

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02827773.2

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)
G01N 33/537 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 4 月 4 日

[11] 授权公告号 CN 1308683C

[22] 申请日 2002.12.4 [21] 申请号 02827773.2

[30] 优先权

[32] 2001.12.4 [33] US [31] 60/338,767

[86] 国际申请 PCT/US2002/038859 2002.12.4

[87] 国际公布 WO2003/048735 英 2003.6.12

[85] 进入国家阶段日期 2004.8.2

[73] 专利权人 特瓦制药工业有限公司

地址 以色列佩塔科-蒂科瓦

[72] 发明人 E·克林格尔

[56] 参考文献

CN1309296A 2001.8.22

BYSTANDER SUPPRESSION OF EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS BY T CELL LINES AND CLONES OF THE TH2 TYPE INDUCED BY COPOLYMER 1 AHARONI ET AL, JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY, Vol. 91 No. 1.2 1998

HUMAN AND MURINE CD4 T CELL REACTIVITY TO A COMPLEX ANTIGEN; RECOGNITION OF THE SYNTHESIS RANDOM POLYPEPTIDE GLATIRAMER ACETATE DUDA ET AL, THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Vol. 165 No. 12 2000

权利要求书 5 页 说明书 40 页 附图 17 页

T SUPPRESSOR HYBRIDOMA AND INTERLEUKIN - 2 DEPENDENT LINES INDUCED BY COPOLYMER OR BY SPINAL CORD HOMOGENAT-EDOWN - REGULATE EXPERIMENTAL AHARONI ET AL, EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Vol. 23 1993

审查员 胡玉连

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 王旭

[54] 发明名称

测量醋酸格拉默功效的方法

[57] 摘要

本发明提供测量试验批次的醋酸格拉默的相对功效的方法。另外,本发明提供制备一批作为药用可接受的醋酸格拉默的方法。

1. 一种测量相对于参考批次的醋酸格拉默的已知功效的试验批次的醋酸格拉默的功效的方法，其包含
- 5 a. 用预定量的来自参考批次的醋酸格拉默免疫试验哺乳动物；
- b. 在免疫后预定时间制备来自步骤（a）试验哺乳动物的细胞的原代培养物；
- c. 分别温育至少 2 个参考样品，其中每个包含预定数量的来自步骤（b）原代培养物的细胞和预定量的来自参考批次的醋酸格拉默；
- 10 d. 温育至少 2 个样品，其中每个包含预定数量的来自步骤（b）原代培养物的细胞和预定量的来自试验批次的醋酸格拉默；
- e. 对于步骤（c）和（d）中的每个样品测定在温育该样品预定时期后在每个样品中由细胞分泌的至少一种下列的细胞因子的量：白细胞介素-2、白细胞介素-6、白细胞介素-10、或干扰素- γ ；
- 15 f. 将由与试验批次的醋酸格拉默温育的样品分泌的细胞因子的量与由与参考批次的醋酸格拉默温育的样品分泌的细胞因子的量关联，以便测定试验批次的醋酸格拉默相对于参考批次的醋酸格拉默的功效，
- 其中在步骤（c）和（d）的每个样品中，预定的细胞数量基本上相同，并且其中对于包含预定量的试验批次的醋酸格拉默的每个样品，存在相应的参考样品，其含有基本上相同的预定量的来自参考批次的醋酸格拉默。
- 20
2. 权利要求 1 的方法，其中所述细胞因子是白细胞介素-2。
3. 权利要求 1 的方法，其中所述细胞因子是白细胞介素-6。
4. 权利要求 1 的方法，其中所述细胞因子是白细胞介素-10。
5. 权利要求 1 的方法，其中所述细胞因子是干扰素- γ 。
- 25 6. 权利要求 1 的方法，其中所述哺乳动物生产对醋酸格拉默参考标准特异性的 T 细胞。
7. 权利要求 1 的方法，其中所述哺乳动物是啮齿动物。
8. 权利要求 7 的方法，其中所述啮齿动物是小鼠。
9. 权利要求 8 的方法，其中所述小鼠是雌性(SJLXBALB/C) F1 小鼠。
- 30 10. 权利要求 1 的方法，其中所述哺乳动物是约 8 至约 12 周龄。

11. 权利要求 1 的方法，其中所述细胞是淋巴结细胞。
12. 权利要求 1 的方法，其中所述细胞是脾细胞。
13. 权利要求 1 的方法，其中该方法包含
- a. 用预定量的来自参考批次的醋酸格拉默免疫 8-12 周龄的雌性
- 5 (SJLXBALB/C) F1 小鼠；
- b. 在免疫后 9-11 天制备来自步骤 (a) 小鼠的淋巴结细胞的原代培养物；
- c. 分别温育至少 5 个参考样品，其中每个包含预定数量的来自步骤
- (b) 原代培养物的细胞和预定量的来自参考批次的、1 $\mu\text{g/ml}$ -25 $\mu\text{g/ml}$ 的
- 10 醋酸格拉默；
- d. 温育至少 2 个样品，其中每个包含预定数量的来自步骤 (b) 原代培养物的细胞和预定量的来自试验批次的醋酸格拉默；
- e. 对于步骤 (c) 和 (d) 中的每个样品测定在温育该样品 18-21 小时后在每个样品中由细胞分泌的白细胞介素-2 的量；
- 15 f. 将由与试验批次的醋酸格拉默温育的样品分泌的白细胞介素-2 的量与由与参考批次的醋酸格拉默温育的样品分泌的白细胞介素-2 的量关联，以便测定试验批次的醋酸格拉默相对于参考批次的醋酸格拉默的功效，
- 其中在步骤 (c) 和 (d) 的每个样品中，预定的细胞数量基本上相同，
- 20 并且其中对于包含预定量的试验批次的醋酸格拉默的每个样品，存在相应的参考样品，其含有基本上相同的预定量的来自参考批次的醋酸格拉默。
14. 权利要求 13 的方法，其中在步骤 (c) 中分别温育 6 个参考样品。
15. 一种制备一批作为药用可接受的醋酸格拉默的方法，其包含
- a. 制备一批醋酸格拉默；
- 25 b. 按照权利要求 1 的方法测量批次的相对功效；和
- c. 如果如此测量的相对功效是参考批次的醋酸格拉默的 80%-125%，使所述批次具有作为药用可接受的资格。
16. 一种制备药用可接受的醋酸格拉默的方法，其包含
- a. 制备一批醋酸格拉默；
- 30 b. 按照权利要求 13 的方法测量批次的相对功效；和

c. 如果如此测量的相对功效是参考批次的醋酸格拉默的 80%-125%，使所述批次具有作为药用可接受的资格。

17. 一种制备含有醋酸格拉默的药物组合物的方法，其中所述醋酸格拉默具有对于包含在药物组合物中可接受的预定功效，并且其中在加工期间检测一批醋酸格拉默以确定所述醋酸格拉默是否具有预定功效，改进包含：

分别测量由淋巴结细胞的原代培养物分泌的白细胞介素-2 的量，所述淋巴结细胞获自在用确定量的醋酸格拉默的参考标准批次免疫后 9-11 天的雌性（SJLXBALB/C）F1 小鼠，

10 a. 其中在预定量的参考标准批次的存在下温育含有预定数量的这些细胞的样品，和

b. 其中在相同预定量的被检测醋酸格拉默的批次的存在下温育含有基本上相同预定数量的细胞的样品；

比较如此测量的分泌的白细胞介素-2 的量；和

15 只有当功效为参考标准批次的 80%-125%时，将如此检测的批次包括在药物组合物中。

18. 一种制备含有醋酸格拉默的药物组合物的方法，其中所述醋酸格拉默具有对于包含在药物组合物中可接受的预定功效，所述方法包含

获得一批醋酸格拉默；

20 分别测量由淋巴结细胞的原代培养物分泌的白细胞介素-2 的量，所述淋巴结细胞获自在用确定量的醋酸格拉默的参考标准批次免疫后 9-11 天的雌性（SJLXBALB/C）F1 小鼠，

a. 其中在预定量的参考标准批次的存在下温育含有预定数量的这些细胞的样品，和

25 b. 其中在相同预定量的被检测醋酸格拉默的批次的存在下温育含有基本上相同预定数量的细胞的样品；

比较如此测量的分泌的白细胞介素-2 的量；和

只有当如此测量的功效为参考标准批次的 80%-125%时，将所述批次包括在药物组合物中。

30 19. 一种测定一批醋酸格拉默的功效的方法，所述方法包含

分别测量由淋巴结细胞的原代培养物分泌的白细胞介素-2 的量，所述淋巴结细胞获自在用确定量的醋酸格拉默的参考标准批次免疫后 9-11 天的雌性 (SJLXBALB/C) F1 小鼠，

5 a. 其中在预定量的参考标准批次的存在下温育含有预定数量的这些细胞的样品，和

b. 其中在相同预定量的被检测醋酸格拉默的批次的存在下温育含有基本上相同预定数量的细胞的样品；

比较如此测量的分泌的白细胞介素-2 的量，由此测定所述批次的功效。

10 20. 一种确定醋酸格拉默是否具有对于包含在药物组合物中可接受的预定功效的方法，所述方法包含

分别测量由淋巴结细胞的原代培养物分泌的白细胞介素-2 的量，所述淋巴结细胞获自在用确定量的醋酸格拉默的参考标准批次免疫后 9-11 天的雌性 (SJLXBALB/C) F1 小鼠，

15 a. 其中在预定量的参考标准批次的存在下温育含有预定数量的这些细胞的样品，和

b. 其中在相同预定量的被检测醋酸格拉默的批次的存在下温育含有基本上相同预定数量的细胞的样品；

20 比较如此测量的分泌的白细胞介素-2 的量以确定所述批次的功效；和将如此测量的功效与预定的功效比较以确定所述批次对于包含在药物组合物中是否可接受。

21. 权利要求 17、18、19 或 20 中任何一项的方法，其中所述参考标准批次是一批具有 7000 Da 的平均分子量的醋酸格拉默。

25 22. 一种测定一批多肽的醋酸盐混合物的功效的方法，每种多肽基本上由 L-谷氨酸，L-丙氨酸，L-酪氨酸和 L-赖氨酸组成，所述方法包含

分别测量由淋巴结细胞的原代培养物分泌的白细胞介素-2 的量，所述淋巴结细胞获自在用确定量的多肽的醋酸盐混合物的参考标准批次免疫后 9-11 天的雌性 (SJLXBALB/C) F1 小鼠，

30 a. 其中在预定量的参考标准批次的存在下温育含有预定数量的这些细胞的样品，和

b. 其中在相同预定量的被检测多肽的醋酸盐混合物批次的存在下温育含有基本上相同预定数量的细胞的样品；

比较如此测量的分泌的白细胞介素-2 的量，由此测定所述批次的功效。

5

测量醋酸格拉默功效的方法

5 本申请要求在 2001 年 12 月 4 日提出的美国临时申请 60/338,767 的利益，其内容结合于此作为参考。

贯穿本申请，在括号中使用缩短的引用，引用各种参考文献。这些参考文献的完整引用可以在说明书的结尾，紧接着权利要求之前发现。这些出版物它们整个被结合于本申请作为参考以更充分地描述本发明相关的
10 现有技术。

发明领域

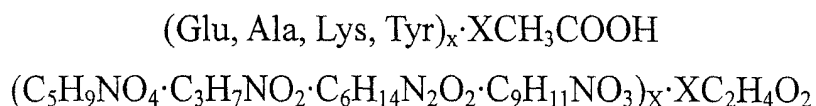
本发明涉及标准化醋酸格拉默功效的测量的方法，其基于醋酸格拉默为 T 细胞特异性识别。

15

背景

因为存在有效治疗施用其的疾病的活性成分的最佳功效和质量，期望标准化药物组合物的功效的测量。

醋酸格拉默 (GA, 也称为共聚物-1 (医师办公桌参考), 共聚物 1, Cop-1 或 COPAXONE[®]), 是批准的治疗多发性硬化 (MS) 的药物。醋酸
20 格拉默由合成多肽的醋酸盐组成, 包含 4 种天然存在的氨基酸 (医师办公桌参考): L-谷氨酸, L-丙氨酸, L-酪氨酸, 和 L-赖氨酸 (医师办公桌参考), 平均摩尔份数分别为 L-谷氨酸: 0.129-0.153; L-丙氨酸: 0.392-0.462; L-酪氨酸: 0.086-0.100; L-赖氨酸: 0.300-0.374。醋酸格拉默的平均分子量为 4,700-11,000 道尔顿 (医师办公桌参考)。在化学上, 醋酸格拉默被称为
25 含有 L 丙氨酸, L-赖氨酸和 L-酪氨酸的 L-谷氨酸聚合物, 醋酸盐 (盐) (医师办公桌参考)。它的结构式是:



CAS-147245-92-9

(医师办公桌参考)。醋酸格拉默还写成：聚[L-Glu¹³⁻¹⁵, L-Ala³⁹⁻⁴⁶, L-Tyr^{8,6-10}, L-Lys³⁰⁻³⁷]_nCH₃COOH。

醋酸格拉默显示抑制实验自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) -- 一种关于各种动物物种中多发性硬化 (MS) 的实验模型 (Lando 等, 1979; Aharoni, 1993)。小鼠 EAE 的研究提示防止 EAE 的保护是通过 T 细胞活性介导的 (Aharoni, 1993)。通过注射醋酸格拉默特异性的 T 抑制细胞, 可以将这种其中涉及几种自身抗原的通过小鼠脊髓匀浆的 EAE 主动诱导的保护过继转移给正常接受者 (Aharoni, 1993)。在 III 期临床试验中, 发现每日皮下注射醋酸格拉默减缓伤残进展和降低恶化-减缓多发性硬化的复发率 (Johnson, 1987)。制备醋酸格拉默的方法在美国专利 3,849,550 和 5,800,808 和 PCT 国际公开号 WO 00/05250 中描述。

通常接受高水平的抗原特异性是 T 细胞激活的特征。免疫系统的 T 细胞识别免疫原性肽, 其与在抗原呈递细胞 (APC) 上表达的主要组织相容性复合体 (MHC) II 类或 I 类分子复合。T 细胞抗原识别的特异性由几个参数确定: 1) T 细胞受体对 MHC 肽复合体的亲和力; 2) 抗原性肽的一级结构; 和 3) 抗原性肽内部某些氨基酸组合的协同作用。基于当前关于醋酸格拉默作用机制的了解, 认为在 MS 中的醋酸格拉默的生物活性受 T 细胞活性的免疫调节的介导。

20

发明概述

本发明提供测量试验批次的醋酸格拉默的功效(相对于参考批次的醋酸格拉默的已知功效)的方法, 其包含

a. 用预定量的来自参考批次的醋酸格拉默免疫 8-12 周龄的雌性 (SJLXBALB/C) F1 小鼠;

b. 在免疫 9-11 天后制备来自步骤 (a) 小鼠的淋巴结细胞的原代培养物;

c. 分别温育至少 5 个参考样品, 其中每个包含预定数量的来自步骤 (b) 原代培养物的细胞和预定量的来自参考批次的、1 μg/ml-25 μg/ml 的醋酸格拉默;

d. 温育至少 2 个样品，其中每个包含预定数量的来自步骤 (b) 原代培养物的细胞和预定量的来自试验批次的醋酸格拉默；

e. 对于步骤 (c) 和 (d) 中的每个样品测定在温育该样品 18-21 小时后在每个样品中由细胞分泌的白细胞介素-2 的量；

5 f. 将由与试验批次的醋酸格拉默温育的样品分泌的白细胞介素-2 的量与由与参考批次的醋酸格拉默温育的样品分泌的白细胞介素-2 的量关联，以便测定试验批次的醋酸格拉默相对于参考批次的醋酸格拉默的功效，

10 其中在步骤 (c) 和 (d) 的每个样品中，预定的细胞数量基本上相同，并且其中对于包含预定量的试验批次的醋酸格拉默的每个样品，存在相应的参考样品，其含有基本上相同的预定量的来自参考批次的醋酸格拉默。

本发明还提供测量试验批次的醋酸格拉默的功效(相对于参考批次的醋酸格拉默的已知功效)的方法，其包含

a. 用预定量的来自参考批次的醋酸格拉默免疫试验动物；

15 b. 在免疫后预定时间制备来自步骤 (a) 试验动物的细胞的原代培养物；

c. 分别温育至少 2 个参考样品，其中每个包含预定数量的来自步骤(b) 原代培养物的细胞和预定量的来自参考批次的醋酸格拉默；

20 d. 温育至少 2 个样品，其中每个包含预定数量的来自步骤 (b) 原代培养物的细胞和预定量的来自试验批次的醋酸格拉默；

e. 对于步骤 (c) 和 (d) 中的每个样品测定在温育该样品预定时期后在每个样品中由细胞分泌的细胞因子的量；

25 f. 将由与试验批次的醋酸格拉默温育的样品分泌的细胞因子的量与由与参考批次的醋酸格拉默温育的样品分泌的细胞因子的量关联，以便测定试验批次的醋酸格拉默相对于参考批次的醋酸格拉默的功效，

其中在步骤 (c) 和 (d) 的每个样品中，预定的细胞数量基本上相同，并且其中对于包含预定量的试验批次的醋酸格拉默的每个样品，存在相应的参考样品，其含有基本上相同的预定量的来自参考批次的醋酸格拉默。

30 附图简述

图 1: 用 GARS (参考标准)。LN 细胞的原代培养物。通过 ELISA 的 IL-2 检测。

图 2: GA-特异性 T 细胞的诱导。在增加浓度的 GARS 的存在下培养 LN 细胞的原代培养物, 其来源于用 250 μ g GARS + CFA 或单独用 CFA 免疫的小鼠。在 37 $^{\circ}$ C 下温育过夜后收集培养基并通过 ELISA 测定 IL-2。

图 3: 血细胞计数器。

图 4: 免疫方案-培养源和 GA 参考标准 (RS) 剂量效应的优化。淋巴结 (LN) 和脾细胞的原代培养来源于用 10 或 250 μ g GARS + 完全弗氏佐剂 (CFA) 免疫的小鼠。在增加浓度的 GA RS 的存在下培养细胞。在 37 $^{\circ}$ C 下温育过夜后收集培养基并通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 测定 IL-2。

图 5: 免疫方案-佐剂和剂量效应的优化。LN 细胞的原代培养物来源于用 250 Ag GARS + CFA 或用 10 mg GARS + 不完全弗氏佐剂 (ICFA) 免疫的小鼠, 在增加浓度的 GARS 的存在下培养。在 37 $^{\circ}$ C 下温育过夜后, 收集培养基并通过 ELISA 测定白细胞介素-2 (IL-2)。

图 6: 免疫时期的影响。用 CFA 中的 250 Ag GARS 免疫小鼠并在 9, 10 和 11 天后去除 LN。通过 ELISA 测量 IL-2 分泌体外检测来自不同组的 LN 细胞对各种浓度 GARS 的反应。

图 7: 培养基对 GA-特异性的 T 细胞反应的影响。用含有 1% 正常小鼠血清 (NMS), 1% 胎牛血清 (FBS) 或合成细胞培养基 (DCCM1) 的不同培养基培养 LN 细胞的原代培养物。在 37 $^{\circ}$ C 下用增加浓度的 GA RS 培养细胞 21 小时。随后, 收集培养基并通过 ELISA 测定 IL-2。

图 8: 响应 GA RS 的 IL-2 分泌的动力学。从用 250 μ g GA RS + CFA 免疫的小鼠制备 LN 细胞的原代培养物。将细胞与 0, 0.5, 2.5 和 5 pg/ml GA RS 在 37 $^{\circ}$ C 下温育指示的时间间隔。在每个时间点, 将 5 X 10⁶ 个细胞的等分试样离心并将上清液保持在 -20 $^{\circ}$ C。通过 ELISA 同时测定所有样品的 IL-2。

图 9: IL-2 在培养基中的稳定性。从用 250 Ag GARS + CFA 免疫的小鼠制备 LN 细胞的原代培养物。在 37 $^{\circ}$ C 下将细胞与不同浓度的 GA RS 温育。过夜温育后, 收集上清液并分成两等分试样。一等分试样通过 ELISA 立即测定, 第二个在测定前在 -20 $^{\circ}$ C 下保持 7 天。

图 10: GARS 溶液在-20℃下的稳定性。制备 1 mg/ml 的 GARS 溶液, 分成等分试样并保持在-20℃。在时间零点(日期 1)和在-20℃下 5 个月后测定 GA-特异性细胞对 GARS 溶液的剂量反应。

图 11: 平均分子量(MW)对 GARS 特异性 T 细胞反应的影响。从用 250 Ag GARS + CFA 免疫的小鼠制备 LN 细胞的原代培养物。在 2 种不同浓度的 GARS 和不同分子量的 GA 药物物质(DS)的存在下培养细胞。在 37℃下温育过夜后, 收集培养基并通过 ELISA 测定 IL-2。

图 12 (A & B): GARS-特异性 T 细胞与 GADS 和药物产品(DP)批次的交叉-反应性。从用 250 Ag GARS + CFA 免疫的小鼠制备 LN 细胞的原代培养物。将 GARS-特异性 T 细胞对另一 GADS 批次(图 12A), 与 GA DP 批次和与甘露糖醇(图 12B)的反应和对 GARS 批次的反应相比较。通过 ELISA 测量培养基中 IL-2 的水平。

图 13: 通过胰蛋白酶的 GARS 蛋白酶解的动力学。通过胰蛋白酶将 GARS 蛋白酶解指示的时刻。通过体外功效试验检测蛋白酶解的样品的活性。

图 14: 在通过胰蛋白酶蛋白酶解之前和之后 GA 的反相高效液相色谱(RP-HPLC)。通过胰蛋白酶蛋白酶解 GARS, 通过 RP-HPLC 检测样品的色谱曲线。

图 15: 通过胰凝乳蛋白酶 GARS 蛋白酶解的动力学。通过胰凝乳蛋白酶蛋白酶解 GARS 指示的时刻。通过体外功效试验检测蛋白酶解的样品的活性。

图 16: 在通过胰凝乳蛋白酶蛋白酶解之前和之后 GA 的 RP-HPLC。通过胰凝乳蛋白酶蛋白酶解 GARS, 通过 RP-HPLC 检测样品的色谱曲线。

25 详细描述

本发明提供测量试验批次的醋酸格拉默的功效(相对于参考批次的醋酸格拉默的已知功效)的方法, 其包含

- a. 用预定量的来自参考批次的醋酸格拉默免疫 8-12 周龄的雌性(SJLXBALB/C) F1 小鼠;
- b. 在免疫 9-11 天后制备来自步骤(a)小鼠的淋巴结细胞的原代培养

物;

c. 分别温育至少 5 个参考样品, 其中每个包含预定量的来自步骤 (b) 原代培养物的细胞和预定量的来自参考批次的、1 $\mu\text{g/ml}$ -25 $\mu\text{g/ml}$ 的醋酸格拉默;

5 d. 温育至少 2 个样品, 其中每个包含预定数量的来自步骤 (b) 原代培养物的细胞和预定量的来自试验批次的醋酸格拉默;

e. 对于步骤 (c) 和 (d) 中的每个样品测定在温育该样品 18-21 小时后在每个样品中由细胞分泌的白细胞介素-2 的量;

10 f. 将由与试验批次的醋酸格拉默温育的样品分泌的白细胞介素-2 的量与由与参考批次的醋酸格拉默温育的样品分泌的白细胞介素-2 的量关联, 以便测定试验批次的醋酸格拉默相对于参考批次的醋酸格拉默的功效,

其中在步骤 (c) 和 (d) 的每个样品中, 预定的细胞数量基本上相同, 并且其中对于包含预定量的试验批次的醋酸格拉默的每个样品, 存在相应的参考样品, 其含有基本上相同的预定量的来自参考批次的醋酸格拉默。

15 在一个实施方案中, 在步骤 (d) 中分别温育 6 个参考样品。

本发明还提供测量试验批次的醋酸格拉默的功效(相对于参考批次的醋酸格拉默的已知功效)的方法, 其包含

a. 用预定量的来自参考批次的醋酸格拉默免疫试验动物;

20 b. 在免疫后预定时间制备来自步骤 (a) 试验动物的细胞的原代培养物;

c. 分别温育至少 2 个参考样品, 其中每个包含预定数量的来自步骤 (b) 原代培养物的细胞和预定量的来自参考批次的醋酸格拉默;

25 d. 温育至少 2 个样品, 其中每个包含预定数量的来自步骤 (b) 原代培养物的细胞和预定量的来自试验批次的醋酸格拉默;

e. 对于步骤 (c) 和 (d) 中的每个样品测定在温育该样品预定时期后在每个样品中由细胞分泌的细胞因子的量;

30 f. 将由与试验批次的醋酸格拉默温育的样品分泌的细胞因子的量与由与参考批次的醋酸格拉默温育的样品分泌的细胞因子的量关联, 以便测定试验批次的醋酸格拉默相对于参考批次的醋酸格拉默的功效,

其中在步骤(c)和(d)的每个样品中,预定的细胞数量基本上相同,并且其中对于包含预定量的试验批次的醋酸格拉默的每个样品,存在相应的参考样品,其含有基本上相同的预定量的来自参考批次的醋酸格拉默。

在一个实施方案中,细胞因子是白细胞介素。

5 在一个优选实施方案中,白细胞介素是白细胞介素-2。

在另一实施方案中,白细胞介素是白细胞介素-6。

在另一实施方案中,白细胞介素是白细胞介素-10。

在另一实施方案中,细胞因子是 γ -干扰素。

10 在一个实施方案中,哺乳动物生产对醋酸格拉默参考标准特异性的 T 细胞。

在另一实施方案中,哺乳动物是啮齿动物。

在还有另一实施方案中,啮齿动物是小鼠。

在另一实施方案中,小鼠是雌性(SJLXBALB/C)F1 小鼠。

在另一实施方案中,哺乳动物是约 8 至约 12 周龄。

15 在还有另一实施方案中,细胞是淋巴结细胞。

在一个实施方案中,细胞是脾细胞。

本发明另外提供制备一批作为药用可接受的醋酸格拉默的方法,其包含

a. 制备一批醋酸格拉默;

20 b. 按照权利要求 1 的方法测量批次的相对功效; 和

c. 如果如此测量的相对功效是参考批次的醋酸格拉默的 80%-125%, 使批次具有作为药用可接受的资格。

另外,本发明提供制备药用可接受的醋酸格拉默的方法,其包含

a. 制备一批醋酸格拉默;

25 b. 按照权利要求 3 的方法测量批次的相对功效; 和

c. 如果如此测量的相对功效是参考批次的醋酸格拉默的 80%-125%, 使批次具有作为药用可接受的资格。

30 因此,本发明提供 GA 功效的测量的标准化。功效试验定量地测定 GA 的生物活性。这是至今第一次显示这种试验。为了显示批次之间关于 DS 和 DP 的功效和质量的再现性,该标准化方法是关键的。在本申请的上下

文中，DS 是指活性成分，即 GA。DP 用来表示成品，即 Copaxone®。RS 表示平均分子量约 7000 Da 批次的醋酸格拉默。

本发明利用观察即与细胞因子例如 IL-2 温育的 T 细胞响应该细胞因子增殖 (Lisak 等, 1974)。

- 5 以下实施例详细描述本发明，其关于显示如何可以制备其某些特定的代表性的实施方案，材料，装置和处理步骤应当理解为仅意欲是说明性的实例。尤其是，本发明意欲不受限于本文具体引用的方法，材料，条件，工艺参数，装置等。

10 实验实施例

常规方法概述

- 用 CFA 中的 250 Ag GA RS 免疫小鼠。如美国专利 5,800,808 或 PCT 国际出版物 WO 00/05250 生产 GA RS。基于在上述 Copaxonee 的中列数 (midrange) 中的化学和生物性质选择 GARS。在 9-11 天后，制备 LN 细胞的原代培养物，将细胞与不同浓度的 GA RS 和试验样品温育。在 37°C 下在湿润 CO₂ 培养箱中温育 18-21 小时后，收集培养物并通过 ELISA 测量 IL-2 的水平。在 2 种浓度下测试 T 细胞对每个 DS 批次的反应 (在线性范围内)，相对于 GARS 批次计算 DS 批次的 % 功效。

20 实施例 1：标准方法

目的

本方法的目的是使用 GARS-特异性 T 细胞体外测定 GADS 批次的相对功效。

25 装置

层流通风橱，血细胞计数器，一次性盖玻片，细胞计数离心机，温控振荡培养箱，湿润、温控 5% CO₂ 培养箱，ELISA 读出器 (450 nm 滤色片)，冷冻机，冷冻机剪刀，镊子，分档器，pipettman 40-200 μl，pipettman 200-1000 μl，pipettman 5-40 μl，powerpette，无菌玻璃注射器和 luer 桥 (bridge)。

30

一次性用品

Cryotubes, 96-孔增强结合 ELISA 板 (Nunc, 目录号 442404), 96-孔未消毒微量培养板 (Falcon 目录号 3911), 24-孔平底无菌组织培养板 (Nunc, 目录号 143982), 培养皿, Eppendorf 管 (聚丙烯), 无菌移液管管头 200-1000
5 μ l, 移液管: 2, 5&10 ml, 实验室外套, 手套, 0.2 μ 醋酸纤维素滤器, 过滤的系统 200 ml (Corning, 目录号 430767), Kim 抹布, 支持平台, 10 ml 注射器, 21Gxl 1/2"针, 胰岛素注射器和注射器式吸嘴 (combitip) 5 ml。

材料和试剂

10 用于免疫方法

95%乙醇 (Bio Lab, 目录号 13680605, 或等价物), 通过用蒸馏水稀释从 95%乙醇制备的 70%乙醇, 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) x 1 (SIGMA, 目录号 3813, 或等价物), 含有 1 mg 结核杆菌 (MT) 的 CFA (H37Ra, ATCC 255177), (SIGMA, 目录号 F-5881, 或等价物), 和 GARS 批次。

15

用于体外生物测定方法

95%乙醇 (Bio Lab, 目录号 13680605, 或等价物), 通过用蒸馏水稀释从 95%乙醇制备的 70%乙醇, 锥虫蓝 (BDH, 目录号 3407), DCCM1 (合成细胞培养基) (Beit Haemek, 目录号 05-010-1A 或等价物), RPMI 1640
20 (Roswell Park 记忆研究所) (Beit Haemek, 目录号 01-100-1A), 无菌 L-谷氨酸 2 mM x 100 (Bio Lab, 目录号 13.015), 无菌 MEM (极限基本培养基)- 非必需氨基酸 x 100 (Bio Lab, 目录号 11.080), 无菌丙酮酸钠 1 mM x 100 (Bio Lab, 目录号 13.016), 抗生素/抗真菌溶液 1 (Bio Lab, 目录号 13.020), 2-巯基乙醇 (SIGMA, 目录号 M-7154), PBS (SIGMA, 目录号 3813), concavalin A (Con A) (SIGMA, 目录号 C-5275), MBP (髓磷脂碱性蛋白) 肽 (87-99) (BACHEM, 目录号 H-1964 或等价物), 和 GARS。
25

用于 ELISA

通过 ELISA 试剂盒测量 IL-2: OptEIA™ Set: 小鼠 IL-2 (Pharmingen,
30 目录号 2614KI, 或等价物)。

动物

- 使用 8-12 周龄的雌性 (SJLXBALB/C) F1 小鼠, 尽管也可以使用来自其它来源的 8-12 周龄的雌性 (BALB/C) F1 小鼠。在无特定病原物 (SPF) 的条件下保持动物的住宿和养护条件。

表 1: 制备溶液的方法

无菌 PBS	将 1 包装的 PBS 的内含物溶解在 1 升双蒸水 (ddH ₂ O) 中。将缓冲液过滤通过 0.2 μ 醋酸纤维素滤器并保存在冰箱 (2-8°C) 中达 1 周。
PBS 中的 2% (w/v) 锥虫蓝	将约 0.5 g 锥虫蓝溶解在 25 ml 过滤的 PBS 中并保存在冰箱中达 6 个月。
PBS 中的 0.1% (w/v) 锥虫蓝	从 2% 锥虫蓝贮存液制备 0.1% 锥虫蓝溶液并通过 0.2 μ 醋酸纤维素滤器。将 0.1% 锥虫蓝溶液保存在室温下达 1 个月。
无菌 2-巯基乙醇	将 10 μl 2-巯基乙醇加入 9.99 ml 无菌 PBS 中并过滤通过 0.2 μ 醋酸纤维素膜并保存在冰箱中达 3 个月。
1 mg/ml 的 GA RS 贮存液	准确称量约 10 mg 醋酸格拉默并溶解在 ddH ₂ O 中至约 1.2 mg/ml 的浓度。在 275 nm 下测量 RS 溶液的光密度 (OD)。用 ddH ₂ O 将 OD 调整至约 1.03, 获得 1 mg/ml 的 GA RS 贮存液。将溶液充分混合, 分成工作等分试样 (200-500 μl) 并保存在 -20°C 下直至使用。
无菌 MEM x 100	将无菌溶液分成每个 5 ml 的等分试样, 并保存在 -20°C 下直至使用。在解冻后, 将工作等分试样保存在冰箱中达 1 个月。
抗生素/抗真菌溶液 1	将原来的 20 ml 包装保持在 20°C。打开包装, 将所有内容物分成每个 2 ml 的等分试样并保存在 -20°C 下直至使用。工作等分试样是稳定的并且能够经受几个解冻循环。
无菌 L-谷氨酸 2 mM x 100	将打开包装的内容物分成每个 2 ml 的等分试样并保持在 -20°C 下直至使用。

DCCM1 富集培养基	对于 100 ml 无菌富集的 DCCM1, 将下列组分混合在一起: 1 ml L-谷氨酸 (2 mM), 1 mM MEM, 1 ml 丙酮酸钠 (1 mM), 200 μ l 抗生素/抗真菌溶液 1, 400 μ l 2-巯基乙醇和 96.4 ml DCCM1。将富集的 DCCM1 过滤通过 0.2 μ 醋酸纤维素滤器并保存在冰箱中达 1 周。
MBP 肽	<p><u>一级库</u>: 制备在 ddH₂O 中 10 mg/ml 的贮存液, 分成工作等分试样并保存在 20°C。</p> <p><u>二级库</u>: 将 1 等分试样的一级库 (10 mg/ml) 解冻并用 ddH₂O 稀释成 1 mg/ml。将一级库溶液分成每个 50 μl 的工作等分试样并保存在 -20°C。在使用时, 将来自二级库的等分试样解冻并用富集的 DCCM1 稀释以获得 20 μg/ml 的溶液。</p>
Con A 溶液	<p><u>一级库</u>: 将 1 小瓶 5 mg Con 的内容物溶解在 1 ml PBS 中, 充分混合并分成每个 50 μl 的等分试样。将等分试样保存在 -20°C 直至由制造商设定的有效期。</p> <p><u>二级库</u>: 将 1 等分试样的一级库 (5 mg/ml) 解冻并用 4.95 ml 富集的 DCCM1 培养基稀释以获得 50 μg/ml 的溶液。将溶液分成每个 100 μl 的工作等分试样并保存在 -20°C。在使用时, 将来自二级库的等分试样解冻并用富集的 DCCM1 稀释至 1 ml (10 倍稀释) 以获得 5 μg/ml 的 Con 溶液。</p>

免疫

在无菌条件下, 即在层流通风橱中使用无菌装置和材料制备在 CFA 中的免疫 GARS 乳剂。

5

GARS 溶液的制备

准确称量约 15 mg GARS 并溶解在无菌 PBS 中至 5 mg/ml 的浓度。

GARS 乳剂的制备

混合等体积的 GARS 溶液(5 mg/ml)和 CFA。将混合物转移至通过 luer 桥与第二个玻璃注射器连接的无菌玻璃注射器中。通过从一个注射器转移至另一注射器将混合物充分混合直至混合物充分乳化。当一滴乳剂漂浮在水上而不分散时证实稳定的乳剂。

注射

将 GARS 乳剂转移至胰岛素注射器。然后将 100 μ l 乳剂(每只小鼠 250 Ag GA) 注射到每只稚鼠的 4 个脚垫中(每个脚垫中约 25 μ l)。在免疫以后 9-11 天将免疫的小鼠用于体外试验。

LN 细胞原代培养物的制备

在免疫以后 9-11 天按照下列方法制备 LN 细胞的原代培养物：

15

去除 LB 细胞的外科手术方法

在层流通风橱中开始工作之前将 UV 灯打开 20 分钟，当工作开始时关掉。在放置任何试剂在通风橱下之前，用 70%乙醇溶液清洗工作表面。制备富集的 DCCM1 培养基。在使用前在 37 $^{\circ}$ C 下预热富集的 DCCM1 和 RPMI 培养基。通过颈椎脱臼处死小鼠。将每只小鼠背向放置并固定在支架平台上。用 70%乙醇喷雾腹部，进行中切(2 cm-长切口通常足够)。将皮肤向后腿切割，从后腿和前腿定位 LN。将 LN 转移至无菌的含有约 5 ml 无菌 RPMI 培养基的平皿，通过无菌注射器柱塞挑出 LN 细胞。将无菌注射器用来从平皿中收集细胞悬浮液(通过使用无菌针避免组织碎片的收集)。

25 将细胞悬浮液转移至 50 ml 无菌管。

细胞计数：用于计数来源于 5 只免疫小鼠的 LN 细胞的方法实例

用 RPMI 培养基装满细胞管至 40 ml。在 200 x g 下在室温(15-25 $^{\circ}$ C)下离心 LN 细胞 10 分钟。用 40 ml RPMI 再悬浮沉淀。在微量试验孔中用 150 μ l 0.1%锥虫蓝稀释 4 倍的细胞悬浮液中每个抽取 50 μ l 的两个等分试

30

样。通过轻轻上下吸取充分混合等分试样。用盖玻片覆盖血细胞计数器。使用 50-200 μl pipettman 将两个等分试样加样到血细胞计数器的上腔和下腔中，每腔一种悬浮液。使混合物静置在腔中约 2 分钟。小心不将气泡引入腔中。使混合物（细胞悬浮液 + 锥虫蓝）覆盖整个腔表面。如果气泡存在腔中，或者如果它加样过多，彻底清洗血细胞计数器并用抹布干燥，将腔再次加样。

在上下腔的中心正方形（每个由 25 个大正方形和 16 个小正方形组成，参见图 3）中对活细胞计数。活细胞不吸收锥虫蓝，因此特征是清澈的外观。然而，死细胞是锥虫蓝所能渗透的和显蓝色。出现在中心正方形边上的细胞仅仅如果细胞的一部分确实在中心正方形中才计数。如果细胞在边上，而根本不在中心正方形内部，不将它计数。使用下列方程计算细胞密度：

$$\text{活细胞平均数（两个腔）} \times 4 \times 10^4 = \text{细胞/ml}$$

将细胞在 200 x g 下在室温下离心 10 分钟。用富集的 DCCM1 将细胞再悬浮至 1×10^7 个细胞/ml。

体外生物测定

在 24-孔的平底组织培养试验板中在 1 ml 的终体积下进行体外生物测定。

GARS 校准曲线的制备

将 1 等分试样的 1 mg/ml GARS 贮存液解冻。用富集 DCCM1 培养基将 GARS 贮存液稀释至 100 $\mu\text{g/ml}$ （10 倍）并过滤通过 0.2 μm 醋酸纤维素滤器。如表 2 中实例所述，制备 2-50 $\mu\text{g/ml}$ 的使用富集 DCCM1 培养基的 6 个连续稀释的 GARS 溶液。

表 2: 制备 GARS 稀释液的实例

GARS 浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	GARS 贮存液 (100 $\mu\text{g/ml}$) 的体积 (μl)	富集 DCCM1 的体积 (μl)
50	1000	1000
30	600	1400
20	400	1600
10	200	1800
5	100	1900
2	40	1960

GADS 稀释液的制备

准确称量来自待检测批次的约 10-20 mg GADS 并用 ddH₂O 稀释至 1.2 mg/ml。在 275 nm 下测量减去溶液空白的 OD。将样品的 OD 用 ddH₂O 调整至约 1.03 以获得 1 mg/ml 的 GA 贮存液。用富集 DCCM1 制备 100 $\mu\text{g/ml}$ 的贮存液并过滤通过 0.2 μm 醋酸纤维素滤器。对于 RS 批次如表 2 所述将贮存液稀释至 10 $\mu\text{g/ml}$ 和 20 $\mu\text{g/ml}$ 。

10 测定反应

将下列各项加入 24-孔平底组织培养板 (参见以下平板模板的实例):

GARS

0.5 ml LN 细胞 (终密度, 例如, 5×10^6 个细胞/孔)。

15 0.5 ml 每种 GARS 稀释液, 因此在各孔中 GARS 的终浓度为 25, 15, 10, 5, 2.5 和 1 $\mu\text{g/ml}$ 。

GADS 样品

0.5 ml LN 细胞 (终密度, 例如, 5×10^6 个细胞/孔)。

20 0.5 ml 每种样品稀释液, 因此在孔中试样的终浓度为 5 和 10 $\mu\text{g/ml}$ 。

每个测试包括下列对照:

1) 阴性对照 - 与对照肽温育的 LN 细胞:

0.5 ml LN 细胞 (终密度 5×10^6 个细胞/孔)

0.5 ml 在富集 DCCM1 中的 MBP 肽溶液 (20 $\mu\text{g/ml}$) (终浓度 10 $\mu\text{g/ml}$)

2) 阳性对照 - 用 Con A (非特异性 T 细胞刺激剂) 刺激的 LN 细胞:

5 0.5 ml LN 细胞 (终密度 5×10^6 个细胞/孔)

0.5 ml 在富集 DCCM1 中的 Con A (5 $\mu\text{g/ml}$) (终浓度 2.5 $\mu\text{g/ml}$)

平板模板的实例

GARS*	GARS*	GARS*	GARS*	GARS*	GARS*
1 $\mu\text{g/ml}$	2.5 $\mu\text{g/ml}$	5 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	15 $\mu\text{g/ml}$	25 $\mu\text{g/ml}$
样品 1 5 $\mu\text{g/ml}$	样品 1 10 $\mu\text{g/ml}$				
样品 2 5 $\mu\text{g/ml}$	样品 2 10 $\mu\text{g/ml}$				
样品 3 5 $\mu\text{g/ml}$	样品 3 10 $\mu\text{g/ml}$			阴性对照	阳性对照

GARS* - 醋酸格拉默参考标样

10

根据它们对 GA 的反应改变细胞的密度。将培养物保持在 37°C 下在湿润的 5% CO_2 培养箱中 18-21 小时。在 200 x g 下在室温下将平板离心 10 分钟。将上清液收集在 cryotube 中。将上清液分成工作等分试样以避免样品重复冷冻/解冻。将上清液保存在 -20°C 下达 1 周。用 70% 乙醇清洗通风橱并用 Kim 抹布干燥。去除手套，用立即消毒剂洗涤。

15

用于 IL-2 检测的 ELISA

所有检测的样品一式三份。每次平板运行 (run) 包括下列各项:

1) IL-2 标准曲线 - 包括至少 6 种非零 IL-2 浓度。

20

2) 空白

+ 第一抗体, 无 IL-2 标样, + 第二抗体 (零点)

3) 样品

如下用富集的 DCCM1 稀释 GARS, 试样和对照的培养基:

a) 1 和 2.5 $\mu\text{g/ml}$ GARS 样品和阴性对照样品的 2-倍稀释液;

b) 5-25 $\mu\text{g/ml}$ GARS 样品和试样的 5-10 倍稀释液; 和

c) 阳性对照样品 (Con A) 的 15-20 倍稀释液。

- 5 按照制造商的推荐进行测量 IL-2 水平的 ELISA 方案。如果任何样品的光密度到达平板读出器的上/下限, 分别在较高/较低稀释度下重新分析样品。

计算和验收标准

10 ELISA 测量

将平均吸光度从标样, 样品和对照中减去空白样品 (零 IL-2 标准点), 对于每组三份计算平均值 (吸光度-空白), 标准偏差 (SD), 和相对标准偏差 (RSD)。

15 样品重复

- 只要存在可疑的异常值, 必需确保异常值基于统计学上的, 以便阐明任何潜在的可能影响总结果的问题。如果一式三份测量之间的 RSD 高于 10% 并且平均 OD-空白 > 0.300, 使用 Dixon Q-检验实行异常值剔除。当在基于一式三份的测试中不满足相关的验收标准时使用 Dixon Q-检验剔除可能的异常值。异常值检验仅可适用于相同标准溶液的重复测量。对于小于 10 次的观察, 仅能够测定和排除 1 个异常值。该方法可能扩展 Dixon Q-检验在从 3-7 之间任何数目的重复测量中剔除异常值中的使用, 置信水平为 95%。

25 方法

将可疑的异常值称为 X_1 。参考可疑的异常值标记所有其它的测量值, 例如 X_2 是可疑异常值的下一个值, X_3 是离可疑异常值的第二个值, X_k 离可疑异常值最远, X_{k-1} 可是第二离最远的值等。

对于 3-7 次重复, 使用下列方程: $X_2 - X_1 / X_k - X_1$ 。

30 表 3: k 值

观察数 (k)	P ₉₅ 值
3	0.94
4	0.76
5	0.642
6	0.560
7	0.507

如果通过 Dixon Q-检验未鉴定出异常值但是 3 次重复中的 2 次之间的差异不超过 10%，将最靠近的 2 次重复用于计算%功效。否则，对该样品重复 ELISA 试验。

- 5 实行从 OD < 0.300（空白，阴性对照和低标准点）的样品中的样品剔除。当确定异常值时，将它剔除和报告。将一式两份测量用于%功效的计算。

空白样品

- 10 每个空白样品的吸光度≤最高浓度的 IL-2 标样的平均吸光度的 10%。如果空白重复之一超过上述范围，剔除它并使用一式二份样品。

IL-2 标准曲线

- 15 按照制造商的推荐将 IL-2 标准曲线作图。如果 6 个非零浓度的 IL-2 标样的最小值保留在曲线中，可以剔除显示差灵敏度或样品处理误差的 IL-2 标样。后推-计算的（back-calculated）标准浓度对于较低的校准点具有大于 20%的相对误差（RE），对于所有其它浓度 15%。从覆盖期望浓度的至少 6 个非零浓度的点（至少 17 个校准点）构建 IL-2 校准曲线。如果高或低浓度失败，标准曲线范围能够被截短。线性回归曲线的 $R^2 \geq 0.97$ 。

20 测定对照

使用线性回归曲线的方程，从 IL-2 标准线性回归曲线计算所有样品中 IL-2 的浓度。通过乘以样品稀释因子计算在所有样品中 IL-2 的终浓度。

阴性对照（MBP 肽）

阴性对照样品 3 次重复中至少 2 次中 IL-2 的终浓度低于对于 GA RS 曲线最低校准点测量的 IL-2 水平。

阳性对照 (Con A)

- 5 阳性对照样品 3 次重复中至少 2 次中 IL-2 的终浓度类似或高于 GA RS 曲线最高校准点的 IL-2 的水平。

GA DS 批次相对功效的计算

GA RS 曲线

- 10 以对数-对数的标度, 以对数 IL-2 浓度为 y 轴和以对数 GA RS 浓度为 x 轴绘制 GA RS 曲线。从至少 5 个非零浓度构建校准曲线 (至少 14 个校准点)。如对于 IL-2 标准点所述剔除校准点。通过标准点计算最佳拟合回归曲线。 $R^2 \geq 0.97$ 。斜率 (β) ≥ 0.77 。

15 平行性分析

以对数-对数的标度, 以对数 IL-2 浓度为 y 轴和以对数 GA DS 浓度为 x 轴绘制每个试样的剂量-反应曲线。通过样品点计算最佳拟合回归曲线。斜率 (β^*) 在下列范围内:

$$\beta \times 0.635 \leq \beta^* \leq \beta \times 1.365$$

- 20 如果 β^* 在范围外, 一式二份重复体外试验 (两次分开的样品制备)。如果在一次重复试验中 β^* 失败, 剔除该批次。如果在两次重复试验中 β^* 在范围内, 测定%功效和 95%的置信范围。

%功效和置信范围的评估

- 25 通过使用 ANOVA 获得用于确定置信范围 (其具有包括“真实功效“的 95%概率) 的随机误差的估计。该统计计数将观察的反应的总差异分成独立的部分, 即:

- | | | |
|---------------|---|----|
| 1. 由线性剂量-反应导致 | } | 模型 |
| 2. 由制剂的平均效应导致 | | |

3. 由于平行性偏差导致
 4. 由于线性的偏差导致
 5. 由于剩余的重复之间的偏差导致
- } 随机误差

由于分别与线性和平行性的非显著的偏差，部分 3 和 4 包括在随机误差项中。将总平方和分成 3 部分（SS-回归，SS-制剂和 SS-误差），适当的自由度数和显著性的 F-检验。

如下所述计算试验批次的%功效和对于估计的功效的 95%置信范围：

计算相对功效和 95%置信范围的计算算法

10 步骤 1：计算给定数据转化成 \log_{10} 标度：

$$Y_{ki} = \log_{10}(\text{反应 } k_i); i=1, \dots, n_k$$

$$X_{ki} = \log_{10}(\text{剂量 } k_i); i=1, \dots, n_k$$

其中 $k=1, 2$ 分别是 GA 批次和 GA. RS 的制剂下标； n_1 和 n_2 是分别对于 GA 批次和 GA. RS 进行的测量总数。

15 因此， $N=n_1+n_2$ 是观察的全部总数。

步骤 2：通过下式基于所有测量的数据点计算对于线性回归的共同斜率：

$$20 \quad \beta = \frac{\sum_{j=1}^N (Y_j - \bar{Y}) \cdot (X_j - \bar{X})}{\sum_{j=1}^N (X_j - \bar{X})^2};$$

其中 \bar{Y} 是 \log_{10} （反应）的总平均值；

\bar{X} 是 \log_{10} （剂量）的总平均值。

步骤 3：如下计算由于对 \log_{10} （剂量）回归导致的平方和：

$$25 \quad SS_{REG} = \beta^2 \cdot \sum_{j=1}^N (X_j - \bar{X})^2;$$

步骤 4：如下计算随机误差的平方和：

$$30 \quad SS_{ERR} = \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} [Y_{ki} - \bar{Y}_k - \beta \cdot (X_{ki} - \bar{X}_k)]^2;$$

其中 \bar{Y}_k , \bar{X}_k 分别是制剂 k 的 \log_{10} (反应) 和 \log_{10} (剂量) 的平均值。

步骤 5: 如下计算均方误差项:

DF_{误差} (随机误差的自由度) = N-3;

MS_{误差} = SS_{误差} / DF_{误差}。

5 步骤 6: 使用 t-分布统计表以便发现 t-统计的适当值:

$t = t(0.975, DF_{\text{误差}})$ 。

步骤 7: 如下计算相对功效的点估计:

$$\% \text{功效} = 10^{\frac{\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2}{\beta} - (\bar{X}_1 - \bar{X}_2)} \cdot 100\%;$$

10

步骤 8: 计算通过下式由 C 表示的表达式:

$$C = \frac{SS_{REG}}{SS_{REG} - MS_{ERR} \cdot t^2};$$

15

步骤 9: 计算 95% 置信区间的上限和下限的对数:

$$\text{Log}_{10}(\text{Lower Limit}) = C \cdot \frac{\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2}{\beta} - (\bar{X}_1 - \bar{X}_2) - \frac{\sqrt{MS_{ERR} \cdot C \cdot t}}{\beta} \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} + \frac{(\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2)^2}{SS_{REG} - MS_{ERR} \cdot t^2}}$$

20

$$\text{Log}_{10}(\text{Upper Limit}) = C \cdot \frac{\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2}{\beta} - (\bar{X}_1 - \bar{X}_2) + \frac{\sqrt{MS_{ERR} \cdot C \cdot t}}{\beta} \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} + \frac{(\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2)^2}{SS_{REG} - MS_{ERR} \cdot t^2}}$$

25 步骤 10: 通过采用反对数获得的对数范围和乘以 100% 将在前述步骤中计算的值转换成原有标度。

GA DS 批次的估计功效不小于表明功效的 80% 和不超过 125%。估计功效的误差置信范围 (P=0.95) 不小于表明功效的 70% 和不超过 43%。如果批次在上述范围外, 一式两份重复体外试验。如果两次重复试验的结果
30 都在说明书的范围内, 批次可接受。如果一次重复试验失败, 剔除该批次。

记录

记录 LN 细胞计数和 ELISA 平板模板。将原始 ELISA 读出器记录和结果表格归档。

5

实施例 2：实施例 1 的标准方法的发展

实验 2A：从 GARS-特异性 T 细胞分泌的细胞因子的轮廓

LN 细胞来源于预先 9-11 天用在 CFA 中的 250 μg GA RS 免疫的雌性 (SJL x BALB/C) F1 小鼠，其在各种浓度的 GARS 的存在下培养。将细胞在 37°C 下在 5%CO₂ 湿润的培养箱中与 GARS 温育 18-24 小时。随后，将培养物离心并收集上清液和通过 ELISA 测定细胞因子。

使用细胞因子特异性的生物素化的抗体和用于检测的偶联的链霉抗生物素-辣根过氧化物酶 (HRP) 进行 ELISA。每次板运行包括空白对照 (不含细胞因子标样的第一和第二抗体)。每次板运行还包括质量控制 (QC) 样品 (在测定线性范围内 3 种浓度的细胞因子标样)。每个体外试验包括阳性对照 (ConA, 非特异性 T-细胞刺激剂) 和阴性对照 (无 GA 或其它任何抗原)。所有细胞因子在温育 18-24 小时后测量。在温育 72 小时后再次检测 TGF- β , IL-10 和 IL-4 的水平。结果在表 4 中显示。

表 4：细胞因子轮廓

细胞因子	分泌水平
IL-2	++
INF- γ	++
IL-6	+
IL-10	+
IL-13	-
TGF- β	-
IL-4	-
TNF- α	-

20

在表 4 中，对于每种细胞因子测量的最大水平以任意单位表示： (-)

<检测范围; (+) 高达大约 400 pg/ml; (++) > 400 pg/ml。表 4 显示响应培养物中的 GARS, LN 细胞分泌 IL-2, INF- γ , IL-10 和 IL-6, 而 TNF- α , IL-4, IL-13 和 TGF- β 在培养基中未检测到。这些结果显示通过 GARS-特异性 T 细胞生产的细胞因子是属于 Th₀ 类型。应当注意在不同免疫方案, 即用 IFA 或用低剂量 GA 免疫中观察到 Th₀ 轮廓。

因为 IL-2 是 T 细胞激活的好标记, 并且因为响应 GARS 的 IL-2 分泌非常可重复, 具有线性的剂量-反应关系, IL-2 似乎是测量 T 细胞激活的最佳细胞因子。

10 实验 2B: 免疫方法的优化

进行几个实验以确定最佳免疫方案。第一个实验检测在 LN 中和在脾中 GARS (免疫抗原) 剂量对 T-细胞反应的影响。用 CFA 中的 250 μ g GA (组 1) (如在 EAE 封闭试验中) 或在 CFA 中的 10 μ g GA 免疫 2 组每组 10 只小鼠。从免疫小鼠的 LN 和脾制备原代培养物。将培养物与各种剂量的 GARS 温育过夜, 之后如实验 2A 收集培养基并测定 IL-2。图 4 中的结果清楚地表明在两个免疫方案中, 与从脾细胞分泌的那些相比从 LN 细胞分泌的 IL-2 的水平高。基于这些结果决定将 LN 细胞的原代培养物用于测定。另外, 注射到小鼠中的 GARS 的剂量不影响培养物中的 T 细胞反应。无论 GARS 的免疫剂量, LN 和脾细胞分泌相似数量的 IL-2。这表明免疫方法是稳固的, 甚至 GARS 免疫剂量的较大变化也不影响免疫结果。

为了进一步优化免疫方案, 一组注射在 CFA 中的 250 μ g GARS, 第二组用 ICFA 中的 10 mg GA 注射。因为使用 ICFA, 一种较弱的佐剂, 第二组中 GARS 的剂量较高。10 天后, 体外检测来自两组的 LN 细胞对 GARS 的反应。图 5 显示尽管使用低得多的剂量, 用在 CFA 中的 250 μ g GARS 免疫在培养物中诱导强得多的反应。

基于这些发现, 和 250 μ g/小鼠的 CFA 中的 GA 在阻断 EAE (在该小鼠品系中 EAE 的至少 80% 阻断) 方面非常有效的事实, 250 μ g/小鼠的 CFA 中的 GA 似乎是最佳剂量。

在用 CFA 单次免疫后, 通常在约 10 天内产生特异性的 T 细胞。图 6 显示在免疫后 9, 10 和 11 天制备的培养物中 LN 细胞对 GARS 的反应。

因为 IL-2 分泌的剂量-反应在所有各天类似，免疫周期可以持续 9-11 天。

实验 2C: 体外试验条件的优化

进行几个实验来确定体外反应的最佳方案。这些研究包括培养条件，
5 温育时间的优化，在试样中 IL-2 的稳定性和 GARS 在-20°C 下的稳定性。

i) 培养基

通常在补充 1%正常小鼠血清的 RPMI 培养基中保养小鼠淋巴细胞的
培养物。正常小鼠血清可以包含内源性 IL-2，其可以通过在 ELISA 试剂
盒中使用的抗-小鼠 IL-2 单克隆抗体检测。另外，不同大量的正常血清的
10 使用可能增加体外试验的日间变化。为了避免与内源性 IL-2 的交叉感染，
和为了减小该方法的日间变化，在 4 种不同培养基中检测 GA-特异性的 T
细胞反应：

- 1) RPMI +1%正常小鼠血清(NMS);
- 2) RPMI +1%胎牛血清 (FBS) (牛 IL-2 不被在 ELISA 试剂盒中使用的
15 的抗小鼠 IL-2 识别);
- 3) Biotarget (由 BeitHaemek,以色列专门生产的无血清培养基);
- 4) DCCM1 (由不同制造商生产的无血清培养基)。

图 7 显示代表性实验的结果，该实验比较在不同培养基中 LN 细胞对
GARS 的反应。当使用无血清培养基时观察到最好的反应。在缺少血清下
20 剂量-反应范围左移。这可以通过先前显示 GA 与白蛋白和其它血清蛋白结
合的研究解释。该结合可以降低培养物中 GA 与 APC 相互作用的可用性，
因此要求更高浓度的 GA 来刺激 T 细胞。基于这些结果，最佳培养基似乎
是 DCCM-1 培养基。

25 ii) IL-2 分泌的动力学

IL-1 是自分泌和旁分泌生长因子，其对于克隆 T-细胞增殖和 B 细胞及
巨噬细胞的功能性质是必需的。在用 GARS 刺激培养物以后，通过激活
的 GA-特异性 T 细胞分泌 IL-2 并随后被 LN 细胞消耗。进行 IL-2 分泌的
热力学研究试图确定在用 GA 刺激后收集上清液的最佳（峰）时间。在湿
30 润的 CO₂ 培养箱中在 37°C 下培养 LN 细胞并与不同浓度的 GARS 温育。

在图 8 所示的时间间隔中，取样等分试样并通过离心去除细胞。将上清液保存在 20°C，在实验结束时用于通过 ELISA 测定。

图 8 显示在培养基中 IL-2 水平的峰在 18-21 小时之间。从 24-48 小时收集的样品中的 IL-2 水平的降低可以通过 LN 细胞的 IL-2 消耗来解释。

5 因此，上清液收集的最佳时间似乎是在温育 18-21 小时后。

iii) 细胞因子的测量

本方法依赖于 GA RS 样品和试样中 IL-2 的准确测量。在实验期间，通过 OptEIA (Pharmingen, 目录号 2614KI) - 对于小鼠 IL-2 特异性的 ELISA 试剂盒来测量 IL-2 的水平。该 ELISA 试剂盒非常灵敏并且结果准确和可重现。

iv) 在-20°C下试样中 IL-2 的稳定性

在大部分进行的实验中，在通过 ELISA 分析之前收集培养基并保持在 -20°C。IL-2 在培养基中稳定性的初步研究表明细胞因子在-20°C下稳定 1 周（图 9）。因此，在测量 IL-2 之前体外试样的培养基可以保持在-20°C下 15 达 1 周。该试验的结果还显示 ELISA 结果是重现非常好的--在隔 1 周的不同两天进行的两次 ELISA 板运行中在样品中测量的 IL-2 水平几乎相同。

v) GARS 溶液在-20°C下的稳定性

为了检验 GARS 溶液在-20°C下的稳定性，在制备后即刻和在-20°C下 20 贮存 5 个月后检测 GA RS 溶液的剂量-反应。图 10 显示在-20°C下贮存 5 个月之前和之后 GA RS 溶液的剂量-反应曲线几乎没有差异。因此，可以制备 GARS 溶液的等份试样并在使用前保存在-20°C下至少 5 个月。

25

实验 2D: 确定 GARS 校准曲线的线性范围

基于对于接受分析的 21 个板中的每一个分别计算和评估的 GA RS 校准曲线进行统计学有效性检查。这些 21 个样品是在约 4 个月的期间的不同时间收集。给定板的 GA 浓度范围为 0.25-50 µg/ml。下列源于 GA RS 30 校准曲线的有效性特征构成分析的主要方面：

1. 最佳转换以确保线性范围的更宽范围;
2. 测定线性范围极限;
3. 接受校准曲线的总标准;
4. 评估测定准确度和精度;
5. 评估一式两份的可靠性 (参见以下段落)。

实验性质如此以致在每个校准点典型地有 3 个重复(一式三份)。然而, 在一些情形下, 当不能提供一式三份的测量时, 一式两份的可靠性的评估变得关键。

10 GA 剂量-反应关系的线性

以下提供的有效性讨论的大多数方面的基础是将 IL-2 浓度 (pg/ml) 与 GA 浓度 ($\mu\text{g/ml}$) 相关联的线性回归模型。该关系的线性假设对于线性回归模型的适当拟合是必需的。以线性-线性标度将数据作图。将相同的关系转化成对数-对数标度, 以及对数-线性标度, 和对数-平方根标度。对数-对数转化显示最适合的线性特征。因此, 选择的回归模型形式是对数-对数的一种:

$$\text{Log}_{10} (\text{IL-2 浓度}) = \alpha + \beta * \text{Log}_{10} (\text{GA 浓度}) + \text{误差}$$

反应变量是在每个校准点测量的 3 次重复的对数-转换平均值。将该模型与每个校准样品拟合并对于每个拟合曲线计算适当的统计学 (R^2 , 截距, 和斜率)。 R^2 值通过下式反映残差平方和 (RSS) 与总平方和 (TSS) 的比率:

$$R^2 = 1 - \text{RSS}/\text{TSS}$$

线性范围确定

25 基于下列标准确定线性范围:

1. 绘制的 Log_{10} (IL-2 浓度) 比 Log_{10} (GA 浓度) 的目视检查;
2. 回归影响诊断, 如在距离统计学 (distance statistic) 领域中已知的 Cook's;

3. 对于几个潜在的线性范围定义的校准曲线计算的精度和准确度值的差异评估提供线性关系的视觉评价。没有在选择的 1-25 $\mu\text{g/ml}$ 线性范围

内部非线性关系的证据。

实验 2E: GARS 标准曲线的测定

5 在选择的线性范围极限 (1-25 $\mu\text{g/ml}$) 拟合的源于 GARS 校准曲线的有效参数测定如下:

1. 对于研究中每个板的 Log_{10} (IL-2 浓度) 对 Log_{10} (GA 浓度) 的线性回归拟合的 R^2 ;

2. 这些直线拟合的斜率和截距;

3. 对于每个板对每个校准点计算的准确度; 和

10 4. 对于每个板对每个校准点计算的精度。

为了计算准确度和精度, 将每个校准曲线用于校准 (后推计算) 给定 IL-2 浓度值的 GA 浓度:

$$X_{i\text{-后推}} = 10^{(\log_{10}(\text{IL-2 conc})_i - \alpha) / \beta}$$

15

$i=1, 2, 3$ - 一式三份下标。

所用准确度的基本度量是一式三份样品中浓度估计的平均值和真实浓度之间的差异百分比:

$$\text{不准确度} = ([\text{平均值}(X_{i\text{-后推}}) - \text{GA 浓度}] / \text{GA 浓度}) * 100\%$$

20

所用精确度的基本度量是一式三份浓度估计的浓度的相对标准偏差 (RSD 或 CV):

$$\text{精度} = \text{CV}(X_{i\text{-后推}}) = [\text{标准偏差}(X_{i\text{-后推}}) / \text{平均值}(X_{i\text{-后推}})] * 100\%$$

25

分析的目标是为拟合校准曲线提议验收标准, 确保方法的准确度和精度是充分的。验收标准是基于 R^2 和 GARS 校准曲线的斜率。通过小的不准确度值 (<13%) 和通过好的精度 (1.1%-6.7%) 可以表征约 80% 的板。对于这些 16 条“表现良好”的标准曲线, 获得下列结果:

1. 高 R^2 值 (> 0.98);

2. 比较高的斜率值, 反应剂量反应关系 (在 16 个板中的 15 个中 > 0.78)。

30

因为与具有较低 R^2 值 (平均值=0.94) 和相当平的斜率 (平均值=0.72)

排除的板形成对比，大部分校准曲线的特征在于比较高的 R^2 值（平均值=0.99）和比较陡的斜率（平均值=0.87），在 R^2 和斜率方面考虑校准曲线的总验收标准。确定接受参数的简单规则是分别基于斜率和 R^2 截止点的计算并将它们定位在拒绝曲线的最大值（最大 $R^2=0.95$ 最大斜率=0.77）和接受曲线的最小值（最小 $R^2=0.98$ 最大斜率=0.77）之间。因此，如下得出验收标准：

1. $R^2 \geq 0.97$;
2. 斜率 ≥ 0.77 。

将这些标准应用于在 1-25 $\mu\text{g/ml}$ GA 浓度范围内拟合校准曲线的至少 5 个不同（一式三份）浓度。另外，截距值的范围为 1.42-1.78，平均值=1.58。该范围对于 16 个合格的和 5 个去除的平板类似。

对于每条曲线和对于板上那些中的各个浓度计算准确度和精度。这些单独的值（对于每条曲线和每个浓度）也在以下各项上平均：

1. 每条曲线的不同浓度；
2. 每个浓度的不同曲线；和
3. 在所有曲线和浓度上。

有关结论是对于基于在线性范围 1-25 $\mu\text{g/ml}$ 内至少 5 个不同校准点的 GA RS 校准曲线，当将校准曲线限制为具有 $R^2 \geq 0.97$ 和斜率 ≥ 0.77 ，得到的平均准确度和精度估计如下：

1. 方法的平均（ \pm SD）准确度值是：8.0% \pm 2.3%；并且
2. 方法的平均（ \pm SD）精度值是：2.9% \pm 1.7%。

基于一式两份的 GA RS 校准曲线的可靠性评估

为了评估在每个校准点使用一式两份测量拟合的 GA RS 校准曲线的可靠性，进行测定的准确度和精度描述性统计的比较。另外，对于在给定一式三份中所有 3 种可能的一式两份测量的选择，研究单个的准确度和精度值（对于每条曲线和每个浓度）。当在满足在先前部分中所述验收标准并且在确定的线性范围 1-25 $\mu\text{g/ml}$ 的极限内的那些曲线上集中时，明显的是当由于某些原因不能提供一式三份测量时，可以成功地用一式两份测量替代。

表 5: 准确度和精度描述性统计总结

	一式三份		一式两份 (1,2)		一式两份 (1,3)		一式两份 (2,3)	
	准确度	精度	准确度	精度	准确度	精度	准确度	精度
平均值	8.00	2.93	8.13	2.53	7.98	2.88	8.40	2.40
S.D.	2.31	1.72	2.80	1.66	2.45	2.13	2.79	1.53
最小值	5.23	1.10	4.93	0.95	5.21	0.93	4.97	0.81
最大值	12.79	6.67	12.51	6.33	12.44	9.24	13.41	5.99

基于一式三份的方法的平均 (\pm SD) 准确度和精度分别是 $8.0\% \pm 2.3\%$ 和 $2.9\% \pm 1.7\%$ (表 5)。

5 基于一式两份的方法的平均 (\pm SD) 准确度和精度是:

1. 准确度: $8.1\% \pm 2.8\%$; 精度: $2.5\% \pm 1.7\%$;
2. 准确度: $8.0\% \pm 2.5\%$; 精度: $2.9\% \pm 2.1\%$; 和
3. 准确度: $8.4\% \pm 2.8\%$; 精度: $2.4\% \pm 1.5\%$ 。

10 实验 2F: 统计学关系的测定

发现方法的平均 (不) 准确度为 8.0% , $SD=2.3\%$ 。目标是发展用于新 GA 批次与 GARS 的两条对数 (剂量) - 对数 (反应) 直线的斜率比较的可靠性检验。检验考虑上述方法的 (不) 准确度。方法平均 (不) 准确度的约 95% 个别容许区域的最高极限用作阈值: $平均值+2*SD=12.6\%$ 。因此, 在范围 $\pm 12.6\%$ 内的变化被认为是非显著的。

如下是 β^* (批次直线的斜率), β (标准直线的斜率) 和最高允许 (不) 准确度值之间的关系的关系的完整数学解释。未失去一般性, 将仅证明其中 $\beta^* > \beta$ 的情形 (由于存在对称性, 扩展到 $\beta^* < \beta$ 的情形的证据是明显的)。对于给定 \log (反应) 的后推-计算剂量值为:

20 $X_{后推} = 10^{(Y-\alpha)/\beta}$, 其中 $Y = \log_{10}$ (IL-2 浓度)。

(不) 准确度计算的式子为:

(不) 准确度 = $[(10^{(Y-\alpha)/\beta} - X_{真实}) / X_{真实}] * 100\%$ 。

$Y_{低}$ 和 $Y_{高}$ 是可容许的 $\pm 12.6\%$ (不) 准确度允许的最低和最高 \log (反应) 值。

因此，接受斜率相等的假设的区域是：

$$\left\{ \begin{array}{l} [(10^{(Y_{low} - \alpha)/\beta} - X_1)/X_1] * 100\% \geq -12.6\% \\ [(10^{(Y_{high} - \alpha)/\beta} - X_2)/X_2] * 100\% \leq -12.6\% \end{array} \right.$$

5

$$\left\{ \begin{array}{l} 10^{(Y_{low} - \alpha)/\beta}/X_1 \geq 0.874 \\ 10^{(Y_{high} - \alpha)/\beta}/X_2 \leq 1.126 \end{array} \right.$$

10 因此，斜率相等的边界是：

$$\left\{ \begin{array}{l} Y_{low} = \alpha + \beta \cdot \log(X_1 \cdot 0.874) \\ Y_{high} = \alpha + \beta \cdot \log(X_2 \cdot 1.126) \end{array} \right.$$

15 直线的斜率计算如下：

$$\beta^* = (Y_{高} - Y_{低}) / (\log X_2 - \log X_1) = [\beta \cdot \log([X_2/X_1] \cdot [1.126/0.874])] / \log(X_2/X_1)$$

$$\beta = [\beta \cdot \log(1.288)] / \log(X_2/X_1) = \beta \cdot (1 + \log(1.288) / \log(X_2/X_1))$$

假设在考虑 $X_2/X_1=2$ （对于 5 和 10 $\mu\text{g/ml}$ 的剂量水平）下的特定情形，如下计算 β^* ：

20
$$\beta^* = \beta \cdot (1 + \log(1.288) / \log 2) = \beta \cdot 1.365$$

将该结果与对于其中 $\beta^* < \beta$ 的对称情形获得的结果结合，如下计算范围：

25
$$\left\{ \begin{array}{l} \beta^* \leq \beta \cdot 1.365 \\ \beta^* \geq \beta \cdot 0.635 \end{array} \right.$$

在给定数据中，所有斜率在匹配的临界范围内，意味着未观察到从平行行假设的偏差。

一旦接受批次为统计学有效（已经证明线性和平行性的存在），估计试验制剂相对于标样的功效比率。这通过将平行直线与数据拟合和确定它们

30

之间的水平距离在平行线测定中完成：

$$M = \log \rho = \frac{\bar{Y}_T - \bar{Y}_S}{B} - (\bar{X}_T - \bar{X}_S) ;$$

5

其中 ρ 表示功效， \bar{Y}_S ， \bar{Y}_T ， \bar{X}_S ， \bar{X}_T 分别是标样和试验制剂的平均 \log （反应）和 \log （剂量）。 B 是标样和试验 \log （剂量）- \log （反应）直线的共有斜率。共有斜率- B 的最小平方估值是分别来自标样线和试验线的两个斜率的最小平方估值的加权平均。采用上述表达式的反对数，能够获得试验制剂相对于它标样的“真实%功效”的点估计：

10

$$\text{功效} = 10^{\frac{\bar{Y}_T - \bar{Y}_S}{B} - (\bar{X}_T - \bar{X}_S)} \cdot 100\%$$

实施例 3：实施例 1 的标准方法的有效性

15

以下显示的分析的目的是确定 GA 批次相对功效的有效释放规定。如果满足基于统计推断的下列标准，GA 批次认为有效：

1. 未违反包括在生物测定分析方法中的下列假设：

20

(a) \log （反应）的独立性和正态性；

(b) \log （反应）方差的均匀性；

(c) 无异常值；

(d) 平行性（斜率比率检验的非显著性）

2. 相对功效的点估计在预先规定的范围内：80%-125%；并且

3. “真实相对功效”值的 95%置信范围在更广的预先限定的置信范围内：70%-143%。

25

该模型假设标样和试验制剂应当表现为似乎一个是另一个的简单稀释。这意味着对于两种制剂的 \log （剂量）- 反应线应当不显著偏离线性和平行性。因此，这些直线之间的常数水平位移的反对数能够作为功效比率的估值。这两个要求，线性和平行性，构成测定有效性的概念。有效性的检查是估计相对功效和它的置信范围的前提。

30

为了计算相对功效真实值的置信范围需要估计随机误差。这个度量是

通过实行称为“方差分析”(ANOVA)的统计技术而获得。因此,必须已经满足 ANOVA 的常规统计学假设。如下是平行线生物测定模型的统计学分析的要求:

1. 关于它们的期望值反应是独立正态分布;
- 5 2. 反应的方差不受反应平均值的影响;
3. 不存在异常值;
4. \log (剂量) 和反应之间的关系能够由跨越剂量范围的直线表示; 和
5. 试验制剂的直线与标样的直线平行。

批次分析数据获自由不同操作者在不同天进行的不同实验。通过一系列实验进行实施例 1 的标准方法的有效性试验, 所述实验每个包括: 1) 用 CFA 中的 250 μg GA RS 免疫小鼠; 2) 在免疫后 9-11 天从 LN 细胞中制备原代培养物; 3) 将 LN 细胞与不同浓度的 GA RS 和试样温育; 4) 收集培养基并通过 ELISA 分析 IL-2 水平; 5) 基于在 1-25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 6 个剂量水平进行的一式三份的 IL-2 测量绘制 GA RS 曲线; 和 6) 在线性范围内的两个浓度 (5 和 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 下比较对每个试样的 T 细胞反应与对 RS 批
15 次 (一式三份) 的反应。还对每个一式三份计算 % CV 以便检测与一式三份之间的变异性有关的任何问题 (通常, 一式三份之间的 % CV 应当不超过 10-15%)。对于给定数据, 未检测到违反条件。

用于提供分析方法能力的总的认识的有效性特征是: 线性, 范围, 准确度, 精度, 特异性和稳定性。有效性的标准和分析是基于 ICH 共同准则, “分析方法的有效性: 方法学”, 1996 年 11 月 (CPMP/ICH/281/95)。为了分析目的将在“欧洲药典”指南中推荐的统计学方法适用于给定数据。

实施例 3A: 线性和范围

25 在每个体外试验中, 将 GA RS 批次的剂量-反应曲线用于计算细胞对试样的相对反应。每条校准曲线包括至少 5 个点 (无零点)。从在发展和有效性检查阶段期间进行的不同体外试验中收集 21 条校准曲线, 对于每个板作图和评估。

数据的统计学分析显示 \log_{10} (IL-2 浓度) 对 \log_{10} (GA RS 浓度) 的作
30 图提供最好的线性拟合。线性范围主要通过目视检查和校准点的准确度和

精度评估而出现。对于每个一式三份计算% RSD 以便检测与一式三份之间变异性有关的任何问题（通常一式三份之间的% RSD 应当不超过10-15%）。GARS 曲线的范围规定在 1-25 $\mu\text{g/ml}$ 之间。

5 基于这些分析，GARS 曲线应当由至少 6 个校准点组成，一个浓度为零（阴性对照），和在 1-25 $\mu\text{g/ml}$ 范围内的至少 5 个 GARS 浓度。 \log_{10} (IL-2 浓度)对 \log_{10} (GARS 浓度)的线性回归应当具有 $R^2 \geq 0.97$ 和斜率 ≥ 0.77 。

实验 3B：准确度

10 跨越 GARS 曲线的指定线性范围确定方法的准确度。数据的统计学分析显示方法的平均准确度为：8.0% \pm 2.3%。

实验 3C：精度

所用精度的基本度量是浓度重复（通常一式三份）估值的相对标准偏差（RSD）。

15 跨越 GARS 曲线的线性范围确定 RSD。数据的统计学分析显示方法的平均精度是 2.9% \pm 1.7%。一式两份测量的可靠性等同于一式三份。因此，当三次重复之一被鉴定为异常值，忽略异常值并接受来自一式两份测量的结果。

20 实验 3D：方法重现性

在相同的体外试验中重复 3 次测量对 GADS 批次的 GA 特异性 T 细胞应答。将相同批次的 3 个重量每个稀释至 5 和 10 $\mu\text{g/ml}$ 并与 GA-特异性 T-细胞温育。通过 ELISA 一式三份测量试样和 GARS 样品的培养基中 IL-2 的水平。相对于 GARS 计算细胞对每个一式三份的%功效和 95%置信范围。表 6 显示对于每个一式三份计算的%反应。

25

表 6: 方法的重现性

样品号	GADS 浓度($\mu\text{g/ml}$)	%功效			平均 N=6	SD	RSD	95%置信范围 (下限-上限)
1	5	75	80	74	77	3.3	4.2	67-89
	10	73	79	81				
2	5	83	83	92	84	5.0	5.9	73-97
	10	80	79	88				
3	5	72	74	71	76	5.2	5.2	65-88
	10	80	78	79				

实验 3E: 中间精度 (intermediate precision)

在 3 个不同体外试验中检测 GADS 的%反应, 所述体外试验由来自相同实验室的 3 位不同研究者在不同天进行。表 7 总结对于 3 次重复实验中该批次确定的%功效和 95%置信范围。

表 7: 中间精度

样品号	GADS 浓度($\mu\text{g/ml}$)	%功效			平均 N=6	SD	RSD	95%置信范围 (下限-上限)
1	5	85	86	83	83	3.1	3.7	71-97
	10	77	84	84				
2	5	90	86	87	86	3.0	3.7	79-94
	10	82	84	89				
3	5	75	80	74	77	3.3	4.2	65-88
	10	73	79	81				

实验 3F: 方法重现性

通过实验室内研究评估方法的重现性。在两个不同实验中检测%反应 GADS 批次, 所述实验在 2 个不同实验室中使用不同分析员, 装置和试剂进行。表 8 总结来自两个实验室的结果。

表 8: 方法重现性

	实验室 1	实验室 2
平均%功效±RSD	86 ± 3.5	83 ± 5.0
95%置信范围	79-94	78-90

基于上述实验，可以得出结论体外试验是可重现的。

实验 3G: 特异性

- 5 在 3 个水平上检测方法的鉴别：1) 与/不与 GARS (基体效应 (matrix effect)) 温育的样品间的鉴别；2) GARS 和其它相关和非相关蛋白质以及肽，包括 GARS 之间的鉴别；和 3) GARS 和 GA 相关共聚物之间的鉴别，在所述共聚物中肽序列被精心修饰。

i) GARS 被 GARS-特异性的 T 细胞识别 (基体效应)

- 10 通过用 CFA 中 250 µg GARS 免疫雌性 (SJL x BALB/C) F1 小鼠诱导 GA-特异性的 T 细胞。该剂量的 GA 通常用于在该小鼠品系中使用 EAE 阻断试验检测 GA 批次的生物活性。该实验中的对照组仅用 CFA 注射。在免疫后 10 天，从两组小鼠中取出 LN 细胞。将细胞与 GARS 在 37°C 下在 5% CO₂ 湿润的培养箱中温育 18-24 小时。

- 15 随后，将培养物离心，收集上清液并通过 ELISA 测定白细胞介素-2 (IL-2，从激活的 T 细胞分泌的细胞因子)，所述 ELISA 使用生物素化的对 IL-2 特异性的抗体和用于检测的链霉抗生物素-辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联物 (图 1)。每次板运行包括空白对照 (不含细胞因子标样的第一和第二抗体)。每次板运行还包括质量控制 (QC) 样品 (在测定线性范围内的 20 3 个细胞因子标样浓度)。每个体外试验包括阳性对照 (ConA，非特异性 T-细胞刺激剂) 和阴性对照 (无 GA 或其它任何抗原)。图 2 显示来自用 GARS 免疫的 LN 细胞依赖性地响应培养物中的 GARS 分泌 IL-2 剂量，而来自对照小鼠的 LN 细胞对培养物中的 GARS 无反应。阴性对照样品中的 IL-2 水平通常低于或接近 ELISA 检测极限 (约 3 pg/ml)。这些 IL-2 水平通常低于 GARS 最低校准点 (1 µg/ml) 分泌的水平。这些结果显示 GA 25 特异性 T-细胞的 IL-2 分泌是 GA 依赖性的。

ii) 相关和非相关抗原之间的鉴别

通过检测 GA RS-特异性 T 细胞对不同抗原的体外反应证明相关和非相关抗原（蛋白质和单肽）之间的鉴别。LN 细胞的原代培养物来源于提前 9-11 天用 CFA 中的 250 μ g GARS 免疫的雌性(SJL x BALB/C) F1 小鼠。将原代培养物与 GARS 和各种其它抗原在 37°C 下在 5% CO₂ 湿润的培养箱中温育过夜。然后, 如实验 3G(i) 将培养物离心, 收集上清液并通过 ELISA 测定 IL-2。

表 9 显示在本实验系统中 GA-特异性 T 细胞对人 MBP(髓磷脂碱性蛋白), MBP 免疫显性肽 pp. 87-99 (致脑炎肽), 或它的类似物 pp. 87-99_{Ala 96} (EAE 抑制肽) 无反应。溶菌酶, 一种非相关碱性蛋白质, 也不被 GA-特异性的 T 细胞识别。TV-35 和 TV-109 是肽分子量分别为 3757 和 11727 的肽 (PCT 国际公开号 WO 00/18794)。这些肽含有由与 GA 相同的 4 种氨基酸(Ala, Glu, Lys, Tyr)以与 GA 相同的摩尔比组成的确定的序列。GARS 特异性 LN 细胞对 TV-35 无反应, 与 TV-109 具有极低的交叉反应性。这些结果可以通过观察即用 GA RS 免疫诱导具有针对 GA 中存在的多个 T-细胞表位的不同特异性的 T 细胞的混合物形成来解释。然而, TV-35 和 TV-109 可以与 GA 共享共有序列, GA-特异性的 T 细胞与单肽的温育可能仅导致培养物中小部分 GA-特异性细胞的部分刺激。因此, 总 T-细胞反应 (IL-2 的分泌) 低于或接近检测极限。

表 9: GARS-特异性 LN 细胞的特异性

抗原	%功效 ¹
GARS	100
溶菌酶	0
人 MBP	0
MBP pp. 87-99	0
MBP pp. 87-99 _{Ala 96}	0
TV-35	0
TV-109	17

¹%功效 = 抗原培养基中 IL-2 浓度 X100/GARS 培养基中的 IL-2 浓度
体外试验对 GA 批次的平均分子量 (MW) 敏感。图 11 显示 GA RS

特异性细胞对 GA RS(MW = 7900)和对平均 MW 不同的 GA DS 各批次的反应。可以看出，反应通常与平均 MW 相关；平均 MW 越高，反应越大。然而，应当注意 GA DS 平均 MW 的释放规定是 4700-10000，响应具有规定内的平均 MW 的 DS 批次分泌类似水平的 IL-2（图 11）。这些结果说明方法对 GA 高度特异性并且对于 GA 平均 MW 的变化敏感。

iii)GA RS-特异性 T 细胞对 GA 药物物质(DS)和 Copaxone[®]药物产品(DP)的识别

在用 CFA 中 250 μ g GA RS 免疫雌性(SJL x BALB/C)F1 小鼠之后 9-11 天，取出 LN 细胞并与不同剂量的 GARS 批次（免疫抗原）和与 DS 批次一起培养。

如实验 3G (i) 测量 IL-2。图 12A 显示 LN 细胞与两个标样批次交叉反应。两个批次的 IL-2 分泌的剂量-反应曲线（如上通过 ELISA 测量）类似，说明试验批次共有类似的 T-细胞表位。GARS 和 Copaxone[®]批次之间的比较显示 GA RS-特异性 T 细胞也与 DP 批次交叉反应，甘露糖醇，Copaxone[®]制剂中的赋形剂不影响或干预 T-细胞反应（图 12B）。因此，该方法提供批次之间重现性的指示。

v) GA 和相关共聚物之间的鉴别

在实验 3G (ii) 中，使用它们平均分子量不同的 GA DS 批次证明体外试验对 GA 肽的平均 MW 敏感。因为实验基于 GA-特异性 T 细胞对 GA 的生物识别，其特异性地对线性序列反应，期望方法将对 GA 肽序列中的变异/修饰敏感。这通过使用下列各项证明：1) 由组成 GA 的 4 种氨基酸中的仅 3 种合成的共聚物；2) 由在制备条件中精心修改得到的 GA 批次 (XX)，即在合成期间将过量的游离氨基酸加入 GA 单体。该批次的平均 MW 高并超出规定 (MW= 11150 Da)；和 3) 通过用胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶蛋白酶解获得的 GARS 的降解产物。

表 10 显示 GA-特异性 T-细胞对缺少赖氨酸，丙氨酸或酪氨酸的 3 种氨基酸共聚物不反应。另外，细胞对批次 XX 的 % 反应较高并超出方法规定 (100 \pm 30%)，表明方法可能对生产方法的修改敏感。如所显示，高 %

反应还可以通过试验对 GA 肽的 MW 的敏感性来解释。

表 10: 方法特异性

共聚物	修饰	平均%功效±RSD
Tyr-Lys-Glu	缺少丙氨酸	0
Tyr-Ala-Glu	缺少赖氨酸	0
Ala-Glu-Lys	缺少酪氨酸	0
批次 XX	聚合阶段过量的游离氨基酸	170±4.7

通过胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的 GA RS 蛋白酶解的动力学研究表明体外试验对 GA 肽的降解敏感。图 13 和 15 显示经蛋白酶解时间后细胞的 IL-2 分泌减少, 细胞对蛋白酶解的肽的%功效超出方法规定 ($100 \pm 30\%$) (表 11)。降解样品的重叠色谱图 (通过 RP-HPLC) (图 14 和 16) 分别显示通过胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的蛋白酶解的动力学。所有特异性研究的累积结果显示方法对于 GA 是高度特异性的并且在 GA 和紧密相关的抗原之间鉴别。

10 表 11: 方法特异性 - 蛋白酶解的影响

酶	蛋白酶解的时间 (分钟)	平均%功效
胰蛋白酶	1	40
	5	36
	15	19
	30	7
	过夜	0
胰凝乳蛋白酶	5	11
	20	0

实验 3G: 稳定性

i) 验收标准的稳定性

15 通过比较对于重复 GA 批次获得的相对功效得到的估值检验确定验收标准的一致性和稳定性。批次分析数据包括许多重复 GA 批次。由不同操作者在不同 3 天测量两个批次。另外由不同操作者在不同 2 天检测一个批次。

在对于重复 GA 批次的平行性检验中，所有 GA 批次的斜率值在对于平行性斜率比率检验的适当临界范围内。所有 GA 批次满足具有 95%置信范围的相对功效值的点估计的验收标准（估计的%功效在 80%-125%的范围内并且 95%置信范围在 70%-143%的范围内）。对于重复 GA 批次的分析数据，它们的有效性不依赖于实验日或进行试验的操作者。这数据支持确定的规定的稳定性。

ii) 免疫方法和体外反应的关键参数的稳定性

评估免疫方法和体外反应的关键参数的稳定性。简短地，表明：1) LN 细胞的免疫反应不受 GA RS 的免疫剂量的影响；2) 免疫时期是 9-11 天；3) 与脾细胞反应相比 LN 细胞对 GARS 的反应较高；4) 用 GARS + CFA 免疫导致与用 ICFA 免疫相比具有更强反应的 LN 细胞；5) 在培养基中血清的存在强烈影响 GA-特异性的 T 细胞反应，因此体外反应在无血清培养基中进行；6) 收集培养基的最佳期限是与 GA RS 和试样温育 18-21 小时以后；和 7) 在 ELISA 检测以前培养基可以保存在-20°C 下达 1 周。因此，表明方法是稳定的。

对于相对功效的点估计和 95%置信范围的总结统计

平均相对功效的 95%容许极限

为了评估估计的新批次相对功效的验收范围，计算单个 log（功效）估值的平均值和标准偏差：

$$\text{平均值 (Mi)} = 0.0074$$

$$\text{SD (Mi)} = 0.0402$$

基于分析的数据，相对功效平均值的约 95%容许范围是：

$$[10^{\text{平均值(Mi)} \pm 2 * \text{SD(Mi)}}] * 100\% = [84\%, 122\%].$$

相对功效 95%置信范围的范围

对于单个相对功效估值，95%置信范围的最小值和最大值是：

$$\text{最小值 (下限)} = 79.3\%$$

$$\text{最大值 (上限)} = 147.3\%$$

验收标准的满足

基于分析，确定验收标准为：

1. 满足包括在生物测定分析方法中的假设，即：
 - 5 (a) log（反应）的独立性和正态性；
 - (b) log（反应）方差的均匀性；
 - (c) 无异常值；和
 - (d) 平行性（斜率比率检验的非显著性）
2. 估计的相对功效不小于标样功效的 80%并且不超过其 125%；并且
- 10 3. 估计相对功效的误差的 95%置信范围不小于标样功效的 70%并且不超过其 143%。

实施例 3 的讨论

体外试验的有效性显示方法是可重现的并且平均值的准确度和精度在
15 可接受的范围内。方法对 GA 肽是高度特异性的，并且对活性物质的质量敏感。

总结和讨论

对于 GA DS 和 Copaxone[®]批次发展了一种体外方法。该方法是基于
20 GA RS-特异性 T 细胞对 T-细胞表位（线性序列）的生物识别。GA RS-特异性的 T 细胞分泌响应于培养物中的 GA 的 Th₀ 细胞因子。在该方法中，通过 ELISA 测量培养基中 IL-2 的水平来监视 T 细胞对 GA 批次的识别。显示 GA RS-特异性的 T 细胞与 DS 和 DP 批次交叉反应，表明这些批次与 RS 批次共有类似序列，并且甘露糖醇，DP 制剂中的赋形剂不干涉反应。

25 该方法对于 GA 肽非常特异性并且对肽混合物的平均 MW 敏感。GA-特异性 T 细胞不识别 MBP。MBP 免疫显性肽（致脑炎的和抑制肽），以及具有与 GA 类似的氨基酸组成的单肽，不刺激 T 细胞。在本实验中优化免疫方法以及体外反应中的关键参数。本实验显示该方法非常具有非常好的可重现性和稳定性。

30 可以将方法修改以标准化在药物组合物中使用的其它 T 细胞抗原。从

针对抗原 RS 免疫的动物可以制备对于抗原 RS, 而不是 GARS 特异性的 T 细胞的原代培养物。可以测量该培养物响应抗原 RS 和响应样品抗原的细胞因子生产。可以将响应抗原 RS 的细胞因子生产对抗原 RS 浓度作图以产生标准曲线。可以将响应样品抗原的细胞因子生产与标准曲线比较以确定抗原是否在可接受的功效范围内。

如实验 2A 可以测定对于监视器的最佳细胞因子。如实验 2B 和 C 可以优化免疫和体外试验的条件。

参考文献

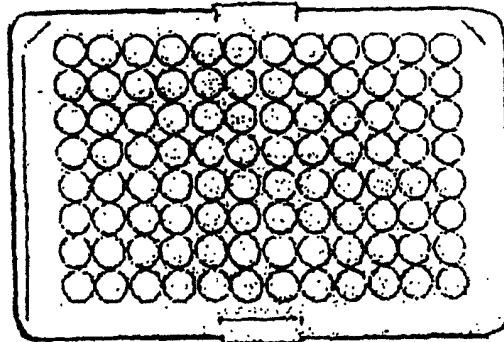
- 10 美国专利 3,849,550, 在 1974 年 11 月 19 日授权 (Teitelbaum, 等)。
美国专利 5,800,808, 在 1998 年 9 月 1 日授权(Konfino, 等)。
PCT 国际公布号 WO 00/05250, 在 2000 年 2 月 3 日公开(Aharoni 等)。
PCT 国际公布号 WO 00/18794
Aharoni, R. 等, T suppressor hybridomas and interleukin-2dependent
15 lines induced by copolymer 1 or by spinal cord homogenate down-regulate
experimental allergic encephalomyelitis, Eur. J. Immunol.,(1993), 23 : 17-25.
Bornstein, 等, New Eng. J. Med., 1987, 317 (7), 408-414.
Johnson, K. P., Neurology, 1: 65-70 (1995).
Lando 等, Effect of cyclophosphamide on suppressor cell activity in mice
20 unresponsive toEAE, J. Immunol. (1979) 123(5) : 2156-2160.
Lisak 等, In vitro and in-vivo immune responses to homologous myelin
basic protein in EAE, Cell. Immunol. (1974) 11: 212-220.
“Copaxone” in Physician’s Desk Reference, 2000, Medical Economics
Co., Inc., Montvale, NJ, 3115.
25 “Validation of Analytical Procedures: Methodology”, Nov. 1996
(CPMP/ICH/281/95).
European Pharmacopoeia, 1997.



用 GARS 免疫



LN细胞的原代培养物



通过 ELISA
的 IL-2 检测

图 1

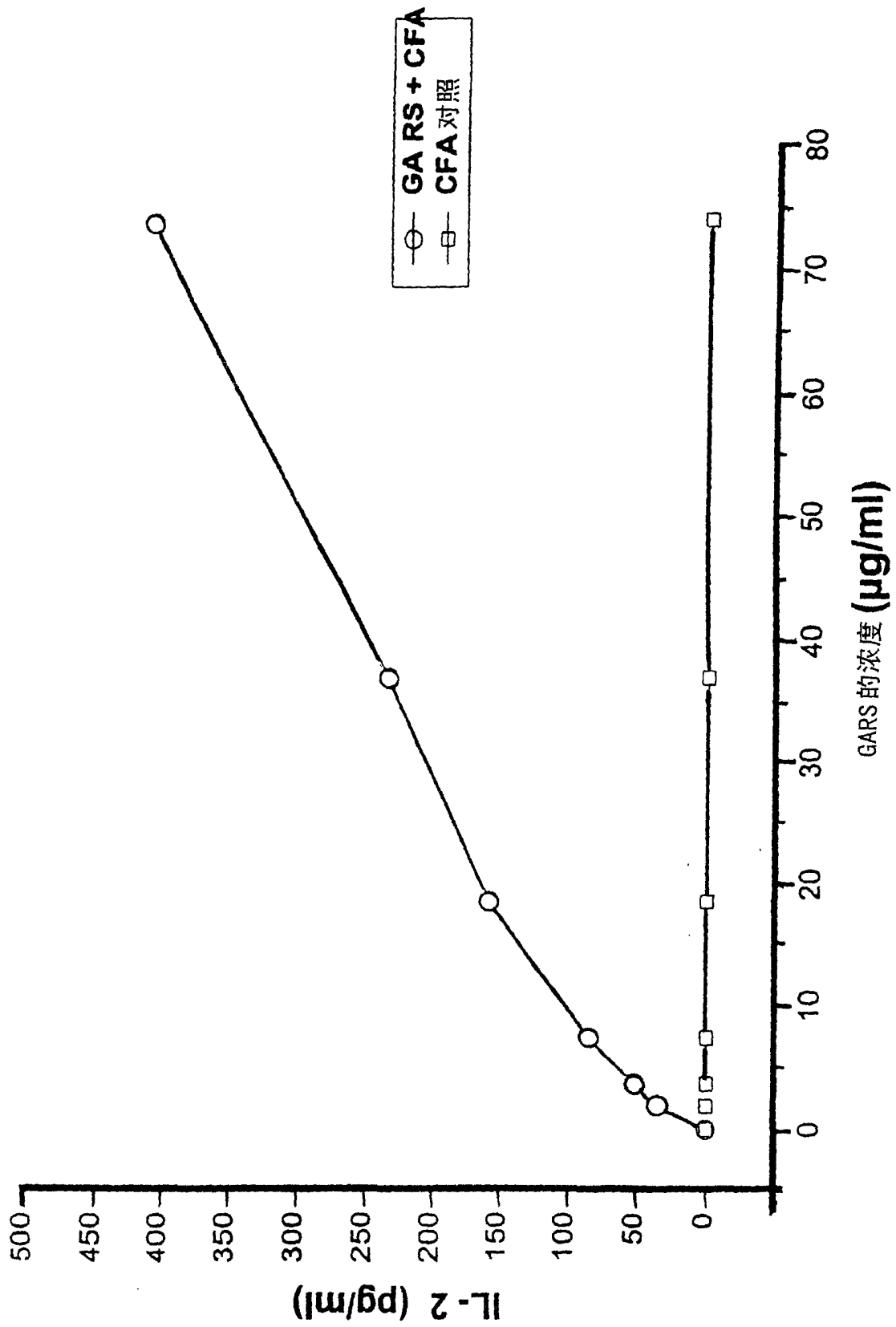


图 2

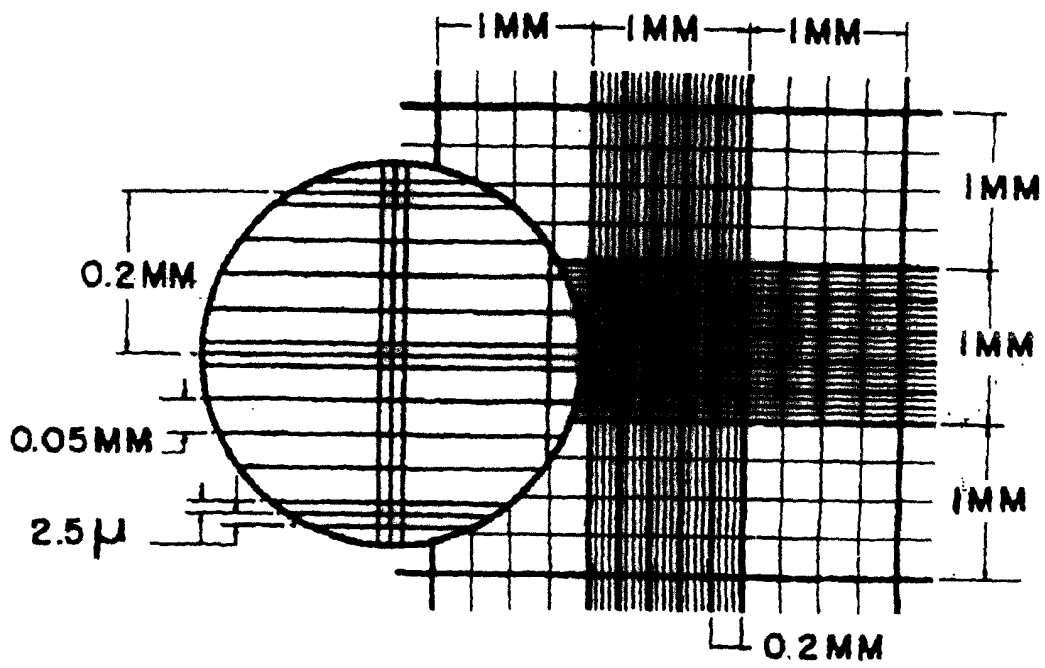


图 3

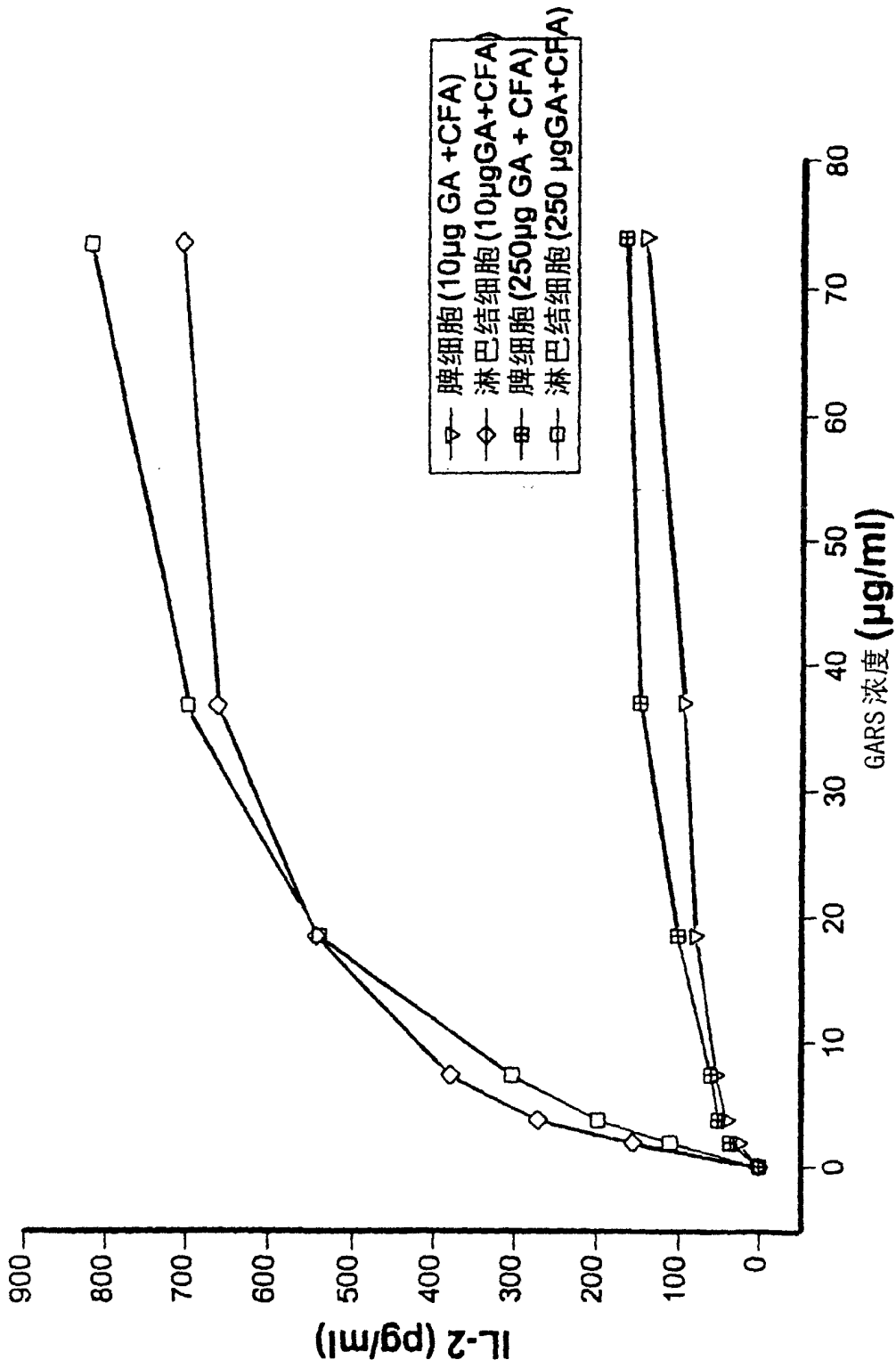


图 4

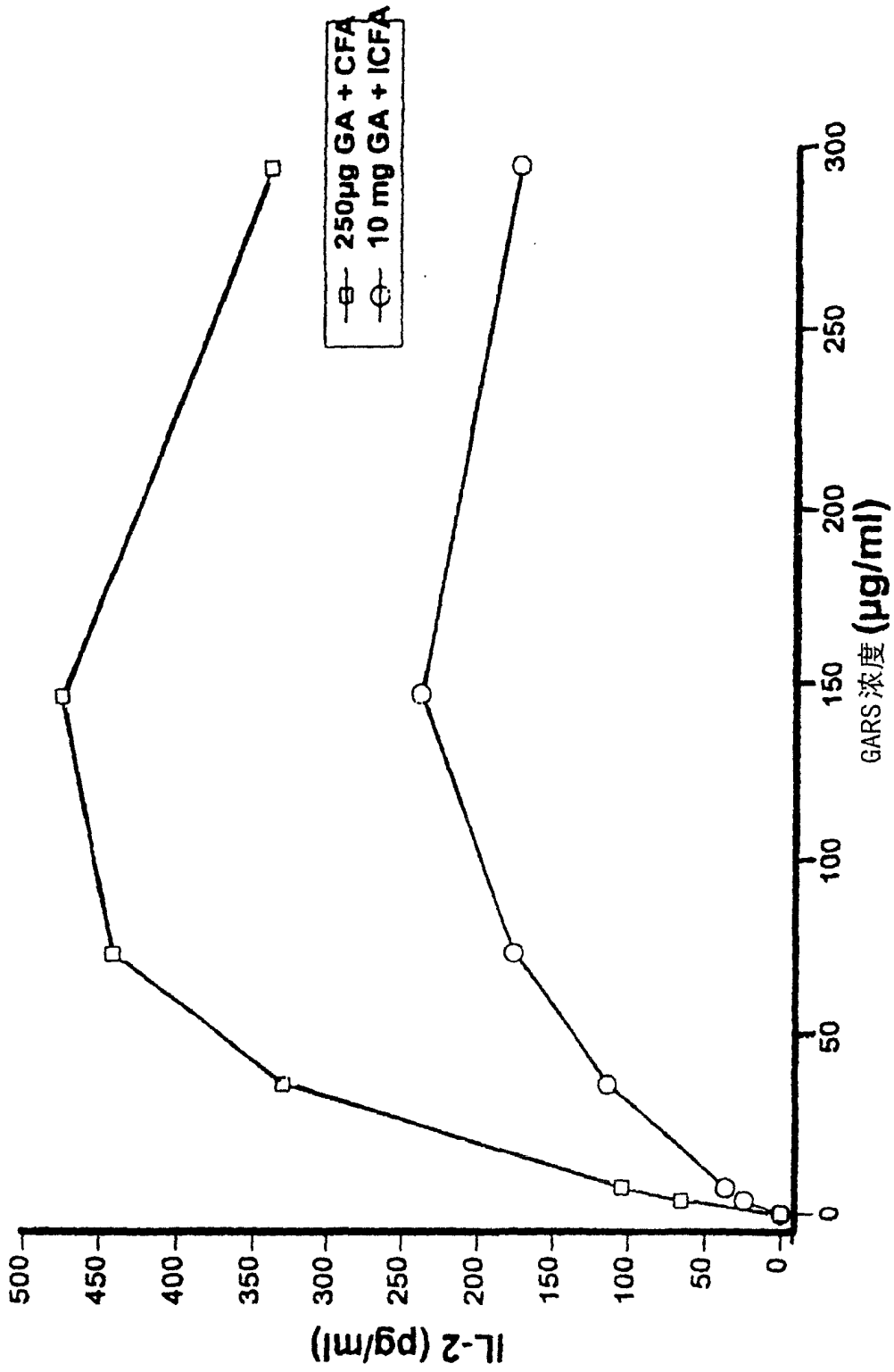


图 5

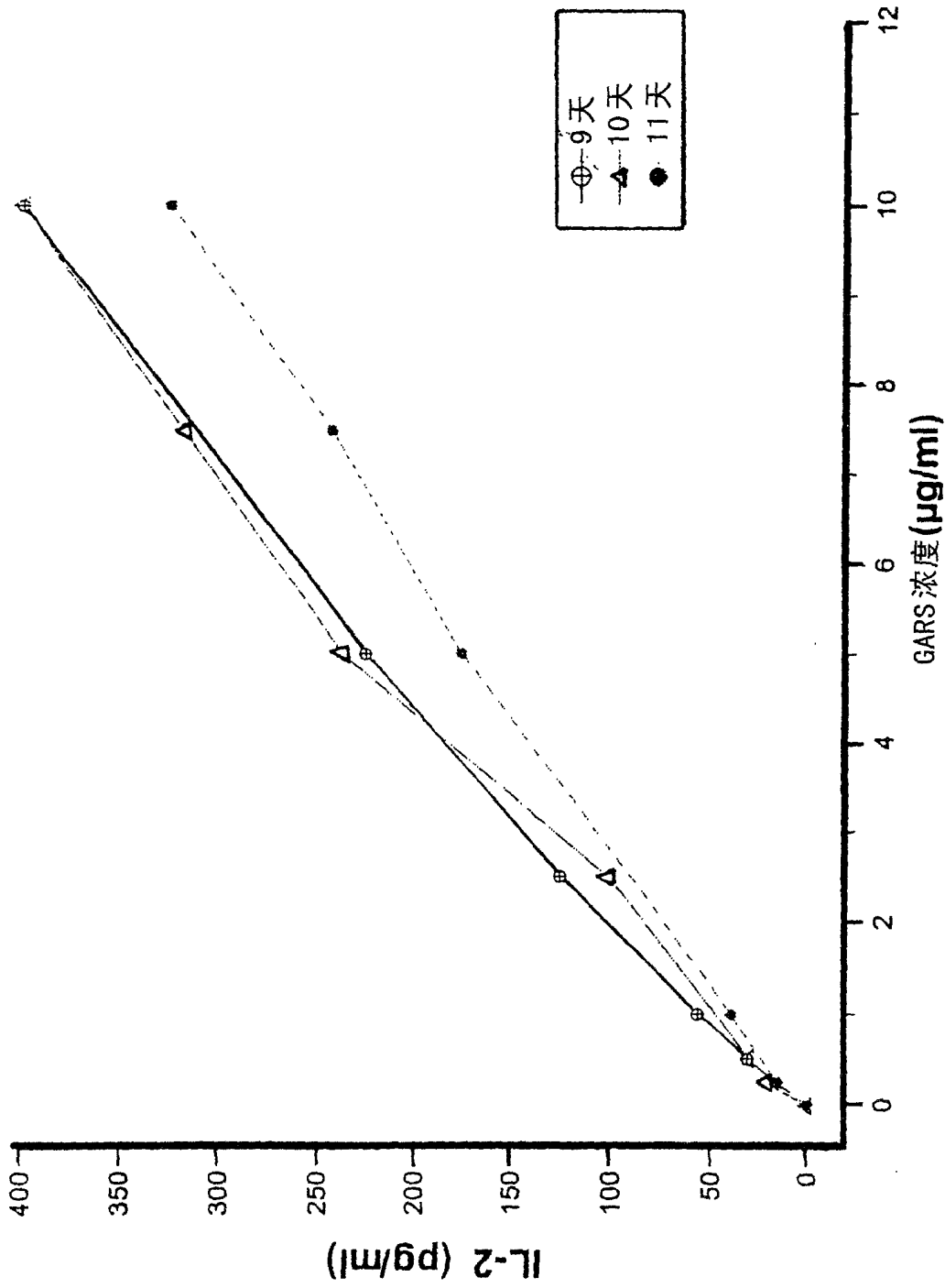


图 6

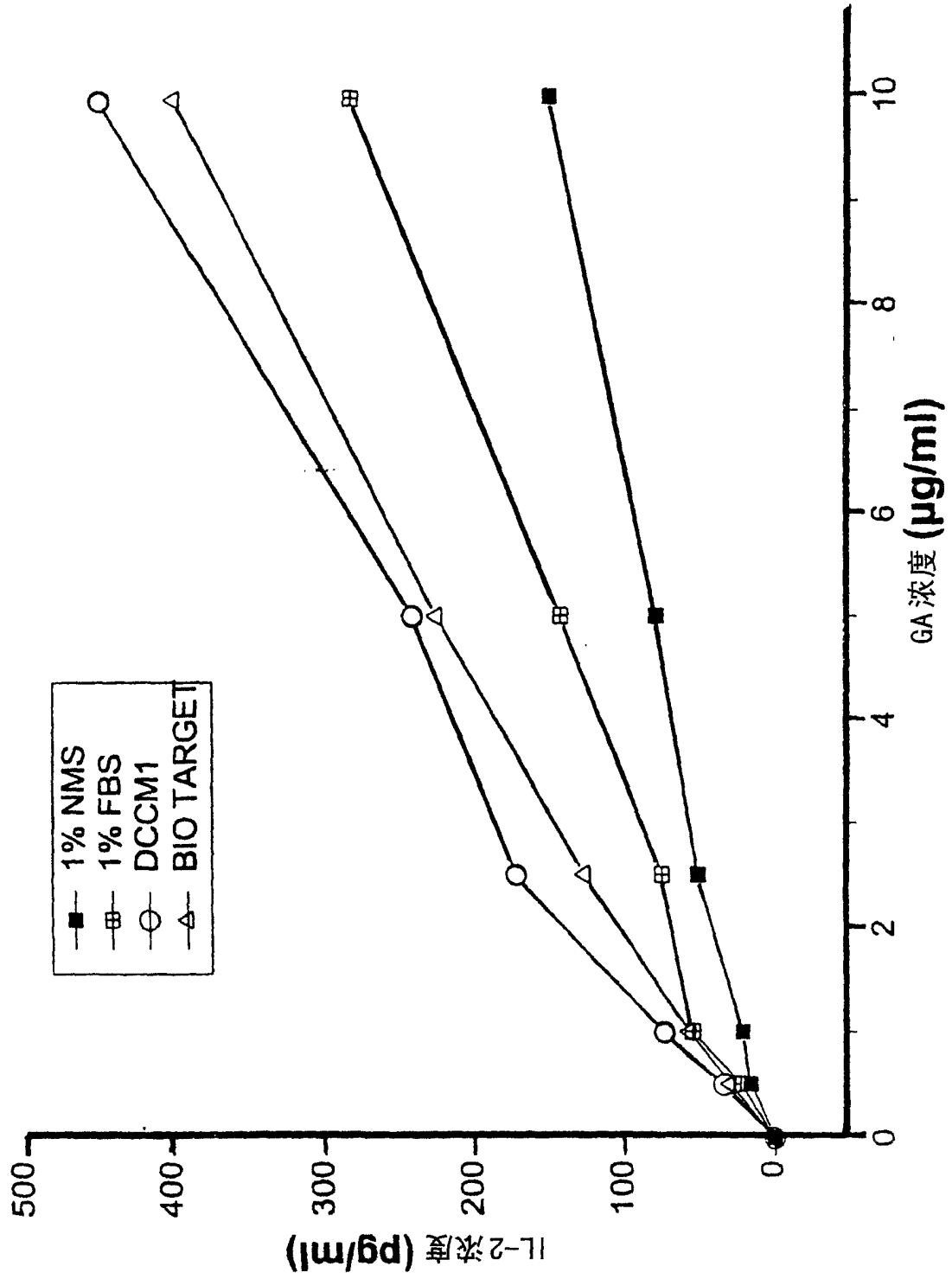


图 7

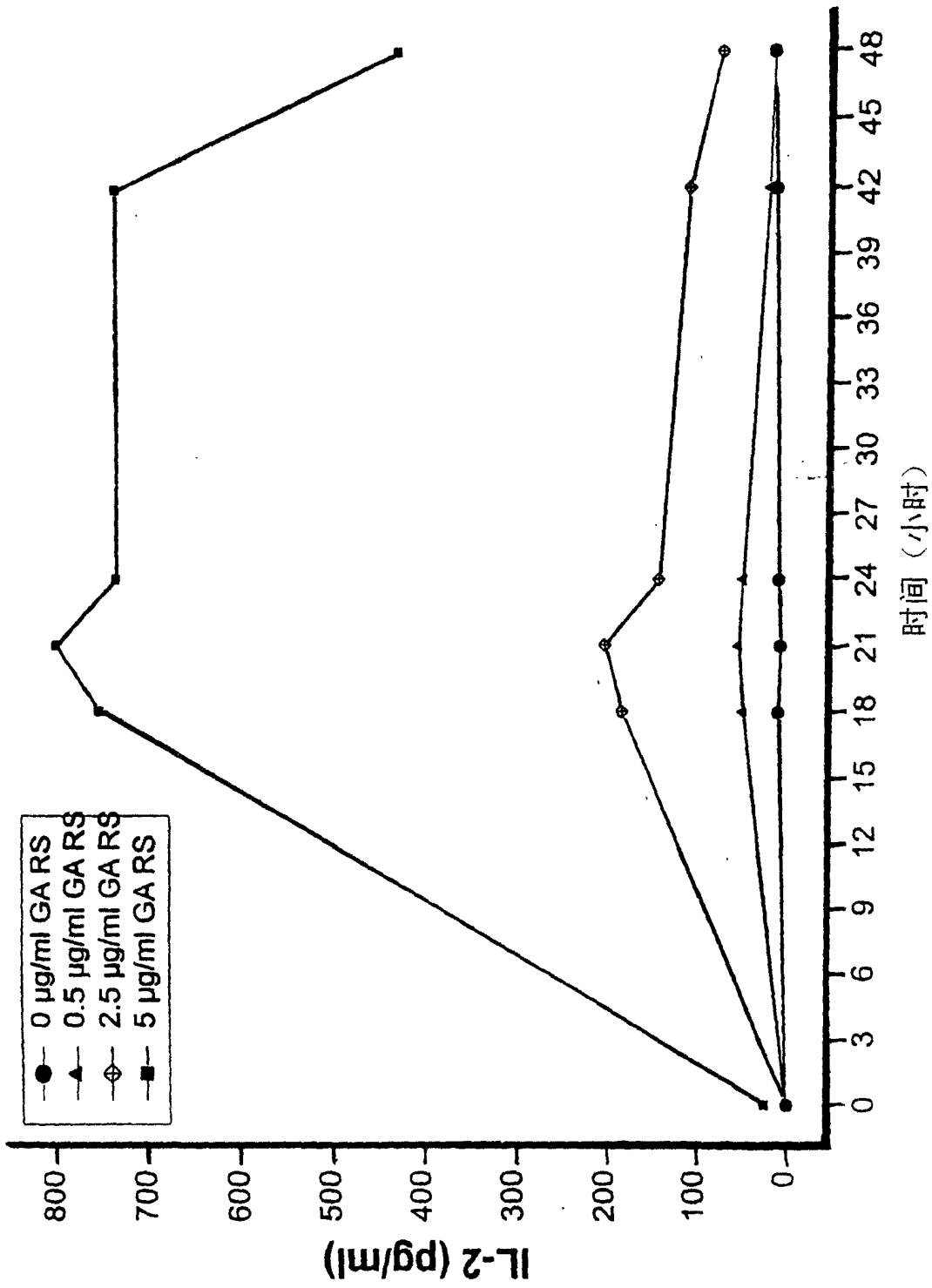


图 8

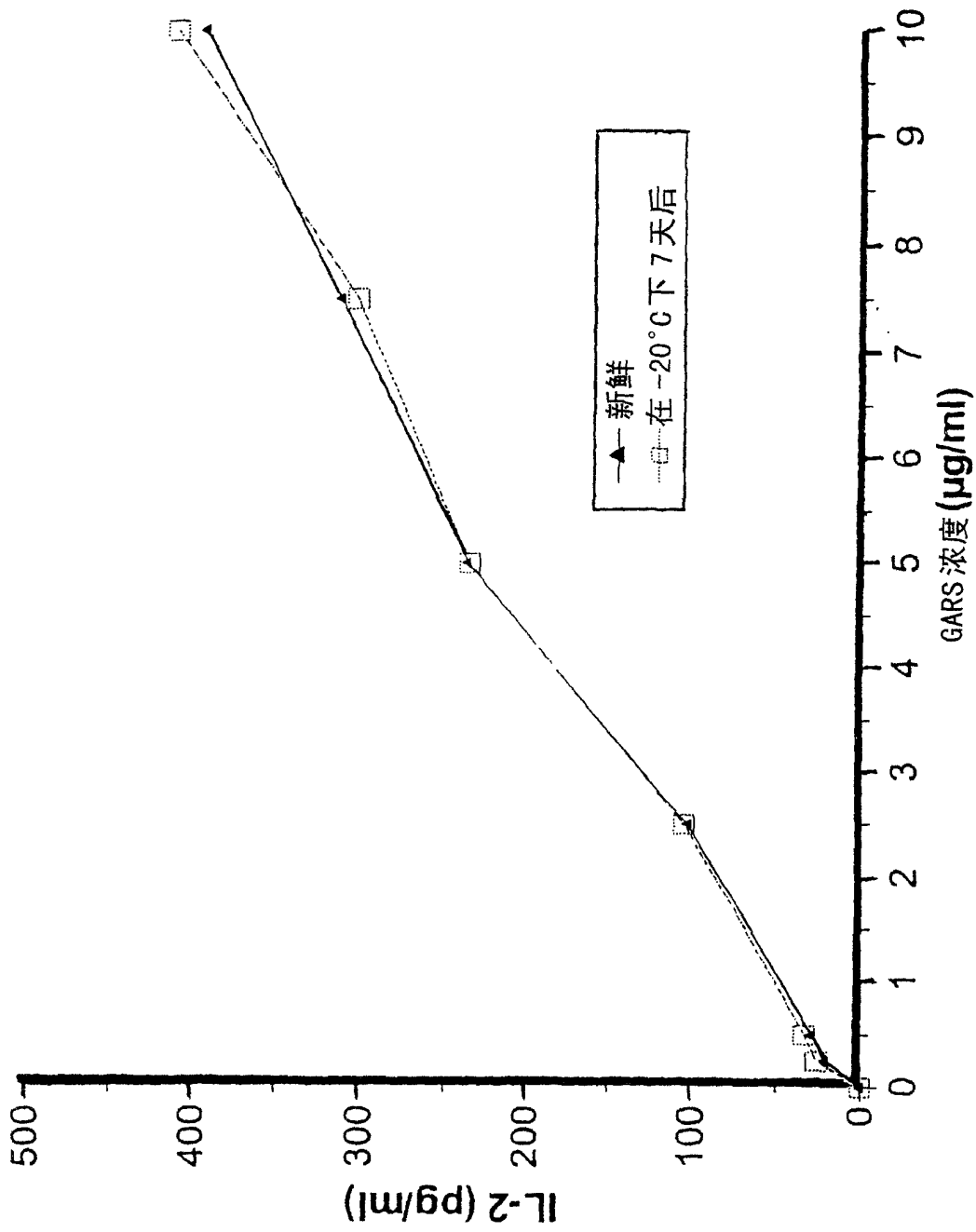


图 9

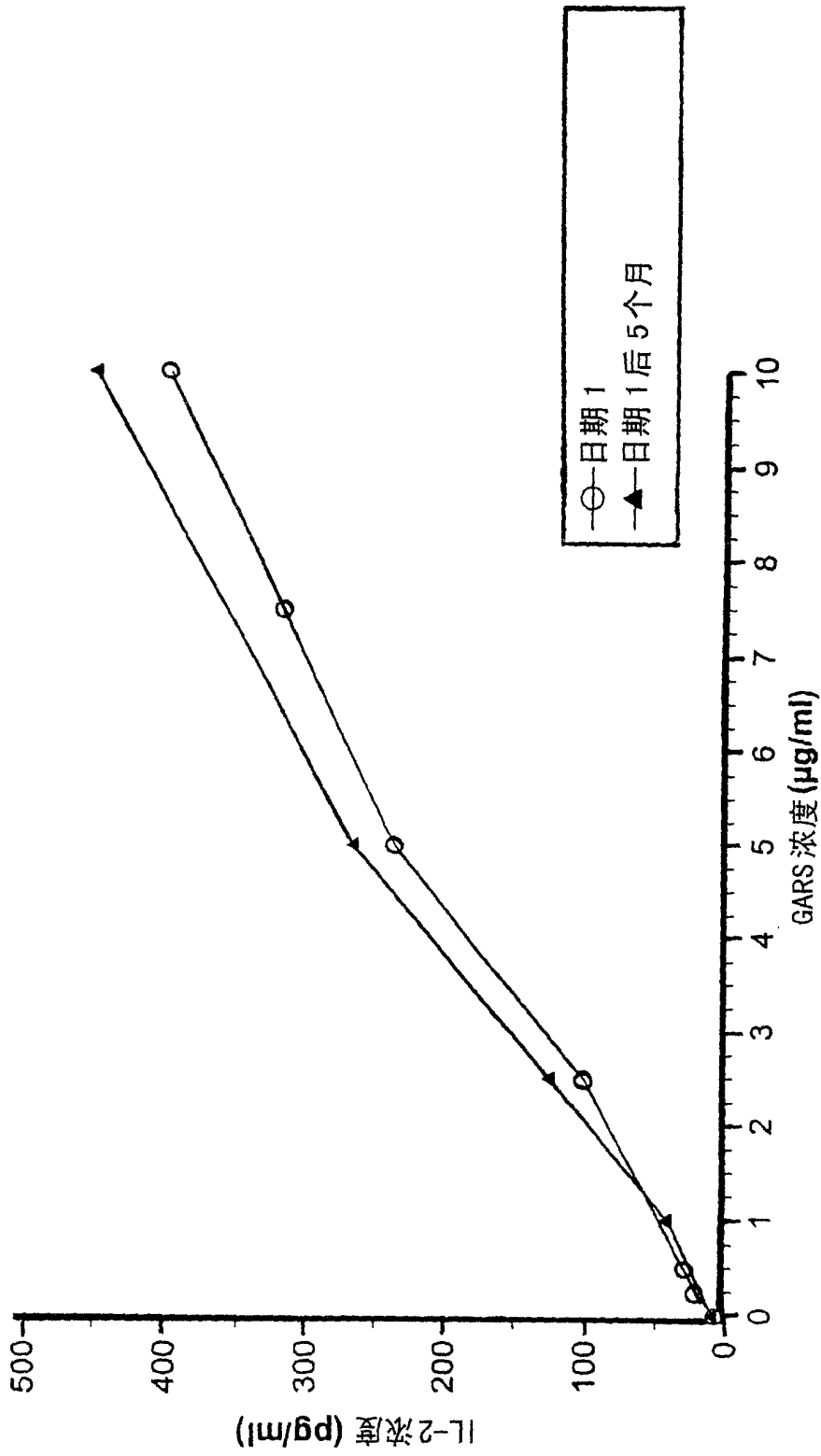


图 10

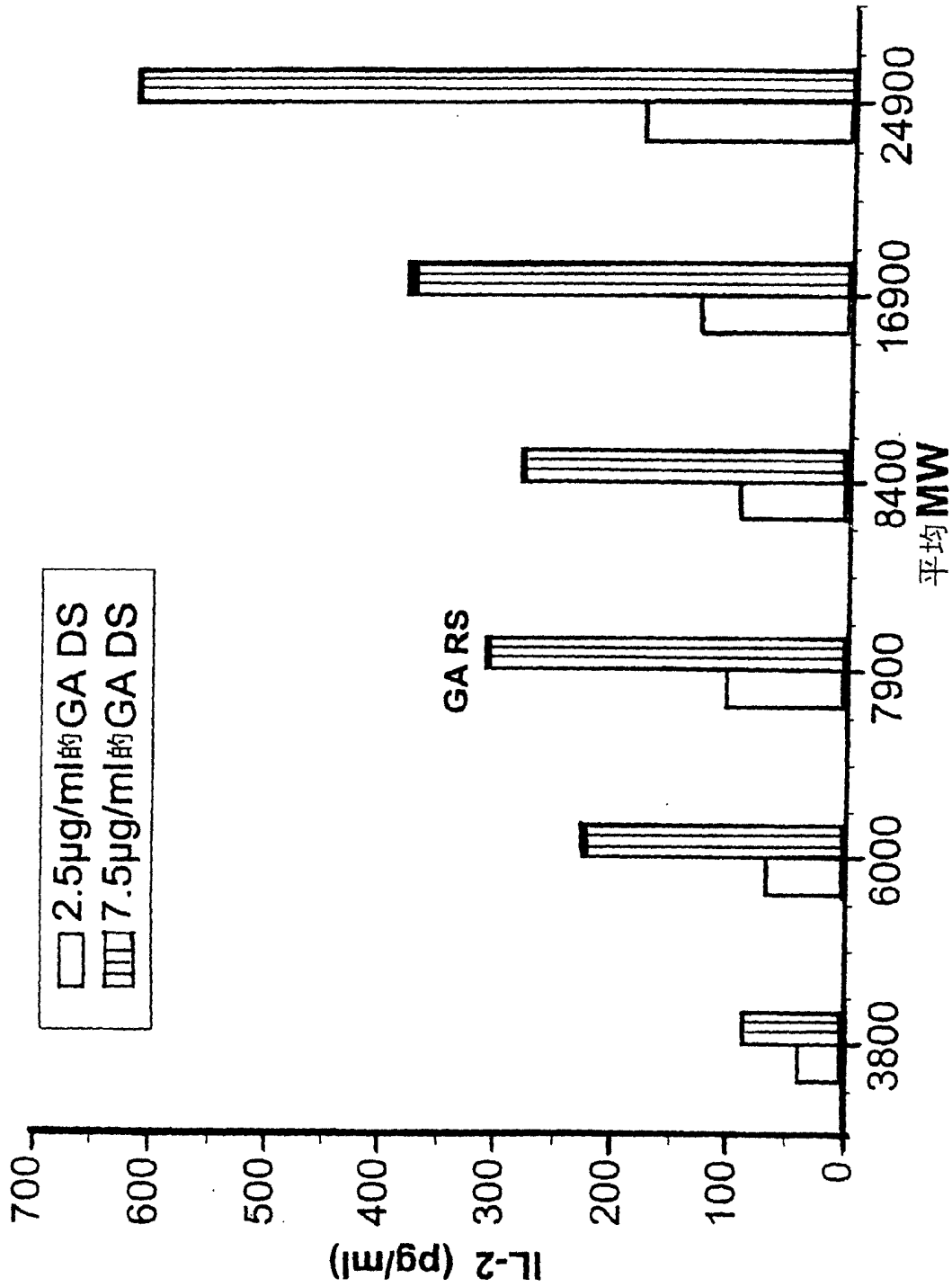


图 11

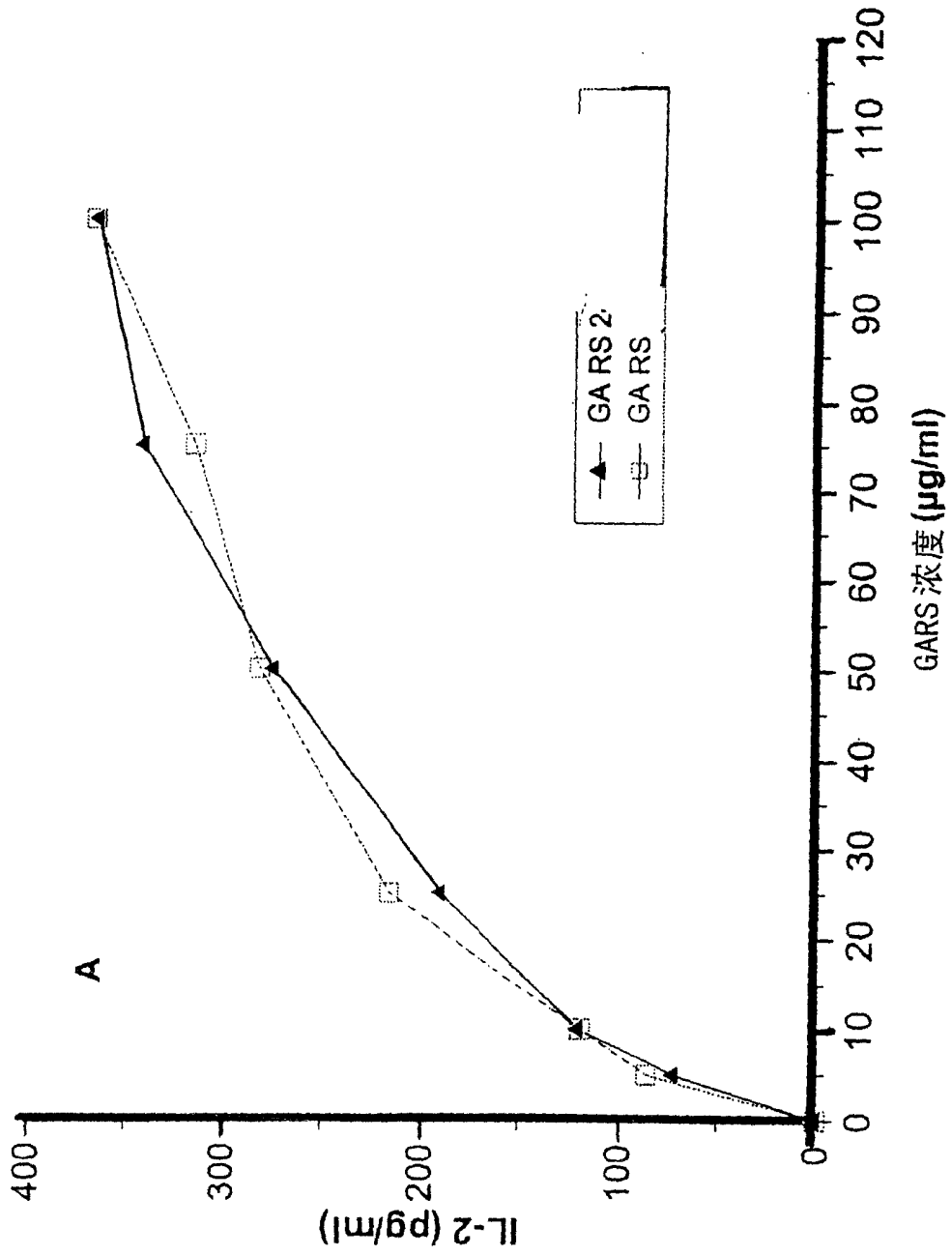


图 12A

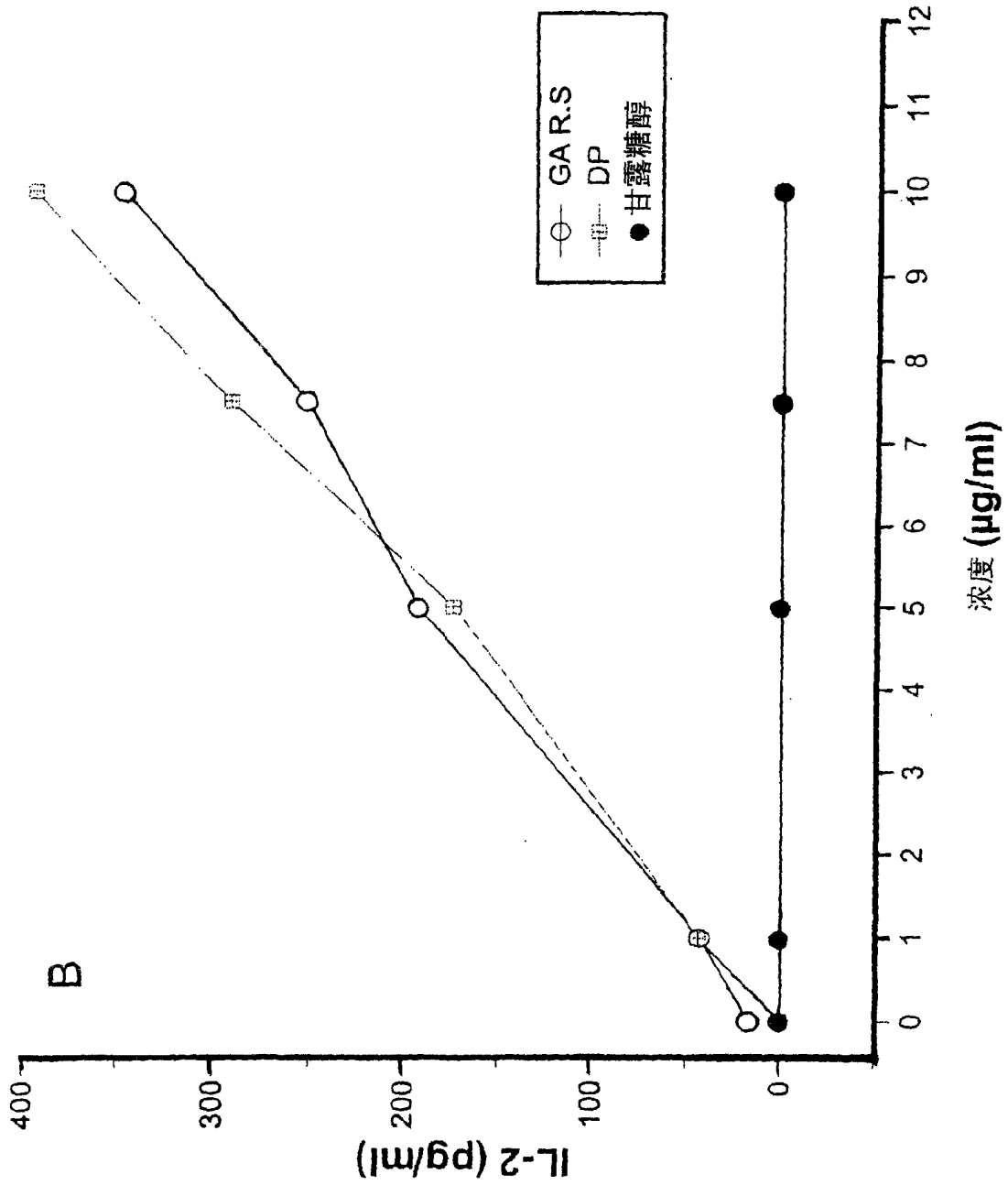


图 12B

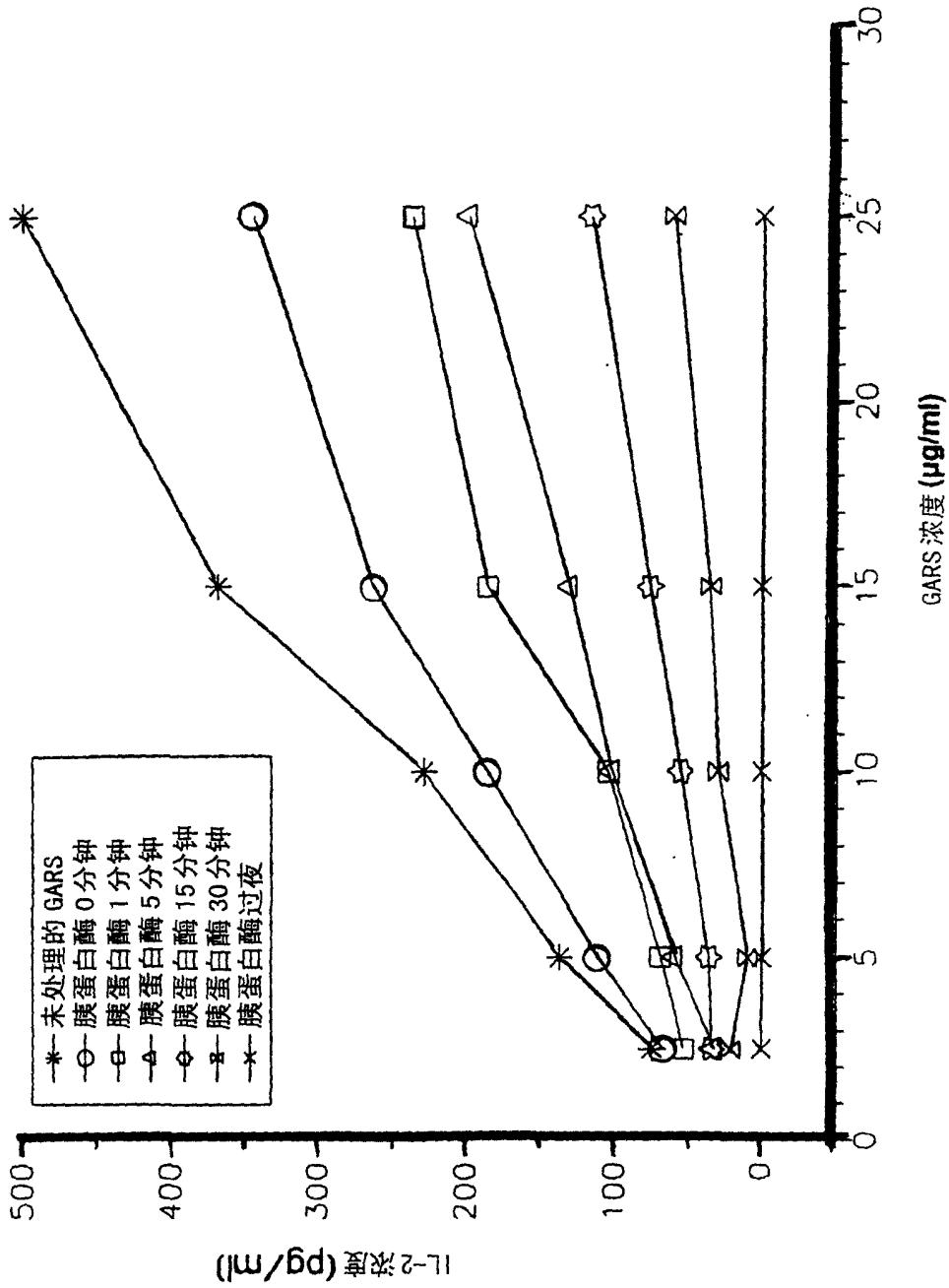


图 13

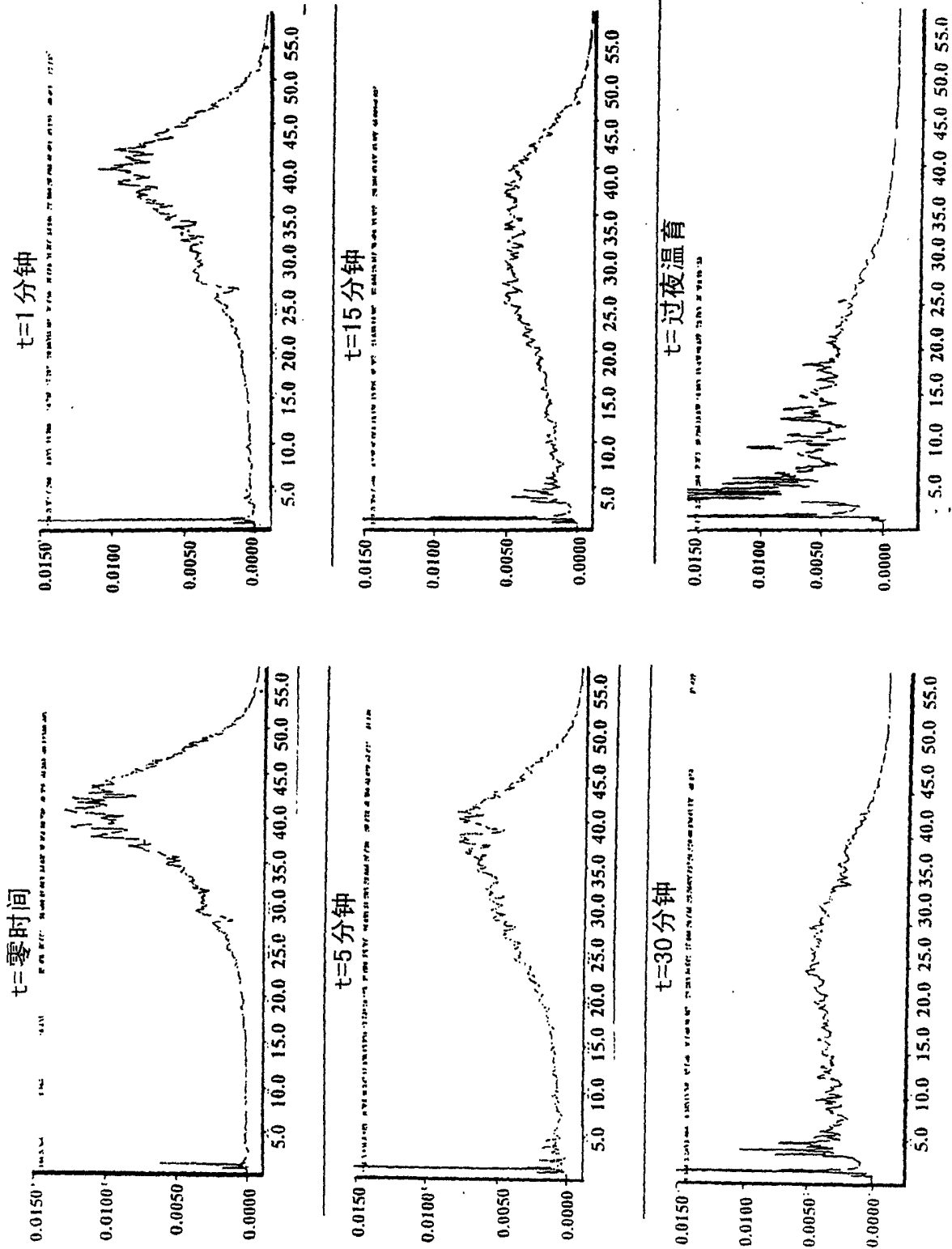


图 14

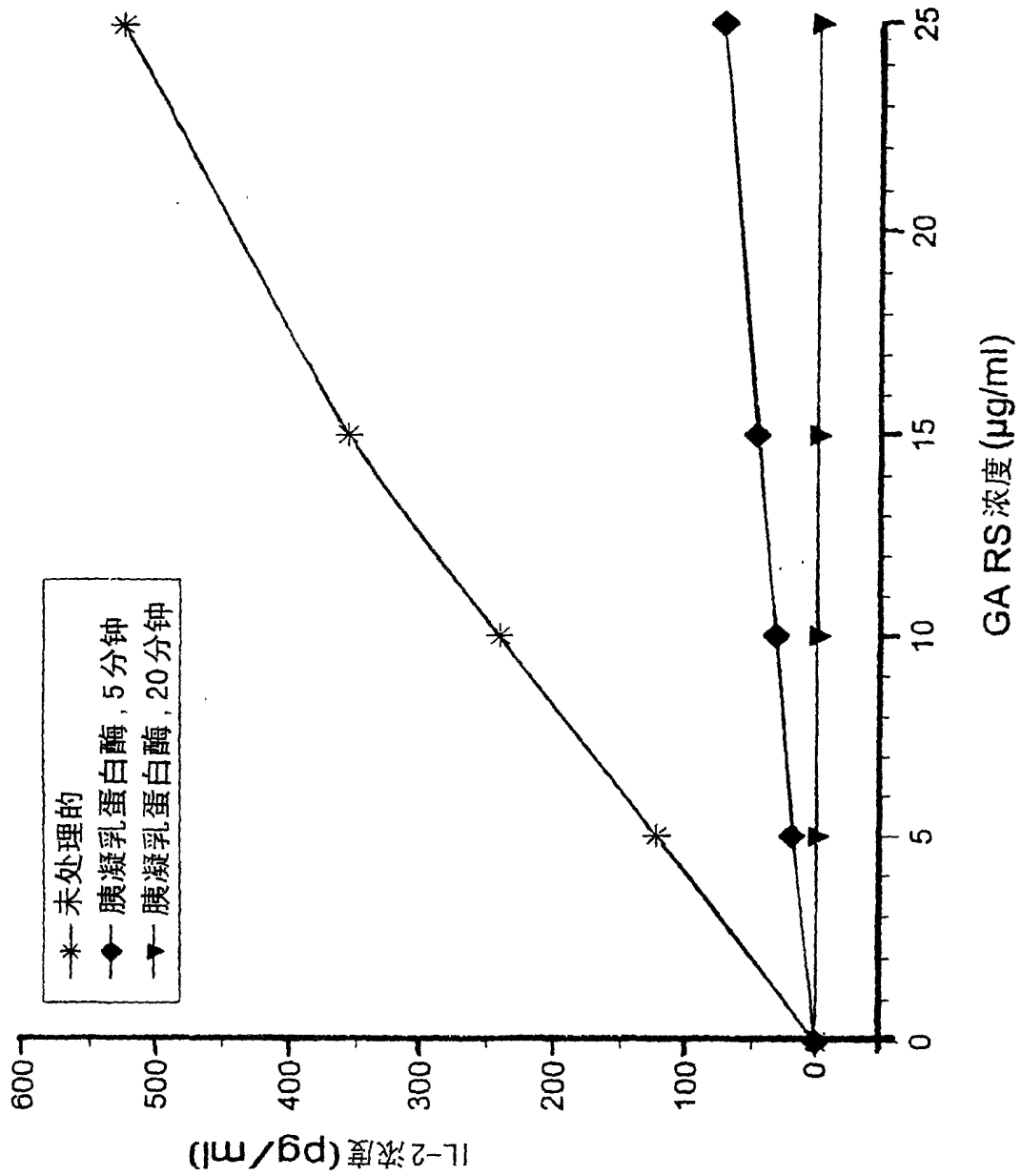


图 15

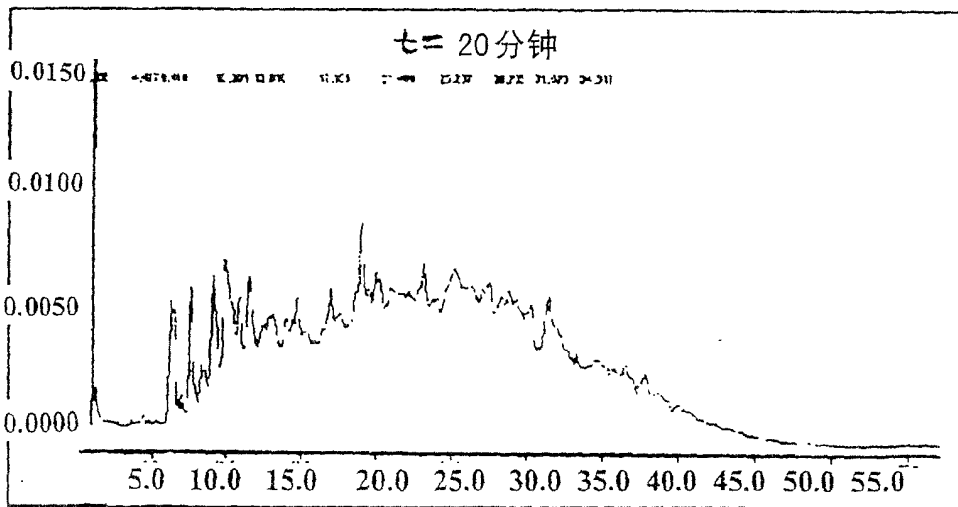
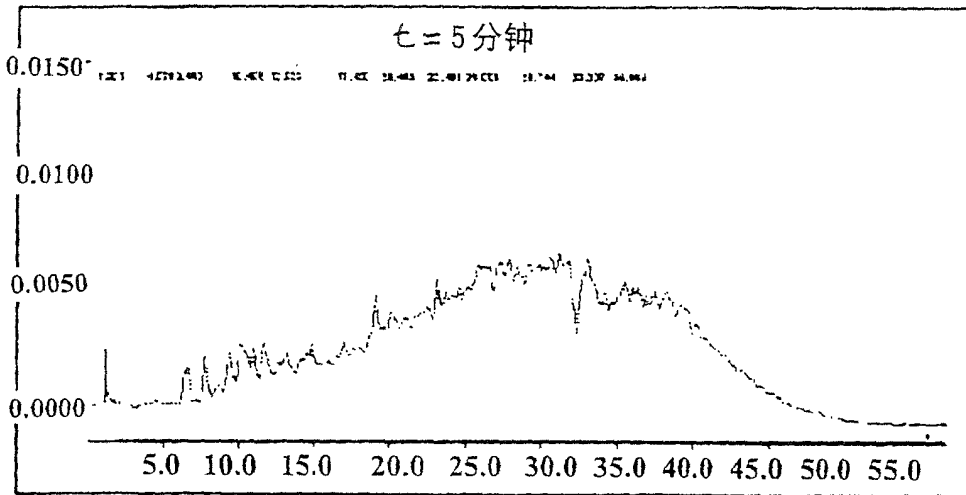
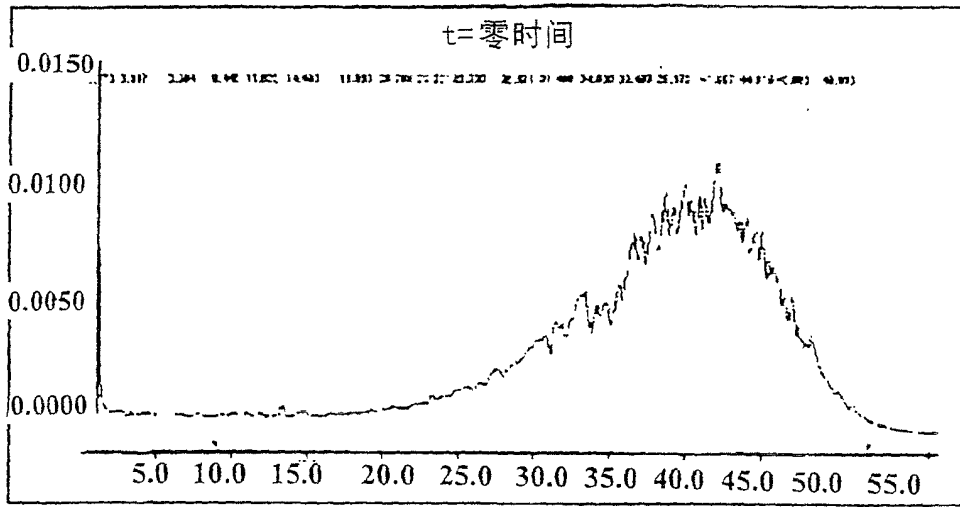


图 16