发生、创伤愈合、胰岛素抗性、免疫应答和炎症应答。

[0218] 在某些方面,在样品中测定至少一种细胞因子的存在或水平,包括但不限于, TNF α 、凋亡的 TNF- 相关的弱诱导子 (TWEAK)、护骨素 (OPG)、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1 受体拮抗剂 (IL-1ra)、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、可溶性 IL-6 受体 (sIL-6R)、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-23 和 IL-27。在某些其他方面,在样品中测定至少一种趋化因子的存在或水平,例如如 CXCL1/GR01/GR0 α , CXCL2/GR02, CXCL3/GR03, CXCL4/PF-4, CXCL5/ENA-78, CXCL6/GCP-2, CXCL7/NAP-2, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC, CXCL12/SDF-1, CXCL13/BCA-1, CXCL14/BRAK, CXCL15, CXCL16, CXCL17/DMC, CCL1, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CCL6/C10, CCL7/MCP-3, CCL8/MCP-2, CCL9/CCL10, CCL11/Eotaxin, CCL12/MCP-5, CCL13/MCP-4, CCL14/HCC-1, CCL15/MIP-5, CCL16/LEC, CCL17/TARC, CCL18/MIP-4, CCL19/MIP-3 β , CCL20/MIP-3 α , CCL21/SLC, CCL22/MDC, CCL23/MPIF1, CCL24/Eotaxin-2, CCL25/TECK, CCL26/Eotaxin-3, CCL27/CTACK, CCL28/MEC, CL1, CL2 和 CX₃CL1。在某些其他方面,在样品中测定至少一种脂肪细胞因子的存在或水平,包括但不限于瘦蛋白、脂联素、抵抗素、活性或总纤溶酶原激活物抑制剂-1 (PAI-1)、内脏脂肪素和视黄醇结合蛋白 4 (RBP4)。优选地,测定 TNF α 、IL-6、IL-8、IL-1 β 、IL-2、IL-12、IL-13、IL-15、IFN (例如, IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ)、IL-10、CCL5/RANTES 和/或其他细胞因子的存在或水平。

[0219] 在某些实例中,使用测定法(例如,杂交测定法或基于扩增的测定法)在 mRNA 表达水平检测特定细胞因子或趋化因子的存在或水平。在某些其他实例中,使用例如,免疫测定

法(例如, ELISA)或免疫组织化学测定法在蛋白质表达水平检测特定细胞因子或趋化因子的存在或水平。适合于在血清、血浆、唾液或尿液样品中测定目的细胞因子或趋化因子的存在或水平的 ELISA 试剂盒可从例如, R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN)、Neogen Corp. (Lexington, KY)、Alpco Diagnostics (Salem, NH)、Assay Designs, Inc. (Ann Arbor, MI)、BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA)、Invitrogen (Camarillo, CA)、Calbiochem (San Diego, CA)、CHEMICON International, Inc. (Temecula, CA)、Antigenix America Inc. (Huntington Station, NY)、QIAGEN Inc. (Valencia, CA)、Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, C) 和 / 或 Bender MedSystems Inc. (Burlingame, CA) 得到。

[0220] 人 IL-6 多肽序列描述于例如 Genbank 检索号 NP_000591 中。人 IL-6 mRNA (编码) 序列描述于例如, Genbank 检索号 NM_000600 中。本领域技术人员应当理解, IL-6 也已知为干扰素 β 2 (IFNB2)、HGF、HSF 和 BSF2。

[0221] 人 IL-1 β 多肽序列描述于例如, Genbank 检索号 NP_000567 中。人 IL-1 β mRNA (编码) 序列描述于例如, Genbank 检索号 NM_000576 中。本领域技术人员应当理解, IL-1 β 也已知为 IL1F2 和 IL-1beta。

[0222] 人 IL-8 多肽序列描述于例如, Genbank 检索号 NP_000575 (SEQ ID NO:1) 中。人 IL-8 mRNA (编码) 序列描述于例如, Genbank 检索号 NM_000584 (SEQ ID NO:2) 中。本领域技术人员应当理解, IL-8 也已知为 CXCL8、K60、NAF、GCP1、LECT、LUCT、NAP1、3-10C、GCP-1、LYNAP、MDNCF、MONAP、NAP-1、SCYB8、TSG-1、AMCF-I 和 b-ENAP。

[0223] 人 TWEAK 多肽序列描述于例如, Genbank 检索号 NP_003800 和 AAC51923 中。人 TWEAK mRNA (编码) 序列描述于例如, Genbank 检索号 NM_003809 和 BC104420 中。本领域技术人员应当理解, TWEAK 还已知为肿瘤坏死因子配体超家族成员 12 (TNFSF12)、AP03 配体 (AP03L)、CD255、DR3 配体、生长因子可诱导的 14 (Fn14) 配体和 UNQ181/PR0207。

[0224] 2. 急性期蛋白质

[0225] 在本发明中, 样品中一种或多种急性期蛋白质的存在或水平的测定也是有用的。急性期蛋白质是在应答炎症中血浆浓度增加(正急性期蛋白质)或减少(负急性期蛋白质)的一类蛋白质。该应答称为急性期反应(也称急性期应答)。正急性期蛋白质的实例包括但不限于, C-反应蛋白质(CRP)、D-二聚体蛋白质、甘露糖结合蛋白质、 α 1-抗胰蛋白酶、 α 1-抗胰凝乳蛋白酶、 α 2-巨球蛋白、血纤蛋白原、凝血酶原、因子 VIII、von Willebrand 因子、血纤蛋白溶酶原、补体因子、铁蛋白、血清淀粉蛋白 P 组分、血清淀粉蛋白 A (SAA)、血清类粘蛋白(α 1-酸性糖蛋白, AGP)、血浆铜蓝蛋白、触珠蛋白及其组合。负急性期蛋白质的非限制性实例包括白蛋白、运铁蛋白、运甲状腺素蛋白、运皮质激素蛋白、视黄醇结合蛋白质及其组合。优选地, 测定 CRP 和 / 或 SAA 的存在或水平。

[0226] 在某些实例中, 用测定法(例如, 杂交测定法或基于扩增的测定法)在 mRNA 表达水平检测特定急性期蛋白质的存在或水平。在某些其他实例中, 使用例如, 免疫测定法(例如, ELISA)或免疫组织化学测定法在蛋白质表达水平检测特定急性期蛋白质的存在或水平。例如, 可以将可从 Alpco Diagnostics (Salem, NH) 得到的夹心比色 ELISA 测定法用于测定血清、血浆、尿液或粪便样品中 CRP 的水平。类似地, 可以将可从 Biomeda Corporation (Foster City, CA) 得到的 ELISA 试剂盒用于在样品中检测 CRP 水平。用于在样品中测定 CRP 水平的其他方法描述于例如, 美国专利号 6, 838, 250 和 6, 406, 862; 以及美国专利

公开 20060024682 和 20060019410 中。用于测定 CRP 水平的其他方法包括例如,免疫浊度测定法、快速免疫扩散测定法和可视化凝集测定法。适合于在样品如血清、血浆、唾液、尿液或粪便中测定 SAA 的存在或水平的 ELISA 试剂盒可从例如, Antigenix America Inc. (Huntington Station, NY)、Abazyme (Needham, MA)、USCN Life (Missouri City, TX) 和 / 或 U. S. Biological (Swampscott, MA) 得到。

[0227] C 反应蛋白质(CRP)是在应答炎症时在血液中发现的蛋白质(急性期蛋白质)。CRP 通常由肝和脂肪细胞产生。其是蛋白质的五聚环蛋白家族的成员。人 CRP 多肽序列描述于例如, Genbank 检索号 NP_000558 中。人 CRP mRNA (编码) 序列描述于例如, Genbank 检索号 NM_000567 中。本领域技术人员应当理解, CRP 还已知为 PTX1、MGC88244 和 MGC149895。

[0228] 血清淀粉样蛋白 A (SAA) 蛋白质是血浆中与高密度脂蛋白(HDL)相关的载脂蛋白家族。不同同种型的 SAA 以不同水平组成型表达(组成型 SAA)或者在应答炎症刺激中表达(急性期 SAA)。这些蛋白质主要由肝产生。在整个无脊椎动物和脊椎动物中这些蛋白质的保守性提示, SAA 在全部动物中都发挥着非常主要的作用。急性期血清淀粉样蛋白 A 蛋白质(A-SAA)在炎症的急性期分泌。人 SAA 多肽序列描述于例如, Genbank 检索号 NP_000322 中。人 SAA mRNA (编码) 序列描述于例如, Genbank 检索号 NM_000331 中。本领域技术人员应当理解, SAA 也已知为 PIG4、TP53I4、MGC111216 和 SAA1。

[0229] 3. 细胞粘附分子(IgSF CAM)

[0230] 在本发明中, 样品中一种或多种免疫球蛋白超家族细胞粘附分子的测定也是有用的。如本文中所用, 术语“免疫球蛋白超家族细胞粘附分子”(IgSF CAM) 包括位于细胞表面上的多种多肽或蛋白质的任何, 其具有一个或多个免疫球蛋白样折叠结构域, 并且其在胞间粘附和 / 或信号转导中发挥作用。在许多情况下, IgSF CAM 是跨膜蛋白质。IgSF CAM 的非限制性实例包括神经细胞粘附分子(NCAM; 例如, NCAM-120、NCAM-125、NCAM-140、NCAM-145、NCAM-180、NCAM-185 等)、胞间粘附分子(ICAM, 例如 ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、ICAM-4 和 ICAM-5)、血管细胞粘附分子-1 (VCAM-1)、血小板-内皮细胞粘附分子(PECAM-1)、L1 细胞粘附分子(L1CAM)、与 L1CAM 同源的细胞粘附分子(L1 的密切同源物)(CHL1)、唾液酸结合 Ig 样凝集素(SIGLEC; 例如 SIGLEC-1、SIGLEC-2、SIGLEC-3、SIGLEC-4 等)、Nectin (例如, Nectin-1、Nectin-2、Nectin-3 等), 以及 Nectin 样分子(例如, Necl-1、Necl-2、Necl-3、Necl-4 和 Necl-5)。优选地, 测定 ICAM-1 和 / 或 VCAM-1 的存在或水平。

[0231] ICAM-1 是跨膜细胞粘附蛋白质, 其以低浓度组成型存在于白细胞和内皮细胞的膜上。细胞因子刺激后, 浓度极大增加。ICAM-1 可受 IL-1 和 TNF α 诱导, 并且通过血管内皮细胞、巨噬细胞和淋巴细胞表达。在 IBD 中, 促炎症细胞因子通过上调粘附分子例如 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达来引起炎症。粘附分子的增加表达招募了更多的淋巴细胞到感染组织, 导致组织炎症(参见, Goke 等人, J., Gastroenterol., 32:480 (1997); 和 Rijcken 等人, Gut, 51:529 (2002)。ICAM-1 由胞间粘附分子 1 基因(ICAM1; Entrez GeneID:3383; Genbank 检索号 NM_000201) 编码, 并且在加工胞间粘附分子 1 前体多肽后产生(Genbank 检索号 NP_000192)。

[0232] VCAM-1 是跨膜细胞粘附蛋白质, 其介导淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞与血管上皮细胞的粘附。作为增加的基因转录的结果, VCAM-1 在内皮细胞中的上调通过细胞因子发生(例如, 在应答肿瘤坏死因子- α (TNF α) 和白细胞介素-1 (IL-1)

中)。VCAM-1 由血管细胞粘附分子 1 基因(VCAM1 ;Entrez GeneID :7412)编码,并在差异剪接转录本(Genbank 检索号 NM_001078 (变体 1)或 NM_080682 (变体 2))和加工前体多肽剪接同种型(Genbank 检索号 NP_001069 (同种型 a)或 NP_542413 (同种型 b))后产生。

[0233] 在某些实例中,用测定法例如如,杂交测定法或基于扩增的测定法在 mRNA 表达水平检测 IgSF CAM 的存在或水平。在某些其他实例中,使用例如,免疫测定法(例如,ELISA)或免疫组织化学测定法在蛋白质表达水平检测 IgSF CAM 的存在或水平。适合于测定样品,例如组织样品、活检样本、血清、血浆、唾液、尿液或粪便中 ICAM-1 和 / 或 VCAM-1 的存在或水平的抗体和 / 或 ELISA 试剂盒可从例如,Invitrogen (Camarillo,CA)、Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz,CA)和 / 或 Abcam Inc. (Cambridge,MA)得到。

[0234] 4. S100 蛋白质

[0235] 在本发明中,样品中至少一种 S100 蛋白质的存在或水平的测定是有用的。如本文中所用,术语“S100 蛋白质”包括以细胞类型特异性表达和 2EF- 手性钙结合结构域的存在为特征的低分子量酸性蛋白质家族的任何成员。在人类中存在至少 21 种不同类型的 S100 蛋白质。名称来源于 S100 蛋白质在中性 pH 的硫酸铵中 100% 可溶的事实。大多数 S100 蛋白质是同源二聚体,由两个相同的多肽通过非共价键结合在一起组成。尽管 S100 蛋白质在结构上类似于钙调蛋白,它们的差异在于它们的细胞特异性,取决于环境因素,以不同水平表达于特定的细胞中。S-100 蛋白质通常存在于来源于神经嵴(例如,Schwann 细胞、黑素细胞、神经胶质细胞)、软骨细胞、脂肪细胞、肌上皮细胞、巨噬细胞、朗氏细胞、树突状细胞和角化细胞的细胞中。S100 蛋白质涉及多种胞内和胞外功能,例如调节蛋白质磷酸化、转录因子、Ca²⁺稳态、细胞骨架构成的动力学、酶活性、细胞生长和分化,以及炎症应答。

[0236] 钙粒蛋白是表达于多种细胞类型,包括肾上皮细胞和中性粒细胞的 S100 蛋白质,并且在慢性炎症条件下,在浸润性单核细胞和粒细胞中是丰富的。钙粒蛋白的实例包括但不限于,钙粒蛋白 A (也已知为 S100A8 或 MRP-8)、钙粒蛋白 B (也已知为 S100A9 或 MRP-14)和钙粒蛋白 C (也已知为 S100A12)。

[0237] 在某些实例中,用测定法例如如,杂交测定法或基于扩增的测定法在 mRNA 表达水平检测特定 S100 蛋白质的存在或水平。在某些其他实例中,使用例如,免疫测定法(例如,ELISA)或免疫组织化学测定法在蛋白质表达水平检测特定 S100 蛋白质的存在或水平。适合于测定样品,例如、血清、血浆或尿液样品中 S100 蛋白质例如钙粒蛋白 A (S100A8)、钙粒蛋白 B (S100A9)或钙粒蛋白 C (S100A12)的存在或水平的 ELISA 试剂盒可从例如, Peninsula Laboratories Inc. (San Carlos,CA)和 Hycult biotechnology b.v. (Uden, The Netherlands)得到。

[0238] 钙防卫蛋白, S100A8 和 S100A9 的复合物,是中性粒细胞、单核细胞和角化细胞的细胞溶质中钙 - 和锌 - 结合蛋白质。钙防卫蛋白是嗜中性粒细胞和巨噬细胞中主要的蛋白质,并占这些细胞中胞液部分中总蛋白质的多达 60%。因此,其是中性粒细胞更新的替代标志物。其在粪便中的浓度与中性粒细胞浸润肠粘膜的强度和炎症的严重程度相关。在一些实例中,可以用使用少量(50-100mg)粪便样品,用 ELISA 测量钙防卫蛋白(参见,例如 John 等人, Scand J Gastroenterol. ,36 :291-296 (2001))。

[0239] 5. 其他炎症标志物

[0240] 在本发明中,样品中乳铁蛋白的存在或水平的测定是有用的。在某些实例中,用测

定法例如如,杂交测定法或基于扩增的测定法在 mRNA 表达水平检测乳铁蛋白的存在或水平。在某些其他实例中,使用例如,免疫测定法(例如,ELISA)或免疫组织化学测定法在蛋白质表达水平检测乳铁蛋白的存在或水平。可以用于检测血浆、尿液、支气管灌洗液或脑脊液样品中人乳铁蛋白的乳铁蛋白 ELISA 试剂盒可从 Calbiochem (San Diego, CA) 得到。类似地,可以用于测定血浆样品中乳铁蛋白的水平的 ELISA 试剂盒可从 U. S. Biological (Swampscott, MA) 得到。美国公开号 20040137536 描述了用于测定粪便样品中升高的乳铁蛋白水平的存在的 ELISA 测定法。同样地,美国专利公开号 20040033537 描述了用于测定粪便、粘膜、或胆汁样品中内源乳铁蛋白的浓度的 ELSIA 测定法。在一些实施方案中,然后可以使用例如,乳铁蛋白蛋白质或其片段在样品中检测抗 - 乳铁蛋白抗体的存在或水平。

[0241] 在本发明中,样品中一种或多种丙酮酸激酶同工酶例如 M1-PK 和 M2-PK 的存在或水平的测定也是有用的。用测定法例如如,杂交测定法或基于扩增的测定法在 mRNA 表达水平检测 M1-PK 和 / 或 M2-PK 的存在或水平。在某些其他实例中,使用例如,免疫测定法(例如,ELISA)或免疫组织化学测定法在蛋白质表达水平检测 M1-PK 和 / 或 M2-PK 的存在或水平。丙酮酸激酶同工酶 M1/M2 也已知为丙酮酸激酶肌肉同工酶(PKM)、丙酮酸激酶型 K、细胞溶质甲状腺激素结合蛋白质(CTHBP)、甲状腺激素结合蛋白质 1 (THBP1)或 opa 相互作用蛋白质 3 (OIP3)。

[0242] 在其他实施方案中,在本发明中,样品中一种或多种生长因子的存在或水平的测定也是有用的。生长因子的非限制性实例包括转化生长因子(TGF)例如, TGF- α 、TGF- β 、TGF- β 2、TGF- β 3 等,其详述于下文中。

[0243] 6. 炎症标志物的示例集

[0244] 在特定的实施方案中,可以检测(例如,单独的或者与来自其他种类的生物标志物组合的)以下炎症标志物的至少一种或多种(例如,2 种、3 种、4 种、5 种、6 种、7 种、8 种、9 种、10 中或者 10 中以上,例如一组),以帮助或辅助预测疾病进程和 / 或改进选定治疗的准确性、优化治疗、降低毒性和 / 或监测针对抗 -TNF α 药物治疗的治疗性治疗的有效性。

[0245] a. CRP

[0246] b. SAA

[0247] c. VCAM

[0248] d. ICAM

[0249] e. 钙防卫蛋白

[0250] f. 乳铁蛋白

[0251] g. IL8

[0252] h. Rantes

[0253] i. TNF α

[0254] j. IL-6

[0255] k. IL-1 β

[0256] l. S100A12

[0257] m. M2- 丙酮酸激酶(PK)

[0258] n. IFN

[0259] o. IL2

[0260] p. TGF

[0261] q. IL-13

[0262] r. IL-15

[0263] s. IL12

[0264] t. 其他趋化因子和细胞因子。

[0265] B. 生长因子

[0266] 可以将多种生长因子,包括生物化学标志物、血清学标志物、蛋白质标志物、遗传标志物,以及其他临床或艾柯图像特征适合用于本发明方法,用于选择治疗、优化治疗、降低毒性和/或检测用一种或多种治疗剂如生物制品(例如,抗-TNF α 药物)治疗性治疗的有效性。在某些方面,在本文中所述的方法使用将算法(例如,统计学分析)应用于测定的一种或多种生长因子(例如,单独的或者与来自其他种类的生物标志物组合的)存在、浓度水平和/或基因型,以帮组或辅助预测疾病进程、选择合适的抗-TNF α 药物治疗、优化抗-TNF α 药物治疗、降低与抗-TNF α 药物治疗相关的毒性或者监测用抗-TNF α 药物的治疗性治疗的有效性。

[0267] 因此,在某些实施方案中,在本发明中,样品中一种或多种生长因子的存在或水平的测定是有用的。如本文中所用,术语“生长因子”包括能刺激细胞增殖和/或细胞分化的任何多种肽、多肽或蛋白质。

[0268] 在某些方面,在样品中测定至少一种生长因子的存在或水平包括但不限于,表皮生长因子(EGF)、肝素结合表皮生长因子(HB-EGF)、血管内皮生长因子(VEGF)、色素上皮衍生因子(PEDF;也称为 SERPINF1)、双调蛋白(AREG;也称为 schwannoma 衍生生长因子(SDGF))、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、肝细胞生长因子(HGF)、转化生长因子- α (TGF- α)、转化生长因子- β (TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3 等人)、内皮素-1 (ET-1)、角化细胞生长因子(KGF;也称为 FGF7)、骨形成蛋白(例如, BMP1-BMP15)、血小板衍生生长因子(PDGF)、神经生长因子(NGF)、 β -神经生长因子(β -NGF)、神经营养因子(例如,脑衍生的神经营养因子(BDNF)、神经营养蛋白 3 (NT3)、神经营养蛋白 4 (NT4)等)、生长分化因子-9 (GDF-9)、粒细胞-克隆刺激因子(G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞克隆刺激因子(GM-CSF)、人肌肉生长抑制素(Myostatin) (GDF-8)、促红细胞生成素(EPO)和促血小板生成素(TPO)。在特定实施方案中,测定 VEGF、EGF、bFGF、ET-1、TGF- β 2 和/或 TGF- β 3 的至少之一的存在或水平。发现这些标志物在活性 IBD 中比在对照中显著更高,表明它们在 IBD 中肠的腔表面的粘膜损伤后起着促进愈合的作用。

[0269] 在某些实例中,用测定法例如如,杂交测定法或基于扩增的测定法在 mRNA 表达水平检测特定生长因子的存在或水平。在某些其他实例中,使用例如,免疫测定法(例如, ELISA)或免疫组织化学测定法在蛋白质表达水平检测特定生长因子的存在或水平。适合于在血清、血浆、唾液或尿液样品中测定生长因子的存在或水平的 ELISA 试剂盒可从例如, Antigenix America Inc. (Huntington Station, NY)、Promega (Madison, WI)、R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN)、Invitrogen (Camarillo, CA)、CHEMICON International, Inc. (Temecula, CA)、Neogen Corp. (Lexington, KY)、PeproTech (Rocky Hill, NJ)、Alpco Diagnostics (Salem, NH)、Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL) 和/或 Abazyme (Needham, MA) 得到。

[0270] 人表皮生长因子(EGF)多肽序列描述于例如, Genbank 检索号 NP_001954 (SEQ ID NO:19) 中。人 EGF mRNA (编码) 序列描述于例如, Genbank 检索号 NM_001963 (SEQ ID NO:20) 中。本领域技术人员应当理解, EGF 还已知为 β -尿抑胃素、URG 和 HOMG4。

[0271] 人血管内皮生长因子(VEGF)多肽序列描述于例如, Genbank 检索号 NP_001020537 (SEQ ID NO:21)、NP_001020538、NP_001020539、NP_001020540、NP_001020541、NP_001028928 和 NP_003367 中。人 VEGF mRNA (编码) 序列描述于例如, Genbank 检索号 NM_001025366 (SEQ ID NO:22)、NM_001025367、NM_001025368、NM_001025369、NM_001025370、NM_001033756 和 NM_003376 中。本领域技术人员应当理解, VEGF 还已知为 VPF、VEGFA、VEGF-A 和 MGC70609。

[0272] 在特定的实施方案中, 可以检测(例如, 单独的或者与来自其他种类的生物标志物组合的) 以下生长因子的至少一种或多种(例如, 2 种、3 种、4 种、5 种、6 种、7 种、8 种、9 种、10 种或 10 种以上, 例如一组), 以帮助或辅助预测疾病进程和 / 或改进选定治疗的准确性、优化治疗、降低毒性和 / 或监测针对抗 -TNF α 药物治疗的治疗性治疗的有效性: GM-CSF; VEGF; EGF; 角化细胞生长因子(KGF; FGF7) 和其他生长因子的治疗性治疗的有效性。

[0273] C. 血清学(免疫标志物)

[0274] 在本发明中, 样品(例如血清样品) 中血清学标志物或免疫标志物例如自身抗体的测定也是有用的。针对抗炎症分子(例如 IL-10、TGF- β) 等的抗体以及其他可以抑制身体控制炎症的能力的分子, 并且这些抗体在患者中的存在或水平指示了有效的免疫抑制剂药物例如抗 -TNF α 药物的用途。粘膜愈合导致了针对细菌抗原, 例如如 OmpC、鞭毛蛋白(cBir-1、Fla-A、Fla-X 等)、I2 等(pANCA、ASCA 等) 的抗体的抗体滴度的降低。

[0275] 因此, 在某些方面, 本文中所述的方法使用将算法(例如, 统计学分析) 应用于测定的一种或多种免疫标志物(例如, 单独的或者与来自其他种类的生物标志物组合的) 的存在、浓度水平和 / 或基因型, 以帮助或辅助预测疾病进程、选择合适的抗 -TNF α 药物治疗、优化抗 -TNF α 药物治疗、降低与抗 -TNF α 药物治疗相关的毒性或者监测用抗 -TNF α 药物治疗性治疗的有效性。

[0276] 适用于本发明的血清学免疫标志物的非限制性实例包括抗中性粒细胞抗体、抗酿酒酵母抗体和 / 或其他抗微生物抗体。

[0277] 1. 抗中性粒细胞抗体

[0278] 在本发明方法中, 样品中 ANCA 水平和 / 或 pANCA 的存在或不存在的测定是有用的。如本文中所用, 术语“抗中性粒细胞胞质抗体”或“ANCA”包括指向中性粒细胞的胞质和 / 或核组分的抗体。基于中性粒细胞中 ANCA 染色模式, 可以将 ANCA 活性分成几种主要的种类: (1) 没有突出核周的胞质中性粒细胞染色(cANCA); (2) 围绕核外边缘的核周染色(pANCA); (3) 围绕核内边缘的核周染色(NSNA); 和 (4) 横跨整个中性粒细胞具有斑点的弥散染色(SAPPA)。在某些实例中, pANCA 染色对于 DNase 处理是敏感的。术语 ANCA 包括抗中性粒细胞反应性的全部种类, 包括但不限于 cANCA、pANCA、NSNA 和 SAPPA。类似地, 术语 ANCA 包括全部免疫球蛋白同种型, 包括但不限于免疫球蛋白 A 和 G。

[0279] 可以例如, 使用免疫测定法如具有醇固定的中性粒细胞的酶联免疫吸附测定法(ELISA) 测定来自个体的样品中 ANCA 的水平。可以例如, 使用免疫组织化学测定法如间接荧光抗体(IFA) 测定法测定特定种类的 ANCA 如 pANCA 的存在或不存在。优选地, 使用具有

DNase 处理的、固定的中性粒细胞的免疫荧光测定法,测定样品中 pANCA 的存在或不存在。除固定的中性粒细胞外,适合于测定 ANCA 水平的对于 ANCA 特异的抗原包括但不限于,未纯化的或部分纯化的中性粒细胞提取物;纯化的蛋白质、蛋白质片段或合成的肽如组蛋白 H1 或其 ANCA 反应性片段(参见,例如美国专利号 6,074,835);组蛋白 H1 样抗原、孔蛋白抗原、拟杆菌属(*Bacteroides*)抗原或其 ANCA 反应性片段(参见,例如美国专利号 6,033,864);分泌泡抗原或其 ANCA 反应性抗原(参见,例如美国专利公开号 08/804,106),以及抗 -ANCA 个体基因型抗体。本领域技术人员应当理解,对 ANCA 特异的其他抗原的使用是在本发明的范围内的。

[0280] 2. 抗 - 酿酒酵母抗体

[0281] 在本发明中,样品中 ASCA (例如, ASCA-IgA 和 / 或 ASCA-IgG) 水平的测定是有用的。如本文中所用,术语“抗 - 酿酒酵母免疫球蛋白 A”或“ASCA-IgA”包括与酿酒酵母特异性反应的免疫球蛋白 A 同种型的抗体。类似地,术语“抗 - 酿酒酵母免疫球蛋白 G”或“ASCA-IgG”包括与酿酒酵母特异性反应的免疫球蛋白 G 同种型的抗体。

[0282] 使用对 ASCA 特异的抗原进行样品是否为 ASCA-IgA 或 ASCA-IgG 阳性的测定。该抗原可以是与 ASCA-IgA 和 / 或 ASCA-IgG 特异性结合的任何抗原或抗原的混合物。尽管 ASCA 抗体最初通过其结合酿酒酵母的能力而表征,但本领域技术人员应当理解,可以从酿酒酵母或者多种其他来源获得与 ASCA 特异性结合的抗原,只要该抗原能与 ASCA 抗体特异性结合。因此,可以用于测定样品中 ASCA-IgA 和 / 或 ASCA-IgG 的水平的对 ASCA 特异的抗原的示例性来源包括但不限于,完整的灭活酵母细胞如酵母属(*Saccharomyces*)或假丝酵母菌属(*Candida*)细胞;酵母细胞壁甘露聚糖如磷酸酯三聚氰胺盐(phosphopeptidomannan)(PPM);寡糖如甘露低聚糖;新糖脂(neoglycolipids);抗 -ASCA 个体基因型抗体等。酵母的不同种类和菌株,例如酿酒酵母菌株 Su1、Su2、CBS1315 或 BM156 或白假丝酵母(*Candida albicans*)菌株 VW32 都适合于用作为对 ASCA-IgA 和 / 或 ASCA-IgG 特异的抗原。对 ASCA 特异的纯化的和合成的抗原也适合用于测定样品中 ASCA-IgA 和 / 或 ASCA-IgG 的水平。纯化的抗原的实例包括但不限于,纯化的寡糖抗原如甘露低聚糖。合成的抗原的实例包括但不限于,合成的甘露低聚糖如那些在美国专利公开号 20030105060 中所述的甘露低聚糖,例如, D-Man β (1-2) D-Man β (1-2) D-Man β (1-2) D-Man-OR、D-Man α (1-2) D-Man α (1-2) D-Man α (1-2) D-Man-OR 和 D-Man α (1-3) D-Man α (1-2) D-Man α (1-2) D-Man-OR, 其中 R 是氢原子, C₁-C₂₀是烷基,或者任选地标记的连接基团。

[0283] 可已将酵母细胞壁甘露聚糖的制备物例如, PPM 用于测定样品中 ASCA-IgA 和 / 或 ASCA-IgG 的水平。可以通过本领域已知的任何合适的提取技术,包括例如,通过高压处理,来制备此类水溶性表面抗原,或者可以商业地获得(参见,例如 Lindberg 等人, Gut, 33 : 909-913 (1992))。还可以将 PPM 的酸稳定性部分用于本发明的统计学算法(Sendid 等人, Clin. Diag. Lab. Immunol., 3 : 219-226 (1996))。用于测定样品中 ASCA 水平的示例性 PPM 来源于酿酒酵母菌株 ATCC#38926。

[0284] 可以将纯化的寡糖抗原如甘露低聚糖用于测定样品中 ASCA-IgA 和 / 或 ASCA-IgG 的水平。如在例如, Faille 等人, Eur. J. Microbiol. Infect. Dis., 11 : 438-446 (1992) 中所述,纯化的甘露低聚糖抗原优选地转化成新糖脂。本领域技术人员应当理解,可以通过改变甘露糖基链长度(Frosh 等人, Proc Natl. Acad. Sci. USA, 82 : 1194-1198 (1985));端基异

构的构型(Fukazawa 等人,在“Immunology of Fungal Disease.”E.Kurstak 编辑,Marcel Dekker Inc., New York,第 37-62 页(1989)中;Nishikawa 等人,Microbiol.Immunol., 34:825-840 (1990);Poulain 等人,Eur.J.Clin.Microbiol.,23:46-52 (1993);Shibata 等人,Arch.Biochem.Biophys.,243:338-348 (1985);Trinel 等人,Infect.Immun.,60:3845-3851 (1992));或者键合的位置(Kikuchi 等人,Planta,190:525-535 (1993)),来优化甘露低聚糖抗原与 ASCA 的反应性。

[0285] 用于本发明方法的合适的甘露低聚糖包括但不限于,具有甘露四糖 Man(1-3)Man(1-2)Man(1-2)Man 的甘露低聚糖。如在例如,Faille 等人,上文中所述,可以从 PPM 中纯化此种甘露低聚糖。可以通过将甘露低聚糖从其各个 PPM 中释放,并随后将释放的甘露低聚糖与 4-十六烷基苯胺等偶联,来构建对 ASCA 特异的示例性新糖肽。

[0286] 3. 抗-微生物抗体

[0287] 在本发明中,样品中抗-OmpC 抗体水平的测定也是有用的。如本文中所用,术语“抗-外膜蛋白质 C 抗体”或“抗-OmpC 抗体”包括指向如在例如,PCT 转录申请号 WO 01/89361 中所述的细菌外膜孔蛋白的抗体。术语“外膜蛋白质 C”或“OmpC”指与抗-OmpC 抗体免疫反应的细菌孔蛋白。

[0288] 使用 OmpC 蛋白质或其片段如其免疫活性片段,可以测定来自个体的样品中存在的抗-OmpC 抗体的水平。适用于在样品中测定抗-OmpC 抗体水平的 OmpC 抗原包括但不限于,OmpC 蛋白质、与 OmpC 蛋白质具有基本上相同的氨基酸序列的 OmpC 多肽或其片段,例如其免疫活性片段。如本文中所用,OmpC 多肽通常描述了与 OmpC 蛋白质具有约 50% 以上的同一性,优选约 60% 以上的同一性,更优选地约 70% 以上的同一性,仍然更优选地约 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 氨基酸序列同一性的氨基酸序列的多肽,其中氨基酸序列同一性使用序列比对程序例如 CLUSTALW 测定。可以例如,通过从完整细菌如大肠杆菌中纯化、通过核酸如 Genbank 检索号 K00541 的重组表达、通过合成方法如溶液或固相肽合成或者通过使用噬菌体展示,来制备此类抗原。

[0289] 在本发明中,样品中抗-I2 抗体水平的测定也是有用的。如本文中所用,术语“抗-I2 抗体”包括指向与如例如美国专利号 6,309,643 中所述的细菌转录调节子共有同源性的细菌抗原的抗体。术语“I2”指与抗-I2 抗体免疫反应的微生物抗原。微生物 I2 蛋白质是与来自巴氏梭菌(*C.pasteurianum*)的预测蛋白质 4、来自结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)的 Rv3557c 和来自超耐热菌(*Aquifex aeolicus*)的转录调节子共有一些类似的弱同源性的 100 个氨基酸的多肽。I2 蛋白质的核酸和蛋白质序列描述于例如,美国专利号 6,309,643 中。

[0290] 可以使用 I2 蛋白质或其片段例如其免疫活性片段,测定来自个体的样品中存在的抗-I2 抗体的水平。适用于在样品中测定抗-I2 抗体水平的 I2 抗原包括但不限于,I2 蛋白质、与 I2 蛋白质具有基本上相同的氨基酸序列的 I2 多肽或其片段,例如其免疫活性片段。此类 I2 多肽表现出比巴氏梭菌蛋白质 4 与 I2 蛋白质更大的序列类似性,并且包括其同种型变体和同源物。如本文中所用,I2 多肽通常描述了与天然存在的 I2 蛋白质具有约 50% 以上的同一性,优选地约 60% 以上的同一性,更优选地约 70% 以上的同一性,仍然更优选地约 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 氨基酸序列同一性的氨基酸序列的多肽,其中氨基酸序列同一性使用序列比对程序如 CLUSTALW 测定。可以例如,通过从微生物中纯

化、通过重组表达编码 I2 抗原的核酸、通过合成方法如溶液或固相肽合成或者通过使用噬菌体展示,来制备此类 I2 抗原。

[0291] 在本发明中,样品中抗-鞭毛蛋白抗体水平的测定也是有用的。如本文中所述,术语“抗-鞭毛蛋白抗体”包括指向如在例如,PCT 专利公开号 WO 03/053220 和美国专利公开号 20040043931 中所述的细菌鞭毛的蛋白质组分的抗体。术语“鞭毛蛋白”指与抗-鞭毛蛋白抗体免疫反应的细菌鞭毛蛋白质。微生物鞭毛蛋白是在细菌鞭毛中发现的蛋白质,其中以中空圆柱体形式自排列,以形成纤丝。

[0292] 可以使用鞭毛蛋白蛋白质或其片段如其免疫活性片段,测定来自个体的样品中存在的抗-鞭毛蛋白抗体的水平。适用于在样品中测定抗-鞭毛蛋白抗体水平的鞭毛蛋白抗原包括但不限于,鞭毛蛋白如 Cbir-1 鞭毛蛋白、鞭毛蛋白 X、鞭毛蛋白 A、鞭毛蛋白 B、其片段及其组合、与鞭毛蛋白蛋白质或其片段如其免疫活性片段具有基本上相同的氨基酸序列的鞭毛蛋白多肽。如本文中所用,鞭毛蛋白多肽通常描述了与天然存在的鞭毛蛋白蛋白质具有约 50% 以上的同一性,优选地约 60% 以上的同一性,更优选地约 70% 以上的同一性,仍然更优选地约 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 氨基酸序列同一性的氨基酸序列的多肽,其中氨基酸序列同一性使用序列比对程序如 CLUSTALW 测定。可以例如,通过从细菌如 *Helicobacter Bilis*, 鼯鼠螺旋杆菌(*Helicobacter mustelae*), 幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)、溶纤维丁酸弧菌(*Butyrivibrio fibrisolvens*)以及在盲肠中发现的细菌中纯化、通过重组表达编码鞭毛蛋白抗原的核酸、通过合成方法如溶液或固相肽合成或者通过使用噬菌体展示,来制备此类鞭毛蛋白抗原。

[0293] D. 氧化应激标志物

[0294] 在本发明中,样品中氧化应激标志物的测定也是有用的。氧化应激标志物的非限制性实例包括那些基于蛋白质或者基于 DNA 的标志物,其可以通过分别测量蛋白质氧化和 DNA 片段检测。氧化应激标志物的其他实例包括有机化合物如丙二醛。

[0295] 氧化应激显示了活性氧的产生及表现和生物系统能容易地解毒活性中间体或者修复造成的损伤之间的不平衡。组织正常氧化还原状态的扰乱会通过过氧化物和游离的自由基的产生造成毒性作用,所述过氧化物和游离的自由基会损伤细胞的全部组分,包括蛋白质、脂质和 DNA。一些活性氧种类甚至会通过称为氧化还原信号通路的现象(through a phenomenon called redox signaling)起着信使的作用。

[0296] 在某些实施方案中,可以将活性氧代谢物的衍生物(DROM)、氧化的与还原的谷胱甘肽的比率($Eh\ GSH$)和/或氧化的与还原的半胱氨酸的比率($Eh\ CySH$)用于定量氧化应激。参见例如,Neuman 等人,Clin. Chem., 53:1652-1657 (2007)。还可以使用技术,例如如质谱(MS)检测或测量蛋白质如酪氨酸磷酸酶和硫氧还蛋白相关的蛋白质中高活性半胱氨酸残基的氧化修饰。参见例如,Naito 等人,Anti-Aging Medicine, 7 (5):36-44 (2010)。氧化应激的其他标志物包括如例如在 Uchida 等人,PNAS, 95 (9) 4882-4887 (1998) 中所述的结合蛋白质的丙烯醛、游离的氧自由基测试(FORT) (其反映了有机的氢过氧化物的水平),以及还原谷胱甘肽/谷胱甘肽二硫化物对的氧化还原能力、(Eh)GSH/GSSG。参见例如,Abramson 等人,Atherosclerosis, 178 (1):115-21 (2005)。

[0297] E. 细胞表面受体

[0298] 在本发明中,样品中细胞表面受体的测定也是有用的。在具有高水平炎症的患者

中,抗-TNF α 药物如 Remicade 和 Humira 的半衰期是显著降低的。CD64,对免疫球蛋白(Ig) G1 和 G3 高亲和力的受体主要通过单核巨噬细胞表达。休眠的多形核(PMN)细胞极少表达 CD64,但该标志物的表达受骨髓中对骨髓前体作用的干扰素和粒细胞-克隆-刺激因子上调。CD64 与 IgG 复合物的交联发挥了许多细胞应答,包括通过胞吞作用的免疫复合物的内在化、调理素化颗粒的吞噬作用、脱颗粒作用、氧化爆炸(oxidative burst)的活化和细胞因子的释放。

[0299] 因此,在某些方面,本文中所述的方法使用将算法(例如,统计学分析)应用于测定的一种或多种细胞表面受体如 CD64(例如,单独地或与来自其他种类的生物标志物组合地)的存在、浓度水平和/或基因型,以帮助或辅助预测疾病进程、选择合适的抗-TNF α 药物治疗、优化抗-TNF α 药物治疗、降低与抗-TNF α 药物治疗相关的毒性或者监测用抗-TNF α 药物治疗性治疗的有效性。

[0300] F. 信号通路

[0301] 在本发明中,样品中信号通路的测定也是有用的。将多形核(PMN)细胞活化,然后浸润到肠粘膜(RA 的滑膜)并迁移穿过小囊上皮视为 IBD 的关键特征。通过粪便髓-111 标记的白血球排出估计,在 IBD 患者中,PMN 细胞从循环到肠的疾病部位的迁移增加了 10 倍或更多。因此,在某些方面,使用测定法如 Collaborative Enzyme Enhanced Reactive ImmunoAssay (CEER),通过测量信号通路来测量来自血液或组织炎症的 PMN 细胞的活性是了解炎症疾病的理想方法。CEER 技术描述于以下专利文件中,所述专利文件出于全部目的在此处以其整体引用作为参考:PCT 公开号 WO 2008/036802、WO 2009/012140、WO 2009/108637、WO 2010/132723、WO 2011/008990 和 WO 2011/050069;和 PCT 申请号 PCT/US2011/066624。

[0302] 因此,在某些方面,本文中所述的方法使用将算法(例如,统计学分析)应用于测定的一种或多种信号通路中一种或多种信号转导分子(例如,单独地或与来自其他种类的生物标志物组合地)的存在、浓度水平和/或基因型,以帮助或辅助预测疾病进程、选择合适的抗-TNF α 药物治疗、优化抗-TNF α 药物治疗、降低与抗-TNF α 药物治疗相关的毒性或者监测用抗-TNF α 药物治疗性治疗的有效性。在优选的实施方案中,测量一种或多种信号通路中一种或多种信号转导分子的总水平和/或活性(例如,磷酸化)水平。

[0303] 术语“信号转导分子”或“信号转导子”包括实施这样的过程的蛋白质和其他分子,其中细胞将胞外信号或刺激转化成应答,通常涉及细胞内级联顺序的生物化学反应。信号转导分子的实例包括但不限于,受体酪氨酸激酶如 EGFR(例如,EGFR/HER1/ErbB1、HER2/Neu/ErbB2、HER3/ErbB3、HER4/ErbB4)、VEGFR1/FLT1、VEGFR2/FLK1/KDR、VEGFR3/FLT4、FLT3/FLK2、PDGFR(例如,PDGFRA、PDGFRB)、c-KIT/SCFR、INSR(胰岛素受体)、IGF-IR、IGF-IIR、IRR(胰岛素受体相关的受体)、CSF-1R、FGFR1-4、HGFR1-2、CCK4、TRK A-C、c-MET、RON、EPHA1-8、EPHB1-6、AXL、MER、TYRO3、TIE1-2、TEK、RYK、DDR1-2、RET、c-ROS、V-钙粘着蛋白、LTK(白血球酪氨酸激酶)、ALK(未分化的淋巴瘤激酶)、ROR1-2、MUSK、AATYK1-3 和 RTK106;受体酪氨酸激酶的截短形式,如具有胞外氨基端结构域缺失的截短型 HER2 受体(例如,p95ErbB2(p95m)、p110、p95c、p95n 等)、具有胞外氨基端结构域缺失的截短型 cMET 受体和具有胞外氨基端结构域缺失的截短型 HER3 受体;受体酪氨酸激酶二聚体(例如,p95HER2/HER3;p95HER2/HER2;具有 HER1、HER2、HER3 或 HER4 的截短型 HER3 受体;HER2/

HER2 ;HER3/HER3 ;HER2/HER3 ;HER1/HER2 ;HER1/HER3 ;HER2/HER4 ;HER3/HER4 等);非受体型酪氨酸激酶,如 BCR-ABL、Src、Frk、Btk、Csk、Ab1、Zap70、Fes/Fps、Fak、Jak、Ack 和 LIMK ;酪氨酸激酶信号级联组分,如 AKT (例如,AKT1、AKT2、AKT3)、MEK (MAP2K1)、ERK2 (MAPK1)、ERK1 (MAPK3)、PI3K (例如,PIK3CA (p110)、PIK3R1 (p85))、PDK1、PDK2、磷酸酶和张力蛋白同源物 (PTEN)、SGK3、4E-BP1、P70S6K (例如,p70S6 激酶剪接变体 α I)、蛋白酪氨酸磷酸酶 (例如,PTP1B、PTPN13、BDP1 等)、RAF、PLA2、MEKK、JNKK、JNK、p38、Shc (p66)、Ras (例如,K-Ras、N-Ras、H-Ras)、Rho、Rac1、Cdc42、PLC、PKC、p53、细胞周期蛋白 D1、STAT1、STAT3、磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸 (PIP2)、磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸 (PIP3)、mTOR、BAD、p21、p27、ROCK、IP3、TSP-1、NOS、GSK-3 β 、RSK1-3、JNK、c-Jun、Rb、CREB、Ki67、桩蛋白、NF-kB 和 IKK ;核激素受体,如雌激素受体 (ER)、孕激素受体 (PR)、雄激素受体、糖皮质激素受体、盐皮质激素受体、维生素 A 受体、维生素 D 受体、类视色素受体、甲状腺激素受体和孤儿受体 ;核受体共激活物或抑制物,分别如 amplified in breast cancer-1 (AIB1) 和核受体共阻遏物 1 (NCOR) ;及其组合。

[0304] 术语“活化状态”指特定的信号转导分子是否是活化的。类似地,术语“活化水平”指特定信号转导分子活化的程度。活化状态通常对应于一种或多种信号转导分子的磷酸化、泛素化和 / 或络合状态。活化状态 (在括弧中列出) 的非限制性实例包括 :HER1/EGFR (EGFRvIII、磷酸化 (p-) EGFR、EGFR:Shc、泛素化 (u-) EGFR、p-EGFRvIII);ErbB2 (p-ErbB2、p95HER2 (截短型 ErbB2)、p-p95HER2、ErbB2:Shc、ErbB2:PI3K、ErbB2:EGFR、ErbB2:ErbB3、ErbB2:ErbB4);ErbB3 (p-ErbB3、截短型 ErbB3、ErbB3:PI3K、p-ErbB3:PI3K、ErbB3:Shc);ErbB4 (p-ErbB4、ErbB4:Shc);c-MET (p-c-MET、截短型 c-MET、c-Met:HGF 复合物);AKT1 (p-AKT1);AKT2 (p-AKT2);AKT3 (p-AKT3);PTEN (p-PTEN);P70S6K (p-P70S6K);MEK (p-MEK);ERK1 (p-ERK1);ERK2 (p-ERK2);PDK1 (p-PDK1);PDK2 (p-PDK2);SGK3 (p-SGK3);4E-BP1 (p-4E-BP1);PIK3R1 (p-PIK3R1);c-KIT (p-c-KIT);ER (p-ER);IGF-1R (p-IGF-1R、IGF-1R:IRS、IRS:PI3K、p-IRS、IGF-1R:PI3K);INSR (p-INSR);FLT3 (p-FLT3);HGFR1 (p-HGFR1);HGFR2 (p-HGFR2);RET (p-RET);PDGFRA (p-PDGFRA);PDGFRB (p-PDGFRB);VEGFR1 (p-VEGFR1、VEGFR1:PLC γ 、VEGFR1:Src);VEGFR2 (p-VEGFR2、VEGFR2:PLC γ 、VEGFR2:Src、VEGFR2:肝素硫酸盐、VEGFR2:VE-钙粘着蛋白);VEGFR3 (p-VEGFR3);FGFR1 (p-FGFR1);FGFR2 (p-FGFR2);FGFR3 (p-FGFR3);FGFR4 (p-FGFR4);TIE1 (p-TIE1);TIE2 (p-TIE2);EPHA (p-EPHA);EPHB (p-EPHB);GSK-3 β (p-GSK-3 β);NF-kB (p-NF-kB、NF-kB-IkB α 复合物等)、IkB (p-IkB、p-P65:IkB);IKK (磷酸 IKK);BAD (p-BAD、BAD:14-3-3);mTOR (p-mTOR);Rsk-1 (p-Rsk-1);Jnk (p-Jnk);P38 (p-P38);STAT1 (p-STAT1);STAT3 (p-STAT3);FAK (p-FAK);RB (p-RB);Ki67;p53 (p-p53);CREB (p-CREB);c-Jun (p-c-Jun);c-Src (p-c-Src);桩蛋白 (p-桩蛋白);GRB2 (p-GRB2)、Shc (p-Shc)、Ras (p-Ras)、GAB1 (p-GAB1)、SHP2 (p-SHP2)、GRB2 (p-GRB2)、CRKL (p-CRKL)、PLC γ (p-PLC γ)、PKC (例如,p-PKC α 、p-PKC β 、p-PKC δ)、内收蛋白 (p-内收蛋白)、RB1 (p-RB1) 和 PYK2 (p-PYK2)。

[0305] 下表提供了可以在样品中测定 (例如,单独的或者与来自其他种类的生物标志物组合的) 总水平和 / 或活化 (例如,磷酸化) 水平的信号转导分子的其他实例,以帮助或辅助预测疾病进程、选择合适的抗-TNF α 药物治疗、优化抗-TNF α 药物治疗、降低与抗-TNF α 药物治疗相关的毒性或者监测用抗-TNF α 药物治疗性治疗的有效性。

[0306] 表 1

[0307]

总/磷酸化测定法		磷酸化位点
总 VEGFR2	磷酸化 VEGFR2	Y951, 1212
总 Erk	磷酸化 Erk	T202/Y204
总 Akt	磷酸化 Akt	T308, S473
总 MEK	磷酸化 MEK	S217/221
总 MEK	磷酸化 MEK	S217/221
总 P70S6K	磷酸化 P70S6K	T389 (T229)
总 PTEN		
总 VEGFR1 (T)	磷酸化 VEGFR1	
总 SGK	磷酸化 SGK	T320, S486
总 CRKL	磷酸化 CRKL	Y207
总 SRC	磷酸化 SRC	Y416, 527
总 FAK	磷酸化 FAK	Y397
总 BCR	磷酸化 BCR	
活化的 PI3K	复合的 PI3K	P85, Y688
4EBP1	磷酸化 4EBP1	T70, T37, T46
PRAS40	磷酸化 PRAS40	T246

[0308] 表 2

[0309]

总/磷酸化测定法		磷酸化位点
总 TIE	磷酸化 TIE-2	Y92 (S1119)
总 Jak2	磷酸化 JAK2	Y1007/1008
总 STAT5	磷酸化 STAT5	Y694/699
总 STAT3	磷酸化 STAT3	Y705
总 FGFR1	磷酸化 FGFR1	Y653, 766
总 FGFR2	磷酸化 FGFR2	Y653
总 FGFR3	磷酸化 FGFR3	
总 FGFR4	磷酸化 FGFR4	
总 Axl	磷酸化 Axl	Y702
总 BAD	磷酸化 BAD	(S112) (S136)
总 RSK	磷酸化 RSK	(T359) (S363)
总 PDK	磷酸化 PDK1	(S241)
总 JAK1 和 3	磷酸化 JAK1 和 3	

[0310]

总 TSC2	磷酸化 TSC2	S664, S939
总 S6RP	磷酸化 S6RP	S235/236

[0311] G. 遗传标志物

[0312] 在本发明方法中,样品中(例如,单独的或者与来自其他种类的生物标志物组合的)一种或多种遗传标志物中等位基因变体(例如,SNP)的存在或不存在的测定是有用的,以帮助或辅助预测疾病进程、选择合适的抗-TNF α 药物治疗、优化抗-TNF α 药物治疗、降低与抗-TNF α 药物治疗相关的毒性或者监测用抗-TNF α 药物治疗性治疗的有效性。

[0313] 遗传标志物的非限制性实例包括但不限于,任何炎症通路基因和相应的 SNP,其可以是如在表 3 中所述的基因型(例如,NOD2/CARD15 基因、IL12/IL23 通路基因等)。优选地,测定至少一个等位基因变体的存在与否,例如 NOD2/CARD15 基因和 / 或 IL12/IL23 通路中一个或多个基因中单核苷酸多态性(SNP)。参见例如,Barrett 等人,Nat. Genet., 40 : 955-62 (2008) 和 Wang 等人,Amer. J. Hum. Genet., 84 :399-405 (2009)。

[0314] 表 3

[0315]

基因	SNP
NOD2 (R702W) – SNP8	rs2066844
NOD2 (G908R) – SNP12	rs2066845
NOD2 (3020insC) – SNP13	rs5743293
ATG16L1 (T300A)	rs2241880
IL23R (R381Q)	rs11209026
DLG5	rs2165047
NOD2/CARD15	rs2066847
IL23R	rs11465804
ATG16L1	rs3828309
MST1	rs3197999
PTGER4	rs4613763
IRGM	rs11747270
TNFSF15	rs4263839
ZNF365	rs10995271
NKX2-3	rs11190140
PTPN2	rs2542151
PTPN22	rs2476601
ITLN1	rs2274910
IL12B	rs10045431
CDKAL1	rs6908425
CCR6	rs2301436
JAK2	rs10758669
C11orf30	rs7927894
LRRK2, MUC19	rs11175593
ORMDL3	rs2872507
STAT3	rs744166
ICOSLG	rs762421
GCKR	rs780094
BTNL2, SLC26A3, HLA-DRB1, HLA-DQA1	rs3763313
PUS10	rs13003464

[0316]

CCL2, CCL7	rs991804
LYRM4	rs12529198
SLC22A23	rs17309827
IL18RAP	rs917997
IL12RB2	rs7546245
IL12RB1	rs374326
CD3D	rs3212262
CD3G	rs3212262
CD247	rs704853
JUN	rs6661505
CD3E	rs7937334
IL18R1	rs1035127
CCR5	
MAPK14	rs2237093
IL18	rs11214108
IFNG	rs10878698
MAP2K6	rs2905443
STAT4	rs1584945
IL12A	rs6800657
TYK2	rs12720356
ETV5	rs9867846
MAPK8	rs17697885
IRGM	rs13361189
IRGM	rs4958847
IRGM	rs1000113
IRGM	rs11747270
TL1A/TNFSF15	rs6478109
TL1A/TNFSF15	rs6478108
TL1A/TNFSF15	rs4263839
PTN22	rs2476601
CCR6	rs1456893
CCR6	rs2301436
5p13/PTGER4	rs1373692
5p13/PTGER4	rs4495224
5p13/PTGER4	rs7720838
5p13/PTGER4	rs4613763
ITLN1	rs2274910
ITLN1	rs9286879
ITLN1	rs11584383
IBD5/5q31	rs2188962

[0317]

IBD5/5q31	rs252057
IBD5/5q31	rs10067603
GCKR	rs780094
TNFRSF6B	rs1736135
ZNF365	rs224136
ZNF365	rs10995271
C11orf30	rs7927894
LRRK2;MUC19	rs1175593
IL-27	rs8049439
TLR2	rs4696480
TLR2	rs3804099
TLR2	rs3804100
TLR2	rs5743704
TLR2	rs2405432
TLR4 (D299G)	rs4986790
TLR4 (T399I)	rs4986791
TLR4 (S360N)	rs4987233
TLR9	rs187084
TLR9	rs352140
NFC4	rs4821544
KIF21B	rs11584383
IKZF1	rs1456893
C11orf30	rs7927894
CCL2,CCL7	rs991804
ICOSLG	rs762421
TNFAIP3	rs7753394
FLJ45139	rs2836754
PTGER4	rs4613763
ECM1	rs7511649
ECM1 (T130M)	rs3737240
ECM1 (G290S)	rs13294
GLI1 (G933D)	rs2228224
GLI1 (Q1100E)	rs2228226
MDR1 (3435C>T)	rs1045642
MDR1 (A893S/T)	rs2032582
MAGI2	rs6962966
MAGI2	rs2160322
IL26	rs12815372
IFNG,IL26	rs1558744
IFNG,IL26	rs971545

[0318]

IL26	rs2870946
ARPC2	rs12612347
IL10,IL19	rs3024493
IL10,IL19	rs3024505
IL23R	rs1004819
IL23R	rs2201841
IL23R	rs11465804
IL23R	rs10889677
BTLN2	rs9268480
HLA-DRB1	rs660895
MEP1	rs6920863
MEP1	rs2274658
MEP1	rs4714952
MEP1	rs1059276
PUS10	rs13003464
PUS10	rs6706689
RNF186	rs3806308
RNF186	rs1317209
RNF186	rs6426833
FCGR2A,C	rs10800309
CEP72	rs4957048
DLD,LAMB1	rs4598195
CAPN10,KIF1A	rs4676410
IL23R	rs11805303
IL23R	rs7517847
IL12B/p40	rs1368438
IL12B/p40	rs10045431
IL12B/p40	rs6556416
IL12B/p40	rs6887695
IL12B/p40	rs3212227
STAT3	rs744166
JAK2	rs10974914
JAK2	rs10758669
NKX2-3	rs6584283
NKX2-3	rs10883365
NKX2-3	rs11190140
IL18RAP	rs917997
LYRM4	rs12529198
CDKAL1	rs6908425
MAGI2	rs2160322

[0319]

TNFRSF6B	rs2160322
TNFRSF6B	rs2315008
TNFRSF6B	rs4809330
PSMG1	rs2094871
PSMG1	rs2836878
PTPN2	rs2542151
MST1/3p21	rs9858542
MST1/3p21	rs3197999
SLC22A23	rs17309827
MHC	rs660895
XBP1	rs35873774
ICOSLG1	rs762421
BTLN2	rs3763313
BTLN2	rs2395185
BTLN2	rs9268480
ATG5	rs7746082
CUL2,CREM	rs17582416
CARD9	rs4077515
ORMDL3	rs2872507
ORMDL3	rs2305480

[0320] 在本发明中使用的其他 SNP 包括例如, rs2188962、rs9286879, rs11584383, rs7746082, rs1456893, rs1551398, rs17582416, rs3764147, rs1736135, rs4807569, rs7758080, 和 rs8098673。参见例如 Barrett 等人, Nat. Genet., 40 :955-62 (2008)。

[0321] 1. NOD2/CARD15

[0322] 在本发明中, NOD2/CARD15 基因中等位基因如 SNP 的存在或不存在的测定是特别有用的。如本文中所用, 术语“NOD2/CARD15 变体”或“NOD2 变体”包括与野生型 NOD2 基因比较含一个或多个改变的 NOD2 基因的核苷酸序列或者与野生型 NOD2 多肽序列比较含一个或多个改变的 NOD2 多肽的氨基酸序列。NOD2, 也已知为 CARD15, 定位于染色体 16 上的 IBD1 基因座, 并通过位点克隆 (Hugot 等人, Nature, 411 :599-603 (2001)) 以及定点候选基因策略 (Ogura 等人, Nature, 411 :603-606 (2001); Hampe 等人, Lancet, 357 :1925-1928 (2001)) 鉴定。IBD1 基因座具有针对炎性肠病的高多点连锁得分 (multipoint linkage score) (MLS) (16q12 中标志物 D16S411 的 MLS=5.7)。参见例如, Cho 等人, Inflamm. Bowel Dis., 3 :186-190 (1997); Akolkar 等人, Am. J. Gastroenterol., 96 :1127-1132 (2001); Ohmen 等人, Hum. Mol. Genet., 5 :1679-1683 (1996); Parkes 等人, Lancet, 348 :1588 (1996); Cavanaugh 等人, Ann. Hum. Genet., 62 :291-8 (1998); Brant 等人, Gastroenterology, 115 :1056-1061 (1998); Curran 等人, Gastroenterology, 115 :1066-1071 (1998); Hampe 等人, Am. J. Hum. Genet., 64 :808-816 (1999); 和 Annese 等人, Eur. J. Hum. Genet., 7 :567-573 (1999)。

[0323] 人 NOD2 的 mRNA (编码) 和多肽序列分别描述于例如, Genbank 检索号 NM_022162 和 NP_071445 中。此外, 包括 NOD 的人染色体 16 克隆 RP11-327F22 的完整序列描述于例如,

Genbank 检索号 AC007728 中。此外,来自其他物种的 NOD2 的序列可见于 GenBank 数据库。

[0324] NOD2 蛋白质含有能活化 NF- κ B (NF-kB)的氨基端胱天蛋白酶募集结构域(CARD)以及几个羧基端富含亮氨酸重复的结构域(Ogura 等人, J. Biol. Chem., 276 :4812-4818 (2001)。NOD2 与凋亡调节子 Apaf-1/CED-4 和一类植物疾病抗性基因产物在结构上具有同源性(Ogura 等人, 上述)。类似于植物疾病抗性基因产物, NOD2 具有氨基端效应子结构域、核苷酸结合结构域和富含亮氨酸的重复(LRR)。野生型 NOD2 活化核因子 NF- κ B, 使其应答细菌脂多糖(LPS ;Ogura 等人, 上述 ;Inohara 等人, J. Biol. Chem., 276 :2551-2554 (2001))。NOD2 可作为 LPS 的胞间受体其作用,具有应答所需的富含亮氨酸的重复。

[0325] 以前描述了 NOD2 编码区中三个单核苷酸多态性的变体。这三种 SNP, 命名为 R702W (“SNP8”)、G908R (“SNP12”)和 1007fs (“SNP13”)定位于 NOD2 基因的羧基端区域(Hugot 等人, 上述)。适用于本发明的 NOD2 基因的 SNP8、SNP12 和 SNP13, 以及其他 SNP 的其他描述可见于例如, 美国专利号 6, 835, 815 ;6, 858, 391 和 7, 592, 437, 以及美国专利公开号 20030190639、20050054021 和 20070072180。

[0326] 在一些实施方案中, NOD2 变体定位于 NOD2 基因座的编码区, 例如在编码 NOD2 多肽的羧基端部分中几个富含亮氨酸的重复的区域内。定位于 NOD2 的富含亮氨酸重复区域的此类 NOD2 变体包括但不限于, R702W (“SNP8”)和 G908R (“SNP12”)。在本发明中有用的 NOD2 变体还编码与野生型 NOD2 多肽活化 NF- κ B 比较, 具有降低的活化 NF- κ B 能力的 NOD2 多肽。作为非限制性实例, NOD2 变体 1007fs (“SNP13”)产生了截短的 NOD2 多肽, 其具有在应答 LPS 刺激中降低的诱导 NF- κ B 的能力(Ogura 等人, Nature, 411 :603-606 (2001))。

[0327] 在本发明中有用的 NOD2 变体可以例如是定位于 NOD2 的编码区内的 R702W、G908R 或 1007fs。R702W、G908R 和 1007fs。在一个实施方案中, 本发明方法用 R702W NOD2 变体实施。如本文中所用, 术语“R702W”包括 NOD2 基因的外显子 4 内的单核苷酸多态性, 其存在于编码 NOD2 蛋白质的氨基酸 702 的三联体内。野生型 NOD2 等位基因在 AC007728 序列的位置 138, 991 处含有胞嘧啶(c)残基, 其存在于编码氨基酸 702 处精氨酸的三联体内。R702W NOD2 变体含有 AC007728 序列的位置 138, 991 处的胸腺嘧啶(t)残基, 导致 NOD2 蛋白质的氨基酸 702 处精氨酸(R)至色氨酸(W)的替换。因此, 基于上述 Hugot 等人的早期编码系统, 该 NOD2 变体可表示为“R702W”或“702W”, 并且还可以表示为“R675W”。此外, R702W 变体还已知为“SNP8”等位基因或者 SNP8 的“2”等位基因。R702W 或 SNP8 的 NCBI SNP ID 号为 rs2066844。通过例如, 等位基因鉴别测定法或序列分析, 可以方便地检测 R702W NOD2 变体和其他 NOD2 变体的存在。

[0328] 本发明还可以使用 G908R NOD2 变体实施。如本文中所用, 术语“G908R”包括 NOD2 基因的外显子 8 内的单核苷酸多态性, 其存在编码 NOD2 蛋白质的氨基酸 908 的三联体内。氨基酸 908 位于 NOD2 基因的富含亮氨酸重复区内。野生型 NOD2 等位基因含有 AC007728 序列的位置 128, 377 处的鸟嘌呤(g)残基, 其存在于编码氨基酸 908 处的甘氨酸的三联体内。G908R NOD 变体含有 AC007728 序列的位置 128, 377 处的胞嘧啶(c)残基, 导致 NOD2 蛋白质的氨基酸 908 处甘氨酸(G)至精氨酸(R)的替换。因此, 基于上述的 Hugot 等人, 早期编码系统, 该 NOD2 变体表示为“G908R”或“908R”, 并还可以表示为“G881R”。此外, G908R 变体还已知为“SNP12”等位基因或者 SNP12 处的“2”等位基因。G908R SNP 的 NCBI SNP ID 号为 rs2066845。

[0329] 本发明还可以使用 1007fs NOD2 变体实施。该变体是单核苷酸插入,所述单核苷酸插入导致 NOD2 蛋白质的第十个富含亮氨酸重复移码,以及后面过早的终止密码子。得到的 NOD2 蛋白质的截短体在应答细菌脂多糖中表现出阻止 NF- κ B 的活化(Ogura 等人,上述)。如本文中所用,术语“1007fs”包括 NOD2 基因的外显子 11 内的单核苷酸多态性,其存在编码 NOD2 蛋白质的氨基酸 1007 的三联体内。1007fs 变体含有 AC007728 序列的位置 121, 139 处的胞嘧啶,导致氨基酸 1007 处移码突变。因此,基于上述的 Hugot 等人的早期编码系统,该 NOD2 变体表示为“1007fs”,并还可以表示为“3020insC”或“980fs”。此外,1007fs NOD2 变体还已知为“SNP13”等位基因或者 SNP123 处的“2”等位基因。1007fs 或 SNP13 的 NCBI SNP ID 号为 rs2066847。

[0330] 本领域技术人员理解,使用例如,获自 PE Biosystems (Foster City, CA) 的市售参照 DNA,例如与 Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH) 参照个体如指定为 1347-02 的个体(Dib 等人,Nature,380:152-154(1996))比较,可以方便地定义特定的 NOD2 变体等位基因或者其他多态性等位基因。此外,SNP 的特定信息可以获自国家生化技术信息中心(NCBI)的 dbSNP。

[0331] NOD2 变体还可以定位于 NOD2 基因座的非编码区。非编码区包括例如,内含子序列以及 5' 或 3' 非翻译序列。定位于 NOD2 基因的非编码区的 NOD2 变体等位基因的非限制性实例是 JW1 变体,其描述于 Sugimura 等人,Am. J. Hum. Genet., 72:509-518 (2003) 和美国专利公开号 20070072180 中。定位于 NOD2 基因的 3' 非翻译区的 NOD2 变体等位基因的实例包括但不限于, JW15 和 JW16 变体等位基因,其描述于美国专利公开号 20070072180 中。定位于 NOD2 基因的 5' 非翻译区(例如,启动子区)的 NOD2 变体等位基因的实例包括但不限于 JW17 和 JW18 变体等位基因,其描述于美国专利公开号 20070072180 中。

[0332] 如本文中所用,术语“JW1 变体等位基因”包括 NOD2 基因的插入序列 8 (内含子 8) 的核苷酸 158 处的遗传变异。与 AC007728 序列相关, JW1 变体等位基因位于位置 128, 143 处。内含子 8 的核苷酸 158 处的遗传变异包括但不限于,单核苷酸替换、多核苷酸替换或者一个或多个核苷酸的缺失或插入。内含子 8 的野生型序列在位置 158 处具有胞嘧啶。作为非限制性实例, JW1 变体等位基因在内含子 8 的核苷酸 158 处具有胞嘧啶(c)至腺嘌呤(a)、胞嘧啶(c)至鸟嘌呤(g)或者胞嘧啶(c)至胸腺嘧啶(t)的替换。在一个实施方案中, JW1 变体等位基因在 NOD2 内含子 8 的核苷酸 158 处为胞嘧啶(c)至胸腺嘧啶(t)的改变。

[0333] 术语“JW15 变体等位基因”包括 AC007728 序列的核苷酸位置 118, 790 处, NOD2 的 3' 非翻译区中的遗传变异。核苷酸 118, 790 处的遗传变异可以是但不限于,单核苷酸替换、多核苷酸替换或者一个或多个核苷酸的缺失或插入。野生型序列在位置 118, 790 处具有腺嘌呤(a)。作为非限制性实例, JW15 变体等位基因在位置 118, 790 处具有腺嘌呤(a)至胞嘧啶(c)、腺嘌呤(a)至鸟嘌呤(g)或者腺嘌呤(a)至胸腺嘧啶(t)的替换。在一个实施方案中, JW15 变体等位基因在核苷酸 118, 790 处为腺嘌呤(a)至胞嘧啶(c)的改变。

[0334] 如本文中所用,术语“JW16 变体等位基因”包括在 AC007728 序列的核苷酸位置 118, 031 处, NOD2 的 3' 非翻译区中的遗传变异。核苷酸 118, 031 处的遗传变异可以是但不限于,单核苷酸替换、多核苷酸替换或者一个或多个核苷酸的缺失或插入。野生型序列在位置 118, 031 处具有鸟嘌呤(g)。作为非限制性实例, JW16 变体等位基因在核苷酸 118, 031 处具有鸟嘌呤(g)至胞嘧啶(c)、鸟嘌呤(g)至腺嘌呤(a)或者鸟嘌呤(g)至胸腺嘧啶(t)的

替换。在一个实施方案中, JW16 变体等位基因在核苷酸 118,031 处为鸟嘌呤(g)至腺嘌呤(a)的改变。

[0335] 如本文中所用,术语“JW17 变体等位基因”包括在 AC007728 序列的核苷酸位置 154,688 处, NOD2 的 5' 非翻译区中的遗传变异。核苷酸 154,688 处的遗传变异可以是但不限于, 单核苷酸替换、多核苷酸替换或者一个或多个核苷酸的缺失或插入。野生型序列在位置 154,688 处具有胞嘧啶(c)。作为非限制性实例, JW17 变体等位基因在位置 154,688 处具有胞嘧啶(c)至鸟嘌呤(g)、胞嘧啶(c)至腺嘌呤(a)或者胞嘧啶(c)至胸腺嘧啶(t)的替换。在一个实施方案中, JW17 变体等位基因在核苷酸 154,688 处为胞嘧啶(c)至胸腺嘧啶(t)的改变。

[0336] 如本文中所用,术语“JW18 变体等位基因”包括在 AC007728 序列的核苷酸位置 154,471 处, NOD2 的 5' 非翻译区中的遗传变异。核苷酸 154,471 处的遗传变异可以是但不限于, 单核苷酸替换、多核苷酸替换或者一个或多个核苷酸的缺失或插入。野生型序列在位置 154,471 处具有胞嘧啶(c)。作为非限制性实例, JW18 变体等位基因在位置 154,471 处具有胞嘧啶(c)至鸟嘌呤(g)、胞嘧啶(c)至腺嘌呤(a)或者胞嘧啶(c)至胸腺嘧啶(t)的替换。在一个实施方案中, JW18 变体等位基因在核苷酸 154,471 处为胞嘧啶(c)至胸腺嘧啶(t)的改变。

[0337] 应当理解,可以用定位于 NOD2 基因座的编码区或非编码区(例如, 内含子或启动子区)的这些或其他 NOD2 变体等位基因实施本发明方法。还应当理解,本发明方法涉及确定 NOD2 变体的一个、两个、三个、四个或者更多的存在,包括但不限于 SNP8、SNP12 和 SNP13 等位基因以及其他编码区变体和非编码区变体。

[0338] V. 实施例

[0339] 本发明将通过特定实施例进行更详细地描述。提供的以下实施例用于说明性目的,并非意图以任何方式限制本发明。本领域技术人员应当容易地理解,可以改变或修饰多种非关键的参数,以产生基本上相同的结果。

[0340] 实施例 1. 用于测量抗 -TNF α 生物制品的水平的新迁移率变动分析

[0341] 该实施例说明了使用大小排阻层析用于在患者样品(例如,血清)中测量抗 -TNF α 药物浓度的新均相测定法,以检测抗 -TNF α 药物与荧光标记的 TNF α 的结合。该测定法是有利的,因为其避免了洗涤步骤的需求,使用荧光团允许直观地和 / 或在 IR 光谱仪(IR spectra)上检测,这降低了背景和血清干扰问题,由于荧光标记检测的高敏感性,增加了在低滴度患者中检测抗 -TNF α 药物的能力,并且以液相反应发生,从而降低了由于与固体表面如 ELISA 平板连接,表位中任何改变的几率。

[0342] 在一个示例性实施方案中,用荧光团(例如, Alexa₆₄₇)标记 TNF α , 其中可以直观地和 / 或在 IR 光谱仪上检测荧光团。在液相反应中,用人血清孵育标记的 TNF α , 以允许血清中存在的抗 -TNF α 药物结合。还可以在液相反应中,用已知量的抗 -TNF α 药物孵育标记的 TNF α , 以产生标准曲线。孵育后,将样品直接上样到大小排阻柱上。与仅标记的 TNF α 比较,抗 -TNF α 药物与标记的 TNF α 的结合导致峰向左变动。然后,可以将血清样品中存在的抗 -TNF α 药物的浓度与标准曲线和对照比较。

[0343] 图 1 显示了本发明测定法的实例,其中将大小排阻 HPLC 用于检测 TNF α -Alexa₆₄₇ 与 HUMIRA™ (阿达木单抗)之间的结合。如图 1 中所示, HUMIRA™ 与 TNF α -Alexa₆₄₇ 的结合

导致 TNF α -Alexa₆₄₇ 峰向左变动。

[0344] 图 2 显示了 HUMIRA™ 与 TNF α -Alexa₆₄₇ 结合的剂量应答曲线。具体而言,图 2A 显示了大小排阻层析测定法中,HUMIRA™ 剂量依赖性增加 TNF α -Alexa₆₄₇ 的变动。图 2B 显示了大小排阻层析测定法中,1% 人血清的存在并不会对 TNF α -Alexa₆₄₇ 的变动产生显著的作用。图 2C 显示了大小排阻层析测定法中,合并的 RF 阳性血清的存在并不会对 TNF α -Alexa₆₄₇ 的变动产生显著的作用。

[0345] 因此,该实施例显示了本发明在监测正在接受抗-TNF α 药物如 HUMIRA™ 中的用途:(1) 指导确定合适的药物剂量;(2) 评价药物的药物动力学,例如确定药物是否从身体中清除得太快;和(3) 指导治疗决定,例如是否将当前的抗-TNF α 药物转变成不同的 TNF α 抑制剂或者另一类型的治疗。

[0346] 实施例 2. 测量 HACA 和 HAHA 水平的新迁移率变动分析

[0347] 该实施例显示了使用大小排阻层析,在患者样品(例如,血清)中测量自身抗体(例如,HACA 和 / 或 HAHA)浓度的新均相测定法,以检测这些自身抗体与荧光标记的抗-TNF α 药物的结合。该测定法是有利的,因为其避免了去除低亲和力 HACA 和 HAHA 的洗涤步骤的需求,使用荧光团允许直观地和 / 或在 IR 光谱仪上检测,这降低了背景和血清干扰问题,由于荧光标记检测的高敏感性,增加了在低滴度患者中检测 HACA 和 HAHA 的能力,并且以液相反应发生,从而降低了由于与固体表面如 ELISA 平板连接,表位中任何改变的几率。

[0348] 通过在用 1mg/kg、3mg/kg 和 10mg/kg 英利昔单抗治疗的 53%、21% 和 7% 类风湿性关节炎患者中检测到 HACA 的事实说明了测量针对 TNF α 抑制剂产生的自身抗体(例如,HACA、HAHA 等)的临床用途。当英利昔单抗与氨甲蝶呤组合时,抗体的发生率降低了 15%、7% 和 0%,这表明协同免疫抑制治疗在降低抗-药物应答中是有效的,但也表明高剂量的抗-TNF α 抗体可能会导致耐受。在克罗恩病中,报道了更高的发生率;第五次灌注后,61% 的患者具有 HACA。当 HACA 存在时,缩短了临床应答。参见,Rutgeerts, N. Engl. J. Med., 348 : 601-608 (2003)。在 2005 年-2008 年的 3 年时间期间,在 155 名患者中测量的英利昔单抗和 HACA 水平的回顾性研究显示,在 22.6% (N=35) 患炎症肠病的患者中检测到了 HACA。参见,Afif 等人,“Clinical Utility of Measuring Infliximab and Human Anti-Chimeric Antibody Levels in Patients with Inflammatory Bowel Disease”;paper presented at Digestive Disease Week;2009 年 5 月 30 日-6 月 3 日;Chicago, IL。作者推断,仅仅基于临床症状来改变治疗可能会造成不合理的治疗。

[0349] 对于在患者样品中测量自身抗体(例如,HACA 和 / 或 HAHA)浓度,均相迁移率变动分析要优于当前的方法,如图 3 中所示的桥连测定法(bridging assay),因为本发明能测量自身抗体如 HACA 的浓度,而没有非特异性结合和来自 ELISA 平板的固相干扰、没有来自抗-TNF α 药物的干扰(例如,使用桥连测定法,HACA 测量必须在抗-TNF α 药物的波谷水平进行),并且不会对抗体的多价有任何依赖性(例如,使用桥连测定法不能检测 IgG4 抗体,因为 IgG4 是双特异性的,并且不能与相同的抗原交联)。因此,本发明比当前方法至少具有以下优点:避免了抗原与固体表面结合(避免了变性);消除了 IgG4 作用;克服了治疗抗体波谷问题;检测具有弱亲和力的抗体;消除了无关 IgG 的非特异性结合;并增加了检测的敏感性和特异性。

[0350] 在一个示例性实施方案中,用荧光团(例如,Alexa₆₄₇)标记抗-TNF α 药物(例如,

REMICADE™),其中可以直观地和 / 或在 IR 光谱仪上检测荧光团。在液相反应中,用人血清孵育标记的抗-TNF α 药物,以允许血清中存在的 HACA 和 HAHA 结合。还可以在液相反应中,用已知量的抗-IgG 抗体孵育标记的抗-TNF α 药物,以产生标准曲线。孵育后,将样品直接上样到大小排阻柱上。与仅标记的药物比较,自身抗体与标记的抗-TNF α 药物的结合导致峰向左变动。然后,可以将血清样品中存在的 HACA 和 HAHA 的浓度与标准曲线和对照比较。图 4 显示了用于测量针对 REMICADE™产生的 HACA/HAHA 的浓度的本发明自身抗体检测测定法的示例性概要。在某些实例中,高 HACA/HAHA 水平表明应当将用 REMICADE™的当前治疗转变成另一抗-TNF α 药物如 HUMIRA™。

[0351] 该测定法的原理基于在大小排阻-高效液相层析(SE-HPLC)上,对比游离的 Alexa₆₄₇- 标记的 Remicade,由于复合物分子量的增加,结合抗体的 Alexa₆₄₇- 标记的 Remicade 复合物的迁移率的变动。

[0352] 在 Agilent-1200HPLC 系统中,使用具有 5,000 - 700,000 的分子量分级和 1X PBS, pH7.4 的移动相的 Bio-Sep300x7.8mmSEC-3000 柱(Phenomenex),以 0.5mL/ 分钟的流速,用 650nm 的 UV 检测进行该实施例中的层析。对于每一分析,将 100 μ L 品体积上样到柱上。

[0353] 在 SE-HPLC 分析前,在 1X PBS, pH7.3,洗脱缓冲液中,通过将已知量的抗体与 Alexa₆₄₇- 标记的 Remicade 室温孵育 1 小时,来形成结合抗体的 Alexa₆₄₇- 标记的 Remicade 复合物。

[0354] 图 5 显示了如使用本发明大小排阻层析测定法检测的,与 REMICADE™-Alexa₆₄₇ 结合的抗-人 IgG 抗体的剂量应答分析。抗-IgG 抗体与 REMICADE™-Alexa₆₄₇ 的结合造成 REMICADE™-Alexa₆₄₇ 峰向左变动。图 6 显示了如使用本发明大小排阻层析测定法检测的与 REMICADE™-Alexa₆₄₇ 结合的抗-人 IgG 抗体的第二次剂量应答分析。如通过 REMICADE™-Alexa₆₄₇ 峰向左变动所示,更大量的抗-IgG 抗体导致抗-IgG/REMICADE™-Alexa₆₄₇ 复合物形成的剂量依赖性增加。图 7 显示了与 REMICADE™-Alexa₆₄₇ 结合的抗-IgG 抗体的剂量应答曲线。

[0355] 图 8 显示了如使用 100 μ L 注射样品的本发明大小排阻层析测定法所检测,在正常人血清和 HACA 阳性血清中,REMICADE™-Alexa₆₄₇ 免疫复合物的形成。如图 8 中所示,患者样品中存在的 HACA 与 REMICADE™-Alexa₆₄₇ 的结合造成了 REMICADE™-Alexa₆₄₇ 峰向左变动。因此,本发明大小排阻层析测定法是特别有利的,因为其可以在 REMICADE™存在的情况下测量 HACA、可以在患者正在治疗的时候使用、可以测量弱和强 HACA 结合、为一种混合的且可读数的迁移率变动分析,并且可以延伸至使用标记的 REMICADE™的其他方法,以平衡 HACA 和 REMICADE™。

[0356] 图 9 提供了使用桥连测定法或本发明迁移率变动分析进行的 20 例患者血清样品的 HACA 测量总结。该比较研究显示,本发明方法对比当前方法具有增加的敏感性,因为使用桥连测定法测量的 3 例 HACA 阴性样品,当使用本发明迁移率变动分析测量时,实际上是 HACA 阳性的(参见,患者 SK07070305、SK07070595 和 SK07110035)。

[0357] 因此,该实施例显示,本发明可用于监测正在接受抗-TNF α 药物(例如,REMICADE™)的患者,以检测针对药物的自身抗体(例如,HACA 和 / 或 HAHA)的存在或水平,因为此类免疫应答与阻碍使用药物进一步治疗的超敏反应和药物动力学的急剧改变,以及

抗-TNF α 药物的生物分配相关。

[0358] 总之,实施例 1 和 2 显示,可以用 Alexa₆₄₇ 有效地标记 TNF α 和抗-TNF α 抗体。当用抗-TNF α 抗体孵育标记的 TNF α -Alexa₆₄₇ 时,改变了标记的 TNF α / 抗-TNF α 抗体复合物的保留时间,并且可以用 HPLC 定量引起改变的抗-TNF α 抗体的量。此外,当用抗-人 IgG 抗体孵育标记的抗-TNF α 抗体时,改变了标记的抗-TNF α / 抗-IgG 抗体复合物的保留时间,并且可以用 HPLC 定量引起改变的抗-IgG 抗体的量。此外,测定系统中低血清含量对 HPLC 分析显示出具有极小的作用。最后,可以产生抗-TNF α 抗体和 HACA/HAHA 测定法的标准曲线,并可以将其用于定量患者血清抗-TNF α 抗体或 HACA/HAHA 水平。有利地,本发明在某些方面提供了迁移率变动分析,例如研发的用于测量药物和针对药物的抗体的均一混合的和可读数的测定法。产生了抗-TNF α 生物学 Remicade 和 Humira,以及针对 Remicade 的 HACA 抗体的标准曲线。迁移率变动分析形式不同于 ELISA,其去除了抗原包被固体表面,并且不会受无关 IgG 的非特异性结合的影响。测定法形式是简单的,但非常敏感,并可用于检测患者血清中的全部抗-TNF α 生物学药物(例如,Remicade、Humira、Enbrel 和 Cimzia),以及中和抗体(抗 RemicadeTM)。

[0359] 实施例 3. 使用新迁移率变动分析测量患者血清中的人抗-嵌合抗体(HACA)和利昔单抗(IFX)水平

[0360] 摘要

[0361] 背景:英利昔单抗(IFX)是针对 TNF α 治疗的嵌合单克隆抗体,已经显示器在治疗自身免疫疾病如类风湿性关节炎(RA)和炎性肠病(IBD)中是有效的。然而,通过检测人抗-嵌合抗体(HACA),在一些 IFX 治疗的患者中发现了针对 IFX 的抗体,其可能会降低药物的有效性或者诱导副作用。在各体患者中监测 HACA 和 IFX 水平可以帮助优化用 IFX 的剂量和治疗。检测 HACA 的当前方法基于固相测定法,其受限于循环中存在的 IFX 可能会掩盖 HACA 的存在的事实,并因此只能在 IFX 给药后至少 8 周进行测量。此外,由于血液循环中高分子量免疫复合物的快速清除,导致该时间推移使该测定法变得更加复杂。为了克服这些缺点,我们研发并评价了一种新方法,以在用 IFX 治疗的患者中测量血清 IFX 和 HACA 水平。

[0362] 方法:研发了新的非放射性标记的液相大小排阻(SE)-HPLC 迁移率变动分析,以在来自用 IFX 治疗的血清中测量 HACA 和 IFX 水平。可以高度敏感地分辨并计算免疫复合物(例如,TNF α / IFX 或 IFX/HACA)、游离的 TNF α 或 IFX,以及结合的 / 游离的比率。使用通过用不同浓度的 IFX 或合并的 HACA 阳性血清孵育产生的标准曲线来测定 IFX 或 HACA 的血清浓度。使用该新测定法,我们已经在收集自用 IFX 治疗的 IBD 复发患者的血清中测量了 IFX 和 HACA 水平,并将结果与通过常规桥连 ELISA 测定法获得的那些结果进行了比较。

[0363] 结果:使用高敏感性的新测定法产生了剂量应答曲线。在过量 IFX 存在的情况下,显示了 HACA 的检测。在来自用 IFX 治疗的患者 117 例血清样品中,发现 65 例样品具有高于检测极限的 IFX 水平,并且平均值为 11.0 $\pm$ 6.9mg/mL。对于 HACA 水平,发现 33 (28.2%) 例样品是阳性的,而桥连 ELISA 测定法仅检测到了 24 例阳性样品。我们还鉴定了都来自通过桥连测定法测定的 9 例假阴性和 9 例假阳性样品。发现在 IFX 治疗期间,HACA 水平在 11 例患者中是增加的,而发现 IFX 水平是显著减少的。

[0364] 结论:研发了新的非放射性标记的液相迁移率变动分析,以在来自用 IFX 治疗的血清中测量 IFX 和 HACA 水平。该测定法具有高敏感性和准确性,并且获得的结果是

可重复的。可以将该新测定法有利地用于测量正在进行治疗的患者的 HACA 和 IFX 水平。

[0365] 简介

[0366] 肿瘤坏死因子- α (TNF α) 在自身免疫疾病如克罗恩病(CD)和类风湿性关节炎(RA)的病理学中起着关键作用。已经报道,用治疗抗体如英利昔单抗(人-鼠嵌合单克隆 IgG1 κ)或阿达木单抗(完全人单克隆抗体)阻断 TNF α 降低了 CD 和 RA 中的疾病活性。然而,约 30-40% 的患者并不应答抗-TNF α 治疗,并且由于缺少足够的应答,一些患者需要更大的剂量或者剂量频率调整。各个患者中药物生物可利用度和药物动力学的不同导致了治疗的失败。造成患者产生 HACA/HAHA 的药物的免疫原性导致了許多不利反应(轻微的变态反应至过敏性休克)。目前,许多研究者、药物控制机构、健康保险公司和药物生产商都意识到了这些问题。此外,对一种抗-TNF α 药物第二次应答失败的许多患者可受益于转变成其他抗-TNF α 药物,显示了特异性靶向用于治疗的蛋白质的中和抗体的作用(Radstake 等人,Ann. Rheum. Dis., 68 (11):1739-45 (2009))。因此,确保患者药物和 HACA/HAHA 水平的监测,以使药物施用适合于各个患者,并且可以有效地且经济地给予长期治疗,而对患者风险极小或者没有风险(Bendtzen 等人,Scand. J. Gastroenterol., 44 (7):774-81 (2009))。

[0367] 已经将几种酶联免疫测定法用于评估药物和 HACA/HAHA 的循环水平。图 10 提供了与本发明新的 HACA 测定法比较,可用于测量 HACA 的当前测定法的总结。当前方法的一个局限是当循环中存在可测量量的药物时,很难测量抗体水平。与用于检测 HACA 的当前固相方法(其只能在给药 IFX 后至少 8 周进行测量)相反,本发明新的测定法是非放射性标记的液相大小排阻(SE)-HPLC 测定法,其能在来自正在用 IFX 治疗的患者的血清中测量 HACA 和 IFX 水平。

[0368] 以下是在患者中测量抗-TNF α 生物学药物和针对 TNF α 生物学药物的抗体的血清浓度的基本原理:(1) 在临床试验中进行 PK 研究;(2) FDA 可能要求在临床试验期间监测患者对生物学药物的免疫应答;(3) 通过测量 HACA 或 HAHA 监测患者对生物学药物的应答,以指导每一患者的药物剂量;和(4) 当初始药物失败时,用作为转变成不同生物学药物的指导。

[0369] 方法

[0370] 患者血清中英利昔单抗(IFX)水平的 SE-HPLC 分析。根据厂商说明,用荧光团(“F1”例如如, Alexa **Fluor**[®] 488)标记人重组 TNF α 。用不同量的 IFX 或患者血清室温孵育标记的 TNF α 1 小时。在 HPLC 系统上,通过大小排阻层析分析 100 μ L 体积的样品。基于其保留时间,将 FLD 用于监测游离的 TNF α -F1 和结合的 TNF α -F1 免疫复合物。根据标准曲线,计算血清 IFX 水平。

[0371] 患者血清中 HACA 水平的 SE-HPLC 分析。用 F1 标记纯化的 IFX。用不同稀释度合并的 HACA 阳性血清或稀释的患者血清室温孵育标记的 IFX 1 小时。在 HPLC 系统上,通过大小排阻层析分析 100 μ L 体积的样品。基于其保留时间,将 FLD 用于监测游离的 IFX-F1 和结合的 IFX-F1 免疫复合物。将结合的和游离的 IFX-F1 比率用于确定 HACA 水平。

[0372] 在血清中测量 HACA 的迁移率变动分析方法。该测定法的原理基于在大小排阻-高效液相层析(SE-HPLC)上,对比游离的 F1-标记的 IFX,由于复合物分子量的增加,结合 HACA 的 F1-标记的英利昔单抗(IFX)复合物的迁移率的变动。在 Agilent-1200HPLC 系统中,使用具有 5,000 - 700,000 的分子量分级的 Bio-Sep300x7.8mmSEC-3000 柱(Phenomenex)和 1X

PBS, pH7.3 的移动相, 以 0.5-1.0mL/ 分钟的流速, 用 FLD 检测进行层析。对于每一分析, 将 100 μ L 样品体积上样到柱上。在 SE-HPLC 分析前, 在 1X PBS, pH7.4, 洗脱缓冲液中, 通过将来自 IFX 治疗的患者的血清与 F1- 标记的 IFX 室温孵育 1 小时, 来形成结合 HACA 的 F1- 标记的 IFX 复合物。还在不同的干扰剂如类风湿因子和 TNF- β 存在的情况进行测定法, 以验证测定法。

[0373] 结果

[0374] 图 11 显示了由于高分子量复合物的迁移率移动, 结合 HACA 的 IFX-F1 复合物与游离的 IFX-F1 的分离。如在图 c 和 d 中所见, 荧光峰的保留时间从 21.8 分钟改变为 15.5-19.0 分钟。在反应混合物中存在的 HACA 越多, 层析谱中剩余的游离 IFX-F1 越少, 并且形成的免疫复合物越多。图 12 显示了由于 HACA 的添加造成的荧光峰变动的剂量应答曲线。使用 HACA 阳性样品, 我们可以检测到 1:1000 稀释的血清的峰变动。

[0375] 图 13 显示了由于高分子量复合物的迁移率变动, 结合 IFX 的 TNF α -F1 复合物与游离的 TNF α -F1 的分离。如在图 c 和 d 中所见, 荧光峰的保留时间从 24 分钟改变成 13-19.5 分钟。在反应混合物中存在的 IFX 越多, 层析谱中剩余的游离 TNF α -F1 越少, 并且形成的免疫复合物越多。图 14 显示了由于 IFX 的添加造成的 TNF α -F1 峰变动的剂量应答曲线。基于加入的 IFX, 血清中检测极限为 10ng/mL 的 IFX。

[0376] 通过测试来自自由桥连测定法测量的 HACA 阳性和阴性患者的血清样品, 验证了本发明的新迁移率变动分析(表 4)。使用该测定法, 我们分析了来自 50 例健康受试者和用 IFX 治疗的 117 例 IBD 患者的血清样品。全部 50 例健康受试者样品具有低于检测极限的 IFX 水平, 而 65 例患者样品具有 11.0 μ g/ml 的平均 IFX 浓度。表 5 显示了通过桥连测定法和迁移率变动分析测量的健康对照和用 IFX 治疗的 IBD 患者血清中的 HACA 水平。桥连测定法比迁移率变动分析检测了更少的 HACA 阳性患者, 以及更多的假阴性和更多的假阳性。

[0377] 表 4. 来自桥连测定法和 SE-HPLC 测定法上强阳性和阴性患者血清中相对 HACA 水平的相关性

[0378]

	桥连测定法	HPLC 改变测定法	相关性
阳性	82	81	99%
阴性	12	12	100%

[0379] 表 5. 用桥连测定法(截断值 1.69 μ g/ml)和 HPLC 变动测定法(截断值 0.19, , 结合的和游离的 IFX 的比率)对 HACA 的血清水平进行患者样品分析

[0380]

	受试者 (n)	HACA 阳性		桥连测定法	
		桥连测定法	HPLC 测定法	假阴性	假阳性
健康对照	50	N/A	0	N/A	N/A
用 IFX 治疗的患者	117	24 (20.5%)	33 (28.2%)	9 (高 IFX)	9

[0381] 假阴性结果由含高水平的 IFX 的患者血清造成,所述高水平的 IFX 干扰了桥连测定法对 HACA 的测定,而 SE-HPLC 测定法不受影响。假阳性结果由含高水平的非特异性干扰物质的患者血清造成,所述非特异性干扰物质可以干扰桥连测定法。

[0382] 图 15 显示了在 IFX 治疗期间,IBD 患者中 HACA 水平与 IFX 浓度之间的关系。HACA 可以早在 V10 (30 周)检测到,并在 IFX 治疗期间在一些患者中持续增加。图 16 显示,使用本发明测定法,可以在 IFX 存在的情况下检测到 HACA。血清中更高水平的 HACA 与可检测到的更低水平的 IFX 相关(例如,降低生物可利用度)。因此,在用 IFX 治疗时早期检测 HACA 可以指导医师和 / 或患者转变成其他抗 -TNF 药物或者增加 IFX 的剂量。

[0383] 就内部精确度和测定间精确度(基于 CV 参数)以及对干扰剂的敏感性,验证了测定法。该分析显示如下:

[0384] 英利昔单抗测定法

[0385]

参数	CV%
内部精确度	2.89
测定间精确度	
运行之间对比	4.57
分析之间对比	6.06
仪器之间对比	2.72

[0386] HACA 测定法

[0387]

参数	CV%
内部精确度	3.96
测定间精确度	
运行之间对比	4.15
分析之间对比	5.84
仪器之间对比	6.88

[0388] 英利昔单抗测定法

[0389]

干扰剂	一般范围	测试的浓度	干扰
IgG、IgA、IgM	0.4-16 mg/mL	10 、 2.0 、 1.5 mg/mL	NA
ATI	3.71-150 U/mL (0-60 μ g/mL)	100 U/ mL (~55 μ g/mL)	干扰低浓度 IFX 样品 (< 5 μ g/mL) 的检测

[0390]

类风湿因子	> 30 IU/mL (RA 阳性患者)	多达 387 IU/mL	NA
TNF- α	6.2-6.6pg/mL	0.0125 ng/mL-40 μ g/mL	100 ng/mL
TNFR1/TNFR2	1.9/4.5 ng/mL	0.1-1000 ng/mL	NA
已溶血的血清	> 20 HI	100-300 HI	NA
也测试了以下试剂, 其并不显示出干扰: 硫唑嘌呤、氨甲蝶呤、TNF- β 、脂血血清 (Lipemic serum)、血红蛋白			

[0391] HACA 测定法

[0392]

干扰剂	一般范围	测试的浓度	干扰
IgG、IgA、IgM	0.4-16 mg/mL	10 、 2.0 、 1.5 mg/mL	NA
英利昔单抗	0-100 μ g/mL	0.78-100 μ g/mL	NA
类风湿因子	> 30 IU/mL (RA 阳性患者)	多达 774 IU/mL	NA
TNF- α	6.2-6.6pg/mL	0.0125 ng/mL-40 μ g/mL	250 ng/mL
TNFR1/TNFR2	1.9/4.5 ng/mL	0.1-1000 ng/mL	NA
已溶血的血清	> 20 HI	100-300 HI	NA
也测试了以下试剂, 其并不显示出干扰: 硫唑嘌呤、氨甲蝶呤、TNF- β 、脂血血清 (Lipemic serum)、血红蛋白			

[0393] 结论

[0394] 抗-TNF α 生物学药物可以容易地用荧光团 (“F1”) 标记, 并且用于测量 HACA/HAHA 的迁移率变动分析形式是均相测定法, 与一般的 ELISA 不一样, 其不用将抗原包被到固体表面以及多个洗涤和孵育步骤。用 HACA- 阳性血清孵育 F1- 标记的 IFX, 导致免疫复合物的形成, 与游离的 F1- 标记的 IFX 比较, 在 SE-HPLC 中, 其在不同的位置洗脱, 并因此可以定量 HACA 的量。其他血清组分的存在对迁移率变动分析影响极小。与 ELISA 不同, 迁移率变动分析形式不受无关 IgG 的非特异性结合的影响, 并且可以检测 IgG4 同种型。健康血清样品不会造成 F1- 标记的 IFX 的迁移率变动, 并且通过本发明测定法, 发现 28.2% 用 IFX 治疗的患者都具有 HACA。因此, 本文中所述的测定法形式非常敏感, 并可以将其用于检测患者血清中的全部生物学药物 (例如, Remicade、Humira、Enbrel 和 Cimzia) 及其抗体 (例如, 抗-Remicade、抗-Humira、抗-Enbrel 和抗-Cimzia)。特别地, 使用本发明迁移率变动分析, 可以在 IFX 存在的情况下检测 HACA, 在用 IFX 治疗期间早期检测 HACA 可以指导医师和/或患者转变成其他抗-TNF 药物或者增加 IFX 的后续剂量。

[0395] 我们研发了新的非放射标记的液相 SE-HPLC 测定法, 以在获自用 IFX 治疗的患者的血清样品中测量 IFX 和 HACA 水平。新测定法具有高敏感性、准确性和精确性, 并且结果是高度可重复的, 使得该测定法适合于常规测试大量的人血清样品。不同于 ELISA, 新测定

法形式去除了抗原对固体表面的包被,并不受无关 IgG 的非特异性结合的影响。本文中所述的测定法形式的这些优点降低了测试的假阴性和假阳性。有利地,本发明测定法形式是非常敏感的,并可以用于检测正在治疗的患者血清中存在的全部生物学药物及其抗体。

[0396] 实施例 4. 使用新迁移率变动分析区分患者血清中的中和性人抗-嵌合抗体和非中和性人抗-嵌合抗体(HACA)

[0397] 该实施例显示了使用大小排阻层析的新均相测定法,用于测量患者样品(例如,血清)中的自身抗体(例如,HACA)浓度,以及用于测定此类自身抗体是中和性自身抗体还是非中和性自身抗体,以在荧光标记的 TNF α 存在的情况下,检测这些自身抗体与荧光标记的抗-TNF α 药物的结合。这些测定法是有利的,因为避免了去除低亲和力 HACA 的洗涤步骤的需求、使用特殊荧光团允许直观地和 / 或在 IR 光谱仪上检测,这降低了背景和血清干扰问题,由于荧光标记检测的高敏感性,增加了在低滴度患者中检测中和性或非中和性 HACA 的能力,并且以液相反应发生,从而降低了由于与固体表面如 ELISA 平板连接,表位中任何改变的几率。

[0398] 在一个示例性实施方案中,用荧光团“F1”标记抗-TNF α 药物(例如, REMICADE™)(参见例如,图 17A),其中可以直观地和 / 或在 IR 光谱仪上检测荧光团。类似地,用荧光团“F2”标记 TNF α (参见例如,图 17A),其中可以直观地和 / 或在 IR 光谱仪上检测荧光团,并且其中“F1”和“F2”是不同的荧光团。在液相反应中,用人血清孵育标记的抗-TNF α 药物,并将标记的 TNF α 加入到反应中,以允许血清中存在的标记的抗-TNF α 药物、标记的 TNF α 和 / 或 HACA 形成复合物(即,免疫复合物)。孵育后,将样品直接上样到大小排阻柱上。与自身抗体和标记的抗-TNF α 药物之间的二元复合物(例如,图 17A 中的“免疫-复合物 2”)、仅标记的药物或者仅标记的 TNF α 比较,自身抗体(例如,HACA)和标记的 TNF α 二者与标记的抗-TNF α 药物的结合导致峰向左变动(例如,图 17A 中的“免疫-复合物 1”)。自身抗体(例如,HACA)、标记的 TNF α 和标记的抗-TNF α 药物的这种三元复合物的存在表明,血清样品中存在的自身抗体是自身抗体(例如,HACA)的非中和形式,以致自身抗体不会干扰抗-TNF α 抗体与 TNF α 之间的结合。在一个特定的实施方案中,如图 17A 中所示,如果血清中存在非中和性 HACA,那么将观察到 F1-REMICADE™和 F2-TNF α 二者的变动,导致免疫-复合物 1 和免疫-复合物 2 峰增加,并且游离的 F1-REMICADE™和游离的 F2-TNF α 峰减少。然而,在自身抗体(例如,HACA)、标记的 TNF α 和标记的抗-TNF α 药物的三元复合物不存在的情况下,自身抗体(例如,HACA)与标记的抗-TNF α 药物之间的二元复合物(例如,图 17B 中的“免疫-复合物 2”)的存在表明,血清样品中存在的自身抗体是自身抗体(例如,HACA)的中和形式,以致自身抗体会干扰抗-TNF α 抗体与 TNF α 之间的结合。在一个特定的实施方案中,如图 17B 中所示,如果血清中存在中和性 HACA,那么将观察到的 F1-REMICADE™变动,导致免疫-复合物 2 峰增加,游离的 F1-REMICADE™峰减少,并且游离的 F2-TNF α 峰没有变动。在某些实例中,中和性 HACA 的存在表明应当将使用 REMICADE™的当前治疗转变成另一种抗-TNF α 药物如 HUMIRA™。

[0399] 在备选的实施方案中,首先在液相反应中将标记的抗-TNF α 药物与人血清孵育,允许标记的抗-TNF α 药物与血清中存在的 HACA 之间形成复合物(即,免疫-复合物)。孵育后,将样品直接上样到大小排阻柱上。与仅标记的药物比较,自身抗体(例如,HACA)与标记的抗-TNF α 药物的结合导致峰(例如,图 18 中的“免疫-复合物 2”)向左变动。然后,可

以将标记的 TNF α 加入到反应中,以测定其是否能取代(例如,竞争)自身抗体(例如,HACA)与标记的抗-TNF α 药物结合,从而允许标记的抗-TNF α 药物与标记的 TNF α 之间形成复合物(即,免疫复合物)。孵育后,将样品直接上样到大小排阻柱上。与仅标记的 TNF α 比较,标记的抗-TNF α 药物与标记的 TNF α 的结合导致峰(例如,图 18 中的“免疫-复合物 3”)向左变动。通过添加标记的 TNF α ,破坏自身抗体(例如,HACA)与标记的抗-TNF α 药物之间的结合,表明血清样品中存在的自身抗体是自身抗体(例如,HACA)的中和形式,以致自身抗体会干扰抗-TNF α 抗体与 TNF α 之间的结合。在某些实例中,中和性 HACA 的存在表明应当将用 REMICADE™ 的当前治疗转变成另一抗-TNF α 药物如 HUMIRA™。

[0400] 实施例 5. 使用新的均相迁移率变动分析分析患者血清中针对阿达木单抗的人抗-药物抗体(ADA)

[0401] 背景和目的:已经显示,针对 TNF- α 的单克隆抗体如英利昔单抗(IFX)、阿达木单抗(HUMIRA™)和培舍珠单抗(certolizumab)在治疗炎症肠病(IBD)和其他炎症疾病中是有效的。抗-药物抗体(ADA)会降低药物的有效性和/或诱导副作用。然而,发现 ADA 不仅在用嵌合抗体英利昔单抗治疗的患者中存在,也在用人源化抗体阿达木单抗治疗的患者中存在。在各个患者中监测 ADA 和药物水平可以帮助优化治疗以及患者的给药。我们研发了非放射性标记的液相均相迁移率变动分析,以准确测量血清中来自患者的 HACA(人抗-嵌合抗体)和 IFX 二者。该测定方法克服了当前用于检测 HACA 的固相测定法的主要局限,即不能在循环中存在 IFX 的情况下准确地检测 HACA。在本研究中,我们评价了用于测量用人源化抗体药物,阿达木单抗治疗的患者中血清 ADA 和药物水平的这种新方法。

[0402] 方法:迁移率变动分析基于大小排阻分离上,游离抗原对比抗原-抗体免疫复合物的保留时间的改变。将荧光团标记的阿达木单抗或 TNF- α 和内部对照与血清样品混合,以测量在 ADA 或药物存在的情况下,游离的阿达木单抗和 TNF- α 的迁移率变动。游离的阿达木单抗或 TNF- α 与内部对照的比率的改变表示免疫复合物的形成。通过用不同浓度的抗人 IgG 抗体或纯化的阿达木单抗孵育而产生的标准曲线测定 ADA 或阿达木单抗的血清浓度。使用迁移率变动分析,我们测量了收集自用阿达木单抗治疗没有应答的 IBD 患者的血清中的阿达木单抗和 ADA 水平。

[0403] 结果:将用抗人 IgG 抗体产生的剂量应答曲线用于测量标记的阿达木单抗的迁移率变动。测定法的检测极限为 1ng 抗-人 IgG。测试了来自 50 例健康对照的血清的 ADA,并且全部样品都具有低于检测极限的 ADA 水平(即,游离的标记的阿达木单抗没有变动)。在外源加入的阿达木单抗存在的情况下,也显示了 ADA 的检测。为了在用阿达木单抗治疗的患者中测量药物浓度,我们在标记的 TNF- α 的迁移率变动上,使用不同量的阿达木单抗产生标准曲线,并且阿达木单抗的检测极限为 10ng。

[0404] 结论:可以将本发明非放射性标记的液相均相迁移率变动分析应用于在来自用阿达木单抗治疗的患者血清样品中测量 ADA 和阿达木单抗水平。发现该测定法是可重复的,具有高敏感性和准确性,并且可以将其用于在来自用阿达木单抗治疗的患者血清样品中评价 ADA 水平。

[0405] 实施例 6. 使用新的可授予专利的迁移率变动分析分析患者血清中针对阿达木单抗的人抗-药物抗体(ADA)

[0406] 摘要

[0407] 背景:已经显示,抗 TNF- α 药物如英利昔单抗(IFX)和阿达木单抗(ADL)在治疗炎症性肠病(IBD)中是有效的。然而,治疗患者中 ADA 的诱导会降低药物的有效性和/或诱导副作用。事实上,发现 ADA 不仅在用 IFX 治疗的患者中存在,也在用 ADL 治疗的患者中存在。在各个患者中监测 ADA 和药物水平可以帮助优化治疗以及患者的给药。我们研发了具有可授予专利的迁移率变动分析,以准确测量血清中来自 IFX 治疗的患者的 HACA (人抗-嵌合抗体)和 IFX 二者。该测定方法克服了当前用于检测 HACA 的固相测定法的主要局限,即不能在循环中存在 IFX 的情况下准确地检测 HACA。在本研究中,我们评价了用于测量用完全人抗体药物 ADL 治疗的患者中血清 ADA 和药物水平的这种新方法。

[0408] 方法:迁移率变动分析基于大小排阻分离上,抗原-抗体免疫复合物对比游离抗原的保留时间的改变。将荧光团标记的 ADL 或 TNF- α 和内部对照与血清样品混合,以测量在 ADA 或药物存在的情况下,标记的 ADL 和 TNF- α 的迁移率变动。游离的 ADL 或 TNF- α 与内部对照的比率的改变表示免疫复合物的形成。通过用不同浓度的抗人 IgG 抗体或纯化的 ADL 孵育而产生的标准曲线测定 ADA 或 ADL 的血清浓度。使用该测定法,我们测量了收集自用 ADL 治疗的 IBD 患者的血清中的 ADL 和 ADA 水平。

[0409] 结果:将用抗人 IgG 抗体产生的剂量应答曲线用于测量标记的 ADL 的迁移率变动。测定法的检测极限为 10ng 抗-人 IgG。测试了来自 100 例健康对照的血清的 ADA,并且全部样品都具有低于检测极限的 ADA 水平(即,游离的标记的 ADL 没有改变)。在 114 例用 ADL 治疗的 IBD 患者样品中的 5 例中显示了 ADA 的检测。为了在用 ADL 治疗的患者中测量药物浓度,我们在标记的 TNF- α 的变动上,使用不同量的 ADL 产生标准曲线,具有 10ng 的检测极限。

[0410] 结论:我们已经将可授予专利的非放射性标记的液相均相迁移率变动分析应用于在来自用 ADL 治疗的患者的血清样品中测量 ADA 和 ADL 水平。发现该测定法是可重复的,具有高敏感性和准确性,并且可以将其用于在来自用 ADL 治疗的患者的血清样品中评价 ADA 水平。

[0411] 简介

[0412] 已经显示,抗-肿瘤坏死因子- α (TNF α) 生物制品如英利昔单抗(IFX)、依他西特、阿达木单抗(ADL)和培舍珠单抗可以降低许多自身免疫疾病,包括克罗恩病(CD)和类风湿性关节炎(RA)的疾病活性。然而,一些患者并不应答抗-TNF α 治疗,而由于缺少足够的应答,其他患者需要更大的或者更频繁的剂量或者发展成输液反应。

[0413] 引起患者产生针对药物的抗体的治疗抗体的免疫原性导致了治疗失败和输液反应。与完全人源化的抗体如 ADL 比较,嵌合抗体如 IFX 具有诱导抗体产生的更高可能性。在 RA 患者中,针对 IFX (HACA) 的抗体的普遍性为 12%-44%,并且与患者血清中的 IFX 水平和治疗应答成反比例。尽管认为完全人源化的 ADL 比鼠或嵌合抗体具有更低的抗原性,但几个研究报道了人抗-人源化抗体(HAHA)的形成,并且在 RA 和 CD 患者中显示出 1%-87% 的抗体产生普遍性(Aikawa 等人, *Immunogenicity of Anti-TNF- α agents in autoimmune diseases. Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 38 (2-3):82-9 (2010))。

[0414] 对一种抗-TNF α 药物第二次应答失败的许多患者可受益于转变成另一个抗-TNF α 药物或者增加剂量和/或剂量频率。因此,确保患者药物和抗-药物抗体(ADA)水平的监测,以使药物施用适合于各个患者。当正当时,本方法允许剂量调整,或

当 ADA 水平存在时终止药物(Bendtzen 等人, Individual medicine in inflammatory bowel disease: monitoring bioavailability, pharmacokinetics and immunogenicity of anti-tumour necrosis factor- α antibodies. Scand. J. Gastroenterol., 44 (7): 774-81 (2009); Afif 等人, 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))。

[0415] 已经研发了许多测定法来测量 HACA 和 HAHA。当前方法的一个局限是,但循环中存在高水平的药物时,不能可靠地测量 ADA 水平。

[0416] 我们已经研发了可授予专利的非放射性标记的液相迁移率变动分析,以在来自用 ADL 治疗的患者的血清中测量 ADA 和 ADL 水平,其不受血清中存在的药物影响。

[0417] 方法

[0418] 用患者血清孵育荧光团(F1)标记的 ADL,以形成免疫复合物。在每一反应中,将 F1 标记的小肽包括为内部对照。将不同量的抗-人 IgG 用于产生标准曲线,以测定血清 ADA 水平。通过大小排阻层析,基于其分子量,将游离的 F1 标记的 ADA 从抗体结合的复合物中分离出来。将来自每一样品的游离 F1 标记的 ADL 与内部对照的比率用于从标准曲线中外推 HAHA 浓度。将类似的方法用于在含 F1 标记的 TNF- α 的患者血清样品中测量 ADL 水平。

[0419] 结果

[0420] 图 19 显示了由于高分子量复合物的迁移率变动,结合抗-人 IgG 的 F1-ADL 复合物从游离的 F1-ADL 中分离出来。如在图 c-h 中所见,荧光峰的保留时间从 10.1 分钟改变成 7.3-9.5 分钟。反应混合物中加入的抗-人 IgG 越多,在层析中剩余的游离 ADL 越少,并且形成的免疫复合物越多(h-c)。内部对照的保留时间为 13.5 分钟。

[0421] 图 20 显示了由于添加抗-人 IgG 造成的荧光峰移动的剂量应答曲线。由于免疫复合物的形成,增加抗-人 IgG 浓度降低了游离 ADL 与内部对照的比率。测定法的敏感性为 10ng/ml 抗-人 IgG。内部对照“F1-BioCyt”对应于 Alexa **Fluor**[®] 488-biocytin (BioCyt),其组合了具有生物素的绿色荧光 Alexa **Fluor**[®] 488 荧光团和醛固定的伯胺(赖氨酸)(Invitrogen Corp.; Carlsbad, CA)。

[0422] 图 21 显示了由于高分子量复合物的迁移率变动,结合 ADL 的 TNF- α -F1 复合物从游离的 TNF- α -F1 中的分离。如在图 c 和 j 中所见,荧光峰的保留时间从 11.9 分钟改变成 6.5-10.5 分钟。反应混合物中加入的 ADL 越多,在层析中剩余的游离 TNF- α -F1 峰越少,并且形成的免疫复合物越多。

[0423] 图 22 显示了由于添加 ADL 造成的 TNF- α -F1 峰移动的剂量应答曲线。基于加入的 ADL,血清中检测极限为 10ng/mL 的 ADL。

[0424] 表 6 显示了使用本发明迁移率变动分析分析了来自 100 例健康受试者和 114 例用 ADL 治疗的 IBD 患者的血清样品的 ADA 和 ADL 水平。全部 100 例健康受试者具有低于检测极限的 ADA 水平(游离的 F1-ADL 没有移动),而 114 例患者样品中的 5 例具有 0.012 至 >20 μ g/ml 的 ADA 浓度。在 100 例健康受试者样品中,ADL 水平的中位数(mean)为 $0.76 \pm 1.0 \mu$ g/ml (范围 0-9.4 μ g/ml)。在来自用 ADL 处理的患者的 114 例血清样品中,ADL 水平的中位数为 $10.8 \pm 17.8 \mu$ g/ml (范围 0 - 139 μ g/ml)。5 例 ADA 阳性样品中的 4 例具有不可检测水

平的 ADL。

[0425] 表 6. 通过迁移率变动分析测量 ADA 和 ADL 的患者血清水平

[0426]

	受试者(n)	性 别 (M/F)	年龄(岁) (中位数)	ADA 阳性	ADL 水平 ($\mu\text{g/ml}$)
健康对照	100	38/62	18-62 (37.1)	0	0.76 ± 1.00
用 ADL 治疗的 IBD 患者	114	51/63	20-69 (39.9)	5 (4.3%)	10.80 ± 17.80

[0427] 结论

[0428] 用于测量 HACA/IFX 的迁移率变动分析形式是均相测定法,与一般 ELISA 不同,其不用将抗原包被到固体表面上,并且不用多个洗涤和孵育步骤。可以将该测定法应用于测定 ADA 和抗 TNF 药物。与 ELISA 方法(mg/ml 范围)比较,对于采用患者血清的 ADA 和 ADL 测量,测定法的敏感性更高($\mu\text{g/ml}$ 范围)。健康对照血清样品不会造成 F1- 标记的 ADL 的迁移率变动,并且通过该测定法发现 4.3% 的用 ADL 治疗的患者具有 ADA。尽管健康对照血清样品造成了 F1- 标记的 TNF- α 的迁移率变动,这可能归因于 TNF- α 的可溶性游离受体的存在,用 ADL 治疗的患者中 ADL 的平均值更高(10.8 对比 0.76 mg/ml)。在患者正在接受 ADL 治疗时,进行 ADA 的早期检测和 ADL 药物水平的监测允许医师优化 ADL 的剂量或者根据需要转变成另一种抗-TNF- α 药物,从而优化患者疾病的整体治疗。

[0429] 表 7. 通过迁移率变动分析测量的 ADA 和 ADL 的患者血清水平

[0430]

	受试者 (n)	性 别 (M/F)	年龄(岁) (中位数)	ADL 水平 ($\mu\text{g/ml}$)	ADA 阳性
健康对照	100	38/62	18-62 (37.1)	0.76 ± 1.00	0
用 ADL 治疗的 IBD 患者	114	51/63	20-69 (39.9)	10.80 ± 17.80	0-4 $\mu\text{g/ml}$ ADL: 4/42 (9.52%)

[0431] 使用该迁移率变动分析,我们分析了来自 100 例健康受试者和 114 例用 ADL 治疗的 IBD 患者的血清样品的 ADA 和 ADL 水平。全部 100 例健康受试者具有低于检测极限的 ADA 水平(游离的 F1-ADL 没有改变),而 42 例用 0-4 $\mu\text{g/ml}$ ADL 治疗的患者样品中的 4 例具有 0.012 至 >20 $\mu\text{g/ml}$ 的平均 ADA 浓度。在 100 例健康受试者样品中,ADL 水平的中位数为 $0.76 \pm 1.0\text{mg/ml}$ (范围 0-9.4 mg/ml)。在来自用 ADL 处理的患者的 114 例血清样品中,ADL 水平的中位数为 $10.8 \pm 17.8\text{mg/ml}$ (范围 0 - 139 mg/ml)。4 例 ADA 阳性样品中的 4 例具有不可检测水平的 ADL。对于 ADA 的检测,将用 ADL 治疗的 114 例 IBD 患者分成两组,0-4 $\mu\text{g/ml}$ 的 ADL 和 > 4 $\mu\text{g/ml}$ 的 ADL。用大量 ADL-F1 测试具有 4 $\mu\text{g/ml}$ 以上 ADL 的患者,以克服循环 ADL 与 ADL-F1 的竞争。

[0432] 健康对照血清样品不会造成 F1- 标记的 ADL 的迁移率变动。在初步的研究中,在该测定法中发现,9.52% 具有 $0.4 \mu\text{g/ml}$ ADL 的患者具有 ADA。

[0433] 实施例 7. 测定 REMICADE™ 和人抗 - 药物抗体的浓度水平

[0434] 该实施例描述了在血清样品中测定抗 -TNF α 药物水平,例如 REMICADE™ (英利昔单抗),以及测定人抗 - 药物抗体水平,例如针对 REMICADE™ (英利昔单抗)的人抗 - 嵌合抗体 (HACA) 的方法。

[0435] 步骤 1:测定样品中 REMICADE™ (英利昔单抗) 的浓度水平

[0436] 在一个示例性实施方案中,用荧光团(例如,Alexa₆₄₇)标记 TNF α ,其中可以直观地和 / 或在荧光光谱仪(fluorescent spectra)上检测荧光团。在液相反应中,用人血清孵育标记的 TNF α ,以允许血清中存在的抗 -TNF α 药物结合。还可以在液相反应中,用已知量的抗 -TNF α 药物孵育标记的 TNF α ,以产生标准曲线。孵育后,将样品直接上样到大小排阻柱上。与仅标记的 TNF α 比较,抗 -TNF α 药物与标记的 TNF α 的结合导致峰向左改变。然后,可以将血清样品中存在的抗 -TNF α 药物的浓度与标准曲线和对照比较。

[0437] 患者血清中 REMICADE™ (英利昔单抗)水平的 SE-HPLC 分析。根据厂商说明,用荧光团,Alexa **Fluor**® 488 标记人重组 TNF α 。用不同量的 REMICADE™ 或患者血清室温孵育标记的 TNF α 1 小时。在 HPLC 系统上,通过大小排阻层析分析 $100 \mu\text{L}$ 体积的样品。基于其保留时间,将荧光标记检测用于监测游离的标记的 TNF α 和结合的标记的 TNF α 免疫复合物。根据标准曲线,计算血清 REMICADE™ 水平。

[0438] 以下等式与该测定法相关:

[0439] 等式 I:标记的 -TNF α + REMICADE™ $\rightarrow$ (标记的 -TNF α • REMICADE™)_{复合物}

[0440] 等式 II:[REMICADE™]_{没有 - 标记的 -TNF α - 存在的} = [(标记的 -TNF α • REMICADE™)_{复合物}]

[0441] 等式 III:[REMICADE™] = [(标记的 -TNF α • REMICADE™)_{复合物}] / [标记的 -TNF α]
x [标记的 -TNF α]

[0442] 在步骤 1 中,将已知量的标记的 -TNF α 与含 REMICADE™ 的血清样品接触。标记的 -TNF α 和 REMICADE™ 形成复合物, (标记的 -TNF α • REMICADE™)_{复合物},参见等式 I。因为几乎全部的 REMICADE™ 都会与标记的 -TNF α 形成复合物,所以在引入标记的 -TNF α 之前存在的 REMICADE™ 的浓度等于标记的 -TNF α • REMICADE™_{复合物} 的测量浓度,参见等式 II。通过将 [(标记的 -TNF α • REMICADE™)_{复合物}] / [标记的 -TNF α] 的比率乘以 [标记的 -TNF α] 来计算 REMICADE™ 的浓度水平,参见等式 III。通过积分来自作为大小排阻 HPLC 的洗脱时间的函数的信号强度的图中的 (标记的 -TNF α • REMICADE™)_{复合物} 峰的曲线下面积,并将该数值除以图中标记的 -TNF α 峰的曲线下面积的最终积分,来获得比率, [(标记的 -TNF α • REMICADE™)_{复合物}] / [标记的 -TNF α]。[标记的 -TNF α] 是推理已知的。

[0443] 步骤 2:测定人抗 - 嵌合抗体, HACA 的水平。

[0444] 在一个示例性实施方案中,用荧光团,例如 Alexa₆₄₇ 标记抗 -TNF α 药物,例如 REMICADE™,其中可以直观地和 / 或在荧光光谱仪上检测荧光团。在液相反应中,用人血清孵育标记的抗 -TNF α 药物,以允许血清中存在的任何 HACA 结合。还可以在液相反应中,用已知量的抗 -IgG 抗体或收集的阳性患者血清孵育标记的抗 -TNF α 药物,以产生标准曲线。孵育后,将样品直接上样到大小排阻柱上。与仅标记的药物比较,自身抗体与标记的抗 -TNF α 药物的结合导致峰向左变动。然后,可以将血清样品中存在的 HACA 的浓度与标

准曲线和对照比较。

[0445] 患者血清中 HACA 水平的 SE-HPLC 分析。用荧光团标记纯化的 REMICADE™。用不同稀释度的合并的 HACA 阳性血清或稀释的患者血清室温孵育标记的 REMICADE™1 小时。在 HPLC 系统上,通过大小排阻层析分析 100 μL 体积的样品。基于其保留时间,将荧光标记检测用于监测游离的纯化的 REMICADE™和结合的标记的 REMICADE™免疫复合物。将结合的和游离的标记的 REMICADE™比率用于确定如下所述的 HACA 水平。

[0446] 测量血清中 HACA 的迁移率变动分析。该测定法的原理基于在大小排阻 - 高效液相层析 (SE-HPLC) 上,对比游离的 Alexa₆₄₇- 标记的 REMICADE™,由于复合物分子量的增加,抗 - 药物抗体 (如, HACA) 与 Alexa₆₄₇- 标记的 REMICADE™的复合物的迁移率的变动。在 Agilent-1200HPLC 系统中,使用具有 5,000 - 700,000 的分子量分级的 Bio-Sep300x7.8mm SEC-3000 柱 (Phenomenex) 和 1X PBS, pH7.3 的移动相,以 0.5-1.0mL/ 分钟的流速,用荧光标记检测,例如 650nm 的 UV 检测进行层析。在具有 Bio-Sep300x7.8mm SEC-3000 柱的 Agilent-1200HPLC 系统的前面是 BioSep75x7.8mm SEC-3000 分析型预处理柱。对于每一分析,将 100 μL 样品体积上样到柱上。在 SE-HPLC 分析前,在 1X PBS, pH7.3, 洗脱缓冲液中,通过将来自 REMICADE™治疗的患者的血清与标记的 REMICADE™室温孵育 1 小时,来形成 HACA 和标记的 REMICADE™的复合物。

[0447] 以下等式与该测定法相关:

[0448] 等式 IV: REMICADE™+ 标记的 -REMICADE™+HACA → (REMICADE™ • HACA)_{复合物} + (标记的 -REMICADE™ • HACA)_{复合物}

[0449] 等式 V: $[\text{REMICADE}^{\text{TM}}] / [\text{REMICADE}^{\text{TM}} \cdot \text{HACA}_{\text{复合物}}] = [\text{标记的 -REMICADE}^{\text{TM}}] / [\text{标记的 -REMICADE}^{\text{TM}} \cdot \text{HACA}_{\text{复合物}}]$

[0450] 等式 VI: $[\text{HACA}] = [\text{REMICADE}^{\text{TM}} \cdot \text{HACA}]_{\text{复合物}} + [\text{标记的 -REMICADE}^{\text{TM}} \cdot \text{HACA}]_{\text{复合物}}$

[0451] 等式 VII: $[\text{REMICADE}^{\text{TM}} \cdot \text{HACA}_{\text{复合物}}] = [\text{REMICADE}^{\text{TM}}] \times [\text{标记的 -REMICADE}^{\text{TM}} \cdot \text{HACA}_{\text{复合物}}] / [\text{标记的 -REMICADE}^{\text{TM}}]$

[0452] 等式 VIII: $[\text{标记的 -REMICADE}^{\text{TM}} \cdot \text{HACA}_{\text{复合物}}] = [\text{标记的 -REMICADE}^{\text{TM}}] \times [\text{标记的 -REMICADE}^{\text{TM}} \cdot \text{HACA}_{\text{复合物}}] / [\text{标记的 -REMICADE}^{\text{TM}}]$

[0453] 等式 IX: $[\text{REMICADE}^{\text{TM}}]_{\text{有效量}} = [\text{REMICADE}^{\text{TM}}] - [\text{HACA}]$

[0454] 测定人抗 -TNF α 药物抗体 (例如 HACA) 的浓度水平。将已知浓度的标记的 -REMICADE™加入到血清样品中。HACA 与 REMICADE™或标记的 -REMICADE™形成复合物,参见等式 IV。在上文步骤 1 中测定 $[\text{REMICADE}^{\text{TM}}]$ 。通过积分标记的 -REMICADE™ • HACA_{复合物} 的曲线下面积,并将该数值除以游离的标记的 -REMICADE™的曲线下面积的最终积分,得到 $[\text{标记的 -REMICADE}^{\text{TM}} \cdot \text{HACA}_{\text{复合物}}]$ 与 $[\text{标记的 -REMICADE}^{\text{TM}}]$ 的比率。 $[\text{REMICADE}^{\text{TM}}]$ 与 $[\text{REMICADE}^{\text{TM}} \cdot \text{HACA}_{\text{复合物}}]$ 的比率等于 $[\text{标记的 -REMICADE}^{\text{TM}}]$ 与 $[\text{标记的 -REMICADE}^{\text{TM}} \cdot \text{HACA}_{\text{复合物}}]$ 的比率,参见等式 V。由于 HACA 平衡且与 REMICADE™和标记的 -REMICADE™二者形成复合物, HACA 的总量等于 REMICADE™ • HACA_{复合物} 的量和标记的 -REMICADE™ • HACA_{复合物} 的量的总和,参见等式 VI。由于 $[\text{REMICADE}^{\text{TM}}]$ 与 $[\text{REMICADE}^{\text{TM}} \cdot \text{HACA}_{\text{复合物}}]$ 的比率等于 $[\text{标记的 -REMICADE}^{\text{TM}}]$ 与 $[\text{标记的 -REMICADE}^{\text{TM}} \cdot \text{HACA}_{\text{复合物}}]$ 的比率,所以通过将 $[\text{标记的 -REMICADE}^{\text{TM}} \cdot \text{HACA}_{\text{复合物}}] / [\text{标记的 -REMICADE}^{\text{TM}}]$ 的比率分别乘以步骤 1 中测定的 REMICADE™的浓度量和推理已知的标记的 -REMICADE™的浓度量,来测定 $[\text{REMICADE}^{\text{TM}}\text{-HACA}]$

复合物和 [标记的 -REMICADETM-HACA_{复合物}] 二者,参见等式 VII 和 VIII。因此,HACA 的总量等于 (1) 步骤 1 的 [REMICADETM] 乘以 [标记的 -REMICADETM•HACA_{复合物}]/[标记的 -REMICADETM] 和 (2) 推理已知的 [标记的 REMICADETM] 乘以 [标记的 -REMICADETM•HACA_{复合物}]/[标记的 -REMICADETM] 的总和。

[0455] 测定 REMICADETM的有效浓度水平。由于 HACA 与 REMICADETM形成复合物,所以血清样品中可利用的 REMICADETM的有效量是步骤 1 测量的 REMICADETM的量减去步骤 2 测量的 HACA 的量,参见等式 IX。

[0456] 示例性计算。在 V10 上的患者 JAG 中,测定的 [REMICADETM] 为 7.5 μg/ml,参见图 16c。该结果通过遵循步骤 1 并使用等式 I-III 获得。7.5 μg/ml 等于 30ng/4 μL。由于将 4 μL 的样品用于步骤 2 中的测量,所以分析的样品中存在总共 30.0ng 的 REMICADETM。V10 上患者 JAG 的 [标记的 -REMICADETM•HACA_{复合物}]/[标记的 -REMICADETM] 的比率为 0.25,参见图 16b。引入到样品中的 [标记的 -REMICADETM] 为 37.5ng/100 μL。由于将 100 μL 的标记的 -REMICADETM用于步骤 2 中的测量,所以分析的样品中存在总共 37.5ng 的标记的 -REMICADETM。使用等式 VII, REMICADETM•HACA_{复合物} 的总量为 30ng 乘以 0.25,其等于 7.5ng 标记的 -REMICADETM•HACA_{复合物}。使用等式 VIII,标记的 -REMICADETM•HACA_{复合物} 的总量为 37.5ng 乘以 0.25,其等于 9.4ng 标记的 -REMICADETM•HACA_{复合物}。使用等式 VI, HACA 的总量等于 9.4ng 和 7.5ng 的总和,其等于 16.9ng HACA。4 μL 的样品中存在 16.9ngHACA。[HACA] 为 16.9ng/4 μL,其等于 4.23 μg/ml。使用等式 IX, REMICADETM的有效量等于步骤 1 测定的 7.5 μg/ml REMICADETM减去步骤 2 测定的 4.23 μg/ml HACA。在该示例性计算中,有效的 [REMICADETM] 等于 3.27 μg/ml。

[0457] 实施例 8. 测定 HUMIRATM和人抗 - 药物抗体的浓度水平

[0458] 该实施例描述了测定血清样品中 HUMIRATM的水平和人抗 - 人抗体(HAHA)的水平的方法。

[0459] 步骤 1 :测定样品中 HUMIRATM的浓度水平。

[0460] 在一个示例性实施方案中,用荧光团(例如,Alexa₆₄₇)标记 TNF α,其中可以直观地和 / 或在荧光光谱仪上检测荧光团。在液相反应中,用人血清孵育标记的 TNF α,以允许血清中存在的抗 -TNF α 药物结合。还可以在液相反应中,用已知量的抗 -TNF α 药物孵育标记的 TNF α,以产生标准曲线。孵育后,将样品直接上样到大小排阻柱上。与仅标记的 TNF α 比较,抗 -TNF α 药物与标记的 TNF α 的结合导致峰向左变动。然后,可以将血清样品中存在的抗 -TNF α 药物的浓度与标准曲线和对照比较。

[0461] 患者血清中 HUMIRATM水平的 SE-HPLC 分析。根据厂商说明,用荧光团, Alexa **Fluor**[®] 488 标记人重组 TNF α。用不同量的 HUMIRATM或患者血清室温孵育标记的 TNF α 1 小时。在 HPLC 系统上,通过大小排阻层析分析 100 μL 体积的样品。基于其保留时间,将荧光标记检测用于监测游离的标记的 TNF α 和结合的标记的 TNF α 免疫复合物。根据标准曲线计算血清 HUMIRATM水平。

[0462] 以下等式与该测定法相关:

[0463] 等式 X :标记的 -TNF α +HUMIRATM→ (标记的 -TNF α • HUMIRATM)_{复合物}

[0464] 等式 XI : [HUMIRATM] = [(标记的 -TNF α • HUMIRATM)_{复合物}]

[0465] 等式 XII : [HUMIRATM] = [(标记的 -TNF α • HUMIRATM)_{复合物}] / [标记的 -TNF α] x [标

记的 -TNF α]

[0466] 在步骤 1 中,将已知量的标记的 -TNF α 与含 HUMIRA™的血清样品接触。标记的 -TNF α 与 HUMIRA™形成复合物, (标记的 -TNF α • HUMIRA™)_{复合物}, 参见等式 X。由于几乎全部 HUMIRA™都会与标记的 -TNF α 形成复合物,所以在引入标记的 -TNF α 之前存在的 [HUMIRA™] 等于测量的 [(标记的 -TNF α • HUMIRA™)_{复合物}], 参见等式 XI。通过将 [(标记的 -TNF α • HUMIRA™)_{复合物}]/[标记的 -TNF α] 的比率乘以 [标记的 -TNF α], 来计算 [HUMIRA™], 参见等式 XII。通过积分标记的 -TNF α 的曲线下面积和 (标记的 -TNF α • HUMIRA™)_{复合物} 的曲线下面积,并将 (标记的 -TNF α • HUMIRA™)_{复合物} 的最终积分除以标记的 -TNF α 的最终积分,来获得 [(标记的 -TNF α • HUMIRA™)_{复合物}]与 [标记的 -TNF α] 的比率。[标记的 -TNF α] 是推理已知的。

[0467] 步骤 2:测定人抗 - 人抗体(例如 HAHA)的水平。在一个示例性实施方案中,用荧光团(如 Alexa₆₄₇) 标记抗 TNF α 药物,例如 HUMIRA™,其中可以直观地和 / 或在荧光光谱仪上检测荧光团。在液相反应中,用人血清孵育标记的抗 -TNF α 药物,以允许血清中存在的任何 HAHA 结合。还可以在液相反应中,用已知量的抗 -IgG 抗体或者合并的阳性患者血清孵育标记的抗 -TNF α 药物,以产生标准曲线。孵育后,将样品直接上样到大小排阻柱上。与仅标记的药物比较,自身抗体与标记的抗 -TNF α 药物的结合导致峰向左移动。然后,可以将血清样品中存在的 HAHA 的浓度与标准曲线和对照比较。

[0468] 患者血清中 HAHA 水平的 SE-HPLC 分析。用荧光团标记纯化的 HUMIRA™。用不同稀释度合并的 HAHA 阳性血清或稀释的患者血清室温孵育标记的 HUMIRA™1 小时。在 HPLC 系统上,通过大小排阻层析分析 100 μ L 体积的样品。基于其保留时间,将荧光标记检测用于监测游离的标记的 HUMIRA™和结合的标记的 HUMIRA™免疫复合物。将结合的和游离的标记的 HUMIRA™比率用于确定如下所述的 HAHA 水平。

[0469] 测量血清中 HAHA 的迁移率变动分析。该测定法的原理基于在大小排阻 - 高效液相层析(SE-HPLC) 上,对比游离的 Alexa₆₄₇- 标记的 HUMIRA™,由于复合物分子量的增加,结合抗体(如, HACA) 的 Alexa₆₄₇- 标记的 HUMIRA™的复合物的迁移率的变动。在 Agilent-1200HPLC 系统中,使用具有 5,000 - 700,000 的分子量分级的 Bio-Sep300x7.8mm SEC-3000 柱(Phenomenex) 和 1X PBS, pH7.3 的移动相,以 0.5-1.0mL/ 分钟的流速,用荧光标记检测(例如 650nm 的 UV 检测) 进行层析。在具有 Bio-Sep300x7.8mm SEC-3000 柱的 Agilent-1200HPLC 系统的前面是 BioSep75x7.8mm SEC-3000 分析型预处理柱。对于每一分析,将 100 μ L 品体积上样到柱上。在 SE-HPLC 分析前,在 1X PBS, pH7.3, 洗脱缓冲液中,通过将来自 HUMIRA 治疗的患者的血清与标记的 HUMIRA™室温孵育 1 小时,来形成结合 HAHA 的标记的 HUMIRA™的复合物。

[0470] 等式 XIII :HUMIRA™+ 标记的 -HUMIRA™+HAHA $\rightarrow$ (HUMIRA™ • HAHA)_{复合物} +(标记的 -HUMIRA™ • HAHA)_{复合物}

[0471] 等式 XIV :[HUMIRA™]/[HUMIRA™ • HAHA]_{复合物} =[标记的 -HUMIRA™]/[标记的 -HUMIRA™ • HAHA]_{复合物}]

[0472] 等式 XV :[HAHA]=[HUMIRA™ • HAHA]_{复合物}]+[标记的 -HUMIRA™ • HAHA]_{复合物}]

[0473] 等式 XVI :[HUMIRA™ • HAHA]_{复合物}]=[HUMIRA™] x [标记的 -HUMIRA™ • HAHA]_{复合物}]/[标记的 -HUMIRA™]

[0474] 等式 XVII: [标记的 -HUMIRATM • HAHA_{复合物}] = [标记的 -HUMIRATM] x [标记的 -HUMIRATM • HAHA_{复合物}] / [标记的 -HUMIRATM]

[0475] 等式 XVIII: [HUMIRATM]_{有效量} = [HUMIRATM] - [HAHA]

[0476] 步骤 2 的计算: 将已知浓度的标记的 -HUMIRATM 加入血清样品中。HAHA 与 HUMIRATM 或标记的 -HUMIRATM 形成复合物, 参见等式 XIII。如上所述, 在步骤 1 中测定 [HUMIRATM]。通过积分标记的 -HUMIRATM • HAHA_{复合物} 的曲线下面积和标记的 -HUMIRATM 的曲线下面积, 并将标记的 -HUMIRATM • HAHA_{复合物} 的最终积分除以标记的 -HUMIRATM 的最终积分, 来获得 [标记的 -HUMIRATM • HAHA_{复合物}] 与 [标记的 -HUMIRATM] 的比率。[HUMIRATM] 与 [HUMIRATM • HAHA_{复合物}] 的比率等于 [标记的 -HUMIRATM] 与 [标记的 -HUMIRATM • HAHA_{复合物}] 的比率, 参见等式 XIV。由于 HAHA 平衡, 并与 HUMIRA 和标记的 -HUMIRATM 二者形成复合物, 所以 HAHA 的总量等于 HUMIRATM • HAHA_{复合物} 和标记的 -HUMIRATM • HAHA_{复合物} 的量的总和, 参见, 等式 XV。由于 [HUMIRATM] 与 [HUMIRATM • HAHA_{复合物}] 的比率等于 [标记的 -HUMIRA] 与 [标记的 -HUMIRATM • HAHA_{复合物}] 的比率, 所以 [HUMIRATM - HAHA_{复合物}] 和 [标记的 -HUMIRATM - HAHA_{复合物}] 二者的浓度通过将 [标记的 -HUMIRA • HAHA_{复合物}] / [标记的 -HUMIRA] 的比率分别乘以步骤 1 中测定的 [HUMIRATM] 和推理已知的 [标记的 -HUMIRATM] 确定, 参见等式 XVI 和 XVII。由于 HAHA 与 HUMIRATM 形成复合物, 所以血清样品中可用的 HUMIRATM 的有效量为步骤 1 中测量的 HUMIRA 的量减去步骤 2 中测量的 HAHA 的量, 参见等式 XVIII。

[0477] 示例性计算。在患者 SL03246013 中, 参见图 25, 测定的 [HUMIRATM] 为 16.9 μg/ml, 参见图 25。该结果通过步骤 1 并使用等式 X-XII 获得。16.9 μg/ml 等于 67.6ng/4 μL。由于在步骤 2 的测量中使用了 4 μL 的样品, 所以在分析的样品中存在总共 67.6ng 的 HUMIRATM。患者 SL03246013 的 [标记的 -HUMIRATM • HAHA_{复合物}] / [标记的 -HUMIRATM] 比率为 0.055, 参见图 25。引入到样品中的 [标记的 -HUMIRATM] 为 37.5ng/100 μL。由于在步骤 2 的测量中使用了 100 μL 的标记的 -HUMIRATM, 所以在分析的样品中存在总共 37.5ng 的标记的 -HUMIRATM。使用等式 XVI, HUMIRATM • HAHA_{复合物} 的总量为 67.6ng 乘以 0.055, 其等于 3.71ng 标记的 -HUMIRATM • HAHA_{复合物}。使用等式 XVII, 标记的 -HUMIRATM • HAHA_{复合物} 的总量为 37.5ng 乘以 0.055, 其等于 2.06ng 标记的 -HUMIRATM • HAHA_{复合物}。使用等式 XV, HAHA 的总量等于 3.71ng 和 2.06ng 之和, 其等于 5.77ng HAHA。在 4 μL 的样品中存在 5.77ng HAHA。[HAHA] 为 5.77ng/4 μL, 其等于 1.44 μg/ml。使用等式 XVIII, HUMIRATM 的有效量等于步骤 1 测定的 16.99 μg/ml HUMIRATM 减去步骤 2 测定的 1.44 μg/ml HAHA。在该示例性计算中, 有效的 [HUMIRATM] 等于 15.46 μg/ml。

[0478] 实施例 9: 测定 HACA 或 HAHA 与 REMICADETM、标记的 -REMICADETM、HUMIRA 或标记的 -HUMIRA 的复合物的量。

[0479] 该实施例描述了参照内部标准, 测定 HACA 或 HAHA 与 REMICADETM、标记的 -REMICADETM、HUMIRA 或标记的 -HUMIRATM 的复合物的量的方法。

[0480] 通过使用内部对照 (例如 Biocytin-Alexa488), 可以鉴定并合理分析实验与实验之间的血清人工产品和变化。内部对照如 Biocytin-Alexa488 的量为分析的每 100 μL 约 50- 约 200pg。

[0481] 用患者血清孵育荧光团 (F1) - 标记的 HUMIRATM, 以形成免疫复合物。在每一反应中, 包括将 F1- 标记的小肽如 Biocytin-Alexa488 作为内部对照。在一个实例中, 将不同量

的抗-人 IgG 用于产生标准曲线,以测定血清 HAHA 水平。在另一实例中,将用纯化的 HAHA 校正的经滴定的合并阳性患者血清用于产生标准曲线,以测定血清 HAHA 水平。又在另一实例中,将实施例 7 中所述的方法用于产生标准曲线,以测定血清 HAHA 水平。通过大小排阻层析,基于其分子量,将游离的标记的 HUMIRA 从结合抗体的复合物中分离。将来自每一样品的游离的标记的 HUMIRA 与内部对照的比率用于从标准曲线中外推 HAHA 浓度。用标记的 TNF- α , 将类似的方法用于测量患者血清样品中的 HUMIRA 水平。

[0482] 标记的-药物,即标记的-REMICADE™或标记的-HUMIRA 与内部对照的最初比率等于 100。如在图 23 和 24 中所述,当标记的-药物与内部对照的比率低于 95 时,标记的-药物可能与结合抗-药物的化合物如 HACA、HAHA 形成了复合物。通过积分标记的-药物和内部对照的曲线下面积,并然后将标记的-药物的最终积分除以内部对照的最终积分,来获得 [标记的-药物] 与 [内部对照] 的比率。

[0483] 实施例 10 :测定复合的抗-TNF α 药物与未复合的抗-TNF α 药物的比率

[0484] 通过积分复合的抗-TNF α 药物和未复合的抗-TNF α 药物二者的曲线下面积,并然后将复合的抗-TNF α 药物的最终积分除以未复合的抗-TNF α 药物的最终积分,来获得复合的抗-TNF α 药物与未复合的抗-TNF α 药物的比率。

[0485] 在一个实施方案中,未复合的抗-TNF α 药物是在样品中具有约 0ng-100ng 之间水平的 REMICADE™。标记的-REMICADE™的量为约 37.5ng。

[0486] 通过使用内部对照,例如 Biocytin-Alexa488,可以鉴定并合理分析实验与实验之间的血清人工产品和变化。内部对照如 Biocytin-Alexa488 的量为分析的每 100 μ L 约 50-约 200pg。

[0487] 通过积分标记的抗 TNF α 药物和标记的内部对照二者的曲线下面积,并然后将标记的抗 TNF α 药物的最终积分除以标记的内部对照的最终积分,来获得标记的抗 TNF α 药物 (例如 REMICADE™或 HUMIRA™) 与标记的内部对照的比率。

[0488] 通过积分来自作为大小排阻 HPLC 的洗脱时间的函数的信号强度的图中的 (标记的-抗-TNF α 药物 • 自身抗体)_{复合物} 峰的曲线下面积,并将该数值除以图中内部对照峰的曲线下面积的最终积分,来获得 [(标记的-抗-TNF α 药物 • 自身抗体)_{复合物}] / [内部对照] 的比率。在一些实施方案中,标记的抗-TNF α 药物是标记的 REMICADE™。在一些其他的实施方案中,标记的抗-TNF α 药物是标记的 HUMIRA™。

[0489] 实施例 11 :测定游离的和复合的标记的 TNF α 的比率。

[0490] 该实施例描述了参照内部标准,测定标记的-TNF α 与 REMICADE™或 HUMIRA™的复合物的量的方法。

[0491] 通过使用内部对照,例如 Biocytin-Alexa488,可以鉴定并合理分析实验与实验之间的血清人工产品和变化。内部对照如 Biocytin-Alexa488 的量为分析的每 100 μ L 约 1-约 25ng。

[0492] 在一个实施方案中,未复合的标记的 TNF α 在样品中具有约 50ng 至 150ng 之间的水平。在某些实例中,标记的-TNF α 的量为约 100.0ng。

[0493] 用患者血清孵育荧光团 (F1) - 标记的 TNF α , 以形成复合物。在每一反应中,将 F1- 标记的小肽,例如 Biocytin-Alexa488 包括为内部对照。通过掺加 (spiking in) 已知浓度的纯化的抗-TNF α 药物,产生标准曲线,并然后从该曲线外推,以测定以 μ g/mL 单位

表示的浓度。

[0494] 标记的 $-\text{TNF } \alpha$ 与内部对照的最初比率等于 100。当标记的 $-\text{TNF } \alpha$ 与内部对照的比率低于 95 时,推测标记的 $-\text{TNF } \alpha$ 可能与抗 $-\text{TNF } \alpha$ 药物,例如 RemicadeTM、HumiraTM 复合。通过积分标记的 $-\text{TNF } \alpha$ 和内部对照的曲线下面积,并然后将标记的 $-\text{TNF } \alpha$ 的最终积分除以内部对照的最终积分,来获得 [标记的 $-\text{TNF } \alpha$] 与 [内部对照] 的比率。

[0495] 实施例 12. 通过测量抗 $-\text{TNF } \alpha$ 药物和 / 或抗 - 药物抗体 (ADA) 水平,

[0496] 优化抗 $-\text{TNF } \alpha$ 药物治疗

[0497] 该实施例描述了通过测量来自正在接受抗 $-\text{TNF } \alpha$ 药物治疗的受试者的血清中抗 $\text{TNF } \alpha$ 药物的量 (例如,浓度水平) (例如,游离的抗 $-\text{TNF } \alpha$ 治疗抗体的水平) 和 / 或抗 - 药物抗体 (ADA) 的量 (例如,浓度水平) (例如,针对抗 $-\text{TNF } \alpha$ 药物的自身抗体的水平),来优化抗 $-\text{TNF } \alpha$ 药物治疗、降低与抗 $-\text{TNF } \alpha$ 药物治疗相关的毒性和 / 或监测用抗 $-\text{TNF } \alpha$ 药物的治疗性治疗的有效性的方法。因此,本实施例中所述的方法通过例如,测定何时或如何调整或修饰 (例如,增加或减少) 抗 $-\text{TNF } \alpha$ 药物的后续剂量、通过测定何时或如何将抗 $-\text{TNF } \alpha$ 药物 (例如,以增加、减少或相同的剂量) 与一种或多种免疫抑制剂如氨甲蝶呤 (MTX) 或硫唑嘌呤组合和 / 或通过测定何时或如何改变当前的疗程 (例如,转变成不同的抗 $-\text{TNF } \alpha$ 药物),来为指导治疗决定提供有用的信息。

[0498] 仅出于说明的目的,以下方案显示了基于来自正在接受抗 $-\text{TNF } \alpha$ 药物治疗的受试者的样品中抗 $-\text{TNF } \alpha$ 药物的水平 (例如,游离的抗 $-\text{TNF } \alpha$ 治疗抗体的水平) 和 / 或 ADA 的水平 (例如,针对抗 $-\text{TNF } \alpha$ 药物的自身抗体的水平),如何使本发明方法有利地优化治疗,以及最小化或降低毒性 (例如,副作用)。可以使用本文中所述的新测定法测量抗 $-\text{TNF } \alpha$ 药物和 ADA 的水平。

[0499] 方案 1 : 具有低水平的抗 - 药物抗体 (ADA) 的高水平的抗 $-\text{TNF } \alpha$ 药物。

[0500] 药物水平 = $10\text{--}50\text{ng}/10\ \mu\text{l}$; ADA 水平 = $0.1\text{--}2\text{ng}/10\ \mu\text{l}$ 。具有该特征的患者样品包括来自就诊者 (visit) 10 (“V10”) 的患者 BAB 和 JAA 的样品。参见,如 16b。

[0501] 应当用免疫抑制药物如硫唑嘌呤 (AZA) 以及抗 $-\text{TNF } \alpha$ 药物 (例如,英利昔单抗) 治疗正在接受抗 $-\text{TNF } \alpha$ 药物治疗且具有这种特定特征的患者。

[0502] 方案 2 : 具有低水平的 ADA 的中等水平的抗 $-\text{TNF } \alpha$ 药物。

[0503] 药物水平 = $5\text{--}20\text{ng}/10\ \mu\text{l}$; ADA 水平 = $0.1\text{--}2\text{ng}/10\ \mu\text{l}$ 。具有该特征的患者样品包括来自 V10 的患者 DGO、JAG 和 JJH 的样品。参见,图 16b。

[0504] 应当用免疫抑制药物如硫唑嘌呤 (AZA) 以及更高剂量的抗 $-\text{TNF } \alpha$ 药物 (例如,英利昔单抗) 治疗正在接受抗 $-\text{TNF } \alpha$ 药物治疗且具有这种特定特征的患者。本领域技术人员应当知道,可以将当前疗程调整为合适的更高或者更低剂量,以优化药物治疗,例如,后续剂量比当前剂量高至少约 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 或 100 倍或比当前剂量低至少约 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 或 100 倍。

[0505] 方案 3 : 具有中等水平的 ADA 的中等水平的抗 $-\text{TNF } \alpha$ 药物。

[0506] 药物水平 = $5\text{--}20\text{ng}/10\ \mu\text{l}$; ADA 水平 = $0.5\text{--}10\text{ng}/10\ \mu\text{l}$ 。具有该特征的患者样品包括来自 V10 (“V10”) 的患者 JMM 和就诊者 14 (“V14”) 的患者 J-L 的样品。参见,图 16b。

[0507] 应当用不同的药物治疗正在接受抗 $-\text{TNF } \alpha$ 药物治疗且具有这种特定特征的患

者。作为非限制性实例,应当将进行英利昔单抗 (IFX) 治疗并具有中等水平的 IFX 和 ADA (即, HACA) 的患者转变成用阿达木单抗 (HUMIRA™) 的治疗。

[0508] 方案 4: 具有高水平的 ADA 的低水平的抗 -TNF α 药物。

[0509] 药物水平 = 0–5ng/10 μ l ;ADA 水平 = 3.0–50ng/10 μ l。具有该特征的患者样品包括来自图 16b 中 V14 的全部患者的样品。

[0510] 应当用不同的药物治疗正在接受抗 -TNF α 药物治疗且具有这种特定特征的患者。作为非限制性实例,应当将进行英利昔单抗 (IFX) 治疗并具有低水平的 IFX 和高水平的 ADA (即, HACA) 的患者转变成用阿达木单抗 (HUMIRA™) 的治疗。

[0511] 实施例 13. 通过 HPLC 迁移率变动分析测量患者血清中的人抗 - 嵌合抗体 (HACA)

[0512] 该实施例描述了意图定量患者血清样品中针对 Remicade 的抗体的水平的高效液相层析 (HPLC) 方法。

[0513] HPLC 迁移率测定法的原理基于在大小排阻 HPLC 层析中, 相对于游离的抗原, 抗原 - 抗体免疫复合物的保留时间的改变。在加入荧光 - 标记的 Remicade 和荧光标记的内部对照之前, 酸解离标准、对照和患者样品 1 小时, 以降低循环 Remicade 的影响。然后, 中和全部反应, 并孵育 1 小时, 以允许免疫复合物的形成。在注射在大小排阻柱上之前, 过滤全部反应物, 并在 4°C 的储存温度下上样到 HPLC 上。通过大小排阻层析从游离的 Remicade 中分离与 Remicade 结合的 HACA。通过游离的标记的 Remicade 峰的面积与标记的内部对照峰的面积的比率, 测定 HACA 的量。

[0514] 可以通过静脉穿刺患者收集血液。可以使用以下另外的材料: Chromasolv HPLC 水; 1.2mL 微型滴定管; Nunc96 孔样品板; 10XPBS pH7.4; Remicade-AlexaFluor488/Biocyttin-AlexaFluor488; 1L 无菌过滤系统; 多显示屏 HTS、GV96- 孔过滤板; BioSep-SEC-S3000Guard 柱, 75x7.8mm; BioSep-SEC-S3000 分析柱, 300x7.8mm; 0.05%Na Azide/HPLC 水; Detector Waste Capillary; HPLC 瓶; HPLC 样品插入物; 多显示屏 HTS 真空歧管; Agilent1200HPLC 系统。

[0515] 制备 HPLC 移动相 (PBS 的 1 $\times$ 溶液, pH7.3 $\pm$ 0.1)。在刻度量筒中, 将 200mL 的 10X PBS pH7.4 与 1750ml 的 HPLC 水合并。测定生成物的 pH, 并用 1N HCl 调整。用 HPLC 水将总体积增加至 2000mL。通过 0.22 μ m 膜过滤生成物。使用用于 HPLC 系统的 Phenomenex BioSep-SEC-S3000guard 柱和 BioSep-SEC-S3000 分析柱。将 UV 探测器设定在 280nm 和 210nm 处记录。

[0516] 制备标准、对照和患者样品。稀释标准、对照和患者样品。在 0.5mL 孔的 Nunc96 孔板中, 冰上制备血清样品、标准和对照。应当首先加入血清样品, 然后加入 0.5M 柠檬酸 pH3.0, 和最后加入 HPLC 水。在平板振荡器上室温孵育标准、对照和样品 1 小时, 以允许样品完全解离。在孵育期间用箔覆盖平板。加入 Remicade-AlexaFluor488/Biocyttin-AlexaFluor488。制备在 HPLC 水中的特定体积的 Remciade-AlexaFluor488/Biocyttin-AlexaFluor488。将 6 μ L 的 HPLC 水加入到合适的孔中。将 Remciade-AlexaFluor488/Biocyttin-AlexaFluor488 加入到合适的孔中。

[0517] 适用于该测定法的其他有机酸包括但不限于, 抗坏血酸或乙酸。

[0518] 中和样品。将特定体积的 10X PBS pH7.4 加入到合适的孔中。通过移液器上下吹打 6 次混合样品。在平板振荡器上室温孵育标准、对照和样品 1 小时, 以允许免疫 - 共复合

物的完全形成。在孵育期间用箔覆盖平板。如果不立即转移到 HPLC 瓶,则将孵育的混合物转移到 4℃冰箱中。

[0519] 将 15 μ L 的柱标准样(Column Standard)和 285 μ L 的移动相加入到相同的给定孔中在新的样品板中制备柱标准样。将标准、对照和样品稀释成 2% 血清。将特定体积的每一标准、对照和样品转移到新样品板的合适孔中。将制备的柱标准样加入到同一样品板中。将特定体积的 10X PBS pH7.4 加入到合适的孔中。将特定体积的 HPLC 水加入到合适的孔中。通过移液器上下吹打 6 次混合样品。通过 0.2 μ m Multiscreen 过滤板过滤样品。将收集板添加在过滤板下。将 295 μ L 的样品转移到过滤板的各个位置中。将样品加入到连接的过滤板中,且收集板与真空装置连接。样品经过滤进入收集板中。将标准、对照和样品转移到 HPLC 瓶中。

[0520] 将吸液管用于将 250 μ L 的标准、对照和样品转移到标记的 HPLC 插入瓶中。将标准、对照和样品上样到 HPLC 上。HPLC 参数如下:注射体积:100 μ L;流速:1.0mL/分钟;洗脱缓冲液 A;终止时间:20 分钟;Post 时间:关;最小压力:0 巴;最大压力:400 巴;温度调节装置:关;DAD 参数为 210nm 和 280nm (4nm),以及参照关闭;峰宽(应答时间):>0.1 分钟(2s);切口:4nm;FLD 参数激发光:494nm、发射光:519nm;每瓶一个注射器;每一样品 100 μ L 注射体积。

[0521] 实施例 14:HACA 酸解离测定法

[0522] 如图 26 中所示,酸解离步骤允许在测量组分种类的浓度水平之前,完全地平衡复合的种类。高药物水平会干扰抗-药物抗体如 HACA 的检测。如图 26 中所示,酸解离步骤允许平衡标记的药物“A”或未标记的药物“C”与抗-药物抗体 HACA “B”的复合物。将酸引入解离 BC 复合物后,可以加入高水平的 A。然后,稀释样品,并测量“AB”的浓度。可以基于已知的或测量的“A”和“B”的量,计算酸解离步骤后“BC”的浓度。

[0523] 图 27 和 28 分别显示了用和不用酸解离步骤,作为 Log 患者血清百分比的函数的游离的标记的-英利昔单抗的百分比。

[0524] 在该测定法中可以使用以下物质:

[0525] Remicade-Alexa488/Biocytin-Alexa488;正常人血清;HACA 阳性对照(HPC);柱标准样;10X PBS;1XPBS pH7.3;Multiscreen 过滤板;样品板;1N HCl;0.5M 柠檬酸。制备 NHS 中的 HPC 滴定法。通过将 35 μ L 的样品转移到 35 μ L 的 NHS 中,制备两倍连续稀释物。可以制备以下溶液用于本实施例:

[0526] 溶液 1:90 μ L 的 25%HPC/75%NHS;

[0527] 溶液 2:90 μ L 的 12.5%HPC/87.5%NHS;

[0528] 溶液 3:90 μ L 的 6.25%HPC/93.75%NHS。

[0529] 在此处描述的分析之前,期间和之后,可以将样品保持于冰上。

[0530] 制备以下溶液:

[0531] 溶液 4:A 缓冲溶液;

[0532] 溶液 5:A 柱标准样溶液;

[0533] 溶液 6:2%NHS;

[0534] 溶液 7:2%NHS+37.5Remicade-Alexa-488/Biocytin-Alexa488。

[0535] 在 96 孔样品板中,将血清样品、柠檬酸、HPLC 水加入到这些溶液中。将血清样品

加入到各个孔中。将 0.5M 柠檬酸 pH3.0 加入到各个孔中。将 HPLC 加入到各个孔中。

[0536] 制备一系列的以下样品：

[0537] 溶液 8 :缓冲液；

[0538] 溶液 9 :15 μ L 柱标准样和 285 μ L 1X PBS pH7.3；

[0539] 溶液 10 :2%NHS；

[0540] 溶液 11 :2%NHS+37.5Remicade-Alexa-488/Biocytin-Alexa488；

[0541] 溶液 12 :2%HPC+0%NHS+37.5Remicade-Alexa-488/Biocytin-Alexa488；

[0542] 溶液 13 :1%HPC+1%NHS+37.5Remicade-Alexa-488/Biocytin-Alexa488；

[0543] 溶液 14 :0.5%HPC+1.5%NHS+37.5Remicade-Alexa-488/Biocytin-Alexa488；

[0544] 溶液 15 :0.25%HPC+1.75%NHS+37.5Remicade-Alexa-488/Biocytin-Alexa488；

[0545] 溶液 16 :0.125%HPC+1.875%NHS+37.5Remicade-Alexa-488/Biocytin-Alexa488；

[0546] 溶液 17 :0.063%HPC+1.937%NHS+37.5Remicade-Alexa-488/Biocytin-Alexa488；

[0547] 溶液 18 :0.031%HPC+1.969%NHS+37.5Remicade-Alexa-488/Biocytin-Alexa488；

[0548] 溶液 19 :0.016%HPC+1.984%NHS+37.5Remicade-Alexa-488/Biocytin-Alexa488；

[0549] 溶液 20 :2%HPC+0%NHS+37.5Remicade-Alexa-488/Biocytin-Alexa488；

[0550] 溶液 21 :高对照；

[0551] 溶液 22 :中等对照；

[0552] 溶液 23 :低对照；

[0553] 溶液 24 :2%NHS；

[0554] 溶液 25 :2%NHS+37.5Remicade-Alexa-488/Biocytin-Alexa488。

[0555] 全部样品都具有加入其中的 5.5 μ L 的 0.5M pH3 柠檬酸和 10.9 μ L HPLC 水。

[0556] 制备 450 μ L 的 0.074mg/mL Remicade-Alexa488/Biocytin-Alexa488。将 6 μ L 的 HPLC 水加入到三个分离的孔中。将 6 μ L 的 0.074mg/mL Remicade-AlexaFluor488/Biocytin-AlexaFluor488 加入到剩余孔中。

[0557] 中和样品。将 27.6 μ L 的 10XPBS pH7.3 加入到除一个孔之外的全部孔中。通过移液器上下吹打 6 次混合样品。在平板振荡器上,室温避光孵育样品 1 小时。将 15 μ L 的柱标准样加入到没有加入 27.6 μ L 的 10XPBS pH7.3 的孔中。将 285 μ L 的 1XPBS pH7.3 加入到没有加入 27.6 μ L 的 10XPBS pH7.3 的孔中。将样品稀释成 2% 血清。

[0558] 将 18.4 μ L 的每一样品转移到新样品板的相应孔中。使用其中制备了标准的同一平板,将 22.6 μ L 的 10X PBS 加入到除没有加入 27.6 μ L 的 10XPBS pH7.3 的孔之外的全部孔中。将 254 μ L 的 HPLC 水加入到除没有加入 27.6 μ L 的 10XPBS pH7.3 的孔之外的全部孔中。通过移液器上下吹打混合样品。将 295 μ L 的标准、对照和样品转移到 96 孔过滤板中。使用移液器,将 250 μ L 的标准、对照和样品转移到 HPLC 插入瓶中。

[0559] 实施例 15. 用抗-TNF α 治疗复发的患者的患者病例 1

[0560] 最初的测试显示,血清中没有 HACA 以及快速清除的 IFX 水平。IFX 的半衰期计算为 46.9 小时。增加了 IFX 的剂量和频率。患者产生了应答。参见描述作为时间的函数的 IFX 水平的图 29。

[0561] 3 个月后,患者复发,重新测试患者,并发现其具有低 HACA,并且没有检测到 IFX。测试的全部细胞因子都在正常范围内。

[0562]

患者	HACA* ($\mu\text{g/mL}$)	IFX ($\mu\text{g/mL}$)	IFN- γ (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
GRD0065	0.34	ND	5.32	0.06	2.38	6.16

[0563] 建议的治疗是硫唑嘌呤和任选地转变成备选的抗-TNF 药物治疗。此外,继续监测患者,以观察是否形成其他抗-药物抗体(ADA)。

[0564] 实施例 16. 用抗-TNF α 治疗复发的患者的患者病例 2

[0565] 最初测试后第 4 个月,测试了间隔 8 天收集的 2 份样品。HACA 水平很高,并且没有检测到 IFX 水平。推荐患者应当转变成备选的抗-TNF 治疗。

[0566]

患者	收集日期	HACA($\mu\text{g/mL}$)	IFX ($\mu\text{g/mL}$)	IFN- γ (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
GRD0077	第一天	>26	ND	1.57	0.61	3.38	0.00
GRD0078	第二天	>26	ND	1.31	0.24	2.01	0.00

[0567] 实施例 17. 用抗-TNF α 治疗复发的患者的患者病例 3

[0568] 用通过不同浓度的 IFX 与标记的 TNF- α 反应产生的标准曲线计算 IFX 浓度。来自第 11 天的样品在 1:25 稀释度为 3.8 $\mu\text{g/mL}$ (至少 3 个半衰期)。参见作为时间的函数描述的英利昔单抗的血清水平的图 30。参见作为时间的函数描述的 TNF- α 的血清水平的图 31。推荐的治疗是将 IFX 与免疫抑制药物组合,或者任选地,转变成备选的抗-TNF α 药物。

[0569] 实施例 18. 用抗-TNF α 治疗复发的患者的患者病例 4

[0570] 发现患者具有高 HACA,并且没有检测到 IFX。TNF- α 水平是升高的;测试的全部其他细胞因子都在正常范围内。建议的治疗是转变成备选的抗-TNF α 治疗。

[0571]

患者	HACA ($\mu\text{g/mL}$)	IFX ($\mu\text{g/mL}$)	IFN- γ (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
GRD0009	21.75	ND	1.07	0.08	2.71	35.54

[0572] 图 32 显示了患者病例 1 (A);患者病例 2 (B、C);和患者病例 4 (D) 的 F1- 标记的 -IFX 的迁移率移动谱。

[0573] 实施例 19. 用抗-TNF α 治疗复发的患者的患者病例 5

[0574] 发现患者具有低 HACA,并且没有检测到 IFX 水平。TNF- α 水平非常高;测试的全部其他细胞因子水平都在正常范围内。建议的治疗是增加 IFX 的剂量或给药频率,或者转变成备选的抗-TNF α 药物,并添加免疫抑制药物。此外,建议的治疗是继续监测患者,观察 HACA/ADA 水平是否增加。

[0575]

患者	HACA ($\mu\text{g/mL}$)	IFX ($\mu\text{g/mL}$)	IFN- γ (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
SK12100143	2.80	ND	2.78	1.38	7.79	161.01

[0576] 实施例 20. 用抗-TNF α 治疗复发的患者的患者病例 6

[0577] 发现患者具有中等 HACA 水平和低 IFX 水平。IL-1 β 和 IL-6 水平非常高。IFN- γ 轻微升高,并且 TNF- α 在正常范围内。建议的治疗是转变成不同的抗-TNF α 药物或者用靶向不同机制(例如,IL-6 受体-抑制性单克隆抗体如 Actemra (托珠单抗(tocilizumab)))的药物,并添加免疫抑制药物

[0578]

患者	HACA ($\mu\text{g/mL}$)	IFX ($\mu\text{g/mL}$)	IFN- γ (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
SK07160939	9.42	11.06	13.31	366.11	2302.41	2.68

[0579] 实施例 21. 用抗-TNF α 治疗复发的患者的患者病例 7

[0580] 发现患者具有低 HACA 水平。检测到低水平的 IFX。IFN- γ 水平非常高;测试的全部其他细胞因子水平都在正常范围内。建议的治疗是增加 IFX 的剂量或者转变成用靶向不同机制(例如,抗-IFN γ 抗体如芳妥珠单抗(fontolizumab))的药物。备选地,建议的治疗可以是加入免疫抑制药物。

患者	HACA ($\mu\text{g/mL}$)	IFX ($\mu\text{g/mL}$)	IFN- γ (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
SK12020346	ND	4.02	98.87	0.52	8.97	7.83

[0582] 图 33 显示了患者病例 5 (A);患者病例 6 (B、C);和患者病例 7 (D、E) 的 F1- 标记的 IFX 的迁移率变动谱。

[0583] 实施例 22. 不同患者血清组的细胞因子水平。

[0584] 该实施例描述了正常对照、经英利昔单抗治疗的 UC、经 humira 治疗的 CD 和 HACA 阳性血清样品中,细胞因子,例如但不限于 IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6 和 TNF α 的水平。如图 34 中所示,HACA- 阳性患者血清通常具有更高水平的经测试的全部细胞因子(例如,IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6 和 TNF α)。基于针对 IFX 的自身抗体(即,HACA)的存在和高水平的细胞因子,应当将这些患者转变成备选的抗-TNF 药物,任选地与免疫抑制药物组合。

[0585] 实施例 23. 通过酸解离测定法定量 HACA 标准。

[0586] 该实施例描述了使用实施例 14 中所述的酸解离测定法,用固定量的 RemicadeTM-AlexaFluor488 和不同量的未标记的 RemicadeTM,在标准样品中定量 HACA。具体而言,可以在几个数量级范围内的未标记的 RemicadeTM存在的情况下测定 25U/mL-100U/mL 的 HACA 浓度。分别在表 8、9 和 10 中显示了测定低浓度标准(25U/mL)、中等浓度标准(50U/mL)和高浓度标准(100U/mL)的 HACA 的数据。使用实施例 1 中所述的迁移率变动分析测定了每一样品中未标记的 RemicadeTM的浓度。酸解离和平衡后,通过 SE-HPLC 测定给定样品中得到的 HACA/RemicadeTM-AlexaFluor488 复合物,并根据实施例 7 中所示的计算方法计算总 HACA。显示了每一分析中 HACA 的回收百分比(基于标准中已知浓度的 HACA)。

[0587] 表 8. 用不同的 Remicade 浓度定量低浓度 HACA 标准 (25U/mL)

[0588]

Remicade™ (µg/mL)	迁移率变动结果					终浓度		
	平均值 (U/mL)	SD	CV (%)	% 改变	回收 (%)	与未标记的 Remicade 结合的 HACA	总 HACA	回收 (%)
0	27.30	1.22	4.47	NA	109.19	NA	27.3	109.19
100	4.20	0.01	0.26	-84.60	16.82	22.35	26.55	106.21
50	6.94	1.67	24.00	-74.56	27.78	18.46	25.40	101.61
25	9.87	1.28	12.98	-63.86	39.47	13.11	22.98	91.91
12.5	12.71	0.71	5.62	-53.42	50.86	8.45	21.16	84.65
6.25	15.67	0.70	4.48	-42.58	62.70	5.21	20.88	83.52
3.125	18.03	1.10	6.08	-33.96	72.11	2.99	21.02	84.09
1.56	20.97	1.39	6.62	-23.17	83.89	1.74	22.71	90.85
0.78	23.30	0.49	2.09	-14.65	93.19	0.97	24.26	97.06

[0589] 表 9. 用不同的 Remicade 浓度定量中等浓度 HACA 标准 (50U/mL)

[0590]

Remicade™ (µg/mL)	迁移率变动结果							
	平均值 (U/mL)	SD	CV (%)	% 变动	回收 (%)	与未标记的 Remicade™ 结合的 HACA	总 HACA	回收 (%)
0	54.16	0.80	1.49	NA	108.33	NA	54.16	108.32
100	7.01	0.80	11.36	-87.06	14.02	37.25	44.25	88.51
50	12.22	0.51	4.14	-77.45	24.43	32.46	44.68	89.36
25	19.15	0.19	1.00	-64.65	38.29	25.44	44.59	89.17
12.5	25.55	0.81	3.17	-52.83	51.09	16.97	42.52	85.04
6.25	31.71	0.33	1.04	-41.46	63.42	10.53	42.24	84.49
3.125	38.32	0.46	1.20	-29.25	76.64	6.38	44.70	89.40
1.56	42.32	0.02	0.05	-21.87	84.63	3.51	45.83	91.65
0.78	49.19	0.85	1.73	-9.19	98.37	2.04	51.23	102.45

[0591] 表 10. 用不同的 Remicade 浓度定量高浓度 HACA 标准 (100U/mL)

[0592]

Remicade™ (µg/mL)	迁移率变动结果					终浓度		
	平均值 (U/mL)	SD	CV (%)	% 改变	回收 (%)	与未标记的 Remicade™ 结合的 HACA	总 HACA	回收 (%)
0	104.61	0.50	0.48	NA	104.61	NA	104.61	104.61
100	15.34	0.24	1.59	-85.34	15.34	81.54	96.88	96.88
50	25.86	0.61	2.37	-75.29	25.86	68.71	94.57	94.57
25	40.50	1.42	3.50	-61.28	40.50	53.82	94.32	94.32
12.5	59.90	0.16	0.27	-42.74	59.90	39.80	99.70	99.70
6.25	76.27	0.94	1.23	-27.10	76.27	25.34	101.60	101.60
3.125	88.80	1.01	1.14	-15.11	88.80	14.77	103.58	103.58
1.56	94.38	0.72	0.76	-9.78	94.38	7.83	102.21	102.21
0.78	104.80	1.26	1.20	0.18	104.80	4.35	109.15	109.15

[0593] 实施例 24 :抗 -TNF 药物治疗的新范例

[0594] 基于患者样品中测定的药物水平和 HACA 水平,下表 11 显示了抗 -TNF 药物治疗的现存范例。

[0595] 表 11 现存范例

[0596]

HACA	药物	行动
低	低	增加剂量
中等	低	增加剂量

[0597]

高	低	转变治疗
低	中等	继续
中等	中等	不确定
高	中等	转变治疗
低	高	继续
中等	高	继续
高	高	转变治疗

[0598] 然而,由于 HACA 未测定(indeterminant)患者中药物水平的高度可变性,该范例是令人困惑的。

[0599] 本发明的治疗范例使用疾病活性 / 严重程度指数,其来源于一种或多种生物标志物基于算法的分析,来选择用抗 -TNF 药物的治疗、优化用抗 -TNF 药物的治疗、降低其毒性、监测使用抗 -TNF 药物的治疗性治疗的有效性或其组合。在某些方面,在下表 12 中,以多种

说明性方案的方式显示了基于这种新范例所采取的行动。

[0600] 表 12. 本发明的范例

[0601]

HACA	药物	疾病活性指数	行动
低	低	低	继续
低	低	中等	增加剂量
低	低	高	增加剂量
低	中等	低	继续
低	中等	中等	增加剂量
低	中等	高	增加剂量
低	高	低	继续或减少剂量以避免毒性
低	高	中等	继续
低	高	高	转变治疗
中等	低	低	继续
中等	低	中等	增加剂量
中等	低	高	增加剂量或改变治疗
中等	中等	低	继续
中等	中等	中等	继续
中等	中等	高	转变治疗

[0602]

中等	高	低	继续或减少剂量以避免毒性
中等	高	中等	继续
中等	高	高	转变治疗
高	低	低	转变治疗
高	低	中等	转变治疗
高	低	高	转变治疗
高	中等	低	转变治疗
高	中等	中等	转变治疗
高	中等	高	转变治疗
高	高	低	转变治疗
高	高	中等	转变治疗
高	高	高	转变治疗

[0603] 应当注意,对具有中等 HACA 水平的患者的治疗性行动之后可以监测疾病活性的改变。在某些实例中,由于情况的免疫学特性,高 HACA 水平可以不考虑其他参数,启动治疗

的改变。

[0604] 实施例 25 :在组织样品中检测低水平的 REMICADE。

[0605] 已经显示,患类风湿性关节炎(RA)的患者在治疗期间对 100ng/mL 以下的 Remicade 具有应答。如本文中所述,已经研发了 Remicade HPLC 迁移率变动分析,其在患者血清中检测 Remicade 的存在,避免了使用 ELISA 形式的许多问题。在某些方面,本发明测定法目前的定量下限 (LLOQ) 为约 0.49 $\mu\text{g/mL}$,这允许大多数患者的分析。我们当前的研究显示,通过调整荧光检测器的多个参数(将发射光波长改变为 525nm,并将 PMTGain 增加至 16),Remicade HPLC 迁移率变动分析可以在血清中高度可重复地定量检测少至 50ng/mL 的 Remicade。事实上,该敏感性水平使得可以在小(<10mg)组织样品中分析 Remicade。检测组织内 Remicade 增强了我们有关 Remicade 到达炎症部位的量的知识。产生了更多有关药物的药物动力学和机制细节的信息。

[0606] 方法

[0607] 通过全细胞提取实现了从患者组织中分离蛋白质。将 1-10mg 的组织切片放置于试管中,并然后冷冻于低温环境中。然后使用 Covaris CryoPrep 机械组织粉碎机均质化低温样品。粉碎后,将样品转移到含 $\sim 300 \mu\text{L}$ 提取缓冲液(50mM Tris, pH8.0、150mM NaCl、1%NP-40、0.25% 脱氧胆酸盐、1mM EDTA)的试管中,所述提取缓冲液含有哺乳动物蛋白酶抑制剂混合物(Sigma, St Louis, Mo)。然后将样品立即转移到 CryoPrep 仪器的声波部分,以通过超声处理进一步破碎。然后在冰上孵育样品 45 分钟,以允许细胞组分的完全解离。在 4°C 高速离心提取物 15 分钟。等分上清液,并冷冻于 -80°C 。使用 Lowry 蛋白质测定法(Bio-Rad)定量蛋白质浓度。解冻 200 μL 等分试样,并然后加入 5.0ng 荧光标记的重组 TNF- α (TNF-Alexa488)。室温孵育 1 小时后,溶液达到平衡,并形成了增加分子量的多种 TNF-Alexa488/Remicade 复合物。过滤后,将样品注射到 Phenomenex BioSep S-3000HPLC 大小排阻柱。该实时、液相测定法基于所形成的复合物的尺寸,从游离的 TNF 中分出 Remicade-TNF 复合物。

[0608] 尽管当前定量下限适合于大多数患者,但对于在 RA 患者中使用,仍需要增加敏感性(参见上文)。在一个方面,测定法依靠 HPLC 大小排阻柱上,100 μL 注射物中 25ng 的 TNF-Alexa488 的检测。荧光作为检测方法的使用提供了优化激发光和发射波长的灵活性,并且能增加光电倍增管(PMT)的放大。用于 Remicade 测定法的确认的当前设定为:

[0609] FLD $\lambda_{\text{ex}}=494$, $\lambda_{\text{em}}=519$

[0610] PMTGain=12

[0611] 基于 AlexaFluor488 基团已公开的波长和 Agilent1200 系列 FLD 的通常 PMTGain 设定来选择这些设定。增加 PMTGain 增加了信号和噪音,但直到某个条件,信号的增加高于噪音的增加。从增益到增益的步幅等于因子 2(The step from gain to gain is equal to a factor of 2)。优化的最重要参数是激发光和发射光波长,并且尽管已公开的最大值是有用的起点,但通常需要优化它们,因为激发光取决于化合物自身,以及特定的设备特性。

[0612] 当检测低量的 Remicade 时,反映 TNF-Alexa488 和 Remicade 的复合物的特定峰升高到 9.2 分钟的保留时间。在一个方面,重要的是该峰的高度高于背景至少 3 倍,并且计算的多个重复的血清浓度应具有 20% 以下的变异系数。在某些实施方案中,因此将该特定 Remicade-TNFAlexa488 峰与正常健康血清背景的信噪比(signal to noise)作为增加测定

法的敏感性的起点。

[0613] 为了增加敏感性,基于放大图和等吸光图的结果优化 PMTGain 以及激发光和发射光波长。使用分别为 494 和 519nm 的当前激发光和发射光波长,在以范围 12-18 的不同 PMTGain 水平稀释的 TNF-Alexa488 存在的情况下滴定 Remicade。

[0614] 图 35 显示了 TNF-Alexa488 的标准量,以及在 Rt=9.2 分钟处,反映 Remicade-TNF 复合物的小峰(上图)。一旦将 TNF-Alexa488 的量减少至 2.5ng,来自 4% 正常人血清的背景明显开始干扰游离的 TNF 峰以及在 9.2 分钟处反映 Remicade-TNF 复合物的峰的分辨率(中图)。将 PMTGain 增加至 18 (下图)同等增加了信号和噪音(对于全部 PMT 水平,数据是类似的)。

[0615] 从数据中可以明确,使用当前设定,来自正常人血清的背景荧光干扰了低水平 Remicade 的定量。为了增加测定法的敏感性,需要 FLD 设定的进一步修改,以减少血清背景信号。为此,基于等吸光图的结果,在不同的激发光和发射光波长进行了实验。用正常人血清、TNF-Alexa488、移动相(1X PBS/0.1%BSA)和水获取等吸光图。

[0616] 图 36 显示了 Y-轴上作图的激发光波长和 X-轴上作图的发射光波长。比较正常人血清(上图)和 TNF-Alexa488 (下图)的图显示,在激发光和发射光最大值(图中 V-形区的顶点)二者具有显著的重叠。将发射光波长改变成至少 525nm 可以维持 TNF-Alexa488 的高敏感性,同时减少正常血清背景。将发射光波长设定为 525nm,并然后重复实验,观察 TNF-Alexa488 和正常人血清背景。在 4%NHS 存在的情况下注射 TNF-Alexa488,并且评价信噪比。

[0617] 图 37 显示了通过使用指定的设置的 HPLC,分析正常人血清(左图)和 25ng TNF-Alexa488(右图)。来自正常人血清的荧光的背景水平大大减少。在显示来自血清的背景荧光的水平减少后,以范围 12-18 的几个不同 PMTGain 水平评价了测定法的信噪比。分析的结果显示于下表 13 中,确证 PMTGain 为 16 提供了显著的益处。

[0618] 表 13

PMT	发射光	NHS 背景的平均面积 (Average Area NHS Background) (n=2)	TNF-Alexa488 峰的平均面积 (Average Area TNF-Alexa488 Peak) (n=2)	信噪比
12	519	45.95	544	11.84
12	525	17.4	481.5	27.67
16	519	1053	8747	8.31
16	525	210.5	8019.5	38.10

[0620] 然后,通过产生标准曲线如在图 38 中所述的图,探查测定法的敏感性。每次注射使用 2.5ng TNF-Alexa488,在 50ng/mL-5.86 μg/mL 的范围内滴定 Remicade,以建立检测的极限。再次监测 9.2 的保留时间处的峰,作为信噪比的判定,并将重复(n=20)产生 3:1 峰高的最低浓度用于计算 LOQ。在下表中显示了这种分析的结果。

[0621] 表 14

[0622]	实验设定: PMTGain = 16 $\lambda_{\text{Ex}} = 494 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 525 \text{ nm}$ 2.5 ng Alexa488/100 μL 注射	
	LOB (面积)	0.040
	LOD (面积)	0.044
	LOD (n=20)	13.00 ng/mL
[0623]	LLOQ (n=20)	51.02 ng/mL
	CV% = 21.07 准确性 = 111.40%	

[0624] 通过将发射光波长改变成 525nm, 并且将 PMT 增加至 16, Remicade HPLC 迁移率变动分析现在可以高重复性地定量检测血清中少至 50ng/mL 的 Remicade。进一步的优化可以更大程度地增加敏感性, 但新的形式应当允许分析 RA 患者, 其甚至在非常低的 Remicade 血清浓度都显示出应答。低 Remicade 水平与患者应答、临床结果和相关生物标志物的相关性可以制定用于更个体化治疗方法的决定。

[0625] 实施例 26 : 迁移率变动分析对比 ELISA 的临床研究分析

[0626] 使用用英利昔单抗治疗几周的活性 CD 患者 (N=117)) 和 UC 患者 (N=10) 样品, 如上所述进行初始研究。将迁移率变动分析数据与 ELISA 结果比较。

[0627] 如图 39 中所示, 对于测定样品中的英利昔单抗, 两种方法是相关的 (对于在定量的下限之上收集的数据, 相关系数 = 0.812, $p < 2.2 \times 10^{-16}$)。通过 ELISA 测定为英利昔单抗阴性的 6% 样品, 通过迁移率变动分析测定为英利昔单抗阳性。没有通过迁移率变动分析测定为英利昔单抗阴性的样品通过 ELISA 测定为英利昔单抗阳性。如通过迁移率变动分析所测定, 发现 4 例英利昔单抗阴性样品是 HACA 阳性。如图 40 中所示, 对于 HACA 的测定, ELISA 和迁移率变动分析数据也是相关的。发现通过 ELISA 测定为 HACA 阴性的 37 例样品, 通过迁移率变动分析测定为 HACA 阳性。

[0628] 如图 41 中所示, 随着时间列表显示了 HACA 阳性样品的每周累积数。尽管 60 周后, 迁移率变动分析的数据 (图 41, 上迹线) 与 ELISA 的数据 (图 41, 下迹线) 会聚在一起, 但在较早的时间点, 迁移率变动分析产生了更高的 HACA 阳性标本数。将 Fisher's exact 检验用于在不同时间点收集的数据。在第 46 周、第 50 周和第 66 周通过检验测定的 p- 值分别为 0.0381、0.0240 和 0.6791。总之, 临床研究显示, 迁移率变动分析克服了 ELISA 的可变性和干扰限制。该技术还可应用于许多用于疾病如类风湿性关节炎和炎性肠病的蛋白质治疗。考虑到在研发的治疗策略中迫切要求精确检测药物水平和抗 - 药物抗体, 迁移率变动分析允许更好地处理患者治疗。

[0629] 实施例 27 : 评价用于测量患者血清中人抗 - 嵌合抗体 (HACA) 和英利昔单抗 (IFX) 水平的新均相迁移率变动分析。

[0630] 背景 : 可用于治疗炎症疾病如炎性肠病 (IBD) 和类风湿性关节炎 (RA) 的基于抗体的生物治疗剂的名单不断增加。然而, 某些患者会产生抗 - 药物抗体 (ADA), 其可以造成许多后果, 包括改变药物的药物动力学、降低 / 损失药物有效性, 以及不利的药物反应。不仅在药物研发过程期间, 监测患者的抗体药物和 ADA 水平是 FDA 要求的, 而且对于在用这些药

物治疗期间,合理的患者处理也是非常重要的。可利用不同的方法评估 ADA 和药物水平,包括固相免疫测定法、放射免疫沉淀法(RIPA)和表面质子共振(SPR)。然而,在这些方法中观察到了许多缺点,包括由于抗原固定或标记掩盖/改变了表位、不能鉴定种属特异性和同种型检测、不能检测低亲和力抗体、需要专门的仪器或放射性标记试剂,以样品中低药物耐受性。我们研发了非放射性标记的液相均相迁移率变动分析,以测量来自用 IFX 治疗的患者的血清中的 HACA 和药物水平。该方法克服了用于测量 HACA 和药物水平的当前方法的诸多局限。

[0631] 方法:为了进行迁移率改变 HACA 测定,用 HACA 阳性血清孵育含 Alexa488 加载 (loading) 对照的 Alexa Fluor488 (Alexa488) 标记的英利昔单抗 (IFX),并允许达到平衡。平衡后,然后将反应混合物注射到 HPLC 柱上。通过大小排阻层析 (SEC) HPLC 分辨游离的 Alexa488-IFX 和免疫复合物,并通过荧光检测器 (FLD) 测量每一经分辨的峰中的荧光强度。游离的 Alexa488IFX 峰面积与 Alexa488 内部对照峰面积的比率的改变表示了形成的免疫复合物的量。将不同稀释度的 HACA 阳性血清用于产生标准曲线,将用 5- 参数逻辑模型对其拟合,以补偿不对称性。根据标准曲线计算样品中 HACA 的量。将类似的方法和解析用于测量血清中的 IFX 水平,但将 Alexa488 标记的 TNF- α 用于结合 IFX,并将纯化的 IFX 用作为标准。我们在 HACA 和 IFX 测定二者上进行了全部方法验证,并将临床样品测试结果与那些获自 ELISA 方法的结果进行了比较。

[0632] 结果:迁移率变动 HACA 测定法的验证显示,血清样品中定量下限为 6.75U/ml,其相当于 35.4ng/ml,并且该值低于工业需求 (250-500ng/ml)。定量的线性范围为 6.75-150U/ml。测定内和测定间精确性测定得出了 15% 以下的变异系数,并且测定的准确性在 20% 以内。测定法中 IFX 药物耐受性在测试血清中高达 100 μ g/ml。硫唑嘌呤 (AZA) 和氨甲蝶呤 (MTX) 的治疗性水平、类风湿因子的存在 (774IU/ml)、免疫球蛋白的正常水平、TNF 和可溶性 TNF 受体都不会显著干扰测定。测试了来自 100 例首次用于实验的健康受试者的血清样品,设立了 6.75U/ml (中位数 +1.65SD) 的截断值。通过桥连 ELISA 分析的 100 例 HACA 阳性血清样品也通过迁移率变动分析进行了评价。总之,在 HACA 水平方面,两种方法之间存在强相关性 (Spearman' s Rho=0.337, p=0.0196)。然而,新方法能鉴定来自桥连 ELISA 的 23 例假阳性样品。类似的结果可获自迁移率变动 IFX 测定的验证。

[0633] 结论:来自该研究的结果显示了迁移率变动分析在测量患者血清样品中 HACA 和 IFX 的优越性。还可以将该方法用于检测例如那些用阿达木单抗治疗的患者血清样品中的其他生物药物和 ADA。

[0634] 尽管出于明确理解的目的,前述发明已经通过说明和实施例的方式进行了相当详细的描述,但本领域技术人员应当理解,在所附权利要求的范围内,可以进行某些改变和修饰。此外,本文中提供的每一参考文献在相同程度上以其整体引入作为参考,就如同每一参考文献单独地引入作为参考一样。

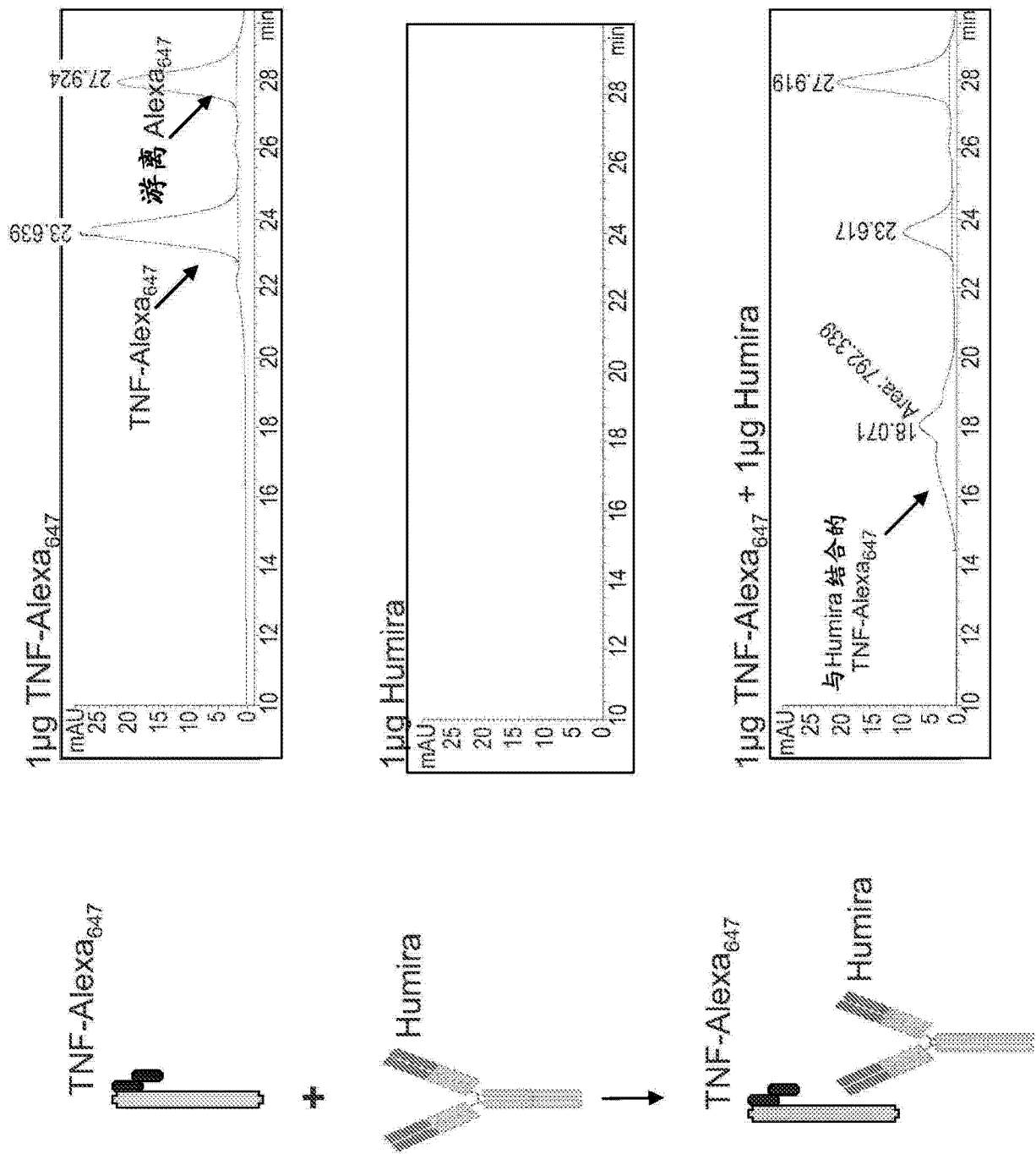


图 1

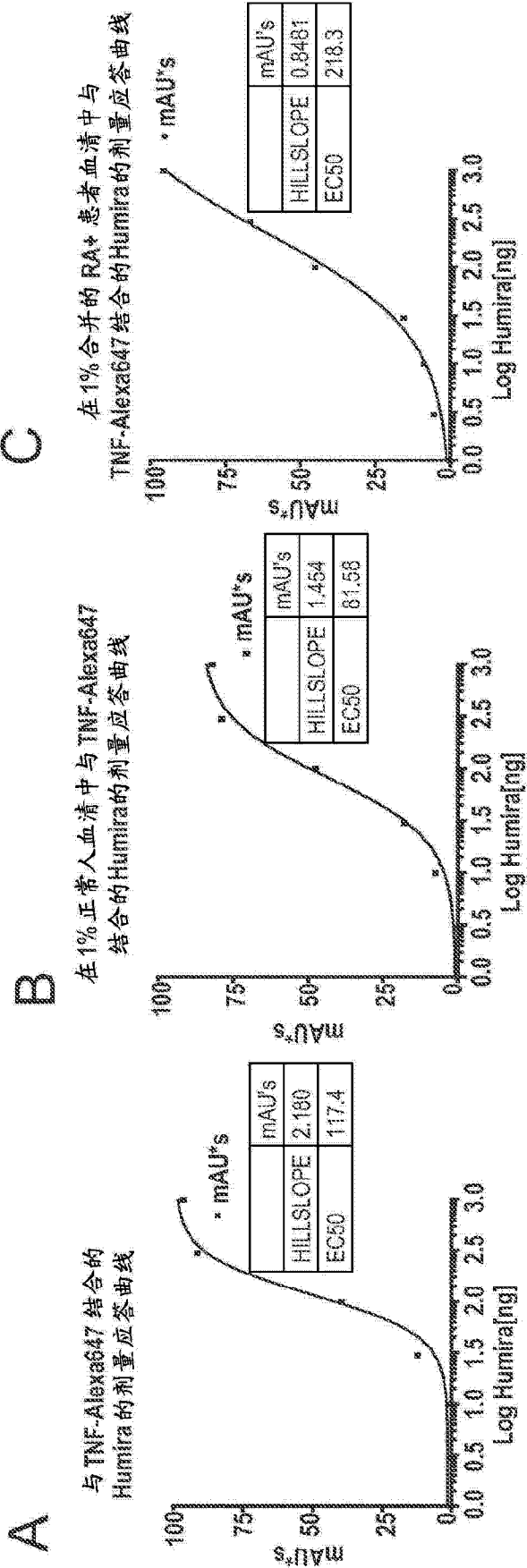


图 2

桥连测定法:

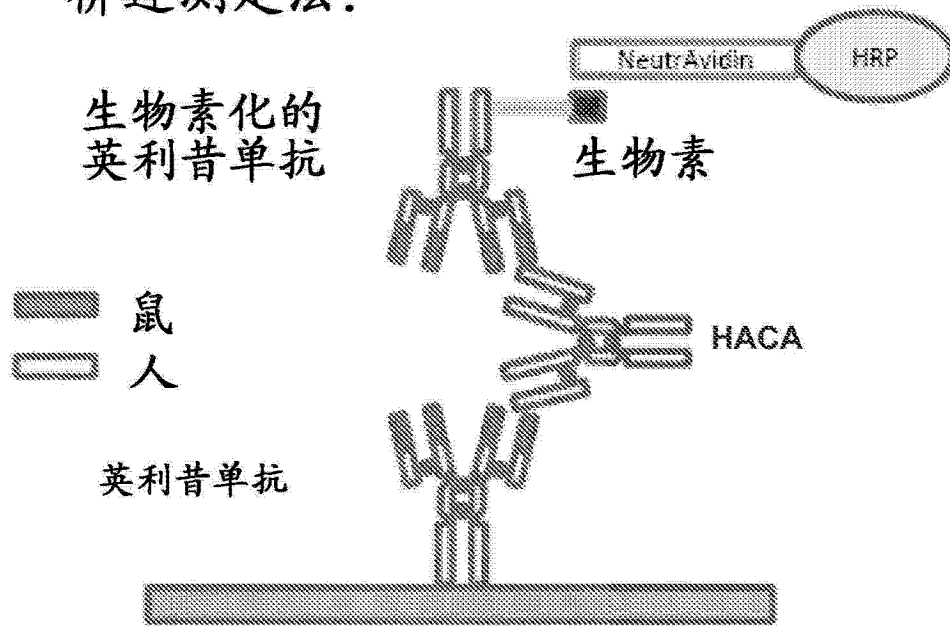


图 3

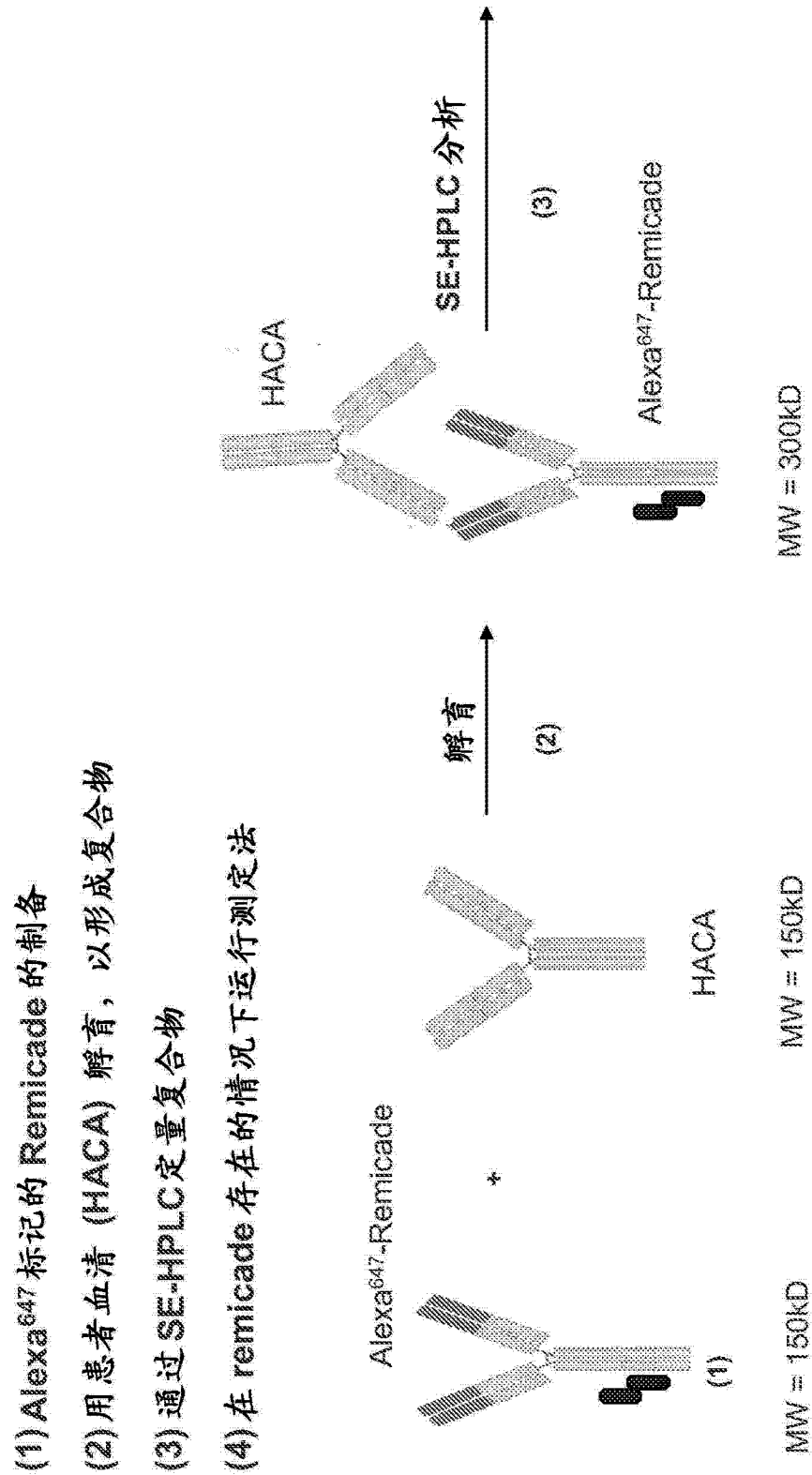


图 4

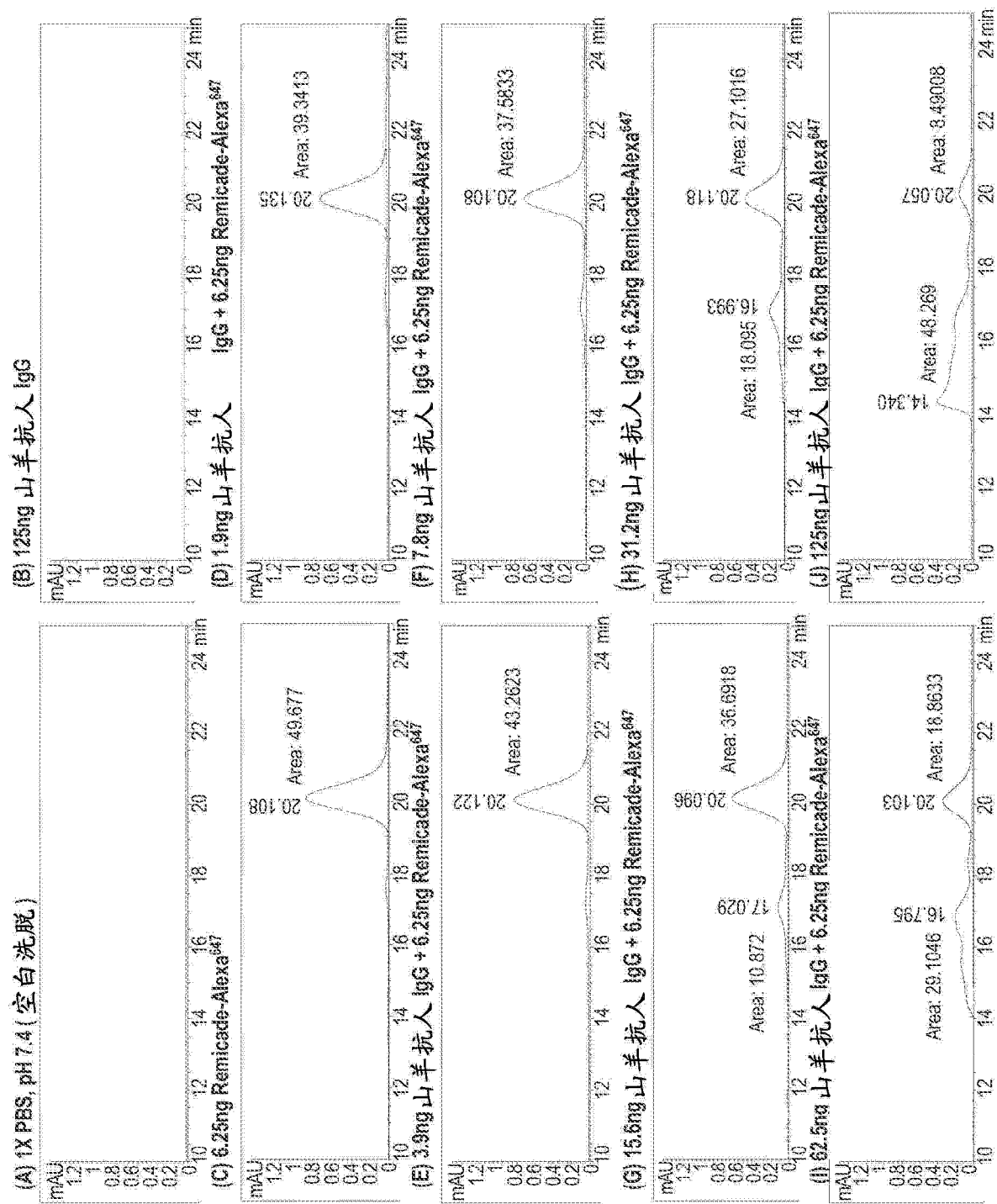


图 5

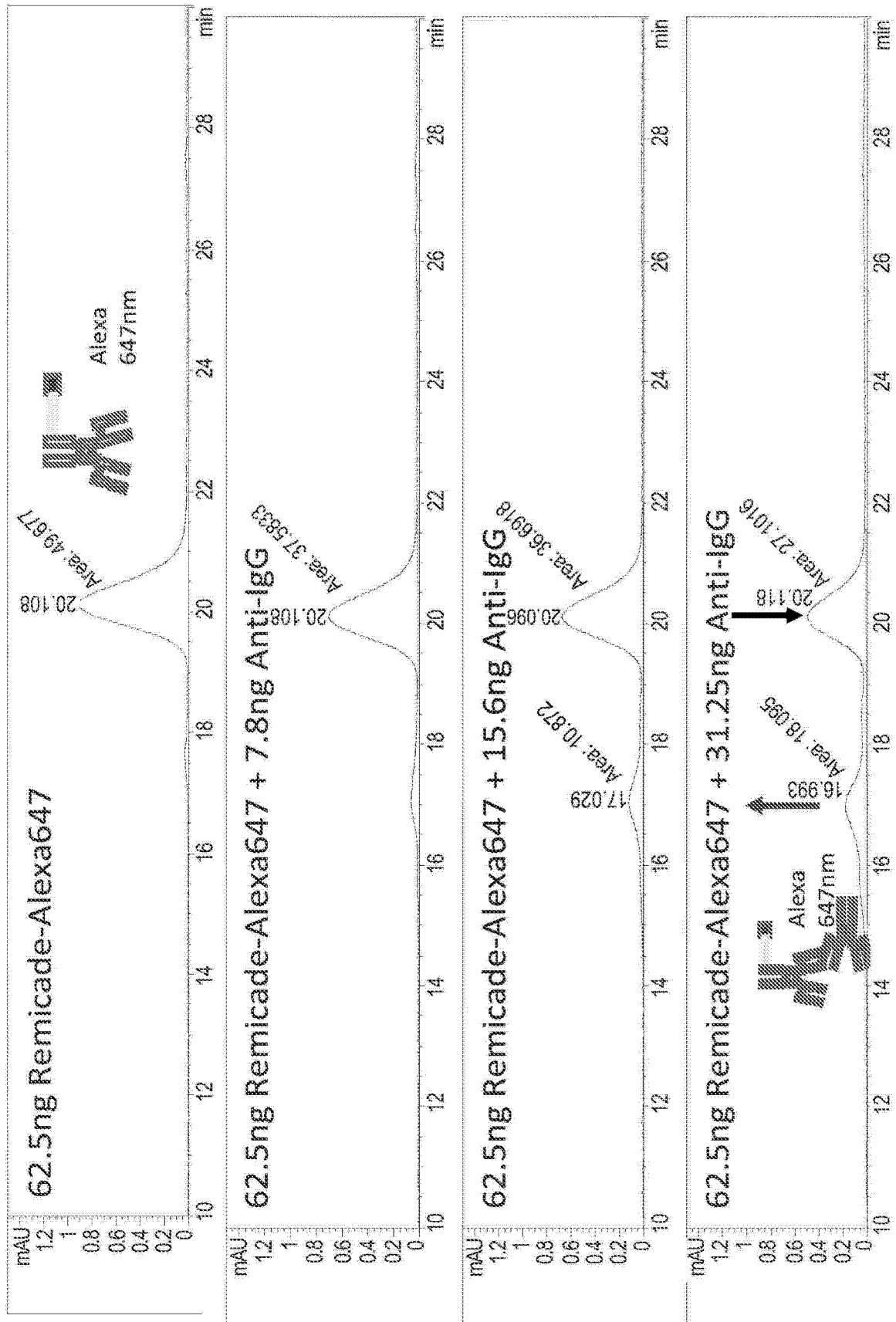
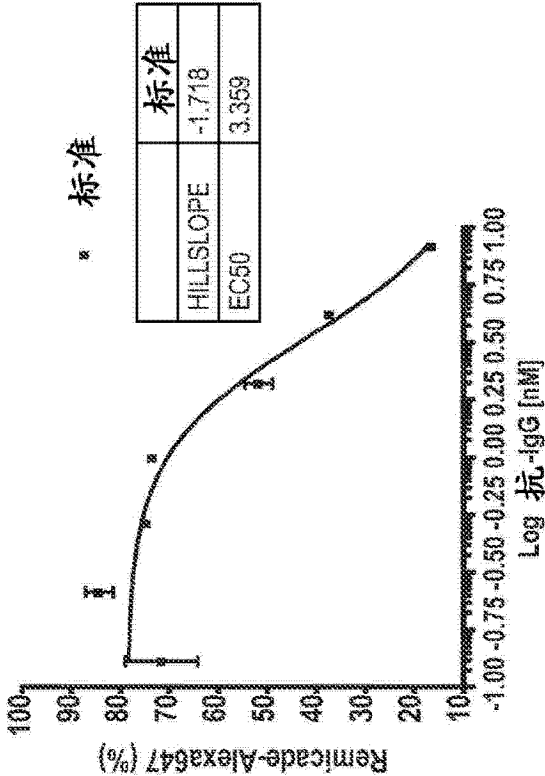


图 6

A.

用不同浓度的抗人 IgG 抗体孵育后，
剩余 Remicade-Alexa647 的剂量应答曲线



B.

不同浓度的抗人 IgG 存在下，
Remicade-Alexa647 复合物的剂量应答

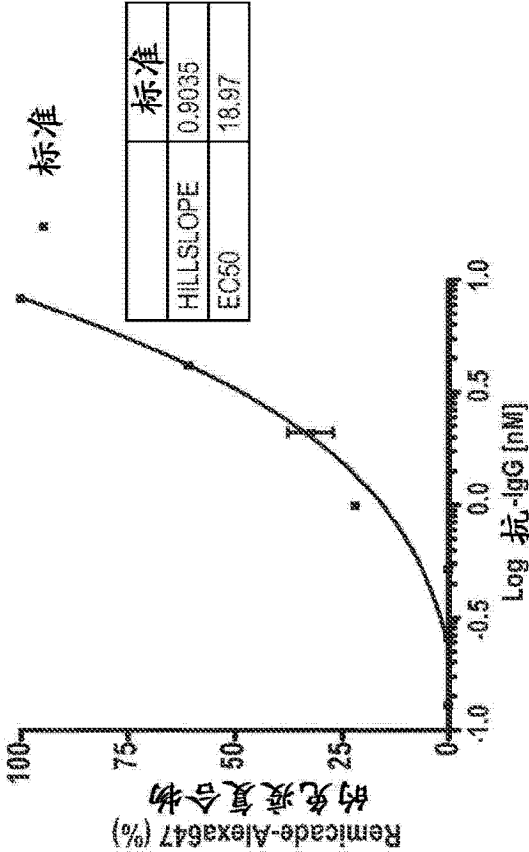


图 7

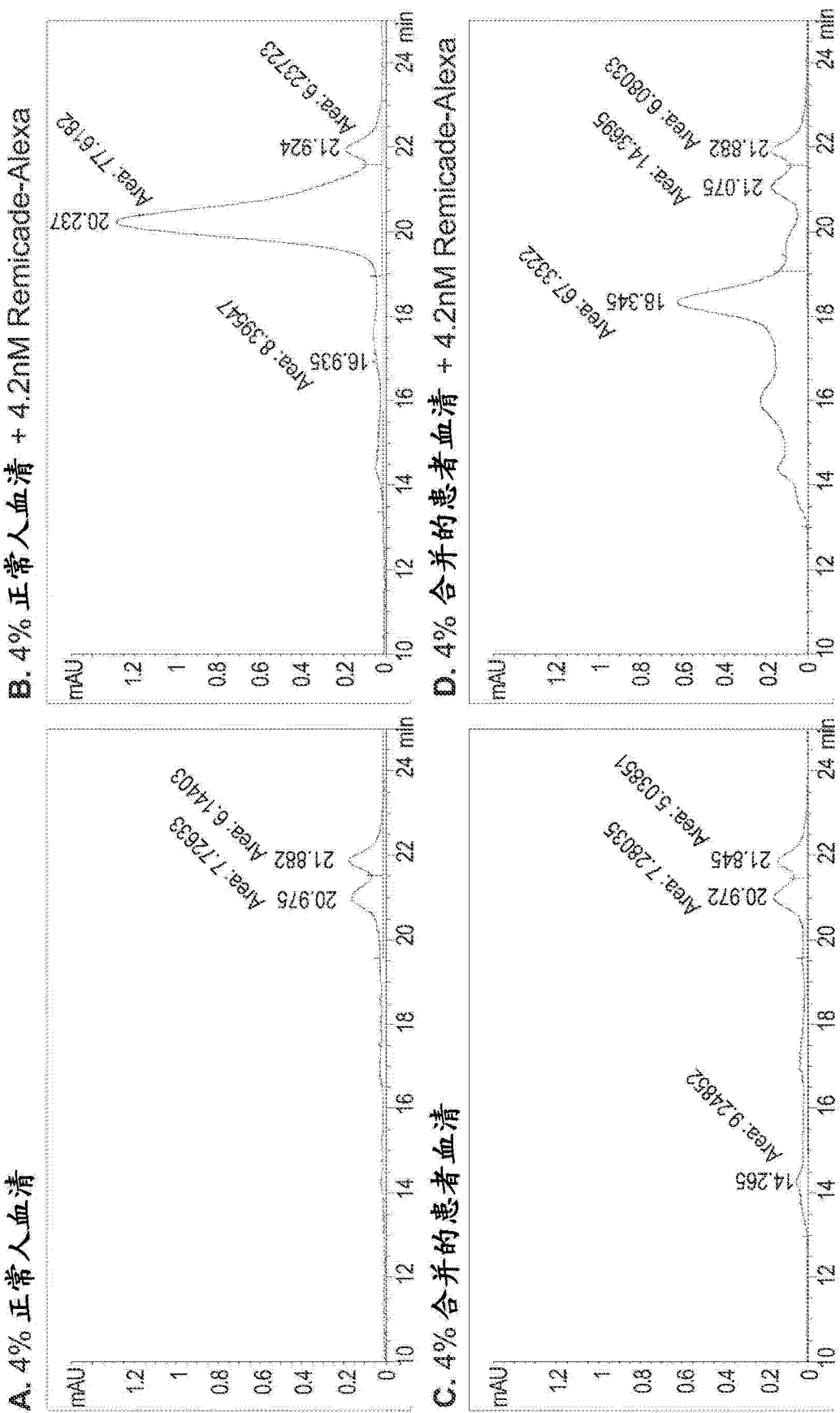


图 8

检索号 #	桥连 ELISA		迁移率变动分析 (4% 血清)		
	定量结果	定性结果	HACA 变动分析	HACA面积/Remicade-647 面积	Remicade (nM)
SK07010477	22.26	阳性	阳性	0.78	3.33
SK07060083	1.41	阴性	阴性	0.1	4.06
SK07070083	1.41	阴性	阴性	0.1	8.81
SK07070305	1.41	阴性	阳性	0.46	7.34
SK07070595	1.41	阴性	阳性	0.25	8.35
SK07071213	2.48	阳性	阳性	0.16	5.30
SK07081127	22.07	阳性	阳性	0.28	3.00
SK07100335	1.41	阴性	阳性	0.18	>66.7
SK07141447	2.62	阳性	阳性	0.42	2.43
SK07171059	10.11	阳性	阳性	18.02	2.59
SK07171095	10.03	阳性	阳性	0.24	2.24
SK07210210	9.26	阳性	阳性	0.8	<0.67
SK07231216	25.58	阳性	阳性	完全变动	1.34
SK07310149	2.74	阳性	阳性	0.21	<0.67
SK08040168	22.21	阳性	阳性	完全变动	<0.67
SK08051035	9.72	阳性	阳性	8.7	1.89
SK08070307	2.49	阳性	阳性	0.23	3.14
SK08120222	9.2	阳性	阳性	0.25	<0.67
SK08260093	23.15	阳性	阳性	0.48	1.04
SK08260783	2.67	阳性	阳性	0.25	3.30
62.5ng Remicade - 647				0.12	
100ng TNF - 647					<0.67

图 9

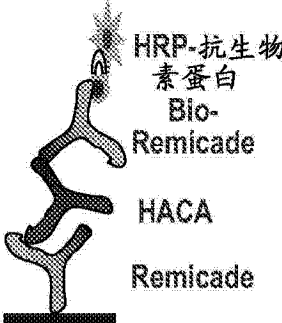
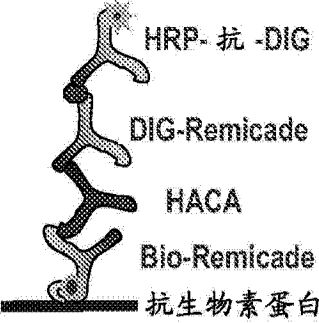
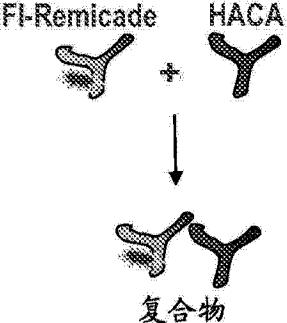
	桥连HACA测定法	基于生物素和DIG的均一性桥连ELISA	本发明的HACA测定法
测定形式			
非特异性背景干扰	高	高	低
敏感性	低	中等	高
假阳性和假阴性的可能性	高	高	低
IgG4 HACA检测	否	否	是
Ig同种型鉴定	否	否	是
样品中药物的耐受性	差	差	好

图 10

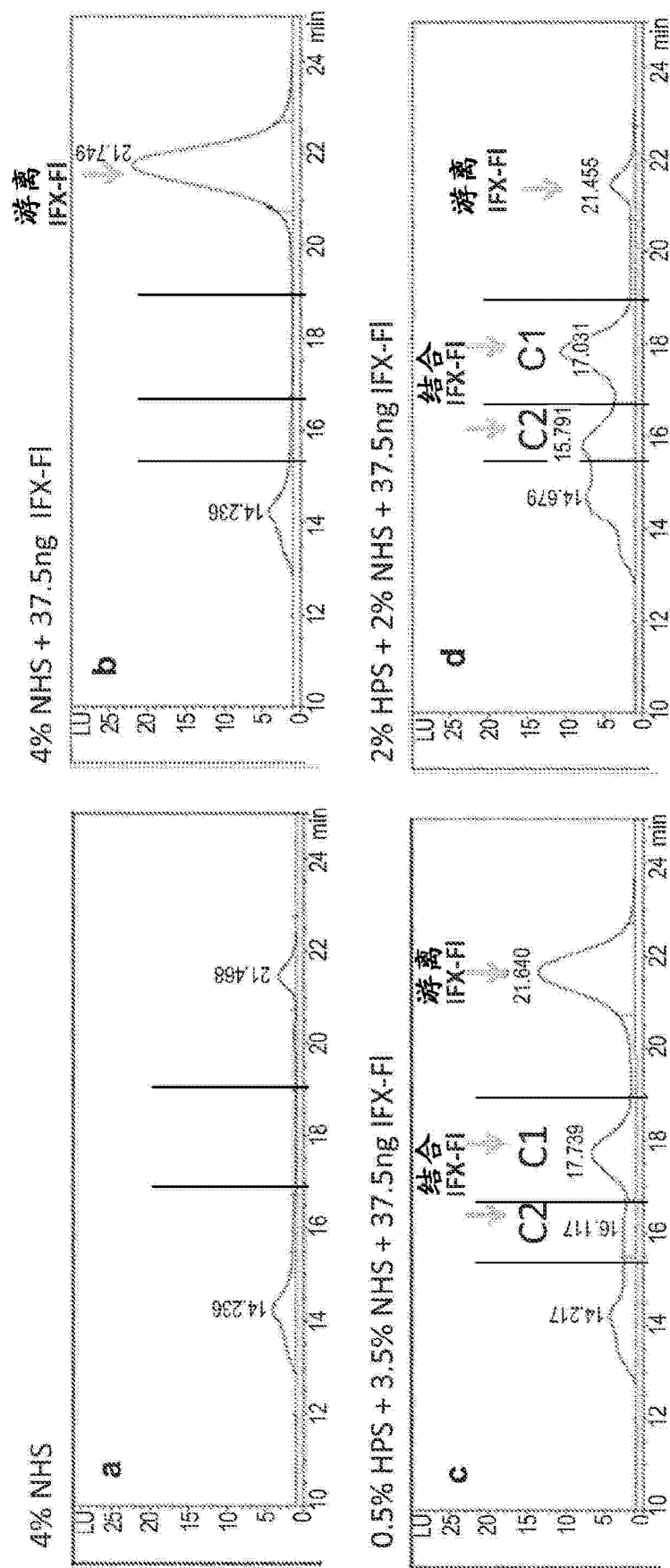


图 11

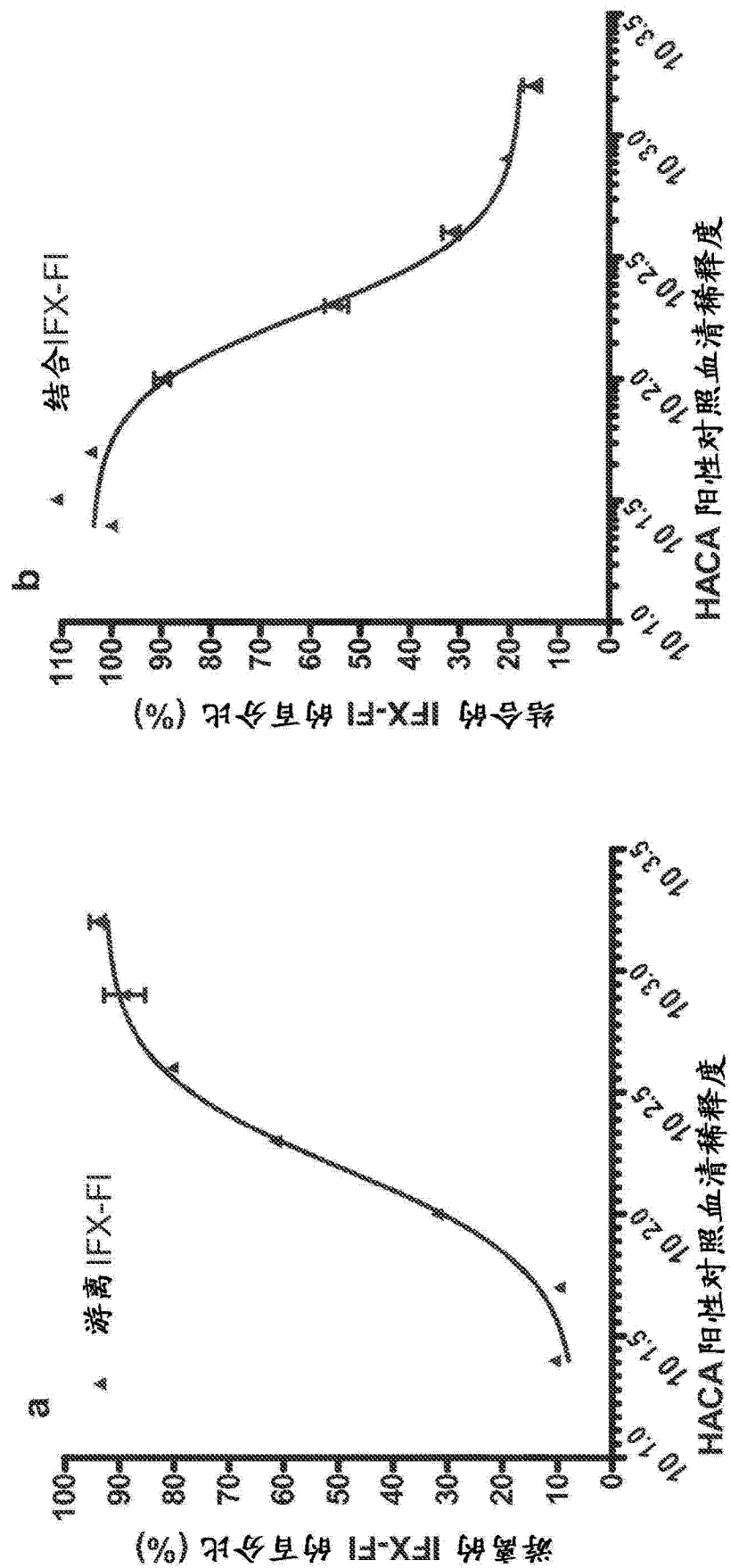


图 12

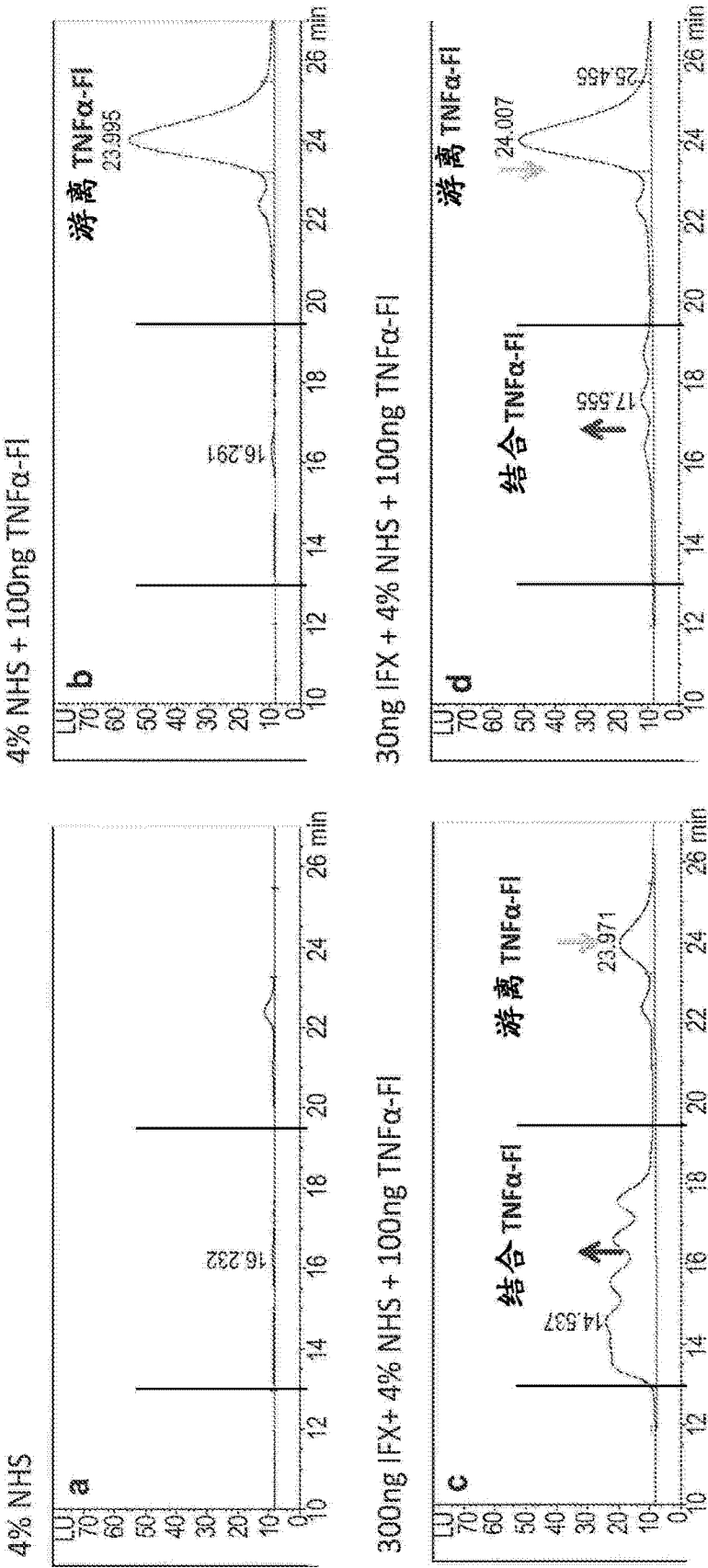


图 13

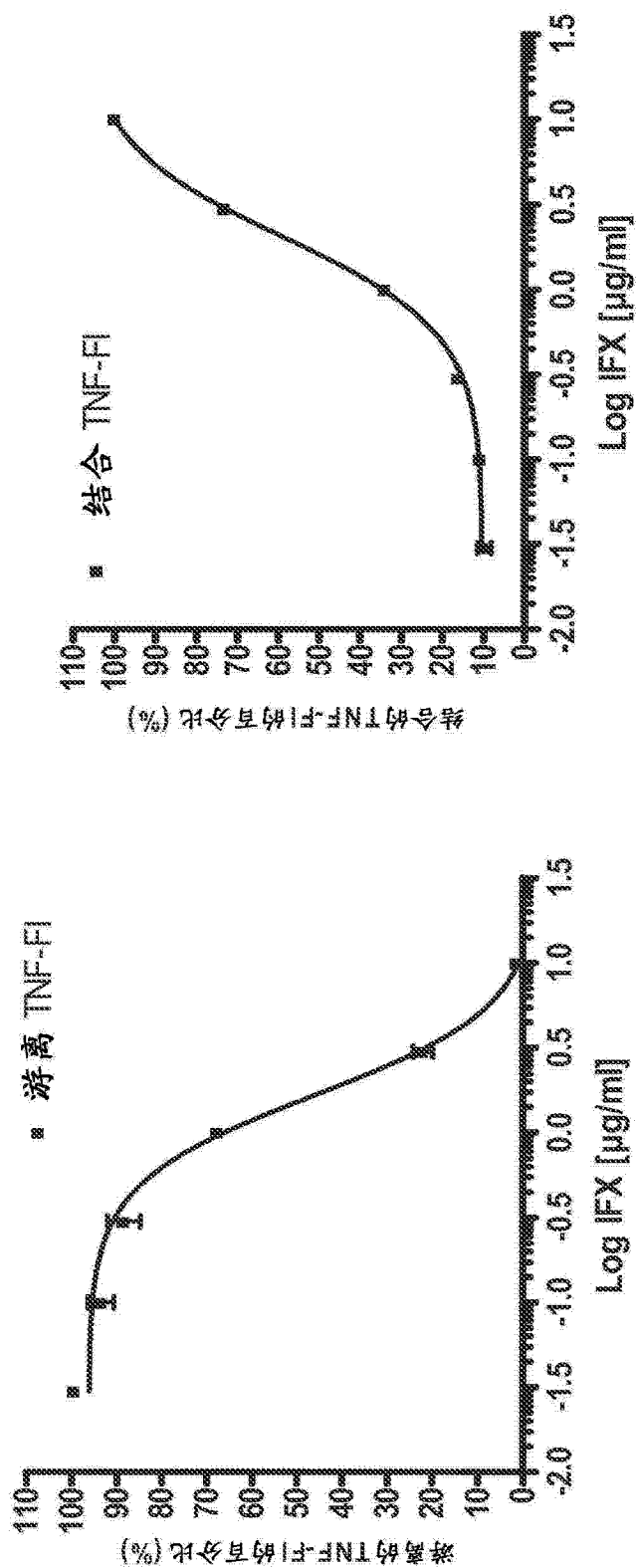


图 14

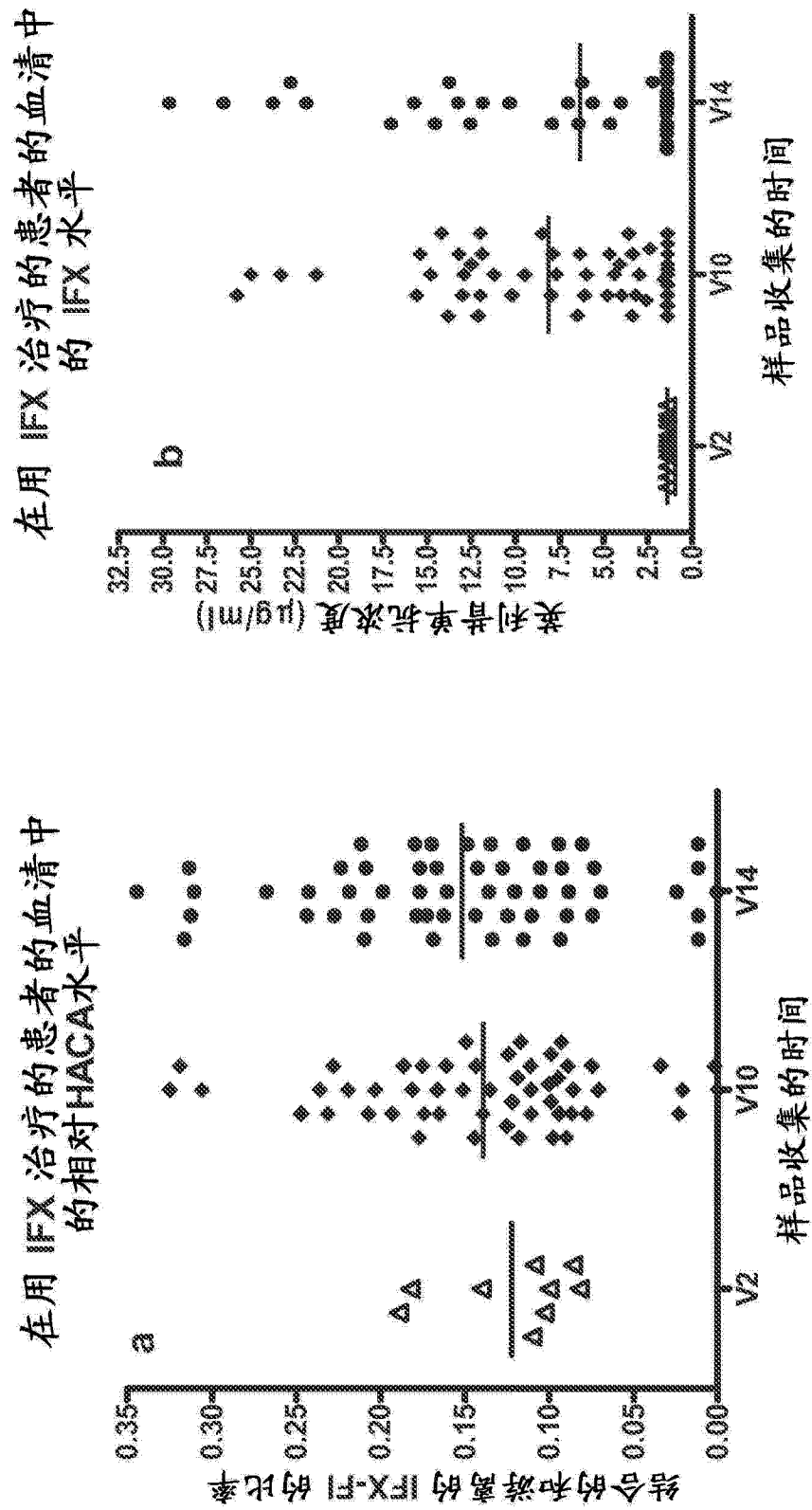


图 15

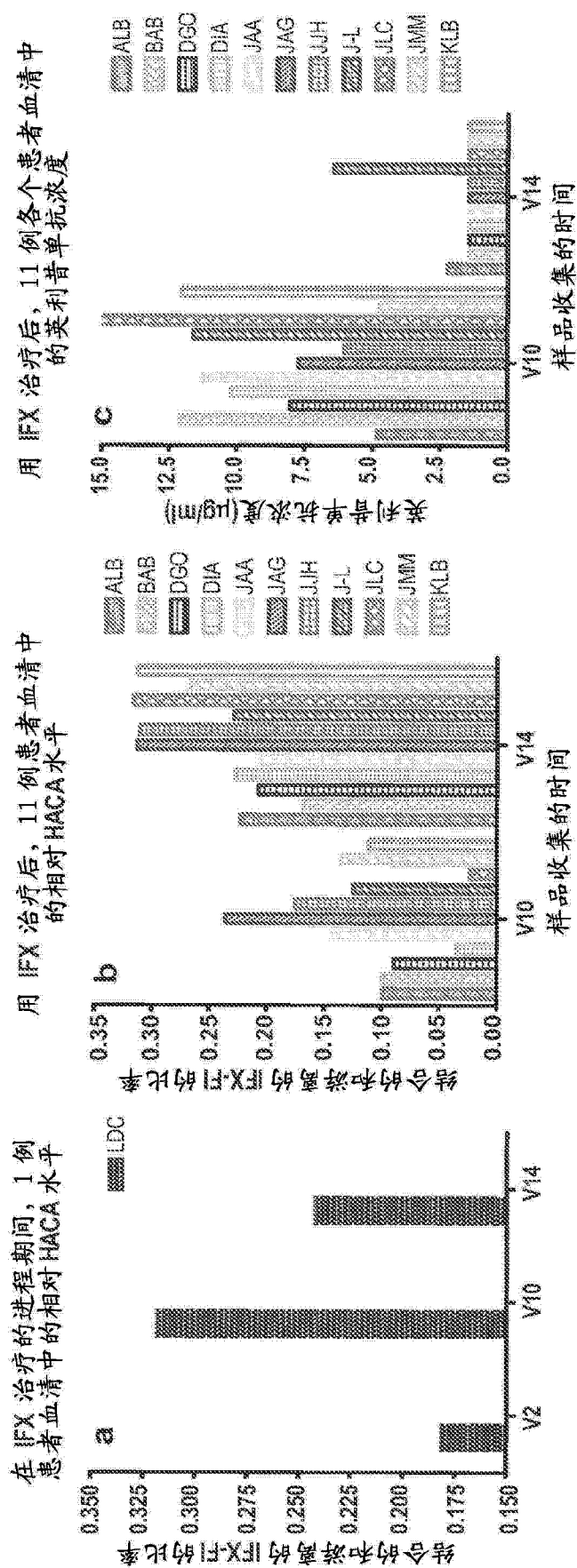
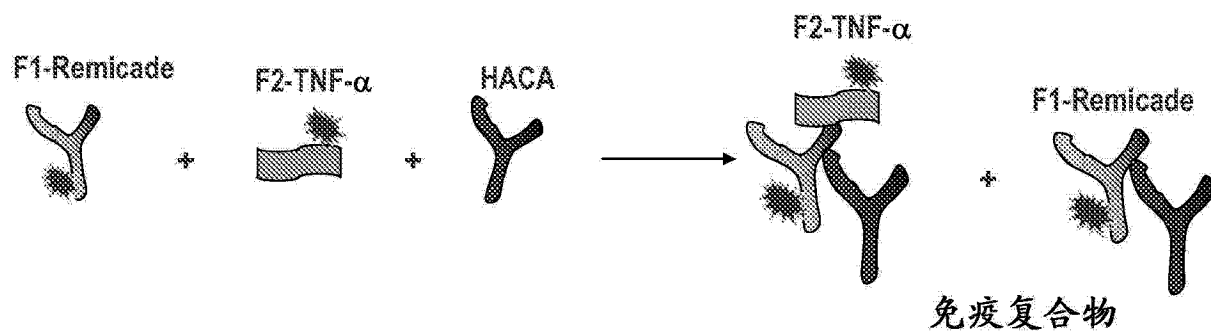


图 16

A. 非中和性HACA



B. 中和性HACA测定法

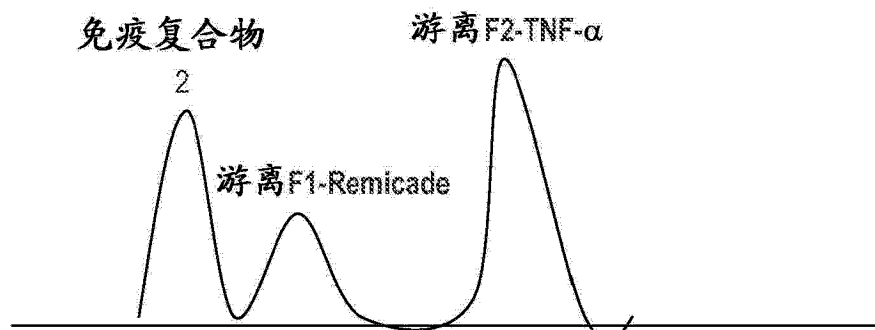
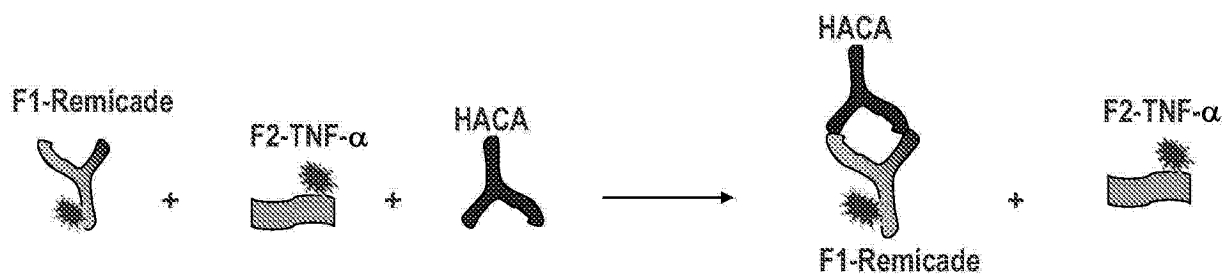


图 17

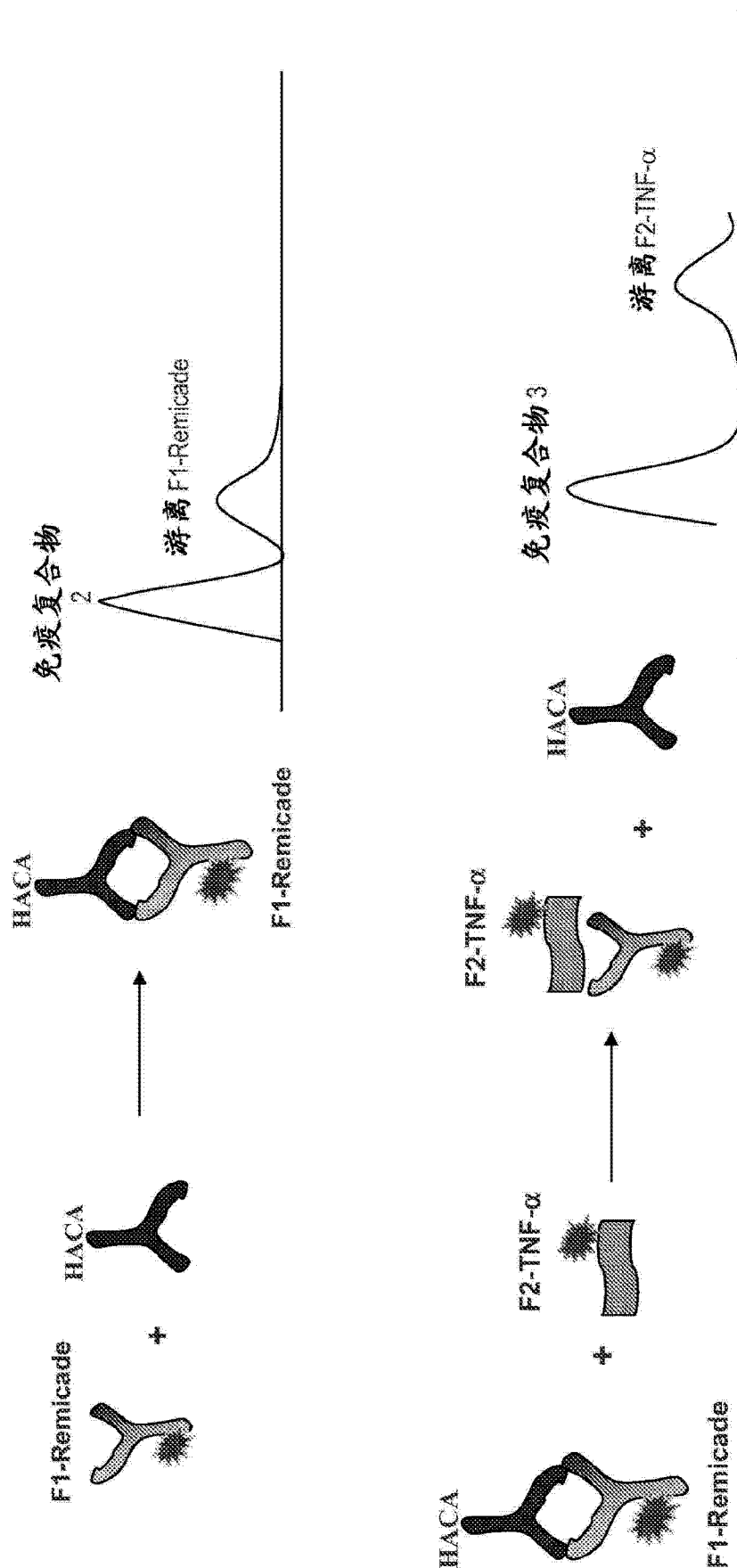


图 18

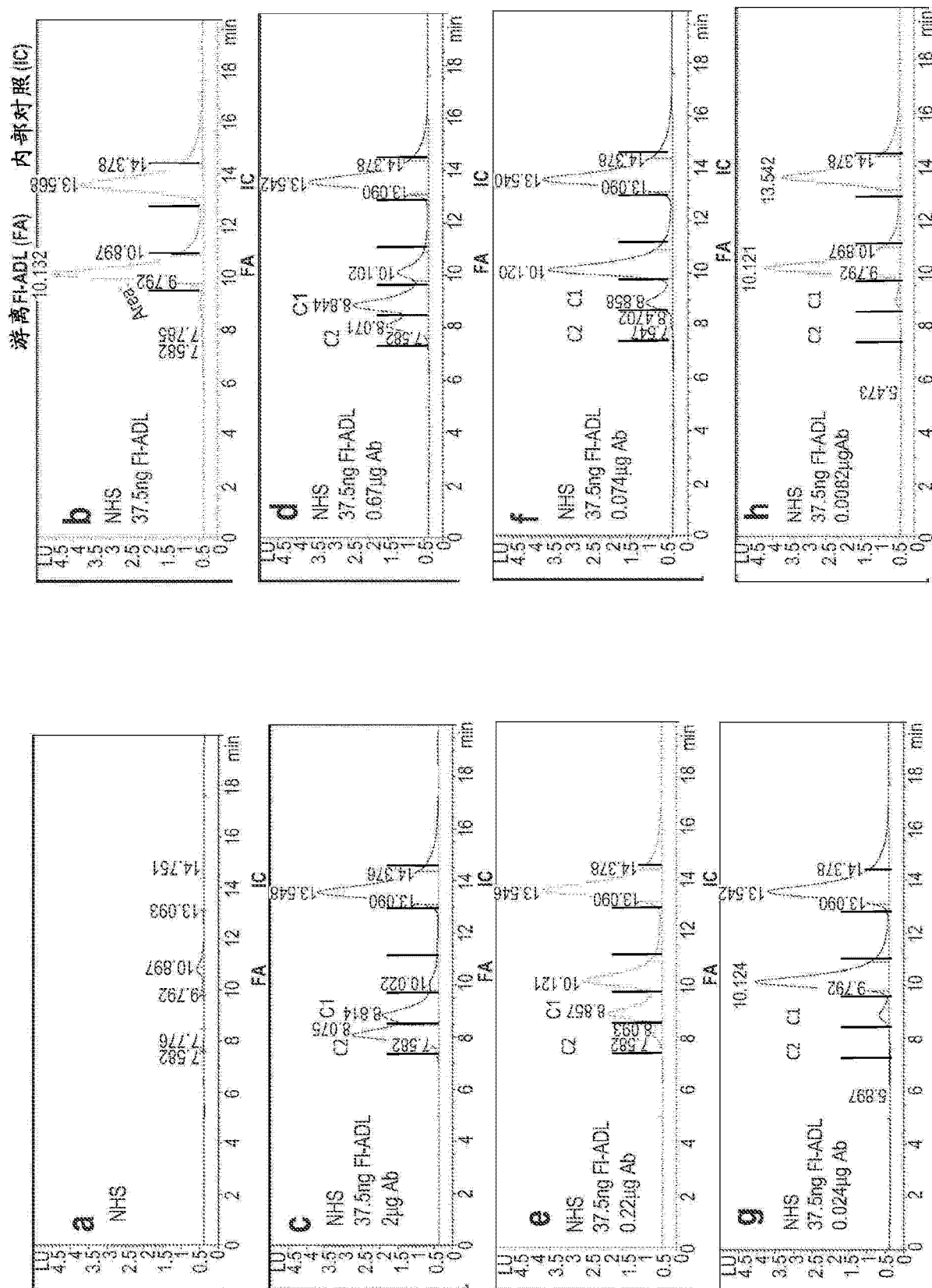


图 19

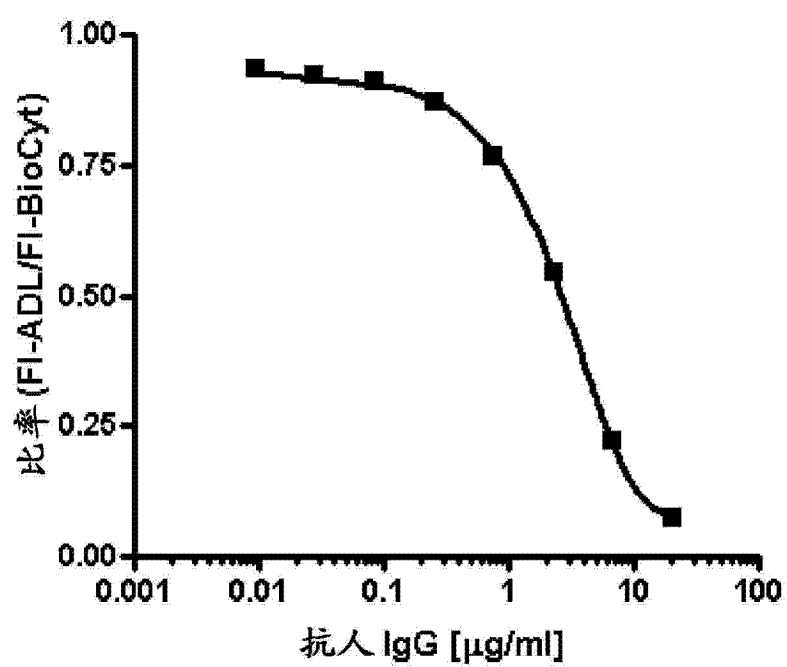


图 20

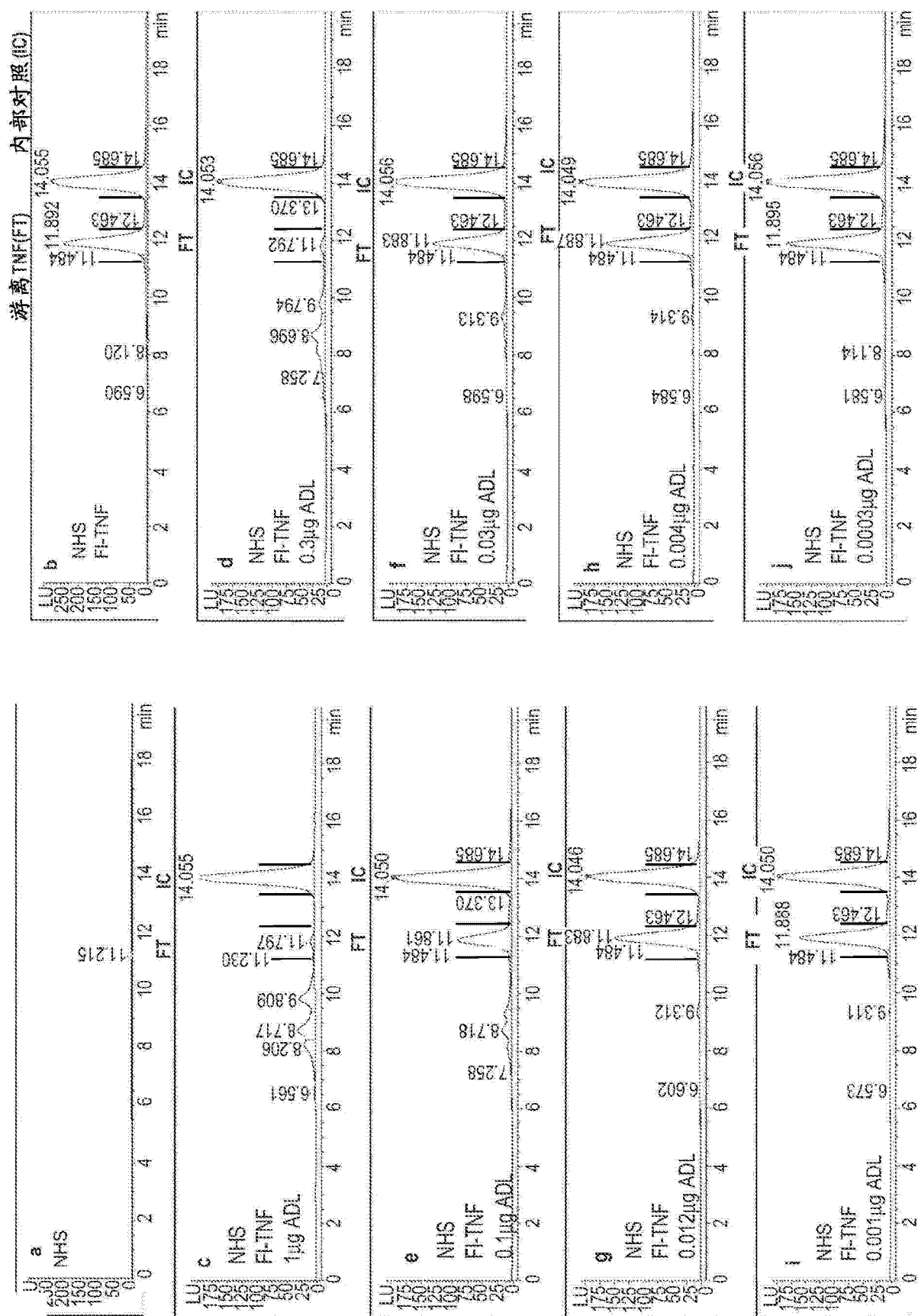
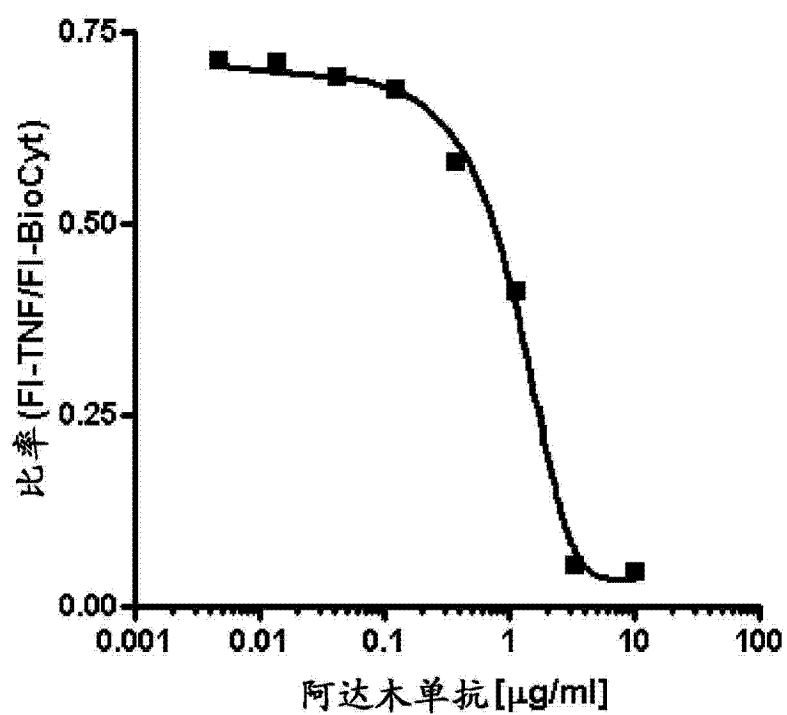


图 21



HILLSLOPE	-1.813
EC50	1.213

图 22

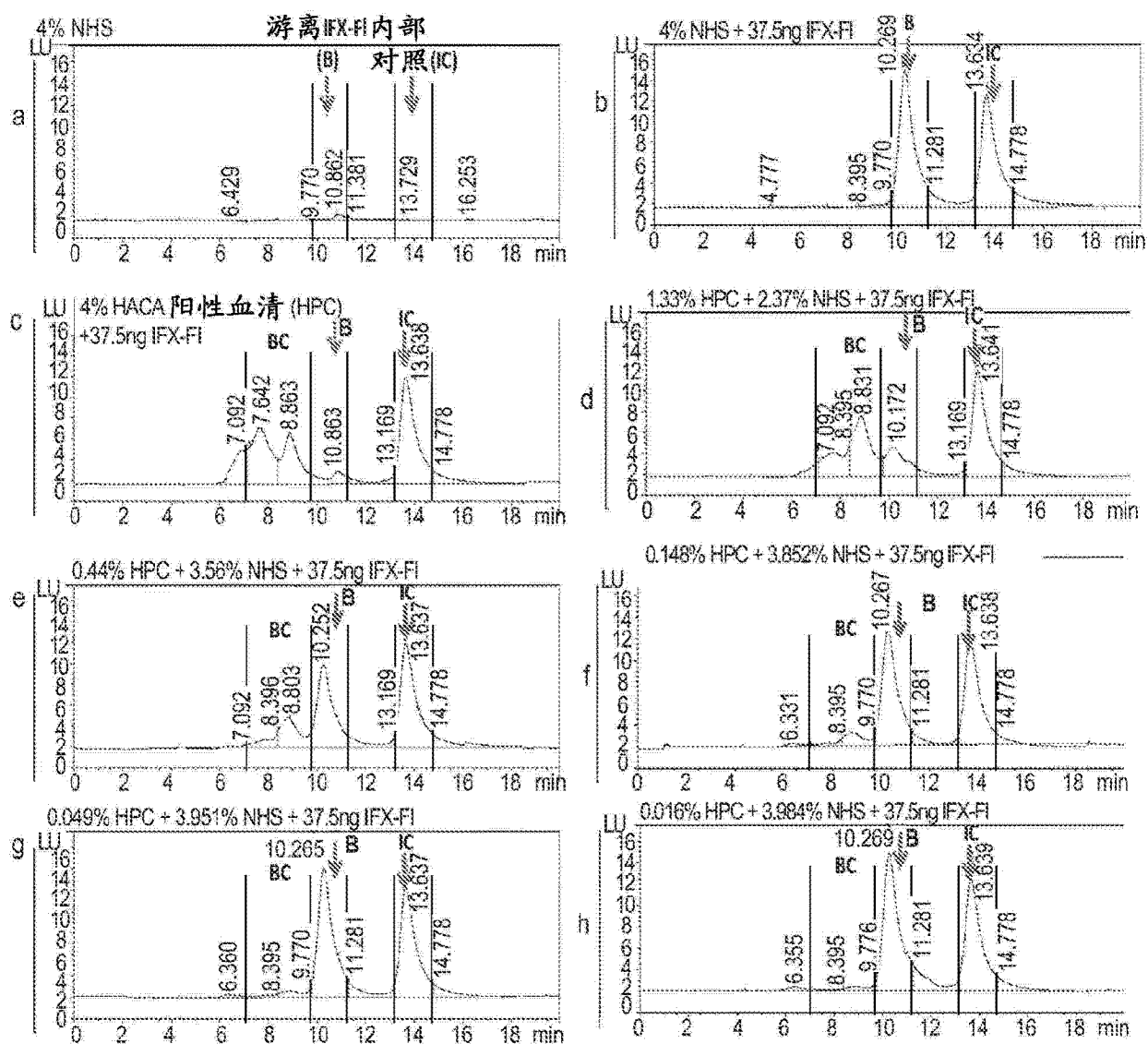


图 23

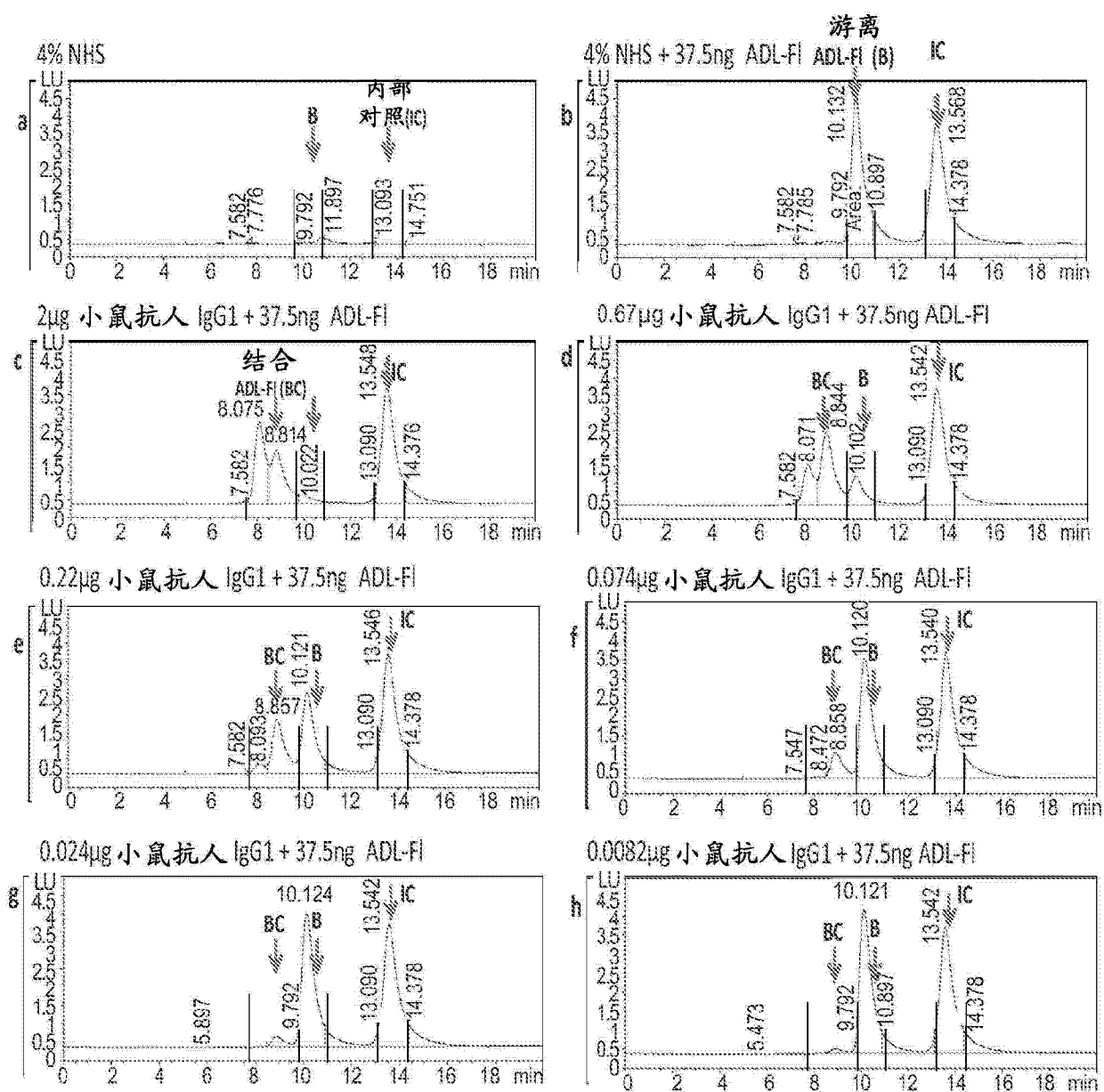


图 24

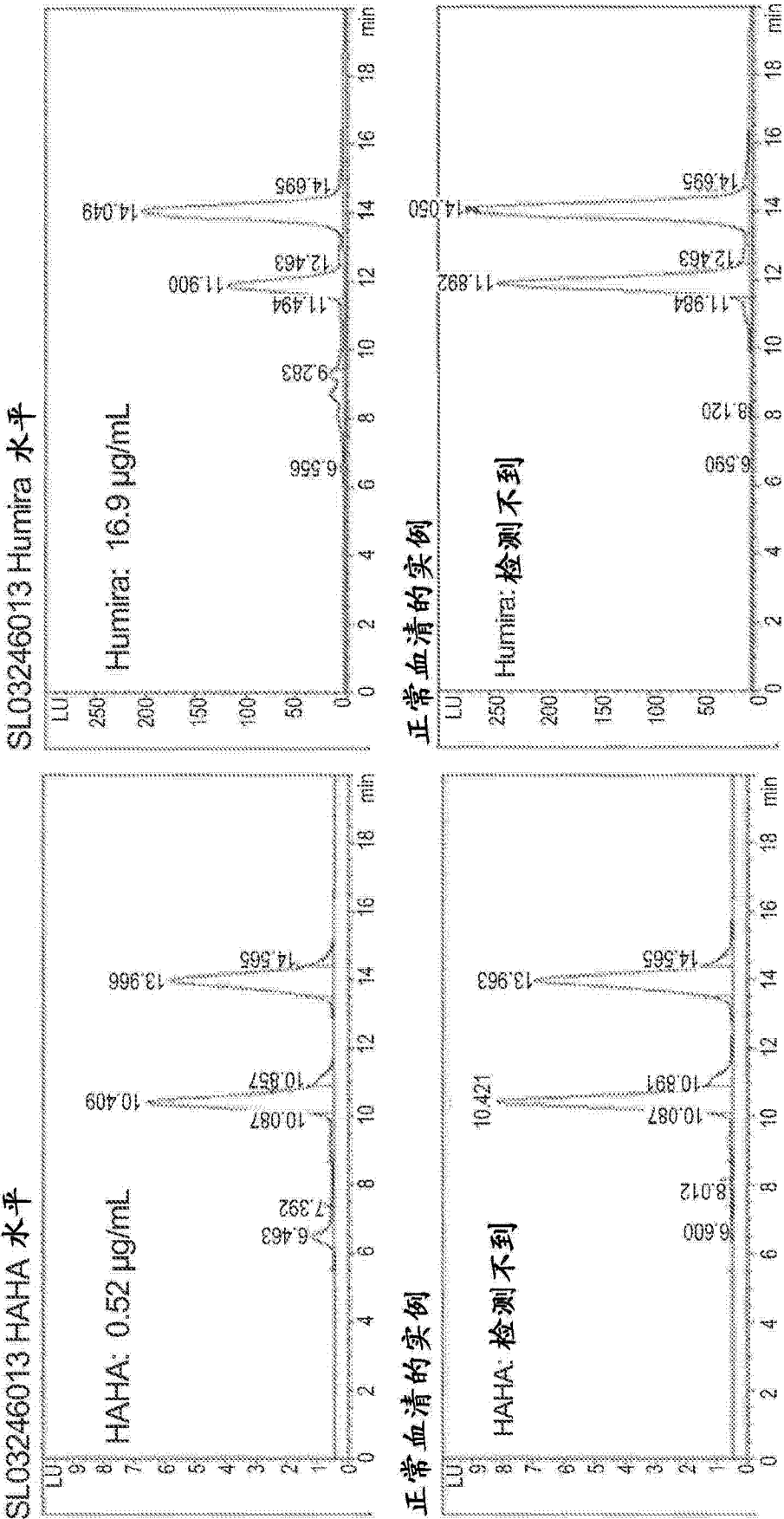


图 25

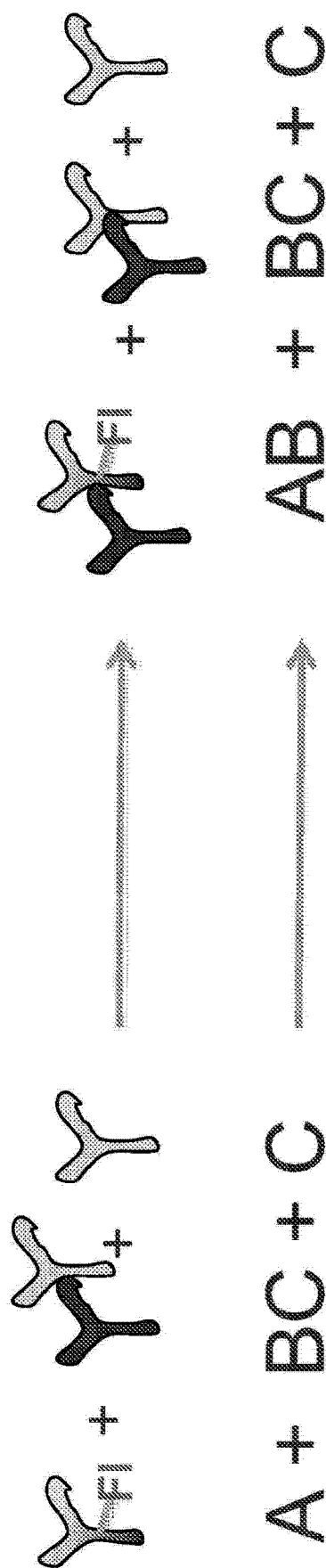


图 26

HACA测定法
IFX 干扰

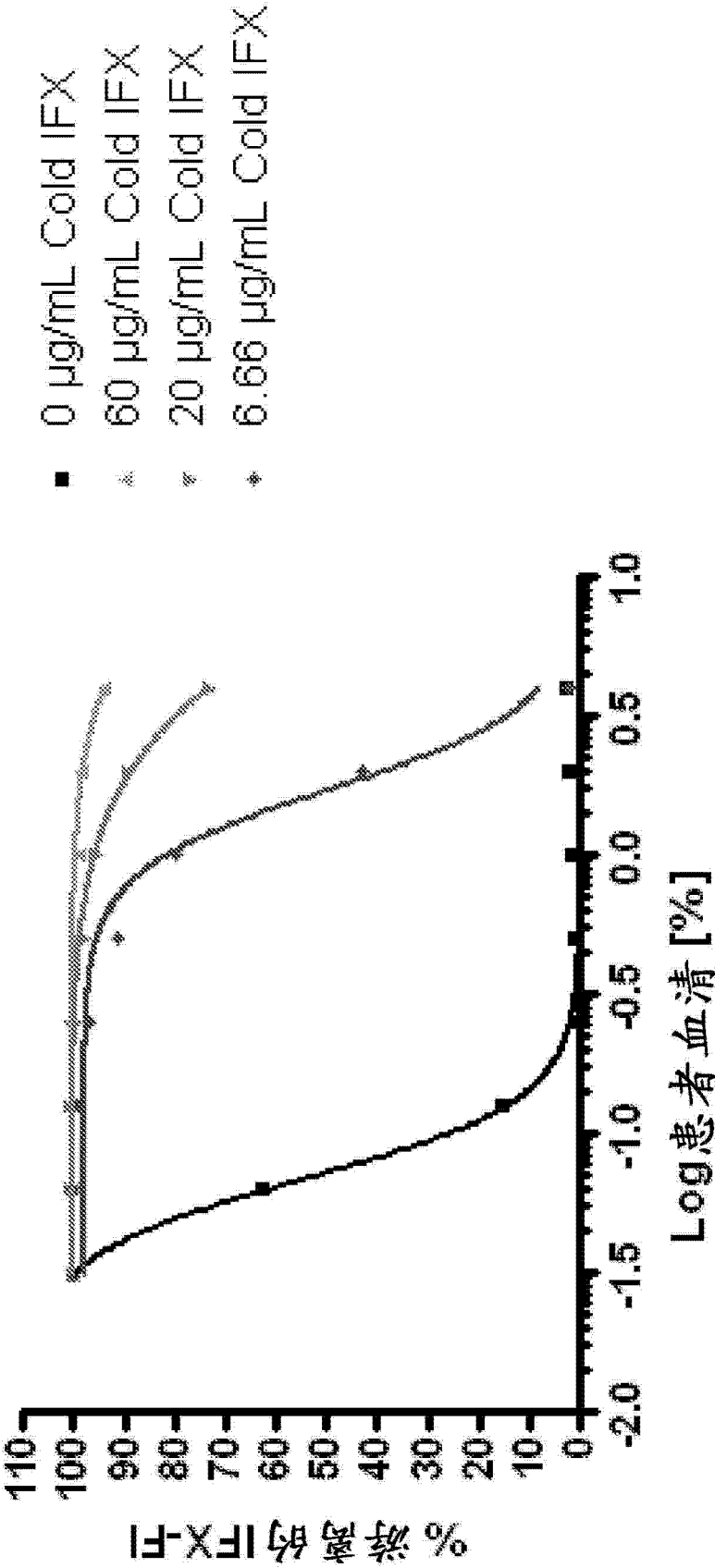


图 27

HACA 测定法 在酸解离下的 IFX 干扰

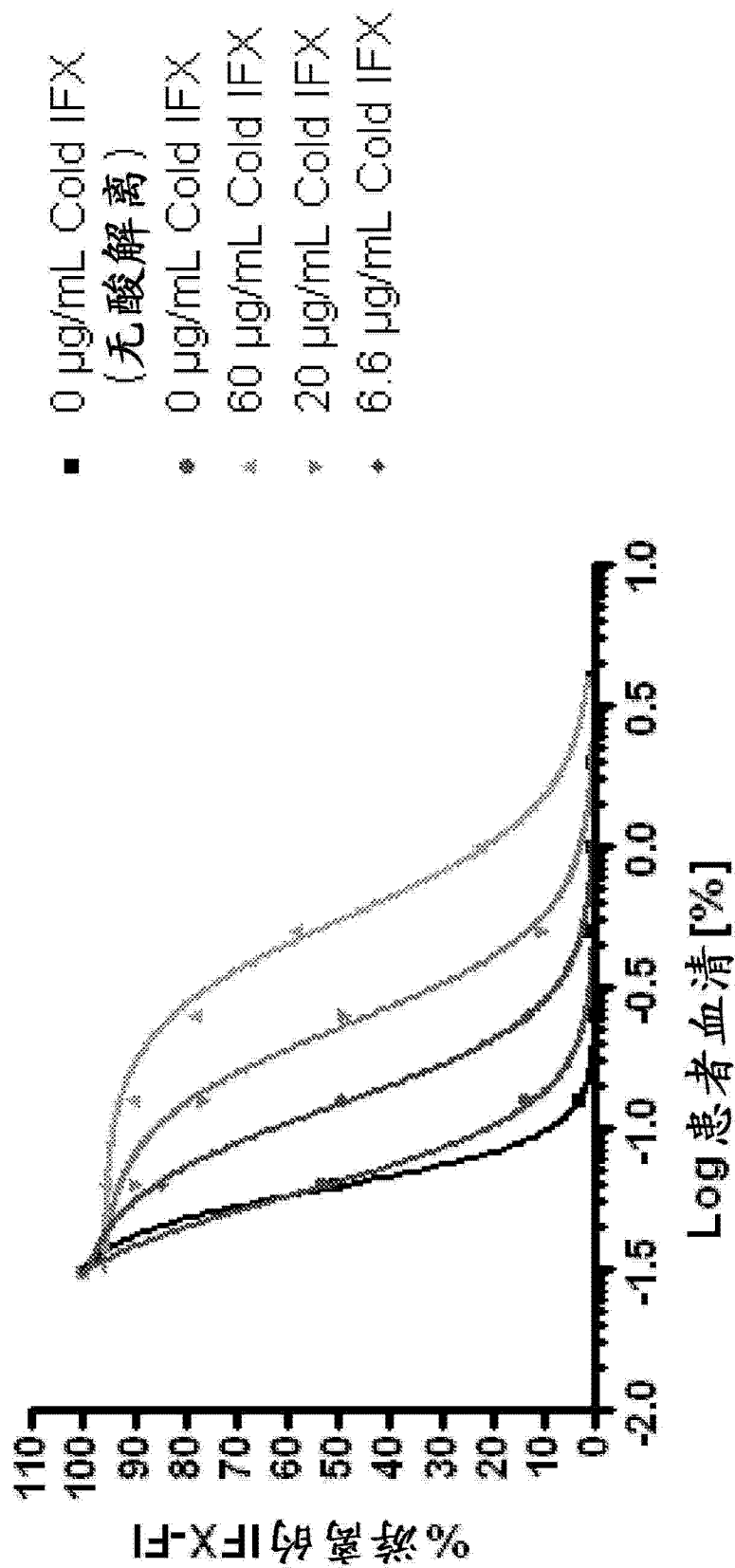


图 28

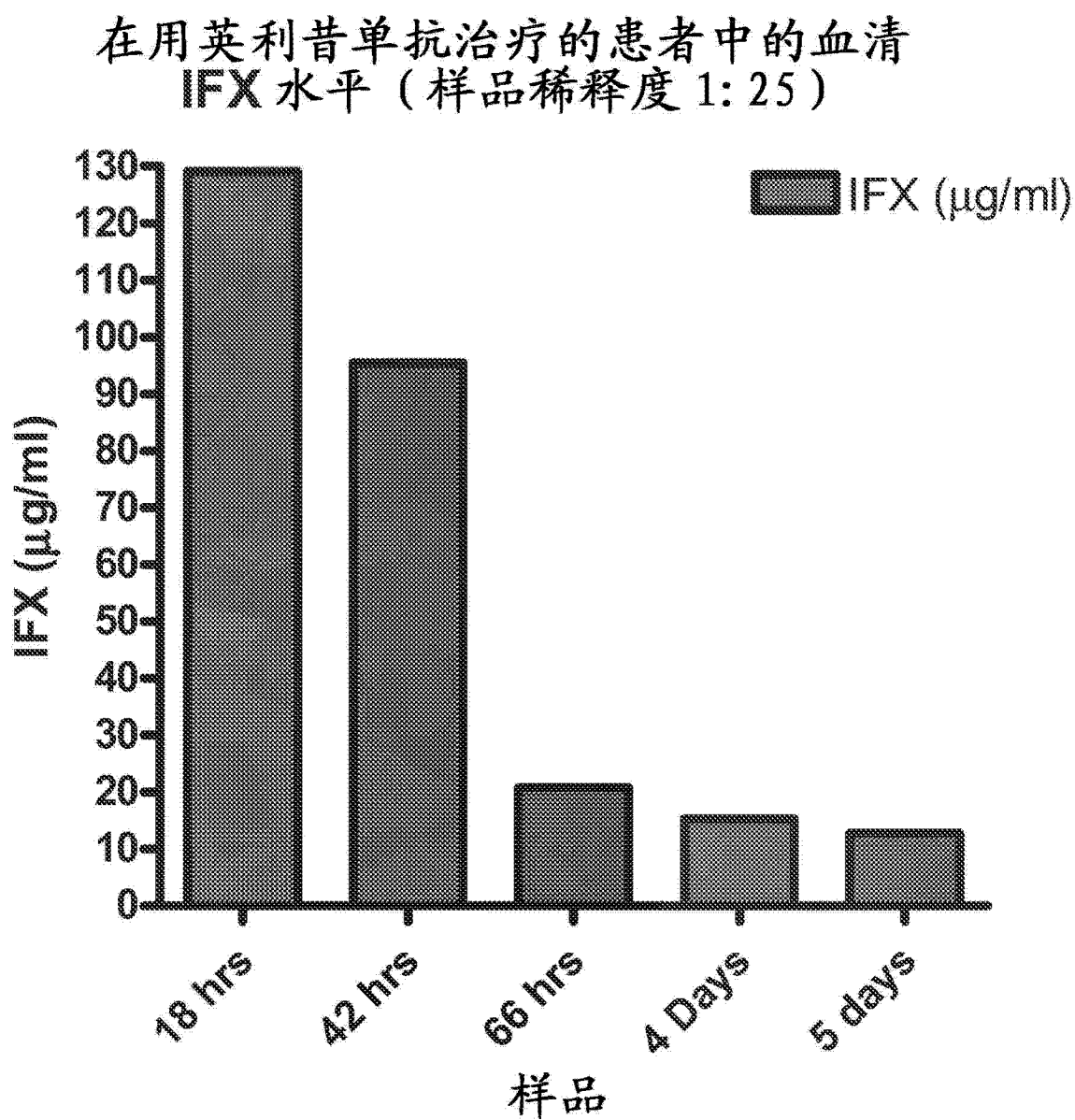


图 29

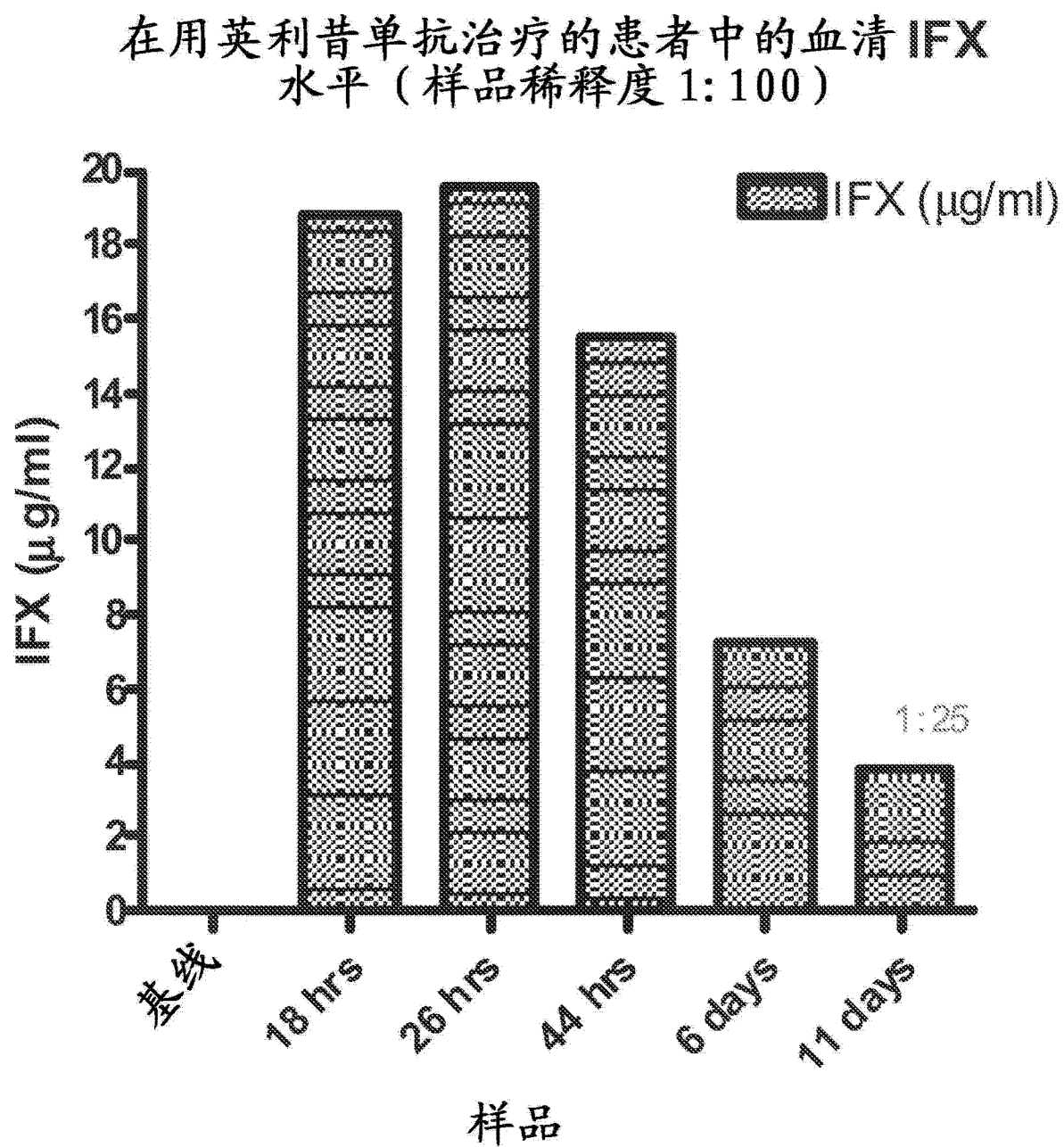


图 30

在用英利昔单抗治疗的患者中的
血清TNF- α 水平

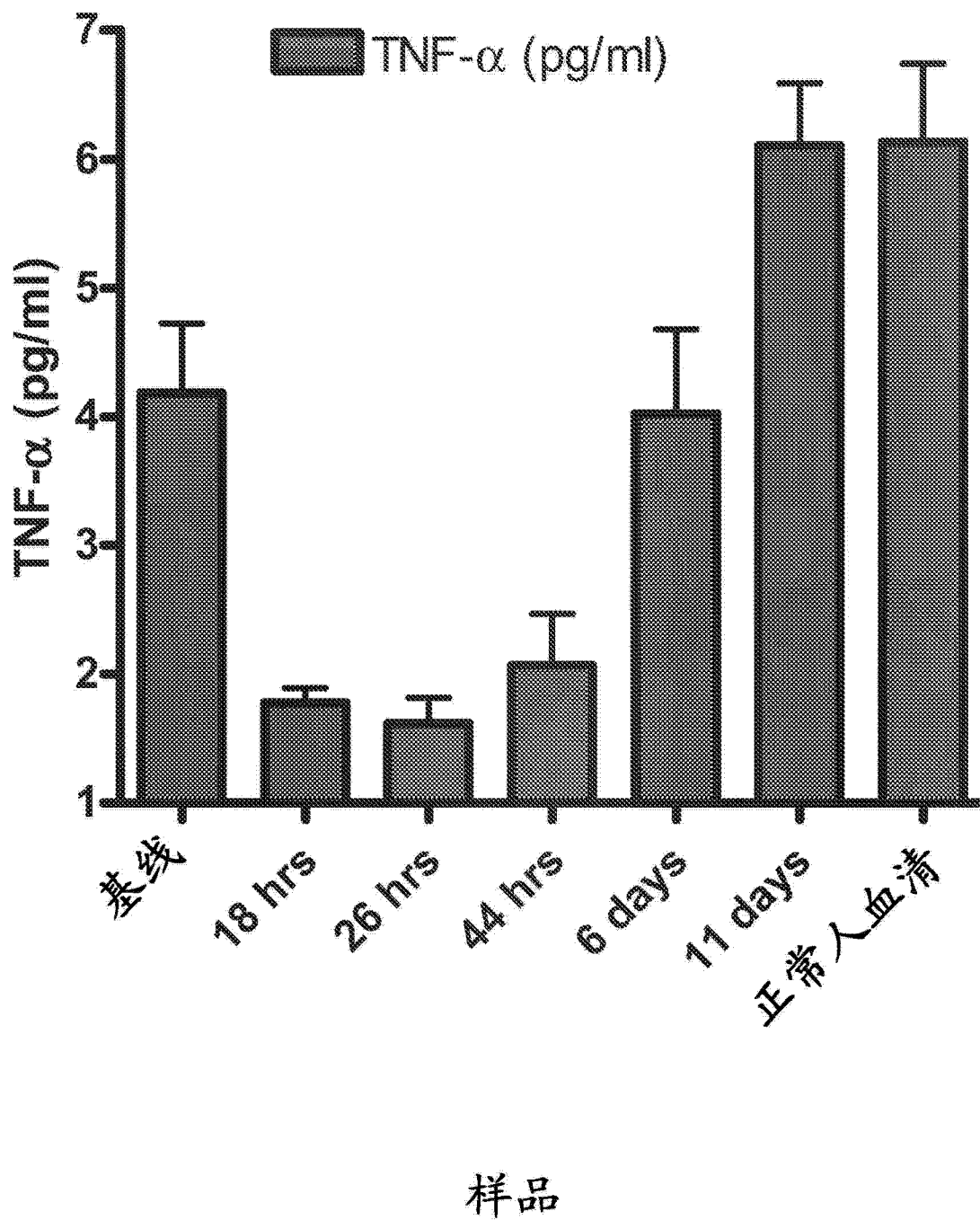
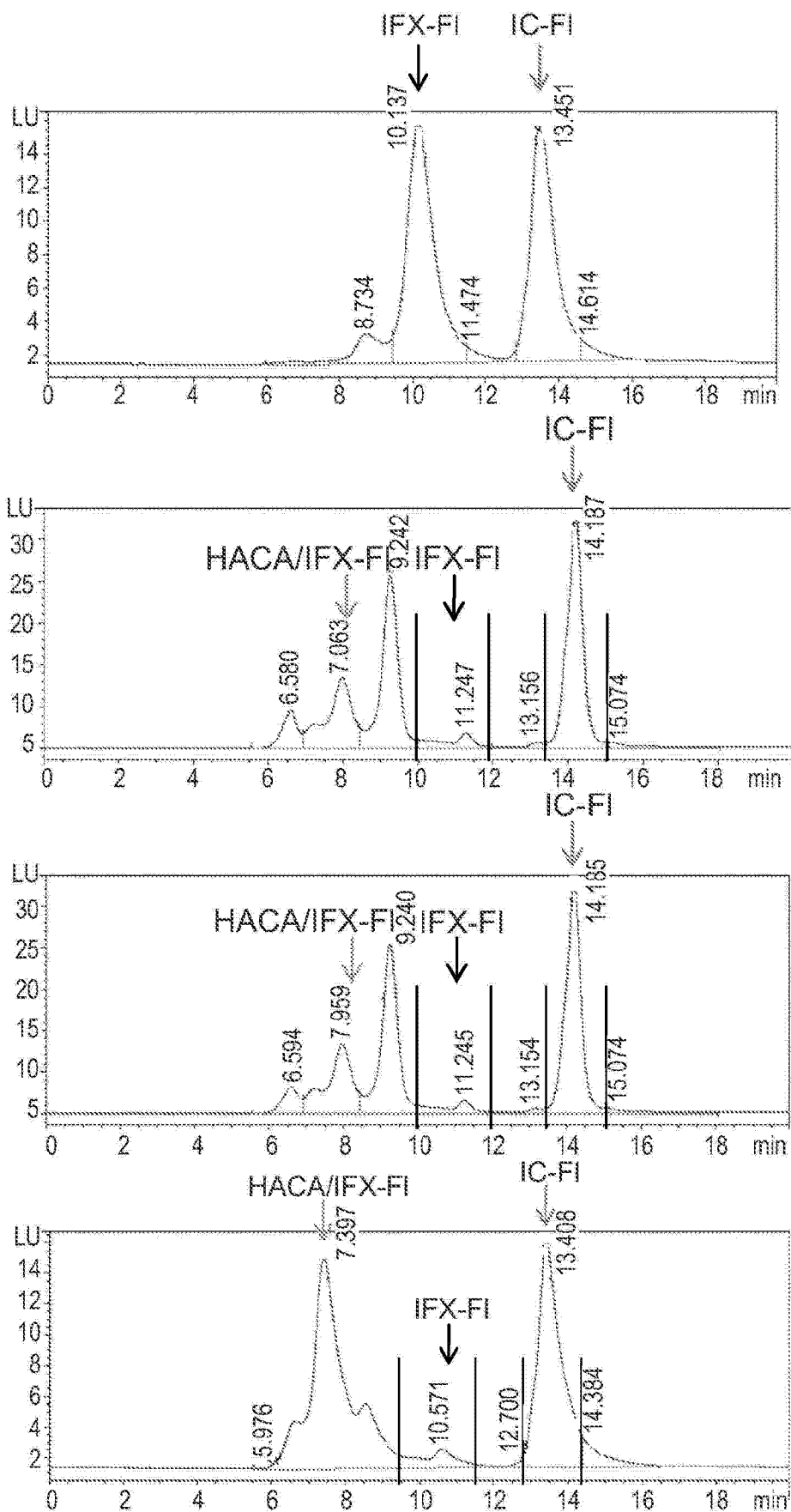


图 31



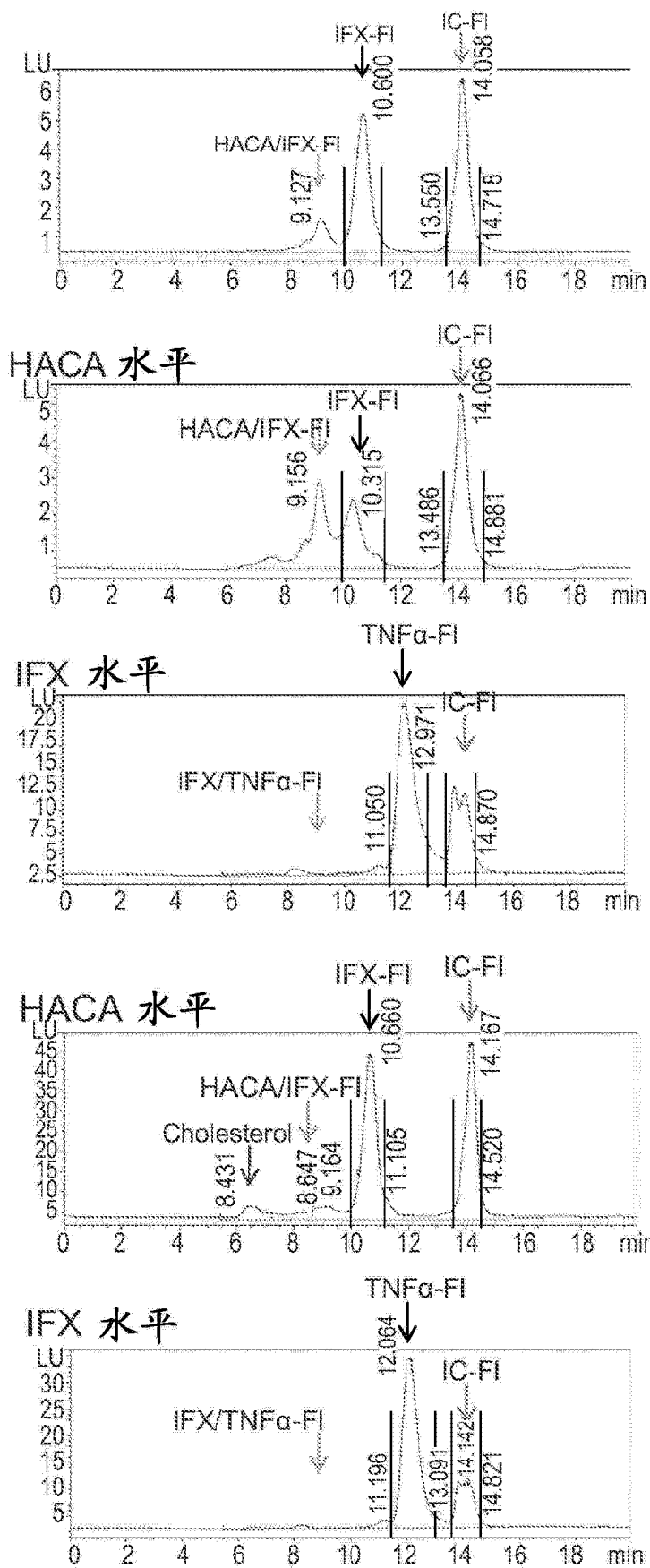
A

B

C

D

图 32



A

B

C

D

E

图 33

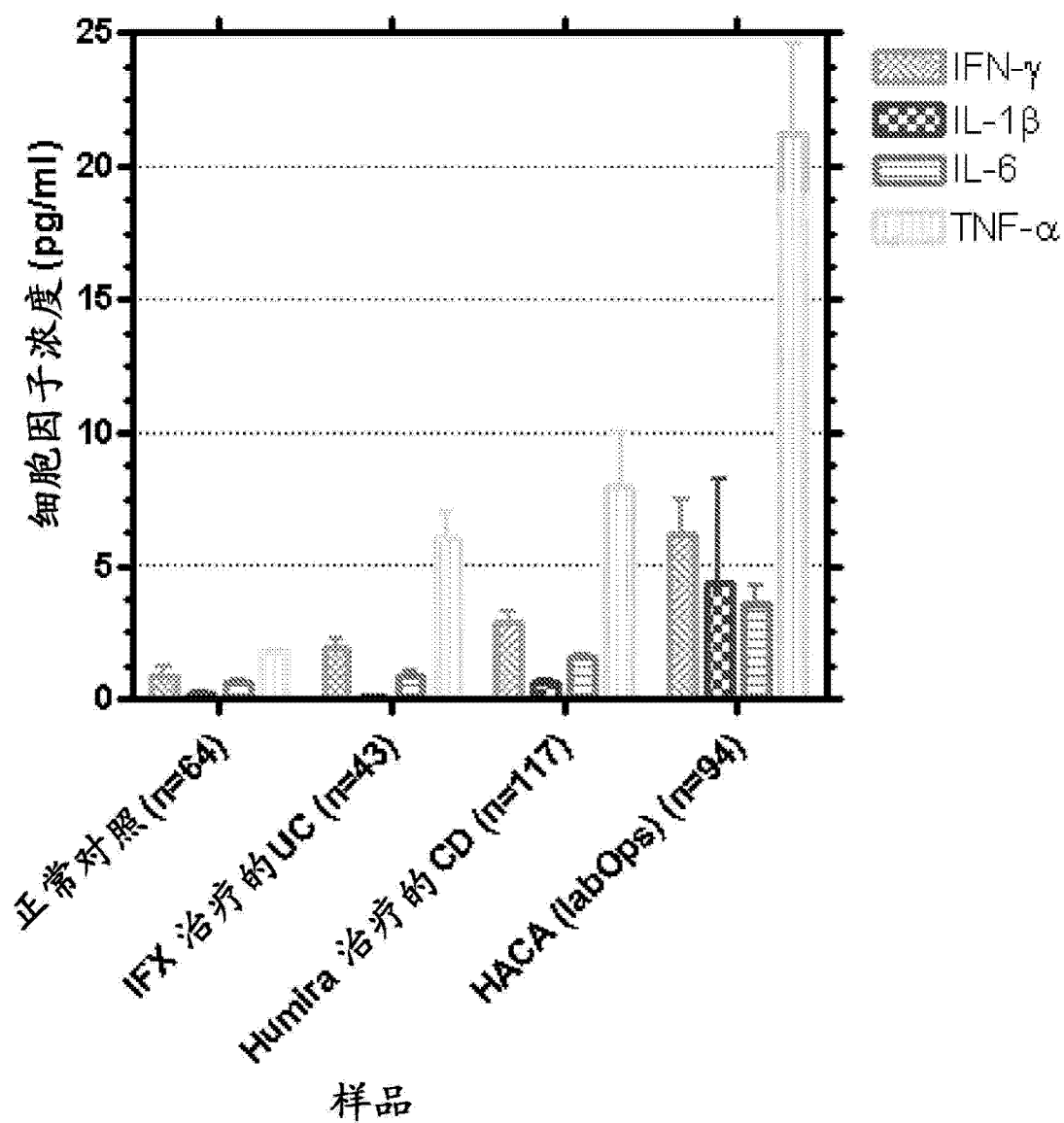


图 34

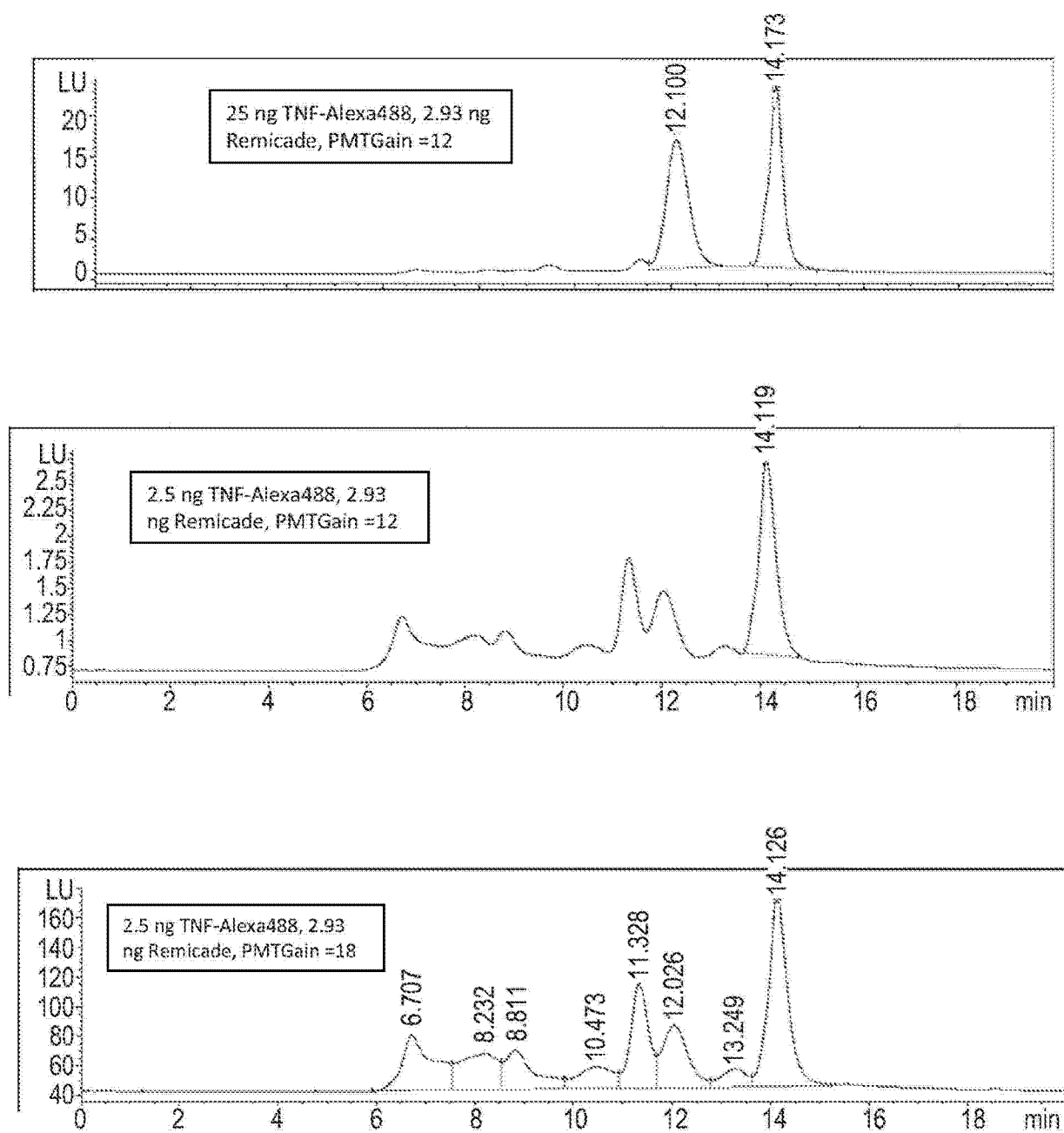


图 35

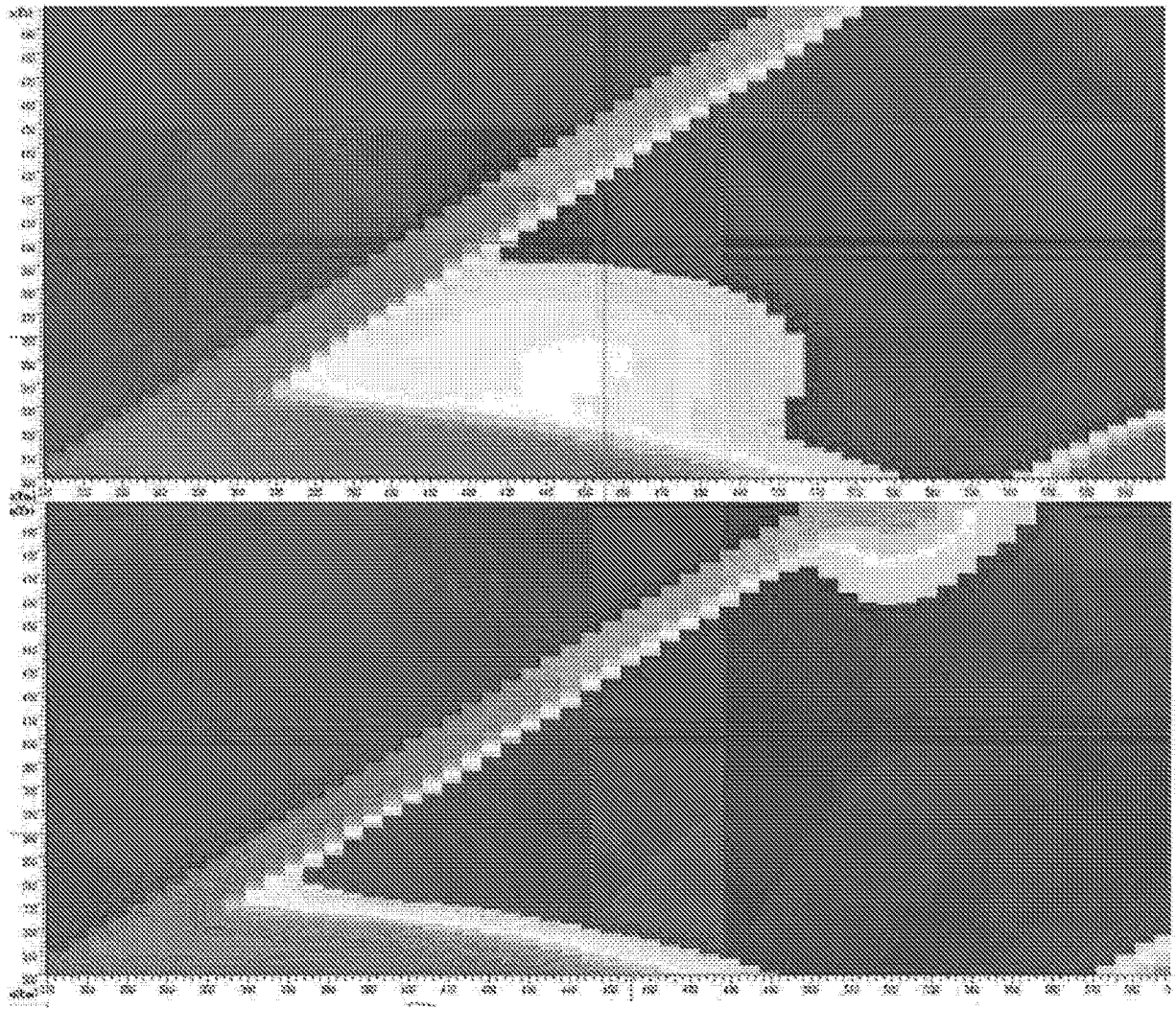


图 36

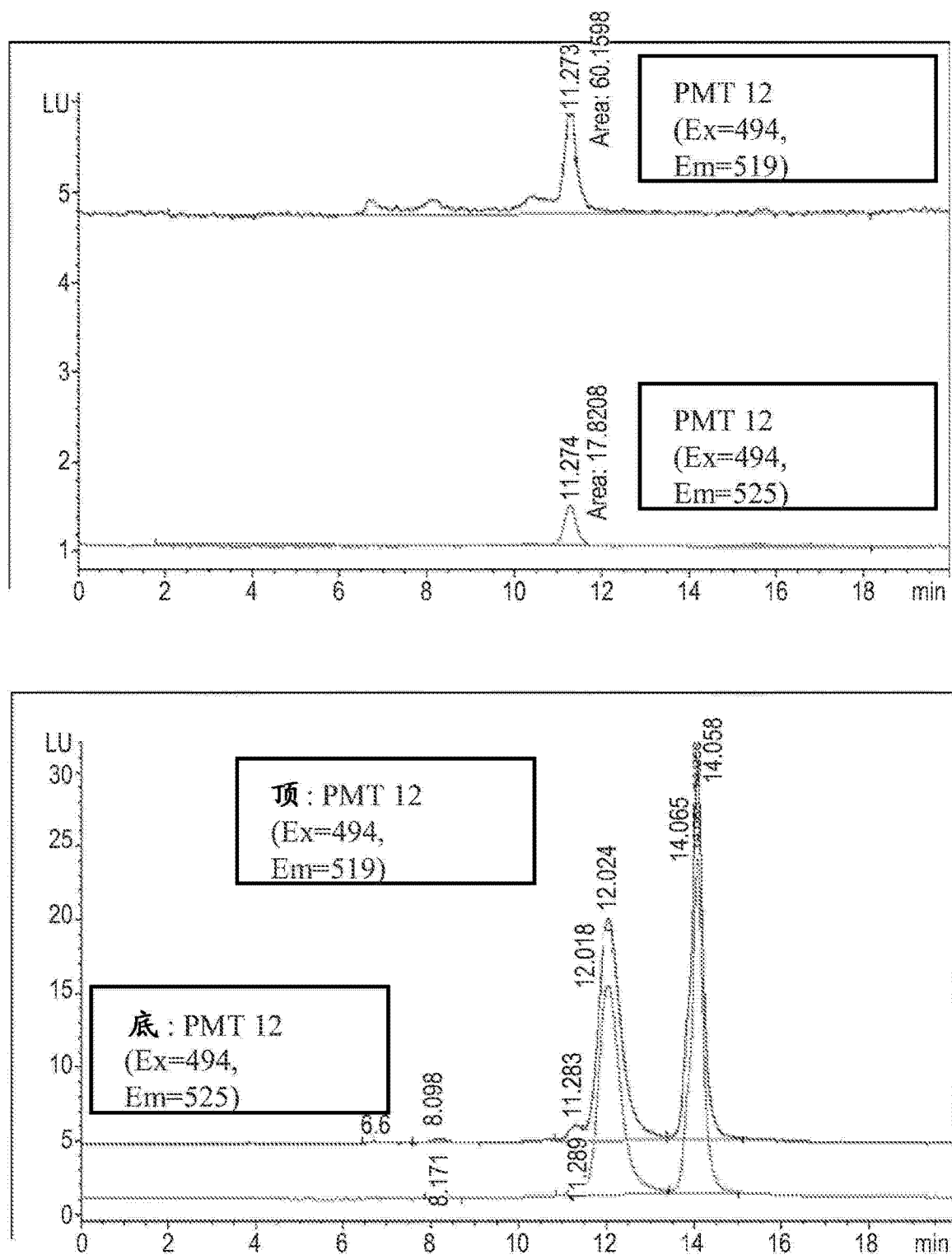


图 37

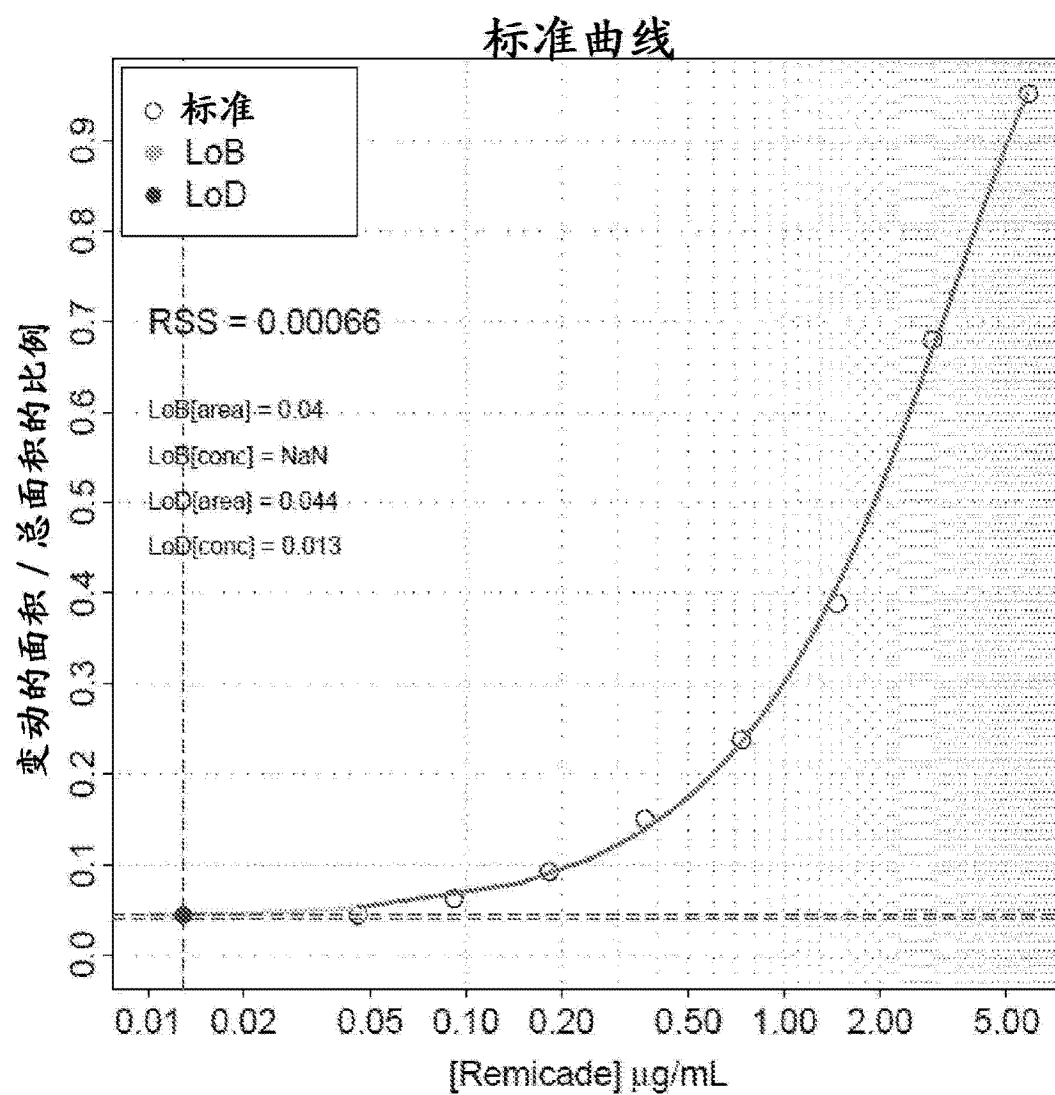


图 38

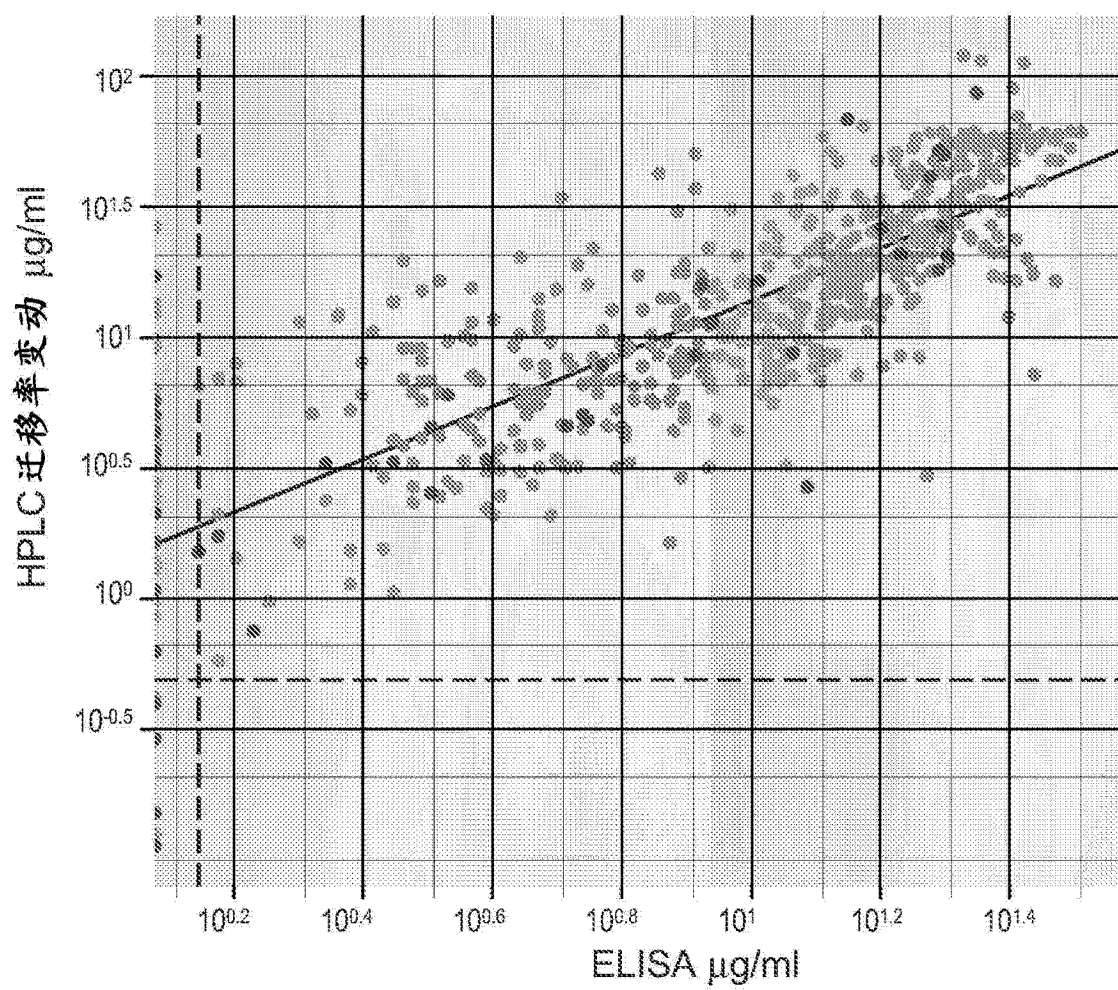


图 39

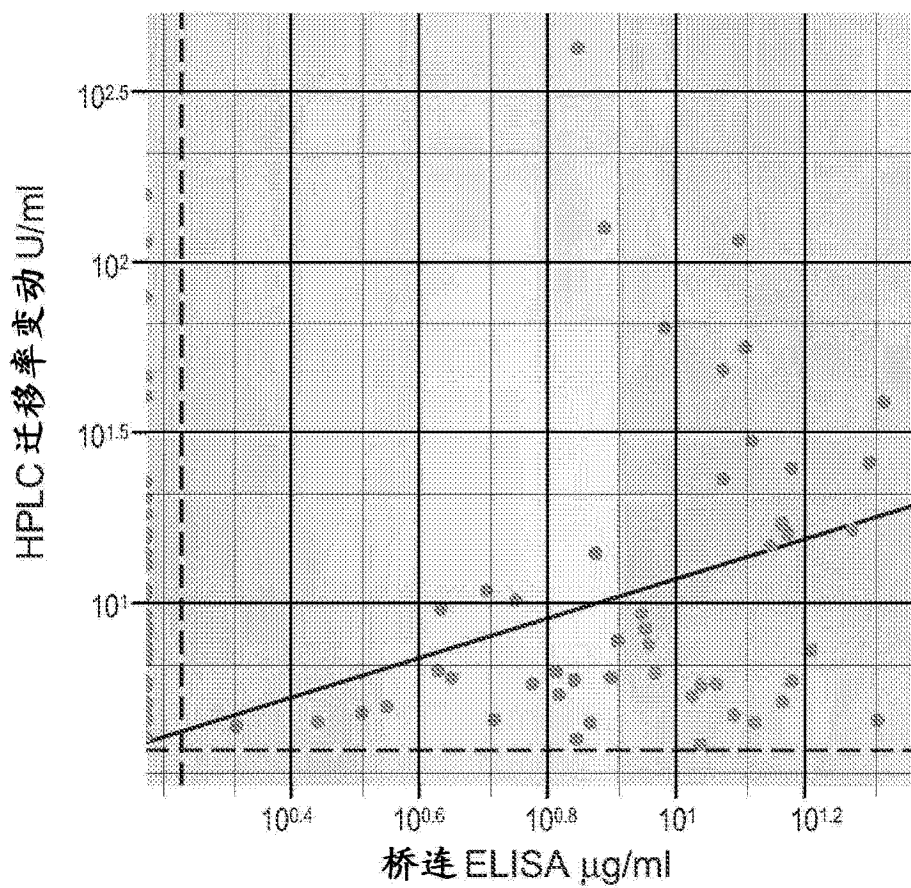


图 40

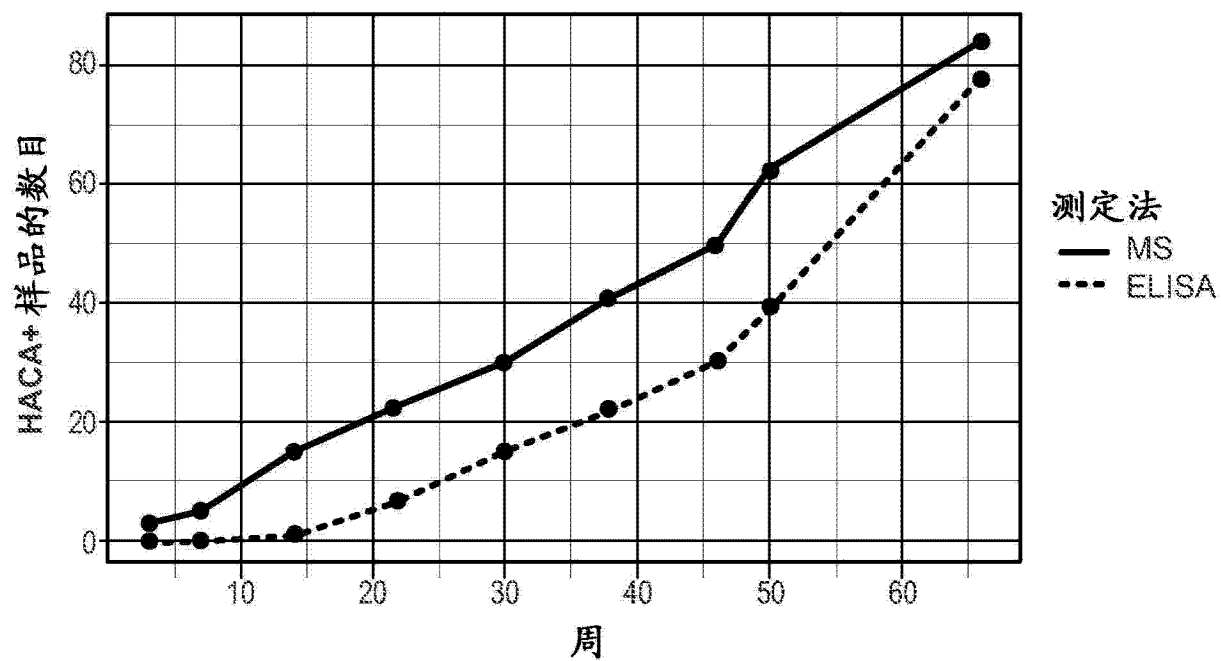


图 41