



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0029034
(43) 공개일자 2016년03월14일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
<i>G01N 33/543</i> (2006.01) <i>A61K 39/395</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
<i>G01N 33/54393</i> (2013.01)
<i>A61K 39/39558</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2015-7037229</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2014년07월01일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2015년12월31일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2014/063891</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2015/000865
국제공개일자 2015년01월08일</p> <p>(30) 우선권주장
13175091.1 2013년07월04일
유럽특허청(EPO)(EP)</p> | <p>(71) 출원인
에프. 호프만-라 로슈 아게
스위스 체하-4070 바젤 그렌짜체스트라체 124</p> <p>(72) 발명자
스투벤라오호 카이-군나르
독일 82377 펜즈베르크 파르크스트라체 1아
보겔 루돌프
독일 82362 바일하임 라버스트라체 5아</p> <p>(74) 대리인
제일특허법인</p> |
|--|---|

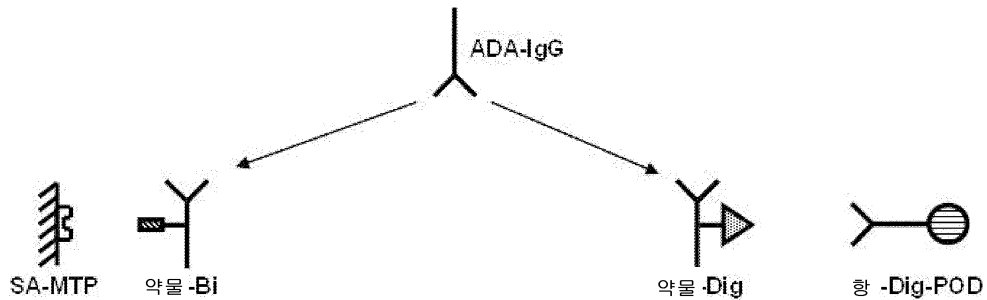
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **혈청 샘플 중 항-약물 항체를 검출하기 위한 간섭-억제된 면역분석**

(57) 요약

본 발명은 포획 약물 항체 및 추적 약물 항체를 포함하는 샘플 중 약물 항체에 대한 항-약물 항체의 검출을 위한 효소 결합된 면역흡수 분석을 보고하며, 여기에서 상기 포획 약물 항체 및 추적 약물 항체를 0.5 µg/ml 이상의 농도로 사용하고, 상기 샘플을 상기 포획 약물 항체 및 상기 추적 약물 항체와 동시에 1 내지 24시간 동안 배양시키고, 상기 포획 약물 항체 및 상기 추적 약물 항체를 단일 리신 잔기를 통해 유도체화하고, 상기 샘플은 10% 혈청을 포함하고, 올리고머성 인간 IgG를 상기 포획 약물 항체 및 상기 추적 약물 항체와의 배양 전에 상기 샘플에 가한다.

대표도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

포획 약물 항체 및 추적 약물 항체를 포함하는 류머티스성 관절염 환자의 샘플 중 약물 항체에 대한 항-약물 항체의 검출 방법으로,

- a) 상기 포획 약물 항체 및 추적 약물 항체가 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도를 가지며,
- b) 상기 샘플을 상기 포획 약물 항체 및 상기 추적 약물 항체와 동시에 0.5 내지 24시간 동안 배양시키고,
- c) 상기 포획 약물 항체 및 상기 추적 약물 항체를 각각 단일의 리신 잔기를 통해 단지 한 번만 유도체화하고,
- d) 상기 샘플이 1% 이상의 혈청/혈장을 포함하고,
- e) 올리고머성 인간 IgG를 상기 포획 약물 항체 및 상기 추적 약물 항체와의 배양 전에 상기 샘플에 가하고,
- f) 포획 및 추적자상의 단량체성 비오틴 및 디곡시제닌

인 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

샘플이 항-약물 항체 및 류머티스성 인자를 포함하는 방법.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

항체가 소염성 항체인 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

소염성 항체가 류머티스성 관절염, 또는 소아 관절염, 또는 골관절염, 또는 캐슬맨 질병, 또는 혈관사이 증식성 사구체신염의 치료를 위한 항체인 방법.

청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

항체가 항암 항체인 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

항암 항체가 골수종 또는 형질세포종의 치료를 위한 항체인 방법.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

항체가 항-IL6R 항체인 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

항-IL6R 항체가 토실리주맵인 방법.

청구항 9

형질세포종이 있는 개체에 유효량의 항-IL6R 항체(약물)를 투여하고 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 따른 분석으로 항-항-IL6R 항체 항체(항-약물 항체)의 존재를 측정함을 포함하는 상기 개체의 치료 방법.

청구항 10

골수종이 있는 개체에 유효량의 항-IL6R 항체(약물)를 투여하고 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 따른 분석으로 항-항-IL6R 항체 항체(항-약물 항체)의 존재를 측정함을 포함하는 상기 개체의 치료 방법.

청구항 11

개체에 IL6R 활성을 억제시키기에 유효한 양의 항-IL6R 항체를 투여하고 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 따른 분석으로 항-항-IL6R 항체 항체(항-약물 항체)의 존재를 측정함을 포함하는 상기 개체에서 IL6R 활성을 억제하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 소염성 항체로 치료된 환자의 혈청 샘플에서 항-약물 항체를 검출하기 위한 간접-억제된 면역억제 및 그의 용도를 보고한다.

배경 기술

[0002] 신규 치료 항체의 임상 개발은 적합한 분석에 의한 상기 항체의 잠재적인 면역원성의 평가를 필요로 한다(문헌[Kaliyaperumal, A. and Jing, S., Curr. Pharm. Biotechnol. 10 (2009) 352-358]). 항-약물 항체(ADA) 시험은 대개 2개의 일련의 접근법을 수반한다: (1) ADA 검출을 위한 분석 및 (2) ADA 특성화를 위한 분석. ADA 검출 분석은 선별 및 특이성 확인(확증) 분석을 포함한다. 미세적정 플레이트-기재 효소-결합된 면역흡수 분석(ELISA)이 여전히 그의 고도의 처리 효율, 상대적인 간편성 및 높은 감도로 인해 ADA를 선별하는데 가장 널리 사용되는 포맷이다(문헌[Geng, D., et al., J. Pharm. Biomed. Anal. 39 (2005) 364-375]). ADA ELISA는 높은 선택성, 모든 아이소타입의 검출 및 범-종 ADA 검출 능력을 제공하는 가교 포맷으로 가장 흔히 설계된다(문헌[Mire-Sluis, A.R., et al., J. Immunol. Methods 289(2004) 1-16]).

[0003] 가교 ELISA가 항-IL6R 항체 토실리주맵에 대한 선별 및 확인 ADA 분석으로서 개발되고 사용되었다(문헌[Stubenrauch, K., et al., Clin. Ther. 32 (2010) 1597-1609]).

[0004] 스투벤라우흐(Stubenrauch, K.) 등은 인가 항체에 노출된 마우스로부터의 혈청 샘플에서 약물내성에 대한 일반적인 항-약물 항체 분석을 보고한다(문헌[Anal. Biochem. 430 (2012) 193-199]). 부르디지(Bourdage, J.S.) 등은 단클론 항체에 대한 면역원성 분석을 설계하기 위한 항원 코팅 농도 의존성 및 관련성에 대한 이중 항원 가교 면역분석 포맷의 효과를 보고한다(문헌[J. Pharm. Biochem. Anal. 39 (2005) 685-690]). 미쿨스키스(Mikulskis, A.) 등은 약물 개발의 지원에서 확고한, 약물내성 면역원성 분석의 개발에 대한 선택 기준으로서 용액 ELISA를 보고한다(문헌[J. Immunol. Meth. 365 (2010) 38-49]). 판(Pan, J.) 등은 2가지 생물요법의 면역원성 시험에서 ELISA 방법과 NDSA(등록상표) 고속 분석과의 비교를 보고한다(문헌[J. Pharm. Tox. Meth. 63 (2010) 150-159]).

[0005] WO 2009/077127에서 식별 분석을 보고한다.

[0006] 퀴(Qiu, Z.J.) 등은 자가면역 혈청 중 인간 항-치료 항체의 검출을 위한 신규의 동종 비오틴-디곡시제닌 기재 분석을 보고한다(문헌[J. Immunol. Meth. 362 (2010) 101-111]).

발명의 내용

[0007] 본 발명은 치료 항체로 치료된 환자의 혈청 함유 샘플에서 항-약물 항체(ADA)의 검출을 위한 선별, 확인 및 추적 분석으로서 사용될 수 있는 가교 효소 결합된 면역흡수 분석(가교 ELISA)을 보고한다. 본 발명에 보고된 바와 같은 분석은 상기 혈청 함유 샘플이 류머티스성 관절염(RA)과 같은 자가면역 질병이 있는 환자로부터의 것인

경우 특히 유용하다.

- [0008] 본 발명에 보고된 바와 같은 분석은 분석하려는 샘플 중 치료 항체의 양에 관하여 개선된 내성(ADA ELISA의 증가된 약물내성)을 나타내며 동시에 위양성 분석 결과의 수를 감소시킨다.
- [0009] 본 발명에 보고된 바와 같은 분석에 의해 유리 약물 및 류머티스성 인자(RF)에 의한 간섭이 최소화될 수 있는 것으로 밝혀졌다.
- [0010] 상기 분석은 상기 샘플이 항-약물 항체의 검출을 위한 면역분석을 간접할 수 있고 따라서 위양성 면역분석 결과의 원인이 될 수 있는 문제의 항-약물 항체 이외의 항체를 함유하는 경우 특히 유용하다.
- [0011] 하나의 실시태양에서 본 발명에 보고된 바와 같은 방법은 소염 요법에 사용되는 약물 항체의 항-약물 항체의 측정에 사용된다.
- [0012] 상기 증가된 약물내성은 1) 비오딘화된 및 디곡시제닌화된 포획 및 추적 시약의 농도의 증가; 2) 상기 포획 및 추적 시약과 상기 혈청 샘플의, 연속 배양 대신 동시적인 배양; 3) 연장된 배양 시간; 4) 균일하게 단일-커플링된 포획 및 추적 시약의 사용; 및 5) 증가된 혈청 기질 함량의 사용의 상승작용적인 상호작용에 의해 성취되었다.
- [0013] 류머티스성 인자로부터의 간섭은 첨가제로서 올리고머성 인간 면역글로불린 G(IgG)의 첨가에 의해 억제될 수 있다.
- [0014] 본 발명에 보고된 바와 같은 간접-억제된 ADA 분석의 약물내성은 당해 분야에 공지된 분석의 경우보다 10배 이상 더 높다.
- [0015] 본 발명에 보고된 바와 같은 하나의 태양은 포획 약물 항체 및 추적 약물 항체를 포함하는 샘플 중 약물 항체에 대한 항-약물 항체의 검출을 위한 효소 결합된 면역흡수 분석이며, 여기에서
- [0016] a) 상기 포획 약물 항체 및 추적 약물 항체를 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 초과 농도로 사용하고,
- [0017] b) 상기 샘플을 상기 포획 약물 항체 및 상기 추적 약물 항체와 동시에 4 내지 24시간 동안 배양시키고,
- [0018] c) 상기 포획 약물 항체 및 상기 추적 약물 항체를 단일 리신 잔기를 통해 유도체화하고,
- [0019] d) 상기 샘플이 7.5% 이상의 혈청을 포함하고,
- [0020] e) 올리고머성 인간 IgG를 상기 포획 약물 항체 및 상기 추적 약물 항체와의 배양 전에 상기 샘플에 가한다.
- [0021] 본 발명에 보고된 바와 같은 하나의 태양은 포획 약물 항체 및 추적 약물 항체를 포함하는 류머티스성 관절염 환자의 샘플 중 약물 항체에 대한 항-약물 항체의 검출을 위한 효소 결합된 면역흡수 분석이며, 여기에서
- [0022] a) 상기 포획 약물 항체 및 추적 약물 항체는 상기 효소 결합된 면역흡수 분석에서 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도를 가지며,
- [0023] b) 상기 샘플을 상기 포획 약물 항체 및 상기 추적 약물 항체와 동시에 0.5 내지 24시간 동안 배양시키고,
- [0024] c) 상기 포획 약물 항체는 상기 포획 약물 항체 및 특정 결합쌍의 제1 성분의 1:1 접합체이고 상기 추적 약물 항체는 상기 추적 약물 항체 및 검출 가능한 표지의 1:1 접합체이며,
- [0025] d) 상기 샘플이 1% 이상의 혈청을 포함하고,
- [0026] e) 올리고머성 인간 IgG를 상기 포획 약물 항체 및 상기 추적 약물 항체와의 배양 전에 상기 샘플에 가한다.
- [0027] 하나의 실시태양에서, 상기 샘플은 5% 이상의 혈청을 포함한다. 하나의 실시태양에서 상기 샘플은 7.5% 이상의 혈청을 포함한다.
- [0028] 하나의 실시태양에서, 상기 샘플은 항-약물 항체 및 류머티스성 인자를 포함한다.
- [0029] 하나의 실시태양에서 상기 약물 항체는 염증 질병의 치료를 위한 항체이다. 하나의 실시태양에서 상기 염증 질병의 치료를 위한 항체는 자가면역 질병의 치료를 위한 항체이다. 하나의 실시태양에서 상기 자가면역 질병은 류머티스성 관절염 또는 소아 관절염 또는 골관절염 또는 케슬맨 질병이다.
- [0030] 하나의 실시태양에서 상기 약물 항체는 암 치료를 위한 항체이다. 하나의 실시태양에서 상기 항체는 골수종 또는 형질세포종의 치료를 위한 것이다.

- [0031] 하나의 실시태양에서 상기 약물 항체는 IL-6 수용체에 대한 항체(항-IL6R 항체), 또는 IGF-1 수용체에 대한(항-IGF1R 항체), 또는 IL13 수용체 1 알파(항-IL13R1알파 항체), 또는 Ox40L에 대한(항-Ox40L 항체), 또는 종양 괴사 인자 알파에 대한(항-TNF알파 항체) 항체이다. 하나의 실시태양에서 상기 약물 항체는 항-IL6R 항체이다. 하나의 실시태양에서 상기 항-IL6R 항체는 토실리주맙이다.
- [0032] 하나의 실시태양에서 상기 포획 약물 항체를 고체상에 접합시킨다. 하나의 실시태양에서 상기 포획 약물 항체의 상기 고체상에서의 접합을 특정한 결합쌍을 통해 수행한다. 하나의 실시태양에서 상기 특정한 결합쌍(제1 성분/제2 성분)은 스트렙트아비딘 또는 아비딘/비오틴, 또는 항체/항원(예를 들어 문헌[Hermanson, G.T., et al., Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996]을 참조하십시오), 또는 렉틴/폴리사카라이드, 또는 스테로이드/스테로이드 결합 단백질, 또는 호르몬/호르몬 수용체, 또는 효소/기질, 또는 IgG/단백질 A 및/또는 G 중에서 선택된다.
- [0033] 하나의 실시태양에서 상기 포획 약물 항체를 비오틴(특정한 결합쌍의 제1 성분으로서)에 접합시킨다. 이 경우에 상기 고체상에서의 접합을 고정화된 아비딘 또는 스트렙트아비딘을 통해 수행한다.
- [0034] 하나의 실시태양에서 상기 추적 약물 항체를 검출 가능한 표지에 접합시킨다. 하나의 실시태양에서 상기 추적 약물 항체를 특정한 결합쌍을 통해 상기 검출 가능한 표지에 접합시킨다. 하나의 실시태양에서 상기 특정한 결합쌍(제1 성분/제2 성분)은 스트렙트아비딘 또는 아비딘/비오틴, 또는 항체/항원(예를 들어 문헌[Hermanson, G.T., et al., Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996]을 참조하십시오), 또는 렉틴/폴리사카라이드, 또는 스테로이드/스테로이드 결합 단백질, 또는 호르몬/호르몬 수용체, 또는 효소/기질, 또는 IgG/단백질 A 및/또는 G 중에서 선택된다.
- [0035] 하나의 실시태양에서 상기 추적 약물 항체를 디콕시제닌(검출 가능한 표지로서)에 접합시킨다. 이 경우에 상기 검출 가능한 표지에의 결합을 디콕시제닌에 대한 항체를 통해서 수행한다.
- [0036] 하나의 실시태양에서 상기 포획 약물 항체 및 상기 추적 약물 항체는 상기 효소 결합된 면역흡수 분석(ELISA)에서 약 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 갖는다. 하나의 실시태양에서 상기 포획 약물 항체 및 상기 추적 약물 항체는 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 초과 10 $\mu\text{g/ml}$ 미만의 농도를 갖는다. 하나의 실시태양에서 상기 포획 약물 항체 및 상기 추적 약물 항체는 약 1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 갖는다. 하나의 실시태양에서 상기 포획 약물 항체 및 상기 추적 약물 항체는 약 1.4 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 1.8 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 갖는다. 하나의 실시태양에서 상기 포획 약물 항체 및 상기 추적 약물 항체는 약 1.45 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 1.6 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 갖는다. 하나의 바람직한 실시태양에서 상기 포획 약물 항체 및 상기 추적 약물 항체는 약 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 갖는다.
- [0037] 하나의 실시태양에서 상기 배양 시간은 6시간 이상이다. 하나의 실시태양에서 상기 배양 시간은 12시간 이상이다. 하나의 실시태양에서 상기 배양 시간은 16시간 이상이다.
- [0038] 하나의 실시태양에서 상기 배양 시간은 24시간 이하이다.
- [0039] 하나의 실시태양에서 상기 배양 시간은 4시간 내지 24시간이다. 하나의 실시태양에서 상기 배양 시간은 6시간 내지 24시간이다. 하나의 실시태양에서 상기 배양 시간은 12시간 내지 24시간이다. 하나의 실시태양에서 상기 배양 시간은 12시간 내지 20시간이다. 하나의 실시태양에서 상기 배양 시간은 14시간 내지 18시간이다. 하나의 실시태양에서 상기 배양 시간은 약 16시간이다.
- [0040] 하나의 실시태양에서 상기 샘플은 1% 내지 20% 혈청을 포함한다. 하나의 실시태양에서 상기 샘플은 약 10% 혈청을 포함한다.
- [0041] 하나의 실시태양에서 상기 올리고머성 인간 IgG를 10 $\mu\text{g/ml}$ 내지 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 최종 농도로 가한다. 하나의 실시태양에서 상기 올리고머성 인간 IgG를 15 $\mu\text{g/ml}$ 내지 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 최종 농도로 가한다. 하나의 실시태양에서 상기 올리고머성 인간 IgG를 20 $\mu\text{g/ml}$ 내지 250 $\mu\text{g/ml}$ 의 최종 농도로 가한다. 하나의 실시태양에서 상기 올리고머성 인간 IgG를 25 $\mu\text{g/ml}$ 내지 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 최종 농도로 가한다. 하나의 실시태양에서 상기 올리고머성 인간 IgG를 약 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 최종 농도로 가한다.
- [0042] 본 발명에 보고된 바와 같은 하나의 태양은 포획 약물 항체 및 추적 약물 항체를 포함하는 류머티스성 관절염 환자의 샘플 중 약물 항체에 대한 항-약물 항체의 검출을 위한 효소 결합된 면역흡수 분석이며, 여기에서
- [0043] a) 상기 포획 약물 항체 및 추적 약물 항체는 상기 효소 결합된 면역흡수 분석에서 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 가지며,
- [0044] b) 상기 샘플을 상기 포획 약물 항체 및 상기 추적 약물 항체와 동시에 14 내지 16시간 동안 배양시키고,

- [0045] c) 상기 포획 약물 항체는 상기 포획 약물 항체의 리신 잔기를 통한 상기 포획 약물 항체 및 비오틴의 1:1 접합체이고 상기 추적 약물 항체는 상기 추적 약물 항체의 리신 잔기를 통한 상기 추적 약물 항체 및 디곡시제닌의 1:1 접합체이며,
- [0046] d) 상기 샘플이 1% 내지 20%의 혈청을 포함하고,
- [0047] e) 올리고머성 인간 IgG를 상기 포획 약물 항체 및 상기 추적 약물 항체와의 배양 전에 상기 샘플에 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종 농도로 가한다.
- [0048] 본 발명에 보고된 바와 같은 하나의 태양은 항-약물 항체 ELISA에서 류머티스성 인자의 포획을 위한 올리고머성 인간 IgG의 용도이다.
- [0049] 본 발명에 보고된 바와 같은 하나의 태양은 질병이 있는 개체에 유효량의 치료 항체(약물)를 투여하고 본 발명에 보고된 바와 같은 분석으로 항-약물 항체의 존재를 측정함을 포함하는 상기 개체의 치료 방법이다.
- [0050] 본 발명에 보고된 바와 같은 하나의 태양은 염증성 질병이 있는 개체에 유효량의 항-IL6R 항체(약물)를 투여하고 본 발명에 보고된 바와 같은 분석으로 항-항-IL6R 항체 항체(항-약물 항체)의 존재를 측정함을 포함하는 상기 개체의 치료 방법이다.
- [0051] 하나의 실시태양에서 상기 염증성 질병은 자가면역 질병이다. 하나의 실시태양에서 상기 자가면역 질병은 류머티스성 관절염, 소아 관절염, 골관절염, 또는 케슬만병 중에서 선택된다.
- [0052] 하나의 실시태양에서 상기 염증성 질병은 혈관사이 증식성 사구체신염이다.
- [0053] 본 발명에 보고된 바와 같은 하나의 태양은 형질세포종이 있는 개체에 유효량의 항-IL6R 항체(약물)를 투여하고 본 발명에 보고된 바와 같은 분석으로 항-항-IL6R 항체 항체(항-약물 항체)의 존재를 측정함을 포함하는 상기 개체의 치료 방법이다.
- [0054] 본 발명에 보고된 바와 같은 하나의 태양은 골수종이 있는 개체에 유효량의 항-IL6R 항체(약물)를 투여하고 본 발명에 보고된 바와 같은 분석으로 항-항-IL6R 항체 항체(항-약물 항체)의 존재를 측정함을 포함하는 상기 개체의 치료 방법이다.
- [0055] 본 발명에 보고된 바와 같은 하나의 태양은 개체에 IL6R 활성을 억제시키기에 유효한 양의 항-IL6R 항체를 투여하고 본 발명에 보고된 바와 같은 분석으로 항-항-IL6R 항체 항체(항-약물 항체)의 존재를 측정함을 포함하는 상기 개체에서 IL6R 활성을 억제하는 방법이다.

도면의 간단한 설명

- [0056] 도 1은 항-IL6R 항체 토실리주맵에 대해 예시된 약물내성 항-약물 항체 분석의 분석 원리이다.
- 도 2는 항-IL6R 항체 토실리주맵에 대한 간섭-억제된 항-약물 항체 분석의 분석 원리이다.
- 도 3은 항-IL6R 항체 토실리주맵에 대한 간섭-억제된 항-약물 항체 분석에 대해 획득된 검량 곡선이다.
- 도 4는 항-IL6R 항체 토실리주맵에 대한 2 단계 항-약물 항체 ELISA 및 본 발명에 보고된 바와 같은 간섭-억제된 항-약물 항체 ELISA의 약물내성의 비교로; 증가하는 양의 약물의 존재하에서 300 ng/ml 항-약물 항체의 신호를 도시한다; 점선: 통상적인 분석 CP; 실선: 본 발명에 보고된 바와 같은 간섭-억제된 분석 CP; 원이 있는 점선: 통상적인 분석; 사각형이 있는 실선: 본 발명에 보고된 바와 같은 간섭-억제된 분석.
- 도 5는 간섭-억제된 항-약물 항체 ELISA에 의한 컷-포인트 측정이다.
- 도 6은 TCZ-Bi(단일) 및 TCZ-Dig(단일)에 대한 간섭-억제된 항-약물 항체 ELISA에 의한 컷-포인트 측정이다.
- 도 7은 TCZ-치료된 RA 환자로부터의 77개의 상이한 혈청 샘플에서 통상적인 ELISA를 사용하는 신호 변동이다.
- 도 8은 TCZ-치료된 RA 환자로부터의 77개의 상이한 혈청 샘플에서 본 발명에 보고된 바와 같은 간섭 억제된 ELISA를 사용하는 신호 변동이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0057] 정의
- [0058] "1:1 접합체"란 용어는 단일의 공유 결합을 통해 서로 결합/접합된 정확하게 2개의 존재로 이루어지는 접합체를

나타낸다. 예를 들어 "포획 약물 항체 및 특정한 결합쌍의 제1 성분의 1:1 접합체"란 용어는 단일의 화학 결합을 통해 특정한 결합쌍의 제1 성분의 정확하게 하나의 분자에 공유적으로 접합된 포획 약물 항체의 정확하게 하나의 분자로 이루어지는 화학 접합체를 나타낸다. 마찬가지로 "추적 약물 항체 및 검출 가능한 표지의 1:1 접합체"란 용어는 단일의 화학 결합을 통해 정확하게 하나의 검출 가능한 표지 분자에 공유적으로 접합된 추적 약물 항체의 정확하게 하나의 분자로 이루어지는 화학 접합체를 나타낸다.

- [0059] 본 발명에 따른 "약물 항체"란 용어는 개체에 투여될 수 있는 항체를 나타내며, 따라서 상기 개체의 샘플은 투여 후 상기 약물 항체를 포함하는 것으로 의심된다. 약물 항체는 치료를 목적으로 인간에게 투여하고자 하는 항체이다. 본 발명에 보고된 바와 같은 하나의 분석내에서, 상기 약물 항체, 상기 포획 약물 항체 및 상기 추적 약물 항체는 "동일한" 항체 분자, 예를 들어 동일한 발현 벡터에 의해 재조합적으로 생산되고 동일한 아미노산 서열을 포함하는 항체 분자를 포함한다. 약물 항체(치료학적 단클론 항체)는 다양한 질병, 예를 들어 종양학적 질병(예를 들어 혈액암 및 고형암, 예를 들어 비-호지킨 림프종, 유방암, 및 결장직장암) 또는 염증성 질병의 치료에 광범위하게 사용된다. 상기와 같은 항체는 예를 들어 문헌[Levene, A.P., et al., Journal of the Royal Society of Medicine 98 (2005) 145-152]; 문헌[Groner, B., et al., Curr. Mol. Meth. 4 (2004) 539-547]; 및 문헌[Harris, M., Lancet Oncol. 5 (2004) 292-302]에 보고되어 있다.
- [0060] 하나의 실시태양에서 상기 약물 항체는 염증성 질병의 치료에 유용한 항체, 즉 소염성 항체, 예를 들어 항-IL6 수용체 항체, 또는 항-IGF-1 수용체 항체, 또는 항-IL-13 수용체 1 알파 항체이다.
- [0061] 예시적인(바람직하게는 단클론성) 약물 항체는 IL-6 수용체에 대한 항체(항 IL6R 항체)이다. 상기와 같은 항체는 예를 들어 문헌[Mihara, et al., Clin. Immunol. 98 (2001) 319-326]; 문헌[Nishimoto, N., et al, Blood 106 (2005) 2627-2632], 임상 시험 NCT00046774, 또는 WO 2004/096274에 보고되어 있다.
- [0062] 예시적인(바람직하게는 단클론성) 약물 항체는 IGF-1 수용체(항 IGF1R 항체)에 대한 항체이다. 상기와 같은 항체는 예를 들어 WO 2004/087756 또는 WO 2005/005635에 보고되어 있다.
- [0063] 예시적인(바람직하게는 단클론성) 약물 항체는 IL-13 수용체 알파에 대한 항체(항 IL13R1알파 항체)이다. IL-13R1알파에 대한 항체는 예를 들어 WO 96/29417, WO 97/15663, WO 03/080675, 문헌[Graber, P., et al., Eur. J. Immunol. 28 (1998) 4286-4298]; 문헌[Poudrier, J., et al., J. Immunol. 163 (1999) 1153-1161]; 문헌[Poudrier, J., et al., Eur. J. Immunol. 30 (2000) 3157-3164]; 문헌[Aikawa, M., et al., Cytokine 13 (2001) 75-84]으로부터 공지되어 있으며, 예를 들어 R&D 시스템스 인코포레이티드(R&D Systems Inc.)(미국 소재)로부터 상업적으로 입수할 수 있다. 추가의 예시적인 IL-13R1알파에 대한 항체는 WO 2006/072564에 보고되어 있다.
- [0064] 본 발명에 사용되는 바와 같은 "소염 요법에 사용되는 약물 항체"란 용어는 염증을 매개하는 세포 표면 수용체에 대한 약물 항체를 나타낸다. 상기와 같은 수용체는 예를 들어 IL-6 수용체, 또는 IGF-1 수용체, 또는 IL-13a 수용체 1이다. 상기와 같은 소염성 약물 항체로 치료되는 환자로부터의 샘플을 분석하는 경우, 상기 방법의 양성 결과가 진정한 항-약물 항체(진양성 결과)에 근거하는지 또는 상기 샘플의 항-약물 항체 이외의 항체(위양성 결과)에 근거하는지를 측정해야 한다. 상기와 같은 경우의 일례는 류머티즘과 같은 자가면역 질병을 갖는 환자로부터의 샘플이며, 따라서 상기 환자로부터 취득된 샘플은 소위 "류머티스성 인자"를 함유한다. 본 발명에 사용되는 바와 같이 "류머티스성 인자"란 용어는 인간 IgG에 결합하는, 보다 엄밀히 인간 IgG의 Fc-영역에 결합하는 항체를 나타낸다. 대부분의 경우에 상기 "류머티스성 인자"는 올리고머성 결합 분자이다.
- [0065] 본 발명에 사용되는 바와 같은 "항-약물 항체"란 용어는 약물 항체의 항원성 영역에 대한, 즉 상기 영역에 결합하는 항체를 나타낸다. 상기 항원성 영역은 상기 약물 항체의 가변 영역, CDR, 불변 영역, 또는 당구조일 수 있다. 하나의 실시태양에서 상기 항-약물 항체는 상기 약물 항체의 CDR에 대한 것, 또는 재조합 세포, 예를 들어 CHO 세포, HEK 세포, Sp2/0 세포, 또는 BHK 세포에서 상기 약물 항체의 재조합 생산으로부터 생성되는 약물 항체의 2차 변형이다. 일반적으로 항-약물 항체는 약물 항체가 투여되는 동물의 면역계에 의해 인식되는 상기 약물 항체의 항원성 영역에 대한 것이다. 상기 개시된 항체를 "특이성 항-약물 항체"라 칭한다.
- [0066] 약물 항체를 가능한 한 적은 항원성 영역을 포함하도록 설계한다. 예를 들어, 인간에 사용하고자 하는 약물 항체를 상기 약물 항체에 대한 면역 반응의 발생을 최소화하기 위해서 인간 환자에게 적용하기 전에 인간화시킨다. 상기 면역 반응은 상기와 같은 인간화된 약물 항체의 비-인간 부분, 예를 들어 가변 도메인 중 상보성 결정 영역에 대한 항-약물 항체(ADA)의 형태로 있을 수 있다(예를 들어 문헌[Pan, Y., et al., FASEB J. 9 (1995) 43-49]을 참조하시오).

- [0067] 본 발명에 사용되는 바와 같은 "고가변 영역" 또는 "HVR"이란 용어는 서열이 고가변성("상보성 결정 영역" 또는 "CDR)이고/이거나 구조적으로 한정된 고리("고가변성 고리")를 형성하고/하거나 항원-접촉 잔기("항원 접촉부")를 함유하는 항체 가변 도메인의 각각의 영역들을 지칭한다. 일반적으로, 항체는 6개의 HVR, 즉 VH 중 3개(H1, H2, H3) 및 VL 중 3개(L1, L2, L3)를 포함한다. 본 발명에서 예시적인 HVR은
- [0068] (a) 아미노산 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), 및 96-101 (H3)에 존재하는 고가변성 고리(문헌[Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]);
- [0069] (b) 아미노산 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2), 및 95-102 (H3)에 존재하는 CDR(문헌[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]);
- [0070] (c) 아미노산 잔기 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2), 및 93-101 (H3)에 존재하는 항원 접촉부(문헌[MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)]); 및
- [0071] (d) HVR 아미노산 잔기 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3), 및 94-102 (H3)를 포함한, (a), (b) 및/또는 (c)의 조합
- [0072] 을 포함한다.
- [0073] 달리 나타내지 않는 한, 상기 가변 도메인 중의 HVR 잔기 및 다른 잔기(예를 들어 FR 잔기)는 본 발명에서 카바트(Kabat)에 따라 넘버링된다.
- [0074] 항체는 다수의 반응성 부분들, 예를 들어 아미노기(리신, 알파-아미노기), 티올기(시스틴, 시스테인 및 메티오닌), 카복실산기(아스파르트산, 글루탐산) 및 당-알콜기를 함유한다. 이들을 표면, 단백질, 중합체(예를 들어 PEG, 셀룰로스 또는 폴리스티롤), 효소 또는 결합쌍의 일원과 같은 결합짝에 커플링시키기 위해 사용할 수 있다(예를 들어 문헌[Aslam M. and Dent, A., Bioconjugation MacMillan Ref. Ltd. (1999) 50-100]을 참조하시오).
- [0075] "항-유전자형 항체"란 용어는 모 항체의 결합 특이성, 예를 들어 결합 부위에 특이적으로 결합하는 항체를 나타낸다, 즉 항-유전자형 항체는 예를 들어 모 항체의 항원 결합 부위에 대한 것이다.
- [0076] 하나의 실시태양에서 상기 항-유전자형 항체는 모 항체의 CDR 중 하나 이상에 특이적으로 결합한다.
- [0077] 하나의 실시태양에서 상기 모 항체는 치료 항체이다. 하나의 실시태양에서 상기 모 항체는 다중특이성 항체이다. 하나의 실시태양에서 상기 모 항체는 이중특이성 항체이다.
- [0078] 단백질의 가장 통상적인 반응기 중 하나는 아미노산 리신의 지방족 ε-아민이다. 일반적으로, 거의 모든 항체가 풍부한 리신 잔기를 함유한다. 리신 아민/아미노기는 pH 8.0 이상에서 상당히 양호한 친핵체(pK_a = 9.18)이며 따라서 다양한 시약들과 쉽고 깨끗하게 반응하여 안정한 결합을 형성한다.
- [0079] 항체 중 또 다른 통상적인 반응기는 황-함유 아미노산 시스틴 및 그의 환원 산물인 시스테인(또는 절반 시스틴)으로부터의 티올 잔기이다. 시스테인은 유리 티올기를 함유하며, 상기 기는 아민보다 더 친핵성이고 일반적으로 단백질 중 가장 반응성인 작용기이다. 티올은 일반적으로 중성 pH에서 반응성이며, 따라서 아민의 존재하에서 선택적으로 다른 분자에 커플링할 수 있다. 유리 설프하이드릴기는 비교적 반응성이기 때문에, 상기 기를 갖는 단백질들은 종종 다이설파이드기 또는 다이설파이드 결합으로서 산화된 형태의 상기 기들과 함께 존재한다.
- [0080] 시스틴 및 시스테인 외에, 일부 단백질들은 또한 아미노산 메티오닌을 가지며, 상기는 티오에테르 결합에 황을 함유하고 있다. 문헌은 반응성 아미노기를 통해 다수의 설프하이드릴기를 도입시키는 효율적인 방식을 제공하기 위한 다수의 티올화 가교결합 시약들, 예를 들어 트라우트(Traut) 시약(2-이미노티올란), 숙신이미딜(아세틸티오) 아세테이트(SATA), 또는 설포숙신이미딜 6-[3-(2-피리딜다이티오) 프로피온아미드] 핵사노에이트(설포-LC-SPDP)의 용도를 보고한다.
- [0081] 반응성 에스터, 특히 N-하이드록시숙신이미드(NHS) 에스터가 아민기의 변형에 가장 통상적으로 사용되는 시약 중 하나이다. 수성 환경에서 반응에 최적인 pH는 pH 8.0 내지 9.0이다.
- [0082] 아이소티오시아네이트는 아민-변형 시약이며 단백질과 티오유레아 결합을 형성한다. 상기는 수용액 중에서 단백질 아민과 반응한다(최적으로 pH 9.0 내지 9.5에서).
- [0083] 알데하이드는 순환 수성 조건하에서 지방족 및 방향족 아민, 하이드라진 및 하이드라지드와 반응하여 이민 중간

체(쉬프의 염기)를 형성한다. 쉬프의 염기를 순한 또는 강한 환원제(예를 들어 붕수소화 나트륨 또는 시아노붕수소화 나트륨)로 선택적으로 환원시켜 안정한 알킬 아민 결합을 유도할 수 있다.

[0084] 아민을 변형시키는데 사용된 다른 시약은 산 무수물이다. 예를 들어, 다이에틸렌트리아민펜타아세트산 무수물(DTPA)은 2개의 아민-반응성 무수물기를 함유하는 이작용성 킬레이트제이다. 상기를 단백질의 N-말단 및 ε-아민기와 반응시켜 아마이드 결합을 형성시킬 수 있다. 상기 무수물 고리는 개환하여, 배위 복합체 중 금속에 단단히 결합할 수 있는 다가의 금속-킬레이트화 가치를 생성시킨다.

[0085] "샘플"이란 용어는 비제한적으로, 살아있는 것 또는 이전에 살아있던 것으로부터의 임의의 양의 물질을 포함한다. 상기와 같은 살아있는 것은 비제한적으로 인간, 마우스, 원숭이, 래트, 토끼 및 다른 동물을 포함한다. 하나의 실시태양에서 상기 샘플을 원숭이, 특히 키노몰구스 원숭이, 또는 토끼, 또는 마우스 또는 래트로부터 취득한다. 상기와 같은 물질은 비제한적으로 하나의 실시태양에서 임상 경로에 가장 널리 사용되는 샘플 공급원인 개체로부터의 전혈, 혈청 또는 혈장을 포함한다.

[0086] "고체상"이란 용어는 비-유동상 물질을 나타내며, 중합체, 금속(상자성, 강자성 입자), 유리 및 세라믹과 같은 물질로부터 제조된 입자(미세입자 및 비드 포함); 젤 물질, 예를 들어 실리카, 알루미늄, 및 중합체 젤; 중합체, 금속, 유리 및/또는 세라믹으로 제조될 수 있는 모세관; 제올라이트 및 다른 다공성 물질; 전극; 미세적정 플레이트; 고체 스트립; 및 큐벳, 튜브 또는 다른 분광계 샘플 용기를 포함한다. 고체상 성분은 "고체상"이 그의 표면에, 샘플 중 물질과 상호작용시키고자 하는 하나 이상의 부분을 함유한다는 점에서 불활성 고체 표면과 구분된다. 고체상은 정지상 성분, 예를 들어 튜브, 스트립, 큐벳 또는 미세적정 플레이트이거나, 또는 비-정지상 성분, 예를 들어 비드 및 미세입자일 수 있다. 단백질 및 다른 물질의 비-공유 또는 공유 결합 모두를 허용하는 다양한 미세입자를 사용할 수 있다. 상기와 같은 입자는 중합체 입자, 예를 들어 폴리스타이렌 및 폴리(메틸메트아크릴레이트); 금 입자, 예를 들어 금 나노입자 및 금 콜로이드; 및 세라믹 입자, 예를 들어 실리카, 유리 및 산화 금속 입자를 포함한다. 예를 들어 문헌[Martin, C.R., et al., Analytical Chemistry-News & Features, 70 (1998) 322A-327A], 또는 문헌[Butler, J.E., Methods 22 (2000) 4-23]을 참조하십시오.

[0087] 하나의 실시태양에서, 색원체(형광 또는 발광기 및 염료), 효소, NMR-활성기, 금속 입자, 또는 합텐, 예를 들어 디곡시제닌으로부터 검출 가능한 표지를 선택한다. 하나의 실시태양에서 상기 검출 가능한 표지는 디곡시제닌이다. 상기 검출 가능한 표지는 또한 광활성화 가능한 가교결합기, 예를 들어 아지도 또는 아지르닌기일 수 있다. 전기화학발광에 의해 검출될 수 있는 금속 킬레이트가 또한 하나의 실시태양에서 신호-방출기이며, 루테튬 킬레이트, 예를 들어 루테튬(비스피리딜)₃²⁺ 킬레이트가 특히 바람직하다. 적합한 루테튬 표지 그룹들은 예를 들어 EP 0 580 979, WO 90/05301, WO 90/11511, 및 WO 92/14138에 개시되어 있다.

[0088] 상이한 면역분석의 원리들이 예를 들어 문헌[Hage, D.S., Anal. Chem. 71 (1999) 294R-304R]에 개시되어 있다. 문헌[Lu, B., et al., Analyst 121 (1996) 29R-32R]은 면역분석에 사용하기 위한 항체의 배향된 고정화를 보고한다. 아비딘-비오틴-매개된 면역분석이 예를 들어 문헌[Wilchek, M., and Bayer, E.A., Methods Enzymol. 184 (1990) 467-469]에 보고되어 있다.

[0089] 발명의 상세한 설명

[0090] 본 발명은 유리 치료 항체에 대한 증가된 내성 및 류머티스성 인자 간섭에 대한 증가된 내성을 갖는 혈청 샘플을 사용하는 간섭-억제된 항-약물 항체 분석을 보고한다.

[0091] 항-약물 항체 분석의 원리는 디곡시제닌화된 약물(약물-Dig) 및 비오틴화된 약물(약물-Bi)(예를 들어 토실리주맵(각각 TCZ-Dig 및 TCZ-Bi))과의 복합체 중에 항-약물 항체(ADA)의 포획이며, 상기 약물-Bi는 스트렙트아비딘-코팅된 플레이트(SA-MTP)상에 고정화되게 된다. 상기 SA-MTP상의 약물-Bi에 결합된 ADA/약물-Dig 복합체는 항-디곡시제닌 항체 양고추냉이 퍼옥시다제 효소 접합체(항-Dig-HRP)에 의해 검출된다. 상기 양고추냉이 퍼옥시다제(HRP)는 기질 ABTS의 색상 반응을 촉매화한다. 상기 색상 강도는 분석물의 농도에 비례한다. 항-약물 항체 분석의 일반적인 원리를 도 1에 도시한다.

[0092] 일반적인 분석 원리의 변경 없이 통상적인 항-약물 항체 분석의 약물 및 류머티스성 인자 내성을

[0093] 1) 비오틴화된 및 디곡시제닌화된 포획 및 추적 시약의 농도의 증가;

[0094] 2) 상기 포획 및 추적 시약과 상기 혈청 샘플의, 연속 배양 대신 동시적인 배양;

- [0095] 3) 상기 혈청 샘플과 상기 포획 및 추적 시약과의 연장된 배양 시간;
- [0096] 4) 이중 커플링된 혼합물 대신에 동종의 포획 및 추적 시약의 사용;
- [0097] 5) 증가된 혈청 기질의 사용;
- [0098] 6) 분석 첨가제로서 올리고머성 IgG의 포함; 및
- [0099] 7) 단일 비오틴화된 포획 및 단일 디곡시제닌화된 추적 항체의 사용
- [0100] 에 의해 증가시킬 수 있다.
- [0101] 이들 수단은 상승작용 효과를 제공하였다.
- [0102] 상기 수단들은 치료 약물 항체에 대한 항-약물 항체의 검출을 위한 간섭-억제된 약물-내성 항-약물 항체 분석을 이끌어낸다.
- [0103] 본 발명에 보고된 바와 같은 간섭-억제된 약물-내성 항-약물 항체 분석의 일반적인 원리를 항-IL6R 항체 토실리주맵에 대해 예시된 도 2에 도시한다.
- [0104] 본 발명에 보고된 바와 같은 분석 구성에 의해서 상기 ADA 분석의 약물내성이 통상적인 항-약물 항체 분석에 비해 환자로부터의 혈청 샘플에서 10배 이상 증가하였다. 동시에 위양성 분석을 유도하는 류머티스성 인자들에 대한 민감성이 또한 감소하였다.
- [0105] 상기 치료학적 소염성 항체 토실리주맵(TCZ)은 인터류킨-6 수용체에 대한 재조합 인간화된 단클론 항체이다. 상기는 류머티스성 관절염의 임상 연구에 유효한 것으로 나타났다(문헌[Ohsugi, Y. and Kishimoto, T., Expert Opin. Biol. Ther. 8 (2008) 669-681]). 상기 연구에 사용된 ADA 선별 및 확인 분석은 정맥내 투여 섭생을 사용하여 정상상태에 도달한 전형적인 TCZ 혈청 농도에 대해 충분한 약물내성을 나타낸다.
- [0106] 그러나, 상이한 투여 경로, 예를 들어 피하 투여, 보다 빈번한 투여, 및 아동에서의 새로운 적응증은 정상 상태에서 보다 높은 TCZ 혈청 농도를 생성시킬 수도 있다.
- [0107] 또한, 예를 들어 류머티스성 인자(RF)는 종종 자가면역 질병이 있는 환자, 예를 들어 류머티스성 관절염 환자에서 현저하게 증가된다. RF는 응집된 감마 글로블린에 대해 우세한 결합을 나타내며 생체내에서 면역 복합체의 제거 기전에 관련된다(문헌[Tatarewicz, S., et al., J. Immunol. Methods. 357 (2010) 10-16]). RF는 우세하게는 오량체성 면역글로블린 M(IgM) 아이소타입(문헌[Artandi, S.E., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1991) 94-98])이며 ADA 분석에서 위양성 결과를 유도하는 치료 항체의 불변 부분에 다가의 중간 친화성으로 비특이적으로 결합할 수 있다. 예를 들어, 친화성 정제된 토끼 항-인간 IgM 항체를 샘플 희석제에 포함시켜 RA 샘플에서의 교차 반응성 IgM 항체 간섭을 극복하였다(예를 들어 문헌[Araujo, J., et al., J. Pharm. Biomed. Anal., 55 (2011) 1041-1049]을 참조하시오).
- [0108] 상기 치료 항체에 대한 혈청 샘플 중에 존재하는 RF의 비특이적인 결합은 상기 ADA 분석을 수행하기 전에 상기 샘플에 올리고머성 인간 IgG를 가함으로써 방지될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 상기 첨가된 올리고머성 IgG는 상기 RF에 대한 추가적인 표적을 제공하며 기껏해야 본 발명에 보고된 바와 같은 ADA 분석에서 RF의 간섭을 제공한다.
- [0109] 하기에서 본 발명에 보고된 바와 같은 간섭-억제된 ADA 분석을 토실리주맵(TCZ) 치료된 류머티스성 관절염 환자의 혈청 샘플의 분석에 의해 예시한다.
- [0110] 항-IL6R 항체 토실리주맵에 대한 항-약물 항체를 검출하기 위한 통상적인 항-약물 항체 분석의 약물내성을 증가시키기 위한 수단은
- [0111] 1) 비오틴화된 및 디곡시제닌화된 TCZ의 농도를 증가시키고(예를 들어 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$);
- [0112] 2) 상기 혈청 샘플을 TCZ-Bi 및 TCZ-Dig와 동시에 배양시키고;
- [0113] 3) 상기 혈청 샘플을 TCZ-Bi 및 TCZ-Dig와 연장 배양시키고(예를 들어 1시간 내지 16시간);
- [0114] 4) 리신- 및 탄수화물-커플링된 시약의 혼합물 대신에 오직 리신-커플링된 TCZ-Bi 및 TCZ-Dig 시약을 사용하고;
- [0115] 5) 증가된 혈청 기질 함량을 사용하고;
- [0116] 6) 올리고머성 인간 IgG를 TCZ-Bi 및 TCZ-Dig 배양 전에 상기 샘플에 가함

[0117] 이었다.

[0118] 약물내성

[0119] 임상 샘플에서 검출되는 항-IL6R 항체 토실리주맙의 농도는 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 이상, 종종 1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 범위이다.

[0120] 상기 통상적인 항-약물 항체 분석의 약물내성을, 주어진 농도의 양성 대조용 ADA가 컷-포인트 이상에서 검출될 수 있는 가장 높은 TCZ 농도를 측정함으로써 평가하였다. 표 1은 상기 결과의 요약을 나타낸다.

[0121] [표 1]

통상적인 항-약물 항체 ELISA에서 약물(토실리주맙) 내성의 측정. 좌측-정렬된 신호 값은 0.136 AU의 플레이트-특이성 컷-포인트 이하이다.						
ADA [ng/ml]	토실리주맙 [$\mu\text{g/ml}$]					
	6250	1250	250	50	10	0
	신호 평균 [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

[0122]

[0123] 125 ng/ml의 ADA 농도가 검출되었으며 10 $\mu\text{g/ml}$ TCZ의 존재하에서 양성으로 시험되었다.

[0124] 본 발명에 보고된 바와 같은 간접-억제된 약물-내성 항-약물 항체 분석의 약물내성을, 주어진 농도의 양성 대조용 ADA가 컷-포인트 이상에서 검출될 수 있는 가장 높은 TCZ 농도를 측정함으로써 평가하였다. 표 2는 상기 결과의 요약을 나타낸다.

[0125] [표 2]

본 발명에 보고된 바와 같은 간접-억제된 약물내성 항-약물 항체 ELISA에서 약물(토실리주맙) 내성의 측정. 좌측-정렬된 신호값은 0.045 AU의 플레이트-특이성 컷-포인트 이하이다.						
ADA [ng/ml]	토실리주맙 [$\mu\text{g/ml}$]					
	100	30	10	3	1	0
	신호 평균 [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

[0126]

[0127] 본 발명에 보고된 바와 같은 간접-억제된 약물-내성 항-약물 항체 ELISA에서 30 ng/ml의 매우 낮은 ADA 농도가 검출되었으며 10 $\mu\text{g/ml}$ TCZ의 존재하에서 양성으로 시험되었다. 더욱 또한 100 ng/ml 및 300 ng/ml의 ADA 농도는 각각 30 $\mu\text{g/ml}$ 및 심지어 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 약물 항체 내성을 나타낸다.

[0128] 토실리주맙에 대한 앞서 사용된 2-단계 통상적인 항-약물 항체 ELISA에 의해 수행된 동일한 실험과의 비교에서 상기 간접-억제된 분석에 의해 10배 이상 더 높은 약물 내성이 밝혀졌다(300 ng/ml ADA 농도에 대해서 또한 도 4를 참조하시오).

[0129] 각각 포획 및 추적 약물 항체에 1가 결합된 비오틴 및 디곡시제닌의 1:1 접합체에 대해 본 발명에 보고된 바와 같은 간접-억제된 약물-내성 항-약물 항체 분석의 약물내성을, 주어진 농도의 양성 대조용 ADA가 컷-포인트 이상에서 검출될 수 있는 가장 높은 TCZ 농도를 측정함으로써 평가하였다. 표 3은 상기 결과의 요약을 나타낸다.

[0130] [표 3]

본 발명에 보고된 바와 같은 포획 및 추적 약물 항체에 대한 비오틴 및 디콕시제닌의 1:1 결합체에 대한 간섭-억제된 약물내성 항-약물 항체 ELISA에서 약물(토실리주맙) 내성의 측정. 좌측-정렬된 신호값은 0.037 AU의 플레이트-특이성 컷-포인트 이하이다.

ADA [ng/ml]	토실리주맙 [$\mu\text{g/ml}$]					
	80	70	60	50	5	0
	신호 수단 [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

[0131]

[0132] 본 발명에 보고된 바와 같은 간섭-억제된 약물내성 항-약물 항체 ELISA에서 250 ng/ml의 ADA 농도가 검출되었으며 80 $\mu\text{g/ml}$ TCZ의 존재하에서 양성으로 시험되었다.

[0133] 간섭 억제:

[0134] 16개의 임상 혈청 샘플을 상기 문헌[Stubenrauch et al.]에 개시된 바와 같은 통상적인 항-약물 항체 분석에 의해 분석하였다. 상기 결과를 표 4a에 요약한다.

[0135] [표 4a]

상기 문헌[Stubenrauch et al.]에 따른 ADA 분석에 의한 토실리주맙으로 치료된 류머티스성 관절염 환자로부터의 16개 혈청 샘플의 분석 결과

샘플 번호	통상적인 ADA 분석
1	+
2	+
3	+
4	+
5	+
6	+
7	+
8	-
9	-
10	-
11	-
12	-
13	-
14	-
15	-
16	+

[0136]

[0137] 상기 분석 원리의 변경 없이, 일련의 측정을 수행하여 본 발명에 보고된 바와 같은 간섭-억제된 약물내성 항-약물 항체 ELISA를 획득하였다.

[0138] 상기는

[0139] 1) 비오틴화된 및 디콕시제닌화된 TCZ의 농도를 증가시키고(예를 들어 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 내지 1.5 $\mu\text{g/ml}$);

[0140] 2) 상기 혈청 샘플을 TCZ-Bi 및 TCZ-Dig와 동시에 배양시키고;

[0141] 3) 상기 혈청 샘플을 TCZ-Bi 및 TCZ-Dig와 연장 배양시키고(예를 들어 1시간 내지 16시간);

[0142] 4) 리신- 및 탄수화물-커플링된 시약의 혼합물 대신에 오직 리신-커플링된 TCZ-Bi 및 TCZ-Dig 시약을 사용하고;

[0143] 5) 증가된 혈청 기질 함량을 사용하고;

[0144] 6) 올리고머성 인간 IgG를 TCZ-Bi 및 TCZ-Dig 배양 전에 상기 샘플에 가함

[0145] 이다.

[0146] 본 발명에 보고된 바와 같은 간섭 억제된 분석에 의해 획득된 바와 같은 결과를 하기 표 4b에 나타낸다.

[0147] [표 4b]

통상적인 및 본 발명에 보고된 간섭 억제된 ADA 분석에 의한 토실리주맙으로 치료된 류머티스성 관절염 환자로부터의 16개 혈청 샘플의 비교 분석		
샘플 번호	통상적인 ADA 분석	간섭 억제된 ADA 분석
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	+	+
6	+	+
7	+	+
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	-	-
13	-	-
14	-	-
15	-	+
16	+	-

[0148]

[0149] 상기에 개략된 바와 같은 수단들 중 단지 일부만을 수행하는 경우 간섭의 감소는 충분하지 않으며 기존의 류머티스성 인자에 의한 간섭에 대한 민감성은 여전히 위양성 ADA 분석 결과를 생성시키는 것으로 밝혀졌다.

[0150] 예를 들어 단지

[0151] 1) 비오틴화된 및 디곡시제닌화된 TCZ의 농도를 증가시키고(예를 들어 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 내지 1.5 $\mu\text{g/ml}$);

[0152] 2) 상기 혈청 샘플을 TCZ-Bi 및 TCZ-Dig와 동시에 배양시키고;

[0153] 3) 상기 혈청 샘플을 TCZ-Bi 및 TCZ-Dig와 연장 배양시키고(예를 들어 1시간 내지 16시간);

[0154] 4) 리신- 및 탄수화물-커플링된 시약의 혼합물 대신에 오직 리신-커플링된 TCZ-Bi 및 TCZ-Dig 시약을 사용하고;

[0155] 5) 증가된 혈청 기질 함량을 사용하는

[0156] 수단만을 수행하는 경우 위양성 분석 결과에 대한 민감성의 충분한 감소는 관찰될 수 없다. 비교 데이터를 표 4c에 나타낸다.

[0157] [표 4c]

상이한 포맷의 ADA 분석에 의한 토실리주맙으로 치료된 류머티스성 관절염 환자로부터의 16개 혈청 샘플의 비교 분석		
본 발명에 보고된 바와 같은 간섭-억제된 ADA 분석		
샘플 번호	첨가제 부재	첨가제 존재
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	+	+
6	+	+
7	+	+
8	+	-
9	-	-
10	+	-
11	+	-
12	+	-
13	+	-
14	+	-
15	+	+
16	+	-

[0158]

[0159] 통상적인 ADA 분석 및 본 발명에 보고된 바와 같은 간섭-억제된 약물내성 ADA 분석에 의한 TCZ-치료된 RA 환자로부터의 258개의 상이한 혈청 샘플의 비교 평가는 12개의 샘플에서 동일한 양성 결과를 나타내었다. 상기 통상적인 분석은 27명의 위약 환자가 양성인 것으로 측정된 반면 본 발명에 보고된 바와 같은 간섭-억제된 약물내성 ADA 분석은 단지 4명뿐이었다. 결론적으로, 본 발명에 개시된 바와 같은 수단 및 ADA 분석 첨가제로서 올리고머성 인간 IgG의 첨가의 조합은 통상적인 ADA 분석에 비해 증가된 약물내성 및 억제된 RF에 의한 간섭을 부여하였다.

[0160] 상기 언급된 데이터의 부분집합 분석을 하기 표 7에 나타낸다.

[0161] [표 7]

환자	통상적인 ELISA		간섭-억제된 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

[0162]

[0163] 연구 관련된 CP: 0.215(통상적인 ELISA); 0.058(간섭-억제된 ELISA); +: 양성 ELISA 결과; -: 음성 ELISA 결과

[0164] 표 8a에서 TCZ로 치료되지 않은 27명의 위약 환자에 대한 분석 신호를 나타낸다. TCZ-치료 유도된 ADA의 부재로 인해, 상기 그룹에서 높은 분석 신호는 예상되지 않으며 상기 신호는 잠재적인 간섭을 가리킬 것이다.

[0165] [표 8a]

환자	통상적인 ELISA		간접-억제된 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

[0166]

[0167] 연구 관련된 컷-포인트(CP): 0.215(통상적인 ELISA); 0.058(간접-억제된 ELISA); +: 양성 ELISA 결과; -: 음성 ELISA 결과

[0168] 상기 두 분석 모두의 신호 패턴은 매우 상이하다: 27개 위약 샘플 모두 통상적인 ELISA를 사용하여 양성인 것으로 측정된 반면, 본 발명에 보고된 바와 같은 간접-억제된 ELISA의 경우 상기 27개 샘플 중 단지 4개만이 양성인 것으로 측정되었다.

[0169] 위약-치료된 환자 외에, TCZ-치료된 환자의 샘플을 분석하였다. 표 8b에서 TCZ-치료 전 환자에 대한 결과를 나타낸다. 표 8c에서 TCZ-치료된 환자에 대한 결과를 나타낸다.

[0170] [표 8b]

환자	시점	통상적인 ELISA		간접-억제된 ELISA		투여
P2	기준선	+	1.009	+	0.893	4
P16	기준선	+	0.745	-	0.021	8
P17	기준선	+	0.281	-	0.020	8
P18	기준선	+	1.401	-	0.023	4

[0171]

[0172] 연구 관련된 CP: 0.215(통상적인 ELISA); 0.058(간접-억제된 ELISA); +: 양성 ELISA 결과; -: 음성 ELISA 결과

[0173] [표 8c]

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

[0174]

[0175] 연구 관련된 CP: 0.215(통상적인 ELISA); 0.058(간접-억제된 ELISA); +: 양성 ELISA 결과; -: 음성 ELISA 결과

[0176] 본 발명에 보고된 바와 같은 분석은 사용된 치료 항체 및 표적과 독립적인 이점을 제공한다. 이를 류머티스성 관절염에 대해 양성으로 진단된 환자의 샘플을 사용하여 항-IL6R 항체, 항-IGF-1R 항체, 항-IL13R알파 항체, 항-OX40L 항체 및 항-A베타 항체에 대해 하기 표에 나타낸다.

[0177] [표 9a]

항-IL6R 항체				
환자	통상적인 ELISA		간접-억제된 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

[0178]

[0179]

[표 9b]

항-IGF-1R 항체				
환자	통상적인		간섭-억제된	
	ELISA		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	

[0180]

[0181]

[표 9c]

항-IL13Rα과 항체				
환자	통상적인		간섭-억제된	
	ELISA		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	

[0182]

[0183]

[표 9d]

항-OX40L 항체				
환자	통상적인		간섭-억제된	
	ELISA		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	

[0184]

[0185] [표 9e]

항-A베타 항체				
환자	통상적인 ELISA		간섭-억제된 ELISA	
	P25	+	0.063	-
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

[0186]

[0187] 하기의 실시예 및 도면을 본 발명의 이해를 돕기 위해서 제공하며, 그의 진정한 범위는 첨부된 특허청구범위에서 설명된다. 변형을 본 발명의 진의로부터 이탈됨 없이 설명된 과정에서 수행할 수 있는 것으로 생각된다.

[0188] **실시예**

[0189] **물질 및 방법**

[0190] 정제된 혼주(pooled) 인간 면역글로불린 부류 G(IgG)를 문헌[Stubenrauch et al., Anal. Biochem. 390 (2009) 189-196]에 개시된 바와 같이 제조하였다. 간단히, 건강한 공여자로부터의 인간 혼주 혈청을 에어로실(Aerosil)(이산화 규소, 1.5%(w/v))로 지질제거하고 암모늄 설페이트(ad 2.0 M)로 침전시켰다. 펠릿을 포스페이이트 완충제 중에서 균질화하고 포스페이이트 완충제(pH 7.0)에 대해 투석시켰다.

[0191] 상기 혼합물을 pH 7.0에서 DEAE 이온 교환 크로마토그래피에 의해 분리시키고 처리액 중의 IgG를 5.93 mg/ml로 농축시키고 젤 여과에 의해 정제시켰다.

[0192] 다클론성 항-디곡시제닌-양고추냉이 퍼옥시다제(HRP) 접합체(Fab 단편)를 룩슈 다이아그노스틱스 GmbH(Roche Diagnostics GmbH)(독일 만하임 소재)(cat.no. 11633716)로부터 취득하였다. 양성 품질 조절(QC) 및 교정 표준(CS)으로서 사용되는 다클론성 토끼 항-TCZ 항체(0.5 mg-당량/ml)를 상기 문헌[Stubenrauch et al.]에 개시된 바와 같이 제조하였다.

[0193] 개별적인 인간 혈청 샘플은 룩슈 다이아그노스틱스 GmbH의 혈청 은행(독일 펜즈베르크 소재)에 의해 제공되었다. 음성 대조용의 인간 혼주 혈청 기질은 TCS 바이오사이언시즈 리미티드(Biosciences Ltd.)(영국 버킹엄 소재)에 의해 공급되었다.

[0194] 하기의 시약들을 룩슈 다이아그노스틱스 GmbH(독일 만하임 소재)로부터 취득하였다: 2,2'-아지도-비스(3-에틸벤즈티아졸린-6-설폰산(ABTS) 기질(cat.no. 11684302-001), ELISA용 세척 완충제: 포스페이이트-완충된 염수(PBS)(0.01M KH₂PO₄, 0.1M Na₂HPO₄, 1.37M NaCl, 0.027M KCl; pH 7.0)/0.05% 폴리솔베이트 20(트윈 20)(cat.no. 11332465-001), 및 ELISA에서 희석 완충제로서 사용된 바로 사용 가능한 범용 완충제(cat no.4742672).

[0195] 스트렙타아비딘-코팅된 미세적정 플레이트(SA-MTP)를 마이크로코트 바이오테크놀로지 GmbH(MicroCoat Biotechnologie GmbH)(독일 베른리드 소재)로부터 취득하였다. 코팅되지 않은 닝크(Nunc) 96-마이크로웰 플레이트를 피셔 사이언티픽 GmbH(Fisher Scientific GmbH)(독일 슈베르테 소재)(cat no. 442587)로부터 취득하였으며 예비-배양에 사용하였다.

[0196] 통상적인 항-약물 항체 분석:

[0197] 상기 분석을 실온에서 수행하였다. 첫 번째 단계에서, TCZ-Bi를 진탕기상에서 400 rpm에서 1시간 동안 100 μl를 배양함으로써 0.5 μg/ml의 농도로 SA-MTP에 결합시켰다. 상기 SA-MTP에 상기 예비-배양 용액을 가하기 전에, 과잉의 결합되지 않은 TCZ-Bi를 3회 세척에 의해 제거하였다. 상기 코팅 과정과 병행하여, 표준물 및 샘플의 예비-배양을 별도의 코팅되지 않은 96-웰 플레이트에서 중복 수행하였다. 상기 샘플 및 표준물을 10% 혈청 기질이 있는 웰에서 75 μl의 부피로 희석하고(1:10) 동일한 부피의 TCZ-DIG와 혼합하여, 1시간 예비-배양 기간을 시작하였다. 상기 TCZ-Bi-코팅된 SA-MTP를, 상기 예비-배양 플레이트의 각 웰로부터 상기 코팅된 MTP의

웰에 100 μ l를 옮김으로써 상기 예비-배양 용액과 함께 로딩하고 진탕기상에서 400 rpm에서 1시간 동안 배양하였다. 세척 후에, 100 μ l(100 mU/ml) 부피의 다클론성 항-Dig 양고추냉이 퍼옥시다제(HRP) 접합체를 상기 웰에 가하고 진탕기상에서 1시간 동안 배양하였다. 세척 후에, 상기 HRP-촉매화된 색상-생성 반응을 100 μ l ABTS 용액의 첨가에 의해 개시시켰다. 최대 광학 밀도(OD)가 약 2.0일 때, 대개는 20 내지 30분 이내에, 상기 색상 반응의 신호를 405 nm(기준, 490 nm)의 파장에서 ELISA 관독기에 의해 측정하였다. 동일한 분석을 확인 시약의 존재하에서 수행하고, 동시에 상기 확인 시약 없이 측정을 수행하였다. 상기 획득된 OD 데이터를, 상기 샘플 농도의 계산을 위해서 비머-로드바르트(Wiemer-Rodbard) 방법에 따라 비선형 4-매개변수 회귀 곡선 정합에 의해 표준 검량 곡선의 생성에 사용하였다.

[0198] 상기 시험 결과의 컷오프 점들은 건강한 자원자 및 RA 환자로부터의 인간 블랭크 혈청 샘플의 수회 분석으로부터 분석 신호(OD)의 95% CI에서 지정되었다. 선별 시험 결과는 상기 컷오프 이상의 값에서 양으로 간주되었다. 비-스파이크(spiked) 샘플에 비해 >20%의 흡광도의 감소는 양의 결과를 가리켰다. 상기 선별 컷오프를 61.4 ng/ml의 기준 항체에서 측정하였다. 분석내 및 분석간 정확도는 각각 84.8% 내지 93.1% 및 91.3% 내지 92.2%이었다. 상기 분석내 및 분석간 정밀도에 대한 상응하는 값은 1.8% 내지 2.0% 및 6.8% 내지 8.0%이었다. 상기 ELISA의 정확도는 분석 결과가 참값과 일치하는 정도에 의해 정의되었다. 정확도를, 인간 혈청에 스파이크된 토끼 다클론성 항-TCZ-양성 대조용 표준의 측정된 농도를 항-TCZ의 공칭 농도와 비교함으로써 측정하였다. 고농도(360 ng 당량/ml) 및 저농도(60 ng 당량/ml) 양성 대조용 표준을, 분석내 정확도를 측정하기 위해 중복해서 측정된 각각의 양성 대조용 표준의 6개 분액, 및 분석간 정확도를 측정하기 위해 중복해서 측정된 각각의 양성 대조용 표준의 3개의 분액에서 분석하였다.

[0199] 실시예 1

[0200] 항-IL6R 항체 토실리주맵의 비오틴화

[0201] a) 통상적으로 비오틴화된 IgG의 제조

[0202] 상기 항-IL6R 항체 토실리주맵을 완충제(100 mM 칼륨 포스페이트 완충제(하기에 K-PO4로서 나타내었다), pH 8.5)에 대해 투석시켰다. 그 후에 상기 용액을 5 mg/ml의 단백질 농도로 조절하였다. D-비오틴노일-아미노카프로산-N-하이드록시숙신이미드 에스터를 다이메틸 설펝사이드(DMSO)에 용해시키고 상기 항체 용액에 1:5의 물비로 가하였다. 60분 후에 상기 반응을 L-리신의 첨가에 의해 중지시켰다. 과잉의 상기 표지 시약을, 150 mM KCl, pH 7.5가 보충된 50 mM K-PO4에 대해 투석시켜 제거하였다. TCZ-Bi의 분액을 -80 °C에서 6.5% 슈크로스를 포함시켜 보관하였다.

[0203] b) 단일 비오틴화된 IgG의 제조

[0204] 상기 항-IL6R 항체 토실리주맵을 100 mM K-PO4, pH 8.5에 대해 투석시키고, 그 후에 상기 용액을 5 mg/ml의 단백질 농도로 조절하였다. D-비오틴노일-아미노카프로산-N-하이드록시숙신이미드 에스터를 다이메틸 설펝사이드(DMSO)에 용해시키고 상기 항체 용액에 1:1의 물비로 가하였다. 60분 후에 상기 반응을 L-리신의 첨가에 의해 중지시켰다. 과잉의 상기 표지 시약을, 150 mM KCl, pH 7.5가 보충된 50 mM K-PO4에 대해 투석시켜 제거하였다. 상기 혼합물을 1M 암모늄 설펝아이드를 포함하는, 100 mM K-PO4, 150 mM KCl, pH 7.2를 갖는 완충제로 옮기고 스트렙타비딘 뮤테인 세파로스가 있는 컬럼에 적용하였다. 비오틴화되지 않은 IgG는 처리액 중에 있으며, 단일 비오틴화된 IgG는 100 mM K-PO4, 150 mM KCl, 1.5% DMSO, pH 7.2에 의해 용리시키고, 보다 높은 비오틴화된 집단을 포함하는 비오틴화된 IgG는 100 mM K-PO4, 150 mM KCl, 2 mM D-비오틴, pH 7.2에 의해 용리시킨다. 상기 단일 비오틴화된 항체를 150 mM KCl, pH 7.5가 보충된 50 mM K-PO4에 대해 투석시켰다. 상기 분액을 -80 °C에서 6.5% 슈크로스를 포함시켜 보관하였다.

[0205] 실시예 2

[0206] 항-IL6R 항체 토실리주맵의 디곡시제닌화

[0207] a) 통상적으로 디곡시제닌화된 IgG의 제조

[0208] 상기 항-IL6R 항체 토실리주맵을 완충제(100 mM 칼륨 포스페이트 완충제(하기에 K-PO4로서 나타내었다), pH 8.5)에 대해 투석시켰다. 그 후에 상기 용액을 5 mg/ml의 단백질 농도로 조절하였다. 디곡시제닌 3-O-메틸카보닐- ϵ -아미노카프로산-N-하이드록시숙신이미드 에스터를 DMSO에 용해시키고 상기 항체 용액에 1:4의 물비로 가하였다. 60분 후에 상기 반응을 L-리신의 첨가에 의해 중지시켰다. 과잉의 상기 표지 시약을, 150 mM KCl, pH 7.5가 보충된 50 mM K-PO4에 대해 투석시켜 제거하였다. 디곡시제닌화된 TCZ(TCZ-Dig)를 -80 °C에서 6.5%

슈크로스를 포함하는 분액 중에 보관하였다.

[0209]

b) 단일 디곡시제닌화된 IgG의 제조

[0210]

상기 항-IL6R 항체 토실리주맵을 100 mM K-PO4, pH 8.5에 대해 투석시키고, 그 후에 상기 용액을 5 mg/ml의 단백질 농도로 조절하였다. 디곡시제닌 3-O-메틸카보닐-ε-아미노카프로산-N-하이드록시숙신이미드 에스터를 다이메틸 설펍사이드(DMSO)에 용해시키고 상기 항체 용액에 1:1의 물비로 가하였다. 60분 후에 상기 반응을 L-리신의 첨가에 의해 중지시켰다. 과잉의 상기 표지 시약을, 150 mM KCl, pH 7.5가 보충된 50 mM K-PO4에 대해 투석시켜 제거하였다. 상기 혼합물을 디곡시제닌에 대한 고정화된 단클론 항체가 있는 세파로스 컬럼에 적용시켰다. 디곡시제닌화되지 않은 항체는 처리액 중에 있으며, 단일 디곡시제닌화된 IgG는 온화한 용리 완충제(써모 사이언티픽, #21013)에 의해 용리시키고, 보다 높은 디곡시제닌화된 집단을 포함하는 디곡시제닌화된 항체는 1M 프로피온산으로 용리시킨다. 상기 단일 디곡시제닌화된 항체를 갖는 분획을 20 mM 트리스, 20 mM NaCl, pH 7.5에 대해서 1차 및 50 mM K-PO4, 150 mM KCl, pH 7.5에 대해서 2차 투석시켰다. 상기 분액들을 -80 °C에서 6.5% 슈크로스를 포함시켜 보관하였다.

[0211]

실시예 3

[0212]

올리고머 형태의 인간 IgG의 생성

[0213]

이온 교환 크로마토그래피에 의해 인간 혈청으로부터 정제된 인간 IgG를 100 mM NaCl, pH 8.4를 함유하는 150 mM 칼륨 포스페이트 완충제에 대해 투석시키고, 상기 단백질 용액을 50 mg/ml의 단백질 농도로 농축시켰다. 다이숙신이미드 수베레이트(DSS)를 DMSO에 용해시키고 1:6(IgG:DSS)의 물비로 상기 항체 용액에 가하였다. 상기 혼합물을 25 °C 및 pH 8.4에서 교반하면서 배양하고 상기 반응물을 분석학적 젤 여과 컬럼(예를 들어 TSK 4000 컬럼 사용)으로 분석하였다. 상기 중합을 140분 후에 리신을 20 mM의 최종 농도로 가하여 중지시켰다. 25 °C에서 45분 배양 후에 상기 올리고머성 인간 IgG를 젤 여과(예를 들어 세파크릴 S400 컬럼 사용)에 의해 분리시켜 저분자 분획을 제거하였다. 상기 올리고머의 조성을 UV 분광분석, 크기 배제 크로마토그래피 및 SDS-PAGE 젤 전기영동에 의해 특성화시켰다. 상기 올리고머성 인간 IgG를 분액하고(10.5 mg/ml) 이를 상기 면역분석에서 ADA 분석 첨가제(AAA)로서 사용하기 위해 55.6 µg/ml의 농도로 범용 완충제(cat no. 4742672)로 새로 희석할 때까지 -65 °C에서 보관하였다.

[0214]

실시예 4

[0215]

교정 표준 및 품질 조절 샘플의 제조

[0216]

교정 표준(CS) 및 품질 조절 샘플(QC)용 모액을 별도로 제조하였다. 상기 CS 샘플을 TCZ의 0.5 mg/ml 모액을 사용하여 분석 당일에 신선하게 제조하였다. 인간 혼주 혈청(HPS)으로 예비-희석 후에, 상기 분석에 사용하기 전에 생성되는 CS 작용 용액을 100% HPS로 단계적으로 1:1 희석하여 1,000; 500; 250; 125; 62.5; 31.3; 및 15.6 ng/ml의 교정 농도를 제공하였다. 음성 대조군은 100% HPS였다. 상기 분석에서 예비-배양 단계를 위해서, 상기 CS 샘플을 1:10 희석하여 10%의 혈청 농도 및 100 ng/ml의 분석 농도 범위를 1.56 ng/ml로 조절하였다.

[0217]

상기 사용된 QC 모액 샘플을 100% 인간 혼주 혈청에서 제조하고 -20 °C에서 1회 사용 분액으로서 보관하였다. 3개의 별도의 QC 샘플을 제조하고 높은(750 ng/ml), 중간(400 ng/ml) 및 낮은(50 ng/ml) 희석되지 않은 혈청 농도를 나타내는 모액 농도로 보관하였다. 상기 분석에서 예비-배양 단계를 위해서, 상기 QC 샘플을 상기 포획/검출 용액 중에서 1:10으로 신선하게 희석하여 10%의 혈청 농도에 도달시켰다. 25 ng/ml의 상기 분석의 전형적인 컷-포인트에서 네 번째 QC 샘플을 추가로 사용하였다.

[0218]

실시예 5

[0219]

ADA 선별 및 확인 분석

[0220]

샌드위치 ELISA를 토실리주맵(TCZ)에 대한 항-약물 항체(ADA)의 선별 및 확인 모두에 사용하였다(문헌 [Stubenrauch, K., et al., Clin. Ther. 32 (2010) 1597-1609]을 참조하시오). 상기 방법의 원리는 TCZ-Dig 및 TCZ-Bi와의 복합체 중 ADA의 포획이며, 상기 TCZ-Bi는 스트렙타아비딘-코팅된 플레이트상에 고정화를 유도한다. 상기 SA-MTP에 결합된 TCZ-Bi/ADA/TCZ-Dig 복합체는 항-Dig-HRP 효소 접합된 항체에 의해 검출되었다. 상기 약물-내성 항-약물 항체 분석의 원리를 도 1에 도시한다. ADA 분석 첨가제로서 올리고머성 IgG의 포함은 도 2에 도시된 바와 같이 간접-억제된 항-약물 항체 분석을 도출한다. 상기 다클론성 항체의 양고추냉이 퍼옥

시다제(HRP)는 상기 기질 ABTS의 색상 반응을 촉매화한다. 상기 색상 강도는 상기 분석물의 농도에 비례한다.

[0221] 상기 선별 분석을 실온에서 수행하였다. 시약 및 혈청 샘플을 범용 완충제(cat no.4742672)로 희석하였으며, 모든 세척 단계를 세척 완충제(PBS, 0.05% 폴리솔베이트 20(트윈(등록상표) 20)(cat.no. 11332465-001))로, 웰 당 300 μ l로 3회 수행하였다. 배양을 500 rpm에서 미세적정 플레이트 진탕기(MTP 진탕기)상에서 진탕하에 수행하였다. 시험 샘플, QC 및 CS 샘플을 포획 항체 TCZ-Bi 및 검출 항체 TCZ-Dig와 함께 밤새(16시간 이하) 배양하였다. 상기 예비-배양 미세적정 플레이트(MTP)의 각 웰에 올리고머성 인간 IgG ADA 분석 첨가제(AAA)와 함께 1.667 μ g/ml TCZ-Bi 및 1.667 μ g/ml TCZ-Dig를 함유하는 포획/검출 용액 225 μ l를 로딩하고 그 후에 25 μ l의 각 샘플을 가하였다. 상기 TCZ-Bi 및 TCZ-Dig의 생성 농도는 각각 1.5 μ g/ml이었으며 상기 올리고머성 인간 IgG는 50 μ g/ml의 농도를 가졌다. 상기 로딩된 MTP를 덮어 증발을 방지하였으며 밤새 배양시켰다. 상기 예비-배양 플레이트의 각 웰 중 100 μ l의 복제물들을 스트랩트아비딘-코팅된 미세적정 플레이트(SA-MTP)의 웰들로 옮기고 이를 덮어 1시간 동안 배양시켰다.

[0222] 세척 후에, 25 mU/ml의 농도를 갖는 상기 다클론성 항-Dig Fab-HRP 접합체를 각 웰에 100 μ l의 부피로 가하고 1시간 동안 배양시켰다. 세척 후에, 상기 ABTS 즉시 사용가능한 용액을 각 웰에 100 μ l의 분액으로 가하고 약 10 내지 15분 동안 진탕하면서 배양시켰다. 상기 색상-생성 반응의 신호를 405 nm 파장(기준 파장: 490 nm)에서 ELISA 판독기에 의해 측정하였다. 각 혈청 샘플의 흡광도 값을 3회 중복하여 측정하였다. 최고의 표준은 1.8 내지 2.2의 임의의 단위(AU)의 광학 밀도(OD)에 도달해야 한다. 상기 획득된 OD 데이터를 상기 샘플 농도의 계산을 위해서 비-선형 4-매개변수 정합 "비머 로드바르트"에 의해 표준 검량 곡선을 생성시키는데 사용하였다. 상기 농도의 회복이 특이성 컷-포인트 미만인 경우 샘플은 ADA에 양성인 것으로 확인되었다.

[0223] 상기 특이성 컷-포인트의 평가를 하나의 MTP상의 복제물에서 32개의 류머티스성 관절염 환자의 개별적인 블랭크 인간 혈청 샘플의 분석에 의해 수행하였다. 상기 컷-포인트는 샘플이 상기 ADA 선별 분석에서 ADA의 존재에 대해 잠재적으로 양성인 것으로서 한정되는 신호 이상의 신호를 명시한다. 상기 데이터의 비-정규성으로 인해, 95% 백분위수를 갖는 비-모수적 접근법을 반복된 플레이트상의 컷-포인트들의 평균을 기준으로 컷-포인트 계산에 적용하였다.

[0224] 상기 32개의 류머티스성 관절염 환자의 개별적인 인간 블랭크 혈청 샘플의 중복 측정으로부터의 ADA 분석의 컷-포인트 측정을 위해 수행된 실험은 약 0.009의 표준 편차(SD)로 3개의 상이한 플레이트상에서 약 0.026의 평균 AU를 밝혀냈다. 상응하는 변동 계수(CV)는 각각 23.8%; 20.0%; 및 19.0%이었다. 이들 데이터 세트를 근거로, NF = 1.6905의 정규화 인자가 유도되었으며 이를 상기 분석 정성분석 전체를 통해 사용하고 플레이트-특이성 컷-포인트(플레이트 특이성 컷-포인트[AU] = 신호[AU](음성 대조군) x NF)에 적용하였다.

[0225] 상기 선별 ADA 분석의 정성분석을 위해서, 1.56 ng/ml 내지 100 ng/ml의 분석 농도 범위를 갖는 7개의 교정 샘플 및 블랭크 샘플에 의한 5개의 독립적인 검량곡선 제제를 하나의 플레이트상에서 중복해서 측정하였다. 상기 분석내 정성분석 실험을 5회 중복해서(5개의 별도의 바이알) 수행하였으며 이때 4개의 QC 샘플을 각각 단일 플레이트상에서 중복해서 측정하였다. 중복해서 측정된 모든 QC 샘플에 대한 분석간 정성분석 데이터를 4개의 상이한 날에 2명 이상의 조작자에 의해 수행된 7개의 독립적인 시험 실험으로부터 획득하였다.

[0226] 상기 간섭-억제된 ELISA의 전형적인 검량 곡선을 도 3에 도시한다. 샘플들의 중복 측정의 정밀도를 상기 정성 분석 실험 동안 평가하였으며 그의 CV는 15%를 초과하지 않았다. 상기 간섭-억제된 ADA ELISA의 분석내 및 분석간 정밀도 및 정확도 값을 표 5에 요약한다.

[표 5]

인간 혈청내에 스파이크된 토실리주맙-특이성 ADA를 사용한 간섭-억제된 ELISA의 분석내 및 분석간 정밀도 및 정확도의 측정						
	100 % 혈청 중 ADA 농도 [ng/ml]					
	분석내 (n=5)			분석간 (n=7)		
	높은 QC	중간 QC	낮은 QC	높은 QC	중간 QC	낮은 QC
스�파이크된(예상된 농도)	750	400	50	750	400	50
측정된 농도의 평균	683	382	50.8	696	402	52.5
측정된 농도의 SD	15.6	15.8	1.33	21.2	13.6	2.8
정밀도 (% CV)	2.28	4.14	2.62	3.04	3.38	5.33
정확도 (% 회수)	91.1	95.5	102	92.8	101	105

[0228] 상기 측정된 분석내 정밀도는 25 ng/ml의 컷-포인트 QC를 포함하여 모든 QC에 대해 <5%였다. 상기 측정된 분석

내 정확도는 91.1% 내지 102%의 범위였고 모든 컷-포인트 QC 샘플들은 양성으로 시험되었다. 역-계산된 QC에 대한 분석간 정밀도는 모든 QC에 대해서 <6%이었다. 상기 측정된 분석간 정확도는 높은, 중간 및 낮은 QC에 대해서 92.8% 내지 105%이었다. 모든 컷-포인트 QC 측정은 ADA-양성을 제공하였다.

[0230] 잠재적인 고-용량 후크(hook) 효과를 25,000 ng/ml 내지 6.1 ng/ml의 분석 농도 범위내의 양성 대조용 샘플의 연속 적정(1:2)에 의해 평가하였다. 상기 분석 범위내 ADA 농도의 회복은 77.9% 내지 98.9%이었다. 잠재적인 기질 효과의 분석을 위해서, 11개의 개별적인 정상 인간 혈청 샘플을 양성 대조용 ADA와 함께, 고용량 및 저용량 QC, 즉 100% 혈청 중 50 및 750 ng/ml로 스파이크하고 정량분석하였다. 또한, QC 샘플을 상기 동일한 플레이트상에서 또한 분석하였다. 상기 낮은 및 높은 ADA 농도의 회복은 111%(범위: 104 내지 117%) 및 111%(범위: 107 내지 117%)이었으며, 이는 상기 간섭-억제된 ADA ELISA에서 기질 효과가 존재하지 않음을 가리켰다.

[0231] 상기 약물내성을, 주어진 농도의 양성 대조용 ADR가 상기 컷-포인트 이상에서 검출될 수 있는 최고의 TCZ 농도를 측정함으로써 평가하였다. 표 2는 완전한 데이터 세트의 요약을 나타낸다.

[0232] [표 2]

본 발명에 보고된 바와 같은 간섭-억제된 약물내성 항-약물 항체 ELISA에서 약물 (토실리주맵)내성의 측정. 좌측-정렬된 신호값은 0.045 AU의 플레이트-특이성 컷-포인트 이상이고, 우측-정렬된 값은 상기 컷-포인트 이하이다.							
TCZ [$\mu\text{g/ml}$]							
	100	30	10	3	1	0	
ADA [ng/ml]	신호 평균 [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	

[0233] 임상 샘플 중에서 검출되는 항-IL6R 항체 토실리주맵의 농도는 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 이상이거나, 종종 1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 범위이다. 30 ng/ml의 매우 낮은 ADA 농도가 10 $\mu\text{g/ml}$ TCZ의 존재하에서 검출되었으며 양성으로 시험되었다. 더욱 또한 100 ng/ml 및 300 ng/ml의 ADA 농도는 각각 30 $\mu\text{g/ml}$ 및 심지어 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 약물 항체 내성을 나타낸다. 토실리주맵에 대해서 앞서 사용된 2-단계 통상적인 ADA ELISA에 의해 수행된 동일한 실험은 상기 간섭-억제된 분석에 의해 10배 이상 더 높은 약물 내성을 나타내었다(300 ng/ml ADA 농도에 대해서 도 4를 참조하시오).

[0234] 상기 확인 분석에서 과잉의 유리 약물로서 사용되는 TCZ의 농도는 상기 약물 간섭 실험에서 획득된 데이터 세트에 근거하였다. 상기 샘플 중 높은 수준의 ADA를 억제할 수 있는 TCZ 농도를 평가하기 위해서, 4개의 상이한 농도의 양성 대조용 샘플(100% 혈청 중 1,000; 500; 250; 83.3 ng/ml)을 각각 증가하는 농도의 TCZ(100% 혈청 중 0; 16; 31; 63; 125; 250 $\mu\text{g/ml}$)와 함께 배양하였다. 높은 농도의 양성 대조용 ADA에서 측정된 신호의 95% 이상(5% 미만의 신호 회복에 상응함)를 억제하는 TCZ 농도는 25 $\mu\text{g/ml}$ 의 TCZ인 것으로 측정되었다.

[0235] 나중의 연구중 시험시기 동안 연구 샘플 중 ADA의 친화성 차이로 인한 위-음성의 가능성을 감소시키기 위해서, 상기 측정된 값의 2배 더 과잉의 유리 약물 농도를 추가의 평가를 위해 사용하였다, 즉 100% 혈청 중 400 $\mu\text{g/ml}$ 에 상응하는 40 $\mu\text{g/ml}$ 분석 농도를 사용하였다.

[0236] 특이적인 ADA를 확인하기 위해 필요한 최소 신호 억제값을 TCZ와 함께 16개의 류머티스성 관절염 환자의 개별적인 블랭크 인간 혈청 샘플의 예비-배양에 의해 측정하고 하나의 시험 실행에서 중복 분석하였다. 상기 분석을 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 유리 TCZ의 존재 및 부재하에서 수행하였다. 유리 TCZ의 첨가는 상기 분석 신호를 -11.5% 내지 34.8% 범위의 14.1%의 평균 및 11.2%의 SD까지 감소시키는 것으로 밝혀졌다. 99.9% 신뢰도 구간(평균 +3.09 SD)을 적용한 결과 블랭크 혈청 샘플에 대해서 49%의 최소 신호 감소가 생성되었다. 상기 계산을 근거로, 샘플을 유리 약물 부재의 경우에 비해 과잉의 유리 약물의 존재하에서 상기 신호가 49%를 초과하여 감소하는 경우 양성 확인으로 평가하였다. 기준 샘플로서, 과잉의 TCZ가 없는 상응하는 샘플을 사용하였다. 상기 확인 분석에서 신호 억제의 재현성을 입증하기 위해서, 높은, 중간 및 낮은 양성 QC 농도를 갖는 혈청 샘플들을 소정 농도의 과잉의 TCZ의 존재 및 부재하에서 3회 분석하였다.

[0237] 상기 TCZ에 대한 간섭-억제된 ADA 분석은 100% 혈청 중에서 1,000 ng/ml 내지 15.6 ng/ml의 ADA 교정기의 측정

범위를 가졌다. 분석내 정밀도는 모든 품질 조절에 대해서 5% 미만이었고 분석내 정확도는 91.1% 내지 102%이었다. 분석간 정밀도 및 정확도는 각각 6% 미만 및 92.8% 내지 105%이었다.

[0239] 상기 분석의 정성분석은 후크 및 기질 효과를 배제하였다.

[0240] 상기 간접-억제된 ADA 분석의 약물내성은 선행 버전의 경우보다 10배 이상 더 높았음을 알 수 있다.

[0241] 상기 확인 분석을, 샘플을 과잉의 유리 약물, 즉 TCZ의 부재 및 존재하에서 병행 분석함을 제외하고 필수적으로 앞서 선별 분석에 대해 개시된 바와 같이 수행하였다. 상기 확인 포획/검출 용액은 상기 샘플의 첨가 후 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TCZ의 최종 분석 농도를 성취하기 위해서 추가적인 과잉의 TCZ(44.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 함께 동일한 부피의 포획/검출 용액을 함유하였다. 과잉의 약물과 함께 확인 조건하에서 신호 억제 퍼센트의 계산을 하기 식을 사용하여 수행하였다:

[0242] $\text{신호 억제\%} = 100 \times (1 - ([\text{AU}]\text{약물-전처리된 샘플}/[\text{AU}]\text{처리되지 않은 샘플}))$.

[0243] 실시예 6

[0244] 임상 샘플에의 간접-억제된 ADA 분석의 적용

[0245] 약물내성을 증가시키는 수단은 1) 비오틴화된 및 디콕시제닌화된 TCZ의 농도를 증가시키고(예를 들어 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지); 2) 상기 혈청 샘플을 TCZ-Bi 및 TCZ-Dig와 동시에 배양시키고; 3) 상기 혈청 샘플을 TCZ-Bi 및 TCZ-Dig와 연장 배양시키고(예를 들어 밤새); 4) 리신- 및 탄수화물-커플링된 시약의 혼합물 대신에 오직 리신-커플링된 TCZ-Bi 및 TCZ-Dig 시약을 사용하고; 증가된 혈청 기질 함량(예를 들어 5% 대신에 10%)을 사용하여 12/28 내지 25/28의 ADA 양성의 증가를 생성시키는 것이다.

[0246] 16개의 임상 혈청 샘플을 일련의 3개의 상이한 ADA 분석, 즉 통상적인 ADA 분석, 첨가되는 올리고머성 인간 IgG 없이 본 발명에 보고된 바와 같은 간접-억제된 ADA 분석, 및 올리고머성 인간 IgG의 첨가와 함께 본 발명에 보고된 바와 같은 간접-억제된 ADA 분석에 의해 분석하였다. 결과를 표 6에 요약한다. 상기 16개의 샘플 중에서, 15개가, 단지 수단 1 내지 5만이 수행된 상기 ADA 분석의 버전에서 양성으로 시험된 반면, 통상적인 분석뿐만 아니라 수단 1 내지 6이 수행된 본 발명에 보고된 바와 같은 간접-억제된 약물내성 ADA 분석에서 오직 8/16만이 양성으로 시험되었고, 상기 8개의 샘플 중 7개에서 동일한 결과를 가졌다. 상기 동일한 결과를 갖는 7개의 샘플은 상기 샘플 및/또는 기준선에서 낮은 RF 농도를 특징으로 하였다. 7개의 샘플은 모두 진정한 토실리주맙 특이성 ADA를 가리키는 토실리주맙의 Fab 부분에 결합된 IgG 아이소타입의 ADA를 함유하였다. 상기 7개의 샘플 중 3개는 또한 IgM 아이소타입 ADA를 가졌으나, 상기도 또한 상기 Fab 부분에 결합되었다. 대조적으로, 나머지 샘플 중 대다수는 토실리주맙의 불변 Fc 부분에 결합된 IgM 아이소타입이 우세한 ADA를 가졌다. 이들 샘플은 또한 높은, 즉 >1000 U/mL의 RF 농도를 함유하였다.

[0247]

[표 6]

BIAcore 분석 및 류머티스성 인자 분석에서 상이한 포맷의 ADA 분석에 의한, 토실리주맵으로 치료된 류머티스성 관절염 환자로부터의 16개 샘플의 비교 분석							
샘플 번호	본 발명에 보고된 바와 같은 간섭-억제된 ADA 분석		통상적인 ADA 분석	BIAcore: 하기의 아이소타입/에피토프 결합		RF 분석 [U/mL]	
	첨가제 부재	첨가제 존재		IgG ADA	IgM ADA	연구 샘플	기준선
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

[0248]

[0249]

실시에 5에 보고된 바와 같은 ADA 면역분석을 사용하여, 기준선 및 토실리주맵 투여 후 취한 류머티스성 관절염 환자로부터의 148개의 상이한 혈청 샘플을 분석하였다. 상기 간섭-억제된 ADA 분석에 의한 분석의 결과를 통상적인 ADA 면역분석에 의한 분석에 의해 획득된 결과와 비교하였다. 보다 상세한 분석을 위해서, ADA 아이소타입 및 결합 영역뿐만 아니라 임상 사건에 대한 추가적인 정보와 함께 18명의 상이한 환자로부터의 총 92개 혈청 샘플(상기 148개 중)을 선택하였다. 환자들이 하기의 기준 중 하나 이상을 충족시키는 경우 상기 환자들을 선택하였다: 1) 임의의 시점에서 ADA 양성 면역 반응; 2) 높은 TCZ 혈청 농도; 3) 주입-관련된, 과민성, 또는 과민증과 같은 임상 반응. 상기 ADA의 결합 영역 및 아이소타입의 분석을 앞서 개시된 바와 같은 바이오센서 면역분석으로 수행하였다(문헌[Stubenrauch, K., et al., Anal. Biochem. 390 (2009) 189-196]). 간단히, 표면 플라즈몬 공명(SPR) 분석 구성은 ADA의 차별적인 결합 분석을 위해 완전길이 항체 및 그의 불변(Fc) 및 항원 결합(Fab) 단편들의 고정화에 의해 단일의 바이오센서 칩상의 4개의 나란한 유동셀을 사용하였다. 상이한 아이소타입의 다클론성 인간 ADA를 모방하는 양성 대조용 표준 접합체는, TCZ에 대한 다클론성 토끼 항체를 인간 면역글로블린(Ig) M, IgG, 또는 IgE에 접합시킴으로써 획득되었다(WO 2008/061684를 참조하시오). 류머티스성 인자(RF) 분석을 지멘스 헬스케어 다이아그노스틱스(Siemens Healthcare Diagnostics)(미국 델라웨어주 뉴워크 소재)로부터의 RF 시약을 사용하여 지멘스 BN II 네펠로미터(Nephelometer)상에서 수행하였다. 간단히, 인간 면역글로블린 및 양으로부터의 항-인간 IgG로 이루어지는 면역-복합체로 코팅된 폴리스타이렌 입자는 RF를 함유하는 샘플과 혼합시 응집된다. 상기 응집체는 상기 샘플을 통과하는 광선을 산란시킨다. 상기 산란된 빛의 강도는 상기 샘플 중 각 단백질의 농도에 비례한다. 상기 결과를 공지된 농도의 표준과의 비교에 의해 평가한다.

[0250]

통상적인 및 본 발명에 보고된 바와 같은 간섭-억제된 약물내성 ADA 분석에 의한, TCZ-치료된 RA 환자로부터의

258개의 상이한 혈청 샘플의 비교 평가는 12개의 샘플에서 동일한 양성 결과를 나타내었다. 상기 통상적인 분석은 27명의 위 환자 양성을 측정한 반면 본 발명에 보고된 바와 같은 간섭-억제된 약물내성 ADA 분석은 4명의 위 환자 양성을 측정하였다. 결론적으로, 본 발명에 개시된 바와 같은 수단들과 ADA 분석 첨가제로서 올리고머성 인간 IgG의 첨가의 조합은 통상적인 ADA 분석에 비해 증가된 약물내성 및 억제된 RF에 의한 간섭을 부여하였다.

[0251] 상기 언급된 데이터의 부분집합 분석을 하기 표 7에 나타낸다.

[0252] [표 7]

환자	시점	통상적인 ELISA		간섭-억제된 ELISA		투여
		+	0.812	+	0.110	
P1	주 4	+	0.812	+	0.110	위약
P2	기준선	+	1.009	+	0.893	4 mg/kg
P2	주 4	-	0.097	+	0.088	4 mg/kg
P2	주 9	+	0.276	+	0.228	4 mg/kg
P3	주 8	+	0.349	+	0.566	4 mg/kg
P3	주 24	+	2.405	+	1.760	4 mg/kg
P3	주 28	+	1.307	+	1.001	4 mg/kg
P4	주 4	+	1.409	+	0.242	4 mg/kg
P5	주 28	+	0.219	+	0.060	8 mg/kg
P6	주 8	+	0.387	+	0.688	4 mg/kg
P6	주 12	+	3.689	+	3.721	4 mg/kg
P6	주 24	+	3.506	+	3.722	4 mg/kg
P7	주 4	+	0.771	+	0.058	위약

[0253]

[0254] 연구 관련된 CP: 0.215(통상적인 ELISA); 0.058(간섭-억제된 ELISA); +: 양성 ELISA 결과; -: 음성 ELISA 결과

[0255] 표 8a에서 TCZ로 치료되지 않은 27명의 위약 환자에 대한 분석 신호를 막대 및 숫자로 나타낸다. TCZ-치료 유도된 ADA의 부재로 인해, 상기 그룹에서 높은 분석 신호는 예상되지 않으며 상기 신호는 잠재적인 간섭을 가리킬 것이다.

[0256] [표 8a]

환자	시점	통상적인 ELISA		간섭-억제된 ELISA		투여
		+	0.270	-	0.032	
P8	기준선	+	0.270	-	0.032	위약
P8	주 4	+	0.231	-	0.033	위약
P9	주 8	+	3.736	-	0.055	위약
P9	기준선	+	3.297	+	0.058	위약
P9	주 12	+	2.863	-	0.046	위약
P9	주 4	+	3.739	-	0.052	위약
P1	주 4	+	0.812	+	0.110	위약
P10	주 4	+	0.755	-	0.021	위약
P10	주 4	+	0.635	-	0.021	위약
P11	기준선	+	0.272	-	0.020	위약
P11	주 4	+	0.271	-	0.021	위약
P11	주 4	+	0.234	-	0.020	위약
P12	기준선	+	1.157	-	0.027	위약
P12	기준선	+	1.362	-	0.028	위약
P12	주 4	+	1.149	-	0.029	위약
P4	기준선	+	0.522	-	0.033	위약
P4	주 4	+	1.409	+	0.242	위약
P4	주 4	+	0.651	-	0.047	위약
P13	주 36	+	0.349	-	0.023	위약
P14	주 4	+	0.245	-	0.033	위약
P14	기준선	+	0.276	-	0.035	위약
P14	주 4	+	0.275	-	0.037	위약
P15	주 4	+	0.580	-	0.049	위약
P7	기준선	+	0.990	-	0.056	위약
P7	주 4	+	0.822	-	0.052	위약
P7	주 4	+	0.523	-	0.042	위약
P7	주 4	+	0.771	+	0.058	위약

[0257]

[0258] 연구 관련된 CP: 0.215(통상적인 ELISA); 0.058(간섭-억제된 ELISA); +: 양성 ELISA 결과; -: 음성 ELISA 결과

[0259] 상기 두 분석 모두의 신호 패턴은 매우 상이하다: 27개의 위약 샘플 모두 통상적인 ELISA를 사용하여 양성인 것으로 측정된 반면, 본 발명에 보고된 바와 같은 간섭-억제된 ELISA의 경우 상기 27개 샘플 중 오직 4개만이 양

성인 것으로 측정되었다.

[0260] 위약-치료된 환자 외에 TCZ-치료된 환자의 샘플을 분석하였다. 표 8b에서 TCZ-치료에 앞서 상기 환자들에 대한 결과를 나타낸다. 표 8c에서 TCZ-치료된 환자에 대한 결과를 나타낸다.

[0261] [표 8b]

환자	시점	통상적인 ELISA		간접-억제된 ELISA		투여
		+	0.009	+	0.893	
P2	기준선	+	1.009	+	0.893	4
P16	기준선	+	0.745	-	0.021	8
P17	기준선	+	0.281	-	0.020	8
P18	기준선	+	1.401	-	0.023	4

[0262]

[0263] 연구 관련된 CP: 0.215(통상적인 ELISA); 0.058(간접-억제된 ELISA); +: 양성 ELISA 결과; -: 음성 ELISA 결과

[0264] [표 8c]

환자	시점	통상적인 ELISA		간접-억제된 ELISA		투여
		+	0.009	+	0.893	
P19	주 24	+	0.281	-	0.030	4 mg/kg
P19	주 24	+	0.226	-	0.031	4 mg/kg
P19	주 4	+	0.293	-	0.030	4 mg/kg
P19	주 8	+	0.362	-	0.028	4 mg/kg
P2	주 4	-	0.097	+	0.088	4 mg/kg
P2	주 8	+	0.276	+	0.228	4 mg/kg
P16	주 24	+	0.416	-	0.030	8 mg/kg
P16	주 4	+	0.542	-	0.029	8 mg/kg
P16	주 4	+	0.397	-	0.024	8 mg/kg
P3	주 24	+	2.405	+	1.760	4 mg/kg
P3	주 28	+	1.307	+	1.001	4 mg/kg
P3	주 4	-	0.181	+	0.120	4 mg/kg
P3	주 8	+	0.349	+	0.566	4 mg/kg
P20	주 8	+	0.818	-	0.034	4 mg/kg
P21	주 4	+	0.289	-	0.031	8 mg/kg
P17	주 12	+	0.369	-	0.023	8 mg/kg
P17	주 24	+	0.330	-	0.022	8 mg/kg
P17	주 4	+	0.488	-	0.022	8 mg/kg
P17	주 4	+	0.465	-	0.025	8 mg/kg
P17	주 8	+	0.409	-	0.026	8 mg/kg
P18	주 4	+	1.218	-	0.026	4 mg/kg
P18	주 4	+	1.041	-	0.028	4 mg/kg
P5	주 28	+	0.219	+	0.060	8 mg/kg
P6	주 12	+	3.689	+	3.721	4 mg/kg
P6	주 24	+	3.506	+	3.722	4 mg/kg
P6	주 8	+	0.387	+	0.688	4 mg/kg
P22	주 24	+	0.423	-	0.020	4 mg/kg

[0265]

[0266] 연구 관련된 CP: 0.215(통상적인 ELISA); 0.058(간접-억제된 ELISA); +: 양성 ELISA 결과; -: 음성 ELISA 결과

[0267] 상기 두 분석 모두에 대한 신호 패턴은 유사하지 않다: 25명의 환자가 통상적인 ELISA를 사용하여 양성인 것으로 측정된 반면, 본 발명에 보고된 바와 같은 간접-억제된 ELISA를 사용하는 경우 단지 10명의 환자만이 양성인 것으로 측정되었다.

[0268] 실시예 7

[0269] 포획 및 추적 시약의 유도체화 종류의 영향

[0270] 단일- 대 다중-표지

[0271] 약물내성을 증가시키는 수단은 비오딘화된 및 디곡시제닌화된 TCZ의 농도를 증가시키는 것이며(예를 들어 1.5 µg/ml까지); 이는 점착성 디곡시제닌에 의해 보다 높은 배경을 야기할 수 있었으며; 보다 높은 컷-포인트로 인한 약화된 약물내성을 주의하기 위해서, 단일 비오딘화 및 단일 디곡시제닌화는 보다 높은 포획 및 추적 농도의 존재에 의해 보다 낮은 배경 신호를 제공한다.

[0272] 샌드위치 ELISA를 토실리주맵(TCZ)에 대한 항-약물 항체(ADA)의 선별 및 확인 모두에 사용하였다(문헌 [Stubenrauch, K., et al., Clin. Ther. 32 (2010) 1597-1609]을 참조하십시오). 상기 방법의 원리는 TCZ-Dig(단일) 및 TCZ-Bi(단일)와의 복합체 중 ADA의 포획이며, 상기 TCZ-Bi는 스트렙트아비딘-코팅된 플레이트상에

고정화를 유도한다. 상기 SA-MTP에 결합된 TCZ-Bi/ADA/TCZ-Dig 복합체는 항-Dig-HRP 효소 결합된 항체에 의해 검출되었다. 상기 약물-내성 항-약물 항체 분석의 원리를 도 1에 도시한다. ADA 분석 첨가제로서 올리고머성 IgG의 포함은 도 2에 도시된 바와 같이 간접-억제된 항-약물 항체 분석을 도출한다. 상기 다클론성 항체의 양고추냉이 퍼옥시다제(HRP)는 상기 기질 ABTS의 색상 반응을 촉매화한다. 상기 색상 강도는 상기 분석물의 농도에 비례한다.

[0273] 상기 선별 분석을 실온에서 수행하였다. 시약 및 혈청 샘플을 범용 완충제(cat no.4742672)로 희석하였으며, 모든 세척 단계를 세척 완충제(PBS, 0.05% 폴리솔베이트 20(트윈(등록상표) 20)(cat.no. 11332465-001))로, 웰당 300 μ l로 3회 수행하였다. 배양을 500 rpm에서 미세적정 플레이트 진탕기(MTP 진탕기)상에서 진탕하에 수행하였다. 시험 샘플, QC 및 CS 샘플을 포획 항체 TCZ-Bi 및 검출 항체 TCZ-Dig와 함께 밤새(16시간 이하) 배양하였다. 상기 예비-배양 미세적정 플레이트(MTP)의 각 웰에 올리고머성 인간 IgG ADA 분석 첨가제(AAA)와 함께 1.667 μ g/ml TCZ-Bi(단일) 및 1.667 μ g/ml TCZ-Dig(단일)를 함유하는 포획/검출 용액 225 μ l를 로딩하고 그 후에 25 μ l의 각 샘플을 가하였다. 상기 TCZ-Bi(단일) 및 TCZ-Dig(단일)의 생성 농도는 각각 1.5 μ g/ml이었으며 상기 올리고머성 인간 IgG는 50 μ g/ml의 농도를 가졌다. 상기 로딩된 MTP를 덮어 증발을 방지하였으며 밤새 배양시켰다. 상기 예비-배양 플레이트의 각 웰 중 100 μ l의 복제물들을 스트랩트아비딘-코팅된 미세적정 플레이트(SA-MTP)의 웰들로 옮기고 이를 덮어 1시간 동안 배양시켰다.

[0274] 세척 후에, 25 mU/ml의 농도를 갖는 상기 다클론성 항-Dig Fab-HRP 접합체를 각 웰에 100 μ l의 부피로 가하고 1시간 동안 배양시켰다. 세척 후에, 상기 ABTS 즉시 사용가능한 용액을 각 웰에 100 μ l의 분액으로 가하고 약 10 내지 15분 동안 진탕하면서 배양시켰다. 상기 색상-생성 반응의 신호를 405 nm 파장(기준 파장: 490 nm)에서 ELISA 관독기에 의해 측정하였다. 각 혈청 샘플의 흡광도 값을 3회 중복하여 측정하였다. 최고의 표준은 1.8 내지 2.2의 임의의 단위(AU)의 광학 밀도(OD)에 도달해야 한다. 상기 획득된 OD 데이터를 상기 샘플 농도의 계산을 위해서 비-선형 4-매개변수 정합 "비머 로드바르트"에 의해 표준 검량 곡선을 생성시키는데 사용하였다. 상기 농도의 회복이 특이성 컷-포인트 미만인 경우 샘플은 ADA에 양성인 것으로 확인되었다.

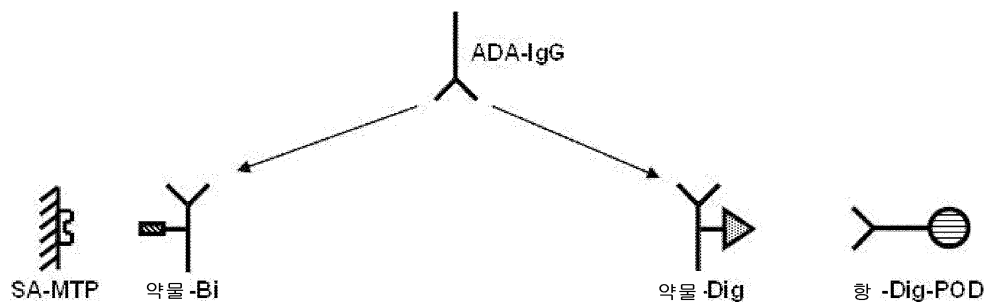
[0275] 컷-포인트를 측정하기 위해서 RD(류머티스성 질병)가 있는 35명 환자의 고유 혈청을 상기 두 분석 모두에서 측정하였다. 도 5 및 6에 도시된 바와 같이, TCZ-Bi(단일) 및 TCZ-Dig(단일)를 갖는 간접-억제된 항-약물 항체 ELISA와 비교하여 상기 간접-억제된 항-약물 항체 ELISA에서 혈청 신호간의 변동이 높다.

[0276] 추가의 평가를 위해서 TCZ-치료된 RA 환자로부터의 상이한 혈청 샘플을 간접-억제된 ADA-분석의 2개의 변형 모두로 분석하였다. 모든 샘플을 TCZ 치료 전에 취했기 때문에(기준선), TCZ에 대한 ADA는 존재하지 않아야 한다. 컷-포인트보다 높은 신호는 치료 약물(TCZ)에 대한 ADA와 관련되지 않은 간접(위 양성)을 가리킬 수 있다.

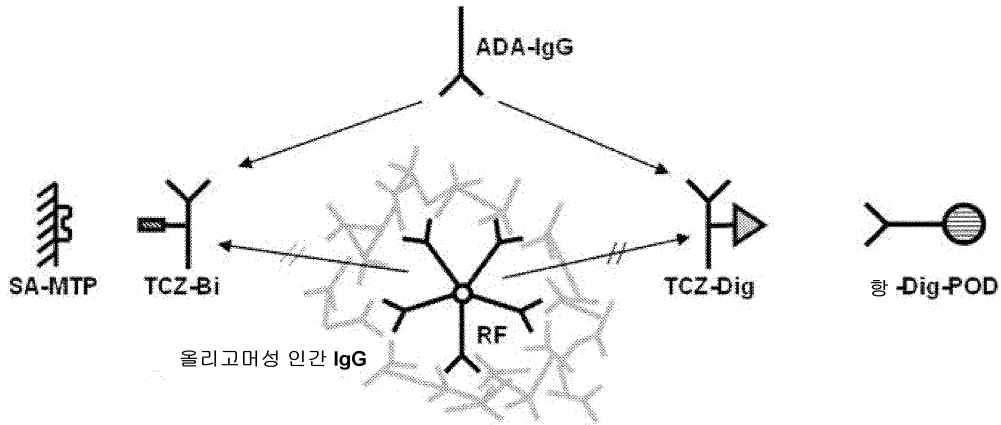
[0277] 다중-표지된 TCZ에 대한 분석(도 7)은 단일 표지된 TCZ에 대한 분석(도 8)보다 더 많은 신호 변동을 나타내었다. 알 수 있는 바와 같이 상기 변동은 상기 시스템의 체계적인 구성이 아니고(상기는 단순히 Y-축상의 이동일 것이다), 획득된 신호의 대역폭의 증가이다. 이러한 분석-특이성 컷-포인트를 사용하는 경우, 상기 간접-억제된 약물-내성 ADA 분석(단일)에서 거의 모든 샘플은 컷-포인트 이하이다. 대개 상기 다중 분석에서 측정된 모든 샘플은 상기 컷-포인트 이상이다.

도면

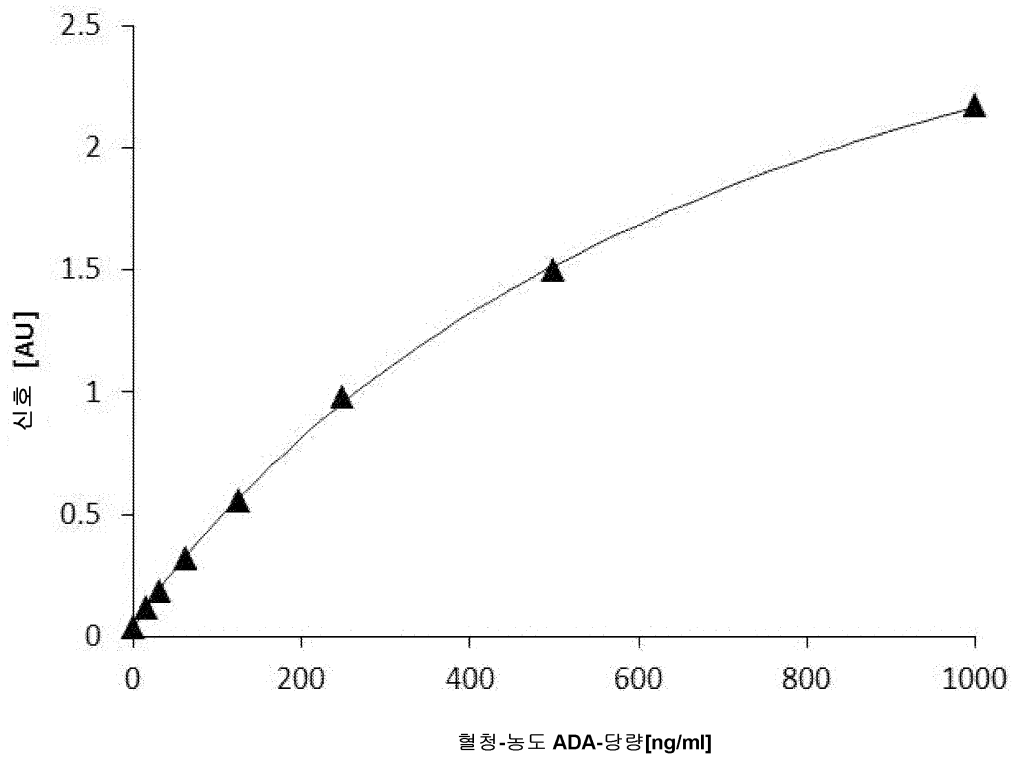
도면1



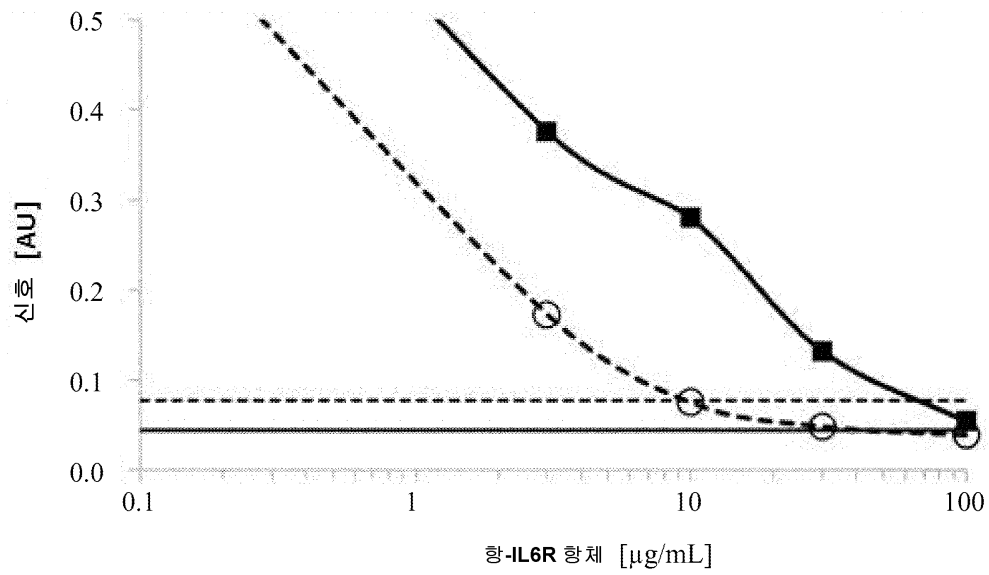
도면2



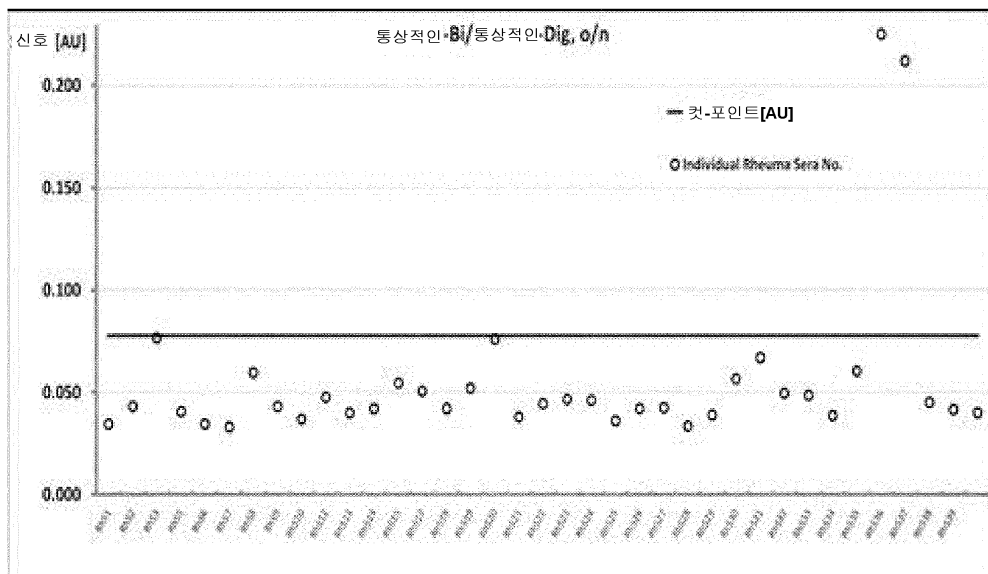
도면3



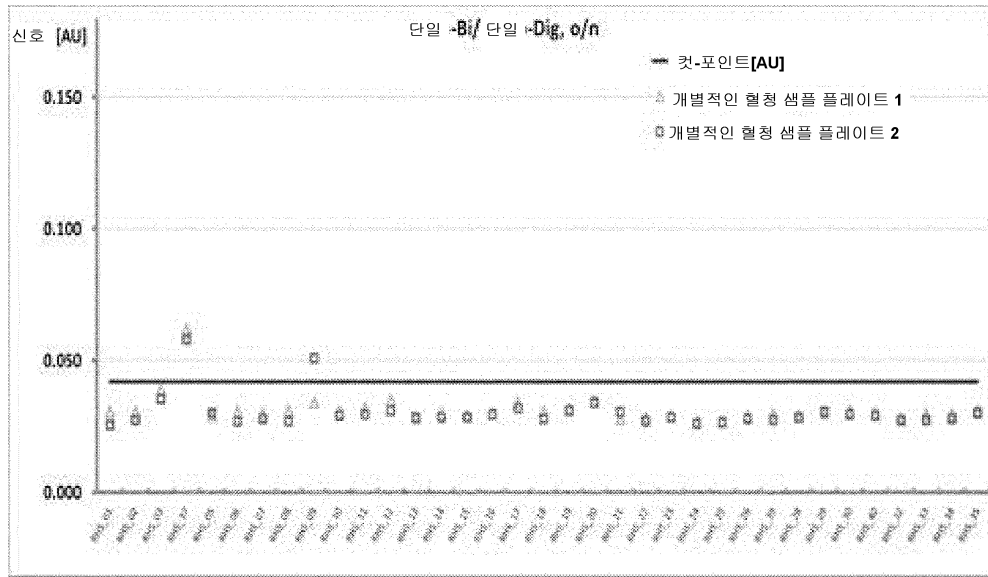
도면4



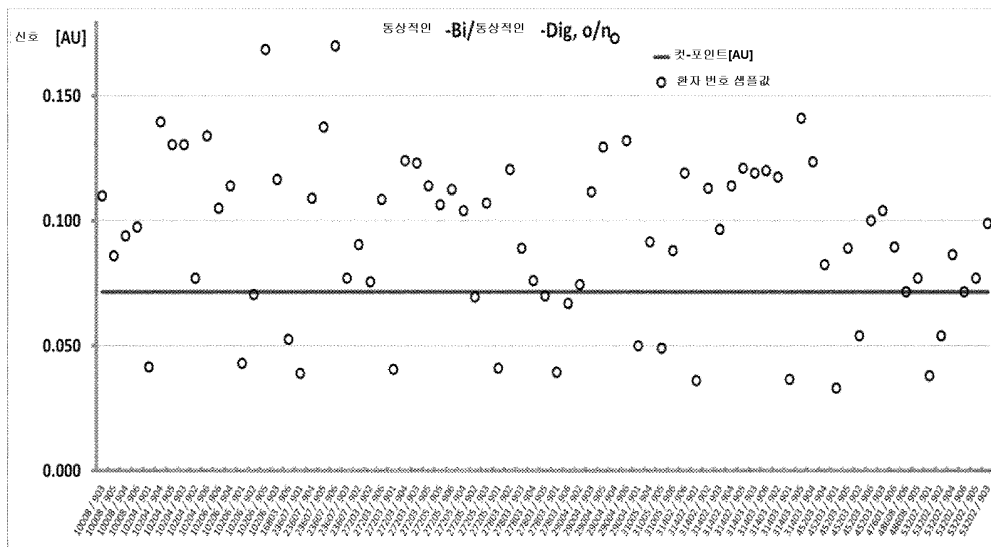
도면5



도면6



도면7



도면8

