



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111133313 A

(43)申请公布日 2020.05.08

(21)申请号 201880058764.2

希兰·格拉西-魏因贝格

(22)申请日 2018.07.10

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

(30)优先权数据

62/530,310 2017.07.10 US

代理人 王玮玮 郑霞

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.03.10

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IL2018/050753 2018.07.10

G01N 33/543(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/012531 EN 2019.01.17

(71)申请人 拉姆巴姆医疗技术有限公司

地址 以色列海法

(72)发明人 耶胡达·乔尔斯

西加尔·普雷斯曼

亚历山德拉·布拉特

权利要求书5页 说明书51页

序列表2页 附图5页

(54)发明名称

评估生物药物治疗的受试者中的中和性抗体水平的测定及其在个性化医疗中的用途

(57)摘要

本发明涉及用于准确确定患有免疫介导的紊乱的、用生物药物治疗的受试者的样品中的中和性抗体水平的测定、装置和试剂盒以及用于预测这些患者对药物的响应性的测定、装置和试剂盒。

1. 一种用于确定用生物药物治疗的受试者的生物样品中的中和性抗药物抗体 (nADA) 的水平的方法, 所述方法包括:

- a. 将所述生物样品与直接或间接固定在固体支持物上的所述生物药物一起孵育;
- b. 向 (a) 的孵育的样品提供所述生物药物的靶, 并且将所述靶与所述固定的药物一起孵育;
- c. 确定与所述固定的药物结合的所述靶的量, 其中所述量指示存在于所述生物样品中的中和性抗药物抗体的水平。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述生物药物是针对生物靶的抗体。

3. 根据权利要求1至2中任一项所述的方法, 其中所述生物靶是细胞因子。

4. 根据权利要求3所述的方法, 其中所述细胞因子是肿瘤坏死因子 α (TNF α)。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法, 其中所述药物是英夫利昔单抗、依那西普、阿达木单抗、赛妥珠单抗、戈利木单抗、其任何生物类似物及其任何组合中的至少一种。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法, 其中所述靶与至少一种可检测部分直接或间接缔合。

7. 根据权利要求6所述的方法, 其中所述可检测部分是导电标记物、电化学标记物、荧光标记物、化学发光标记物、酶标记物、放射性标记物、磁性标记物、金属标记物和比色标记物或其任何组合中的至少一种。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法, 其中所述受试者患有免疫介导的紊乱。

9. 根据权利要求8所述的方法, 其中所述免疫介导的紊乱是炎性疾病、自身免疫疾病和增殖性紊乱中的至少一种。

10. 根据权利要求9所述的方法, 其中所述炎性紊乱是炎性肠病 (IBD)。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法, 其中所述生物样品是血清和全血样品或其任何级分或制剂中的任何一种。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法, 其中所述药物是包含两条 κ 轻链的单克隆抗体, 并且其中所述方法还包括以下步骤: 通过向通过步骤 (a) 或步骤 (b) 获得的所述孵育的样品提供与第二可检测部分缔合的抗 λ 链抗体确定所述生物样品中的中和性抗药物抗体和非中和性抗药物抗体的水平, 将所述标记的抗 λ 链抗体与所述固定的药物一起孵育, 以及确定所述第二可检测部分的量, 其中所述量指示存在于所述生物样品中的中和性 λ 链ADA和非中和性 λ 链ADA的水平。

13. 一种用于评估受试者对生物药物治疗的响应性、用于监测疾病进展和疾病复发的早期预后的预后方法, 所述方法包括以下步骤:

- a. 确定所述受试者的至少一个生物样品中的nADA水平, 从而获得所述样品的nADA值;
- b. 确定步骤 (a) 中获得的所述nADA值相对于预先确定的标准nADA值或相对于至少一个对照样品的nADA值是否为阳性或阴性中的任一项;

c. 将所述受试者分类为无响应者或响应者, 其中所述样品的阳性nADA值指示所述受试者属于与对所述生物药物治疗无响应相关的预先确立的群体, 并且其中所述样品的阴性nADA值指示所述受试者属于与对所述生物药物治疗响应相关的预先确立的群体, 从而预测、评估和监测哺乳动物受试者对所述治疗方案的响应性。

14. 根据权利要求13所述的预后方法, 其中确定所述至少一个生物样品中的nADA水平

通过以下步骤进行：

- a. 将所述生物样品与直接或间接固定在固体支持物上的所述生物药物一起孵育；
- b. 向 (a) 的孵育的样品提供所述生物药物的靶，并且将所述靶与所述固定的药物一起孵育；
- c. 确定与所述固定的药物结合的所述靶的量，其中所述量指示存在于所述生物样品中的nADA水平。

15. 根据权利要求14所述的预后方法，所述方法用于监测疾病进展，所述方法包括：

- d. 重复步骤 (a) 至 (c) 以获得至少另一个时间上分开的样品的nADA值；
- e. 计算在所述时间上分开的样品之间所述nADA值的变化速率；
- f. 确定步骤 (e) 中获得的变化速率值相对于预先确定的标准变化速率值或相对于针对至少一个对照样品的nADA值计算的变化速率值为阳性还是阴性；

其中阳性变化速率值指示所述受试者属于与对所述治疗的响应丧失 (LOR)、响应不足、不耐受或复发中的至少一种相关的预先确立的无响应群体，从而监测疾病进展或提供疾病复发的早期预后。

16. 根据权利要求13至15中任一项所述的预后方法，其中所述生物药物是针对生物靶的抗体。

17. 根据权利要求13至16中任一项所述的预后方法，其中所述生物靶是细胞因子。

18. 根据权利要求17所述的预后方法，其中所述细胞因子是TNF α 。

19. 根据权利要求18所述的预后方法，其中所述药物是英夫利昔单抗、依那西普、阿达木单抗、赛妥珠单抗、戈利木单抗、其任何生物类似物及其任何组合中的至少一种。

20. 根据权利要求13至19中任一项所述的方法，其中所述靶与至少一种可检测部分直接或间接缔合。

21. 根据权利要求20所述的方法，其中所述可检测部分是导电标记物、电化学标记物、荧光标记物、化学发光标记物、酶标记物、放射性标记物、磁性标记物和比色标记物或其任何组合中的至少一种。

22. 根据权利要求13至21中任一项所述的预后方法，其中所述受试者患有免疫介导的紊乱。

23. 根据权利要求22所述的预后方法，其中所述免疫介导的紊乱是IBD。

24. 根据权利要求13至23中任一项所述的预后方法，其中所述药物是包含两条 κ 轻链的单克隆抗体，并且其中所述方法还包括以下步骤：通过向 (a) 或 (b) 的所述孵育的样品提供与第二可检测部分缔合的抗 λ 链抗体确定所述生物样品中的中和性抗药物抗体和非中和性抗药物抗体的水平，将所述标记的抗 λ 链抗体与所述固定的药物一起孵育，以及确定所述第二可检测部分的量，其中所述量指示存在于所述生物样品中的中和性 λ 链ADA和非中和性 λ 链ADA的水平。

25. 根据权利要求13至24中任一项所述的预后方法，所述预后方法还包括确定用所述生物药物治疗的受试者的生物样品中的活性生物药物的水平的步骤，其中确定活性药物的水平通过包括以下的方法来进行：

- a. 将所述样品与对所述生物药物特异的至少一种非中和性抗体一起孵育，其中所述非中和性抗体被固定到固体支持物；

b. 向 (a) 的所述孵育的样品提供所述生物药物的靶, 其中所述靶与至少一种可检测部分直接或间接缔合;

c. 检测所述可检测部分以确定所述靶的量, 其中所述量指示存在于所述生物样品中的所述活性药物的水平。

26. 一种为患有免疫介导的紊乱的受试者确定治疗方案的方法, 所述方法包括以下步骤:

a. 确定所述受试者的至少一个生物样品中的nADA水平, 从而获得所述样品的nADA值;

b. 确定步骤 (a) 中获得的所述nADA值相对于预先确定的标准nADA值或相对于至少一个对照样品的nADA值是否为阳性或阴性中的任一项;

c. 确定针对所述受试者的治疗方案, 其中:

(i) 所述样品的阳性nADA值指示所述受试者属于与对所述生物药物治疗的响应丧失 (LOR)、响应不足和不耐受中的至少一种相关的预先确立的群体, 并且所述受试者被建议不维持所述治疗和/或被建议施用免疫抑制剂; 并且

(ii) 所述样品的阴性nADA值指示所述受试者属于与对所述生物药物治疗响应相关的预先确立的群体, 并且所述受试者被建议维持所述治疗。

27. 根据权利要求26所述的方法, 其中确定所述至少一个生物样品中的nADA水平通过以下步骤进行:

a. 将所述生物样品与直接或间接固定在固体支持物上的所述生物药物一起孵育;

b. 向 (a) 的所述孵育的样品提供所述生物药物的靶, 并且将所述靶与所述固定的药物一起孵育;

c. 确定与所述固定的药物结合的所述靶的量, 其中所述量指示存在于所述生物样品中的中和性抗药物抗体的水平。

28. 一种用于检测用所述生物药物治疗的受试者的生物样品中的nADA的装置, 所述装置包括:

a. 包含所述生物药物的生物靶的标记组合物, 所述靶特异性识别并且结合所述生物药物;

b. 包含直接或间接固定在固体支持物上的所述生物药物的捕获组合物; 和

c. 适用于接收和运输所述生物样品的固体支持物。

29. 根据权利要求28所述的装置, 其中所述装置是横流装置, 包括:

a. 适用于接收和运输所述生物样品的固体支持物;

b. 包含所述生物药物的生物靶的标记组合物, 所述靶特异性识别并且结合所述生物药物, 所述标记组合物位于所述固体支持物中从样品应用区域至捕获区域的流动路径中的预先确定的特定起始区域中; 和

c. 包含直接或间接固定在固体支持物上的所述生物药物的捕获组合物, 所述捕获组合物在所述固体支持物的末端区域中的预先确定的位置被附接到所述固体支持物。

30. 根据权利要求28和29中任一项所述的装置, 其中所述生物药物是针对生物靶的抗体。

31. 根据权利要求28至30中任一项所述的装置, 其中所述生物靶是TNF α 。

32. 根据权利要求31所述的装置, 其中所述药物是对TNF α 特异的抗体, 所述药物是英夫

利昔单抗、依那西普、阿达木单抗、赛妥珠单抗、戈利木单抗、其任何生物类似物及其任何组合中的至少一种。

33. 根据权利要求28至32中任一项所述的装置,其中所述靶与至少一种可检测部分直接或间接缔合。

34. 根据权利要求33所述的装置,其中所述可检测部分是导电标记物、电化学标记物、荧光标记物、化学发光标记物、酶标记物、放射性标记物、磁性标记物和比色标记物或其任何组合中的至少一种。

35. 根据权利要求28至34中任一项所述的装置,其中所述装置还包括第二捕获组合物,所述第二捕获组合物包含对直接或间接固定在固体支持物上的所述生物药物特异的至少一种非中和性抗体。

36. 一种试剂盒,所述试剂盒包括:

- a. 直接或间接固定在固体支持物上的生物药物;
- b. 所述生物药物的生物靶;以及任选地以下中的至少一种:
- c. 使用说明书;
- d. 标准曲线或对照样品;
- e. 任选地与第二可检测部分缔合的至少一种抗 λ 链抗体;

f. 对所述生物药物特异的至少一种非中和性抗体,所述非中和性抗体被直接或间接固定在固体支持物上。

37. 根据权利要求36所述的试剂盒,其中所述生物药物是针对生物靶的抗体。

38. 根据权利要求37所述的试剂盒,其中所述生物靶是细胞因子。

39. 根据权利要求38所述的试剂盒,其中所述细胞因子是TNF α 。

40. 根据权利要求36至39中任一项所述的试剂盒,其中所述药物是英夫利昔单抗、依那西普、阿达木单抗、赛妥珠单抗、戈利木单抗、其任何生物类似物及其任何组合中的至少一种。

41. 根据权利要求36至40中任一项所述的试剂盒,其中所述靶与至少一种可检测部分直接或间接缔合。

42. 根据权利要求41所述的试剂盒,其中所述可检测部分是导电标记物、电化学标记物、荧光标记物、化学发光标记物、酶标记物、放射性标记物、磁性标记物、金属标记物和比色标记物或其任何组合中的至少一种。

43. 根据权利要求36至42中任一项所述的试剂盒,所述试剂盒包括根据权利要求28至34中任一项所述的装置。

44. 根据权利要求36至43中任一项所述的试剂盒,所述试剂盒用于预测和评估受试者对生物药物治疗的响应性、用于监测疾病进展和疾病复发的早期预后。

45. 一种用于确定用所述生物药物治疗的受试者的生物样品中的活性生物药物的水平的方法,所述方法包括:

a. 将所述样品与对所述生物药物特异的至少一种非中和性抗体一起孵育,其中所述非中和性抗体被固定在固体支持物上;

b. 向(a)的孵育的样品提供所述生物药物的靶,其中所述靶与至少一种可检测部分直接或间接缔合;

c. 检测所述可检测部分以确定所述靶的量, 其中所述量指示存在于所述生物样品中并且附接到固定的非中和性抗体的所述活性药物的水平。

46. 根据权利要求45所述的方法, 其中所述可检测部分是导电标记物、电化学标记物、荧光标记物、化学发光标记物、酶标记物、放射性标记物、磁性标记物、金属标记物和比色标记物或其任何组合中的至少一种。

47. 根据权利要求45至46中任一项所述的方法, 其中所述生物药物是针对生物靶的抗体, 并且其中所述生物靶是细胞因子。

48. 根据权利要求47所述的方法, 其中所述细胞因子是 $TNF\alpha$, 并且其中所述药物是对 $TNF\alpha$ 特异的单克隆抗体。

49. 根据权利要求45至48中任一项所述的方法, 其中所述受试者患有免疫介导的紊乱。

50. 根据权利要求49所述的方法, 其中所述免疫相关的紊乱是IBD。

评估生物药物治疗的受试者中的中和性抗体水平的测定及其在个性化医疗中的用途

发明领域

[0001] 本发明涉及个性化医疗 (personalized medicine)。更特别地,本发明提供了用于准确确定患有免疫介导的紊乱的、用生物药物治疗的受试者中的中和性抗体水平的测定、装置和试剂盒。

背景技术

[0002] 以下列出了被认为与本公开的主题相关的作为背景的参考文献:

[0003] [1]Baert F,Noman M,Vermeire S,et al.Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease.N Engl J Med 2003; 348:601-8.

[0004] [2]Ordas I,Feagan BG,Sandborn WJ.Therapeutic drug monitoring of tumor necrosis factor antagonists in inflammatory bowel disease.Clin Gastroenterol Hepatol 2012;10:1079-87;quiz e85-6.

[0005] [3]Yanai H,Lichtenstein L,Assa A,et al.Levels of drug and antidrug antibodies are associated with outcome of interventions after loss of response to infliximab or adalimumab.Clin Gastroenterol Hepatol 2015;13:522-530e2.

[0006] [4]Ungar B,Levy I,Yavne Y,et al.Optimizing Anti-TNF-alpha Therapy: Serum Levels of Infliximab and Adalimumab Are Associated With Mucosal Healing in Patients With Inflammatory Bowel Diseases.Clin Gastroenterol Hepatol 2016; 14:550-557e2.

[0007] [5]Ben-Horin,S.&Chowers,Y.Tailoring anti-TNF therapy in IBD:drug levels and disease activity.Nat.Rev.Gastroenterol.Hepatol.11,243-255 (2014) .

[0008] [6]Weisshof,R.et al.Anti-infliximab Antibodies with Neutralizing Capacity in Patients with Inflammatory Bowel Disease:Distinct Clinical Implications Revealed by a Novel Assay.Inflamm.Bowel Dis.(2016) .

[0009] [7]Kopylov,U.et al.Clinical utility of antihuman lambda chain-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) versus double antigen ELISA for the detection of anti-infliximab antibodies.Inflamm.Bowel Dis.18.1628-1633 (2012) .

[0010] [8]Wang,S.-L.et al.Development and validation of a homogeneous mobility shift assay for the measurement of infliximab and antibodies-to-infliximab levels in patient serum.J.Immunol.Methods 382,177-188 (2012) .

[0011] [9]Bendtzen,K.Immunogenicity of anti-TNF-alpha biotherapies:II.Clinical relevance of methods used for anti-drug antibody detection.B Cell Biol.6,109 (2015) .

[0012] [10]Lallemand,C.et al.Reporter gene assay for the quantification of the activity and neutralizing antibody response to TNF α antagonists.J.Immunol.Methods 373,229-239 (2011).

[0013] [11]G.R.Gunn III et al.,From the bench to clinical practice: understanding the challenges and uncertainties in immunogenicity testing for biopharmaceuticals.Clinical and Experimental Immunology,184:137-146 (2016).

[0014] [12]Ungar B,Chowers Y,Yavzori M,et al.The temporal evolution of antidrug antibodies in patients with inflammatory bowel disease treated with infliximab.Gut 2014;63:1258-64.

[0015] 本文对以上参考文献的承认不应被推断为意味着这些参考文献以任何方式与本公开的主题的可专利性相关。

[0016] 发明背景

[0017] 过去十年,已经证明了具有针对免疫系统的特定组分的生物剂的引入的疗法的实质性进展。主要突破是引入了抗肿瘤坏死因子 α (TNF α) 的剂,即英夫利昔单抗 (Infliximab)。

[0018] 抗TNF治疗的治疗药物监测 (TDM) 已经成为全世界许多临床医师的护理标准。英夫利昔单抗和阿达木单抗 (adalimumab) 的波谷血清水平与临床响应呈正相关[1,2]。适当的波谷水平还与UC和CD二者中较高的粘膜愈合速率和降低的长期并发症发生率相关[3-4]。

[0019] 在IBD患者中使用靶向TNF α 或任何其他生物靶的生物药物通常受碍于降低药物效力的抗药物抗体 (ADA) 的出现。对疾病活动的评估连同抗TNF药物水平的测量促成了对于管理响应丧失 (loss of response)、优化维持治疗期间的疾病控制以及可能停止治疗的合理决策。抗药物抗体测量在这些临床情况中有帮助,并且在丧失响应而有待选择下一步干预的患者中最有用[5]。

[0020] 对药物活性的干扰可以是由ADA介导的药物清除增加引起的,或在产生了针对药物的结合位点特异性ADA从而中和了药物与靶结合的能力的情况中,导致临床响应丧失。与免疫抑制剂共治疗可以消除抗体的出现,但该共治疗与显著的副作用相关。此外,最近显示出,区分中和性抗体和非中和性抗体是重要的,并且至少在接受抗TNF α 治疗的IBD患者中,在与临床响应丧失以及预测随后的响应丧失相关联方面,对竞争靶结合位点的特异性中和性抗体的检测优于目前的抗体检测方法[6]。

[0021] 临床上目前用于ADA检测的方法包括依赖于抗体的二价结构的桥接测定 (bridging assay) 的一些变化形式和使用ADA的 λ 轻链以检测所述抗体的基于抗 λ 链的酶联免疫吸附测定 (ELISA) [7]。其他方法,诸如均相迁移率变动测定 (homogenous mobility-shift assay) (HMSA),使用尺寸排阻高效液相色谱法 (SE-HPLC) 以定量地测量血清中掺有标记的药物的药物-抗体复合物[8]。这些测定的局限性是检测任何抗药物结合活性,而不区分中和性抗体和非中和性抗体[9]。这些测定耗时、费力、对血清药物敏感并且因此不适合作为即时测定 (point of care assay)。

[0022] 另一种类型的ADA测定是报告物基因测定[10]。这种基于细胞的测定(其确实鉴定出中和性抗体)依赖于TNF α -敏感报告物基因的活化。在活性药物的存在下,报告物基因表达将减少,而当中和性ADA存在于血清中时,报告物基因表达将又增加。在这种情况下,除了

需要细胞培养设施和熟练的实验室人员之外,一种重要的局限性是该测定还对血清中的过量药物敏感。

[0023] G.R.Gunn III等综述了用于评估用生物药物治疗的患者中的中和性抗体的水平的基于ELISA的测定[11]。

[0024] 因此,对及时预测和监测抗药物免疫原性的有效且灵敏的工具的医疗需求未被满足。

[0025] 发明概述

[0026] 根据第一方面,本发明涉及用于确定用生物药物治疗的受试者的生物样品中的中和性抗药物抗体(nADA)的水平的方法。在一些实施方案中,本发明的方法可以包括以下步骤:

[0027] 首先,在步骤(a)中,将生物样品与直接或间接固定在固体支持物上的生物药物一起孵育。步骤(b)包括向步骤(a)的孵育的样品提供生物药物的靶,并且将靶与固定的药物一起孵育。

[0028] 在步骤(c)中,确定与固定的药物结合的靶的量。在一些实施方案中,确定靶的量可以通过检测与靶直接缔合或可选地间接缔合的至少一种可检测部分,例如通过使用与可检测部分直接或间接缔合的特定抗体检测已结合的靶来进行。应当注意,确定的标记的靶的量指示存在于生物样品中的中和性抗药物抗体的水平。在更具体的实施方案中,中和性抗体的水平与检测到的靶的水平呈负相关。

[0029] 在另外的方面中,本发明涉及用于评价和/或评估受试者对生物药物治疗的响应性、用于监测疾病进展和疾病复发的早期预后的预后方法。更具体地,这样的方法可以包括以下步骤:

[0030] 首先,在步骤(a)中,确定受试者的至少一个生物样品中的nADA水平,从而获得样品的nADA值。

[0031] 接下来,在步骤(b)中,确定步骤(a)中获得的nADA值相对于预先确定的标准nADA值或相对于至少一个对照样品的nADA值是否为阳性或阴性中的任一项。

[0032] 步骤(c)包括将受试者分类为无响应者或响应者。更具体地,样品的阳性nADA值可以指示受试者属于与对生物药物治疗无响应相关的预先确立的群体。然而,样品的阴性nADA值可以指示受试者属于与对生物药物治疗响应相关的预先确立的群体,从而预测、评估和监测受试者对治疗方案响应性。

[0033] 在一些实施方案中,受试者的至少一个生物样品中的nADA的水平可以通过以下步骤确定:(a)将生物样品与直接或间接固定在固体支持物上的生物药物一起孵育;(b)向(a)的孵育的样品提供所述生物药物的靶,并且将靶与固定的药物一起孵育;和(c)确定与所述的固定的药物结合的靶的量。该量指示存在于生物样品中的nADA的水平,并且在一些实施方案中,该量与结合的靶的水平呈负相关。

[0034] 在另外的方面中,本发明涉及为患有免疫介导的紊乱的受试者确定治疗方案的方法。该方法可以包括以下步骤:

[0035] 在第一个步骤(a)中,确定受试者的至少一个生物样品中的nADA水平,从而获得样品的nADA值。

[0036] 在步骤(b)中,确定步骤(a)中获得的nADA值相对于预先确定的标准nADA值或相对

于至少一个对照样品的nADA值是否为阳性或阴性中的任一项。

[0037] 在步骤(c)中,确定针对受试者的治疗方案,其中:

[0038] (i)样品的阳性nADA值指示受试者属于与对生物药物治疗的响应丧失(LOR)、响应不足和不耐受中的至少一种相关的预先确立的群体,所述受试者被建议不维持治疗。可选地或另外地,受试者可以被建议施用至少一种免疫抑制剂;并且

[0039] (ii)样品的阴性nADA值指示受试者属于与对生物药物治疗响应相关的预先确立的群体。在一些实施方案中,受试者可以被建议维持治疗。

[0040] 在又一个方面中,本发明涉及用于检测用生物药物治疗的受试者的生物样品中的nADA的装置。更具体地,本发明的装置可以包括以下元件或组件:

[0041] 在第一元件(a)中为包含生物药物的生物靶的标记组合物。靶特异性识别并且结合生物药物。应当注意,在一些实施方案中,靶可以与至少一种可检测部分直接或间接结合。在一些可选的实施方案中,靶的检测可以使用与可检测部分直接或间接结合的特异性抗体来完成。

[0042] 在第二元件(b)中,本发明的装置可以包括含有直接或间接固定在固体支持物上的生物药物的捕获组合物;和

[0043] 最后,作为第三元件(c),该装置可以包括适用于接收和运输生物样品的固体支持物。

[0044] 本发明的另一个方面涉及包括以下的试剂盒:

[0045] (a)直接或间接固定在固体支持物上的生物药物;

[0046] (b)生物药物的生物靶(任选地,与可检测部分结合);以及任选地以下至少一种:

[0047] (c)使用说明书;(d)标准曲线和/或对照样品;(e)至少一种抗 λ 链抗体(或可选地,抗 κ 轻链抗体),其任选地与第二可检测部分结合;和(f)对所述生物药物特异的至少一种非中和性抗体,其中所述非中和性抗体被固定在固体支持物上。

[0048] 在一些实施方案中,本发明的试剂盒可适用于预测和评估受试者对生物药物治疗的响应性、适用于监测疾病进展和疾病复发的早期预后。

[0049] 在又一个方面中,本发明涉及用于确定用生物药物治疗的受试者的生物样品中的活性生物药物的水平的方法。在一些实施方案中,该方法可以包括以下步骤:

[0050] 在第一个步骤(a)中,将样品与对所述生物药物特异的至少一种非中和性抗体一起孵育。非中和性抗体可以被固定到固体支持物。

[0051] 在步骤(b)中,向步骤(a)的孵育的样品提供生物药物的靶。在一些实施方案中,靶可以与可检测部分(直接或间接)结合。

[0052] 下一个步骤(c)包括检测可检测部分以确定靶的量。该量可以指示存在于生物样品中的被附接到固定的非中和性抗体的活性药物的水平。

[0053] 借助于以下附图,本发明的这些方面和另外的方面将变得明显。

[0054] 附图简述

[0055] 为了更好地理解本文公开的主题并且为了例示可以如何在实践中实施该主题,现在将参考附图通过仅是非限制性的实例的方式描述实施方案,在附图中:

[0056] 图1. 新型抗药物中和性抗体测定

[0057] 生物药物首先被直接或间接固定到固体基质上。添加ADA-疑似血清(ADA-

suspected serum), 允许抗药物抗体结合已固定的药物。在任选的洗涤步骤后, 添加标记形式的靶并且允许其结合已固定的药物。任选地洗涤掉过量的未结合的靶, 并且测量结合的靶。如该图的下图中示出的, 在不存在中和性抗体的情况下 (A), 药物的抗抗原结合位点自由地结合标记的靶, 而在存在中和性抗体的情况下 (B和C), 并且与非中和性抗体 (D) 相反, 结合位点被阻断, 防止靶与药物结合, 并且因此测量到减少的信号。

[0058] 图2. 在存在英夫利昔单抗中和性抗体或非中和性抗体的情况下的TNF α 结合

[0059] 在英夫利昔单抗包被的孔上, 将游离英夫利昔单抗 (白色柱) 或指定浓度的中和性抗体 (灰色柱) 或非中和性抗体 (虚线柱) 孵育30min。结果表示为测量的结合的TNF α 与在不存在抗体情况下获得的基线测量结果 (黑色柱) 相比的百分比。

[0060] 图3. 在存在血清的情况下TNF α 与英夫利昔单抗结合的中和

[0061] 为了确保血清的存在不干扰结果, 用在PBS中的1% BSA中1:20稀释的汇集的 (pooled) 阴性血清进行测定。将标准ELISA板用250ng/ml英夫利昔单抗包被过夜, 并且在PBS中的1% BSA或在稀释在1% BSA溶液中的5% (1:20) 汇集的阴性血清中制备中和性抗体的系列稀释物 (20ng/ml至2.5ng/ml)。添加血清似乎不影响结合的TNF的信号。

[0062] 图4. 定义最佳血清浓度

[0063] 如先前描述地, 用在PBS中的1% BSA中稀释的2%、5%或10%汇集的阴性血清中制备的系列抗体稀释物进行测定。

[0064] 图5. 使用标记的靶作为读出 (readout) 并且在患者血清中对该标记的靶进行测试来测量药物水平

[0065] 将商业化的非中和性抗药物抗体固定到固体基质上。然后添加血清, 允许已固定的抗体捕获存在于样品中的药物。添加标记形式的靶, 其与捕获的活性药物结合, 从而反映样品中的活性药物的量。

[0066] 图6A-图6B. 使用待检测的TNF对英夫利昔单抗血清水平测定进行验证

[0067] 图6A. 使用3.125ng/ml和200ng/ml之间的英夫利昔单抗浓度拟合标准曲线的四参数逻辑回归模型。 $R^2=0.9973$ 。

[0068] 图6B. 通过使用抗Fc检测英夫利昔单抗的常规测定和通过该新测定, 评价来自32名患者的血清样品的药物水平。发现两种方法之间的高相关系数。

[0069] 发明详述

[0070] 从引入单克隆抗体用于治疗免疫介导的紊乱诸如例如IBD以来, 这些剂的使用已经指数地增加。尽管生物剂的效力已被证明的和通常是临床显著的, 但它们不能避免治疗失败, 治疗失败可以表现为原发性无响应、继发性响应丧失或在先前已暴露于药物的患者中重新诱导后无法恢复响应。相比之下, 这些剂的巨大成本连同关于对可能的治疗介导的不良事件的担忧已经导致临床医师和一些国家健康提供机构 (health-payer agency) 考虑在实现某些治疗目标后停止这些治疗, 或探索是否可以在某些患者或临床情况中诸如在术后情况中减少常规给药。为了应对这些挑战, 测量活性药物和抗药物抗体, 特别是中和性抗药物抗体 (其在患者亚组中引发) 的水平已经成为阐明响应丧失的机制和指导相当大一部分患者的治疗的潜在有力的工具。然后转化这些测量结果以便为无响应患者选择最佳策略和/或在维持疗法表现良好的患者中调整持续疗法或甚至停止疗法。基于该测试的方法是朝向个体化治疗免疫介导的紊乱诸如IBD的重要飞跃。

[0071] 因此,本文公开的发明具有特别的临床相关性,因为在第一方面中,本发明涉及一种用于确定用生物药物治疗的受试者的生物样品中的中和性抗药物抗体(nADA)的水平的方法。在一些实施方案中,本发明的方法可以包括以下步骤:

[0072] 首先,在步骤(a)中,将生物样品与直接或间接固定在固体支持物上的生物药物一起孵育。步骤(b)包括向步骤(a)的孵育的样品提供生物药物的靶,并且将该靶与固定的药物一起孵育。应当理解,本发明的方法使用的靶可以与可检测部分(直接或间接)缔合,或可选地,对所述靶特异的特定抗体或任何其他亲和分子(特别是当与固定的药物结合时)可以被用于检测靶。在又一些可选的实施方案中,靶可以不与可检测部分直接或间接缔合。

[0073] 在步骤(c)中,确定与固定的药物结合的靶的量。如上文指示的,该步骤可以通过检测与靶缔合的可检测部分,或可选地,通过使用识别并结合附接到固定的药物的靶的特定抗体(或任何亲和分子)来进行。应当注意,确定的标记的靶的量指示存在于生物样品中的中和性抗药物抗体的水平。应当注意,在某些实施方案中,样品中的nADA的水平或量可以与与固定的药物结合的靶的量或水平呈负相关。更具体地,高水平的结合的靶指示样品中低水平的nADA,并且标记的靶的低结合反映样品中高水平的与固定的药物结合从而防止结合靶的nADA。在一些实施方案中,本发明的方法的非限制性说明由图1和实施例1展示。更进一步地,在一些特定的和非限制性的实施方案中,样品中nADA的水平可以反映或掩盖与活性药物水平相关的一些间接信息,其中高水平的nADA通常可以反映和指示活性药物水平降低。

[0074] 如本文使用的,术语“药物”、“生物药物”及其复数可互换地使用并且是指由生物分子或材料即二者组成或者包含生物分子或材料即二者的药物,所述生物分子或材料为蛋白质、多肽、肽、多核苷酸、寡核苷酸、多糖、寡糖及其片段,以及细胞、组织、生物流体或其提取物,并且药物在受试者中诱导抗体。在一些实施方案中,生物药物可以包括蛋白质,诸如单克隆抗体、细胞因子、可溶性受体、生长因子、激素、酶、粘附分子和融合蛋白和肽,它们是对已知调节疾病机制的某些靶特异的。在又一些另外的实施方案中,生物药物可以包括或靶向参与分子过程和/或细胞过程诸如细胞周期、细胞存活、凋亡、免疫等的任何组分。在更具体的实施方案中,生物药物可以是任何检查点蛋白或其任何调节剂或抑制剂、或其任何组合。在又一些另外的实施方案中,生物药物(或它们的前体或组分)可以从活的来源人类、动物、植物、真菌或微生物中分离。

[0075] 更进一步地,在一些实施方案中,“生物药物”或“生物制品(biologics)”是指一类借助包括重组DNA技术的生物过程产生的治疗剂,其通常是以下三种类型中的一种:(a)与天然存在的蛋白质相似的物质;(b)单克隆抗体;和(c)通常基于与免疫球蛋白框架连接的天然存在的受体的受体构建体或融合蛋白。生物制品的主要种类包括但不限于:血液因子(诸如因子VIII和因子IX)、溶栓剂(诸如组织纤溶酶原活化物)、激素(诸如胰岛素、胰高血糖素、生长激素、促性腺激素)、造血生长因子(诸如红细胞生成素、集落刺激因子)、干扰素(诸如干扰素- α 、干扰素- β 、干扰素- γ)、基于白细胞介素的产品(诸如白细胞介素-2)、疫苗(诸如乙型肝炎表面抗原)和单克隆抗体。用重组DNA技术制备的生物药物的非限制性实例可以包括以下至少一种:阿巴西普(abatacept)(**Orencia®**),其为包含融合到CTLA-4的细胞外结构域的免疫球蛋白IgG1的Fc区的融合蛋白,被用于通过干扰T细胞的免疫活性治疗

自身免疫疾病如类风湿性关节炎；红细胞生成素或红细胞生成素 α (**Epogen®**), 其为使用重组DNA技术在细胞培养中产生的人类红细胞生成素, 其刺激红细胞生成并且被用于治疗通常与慢性肾衰竭和癌症化学疗法相关的贫血；莫罗单抗-CD3 (Muromonab-CD3) (Orthoclone **OKT3®**), 其为作为免疫抑制剂药物被给予以降低具有器官移植物的患者中的急性排斥而起作用的单克隆抗体, 它与循环T细胞的表面上的T细胞受体-CD3-复合物结合, 从而诱导T细胞的阻滞 (blockage) 和凋亡；阿昔单抗 (Abciximab) (**ReoPro®**), 其为主要在冠状动脉手术期间和之后使用的糖蛋白 IIb/IIIa 受体拮抗剂；巴利西单抗 (Basiliximab) (**Simulect®**), 其为IgG1同种型的嵌合CD25单克隆抗体, 被用作免疫抑制剂以预防即时移植排斥；和帕利珠单抗 (Palivizumab) (**Synagis®**), 其为针对呼吸道合胞病毒 (RSV) 的F蛋白的A抗原位点中的表位的人源化单克隆抗体 (IgG)。

[0076] 如上文详细描述, 已知在一些情况中, 生物药物在体内引发抗药物抗体 (ADA) 的形成, 并且它们的检测通常等同于免疫原性的测量。随ADA形成而来的大多数不良作用, 诸如药理学消除、对治疗暴露的影响或超敏反应, 是ADA和治疗性蛋白之间形成免疫复合物的后果。它们的水平、相互作用的动力学、尺寸、多克隆多样性、分布和Fc介导的生理作用可以被潜在地转化为临床上可观察到的不良作用。ADA代表分析物的非常复杂的集合, 因为它们通常是多克隆的, 可能包括不同的同种型 [免疫球蛋白 (Ig) G、IgA、IgM或IgE], 与药物分子的不同区域 (“结构域”) 结合, 亲和力 (结合强度) 不同并且可以在患者之间不同。应当理解, 如本文指明的nADA还可以适用于本文随后公开的本发明的任何其他方面。

[0077] 存在两种主要类型的ADA: 中和性抗体 (NAb) 和非中和性抗体 (非NAb)。中和性抗体 (NAb) 是与药物结合的并且通过防止靶结合抑制药物的药理学功能的结合性ADA的子集。因此, 非中和性抗体 (非NAb) 是与药物分子上的位点结合的、不影响靶结合并且从而通常不影响药物的药效动力学活性的ADA。在检测到ADA (“结合性” ADA) 后, 确定它们的中和能力, 特别是对于具有短半衰期 (几分钟至几天) 的药物或具有相同内源对应物的那些药物的中和能力是有用的。

[0078] NAb可以在药物被施用后不久抑制药物活性, 但非NAb不抑制药物的药效动力学活性。因此, 本发明的方法具有特别的临床意义, 因为它能够检测中和性抗体 (NAb), 并且因此, 在一些实施方案中, 可以允许评价活性生物药物, 并且此外, 可以允许评价治疗的患者对生物治疗的响应的潜力。更具体地, 中和性抗体的量可以抑制生物药物对期望的靶的期望的活性。在这方面与不存在nADA情况下的生物药物的活性相比, 中和性抗体可以抑制、降低、阻止或消除生物药物的活性 (例如生物药物与它的靶的结合以及从而与此相关的活性) 的约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或约100%或更多。

[0079] 在一些实施方案中, 本发明的方法的步骤 (a) 可以在适合药物-靶的识别和结合的

条件下,或者可选地或另外地,在适合样品中的nADA与固定的药物结合的条件下进行。在又一些另外的实施方案中,该步骤之后可以是洗涤步骤或至少去除样品。在一些实施方案中,洗涤步骤可以包括使用任何合适的洗涤缓冲液,该洗涤缓冲液不仅足以严格去除大部分非特异性结合,而且仅保留标记的靶与固定的生物药物的特异性结合。如果需要,这样的任选的洗涤步骤可以进行一次或更多次,例如1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次或更多次。

[0080] 在一些可选的或任选的实施方案中,本发明的方法还可以包括另外的解离步骤。在一些实施方案中,这样的解离步骤可以在步骤(a)之前进行。如本文使用的,术语解离步骤是指在步骤(a)的孵育之前应用于生物样品的预处理步骤,该预处理步骤在适合使可能干扰测试的表现或准确性的任何复合物释放和/或解离的条件中进行。在一些具体的实施方案中,这样的解离步骤可以使药物/抗药物抗体复合物释放或解离,从而促进nADA与固定的药物的结合。

[0081] 在一些特定的和非限制性的实施方案中,解离步骤可以包括用至少一种解离剂预处理样品约1分钟至30分钟,具体地,1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、11分钟、12分钟、13分钟、14分钟、15分钟、16分钟、17分钟、18分钟、19分钟、20分钟、21分钟、22分钟、23分钟、24分钟、25分钟、26分钟、27分钟、28分钟、29分钟、30分钟或更多分钟,更具体地,15分钟。合适的解离剂的非限制性实例包括任何酸性物质,例如任何酸,诸如乙酸、甘氨酸-HCl或任何等效的酸,随后是中和缓冲液。在一些特定实施方案中,用作解离剂的酸可以以约10mM至约1000mM之间或更大,更具体地,10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM、100mM、150mM、200mM、250mM、300mM、350mM、400mM、450mM、500mM、550mM、600mM、650mM、700mM、750mM、800mM、850mM、900mM、950mM、1000mM或更大的量存在。在又一些另外的具体实施方案中,使用的解离剂可以是量为约300mM至600mM之间的乙酸。在又一些另外的具体实施方案中,使用的乙酸可以是300mM的量。仍然在一些另外的实施方案中,甘氨酸-HCl可以被用作解离剂。在某些具体实施方案中,可以使用量为100mM的甘氨酸-HCl。如上文指示的,在解离步骤之后,解离剂可以通过添加中性缓冲液诸如Tris 1M来中和。

[0082] 在一些实施方案中,生物药物可以以不同浓度直接或间接固定在固体支持物上(还被称为包被步骤)。在更具体的实施方案中,这样的药物浓度可以在从约1ng/ml至约10000ng/ml之间的范围内,具体地,约1ng/ml、约5ng/ml、约10ng/ml、约15ng/ml、约20ng/ml、约25ng/ml、约30ng/ml、约35ng/ml、约40ng/ml、约45ng/ml、约50ng/ml、约55ng/ml、约60ng/ml、约65ng/ml、约70ng/ml、约75ng/ml、约80ng/ml、约85ng/ml、约90ng/ml、约95ng/ml、约100ng/ml或更大,具体地,约110ng/ml、约120ng/ml、约130ng/ml、约140ng/ml、约150ng/ml、约160ng/ml、约170ng/ml、约180ng/ml、约190ng/ml、约200ng/ml、约210ng/ml、约220ng/ml、约230ng/ml、约240ng/ml、约250ng/ml、约260ng/ml、约270ng/ml、约280ng/ml、约290ng/ml、约300ng/ml、约310ng/ml、约320ng/ml、约330ng/ml、约340ng/ml、约350ng/ml、约360ng/ml、约370ng/ml、约380ng/ml、约390ng/ml、约400ng/ml、约410ng/ml、约420ng/ml、约430ng/ml、约440ng/ml、约450ng/ml、约460ng/ml、约470ng/ml、约480ng/ml、约490ng/ml、约500ng/ml或更大,具体地,550ng/ml、600ng/ml、650ng/ml、700ng/ml、750ng/ml、800ng/ml、850ng/ml、900ng/ml、950ng/ml、1000ng/ml或更大,具体地,2000ng/ml、1500ng/ml、3000ng/ml

ml、3500ng/ml、4000ng/ml、4500ng/ml、5000ng/ml、5500ng/ml、6000ng/ml、6500ng/ml、7000ng/ml、7500ng/ml、8000ng/ml、8500ng/ml、9000ng/ml、9500ng/ml、10000ng/ml或甚至更大。在又一些另外的具体实施方案中,固定的生物药物可以是在从100ng/ml至500ng/ml的范围内的量。在更具体的实施方案中,生物药物浓度可以是250ng/ml。

[0083] 更进一步地,本发明的方法的下一个步骤(b)包括向(a)的孵育的样品提供生物药物的靶并且将该靶与固定的药物一起孵育。在某些实施方案中,通过检测标记的靶的可检测部分在步骤(c)中确定标记的靶的水平还可以包括通过任何合适的手段检测来自标记的靶的可检测部分的信号,该信号与结合固定的药物的标记的靶的水平相关。与固定的药物结合的标记的靶的量与受试者的样品中的中和性ADA的量相关(例如,负相关)。根据一些实施方案,通过下文详细描述的任何一种实验方法从样品检测到的信号与结合的靶的量相关并且因此反映中和性ADA的量。应当注意,在某些实施方案中,这样的信号-至-水平数据可以从标准曲线计算和推导。

[0084] 因此,在某些实施方案中,本发明的方法还可以任选地包括使用通过检测每一种预先确定的递增浓度的标记的生物靶的信号而产生的标准曲线,其指示生物样品中的中和性ADA水平。获得这样的标准曲线可以指示评价检测到的标记的结合的靶的水平与存在于生物样品中的中和性ADA的浓度负相关的范围。应当注意,在这方面,当没有观察到检测到的标记的靶的水平的变化时,应当评价标准曲线以排除测量的水平不展示出饱和和类型曲线(即递增浓度展示出相同信号的范围)的可能性。

[0085] 必须理解,在某些实施方案中,如上文描述的这样的标准曲线还可以是如下文描述的本发明提供的任何试剂盒中的一部分或组分。

[0086] 如本文描述的,本发明的方法以及本文随后公开的装置和试剂盒公开了生物药物可以被直接或间接固定在固体支持物上。如本文使用的,术语“固定的”是指生物药物(或非中和性抗体)与固体支持物的表面的稳定缔合。“稳定缔合”意指两个实体之间的物理缔合,其中缔合的平均半衰期是例如在生理条件下的一天或更长时间、两天或更长时间、一周或更长时间、一个月或更长时间,包括六个月或更长时间。根据某些实施方案,稳定缔合由两个实体之间的共价键、两个实体之间的非共价键(例如,离子键或金属键)、或其他形式的化学吸引诸如氢键合、范德华力等产生。适用于在本发明的方法、装置和试剂盒中使用的固体支持物通常基本上不溶于液相。本发明的固体支持物不限于特定类型的支持物。而是,大量支持物是可得的并且是本领域普通技术人员已知的。因此,有用的固体支持物包括固体基质和半固体基质,诸如气凝胶和水凝胶、树脂、珠、生物芯片(包括薄膜包被的生物芯片)、微流体芯片、硅芯片、纳米颗粒、聚合物、多孔板(还被称为微量滴定板或微板)、膜、过滤器、导电金属和不导电金属、玻璃(包括显微镜载玻片)和磁性支持物。有用的固体支持物的更具体的实例包括硅胶、聚合物膜诸如硝化纤维素、颗粒、衍生化塑料膜、玻璃珠、棉、塑料珠、铝凝胶、多糖诸如琼脂糖、尼龙、乳胶珠、磁珠、顺磁性珠、超顺磁性珠、淀粉等。在又一些另外的实施方案中,在电化学测定通过本发明的方法、装置和试剂盒应用的情况下,固体支持物还可以包括纳米尺寸的材料和微米尺寸的材料,诸如金纳米颗粒(GNP)、碳纳米管(CNT)、石墨烯(GR)、磁性颗粒(MB)、量子点(QD)和导电聚合物。在又一些另外的实施方案中,用作固体支持物的这样的纳米尺寸的材料和微米尺寸的材料可以被用于修饰电极表面。因此,在一些实施方案中,特别是当电化学测定通过本发明应用时,固体支持物可以包括导电材料

或者被直接或间接连接到导电材料,导电材料诸如电极或任何其他修饰的电表面,导电材料可以适用于转换由固定的药物及其靶的识别和结合形成的电学信号。更具体地,这样的电极表面能够使电子从标记物(可检测部分)转移到电极,并且受发生在电极表面上的结合事件的影响。在又一些另外的实施方案中,适用于这样的用途的电极可以包括可被固体支持物进一步修饰的玻碳电极和丝网印刷电极(SPE)。

[0087] 如实施例描述的,本发明的方法在其一些实施方案中可以特别适用于检测用抗体治疗的受试者中引发的nADA。因此,在一些实施方案中,用于本发明的方法的合适的生物药物可以是针对生物靶的抗体。

[0088] 如本文使用的,术语“抗体”意指与特定抗原特异性结合或相互作用的任何抗原结合分子或分子复合物。术语“抗体”包括免疫球蛋白分子及其多聚体(例如,IgM),免疫球蛋白分子包括四条多肽链,通过二硫键相互连接的两条重(H)链和两条轻(L)链。每一条重链包含重链可变区(在本文中缩写为HCVR或 V_H)和重链恒定区(CH)。重链恒定区包含3个结构域,CH1、CH2和CH3。每一条轻链包含轻链可变区(在本文中缩写为LCVR或 V_L)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域(CL1)。 V_H 和 V_L 区可以被进一步细分为被称为互补决定区(CDR)的高变区,其散布着被称为框架区(FR)的更保守的区域。每一个 V_H 和 V_L 包含3个CDR和4个FR,按以下顺序从氨基末端向羧基末端排列:FR1、CD1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0089] 通常,抗体包含两条免疫球蛋白(Ig)重链和两条Ig轻链。在人类中,抗体由三个独立的基因座,即分别位于2号染色体、22号染色体和14号染色体的轻链的kappa(κ)链(Ig κ)和lambda(λ)链(Ig λ)基因和重链的IgH基因编码。

[0090] 本发明的方法使用的抗体可以是多克隆抗体、单克隆抗体或人源化抗体或其任何抗原结合片段中的任何一种。术语“抗原结合片段”是指抗体保持与抗原结合的任何部分。抗体功能片段的实例包括但不限于完整的抗体分子、抗体片段,诸如Fv、单链Fv(scFv)、互补决定区(CDR)、 V_L (轻链可变区)、 V_H (重链可变区)、Fab、F(ab)₂'以及那些的任何组合或免疫球蛋白肽的能够与靶抗原结合的任何其他功能部分。

[0091] 如由本领域技术人员理解的,多种抗体片段可以通过多种方法,例如,用酶诸如胃蛋白酶消化完整抗体,或从头合成来获得。抗体片段通常通过化学或通过使用重组DNA方法学从头合成。因此,如本文使用的,术语抗体包括通过修饰完整抗体产生的抗体片段、或使用重组DNA方法学从头合成的那些抗体片段(例如,单链Fv)、或使用噬菌体展示文库鉴定的那些抗体片段。术语抗体还包括二价分子、双抗体(diabody)、三抗体(triobody)和四抗体(tetrabody)。

[0092] 提及“ V_H ”或“ VH ”是指免疫球蛋白重链的可变区,包括Fv、scFv、二硫键稳定的Fv(dsFv)或Fab。提及“ V_L ”或“ VL ”是指免疫球蛋白轻链的可变区,包括Fv、scFv、dsFv或Fab。

[0093] 更具体地,短语“单链Fv”或“scFv”是指其中传统双链抗体的重链的可变结构域和轻链的可变结构域已经被连接以形成一条链的抗体。通常,接头肽被插入在两条链之间以允许可变结构域的稳定化,而不干扰活性结合位点的正确折叠和产生。适用于本发明的单链抗体例如可以作为单体结合。其他示例性单链抗体可以形成双抗体、三抗体和四抗体。

[0094] 应当理解,在一些实施方案中,本发明的方法、装置和试剂盒使用的作为生物药物或作为非中和性抗体的任何抗体不是天然存在的抗体。具体地,本文使用的任何抗体可以不被视为天然产物。在又一些另外的实施方案中,用于产生固定的药物或固定的非中和性

抗体的任何抗体的固定清楚地区分了使用的产物与其天然对应物。

[0095] 在其中本发明的方法的生物药物是抗体的一些实施方案中,步骤(b)中提供的生物靶因此代表并且包括表位。术语“表位”意指能够被抗体结合的任何分子的部分,其还可以被该抗体识别。表位或“抗原决定簇”通常由分子的化学活性表面分组(chemically active surface groupings of molecules)诸如氨基酸或糖侧链组成,并且具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。

[0096] 应当理解,如本文指明的抗体和抗原还可以适用于本文随后公开的本发明的任何其他方面。

[0097] 此外,在某些实施方案中,本发明的方法使用的生物药物的生物靶可以是细胞因子。

[0098] 术语“细胞因子”通常是指由各自各样的造血细胞和非造血细胞产生的、影响其他细胞的行为的蛋白质。它们通过受体起作用,并且在免疫系统中特别重要;细胞因子调节体液免疫响应和基于细胞的免疫响应之间的平衡,并且调控特定细胞群体的成熟、生长和响应性。细胞因子在调控免疫响应中的特定重要性促使产生生物药物以特异性靶向它们。细胞因子可以是诸如酰化刺激蛋白、脂肪因子、Albinterferon、CCL1、CCL2、CCL3、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、Cerberus蛋白、趋化因子、集落刺激因子、CX3CL1、CX3CR1、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCL17、红细胞生成素、FMS样酪氨酸激酶3配体、GcMAF、粒细胞集落刺激因子(或CSF 3)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(或CSF2)、IL 17家族、IL-10家族、干扰素、干扰素 β -1a、干扰素 β -1b、干扰素 γ 、I型干扰素、II型干扰素、III型干扰素、干扰素刺激的基因、白细胞介素1受体拮抗剂、白细胞介素8、白细胞介素12、白细胞介素-18、白血病抑制因子、白细胞促进因子、淋巴因子、淋巴毒素、淋巴毒素 α 、淋巴毒素 β 、巨噬细胞集落刺激因子(CSF1)、巨噬细胞炎性蛋白、巨噬细胞活化因子、单核因子、肌因子(Myokine)、肌联素(Myonectin)、还被称为前B细胞集落增强因子(PBEF1)的烟酰胺磷酸核糖基转移酶(NAmPRT酶或Nampt)、抑癌蛋白M(Oncostatin M)、奥普瑞白细胞介素(Oprelvekin)、血小板因子4、还被称为肿瘤坏死因子配体超家族成员11(TNFSF11)的核因子 κ -B配体的受体活化物(RANKL)、还被称为C-X-C基序趋化因子12(CXCL12)的基质细胞衍生的因子1(SDF1)、肿瘤坏死因子(TNF)超家族诸如肿瘤坏死因子 α 、淋巴毒素 α 、T细胞抗原gp39(CD40L)、CD27L、CD30L、FASL、4-1BBL、OX40L、TNF相关凋亡诱导配体(TRAIL)、还被称为TNF样配体1A(TL1A)的血管内皮生长抑制剂(VEGI)、XCL1、XCL2、XCR1。应当理解,如本文指明的细胞因子还可以适用于本文随后公开的本发明的任何其他方面。

[0099] 更具体地,在一些实施方案中,肿瘤坏死因子(TNF、肿瘤坏死因子 α 、TNF α 、cachexin或恶病质素(cachectin))是特别感兴趣的细胞因子。它参与全身炎症并且是构成急性期反应的细胞因子中的一种。它主要由活化的巨噬细胞产生,尽管它可以由许多其他细胞类型诸如CD4⁺淋巴细胞、NK细胞、嗜中性粒细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞和神经元产生。

[0100] 在一些具体实施方案中,生物靶可以是细胞因子。更具体地,本发明中特别感兴趣的至少一种细胞因子可以是肿瘤坏死因子 α (TNF α)。在更具体的实施方案中,生物靶可以是

人类TNF α 。在又一些另外的实施方案中，TNF α 可以包含由登录号NP_000585.2表示的氨基酸序列。在又一些另外的实施方案中，本发明使用的生物靶可以是包含由SEQ ID NO.1表示的氨基酸序列的人类TNF α 。在又一些另外的实施方案中，这样的人类TNF α 可以由如由SEQ ID NO.2表示的核酸序列编码。归因于TNF- α 的生物活性包括诱导促炎性细胞因子(诸如白细胞介素IL-1和IL-6)、增强白细胞从血管向组织的移动或迁移(通过增加血管的内皮层的通透性)以及增加粘附分子的释放。应当注意，在一些实施方案中，可以由本发明使用的针对TNF- α (其被用作这样的药物的靶)的生物药物可以阻断和抑制本文公开的所述TNF- α 活性中的至少一种。因此，在又一些另外的实施方案中，通过本发明的方法检测的nADA可以是防止生物药物对本文讨论的TNF- α 活性的阻断作用的任何抗体。

[0101] 因此，在其中本发明的方法使用的靶可以是至少一种细胞因子，具体地TNF α 的一些另外的实施方案中，药物可以是对TNF α 特异的抗体。更具体地，药物可以是对TNF α 特异的单克隆抗体。可被用于本发明的方法的这样的抗体的非限制性实例包括英夫利昔单抗、依那西普(etanercept)、阿达木单抗、赛妥珠单抗(certolizumab pegol)、戈利木单抗(golimumab)、其任何生物类似物及其任何组合中的至少一种。

[0102] 在更具体的实施方案中，这样的生物类似物可以包括但不限于**Remsima/INFLECTRA[®]**(英夫利昔单抗-dyyb)、SB4依那西普、SB2英夫利昔单抗和SB5阿达木单抗。

[0103] TNF抑制剂是抑制对肿瘤坏死因子(TNF)的生理响应的药物，生理响应是炎症响应的一部分。使用单克隆抗体诸如英夫利昔单抗**REMICADE[®]**、依那西普、**ENBREL[®]**、阿达木单抗**HUMIRA[®]**、赛妥珠单抗**CIMZIA[®]**、戈利木单抗、**SIMPONI[®]**及其任何生物类似物，仅举几例，**Remsima/INFLECTRA[®]**(英夫利昔单抗-dyyb)、SB4依那西普、SB2英夫利昔单抗和SB5阿达木单抗，可以实现TNF作用的抑制。沙利度胺(Thalidomide)(Immunoprin)及其衍生物来那度胺(lenalidomide)(Revlimid)和泊马度胺(pomalidomide)(Pomalyst, Imnovid)也具有针对TNF的活性。

[0104] 在一些具体实施方案中，本发明的方法使用的生物药物可以是英夫利昔单抗。术语“英夫利昔单抗”是指作为**REMICADE[®]**销售的抗TNF抗体，具有FDA独特成分标识(UNII):B72HH48FLU和DRUG BANK登录号DB00065。英夫利昔单抗是免疫球蛋白G(人类-小鼠单克隆cA2重链)，具有人类-小鼠单克隆cA2轻链的二硫化物，二聚体。更具体地，英夫利昔单抗被用于治疗免疫介导的疾病，诸如克罗恩病(Crohn's disease)、溃疡性结肠炎、银屑病、银屑病性关节炎、强直性脊柱炎和类风湿性关节炎以及白塞病(**Behçet's disease**)和其他状况。英夫利昔单抗通过静脉内输注通常以6周至8周的间隔施用，但不可以口服给予。

[0105] 英夫利昔单抗是一种纯化的重组DNA衍生的嵌合人类-小鼠IgG单克隆抗体，其由与人类重链恒定区和轻链恒定区组合的小鼠重链可变区和轻链可变区组成。英夫利昔单抗具有9.5天的血清半衰期，并且可以在输注治疗后8周在血清中检测到。

[0106] 英夫利昔单抗通过与可溶性形式的TNF- α 和跨膜形式的TNF- α 二者以高亲和力结合来中和TNF- α 的生物活性，从而抑制TNF- α 与其受体的有效结合。

[0107] 英夫利昔单抗具有对TNF- α 的高特异性，并且不中和TNF β (TNF β ，还被称为淋巴毒素 α)，TNF β 是一种使用与TNF- α 不同的受体的不相关的细胞因子。

[0108] 阻断的TNF- α 作用进一步导致局部和全身促炎性细胞因子(即IL-1、IL-6)的下调、淋巴细胞和白细胞向炎症部位迁移的降低、TNF产生细胞(即活化的单核细胞和T淋巴细胞)的凋亡的诱导、增加的核因子- κ B抑制剂水平以及内皮粘附分子和急性期蛋白的降低。英夫利昔单抗还减弱由滑膜细胞和/或软骨细胞合成的组织降解酶的产生。

[0109] 在又一些另外的具体实施方案中,本发明的方法使用的生物药物可以是依那西普。术语“依那西普”是指作为 **ENBREL**[®]销售的抗TNF抗体,具有FDA独特成分标识(UNII):0P401G70JC和DRUG BANK登录号DB00005。依那西普是由重组DNA产生的融合蛋白。依那西普将TNF受体如下融合到IgG1抗体的恒定末端:残基1-235-是肿瘤坏死因子受体(人类)融合蛋白,而残基236-467-是免疫球蛋白G1(人类 γ 1-链Fc片段)。依那西普是一个大分子,具有150kDa的分子量。

[0110] 在仍另外的具体实施方案中,本发明的方法使用的生物药物可以是阿达木单抗。术语“阿达木单抗”是指作为 **HUMIRA**[®]销售的抗TNF抗体,具有FDA独特成分标识(UNII):FYS6T7F842和DRUG BANK登录号DB00051。阿达木单抗是免疫球蛋白G1(人类单克隆D2E7重链),具有人类单克隆D2E7轻链的二硫化物,二聚体。

[0111] 在又一些另外的具体实施方案中,本发明的方法使用的生物药物可以是赛妥珠单抗。术语“赛妥珠单抗”是指作为 **CIMZIA**[®]销售的抗TNF抗体,具有FDA独特成分标识(UNII):UMD07X179E。赛妥珠单抗是与TNF α 特异性结合并且以剂量依赖的方式中和TNF α 的肿瘤坏死因子抗体的聚乙二醇化的Fab'片段。

[0112] 在一些另外的具体实施方案中,本发明的方法使用的生物药物可以是戈利木单抗。术语“戈利木单抗”是指作为 **SIMPONI**[®]销售的抗TNF抗体,具有FDA独特成分标识(UNII):91X1KLU43E。戈利木单抗是免疫球蛋白G1(人类单克隆CNT0 148 γ 1-链),具有人类单克隆CNT0 148 κ -链的二硫化物,二聚体。其分子量为约147kDa。

[0113] 在仍另外的具体实施方案中,本发明的方法使用的生物药物可以是优特克单抗(Ustekinumab)。术语“优特克单抗”是指作为 **STELARA**[®]销售的、与IL-12和IL-23结合的人源化单克隆抗体,具有FDA独特成分标识(UNII):FU77B4U5Z0。优特克单抗是免疫球蛋白G1,抗(人类白细胞介素12p40亚基)(人类单克隆CNT0 1275 γ 1-链),具有人类单克隆CNT0 1275 κ -链的二硫化物,二聚体。应当理解,在某些实施方案中,本发明的方法使用的药物靶可以是任何生物类似物,特别是上文提及的原始生物制品(originator biologic)的任何经批准的生物类似物。

[0114] 在仍另外的具体实施方案中,本发明的方法使用的生物药物可以是Etrolizumab。术语“Etrolizumab”或“rhuMAb β 7”是指针对整合素 α 4 β 7和 α E β 7的 β 7亚基的人源化单克隆抗体,具有FDA独特成分标识(UNII):I2A72G2V3J。Etrolizumab是免疫球蛋白G1,抗(人类整合素 α 47/整合素 α E7)(人类-大鼠单克隆rhuMAb β 7重链),具有人类-大鼠单克隆rhuMAb β 7轻链的二硫化物,二聚体。应当理解,在某些实施方案中,上文的任何生物类似物,特别是任何经批准的生物类似物,可以被本发明的方法作为靶使用。在又一些另外的实施方案中,本发明的方法使用的药物可以是靶向白细胞介素23A并且在临床上用于治疗炎性状况诸如中度至重度溃疡性结肠炎的Mirikizumab(LY3074828)。在又一些另外的实施方案中,本发明的方法可以使用Risankizumab(ABBV-066),其是正被临床上用于治疗多种炎性疾病包括银屑病

病、克罗恩病和银屑病性关节炎的抗IL-23抗体。

[0115] 在更具体的实施方案中,生物类似物可以是上文提及的原始生物制品的任何经批准的生物类似物。

[0116] 术语“生物类似物”意指与美国许可的参考生物产品高度相似的生物产品,尽管有无临床活性组分的微小差异,并且关于产品的安全性、纯度和效力,生物产品和参考产品之间不存在临床上有意义的差异。此外,相似的生物药物或“生物类似物”药物是与已经由欧洲药品管理局(European Medicines Agency)授权使用的另一种生物药物相似的生物药物。术语“生物类似物”还被其他国家和地区监管机构同义地使用。生物产品或生物药物是从生物来源诸如细菌或酵母制成或得到的药物。例如,如果参考抗TNF单克隆抗体是英夫利昔单抗,由药物监管机构参考英夫利昔单抗批准的抗TNF生物类似物单克隆抗体是英夫利昔单抗的“生物类似物”或是英夫利昔单抗的“其生物类似物”。

[0117] 在欧洲,相似的生物药物或“生物类似物”药物是与已经由欧洲药品管理局(EMA)授权使用的另一种生物药物相似的生物药物。在欧洲,关于相似的生物应用的相关法律基础是经修订的第726/2004号法规(EC)第6条和指令2001/83/EC第10(4)条,并且因此在欧洲,生物类似物可以根据第726/2004号法规(EC)第6条和指令2001/83/EC第10(4)条授权、批准授权或进行授权申请。在欧洲,已经授权的原始生物药物产品可以被称为“参考药物产品”。关于相似生物药物产品的CHMP指南(CHMP Guideline on Similar Biological Medicinal Products)中概述了对于被认为生物类似物的产品的一些要求。此外,产品特定的指南,包括与单克隆抗体生物类似物相关的指南,由EMA基于产品逐个提供。如本文描述的生物类似物在质量特征、生物活性、作用机制、安全性谱和/或效力或其任何组合方面与参考药物产品相似。此外,生物类似物可以被用于或预期用于治疗与参考药物产品相同的状况。因此,如本文描述的生物类似物可以被认为具有与参考药物产品相似或高度相似的质量特征。可选地或另外地,如本文描述的生物类似物可以被认为具有与参考药物产品相似或高度相似的生物活性。可选地或另外地,如本文描述的生物类似物可以被认为具有与参考药物产品相似或高度相似的安全性谱。可选地或另外地,如本文描述的生物类似物可以被认为具有与参考药物产品相似或高度相似的效力。如本文描述的,在欧洲,将生物类似物与已经由EMA授权的参考药物产品进行比较。然而,在一些情况中,在某些研究中,生物类似物可以与已经在欧洲经济区(European Economic Area)以外授权的生物药物产品(非EEA授权的“比较物(comparator)”)进行比较。这样的研究包括例如某些临床研究和体内非临床研究。

[0118] 如本文使用的,术语“生物类似物”还涉及已经或可以与非EEA授权的比较物比较的生物药物产品。某些生物类似物是蛋白质诸如抗体、抗体片段(例如,抗原结合部分)和融合蛋白。蛋白质生物类似物可以具有在氨基酸结构上具有不显著影响多肽的功能的少量修饰(包括例如氨基酸的缺失、添加和/或替换)的氨基酸序列。生物类似物可以包含与其参考药物产品的氨基酸序列具有97%或更大例如97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。生物类似物可以包括一种或更多种翻译后修饰,例如,尽管不限于与参考药物产品的翻译后修饰不同的糖基化、氧化、脱酰胺和/或截短,只要差异不导致药物产品的安全性和/或效力的改变。生物类似物可以具有与参考药物产品相同或不同的糖基化模式。特别地,尽管不排除地,如果差异解决或预期解决与参考药物产品相关的安全性问题,生物类似物可

以具有不同的糖基化模式。此外,生物类似物可以在例如其强度、药物形式、制剂、赋形剂和/或表现形式 (presentation) 方面偏离参考药物产品,只要药物产品的安全性和效力不受损。生物类似物可以包括与参考药物产品相比的例如药代动力学 (PK) 和/或药效动力学 (PD) 谱的差异,但仍然被认为与参考药物产品足够相似以被授权或被认为适合于授权。在某些情况中,生物类似物展示出与参考药物产品相比不同的结合特征,其中不同的结合特征被监管机构诸如EMA认为不是作为相似的生物产品授权的障碍。术语“生物类似物”还被其他国家和地区监管机构同义地使用。

[0119] 在一些具体实施方案中,已经开发了用于治疗免疫介导的紊乱诸如炎症肠病 (IBD) 的上文提及的生物药物。

[0120] 在又一些其他具体实施方案中,本发明的方法可以适用于患有免疫介导的紊乱的受试者。

[0121] 如本文使用的“免疫相关的紊乱”或“免疫介导的紊乱”包括通过免疫系统的活化或抑制与受试者的免疫系统相关的任何状况,或者可以通过靶向受试者中的免疫反应的某种组分诸如适应性免疫反应或先天免疫反应来治疗、预防或诊断的任何状况。免疫相关的紊乱可以是慢性炎症状况,具体地炎症性疾病、病毒感染、自身免疫疾病、代谢紊乱和增殖性紊乱中的任何一种,具体地癌症。在一些实施方案中,免疫介导的紊乱可以是炎症性疾病、自身免疫疾病和增殖性紊乱(具体地癌症)中的至少一种。因此,在更具体的实施方案中,本发明的方法适用于炎症紊乱、自身免疫疾病和增殖性疾病中的至少一种。

[0122] 一般术语“炎症紊乱”涉及其中炎症主要对有害刺激诸如病原体、受损的细胞或刺激物响应的紊乱。炎症是一种涉及免疫细胞、血管和分子介质的保护性响应以及长期氧化应激的最终结果。

[0123] “炎症紊乱”是一大组牵涉许多种人类疾病的紊乱。此外,免疫系统可以参与炎症紊乱,炎症紊乱起因于生物体针对其自身的物质的异常免疫反应,或出于未知原因启动炎症过程,即分别自身免疫紊乱和自身炎症紊乱。具有炎症过程的病因学起源的非免疫疾病包括癌症、动脉粥样硬化和缺血性心脏病。

[0124] 炎症的目的是消除细胞损伤的初始原因,清除坏死的细胞和组织,并且启动组织修复。急性炎症的经典生理学迹象是疼痛、发热、发红、肿胀和功能丧失。一系列生物化学事件传播并且使涉及局部血管系统、免疫系统和受损组织内的多种细胞的炎症响应成熟。长期的炎症,被称为“慢性炎症”,导致存在于炎症部位处的细胞类型的进行性变化,并且其特征是来自炎症过程的组织的同时破坏和愈合。炎症还诱导高全身水平的特定细胞因子,特定细胞因子被指定为促炎症细胞因子,其包括IL-1 α 、IL-6、IL-8、IFN- γ 、TNF- α 、IL-17和IL-18。当不再需要预防对组织的不必要的“旁观(bystander)”损伤时,必须主动终止炎症响应。未能如此则导致慢性炎症和细胞破坏。

[0125] 如本文使用的术语“与炎症相关的病理状况”涉及至少一种但不限于以下:炎症肠病(例如,克罗恩病、溃疡性结肠炎)、关节炎(强直性脊柱炎、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、银屑病性关节炎)、哮喘、动脉粥样硬化、皮炎和银屑病。

[0126] 在更具体的实施方案中,与本发明的方法相关的免疫介导的紊乱可以是炎症肠病 (IBD)。

[0127] 炎症肠病 (IBD) 是常见的胃肠紊乱,其可以被视为粘膜免疫系统的不适当活化导

致肠损伤和相关的肠外表现的结果。IBD是结肠和小肠的一组炎性状况。IBD的主要类型是克罗恩病和溃疡性结肠炎(UC)。IBD的其他形式占远远更少的病例。这些是胶原性结肠炎、淋巴细胞性结肠炎、缺血性结肠炎、转移性结肠炎和不确定性结肠炎,在这样的情况中不可能做出明确的诊断将克罗恩病和溃疡性结肠炎区分开。

[0128] 克罗恩病和UC之间的主要差异是炎性变化的位置和性质。克罗恩病可以影响胃肠道的任何部分,从口到肛门(跳过损伤),尽管大多数病例开始于回肠末端。相比之下,溃疡性结肠炎限于结肠和直肠。通过显微镜,溃疡性结肠炎限于粘膜(肠的上皮衬里(lining)),而克罗恩病影响整个肠壁。最后,克罗恩病和溃疡性结肠炎展现出不同比例的肠外表现(诸如肝脏问题、关节炎、皮肤表现和眼问题)。克罗恩病和溃疡性结肠炎共享相同的症状,诸如腹泻、呕吐、体重减轻、发热和腹痛。

[0129] 最近的一项假设认为,因为没有传统的靶诸如寄生虫和蠕虫,IBD可能由攻击消化道的多种组织的过度活化的免疫系统引起。

[0130] 存在伴随IBD的若干种肠外表现,例如:自身免疫现象,其中免疫复合物在靶器官损伤中具有作用。具有IBD(仅UC)的患者具有针对结肠细胞的组分和若干种不同的细菌抗原(主要是CD)的抗体。由于上皮损伤,这些抗原被认为可进入免疫系统。

[0131] 在一些具体实施方案中,适用于本发明的诊断和预后方法的免疫介导的紊乱可以是炎性肠病,具体地溃疡性结肠炎(UC)、克罗恩病(CD)和不确定性结肠炎(IC)或未分类的IBD(IBDU)中的任何一种。

[0132] 克罗恩病,如许多其他慢性炎性疾病一样,可以引起多种全身症状。在儿童中,生长异常是常见的。许多儿童基于不能维持生长而首先被诊断为具有克罗恩病(儿科克罗恩病)。除了涉及全身和胃肠之外,克罗恩病可以影响许多其他器官系统。眼睛的内部部分的炎症,被称为葡萄膜炎,特别是在暴露于光(畏光)时可以引起眼睛疼痛。炎症还可能涉及眼睛的白色部分(巩膜),一种被称为巩膜外层炎的状况。如果未治疗,巩膜外层炎和葡萄膜炎二者可以引起视力丧失。

[0133] 克罗恩病与被称为血清阴性脊柱关节病的一种类型的风湿病相关。这组疾病的特征是一个或更多个关节的炎症(关节炎)或肌肉附着(muscle insertion)的炎症(肌腱端炎(enthesis))。关节炎可以影响更大的关节诸如膝或肩,或者可能排他地涉及手和足的小关节。关节炎还可能涉及脊柱,如果涉及整个脊柱,导致强直性脊柱炎,或者如果仅涉及下脊柱,仅导致骶髂关节炎。关节炎的症状包括疼痛、温暖、肿胀、僵硬的关节和关节活动性或功能的丧失。

[0134] 溃疡性结肠炎是胃肠道的衬里的另一种慢性炎症。在美国,溃疡性结肠炎发生于每100,000人的35-100人中或少于群体的0.1%。认为发作的年龄呈双峰分布,而发病的第二个峰出现在生命的第六个十年。该疾病对女性的影响大于男性。

[0135] 溃疡性结肠炎的临床表现取决于疾病过程的程度。患者通常表现出逐渐发作的腹泻,混有血液和粘液。他们还可能具有体重减轻和在直肠检查中出血的迹象。该疾病通常伴有不同程度的腹痛,从轻微不适至严重疼痛的痉挛。

[0136] 溃疡性结肠炎通常局限于结肠(大肠),几乎普遍地涉及直肠。受影响的结肠的衬里变得发炎并且特征是开放性疮或溃疡,它们出血并且产生脓。结肠中的炎症还引起结肠频繁地排空,引起混有血液的腹泻。溃疡性结肠炎是一种间歇性疾病,具有症状加重期和相

对无症状期。尽管溃疡性结肠炎的症状有时可以自行减轻,但该疾病通常需要治疗以进入缓解期。

[0137] 溃疡性结肠炎与影响身体的许多部位的一般炎性过程相关。有时这些相关的肠外症状是疾病的初始迹象,诸如青少年的疼痛的、关节炎的膝盖。然而,该疾病的存在不能被确认,直到肠道表现的发作。

[0138] 约一半被诊断为具有溃疡性结肠炎的人具有轻微的症状。其他人患有频繁发热、血性腹泻、恶心和严重腹部痉挛。溃疡性结肠炎还可能引起诸如关节炎(血清阴性关节炎、强直性脊柱炎、骶髂关节炎)、眼睛炎症(虹膜炎、葡萄膜炎、巩膜外层炎)、肝病和骨质疏松的问题。这些并发症可能是由免疫系统触发的炎症的结果,因为具有溃疡性结肠炎的人具有免疫系统的异常。

[0139] 对于关节炎,相关的状况可以包括,通过举例的方式,所有类型的原发性炎性关节炎,例如类风湿性关节炎、银屑病性关节炎、强直性脊柱炎(先前被称为Bechterew病或Bechterew综合征)、幼年特发性关节炎(JIA)和痛风(代谢性关节炎)。除了指示的关节炎的所有原发性形式之外,通过本发明的方法诊断并且通过生物药物治疗的状况可以包括关节炎的所有继发性形式,例如红斑狼疮、**Henoch-Schönlein**紫癜、血色病、肝炎、韦格纳肉芽肿病(和许多其他血管炎综合征)、莱姆病和家族性地中海热。

[0140] 在又一些另外的实施方案中,本发明的方法可以与患有关节炎并且通过生物药物治疗的受试者相关。

[0141] 应当理解,多种形式的关节炎通常可以被分组为两个主要的类别,炎性关节炎和退行性关节炎,每一个类别具有不同的原因。因此,根据一些具体实施方案,本发明的预后方法可以特别预期用于患有炎性紊乱例如炎性关节炎的患者,特别是用至少一种生物药物治疗的那些患者的诊断和/或预后。

[0142] 炎性关节炎的特征是滑膜炎、骨侵蚀、骨质减少、软组织肿胀和关节间隙均匀变窄。更具体地,关节炎的标志是滑膜炎和骨侵蚀。后者将初始作为局灶性不连续的薄的白色软骨下骨板出现。通常,该软骨下骨板甚至可以在严重骨质减少的情况中被观察到,而它的不连续性指示侵蚀。尽管真实的是关节周围骨质减少和局灶性软骨下骨质减少可以在真正的骨侵蚀之前出现,但骨侵蚀的存在指示明确的关节炎。随着骨侵蚀扩大,骨质破坏扩展到髓腔内的小梁中。炎性关节炎的一个重要特征与边缘骨侵蚀的概念有关。该术语给出了位于发炎的滑膜关节的边缘处的骨侵蚀。该特定位置代表关节内但未被透明软骨覆盖的关节的部分。因此,早期关节炎将在关节表面下的软骨下骨板的侵蚀之前产生边缘侵蚀。当寻找骨侵蚀时,关节的多个视图对于剖析(profile)多个骨表面是必需的。炎性关节过程的第二个重要特征是关节间隙均匀变窄。该情况出现是因为关节软骨的破坏在整个关节内间隙是均匀的。炎性关节疾病的第三个发现是软组织肿胀。

[0143] 全身性关节炎的特征是涉及多个关节,并且包括两个主要的类别,类风湿性关节炎和血清阴性脊柱关节病。

[0144] 类风湿性关节炎(RA)(其在一些实施方案中也可以适用于本发明)是一种慢性全身性自身免疫紊乱,其最常见地引起关节的炎症和组织损伤(关节炎)和腱鞘的炎症和组织损伤,以及贫血。类风湿性关节炎还可以在肺、心包膜、胸膜和眼睛的巩膜中产生弥漫性炎症,并且还产生最常见于皮下组织的结节性损伤。类风湿性关节炎可以是一种致残和痛苦

的状况,其可以导致功能和活动性的基本丧失。血清标志物诸如类风湿因子和针对环瓜氨酸肽的抗体是类风湿性关节炎的重要指示物。类风湿性关节炎的放射显影特征是关节炎的那些放射显影特征,并且包括特定骨质减少、关节间隙均匀丧失、骨侵蚀和软组织肿胀。因为炎症的慢性性质,另外的发现诸如关节半脱位和软骨下囊肿也可能是明显的。

[0145] 血清阴性脊柱关节病类别包括银屑病性关节炎、反应性关节炎和强直性脊柱炎,并且特征是手和足的炎症、多关节受累和远端受累的迹象,具有骨增生的另外的特征。

[0146] 银屑病性关节炎是一种特征为皮肤的炎症(银屑病)和关节的炎症(关节炎)的慢性疾病。

[0147] 男性和女性患银屑病的可能性相同。对于银屑病性关节炎,男性更可能具有脊柱炎形式(其中脊柱受影响),并且女性更可能具有类风湿性关节炎形式(其中可能涉及许多关节)。银屑病性关节炎通常在年龄为35岁-55岁的人中发展。然而,银屑病性关节炎可能在几乎任何年龄的人中发展。银屑病性关节炎与若干种其他关节状况诸如强直性脊柱炎、反应性关节炎以及与克罗恩病和溃疡性结肠炎相关的关节炎共享许多特征。所有这些状况可以引起脊柱和关节、眼睛、皮肤、口和多种器官中的炎症。

[0148] 强直性脊柱炎(AS,先前被称为Bechterew病、Bechterew综合征、Marie-Strümpell病和脊柱关节炎的形式)通常是一种慢性和进行性形式的关节炎,由多个关节特别是脊柱小平面关节(spinal facet joint)和脊柱的底部处的骶髂关节的炎症引起。虽然强直性脊柱炎倾向于影响这些关节和脊柱周围的软组织,但还可能影响其他关节以及关节周围的组织(肌腱端(entheses),其中腱和韧带附着于骨)。强直性脊柱炎还可能涉及除关节以外的身体的区域,诸如眼睛、心脏和肺。该紊乱频繁引起骨强直(或融合),因此从希腊语强直(ankylos)衍生的术语强直(ankylosing)意指关节僵硬。脊椎炎意指椎骨(或脊柱)的炎症,并且是指一个或更多个椎骨的炎症。

[0149] 强直性脊柱炎主要影响年轻男性。男性具有强直性脊柱炎的可能性是女性的4倍至10倍。具有该疾病的大多数人在15岁-35岁的年龄发展该疾病,发作时的平均年龄为26岁。

[0150] 反应性关节炎(ReA),另一种类型的血清阴性脊柱关节病,是响应于身体的另一个部分中的感染而发展的自身免疫状况。接触细菌并且发展成感染可以触发反应性关节炎。反应性关节炎具有与其他多种统称为“关节炎”的状况诸如风湿病相似的症状。反应性关节炎由另一种感染引起并且因此是“反应性的”,即取决于另一种状况。在慢性病例中,“触发”感染通常已经被治愈或正在缓解,因此使得难以确定初始原因。

[0151] 反应性关节炎的症状经常包括三种似乎不相关的症状(大关节的炎性关节炎、眼睛炎症(结膜炎和葡萄膜炎)和尿道炎)的组合。应当指出,ReA还被称为Reiter综合征,它还被称为关节炎尿道炎、性病关节炎和肠多动脉炎。

[0152] 应当理解,存在许多其他形式的炎性关节炎,包括幼年特发性关节炎、痛风和假性痛风,以及与结肠炎或银屑病相关的关节炎。因此应当理解,本发明的方法还适用于患有这些状况的患者,特别是用生物药物治疗的那些患者。

[0153] 更具体地,在一些实施方案中,本发明的方法可以适用于用生物药物治疗的患有幼年特发性关节炎(JIA)的受试者。JIA,是儿童中最常见形式的持续性关节炎(本文中的幼年是指16岁前发作,特发性是指不具有明确原因的状况,并且关节炎是关节的滑膜的炎

症)。JIA是在儿童中观察到的关节炎的子集,其可能是短暂的和自限性的或慢性的。JIA与成人中通常观察到的关节炎(类风湿性关节炎)和可以存在于儿童中的为慢性状况的其他类型的关节炎(例如银屑病性关节炎和强直性脊柱炎)显著不同。

[0154] 应当理解,本发明的方法可适用于患有任何疾病阶段或类型的上文讨论的任何免疫介导的紊乱或上文详细描述的任何症状的受试者。

[0155] 还应当理解,可用于本发明的方法、装置和试剂盒中的生物药物可以是用于治疗本发明公开的任何紊乱的任何生物药物。

[0156] 如上文指示的,适用于本发明的免疫介导的疾病的子集被称为自身免疫疾病。如本文使用的,自身免疫疾病从身体针对通常存在于身体中的物质和组织的不适当免疫响应产生。换言之,免疫系统将身体的某个部分误认为病原体并且攻击它本身的细胞。这可能限于某些器官(例如,在自身免疫甲状腺炎中),或涉及不同位置中的特定组织(例如可以影响肺和肾二者中的基底膜的Goodpasture病)。自身免疫疾病通过Witebsky假设分类,并且包括(i)来自致病抗体或致病T细胞的转移的直接证据,(ii)基于实验动物中自身免疫疾病的复制的间接证据,以及(iii)来自临床线索的间接证据。仅举几例,适用于本发明的方法的自身免疫疾病包括但不限于伊顿-兰伯特综合征(Eaton-Lambert syndrome)、Goodpasture综合征、Greave病、吉兰-巴雷综合征(Guillain-Barr syndrome)、自身免疫性溶血性贫血(AIHA)、肝炎、胰岛素依赖性糖尿病(IDDM)和NIDDM、系统性红斑狼疮(SLE)、多发性硬化(MS)、重症肌无力、神经丛紊乱例如急性臂神经炎、多腺体缺陷综合征、原发性胆汁性肝硬化、硬皮病、血小板减少症、甲状腺炎例如桥本病(Hashimoto's disease)、干燥综合征(Sjogren's syndrome)、过敏性紫癜、银屑病、幼年特发性关节炎、痛风和假性痛风混合性结缔组织疾病、多肌炎、皮肌炎、血管炎、结节性多动脉炎、风湿性多肌痛、韦格纳肉芽肿病、Behget综合征、天疱疮、大疱性类天疱疮、疱疹样皮炎和脂肪肝病。

[0157] 在又一些另外的实施方案中,本发明的方法可以适用于患有免疫介导的紊乱的受试者,所述免疫介导的紊乱可以是增殖性紊乱,具体地癌症。如本文描述本发明使用的,“癌症”、“肿瘤”和“恶性肿瘤”都等同地涉及组织或器官的增生。如果组织是淋巴系统或免疫系统的一部分,恶性细胞可能包括循环细胞的非实体肿瘤。其他组织或器官的恶性肿瘤可能产生实体肿瘤。通常,本发明的方法可以适用于非实体肿瘤和实体肿瘤。

[0158] 如本发明中预期的,恶性肿瘤可以选自自由癌、黑色素瘤、淋巴瘤和肉瘤组成的组。可用于本发明的恶性肿瘤可以包括但不限于血液恶性肿瘤(包括白血病、淋巴瘤和骨髓增殖性紊乱)、再生不良性贫血和再生障碍性贫血(病毒诱导的和特发性的二者)、骨髓增生异常综合征、所有类型的副肿瘤综合征(免疫介导的和特发性的二者)和实体肿瘤(包括肺、肝、乳腺、结肠、前列腺、GI道、胰腺和卡波西)。更特别地,恶性紊乱可以是肝细胞癌、结肠癌、黑色素瘤、骨髓瘤、急性或慢性白血病。

[0159] 应当理解,在一些另外的实施方案中,当本发明的方法被用于患有癌症的受试者时,用于治疗癌症的生物药物可以适用于本文。用于治疗癌症的生物药物的一些实例包括但不限于单克隆抗体,诸如贝伐单抗(Bevacizumab)(UNII:2S9ZM9Q9V)、西妥昔单抗(Cetuximab)(UNII:PQX0D8J21J)、帕尼单抗(Panitumumab)(UNII:6A901E312A)、利妥昔单抗(Rituximab)(UNII:4F4X42SYQ6)、阿仑单抗(Alemtuzumab)(UNII:3A189DH42V)、伊匹单抗(Ipilimumab)(UNII:6T8C155666,Yervoy),其为一种检查点抑制剂,具体地一种通过靶

向CTLA-4使免疫系统活化而起作用的单克隆抗体、曲妥珠单抗(Trastuzumab)(UNII:P188ANX8CK,原名为ticilimumab,CP-675,206),其为针对CTLA-4的完全人类单克隆抗体、替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan)(UNII:4Q52C550XK)、lambrolizumab(原名为MK-3475,派姆单抗(Pembrolizumab),**Keytruda®**UNII:DPT003T46P),其为一种检查点抑制剂,具体地一种靶向程序性细胞死亡(PD-1)的人源化抗体、纳武单抗(Nivolumab)(**Opdivo®**UNII:31Y063LBSN),其为结合PD-1的细胞外结构域的抗体的Fab片段、阿特珠单抗(Atezolizumab)(商品名Tecentriq),其为针对蛋白质程序性细胞死亡-配体1(PD-L1)的IgG1同种型的完全人源化工程化的单克隆抗体、Avelumab(商品名Bavencio),其为靶向PD-L1的完全人类单克隆抗体、Durvalumab,其为阻断PD-L1与PD-1和CD80(B7.1)分子的相互作用的人类免疫球蛋白G1κ(IgG1κ)单克隆抗体、Tremelimumab(原名为ticilimumab;UNII:QEN1X95CIX),其为一种检查点抑制剂、以及ado-曲妥珠单抗(ado-trastuzumab emtansine)(UNII:SE2KH7T06F);治疗性肽诸如干扰素ct-2b(IntronA®UNII:43K1W2T1M6)或干扰素P-1b(**Betaseron®**UNII:TTD90R31WZ);粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子诸如沙格司亭(Sargramostim)(**Leukine®**UNII:5TAA004E22);IL-2产品诸如阿地白介素(Aldesleukin)(**Proleukin®**UNII:M89N0Q7EQR)。

[0160] 应当理解,在一些实施方案中,本发明公开的方法、装置和试剂盒可以适用于本发明公开的任何免疫相关的紊乱,并且可以适用于确定患有任何指示的紊乱且用于本文讨论的任何免疫相关的紊乱的生物药物(具体地,本发明指示的任何药物)治疗的患者的样品中的nADA的量。本发明还提供了可适用于确定患有本发明公开的任何免疫相关的紊乱的患者的治疗方案的预后方法。如本文使用的,因为“疾病”、“紊乱”、“状况”等涉及受试者的健康,所以它们可互换地使用并且具有属于这样的术语的每一个或所有的含义。

[0161] 应当理解,当本文中提及病理学时,可互换地使用的术语“相关的(associated)”和“相关的(related)”意指这样的疾病、紊乱、状况或任何病理学,其具有共享因果关系、以高于巧合的频率共存中的至少一种,或其中至少一种疾病、紊乱、状况或病理学引起第二种疾病、紊乱、状况或病理学。

[0162] 应当理解,如本文指明的所有免疫相关的紊乱还可以适用于本文随后公开的本发明的任何其他方面。

[0163] 本发明涉及在用至少一种生物药物治疗的、患有免疫介导的紊乱的受试者中进行的预后方法。“患者”、“个体”或“受试者”意指可能受上文提及的状况影响的以及本文描述的预后方法对其是期望的任何生物体,包括人类。更具体地,本文随后描述的本发明的方法、装置和试剂盒预期用于哺乳动物。“哺乳动物受试者”意指提议的疗法对其是期望的任何哺乳动物,包括人类、马科、犬科和猫科受试者,最具体地是人类。

[0164] 如上文提到的,用至少一种生物药物治疗受试者。术语“治疗”是指向受试者施用的治疗积极效果的完整范围,包括抑制、降低、减轻和缓解已知用生物药物治疗的状况,例如如本文详细描述免疫介导的紊乱。更具体地,疾病的复发(relapse)或复发(recurrence)的治疗或预防包括预防或延缓疾病的发展、预防或延缓症状的发展和/或降低将要发展或预期发展的这样的症状的严重程度。这些还包括改善现有症状、预防另外的症状以及改善或预防症状的潜在代谢原因。应当理解,如本文提及的,术语“抑制”、“缓和”、

“降低”、“减弱”涉及以下任何一值减缓、遏制或降低过程：约1%至99.9%，具体地，约1%至约5%、约5%至10%、约10%至15%、约15%至20%、约20%至25%、约25%至30%、约30%至35%、约35%至40%、约40%至45%、约45%至50%、约50%至55%、约55%至60%、约60%至65%、约65%至70%、约75%至80%、约80%至85%、约85%至90%、约90%至95%、约95%至99%、或约99%至99.9%。

[0165] 关于上文，应当理解，在提供了百分比值的情况下，百分比值诸如例如10%、50%、120%、500%等分别与“倍数变化”值即0.1、0.5、1.2、5等可互换地使用。

[0166] 更进一步地，根据某些实施方案，本发明的方法使用任何适当的生物样品。本说明书和权利要求书中的术语“生物样品”意指包括从哺乳动物受试者获得的样品。

[0167] 在某些实施方案中，适用于本发明的方法的生物样品可以是血清和全血样品或其任何级分或制剂中的任何一种。

[0168] 在一些实施方案中，适用于本发明的方法、装置和试剂盒的样品可以是血清样品。在又一些另外的实施方案中，本发明使用的血清样品可以从测试的受试者天然地获得或者操纵和制备。在一些实施方案中，血清样品可以是浓缩的样品。在又一些另外的实施方案中，血清样品可以被稀释并且因此，可以使用不同的血清浓度。在一些另外的实施方案中，血清浓度可以在约0.01%和100%之间的范围内，更具体地，0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%、0.1%、0.2%、0.2%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或更大。在更具体的实施方案中，血清浓度可以在约1%至约20%之间的范围内，在又一些另外的特定实施方案中，样品的血清浓度可以是5%。

[0169] 应当认识到，在某些实施方案中，生物样品可以是例如血细胞、血液、血清、血浆、骨髓、淋巴液、尿液、痰、唾液、粪便、精液、脊髓液或CSF、皮肤、呼吸道、肠道和泌尿生殖道的外分泌物、眼泪、乳汁、任何人类器官或组织、通过灌洗获得的任何样品、任选的乳腺导管系统、胸膜积液、体外或离体细胞培养的和细胞培养成分。特别感兴趣的并且在一些具体实施方案中，样品可以是哺乳母亲的母乳。在又一些具体实施方案中，通过本发明的方法检查的生物样品可以是唾液样品。在又一些另外的具体实施方案中，生物样品可以是尿液样品。

[0170] 如上文指示的，本发明的方法的步骤(b)包括将固定的生物药物与至少一种靶一起孵育。在一些具体实施方案中，该靶可以用可检测部分直接或间接标记。在又一些另外的实施方案中，可以使用亲和分子例如特异性识别并且结合靶的抗体检测与固定的药物缔合时的靶。应当理解，这样的抗体或适用于本文的任何其他亲和分子可以与可检测部分直接或间接缔合。

[0171] 在一些另外的实施方案中，与本发明的方法使用的靶缔合，或可选地，与对所述靶特异的抗体缔合的可检测部分，可以指可被用于提供可检测信号并且可以经由共价键或非共价相互作用(例如，通过离子键合或氢键合，或经由固定、吸附等)附接到核酸或蛋白质的任何化学部分。标记物通常提供可通过荧光、化学发光、放射性、比色法、质谱法、X-射线衍射或吸收、磁性、酶活性、电化学活性化合物等中的至少一种检测的信号。在一些具体实施

方案中,可检测部分可以是导电标记物、电化学标记物、荧光标记物、化学发光标记物、酶标记物、放射性标记物、磁性标记物、金属标记物和比色标记物或其任何组合中的至少一种。结合本发明使用的标记物的实例包括但不限于以下的至少一种:半抗原、酶、酶底物、辅酶、酶抑制剂、荧光团、猝灭剂、发色团、磁性颗粒或磁珠、氧化还原敏感部分(例如,电化学活性部分)、发光标志物、放射性同位素(包括放射性核苷酸)、导电材料、或电化学材料(在一些实施方案中,其可以适用于电化学检测),具体地,纳米尺寸的材料和微米尺寸的材料,诸如金纳米颗粒(GNP)、碳纳米管(CNT)、石墨烯(GR)、磁性颗粒(MB)、量子点(QD)和导电聚合物、生物条形码和结合对的成员。更具体的实例包括荧光素、藻胆蛋白、四乙基罗丹明和 β -半乳糖苷酶中的至少一种。结合对可以包括生物素/链霉亲和素、生物素/亲和素、生物素/中性亲和素、生物素/captavidin、GST/谷胱甘肽、麦芽糖结合蛋白/麦芽糖、钙调蛋白结合蛋白/钙调蛋白、酶-酶底物、受体-配体结合对以及结合对的类似物和突变体。应当理解,本发明还包括使用标签用于标记靶或识别与固定的药物结合的靶的任何亲和分子。因此,在一些实施方案中,靶可以包括被抗体或被任何其他亲和分子识别的作为融合蛋白的标签。这样的标签的非限制性实例可以包括His-标签、Flag、HA、myc等。在结合本发明的其他方面和实施方案后,本文公开了另外的标签。还应当理解,本文公开的可检测部分适用于本发明的任何方面。

[0172] 在更具体的实施方案中,与本发明的方法的靶缔合的可检测部分可以是金标记物或乳胶标记物。

[0173] 如上文指示的,本发明在其一些实施方案中包括基于由使用的标记物和/或由固体支持物提供的电化学信号的方法、装置和试剂盒,本发明还提供适于转换和任选地放大或增强对电极的电化学信号的导电材料。因此,该系统可以在一些实施方案中被定义为电化学生物传感器。因此,在一些实施方案中,本发明的方法、试剂盒和装置可以基于电化学生物传感器。如本文使用的,术语“电化学生物传感器”意指由灵敏的生物识别材料和转换元件组成的分析装置,所述灵敏的生物识别材料在本情况中为固定的药物,靶向感兴趣的分析物(用包含导电材料的可检测部分直接或间接标记的靶),所述转换元件用于将识别过程转换成电流测量(amperometric)信号或电位测量(potentiometric)信号。

[0174] 更进一步地,电化学免疫传感器是基于固态装置的亲和配体生物传感器,其中免疫化学反应发生在转换器表面以产生电化学信号。免疫传感器方法学的概念与传统的ELISA(酶联免疫吸附测定)相似,然而,与该免疫测定相比,现代转换器技术允许以不同方式高度灵敏地确定免疫复合物(抗体-抗原,具体地,生物药物及其靶)。基于标记物的电化学免疫传感器需要附接到抗原(Ag)或抗体(Ab)的可检测部分或标志物(标记物),在本情况中,实现电子转移的靶。在读出期间,检测标记物的量并且假设其对应于靶分析物的浓度。

[0175] 可检测部分本身可以是电活性的,或者能够在转换器表面上直接产生电活性产物。此外,金纳米颗粒(GNP)通常被用于修饰工作电极表面。因为用多种剂标记分子可能影响结合事件的效率,并且分子-标记物偶联反应的产生是高度可变的,所以近年来无标记物电化学免疫传感器的使用变得越来越普遍,并且还被包括在本发明的一些实施方案中。电化学阻抗谱(EIS)是最广泛使用的检测技术,其通常需要添加外部氧化还原探针。从可检测部分向电极的电子转移受发生在电极表面上的结合事件的影响。

[0176] 电化学生物传感器的不同类别可以被分为两个主要的子类别:基于标记物的和无

标记物的。它们基本上基于使用与纳米尺寸的材料和微米尺寸的材料偶联的丝网印刷电极 (SPE), 所述纳米尺寸的材料和微米尺寸的材料诸如金纳米颗粒 (GNP)、碳纳米管 (CNT)、石墨烯 (GR)、磁性颗粒 (MB)、量子点 (QD) 和导电聚合物, 被用于修饰电极表面和/或作为标记物以产生高性能的分析工具。

[0177] 如上文指示的, 本发明的方法在基于电化学的应用中使用的导电材料可以被用作可检测部分和/或固体支持物。在一些具体实施方案中, GNP可以在本发明的方法、试剂盒和装置中被用作标记部分(可检测部分)和/或固体支持物。

[0178] 因此, 在一些具体实施方案中, GNP可以被用作固体支持物, 例如与壳聚糖水凝胶组合并且应用于修饰玻碳电极, 形成复合膜 (GNP/Chi)。在这样的实施方案中, 生物聚合物壳聚糖可以被氧化(通过向电极施加阳极电位)并且用作固定本发明的药物的平台。在将修饰的电极与样品一起孵育后, 在本发明的方法的步骤 (b) 中添加生物药物的靶(例如TNF)。这样的靶可以用可检测部分例如酶标记物, 诸如辣根过氧化物酶 (HRP) 直接或间接标记。应当注意, 在一些可选的实施方案中, HRP可以被连接到针对靶的抗体。在添加包含HRP的溶液后, 构建了夹心电化学免疫传感器, 并且GNP/Chi的导电性促进电子转移到电极, 例如玻碳电极。

[0179] 在又一些另外的可选实施方案中, GNP可以被电沉积到基于碳的SPE的表面上用于捕获抗体, 即固定的生物药物, 用于增强信号。此外, 为了产生用于药物的有利微环境(关于活性和稳定性), 可以使用离子液体来修饰电极表面。过氧化氢和硫堇(还原形式)可以被用作HRP底物, 并且酶产物(硫堇氧化形式)可以经由循环伏安法 (CV) 检测, 测量还原峰。

[0180] 在更具体的实施方案中, 适用于本发明的方法、试剂盒和装置的生物药物可以被固定到具有DNA四面体 (DNATH) 的纳米结构的金电极上, 并且靶可以与二茂铁缀合 (FeC-Ab) 作为检测物。靶的浓度可以通过测量对应于FeC-AbC中的Fc的氧化的方波伏安 (SWV) 信号的增加来追踪。

[0181] 在又一些另外的实施方案中, 在本发明的方法、试剂盒和装置中可以使用属于基于标记物的电化学免疫传感器的若干个生物传感器, 所述生物传感器使用抗体修饰的磁性颗粒的免疫磁性分离。

[0182] 在一些实施方案中, 磁性颗粒 (MB) 可以被用作夹心免疫复合物的固体支持物, 其中与生物药物的靶(即TNF) 缀合的GNP可以被用作可检测部分(标记物)。在所有免疫步骤结束时, 修饰的MB可以被捕获在基于碳的SPE的工作电极上, 所述工作电极在下方掺入永久磁体; 金的电还原可以使用差分脉冲伏安法 (DPV) 来测量。

[0183] 在其他具体实施方案中, 范围从1 μ m-5 μ m的微米尺寸的磁珠 (MMB) 或范围从100nm-500nm的纳米尺寸的磁珠 (NMB) 可以被用于包被适用于本发明的方法、试剂盒和装置的固体支持物。

[0184] 在一些其他实施方案中, HRP可检测部分(标记物) 而不是GNP可以被用作电化学报告物。因此, 在一些实施方案中, 生物药物的靶可以用可检测部分例如酶标记物, 诸如辣根过氧化物酶 (HRP) 直接或间接标记。

[0185] 在一些另外的实施方案中, 在本发明的方法、试剂盒和装置中可以采用两步策略, 其包括免疫磁性预浓缩和氧化还原循环, 以放大电化学信号。特别地, 用生物药物修饰的MB(其被作用于固定的药物的固体支持物) 可以被用于靶的分离和预浓缩。然后, 可以使用

与碱性磷酸酶 (ALP) 缀合的靶来形成夹心复合物。在结合步骤完成后,可以将抗坏血酸2-磷酸酯 (AAP) 和三 (2-羧乙基) 膦 (TCEP) 的混合物添加到MB。ALP催化AAP转化为电活性抗坏血酸 (AA), 并且在酶促反应后,溶液可以被转移到金SPE上,并且可以发生AA的氧化。氧化的AA然后可以被还原剂TCEP还原回来,允许在电极表面处产生另外的信号。

[0186] 在又一些其他实施方案中,在本发明的方法、试剂盒和装置中可以使用ELIME (酶联免疫磁性电化学) 测定,其包括形成由MB支持的夹心免疫复合物以及连接到便携式仪器的若干个磁化的SPE的条带 (位于孔底部) 并且允许多个同时电流测量。在一些实施方案中,磁化的SPE的数目可以是2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、18个或20个。

[0187] 在又一些其他实施方案中,生物药物可以被固定在二氧化硅包被的磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒上,并且靶可以被固定在金纳米胶体上并且用作为附接到靶的可检测部分的EnVision试剂 (EV, 锚定多于100个HRP分子和靶的葡聚糖胺骨架) 的共聚物来检测。可以在将表面等离子体耦联发射 (SPCE) 表面上的MNP免疫复合物磁性捕获之后监测DPV信号。

[0188] 在一些另外的实施方案中,生物条形码可以被用于本发明的方法、试剂盒和装置中。纳米尺寸的颗粒和微米尺寸的颗粒可以用非特异性寡核苷酸链官能化,允许颗粒被“读取”。在一些实施方案中,乳胶球可以用铁磁性 Fe_3O_4 颗粒修饰。生物条形码可以通过用生物药物和单链DNA序列修饰用作固体支持物的每一个球来形成。生物药物的靶可以通过将生物条形码添加到包含靶和针对该靶的生物素缀合的多克隆抗体的孔板中来检测。在形成夹心型结构后,可以在亲和素修饰的SPE上洗涤和收集生物条形码,允许它们通过使用电极限制的亲和素和加生物素标签的多克隆抗体之间的相互作用与SPE表面共价结合。可以洗涤掉过量的生物条形码 (不具有靶并且然后不具有生物素化的夹心复合物)。最后,可以将Ag增强剂溶液装载到SPE上,并且可以通过差分脉冲阳极溶出伏安法 (DPASV) 测量酸性溶液中的 Ag^+ 来定量电极表面上剩余的生物条形码的量 (与抗原浓度成比例)。

[0189] 在一些其他实施方案中,量子点 (QD) 可以在本发明的方法、试剂盒和装置中被用作标记策略。

[0190] 在一些特定实施方案中,可以使用不同的量子点诸如CdS、PbS、CuS。在溶解步骤后,QD的金属组分可以被释放,并且可以使用方波阳极溶出伏安法 (SWASV) 获得电流峰,方波阳极溶出伏安法 (SWASV) 是一种非常有效且广泛采用的用于高灵敏度金属分析的技术。

[0191] 在一些其他实施方案中,生物药物可以被共价附接到本文中被用作固体支持物的SU-8基质,SU-8基质是最初在IBM Research开发的基于环氧的负性光致抗蚀剂并且由于暴露的环氧基团的存在理想地在没有任何预处理的情况下用生物分子官能化。可以用碱性磷酸酶缀合的二级抗体标记靶,并且可以通过差分脉冲伏安法 (DPV) 测量通过AP水解对氨基苯基磷酸酯产生的对氨基苯酚的氧化。

[0192] 本发明的方法提供了评价和测量用生物药物治疗的受试者中的中和性ADA的明确策略。然而,本发明在其一些实施方案中提供了另外的手段以评价ADA (受试者中的中和性ADA和非中和性ADA) 的总量。因此,在一些实施方案中,本发明的方法可以包括用于确定样品中的总ADA的另外的步骤。更具体地,将药物固定到固体支持物后,本发明的方法可以使用被可检测标记物标记的抗体直接测量样品中结合固定的药物的ADA,所述可检测标记物特异性识别并且结合ADA,而不特异性识别并且结合固定的药物,所述固定的药物在某些实

施方案中为抗体。因此,在本发明的方法中使用的药物是包含两条 κ 轻链的单克隆抗体的情况下,可以通过包含至少一条 λ 轻链的、特异性针对ADA的抗体来检测ADA。在这样的情况下,本发明的方法还包括以下步骤:通过向通过步骤(a)或步骤(b)获得的孵育的样品提供任选地与第二可检测部分缔合的抗 λ 链抗体确定生物样品中的中和性抗药物抗体和非中和性抗药物抗体的水平、将标记的抗 λ 链抗体与固定的药物一起孵育以及确定第二可检测部分的量。该量指示存在于生物样品中的中和性 λ 链ADA和非中和性 λ 链ADA的水平,特别是包含至少一条 λ 轻链的ADA。然而,应当理解,在固定的药物是包含两条 λ 轻链的单克隆抗体的情况下,该另外的步骤包括使用用可检测标记物标记的抗 κ 抗体,该抗 κ 抗体特异性识别并且结合包含至少一条 κ 轻链的ADA。

[0193] 如上文指示的,本发明在其一些实施方案中除了确定样品中的nADA之外还提供了评价同一样品或同一受试者的另一个样品中的活性生物药物的量的手段。在一些实施方案中,该另外的评价可以使用用于本发明的方法的一些组分,例如相同标记的靶来进行。因此,在一些实施方案中,本发明的预后方法还可以包括确定用所述生物药物治疗的受试者的生物样品中活性生物药物的水平的步骤。更具体地,该方法包括:

[0194] 首先(a),将样品与对生物药物特异的至少一种非中和性抗体一起孵育。应当注意,非中和性抗体被固定到固体支持物。在一些实施方案中,使用的样品可以是上文讨论的本发明的方法检查的相同样品,并且因此可以用于本发明的方法的下一个步骤。可选地,从同一受试者获取的任何其他样品或样品的等分试样可以被用于这种进一步分析。第二个步骤(b)包括向(a)的孵育的样品提供所述生物药物的靶。应当注意,该靶与至少一种可检测部分直接或间接缔合。在一些实施方案中,本文使用的靶可以是用于本发明的方法的相同靶,或可选地,新添加的靶。

[0195] 下一个步骤(c),检测可检测部分以确定靶的量。应当注意,该靶的量指示存在于生物样品中并且与固定的非中和性抗体结合的活性药物的水平。

[0196] 更进一步地,在一些另外的实施方案中,适用于本发明的方法的生物药物可以由抗药物抗体、抗Fc片段抗体和免疫球蛋白结合细菌蛋白,蛋白A、蛋白G、蛋白L及其任何组合中的至少一种间接固定在固体支持物上。

[0197] 蛋白A,一种最初在细菌金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的细胞壁中发现的42kDa蛋白;蛋白G,表达于C组和G组链球菌(*Streptococcal*)细菌中,与蛋白A十分类似;蛋白L,从细菌大消化链球菌(*Peptostreptococcus magnus*)的表面分离;以及蛋白M,在细菌生殖支原体(*Mycoplasma genitalium*)的细胞表面上发现。

[0198] 在一些具体实施方案中,生物药物可以被直接固定在固体支持物上。

[0199] 如由实施例示出的,本发明提供了检测少量nADA的灵敏方法。在又一些另外的实施方案中,本发明的方法可以允许检测患者血清中在约0.1ng/ml至约1000ng/ml之间的范围内,具体地,约0.1ng/ml、约0.2ng/ml、约0.3ng/ml、约0.4ng/ml、约0.5ng/ml、约0.6ng/ml、约0.7ng/ml、约0.8ng/ml、约0.9ng/ml、约1ng/ml、约5ng/ml、约10ng/ml、约15ng/ml、约20ng/ml、约25ng/ml、约30ng/ml、约35ng/ml、约40ng/ml、约45ng/ml、约50ng/ml、约55ng/ml、约60ng/ml、约65ng/ml、约70ng/ml、约75ng/ml、约80ng/ml、约85ng/ml、约90ng/ml、约95ng/ml、约100ng/ml或更大,具体地,约110ng/ml、约120ng/ml、约130ng/ml、约140ng/ml、约150ng/ml、约160ng/ml、约170ng/ml、约180ng/ml、约190ng/ml、约200ng/ml、约210ng/ml、

约220ng/ml、约230ng/ml、约240ng/ml、约250ng/ml、约260ng/ml、约270ng/ml、约280ng/ml、约290ng/ml、约300ng/ml、约310ng/ml、约320ng/ml、约330ng/ml、约340ng/ml、约350ng/ml、约360ng/ml、约370ng/ml、约380ng/ml、约390ng/ml、约400ng/ml、约410ng/ml、约420ng/ml、约430ng/ml、约440ng/ml、约450ng/ml、约460ng/ml、约470ng/ml、约480ng/ml、约490ng/ml、约500ng/ml或更大,具体地,550ng/ml、600ng/ml、650ng/ml、700ng/ml、750ng/ml、800ng/ml、850ng/ml、900ng/ml、950ng/ml、1000ng/ml或更大的nADA浓度。在更具体的实施方案中,本发明的方法可以允许检测患者血清中在约10ng/ml至500ng/ml之间的范围内的nADA浓度。在更具体的实施方案中,患者血清中的nADA浓度可以在100ng/ml-200ng/ml之间。

[0200] 确定受试者中的活性生物药物的水平是临床上重要的,因为它可能能够预测用生物药物治疗的临床结果。如下文描述的,本发明在本文中提供了基于确定受试者中的活性药物的水平的预后方法。

[0201] 因此,在另外的方面中,本发明涉及用于评价和评估受试者对生物药物治疗的响应性、用于监测疾病进展和疾病复发的早期预后的预后方法。更具体地,这样的方法可以包括以下步骤:

[0202] 首先,在步骤(a)中,确定受试者的至少一个生物样品中的nADA水平,从而获得样品的nADA值。

[0203] 接下来,在步骤(b)中,确定步骤(a)中获得的nADA值相对于预先确定的标准nADA值或相对于至少一个对样品品的nADA值是否为阳性或阴性中的任一项。

[0204] 步骤(c)包括将受试者分类为无响应者或响应者。更具体地,样品的阳性nADA值可以指示受试者属于与对生物药物治疗无响应相关的预先确立的群体。然而,样品的阴性nADA值可以指示受试者属于与对生物药物治疗响应相关的预先确立的群体,从而预测、评估和监测哺乳动物受试者对治疗方案响应性。

[0205] 因此,在一些实施方案中,本发明提供了一种用于评估受试者对治疗方案响应性、监测疾病进展和疾病复发的早期预后的方法。应当注意,这样的方法还可以包括计算样品中的中和性ADA的值响应于治疗的变化速率的步骤。应当注意,监测受试者可以包括确定受试者的至少两个或更多个样品中的nADA的水平,如将在下文中阐述的。

[0206] 因此,在一些具体实施方案中,本发明的用于确定至少一个生物样品中的nADA水平的预后方法可以通过以下步骤进行:

[0207] 首先,在步骤(a)中,将生物样品与直接或间接固定在固体支持物上的生物药物一起孵育。

[0208] 在下一个步骤(b)中,向步骤(a)的孵育的样品提供生物药物的靶,并且将该靶与固定的药物一起孵育。如上文提到的,应当理解,在本发明的一些实施方案中,靶可以与可检测部分缔合。在又一些可选的实施方案中,可以使用与靶特异性结合的抗体或任何其他亲和分子,所述靶与固定的药物结合。在一些实施方案中,这样的抗体可以与至少一种可检测部分直接或间接缔合。

[0209] 最后,在步骤(c)中,确定与固定的药物结合的靶的量。如上文提到的,该步骤可以通过检测与靶缔合的可检测部分,或可选地通过检测与识别并且结合靶(当附接到固定的药物时)的抗体或任何其他亲和分子缔合的可检测部分来完成。量可以指示存在于生物样品中的nADA的水平。在一些实施方案中,结合的靶的量与nADA的量呈负相关。

[0210] 应当理解,在一些实施方案中,相对于标准值或对照值确定“阳性”nADA值或可选地“阴性”nADA值可以包括将步骤(a)中确定或获得的检查的样品的nADA值与针对对照样品获得或确定的nADA值、或从已知对照(健康对照或患有相同免疫相关紊乱的受试者的已知对照,所述受试者为响应者或无响应者)获得的任何确定的或预先确定的nADA值(例如,标准值)进行比较。应当理解,在一些实施方案中,在用生物药物开始治疗之前,从同一测试的受试者获得的样品可以被用作对照样品。因此,在一些实施方案中,“阳性”意指当与健康或响应者对照、任何其他合适的对照或任何其他预先确定的标准的nADA值相比时nADA值变高、增加、升高、过产生约5%至100%或更大,具体地,5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%。更进一步地,在一些实施方案中,“阴性”nADA值可以是当与无响应者对照、任何其他合适的对照或任何其他预先确定的标准的nADA值相比时nADA低、降低约5%至100%或更多,具体地,5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、不存在或缺乏。应当注意,当在治疗开始前同一测试的受试者的样品被用作对照时,“阴性”结果在一些实施方案中可以反映nADA水平,所述nADA水平当与治疗开始前的同一受试者的水平(其中不预期产生nADA)相比时降低,或在这样的对照的nADA水平的范围内。在大多数实施方案中,在治疗开始前没有(或几乎没有)发现nADA。即,在用生物药物治疗后,nADA水平未发生变化。因此,这样的受试者可以被分类为响应者。在又一些可选的实施方案中,当测试的样品与治疗前的同一受试者的水平相比为“阳性”时,这意味着nADA水平(nADA值)与对照(例如,治疗开始前的同一患者)相比时升高、增加和增强。在这样的情况中,测试的受试者可以被分类为无响应者。

[0211] 因此,在一些实施方案中,本发明的方法的步骤(b)可以包括将步骤(a)中确定和获得的nADA值与适当的对照或标准的nADA值进行比较。其中在检查的样品中获得的nADA值当与健康对照或响应者对照相比时为“阳性”,具体地,更高、增强、升高的情况下,受试者被分类为无响应受试者。应当注意,在存在nADA的情况中,“阳性”nADA值应当在被分类为无响应者的对照患者的nADA值的范围内或在针对无响应患者的群体获得的任何其他截止值的范围内。更进一步地,当检查的样品中获得的nADA值与无响应者对照或针对无响应患者的群体获得的任何其他截止值相比时被确定为“阴性”,具体地,nADA水平更低、降低、不存在时,受试者被分类为可能对生物药物治疗响应的受试者。

[0212] 在一些可选的或任选的实施方案中,本发明的方法还可以包括另外的解离步骤。在一些实施方案中,这样的解离步骤可以在步骤(a)之前进行。如本文使用的,术语解离步骤是指在步骤(a)的孵育之前应用于生物样品的预处理步骤,该预处理步骤在适用于使可能干扰测试的表现或准确性的任何复合物释放和/或解离的条件中进行。在一些具体实施方案中,这样的解离步骤可以使药物/抗药物抗体复合物释放或解离,从而促进nADA与固定的药物的结合。在一些特定和非限制性实施方案中,解离步骤可以包括用至少一种解离剂预处理样品约1分钟至30分钟,具体地,1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、11分钟、12分钟、13分钟、14分钟、15分钟、16分钟、17分钟、18分钟、19分钟、20分钟、21分钟、22分钟、23分钟、24分钟、25分钟、26分钟、27分钟、28分钟、29分钟、30分钟或更多分钟,更具体地,15分钟。合适的解离剂的非限制性实例包括任何酸性物质,例如任何酸,诸如乙酸、甘氨酸-HCl或任何等效的酸,随后是中和缓冲液。在一些特定实施方

案中,用作解离剂的酸可以以约10mM至约1000mM之间或更大的量存在。在又一些另外的具体实施方案中,使用的解离剂可以是量为约300mM至600mM之间,具体地量为300mM的乙酸。仍然在一些另外的实施方案中,甘氨酸-HCl可以具体地以100mM甘氨酸-HCl的量被用作解离剂。在一些实施方案中,在解离步骤之后,解离剂可以通过添加中性缓冲液诸如Tris 1M来中和。

[0213] 应当理解,由于人为误差和设备故障,任何测定的样品可能包含比预期更多或更少的生物材料。重要地,相同的误差或偏差适用于使用的生物样品和任何对照二者。因此,将中和性ADA值的水平除以对照产生了一个商(quotient),该商基本上不受任何技术故障或不准确性(出于测试目的破坏样品的主要误差除外)影响并且构成nADA水平的归一化表示值。

[0214] 因此,在一些实施方案中,本发明描述的包括通过测量如上文讨论的标记的靶或可选地任何其他组分的水平来确定样品中的nADA水平的所有诊断方法还可以包括归一化步骤。因此,在特定和具体的实施方案中,通过本发明的方法确定生物样品中可检测的生物药物-靶的水平以获得中和性ADA水平值的步骤还可以包括另外的和任选的归一化步骤。根据一些实施方案,除了确定本发明的中和性ADA水平之外,可检测的生物-靶的水平可以在不与生物样品一起孵育的情况下,或可选地在与附接到固体支持物的不相关药物一起孵育后确定。

[0215] 根据这样的实施方案,在步骤(c)中获得的本发明的可检测的生物-靶的水平可以根据在这样的另外的任选步骤中获得的阴性对照诸如在未与生物样品一起孵育或将样品与附接到固体支持物的非相关药物一起孵育的情况下能够检测到的生物-靶来归一化,从而获得归一化值。

[0216] 任选地,当可适用时,可以使用预先确定的标准来进行相似的归一化。

[0217] 更进一步地,应当理解,在一些实施方案中,具有临床适用性的预后方法,诸如本方面定义的那些预后方法在确定nADA水平(归一化的或未归一化的)后的一个重要步骤可以是,确定测试的样品的nADA值是否在标准群体的nADA值或针对该群体预先确定的截止值的范围内。该步骤能够进行将受试者分类的步骤。更具体地,该步骤包括确定针对样品计算的nADA值是否在针对响应者群体预先确定的截止值或标准值的范围内(例如 $\pm 10\%$),或可选地在无响应者群体的截止值的范围内。

[0218] 更具体地,可以将测试的样品的nADA值的水平与针对确立的群体预先确定的预先确定的截止值进行比较。如本文使用的,术语“比较”表示如全文详细描述的对本发明的样品获得的水平和/或值的任何检查,以发现至少两个不同样品之间的相似性或差异。

[0219] 应当注意,根据本发明的比较包括使用基于计算机的方法的可能性。

[0220] 如上文描述的,本发明的方法可以参考预先确定的截止值。应当注意,“截止值”,在本文中有时简称为“截止”,是满足对高诊断灵敏度(真阳性率)和高诊断特异性(真阴性率)二者的要求的值。

[0221] 在一些特定的非限制性实施方案中,真阳性测量的截止值,即对应于展示出nADA的患者血清的截止值可以在约50ng/ml至约100ng/ml之间的范围内,具体地,约50ng/ml、约55ng/ml、约60ng/ml、约65ng/ml、约70ng/ml、约75ng/ml、约80ng/ml、约85ng/ml、约90ng/ml、约95ng/ml、约100ng/ml或更大。更具体地,在一些实施方案中,截止可以在约70ng/ml至

约90ng/ml之间的范围内。在更具体的实施方案中,这样的截止值可以是80ng/ml。

[0222] 更具体地,术语“灵敏度”和“特异性”关于通过本发明的方法检测的样品中的nADA水平的能力在本文中使用的,以正确地将该样品分类为属于与对特定生物药物治疗响应相关或可选地与无响应相关的预先确立的群体。

[0223] 简言之,如本文中使用的,“阳性”nADA值是指高nADA值,其反映增强的nADA、升高的nADA、高的nADA水平,并且甚至在一些实施方案中,中等但存在表达的nADA值。“阴性”nADA值反映抑制的、低的、降低的或不存在nADA(缺乏nADA)。因此,在一些实施方案中,当产生nADA时,被检查的样品的“阳性”nADA值可以是这样的值,该值高于从被分类为无响应者的患者获取的样品的nADA值或针对无响应者计算的标准截止值,或在从被分类为无响应者的患者获取的样品的nADA值或针对无响应者计算的标准截止值的范围内。“阴性”值将是低于无响应患者的nADA值(或标准值、或对照样品的值)的nADA值。这样的值可以在健康或响应者对照样品的值的范围内或健康群体或受试者的响应者群体或曾用药物治疗的受试者的响应者群体的标准值的范围内。

[0224] 应当理解,如本文使用的,“对照样品”可以反映至少一个受试者(健康的,未受相同的免疫相关紊乱影响的受试者,或可选地,IBD患者)的样品,并且优选地至少六个或更多个患者的混合物。

[0225] 应当强调,本发明的本质是使得另外的患者数据的累积可以改善任何截止值的准确性,这可以基于根据所述患者数据使用分析软件程序产生的ROC(接收者操作特征)曲线。针对尽可能接近100%的诊断灵敏度和诊断特异性的最佳组合沿ROC曲线选择中性ADA值的水平,并且所得的值被用作区分对治疗响应的受试者、无响应受试者、处于缓解的受试者或处于复发的受试者之间的截止值。随记录和纳入考虑的数据值越来越多,ROC曲线可能有进展,修改最佳截止值并且改善灵敏度和特异性。因此,应当理解,任何初始截止值应当被视为一个起点,该起点因为更多的数据允许更准确的截止值计算而可以改变。在又一些另外的实施方案中,截止值可以取决于用特定装置测量的阴性血清中发现的背景。在又一些另外的实施方案中,截止值可以取决于在特定受试者中发现的背景,并且因此可以与先前从同一受试者获取的样品进行比较。

[0226] 应当理解,如本文使用的“标准”或“预先确定的标准”表示与来自测试的样品的中和性ADA水平进行比较的单个标准值或多于一个标准值。标准可以例如以离散数值的形式提供,或对于不同量的结合的标记的靶以具有不同色彩或阴影的图表的形式量热;或者它们可以以基于这样的标准制备的比较曲线(标准曲线)的形式提供。

[0227] 在某些可选的实施方案中,可以使用对照样品(代替预先确定的截止值或标准曲线、或除预先确定的截止值或标准曲线之外)。因此,将本发明在测试样品中检测到的nADA值与对照样品的值进行比较。在某些实施方案中,这样的对照样品可以从健康受试者、患有相同病理紊乱的受试者、对所述药物治疗响应的受试者和无响应受试者中的至少一种获得。应当注意,在一些实施方案中,在用相同生物药物治疗开始前,或从治疗的另一个时间点,同一测试的受试者的样品也可以被用作对照。

[0228] 因此,将样品分类为属于“响应”受试者或可选地“无响应”受试者可以包括确定通过本发明的方法确定的nADA值是否在响应受试者群体或无响应受试者群体的预先确定的截止值的范围内。更进一步地,在一些实施方案中,高水平的nADA可以指示测试的受试者可

能展示出无响应性。因此,在一些实施方案中,如本文定义的“阳性”可以针对已经计算了nADA值的受试者(通过本发明的方法)来确定,所述nADA值在针对无响应群体确定的截止值的范围内。以相同的方式,如本文使用的,“阴性”是具有在针对响应者群体预先确定的截止的范围内的nADA值的受试者。

[0229] 如上文提到的,本发明的预后方法可以被用于预测受试者对生物药物治疗的响应性或无响应性。

[0230] 术语对某种治疗的“响应”或“响应性”是指与被诊断为具有相同病理学(例如,相同的病理学类型、阶段、程度和/或分类)的未治疗的受试者相比,或与在用所述生物药物治疗之前的相同受试者的临床参数相比,至少一个相关临床参数的改善。

[0231] 术语对用特定生物药物治疗的“无响应者”是指这样的患者,所述患者没有经历至少一个临床参数的改善并且被诊断为具有与被诊断为具有相同病理学(例如,相同的病理学类型、阶段、程度和/或分类)的未治疗的受试者相同的状况、或在用特定药物治疗之前经历相同受试者的临床参数。在又一些另外的实施方案中,无响应者可以是经历疾病的进展并且因此临床参数恶化的受试者。

[0232] 如本文使用的,术语“复发”是指过去影响人的状况、疾病或紊乱的再出现。具体地,该术语涉及正用生物药物(具体地,如本文讨论的单克隆抗体诸如英夫利昔单抗)治疗的疾病的再出现。在一些实施方案中,在IBD患者的情况中复发可以包括临床症状的表现,具体地,腹泻、呕吐、体重减轻、发热、腹痛或本发明公开的任何临床症状中的至少一种。

[0233] 在本发明的方法被用于监测疾病进展的情况中,可以从受试者获得至少两个样品。这些样品可以从不同时间点,例如,治疗之前和治疗之后或治疗期间的两个时间点之间获得。这样的不同时间点的样品在本文中可以被定义为“时间上分开的样品”。

[0234] 因此,在某些实施方案中,本发明的用于监测疾病进展的预后方法可以包括以下另外的步骤:

[0235] 在步骤(d)中,重复步骤(a)至(c)以获得至少另一个时间上分开的样品的nADA值。

[0236] 步骤(e)包括计算时间上分开的样品之间的nADA值的变化速率。

[0237] 最后,在步骤(f)中,确定步骤(e)中获得的变化速率值是否相对于预先确定的标准变化速率值或针对至少一个对照样品的nADA计算的变化速率值为阳性或阴性。换言之,当比较从至少两个时间点获取的至少两个样品时,确定治疗期间的nADA值是否存在任何变化。

[0238] 在一些实施方案中,阳性变化速率值可以指示受试者属于与对治疗响应丧失(LOR)、响应不足、不耐受或复发中的至少一种相关的预先确立的无响应群体,从而监测疾病进展或提供疾病复发的早期预后。更具体地,“阳性”变化速率可以反映,当在治疗期间的不同时间点之间进行比较时,针对样品确定的nADA值的约5%至100%或更大,具体地,5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或更大的增加、升高或增强。这样的增加,或换言之,“阳性”变化速率,可以反映对治疗的无响应性、LOR、响应不足、不耐受或疾病的复发。应当注意,在一些实施方案中,计算的变化速率还可以与针对健康或响应者对照、或可选地,无响应者对照或任何其他预先确定的标准计算的变化速率进行比较。在阳性变化速率的情况中,在一些实施方案中,这样的变化速率可以高于针对无响应对照或标准值确定的变化速率,或在针对无

响应对照或标准值确定的变化速率的范围内。在又一些另外的实施方案中，“阴性”变化速率可以反映治疗(时间上分开的样品)之间的nADA值的约5%至100%或更大,具体地,5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或更大的降低,并且因此可以指示受试者的响应性。这样的阴性变化速率可以低于从健康或响应受试者获得的对照样品的变化速率或响应者的标准值,或在从健康或响应受试者获得的对照样品的变化速率或响应者的标准值的范围内。

[0239] 如上文指示的,根据本发明的一些实施方案,为了评估在用特定生物药物治疗后的响应并且确定本发明的中和性ADA水平的变化速率,必须从治疗的患者收集至少两个“时间上分开的”测试样品,并且之后进行比较以获得中和性ADA水平的变化速率。在实践中,为了检测中和性ADA水平的变化,必须从患者收集至少两个并且优选地更多个“时间上分开”的测试样品。

[0240] 然后使用本发明的方法确定应用于每一个样品的中和性ADA的水平。如上文详细描述,通过确定在不同时间点或时间间隔从同一患者获得的两个值之间的比率来计算变化速率。

[0241] 这个时间段,还被称为“时间间隔”或时间点之间的差值(其中每一个时间点是收集特定样品时的时间),可以是医疗人员认为适当的任何时间段,并且根据患者的具体需要和他或她可能处于的临床状态按照需要修改。在实施例2中公开了与本发明相关的时间间隔的非限制性实例(参见表2)。例如,该间隔可以是至少一天、至少两天、至少三天、至少一周、至少两周、至少三周、至少四周、至少五周、至少六周、至少七周、至少八周、至少九周、至少十周、至少十一周、至少十二周、至少十三周、至少十四周、至少十五周,至少十六周、至少十七周、至少十八周、至少十九周、至少二十周、至少二十一周、至少二十二周、至少二十三周、至少二十四周、至少二十五周或更长时间。在又一些另外的实施方案中,时间间隔可以包括至少一个月、至少两个月、至少三个月、至少四个月、至少五个月、至少一年、两年、三年、四年、五年、六年、七年、八年、九年、十年或甚至更长时间的时间段。

[0242] 更具体地,在用特定药物治疗之前,应当从检查的受试者获得一个样品。如本文使用的,之前意指第一时间点,其是治疗开始前的任何时间,理想的是治疗开始前的若干秒钟或分钟。然而,应当注意,在治疗开始前的任何时间点,包括小时、天、周、月或年,对于该方法可能是有用的并且因此被本发明所包括。第二时间点是在治疗开始后的几秒、几分钟、几小时、几天、几周、几个月或甚至几年,更具体地,在治疗开始后的至少1秒、至少1分钟、至少1小时、至少2小时、至少3小时、至少4小时、至少6小时、至少10小时、至少12小时、至少24小时、至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少7天、至少8天、至少9天、至少10天、至少11天、至少12天、至少13天、至少14天、至少15天、至少16天、至少17天、至少18天、至少19天、至少20天、至少21天、至少22天、至少23天、至少24天、至少25天、至少26天、至少27天、至少28天、至少29天、至少30天、至少31天、至少32天、至少33天、至少40天、至少50天、至少60天、至少70天、至少78天、至少80天、至少90天、至少100天、至少110天、至少120天、至少130天、至少140天或至少150天或更长一段时间后从同一患者收集的。

[0243] 在一些实施方案中,第二时间点可以在治疗开始后1小时至30个月之间获得。在一些其他实施方案中,第二时间点在治疗开始后的1周至54周之间。在其他实施方案中,第二时间点可以在治疗开始后的2周至22周之间获得。在又一些其他实施方案中,不同时间点可

以包括治疗开始后的2周、6周、14周、22周和54周。

[0244] 更进一步地,在一些实施方案中,第一样品可以在治疗开始时(时间“0”)获得,刚好在应用生物药物前或在治疗开始后立即获得,其中至少一个样品可以如上文讨论的在治疗开始后获得。在一些实施方案中,时间点“0”的样品可以从从未暴露于任何治疗方案的未治疗的患者(naïve patient)获得。在其他实施方案中,时间点“0”的样品可以从过去已经治疗但尚未用相同治疗性治疗剂治疗的患者获得。更进一步地,时间点“0”的样品可以从过去已经用相同治疗方案治疗的患者,例如,在目前的治疗之前1年、在监测的治疗之前6个月、在监测的治疗之前5个月、在监测的治疗之前4个月、在监测的治疗之前3个月、在监测的治疗之前2个月、在监测的治疗之前1个月、在监测的治疗之前3周、在监测的治疗之前2周或在监测的治疗之前1周获得。

[0245] 在实践中,为了评估对特定治疗的响应,必须从治疗的患者收集至少两个测试样品(例如,在治疗开始后的两个不同时间点)并且优选地更多个测试样品。然后使用本发明的方法确定应用于每一个样品的中和性ADA的水平。然后通过将在不同时间点或时间间隔从同一患者获得的两个值彼此相除来计算和确定中和性ADA水平的变化速率。

[0246] 应当注意,将治疗开始值除以治疗后值是可能的,并且反之亦然。为了清楚起见,如本文使用的,变化速率是指当将在时间间隔的较晚时间点获得的值除以在较早时间点(例如在治疗开始之前)获得的值时获得的比率。

[0247] 例如,该间隔可以是至少一天、至少两天、至少三天、至少一周、至少两周、至少三周、至少一个月、至少两个月、至少三个月、至少四个月、至少五个月、至少一年或甚至更长时间。优选地,第二时间点较早的时间点获得,其可以提供关于评估患者对生物药物治疗的响应的有价值的信息。

[0248] 如理解的,如上文详细描述的对预先确立的群体计算的预先确定的变化速率例如包括从个体群体获得的具有低值和高值的变化速率的范围,所述个体群体包括健康对照、对所述药物特别是生物药物的响应者和无响应者。因此,可以从整个测试的群体获得响应患者的亚组。在这个预先确立的响应群体中,低值可以以低响应为特征,而高值可以与高响应相关,如由常规临床评价指示的。因此,除了评估对治疗的响应性之外,变化速率可以提供对响应性程度的见解。例如,值更接近高值的计算的变化速率可以指示低响应,并且因此尽管患者被认为有响应,但可以考虑增加给药或施用频率。可选地,值更接近低值的计算的变化速率可以指示高响应,甚至有时引起缓解并且因此可以考虑维持治疗。

[0249] 为了清楚起见,当提及与响应性相关的预先确立的群体时,意指如本文公开的分析用特定药物特别是本发明的生物药物治疗的统计学上有意义的一组患者,并且计算中和性ADA值的水平(以及任选地其他患者临床参数)与对这样的治疗的响应性之间的相关性。根据其他患者参数,例如性别和年龄,可以任选地将群体进一步分成子群体。

[0250] 在又一些其他实施方案中,本发明的预后方法使用的生物药物可以是针对生物靶的抗体。

[0251] 在某些实施方案中,本发明的预后方法的生物靶可以是细胞因子。

[0252] 在更具体的实施方案中,本发明的预后方法使用的生物药物的生物靶可以是至少一种细胞因子,具体地,TNF α 。在这样的情况中,在一些实施方案中药物可以是对TNF α 特异的至少一种抗体。在一些特定实施方案中,本发明的预后方法使用的生物药物可以是对TNF

α 特异的单克隆抗体,具体地,英夫利昔单抗、依那西普、阿达木单抗、赛妥珠单抗、戈利木单抗、其任何生物类似物及包含以上的任何组合中的至少一种。

[0253] 必须理解,本发明结合其他方面公开的任何生物药物或任何生物类似物还适用于目前的方面。

[0254] 在其他实施方案中,本发明的预后方法的受试者可能患有免疫介导的紊乱。在一些实施方案中,免疫介导的紊乱可以是炎性疾病、自身免疫疾病和增殖性紊乱(具体地癌症)中的至少一种。在一些实施方案中,本发明的预后方法的免疫介导的紊乱可以是IBD。在又一些另外的实施方案中,本发明的预后方法涉及IBD,其中IBD可以指UC、CD和IC(或IBDU)中的任何一种。必须理解,本发明结合其他方面公开的任何免疫相关的紊乱还适用于目前的方面。

[0255] 在一些实施方案中,本发明的方法使用的靶与至少一种可检测部分直接或间接结合。在又一些另外的实施方案中,可检测部分可以是荧光标记物、化学发光标记物、酶标记物、放射性标记物、磁性标记物和比色标记物中的至少一种。在更具体的实施方案中,本发明的方法使用的可检测部分可以是半抗原、酶、酶底物、辅酶、酶抑制剂、荧光团、猝灭剂、发色团、磁性颗粒或磁珠、氧化还原敏感部分(例如,电化学活性部分)、发光标志物、放射性同位素(包括放射性核苷酸)、导电材料,具体地纳米尺寸的材料和微米尺寸的材料,诸如金纳米颗粒(GNP)、碳纳米管(CNT)、石墨烯(GR)、磁性颗粒(MB)、量子点(QD)和导电聚合物、生物条形码和结合对的成员。

[0256] 在又一些另外的实施方案中,适用于本发明的预后方法的生物样品可以是血清和全血样品或其任何级分或制剂中的任何一种,或在上文结合本发明的先前方面公开的任何样品。

[0257] 在某些实施方案中,与本发明的预后方法的步骤(b)中使用的靶结合的可检测部分可以是如上文公开的金标记物、乳胶标记物或可选地任何其他可检测部分。然而,应当理解,本发明还包括使用特异性识别并且结合靶的抗体或任何其他亲和分子。这些抗体或任何其他亲和分子可以用如上文公开的金标记物、乳胶标记物或任何其他可检测部分直接或间接标记。

[0258] 如上文提到的,本发明的方法提供了对用生物药物治疗的受试者中的中和性ADA的评估。然而,本发明在其一些实施方案中还可以提供用于评价ADA(受试者中的中和性ADA和非中和性ADA)的总量的手段。因此,在一些实施方案中,本发明的方法可以包括用于确定样品中的总ADA的另外的步骤。更具体地,将药物固定到固体支持物后,本发明的方法可以使用被可检测标记物标记的抗体直接测量样品中结合固定的药物的ADA,所述可检测标记物特异性识别并且结合ADA,但不特异性识别并且结合固定的药物。

[0259] 因此,在其中本发明的预后方法的药物是包含两条 κ 轻链的单克隆抗体的一些实施方案中,该方法还可以允许检测包含至少一条 λ 轻链的任何ADA。在这样的实施方案中,该方法还包括以下步骤:通过向步骤(a)或步骤(b)的孵育的样品提供任选地与第二可检测部分结合的抗 λ 链抗体确定生物样品中的中和性抗药物抗体和非中和性抗药物抗体的水平、将标记的抗 λ 链抗体与固定的药物一起孵育以及确定第二可检测部分的量。抗 λ 链抗体将识别并且结合与固定的药物结合的任何ADA(具有至少一条 λ 轻链)。可检测标记物的量指示存在于生物样品中的中和性 λ 链ADA和非中和性 λ 链ADA的水平。然而,应当理解,在固定的药物

是包含两条 λ 轻链的单克隆抗体的情况中,该另外的步骤包括使用可检测标记物标记的抗 κ 抗体,该抗 κ 抗体特异性识别并且结合包含至少一条 κ 轻链的ADA。应当理解,如本文提及的 κ 轻链或 λ 轻链涉及免疫球蛋白轻链。

[0260] 在又一些其他实施方案中,本发明的预后方法的生物药物可以经由抗药物抗体、抗Fc片段抗体和免疫球蛋白结合细菌蛋白,蛋白A、蛋白G、蛋白L及其任何组合中的至少一种间接固定在固体支持物上。

[0261] 在一些其他可选的具体实施方案中,生物药物可以被直接固定在固体支持物上。应当理解,本发明结合其他方面公开的任何固体支持物以及固体支持物和可检测部分的任何组合还适用于目前的方面。

[0262] 对于提供关于样品中的nADA的信息,本发明在其一些实施方案中还可以提供基于固定的靶的预后方法的可选的或另外的形式,其中测量了样品中结合的活性生物药物。从这两种形式获得的信息可以被比较并且甚至可以改善临床显著性。

[0263] 因此,在某些实施方案中,本发明的预后方法还可以包括确定用生物药物治疗的受试者的生物样品中的活性生物药物的水平的方法。在一些实施方案中,这种另外的评价可以使用用于本发明的方法的一些组分,例如相同的标记的靶来进行。更具体地,这样的方法可以包括:首先(a)将样品与对生物药物特异的至少一种非中和性抗体一起孵育。应当注意,非中和性抗体被固定到固体支持物。在一些实施方案中,使用的样品可以通过上文讨论的本发明的方法检查的相同样品,并且因此可以用于本发明的方法的下一个步骤。可选地,从相同受试者获取的任何其他样品或样品的等分试样可以被用于这种进一步分析。第二个步骤(b)包括向(a)的孵育的样品提供所述生物药物的靶。应当注意,该靶与至少一种可检测部分直接或间接缔合。在一些实施方案中,本文使用的靶可以是用于本发明的方法的相同靶,或可选地,新添加的靶。

[0264] 下一个步骤(c),检测可检测部分以确定靶的量。应当注意,该靶的量指示存在于生物样品中并且与固定的非中和性抗体结合的活性药物的水平。

[0265] 在又一些其他实施方案中,本发明的预后方法的生物药物可以是针对生物靶的抗体,并且生物靶可以是本发明公开的任何分子,在一些具体实施方案中,生物靶可以是至少一种细胞因子。在又一些另外的具体实施方案中,这样的靶可以是肿瘤坏死因子(TNF α)中的至少一种。

[0266] 在某些实施方案中,本发明的预后方法的药物可以是对细胞因子具体地TNF α 特异的抗体。在更具体的实施方案中,这样的药物可以是对TNF α 特异的单克隆抗体。这样的药物的非限制性实例可以是英夫利昔单抗、依那西普、阿达木单抗、赛妥珠单抗、戈利木单抗、其任何生物类似物及其组合中的至少一种。

[0267] 在某些实施方案中,生物类似物可以是上文提及的原始生物制品的任何经批准的生物类似物。

[0268] 在又另一个方面中,本发明涉及用于预测和评估受试者对生物药物治疗的响应性、用于监测疾病进展和疾病复发的早期预后的预后方法。具体地,该方法可以包括以下步骤:

[0269] 在步骤(a)中,确定受试者的至少一个生物样品中的至少一种生物药物的至少一个生物靶的水平。在一些实施方案中,生物样品可以在用生物药物治疗开始之前获得。在该

步骤中,计算生物靶的水平以获得样品的靶值。

[0270] 在下一个步骤 (b) 中,确定步骤 (a) 中获得的靶值相对于预先确定的标准靶值或相对于至少一个对照样品的靶值是否为阳性或阴性中的任一项。

[0271] 步骤 (c) 包括将受试者分类为无响应者或响应者。更具体地,样品的阳性靶值指示受试者属于与对生物药物治疗响应相关的预先确立的群体。然而,样品的阴性靶值指示受试者属于与对生物药物治疗无响应相关的预先确立的群体,从而预测、评估和监测哺乳动物受试者对治疗方案的响应性。因此,在一些实施方案中,“阳性”意指当与健康或响应者对照、任何其他合适的对照或任何其他预先确定的标准的靶值或nADA值相比时计算的靶值或所得的nADA值变高、增加、升高、过产生约5%至100%或更大,具体地,5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%。应当注意,对照在本文中指的是预先确立的响应者群体,具体地,使用临床参数被分类为响应者的已知响应者群体。更进一步地,在一些实施方案中,“阴性”靶值或nADA值可以是当与无响应者对照、任何其他合适的对照或任何其他预先确定的标准(从已知的无响应者的预先确立的群体获取)的靶值或nADA值相比时结合的靶或计算的nADA低、降低约5%至100%或更大,具体地,5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、不存在或缺乏。应当注意,当治疗开始前同一测试的受试者的样品被用作对照时,“阴性”结果在一些实施方案中可以反映靶水平并因此反映nADA水平,所述靶水平和nADA水平当与治疗开始前的同一受试者的水平相比时降低(其中不预期产生nADA),或在这样的对照的nADA水平的范围内。在大多数实施方案中,在治疗开始前没有(或几乎没有)发现nADA。

[0272] 确定受试者中的活性生物药物的水平还能够指导医疗人员做出关于最适用于受试者的方案的更准确和个体化的决策。

[0273] 因此,在另外的方面中,本发明涉及一种为患有免疫介导的紊乱的受试者确定治疗方案的方法。该方法可以包括以下步骤:

[0274] 在第一个步骤 (a) 中,确定受试者的至少一个生物样品中的nADA水平,从而获得样品的nADA值;

[0275] 在步骤 (b) 中,确定步骤 (a) 中获得的nADA值相对于预先确定的标准nADA值或相对于至少一个对照样品的nADA值是否为阳性或阴性中的任一项。

[0276] 在步骤 (c) 中,确定用于受试者的治疗方案,其中:

[0277] (i) 样品的阳性nADA值指示受试者属于与对生物药物治疗的LOR、响应不足和不耐受中的至少一种相关的预先确立的群体,并且受试者被建议不维持治疗,或可选地或另外地被建议施用至少一种免疫抑制剂;并且(ii) 样品的阴性nADA值指示受试者属于与对生物药物治疗响应相关的预先确立的群体,并且受试者被建议维持治疗。

[0278] 换言之,“阳性”意指当与健康或响应者对照、任何其他合适的对照或任何其他预先确定的标准的nADA值相比时nADA值高、增加、升高、过表达约5%至100%或更大,具体地,5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%。因此,这样的受试者被分类为展示出对生物药物治疗的LOR、响应不足和不耐受。在另外的实施方案中,这样的受试者被建议不维持治疗,或可选择地或另外地被建议施用至少一种免疫抑制剂。更进一步地,在一些实施方案中,“阴性”nADA值可

以是当与无响应者对照、任何其他合适的对照或任何其他预先确定的标准的nADA值相比时nADA低、降低约5%至100%或更大,具体地,5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、不存在或缺乏。这样的受试者将被分类为生物药物治疗的响应者,并且在一些实施方案中,受试者被建议维持治疗。

[0279] 在一些其他实施方案中,本发明的方法的用于确定至少一个生物样品中nADA水平的步骤可以通过以下步骤进行:

[0280] 步骤(a)包括将生物样品与直接或间接固定在固体支持物上的生物药物一起孵育。

[0281] 在步骤(b)中,向(a)的孵育的样品提供生物药物的靶,并且将该靶与固定的药物一起孵育。如上文提到的,靶可以与可检测部分(直接或间接)缔合,或可选地,可以使用抗体或任何其他亲和分子。

[0282] 步骤(c),通过检测可检测部分来确定与固定的药物结合的标记的靶的量,其中该量指示存在于生物样品中的中和性抗药物抗体的水平。

[0283] 在一些实施方案中,本发明的方法可以包括解离步骤。在又一些另外的实施方案中,这样的解离步骤可以在将样品与固定的药物一起孵育的步骤(a)之前进行。在更具体的实施方案中,样品可以经历解离步骤以降低或消除存在于患者的样品中的nADA和药物的复合物。在一些特定和非限制性实施方案中,解离步骤可以包括用至少一种解离剂预处理样品约1分钟至30分钟,具体地,1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、11分钟、12分钟、13分钟、14分钟、15分钟、16分钟、17分钟、18分钟、19分钟、20分钟、21分钟、22分钟、23分钟、24分钟、25分钟、26分钟、27分钟、28分钟、29分钟、30分钟或更多分钟,更具体地,15分钟。合适的解离剂的非限制性实例包括任何酸性物质,例如任何酸,诸如乙酸、甘氨酸-HCl或任何等效的酸,随后是中和缓冲液。在一些特定实施方案中,用作解离剂的酸可以以约10mM至约1000mM之间或更大的量存在。在又一些另外的具体实施方案中,使用的解离剂可以是量为约300mM至600mM之间的乙酸,具体地,使用的乙酸可以是300mM的量。仍然在一些另外的实施方案中,甘氨酸-HCl可以被用作解离剂。在某些具体实施方案中,可以使用量为100mM的甘氨酸-HCl。如上文指示的,在解离步骤之后,解离剂可以通过添加中性缓冲液诸如Tris 1M来中和。

[0284] 在一些实施方案中,本发明的方法使用的生物药物可以是针对生物靶的抗体。在又一些另外的实施方案中,生物靶可以是细胞因子。在更具体的实施方案中,这样的细胞因子可以是TNF α 。因此,在一些实施方案中,本发明的方法使用的药物可以是英夫利昔单抗、依那西普、阿达木单抗、赛妥珠单抗、戈利木单抗、优特克单抗、其任何生物类似物和其任何组合中的至少一种。

[0285] 在又一些另外的实施方案中,本发明的方法使用的靶可以与至少一种可检测部分直接或间接缔合。在更具体的实施方案中,这样的可检测部分可以是导电标记物、荧光标记物、化学发光标记物、酶标记物、放射性标记物、磁性标记物和比色标记物或其任何组合中的至少一种。应当注意,本发明结合其他方面公开的任何可检测部分还适用于本方法。

[0286] 更进一步地,在一些实施方案中,本发明的方法可以特别适用于确定患有免疫介导的紊乱的受试者的治疗方案,具体地,免疫介导的紊乱可以是炎性疾病、自身免疫疾病和

增殖性紊乱(具体地癌症)中的至少一种。在又一些另外的具体实施方案中,免疫介导的紊乱可以是炎性紊乱,具体地IBD。

[0287] 在一些实施方案中,本发明的方法还可以包括确定用所述生物药物治疗的受试者的生物样品中活性生物药物的水平的方法。更具体地,该方法还可以包括以下步骤:首先(a)将样品与对生物药物特异的至少一种非中和性抗体一起孵育。应当注意,非中和性抗体被固定到固体支持物。在一些实施方案中,使用的样品可以通过上文讨论的本发明的方法检查的相同样品,并且因此可以用于本发明的方法的下一个步骤。可选地,从相同受试者获取的任何其他样品或样品的等分试样可以被用于这种进一步分析。第二个步骤(b)包括向(a)的孵育的样品提供所述生物药物的靶。应当注意,该靶与至少一种可检测部分直接或间接缔合。在一些实施方案中,本文使用的靶可以是用于本发明的方法的相同靶,或可选地,新添加的靶。

[0288] 下一个步骤(c),检测可检测部分以确定靶的量。应当注意,靶的量指示存在于生物样品中并且与固定的非中和性抗体结合的活性药物的水平。

[0289] 本发明还涉及可以被商业化的应用,诸如能够检测用生物药物治疗的受试者的生物样品中nADA的水平装置或试剂盒。

[0290] 因此,在又另一个方面中,本发明涉及用于检测用生物药物治疗的受试者的生物样品中的nADA的装置。更具体地,该装置可以包括:

[0291] 在第一组件(a),包含生物药物的生物靶的标记组合物中,靶特异性识别并且结合生物药物。应当理解,在一些实施方案中,提供的靶可以与可检测部分直接或间接缔合。在又一些另外的实施方案中,还可以使用识别与固定的药物结合时的这样的靶的特定抗体。

[0292] 本发明的装置的第二组件(b)可以是包含直接或间接固定在固体支持物上的生物药物的捕获组合物,并且第三组件(c)包括适用于接收和运输生物样品的固体支持物。

[0293] 特别适于商业用途的以“容易使用”的形式的用于检测和定量生物样品中的nADA的装置可以是诸如横流(lateral flow)系统,还被称为“条带测试(strip test)”。

[0294] 因此,在更具体的实施方案中,本发明的装置在一些实施方案中可以是横流装置的形式,包括:

[0295] a. 适用于接收和运输生物样品的固体支持物;

[0296] b. 包含生物药物的生物靶的标记组合物。靶特异性识别并且结合生物药物。应当理解,在一些实施方案中,提供的靶可以是与可检测部分缔合的“标记的靶”。在又一些另外的实施方案中,还可以使用识别与固定的药物结合时的这样的靶的特定抗体。更具体地,标记组合物可以位于固体支持物中从样品应用区域至捕获区域的流动路径中的预先确定的特定起始区域中;和

[0297] c. 包含直接或间接固定在固体支持物上的生物药物的捕获组合物,所述捕获组合物在固体支持物中的终末区域中的预先确定的位置被附接到固体支持物。

[0298] “横流”意指检查的样品可以被放置在由吸水材料、色谱材料或其他多孔材料组成的测试条带上,并且样品通过毛细管作用横向穿过测试条带,同时与条带中的多种试剂反应。本发明的范围不受关于样品移动通过测试条带的方向限制。

[0299] 横流测试是预期检测和/或定量样品(基质)中的靶分析物的存在(或不存在的)装置。在本发明中,生物药物的标记的靶被定量,并且其与用作捕获组合物的固定的药物的结

合取决于测试的样品中的nADA的量。具体地,样品中高的nADA量将引起标记的生物靶与固定的药物的结合降低。许多常用的横流测试适用于家庭测试、护理点测试或实验室使用的医疗诊断。通常以试纸条(dipstick)形式产生的横流测试是一种免疫测定形式,其中测试样品经由毛细管作用沿固体多孔基质流动。在一些情况中,在将样品应用于测试后,样品会遇到与样品混合并且在基质中与样品一起通过的有色试剂,遇到已经用捕获分子预处理的线或区域。

[0300] 在本发明中,有色试剂可以用有色标记物或其他可检测标记物直接或间接标记的药物-靶。本发明还包括使用识别所述靶的特定抗体的替代方案。取决于存在于样品中的分析物,具体地nADA,有色试剂可以在测试线或区域变为与固定的药物结合。测试线将在阳性样品中显示为有色条带或斑点。在这种情况下,如本发明的该方面中定义的“阳性”样品是展示出少量或不可检测的量的能够使标记的靶与固定的药物结合的nADA并且因此展示出可检测的信号的产品。这样的样品可以反映响应受试者。大多数测试预期仅基于定性来操作。然而,测量测试线的强度以确定样品中分析物的量是可能的。被称为横流读取仪的手持诊断装置由若干公司使用以提供完全定量的测定结果。通过结合CMOS或CCD检测技术使用独特波长的光用于照明,可以产生实际测试线的信号丰富的图像。使用专门设计的用于特定测试类型和介质的图像处理算法,然后可以使线强度与分析物浓度相关。一种这样的手持横流装置平台由Detekt Biomedical L.L.C.制造。可选的非光学技术也能够报告定量的测定结果。一种这样的实例是磁性免疫测定(MIA),其是横流测试形式,也允许得到定量的结果。人们还可以通过将由标记的药物-靶发射的信号与标准曲线中观察到的信号的强度或与任何已知量进行比较,获得半定量的结果。

[0301] 对于所述横流测定的标记,原则上,可以使用任何有色颗粒,然而通常使用乳胶(蓝色)或纳米尺寸的金颗粒(红色)。也可以使用荧光或磁性标记的颗粒,然而,这些颗粒需要使用电子读取仪来评估测试结果。

[0302] 更具体地,本发明还包括电化学信号的应用,并且因此,在其一些实施方案中,本发明的装置可以是适于基于电化学的信号的设备。因此,在一些实施方案中,本发明提供的装置可以以电化学横流生物传感器(ELFB)的形式提供。本发明的一些实施方案的ELFB可以包括ELFB条带和电子检测器单元。条带可以被放置在塑料外壳内并且连接到从ELFB条带读取电流测量信号的外部电子检测器单元(接收器)。电子检测器单元可以是具有电化学传感器接口的任何商购可得的恒电位仪或恒流器,诸如Ivium PocketStat、DropSense micro STAT 400、Metrohm Autolab PGSTAT204和910PSTAT mini、Palm|Sense和EmiStat (Palm|Sense)、SP系列和SensorStat (BioLogic)、EZStat和PowerStat (NuVant Systems)和小手持PG581 (Uniscan Instruments)或更合适的专用设备,包括手机或任何其他合适的移动设备的电子适配器芯片。

[0303] 在又一些另外的实施方案中,本发明的装置可以包括使用可以是本发明的固定的药物(在捕获组合内)的生物识别元件,以及可以与可检测标记物(其可以产生或传输电化学信号)直接或间接缔合的标记组合。适用于本发明的装置的可检测标记物可以包括导电标记物、荧光标记物、化学发光标记物、酶标记物、放射性标记物、磁性标记物和比色标记物或其任何组合中的至少一种。在更具体的实施方案中,纳米尺寸的材料和微米尺寸的材料,诸如金纳米颗粒(GNP)、碳纳米管(CNT)、石墨烯(GR)、磁性颗粒(MB)、量子点(QD)和导

电聚合物,可以作为可检测部分特别适用于本发明的装置并且还修饰固体支持物。应当理解,本发明结合本发明的其他方面公开的任何可检测部分还可以适用于本方面。

[0304] 更进一步地,在一些实施方案中,本发明的装置可以包括使用可以附接到固体支持物或与固体支持物缔合的至少一个电极。这样的电极的非限制性实例可以包括丝网印刷电极(SPE)。SPE可以包括多于一个工作电极。由DropSense开发的具有两个椭圆形工作电极、一个对电极和一个参比电极的双丝网印刷电极(DSPE)允许同时检测两种不同类型的抗体并且定量它们的比率。可选地,一个工作电极可以被用作对照并且另一个被用作测试电极。

[0305] 在又一些另外的实施方案中,为了获得电流测量信号,ELFB装置包括电化学活性组分(EAC)。EAC在电化学系统中的作用是将电子转移到与其氧化还原电位对应的电极。许多种EAC是商购可得的。为了选择用于生物传感器应用的合适的EAC化合物,人们应当将以下考虑因素纳入考虑。首先,在大多数生物系统中,工作电极电位相对较低。其次,用小体积的样品进行测量(这意味着EAC必须在低的量是反应性的)。第三,EAC必须能够与缀合物颗粒诸如金纳米颗粒或聚合物颗粒结合。通常被用作电化学介质的EAC的实例是二茂铁、硫堇和亚甲蓝。

[0306] 当EAC在其还原电位下将电子转移到电极,例如丝网印刷电极(SPE)时,SPE的检测效率取决于EAC和工作电极之间的距离。因此,EAC还原反应电位的测量使得能够通过固定的捕获药物或捕获组合物检测和定量分析物复合物。因此,与本发明的一些实施方案所包括的基于氧化还原酶的测定(其中分析物检测基于由连接的氧化还原酶产生的电流测量信号)相比,本发明的其他可选的实施方案基于电流测量信号的测量,作为使EAC足够接近工作电极以测量产生的电流的结果。后者与样品中的分析物(具体地,标记的靶)的量成比例。

[0307] 如本发明中的,横流测试可以作为直接或竞争夹心测定来操作。

[0308] 根据一些特定实施方案,根据本发明的装置可以特别适于进行根据本发明的任何方法。

[0309] 在某些实施方案中,与本发明的装置相关的生物药物可以是针对生物靶的抗体,并且更具体地,生物靶可以是细胞因子中的至少一种。在更具体的实施方案中,这样的靶可以是细胞因子,具体地,肿瘤坏死因子 α (TNF α)。

[0310] 在另一种实施方案中,本发明的装置的药物可以是对细胞因子具体地TNF α 特异的抗体。在这样的情况中,药物可以是对TNF α 特异的单克隆抗体。在一些特定实施方案中,这样的药物可以是对TNF α 特异的抗体,所述药物是 REMICADE[®](英夫利昔单抗)、ENBREL[®](依那西普)、HUMIRA[®](阿达木单抗)、CIMZIA[®](赛妥珠单抗)、SIMPONI[®](戈利木单抗)、其任何生物类似物及其任何组合中的至少一种。

[0311] 在又一些另外的实施方案中,本发明的装置还可以包括第二捕获组合物,所述第二捕获组合物包含对直接或间接固定在固体支持物上的生物药物特异的至少一种非中和性抗体。应当注意,这样的另外的捕获组合物可以被用于捕获存在于样品中的生物药物。本发明的装置的相同的标记组合物,具体地标记的靶,在本文中还可以被用于检测与第二捕获组合物结合的捕获的药物。

[0312] 因此,在一些实施方案中,通过使用两种不同的捕获组合物和单独的标记组合物,

本发明的装置可以允许检测和确定样品中的nADA以及样品中的活性生物药物二者。

[0313] 在本发明的又一个方面中,本发明涉及试剂盒,具体地预后试剂盒,包括:

[0314] (a) 直接或间接固定在固体支持物上的生物药物;

[0315] (b) 生物药物的生物靶(任选地,与可检测部分缔合)。在一些实施方案中,本发明的试剂盒可以任选地包括以下至少一种:(c) 使用说明书;(d) 标准曲线或对照样品;(e) 任选地与第二可检测部分缔合的至少一种抗 λ 链抗体;和(f) 对生物药物特异的至少一种非中和性抗体。应当注意,非中和性抗体被直接或间接固定在固体支持物上。

[0316] 在一些实施方案中,被用于本发明的试剂盒的生物药物可以包括针对生物靶的抗体。在另外的实施方案中,生物靶可以是细胞因子。在又一些另外的具体实施方案中,细胞因子可以是TNF α 。

[0317] 这样的药物的更特定实施方案可以包括英夫利昔单抗、依那西普、阿达木单抗、赛妥珠单抗、戈利木单抗、其任何生物类似物及其任何组合中的至少一种。

[0318] 在又一些另外的实施方案中,本发明的试剂盒的靶可以与至少一种可检测部分直接或间接缔合。更进一步地,这样的可检测部分可以是导电标记物、荧光标记物、化学发光标记物、酶标记物、放射性标记物、磁性标记物、金属标记物和比色标记物或其任何组合中的至少一种。

[0319] 在一些实施方案中,本发明的预后试剂盒可以包括本发明的任何装置。

[0320] 本发明在其一些实施方案中还包括如本文描述的本发明的任何试剂盒,其用于预测和评估受试者对生物药物治疗的响应性、用于监测疾病进展和疾病复发的早期预后。

[0321] 应当注意,在一些实施方案中,本发明的试剂盒还可以包括适用于进行如上文描述的用于检测生物样品中的nADA的本发明的任何方法的任何试剂、物质或成分。还应当理解,包括在本发明的任何方法和试剂盒中的任何试剂、物质或成分可以作为嵌入、连接(linked)、连接(connected)、附接、放置或融合到上文描述的任何固体支持物材料的试剂提供。这些试剂和化合物还可以被提供在分离的容器中。

[0322] 更进一步地,本发明提供了能够确定活性生物药物水平的另外的方法。如上文指示的,在一些实施方案中,这样的方法可以作为另外的步骤被本发明的方法或装置和试剂盒包括,或平行地进行,并且提供与治疗的患者相关的另外的信息。

[0323] 因此,在又一个方面中,本发明提供了一种用于确定用生物药物治疗的受试者的生物样品中的活性生物药物的水平的方法。更具体地,该方法包括:

[0324] 在第一个步骤(a)中,将样品与对生物药物特异的至少一种非中和性抗体一起孵育。应当注意,非中和性抗体被固定在固体支持物上。应当理解,如本发明结合其他方面讨论的任何固体支持物还可以适用于该方法。在下一个步骤(b)中,向(a)的孵育的样品提供生物药物的靶,应当注意,在一些实施方案中,该靶与至少一种可检测部分直接或间接缔合。应当理解,本公开内容结合其他方面讨论的所有可检测部分还适用于本方面。

[0325] 在下一个步骤(c)中,检测可检测部分以确定靶的量。应当注意,该量指示存在于生物样品中并且附接到固定的非中和性抗体的活性药物的水平。

[0326] 如上文提到的,非中和性抗体是针对生物药物的任何抗体,其不可以防止、降低、减少或消除生物药物与药物的生物靶的结合并且因此不可以减弱或影响生物药物的活性。

[0327] 在一些具体实施方案中,本发明的方法使用的靶可以用至少一种可检测部分直接

或间接标记,所述可检测部分可以是导电标记物、荧光标记物、化学发光标记物、酶标记物、放射性标记物、磁性标记物、金属标记物和比色标记物或其任何组合中的至少一种。

[0328] 在某些实施方案中,与本发明的方法相关的生物药物可以是针对生物靶的抗体,其中生物靶是细胞因子。

[0329] 在其他实施方案中,本发明的方法的细胞因子可以是TNF α ,并且药物可以是对TNF α 特异的单克隆抗体并且更具体地药物可以是英夫利昔单抗、依那西普、阿达木单抗、赛妥珠单抗、戈利木单抗、其任何生物类似物及包含以上的任何组合中的至少一种。

[0330] 在更具体的实施方案中,这样的生物类似物可以包括但不限于英夫利昔单抗-dyyb和SB4依那西普、SB2英夫利昔单抗和SB5阿达木单抗。

[0331] 在一些具体实施方案中,本发明的方法可以适用于患有免疫介导的紊乱的受试者。应当理解,本发明的方法可以适用于本发明结合本发明的其他方面公开的患有任何免疫介导的紊乱的受试者。在一些实施方案中,免疫相关的紊乱可以是炎性疾病、病毒感染、自身免疫疾病、代谢紊乱和增殖性紊乱中的任何一种,具体地炎性疾病、自身免疫疾病和增殖性紊乱中的至少一种。

[0332] 在又一些其他具体实施方案中,特别感兴趣的是,由本发明的方法提及的免疫介导的紊乱可以是炎性疾病、自身免疫疾病和增殖性紊乱(具体地癌症)中的至少一种。在一些具体实施方案中,免疫介导的紊乱可以是炎性紊乱诸如IBD。在另外的具体实施方案中,IBD可以是UC、CD和IC或未分类的IBD (IBDU)中的任何一种。

[0333] 在某些实施方案中,与本发明的方法相关的生物样品可以是血清和全血样品或其任何级分或制剂中的任何一种。

[0334] 尽管现在将结合以下实施例中的某些优选的实施方案来描述本发明,使得可以更充分地理解和领会本发明的方面,但不意图将本发明限制于这些特定实施方案。相反,意图覆盖可能包括在由所附权利要求书限定的本发明的范围内的所有替代、修改和等同物。因此,包括优选的实施方案的以下实施例将用于说明本发明的实践,应当理解示出的细节仅通过举例的方式并且用于本发明的优选的实施方案的说明性讨论的目的,并且为了提供被认为是本发明的配制程序以及原理和概念方面最有用和容易理解的描述是什么而展示。

[0335] 因此,应当理解,本发明不限于本文公开的特定实施例、过程步骤和材料,因为这样的过程步骤和材料可以稍微变化。还应当理解,本文使用的术语仅出于描述特定实施方案的目的而被使用,并且不意图是限制性的,因为本发明的范围将仅由所附的权利要求书及其等同物限定。

[0336] 除非另有指示,在实施本发明时,可以使用化学、分子生物学、生物化学、蛋白质化学和重组DNA技术的常规技术,它们全部在本领域技术人员的技术内。

[0337] 应当理解,出于清楚起见,在单独的实施方案的上下文中描述的本发明的某些特征还可以在单个实施方案中组合提供。相反,出于简洁起见而描述于单个实施方案的上下文中的本发明的多种特征还可以单独提供,或以任何合适的子组合提供,或合适时在描述的本发明的任何其他实施方案中提供。在多种实施方案的上下文中描述的某些特征不被认为是那些实施方案的必需特征,除非实施方案无那些元素则不起作用。

[0338] 如上文描绘的以及如在以下权利要求部分中请求保护的本发明的多种实施方案和方面在以下实施例中找到实验支持。

[0339] 本文使用的所有科学和技术术语具有本领域通常使用的含义,除非另外指明。本文提供的定义是为了促进理解本文频繁使用的某些术语并且并不意味着限制本公开内容的范围。

[0340] 如本文使用的,术语“约”指示可以偏离所指的值,比所指的值高或低多达1%、更具体地5%、更具体地10%、更具体地15%、并且在一些情况中多达20%的值,偏离范围包括整数,并且如果适用还包括非整数,构成连续的范围。如本文使用的,术语“约”是指±10%。

[0341] 术语“包含 (comprises)”、“包含 (comprising)”、“包括 (includes)”、“包括 (including)”、“具有”及其同源词意指“包括但不限于”。该术语包括术语“由…组成”和“基本上由…组成”。短语“基本上由…组成”意指方法、装置和试剂盒可以包括另外的成分和/或步骤,但只要另外的成分和/或步骤不实质性地改变请求保护的方法、装置或试剂盒的基础特征和新特征。贯穿本说明书和实施例和随后的权利要求,除非上下文另有要求,术语“包含 (comprise)”和变化形式诸如“包含 (comprises)”和“包含 (comprising)”将被理解为隐含包括陈述的整数或步骤或者整数或步骤的组,但不排除任何其他的整数或步骤或者整数或步骤的组。

[0342] 应当注意,本发明的多种实施方案可以以范围形式存在。应当理解,以范围形式的描述仅仅是出于方便和简洁,并且不应当被理解为对本发明的范围的僵化限制。因此,范围的描述应当被认为已经具体地公开了所有可能的子范围以及该范围内的单个数值。例如,诸如从1至6的范围的描述应当被认为已经具体地公开了诸如从1至3、从1至4、从1至5、从2至4、从2至6、从3至6等的子范围,以及该范围内的单个数值例如1、2、3、4、5和6。无论范围的广度如何,这都适用。无论何时本文指示数值范围,其意指包括所指示的范围内的任何引述的数值(分数或整数)。短语“范围在 (ranging/ranges between)”第一个指示数和第二个指示数“之间”以及“范围为从 (ranging/ranges from)”第一个指示数“到 (to)”第二个指示数在本文可互换地使用并且意指包括第一个指示数和第二个指示数及其之间的所有分数和整数。

[0343] 公开的和描述的将被理解为本发明不被限制于本文公开的特定实施例、方法步骤和装置或试剂盒,因为这样的方法步骤和装置或试剂盒可以稍微变化。还应当理解,本文使用的术语仅出于描述特定实施方案的目的,并且不意图为限制性的,因为本发明的范围将仅由所附的权利要求及其等同物限定。

[0344] 必须注意,如本说明书和所附的权利要求中使用的,单数形式“一 (a)”、“一 (an)”和“该 (the)”包括复数指代物,除非内容另外明确规定。

[0345] 以下实施例代表发明人在实施本发明的各方面时使用的技术。应当理解,尽管这些技术是用于实践本发明的优选的实施方案的示例,但根据本公开内容,本领域技术人员将认识到,可以进行许多修改而不脱离本发明的精神和预期范围。

实施例

[0346] 现在参考以下实施例,这些实施例连同上文的描述以非限制性方式对本发明进行举例说明。

[0347] 实验程序

[0348] 患者群体

[0349] 针对被包括在先前报道的英夫利昔单抗药代动力学和免疫原性前瞻性研究中的IBD患者检索了关于英夫利昔单抗药代动力学的比较数据,其中英夫利昔单抗水平在相似时间点使用相似的ELISA技术测量[12]。

[0350] 本研究得到医学中心的伦理委员会的批准并且所有患者给出了书面知情同意书。

[0351] 表1:患者信息(提供表3中展示的样品的患者的信息)

	患者数量	36	
	年龄, 岁-中位数(IQR)	37 (25-49)	
	疾病持续时间, 年-中位数(IQR)	5 (1-13)	
	诊断时的年龄-中位数(IQR)	26 (20-36.5)	
	男性/女性比率	0.8	
	采样时的治疗持续时间, 月-中位数(IQR)	4 (1-14)	
	先前用生物制品治疗, n (%)	3 (8.3)	
	克罗恩病(CD), n (%)	24 (67)	
	溃疡性结肠炎(UC), n (%)	12 (33)	
[0352]	CD 表现	炎性 n (%)	11 (46)
		狭窄 n (%)	3 (13)
		穿透 n (%)	11 (46)
CD 位置	回肠 n (%)	6 (25)	
	回肠-结肠 n (%)	13 (54)	
	结肠 n (%)	3 (13)	
UC 位置	左侧结肠炎 n (%)	7 (58)	
	直肠炎 n (%)	2 (17)	
	全结肠炎 n (%)	3 (25)	
	采样时英夫利昔单抗的波谷血清水平 $\mu\text{g/mL}$(中位数, IQR)	3.45 (0.6-12.5)	

[0353] 表2:患者信息(提供表4中展示的样品的患者的信息)

	患者数量	8
[0354]	年龄, 岁-中位数(IQR)	36.5 (30.5-55)
	疾病持续时间, 年-中位数(IQR)	14.5 (8.5-20.5)

[0355]	诊断时的年龄-中位数(IQR)		23 (17-32)
	男性/女性比率		1.7
	先前用生物制品治疗, n (%)		3 (38)
	CD, n (%)		5 (63)
	UC, n (%)		3 (37)
	CD 表现	狭窄 n (%)	4 (80)
		穿透 n (%)	1 (20)
	CD 位置	回肠 n (%)	1 (20)
		回肠-结肠 n (%)	4 (80)
	UC 位置	左侧结肠炎 n (%)	2 (67)
		全结肠炎 n (%)	1 (33)
英夫利昔单抗 2 周的波谷血清水平 $\mu\text{g/mL}$ (中位数, IQR)		13.45 (7.2-20)	

[0356] 临床评分

[0357] 临床状态通过对于克罗恩病 (CD) 患者的 HBI (Harvey-Bradshaw 指数) 和对于溃疡性结肠炎 (UC) 患者的 SCCAI (简单临床结肠炎活动指数) 来确定 (Higgins PD 等 Gut 2005; 54:782-8; Harvey RF 等 Lancet 1980; 1:514)。临床缓解被定义为: 对于 CD 患者, HBI < 5, 并且对于 UC 患者, SCCAI \leq 3。临床响应被定义为, 对于 CD 患者和 UC 患者分别是 HBI 评分下降 \geq 3 分和 SCCAI 评分下降 \geq 3 分。原发性无响应被定义为由于缺乏如上文定义的临床响应而截止到第 14 周停止维多珠单抗 (vedolizumab) 治疗 (Papamichael K 等 J Crohns Colitis 2016; 10:1015-23)。

[0358] 用于仅特异性检测中和性抗药物抗体 (ADA) 浓度的 Elisa 测定

[0359] 标准 ELISA 板用 250ng/ml 英夫利昔单抗在 4°C 包被过夜, 随后在 PBS 中的 1% BSA 中在室温 (RT) 封闭 1 小时。将不同浓度的中和性抗体 (HCA233, BioRad) 或非中和性抗体 (HCA234, BioRad) 添加到板, 在 RT 孵育 1 小时。在洗涤后, 将板与封闭缓冲液中的 1 $\mu\text{g/mL}$ TNF α 在 RT 孵育 1 小时。为了检测, 将 HRP 标记的抗 TNF α 抗体 (ab24473, abcam) 添加到板, 在 RT 持续 1 小时, 随后添加 TMB 底物。将与抗体孵育后的 TNF 结合与不存在抗体情况下的基线结合进行比较。

[0360] 在存在血清的情况下特异性检测中和性 ADA 浓度

[0361] 标准 ELISA 板用 250ng/ml 英夫利昔单抗在 4°C 包被过夜, 随后在 PBS 中的 1% BSA 中在室温 (RT) 封闭 1 小时。中和性抗体 (HCA-233, BioRad) 的系列稀释物 (20ng/ml 至 2.5ng/ml) 在 PBS 中的 1% BSA 中或在稀释在 1% BSA 溶液中的 5% 汇集的阴性血清中制备, 并且添加到板, 在 RT 孵育 1 小时。在洗涤后, 将板与 1% BSA 中的 1 $\mu\text{g/mL}$ TNF α 在 RT 孵育 1 小时。为了检测, 将 HRP 标记的抗 TNF α 抗体添加到板, 在 RT 持续 1 小时, 随后添加 TMB 底物。

[0362] 使用待检测的 TNF 来特异性检测英夫利昔单抗血清水平测定的 Elisa 测定

[0363] 使用抗英夫利昔单抗结合性抗体 HCA-216 (克隆 AbD19376_hIgG, Bio-Rad Laboratories, Inc.) 在 4°C 过夜包被标准 ELISA 板 (每孔使用稀释在碳酸盐缓冲液中的 100 μL 的 1 $\mu\text{g/mL}$ 抗体)。在洗涤后, 使用 150 μL 的在 PBS 中的 1% BSA 在室温封闭该板 60min。将 100 μL

标准浓度的英夫利昔单抗或血清样品(在1%BSA中1:50稀释)一式两份地在室温孵育60min。然后洗涤板并且将其与100 μ l的1.5 μ g/ml TNF α (PeproTech, Inc) 在室温孵育另外的60min。最后,添加70ng/ml浓度的100 μ lHRP标记的抗TNF抗体(ab24473, abcam, UK) 在室温持续60min。在最后的洗涤步骤后,使该板与四甲基联苯胺(TMB)底物反应。通过使用抗Fc检测英夫利昔单抗的常规测定和通过本发明的新测定,评价来自32名患者的血清样品的药物水平。结果通过ELISA读取仪读取,并且以相对于3.125ng/ml-200ng/ml梯度浓度的英夫利昔单抗归一化后的 μ g/ml表示。

[0364] 实施例1

[0365] 用于只确定特异性中和性抗药物抗体的水平的方法的开发

[0366] 为了开发检测血清中的活性药物水平的替代测定,本发明人先前基于中和性抗体降低外源添加的药物英夫利昔单抗(IFX)结合固定的靶(TNF α)的可用率的能力,开发了改良的基于ELISA的抗体测定[6]。将患者的血清掺入外源药物,装载到用TNF α 包被的ELISA板上并且对已结合的药物定量。然而,尽管这种基于ELISA的测定关于预测对抗TNF α 药物的响应丧失显示出价值,但发现这些测定对高的药物血清水平敏感,因为患者血清中的游离药物还可以与辅板的TNF α 结合并且掩蔽ADA中和性活性。

[0367] 因此,在克服该问题的尝试中,开发了一种改进的测定,其中以直接方式测量血清的中和能力(参见图1)。在新技术中,首先将生物药物直接或间接固定到固体基质上。然后添加血清,允许抗药物抗体结合固定的药物。应当注意,靶可以被直接或间接标记。在洗涤步骤(在该步骤期间任何未结合的药物被去除)后,添加标记形式的靶(例如在检测针对抗TNF α 的ADA的情况下为TNF α),该靶与固定的药物结合。其后,洗涤掉过量的未结合的靶并且测量已结合的靶。在不存在中和性抗体的情况下,药物的抗抗原结合位点自由地结合标记的靶,而在存在中和性抗体的情况下(与非中和性抗体相比),靶结合位点被阻断,防止靶与药物结合,并且因此测量到减少的信号。首先在ELISA设置中使用商业化的中和性抗体以及非中和性抗体测试该方法。如图2中示出的,展示了反映递增量的中和性抗体的存在的TNF α 结合曲线,而游离药物或非中和性抗体的存在不影响TNF α 结合。因此,本发明新提出的测定明显能够克服药物敏感性挑战,对血清药物耐受,并且具有快速和随时可用的优点。

[0368] 优化测定的灵敏度

[0369] 在上文描述的实验中,用在PBS中的1%BSA作为稀释剂进行测定。为了确保血清的存在不干扰TNF的结合或中和性抗体与辅板的英夫利昔单抗的相互作用,使用在作为抗体稀释剂的PBS中的1%BSA中1:20稀释的汇集的阴性血清进行测定。如图3中描绘的,添加血清确实影响了结合的TNF信号,但尽管如此仍然观察到标准曲线。

[0370] FDA建议筛选和证实性ADA测定实现至少100纳克/毫升(ng/ml)的灵敏度。尽管传统上FDA已经建议至少为250ng/mL-500ng/ml的灵敏度,但最近的数据表明,低至100ng/ml的浓度可能与临床事件相关。此外,中和性抗体可能对已经处于较低浓度的药物活性具有更大影响。然而,应当理解,中和性测定可能不总是实现该灵敏度水平。

[0371] 因此,本发明人评价了该测定的方法学的若干种变化形式:

[0372] • 降低结合到板上的英夫利昔单抗的量-以将更大的影响赋予被引入的抗体,仍需要保持能够检测到结合的TNF信号。

[0373] • 增加血清浓度-避免抗体的稀释增加检测这些抗体的能力;然而,应当评价和避

免其他血清蛋白对测量的信号的可能干扰。

[0374] 降低结合到板上的英夫利昔单抗的量。

[0375] 测试了在96孔板的每孔100 μ l体积中范围从100ng/ml至500ng/ml的不同浓度的板结合英夫利昔单抗。使用相同的中和性抗体标准物,注意到尽管用100ng/ml包被显示出TNF结合降低最大,但用250ng/ml包被可以检测到10ng/ml的中和性抗体,而曲线的整体一致性比用100ng/ml包被获得的曲线的整体一致性更好。随后的英夫利昔单抗包被是250ng/ml。评价另外的条件以确保TNF结合的最佳阻断和饱和。

[0376] 增加血清浓度。

[0377] 测试不同的血清稀释比率以确定可使用的血清浓度的限值,而不增加测定的背景且不影响其可再现性。测试了掺有相同浓度的商业化中和性抗体的2%和10%之间的血清浓度。如图4中示出的,增加血清浓度,虽然在很大程度上不影响中和的程度,但确实降低了结果的再现性。

[0378] 因此以1:20稀释(5%)进行以下实验。基于浓度为5ng/ml-10ng/ml的掺入的中和性抗体已经显示出TNF结合降低的观察结果,假设1:20稀释能够检测患者血清中浓度为100ng/ml-200ng/ml的中和性抗体。

[0379] 确定未治疗的血清的中和活性的截止值

[0380] 为了评估中和活性背景并且确定真阳性测量值的截止值,测试了来自从未暴露于药物的15名健康供体的血清样品。在这些样品中测量的平均抗体浓度为29ng/ml并且标准偏差为16.3。因此,如果期望的置信水平是99.7%(平均值 \pm 3个标准偏差,假设为正态分布),截止值约为80ng/ml。

[0381] 实施例2

[0382] 仅确定特异性中和性抗药物抗体的水平:患者血清的验证步骤和对后来药物响应丧失的预测

[0383] 测试在来自用英夫利昔单抗治疗的患者的血清样品中进行,同时存在适当的对照。对测试进行微调以在患者血清中存在的中和性抗体的范围表现最佳。患者群组(cohort)包括已经用本发明人先前设计的如上文指示的其他中和测试进行了测试的那些患者,以允许不同方法之间以及来自目前治疗的患者的另外的样品之间的比较。总抗体水平的免疫检测也使用 λ 链ELISA进行,以便比较。为了测试方法对血清药物水平的耐受性,在存在掺入的药物的情况下再次测试一部分血清,评估掺入的药物对结果的影响。

[0384] 将结果与用使用来自早期治疗时间点的患者血清的先前的免疫测定产生的那些结果进行比较。进行统计学分析以评价方法之间的一致性和新测定预测患者中随后的响应丧失和出现高抗体滴度的能力。

[0385] 更进一步地,本发明的新方法接下来使用包含如下文指示的三种类型的样品的第一群组的血清进行评价,当通过常规的“抗 λ ”方法测定时,抗药物抗体都为阴性,其中抗药物抗体使用针对抗体的 λ 轻链的抗体来检测。然而,该方法不能检测包含 κ 轻链的抗药物抗体:

[0386] 1. 来自具有中到高水平的英夫利昔单抗的患者的样品-血清编号在表3中标记为粗体

[0387] 2. 来自在其下一次就诊时发展出能够被抗 λ 方法检测到的抗体(结合性抗体)的患

者的样品-血清编号在表3中加下划线。

[0388] 3. 来自具有下降水平的英夫利昔单抗 (英夫利昔单抗水平为 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 及以下, 在中间列用斜体标记)、未发展出可检测抗体的患者的样品-血清编号在表3中用斜体标记。

[0389] 基于样品的中和性抗体测量值对样品分类。如可以在表3中观察到的, 测量到中和性抗体似乎不总是先于能够被抗 λ 测定检测到的抗体的出现。该结果可以指示, 可测量的抗体的发展与中和性抗体的更早出现之间不存在关联。然而, 可能是, 存在阻止检测到此类抗体的机制性抑制。在该阶段, 少量的抗体可以与那些血清样品中仍然可用的药物结合。在该情况中, 这些抗体虽然在测试的时间点是存在的, 但不能自由地结合并中和性测定药物。

[0390] 表3-测量患者血清中的抗英夫利昔单抗中和性抗体

血清编号	英夫利昔单抗水平	中和性抗体ng/ml
3105	MAX	0
4465	MAX	0
2566	MAX	0
<u>408</u>	18.2	0
<u>3162</u>	16.5	0
<u>3234</u>	16.4	0
<u>2659</u>	16.2	0
3586	11.4	0
<u>1992</u>	7.0	0
4386	6.4	0
<u>1855</u>	6.1	0
<u>4460</u>	4.1	0
<u>4186</u>	2.8	0
<u>1039</u>	2.8	0
<u>4171</u>	2.6	0
<u>3661</u>	<i>0.3</i>	0
1449	max	25
<u>3753</u>	<i>0.9</i>	25
<u>4883</u>	<i>0.6</i>	32
<u>1564</u>	1.6	33
<u>3555</u>	<i>0.4</i>	43
<u>1619</u>	<i>0.6</i>	49
<u>1534</u>	5.4	70
<u>752</u>	4.6	77
<u>1285</u>	<i>0.2</i>	77
<u>1427</u>	<i>0.0</i>	81
<u>3526</u>	<i>1.0</i>	93
1617	4.3	96
<u>5118</u>	<i>0.0</i>	100
1018	11.8	109
<u>678</u>	<i>0.4</i>	119
<u>2093</u>	<i>0.6</i>	123
3267	14.5	136
<u>528</u>	<i>0.2</i>	152
<u>1308</u>	<i>0.0</i>	186
<u>1323</u>	<i>0.0</i>	323

[0391]

[0392] 表格字体:粗体:高药物水平,就诊时无Ab发展;加下划线的:在抗 λ 测定检测到抗体前的最后时间点;和斜体:下降的药物水平,未随后检测到抗体。

[0393] 中和活性的出现可以解释大多数样品中的药物水平开始下降,而随后没有出现被抗 λ 测定测量到的抗体(表3中的斜体)。这表明这些患者发展有害的抗体,其可能受益于免疫调节药物的添加,而现有可用的测定未考虑将免疫调节药物用于这些患者的治疗。

[0394] 添加解离步骤

[0395] 评价了解离步骤的添加,解离步骤使抗体从药物释放并且使它们可用于中和板结合的药物。将样品用300mM乙酸处理15分钟以使任何药物-抗-药物抗体复合物解离,之后评估它们的中和能力。还在来自相同患者的随后血清样品中检查了中和活性,以确定出现的抗体是否是中和性抗体。

[0396] 本发明人分析了是否存在确实发展出可由抗 λ 测定测量到的抗体但不丧失响应的患者。这些抗体可能是非中和性的,对药物活性和效率具有较小的影响。这样的患者可能不受益于对其治疗方案添加免疫调节药物。

[0397] 患者血清中的中和性活性的系列测量

[0398] 假设患者之间的异质性可能使中和性抗体的出现和产生难以阐明,因为每一个患者血清的基线中和能力可能不同,并且因此通过阴性血清的标准化可能不太合适。因此,测试了来自丧失响应的患者的系列样品。这些患者没有发展出可由 λ 测定检测到的抗药物抗体。如表4中示出的,与基线水平(治疗之前)相比,递增的中和抗体的趋势在丧失响应的患者中是明显的。因此,这些结果确立了使用本发明的方法预测生物药物治疗的患者中的无响应性的可行性。

[0399] 在此处,还检查了使用解离步骤的必要性以了解当患者血清中仍存在高水平的英夫利昔单抗时,是否能够甚至更早地检测到中和性活性。

[0400] 表4-对患者血清的中和活性的系列测量

[0401]

患者从治疗开始后第几周丧失响应	中和性抗体	Remicade	λ测定测量的药物	
0	-12.78	NA	NA	急诊手术
2	41.36	7	0	
6	25.81	7.9	0	
0	61.31	NA	NA	
2	88.21	最大值	0	
6	70.61	9.2	0	
14	159.91	3.3	0	
从治疗开始后患者丧失响应的周	中和抗体	Remicade	λ测定测量的药物	
0	-12.78	NA	NA	急诊手术
2	41.36	7	0	
6	25.81	7.9	0	
0	61.31	NA	NA	
2	88.21	最大值	0	
6	70.61	9.2	0	
14	159.91	3.3	0	

[0402]	22	11.06	1.8	0	停止IFX
	35	46.07	0	0	
	0	92.77	NA	NA	缩短的间隔
	2	72.77	6.7	0	
	13	107.77	0	0	
	19	170.97	0	0.4	
	25	156.77	0	0	
	0	NA	NA	NA	
	2	18.86	5.8	0	
	21	57.12	2.5	0	
	35	83.12	1.1	0	
	43	310.62	0	4.6	
	0	110.02	NA	NA	停止IFX。 无临床响应
	2	172.22	7.4	0	
	14	208.12	0	0	副作用-过敏
	0	-14.61	NA	NA	
	2	8.33	最大值	0	
	6	52.61	4.2	0	
	14	51.41	1.1	0	
	22	191.71	0	0	
	0	92.61	NA	NA	停止IFX。 无临床响应
	2	172.51	7.7	0	
6	0.3	5.5	0		
14	18	0.7	0		
25	57.5	0.3	0		
44	126.5	0.1	0		
0	-15.3	NA	NA		
2	-17.4	最大值	0		
14	-12.7	0.55	0.8		

[0403] 实施例3

[0404] 设置平行药物水平测定,使用标记的靶作为读出并且在患者血清中对标记的靶进行测试

[0405] 与在血清中测试中和性抗体的测定平行地,使用具有相同标记的靶,即标记的TNF α 的相似版式(format)来更准确地定量血清药物水平。评价所测量的水平与已使用的药物水平测量方法(即使用抗Fc检测药物与靶(TNF α)包被的ELISA板的结合)的一致性。

[0406] 在本发明的新的药物水平测定中,首先将商业化的抗药物抗体固定到固体基质上。然后添加血清,允许固定的抗体捕获药物。在洗涤步骤后,添加标记形式的靶(例如在检测英夫利昔单抗的情况中为TNF α),该靶与已捕获的药物结合。其后,洗涤掉过量的未结合的靶并且如图5中图示的测量结合的靶。

[0407] 在该测定中,通过ELISA进行第一个步骤,抗药物结合性抗体(与中和性抗体相反)被用于包被。将血清样品添加到板,使循环的药物能够与已被结合的抗体结合。已知的药物标准物被用于产生标准曲线并且确定准确的血清药物浓度。在洗涤步骤后,添加TNF并且其被已捕获的药物结合,并且然后通过HRP标记的抗TNF抗体来检测。

[0408] 测试了不同的条件以确保在患者血清中通常测量的浓度的范围的结果的灵敏度和线性度(图6A)。使用这种新的测定以及使用抗Fc检测英夫利昔单抗的测定来测量患者血清中的药物水平。发现结果高度相关,相关系数为0.96(图6B)。

[0409] 实施例4

[0410] 基于ELISA设置开发快速横流试剂盒的原型,用于检测中和性抗体和药物浓度

[0411] 商业化的试剂盒被用于设置实验室快速横流测定。出于该目的,首先在ELISA设置中并且然后继续在快速横流设置中,将TNF α 与金标记物或乳胶标记物缀合以被用作读出并且评价标记的分子与药物结合的能力。检查了被掺入到阴性未暴露的血清中的商业化的中和性抗体或从丧失响应的患者血清中获得的抗体在横流平台中与标记的靶竞争结合固定的药物的能力。使用掺入到阴性血清中的不同浓度的药物来测试用于测量药物水平的测定的准确性。将结果与ELISA设置或与通常使用的确定患者的药物水平的方法进行比较。

[0412] 实施例5

[0413] 在患者血清和全血中测试快速横流设置

[0414] 首先用已知其中和性结合能力的患者血清测试快速横流测定,并且将结果与基于ELISA的设置结果进行比较。还直接使用全血检查了该方法。由掺有不同浓度和抗体-药物比率的药物和商业化中和性抗体的新鲜全血将针对来自具有已知的药物和中和性抗体的血清水平的患者的血液样品的模型具体化,被用作模型。将结果与相同的掺入阴性血清的结果进行比较。在验证了具有商业抗体的试剂盒后,使用来自被确认已经发展出中和性抗体的患者的新鲜血液样品(在知情同意之后)。

序列表

<110> 拉姆巴姆医疗技术有限公司

<120> 评估生物药物治疗的受试者中的中和性抗体水平的测定及其在个性化医疗中的用途

<130> 2565151

<150> US 62/530,310

<151> 2017-07-10

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 233

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> TNF- α

登录号NP_000585.2

<400> 1

```

Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala
1           5           10           15
Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe
           20           25           30
Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe
           35           40           45
Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro
           50           55           60
Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser
65           70           75           80
Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro
           85           90           95
Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu
           100          105          110
Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser
           115          120          125
Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly
           130          135          140
Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala
145          150          155          160

```

Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro
 165 170 175
 Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu
 180 185 190
 Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu
 195 200 205
 Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly
 210 215 220
 Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 225 230

<210> 2

<211> 702

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> misc_feature

<223> TNF- α

登录号NM_000594.3

<400> 2

atgagcactg aaagcatgat ccgggacgtg gagctggccg aggaggcgct cccaagaag 60
 acaggggggc cccagggctc caggcggtgc ttgttctca gctcttctc cttctgac 120
 gtggcaggcg ccaccacgct cttctgctg ctgcacttg gagtgatcg ccccagagg 180
 gaagagtcc ccagggacct ctctctaate agcctctgg cccaggcagt cagatcatct 240
 tctcgaacct cgagtgacaa gcctgtagcc catgtttag caaacctca agctgagggg 300
 cagctccagt ggctgaaccg ccgggccaat gcctctctgg ccaatggcgt ggagctgaga 360
 gataaccagc tgggtggtgcc atcagagggc ctgtacctca tctactcca ggtcctcttc 420
 aagggccaag gctgcccctc cacccatgtg ctctcacc acaccatcag ccgcatcgcc 480
 gtctcctacc agaccaaggt caacctctc tctgcatca agagcccctg ccagagggag 540
 accccagagg gggctgagc caagcctgg tatgagcca tctatctgg aggggtcttc 600
 cagctggaga agggtagcc actcagcgt gagatcaat ggcccgacta tctcacttt 660
 gccgagtctg ggcaggtcta ctttgggatc attgcctgt ga 702

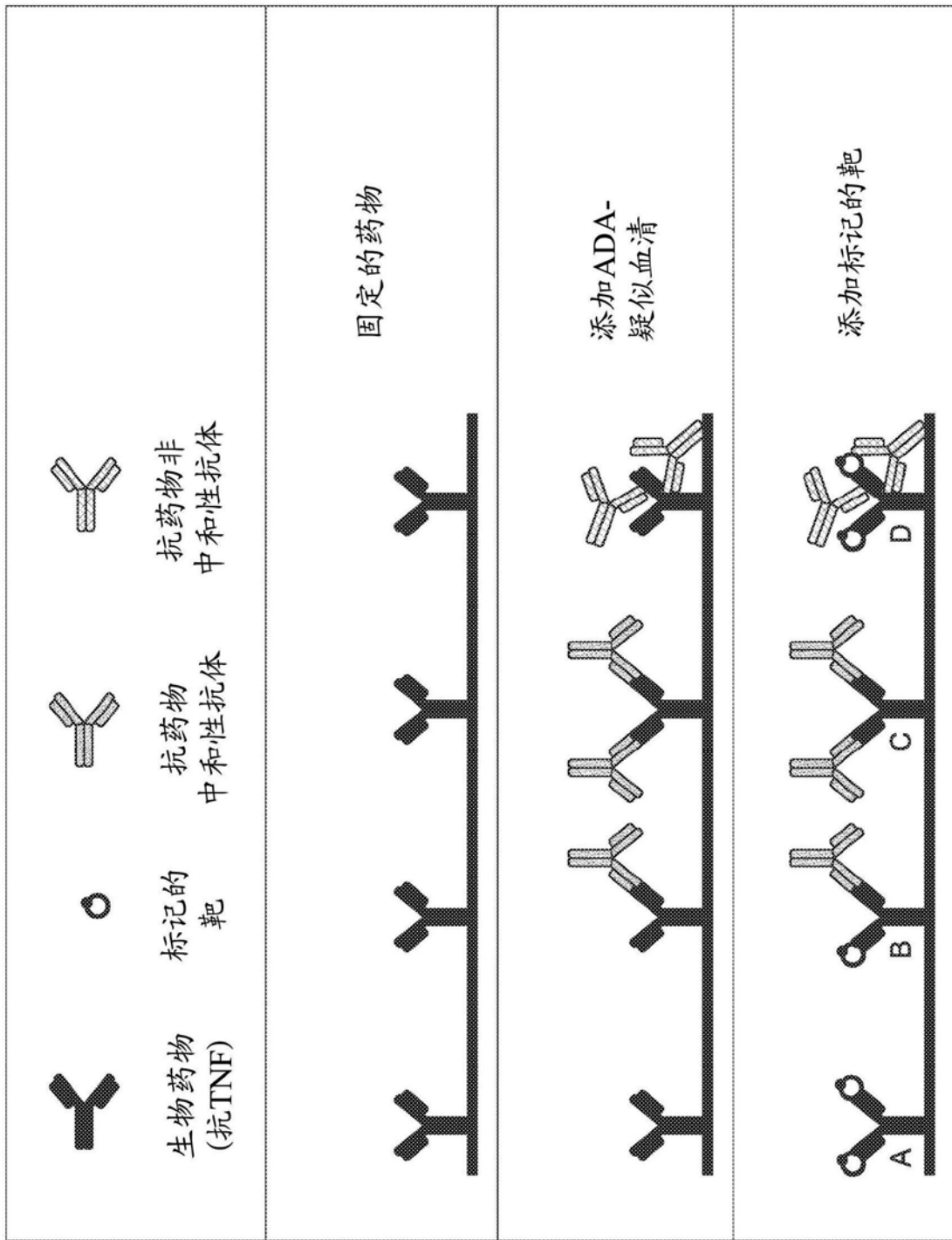


图1

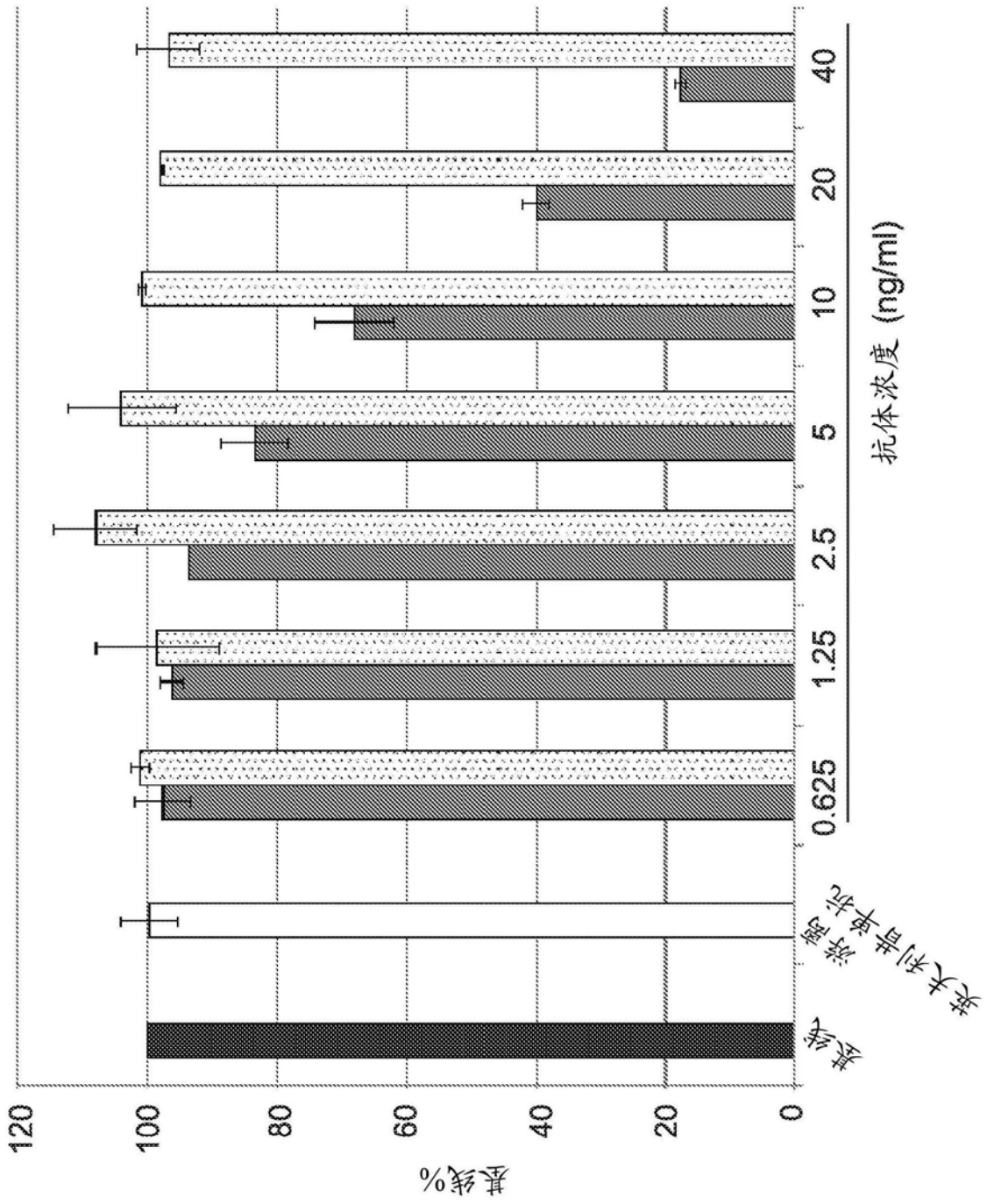


图2

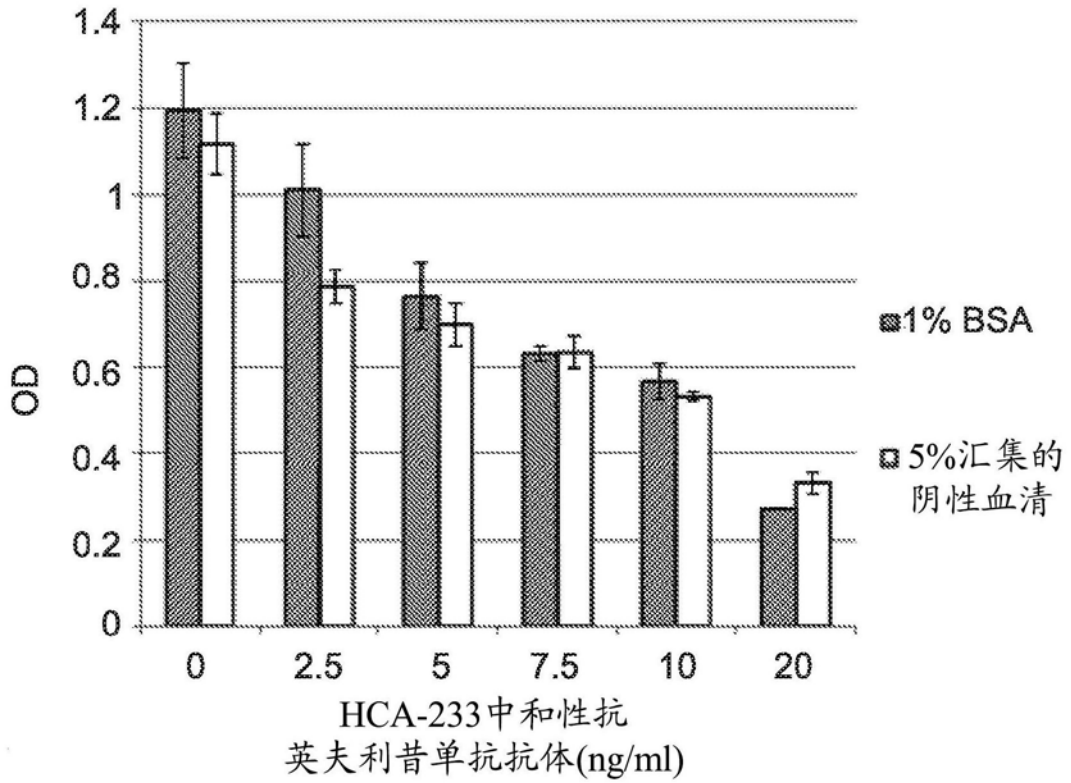


图3

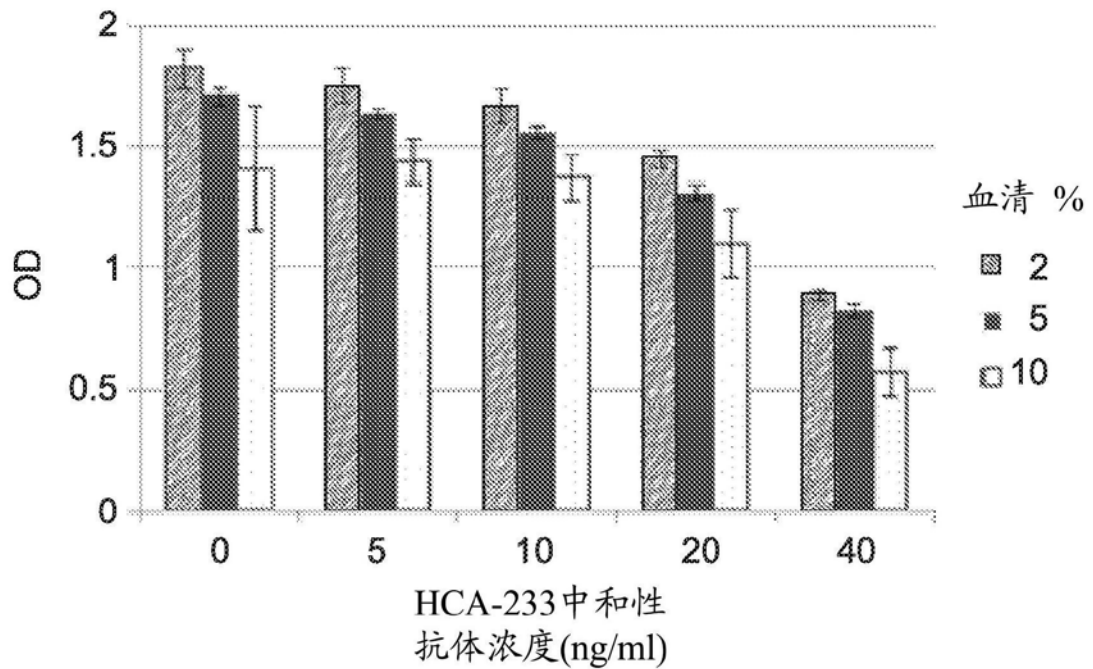


图4

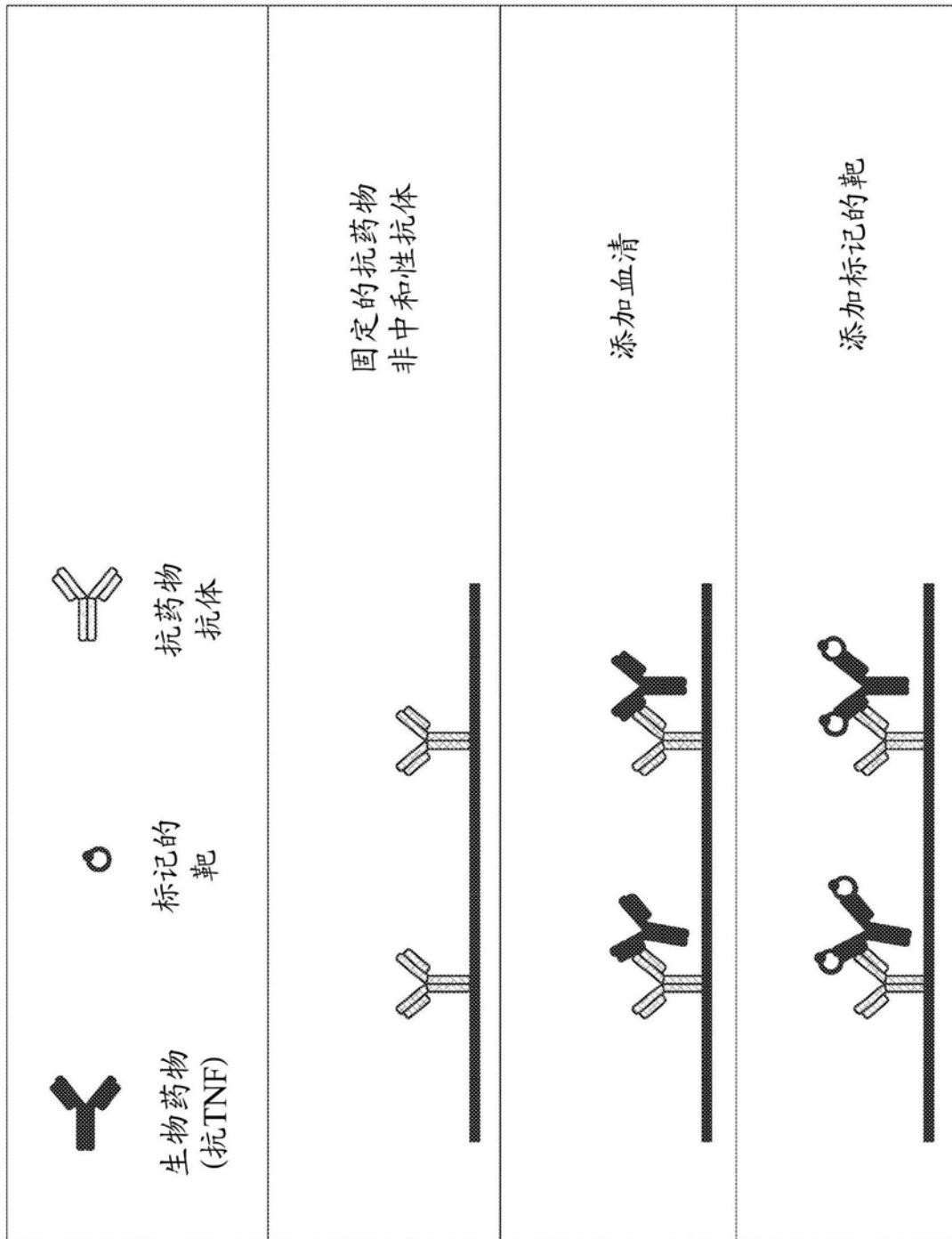


图5

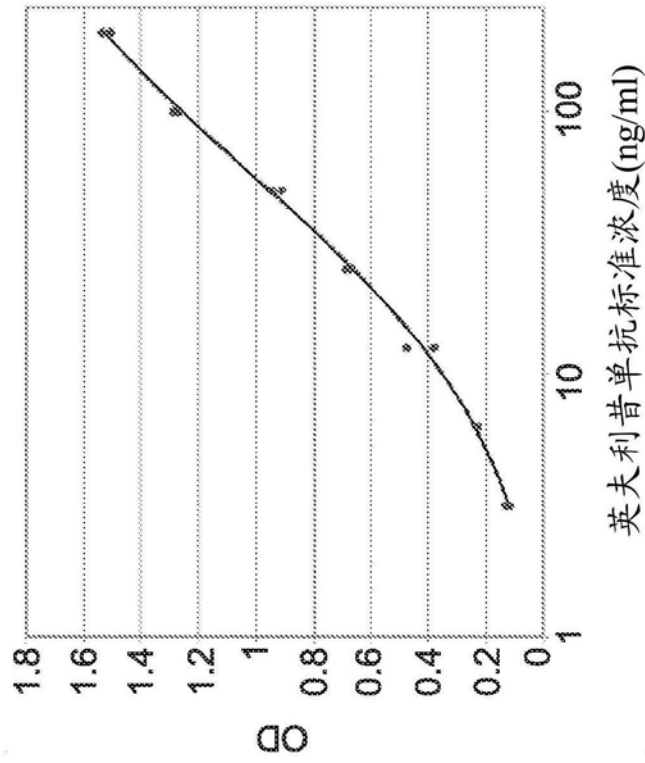


图6A

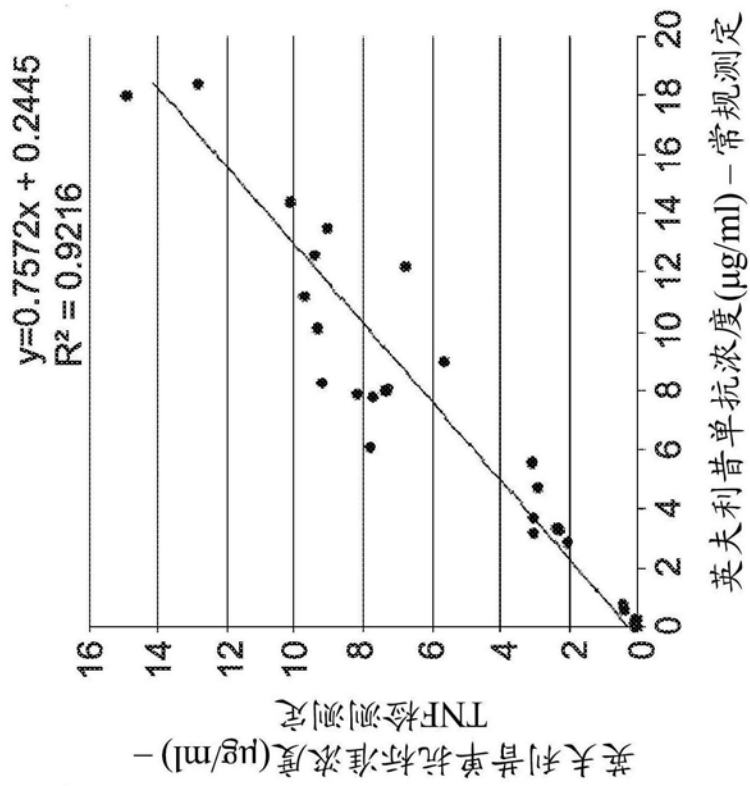


图6B

专利名称(译)	评估生物药物治疗的受试者中的中和性抗体水平的测定及其在个性化医疗中的用途		
公开(公告)号	CN111133313A	公开(公告)日	2020-05-08
申请号	CN201880058764.2	申请日	2018-07-10
发明人	耶胡达·乔尔斯 西加尔·普雷斯曼 亚历山德拉·布拉特 希兰·格拉西-魏因贝格		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/564 G01N33/6854 G01N33/94 C07K16/2875 G01N33/543 G01N2800/52 G01N2800/54		
代理人(译)	王玮玮 郑霞		
优先权	62/530310 2017-07-10 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于准确确定患有免疫介导的紊乱的、用生物药物治疗的受试者的样品中的中和性抗体水平的测定、装置和试剂盒以及用于预测这些患者对药物的响应性的测定、装置和试剂盒。

患者数量	36
年龄, 岁-中位数(IQR)	37 (25-49)
疾病持续时间, 年-中位数(IQR)	5 (1-13)
诊断时的年龄-中位数(IQR)	26 (20-36.5)
男性/女性比率	0.8
采样时的治疗持续时间, 月-中位数(IQR)	4 (1-14)
先前用生物制品治疗, n (%)	3 (8.3)
克罗恩病(CD), n (%)	24 (67)
溃疡性结肠炎(UC), n (%)	12 (33)
CD 表现	
炎性 n (%)	11 (46)
狭窄 n (%)	3 (13)
穿透 n (%)	11 (46)
CD 位置	
回肠 n (%)	6 (25)
回肠-结肠 n (%)	13 (54)
结肠 n (%)	3 (13)
UC 位置	
左侧结肠炎 n (%)	7 (58)
直肠炎 n (%)	2 (17)
全结肠炎 n (%)	3 (25)
采样时英夫利昔单抗的波谷血清水平 $\mu\text{g/mL}$ (中位数, IQR)	3.45 (0.6-12.5)