

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880015303.3

[43] 公开日 2010年3月24日

[11] 公开号 CN 101680880A

[22] 申请日 2008.5.6

[21] 申请号 200880015303.3

[30] 优先权

[32] 2007.5.7 [33] US [31] 60/928,144

[32] 2007.5.8 [33] US [31] 60/928,438

[86] 国际申请 PCT/US2008/062739 2008.5.6

[87] 国际公布 WO2008/137885 英 2008.11.13

[85] 进入国家阶段日期 2009.11.9

[71] 申请人 惠氏公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 戴维·勒罗伊·温塞尔

米歇尔·阿瓦德

[74] 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限责任
公司
代理人 刘国伟

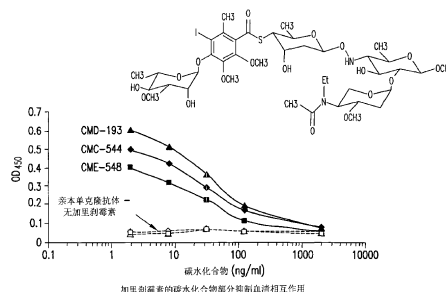
权利要求书 10 页 说明书 22 页 附图 9 页

[54] 发明名称

免疫检定中由抗碳水化合物抗体引起的干扰的消除

[57] 摘要

本发明针对大致说来用于检测抗药物抗体并且具体说来用于检测药物具有碳水化合物部分的抗药物抗体的检定。本发明还针对大致说来用于检测药物并且具体说来用于检测具有碳水化合物部分的药物的检定。本发明进一步针对鉴别适于利用含有碳水化合物部分的药物治疗的个体的方法。



1. 一种检测来自个体的含有抗体的流体样品中针对含有碳水化合物部分的药物的抗体的存在的检定，所述检定包含以下步骤：
 - (a) 组合
 - (i) 所述流体样品与
 - (ii) 所述含有碳水化合物部分的药物和
 - (iii) 其它碳水化合物；和
 - b) 检测所述样品中的抗体与所述含有碳水化合物部分的药物之间是否发生特异性结合；

其中在检测所述样品中的抗体与所述含有碳水化合物部分的药物之间是否发生特异性结合之前，所述其它碳水化合物未与所述流体样品预先混合。
2. 一种检测来自个体的含有抗体的流体样品中针对含有碳水化合物部分的药物的抗体的存在的检定，所述检定包含以下步骤：
 - (a) 组合
 - (i) 所述流体样品与
 - (ii) 所述含有碳水化合物部分的药物和
 - (iii) 其它碳水化合物；和
 - (b) 检测所述样品中的抗体与所述含有碳水化合物部分的药物之间是否发生特异性结合；

其中所述含有碳水化合物部分的药物不包含糖蛋白。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的检定，其中所述检定是在所述个体暴露于所述含有碳水化合物部分的药物之后进行。
4. 根据权利要求 1 或 2 所述的检定，其中所述检定是在所述个体暴露于所述含有碳水化合物部分的药物之前进行。
5. 根据任一前述权利要求所述的检定，其中所述其它碳水化合物是在将所述样品与所述含有碳水化合物部分的药物组合之后添加。

6. 根据任一前述权利要求所述的检定，其中所述来自所述个体的流体样品包含以下至少一者：全血；血清；粘液；唾液；初乳；和血浆。
7. 根据权利要求 6 所述的检定，其中所述检测步骤包含夹心检定、桥接检定和竞争结合检定中的至少一者。
8. 根据任一前述权利要求所述的检定，其中所述检测步骤包含以下至少一者：检测与所述样品接触的固体光学表面处的折射率变化；检测发光性变化；测量颜色变化；检测放射性变化；使用生物薄膜干涉技术进行测量；使用悬臂检测进行测量；使用无标记本征成像技术进行测量；和使用声学检测进行测量。
9. 根据权利要求 8 所述的检定，其中所述检测步骤包含选自由以下组成的群组的检定：酶联免疫吸附检定 (ELISA)；电致化学发光检定 (ECL)；放射免疫检定 (RIA)；固相放射免疫检定 (SPRIA)；免疫印迹；免疫沉淀；荧光活化细胞分选 (FACS)。
10. 根据权利要求 9 所述的检定，其中所述检测步骤包含桥接检定。
11. 根据任一前述权利要求所述的检定，其中所述检测步骤包含 ELISA。
12. 根据任一前述权利要求所述的检定，其中所述其它碳水化合物为细菌脂多糖 (LPS) 或其片段、葡聚糖或其片段、果聚糖或其片段、肺炎球菌多糖或其片段、琼脂糖或其片段、纤维素或其片段、角叉菜胶或其片段，和甲基糖苷或其片段。
13. 根据任一前述权利要求所述的检定，其中所述其它碳水化合物是以介于约 10 ng/ml 与约 1 mg/ml 之间的浓度存在于步骤 a) 中的组合中
14. 根据任一前述权利要求所述的检定，其中所述含有碳水化合物部分的药物另外包含与所述药物结合的载体。
15. 根据权利要求 14 所述的检定，其中所述载体是选自由以下组成的群组：单克隆和多克隆抗体及其经化学或遗传方式处理的对应物；其抗原识别片段及其经化学或遗传方式处理的对应物；小型组合式免疫治疗药物 (small modular

immunopharmaceutical, SMIP) 以及其经化学或遗传方式处理的对应物; 纳米抗体以及其经化学或遗传方式处理的对应物; 可溶性受体以及其经化学或遗传方式处理的对应物; 生长因子以及其经化学或遗传方式处理的对应物; 适体; 脂质体; 非糖基化蛋白; 和纳米粒子。

16. 根据权利要求 14 或 15 所述的检定, 其中所述载体特异性结合癌细胞表面上表达的抗原。
17. 根据权利要求 16 所述的检定, 其中所述癌细胞上表达的抗原是选自由以下组成的群组: 5T4; CD19; CD20; CD22; CD33; 路易斯 Y 抗原 (Lewis Y); HER-2; 免疫球蛋白 G 的 I 型 Fc 受体 (Fc γ R1); CD52; 表皮生长因子受体 (EGFR); 血管内皮生长因子 (VEGF); DNA/组蛋白复合物; 癌胚抗原 (CEA); CD47; VEGFR2 (血管内皮生长因子受体 2 或含激酶插入结构域的受体, KDR); 上皮细胞粘附分子 (Ep-CAM); 成纤维细胞活化蛋白 (FAP); Trail 受体-1 (DR4); 孕酮受体; 肿瘤胚胎抗原 CA 19.9; 和血纤维蛋白。
18. 根据权利要求 15 至 17 中任一权利要求所述的检定, 其中所述载体为单克隆抗体。
19. 根据权利要求 18 所述的检定, 其中所述单克隆抗体是选自由以下组成的群组: 抗 CD22 单克隆抗体; 抗 5T4 单克隆抗体; 抗路易斯 Y 抗原单克隆抗体; 和抗 CD33 单克隆抗体。
20. 根据任一前述权利要求所述的检定, 其中所述含有碳水化合物部分的药物是选自由以下组成的群组: 细胞毒性剂; 放射性治疗剂; 免疫调节剂; 抗血管生成剂; 抗增殖剂; 促细胞凋亡剂; 化疗剂; 和治疗性核酸。
21. 根据权利要求 20 所述的检定, 其中所述含有碳水化合物部分的药物为细胞毒性剂。
22. 根据权利要求 21 所述的检定, 其中所述细胞毒性剂为微管蛋白聚合抑制剂; 结合并破坏 DNA 的烷化剂; 蛋白质合成抑制剂; 或酪氨酸激酶抑制剂。
23. 根据权利要求 21 所述的检定, 其中所述细胞毒性剂是选自加里刹霉素

(calicheamicin)、噻替派 (thiotepa)、紫杉烷 (taxane)、长春新碱 (vincristine)、道诺霉素 (daunorubicin)、多柔比星 (doxorubicin)、表柔比星 (epirubicin)、放线菌素 (actinomycin)、安曲霉素 (anthramycin)、重氮丝氨酸 (azaserine)、博来霉素 (bleomycin)、他莫昔芬 (tamoxifen)、伊达比星 (idarubicin)、海兔毒素 (dolastatin/auristatin)、哈密特林 (hemiasterlin) 和类美登素 (maytansinoid)。

24. 根据权利要求 23 所述的检定，其中所述细胞毒性剂为加里刹霉素。
25. 根据权利要求 24 所述的检定，其中所述加里刹霉素为 N-乙酰基 γ 二甲基酰肼加里刹霉素。
26. 根据权利要求 25 所述的检定，其中所述 N-乙酰基 γ 二甲基酰肼加里刹霉素是与载体单克隆抗体结合，并且所述单克隆抗体特异性结合选自以下组成的群组的抗原：5T4；CD19；CD20；CD22；CD33；路易斯 Y 抗原；HER-2；免疫球蛋白 G 的 I 型 Fc 受体 (Fc γ R1)；CD52；表皮生长因子受体 (EGFR)；血管内皮生长因子 (VEGF)；DNA/组蛋白复合物；癌胚抗原 (CEA)；CD47；VEGFR2 (血管内皮生长因子受体 2 或含激酶插入结构域的受体, KDR)；上皮细胞粘附分子 (Ep-CAM)；成纤维细胞活化蛋白 (FAP)；Trail 受体-1 (DR4)；孕酮受体；肿瘤胚胎抗原 CA 19.9；和血纤维蛋白。
27. 根据权利要求 22 至 24 中任一权利要求所述的检定，其中所述其它碳水化合物为 S-[(2R,4S,6S)-6-([[(2R,4S,5R)-5-([(2S,4S,5S)-5-[乙酰基(乙基)氨基]-4-甲氧基四氢-2H-吡喃-2-基]氧基)-4-羟基-6-甲氧基-2-甲基四氢-2H-吡喃-3-基]氨基]氧基)-4-羟基-2-甲基四氢-2H-吡喃-3-基]4-([(2S,3R,4R,5S,6S)-3,5-二羟基-4-甲氧基-6-甲基四氢-2H-吡喃-2-基]氧基)-3-碘-5,6-二甲氧基-2-甲基苯硫代甲酸酯)。
28. 根据任一前述权利要求所述的检定，其中所述检测步骤另外包含捕获剂与所述样品中特异性结合所述含有碳水化合物部分的药物的抗体的特异性结合。
29. 根据权利要求 28 所述的检定，其中所述特异性结合所述含有碳水化合物部分的药物的抗体的存在是通过化合物与所述特异性结合所述含有碳水化合物部分的药物

的抗体的特异性结合来检测。

30. 根据权利要求 29 所述的检定，其中所述化合物是选自由以下组成的群组：另外包含可检测标记的捕获剂；和另外包含可检测标记的二次抗体，其中所述二次抗体特异性结合所述经结合抗体。
31. 根据权利要求 30 所述的检定，其中所述可检测标记包含至少一种选自由酶标记、发光标记、蛋白质标记、维生素标记、放射性同位素标记组成的群组的标记。
32. 根据权利要求 28 至 31 中任一权利要求所述的检定，其中所述捕获剂包含加里刹霉素。
33. 根据权利要求 32 所述的检定，其中所述捕获剂为加里刹霉素的碳水化合物部分或其功能片段。
34. 根据权利要求 33 所述的检定，其中所述加里刹霉素的碳水化合物部分为加里刹霉素上存在的 S-[(2R,4S,6S)-6-({[(2R,4S,5R)-5-({(2S,4S,5S)-5-[乙酰基(乙基)氨基]-4-甲氧基四氢-2H-吡喃-2-基}氧基)-4-羟基-6-甲氧基-2-甲基四氢-2H-吡喃-3-基]氨基}氧基)-4-羟基-2-甲基四氢-2H-吡喃-3-基]4-[(2S,3R,4R,5S,6S)-3,5-二羟基-4-甲氧基-6-甲基四氢-2H-吡喃-2-基]氧基)-3-碘-5,6-二甲氧基-2-甲基苯硫代甲酸酯)
35. 根据权利要求 1 所述的检定，其如实例 5、6 或 7 中任一者中进一步描述。
36. 一种检测含有抗体的流体样品中含有碳水化合物部分的药物的存在的检定，所述检定包含以下步骤：
 - (a) 组合
 - (i) 所述流体样品与
 - (ii) 特异性结合所述含有碳水化合物部分的药物的捕获剂和
 - (iii) 其它碳水化合物；和
 - (b) 检测所述样品中所述含有碳水化合物部分的药物与所述捕获剂之间是否发生特异性结合；

其中在检测所述捕获剂与所述含有碳水化合物部分的药物之间是否发生特异性结合之前，所述其它碳水化合物未与所述流体样品预先混合。

37. 一种检测含有抗体的流体样品中含有碳水化合物部分的药物的存在的检定，所述检定包含以下步骤：
- (a) 组合
 - (i) 所述流体样品与
 - (ii) 特异性结合所述含有碳水化合物部分的药物的捕获剂和
 - (iii) 其它碳水化合物；和
 - (b) 检测所述样品中所述含有碳水化合物部分的药物与所述捕获剂之间是否发生特异性结合；
- 其中所述含有碳水化合物部分的药物不包含糖蛋白。
38. 根据权利要求 36 或 37 所述的检定，其中所述结合所述捕获剂的药物的存在是利用也特异性结合所述药物的化合物来检测。
39. 根据权利要求 38 所述的检定，其中所述捕获剂为特异性结合所述含有碳水化合物部分的药物的抗体或其片段以及特异性结合所述含有碳水化合物部分的药物的靶分子中至少一者。
40. 根据权利要求 38 或 39 所述的检定，其中所述也特异性结合所述药物的化合物经标记并且选自以下组成的群组：另外包含可检测标记的捕获剂；和另外包含可检测标记的抗体，其中所述抗体特异性结合所述含有碳水化合物部分的药物。
41. 根据权利要求 38 或 39 所述的检定，其中所述也特异性结合所述药物的化合物是通过结合一种或多种连续中间化合物来检测，其中所述连续中间化合物中的一者或多者包含可检测标记。
42. 根据权利要求 40 或 41 所述的检定，其中所述可检测标记包含至少一种选自酶标记、发光标记、蛋白质标记、维生素标记和放射性同位素标记组成的群组的标记。

43. 根据前述权利要求 36 至 42 中任一权利要求所述的检定,其中所述流体样品包含以下至少一者:全血;血清;粘液;唾液;初乳;和血浆。
44. 根据前述权利要求 36 至 43 中任一权利要求所述的检定,其中所述检测步骤包含选自由以下组成的群组的检定:夹心检定、桥接检定和竞争结合检定。
45. 根据权利要求 44 所述的检定,其中所述检测步骤包含以下至少一者:测量与所述样品接触的固体光学表面处的折射率变化;测量发光性变化;测量颜色变化;和测量放射性变化;使用生物薄膜干涉技术进行测量;使用悬臂检测进行测量;使用无标记本征成像技术进行测量;和使用声学检测进行测量。
46. 根据权利要求 45 所述的检定,其中所述检测步骤包含选自由以下组成的群组的检定:ELISA;ECL;RIA;SPRIA;免疫印迹;免疫沉淀;和免疫染色。
47. 根据权利要求 46 所述的检定,其中所述检测步骤包含桥接检定。
48. 根据权利要求 47 所述的检定,其中所述检测步骤包含 ELISA。
49. 根据前述权利要求 36 至 48 中任一权利要求所述的检定,其中所述其它碳水化合物是以介于约 10 ng/ml 与约 1 mg/ml 之间的浓度存在于所述样品中。
50. 根据权利要求 49 所述的检定,其中所述添加到所述样品中的碳水化合物为细菌脂多糖(LPS)、葡聚糖、果聚糖、肺炎球菌多糖、琼脂糖、纤维素、角叉菜胶或甲基糖苷。
51. 根据权利要求 36 至 50 中任一权利要求所述的检定,其中所述含有碳水化合物部分的药物另外包含与所述药物结合的载体。
52. 根据权利要求 51 所述的检定,其中所述载体是选自由以下组成的群组:单克隆和多克隆抗体及其经化学或遗传方式处理的对应物;其抗原识别片段及其经化学或遗传方式处理的对应物;小型组合式免疫治疗药物(SMIP)及其经化学或遗传方式处理的对应物;纳米抗体及其经化学或遗传方式处理的对应物;可溶性受

体以及其经化学或遗传方式处理的对应物；生长因子以及其经化学或遗传方式处理的对应物；适体；脂质体；非糖基化蛋白；和纳米粒子。

53. 根据权利要求 51 或 52 所述的检定，其中所述载体特异性结合癌细胞表面上表达的抗原。
54. 根据权利要求 53 所述的检定，其中所述癌细胞上表达的抗原是选自由以下组成的群组：5T4；CD19；CD20；CD22；CD33；路易斯 Y 抗原；HER-2；免疫球蛋白 G 的 I 型 Fc 受体 (Fc γ R1)；CD52；表皮生长因子受体 (EGFR)；血管内皮生长因子 (VEGF)；DNA/组蛋白复合物；癌胚抗原 (CEA)；CD47；VEGFR2 (血管内皮生长因子受体 2 或含激酶插入结构域的受体, KDR)；上皮细胞粘附分子 (Ep-CAM)；成纤维细胞活化蛋白 (FAP)；Trail 受体-1 (DR4)；孕酮受体；肿瘤胚胎抗原 CA 19.9；和血纤维蛋白。
55. 根据权利要求 53 或 54 所述的检定，其中所述载体为单克隆抗体。
56. 根据权利要求 55 所述的检定，其中所述单克隆抗体特异性结合选自由以下组成的群组的抗原：5T4；CD19；CD20；CD22；CD33；路易斯 Y 抗原；HER-2；免疫球蛋白 G 的 I 型 Fc 受体 (Fc γ R1)；CD52；表皮生长因子受体 (EGFR)；血管内皮生长因子 (VEGF)；DNA/组蛋白复合物；癌胚抗原 (CEA)；CD47；VEGFR2 (血管内皮生长因子受体 2 或含激酶插入结构域的受体, KDR)；上皮细胞粘附分子 (Ep-CAM)；成纤维细胞活化蛋白 (FAP)；Trail 受体-1 (DR4)；孕酮受体；肿瘤胚胎抗原 CA 19.9；和血纤维蛋白。
57. 根据权利要求 36 至 56 中任一权利要求所述的检定，其中所述含有碳水化合物部分的药物是选自由以下组成的群组：细胞毒性剂；放射性治疗剂；免疫调节剂；抗血管生成剂；抗增殖剂；促细胞凋亡剂；化疗剂；和治疗性核酸。
58. 根据权利要求 57 所述的检定，其中所述含有碳水化合物部分的药物为细胞毒性剂。
59. 根据权利要求 58 所述的检定，其中所述细胞毒性剂为微管蛋白聚合抑制剂；结合

并破坏 DNA 的烷化剂；蛋白质合成抑制剂；或酪氨酸激酶抑制剂。

60. 根据权利要求 59 所述的检定，其中所述细胞毒性剂是选自加里刹霉素、噻替派、紫杉烷、长春新碱、道诺霉素、多柔比星、表柔比星、放线菌素、安曲霉素、重氮丝氨酸、博来霉素、他莫昔芬、伊达比星、海兔毒素、哈密特林和类美登素。
61. 根据权利要求 57 所述的检定，其中所述细胞毒性剂为加里刹霉素。
62. 根据权利要求 61 所述的检定，其中所述加里刹霉素为 N-乙酰基 γ 二甲基酰肼加里刹霉素。
63. 根据权利要求 62 所述的检定，其中所述 N-乙酰基 γ 二甲基酰肼加里刹霉素是与载体单克隆抗体结合，并且所述载体-药物结合物是选自由以下组成的组合物的群组：CMC-544；CME-548；CMD-193；和吉妥珠单抗奥唑米星 (gemtuzumab ozogamicin)。
64. 根据权利要求 61 至 63 中任一权利要求所述的检定，其中所述其它碳水化合物为甲基糖苷。
65. 根据权利要求 36 至 64 中任一权利要求所述的检定，其中所述捕获剂是选自由以下组成的群组：5T4；CD19；CD20；CD22；CD33；路易斯 Y 抗原；HER-2；免疫球蛋白 G 的 I 型 Fc 受体 (Fc γ R1)；CD52；表皮生长因子受体 (EGFR)；血管内皮生长因子 (VEGF)；DNA/组蛋白复合物；癌胚抗原 (CEA)；CD47；VEGFR2 (血管内皮生长因子受体 2 或含激酶插入结构域的受体，KDR)；上皮细胞粘附分子 (Ep-CAM)；成纤维细胞活化蛋白 (FAP)；Trail 受体-1 (DR4)；孕酮受体；肿瘤胚胎抗原 CA 19.9；和血纤维蛋白。
66. 根据权利要求 36 至 64 中任一权利要求所述的检定，其中所述捕获剂为抗加里刹霉素抗体。
67. 根据权利要求 36 至 66 中任一权利要求所述的检定，其如实例 7 中进一步描述。
68. 根据权利要求 29 或 30 所述的检定，其中所述与所述特异性结合所述含有碳水化合物

物部分的药物的抗体结合的化合物是通过结合一种或多种连续中间化合物来检测，其中所述连续中间化合物中的一者或多者包含可检测标记。

免疫检定中由抗碳水化合物抗体引起的干扰的消除

技术领域

本发明针对大致说来用于检测抗药物抗体并且具体说来用于检测药物具有碳水化合物部分的抗药物抗体的检定。本发明还针对大致说来用于检测药物并且具体说来用于检测具有碳水化合物部分的药物的检定。本发明进一步针对鉴别适于利用含有碳水化合物部分的药物治疗的个体的方法。

背景技术

糖蛋白被越来越多地应用于治疗和诊断癌症、感染和免疫疾病。具体说来，来自各种物种的单克隆抗体以及嵌合或“人源化”抗体是临床上获得越来越多使用的糖蛋白类别。当对个体投与时，患者有时会对这些抗体产生免疫应答。由治疗前与治疗后输注抗体的血清或血浆的反应性之间的差异来确定所述应答。

管理机构需要监测和定量接受治疗的患者体内对于药物和或蛋白质的人免疫应答。然而，在一些情况下，人血清或血浆对单克隆抗体的给药前反应性很高，并且可能干扰针对糖蛋白的特异性免疫应答的监测和定量。此外，还注意到，未曾暴露于用作治疗剂的某些抗体的个体通常在利用治疗性蛋白质时会展现治疗前血清反应性。这种反应性可归因于人血清或血浆中存在对抗体且具体说来对所投与的糖蛋白的碳水化合物部分具有反应性的“天然抗体”。（例如，参看罗伯特 G.汉密尔顿（*Robert G. Hamilton*）和 N.弗兰克林安德金森（*N. Franklin Adkinson*），天然存在的碳水化合物抗体：固相免疫检定中的干扰（*Naturally Occurring Carbohydrate Antibodies: Interference in Solid-Phase Immunoassays*）。免疫方法杂志（*Journal of Immunological Methods*），77（1985）95-108.）；“汉密尔顿（Hamilton）”。另外，还观察到，抗碳水化合物抗体可充当免疫检定中干扰的来源。朱斯图斯安德多因（*Justus Adédoyin*），S.G.O. 乔纳森（*S.G.O. Johansson*），汉斯哥罗伦德（*Hans Grönlund*），玛瑞尼范汉格（*Marianne van Hage*）。免疫检定中对动物蛋白的碳水化合物部分具有特异性的人 IgM 所造成的干扰（*Interference in immunoassays by human IgM with specificity for the carbohydrate moiety of animal proteins*）。免疫方法杂志（*Journal of Immunological Methods*），310（2006）117-125）。

汉密尔顿揭示出，可利用对中性抗体具有反应性的可溶性或固相碳水化合物预先吸附个体血清，从而去除这些中性抗体对人血清免疫检定分析中的碳水化合物造成的干扰。另外，美国专利第 5,856,106 号中揭示一种通过使糖蛋白治疗之后从个体获得的体液样品与已修饰成具有经氧化的碳水化合物部分的糖蛋白接触，来测定经糖蛋白治疗的个体中对于所述糖蛋白的特异性免疫应答水平的方法。

由于当将糖蛋白作为治疗剂投与时，利用糖蛋白所产生的治疗前血清反应性可能掩盖或增大对于所述糖蛋白的实际免疫应答，故需要在评定潜在治疗性糖蛋白的免疫反应性之前降低所述反应性。

发明内容

本发明报导具有碳水化合物部分的药物存在治疗前血清反应性，其中所述碳水化合物部分不与糖蛋白直接缔合。已发现，包含药物加里刹霉素（calicheamicin）与使加里刹霉素靶向一种或多种特定细胞类型的单克隆抗体的结合物的药物-载体结合物可与治疗前或原生人类和猴血清反应。治疗前反应性是特异性针对药物-载体结合物的加里刹霉素部分，并且具体说来是针对加里刹霉素的碳水化合物部分。另外还发现，在治疗前血清中提供其它碳水化合物可去除血清与加里刹霉素的背景反应性。

因此，一方面，本发明提供一种检测含有抗体的流体样品中针对含有碳水化合物部分的药物的抗体的存在的检定，所述检定包含以下步骤：组合（i）所述样品与（ii）含有碳水化合物部分的药物和（iii）其它碳水化合物；和检测所述样品中的抗体与含有碳水化合物部分的药物之间是否发生特异性结合；其中所述含有碳水化合物部分的药物不包含糖蛋白。

另一方面，本发明提供一种检测含有抗体的流体样品中含有碳水化合物部分的药物的存在的检定，所述检定包含：组合（i）所述样品与（ii）特异性结合所述含有碳水化合物部分的药物的捕获剂和（iii）其它碳水化合物；和检测所述样品中含有碳水化合物部分的药物与所述捕获剂之间是否发生特异性结合；其中所述含有碳水化合物部分的药物不包含糖蛋白。

另一方面，本发明提供一种检测含有抗体的流体样品中针对含有碳水化合物部分的药物的抗体的存在的检定，所述检定包含以下步骤：a) 组合（i）所述流体样品与（ii）含有碳水化合物部分的药物和（iii）其它碳水化合物；和 b) 检测所述样品中的抗体与含有碳水化合物部分的药物之间是否发生特异性结合；其中在检测样品中的抗体与含有碳水化合物部分的药物之间是否发生特异性结合之前，所述其它碳水化合物未经流体样

品预先吸附。

另一方面，本发明提供一种检测含有抗体的流体样品中含有碳水化合物部分的药物的存在的检定，所述检定包含：组合（i）所述样品与（ii）特异性结合所述含有碳水化合物部分的药物的捕获剂和（iii）其它碳水化合物；和检测所述样品中含有碳水化合物部分的药物与所述捕获剂之间是否发生特异性结合；其中在检测所述捕获剂与含有碳水化合物部分的药物之间是否发生特异性结合之前，所述其它碳水化合物未经流体样品预先吸附。

在一个实施例中，本发明提供任一种或多种本文所述的检定，其中所述检定是在个体暴露于含有碳水化合物部分的药物之后，针对来自所述个体的流体样品进行。

在另一实施例中，本发明提供任一种或多种本文所述的检定，其中所述检定是在个体暴露于含有碳水化合物部分的药物之前（即，未曾接受治疗的个体）针对流体样品进行。在所述实施例中，所述检定提供有关未曾接受治疗的个体中是否存在特异性结合含有碳水化合物部分的药物的预先存在的内源性抗体的信息。

在一些实施例中，可利用有关未曾接受治疗的个体中是否存在特异性结合含有碳水化合物部分的药物的预先存在的内源性抗体的信息来鉴别很可能应答利用含有碳水化合物部分的药物进行的治疗的个体。

在针对来自未曾接受治疗的个体的流体样品进行所述检定的一些实施例中，所述检定可进一步包含在个体暴露于药物之前来自所述个体的样品与在同个体暴露于药物之后来自所述个体的样品之间的比较分析，其中暴露后，样品中针对含有碳水化合物部分的药物的抗体的量将指示对于所述药物的免疫应答。

在针对来自未曾接受治疗的个体的流体样品进行所述检定的一些实施例中，添加其它碳水化合物达到一定的最终浓度，以致能去除由未曾接受治疗的个体的血清中存在的治疗前内源性抗碳水化合物抗体引起的与含有碳水化合物部分的药物的任何反应性。

在另一实施例中，本发明提供任一种或多种本文所述的检定，其中来自个体的流体样品包含以下至少一者：全血；血清；粘液；唾液；初乳；和血浆。

在另一实施例中，本发明提供任一种或多种本文所述的检定，其中检测步骤包含夹心检定（sandwich assay）、桥接检定（bridging assay）和竞争结合检定中的一者或多者。

在另一实施例中，本发明提供任一种或多种本文所述的检定，其中检测步骤包含以下至少一者：检测或测量与样品接触的固体光学表面处的折射率变化；检测或测量发光性变化；检测或测量颜色变化；检测或测量放射性变化；使用生物薄膜干涉技术（biolayer interferometry）进行检测或测量；使用悬臂检测（cantilever-detection）进行检测或测量；

使用无标记本征成像技术进行检测或测量；和使用声学检测进行检测或测量。

在另一实施例中，本发明提供任一种或多种本文所述的检定，其中检测步骤包含选自以下组成的群组的检定：酶联免疫吸附检定（ELISA）；电致化学发光检定（ECL）；放射免疫检定（RIA）；固相放射免疫检定（SPRIA）；免疫印迹；免疫沉淀；荧光活化细胞分选（FACS）；和免疫染色。

在另一实施例中，本发明提供任一种或多种本文所述的检定，其中所述其它碳水化合物为以下一者或多者：细菌脂多糖（LPS）、葡聚糖、果聚糖、肺炎球菌多糖、琼脂糖、纤维素、角叉菜胶和甲基糖苷，或任一种前述碳水化合物的功能片段。

在另一实施例中，本发明提供任一种或多种本文所述的检定，其中所述其它碳水化合物是以介于约 10 ng/ml 与约 1 mg/ml 之间的浓度存在于组合中。在另一实施例中，所述其它碳水化合物是以介于约 10 ng/ml 与约 0.5 mg/ml 之间的浓度存在于组合中。在另一实施例中，所述其它碳水化合物是以介于约 100 ng/ml 与约 0.5 mg/ml 之间的浓度存在于组合中。在另一实施例中，所述其它碳水化合物是以介于约 100 ng/ml 与约 0.75 mg/ml 之间的浓度存在于组合中。在另一实施例中，所述其它碳水化合物是以介于约 100 ng/ml 与约 0.25 mg/ml 之间以及其间任何范围（包括其部分）的浓度存在于组合中。

在另一实施例中，本发明提供任一种或多种本文所述的检定，其中含有碳水化合物部分的药物另外包含与所述药物结合的载体。在一些实施例中，所述载体是选自以下组成的群组：单克隆和多克隆抗体及其经化学或遗传方式处理的对应物；其抗原识别片段以及其经化学或遗传方式处理的对应物；小型组合式免疫治疗药物（small modular immunopharmaceutical, SMIP）以及其经化学或遗传方式处理的对应物；纳米抗体（nanobody）以及其经化学或遗传方式处理的对应物；可溶性受体以及其经化学或遗传方式处理的对应物；生长因子以及其经化学或遗传方式处理的对应物；适体；脂质体；非糖基化蛋白；和纳米粒子。在一些实施例中，所述载体特异性结合癌细胞上或癌细胞内表达的抗原。在一些实施例中，所述癌细胞上或癌细胞内表达的抗原是选自以下组成的群组：5T4；CD19；CD20；CD22；CD33；路易斯 Y 抗原（Lewis Y）；HER-2；免疫球蛋白 G 的 I 型 Fc 受体（Fc γ R1）；CD52；表皮生长因子受体（EGFR）；血管内皮生长因子（VEGF）；DNA/组蛋白复合物；癌胚抗原（CEA）；CD47；VEGFR2（血管内皮生长因子受体 2 或含激酶插入结构域的受体，KDR）；上皮细胞粘附分子（Ep-CAM）；成纤维细胞活化蛋白（FAP）；Trail 受体-1（DR4）；孕酮受体；肿瘤胚胎抗原（oncofetal antigen）CA 19.9；和血纤维蛋白。

在另一实施例中，本发明提供一种或多种本文所述的检定，其中所述载体为单克隆

抗体。在一些实施例中，所述单克隆抗体是选自由以下组成的群组：抗 CD22 单克隆抗体；抗 5T4 单克隆抗体；抗 CD33 抗体；和抗路易斯 Y 抗原单克隆抗体。

在另一实施例中，本发明提供一种或多种本文所述的检定，其中含有碳水化合物部分的药物是选自由以下组成的群组：细胞毒性剂；放射性治疗剂；免疫调节剂；抗血管生成剂；抗增殖剂；促细胞凋亡剂；化疗剂；治疗性核酸；微管蛋白聚合抑制剂；结合并破坏 DNA 的烷化剂；蛋白质合成抑制剂；和酪氨酸激酶抑制剂。可对含有一种以上含有碳水化合物部分的药物或暴露于一种以上含有碳水化合物部分的药物的流体样品进行本文所述的检定。本文所述的检定可包括含有碳水化合物部分的药物的部分或功能片段。

在其它实施例中，本发明提供任一种或多种本文所述的检定，其中含有碳水化合物部分的药物为细胞毒性剂，其选自：加里刹霉素、噻替派 (thiotepa)、紫杉烷 (taxane)、长春新碱 (vincristine)、道诺霉素 (daunorubicin)、多柔比星 (doxorubicin)、表柔比星 (epirubicin)、放线菌素 (actinomycin)、安曲霉素 (anthramycin)、重氮丝氨酸 (azaserine)、博来霉素 (bleomycin)、他莫昔芬 (tamoxifen)、伊达比星 (idarubicin)、海兔毒素 (dolastatin/auristatin)、哈密特林 (hemiasterlin) 和类美登素 (maytansinoid)。在一些优选实施例中，细胞毒性剂为加里刹霉素，并且在一些实施例中可为 N-乙酰基 γ 二甲基脯加里刹霉素。

在另一实施例中，本发明提供如本文所述的检定，其中针对具有碳水化合物部分的药物或含有碳水化合物部分的药物的抗体是通过结合捕获剂来检测。

在一些实施例中，特异性结合抗药物抗体的捕获剂包含具有碳水化合物部分的药物，或者所述含有碳水化合物部分的药物的一部分或功能片段。

在一些实施例中，特异性结合抗药物抗体的捕获剂为含有碳水化合物部分的药物的碳水化合物部分，或者含有碳水化合物部分的药物的功能片段或部分。

在一些实施例中，含有碳水化合物部分的药物和捕获剂为 S-[(2R,4S,6S)-6-({[(2R,4S,5R)-5-({(2S,4S,5S)-5-[乙酰基(乙基)氨基]-4-甲氧基四氢-2H-吡喃-2-基}氧基)-4-羟基-6-甲氧基-2-甲基四氢-2H-吡喃-3-基]氨基}氧基)-4-羟基-2-甲基四氢-2H-吡喃-3-基]4-[(2S,3R,4R,5S,6S)-3,5-二羟基-4-甲氧基-6-甲基四氢-2H-吡喃-2-基]氧基]-3-碘-5,6-二甲氧基-2-甲基苯硫代甲酸酯。

在一些实施例中，特异性结合具有碳水化合物部分的药物的捕获剂包含针对含有碳水化合物部分的药物的抗体。在含有碳水化合物部分的药物包含载体-药物结合物的一些实施例中，特异性结合具有碳水化合物部分的药物的捕获剂包含特异性结合载体-药物结

合物的载体部分的靶。

在含有碳水化合物部分的药物包含载体-药物结合物的一些实施例中,特异性结合具有碳水化合物部分的药物的捕获剂包含以下各物的至少一部分: 5T4; CD19; CD20; CD22; CD33; 路易斯 Y 抗原; HER-2; 免疫球蛋白 G 的 I 型 Fc 受体 (Fc γ R1); CD52; 表皮生长因子受体 (EGFR); 血管内皮生长因子 (VEGF); DNA/组蛋白复合物; 癌胚抗原 (CEA); CD47; VEGFR2 (血管内皮生长因子受体 2 或含激酶插入结构域的受体, KDR); 上皮细胞粘附分子 (Ep-CAM); 成纤维细胞活化蛋白 (FAP); Trail 受体-1 (DR4); 孕酮受体; 肿瘤胚胎抗原 CA 19.9; 和血纤维蛋白, 其中所述部分特异性结合载体-药物结合物的载体部分。

在另一实施例中, 通过经标记化合物与针对含有碳水化合物部分的药物的经结合抗体的结合, 来检测所述抗体。在一些优选实施例中, 经标记化合物包含另外包含可检测标记的捕获剂; 或另外包含可检测标记的二次抗体或抗体片段, 其中所述二次抗体特异性结合经结合抗体。在一些实施例中, 可检测标记包含酶标记、发光标记和放射性同位素标记中的至少一者。

在一些实施例中, 本发明在实例 1 到 8 中的任一者或多者中提供如本文所述的检定。

在一些实施例中, 利用也特异性结合含有碳水化合物部分的药物的经标记化合物来检测结合捕获剂的所述药物的存在。在一些实施例中, 经标记化合物是选自由以下组成的群组: 另外包含可检测标记的捕获剂; 和另外包含可检测标记的抗体, 其中所述抗体特异性结合所述药物。在一些实施例中, 所述可检测标记包含至少一种选自由酶标记、发光标记和放射性同位素标记组成的群组的标记。

在一些实施例中, 检测含有抗体的流体样品中针对含有碳水化合物部分的药物的抗体的存在或含有碳水化合物部分的药物的存在的检定包含以下至少一者: 测量与样品接触的固体光学表面处的折射率变化; 测量发光性变化; 测量颜色变化; 和测量放射性变化。

在一些实施例中, 检测含有抗体的流体样品中针对含有碳水化合物部分的药物的抗体的存在或含有碳水化合物部分的药物的存在的检定包含选自由以下组成的群组的检定: ELISA; ECL; RIA; SPRIA; 免疫印迹; 免疫沉淀; 和免疫染色。

附图说明

图 1 为原生血清中存在特异性结合加里刹霉素的干扰因子的图示。

图 2 绘示与抗体结合的加里刹霉素的图解。

图 3 为利用各种浓度的脱毒脂多糖滴定的血清中加里刹霉素特异性结合减少的图示。

图 4 为利用各种浓度的加里刹霉素的碳水化合物部分甲基糖苷滴定的血清中加里刹霉素特异性结合减少的图示。

图 5 为描述利用各种浓度的脱毒脂多糖滴定的血清中加里刹霉素特异性结合减少的图示。

图 6 绘示来自结合 IgM 的加里刹霉素特异性血清的加里刹霉素特异性 IgM 的图示。

图 7 绘示来自结合加里刹霉素的加里刹霉素特异性血清的 IgM 的图示。

图 8 绘示原生人类血清中存在加里刹霉素特异性结合因子的图示。

图 9 绘示 S-[(2R,4S,6S)-6-({[(2R,4S,5R)-5-({(2S,4S,5S)-5-[乙酰基(乙基)氨基]-4-甲氧基四氢-2H-吡喃-2-基}氧基)-4-羟基-6-甲氧基-2-甲基四氢-2H-吡喃-3-基]氨基}氧基)-4-羟基-2-甲基四氢-2H-吡喃-3-基]4-{{[(2S,3R,4R,5S,6S)-3,5-二羟基-4-甲氧基-6-甲基四氢-2H-吡喃-2-基]氧基}-3-碘-5,6-二甲氧基-2-甲基苯硫代甲酸酯)。

具体实施方式

所开发的用于全身药物疗法的药物结合物为靶特异性细胞毒性剂。所述概念涉及使治疗剂与对指定靶细胞群具有特异性的载体分子偶合。如本文所使用，所述药物结合物也称为“载体-药物结合物”。

对抗原具有高亲和力的抗体为靶部分或载体-药物结合物的“载体”部分的自然选择。由于高亲和力单克隆抗体的可用性，靶向抗体的治疗剂的前景变得让人乐观。已结合单克隆抗体的有毒物质包括毒素、低分子量细胞毒性药物、生物应答调节剂（biological response modifier）和放射性核素。抗体-毒素结合物通常称为免疫毒素，而由抗体和低分子量药物（例如氨甲喋呤（methothrexate）和阿霉素（Adriamycin））组成的免疫结合物则被称为化学免疫结合物。免疫调节剂含有已知具有调控功能的生物应答调节剂，例如淋巴因子（lymphokine）、生长因子和补体活化的眼镜蛇毒因子（CVF）。放射性免疫结合物是由放射性同位素组成，其可用作通过其辐射杀死细胞的治疗剂或用于成像。预期抗体介导的细胞毒性药物向肿瘤细胞的特异性传递不仅会增大所述药物的抗肿瘤功效，而且还防止正常组织的非靶向吸收，由此增加所述药物的治疗指数。

多种用于治疗多种疾病（包括癌症和类风湿性关节炎）的基于抗体的治疗剂已获批准用于临床使用，或用于有关多种恶性肿瘤（包括 B 细胞恶性肿瘤，例如非霍奇金氏淋巴瘤（Non-Hodgkin's lymphoma））的临床试验中。一种此类基于抗体的治疗剂为利妥昔单

抗 (rituximab) (利妥昔 (Rituxan.TM.)) 其是一种未经标记的嵌合人类 $\gamma 1$ (+m $\gamma 1$ V-区) 抗体, 其对 B 细胞上表达的细胞表面抗原 CD20 具有特异性。这些基于抗体的治疗剂取决于针对 B 细胞的补体介导的细胞毒性 (CDCC) 或抗体依赖性细胞毒性 (ADCC), 或者取决于放射性核素 (例如 ^{131}I 或 ^{90}Y) 的使用, 而所述放射性核素对于临床医师和患者存在有关制备和使用的问题。因此, 需要产生可克服当前基于抗体的治疗剂治疗多种恶性肿瘤 (包括造血系统恶性肿瘤, 如非霍奇金氏淋巴瘤 (NHL)) 的缺点的免疫结合物, 其可容易且有效地制备, 并可反复使用而不会诱导免疫应答。

已开发出包含有效抗细菌剂和抗肿瘤剂家族的成员的免疫结合物 (统称为加里刹霉素或 LL-E33288 复合物) (参看美国专利第 4,970,198 号(1990)), 用于治疗骨髓瘤。一种最有效的加里刹霉素被称为 γ_1 , 其在本文中简称为 γ 。这些化合物含有甲基三硫醚, 其可与适当硫醇反应形成二硫醚, 同时这些化合物还引入例如酰肼等官能团, 或可用于将加里刹霉素衍生物与载体连接的其它官能团。(参看美国专利第 5,053,394 号)。

原生血清中特异性结合含有碳水化合物部分的药物的碳水化合物部分或载体药物结合物 (其中所述结合物的药物部分含有碳水化合物部分) 的抗体的存在可干扰检测 (i) 响应载体药物结合物而产生的抗体或 (ii) 具有碳水化合物的药物或载体药物结合物的免疫检定。现已确定, 所述干扰包括特异性结合不与糖蛋白或载体药物结合物的糖蛋白部分缔合的碳水化合物的内源性抗体。

举例来说, 如果将药物用作捕获对所述药物具有特异性的抗体的靶, 那么当内源性抗碳水化合物部分抗体结合所述捕获剂时, 可能存在假阳性反应 (或数量增加)。另外, 在将针对所述药物的捕获剂与经标记化合物组合用于检测血清中的药物的检定中, 如果经结合抗体干扰经标记化合物的结合, 那么由于抗碳水化合物抗体与所述药物结合, 阻止或减少了经标记化合物与所述药物的结合, 致使可能存在假阴性 (或数量减少)。

本文中报导, 检测含有抗体的流体样品中抗载体-药物结合物抗体与所述载体-药物结合物之间的特异性结合的检定中其它碳水化合物的存在将使得能够特异性检测响应个体暴露于所述载体-药物结合物而产生的抗载体-药物结合物抗体。在检测抗载体-药物结合物抗体与载体-药物结合物之间的特异性结合之前, 所述其它碳水化合物无须经流体样品预先吸附。由于添加到检定中的其它碳水化合物将去除在暴露于药物之前已经存在的任何活性, 故可能进行特异性检测。

同样地, 检测含有抗体的流体样品中捕获剂与载体-药物结合物之间的特异性结合的检定中其它碳水化合物的存在将使得能够特异性检测载体-药物结合物抗体。在检测捕获剂与载体-药物结合物之间的特异性结合之前, 所述其它碳水化合物无须经流体样品预先

吸附。由于添加到检定中的其它碳水化合物将去除样品中存在的预先存在的抗药物抗体的任何遮蔽活性，故可能进行特异性检测。

将其它碳水化合物添加到血清中，以便排除血清中的内源性抗体与含有碳水化合物部分的药物的结合效应。可利用原生血清来滴定其它碳水化合物的量以便在试图减少背景时，确定最佳添加量。如果含有碳水化合物部分的药物的分析和检测将取决于不结合碳水化合物部分的捕获剂，那么可添加过量的其它碳水化合物。

特异性结合检定技术的开发提供了测定以极低浓度出现在各种液体或固体（例如组织）样品中的各种具有诊断、医学、环境和工业重要性的物质的极其有用的分析方法。特异性结合检定是基于待测定的可结合分析物与其结合搭配物（即，分析物特异性部分）之间的特异性相互作用。分析物特异性部分的结合和任何其它试剂的相互作用必要时会实现经结合和未结合的结合标记分析物的机械分离，或以调节可检测信号的方式影响标记。前一种情况一般被称为异源的，而后一种情况则被称为同源的，这是因为后一种情况无需分离步骤。

美罗他格[®]（MYLOTARG[®]）（E. L.希文斯（Sievers, E. L.）等人，(1999) 血液学（Blood）：93, 3678-3684）也称为 CMA-676 或 CMA，是一种包含与作为载体的单克隆抗体结合的加里刹霉素的市售药物。美罗他格[®]（吉妥珠单抗奥唑米星（gemtuzumab ozogamicin））当前获批用于治疗老年患者的急性髓细胞白血病。所述药物是由借助于酸可水解的连接基与加里刹霉素结合的 CD33 抗体组成。半合成 N-乙酰基 γ 加里刹霉素的二硫醚类似物可用于结合（美国专利第 5,606,040 号和第 5,770,710 号）。

在常规的标记结合物特异性结合检定技术中，将待检定的液体介质的样品与各种试剂组合物组合。所述组合物包括标记结合物，其包含合并有标记的结合组分。所述结合物中的结合组分与试剂组合物的其它成分（如果存在的话）以及待检定介质中的配体一起参与形成结合反应系统，从而产生两种物质或结合物形式，例如经结合物质（结合物复合物）和游离物质。在经结合物质中，所述结合物的结合组分与相应的结合搭配物结合，而在游离物质中，结合组分未如此结合。产生经结合物质（相对游离物质）的结合物的量或比例随测试样品中待检测的分析物的存在（或量）而变化。

特异性结合检定的另一种型式为“夹心”检定方案，其中靶分析物结合于第一特异性结合搭配物（其直接固定于固体基质上，或经由键联基团固定于固体基质上）与第二特异性结合搭配物（其与产生或标记系统的信号有关）之间。

所属领域中还知道其它免疫检定型式和方案，并且其适用于本发明中。推荐使用直接固定结合检定反应中的一种结合参与物的固定材料或可固定材料（例如固定抗原或抗

体) 以便实现所需的经标记试剂的经结合与游离形式的分离的各种结合检定。具体说来, 已描述多种此类结合检定, 其中针对待检测抗原的抗体与固定材料(例如试管内壁或者塑料珠或磁珠) 结合。

美国专利第 4,243,749 号揭示一种竞争结合检定, 其中反应是在试管中进行, 所述试管使得针对待测定的半抗原的特异性抗体不溶解或固定于试管内壁上。所述反应包括经标记半抗原结合物, 其中变得与试管壁结合的经标记半抗原结合物的量与待测定的半抗原的量成反比。

另一种此类结合检定描述于美国专利第 4,230,683 号中, 所述专利揭示一种使用结合有抗原或抗体的 6 毫米聚苯乙烯珠的方法, 其中所述抗原或抗体与针对所述抗原或抗体的结合半抗原的抗体反应。经结合的结合半抗原的抗体进一步与经标记的抗半抗原抗体反应, 以便测定测试样品中抗原或抗体的量。

另一种此类结合检定描述于美国专利第 4,228,237 号中, 所述专利揭示一种在特异性结合过程中使用酶标记的抗生物素蛋白和生物素标记的试剂来检测和测定液体介质中的配体的方法。在这一方法中, 使待检测的配体与含有特异性结合所述配体的物质的不可溶相接触。

除前文所述的直接固定技术外, 还推荐间接固定技术, 其是通过用第一结合物质标记 (marking 或 labeling) 待固定的结合检定反应参与物, 随后添加固定的第二结合物质来进行。

举例来说, 美国专利第 4,298,685 号中揭示一种酶免疫检定, 其中将含有待测定的生物物质的样品与经生物素标记的针对所述生物物质的抗体以及待检定物质的酶标记形式混合。随后添加固定形式的抗生物素蛋白, 其中所述抗生物素蛋白结合经生物素标记的抗体, 以固定所述酶标记试剂的抗体结合部分。同样, 英国专利申请案第 GB 2,084,317A 号揭示一种使用与固体材料结合的抗生物素蛋白和经生物素标记的抗原的抗原连接的竞争性酶免疫检定。放射性标记和酶标记的免疫检定都需要某种类型的分离步骤。近来, 揭示一种不同的方法, 其不需要分离步骤, 并因此被称为同源系统, 与必需分离的异源系统形成对比。美国专利第 3,817,837 号揭示一种竞争结合检定方法, 其涉及以下步骤: 组合待检定的液体与可溶性复合物(其由与待检测配体共价结合的作为标记物质的酶组成) 和所述配体的可溶性受体(通常为抗体); 和分析待检定液体对所述复合物中的酶的酶活性的影响。

此外, 经标记试剂可包括其它常规的可检测化学基团。所述可检测化学基团可为任何具有可检测的物理或化学特性的材料。所述材料在免疫检定领域中得到良好开发, 并

且一般适用于所述方法中的任何标记都可用于本发明。特别有用的是酶活性基团，例如酶（参看临床化学杂志（Clin. Chem.）(1976)22:1243）、酶底物（参看美国专利第 4,492,751 号）、辅基或辅酶（参看美国专利第 4,230,797 号和第 4,238,565 号）和酶抑制剂（参看美国专利第 4,134,792 号）；自旋标记；荧光剂（参看临床化学杂志（Clin. Chem.）(1979)25:353）；发色团；发光物质（luminescer），例如化学发光物质和生物发光物质（参看美国专利第 4,380,580 号）；可特异性结合的配体（例如生物素和半抗原）；电活性物质；和放射性同位素，例如 ^3H 、 ^{35}S 、 ^{32}P 、 ^{125}I 和 ^{14}C 。所述标记和标记对是根据其自身的物理特性（例如荧光剂、发色团和放射性同位素）或其反应性或结合特性（例如酶、底物、辅酶和抑制剂）来检测。

定义

除非上下文另作清楚指示，否则如本说明书和随附权利要求书中所使用，单数形式“一”和“所述”包括多个参考物。因此，例如提及“一抗体”包括多种所述组合物，即“多种抗体”。

术语“约”意思指在所述测量值或浓度的 20% 以内，更优选在 10% 以内，并且更优选在 5% 以内。

如本文所使用，术语“其它碳水化合物”是指可与结合血清中的内源抗体的碳水化合物竞争的碳水化合物。免疫检定中细菌脂多糖（LPS）、甲基糖苷、葡聚糖、果聚糖、肺炎球菌多糖、琼脂糖、纤维素或角叉菜胶的使用可阻断一般与碳水化合物结合的抗体的结合。添加这些碳水化合物中的任一者都将允许所述检定中的其它试剂结合单独或作为载体-药物结合物的一部分的 N-乙酰基 γ 二甲基酰肼的非碳水化合物区的特异性结合，由此减少由血清中的抗碳水化合物抗体产生的非特异性背景信号。此外，适当碳水化合物的选择可涉及特异性结合药物-载体结合物的碳水化合物。

除非上下文另作明确指示，否则如本文所使用，术语“抗体”打算包括以下一者或多者：单克隆和多克隆抗体及其经化学或遗传方式处理的对应物；其抗原识别片段以及其经化学或遗传方式处理的对应物；和包含其抗原识别片段的合成分子。

如本文所使用，短语“其它碳水化合物”还打算涵盖与含有碳水化合物部分的药物连接的同一种碳水化合物或其片段，以及特异性模拟所述含有碳水化合物部分的药物的碳水化合物部分的其它碳水化合物或其片段。为了特异性模拟含有碳水化合物部分的药物的碳水化合物部分，所述碳水化合物或其片段应特异性结合与所述药物的碳水化合物部分结合的同一种靶和受体化合物。

“桥接检定”是指一种免疫检定，其中捕获系统为含有样品分析物的免疫复合物，

所述样品分析物是在溶液中形成，随后由连接所述免疫复合物与固相的桥接元件捕获。与结合所述桥接元件的元件共价偶合的可检测标记可用于检测结合事件。

如本文所使用，术语“捕获剂”打算包括任何特异性结合相应靶的组合物。举例来说，相应靶（其为含有碳水化合物部分的药物）的捕获剂包括（但不限于）特异性结合所述含有碳水化合物部分的药物的抗体，以及所述含有碳水化合物部分的药物的任何特异性结合搭配物。举例来说，如果含有碳水化合物部分的药物另外包含与所述药物结合的抗体，那么所述抗体的抗原结合结构域的靶也为所述含有碳水化合物部分的药物的捕获剂。此外，如果含有碳水化合物部分的药物具有相应的受体结合搭配物，或包含具有相应的结合搭配物的受体的可溶形式，那么所述受体与受体结合搭配物互为捕获剂。

术语“竞争检定”是指一种利用异源样品中未经标记的分析物与共价连接可检测标记的元件（主要为抗体或抗原）竞争的能力来测量所述分析物的检定。未经标记的分析物和经标记分子将彼此竞争与固定于固相上的捕获剂结合。由于捕获剂上的结合位点已经被占据，故所述未经标记的分析物会阻断经标记分子结合的能力。因此，在竞争性免疫检定中，在所述检定中测量到较少标记就意味着存在较多的未经标记的分析物。异源样品中抗原的量与所测量的标记的量呈反向关系。

术语“细胞毒素”或“细胞毒性剂”一般是指抑制或阻止细胞功能和/或导致细胞受到破坏的试剂。代表性细胞毒素包括抗生素、微管蛋白聚合抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、结合并破坏 DNA 的烷化剂，以及破坏蛋白质合成或必需细胞蛋白（例如蛋白激酶、磷酸酶、拓扑异构酶、酶和细胞周期蛋白）的功能的试剂。代表性细胞毒素包括（但不限于）多柔比星、道诺霉素、伊达比星、阿柔比星（aclarbucin）、左柔比星（zorubicin）、米托蒽醌（mitoxantrone）、表柔比星、卡柔比星（carbubicin）、诺拉霉素（nogalamycin）、美诺立尔（menogaril）、吡柔比星（pitarubicin）、伐柔比星（valrubicin）、阿糖胞苷（cytarabine）、吉西他滨（gemcitabine）、曲氟尿苷（trifluridine）、安西他滨（ancitabine）、依诺他滨（enocitabine）、阿扎胞苷（azacitidine）、去氧氟尿苷（doxifluridine）、喷司他丁（pentostatin）、溴尿苷（broxuridine）、卡培他滨（capecitabine）、克拉屈滨（cladribine）、地西他滨（decitabine）、氟尿苷（floxuridine）、氟达拉滨（fludarabine）、谷氏菌素（gougerotin）、嘌呤霉素（puromycin）、替加氟（tegafur）、噻唑呋林（tiazofurin）、阿霉素、顺铂（cisplatin）、卡铂（carboplatin）、环磷酰胺（cyclophosphamide）、达卡巴嗪（dacarbazine）、长春花碱（vinblastine）、长春新碱、米托蒽醌、博来霉素、氮芥（mechlorethamine）、泼尼松（prednisone）、丙卡巴肼（procarbazine）、氨甲喋呤（methotrexate）、氟尿苷（flurouracil）、依托泊苷（etoposide）、紫杉醇（taxol）、紫杉醇

类似物、铂（例如顺铂和卡铂）、丝裂霉素（mitomycin）、噻替派、紫杉烷、长春新碱、道诺霉素、表柔比星、放线菌素、安曲霉素、重氮丝氨酸、博来霉素、他莫昔芬、伊达比星、海兔毒素、哈密特林、埃斯波霉素（esperamicin）和类美登素。

如本文所使用，术语“载体或载体分子包括（但不限于）：单克隆和多克隆抗体以及其经化学或遗传方式处理的对应物；其抗原识别片段以及其经化学或遗传方式处理的对应物；小型组合式免疫治疗药物（SMIP）以及其经化学或遗传方式处理的对应物；纳米抗体以及其经化学或遗传方式处理的对应物；可溶性受体以及其经化学或遗传方式处理的对应物；生长因子以及其经化学或遗传方式处理的对应物；适体；脂质体；非糖基化蛋白；和纳米粒子；适体；脂质体；非糖基化蛋白；和纳米粒子

“可检测标记”是指直接或间接涉及可检测信号的产生并且可与本发明的任一种免疫检定中所使用的任何抗体或抗原共价连接的任何物质或物质群组。常用的可检测标记为例如酶标记、放射性标记、发光标记、化学发光标记或磷光标记。优选标记为酶标记，并且更优选辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase, HRP），其在添加酶底物后随即会引起比色检定，所述酶底物在 HRP 的情况下为过氧化氢与 3,3',5,5'-四甲基联苯胺-2 HCl（TMB）的溶液。当共价连接到将特异性结合已经结合的所捕获分析物的抗体或抗原上时，HRP 可以直接方式使用。HRP 在作为二次试剂添加时，也可以间接方式添加到免疫检定中，例如，如果抗体或抗原经生物素标记，那么随后添加抗生物素蛋白-HRP。

如本文所使用，术语“含有碳水化合物部分的药物”是指任何具有生物或可检测活性的物质，例如治疗剂、可检测标记、结合剂等，以及前药，其在体内代谢成活性剂。术语含有碳水化合物部分的药物还包括药物衍生物，其中含有碳水化合物部分的药物已官能化，以致能与抗体或另一载体分子结合。一般将这些类型的结合物称为免疫结合物。此外，所述术语打算指含有碳水化合物部分的药物的一部分或功能片段，当其为所述药物或载体-药物结合物的一部分时，将能够结合特异性结合碳水化合物部分的抗体。因此，如本文所使用，术语含有碳水化合物部分的药物可用于载体-药物结合物（例如结合加里刹霉素的单克隆载体）的药物部分，以及药物的加里刹霉素部分或加里刹霉素的甲基糖苷部分（即，S-[(2R,4S,6S)-6-([(2R,4S,5R)-5-[(2S,4S,5S)-5-[乙酰基(乙基)氨基]-4-甲氧基四氢-2H-吡喃-2-基]氧基)-4-羟基-6-甲氧基-2-甲基四氢-2H-吡喃-3-基]氨基]氧基)-4-羟基-2-甲基四氢-2H-吡喃-3-基]4-[(2S,3R,4R,5S,6S)-3,5-二羟基-4-甲氧基-6-甲基四氢-2H-吡喃-2-基]氧基]-3-碘-5,6-二甲氧基-2-甲基苯硫代甲酸酯)）。

如本文所使用，经官能化以致能与抗体结合的含有碳水化合物部分的药物还打算包括“载体-药物结合物”的“药物”部分。作为载体-药物结合物的一部分的抗体的实例

对 CD22、5T4、CD33 和路易斯 Y 抗原具有特异性。这些抗体对特异性结合癌细胞上表达的抗原的受体具有特异性。当提及含有碳水化合物部分的药物“不包含糖蛋白”时，所述提及打算包括载体-药物结合物的载体部分可包括糖蛋白的情形。

可用作载体-药物结合物的一部分的治疗性药物的代表性非限制性实例包括细胞毒素、放射性同位素、化疗剂、免疫调节剂、抗血管生成剂、抗增殖剂、促细胞凋亡剂以及细胞抑制和细胞溶解酶（例如 RNase）。药物还可包括治疗性核酸，例如编码免疫调节剂、抗血管生成剂、抗增殖剂或促细胞凋亡剂的基因。这些药物描述术语不互相排斥，因此可使用一个或多个上述术语来描述治疗剂。举例来说，所选放射性同位素也为细胞毒素。治疗剂可制备成任一种上述物质的医药学上可接受的盐、酸或衍生物形式。一般说来，将具有放射性同位素作为药物的结合物称为放射性免疫结合物，并且将具有化疗剂作为药物的结合物称为化学免疫结合物。适用于免疫结合物中的药物的实例包括紫杉烷、类美登素、CC-1065 和倍癌霉素（duocarmycin）、加里刹霉素和其它烯二炔以及奥瑞他汀（auristatin）。其它实例包括抗叶酸剂、长春花生物碱（vinca alkaloid）和蒽环类（anthracycline）。植物毒素、其它生物活性蛋白、酶（即，ADEPT）、放射性同位素、光敏剂（即，用于光动力学疗法）也可用于免疫结合物中。此外，也可使用二次载体（例如脂质体或聚合物）作为细胞毒性剂来制备结合物。

“免疫应答”打算指脊椎动物个体的免疫系统对抗原或抗原决定基的任何应答，包括体液免疫应答（例如产生抗原特异性抗体）和细胞介导的免疫应答（例如淋巴细胞增殖）。代表性免疫调节剂包括细胞激素、黄嘌呤（xanthine）、白细胞介素、干扰素和生长因子（例如 TNF、CSF、GM-CSF 和 G-CSF），以及激素，例如雌激素（二乙基己烯雌酚、雌二醇）、雄激素（睾酮、哈乐泰斯停®（HALOTESTIN®）（氟甲睾酮（fluoxymesterone））、孕酮（梅格施®（MEGACE®）（醋酸甲地孕酮（megestrol acetate））、普维拉®（PROVERA®）（醋酸甲羟孕酮（medroxyprogesterone acetate）），和皮质类固醇（泼尼松、地塞米松（dexamethasone）、氢化可的松（hydrocortisone））。

“发光”标记包括涉及磷光、化学发光和荧光的标记。“荧光”标记是指当与蛋白质（或其它化合物）共价连接时，在经短波长激发时将展现荧光团之间的最佳能量转移并且能在特定波长（主要为紫外线）下读取的荧光团。最常用的荧光标记为荧光素和若丹明（rhodamine）的衍生物，分别为 FITC 和 TRITC。这些荧光团与抗体或抗原共价连接，并用于检测特异性结合事件。化学发光标记为由显影剂诱导形成会衰变的激发态分子，借此发射可检测的光，从而发光的标记。最常用的化学发光标记为：吖啶（acrodinium）、鲁米诺（luminol）和二氧环丁烷。吖啶和鲁米诺可由过氧化物酶反应激

发，并且可用于使用 HRP 标记的免疫检定中。磷光标记为由于物质暴露于辐射而发光并且在去除激发辐射后持续发光的标记。磷光可检测标记的实例为对异硫氰酸苯基 Pt(II)-和 Pd(II)-粪卟啉 I 的衍生物。

放射性标记是指一种放射性核素，其与蛋白质共价连接时将会衰变，随后通过检测所发射的辐射来确定结合事件的存在。用作可检测标记的常见放射性核素为： ^3H 、 ^{125}I 和 ^{35}S 。上文所列的标记可使用对各标记的性质具有特异性的检测系统来检测。

如本文所使用，当用于鉴别捕获剂、抗体或含有碳水化合物部分的药物时，术语“其一部分或功能片段”打算包括能够以与母分子相同或类似的方式特异性结合靶搭配物的相关化合物的任何部分。

如本文所使用，术语“预先混合”（“pre-mixing”或“pre-mixed”）是指在开始检定之前混合所述检定的两种或两种以上组分。举例来说，如本文所述的检定中所使用，“血清和其它碳水化合物的预先吸附”意思指在将血清或其它碳水化合物与含有碳水化合物部分的药物混合之前，预先混合或预先培育所述血清和其它碳水化合物。

术语“夹心检定”是指一种提供高灵敏性和特异性水平的非竞争性检定型式。所述型式被称为夹心是因为以下事实：分析物（包含不同抗体和抗原的异源样品）结合于（夹于）两种高特异性试剂之间。第一特异性试剂为结合到通常附着在板孔底部的固相上的捕获剂，其为纯化抗体或抗原。将异源分析物暴露于捕获剂，并且对捕获剂具有亲和力的分析物的任何成分都将与其特异性结合。添加第二高特异性结合元件。所述结合元件具有共价连接的可检测标记。随后可检测复合物，通常为抗体-抗原复合物。在非竞争性夹心检定中，经标记结合事件的测量值与样品中存在的抗原的量成正比。

术语“特异性结合”是指两个分子之间的亲和力，例如分子与其结合搭配物之间的特异性结合会引起包含所述分子和其结合搭配物以及一个或多个不同分子的异源样品中的优先结合。IgG 抗体的结合例如一般以至少约 10^{-7} M 或更高，例如至少约 10^{-8} M 或更高，或至少约 10^{-9} M 或更高，或至少约 10^{-10} M 或更高，或至少约 10^{-11} M 或更高，或至少约 10^{-12} M 或更高的亲和力为特征。在一些情况中，已知 IgM 分子具有低达 10^{-4} 的亲和力。

代表性抗血管生成剂包括血管形成抑制剂，例如法尼基转移酶抑制剂（farnesyltransferase inhibitor）、COX-2 抑制剂、VEGF 抑制剂、bFGF 抑制剂、类固醇硫酸酯酶抑制剂（例如 2-甲氧基雌二醇双氨基磺酸酯（2-MeOE2bisMATE）、白细胞介素-24、凝血蛋白、metallospodin protein、I 类干扰素、白细胞介素 12、鱼精蛋白、血管生长抑素、层粘蛋白（laminin）、内皮抑素和催乳素片段。

抗增殖剂和促细胞凋亡剂包括 PPAR- γ 活化剂（例如环戊烯酮前列腺素（cyclopentenone prostaglandin, cyPG）、类维生素 A、三萜类化合物（例如环安坦烷（cycloartane）、羽扇豆烷（lupane）、乌斯烷（ursane）、齐墩果烷（oleanane）、木栓烷（friedelane）、达玛烷（dammarane）、葫芦素（cucurbitacin）和柠檬苦素类三萜（limonoid triterpenoid））、EGF 受体（例如 HER4）抑制剂、雷帕霉素（rapamycin）、骨化三醇（CALCITRIOL.RTM.）（1,25-二羟基胆钙骨化醇（维生素 D））、芳香酶抑制剂（菲马拉（FEMARA.RTM.）（来曲唑（letrozole））、端粒酶抑制剂、铁螯合剂（例如 3-氨基吡啶-2-甲醛缩氨基硫脲（托艾平（Triapine））、凋亡素（apoptin）（病毒蛋白 3--VP3，来自鸡贫血病毒）、Bcl-2 和 Bcl-X(L)抑制剂、TNF- α 、FAS 配体、TNF 相关细胞凋亡诱导配体（TRAIL/Apo2L）、TNF- α /FAS 配体/TNF 相关细胞凋亡诱导配体（TRAIUApo2L）信号传导活化剂和 PI3K-Akt 存活通路信号传导抑制剂（例如 UCN-01 和格尔德霉素（geldanamycin））。

在本发明的特定实施例中，具有碳水化合物部分的细胞毒性药物为抗生素，例如加里刹霉素，也称为 LL-E33288 复合物，例如 γ -加里刹霉素 γ_1 。参看美国专利第 4,970,198 号。利用 γ 加里刹霉素酰肼衍生物的抗体结合物进行的早期研究展现在体外基于抗原的细胞毒性以及在异种移植物实验中的活性。通过添加二甲基取代基使所有加里刹霉素结合物中存在的二硫键稳定，从而引起进一步改进。适用于制备本发明的抗体/药物结合物的加里刹霉素的其它实例揭示于美国专利第 4,671,958 号、第 5,053,394 号、第 5,037,651 号、第 5,079,233 号和第 5,108,912 号中，其均以全文引用的方式并入本文中。这些化合物含有甲基三硫醚，其可与适当硫醇反应形成二硫醚，同时这些化合物还引入例如酰肼等官能团，或可用于将加里刹霉素与抗体连接的其它官能团。通过添加二甲基取代基使所有加里刹霉素结合物中存在的二硫键稳定，从而引起进一步改进。这导致可选择 N-乙酰基 γ 加里刹霉素二甲基酰肼或 NAc- γ DMH 作为供结合的最佳衍生物之一。还可使用加里刹霉素的二硫醚类似物，例如美国专利第 5,606,040 号和第 5,770,710 号（其以全文引用的方式并入本文中）中所述的类似物。

制备抗体/药物结合物的代表性方法包括美国专利申请公开案第 2004-0082764A1 号和美国专利申请公开案第 2004-0192900 号（其以全文引用的方式并入本文中）中关于 CMC-544 的制备所述的方法。可使用以下条件进行结合：10 mg/ml 抗体、8.5%（w/w）加里刹霉素衍生物、37.5 mM 癸酸钠、9%（v/v）乙醇、50 mM HEPBS（N-(2-羟基乙基)哌嗪-N'-(4-丁烷磺酸)），pH 8.5，32 摄氏度，1 小时。可使用丁基琼脂糖凝胶（butyl sepharose）FF 树脂、0.65 M 磷酸钾上样缓冲液（loading buffer）、0.49 M 磷酸钾洗涤缓

冲液和 4 mM 磷酸钾洗脱缓冲液来进行疏水相互作用色谱(HIC)。可利用尺寸排阻色谱、超滤/透滤或其它适当方式实现缓冲液更换。

使作为上述载体-药物结合物的一部分的 N-乙酰基 γ 二甲基酰肼与特异性结合 CD22 受体、5T4 受体和路易斯 Y 抗原(都在癌细胞上表达)的单克隆抗体结合。这些载体-药物结合物具有甲基糖苷(即, S-[(2R,4S,6S)-6-([(2R,4S,5R)-5-([(2S,4S,5S)-5-[乙酰基(乙基)氨基]-4-甲氧基四氢-2H-吡喃-2-基]氧基)-4-羟基-6-甲氧基-2-甲基四氢-2H-吡喃-3-基]氨基)氧基)-4-羟基-2-甲基四氢-2H-吡喃-3-基]4-([(2S,3R,4R,5S,6S)-3,5-二羟基-4-甲氧基-6-甲基四氢-2H-吡喃-2-基]氧基)-3-碘-5,6-二甲氧基-2-甲基苯硫代甲酸酯,一种碳水化合物部分)作为 N-乙酰基 γ 二甲基酰肼分子的一部分。所述碳水化合物连同其它碳水化合物可与血清中针对常见碳水化合物部分的内源性抗体相互作用。

本文中引用的所有专利、专利申请案和其它参考文献都以全文引用的方式并入本文中。

以下实例将进一步描述和支持本发明。然而,这些实例决不应被视为进一步限制本发明的范围。相反,所属领域技术人员易于了解,在不偏离本发明的精神和/或随附权利要求书的范围的情况下,还存在本发明的其它实施例、修改和等效内容。

实例

实例 1

原生血清中信号的干扰

在抗加里刹霉素结合物抗体检定的开发过程中,初始研究是对原生人类或猴血清进行。使用固定于微量滴定检定板的孔中并用 4% NFDM/PBST 缓冲液(脱脂奶粉/磷酸盐缓冲的生理盐水吐温(Tween); 137 mM NaCl、2.7mM KCl、4.3 mM Na₂HPO₄、1 mM KH₂PO₄, pH 7.2)阻断的加里刹霉素作为捕获剂,进行 ELISA。利用 1% NFDM/PBST 稀释所述人类或猴血清,添加到 ELISA 的孔中,随后培育。用 THST(50 mM Tris-HCl、0.5 M NaCl、1 mM 甘氨酸和 0.05% (v/v) 吐温 20, pH 8)洗涤各孔,并与抗物种-HRP 结合物一起培育。用 THST 洗涤所述板,随后添加 TMB(四甲基联苯胺)试剂使其显色以进行显色反应。

这些初始检定过程中的数据揭示,在使所述反应显色后观察到高的干扰性背景信号。在随后的检定中,对添加到各孔中的血清进行大幅稀释,达到 1:160。这些检定中的背景减少,所述检定的灵敏性也降低。数据表明,在血清中存在会干扰检定孔中的特定信号的元件。在约 1/3 所测试的人类血清和 1/3 所测试的猴血清中,观察到这种高背景。

为确定加里刹霉素结合物中哪一部分与干扰血清元件相互作用，进行桥接型 ELISA。将浓度为 100 ng/ml 的加里刹霉素结合物 CMC-544、CMD-193 和 CME-548 和其亲本、未结合抗体（分别为抗 CD22 人源化单克隆抗体 G544、抗路易斯 Y 抗原人源化单克隆 G193 和抗 5T4 人源化单克隆抗体 huH8）固定于板上，并利用 4% NFDM/PBST 阻断。

CMD-544 为美国专利申请案 US2004082764 中所述的加里刹霉素-单克隆抗体药物结合物。所述载体药物结合物的单克隆抗体部分对人 CD22 抗原具有靶特异性，其中亲本抗体在本文中称为“G-544”。

CMD-193 为美国专利申请公开案第 US20060002942 号中所述的加里刹霉素-单克隆抗体药物结合物。所述载体药物结合物的单克隆抗体部分对路易斯 Y 抗原具有靶特异性，其中亲本抗体在本文中称为“G-193”。

CME-548 为美国专利申请公开案第 US2006008522 号中所述的加里刹霉素-单克隆抗体药物结合物。所述载体药物结合物的单克隆抗体部分对人 5T4 受体抗原具有靶特异性，其中亲本抗体在本文中称为“huH8”。

利用 1% NFDM/PBST 以 1:20 稀释汇集的食蟹猴（*cynomolgus monkey*）血清，并在各孔中培育。在无血清缓冲液中培育的其它孔作为对照。在用 THST 洗涤后，将检定板与利用 PBST 以 1:2000 稀释的加里刹霉素-HRP 结合物一起培育。用 THST 洗涤各孔，随后利用 TMB 试剂显色。

如图 1 中所示，只在含有加里刹霉素结合物并且无亲本抗体的孔中观察到高背景，这表明血清元件仅特异性结合所述结合物，而不结合其亲本抗体，并且将所述结合物与加里刹霉素-HRP “桥接”。所述数据表明，血清中的干扰元件与加里刹霉素部分结合，但不与亲本未结合抗体结合。此外，血清元件桥接两个不同的加里刹霉素部分（结合加里刹霉素的抗体和加里刹霉素-HRP）的能力表明多价分子（即，免疫球蛋白）为干扰血清元件。

实例 2

使用其它碳水化合物来减少干扰

为了确定血清中的干扰元件与加里刹霉素之间的相互作用的性质，进行桥接型 ELISA。加里刹霉素具有碳水化合物部分作为分子的一部分，所述碳水化合物部分能与一些血清样品中预先存在的抗碳水化合物抗体结合。CMC-544 用作捕获剂，其固定于检定孔中，随后用 4% NFDM/PBST 缓冲液阻断。利用 1% NFDM/PBST 来稀释先前所述的检定中所用的血清（原生），并添加到各孔中。在尝试竞争与加里刹霉素碳水化合物的

任何相互作用时，以脱毒脂多糖滴定血清，使其达到介于 1 ng/ml 到 100 ng/ml 范围内的浓度。对照孔中不含 LPS。随后，振荡（除非本文所有实例中另作指示，否则为标准）培育所述检定达 1 小时。利用 THST 洗涤各孔，随后与利用 PBST 以 1:2000 的稀释度稀释的加里刹霉素-HRP 结合物一起培育。接着添加 TMB 试剂使检定显色，以进行显色反应。如图 3 中所示，添加到 CMC-544 孔中的较多量的 LPS 引起背景信号的降低。在含有 CMC-544 而无 LPS 的对照孔中，所有样品中都观察到高背景。

利用二次 ELISA 进行类似测试，其中 CMC-544 单克隆抗体。将抗体固定于检定孔中，随后利用 4% NFDm/PBST 缓冲液阻断。利用 1% NFDm/PBST 稀释先前所述的检定中所用的血清（原生），并添加到各孔中。将干扰量的 LPS 的脱毒部分或 LPS 添加到反应物中。与板上的 CMC-544 结合的 CMC-544（生物素）经由血清中的抗体桥接。利用与 HRP 检测剂结合的抗生蛋白链菌素（Streptavidin）检测 CMC-544 生物素。较多量的 LPS 和脱毒 LPS 会干扰这一特异性结合。结果呈现于图 5 中。

这些数据表明，血清中的干扰元件与加里刹霉素上的碳水化合物部分相互作用，而不与结合物的抗体部分相互作用。添加 LPS 能与加里刹霉素上的碳水化合物竞争干扰血清元件，而无需用 LPS 预先吸附血清。

进行另一项研究来说明血清元件对加里刹霉素的碳水化合物部分的特异性。对外源添加的甲基糖苷 S-[(2R,4S,6S)-6-({[(2R,4S,5R)-5-({(2S,4S,5S)-5-[乙酰基(乙基)氨基]-4-甲氧基四氢-2H-吡喃-2-基}氧基)-4-羟基-6-甲氧基-2-甲基四氢-2H-吡喃-3-基]氨基}氧基)-4-羟基-2-甲基四氢-2H-吡喃-3-基]4-[(2S,3R,4R,5S,6S)-3,5-二羟基-4-甲氧基-6-甲基四氢-2H-吡喃-2-基]氧基)-3-碘-5,6-二甲氧基-2-甲基苯硫代甲酸酯)特异性竞争与加里刹霉素上的甲基糖苷部分的任何相互作用并由此抑制与血清元件的相互作用的能力进行测试。在含有 CMD-193、CME-548 和 CMC-544 的单独孔中进行与上文关于添加 LPS 所述相同的检定。其亲本、未结合的抗体用作对照。在所述检定中，用各种最终浓度在 2 到 2000 ng/ml 范围内的上述甲基糖苷来代替 LPS。如图 4 中所示，证实上述甲基糖苷为所测试的血清中的干扰元件的有效抑制剂，其 IC₅₀ 在 30-70 nM 的范围内。这些数据表明，血清中的干扰元件特异性结合加里刹霉素上存在的碳水化合物甲基糖苷 S-[(2R,4S,6S)-6-({[(2R,4S,5R)-5-({(2S,4S,5S)-5-[乙酰基(乙基)氨基]-4-甲氧基四氢-2H-吡喃-2-基}氧基)-4-羟基-6-甲氧基-2-甲基四氢-2H-吡喃-3-基]氨基}氧基)-4-羟基-2-甲基四氢-2H-吡喃-3-基]4-[(2S,3R,4R,5S,6S)-3,5-二羟基-4-甲氧基-6-甲基四氢-2H-吡喃-2-基]氧基)-3-碘-5,6-二甲氧基-2-甲基苯硫代甲酸酯)。

实例 3

血清 IgG 不是干扰因子

如先前所述,所述因子的桥接能力指示免疫球蛋白。最初检验 IgG 和 IgM 的可能性。对于 IgG, 使用蛋白质 A 树脂从已知含有干扰因子的猴血清中纯化出 IgG 部分。SDS-PAGE 指示 IgG 的成功分离(未图示; L38054-17)。在调整浓度后, 测试血清中富含 IgG 的部分和缺少 IgG 的部分的桥接能力, 以说明在分批结合色谱过程中样品不可避免地存在稀释。

结果说明, 经纯化 IgG 部分未展现高于仅缓冲液背景的桥接活性, 并且缺少 IgG 的部分展现与未经处理的血清相同水平的 LPS 敏感性桥接活性。因此, IgG 看来不会引起所述活性。

实例 4

鉴别血清因子为 IgM

为了测定血清中结合加里刹霉素的碳水化合物部分会引起先前所述检定中所观察到的干扰的干扰分子的性质, 进行桥接型 ELISA。用捕获剂涂布检定孔作为阳性对照: CMC-544、其未结合的亲本抗体 G544 或猴 IgM。牛奶用作阴性对照。随后利用 4% NFDMP/PBST 缓冲液阻断各孔。利用 1% NFDMP/PBST 稀释血清, 并添加到各孔中。将浓度为 250 $\mu\text{g/ml}$ 的 LPS 添加到血清中, 并培育。用 THST 洗涤各孔, 并与抗 IgM-HRP 一起培育以检测任何 IgM 与所述板的结合。添加 TMB 试剂使检定显色, 以进行显色反应。如图 6 中所示, CMC-544 捕获血清中的大量 IgM, 并且在脂多糖存在下获得的信号明显降低。极少的 IgM 与亲本未结合抗体 G544 结合。

在另一检定中, 用抗猴 IgM 涂布各孔。抗小鼠 IgG 用作阴性对照。制备利用 PBST 制得的在.001 到 10%范围内的血清稀释液, 并添加到各孔中。培育后, 添加加里刹霉素-HRP。洗涤板, 并利用 TMB 试剂显色。如图 7 中所示, 血清 IgM 以剂量依赖性方式捕获所述板上结合的加里刹霉素-HRP。而含有抗小鼠 IgG 的孔却并非如此。

这些数据表明, 一些血清中存在的 IgM 能够特异性结合加里刹霉素分子的碳水化合物部分。所述结合可在用于检测针对加里刹霉素结合物的抗体或检测加里刹霉素本身的检定中产生高背景信号。向检定中添加外源添加的碳水化合物将有助于消除由于血清中存在干扰性 IgM 而产生的信号。

实例 5

含有抗碳水化合物 IgM 的原生血清

为了测定随机原生人类血清盘中抗碳水化合物抗体的普遍性, 进行桥接型 ELISA。CMC-544 用作捕获剂, 并固定于检定孔中。利用 4% NFDMP-PBST 缓冲液阻断各孔。利

用 1% NFDm-PBST 稀释原生血清样品，添加到各孔中，随后培育。利用 THST 洗涤各孔，随后与加里刹霉素-HRP 一起培育。随后添加 TMB 试剂使检定显色，以进行显色反应。在尝试测定多少百分数的所检验的血清样品含有可结合加里刹霉素上的碳水化合物部分的干扰性 IgM 时，未将碳水化合物添加到所述检定中。如图 8 中所示，约 30% 的所测试的血清样品展现干扰。在原生猴血清中注意到类似观察结果，其中 20 只猴中有 2 只展现高抗碳水化合物抗体含量，并且 20 只中有 8 只展现明显的抗碳水化合物抗体含量。

实例 6

检测血清中的抗加里刹霉素结合物抗体

为了检测血清中响应暴露于结合加里刹霉素的单克隆抗体（例如 CMC-544）而特异性产生的抗体的存在，在确定加里刹霉素上存在的甲基糖苷 S-[(2R,4S,6S)-6-([(2R,4S,5R)-5-((2S,4S,5S)-5-[乙酰基(乙基)氨基]-4-甲氧基四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)-4-羟基-6-甲氧基-2-甲基四氢-2H-吡喃-3-基]氨基)氧基)-4-羟基-2-甲基四氢-2H-吡喃-3-基]4-[(2S,3R,4R,5S,6S)-3,5-二羟基-4-甲氧基-6-甲基四氢-2H-吡喃-2-基]氧基]-3-碘-5,6-二甲氧基-2-甲基苯硫代甲酸酯)的最佳浓度后，进行桥接型 ELISA。

如上所述滴定原生血清，以确定将会去除用于测试暴露于药物后抗药物抗体的产生的个体的原生血清中的内源性抗碳水化合物背景噪声的碳水化合物的最低（因此最佳）浓度。

用 CMC-544 注射实验个体，或将实验个体以其它方式暴露于 CMC-544，并收集血清。CMC-544 以及未结合的亲本抗体 G544 用作捕获剂，并以 100 ng/ml 的浓度固定于单独孔中。利用 4% NFDm/PBST 缓冲液阻断各孔。从经暴露个体收集血清，并与 1% NFDm/PBST 混合，添加到各孔中，随后培育。利用 THST 洗涤各孔，并与加里刹霉素-HRP 结合物以及最佳浓度的其它碳水化合物甲基糖苷（加里刹霉素上存在的 S-[(2R,4S,6S)-6-([(2R,4S,5R)-5-((2S,4S,5S)-5-[乙酰基(乙基)氨基]-4-甲氧基四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)-4-羟基-6-甲氧基-2-甲基四氢-2H-吡喃-3-基]氨基)氧基)-4-羟基-2-甲基四氢-2H-吡喃-3-基]4-[(2S,3R,4R,5S,6S)-3,5-二羟基-4-甲氧基-6-甲基四氢-2H-吡喃-2-基]氧基]-3-碘-5,6-二甲氧基-2-甲基苯硫代甲酸酯)一起培育。或者，其它碳水化合物可直接添加到在最初与捕获剂一起培育时具有血清的孔以及对照孔中。洗涤后，接着添加 TMB 试剂使板显色，以进行显色反应。显色后显色反应的存在指示血清中针对加里刹霉素结合物的抗体的存在，这不是内源性抗碳水化合物抗体引起的结果，而是响应载体-药物结合物产生免疫反应的结果。

为确定是否产生针对加里刹霉素的碳水化合物部分的抗体应答，接着用加里刹霉素特异性甲基糖苷滴定来自经暴露个体的血清，以确定抗体反应性是否返回到背景水平。如果滴定抗体应答回到背景水平，那么响应载体-药物结合物而产生的抗体应答是归因于加里刹霉素的碳水化合物部分。

实例 7

测试原生血清中针对载体药物结合物（其中所述药物具有碳水化合物部分）的抗体的存在

为了确定用加里刹霉素结合物处理的候选个体的血清中预先存在的干扰性 IgM 的存在，进行桥接型 ELISA。加里刹霉素用作捕获剂，并固定于检定孔中。利用 4% NFDm/PBST 缓冲液阻断各孔。利用 1% NFDm/PBST 稀释从未曾接受药物的个体收集的 血清，添加到检定中，并培育。如上文所述确定甲基糖苷的最佳浓度。碳水化合物的滴定也可包括各血清样品的无碳水化合物对照测试。利用 THST 洗涤各孔，并与加里刹霉素-HRP 结合物和最佳浓度的其它甲基糖苷（加里刹霉素上存在的 S-[(2R,4S,6S)-6-([(2R,4S,5R)-5-((2S,4S,5S)-5-[乙酰基(乙基)氨基]-4-甲氧基四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)-4-羟基-6-甲氧基-2-甲基四氢-2H-吡喃-3-基]氨基)氧基)-4-羟基-2-甲基四氢-2H-吡喃-3-基]4-[(2S,3R,4R,5S,6S)-3,5-二羟基-4-甲氧基-6-甲基四氢-2H-吡喃-2-基]氧基)-3-碘-5,6-二甲氧基-2-甲基苯硫代甲酸酯))一起培育。洗涤后，接着添加 TMB 试剂使板显色，以进行显色反应。显色反应将指示 Ig 与各孔中所结合的加里刹霉素结合，并且还与随后添加的加里刹霉素 HRP 结合。

或者，原生血清的初始筛选不添加其它碳水化合物。随后使血清经历碳水化合物的滴定，以验证所述碳水化合物为血清反应性的靶。

实例 8

测试利用加里刹霉素作为药物的载体-药物结合物

为了检测投与这一药物的个体的血清中的加里刹霉素结合物（例如 CMC-544），进行 ELISA。用 CMC-544 注射个体，或将个体以其它方式暴露于 CMC-544，并收集血清。将 CD22（特异性结合亲本抗体 G544 的抗原）固定于检定孔中，并用作捕获剂。随后利用 4% NFDm/PBST 缓冲液阻断各孔。利用 1% NFDm/PBST 稀释血清，并添加到各孔中，随后培育。由于其它碳水化合物不应干扰 CD22 特异性结合对 CMC-544 的捕获，故在此可添加大量过量的碳水化合物，以阻断血清中存在的可能结合 CMC-544 的抗体。（利用 THST 洗涤板，并与抗加里刹霉素-HRP 结合物一起培育，随后添加 TMB 试剂使板显色，以进行显色反应。显色反应将指示血清中存在加里刹霉素结合物。

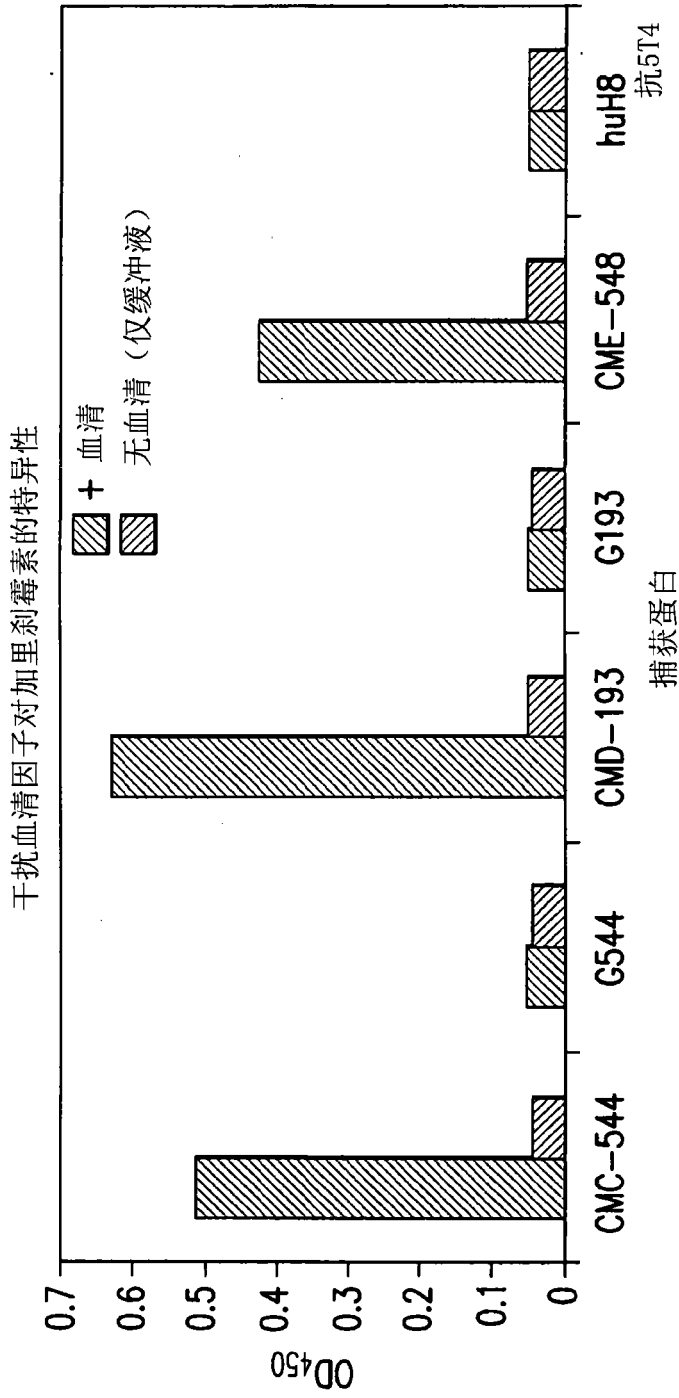


图1

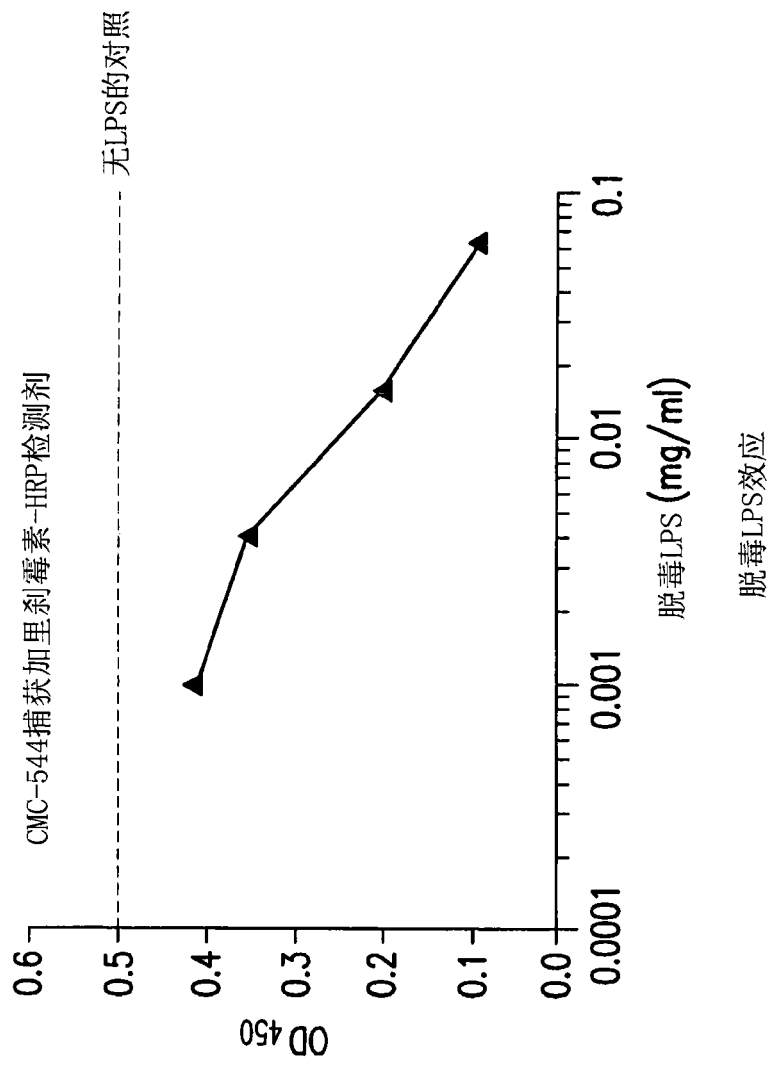
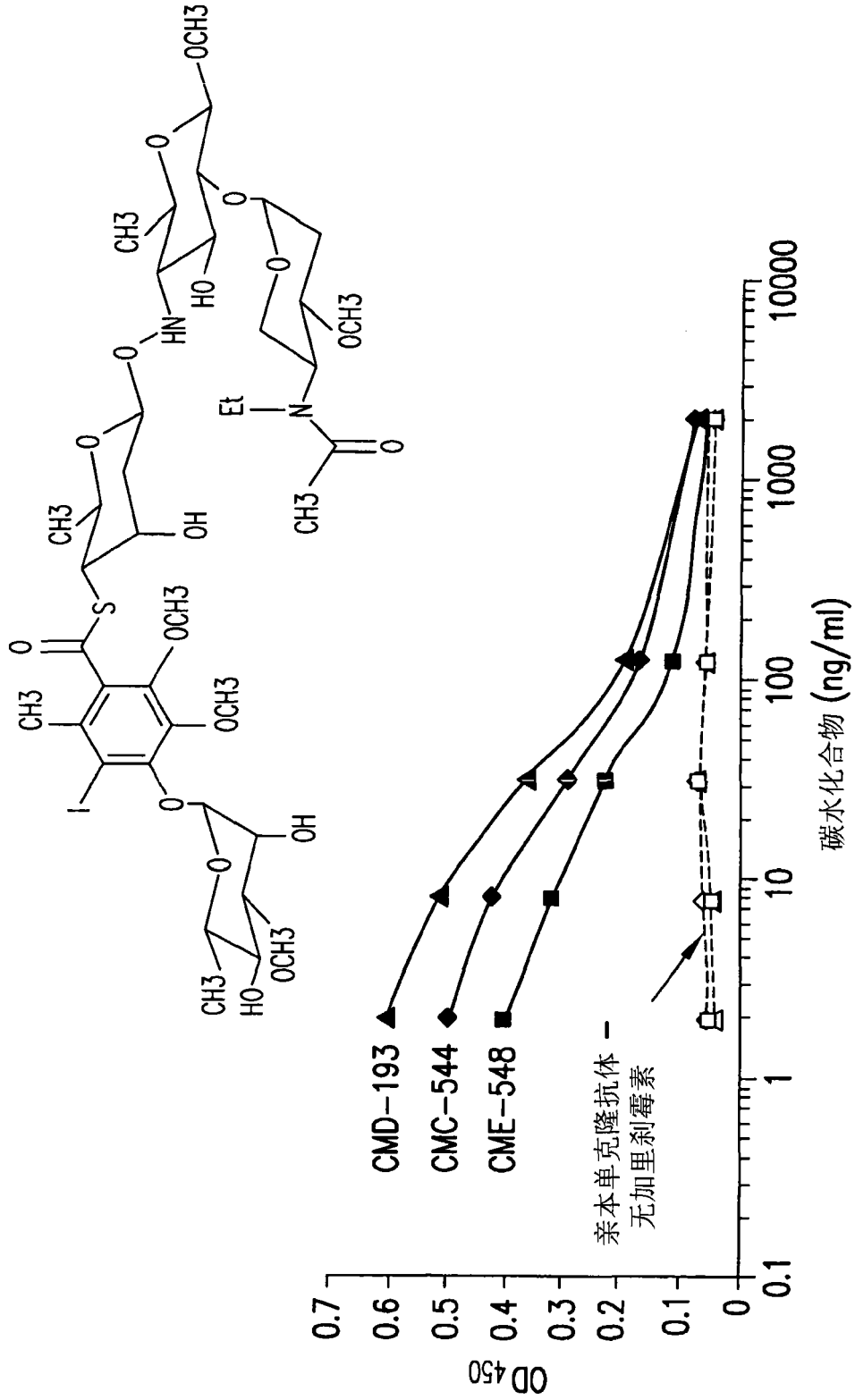


图3



加里刹霉素的碳水化合物部分抑制血清相互作用

图4

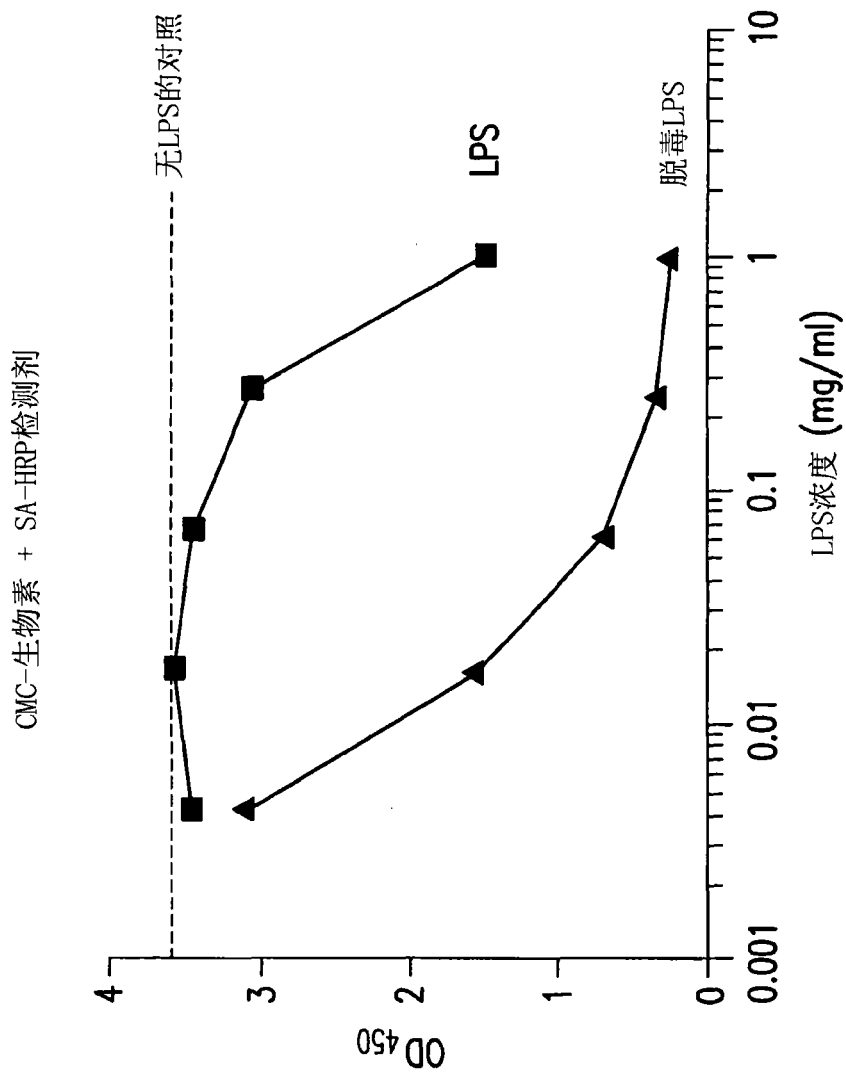


图5

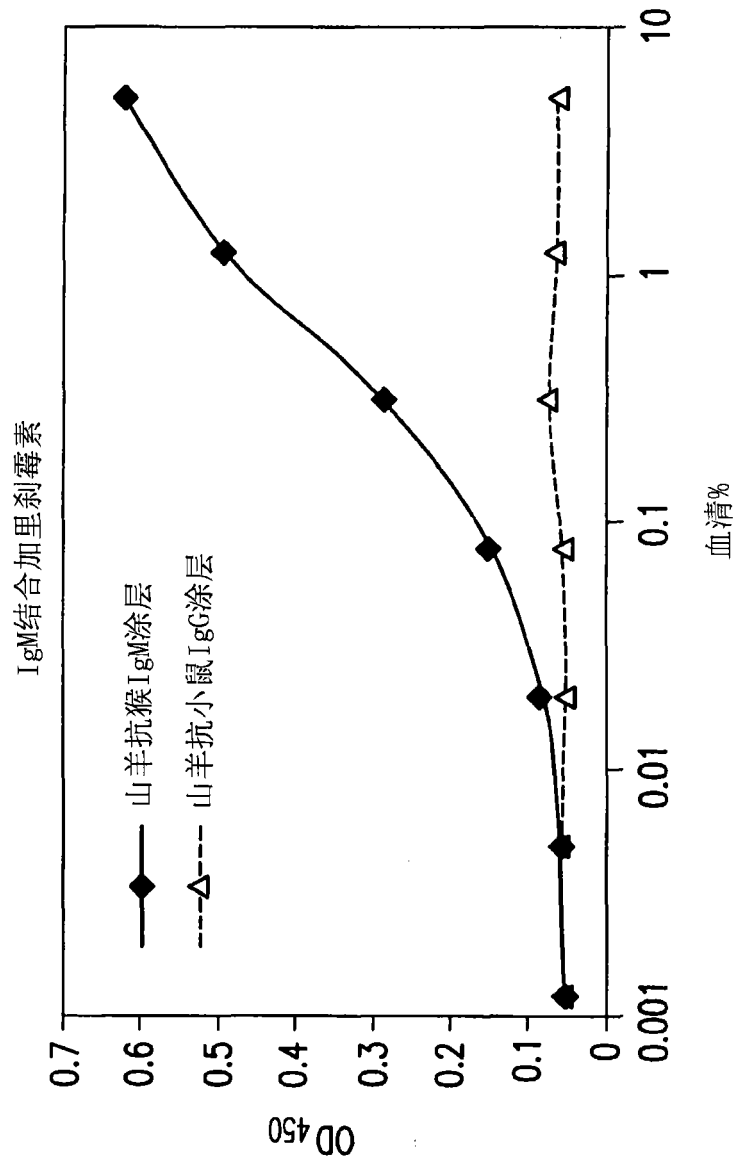


图7

利用加里刹霉素-HRP检测剂进行人类血清筛选

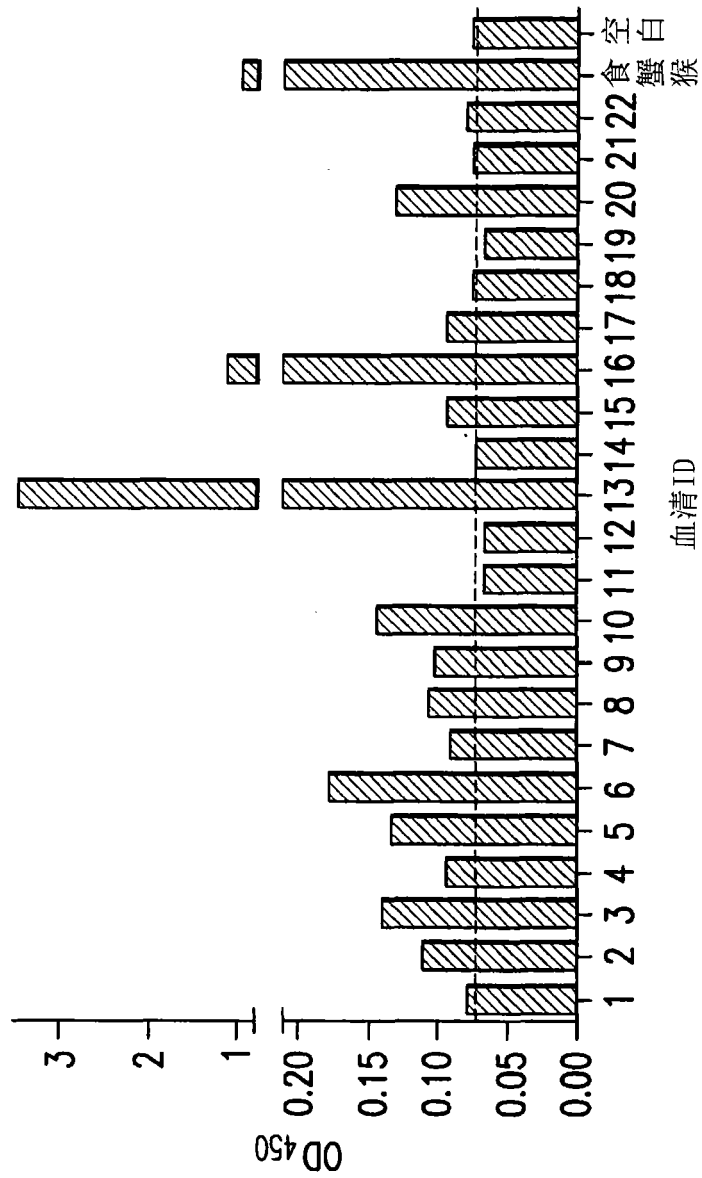


图8

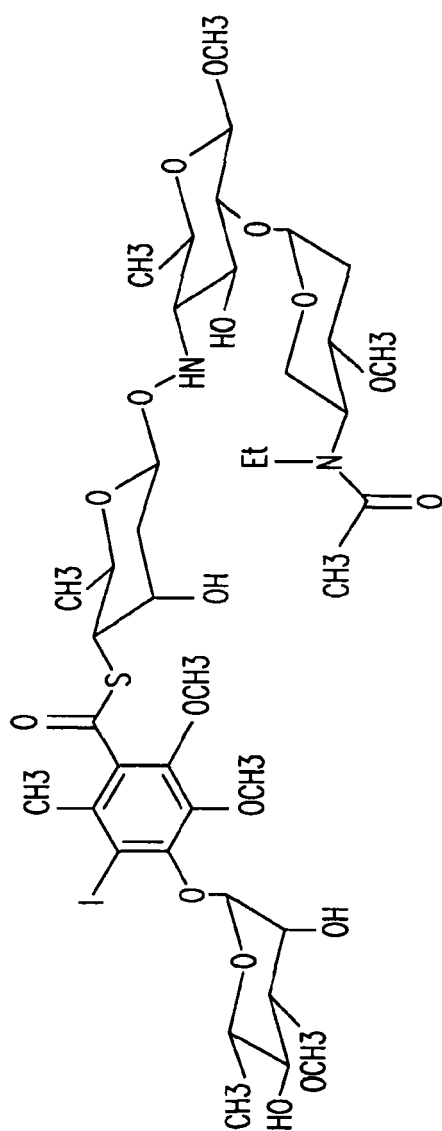


图9

专利名称(译)	免疫检定中由抗碳水化合物抗体引起的干扰的消除		
公开(公告)号	CN101680880A	公开(公告)日	2010-03-24
申请号	CN200880015303.3	申请日	2008-05-06
[标]申请(专利权)人(译)	惠氏公司		
申请(专利权)人(译)	惠氏公司		
当前申请(专利权)人(译)	惠氏公司		
[标]发明人	戴维勒罗伊温塞尔 米歇尔阿瓦德		
发明人	戴维·勒罗伊·温塞尔 米歇尔·阿瓦德		
IPC分类号	G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5306 A61P35/00 A61P37/00		
代理人(译)	刘国伟		
优先权	60/928144 2007-05-07 US 60/928438 2007-05-08 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明针对大致说来用于检测抗药物抗体并且具体说来用于检测药物具有碳水化合物部分的抗药物抗体的检定。本发明还针对大致说来用于检测药物并且具体说来用于检测具有碳水化合物部分的药物的检定。本发明进一步针对鉴别适于利用含有碳水化合物部分的药物治疗的个体的方法。

