

(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2016-530495  
(P2016-530495A)

(43) 公表日 平成28年9月29日(2016.9.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 N	4 C 0 8 5
<b>GO 1 N 33/536 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/536 E	4 H 0 4 5
<b>CO 7 K 16/24 (2006.01)</b>	CO 7 K 16/24	
<b>CO 7 K 16/28 (2006.01)</b>	CO 7 K 16/28	
<b>CO 7 K 16/18 (2006.01)</b>	CO 7 K 16/18	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 43 頁) 最終頁に続く

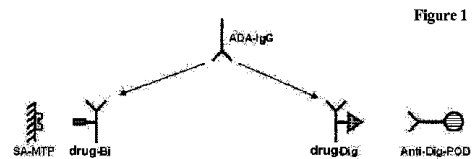
(21) 出願番号 特願2016-522572 (P2016-522572)  
 (86) (22) 出願日 平成26年7月1日(2014.7.1)  
 (85) 翻訳文提出日 平成28年3月4日(2016.3.4)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2014/063891  
 (87) 国際公開番号 W02015/000865  
 (87) 国際公開日 平成27年1月8日(2015.1.8)  
 (31) 優先権主張番号 13175091.1  
 (32) 優先日 平成25年7月4日(2013.7.4)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 591003013  
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー  
 F. HOFFMANN-LA ROCH  
 E AKTIENGESELLSCHAFT  
 スイス・シーエイチ-4070バーゼル・  
 グレンツアーヘルストラッセ124  
 (74) 代理人 110001508  
 特許業務法人 津国  
 (72) 発明者 シュトゥーベンラウホ, カイ-グンナー  
 ドイツ国、82377 ペンツベルク、パ  
 ークシュトラッセ 1アー  
 (72) 発明者 フォーゲル, ルドルフ  
 ドイツ国、82362 ヴァイルハイム、  
 ラーベルシュトラッセ 5アー  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血清サンプル中の抗薬物抗体を検出するための干渉抑制イムノアッセイ

(57) 【要約】

本明細書において報告するのは、捕捉薬物抗体及びトレーサー薬物抗体を含むサンプル中の薬物抗体に対する抗薬物抗体の検出のための酵素結合免疫吸着アッセイであって、ここでは、捕捉薬物抗体及びトレーサー薬物抗体は、0.5 µg/ml又はそれ以上の濃度で用いられ、サンプルを、捕捉薬物抗体及びトレーサー薬物抗体と1~24時間にわたり同時にインキュベートし、捕捉薬物抗体及びトレーサー薬物抗体を、単一のリジン残基を介して誘導体化し、サンプルは10%血清を含み、オリゴマーヒトIgGを、捕捉薬物抗体及びトレーサー薬物抗体とのインキュベーションの前にサンプルに加える。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

捕捉薬物抗体及びトレーサー薬物抗体を含む、関節リウマチ患者のサンプル中の薬物抗体に対する抗薬物抗体の検出のための方法であって、ここで、

- a) 捕捉薬物抗体及びトレーサー薬物抗体は、0.5 µg/ml又はそれ以上の濃度を有し、
- b) サンプルを、捕捉薬物抗体及びトレーサー薬物抗体と0.5～24時間にわたり同時にインキュベートし、
- c) 捕捉薬物抗体及びトレーサー薬物抗体を、各々、単一のリジン残基を介して1回だけ誘導体化し、
- d) サンプルは1%血清/血漿又はそれ以上を含み、
- e) オリゴマーヒトIgGを、捕捉薬物抗体及びトレーサー薬物抗体とのインキュベーションの前にサンプルに加え、並びに
- f) 捕捉及びトレーサー上でのモノマービオチン及びジゴキシゲニン。

## 【請求項 2】

サンプルが、抗薬物抗体及びリウマチ因子を含む、請求項1記載の方法。

## 【請求項 3】

抗体が抗炎症抗体である、請求項1～2のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 4】

抗炎症抗体が、関節リウマチ、又は若年性関節炎、又は変形性関節症、又はキャスルマン病、又はメサングウム増殖性糸球体腎炎の処置のための抗体である、請求項3記載の方法。

## 【請求項 5】

抗体が抗癌抗体である、請求項1又は2のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 6】

抗癌抗体が、骨髄腫又は形質細胞腫の処置のための抗体である、請求項5記載の方法。

## 【請求項 7】

抗体が抗IL6R抗体である、請求項1～6のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 8】

抗IL6R抗体がトシリズマブである、請求項7記載の方法。

## 【請求項 9】

抗IL6R抗体(薬物)の有効量を個体に投与し、請求項1～8のいずれか一項記載のアッセイを用いて抗IL6R抗体抗体(抗薬物抗体)の存在を決定することを含む、形質細胞腫を有する個体を処置する方法。

## 【請求項 10】

抗IL6R抗体(薬物)の有効量を個体に投与し、請求項1～8のいずれか一項記載のアッセイを用いて抗IL6R抗体抗体(抗薬物抗体)の存在を決定することを含む、骨髄腫を有する個体を処置する方法。

## 【請求項 11】

IL6R活性を阻害するために、抗IL6R抗体の有効量を個体に投与し、請求項1～8のいずれか一項記載のアッセイを用いて抗IL6R抗体抗体の存在を決定することを含む、個体においてIL6R活性を阻害する方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本明細書において報告するのは、抗炎症性抗体で処置された患者からの血清サンプル中の抗薬物抗体を検出するための干渉抑制イムノアッセイ及びその使用である。

## 【0002】

発明の背景

新規治療用抗体の臨床開発では、適当なアッセイによる、それらの潜在的な免疫原性の

10

20

30

40

50

評価が要求される (Kaliyaperumal, A. and Jing, S., *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10 (2009) 352-358)。抗薬物抗体 (ADA) テストは、通常、2段階のアプローチを含む：(1) ADA 検出のためのアッセイ及び(2) ADA 特徴付けのためのアッセイ。ADA 検出アッセイは、スクリーニング及び特異性の確認 (確証的) アッセイを含む。マイクロタイタープレートベースの酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) は、それらのハイスループット効率、相対的な単純さ、及び高い感度のため、依然として、ADA についてスクリーニングするために最も広く使用されているフォーマットである (Geng, D., et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005) 364-375)。ADA ELISA は、最もしばしば、高い選択性、全てのアイソタイプの検出、及び汎種 ADA 検出能力を提供する架橋フォーマットにおいて設計されている (Mire-Sluis, A.R., et al., *J. Immunol. Methods* 289 (2004) 1-16)。

10

**【0003】**

架橋 ELISA が開発され、抗 IL6R 抗体 トシリズマブ についてのスクリーニング及び確認 ADA アッセイとして使用されてきた (Stubenrauch, K., et al., *Clin. Ther.* 32 (2010) 1597-1609)。

**【0004】**

Stubenrauch, K. らは、ヒト抗体に曝露されたマウスからの血清サンプル中での薬物耐性を用いたジェネリック抗薬物抗体アッセイを報告している (*Anal. Biochem.* 430 (2012) 193-199)。Bourdage, J. S. らは、抗原コーティング濃度依存性に対する二重抗原架橋イムノアッセイフォーマットの効果及びモノクローナル抗体のための免疫原性アッセイを設計するための意義を報告している (*J. Pharm. Biochem. Anal.* 39 (2005) 685-690)。Mikulskis, A. らは、薬物開発のサポートにおける頑強な、薬物耐性の免疫原性アッセイの開発のための選択肢のプラットフォームとして溶液 ELISA を報告している (*J. Immunol. Meth.* 365 (2010) 38-49)。Pan, J. らは、2つのバイオ治療薬の免疫原性テストにおいて、NIDSA (登録商標) 迅速アッセイと ELISA 方法との比較を報告している (*J. Pharm. Tox. Meth.* 63 (2010) 150-159)。

20

**【0005】**

WO 2009/077127 において、識別アッセイが報告されている。

**【0006】**

Qiu, Z. J. らは、自己免疫血清中のヒト抗治療用抗体の検出のための新規の均一ビオチン-ジゴキシゲニンベースのアッセイを報告している (*J. Immunol. Meth.* 362 (2010) 101-111)。

30

**【0007】****発明の概要**

本明細書において報告するのは、治療用抗体を用いて処置された患者のサンプルを含む血清中の抗薬物抗体 (ADA) の検出のためのスクリーニング、確認、及び追跡調査アッセイとして使用することができる架橋酵素結合免疫吸着アッセイ (架橋 ELISA) である。本明細書において報告するアッセイは、サンプルを含む血清が、自己免疫疾患 (例えば関節リウマチ (RA) など) を伴う患者からである場合に特に有用である。

**【0008】**

本明細書において報告するアッセイは、分析されるサンプル中の治療用抗体の量に関して、改善された耐性 (ADA ELISA での増加した薬物耐性) を示し、及び、同時に、偽陽性のアッセイ結果の数が低下する。

40

**【0009】**

本明細書において報告するアッセイを用いて、遊離薬物による、及びリウマチ因子 (RF) による干渉を最小限にすることができることを見出されている。

**【0010】**

このアッセイは、サンプルが、抗薬物抗体の検出のためのイムノアッセイにおいて干渉ことができ、このように、偽陽性のイムノアッセイ結果を説明しうる、問題の抗薬物抗体以外の抗体を含む場合に特に有用である。

50

## 【0011】

一実施形態において、本明細書において報告する方法は、抗炎症治療のために使用される薬物抗体の抗薬物抗体の決定のために使用される。

## 【0012】

増加した薬物耐性は、以下の相乗的な相互作用により達成された：1) ビオチン化及びジゴキシゲニン化捕捉及びトレーサー試薬の濃度を増加させること；2) 血清サンプルと捕捉試薬及びトレーサー試薬との同時（連続の代替りの）インキュベーション；3) 長期インキュベーション時間；4) 均一にモノ共役された捕捉試薬及びトレーサー試薬の使用；並びに5) 増加した血清マトリックス含量の使用。

## 【0013】

リウマチ因子からの干渉は、添加剤としてのオリゴマーヒト免疫グロブリンG ( I g G ) の添加により抑制することができる。

## 【0014】

本明細書において報告する干渉抑制ADAアッセイの薬物耐性は、当技術分野において公知のアッセイよりも少なくとも10倍高い。

## 【0015】

本明細書において報告する一態様は、捕捉薬物抗体及びトレーサー薬物抗体を含むサンプル中の薬物抗体に対する抗薬物抗体の検出のための酵素結合免疫吸着アッセイであり、ここで、

a) 捕捉薬物抗体及びトレーサー薬物抗体は、0.5 µg/mlを上回る濃度で用いられ、

b) サンプルは、捕捉薬物抗体及びトレーサー薬物抗体と4~24時間にわたり同時にインキュベートされ、

c) 捕捉薬物抗体及びトレーサー薬物抗体は、単一のリジン残基を介して誘導体化され、

d) サンプルは、7.5%血清又はそれ以上を含み、並びに

e) オリゴマーヒトI g Gを、捕捉薬物抗体及びトレーサー薬物抗体とのインキュベーションの前にサンプルに加える。

## 【0016】

本明細書において報告する一態様は、捕捉薬物抗体及びトレーサー薬物抗体を含む、関節リウマチ患者のサンプル中の薬物抗体に対する抗薬物抗体の検出のための酵素結合免疫吸着アッセイであって、ここで、

a) 捕捉薬物抗体及びトレーサー薬物抗体は、酵素結合免疫吸着アッセイにおいて0.5 µg/ml又はそれ以上の濃度を有し、

b) サンプルを、捕捉薬物抗体及びトレーサー薬物抗体と0.5~24時間にわたり同時にインキュベートし、

c) 捕捉薬物抗体は、捕捉薬物抗体及び特異的結合対の第1成分の1:1コンジュゲートであり、トレーサー薬物抗体は、トレーサー薬物抗体及び検出可能な標識の1:1コンジュゲートであり、

d) サンプルは1%血清又はそれ以上を含み、並びに

e) オリゴマーヒトI g Gを、捕捉薬物抗体及びトレーサー薬物抗体とのインキュベーションの前にサンプルに加える。

## 【0017】

一実施形態において、サンプルは、5%血清又はそれ以上を含む。一実施形態において、サンプルは、7.5%血清又はそれ以上を含む。

## 【0018】

一実施形態において、サンプルは、抗薬物抗体及びリウマチ因子を含む。

## 【0019】

一実施形態において、薬物抗体は、炎症性疾患の処置のための抗体である。一実施形態において、炎症性疾患の処置のための抗体は、自己免疫疾患の処置のための抗体である。一実施形態において、自己免疫疾患は、関節リウマチ又は若年性関節炎又は変形性関節症

10

20

30

40

50

又はキャスルマン病である。

【0020】

一実施形態において、薬物抗体は、癌の処置のための抗体である。一実施形態において、抗体は、骨髄腫又は形質細胞腫の処置のためである。

【0021】

一実施形態において、薬物抗体は、IL-6受容体に対する(抗IL6R抗体)、又はIGF-1受容体(抗IGF1R抗体)、又はIL-13受容体1(抗IL13R1抗体)に対する、又はOX40L(抗OX40L抗体)に対する、又は腫瘍壊死因子(抗TNF抗体)に対する抗体である。一実施形態において、薬物抗体は、抗IL6R抗体である。一実施形態において、抗IL6R抗体は、トシリズマブである。

10

【0022】

一実施形態において、捕捉薬物抗体は、固相にコンジュゲートされている。一実施形態において、固相への捕捉薬物抗体のコンジュゲーションは、特異的結合対を介して実施される。一実施形態において、特異的結合対(第1成分/第2成分)は、ストレプトアビジン若しくはアビジン/ビオチン、又は抗体/抗原(例えば、Hermanson, G.T., et al., Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996を参照のこと)、又はレクチン/多糖類、又はステロイド/ステロイド結合タンパク質、又はホルモン/ホルモン受容体、又は酵素/基質、又はIgG/プロテインA及び/若しくはGより選択される。

【0023】

一実施形態において、捕捉薬物抗体は、(特異的結合対の第1成分として)ビオチンにコンジュゲートされる。この場合において、固相へのコンジュゲーションは、固定化されたアビジン又はストレプトアビジンを介して実施される。

20

【0024】

一実施形態において、トレーサー薬物抗体は、検出可能な標識にコンジュゲートされる。一実施形態において、トレーサー薬物抗体は、特異的結合対を介して検出可能な標識にコンジュゲートされる。一実施形態において、特異的結合対(第1成分/第2成分)は、ストレプトアビジン若しくはアビジン/ビオチン、又は抗体/抗原(例えば、Hermanson, G.T., et al., Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996を参照のこと)、又はレクチン/多糖類、又はステロイド/ステロイド結合タンパク質、又はホルモン/ホルモン受容体、又は酵素/基質、又はIgG/プロテインA及び/若しくはGより選択される。

30

【0025】

一実施形態において、トレーサー薬物抗体は、(検出可能な標識として)ジゴキシゲニンにコンジュゲートされる。この場合において、検出可能な標識への連結は、ジゴキシゲニンに対する抗体を介して実施される。

【0026】

一実施形態において、捕捉薬物抗体及びトレーサー薬物抗体は、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)において約0.5 µg/mlから約10 µg/mlの濃度を有する。一実施形態において、捕捉薬物抗体及びトレーサー薬物抗体は、0.5 µg/ml超から10 µg/ml未満の濃度を有する。一実施形態において、捕捉薬物抗体及びトレーサー薬物抗体は、約1 µg/mlから約5 µg/mlの濃度を有する。一実施形態において、捕捉薬物抗体及びトレーサー薬物抗体は、約1.4 µg/mlから約1.8 µg/mlの濃度を有する。一実施形態において、捕捉薬物抗体及びトレーサー薬物抗体は、約1.45 µg/mlから約1.6 µg/mlの濃度を有する。好ましい一実施形態において、捕捉薬物抗体及びトレーサー薬物抗体は、約1.5 µg/mlの濃度を有する。

40

【0027】

一実施形態において、インキュベーション時間は、少なくとも6時間である。一実施形態において、インキュベーション時間は、少なくとも12時間である。一実施形態において、インキュベーション時間は、少なくとも16時間である。

【0028】

50

一実施形態において、インキュベーション時間は、最大24時間である。

【0029】

一実施形態において、インキュベーション時間は、4時間と24時間の間である。一実施形態において、インキュベーション時間は、6時間と24時間の間である。一実施形態において、インキュベーション時間は、12時間と24時間の間である。好ましい一実施形態において、インキュベーション時間は、12時間と20時間の間である。一実施形態において、インキュベーション時間は、14時間と18時間の間である。一実施形態において、インキュベーション時間は、約16時間である。

【0030】

一実施形態において、サンプルは、1%~20%血清を含む。一実施形態において、サンプルは、約10%血清を含む。

10

【0031】

一実施形態において、オリゴマーヒトIgGを、10µg/mlから1000µg/mlの最終濃度まで加える。一実施形態において、オリゴマーヒトIgGを、15µg/mlから500µg/mlの最終濃度まで加える。一実施形態において、オリゴマーヒトIgGを、20µg/mlから250µg/mlの最終濃度まで加える。一実施形態において、オリゴマーヒトIgGを、25µg/mlから100µg/mlの最終濃度まで加える。好ましい一実施形態において、オリゴマーヒトIgGを、約50µg/mlの最終濃度まで加える。

【0032】

本明細書において報告する一態様は、捕捉薬物抗体及びトレーサー薬物抗体を含む、関節リウマチ患者のサンプル中の薬物抗体に対する抗薬物抗体の検出のための酵素結合免疫吸着アッセイであって、ここで、

20

a) 捕捉薬物抗体及びトレーサー薬物抗体は、酵素結合免疫吸着アッセイにおいて約1.5µg/mlの濃度を有し、

b) サンプルを、捕捉薬物抗体及びトレーサー薬物抗体と14~16時間にわたり同時にインキュベートし、

c) 捕捉薬物抗体は、捕捉薬物抗体のリジン残基を介した捕捉薬物抗体及びビオチンの1:1コンジュゲートであり、トレーサー薬物抗体は、トレーサー薬物抗体のリジン残基を介したトレーサー薬物抗体及びジゴキシゲニンの1:1コンジュゲートであり、

d) サンプルは1%~20%血清を含み、並びに

30

e) オリゴマーヒトIgGを、捕捉薬物抗体及びトレーサー薬物抗体とのインキュベーションの前に、25µg/ml~100µg/mlの最終濃度までサンプルに加える。

【0033】

本明細書において報告する一態様は、抗薬物抗体ELISAにおけるリウマチ因子の捕捉のためのオリゴマーヒトIgGの使用である。

【0034】

本明細書において報告する一態様は、治療的抗体(薬物)の有効量を個体に投与し、本明細書において報告するアッセイを用いて抗薬物抗体の存在を決定することを含む、疾患を有する個体を処置する方法である。

【0035】

40

本明細書において報告する一態様は、抗IL6R抗体(薬物)の有効量を個体に投与し、本明細書において報告するアッセイを用いて抗IL6R抗体抗体(抗薬物抗体)の存在を決定することを含む、炎症性疾患を有する個体を処置する方法である。

【0036】

一実施形態において、炎症性疾患は、自己免疫疾患である。一実施形態において、自己免疫疾患は、関節リウマチ、若年性関節炎、変形性関節症、又はキャスルマン病より選択される。

【0037】

一実施形態において、炎症性疾患は、メサンギウム増殖性糸球体腎炎である。

【0038】

50

本明細書において報告する一態様は、抗 I L 6 R 抗体（薬物）の有効量を個体に投与し、本明細書において報告するアッセイを用いて抗 I L 6 R 抗体抗体（抗薬物抗体）の存在を決定することを含む、形質細胞腫を有する個体を処置する方法である。

【0039】

本明細書において報告する一態様は、抗 I L 6 R 抗体（薬物）の有効量を個体に投与し、本明細書において報告するアッセイを用いて抗 I L 6 R 抗体抗体（抗薬物抗体）の存在を決定することを含む、骨髄腫を有する個体を処置する方法である。

【0040】

本明細書において報告する一態様は、I L 6 R 活性を阻害するための抗 I L 6 R 抗体の有効量を個体に投与し、本明細書において報告するアッセイを用いて抗 I L 6 R 抗体抗体（抗薬物抗体）の存在を決定することを含む、個体において I L 6 R 活性を阻害する方法である。

10

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1】抗 I L 6 R 抗体トシリズマブについて例示した薬物耐性の抗薬物抗体アッセイのアッセイ原理。

【図2】抗 I L 6 R 抗体トシリズマブについての干渉抑制された抗薬物抗体アッセイのアッセイ原理。

【図3】抗 I L 6 R 抗体トシリズマブについての干渉抑制された抗薬物抗体アッセイについて得られた検量曲線。

20

【図4】抗 I L 6 R 抗体トシリズマブについて本明細書において報告する2ステップ抗薬物抗体 E L I S A における、及び干渉抑制された抗薬物抗体 E L I S A における薬物耐性の比較；増加量の薬物の存在における 300 ng/mL 抗薬物抗体のシグナル；点線：C P の従来のアッセイ；実線：本明細書において報告する C P 干渉抑制アッセイ；円を伴う点線：従来のアッセイ；四角を伴う実線：本明細書において報告する干渉抑制アッセイ。

【図5】干渉抑制された抗薬物抗体 E L I S A を用いたカットポイント決定。

【図6】T C Z - B i (モノ) 及び T C Z - D i g (モノ) を伴う干渉抑制された抗薬物抗体 E L I S A を用いたカットポイント決定。

【図7】T C Z 処置された R A 患者からの 77 の異なる血清サンプルにおける、従来の E L I S A を使用したシグナル変動。

30

【図8】T C Z 処置された R A 患者からの 77 の異なる血清サンプルにおける、本明細書において報告する干渉抑制 E L I S A を使用したシグナル変動。

【0042】

定義

用語「1 : 1 コンジュゲート」は、単一の共有結合を介して互いに連結 / コンジュゲートされた、正確には 2 つの実体からなるコンジュゲートを表示する。例えば、用語「捕捉薬物抗体及び特異的結合対の第 1 の成分の 1 : 1 コンジュゲート」は、特異的結合対の第 1 の成分の正確に 1 分子への単一の化学結合を介して共有結合的にコンジュゲートされた捕捉薬物抗体の正確に 1 分子からなる化学的コンジュゲートを表示する。同様に、用語「トレーサー薬物抗体及び検出可能な標識の 1 : 1 コンジュゲート」は、正確に 1 つの検出可能な標識分子への単一の化学的結合を介して共有結合的にコンジュゲートされたトレーサー薬物抗体の正確に 1 分子からなる化学的コンジュゲートを表示する。

40

【0043】

本発明に従った用語「薬物抗体」は、個体に投与することができる抗体を表示し、そのため前記個体のサンプルは、投与後に前記薬物抗体を含むことが推測される。薬物抗体は、治療目的のためにヒトに投与されることが意図される抗体である。本明細書に報告される 1 つのアッセイ内で、薬物抗体、捕捉薬物抗体、及びトレーサー薬物抗体は、例えば、同じ発現ベクターを用いて組換え産生され、同じアミノ酸配列を含む「同じ」抗体分子を含む。薬物抗体（治療用モノクローナル抗体）は、種々の疾患、例えば腫瘍学的疾患（例、血液学的及び固形悪性腫瘍（非ホジキンリンパ腫、乳癌、及び結腸直腸癌を含む）又は

50

炎症性疾患など様々な疾患の処置のために広く使用されている。そのような抗体は、例えば、Levene, A. P., et al., *Journal of the Royal Society of Medicine* 98 (2005) 145-152; Groner, B., et al., *Curr. Mol. Meth.* 4 (2004) 539-547; 及び Harris, M., *Lancet Oncol.* 5 (2004) 292-302により報告されている。

【0044】

一実施形態において、薬物抗体は、炎症性疾患の処置のために有用である抗体、即ち、抗炎症抗体、例えば抗IL-6受容体抗体、又は抗IL-IGF-1受容体抗体、又は抗IL-13受容体1抗体などである。

【0045】

例示的な(好ましくはモノクローナル)薬物抗体は、IL-6受容体に対する抗体(抗IL-6R抗体)である。そのような抗体は、例えば、Mihara, et al., *Clin. Immunol.* 98 (2001) 319-326; Nishimoto, N., et al., *Blood* 106 (2005) 2627-2632により、臨床試験NCT00046774において、又はWO 2004/096274において報告されている。

10

【0046】

例示的な(好ましくはモノクローナル)薬物抗体は、IGF-1受容体に対する抗体(抗IGF1抗体)である。そのような抗体は、例えば、WO 2004/087756において、又はWO 2005/005635において報告されている。

【0047】

例示的な(好ましくはモノクローナル)薬物抗体は、IL-13受容体に対する抗体(抗IL13R1抗体)である。IL13R1に対する抗体は、例えば、WO 96/29417、WO 97/15663、WO 03/080675、Graber, P., et al., *Eur. J. Immunol.* 28 (1998) 4286-4298; Poudrier, J., et al., *J. Immunol.* 163 (1999) 1153-1161; Poudrier, J., et al., *Eur. J. Immunol.* 30 (2000) 3157-3164; Aikawa, M., et al., *Cytokine* 13 (2001) 75-84から公知であり、例えば、R&D Systems Inc. USAから商業的に入手可能である。IL13R1に対するさらなる例示的な抗体が、WO 2006/072564に報告されている。

20

【0048】

本明細書において使用する用語「抗炎症治療のために使用される薬物抗体」は、炎症を媒介する細胞表面受容体に対して向けられた薬物抗体を表示する。そのような受容体は、例えば、IL-6受容体、又はIGF-1受容体、又はIL-13a受容体1である。患者からのサンプル(そのような抗炎症薬物抗体を用いて処理される)を分析する場合、方法の陽性結果が、真の抗薬物抗体(真の陽性結果)又はサンプルの抗薬物抗体以外の抗体(偽陽性結果)に基づくか否かを決定しなければならない。そのような場合の例は、患者からのサンプルであり、その患者は、自己免疫疾患、例えばリウマチなどを有し、このように、前記患者から得られたサンプルは、いわゆる「リウマチ因子」を含む。本明細書において使用する用語「リウマチ因子」は、ヒトIgG、より厳密にはヒトIgGのFc領域に結合する抗体を表示する。大半の場合において、これらの「リウマチ因子」は、オリゴマー結合分子である。

30

【0049】

本明細書において使用する用語「抗薬物抗体」は、薬物抗体の抗原性領域に対して向けられる、即ち、それに結合する抗体を表示する。この抗原性領域は、薬物抗体の可変領域、CDR、定常領域、又は糖構造でありうる。一実施形態において、抗薬物抗体は、薬物抗体のCDR又は薬物抗体の二次修飾(組換え細胞、例えばCHO細胞、HEK細胞、Sp2/O細胞、又はBHK細胞などにおける薬物抗体の組換え産生に起因する)に対して向けられる。一般的に、抗薬物抗体は、薬物抗体が投与される動物の免疫系により認識される薬物抗体の抗原性領域に対して向けられる。上に記載する抗体を「特異的な抗薬物抗体」と呼ぶ。

40

【0050】

薬物抗体は、可能な限り少ない抗原性領域を含むように設計される。例えば、ヒトにおける使用が意図される薬物抗体は、薬物抗体に対する免疫応答の生成を最小限にするために、ヒト患者への適用前にヒト化される。この免疫応答は、抗薬物抗体(ADA)の形態

50

でありうるが、それは、そのようなヒト化薬物抗体の非ヒト部分（例えば可変ドメイン中の相補性決定領域など）に対して向けられる（例、Pan, Y., et al., FASEB J. 9 (1995) 43-49を参照のこと）。

【0051】

本明細書において使用する用語「超可変領域」又は「HVR」は、配列（「相補性決定領域」又は「CDR」）において超可変である、及び／又は構造的に定義されたループ（「超可変ループ」）を形成する、及び／又は抗原接触残基（「抗原接触部」）を含む、抗体可変ドメインの領域の各々を指す。一般的に、抗体は6つのHVRを含む：VH中の3つ（H1、H2、H3）及びVL中の3つ（L1、L2、L3）。本明細書における例示的なHVRは、以下を含む：

(a) アミノ酸残基26-32（L1）、50-52（L2）、91-96（L3）、26-32（H1）、53-55（H2）、及び96-101（H3）で生じる超可変ループ（Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)）；

(b) アミノ酸残基24-34（L1）、50-56（L2）、89-97（L3）、31-35b（H1）、50-65（H2）、及び95-102（H3）で生じるCDR（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)）；

(c) アミノ酸残基27c-36（L1）、46-55（L2）、89-96（L3）、30-35b（H1）、47-58（H2）、及び93-101（H3）で生じる抗原接触部（MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)）；並びに

(d) HVRアミノ酸残基46-56（L2）、47-56（L2）、48-56（L2）、49-56（L2）、26-35（H1）、26-35b（H1）、49-65（H2）、93-102（H3）、及び94-102（H3）を含む、(a)、(b)、及び／又は(c)の組み合わせ。

【0052】

他に示さない場合、可変ドメイン中のHVR残基及び他の残基（例、FR残基）を、本明細書において、Kabatに従ってナンバリングする。

【0053】

抗体は、多くの反応性成分、例えば、アミノ基（リジン、 $\epsilon$ -アミノ基）、チオール基（シスチン、システイン、及びメチオニン）、カルボン酸基（アスパラギン酸、グルタミン酸）、及び糖アルコール基などを含む。これらを、表面、タンパク質、ポリマー（例えば、PEG、セルロース、又はポリスチロールなど）、酵素、又は結合対のメンバーなどの結合パートナーへの共役のために用いることができる（例、Aslam M., and Dent, A., Bioconjugation MacMillan Ref. Ltd. (1999) 50-100を参照のこと）。

【0054】

用語「抗イディオタイプ抗体」は、結合特異性（例えば親抗体の結合部位など）に、特異的に結合する抗体を表示し、即ち、抗イディオタイプ抗体は、例えば、親抗体の抗原結合部位に対して向けられる。

【0055】

一実施形態において、抗イディオタイプ抗体は、親抗体のCDRの1つ以上に、特異的に結合する。

【0056】

一実施形態において、親抗体は治療用抗体である。一実施形態において、親抗体は多重特異性抗体である。一実施形態において、親抗体は二重特異性抗体である。

【0057】

タンパク質の最も共通の反応基の1つは、アミノ酸リジンの脂肪族アミンである。一般的に、ほぼ全ての抗体が大量のリジン残基を含む。リジンアミン/アミノ基は、pH 8.0以上で適度に良好な求核剤であり（ $pK_a = 9.18$ ）、従って、種々の試薬と簡単及び円滑に反応し、安定な結合を形成する。

【0058】

10

20

30

40

50

抗体中の別の共通の反応基は、硫黄を含むアミノ酸シスチン及びその還元産物システイン（又はハーフシスチン）からの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、それはアミンよりも求核性であり、一般的に、タンパク質中で最も反応性の官能基である。チオールは、一般的に、中性pHで反応性であり、従って、アミンの存在において選択的に他の分子と共役させることができる。遊離スルフヒドリル基は比較的反応性であるため、これらの基を伴うタンパク質は、しばしば、それらを伴い、それらの酸化形態で、ジスルフィド基又はジスルフィド結合として存在する。

**【0059】**

シスチン及びシステインに加えて、一部のタンパク質は、アミノ酸メチオニンも有し、それはチオエーテル連結中に硫黄を含んでいる。文献には、いくつかのチオール化架橋試薬、例えばトラウト試薬（2-イミノチオラン（*iminothiolane*））、サクシニミジル（アセチルチオ）酢酸（*SATA*）、又はスルホスクシニミジル6-[3-(2-ピリジリジチオ)プロピオンアミド]ヘキサ酸（スルホ-LC-SPDP）などの使用が報告されており、複数のスルフヒドリル基を、反応性アミノ基を介して導入する効率的な方法を提供している。

10

**【0060】**

反応性エステル、特にNヒドロキシサクシンイミド（*NHS*）エステルは、アミノ基の修飾のための最も共通に用いられる試薬である。水性環境中での反応のための最適pHはpH 8.0~9.0である。

**【0061】**

イソチオシアネートはアミン修飾試薬であり、タンパク質とチオ尿素結合を形成する。それらは、水性溶液中で（最適にはpH 9.0~9.5で）タンパク質アミンと反応する。

20

**【0062】**

アルデヒドは、穏やかな水性条件下で、脂肪族及び芳香族のアミン、ヒドラジン、及びヒドラジドと反応し、イミン中間体（ Schiff塩基）を形成する。Schiff塩基は、穏やかな又は強い還元剤（例えば水素化ホウ素ナトリウム又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されて、安定なアルキルアミン結合を生じることができる。

**【0063】**

アミンを修飾するために使用されてきた他の試薬は、酸無水物である。例えば、ジエチレントリアミン五酢酸無水物（*DTPA*）は、2つのアミン反応性無水物基を含む二機能性キレート剤である。それは、タンパク質のN末端基及び -アミン基と反応し、アミド連結を形成することができる。無水物環が開き、配位複合体中で金属に強固に結合することができる多価の金属キレート化アームが作られる。

30

**【0064】**

用語「サンプル」は、生きている物又は過去に生きていた物からの物質の任意の量を含むが、それに限定されない。そのような、生きている物は、ヒト、マウス、サル、ラット、ウサギ、及び他の動物を含むが、これらに限定されない。一実施形態において、サンプルは、サル、特にカニクイザル、又はウサギ、又はマウス若しくはラットから得られる。そのような物質は、一実施形態において、個体からの全血、血清、又は血漿を含むが、これらに限定されず、それらは臨床ルーチンにおいて最も広く使用されるサンプルの供給源である。

40

**【0065】**

用語「固相」は、非液体物質を表示し、材料、例えばポリマー、金属（常磁性粒子、強磁性粒子）、ガラス、及びセラミックなどで作られた粒子（微粒子及びビーズを含む）；ゲル物質、例えばシリカゲル、アルミナゲル、及びポリマーゲルなど；毛細管（ポリマー、金属、ガラス、及び/又はセラミックで作られる）；ゼオライト及び他の多孔物質；電極；マイクロタイタプレート；固体細片；及びキュベット、チューブ、又は他の分光計サンプル容器を含む。固相成分は、「固相」が、サンプル中の物質と相互作用することが意図される、少なくとも1つの部分をその表面上に含む点で、不活性な固体表面から区

50

別される。固相は、固定成分、例えばチューブ、細片、キュベット、若しくはマイクロタイプレートなどでありうる、又は、非固定成分、例えばビーズ及び微粒子などでありうる。タンパク質及び他の物質の非共有付着又は共有付着の両方を可能にする種々の微粒子を使用することができる。そのような粒子は、ポリマー粒子、例えばポリスチレン及びポリ(メチルメタクリル酸)など；金粒子、例えば金ナノ粒子及び金コロイドなど；並びにセラミック粒子、例えばシリカ、ガラス、及び金属酸化物粒子などを含む。例えば、Martin, C.R., et al., Analytical Chemistry-News & Features, 70 (1998) 322A-327A、又はButler, J.E., Methods 22 (2000) 4-23を参照のこと。

#### 【0066】

色原体(蛍光性又は発光性の基及び色素)、酵素、NMR活性基、金属粒子、又はハプテン(例えばジゴキシゲニンなど)から、検出可能な標識が、一実施形態において選択される。一実施形態において、検出可能な標識は、ジゴキシゲニンである。検出可能な標識は、また、光活性化可能な架橋基(例、アジド基又はアジリン基)でありうる。電気化学発光により検出することができる金属キレートは、また、一実施形態において、シグナル放出基であり、特に好ましくはルテニウムキレート(例、ルテニウム(ビスピリジル)<sub>3</sub><sup>2+</sup>キレート)である。適切なルテニウム標識基が、例えば、EP 0 580 979、WO 90/0530 1、WO 90/11511、及びWO 92/14138において記載されている。

#### 【0067】

異なるイムノアッセイの原理が、例えば、Hage, D. S. (Anal. Chem. 71 (1999) 294R-304R)により記載されている。Lu, B.ら (Analyst. 121 (1996) 29R-32R)には、イムノアッセイにおける使用のための抗体の配向固定化が報告されている。アビジン-ビオチン媒介性イムノアッセイが、例えば、Wilchek, M. and Bayer, E.A., Methods Enzymol. 184 (1990) 467-469により報告されている。

#### 【0068】

発明の詳細な説明

本明細書において報告するのは、遊離の治療用抗体への増加した耐性及びリウマチ因子干渉への増加した抵抗性を伴う血清サンプルを使用した、干渉抑制された抗薬物抗体アッセイである。

#### 【0069】

抗薬物抗体アッセイの原理は、ジゴキシゲニン化薬物(薬物 Dig)及びビオチン化薬物(薬物 Bi)(例、トシリズマブ(それぞれTCZ-Dig及びTCZ-Bi))との複合体中の抗薬物抗体(ADA)の捕捉であり、後者は、ストレプトアビジンでコーティングされたプレート(SA-MTP)上への固定化に導く。SA-MTP上で薬物Biに結合されたADA/薬物Dig複合体は、抗ジゴキシゲニン抗体西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素コンジュゲート(抗Dig-HRP)により検出される。西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)は、基質ABTSの呈色反応を触媒する。色の強度は、検体物の濃度に比例する。抗薬物抗体アッセイの一般的原理を図1に示す。

#### 【0070】

一般的なアッセイ原理の変更を伴わず、従来抗薬物抗体アッセイの薬物及びリウマチ因子耐性は、以下により増加されることが見出されている：

- 1) ビオチン化及びジゴキシゲニン化捕捉及びトレーサー試薬の濃度を増加させること；
- 2) 血清サンプルと捕捉試薬及びトレーサー試薬との同時(連続の代わりに)インキュベーション；
- 3) 血清サンプルと捕捉試薬及びトレーサー試薬との延長されたインキュベーション；
- 4) 不均一に共役された混合物の代わりに、均一の捕捉試薬及びトレーサー試薬の使用；
- 5) 増加した血清マトリックスの使用；
- 6) アッセイ添加剤としてのオリゴマーIgGの含有；並びに
- 7) モノビオチン化捕捉及びモノジゴキシゲニン化トレーサー抗体の使用。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 1 】

これらの対処は、相乗効果を提供した。

## 【 0 0 7 2 】

上の対処は、治療薬物抗体に対する抗薬物抗体の検出のための、干渉抑制された薬物耐性の抗薬物抗体アッセイに導く。

## 【 0 0 7 3 】

本明細書において報告する、干渉抑制された薬物耐性の抗薬物抗体アッセイの一般的な原理を図 2 に示し、抗 I L 6 R 抗体トシリズマブについて例示する。

## 【 0 0 7 4 】

本明細書において報告するアッセイのセットアップを用いて、A D A アッセイの薬物耐性が、従来の抗薬物抗体アッセイと比較して、患者からの血清サンプル中で少なくとも 1 0 倍増加した。同時に、偽陽性のアッセイ結果に導くりウマチ因子への感受性も減少した。

10

## 【 0 0 7 5 】

治療用の抗炎症抗体トシリズマブ ( T C Z ) は、インターロイキン 6 受容体に対する組換えヒト化モノクローナル抗体である。それは、関節リウマチの臨床試験において効果的であることが示されている ( Ohsugi, Y. and Kishimoto, T., Expert Opin. Biol. Ther. 8 (2008) 669-681 )。これらの試験において使用される A D A スクリーニング及び確認アッセイは、静脈内投薬計画を使用し、定常状態で達した、典型的な T C Z 血清濃度について十分な薬物耐性を示す。

20

## 【 0 0 7 6 】

しかし、異なる投与の経路、例えば皮下投与、より頻繁な投与、及び小児における新たな適応症は、定常状態でより高い T C Z 血清濃度をもたらさう。

## 【 0 0 7 7 】

加えて、例えば、リウマチ因子 ( R F ) は、しばしば、自己免疫疾患を伴う患者 ( 例えば関節リウマチ患者など ) において有意に増加する。R F は、凝集されたガンマグロブリンへの優先的な結合を実証し、インビボでの免疫複合体のクリアランス機構に含まれる ( Tatarewicz, S., et al., J. Immunol. Methods. 357 (2010) 10-16 )。R F は、優先的に五量体免疫グロブリン M ( I g M 抗体 ) アイソタイプであり ( Artandi, S.E., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1991) 94-98 )、多価及び培地親和性を伴い、治療用抗体の定常部に非特異的に結合することができ、A D A アッセイにおいて偽陽性結果に導く。例えば、親和性精製されたウサギ抗ヒト I g M 抗体をサンプル希釈物中に含めて、R A サンプル中の交差反応性 I g M 抗体干渉が克服された ( 例、Araujo, J., et al., J. Pharm. Biomed. Anal., 55 (2011) 1041-1049 を参照のこと )。

30

## 【 0 0 7 8 】

治療用抗体の血清サンプル中に存在する R F の非特異的結合が、A D A アッセイを実施する前に、オリゴマーヒト I g G をサンプルに加えることにより防止することができることを見出された。加えられたオリゴマー I g G は、R F のための追加の標的を提供し、本明細書において報告する A D A アッセイにおいて R F の干渉を最大に排除する。

## 【 0 0 7 9 】

以下において、本明細書において報告する干渉抑制 A D A アッセイは、トシリズマブで処置された関節リウマチ患者の血清サンプル ( T C Z ) の分析により例示される。

40

## 【 0 0 8 0 】

抗 I L 6 R 抗体トシリズマブに対する抗薬物抗体を検出するための従来の抗薬物抗体アッセイの薬物耐性を増加させるための対処は、以下である：

- 1 ) ピオチン化及びジゴキシゲニン化 T C Z の濃度を増加させること ( 例、0 . 5  $\mu$ g/ml から 1 . 5  $\mu$ g/ml まで ) ；
- 2 ) 血清サンプルと T C Z - B i 及び T C Z - D i g との同時インキュベーション ；
- 3 ) 血清サンプルと T C Z - B i 及び T C Z - D i g との長期インキュベーション ( 例、1 時間 ~ 1 6 時間 ) ；

50

4) リジン及び糖共役試薬の混合物の代わりに、リジン共役TCZ - Bi及びTCZ - Dig試薬だけの使用；

5) 増加した血清マトリックス含量の使用；並びに

6) TCZ - Bi及びTCZ - Digのインキュベーションの前にサンプルへのオリゴマーヒトIgGの添加。

【0081】

薬物耐性

臨床サンプル中で検出される抗IL6R抗体トシリズムブの濃度は、0.5 µg/ml又はそれより高く、しばしば、1 µg/ml ~ 10 µg/mlの範囲中にある。

【0082】

従来の抗薬物抗体アッセイの薬物耐性は、陽性対照ADAの所与の濃度が、カットポイントを上回り検出することができる最も高いTCZ濃度を決定することにより評価された。表1は、結果の要約を提示する。

【0083】

【表1】

表1: 従来の抗薬物抗体ELISAにおける薬物(トシリズムブ)耐性の決定。左整列シグナル値は、0.136 AUのプレート特異的なカットポイントを下回る。

	トシリズムブ [µg/mL]					
	6250	1250	250	50	10	0
ADA [ng/mL]	シグナル平均値 [AU]					
100000	0.049	0.109	0.949	3.094	3.169	3.144
10000	0.050	0.062	0.156	1.265	3.117	3.387
1000	0.052	0.058	0.071	0.189	0.865	2.141
500.0	0.051	0.057	0.065	0.120	0.448	1.282
250.0	0.055	0.060	0.065	0.092	0.255	0.703
125.0	0.056	0.060	0.064	0.076	0.157	0.385
62.5	0.056	0.060	0.062	0.067	0.108	0.226
0	0.059	0.061	0.062	0.062	0.060	0.071

【0084】

125 ng/mLのADA濃度が検出され、10 µg/mlのTCZの存在において陽性とテストされた。

【0085】

本明細書において報告する干渉抑制された薬物耐性の抗薬物抗体アッセイでの薬物耐性を、陽性対照ADAの所与の濃度が、カットポイントを上回り検出することができる最も高いTCZ濃度を決定することにより評価した。表2は、結果の要約を提示する。

【0086】

## 【表 2】

**表 2:** 本明細書において報告する干渉抑制された薬物耐性の抗薬物抗体 ELISA における薬物 (トシリズマブ) 耐性の決定。左整列シグナル値は、0.045 AU のプレート特異的なカットポイントを下回る。

	トシリズマブ [ $\mu\text{g/mL}$ ]					
	100	30	10	3	1	0
ADA [ng/mL]	シグナル平均値 [AU]					
10,000	0.948	2.263	3.266	3.536	3.146	3.272
3,000	0.310	0.943	1.956	> 3.5	2.860	3.161
1,000	0.119	0.364	0.789	1.051	1.180	2.292
300	0.055	0.133	0.280	0.376	0.426	0.857
100	0.033	0.057	0.105	0.144	0.163	0.310
30	0.027	0.036	0.051	0.063	0.068	0.113
10	0.022	0.025	0.032	0.039	0.040	0.056
0	0.024	0.023	0.026	0.027	0.027	0.027

10

20

## 【 0 0 8 7 】

本明細書において報告する干渉抑制された薬物耐性の抗薬物抗体 ELISA において、30 ng/mL の非常に低い ADA 濃度が検出され、10  $\mu\text{g/ml}$  の TCZ の存在において陽性とテストされた。さらに、100 ng/mL 及び 300 ng/mL の ADA 濃度は、それぞれ 30  $\mu\text{g/ml}$  及びさらに 100  $\mu\text{g/ml}$  の薬物抗体耐性を示す。

## 【 0 0 8 8 】

以前に使用された、トシリズマブについての二段階の従来抗薬物抗体 ELISA を用いて行われた同じ実験との比較において、干渉抑制アッセイを用いて少なくとも 10 倍高い薬物耐性が明らかになった (また、300 ng/mL の ADA 濃度についての図 4 を参照のこと)。

30

## 【 0 0 8 9 】

一価結合ビオチン及びジゴキシゲニンと捕捉及びトレーサー薬物抗体との、それぞれ 1 : 1 コンジュゲートを伴う、本明細書において報告する干渉抑制された薬物耐性の抗薬物抗体アッセイの薬物耐性を、陽性対照 ADA の所定の濃度が、カットポイントを上回り検出することができる、最も高い TCZ 濃度を決定することにより評価した。表 3 は、結果の要約を提示する。

## 【 0 0 9 0 】

## 【表 3】

**表 3:** 本明細書において報告する、ビオチン及びジゴキシゲニンと捕捉及びトレーサー薬物抗体との 1:1 コンジュゲートを伴う、干渉抑制された薬物耐性の抗薬物抗体 ELISA における薬物 (トシリズマブ) 耐性の決定。左整列シグナル値は、0.037 AU のプレート特異的なカットポイントを下回る。

	トシリズマブ [ $\mu\text{g/mL}$ ]					
	80	70	60	50	5	0
ADA [ng/mL]	シグナル平均値 [AU]					
500	0.090	0.097	0.112	0.122	0.380	1.071
250	0.057	0.061	0.067	0.075	0.215	0.653
125	0.043	0.045	0.048	0.053	0.133	0.343
0.0	0.025	0.024	0.026	0.027	0.030	0.027

10

## 【0091】

本明細書において報告する干渉抑制された薬物耐性の抗薬物抗体 ELISA において、250 ng/mL の ADA 濃度が検出され、80  $\mu\text{g/mL}$  の TCZ の存在において陽性とテストされた。

20

## 【0092】

干渉抑制：

16 の臨床血清サンプルが、Stubenrauch ら (上記) において記載される通りの従来の抗薬物抗体アッセイにより分析された。結果を表 4 a に要約する。

## 【0093】

## 【表 4】

**表 4a:** Stubenrauch ら (上記) に従った ADA アッセイを用いた、トシリズマブで処置された関節リウマチ患者からの 16 の血清サンプルでの分析の結果。

30

サンプル番号	従来の ADA アッセイ
1	+
2	+
3	+
4	+
5	+
6	+
7	+
8	-
9	-
10	-
11	-
12	-
13	-
14	-
15	-
16	+

40

## 【0094】

50

アッセイ原理の変更を伴わず、一連の対処が、本明細書において報告する通りの干渉抑制された薬物耐性の抗薬物抗体 E L I S A を得るために取られた。

【 0 0 9 5 】

これらは以下である：

- 1) ビオチン化及びジゴキシゲニン化 T C Z の濃度を増加させること (例、0.5 µg/ml から 1.5 µg/ml まで)；
- 2) 血清サンプルと T C Z - B i 及び T C Z - D i g との同時インキュベーション；
- 3) 血清サンプルと T C Z - B i 及び T C Z - D i g との長期インキュベーション (例、1 時間 ~ 1 6 時間)；
- 4) リジン及び糖共役試薬の混合物の代わりに、リジン共役 T C Z - B i 及び T C Z - D i g 試薬だけの使用；
- 5) 増加した血清マトリックス含量の使用；並びに
- 6) T C Z - B i 及び T C Z - D i g のインキュベーションの前にサンプルへのオリゴマーヒト I g G の添加。

10

【 0 0 9 6 】

本明細書において報告する干渉抑制アッセイを用いて得られた結果を表 4 b に示す。

【 0 0 9 7 】

【表 5】

**表 4b:** 従来の、及び本明細書において報告する干渉抑制 ADA アッセイを用いた、トシリズマブで処置された関節リウマチ患者からの 16 の血清サンプルの比較分析。

20

サンプル番号	従来の ADA アッセイ	干渉抑制 ADA アッセイ
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	+	+
6	+	+
7	+	+
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	-	-
13	-	-
14	-	-
15	-	+
16	+	-

30

40

【 0 0 9 8 】

上に概説する通りの対処の一部だけが取られた場合、干渉の低下が十分ではなく、依然として、リウマチ因子による干渉に対する感受性が存在し、偽陽性 A D A アッセイ結果をもたらすことが見出されている。

【 0 0 9 9 】

例えば、以下の対処が取られた場合、

- 1) ビオチン化及びジゴキシゲニン化 T C Z の濃度を増加させること (例、0.5 µg/ml から 1.5 µg/ml まで)；
- 2) 血清サンプルと T C Z - B i 及び T C Z - D i g との同時インキュベーション；

50

- 3) 血清サンプルとTCZ - Bi及びTCZ - Digとの長期インキュベーション(例、1時間~16時間)；
  - 4) リジン及び糖共役試薬の混合物の代わりに、リジン共役TCZ - Bi及びTCZ - Dig試薬だけの使用；並びに
  - 5) 増加した血清マトリックス含量の使用；
- 偽陽性のアッセイ結果に対する感受性の完全な低下を見ることはできない。比較データを表4cに示す。

【0100】

【表6】

**表 4c:** 異なるフォーマットの ADA アッセイを用いた、トシリズマブで処置された関節リウマチ患者からの 16 の血清サンプルでの比較分析。

10

サンプル番号	本明細書において報告する干渉抑制 ADA アッセイ	
	添加剤を伴わない	添加剤を伴う
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	+	+
6	+	+
7	+	+
8	+	-
9	-	-
10	+	-
11	+	-
12	+	-
13	+	-
14	+	-
15	+	+
16	+	-

20

30

【0101】

従来の ADA アッセイ及び本明細書において報告する干渉抑制された薬物耐性の ADA アッセイを用いた、TCZ 処置 RA 患者からの 258 の異なる血清サンプルの比較評価では、12 サンプルにおいて同じ陽性結果が示された。従来のアッセイでは、27 のプラセボ患者が陽性と測定されたのに対し、本明細書において報告する干渉抑制された薬物耐性の ADA アッセイでは4つだけであった。結論として、本明細書において記載する一連の対処及び ADA アッセイ添加物としてのオリゴマーヒト IgG の添加によって、従来の ADA アッセイと比較し、増加した薬物耐性及び抑制された RF による干渉が付与された。

40

【0102】

上記のデータのサブセット分析を表7に示す。

【0103】

【表 7】

表 7.

患者		従来の ELISA		干渉抑制 ELISA
P1	+	0.812	+	0.110
P2	+	1.009	+	0.893
P2	-	0.097	+	0.088
P2	+	0.276	+	0.228
P3	+	0.349	+	0.566
P3	+	2.405	+	1.760
P3	+	1.307	+	1.001
P4	+	1.409	+	0.242
P5	+	0.219	+	0.060
P6	+	0.387	+	0.688
P6	+	3.689	+	3.721
P6	+	3.506	+	3.722
P7	+	0.771	+	0.058

10

試験関連 CP : 0 . 2 1 5 ( 従来の E L I S A ) ; 0 . 0 5 8 ( 干渉抑制 E L I S A ) ;  
+ : 陽性の E L I S A 結果 ; - : 陰性の E L I S A 結果

20

【 0 1 0 4 】

表 8 a において、T C Z で処置されていない 2 7 人のプラセボ患者についてのアッセイシグナルが示されている。T C Z 処置誘導性 A D A の非存在に起因して、この群における高いアッセイシグナルは、予想されておらず、潜在的な干渉を示しうる。

【 0 1 0 5 】

【表 8】

表 8a.

患者		従来の ELISA		干渉抑制 ELISA
P8	+	0.270	-	0.032
P8	+	0.231	-	0.033
P9	+	3.736	-	0.055
P9	+	3.297	+	0.058
P9	+	2.863	-	0.046
P9	+	3.739	-	0.052
P1	+	0.812	+	0.110
P10	+	0.755	-	0.021
P10	+	0.635	-	0.021
P11	+	0.272	-	0.020
P11	+	0.271	-	0.021
P11	+	0.234	-	0.020
P12	+	1.157	-	0.027
P12	+	1.362	-	0.028
P12	+	1.149	-	0.029
P4	+	0.522	-	0.033
P4	+	1.409	+	0.242
P4	+	0.651	-	0.047
P13	+	0.349	-	0.023
P14	+	0.245	-	0.033
P14	+	0.276	-	0.035
P14	+	0.275	-	0.037
P15	+	0.580	-	0.049
P7	+	0.990	-	0.056
P7	+	0.822	-	0.052
P7	+	0.523	-	0.042
P7	+	0.771	+	0.058

10

20

30

40

試験関連カットポイント (CP) : 0.215 (従来の ELISA) ; 0.058 (干渉抑制 ELISA) ; + : 陽性の ELISA 結果 ; - : 陰性の ELISA 結果

## 【0106】

両方のアッセイのシグナルパターンは、非常に異なっている : 全ての 27 のプラセボサンプルが、従来の ELISA を使用して陽性と決定されたのに対し、しかし、27 サンプルのうち 4 つだけが、本明細書において報告する干渉抑制 ELISA を用いて陽性と決定された。

## 【0107】

プラセボ処置患者に加えて、TCZ 処置患者のサンプルが分析されている。表 8 b において、TCZ 処置前の患者についての結果が示されている。表 8 c において、TCZ 処置患者についての結果が示されている。

## 【0108】

【表 9】

表 8b.

患者	時点	従来 ELISA		干渉抑制 ELISA		投薬
		+	値	+	値	
P2	ベースライン	+	1.009	+	0.893	4
P16	ベースライン	+	0.745	-	0.021	8
P17	ベースライン	+	0.281	-	0.020	8
P18	ベースライン	+	1.401	-	0.023	4

10

試験関連 CP : 0 . 2 1 5 ( 従来 の E L I S A ) ; 0 . 0 5 8 ( 干渉抑制 E L I S A ) ;  
 + : 陽性の E L I S A 結果 ; - : 陰性の E L I S A 結果

【 0 1 0 9 】

【 表 1 0 】

表 8c.

患者	時点	従来 ELISA		干渉抑制 ELISA		投薬
		+	値	+	値	
P19	24 週	+	0.281	-	0.030	4 mg/kg
P19	24 週	+	0.226	-	0.031	4 mg/kg
P19	4 週	+	0.293	-	0.030	4 mg/kg
P19	8 週	+	0.362	-	0.028	4 mg/kg
P2	4 週	-	0.097	+	0.088	4 mg/kg
P2	8 週	+	0.276	+	0.228	4 mg/kg
P16	24 週	+	0.416	-	0.030	8 mg/kg
P16	4 週	+	0.542	-	0.029	8 mg/kg
P16	4 週	+	0.397	-	0.024	8 mg/kg
P3	24 週	+	2.405	+	1.760	4 mg/kg
P3	28 週	+	1.307	+	1.001	4 mg/kg
P3	4 週	-	0.181	+	0.120	4 mg/kg
P3	8 週	+	0.349	+	0.566	4 mg/kg
P20	8 週	+	0.818	-	0.034	4 mg/kg
P21	4 週	+	0.289	-	0.031	8 mg/kg
P17	12 週	+	0.369	-	0.023	8 mg/kg
P17	24 週	+	0.330	-	0.022	8 mg/kg
P17	4 週	+	0.488	-	0.022	8 mg/kg
P17	4 週	+	0.465	-	0.025	8 mg/kg
P17	8 週	+	0.409	-	0.026	8 mg/kg
P18	4 週	+	1.218	-	0.026	4 mg/kg
P18	4 週	+	1.041	-	0.028	4 mg/kg
P5	28 週	+	0.219	+	0.060	8 mg/kg
P6	12 週	+	3.689	+	3.721	4 mg/kg
P6	24 週	+	3.506	+	3.722	4 mg/kg
P6	8 週	+	0.387	+	0.688	4 mg/kg
P22	24 週	+	0.423	-	0.020	4 mg/kg

20

30

40

試験関連 CP : 0 . 2 1 5 ( 従来 の E L I S A ) ; 0 . 0 5 8 ( 干渉抑制 E L I S A ) ;  
 + : 陽性の E L I S A 結果 ; - : 陰性の E L I S A 結果

50

## 【 0 1 1 0 】

本明細書において報告するアッセイは、用いられる治療用抗体及び標的から独立した利益を提供する。これは、関節リウマチについて陽性と診断された患者のサンプルを使用して、抗 I L 6 R 抗体、抗 I G F - 1 R 抗体、抗 I L 1 3 R 抗体、抗 O X 4 0 L 抗体、及び抗 A b e t a 抗体について、下表に示す。

## 【 0 1 1 1 】

## 【表 1 1】

表 9a: 抗 IL6R 抗体

患者	従来の ELISA		干渉抑制 ELISA	
P23	+	0.169	-	0.079
P24	+	0.197	-	0.082
P25	+	0.240	-	0.110
P26	-	0.131	-	0.088
P27	+	0.215	-	0.111
P28	+	0.199	-	0.136
P29	-	0.135	-	0.085
P30	+	0.220	-	0.086
P31	+	0.158	-	0.100
P32	+	0.221	-	0.132
P33	-	0.110	-	0.081
P34	-	0.099	-	0.090
P35	-	0.100	-	0.082
P36	-	0.098	-	0.076
CP	0.157		0.140	

10

20

## 【 0 1 1 2 】

## 【表 1 2】

表 9b: 抗 IGF-1R 抗体

患者	従来の ELISA		干渉抑制 ELISA	
P23	-	0.153	-	0.127
P24	+	0.423	-	0.132
P25	+	0.266	-	0.145
P26	-	0.171	-	0.163
P27	-	0.152	-	0.132
P28	-	0.133	-	0.120
P29	+	0.245	-	0.124
P30	-	0.173	-	0.142
P31	-	0.152	-	0.115
P32	-	0.172	-	0.131
P33	-	0.131	-	0.134
P34	-	0.124	-	0.115
P35	+	0.189	+	0.189
P36	-	0.157	-	0.154
CP	0.176		0.185	

30

40

## 【 0 1 1 3 】

50

## 【表 1 3】

表 9c: 抗 IL13R $\alpha$  抗体

患者	従来の ELISA		干渉抑制 ELISA	
P23	+	0.556	-	0.080
P24	+	0.881	+	0.198
P25	+	2.192	+	0.761
P26	+	0.674	+	0.235
P27	+	0.604	-	0.044
P28	+	0.177	-	0.000
P29	-	0.000	-	0.006
P30	+	0.424	-	0.091
P31	+	0.342	-	0.000
P32	+	0.353	-	0.092
P33	+	0.208	-	0.021
P34	-	0.000	-	0.000
P35	-	0.079	-	0.097
P36	+	0.238	+	0.235
CP		0.100		0.100

10

20

## 【 0 1 1 4】

## 【表 1 4】

表 9d: 抗 OX40L 抗体

患者	従来の ELISA		干渉抑制 ELISA	
P23	+	0.148	-	0.073
P24	+	0.477	-	0.066
P25	+	0.414	+	0.087
P26	-	0.103	-	0.067
P27	+	0.137	-	0.072
P28	+	0.211	+	0.126
P29	-	0.116	-	0.074
P30	+	0.436	-	0.064
P32	+	0.198	-	0.079
P33	+	0.122	-	0.078
P34	-	0.096	-	0.070
P35	-	0.088	-	0.067
P36	+	0.121	-	0.076
CP		0.117		0.085

30

40

## 【 0 1 1 5】

## 【表 15】

表 9e: 抗 A $\beta$  抗体

患者	従来の ELISA		干渉抑制 ELISA	
P25	+	0.063	-	0.025
P26	-	0.025	-	0.026
P28	+	0.086	+	0.080
P29	-	0.020	-	0.021
P30	-	0.037	-	0.022
P31	-	0.036	-	0.024
P32	-	0.029	-	0.024
P33	-	0.027	-	0.026
P34	+	0.069	+	0.069
P35	-	0.019	-	0.021
P36	-	0.033	-	0.032
CP	0.044		0.042	

10

## 【0116】

以下の実施例及び図を提供し、本発明の理解を助け、その真の範囲は、添付の特許請求の範囲に示されている。変更が、本発明の精神から逸脱することなく示される手順においてなされることが理解される。

20

## 【0117】

## 実施例

## 材料及び方法

精製されたプールヒト免疫グロブリンクラス G ( I g G ) を、Stubenrauch ( Anal. Biochem. 390 (2009) 189-196 ) により記載される通りに調製した。簡単には、健康なドナーからのプールヒト血清を、Aerosil ( 二酸化ケイ素、1.5% ( w / v ) ) を用いて脱脂し、硫酸アンモニウム ( 2.0M ) を用いて沈殿させた。ペレットをリン酸緩衝液中でホモジナイズし、リン酸緩衝液 ( pH 7.0 ) に対して透析した。この混合物を、DEAE イオン交換クロマトグラフィー ( pH 7.0 ) により分離し、フロースルー中の I g G を 5.93 mg/mL まで濃縮し、ゲル濾過により精製した。

30

## 【0118】

ポリクローナル抗ジゴキシゲニン西洋ワサビペルオキシダーゼ ( HRP ) コンジュゲート ( Fab フラグメント ) を、Roche Diagnostics GmbH ( ドイツ、マンハイム ) ( カタログ番号 11633716 ) から入手した。陽性品質管理 ( QC ) 及び較正標準 ( CS ) として使用されるポリクローナルウサギ抗 T C Z 抗体 ( 0.5 mg 等量/mL ) を、Stubenrauch ( 上記 ) に記載される通りに調製した。

## 【0119】

個々のヒト血清サンプルは、Roche Diagnostics GmbH ( ドイツ、ペンツベルク ) の血清銀行により提供された。陰性対照用のプールヒト血清マトリクスは、TCS Biosciences Ltd. ( 英国、バッキンガム ) により供給された。

40

## 【0120】

以下の試薬は、Roche Diagnostics GmbH ( ドイツ、マンハイム ) から入手した：2, 2'-アジノ-ビス ( 3-エチルペンズチアゾリン-6-スルホン酸 ( A B T S ) 基質 ( カタログ番号 11684302-001 ) )、ELISA 用の洗浄緩衝液：リン酸緩衝生理食塩水 ( PBS ) ( 0.01M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.37M NaCl、0.027M KCl ; pH 7.0 ) / 0.05% ポリソルベート 20 ( Tween 20 ) ( カタログ番号 11332465-001 ) 及び ELISA において希釈緩衝液として使用される調整済みユニバーサル緩衝液 ( カタログ番号 4742672 )。全ての化学物

50

質は分析グレードであった。

【0121】

ストレプトアビジンコーティングされたマイクロタイタープレート (S A - M T P) は、MicroCoat Biotechnologie GmbH (ベルンリート) から得られた。コーティングされていないNunc 96マイクロウェルプレートは、Fisher Scientific GmbH (ドイツ、シュヴェーアテ) (カタログ番号442587) からであり、プレインキュベーションのために使用された。

【0122】

従来の抗薬物抗体アッセイ：

アッセイは室温で実施した。第1工程において、T C Z - B iを、シェーカー上で、400 rpmで1時間にわたり100 µLをインキュベートすることにより、0.5 µg/mlの濃度でS A - M T Pに結合させた。プレインキュベーション溶液をS A - M T Pに加える前に、過剰の未結合T C Z - B iを、3回洗浄することにより除去した。コーティング手順と並行して、標準及びサンプルのプレインキュベーションは、別々のコーティングされていない96ウェルプレート中で2通りに実施した。サンプル及び標準を、ウェル中で10%血清マトリックスを用いて75 µLの容量まで希釈し(1:10)、同じ容量のT C Z - D I Gと混合し、1時間のプレインキュベーション期間を開始した。T C Z - B iコーティングされたS A - M T Pを、プレインキュベーションプレートの各ウェルから、コーティングされたM T Pのウェルに100 µLを移すことにより添加し、シェーカー上で、400 rpmで1時間にわたりインキュベートした。洗浄後、100 µL (100 mU/mL) の容量中のポリクローナル抗D i g西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) コンジュゲートをウェルに加え、1時間にわたりシェーカー上でインキュベートした。洗浄後、H R P触媒による発色反応を、100 µLのA B T S溶液を加えることにより開始した。最大光学密度 (O D) が約2.0であった時、通常20~30分間以内に、呈色反応のシグナルを、405 nm (参照、490 nm) の波長で、E L I S Aリーダーにより測定した。同じアッセイを、確認試薬の存在において、確認試薬を伴わない同時測定を用いて実施した。得られたO Dのデータは、サンプル濃度を算出するためのW i e m e r - R o d b a r d方法に従った非線形4パラメーター回帰曲線適合により標準検量曲線を作成するために使用した。

【0123】

テスト結果についてのカットオフポイントは、健康なボランティア及びR Aを伴う患者からのヒトblank血清サンプルの複数の分析からのアッセイシグナル (O D) の95% C Iで設定した。スクリーニングテストの結果は、カットオフを上回る値で陽性と考えた。非スパイクサンプルと比べた、吸光度における>20%の減少は、陽性結果を示した。スクリーニングのカットオフは、参照抗体の61.4 ng/mLで決定した。アッセイ内及びアッセイ間の正確性は、それぞれ84.8%~93.1%及び91.3%~92.2%であった。アッセイ内及びアッセイ間の精度についての対応する値は1.8%~2.0%及び6.8%~8.0%であった。E L I S Aの正確性は、アッセイの結果が真の値と一致した程度により定義した。正確性は、ヒト血清中にスパイクされたウサギポリクローナル抗T C Z陽性対照標準の測定濃度を、抗T C Zの名目濃度と比較することにより決定した。高濃度 (360 ng当量/mL) 及び低濃度 (60 ng当量/mL) 陽性対照標準を、アッセイ内の正確性を決定するために、2通りに測定された各陽性対象標準の6アリコート中、及び、アッセイ間の正確性を決定するために、2通りに測定された各陽性対照標準の3アリコート中で分析した。

【0124】

実施例1

抗I L 6 R抗体トシリズマブのビオチン化

a) 従来のビオチン化I g Gの調製

抗I L 6 R抗体トシリズマブを、緩衝液 (100 mMリン酸カリウム緩衝液 (以下において、K - P O 4として表示する)、p H 8.5) に対して透析した。その後、溶液を、5

mg/mLのタンパク質濃度まで調整した。D - ビオチノイル - アミノカプロン酸 - N - ヒドロキシスクシンイミドエステルを、ジメチルスルホキシド (DMSO) 中に溶解し、1 : 5 のモル比で抗体溶液に加えた。60分後、反応を、L - リジンを加えることにより停止させた。余剰の標識試薬を、150mM KCl、pH 7.5を添加した50mM K - PO<sub>4</sub>に対する透析により除去した。TCZ - Biのアリコートに、6.5%スクロースを含め、-80 で保存した。

【0125】

b) モノビオチン化 IgG の調製

抗IL6R抗体トシリズマブを、100mM K - PO<sub>4</sub>、pH 8.5に対して透析し、その後、溶液を5mg/mLのタンパク質濃度まで調整した。D - ビオチノイル - アミノカプロン酸 - N - ヒドロキシスクシンイミドエステルを、ジメチルスルホキシド (DMSO) 中に溶解し、1 : 1のモル比で抗体溶液に加えた。60分後、反応を、L - リジンを加えることにより停止させた。余剰の標識試薬を、150mM KCl、pH 7.2を添加した25mM K - PO<sub>4</sub>に対する透析により除去した。混合物を、1M硫酸アンモニウムを含む100mM K - PO<sub>4</sub>、150mM KCl、pH 7.2を伴う緩衝液に移し、ストレプトアビジンムテインセファロースを伴うカラムに適用した。非ビオチン化IgGはフロースルー中あり、モノビオチン化IgGは、100mM K - PO<sub>4</sub>、150mM KCl、1.5%DMSO、pH 7.2を用いて溶出し、より高いビオチン化集団を含むビオチン化IgGを、100mM K - PO<sub>4</sub>、150mM KCl、2mM D - ビオチン、pH 7.2を用いて溶出する。モノビオチン化抗体を、150mM KCl、pH 7.5を添加した50mM K - PO<sub>4</sub>に対して透析した。アリコートに、6.5%スクロースを含め、-80 で保存した。

10

20

【0126】

実施例 2

抗IL6R抗体トシリズマブのジゴキシゲニン化

a) 従来 of ジゴキシゲニン化 IgG の調製

抗IL6R抗体トシリズマブを、緩衝液 (100mMリン酸カリウム緩衝液 (以下において、K - PO<sub>4</sub>として表示する)、pH 8.5) に対して透析した。その後、溶液を、5mg/mLのタンパク質濃度まで調整した。ジゴキシゲニン 3 - O - メチル - アミノカプロン酸 - N - ヒドロキシスクシンイミドエステルを、DMSO中に溶解し、1 : 4のモル比で抗体溶液に加えた。60分後、反応を、L - リジンを加えることにより停止させた。余剰の標識試薬を、150mM NaCl、pH 7.5を添加した50mM K - PO<sub>4</sub>に対する透析により除去した。ジゴキシゲニン化TCZ (TCZ - Dig) は、6.5%スクロースを含むアリコートとして、-80 で保存した。

30

【0127】

b) モノジゴキシゲニン化 IgG の調製

抗IL6R抗体トシリズマブを、100mM K - PO<sub>4</sub>、pH 8.5に対して透析し、その後、溶液を5mg/mLのタンパク質濃度まで調整した。ジゴキシゲニン 3 - O - メチル - アミノカプロン酸 - N - ヒドロキシスクシンイミドエステルを、ジメチルスルホキシド (DMSO) 中に溶解し、1 : 1のモル比で抗体溶液に加えた。60分後、反応を、L - リジンを加えることにより停止させた。余剰の標識試薬を、150mM KCl、pH 7.5を添加した50mM K - PO<sub>4</sub>に対する透析により除去した。混合物を、ジゴキシゲニンに対する固定化モノクローナル抗体を伴うセファロースカラムに適用した。非ジゴキシゲニン化抗体は通過画分にあり、モノジゴキシゲニン化IgGは、穏やかな溶出緩衝液 (Thermo Scientific、# 21013) を用いて溶出し、より高いジゴキシゲニン化集団を含むジゴキシゲニン化抗体を、1Mプロピオン酸を用いて溶出する。モノジゴキシゲニン化抗体を伴う分画を、第1に20mM TRIS、20mM NaCl、pH 7.5に対して、第2に50mM K - PO<sub>4</sub>、150mM KCl、pH 7.5に対して透析した。アリコートに、6.5%スクロースを含め、-80 で保存した。

40

【0128】

50

## 実施例 3

## オリゴマー形態におけるヒト Ig G の生成

イオン交換クロマトグラフィーによりヒト血清から精製したヒト Ig G を、100 mM NaCl、pH 8.4 を含む 150 mM リン酸カリウム緩衝液に対して透析し、タンパク質溶液を、50 mg/mL タンパク質濃度まで濃縮した。ジスクシンイミジルスプレート (DSS) を DMSO 中に溶解し、1:6 (Ig G : DSS) のモル比で抗体溶液に加えた。混合物を 25 及び pH 8.4 で攪拌を伴いインキュベートし、反応物を、分析用ゲル濾過カラム (例、TSK 4000 カラムを使用して) を用いて分析した。重合を、140 分後に、最終濃度 20 mM までリジンを加えることにより停止させた。25 での 45 分のインキュベーション後、オリゴマーヒト Ig G をゲル濾過 (例、セファクリル S 400 カラムを使用する) により分離し、低分子量画分を除去した。オリゴマーの組成物は、UV 分光法、サイズ排除クロマトグラフィー、及び SDS-PAGE ゲル電気泳動により特徴付けた。オリゴマーヒト Ig G を分注し (10.5 mg/mL)、それを、イムノアッセイにおける ADA アッセイ添加剤 (AAA) としての使用のために、Universal 緩衝液 (カタログ番号 4742672) を用いて 55.6 µg/ml の濃度まで新たに希釈するまで、-65 で保存した。

【0129】

## 実施例 4

## 較正標準及び品質管理サンプルの調製

較正標準 (CS) 及び品質管理サンプル (QC) のためのストック溶液を別々に調製した。CS サンプルは、TCZ の 0.5 mg/mL ストック溶液を使用し、アッセイの日に新たに調製した。ヒトプール血清 (HPS) を用いた予備希釈後、結果として得られた CS 作業溶液を、100% HPS を用いて段階的に希釈し、アッセイ使用前に、1,000; 500; 250; 125; 62.5; 31.3; 及び 15.6 ng/mL のキャリブレーション濃度をもたらした。陰性対照は 100% HPS であった。アッセイにおけるプレインキュベーション工程のために、CS サンプルを 1:10 に希釈し、10% の血清濃度及び 100 ng/mL ~ 1.56 ng/mL のアッセイ濃度範囲に調整した。

【0130】

使用された QC ストックサンプルは、100% ヒトプール血清中で作られ、単一使用のアリコートとして -20 で保存した。3つの別々の QC サンプルを調製し、高 (750 ng/mL)、中程度 (400 ng/mL)、及び低 (50 ng/mL) の非希釈血清濃度を表すストック濃度で保存した。アッセイにおけるプレインキュベーション工程のために、QC サンプルを、10% の血清濃度に達するように、捕捉/検出溶液中で新たに 1:10 希釈した。25 ng/mL でのアッセイの典型的なカットポイントでの第 4 の QC サンプルをさらに使用した。

【0131】

## 実施例 5

## ADA スクリーニング及び確認アッセイ

サンドイッチ ELISA を、トシリズマブ (TCZ) に対する抗薬物抗体 (ADA) のスクリーニング及び確認の両方のために使用した (Stubenrauch, K., et al., Clin. Ther. 32 (2010) 1597-1609 を参照のこと)。この方法の原理は、TCZ-Di g 及び TCZ-Bi との複合体における ADA の捕捉であり、後者は、ストレプトアビジンでコーティングされたプレート上での固定化に導く。SA-MTP に結合した TCZ-Bi / ADA / TCZ-Di g 複合体は、抗 Di g-HRP 酵素コンジュゲート抗体により検出された。薬物耐性抗薬物抗体アッセイの原理を図 1 に示す。ADA アッセイの添加剤としてのオリゴマー Ig G の包含は、図 2 に示す通りの干渉抑制された抗薬物抗体アッセイに導く。ポリクロナル抗体の西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) は、基質 ABTS の呈色反応を触媒する。色の強度は、分析物の濃度に比例する。

【0132】

スクリーニングアッセイは、室温で実施した。試薬及び血清サンプルを、Universal 緩

10

20

30

40

50

衝液（カタログ番号4742672）を用いて希釈し、全ての洗浄工程を、洗浄緩衝液（PBS、0.05%ポリソルベート20（Tween 20）（カタログ番号11332465-001））を用いて3回実施した（1ウェル当たり300 $\mu$ L）。インキュベーションは、500rpmでのマイクロタイタープレートシェーカー（MTPシェーカー）上で、震盪下で実施した。テストサンプル、QC及びCSサンプルは、捕捉抗体TCZ-Bi及び検出抗体TCZ-Digを用いて、一晚（16時間まで）インキュベートした。プレインキュベーションマイクロタイタープレート（MTP）の各ウェルに、オリゴマーヒトIgG ADAアッセイ添加剤（AAA）を伴う、1.667 $\mu$ g/mlのTCZ-Bi及び1.667 $\mu$ g/mlのTCZ-Digを含む捕捉/検出溶液の225 $\mu$ Lを添加し、その後、それぞれのサンプルの25 $\mu$ Lを加えた。結果として得られるTCZ-Bi及びTCZ-Digの濃度は、各々1.5 $\mu$ g/mlであり、オリゴマーヒトIgGは50 $\mu$ g/mlの濃度を有していた。添加されたMTPは、蒸発を防止するために被覆し、一晚インキュベートした。プレインキュベーションプレートの各ウェルの100 $\mu$ Lの2通りを、ストレプトアビジンコーティングされたマイクロタイタープレート（SA-MTP）のウェルに移し、被覆し、1時間にわたりインキュベートした。

#### 【0133】

洗浄後、2.5mU/mLの濃度を伴うポリクローナル抗Dig Fab-HRP複合体を、各ウェルに100 $\mu$ Lの容量で加え、1時間にわたりインキュベートした。洗浄後、ABTS調製済み溶液を、各ウェルに100 $\mu$ Lアリコートで加え、約10～15分間にわたり、振盪しながらインキュベートした。発色反応のシグナルを、405nm波長（リファレンス波長：490nm）でELISAリーダーにより測定した。各々の血清サンプルの吸光度値を3通りに測定した。最も高い標準は、1.8～2.2の間の任意単位（AU）の光学密度（OD）に達しなくてはならない。得られたODのデータを、サンプル濃度を算出するために、非線形4パラメーター適合「Wiener Rodbard」により標準検量曲線を生成するために使用した。サンプルは、濃度の回収が、特異性カットポイント未満である場合、ADAに陽性として確認された。

#### 【0134】

特異性カットポイントの評価を、1つのMTPについて2通りに、関節リウマチ患者の32の個々のブランクヒト血清サンプルの分析により実施した。カットポイントによって、それを上回る場合、サンプルがADAスクリーニングアッセイにおけるADAの存在について潜在的に陽性として定義されるシグナルが特定される。データの非正規性に起因して、95%パーセンタイルを伴う非パラメトリックアプローチが、複製プレート上のカットポイントの平均値に基づくカットポイントの算出のために適用された。

#### 【0135】

関節リウマチ患者の32の個々のヒトブランク血清サンプルの重複測定からADAアッセイのカットポイントを決定するために行った実験によって、約0.009の標準偏差（SD）を伴う3つの異なるプレート上での約0.026の平均AUが明らかになった。対応する変動係数（CV）は、それぞれ23.8%；20.0%；及び19.0%であった。これらのデータセットに基づき、NF=1.6905の正規化係数が得られ、それは、アッセイ定量化を通して使用され、プレート特異的なカットポイントに適用される（プレート特異的なカットポイント[AU]=シグナル[AU]（陰性対照） $\times$ NF）。

#### 【0136】

スクリーニングADAアッセイの定量化については、1.56ng/mL～100ng/mLのアッセイ濃度範囲を伴う7つの較正サンプル及びブランクサンプルを伴う5つの独立した検量曲線製剤を、1つのプレート上で2通りに測定した。アッセイ内での定量化の実行は、単一のプレート上で2通りに測定された4つのQCサンプルの各々を伴う5つの複製物（5つの別々のバイアル）を用いて実施した。2通りに測定された全てのQCサンプルのアッセイ間の定量化データが、4つの異なる日に少なくとも2人のオペレーターにより実施される7つの独立したテストの実行から得られた。

#### 【0137】

10

20

30

40

50

干渉抑制 E L I S A の典型的な較正曲線を図 3 に示す。サンプルの二重測定を精度を定量化実験の間に評価し、その C V は 1 5 % を超えなかった。干渉抑制 A D A E L I S A のアッセイ内及びアッセイ間の精度及び正確性の値を表 5 に要約する。

【 0 1 3 8 】

【表 1 6】

**表 5:** ヒト血清中にスパイクされたトシリズマブ特異的な ADA を使用した干渉抑制 ELISA のアッセイ内及びアッセイ間の精度及び正確性の決定。

	100 %血清中の ADA 濃度 [ng/mL]					
	アッセイ内 (n=5)			アッセイ間 (n=7)		
	高 QC	中 QC	低 QC	高 QC	中 QC	低 QC
スパイク (予測濃度)	750	400	50	750	400	50
測定濃度の平均値	683	382	50.8	696	402	52.5
測定濃度の SD	15.6	15.8	1.33	21.2	13.6	2.8
精度 (% CV)	2.28	4.14	2.62	3.04	3.38	5.33
正確性 (%回収)	91.1	95.5	102	92.8	101	105

10

【 0 1 3 9 】

決定されたアッセイ内精度は、25 ng/mL のカットポイント QC を含む、全ての QC について < 5 % であった。決定されたアッセイ内の正確性は、91.1% ~ 102% の範囲中であつたが、全てのカットポイント QC サンプルは陽性とテストされた。逆算された QC についてのアッセイ間の精度は、全ての QC について < 6 % であった。決定されたアッセイ間の正確性は、高、中、低 QC について 92.8% ~ 105% であった。全てのカットポイントの QC 測定値が、ADA 陽性を提供した。

20

【 0 1 4 0 】

潜在的な高用量フック効果は、25,000 ng/mL ~ 6.1 ng/mL のアッセイ濃度範囲内の陽性対照サンプルでの連続滴定 (2 : 1) により評価した。アッセイ範囲内の ADA 濃度の回復は、77.9% と 98.9% の間であつた。潜在的なマトリックス効果の分析のために、11 の個々の正常ヒト血清サンプルを、高及び低用量 QC、即ち、100% 血清中の 50 及び 750 ng/mL で、陽性対照 ADA を用いてスパイクし、定量化した。また、QC サンプルも同じプレート上で分析した。低及び高 ADA 濃度の回復は、111% (範囲 : 104 ~ 117%) 及び 111% (範囲 : 107 ~ 117%) であり、干渉抑制 ADA ELISA においてマトリックス効果がないことを示した。

30

【 0 1 4 1 】

薬物耐性は、最も高い TCZ 濃度を決定することにより評価したが、その濃度では、陽性対照 ADA の所与の濃度が、カットポイントを上回り検出することができる。表 2 は、完全なデータセットの要約を提示する。

【 0 1 4 2 】

## 【表 17】

**表 2:** 本明細書において報告する干渉抑制された薬物耐性の抗薬物抗体 ELISA における薬物 (トシリズマブ) 耐性の決定。左整列シグナル値は、0.045 AU のプレート特異的なカットポイントを上回り、右調整値は、カットポイントを下回る。

	TCZ [ $\mu\text{g/mL}$ ]					
	100	30	10	3	1	0
ADA [ $\text{ng/mL}$ ]	シグナル平均値 [AU]					
10,000	0.948	2.263	3.266	3.536	3.146	3.272
3,000	0.310	0.943	1.956	> 3.5	2.860	3.161
1,000	0.119	0.364	0.789	1.051	1.180	2.292
300	0.055	0.133	0.280	0.376	0.426	0.857
100	0.033	0.057	0.105	0.144	0.163	0.310
30	0.027	0.036	0.051	0.063	0.068	0.113
10	0.022	0.025	0.032	0.039	0.040	0.056
0	0.024	0.023	0.026	0.027	0.027	0.027

10

## 【0143】

臨床サンプル中で検出される抗 IL6R 抗体トシリズマブの濃度は、0.5  $\mu\text{g/ml}$  又はそれより高く、しばしば、1  $\mu\text{g/ml}$  ~ 10  $\mu\text{g/ml}$  の範囲中にある。30  $\text{ng/mL}$  の非常に低い ADA 濃度が検出され、10  $\mu\text{g/ml}$  の TCZ の存在において陽性とテストされた。さらに、100  $\text{ng/mL}$  及び 300  $\text{ng/mL}$  の ADA 濃度は、それぞれ 30  $\mu\text{g/ml}$  及びさらに 100  $\mu\text{g/ml}$  の薬物抗体耐性を示す。以前に使用された、トシリズマブについての二段階の従来の ADA ELISA を用いて行われた同じ実験によって、干渉抑制アッセイを用いて少なくとも 10 倍高い薬物耐性が明らかになった (300  $\text{ng/mL}$  の ADA 濃度についての図 4 を参照のこと)。

20

## 【0144】

確認アッセイにおける過剰な遊離薬物として使用された TCZ の濃度は、薬物干渉実験において得られたデータセットに基づいていた。サンプル中の高レベルの ADA を抑制することができる TCZ 濃度を評価するために、陽性対照サンプルの 4 つの異なる濃度 (100% 血清中の 1,000 ; 500 ; 250 ; 83.3  $\text{ng/mL}$ ) を、各々、漸増濃度の TCZ (100% 血清中の 0 ; 16 ; 31 ; 63 ; 125 ; 250  $\mu\text{g/ml}$ ) とインキュベートした。陽性対照 ADA の高濃度での測定シグナルの少なくとも 95% (5% 未満のシグナル回復に相当する) を阻害する TCZ 濃度は、TCZ の 25  $\mu\text{g/ml}$  と決定された。

30

## 【0145】

後の試験中のテスト段階の間に試験サンプル中の ADA の親和性の差に起因する偽陰性の可能性を低下させるために、決定された値の 2 倍高い過剰な遊離薬物濃度を、さらなる評価のために使用した (即ち、100% 血清中の 400  $\mu\text{g/ml}$  に相当する 40  $\mu\text{g/ml}$  のアッセイ濃度)。

40

## 【0146】

特定の ADA を確認するために必要とされる最小のシグナル阻害値は、関節リウマチ患者の 16 の個々のブランクヒト血清サンプルと TCZ とのプレインキュベーションにより決定され、1 つのテスト実行において 2 通りに分析された。分析は、400  $\mu\text{g/ml}$  の遊離 TCZ を伴い、又は伴わずに実施された。遊離 TCZ の添加は、平均 14.1% (-11.5% から 34.8% の範囲及び 11.2% の SD) だけアッセイシグナルを低下させることが見出されている。99.9% の信頼区間 (平均値 + 3.09 SD) を適用することによって、ブランク血清サンプルについての 49% の最小シグナル低下がもたらされた。この計算に基づき、サンプルは、シグナルが、遊離薬物の非存在下におけるそれと比較した際に、過剰の遊離薬物の存在において多く 49% を上回り減少した場合、陽性確認と評価

50

された。参照サンプルとして、過剰TCZを伴わない、対応するサンプルが使用された。確認アッセイにおけるシグナル阻害の再現性を実証するために、高、中、低の陽性QC濃度を伴う血清サンプルを、事前に定められた濃度で、過剰のTCZを伴い、及び伴わず、3回分析した。

【0147】

TCZについての干渉抑制ADAアッセイは、100%血清中のADAキャリブレータの1,000 ng/mL ~ 15.6 ng/mLの測定範囲を有していた。アッセイ内の精度は、全ての品質管理について5%未満であり、アッセイ内の正確性は、91.1% ~ 102%であった。アッセイ間の精度及び正確性は、それぞれ6%未満及び92.8% ~ 105%であった。

10

【0148】

アッセイの定量化によって、フック及びマトリックス効果が排除された。

【0149】

干渉抑制ADAアッセイの薬物耐性は、以前のバージョンよりも少なくとも10倍高いことが分かる。

【0150】

確認アッセイは、サンプルが、過剰な遊離薬物、即ち、TCZを伴わず、及び伴い、並行して分析されたことを除き、本質的に、スクリーニングアッセイについて前に記載された通りに実施された。確認の捕捉/検出溶液には、サンプルの添加後に40 µg/ml TCZの最終アッセイ濃度を達成するために、追加の過剰TCZ(44.4 µg/ml)を伴う、捕捉/検出溶液の同じ用量が含まれた。過剰薬物を伴う確認条件下でのパーセントシグナル阻害の算出は、以下の等式を使用して行われた：

20

$\% \text{シグナル阻害} = 100 \times (1 - ([AU] \text{薬物前処理サンプル} / [AU] \text{未処理サンプル}))$

【0151】

実施例6

臨床サンプルへの干渉抑制ADAアッセイの適用

1) ビオチン化及びジゴキシゲニン化TCZの濃度を増加させること(例、1.5 µg/mlまで)；2) 血清サンプルとTCZ-Bi及びTCZ-Digとの同時インキュベーション；3) 血清サンプルとTCZ-Bi及びTCZ-Digとの長期インキュベーション(例、一晚)；4) リジン及び糖共役試薬の混合物の代わりに、リジン共役TCZ-Bi及びTCZ-Dig試薬だけの使用；並びに、増加した血清マトリックス(例、5%の代わりに10%)の使用からなる薬物耐性を増加させるための対処は、12/28から25/28へのADA陽性の増加をもたらした。

30

【0152】

16の臨床血清サンプルを、一連の3つの異なるADAアッセイにより分析した：従来のADAアッセイ、本明細書において報告する干渉抑制ADAアッセイ(オリゴマーヒトIgGを加えない)、及び本明細書において報告する干渉抑制ADAアッセイ(オリゴマーヒトIgGを加える)。結果を表6に要約する。16サンプルのうち、15が、ADAアッセイのバージョンにおいて陽性とテストされ、ここで、対処1から5だけが取られているのに対し、8/16だけが、従来の、並びに本明細書において報告する干渉抑制された薬物耐性ADAアッセイにおいて陽性とテストされ、ここで、対処1から6が取られており、8サンプル中7つにおいて同一の結果を伴った。同一の結果を伴う、これらの7のサンプルは、サンプル中の低RF濃度により、及び/又はベースラインで特徴付けられた。全ての7つのサンプルが、真のトシリズマブ特異的なADAを示しているトシリズマブのFab部分に結合したIgGアイソタイプのADAを含んだ。7つのサンプルのうち3つが、また、IgMアイソタイプADAを有していたが、しかし、それは、また、Fab部分に結合していた。対照的に、残りのサンプルの大部分が、主に、トシリズマブの定常Fc部分に結合したIgMアイソタイプのADAを有していた。これらのサンプルは、また、RFの高い、即ち、>1,000 U/mLの濃度を含んでいた。

40

50

【 0 1 5 3 】

【 表 1 8 】

**表 6:** BIAcore アッセイにおいて、及びリウマチ因子アッセイにおいて、ADA アッセイの異なるフォーマットを用いた、トシリズマブで処置された関節リウマチ患者からの 16 の血清サンプルの比較分析。

サンプル 番号	本明細書において 報告する干渉抑制 ADA アッセイ		従来の ADA アッセイ	BIAcore: アイソタイプ / エピトープ 結合		RF アッセイ [U/ml]	
	添加剤を 伴わない	添加剤を 伴う		IgG ADA	IgM ADA	試験 サンプル	ベース ライン
1	+	+	+	IgG / Fab	IgG	-	312
2	+	+	+	IgG / Fab	-	324	324
3	+	+	+	IgG / Fab	-	591	324
4	+	+	+	IgG / Fab	-	56	37
5	+	+	+	IgG / Fab	IgG / Fab	117	129
6	+	+	+	IgG / Fab	IgG / Fab	-	47
7	+	+	+	IgG / Fab	-	-	< 15
8	+	-	-	IgG / Fc	IgG / Fc	2,870	1,305
9	-	-	-	IgG / Fc	IgG / Fc	1,790	1,790
10	+	-	-	IgG / Fc	IgG / Fc	1,630	-
11	+	-	-	-	IgG / Fc	2,320	1,393
12	+	-	-	-	IgG / Fc	-	5,510
13	+	-	-	IgG / Fc	IgG / Fc	1,500	1,315
14	+	-	-	-	IgG / Fc; Fab	-	107
15	+	+	-	IgG / Fab; Fc	IgG / Fc	4,450	2,620
16	+	-	+	IgG	-	-	1,099

【 0 1 5 4 】

実施例 5 において報告する ADA イムノアッセイを使用し、ベースラインで、及びトシリズマブの投与後に採取した、関節リウマチ患者からの 148 の異なる血清サンプルを分析した。干渉抑制 ADA アッセイを用いた分析の結果を、従来の ADA イムノアッセイを用いた分析により得られた結果と比較した。より詳細な分析のために、ADA アイソタイ

10

20

30

40

50

ブ及び結合領域、並びに臨床事象に関する追加情報を伴う18人の異なる患者からの(148のうち)合計92の血清サンプルを選択した。患者は、彼らが以下の基準の少なくとも1つ満たした場合に選択された: 1) 任意の時点でのADA陽性免疫応答; 2) 高いTCZ血清濃度; 3) 臨床反応(例えば注入関連、過敏症、又はアナフィラキシーなど)。ADAの結合領域及びアイソタイプの分析は、以前に記載された通りに(Stubenrauch, K., et al., Anal. Biochem. 390 (2009) 189-196)、バイオセンサーイムノアッセイを用いて実施した。簡単には、表面プラズモン共鳴(SPR)アッセイのセットアップでは、ADAの差動結合分析のための、完全長抗体並びにその定常(Fc)及び抗原結合(Fab)フラグメントの固定化により、単一のバイオセンサーチップ上で4つの平行フローセルが使用された。異なるアイソタイプのポリクローナルヒトADAを模倣する陽性対照標準コンジュゲートは、ヒト免疫グロブリン(Ig)M、IgG、又はIgEへのTCZに対するポリクローナルウサギ抗体をコンジュゲートさせることにより得られた(WO 2008/061684を参照のこと)。リウマチ因子(RF)アッセイは、Siemens Healthcare Diagnostics (Newark, DE, USA)からのRF試薬を使用して、Siemens BN II比濁計で実施した。簡単には、ヒト免疫グロブリン及び羊からの抗ヒトIgGからなる免疫複合体を用いてコーティングされたポリスチレン粒子は、RFを含むサンプルと混合した場合に凝集する。これらの凝集体は、サンプルを通過した光のビームを散乱する。散乱光の強度は、サンプル中のそれぞれのタンパク質の濃度に比例する。結果は、公知の濃度の標準との比較により評価される。

10

20

## 【0155】

本明細書において報告する従来のアッセイ及び干渉抑制された薬物耐性ADAアッセイを用いた、TCZ処置されたRA患者からの258の異なる血清サンプルの比較評価では、12のサンプルにおいて同じ陽性結果が示された。従来のアッセイでは、27のプラセボ患者が測定されたのに対し、干渉抑制された薬物耐性ADAアッセイは、本明細書において報告する通りである4。結論として、本明細書において報告する一連の対処及びADAアッセイの添加物としてのオリゴマーヒトIgGの添加によって、増加した薬物耐性が付与され、従来ADAアッセイと比較し、RFによる干渉が抑制された。

## 【0156】

上記データのサブセット分析を以下の表7に示す。

30

## 【0157】

## 【表19】

表7.

患者	時点	従来 ELISA		干渉抑制 ELISA		投薬
P1	4週	+	0.812	+	0.110	プラセボ
P2	ベースライン	+	1.009	+	0.893	4 mg/kg
P2	4週	-	0.097	+	0.088	4 mg/kg
P2	9週	+	0.276	+	0.228	4 mg/kg
P3	8週	+	0.349	+	0.566	4 mg/kg
P3	24週	+	2.405	+	1.760	4 mg/kg
P3	28週	+	1.307	+	1.001	4 mg/kg
P4	4週	+	1.409	+	0.242	4 mg/kg
P5	28週	+	0.219	+	0.060	8 mg/kg
P6	8週	+	0.387	+	0.688	4 mg/kg
P6	12週	+	3.689	+	3.721	4 mg/kg
P6	24週	+	3.506	+	3.722	4 mg/kg
P7	4週	+	0.771	+	0.058	プラセボ

40

50

試験関連CP：0.215（従来のELISA）；0.058（干渉抑制ELISA）；  
+：陽性のELISA結果；-：陰性のELISA結果

【0158】

表8Aには、TCZで処置されていない27人のプラセボ患者についてのアッセイシグナルをバー及び数字として示す。TCZ処置誘導性のADAの非存在に起因して、この群における高いアッセイシグナルは予想されず、潜在的な干渉を示しうる。

【0159】

【表20】

表 8a.

患者	時点		従来の ELISA		干渉抑制 ELISA	投薬
P8	ベースライン	+	0.270	-	0.032	プラセボ
P8	4週	+	0.231	-	0.033	プラセボ
P9	8週	+	3.736	-	0.055	プラセボ
P9	ベースライン	+	3.297	+	0.058	プラセボ
P9	12週	+	2.863	-	0.046	プラセボ
P9	4週	+	3.739	-	0.052	プラセボ
P1	4週	+	0.812	+	0.110	プラセボ
P10	4週	+	0.755	-	0.021	プラセボ
P10	4週	+	0.635	-	0.021	プラセボ
P11	ベースライン	+	0.272	-	0.020	プラセボ
P11	4週	+	0.271	-	0.021	プラセボ
P11	4週	+	0.234	-	0.020	プラセボ
P12	ベースライン	+	1.157	-	0.027	プラセボ
P12	ベースライン	+	1.362	-	0.028	プラセボ
P12	4週	+	1.149	-	0.029	プラセボ
P4	ベースライン	+	0.522	-	0.033	プラセボ
P4	4週	+	1.409	+	0.242	プラセボ
P4	4週	+	0.651	-	0.047	プラセボ
P13	36週	+	0.349	-	0.023	プラセボ
P14	4週	+	0.245	-	0.033	プラセボ
P14	ベースライン	+	0.276	-	0.035	プラセボ
P14	4週	+	0.275	-	0.037	プラセボ
P15	4週	+	0.580	-	0.049	プラセボ
P7	ベースライン	+	0.990	-	0.056	プラセボ
P7	4週	+	0.822	-	0.052	プラセボ
P7	4週	+	0.523	-	0.042	プラセボ
P7	4週	+	0.771	+	0.058	プラセボ

試験関連CP：0.215（従来のELISA）；0.058（干渉抑制ELISA）；  
+：陽性のELISA結果；-：陰性のELISA結果

【0160】

両方のアッセイのシグナルパターンは、非常に異なっている：全ての27のプラセボサンプルが、従来のELISAを使用して陽性と決定されたのに対し、27サンプル中の4つだけが、本明細書において報告する干渉抑制ELISAを用いて陽性と決定された。

【0161】

プラセボ処置された患者に加えて、TCZ処置された患者のサンプルが分析されている。表8bには、TCZ処置前の患者についての結果を示す。表8cには、TCZ処置され

10

20

30

40

50

た患者についての結果を示す。

【 0 1 6 2 】

【 表 2 1 】

**表 8b.**

患者	時点	従来の ELISA		干渉抑制 ELISA		投薬
P2	ベースライン	+	1.009	+	0.893	4
P16	ベースライン	+	0.745	-	0.021	8
P17	ベースライン	+	0.281	-	0.020	8
P18	ベースライン	+	1.401	-	0.023	4

10

試験関連CP：0.215（従来のELISA）；0.058（干渉抑制ELISA）；  
+：陽性のELISA結果；-：陰性のELISA結果

【 0 1 6 3 】

【 表 2 2 】

**表 8c.**

患者	時点	従来の ELISA		干渉抑制 ELISA		投薬
P19	24週	+	0.281	-	0.030	4 mg/kg
P19	24週	+	0.226	-	0.031	4 mg/kg
P19	4週	+	0.293	-	0.030	4 mg/kg
P19	8週	+	0.362	-	0.028	4 mg/kg
P2	4週	-	0.097	+	0.088	4 mg/kg
P2	8週	+	0.276	+	0.228	4 mg/kg
P16	24週	+	0.416	-	0.030	8 mg/kg
P16	4週	+	0.542	-	0.029	8 mg/kg
P16	4週	+	0.397	-	0.024	8 mg/kg
P3	24週	+	2.405	+	1.760	4 mg/kg
P3	28週	+	1.307	+	1.001	4 mg/kg
P3	4週	-	0.181	+	0.120	4 mg/kg
P3	8週	+	0.349	+	0.566	4 mg/kg
P20	8週	+	0.818	-	0.034	4 mg/kg
P21	4週	+	0.289	-	0.031	8 mg/kg
P17	12週	+	0.369	-	0.023	8 mg/kg
P17	24週	+	0.330	-	0.022	8 mg/kg
P17	4週	+	0.488	-	0.022	8 mg/kg
P17	4週	+	0.465	-	0.025	8 mg/kg
P17	8週	+	0.409	-	0.026	8 mg/kg
P18	4週	+	1.218	-	0.026	4 mg/kg
P18	4週	+	1.041	-	0.028	4 mg/kg
P5	28週	+	0.219	+	0.060	8 mg/kg
P6	12週	+	3.689	+	3.721	4 mg/kg
P6	24週	+	3.506	+	3.722	4 mg/kg
P6	8週	+	0.387	+	0.688	4 mg/kg
P22	24週	+	0.423	-	0.020	4 mg/kg

20

30

40

50

試験関連CP：0.215（従来のELISA）；0.058（干渉抑制ELISA）；  
+：陽性のELISA結果；-：陰性のELISA結果

【0164】

両方のアッセイを用いたシグナルパターンは、類似していない：25人の患者が、従来のELISAを使用して陽性と決定されたのに対し、10人の患者だけが、本明細書において報告する干渉抑制ELISAを使用して陽性と決定された。

【0165】

実施例7

捕捉試薬及びトレーサー試薬の誘導體化の種類の影響

モノラベリング対マルチラベリング

ビオチン化及びジゴキシゲニン化TCZの濃度を増加させる（例、1.5 µg/mlまで）ことからなる、薬物耐性を増加させるための対処；これによって、粘着性のジゴキシゲニンにより、より高いバックグラウンドが起こりうる；より高いカットポイントに起因する悪化した薬物耐性に注意するために、モノビオチン化及びモノジゴキシゲニン化によって、より高い捕捉及びトレーサー濃度の存在により、より低いバックグラウンドシグナルが与えられる。

【0166】

サンドイッチELISAを、トシリズマブ（TCZ）に対する抗薬物抗体（ADA）のスクリーニング及び確認の両方のために使用した（Stubenrauch, K., et al., Clin. Ther. 32 (2010) 1597-1609を参照のこと）。この方法の原理は、TCZ-Di g（モノ）及びTCZ-Bi（モノ）との複合体におけるADAの捕捉であり、後者は、ストレプトアビジンでコーティングされたプレート上での固定化に導く。SA-MTPに結合したTCZ-Bi/ADA/TCZ-Di g複合体（一晚のインキュベーション）は、抗Di g-HRP酵素コンジュゲート抗体により検出された。薬物耐性抗薬物抗体アッセイの原理を図1に示す。ADAアッセイの添加剤としてのオリゴマーIg Gの含有は、図2に示す通りの干渉抑制された抗薬物抗体アッセイに導く。ポリクローマル抗体の西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）は、基質ABTSの呈色反応を触媒する。色の強度は、分析物の濃度に比例する。

【0167】

スクリーニングアッセイは、室温で実施した。試薬及び血清サンプルを、Universal緩衝液（カタログ番号4742672）を用いて希釈し、全ての洗浄工程を、洗浄緩衝液（PBS、0.05%ポリソルベート20（Tween（登録商標）20）（カタログ番号11332465-001））を用いて3回実施した（1ウェル当たり300 µL）。インキュベーションは、500 rpmでのマイクロタイタープレートシェーカー（MTPシェーカー）上で、震盪下で実施した。テストサンプル、QC及びCSサンプルは、捕捉抗体TCZ-Bi及び検出抗体TCZ-Di gを用いて、一晚（16時間）インキュベートした。プレインキュベーションマイクロタイタープレート（MTP）の各ウェルを、オリゴマーヒトIg G ADAアッセイ添加剤（AAA）を伴う、1.667 µg/mlのTCZ-Bi（モノ）及び1.667 µg/mlのTCZ-Di g（モノ）を含む捕捉/検出溶液の225 µLを添加し、その後、それぞれのサンプルの25 µLを加えた。結果として得られるTCZ-Bi（モノ）及びTCZ-Di g（モノ）の濃度は、各々1.5 µg/mlであり、オリゴマーヒトIg Gは50 µg/mlの濃度を有していた。添加されたMTPは、蒸発を防止するために被覆し、一晚インキュベートした。プレインキュベーションプレートの各ウェルの100 µLの2通りを、ストレプトアビジンコーティングされたマイクロタイタープレート（SA-MTP）のウェルに移し、被覆し、1時間にわたりインキュベートした。

【0168】

洗浄後、2.5 mU/mLの濃度を伴うポリクローマル抗Di g Fab-HRP複合体を、各ウェルに100 µLの容量で加え、1時間インキュベートした。洗浄後、ABTS調製済み溶液を、各ウェルに100 µLアリコートで加え、約10～15分間、振盪しながらインキュベートした。色生成反応のシグナルを、405 nm波長（参照波長：490 nm）で

10

20

30

40

50

E L I S Aリーダーにより測定した。各血清サンプルの吸光度値を3通りに測定した。最も高い標準は、1.8~2.2の間の任意単位(AU)の光学密度(OD)に達しなくてはならない。得られたODのデータを、サンプル濃度を算出するために、非線形4パラメーター適合「Wiener-Rodbard」により標準検量曲線を生成するために使用した。サンプルは、濃度の回収が、特異性カットポイント未満である場合、ADAに陽性として確認された。

【0169】

カットポイントを決定するために、RD(リウマチ性疾患)を伴う患者の35の未処理の血清を、両方のアッセイにおいて測定した。図5及び6に示す通り、TCZ-Bi(モノ)及びTCZ-Dig(モノ)を伴う干渉抑制された抗薬物抗体ELISAと比較し、干渉抑制された抗薬物抗体ELISAにおける血清のシグナル間の変動は高かった。

10

【0170】

さらなる評価のために、TCZ処置されたRA患者からの77の異なる血清サンプルを、干渉抑制ADAアッセイの両方の変異体を用いて分析した。全てのサンプルが、TCZ処置の前(ベースライン)に採取されたため、TCZに対するADAは存在しないはずである。カットポイントよりも高いシグナルは、処置薬物(TCZ)に対するADAと関係のない推定(偽陽性)を示しうる。

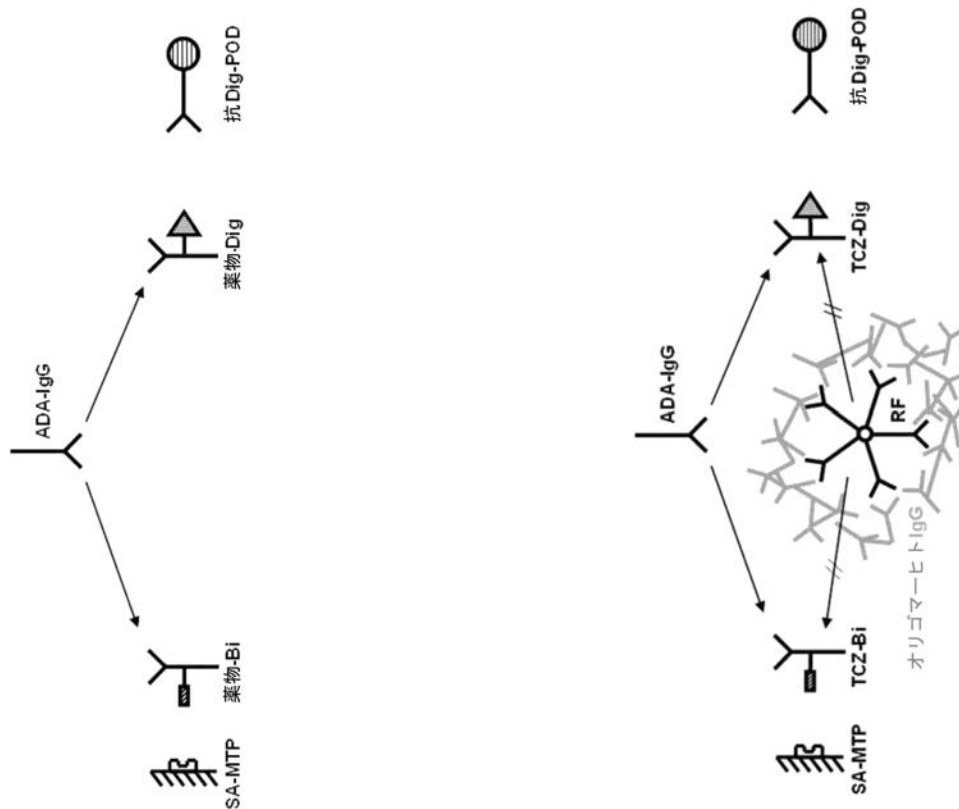
【0171】

マルチラベルTCZを用いたアッセイ(図7)では、モノラベルTCZを用いたアッセイ(図8)よりも多くのシグナル変動が示された。見て分かる通り、この変動はシステムの体系的セットアップではないが(単純に、Y軸上でのシフトでありうる)、しかし、それは、得られたシグナルのバンド幅における増加である。これらのアッセイ特異的なカットポイントを使用し、干渉抑制された薬物耐性ADAアッセイ(モノ)におけるほぼ全てのサンプルが、カットポイントを下回っている。マルチアッセイにおいて測定されたほとんど全てのサンプルが、カットポイントを上回っている。

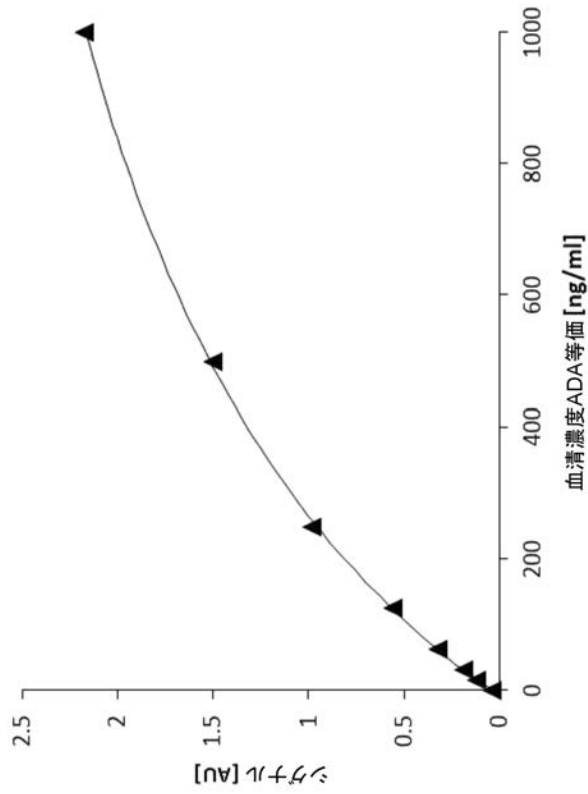
20

【図1】

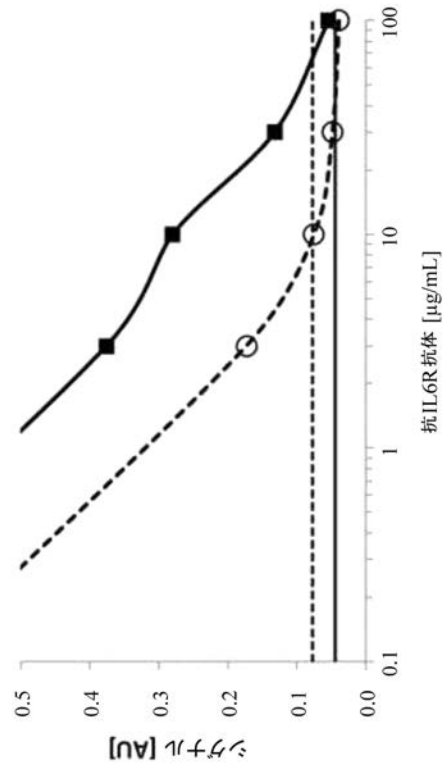
【図2】



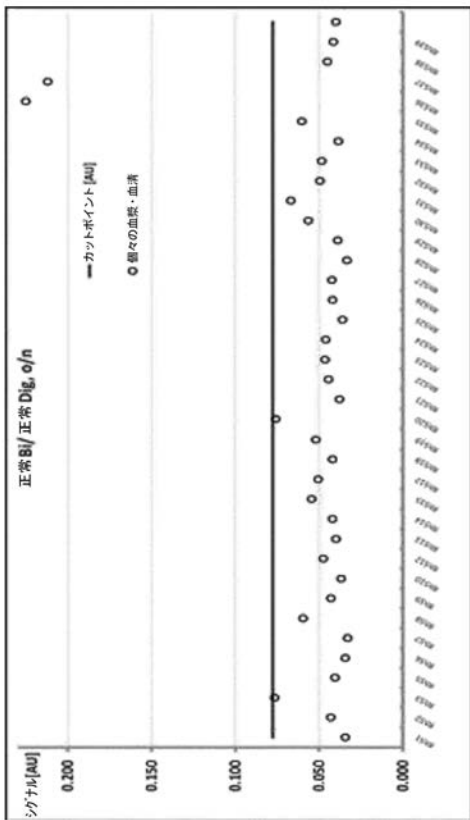
【 図 3 】



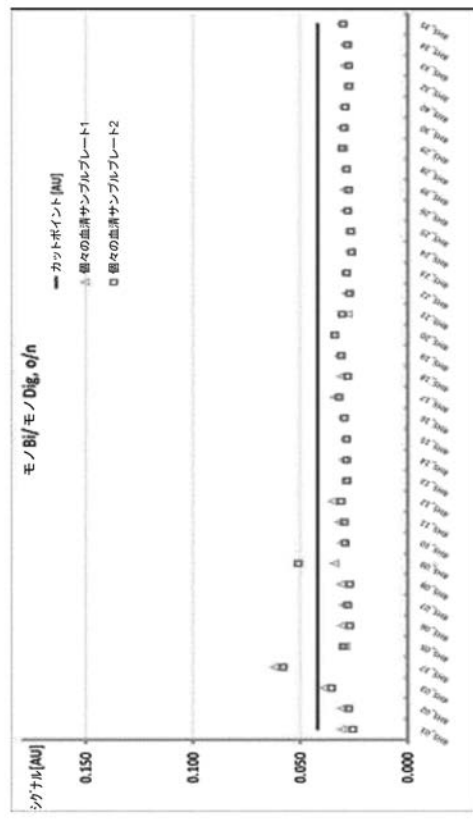
【 図 4 】



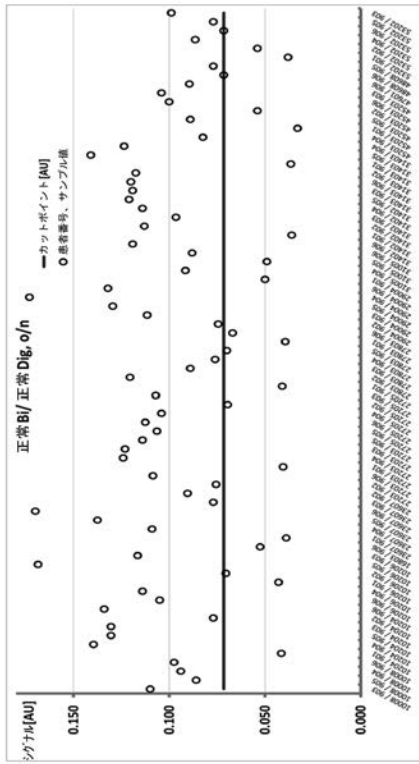
【 図 5 】



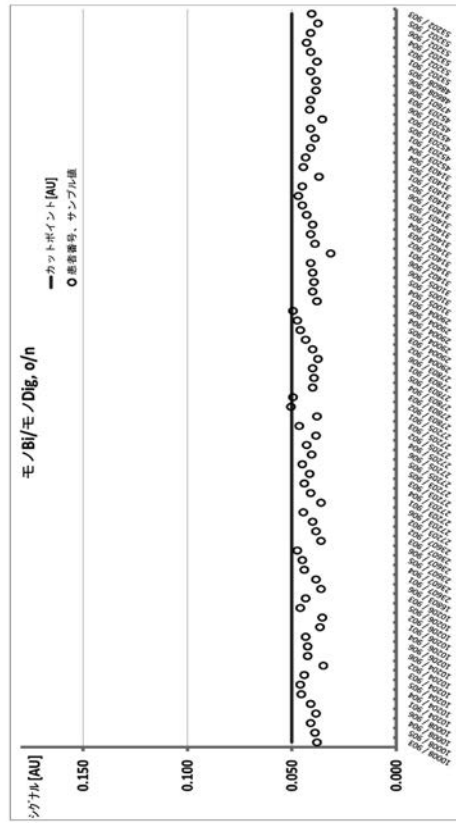
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2014/063891
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/543 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> 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		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	QIU Z J ET AL: "A novel homogeneous Biotin-digoxigenin based assay for the detection of human anti-therapeutic antibodies in autoimmune serum", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 362, no. 1-2, 31 October 2010 (2010-10-31), pages 101-111, XP027509596, ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/J.JIM.2010.09.013 [retrieved on 2010-09-22] abstract; figures 1, 6, 7 page 102, left-hand column, paragraph 3 - page 106, right-hand column, paragraph 2 ----- -/--	1-8
<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		Date of mailing of the international search report
22 September 2014		01/10/2014
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  Luis Alves, Dulce

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2014/063891
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2009/077127 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; STUBENRAUCH KAY-GUNNAR [DE]; ZADAK MARKUS [DE]) 25 June 2009 (2009-06-25) page 21, paragraph 1 - paragraph 2; claims; figure 1 -----	1-8
Y	STUBENRAUCH K ET AL: "Subset analysis of patients experiencing clinical events of a potentially immunogenic nature in the pivotal clinical trials of tocilizumab for rheumatoid arthritis: Evaluation of an antidrug antibody ELISA using clinical adverse event-driven immunogenicity testing", CLINICAL THERAPEUTICS, EXCERPTA MEDICA, PRINCETON, NJ, US, vol. 32, no. 9, 1 August 2010 (2010-08-01), pages 1597-1609, XP027437165, ISSN: 0149-2918, DOI: 10.1016/J.CLINTHERA.2010.07.021 [retrieved on 2010-08-01] "Screening and confirmation assays" on pages 1601-2 -----	1-8
Y	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 "Specific ADA immunoassays" on pages 195-6; figure 2 -----	1-8
Y	BOURDAGE J S ET AL: "Effect of double antigen bridging immunoassay format on antigen coating concentration dependence and implications for designing immunogenicity assays for monoclonal antibodies", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS, NEW YORK, NY, US, vol. 39, no. 3-4, 15 September 2005 (2005-09-15), pages 685-690, XP027718887, ISSN: 0731-7085 [retrieved on 2005-09-15] abstract page 686, paragraph 2 ----- ----- -/--	1-8

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/063891

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ALVYDAS MIKULSKIS ET AL: "Solution ELISA as a platform of choice for development of robust, drug tolerant immunogenicity assays in support of drug development", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 365, no. 1, 10 November 2010 (2010-11-10), pages 38-49, XP028141184, ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/J.JIM.2010.11.011 [retrieved on 2010-12-01] abstract Sections 2.2, 2.9.1 and 3.4 -----	1-8
X	WO 2012/064627 A2 (GENENTECH INC [US]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]; BAO MIN [US]; HARARI OLIVI) 18 May 2012 (2012-05-18) page 30, line 11 - page 31, line 15 -----	9-11
A	STACK ROLAND F ET AL: "Quality requirements for critical assay reagents used in bioanalysis of therapeutic proteins: what bioanalysts should know about their reagents", BIOANALYSIS, vol. 3, no. 5, March 2011 (2011-03), pages 523-534, XP008158610, ISSN: 1757-6180 abstract; figure 2 page 529 -----	1-8
A	PENDLEY CHARLES ET AL: "Bioanalytical interferences in immunoassays for antibody biotherapeutics.", BIOANALYSIS APR 2011, vol. 3, no. 7, April 2011 (2011-04), pages 703-706, XP002713526, ISSN: 1757-6199 page 705, paragraph 1 page 705, last paragraph -----	1-8
A	MIRE-SLUIS A R ET AL: "Recommendations for the design and optimization of immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 289, no. 1-2, 1 June 2004 (2004-06-01), pages 1-16, XP004520874, ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/J.JIM.2004.06.002 the whole document -----	1-8

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/063891

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009077127 A1	25-06-2009	AU 2008337904 A1	25-06-2009
		CA 2709127 A1	25-06-2009
		CN 101896820 A	24-11-2010
		CN 103399145 A	20-11-2013
		EP 2223118 A1	01-09-2010
		EP 2573568 A1	27-03-2013
		ES 2407603 T3	13-06-2013
		IL 205206 A	30-04-2014
		IL 220024 A	30-04-2014
		JP 5221673 B2	26-06-2013
		JP 2011506943 A	03-03-2011
		JP 2012112972 A	14-06-2012
		KR 20100077056 A	06-07-2010
		US 2010304400 A1	02-12-2010
		US 2012219974 A1	30-08-2012
		WO 2009077127 A1	25-06-2009
		WO 2012064627 A2	18-05-2012
CN 103476793 A	25-12-2013		
EP 2638067 A2	18-09-2013		
EP 2787007 A2	08-10-2014		
JP 2013541594 A	14-11-2013		
KR 20130086628 A	02-08-2013		
TW 201302219 A	16-01-2013		
US 2012301460 A1	29-11-2012		
US 2014056883 A1	27-02-2014		
US 2014056884 A1	27-02-2014		
US 2014056885 A1	27-02-2014		
WO 2012064627 A2	18-05-2012		

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P	35/00	
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K	39/395	N

(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, KM, 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, IR, IS, JP, KE, KG, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

Fターム(参考) 4C085 AA14 CC23 EE01 GG01  
4H045 AA11 CA40 DA75 EA20

专利名称(译)	用于检测血清样品中抗药物抗体的干扰抑制免疫测定法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2016530495A</a>	公开(公告)日	2016-09-29
申请号	JP2016522572	申请日	2014-07-01
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	シュトウベンラウホカイグンナー フォーゲルルドルフ		
发明人	シュトウベンラウホ,カイ-グンナー フォーゲル,ルドルフ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/536 C07K16/24 C07K16/28 C07K16/18 A61P35/00 A61K39/395		
CPC分类号	A61P13/12 A61P19/02 A61P29/00 G01N33/54393 G01N33/53 C07K16/2866 C07K2317/24 G01N33/6854		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/536.E C07K16/24 C07K16/28 C07K16/18 A61P35/00 A61K39/395.N		
F-TERM分类号	4C085/AA14 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20		
优先权	2013175091 2013-07-04 EP		
其他公开文献	JP2016530495A5 JP6563910B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本文所报告的，用于检测抗药物抗体与样品中的药物抗体包含俘获药物抗体和示踪药物抗体，酶联免疫测定法，其中俘获药物抗体和示踪药物抗体，0。在5μg/ml或更高的浓度下，样品与捕获药物抗体和示踪药物抗体同时温育1-24小时，并且捕获药物抗体和示踪药物抗体通过单个赖氨酸残基连接将样品衍生化，并且样品含有10%血清，并加入低聚人IgG以捕获药物抗体和与示踪药物抗体孵育前加入样品。

