



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105683755 A

(43) 申请公布日 2016. 06. 15

(21) 申请号 201480060361. 3

G01N 33/536(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 11. 03

(30) 优先权数据

13005218. 6 2013. 11. 05 EP

14002015. 7 2014. 06. 11 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016. 05. 04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2014/073523 2014. 11. 03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/067547 EN 2015. 05. 14

(71) 申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 M. 施雷姆尔 M. 罗斯勒 M. 盖格

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 唐华东 黄希贵

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

权利要求书3页 说明书21页 附图3页

(54) 发明名称

在存在结合分子的情况下测定分析物的总量和 / 或浓度的方法及其相关试剂盒、组合物和用途

(57) 摘要

本发明涉及在存在结合分子的情况下测定分析物的总量和 / 或浓度的方法及其相关试剂盒、组合物和用途。

1. 用于在存在结合分子的情况下测定分析物的总量和/或浓度的体外方法,所述结合分子能够借助其结合位点而结合至分析物,所述方法包括步骤:

(i)使包含所述分析物和所述结合分子的样品与以下接触

- 针对所述结合分子的结合位点的陷阱分子和
- 能够与所述分析物形成复合物的检测分子,以及

(ii)检测检测分子-分析物复合物,从而测定所述分析物的总量和/或浓度,

其中所述检测分子不同于所述结合分子,并且

其中所述分析物不同于所述陷阱分子,并且

其中所述检测分子仅能够在所述分析物不被所述结合分子结合时与所述分析物形成复合物。

2. 根据权利要求1的方法,其中所述陷阱分子促进所述分析物从所述结合分子上基本完全释放。

3. 根据权利要求1或2的方法,其中

— $K(\text{陷阱})/K(\text{结合分子})$ 为至少3、优选5、更优选至少10;和/或

— $\text{Conc}(\text{陷阱})/\text{Conc}(\text{结合分子})$ 为至少3、优选5、更优选至少10;和/或

— $(K(\text{陷阱})/K(\text{结合分子})) \times (\text{Conc}(\text{陷阱})/\text{Conc}(\text{结合分子}))$ 为至少3、优选5、更优选至少10;和/或

— $(K(\text{陷阱})/K(\text{结合分子})) \times (\text{Conc}(\text{陷阱})/\text{Conc}(\text{结合分子})) \times (\text{MR}(\text{陷阱})/\text{MR}(\text{结合分子}))$ 为至少3、优选5、更优选至少10;

其中 $K(\text{陷阱})$ 为所述陷阱分子对所述结合分子的亲和力,而 $K(\text{结合分子})$ 为所述结合分子对所述分析物的亲和力,并且

其中 $\text{Conc}(\text{陷阱})$ 和 $\text{Conc}(\text{结合分子})$ 分别为步骤i)中所述陷阱分子和所述结合分子的摩尔浓度,特别是其中 $\text{Conc}(\text{结合分子})$ 在1至5 $\mu\text{mol}/\text{l}$ 的范围内,和/或 $\text{Conc}(\text{陷阱})$ 在3*(1至5) $\mu\text{mol}/\text{l}$ 的范围内,并且

其中 $\text{MR}(\text{陷阱})$ 为所述陷阱分子与所述结合分子结合的结合价,而 $\text{MR}(\text{结合分子})$ 为所述结合分子与所述分析物结合的结合价。

4. 根据权利要求1至3中任一项的方法,其中

— 所述检测分子结合所述分析物的亲和力为至少 $10^8 (\text{mol}/\text{l})^{-1}$ 、更优选 $10^9 (\text{mol}/\text{l})^{-1}$ 、甚至更优选至少 $10^{10} (\text{mol}/\text{l})^{-1}$;和/或

— 所述陷阱分子结合至所述结合分子的亲和力为至少 $5 \times 10^9 (\text{mol}/\text{l})^{-1}$ 、更优选至少 $10^{10} (\text{mol}/\text{l})^{-1}$;和/或

— 所述检测分子的摩尔浓度为样品中所述结合分子的摩尔浓度的至多5%、优选至多3%、更优选至多1%、甚至更优选至多0.5%、最优选至多0.1%。

5. 根据权利要求1至4中任一项的方法,其中对所述检测分子-分析物复合物的检测以非竞争性测定法进行,特别是以夹心测定法进行,尤其是其中所述夹心测定法采用了能够结合至所述分析物的捕获分子,并且

其中

— 所述捕获分子带有用于固定的装置,并且

— 所述检测分子和所述捕获分子结合至所述分析物上不同的、非重叠的表位。

6. 根据权利要求1至5中任一项的方法,其中
- 所述结合分子为或包含抗体或其功能活性部分;和/或
 - 所述陷阱分子为或包含针对所述结合分子的抗原结合位点的抗独特型抗体或其功能活性部分;和/或
 - 所述检测分子为或包含抗体或其功能活性部分;和/或
 - 所述捕获分子为或包含抗体或其功能活性部分;
- 特别是其中所述陷阱分子、所述结合分子、所述检测分子和所述捕获分子各自为或包含抗体或其功能活性部分。
7. 根据权利要求1至6中任一项的方法,其中
- 所述结合分子为或包含抗体、抗体的功能活性部分、受体或受体片段,特别是治疗活性抗体或抗体的治疗活性功能活性部分、或治疗活性受体或治疗活性受体片段;和/或
 - 所述分析物为化合物,优选激素、肽或蛋白质、在动物或人血液中循环的分子、或生物标记物,特别是肿瘤标记物;和/或
 - 所述检测分子带有用于可检测标记的装置,特别是用于直接或间接检测的装置。
8. 根据权利要求1至7中任一项的方法,其中所述分析物为蛋白质和/或其中所述样品中的蛋白质未发生变性或不可逆的变性。
9. 根据权利要求1至8中任一项的方法,其中
- 在步骤(i)后进行洗涤步骤,或者
 - 在步骤(i)后不进行洗涤步骤,
- 优选在步骤(i)后不进行洗涤步骤。
10. 根据权利要求1至9中任一项的方法,其中
- 所述样品为液体,特别是含水液体、血液或血清,和/或
 - 所述样品特别是血液或血清中分析物的浓度在1 pg/ml至20 μg/ml、优选1 ng/ml至10 μg/ml的范围内;和/或
 - 已向从其获取所述样品的主体施用了所述结合分子,特别是治疗或诊断剂。
11. 根据权利要求1至10中任一项的方法,其中所述方法包括
- i) 进行如权利要求1至10中定义的步骤(i);
 - ii) 进行如权利要求1至10中定义的步骤(ii);以及
 - iii) 另外测定 — 在不存在陷阱分子的情况下 — 所述样品中游离的分析物的量和/或浓度,所述游离的分析物没有结合至所述结合分子,并且任选地,测定所述样品中结合至所述结合分子的分析物的量和/或浓度和/或比率。
12. 根据权利要求1至11中任一项的方法,其中
- 所述分析物的总量和/或浓度表明了患者疾病的不存在、存在和/或严重程度,和/或
 - 所述总量和/或浓度表明了患者对治疗的治疗反应,特别是其中已使用所述结合分子对所述患者进行了治疗,和/或
 - 所述样品中结合至所述结合分子的分析物的量和/或浓度和/或比率表明了患者疾病的不存在、存在和/或严重程度和/或患者对治疗的治疗反应,特别是其中已使用所述结合分子对所述患者进行了治疗,和/或

— 所述方法用于监测治疗,特别是在癌症治疗中。

13. 适用于测定样品中分析物的总量和/或浓度的试剂盒或组合物,所述样品还包含能够结合至所述分析物的结合分子,所述试剂盒或组合物包含:

- a) 能够与所述分析物形成复合物的检测分子;和
- b) 针对所述结合分子的结合位点的陷阱分子;和
- c) 任选地,所述分析物;和
- d) 任选地,能够结合至所述分析物的所述结合分子;和
- e) 任选地,捕获分子,所述捕获分子带有用于固定所述分析物的装置,其中所述检测分子不同于所述结合分子,并且其中所述分析物不同于所述陷阱分子,并且

其中所述检测分子仅能够在所述分析物不被所述结合分子结合时与所述分析物形成复合物,

特别是其中所述试剂盒或组合物适合用于根据权利要求1至12的任何方法。

14. 根据权利要求13的试剂盒或组合物

- 在根据权利要求1至12的任何方法中的用途,和/或
- 用于测定样品中分析物的总量和/或浓度的用途,优选其中所述分析物为生物标记物,和/或所述样品为血液或血清,和/或
- 用于测定患者对治疗的治疗反应的用途,特别是其中使用结合分子治疗所述患者。

在存在结合分子的情况下测定分析物的总量和/或浓度的方法及其相关试剂盒、组合物和用途

[0001] 本发明涉及在存在结合分子的情况下测定分析物的总量和/或浓度的方法及其相关试剂盒、组合物和用途。

[0002] 在许多采用结合分子(例如针对动物或人中的靶标的治疗活性抗体)的应用的情况下,存在对以下方法的需求,所述方法使得能够在存在结合分子的情况下测定此类靶标而不需要在测定该靶标的量或浓度之前移除结合分子。特别是对于例如治疗活性抗体或治疗活性受体或受体片段而言,存在对以下体外方法的需求,所述方法允许测定身体样品中治疗活性抗体或治疗活性受体或受体片段所针对的靶标的总量或浓度,而不用将治疗活性抗体或治疗活性受体或融合蛋白从样品中移除。从而,该总量既包含游离的、未结合的靶标,也包含结合至治疗活性抗体或治疗活性受体或受体片段的靶标。

[0003] 本发明提供了此类方法及可用于本发明的方法的试剂盒。

[0004] 在一个实施方案中,本发明涉及用于在存在结合分子的情况下测定分析物的总量和/或浓度的体外方法,所述结合分子能够借助其结合位点而结合至分析物,所述方法包括步骤:

- (i) 使包含分析物和结合分子的样品与以下接触
 - 针对所述结合分子的结合位点的陷阱分子和
 - 能够与所述分析物形成复合物的检测分子,以及
- (ii) 检测所述检测分子-分析物复合物,从而测定分析物的总量和/或浓度,其中所述检测分子不同于所述结合分子,并且其中所述分析物不同于所述陷阱分子,并且

其中所述检测分子仅能够在所述分析物不被所述结合分子结合时与所述分析物形成复合物。

[0005] 作为第一个步骤,使包含分析物和结合分子的样品与陷阱分子以及检测分子接触,所述陷阱分子针对结合分子的结合位点,所述检测分子能够与分析物形成复合物。

[0006] 待测量的分析物可以是任何化合物。通常,此类分析物可以是存在于生物样品,特别是人或动物的体液中的分析物。具体地讲,分析物可以是生物标记物、肽和/或蛋白质。

[0007] 包含分析物的样品可以是液体、凝胶或可液化的组合物,优选液体。此类液体可以是溶液、悬浮液或乳液。具体地讲,样品为生物样品,特别是得自人或动物的身体样品或其混合物。此类身体样品可在从主体中提取后直接使用,或可被保存在适当条件下,例如通过冷冻,以在计划的时间点实施本发明的方法。具体地讲,可以测量来自各种主体和/或不同时间点的样品以比较主体或监测治疗。提取身体样品可根据样品由技术人员进行。在优选的实施方案中,身体样品为血液或血清。在此情况下,血液取自主体。血清可以通过本领域已知的方法而从血液中获得。类似地,其它身体样品可通过例如收集尿液或通过进行活检以及通过进一步处理样品(如果必要)而获得。

[0008] 如上所述,样品包含分析物和能够借助其结合位点而结合至分析物的结合分子。此类结合分子可以是能够结合至分析物的任何类型的分子。此类结合优选为可逆且非共价

的。优选地,此类结合分子为蛋白质或肽,或包含蛋白质或肽。更优选地,结合分子包含抗体、抗体的功能活性部分、受体或受体片段,特别是治疗和/或诊断活性抗体或抗体的治疗和/或诊断活性功能活性部分,或治疗和/或诊断活性受体或治疗和/或诊断活性受体片段。因此,在优选的实施方案中,结合分子为治疗和/或诊断剂。例如,结合分子为向有此需要的人主体所施用的治疗剂。在该主体的体内,结合分子与在此情况下代表该治疗剂靶标的分析物结合。当从该主体中提取样品时,该样品通常将同时包含分析物和治疗剂。由于治疗剂可结合至分析物,所以一些或全部的分析物将与治疗剂结合在一起。

[0009] 结合分子能够借助其结合位点而结合至分析物。结合位点是分子(特别是蛋白质、DNA或RNA,更优选蛋白质)上的一个区域,至少一种特异性其它分子可以非共价地且可逆地与之结合。在识别抗原的抗体作为优选的结合分子与抗原对的情况下,结合位点经常被称为抗原结合位点,而该结合位点所结合的位点经常被称为表位。结合位点在抗体上作为特异性编码区而存在,其基于其结构与抗原结合,如在下文中更详细地说明的。

[0010] 作为本发明的方法中的第一个步骤,使包含分析物和结合分子的样品与陷阱分子以及检测分子接触,所述陷阱分子针对结合分子的结合位点,所述检测分子能够与分析物形成复合物。陷阱分子可以是任何化合物,其优选为蛋白质,更优选为抗体或抗体的功能活性部分或受体或受体片段。陷阱分子针对结合分子的结合位点,这意味着陷阱分子能够与该结合分子的所述结合位点共价地或非共价地结合,优选非共价地。在同样优选的实施方案中,陷阱分子为抗体或功能活性部分。在进一步优选的实施方案中,陷阱分子为抗独特型抗体。抗独特型抗体或其功能活性部分是针对抗体的抗原特异性部分的抗体或其功能活性部分,并因而能识别其它抗体的结合位点。在此实施方案中,结合分子同样为抗体或其功能活性部分。

[0011] 能够与分析物形成复合物的检测分子可以是任何种类的化合物,其优选为蛋白质、DNA或RNA,更优选为蛋白质,甚至更优选为抗体或其功能活性部分,前提是检测分子不同于结合分子。在同样优选的实施方案中,检测分子为抗体或功能活性部分。检测分子带有可用可检测标记进行可检测标记的装置,尤其是直接或间接检测的装置。此类装置和标记在下文中更有详细的描述。所谓检测分子不同于结合分子应当理解为,即便忽略用于进行可检测标记的装置,这两种分子仍然是不同的分子,更优选地其能够结合分析物的结合位点是不同的。在结合分子和检测分子均包含或均为抗体或其功能活性部分的情况下,抗原结合位点优选为不同的,更优选地1、2、3、4、5或6个对应的CDR序列(HCDR1、2、3和LCDR1、2、3)为不同的。

[0012] 检测分子能够与分析物形成复合物。这意味着检测分子可以共价地或非共价地结合至分析物。当非共价结合时,就像抗体-抗原结合那样,检测分子优选地对此分析物展示足够高的亲和力以形成复合物。因此,在进一步优选的实施方案中,检测分子结合分析物的亲和力为至少 10^8 (mol/l)⁻¹、更优选 10^9 (mol/l)⁻¹、甚至更优选至少 10^{10} (mol/l)⁻¹。亲和力可通过本领域已知的方法测定,特别是通过表面等离子体共振测量,具体地讲采用BiaCore®系统。此外,检测分子仅能够在分析物不被结合分子结合时与所述分析物形成复合物。如图1B中所示,此类检测分子将仅当通过结合分子与陷阱分子的结合而使结合分子从分析物上释放时,才与分析物形成复合物。

[0013] 根据本发明,使包含分析物和结合分子的样品与陷阱分子以及检测分子接触,所

述陷阱分子针对结合分子的结合位点,所述检测分子能够与分析物形成复合物。该接触可以通过本领域已知的方法进行。具体地讲,可在合适的容器中提供样品,并且可分别或同时加入陷阱分子和检测分子,例如通过吸取包含陷阱分子和/或检测分子的溶液;然而接触组分的顺序不是决定性的。合适的条件包括适当的温度和溶液以避免例如对化合物的不期望的化学修饰、失去相应的结合能力、所涉及蛋白质的变性或以保持活细胞(如果存在)。

[0014] 所谓陷阱分子不同于分析物应当理解为两种分子为不同的分子。在优选的实施方案中,其能够与结合分子结合的结合位点是不同的。在陷阱分子和分析物均包含或均为抗体或其功能活性部分的情况下,抗原结合位点优选为不同的,更优选地1、2、3、4、5或6个对应的CDR序列(HCDR1、2、3和LCDR1、2、3)为不同的。

[0015] 用于实施本发明的方法的合适的条件将取决于具体的测定设计以及所选择的组分,并且技术人员将根据其常识来选择它们。温育步骤可以在约5秒至数小时变化,优选约5分钟至约24小时。然而,温育时间将取决于测定形式、标记、溶液体积、浓度等。通常,测定在环境温度下进行,但其也可在一定的温度范围内进行,如10°C至95°C或15°C至40°C。同样地,所使用的容器也将取决于测定形式、标记、溶液体积、浓度等。

[0016] 本发明的方法使得能够测定此类分析物的总量和/或浓度。在样品中,同时存在分析物和结合分子。因为结合分子经常由于空间原因而占据分析物上的合适的结合位点并且/或阻碍检测分子的结合,所以难以测定样品中分析物的总量。分析物的总量意指在给定样品中所有分析物分子的数量,游离的、未与结合分子面对面结合的(unbound vis-à-vis)分析物以及结合至结合分子的分析物分子均包括在内。可以类似的方式测定给定样品中此类分析物的总浓度,即在给定样品中所有分析物分子的浓度,游离的、未与结合分子面对面结合的分析物以及结合至结合分子的分析物分子均包括在内。浓度通常以摩尔浓度或(w/v)浓度给出。

[0017] 作为本发明的方法的第二个步骤,检测了检测分子-分析物复合物。如上所述,此类复合物可以是共价的或非共价的。通过进行本发明的第一个步骤,由于结合分子被陷阱分子所囚禁,所以检测分子现在可与样品中存在的所有分析物分子形成复合物,如图1B中所示。因此,对检测分子-分析物复合物的检测使得能够测定分析物分子总量的量和/或浓度,而不论其是否从一开始即结合至结合分子。对复合物的检测可根据测定形式和/或标记(详述于下)而以各种方式进行。优选的测定法为非竞争性测定法,特别是夹心测定法。

[0018] 因此,在本发明的优选的实施方案中,对检测分子-分析物复合物的检测以非竞争性测定法进行,特别是以夹心测定法进行,尤其是其中所述夹心测定法采用了能够结合至分析物的捕获分子,并且其中

- 所述捕获分子带有用于固定的装置,并且
- 所述检测分子和所述捕获分子结合至所述分析物上不同的、非重叠的表位。

[0019] 在图1中示出了根据此类优选的实施方案的本发明。在此实施方案中,通过捕获分子将分析物捕获到支持物上并从而将其固定。在样品中,至少一些分析物分子被结合分子结合。在此情况下,由于检测分子仅能够在分析物不被结合分子结合时与所述分析物形成复合物,所以检测分子不能结合至被结合分子结合的分析物(图1A)。因此,在此情况下不能检测到已结合的分析物。当加入陷阱分子时,结合分子从分析物上释放,而检测分析物就可以结合至分析物分子(图1B)。在此情况下,检测分子可以结合至存在于样品中的基本上所

有的分析物分子,并且可以测定分析物的总量或浓度。

[0020] 在此类优选的实施方案中,捕获分子带有用于固定的装置并可被用于固定。固定装置可允许共价地或非共价地结合至支持物,优选固体支持物。

[0021] 术语“固体支持物”指代通过非均相反应与液相试剂相互作用的固相材料。固体支持物的用途在化学、生物化学、药学和分子生物学领域中是众所周知的。根据待解决的技术问题,已经开发了许多类型的固体支持物。任何这些均可被用于本发明的背景中。例如,用于本发明的方法的固体支持物可包括以下组分:二氧化硅、醋酸纤维素、硝酸纤维素、尼龙、聚酯、聚醚砜、聚烯烃或聚偏二氟乙烯或其组合。另外的合适的固体支持物包括但不限于:可控孔度玻璃、玻璃平板或载玻片、聚苯乙烯和活性葡聚糖。在其它的方面,合成有机聚合物(如聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸酯和聚苯乙烯)也是说明性的支持物表面。此外,多糖(如纤维素和葡聚糖)也是支持物表面的另外的说明性实例。其它支持物表面如纤维也是可行的。

[0022] 用于例如组合化学或蛋白质化学中的常见树脂支持物包括:聚苯乙烯树脂(例如与二乙烯基苯交联的);羟甲基聚苯乙烯;氨甲基聚苯乙烯;TentaGel树脂(TG)和ArgoGel(AG);聚苯乙烯/DVB聚(乙二醇)接枝共聚物(PS-PEG)-Bayer;冠/针(CP)(辐射接枝聚乙烯/聚丙烯支持物);基于硅藻土/聚丙烯酰胺的树脂(KPA);可控孔度玻璃;PEGA-聚(乙二醇)/二甲基丙烯酰胺共聚物。

[0023] 可以使用下述固体支持物来完成在固体支持物上的固定,所述固体支持物经过修饰或活化以包含使得实体或支持物能够与捕获分子(例如蛋白质)共价偶联的官能团。通常采用脂肪族连接臂。捕获分子,尤其是蛋白质,还可以通过,例如,离子或疏水机制,非共价地附接至表面,并且由局部抑制这些机制的释放剂分离。另外,可通过先用氨基硅烷对表面进行活化来完成捕获分子(例如蛋白质)与表面(例如玻璃或金属氧化物表面)的共价附接。使用胺反应性官能团进行衍生的捕获分子可以随后附接至表面。支持物,尤其是固体支持物,可经由一个或多个附接位点通过共价或非共价键合而使用蛋白质(如酶、肽、寡核苷酸和多核苷酸)进行衍生,从而将相同的酸结合至固体支持物。

[0024] (固体)支持物可包含在容器中,其中所述容器为管(如离心管或旋转管)、注射器、筒、腔室、多孔平板或试管或其组合。(固体)支持物可经预处理或官能化以允许与捕获分子进行接头介导的结合。在一个实施方案中,固体支持物可以是纤维状或颗粒状的,通常允许恰当接触。适用于本发明的方法的(固体)支持物的大小可根据所选方法而变化。捕获分子可仅结合至一个(固体)支持物(例如一个容器或多孔平板),或可结合至许多(固体)支持物(例如珠粒)。适用于本发明的方法的(固体)支持物的形状可以是,例如,薄片、预制盘、圆柱体、单纤维或由颗粒构成的固体支持物。在一个实施方案中,(固体)支持物可以是纤维状或颗粒状的以允许最优接触。(固体)支持物的大小可以变化并且可根据将要进行的方法来选择。

[0025] 在一些实施方案中,固体支持物为试纸条、芯片(特别是微阵列或纳米阵列芯片)、微量滴定板或微粒。

[0026] 如果当加入陷阱分子后,能实现分析物从结合分子上基本完全释放,那么这是有利的,因为这有助于正确测定样品中分析物的总量,如图1B中所示。因此,在本发明的优选的实施方案中,陷阱分子会促进分析物从结合分子上基本完全释放。

[0027] 根据本发明,“基本完全释放”应当理解为:在本发明的步骤(i)后,样品中有小于10%、优选小于5%、更优选小于1%的分析物分子与结合分子结合。

[0028] 根据本发明,K(陷阱)为陷阱分子对结合分子的亲和力,而K(结合分子)为结合分子对分析物的亲和力。

[0029] “亲和力”定义了两种物质间相互作用的强度,并且优选通过表面等离子体共振,具体地讲使用BiaCore®系统测定。就抗体或抗体片段而言,亲和力被测定为 K_D 值,优选通过表面等离子体共振,具体地讲使用BiaCore®系统测定。亲和力的测定可以如“Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics”, Current Opinion in Immunology, Volume 5, Issue 2, 1993, 第282-286页”中所述进行。

[0030] 此外,根据本发明,在上述本发明的方法的步骤i)中,Conc(陷阱)和Conc(结合分子)分别为陷阱分子和结合分子的摩尔浓度。

[0031] 此外,根据本发明,MR(陷阱)为陷阱分子与结合分子结合的结合价,而MR(结合分子)为结合分子与分析物结合的结合价。

[0032] 根据本发明,“结合价”应当理解为:对于给定的结合伴侣对而言,通过实验测定的结合位点的数量。就抗体或其功能活性部分而言,理论结合价通常为1或2,但由于空间效应,所以实验测定的结合价可以为非整数值(例如1.4)。在抗独特型抗体作为优选的陷阱分子的情况下,理论结合价通常为1。同样,由于空间效应,所以实验测定的结合价可以为非整数值(例如0.9)。结合价的测定可以如Schraeml M.等人,(2012) Methods in Molecular Biology Vol. 901, 171-181中所述进行。

[0033] 为了实现结合分子从分析物上基本完全释放,如果陷阱分子对结合分子的亲和力较结合分子对分析物的亲和力高至少3倍,则是有利的。因此,在进一步优选的实施方案中, $K(\text{陷阱})/K(\text{结合分子})$ 为至少3、优选5、更优选至少10。

[0034] 为了实现结合分子从分析物上基本完全释放,如果陷阱分子的浓度较结合分子的浓度高至少3倍,则是有利的。因此,在又进一步优选的实施方案中, $\text{Conc}(\text{陷阱})/\text{Conc}(\text{结合分子})$ 为至少3、优选5、更优选至少10,特别是其中Conc(结合分子)在1至5 $\mu\text{mol}/\text{l}$ 的范围内和/或Conc(陷阱)在 $3*(1\text{至}5)\mu\text{mol}/\text{l}$ 的范围内。

[0035] 如果将上述相应的亲和力和浓度均纳入考量,则其甚至更有利于实现结合分子从分析物上基本完全释放;具体地讲,优选的是:陷阱分子对结合分子的亲和力乘以陷阱分子的摩尔浓度较结合分子对分析物的亲和力乘以结合分子的摩尔浓度高至少3倍。因此,在还优选的实施方案中, $(K(\text{陷阱})/K(\text{结合分子})) \times (\text{Conc}(\text{陷阱})/\text{Conc}(\text{结合分子}))$ 为至少3、优选5、进一步优选至少10。

[0036] 另一个重要的方面是本发明的方法中所采用结合分子与陷阱分子的结合价,特别是当结合分子和/或陷阱分子为抗体或其功能活性部分时。当结合至小的分析物时,身为抗体的结合分子通常表现出MR=2的结合价,而由于空间原因,身为抗独特型抗体的陷阱分子通常表现出MR=1及更小的结合价。在这种情况下,优选考虑功能摩尔浓度商(functional molarity quotient)。

[0037] 因此,在又进一步优选的实施方案中, $(K(\text{陷阱})/K(\text{结合分子})) \times (\text{Conc}(\text{陷阱})/\text{Conc}(\text{结合分子})) \times (\text{MR}(\text{陷阱})/\text{MR}(\text{结合分子}))$ 为至少3、优选5、还优选至少10。

[0038] 如果旨在结合分析物的检测分子对该分析物展示足够高的亲和力,则其进一步有利于测定该分析物的总量。因此,在进一步优选的实施方案中,检测分子结合分析物的亲和力为至少 10^8 (mol/l)⁻¹、更优选 10^9 (mol/l)⁻¹、甚至更优选至少 10^{10} (mol/l)⁻¹。

[0039] 如果陷阱分子结合至结合分子的亲和力高到足以实现结合分子从分析物上基本完全释放,则其进一步有利于测定该分析物的总量。因此,在又进一步优选的实施方案中,陷阱分子结合至结合分子的亲和力为至少 5×10^9 (mol/l)⁻¹、更优选至少 10^{10} (mol/l)⁻¹。

[0040] 如果检测分子对分析物展示特异性,则其进一步有利于使分析物的假阳性检测最小化。因此,在优选的实施方案中,检测分子特异性地结合分析物,具体地讲,检测分子与分析物以外的靶标的结合为检测分子与分析物的结合的至多5%。

[0041] 如果陷阱分子对结合分子展示特异性,则其进一步有利于(具体地讲)最小化陷阱分子的损耗并且使对结合分子的结合最大化。因此,优选地,陷阱分子特异性地结合至结合分子,具体地讲,陷阱分子与结合分子以外的靶标的结合为陷阱分子与结合分子的结合的至多5%。

[0042] 就一种分子与另一种分子的结合(如陷阱分子与结合分子的结合)而言,“特异的”或“特异性”意指识别者与靶标对象之间的识别、接触以及形成稳定复合物,同时该识别者与靶标对象以外的对象(也被称为其它对象)之间的实质上较低的识别、接触或复合物形成。在一个方面,就识别者与靶标对象的结合而言,“特异的”意指:识别者在识别靶标对象并与之形成复合物的程度上,相比其它对象,其与靶标对象形成的复合物数量最多。在一个方面,此最多的数量为所有由识别者与靶标对象所形成的此类复合物的至少50%,优选至少75%,更优选至多80%或90%,仍更优选至多95%、96%、97%、98%或99%。通常,涉及特异性结合事件的分子在其表面上或腔内具有一些区域,这些区域造成了彼此结合的分子之间的特异性识别。特异性结合的实例包括:抗体-抗原相互作用、酶-底物相互作用、在多核苷酸和/或寡核苷酸间形成二联体或三联体、受体-配体相互作用等。

[0043] 此外,如果需要相当少量的检测分子,则是有利的。因此,在进一步优选的实施方案中,检测分子的摩尔浓度为样品中结合分子的摩尔浓度的至多5%、优选至多3%、更优选至多1%、甚至更优选至多0.5%、最优选至多0.1%。

[0044] 在又进一步优选的实施方案中,陷阱分子的浓度在 $3 \times (1$ 至 $5) \mu\text{mol/l}$ 至 $5 \times (1$ 至 $5) \mu\text{mol/l}$ 的范围内,如 $3 \times (1,2,3,4$ 或 $5) \mu\text{mol/l}$ 至 $5 \times (1,2,3,4$ 或 $5) \mu\text{mol/l}$,特别是 3 至 $5 \mu\text{mol/l}$ 、 3 至 $10 \mu\text{mol/l}$ 、 3 至 $15 \mu\text{mol/l}$ 、 3 至 $20 \mu\text{mol/l}$ 、 3 至 $25 \mu\text{mol/l}$ 、 5 至 $25 \mu\text{mol/l}$ 、 10 至 $25 \mu\text{mol/l}$ 、 15 至 $25 \mu\text{mol/l}$,如实施例2B所示。

[0045] 如上所述,本发明的方法对于在存在(特别是身为抗体或其功能活性部分的)结合分子(例如与分析物结合的治疗活性抗体)的情况下,在体液或组织中测定某一靶标(例如该分析物)的总量特别有用。

[0046] 此类治疗活性抗体可包含与治疗和/或诊断部分共价地或非共价地结合的抗体或其功能活性部分。例如,放射性核素、毒素、细胞因子或细胞毒性剂可共价地或非共价地结合至抗体或其功能活性部分。当治疗 and/或诊断部分为蛋白质或肽时,结合分子可以是包含抗体或其功能活性部分的融合蛋白。或者,结合分子可以具有治疗活性,例如中和抗体。因此,在又进一步优选的实施方案中,结合分子为或包含抗体或其功能活性部分。

[0047] 针对结合分子(例如治疗活性抗体或治疗活性受体)的抗独特型抗体或其功能活

性部分可被用作陷阱分子。抗独特型抗体或其功能活性部分结合至结合分子的结合位点，并且一经结合，其会阻止结合分子与分析物的结合。检测分子可随后结合至游离的分析物。同样地，此类抗独特型抗体或其功能活性部分可包含共价地或非共价地结合至抗体的其他部分，作为例如诊断部分或固定装置。

[0048] 因此，在又进一步优选的实施方案中，陷阱分子为或包含针对结合分子的抗原结合位点的抗独特型抗体或其功能活性部分。抗独特型抗体或其功能活性部分的生成是技术人员所熟知的，并且在例如Sege K 等人，PNAS (1978) Vol. 75 No. 5: 2443-2447和Pan Y. 等人，FASEB J. (1995) Vol. 9 No. 1:43-49中有述。

[0049] 抗体或其功能活性部分也可被用作能够结合分析物的检测分子。抗体或其功能活性部分的生成是众所周知的，如下详述。因此，在又进一步优选的实施方案中，检测分子为或包含抗体或其功能活性部分。

[0050] 在本发明的优选的方法中，采用了捕获分子，其带有固定装置并能够结合分析物（参见图1）。同样地，抗体或其功能活性部分及其生成是本领域熟知的，如下所述。因此，在又进一步优选的实施方案中，捕获分子因此是或包含抗体或其功能活性部分，更优选地，装置，捕获分子包含抗体或其功能活性部分以及固定装置。

[0051] 在还优选的实施方案中，陷阱分子、结合分子、检测分子和捕获分子各自为或包含抗体或其功能活性部分。

[0052] 在又进一步优选的实施方案中，结合分子为或包含抗体、抗体的功能活性部分、受体或受体片段，特别是治疗和/或诊断活性抗体或抗体的治疗和/或诊断活性功能活性部分，或治疗和/或诊断活性受体或治疗和/或诊断活性受体片段。因此，在优选的实施方案中，结合分子为治疗和/或诊断剂。

[0053] 因此，在进一步优选的实施方案中，陷阱分子、检测分子和捕获分子各自为或包含抗体或其功能活性部分，而结合分子为或包含抗体、抗体的功能活性部分、受体或受体片段，特别是治疗活性抗体或抗体的治疗活性功能活性部分，或治疗活性受体或治疗活性受体片段。

[0054] 包含治疗活性受体片段的结合分子的实例为阿柏西普(aflibercept)(也被称为VEGF陷阱;Moroney等人,Future Oncol.(2009); 5(5):591-600)。VEGF陷阱是重组融合蛋白，其中可溶性VEGF受体的结合域与IgG的Fc片段组合。VEGF陷阱能结合VEGF的所有同工型。VEGF陷阱据描述可用于治疗湿黄斑变性及癌症治疗。

[0055] 天然存在的抗体为球状血浆蛋白质(~150 kDa (http://en.wikipedia.org/wiki/Dalton_unit)),其也称为免疫球蛋白(其共享基本结构)。由于它们在氨基酸残基上添加了糖链，所以其是糖蛋白。各抗体的基本功能单元为免疫球蛋白(Ig)单体(仅含有一个Ig单元);所分泌的抗体也可以是如IgA般的二聚化的(具有两个Ig单元)、类似硬骨鱼IgM的四聚化的(具有四个Ig单元)或如哺乳动物IgM的五聚化的(具有五个Ig单元)。在本发明中，合适形式的实例包括天然存在的抗体形式，包括被称为IgA、IgD、IgE、IgG和IgM的抗体同种型。

[0056] Ig单体为由四条多肽链组成的“Y”状分子:由半胱氨酸残基之间的二硫键连接的两条相同的重链与两条相同的轻链。每条重链长约440个氨基酸;每条轻链长约220个氨基酸。重链与轻链各含有稳定其折叠的链内二硫键。每条链均由称为Ig域的结构域构成。这些

域含有约70-110个氨基酸并根据其大小和功能被划入不同的类别(例如,可变的或V,以及恒定的或C)。其具有特征性的免疫球蛋白折叠,其中两个 β 折叠构成“三明治”形状,通过保守半胱氨酸及其它带电氨基酸之间的相互作用而维系在一起。

[0057] 存在五种类型的哺乳动物Ig重链,记作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。所呈现的重链类型限定了抗体同种型:这些链分别存在于IgA、IgD、IgE、IgG和IgM抗体中。

[0058] 不同的重链在大小和组成上有所不同: α 和 γ 含有大约450个氨基酸, δ 含有大约500个氨基酸,而 μ 和 ϵ 则含有大约550个氨基酸。每条重链具有两个区:恒定区(CH)和可变区(VH)。在同一物种中,恒定区在同一同种型的所有抗体中是相同的,但在不同同种型的抗体中是不同的。重链 γ 、 α 和 δ 具有由三个串联的Ig域构成的恒定区以及用于增加的柔性的铰链区;重链 μ 和 ϵ 具有由四个免疫球蛋白域构成的恒定区。重链的可变区在由不同B细胞产生的抗体中有所不同,但在由单个B细胞或B细胞克隆产生的所有抗体中是相同的。每条重链的可变区长约110个氨基酸并由单个Ig域构成。

[0059] 在哺乳动物中,存在两种类型的免疫球蛋白轻链,记作 λ 和 κ 。轻链具有两个连续的域:一个恒定域(CL)和一个可变域(VL)。轻链的大致长度为211至217个氨基酸。每个抗体含有两条总是相同的轻链,在哺乳动物中,每个抗体仅具有一种类型的轻链, κ 或 λ 。其它类型的轻链,如 ι 链,存在于低等脊椎动物如软骨鱼和硬骨鱼中。

[0060] 除了天然存在的抗体以外,也已开发出了人工抗体形式(包括抗体片段)。其中一些在下面有述。

[0061] 尽管所有抗体的总体结构非常相似,但给定抗体的独特性质是由可变(V)区决定的,如上详述。更具体地讲,可变环(三个各自在轻(VL)链上以及三个在重(VH)链上)负责结合抗原,即决定其抗原特异性。这些环被称为互补决定区(CDR)。因为来自VH和VL域的CDR构成抗原结合位点,所以其是重链与轻链的组合,而非单独一者,所述抗原结合位点决定了最终的抗原特异性。

[0062] 因此,术语“抗体”,如本文中所示,意指与天然存在的抗体具有结构相似性的任何多肽,并且其能够特异性地结合相应的靶标,其中所述结合特异性由CDR决定。因此,“抗体”旨在涉及能结合相应靶标的免疫球蛋白来源的结构,包括但不限于:全长的或全抗体、抗原结合片段(物理上或概念上源自抗体结构的片段)、上述任何一项的衍生物、嵌合分子、上述任何一项与另一种多肽的融合体、或能选择性地结合相应靶标的任何替代结构/组成。抗体或其功能活性部分可以是包含至少一个抗原结合片段的任何多肽。抗原结合片段由至少重链可变域和轻链可变域组成,并以一定的方式排列使得两个域一起能够结合特异性抗原。就捕获分子、结合分子和检测分子而言,“相应的靶标”为分析物,而当抗独特型抗体作为优选的陷阱分子时,“相应的靶标”则为结合分子。

[0063] “全长”或“完整的”抗体指代包含由二硫键相互连接的两条重(H)链和两条轻(L)链的蛋白质,其包含:(1)就重链而言,可变区和包含三个域(CH1、CH2和CH3)的重链恒定区;以及(2)就轻链而言,轻链可变区和包含一个域(CL)的轻链恒定区。关于术语“完整的抗体”,其意指任何这样的抗体:其具有典型的天然存在的抗体的总体域结构(即包含具有三个或四个恒定域的重链和具有一个恒定域的轻链以及相应的可变域),即使每个域可包含进一步的修饰,如突变、缺失或插入,其不会改变其总体域结构。

[0064] “抗体的功能活性部分”或“抗体片段”也含有至少一个如上定义的抗原结合片段,

并具有与该功能活性部分(或片段)所来源于的完整的抗体基本上相同的功能和结合特异性。使用木瓜蛋白酶的有限度的蛋白水解消化将Ig原型切割成三个片段。两个相同的氨基末端片段(各自含有一个完整的L链和大约半个H链)为抗原结合片段(Fab)。第三个片段(大小类似但含有两条重链的羧基末端一半及其链间的二硫键)为可结晶片段(Fc)。Fc含有碳水化合物、补体结合和FcR结合位点。有限度的胃蛋白酶消化得到单个F(ab')₂片段,其含有Fab片断和铰链区,包括H-H链间二硫键。F(ab')₂对于抗原结合是二价的。可切割F(ab')₂的二硫键以获得Fab'。此外,重链和轻链的可变区可以融合在一起以形成单链可变片段(scFv)。

[0065] 由于第一代完整大小的抗体存在一些问题,所以许多第二代抗体仅包含抗体的片段。可变域(Fvs)是具有完整抗原结合域的最小片段,其由一个VL和一个VH组成。此类仅具有结合域的片段可例如在细菌细胞和真核细胞中,通过酶促方法或表达相关基因片段而生成。可使用不同的方法,例如仅Fv片段或包含“Y”的上臂之一的'Fab'片段,所述“Y”的上臂之一包含Fv加上第一恒定域。这些片段通常通过引入两条链间的多肽连接而稳定,所述多肽连接导致了单链Fv(scFv)的产生。可选地,可以使用二硫键连接的Fv(dsFv)片段。片段的结合域可与任何恒定域组合以产生全长的抗体,或可与其它蛋白质和多肽融合。

[0066] 重组的抗体片段为单链Fv(scFv)片段,其为根据本发明的抗体的优选的功能活性部分。一般来讲,它对其抗原具有高亲和力并且可以在多种宿主中表达。这些及其它特性使得scFv片段不仅可用于医药,还可能用于生物技术应用。如上详述,在scFv片段内,VH和VL域通过亲水性和柔性肽接头相连,这提高了表达和折叠效率。通常使用具有约15个氨基酸的接头,其中(Gly4Ser)₃接头的使用频率最高。取决于所用的接头,scFv分子可以容易被蛋白水解降解。随着基因工程技术的发展,这些限制可以通过着眼于提高功能和稳定性的研究而在实践中被克服。一个实例是生成链间二硫化物稳定的(或二硫化物连接的)Fv片段,其中VH-VL二聚体通过链间的二硫键来稳定。在VL和VH域的界面处引入半胱氨酸,形成二硫键,而将两个域维系在一起。

[0067] scFv的解离会产生单体scFv,其可复合成二聚体(双抗体)、三聚体(三抗体)或更大的聚集体如TandAbx和Flexibodies,这些聚集体也代表了根据本发明的抗体的功能活性部分。

[0068] 可通过将两个scFv用简单的多肽接头结合(scFv)₂,或通过两个单体的二聚化(双抗体)来产生具有两个结合域的抗体。最简单的设计是具有两个功能性抗原结合域的双抗体,这两个抗原结合域可以是相同的、相似的(二价双抗体)或对不同的抗原具有特异性(双特异性双抗体)。这些双特异性抗体允许例如募集针对靶细胞的新型效应子功能(如细胞毒性T细胞),这使其在医药应用中非常有用。

[0069] 也已经开发出了包含四个重链可变域和四个轻链可变域的抗体形式。其实例包括四价双特异性抗体(TandAbs和Flexibodies, Affimed Therapeutics AG, Heidelberg, Germany)。与双特异性双抗体不同,双特异性TandAb是仅由一种多肽组成的同源二聚体。由于两条不同的链,所以双抗体可以形成三种不同的二聚体,而其中仅一种是有功能的。因此,生产和纯化这种均质产物更简单也更便宜。此外,TandAb通常表现出更好的结合特性(拥有两倍数量的结合位点)和增强的体内稳定性。Flexibodies是scFv与双抗体多聚体基序的组合,从而生成具有高柔韧度的多价分子用以连接在细胞表面上彼此相距甚

远的两个分子。如果存在多于两个功能性抗原结合域并且如果它们对于不同抗原具有特异性,则该抗体为多特异性的。

[0070] 概括地说,代表抗体或其功能活性部分的具体的免疫球蛋白类型包括但不限于下列抗体:Fab(具有轻链可变域(VL)、重链可变域(VH)、轻链恒定域(CL)和重链恒定域1(CH1)的单价片段、F(ab')₂(包含由二硫键或可选地在铰链区连接的两个Fab片段的二价片段)、Fv(VL和VH域)、scFv(单链Fv,其中VL和VH通过接头例如肽接头相连)、双特异性抗体分子(具有如本文所述的特异性的抗体分子,其连接至具有与抗体不同的结合特异性的第二功能部分,所述第二功能部分包括但不限于另一种肽或蛋白质如抗体或受体配体)、双特异性单链Fv二聚体、双抗体、三抗体、四抗体、微抗体(与CH3相连的scFv)。

[0071] 包括但不限于Fv、scFv、双抗体分子或域抗体(Domantis)在内的某些抗体分子或其功能活性部分可以通过掺入二硫键将VH和VL域排列起来而得到稳定。可使用常规技术(其中具体方法包括化学生产或杂种杂交瘤(hybrid hybridomas)生产)和其它技术(包括但不限于BiTETM技术(拥有具有不同特异性的抗原结合区以及肽接头的分子)和knobs-into-holes工程改造)来生产双特异性抗体。

[0072] 因此,抗体分子或其功能活性部分可以是Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、二硫化物连接的Fv、scFv、(scFv)₂、二价抗体、双特异性抗体、多特异性抗体、双抗体、三抗体、四抗体或微抗体。

[0073] 在另一个优选的实施方案中,抗体为单克隆抗体、嵌合抗体或人源化抗体。单克隆抗体是完全相同的单特异性抗体,因为其通过同一类型的免疫细胞生产,所述免疫细胞均为单个亲本细胞的克隆。嵌合抗体是这样一种抗体,其中通过基因工程将一个物种的免疫球蛋白的至少一个区与另一个物种的免疫球蛋白的另一个区融合以降低其免疫原性。例如,可将鼠VL和VH区与人免疫球蛋白的其余部分融合。一种特定类型的嵌合抗体是人源化抗体。人源化抗体是通过将编码非人抗体CDR的DNA与产生人抗体的DNA合并而生成的。所得到的DNA构建体可以随后被用于表达和生产抗体,由于仅CDR是非人的,因而所述抗体的免疫原性通常不如非人肠胃外抗体(non-human parenteral antibody)或嵌合抗体。

[0074] 在本发明的优选的实施方案中,本发明的方法中所用的抗体分子或其功能活性部分包含选自以下的重链免疫球蛋白恒定域:人IgM恒定域、人IgG1恒定域、人IgG2恒定域、人IgG3恒定域、人IgG4恒定域、人IgE恒定域和人IgA恒定域。

[0075] 如上详述,在本发明的抗体的背景下,天然存在的抗体的每条重链具有两个区,恒定区和可变区。存在五种类型的哺乳动物免疫球蛋白重链:γ、δ、α、μ和ε,其分别定义了免疫球蛋白的类别:IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。

[0076] 在人中存在四种IgG亚类(IgG1、2、3和4),以其在血清中的丰度排序而命名(IgG1为最丰富的)。尽管IgG亚类的其Fc区之间有着约95%的相似度,但铰链区的结构仍然相对不同。此区域,介于Fab臂(抗原结合片段)与两条重链的两个羧基末端域CH2和CH3之间,决定了分子的柔性。铰链上段(偏氨基末端)给予了Fab臂间角度的可变性(Fab-Fab柔性)以及每个单独Fab的转动柔性。下铰链区(偏羧基末端)的柔性直接决定了Fab臂相对于Fc区的位置(Fab-Fc柔性)。依赖于铰链的Fab-Fab和Fab-Fc柔性可能对于触发进一步的效应子功能(如补体活化和Fc受体结合)很重要。因此,铰链区的结构赋予了四种IgG类别中的每一者其独特的生物学概况。

[0077] 铰链区的长度和柔性在IgG亚类间会有变化。IgG1的铰链区涵盖了氨基酸216-231,并且由于其高度柔性,使得Fab片段可以在其对称轴附近旋转并且在以两个重链间二硫键的第一个为中心的球形空间内移动。IgG2的铰链比IgG1的短,具有12个氨基酸残基和四个二硫键。IgG2的铰链区缺乏甘氨酸残基,其相对短并含有刚性的聚脯氨酸双螺旋,其通过额外的重链间二硫键来稳定。这些特性限制了IgG2分子的柔性。IgG3因其独特的延长的铰链区(长度为IgG1铰链的约四倍)而不同于其它亚类,其含有62个氨基酸(包括21个脯氨酸和11个半胱氨酸),形成了缺乏柔性的聚脯氨酸双螺旋。在IgG3中,Fab片段相对远离Fc片段,赋予了分子更大的柔性。IgG3中延长的铰链也造成了其相比于其它亚类更高的分子量。IgG4的铰链区比IgG1的更短,并且其柔性处于IgG1与IgG2中间。

[0078] 使用本发明的方法,可以检测种类繁多的分析物的总量和/或浓度。例如,分析物可以是任何化合物。如上所述,本发明的方法对于检测作为治疗活性抗体或抗体的功能活性部分或受体或受体片段的靶标的分析物特别有用,并且其中此类治疗活性抗体或抗体的功能活性部分或受体或受体片段代表了本发明的结合分子。此类靶标可以是激素、肽或蛋白质、在动物或人血液中循环的分子、或生物标记物,特别是肿瘤标记物。因此,在进一步优选的实施方案中,分析物为化合物,优选激素、肽或蛋白质、在动物或人血液中循环的分子、或生物标记物,特别是肿瘤标记物。

[0079] 在一个同样优选的实施方案中,分析物为蛋白质。

[0080] 如上所公开的,在本发明的优选的实施方案中,对检测分子-分析物复合物的检测以非竞争性测定进行,特别是以夹心测定法进行,尤其是其中所述夹心测定法采用了能够结合至分析物的捕获分子,并且其中

- 所述捕获分子带有用于固定的装置,并且
- 所述检测分子和所述捕获分子结合至所述分析物上不同的、非重叠的表位。

[0081] 在又进一步优选的实施方案中,检测分子带有用可检测标记进行可检测标记的装置,尤其是用于直接或间接检测的装置。

[0082] 如本文中所述的术语“可检测标记”指代能够产生用于直接或间接检测的信号的任何物质。因此,可检测标记可以被直接或间接检测到。对于直接检测,适用于本发明的标记可选自任何已知的可检测标记组,如色原体、荧光基团、化学发光基团(例如吡啶酯或二氧杂环丁烷)、电化学发光化合物、催化剂、酶、酶底物、染料、荧光染料(例如荧光素、香豆素、若丹明、噁嗪、试卤灵、花青及其衍生物)、胶体金属和非金属颗粒以及有机聚合物乳胶颗粒。可检测标记的其它实例有:发光金属络合物如钐或铕络合物(例如用于ECLIA)、酶(例如用于ELISA)以及放射性同位素(例如用于RIA)。

[0083] 间接检测系统包括,例如,用生物亲和结合对的第一伴侣对检测分子(例如抗体或其功能活性片段)进行标记。合适的结合对的实例有:半抗原或抗原/抗体、生物素或生物素类似物如氨基生物素、亚氨基生物素或脱硫生物素/亲和素或链霉亲和素、糖/凝集素、核酸或核酸类似物/互补核酸以及受体/配体(例如类固醇激素受体/类固醇激素)。优选的第一结合对成员包括半抗原、抗原和激素。同样优选的是半抗原如地高辛和生物素及其类似物。通常对此类结合对的第二伴侣(例如抗体、链霉亲和素等)进行标记以允许例如通过如上所述的可检测标记进行直接检测。

[0084] 对于非竞争性测定或夹心测定法,需要两种不同的抗体或其功能活性片段,其结

合相同的抗原并且当结合至抗原时不会互相阻碍。由于其更高的灵敏度,所以非竞争性测定或夹心测定法要优于竞争性测定。就夹心测定法而言,可将抗体之一(此处为捕获分子)固定在支持物上。当加入探针溶液时,其中的抗原(即根据本发明的分析物)结合至捕获分子,而检测分子可以结合至分析物的不同的结合位点(参见图1B)。为了检测到检测分子-分析物复合物,使用了检测分子,如上详述。由于在本发明的此实施方案中,检测分子和捕获分子均须结合至分析物,所以在此实施方案中,两种分子结合至分析物上不同的、非重叠的表位。表位,也被称为抗原决定簇,是抗原的一部分,其由结合分子(具体地讲,抗体或其功能活性部分)所识别。识别表位的抗体部分也被称为对位。根据其结构以及与对位的相互作用,蛋白质抗原的表位分为两类:构象表位和线性表位。确定表位的方法是本领域已知的,包括例如表位定位,例如使用蛋白质微阵列以及使用ELISPOT或ELISA技术。蛋白质表位通常包含若干个氨基酸,就线性表位而言,通常为一段5至15个氨基酸。为了避免空间位阻,因此捕获分子和检测分子的表位优选是非重叠的,即对于线性表位的一级结构而言是完全分开的。

[0085] 在优选的实施方案中,夹心测定法为夹心免疫测定法,具体地讲是,酶联免疫测定法(ELISA)。免疫测定法是生物化学测试,其通过使用抗体或其功能活性片段来测量溶液中分子的存在或浓度。由免疫测定法检测到的分子经常被称为“分析物”并且在多数情况下为蛋白质。免疫测定法有许多不同的形式和变型。免疫测定法可分多个步骤运行,其中在测定的不同点加入以及洗掉或分离试剂。多步骤测定法经常被称为分离免疫测定法或异质免疫测定法。一些免疫测定法可以通过混合试剂与样品并作出物理测量而简单地进行。此类测定法被称为均质免疫测定法。

[0086] 在免疫测定法中经常采用校准物(calibrator)。校准物是已知含有所考虑的分析物的溶液,并且该分析物的浓度一般是已知的。针对由校准物产生的测定反应来比较对真实样品的测定反应,使之能够就样品中分析物的存在或浓度方面对信号强度作出解读。

[0087] 除ELISA之外的合适的夹心测定法有:(电)化学发光免疫测定法(ECLIA)、放射性免疫测定法(RIA)、荧光免疫测定法(FIA)、微粒捕获酶免疫测定法(MEIA)、固相荧光免疫测定法(SPFIA)、粒子浓度荧光免疫测定法(PCFIA)、使用及不使用乳胶颗粒增强(LPFA)的比浊和浊度测定法。测定也可以是试纸条的形式。

[0088] 技术人员已知,当适用时,将根据所选定的非竞争性测定(具体地讲,夹心测定法)来选择可检测标记和捕获分子,反之亦然。

[0089] 在进一步优选的实施方案中,样品中的蛋白质在本发明的方法之前或期间不发生变性。这确保了本发明的方法中所采用的各种结合分子的结合特性以及分析物的三维结构得以保持。在进一步优选的实施方案中,样品中的蛋白质在本发明的方法之前或期间不发生不可逆的变性。当在本发明的方法的第一步之前采用了可逆的变性步骤的情况下,应当在本方法前将变性逆转,以确保结合事件可以正常进行。在进一步优选的实施方案中,分析物是蛋白质,其在本发明的方法之前或期间不发生变性。在进一步优选的实施方案中,分析物是蛋白质,其在本发明的方法之前或期间不发生不可逆的变性。在进一步优选的实施方案中,当适用时,检测分子和/或陷阱分子和/或结合分子和/或捕获分子为蛋白质,其在本发明的方法之前或期间不发生变性。

[0090] 本发明的方法的优点在于,可以在存在能够结合至分析物的结合分子的情况下测

定分析物的总量。因此,不需要进行洗涤步骤,具体地讲,以移除结合分子。因此,在优选的实施方案中,在本发明的步骤(i)后不进行洗涤步骤。

[0091] 可选地,也可进行洗涤步骤。在例如图1中所示的优选的实施方案的情况下,可进行此洗涤步骤,其中分析物通过结合至捕获分子而被固定。在此实施方案中,可在对检测分子-分析物复合物进行检测之前洗掉结合分子与陷阱分子的复合物。然而,应当理解,也有可能在此实施方案中对检测分子-分析物复合物进行检测而无之前的洗涤步骤。此洗涤步骤(如果进行)可(具体地讲)使用缓冲溶液以技术人员已知的方式进行,所述步骤优选不会扰乱在本发明的方法期间所形成的复合物的结合。

[0092] 因此,在另外的实施方案中,在本发明的步骤(i)后进行洗涤步骤。优选地,在本发明的步骤(i)后不进行洗涤步骤。

[0093] 本发明的方法可被用于各种类型的样品,优选其中样品为液体,特别是体液。因此,在本发明的另外的实施方案中,样品为液体,特别是含水液体、血液或血清。

[0094] 在进一步优选的实施方案中,样品(特别是血液或血清)中分析物的浓度在1 pg/ml至20 µg/ml、优选1 ng/ml至10 µg/ml的范围内。

[0095] 如上所公开的,在优选的实施方案中,结合分子为治疗和/或诊断剂,特别是治疗剂。此类治疗和/或诊断剂通常很昂贵,再者,此类治疗和/或诊断剂的功效和药代动力学可能在主体间存在相当大的差异。因此,测定主体样品中的分析物将有助于从而确定治疗成功和/或疾病进程,以及患者疾病的不存在、存在和/或其严重程度。

[0096] 因此,在进一步优选的实施方案中,已向从中获取样品的主体施用了结合分子,特别是治疗或诊断剂。结合分子的施用取决于该结合分子的性质,而医生将随之调整施用的模式、给药方案和剂量。通常,对于治疗活性结合分子而言,将施用治疗有效量。因此,此方法可用于测定或监测主体中治疗或诊断剂的量或浓度。

[0097] 作为另外一种选择,结合分子不是治疗剂,而是例如诊断剂或天然存在的分析物结合伴侣。优选地,分析物为生物标记物。在此情况下,对分析物总量和/或浓度的测定也使得能够监测疾病以及疾病对治疗的反应性。

[0098] 此外,通常还有利的是不仅仅测定分析物的总量,还有测定游离的分析物、结合的分析物的量以及/或结合的对游离的和/或总分析物的比率、或游离的对结合的和/或总分析物的比率。这还对于监测疾病以及疾病对治疗的反应性有用。

[0099] 具体地讲,测定结合至结合分子的分析物的量和/或测定结合至结合分子的分析物的量(或浓度,分别地)对总分析物或游离的分析物的量(或浓度,分别地)的比率常常很重要。此量或比率对于监测疾病的治疗,特别是使用身为治疗剂的结合分子治疗疾病而言很重要。

[0100] 因此,在又进一步优选的实施方案中,本发明的方法包括:

i) 进行如上定义的步骤(i);

ii) 进行如上定义的步骤(ii);以及

iii) 另外测定—在不存在陷阱分子的情况下一样品中游离的分析物的量和/或浓度,所述游离的分析物没有结合至结合分子,并且任选地,测定样品中结合至结合分子的分析物的量和/或浓度和/或比率。

[0101] 在结合分子为治疗剂的情况下,分析物优选地代表使用该结合分子进行治疗的靶

标;作为另外一种选择,分析物是用于某种疾病的生物标记物。分析物的量和/或浓度的减少因而表明该疾病不再存在或其严重程度减轻。类似地,分析物的量和/或浓度的增加因而可表明该疾病存在或更严重了。具体地讲,可通过测定分析物的总量和/或浓度是否高于或低于某种疾病的某种分析物的某个截断值来确定患者是否患该疾病。因此,在本发明的优选的实施方案中,分析物的总量和/或浓度表明了患者疾病的不存在、存在和/或严重程度。因此,在本发明的进一步优选的实施方案中,分析物的总量和/或浓度表明了患者对治疗的治疗反应,特别是其中已使用结合分子对患者进行了治疗。

[0102] 在本发明的又进一步优选的实施方案中,样品中结合至结合分子的分析物的量和/或浓度和/或比率表明了患者疾病的不存在、存在和/或严重程度和/或患者对治疗的治疗反应,特别是其中已使用结合分子对患者进行了治疗。

[0103] 使用本发明的方法,可以对疗法(特别是使用身为治疗剂的结合分子的疗法)进行监测,从而允许对疗法进行调整(如有必要)。这对于疾病如癌症特别有帮助。因此,在本发明的进一步优选的实施方案中,该方法被用于监测治疗,特别是在癌症治疗中。在一个实施方案中,使用结合分子作为治疗剂和/或使用本领域已知的疗法进行治疗,特别是癌症治疗。就癌症而言,已知的疗法包括化学疗法,特别是使用细胞毒性化合物如紫杉烷类进行治疗,和/或放射疗法。

[0104] 在另一个方面,本发明涉及适用于测定样品中分析物的总量和/或浓度的试剂盒或组合物,所述样品还包含能够结合至所述分析物的结合分子,所述试剂盒或组合物包含:

- a) 能够与所述分析物形成复合物的检测分子;和
 - b) 针对所述结合分子的结合位点的陷阱分子;和
 - c) 任选地,所述分析物;和
 - d) 任选地,能够结合至所述分析物的所述结合分子;和
 - e) 任选地,带有用于固定所述分析物的装置的捕获分子,
- 其中所述检测分子不同于所述结合分子,并且
其中所述分析物不同于所述陷阱分子,并且

其中所述检测分子仅能够在所述分析物不被所述结合分子结合时与所述分析物形成复合物。

[0105] 此试剂盒可被用于上述本发明的方法。在优选的实施方案中,本发明的试剂盒或组合物适用于本发明的任何方法。同样,所有作为本发明的方法的优选实施方案而公开的实施方案也均适用于本发明的试剂盒。

[0106] 因此,在又另一个方面,本发明涉及在本发明的任何方法中使用本发明的试剂盒或组合物。具体地讲,可测定分析物的总量,如上所述。在优选的实施方案中,分析物不同于陷阱分子。在进一步优选的实施方案中,检测分子仅能够在分析物不被结合分子结合时与所述分析物形成复合物。因此,在又另一个方面,本发明涉及使用本发明的试剂盒或组合物测定样品中分析物的总量和/或浓度,优选其中所述分析物不同于陷阱分子和/或其中检测分子仅能够在所述分析物不被结合分子结合时与所述分析物形成复合物。优选地,分析物为生物标记物,和/或样品为血液或血清。

[0107] 也可以使用本发明的试剂盒通过在本发明的方法中采用它们来测定患者对治疗的治疗反应,特别是其中使用了结合分子对所述患者进行治疗。因此,在又另一个方面,本

发明涉及使用本发明的试剂盒或组合物测定患者对治疗的治疗反应,特别是其中使用了结合分子对所述患者进行治疗。

[0108] 附图

图1:显示了本发明的优选的方法的示意图。

[0109] A) 此图说明这样的情况,其中结合分子结合至经捕获分子固定的分析物。检测分子无法结合至分析物。

[0110] B) 在此情况下,陷阱分子结合至结合分子,从而将结合分子从分析物上释放。检测分子现在可以结合至经固定的分析物。这使得能够测定基本上所考虑的分析物的总量或总浓度,即使样品中存在结合分子。

[0111] 图2:显示了根据实施例4的结果(检测总TWEAK)。

[0112] 人工基质(EKM);5 ng/ml重组TWEAK(5 ng/ml AG);掺杂了515 µg/ml治疗抗体的5 ng/ml重组TWEAK(5 ng/ml AG + 515 µg/ml药物)。显示了没有抗独特型抗体(w/o)的样品和有大量过剩抗独特型抗体(+ M-2.38.37)的样品的结果。

[0113] 图3:显示了根据实施例4的结果(检测总TWEAK)。

[0114] 人工基质(EKM);血清样品(分别为:样品7和样品8);含有治疗抗体的血清样品(分别为:样品7 + 515 µg/ml药物和样品8 + 515 µg/ml药物);显示了没有抗独特型抗体(w/o)的样品和有大量过剩抗独特型抗体(+ M-2.38.37)的样品的结果。

实施例

[0115] 实施例1:本发明的方法,其中结合分子为治疗活性抗体,而陷阱分子为抗独特型抗体(抗-id Ab)

常用的最大抗体(1gG,150 kDa)在粘度制剂测试(viscosity formulation testing)中的浓度为150 mg/ml = 1 mM 抗体。例如,在患者血清(以500 mg 赫赛汀的周赫赛汀剂量)中的稳定的赫赛汀(作为治疗活性抗体)浓度为377 µg/ml = 2.6 µM 赫赛汀,而帕妥珠单抗为200 µg/ml = 1.4 µM(两种抗体均结合至代表了根据本发明的分析物的HER2/neu)。最大剂量与常用血清浓度值之间的浓度差异可被视为抗-id Ab的应用浓度的窗口,以在体外测定样品中的总分析物(在本实施例中,分析物为HER2)。1 mM 抗-id Ab是非常高的可能应用浓度,但出于成本效益,优选低得多的抗-id抗体浓度。此外,抗-id Ab浓度必须足够高,以在电化学发光测量(具体地讲,使用Elecsys® (Roche))的典型温育时间内,使反应趋向平衡。

[0116] 估算达到平衡的时间(T): $T = 3.5 / (k_a * c) + k_d$ 。

[0117] 在Elecsys® 系统中9 min温育时间不被视为对具有1.3 nM 亲和力、普通动力学速率概况和1 µM 浓度的抗-id-抗体的限制因素。

[0118] 动力学竞争测定(优选通过表面等离子体共振,具体地讲使用Biacore® 系统)通常以各竞争物相对于靶标3倍至5倍的摩尔过量驱动。抗-id抗体不应当以低于浓度[治疗活性抗体] * 3 = [抗-id-Ab]应用。当使用抗-id抗体阻断血清赫赛汀时,抗-id Ab浓度应当为5 * 2.6 µM = 13 µM(2 mg/ml)抗-id Ab,这是可行的并且满足达到平衡要求的时间。

[0119] 实施例2:对于极高亲和力结合分子也有用的应用

用于陷阱分子的应用浓度的稳健算法可以由亲和力商(affinity quotient)补充:

实例A:

$$(KD_{\text{陷阱分子}} / KD_{\text{结合分子}}) * 5 \mu\text{M} = [\text{抗-id-Ab}]$$

$$(KD_{\text{抗赫赛汀}} 1 \text{ nM} / KD_{\text{赫赛汀}} 0.1 \text{ nM}) * 5 \mu\text{M} = 50 \mu\text{M} = 7 \text{ mg/ml 抗-id-Ab}$$

实例B,加入血清结合分子浓度:

$$(KD_{\text{陷阱分子}}/KD_{\text{结合分子}}) * [\text{血清结合分子}] * 3 = [\text{抗-id-Ab}].$$

$$(KD_{\text{抗赫赛汀}} 1 \text{ nM} / KD_{\text{赫赛汀}} 0.1 \text{ nM}) * 2.6 \mu\text{M}_{\text{血清赫赛汀}} * 3 = 78 \mu\text{M} = 11 \text{ mg/ml 抗-id-Ab}$$

因为抗-id-Ab浓度会通过乘以亲和力商而增加,所以3倍的抗-id-Ab对结合分子摩尔过量因子是足够的。

[0120] 实例C:

$$(KD_{\text{抗AbxY}} 1 \text{ nM} / KD_{\text{AbxY}} 0.01 \text{ nM}) * 2.6 \mu\text{M}_{\text{血清Abxy}} * 3 = 780 \mu\text{M} = 111 \text{ mg/ml}$$

实施例C是可行的,然而并不是成本节约的。优选更高亲和性(affine)的陷阱分子。

[0121] 另一个非常重要的方面是结合分子(特别是抗体)的结合价。当结合至小的靶标时,身为抗体的结合分子通常表现出MR=2的结合价,而由于空间原因,身为抗独特型抗体的陷阱分子多半表现出MR=1及更小的结合价。在这种情况下,需要在计算中优选考虑功能摩尔浓度商。

[0122] 实例D:

$$(MR_{\text{结合分子}}) / MR_{\text{陷阱分子}}) * (KD_{\text{抗-id-Ab}} / KD_{\text{结合分子}}) * [\text{血清结合分子}] * 3 = [\text{抗-id-Ab}]$$

$$(MR_{\text{结合分子}} 2 / MR_{\text{抗-id-Ab}} 1) * (KD_{\text{抗-id-Ab}} 1 \text{ nM} / KD_{\text{结合分子}} 0.1 \text{ nM}) * [2.6 \mu\text{M}] * 3 = 156 \mu\text{M}$$

需要22 mg/ml 身为抗-id抗体的陷阱分子。

[0123] 实例D代表了根据本发明的优选的实施方案。

[0124] 实施例3A:生成单克隆抗体

用重组的、源自大肠杆菌的TWEAK蛋白质对Balb/C、NMR1和SJL小鼠进行了免疫,以生成针对TWEAK的抗体。所有的小鼠于免疫活动开始后0、6和10周的时间点接受了3次免疫接种。在各个时间点,使用溶于100 μl PBS中的100 μg 免疫原为每只小鼠进行免疫接种。在第一次免疫接种中,将免疫原与100 μl CFA混合。在第二次和第三次免疫接种中,将免疫原与100 μl IFA混合。第一次和第三次免疫接种经由腹腔内途径实施,而第二次免疫接种经皮下实施。在使用杂交瘤技术制备用于抗体开发的脾细胞之前的2和3天,使用不含佐剂的12.5 μg 免疫原(在100 μl PBS中)为小鼠进行静脉内加强免疫接种。

[0125] 在免疫接种开始后的第11周从每只小鼠采集少量的血清,以测定针对各免疫原的血清效价。将重组TWEAK固定在平板表面,以进行ELISA。使用了浓度为0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的免疫原,以进行固定。将来自各只小鼠的血清稀释于含有1% BSA的PBS中,并将稀释液加入到平板中。以1:300、1:900、1:2700、1:8100、1:24300、1:72900、1:218700和1:656100的稀释度对血清进行了测试。以ABTS(Roche)作为底物,使用HRP标记的F(ab')₂山羊抗小鼠Fc γ (Dianova)检测了结合的抗体。

[0126] 经过免疫的小鼠的血清效价示于表1中。分析物,源自大肠杆菌的重组人TWEAK,以250 ng/ml的浓度被固定。通过在96孔板上各个小鼠血清的系列稀释度测量了血清效价。

表1:

小鼠品系	小鼠编号	血清效价
Balb/c	1831/1	48788
Balb/c	1831/2	61589
Balb/c	1831/3	33658
Balb/c	1831/4	39573
Balb/c	1831/5	72775
NMRI	1832/1	3460
NMRI	1832/2	51925
NMRI	1832/3	64945
NMRI	1832/4	24769
NMRI	1832/5	3664
SJL	1833/1	25774
SJL	1833/2	30777
SJL	1833/3	23692
SJL	1833/4	55638
SJL	1833/5	49018

[0127] 使用杂交瘤技术通过将原发性B细胞与P3X63Ag8.653骨髓瘤细胞融合而开发出了抗体。在最终加强免疫接种后2天,处死经过免疫的小鼠并制备脾脏细胞群。通过使用PEG融合将脾细胞与P3X63Ag8.653融合。将来源于该融合细胞分批培养物在37°C、5% CO₂下温育过夜。翌日,将含有融合细胞的细胞批次在400 g离心10 min。之后,将细胞悬浮于补充有0.1x 重氮丝氨酸-次黄嘌呤(Sigma)的杂交瘤选择培养基中,并且以2.5x10⁴个细胞/孔的浓度将其接种在96孔板中。将平板在37°C、5% CO₂下培养至少1周。在ELISA分析之前3天,更换选择培养基。

[0128] 在ELISA中,针对重组TWEAK抗原(固定在平板表面)对初级培养上清液进行了测试。重组TWEAK以0.25 µg/ml的浓度被固定。向平板中加入杂交瘤上清液并在室温下温育1 h。使用HRP标记的F(ab')₂山羊抗小鼠Fcγ (Dianova)检测结合的抗体,并将ABTS(Roche)用作HRP底物。

[0129] 表2示出了通过ELISA对所选克隆的评价。在ELISA中测试了所选克隆针对重组人TWEAK的结合。分析物以0.25 µg/ml的浓度被固定在平板表面。所有的克隆均显示结合人TWEAK。

表2:

克隆编号	TWEAK ELISA [OD]
10.180.3	1.39
10.43.14	1.19
10.156.32	1.50
10.209.34	1.14
10.250.35	1.28
10.10.36	1.08
10.217.66	1.31
10.61.71	1.08
10.230.79	1.04
11.226.1	1.429

[0130] 实施例3B:生成单克隆抗独特型抗体

a) 对小鼠的免疫接种

NMR1小鼠主要使用与CFA(完全弗氏佐剂)一起配制的100 μg F(ab')₂人源化单克隆抗TWEAK抗体,腹膜内免疫接种。在6和10周后,接着进行两次进一步的腹膜内免疫接种,应用的是混合了IFA(不完全弗氏佐剂)的100 μg 的上述F(ab')₂/小鼠。随后,在处死动物之前3天,通过静脉内施用25 μg F(ab')₂(在PBS中)对小鼠进行加强免疫接种,并分离脾脏细胞并用于融合。

[0131] b) 融合与克隆

使用聚乙二醇通过标准程序进行脾脏细胞与骨髓瘤细胞的融合。简而言之,在RPMI-1640中,将大约 1×10^8 个脾细胞与大约 2×10^7 个骨髓瘤细胞(P3x63-Ag8.653, ATCC CRL1580)混合并离心(10 min, 以 $510 \times g$ 和 4°C)。用RPMI-1640洗涤细胞一次并再次离心。之后,加入1 ml PEG(聚乙二醇,分子量4,000 g/mol),通过抽吸完成混合。1 min后,在 37°C 水浴中,逐滴加入5 ml RPMI-1640,混合悬浮液,用RPMI-1640加至30 ml并离心。将细胞重悬浮于选择培养基(补充有10% FCS、100 U/ml IL-6、2 mM L-谷氨酰胺、100 μM NEAA、1 mM 丙酮酸钠、24 μM 2-巯基乙醇、100 μM 次黄嘌呤和1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 重氮丝氨酸的RPMI-1640)中并随后涂布到96孔细胞培养板中。大约10天后,测定初级培养物中特异性抗体的产生(如下所述)。使用流式细胞仪(FACS Aria, BD Biosciences),通过单细胞分选克隆表现为结合上述人源化F(ab')₂并且与正常人IgG无交叉反应性的初级培养物。在补充有10% FCS、50 U/ml IL-6、2 mM L-谷氨酰胺、100 μM NEAA、1 mM 丙酮酸钠和24 μM 2-巯基乙醇的RPMI-1640中生长细胞克隆。如下所述,重新测试所形成的单克隆杂交瘤细胞系的特异性。

[0132] 关于保存,使用冷冻容器(冷却速率 $-1^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$)(Mr.Frosty,Nalgene)将杂交瘤细胞系于冷冻培养基(92.5% FCS、7.5% DMSO)中冷冻于 -80°C 并随后保存在液氮中。

[0133] 实施例4:用于检测抗独特型抗体的筛选测定法

a)初步筛选优先结合至人源化抗TWEAK mAb的抗体

为了测定杂交瘤细胞培养上清液中抗体的特异性,将预涂覆有重组链霉亲和素(MicroCoat,Bernried,Germany)的MTP(微量滴定板)涂覆有 $100\ \mu\text{l}/\text{孔}$ 的人源化抗TWEAK mAb的经生物素化的 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 片段($250\ \text{ng}/\text{ml}$)或经生物素化的多克隆人IgG($2\ \mu\text{g}/\text{ml}$)。将抗体稀释于PBS/1.0% BSA 11(Roche)中。为了高效涂覆而将平板在RT下用各抗体溶液温育1 h。随后,用0.9% NaCl/0.05% Tween-20[®]洗涤平板。在下一步骤中,加入 $100\ \mu\text{l}/\text{孔}$ 的待测定的抗体溶液(培养上清液)并在RT下温育1 h。在用0.9% NaCl/0.05% Tween-20[®]洗涤后,加入 $100\ \mu\text{l}/\text{孔}$ 的多克隆绵羊抗小鼠Fc γ 抗体的经辣根过氧化物酶标记的 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 片段($100\ \text{ng}/\text{ml}$),以检测结合的样品抗体。在RT下温育1 h后,如上所述洗涤平板。最后,加入 $100\ \mu\text{l}/\text{孔}$ 的ABTS[®](Roche)。在RT下温育30 min后,测量405 nm和492 nm的消光度(extinction,OD),[405/492]。

[0134] 此筛选得到了结合至人源化抗TWEAK mAb以及对人IgG仅表现出低交叉反应性或无交叉反应性的抗体的选集。这一抗体选集进一步接受测定b)。

[0135] b)选择与人IgG具有最低交叉反应性的抗体

为了从筛选b)的候选者中鉴别出具有与人IgG最低交叉反应性的那些,进行了下列测定。如上所述,将预涂覆有重组链霉亲和素(MicroCoat)的MTP涂覆有 $100\ \mu\text{l}/\text{孔}$ 的人源化抗TWEAK mAb的经生物素化的 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 片段($250\ \text{ng}/\text{ml}$,在PBS/1.0% BSA 11中)。随后,用0.9% NaCl/0.05% Tween-20[®]洗涤经涂覆的平板。在下一步骤中,向孔中加入 $50\ \mu\text{l}$ 候选抗体(培养上清液)和 $50\ \mu\text{l}$ 多克隆人IgG(以 $40\ \text{mg}/\text{ml}$ 的最终浓度)的混合物。在对照实验中,向孔中加入 $50\ \mu\text{l}$ 各候选抗体(培养上清液)和 $50\ \mu\text{l}$ 缓冲液的混合物。将平板在RT下温育1 h。在用0.9% NaCl/0.05% Tween-20[®]洗涤后,加入 $100\ \mu\text{l}/\text{孔}$ 的多克隆绵羊抗小鼠Fc γ 抗体的经辣根过氧化物酶标记的 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 片段($100\ \text{ng}/\text{ml}$),以检测结合的样品抗体。在RT下温育1 h后,如上所述洗涤平板。最后,加入 $100\ \mu\text{l}/\text{孔}$ 的ABTS[®](Roche Diagnostics GmbH)。在RT下温育30 min后,测量405和492 nm的消光度(OD)[405/492]。

[0136] 在存在多克隆人IgG的情况下,具有最小的测定信号损耗的抗体表现出最低的交叉反应性,将其选出用于进一步评价。

[0137] c)相互作用分析

通过Biacore分析,评价了不同的鼠抗独特型mAb与人源化抗TWEAK抗体的相互作用的动力学和亲和力,及其与正常多克隆人IgG的交叉反应性。简而言之,涂覆有抗小鼠Fc γ 抗体的CM5传感器芯片(GE Healthcare)被用于捕获鼠抗独特型mAb。人源化抗TWEAK抗体的Fab片段以下列浓度被用作分析物: $0.04\ \text{nM}$ 、 $0.12\ \text{nM}$ 、 $0.37\ \text{nM}$ 、 $1.11\ \text{nM}$ 、 $3.33\ \text{nM}$ 和 $10\ \text{nM}$ 。为了评价抗独特型mAb与正常人IgG的交叉反应性,将 $1000\ \text{nM}$ 多克隆人IgG溶液用作分析物。所有实验均使用Biacore A100系统(GE Healthcare)在 37°C 下进行;分别记录结合与解离,持续180秒或300秒。选出具有最高亲和力并且与正常人IgG没有可检测到的交叉反应性的抗体用于进一步使用。

表3:

克隆编号 抗-1d mAb	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	$t/2$ 解离 (diss) [min]	KD (pM)	交叉反应性 人 IgG
5.4.1	> 1.00E+06	3.18E-05	363	< 32	未检测到
5.5.1	> 1.00E+06	2.44E-04	47	< 244	未检测到
5.10.4	> 1.00E+06	1.41E-04	82	< 141	未检测到
5.11.4	> 1.00E+06	2.44E-05	474	< 24	未检测到
5.12.6	> 1.00E+06	3.18E-05	364	< 32	未检测到
5.13.6	> 1.00E+06	3.05E-05	379	< 30	未检测到
5.17.11	> 1.00E+06	1.63E-05	709	< 16	未检测到
5.19.11	> 1.00E+06	1.49E-05	777	< 15	未检测到
5.25.20	> 1.00E+06	1.90E-05	609	< 19	未检测到
5.28.20	> 1.00E+06	1.96E-05	589	< 20	未检测到
5.36.37	> 1.00E+06	3.18E-05	364	< 32	未检测到
5.38.37	> 1.00E+06	3.79E-05	305	< 38	未检测到

[0138] 表3显示了不同的鼠抗独特型mAb(克隆编号 抗-1d mAb)与人源化抗TWEAK抗体的相互作用的动力学和亲和力,及其与正常多克隆人IgG的交叉反应性(交叉反应性 人IgG)。

[0139] 实施例5:检测可溶性TWEAK(10.180.003-IgG-Bi/11.226.001-IgG-Ru)

使用cobas® 分析仪e411开发出了用于特异性测量人血清或血浆样品中的TWEAK的电化学发光免疫测定法(ECLIA)。

[0140] cobas® TWEAK免疫测定法是通过夹心原理起作用的电化学发光免疫测定法(ECLIA)。在测定中包括两种抗体 — 经生物素化的单克隆抗体10.180.003-IgG-Bi(捕获抗体)和经钌化(ruthenylated)的单克隆抗TWEAK抗体11.226.001-IgG-Ru(检测抗体) — 其与样品中的TWEAK形成夹心免疫测定复合物。该复合物随后结合至固相涂覆有链霉亲和素的微粒。该微粒被磁性捕获至电极表面,并且向该电极施加电压诱导化学光发射,将其通过光电倍增器测量读出。通过仪器特有的校准曲线测定结果。使用了抗独特型单克隆抗体(MAK<1D<<TWEAK>5.38.37-IgG)以检测总TWEAK。在加入夹心单克隆抗体(10.180.003-IgG-Bi-11.226.001-IgG-Ru)之前,将此抗体与样品在cobas® 分析仪e411上温育。

[0141] 如cobas® 分析仪e411的操作手册中所述应用该测定法,让35 μ l 样品与35 μ l 在反应缓冲液中的含有35 mg/ml MAK<1D<<TWEAK>5.38.37-IgG的试剂1(R1)温育36分钟,以检测总TWEAK。使用了不含抗-1D单克隆抗体MAK<1D<<TWEAK>5.38.37-IgG的相同缓冲液R1以检测游离的TWEAK。然后将混合物与95 μ l 在相同的反应缓冲液中的含有0.68 μ g/ml 经生物素化的10.180.003-IgG-Bi和0.68 g/ml 经钌化的11.226.001-IgG-Ru的试剂2(R2)及35 μ l 微粒悬浮液中温育9分钟。在温育期间,形成了结合至微粒的抗体-分析物-抗体夹心结构。最后,将微粒转移至cobas® 分析仪e411的检测室用于信号生成和读出。在校准基质(50 mM Tris/HCl;25 mM L-Asn;pH 7.5)中制备了含有不同浓度重组TWEAK(PeproTech)的一系列校准物(0 ng/ml、0.037 ng/ml、0.111 ng/ml、0.333 ng/ml、1 ng/ml和3 ng/ml)用于校准。通过非线性最小二乘法曲线拟合(RCM-Rodbard)计算出校准曲线公式,并用于将

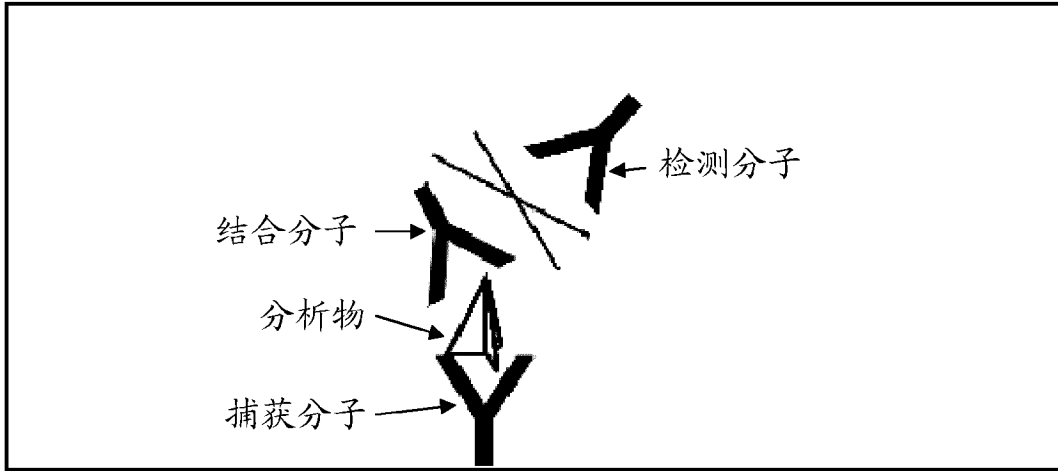
信号读出转换成对应的浓度值。

[0142] 实施例6:检测总TWEAK

为了评估药物化合物的存在的影响,分别向含有5 ng/ml 重组(rec.)TWEAK的人工基质(EKM)(结果示于图2中)和两种天然样品(结果示于图3中)中掺杂了515 µg/ml 药物化合物。比较了没有抗独特型抗体(w/o)的样品和有大量过剩抗独特型抗体(M-2.38.37)的样品的结果。

[0143] 虽然在含有治疗抗体的样品中没有可检测到的信号,但是可以通过加入抗独特型抗体而将信号水平恢复到不含治疗抗体的样品的水平。这对于经掺杂的缓冲液以及经掺杂的血清样品同样适用。通过这种方法,有可能在单次运行中从一个单独的样品管中测定游离的和总的靶标(与先前治疗抗体的结合无关)。

A)



B)

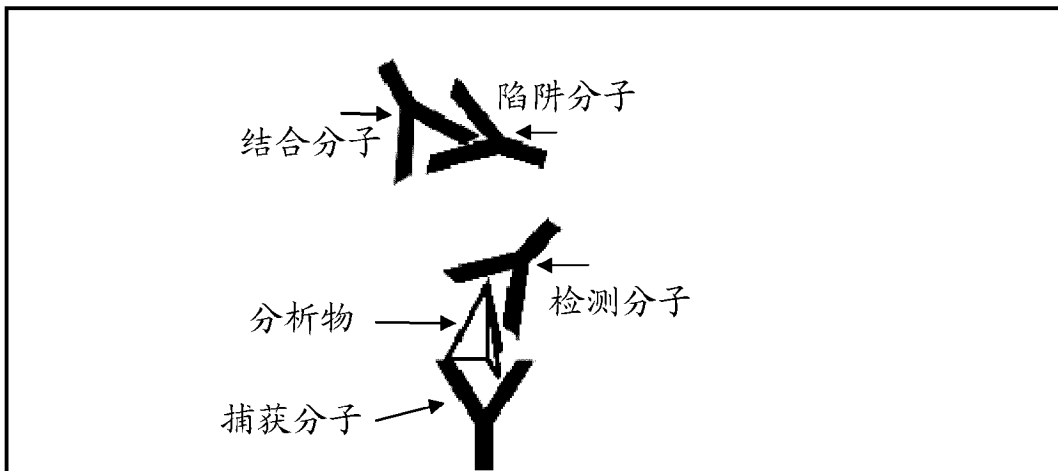


图 1

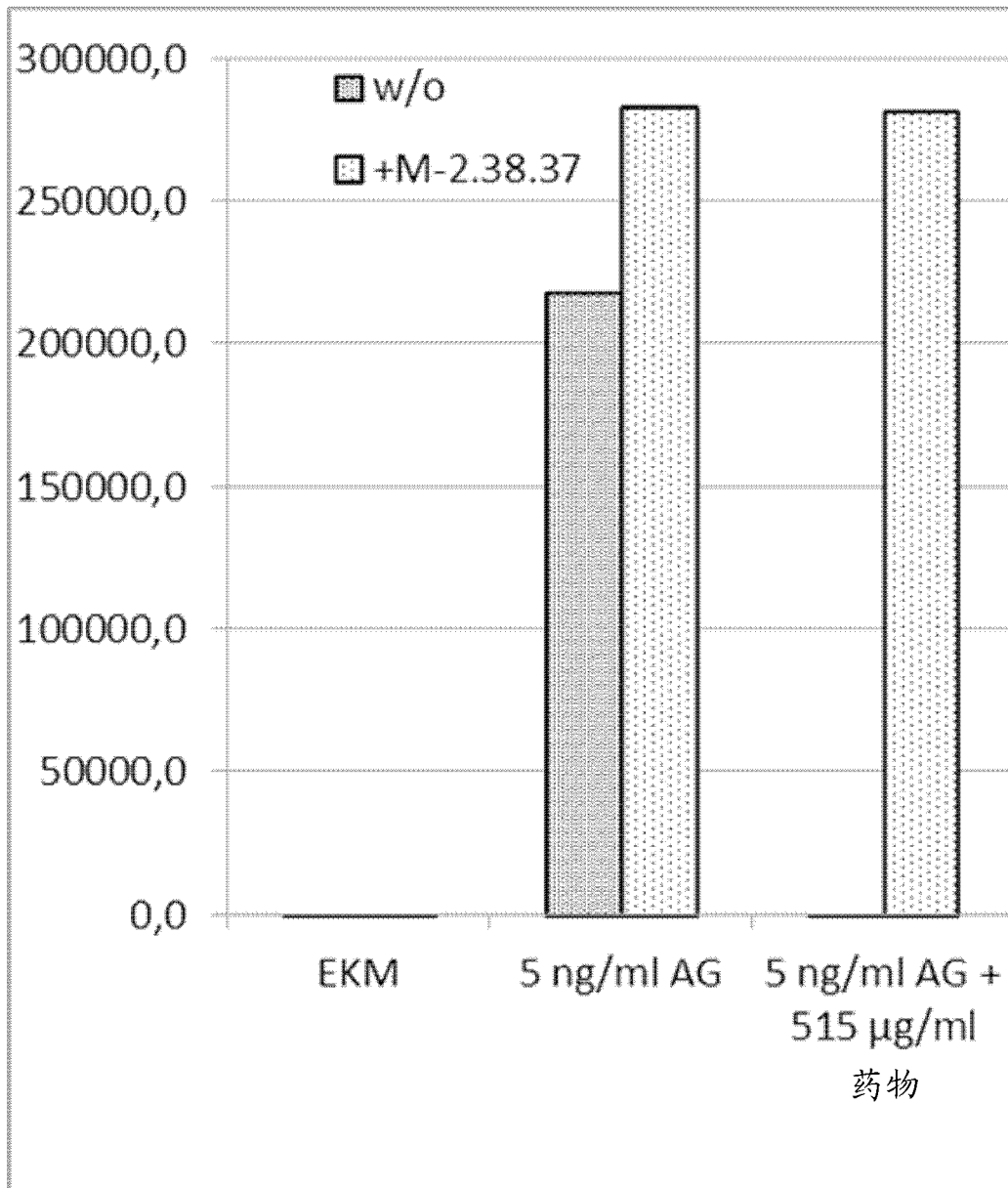


图 2

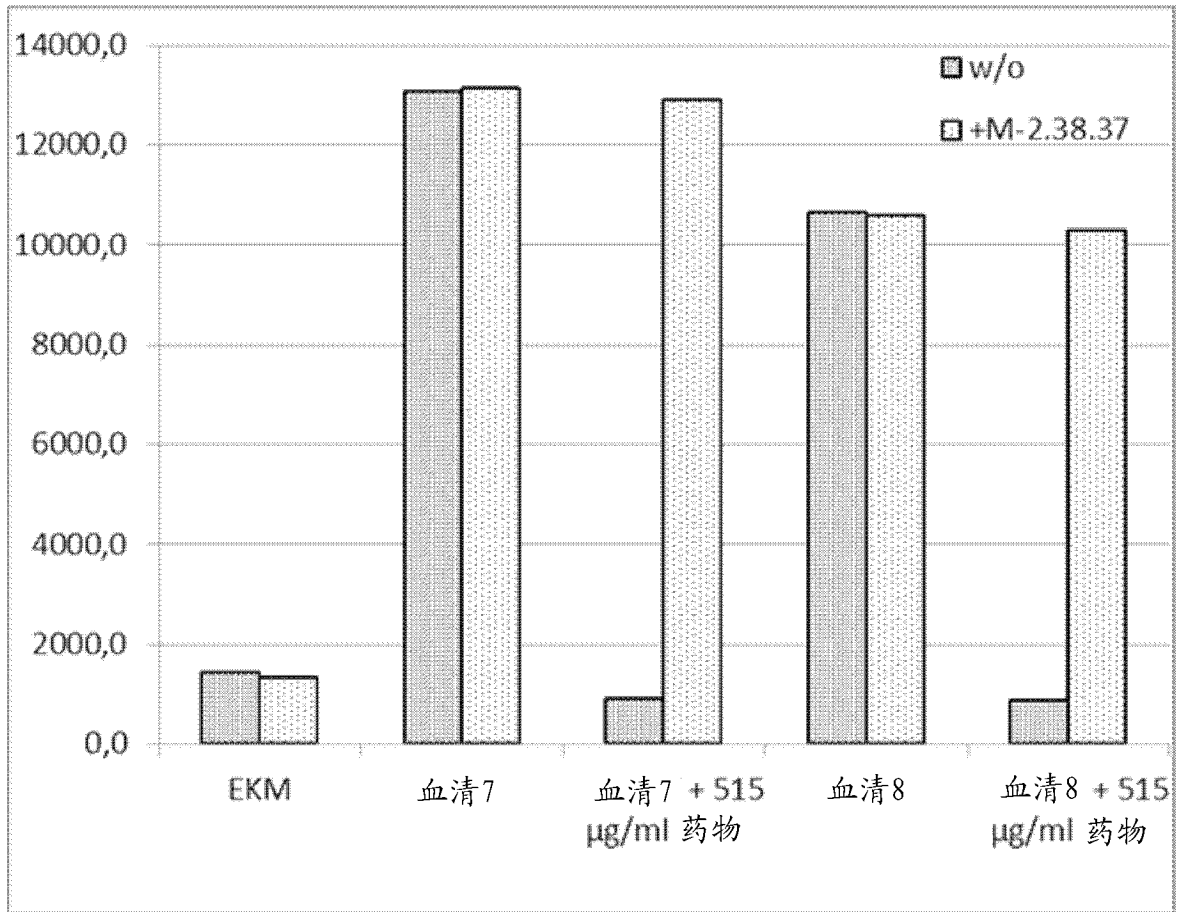


图 3

专利名称(译)	在存在结合分子的情况下测定分析物的总量和/或浓度的方法及其相关试剂盒、组合物和用途		
公开(公告)号	CN105683755A	公开(公告)日	2016-06-15
申请号	CN201480060361.3	申请日	2014-11-03
申请(专利权)人(译)	豪夫迈·罗氏有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	豪夫迈·罗氏有限公司		
[标]发明人	M 施雷姆尔 M 罗斯勒 M 盖格		
发明人	M.施雷姆尔 M.罗斯勒 M.盖格		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/536		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
代理人(译)	唐华东		
优先权	2013005218 2013-11-05 EP 2014002015 2014-06-11 EP		
其他公开文献	CN105683755B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及在存在结合分子的情况下测定分析物的总量和/或浓度的方法及其相关试剂盒、组合物和用途。

