



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103109190 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 22

(21) 申请号 201180042537. 9

代理人 封新琴

(22) 申请日 2011. 08. 17

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

G01N 33/68(2006. 01)

10173408. 5 2010. 08. 19 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2013. 03. 04

WO 2009003082 A2, 2008. 12. 31,

(86) PCT国际申请的申请数据

EP 1653233 A1, 2006. 05. 03,

PCT/EP2011/064178 2011. 08. 17

CN 1766621 A, 2006. 05. 03,

(87) PCT国际申请的公布数据

CN 101437536 A, 2009. 05. 20,

W02012/022774 EN 2012. 02. 23

CN 101646449 A, 2010. 02. 10,

(73) 专利权人 霍夫曼 - 拉罗奇有限公司

DAVID M. KNIGHT 等 . THE IMMUNOGENICITY

地址 瑞士巴塞尔

OF THE 7E3 MURINE MONOCLONAL FAB ANTIBODY
FRAGMENT VARIABLE REGION IS DRAMATICALLY
REDUCED IN HUMANS BY SUBSTITUTION OF HUMAN
FOR MURINE CONSTANT REGIONS. 《Molecular
Immunology》. 1995, 第 32 卷 (第 16 期),

(72) 发明人 V. P. 格鲁纳特 U. 克劳斯

审查员 黄晓丽

P. 库巴莱克 M. 罗思福斯

B. 厄普梅尔

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

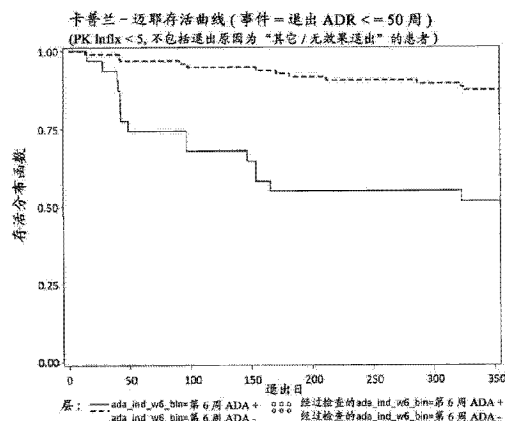
权利要求书2页 说明书26页 附图6页

(54) 发明名称

用于测量结合治疗性单克隆抗体的抗体的测定法

(57) 摘要

本发明涉及一种用于在样品中体外测定抗 < 治疗性单克隆抗体 > 抗体 (抗 < TmAB > AB) 的免疫测定方法, 所述样品来自用治疗性单克隆抗体 (TmAB) 治疗的患者。所述方法包括下列步骤: (a) 提供结合至固相的所述 TmAB 的 F(ab) 片段, (b) 将 (a) 中提供的固相与样品一起温育, 由此经由 F(ab) 片段使抗 < TmAB > AB 与所述固相结合, (c) 将在 (b) 中获得的固相与结合抗 < TmAB > AB 的单克隆抗体一起温育, (d) 检测 (c) 中结合的单克隆抗体, 并由此测定样品中的抗 < TmAB > AB。本发明还关注依靠阵列形式的免疫测定法来测定特定类免疫球蛋白的抗原特异性抗体的方法, 其中在体外测定样品中针对 TmAB 的抗 < TmAB > AB 的检测, 所述样品自用所述 TmAB 治疗的患者提供。还公开了这类方法用于检测抗 < TmAB > AB 以及在鉴定用 TmAB 治疗期间有风险形成不良药物反应 (ADR) 的患者中的用途。



1. 治疗性单克隆抗体 (TmAB) 的 F(ab) 片段在制备用于在来自用所述 TmAB 治疗的患者的样品中体外测定抗 < 治疗性单克隆抗体 > 抗体 (抗 <TmAB>AB) 的试剂盒中的用途, 所述测定包括:

- a) 提供结合至固相的所述 TmAB 的 F(ab) 片段,
- b) 将 (a) 中提供的所述固相与所述样品一起温育, 由此经由所述 F(ab) 片段使所述抗 <TmAB>AB 与所述固相结合,
- c) 将在 (b) 中获得的固相与单克隆抗体 <h-Agg. -IgG> 一起温育, 由此所述单克隆抗体结合所述抗 <TmAB>AB, 其中所述单克隆抗体是具有 10^{-6}mol/l - 10^{-8}mol/l 的解离常数 ($=K_D$) 值的 IgM 抗体, 并
- d) 检测 (c) 中结合的单克隆抗体 <h-Agg. -IgG>, 并由此测定所述样品中的所述抗 <TmAB>AB。

2. 依照权利要求 1 的用途, 其中所述样品是全血、血清或血浆。

3. 依照权利要求 1 或 2 的用途, 其中所述 TmAB 选自下组: 嵌合抗体 (CA) 和人源化抗体 (HA)。

4. 依照权利要求 1 或 2 的用途, 其中所述 TmAB 选自下组: 英夫利昔单抗 (infliximab)、阿达木单抗 (adalimumab)、赛妥珠单抗 (certolizumab) 和利妥昔单抗 (rituximab)。

5. 依照权利要求 1 至 4 中任一项的用途, 其中通过选自下组的结合系统将所述 F(ab) 片段结合至所述固相: 生物素 / 链霉亲和素、生物素 / 亲和素、和生物素 - 抗 <生物素> 抗体。

6. 依照权利要求 1 至 5 中任一项的用途, 其中所述单克隆抗体是具有 10^{-7}mol/l - 10^{-8}mol/l 的解离常数 ($=K_D$) 值的抗体。

7. 依照权利要求 1 至 6 中任一项的用途, 其中所述单克隆抗体 <h-Agg. -IgG> 是标记的。

8. 依照权利要求 7 的用途, 其中所述单克隆抗体 <h-Agg. -IgG> 是用 Dig 标记的。

9. 依照权利要求 8 的用途, 其中通过与同可检测标记物缀合的抗 <Dig> 抗体一起温育来检测经 Dig 标记的单克隆抗体 <h-Agg. -IgG>。

10. 依照权利要求 9 的用途, 其中所述可检测标记物选自下组: 发光标记物、化学发光标记物、电化学发光标记物、荧光标记物、和放射性标记物。

11. 依照权利要求 1 至 10 中任一项的用途, 其中所述试剂盒用于检测抗 <TmAB> 抗体。

12. 依照权利要求 1 至 10 中任一项的用途, 其中所述试剂盒用于鉴定在用 TmAB 治疗期间有风险形成不良药物反应 (ADR) 的患者, 其中在所述测定中对抗 <TmAB>AB 测试呈阳性的患者有风险形成 ADR。

13. 依照权利要求 12 的用途, 其中在第一次施用所述 TmAB 后不迟于 14 周自患者采集的样品中检测抗 <TmAB>AB。

14. 第一治疗性单克隆抗体 (TmAB) 的 F(ab) 片段在制备用于为在用所述第一 TmAB 治疗下的患者选择备选的治疗性抗体的试剂盒中的用途, 其中至少可用第一和一种或多种备选的 TmAB, 所述选择包括:

- a) 在来自用所述第一 TmAB 治疗的患者的样品中体外测定针对所述第一 TmAB 的抗 <TmAB>AB, 并

b) 如果存在针对所述第一 TmAB 的抗 <TmAB>AB, 那么选择备选的 TmAB 以供未来疗法用。

15. 依照权利要求 14 的用途, 其中可以在第一次施用所述第一 TmAB 后不迟于 14 周自患者提供的样品内体外测定所述抗 <TmAB>AB。

16. 依照权利要求 14 或 15 的用途, 其中所述备选的 TmAB 选自下组: 抗 <TNF α > 单克隆抗体和利妥昔单抗。

17. 依照权利要求 14 或 15 的用途, 其中所述备选的 TmAB 选自下组: 英夫利昔单抗、阿达木单抗、赛妥珠单抗和利妥昔单抗。

18. 依照权利要求 14 或 15 的用途, 其中所述备选的 TmAB 是抗 <TNF α > 单克隆抗体。

19. 依照权利要求 14 或 15 的用途, 其中所述备选的 TmAB 选自下组: 英夫利昔单抗、阿达木单抗和赛妥珠单抗。

20. 依照权利要求 14 或 15 的用途, 其中所述第一 TmAB 是抗 <TNF α > 单克隆抗体, 而所述备选的 TmAB 是利妥昔单抗。

用于测量结合治疗性单克隆抗体的抗体的测定法

[0001] 描述

[0002] 本发明涉及一种用于在样品中体外测定抗<治疗性单克隆抗体>抗体(抗<TmAB>AB)的免疫测定方法,所述样品来自用治疗性单克隆抗体(TmAB)治疗的患者。所述方法包括下列步骤:(a)提供结合至固相的所述TmAB的F(ab)片段,(b)将(a)中提供的固相与样品一起温育,由此经由F(ab)片段使抗<TmAB>AB与所述固相结合,(c)将在(b)中获得的固相与结合抗<TmAB>AB的单克隆抗体一起温育,(d)检测(c)中结合的单克隆抗体,并由此测定样品中的抗<TmAB>AB。本发明还关注依靠阵列形式的免疫测定法来测定特定类免疫球蛋白的抗原特异性抗体的方法,其中在体外测定样品中针对TmAB的抗<TmAB>AB的检测,所述样品自用所述TmAB治疗的患者提供。还公开了这类方法用于检测抗<TmAB>AB以及在鉴定用TmAB治疗期间有风险形成不良药物反应(ADR)的患者中的用途。

[0003] 发明背景

[0004] 自Koeher和Milstein在1974年开发出第一批单克隆抗体以来,已经对开发适合于人用疗法的抗体投入了诸多努力。变得可用的第一批单克隆抗体已经在小鼠和大鼠中形成。在过去十年中,数目不断增长的嵌合单克隆抗体、人源化单克隆抗体或人单克隆抗体已经进入市场。

[0005] 治疗性单克隆抗体(=TmAB)的公知的例子是阿昔单抗(abciximab) (ReoPro®)、阿达木单抗(adalimumab) (Humira®)、阿仑单抗(alemtuzumab) (Campath®)、巴利昔单抗(basiliximab) (Simulect®)、贝伐单抗(bevacizumab) (Avastin®)、西妥昔单抗(cetuximab) (Erbix®)、赛妥珠单抗(certolizumabpegol) (Cimzia®)、达克珠单抗(daclizumab) (Zenapax®)、依库珠单抗(eculizumab) (Soliris®)、依法珠单抗(efalizumab) (Raptiva®)、吉姆单抗(gemtuzumab) (Mylotarg®)、替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan) (Zevalin®)、英夫利昔单抗(infliximab) (Remicade®)、莫罗单抗-CD3(muromonab-CD3) (Orthoclone OKT3®)、那他珠单抗(natalizumab) (Tysabri®)、奥马珠单抗(omalizumab) (Xolair®)、帕利珠单抗(palivizumab) (Synagis®)、帕尼单抗(panitumumab) (Vectibix®)、兰尼单抗(ranibizumab) (Lucentis®)、利妥昔单抗(rituximab) (Rituxan®, MabThera®)、曲妥单抗(trastuzumab) (Herceptin®)和托西莫单抗(tositumomab) (Bexxar®)。

[0006] 可用不同种类的TmAB,其中一些在患者治疗期间可能诱发不良药物反应(ADR)或二次治疗失败。

[0007] 目前可用的各种TmAB包括嵌合抗体(例如英夫利昔单抗(一种抗<TNF α >AB))、

人源化抗体（例如赛妥珠单抗（一种抗<TNF α >AB）和人抗体（例如阿达木单抗（也是一种抗<TNF α >AB）或帕尼单抗（一种抗<表皮生长因子受体>AB））。

[0008] 相当大量的嵌合、人源化或人 TmAB 已上市或者目前在开发中并且需要进一步调查。这类调查中的重要标准是，治疗期间自身抗体的诱导、不良药物反应 (ADR)、生物利用度和抗体清除，等等。

[0009] 对用 TmAB 治疗患者的 EMEA 批准将来还会依靠与抗<TmAB>AB 形成有关的数据。

[0010] 在现有技术中已经采用许多不同方法来检测抗<TmAB>AB，并且已经产生了完全不同或者甚至矛盾的结果和含意。

[0011] Mire-Sluis, A. R. 等，于 J. Immunol. Methods 289 (2004) 1-16 中概述了设计和优化用于检测宿主中针对生物技术生成的治疗性抗体的抗药物抗体（抗<TmAB>AB）的免疫测定法的建议。依照 Mire-Sluis 等，公知的抗药物抗体测定法形式显示相当多的缺点。例如，在 W02005/045058 和 W090/006515 中提述了抗药物抗体测定法。例如，在 US5, 219, 730 ; W087/002778 ; EP0139389 ; 和 EP0170302 中提述了抗独特型抗体测定法。Wadhwa, M. 等，于 J. Immunol. Methods 278 (2003) 1-17 中报告了用于检测、测量和表征由治疗性生物制剂诱导的不期望的抗体的策略。

[0012] Arden 等，Current Opinion in Immunology 20 (2008) 431-435 综述了抗<肿瘤坏死因子>抗体的免疫原性，并且改善了抗<抗体>测量的方法。

[0013] 免疫系统（例如哺乳动物生物体的）生成也称作免疫球蛋白的抗体作为对外来（非自身）物质或传染原的应答。这类非自身物质也称为抗原。哺乳动物生物体使用抗体来使自身防御外来物质或传染原。

[0014] 免疫球蛋白 (Ig) 可以分成 5 种不同类。能区分 M、G、A、E 和 D 类免疫球蛋白。这五种免疫球蛋白类就重链（其称为 μ 、 γ 、 α 、 ϵ 或 δ 链）组成而言各有所不同。

[0015] 每类免疫球蛋白在生物体中具有不同的功能。当与抗原进行第一次接触（即所谓的初次免疫）时出现 M 类免疫球蛋白。然而，这些免疫球蛋白的浓度在这类第一次感染后降低。G 类免疫球蛋白在初次免疫期间第一次缓慢形成，并且当与相同抗原第二次感染时大量出现。A 类免疫球蛋白发现于哺乳动物组织的一些粘膜表面上，并且负责那里发生的防御过程。E 类免疫球蛋白主要负责变应性反应。D 类免疫球蛋白的确切功能至今未知。

[0016] 各个免疫球蛋白类在血液中以非常不同的浓度出现。G 类免疫球蛋白 (IgG) 是人血清中出现最高的类，以约 75% 的比例存在，其对应于约 8-18mg/ml 的血清含量。免疫球蛋白第二最常见的类是 A 类 (IgA)，其平均血清浓度通常为 0.9-4.5mg/ml。M 类免疫球蛋白 (IgM) 通常以 0.6-2.8mg/ml 的浓度存在，而 D 类免疫球蛋白 (IgD) 以通常为 0.003-0.4mg/ml 的浓度存在。IgE 抗体以最低比例存在，并且在血清中仅以约 0.02-0.05 μ g/ml 的浓度出现。

[0017] 对于许多疾病的差异诊断学，检测特定的一类或多类免疫球蛋白的抗体是重要的。只有依靠类特异性抗体检测和 / 或通过排除某些其它类免疫球蛋白的干扰测量（例如检测 IgG 和 IgA 抗体，但不检测 IgM 抗体），才能确保在病毒性、细菌性和寄生物感染的情况中的满意诊断。这对于区别新的或急性感染与更久的感染以及临床监测感染过程是特别重要的。抗体的类特异性检测对于 HIV、甲肝、乙肝、弓形虫病 (toxoplasmosis)、风疹和衣原体感染是特别重要的。在测定保护性抗体的滴度（例如以检查免疫是否已经获得成功）

时,某种抗原特异性抗体的类特异性检测也是必要的。

[0018] 经常如下检测特定类的抗原特异性抗体,即将样品中包含的抗原特异性抗体结合至用该特定抗原包被的固相。然后,通过特异性针对某类人 Ig 的检测抗体来检测经由包被抗原而特异性结合至固相的免疫球蛋白(Ig)。然而,仅在与针对人 Ig 的类特异性标记抗体反应前,通过清洗除去所有非特异性的、非抗原结合的 Ig 时,这类测试规程才是有可能的。如此,例如在检测样品中的特异性 IgG 分子时,存在相对大量(血清中 4-20mg/ml)的非特异性 IgG,其可以非特异性结合至固相。如果使用针对 IgG 的检测抗体,那么这些非特异性结合的免疫球蛋白也会受到检测抗体识别并结合。这导致升高的背景信号和降低的信噪比,并且最后但非最不重要的是导致降低的灵敏度。

[0019] 在 US2006/0115907A1 中,已经描述了在免疫测定阵列测试中实现灵敏度升高的免疫复合物特异性抗体。免疫复合物特异性抗体是类风湿因子样抗体,优选地,其结合聚集的或寡聚化的免疫球蛋白,但不结合单个免疫球蛋白。EP1098198(Berti 等)关注一种用于在酶免疫测定法中定性和定量测定人 IgG 抗体的方法。在此测定法中,使用了一种单克隆抗体,其经由在抗体结合其抗原后形成的新表位与人 IgG 抗体特异性结合。此方法中没有描述由非特异性结合至固相的抗体所致的背景信号降低。

[0020] 降低背景信号的一种方法是修饰固相以避免免疫球蛋白的非特异性结合以及使用假定降低或防止免疫球蛋白对固相(例子:HydroGel 固相(Perkin Elmer)、FAST 载玻片(Schleicher&Schull)、去污剂、离液盐)的非特异性结合的特殊缓冲添加物。对固相的修饰是费力且昂贵的。此外,已经显示缓冲添加物可以降低一些抗体的反应性,并且如此也降低期望的阳性信号。

[0021] 如提述的,由非特异性结合的免疫球蛋白诱导的背景信号增加空白值,这使得检测特异性结合的抗体更加困难。对于小型化的测试系统诸如阵列形式的免疫测定法而言尤其如此。这类阵列可以包含在一些情况中甚至不同测试形式的多个特定测试,而且测试规程在单个反应容器中实施。因此,例如添加某种去污剂可以抑制抗体对这类阵列中第一分析物的非特异性结合,但是相同去污剂在用于检测同一阵列系统上第二分析物的另一测试中可以没有效果或甚至相反的效果。

[0022] 使用凝固因子 C1q(其是第一补体成分的亚基)作为降低免疫测定法中背景信号的进一步可能性披露于 EP0222146B1 中。在美国专利 No. 5,698,449A1 中,披露了用于自血液选择性取出免疫复合物并用于检测及量化该免疫复合物的 C1q 片段。美国专利 No. 4,062,935A1 描述了向样品添加类风湿因子或 C1q 以及所得免疫复合物的结合和量化。然而,现有技术并未显示 C1q 对阵列形式的免疫测定法的任何应用。

[0023] 阵列形式的免疫测定法的一个特征性特征是固相。在这类基于阵列的免疫测定法中,优选地,所述固相由定位的、限定的、离散的测试区组成。优选地,固相上的这些测试区由惰性区彼此在空间上分开。在大多数情况中这些定位的离散测试区是点,并且优选地,具有 10 μ m-1mm 的直径,而且特别优选地,具有 100-200 μ m 的直径。阵列系统记载于例如 Ekins, R. P. 和 Chu, F. W. (Clin. Chem. 37(1995)1955-1967) 以及美国专利 No. 5,432,099, 5,516,635 和 5,126,276 中。

[0024] 阵列系统具有的优点是,可以自一种样品同时实施数项分析物测定。优选地,这些阵列系统的固相可以用通用结合剂如链霉亲和素或亲和素包被,如 EP0939319(Hornauer

等)中披露的。有可能对固相(固体支持物)上单独的测试区或点应用多种结合配偶,诸如抗原特异性抗体。如果例如使用链霉亲和素作为通用结合基质,那么可以将每种结合配偶生物素化,并容易地定位/结合到这类固相上。样品成分且特别是 IgG 可以非特异性地结合一种或多种这些结合配偶或固相。在此情况中,鉴定出通用的缓冲添加物来降低背景信号几乎是不可能的,因为每种个别的结合配偶可能需要非常特别的缓冲添加物。在一种结合配偶的情况中具有积极效果的缓冲添加物对于其它结合配偶可能甚至具有不利效果。为众多不同结合配偶修饰固相也是非常困难的。

[0025] 因此,本发明的一个目的是开发用于检测样品中抗<治疗性单克隆抗体>抗体(抗<TmAB>AB)的灵敏方法,所述样品从用所述 TmAB 治疗的患者获得。

[0026] 令人惊讶地,证实了使用依照本发明的免疫测定方法容许很早地检测抗<TmAB>AB,并由此还会容许鉴定大多数那些在用 TmAB 治疗期间有风险形成不良药物反应(ADR)的患者。

[0027] 发明概述

[0028] 本发明关注一种用于在来自用治疗性单克隆抗体(TmAB)治疗的患者样品中体外测定抗<治疗性单克隆抗体>抗体(抗<TmAB>AB)的免疫测定方法,所述方法包括:a)提供结合至固相的所述 TmAB 的 F(ab) 片段,b)将(a)中提供的固相与所述样品一起温育,由此经由所述 F(ab) 片段使抗<TmAB>AB 与所述固相结合,c)将在(b)中获得的固相与单克隆抗体<h-Agg. -IgG>一起温育,由此所述单克隆抗体结合抗<TmAB>AB,并 d)检测(c)中结合的单克隆抗体<h-Agg. -IgG>,并且由此测定所述样品中的抗<TmAB>AB。

[0029] 在一个实施方案中,本发明涉及所述免疫测定方法用于鉴定有风险形成不良药物反应(ADR)的患者的用途,其通过在来自用治疗性单克隆抗体(TmAB)治疗的患者样品中体外测定抗<TmAB>AB 来进行。此方法包括 a)提供结合至固相的所述 TmAB 的 F(ab) 片段,b)将(a)中提供的固相与所述样品一起温育,由此经由 F(ab) 片段使抗<TmAB>AB 与所述固相结合,c)将在(b)中获得的固相与单克隆抗体<h-Agg. -IgG>一起温育,由此所述单克隆抗体结合抗<TmAB>AB,并 d)检测(c)中结合的单克隆抗体<h-Agg. -IgG>,并由此在用 TmAB 治疗期间测定样品中的抗<TmAB>AB,其中在此方法中对抗<TmAB>AB 测试呈阳性的患者有风险形成 ADR。

[0030] 在又一个的实施方案中,本发明涉及一种用于为在用第一 TmAB 治疗下的患者选择备选的治疗性抗体的方法,其中至少可用第一和一种或多种备选的 TmAB,所述方法包括:a)在来自用所述第一 TmAB 治疗的患者样品中体外测定针对所述第一 TmAB 的抗<TmAB>AB,并 b)如果存在针对所述第一 TmAB 的抗<TmAB>AB,那么选择备选的 TmAB 以供未来疗法用。

[0031] 发明详述

[0032] 除非另外指出,本发明的实施会采用本领域技术内的分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学、和免疫学的常规技术。这类技术在以下文献中得到充分解释,诸如“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”,第二版(Sambrook 等,1989);“Oligonucleotide Synthesis”(M. J. Gait 编,1984);“Animal Cell Culture”(R. I. Freshney 编,1987);“Methods in Enzymology”(Academic Press, Inc.);“Current Protocols in Molecular Biology”(F. M. Ausubel 等编,1987 及

定期更新);“PCR:The Polymerase Chain Reaction”,(Mullis 等编,1994)。

[0033] 除非另外定义,本文中使用的技术和科学术语与本发明所属领域的普通技术人员的通常理解具有相同的含义。Singleton,P. 和 Sainsburg,D. 等,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology,第2版,J.Wiley&Sons,New York,N.Y.(1994);March,Advanced Organic Chemistry Reactions,Mechanisms and Structure,第4版,John Wiley&Sons(New York,N.Y.1992);Lewin,B.,Genes V,由Oxford University Press 出版(1994),ISBN0-19-8542879;Kendrew,J. 等(编),The Encyclopedia of Molecular Biology,由Blackwell Science Ltd. 出版(1994),ISBN0-632-02182-9;及 Meyers,R.A.(编),Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference,由VCH Publishers,Inc. 出版(1995),ISBN1-56081-5698)为本领域技术人员提供了对本申请中使用的许多术语的一般性指导。

[0034] 本文中引用的所有参考文献(包括专利申请和出版物)通过提述完整并入。

[0035] 定义

[0036] 如本文中使用的,下列每项术语在此部分中具有与其有关的含义。

[0037] 冠词“一个”和“一种”在本文中用于指一个/种或超过一个/种(即至少一个/种)冠词语法对象。举例而言,“一个/种抗体”意味着一个/种抗体或超过一个/种抗体。术语“至少一个/种”用于指示任选地,可以存在一个/种或多个/种别的对象。举例而言,任选地,包含至少两个离散区域的阵列可以包含两个或更多个离散测试区。

[0038] 表述“一个/种或多个/种”指1-50,优选1-20,还优选2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、或15。

[0039] 表述“感兴趣的”指应该分析或测定的可能关联的分析物或物质。

[0040] “检测”包括任何检测手段,包括直接和间接检测。术语“检测”以最广义使用,包括分析物的定性和定量测量两者,本文中测量分析物诸如抗<治疗性抗体>抗体。在一个方面,使用如本文中描述的检测方法来鉴定样品中感兴趣的分析物的少量存在。在另一方面,可以使用所述方法来量化样品中分析物的量。

[0041] “关联”意指以任意方式将第一分析或方案的性能和/或结果与第二分析或方案的性能和/或结果比较。例如,可以在实施第二方案中使用第一分析或方案的结果和/或可以使用第一分析或方案的结果来确定是否应当实施第二分析或方案。

[0042] “降低”或“抑制”是与参照物相比,减少或降低活性、功能、和/或量。降低或抑制意指引起优选地20%或更大,更优选地50%或更大,且最优选地75%、85%、90%、95%、或更大的总体降低的能力。降低或抑制可以指所治疗病症的症状。

[0043] 如本文中使用的,术语“样品”或“测试样品”指自患者获得的出于体外评估目的获得的生物学样品。样品可以包含与已经用来治疗患者的抗体或药物结合的抗体,诸如人抗<嵌合抗体>(HACA)或人抗<人抗体>(HAHA),两者都是抗<TmAB>AB。术语样品或测试样品包括在其取得后已经以任意方式操作过,诸如通过用试剂处理、溶解、或富集某些组分,诸如蛋白质或多核苷酸的生物学样品。典型地,所述样品是液体样品。

[0044] 例如,生物学样品可以是全血、血清、自患者回收的抗体或血浆。优选地,所述样品是全血、血清或血浆。生物学样品可以包含自患者回收的抗体。在一个实施方案中,所述样品是临床样品。在另一个实施方案中,所述样品在诊断测定法中使用。

[0045] 在一个实施方案中,在治疗性单克隆抗体 (TmAB) 疗法前自受试者或患者获得样品。在一个实施方案中,自在 TmAB 疗法下的受试者或患者获得样品。在一个实施方案中,在用 TmAB 至少治疗一次后自受试者或患者获得样品。

[0046] 如果本文中规定在第 2 周采集样品,那么可以在用所述 TmAB 启动疗法后第 9 天至第 21 天采集样品。如果本文中规定在第 6 周采集样品,那么可以在启动治疗后第 28 天至第 64 天采集样品。如果本文中规定在第 14 周采集样品,那么可以在启动疗法后第 13 周至第 16 周采集样品。

[0047] 如本文中使用的,“参照样品”指用于比较目的的任何样品、标准品、或水平。在一个实施方案中,自未治疗的受试者或患者获得参照样品。在另一个实施方案中,自不是受试者或患者的健康的和 / 或未患病的个体获得参照样品。在另一个实施方案中,从不是受试者或患者的未治疗的个体获得参照样品。在某些实施方案中,参照样品是单一样品或来自同一受试者或患者的组合的多份样品,其在一个或多个与获得测试样品时不同的时间点获得。例如,在比获得测试样品时更早的时间点时自同一受试者或患者获得参照样品。在某些实施方案中,参照样品包括自不是受试者或患者的一名或多名个体获得的如上文在术语“样品”下定义的所有类型的生物学样品。在某些实施方案中,参照样品是来自不是受试者或患者的一名或多名健康个体的组合的多份样品。在某些实施方案中,参照样品是来自不是受试者或患者的一名或多名患有疾病或病症 (例如类风湿性关节炎) 的个体的组合的多份样品。在某些实施方案中,参照样品是来自不是受试者或患者的一名或多名个体的合并的血浆或血清样品。在某些实施方案中,参照样品是来自不是受试者或患者的一名或多名患有疾病或病症的个体的合并的血浆或血清样品。

[0048] 如熟练技术人员会领会的,在体外实施依照本发明的免疫测定方法。然后,弃去患者样品。患者样品仅用于本发明的体外诊断方法,并且没有将患者样品的材料转移回到患者身体中。

[0049] 术语“抗体”以最广义使用,且明确涵盖单克隆抗体 (包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体 (例如双特异性抗体)、和抗体片段。

[0050] 来自许多脊椎动物物种的抗体 (免疫球蛋白) 的“轻链”可以归入两种截然不同的型 (称作 κ 和 λ) 中的一种。此分类和命名基于其恒定域的氨基酸序列。

[0051] 根据免疫球蛋白重链恒定域的氨基酸序列,可以将其归入不同类。有主要的五类免疫球蛋白: IgA、IgD、IgE、IgG、和 IgM, 并且可以将这些中的数种进一步分成亚类 (同种型), 例如 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。

[0052] 如下书写抗体的符号,使得抗体特异性结合的抗原在“<...>”中表示,例如针对抗原“X”的抗体表示为“抗 <X> 抗体”。

[0053] “抗体片段”包括完整抗体中优选包含其抗原结合或可变区的部分。抗体片段的例子包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段; 双抗体; 线性抗体; 单链抗体分子; 和自抗体片段形成的多特异性抗体。对抗体的木瓜蛋白酶消化生成两个各具有单个抗原结合位点的相同抗原结合片段 (称作“Fab”片段), 以及残留的“Fc”片段, 即反映容易结晶的能力的名称。胃蛋白酶处理产生 F(ab')₂ 片段, 其具有两个抗原组合位点, 而且仍能够交联抗原。

[0054] “Fab”片段含有抗体轻链和重链的可变域, 而且还有轻链的恒定域和重链的第一恒定域 (CH1)。

[0055] “Fab'”片段与 Fab 片段的不同之处在于在重链 CH1 域的羧基端另外具有几个氨基酸残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。最初, Fab' 抗体片段以其间具有铰链胱氨酸桥的 Fab' 片段对 (F(ab')₂) 生成。通过还原半胱氨酸桥从 F(ab')₂ 获得 Fab' 单体。

[0056] “单链 Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的 VH 和 VL 域,其中这些域存在于单条多肽链中。优选地, Fv 多肽进一步包含在 VH 和 VL 域之间的多肽接头,其使得 scFv 能够形成抗原结合期望的结构。对于 scFv 的综述,参见 Plueckthun 于 *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第 113 卷, Rosenberg 和 Moore 编, Springer-Verlag, New York, 第 269 页 - 第 315 页 (1994)。

[0057] 术语“双抗体”指具有两个抗原结合位点的小抗体片段,该片段包含在同一多肽链 (VH-VL) 中相连接的重链可变域 (VH) 和轻链可变域 (VL)。通过使用太短以致不能容许在同一条链上的两个域之间配对的接头,迫使所述域与另一条链的互补域配对并创建两个抗原结合位点。双抗体更全面地记载于例如 EP404097 ; W093/11161 ; 及 Holliger, P. 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 6444-6448 中。

[0058] 依照本发明的“F(ab) 片段”包括 Fab、Fab'、scFv 和双抗体。通过加工所述 TmAB 生成 TmAB 的 Fab 或 Fab' 片段,例如通过将 TmAB 分别消化成 Fab 或 F(ab')₂ 片段和 Fc 部分来实现。在治疗性抗体是 scFv 或双抗体的情况下,这些分子不必进一步消化,而是本身可以在依照本发明的免疫测定方法中使用。

[0059] 如本文中使用的,术语“单克隆抗体”(单抗)指自基本上同质的抗体群体获得的抗体,即除了可以以微量存在的可能天然存在的突变外,构成群体的个别抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异的,针对单一抗原位点。此外,与通常包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制备物形成对比,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。修饰语“单克隆”指示抗体为自基本上同质的抗体群体获得的特征,而不应理解为需要通过任何特定的方法生成抗体。例如,要依照本发明使用的单克隆抗体可以通过由 Kohler, G 等, *Nature* 256 (1975) 495-497 首次描述的杂交瘤方法生成,或者可以通过重组 DNA 方法(参见例如美国专利 No. 4, 816, 567) 生成。也可以从噬菌体抗体文库中分离“单克隆抗体”,例如,其使用在 Clackson, T 等, *Nature* 352 (1991) 624-628 和 Marks, J. D 等, *J. Mol. Biol.* 222 (1991) 581-597 中描述的技术进行。

[0060] 本文中的单克隆抗体明确包括其中的重链和 / 或轻链的部分与自特定物种衍生或属于特定抗体类或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的剩余部分与自另一物种衍生或属于另一抗体类或亚类的抗体中的相应序列相同或同源的“嵌合”抗体(免疫球蛋白),以及这类抗体的片段,只要它们展现出期望的生物学活性(美国专利 No. 4, 816, 567 ; 和 Morrison, S. L. 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 6851-6855)。

[0061] 非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式是含有自非人免疫球蛋白衍生的最小限度序列的嵌合抗体。通常,人源化抗体是其中来自接受体的高变区残基用来自具有期望的特异性、亲和力和性能的非人物种(供体抗体)诸如小鼠、大鼠、家兔或非人灵长类的高变区残基替换的人免疫球蛋白(接受抗体)。在一些情况中,人免疫球蛋白的 Fv 框架区 (FR) 残基用相应的非人残基替换。此外,人源化抗体可以包含未在接受抗体或供体抗体中发现的残基。做出这些修饰以进一步改善抗体性能。一般地,人源化抗体会包含至少一个,且通常

两个基本上整个可变域,其中所有或基本上所有高变环对应于非人免疫球蛋白的那些高变环,而所有或基本上所有FR区是人免疫球蛋白序列的那些FR区。任选地,人源化抗体还会至少包含(通常为人免疫球蛋白的)免疫球蛋白恒定区的部分(Fc)。对于更多细节,参见Jones, P. T. 等, Nature 321 (1986) 522-525; Riechmann, L. 等, Nature 332 (1988) 323-327; 及 Presta, L. G., Curr. Op. Struct. Biol. 2 (1992) 593-596。

[0062] “人抗体”是拥有与由人生成的抗体的氨基酸序列对应的氨基酸序列的抗体和/或已经使用如本文中公开的用于生成成人抗体的任何技术生成的抗体。人抗体的这种定义明确地排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。使用本领域中已知的各种技术来生成成人抗体。在一个实施方案中,自噬菌体文库选择人抗体,其中所述噬菌体文库表达人抗体(Vaughan, T. J. 等, Nature Biotechnology 14 (1996) 309-314; Sheets, M. D. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. 95 (1998) 6157-6162; Hoogenboom, H. R. 和 Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J. D. 等, J. Mol. Biol., 222 (1991) 581)。也可以通过将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物,例如内源免疫球蛋白基因已经部分或完全失活的小鼠中来生成成人抗体。一旦攻击,观察到人抗体生成,其在所有方面(包括基因重排、装配、和抗体全集)极其类似人看到的。此办法记载于例如美国专利 No. 5, 545, 807; 5, 545, 806; 5, 569, 825; 5, 625, 126; 5, 633, 425; 5, 661, 016, 以及下列科学出版物中: Marks, J. D. 等, Bio/Technology 10 (1992) 779-783; Lonberg, N. 等, Nature 368 (1994) 856-859; Morrison, S. L., Nature 368 (1994) 812-813; Fishwild, D. M. 等, Nature Biotechnology 14 (1996) 845-851; Neuberger, M., Nature Biotechnology 14 (1996) 826; Lonberg, N. 和 Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. 13 (1995) 65-93。或者,可以经由永生化生成针对靶抗原的抗体的人B淋巴细胞来制备人抗体(所述B淋巴细胞可以自个体回收或者可以已经在体外免疫)。参见例如Cole等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 第77页(1985); Boerner, P. 等, J. Immunol. 147 (1991) 86-95; 以及美国专利 No. 5, 750, 373。

[0063] 术语“治疗性抗体”指为了批准为人治疗剂在临床研究中测试并且可以对个体施用以治疗疾病的抗体。在一个实施方案中,所述治疗性抗体是单克隆抗体。在又一个实施方案中,自类人猿或用人抗体基因座转化的动物或人单克隆抗体或人源化单克隆抗体获得治疗性抗体。在一个实施方案中,所述治疗性抗体是人单克隆抗体。在又一个实施方案中,所述治疗性抗体是人源化单克隆抗体。治疗性抗体广泛用于治疗各种疾病,诸如肿瘤学疾病、免疫学疾病、中枢神经疾病、血管疾病、慢性炎症性疾病、或传染病。这类抗体是例如针对CD20、CD22、HLA-DR、CD33、CD52、EGFR、G250、GD3、HER2、PSMA、CD56、VEGF、VEGF2、CEA、路易士(Levis)Y抗原、IL-6受体(IL6R)、TNF α 、或IGF-1受体(IGF1R)的抗体。治疗性抗体还由Groner, B. 等, Curr. Mol. Meth. 4 (2004) 539-547; 及 Harris, M., Lancet Oncol. 5 (2004) 292-302 描述。

[0064] 如本文中使用的,“抗<治疗性抗体>抗体”是结合治疗性抗体的抗体。“抗<治疗性单克隆抗体>抗体”(抗<TmAB>AB)是结合治疗性单克隆抗体的抗体。例如,抗<英夫利昔单抗>抗体是结合靶向TNF α 的英夫利昔单抗(一种治疗性单克隆抗体)的抗体。

[0065] 与/或对特定多肽或特定多肽上的表位“特异性结合”或“特异性”的抗体是结合该特定多肽或特定多肽上的表位,而基本上不结合任何其它多肽或多肽表位的抗体。

[0066] “分离的”多肽或“分离的”抗体是已经鉴定并自其天然环境的组分分开和/或回

收的。其天然环境的污染性组分是会干扰多肽或抗体的诊断或治疗用途的材料,并且可以包括酶、激素、和其它蛋白质性或非蛋白质性溶质。在优选的实施方案中,会将多肽或抗体纯化至(1)如 Lowry 法测定的,多肽或抗体重量的大于 95%,且最优选重量超过 99%, (2) 足以通过使用转杯式测序仪获得至少 15 个残基的 N- 末端或内部氨基酸序列的程度,或 (3) 根据在还原性或非还原性条件下的 SDS-PAGE 使用考马斯蓝或优选地银染色,达到同质。由于多肽的天然环境的至少一种成分不会存在,分离的多肽或抗体包括重组细胞内的原位多肽或抗体。然而,分离的多肽或抗体通常会通过至少一个纯化步骤来制备。

[0067] “受试者”或“患者”意指哺乳动物,包括但不限于人或非人哺乳动物,诸如牛、马、犬、绵羊、或猫。优选地,所述受试者或患者是人。

[0068] 如本文中使用的,“治疗 / 处理”指试图改变所处理个体或细胞的天然过程的临床干预,并且可以为了预防或在临床病理学过程期间实施。治疗的期望效果包括预防疾病的发生或复发、减轻症状、减少疾病的任何直接或间接的病理学后果、降低疾病进展的速率、改善或减轻疾病状态、以及缓解或改善的预后。在一些实施方案中,本发明的方法可用于试图延缓疾病或病症,特别是不良药物反应的形成。

[0069] “有效量”指以必要的剂量和时间段,对实现期望的治疗或预防结果有效的量。治疗剂的“治疗有效量”可以随诸如疾病状态、个体年龄、性别、和重量、以及抗体在个体中引发期望响应的能力等因素而变化。治疗有效量也是治疗有益效果超过治疗剂的任何毒性或有害效果的量。“预防有效量”指以必要的剂量和时间段,对实现期望的预防结果有效的量。通常但不必要地,由于在疾病前或在疾病的较早阶段在受试者中使用预防剂量,预防有效量会小于治疗有效量。

[0070] 术语“诊断”在本文中用于指对分子或病理学状态、疾病或状况的鉴定,或指可以受益于特定治疗方案的患者的鉴定。术语“预后”在本文中用于指预测来自疗法的临床益处可能性。术语“预测”在本文中用于指患者会有利地或不利地响应特定疗法的可能性。在一个实施方案中,预测涉及那些响应的程度。在一个实施方案中,预测涉及患者在治疗(例如用特定治疗剂的治疗)后是否会存活或改善和 / 或存活或改善且某段时间不复发疾病的可能性。可以在临床上使用本发明的预测方法来做出治疗决定,为任何特定患者选择最适宜的治疗形式。本发明的预测方法是有价值的工具,用于预测患者是否可能对治疗方案有好的响应,诸如给定的治疗方案,包括例如施用给定的治疗剂或组合、外科手术干预、类固醇治疗等,或用于预测患者在治疗方案后是否可能长期存活。术语“选择”在本文中用于指从许多备选中选择。举例而言,“选择”是从可用于疾病治疗的两种或更多种可用 TmAB 选出一种 TmAB 的过程。

[0071] “患者响应”可以使用指示对患者有益的任何终点来评估,包括但不限于:(1) 在某种程度上抑制疾病进展,包括减缓和完全阻滞;(2) 减小损伤尺寸;(3) 抑制(即降低、减缓或完全阻止)疾病细胞渗入临近的外周器官和 / 或组织;(4) 抑制(即降低、减缓或完全阻止)疾病扩散;(5) 在某种程度上减轻一种或多种与病症有关的症状;(6) 延长治疗后无疾病呈现的长度;和 / 或 (7) 降低治疗后给定时间点的死亡率。

[0072] “不良药物反应”(ADR) 描述与在正常剂量使用给定药物有关的损害。ADR 可以是局部的,即限于某个位置,或系统性的,其中药物已经引起遍及整个生物体的 ADR,并且是例如自循环可测量的。ADR 可以根据原因(A型:提升的药理学效果;剂量依赖性的且可预测

的（不耐性、副作用），B 型：奇怪的效果（或特质的）；剂量依赖性的且不可预测的，C 型：慢性效果，D 型：延迟效果，E 型：治疗结束效果或 F 型：疗法失败），或根据严重性分类。美国 FDA 将重度“不良药物反应”（ADR）定义为当患者后果是下列一项时的：死亡、威胁生命、住院（初始的或延长的）、失能（患者身体功能 / 结构、体格活动或生活质量的重大的、持续的、或永久的变化、病损、损害、或破坏）、先天性异常、需要干预来防止永久性病损或损害。尽管尚没有官方量表来沟通总体药物风险，但是 iGuard 药物风险评级系统（Drug Risk Rating System）（www.iguard.org）是一种五色评级量表：红色（高风险）、橙色（升高的风险）、黄色（警戒风险）、蓝色（一般风险）、绿色（低风险）。ADR 还包括输注反应。例如，这些输注反应包括荨麻疹、低血压、胸部紧迫感（chest tightness）、潮红或降低的血压。

[0073] “缺乏效力”（LOE）定义为尽管在其它情况中认为足够的条件下（例如用通常有效量的治疗剂）治疗，疾病活动仍较高。

[0074] “治疗效力”是干预在一般应用情况中产生期望的有益临床效果的能力的测量，其通常在非随机化的结果研究中测定。治疗效力可以受到 LOE 和 / 或患者顺从性影响。

[0075] 术语“益处”以最广义使用，指任何期望的效果，且明确包括如本文中限定的临床益处。可以通过评估各种终点来测量临床益处，所述终点例如在一定程度上抑制疾病进展，包括延缓和完全阻滞；疾病事件和 / 或症状数目的减少；损伤大小的降低；抑制（即降低、减缓或完全阻止）疾病细胞渗入邻近周围器官和 / 或组织中；抑制（即降低、减缓或完全阻止）疾病扩散；降低自身免疫应答，其可以但不必导致疾病损伤的消退或消除；在一定程度上减轻一种或多种与病症有关的症状；延长治疗后无疾病呈现例如无进展存活的长度；增加的总体存活；较高的响应率；和 / 或在治疗后给定时间点时降低的死亡率。

[0076] 如本文中使用的，术语“免疫测定法”（IA）意指一种特异性结合测定法，其中通过使用至少一种抗体作为特异性结合配偶或药剂来检测分析物。免疫测定法包括但不限于放射性免疫测定法（RIA）、荧光发光测定法（FLA）、化学发光测定法（CLA）、电化学发光测定法（ECLA）、和酶联免疫吸附测定法（ELISA）。ELISA 方法记载于例如 W02001/36972 中。

[0077] 术语“检测剂”指结合分析物并且可检测标记的药剂。检测剂的例子包括但不限于抗体、抗体片段、可溶性受体、受体片段，等等。有可能直接，即经由与该药剂直接连接的标记物或者经由经标记的第二结合配偶，诸如特异性结合检测剂的别的抗体或受体间接检测检测剂。

[0078] 如本文中使用的，术语“标记物”指任何能够产生可检测信号（无论是可见地或通过使用适合的仪器）的物质。适用于本发明的各种标记物包括但不限于色原、荧光的、化学发光的或电化学发光的化合物、催化剂、酶、酶底物、染料、胶体金属和非金属颗粒、以及有机聚合物胶乳颗粒。

[0079] “直接可检测标记物”是例如色原（荧光或发光基团和染料）、NMR 活性基团或金属颗粒。可以通过电化学发光检测的金属螯合物是优选的信号发射基团，特别优选的是钆螯合物，例如钆（二吡啶基）₃²⁺螯合物。合适的钆标记基团记载于例如 EP0580979、W090/05301、W090/11511 和 W092/14138 中。

[0080] 术语“发光”指不从能源（例如，电磁辐射源、化学反应、机械能）的温度衍生能量的任何光发射。一般地，该来源引起原子的电子从较低的能量状态迁移到“激发的”较高能量状态；然后电子在其回落至较低能量状态时以发射光的形式释放能量。这类光发射通常

在电磁谱的可见或近可见范围中发生。术语“发光”包括但不限于这类光发射现象诸如磷光、荧光、生物发光、辐射发光、电致发光、电化学发光和热释发光。

[0081] 术语“发光标记物”指生成发光信号的标记物,所述发光信号例如不从发射源的温度衍生能量的光发射。发光标记物可以是例如荧光分子、磷光分子、辐射发光分子、发光螯合剂、磷或含磷化合物、或量子点。

[0082] “电化学发光测定法”或“ECLA”是一种通过与检测剂(靶分子)连接的标记物来检测结合的分析物分子的电化学测定法。电极电化学启动与检测剂连接的化学标记物的发光。通过光检测器测量由标记物发射的光,并且其指示结合的分析物分子/靶分子复合物的存在或量。ECLA方法记载于例如美国专利 No. 5,543,112;5,935,779;和 6,316,607 中。可以为了精确且灵敏的测量针对不同分析物分子浓度使信号调控最大化。

[0083] 在 ECLA 规程中,可以将微粒在样品中悬浮以有效结合分析物。例如,颗粒可以具有 $0.05\ \mu\text{m}$ – $200\ \mu\text{m}$ 、 $0.1\ \mu\text{m}$ – $100\ \mu\text{m}$ 、或 $0.5\ \mu\text{m}$ – $10\ \mu\text{m}$ 的直径,和能够结合分析物分子的表面组分。在一种经常使用的 ECLA 系统(Elecsys, Roche Dagnsotics, Germany)中,该微粒具有约 $3\ \mu\text{m}$ 的直径。微粒可以由交联的淀粉、右旋糖苷、纤维素、蛋白质、有机聚合物、苯乙烯共聚物诸如苯乙烯/丁二烯共聚物、丙烯腈/丁二烯/苯乙烯共聚物、乙烯乙酰丙烯酸酯共聚物、氯乙烯/丙烯酸酯共聚物、惰性无机颗粒、二氧化铬、铁的氧化物、硅土、硅土混合物、蛋白质性物质、或其混合物,包括但不限于琼脂糖珠、胶乳珠、壳芯颗粒等形成。优选地,微粒是单分散的,并且可以是磁性的,诸如顺磁性珠。参见例如美国专利 No. 4,628,037;4,965,392;4,695,393;4,698,302;和 4,554,088。可以以范围为约 1 – $10,000\ \mu\text{g/ml}$, 优选地 5 – $1,000\ \mu\text{g/ml}$ 的量使用微粒。

[0084] 特定测定法中分析物分子的“检测限”是可以高于所述测定法的背景水平检出的分析物分子的最小浓度。例如,在 IA 和 ECLA 中,特异性结合靶分子的分析物分子的检测限可以是分析物分子产生的 IA 信号或 ECLA 信号高于由不结合或非特异性结合靶抗原的对照抗体产生的 IA 信号或 ECLA 信号的浓度。具有小于 IA 检测限的 IA 应答的分子是 IA^- 。具有等于或大于 IA 检测限的 IA 应答的分子是 IA^+ 。具有小于 ECLA 检测限的 ECLA 应答的分子是 ECLA^- 。具有等于或大于 ECLA 检测限的 ECLA 应答的分子是 ECLA^+ 。可以提高或降低检测限来实现期望的测定法结果。

[0085] “固相”,也称为“固体支持物”,是不可溶的、官能化的、聚合材料,可以对其附着或共价结合(经常经由接头)文库成员或试剂以固定化或者容许它们自过量的试剂、可溶性反应副产物、或溶剂容易地分开(通过过滤、离心、清洗等进行)。用于依照本发明的免疫测定法的固相广泛记载于现有技术中(参见例如 Butler, J. E., Methods 22(2000)4–23)。术语“固相”指非流体物质,并且包括自材料诸如聚合物、金属(顺磁性、铁磁性颗粒)、玻璃、和陶瓷制成的颗粒(包括微粒、珠、磁珠、金属或非金属颗粒);凝胶物质诸如硅土、氧化铝、和聚合物凝胶;可以由聚合物、金属、玻璃、和/或陶瓷制成的毛细管;沸石和其它多孔物质;膜;电极;微量滴定板;固体条;以及小杯、管、芯片或其它分光计样品容器。测定法的固相组分与测定法可以接触的惰性固体表面的区别在于,“固相”在其表面上含有至少一种模块,该模块意图与捕捉抗体或捕捉分子相互作用。固相可以是固定的组分,诸如管、条、小杯、芯片或微量滴定板,或者可以是不固定的组分,诸如珠和微粒。微粒也可以作为固相用于同质测定法形式。可以使用容许蛋白质和其它物质非共价或共价附着的多种

微粒。这类颗粒包括聚合物颗粒诸如聚苯乙烯和聚（甲基丙烯酸甲酯）；金颗粒诸如金纳米颗粒和金胶体；以及陶瓷颗粒诸如硅土、玻璃、和金属氧化物颗粒。参见例如 Martin, C. R. 等, *Analytical Chemistry-News&Features* 70 (1998) 322A-327A, 其通过提述并入本文。

[0086] 术语“芯片”、“生物芯片”、“聚合物芯片”或“蛋白质芯片”可交换使用, 并且指在共享的基片（例如固相）上排列的大量探针、标志物或生物化学标志物的集合, 所述基片可以是硅片、尼龙条、塑料条、或玻璃载玻片的部分。

[0087] 依照本发明的术语“离散测试区”用于含有单一类型的捕捉分子。在固定组分固相（例如阵列或芯片）上的相邻离散测试区彼此不重叠。在固相是例如阵列或芯片的情况下, 离散测试区可以彼此相邻。在固定组分上的至少两个“离散测试区”之间的间隔也是可能的。在固定组分固相上（例如阵列或芯片上）的离散测试区可以以几何学式样排列。如果固相是不固定的组分, 诸如珠和微粒, 那么术语“离散测试区”意味着在每个不固定的组分上固定化一种类型的捕捉分子。

[0088] “阵列”、“宏阵列 (macroarray)”或“微阵列”是对基片或固体表面（诸如玻璃、塑料、硅芯片或其它形成阵列的材料）附着或其上制作的有意创建的物体（诸如分子、标志物、开口、微线圈、检测器和 / 或传感器）的集合。阵列可以用于同时测量大量（例如, 数十、数千或数百万）水平的反应或组合。阵列也可以含有少量物质（例如, 一个、几个或一打）。阵列中的物质可以是彼此相同或不同的。阵列可以采取多种形式, 例如可溶性分子的文库、固定化分子的文库、固定化抗体的文库、束缚于树脂珠的化合物文库、硅土芯片、或其它固相。根据阵列上垫的大小, 阵列可以是宏阵列或微阵列。宏阵列一般含有约 300 微米或更大的垫大小, 并且可以容易地通过凝胶和印迹扫描仪成像。微阵列一般会含有小于 300 微米的垫大小。

[0089] 方法：

[0090] 治疗性单克隆抗体 (TmAB) 越来越多地用于抗击极其多种疾病。分别针对肿瘤坏死因子 ($\text{TNF } \alpha$) 或 CD20 (CD20) 的 TmAB 的应用对许多诊断为慢性炎性疾病诸如类风湿性关节炎 (RA) 的患者具有极为重要的意义。这些 TmAB 也经常用于治疗克罗恩 (Crohn) 氏病 (CD)、强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis, AS)、多关节幼年型特发性关节炎 (polyarticular juvenile idiopathic arthritis, JIA)、银屑病关节炎 (PsA)、白赫铁列夫症 (Morbus Bechterew) 或慢性斑块状银屑病 (Ps)、以及其它疾病。在慢性炎性疾病的疗法中使用的数种 TmAB 属于抗 $\text{TNF } \alpha$ 抗体组。

[0091] 如上文详细论述的, TmAB 是小鼠 - 人嵌合 TmAB (例如英夫利昔单抗) 或人 TmAB (例如阿达木单抗)。TmAB 含有对于患者免疫系统而言可以是“外来”的元件。在用所述 TmAB 治疗期间可以由于患者免疫防御反应而出现这类抗 $\langle \text{TmAB} \rangle \text{AB}$ (Pan, Y. 等, *FASEB J.* 9 (1995) 43-49)。

[0092] 在免疫系统将 TmAB 的元件作为外来物处理的情况中, 预期此蛋白质的施用会引发免疫应答。抗 $\langle \text{TmAB} \rangle \text{AB}$ 可以针对 TmAB 的任何区, 如 TmAB 的可变区、恒定区或糖结构。可变域区包含罕见的序列元件, 那些是可以完全通过用 TmAB 治疗的患者的免疫系统引起免疫应答的域。

[0093] 我们开发出用于检测针对治疗性单克隆抗体 (TmAB) 的抗 $\langle \text{治疗性单克隆抗体} \rangle$ 抗体 (抗 $\langle \text{TmAB} \rangle \text{AB}$) 的免疫测定方法。

[0094] 在一个实施方案中,本发明涉及一种用于在来自用治疗性单克隆抗体 (TmAB) 治疗的患者的样品中体外测定抗 <治疗性单克隆抗体> 抗体 (抗 <TmAB>AB) 的免疫测定方法,所述方法包括:(a) 提供结合至固相的所述 TmAB 的 F(ab) 片段,(b) 将 (a) 中提供的固相与样品一起温育,由此经由 F(ab) 片段使抗 <TmAB>AB 与所述固相结合,(c) 将在 (b) 中获得的固相与单克隆抗体 <h-Agg. -IgG> 一起温育,由此所述单克隆抗体结合抗 <TmAB>AB,并 (d) 检测 (c) 中结合的单克隆抗体 <h-Agg. -IgG>,并由此测定样品中的抗 <TmAB>AB。

[0095] 受试者或患者可以是任何哺乳动物物种。在一个优选的实施方案中,受试者或患者是人。在一个实施方案中,在所述免疫测定方法中测定人抗 <TmAB>AB。

[0096] 在一个实施方案中,所述样品会选自下组:液体样品如自患者回收的抗体、全血、血浆、或血清。在又一个的实施方案中,所述样品会选自下组:全血、血浆或血清,最优选的是血清。在一个实施方案中,所述样品自人衍生。

[0097] 结合至固相以测定针对 TmAB 的抗 <TmAB>AB 的抗原选自下组:TmAB 的 Fab' 片段、TmAB 的 Fab 片段、代表 TmAB 的 scFv 和代表 TmAB 的双抗体。在一个优选的实施方案中,所述 TmAB 的 F(ab) 片段选自下组:所述 TmAB 的 Fab' 片段和所述 TmAB 的 Fab 片段。在一个优选的实施方案中,结合至固相以测定抗 <TmAB>AB 的抗原是感兴趣 TmAB 的 Fab 片段。在一个优选的实施方案中,结合至固相以测定抗 <TmAB>AB 的抗原是感兴趣 TmAB 的 Fab' 片段。

[0098] 令人惊讶地,本发明人发现了基于使用结合至固相的感兴趣 TmAB 的 F(ab) 片段的免疫测定方法至少可以克服一些目前的限制,其关于来自用所述 TmAB 治疗的患者的样品中抗 <TmAB>AB 的检测特异性和灵敏度。

[0099] 在一个实施方案中,通过选自下组的结合系统将免疫测定方法中提供的抗原(例如 F(ab) 片段)结合至固相:共价结合、直接附着和亲和相互作用。例如,可以通过固相的环氧、NHS、羧甲基活化及随后与抗原的合适官能团反应来完成免疫测定方法中提供的抗原(例如 F(ab) 片段)的共价结合。免疫测定方法中提供的抗原(例如 F(ab) 片段)的直接附着可以基于例如疏水或亲水相互作用、螯合物结合或吸附相互作用。抗原(例如 F(ab) 片段)的亲和相互作用可以基于例如生物素/链霉亲和素、生物素/亲和素、标签/抗标签、卵磷脂/抗体、或生物素-抗<生物素>抗体相互作用。

[0100] 在一个实施方案中,通过选自下组的结合系统将免疫测定方法中提供的抗原结合至固相:生物素/链霉亲和素、生物素/亲和素、和生物素-抗<生物素>抗体。为了容许这类结合,所述抗原是经生物素化的(例如 F(ab)-Bi 片段)。在一个优选的实施方案中,通过选自下组的结合系统将该方法中提供的 F(ab) 片段结合至固相:生物素/链霉亲和素和生物素/亲和素。在又一个优选的实施方案中,通过选自下组的结合系统将方法中提供的 Fab 片段结合至固相:生物素/链霉亲和素和生物素/亲和素。在又一个优选的实施方案中,通过选自下组的结合系统将方法中提供的 Fab' 片段结合至固相:生物素/链霉亲和素和生物素/亲和素。

[0101] 用于生物素化的方法是熟练技术人员已知的。用于缀合抗体片段以及其它蛋白质和生物分子的反应变量和反应条件的详细描述参见 G. T. Hermanson: Bioconjugate Techniques, Elsevier/AP, (2008); 第二版 (ISBN:978-0-12-370501-3)。在实施例 1 中描述了用于生成依照本发明的 TmAB 的缀合有生物素的 Fab 片段 (Fab-Bi) 的方法。

[0102] 可以在侧面受控条件下实现抗原(例如 F(ab) 片段)对固相的附着,使得抗原

结合域向固相表面外呈现,提供抗原的最高可达性,其使用(i)位点特异性缀合(例如在F(ab)片段铰链区中的缀合或标签辅助缀合)或者(ii)与固相的位点特异性相互作用(例如抗原与经卵磷脂包被的固相的特定空间取向相互作用)来实现。

[0103] 在一个实施方案中,将F(ab)片段的铰链区与固相缀合。在一个实施方案中,将Fab片段的铰链区与固相缀合。在一个实施方案中,将Fab'片段的铰链区与固相缀合。

[0104] 在一个实施方案中,通过F(ab)片段与经卵磷脂包被的固相的空间取向相互作用将所述F(ab)片段与固相缀合。在一个实施方案中,通过Fab片段与经卵磷脂包被的固相的空间取向相互作用将所述Fab片段与固相缀合。在一个实施方案中,通过Fab'片段与经卵磷脂包被的固相的空间取向相互作用将F(ab)片段的铰链区与固相缀合。

[0105] F(ab)片段与固相的随机空间非定向偶联提供与空间定向偶联等同的结果。然而,不希望限于此理论,定向偶联在一些情况下可以是有利的。

[0106] 在一个实施方案中,用选自下组的感兴趣TmAB来实施依照本发明的方法:嵌合抗体(CA)和人源化抗体(HA)。

[0107] 在一个实施方案中,用选自下组的治疗性单克隆抗体(TmAB)的生物素化的F(ab)(F(ab)-Bi)片段来实施依照本发明的方法:阿昔单抗、阿达木单抗、阿仑单抗、巴利昔单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、赛妥珠单抗、达克珠单抗、依库珠单抗、依法珠单抗、吉姆单抗、替伊莫单抗、英夫利昔单抗、莫罗单抗-CD3、那他珠单抗、奥马珠单抗、帕利珠单抗、帕尼单抗、兰尼单抗、利妥昔单抗、托西莫单抗和曲妥单抗。在一个优选的实施方案中,用选自下组的治疗性单克隆抗体(TmAB)的F(ab)-Bi片段来实施依照本发明的方法:英夫利昔单抗、阿达木单抗、赛妥珠单抗和利妥昔单抗。在另一个优选的实施方案中,用选自下组的治疗性单克隆抗体(TmAB)的F(ab)-Bi片段来实施依照本发明的方法:英夫利昔单抗和阿达木单抗。在另一个优选的实施方案中,用治疗性单克隆抗体(TmAB)英夫利昔单抗的F(ab)-Bi片段来实施依照本发明的方法。

[0108] 在一个实施方案中,用选自下组的治疗性单克隆抗体(TmAB)的生物素化的Fab(Fab-Bi)片段来实施依照本发明的方法:阿昔单抗、阿达木单抗、阿仑单抗、巴利昔单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、赛妥珠单抗、达克珠单抗、依库珠单抗、依法珠单抗、吉姆单抗、替伊莫单抗、英夫利昔单抗、莫罗单抗-CD3、那他珠单抗、奥马珠单抗、帕利珠单抗、帕尼单抗、兰尼单抗、利妥昔单抗、托西莫单抗和曲妥单抗。在一个优选的实施方案中,用选自下组的治疗性单克隆抗体(TmAB)的Fab-Bi片段来实施依照本发明的方法:英夫利昔单抗、阿达木单抗、赛妥珠单抗和利妥昔单抗。在另一个优选的实施方案中,用选自下组的治疗性单克隆抗体(TmAB)的Fab-Bi片段来实施依照本发明的方法:英夫利昔单抗和阿达木单抗。在另一个优选的实施方案中,用治疗性单克隆抗体(TmAB)英夫利昔单抗的Fab-Bi片段来实施依照本发明的方法。

[0109] 在一个实施方案中,用选自下组的治疗性单克隆抗体(TmAB)的生物素化的Fab'(Fab'-Bi)片段来实施依照本发明的方法:阿昔单抗、阿达木单抗、阿仑单抗、巴利昔单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、赛妥珠单抗、达克珠单抗、依库珠单抗、依法珠单抗、吉姆单抗、替伊莫单抗、英夫利昔单抗、莫罗单抗-CD3、那他珠单抗、奥马珠单抗、帕利珠单抗、帕尼单抗、兰尼单抗、利妥昔单抗、托西莫单抗和曲妥单抗。在一个优选的实施方案中,用选自下组的治疗性单克隆抗体(TmAB)的Fab'-Bi片段来实施依照本发明的方法:英夫利昔单抗、

阿达木单抗、赛妥珠单抗和利妥昔单抗。在另一个优选的实施方案中,用选自下组的治疗性单克隆抗体 (TmAB) 的 Fab'-Bi 片段来实施依照本发明的方法: 英夫利昔单抗和阿达木单抗。在另一个优选的实施方案中,用治疗性单克隆抗体 (TmAB) 英夫利昔单抗的 Fab'-Bi 片段来实施依照本发明的方法。

[0110] 本领域技术人员已知的是,在经由形成抗 <TmAB>AB-F(ab) 片段复合物的 F(ab) 片段使抗 <TmAB>AB 结合至固相后,可以例如通过清洗步骤除去非特异性松散结合的化合物。

[0111] 要测定的抗 <TmAB>AB 特异性结合感兴趣的 TmAB 的 F(ab) 片段。在一个优选的实施方案中,感兴趣的抗体是抗 <TNF α >TmAB。在另一个优选的实施方案中,感兴趣的抗体选自下组: 英夫利昔单抗、阿达木单抗、赛妥珠单抗和利妥昔单抗。在另一个优选的实施方案中,感兴趣的抗体选自下组: 英夫利昔单抗和阿达木单抗。在另一个优选的实施方案中,感兴趣的抗体是英夫利昔单抗。如果抗 <TmAB>AB 存在于自用 TmAB 治疗的患者采集的样品中,并且结合与固相结合的所述 TmAB 的 F(ab) 片段,那么形成“抗 <TmAB>AB-F(ab) 片段复合物”。如熟练技术人员显而易见的,在容许形成抗 <TmAB>AB-F(ab) 复合物的条件下温育 TmAB 的 F(ab) 片段和抗 <TmAB>AB。

[0112] 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 技术是一种常见的测定法类型,用于调查患者对 TmAB 的免疫原性响应。存在着熟练技术人员已知的数种不同 ELISA 形式,例如“间接测定法”、“夹心/三明治式测定法”、“竞争性测定法”、“双重抗原桥接测定法 (DAGS)”或“反向测定法”。Mire-Sluis, A. R. 等, J. Immunol. Methods 289 (2004) 1-16 概述了使用宿主抗体 (例如针对生物技术产品 (例如 TmAB) 的抗 <TmAB>AB) 检测的免疫测定法的设计和优化的推荐。

[0113] 在一个优选的实施方案中,以间接测定法形式实施依照本发明的方法。令人惊讶地,在间接测定法形式中,Fab 片段导致好得多地区别阴性和真阳性结果,如实施例 4 和 5 中显示的。在这类间接测定法形式中,使用单克隆抗体 <h-Agg. -IgG> 作为检测单克隆抗体。

[0114] 在一个实施方案中,用检测抗体 <h-Agg. -IgG> 来实施依照本发明的免疫测定方法,所述检测抗体 <h-Agg. -IgG> 对结合抗原特异性抗体 (抗 <TmAB>AB) 具有低亲和力。抗体对表位的亲和力定义为抗体上个别抗原结合位点和个别表位之间所有非共价相互作用的强度。具有低亲和力的抗体较弱地结合并且快速解离,而高亲和力抗体较强地结合并且使结合保持较长的时间段。结合位点的亲和力并不总是反映抗原-抗体相互作用的真实强度。不过,例如,在具有许多重复抗原决定簇的复杂抗原和具有数个低亲和力结合位点的互补抗体的情况中,由于协同结合现象而观察到相当强的结合。抗原和抗体的抗原结合位点在第一位点处的相互作用提高同一抗体的第二抗原结合位点处的反应可能性。多价抗体和抗原之间的这类多重相互作用的强度称为亲合力。高亲合力补偿低亲和力,如例如在五聚体免疫球蛋白 IgM 的情况中。在依照本发明的方法中,优选地,使用对抗原特异性抗体具有低亲和力的抗体,其具有数个,即至少 2 个,优选地至少 4 个,且还优选 10 个和更多个互补位,诸如彼此交联的 IgM 或 IgG 免疫球蛋白。这点的例子是类风湿因子,其通常由 IgM 分子构成,且更罕见地也由 IgG、IgA 和 IgE 分子构成。

[0115] 技术人员已知通过由朗缪尔 (Langmuir) 模型限定的亲和系数来测定结合配偶 (优选地,抗体) 的亲和力值。具有高解离速率常数 ($K_{\text{解离}}$) 的分子可能具有低亲和力,因为平衡解离常数 $K_D = K_{\text{解离}} / K_{\text{结合}}$ 。预测亲和系数对于非常高的结合亲和力是约 10^{-9} 至 10^{-11} , 对于

中等结合亲和力为约 10^{-8} , 对低结合亲和力为约 10^{-7} , 而对于非常低的结合亲和力为约 10^{-6} 。本发明的检测单克隆抗体 <h-Agg. -IgG> 拥有低结合亲和力。在一个实施方案中, 在本发明的免疫测定法中使用的检测单克隆抗体 <h-Agg. -IgG> 是具有约 10^{-6} mol/l 至 10^{-8} mol/l 的 K_D 值的抗体。在一个优选的实施方案中, 检测单克隆抗体 <h-Agg. -IgG> 是具有约 10^{-7} mol/l 至 10^{-8} mol/l 的 K_D 值的抗体。

[0116] 如前面论述的, 通过检测单克隆抗体 <h-Agg. -IgG> 来实施样品中在本发明中公开的免疫测定方法的步骤 (c) 中结合的抗 <TmAB>AB 的测定。在一个实施方案中, 此检测单克隆抗体属于 IgM 类免疫球蛋白。优选地, 单克隆抗体 <h-Agg. -IgG> 结合已经以特异性方式结合其抗原的免疫球蛋白 IgG 类抗体。此单克隆抗体仅识别密集包装且特异性结合的抗 <TmAB>AB, 即那些已经结合定位于固相上的感兴趣 TmAB 的 F(ab) 片段的抗 <TmAB>AB。此检测抗体不与非特异性结合的或吸附的 IgG 起反应。

[0117] 在一个实施方案中, 使用经标记的单克隆抗体 <h-Agg. -IgG> 来实施依照本发明的方法。在一个优选的实施方案中, 单克隆抗体 <h-Agg. -IgG> 是用 Dig 标记的 (<h-Agg. -IgG>-Dig)。经由与可检测标记物缀合的抗 <Dig> 抗体容易检出此经 Dig 标记的单克隆抗体 <h-Agg. -IgG>-Dig。例如, 这类可检测标记物可以选自发光标记物、化学发光标记物、电化学发光标记物、荧光标记物或放射性标记物。

[0118] 在一个实施方案中, 在依照本发明的方法中使用的单克隆抗体 <h-Agg. -IgG> 对选出的要测定的 Ig 类是特异性的。在一个优选的实施方案中, 在依照本发明的方法中使用的单克隆抗体 <h-Agg. -IgG> 对 IgG 类是特异性的。在一个实施方案中, 单克隆抗体 <h-Agg. -IgG> 能够检测所有 IgG 亚类。

[0119] 令人惊讶地, 发明人可以显示, 在如本发明中公开的免疫测定方法中使用检测单克隆抗体 <h-Agg. -IgG> 导致样品中抗 <TmAB>AB 的检测改善, 并且至少克服了一些目前在抗 <TmAB>AB 早期检测中的限制。令人惊讶地, 在间接免疫测定法形式中组合定位到固相上的感兴趣 TmAB 的 F(ab) 片段与检测抗体 <h-Agg. -IgG> 容许发明人非常早地检测所述 TmAB 的 IgG 类抗 <TmAB>AB。有可能在第一次施用所述 TmAB 后从 2 周起在来自用 TmAB 治疗的患者的样品中体外检测 IgG 类抗 <TmAB>AB。在一个优选的实施方案中, 在间接免疫测定法形式中组合定位到固相上的感兴趣 TmAB 的 Fab 片段与检测抗体 <h-Agg. -IgG> 容许在第一次施用所述 TmAB 后从 2 周起检测所述 TmAB 的 IgG 类抗 <TmAB>AB。在又一个优选的实施方案中, 在间接免疫测定法形式中组合定位到固相上的感兴趣 TmAB 的 Fab' 片段与检测抗体 <h-Agg. -IgG> 容许在第一次施用所述 TmAB 后从 2 周起检测所述 TmAB 的 IgG 类抗 <TmAB>AB。

[0120] 在一个实施方案中, 在依照本发明的方法中使用的单克隆抗体 <h-Agg. -IgG> 选自下组: 单抗 <h-Agg. -IgG>M-3.022.5-IgM(DSM ACC2873)、单抗 <h-Agg. -IgG>M-1.010.2-IgM 和单抗 <h-Agg. -IgG>M-1.1.7-IgM(在表 1 中显示)。在一个优选的实施方案中, 所述检测单克隆抗体 <h-Agg. -IgG> 是单抗 <h-Agg. -IgG>M3.022.5-IgM-Dig(DSM ACC2873)。单抗 <h-Agg. -IgG>M3.022.5-IgM-Dig 的特征性特征是与固相非特异性结合的免疫球蛋白(即那些非特异性结合抗原的)没有得到识别或仅以可忽略的程度识别。不希望限于此理论, 单抗 <h-Agg. -IgG>M3.022.5-IgM-Dig 的使用可以实质性降低免疫测定法中的背景信号, 并且由此将其以恒定的低水平保持, 该水平与有待分析的样品中

包含的可能干扰性的 IgG 无关。

[0121] 在一个实施方案中,以阵列形式,例如在芯片或生物芯片上实施依照本发明的免疫测定方法。在这类阵列形式中,一种或多种 TmAB 的 F(ab) 片段在固相的离散区上固定化,所述离散区定义为彼此空间分开的测试区。用于固定化捕捉结合配偶(例如 F(ab) 片段)的方法是本领域技术人员熟悉的,并且例如披露于 EP0929319(Hornauer 等)中。

[0122] 包含一个或多个点的测试区可以存在于固相上,所述点含有相同的捕捉结合配偶。在一个实施方案中,可以形成由数个相同点组成的式样。

[0123] 可以同时测定不同分析物正是阵列形式(例如在芯片或生物芯片上)的此类免疫测定法的优点。在一个实施方案中,阵列形式中的多个离散区或点之每个含有感兴趣的 TmAB 之一的 F(ab) 片段,其能够特异性结合要测定的抗<TmAB>AB。在一个实施方案中,这类阵列包含至少两个离散区,其中在每个区域中存在感兴趣的 TmAB 的不同 F(ab) 片段(捕捉分子)。在一个阵列上也有可能具有自感兴趣的 TmAB 衍生的 F(ab) 片段和分别各含有这些不同 TmAB 之一的 F(ab) 片段的数个点的组合。在一个实施方案中,在这类阵列上存在自感兴趣的 TmAB 衍生的至少两种不同 F(ab) 片段,其各具有两个或更多个单独的点。在一个实施方案中,优选地,在方法中使用的阵列由支持物组成,所述支持物由金属、玻璃、塑料、或聚苯乙烯制成。优选地,在依照本发明的方法中使用聚苯乙烯支持物,所述方法是本领域技术人员已知的,并且记载于例如 EP0939319(Hornauer 等)中。在以阵列形式实施的所述方法中使用<h-Agg. -IgG>M3.022.5-IgM-Dig 抗体实现可以在阵列上组合数个至大量针对感兴趣抗<TmAB>AB 的不同测试。阵列测定法形式的主要优点在于在每个操作步骤中仅需要一种缓冲液组成。

[0124] 在一个实施方案中,使用在第一次施用 TmAB 后不迟于 14 周自患者提供的样品来实施依照本发明的方法。在一个实施方案中,在第一次施用 TmAB 后从 2 周起实施抗<TmAB>AB 的检测。在一个实施方案中,在第一次施用 TmAB 后第 2 周至第 6 周实施抗<TmAB>AB 的检测。在一个实施方案中,在首次施用 TmAB 后 6 周实施抗<TmAB>AB 的检测。

[0125] 依照本发明的方法对于选择适当的 TmAB 疗法也具有价值。

[0126] TmAB 疗法的缺乏有效性(LOE)在用 TmAB 治疗下的患者中,例如对于在用抗<TNF α >抗体治疗下的患者是一种罕见但已知的现象。已经使用在用 TmAB 治疗下的患者中的抗<TmAB>AB 测定,试图预测 TmAB 疗法的 LOE。现有技术中已经显示了,抗<TmAB>AB 可以减少在用所述 TmAB 治疗下的患者的循环中可用的 TmAB 的有效量。目前不清楚什么决定在用所述 TmAB 治疗的患者中抗<TmAB>AB 响应的量级(Aarden, L. 等, Current Opinion in Immunology 20(2008) 431-435)。在一些治疗办法中,已经在 LOE 诊断后提高所述 TmAB 的剂量来补偿患者循环中可用的 TmAB,从而开启了新的科学和临床相关问题。测定 TmAB 的血清水平目前是监测 TmAB 疗法的治疗效力的黄金标准。Aarden 等提出应当经常对患者监测血清 TmAB 水平,并且抗体水平可以在决定是否增加剂量或者转换成另一种 TmAB/药物中作指导。

[0127] 从现有技术中还已知的是在 TmAB 疗法期间,例如在抗<TNF α >疗法期间的副作用(不利效应, ADR)。熟练技术人员已知的是,在 TmAB 疗法下的患者有风险形成 ADR。然而,似乎没有方法可用于在启动基于 TmAB 的疗法后早期(例如在重度 ADR 到来前)评估这类风险。

[0128] 令人惊讶地,已经发现了在来自用所述 TmAB 治疗下的患者的样品中体外测定针对感兴趣 TmAB 的抗体容许我们在发生 ADR 前预测哪些患者在用 TmAB 治疗期间有升高的形成 ADR 的风险。

[0129] 在又一个实施方案中,在来自用所述 TmAB 治疗下的患者的样品中体外测定针对 TmAB 的抗体用于鉴定在用 TmAB 治疗期间有风险形成 ADR 的患者,其中对抗 <TmAB>AB 测试呈阳性的患者有风险形成 ADR。不希望限于此理论,很可能是,在用较高剂量的所述 TmAB 治疗针对某种 TmAB 的抗 <TmAB>AB 测试呈阳性的患者的情况中,后来形成 ADR 的风险高得多。因此,为了降低后来的 ADR 风险,应该严肃考虑在测定出针对施用的第一 TmAB 的抗 <TmAB>AB 后将疗法改变为另一种(第二)TmAB。

[0130] 在一个实施方案中,使用本发明的方法来测定患者在用 TmAB 治疗期间是否有风险形成 ADR。在此实施方案中,对抗 <TmAB>AB 测试呈阳性的患者有风险形成 ADR。在本文中公开的方法中对抗 <TmAB>AB 测试呈阳性的患者有升高的形成 ADR 的风险。可以使用熟练技术人员已知的数学方法以相对风险测定这类风险。如在例子中显示的,抗 <TmAB>AB 的早期形成先于 ADR 的后期形成和/或患者自研究的退出。在一个实施方案中,形成 ADR 的风险是至少 40% 的相对风险,在一个优选的实施方案中,该风险是至少 45% 的相对风险。

[0131] 图 2 和图 3 的抗 <TmAB>AB 时间系列图显示了未退出的患者和那些由于 ADR 而从研究退出的患者之间的差别。在图 2 中呈现了实施例 5 的研究数据,以卡普兰-迈耶(Kaplan-Meier, KM) 曲线就第 6 周抗 <TmAB>AB 状态显示用英夫利昔单抗治疗的患者的结果。在图 3 中,显示了就第 14 周抗 <TmAB>AB 状态而言用英夫利昔单抗治疗的患者的结果,作为 KM 曲线。在关于由于 ADR 而退出的患者(或对于由于没有治疗效果而退出的患者)的这两幅图中,抗 <TmAB>AB 阳性(抗 <TmAB>AB+) 患者的 KM 曲线低于抗 <TmAB>AB 阴性(抗 <TmAB>AB-) 患者的 KM 曲线。此差异在第 6 周甚至比第 14 周中更明显。

[0132] 在一个实施方案中,本发明涉及用于为在用第一 TmAB 治疗下的患者选择备选的治疗性抗体的方法,其中至少可用第一和一种或多种备选的 TmAB,所述方法包括:a) 在来自用所述第一 TmAB 治疗的患者的样品中体外测定针对所述第一 TmAB 的抗 <TmAB>AB,并 b) 如果存在针对所述第一 TmAB 的抗 <TmAB>AB,那么选择备选的 TmAB 供未来疗法用。

[0133] 在一个实施方案中,使用从诊断为慢性炎症性疾病的患者获得的样品来实施用于选择备选的治疗性抗体的方法。在一个实施方案中,所述慢性炎症性疾病选自下组:类风湿性关节炎(RA)、克罗恩氏病(CD)、强直性脊柱炎(AS)、多关节幼年型特发性关节炎(JIA)、银屑病关节炎(PsA)、白赫铁列夫症和或慢性斑块状银屑病(Ps)。在一个优选的实施方案中,所述患者诊断为类风湿性关节炎(RA)。

[0134] 在一个实施方案中,使用从人患者获得的样品来实施用于选择备选的治疗性抗体的方法。在一个实施方案中,测定的抗 <TmAB>AB 是抗 <TNF α AB> 抗体。

[0135] 在一个实施方案中,本发明涉及用于为在用第一 TmAB 治疗下的患者选择备选的 TmAB 的方法,其中至少可用第一和一种或多种备选的 TmAB,所述方法包括:a) 来自用所述第一 TmAB 治疗的患者的样品中体外测定针对第一 TmAB 的 IgG 类抗 <TmAB>AB,并 b) 如果存在针对所述第一 TmAB 的抗 <TmAB>AB,那么选择备选的 TmAB 供未来疗法用。

[0136] 在一个实施方案中,使用在第一次施用 TmAB 后不迟于 14 周自患者提供的样品来实施用于选择备选的治疗性抗体的方法。在一个实施方案中,在第一次施用 TmAB 后从 2 周

起实施抗 <TmAB>AB 的检测。在一个实施方案中,在第一次施用 TmAB 后第 2 周至第 6 周实施抗 <TmAB>AB 的检测。在一个实施方案中,在第一次施用 TmAB 后 6 周实施抗 <TmAB>AB 的检测。

[0137] 如果在自在所述第一 TmAB 治疗下的患者获得的样品中存在针对所述第一 TmAB 的抗 <TmAB>AB,那么如何选择备选的 TmAB 以供未来疗法用是熟练技术人员已知的。在一个实施方案中,备选的 TmAB 选自下组:抗 <TNF α > 单克隆抗体和利妥昔单抗。在一个实施方案中,备选的 TmAB 选自下组:英夫利昔单抗、阿达木单抗、赛妥珠单抗和利妥昔单抗。在一个实施方案中,备选的 TmAB 是抗 <TNF α > 单克隆抗体。在一个实施方案中,备选的 TmAB 是抗 <CD20> 抗体。在一个实施方案中,备选的 TmAB 是利妥昔单抗。在一个实施方案中,第一 TmAB 是抗 <TNF α > 单克隆抗体,而备选的 TmAB 是抗 <CD20> 抗体。在一个实施方案中,第一 TmAB 是抗 <TNF α > 单克隆抗体,而备选的 TmAB 是利妥昔单抗。

[0138] 用途:

[0139] 一般地,可以使用依照本发明的方法来在临床试验以及临床常规两者中检测抗 <TmAB>AB。在一个实施方案中,本发明涉及本发明的免疫测定方法用于检测抗 <TmAB>AB 的用途。

[0140] 在一个实施方案中,本发明涉及如本文中公开的免疫测定方法用于鉴定有风险形成不良药物反应 (ADR) 的患者的用途,其通过在来自用治疗性单克隆抗体 (TmAB) 治疗的患者的样品中体外测定的抗 <TmAB>AB 来进行。

[0141] 在一个实施方案中,本发明涉及免疫测定方法用于体外测定抗 <TmAB>AB 的用途,其中使用在第一次施用 TmAB 后不迟于 14 周自患者提供的样品来检测抗 <TmAB>AB。在一个实施方案中,在第一次施用 TmAB 后从 2 周起实施抗 <TmAB>AB 的检测。在一个实施方案中,在第一次施用 TmAB 后第 2 周至第 6 周实施抗 <TmAB>AB 的检测。在一个实施方案中,在第一次施用 TmAB 后不迟于 6 周实施抗 <TmAB>AB 的检测。

[0142] 可以使用依照本发明的方法来监测用治疗性单克隆抗体 (TmAB) 治疗且有风险形成 ADR 的患者。在一个实施方案中,使用该方法来调查在用 TmAB 治疗期间患者中形成抗 <TmAB>AB 的频率,并且测定这类抗 <TmAB>AB 的形成是否与早期 ADR 和 / 或治疗失败有关。

[0143] 提供以下实施例和图来帮助理解本发明,本发明的真实范围在所附权利要求书中列出。应当理解,可以在不背离本发明精神的前提下对所列的规程做出修改。

[0144] 附图描述

[0145] 图 1 图 1 显示了如实施例 3 中描述的间接免疫测定测试形式。抗 <TmAB>AB= 待调查的样品中要检测的抗 <治疗性单克隆抗体> 抗体;单抗 <h-Agg. -IgG>Dig= 经 Dig 标记的单克隆抗体 <h-Agg. -IgG>;F(ab')₂-Bi 和 Fab-Bi= 在固相上固定化的生物素化抗原,其特异性结合抗 <TmAB>AB。

[0146] 图 2 图 2 显示了用英夫利昔单抗治疗的患者的卡普兰 - 迈耶存活曲线,所述患者由于 ADR<=50 周而自研究退出。X 轴 = 以天计的自研究退出 (退出日);Y 轴 = 存活分布函数;下面的线 = 在第 6 周时检测出抗药物抗体 (抗 <TmAB>AB+) 的患者:总体 = 31,失败 = 15;上面的线 = 在第 6 周时没有检出抗药物抗体 (抗 <TmAB>AB-) 的患者:总体 = 94,失败 = 12; p 值时序检验 = <0.0001;危害比 = 5.06,95%CI 危害比 = [2.36, 10.84]。在表 4 中显示数据。

[0147] 图 3 图 3 显示了用英夫利昔单抗治疗的患者的卡普兰 - 迈耶存活曲线,所述患者

由于 $ADR \leq 50$ 周而自研究退出。X 轴 = 以天计的自研究退出 (wd_天); Y 轴 = 存活分布函数; 下面的线 = 在第 14 周时检测出抗药物抗体 (抗 <TmAB>AB+) 的患者: 总体 = 43, 失败 = 16; 上面的线 = 在第 14 周时没有检出抗药物抗体 (ADA-) 的患者: 总体 = 88, 失败 = 12; p 值时序检验 = <0.0009; 危害比 = 3.30, 95%CI 危害比 = [1.56, 6.99]。在表 4 中显示数据。

[0148] 图 4 图 4 显示了夹心 / 三明治式免疫测定法形式, 如说明书中提及的。抗 <TmAB>AB = 待调查样品中要检测的抗 <治疗性单克隆抗体> 抗体; $F(ab')_2$ -Dig = 经 Dig 标记的 $F(ab')_2$ 片段; $F(ab')_2$ -Bi 或 Fab-Bi = 在固相上固定化的生物素化抗原, 其特异性结合抗 <TmAB>AB。

[0149] 图 5a 图 5a 显示了 $F(ab')_2$ -Bi 英夫利昔单抗片段作为捕捉抗体的结果。TN = 自表观健康的人供血者采集的血清样品 (真阴性)。TP = 自用英夫利昔单抗治疗的 RA 患者采集的血清样品 (真阳性)。50、500、和 150000 栏在高度上是截短的。

[0150] 图 5b 图 5b 显示了 Fab-Bi 英夫利昔单抗片段作为捕捉抗体的结果。TN = 自表观健康的人供血者采集的血清样品 (真阴性)。TP = 自用英夫利昔单抗治疗的 RA 患者采集的血清样品 (真阳性)。50、75000、100000 和 150000 栏在高度上是截短的。

实施例

[0151] 实施例 1

[0152] 制备特定治疗性单克隆抗体的缀合有生物素的 Fab 和 $F(ab')_2$ 片段

[0153] Fab 片段: 将 100mM 磷酸盐、2mM EDTA 缓冲液 (pH7.0) 中的免疫球蛋白 G 类 (IgG) 的全长治疗性单克隆抗体在存在 10–20mM 半胱氨酸的情况下与木瓜蛋白酶一起温育 (每 mg IgG 为 5–20mU 木瓜蛋白酶)。通过分析用凝胶渗透层析来分析片段化, 并在 60–120 分钟后通过添加碘乙酰胺溶液 (添加 10mM) 来终止。

[0154] $F(ab')_2$ 片段: 将 100mM 柠檬酸钠缓冲液 (pH3.7) 中的免疫球蛋白 G 类 (IgG) 的全长治疗性抗体与胃蛋白酶 (每 mg IgG 为 1–15 μ g 胃蛋白酶) 一起温育。通过分析性凝胶渗透层析来分析片段化, 并在 90 分钟后通过添加磷酸钾将 pH 值调节至 6.5 来终止。

[0155] 纯化: 将这两种片段化混合物各自针对具有 10mM 氯化钠的 10mM 磷酸钠缓冲液 (pH5.5) 透析, 将溶液应用到 SP-sepharose 层析柱, 通过分析用凝胶过滤个别分析在盐梯度中洗脱的分离的级分。将含有抗体 Fab 或 $F(ab')_2$ 片段的集合应用到具有固定化的针对人 Fc γ 的多克隆抗体的亲和基质, 从而消除痕量的 Fc γ 片段, 将流过物合并, 并针对残留的 Fc γ 含量分析。将亲和纯化规程至少重复三次, 直到残留的 Fc γ 浓度下降到低于 0.5ppm。将产物浓缩到约 10mg/ml, 并且最终应用到凝胶过滤柱 (Superdex200)。

[0156] 缀合: 于 pH 值为 8.2–8.4 使用 NHS 活化的生物素标记物缀合纯化的无 Fc γ 片段。反应化学计量是 1:5 (IgG: 标记物), 在 1 小时后通过添加 1M 赖氨酸溶液来终止反应, 并在凝胶过滤柱 (Superdex200) 上纯化粗制缀合物。

[0157] 制备特定治疗性抗体的缀合有生物素的 Fab 片段:

[0158] 将纯化的 $F(ab')_2$ 片段与 5mM 半胱胺一起温育 1 小时, 通过分析用凝胶渗透层析来监测向 Fab 片段的还原。将粗制产物应用到凝胶过滤柱 (Superdex200) 上, 并将合并的 Fab 级分立即与 MEA 活化的生物素标记物缀合 (化学计量 1:10, 1 小时)。通过 ESI-MS 实施最终的分析表征以分别确认缀合位点和产量。

[0159] 实施例 2

[0160] 具有类风湿因子样特异性的单克隆小鼠 IgM 抗体的生成

[0161] 免疫原 :H-IgG 多聚体

[0162] 将 10mg 人 IgG1 (Sigma Company) 在 0.6ml25mM 碳酸氢盐缓冲液 (pH9.5) 中溶解。在添加 3.5 μ l 12.5% 戊二醛溶液后,将其于室温温育 2 小时。随后,将其在冰浴中冷却,用 50mM 三乙醇胺溶液 (pH8.0) 调节至 pH8.3,并添加 0.15ml 新鲜制备的硼氢化钠溶液 (8mg 氢化硼 /ml 水)。于 0 $^{\circ}$ C 2.5 小时后,将制备物于 4 $^{\circ}$ C 针对 10mM 磷酸钾缓冲液 /0.2M NaCl (pH7.5) 透析 16 小时。将含有 IgG 多聚体的透析液以等分试样于 -80 $^{\circ}$ C 贮存或用于免疫及用于杂交瘤细胞培养物上清液中的特异性测试。

[0163] 以类似的方式从人 IgG3 (Sigma Company) 开始生成 H-IgG3 多聚体。

[0164] 小鼠免疫 :

[0165] 首先,用与佐剂 CFA (完全弗氏佐剂) 一起的 100 μ g H-IgG1 或 IgG3 多聚体腹膜内免疫 12 周龄雌性 Balb/c 小鼠。8 天后,用 CFA 中的 100 μ g 相应的 IgG 多聚体实施又一次免疫。初始免疫后 13 天,在没有佐剂的情况中腹膜内施用 200 μ g 相应的多聚体,初始免疫后 14 和 15 天,在每种情况中腹膜内及静脉内施用 100 μ g。在 16 天后实施融合。

[0166] 杂交瘤克隆的生成 :

[0167] 融合和克隆 :

[0168] 遵循 Galfré, G., Methods in Enzymology 73 (1981) 3-46 的方法将经免疫小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞融合。将经免疫小鼠的约 1×10^8 个脾细胞与 2×10^7 个骨髓瘤细胞 (P3X63-Ag8-653, ATCC CRL1580) 混合并离心 (以 300g 且于 4 $^{\circ}$ C 持续 10 分钟)。然后,将细胞用没有胎牛血清 (FCS) 的 RPMI-1640 培养基清洗一次,并在 50ml 圆锥管中以 400g 再次离心。添加 1ml PEG (聚乙二醇) (分子量 4000, Merck, Darmstadt), 并通过移液混合。于 37 $^{\circ}$ C 在水浴中 1 分钟后,逐滴添加 5ml 没有 FCS 的 RPMI 1640, 混合,用培养基 (RPMI 1640+10%FCS) 充满至 50ml, 随后离心。将沉降的细胞在含有 10%FCS 的 RPMI 1640 培养基中取出,并在次黄嘌呤 - 重氮丝氨酸选择培养基 (RPMI 1640+10%FCS 中 100mmol/l 次黄嘌呤、1 μ g/ml 重氮丝氨酸) 中散布。向培养基添加白介素 6 (100U/ml) 作为生长因子。在约 10 天后,对原代培养物测试特异性抗体合成。在 96 孔细胞培养板中依靠荧光活化细胞分选仪来克隆原代培养物,该原代培养物显示与聚集的人 IgG1 的阳性反应,但是与单体 IgG 没有交叉反应。向培养基添加白介素 6 (100U/ml) 作为生长添加剂。

[0169] 以此方式获得下列杂交瘤克隆 :

[0170] 表 1 :

[0171]

单克隆抗体名称	免疫原	亚类特异性
单抗 <h-Agg. -IgG>M-3.022.5-IgM	h-IgG1 多聚体	IgG1>IgG3>IgG4>IgG2
单抗 <h-Agg. -IgG>M-1.010.2-IgM	h-IgG1 多聚体	IgG1>IgG3>IgG4>IgG2
单抗 <h-Agg. -IgG>M-1.1.7-IgM	h-IgG3 多聚体	IgG1>IgG3>IgG2>IgG4

[0172] 对聚集的人 IgG 具有特异性的单克隆抗体的筛选测试

[0173] 用生物素化的人 IgG1 或 IgG3 包被经链霉亲合素包被的 MTP。然后,将它们与细胞培养物上清液中的单克隆抗体一起温育。随后,使用抗 <小鼠 -IgM>-POD 通过与 POD 底物的反应以通常的方式检测结合的抗体。

[0174] 使用结合至固相的人 IgG 来测定亚类特异性:

[0175] 为了测定杂交瘤细胞的培养物上清液中抗体的特异性,用在温育缓冲液中的 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ 生物素化的 1 或 2 或 3 或 4 亚类 h-IgG(=h-IgG-Bi) 包被用重组链霉亲合素 (MicroCoat Company, 订购号 12-K96N) 包被的 MTP。由于经由生物素结合至固相的 IgG 表现得像聚集的多聚 IgG,可以使用此实验办法来测定亚类特异性。为此,将每孔 $100\text{ }\mu\text{l}$ h-IgG-Bi 溶液在摇动的情况中于室温温育 60 分钟,随后用 $0.9\%\text{NaCl}/0.05\%\text{Tween}^{\circledR} 20$ 清洗 3 次。

[0176] 在下一步中,将待检查的 $100\text{ }\mu\text{l}$ 抗体溶液(培养物上清液)添加至经包被的孔,并于室温在摇动的情况中温育 1 小时。在用 $0.9\%\text{氯化钠}/0.05\%\text{Tween}^{\circledR} 20$ 清洗 3 次后,在每种情况中添加 $100\text{ }\mu\text{l}$ 针对小鼠 IgM 的来自山羊的多克隆抗体的经 POD 标记的 Fab 片段 (Dianova Company, 订购号 115-036-075, 使用的浓度 $0.16\text{ }\mu\text{g/ml}$ 温育缓冲液) 以检测从样品结合的抗体,于室温在摇动的情况中温育 1 小时,随后用 $0.9\%\text{氯化钠}/0.05\%\text{Tween}^{\circledR} 20$ 清洗 3 次。

[0177] 最后,添加 $100\text{ }\mu\text{l}/\text{孔}$ ABTS[®] 底物 (Roche Diagnostics GmbH, 订购号 1684302),并于室温在 30 分钟后在来自 Dynatech Company 的 MR700 微板阅读器中测量于 $405/492\text{nm}$ 的吸光度。

[0178] 温育缓冲液:

[0179] 40mM 磷酸钠, $\text{pH}7.4$, 200mM 酒石酸钠, $0.1\%\text{Tween}^{\circledR} 20$, 0.2% 牛血清清蛋白。

[0180] 测定与单体人 IgG1 的反应性 / 交叉反应:

[0181] 为了测定与单体、非聚集的 H-IgG1 的反应性 / 交叉反应,将待检查的单克隆抗体在上文所描述的测试中与浓度递增或过量的单体、非聚集的 IgG1 一起预温育。如果所测量的信号在高水平保持不变,那么没有交叉反应。如果所测量的信号降低,那么发生了交叉反应。

[0182] 对此,用温育缓冲液中 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ 生物素化的 H-IgG1(=H-IgG1-Bi) 包被用重组链霉亲合素包被的微量滴定板 (MTP) (MicroCoat Company, 订购号 12-K96N)。每孔使用 $100\text{ }\mu\text{l}$ H-IgG1-Bi 溶液,并于室温在摇动的情况中温育 60 分钟,随后用 $0.9\%\text{NaCl}/0.05\%\text{Tween}^{\circledR} 20$ 清洗 3 次。

[0183] 将要测试交叉反应的单克隆抗体与多至 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ 的一系列浓度的单体、非聚集的 IgG1 一起预温育。预温育在未包被的 96 孔 MTP 中于室温在摇动的情况中发生 1 小时。

[0184] 在下一步,将 $100\text{ }\mu\text{l}$ 此溶液(抗体 + 过量的未聚集的单体 IgG1) 添加至经包被的孔,并于室温在摇动的情况中温育 1 小时。在用 $0.9\%\text{氯化钠}/0.05\%\text{Tween}^{\circledR} 20$ 清洗 3 次后,在每种情况中添加 $100\text{ }\mu\text{l}$ 针对小鼠 IgM 的来自山羊的多克隆抗体的经 POD 标记的 Fab 片段 (Dianova Company, 订购号 115-036-075, 使用的浓度为 $0.16\text{ }\mu\text{g/ml}$ 温育缓

冲液)来检测从样品结合的抗体,于室温在摇动的情况中温育 1 小时,随后用 0.9% 氯化钠/0.05% Tween® 20 清洗 3 次。

[0185] 最后,添加 100 μ l/孔的 ABTS® 底物 (Roche Diagnostics GmbH, 订购号 1684302),并于室温在 30 分钟后在来自 Dynatech Company 的 MR700 微板阅读器中测量于 405/492nm 的吸光度。

[0186] 在本发明的意义中合适的单克隆类风湿因子样结合抗体识别所有人 IgG 亚类,并且在竞争测试中与单体 h-IgG 显示小于 10% 的交叉反应。如果使用 H-IgG1 多聚体来测定反应性,那么所测量的信号大大降低。表 1 显示了找到的单克隆抗体的主要特性。

[0187] 发酵杂交瘤克隆以分离单克隆抗体:

[0188] 将获得的杂交瘤细胞以在含有 10%FCS 的 RPMI1640 培养基中每 ml 为 1×10^5 个细胞/ml 的密度散布,并在发酵罐 (Thermodux Company, Wertheim/_Main, MCS-104XL 型,订购号 144-050) 中增殖 7 天。在培养物上清液中达到每 ml 为 100 μ g 单克隆抗体的平均浓度。

[0189] 单克隆单抗 <h-Agg. -IgG>M-3.022.5-IgM 的分离:

[0190] 用 0.1M 磷酸钠缓冲液 (pH8.6) 将 5mg 单抗 <h-Agg. -IgG>M-3.022.5-IgM (DSM ACC2873) 调节至总体积 2ml。将 50 μ l 在二甲亚砜中的 1.11mM 洋地黄毒苷 -3-O-甲基-羰基-e-氨基己酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯溶液添加到此溶液,随后于 25° C 搅拌 60 分钟。IgM 与活化的洋地黄毒苷的比率是 1:10。将形成的 IgM-洋地黄毒苷针对 20mM 磷酸钾缓冲液/0.1M NaCl/3% 蔗糖 (pH7.5) 透析。将经过透析的 IgM-Dig 以等分试样于 -80° C 贮存。

[0191] 实施例 3

[0192] 在多参数生物芯片平台上的全自动化 ELISA 测定法

[0193] 多参数生物芯片平台记载于 Hornauer, H. 等, BIOspectrum, Special Proteomics10(2004)564-565 及 Hornauer, H. 等, Laborwelt4(2004)38-39 中。

[0194] 在染黑的聚苯乙烯支持物(固相)上约 2.5x6mm 的测试区的整个面积里应用链霉亲和素包被。将每条线约 10-20 个由治疗性抗体的生物素化片段组成的相同点的各条线在喷墨规程中应用到测试区;每个点的直径是约 150 μ m。

[0195] 使用下列测试特异性试剂:

[0196] 样品稀释缓冲液:

[0197] 50mM Tris(pH7.6);150mM NaCl;0.1% 去污剂(聚多卡醇);0.6%BSA;0.2% 防腐剂(醋氧甲苯酸 (oxypyrrion, oxypyrin) 和盐酸甲基异噻唑酮 (methylisothiazolone hydrochloride, MIT))

[0198] 清洗缓冲液:

[0199] 10mM Tris,0.01% 聚多卡醇,0.001% 醋氧甲苯酸,0.001%MIT

[0200] 样品:

[0201] 通过筛选用相应的治疗性抗体治疗的研究群来获得人血清阳性样品;阴性样品是未用相应的治疗性抗体治疗的健康供血者。

[0202] 使用英夫利昔单抗 Fab 片段作为生物素化的抗原。以间接测试形式检测针对这些抗原的自身抗体(抗 <TmAB>AB)。在每个点溶液中使用 50 μ g/ml 相应的生物素化的抗原。

[0203] 测试规程的描述:

[0204] 用样品稀释缓冲液将样品以 1:50 稀释以进行测量。将稀释的样品于 37° C 温育 12 分钟。在吸出样品并用清洗缓冲液清洗测试场后,将它们与单抗 <h-Agg. -IgG>M-3.022.5-IgM(DSM ACC2873),即一种用地高辛标记的抗体(经 Dig 标记的单克隆抗体 <h-Agg. -IgG>)于 37° C 一起温育 6 分钟,随后是清洗步骤。在于 37° C 与经荧光标记的 <Dig> 抗体一起温育 3 分钟,随后清洗并抽吸干燥测试场后,通过 CCD 照相机检测信号。

[0205] 实施例 4

[0206] 以间接测定法形式比较 $F(ab')_2$ 和 Fab 片段

[0207] 将生物素化的英夫利昔单抗(作为片段 $F(ab')_2$ -Bi 或 Fab-Bi)各自定位至芯片表面(固相)上的不同区域上。使用洋地黄毒苷化的抗<人 IgG>作为检测试剂。由于英夫利昔单抗是一种人源化 IgG1,检测抗体会直接结合定位的抗体。因此,仅英夫利昔单抗片段(更一般地,抗<TNF α 抗体片段>) $F(ab')_2$ -Bi 或 Fab-Bi 的使用在此测定法形式中是有可能的。

[0208] 总共采集来自表观健康供血者的 100 份血清样品(TN)以及来自用英夫利昔单抗治疗的类风湿性关节炎(RA)患者的 155 份血清样品(TP)来比较两种不同测定法的特异性,其使用英夫利昔单抗片段 Fab-Bi 或 $F(ab')_2$ -Bi 作为捕捉抗体进行。使用生物素化的英夫利昔单抗(作为 $F(ab')_2$ -Bi)在自几名表观健康供血者采集的样品(TN)中导致假升高的信号,其与自用英夫利昔单抗治疗的类风湿性关节炎患者采集的真阳性样品(TP)的信号几乎一样强(在表 2 中显示了结果,且在图 5a 中给出了该结果的图形呈现)。

[0209] 表 2:

[0210]

英夫利昔单抗片段 $F(ab')_2$ -Bi									
计数	50	500	5000	10000	25000	50000	75000	100000	150000
TN (n=100)	58	26	9	1	3	2	0	0	0
TP (n=155)	0	0	0	0	0	0	1	9	145

[0211] 使用英夫利昔单抗的生物素化的 Fab-Bi 片段作为捕捉抗体容许我们好得多地区分真阳性(TP)和真阴性(TN)样品。在表 3 中显示了结果,并且在图 5b 中给出了该结果的图形呈现。

[0212] 表 3:

[0213]

英夫利昔单抗片段 Fab-Bi									
计数	50	500	5000	10000	25000	50000	75000	100000	150000
TN (n=100)	87	10	2	0	0	0	0	0	0
TP (n=155)	0	0	0	0	0	6	33	34	82

[0214] 实施例 5

[0215] 用于检测抗<TNF α 抗体>抗体(抗<TNF α AB>AB)的筛选测定法

[0216] 研究数据基于来自哥本哈根分组的样品。血液样品自总共 218 位用英夫利昔单抗治疗的类风湿性关节炎 (RA) 患者采集。对此血液样品分析针对英夫利昔单抗的抗 <TmAB>AB (抗 <TNF α AB>AB) 的存在。在第 0 周时,在第一次施用 TmAB 前采集基线样品 (参照样品)。如果本文中规定样品在第一次施用 TmAB 后第 2 周时采集,那么该样品可以自第 9 天至第 21 天采集。如果本文中规定样品在第一次施用 TmAB 后第 6 周时采集,那么该样品可以自第 28 天至第 64 天采集。如果本文中规定样品在第一次施用 TmAB 后第 14 周时采集,那么该样品可以自第 13 周至第 16 周采集。

[0217] 使用如描述的间接测定法形式测定针对英夫利昔单抗的抗 <TmAB>AB。在实施例 3 中给出了罕见试剂、缓冲液、校准物和对照的全面概述。

[0218] 间接测定法形式:

[0219] 将生物素化的英夫利昔单抗 (作为 Fab-Bi) 定位至芯片表面上。使用洋地黄毒苷化的抗 <人 IgG> 作为检测试剂。由于英夫利昔单抗是一种人源化 IgG1,检测抗体会直接结合定位的抗体。因此,仅英夫利昔单抗片段 (更一般地,抗 -<TNF α 抗体片段>)F(ab')₂-Bi 或 Fab-Bi 的使用在此测定法形式中是有可能的。

[0220] 如由来自实施例 4 的结果显示的,优选使用 Fab 片段。在间接测定法形式中, Fab 片段导致好得多地区别阴性和真阳性结果。

[0221] 表 4:抗 <TmAB>AB 间接测定法 (在灵敏度方面优化)

[0222]

时间点	第2周	第6周	第14周
具有抗<TmAB>AB+测试结果的 患者数目	4	31	43

[0223]

在第50周前由于ADR退出的患者数目	3	15	16
百分比退出	75%	48%	37%
具有抗<TmAB>AB-测试结果的患者数目		94	88
在第50周前由于ADR退出的患者数目		12	12
百分比退出		13%	14%
危害比(95% CI)		5.06 (2.36 – 10.84)	3.30 (1.54 – 6.99)
p值		< 0.0001	0.0009

[0224] 在图 1 中显示的具有卓越灵敏度的抗 <TmAB>AB 间接测定法形式早在第一次治疗性施用英夫利昔单抗后 2 周在自患者采集的样品中检测出抗 <TmAB>AB。

[0225] 可以通过测定抗 <TmAB>AB 预测后来由于 ADR 而从研究的退出：

[0226] 第 2 周或第 6 周时抗 <TmAB>AB 的早期形成让我们分别以 75% 和 48% 可能性预测后来的 ADR 和患者从研究的退出（在表 4 中显示数据）。

[0227] 用 TmAB 例如英夫利昔单抗治疗在少数但仍然大量患者中导致针对所述 TmAB 的抗 <TmAB>AB 形成。最重要地，大量这些患者在后来的时间点由于 ADR 而离开研究。这些发现可以指示，在依照本发明的方法中评估的抗药物抗体可以在发生 ADR 前检出，并且如此使用抗 <TmAB> 抗体阳性测试来更好地指导疗法（例如从第一 TmAB 转换为第二备选 TmAB）可以是有可能的。

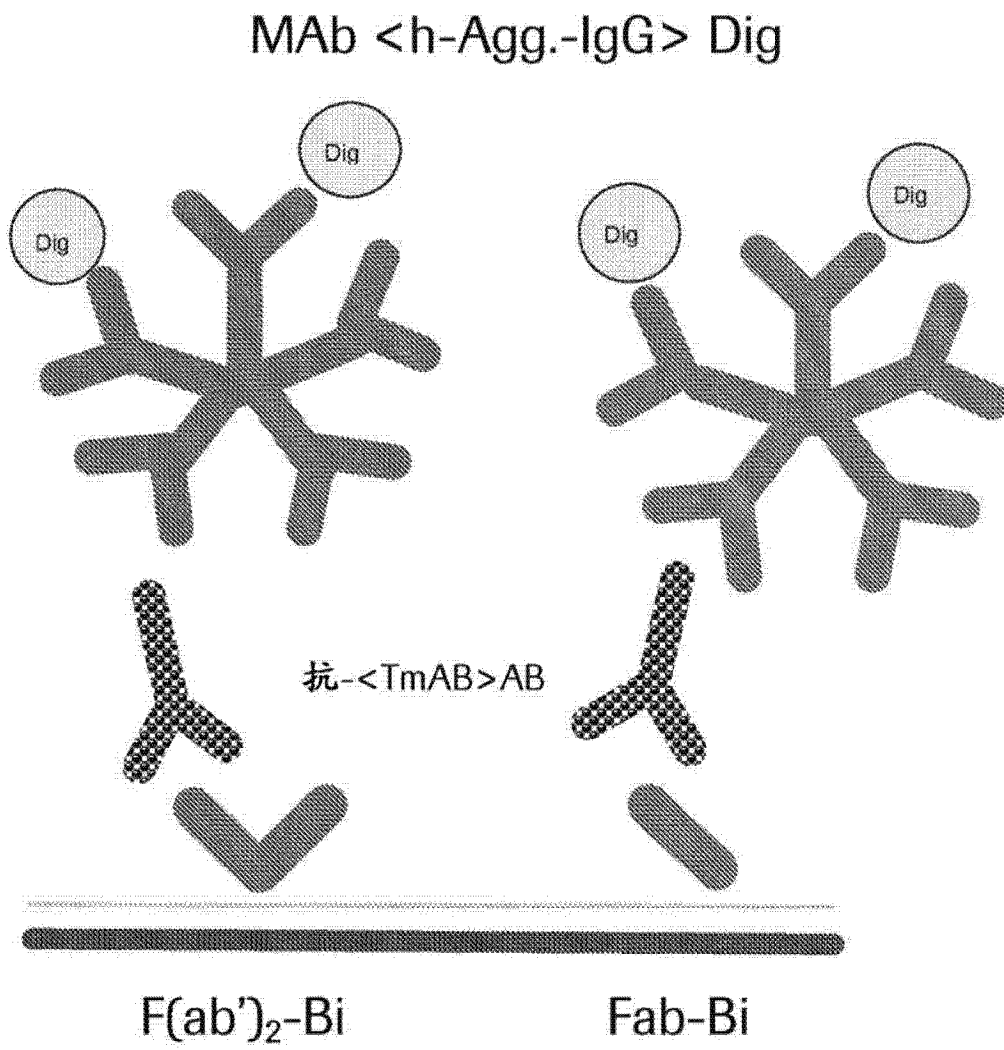


图 1

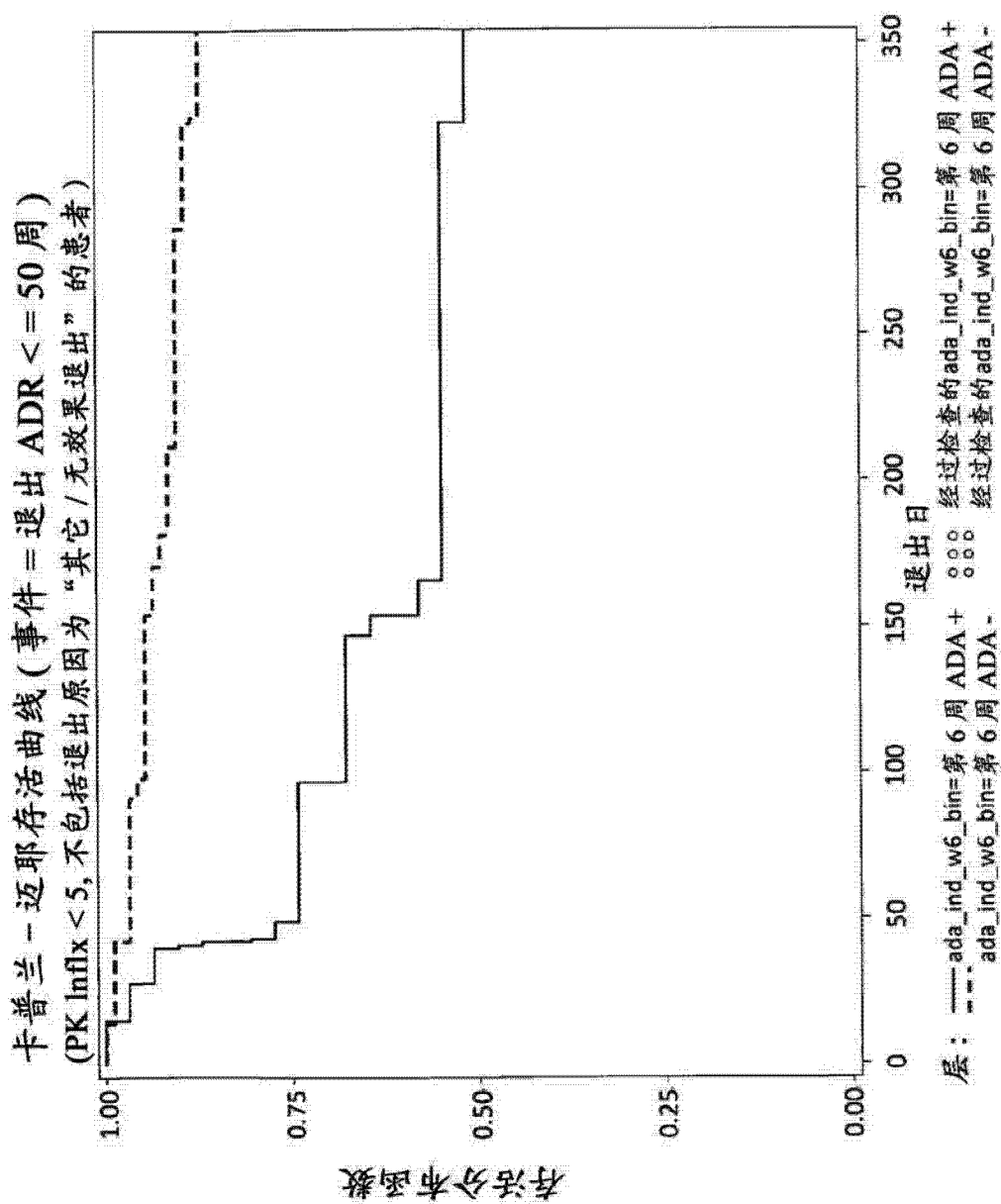


图 2

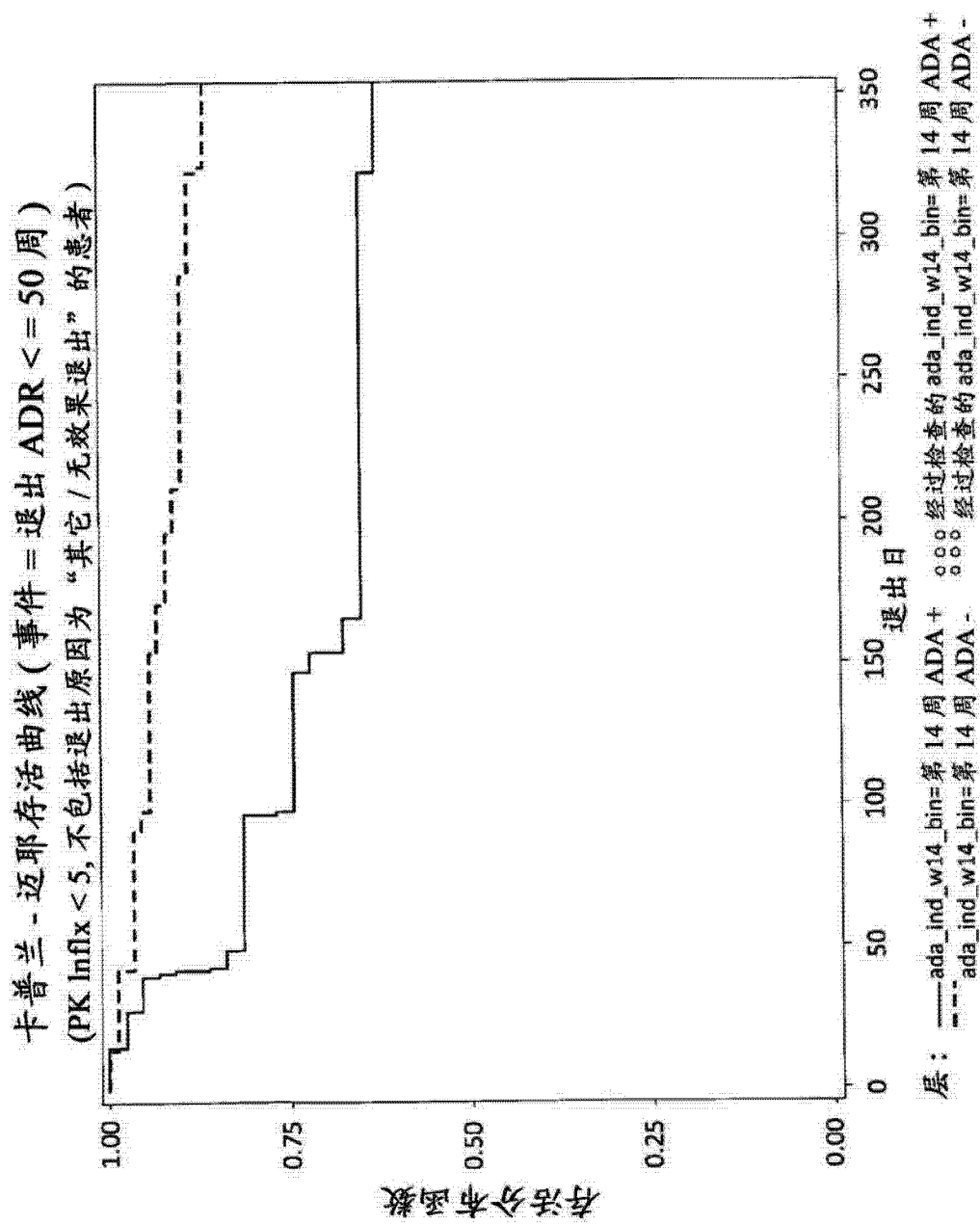


图 3

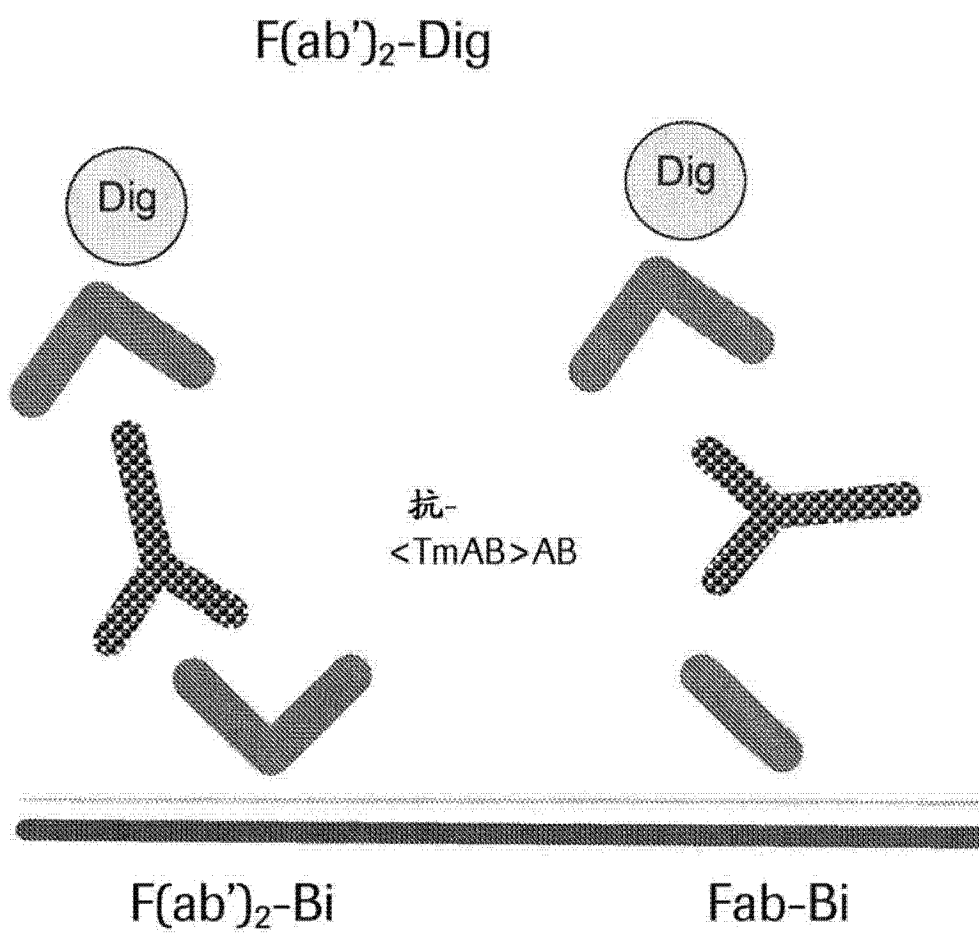


图 4

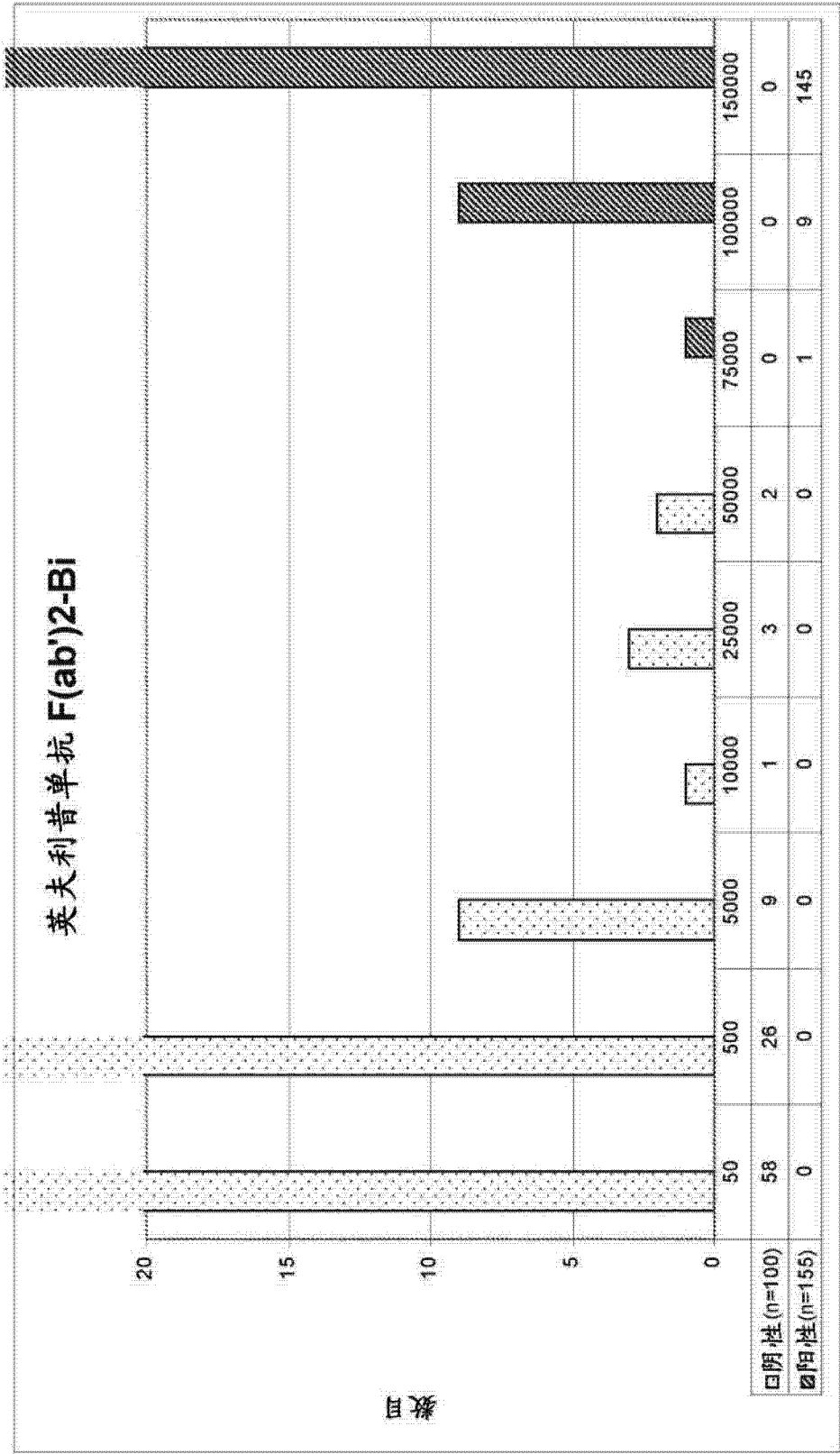


图 5a

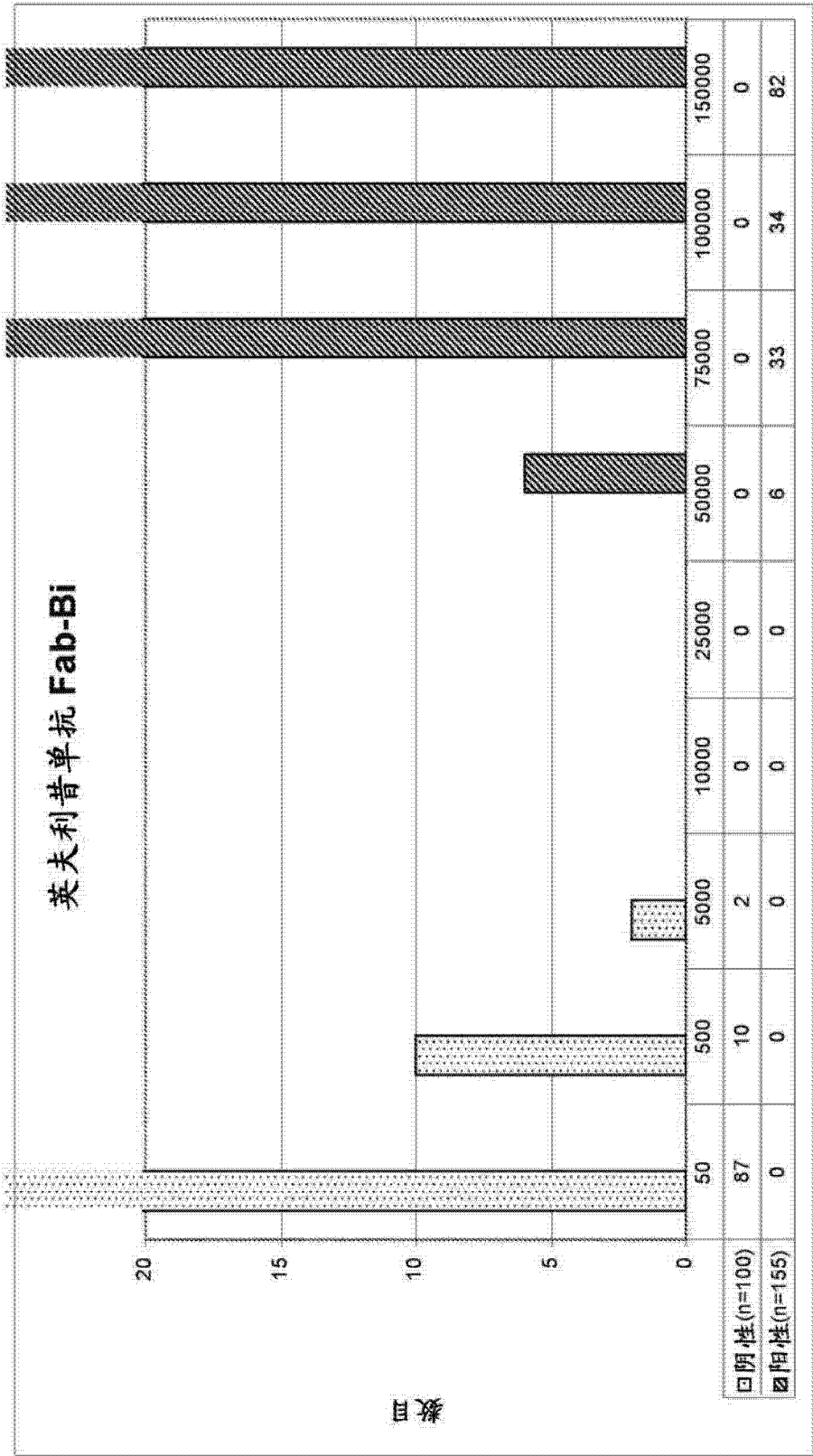


图 5b