

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-509598

(P2015-509598A)

(43) 公表日 平成27年3月30日(2015.3.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	2 GO 4 1
GO 1 N 30/88 (2006.01)	GO 1 N 30/88 J	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 D	
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 27/62 V	
	GO 1 N 27/62 X	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 43 頁)		

(21) 出願番号	特願2014-560373 (P2014-560373)	(71) 出願人	591003013
(86) (22) 出願日	平成25年3月7日 (2013.3.7)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成26年9月5日 (2014.9.5)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/054587		E AKTIENGESELLSCHAFT
(87) 国際公開番号	W02013/132000		T
(87) 国際公開日	平成25年9月12日 (2013.9.12)		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(31) 優先権主張番号	12158634.1		グレンツァーヘルストラッセ124
(32) 優先日	平成24年3月8日 (2012.3.8)	(74) 代理人	110001508
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		特許業務法人 津国
		(74) 代理人	100078662
			弁理士 津国 肇
		(74) 代理人	100119079
			弁理士 伊藤 佐保子
		(74) 代理人	100116528
			弁理士 三宅 俊男
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 循環中の免疫複合体を特徴付けるためのマルチブレックス式クロマトグラフィー-イムノアッセイ法

(57) 【要約】

従って、本明細書において、免疫複合体の重量/サイズを測定するための、薬物が少なくとも1回投与された哺乳動物から得られた試料のサイズ排除クロマトグラフィー、場合により、2回目のSECではないクロマトグラフィー、および少なくとも1回のイムノアッセイを含む、in vivoで形成された循環中免疫複合体(CIC)を分析/特徴付けるための方法が報告され、前記免疫複合体は、免疫複合体のサイズとイムノアッセイの結果/読取値との相関によって特徴付けられる。また、本明細書において、薬物動態の変化との相関を測定するための、効力の消失または減少を測定するための、薬物の天然対応物の中和を測定するための、免疫反応および過敏症反応(血清病/III型過敏症反応/免疫複合体により媒介される疾患を含む)を測定するための本明細書において報告された方法の使用が報告されている。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(外来性の)治療用ポリペプチドと *in vivo* で形成された内在性の抗薬物抗体とを含む循環中の複合体を形成した、抗薬物抗体を測定するための方法であって、

a) 免疫複合体の重量/サイズを測定するための、薬物が少なくとも 1 回投与された哺乳動物からの試料のサイズ排除クロマトグラフィー、

b) 場合により、2 回目の SEC ではないクロマトグラフィー、

c) 抗薬物抗体を検出するための少なくとも 1 回の不均一系のイムノアッセイ、および

d) 場合により、質量分析に基づいた分析

を含み、

前記免疫複合体は、免疫複合体のサイズと、イムノアッセイまたは質量分析アッセイの読取値/結果との相関によって特徴付けられ、

前記治療用ポリペプチドは、合成または非天然の治療用ポリペプチドである、前記方法。

【請求項 2】

試料が血清または脳脊髄液であることを特徴とする、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

サイズ排除クロマトグラフィーが、溶出液を分画して回収するサイズ排除クロマトグラフィーであることを特徴とする、請求項 1 または 2 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 4】

サイズ排除クロマトグラフィーの少なくとも 1 つの画分が、さらに、溶出液を分画して回収する 2 回目の SEC ではないクロマトグラフィーによって分離されることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 5】

各画分をイムノアッセイで分析することを特徴とする、請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 6】

前記イムノアッセイが抗薬物抗体イムノアッセイであることを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 7】

少なくとも 1 回の前記イムノアッセイが、架橋酵素結合イムノソルベントアッセイであることを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 8】

少なくとも 1 回の前記イムノアッセイが、ADA-D 複合体の検出のための複合アッセイであることを特徴とする、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 9】

前記複合アッセイが、薬物に特異的な捕捉用抗体および検出抗体としての抗種特異的抗体を含むことを特徴とする、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

少なくとも 1 回の前記イムノアッセイが、薬物および/または内在性の薬物の対応物に結合した抗薬物抗体の検出のための直接的なアッセイであることを特徴とする、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 11】

前記直接的なアッセイが、捕捉分子としての固定された薬物または内在性の薬物の対応物と、検出抗体としての抗種特異的抗体とを含むことを特徴とする、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

免疫複合体の特性と薬物動態の変化との相関のための請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項記載の方法の使用。

【請求項 13】

薬物の効力の減少を測定するための請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項記載の方法の使用。

10

20

30

40

50

【請求項 1 4】

薬物の天然対応物の中和を測定するための請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項記載の方法の使用。

【請求項 1 5】

薬物に対する免疫反応および過敏症反応を測定するための請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項記載の方法の使用。

【請求項 1 6】

前記免疫反応および過敏症反応が、血清病 / I I I 型過敏症反応 / 免疫複合体により媒介される疾患であることを特徴とする請求項 1 5 記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本明細書において、サイズ排除クロマトグラフィー (S E C) およびイムノアッセイを含む多工程法により、生体マトリックス中の循環中免疫複合体を検出し特徴付ける (サイズおよび組成) ための方法を報告する。

【0 0 0 2】

発明の背景

大半の生物学的治療剤は、安全性および効力に因果関係を及ぼす可能性のある望ましくない免疫応答を誘発する可能性があり、これらの応答の頻度および重度は変動する (Buttel, I.C. et al., Biologicals 39 (2011) 100-109; COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE (CHMP), EMEA Guideline on Immunogenicity Assessment of Biotechnology-derived Therapeutic Proteins, <http://www.emea.europa.eu>(2007))。

【0 0 0 3】

抗薬物抗体 (A D A) の形成は、薬物動態の変化、効力の消失または減少、天然対応物の中和、並びに、全身免疫反応および過敏症反応 (血清病 / I I I 型過敏症反応 / 免疫複合体により媒介される疾患を含む) をもたらし得る (Buttel, I.C. et al., Biologicals 39 (2011) 100-109; COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE (CHMP), EMEA Guideline on Immunogenicity Assessment of Biotechnology-derived Therapeutic Proteins, <http://www.emea.europa.eu>(2007))。

【0 0 0 4】

A D A - D 複合体の形成の結果としての血清病様症候群は周知の有害事象であり、そして前臨床試験 (Ponce, R. et al., Regul.Toxicol.Pharmacol.54 (2009) 164-182) および診療 (COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE (CHMP), EMEA Guideline on Immunogenicity Assessment of Biotechnology-derived Therapeutic Proteins, <http://www.emea.europa.eu> (2007); Dreyfus, D.H. et al., Ann.Allergy Asthma Immunol. 96 (2006) 624-627; Gamarra, R.M., J.Emerg.Med. 30 (2006) 41-44; Goto, S. et al., Int.J.Hematol. 89 (2009) 305-309; Hansel, T.T. et al., Nat.Rev.Drug Discov. 9 (2010) 325-338; Pilette, C. et al., J. Allergy Clin. Immunol. 120 (2007) 972-973; Tamilvanan, S. et al., J. Drug Target 18 (2010) 489-498) における様々な生物学的製剤に対して報告されている。

【0 0 0 5】

市販薬についての、血清病または重度のアレルギー反応などの主要な反応の特徴は臨床的に診断される。関係する m A b の投与後に有害事象が起こる症例では、反応は抗体応答が原因である (COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE (CHMP), EMEA Guideline on Immunogenicity Assessment of Biotechnology-derived Therapeutic Proteins, <http://www.emea.europa.eu> (2007))。実際に、A D A の形成が調査されそしてそれが臨床的に観察されたシグナルと関連していたデータを非常に僅かしか発見することができない (Goto, S. et al., Int. J. Hematol. 89 (2009) 305-309)。

【0 0 0 6】

免疫原性が深刻である可能性から、E M E A は、A D A の形成の確認および特徴付けの

10

20

30

40

50

重要性を強調した (COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE (CHMP), EMEA Guideline on Immunogenicity Assessment of Biotechnology-derived Therapeutic Proteins, <http://www.emea.europa.eu> (2007))。

【 0 0 0 7 】

免疫原性の評価は、典型的には、A D Aを検出するために設計されたイムノアッセイを使用して行なわれる (Mire-Sluis, A.R. et al., J. Immunol. Methods 289 (2004) 1-16; Shankar, G. et al., J. Pharm. Biomed. Anal. 48 (2008) 1267-1281; Koren, E. et al., J. Immunol. Methods 333 (2008) 1-9)。

【 0 0 0 8 】

しかしながら、A D Aの出現の情報は、現在まで、臨床所見および薬物動態の変化との著明な相関を可能とはしていない。

10

【 0 0 0 9 】

形成されたA D A - 薬物複合体の量およびサイズは、いくつかのパラメーター、例えばA D Aおよび薬物の濃度 / 比、並びにエピトープおよび抗体価に依存している (Abbas, A.K.およびLichtman, A.H., Diseases caused by immunity responses: Hypersensitivity and Autoimmunity, in: Saunders (2003); Murphy, K. et al., Janeway's Immunobiology, in: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC (2008))。

【 0 0 1 0 】

複合体のサイズおよび荷電状態は、複合体のクリアランスまたは有害事象の誘導の重要な決定因子である。典型的には、より大きな複合体は細網内皮系によって除去され、小さな複合体は、通常、炎症をトリガーせず、一方、中間サイズの複合体は補体に結合し得、そして組織損傷を引き起こし得る (Abbas, A.K.およびLichtman, A.H., Diseases caused by immunity responses: Hypersensitivity and Autoimmunity, in: Saunders (2003); Murphy, K. et al., Janeway's Immunobiology, in: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC (2008); Mannik, M., Serum Sickness and pathophysiology of immune complexes, in: Clinical Immunology: Principles and Practices, Rich R.R., Fleisher T.A.S.B.D., Shearer W.T., Strober W. (eds.) 1062-1071 (1996); Sicherer, S.H., Leung D.Y.M., Serum Sickness, in: Nelsons textbook of pediatrics, Kliegman R.M., Behrman R.E., Jenson H.B.J., Stanton B.F. (eds.), Saunders Elsevier, pp. 985-986 (2007)。さらに、複合体の荷電状態は、複合体の組織への沈着にとって重要な因子である (Abbas, A.K.およびLichtman, A.H., Diseases caused by immunity responses: Hypersensitivity and Autoimmunity, in: Saunders (2003); Mannik, M., Serum Sickness and pathophysiology of immune complexes, in: Clinical Immunology: Principles and Practices, Rich R.R., Fleisher T.A.S.B.D., Shearer W.T., Strober W. (eds.) 1062-1071 (1996))。

20

30

【 0 0 1 1 】

A D A 応答の徹底的な評価のために、形成される可能性のあるA D A - 薬物複合体は、サイズおよび荷電状態に関して特徴付けられるべきである。さらに、内在性の薬物の対応物が存在する場合には、形成されたA D Aがこれらの分子と交差反応するかどうか、そして内在性対応物はまた複合体の一部であるかどうかの情報は、価値ある情報である。さらに、免疫複合体における抗原 / 薬物の構造的な特徴付けは、発病に関する情報を提供する。

40

【 0 0 1 2 】

Coyle et al.は、多発性硬化症の脳脊髄液中の免疫複合体の検出および単離を報告している (Journal of Neuroimmunology 15 (1987) 97-107)。E L I S A 技術と等電点電気泳動の組合せは、免疫複合体の分析のための高感度な方法であるが、これはKneba, M., et al. (J. Immunol. Meth. 61 (1983) 233-243) によって報告されている。Matousovic, K., et al.は、I g A 腎症患者の尿中のI g A 含有免疫複合体を報告している (Nephrology Dialysis Transplantation 21 (2006) 2478-2484)。牛痘ウイルス感染から生き長らえたウサギにおける循環中の免疫複合体が、Rattan, B., et al. (Acta Vir. 38 (1994) 105-110) によって報告されている。国際公開公報第 2 0 0 8 / 0 3 1 5 3 2 号では、抗薬物

50

抗体アッセイが報告されている。Stubenrauch, K., et al.は、ヒト抗体の投与後のカニクイザルの血清試料中の免疫複合体を検出するための、薬物耐性を有する一般的なイムノアッセイの評価を報告している (J. Pharm. Biomed. Anal. 52 (2010) 249-254)。国際公開公報第 2 0 1 1 / 0 5 6 5 9 0 号では、抗 T N F 薬物および自己抗体の検出のためのアッセイが報告されている。Wang Shui Long et al.は、新規な均一系の移動度シフトアッセイを使用した、患者の血清中のアダリムマブに対する抗薬物抗体 (A D A) の分析を報告している (Am. J. Gastroent. 105 (Sup 1, 2010) S444-S445)。E P 2 3 5 4 7 9 2 号では、抗薬物抗体を検出するための方法が報告されている。Lambert, P.H., et al.は、血清中の免疫複合体を検出するための 1 8 個の方法の評価についての W H O の共同比較試験を報告している (J. Clin. Lab. Immunol. 1 (1978) 1-15)。循環中の免疫複合体を測定するための方法が、Levinson, S.S. et al. (Clin. Immunol. Newsletter 3 (1987) 39-42) によって報告されている。

10

【 0 0 1 3 】

発明の概要

サイズ排除クロマトグラフィー (S E C) を少なくとも 1 回のイムノアッセイと組み合わせて使用する多工程の方法を含む、生体マトリックス中の循環中の免疫複合体、例えば所与の薬物に対する A D A を含む複合体の検出および特徴付け (サイズおよび組成) のための方法を用いて、薬物動態の変化との相関、効力の消失または減少、天然対応物の中和、並びに、全身免疫反応および過敏症反応 (血清病 / I I I 型過敏症反応 / 免疫複合体により媒介される疾患を含む) を測定することができることが判明した。

20

【 0 0 1 4 】

本明細書において報告された 1 つの局面は、

- a) 免疫複合体の重量 / サイズを測定するための、薬物が少なくとも 1 回投与された哺乳動物から得られた試料のサイズ排除クロマトグラフィー、
- b) 場合により、2 回目の S E C ではないクロマトグラフィー、
- c) 少なくとも 1 回のイムノアッセイ、および
- d) 場合により、質量分析に基づいた分析

を含む、in vivo で形成された循環中免疫複合体 (C I C) を分析 / 特徴付けるための方法であり、

前記免疫複合体は、免疫複合体のサイズとイムノアッセイまたは質量分析アッセイの結果 / 読取値との相関によって特徴付けられる。

30

【 0 0 1 5 】

本明細書において報告された 1 つの局面は、(外来性) 治療用ポリペプチドおよび in vivo で形成された内在性抗薬物抗体を含む、循環中の複合体を形成した抗薬物抗体免疫複合体を分析測定するための方法であり、これは

- a) 免疫複合体の重量 / サイズを測定するための、薬物が少なくとも 1 回投与された哺乳動物から得られた試料のサイズ排除クロマトグラフィー、
- b) 場合により、2 回目の S E C ではないクロマトグラフィー、
- c) 抗薬物抗体を検出するための少なくとも 1 回の不均一系のイムノアッセイ、および
- d) 場合により、質量分析に基づいた分析

40

を含み、

前記免疫複合体は、免疫複合体のサイズとイムノアッセイまたは質量分析アッセイの読取値 / 結果との相関によって特徴付けられ、

前記治療用ポリペプチドは合成または非天然の治療用ポリペプチドである。

【 0 0 1 6 】

全ての局面の 1 つの態様において、試料は血清または脳脊髄液である。

【 0 0 1 7 】

全ての局面の 1 つの態様において、免疫複合体は薬物特異的免疫複合体である。

【 0 0 1 8 】

薬物特異的免疫複合体は、薬物を、他の薬物ではない分子と共に含む。

50

【0019】

全ての局面の1つの態様において、イムノアッセイは、抗薬物抗体検出アッセイ、薬物中和抗体検出アッセイ、薬物動態アッセイ（薬物定量アッセイ）、抗体アイソタイプ決定アッセイ、内在性薬物対応物に対するADAの交差反応性を決定するためのアッセイ（薬物が、哺乳動物において内在的に発生する部分を含む場合）、補体結合アッセイ（結合した補体または補体に対する結合能）、免疫複合体に含まれる内在性の薬物の対応物を決定するためのアッセイ（薬物が、哺乳動物において内在的に発生する部分を含む場合）を含む群から選択される。

【0020】

全ての局面の1つの態様において、イムノアッセイは、均一系のイムノアッセイまたは不均一系のイムノアッセイである。1つの態様において、イムノアッセイはラジオイムノアッセイ（RIA）、または酵素イムノアッセイ（EIA、ELISA、EMIT）、または蛍光偏光イムノアッセイ（FPIA）、または発光イムノアッセイ（LIA）、またはイムノラジオイムノアッセイ（IRMA）、またはマイクロビーズ-酵素イムノアッセイ（MELIA）、または酵素結合蛍光アッセイ（ELFA）、またはレクチン-酵素イムノアッセイ（LEIA）、または免疫蛍光アッセイ（IFA）、または電気化学発光アッセイ（ECLA）、または免疫磁気電気化学発光アッセイ（IMECL）、または化学発光ドット-免疫結合アッセイ（CDIA）、または濁度アッセイ、または粒子増強免疫比濁アッセイである。1つの態様において、イムノアッセイは、酵素結合イムノソルベントアッセイ（ELISA）、または電気化学発光アッセイ（ECLA）、または化学発光ドット-免疫結合アッセイ（CDIA）、または蛍光偏光イムノアッセイ（FPIA）、または濁度アッセイ、または粒子増強免疫濁度アッセイである。

10

20

【0021】

全ての局面の1つの態様において、2回目のSECではないクロマトグラフィーは、イオン交換クロマトグラフィー（陽イオンまたは陰イオン交換クロマトグラフィー）、または逆相クロマトグラフィー、または親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）、または疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）、または疎水性電荷相互作用クロマトグラフィー（HCIC）、または受容制限物質クロマトグラフィー（RAMC）である。

【0022】

全ての局面の1つの態様において、サイズ排除クロマトグラフィーは、溶出液を分画して回収するサイズ排除クロマトグラフィーである。1つの態様において、各画分はイムノアッセイで分析される。

30

【0023】

全ての局面の1つの態様において、サイズ排除クロマトグラフィーの少なくとも1つの画分は、2回目のSECではないクロマトグラフィーによってさらに分離され、溶出液は分注して回収される。1つの態様において、各画分はイムノアッセイで分析される。1つの態様において、サイズ排除クロマトグラフィーの各画分は、2回目のSECではないクロマトグラフィーによって分析される。

【0024】

全ての局面の1つの態様において、画分はアリコートである。

40

【0025】

全ての局面の1つの態様において、イムノアッセイは酵素結合イムノソルベントアッセイである。

【0026】

全ての局面の1つの態様において、少なくとも1回のイムノアッセイは、1回、または2回、または3回、または4回、または5回、または6回のイムノアッセイである。

【0027】

全ての局面の1つの態様において、イムノアッセイは抗薬物抗体イムノアッセイである。

50

【 0 0 2 8 】

全ての局面の1つの態様において、少なくとも1回のイムノアッセイは架橋酵素結合イムノソルベントアッセイである。

【 0 0 2 9 】

陽性架橋酵素結合イムノソルベントアッセイは、抗薬物抗体がA D A - D複合体の一部であったことを示す。より分子量の高い画分、すなわち、サイズ排除クロマトグラフィーのより早期に溶出する画分における抗薬物抗体の検出は、抗薬物抗体がより高い分子量の複合体の一部であったことを示す。

【 0 0 3 0 】

全ての局面の1つの態様において、少なくとも1回の酵素結合イムノソルベントアッセイは、A D A - D複合体の検出のための複合アッセイである。1つの態様において、複合アッセイは、薬物に特異的な捕捉抗体、および検出抗体としての抗種特異的抗体を含む。

10

【 0 0 3 1 】

全ての局面の1つの態様において、少なくとも1回のイムノアッセイは、薬物におよび/または内在性の薬物の対応物に結合した抗薬物抗体の検出のための直接的アッセイである。1つの態様において、直接的アッセイは、捕捉分子としての固定された薬物または内在性の薬物の対応物、および検出抗体としての抗種特異的抗体を含む。

【 0 0 3 2 】

直接的アッセイは、遊離抗薬物抗体がサイズ排除クロマトグラフィーによって除去された後、試料中の薬物および/または内在性対応物に結合している抗薬物抗体と、固定された薬物との間の平衡の確立を使用する。

20

【 0 0 3 3 】

全ての局面の1つの態様において、薬物表面コーティングは、高密度の薬物表面コーティングである。

【 0 0 3 4 】

高密度の表面コーティングによって、表面に結合した薬物への結合に対する平衡のシフトの変化が起こる(抗薬物抗体の結合力を使用して)。

【 0 0 3 5 】

全ての局面の1つの態様において、イムノアッセイにおいて試料を16~32時間の時間をかけてインキュベーションする。

30

【 0 0 3 6 】

本明細書において報告された1つの局面は、その後のA D Aアッセイ/イムノアッセイの薬物耐性を増加させるために、A D A - D複合体から薬物を分離するための方法である。同様に、本明細書において報告された方法を使用して、イムノアッセイの薬物耐性を増加させることができる。

【 0 0 3 7 】

本明細書において報告された1つの局面は、

a) A D A - D複合体の重量/サイズを測定するための、薬物が少なくとも1回投与された哺乳動物から得られた試料のサイズ排除クロマトグラフィー、

b) 抗薬物抗体の検出のための少なくとも1回の酵素結合イムノソルベントアッセイを含む、in vivoにおいて形成された抗薬物抗体 - 薬物(A D A - D)複合体の特徴付けのための方法であり、

40

前記免疫複合体は、

- 陽性酵素結合イムノソルベントアッセイによる低分子量の複合体および約150 kDa ~ 約400 kDaの重量、

- 陽性酵素結合イムノソルベントアッセイによる中間分子量の複合体および約400 kDa ~ 約1,500 kDaの重量、または

- 陽性酵素結合イムノソルベントアッセイによる高分子量の複合体および約1,500 kDa ~ 約7,000 kDaの重量

であることが特徴付けられている。

50

【 0 0 3 8 】

本明細書において報告された1つの局面は、免疫複合体の特性と薬物動態の変化との相関のための本明細書において報告された方法の使用である。

【 0 0 3 9 】

本明細書において報告された1つの局面は、薬物の効力の減少を測定するための本明細書において報告された方法の使用である。

【 0 0 4 0 】

本明細書において報告された1つの局面は、薬物の天然対応物の中和を測定するための本明細書において報告された方法の使用である。

【 0 0 4 1 】

本明細書において報告された1つの局面は、薬物に対する免疫反応および過敏症反応を測定するための本明細書において報告された方法の使用である。

【 0 0 4 2 】

本明細書において報告された1つの局面は、I g Gの系球体への沈着を測定するための本明細書において報告された方法の使用である。

【 0 0 4 3 】

全ての局面の1つの態様において、免疫反応および過敏症反応は、血清病 / I I I型過敏症反応 / 免疫複合体により媒介される疾患である。

【 0 0 4 4 】

本明細書において報告された1つの局面は、免疫複合体を含む自己免疫抗体の存在を決定するための本明細書において報告された方法の使用である。

【 0 0 4 5 】

本明細書において報告された1つの局面は、改変された / 複合体を形成した薬物の存在を決定するための本明細書において報告された方法の使用要求である。

【 0 0 4 6 】

全ての局面の1つの態様において、薬物はヒト抗体またはヒト化抗体である。

【 0 0 4 7 】

発明の詳細な説明

定義

「抗薬物抗体」という用語は、薬物の抗原性領域に対して指向される抗体を示す。この抗原性領域は、薬物の抗原性アミノ酸配列、または薬物の糖構造であり得る。1つの態様において、抗薬物抗体は、C H O細胞、H E K細胞、またはB H K細胞などの非ヒト細胞における前記薬物抗体の組換え産生から生じた薬物の第2の改変に対して指向される。一般的に、抗薬物抗体は、薬物が投与された動物の免疫系によって認識される薬物の抗原性領域に対して指向される。このような抗薬物抗体は、「特異的抗薬物抗体」である。薬物は、できるだけ少ない抗原性領域を含むように設計される。例えば、ヒトにおける使用を目的とした薬物は、薬物に対する免疫応答の発生を最小限にするためにヒト患者に適用する前にヒト化することができる。この免疫応答は、このようなヒト化薬物の非ヒト部分に対して指向される抗薬物抗体の形態である（例えばPan, Y., et al., FASEB J. 9 (1995) 43-49参照）。

【 0 0 4 8 】

「色原体」という用語は、蛍光基または発光基および色素を示す。

【 0 0 4 9 】

「検出可能な標識」という用語は、酵素、N M R活性基または金属粒子、ハプテン、例えばジゴキシゲニンを示す。検出可能な標識はまた、光で活性化され得る架橋基、例えばアジド基またはアジリン基であり得る。電気化学発光によって検出することのできる金属キレートもまた、好ましいシグナル発生基であり、特に好ましいのはルテニウムキレート、例えばルテニウム(ビスピリジル)₃²⁺キレートである。適切なルテニウム標識基は、例えば、第E P 0 5 8 0 9 7 9号、国際公開公報第9 0 / 0 5 3 0 1号、国際公開公報第9 0 / 1 1 5 1 1号、および国際公開公報第9 2 / 1 4 1 3 8号に記載されている。

10

20

30

40

50

【0050】

「薬物」という用語は、疾患の処置のために個体に投与することのできるポリペプチド、例えば抗体または非抗体分子を示す。薬物（例えば治療用ポリペプチドまたは治療用モノクローナル抗体）は、癌疾患（例えば血液系腫瘍および固形腫瘍（非ホジキンリンパ腫、乳癌および結腸直腸癌を含む））、免疫疾患、中枢神経疾患、血管疾患、または感染症などの様々な疾患の処置に広く使用されている。このような薬物は、例えば、Levine, A. P., et al., *Journal of the Royal Society of Medicine* 98 (2005) 145-152に記載されている。このような薬物は、例えば、CD20、CD22、HLA-DR、CD33、CD52、EGFR、G250、GD3、HER2、PSMA、CD56、VEGF、VEGF2、CEA、ルイスY抗原、IL-6レセプター、またはIGF-1レセプターに対する抗体である。治療用抗体はまた、Gröner, B., et al., *Curr. Mol. Meth.* 4 (2004) 539-547; およびHarris, M., *Lancet Oncol.* 5 (2004) 292-302によって記載されている。

10

【0051】

「哺乳動物」という用語は、脊椎動物の綱に属する生物を示す。哺乳動物という用語は、1つの態様において、霊長類、ネコ、イヌ、ヒツジ、ラット、マウスおよびウサギを示す。1つの態様において、哺乳動物という用語は、マーモセットおよびタマリン（Callitrichidae科）、新世界ザル（Cebidae科）、旧世界ザル（Cercopithecidae科）、ユビトキツネザルおよびネズミキツネザル（Cheirogaleidae科）、アイアイ（Daubentoniidae科）、ブッシュベビーおよびガラゴ（Galagonidae科）、テナガザルおよび小型類小猿（Hylobatidae科）、インドリ、シファカおよび類縁（Indridae科）、キツネザル属（Lemuridae科）、ロリス（Loridae科）、イタチキツネザル（Megaladapidae科）、メガネザル（Tarsiidae科）、並びにその交雑種を含む霊長目の科のメンバーを示す。1つの態様において、哺乳動物は、マーモセットおよびタマリン、旧世界ザル、ユビトキツネザルおよびネズミキツネザル、テナガザルおよび小型類小猿、キツネザル属、並びにその交雑種の科のメンバーを含む群から選択される。この特定の態様において、人類に最も近い類縁である大型類人猿、特にチンパンジー、ボノボ、ゴリラおよびオランウータンの群は除外される。

20

【0052】

「試料」という用語は、薬物が投与された哺乳動物に由来する任意の量の物質を示す。このような物質としては、このような哺乳動物に由来する全血、血清、または血漿が挙げられるがそれらに限定されず、これらは前臨床的日常業務において最も広く使用されている試料源である。1つの態様において、試料は、唾液、尿、滑液、全血、血漿、または血清のような液体試料である。1つの態様において、試料は、全血、血漿または血清である。

30

【0053】

「固相」という用語は、液体ではない物質を意味し、そしてこれには、ポリマー、金属（常磁性粒子、強磁性粒子）、ガラスおよびセラミックなどの材料から製造された粒子（微粒子およびビーズを含む）；シリカ、アルミナおよびポリマーゲルなどのゲル物質；ポリマー、金属、ガラスおよび/またはセラミックから製造され得るキャピラリー；ゼオライトおよび他の多孔性物質；電極；マイクロタイタープレート；ソリッドストリップ；並びにキュベット、チューブまたは他の分光計サンプル容器が挙げられる。アッセイの固相成分は、アッセイが接触し得る不活性な固体表面とは、「固相」が捕捉抗体と相互作用するように意図されたその表面上の少なくとも1つの部分を含む点で、区別される。固相は、静止成分、例えばチューブ、ストリップ、キュベットもしくはマイクロタイタープレートであり得るか、または、非静止成分、例えばビーズおよび微粒子であり得る。微粒子はまた、均一なアッセイフォーマットのための固相としても使用することができる。ポリペプチドおよび他の物質の非共有結合的または共有結合的な付着のいずれかを可能とする様々な微粒子を使用し得る。このような粒子としては、ポリマー粒子、例えばポリスチレンおよびポリ（メチルメタクリレート）；金粒子、例えば金ナノ粒子および金コロイド；およびセラミック粒子、例えばシリカ、ガラスおよび金属酸化物の粒子が挙げられる。例え

40

50

ば、Martin, C.R., et al., Analytical Chemistry-News & Features, May 1, 1998, 322 A-327A (これは本明細書に参照により組み入れられる)を参照されたい。

【0054】

マルチプレックス式の免疫複合体分析法

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) をイムノアッセイと組み合わせて使用する多工程法を含む、生体マトリックスにおける投与された薬物に対して指向される免疫複合体の検出および特徴付け (サイズおよび組成) のための方法を用いて、薬物動態の変化との相関、効力の消失または減少、天然対応物の中和、並びに、全身免疫反応および過敏症反応 (血清病 / III型過敏症反応 / 免疫複合体により媒介される疾患を含む) を測定することができることが判明した。

10

【0055】

従って、本明細書において、1つの局面として、免疫複合体の重量 / サイズを測定するための、薬物が少なくとも1回投与された哺乳動物から得られた試料のサイズ排除クロマトグラフィー、場合により、2回目のSECではないクロマトグラフィー、および少なくとも1回のイムノアッセイを含む、in vivoで形成された循環中免疫複合体 (CIC) を分析 / 特徴付けるための方法が報告され、前記免疫複合体は、免疫複合体のサイズとイムノアッセイの結果 / 読取値との相関によって特徴付けられる。

【0056】

本明細書において、1つの局面として、ADA-D複合体の重量 / サイズを測定するための、薬物が少なくとも1回投与された哺乳動物から得られた試料のサイズ排除クロマトグラフィー、および抗薬物抗体の検出のための少なくとも1回の酵素結合イムノソルベントアッセイを含む、in vivoで形成された抗薬物抗体 - 薬物 (ADA-D) 複合体を特徴付けるための方法がさらに報告され、前記免疫複合体は、陽性酵素結合イムノソルベントアッセイにより低分子量の複合体および約150 kDa ~ 約400 kDaの重量、陽性酵素結合イムノソルベントアッセイにより中間分子量の複合体および約400 kDa ~ 約1,500 kDaの重量、または陽性酵素結合イムノソルベントアッセイにより高分子量の複合体および約1,500 kDa ~ 約7,000 kDaの重量であることが特徴付けられる。

20

【0057】

また、本明細書において、薬物動態の変化との相関を測定するための、効力の消失または減少を測定するための、薬物の天然対応物の中和を測定するための、免疫反応および過敏症反応 (血清病 / III型過敏症反応 / 免疫複合体により媒介される疾患を含む) を測定するための本明細書において報告された方法の使用が報告されている。

30

【0058】

例えば、薬物を哺乳動物に投与した後、哺乳動物の免疫系は、異物として投与薬物を認識し得、そして抗薬物抗体を産生して、投与された異物を中和し得る。薬物が哺乳動物に対して内在性の要素を含む場合、抗薬物抗体はまた、薬物のこの要素に対しても指向され得、そして同様にまた、哺乳動物における内在性対応物も標的化し得る。

【0059】

投与された治療薬物に対する免疫応答 / ADAの形成 / 補体活性化により、免疫複合体が形成され得る。免疫複合体 (ADA-D複合体) の形成により、薬物動態の特性の変化、または続発症、例えば血清病様症候群が生じ得る。

40

【0060】

免疫複合体の特性は、誘導されたフォローアップ効果の重要な決定因子であり得る：

- 複合体のサイズ

大きなサイズの複合体の形成は、細網内皮系による増強されたクリアランスをもたらし得る。

中間サイズの複合体の形成は、補体との結合、続いて、組織への沈着および「血清病」をもたらし得る。

小さなサイズの複合体の形成は、「全く」顕著な効果をもたらさない場合がある。

50

- 複合体の荷電状態

陽イオン性免疫複合体は、細胞 / 組織膜 (陰イオン性細胞表面) に沈着 / 結合し得る。

- 複合体の極性
- C 1 q への結合または結合能。

【 0 0 6 1 】

従って、綿密な免疫複合体の特徴付けは、in vivoでの効果 (薬物動態の変化および / または毒性作用) との相関にとって必要条件である。

【 0 0 6 2 】

しかしながら、例えば抗薬物抗体 (A D A) の発生に関する唯一の情報は、臨床所見と薬物動態の変化との顕著な相関の判明を可能としない。

【 0 0 6 3 】

抗薬物抗体 - 薬物複合体 (A D A - D 複合体) などの形成された免疫複合体の量およびサイズは、いくつかのパラメーター、例えば濃度 / 比並びにエピトープおよび抗体価に依存する。

【 0 0 6 4 】

複合体のサイズは、複合体のクリアランスまたは有害事象の誘導の重要な決定因子である。典型的には、より大きな複合体は細網内皮系によって除去され、小さな複合体は、通常、炎症をトリガーせず、一方、中間サイズの複合体は補体と結合し得、そして組織損傷を引き起こし得る。

【 0 0 6 5 】

免疫応答の徹底的な評価のために、形成された可能性のある免疫複合体はサイズに関して特徴付けされるべきである。さらに、内在性の薬物の対応物が存在する場合には、例えば、形成された A D S がこれらの分子と交差反応するかどうか、そして内在性対応物がまた、免疫複合体の一部であるかどうかの情報は価値ある情報である。

【 0 0 6 6 】

情報を、免疫の形成に因る薬物動態の変化または有害事象などの所見と相関させ得、そして、ほんの数人の免疫複合体陽性被験者における、全く影響を伴わない免疫複合体陽性被験者と、薬物動態の変化または続発症または血清病様症候群を伴う免疫複合体陽性被験者との間の差異を説明するさらなる情報を提供し得る。

【 0 0 6 7 】

薬物が投与された哺乳動物における免疫複合体の形成を測定するために、そして形成された免疫複合体を特徴付けるために、2工程の方法が必要とされる。

【 0 0 6 8 】

本明細書において報告された方法は、例えば A D A - D 複合体並びに自己免疫複合体 (自己免疫疾患、例えば関節リウマチ、ループスなど) の任意の免疫複合体の特徴付けに使用することができる。

【 0 0 6 9 】

サイズ排除クロマトグラフィー

第1工程において、形成された免疫複合体をそのサイズに関して分離し、複合体における見かけの成分を測定する。これは、溶出液のサイズ排除クロマトグラフィー (S E C) および分画 (1つの態様において分注) によって行なうことができる。

【 0 0 7 0 】

抗薬物抗体が I g G クラスであると仮定すると、それは約 1 5 0 k D a の分子量を有し、そして治療用ポリペプチドの分子量の範囲は約 2 . 5 k D a (ポリペプチド薬物 ; 2 0 アミノ酸残基からなるポリペプチド) から約 2 5 0 k D a (薬物抗体 ; 追加の融合したエフェクターポリペプチドまたは多重特異的抗体を含む I g G クラスの完全長の治療用抗体) であり、抗薬物抗体と薬物の 1 : 1 の化学量論的複合体は、小さなポリペプチド薬物の場合には少なくとも約 1 5 0 k D a の分子量を有し、そして複合体薬物抗体の場合には約 4 0 0 k D a 以下の分子量を有する。

【 0 0 7 1 】

10

20

30

40

50

分画時間の選択は、サイズ情報の分解能を規定する。

【0072】

試料（生体マトリックス）は、血清血漿（例えば抗薬物抗体の検出のための）または滑液（例えばリウマチ疾患において）であり得るが、これはサイズ排除クロマトグラフィーを使用して分画される。サイズ排除クロマトグラフィーは、最初の情報、すなわち分析物（複合体）のサイズを提供する。

【0073】

サイズ排除クロマトグラフィーの個々の画分をIECによる分離などの2次元クロマトグラフィーを使用して分析して、複合体の荷電状態を測定することができるか、あるいは逆相（RP）クロマトグラフィーまたはHILICによる分離を使用して、複合体の極性を決定することができる。

10

【0074】

また、サイズ排除クロマトグラフィーの個々の画分を、補体結合活性について分析することができる。

【0075】

また、サイズ排除クロマトグラフィーの個々の画分を、酵素結合イムノソルベントアッセイ（ELISA）を使用して分析することができる。

【0076】

酵素結合イムノソルベントアッセイ

例えば、

20

- 架橋型ELISA（「古典的ADAスクリーニングアッセイ」）：より高分子量の画分におけるADAの検出は、ADAがより高分子量の画分の一部であったことを示す、

- 複合型アッセイ：薬物特異的捕捉および抗種検出を使用したADA-D複合体の検出は、前臨床試験におけるmAbに対する一般的なアプローチである（例えば国際公開公報第2006/066912号、国際公開公報第2008/031532号を参照、両方共に本明細書に参照により組み入れられる）、

- 直接型アッセイ：固定した薬物および抗種特異的検出を使用することによる、薬物および/または内在性対応物に結合したADAの検出、

のような種々のイムノアッセイを実施して種々の複合体を測定することができるので、サイズ排除クロマトグラフィー溶出液の画分は、マルチプレックス式のSEC分析を可能とする。

30

【0077】

1つの態様において、各アッセイについての特定のカットポイントは、ブランクまたは理想的には投与前の試料の分析によって評価される。

【0078】

カットポイントの定義のために、および異なるプレート間の半定量的結果の比較のために、ELISAシグナルを、一定時間後に読み取られるべきである（1つの態様においてMTP上の陽性対照の使用によりモニタリング）。

【0079】

イムノアッセイは当業者に周知である。このようなアッセイ並びに実践的な適用および手順を実施するための方法は、関連参考書に要約されている。関連参考書の例は、Tijssen, P., Preparation of enzyme-antibody or other enzyme-macromolecule conjugates (「Practice and theory of enzyme immunoassays」, Burdon, R.H. and v. Knippenberg, P.H. (eds.), Elsevier, Amsterdam (1990) pp. 221-278)および免疫学的検出法を扱った「Methods in Enzymology」, Colowick, S.P. and Caplan, N.O. (eds.), Academic Pressの種々の巻、特に70、73、74、84、92および121巻である。

40

【0080】

種々のイムノアッセイの原理が例えばHage, D.S., in Anal. Chem. 71 (1999) 294R-304Rによって記載されている。Lu, B., et al., Analyst. 121 (1996) 29R-32Rは、イムノアッセイにおいて使用するための抗体の方向付けされた固定化を報告している。アビジン

50

- ビオチンにより媒介されるイムノアッセイは、例えば、Wilchek, M.およびBayer, E.A., Methods Enzymol. 184 (1990) 467-469によって報告されている。

【0081】

第2工程において、サイズで分離された複合体は、その組成に基づいて特徴付けられ、例えば、抗薬物抗体の存在が確認され、そして抗薬物抗体の特異性が決定される。1つの態様において、第2工程は、少なくとも1回の酵素結合イムノソルベントアッセイ(ELISA)を含む。

【0082】

一般的に、ELISAは、捕捉分子およびトレーサー分子を含む。捕捉分子は、一般的に、固相に固定/結合している。トレーサー分子は一般的に、検出可能な標識にコンジュゲートし、検出可能な標識は、直接的に検出可能な標識であっても、または間接的に検出可能な標識であってもよい。

10

【0083】

抗薬物抗体の存在の決定のために、種々のELISAフォーマットを使用することができる：

【0084】

- サンドイッチELISA

1つの態様において、固相にコンジュゲートさせた薬物を捕捉分子として使用し、そして検出可能な標識にコンジュゲートさせた薬物をトレーサー分子として使用する。

【0085】

サンドイッチELISAにおいて、抗薬物抗体は、その二価構造に因り、捕捉分子とトレーサー分子との間に橋を形成する。このアッセイフォーマットはまた、架橋ELISAとも称され得る。

20

【0086】

サンドイッチ/架橋ELISAを使用することによって、抗薬物抗体を検出することができる。その分子量とは異なる(例えば、IgG-IgG複合体については約300kDaとは異なる)質量範囲をカバーするSEC画分におけるADAの検出は、ADAがより分子量の高い複合体の一部であったことを示す。

【0087】

- 複合型ELISA

1つの態様において、薬物特異的抗体を捕捉分子として使用し、そして検出可能な標識にコンジュゲートさせた種特異的抗体に対する抗体をトレーサー分子として使用する。

30

【0088】

1つの態様において、固相にコンジュゲートさせた薬物を捕捉分子として使用し、そして検出可能な標識にコンジュゲートさせた種特異的抗体に対する抗体をトレーサー分子として使用する。

【0089】

1つの態様において、固相にコンジュゲートさせた種特異的抗体に対する抗体を捕捉分子として使用し、そして検出可能な標識にコンジュゲートさせた薬物をトレーサー分子として使用する。

40

【0090】

1つの態様において、固相にコンジュゲートさせた種特異的抗体に対する抗体を捕捉分子として使用し、そして検出可能な標識にコンジュゲートさせた薬物特異的抗体をトレーサー分子として使用する。

【0091】

複合型ELISAにおいて、抗薬物抗体-薬物複合体を検出することができる。

【0092】

前臨床試料分析において、薬物特異的捕捉抗体および抗種特異的検出抗体を使用することができる。

【0093】

50

臨床試料分析において、抗イディオタイプ抗体などの薬物に特異的な捕捉分子、および抗種特異的検出抗体を検出することができる。

【0094】

このアッセイは、ADAが薬物に結合しているか否かの情報を提供する。これは、複合体の捕捉のために（薬物とのまたは抗薬物抗体との相互作用のいずれかを介して）、および捕捉された複合体の検出のために（薬物との相互作用が複合体の捕捉のために使用されている場合には、抗薬物抗体との特異的相互作用を介して、または抗薬物抗体が複合体の捕捉のために使用されている場合には薬物との特異的相互作用を介してのいずれかで）、ADA-D複合体の種々の成分を使用することによって達成される。

【0095】

抗薬物抗体は、一般的に、薬物が投与された哺乳動物によって産生される完全長抗体であるので、抗薬物抗体は、哺乳動物に特異的な定常領域を含む。それ故、種特異的定常領域の存在を活用して、抗薬物抗体の結合特異性に関係なく、抗薬物抗体の特異的結合（捕捉または検出）のために種特異的抗体を使用することができる。

【0096】

- 直接型ELISA

1つの態様において、固相にコンジュゲートさせた薬物を捕捉分子として使用し、そして検出可能な標識にコンジュゲートさせた種特異的抗体に対する抗体をトレーサー分子として使用する。

【0097】

1つの態様において、固相にコンジュゲートさせた内在性の薬物の対応物を捕捉分子として使用し、そして検出可能な標識にコンジュゲートさせた種特異的抗体に対する抗体をトレーサー分子として使用する。

【0098】

固定された薬物の内在性対応物および検出のための抗種抗体を含む直接型ELISAを使用することによって、抗薬物抗体を検出し、そしてADAが薬物または内在性対応物に結合するかどうかを特定することができる。さらに、種およびサブタイプ特異的抗体を使用することによって、抗薬物抗体の抗体アイソタイプを決定することができる。

【0099】

結果の評価は、シグナルvsマトリックスのサイズによりなされる。

【0100】

1つの態様において、試料を、捕捉分子および/またはトレーサー分子と共に、16時間~32時間の時間をかけてインキュベーションする。

【0101】

架橋型ELISAは、二重抗原架橋イムノアッセイを使用して、哺乳動物の試料中の、薬物(D)と薬物に対する抗体(抗薬物抗体、ADA)との免疫複合体を免疫学的に測定するための方法である。

【0102】

免疫複合体はさらに、ADA-D複合体と略称される。

【0103】

1つの態様において、試料中のADA-D複合体の免疫学的測定は、捕捉抗体およびトレーサー抗体を含む二重抗原架橋イムノアッセイを使用し、一方の抗体は、哺乳動物のIgに特異的に結合する抗体であり、そして他方の抗体は薬物に特異的に結合する抗体であることを特徴とする。

【0104】

測定の過程で、複合体は、抗哺乳動物Ig抗体とADA-D複合体と抗薬物抗体との間で形成され、そして形成された複合体の量は、ADA-D複合体、薬物および/またはADAの濃度に相関する。

【0105】

1つの態様において、形成されたADA-D複合体の検出のための直接的な試料の分析

10

20

30

40

50

を実施することができる。このようなアッセイにおいて、陽性シグナルは、試料が薬物および抗薬物抗体の両方を含む場合にのみ認められる。

【0106】

1つの態様において、試料分析は、試料を予め決定された量の薬物抗体とブレインキューベーションした後に実施される。このようなアッセイにおいて、陽性シグナルは、試料が、試料中の薬物の有無とは独立して抗薬物抗体を含む場合に認められる。

【0107】

1つの態様において、薬物とそのコンジュゲーション対とのコンジュゲーションは、薬物のアミノ酸骨格のN末端および/または -アミノ基(リジン)、種々のリジンの -アミノ基、カルボキシ -、スルフヒドリル -、ヒドロキシル - および/またはフェノール官能基、および/または薬物の炭水化物構造の糖アルコール基を介した化学結合によって行なわれる。

10

【0108】

1つの態様において、捕捉抗体または薬物は、受動吸着により固相にコンジュゲートし、そしてそれ故、少なくとも2つの異なる抗体部位で固相にコンジュゲートしている。受動吸着は、例えば、Butler, J.E., in "Solid Phases in Immunoassay", page 205-225; Diamandis, E.P. および Christopoulos, T.K. (Editors): Immunoassays (1996) Academic Press San Diegoによって記載されている。

【0109】

1つの態様において、捕捉抗体または薬物は、特異的結合対を介して固定されている。このような結合対(第1成分/第2成分)は、例えば、ストレプトアビジンまたはアビジン/ビオチン、抗体/抗原(例えば、Hermanson, G.T., et al., Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996参照)、レクチン/多糖、ステロイド/ステロイド結合タンパク質、ホルモン/ホルモンレセプター、酵素/基質、IgG/プロテインAおよび/またはGなどである。1つの態様において、捕捉抗体または薬物は、ビオチンにコンジュゲートし、そして固定は、固定されたアビジンまたはストレプトアビジンを介して実施される。

20

【0110】

1つの態様において、トレーサー抗体は、検出可能な標識にコンジュゲートしている。1つの態様において、トレーサー抗体は、特異的結合対を介してコンジュゲートしている。このような結合対(第1成分/第2成分)は、例えば、ストレプトアビジンまたはアビジン/ビオチン、抗体/抗原(例えば、Hermanson, G.T., et al., Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996参照)、レクチン/多糖、ステロイド/ステロイド結合タンパク質、ホルモン/ホルモンレセプター、酵素/基質、IgG/プロテインAおよび/またはGなどである。1つの態様において、トレーサー抗体は、ジゴキシゲニンおよびジゴキシゲニンに対する抗体を介して、検出可能な標識にコンジュゲートしている。あるいは、トレーサー抗体は、ルテニウムビスピリジル複合体のような電気化学発光標識にコンジュゲートしている。

30

【0111】

1つの態様において、前記方法は、二重抗原架橋イムノアッセイを使用してサル種の試料中の薬物に対する抗体(抗薬物抗体、ADA)を免疫学的に測定するためのものである。

40

【0112】

1つの態様において、前記方法は、捕捉分子およびトレーサー分子を含む二重抗原架橋イムノアッセイを使用して哺乳動物の試料中のADAを免疫学的に測定するためのものであり、捕捉分子またはトレーサー分子のいずれかが、哺乳動物のIgGに特異的に結合する抗体であり、そしてそれぞれの他の分子が薬物であることを特徴とする。

【0113】

ADAの免疫学的測定の一つの態様において、捕捉分子は薬物であり、そしてトレーサー分子は、試料が由来する/得られた哺乳動物のIgGに特異的に結合する抗哺乳動物Ig

50

G抗体である。ADAの免疫学的測定の一つの態様において、捕捉分子は、試料が由来する/得られた哺乳動物のIgGに特異的に結合する抗哺乳動物IgG抗体であり、そしてトレーサー分子は薬物である。測定の過程で、複合体は、薬物とADAと抗哺乳動物IgG抗体との間で形成され、そして形成された複合体の量は、ADAの濃度に相関する。ADAの免疫学的測定の一つの態様において、抗哺乳動物IgG抗体は、モノクローナル抗体(抗哺乳動物IgGmAb)である。

【0114】

ポリペプチド、例えば薬物ポリペプチドまたは薬物抗体は、多くの反応性部分、例えばアミノ基(リジン、 ϵ -アミノ基)、チオール基(シスチン、システインおよびメチオニン)、カルボン酸基(アスパラギン酸、グルタミン酸)および糖アルコール基を含む。これらは、表面、タンパク質、ポリマー(例えばPEG、セルロースまたはポリスチロール)、酵素、または結合対のメンバー(例えばAslam M., およびDent, A., Bioconjugation Mac Millan Ref. Ltd. (1999) 50-100参照)のような結合パートナーにカップリングさせるために使用することができる。

10

【0115】

ポリペプチドの最も一般的な反応基の一つは、アミノ酸リジンの脂肪族 ϵ -アミンである。一般的に、ほぼ全てのポリペプチドが、豊富なリジンを含む。リジンアミンは、 $pH 8.0$ ($pK_a = 9.18$) 超で妥当で良好な求核試薬であり、それ故、様々な試薬と容易かつ明瞭に反応して、安定な結合を形成する。ポリペプチド中の別の一般的な反応基は、硫黄含有アミノ酸シスチンおよびその還元生成物のシステイン(またはハーフシスチン)に由来するチオール残基である。システインは遊離チオール基を含み、これはアミンよりも求核性が高く、そして一般的にタンパク質中の最も反応性の高い官能基である。チオールは、一般的に中性 pH で反応性であり、それ故、アミンの存在下で選択的に他の分子とカップリングすることができる。遊離スルフヒドリル基は相対的に反応性であるので、これらの基を有するポリペプチドは、しばしば、それらと共に、その酸化形で、ジスルフィド基またはジスルフィド結合として存在する。シスチンおよびシステインに加えて、いくつかのポリペプチドもまた、アミノ酸のメチオニンを有し、これは、チオエーテル結合中に硫黄を含む。文献は、反応性アミノ基を介して複数のスルフヒドリル基を導入する効率的な方法を提供するための、いくつかのチオラート架橋試薬、例えばTraut試薬(2-イミノチオラン)、スクシンイミジル(アセチルチオ)アセテート(SATA)、またはスルホスクシンイミジル6-[3-(2-ピリジルジチオ)プロピオンアミド]ヘキサノエート(スルホ-LC-SPDP)の使用を報告している。反応性エステル、特にN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)エステルは、アミノ基の修飾のために、とりわけ最も一般的に使用されている試薬である。水性環境における反応に至適な pH は $pH 8.0 \sim 9.0$ である。イソチオシアネートはアミン修飾試薬であり、そしてタンパク質とチオ尿素結合を形成する。それらはポリペプチドのアミンと水溶液中(至適には $pH 9.0 \sim 9.5$)で反応する。アルデヒドは、穏やかな水性条件下で脂肪族および芳香族アミン、ヒドラジンおよびヒドラジドと反応して、イミン中間体(シッフ塩基)を形成する。シッフ塩基を、穏やかなまたは強力な還元剤(例えば水素化ホウ素ナトリウムまたはシアノ水素化ホウ素ナトリウムなど)を用いて選択的に還元して、安定なアルキルアミン結合を導くことができる。アミンを修飾するために使用される他の試薬は、酸無水物である。例えば、ジエチレントリアミンペンタ酢酸無水物(DTPA)は、2つのアミン反応性無水物基を含む、二官能基性のキレート剤である。それは、タンパク質のN末端および ϵ -アミノ基と反応して、アミド結合を形成することができる。無水物環が開環して、配位化合物中の金属に強く結合することのできる多価で金属キレート形成しているアームを作る。

20

30

40

【0116】

ポリペプチド中の別の一般的な反応基は、カルボン酸(アスパラギン酸、グルタミン酸)である。ポリペプチドは、C末端位並びにアスパラギン酸およびグルタミン酸の側鎖にカルボン酸基を含む。コンジュゲートのために、カルボン酸基は通常、水溶性カルボジイ

50

ミドの使用によって反応性エステルに変換され、そして、アミン、ヒドラジドまたはヒドラジンなどの求核試薬と反応させる。アミン含有試薬は、ポリペプチド上の他のアミンの存在下で活性化カルボン酸と選択的に反応するように弱塩基性であるべきである。ポリペプチド架橋は、pHが8.0を超えて上昇する場合に起こり得る。

【0117】

過ヨウ素酸ナトリウムを使用して、炭水化物部分の中の糖のアルコール部分をアルデヒドへと酸化することができる。各アルデヒド基を、カルボン酸について記載されているように、アミン、ヒドラジド、またはヒドラジンと反応させることができる。

【0118】

チオール反応性試薬は、ポリペプチド上のチオール基に結合して、チオエーテル結合した生成物を形成するものである。これらの試薬は、僅かに酸性から中性pHで迅速に反応し、それ故、アミン基の存在下で選択的に反応することができる。ハロアセチル誘導体、例えばヨードアセトアミドはチオエーテル結合を形成し、そしてこれはチオール修飾のための試薬である。反応はシステイン基で起こり、このシステイン基は内在するものであるか、または、ポリペプチドの種々の位置におけるシスチンのジスルフィドの還元から生じたもののいずれかである。さらに有用な試薬はマレイミドである。マレイミドとチオール反応試薬の反応は、本質的にヨードアセトアミドと同じである。マレイミドは、僅かに酸性から中性pHで迅速に反応する。

10

【0119】

アミン、ヒドラジド、およびヒドラジンは、アルデヒドおよびカルボン酸に反応性の試薬である（アミド、ヒドラゾンまたはアルキルアミン結合の形成）。アミン、ヒドラジドおよびヒドラジンは、水溶性カルボジイミドによるカルボキシル基の活性化後、ポリペプチドのカルボン酸に結合することができる。アミン含有試薬は、より塩基性の高いリジンの - アミンの存在下でカルボジイミド活性化ポリペプチドと選択的に反応して安定なアミド結合を形成するために、弱塩基性でなければならない。ポリペプチド上の炭水化物残基の過ヨウ素酸塩による酸化によりポリペプチド上に生成され得るアルデヒド基との反応において、シッフ塩基中間体が形成され、これはシアノ水素化ホウ素ナトリウム（穏やかおよび選択的）または水素化ホウ素ナトリウム（強力）の水溶性還元剤を用いての中間体の還元を通して、アルキルアミンへと還元され得る。

20

【0120】

図1には、薬物ADA-D複合体の形成の動態が示されている（1mgの薬物および1mgのADA）。時間が経てば経つほど、より高次の複合体が形成され、例えば、1:1の薬物:ADA複合体から出発して、1:2の薬物:ADA複合体を介して、1:3の薬物:ADA複合体となることが分かる（時点は0分、50分、100分、160分、200分）。さらなるADAの添加により、試料の組成はさらに、より高い分子量の複合体へとシフトし得、モノマー薬物のピークは減少し得る（図2）。

30

【0121】

図3には、本明細書において報告された方法を用いて得られた、例示的な再構成されたSEC図（y軸はELISAのODである）およびELISAの結果が示されている。図4には、試料201の再構成されたSECの拡大表示が示され、Y軸は一定を維持する。それによると、試料組成の差が認められる。

40

【0122】

以下の略称を本明細書において使用する：

ABTS	2, 2'-アジノ-ジ-[3-エチルベンゾチアゾリンスルホネート(6)]ジアンモニウム
Ab	抗体
ADA	抗薬物抗体
Bi	ビオチン
CoA	分析証明書
Conc.	濃度

50

C P P	カニクイザルのプールされたブランク血漿
D i l .	希釈
E L I S A	酵素結合イムノソルベントアッセイ
H R P	セイヨウワサビペルオキシダーゼ
m A b	モノクローナル抗体
M T P	マイクロタイタープレート
O D	吸光度
P B S	リン酸緩衝食塩水
r p m	毎分回転数
R T	室温 (+ 1 5 ~ + 2 5)
R T U	使用準備のできた
S A	ストレプトアビジン
S E C	サイズ排除クロマトグラフィー

10

【 0 1 2 3 】

以下の実施例は、本発明の理解を助けるために提供され、その真の範囲は添付の特許請求の範囲に示されている。本発明の精神から逸脱することなく、示された手順を改変できることが理解される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 2 4 】

【 図 1 】 薬物 A D A - D 複合体 (1 mg の薬物および 1 mg の A D A) の形成の動態。

20

【 図 2 】 A D A がさらに添加された図 1 に示されたような動態。

【 図 3 】 本明細書において報告された方法を用いて得られた、例示的な再構成された S E C 図および E L I S A の結果。

【 図 4 】 図 3 で示された再構成された S E C の拡大表示。

【 図 5 】 5 匹のサルに適用された薬物の濃度経過 (用量 = 1 0 0 mg/kg、反復適用、試験の 1 7 日目に適用)。

【 図 6 】 I g G 沈着陽性動物 (半定量評価)。

【 0 1 2 5 】

実施例 1

カニクイザル試験の試料の分析

30

カニクイザル試験から得られた 2 7 個の血漿試料を、投与された薬物に対する抗薬物抗体 (A D A) を含む複合体の検出のために分析した。さらに、複合体のサイズの評価を実施した。

【 0 1 2 6 】

分析は、サイズ排除クロマトグラフィー (S E C) および酵素結合イムノソルベントアッセイ (E L I S A) を含む 2 工程法を使用して実施された。

【 0 1 2 7 】

存在し得る複合体のサイズに依存した分離を、S E C、続いて、S E C 溶出液の分画 (1 分間ずつの分画) によって実施し、これはマルチプレックス式の S E C 分析を可能とする。なぜなら、各画分を、種々の E L I S A によって分析できるからである。回収された画分における投与された薬物に対する A D A の検出および A D A - D 複合体の存在の検出は、2 つの異なる E L I S A によって行なわれた。1 つは、捕捉のためのビオチニル化薬物および抗カニクイザル I g G 特異的検出抗体を使用することによって、A D A を検出するように設計され (A D A アッセイ)、2 番目のアッセイは、薬物に特異的な捕捉分子および抗カニクイザル I g G 特異的検出抗体を使用することによって、A D A - D 複合体を検出するように設計されている。

40

【 0 1 2 8 】

カニクイザル血漿試料は、主要な群および回復群の動物から回収した。第 1 群 : プラセボ群 (試料 0 1、0 2、0 3、0 4、0 5、0 6)、第 2 群 : 基本的な用量 (試料 0 7、0 8、0 9、1 0、1 1、1 2)、第 3 群 : 基本的な用量の 2 倍 (試料 1 3、1 4、1 5

50

、16、17、18)、第4群：基本的な用量の4倍(試料19、20、21、22、23、24、25、26、27)。

【0129】

分画時間の選択は、サイズ情報の分解能を規定する。分画サイズは1分間であった。いくつかの画分のELISA結果を合わせて、情報を「高分子量、中間分子量、および低分子量の画分」へと凝縮した。

【0130】

SEC:

カニクイザルの血漿試料を、BioSuite 450で、13 μmのSECカラムで、約20,000から約7,000,000 Daまでの分子量範囲で分離した。カラム上部におけるタンパク質の望ましくない沈降を回避するために、カニクイザルの血漿をエタノールと混合し(移動相のエタノール組成と同等)、続いて、1分間遠心分離にかけた(カニクイザルの血漿:エタノール(95重量%)の比は約16:1;20,800 rcfでの1分間の遠心分離)。20 μlの試料をHPLCシステム(Agilent 1100)に注入した。UVトレースを、280 nmの波長でモニタリングした。均一溶媒での分離を、移動相としてリン酸緩衝食塩水(PBS)緩衝液中5%エタノールを用いて実施した(25分間0.5 ml/分の流速で、その後、13分間0.75 ml/分の流速で、そして最後の2分間は0.5 ml/分の流速で)。

10

【0131】

SECにより分離した溶出液を分画して、ELISAによる検出を可能とした。1つの態様において、9分(空隙容量)から21分までの溶出時間をカバーする、1分間ずつの分画時間を有する12個の連続画分を回収した。

20

【0132】

それぞれの画分に対応する計算された分子量を以下の表に示す。

【0133】

【表1】

表

画分	保持時間 [分]	分子量 [kDa]
1	9-10	>7000-3515
2	10-11	3515-2285
3	11-12	2285-1486
4	12-13	1486-966
5	13-14	966-628
6	14-15	628-408
7	15-16	408-265
8	16-17	265-173
9	17-18	173-112
10	18-19	112-73
11	19-20	73-47
12	20-21	47-31

30

40

【0134】

ADAアッセイ:

高分子量のSEC画分(150 kDaより大きく、これはIgG/ADAモノマーの質量に等しい)におけるADAの検出は、ADAが、高分子量の複合体の一部であったことを示す。ADAの検出は、ADAアッセイを使用して回収された画分の分析によって実施される。複合体のサイズの特徴付けは、SECの保持時間に基づく。複合体の組成の特徴付けは、それぞれの画分におけるADA-D複合体(ADA-薬物複合体)の存在の分析

50

によって行なわれる。

【0135】

A D A および A D A - D 複合体の検出のために、2つの連続的な E L I S A 法を確立した。

【0136】

A D A の検出のために、S A - M T P のウェルを、ビオチニル化薬物 (D - B i ; c = 1 μg/ml) を用いて1時間かけてコーティングした。コーティング溶液を除去した後、ウェルを、0.05% T w e e n 2 0 を含む 1 × P B S で3回洗浄し、S E C 画分のアリコートを加え、そして振とうしながら M T P 中で一晩インキュベーションする。ウェルを 0.05% T w e e n 2 0 を含む 1 × P B S で3回洗浄した後、ジゴキシゲニン化抗カニクイザル F c 抗体 (< C y n o F c > - D i g , c = 0.1 μg/ml) を加え、そして振とうしながら1時間インキュベーションする。ウェルを 0.05% T w e e n 2 0 を含む 1 × P B S で3回洗浄した後、H R P (ポリ) F a b フラグメント (5 m U) にコンジュゲートさせた抗ジゴキシゲニン抗体を加え、そして振とうしながら1時間インキュベーションする。ウェルを 0.05% T w e e n 2 0 を含む 1 × P B S で3回洗浄した後、A B T S 溶液を加え、そして発色をモニタリングする (測定波長 4 0 5 nm ; 基準波長 4 9 0 nm) 。

10

【0137】

A D A - D 複合体の検出のために、S A - M T P のウェルを、ビオチニル化抗薬物抗体 (< 薬物 > - B i : c = 2 μg/ml) を用いて1時間かけて振とうしながらコーティングする。コーティング溶液を除去した後、ウェルを 0.05% T w e e n 2 0 を含む 1 × P B S で3回洗浄した後、S E C 画分のアリコートを加え、そして M T P 中で1時間かけて振とうしながら複合体の検出のためにインキュベーションする。溶液を除去した後、ウェルを、0.05% T w e e n 2 0 を含む 1 × P B S で3回洗浄した後、ジゴキシゲニン化抗カニクイザル F c 抗体 (< C y n o - F c > - D i g) 溶液を加え (c = 0.1 μg/ml) 、そして振とうしながら1時間インキュベーションする。溶液を除去した後、ウェルを、0.05% T w e e n 2 0 を含む 1 × P B S で3回洗浄した後、抗ジゴキシゲニン抗体 - H R P コンジュゲート (ポリ) F a b フラグメント溶液 (5 m U) を加え、そして振とうしながらインキュベーションする。ウェルを 0.05% T w e e n 2 0 を含む 1 × P B S で3回洗浄した後、A B T S 溶液を加え、そして発色をモニタリングする (測定波長 4 0 5 nm ; 基準波長 4 9 0 nm) 。

20

30

【0138】

O D シグナルに基づいたカットオフ値 (これを超える S E C 画分の結果は、A D A (A D A アッセイ) または A D A - D 複合体 (A D A - D アッセイ) の存在について陽性と定義される) は、試験プラセボ試料の分析に基づいて定義された。

【0139】

A D A アッセイおよび A D A - D アッセイについての結果を、以下の表に示す (E L I S A の結果は、プラセボ試料の画分の分析の O D 値として列挙される (上の部分 : A D A アッセイ ; 下の部分 : A D A - D アッセイ)) 。

【0140】

40

【表 2】

表

ADA アッセイ

画分/保持時間 [分]

試料	9-10	10-11	11-12	12-13	13-14	14-15	15-16	16-17
1	0.07	0.08	0.09	0.10	0.11	0.09	0.10	0.11
2	0.08	0.13	0.14	0.13	0.13	0.13	0.12	0.14
3	0.10	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.13
4	0.08	0.08	0.08	0.10	0.10	0.10	0.10	0.12
5	0.08	0.07	0.09	0.09	0.10	0.10	0.10	0.12
6	0.07	0.07	0.08	0.12	0.09	0.10	0.09	0.11

10

ADA-D アッセイ

画分/保持時間 [分]

試料	9-10	10-11	11-12	12-13	13-14	14-15	15-16	16-17
1	0.04	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.04	0.04
2	0.04	0.04	0.05	0.08	0.05	0.04	0.05	0.06
3	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
4	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04
5	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04
6	0.04	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04

20

【0141】

これらのデータに基づいて、ADA アッセイについてはOD 0.20のカットオフ値が定められ、ADA-DアッセイについてはOD 0.10のカットオフ値が定められ、これは分析画分におけるブランクシグナル平均の約2倍を示す。

【0142】

さらなる半定量評価のために、以下の表に示される数値を定義した（ADA - アッセイ（左）およびADA-Dアッセイ（右）についてのカットオフ値（OD））。

30

【0143】

【表 3】

表

シグナル [OD]	結果
0.20 未満	陰性
0.20 - 1.00	陽性 (中間のシグナル)
1.00 を超える	陽性 (高いシグナル)

シグナル [OD]	結果
0.10 未満	陰性
0.10 - 0.75	陽性 (中間のシグナル)
0.75 を超える	陽性 (高いシグナル)

40

【0144】

試験から得られた27個のカニクイザル血漿試料を、投与された薬物に対する抗薬物抗体（ADA）を含む複合体の検出のために分析した。さらに、複合体のサイズの評価を実施した。

【0145】

画分1～3の結果を合わせて高分子量複合体画分として示され、画分4～6は中間分子量複合体画分として示され、そして画分7～8は低分子量複合体画分として示される。試験試料の画分の分析のELISA結果の概要を、次の表に提示する（左：ADAアッセイ；右：ADA-Dアッセイ；第1群はプラセボ群であり；第2群は基本的な用量であり；

50

第3群は基本的な用量の2倍であり；第4群は基本的な用量の4倍である）。

【 0 1 4 6 】

【 表 4 】

表

群	試料	ADA アッセイ (<Cyno Fc>)			ADA-D アッセイ		
		高 分子量複合体	中間	低	高	中間	低
1	1	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	2	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	3	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	4	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	5	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	6	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
2	7	neg./pos.	pos.	hpos.	neg.	pos.	pos.
	8	pos.	hpos.	hpos.	neg.	neg.	pos.
	9	pos.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.
	10	pos.	hpos.	hpos.	neg.	pos.	pos.
	11	pos.	hpos.	hpos.	neg.	pos.	pos.
	12	pos.	hpos.	hpos.	neg.	pos.	pos.
3	13	pos.	hpos.	hpos.	neg.	pos.	pos.
	14	pos.	hpos.	hpos.	neg.	pos.	pos.
	15	pos.	hpos.	hpos.	neg.	pos.	pos.
	16	pos./hpos.	hpos.	hpos.	neg.	pos.	pos.
	17	hpos.	hpos.	hpos.	neg.	pos.	pos.
	18	hpos.	hpos.	hpos.	neg.	pos.	pos.
4	19	hpos.	hpos.	hpos.	pos.	pos.	hpos.
	20	pos.	pos.	hpos.	pos.	pos.	pos.
	21	pos.	pos.	hpos.	neg.	pos.	pos.
	22	pos.	pos.	pos.	neg.	neg.	pos.
	23	neg./pos.	pos.	hpos.	neg.	neg.	pos.
	24	neg.	pos.	hpos.	neg.	neg.	neg.
	25	pos.	hpos.	hpos.	neg.	pos.	pos.
	26	pos.	pos.	hpos.	neg.	pos.	hpos.
	27	neg.	pos.	hpos.	neg.	pos.	pos.

neg. = 陰性/カットオフ値未満; pos. = 陽性; hpos. = 高度に陽性

【 0 1 4 7 】

10

20



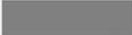
30

【表 5】

表

群	試料	ADA アッセイ (<Cyno Fc>)			ADA-D アッセイ		
		高 分子量複合体	中間	低	高 分子量複合体	中間	低
1	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						
2	7	高度に陽性	陽性	陰性			
	8	高度に陽性	陽性	陰性			
	9	高度に陽性	陽性	陰性			
	10	高度に陽性	陽性	陰性			
	11	高度に陽性	陽性	陰性			
	12	高度に陽性	陽性	陰性			
3	13	高度に陽性	陽性	陰性			
	14	高度に陽性	陽性	陰性			
	15	高度に陽性	陽性	陰性			
	16	高度に陽性	陽性	陰性			
	17	高度に陽性	陽性	陰性			
	18	高度に陽性	陽性	陰性			
4	19	高度に陽性	陽性	陰性			
	20	高度に陽性	陽性	陰性			
	21	高度に陽性	陽性	陰性			
	22	高度に陽性	陽性	陰性			
	23	高度に陽性	陽性	陰性			
	24	陰性	陽性	陰性			
	25	高度に陽性	陽性	陰性			
	26	高度に陽性	陽性	陰性			
	27	陰性	陽性	陰性			

シグナル [OD] 結果

-  陰性
-  陽性 (中間のシグナル)
-  高度に陽性 (高度なシグナル)

【 0 1 4 8 】

前の表に示されている試験試料の画分の分析の詳細な E L I S A 結果を、次の表に示す (上の部分: ADA アッセイ; 下の部分: ADA-D アッセイ: 第 1 群はプラセボ群であり; 第 2 群は基本的な用量であり; 第 3 群は基本的な用量の 2 倍であり; 第 4 群は基本的な用量の 4 倍である)。

【 0 1 4 9 】

10

20

30

40

【表 6】

表

ADA アッセイ (<Cyno Fc>)

群	試料	1	2	3	4	5	6	7	8
		画	画	画	画	画	画	画	画
		高分子量複合体			中間分子量複合体			中間分子量複合体	
1	1	0.074	0.083	0.091	0.097	0.105	0.094	0.098	0.111
	2	0.081	0.125	0.145	0.132	0.125	0.130	0.121	0.141
	3	0.103	0.119	0.122	0.123	0.120	0.120	0.123	0.130
	4	0.081	0.079	0.085	0.098	0.098	0.099	0.104	0.117
	5	0.076	0.075	0.085	0.090	0.099	0.097	0.100	0.120
	6	0.067	0.068	0.075	0.121	0.091	0.104	0.092	0.108
2	7	0.129	0.259	0.303	0.470	0.899	0.959	1.259	1.710
	8	0.516	0.674	0.667	0.712	0.836	1.282	1.539	1.899
	9	0.753	0.656	0.656	0.579	0.618	0.735	0.819	0.963
	10	0.618	0.672	0.644	0.959	1.255	1.360	1.664	1.844
	11	0.307	0.328	0.312	0.633	1.115	1.674	1.986	2.119
	12	0.467	0.536	0.622	0.840	1.228	1.449	1.723	1.266
3	13	0.656	0.604	0.692	0.833	1.344	1.701	2.127	2.337
	14	0.577	0.774	0.482	0.911	1.101	1.422	1.877	2.072
	15	0.595	0.612	0.555	0.944	1.277	1.886	2.169	2.170
	16	0.440	0.808	1.116	1.573	1.826	1.891	1.955	2.022
	17	1.610	1.562	1.521	1.544	1.617	1.672	1.844	2.029
	18	1.232	1.324	1.239	1.378	1.447	1.711	1.878	1.941
4	19	1.251	1.485	1.552	1.645	1.696	1.783	1.894	1.984
	20	0.268	0.390	0.392	0.495	0.484	0.795	1.639	2.118
	21	0.253	0.423	0.450	0.528	0.629	0.999	1.518	2.210
	22	0.236	0.233	0.214	0.222	0.228	0.259	0.317	0.550
	23	0.158	0.198	0.220	0.250	0.288	0.466	0.884	1.860
	24	0.023	0.048	0.081	0.124	0.231	0.457	0.826	1.294
	25	0.383	0.776	0.891	0.896	0.946	1.170	1.649	2.013
	26	0.173	0.272	0.265	0.289	0.409	0.692	1.214	1.999
	27	0.128	0.167	0.204	0.187	0.228	0.345	0.559	1.127

10

20

30

【表 7】

表

ADA-D アッセイ

群	試料	高分子量複合体			中間分子量複合体			中間分子量複合体	
		1 画	2 画	3 画	4 画	5 画	6 画	7 画	8 画
1	1	0.035	0.034	0.031	0.037	0.035	0.034	0.039	0.043
	2	0.036	0.041	0.051	0.077	0.053	0.043	0.048	0.056
	3	0.035	0.038	0.037	0.044	0.040	0.039	0.041	0.043
	4	0.028	0.029	0.029	0.034	0.030	0.030	0.034	0.036
	5	0.028	0.029	0.027	0.032	0.031	0.032	0.036	0.038
	6	0.035	0.034	0.033	0.040	0.036	0.036	0.044	0.044
2	7	0.038	0.053	0.060	0.097	0.116	0.166	0.206	0.211
	8	0.033	0.038	0.035	0.042	0.048	0.064	0.097	0.123
	9	0.035	0.042	0.038	0.049	0.046	0.051	0.068	0.085
	10	0.037	0.048	0.057	0.168	0.199	0.155	0.163	0.155
	11	0.051	0.064	0.065	0.089	0.139	0.246	0.322	0.376
	12	0.032	0.037	0.044	0.071	0.097	0.134	0.156	0.154
3	13	0.052	0.060	0.069	0.111	0.185	0.388	0.478	0.436
	14	0.036	0.042	0.050	0.075	0.133	0.244	0.339	0.460
	15	0.047	0.052	0.060	0.104	0.174	0.386	0.673	0.549
	16	0.043	0.055	0.061	0.096	0.158	0.258	0.358	0.518
	17	0.052	0.056	0.058	0.073	0.077	0.140	0.217	0.178
	18	0.034	0.042	0.043	0.059	0.071	0.136	0.176	0.207
4	19	0.073	0.122	0.144	0.186	0.236	0.417	0.820	0.748
	20	0.333	0.392	0.364	0.371	0.358	0.374	0.435	0.431
	21	0.044	0.063	0.066	0.079	0.099	0.165	0.315	0.457
	22	0.044	0.050	0.052	0.061	0.061	0.070	0.092	0.137
	23	0.036	0.040	0.044	0.054	0.062	0.100	0.206	0.290
	24	0.031	0.033	0.032	0.037	0.038	0.044	0.058	0.074
	25	0.047	0.055	0.060	0.100	0.116	0.108	0.151	0.188
	26	0.040	0.055	0.055	0.074	0.119	0.256	1.574	2.739
	27	0.085	0.082	0.084	0.095	0.114	0.176	0.298	0.380

10

20

30

【0151】

薬物に対するADAは、処置動物（第2～4群）の全ての分析試料において検出することができた。試料間の差異を、シグナル強度に関して、並びに、高分子量画分の陽性度に関して観察する。陰性結果が、以下の試料の特定の画分に観察された：試料7 / 画分1；試料23 / 画分1～2、試料24 / 画分1～4；試料26 / 画分1；試料27 / 画分1～3。

40

【0152】

ADA-D複合体を、処置動物の2つの試料（試料10、24）を除く全ての試料で検出することができた。試料間の差異を、シグナル強度に関して観察する。試料19および試料20の例外を除いて、全ての試料が、高分子量画分（画分1～3）に陰性の結果を示した。

【0153】

50

実施例 2

SEC - ELISA 分析と薬物動態との相関

5 個のカニクイザル血漿試料を、投与前および以下の時点で、すなわち 9 日目、13 日目、21 日目、23 日目（全ての試料）および 63 日目（動物 2004、2005、3002、3105）に回収し、そして投与された薬物に対する抗薬物抗体（ADA）を含む複合体の検出のために分析した。さらに、投与された薬物の薬物動態が観察された複合体のサイズの評価を実施した。

【0154】

分析を、実施例 1 に報告したようなサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）および酵素結合イムノソルベントアッセイ（ADA - D アッセイおよび ADA アッセイ）を含む 2 工程の方法を使用して実施した。投与された薬物の薬物動態との相関のために、ADA - D アッセイの結果のみを使用した。

【0155】

カニクイザル血漿試料を、100 mg/kg の薬物の投与された 5 匹のカニクイザルから回収した。

【0156】

血漿分析から、2003 番および 2005 番のカニクイザルと比較して、2001 番、2002 番および 2004 番のカニクイザルにおいては、より急速な血清中クリアランスを観察できたことが分かる（図 5 参照）。

【0157】

SEC 分離の溶出液を、9 分（空隙容量）から 21 分までの溶出時間をカバーする、1 分間ずつの分画時間で分画する。それぞれの画分に対応する計算された分子量を上の実施例 1 に記載のように使用する。

【0158】

OD シグナルに基づいたカットオフ値（これを超える SEC 画分の結果は、ADA（ADA アッセイ）または ADA - D 複合体（ADA - D アッセイ）の存在について陽性と定義される）は、試験動物の投与前試料の分析に基づいて定義された。

【0159】

ADA アッセイおよび ADA - D アッセイの結果を以下の表に示す（ELISA 結果はプラセボ試料の画分の分析の OD 値として列挙される（上の部分：ADA アッセイ；下の部分：ADA - D アッセイ））。

【0160】

10

20

30

【表 8】

表

ADA-アッセイ

		画分/保持時間 [分]							
類人猿の番号	時間	9-10	10-11	11-12	12-13	13-14	14-15	15-16	16-17
2001	t=0	0.031	0.032	0.031	0.036	0.039	0.042	0.043	0.045
	t=9d	0.043	0.053	0.050	0.049	0.051	0.050	0.053	0.052
	t=13d	0.140	0.129	0.103	0.085	0.091	0.099	0.093	0.092
	t=21d	0.471	0.566	0.557	0.691	0.898	1.064	1.419	1.497
	t=23d	0.284	0.461	0.470	0.803	1.539	1.906	2.039	2.113
類人猿の番号	時間	9-10	10-11	11-12	12-13	13-14	14-15	15-16	16-17
2002	t=0	0.032	0.040	0.035	0.043	0.045	0.050	0.055	0.053
	t=9d	0.043	0.044	0.041	0.044	0.049	0.049	0.049	0.054
	t=13d	0.116	0.98	0.085	0.083	0.083	0.117	0.083	0.065
	t=21d	1.259	1.506	1.627	1.840	1.932	1.909	2.009	2.010
	t=23d	0.185	0.401	0.945	1.573	1.991	2.106	2.205	2.149
類人猿の番号	時間	9-10	10-11	11-12	12-13	13-14	14-15	15-16	16-17
2003	t=0	0.035	0.040	0.034	0.035	0.038	0.042	0.054	0.067
	t=9d	0.040	0.040	0.037	0.042	0.045	0.042	0.055	0.071
	t=13d	0.046	0.045	0.060	0.089	0.107	0.146	0.188	0.299
	t=21d	0.191	0.150	0.123	0.125	0.175	0.177	0.167	0.423
	t=23d	0.097	0.180	0.551	1.393	1.622	1.915	1.939	1.969
類人猿の番号	時間	9-10	10-11	11-12	12-13	13-14	14-15	15-16	16-17
2004	t=0	0.042	0.050	0.042	0.042	0.044	0.050	0.069	0.121
	t=9d	0.043	0.053	0.054	0.054	0.054	0.050	0.070	0.108
	t=13d	0.106	0.120	0.218	0.693	1.250	1.512	1.429	1.781
	t=21d	0.774	0.679	0.842	0.812	1.304	1.724	1.998	2.273
	t=23d	0.253	0.338	0.375	0.763	1.500	1.769	2.020	2.176
	t=63d	0.059	0.063	0.067	0.086	0.090	0.108	0.223	0.870
類人猿の番号	時間	9-10	10-11	11-12	12-13	13-14	14-15	15-16	16-17
2005	t=0	0.046	0.054	0.047	0.050	0.056	0.062	0.067	0.075
	t=9d	0.045	0.054	0.050	0.053	0.053	0.048	0.047	0.053
	t=13d	0.046	0.068	0.061	0.065	0.056	0.064	0.060	0.067
	t=21d	1.769	1.524	1.823	1.256	1.294	1.312	1.572	1.393
	t=23d	0.136	0.144	0.199	0.608	0.867	1.111	1.387	1.471
	t=63d	0.604	0.635	0.811	0.552	0.444	0.573	0.477	0.791

10

20

30

【 0 1 6 1 】

【表 9】

表

ADA-D-アッセイ

		画分/保持時間 [分]							
類人猿の番号	時間	9-10	10-11	11-12	12-13	13-14	14-15	15-16	16-17
2001	t=0	0.074	0.086	0.074	0.083	0.094	0.100	0.097	0.102
	t=9d	0.059	0.105	0.092	0.087	0.084	0.084	0.088	0.087
	t=13d	0.561	0.563	0.268	0.183	0.103	0.086	0.081	0.088
	t=21d	0.121	0.127	0.124	0.143	0.163	0.187	0.247	0.258
	t=23d	0.136	0.160	0.222	0.572	1.481	2.156	1.896	1.247
類人猿の番号	時間	9-10	10-11	11-12	12-13	13-14	14-15	15-16	16-17
2002	t=0	0.087	0.094	0.076	0.085	0.089	0.097	0.102	0.088
	t=9d	0.061	0.081	0.077	0.076	0.073	0.072	0.078	0.079
	t=13d	0.644	0.364	0.223	0.149	0.125	0.092	0.080	0.082
	t=21d	0.174	0.187	0.198	0.253	0.285	0.300	0.392	0.422
	t=23d	0.062	0.090	0.152	0.369	0.725	1.116	1.141	0.476
類人猿の番号	時間	9-10	10-11	11-12	12-13	13-14	14-15	15-16	16-17
2003	t=0	0.078	0.086	0.068	0.069	0.070	0.076	0.088	0.116
	t=9d	0.055	0.066	0.065	0.070	0.068	0.071	0.092	0.135
	t=13d	0.068	0.065	0.063	0.065	0.065	0.069	0.079	0.113
	t=21d	0.361	0.331	0.253	0.227	0.207	0.274	0.296	0.328
	t=23d	0.416	0.412	0.476	0.605	0.410	0.365	0.256	0.301
類人猿の番号	時間	9-10	10-11	11-12	12-13	13-14	14-15	15-16	16-17
2004	t=0	0.086	0.110	0.083	0.090	0.086	0.091	0.121	0.217
	t=9d	0.067	0.119	0.111	0.111	0.100	0.098	0.136	0.220
	t=13d	0.168	0.156	0.245	0.359	0.264	0.224	0.200	0.294
	t=21d	0.129	0.167	0.256	0.174	0.191	0.242	0.403	0.605
	t=23d	0.082	0.095	0.107	0.208	0.483	1.070	1.820	1.490
	t=63d	0.036	0.036	0.038	0.047	0.046	0.046	0.056	0.098
類人猿の番号	時間	9-10	10-11	11-12	12-13	13-14	14-15	15-16	16-17
2005	t=0	0.046	0.057	0.057	0.065	0.075	0.082	0.093	0.110
	t=9d	0.081	0.116	0.114	0.109	0.103	0.097	0.099	0.113
	t=13d	0.142	0.206	0.163	0.173	0.165	0.165	0.182	0.165
	t=21d	0.307	0.291	0.262	0.269	0.269	0.258	0.303	0.276
	t=23d	0.217	0.213	0.215	0.236	0.178	0.143	0.136	0.139
	t=63d	0.036	0.039	0.036	0.041	0.040	0.043	0.046	0.055

【 0 1 6 2 】

10

20

30

40

【表 10】

表

OD との相関

類人猿の 番号	時間	ADA-アッセイ		ADA-D-アッセイ	
		OD の合計	OD の合計 (前投与を行な わない全ての日 および 63 日目)	OD の合計	OD の合計 (前投与を行な わない全ての日 および 63 日目)
2001	t=0	0.297	18.0	0.708	11.9
	t=9d	0.400		0.685	
	t=13d	0.830		1.932	
	t=21d	7.161		1.369	
	t=23d	9.614		7.868	
2002	t=0	0.352	26.7	0.716	8.7
	t=9d	0.371		0.594	
	t=13d	0.729		1.756	
	t=21d	14.090		2.210	
	t=23d	11.552		4.129	
2003	t=0	0.344	12.5	0.648	6.7
	t=9d	0.370		0.620	
	t=13d	0.977		0.584	
	t=21d	1.529		2.275	
	t=23d	9.664		3.240	
2004	t=0	0.457	27.2	0.883	10.3
	t=9d	0.484		0.960	
	t=13d	7.107		1.909	
	t=21d	10.404		2.065	
	t=23d	9.139		5.353	
	t=63d	1.565		0.401	
	2005	t=0		0.456	
t=9d		0.402	0.830		
t=13d		0.485	1.360		
t=21d		11.942	2.234		
t=23d		5.920	1.475		
t=63d		4.885	0.333		

10

20

30

40

図5から、増強されたクリアランスが、動物2001、2002および2004に観察されることが分かる。これらの動物のために、ADA-Dアッセイの得られたODの合計（前投与を行わない全ての日および63日目）のシグナルは11.9（動物2001）、8.7（動物2002）および10.3（動物2004）である。これらのシグナルは、明らかに、6.7（動物2003）および5.9（動物2004）のシグナルを超えており、これは増強されたクリアランスを示さなかった。従って、漸増量のADA-薬物複合体は、より速い血漿クリアランスを示す。

【0164】

実施例3

SEC-E L I S A分析とI g Gの系球体への沈着の所見との相関

10

t = 21日目およびt = 23日目の各アッセイ（ADA-アッセイおよびADA-Dアッセイ）および各投与群（A群およびB群）について、9分から12分（ブロック1）、12分から15分（ブロック2）および15分から17分（ブロック3）の保持時間ブロックの画分のシグナルを要約する（ADA-DアッセイおよびADA-アッセイについて以下の表を参照）。

【0165】

【表11】

表

ADA-D-アッセイ

20

類人猿の番号/群	時間	ブロック1	ブロック2	ブロック3
2001/A	t=21d	0.372	0.492	0.505
	t=23d	0.517	4.209	3.143
2002/A	t=21d	0.558	0.838	0.814
	t=23d	0.303	2.210	1.616
2003/A	t=21d	0.944	0.708	0.624
	t=23d	1.304	1.380	0.557
3001/B	t=21d	0.491	0.542	0.562
	t=23d	1.966	4.988	1.652
3003/B	t=21d	0.585	0.801	0.907
	t=23d	0.512	2.324	3.595
3004/B	t=21d	0.522	0.522	0.446
	t=23d	0.493	1.378	1.944

30

【0166】

【表 1 2】

表

ADA-アッセイ

類人猿の番号 /群	時間	ブロック 1	ブロック 2	ブロック 3
2001 / A	t=21d	1.593	2.652	2.916
	t=23d	1.215	4.248	4.152
2002 / A	t=21d	4.392	5.681	4.018
	t=23d	1.530	5.669	4.353
2003 / A	t=21d	0.464	0.476	0.589
	t=23d	0.827	4.930	3.908
3001 / B	t=21d	3.111	3.303	2.554
	t=23d	1.195	4.746	4.253
3003 / B	t=21d	4.174	4.654	4.352
	t=23d	0.882	3.242	4.170
3004 / B	t=21d	3.616	3.783	3.396
	t=23d	0.574	1.870	3.900

10

【 0 1 6 7】

20

時点 t = 2 3 日目で得られた合計されたシグナルを、時点 t = 2 1 日目で得られたシグナルで割ることにより（「指数 1」）、t = 2 3 日目におけるシグナルの減少または上昇が示される。

【 0 1 6 8】

【表 1 3】

表

指数 1 (23 日目/21 日目)

類人猿の番号 /群	ブロック 1 ADA-D	ブロック 2 ADA-D	ブロック 3 ADA-D	ブロック 1 ADA	ブロック 2 ADA	ブロック 3 ADA
2001 / A	1.390	8.554	6.229	0.762	1.602	1.424
2002 / A	0.543	2.638	1.985	0.348	0.998	1.083
2003 / A	1.382	1.950	0.892	1.784	10.356	6.634
3001 / B	4.003	9.211	2.941	0.384	1.437	1.665
3003 / B	0.876	2.903	3.966	0.211	0.697	0.958
3004 / B	0.945	2.642	4.358	0.159	0.494	1.148

30

【 0 1 6 9】

40

ADA - Dアッセイの「指数 1」の値を、ADA - アッセイの「指数 1」の値で割ることにより、「指数 2」の値を得る。ブロック 1 における高い「指数 2」の値は（例えば、2 または 3 を超える）、動物の系球体への沈着を示す。

【 0 1 7 0】

【表 1 4】

表

指数 2 (ADA-D/ADA)

類人猿の番号 /群	ブロック 1	ブロック 2	ブロック 3
2001 / A	1.823	5.341	4.374
2002 / A	1.559	2.644	1.832
2003 / A	0.774	0.188	0.134
3001 / B	10.421	6.411	1.766
3003 / B	4.145	4.168	4.139
3004 / B	5.955	5.346	3.795

10

【 0 1 7 1】

さらに、各投与群およびブロックの「指数 2」の値は、F 検定および T 検定 (5 %) によって統計学的に試験され、群のブロック 1 からブロック 3 の数値 / 平均が異なるか否かを識別する。

【 0 1 7 2】

【表 1 5】

表

指数 2 の平均

20

群	ブロック 1	ブロック 2	ブロック 3
A	1.385	2.724	2.114
B	6.840	5.308	3.233
A と B とは統計学的 に異なる	はい	いいえ	いいえ

【 0 1 7 3】

糸球体への沈着のデータは、全く沈着していない場合「 - 」で、糸球体への沈着が僅かに見られる場合「 (+) 」で、動物に見られる糸球体への沈着の半定量的な差異を有する陽性試料については「 + 」および「 ++ 」でランキングされる。

30

【 0 1 7 4】

【表 1 6】

表

糸球体への沈着

類人猿の番号/群	IgG IF の糸球体への沈着
2001 / A	-
2002 / A	(+)
2003 / A	-
3001 / B	+
3003 / B	++
3004 / B	++

40

【 0 1 7 5】

上の表に列挙した結果は、SEC により分離された免疫複合体と動物の糸球体への沈着との相関を示す。ブロック 1 における高い数値は、動物における糸球体への沈着を示す。A 群の全ての動物は、「 - 」および「 (+) 」とランキングされ、そして B 群の全ての動

50

物は「+」および「++」とランキングされる。これらの群の平均値は統計学的に差異がある。

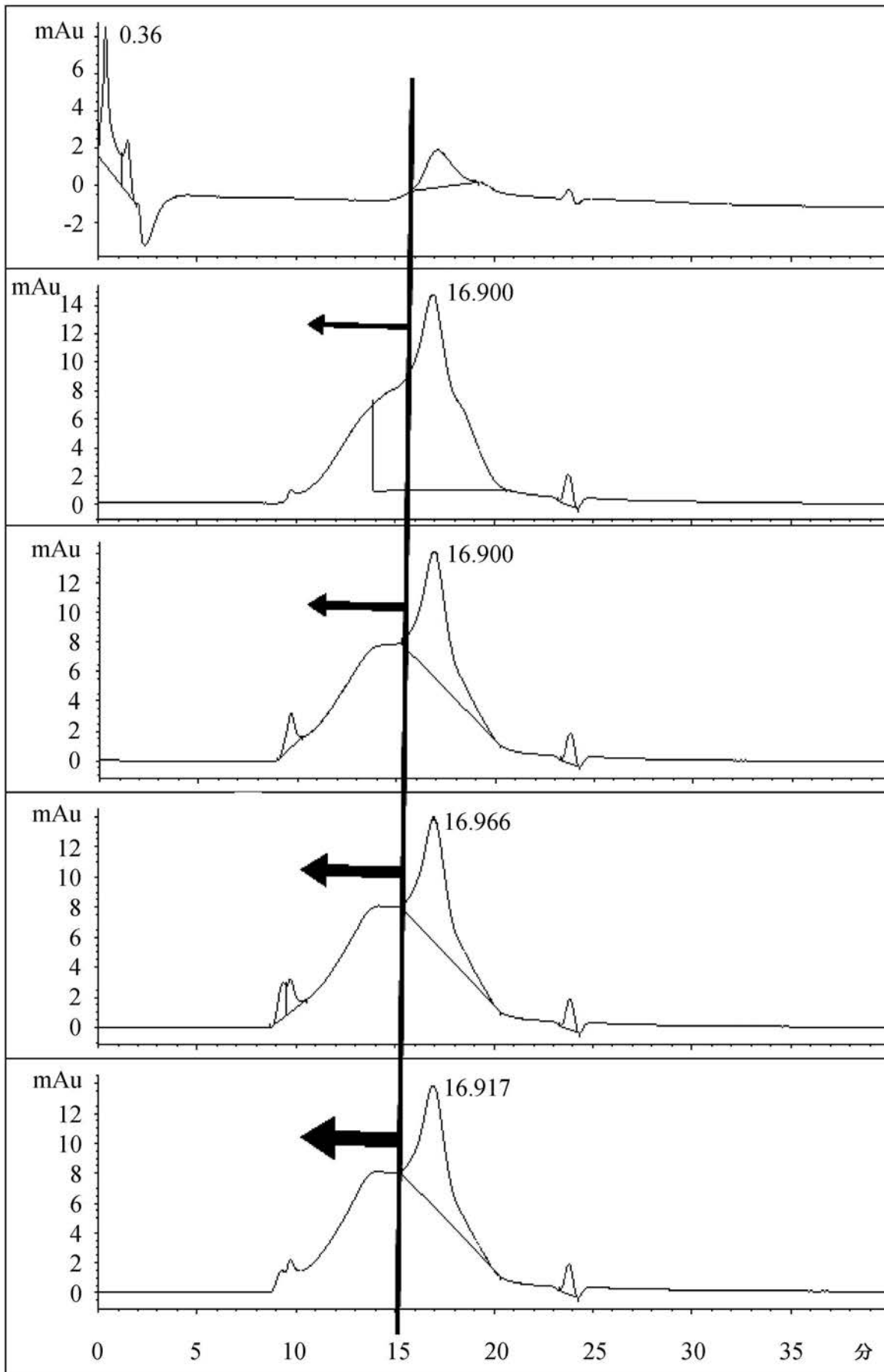
【0176】

「糸球体への沈着」の表に示したように、I g Gの糸球体への沈着の結果間の半定量的な差異が観察され、動物3003および3004がより顕著な沈着を示した。

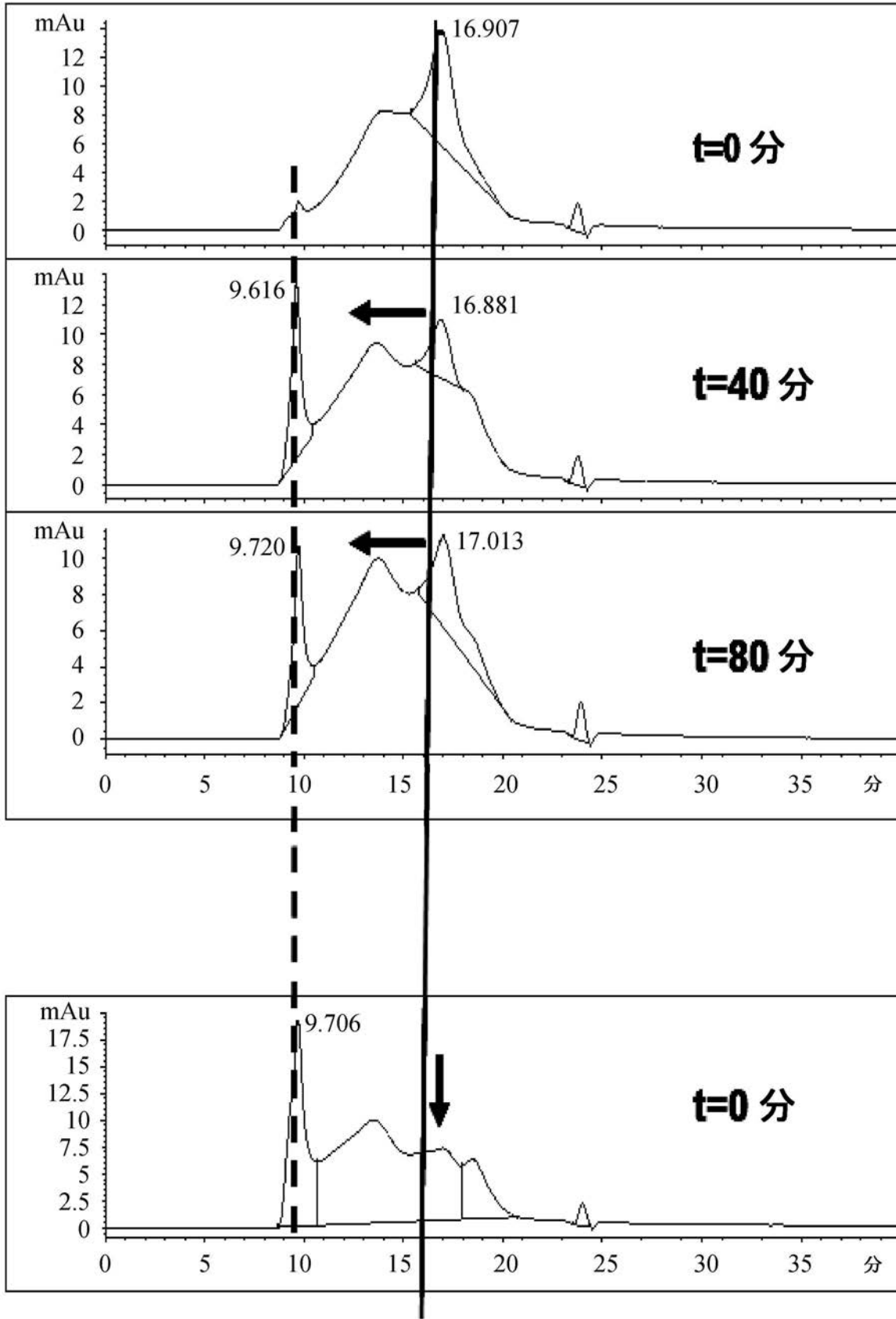
【0177】

A D A - 薬物アッセイおよびA D A - アッセイについて表に示したように、ブロック1のシグナルの合計は、糸球体への沈着の結果と反比例する（図6も参照）。

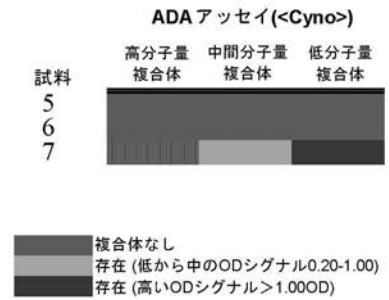
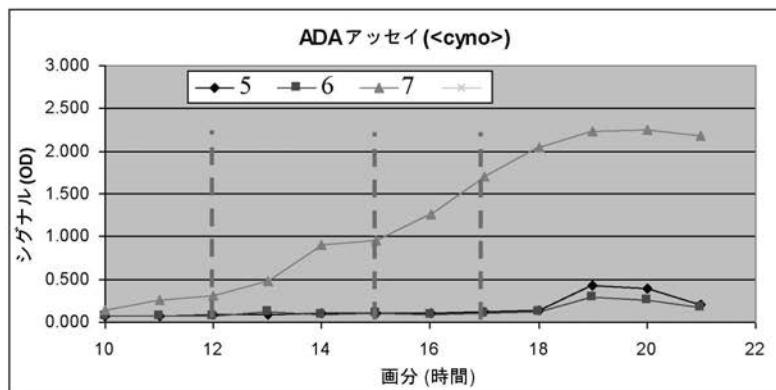
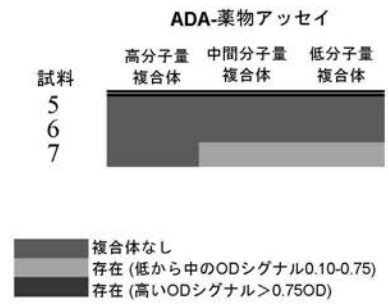
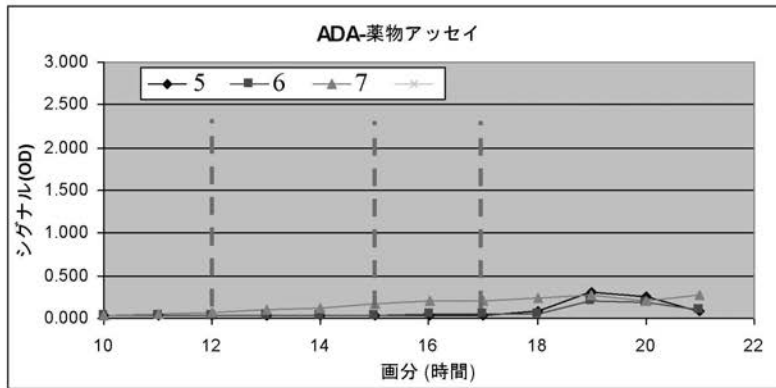
【 図 1 】



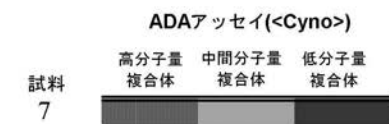
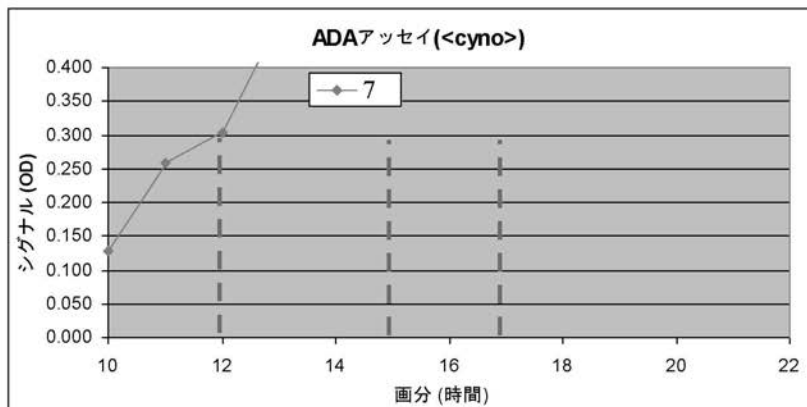
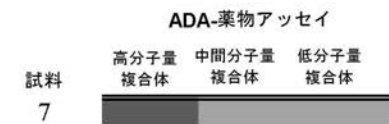
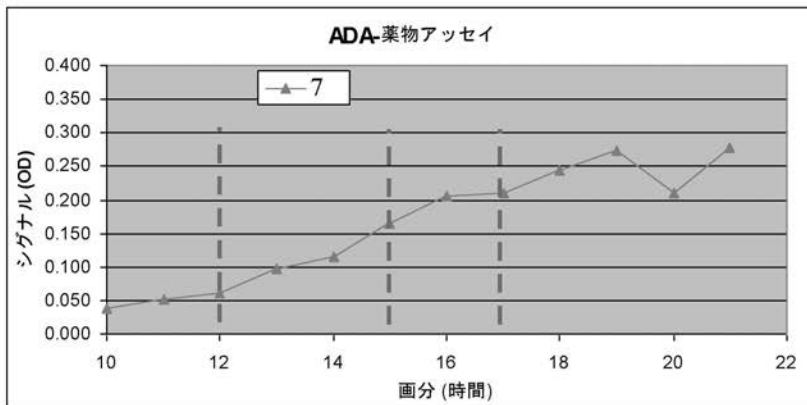
【 図 2 】



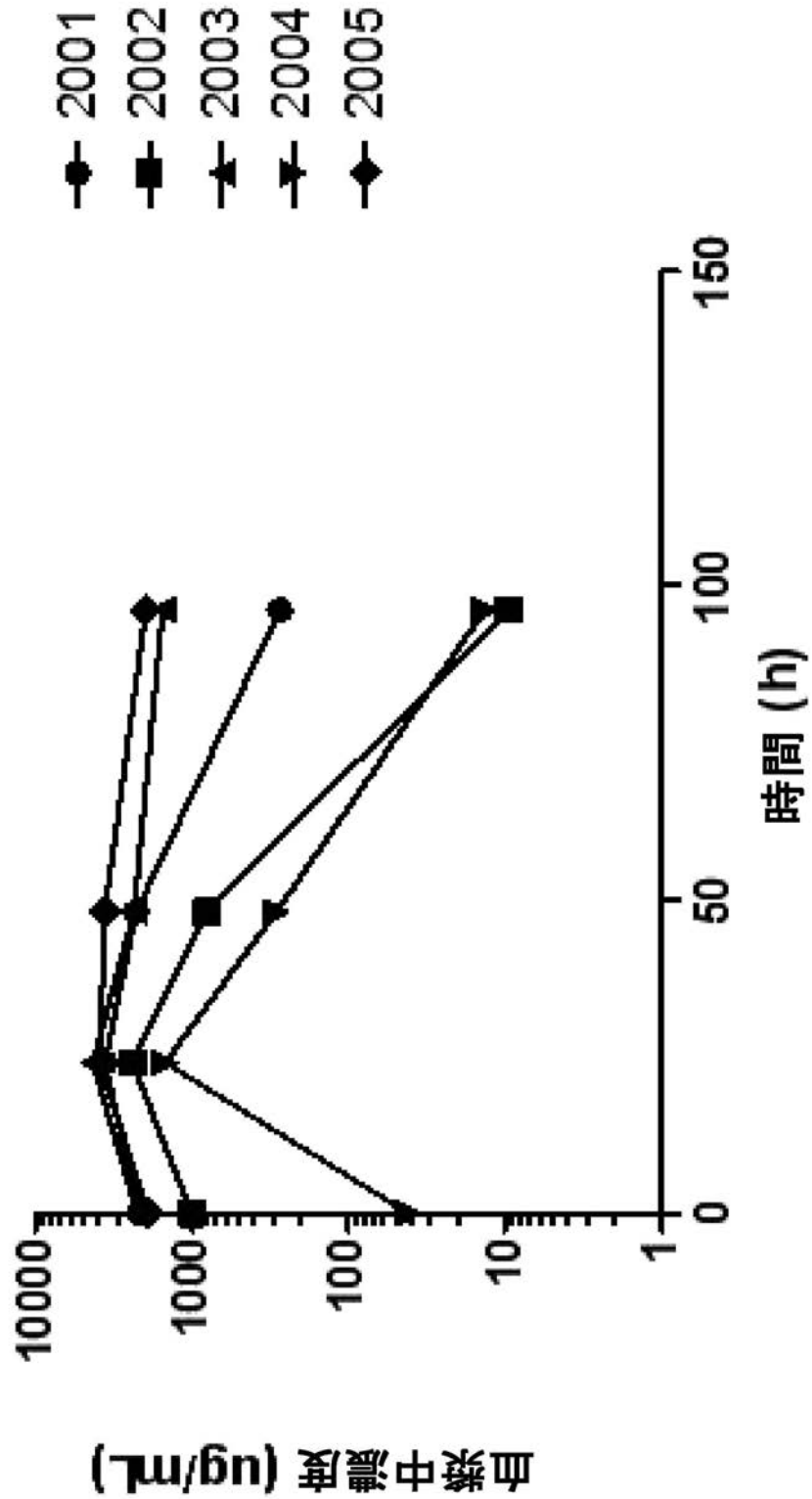
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】





【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/054587

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/564 G01N33/68 G01N33/94 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/031532 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; ESSIG ULRICH [DE]; STUBENRAUCH KAY-GUNNAR [DE]) 20 March 2008 (2008-03-20) cited in the application examples 7, 8, 9; claims 3-8, 11-14; fig. 1, 2, 5, 6; p. 2, l. 10-14; p. 5, l. 8-17 -----	1-15
X	WO 2011/056590 A1 (PROMETHEUS LAB INC [US]; SINGH SHARAT [US]; WANG SHUI LONG [US]; OHRMU) 12 May 2011 (2011-05-12) abstract; example 3 ----- -/--	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 18 June 2013	Date of mailing of the international search report 26/06/2013	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Schindler-Bauer, P	

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2013/054587

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	SHUI-LONG WANG ET AL: "Development and validation of a homogeneous mobility shift assay for the measurement of infliximab and antibodies-to-infliximab levels in patient serum", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 382, no. 1, 4 June 2012 (2012-06-04), pages 177-188, XP028399736, ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/J.JIM.2012.06.002 [retrieved on 2012-06-09] abstract figures 1-3	1-16
X	----- STUBENRAUCH KAY ET AL: "Evaluation of a generic immunoassay with drug tolerance to detect immune complexes in serum samples from cynomolgus monkeys after administration of human antibodies", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS, vol. 52, no. 2, June 2010 (2010-06), pages 249-254, XP002680072, ISSN: 0731-7085 the whole document	1-15
X	----- KNEBA M ET AL: "Chromatofocusing combined with the ELISA technique. A sensitive method for the analysis of immune complexes", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 61, no. 2, 15 July 1983 (1983-07-15), pages 233-243, XP024097469, ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/0022-1759(83)90167-9 [retrieved on 1983-07-15] the whole document	1-16
X	----- WANG SHUI LONG ET AL: "Analysis of Anti-drug Antibodies (ADA) to Adalimumab in Patient Serum Using a Novel Homogeneous Mobility Shift Assay", AMERICAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER SCIENCE INC, US, vol. 105, no. Supl.1, 1 October 2010 (2010-10-01), pages S444-S445, XP009155051, ISSN: 0002-9270 abstract	1-15
	----- -/--	

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2013/054587

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 2 354 792 A1 (BIOMONITOR AS [DK]) 10 August 2011 (2011-08-10) abstract page 19, paragraph 0045 - page 23; figures 1-3 -----	1-15
Y	LAMBERT P H ET AL: "A WHO collaborative study for the evaluation of eighteen methods for detecting immune complexes in serum", JOURNAL OF CLINICAL AND LABORATORY IMMUNOLOGY, TREVIOT-KIMPTON PUBLICATIONS, LONDON, GB, vol. 1, no. 1, 1 January 1978 (1978-01-01) , pages 1-15, XP009161125, ISSN: 0141-2760 the whole document -----	1-15
Y,P	KAY STUBENRAUCH ET AL: "Generic anti-drug antibody assay with drug tolerance in serum samples from mice exposed to human antibodies", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 430, no. 2, 1 November 2012 (2012-11-01), pages 193-199, XP055063008, ISSN: 0003-2697, DOI: 10.1016/j.ab.2012.08.022 the whole document -----	1-16
Y,P	WO 2012/054532 A1 (PROMETHEUS LAB INC [US]; WANG SHUI LONG [US]; OHRMUND LINDA [US]; HAUE) 26 April 2012 (2012-04-26) the whole document -----	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/054587

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008031532 A1	20-03-2008	CA 2662416 A1	20-03-2008
		EP 2067044 A1	10-06-2009
		EP 2221619 A1	25-08-2010
		JP 4964957 B2	04-07-2012
		JP 2010500388 A	07-01-2010
		US 2010041063 A1	18-02-2010
		WO 2008031532 A1	20-03-2008
WO 2011056590 A1	12-05-2011	AU 2010315547 A1	10-05-2012
		CA 2778454 A1	12-05-2011
		CN 102695955 A	26-09-2012
		EP 2494352 A1	05-09-2012
		JP 2013508739 A	07-03-2013
		KR 20120108978 A	05-10-2012
		US 2012329172 A1	27-12-2012
WO 2011056590 A1	12-05-2011		
EP 2354792 A1	10-08-2011	EP 2354792 A1	10-08-2011
		EP 2534486 A1	19-12-2012
		WO 2011095636 A1	11-08-2011
WO 2012054532 A1	26-04-2012	AU 2011317149 A1	02-05-2013
		CA 2815026 A1	26-04-2012
		WO 2012054532 A1	26-04-2012

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74)代理人 100146031

弁理士 柴田 明夫

(74)代理人 100122736

弁理士 小國 泰弘

(74)代理人 100122747

弁理士 田中 洋子

(74)代理人 100132540

弁理士 生川 芳徳

(72)発明者 ダール, ウーヴェ

ドイツ国、8 2 3 7 7 ペンツベルク、アホルンシュトラッセ 1 3

(72)発明者 ヨルダン, グレゴール

ドイツ国、8 2 1 9 4 グレーベンツェル、フーベルトゥスシュトラッセ 1 5

(72)発明者 スターク, ローラント

ドイツ国、8 0 3 3 7 ミュンヘン、ヴァルターシュトラッセ 2 1

Fターム(参考) 2G041 CA01 DA05 EA04 FA12 HA01 LA08

专利名称(译)	用于表征循环免疫复合物的多重色谱 - 免疫测定方法		
公开(公告)号	JP2015509598A	公开(公告)日	2015-03-30
申请号	JP2014560373	申请日	2013-03-07
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	ダールウーヴェ ヨルダングレゴール スタークローラント		
发明人	ダール,ウーヴェ ヨルダン,グレゴール スターク,ローラント		
IPC分类号	G01N33/53 G01N30/88 G01N33/543 G01N27/62		
CPC分类号	G01N33/686 G01N33/94 G01N33/564		
FI分类号	G01N33/53.N G01N30/88.J G01N33/543.545.D G01N27/62.V G01N27/62.X		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/DA05 2G041/EA04 2G041/FA12 2G041/HA01 2G041/LA08		
代理人(译)	津国 肇 三宅 俊男 阿基奥·希巴达 田中洋子		
优先权	2012158634 2012-03-08 EP		
其他公开文献	JP6272788B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

因此，本文报道了用于分析/表征体内形成的循环免疫复合物（CIC）的方法，所述方法包括从施用了药物的哺乳动物获得的样品的大小排阻层析至少一次，以确定免疫复合物，任选的第二种非SEC色谱和至少一种免疫测定，其中免疫复合物的特征在于免疫复合物大小与免疫测定结果/读出的相关性。本文还报道了本文报道的用于确定与改变的药代动力学的相关性，用于确定功效的损失或降低，用于确定药物的天然对应物的中和，用于确定免疫和超敏反应，包括血清病/类型III超敏反应/免疫复合物介导的疾病。

画分	保持時間 [分]	分子量 [kDa]
1	9-10	>7000-3515
2	10-11	3515-2285
3	11-12	2285-1486
4	12-13	1486-966
5	13-14	966-628
6	14-15	628-408
7	15-16	408-265
8	16-17	265-173
9	17-18	173-112
10	18-19	112-73
11	19-20	73-47
12	20-21	47-31