



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101351710 B

(45) 授权公告日 2013.06.05

(21) 申请号 200680019422.7

代理人 刘晓东 顾晋伟

(22) 申请日 2006.04.04

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

G01N 33/68 (2006.01)

60/668,404 2005.04.04 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2007.11.30

US 5840299 A, 1998.11.24, 全文.

(86) PCT申请的申请数据

WO 03/016909 A1, 2003.02.27, 全文.

PCT/US2006/012493 2006.04.04

Sands B.E. et al.. Safety and

(87) PCT申请的公布数据

tolerability of natalizumab in patients concurrently receiving infliximab in a phase 2 study of active Crohn's disease. 《Gastroenterology》. 2004, 第 126 卷 (第 4

W02006/107962 EN 2006.10.12

期), A463.

(73) 专利权人 生物基因 IDEC MA 公司

Calabresi P.A. et al.. Safety and

地址 美国马萨诸塞州

tolerability of natalizumab: results from the sentinel trial. 《Neurology》. 2005, 第 64 卷 (第 6 期), A277.

专利权人 艾兰制药公司

Giovannoni et al.. The immunogenicity of natalizumab in patients with multiple sclerosis. 《Clinical Immunology》. 2006, 第 119 卷 S116.

(72) 发明人 米纳·苏布拉马亚姆

拉克希米·阿马拉瓦迪

埃里克·瓦克休尔 弗兰西斯·林恩

迈克尔·潘扎拉

罗宾·麦克戴德·巴尔布尔

朱利耶·伊丽莎白·泰勒

审查员 李子东

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

公司 11227

权利要求书5页 说明书28页 附图5页

(54) 发明名称

评价对治疗性蛋白质的免疫应答的方法和产
品

(57) 摘要

本发明涉及在用治疗性蛋白质治疗的对象中鉴定临床显著的免疫应答的方法和产物。本发明的第一方面涉及在用治疗量的 VLA-4 结合抗体 (例如那他珠单抗) 治疗的患者中鉴定临床显著的免疫应答的方法和组合物。本发明的第二方面涉及收集用于确定抗所述治疗性蛋白质的抗体效价的样品的以时间发生顺序排列的细节, 例如在两个不同的时间点上收集至少两个样品。本发明的第三方面涉及选择关键的阈值水平, 其对应于未治疗患者的增加所述对照抗体效价标准偏差两倍的抗体效价。

1. VLA-4 结合抗体在制备用于检测对象中针对 VLA-4 结合抗体的临床显著的免疫应答的试剂盒中的用途,其中所述试剂盒用于确定来自施用 VLA-4 结合抗体的对象的生物样品是否包含临床显著的阈值水平的可溶性抗体,该可溶性抗体结合 VLA-4 结合抗体,其中至少阈值水平的所述可溶性抗体的存在指示对所述 VLA-4 结合抗体的临床显著的免疫应答,其中所述阈值水平是未治疗患者群体中测量的结合所述 VLA-4 结合抗体的抗体平均水平以上至少两倍标准偏差,其中所述 VLA-4 结合抗体是人源化形式的鼠抗体 mAb 21.6。

2. 根据权利要求 1 的用途,其中由在从不同时间点上采自所述对象的至少两个生物样品中存在至少阈值水平的针对 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体来指示针对所述 VLA-4 结合抗体的临床显著的免疫应答。

3. 根据权利要求 2 的用途,其中所述时间点分开至少一个月。

4. 根据权利要求 2 的用途,其中至少阈值水平的结合 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体存在于在两个连续时间点上采自对象的两个生物样品中。

5. 根据权利要求 1 的用途,其中通过以下步骤确定结合 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体的水平:

在所述生物样品的第一等分试样中确定针对所述 VLA-4 结合抗体的可溶性结合活性的水平;和

确定所述可溶性结合活性是否对所述 VLA-4 结合抗体有特异性。

6. 根据权利要求 5 的用途,其中在所述生物样品的第二等分试样中确定所述可溶性结合活性的特异性。

7. 根据权利要求 1 的用途,其中通过以下来确定在所述生物样品中结合所述 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体的水平:比较在存在两个或多个不同量的未标记 VLA-4 结合抗体条件下测量的针对标记 VLA-4 结合抗体的结合活性的水平。

8. 根据权利要求 1 的用途,其中通过以下来确定在所述生物样品中结合所述 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体的水平:比较在存在两个或多个不同量的可溶性 VLA-4 结合抗体条件下测量的针对固定化 VLA-4 结合抗体的结合活性的水平。

9. 根据权利要求 7 的用途,其中将在存在第一量未标记 VLA-4 条件下测量的针对标记 VLA-4 结合抗体的结合活性的第一水平与在存在第二量未标记 VLA-4 结合抗体条件下测量的针对标记 VLA-4 结合抗体的结合活性的第二水平进行比较。

10. 根据权利要求 9 的用途,其中在所述生物样品的第一和第二等分试样中确定所述结合活性的第一和第二水平。

11. 根据权利要求 1 的用途,其中应用桥连 ELISA 测定法确定针对 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体的量。

12. 根据权利要求 1 的用途,其中在对于所述生物样品第一等分试样的第一免疫测定中确定针对 VLA-4 结合抗体的结合活性的第一水平,并且在对于所述生物样品第二等分试样的第二免疫测定中确定针对 VLA-4 结合抗体的结合活性的第二水平,其中向所述第二免疫测定添加比所述第一免疫测定更多量的未标记可溶性 VLA-4 结合抗体,并且其中如果所述第一水平的结合活性大于参考水平并且所述第二水平的结合活性小于所述第一水平的结合活性的预定百分率的话,就表明在所述生物样品中存在至少阈值水平的针对 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体。

13. 根据权利要求 12 的用途,其中所述参考水平是对参考量的针对 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体所测量的结合活性的水平。

14. 根据权利要求 13 的用途,其中所述参考量是约 500ng/ml。

15. 根据权利要求 1 的用途,其中所述 VLA-4 结合抗体是那他珠单抗。

16. 根据权利要求 12 的用途,其中所述第一和第二免疫测定是桥连 ELISA 测定。

17. 根据权利要求 12 的用途,其中所述第一和第二测定包括固定化的未标记 VLA-4 结合抗体和可溶性的标记 VLA-4 结合抗体,其中所述可溶性的标记 VLA-4 结合抗体用酶、荧光标记或者放射性标记进行标记。

18. 根据权利要求 16 或 17 的用途,其中在单个反应基底上在平行反应体积中实施所述第一和第二免疫测定。

19. 根据权利要求 1 或 12 的用途,其中所述生物学样品是血清样品。

20. 根据权利要求 1 或 12 的用途,其中所述对象是人患者。

21. 根据权利要求 20 的用途,其中所述患者具有多发性硬化。

22. 根据权利要求 20 的用途,其中所述患者具有类风湿性关节炎。

23. 根据权利要求 20 的用途,其中所述患者具有克罗恩氏病。

24. 根据权利要求 2 的用途,其中从对象获取所述至少两个生物学样品的时间点被分开至少 15 天。

25. 根据权利要求 2 的用途,其中从对象获取所述至少两个生物学样品的时间点被分开至少 30 天。

26. 根据权利要求 2 的用途,其中从对象获取所述至少两个生物学样品的时间点被分开至少 45 天。

27. 根据权利要求 2 的用途,其中从对象获取所述至少两个生物学样品的时间点被分开至少 60 天。

28. 根据权利要求 2 的用途,其中所述试剂盒用于,如果在来自所述对象的所述至少两个生物学样品中确定了结合 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体的阈值水平,则选择针对所述对象的治疗方案。

29. 根据权利要求 28 的用途,其中选择治疗方案包括,评价所述对象的当前疗法,确定针对该对象的新疗法,修改该对象的当前疗法,或者停止该对象的当前疗法。

30. 根据权利要求 29 的用途,其中当前疗法包括向所述对象施用 VLA-4 结合抗体。

31. 根据权利要求 1 的用途,其中所述试剂盒用于:

用那他珠单抗包被测定孔;

在分开的测定孔中孵育对照样品、筛选样品和竞争样品;

向测定孔中的样品添加生物素化的那他珠单抗;和

应用辣根过氧化物酶测定来检测生物素化的那他珠单抗。

32. 根据权利要求 31 的用途,其中应用 0.25 μ g/ml 浓度的那他珠单抗包被所述测定孔。

33. 根据权利要求 31 的用途,其中所述竞争样品包含终浓度约 100 μ g/ml 的未标记可溶性那他珠单抗。

34. VLA-4 结合抗体在制备用于选择针对对象的治疗方案的试剂盒中的用途,其中所述

试剂盒用于

测定已施用 VLA-4 结合抗体的对象在第一和第二时间点上是否存在针对 VLA-4 结合抗体的阳性免疫应答,基于第一和第二时间点的测定结果选择针对所述对象的治疗方案,

其中由在一个时间点从对象获得的生物学样品中存在至少临床显著的阈值量的结合活性来指示在所述时间点上存在阳性免疫应答,其中所述阈值水平是未治疗患者群体中测量的结合所述 VLA-4 结合抗体的抗体平均水平以上至少两倍标准偏差,其中所述 VLA-4 结合抗体是人源化形式的鼠抗体 mAb 21.6。

35. 根据权利要求 34 的用途,其中所述第一和第二时间点分开临床显著的一段时间。

36. 根据权利要求 35 的用途,其中所述临床显著的一段时间是至少 30 天。

37. 根据权利要求 34 的用途,其中如果在所述第二时间点检测到阴性免疫应答,就继续 VLA-4 结合抗体治疗。

38. 根据权利要求 34 的用途,其中如果在第一和第二时间点都检测到阳性免疫应答,就选择不同于 VLA-4 结合抗体治疗的疗法。

39. 根据权利要求 34 的用途,其中所述对象具有多发性硬化。

40. 根据权利要求 34 的用途,其中所述对象具有克罗恩氏病。

41. 根据权利要求 34 的用途,其中所述对象具有类风湿性关节炎。

42. 根据权利要求 34 的用途,其中所述 VLA-4 结合抗体是那他珠单抗。

43. VLA-4 结合抗体在制备用于选择针对对象的治疗方案的试剂盒中的用途,其中所述试剂盒用于

从对象获得的至少两个生物学样品中检测是否存在针对 VLA-4 结合抗体的临床显著的免疫应答,其中所述对象已施用了 VLA-4 结合抗体并且是在分开至少临床显著的时间间隔的不同时间点上从所述对象获得所述至少两个生物学样品,以及基于对所述至少两个生物学样品的时间处所述对象中针对 VLA-4 抗体的临床显著的免疫应答的检测来选择治疗方案,其中检测是否存在针对 VLA-4 结合抗体的临床显著的免疫应答包括确定来自已施用 VLA-4 结合抗体的对象的生物学样品是否包含阈值水平的结合 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体,其中至少阈值水平的所述可溶性抗体的存在指示针对所述 VLA-4 结合抗体的临床显著的免疫应答,其中所述阈值水平是未治疗患者群体中测量的结合所述 VLA-4 结合抗体的抗体平均水平以上至少两倍标准偏差,其中所述 VLA-4 结合抗体是人源化形式的鼠抗体 mAb 21.6。

44. 根据权利要求 43 的用途,其中将从所述对象获取样品的时间分开的临床显著的间隔为至少 15 天。

45. 根据权利要求 43 的用途,其中将从所述对象获取样品的时间分开的临床显著的间隔为至少 30 天。

46. 根据权利要求 43 的用途,其中将从所述对象获取样品的时间分开的临床显著的间隔为至少 45 天。

47. 根据权利要求 43 的用途,其中将从所述对象获取样品的时间分开的临床显著的间隔为至少 60 天。

48. 根据权利要求 43 的用途,其中选择治疗方案包括,评价所述对象的当前疗法,确定针对该对象的新疗法,修改该对象的当前疗法,或者停止该对象的当前疗法。

49. 根据权利要求 48 的用途,其中当前疗法包括向所述对象施用 VLA-4 抗体。

50. 根据权利要求 43 的用途,其中至少阈值水平的结合 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体存在于在两个连续时间点上采自所述对象的两个生物学样品中。

51. 根据权利要求 50 的用途,其中通过以下步骤确定结合 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体的水平:

在所述生物学样品的第一等分试样中确定针对 VLA-4 结合抗体的可溶性结合活性的水平;并且

确定所述可溶性结合活性是否对 VLA-4 结合抗体有特异性。

52. 根据权利要求 51 的用途,其中在所述生物学样品的第二等分试样中确定所述可溶性结合活性的特异性。

53. 根据权利要求 43 的用途,其中通过以下来确定在所述生物学样品中结合 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体的水平:比较在存在两个或多个不同量的未标记 VLA-4 结合抗体条件下测量的针对标记 VLA-4 结合抗体的结合活性的水平。

54. 根据权利要求 43 的用途,其中通过以下来确定在所述生物学样品中结合 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体的水平:比较在存在两个或多个不同量的可溶性 VLA-4 结合抗体条件下测量的针对固定化 VLA-4 结合抗体的结合活性的水平。

55. 根据权利要求 54 的用途,其中将在存在第一量未标记 VLA-4 条件下测量的针对标记 VLA-4 结合抗体的结合活性的第一水平与在存在第二量未标记 VLA-4 结合抗体条件下测量的针对标记 VLA-4 结合抗体的结合活性的第二水平进行比较。

56. 根据权利要求 55 的用途,其中在所述生物学样品的第一和第二等分试样中确定结合活性的第一和第二水平。

57. 根据权利要求 43 的用途,其中应用桥连 ELISA 测定法确定针对 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体的量。

58. 根据权利要求 43 的用途,其中在对于所述生物学样品第一等分试样的第一免疫测定中确定针对 VLA-4 结合抗体的结合活性的第一水平,并且在对于所述生物学样品第二等分试样的第二免疫测定中确定针对 VLA-4 结合抗体的结合活性的第二水平,其中向所述第二免疫测定掺加比所述第一免疫测定更多量的未标记可溶性 VLA-4 结合抗体,并且其中如果所述第一水平的结合活性大于参考水平并且所述第二水平的结合活性小于所述第一水平的结合活性的预定百分率的话,就表明在所述生物学样品中存在至少阈值水平的针对 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体。

59. 根据权利要求 58 的用途,其中所述参考水平是对参考量的针对 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体测量的结合活性的水平。

60. 根据权利要求 59 的用途,其中所述参考量是约 500ng。

61. 根据权利要求 43 的用途,其中所述 VLA-4 结合抗体是那他珠单抗。

62. 根据权利要求 58 的用途,其中所述第一和第二免疫测定是桥连 ELISA 测定。

63. 根据权利要求 58 的用途,其中所述第一和第二测定包括固定化的未标记 VLA-4 结合抗体和可溶性的标记 VLA-4 结合抗体,其中所述可溶性的标记 VLA-4 结合抗体用酶、荧光标记或者放射性标记进行标记。

64. 根据权利要求 62 或 63 的用途,其中在单个反应基底上在平行反应体积中实施所述

第一和第二免疫测定。

- 65. 根据权利要求 43 的用途,其中所述生物学样品是血清样品。
- 66. 根据权利要求 43 的用途,其中所述对象是人患者。
- 67. 根据权利要求 66 的用途,其中所述患者具有多发性硬化。
- 68. 根据权利要求 66 的用途,其中所述患者具有类风湿性关节炎。
- 69. 根据权利要求 66 的用途,其中所述患者具有克罗恩氏病。

评价对治疗性蛋白质的免疫应答的方法和产品

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据 35 U. S. C. § 119(e) 要求于 2005 年 4 月 4 日提交的美国临时申请序号 60/668, 404 的优先权, 其全部内容通过参考并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及评价患者对治疗剂、尤其是治疗性蛋白质、例如 VLA-4 结合抗体 (例如那他珠单抗 (natalizumab)) 的免疫应答。

背景技术

[0004] 生物治疗剂目前可用于治疗疾病和病症比如移植排斥、白血病、乳癌、关节炎、多发性硬化和克罗恩氏病; 并且其它许多基于蛋白质的治疗正在开发中。可用的生物治疗剂包括 AMEVIVE[®] (alefacept), ZEVALIN[®] (ibritumomab tiuxetan), ORTHOCLONE[®] (muromonab-CD3), ENBREL[®] (etanercept), REOPRO[®] (abciximab, 阿昔单抗), RITUXAN[®] (rituximab, 利妥希玛), SIMULECT[®] (basiliximab), REMICADE[®] (infliximab, 英夫单抗), SYNAGIS[®] (帕利珠单抗 (palivizumab)), HERCEPTIN[®] (trastuzumab, 司徒曼布), ZENAPAX[®] (达克珠单抗 (daclizumab)), CAMPATH[®] (alemtuzumab), MYLOTARG[®] (吉妥单抗 (gemtuzumab ozogamicin)), HUMIRA[®] (阿达木单抗 (adalimumab)), AVONEX[®] (干扰素 β -1a) 和 TYSABRI[®] (natalizumab, 那他珠单抗)。那他珠单抗是一种抗 $\alpha 4 \beta 1$ 整联蛋白 (VLA-4) 的人源化单克隆抗体。那他珠单抗结合 $\alpha 4 \beta 1$ 和 $\alpha 4 \beta 7$ 整联蛋白的 $\alpha 4$ 亚基。那他珠单抗可用于治疗某些炎性疾病和病况, 包括多发性硬化、克罗恩氏病和类风湿性关节炎。

[0005] 因为针对生物性治疗剂的免疫应答可能有临床后果, 所以在生物治疗剂领域, 免疫原性测定的开发和确认具有极大的重要性。

发明内容

[0006] 本发明提供用于鉴定、监测和 / 或评价针对治疗剂例如治疗性蛋白质例如治疗性抗体的免疫应答的方法和组合物。患者产生针对治疗剂 (比如治疗性蛋白质或者治疗性抗体) 的任何抗体的事实可能与针对所述治疗剂的临床反应相关或不相关。本发明的一些方面是部分基于发现未预料水平的抗体应答, 其可以用作检测针对治疗剂的临床显著反应的阈值。在一些实施方案中, 所述阈值水平高于应用有关未接受该治疗剂患者的统计学分析来预测的阈值水平。临床显著的阈值通常高于在患者中可检测的最低免疫应答水平。例如, 临床显著的阈值水平通常是在阴性对照水平之上例如在未治疗患者群体的平均治疗前水平之上至少 2 倍标准偏差。在一些实施方案中, 相比阈值水平基于在还未接受治疗剂的患者中观测到的免疫应答的 5% 截断值 (例如, 平均值之上 1.645 倍标准偏差) 时所鉴定的情况, 本发明方法中所用的较高阈值水平导致较少的假阳性。根据本发明的某些方面, 在患

者样品中存在可检测的免疫应答不具临床意义,除非所述免疫应答至少达到预定的阈值水平。本发明还提供鉴定针对治疗剂(例如,治疗性蛋白质,例如治疗性抗体)的抗体应答之临床显著的阈值水平的方法,以及鉴定对治疗剂具有临床显著的抗体应答的患者的方法。本发明的一部分还提供用来鉴定对象中有临床意义之抗体的阈值水平。根据本发明的一些方面,针对治疗剂(例如,那他珠单抗)的免疫应答可能不具临床显著性(例如,可能未显示出与临床功效降低的显著相关性),除非该免疫应答的强度达到可以预先确定的(例如,基于从不同患者组获得的免疫应答)阈值水平。令人惊奇的是,本文所述的方法不依赖于对从每个患者在治疗前后所获得的样品进行比较,它们也不依赖于仅鉴定针对治疗剂的可检测免疫应答的存在。相比而言,本发明的方法涉及检测至少阈值水平的针对治疗剂的免疫应答,在此所述阈值水平可高于免疫应答的最低可检测水平,并且其中所述测定的阳性结果具有临床意义,这部分地是因为该测定避免了没有相关临床意义的假阳性。

[0007] 目前,没有检测针对治疗性蛋白质的临床显著的抗体应答的通用技术或者标准。不同的治疗性蛋白质可以诱导不同类型的抗体,这些抗体的存在可能影响或者不影响治疗性蛋白质的安全性、药代动力学和/或功效。监测患者针对治疗性抗体的反应的通行方法通常涉及比较每个患者在治疗前后的血清抗体水平,鉴定任何可检测免疫应答的存在,以及评价该患者以确定所述的可检测免疫应答是否与任何的安全性、药代动力学和/或功效问题相关。相比而言,通过提供用于检测临床显著的阈值水平应答的筛选测定方法,本发明的方法可用来鉴定具有临床显著的免疫应答的那些患者。

[0008] 根据本发明,针对治疗剂的临床显著的免疫应答是这样的抗体应答,其可以影响患者的一种或多种临床参数,和/或所述治疗剂的药代动力学和/或功效。通常,临床显著的抗体应答指示所述治疗剂功效的减弱或者缺乏功效,或者对所述治疗剂有不良反应。例如,对于多发性硬化,针对治疗性蛋白质的临床显著的抗体应答包括以下一个或多个方面:(a) 所述治疗剂在减少患者的数目、严重程度或者复发率方面的功效缺乏或者功效降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%或更多;(b) 使所述治疗剂在残疾状态扩展评分表(Expanded Disability Status Scale, EDSS)得分或者多发性硬化综合功能评分表(Multiple Sclerosis Functional Composite, MSFC)得分中残疾进程减慢方面的功效缺乏或者降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%或更多;(c) 在降低新的或者新近扩大的T2高信号病变(T2 hyperintense lesion)的数量或体积或者削弱在脑MRI上T2高信号病变体积增加方面的功效缺乏或者降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%或更多;(d) 在降低脑MRI上钆增强病变的数量或者体积方面的功效缺乏或者降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%或更多;(e) 在改善视觉功能方面的功效缺乏或者降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%或更多;(f) 存在严重不良反应(例如,超敏反应,例如,过敏反应)。除(f)以外,在施用所述治疗剂后规定时间内,例如3个月、6个月、9个月或者至少一年内,评价这些应答。

[0009] 在一方面,本发明提供鉴定临床显著的阈值水平的针对治疗剂(例如治疗性蛋白质,例如治疗性抗体)的抗体应答的方法。所述方法包括(a) 评价患有病症的对照患者群体的抗治疗剂抗体的水平(例如,确定至少2、3、5、10、20、30、50、100名或更多患有病症的以及没有接受目的治疗剂治疗已至少3个月、6个月或者更长时间的患者的抗治疗剂抗体的平均值或者中值水平);和(b) 选择在所述对照群体的抗治疗剂抗体水平之上至少

2(例如,2.5,3,4,5或者6)倍标准偏差的阈值水平。在已施用所述治疗剂的患者(已治疗患者)中存在的抗治疗剂抗体的至少阈值水平与所述已治疗患者中临床显著的应答相关。优选地,使用与在对照群体中用来鉴定抗治疗剂抗体水平的相同的检测剂(例如,标记的抗治疗剂抗体)来评价已治疗患者。在一个实施方案中,所述治疗剂是治疗性抗体,例如人源化 21.6 抗 VLA-4 抗体,例如那他珠单抗。在一个实施方案中,所述病症是多发性硬化。在一些实施方案中,所述病症是中枢神经系统的炎症(例如,除了多发性硬化之外或者替代多发性硬化,脑膜炎、视神经脊髓炎(neuromyelitis optica)、神经性结节病(neurosarcoidosis)、CNS 脉管炎、脑炎或者横贯性脊髓炎)、组织或器官移植排斥或者移植植物抗宿主病、急性 CNS 损伤(例如,中风或者脊髓损伤);慢性肾病;变态反应(例如,变应性哮喘);1 型糖尿病;炎性肠病(例如,克罗恩氏病或者溃疡性结肠炎);重症肌无力;纤维肌痛;关节炎病症(例如,类风湿性关节炎或者银屑病关节炎);炎性/免疫性皮肤病(例如,银屑病、白癜风、皮炎或者扁平苔藓(lichenplanus));系统性红斑狼疮;Sjogren 综合征;血液性癌症(例如,多发性骨髓瘤、白血病或者淋巴瘤);实体瘤比如肉瘤或者癌瘤(例如,肺癌、乳癌、前列腺癌或者脑癌);纤维化病症(例如,肺纤维化、骨髓纤维化、肝硬化、系膜增生性肾小球肾炎、新月体肾小球肾炎、糖尿病肾病或者肾性间质性纤维化)。在一些实施方案中,所述病症是涉及 $\alpha 4\beta 1$ 和 / 或 $\alpha 4\beta 7$ 亚基调节的疾病。

[0010] 在另一方面,本发明提供鉴定针对治疗性蛋白质(例如,治疗性抗体)具有临床显著的抗体应答的患者的方法。所述方法包括从具有病症并且已施用所述治疗性蛋白质的对象获得的生物学样品中鉴定与所述治疗性蛋白质特异性结合的一种或多种抗体的阈值水平的存在,其中所述阈值水平是在对照群体(例如,具有所述病症但是在最近3个月、6个月或更长时间内没有施用所述治疗性蛋白质的患者群体)中特异性结合所述治疗性蛋白质的抗体水平之上至少 2(例如,2.5、3、4、5 或 6) 倍标准偏差。在一个实施方案中,所述治疗性蛋白质是治疗性抗体,例如,人源化 21.6(也被称作 AN100226) 抗 -VLA-4 抗体,例如,那他珠单抗。在一个实施方案中,所述病症是多发性硬化。在一些实施方案中,所述病症是类风湿性关节炎。在某些实施方案中,所述病症是克罗恩氏病。在一个实施方案中,所述方法还包括调整由此被鉴定为对治疗性蛋白质具临床显著抗体应答的患者的治疗方案。

[0011] 在一个方面中,本发明提供用于从对象获得的生物学样品中鉴定是否存在具有临床显著水平的一种或多种抗体的方法和组合物,所述抗体特异性结合被施用给所述对象的治疗性 VLA-4 结合抗体。本发明的一些方面包括应用 ELISA 测定来检测诱导抗体的水平,所述诱导抗体指示在对象中针对施用治疗性 VLA-4 结合抗体的临床显著免疫应答。在一个实施方案中,本发明提供用于鉴定临床显著水平的抗那他珠单抗抗体的方法和试剂盒,所述抗那他珠单抗抗体指示在已接受至少一剂量那他珠单抗的对象中针对那他珠单抗的免疫应答。

[0012] 在一个方面中,本发明提供基于对象针对 VLA-4 结合抗体的免疫应答来评价和 / 或调整治疗方案的方法。

[0013] 根据本发明的一个方面,提供了检测对象中针对 VLA-4 结合抗体的临床显著的免疫应答的方法。所述方法包括确定来自已施用 VLA-4 结合抗体之对象的生物样品是否包含临床显著的阈值水平的结合 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体,其中至少阈值水平的所述可溶性抗体的存在指示针对 VLA-4 结合抗体的临床显著的免疫应答。在一些实施方案中,由在

不同时间点上采自对象的至少两个生物学样品中存在至少阈值水平的针对 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体来指示针对所述 VLA-4 结合抗体的临床显著的免疫应答。在某些实施方案中,所述时间点分开至少一个月。在一些实施方案中,在两个连续时间点上采自对象的两个生物学样品中存在至少阈值水平的结合 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体。在一些实施方案中,通过以下来测定结合 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体的水平:确定在所述生物学样品的第一等分试样中针对 VLA-4 结合抗体的可溶性结合活性的水平;和确定所述可溶性结合活性是否对所述 VLA-4 结合抗体具有特异性。在某些实施方案中,在所述生物学样品的第二等分试样中确定所述可溶性结合活性的特异性。在一些实施方案中,通过以下来确定生物学样品中结合 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体的水平:比较在存在两种或多种不同量的未标记 VLA-4 结合抗体的情况下测量的对标记 VLA-4 结合抗体的结合活性的水平(例如,可以将不存在未标记 VLA-4 结合抗体的情况下测量的水平和在存在竞争量的未标记 VLA-4 结合抗体的情况下测量的水平进行比较)。在某些实施方案中,通过比较在存在两种或多种不同量的可溶性 VLA-4 结合抗体的情况下测量的针对固定化 VLA-4 结合抗体的结合活性的水平(例如,可以将不存在可溶性 VLA-4 结合抗体情况下测量的水平和在存在竞争量的可溶性 VLA-4 结合抗体情况下测量的水平进行比较)来确定在生物学样品中结合 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体的水平。在一些实施方案中,在存在第一量未标记 VLA-4 的情况下测量的针对标记 VLA-4 结合抗体的结合活性的第一水平与在存在第二量未标记 VLA-4 结合抗体的情况下测量的针对标记 VLA-4 结合抗体的结合活性的第二水平进行比较。在一些实施方案中,在所述生物学样品的第一和第二等分试样中确定结合活性的第一和第二水平。在某些实施方案中,应用桥连 ELISA 测定法确定针对 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体的量。在一些实施方案中,在对所述生物学样品的第一等分试样的第一免疫测定中确定针对 VLA-4 结合抗体的结合活性的第一水平,以及在对所述生物学样品的第二等分试样的第二免疫测定中确定针对 VLA-4 结合抗体的结合活性的第二水平,其中第二免疫测定掺入比第一免疫测定更大量的未标记可溶性 VLA-4 结合抗体,并且其中如果结合活性的所述第一水平大于参考水平以及结合活性的所述第二水平小于结合活性的所述第一水平的预定百分比的话,就表明在所述生物学样品中存在至少阈值水平的针对 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体。在某些实施方案中,所述参考水平是关于参考量的针对 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体而测量的结合活性水平。在一些实施方案中,所述参考量是约 500ng/ml(例如,在血清样品中)的针对 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体。例如,所述参考量可以在约 400ng/ml 至约 600ng/ml 之间(例如,约 400ng/ml,约 425ng/ml,约 450ng/ml,约 475ng/ml,约 500ng/ml,约 525ng/ml,约 550ng/ml,约 575ng/ml 或者约 600ng/ml)。应当理解,与所述参考量对应的结合活性的所述参考水平可以在稀释样品(例如,样品对应于 10 倍稀释,并含有约 40ng/ml 至约 60ng/ml 例如约 50ng/ml 的针对 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体)中进行测量。可通过与所述参考量的适当稀释度相对应的任何预定量的针对 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体来提供测定中结合活性的参考水平。在某些实施方案中,VLA-4 结合抗体是针对 VLA-4 的人源化的鼠单克隆抗体。在一些实施方案中,所述 VLA-4 结合抗体是人源化形式的鼠抗体 mAb 21.6(例如,AN100226)。在一些实施方案中,所述 VLA-4 结合抗体是那他珠单抗。在一些实施方案中,针对 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体是参考抗体,其以高亲和性与那他珠单抗结合。在一些实施方案中,所述参考抗体阻断那他珠单抗和 VLA-4 之间的相互作用。在某些实施方案中,

所述的第一和第二免疫测定是桥连 (bridging) ELISA 测定。在一些实施方案中,所述第一和第二测定中包括固定化的未标记 VLA-4 结合抗体和可溶性的标记 VLA-4 结合抗体,其中所述可溶性的标记 VLA-4 结合抗体用酶、荧光标记物、生物素标记物(例如,VLA-4 结合抗体可以被生物素化)或者放射性标记物进行标记。在一些实施方案中,在单一反应基底上在平行反应体积中实施第一和第二免疫测定。在一些实施方案中,所述生物学样品是血清样品。在某些实施方案中,所述对象是人患者。在一些实施方案中,所述患者具有多发性硬化。在一些实施方案中,所述患者具有类风湿性关节炎。在某些实施方案中,所述患者具有克罗恩氏病。在一些实施方案中,从所述对象获得至少两个或多个生物学样品的时间点分开至少 15 天、30 天、45 天、60 天、90 天或更长时间。在某些实施方案中,所述方法还包括,如果在从所述对象获得的至少两个生物学样品中检测到结合 VLA-4 结合抗体的临床显著阈值水平的可溶性抗体,选择针对所述对象的治疗方案。在一些实施方案中,选择治疗方案包括评价所述对象当前的疗法,确定针对所述对象的新疗法,调整所述对象的当前疗法,或者停止所述对象的当前疗法。在一些实施方案中,当前疗法包括给对象施用 VLA-4 结合抗体。

[0014] 根据本发明的另一方面,提供选择针对对象的治疗方案的方法。所述方法包括,测定已施用 VLA-4 结合抗体的对象在第一和第二时间点上是否存在针对 VLA-4 结合抗体的阳性免疫应答,基于在第一和第二时间点的测定结果选择针对所述对象的治疗方案,其中在一时间点从对象获得的生物学样品中存在至少临床显著的阈值量的结合活性指示在所述时间点上存在阳性免疫应答。在一些实施方案中,所述第一和第二时间点分隔开临床显著的时间段。在某些实施方案中,临床显著的时间段为至少 30 天。在一些实施方案中,如果在第二时间点检测到阴性免疫应答,就继续 VLA-4 结合抗体治疗。在一些实施方案中,如果在第一和第二两个时间点上都检测到阳性免疫应答,就选择不同于 VLA-4 结合抗体治疗的疗法。在一些实施方案中,所述对象具有多发性硬化。在某些实施方案中,所述对象具有克罗恩氏病。在一些实施方案中,所述对象具有类风湿性关节炎。

[0015] 仍根据本发明的另一方面,提供选择针对对象的治疗方案的方法。所述方法包括检测从对象获得的至少两个生物学样品中是否存在针对 VLA-4 结合抗体的临床显著的免疫应答,其中所述对象已施用了 VLA-4 结合抗体并且是在由至少临床显著的时间间隔分开的时间点上从所述对象获得至少两个生物学样品,以及基于在从所述对象获得所述至少两个生物学样品的时间在所述对象中针对 VLA-4 抗体的临床显著的免疫应答的检测来选择治疗方案。在一些实施方案中,将从所述对象获取样品的时间分开的临床显著的间隔为至少 15 天、30 天、45 天、60 天、90 天或更长时间。在某些实施方案中,选择治疗方案包括评价所述对象的当前疗法,确定对于所述对象的新疗法,调整所述对象的当前疗法或者停止所述对象的当前疗法。在一些实施方案中,当前疗法包括给所述对象施用 VLA-4 抗体。在一些实施方案中,检测是否存在针对 VLA-4 结合抗体的临床显著的免疫应答包括,确定从已施用 VLA-4 结合抗体的对象获得的生物学样品是否包含阈值水平的结合 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体,其中存在至少阈值水平的可溶性抗体指示针对 VLA-4 结合抗体的临床显著的免疫应答。在某些实施方案中,至少阈值水平的结合 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体存在于在两个连续时间点从所述对象获取的两个生物学样品中。在一些实施方案中,通过以下来确定结合 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体的水平:确定在所述生物学样品的第一等分试样中针

对 VLA-4 结合抗体的可溶性结合活性的水平,以及确定所述可溶性结合活性是否对 VLA-4 结合抗体有特异性。在一些实施方案中,在相同生物样品中的第二等分试样中确定所述可溶性结合活性的特异性。在某些实施方案中,通过比较在存在两种或多种不同量的未标记 VLA-4 结合抗体的情况下测量的针对标记 VLA-4 结合抗体的结合活性的水平(例如,可以将不存在未标记 VLA-4 结合抗体情况下测量的水平和在存在竞争量的未标记 VLA-4 结合抗体情况下测量的水平进行比较)来确定在生物样品中结合 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体的水平。在一些实施方案中,通过比较在存在两种或多种不同量的可溶性 VLA-4 结合抗体的情况下测量的针对固定化 VLA-4 结合抗体的结合活性的水平(例如,可以将不存在可溶性 VLA-4 结合抗体情况下测量的水平和在存在竞争量的可溶性 VLA-4 结合抗体情况下测量的水平进行比较)来确定在所述生物样品中结合 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体的水平。在一些实施方案中,将在存在第一量的未标记 VLA-4 的情况下测量的针对标记 VLA-4 结合抗体的结合活性的第一水平与在存在第二量的未标记 VLA-4 结合抗体的情况下测量的针对标记 VLA-4 结合抗体的结合活性的第二水平进行比较。在某些实施方案中,在同一生物样品中的第一和第二等分试样中确定结合活性的所述第一和第二水平。在一些实施方案中,应用桥连 ELISA 测定法确定针对 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体的量。在一些实施方案中,在对所述生物样品中的第一等分试样的第一免疫测定中确定针对 VLA-4 结合抗体的结合活性的第一水平,以及在对所述生物样品中的第二等分试样的第二免疫测定中确定针对 VLA-4 结合抗体的结合活性的第二水平,其中第二免疫测定掺入比第一免疫测定更大量的未标记可溶性 VLA-4 结合抗体,并且其中如果所述的结合活性的第一水平大于参考水平以及所述的结合活性的第二水平小于所述结合活性的第一水平的预定百分比的话,就指示在所述生物样品中存在至少阈值水平的针对 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体。在一些实施方案中,所述参考水平是对参考量的针对 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体所测量的结合活性水平。在某些实施方案中,所述参考量是约 500ng。在一些实施方案中,VLA-4 结合抗体是针对 VLA-4 的人源化的鼠单克隆抗体。在一些实施方案中,VLA-4 结合抗体是人源化形式的鼠抗体 mAb 21.6。在一些实施方案中,所述 VLA-4 结合抗体是那他珠单抗。在某些实施方案中,所述的第一和第二免疫测定是桥连 ELISA 测定。在一些实施方案中,所述第一和第二测定包括固定化的未标记 VLA-4 结合抗体和可溶性的标记 VLA-4 结合抗体,其中可溶性的标记 VLA-4 结合抗体用酶、荧光标记物、生物素标记物(例如,VLA-4 结合抗体可以被生物素化)或者放射性标记物进行标记。在一些实施方案中,在单一反应基底上在平行反应体积中(例如在多孔板的分离孔中)实施第一和第二免疫测定。在某些实施方案中,所述生物样品是血清样品。在一些实施方案中,所述对象是人患者。在一些实施方案中,患者具有多发性硬化。在一些实施方案中,患者具有类风湿性关节炎。在某些实施方案中,所述患者具有克罗恩氏病。

[0016] 根据本发明的另一方面,提供鉴定患有病症的患者对蛋白质治疗剂的临床显著阈值水平的抗体应答的方法。所述方法包括(a)评价在具有所述病症并且没有用所述治疗剂治疗的对照患者群体中抗治疗剂抗体的水平和(b)选择在所述对照群体的抗治疗剂抗体水平之上至少 2 倍标准偏差的水平作为具有所述病症并且用所述治疗剂治疗之患者的抗体应答的临床显著的阈值水平。在一些实施方案中,所述蛋白质治疗剂是治疗性抗体或者其抗原结合片段。

[0017] 仍根据本发明的另一方面,提供鉴定针对治疗性蛋白质具有临床显著的抗体应答的患者的方法。所述方法包括测定从患有病症并且已施用所述治疗性蛋白质的患者获得的生物学样品中是否存在有阈值水平的特异性结合所述治疗性蛋白质的抗体,其中所述阈值水平为在具有所述病症的未治疗对照患者群体中特异性结合所述治疗性蛋白质的抗体水平之上至少 2 倍标准偏差。在一些实施方案中,所述治疗性蛋白质是治疗性抗体或者其抗原结合片段。因此,本发明的一些方面提供检测对象中针对 VLA-4 结合抗体的临床显著的免疫应答的方法,这是通过确定从已施用 VLA-4 结合抗体的对象所获得的生物学样品是否含有阈值水平的结合 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体,其中存在至少阈值水平的所述可溶性抗体指示针对 VLA-4 结合抗体的临床显著的免疫应答。

[0018] 本发明的每个所述限定可以涵盖本发明的很多不同实施方案。因此,预期本发明涉及任一要素或者要素组合的每个所述界限可以包括在本发明的各个方面中。

附图说明

[0019] 图 1 举例说明在免疫测定中游离那他珠单抗的干扰。

[0020] 图 2 举例说明在封闭测定中游离那他珠单抗的干扰。

[0021] 图 3 显示作为在初始施用那他珠单抗之后时间的函数,临床显著的免疫应答的概率。

[0022] 图 4 举例说明阳性免疫应答对复发率的总体影响。P = 安慰剂, n = 315。AN = 抗体阴性, n = 569。TP = 一过性阳性, n = 19。PP = 持续阳性, n = 37。

[0023] 图 5 举例说明在初始施用那他珠单抗之后在特定时间间隔期间(A:0-3 个月, B:3-6 个月, C:6-9 个月, 和 D:9-12 个月)阳性免疫应答对复发率的影响。P = 安慰剂, n = 315。AN = 抗体阴性, n = 569。TP = 一过性阳性, n = 19。PP = 持续阳性, n = 37。

[0024] 发明详细说明

[0025] 本发明的一部分涉及用于检测和监测针对施用给对象的治疗性蛋白质(例如,治疗性抗体)的免疫应答的方法、组合物和试剂盒。在一方面,本发明提供用于鉴定针对治疗性抗体具有临床显著的免疫应答的患者的方法。根据本发明,除非免疫应答达到临床显著的阈值水平,存在可检测免疫应答不是临床显著的。例如,在那他珠单抗的临床研究中,免疫应答的临床显著的阈值水平令人吃惊地是在没有接受该治疗剂的对象中所观测到的对照免疫应答水平之上超过 1.645 倍标准偏差(例如,超过约 2 倍标准偏差)。

[0026] 本发明的某些方面涉及用于检测抗被施用给对象的治疗性 VLA-4 结合抗体的临床显著免疫应答的方法。本发明的一些方面尤其可用于检测和监测已接受至少一剂量(例如一个治疗剂量)的 VLA-4 结合抗体的对象的免疫应答。本发明的一些方面包括鉴定和/或监测对治疗性 VLA-4 结合抗体具有临床显著的免疫应答的对象,评价免疫应答,和/或基于所述免疫应答的本质和/或程度确定适合的临床治疗(例如,特定治疗方案)。可以应用关于对象针对施用 VLA-4 结合抗体的应答的信息来调整、设计和/或优化对所述对象的治疗方案。因此,本发明的一个方面涉及鉴定对治疗性 VLA-4 结合抗体具有临床显著的免疫应答的对象。本发明的另一方面涉及监测对象针对治疗性 VLA-4 结合抗体的免疫应答。本发明进一步的一个方面还涉及基于对象针对治疗性 VLA-4 结合抗体的免疫应答来确定适合的治疗策略以治疗某些疾病(例如,多发性硬化、克罗恩氏病或者类风湿性关节炎等)。

[0027] 可以应用 VLA-4 结合抗体治疗许多与炎症有关的疾病和病症。这样的病症包括,例如中枢神经系统炎症(例如,除多发性硬化外,还有脑膜炎、视神经脊髓炎、神经性结节病、CNS 脉管炎、脑炎和横贯性脊髓炎)、组织或器官移植排斥或者移植物抗宿主病、急性 CNS 损伤(例如,中风或者脊髓损伤);慢性肾病;变态反应(例如,变应性哮喘);1 型糖尿病;炎性肠病(例如,克罗恩氏病、溃疡性结肠炎);重症肌无力;纤维肌痛;关节炎病症(例如,类风湿性关节炎、银屑病关节炎);炎性/免疫性皮肤病(例如,银屑病、白癜风、皮炎、扁平苔藓(lichenplanus));系统性红斑狼疮;Sjogren 综合征;血液性癌症(例如,多发性骨髓瘤、白血病、淋巴瘤);实体瘤,比如肉瘤或者癌瘤(例如,肺癌、乳癌、前列腺癌、脑癌);和纤维化病症(例如,肺纤维化、骨髓纤维化、肝硬化、系膜增生性肾小球肾炎、新月体肾小球肾炎、糖尿病肾病和肾性间质性纤维化)。在一些实施方案中,所述病症是由 $\alpha 4 \beta 1$ 或/和 $\alpha 4 \beta 7$ 亚基调节引起的疾病。

[0028] 在一个实施方案中,VLA-4 结合抗体是人源化形式的鼠 mAb 21.6,例如那他珠单抗。因此,本发明的一些方面涉及评价对象针对那他珠单抗的应答和确定对于多发性硬化和可用那他珠单抗治疗的其它炎性病况或疾病的适合治疗。

[0029] 本发明的一部分涉及鉴定对象针对 VLA-4 结合抗体(例如,人源化形式的鼠 mAb 21.6,比如那他珠单抗或 AN100226)的免疫应答,以及确定该应答是否具临床显著性。

[0030] 如本文中使用的,“鉴定”具有免疫应答的对象是指检测或诊断对象中是否存在免疫应答。因此,鉴定具有临床显著免疫应答的对象是指检测或者诊断对象中是否存在临床显著的免疫应答。

[0031] 如本文中使用的,针对治疗性蛋白质的抗体应答的“临床显著的阈值”为在对照参考水平之上至少 2 倍标准偏差。在一个实施方案中,针对治疗性蛋白质的临床显著的免疫应答的阈值水平可以为在对照水平之上 3-6(例如,约 4 或 5) 倍标准偏差之间。所述对照水平可以是,在接触所述治疗性蛋白质之前患者群体(例如,具有比如多发性硬化、克罗恩氏病或者类风湿性关节炎疾病或者病况的对象群体)中存在的结合活性的平均或者中值水平。在一个实施方案中,对于抗那他珠单抗抗体的临床显著的阈值是 500ng/ml 患者血清(例如,在 10 倍稀释血清的测定中为 50ng/ml 的阈值)。

[0032] 如本文中使用的,免疫应答是针对治疗性蛋白质的免疫原性应答,其特征存在于对象中一种或多种结合所述蛋白质的抗体的水平增加。因此,免疫应答的特征可以是诱导识别(例如,特异性识别)和结合所述蛋白质(例如 VLA-4 结合抗体,如那他珠单抗)的可溶性抗体的水平增加。典型的免疫应答是多克隆的并且可以包含对所述治疗性蛋白质具有不同亲和性(和因此不同程度的特异性)的抗体。因此,本发明的方法可以包括检测对象中一种或多种诱导抗体的存在,所述抗体结合被施用给该对象的治疗性蛋白质(例如,VLA-4 结合抗体)。在一些实施方案中,所述诱导抗体可以作为存在于生物样品(例如,血清样品)中的可溶性抗体而被检测到。

[0033] 本发明的一些方面涉及用于检测从患者所得生物样品中临床显著的阈值水平的结合活性的测定。所述阈值水平表示低于该水平的任何可检测结合活性被认为不具有临床显著的水平。如本文中使用的,结合活性指在生物样品中检测到的与治疗性蛋白质结合的量。如本文中所描述的,生物样品中结合活性的存在可以反映针对施用所述治疗性蛋白质的多克隆应答。因此,结合量可以反映由对所述蛋白质具有不同亲和性的不同抗体

的结合的合计。在某些实施方案中,对所述结合活性进一步进行分析以便以更大置信度确定,所述结合水平是由于抗所述治疗性蛋白质的特异性抗体的存在还是由于其它因素比如类风湿因子。可以在如本文所述的竞争性测定中评价结合活性的特异性。

[0034] 在本发明的一个方面中,只有当一个或多个得自对象的样品在本发明的测定中被检测为阳性时,该对象才被鉴定为阳性(即,对治疗性蛋白质具有临床显著的免疫应答)。当得自对象的样品包含对治疗性蛋白质(例如 VLA-4 结合抗体)的至少临床显著的阈值水平的结合活性时就被确定为阳性检验结果。令人吃惊地,对治疗性抗体的任何可检测免疫应答的存在不是临床显著的。根据本发明,基于筛选患者以检测对治疗性抗体的任何免疫应答水平的方法鉴定了许多假阳性患者,这导致了不必要的额外临床监测和对无临床显著性免疫应答的患者的潜在焦虑。例如,当基于对治疗性抗体的免疫应答在未接受所述治疗性抗体对象中所存在平均结合活性水平之上超过 1.645 倍标准偏差而将患者鉴定为阳性时,就检测到过多的假阳性。根据本发明,当采用 1.645 倍标准偏差截断值时,理论上 5% 的假阳性率是对假阳性数的低估,因为这 5% 代表对任何免疫应答的假性检测率并且不是关于临床显著的免疫应答的假阳性率。令人惊奇地,通过提高该截断水平(水平低于该截断值时,应答被认为是阴性)至高于对照参考水平之上 1.645 倍标准偏差,假阳性数降低,并且不影响对具临床显著的免疫应答的对象的鉴定。应当理解所述阈值应被设置为可产生对于具临床显著的免疫应答患者的可接受检测率的水平。因此,即使临床显著的阈值应当被设置在免疫前参考水平之上超过 1.645 倍标准偏差,也不应当将该阈值设置得过高以致于降低真实阳性的检测效率。

[0035] 在本发明的一个方面中,如果得自对象的样品在本发明的测定中未检验到阳性,例如,它们没有达到抗体应答的临床显著的阈值水平,则该对象的免疫应答可以被分类为阴性。相反,如果在单一测定中基于结合活性的阳性水平(临床显著的阈值水平或者之上的水平)而将对象鉴定为阳性,所述患者可能是“一过性”或者“持续性”阳性。一过性阳性是指在规定时间内对治疗性抗体具有阳性免疫应答的患者,而在所述时间段之后该患者变成阴性。相反,持续阳性是指在比规定时间段更长的时间内临床显著的水平的免疫应答为阳性的患者。应当理解的是,一过性和持续性是相对性术语。因此,如果在由临床显著的时间段分开的两个或多个时间点(例如在 3、4、5、6、7、8、9、10 或更长的时间点)上对于免疫应答而言患者检验为阳性,那么患者就可以初始被分类为持续性的。然而,如果在随后测定中对于免疫应答而言患者被检验为阴性,那么所述患者随后就可以被重新分类为一过性的。临床显著的时间间隔可以是至少一周、一个月、一年或者更长时间。例如,阈值时间间隔可以是在 30 至 180 天之间,约 60 天、约 42 天等。一过性免疫应答的存在可以作为疗效暂时降低的指示。持续性免疫应答的存在可以作为疗效持续降低的指示。因此,一过性或持续性免疫应答的存在可以是临床上相关的,并且可以影响被鉴定为一过性阳性或者持续阳性之对象的治疗方案的特点。持续性免疫应答可使调整对象的治疗方案成为必要。

[0036] 如本文中所使用的,术语“治疗方案”指对象的治疗过程。治疗方案可以包括施用药用剂和/或实施治疗。方案的选择可以包括选择剂量、给药时间安排、给药频率、治疗持续期间、与一种或多种药用剂或疗法的联合治疗以及由医学和治疗领域的技术人员使用的关于治疗决策的任何其它方面。治疗方案还可以包括应用疗法比如施用于对象或者由对象使用的程序或装置以预防或治疗疾病或病症。治疗程序的实例,尽管没有限制的意图,包括

应用医疗设备或者外科手术。因此,确定或者变更 VLA-4 结合抗体治疗方案可以包括确定或者变更施用给对象的治疗性 VLA-4 结合抗体的剂量、施用频率、施用途径、治疗持续期间(例如,给药次数)、是否将 VLA-4 结合抗体治疗与一种或多种另外的治疗相组合、是否中止 VLA-4 结合抗体治疗、是否应用不同的 VLA-4 结合抗体、和 / 或是否应用 VLA-4 结合抗体的联合等。在一个实施方案中,本发明可以包括确定是否应用 VLA-4 结合抗体的替代治疗,例如,是否应用 β 干扰素。

[0037] 本发明的一些方面涉及检测和 / 或监测人体(如人类患者)中针对 VLA-4 结合抗体的免疫应答。因此,如本文中所应用的,对象可以是人类对象。对象可以是患有炎性疾病或病况的人类患者。对象可以是已接受至少一剂量 VLA-4 结合抗体(例如,那他珠单抗)的患者。对象可以是正应用(或者已应用)VLA-4 结合抗体(例如,那他珠单抗)进行长期治疗的患者。对象可以是正应用(或者已应用)VLA-4 结合抗体(例如,那他珠单抗)进行重复治疗的患者。如本文中应用的,长期治疗可以包括在一段长时期中(例如,在该时期中来控制或者治疗炎性疾病或者病况)施用 VLA-4 结合抗体。相对而言,重复治疗可以包括当必要时(例如,当它们恶化或者“突发”时治疗炎性疾病的症状)重复应用 VLA-4 结合抗体的治疗过程(例如,一段施用期)。在一个实施方案中,当对象第一次用治疗性 VLA-4 结合抗体进行再治疗时,认为患者正接受重复治疗。本领域技术人员应当理解的是,与用 VLA-4 结合抗体治疗相联合或者除此之外分别地,对象还可以经受或者已经受其它疗法或者程序的治疗。应当理解的是,本发明的各个方面不限于人类对象。因此,对象可以是非人灵长类动物、牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫、啮齿动物或者其他非人类对象。

[0038] 鉴定和监测免疫应答

[0039] 在一方面,本发明涉及鉴定和 / 或监测对象中针对 VLA-4 结合抗体的免疫应答。在某些实施方案中,通过测定得自对象的生物样品优选血中是否存在与如本文所述的施用 VLA-4 结合抗体相结合的诱导抗体来实施所述鉴定和 / 或监测。

[0040] 在本发明的一个方面中,对得自对象的生物样品实施定性测定,如果所述生物样品含有大于阈值量的抗 VLA-4 结合抗体的抗体,则鉴定为存在免疫应答。在一个实施方案中,阈值量是在该值之上时免疫应答被鉴定为临床相关的量,例如如本文所述确定阈值水平。临床相关的免疫应答可以具有临床影响,例如,它指示应当评价对象以确定是否应当调整所施用 VLA-4 结合抗体的剂量、以确定是否应当监测该患者的其它生理参数、以确定是否应当实施对于免疫应答的进一步测定、或者以确定是否应当采取任何替代的或者另外的步骤来治疗或者监测所述对象等。临床相关的免疫应答可以与一种或多种其它因素一起进行评价。应当理解的是,对临床相关免疫应答进行鉴定本身不要求对对象的疗法或者治疗方案作出改变。

[0041] 在本发明的另一方面中,可对生物样品实施定量测定以确定抗施用给对象的 VLA-4 结合抗体的抗体量(例如,抗体效价)。还可以对定量结果进行分析来确定免疫应答是否是在临床显著的阈值水平之上。

[0042] 根据本发明,可以通过对在不同时间点上从对象获得的样品进行测定在一段时间中来评价对象中抗 VLA-4 结合抗体(例如,那他珠单抗)的免疫应答。多重评价策略允许监测对象针对 VLA-4 结合抗体的免疫应答并且可以允许对治疗性 VLA-4 结合抗体方案进行个体化调整以适合对象的治疗需要。例如,可以从对象获取样品,检验有关针对已施用给对

象的 VLA-4 结合抗体的免疫应答,随后在第二次可以从对象获取另一样品并进行相似的检验。通过对于以预定时间间隔的依次测定而在一段时间中来检测和证实对象样品中抗体应答的存在,允许监测针对治疗性 VLA-4 结合抗体治疗的免疫应答。检测和监测针对所施用 VLA-4 结合抗体的免疫应答还允许调整对象的总体治疗,例如通过调整(例如,改变或者暂停)VLA-4 结合抗体治疗和/或通过调整另外的治疗(例如,调节对象免疫应答的治疗)。

[0043] 可以基于在不同时间从已施用过 VLA-4 结合抗体的对象获得的至少两个生物学样品中对针对 VLA-4 结合抗体的临床显著的免疫应答的确定来选择或者调整治疗方案。对于对象针对 VLA-4 结合抗体的临床显著的免疫应答的确定可以指示起始、继续、调整或者停止给对象施用特定药用剂和/或治疗是否是有益的。例如,在得自对象的至少两个生物学样品中对针对 VLA-4 结合抗体的临床显著的免疫应答的确定,可以作为改变作为目前治疗方案一部分的施用给对象的药剂剂量的基础。可以改变治疗从而包括另外的药用剂或治疗或者降低或提高目前所施用药用剂或治疗的剂量。例如,鉴定对象中针对 VLA-4 结合抗体的免疫应答可以提示启动或者继续应用免疫抑制药用剂的治疗等。在一些实施方案中,可以基于对得自己用 VLA-4 结合抗体治疗的对象的单个生物学样品中针对 VLA-4 结合抗体的初始免疫应答的测定,来选择初始治疗方案。选择并施用所选治疗方案后,可以对得自对象的一个或多个随后的生物学样品进行针对 VLA-4 结合抗体的免疫应答的进一步确定并且可以提供调整治疗方案的根据。

[0044] 在不同时间点上从对象获取的一个或多个生物学样品中,可以对针对 VLA-4 结合抗体的临床显著的免疫应答的确定结果进行比较,以评价或者衡量对象中对 VLA-4 结合抗体治疗的免疫应答的发生、发展或者消退。对象中对 VLA-4 结合抗体的免疫应答的发生,其特征可以是结合 VLA-4 结合抗体的至少一种抗体水平的增加,并且可伴随对象中发生一种或多种生理变化或者症状。针对治疗性 VLA-4 结合抗体的免疫应答的发展,其特征可以是结合所述治疗性 VLA-4 结合抗体的至少一种抗体水平的进一步增加。然而,免疫应答的发展可以包括至少另外一种抗体水平的增加,和/或随着免疫应答发生而增加的至少一种抗体的水平降低。例如,起始免疫应答可以主要是 IgM 应答。随着免疫应答的发展,优势抗体可以从 IgM 转换为 IgG 抗体。免疫应答的发展还可以伴随一种或多种起始生理变化或症状的发展(例如,增加、降低或者调整)或者一种或多种其它生理变化或症状的发生。对象中针对治疗性 VLA-4 结合抗体的免疫应答的消退,其特征可以是结合治疗性 VLA-4 结合抗体的一种或多种抗体水平的降低。免疫应答的消退还可以伴随有某些生理变化或者症状的降低。然而,应当理解的是,针对治疗性 VLA-4 结合抗体的免疫应答的发生、发展和/或消退,除了抗体水平的可检测变化外,可以是无临床症状的。

[0045] 针对 VLA-4 结合抗体的临床显著的免疫应答的发展和消退通常可以通过对象样品中结合 VLA-4 结合抗体的抗体水平分别随时间而增加或者降低来指示。例如,如果在来自对象的第一样品中确定没有特异性结合 VLA-4 结合抗体的抗体、或者确定存在有低于临床显著水平的所述抗体,并且在来自所述对象的第二或者随后样品中确定存在临床显著的阈值水平的特异性结合 VLA-4 结合抗体的抗体,就可以表明在该对象中发生了针对 VLA-4 结合抗体的免疫应答。可以通过与在得自所述对象的初始或者之前的样品相比较,在得自对象的第二或者随后样品中存在更高水平的特异性结合 VLA-4 结合抗体的抗体,来指示对象中针对 VLA-4 结合抗体的免疫应答的发展。可以通过与在得自所述对象的初始或者之前

的样品相比较,在得自对象的第二或者随后样品中存在更低水平的特异性结合 VLA-4 结合抗体的抗体,来指示针对 VLA-4 结合抗体的免疫应答的消退。

[0046] 在本发明的一个方面中,可以基于抗治疗性 VLA-4 结合抗体的抗体水平是否在预定的临床显著的阈值之上,将免疫应答归类为阳性或者阴性。在一些实施方案中,临床显著的阈值是在免疫前对象(即,还没有接受任何剂量的治疗性 VLA-4 抗体的对象)中所测量结合活性平均水平之上超过 1.645(例如,超过 2、3、4、5 或者 6) 倍标准偏差。在一些实施方案中,对象是健康对象,以及在某些实施方案中,对象是有病的患者(例如,患有多发性硬化、克罗恩氏病或者类风湿性关节炎的患者)。在一个实施方案中,阈值水平是 > 0.5 微克/ml 血清。在一些实施方案中,阈值水平为等于约 0.5 微克/ml 血清。

[0047] 在一个实施方案中,已施用过 VLA-4 结合抗体的对象可以被归类而分为至少三种类别之一。一种类别,在本文中被称作“阴性”,包括结合活性处于或者低于临床显著的阈值水平的对象(例如,在得自对象的生物学样品(例如血清)中未检测到浓度至少约 500ng/ml 的针对 VLA-4 结合抗体的抗体的对象)。第二类别,在本文中被称作“一过性阳性”,包括仅在有限次中,例如在 1、2、3、4、5 个时间点上(例如,从所述最后时间点起间隔至少 30 天的随后时间点上没有检测到针对 VLA-4 结合抗体的抗体)检测到结合活性在阈值水平之上的对象。第三类别,在本文中被称作“持续性阳性”,包括在预定次数中,例如在至少由阈值时间间隔分开的 2、3、4、5、6、7 或更多时间点上检测到结合活性在阈值水平之上的对象(例如,在由最小阈值间隔分开的的时间点上,在从对象获取的 2、3、4、5、6、7 或更多个生物学样品中检测到浓度至少约为 500 ng/ml 的针对 VLA-4 结合抗体的抗体的对象)。在一些实施方案中,所述阈值间隔为至少约 10、20、30、40、50、60、70、80、90 或者更多的天数。“持续性阳性”患者中 VLA-4 抗体疗法的功效可能有损失,而对于“一过性阳性”患者却在功效仅仅暂时性降低后完全恢复。

[0048] 应当理解的是,阴性对象可以变成一过性阳性。并且如果阳性免疫应答发生并且在规定数的时间点(例如至少两个时间点)上持续,则任一种对象可能变成持续性阳性。

[0049] 在一个实施方案中,可以根据对单一阳性结果的确定来改变疗法。在另一实施方案中,可以根据确定对象为一过性阳性对象来改变疗法。仍在另一实施方案中,可以根据确定对象为持续性阳性对象来改变疗法。

[0050] 如上所论述的,应当理解的是,术语一过性和持续性是相对的术语,并且看上去为持续阳性的患者可以在以后的时间变为阴性。因此,应当对阳性应答的患者进行定期监测以评价阳性应答的持续性、治疗的有效性和/或阳性免疫应答其它临床表现的存在性。

[0051] 根据本发明,疗效降低的风险(例如,复发的风险)随着阳性免疫应答持续时间的延长而增加。因此,在本发明的一个方面中,患者检验为阳性的次数的重要性低于患者保持阳性的时间长度的重要性。在一个实施方案中,如果在第一次施用治疗性 VLA-4 结合抗体起 3 个月内检测到阳性结果,就可以确定患者具有疗效降低的风险(例如,复发的风险)。在一个实施方案中,在第一次施用治疗性 VLA-4 结合抗体之后,如果阳性免疫应答持续 3-6 个月这种风险就增加,并且如果阳性免疫应答持续 6-9 个月这种风险就进一步增加,并且随着持续 9-12 个月这种风险仍将进一步增加。应当理解,如果持续超过一年的话,复发的可能性甚至会进一步增加。因此,不同的治疗方案可能适合于具有持续阳性免疫应答的患者。然而,应当理解即使在存在持续阳性免疫应答的情况,治疗性抗体疗法并不需要中止,

除非该疗法变得无效（例如，几乎丧失所有的疗效）或者引起其它消极的临床表现。

[0052] 在一些实施方案中，如果治疗无效或者在具有低于阈值水平免疫应答的患者中疗效正在丧失的话可以中止治疗性 VLA-4 结合抗体的治疗。在缺少临床显著的免疫应答的情况下，缺乏疗效（或者疗效降低）可能表明治疗的无效性是由于患者针对治疗剂的免疫应答以外的一种或多种因素造成的。如果未检测到阳性应答，患者将不是一过性阳性。因此，可以考虑替代治疗。

[0053] 应当理解，结合活性或者抗体水平可以与免疫前的活性或者水平（即，在施用第一剂 VLA-4 结合抗体之前所测量的）进行比较。然而，如本文所述，与免疫前的量进行对比并不是必需的，因为当临床显著的阈值（或者在阈值之上的）量的结合活性或者抗体水平存在于患者样品中时，就可以鉴定为阳性免疫应答。

[0054] 测定和检测方法

[0055] 根据本发明的一些方面，测定抗体应答的阈值量。如本文所论述的，可以实施定性测定。作为替代，可以实施定量测定并且在一个实施方案中，定量数据可以被解释成定性输出结果（例如，抗体的量是否大于阈值量）。

[0056] 可以采用任何适合检测抗体量或者结合活性的方法来确定其是否至少为阈值量或者活性。检测测定可以包括用于检测、确认、结合、纯化、去除、定量和 / 或其它常规检测特异性结合特定治疗性蛋白质（例如，VLA-4 结合抗体，或者其片段）的抗体的任何已知免疫检测方法。例如，免疫检测技术可以包括但不限于酶联免疫吸附测定 (ELISA)（包括但不限于标准夹心 ELISA 或者桥连 ELISA）、放射免疫测定 (RIA)、免疫放射测定 (immunoradiometric assay)、荧光免疫测定、化学发光测定、生物发光测定、放射免疫沉淀测定 (RIPA) 和 Western 印迹。此外，免疫检测技术可以包括基于光学传感器的方法，比如表面等离子体共振 (SPR) 或者导模共振滤波器 (guided mode resonance filter) (BIND)。尽管本文中提供的某些实施例涉及利用附着于表面的固定化 VLA-4 结合抗体的测定（例如 ELISA），本领域的普通技术人员应当认识到本发明在一些方面可以包括不用 VLA-4 结合抗体表面附着的测定（例如，流式细胞仪测定等）。其它的免疫检测技术可以包括免疫放射测定 (IRMA)、时间分辨荧光分析 (TRF) 或者电化学发光 (ECL)。大量可用的免疫检测方法已经在科学文献中有过描述，比如，例如 Doolittle M H 和 Ben-Zeev O, 1999 ; Gulbis B 和 Galand P, 1993 ; De Jager R et al., 1993 ; 和 Nakamura et al., 1987, 其每一篇通过参考并入本文中。

[0057] 在一个方面中，实施测定来检测生物学样品中存在针对 VLA-4 结合抗体的结合活性。在一个实施方案中，可以通过确定所观测到的结合活性是否对 VLA-4 结合抗体具有特异性或者确定这是否是由于生物学样品中可能存在的干扰因子比如类风湿因子或者其它结合因子造成的，来评价结合活性的特异性。

[0058] 本发明的一些方面可以包括涉及将生物学样品与固定化结构接触的测定法，以固定化存在于生物学样品的任何结合活性。可以应用检测结构来检测固定化的结合活性。固定和检测结构可以分别是固定化的未标记的和非固定的标记的如本文所述的 VLA-4 结合抗体。在一个实施方案中，固定化结构可以结合于固体基底或者表面（例如，在多孔板的孔中，在 ELISA 板的表面上等）。在另一实施方案中，固定化结构可以通过共价键或者其它连接（例如，固定化结构可以与生物素分子相偶联并通过生物素 - 链亲合素相互作用附着于

包被有链亲合素的珠)附着于珠(例如磁性珠)。在一些实施方案中,所述的珠可以附着于表面或者基质。例如,磁性珠可以被固定在磁性表面上。相似的,带电的珠可以被固定在带电的表面上(例如,电极)。

[0059] 如果结合活性(例如,由固定化结构捕获的结合活性的量)的检测量在预定的阈值之上,就可以确定为阳性结果。可通过在测定中包含竞争性结构来评价所检测结合活性的特异性。所述竞争性部分可以是所包含的非固定化的未标记 VLA-4 结合抗体,用来与所述测定的固定和/或检测步骤竞争。如果竞争结构的存在使所述结合活性降低了预定的最低限度百分率或者截断值的话,则确定所述结合活性具有特异性并且确认为阳性结果。如果竞争结构的存在未能使所述结合活性降低预定的最低限度百分率或者截断值的话,则确定该结合活性不具有特异性并且同时确定初始阳性结果对于免疫应答为阴性结果。

[0060] 根据本发明的一些方面,可以应用预定量的固定、检测和/或竞争结构。相似地,可以应用包含预定量抗体的样品来确立结合活性的初始阈值水平,已知所述抗体结合 VLA-4 结合抗体。例如,可以在测定中应用 10ng/ml 至 1000ng/ml(例如,约 50ng 或者约 500ng)的对照抗体来确立阈值水平。用来确定阈值水平的抗体量将决定所述测定的灵敏度。通常,可以认为测定的灵敏度与用来确定初始阈值的抗体的量相近。应当理解,在对照中的结合量可以作为参考用来确定阈值(例如,阈值量可以是在对照中所获得信号的倍数或者分数)。然而,在一个实施方案中,在对照测定中获得的信号被用作阈值量。还应当理解的是,有大量的因素(包括对照抗体的亲和性和特异性)可以影响测定敏感性。

[0061] 在一个实施方案中,可以通过在测定中掺加一定量的竞争结构来评价结合活性的特异性,所述量与用来确立结合阈值水平的对照抗体量相近。例如,测定中可以掺加约 10ng/ml 至 1000ng/ml(例如,约 50ng,或者约 500ng)的未标记可溶性 VLA-4 结合抗体。不过,可以应用其它量的竞争结构。

[0062] 因此,在本发明的一些实施方案中,在对生物学样品第一等分试样的第一免疫测定中确定生物学样品中针对 VLA-4 结合抗体的结合活性的第一水平,并且在生物学样品第二等分试样的第二免疫测定中确定针对 VLA-4 结合抗体的结合活性的第二水平,其中在第二免疫测定中掺加比第一免疫测定中更大量的未标记可溶性 VLA-4 结合抗体,并且如果结合活性的第一水平大于参考水平以及结合活性的第二水平小于结合活性第一水平的预定百分率的话,就表明存在至少阈值水平的针对 VLA-4 结合抗体的可溶性抗体。

[0063] 本领域的普通技术人员应当认识到可以应用不同的方法评价和/或监测已用治疗性抗体比如 VLA-4 结合抗体治疗的对象中的免疫应答。例如,如上所述,可以通过应用单一水平“截断值”确定特异性结合 VLA-4 结合抗体的抗体量来实施所述评价和/或检测。当处于或者大于本文所使用的截断值结合水平时,检测增加将被记为显著的和/或阳性的,并且是对生物学样品中可溶性结合活性水平检测反映样品中特异性结合 VLA-4 结合抗体的抗体水平的证实性确定。在另一些实施方案中,可以定量实施针对治疗性 VLA-4 结合抗体的免疫应答的鉴定以确定来自对象的生物学样品中特异性结合 VLA-4 结合抗体的抗体的效价。

[0064] 在本发明的一个方面中,免疫检测测定可以是 ELISA。正如本领域普通技术人员所应理解的,术语“ELISA”涵盖了用于免疫检测的大量方案。例如,ELISA 方法包括夹心 ELISA、桥连 ELISA 等。在本发明的一些实施方案中,ELISA 免疫测定是手动测定。然而,在

本发明的一些实施方案中,所有或部分的 ELISA 可以以自动方式来实现。

[0065] 在本发明的一些实施方案中,ELISA 测定包括使用 VLA-4 结合抗体作为固定化靶结构,其被包被于 ELISA 板上。随后包被的 ELISA 板可以与生物学样品接触用以确定对象抗体的水平,所述抗体特异性结合 VLA-4 结合抗体。在本发明的一些实施方案中,应用 ELISA 测定生物学样品的第一等分试样用以确定是否存在结合于所述固定化靶 VLA-4 结合抗体的阈值量,并且应用 ELISA 测定相同生物学样品的第二等分试样以确定结合于固定化靶 VLA-4 结合抗体的阈值(或者阈值之上的)水平是否指示 VLA-4 结合抗体特异性的抗体。在本发明的一个方面中,在等分试样中可溶性结合活性的阈值水平是约等于对照或者参照样品中存在的结合活性水平,其中所述对照或参照样品中包含至少约 50ng/ml、100ng/ml、200ng/ml、300ng/ml、400ng/ml、500ng/ml、600ng/ml、700ng/ml、800ng/ml、900ng/ml 或者 1000ng/ml 的结合于 VLA-4 结合抗体的参照抗体。在一个实施方案中,确定阈值水平为大约等于对照或者参照样品中结合活性的水平,所述样品中含有约 500ng/ml 的结合于 VLA-4 结合抗体的参照抗体。所述参照抗体可以是多克隆的或者单克隆的。所述参照抗体可以是鼠抗-那他珠单抗抗体(例如,在 Sheremata et al., 1999, Neurology 52, pages 1072-1074 中描述的 12C4, 该文献通过参考并入本文)。如本文所述,如果结合于固定化靶 VLA-4 结合抗体的水平至少为阈值水平,并且可溶性结合活性被确定为是特异性结合 VLA-4 结合抗体的抗体的结合活性,那么它就鉴定了对象中针对 VLA-4 结合抗体的免疫应答。

[0066] 通常,可用于本发明方法的 ELISA 方法可以包括,从已施用治疗性抗体比如 VLA-4 结合抗体(例如那他珠单抗等)的对象获取生物学样品并将该样品的等分试样与固定化抗体相接触。在一些实施方案中,固定化抗体可以是与施用给对象的抗体相同的 VLA-4 结合抗体。固定化抗体捕获样品中与所述抗体结合的分子或者化合物,并且将所述样品与第二检测结构相接触,所述第二检测结构能够选择性结合或者检测所捕获的分子或者化合物(例如,标记的第二抗体)。能选择性结合或者检测所述复合物的结构的实例包括但不限于能用各种标记物(例如,生物素/亲合素配体结合方案,如本领域所公知的)标记的抗体或者其它配体。本领域的技术人员还可以应用标记的第三抗体。在一些优选实施方案中,所述第二结构为所述固定化抗体的标记形式。

[0067] 在本发明的一些实施方案中,ELISA 测定包括,应用治疗性 VLA-4 结合抗体作为固定化靶结构,用其包被 ELISA 板。所包被的 ELISA 板随后可以与生物学样品接触用以确定特异性结合治疗性 VLA-4 结合抗体的对象抗体的水平。在本发明的一些实施方案中,应用 ELISA 测定生物学样品的第一等分试样以确定是否存在针对固定化靶 VLA-4 结合抗体的结合活性阈值量,并且应用 ELISA 测定同一生物学样品的第二等分试样以确定结合于固定化靶 VLA-4 结合抗体的阈值(或阈值以上)水平是否指示 VLA-4 结合抗体特异性的抗体。在本发明的一个方面中,等分试样中可溶性结合活性的阈值水平为大约等于对照或者参照样品中存在的结合活性水平,所述对照或者参照样品包含至少约 50ng/ml、100ng/ml、200ng/ml、300ng/ml、400ng/ml、500ng/ml、600ng/ml、700ng/ml、800ng/ml、900ng/ml 或者 1000ng/ml 的结合 VLA-4 结合抗体的参照抗体。在一个实施方案中,确定阈值水平为大约等于对照或者参照样品中的结合活性水平,所述样品包含约 500ng/ml 的结合于 VLA-4 结合抗体的参照抗体。所述参照抗体可以是多克隆的或者单克隆的。所述参照抗体可以是鼠抗-那他珠单抗抗体(例如,在 Sheremata et al., 1999, Neurology 52, pages 1072 中描述的 12C4)。

[0068] 结合 VLA-4 结合抗体的参照抗体可以是结合那他珠单抗的参照抗体（例如，以高亲和性例如纳摩尔级亲和性结合那他珠单抗的抗体）。在一些实施方案中，结合那他珠单抗的参照抗体可以阻断那他珠单抗结合 VLA-4（例如，它可以将那他珠单抗与 VLA-4 的结合抑制至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90% 或者更多）。所述参照抗体可以是鼠单克隆抗体。所述参照抗体可以是对那他珠单抗有特异性的抗独特型抗体。在一些实施方案中，所述参照抗体是 12C4 抗体（可以从 Maine Biotechnology Services, Inc., Portland ME 获得；见，例如 Sheremata et al., 1999, Neurology 52, page 1072）。12C4 是一种阻断性抗体，其阻断那他珠单抗结合 VLA-4。在一些实施方案中，所述参照抗体与 12C4 竞争与那他珠单抗的结合。可以使用评价抗体能力的标准方法来证明抗体结合的竞争性，所述抗体能力是用来竞争性抑制 12C4 抗体阻断那他珠单抗结合 VLA-4 的能力。在一些实施方案中，应用桥连 ELISA 确定是否存在特异性结合 VLA-4 结合抗体的抗体。在桥连 ELISA 中，特异性结合 VLA-4 结合抗体的抗体（例如，来自生物学样品）充当包被在 ELISA 板上的 VLA-4 结合抗体与溶液中经可检测标记的 VLA-4 结合抗体（例如非固定化的）之间的桥。由此，经标准处理后的 ELISA 信号表明可检测标记已经被连接于固体相以及在该生物学样品中存在可溶性结合活性。

[0069] 将所述生物学样品的等分试样与固定化抗体在有效条件下以及在足以允许形成免疫复合物（初级免疫复合物）的一段时间中相接触通常涉及，向固定化抗体（例如，固定在 ELISA 板上的 VLA-4 结合抗体）加入生物学样品的等分试样并且孵育该混合物足够长的时间，以使固定化抗体与存在于生物学样品等分试样中并具有可溶性结合活性的分子或者化合物形成（即结合）免疫复合物。具有可溶性结合活性的分子或者化合物可以是特异性结合 VLA-4 结合抗体的诱导抗体，或者可以是结合 VLA-4 结合抗体的非诱导的内源性抗体或受体（例如，类风湿因子 [RF] 或者抗 Fab 抗体）。之后，通常清洗该样品抗体混合物（例如，ELISA 板、斑点印迹或者 Western 印迹）以去除未结合的抗体和 / 或来自测定混合物的物质。

[0070] 如果检测到阈值水平的结合活性，可以实施另外的步骤以确认所述结合活性是否指示特异性结合治疗性 VLA-4 结合抗体的诱导抗体。对于此确认步骤，可以制备生物学样品的第二等分试样，并且除了还要在测定（例如，ELISA 测定）中添加预定量的非固定的未标记竞争性 VLA-4 结合抗体以外，根据关于对第一等分试样的描述进行测定。例如，预定量的竞争性抗体可以是未标记量的抗体，其在对照测定中降低特异性信号约 50% 或者更多。如果未标记的 VLA-4 结合抗体的存在降低信号超过预期的百分比量，那么所述阈值（或者阈值之上）结合活性就被判断为是存在特异性结合治疗性 VLA-4 结合抗体的抗体的阳性指标。相反，如果未标记 VLA-4 结合抗体的存在降低信号少于预期的百分比量，那么阈值（或者阈值之上）结合活性就被判断为对于特异性结合治疗性 VLA-4 结合抗体的抗体为阴性。应当理解的是，非特异性信号可能是由于血清因子所致，而不是结合 VLA-4 结合抗体的抗体。如本文中使用的，术语“掺加”（spike, spiked）是指向样品或者测定中添加未标记的（或者不同标记的）可溶性竞争 VLA-4 结合抗体。

[0071] 如本文中使用的，“降低百分率（percentage reduction）”是在第一等分试样中所确定之结合水平的百分率。因此，例如，如果在第一等分试样中指示有约 500ng/ml 当量的具有结合活性的分子或者化合物，并且在第二等分试样中包括未标记的 VLA-4 结合抗体使

信号量降低超过 40-90% (例如,约 50%或者更多、约 55%或者更多、约 60%或者更多、约 65%或者更多、约 70%或者更多、约 75%或者更多、约 80%或者更多、约 85%或者更多、约 90%或者更多),那么就认为生物样品中的结合活性指示存在特异性结合治疗性 VLA-4 结合抗体的诱导抗体。但是如果在第二等分试样中包括未标记的 VLA-4 结合抗体使信号量降低小于 20-40%,那么就不认为生物样品中的结合活性指示存在特异性结合治疗性 VLA-4 结合抗体的诱导抗体。在一些实施方案中,竞争抗体可以是可溶性未标记的那他珠单抗。在一些实施方案中,可以以约 100 μ g/ml 的终浓度使用可溶性未标记的那他珠单抗。然而,如果它导致所获得信号对于含有对照量的参照抗体的对照样品有预定的下降(例如,约 40%、约 50%或者更多),就可以使用任何浓度的游离未标记的那他珠单抗。例如,对照样品可以含有约 500ng/ml、约 3 μ g/ml 或者任何其它合适量的参照抗体(例如,12C4)。如本文中所指出的,在得自患者的生物样品中存在特异性结合 VLA-4 结合抗体的抗体,这表明所述对象具有针对 VLA-4 结合抗体的临床显著的免疫应答。

[0072] 在“夹心”ELISA 实例中,治疗性 VLA-4 结合抗体(例如,那他珠单抗)可以用作靶抗体并且可以被固定在表现出蛋白质亲和性的所选表面上,比如聚苯乙烯微量滴定板的孔。随后,将来自己至少施用一次治疗性 VLA-4 结合抗体(例如那他珠单抗)的对象的样品添加到孔中。在结合和/或清洗以去除未结合物质之后,可以检测结合于所述靶抗体的结合分子或者化合物。可以通过添加连接有可检测标记的第二抗体来完成检测。此外,可以根据上文所述来确认所述结合分子或化合物作为抗体的身份,所述抗体特异性结合 VLA-4 结合抗体。

[0073] 本领域普通技术人员应当理解的是,不管个别特征(例如,本文描述的确认步骤),一般而言,ELISA 具有某些共同的特征,比如包被、孵育和结合、清洗以去除未特异性结合的物质,和检测结合的免疫复合物。

[0074] 在用抗原或者抗体包被板时,通常用靶抗体溶液孵育所述板的孔,保持过夜或者规定的若干小时。包被缓冲液可以是磷酸钠/BSA 包被缓冲液或者另一本领域已知的合适的包被缓冲液。随后,将清洗所述板的孔以去除不完全吸附的物质。随后用非特异性蛋白质“包被”所述孔的任何剩余的可用表面,所述蛋白质对于测试样品是抗原性中性的(antigenically neutral)。该蛋白质可以是牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白或者奶粉溶液等。包被允许封闭固定表面上非特异性吸附位点并且由此降低由于抗血清在所述表面上的非特异性结合引起的背景。

[0075] 在 ELISA 中,可以应用第二或者第三检测手段或者可以应用直接检测手段。当应用第二或者第三检测方法时,在蛋白质或者抗体结合所述孔之后,用非反应性物质包被以降低背景(例如,用封闭缓冲液比如 Tris-蔗糖封闭缓冲液或者本领域公认的其它封闭缓冲液),并进行清洗以去除未结合的物质,使固定表面与待检验的生物样品在有效允许免疫复合物(抗原/抗体)形成的条件下接触。随后,对所述免疫复合物的检测需要标记的第二结合配体或者抗体,以及第二结合配体或者抗体连同标记的第三抗体或者第三结合配体。在本发明的一些优选实施方案中,所述第二结合配体是 VLA-4 结合抗体(例如,与用作靶抗体相同的 VLA-4 结合抗体)。

[0076] 如本文所用的,术语“在有效允许免疫复合物形成的条件下”表示一些条件,其优选包括用溶液来稀释所述抗原和/或抗体,所述溶液比如 BSA、牛 γ 球蛋白(BGG)、磷酸盐

缓冲液 (PBS)/Tween、含酪蛋白和 Tween 20 的 PBS 或者含 Tween 20 的 PBS/BSA 缓冲液。在本发明的方法中可以应用本领域已知的其它各种测定稀释剂。这些添加剂还倾向于帮助降低非特异性背景并且可以包含最多 0.5 M 的 NaCl。

[0077] 如本文所用的,“适合的”条件还表示孵育的温度或者持续时间足以允许有效的结合。孵育步骤通常从约 1 至 2 至 4 小时左右,温度优选 25℃ 至 27℃,或者可以在 4℃ 过夜。在本发明的方法中可以应用本领域已知的各种测定温度和时间参数。

[0078] 在 ELISA 中孵育步骤之后,清洗接触表面以去除未结合的物质。优选的清洗步骤可包括用溶液比如 PBS/Tween、TBS/Tween 或硼酸盐缓冲液进行清洗,所述溶液还可以包含最多 0.5M NaCl。在所述测试样品和所述靶抗体之间形成特异性免疫复合物以及随后的清洗之后,可以确定甚至微量免疫复合物的存在。应当理解的是,在本发明的方法中,可以应用本领域已知的其它的清洗缓冲液配方。

[0079] 为了提供检测手段,所述第二或者第三抗体将具有相连的可检测标记。在某些实施方案中,所述可检测标记是酶,其一旦与适宜的发色底物一起孵育将产生显色。因此,例如,可以在有利于形成进一步免疫复合物的条件(例如,在室温下,在含 PBS 溶液比如 PBS-Tween 中孵育 2 小时)下使所述的第一和第二免疫复合物与偶联脲酶-、葡萄糖氧化酶-、碱性磷酸酶-、过氧化氢酶-的抗体或者其它偶联抗体接触或者孵育一段时间。

[0080] 本领域技术人员还应当理解的是,在本发明的方法中可以利用一种或多种阳性和阴性质量控制。阳性质量控制样品可以是正常的血清样品,其含有预定量的已知结合 VLA-4 结合抗体的抗体。质量控制样品可以在测定所述生物学和对照样品的相同条件下并与之平行地进行反应。阴性质量控制样品可以是已知不包括已知结合 VLA-4 结合抗体的抗体的血清样品。本领域的技术人员应知道在 ELISA 中如何利用阳性和阴性对照反应以及样品,从而确认并验证在所述测定中应用的溶液和/或底物和/或方案的功能。例如,阳性对照可以包括已知量的特异性结合 VLA-4 结合抗体的抗体,因此当在与测试样品(例如生物学样品)同样的条件下处理时,它指示所述测定在预期参数内工作。阴性对照的实例可以是已知不包含特异性结合 VLA-4 结合抗体的抗体的样品。当在与所述测试样品(例如,生物学样品)同样条件下处理这样的阴性对照时,该阴性对照将指示在生物学样品中检测到的结合是由所述生物学样品引起的,而不是由于测定成分的污染或者与所述生物学样品无关的其它因素所造成的。本发明方法涵盖的测定方法的一个非限制性实施例可以包括以下步骤。用溶于缓冲液的约 0.25 μ g/mL 那他珠单抗参比标准溶液包被 ELISA 板的孔并在环境温度下过夜孵育所包被的板;用清洗缓冲液清洗所述板孔至少一次并用封闭缓冲液在环境温度下孵育所述板孔最少 1 小时;在测定稀释剂中以约 1 : 10 稀释对照样品和筛选样品;在所述测定稀释剂中一起稀释竞争性样品和那他珠单抗(约 1mg/mL),使得那他珠单抗的终浓度为约 100 μ g/mL 以及所述竞争性样品的最终稀释度约为 1 : 10;在环境温度下孵育对照样品、筛选样品和竞争样品约 1 小时并用清洗缓冲液清洗所述板孔至少一次;在环境温度下孵育所述板孔中的所述样品约 60 至 150 分钟并用清洗缓冲液清洗所述板孔至少三次;添加约 100 μ L/板孔的生物素化-那他珠单抗,该生物素化-那他珠单抗在测定稀释剂中被稀释到约 1 : 1000,在环境温度下孵育该板约 60-90 分钟,并用清洗缓冲液清洗所述板孔至少三次;向板孔中的样品添加链亲合素-辣根过氧化物酶,其在测定稀释剂中以约 1 : 5000 稀释,在环境温度下孵育该板约 60-90 分钟,并用清洗缓冲液清洗该板至少三次;

向所述板孔中添加足够量的发色底物以使抗体结合可见,在环境温度下显影该板几分钟,通过向所述板孔中添加 1N H_2SO_4 来停止显影;以及读取所述板孔,由此获得结果。

[0081] 本发明还考虑,本文描述的 ELISA 试剂可以通过商业化生产包装成试剂盒,以检测在本文所述生物学样品中是否存在特异性结合 VLA-4 结合抗体的抗体和/或测量该抗体。

[0082] 还应理解的是,除了预定的值(比如依照本文描述鉴定的有临床显著性的阈值,其用于具体的治疗性蛋白质)以外,用于本发明的对照可以包括,与所述试验材料平行检验的材料的样品。实例包括准备与试验样品平行检验的阴性对照样品(例如,通过制造产生的)。

[0083] 如本文所用的,生物学样品可以是但不限于以下任一项:对象的体液,包括血、血清、血浆、尿、唾液、胸腔积液、粪便、滑液、脑脊液、粘液和组织浸润物。优选的体液包括血、血浆和血清。如本文所用的,可以应用医学相关领域技术人员众所周知的方法获取生物学样品。可以直接从对象或者可以从细胞、组织或者其它培养物获取生物学样品。生物学样品可以是新鲜的或者可以在用于本发明方法之前已被保存在适宜条件(例如,冷冻、冷藏等)下。

[0084] 应当理解的是,可以在施用治疗剂之后在不同的时间间隔上从对象获取生物学样品。然而,治疗剂可以具有特征性体内半衰期,并且在给对象施用所述治疗剂之后,存在于生物学样品中的游离治疗剂的量通常将以时间函数的形式降低。在生物样品中存在的游离治疗剂(未标记的和未固定的)可以干扰本发明的结合和检测反应。因此,应当在治疗剂施用后尽可能长的时间再获取生物学样品,例如在治疗周期中的“波谷”(trough)。“波谷”表示在治疗周期期间存在于对象中的游离治疗剂的最低量。例如,在一个治疗剂施用后很长时间以及在随后的治疗剂施用前不久可以出现波谷。应当理解的是,许多因素可以影响波谷的时间安排,所述因素包括所施用治疗剂的量、所述治疗剂的半衰期、施用频率等。例如,每月一次施用 VLA-4 结合抗体(例如 300mg 那他珠单抗)导致在一次施用后约 30 天并且紧接在随后施用之前出现波谷。然而,应当理解的是,如果本发明的测定对生物学样品中治疗剂的存在是相对不敏感的、或者可以解决生物学样品中游离治疗剂的存在,可以对在治疗施用后不同时间采集的多个样品实施本发明的测定法。当比较在不同时间点采集的不同样品的结合活性水平时,从治疗周期的相似阶段(例如,在治疗剂施用后的相似时间长度)获得各个样品是尤其重要的,从而可以不需要对生物学样品中游离治疗剂水平的差异进行修正就可以解释所获得的结果。

[0085] 应当理解的是,可以在进行测定前稀释生物学样品(例如,2 倍、5 倍、10 倍、50 倍、100 倍,以及包括更高或者更低的倍数或者它们之间的任何倍数)。在一个实施方案中,可以将包含临床显著的阈值量参照抗体的参照样品稀释与待检验生物学样品相同的倍数,从而使获得的生物学样品的信号可以直接与获得的参照样品的信号进行比较。

[0086] 在本发明的一些实施方案中,应用生物样品的一个或多个等分试样。如本文所用的,术语“等分试样”(aliquot)表示生物学样品的一部分。在一些实施方案中,可以从得自对象的生物学样品取两个或多个等分试样,并且可以应用本发明的方法检验所述等分试样以确定所述对象中是否存在针对 VLA-4 结合抗体的免疫应答。例如,可以从得自对象的生物学样品取两个基本等同的等分试样,其中所述对象已被施用过 VLA-4 结合抗体(例如那

他珠单抗),并且可以在一个等分试样(例如,“第一”等分试样)中检测并确定可溶性结合活性的水平。另外,可以应用本发明的方法评价所述的另外等分试样(例如,“第二”等分试样),从而确认在第一等分试样中检测的可溶性结合活性是特异性结合 VLA-4 结合抗体的抗体,这是因为它们具有共同的样品来源,所以可溶性结合活性也存在于第二等分试样中。在一些实施方案中,如果在第一等分试样中存在最小阈值水平的结合并且确定可溶性结合活性是特异性结合 VLA-4 结合抗体的抗体的活性,就可以鉴定在该对象中存在针对 VLA-4 结合抗体的免疫应答。

[0087] VLA-4 结合抗体

[0088] 本发明的一些方面涉及用于鉴定和/或监测针对施用给对象的一种或多种治疗性 VLA-4 结合抗体的免疫应答的检测测定法。在本发明的某些方面中,检测测定法包括固定和检测结构。在一些实施方案中,检测测定法还可以包括竞争结构。如本文所描述的,可以用固定结构来固定结合 VLA-4 结合抗体的诱导抗体(例如血清抗体)。可以用检测结构来检测所固定的抗体。可以让竞争结构与固定结构和/或检测结构进行竞争来结合所述诱导抗体,从而确定结合所述诱导抗体的特异性。所述的固定和检测结构可以独立地结合一种或多种抗体,所述抗体是针对 VLA-4 结合抗体的免疫应答的特征。因此,所述的固定和检测结构可以是施用给对象的同样的 VLA-4 结合抗体(例如,所述固定结构可以是施用给对象的治疗性 VLA-4 结合抗体的固定形式,并且所述检测结构可以是施用给对象的治疗性 VLA-4 结合抗体的标记形式)。然而,在另一些实施方案中,固定和检测结构中每种独立地可以是施用给对象的治疗性 VLA-4 结合抗体的变体,只要所述的固定和检测结构以适合的亲和性结合来检测一种或多种抗治疗性 VLA-4 结合抗体的诱导抗体(例如,血清抗体)即可。所述的竞争结构通常是所述固定或者检测结构的可溶性未标记(或者差异化标记)形式。然而,所述竞争结构可以是所述固定或者检测结构的变体,只要它足以竞争性结合治疗性 VLA-4 结合抗体从而确定测定中所检测的结合活性的特异性即可。

[0089] 根据本发明的一些方面,可以以治疗目的应用任意一种或多种 VLA-4 结合抗体(包括那他珠单抗和/或相关的 VLA-4 结合抗体)。因此,可以使用任意一种或多种 VLA-4 结合抗体作为本发明检测测定法中的固定、检测和/或竞争结构。在一个实施方案中,VLA-4 结合抗体可以是 IgG 抗体(例如,IgG4 抗体)。在另一实施方案中,VLA-4 结合抗体可以是多克隆的或者单克隆的。仍在另一实施方案中,VLA-4 结合抗体可以是人源化形式的鼠抗体。

[0090] 例如,在 US5,840,299 中描述了那他珠单抗和相关的 VLA-4 结合抗体。mAb(单抗)21.6 和 HP 1/2 是结合 VLA-4 的鼠单克隆抗体的实例。那他珠单抗是鼠 mAb 21.6 的人源化形式(见,例如,美国专利 No. 5,840,299)。人源化形式的 HP 1/2 也已描述过(见,例如,美国专利 No. 6,602,503)。另外几种 VLA-4 结合单克隆抗体比如 HP2/1、HP2/4、L25 和 P4C2 也已描述过(例如,见美国专利 No. 6,602,503;Sanchez-Madrid et al.,1986 Eur. J. Immunol,16:1343-1349;Hemler et al.,1987 J. Biol. Chem. 264:11478-11485;Issekutz and Wykretowicz,1991, J. Immunol,147:109(TA-2 mab);Pulido et al,1991 J. Biol. Chem.,266(16):10241-10245;和美国专利 No. 5,888,507)。许多可用的 VLA-4 结合抗体与细胞(例如淋巴细胞)上的 VLA-4 相互作用,但不引起细胞聚集。然而,已观察到另一些抗-VLA-4 结合抗体引起这样的聚集。HP1/2 不引起细胞聚集。HP1/2 MAb(Sanchez-Madrid

et al., 1986 Eur. J. Immunol., 16:1343-1349) 有极高的效能, 阻断 VLA-4 与 VCAM1 和纤连蛋白的相互作用, 并且对 VLA-4 的表位 B 具有特异性。该抗体和它的 B 表位特异性抗体 (比如 B1 或者 B2 表位结合抗体; Pulido et al., 1991 J. Biol. Chem., 266(16): 10241-10245) 代表一类可用的 VLA-4 结合抗体。

[0091] 示例性 VLA-4 结合抗体具有一个或多个 CDR, 例如, 本文所公开特定抗体的所有三种 HC CDR 和 / 或所有三种 LC CDR, 或者与这种抗体 (例如那他珠单抗) 总计有至少 80、85、90、92、94、95、96、97、98 或 99% 一致性的 CDR。在一个实施方案中, H1 和 H2 超变环 (hypervariable loop) 具有与本文所述抗体的那些 H1 和 H2 超变环一样的规范 (canonical) 结构。在一个实施方案中, L1 和 L2 超变环具有与本文所述抗体的那些 L1 和 L2 超变环一样的规范结构。

[0092] 在一个实施方案中, HC 和 / 或 LC 可变结构域序列的氨基酸序列与本文所述抗体 (例如那他珠单抗) 的 HC 和 / 或 LC 可变结构域的氨基酸序列有至少 70、80、85、90、92、95、97、98、99 或者 100% 一致性。所述 HC 和 / 或 LC 可变结构域序列的氨基酸序列可以与本文所述抗体 (例如, 那他珠单抗) 的相应序列具有至少一个氨基酸、但不超过 10、8、6、5、4、3 或 2 个氨基酸的差异。例如, 所述差异可以主要或者全部在框架区中。

[0093] 所述 HC 和 LC 可变结构域序列的氨基酸序列可以由在高严谨条件下与另外序列杂交的序列来编码, 所述另外序列是本文所述的核酸序列或者编码本文所述氨基酸序列的核酸或者编码其可变结构域的核酸序列。在一个实施方案中, 所述 HC 和 / 或 LC 可变结构域的一个或多个框架区 (例如, FR1、FR2、FR3 和 / 或 FR4) 的氨基酸序列与本文所述抗体的 HC 和 LC 可变结构域的相应框架区有至少 70、80、85、90、92、95、97、98、99 或者 100% 的一致性。在一个实施方案中, 一种或多种重链或轻链框架区 (例如, HC FR1、FR2 和 FR3) 与来自人生殖系抗体的相应框架区的序列具有至少 70、80、85、90、95、96、97、98 或者 100% 的一致性。

[0094] 计算两个序列间的“同源性”或者“序列一致性” (所述术语可以在本文中互换使用) 依照以下各项实施。为最优比较目的来比对所述序列 (例如, 为了最优比对可以向第一和第二氨基酸或者核酸序列之一或者两者中引入间隙, 并且为了比对目的可以忽略非同源性序列)。应用 GCG 软件包中的 GAP 程序确定最优比对的最佳得分, 所述程序具有 Blossum 62 评分矩阵, 其中间隙罚 12 分, 间隙扩展罚 4 分和移码间隙罚 5 分。随后比较氨基酸残基或者在相应氨基酸位置的核苷酸或者核苷酸位置。当第一序列中的位置由第二序列中相应位置上的相同氨基酸残基或者核苷酸所占据时, 那么在该位置上所述分子是一致的 (本文应用的氨基酸或者核酸“一致性”等同于氨基酸或者核酸“同源性”)。两个序列间的一致性百分率是所述序列共享的一致性位置数目的函数。

[0095] 技术人员应意识到, 在 VLA-4 结合抗体中可发生保守性氨基酸替换, 从而提供所述抗体的功能等同的变体, 即, 所述变体保留了 VLA-4 多肽的功能性。如本文所用的, “保守性氨基酸替换” 是指不改变发生氨基酸替换的蛋白质中相对电荷或者大小特性的氨基酸替换。可以根据本领域技术人员公知的改变多肽序列的方法来制备变体, 比如这些方法汇编在文献中, 例如, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, 或者 Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York。VLA-4 结合抗体的示例性功能等同变体包括在本文所公开

蛋白质的氨基酸序列中的保守性氨基酸替换。氨基酸的保守性替换包括在以下组之内的氨基酸中发生的替换：(a) M、I、L、V；(b) F、Y、W；(c) K、R、H；(d) A、G；(e) S、T；(f) Q、N；和 (g) E、D。

[0096] 如本文所用的，术语“在高严谨条件下杂交”描述用于杂交和清洗的条件。实施杂交反应的指导可以在 *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 中找到，其通过参考并入本文。在该文献中描述了水性和非水性的方法，可以应用其任一种方法。高严谨杂交条件包括在约 45℃ 在 6×SSC 中杂交，然后在 65℃ 在 0.2×SSC、0.1% SDS 中清洗一或多次，或者基本相似的条件。

[0097] 可以检验抗体的功能特性，例如 VLA-4 结合性，例如，根据美国专利 No. 6,602,503 的描述。

[0098] 抗体生成

[0099] 可以通过免疫法产生结合 VLA-4 的抗体，例如，利用动物。可以利用 VLA-4 的全部或者部分作为免疫原。例如，可以用 α -4 亚基的细胞外区域作为免疫原。在一个实施方案中，被免疫的动物含有产生免疫球蛋白的细胞，所述细胞具有天然的、人的或者部分人的免疫球蛋白基因座。在一个实施方案中，所述非人动物包括至少一部分的人免疫球蛋白基因。例如，能够工程化改造小鼠抗体生成有缺陷的小鼠品系，使其具有大片段的人 Ig 基因座。应用杂交瘤技术，可以产生并选择具有期望特异性的源于所述基因的抗原特异性单克隆抗体。见，例如，XenoMouse™, Green et al. *Nature Genetics* 7:13-21 (1994)，美国公开专利申请 No. 2003-0070185、美国专利 No. 5,789,650 和 W096/34096。例如，还可以在啮齿动物中产生针对 VLA-4 的非人抗体。非人抗体可以被入源化，例如，描述于美国专利 No. 6,602,503、EP239400、美国专利 No. 5,693,761 和美国专利 No. 6,407,213。

[0100] EP239400 (Winter et al.) 描述了通过用一个物种替换另一物种互补决定区 (CDR) (在指定可变区域内) 来改变抗体。预计 CDR 替换的抗体与真正的嵌合抗体相比有更少可能在人中引起免疫应答，因为所述 CDR 替换的抗体包含相当少的非人成分 (Riechmann et al., 1988, *Nature* 332, 323-327; Verhoeyen et al., 1988, *Science* 239, 1534-1536)。典型地，通过应用重组核酸技术将鼠抗体的 CDR 替换为人抗体的相应区域，从而产生编码期望替换抗体的序列。可以添加期望亚型的人恒定区基因片段 (通常对 CH 为 γ I 和对 CL 为 κ) 并且在哺乳动物细胞中共表达入源化重链和轻链基因，从而产生可溶性入源化抗体。

[0101] Queen et al., 1989 *Proc Natl Acad Sci U S A* Dec; 86(24):10029-33 和 W090/07861 已描述了一种方法，其包括通过计算机分析针对与来源鼠抗体 V 区框架的最优蛋白质序列同源性来选择人 V 框架区，并建立鼠 V 区的三级结构模型从而显现可能与鼠 CDR 相互作用的框架氨基酸残基。随后，将这些鼠氨基酸残基叠加在同源的人框架之上。还可参见美国专利 No. 5,693,762; 5,693,761; 5,585,089 和 5,530,101。Tempest et al., 1991, *Biotechnology* 9, 266-271) 利用对于 CDR 移植分别源于 NEWM 和 REI 重链和轻链的 V 区框架作为标准，而没有大量引入小鼠残基。应用 Tempest et al., 的方法构建基于 NEWM 和 REI 的入源化抗体的优点是，通过 x 射线晶体学已经知道 NEWM 和 REI 可变区的三维结构并且由此可以对 CDR 和 V 区框架残基之间的特异性相互作用建立模型。

[0102] 可以修饰非人抗体以包括在特定位置插入人免疫球蛋白序列 (例如共有人氨基酸残基) 的替换，所述特定位置例如以下一个或多个位置 (优选至少五个、十个、十二

个或者全部):(在轻链可变结构域的FR中)4L、35L、36L、38L、43L、44L、58L、46L、62L、63L、64L、65L、66L、67L、68L、69L、70L、71L、73L、85L、87L、98L、和/或(在重链可变结构域的FR中)2H、4H、24H、36H、37H、39H、43H、45H、49H、58H、60H、67H、68H、69H、70H、73H、74H、75H、78H、91H、92H、93H、和/或103H(根据Kabat编号方式))的取代。例如,见美国专利No. 6, 407, 213。

[0103] 正如对于本领域技术人员是显而易见的,本发明还提供F(ab')₂、Fab、Fv和Fd片段;嵌合抗体,其中Fc和/或FR和/或CDR1和/或CDR2和/或轻链CDR3区已被同源的人或者非人序列所替代;嵌合F(ab')₂片段抗体,其中FR和/或CDR1和/或CDR2和/或轻链CDR3区已被同源的人或者非人序列所替代;嵌合Fab片段抗体,其中FR和/或CDR1和/或CDR2和/或轻链CDR3区已被同源的人或者非人序列所替代;和嵌合Fd片段抗体,其中FR和/或CDR1和/或CDR2区已被同源的人或者非人序列所替代。

[0104] 在某些实施方案中,VLA-4结合抗体可以是VLA-4单链抗体、单结构域抗体或者NanobodyTM。这些抗体类型中每一种的特性以及它们的应用方法在本领域中是众所周知的。NanobodiesTM是抗体的最小功能性片段并且是源于天然的单链抗体(见Ablynx, Belgium; ablynx.com)。NanobodyTM技术是根据以下发现发展而来的, camelidae(骆驼 camels 和骆驼 llamas) 拥有独特的缺少轻链的全功能抗体的储库(repertoire)。NanobodyTM结构由单可变结构域(VHH)、铰链区和两个恒定结构域(CH2和CH3)组成。克隆的和分离的VHH结构域是稳定的多肽,其拥有原始重链的全部抗原结合能力。NanobodyTM将常规抗体的特性和小分子药物的特性结合在一起。NanobodyTM显示出高靶向特异性和低自身毒性。另外, NanobodyTM是非常稳定的,可以通过注射以外的手段施用,并且易于制造。在某些实施方案中,治疗性VLA-4结合抗体、固定结构和/或检测结构可以是人源化NanobodyTM。

[0105] 抗体生产

[0106] 可以应用,例如,体外致敏的人脾细胞来产生结合VLA-4的完全人单克隆抗体,如Boerner et al., 1991, J. Immunol., 147, 86-95描述的。它们可以通过全功能克隆(repertoire cloning)来制备,如Persson et al., 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 88 : 2432-2436或者Huang and Stollar, 1991, J. Immunol. Methods 141, 227-236. US5, 798, 230描述的。还可以应用大的非免疫人噬菌体展示文库分离高亲和性抗体,应用标准噬菌体技术可以将所述抗体开发为人治疗剂(见,例如, Vaughan et al, 1996 NatBiotechnol. Mar ;14(3) :309-14 ;Hoogenboom et al. (1998) Immunotechnology 4 :1-20 ;和Hoogenboom et al. (2000) Immunol Today 2 :371-8 ;美国公开专利申请 No. 2003-0232333)。可以在原核细胞和真核细胞中生产抗体。在一个实施方案中,在酵母细胞比如毕赤酵母属(见,例如, Powers et al. (2001) J Immunol Methods. 251 :123-35)、汉逊酵母属或者酵母属(Saccharomyces)细胞中表达所述抗体(例如, scFv)。在一个实施方案中,在哺乳动物细胞中生产抗体,尤其是全长抗体,例如IgG。用于重组表达的典型哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)(包括dhfr-CHO细胞,见 Urlaub and Chasin(1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 :4216-4220,与DHFR选择标记一起使用,例如,见 Kaufman and Sharp(1982) Mol. Biol. 159 :601-621)、淋巴细胞系,例如, NS0骨髓瘤细胞和SP2细胞、COS细胞、K562和来自转基因动物(例如,转基因哺乳动物)的细胞。例如,所述细胞是乳腺上皮细胞。

[0107] 除了编码免疫球蛋白结构域的核酸序列之外,重组表达载体可以携带有其它序列,比如调节所述载体在宿主细胞中复制的序列(例如复制起点)和选择标记基因。所述的选择标记基因帮助选择已引入载体的宿主细胞(见,例如,美国专利 No. 4, 399, 216、4, 634, 665 和 5, 179, 017)。选择标记基因的实例包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于具有甲氨蝶呤选择/扩增的 dhfr- 宿主细胞)和 neo 基因(用于 G418 选择)。

[0108] 在用于抗体(例如,全长抗体或者其抗原结合部分)重组表达的实例系统中,通过磷酸钙介导转染将编码抗体重链和抗体轻链的重组表达载体引入 dhfr-CHO 细胞。在重组表达载体内,抗体的重链和轻链基因分别可操作性地连接至增强子/启动子调节元件(例如,源于 SV40、CMV、腺病毒等,比如 CMV 增强子/AdMLP 启动子调节元件或者 SV40 增强子/AdMLP 启动子调节元件)以驱动高水平的基因转录。重组表达载体还携带 DHFR 基因,其允许应用甲氨蝶呤选择/扩增来选择已转染了所述载体的 CHO 细胞。培养选择的转化宿主细胞以允许表达抗体重链和轻链并且从培养基中收集完整抗体。应用标准的分子生物学技术制备重组表达载体、转染宿主细胞、选择转化体、培养宿主细胞和从培养基收集抗体。例如,可以通过应用蛋白质 A 或者蛋白质 G 的亲亲和层析来分离一些抗体。US6, 602, 503 也描述了表达和纯化 VLA-4 结合抗体的典型方法。

[0109] 抗体还可以包括修饰,例如,改变 Fc 功能的修饰,例如从而降低或者消除与 Fc 受体、或者与 C1q 或者与两者的相互作用。例如,人 IgG1 恒定区可以在一个或多个残基上被突变,例如残基 234 和 237 的一个或多个,例如,根据美国专利 No. 5, 648, 260 的编号方式。其它示例性修饰包括在美国专利 No. 5, 648, 260 中描述的那些修饰。

[0110] 对于包括 Fc 结构域的一些抗体,可以设计抗体生产系统以合成 Fc 区被糖基化的抗体。例如 IgG 分子的 Fc 结构域在 CH2 结构域中 297 位天冬酰胺被糖基化。该天冬酰胺是用双触角型寡糖修饰的位点。该糖基化参与由 Fc γ 受体和补体 C1q 介导的效应子功能(Burton and Woof(1992)Adv. Immunol. 51:1-84;Jefferis et al.(1998)Immunol. Rev. 163:59-76)。可以在哺乳动物表达系统中生产所述 Fc 结构域,所述表达系统适当地将对天冬酰胺 297 的残基糖基化。所述 Fc 结构域还可以包括其它的真核翻译后修饰。

[0111] 还可以通过转基因动物产生抗体。例如,美国专利 No. 5, 849, 992 描述了在转基因哺乳动物的乳腺中表达抗体的方法。构建转基因使之包括乳特异性启动子和编码目标抗体的核酸以及用于分泌的信号序列。由这样的转基因哺乳动物的雌性动物产生的乳包含分泌于其中的目标抗体。可以从乳中纯化所述抗体,或者对于一些应用来说,可以直接使用。

[0112] 如本文所用的,本发明的 VLA-4 结合抗体可以是基本全长的 VLA-4 结合抗体或者其功能片段。例如,如果 VLA-4 结合抗体的片段足以允许特异性结合 VLA-4 结合抗体的抗体与其特异性结合的话,它就是功能性 VLA-4 结合抗体并且可以用于本发明的方法和试剂盒。本领域的技术人员应能够仅应用常规方法和结合测定来鉴定 VLA-4 结合抗体片段以及确定 VLA-4 结合抗体片段是否是功能性 VLA-4 结合抗体片段。因此,在本文中提供的对应用固定和非固定化 VLA-4 结合抗体的方法的描述和实施例,还将适用于应用功能性固定和非固定化的 VLA-4 结合抗体片段。

[0113] 标记和检测

[0114] 本发明的一些方面包括应用非固定的、抗治疗性蛋白质抗体(例如,VLA-4 结合抗体)作为检测结构来评价结合固定化抗治疗性蛋白质(例如,靶 VLA-4 结合抗体)的抗体

的可溶性结合活性的存在和 / 或水平。评价可溶性结合活性存在和 / 或水平的方法可以包括应用一种或多种标记的检测结构 (例如, 包含有或者附着于检测标记的 VLA-4 结合抗体)。检测标记被定义为可以应用测定法检测的任何结构。本发明的抗体和功能性抗体片段可以根据标准偶联方法被偶联于用于检测结合的特异性标记剂。可以应用许多种检测标记, 比如提供直接检测 (例如, 放射性标记、荧光团 [例如, 绿色荧光蛋白 (GFP)、红色荧光蛋白 (RFP) 等]、发色团、光学或者电子致密标记等) 或者间接检测 (例如, 酶标签比如辣根过氧化物酶) 的那些标记。已被附着于或者掺入抗体的检测标记的非限制性实例包括: 酶、放射性标记、荧光标记、磷光分子、化学发光分子、发色团、发冷光分子、光亲和性分子 (photoaffinity molecules) 和有色颗粒或者配体比如生物素等。此外, 本发明的检测方法可以包括电化学发光方法 (electrochemiluminescence) (ECL)。

[0115] 可以应用许多方法检测标记, 这取决于所述标记和其它测定成分的性质。可以通过光学或者电子密度、放射性发射、非放射性能量转移等直接检测标记, 或者用抗体偶联物、链亲合素-生物素偶联物等间接检测标记。其它许多可检测标记在本领域中是已知的, 将它们附着于抗体的方法也是如此。

[0116] 本发明的标记抗体可以是用于体外的抗体, 例如, 用于免疫测定比如 ELISA 中。这些可检测的标记抗体可以是已掺入检测标记的抗体或者可以是连接至第二结合配体和 / 或酶 (酶标签) 的抗体, 一旦与发色底物接触时所述酶将生成有色产物。合适酶的实例包括脲酶、碱性磷酸酶、(辣根) 过氧化氢酶或者葡萄糖氧化酶。优选的第二结合配体是生物素和 / 或亲合素和链亲合素化合物。这些标记的应用对于本领域的技术人员是公知的并且被描述于, 例如, 美国专利 No. 3, 817, 837 ; 3, 850, 752 ; 3, 939, 350 ; 3, 996, 345 ; 4, 277, 437 ; 4, 275, 149 和 4, 366, 241 ; 其每一篇通过参考并入本文。

[0117] 将抗体附着于或者偶联于其检测标记的各种方法在本领域中是公知的。附着方法可以包括将金属螯合复合物附着于抗体, 其中应用例如有机螯合剂比如二亚乙基三胺五乙酸酐 (DTPA) ; 亚乙基三胺四乙酸 ; N- 氯 - 对 - 甲苯磺酰胺 ; 和 / 或四氯 -3 α -6 α - 二苯基甘脲 -3 (美国专利 No. 4, 472, 509 和 4, 938, 948, 其每一篇通过参考并入本文)。单克隆抗体还可以在偶联剂 (比如戊二醛或者高碘酸盐) 存在条件下与酶反应。在这些偶联剂存在的条件下或者通过与异硫氰酸反应可以用荧光标记来标记抗体。在另一些实施方案中, 可以通过衍生化作用, 应用不改变抗体识别位点的反应条件, 例如在抗体 Fc 区中选择性引入巯基基团, 来标记抗体。

[0118] 在本发明测定法中对检测标记的检测在本文中还被称为检测“信号”。在免疫测定中检测信号的方法在本领域中是众所周知的。在本发明的一些重要实施方案中, 可以应用多孔板读取器 (例如, 微板读取器) 检测所述测定信号来评价信号的量和 / 或位置。信号检测可以是光学检测或者其它适于检测用于本发明的检测标记的检测手段。检测标记的其它方法在本领域中是众所周知的并且可用于本发明的方法。本发明的方法包括 ELISA, 其对检测特异性结合 VLA-4 结合抗体的抗体有敏感性, 其中该敏感性为至少约 1000ng、500ng 或者 50ng。在一些优选实施方案中, 检测特异性结合 VLA-4 结合抗体的抗体的 ELISA 敏感性是至少约 500ng。

[0119] 通常, 通过施用许多方法可以实现对免疫复合物形成的检测。这些方法通常基于对标记 (label) 或者标志物 (marker) 的检测, 比如任何的放射性、荧光性、生物性和酶标

签。关于应用这些标记的美国专利包括美国专利 No. 3, 817, 837 ;3, 850, 752 ;3, 939, 350 ; 3, 996, 345 ;4, 277, 437 ;4, 275, 149 和 4, 366, 241, 其每一篇通过参考并入本文。当然, 通过应用第二结合配体比如第二抗体和 / 或生物素 / 亲合素配体结合方案可以发现额外的优点, 这是本领域中所知的。

[0120] 应当理解的是, 可以应用在本文中描述的用来获得和产生 VLA-4 结合抗体 (例如那他珠单抗) 的技术来获得和产生以高亲和性结合 VLA-4 结合抗体的参考抗体 (例如, 高亲和性那他珠单抗结合抗体 (例如, 12C4))。

[0121] 试剂盒

[0122] 本发明的一部分还涉及测定样品中是否存在针对 VLA-4 结合抗体的免疫应答的试剂盒。所述试剂盒的实例可以包括上述抗体, 包括但不限于那他珠单抗或者其它的 VLA-4 结合抗体, 或者其片段。试剂盒可以包括可检测标记的和 / 或未标记的抗体并且可以包括用于检测性标记抗体的溶液和化合物。本发明的试剂盒还可以包括一种或多种以下组分: 板、移液器、小瓶、检测标记、溶液 (例如, 封闭缓冲液、清洗缓冲液、结合溶液、稀释溶液等)、阳性和 / 或阴性对照样品和溶液。本发明的试剂盒还可以包括用于应用试剂盒鉴定生物学样品中针对 VLA-4 结合抗体的免疫应答的书面使用说明。本发明的试剂盒还可以包括用于实施阳性和 / 或阴性 ELISA 对照测定的其它组分。本发明的试剂盒还可以包含用于本发明方法的装备, 比如读板器和 / 或自动仪器。

[0123] 实施例

[0124] 实施例 1: 那他珠单抗免疫原性测定

[0125] 测定形式和设计基于桥连酶联免疫吸附测定 (ELISA)。应用适于桥连测定的标准试剂和方法。简单地说, 应用标准方法将那他珠单抗吸附于微滴定板的表面, 随后通过封闭步骤使血清抗体的非特异性结合最小化。稀释对照和样品并加到孔中。应用标准方法, 通过将板和生物素 - 那他珠单抗一起孵育, 之后与链亲合素 - 碱性磷酸酶 (SA-AP) 一起孵育来完成对结合的抗那他珠单抗抗体的检测。显色程度与结合的抗那他珠单抗抗体的量成比例。

[0126] 在板包被缓冲液中将那他珠单抗稀释到特定的浓度, 在环境温度下将其孵育在 96 孔微滴定 ELISA 板中过夜。推荐的体积是 100 μ l / 孔。用清洗缓冲液清洗该板, 随后在环境温度下用封闭缓冲液孵育超过 1 小时。封闭缓冲液的体积是 200 μ l / 孔。用清洗缓冲液清洗该板, 并随后用在测定稀释剂 (添加或者没有添加那他珠单抗 (100 μ g/ml 终浓度)) 中稀释为 1 : 10 的质量控制和对象 (患者) 样品在环境温度下孵育 2 小时 $\pm$ 15 分钟。包含添加那他珠单抗的测定稀释剂代表确认步骤。测定稀释剂的体积是 100 μ l / 孔。接下来在清洗缓冲液中清洗所述板, 随后在环境温度下与 SA-AP 一起孵育 30-35 分钟。与 SA-AP 一起孵育的体积是 100 μ l / 孔。接下来在清洗缓冲液中清洗该板, 随后在环境温度下与 AP 底物、磷酸对硝基苯酯 (PNPP) 一起孵育 45-50 分钟。在 AP 底物中孵育的体积是 100 μ l / 孔。随后直接向底物反应混合物添加终止溶液 (例如 H₂SO₄ 等) 并在 405nm 处读取光密度 (OC)。

[0127] 为了使测定可以接受, 阳性和阴性对照必须提供在预定值和精度之内的结果。对于评价对象 (患者) 样品的结果来说, 如果它们的 OD 值落在规定的阴性截断质量控制样品之下, 那么就判断所述样品为阴性。如果它们的 OD 值位于规定的阴性截断质量控制样品之

上并且在确认步骤中由于添加那他珠单抗而引起的对象（患者）样品信号的抑制小于预定百分率的话，也判断样品为阴性。如果它们的 OD 值位于规定的阴性截断质量控制样品之上并且在确认步骤中由于添加那他珠单抗而引起的对象（患者）样品的抑制大于或者等于预定百分率的话，就判断样品为阳性。

[0128] 实施例 2：筛选测定针对 VLA-4 抗体的免疫应答

[0129] 对来自对象的样品实施筛选测定（如上所述），所述对象已施用了那他珠单抗。在已施用了那他珠单抗的患者中检测是否存在针对 VLA-4 抗体的免疫应答。

[0130] 对来自已施用那他珠单抗的对象的生物学样品，应用实施例 1 中描述的方法，检验特异性结合那他珠单抗的可溶性抗体的存在。

[0131] 所述检验包括应用高亲和性 mAb（单抗）作为阳性对照。该高亲和性 mAb 检测存在于来自对象的生物学样品中的结合抗体（例如，结合那他珠单抗的抗体）。确定阴性截断水平为返回可接受准确度 / 精密度（25% / 25%）的最低浓度；在 10% 血清中为 50ng/mL。在原（未稀释）血清中，所述 mAb 的敏感性是 500ng/mL。对于敏感性，所述 mAb 被确定为检测抗 - 那他珠单抗的抗体，但是对不相关的人单克隆抗体不敏感。样品中其它分子或者组分对所述 mAb 的干扰被确定为包括在 mAb：药物比率大于 1：2 时游离药物引起的干扰。图 1 举例说明了游离那他珠单抗干扰抗 - 那他珠单抗抗体免疫测定的影响。还发现类风湿因子也干扰该测定。

[0132] 除了在实施例 1 和 2 中描述的筛选测定，还实施了用来评价所述筛选测定中结合的表征测定。应用流式细胞术阻断测定，对来自已施用那他珠单抗的对象的生物学样品，检验其中特异性结合那他珠单抗的可溶性抗体的存在。应用高亲和性 mAb 作为阳性对照。所述测定检测阻断性抗体。关于所用 mAb 的阴性截断水平被确定为在从未给药患者获取的血清中平均测量水平之上 3-4 倍标准偏差。有 5% 的假阳性率并且测定敏感性为 500ng/ml 的原血清。检验所述 mAb 的特异性并且所述 mAb 被确定为检测抗 - 那他珠单抗的抗体，但是发现对不相关的人单克隆抗体不敏感。还检测了游离药物对测定的干扰。所述测定显示存在游离药物的干扰。由于游离药物引起的阻断测定干扰的评价结果显示在图 2 中。

[0133] 关于那他珠单抗的阻断测定

[0134] 结果

[0135] 比较所述的筛选和阻断测定的阳性结果。有 217 个阻断测定阳性和 222 个筛选测定阳性，因此有 5% 的差异和 98% 的一致性。因此，所述筛选测定提供对象针对治疗性 VLA-4 结合抗体的免疫应答的准确测量。

[0136] 实施例 3

[0137] 对来自已施用那他珠单抗的 625 名对象的样品实施筛选测定（如实施例 1 和 2 中描述）。在已施用那他珠单抗的患者中检测针对 VLA-4 抗体的免疫应答的存在。在患者中检测到针对那他珠单抗的抗体的发生率是：91%（569 名患者）抗体阴性和 9%（56 名患者）“结合抗体”阳性，并且在任何时间点上具有 3%（19 名患者）“一过性”阳性和 6%（37 名患者）“持续”阳性。所述一过性阳性患者在单个时间点上具有可检测抗体（浓度为 $> 0.5 \mu\text{g/ml}$ ），但是在其它所有时间点上为抗体阴性。所述持续阳性患者在两个或者多个时间点上（所述时间点至少间隔 42 天）或者在没有跟踪样品检验的单个时间点上具有可检测抗体。

[0138] 图 3 显示产生任何抗体的患者中第一阳性结果的时间。6% 的患者产生了针对那他珠单抗的“持续”抗体。在第 12 周时,超过 90% 的最初持续阳性患者具有可检测抗体。在第 36 周后没有对象变为持续抗体阳性。在第 12 周时,一过性阳性患者具有可检测抗体,但是随后变为抗体阴性。

[0139] 分析这些结果以确定在治疗患者中抗体对原发病症复发率的影响。图 4 举例说明抗体对复发率的总体影响。还评价了对象从施用那他珠单抗起复发时间的影响。图 5A-D 分别描述了在 0-3 个月、3-6 个月、6-9 个月和 9-12 个月时的复发率。

[0140] 结果

[0141] 这些结果表明在治疗最开始的 3 个月期间,没有明显的抗体影响。从 3-6 个月,“一过性”抗体阳性患者显示那他珠单抗治疗功效的降低。“持续”抗体阳性患者显示丧失了那他珠单抗治疗的很多功效。从 6-12 个月,在“一过性”抗体阳性患者中功效完全恢复,但是在“持续”抗体阳性患者中没有。因此,鉴定一过性抗体阳性患者作为继续 VLA-4 结合抗体治疗的靶群体是重要的。

[0142] 等同物

[0143] 本领域的技术人员应当承认,或者能够确定,针对本发明具体实施方案的许多等同物仅需要常规试验。这样的等同物也被涵盖于以下的权利要求中。

[0144] 本文公开的所有参考文献,包括专利文件,都以整体通过参考并入本文。如果有抵触的话,将以本申请包括本文中任何定义为准。

[0145] 已使用的术语和表述被用作说明性术语,但没有限制的意思,并且没有应用这些术语和表述而排除所显示和描述的任何等同物或者其部分的意思,应承认在本发明范围内可以进行各种改进和变化。

游离那他珠单抗对抗那他珠单抗抗体免疫测定的干扰

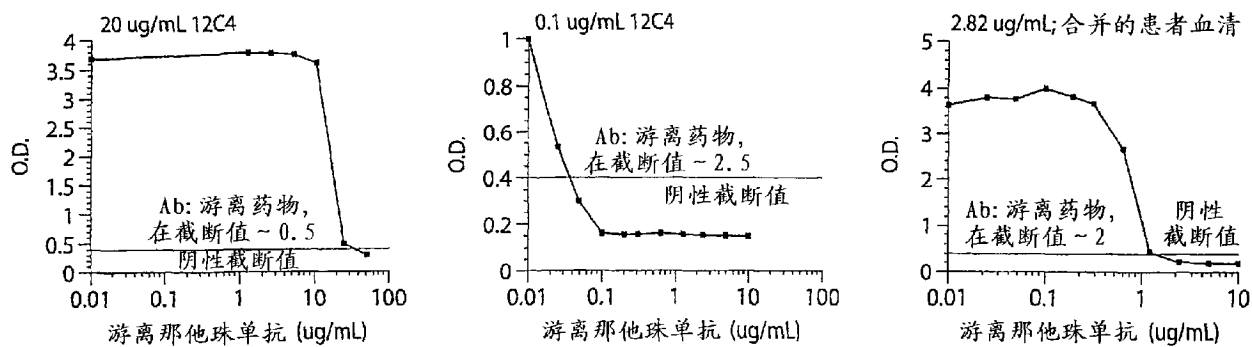


图1

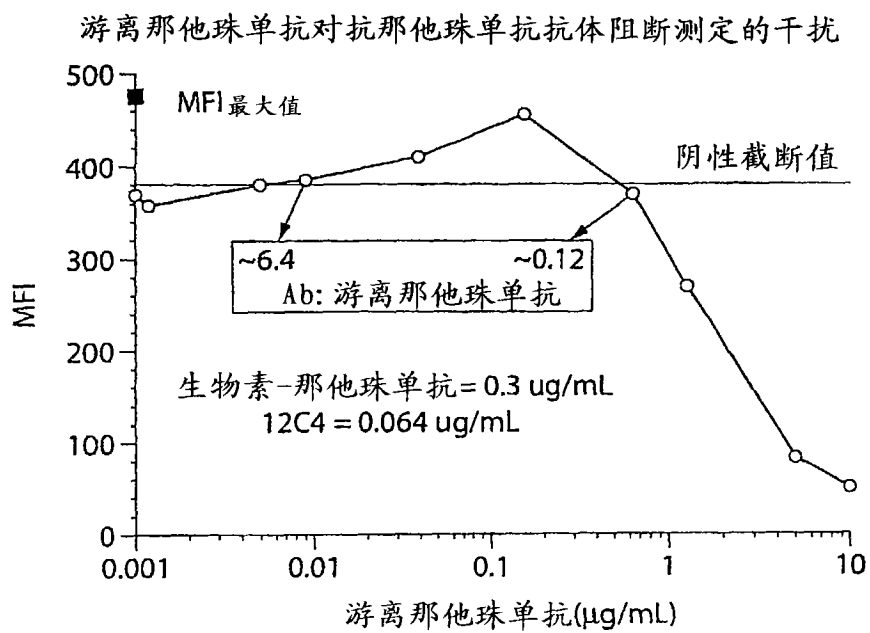


图2

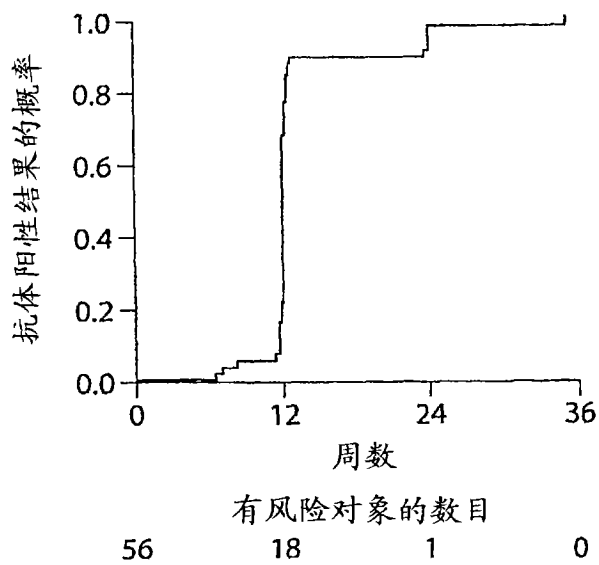


图3

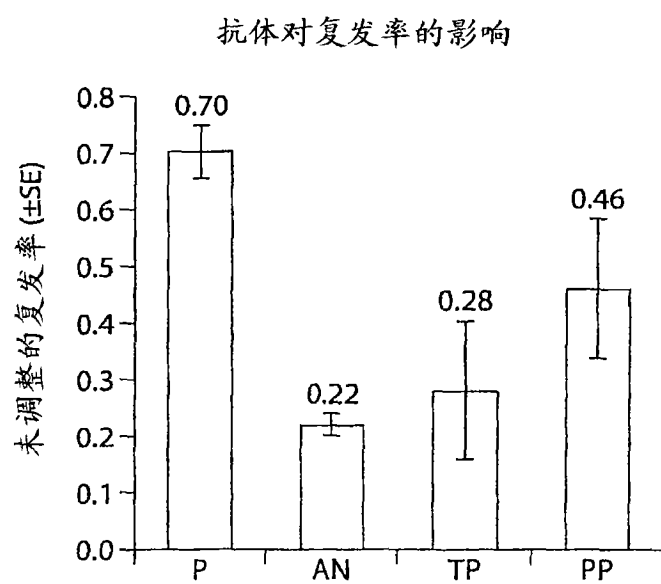


图 4

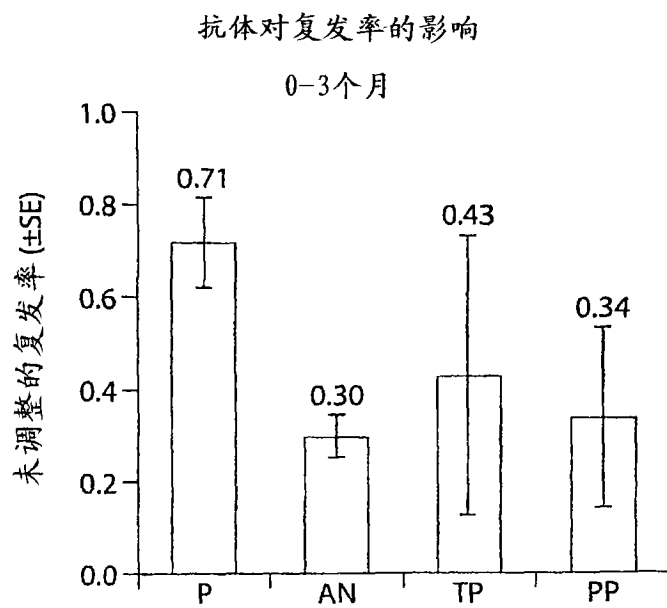


图 5A

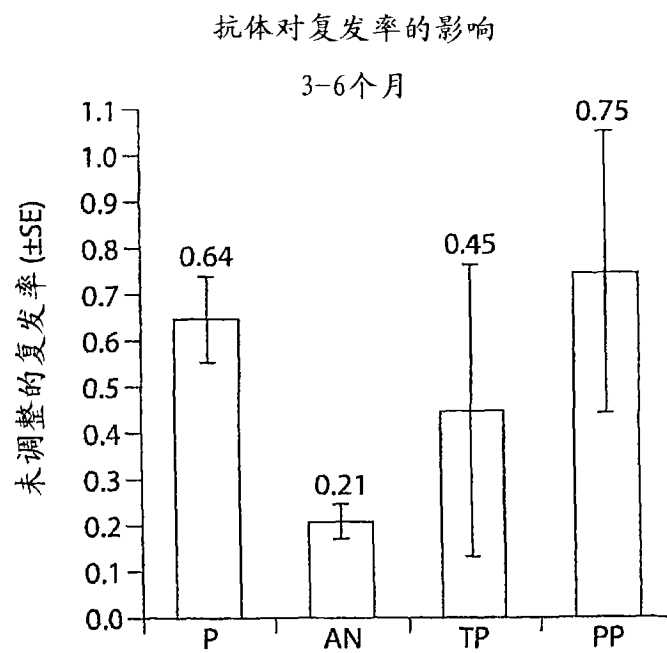


图 5B

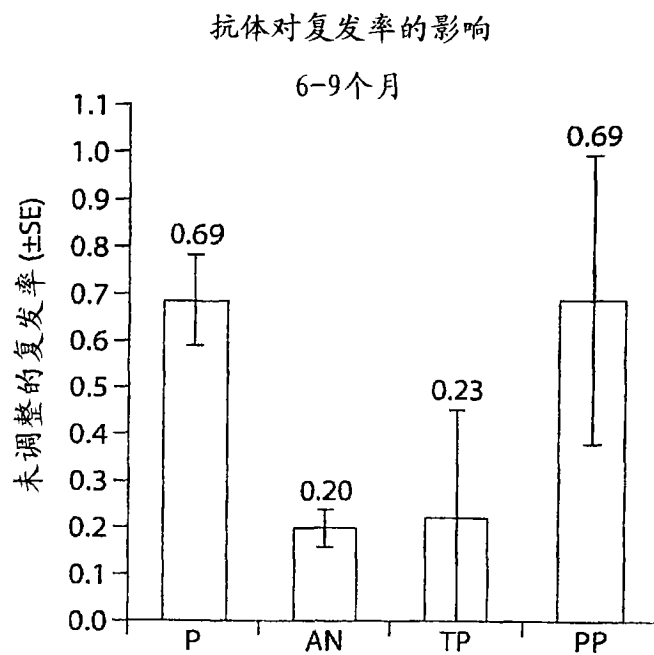


图 5C

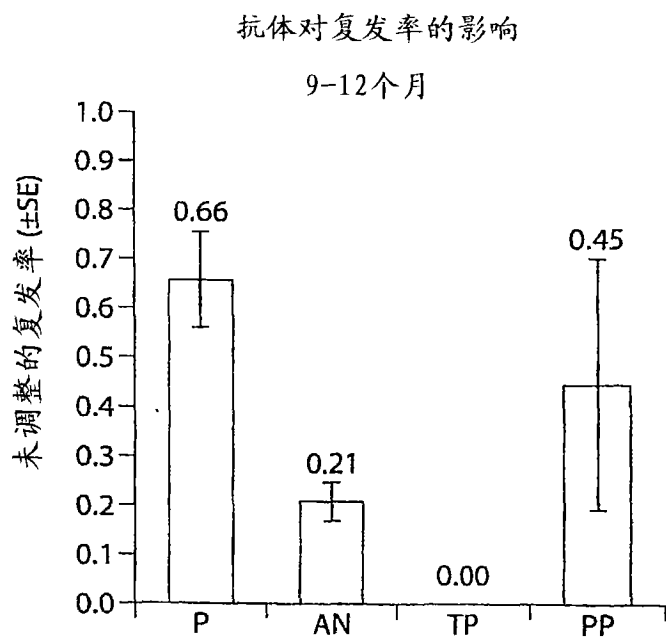


图 5D