

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5662684号  
(P5662684)

(45) 発行日 平成27年2月4日(2015.2.4)

(24) 登録日 平成26年12月12日(2014.12.12)

(51) Int.Cl.	F I
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 N
	GO 1 N 33/53 S

請求項の数 13 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2009-549628 (P2009-549628)	(73) 特許権者	591042816
(86) (22) 出願日	平成20年2月15日 (2008.2.15)		ジェンザイム コーポレーション
(65) 公表番号	特表2010-519512 (P2010-519512A)		アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 O
(43) 公表日	平成22年6月3日 (2010.6.3)		2142、ケンブリッジ、ケンダル スト
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/002047		リート 500
(87) 国際公開番号	W02008/103292	(74) 代理人	100095832
(87) 国際公開日	平成20年8月28日 (2008.8.28)		弁理士 細田 芳徳
審査請求日	平成23年1月26日 (2011.1.26)	(72) 発明者	マーゴリン, デビッド, エイチ.
(31) 優先権主張番号	60/901, 732		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O2
(32) 優先日	平成19年2月16日 (2007.2.16)		144 サマービル, ハイランド ロード
(33) 優先権主張国	米国 (US)		48

審査官 三木 隆

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 甲状腺障害リスクの同定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者から得られた生物学的試料中の甲状腺ペルオキシダーゼに対する抗体または甲状腺ミクロソームに対する抗体の存在または量を測定する工程を含む、リンパ球を枯渇させる計画を用いた治療の後に甲状腺障害を発症するリスクがある患者を同定するための方法。

【請求項 2】

該リンパ球を枯渇させる計画が、CD52陽性細胞を枯渇させる薬剤の投与を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

該CD52陽性細胞を枯渇させる薬剤が、CD52に特異的に結合する抗体である、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

該CD52に特異的に結合する抗体が、アレムツズマブのCDRのアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する 1 つ以上のCDRを含む、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

該抗体がアレムツズマブである、請求項 3 記載の方法。

【請求項 6】

患者が多発性硬化症を有する、請求項 1 ~ 5 いずれかに記載の方法。

【請求項 7】

多発性硬化症が再発寛解型多発性硬化症である、請求項 6 記載の方法。

10

20

## 【請求項 8】

患者が、対宿主性移植片病、関節リウマチ、脈管炎、臓器移植拒絶、ブドウ膜炎、強皮症および自己免疫性血球減少症からなる群より選択される免疫媒介疾患を有する、請求項 1 ~ 5 いずれかに記載の方法。

## 【請求項 9】

リンパ球を枯渇させる計画が、骨髄移植法と共に実施される、請求項 1 ~ 5 いずれかに記載の方法。

## 【請求項 10】

甲状腺ペルオキシダーゼに対する抗体または甲状腺ミクロソームに対する抗体の存在または量が、リンパ球を枯渇させる計画を用いる治療の前に測定される、請求項 1 ~ 9 いずれかに記載の方法。

10

## 【請求項 11】

甲状腺ペルオキシダーゼに対する抗体または甲状腺ミクロソームに対する抗体の存在または量が、リンパ球を枯渇させる計画を用いた少なくとも 1 つの治療の経過後に測定される、請求項 1 ~ 10 いずれかに記載の方法。

## 【請求項 12】

甲状腺障害が、甲状腺機能低下症、甲状腺機能亢進症、グレーブス病、自己免疫性甲状腺炎、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 1 ~ 11 いずれかに記載の方法。

## 【請求項 13】

甲状腺ペルオキシダーゼに対する抗体または甲状腺ミクロソームに対する抗体が、酵素免疫測定法、ラジオイムノアッセイ、血球凝集アッセイ、および抗体を誘引し、かつ抗体に結合することを目的とした標的として甲状腺ペルオキシダーゼの形態または断片を使用するアッセイからなる群より選択されるアッセイを用いて検出される、請求項 1 ~ 12 いずれかに記載の方法。

20

## 【発明の詳細な説明】

30

## 【技術分野】

## 【0001】

(関連出願)

本願は、2007年2月16日に出願された米国特許仮出願第60/901,732号の利益を主張する。上記出願の全教示は参照によって本明細書に援用される。

## 【背景技術】

## 【0002】

(発明の背景)

甲状腺の主な機能は、甲状腺ホルモンL-チロキシン(T4)およびL-トリヨードサイロニン(T3)を分泌することである。これらの甲状腺ホルモンは、代謝の重要な局面を調節している。T3およびT4の血中レベルが異常に低い場合に甲状腺機能低下症の状態が存在し、そのレベルが異常に高い場合に甲状腺機能亢進症が存在する。治療されていない重度の甲状腺機能低下症は、体重増加、低エネルギーおよび抑鬱、寒さに耐えられないこと、ならびに皮膚および髪の変化を特徴とする。治療されていない重度の甲状腺機能亢進症は、甲状腺中毒症と呼ばれる状態を示し、体重低下、神経質または感情の不安定、暑さに耐えられないこと、震え、ならびに速い心拍数を特徴とし、心臓心房細動を生じ得る。いくつかの場合に、甲状腺機能低下症または甲状腺機能亢進症は、実験室の試験で甲状腺機能の異常が発見されるにも関わらず、識別可能な症状または徴候がなく生じ得る(例えば、無症状甲状腺障害)。

40

## 【0003】

50

T3およびT4は、視床下部ホルモンチロトロピン放出ホルモン(TRH)によって調節される、下垂体前部の糖タンパク質ホルモンチロトロピン(甲状腺刺激ホルモン、TSH)による直接制御下で生成される。TSHは、膜結合型Gタンパク質共役レセプター(TSH-R)を介して作用し、主な甲状腺機能を活性化する。T3およびT4の合成には、前駆体へのヨウ素の取り込みを必要とする。甲状腺ペルオキシダーゼ(TPO)は、膜結合型グリコシル化鉄含有酵素であり、チロシル残基のヨウ素化およびチログロブリンのヨードチロシル残基の結合の両方を触媒し、T3およびT4を形成する。合成されると、T3およびT4は、ホルモンの放出前にタンパク質チログロブリン(Tg)上のコロイド形態で保存される。

#### 【0004】

病理学的条件下で、TPO、TSH-R、およびTgタンパク質は、自己抗原、即ち、これらのタンパク質と結合する自己抗体によって最も容易に同定される自己免疫応答の標的になり得る。歴史的には、甲状腺組織のミクロソーム部分と反応する抗体も、検出され、かつ研究された。後に、甲状腺ペルオキシダーゼは、このような抗甲状腺ミクロソーム抗体の主な標的であることが見出された。この理解によって、甲状腺ミクロソーム抗体および甲状腺ペルオキシダーゼ抗体は、本質的に等価な用語であるとみなされている。

#### 【0005】

TSH-Rタンパク質のシグナル伝達機能は、通常、チロトロピンの結合時だけに活性化される。しかし、TSH-Rに対するいくつかの抗体(以後、TSHRA)は、チロトロピンドッキング部位で結合し得、このクラスのTSHRA自己抗体は、TSH-Rの(抗体を刺激する)直接アゴニストまたは(抗体をブロックする)アンタゴニストとして機能し得る。従って、甲状腺自己免疫は、甲状腺ホルモン分泌の異常な調節と関連し得、甲状腺機能低下症または甲状腺機能亢進症のいずれかを生じる。

#### 【0006】

グレーブス病、びまん性毒性甲状腺腫、フォン・バセドー病、またはパリー病として様々に公知な障害を有する患者における共通の診断所見は、血中のTSHRAの存在である。TPOに対する抗体(以後、TPOA)は、グレーブス病に存在し得るか、または存在し得ない。上記に説明されるように、この障害を有する患者は、臨床的には、甲状腺機能低下症または甲状腺機能亢進症のいずれかを表し得、ある患者は、種々の時点で両方の状態を示し得る。甲状腺機能不全の他に、該障害には、他の組織が含まれ得る。グレーブス眼症(変化が眼窩構造に集約され、眼の内部構造をそのまま残すために、技術的に眼窩疾患)において、外眼筋束の拡大および脂肪細胞肥大によって眼球の突出(眼球突出症または突出症)がもたらされ、二重視野(複視)をもたらす。重度の場合には、視力の低下をもたらす。ある患者は、皮膚の浮腫および肥厚、または指の骨の肥厚を特徴とする皮膚障害を発症する。甲状腺機能亢進グレーブス病は、メチマゾールまたはプロピルチオウラシルなどの眼窩甲状腺抑制剤を用いてしばしば管理され得る。難治性の症例には、放射性ヨウ素または外科的甲状腺切除を用いた甲状腺切除が必要とされ得る。甲状腺が抑制されると、患者は甲状腺置換ホルモンを要する。重度の眼症には、眼窩に送達される放射線治療または眼窩の外科的減圧が必要とされ得る。

#### 【0007】

自己免疫性甲状腺炎は、内分泌学者の間で「無症候性甲状腺炎」および橋本甲状腺炎として一般的に公知である。TPOAは、一般的に、この障害を有する患者に存在する; 甲状腺機能低下症を臨床で示す状況においてTPOAの高いレベルは、橋本病の診断の確認としてよく採用されている。TSHRAは、通常存在しない。この障害において、甲状腺に対する免疫媒介損傷によって、一過性の甲状腺中毒症と関連する保存されたホルモンの漏洩がもたらされ得るが、一般的に甲状腺機能低下症と関連する異常に不活発な甲状腺となる。通常、治療には甲状腺置換ホルモンが必要とされる。

#### 【0008】

特定の疾患状態または治療介入が、自己免疫性甲状腺障害のリスク増大と関連している。例えば、甲状腺障害は、C型肝炎ウイルス感染のインターフェロン治療を受ける患者の間で頻度高く生じる(Preziati, D.ら、Eur J Endocrinol, 132(5)587-93 (1995))。C型

10

20

30

40

50

肝炎ウイルス感染を有する患者の間で、TPOまたは甲状腺ミクロソーム部分(TPOを認識することが公知である部分)に対する前処理抗体は、後にインターフェロン治療を受ける患者の間で甲状腺機能亢進および甲状腺機能低下障害のリスク増大のためのマーカーであるように思われる(Marazuela, M.ら、Clin Endocrinol 44:635-42(1996); Watanabe, U.ら、Am J Gastroenterol, 89(3):399-403(1994); Fernandez-Soto, L.ら、Arch Intern Med, 158:1445-1448(1998))。同様に、妊娠中に検出されるTPOAは、分娩後の甲状腺障害のリスクを予測するように思われる(Vargas, M. T.ら、J. Clin. Endocrinol. Metab., 67(2):327-33(1988))。

#### 【 0 0 0 9 】

また、自己免疫性甲状腺障害は、以前にリンパ球枯渇治療を受けた患者の間で高い頻度で生じる。かかる1つの治療剤は、アレムツズマブである。アレムツズマブ(Campath(登録商標)、MabCampath(登録商標)、Campath-1H(登録商標))は、CD52として知られるタンパク質抗原と選択的に結合するヒト化モノクローナル抗体である。CD52は、ヒト末梢血液リンパ球および単球/マクロファージの全てのうち少なくとも95%に存在する余剰分子(細胞あたりおよそ $5 \times 10^5$ 抗体結合部位)である(Hale G.ら、The CAMPATH-1 antigen (CD 52). Tissue Antigens;35:178-327(1990))が、造血幹細胞には存在しない。適切な用量および計画を用いたアレムツズマブでの個体の治療は、他の効果の中でも、免疫系を再増殖するために必要とされる造血幹細胞をそのまま残しながら、体の組織および血液からの正常および新形成リンパ球の促進されかつ比較的持続した枯渇をもたらす。アレムツズマブは、米国特許第5,846,534号に開示されている。

#### 【 0 0 1 0 】

アレムツズマブは、アルキル化剤で治療され、かつフルダラビン治療に成功しなかった患者において、B細胞慢性リンパ性白血病(B-CLL)の治療に承認されている。臨床試験によって、アレムツズマブはまた、非ホジキンリンパ腫および白血病などの他の血液悪性疾患、ならびに対宿主性移植片病、臓器移植拒絶、関節リウマチ、および顕著に多発性硬化症などの様々な免疫媒介障害において、有効であることが示されている(Hale G.およびWaldmann H., From laboratory to clinic: the story of CAMPATH-1. In: George AJT, Urech CE, 編. Methods in Molecular Medicine: Diagnostic and Therapeutic Antibodies. NJ: Humana Press; 2000; 40:243-266)。

#### 【 0 0 1 1 】

HaleおよびWaldmannは、最初に多発性硬化症(MS)を治療するためのCampath-1Hの使用を開示した(米国特許第6,120,766号参照)。それ以来、Campath-1Hの安全性および効能は、MSを有する患者においていくつかの臨床試験の焦点であった(例えば: T. Moreauら、Lancet(1994), 344:298-301; T. Moreauら、Brain(1996), 119:225-237; A. Colesら、Ann. Neurol.(1999), 46:296-304; A. Colesら、Neurology 60 March 2003(別冊1); A. Colesら、Clinical Neurology and Neurosurgery (2004), 106:270-274参照)。

#### 【 0 0 1 2 】

ごく最近では、CAMMS223と称された第II相臨床試験において、アレムツズマブが2つの用量レベルで投与された(1年目に、12mgまたは24mg/日の5日間経過で60または120mgの蓄積用量、続いて2年目に、12mgまたは24mg/日の3日間経過で36または72mgの蓄積用量、おそらく3年目に、36または72mgを同様に用いた再治療)。有効なコンパレータデザインにおいて、患者は、製品表示に示されるように週あたり3回の44mcgのインターフェロン-1a(Rebif(登録商標); EMD Serono, Inc.)を対照の腕に皮下(SC)で受けた(O'Donnell, Lら、Consortium of Multiple Sclerosis Centers Annual Meetingでのプレゼンテーション、2004年6月2日~6日カナダ、トロント; Compston, A.ら、第22回のEuropean Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS)ミーティングでのプレゼンテーション、2006年9月27日~30日スペイン、マドリッド; Fox, E.ら、ECTRIMSでのプレゼンテーション、スペイン、マドリッド(2006))。

#### 【 0 0 1 3 】

中間結果は、計画された3年の治験の全ての患者について1年または2年の治療後に行わ

10

20

30

40

50

れ、予め特定された効能および安全性の中間分析から得た。これらは、アレムツズマブが、MSの再発リスクの枯渇および持続性障害の発生の遅延において、MSのためにライセンス化された治療薬であるインターフェロン-1a(Rebif(登録商標); EMD Serono, Inc.)よりも有効であることを示した。具体的に、いずれかのアレムツズマブ計画で治療された患者は、インターフェロン-1aで治療された患者と比べた場合、少なくとも1年および2年の追跡後の再発のリスクにおいて少なくとも75%減少した。アレムツズマブで治療された患者は、さらに、1年後の障害の持続性蓄積のリスクにおいて、(Rebif(登録商標)で治療された患者に対して)少なくとも60%減少し、2年後のそのリスクにおいて少なくとも65%減少した。

#### 【0014】

MSの治療薬としてのアレムツズマブのパイロット試験中に、高い割合の個体が甲状腺を含む障害を発症したことに注目した。この現象の最初の報告(Colesら、Lancet, 354:1691-95(1999))によって、MSの治療薬としてアレムツズマブを以前に受けた患者の大体3分の1(27人のうち9人)で発症する自己免疫性甲状腺疾患の臨床証拠および研究室証拠が記された。具体的に、これらの患者は、チロトロピンレセプターに対する抗体を生じ、カルピマゾール応答性の自己免疫性甲状腺機能亢進症を発症した。これらのうち数人は自己免疫性甲状腺炎として特徴付けられるエピソードを有した。同じグループ(Colesら、Neurology 60 March 2003(別冊1))およびその他(Compston, A.ら、第22回のEuropean Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS)ミーティングでのプレゼンテーション、2006年9月27日~30日スペイン、マドリッド)の後の研究によって、甲状腺障害が、MSを有する患者においてアレムツズマブ治療の後に高い頻度で生じることが確認された。甲状腺障害の発症は、典型的には、アレムツズマブへの最初の曝露後、数ヶ月または数年遅れる。

#### 【0015】

自己組織または同種異系であろうと、原発性免疫不全症の治療または医原性骨髄抑制後の再構築のためであろうと、甲状腺障害の遅れた発症はまた、リンパ球の枯渇および再増殖を特徴とする他の環境で生じ、顕著には、甲状腺障害の遅れた発症は、骨髄移植の後に起こる(Ishiguro H.ら、J Clin Endocrinol Metab, 89(12):5981-6(2004); Slatter M.A.ら、Bone Marrow Transplant., 33(9):949-53(2004); Carlson K.ら、Bone Marrow Transplant., 10(2):123-7.(1992); Lee W. Y.ら、Bone Marrow Transplant., 28(1):63-6.(2001))。これらの場合、化学療法計画は広く変化した。甲状腺疾患になりやすいアレムツズマブで治療されるMS患者についての主な類似性は、最初の天然または医原性枯渇状態からのリンパ球集団の再生である。

#### 【0016】

リンパ球枯渇治療を複雑にする甲状腺自己免疫障害の病因の科学的な理解、およびこれらの障害の発症における遅延の理由は、現在まで不十分である。

#### 【0017】

要約すると、アレムツズマブは、MSにおけるその使用だけでなく、様々な障害を有する患者にとって有効な治療薬であるように思われるが、甲状腺障害などの自己免疫合併症と関連している。同様な合併症が、他のリンパ球枯渇治療で生じる。ある個体において、リンパ球枯渇などの治療計画の利益は、有害な影響により相殺され得る。従って、患者(例えば、MS患者)におけるアレムツズマブなどのリンパ球枯渇治療の使用に付随する利益対リスクの比を最大にするために、自己免疫性甲状腺障害のリスクが増大した個体を(例えば、アレムツズマブ治療の開始前に)同定する手段を有することが望ましい。このようなリスク予測は、情報に基づく医学的意思決定、例えば、この有害な影響の予測リスクに基づいたある個体におけるリンパ球枯渇計画を用いた治療を開始するかどうかを支持するために有用である。

#### 【発明の概要】

#### 【0018】

本発明は、リンパ球を枯渇させる(deplete)治療計画(therapeutic regimen)(リンパ

10

20

30

40

50

球枯渴計画)の合併症として患者で生じ得る甲状腺障害のリスクを予測する方法に関する。該方法は、リンパ球枯渴計画の最初または後の経過を受ける前に(例えば、血中の自己抗体の評価前に)、患者における自己抗体の存在または非存在を検出することに基づくものである。例えば、アレムツズマブ治療の前の血液検査によって、アレムツズマブ治療の後に生じ得る甲状腺障害のリスクの予測が可能になる。

【0019】

より具体的には、本発明は、アレムツズマブを用いた最初の治療の前にまたはアレムツズマブを用いた最初の治療時に、甲状腺ペルオキシダーゼ酵素(TPO)に対する(directed)抗体を有するMS患者がこのような治療の後に甲状腺障害を発症するリスクが増大しているという発見に部分的に基づいている。

10

【0020】

従って、一態様において、本発明は、甲状腺ペルオキシダーゼ(TPOA)に対する抗体について患者由来の生物試料をアッセイする工程を含む、リンパ球を枯渴させる(およびおそらくは他の細胞種類も枯渴させる)治療計画を用いた治療の後に甲状腺障害を発症する比較的高いリスクがある患者を判定する方法を含んでなる。予測自己抗体に陽性であると判断される患者は、かかる計画を用いた治療を受けると甲状腺障害を発症するリスクが比較的高い。予測自己抗体に陰性であると判断される個体は、治療を受けると甲状腺障害のリスクが比較的低い。

【0021】

別の態様において、本発明は、甲状腺ペルオキシダーゼ(TPOA)に対する抗体について患者由来の生物試料をアッセイする工程を含む、表面マーカーとしてCD52を生じる細胞(即ち、CD52陽性細胞)を枯渴させる治療計画を用いた治療の後に甲状腺障害を発症する比較的高いリスクがある患者を判定する方法を含んでなる。予測自己抗体に陽性であると判断される患者は、CD52陽性細胞を枯渴させる計画を用いた治療を受けると甲状腺障害を発症するリスクが比較的高い。予測自己抗体に陰性であると判断される個体は、かかる治療を受けると甲状腺障害のリスクが比較的低い。

20

【0022】

本明細書で使用されるように、「CD52陽性細胞を枯渴させる計画」には、CD52マーカーを生じるヒト細胞を部分的にまたは完全に枯渴させる任意の分子が含まれる。例えば、CD52陽性細胞を枯渴させる薬剤としては、限定されないが、血液循環および/または体組織のCD52を生じる細胞の数を減少させる、抗体、低分子干渉RNAまたは低分子が挙げられる。特定の態様において、CD52陽性細胞を枯渴させる治療計画は、CD52に特異的に結合する抗体の投与を含んでなる。いくつかの態様において、抗体は、アレムツズマブ(Campath(登録商標)、MabCampath(登録商標)、Campath-1H(登録商標))等のまたはアレムツズマブに類似する、ヒト抗CD52抗体またはヒト化抗CD52抗体である。

30

【0023】

別の態様において、本発明は、甲状腺ペルオキシダーゼに対する抗体が患者に存在するかどうかを判定する工程を含み、該抗体が患者に存在する場合に、患者は治療後に甲状腺障害を発症するリスクがある、リンパ球を枯渴させる計画を用いた治療(例えば、CD52陽性細胞を枯渴させる薬剤、例えばアレムツズマブを用いた治療)の後に甲状腺障害を発症するリスクがある多発性硬化症を有する患者を同定する方法に関する。本明細書に記載される方法は、再発性で寛解性の多発性硬化症ならびに一次性および二次性進行型多発性硬化症を有する患者に適用可能である。

40

【0024】

別の態様において、本発明は、治療の後に甲状腺障害を発症する比較的高いリスクがある患者を判定する方法であって、該治療が所望の治療効果に付随するものとして医原性リンパ球枯渴を生じる治療計画を含む方法を含んでなる。このような計画の例としては、限定されないが、新形成、自己免疫病の治療または骨髄移植もしくは固体臓器移植の準備に関して、1つ以上の細胞傷害性化学治療剤の投与;および臓器移植拒絶の抑制のためにTリンパ球を枯渴させることを意図した抗チモサイトグロブリン(例えば、チモグロブリン(登

50

録商標))の投与を含むものが挙げられる。

【0025】

本発明の方法は、治療によって、リンパ球を枯渇させるが、他の細胞種類を枯渇させ得るかまたは枯渇させ得ない任意の治療計画を用いた治療の後に患者で発症する甲状腺障害のリスクの予測に有用であることが予測される。全リンパ球集団には、主にサブセットのT細胞、B細胞、およびNK細胞が含まれる。一態様において、リンパ球を枯渇させる治療計画は、Tリンパ球に対して標的とされる計画である。別の態様において、これは、Bリンパ球に対して標的とされる計画である。別の態様において、これは、NK細胞に対して標的とされる計画である。他の態様において、これは、TおよびBリンパ球ならびにNK細胞の種々の組み合わせ(例えば、TおよびBおよびNK; NKではなくTおよびB;等)に対して標的とされる計画である。

10

【0026】

リンパ球枯渇と関連する甲状腺障害を発症するリスクの予知は、情報に基づく医学的意思決定、例えば甲状腺障害の発症の予測リスクに基づいてある患者でリンパ球枯渇計画を用いた治療を開始するかどうかを支持するために有用である。

【0027】

甲状腺ペルオキシダーゼに対する抗体が患者に存在するかどうかを判定する試験は、リンパ球を枯渇させる計画を用いた治療の前に行われ得る。理想的には、TPOAの試験は、所定の治療の経過の前に行われ、治療の潜在的なリスクの情報が治療判定時に医者と患者によって考慮され得る。しかし、TPOAが存在する情報はまた、増大するリスクの早期指標として治療後に有用である。

20

【0028】

リンパ球枯渇治療で患者を治療する結果として生じ得る自己免疫性甲状腺障害は、甲状腺機能低下症または甲状腺機能亢進症のいずれかを示し得る。一般的な診断には、グレーブス病(びまん性毒性甲状腺腫、フォン・バセドー病、またはパリー病としても公知)および自己免疫性甲状腺炎(無症候性甲状腺炎または橋本甲状腺炎としても公知)およびその組み合わせが含まれる。

【0029】

甲状腺ペルオキシダーゼに対する抗体は、通常、患者から得られた血液試料(一般的に血清または血漿)中で調べられるが、リンパ、尿および/または組織などの、患者から得られた任意の生物試料中で検出され得る。

30

【0030】

当業者が認識するように、TPOに対する抗体の存在を検出するために使用される特定の方法は、本発明を限定する特徴ではない。甲状腺ペルオキシダーゼに対する抗体を検出するための様々な方法が、当業者に周知である。かかる方法としては、酵素免疫測定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、血球凝集アッセイおよび測定される抗体を誘引し、かつ抗体に結合することを目的とした標的として甲状腺ペルオキシダーゼタンパク質の形態または断片を使用する様々な他の技術の使用、ならびに結合した抗体を検出あるいは定量するために適切な任意の方法の使用が挙げられる。また、上記の様々な方法および他の類似する方法が、甲状腺ペルオキシダーゼ酵素タンパク質が濃縮された組織画分の、甲状腺ミクロソームと反応する抗体を検出するために使用され、等価な診断結果をもたらし得る。抗ミクロソーム抗体は、本質的にTPOAに等価である。他の方法には、TPO酵素活性の阻害により示されるTPOAの存在および濃度と共に、TPO酵素活性の測定が含まれる。

40

【発明を実施するための形態】

【0031】

(発明の詳細な説明)

CAMMS223は、初期、進行性、再発-寛解性MSを有する患者の治療におけるインターフェロン-1a(Rebif(登録商標))と比較してアレムツズマブ(alemtuzumab)の2つの用量レベルの安全性および有効性を調査する第2相臨床試験の名称である。CAMMS223への参加に当てはまる患者を、登録前に抗甲状腺刺激ホルモン(TSH)受容体抗体(以下、TSHRA)について

50

スクリーニングし、陽性の場合は排除した。また、患者を抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体(以下、TPOA)について試験したが、これは、適格性または治療に影響を及ぼさなかった。合計334名の患者をIFN- $\gamma$ -1a (44mcg SC週3回)、またはアレムツズマブ高用量(24mg/日静脈内(IV))もしくは低用量(12mg/日 IV)に無作為化した。アレムツズマブは、1日1回、0ヶ月目に5日間および12ヶ月目に3日間、ならびに一部の患者では24ヶ月目に再度与えた。

#### 【0032】

次の3年間、甲状腺関連有害事象を記録し、すべての患者は、一定間隔で甲状腺関連ホルモンおよび甲状腺自己抗体試験を受けた。TSH、L-サイロキシン(T3)およびL-トリイオドサイロニン(T4)およびTSHRAを四半期毎に試験し、甲状腺ペルオキシダーゼ抗体(TPOA)を年に2回試験した。Sweden Diagnosticsによって製造され、Somagenカタログ番号12396で販売される市販のキットVarelisa TPO抗体(実施例1に記載の試験プロトコル)を用いてTPOAを試験した。

10

#### 【0033】

解析の焦点の1つは、いくつかの甲状腺関連実験室パラメータにおける異常の間での相関であった。2.2年間のメジアン(median)追跡による中間解析を行なった(第1四分位数 = 2.0; 第3 = 2.5)。甲状腺関連有害事象(AE)および実験室での異常は、3つの治療集団すべてで起こった(Compstonら、2006前掲参照)。

#### 【0034】

上記の中間解析によれば、甲状腺臨床AEを有するアレムツズマブ治療患者の割合は11.1%であったのに対し、IFN- $\gamma$ -1aを受けた患者では1.9%であった。低用量集団では、より多くの甲状腺AEが発生したが、アレムツズマブ用量間でのこの差は有意ではなかった。グループス病または甲状腺機能亢進症が14名/216名のアレムツズマブ治療患者(6.5%)および0名/106名のIFN- $\gamma$ -1a治療患者( $p < 0.0001$ )において報告された。TSHRAは、アレムツズマブ後の患者の47名/216名(21.8%)およびIFN- $\gamma$ -1a後の2名/103名(1.9%)において見られた。甲状腺自己免疫の研究用マーカー(TSHRAおよび/またはTPOA)は、臨床甲状腺AEなしでアレムツズマブでの治療後の患者の16.7%に対してIFN- $\gamma$ -1aで治療された患者の11.3%において、存在した。

20

#### 【0035】

本明細書において上記のように、これらの甲状腺関連事象を、ベースライン(治療前)実験室評価の状況において検査した(実施例1参照)。甲状腺臨床AEは、ベースラインでのTPOA試験で陰性であったアレムツズマブ治療患者の17名/176名(9.7%)に対して、試験で最初に陽性であった患者の5名/16名(31.3%)(相対リスク=3.2、 $p=0.029$ )、およびベースラインでのTPOA試験で陰性であったIFN- $\gamma$ -1a治療患者の2名/87名(2.3%)に対して、試験で最初に陽性であった患者の0名/3名(0%)で報告されたことがわかった。顕著なことに、TSHRAは、ベースラインでのTPOA試験で陰性であったアレムツズマブ治療患者の24名/176名のみ(13.6%)に対して、試験で最初に陽性であった患者の9名/16名(56.3%)(相対リスク = 4.1、 $p < 0.0001$ )、およびベースラインでのTPOA試験で陰性であったIFN- $\gamma$ -1a治療患者の2名/87名(2.3%)に対して、試験で最初に陽性であった患者の0名/3名(0%)において生じた。

30

#### 【0036】

したがって、アレムツズマブで治療されたMS患者間の遡及解析において、アレムツズマブへの初期曝露時またはその前にTPOに対する抗体を有した個体は、ベースラインでの抗TPO抗体試験で陰性であった個体と比べた場合、その後の甲状腺障害のリスクが3倍または4倍増大した。

40

#### 【0037】

試験時に甲状腺異常が発生したほとんどの患者は、登録時にTPOAの試験で陰性であったことに注意されたい。したがって、TPOA試験は、かなり高い特異性を有するが感受性は低いようである。これは、不十分なTPOAアッセイ感受性を反映し得るか、または何人かの患者は、ベースラインでTPOAが存在しないにもかかわらず、アレムツズマブ関連甲状腺障害のリスクがあることを示し得る。

#### 【0038】

50

したがって、本発明は、甲状腺ペルオキシダーゼに対する抗体が患者に存在するかどうかを判定する工程を含み、該抗体が患者に存在する場合に、患者は治療後に甲状腺障害を発症するリスクがある、リンパ球を枯渇させる計画を用いた治療の後に甲状腺障害を発症するリスクのある患者の同定方法を包含する。

【0039】

リンパ球は、個体のリンパ組織内で形成される白血球であり、3つの主な群：T細胞、B細胞、およびNK細胞に分けられる。したがって、一局面において、該計画はT細胞を枯渇させる。別の局面において、該計画はB細胞を枯渇させる。別の局面において、該計画はNK細胞を枯渇させる。また別の局面において、該計画はTおよびBおよびNK細胞の種々の組合せを枯渇させる。該計画は、治療中または治療後、患者のリンパ球の一部または完全な欠失をもたらす任意の治療計画を含む。一態様において、該計画は1種類以上の細胞傷害剤(例えば、薬物)の投与を含む。一態様において、該計画は、細胞表面マーカーとしてCD52を発現する細胞(すなわち、CD52陽性細胞)を枯渇させる薬剤の投与を含む。

10

【0040】

したがって、一態様において、本発明は、甲状腺ペルオキシダーゼに対する抗体が患者に存在するかどうかを判定する工程を含み、該抗体が患者に存在する場合に、患者は治療後に甲状腺障害を発症するリスクがある、CD52陽性細胞を枯渇させる薬剤を用いた治療の後に甲状腺障害を発症するリスクのある患者の同定方法を包含する。

【0041】

特定の局面において、本発明は、甲状腺ペルオキシダーゼに対する抗体が患者に存在するかどうかを判定する工程を含み、該抗体が患者に存在する場合に、患者は甲状腺障害を発症するリスクがある、CD52陽性細胞を枯渇させる薬剤を用いた治療の後に甲状腺障害を発症するリスクのあるMS患者の同定方法に関する。

20

【0042】

本明細書で使用されるように、「CD52陽性細胞を枯渇させる計画」は、CD52マーカーを有するヒト細胞を一部または完全に枯渇させる任意の計画を含む。例えば、CD52陽性細胞を枯渇させる計画としては、限定されないが、血液循環および/または体組織からCD52を有する細胞数を減少させる抗体、低分子干渉RNAまたは小分子の投与が挙げられる。

【0043】

特定の態様において、CD52陽性細胞を枯渇させる薬剤は、CD52に特異的な抗体である。CD52に特異的な抗体は、CD52に選択的に結合するが、試料、例えばCD52を含む生物学的試料中の他の分子には実質的に結合しない分子である。用語「抗体」は、本明細書で 사용되는ように、免疫グロブリンまたはその一部をいい、供給源、作製方法および他の特徴とは関係なく抗原結合部位を含む任意のポリペプチドを包含する。該用語は、限定されないが、ポリクローナル、モノクローナル、単一特異性、多重特異性、ヒト化、ヒト、単鎖、キメラ、合成、組換え、ハイブリッド、変異、コンジュゲートおよびCDR移植抗体を含む。用語「抗原結合部位」は、抗原の一部または全部に特異的に結合するか、あるいは相補的である領域を含む抗体分子の部分のいう。抗原結合部位は、抗体軽鎖可変領域( $V_L$ )および抗体重鎖可変領域( $V_H$ )を含み得る。抗原結合部位は、1つ以上の抗体可変ドメイン(例えば、 $V_H$ ドメインからなるFd抗体断片、 $V_H$ ドメインおよび $V_L$ ドメインからなるFv抗体断片、またはリンカーによって連結された $V_H$ ドメインおよび $V_L$ ドメインからなるscFv抗体断片)によって提供され得る。用語「抗CD52抗体」または「CD52に対する抗体」は、CD52の少なくとも1つのエピトープに特異的に結合する任意の抗体をいう。

30

40

【0044】

種々の抗体およびその部分は、任意の種々の技術を用いて作製され得る(例えば、KohlerおよびMilstein, Nature 256:495-497 (1975); Current Protocols in Immunology, Coliganら(編)John Wiley & Sons, Inc., New York, NY (1994); Cabillyら、米国特許第4,816,567号; Cabillyら、欧州特許第0,125,023号B1; Bossら、米国特許第4,816,397号; Bossら、欧州特許第0,120,694号B1; Neuberger, M.S.ら、WO 86/01533; Neuberger, M.S.ら、欧州特許第0,194,276号B1; Winter, 米国特許第5,225,539号; Winter, 欧州特許第0,23

50

9,400号B1; Queenら、欧州特許第0 451 216号B1;ならびにPadlan, E.A.ら、EP 0 519 596 A1; Newman, R.ら、BioTechnology, 10: 1455-1460 (1992); Ladnerら、米国特許第4,946,778号; Bird, R.E.ら、Science, 242: 423-426(1988)参照)。

【0045】

特定の態様において、CD52抗体は、CD52に対する組換えDNA誘導ヒト化モノクローナル抗体であるアレムツズマブである。内部に含有された3つのCDRの配列を含むアレムツズマブ(Campath-1H(登録商標))の配列は、米国特許第5,846,534号に開示されており、これには、抗原CD52に有効に結合するヒト化抗体ならびにリンパ系悪性腫瘍を有するヒト患者のかかる抗体での治療方法が記載されている。かかる抗体の調製および試験のための手順もまた開示されている。

10

【0046】

多発性硬化症(再発寛解型ならびに原発性および続発性進行性の両方)に加えて、アレムツズマブで治療された状態としては、B細胞慢性リンパ性白血病(B-CLL)、非ホジキンリンパ腫および白血病などの血液の悪性疾患、ならびに対宿主性移植片病、臓器移植拒絶、膵管炎、ブドウ膜炎、硬皮症、自己免疫性血球減少症および関節リウマチを含む種々の免疫媒介障害が挙げられる。しかしながら、本発明の方法は、これらの特定の疾患を有する患者に対して行なわれるものに限定されない。むしろ、疾患がリンパ球を枯渇させる薬剤での治療に感受性である限り、任意の疾患を有する患者に有用であり、かかる治療は少なくとも一部の患者において、甲状腺障害の発症と相関する。

【0047】

リンパ球枯渇治療での患者の治療の結果として起こり得る自己免疫性甲状腺障害は、甲状腺機能低下症または甲状腺機能亢進症のいずれかとして現れ得る。一般的な診断としては、グレーブス病(びまん性中毒性甲状腺腫、フォン・バセドー病、またはパリー病としても知られる)および自己免疫性甲状腺炎(無症候性甲状腺炎または橋本甲状腺炎としても知られる)ならびにその組合せが挙げられる。

20

【0048】

甲状腺ペルオキシダーゼに対する抗体が患者に存在するかどうかを判定するための試験は、リンパ球枯渇計画を用いた治療の前または治療の後に行なわれ得る。理想的には、潜在治療リスクの知識が医師および患者によって考慮され、治療の利益に対して加重されるように、抗体の存在が初期治療過程の前に判定される。しかしながら、例えば、その後の治療過程のリスク/利益を調べるため、または治療後の任意の時点での甲状腺障害の発症の任意のリスクの増加をモニターするために、患者の初期治療の後に本発明の方法を行なうことも有用である。

30

【0049】

甲状腺ペルオキシダーゼに対する抗体を検出するための種々の方法が当業者に公知である。特定の態様において、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)が使用され得る(Premawardhana, L.ら、J. Clin. Endocrinol. Metab., 85:71-75 (2000); Stagnaro-Green, A.ら、J. Clin. Endocrinol Metab., 74(3):645-653 (1992))。この方法の一般的な利用において、プラスチック基材を、標準化された量の精製甲状腺ペルオキシダーゼ酵素タンパク質でコーティングする。解析される血液試料は、正確に希釈し、コーティングした基材にある期間加えて、その間、血液試料中のTPOA抗体が、この基材に接着したTPOとの相互作用のためにプラスチックに結合する。TPOに結合しないすべての血液成分を除去するための標準化された洗浄工程後、特にTPOAを含む任意の結合抗体を認識して付着する試薬を添加する。この試薬は二重機能を有するように：抗体との結合に加えて、結合量に比例したシグナル(通常、発色または化学発光)を提供し得るように設計される。したがって、シグナルは、間接的に元の試料中のTPOAの量を示す。

40

【0050】

甲状腺ペルオキシダーゼに対する抗体を検出するための種々の方法が当業者に公知であり、ラジオイムノアッセイ(Kung, V.T.ら、Clin. Chem., 27(1):39-42(1981); 血球凝集アッセイ(Marazuelaら、上掲); およびSiemens Medical Solutions Diagnosticsから販売

50

されている化学発光検出によるImmulite 2000 Anti-TPO Abイムノアッセイなどの、いくつかは広く使用されている。これらおよび種々の他の技術は、測定される抗体を誘引し、かつ抗体と結合することが意図される標的として甲状腺ペルオキシダーゼタンパク質の形態または断片を使用し、結合抗体を検出あるいは定量するのに適切な任意の方法を使用するという共通点を有する。別の態様において、上記の種々の方法および他の類似の方法は、甲状腺ペルオキシダーゼ酵素タンパク質が濃縮された組織画分である甲状腺ミクロソームと反応性である抗体を検出するために使用される。

#### 【0051】

本発明の方法において、患者における甲状腺ペルオキシダーゼに対する抗体の存在は、患者から得られた生物学的試料をアッセイすることにより判定され得る。本明細書で使用されるように、「試料」は、甲状腺ペルオキシダーゼに対する抗体を含み得る任意の適切な生物学的試料を包含する。例えば、試料としては、個体から得られた(例えば、単離された)組織、細胞、生物学的液体およびその抽出物が挙げられる。生物学的液体としては、血液(例えば、全血、濃縮赤血球)、血清、血漿、リンパ、尿および精液が挙げられる。

10

#### 【0052】

本明細書に記載の方法は、患者に存在する甲状腺ペルオキシダーゼに対する抗体(TPOA)の量(レベル、力価)を、適切な対照試料中のTPOAの量と比較する工程をさらに含み得る。例えば、対照試料は、甲状腺障害の発症のリスクがあると考えられない個体から採取され得る(例えば、健常個体由来の試料)。あるいは、対照試料は、同じまたは類似の疾患状態を有し、甲状腺障害のリスクの増加を伴わずリンパ球枯渇性でない代替治療計画が行なわれた患者から採取され得る。あるいは、TPOAの測定は、対照生物学的試料に基づいていない検証された標準、例えば、陽性試験結果をもたらすことが期待されない希釈液または他の溶液と比較され得る。

20

#### 【0053】

以下の実施例は、本発明の例示的な態様を提供する。当業者には、本発明の精神または範囲を改変することなく行なわれ得る数多くの修正および変形が認識されよう。かかる修正および変形は本発明の範囲に包含される。実施例は、本発明をいかにようにも限定しない。

#### 【実施例】

#### 【0054】

実施例1 甲状腺ペルオキシダーゼと反応性がある抗体のアッセイ方法

30

TPOタンパク質に特異的な間接的非競合的酵素イムノアッセイを含む定性的方法を、実施例2に記載のTPOA測定に使用した。該方法は、Phadia GmbH(以前のSweden Diagnostics)によって製造され、Somagenカタログ番号12396によって販売されている市販のキット(Var elisa)TPO抗体試験の使用を含んだ。簡単に、提供された希釈剤を用いて患者血清試料を1/100に希釈し、100マイクロリットルの希釈試料を、精製TPOタンパク質で予めコーティングしたプラスチックウェルに入れた。試料を30分間インキュベートし、次いで、300マイクロリットルの提供された洗浄溶液で3~5回洗浄した。次いで、各ウェルに、抗免疫グロブリンG(IgG)アイソタイプ特異的抗体に共有結合された酵素ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)を含む100マイクロリットルの提供された試薬を添加した。さらに30分間のインキュベーション工程後、コンジュゲートを300マイクロリットルの提供された洗浄溶液で3~5回洗浄した。次いで、各ウェルに、付着したHRPコンジュゲートの量および反応持続時間に比例した可視的比色定量的シグナルを生成し、HRPによって触媒される化学反応に有効な基質である、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンを含む100マイクロリットルの溶液を添加した。10分間のインキュベーション工程後、50マイクロリットルの硫酸溶液の添加によって比色定量的反応を終了した。分光光度計を用いて比色定量的シグナルを測定し、硫酸溶液の添加10~30分後、波長450nmでの吸光度を測定した。結果を、陰性(陽性対照の吸光度/試料の吸光度<1)、陽性(陽性対照の吸光度/試料の吸光度>1.4)、または不定(比>1.0<1.4)のいずれかとして定性的に解釈した。

40

#### 【0055】

50

### 実施例2 再発-寛解性多発性硬化症(RRMS)のアレムツズマブ治療後の甲状腺有害事象のリスクの自己抗体予測

この試験の目的は、最初の薬物曝露の2年以内のアレムツズマブ関連自己免疫性甲状腺障害のリスクの予測量としての治療前甲状腺ペルオキシダーゼ抗体(TPOA)を調べることであった。上記のCAMMS223臨床試験と関連して、実施例1に記載の試験プロトコルおよびキットを使用し、すべての患者においてTSH、遊離T3、遊離T4、およびTSHRAを四半期毎、および抗甲状腺ペルオキシダーゼ(TPOA)を年2回試験した。

#### 【0056】

以下の表に示すように、2.2年間のメジアン追跡で、甲状腺AEは、ベースラインでのTPOA試験で陰性であったアレムツズマブ治療患者の17名/176名(9.7%)に対して、試験で最初に陽性であった患者の5名/16名(31.3%)(RR=3.2、p=0.029)、およびベースラインでのTPOA試験で陰性であったIFN- $\beta$ 1a治療患者の2名/87名(2.3%)に対して、試験で最初に陽性であった患者の0名/3名(0%)で報告された。顕著なことに、TSHRAは、ベースラインでのTPOA試験で陰性であったアレムツズマブ治療患者の24名/176名のみ(13.6%)に対して、試験で最初に陽性であった患者の9名/16名(56.3%)(RR=4.1、p<0.0001)、およびベースラインでのTPOA試験で陰性であったIFN- $\beta$ 1a治療患者の2名/87名(2.3%)に対して、試験で最初に陽性であった患者の0名/3名(0%)で生じた。

#### 【0057】

表 1

		人数	%
評価可能なアレムツズマブ患者		192	100
ベースライン抗TPO-		176	91.7
	甲状腺 AE	176 のうち 17	9.7
	TSH-R Ab	176 のうち 24	13.6
ベースライン抗TPO+		16	8.3
	甲状腺 AE	16 のうち 5	31.3
	TSH-R Ab	16 のうち 9	56.3

これらのデータから、ベースラインでのTPOAの存在がアレムツズマブでの治療後に甲状腺障害のリスクの増大をもたらしている可能性があることが明らかである。

#### 【0058】

### 実施例3 再発-寛解性多発性硬化症(RRMS)のアレムツズマブ治療後の甲状腺有害事象のリスクの自己抗体予測

実施例2に示したCAMMS223のデータの予備解析を、3年間のメジアン追跡後の同じ治療からのデータの解析によって拡張した。以下の表に示されるように、最初のアレムツズマブ曝露から3年以内に発症する甲状腺AEは、ベースラインでのTPOA試験で陰性であったアレムツズマブ治療患者の35名/182名(19.2%)に対して、試験で最初に陽性であった患者の8名/16名(50%)(RR=2.60、p=0.0087)、およびベースラインでのTPOA試験で陰性であったIFN- $\beta$ 1a治療患者の2名/93名(2.2%)に対して、試験で最初に陽性であった患者の0名/6名(0%)で報告された。顕著なことに、TSHRAは、ベースラインでのTPOA試験で陰性であったアレムツズマブ治療患者の46名/182名のみ(25.3%)に対して、試験で最初に陽性であった患者の10名/16名(62.5%)(RR=2.47、p<0.0031)、およびベースラインでのTPOA試験で陰性であったIFN- $\beta$ 1a治療患者の2名/93名(2.2%)に対して、試験で最初に陽性であった患者の0名/3名(0%)において生じた。

【 0 0 5 9 】

表 2

		人数	%
評価可能なアテムツズマブ患者		198	100
ベースライン抗 TPO-		182	91.9
	甲状腺 AE	182 のうち 35	19.2
	TSH-R Ab	182 のうち 46	25.3
ベースライン抗 TPO+		16	8.1
	甲状腺 AE	16 のうち 8	50
	TSH-R Ab	16 のうち 10	62.5

10

これらの長期間データは、引き続き、ベースラインでのTPOAの存在がアテムツズマブでの治療後に甲状腺障害のリスクの増大をもたらしている可能性があるという結論を支持する。

20

【 0 0 6 0 】

本開示において引用した特許を含むすべての刊行物は、参照によりその全体が本明細書に援用される。

【 0 0 6 1 】

本発明を、実施例態様を参照して具体的に示し、記載したが、形態および詳細における種々の変形が、添付の特許請求の範囲によって包含される本発明の範囲から逸脱せずになされ得ることは、当業者によって理解されよう。

---

フロントページの続き

- (56)参考文献 英国特許出願公開第02265713(GB,A)  
特表2001-514750(JP,A)  
特表2002-528722(JP,A)  
国際公開第2006/044332(WO,A1)  
Lancet, 1999年, Vol.354, No.9191, Page.1691-1695  
Blood, 2002年, Vol.99, No.10, Page.3554-3561  
Journal of Nuclear Medicine, 1998年, Vol.39, No.5 Suppl., Page.263P  
Bone marrow transplantation, 1992年, Vol.10, No.2, Page.123-127  
J Immunol, 1977年, Vol.118, No.4, Page.1191-1200  
Clinical Endocrinology, 1996年, Vol.44, No.6, Page.635-642  
Cell Growth Differ, 1999年, Vol.10, No.8, Page.575-582
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 33/53  
Caplus/MEDLINE/BIOSIS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)