



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108369227 A

(43)申请公布日 2018.08.03

(21)申请号 201680073882.1

(22)申请日 2016.12.14

(30)优先权数据

15200446.1 2015.12.16 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.06.15

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/080887 2016.12.14

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2017/102786 EN 2017.06.22

(71)申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 G·乔丹 R·史塔克

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 张莉 黄革生

(51)Int.Cl.

G01N 33/536(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/94(2006.01)

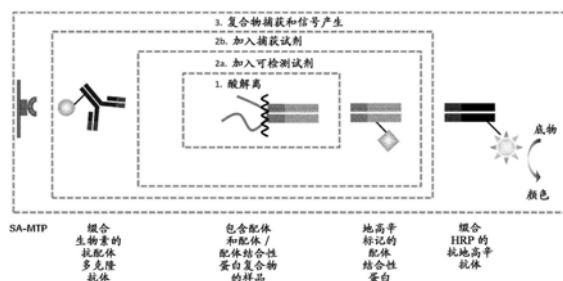
权利要求书2页 说明书17页 附图8页

(54)发明名称

三步酸解离酶联免疫吸附(TADELIS)测定法

(57)摘要

本文报道了用于在样品中测定配体结合性蛋白(治疗剂)的配体的量(总量,即结合能力)的方法,其按以下顺序包括以下步骤:对样品进行酸处理,通过向样品中加入抗配体抗体和标记的配体结合性蛋白,在溶液中形成非共价复合物,所述复合物包含i)抗配体抗体,ii)配体,和iii)标记的配体结合性蛋白,和测定复合物的量,从而确定配体结合性蛋白的配体的量。



1. 一种用于在样品中测定配体结合性蛋白(治疗剂)的配体的量的方法,其按以下顺序包括以下步骤:

-对样品进行酸处理,

-通过首先向样品中加入标记的配体结合性蛋白以形成二元标记的配体结合性蛋白-配体复合物,并通过在形成二元复合物之后向样品中加入抗配体抗体以形成三元标记的配体结合性蛋白-配体-抗配体抗体复合物,在溶液中形成三元复合物,其包含

i) 抗配体抗体,

ii) 配体,和

iii) 标记的配体结合性蛋白,和

-测定三元复合物的量,和

由此确定配体结合性蛋白的配体的量。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法用于测定能够被配体结合性蛋白(特异地)结合的配体的量。

3. 根据权利要求1至2中任一项所述的方法,其中所述样品是血浆样品或血清样品。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述样品在酸处理之前不被稀释。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中将酸处理的样品与过量的标记配体结合性蛋白孵育,形成复合物。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中通过首先将酸处理的样品与过量的标记配体结合性蛋白孵育,然后再与抗配体抗体孵育,形成复合物。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中在复合物的形成中,标记的配体结合性蛋白与可检测标记缀合。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中抗配体抗体与结合对的第一成员缀合。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述方法包括在形成三元复合物之后将形成的三元复合物固定在固体支持物上的步骤。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中固体支持物与结合对的第二成员缀合(该结合对的第二成员可与缀合至抗配体抗体的结合对的第一成员形成复合物)。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法,其中抗配体抗体是多克隆抗体。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其中所述方法按以下顺序包括以下步骤:

-对样品进行酸处理,

-将样品与标记的配体结合性蛋白孵育,所述标记的配体结合性蛋白与可检测的标记缀合,

-将样品与多克隆抗配体抗体孵育,所述多克隆抗配体抗体与结合对的第一成员缀合,

-将样品施加至与结合对的第二成员缀合的固体支持物上,所述结合对的第二成员与结合对的第一成员形成非共价复合物,和

-通过测定固相固定的标记配体结合性蛋白的量来确定配体结合性蛋白的配体的量。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的方法,其中所述配体结合性蛋白是抗体。

14. 根据权利要求10至13中任一项所述的方法,其中所述结合对的第一成员是生物素

并且所述结合对的第二成员是链霉亲和素。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的方法,其中加入的标记配体结合性蛋白与加入的抗配体抗体的基于分子量的比率为约8-9:1。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的方法,其中所述三元复合物是非共价复合物。

### 三步酸解离酶联免疫吸附 (TADELIS) 测定法

[0001] 本发明属于免疫测定领域。本文报道了三步酸解离酶联免疫吸附测定法 (TADELIS 测定法)。本文报道的方法可以用于测定配体结合性蛋白治疗剂的循环配体的量,所述方法包括酸解离步骤和溶液中复合物形成步骤。

#### 背景技术

[0002] Moxness, M. 等人 (Ann. N. Y. Acad. Sci. USA 1005 (2003) 265-268) 报道了总胰岛素抗体和 Ig 类胰岛素抗体 (IAB) 的放射性配体结合测定法。首先将测试血清和对照血清酸化以解离结合的胰岛素,加入活性炭以吸附血清胰岛素。中和后,通过离心从血清中除去结合有胰岛素的活性炭。对于每个测定,在存在和不存在高水平未标记的胰岛素的情况下,将提取了胰岛素后的血清样品与放射性标记的胰岛素孵育,以分别测定非特异性结合和总结合。

[0003] Patton, A. 等人 (J. Immunol. Meth. 304 (2005) 189-195) 报道了桥连 ELISA, 其组合使用共价偶联的高密度抗原表面与酸解离步骤以允许在人血清中存在抗原时检测抗体,即不事先除去过量的抗原。

[0004] Lee, J. W. 等人 (AAPS J. 13 (2011) 99-110) 报道了,在支持药物开发方面,驱动生物分析的主要因素是数据的预期用途。测量循环中 mAb 及其靶配体 (L) 的可靠方法,对于评估暴露-反应关系以支持疗效和安全性评估以及剂量选择是重要的。配体结合测定法 (LBA) 被广泛用于分析蛋白生物治疗剂和靶配体 (L) 以支持药代动力学/药效学 (PK/PD) 和安全性评估。对于单克隆抗体药物 (mAb), 特别是与 L 非共价结合的单克隆抗体药物,体内可能存在多种形式的 mAb 和 L, 包括游离 mAb、游离 L、mAb 和 L 的单价和/或二价复合物。考虑到给药后体内出现的动态结合平衡的复杂性以及生物分析过程中干扰平衡的多种干扰源,很明显离体定量感兴趣的形式 (游离的、结合的或总的 mAb 和 L) 可能不同于体内的实际情况。原则上可以设计 LBA 试剂和测定形式以测量总的或游离形式的 mAb 和 L。但是,对在特定条件下进行测量的这些形式进行验证,在技术上具有挑战性。

[0005] Kelly, M. 等人 (AAPS J., 15 (2013) 646-658) 报道了,最近越来越受关注的一个领域是,对“游离”和“总”分析物的评估以及测定形式对这些评估的影响。作者提供了对现有文献的评论,并前瞻性地探索了减轻抗药物抗体对 PK 测定法测量的潜在影响的方法。此外,在 ADA (抗药物抗体) 测定中增加药物耐受性的方法可以被重新用于不同目的,用于评估或增加 PK 测定法中 ADA 耐受性,其中通常利用准备步骤来分解免疫复合物和提取药物。必须指出,实施这些具有挑战性的操作并不被认为是后期临床生物分析的常规手段,但是可以在方法开发的研究阶段早期向药代动力学提供有价值的信息供其解释。总之,用于帮助定量药物的任何提取过程都可能导致“总”评估。

[0006] Davis, R. A. 等人 (J. Pharm. Biomed. Anal. 48 (2008) 897-901) 报道了,在存在高水平的治疗性 MoAb 时,使用单一非竞争性 MoAb 以捕获/酸洗脱形式定量总的 (游离的加上结合的) 生物标记物浓度的方法。该测定法能够在 200  $\mu$ /ml 或更多治疗性 MoAb 存在下准确检测和定量循环中的 ng/ml 生物标记物水平。

[0007] Salimi-Moosavi, H. 等人 (J. Pharm. Biomed. Anal. 51 (2010) 1128-1133) 报道了碱和酸/胍处理方法, 以解离蛋白质结合和优先地变性ThA。中和的靶蛋白可以通过ELISA测定。这些方法提供了总靶蛋白的可再现测量, 无ThA干扰。用含有酪蛋白的碱性缓冲液 (pH>13) 或酸性/胍缓冲液 (pH<1) 处理血清样品、标准品和含有靶蛋白和ThA的QC。成功测量了两种不同ThA系统的总靶蛋白, 并通过处理完全消除了干扰。这些方法已成功应用于临床前血清样品的分析。

[0008] 在US2015/226758中提供了用于检测样品中抗药物抗体存在的方法和试剂盒, 并且更具体地提供了用于在样品中存在药物的情况下检测抗药物抗体的方法和试剂盒。

[0009] 在US2012/269728中报道了用于实时检测样品中靶物质的装置和方法。这些装置利用示踪技术和选择性结合, 允许鉴定样品中, 优选生物样品中的一种或多种靶物质。

[0010] Li, J等人报道了通过Octet (>R) 生物层干涉测量法 (J. Pharm. Biomed. Anal. 54 (2011) 286-294) 在免疫原性测试中对低亲和力抗药物抗体的检测以及对药物耐受性的改善。

[0011] Mikulskis, A. 等人报道了, 将溶液ELISA作为可选平台用于开发稳健的药物耐受性免疫原性测定法以支持药物开发 (J. Immunol. Meth. 365 (2010) 38-49)。

[0012] Qiu, Z. J. 等人报道了新型均质的基于生物素-地高辛的测定法, 用于在自身免疫血清中检测人抗-治疗性抗体 (J. Immunol. Meth. 362 (2010) 101-111)。

[0013] Zhong, Z. D. 等人报道了免疫原性测定中药物靶干扰的鉴定和抑制 (J. Immunol. Meth. 355 (2010) 21-28)。

## 发明内容

[0014] 本文报道了, 使用免疫测定法测定蛋白治疗剂的循环配体/靶 (作为可溶形式分泌或脱落) 的方法, 包括酸解离步骤和溶液中复合物形成步骤 (三步酸解离酶联免疫吸附测定法 (TADELIS测定法))。在TADELIS测定法中, 第一次将酸解离/重组步骤用于免疫测定法中来测定循环配体的量。

[0015] 已经发现, 用本文报道的方法可以改善用于测定配体结合性蛋白的循环配体/靶的免疫测定法的药物耐受性。本文报道的方法解决了样品中存在的配体结合性蛋白 (例如由于施用而存在) 和免疫测定期间加入的标记的配体结合性蛋白之间的干扰问题。因此, 本文报道的方法适用于分析来自药代动力学和/或药效学实验的样品。

[0016] 此外, 已经发现使用配体结合性蛋白作为试剂允许选择性检测“配体结合性蛋白特异性的”配体浓度。也就是说, 本文报道的方法仅测定实际上可被配体结合性蛋白结合的循环配体的量。使用本文报道的方法, 例如配体的同种型或修饰形式将不包括在测定的量中, 这是因为本身具有结合特异性的配体结合性蛋白被包括在方法中。此外, 不需要额外的努力来阐明商业上可获得的或基于不同抗体/克隆的“生物标记物”测定法是否实际上仅测定活性靶。只有实际上能够被配体结合性蛋白治疗剂结合的循环配体级分可以被检测。

[0017] 在所用的酸解离步骤中, 所有结合的配体被释放, 例如从配体/配体结合性蛋白复合物中释放。因此, 用本文报道的方法, 可以测定样品中配体结合性蛋白特异性配体的总量。

[0018] (酸解离步骤后) 在pH调节后与过量的标记配体结合性蛋白在溶液中孵育, 可以使

平衡移向配体/标记配体结合性蛋白复合物。因此,基于标记的配体结合性蛋白的浓度(样品中配体结合性蛋白与加入的标记配体结合性蛋白的比率),可以克服同等亲和(affine)配体结合性蛋白之间的竞争。借此可以进行药物耐受性的调整。

[0019] 此外,标记配体结合性蛋白的标记必须不同于用于固定的(抗配体抗体)结合对的成员。通过这一先决条件,可以确保可以使用(与标记的配体结合性蛋白相比)较低浓度的抗配体抗体(例如,与样品中预期配体量相比,仅需要少量过量)。这防止了游离(即未复合)的标记配体结合性蛋白对固相的饱和。因此,在本文报道的方法中,使用相对于样品中存在的配体过量的标记配体结合性蛋白。该过量小于(固定的)抗配体抗体相对于样品中存在的配体的过量。

[0020] 在一个实施方案中,未稀释的样品中配体结合性蛋白的浓度为150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更低。在一个实施方案中,样品中配体的浓度为75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0021] 与通常使用的免疫测定法相比,本文报道的方法采用反向形式。配体结合性蛋白本身(以标记形式)用于测定其循环配体。这确保了明确的读出。此外,在TADELIS测定法中回收的配体预期可以/可以直接适用于定量。

[0022] 通过在不存在捕获试剂的情况下与过量检测试剂孵育,实现了本文所报道的方法(测定法)的更高/改善的药物耐受性。

[0023] 如本文报道的一个方面是用于在样品中测定配体结合性蛋白(治疗剂/药物)的配体的量的方法,包括按以下顺序进行的以下步骤:

[0024] -对样品进行酸处理,

[0025] -通过向样品中加入抗配体抗体和标记的配体结合性蛋白,在溶液中形成非共价复合物,所述复合物包含

[0026] i) 抗配体抗体,

[0027] ii) 配体,和

[0028] iii) 标记的配体结合性蛋白,和

[0029] -测定复合物的量,

[0030] 由此确定配体结合性蛋白的配体的量。

[0031] 在一个实施方案中,该方法按以下顺序包括以下步骤:

[0032] -对样品进行酸处理,

[0033] -通过首先向样品中加入(并孵育)标记的配体结合性蛋白以形成二元的标记配体结合性蛋白-配体复合物,并通过在形成二元复合物之后向样品中加入(并孵育)抗配体抗体以形成三元的标记配体结合性蛋白-配体-抗配体抗体复合物,在溶液中形成三元(非共价)复合物,其包含

[0034] i) 抗配体抗体,

[0035] ii) 配体,和

[0036] iii) 标记的配体结合性蛋白,和

[0037] -测定三元(非共价)复合物的量,

[0038] 从而确定配体结合性蛋白的配体的量。

[0039] 在一个实施方案中,该方法用于测定可(特异性地)与配体结合性蛋白结合的配体的量。

[0040] 在一个实施方案中,该方法用于测定样品中配体结合性蛋白的配体的总量。

[0041] 在一个实施方案中,样品是血浆样品或血清样品。

[0042] 在一个实施方案中,样品来自动物。在一个实施方案中,动物选自人和实验动物。在一个实施方案中,样品来自在获得样品之前已经施用了配体结合性蛋白的动物。在一个实施方案中,样品来自需要用配体结合性蛋白治疗的患者,在获得样品之前该患者施用了配体结合性蛋白。在任何情况下样品不再被重新应用于已经实施了该方法的活体。

[0043] 在一个优选实施方案中,样品在酸处理之前不被稀释。

[0044] 在一个实施方案中,通过将酸处理的样品与过量的标记配体结合性蛋白孵育形成非共价复合物。在一个实施方案中,过量是以重量计过量5倍或更多。在一个实施方案中,过量是以重量计过量10倍或更多。在一个实施方案中,过量是过量5倍至1000倍。在一个实施方案中,过量是过量5倍至700倍。在一个实施方案中,过量是过量25倍至700倍。在一个实施方案中,过量是约过量27倍。在一个实施方案中,过量是约过量665倍。

[0045] 在一个实施方案中,该方法中使用的标记配体结合性蛋白与样品中的配体结合性蛋白的质量比为0.1或更高。在一个实施方案中,该方法中使用的标记配体结合性蛋白与样品中的配体结合性蛋白的质量比在0.1-300的范围内。在一个实施方案中,该方法中使用的标记配体结合性蛋白与样品中的配体结合性蛋白的质量比在0.15至500的范围内。在一个实施方案中,该方法中使用的标记配体结合性蛋白与样品中的配体结合性蛋白的质量比在0.2至250的范围内。

[0046] 在一个实施方案中,方法中使用的抗配体抗体与样品中的配体结合性蛋白的质量比为0.05或更高。在一个实施方案中,方法中使用的抗配体抗体与样品中的配体结合性蛋白的质量比在0.05至1的范围内。

[0047] 在一个实施方案中,标记的配体结合性蛋白与抗配体抗体的质量比为2或更高。在一个实施方案中,标记的配体结合性蛋白与抗配体抗体的质量比在2至70的范围内。在一个实施方案中,标记的配体结合性蛋白与抗配体抗体的质量比在5至50的范围内。在一个实施方案中,标记的配体结合性蛋白与抗配体抗体的质量比在5至25的范围内。在一个实施方案中,标记的配体结合性蛋白与抗配体抗体的质量比为约8至9。

[0048] 在一个实施方案中,通过首先将酸处理的样品与过量的标记配体结合性蛋白孵育,然后再与抗配体抗体孵育,形成非共价复合物。

[0049] 在一个实施方案中,标记的配体结合性蛋白与可检测标记缀合。

[0050] 在一个实施方案中,抗配体抗体与结合对的第一成员缀合。

[0051] 在一个实施方案中,方法包括,在形成非共价复合物之后,将形成的非共价复合物固定在固体支持物上的步骤。在一个优选的实施方案中,固体支持物与结合对的第二成员缀合,该结合对的第二成员可与结合对的第一成员(其与非共价复合物的抗配体抗体缀合)形成复合物。

[0052] 在一个实施方案中,抗配体抗体是多克隆抗体。

[0053] 在一个实施方案中,方法按以下顺序包括以下步骤:

[0054] -对样品进行酸处理,

[0055] -将样品与标记的配体结合性蛋白(其与可检测的标记缀合)孵育,

[0056] -将样品与(多克隆)抗配体抗体(其与结合对的第一成员缀合)孵育,

[0057] -将样品施加至与结合对的第二成员缀合的固体支持物上(使得非共价复合物通过结合对的第一成员缀合/固定至固体支持物),和

[0058] -通过测定固相固定的标记的配体结合性蛋白的量来测定配体结合性蛋白的配体的量。

[0059] 在一个实施方案中,配体结合性蛋白是抗体或抗体片段或抗体缀合物。

[0060] 在一个实施方案中,配体结合性蛋白是外源配体结合性蛋白。

[0061] 在一个实施方案中,配体不是抗体。

[0062] 在一个实施方案中,结合对的第一成员是生物素,以及结合对的第二成员是链霉亲和素。

[0063] 在一个实施方案中,加入的标记配体结合性蛋白和加入的抗配体抗体基于分子量的比率为约8-9:1。

[0064] 在一个实施方案中,与标记的配体结合性蛋白的孵育时间为至少20分钟。在一个实施方案中,孵育时间从(并且包括)20分钟至120分钟。在一个实施方案中,孵育时间从(并且包括)40分钟至80分钟。在一个实施方案中,孵育时间为约60分钟。

[0065] 在一个实施方案中,与抗配体抗体的孵育时间为最多60分钟。在一个实施方案中,孵育时间从(并且包括)10分钟至45分钟。在一个实施方案中,孵育时间从(并且包括)15分钟至30分钟。在一个实施方案中,孵育时间为约20分钟。

[0066] 在一个实施方案中,配体不是抗体,特别是不是抗药物抗体。

[0067] 在一个实施方案中,方法在不存在其他配体和/或配体结合性蛋白结合物(例如抗配体抗体或抗配体结合性蛋白抗体)的情况下进行。

[0068] 发明详述

[0069] 对于分析体外或体内来源的样品中的治疗性抗体(tmAb)以及相应的治疗性mAb的配体(tmAb的配体或简称配体),相应的测定法是必需的,尤其是在tmAb开发的早期阶段。但在早期开发阶段,通常很少能获得所需的特异性结合试剂,如用于测定tmAb的抗独特型抗体、或用于测定tmAb配体的与配体的不同表位结合的抗体。

[0070] 特别是样品中tmAb配体的测定既重要又要求高。tmAb与其配体(体外和体内)结合,并分别在游离tmAb和游离配体以及单和双复合的tmAb(假设为二价单特异性tmAb)之间形成平衡。该平衡是动态的,即参与该平衡的一种组分浓度的变化也改变参与该平衡的所有其他组分的浓度。例如,可使用配体浓度来确定生物活性tmAb部分,以阐明tmAb(结合和游离)和配体(结合和游离)之间的关系并预测/鉴定所需的剂量和治疗方案。

[0071] 更详细地说,如果能够建立配体的结合或甚至游离配体与tmAb的临床反应之间的相关性,那么配体的结合和捕获以及相应地游离配体的部分可以作为潜在标记物分别用于药代动力学和药效学预测以及治疗方案确定/选择。尽管游离(即未结合)tmAb的部分与可用于配体结合(即治疗作用)的tmAb利用度以及体内tmAb与其配体结合的能力相关,但总tmAb的测定可用于表征tmAb与其配体的相互作用。

[0072] 对于例如tmAb的完整药代动力学评估,血浆/血清样品中可溶性靶浓度的知识是重要的。通常将可溶性配体/靶标评估为潜在生物标记物。如果药物存在于样品中,由于药物与免疫测定试剂之间的空间位阻或重叠表位,测定试验通常会被显著干扰。有时存在可溶性靶的变异(例如剪接变体、异源与同源二聚体)。这些对于生物标记物目的来说可能是

重要的,但对于药代动力学评估来说,只有可以被药物结合或被药物结合的靶部分是重要的。

[0073] 本文中的术语“抗体”以最广泛的含义使用并且涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)和抗体片段,只要它们表现出所需的抗原结合活性即可。

[0074] 在某些实施方案中,抗体是多特异性抗体,例如双特异性抗体。多特异性抗体是对至少两个不同位点具有结合特异性的单克隆抗体。在某些实施方案中,结合特异性中的一个针对第一抗原,另一个针对不同的第二抗原。在某些实施方案中,双特异性抗体可以结合相同抗原的两个不同表位。双特异性抗体可以制备为全长抗体或抗体片段。在一个实施方案中,抗体是双特异性抗体,其特异性结合第一和第二抗原。在一个实施方案中,双特异性抗体具有i)特异性结合第一抗原或抗原上的第一表位的第一结合特异性,和ii)特异性结合第二抗原或(相同)抗原上的第二表位的第二结合特异性。在一个实施方案中,相同抗原上的第二表位是非重叠表位。

[0075] 多特异性抗体描述于WO 2009/080251、WO 2009/080252、WO 2009/080253、WO 2009/080254、WO 2010/112193、WO 2010/115589、WO 2010/136172、WO 2010/145792或WO 2010/145793。

[0076] 示踪剂和/或捕获抗体与其缀合配偶体的缀合可以通过不同的方法进行,如化学结合或通过特异性结合对进行的结合。本文使用的术语“缀合配偶体”表示例如固体支持物、多肽、可检测标记、特异性结合对的成员。在一个实施方案中,通过经由以下的化学结合进行捕获和/或示踪抗体与其缀合配偶体的缀合:N-末端和/或 $\epsilon$ -氨基(赖氨酸)、不同赖氨酸的 $\epsilon$ -氨基、抗体氨基酸骨架的羧基-、巯基-、羟基-、和/或酚官能团、和/或抗体碳水化合物结构的糖醇基团。在一个实施方案中,捕获和/或示踪抗体通过特异性结合对与其缀合配偶体缀合。捕获抗体优选与生物素缀合,并且通过固定有亲和素或链霉亲和素的固体支持物,固定至固体支持物。优选示踪抗体与地高辛缀合,并且通过针对地高辛的抗体,与可检测标记连接。

[0077] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本上均质的抗体群获得的抗体,即除了可能的变体抗体,例如包含天然存在的突变或在单克隆抗体制剂生产期间发生的突变(这些变体通常以少量存在)外,抗体群包含的各抗体是相同的和/或结合相同的表位。与通常包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂不同,单克隆抗体制剂中的每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。因此,修饰语“单克隆”表示从基本上均质的抗体群获得的抗体的特征,并且不应被解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,可以通过多种技术制备根据本发明使用的单克隆抗体,所述技术包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法、和利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法,本文描述了用于制备单克隆抗体的此类方法和其他示例性方法。

[0078] 例如,Hage,D.S. (Anal.Chem.71 (1999) 294R-304R) 描述了不同免疫测定法的原理。Lu,B.等人 (Analyst 121 (1996) 29R-32R) 报道了在免疫测定法中使用的抗体的定向固定。例如,Wilchek,M.和Bayer,E.A.在Methods Enzymol.184 (1990) 467-469中报道了亲和素-生物素介导的免疫测定法。

[0079] 多肽和单克隆抗体及其恒定结构域含有许多可以用于与结合对的成员(如多肽/

蛋白、聚合物(例如PEG、纤维素或聚苯乙烯)、或酶)缀合的反应性氨基酸侧链。氨基酸的化学反应性基团例如有氨基(赖氨酸、 $\alpha$ -氨基)、巯基(胱氨酸、半胱氨酸和甲硫氨酸)、羧酸基团(天冬氨酸、谷氨酸)和糖醇基团。这样的方法例如由Aslam M.和Dent, A.描述于“Bioconjugation”, MacMillan Ref. Ltd. 1999, 第50-100页。

[0080] 多肽和抗体最常用的反应性基团之一是氨基酸赖氨酸的脂肪族 $\epsilon$ -胺。一般来说,几乎所有的多肽和抗体都含有丰富的赖氨酸。赖氨酸的胺在pH8.0以上( $pK_a=9.18$ )是相当好的亲核试剂,因此容易并且利落地与各种试剂反应以形成稳定的键。胺反应性试剂主要与蛋白的赖氨酸和 $\alpha$ -氨基反应。反应性酯,特别是N-羟基-琥珀酰亚胺(NHS)酯是用于修饰胺基的最常用试剂中的试剂。在水性环境中反应的最佳pH为pH 8.0至9.0。异硫氰酸酯是胺修饰试剂并与蛋白形成硫脲键。它们与蛋白胺在水性溶液中反应(最佳pH 9.0-9.5)。醛在温和的水性条件下与脂族和芳族胺、肼和酰肼反应形成亚胺中间体(席夫碱)。用温和或强还原剂(如硼氢化钠或氰基硼氢化钠)可以选择性还原希夫碱以衍生稳定的烷基胺键。其他用于修饰胺的试剂是酸酐。例如,二亚乙基三胺五乙酸酐(DTPA)是含有两个胺反应性酸酐基团的双官能螯合剂。它可以与氨基酸的N-末端和 $\epsilon$ -胺基反应形成酰胺键。酸酐环打开以产生多价金属螯合臂,其能够与配位络合物中的金属紧密结合。

[0081] 多肽和抗体中另一常见的反应性基团是来自含硫氨基酸胱氨酸和其还原产物半胱氨酸(或half cystine)的巯基残基。半胱氨酸含有游离的巯基,其比胺更亲核,并且通常是蛋白质中最具反应性的官能团。巯基在中性pH下通常是反应性的,因此可以在胺存在下选择性地与其他分子偶联。由于游离巯基是相对反应性的,具有这些基团的蛋白通常以这些基团的氧化形式(作为二巯基团或二硫键)存在。在这些蛋白中,需要用试剂如二硫苏糖醇(DTT)还原二硫键以产生反应性游离巯基。巯基反应性试剂是与多肽上的巯基偶联以形成硫醚偶联产物的那些试剂。这些试剂在轻微酸性至中性pH下迅速反应,因此可在胺基存在下选择性反应。文献报道使用几种硫醇化交联试剂如Traut's试剂(2-亚氨基噻吩)、琥珀酰亚胺基(乙酰巯基)乙酸酯(SATA)和6-[3-(2-吡啶基二硫代)丙酰胺基]己酸磺基琥珀酰亚胺酯(Sulfo-LC-SPDP)以提供通过反应性氨基引入多个巯基的有效方式。卤代乙酰衍生物(例如碘乙酰胺)形成硫醚键,也是用于巯基修饰的试剂。其他有用的试剂是马来酰亚胺。马来酰亚胺与巯基反应性试剂的反应基本上与碘乙酰胺相同。马来酰亚胺在轻微酸性至中性pH下迅速反应。

[0082] 多肽和抗体中另一常见的反应性基团是羧酸。多肽和抗体在C-末端位置和天冬氨酸和谷氨酸侧链内含有羧酸基团。羧酸在水中相对低的反应性通常使得难以使用这些基团来选择性修饰多肽和抗体。当使用时,羧酸基团通常通过使用水溶性碳二亚胺转化为反应性酯并与亲核试剂如胺、酰肼或肼反应。含胺试剂应该是弱碱性的,以便在更高碱性的赖氨酸 $\epsilon$ -胺存在下选择性与活化的羧酸反应以形成稳定的酰胺键。当pH升高到8.0以上时可发生蛋白交联。

[0083] 高碘酸钠可用于氧化附着于抗体的碳水化合物部分中的糖的醇部分以形成醛。如对于羧酸所述,每个醛基可以与胺、酰肼或肼反应。由于碳水化合物部分主要存在于抗体的可结晶片段(Fc)区域上,所以可通过远离抗原结合位点的碳水化合物的定点修饰实现缀合。形成席夫碱中间体,其可通过用氰基硼氢化钠(温和的且选择性的)或硼氢化钠(强)水溶性还原剂还原该中间体而还原成烷基胺。

[0084] 术语“实验动物”表示任何哺乳动物,包括驯养动物和农场动物,以及高等灵长类动物,但不包括人。在一个实施方案中,本文报道的方法用从实验动物获得的样品进行,所述实验动物选自小鼠、大鼠、兔、山羊、绵羊、狗、猫和灵长类动物如狐猴、猴、狨猴和猿。如果实验动物是与人最亲近的小猿(lesser ape),则不包括大猿(great ape),尤其是黑猩猩(chimpanzee)、倭黑猩猩(bonobo)、大猩猩(gorilla)和猩猩(orangutan)。

[0085] 术语“样品”包括但不限于来自活体或之前为活体的任何数量的物质。这样的活体包括但不限于人、小鼠、猴、大鼠、兔和其他动物。在一个实施方案中,样品获自猴,尤其是食蟹猴,或兔、或小鼠、或大鼠或人。在一个实施方案中,这样的物质包括但不限于来自个体的全血、血浆或血清,其是临床实践中最广泛使用的样品来源。

[0086] 术语“固相”表示非流体物质,并且包括由如聚合物、金属(顺磁性、强磁性颗粒)、玻璃和陶瓷等材料制成的颗粒(包括微粒和珠子);凝胶物质如二氧化硅、氧化铝和聚合物凝胶;可由聚合物、金属、玻璃和/或陶瓷制成的毛细管;沸石和其他多孔物质;电极;微量滴定板;固体条;和比色皿、试管或其他光谱仪样品容器。固相组分与惰性固体表面的区别在于“固相”在其表面上含有至少一个部分,其旨在与样品中的物质相互作用。固相可以是不动组分,如管、条、比色皿或微量滴定板,或者可以是可动组分,如珠子和微粒。可以使用允许蛋白和其他物质非共价或共价连接的各种微粒。这样的颗粒包括聚合物颗粒如聚苯乙烯和聚(甲基丙烯酸甲酯);金颗粒如金纳米颗粒和金胶体;和陶瓷颗粒如二氧化硅、玻璃和金属氧化物颗粒。参见例如Martin,C.R.等人AnalyticalChemistry-News&Features,70(1998)322A-327A,or Butler,J.E.,Methods 22(2000)4-23。

[0087] 发色团(荧光或发光基团和染料)、酶、NMR活性基团或金属颗粒、半抗原例如地高辛是“可检测标记”的例子。可检测标记也可以是可光活化的交联基团,例如,叠氮或吡丙因基团。可以通过电化学发光检测的金属螯合物也是优选的信号发射基团,特别优选钆螯合物,例如钆(双吡啶基)<sub>3</sub><sup>2+</sup>螯合物。合适的钆标记基团描述于例如EP 0 580 979、WO 90/05301、WO 90/11511和WO 92/14138中。对于直接检测,标记基团可以选自任何已知的可检测标记基团,如染料、发光标记基团如化学发光基团,例如吡啶酯或dioxetanes、或荧光染料,例如荧光素、香豆素、若丹明、**噁**嗪、试卤灵、花青素及其衍生物。标记基团的其他实例是发光金属络合物,如钆或铈络合物、酶,例如用于ELISA或用于CEDIA(克隆的酶供体免疫测定法,例如EP-A-0 061 888)的酶和放射性同位素。

[0088] 间接检测系统包括例如用生物亲和(bioaffine)结合对的第一配偶体标记检测试剂(例如检测抗体)。合适的结合对的实例是半抗原或抗原/抗体、生物素或生物素类似物如氨基生物素、亚氨基生物素或脱硫生物素/亲和素或链霉亲和素、糖/凝集素、核酸或核酸类似物/互补核酸、以及受体/配体,例如类固醇激素受体/类固醇激素。优选的第一结合对成员包含半抗原、抗原和激素。特别优选的是半抗原如地高辛和生物素及其类似物。这种结合对的第二配偶体,例如抗体、链霉亲和素等通常例如通过如上所述的标记物标记以允许直接检测。

[0089] “蛋白”是由肽键连接的氨基酸组成的聚合物,无论是天然产生还是合成产生。少于约20个氨基酸残基的蛋白可以被称为“肽”,而包含少于50个氨基酸残基的分子可以被称为“多肽”。蛋白还可以包含非氨基酸组分,如碳水化合物基团、金属离子或羧酸酯。非氨基酸组分可以由在其中表达蛋白的细胞加入,并且可以随细胞类型而变化。本文根据蛋白的

氨基酸骨架结构或编码其的核酸来定义蛋白。通常不规定加入物,如碳水化合物基团,但其可以存在。

[0090] 术语“样品中配体结合性蛋白的配体总量”表示游离循环配体(即不与任何其他组分结合的配体)和结合的循环配体(即与任何其他组分以可酸解离形式结合的配体)的总和。

[0091] 本文报道的方法

[0092] 用本文报道的方法可检测“药物特异性”靶浓度。无需额外的努力来阐明“生物标记物”测定法(商业或基于不同抗体/克隆的测定法)是否检测相同的靶标。此外,所需的试剂可在早期项目阶段获得,这可确保早期项目支持(药物可获得,多克隆抗体在适度时间内可获得)。因此,本文报道的方法(=TADELIS测定形式)是普遍适用的。

[0093] 在本文报道的方法中测定的循环配体是配体结合性蛋白的靶标。配体结合性蛋白是旨在用于在人中治疗疾病的治疗性蛋白。因此,该配体在活的生物体(人或非人)内具有特定功能,该功能通过配体与其内源对应物的结合而发挥。因此,配体能够结合外源配体结合性蛋白外的一个或多个实体。

[0094] 此外,配体可以以不同的形式存在于体内,例如不同的同种型、修饰形式,其中只有有限数量,甚至是单一形式,是配体结合性蛋白的靶标。因此,只有这个/这些形式应该被测定。

[0095] 本文报道了一种测定配体结合性蛋白的循环配体的方法,其中所述配体在体内被配体结合性蛋白实际识别和结合。该方法用于测定治疗性配体结合性蛋白的循环结合型配体的总量。

[0096] 通常,配体结合性蛋白与其配体(即靶标)的结合将是一种动态平衡,其受到它们各自的浓度以及配体结合性蛋白对配体的亲和力和/或亲合性的影响。因此,为了理解体内这种平衡,即为了测定配体结合性蛋白的药代动力学和药效学特征,必须测定血浆或血清样品中二者(配体和配体结合性蛋白)的浓度(即量)。

[0097] 由于体内配体结合性蛋白的存在,配体的浓度可以变化/改变。在配体与配体结合性蛋白结合后,配体转化为潜在失活形式。这可导致循环配体浓度降低(例如,如果结合的配体与配体结合性蛋白一起从循环中除去)、几乎恒定的循环配体浓度(例如,如果配体的产生增加以抵消配体结合性蛋白诱导的配体浓度降低)、或增加的循环配体浓度(例如,如果配体的产生增加、或配体积聚或配体清除减少)。在后一种情况下,给药后游离配体和总配体增加。这可能会抵消配体结合性蛋白的预期治疗效果或可能引起副作用。

[0098] 循环配体的总量可用于表征体内施用的配体结合性蛋白的效果。

[0099] 如本文报道的方法中使用的TADELIS测定形式允许药物耐受性(=配体结合性蛋白耐受性)。

[0100] 在该方法中使用的TADELIS测定形式允许有效地检测配体结合性蛋白并具有增强的药物耐受性(=配体结合性蛋白耐受性)。

[0101] 已经发现,通过使用反向TADELIS测定形式,方法的药物耐受性可以增加(即通过修饰检测试剂以包含与捕获试剂不同的缀合配偶体)。从而可以以最小需要浓度使用捕捉试剂以确保/增强灵敏度。这对于药物耐受性并不是关键的。因此,除了其他之外,与使用相同修饰的捕获和检测试剂(例如二者均生物素化)的常规“ADA样桥连”形式相比,可以实现

更低的试剂消耗。另外,在本文报道的方法中使用的TADELIS测定法没有例如如在一步形式中对于相同表位的试剂竞争(因为多步复合物形成)。

[0102] 此外,捕获试剂可以是多克隆抗体。通过标记的配体结合性蛋白与配体的结合,相应的表位被掩蔽。由于捕获试剂的多克隆性质,配体上的其他表位也可以被识别并用于形成复合物。此外,由于完整形成的复合物被固定,因此无固体载体上的结合位点丢失(由于结合的抗配体抗体(捕获试剂)的空间位阻所致)。因此,与其他测定法设置相比,固体表面的有效负载增加。

[0103] 在一个实施方案中,(单独)常规测定的配体结合性蛋白的解离速率与孵育时间相关并可用于确定孵育时间,例如,以最小化捕获试剂和检测试剂对相同表位的竞争。在使用多克隆抗体的情况下,捕获试剂的结合特性(表位分布、亲和力)不相关,并且不必测定。这允许使用来自不同来源或不同电荷的多克隆捕获试剂而不影响测定法的药物耐受性(增加测定法的稳健性)。

[0104] 本文报道的方法将在下面进行举例说明。因此必须使用特定的试剂。但是这不能被解释为对本文报道的方法的限制。这仅仅是举例说明。本发明的实际范围在权利要求中设定。

[0105] 用于实施例的组分:

[0106] 配体结合性蛋白:与假单胞菌外毒素缀合的抗间皮素抗体

[0107] 抗配体抗体:多克隆抗间皮素抗体

[0108] TADELIS测定法按以下步骤进行:

[0109] -酸解离(10 $\mu$ L样品;50 $\mu$ L 0.1mol/L甘氨酸溶液,pH 2;30分钟);

[0110] -加入50 $\mu$ L包含与地高辛缀合的单克隆抗间皮素抗体的**Tris/LowCross-buffer®**,并孵育1小时;

[0111] -加入多孔板的孔中并孵育1小时;

[0112] -加入200 $\mu$ L包含与生物素缀合的多克隆抗间皮素抗体制剂的**LowCross-buffer®**,并孵育20分钟;

[0113] -将溶液加入到链霉亲和素包被的多孔板的孔中,并孵育30分钟;

[0114] -去除上清液并洗涤孔;

[0115] -加入包含抗地高辛抗体与HRP (50mU)的缀合物的溶液;

[0116] -孵育板40分钟;

[0117] -去除上清液并洗涤孔;

[0118] -加入底物溶液以生成读数;

[0119] -孵育板;

[0120] -测定吸收值;

[0121] -使用校准曲线测定分析物浓度。

[0122] 使用不含交叉反应性间皮素的兔血浆进行该测定试验。生成校准曲线(如图6所示)。测定范围为0.16nM至25nM(血浆浓度)。

[0123] 测定试验中的回收率定义为检测到的药物与残留药物的比率,如下式所示:

## 检测的药物量

$$[0124] \quad \text{回收} = \frac{\text{检测的药物量}}{\text{检测的药物量} + \text{残留的药物量}}$$

[0125] 可以通过保持捕获抗体的浓度恒定并改变示踪抗体的浓度(并由此改变比率),或者同样地通过保持示踪抗体的浓度恒定并改变捕获抗体的浓度,从捕获抗体或示踪抗体的第一浓度获得的回收率出发,改善测定试验的回收率。

[0126] 当检测抗体与捕获抗体的重量比为约1.7时,该测定试验中的平均靶回收率在药物浓度75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时为约24%,在药物浓度15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时为约56%,在药物浓度3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时为约86%,在药物浓度0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时为约92%。

[0127] 在第二个实施例中增加比率,也生成了校准曲线(如图7所示)。测定范围为0.78nM到50nM。

[0128] 当检测抗体与捕获抗体的重量比为约8.86时,该测定试验中的平均靶回收率在药物浓度75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时为约67%,在药物浓度15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时为约82%,在药物浓度3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时为约88%,在药物浓度0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时为约98%。

[0129] 在第三个实施例中进一步增加比率,也生成了校准曲线(如图8所示)。测定范围为1.56nM至50nM。

[0130] 当检测抗体与捕获抗体的重量比为约44.3时,该测定试验中的平均靶回收率在药物浓度75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时为约83%,在药物浓度15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时为约83%,在药物浓度3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时为约86%,在药物浓度0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时为约90%。

[0131] 尽管80%或更高的回收率是使用本文报道的测定法的目标,但是在含药物样品的分析中(例如,在临床前或临床试验中)这不是强制性的。然而,上面提供的数据清楚地表明,不依赖于检测抗体与捕获抗体的重量比,可以鉴定具有80%或更高回收率的工作范围。本领域技术人员无需过度负担,例如通过进行一系列掺入了(即存在于样品中)递减量的配体(=分析物)的样品分析,可以容易地确定该工作范围。

[0132] 此外,如果结果应该是“是”或“否”,即配体结合性蛋白(治疗剂)的配体存在或不存在,那么可以以任何回收率使用本文报道的测定法。在这种情况下,测定法只需在检测限以上进行操作即可。

[0133] 此外,如用于分析物定量的任何其他测定法一样,本文报道的测定法必须被验证。在此验证期间,将基于目标回收率确定相应的工作范围。

[0134] 另外,可以建立本文报道的测定法的校准曲线。利用该校准曲线,建立样品中存在的分析物的量与分析物的回收量之间的关系。利用这种关系,在分析结果计算期间对任何回收均进行校正,因此解决低回收率。

[0135] 因此,在一个实施方案中,本文报道的方法包括以下步骤

[0136] a)

[0137] -对样品进行酸处理,

[0138] -通过向样品中加入抗配体抗体和标记的配体结合性蛋白,在溶液中形成非共价复合物,所述复合物包含

[0139] i) 抗配体抗体,

[0140] ii) 配体,和

[0141] iii) 标记的配体结合性蛋白,和

[0142] -测定复合物的量,

[0143] b)

[0144] -通过向不含配体(即包含低于步骤a)的检测限的量的配体)的样品中掺入规定但不同量的配体获得至少两个样品,进行步骤a)来确定校准曲线,

[0145] c)

[0146] -用步骤a)和步骤b)的结果确定配体结合性蛋白的配体的量。

[0147] 因此,在一个实施方案中,进行本文报道的方法,其中

[0148] -检测抗体与捕获抗体的重量比为约1.7,药物浓度在 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更低,在一个实施方案中,在 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 至 $0.01\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内,在另一个实施方案中,在 $3\mu\text{g}/\text{mL}$ 至 $0.6\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内,和/或

[0149] -检测抗体与捕获抗体的重量比为约8.85,药物浓度在 $18\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更低,在一个实施方案中,在 $18\mu\text{g}/\text{mL}$ 至 $0.01\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内,在另一个实施方案中,在 $15\mu\text{g}/\text{mL}$ 至 $0.6\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内,和/或

[0150] -检测抗体与捕获抗体的重量比为约44,药物浓度在 $80\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更低,在一个实施方案中,在 $80\mu\text{g}/\text{mL}$ 至 $0.01\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内,在另一个实施方案中,在 $75\mu\text{g}/\text{mL}$ 至 $0.6\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内。

[0151] 因此,在一个实施方案中,进行本文报道的方法,其中

[0152] -检测抗体与捕获抗体的重量比为约1.7,检测抗体浓度为约 $14\text{nM}$ ,药物浓度为 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更低,在一个实施方案中,在 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 至 $0.01\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内,在另一个实施方案中,在 $3\mu\text{g}/\text{mL}$ 至 $0.6\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内,和/或

[0153] -检测抗体与捕获抗体的重量比为约8.85,药物浓度在 $18\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更低,在一个实施方案中,在 $18\mu\text{g}/\text{mL}$ 至 $0.01\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内,在另一个实施方案中,在 $15\mu\text{g}/\text{mL}$ 至 $0.6\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内,和/或

[0154] -检测抗体与捕获抗体的重量比为约44,检测抗体浓度为约 $338\text{nM}$ ,药物浓度在 $80\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更低,在一个实施方案中,在 $80\mu\text{g}/\text{mL}$ 至 $0.01\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内,在另一个实施方案中,在 $75\mu\text{g}/\text{mL}$ 至 $0.6\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内。

[0155] 假设配体结合性蛋白的血清浓度在 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 至 $150\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间,则在TADELIS测定法中通常使用如下表中列出的比率。

	样品中配体 结合性蛋白 的浓度 →	150 µg/ml	75 µg/ml	10 µg/ml
[0156] 与检测试剂的 重量比	低	0.15	0.3	2.3
	中	1.87	3.74	28.1
	高	2.68	5.36	40.2
与捕获试剂的 重量比		0.06	0.12	0.9

[0157] 因此,在一个实施方案中,进行本文报道的方法,其中样品中的配体结合性蛋白与检测抗体的重量比为0.1至45,在样品中配体结合性蛋白浓度为150µg/mL或更低,在一个实施方案中,在150µg/mL至10µg/mL的范围内。

[0158] 因此,在一个实施方案中,进行本文报道的方法,其中样品中配体结合性蛋白与检测抗体的重量比为1.75至45,在样品中配体结合性蛋白浓度为150µg/mL或更低,在一个实施方案中,在150µg/mL至10µg/mL的范围内。

[0159] 因此,在一个实施方案中,进行本文报道的方法,其中样品中配体结合性蛋白与检测抗体的重量比为2.5至45,在样品中配体结合性蛋白浓度为150µg/mL或更低,在一个实施方案中,在150µg/mL至10µg/mL的范围内。

[0160] 因此,在一个实施方案中,进行本文报道的方法,其中样品中配体结合性蛋白与捕获抗体的重量比为0.05-0.15,在样品中配体结合性蛋白浓度为150µg/mL或更低,在一个实施方案中,在150µg/mL至10µg/mL的范围内。

[0161] TADELIS测定法的总运行时间为约3.5小时。

[0162] 比较测定形式

[0163] 在下面,三种不同的通常已知的测定形式已尽可能调整适应于TADELIS测定法。特别是在这些测定法中已经包括迄今为止未曾报道的在配体检测测定法中酸解离步骤的使用。

[0164] 1. 市售间皮素测定试验

[0165] 根据制造商的说明书进行来自Fujirebio Diagnostics, Inc. (Malvern, PA, USA)的市售间皮素测定试验**Mesomark®**。

[0166] **Mesomark®**测定试验是手动酶联免疫吸附测定,用于定量测量可溶性间皮素相关肽(SMRP)。SMRP是间皮瘤细胞释放到血流中的生物标记物。从患者采集血液样本,然后测试以确定血液中存在的SMRP水平。通过使用已知特异性结合SMRP的单克隆抗体来测定血液中的SMRP的量。通过测量结合性抗体的量,可以计算患者血液中存在的SMRP的量(从制造商网站获取的信息)。

[0167] 通过使用标准ELISA微孔板夹心测定,通过比色反应进行检测。使用两种不同的单克隆抗体:一种用于捕获SMRP分子,另一种用于检测SMRP分子。比色反应通过加入与辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗体反应的显色底物来实施。

[0168] 该测定试验包括以下步骤:

[0169] -稀释血清样品(1:101,10 $\mu$ L样品和1mL缓冲液);

[0170] -将稀释的样品(100 $\mu$ L)加入包被了捕获单克隆抗体的微量滴定板的孔中;

[0171] -在室温下摇动(700rpm)并温育培养板约60分钟;

[0172] -去除上清液并彻底洗涤孔;

[0173] -加入100 $\mu$ L包含与HRP缀合的第二单克隆抗体的溶液;

[0174] -在室温下摇动(700rpm)孵育板约60分钟;

[0175] -去除上清液并彻底洗涤孔;

[0176] -加入100 $\mu$ L底物溶液以产生读数;

[0177] -在室温下摇动(700rpm)孵育板约15分钟;

[0178] -通过加入盐酸(100 $\mu$ L,1% (w/v))终止反应;

[0179] -测定吸收值;

[0180] -使用校准曲线测定分析物浓度。

[0181] 使用兔血清、使用试剂盒的校准探针和质量对照样品进行该测定试验。尽管兔血清含有兔间皮素,但由于所提供的抗体不与兔间皮素结合,因此在该测定法中其不是交叉反应性的。因此只可以测定掺入人间皮素的样品。

[0182] 产生跨越0nM至32nM间皮素浓度的校准曲线(如图3所示)。测定范围为2nM至32nM。

[0183] 对于校准样品,该测定试验中的目标回收率在96%至104%之间,平均约为100%。使用质量对照样品,回收率在93%至96%之间。

[0184] **Mesomark®**测定法的总运行时间约为2.5小时。该测定法不检测食蟹猴间皮素。

[0185] 2.ADA形式

[0186] 在该比较实施例中,使用了与TADELIS测定法相同的试剂。

[0187] 该测定试验包括以下步骤:

[0188] -酸解离(10 $\mu$ L样品;50 $\mu$ L 0.1mol/L甘氨酸溶液,pH 2;30分钟);

[0189] -向酸解离中加入50 $\mu$ L **Tris/LowCross-buffer®** (2100 $\mu$ L **LowCross-buffer®** 加900 $\mu$ L 0.5MTris-HCl (pH8.5),其包含与靶标的不同表位结合的两种抗体溶液(mAb和pAb),一种缀合生物素和一种缀合地高辛),和200 $\mu$ L **LowCross-buffer®**,孵育1小时;

[0190] -加入包被链霉亲和素的多孔板的孔中并孵育1小时;

[0191] -去除上清液并洗涤孔;

[0192] -加入包含与HRP缀合的抗地高辛抗体的溶液(50mU);

[0193] -孵育板约1小时;

[0194] -去除上清液并洗涤孔;

[0195] -加入底物溶液以生成读数;

[0196] -孵育板;

[0197] -测定吸收值或荧光单位;

- [0198] -使用校准曲线测定分析物浓度。
- [0199] 使用不含交叉反应性间皮素的兔血浆进行测定。生成校准曲线(如图5所示)。测定范围从0.78nM到50nM。
- [0200] 该测定试验中的平均目标回收率在药物浓度为75 $\mu$ g/mL时为约54%，在药物浓度为15 $\mu$ g/mL时为约80%，在药物浓度为3 $\mu$ g/mL时为约91%，并且在药物浓度为0.6 $\mu$ g/mL时为约98%。
- [0201] ADA形式测定试验的总运行时间为约4小时。
- [0202] ADA形式通常需要至少两种与靶标上不同表位结合但具有相同物种交叉反应性的单克隆抗体。能否提供结合非干扰性表位且具有相同的物种交叉反应性/亲和力的两种抗体是有疑问的。
- [0203] 3. 系列间皮素测定法
- [0204] 在该比较实施例中，使用了与TADELIS测定法相同的试剂。
- [0205] 该测定试验包括以下步骤：
- [0206] -将链霉亲和素包被的多孔板的孔与生物素标记的多克隆抗间皮素抗体(500ng/mL; 1.25小时)孵育；
- [0207] -去除上清液并洗涤孔；
- [0208] -酸解离(10 $\mu$ L样品; 50 $\mu$ L 0.1mol/L甘氨酸溶液, pH 2; 30分钟)；
- [0209] -向酸解离中加入50 $\mu$ L **Tris/LowCross-buffer®** (2100 $\mu$ L **LowCross-buffer®** 加900 $\mu$ L 0.5M Tris-HCl (pH8.5)) 和200 $\mu$ L **LowCross-buffer®**, 并加入至多孔板的孔并孵育1小时；
- [0210] -去除上清液并洗涤孔；
- [0211] -加入包含地高辛标记的单克隆抗间皮素抗体的溶液(500ng/mL) 并孵育1小时；
- [0212] -去除上清液并洗涤孔；
- [0213] -加入包含抗与HRP缀合的地高辛抗体的溶液(50mU)
- [0214] -孵育板约1小时；
- [0215] -去除上清液并洗涤孔；
- [0216] -加入底物溶液以生成读数；
- [0217] -孵育板；
- [0218] -测定吸收值；
- [0219] -使用校准曲线测定分析物浓度。
- [0220] 使用不含交叉反应性间皮素的兔血浆进行测定试验。产生跨0nM至25nM间皮素浓度的校准曲线(如图4所示)。测定范围为0.39nM至25nM。
- [0221] 在该测定试验中，平均目标回收率在药物浓度为9 $\mu$ g/mL时为约20%，在药物浓度为3 $\mu$ g/mL时为约44%，在药物浓度为1 $\mu$ g/mL时为约71%。
- [0222] 使用增加5倍的检测抗体与捕获抗体比率进行该测定试验。在这种情况下，平均目标回收率在药物浓度为75 $\mu$ g/mL时为约10%，在药物浓度为15 $\mu$ g/mL时为约12%，在药物浓度为3 $\mu$ g/mL时为约34%，在药物浓度为0.6 $\mu$ g/mL时为约69%。
- [0223] 系列测定试验的总运行时间为约5小时。
- [0224] 总结：

[0225] 从下表可以看出,本文报道的TADELIS测定法相对于其他测定形式,在所用试剂的早期(在项目生命期中)可得性、含药物样品的平均回收率、覆盖物种范围和时间方面,具有优势。

[0226]

测定形式	物种交叉反应性	克隆性		含药物样品的平均回收率	75 $\mu\text{g/mL}$ 含药物样品的平均回收率	测定时间
		捕获试剂	检测试剂			
Mesomark <sup>®</sup>	无	单克隆	单克隆	食蟹猴间皮素是不可检测的	--	$\approx 2.5 \text{ h}$
ADA形式	可能有	单克隆/多克隆	单克隆	$\approx 80 \%$	$\approx 54\%$	$\approx 4 \text{ h}$
系列测定法	有	多克隆	单克隆	$\approx 30 \%$	$\approx 10\%$	$\approx 5 \text{ h}$
TADELIS测定法	有	多克隆	单克隆	$\approx 85 \%$	$\approx 83\%$	$\approx 3.5 \text{ h}$

[0227] 提供以下实施例和附图以帮助理解本发明,本发明的真实范围在所附权利要求中阐述。应该理解,可以在不背离本发明精神的情况下对所述程序进行修改。

#### 附图说明

[0228] 图1:本文报道的方法的总体方案,用实施例1中使用的化合物举例说明。

[0229] 图2:本文报道的方法的流程图,用实施例1中使用的化合物举例说明。

[0230] 图3: **Mesomark<sup>®</sup>**测定法的校准曲线(x轴:靶浓度;y轴:光密度)。

[0231] 图4:系列间皮素测定法的药物耐受性(x轴:靶浓度;y轴:[FU]);1:无药物;2:1 $\mu\text{g/mL}$ 药物;3:3 $\mu\text{g/mL}$ 药物;4:9 $\mu\text{g/mL}$ 药物。

[0232] 图5:ADA形式测定法的校准曲线(x轴:靶浓度;y轴:光密度)。

[0233] 图6:TADELIS形式测定法的校准曲线(x轴:靶浓度;y轴:光密度),其中检测抗体与捕获抗体的重量比为约1.7。

[0234] 图7:TADELIS形式测定法的校准曲线(x轴:靶浓度;y轴:光密度),其中检测抗体与捕获抗体的重量比为约8.86。

[0235] 图8:TADELIS形式测定法的校准曲线(x轴:靶浓度;y轴:光密度),其中检测抗体与捕获抗体的重量比为约44.3。

## 实施例1

[0236] 本文报道的方法

[0237] 使用人间皮素在100%兔汇集血浆中制备阳性对照标准物,以构建浓度范围为50nM至0nM(50.0nM、21.45nM、9.21nM、3.95nM、1.70nM、0.73nM、0.31nM和0nM)的校准曲线。通过用兔汇集血浆进行一比一的稀释(稀释因子=2),实现最终的校准物浓度。在100%兔汇集血浆中制备另外的质量对照样品(单独稀释),其具有以下的浓度:25、17.5、12.5、0.469和0.156nM。

[0238] 通过含有150、30、6和1.2 $\mu$ g/mL药物的兔汇集血浆的一比一稀释(稀释因子=2),制备阳性测试样品。

[0239] 将10 $\mu$ L测试样品、质量对照样品、空白样品和每个阳性对照标准,与50 $\mu$ L 0.1M甘氨酸-HCl(pH 2.0)溶液混合30分钟。然后通过加入50 $\mu$ L DIG缀合的检测试剂(2,100 $\mu$ L含有DIG缀合的检测试剂(c=4.5 $\mu$ g/mL)的**LowCross®**缓冲液和900 $\mu$ L 0.5M Tris缓冲液(pH=8.5)),中和混合物。将中和的样品孵育60分钟。通过加入200 $\mu$ L浓度为450ng/mL的生物素化的捕获试剂(生物素化的多克隆抗人间皮素抗体)并孵育20分钟,确保免疫复合物的延伸。总样品体积为310 $\mu$ L,含有3.2%血浆。

[0240] 将100 $\mu$ L各样品一式两份加入到链霉亲和素包被的微量滴定板并在微量滴定板摇床上孵育30分钟。用含有0.05%Tween-20的磷酸缓冲盐溶液洗涤板三次。将100 $\mu$ L缀合至辣根过氧化物酶(HRP)(聚)的抗地高辛抗体Fab片段以50mU/mL的终浓度加入到各孔中并孵育40分钟。随后用含有0.05%Tween20的磷酸缓冲盐溶液洗涤板三次。

[0241] 向每个孔中加入150 $\mu$ L HPPA(3-(4-羟基苯基)丙酸溶液(83mg HPPA在25mL 0.1Tris缓冲液pH=8.5中,并补充有3.75 $\mu$ L 30%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),并在发射波长405nm(激发波长320nm)下测定光发射。

[0242] 通过使用Wiemer-Rodbard函数,以非线性4参数拟合,产生标准校准曲线。如果质量对照样品的回收率在标称浓度的20%以内,测量被定义为可接受的。在这个实验中,回收率在83%至108%的范围内。

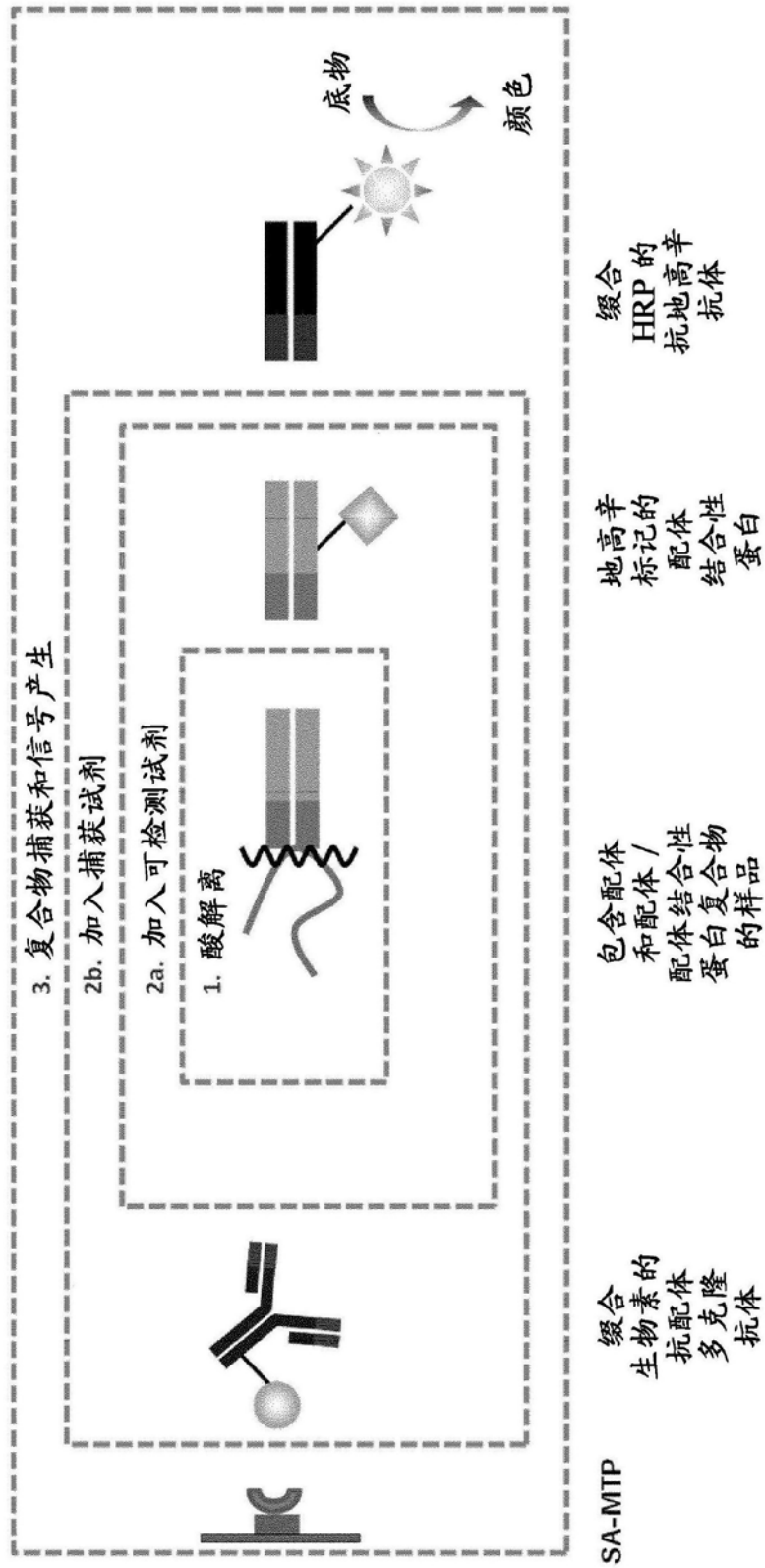


图1

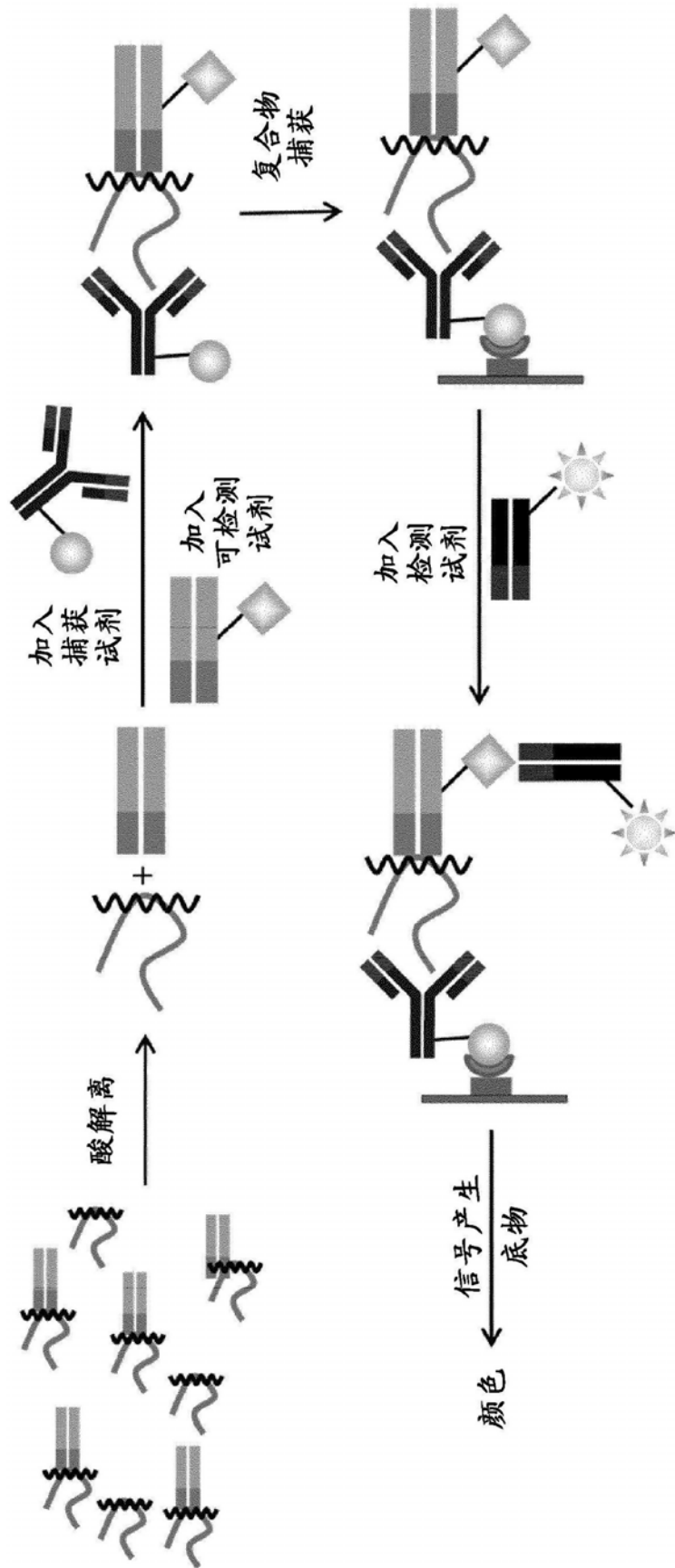


图2

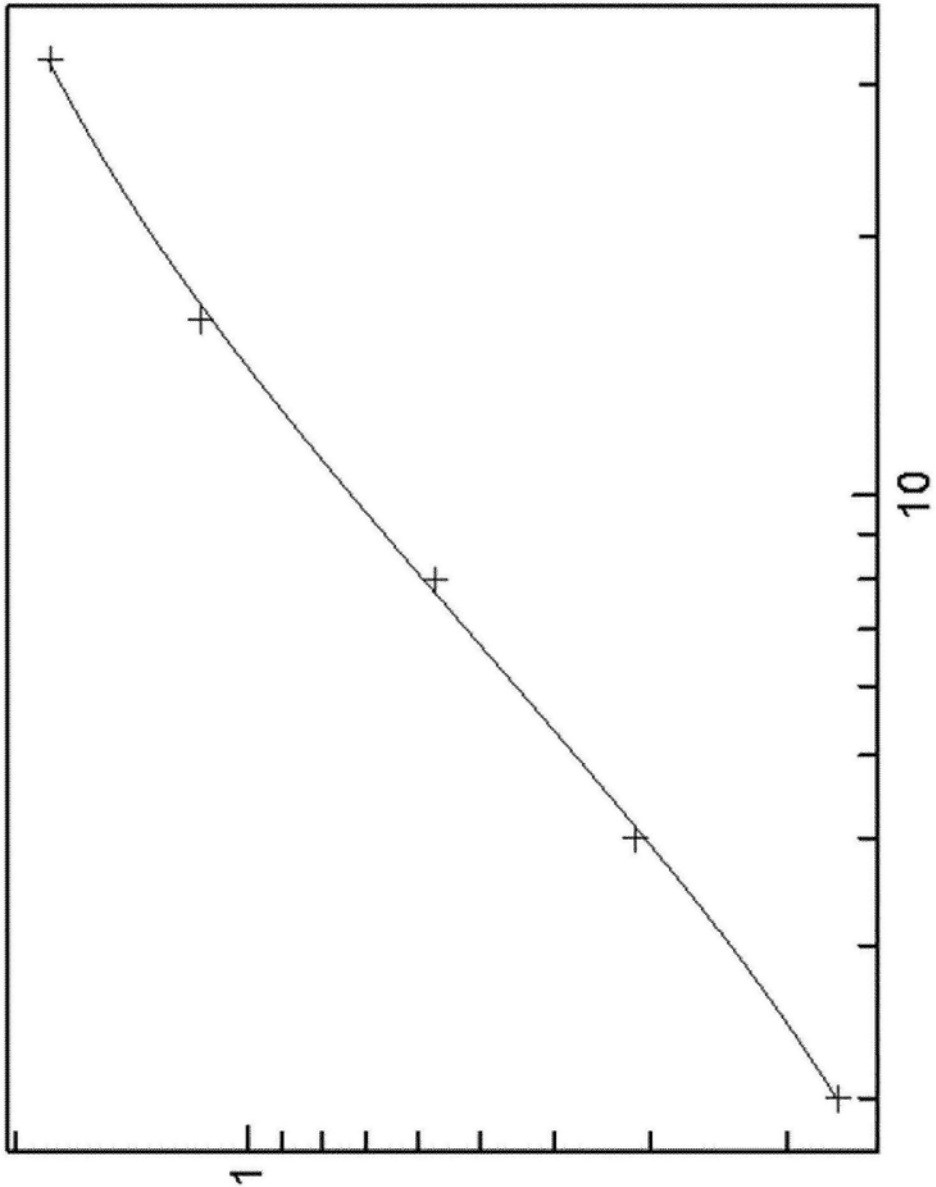


图3

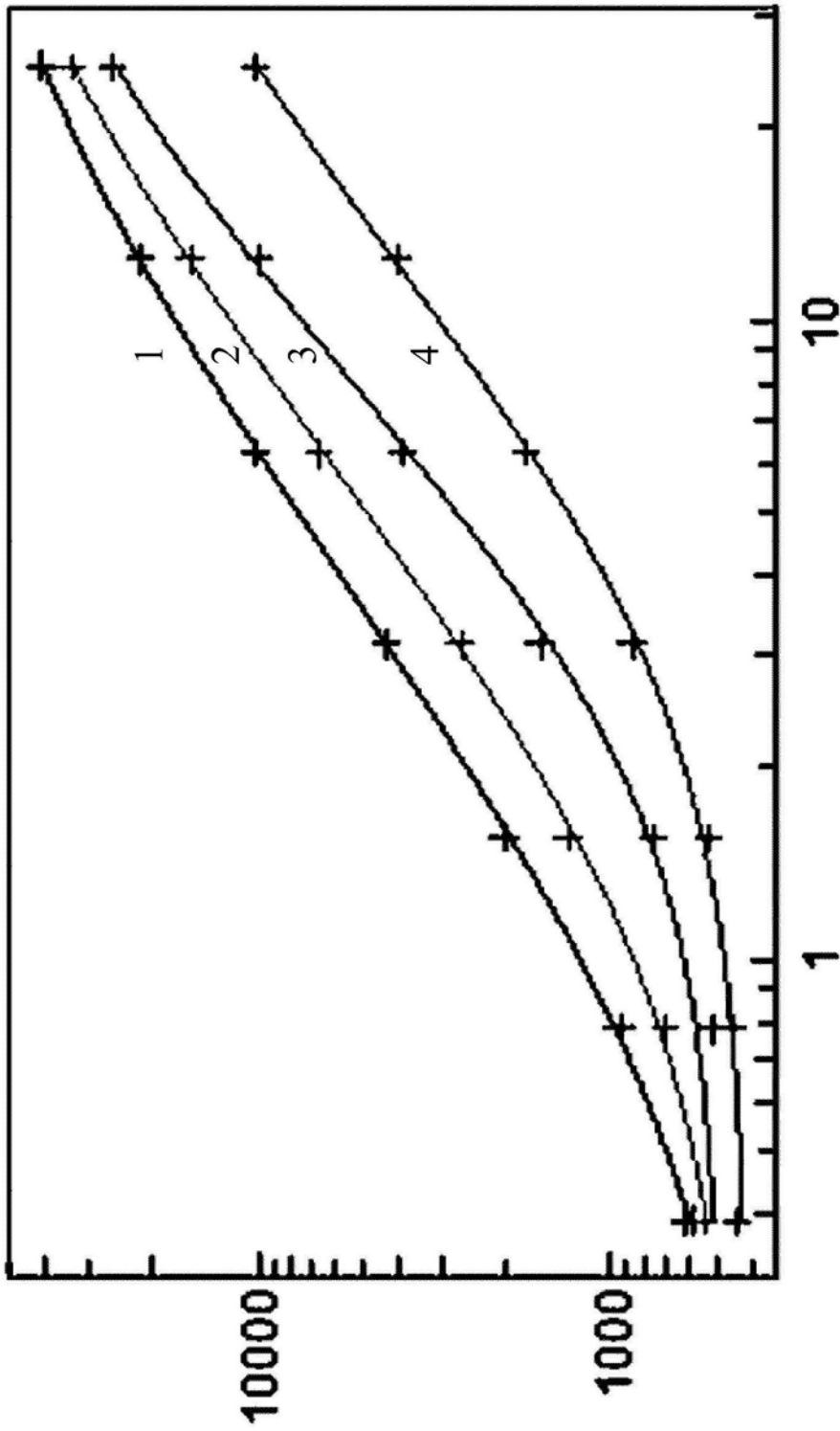


图4

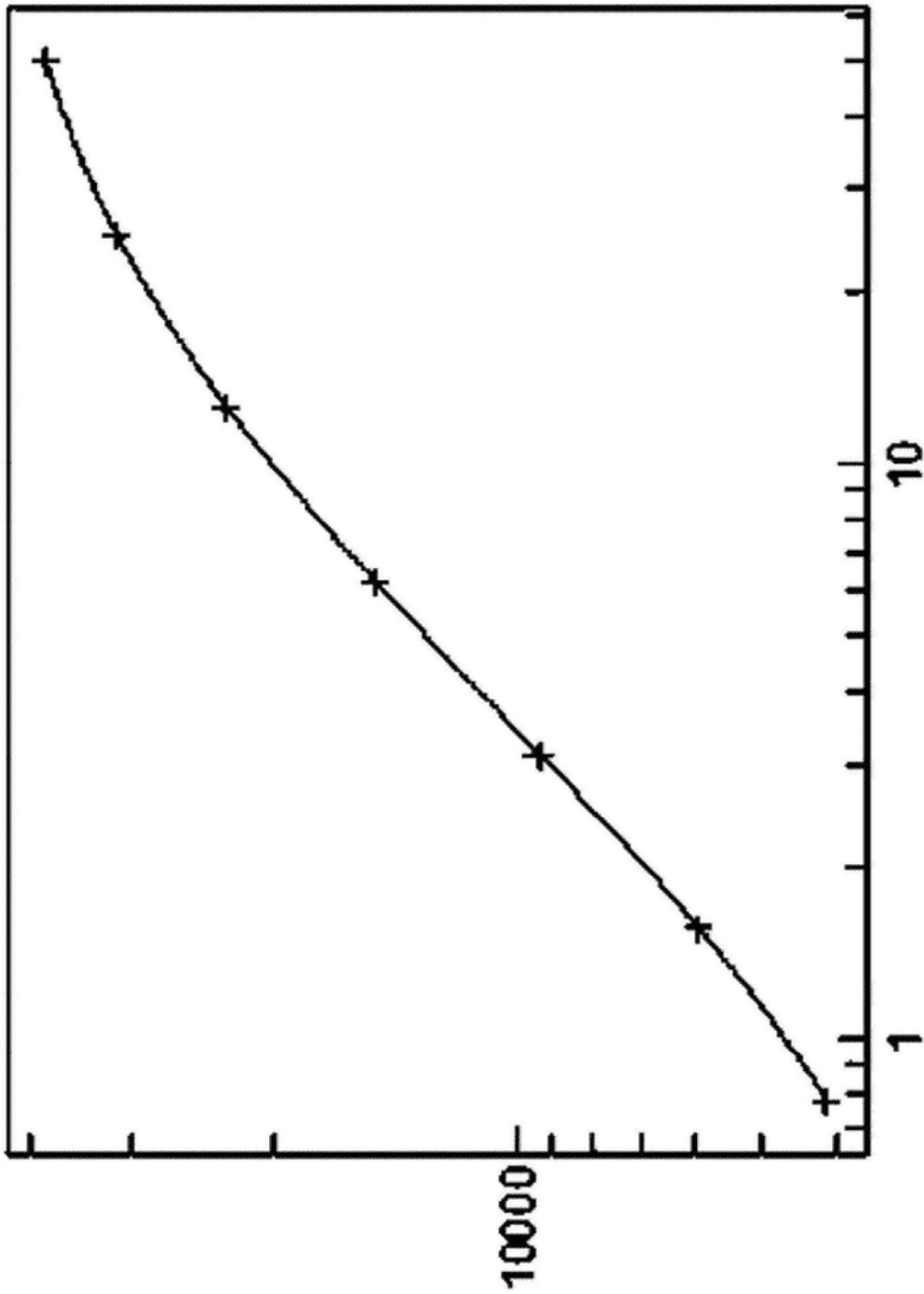


图5

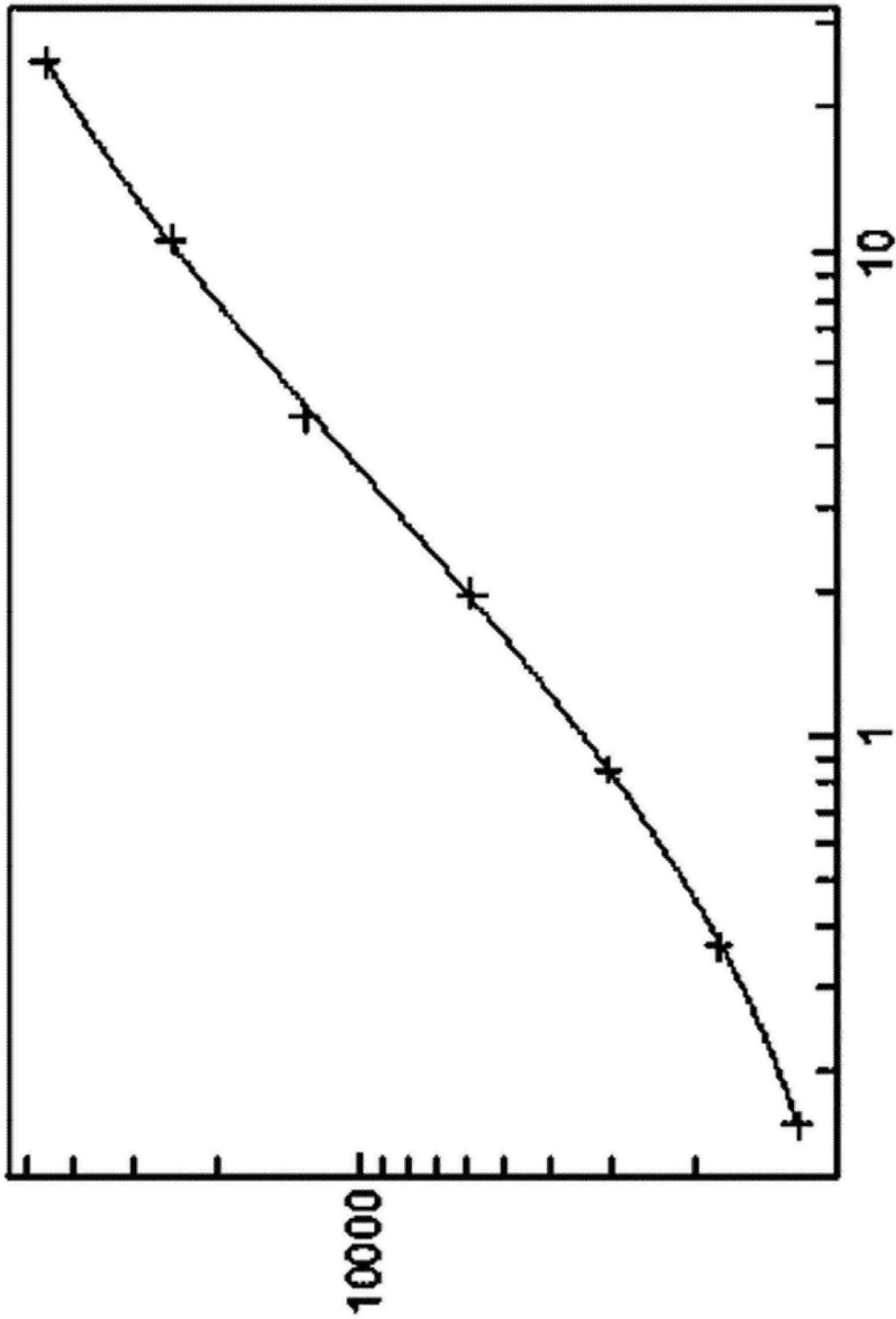


图6

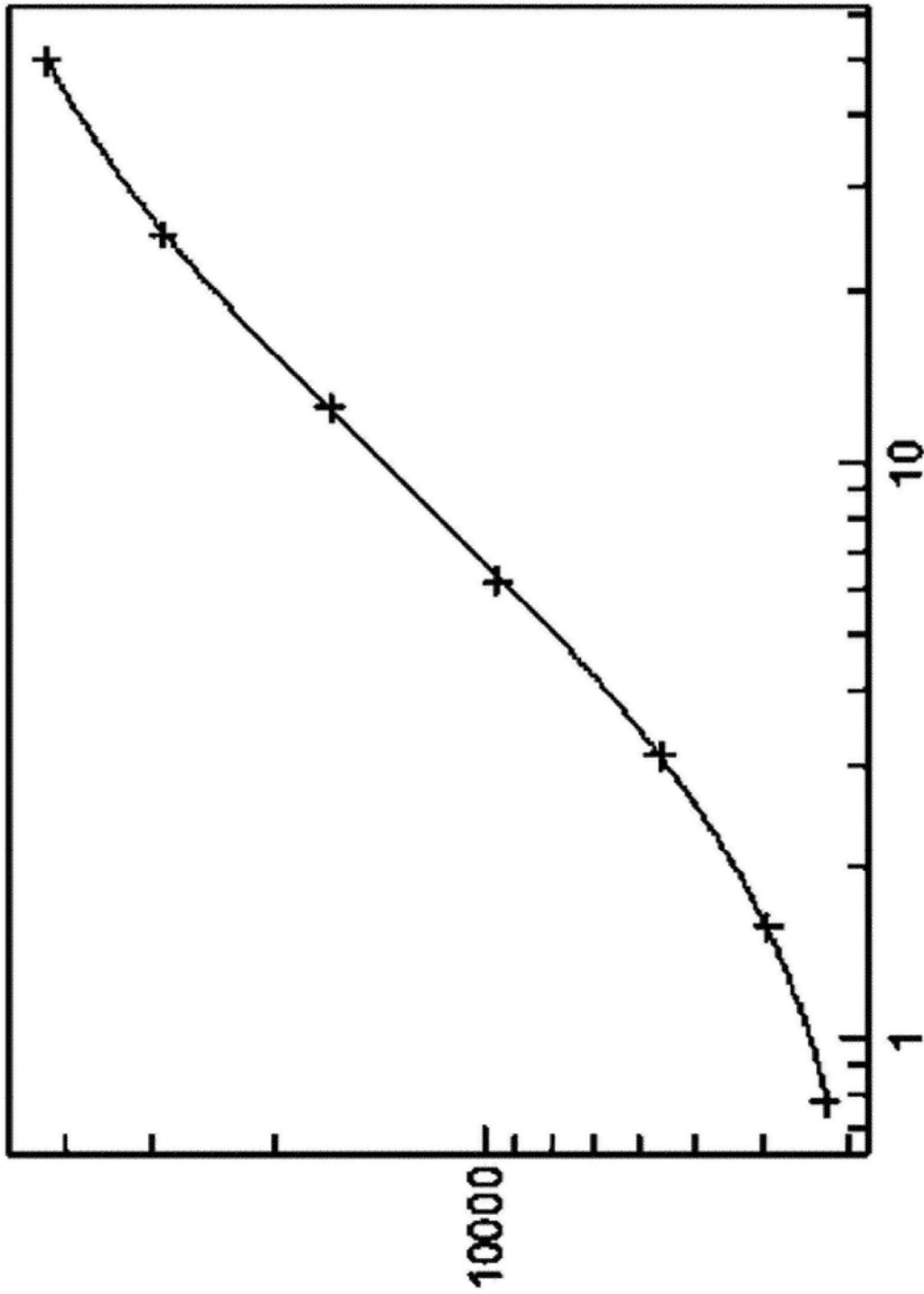


图7

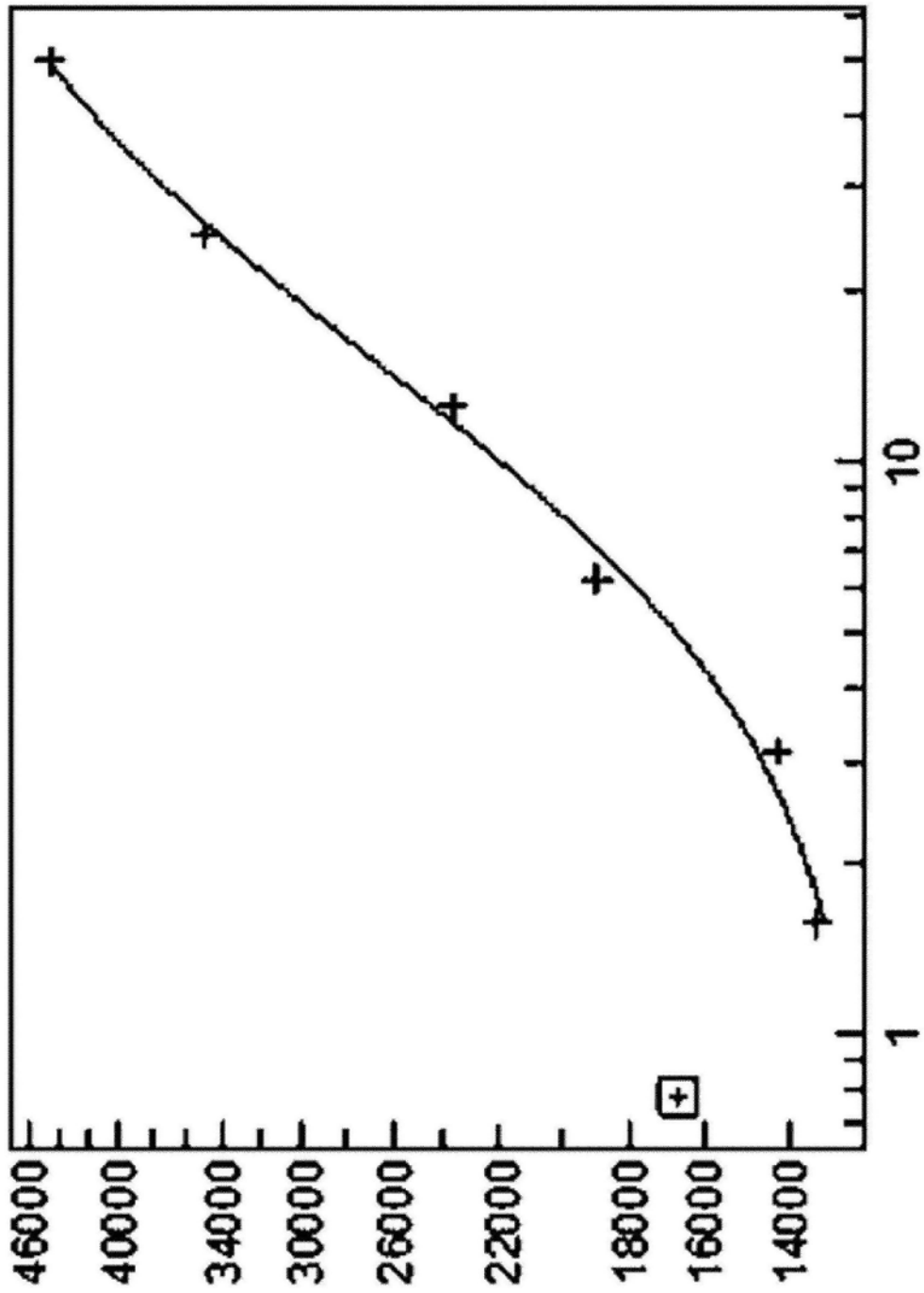


图8

专利名称(译)	三步酸解离酶联免疫吸附(TADELIS)测定法		
公开(公告)号	<a href="#">CN108369227A</a>	公开(公告)日	2018-08-03
申请号	CN201680073882.1	申请日	2016-12-14
申请(专利权)人(译)	豪夫迈·罗氏有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	豪夫迈·罗氏有限公司		
[标]发明人	G·乔丹 R·史塔克		
发明人	G·乔丹 R·史塔克		
IPC分类号	G01N33/536 G01N33/68 G01N33/94		
代理人(译)	张莉		
优先权	2015200446 2015-12-16 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本文报道了用于在样品中测定配体结合性蛋白(治疗剂)的配体的量(总量, 即结合能力)的方法, 其按以下顺序包括以下步骤: 对样品进行酸处理, 通过向样品中加入抗配体抗体和标记的配体结合性蛋白, 在溶液中形成非共价复合物, 所述复合物包含i)抗配体抗体, ii)配体, 和iii)标记的配体结合性蛋白, 和测定复合物的量, 从而确定配体结合性蛋白的配体的量。

