



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105378480 B

(45)授权公告日 2018.06.12

(21)申请号 201480037364.5

(22)申请日 2014.07.01

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105378480 A

(43)申请公布日 2016.03.02

(30)优先权数据

13175091.1 2013.07.04 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.12.29

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2014/063891 2014.07.01

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/000865 EN 2015.01.08

(73)专利权人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 K-G·施图本拉赫 R·福格尔

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

(56)对比文件

CN 101896820 A,2010.11.24,

CN 103476793 A,2013.12.25,

Kay Stubenrauch et al.Generic anti-drug antibody assay with drug tolerance in serum samples from mice exposed to human antibodies.《Anal. Biochem.》.2012,第430卷(第2期),

Kay Stubenrauch et al.Subset Analysis of Patients Experiencing Clinical Events of a Potentially Immunogenic Nature in the Pivotal Clinical Trials of Tocilizumab for Rheumatoid Arthritis.《Clinical Therapeutics》.2010,第32卷(第9期),

James S. Bourdage et al.Effect of double antigen bridging immunoassay format on antigen coating concentration dependence and implications for designing immunogenicity assays for monoclonal antibodies.《Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis》.2005,第39卷(第3-4期),

Zhihua Julia Qiu et al.A novel homogeneous Biotin-digoxigenin based assay for the detection of human anti-therapeutic antibodies in autoimmune serum.《Journal of Immunological Methods》.2010,第362卷(第1-2期),

审查员 王在竹

权利要求书2页 说明书33页 附图8页

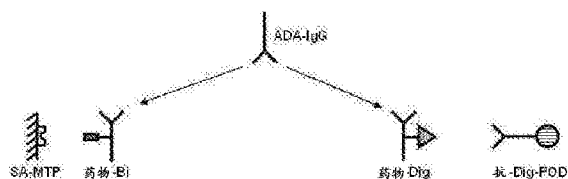
(54)发明名称

检测血清样品中抗药物抗体的干扰抑制性免疫测定

(57)摘要

本文中报道了包含捕获药物抗体和示踪药物抗体的用于检测样品中的针对药物抗体的抗药物抗体的酶联免疫吸附测定,其中捕获药物抗体和示踪药物抗体以0.5 μg/ml或更大的浓度使用,将样品同时与捕获药物抗体和示踪药物抗体孵育1至24小时,将捕获药物抗体和示踪药物抗

体经由单个赖氨酸残基衍生化,所述样品包含10%血清,并且在与捕获药物抗体和示踪药物抗体孵育之前,向样品添加寡聚人IgG。



1. 包含捕获药物抗体和示踪药物抗体的用于检测类风湿性关节炎患者的样品中针对药物抗体的抗药物抗体的方法, 其中

- a) 捕获药物抗体和示踪药物抗体具有0.5 μ g/ml或更大的浓度,
- b) 将样品同时与捕获药物抗体和示踪药物抗体孵育0.5至24小时,
- c) 将捕获药物抗体和示踪药物抗体各自经由单个赖氨酸残基仅衍生一次,
- d) 样品包含1%或更多的血清/血浆,
- e) 与捕获药物抗体和示踪药物抗体孵育之前, 向样品添加寡聚人IgG, 并且
- f) 单体生物素和洋地黄毒甙分别标记在捕获药物抗体和示踪药物抗体上。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中样品包含5%或更多的血清。

3. 根据权利要求2所述的方法, 其中样品包含7.5%或更多的血清。

4. 根据权利要求1所述的方法, 其中样品包含抗药物抗体和类风湿因子。

5. 包含捕获药物抗体和示踪药物抗体的用于检测类风湿性关节炎患者的样品中针对药物抗体的抗药物抗体的方法, 其中

- a) 在酶联免疫吸附测定中捕获药物抗体和示踪药物抗体具有0.5 μ g/ml或更大的浓度,
- b) 将样品同时与捕获药物抗体和示踪药物抗体孵育0.5至24小时,
- c) 捕获药物抗体是捕获药物抗体和特异性结合对的第一组分的1:1缀合物并且示踪药物抗体是示踪药物抗体和可检测标记物的1:1缀合物,
- d) 样品包含1%或更多的血清, 和
- e) 用捕获药物抗体和示踪药物抗体孵育之前, 向样品添加寡聚人IgG。

6. 根据权利要求5所述的方法, 其中样品包含5%或更多的血清。

7. 根据权利要求6所述的方法, 其中样品包含7.5%或更多的血清。

8. 根据权利要求5所述的方法, 其中样品包含抗药物抗体和类风湿因子。

9. 根据权利要求1至8中任一项的方法, 其中药物抗体是抗炎症抗体。

10. 根据权利要求9的方法, 其中抗炎症抗体是用于治疗类风湿性关节炎、或青少年关节炎、或骨关节炎、或Castleman病、或系膜增生性肾小球肾炎的抗体。

11. 根据权利要求1至8中任一项的方法, 其中药物抗体是抗癌抗体。

12. 根据权利要求11的方法, 其中抗癌抗体是用于治疗骨髓瘤或浆细胞瘤的抗体。

13. 根据权利要求1至8中任一项的方法, 其中药物抗体是抗IL6R抗体。

14. 根据权利要求13的方法, 其中抗IL6R抗体是托珠单抗。

15. 根据权利要求1至8中任一项的方法, 其中捕获药物抗体和示踪药物抗体具有约0.5 μ g/ml至约10 μ g/ml的浓度。

16. 根据权利要求1至8中任一项的方法, 其中捕获药物抗体和示踪药物抗体具有约1 μ g/ml至约5 μ g/ml的浓度。

17. 根据权利要求1至8中任一项的方法, 其中捕获药物抗体和示踪药物抗体具有约1.4 μ g/ml至约1.8 μ g/ml的浓度。

18. 根据权利要求1至8中任一项的方法, 其中捕获药物抗体和示踪药物抗体具有约1.45 μ g/ml至约1.6 μ g/ml的浓度。

19. 根据权利要求1至8中任一项的方法, 其中捕获药物抗体和示踪药物抗体具有约1.5 μ g/ml的浓度。

20. 根据权利要求1至8中任一项的方法,其中孵育时间是至少6小时。
21. 根据权利要求1至8中任一项的方法,其中孵育时间是至少12小时。
22. 根据权利要求1至8中任一项的方法,其中孵育时间是至少16小时。
23. 根据权利要求1至8中任一项的方法,其中孵育时间是最多24小时。
24. 根据权利要求1至8中任一项的方法,其中孵育时间在4小时和24小时之间。
25. 根据权利要求1至8中任一项的方法,其中孵育时间在6小时和24小时之间。
26. 根据权利要求1至8中任一项的方法,其中孵育时间在12小时和24小时之间。
27. 根据权利要求1至8中任一项的方法,其中孵育时间在12小时和20小时之间。
28. 根据权利要求1至8中任一项的方法,其中孵育时间在14小时和18小时之间。
29. 根据权利要求1至8中任一项的方法,其中孵育时间是约16小时。
30. 根据权利要求1至8中任一项的方法,其中将寡聚人IgG添加至终浓度10 μ g/mL至1000 μ g/mL。
31. 根据权利要求1至8中任一项的方法,其中将寡聚人IgG添加至终浓度15 μ g/mL至500 μ g/mL。
32. 根据权利要求1至8中任一项的方法,其中将寡聚人IgG添加至终浓度20 μ g/mL至250 μ g/mL。
33. 根据权利要求1至8中任一项的方法,其中将寡聚人IgG添加至终浓度25 μ g/mL至100 μ g/mL。
34. 根据权利要求1至8中任一项的方法,其中将寡聚人IgG添加至终浓度约50 μ g/mL。

检测血清样品中抗药物抗体的干扰抑制性免疫测定

[0001] 本文中报道了检测来自用抗炎症抗体治疗的患者的血清样品中抗药物抗体的干扰抑制性免疫测定及其用途。

[0002] 发明背景

[0003] 新治疗性抗体的临床开发需要通过适宜的测定评价其潜在免疫原性(Kaliyaperumal, A. 和Jing, S., Curr. Pharm. Biotechnol. 10 (2009) 352-358)。抗药物抗体(ADA)检验通常涉及双滴度方案：(1)用于ADA检测的测定和(2)用于表征ADA的测定。ADA检测测定包括筛查和特异性验证(验证性)测定。基于微量滴定板的酶联免疫吸附测定(ELISA)仍然是筛查ADA的最广泛使用样式，原因在于其高通量效率、相对简单和高灵敏度(Geng, D. 等人, J. Pharm. Biomed. Anal. 39 (2005) 364-375)。ADA ELISA最经常以提供高度选择性、检测全部同种型和泛物种ADA检测能力的桥样式设计(Mire-Sluis, A.R. 等人, J. Immunol. Methods 289 (2004) 1-16)。

[0004] 已经开发桥接ELISA并且用作抗IL6R抗体托珠单抗(tocilizumab)的筛查和验证ADA测定(Stubenrauch, K. 等人, Clin. Ther. 32 (2010) 1597-1609)。

[0005] Stubenrauch, K. 等人报告了用于来自暴露于人抗体的小鼠的血清样品中药物耐受性的一般抗药物抗体测定(Anal. Biochem. 430 (2012) 193-199)。Bourdage, J.S. 等人报道双抗原桥接免疫测定样式对抗原包被浓度依赖性的影响和设计用于单克隆抗体的免疫原性测定的意义(J. Pharm. Biochem. Anal. 39 (2005) 685-690)。Mikulskis, A. 等人报道了溶液ELISA作为开发稳健、药物耐受性免疫原性测定支持药物开发的选择平台(J. Immunol. Meth. 365 (2010) 38-49)。Pan, J. 等人报道在两种生物治疗药的免疫原性检验中**NIDSA**[®]快速测定与ELISA方法的比较(J. Pharm. Tox. Meth. 63 (2010) 150-159)。

[0006] 在WO 2009/077127中，报道了区分性测定。

[0007] Qiu, Z.J. 等人报道了用于检测自身免疫血清中人抗治疗性抗体的基于生物素-洋地黄毒甙的新型均相测定(J. Immunol. Meth. 362 (2010) 101-111)。

[0008] 发明简述

[0009] 本文中报道了桥接酶联免疫吸附测定(桥接ELISA)，所述测定可以用作为筛查、验证和跟踪测定用于检测以治疗性抗体治疗的患者的含有血清的样品中的抗药物抗体(ADA)。如果含有血清的样品来自患有自身免疫疾病(如类风湿性关节炎(RA))的患者，则如本文中报道的测定特别有用。

[0010] 如本文中报道的测定显示在待分析样品中治疗性抗体的量方面改进的耐受性(ADA ELISA的药物耐受性增加)并且同时假阳性测定结果的数目减少。

[0011] 已经发现采用如本文中报道的测定时，由游离药物和由类风湿因子(RF)所致的干扰可以最小化。

[0012] 如果样品含有非所讨论的抗药物抗体的、能够在免疫测定中干扰抗药物抗体的检测并且，因此，将导致假阳性免疫测定结果的抗体，则这种测定特别有用。

[0013] 在一个实施方案中，如本文中报道的方法用于测定用于抗炎疗法的药物抗体的抗药物抗体。

[0014] 通过以下方面的协同性相互作用实现增加的药物耐受性:1) 增加生物素化的和洋地黄毒甙化的捕获和示踪试剂的浓度;2) 同时,而不是顺序孵育血清样品与捕获和示踪试剂;3) 延长的孵育时间;4) 使用均匀单偶联的捕获和示踪试剂;和5) 使用增加的血清基质含量。

[0015] 可以通过添加寡聚人免疫球蛋白G (IgG) 作为添加物,抑制来自类风湿因子的干扰。

[0016] 如本文中报道的干扰抑制性ADA测定的药物耐受性高于本领域已知的测定至少10倍。

[0017] 如本文中报道的一个方面是包含捕获药物抗体和示踪药物抗体的用于检测样品中针对药物抗体的抗药物抗体的酶联免疫吸附测定,其中

[0018] a) 捕获药物抗体和示踪药物抗体以多于0.5 μ g/ml的浓度使用,

[0019] b) 将样品同时与捕获药物抗体和示踪药物抗体孵育4至24小时,

[0020] c) 将捕获药物抗体和示踪药物抗体经由单个赖氨酸残基衍生,

[0021] d) 样品包含7.5%或更多的血清,和

[0022] e) 用捕获药物抗体和示踪药物抗体孵育之前,向样品添加寡聚人IgG。

[0023] 如本文中报道的一个方面是包含捕获药物抗体和示踪药物抗体的用于检测类风湿性关节炎患者的样品中针对药物抗体的抗药物抗体的酶联免疫吸附测定,其中

[0024] a) 在酶联免疫吸附测定中捕获药物抗体和示踪药物抗体具有0.5 μ g/ml或更大的浓度,

[0025] b) 将样品同时与捕获药物抗体和示踪药物抗体孵育0.5至24小时,

[0026] c) 捕获药物抗体是捕获药物抗体和特异性结合对的第一组分的1:1缀合物并且示踪药物抗体是示踪药物抗体和可检测标记物的1:1缀合物,

[0027] d) 样品包含1%或更多的血清,和

[0028] e) 用捕获药物抗体和示踪药物抗体孵育之前,向样品添加寡聚人IgG。

[0029] 在一个实施方案中,样品包含5%或更多的血清。在一个实施方案中,样品包含7.5%或更多的血清。

[0030] 在一个实施方案中,样品包含抗药物抗体和类风湿因子。

[0031] 在一个实施方案中,药物抗体是治疗炎症性疾病的抗体。在一个实施方案中,治疗炎症性疾病的抗体是治疗自身免疫疾病的抗体。在一个实施方案中,自身免疫疾病是类风湿性关节炎或青少年关节炎或骨关节炎或Castleman病。

[0032] 在一个实施方案中,药物抗体是治疗癌症的抗体。在一个实施方案中,抗体用于治疗骨髓瘤或浆细胞瘤。

[0033] 在一个实施方案中,药物抗体是针对IL-6受体的抗体(抗IL6R抗体)、或针对IGF-1受体的抗体(抗IGF1R抗体)、或针对IL-13受体1 α 的抗体(抗IL13R1 α 抗体)、或针对Ox40L的抗体(抗Ox40L抗体)、或针对肿瘤坏死因子 α 的抗体(抗TNF α 抗体)。在一个实施方案中,药物抗体是抗IL6R抗体。在一个实施方案中,抗IL6R抗体是托珠单抗。

[0034] 在一个实施方案中,捕获药物抗体缀合至固相。在一个实施方案中,捕获药物抗体缀合至固相是经由特异性结合对实施的。在一个实施方案中,特异性结合对(第一组分/第二组分)选自链霉亲和素或抗生物素蛋白/生物素、或抗体/抗原(参见,例如,Hermanson,

G.T.等人,Bioconjugate Techniques,Academic Press,1996)、或凝集素/多糖、或类固醇/类固醇结合蛋白、或激素/激素受体、或酶/底物、或IgG/蛋白A和/或蛋白G。

[0035] 在一个实施方案中,捕获药物抗体缀合至生物素(作为特异性结合对的第一组分)。在这种情况下,经由固定化的抗生物素蛋白或链霉亲和素实施缀合至固相。

[0036] 在一个实施方案中,示踪药物抗体缀合至可检测标记物。在一个实施方案中,示踪药物抗体经由特异性结合对缀合至可检测标记物。在一个实施方案中,特异性结合对(第一组分/第二组分)选自链霉亲和素或抗生物素蛋白/生物素、或抗体/抗原(参见,例如,Hermanson,G.T.等人,Bioconjugate Techniques,Academic Press,1996)、或凝集素/多糖、或类固醇/类固醇结合蛋白、或激素/激素受体、或酶/底物、或IgG/蛋白A和/或蛋白G。

[0037] 在一个实施方案中,示踪药物抗体缀合至洋地黄毒甙(作为可检测标记物)。在这种情况下,经由针对洋地黄毒甙的抗体实施连接至可检测标记物。

[0038] 在一个实施方案中,捕获药物抗体和示踪药物抗体在酶联免疫吸附测定(ELISA)中具有约0.5 μ g/ml至约10 μ g/ml的浓度。在一个实施方案中,捕获药物抗体和示踪药物抗体具有多于0.5 μ g/ml至小于10 μ g/ml的浓度。在一个实施方案中,捕获药物抗体和示踪药物抗体具有约1 μ g/ml至约5 μ g/ml的浓度。在一个实施方案中,捕获药物抗体和示踪药物抗体具有约1.4 μ g/ml至约1.8 μ g/ml的浓度。在一个实施方案中,捕获药物抗体和示踪药物抗体具有约1.45 μ g/ml至约1.6 μ g/ml的浓度。在一个优选的实施方案中,捕获药物抗体和示踪药物抗体具有约1.5 μ g/ml的浓度。

[0039] 在一个实施方案中,孵育时间是至少6小时。在一个实施方案中,孵育时间是至少12小时。在一个实施方案中,孵育时间是至少16小时。

[0040] 在一个实施方案中,孵育时间是最多24小时。

[0041] 在一个实施方案中,孵育时间在4小时和24小时之间。在一个实施方案中,孵育时间在6小时和24小时之间。在一个实施方案中,孵育时间在12小时和24小时之间。在一个优选的实施方案中,孵育时间在12小时和20小时之间。在一个实施方案中,孵育时间在14小时和18小时之间。在一个实施方案中,孵育时间是约16小时。

[0042] 在一个实施方案中,样品包含1%至20%的血清。在一个实施方案中,样品包含约10%的血清。

[0043] 在一个实施方案中,将寡聚人IgG添加至终浓度10 μ g/mL至1000 μ g/mL。在一个实施方案中,将寡聚人IgG添加至终浓度15 μ g/mL至500 μ g/mL。在一个实施方案中,将寡聚人IgG添加至终浓度20 μ g/mL至250 μ g/mL。在一个实施方案中,将寡聚人IgG添加至终浓度25 μ g/mL至100 μ g/mL。在一个优选的实施方案中,将寡聚人IgG添加至终浓度约50 μ g/mL。

[0044] 如本文中报道的一个方面是包含捕获药物抗体和示踪药物抗体的用于检测类风湿性关节炎患者的样品中针对药物抗体的抗药物抗体的酶联免疫吸附测定,其中

[0045] a) 在酶联免疫吸附测定中捕获药物抗体和示踪药物抗体具有约1.5 μ g/ml的浓度,

[0046] b) 将样品同时与捕获药物抗体和示踪药物抗体孵育14至16小时,

[0047] c) 捕获药物抗体是经由捕获药物抗体的赖氨酸残基的捕获药物抗体和生物素的1:1缀合物并且示踪药物抗体是经由示踪药物抗体的赖氨酸残基的示踪药物抗体和洋地黄毒甙的1:1缀合物,

[0048] d) 样品包含1%至20%的血清,并且

[0049] e) 用捕获药物抗体和示踪药物抗体孵育之前,向样品添加寡聚人IgG至终浓度25 μ g/mL至100 μ g/mL,

[0050] 如本文中报道的一个方面是寡聚人IgG在抗药物抗体ELISA中捕获类风湿因子的用途。

[0051] 如本文中报道的一个方面是治疗患有疾病的个体的方法,所述方法包括向该个体施用有效量的治疗性抗体(药物)并且用如本文中报道的测定确定抗药物抗体的存在。

[0052] 如本文中报道的一个方面是治疗患有炎症性疾病的个体的方法,所述方法包括向该个体施用有效量的抗IL6R抗体(药物)并且用如本文中报道的测定确定抗-抗IL6R抗体的抗体(抗药物抗体)的存在。

[0053] 在一个实施方案中,炎症性疾病是自身免疫疾病。在一个实施方案中,自身免疫疾病选自类风湿性关节炎、青少年关节炎、骨关节炎或Castleman病。

[0054] 在一个实施方案中,炎症性疾病是系膜增生性肾小球肾炎。

[0055] 如本文中报道的一个方面是治疗患有浆细胞瘤的个体的方法,所述方法包括向该个体施用有效量的抗IL6R抗体(药物)并且用如本文中报道的测定确定抗-抗IL6R抗体的抗体(抗药物抗体)的存在。

[0056] 如本文中报道的一个方面是治疗患有骨髓瘤的个体的方法,所述方法包括向该个体施用有效量的抗IL6R抗体(药物)并且用如本文中报道的测定确定抗-抗IL6R抗体的抗体(抗药物抗体)的存在。

[0057] 如本文中报道的一个方面是抑制个体中IL6R活性的方法,所述方法包括向该个体施用有效量的抗IL6R抗体以抑制IL6R活性并且用如本文中报道的测定确定抗-抗IL6R抗体的抗体(抗药物抗体)的存在。

[0058] 附图简述

[0059] 图1对于抗IL6R抗体托珠单抗示例的药物耐受性抗药物抗体测定的测定原理。

[0060] 图2用于抗IL6R抗体托珠单抗的干扰抑制性抗药物抗体测定的测定原理。

[0061] 图3用于抗IL6R抗体托珠单抗的干扰抑制性抗药物抗体测定所获得的校正曲线。

[0062] 图4比较在两步骤抗药物抗体ELISA中和在如本文中报道的干扰抑制性抗药物抗体ELISA中对于抗IL6R抗体托珠单抗的药物耐受性;显示在渐增量的药物存在下300ng/mL抗药物抗体的信号;点线:CP常规测定;实线:如本文中报道的CP干扰抑制性测定;带圆圈的点线:常规测定;带方框的实线:如本文中报道的干扰抑制性测定。

[0063] 图5用干扰抑制性抗药物抗体ELISA确定分割点。

[0064] 图6用具有TCZ-Bi (mono) 和TCZ-Dig (mono) 的干扰抑制性抗药物抗体ELISA确定分割点。

[0065] 图7使用常规ELISA时在来自TCZ治疗的RA患者的77份不同血清样品中的信号变异。

[0066] 图8使用如本文中报道的干扰抑制性ELISA时在来自TCZ治疗的RA患者的77份不同血清样品中的信号变异。

[0067] 定义

[0068] 术语“1:1缀合物”指由经由单个共价键彼此连接/缀合的恰好两个实体组成的缀合物。例如,术语“捕获药物抗体和特异性结合对的第一组分的1:1缀合物”指由经由单个化

学键与恰好一分子特异性结合对的第一组分共价缀合的恰好一分子捕获药物抗体组成的化学缀合物。同样地,术语“示踪药物抗体和可检测标记物的1:1缀合物”指由经由单个化学键与恰好一个可检测标记物分子共价缀合的恰好一分子示踪药物抗体组成的化学缀合物。

[0069] 根据本发明,术语“药物抗体”指可以向个体施用的抗体,从而在施用后所述个体的样品疑似包含所述药物抗体。药物抗体是出于治疗目的意在施用至人的抗体。在如本文中报道的一种测定中,药物抗体、捕获药物抗体和示踪药物抗体包含“相同”的抗体分子,例如用相同表达载体重组产生并包含相同氨基酸序列的抗体分子。药物抗体(治疗性单克隆抗体)正在广泛地用于治疗多种疾病如肿瘤学疾病(例如血液学肿瘤和恶性实体肿瘤,包括非霍奇金淋巴瘤、乳腺癌和结直肠癌)或炎症性疾病。这类抗体例如由Levene,A.P.等人,Journal of the Royal Society of Medicine 98(2005)145-152;Groner,B.等人,Curr.Mol.Meth.4(2004)539-547;和Harris,M.,Lancet Oncol.5(2004)292-302报道。

[0070] 在一个实施方案中,药物抗体是可用于治疗炎症性疾病的抗体,即抗炎症抗体,如抗IL-6受体抗体、或抗IGF-1受体抗体或抗IL-13受体1 α 抗体。

[0071] 实例(优选地单克隆)药物抗体是针对IL-6受体的抗体(抗IL6R抗体)。这种抗体例如由Mihara等人,Clin.Immunol.98(2001)319-326;Nishimoto,N.等人,Blood 106(2005)2627-2632;在临床试验NCT00046774中或在WO 2004/096274中报道。

[0072] 实例(优选地单克隆)药物抗体是针对IGF-1受体的抗体(抗IGF1R抗体)。这种抗体例如在WO 2004/087756中或在WO 2005/005635中报道。

[0073] 实例(优选地单克隆)药物抗体是针对IL-13受体 α 的抗体(抗IL13R1 α 抗体)。针对IL-13R1 α 的抗体从例如WO 96/29417、WO 97/15663、WO 03/080675、Graber,P.等人,Eur.J.Immunol.28(1998)4286-4298;Poudrier,J.等人,J.Immunol.163(1999)1153-1161;Poudrier,J.等人,Eur.J.Immunol.30(2000)3157-3164;Aikawa,M.等人,Cytokine 13(2001)75-84已知,并且例如从R&D Systems Inc.USA可商业获得。其他针对IL-13R1 α 的示例性抗体在WO 2006/072564中报道。

[0074] 如本文所用,术语“用于抗炎疗法的药物抗体”指针对介导炎症的细胞表面受体的药物抗体。这类受体例如是IL-6受体、或IGF-1受体、或IL-13 α 受体1。如果分析来自用这种抗炎药物抗体治疗的患者的样品,不得不确定方法的阳性结果是否基于真实抗药物抗体(真阳性结果)或基于非样品的抗药物抗体的抗体(假阳性结果)。这种情况的例子是来自患有自身免疫疾病如风湿病的患者的样品并且因此,从所述患者获得的样品含有所谓“类风湿因子”。如本文所用的术语“类风湿因子”指与人IgG结合、更精确地与人IgG的Fc区结合的抗体。在大多数情况下,这些“风湿因子”是寡聚结合分子。

[0075] 如本文所用的术语“抗药物抗体”指针对,即与药物抗体的抗原性区域结合的抗体。这种抗原性区域可以是药物抗体的可变区、CDR、恒定区或糖结构。在一个实施方案中,抗药物抗体针对药物抗体的CDR或药物抗体的次级修饰,所述次级修饰因在重组细胞(如,CHO细胞、HEK细胞、Sp2/0细胞或BHK细胞)中重组生产药物抗体所致。通常,抗药物抗体针对由向其施用药物抗体的动物的免疫系统识别的药物抗体的抗原性区域。上述的抗体称作“特异性抗药物抗体”。

[0076] 药物抗体设计成包含尽可能少的抗原性区域。例如,意在人类中使用的药物抗体在施加至人类患者之前人源化,以最小化针对药物抗体的免疫应答的产生。这种免疫应答

将处于抗药物抗体 (ADA) 形式,所述抗药物抗体针对这种人源化药物抗体的非人类部分,例如可变结构域中的互补决定区 (参见例如Pan, Y. 等人,FASEB J.9 (1995) 43-49)。

[0077] 如本文所用,术语“高变区”或“HVR”指抗体可变结域的下述每个区域,所述区域在序列上高变 (“互补决定区”或“CDR”) 和/或形成结构上确定的环 (“高变环”) 和/或含有抗原接触残基 (“抗原触点”)。通常,抗体包含六个HVR: VH中三个 (H1、H2、H3), 和VL中三个 (L1、L2、L3)。本文中的示例性HVR包括:

[0078] (a) 出现在氨基酸残基26-32 (L1)、50-52 (L2)、91-96 (L3)、26-32 (H1)、53-55 (H2), 和96-101 (H3) 处的高变环 (Chothia和Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987));

[0079] (b) 出现在氨基酸残基24-34 (L1)、50-56 (L2)、89-97 (L3)、31-35b (H1)、50-65 (H2), 和95-102 (H3) 处的CDR (Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

[0080] (c) 出现在氨基酸残基27c-36 (L1)、46-55 (L2)、89-96 (L3)、30-35b (H1)、47-58 (H2), 和93-101 (H3) 处的抗原触点 (MacCallum等人, J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)); 和

[0081] (d) (a)、(b) 和/或 (c) 的组合, 包括HVR氨基酸残基46-56 (L2)、47-56 (L2)、48-56 (L2)、49-56 (L2)、26-35 (H1)、26-35b (H1)、49-65 (H2)、93-102 (H3) 和94-102 (H3)。

[0082] 除非另外说明, 否则HVR残基和可变结构域中的其他残基 (例如, FR残基) 在本文中根据Kabat编号。

[0083] 抗体含有众多反应性部分, 诸如, 例如, 氨基团 (赖氨酸、 α -氨基团)、巯基团 (胱氨酸、半胱氨酸和甲硫氨酸)、羧基团 (天冬氨酸、谷氨酸) 和糖醇基团。这些可以用于偶联至结合配偶体如表面、蛋白质、聚合物 (例如PEG、纤维素或聚苯乙烯)、酶或结合对的成员 (参见例如Aslam M. 和Dent, A., Bioconjugation MacMillan Ref. Ltd. (1999) 50-100)。

[0084] 术语“抗独特型抗体”指与亲本抗体的结合特异性, 如例如结合位点特异性结合的抗体, 即抗独特型抗体针对例如亲本抗体的抗原结合位点。

[0085] 在一个实施方案中, 抗独特型抗体与亲本抗体的一个或多个CDR特异性结合。

[0086] 在一个实施方案中, 亲本抗体是治疗性抗体。在一个实施方案中, 亲本抗体是多特异性抗体。在一个实施方案中, 亲本抗体是双特异性抗体。

[0087] 蛋白质的最常见反应性基团之一是氨基酸赖氨酸的脂肪族 ϵ -胺。通常而言, 几乎全部抗体均含有丰富的赖氨酸残基。高于pH8.0时, 赖氨酸胺/氨基是相当好的亲核体 ($pK_a = 9.18$) 并且因此容易及干净地与多种试剂反应以形成稳定键。

[0088] 抗体中的另一个常见反应性基团是来自含硫氨基酸胱氨酸和其还原产物半胱氨酸 (或半型胱氨酸) 的巯基残基。半胱氨酸含有比胺更亲核并且通常是蛋白质中反应性最强的官能团的游离巯基。巯基通常在中性pH具有反应性, 并且因此可以在胺存在下与其他分子选择性偶联。由于游离硫氢基团相对具有反应性, 具有这些基团的蛋白质经常以其氧化形式作为二巯基或二硫键存在。

[0089] 除胱氨酸和半胱氨酸之外, 某些蛋白质还具有在硫醚键中含有硫的氨基酸-甲硫氨酸。文献报告了几种硫磺化交联试剂如Traut试剂 (2-亚氨基硫杂环戊烷)、琥珀酰亚胺基 (乙酰硫代) 乙酸酯 (SATA) 或磺基琥珀酰亚胺基6-[3-(2-吡啶基硫代) 丙酰氨基] 己酸酯 (磺基-LC-SPDP) 通过反应性氨基提供引入多个硫氢基的有效方式的用途。

[0090] 反应性酯,特别地N-羧琥珀酰亚胺(NHS)酯,属于用于修饰胺基团的最常用试剂。水性环境下反应的最佳pH是pH 8.0至9.0。

[0091] 异硫氰酸酯是胺修饰试剂并且与蛋白质形成硫脲键。它们与蛋白质胺在水性溶液中(最佳地在pH 9.0至9.5)反应。

[0092] 醛在温和水性条件下与脂肪族和芳族胺、肼和酰肼反应以形成亚胺中间体(西夫碱)。西夫碱可以用温和还原剂或强还原剂(如硼氢化钠或氰基硼氢化钠)选择性还原以衍生稳定的烷基胺键。

[0093] 已经用来修饰胺的其他试剂是酸酐。例如,二亚乙基三胺五乙酸酐(DTPA)是含有两个胺反应性酐基团的双官能螯合剂。它可以与蛋白质的N端基团和ε-胺基团反应以形成酰胺键。酐环开放以产生能够与配位络合物中金属牢固结合的多价金属螯合臂。

[0094] 术语“样品”包括但不限于任何量的来自活物或先前活的物体的物质。这类活物包括但不限于人、小鼠、猴、大鼠、兔和其他动物。在一个实施方案中,样品从猴、尤其食蟹猴、或兔、或小鼠或大鼠获得。在一个实施方案中,这类物质包括但不限于来自个体的全血、血清或血浆,这些是临床日常工作中最广泛使用的样品来源。

[0095] 术语“固相”指非流体物质,并且包括由多种材料如聚合物、金属(顺磁性、铁磁性颗粒)、玻璃和陶瓷制成的颗粒(包括微颗粒和珠);胶状物质如二氧化硅、氧化铝和聚合物凝胶;可以由聚合物、金属、玻璃、和/或陶瓷构成的毛细管;沸石和其他多孔物质;电极;微量滴定板;固态条;和比色皿、管或其他分光仪样品容器。固相组分与惰性固体表面的区别在于,“固相”在其表面上含有意在与样品中物质相互作用的至少一种部分。固相可以是固定组分,如管、条、比色皿或微量滴定板,或可以是非固定组分,如珠和微颗粒。可以使用允许蛋白质和其他物质的非共价或共价附着的多种微颗粒。这类颗粒包括聚合物颗粒如聚苯乙烯和聚(甲基丙烯酸甲酯);金颗粒如金纳米颗粒和金胶体;和陶瓷颗粒如石英、玻璃,和金属氧化物颗粒。参见例如Martin,C.R.等人,Analytical Chemistry-News&Features,70(1998)322A-327A或Butler,J.E.,Methods 22(2000)4-23。

[0096] 在一个实施方案中,可检测标记物选自生色原(荧光或发光基团和染料)、酶、NMR-活性基团、金属颗粒或半抗原如洋地黄毒甙。在一个实施方案中,可检测标记物是洋地黄毒甙。可检测标记物也可以是光可活化交联基团,例如叠氮基或氮丙啶基团。还在一个实施方案中,可以通过电化学发光检测的金属螯合物是发出信号的基团,特别优选的是钆螯合物,例如,钆(双吡啶) 3^{2+} 螯合物。合适的钆标记基团在例如EP 0 580 979、WO 90/05301、WO 90/11511和WO 92/14138中描述。

[0097] 不同免疫测定的原理例如由Hage,D.S.(Anal.Chem.71(1999)294R-304R)描述。Lu,B.等人(Analyst 121(1996)29R-32R)报道了用于免疫测定中的抗体的定向固定化。抗生物素蛋白-生物素介导的免疫测定例如由Wilchek,M.和Bayer,E.A.在Methods Enzymol.184(1990)467-469中报道。

具体实施方案

[0098] 本文中报道了使用血清样品的干扰抑制性抗药物抗体测定,所述测定具有增加的对游离治疗性抗体的耐受性和增加的对类风湿因子干扰的抵抗性。

[0099] 抗药物抗体测定的原理是捕获与洋地黄毒甙化的药物(药物-Dig)和生物素化的

药物(药物-Bi)(例如分别是托珠单抗(TCZ-Dig和TCZ-Bi))复合的抗药物抗体(ADA),所述生物素化的药物导致固定化到链霉亲和素包被的平板(SA-MTP)上。与SA-MTP上的药物-Bi结合的ADA/药物-Dig复合物由抗洋地黄毒甙抗体辣根过氧化物酶酶缀合物(抗Dig-HRP)检测。辣根过氧化物酶(HRP)催化底物ABTS的颜色反应。颜色强度与分析物的浓度成比例。图1中显示抗药物抗体测定的一般原理。

[0100] 已经发现在不改变一般测定原理的情况下,可以通过以下方式增加常规抗药物抗体测定的药物和类风湿因子耐受性:

[0101] 1) 增加生物素化和洋地黄毒甙化的捕获试剂和示踪试剂的浓度;

[0102] 2) 同时,而非顺序孵育血清样品与捕获试剂和示踪试剂;

[0103] 3) 延长血清样品与捕获试剂和示踪试剂的孵育;

[0104] 4) 使用均质捕获试剂和示踪试剂而非异质偶联的混合物;

[0105] 5) 使用增加的血清基质;

[0106] 6) 纳入寡聚IgG作为测定添加物;并且

[0107] 7) 使用单生物素化的捕获抗体和单洋地黄毒甙化的示踪抗体。

[0108] 这些措施提供了协同效应。

[0109] 上述措施导致用于检测针对治疗性药物抗体的抗药物抗体的干扰抑制性药物耐受性抗药物抗体测定。

[0110] 对于抗IL6R抗体托珠单抗示例的图2中显示了如本文中报道的干扰抑制性药物耐受性抗药物抗体测定的一般原理。

[0111] 采用如本文中报道的测定设置,与常规抗药物抗体测定相比,在来自患者的血清样品中ADA测定的药物耐受性增加至少10倍。同时,还减少对导致假阳性测定结果的类风湿因子的易感性。

[0112] 治疗性抗炎症抗体托珠单抗(TCZ)是针对白介素-6受体的重组人源化单克隆抗体。已经显示它在类风湿性关节炎的临床研究中有效(Ohnishi,Y.和Kishimoto,T.,Expert Opin.Biol.Ther.8(2008)669-681)。这些研究中所用的ADA筛查和验证测定显示了使用静脉内给药方案达到稳态时对常见TCZ血清浓度的足够药物耐受性。

[0113] 但是不同施用途径(如皮下施用、更频繁施用)和儿童中的新适应症可能导致在稳态时更高的TCZ血清浓度。

[0114] 另外,例如,类风湿因子(RF)经常在自身免疫疾病患者例如类风湿性关节炎患者中显著地增加。RF显示偏好地与聚集的 γ 球蛋白结合并参与体内免疫复合物的清除机制(Tatarewicz,S.等人,J.Immunol.Methods.357(2010)10-16)。RF偏好五聚体免疫球蛋白M(IgM)同种型(Artandi,S.E.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89(1991)94-98)并且可以以多价态和中等亲和力与治疗性抗体的恒定部分非特异性结合,导致ADA测定中的假阳性结果。例如,样品稀释剂中包含亲和纯化的兔抗人IgM抗体以克服RA样品中交叉反应性IgM抗体干扰(参见例如Araujo,J.等人,J.Pharm.Biomed.Anal.,55(2011)1041-1049)。

[0115] 已经发现可以通过在进行ADA测定之前向样品添加寡聚人IgG,防止血清样品中存在的RF与治疗性抗体的非特异性结合。添加的寡聚IgG为RF提供额外的靶并且在如本文中报道的ADA测定中最大限度地消除RF的干扰。

[0116] 在下文中,通过分析托珠单抗(TCZ)治疗的类风湿性关节炎患者的血清样品,示例

如本文中报道的干扰抑制性ADA测定。

[0117] 增加用于检测针对抗IL6R抗体托珠单抗的抗药物抗体的常规抗药物抗体测定的药物耐受性的措施是

[0118] 1) 增加生物素化和洋地黄毒甙化的TCZ的浓度(例如从0.5 μ g/mL至1.5 μ g/mL);

[0119] 2) 同时孵育血清样品与TCZ-Bi和TCZ-Dig孵育;

[0120] 3) 延长血清样品与TCZ-Bi和TCZ-Dig的孵育(例如从1小时至16小时);

[0121] 4) 仅使用赖氨酸偶联的TCZ-Bi试剂和TCZ-Dig试剂而非赖氨酸和糖偶联试剂的混合物;

[0122] 5) 使用增加的血清基质含量;并且

[0123] 6) 在孵育TCZ-Bi和TCZ-Dig之前向样品添加寡聚人IgG。

[0124] 药物耐受性

[0125] 临床样品中待检测的抗IL6R抗体托珠单抗的浓度是0.5 μ g/mL或更高,经常在1 μ g/mL至10 μ g/mL范围内。

[0126] 通过确定可以在分割点以上检测到给定浓度的阳性对照ADA的最高TCZ浓度,评价常规抗药物抗体测定的药物耐受性。表1展示了结果汇总。

[0127] 表1:测定常规抗药物抗体ELISA中的药物(托珠单抗)耐受性。左侧对齐的信号值低于平板特异性分割点0.136AU。

[0128]

	托珠单抗[μ g/mL]					
	6250	1250	250	50	10	0
ADA [ng/mL]	信号均值[AU]					
100000	0.049	0.109	0.949	3.094	3.169	3.144
10000	0.050	0.062	0.156	1.265	3.117	3.387
1000	0.052	0.058	0.071	0.189	0.865	2.141
500.0	0.051	0.057	0.065	0.120	0.448	1.282
250.0	0.055	0.060	0.065	0.092	0.255	0.703
125.0	0.056	0.060	0.064	0.076	0.157	0.385
62.5	0.056	0.060	0.062	0.067	0.108	0.226
0	0.059	0.061	0.062	0.062	0.060	0.071

[0129] 检测到ADA浓度125ng/mL并在10 μ g/mL TCZ存在下测试为阳性。

[0130] 通过确定可以在分割点以上检测到给定浓度的阳性对照ADA的最高TCZ浓度,评价如本文中报道的干扰抑制性药物耐受性抗药物抗体测定的药物耐受性。表2展示了结果汇总。

[0131] 表2:测定如本文中报道的干扰抑制性药物耐受性抗药物抗体ELISA中的药物(托珠单抗)耐受性。左侧对齐的信号值低于平板特异性分割点0.045AU。

[0132]

	托珠单抗[$\mu\text{g/mL}$]					
	100	30	10	3	1	0
ADA [ng/mL]	信号均值[AU]					
10,000	0.948	2.263	3.266	3.536	3.146	3.272
3,000	0.310	0.943	1.956	> 3.5	2.860	3.161
1,000	0.119	0.364	0.789	1.051	1.180	2.292
300	0.055	0.133	0.280	0.376	0.426	0.857
100	0.033	0.057	0.105	0.144	0.163	0.310
30	0.027	0.036	0.051	0.063	0.068	0.113

[0133]

	托珠单抗[$\mu\text{g/mL}$]					
	100	30	10	3	1	0
ADA [ng/mL]	信号均值[AU]					
10	0.022	0.025	0.032	0.039	0.040	0.056
0	0.024	0.023	0.026	0.027	0.027	0.027

[0134] 在如本文中报道的干扰抑制性药物耐受性抗药物抗体ELISA中,检测到非常低的ADA浓度30ng/mL并在10 $\mu\text{g/mL}$ TCZ存在下测试为阳性。另外,ADA浓度100ng/mL和300ng/mL分别显示30 $\mu\text{g/mL}$ 和甚至100 $\mu\text{g/mL}$ 的药物抗体耐受性。

[0135] 与采用先前使用的托珠单抗的两步骤常规抗药物抗体ELISA所实施的相同实验比较揭示了采用干扰抑制性测定至少10倍更高的药物耐受性(对于300ng/mLADA浓度,还参见图4)。

[0136] 通过确定可以在分割点以上检测到给定浓度阳性对照ADA的最高TCZ浓度,评价分别用单价结合的生物素和洋地黄毒甙与捕获和示踪药物抗体的1:1缀合物的如本文中报道的干扰抑制性药物耐受性抗药物抗体测定的药物耐受性。表3展示了结果汇总。

[0137] 表3:测定如本文中报道的使用生物素和洋地黄毒甙与捕获和示踪药物抗体的1:1缀合物的干扰抑制性药物耐受性抗药物抗体ELISA中的药物(托珠单抗)耐受性。左侧对齐的信号值低于平板特异性分割点0.037AU。

[0138]

	托珠单抗[$\mu\text{g/mL}$]					
	80	70	60	50	5	0
ADA [ng/mL]	信号均值[AU]					
500	0.090	0.097	0.112	0.122	0.380	1.071
250	0.057	0.061	0.067	0.075	0.215	0.653
125	0.043	0.045	0.048	0.053	0.133	0.343
0.0	0.025	0.024	0.026	0.027	0.030	0.027

[0139] 在如本文中报道的干扰抑制性药物耐受性抗药物抗体ELISA中,检测到ADA浓度250ng/mL并在80 $\mu\text{g/mL}$ TCZ存在下测试为阳性。

[0140] 干扰抑制:

[0141] 通过如Stubenrauch等人(上文)中所述的常规抗药物抗体测定分析16份临床血清样品。表4a中汇总结果。

[0142] 表4a:用根据Stubenrauch等人(上文)的ADA测定分析来自用托珠单抗治疗的类风湿性关节炎患者的16份血清样品的结果。

[0143]

样品编号	常规ADA测定
1	+
2	+
3	+
4	+
5	+
6	+
7	+
8	-
9	-
10	-
11	-
12	-
13	-
14	-
15	-
16	+

[0144] 在不改变分析原理的情况下,采取一系列措施以获得如本文中报道的干扰抑制性药物耐受性抗药物抗体ELISA。

[0145] 这些是:

[0146] 1) 增加生物素化和洋地黄毒甙TCZ的浓度(例如从0.5 $\mu\text{g/mL}$ 至1.5 $\mu\text{g/mL}$);

- [0147] 2) 同时孵育血清样品与TCZ-Bi和TCZ-Dig;
- [0148] 3) 延长血清样品与TCZ-Bi和TCZ-Dig的孵育(例如从1小时至16小时);
- [0149] 4) 仅使用赖氨酸偶联的TCZ-Bi试剂和TCZ-Dig试剂而非赖氨酸和糖偶联试剂的混合物;
- [0150] 5) 使用增加的血清基质含量;并且
- [0151] 6) 在孵育TCZ-Bi和TCZ-Dig之前向样品添加寡聚人IgG。
- [0152] 下表4b中显示如采用本文中报道的干扰抑制性测定所获得的结果。
- [0153] 表4b:采用常规和本文报告的干扰抑制性ADA测定对来自用托珠单抗治疗的类风湿性关节炎患者的16份血清样品的对比性分析。

样品编号	常规ADA测定	干扰抑制性ADA测定
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	+	+
6	+	+
7	+	+
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	-	-
13	-	-
14	-	-
15	-	+
16	+	-

[0154] 已经发现如果仅采取如上文概述的部分措施,则干扰作用的减少不充分并且仍易遭受存在的类风湿因子的干扰,导致假阳性ADA测定结果。

[0155] 例如,如果仅采取以下措施

- [0156] 1) 增加生物素化和洋地黄毒甙化TCZ的浓度(例如从0.5 μ g/mL至1.5 μ g/mL);
- [0157] 2) 同时孵育血清样品与TCZ-Bi和TCZ-Dig;
- [0158] 3) 延长血清样品与TCZ-Bi和TCZ-Dig的孵育(例如从1小时至16小时);
- [0159] 4) 仅使用赖氨酸偶联的TCZ-Bi试剂和TCZ-Dig试剂而非赖氨酸和糖偶联的试剂的混合物;以及
- [0160] 5) 使用增加的血清基质含量
- [0161] 则能观察到对假阳性测定结果的易感性并未完全减少。表4c中显示对比数据。

[0163] 表4c:采用不同样式的ADA测定对来自用托珠单抗治疗的类风湿性关节炎患者的16份血清样品的对比分析。

[0164]

样 品 编 号	如本文中报道 的干扰抑制性 ADA 测定	
	无 添 加物	有 添 加物
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	+	+
6	+	+
7	+	+
8	+	-
9	-	-
10	+	-
11	+	-
12	+	-
13	+	-
14	+	-
15	+	+
16	+	-

[0165] 使用常规ADA测定和如本文中报道的干扰抑制性药物耐受性ADA测定的来自TCZ治疗的RA患者的258份不同血清样品的对比评价显示在12份样品中相同的阳性结果。常规测定测量27位安慰剂患者为阳性,而如本文中报道的干扰抑制性药物耐受性ADA测定仅测量4位安慰剂患者为阳性。综上所述,与常规ADA测定相比,本文所述的一套措施和添加寡聚人IgG作为ADA测定添加物赋予增加的药物耐受性及受抑制RF的干扰。

[0166] 下表7中显示上述数据的子集分析。

[0167] 表7.

[0168]

患者	常	规	干扰抑制	性 ELISA
	ELISA			
P1	+	0.812	+	0.110
P2	+	1.009	+	0.893
P2	-	0.097	+	0.088
P2	+	0.276	+	0.228
P3	+	0.349	+	0.566
P3	+	2.405	+	1.760
P3	+	1.307	+	1.001
P4	+	1.409	+	0.242
P5	+	0.219	+	0.060
P6	+	0.387	+	0.688
P6	+	3.689	+	3.721
P6	+	3.506	+	3.722
P7	+	0.771	+	0.058

[0169] 研究相关的CP:0.215 (常规ELISA) ;0.058 (干扰抑制性ELISA) ;+: 阳性ELISA结果;-: 阴性ELISA结果

[0170] 在表8中,显示了27位没有用TCZ治疗的安慰剂患者的测定信号。由于不存在TCZ治疗诱导的ADA,这个组中不期望高测定信号并且高测定信号将提示潜在干扰。

[0171] 表8a.

[0172]

患者	常 规 ELISA	干扰抑制 性 ELISA
P8	+ 0.270	- 0.032
P8	+ 0.231	- 0.033
P9	+ 3.736	- 0.055
P9	+ 3.297	+ 0.058
P9	+ 2.863	- 0.046
P9	+ 3.739	- 0.052
P1	+ 0.812	+ 0.110
P10	+ 0.755	- 0.021
P10	+ 0.635	- 0.021
P11	+ 0.272	- 0.020
P11	+ 0.271	- 0.021
P11	+ 0.234	- 0.020
P12	+ 1.157	- 0.027
P12	+ 1.362	- 0.028
P12	+ 1.149	- 0.029
P4	+ 0.522	- 0.033
P4	+ 1.409	+ 0.242
P4	+ 0.651	- 0.047
P13	+ 0.349	- 0.023
P14	+ 0.245	- 0.033
P14	+ 0.276	- 0.035
P14	+ 0.275	- 0.037
P15	+ 0.580	- 0.049
P7	+ 0.990	- 0.056
P7	+ 0.822	- 0.052
P7	+ 0.523	- 0.042
P7	+ 0.771	+ 0.058

[0173] 研究相关的分割点 (CP) : 0.215 (常规ELISA) ; 0.058 (干扰抑制性ELISA) ; +: 阳性ELISA结果; -: 阴性ELISA结果

[0174] 两种测定的信号模式非常不同: 尽管使用常规ELISA确定全部27份安慰剂样品均为阳性, 而使用如本文中报道的干扰抑制性ELISA确定27份样品中的仅4份为阳性。

[0175] 除安慰剂治疗的患者样品之外, 也分析了TCZ治疗的患者。在表8b中显示了TCZ治疗前的患者的结果。在表8c中显示了TCZ治疗的结果。

[0176] 表8b.

[0177]

患者	时间点	常 规 ELISA		干扰抑制 性 ELISA		给药
P2	基线	+	1.009	+	0.893	4
P16	基线	+	0.745	-	0.021	8
P17	基线	+	0.281	-	0.020	8
P18	基线	+	1.401	-	0.023	4

[0178] 研究相关的CP:0.215 (常规ELISA) ;0.058 (干扰抑制性ELISA) ;+: 阳性ELISA结果;-: 阴性ELISA结果

[0179] 表8c.

[0180]

患者	时间点	常 规 ELISA		干扰抑制 性 ELISA		给药
P19	第 24 周	+	0.281	-	0.030	4 mg/kg
P19	第 24 周	+	0.226	-	0.031	4 mg/kg
P19	第 4 周	+	0.293	-	0.030	4 mg/kg
P19	第 8 周	+	0.362	-	0.028	4 mg/kg
P2	第 4 周	-	0.097	+	0.088	4 mg/kg
P2	第 8 周	+	0.276	+	0.228	4 mg/kg
P16	第 24 周	+	0.416	-	0.030	8 mg/kg
P16	第 4 周	+	0.542	-	0.029	8 mg/kg
P16	第 4 周	+	0.397	-	0.024	8 mg/kg
P3	第 24 周	+	2.405	+	1.760	4 mg/kg
P3	第 28 周	+	1.307	+	1.001	4 mg/kg
P3	第 4 周	-	0.181	+	0.120	4 mg/kg
P3	第 8 周	+	0.349	+	0.566	4 mg/kg
P20	第 8 周	+	0.818	-	0.034	4 mg/kg
P21	第 4 周	+	0.289	-	0.031	8 mg/kg
P17	第 12 周	+	0.369	-	0.023	8 mg/kg
P17	第 24 周	+	0.330	-	0.022	8 mg/kg
P17	第 4 周	+	0.488	-	0.022	8 mg/kg

患者	时间点	常规 ELISA		干扰抑制性 ELISA		给药
P17	第 4 周	+	0.465	-	0.025	8 mg/kg
P17	第 8 周	+	0.409	-	0.026	8 mg/kg
P18	第 4 周	+	1.218	-	0.026	4 mg/kg
P18	第 4 周	+	1.041	-	0.028	4 mg/kg
P5	第 28 周	+	0.219	+	0.060	8 mg/kg
P6	第 12 周	+	3.689	+	3.721	4 mg/kg
P6	第 24 周	+	3.506	+	3.722	4 mg/kg
P6	第 8 周	+	0.387	+	0.688	4 mg/kg
P22	第 24 周	+	0.423	-	0.020	4 mg/kg

[0182] 研究相关的CP:0.215 (常规ELISA) ; 0.058 (干扰抑制性ELISA) ; +: 阳性ELISA结果; -: 阴性ELISA结果

[0183] 如本文中报道的测定提供独立于所用治疗性抗体和靶的益处。下表中使用诊断为类风湿性关节炎阳性的患者的样品,对于抗IL6R抗体、抗IGF-1R抗体、抗IL13R α 抗体、抗OX40L抗体和抗AB抗体显示这种益处。

[0184] 表9a: 抗IL6R抗体

患者	常规 ELISA		干扰抑制性 ELISA	
P23	+	0.169	-	0.079
P24	+	0.197	-	0.082
P25	+	0.240	-	0.110
P26	-	0.131	-	0.088
P27	+	0.215	-	0.111
P28	+	0.199	-	0.136
P29	-	0.135	-	0.085
P30	+	0.220	-	0.086
P31	+	0.158	-	0.100
P32	+	0.221	-	0.132
P33	-	0.110	-	0.081
P34	-	0.099	-	0.090
P35	-	0.100	-	0.082
P36	-	0.098	-	0.076
CP	0.157		0.140	

[0186] 表9b: 抗IGF-1R抗体

[0187]

患者	常 规 ELISA		干扰抑制 性 ELISA	
P23	-	0.153	-	0.127
P24	+	0.423	-	0.132
P25	+	0.266	-	0.145
P26	-	0.171	-	0.163
P27	-	0.152	-	0.132
P28	-	0.133	-	0.120
P29	+	0.245	-	0.124
P30	-	0.173	-	0.142
P31	-	0.152	-	0.115
P32	-	0.172	-	0.131
P33	-	0.131	-	0.134
P34	-	0.124	-	0.115
P35	+	0.189	+	0.189
P36	-	0.157	-	0.154
CP	0.176		0.185	

[0188] 表9c: 抗IL13R α 抗体

[0189]

患者	常 规 ELISA		干扰抑制 性 ELISA	
P23	+	0.556	-	0.080
P24	+	0.881	+	0.198
P25	+	2.192	+	0.761
P26	+	0.674	+	0.235
P27	+	0.604	-	0.044
P28	+	0.177	-	0.000
P29	-	0.000	-	0.006
P30	+	0.424	-	0.091
P31	+	0.342	-	0.000
P32	+	0.353	-	0.092
P33	+	0.208	-	0.021
P34	-	0.000	-	0.000
P35	-	0.079	-	0.097
P36	+	0.238	+	0.235
CP	0.100		0.100	

[0190] 表9d: 抗OX40L抗体

[0191]

患者	常 规 ELISA	干扰抑制 性 ELISA
P23	+ 0.148	- 0.073
P24	+ 0.477	- 0.066
P25	+ 0.414	+ 0.087
P26	- 0.103	- 0.067
P27	+ 0.137	- 0.072
P28	+ 0.211	+ 0.126
P29	- 0.116	- 0.074
P30	+ 0.436	- 0.064
P32	+ 0.198	- 0.079
P33	+ 0.122	- 0.078
P34	- 0.096	- 0.070
P35	- 0.088	- 0.067
P36	+ 0.121	- 0.076
CP	0.117	0.085

[0192] 表9e: 抗Aβ抗体

[0193]

患者	常 规 ELISA	干扰抑制 性 ELISA
P25	+ 0.063	- 0.025
P26	- 0.025	- 0.026
P28	+ 0.086	+ 0.080
P29	- 0.020	- 0.021
P30	- 0.037	- 0.022
P31	- 0.036	- 0.024
P32	- 0.029	- 0.024
P33	- 0.027	- 0.026
P34	+ 0.069	+ 0.069
P35	- 0.019	- 0.021
P36	- 0.033	- 0.032
CP	0.044	0.042

[0194] 提供以下实施例和附图以辅助理解本发明, 本发明的真实范围在所附权利要求书中阐述。可以理解, 可以对所示出流程作修改而不脱离本发明的精神。

[0195] 实施例

[0196] 材料和方法

[0197] 汇集的纯化人免疫球蛋白G类(IgG) 如Stubenrauch等人, (Anal. Biochem. 390 (2009) 189-196) 所述那样制备。简而言之, 从健康供体汇集的人血清已经用Aerosil (二氧

化硅,1,5% (w/v)) 脱脂并用硫酸铵 (ad 2.0M) 沉淀。将沉淀物在磷酸盐缓冲液中均化并对磷酸盐缓冲液, pH 7.0透析。在pH 7.0通过DEAE离子交换色谱分离混合物并且将流通液中的IgG浓缩至5.93mg/mL并通过凝胶过滤纯化。

[0198] 多克隆抗洋地黄毒甙-辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合物 (Fab片段) 从Roche Diagnostics GmbH, 曼海姆, 德国 (目录号11633716) 获得。如Stubenrauch等人 (上文) 中所述制备作为阳性质量控制 (QC) 和校正标准物 (CS) 使用的多克隆兔抗TCZ抗体 (0.5mg-当量/mL)。

[0199] 各份人血清样品由德国彭茨贝格Roche Diagnostics GmbH的血清库提供。用于阴性对照的汇集的人血清基质由TCS Biosciences Ltd., Buckingham, UK供应。

[0200] 以下试剂从德国曼海姆Roche Diagnostics GmbH获得: 2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (ABTS) 底物 (目录号11684302-001)、ELISA洗涤缓冲液: 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) (0.01M KH_2PO_4 , 0.1M Na_2HPO_4 , 1.37M NaCl, 0.027M KCl; pH 7.0) / 0.05% 聚山梨醇酯 20 (Tween 20) (目录号11332465-001) 和ELISA中作为稀释缓冲液使用的即用型通用缓冲液 (目录号4742672)。全部化学品均为分析级。

[0201] 链霉亲和素包被的微量滴定板 (SA-MTP) 从MicroCoat Biotechnologie GmbH, Bernried获得。未包被的Nunc96-微孔板来自德国施韦特Fisher Scientific GmbH (目录号442587) 并用于预孵育。

[0202] 常规抗药物抗体测定:

[0203] 该测定在室温进行。在第一步骤中, 通过将100 μL 在摇床上以400转/分钟孵育1小时, 将TCZ-Bi以0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度与SA-MTP结合。在添加预孵育溶液至SA-MTP之前, 通过洗涤3次移除过量未结合的TCZ-Bi。与包被程序平行, 在独立的未包被的96孔平板中一式两份进行标准物和样品的预孵育。将样品和标准物在孔中用10%血清基稀释 (1:10) 至体积75 μL 并且与等体积的TCZ-DIG混合, 开始1小时预孵育阶段。通过从预孵育平板的每个孔转移100 μL 至包被的MTP的孔向TCZ-Bi包被的SA-MTP装载预孵育溶液并且在摇床上以400转/分钟孵育1小时。在洗涤后, 将多克隆抗Dig辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合物以100 μL (100mU/mL) 体积添加至孔并在摇床上孵育1小时。在洗涤后, 通过添加100 μL ABTS溶液, 启动HRP催化的生色反应。当最大光密度 (OD) 是约2.0时, 通常在20至30分钟内, 通过ELISA读数仪在波长405nm (参比, 490nm) 测量颜色反应的信号。在验证试剂存在下进行相同测定, 同时无验证试剂的情况下测量。获得的OD数据用于根据Wiener-Rodbard法, 通过非线性4参数回归曲线拟合生成标准校正曲线, 以计算样品浓度。

[0204] 测试结果的截断点设定在测定信号 (OD) 的95%CI, 所述测定信号来自源于健康志愿者和RA患者的人空白血清样品的多重分析。在截断以上的值时, 认为筛查测试结果为阳性。吸光度相对非掺入样品下降>20%表示阳性结果。确定筛查截断点在参考抗体的61.4ng/mL处。测定内和测定间准确度分别是84.8%至93.1%和91.3%至92.2%。测定内和测定间精度的相应值分别是1.8%至2.0%和6.8%至8.0%。ELISA的准确度由测定的结果与真值相符的程度限定。通过掺入人血清的兔多克隆抗TCZ-阳性对照标准物的测量浓度与抗TCZ的名义浓度比较, 确定准确度。在一式两份测量以确定测定内准确度的每种阳性对照标准物的六个等分试样中和在一式两份测量以确定测定间准确度的每种阳性对照标准物的三个等分试样中分析高浓度 (360ng当量/mL) 和低浓度 (60ng当量/mL) 阳性对照标准物。

[0205] 实施例1

[0206] 抗IL6R抗体托珠单抗的生物素化

[0207] a) 制备常规生物素化的IgG

[0208] 抗IL6R抗体托珠单抗已经对缓冲液(100mM磷酸钾缓冲液(在下文称作K-PO₄), pH 8.5)透析。此后,将溶液调节至蛋白质浓度5mg/ml。将D-生物素酰-氨基己酸-N-羧琥珀酰亚胺酯溶解于二甲基亚砜(DMSO)中并以摩尔比1:5添加至抗体溶液。在60分钟后,通过添加L-赖氨酸终止反应。通过对补充有150mM KCl的50mM K-PO₄, pH 7.5透析,移除多余的标记试剂。将包含6.5%蔗糖的TCZ-Bi的等分试样贮存在-80℃。

[0209] b) 制备单生物素化的IgG

[0210] 抗IL6R抗体托珠单抗已经对100mM K-PO₄, pH 8.5透析并且此后,将溶液调节至蛋白质浓度5mg/ml。将D-生物素酰-氨基己酸-N-羧琥珀酰亚胺酯溶解于二甲基亚砜(DMSO)中并以摩尔比1:1添加至抗体溶液。在60分钟后,通过添加L-赖氨酸终止反应。通过对补充有150mM KCl的25mM K-PO₄, pH 7.2透析,移除多余的标记试剂。将混合物转移至包含1M硫酸铵的具有100mM K-PO₄, 150mM KCl, pH 7.2的缓冲液并施加到具有链霉亲和素突变蛋白琼脂糖凝胶的柱上。未生物素化的IgG在流通液中,用100mM K-PO₄, 150mM KCl, 1.5% DMSO, pH 7.2洗脱单生物素化的IgG并且用100mM K-PO₄, 150mM KCl, 2mM D-生物素, pH 7.2洗脱生物素化的IgG,包括更高生物素化的群体。将单生物素化的抗体对补充有150mM KCl的50mM K-PO₄, pH 7.5透析。将包含6.5%蔗糖的等分试样贮存在-80℃。

[0211] 实施例2

[0212] 抗IL6R抗体托珠单抗的洋地黄毒甙化

[0213] a) 制备常规洋地黄毒甙化的IgG

[0214] 抗IL6R抗体托珠单抗已经对缓冲液(100mM磷酸钾缓冲液(在下文称作K-PO₄), pH 8.5)透析。此后,将溶液调节至蛋白质浓度5mg/ml。将洋地黄毒甙3-O-甲基羰基-ε-氨基己酸-N-羧琥珀酰亚胺酯溶解于DMSO中并以摩尔比1:4添加至抗体溶液。在60分钟后,通过添加L-赖氨酸终止反应。通过对补充有150mM NaCl的50mM K-PO₄, pH 7.5透析,移除多余的标记试剂。洋地黄毒甙化的TCZ(TCZ-Dig)以包含6.5%蔗糖的等分试样贮存在-80℃。

[0215] b) 制备单洋地黄毒甙化的IgG

[0216] 抗IL6R抗体托珠单抗已经对100mM K-PO₄, pH 8.5透析并且此后,将溶液调节至蛋白质浓度5mg/ml。将洋地黄毒甙3-O-甲基羰基-ε-氨基己酸-N-羧琥珀酰亚胺酯溶解于二甲基亚砜(DMSO)中并以摩尔比1:1添加至抗体溶液。在60分钟后,通过添加L-赖氨酸终止反应。通过对补充有150mM KCl的50mM K-PO₄, pH 7.5透析,移除多余的标记试剂。将混合物施加至具有针对洋地黄毒甙的固定化单克隆抗体的琼脂糖凝胶柱上。未洋地黄毒甙化的IgG在流通液中,用温和洗脱缓冲液(Thermo Scientific, #21013)洗脱单洋地黄毒甙化的IgG并且用1M丙酸洗脱洋地黄毒甙化的IgG,包括更高洋地黄毒甙化的群体。将含有单洋地黄毒甙化抗体的级分首先对20mM TRIS, 20mM NaCl, pH 7.5透析并且接着对50mM K-PO₄, 150mM KCl, pH 7.5透析。将包含6.5%蔗糖的等分试样贮存在-80℃。

[0217] 实施例3

[0218] 产生寡聚体形式的人IgG

[0219] 通过离子交换色谱从人血清纯化的人IgG对含有100mM NaCl, pH 8.4的150mM磷酸

钾缓冲液透析,并且将蛋白质溶液浓缩至蛋白质浓度50mg/ml。将辛二酸二琥珀酰亚胺酯(DSS)溶解于DMSO中并以摩尔比1:6(IgG:DSS)添加至抗体溶液。将混合物在25℃和pH 8.4孵育伴以搅拌,并用分析性凝胶过滤柱(例如使用TSK4000柱)分析反应。在140分钟后通过添加赖氨酸至终浓度20mM终止聚合。在25℃孵育45分钟后,通过凝胶过滤(例如使用Sephacryl S400柱)分离寡聚人IgG,以除去低分子部分。通过紫外光谱法、大小排阻色谱和SDS-PAGE凝胶电泳表征寡聚体的组成。将寡聚人IgG等分(10.5mg/mL)并贮存在-65℃直至将它通用缓冲液(目录号4742672)新鲜稀释至浓度55.6μg/mL,以用作免疫测定中的ADA测定添加物(AAA)。

[0220] 实施例4

[0221] 校正标准物样品和质量控制样品的制备

[0222] 分别制备校正标准物(CS)和质量控制样品(QC)的储液。在测定当日使用0.5mg/mL TCZ储液新鲜制备CS样品。在用人汇集血清(HPS)预稀释后,将所产生的CS工作液在测定中使用之前用100% HPS逐步1:1稀释以产生校准物浓度1,000;500;250;125;62.5;31.3和15.6ng/mL。阴性对照是100% HPS。对于测定中的预孵育步骤,将CS样品1:10稀释以调节至10%血清浓度和100ng/mL至1.56ng/mL的测定浓度范围。

[0223] 所用的QC储液样品在100%汇集的人血清中产生并作为单次使用等分试样贮存在-20℃。制备三份独立QC样品并以储液浓度贮存,代表高(750ng/mL)、中等(400ng/mL)和低(50ng/mL)的未稀释血清浓度。对于测定中的预孵育步骤,将QC样品在捕获/检测溶液中1:10新鲜稀释以达到血清浓度10%。还使用处于典型测定分割点的25ng/mL第四QC样品。

[0224] 实施例5

[0225] ADA筛查和验证测定

[0226] 夹心ELISA用于针对托珠单抗(TCZ)的抗药物抗体(ADA)的筛查和验证(参见Stubenrauch,K.等人,Clin.Ther.32(2010)1597-1609)。该方法的原理是捕获与TCZ-Dig和TCZ-Bi复合的ADA,所述TCZ-Bi导致固定化到链霉亲和素包被的平板上。通过抗Dig-HRP酶缀合的抗体检测与SA-MTP结合的TCZ-Bi/ADA/TCZ-Dig复合物。图1中显示药物耐受性抗药物抗体测定的原理。纳入寡聚体IgG作为ADA测定添加物产生如图2中所示的干扰抑制性抗药物抗体测定。多克隆抗体的辣根过氧化物酶(HRP)催化底物ABTS的颜色反应。颜色强度与分析物的浓度成比例。

[0227] 该筛查测定在室温进行。试剂和血清样品用通用缓冲液(目录号4742672)稀释,全部洗涤步骤均用洗涤缓冲液(PBS,0.05%聚山梨醇酯20(Tween 20)(目录号11332465-001))进行3次,每个孔300μL。在振摇下在500转/分钟的微量滴定板摇床(MTP摇床)上进行孵育。将试样、QC和CS样品与捕获抗体TCZ-Bi和检测抗体TCZ-Dig孵育过夜(多至16小时)。向预孵育微量滴定板(MTP)的每个孔装入225μL含有1.667μg/mL TCZ-Bi和1.667μg/mL TCZ-Dig连同寡聚人IgG ADA测定添加物(AAA)的捕获/检测溶液并且此后添加25μL的各个样品。所产生的TCZ-Bi浓度和TCZ-Dig浓度各自是1.5μg/mL并且寡聚人IgG具有浓度50μg/mL。为防止蒸发,覆盖加载的MTP并孵育过夜。预孵育平板的每个孔100μL一式两份转移至链霉亲和素包被的微量滴定板(SA-MTP)的孔,将所述微量滴定板覆盖并孵育1小时。

[0228] 在洗涤后,将浓度25mU/mL的多克隆抗Dig Fab-HRP缀合物以体积100μL添加至每个孔并孵育1小时。在洗涤后,将ABTS即用型溶液以100μL等分试样添加至每个孔并孵育约

10至15分钟,同时振摇。通过ELISA读数仪在405nm波长(参考波长:490nm)测量生色反应的信号。一式三份测定每份血清样品的吸光度值。最高标准物应当达到1.8和2.2任意单位(AU)之间的光密度(OD)。获得的OD数据用于通过非线性4参数回归曲线拟合“Wiemer-Rodbard”生成标准校正曲线,以计算样品浓度。如果浓度的回收率小于特异性分割点,则证实样品为ADA阳性。

[0229] 通过在一块MTP上一式两份分析类风湿性关节炎患者的32份单独空白人血清样品,评价特异性分割点。分割点指这样的信号,高于所述信号时,样品定义为ADA筛查测定中ADA的存在为可能阳性。归因于数据的非正态性,基于重复平板上分割点的均值,将具有95%百分位数的非参数方法用于分割点计算。

[0230] 为了从类风湿性关节炎患者的32份单独人空白血清样品的独立测量确定ADA测定的分割点所实施的实验揭示三块不同平板上的平均AU为约0.026,标准偏差(SD)为约0.009。相应的变异系数(CV)分别是23.8%;20.0%;和19.0%。基于这些数据集,推算出归一化因数 $NF=1.6905$,所述归一化因数在测定定性期间始终使用并适用于平板特异性分割点(平板特异性分割点[AU]=信号[AU](阴性对照) $\times NF$)。

[0231] 为了筛查ADA测定的定性,在一块平板上一式两份测量5份独立校正曲线制备物连同测定浓度范围为1.56ng/mL至100ng/mL的7份校准物样品和空白样品。测定内定性运行用5份重复(5个独立小瓶)进行,在单块平板上一式两份测量4份QC样品测量的每一份。一式两份测量的全部QC样品的测定间定性数据从7次独立测试运行获得,所述测试运行由至少两名操纵员在4个不同日执行。

[0232] 图3中显示干扰抑制性ELISA的典型校正曲线。在定性实验期间评估样品重复测量的精度并且其CV不超过15%。表5中汇总了干扰抑制性ADA ELISA的测定内和测定间精度值及准确度值。

[0233] 表5:使用掺入人血清中的托珠单抗特异性ADA时干扰抑制性ELISA的测定内和测定间精度及准确度的测定。

	100%血清中的 ADA 浓度[ng/mL]					
	测定内(n=5)			测定间(n=7)		
	高 QC	中等 QC	低 QC	高 QC	中等 QC	低 QC
掺入的(期望浓度)	750	400	50	750	400	50
[0234] 测量浓度的均值	683	382	50.8	696	402	52.5
测量浓度的 SD	15.6	15.8	1.33	21.2	13.6	2.8
精度(%CV)	2.28	4.14	2.62	3.04	3.38	5.33
准确度(%回收率)	91.1	95.5	102	92.8	101	105

[0235] 对于包含25ng/mL分割点QC的全部QC,确定的测定内精度均<5%。确定的测定内准确度处于91.1%至102%范围内并且全部分割点QC样品均测试为阳性。对于全部QC,反算的QC的测定间精度均<6%。对于高QC、中等QC和低QC,确定的测定间准确度是92.8%至105%。全部分割点QC测量均提供ADA阳性。

[0236] 通过在25,000ng/mL至6.1ng/mL的测定浓度范围内连续滴定(1:2)阳性对照样品评估潜在的高剂量钩状效应。该测定范围内部ADA浓度的回收率在77.9%和98.9%之间。为了分析潜在的基质效应,将11份单独的正常人血清样品掺入高剂量QC和低剂量QC(即100%血清中50ng/mL和750ng/mL)连同阳性对照ADA并定量。此外,还在相同平板上分析QC样品。低ADA浓度和高ADA浓度的回收率是111%(范围:104%至117%)和111%(范围:107%至117%),这表明在干扰抑制性ADA ELISA中不存在基质效应

[0237] 通过确定可以在分割点以上检出给定浓度的阳性对照ADA的最高TCZ浓度,评价药物耐受性。表2展示了完整数据集的汇总。

[0238] 表2:测定如本文中报道的干扰抑制性药物耐受性抗药物抗体ELISA中的药物(托珠单抗)耐受性。左侧对齐的信号值高于平板特异性分割点0.045AU,右侧对齐的值低于分割点。

[0239]

	TCZ [$\mu\text{g/mL}$]					
	100	30	10	3	1	0
ADA [ng/mL]	信号均值[AU]					
10,000	0.948	2.263	3.266	3.536	3.146	3.272
3,000	0.310	0.943	1.956	> 3.5	2.860	3.161
1,000	0.119	0.364	0.789	1.051	1.180	2.292
300	0.055	0.133	0.280	0.376	0.426	0.857
100	0.033	0.057	0.105	0.144	0.163	0.310
30	0.027	0.036	0.051	0.063	0.068	0.113
10	0.022	0.025	0.032	0.039	0.040	0.056
0	0.024	0.023	0.026	0.027	0.027	0.027

[0240] 临床样品中待检测的抗IL6R抗体托珠单抗的浓度是0.5 $\mu\text{g/mL}$ 或更高,经常在1 $\mu\text{g/mL}$ 至10 $\mu\text{g/mL}$ 范围内。检测到非常低的ADA浓度30ng/mL并在10 $\mu\text{g/mL}$ TCZ存在下经测试为阳性。另外,ADA浓度100ng/mL和300ng/mL分别显示30 $\mu\text{g/mL}$ 和甚至100 $\mu\text{g/mL}$ 的药物抗体耐受性。采用先前使用的托珠单抗的两步骤常规ADA ELISA所实施的相同实验揭示了采用干扰抑制性测定时至少10倍更高的药物耐受性(对于300ng/mL ADA浓度,参见图4)。

[0241] 在验证测定中待作为过量游离药物使用的TCZ的浓度基于药物干扰实验中获得的数据集。为了评价可以抑制样品中高水平ADA的TCZ浓度,4种不同浓度的阳性对照样品(100%血清中1,000、500、250、83.3ng/mL)各自与渐增浓度的TCZ(100%血清中0、16、31、63、125、250 $\mu\text{g/mL}$)孵育。确定抑制高浓度的阳性对照ADA时至少95%(对应于小于5%信号回收率)测量信号的TCZ浓度是25 $\mu\text{g/mL}$ TCZ。

[0242] 为了减少因研究内后期检验阶段期间研究样品中ADA的亲和力差异所致假阴性的可能性,将所确定值的两倍更高过量游离药物浓度(即与100%血清中400 $\mu\text{g/mL}$ 对应的40 $\mu\text{g/mL}$ 测定浓度)用于进一步评价。

[0243] 验证特异性ADA所需要的最小信号抑制值通过类风湿性关节炎患者的16份单独的空白人血清样品与TCZ预孵育并在一次测试运行中一式两份分析来确定。在具有和没有400 $\mu\text{g/mL}$ 游离TCZ的情况下进行分析。已经发现游离TCZ的添加平均减少分析信号14.1%,范围从-11.5%至34.8%,并且SD为11.2%。对于空白血清样品,应用99.9%置信区间(均数+3.09SD)导致49%的最低信号减少。基于这种计算,如果与游离药物不存在情况下相比时,在过量游离药物存在下信号减少多于49%,则将样品评定为验证阳性。作为参比样品,使用无过量TCZ的相应样品。为了展示验证测定中信号抑制的重现性,在具有或没有预定浓度的过量TCZ情况下分析具有高、中等和低阳性QC浓度的血清样品3次。

[0244] TCZ的干扰抑制性ADA测定具有在100%血清中1,000ng/mL至15.6ng/mL ADA校准物的测量范围。对于全部质量控制,测定内精度均小于5%,并且测定内准确度是91.1%至102%。测定间精度和准确度分别是小于6%和92.8%至105%。

[0245] 测定的定性排除钩状效应和基质效应。

[0246] 可以看出,干扰抑制性ADA测定的药物耐受性至少10倍高于先前形式的药物耐受性。

[0247] 验证测定基本上如前对筛查测定所述那样进行,例外是在没有和具有过量游离药物即TCZ情况下平行分析样品。验证捕获/检测溶液含有相同体积的捕获/检测溶液连同额外的过量TCZ (44.4 μ g/mL) 以实现添加样品后40 μ g/mL TCZ的终测定浓度。使用以下等式在验证性条件下具有过量药物时计算%信号抑制:

[0248] $\% \text{信号抑制} = 100 \times (1 - ([\text{AU}] \text{药物预处理的样品} / [\text{AU}] \text{未处理的样品}))$ 。

[0249] 实施例6

[0250] 干扰抑制性ADA测定应用于临床样品

[0251] 增加药物耐受性的措施导致ADA阳性从12/28增长至25/28,其中所述措施在于1) 增加生物素化的和洋地黄毒甙化的TCZ的浓度(例如至1.5 μ g/mL); 2) 同时孵育血清样品与TCZ-Bi和TCZ-Dig; 3) 延长血清样品与TCZ-Bi和TCZ-Dig孵育(例如过夜); 4) 仅使用赖氨酸偶联的TCZ-Bi试剂和TCZ-Dig试剂而非赖氨酸和糖偶联试剂的混合物; 和使用增加的血清基质(例如10%而非5%)。

[0252] 16份临床血清样品由一组三种不同的ADA测定分析:常规ADA测定、不添加寡聚人IgG的如本文中报道的干扰抑制性ADA测定,和添加寡聚人IgG的如本文中报道的干扰抑制性ADA测定。表6中汇总结果。对于16份样品,在其中仅已经采取措施1至5的ADA测定形式中15份样品测试为阳性,而在常规ADA测定中以及在仅已经采取措施1至6的如本文中报道的干扰抑制性药物耐受性ADA测定中仅8/16的样品测试为阳性,8份样品中有7份样品结果相同。这7份具有相同结果的样品以样品中和/或基线处的低RF浓度为特征。全部7份样品均含有与托珠单抗Fab部分结合的IgG同种型的ADA,提示真实托珠单抗特异性ADA。7份样品中有三份还具有IgM同种型ADA,但是发现其也与Fab部分结合。与之相反,绝大部分的剩余样品优势地具有与托珠单抗的恒定Fc部分结合的IgM同种型的ADA。这些样品还含有高浓度即>1,000U/mL的RF。

[0253] 表6:在BIAcore测定中和在类风湿因子测定中,采用不同样式的ADA测定对来自用托珠单抗治疗的类风湿性关节炎患者的16份血清样品的对比分析。

[0254]

样 品 编 号	如本文中报道 的干扰抑制性 ADA 测定		常规 ADA 测定法	BIAcore: 同种型/表 位结合		RF 测定 [U/mL]	
	无添加 物	有添加 物		IgG AD A	IgM AD A	研 究 样品	基线
1	+	+	+	IgG/ Fab	IgG	-	312
2	+	+	+	IgG/ Fab	-	324	324
3	+	+	+	IgG/ Fab	-	591	324
4	+	+	+	IgG/ Fab	-	56	37
5	+	+	+	IgG/ Fab	IgG/ Fab	117	129
6	+	+	+	IgG/ Fab	IgG/ Fab	-	47
7	+	+	+	IgG/ Fab	-	-	< 15
8	+	-	-	IgG/ Fc	IgG/ Fc	2,870	1,305
9	-	-	-	IgG/ Fc	IgG/ Fc	1,790	1,790
10	+	-	-	IgG/ Fc	IgG/ Fc	1,630	-
11	+	-	-	-	IgG/ Fc	2,320	1,393
12	+	-	-	-	IgG/ Fc	-	5,510
13	+	-	-	IgG/ Fc	IgG/ Fc	1,500	1,315
14	+	-	-	-	IgG/ Fab ; Fab	-	107

[0255]	如本文中报道的干扰抑制性ADA测定		常规ADA测定法	BIAcore: 同种型/表位结合		RF 测定 [U/mL]	
	样品编号	无添加物	有添加物	IgG ADA	IgM ADA	研究样品	基线
	15	+	+	-	IgG/Fab ; Fc	4,450	2,620
	16	+	-	+	IgG	-	1,099

[0256] 如实施例5中报道的ADA免疫测定用来分析在基线处和在施用托珠单抗后取得的148份来自类风湿性关节炎患者的不同血清样品。采用干扰抑制性ADA测定分析的结果与通过用常规ADA免疫测定分析获得的那些结果比较。为了更详细地分析,选择来自18位不同患者的总计92份血清样品(在148份中),所述患者具有关于ADA同种型和结合区以及临床事件的额外信息。如果患者满足以下标准中的至少一个则选择患者:1)在任何时间点均为ADA阳性免疫反应;2)高TCZ血清浓度;3)临床反应如输注相关、超敏或过敏反应。用如前所述的生物传感器免疫测定(Stubenrauch, K. 等人, Anal. Biochem. 390 (2009) 189-196) 进行ADA的结合区和同种型分析。简而言之,通过固定化全长抗体和其恒定 (Fc) 片段和抗原结合 (Fab) 片段,表面等离子体共振 (SPR) 测定设置利用单个生物传感器芯片上的4个平行流动池对ADA进行差异性结合分析。通过将针对TCZ的兔多克隆抗体与人免疫球蛋白 (Ig) M、IgG或IgE缀合,获得了模拟不同同种型的多克隆人ADA的阳性对照标准缀合物(参见WO 2008/061684)。使用来自Siemens Healthcare Diagnostics的RF试剂(Newark, DE, USA),在Siemens BN II比浊计上进行类风湿因子(RF)测定。简而言之,当与含有RF的样品混合时,用免疫复合物包被的聚苯乙烯颗粒聚集,所述免疫复合物由人免疫球蛋白和来自羊的抗人IgG组成。这些聚集物散射穿过样品的光束。散射光的强度与样品中各蛋白质的浓度成比例。通过与已知浓度的标准物比较,评价结果。

[0257] 用常规和如本文中报道的干扰抑制性药物耐受性ADA测定对比评价了来自TCZ治疗的RA患者的258份不同血清样品,在12份样品中显示相同的阳性结果。常规测定测量27位安慰剂患者为阳性,而如本文中报道的干扰抑制性药物耐受性ADA测定测量4位安慰剂患者为阳性。综上所述,与常规ADA测定相比,如本文所述的一组措施和添加作为ADA测定添加物的寡聚人IgG赋予增强的药物耐受性及受抑制的RF干扰。

[0258] 下表7中显示上述数据的子集分析。

[0259] 表7.

[0260]

患者	时间点	常规 ELISA		干扰抑制性 ELISA		给药
P1	第 4 周	+	0.812	+	0.110	安慰剂
P2	基线	+	1.009	+	0.893	4 mg/kg
P2	第 4 周	-	0.097	+	0.088	4 mg/kg
P2	第 9 周	+	0.276	+	0.228	4 mg/kg
P3	第 8 周	+	0.349	+	0.566	4 mg/kg
P3	第 24 周	+	2.405	+	1.760	4 mg/kg
P3	第 28 周	+	1.307	+	1.001	4 mg/kg
P4	第 4 周	+	1.409	+	0.242	4 mg/kg
P5	第 28 周	+	0.219	+	0.060	8 mg/kg
P6	第 8 周	+	0.387	+	0.688	4 mg/kg
P6	第 12 周	+	3.689	+	3.721	4 mg/kg
P6	第 24 周	+	3.506	+	3.722	4 mg/kg
P7	第 4 周	+	0.771	+	0.058	安慰剂

[0261] 研究相关的CP:0.215 (常规ELISA) ;0.058 (干扰抑制性ELISA) ;+: 阳性ELISA结果;-: 阴性ELISA结果

[0262] 在表8中,将27位没有用TCZ治疗的安慰剂患者的测定信号显示为误差线和数值。由于不存在TCZ治疗诱导的ADA,这个组中不期望高测定信号并且高测定信号将表示潜在干扰。

[0263] 表8a.

[0264]

患者	时间点	常规 ELISA		干扰抑制性 ELISA		给药
P8	基线	+	0.270	-	0.032	安慰剂
P8	第 4 周	+	0.231	-	0.033	安慰剂

[0265]

患者	时间点	常规 ELISA		干扰抑制性 ELISA		给药
P9	第 8 周	+	3.736	-	0.055	安慰剂
P9	基线	+	3.297	+	0.058	安慰剂
P9	第 12 周	+	2.863	-	0.046	安慰剂
P9	第 4 周	+	3.739	-	0.052	安慰剂
P1	第 4 周	+	0.812	+	0.110	安慰剂
P10	第 4 周	+	0.755	-	0.021	安慰剂
P10	第 4 周	+	0.635	-	0.021	安慰剂
P11	基线	+	0.272	-	0.020	安慰剂
P11	第 4 周	+	0.271	-	0.021	安慰剂
P11	第 4 周	+	0.234	-	0.020	安慰剂
P12	基线	+	1.157	-	0.027	安慰剂
P12	基线	+	1.362	-	0.028	安慰剂
P12	第 4 周	+	1.149	-	0.029	安慰剂
P4	基线	+	0.522	-	0.033	安慰剂
P4	第 4 周	+	1.409	+	0.242	安慰剂
P4	第 4 周	+	0.651	-	0.047	安慰剂
P13	第 36 周	+	0.349	-	0.023	安慰剂
P14	第 4 周	+	0.245	-	0.033	安慰剂
P14	基线	+	0.276	-	0.035	安慰剂
P14	第 4 周	+	0.275	-	0.037	安慰剂
P15	第 4 周	+	0.580	-	0.049	安慰剂
P7	基线	+	0.990	-	0.056	安慰剂
P7	第 4 周	+	0.822	-	0.052	安慰剂
P7	第 4 周	+	0.523	-	0.042	安慰剂
P7	第 4 周	+	0.771	+	0.058	安慰剂

[0266] 研究相关的CP:0.215(常规ELISA);0.058(干扰抑制性ELISA);+:阳性ELISA结果;-:阴性ELISA结果

[0267] 两种测定的信号模式非常不同:尽管使用常规ELISA确定全部27份安慰剂样品均为阳性,而用如本文中报道的干扰抑制性ELISA确定27份样品中的仅4份为阳性。

[0268] 除安慰剂治疗的患者样品之外,也分析了TCZ治疗的患者。在表8b中显示了TCZ治疗前的患者的结果。在表8c中显示了TCZ治疗的结果。

[0269] 表8b.

[0270]

患者	时间点	常 规 ELISA		干扰抑制 性 ELISA		给药
P2	基线	+	1.009	+	0.893	4
P16	基线	+	0.745	-	0.021	8
P17	基线	+	0.281	-	0.020	8
P18	基线	+	1.401	-	0.023	4

[0271] 研究相关的CP:0.215 (常规ELISA) ;0.058 (干扰抑制性ELISA) ;+: 阳性ELISA结果;-: 阴性ELISA结果

[0272] 表8c.

[0273]

患者	时间点	常 规 ELISA		干扰抑制 性 ELISA		给药
P19	第 24 周	+	0.281	-	0.030	4 mg/kg
P19	第 24 周	+	0.226	-	0.031	4 mg/kg
P19	第 4 周	+	0.293	-	0.030	4 mg/kg
P19	第 8 周	+	0.362	-	0.028	4 mg/kg
P2	第 4 周	-	0.097	+	0.088	4 mg/kg
P2	第 8 周	+	0.276	+	0.228	4 mg/kg
P16	第 24 周	+	0.416	-	0.030	8 mg/kg
P16	第 4 周	+	0.542	-	0.029	8 mg/kg
P16	第 4 周	+	0.397	-	0.024	8 mg/kg
P3	第 24 周	+	2.405	+	1.760	4 mg/kg
P3	第 28 周	+	1.307	+	1.001	4 mg/kg
P3	第 4 周	-	0.181	+	0.120	4 mg/kg
P3	第 8 周	+	0.349	+	0.566	4 mg/kg
P20	第 8 周	+	0.818	-	0.034	4 mg/kg
P21	第 4 周	+	0.289	-	0.031	8 mg/kg
P17	第 12 周	+	0.369	-	0.023	8 mg/kg
P17	第 24 周	+	0.330	-	0.022	8 mg/kg
P17	第 4 周	+	0.488	-	0.022	8 mg/kg
P17	第 4 周	+	0.465	-	0.025	8 mg/kg

[0274]	患者	时间点	常规 ELISA		干扰抑制性 ELISA		给药
	P17	第 8 周	+	0.409	-	0.026	8 mg/kg
	P18	第 4 周	+	1.218	-	0.026	4 mg/kg
	P18	第 4 周	+	1.041	-	0.028	4 mg/kg
	P5	第 28 周	+	0.219	+	0.060	8 mg/kg
	P6	第 12 周	+	3.689	+	3.721	4 mg/kg
	P6	第 24 周	+	3.506	+	3.722	4 mg/kg
	P6	第 8 周	+	0.387	+	0.688	4 mg/kg
	P22	第 24 周	+	0.423	-	0.020	4 mg/kg

[0275] 研究相关的CP:0.215 (常规ELISA) ;0.058 (干扰抑制性ELISA) ;+: 阳性ELISA结果;-: 阴性ELISA结果

[0276] 采用两种测定的信号模式不相似: 尽管使用常规ELISA时确定25位患者为阳性, 而使用如本文中报道的干扰抑制性ELISA时仅确定10位患者为阳性。

[0277] 实施例7

[0278] 捕获和示踪试剂的衍生化类型的影响

[0279] 单标记vs. 多重标记

[0280] 增加药物耐受性的措施在于增加生物素化和洋地黄毒甙化的TCZ的浓度 (例如至1.5 μ g/mL); 这能够由粘性洋地黄毒甙造成较高的背景; 为了提防由于较高分割点的更差的药物耐受性, 由于存在较高的捕获和示踪剂浓度单生物素化和单洋地黄毒甙化给出较低的背景信号。

[0281] 夹心ELISA用于针对托珠单抗 (TCZ) 的抗药物抗体 (ADA) 筛查和验证 (参见 Stubenrauch, K. 等人, Clin. Ther. 32 (2010) 1597-1609)。该方法的原理是捕获与TCZ-Dig (单) 和TCZ-Bi (单) 复合的ADA, 所述TCZ-Bi导致固定化到链霉亲和素包被的平板上。通过抗 Dig-HRP酶缀合的抗体检测与SA-MTP结合的TCZ-Bi/ADA/TCZ-Dig复合物。图1中显示药物耐受性抗药物抗体测定的原理。纳入寡聚体IgG作为ADA测定添加物导致如图2中所示的干扰抑制性抗药物抗体测定。多克隆抗体的辣根过氧化物酶 (HRP) 催化底物ABTS的颜色反应。颜色强度与分析物的浓度成比例。

[0282] 该筛查测定在室温进行。试剂和血清样品用通用缓冲液 (目录号4742672) 稀释, 全部洗涤步骤均用洗涤缓冲液 (PBS, 0.05% 聚山梨醇酯20 (**Tween®** 20) (目录号11332465-001)) 进行3次, 每个孔300 μ L。孵育在振摇下在500转/分钟的微量滴定板摇床 (MTP摇床) 上进行。将测试样品、QC和CS样品与捕获抗体TCZ-Bi和检测抗体TCZ-Dig孵育过夜 (16小时)。向预孵育微量滴定板 (MTP) 的每个孔装入225 μ L含有1.667 μ g/mL TCZ-Dig (单) 和1.667 μ g/mL TCZ-Dig (单) 连同寡聚人IgG ADA测定添加物 (AAA) 的捕获/检测溶液并且此后添加25 μ L的各样品。所产生的TCZ-Bi (单) 浓度和TCZ-Dig (单) 浓度分别是1.5 μ g/mL并且寡聚人IgG具有浓度50 μ g/mL。为防止蒸发, 覆盖加载的MTP并孵育过夜。预孵育平板的每个孔100 μ L一式两份转移至链霉亲和素包被的微量滴定板 (SA-MTP) 的孔, 将所述微量滴定板覆盖并孵育1

小时。

[0283] 在洗涤后,将浓度25mU/mL的多克隆抗Dig Fab-HRP缀合物以体积100 μ L添加至每个孔并孵育1小时。在洗涤后,将ABTS即用型溶液以100 μ L等分试样添加至每个孔并孵育约10至15分钟,同时振摇。通过ELISA读数仪在405nm波长(参考波长:490nm)测量生色反应的信号。一式三份测定每份血清样品的吸光度值。最高标准物应当达到1.8和2.2任意单位(AU)之间的光密度(OD)。获得的OD数据用于通过非线性4参数回归曲线拟合“Wiemer-Rodbard”生成标准校正曲线,以计算样品浓度。如果浓度的回收率小于特异性分割点,则证实样品为ADA阳性。

[0284] 为了确定分割点,在两种测定中测量RD(风湿病)患者的35份天然血清。如图5和图6中所示,与采用TCZ-Bi(单)和TCZ-Dig(单)的干扰抑制性抗药物抗体ELISA相比,干扰抑制性抗药物抗体ELISA中血清的信号之间的变异高。

[0285] 为了进一步评估,用干扰抑制性ADA测定的两种变体分析来自TCZ治疗的RA患者的77份不同血清样品。因为全部样品均在TCZ治疗之前取得(基线),针对TCZ的ADA应当不存在。高于分割点的信号可表示与针对治疗药物(TCZ)的ADA不相关的推断(假阳性)。

[0286] 采用多重标记的TCZ的测定(图7)比采用单标记的TCZ的测定(图8)显示更大的信号变异。如可以见到,这种变异不是该体系的系统性设置(这本来单纯是Y-轴上位移),但其所获得信号的带宽增加。使用这些测定特异性分割点,在干扰抑制性药物耐受性ADA测定(单)中几乎全部样品低于分割点。多重测定中测量的几乎全部样品在分割点以上。

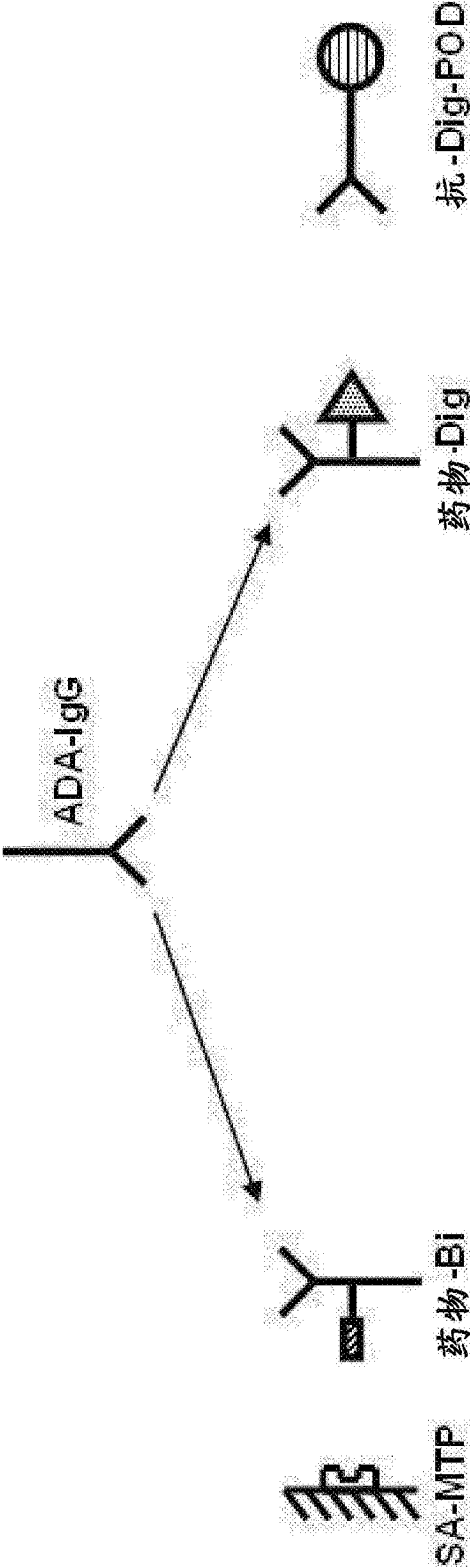


图1

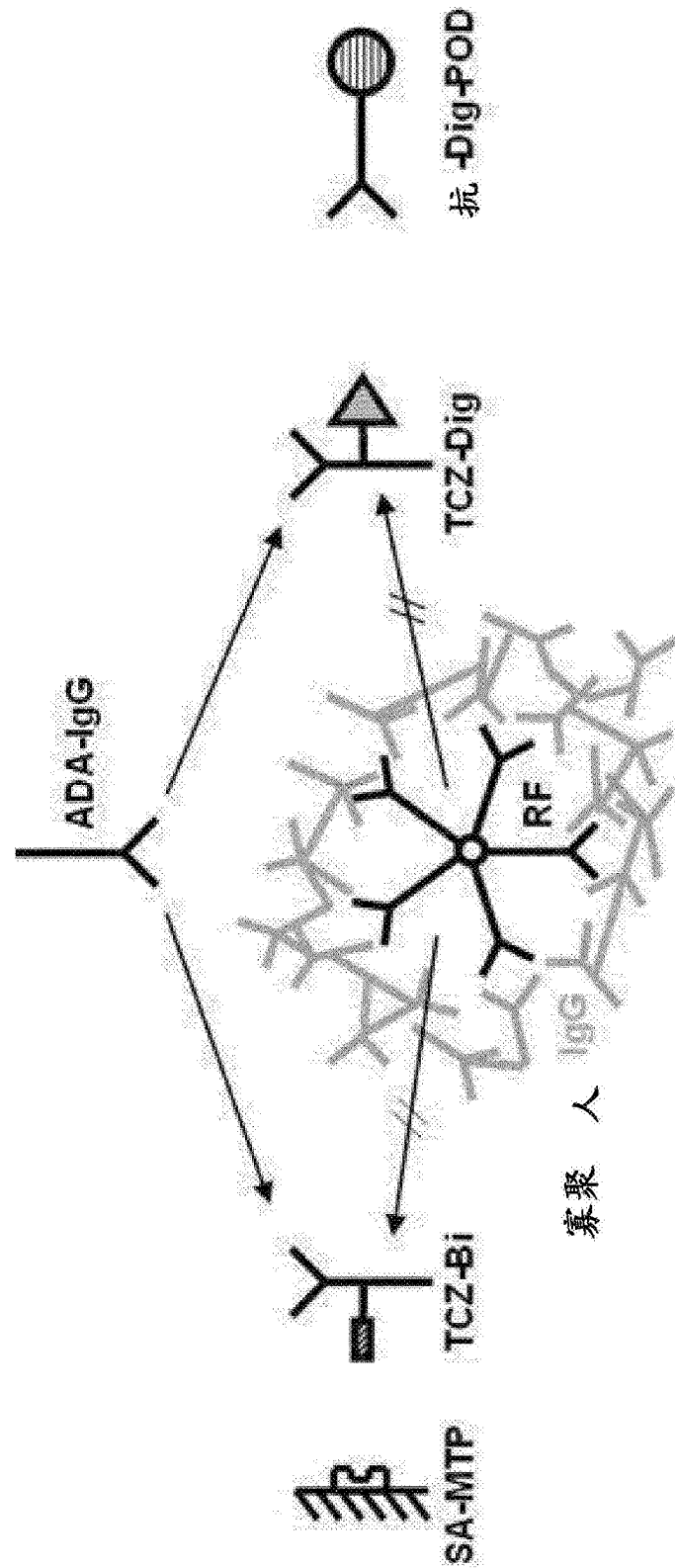


图2

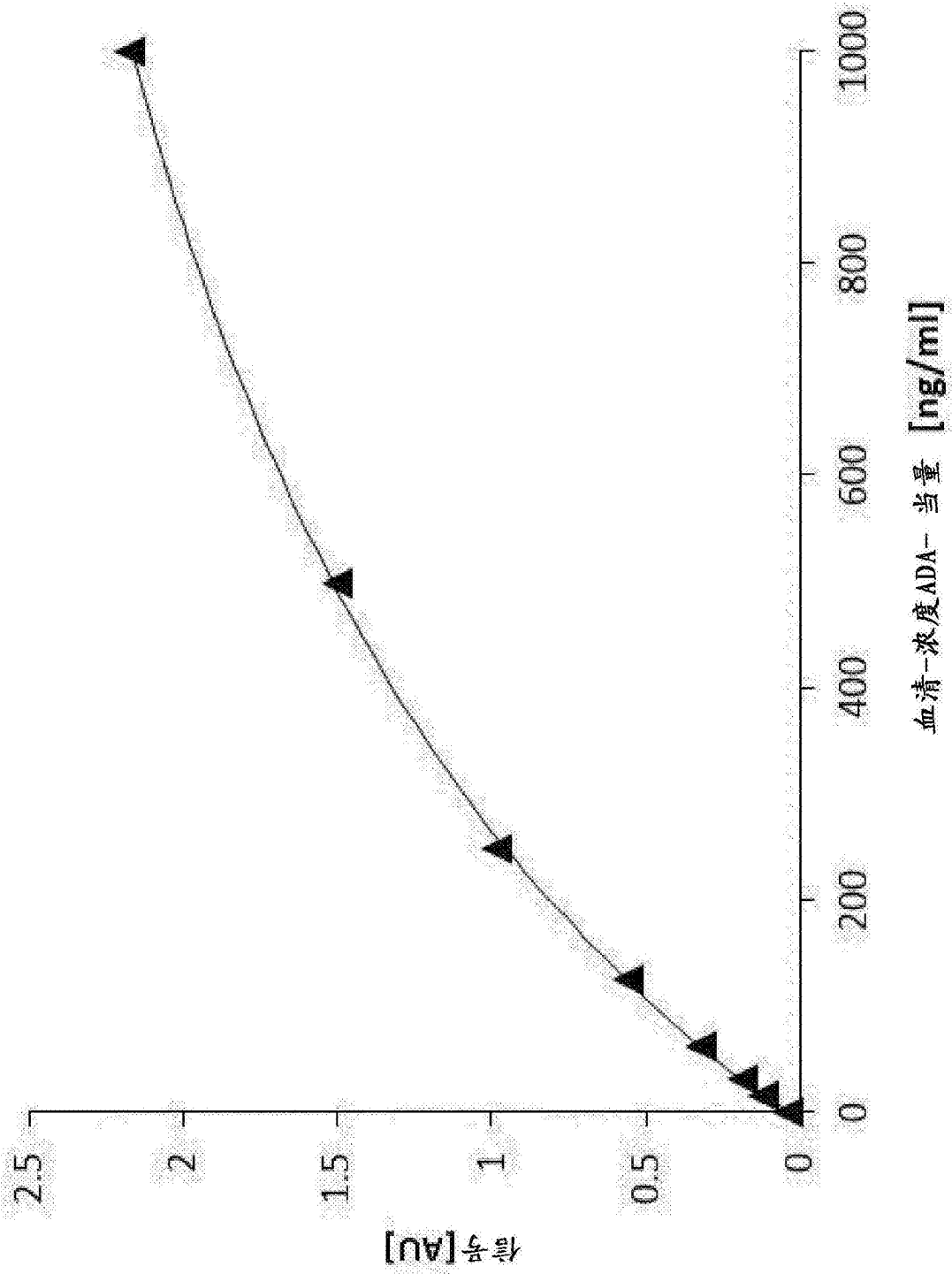


图3

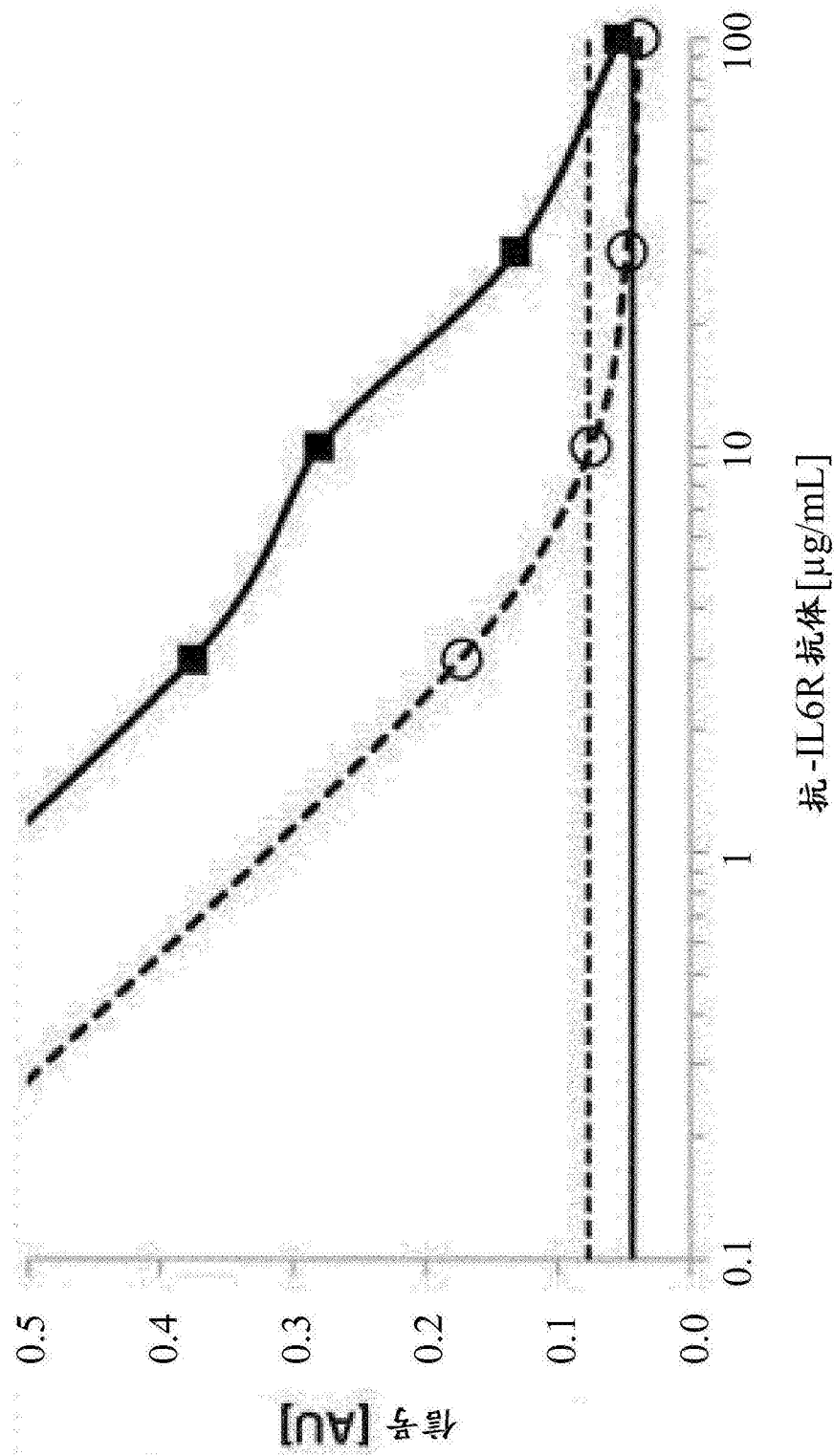


图4

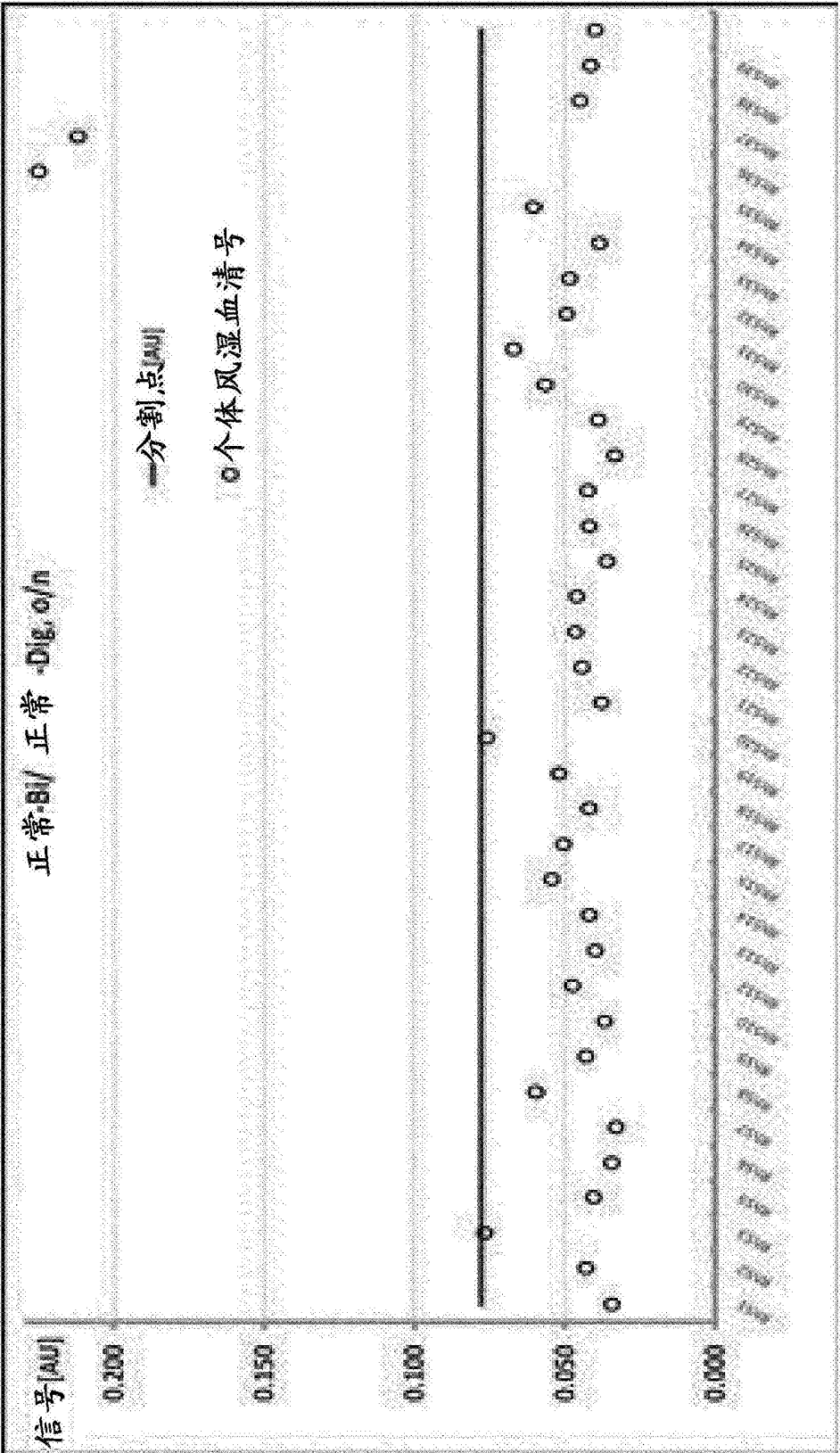


图5

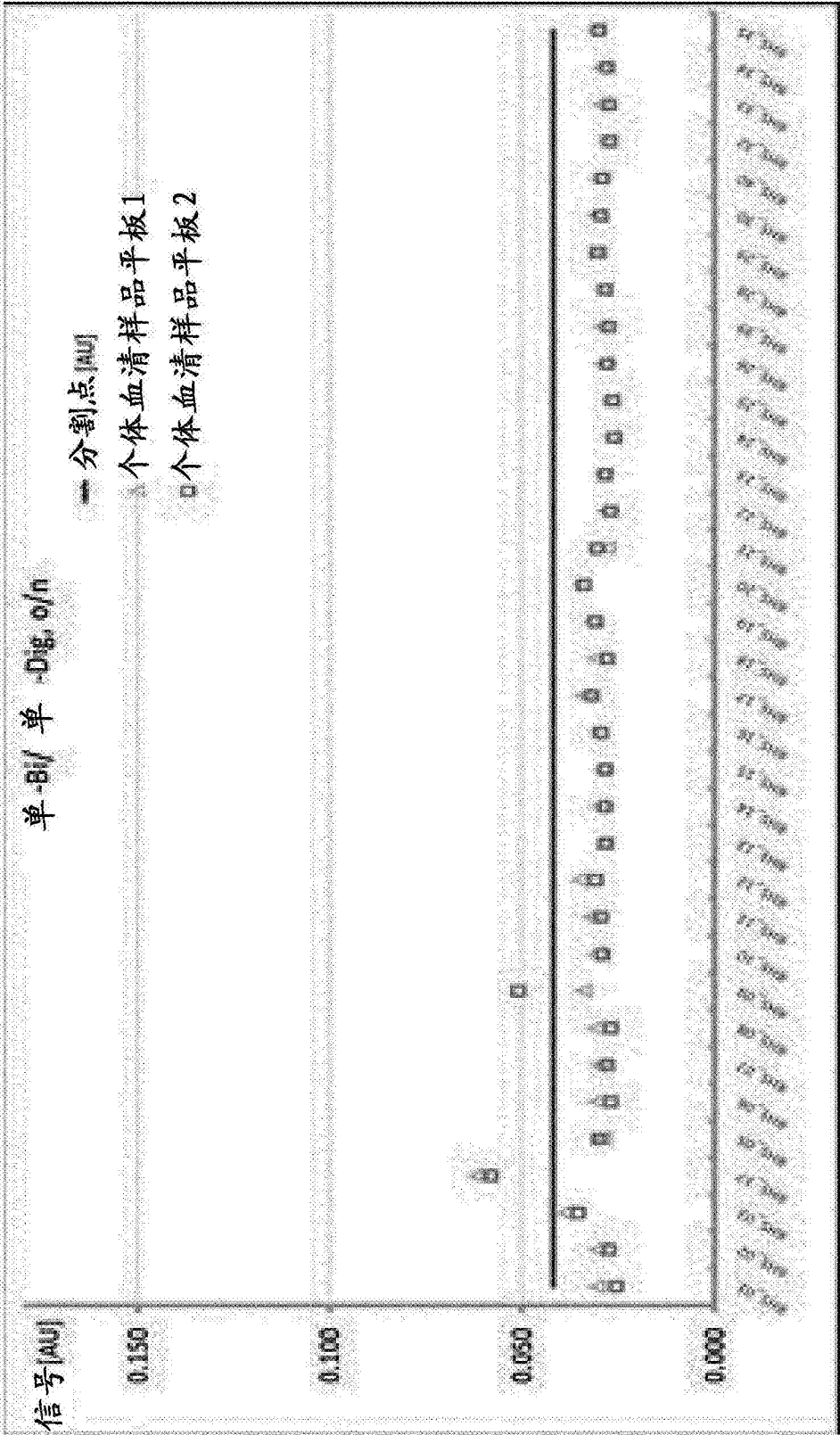


图6

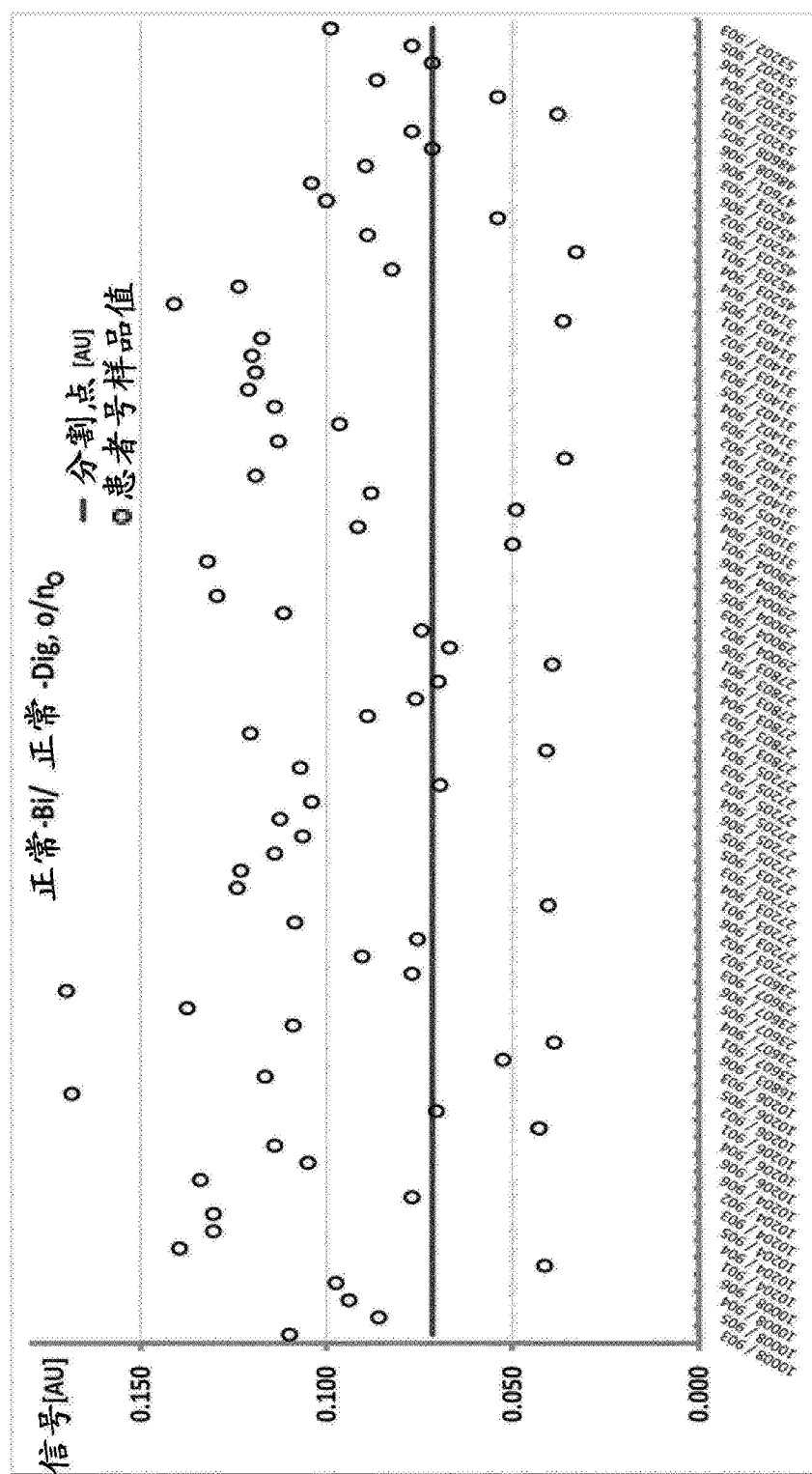


图7

