 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0047628 (43) 공개일자 2014년04월22일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>G01N 33/538</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2013-7034951 (22) 출원일자(국제) 2012년07월06일 심사청구일자 없음 (85) 번역문제출일자 2013년12월30일 (86) 국제출원번호 PCT/US2012/045794 (87) 국제공개번호 WO 2013/006810 국제공개일자 2013년01월10일 (30) 우선권주장 61/505,031 2011년07월06일 미국(US) (뒷면에 계속)	(71) 출원인 네스텍 소시에테아노님 스위스연방 버베이 1800 아브뉴 네슬레 55 (72) 발명자 하웁스테인 스코트 미국 92130 캘리포니아주 샌디에고 카니미토 엘 링콘 3565 넘버211 오르먼드 린다 미국 92106 캘리포니아주 샌디에고 테니스 스트리트 3519 (뒷면에 계속) (74) 대리인 특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 41 항

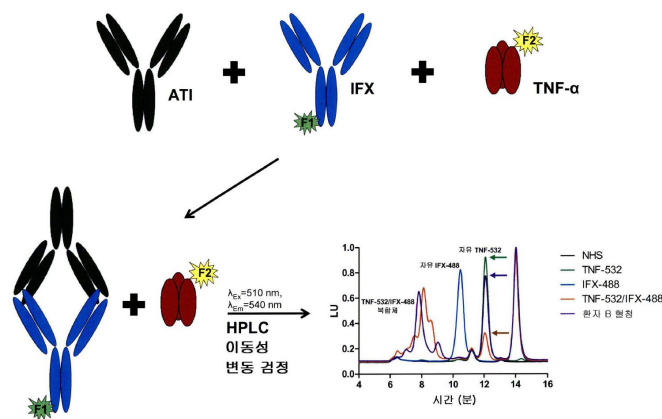
(54) 발명의 명칭 **T N F 알파로의 생물학적 치료요법에 대한 중화 자가항체의 검출을 위한 검정**

(57) 요약

본 발명은 시료 내 항-TNF α 약물 치료요법과 같은 생물제제에 대한 중화 및 비중화 자가항체의 존재 또는 수준을 검출 및 측정하기 위한 검정을 제공한다. 본 발명은 대상체가 생물제제 치료요법 중인 동안 시간 경과에 따른 중화 및/또는 비중화 항-약물 항체의 형성을 모니터링하기에 유용하다. 본 발명은 또한 대안적인 생물제제 치료요법을 받은 대상체의 시료 내 중화 항-약물 항체의 교차 반응성을 예측 및/또는 결정하기 유용하다.

이로써, 본 발명은 생물학적 제제로의 치료요법을 수여받는 대상체를 위한 치료 결정 안내 정보를 제공하고, 치료요법을 최적화하고, 독성을 경감하고 및/또는 생물학적 치료요법에 대한 치료학적 치료의 효능을 모니터링하는 데 있어서 정확도를 개선시킨다.

대표도



(72) 발명자

성 샤라트

미국 92127 캘리포니아주 란초 산타 페 탑 오브 더
모닝 웨이 8171

왕 쉬 룡

미국 92130 캘리포니아주 샌디에고 새들 마운틴 코
트 4555

(30) 우선권주장

61/528,072 2011년08월26일 미국(US)

61/535,884 2011년09월16일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

하기를 포함하는, 시료 내 항-TNF α 약물에 대한 중화 형태의 자가항체의 수준 또는 백분율을 측정하는 방법:

- (a) 시료를, 표지된 항-TNF α 약물 및 표지된 TNF α 와 접촉시켜 하기를 형성시킴:
 - (i) 표지된 항-TNF α 약물 및 자가항체의 제 1 의 표지된 복합체; 및/또는
 - (ii) 표지된 항-TNF α 약물, 표지된 TNF α , 및 자가항체의 제 2 의 표지된 복합체;
- (b) 제 1 의 표지된 복합체 및/또는 제 2 의 표지된 복합체를 크기 배제 크로마토그래피에 적용해, 이들을 자유 표지된 TNF α , 자유 표지된 항-TNF α 약물, 및/또는 표지된 항-TNF α 약물 및 표지된 TNF α 의 복합체로부터 분리함;
- (c) 크기 배제 크로마토그래피 이후에 자유 표지된 TNF α 의 수준을 측정함; 및
- (d) 단계 (c) 에서 측정된 자유 표지된 TNF α 의 수준을, 대조군 시료 내 자유 표지된 TNF α 의 정규화된 수준 또는 백분율과 비교함, 이때 대조군 시료 내 자유 표지된 TNF α 의 정규화된 수준 또는 백분율은 중화 형태의 자가항체의 수준 또는 백분율에 상응함.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 항-TNF α 약물이 REMICADETM(인플릭시마브), ENBRELTM(에타네르셉트), HUMIRATM(아달리무마브), CIMZIA[®](세르톨리주마브 페골), SIMPONI[®](골리무마브; CNTO 148), 및 그의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 항-TNF α 약물에 대한 자가항체는 인간 항-키메라성 항체 (HACA), 인간 항-인간화 항체 (HAHA), 인간 항-마우스 항체 (HAMA), 및 그의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (c) 는 크기 배제 크로마토그래피 이후 자유 표지된 TNF α 의 피크 면적을 측정하는 것을 포함하는 방법.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 대조군 시료는 오로지 자유 표지된 TNF α 만을 함유하는 기준 시료인 방법.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 대조군 시료 내 자유 표지된 TNF α 의 수준 또는 백분율은, 표지된 항-TNF α 약물과 표지된 TNF α 사이에서 형성된 제 3 의 표지된 복합체의 측정된 피크 면적을, 자유 표지된 TNF α 의 측정된 피크 면적에서 차감함으로써 정규화되는 방법.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 대조군 시료 내 자유 표지된 TNF α 의 정규화된 수준 또는 백분율과 단계 (c) 에서 측정된 자유 표지된 TNF α 의 수준간 차이는 비중화 형태의 자가항체의 수준 또는 백분율에 상응하는 방법.

청구항 8

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 시료가 약 3.00% 이상의 중화 형태의 자가항체를 갖는 경우, 시료는 중화 형태의 자가항체에 대해 양성인 방법.

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, 시료가 혈청인 방법.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 시료가 항-TNF α 약물로의 치료요법을 받는 대상체로부터 수득되는 방법.

청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서, 표지된 항-TNF α 약물 및 표지된 TNF α 는 상이한 형광단 또는 형광 염료를 포함하는 방법.

청구항 12

하기를 포함하는, 시료 내 항-TNF α 약물에 대한 중화 및/또는 비중화 형태의 자가항체의 존재를 검출하는 방법:

- (a) 시료를, 표지된 항-TNF α 약물 및 표지된 TNF α 와 접촉시켜 하기를 형성시킴:
 - (i) 표지된 항-TNF α 약물 및 자가항체의 제 1 의 표지된 복합체; 및/또는
 - (ii) 표지된 항-TNF α 약물, 표지된 TNF α , 및 자가항체의 제 2 의 표지된 복합체;
- (b) 제 1 의 표지된 복합체 및/또는 제 2 의 표지된 복합체를 크기 배제 크로마토그래피에 적용해 이들을 자유 표지된 TNF α , 자유 표지된 항-TNF α 약물, 및/또는 표지된 항-TNF α 약물 및 표지된 TNF α 의 복합체로부터 분리함;
- (c) 크기 배제 크로마토그래피 이후 자유 표지된 TNF α 수준을 측정함; 및
- (d) 단계 (c) 에서 측정된 자유 표지된 TNF α 의 수준을, 대조군 시료 내 자유 표지된 TNF α 의 수준과 비교해, 이로써 중화 및/또는 비중화 형태의 자가항체의 존재를 검출함.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 항-TNF α 약물이 REMICADE™(인플릭시마브), ENBREL™(에타네르셉트), HUMIRA™(아달리무마브), CIMZIA®(세르톨리주마브 페골), SIMPONI®(골리무마브; CNTO 148), 및 그의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 14

제 12 항 또는 제 13 항에 있어서, 항-TNF α 약물에 대한 자가항체는 인간 항-키메라성 항체 (HACA), 인간 항-인간화 항체 (HAHA), 인간 항-마우스 항체 (HAMA), 및 그의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 15

제 12 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (c) 는 크기 배제 크로마토그래피 이후 자유 표지된 TNF α 의 피크 면적을 측정하는 것을 포함하는 방법.

청구항 16

제 12 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 있어서, 대조군 시료는 오로지 자유 표지된 TNF α 을 함유하는 기준 시료인 방법.

청구항 17

제 12 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (c) 에서 측정된 자유 표지된 TNF α 의 수준이 대조군 시료 내 자유 표지된 TNF α 의 수준과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 경우, 중화 형태의 자가항체가 검출되는 방법.

청구항 18

제 12 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (c) 에서 측정된 자유 표지된 TNF α 의 수준이 대조군 시료 내 자유 표지된 TNF α 의 수준과 비교시 감소 또는 부재인 경우, 비중화 형태의 자가항체가 검출되는 방법.

청구항 19

제 12 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항에 있어서, 시료가 혈청인 방법.

청구항 20

제 12 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 있어서, 시료가 항-TNF α 약물로의 치료요법을 받는 대상체로부터 취득되는 방법.

청구항 21

제 12 항 내지 제 20 항 중 어느 한 항에 있어서, 표지된 항-TNF α 약물 및 표지된 TNF α 가 상이한 형광단 또는 형광 염료를 포함하는 방법.

청구항 22

하기를 포함하는, 제 1 의 항-TNF α 약물에 대한 중화 형태의 자가항체가 제 2 의 항-TNF α 약물과 교차 반응성 인지 여부를 결정하는 방법:

(a) 제 1 항 내지 제 21 항 중 어느 한 항의 방법에 따라 시료 내 중화 형태의 자가항체의 존재, 수준 또는 백분율을 검출 또는 측정해, 시료가 중화 형태의 자가항체에 대해 양성 또는 음성인지 결정함; 및

시료가 중화 형태의 자가항체에 대해 양성인 경우:

(b) 시료를, 표지된 제 2 의 항-TNF α 약물과 접촉시켜, 표지된 제 2 의 항-TNF α 약물 및 중화 형태의 자가항체의 표지된 복합체를 형성시킴;

(c) 표지된 복합체를 크기 배제 크로마토그래피에 적용해 표지된 복합체를 분리함; 및

(d) 표지된 복합체를 검출해, 이로써 제 1 의 항-TNF α 약물에 대한 중화 형태의 자가항체가 제 2 의 항-TNF α 약물과 교차 반응성인지 여부를 검출함.

청구항 23

제 22 항에 있어서, 제 1 및 제 2 의 항-TNF α 약물이 독립적으로 REMICADE™(인플릭시마브), ENBREL™(에타네르셉트), HUMIRA™(아달리무마브), CIMZIA®(세르톨리주마브 페골), SIMPONI®(골리무마브; CNTO 148), 및 그의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 24

제 22 항 또는 제 23 항에 있어서, 제 1 의 항-TNF α 약물에 대한 자가항체가 인간 항-키메라성 항체 (HACA), 인간 항-인간화 항체 (HAHA), 인간 항-마우스 항체 (HAMA), 및 그의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 25

제 22 항 내지 제 24 항 중 어느 한 항에 있어서, 표지된 복합체의 존재는, 제 1 의 항-TNF α 약물에 대항하는 중화 항체가 제 2 의 항-TNF α 약물과 교차 반응성이라는 표시인 방법.

청구항 26

제 22 항 내지 제 24 항 중 어느 한 항에 있어서, 표지된 복합체의 부재는, 제 1 의 항-TNF α 약물에 대항하는 중화 자가항체가 제 2 의 항-TNF α 약물과 교차 반응성이 아니라는 표시인 방법.

청구항 27

제 22 항 내지 제 26 항 중 어느 한 항에 있어서, 시료가 혈청인 방법.

청구항 28

제 22 항 내지 제 27 항 중 어느 한 항에 있어서, 시료가 항-TNF α 약물로의 치료요법을 받는 대상체로부터 수득되는 방법.

청구항 29

제 22 항 내지 제 28 항 중 어느 한 항에 있어서, 표지된 제 2 의 항-TNF α 약물이 형광단 또는 형광 염료를 포함하는 방법.

청구항 30

하기를 포함하는, 항-TNF α 약물로의 치료요법 과정을 수여받는 대상체에서 항-TNF α 약물에 대한 치료요법을 모니터링 또는 최적화하는 방법:

- (a) 제 1 항 내지 제 21 항 중 어느 한 항의 방법에 따른 항-TNF α 약물에 대한 중화 형태의 자가항체의 존재, 수준 또는 백분율을, 치료요법 과정 동안 복수의 시간 지점에서 검출 또는 측정함;
- (b) 시간 경과에 따른 중화 형태의 자가항체의 존재, 수준 또는 백분율 변화를 검출함; 및
- (c) 시간 경과에 따른 중화 형태의 자가항체의 존재, 수준 또는 백분율 변화를 근거로, 대상체를 위한 치료요법 과정의 후속 투여용량 또는 상이한 치료요법 과정을 대상체에 적용해야 하는지 여부를 결정함.

청구항 31

제 30 항에 있어서, 항-TNF α 약물이 REMICADE™(인플릭시마브), ENBREL™(에타네르셉트), HUMIRA™(아달리무마브), CIMZIA®(세르톨리주마브 페골), SIMPONI®(골리무마브; CNTO 148), 및 그의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 32

제 30 항 또는 제 31 항에 있어서, 항-TNF α 약물에 대한 자가항체가 인간 항-키메라성 항체 (HACA), 인간 항-인간화 항체 (HAHA), 인간 항-마우스 항체 (HAMA), 및 그의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 33

제 30 항 내지 제 32 항 중 어느 한 항에 있어서, 치료요법 과정의 후속 투여용량이, 시간 경과에 따른 중화 형태의 자가항체의 존재, 수준 또는 백분율 변화를 기준으로 증량, 감량 또는 유지되는 방법.

청구항 34

제 30 항 내지 제 32 항 중 어느 한 항에 있어서, 상이한 치료요법 과정은 상이한 항-TNF α 약물, 면역억제제와 함께하는 현 치료요법 과정, 또는 항-TNF α 약물이 아닌 치료요법 과정으로의 전환을 포함하는 방법.

청구항 35

제 34 항에 있어서, 상이한 치료요법 과정이, 중화 형태의 자가항체의 수준 또는 백분율이 시간 경과에 따라 증가되는 경우에 적용되는 방법.

청구항 36

하기를 포함하는, 제 1 의 항-TNF α 약물로의 치료요법 과정을 수여받는 대상체에서 독성을 경감하고 및/또는 치료요법을 최적화하는 방법:

- (a) 제 1 의 항-TNF α 약물에 대한 중화 형태의 자가항체가, 제 1 항 내지 제 21 항 중 어느 한 항의 방법에 따라 대상체로부터의 시료 내 중화 형태의 자가항체의 존재, 수준 또는 백분율을 검출 또는 측정함으로써, 제 2 의 항-TNF α 약물과 교차-반응성인지를 결정함; 및
- (b) 중화 형태의 자가항체가 제 2 의 항-TNF α 약물과 교차-반응성인 경우 상이한 치료요법 과정을 대상체

에 적용해야 하는지를 결정함.

청구항 37

제 36 항에 있어서, 제 1 및 제 2 의 항-TNF α 약물이 독립적으로 REMICADE™(인플릭시마브), ENBREL™(에타네르셉트), HUMIRA™(아달리무마브), CIMZIA®(세르톨리주마브 페골), SIMPONI®(골리무마브; CNTO 148), 및 그의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 38

제 36 항 또는 제 37 항에 있어서, 제 1 의 항-TNF α 약물에 대한 자가항체가 인간 항-키메라성 항체 (HACA), 인간 항-인간화 항체 (HAHA), 인간 항-마우스 항체 (HAMA), 및 그의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 39

제 36 항 내지 제 38 항 중 어느 한 항에 있어서, 상이한 치료요법 과정이 항-TNF α 약물이 아닌 치료요법 과정으로의 전환을 포함하는 방법.

청구항 40

제 39 항에 있어서, 비-항-TNF α 약물이 IL-6 수용체-억제 모노클로날 항체, 항-인테그린 분자, JAK-2 억제제, 티로신 키나아제 억제제, 영양 치료요법 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 41

제 36 항 내지 제 40 항 중 어느 한 항에 있어서, 중화 형태의 자가항체가 제 2 의 항-TNF α 약물과 교차-반응성이 아닌 경우, 현 치료요법 과정의 후속 투여용량을 증량 또는 감량해야 하는지, 또는 상이한 치료요법 과정을 대상체에 적용해야 하는지 결정하는 것을 추가로 포함하는 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본 출원은 2011 년 7 월 6 일에 출원된 미국 가출원 제 61/505,031 호, 2011 년 8 월 26 일자에 출원된 미국 가출원 제 61/528,072 호, 및 2011 년 9 월 16 일에 출원된 미국 가출원 제 61/535,884 호에 대한 우선권을 청구하며, 상기 문헌들은 그 어떤 목적으로든 그 전체가 본원에 참고문헌으로 포함된다.

배경 기술

[0003] 자가면역 장애는 심각하고 만연되어 있는 의학적인 과제이다. 예를 들면, 류마티스 관절염 (RA) 은 약 2백만 이상의 미국인에게 영향을 미치고 있는 자가면역 질환이다. RA 는 관절의 만성 염증을 야기하고 전형적으로 관절 파괴 및 기능적 불능을 야기할 수 있는 잠재성이 있는 진행성 질병이다. 비록 유전적 소인, 감염 인자 및 환경적 인자가 모두 상기 질병의 병인에 상관있지만, 류마티스 관절염의 원인은 알려져 있지 않다. 활성 RA 에서, 증상은 피로, 식욕 부진, 미열, 근육 및 관절의 통증 및 뻣뻣함을 포함할 수 있다. 질병이 발병되는 동안, 관절은 활막 (synovium) 의 염증으로 인해, 종종 붉게 부풀어오르고, 통증을 느끼며 약해진다. 또한, RA 는 전신적인 질병이기 때문에, 염증이 눈과 입의 샘, 폐 라이닝 (lining), 심낭막 및 혈관을 포함하는, 관절 이외의 다른 신체의 장기 및 영역에 영향을 줄 수 있다.

[0004] RA 및 다른 자가면역 장애를 관리하기 위한 통상적인 치료방법은 "1 차 약물" 로 먼저 조치를 취하고 "2 차 약물" 로 후속 조치를 취하는 것이다. 1 차 약물은 통증 및 염증을 경감시킨다. 그러한 1 차 약물의 예는 아스피린, 아프로펜, 이부프로펜, 에토도락 및 다른 비-스테로이드성 항-염증 약물(NSAID) 뿐만 아니라 코르티코스테로이드를 포함하고, 상기 약물은 경구적으로 또는 조직 및 관절로 직접 주입된다. 2 차 약물은 질병을 완화시키고 진행성 관절 파괴를 막는 것으로 질병-변형 항-류마티스 약물 또는 DMARD 를 지칭한다. 상기

2차 약물은 하이드로클로로퀴닌, 아주르피딘 및 면역억제제, 예를 들면 메토타렉세이트, 아자티오프린, 사이클로포스파미드, 클로람부실 및 시클로스포린을 포함한다. 그러나, 상기 약물의 대부분은 치명적인 부작용을 가질 수 있다. 따라서, 류마티스 관절염 및 다른 자가면역 장애와 관련된 추가적인 치료요법이 모색되고 있다.

[0005] 종양 괴사 인자 알파 (TNF- α) 는 단핵구 및 대식세포를 비롯한 많은 세포들로부터 생성된 싸이토카인으로, 본래 특정 마우스 종양의 괴사를 유도하는 능력을 기반으로 밝혀졌다. 그 다음 악액질 (cachexia) 과 관련된 카케틴 (cachectin) 으로 불리는 인자들이 TNF- α 와 동일한 것으로 나타났다. TNF- α 는 쇼크, 패혈증, 감염, 자가면역 질환, RA, 크론병, 이식 거부반응 및 이식편-대-숙주 질병을 포함하는, 다양한 인간 질병 및 장애의 병리생리학에 관여한다.

[0006] 다양한 인간 장애에서의 인간 TNF- α (hTNF- α) 의 해로운 역할로 인해, hTNF- α 활성을 억제하거나 중화시키기 위한 치료적 전략이 고안되어 왔다. 특히, hTNF- α 에 결합할 수 있고, 이를 중화시킬 수 있는 항체들이 hTNF- α 활성을 억제하기 위한 수단으로서 모색되어 왔다. 가장 최초의, 그러한 항체로서 마우스의 림프구로부터 제조된 하이브리도마에 의해 분비되는, 마우스 모노클로날 항체 (mAbs) 가 있다 (예를 들면, Moeller 등에 허여된 미국 특허 5,231,024) 이러한 마우스 항-hTNF- α 항체는 hTNF- α 에 대한 높은 친화성을 나타내고 hTNF- α 활성을 중화시킬 수 있으나, 생체내에서의 그들의 사용은 짧은 혈청 반감기, 특정 인간 영향인자 가능의 유발 불능, 및 인간 내의 마우스 항체에 대한 원치않는 면역 반응 ("인간 항-마우스 항체" (HAMA) 반응) 과 같은 인간에서의 마우스 항체의 투여와 관련된 문제들로 인해 제한적이었다.

[0007] 더욱 최근에는, 생물학적 치료요법이 류마티스 관절염과 같은 자가면역 장애의 치료에 적용되어 왔다. 예를 들면, 4 개의 TNF α 억제제, REMICADE™ (인플릭시마브; infliximab), 키메라성 항-TNF α mAb, ENBREL™ (etanercept; 에타네르셉트), TNFR-Ig Fc 융합 단백질, HUMIRA™ (아달리무마브; adalimumab), 인간 항-TNF α mAb, 및 CIMZIA® (세르톨리주마브 페골; certolizumab pegol), PEG화된 Fab 단편이 류마티스 관절염의 치료를 위해 FDA의 승인을 받았다. CIMZIA®는 경증 내지 중증 크론병 (CD) 의 치료용으로 사용된다. 그러한 생물학적 치료요법이 류마티스 관절염 및 CD와 같은 다른 자가면역 장애의 치료에 성공적임이 입증되었지만, 모든 치료받은 환자들이 그러한 치료에 반응을 하거나 잘 반응하는 것은 아니다. 게다가, TNF α 억제제의 투여는 약물에 대한 면역 반응을 유도할 수 있고, 인간 항-키메라성 항체 (HACA), 인간 항-인간화 항체 (HAHA), 및 인간 항-마우스 항체 (HAMA) 와 같은 자가항체의 생산을 야기할 수 있다. 그러한 HACA, HAHA, 또는 HAMA 면역 응답 반응은 과민감성 반응 및 약물을 이용한 추가적인 치료를 막는 면역치료학적 TNF α 억제제의 약동학 및 생체분배에서의 급격한 변화와 관련될 수 있다. 따라서, 당해 기술분야에서는 생물제제 치료요법을 모니터링하고 치료 결정을 안내하기 위하여, 환자 시료 중의 항-TNF α 약물과 같은 생물학적 제제에 대한 자가항체의 존재를 검출할 검정의 필요성이 요구되고 있다. 본 발명은 그러한 필요를 충족시키며, 관련된 장점도 제공한다.

발명의 내용

[0008] 본 발명의 개요

[0009] 본 발명은 시료 내 항-TNF α 약물 치료요법과 같은 생물제제에 대한 중화 및 비(非)중화 자가항체의 존재 또는 수준을 검출 및 측정하기 위한 검정을 제공한다. 본 발명은 대상체가 생물학적 치료요법 (예, 항-TNF α 와 약물 치료요법) 을 받는 동안, 시간 경과에 따른 중화 및/또는 비중화 항-약물 항체의 형성을 모니터링하기에 유용하다. 본 발명은 또한 대안적인 생물학적 치료요법 (예, 대안적인 항-TNF α 와 치료요법) 을 받는 대상체의 시료 내에서 중화 항-약물 항체의 교차-반응성을 예측 및/또는 측정하기에 유용하다. 이로써, 본 발명은 생물학적 제제로 치료 받는 대상체를 위한 치료 결정의 안내 정보를 제공하고, 치료요법을 최적화하고, 독성을 경감시키고 및/또는 생물학적 치료요법으로의 치료요법적 처치의 효능을 모니터링하는데 있어서 정확도를 개선한다.

[0010] 한 측면에서, 본 발명은, 하기를 포함하는, 시료 내 생물제제에 대한 중화 및/또는 비중화 형태의 자가항체의 존재를 검출하는 방법을 제공한다:

[0011] (a) 시료를, 표지된 생물제제 및 표지된 생물학적 결합 부분과 접촉시켜 하기를 형성시킴:

[0012] (i) 표지된 생물제제 및 자가항체의 제 1 의 표지된 복합체 (즉, 면역-복합체 또는 컨쥬게이트), (즉, 제 1 의 표지된 복합체의 성분들은 서로 공유 결합되지 않음); 및/또는

- [0013] (ii) 표지된 생물제제, 표지된 생물학적 결합 부분 및 자가 항체의 제 2 의 표지된 복합체 (즉, 면역-복합체 또는 컨주게이트) (즉, 제 2 의 표지된 복합체의 성분들은 서로 공유 결합되지 않음);
- [0014] (b) 제 1 의 표지된 복합체 및/또는 제 2 의 표지된 복합체를 크기 배제 크로마토그래피에 적용시켜, 이들을 자유 (즉, 비(非)결합된) 표지된 생물학적 결합 부분, 자유 표지된 생물제제, 및/또는 표지된 생물제제 및 표지된 생물학적 결합 부분의 복합체로부터 분리시킴;
- [0015] (c) 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준을 크기 배제 크로마토그래피 이후 측정함 (예, 크기 배제 크로마토그래피 (SEC) 후 자유 표지된 생물학적 결합 부분 피크의 곡선하 면적 (AUC) 을 측정하는 것에 의함); 및
- [0016] (d) 단계 (c) 에서 측정된 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준을, 대조군 시료 내 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준과 비교해 (예, 오로지 자유 표지된 생물학적 결합 부분만을 함유하는 기준 시료의 SEC 후, 자유 표지된 생물학적 결합 부분 피크의 AUC 를 측정하는 것에 의함), 이로써 중화 및/또는 비중화 형태의 자가 항체의 존재를 검출함.
- [0017] 특정 구현예에서, 중화 형태의 자가항체는, 단계 (c) 에서 측정된 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준이, 대조군 시료 내 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준과 동일하거나 실질적으로 동일한 경우 탐지된다. 특정 기타 구현예에서, 비중화 형태의 자가항체는, 단계 (c) 에서 측정된 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준이, 대조군 시료에서 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준과 비교시, 감소되거나 (예, 실질적으로 감소) 또는 부재인 경우 (예, 검출되지 않음) 에 탐지된다.
- [0018] 또 다른 측면에서, 본 발명은, 하기를 포함하는, 시료 내 생물제제에 대한 중화 형태의 자가항체의 수준 또는 백분율을 측정하는 방법을 제공한다:
- [0019] (a) 시료를, 표지된 생물제제 및 표지된 생물학적 결합 부분과 접촉시켜 하기를 형성시킴:
- [0020] (i) 표지된 생물제제 및 자가항체의 제 1 의 표지된 복합체 (즉, 면역-복합체 또는 컨주게이션) (즉, 제 1 의 표지된 복합체의 성분들은 서로 공유 결합되지 않음); 및/또는
- [0021] (ii) 표지된 생물제제, 표지된 생물학적 결합 부분 및 자가항체의 제 2 의 표지된 복합체 (즉, 면역-복합체 또는 컨주게이트) (즉, 제 2 의 표지된 복합체의 성분들은 서로 공유 결합되지 않음);
- [0022] (b) 제 1 의 표지된 복합체 및/또는 제 2 의 표지된 복합체를 크기 배제 크로마토그래피에 적용하여, 이들을 자유 (즉, 비결합된) 표지된 생물학적 결합 부분, 자유 표지된 생물제제, 및/또는 표지된 생물제제 및 표지된 생물학적 결합 부분의 복합체로부터 분리시킴;
- [0023] (c) 크기 배제 크로마토그래피 후 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준을 측정함 (예, 크기 배제 크로마토그래피 (SEC) 후 자유 표지된 생물학적 결합 부분 피크의 곡선하 면적 (AUC) 을 측정하는 것에 의함); 및
- [0024] (d) 단계 (c) 에서 측정된 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준을, 대조군 시료 내 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 정규화된 수준 또는 백분율을 비교함 (예, 오로지 자유 표지된 생물학적 결합 부분만을 함유하는 기준 시료의 SEC 후 자유 표지된 생물학적 결합 부분 피크의 AUC 를 측정 및 정규화해, 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준 또는 백분율을 산출하는 것에 의함), 이때 대조군 시료 내 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 정규화된 수준 또는 백분율은 중화 형태의 자가항체의 수준 또는 백분율에 상응함.
- [0025] 일부 구현예에서, 대조군 시료 내 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 정규화된 수준 또는 백분율과 단계 (c) 에서 측정된 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준간 차이는, 비중화 형태의 자가항체의 수준 또는 백분율에 해당한다.
- [0026] 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은, 하기를 포함하는, 제 1 의 생물제제에 대한 중화 형태의 자가항체가 제 2 의 (즉, 상이한) 생물제제와의 교차 반응성인지 여부에 대해 결정하는 방법을 제공한다:
- [0027] (a) 본원에서 기재된 검정법에 준수하여 시료 내 중화 형태의 자가항체의 존재, 수준 또는 백분율을 검출 또는 측정하여, 시료가 중화 형태의 자가항체에 대해 양성 또는 음성인지 여부를 판단함; 및
- [0028] 시료가 중화 형태의 자가항체에 대해 양성인 경우:
- [0029] (b) 시료를 표지된 제 2 의 생물제제와 접촉시켜, 표지된 제 2 의 생물제제 및 중화 형태의 자가항체의 표지된 복합체를 형성함 (즉, 표지된 복합체의 성분들은 서로 공유 결합되지 않음);

- [0030] (c) 표지된 복합체를 크기 배제 크로마토그래피에 적용시켜, 표지된 복합체를 분리시킴 (예, 자유 표지된 제 2 의 생물체제로부터); 및
- [0031] (d) 표지된 복합체를 검출해, 이로써 제 1 의 생물체제에 대한 중화 형태의 자가항체가 제 2 의 생물체제와 교차반응성인지 여부를 판단함.
- [0032] 특정 구현예에서, 표지된 복합체의 존재는, 제 1 의 생물체제에 대항하는 중화 자가항체가 제 2 의 생물체제와 교차-반응성이라는 점의 지시자로, 즉 중화 자가항체가 제 1 의 생물학적 약물과 제 2 의 생물학적 약물 모두의 활성을 억제할 것이다.
- [0033] 특정 기타 구현예에서, 표지된 복합체의 부재는 제 1 의 생물체제에 대항하는 중화 자가항체가 제 2 의 생물체제와 교차-반응성이 아니라는 점의 지시자로, 즉 중화 자가항체는 제 2 의 생물학적 약물의 활성을 억제하지 않을 것이다.
- [0034] 일부 구현예에서, 생물체제는 항체 (예, 항-TNF α 모노클로날 항체), 항체 단편, 단백질 (예, 사이토카인, 예컨대 인터류킨), 폴리펩티드, 펩티드, 융합 단백질, 다가 결합 단백질, 항체-약물 컨쥬게이트, 백신, 핵산, 당, 그의 재조합 형태, 그의 가공된 (engineered) 형태 및 그의 조합물을 포함한다.
- [0035] 기타 구현예에서, 시료는 전혈, 혈청 또는 혈장 시료, 예를 들어 생물학적 치료요법을 수여받은 대상체의 전혈, 혈청 또는 혈장 시료이다. 바람직한 구현예에서, 시료는 혈청이다. 특정 구현예에서, 대상체는 자가면역 질환 (예, 류마티스 관절염), 염증성 질환 (예, 염증성 장질환 (IBD), 예컨대 크론병 (CD) 또는 궤양대장염 (UC)), 또는 암 등의 질환 또는 장애가 있다.
- [0036] 특정 구현예에서, 시료는 생물체제에 대한 자가항체를 갖거나 또는 이를 갖는 것으로 의심된다. 기타 구현예에서, 생물학적 자가항체에는 이에 제한되는 것은 아니나 인간 항-키메라성 항체 (HACA), 인간 항-인간화 항체 (HAHA), 및 인간 항-마우스 항체 (HAMA) 뿐 아니라 그의 조합물이 포함된다.
- [0037] 특정 구현예에서, 본 발명의 검정 방법은, 시료를 표지된 생물체제 및 표지된 생물학적 결합 부분과 접촉하기 이전, 동안 및/또는 이후에, 상기 시료를 산과 접촉시키는 것을 포함하는 산 해리 단계를 추가로 포함한다.
- [0038] 특정 기타 측면에서, 본 발명의 검정 방법은 새로 내 생물체제에 대한 중화 및/또는 비중화 형태의 자가항체의 하나 이상의 아형 (isotype) 의 존재 또는 수준을 검출하는 것을 포함한다.
- [0039] 하나의 특정 측면에 있어서, 본 발명은, 하기를 포함하는, 시료 내 항-TNF α 약물에 대한 중화 및/또는 비중화 형태의 자가항체의 존재를 검출하는 방법을 제공한다:
- [0040] (a) 시료를, 표지된 항-TNF α 약물 및 표지된 TNF α 과 접촉시켜 하기를 형성시킴:
- [0041] (i) 표지된 항-TNF α 약물 및 자가항체의 제 1 의 표지된 복합체 (즉, 면역-복합체 또는 컨쥬게이트) (즉, 제 1 의 표지된 복합체의 성분들은 서로 공유 결합되지 않음); 및/또는
- [0042] (ii) 표지된 항-TNF α 약물, 표지된 TNF α , 및 자가항체의 제 2 의 표지된 복합체 (즉, 면역-복합체 또는 컨쥬게이트) (즉, 제 2 의 표지된 복합체의 성분들은 서로 공유 결합되지 않음);
- [0043] (b) 제 1 의 표지된 복합체 및/또는 제 2 의 표지된 복합체를 크기 배제 크로마토그래피에 적용시켜, 이들을 자유 (즉, 비결합된) 표지된 TNF α , 자유 표지된 항-TNF α 약물 및/또는 표지된 항-TNF α 약물 및 표지된 TNF α 의 복합체로부터 분리시킴;
- [0044] (c) 크기 배제 크로마토그래피 후 자유 표지된 TNF α 의 수준을 측정함 (예, 크기 배제 크로마토그래피 (SEC) 후 자유 표지된 TNF α 피크의 곡선하 면적 (AUC) 을 측정하는 것에 의함); 및
- [0045] (d) 단계 (c) 에서 측정된 자유 표지된 TNF α 을, 대조군 시료 내 자유 표지된 TNF α 의 수준과 비교하여 (예, 오로지 자유 표지된 TNF α 만을 함유하는 기준 시료의 SEC 후 자유 표지된 TNF α 피크의 AUC 를 측정하는 것에 의함), 이로써 중화 및/또는 비중화 형태의 자가항체의 존재를 검출함.
- [0046] 특정 구현예에서, 중화 형태의 자가항체는, 단계 (c) 에서 측정된 자유 표지된 TNF α 의 수준이 대조군 시료 내 자유 표지된 TNF α 의 수준과 동일하거나 실질적으로 동일한 경우에 검출된다. 특정 기타 구현예에서, 비중화 형태의 자가항체는, 단계 (c) 에서 측정된 자유 표지된 TNF α 의 수준이, 대조군 시료 내 자유 표지된 TNF α 의 수준과 비교시 감소되거나 (예, 실질적으로 감소됨) 또는 부재인 (예, 검출되지 않음) 경우에 검출된다.

- [0047] 또 다른 특정 측면에 있어서, 본 발명은, 하기를 포함하는, 시료 내 항-TNF α 약물에 대한 중화 형태의 자가항체의 수준 또는 백분율을 측정하는 방법을 제공한다:
- [0048] (a) 시료를, 표지된 항-TNF α 약물 및 표지된 TNF α 과 접촉시켜 하기를 형성시킴:
- [0049] (i) 표지된 항 TNF α 약물 및 자가항체의 제 1 의 표지된 복합체 (즉, 면역-복합체 또는 컨쥬게이트) (즉, 상기 제 1 의 표지된 복합체의 성분들은 서로 공유 결합되지 않음); 및/또는
- [0050] (ii) 표지된 항-TNF α 약물, 표지된 TNF α , 및 자가 항체의 제 2 의 표지된 복합체 (즉, 면역-복합체 또는 컨쥬게이트) (즉, 제 2 의 표지된 복합체의 성분들은 서로 공유 결합되지 않음);
- [0051] (b) 제 1 의 표지된 복합체 및/또는 제 2 의 표지된 복합체를 크기 배제 크로마토그래피에 적용시켜, 이들을 자유 (즉, 비결합된) 표지된 TNF α , 자유 표지된 항-TNF α 약물, 및/또는 표지된 항-TNF α 약물 및 표지된 TNF α 의 복합체로부터 분리시킴;
- [0052] (c) 크기 배제 크로마토그래피 후 자유 표지된 TNF α 의 수준을 측정함 (예, 크기 배제 크로마토그래피 (SEC) 후 자유 표지된 TNF α 피크의 곡선하 면적 (AUC) 을 측정하는 것에 의함); 및
- [0053] (d) 단계 (c) 에서 측정된 자유 표지된 TNF α 의 수준을, 대조군 시료 내 자유 표지된 TNF α 의 정규화된 수준 또는 백분율과 비교함 (예, 오로지 자유 표지된 TNF α 만을 함유하는 기준 시료의 SEC 후 자유 표지된 TNF α 의 AUC 를 측정 및 정규화하여, 자유 표지된 TNF α 의 수준 또는 백분율을 산출하는 것에 의함), 이때 대조군 시료 내 자유 표지된 TNF α 의 정규화된 수준 또는 백분율은 중화 형태의 자가항체의 수준 또는 백분율에 상응함.
- [0054] 일부 구현예에서, 대조군 시료 내 자유 표지된 TNF α 의 정규화된 수준 또는 백분율과 단계 (c) 에서 측정된 자유 표지된 TNF α 의 수준의 차이는 비중화 형태의 자가항체의 수준 또는 백분율에 상응한다.
- [0055] 또 다른 특정 측면에 있어서, 본 발명은 하기를 포함하는, 제 1 의 항-TNF α 약물에 대한 중화 형태의 자가항체가 제 2 의 (상이한) 항-TNF α 약물과 교차-반응성인지 여부를 판단하는 방법을 제공한다:
- [0056] (a) 본원에서 기재된 검정법에 준수하여 시료 내 중화 형태의 자가항체의 존재, 수준 또는 백분율을 검출 또는 측정해, 시료가 중화 형태의 자가항체에 대해 양성 또는 음성인지 여부를 판단함; 및
- [0057] 시료가 중화 형태의 자가항체에 대해 양성인 경우, 이때:
- [0058] (b) 시료를, 표지된 제 2 의 항-TNF α 약물과 접촉시켜, 표지된 제 2 의 항-TNF α 약물 및 중화 형태의 자가항체의 표지된 복합체를 형성함 (즉, 이때 표지된 복합체의 성분들은 서로 공유 결합되지 않음);
- [0059] (c) 표지된 복합체를 크기 배제 크로마토그래피에 적용시켜, 표지된 복합체를 분리시킴 (예, 자유 표지된 제 2 의 항-TNF α 약물로부터); 및
- [0060] (d) 표지된 복합체를 검출시켜, 이로써 제 1 의 항-TNF α 약물에 대한 중화 형태의 자가항체는 제 2 의 항-TNF α 약물과 교차-반응성인지 여부를 판단함.
- [0061] 특정 구현예에서, 표지된 복합체의 존재는 제 1 의 항-TNF α 약물에 대항하는 중화 자가항체가 제 2 의 항-TNF α 약물과 교차-반응성이라는 점을 지시하고, 즉, 중화 자가항체는 제 1 의 항-TNF α 약물 및 제 2 의 항-TNF α 약물 양자 모두의 활성을 억제할 것이다.
- [0062] 특정 기타 구현예에 있어서, 표지된 복합체의 부재는 제 1 의 항-TNF α 약물에 대항하는 중화 자가항체가 제 2 의 항-TNF α 약물과 교차-반응성이 아니라는 점을 지시하고, 즉, 중화 자가항체가 제 2 의 항-TNF α 약물의 활성을 억제할 것이다.
- [0063] 일부 구현예에서, 항-TNF α 약물은 REMICADE™(인플릭시마브), ENBREL™(에타네르셉트), HUMIRA™(아달리무마브), CIMZIA®(세르톨리주마브 페골), SIMPONI®(골리무마브 (golimumab); CNTO 148), 및 그 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0064] 기타 구현예에서, 시료는 전혈, 혈청 또는 혈장 시료, 예를 들어 항-TNF α 약물 치료요법을 수여받은 대상체로부터의 전혈, 혈청 또는 혈장 시료이다. 바람직한 구현예에서, 시료는 혈청이다. 특정 구현예에서, 대상체는 TNF α -매개성 질환 또는 장애, 예컨대 자가면역 질환 (예, 류마티스 관절염) 또는 염증성 질환 (예, 염증성 장질환 (IBD), 예컨대 크론병 (CD) 또는 궤양대장염 (UC)) 을 갖는다.
- [0065] 특정 구현예에서, 시료는 항-TNF α 약물에 대한 자가항체를 갖거나 또는 이를 갖는 것으로 의심된다. 기타

구현예에서, 항-TNF α 약물 자가항체에는, 이에 제한되는 것은 아니나, 인간 항-키메라성 항체 (HACA), 인간 항-인간화 항체 (HAHA), 및 인간 항-마우스 항체(HAMA) 뿐만 아니라 그의 조합물이 포함된다.

- [0066] 특정 측면에서, 본 발명의 검정 방법은, 표지된 항-TNF α 약물 및 표지된 TNF α 와 시료를 접촉하기 이전, 동안 및/또는 이후에, 상기 시료를 산과 접촉시키는 것을 포함하는 산 해리 단계를 추가로 포함한다.
- [0067] 특정 기타 측면에서, 본 발명의 검정 방법은, 시료 내 항-TNF α 약물에 대한 중화 및/또는 비중화 형태의 자가항체 중 하나 이상의 아형의 존재 또는 수준을 검출하는 것을 포함한다.
- [0068] 추가 측면에서, 본 발명은 하기를 포함하는, 생물체제로의 치료요법 과정을 수여받은 대상체에서, 생물체제에 대한 치료요법을 모니터링 및/또는 최적화하는 방법을 제공한다:
- [0069] (a) 본원에서 기재된 검정을 준수하여 생물체제에 대한 중화 형태의 자가항체의 존재, 수준 또는 백분율을 복수의 시간 지점에서 치료요법 과정 동안 검출 또는 측정함;
- [0070] (b) 시간 경과에 따른 중화 형태의 자가항체의 존재, 수준 또는 백분율 변화를 검출함; 및
- [0071] (c) 시간 경과에 따른 중화 형태의 자가항체의 존재, 수준 또는 백분율 변화를 근거로, 대상체를 위한 치료요법 과정의 후속 투여용량 또는 상이한 치료요법 과정을 대상체에 적용해야 하는지 여부를 결정함.
- [0072] 한 특정 측면에 있어서, 본 발명은 하기를 포함하는, 생물체제로의 치료요법 과정을 수여 받은 대상체에서 생물체제에 대한 치료요법을 모니터링 및/또는 최적화하기 위한 방법을 제공한다:
- [0073] (a) 시간 지점 t_0 에서, 본원에서 기재된 바와 같은 대상체로부터의 제 1 의 시료 내 생물체제에 대한 중화 형태의 자가항체의 수준 또는 백분율을 측정함;
- [0074] (b) 시간 지점 t_1 에서, 본원에서 기재된 바와 같은 대상체로부터의 제 2 의 시료 내 중화 형태의 자가항체의 수준 또는 백분율을 측정함;
- [0075] (c) 임의로는, 시간 지점 t_{n+1} 에서, 대상체로부터 n 개의 추가적인 시료로 단계 (b) 를 반복함, 이때 n 은 1 내지 약 25 의 정수임 (예, n 은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25, 또는 임의의 그 내부의 범위임).
- [0076] (d) 시간 지점 t_0 내지 t_1 또는 시간 지점 t_0 내지 t_{n+1} 에서 중화 형태의 자가항체의 수준 또는 백분율 변화를 검출함; 및
- [0077] (e) 시간 경과에 따른 중화 형태의 자가항체의 수준 또는 백분율 변화를 근거로, 대상체에 대한 치료요법의 과정의 후속적인 투여용량 또는 상이한 치료요법 과정을 대상체에 적용해야 하는지 여부를 결정함.
- [0078] 추가적인 측면에서, 본 발명은 하기를 포함하는, 제 1 의 생물체제로의 치료요법 과정을 수여 받은 대상체에서 치료요법을 최적화 및/또는 독성을 경감시키기 위한 방법을 제공한다:
- [0079] (a) 제 1 의 생물체제에 대한 중화 형태의 자가항체가 제 2 의 (즉, 상이한) 생물체제와 교차-반응성인지 여부를, 본원에서 기재된 검정을 준수해 대상체로부터의 시료 내 중화 형태의 자가항체의 존재, 수준 또는 백분율을 검출 또는 측정함으로써 판단함; 및
- [0080] (b) 중화 형태의 자가항체가 제 2 의 생물체제와 교차-반응성인 경우 상이한 치료요법 과정을 대상체에 적용해야 하는지 결정함.
- [0081] 하나의 특정 측면에 있어서, 본 발명은 하기를 포함하는, 항-TNF α 약물로의 치료요법의 과정을 수여 받은 대상체에서 항-TNF α 약물에 대한 치료요법을 모니터링 및/또는 최적화하는 방법을 제공한다.
- [0082] (a) 치료요법 과정 전반에 걸쳐 복수의 시간 지점에서 본원에서 기재된 검정을 준수해 항-TNF α 약물에 대한 중화 형태의 자가항체의 존재, 수준 또는 백분율을 검출 또는 측정함;
- [0083] (b) 시간 경과에 따라 중화 형태의 자가항체의 존재, 수준 또는 백분율 변화를 검출함; 및
- [0084] (c) 시간 경과에 따라 중화 형태의 자가항체의 존재, 수준 또는 백분율 변화를 근거로, 대상체에 상이한 과정의 치료요법을 적용해야 하는지 여부 또는 대상체를 위한 치료요법 과정의 후속 투여용량을 결정함.
- [0085] 또 다른 특정 측면에서, 본 발명은 하기를 포함하는, 항-TNF α 약물로의 치료요법 과정을 수여 받은

대상체에서, 항-TNF α 약물에 대한 치료요법의 최적화 및/또는 모니터링 방법을 제공한다:

- [0086] (a) 시간 지점 t_0 에서 본원에서 기재된 바와 같은 대상체로부터의 제 1 의 시료에서 항-TNF α 약물에 대한 중화 형태의 자가항체의 수준 또는 백분율을 측정함;
- [0087] (b) 시간 지점 t_1 에서 본원에서 기재된 바와 같은 대상체로부터의 제 2 의 시료에서 중화 형태의 자가항체의 수준 또는 백분율을 측정함;
- [0088] (c) 임의로는, 시간 지점 t_{n+1} 에서 대상체로부터의 n 개의 추가 시료로 단계 (b) 를 반복함 (이때, n 은 1 내지 약 25 의 정수 (예, n 은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25, 또는 그 내부의 임의의 범위임) 임);
- [0089] (d) 시간 지점 t_0 내지 t_1 또는 시간 지점 t_0 내지 t_{n+1} 에서 중화 형태의 자가항체의 수준 또는 백분율 변화를 검출함, 및
- [0090] (e) 시간 경과에 따라 중화 형태의 자가항체의 수준 또는 백분율 변화를 근거로, 대상체를 위한 치료요법의 과정의 후속적인 투여용량 또는 상이한 치료요법 과정을 대상체에 적용해야하는지 여부를 결정함.
- [0091] 또 다른 특정 측면에서, 본 발명은 하기를 포함하는, 제 1 의 항-TNF α 약물로의 치료요법 과정을 수여받는 대상체에서 치료요법의 최적화 및/또는 독성 경감 방법을 제공한다:
- [0092] (a) 본원에서 기재된 검정을 준수해, 대상체로부터의 시료 내 중화 형태의 자가항체의 존재, 수준 또는 백분율을 검출 또는 측정함으로써, 제 1 의 항-TNF α 약물에 대한 중화 형태의 자가항체가 제 2 의 (즉, 상이한) 항-TNF α 약물과 교차-반응성인지 여부를 판단함; 및
- [0093] (b) 중화 형태의 자가항체가 제 2 의 항-TNF α 약물과 교차-반응성인 경우, 대상체에 상이한 치료요법 과정을 적용해야 하는지 결정함.
- [0094] 본 발명의 여타 목적, 특징 및 장점은 하기의 상세한 설명 및 도면으로부터 당업자에게 자명할 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0095] 도 1 은 NAb 백분율 (y 축) 및 ATI 수준 사이의 분명한 상호관계가 존재함을 나타낸다.
- 도 2 는 ATI 농도 ≥ 60 U/ml 는 NAb+ 을 예측한다는 점을 나타낸다.
- 도 3 은 ATI 가 0.931 의 ROC AUC 를 갖는 NAb 를 예측한다는 점을 나타낸다.
- 도 4 는 본 발명의 유체 상 이동성 변동 검정 (fluid phase mobility shift assay) 에 의한 ATI 의 검출을 나타낸다.
- 도 5 는 본 발명의 예의 ATI/IFX 유체 상 이동성 변동 검정을 나타낸다.
- 도 6 은 본 발명의 비중화 항-약물 항체 (ADA) 검정을 나타낸다.
- 도 7 은 본 발명의 중화 ADA 검정을 나타낸다.
- 도 8 은 1, 2, 또는 3 개월째에 취한 UC 환자로부터의 5 가지 시료의 시간 경과에 따른 IFX 및 AIT 의 수준을 나타낸다.
- 도 9 는 UC 환자에서 시간 경과에 따른 자유 TNF α 의 백분율을 결정하기 위한 피크 분석을 나타낸다.
- 도 10 은 IFX 로 스파이크되고 2 또는 3 개월째에 취한 UC 환자로부터의 3 가지의 시료에서 예시되는 바와 같이, 시간 경과에 따른 비중화 자가항체로부터 중화 자가항체로의 존재 변동을 나타낸다.
- 도 11 은 IFX 로 스파이크된 UC 환자 시료에서 시간 경과에 따른 자유 TNF α 의 백분율을 결정하는 피크 분석을 나타낸다.
- 도 12 는 비중화 항체 (Ab) 대조군으로서의 토끼 항-인간 IgG1 Fc 의 용도를 나타낸다.
- 도 13 은 혼합 중화 항체 (NAb)/비중화 항체 (Ab) 대조군으로서의 ATI 양성 혈청의 용도를 나타낸다.
- 도 14 는 ATI 양성 혈청으로부터의 ATI 정제 결과, 약 친화성 NAb 의 손실을 나타낸다.

도 15 는 이들 각종 대조군에서 자유 TNF α 의 백분율을 결정하기 위한 UC 환자 케이스 연구로부터의 피크 분석을 나타낸다.

도 16 은 30 주 기간 동안 7 또는 8 주째에 취한 4 가지 시료의 시간 경과에 따른 자유 TNF α 의 백분율을 결정하기 위한, CD 환자 케이스 연구로부터의 피크 분석을 나타낸다.

도 17 은 50 주 기간 동안 취한 3 가지의 시료의 시간 경과에 따른 자유 TNF α 의 백분율을 결정하기 위한 또 다른 CD 환자 케이스 연구로부터의 피크 분석을 나타낸다.

도 18 은 치료요법 유도 또는 유지 동안 또는 이후의 특정 주에 시료 내 자유 TNF α 의 백분율을 측정하기 위한 추가 4 가지의 CD 환자 케이스 연구로부터의 피크 분석을 나타낸다.

도 19 는 이동성 변동 검정을 통한 비중화 항체 활성의 검출을 나타낸다.

도 20 은 IFX 및 ADL 양자 모두에 대한 ADA 의 교차 반응성을 나타내며, 이때 ADA 의 결합 부위는 TNF α 의 결합 부위를 모방하고 그리하여 다중 항-TNF 약물에 결합될 수 있음을 나타낸다.

도 21 은 하나의 항-TNF 약물에 대해 반응해 생성되는 NAb 의, 다른 항-TNF 약물에 대한 교차-반응성을 측정하는 두 환자의 예시 (환자 1 및 2) 를 나타낸다. 특히, 환자가 Remicade (IFX) 치료 중인 경우에 발달된 (develop) NAb 를 Humira (ADL) 에 대해 시험하였다.

도 22 는 IFX 또는 ADL 등의 약물에 대한 비중화 항체 (비-NAb) (상단) 또는 중화 항체 (NAb) (하단) 의 존재를 검출하기 위한 본 발명의 검정의 예의 구현을 나타낸다.

도 23 은 NAb 표준 곡선의 제작 및 용도를 나타낸다.

도 24 는 ADL 에 대한 IFX 에 대항해 제조된 NAb 의 교차-반응성을 결정하기 위해, IFX 로 치료하였으나, IFX 에 대한 응답성이 결실된 환자 3 에 대한 케이스 연구의 결과를 제공한다.

도 25 는 IFX 에 대항해 제조된 NAb 의 ADL 에 대한 교차-반응성을 결정하기 위해, IFX 로 치료하였으나 IFX 에 대한 응답성이 결실된 환자 4 의 케이스 연구 결과를 제공한다.

도 26 은 교차 반응성 ATI 의 발달 및 ATI 친화도 성숙을 증명하는 환자 연구의 비제한적인 예시를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 발명의 상세한 설명

I. 도입부

본 발명은 부분적으로는 면역 복합체의 평형화를 가능케 하는 크기 배제 크로마토그래피 및 임의로는 산 해리를 이용한 균질 이동성 변동 검정법이 항-TNF α 약물과 같은 생물체제에 대해 생성되는 중화 및 비중화 형태의 자가항체들 (예를 들어, HACA, HAHA 등) 의 존재 또는 수준을 측정하기 위해 특히 유리하다는 발견사실을 근거로 한다. 그러한 자가항체들은 항-약물 항체 또는 ADA 로도 공지되어 있고, 이의 중화 및 비중화 형태도 또한 각각 NAb 및 비-NAb 로서 공지되어 있다.

특정 구현예에서, 본 발명의 균일한 이동성 변동 검정법을 (형광) 표지된 생물체제 (예, 항-TNF α 약물) 및 (예, 형광) 표지된 생물학적 결합 부분 (예, TNF α) 로 대상체의 시료를 접촉시켜 수행한다. 본원에서 기재된 검정법은, 적어도 하기의 이유로 유리하다: 저 친화도 ADA 를 제거하는 세정 단계에 대한 필요성을 배제함; 백그라운드 및 혈청 간섭 문제점을 줄이는, 가시, IR 및/또는 근 IR (NIR) 스펙트럼에서 검출을 허용하는 형광 단과 같은 뚜렷한 표지자를 이용함; 형광 표지 검출의 고민감도로 인해 낮은 역가를 갖는 대상체에서 중화 및/또는 비중화 ADA 를 검출할 능력을 증가시킴; 및 액체 상 반응이므로, ELISA 플레이트 등의 고체 표면으로의 부착에 의한 에피토프 내 임의의 변화 가능성을 감소시킴.

예의 구현예에서, 본 발명의 검정법은 상이한 시간 지점에서 다중의 시료 내 중화 및/또는 비중화 항-약물 항체의 형성을 모니터링하기 위한 항-TNF α 약물 치료요법 중인 IBD 환자의 시간 경과적 케이스 연구를 가능하게 하기 때문에 유리하다. 본 발명의 검정법은 또한 대상체가 항-TNF α 약물 치료요법 중인 동안 시간 경과에 따른 비중화에서 중화 항-약물 항체로의 변동이 존재하는지 판단 가능하기 때문에 유리하다. 임의의 특정 이론에 구애 받지 않고, 중화 항-약물 항체는 유의미한 음성 임상적 결과를 낳을 수 있는데, 그 이유는 이것이 항-TNF α 약물과 TNF α 간 결합을 방해하므로, 그리하여 효능 손실을 유도하기 때문이다.

- [0101] 추가적인 예의 구현예에서, 본 발명의 검정법은 대안적인 생물학적 약물, 예컨대 기타 항-TNF 약물로 대상체 시료 내 중화 항-약물 항체의 교차-반응성을 예측 및/또는 결정하는데 유용한 것으로 밝혀졌다. 단지 예시 목적으로, 시료가 하나의 항-TNF α 약물에 대한 중화 ADA 를 함유하는 경우, 이들 중화 ADA 는 아마도 다른 항-TNF α 약물에 대해 교차 반응 가능하고, 이들에 대해 중화적일 가능성이 있으므로, 대상체를 위해 권고되는 치료 조정은 상이한 작용 메커니즘을 갖는 약물 (예, 비-항-TNF 제제) 로 전환될 것이다. 그러나, 시료가 하나의 항-TNF α 약물에 대한 비중화 ADA 를 함유하는 경우에는, 대상체에 권고되는 치료 조정은 또 다른 항-TNF α 약물로 전환될 수 있을 것이다.
- [0102] 따라서, 본 발명은 부분적으로는 항-TNF α 약물 치료요법을 제공받고 있는 대상체에 있어서 치료 결정을 안내하기에 유용한 정보를 제공함으로써, 항-TNF α 약물, 예컨대 인플릭시마브 및 아달리무마브의 투여와 연관된 현재의 제약점을 해결하고 극복한다. 본 발명의 방법은 항-TNF α 약물을 수여받은 상기 대상체를 모니터링하여, 중화 ADA 의 형성 및/또는 발달을 (예, 항-TNF α 약물 치료요법 과정 동안 시간 경과에 따라) 검출 또는 측정하는데 특히 유용하고, 또한 대상체가 항-TNF α 약물 치료요법 중인 동안 시간 경과에 따른 비중화 ADA 와 비교되는 중화 ADA 의 양, 백분율 또는 비율 변화 (예, 증가) 를 검출 또는 측정하는데 역시 유용하다.
- [0103] 이로써, 본 발명은 (1) 중화 ADA 의 존재, 수준 또는 백분율 측면에서, 항-TNF α 약물의 후속 투여량을 조절 또는 개질 (예, 증가 또는 감소) 해 치료적 효능을 최적화하고/하거나 독성을 감소시키기 위한, (2) 항-TNF α 약물 (예, 최초에, 증가, 감소 또는 동일한 투여량) 을 메토타렉세이트 (MTX) 또는 아자티오프린 (AZA) 와 같은 하나 이상의 면역억제제와, 중화 ADA 의 존재, 수준 또는 백분율의 측면에서 병용하기 위한, 및/또는 (3) 중화 ADA 의 존재, 수준 또는 백분율 측면에서 치료요법의 현 과정을 변경하기 위한 (예, 상이한 항-TNF α 약물 또는 상이한 메커니즘을 표적하는 약물로 전환) 시기 및/또는 방법을 결정하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 항-TNF α 약물을 수여받은 대상체가 올바른 용량을 취하고 있는지, 약물에 대한 면역 반응을 일으키지 않게, 초기 약물을 이용시 실제로 인해 상이한 약물로 전환해야 하는지 (예, 초기 항-TNF α 약물에 대한 교차 반응성 중화 ADA 의 발달) 를, 확실히 보장하는데 유용하다.
- [0104] **II. 정의**
- [0105] 명세서에서 사용되는 바와 같이, 하기의 용어들은 달리 구체화되어 있지 않는 한, 그들 본래의 의미를 갖는다.
- [0106] 본원에서 사용된 용어 "생물제제 (biologic)" 또는 "생물학적 제제 (biologic agent)" 또는 "생물학적 약물 (biologic drug)" 은, 생물체 (예, 생물) 로부터 생성되거나 또는 추출된 생성물 및 물질을 포함한다. 생물제제의 비제한적인 예에는, 항체, 항체 단편, 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 융합 단백질 (예, Ig 융합 단백질 또는 Fc 융합 단백질), 다가 결합 단백질 (예, DVD Ig), 항체-약물 컨쥬게이트, 백신, 핵산, 당, 그의 재조합 형태, 그의 가공된 형태 및 그의 조합물이 포함된다.
- [0107] 용어 "생물학적 결합 부분"은 생물제제와 (특이적으로) 결합 또는 상호작용하는 임의의 분자, 시약 또는 물질을 포함한다. 일부 예에서, 중화 형태의 자가항체는 생물학적 결합 부분과 생물제제 사이에서의 결합을 방해한다. 특정 기타 예에서, 비중화 형태의 자가항체는 생물학적 결합 부분과 생물제제 사이의 결합을 방해하지 않는다. 하나의 비제한적인 예로서, 생물학적 결합 부분은, 생물제제가 항-TNF α 약물을 포함하는 경우 TNF α 을 포함한다. 또 다른 비제한적인 예로서, 생물학적 결합 부분은, 생물제제가 IL-2 와 같은 인터류킨을 포함하는 경우 인터류킨 수용체 (예, 인터류킨 수용체의 가용성 세포외 단편) 을 포함한다.
- [0108] 본 명세서에서 사용된, 용어 "항-TNF α 약물 (anti-TNF α drug)" 또는 "TNF α 억제제 (TNF α inhibitor)" 는 단백질, 항체, 항체 단편, 융합 단백질 (예를 들면, Ig 융합 단백질 또는 Fc 융합 단백질), 다가 결합 단백질 (예를 들면, DVD Ig), 소분자 TNF α 안타고니스트 및 유사한 천연적으로- 또는 비천연적으로-발생된 분자, 및/또는 재조합체 및/또는 그것의 가공된 형태와 같이, 직접적으로 또는 간접적으로, 예를 들면 TNF α 와 TNF α 에 대한 세포 표면 수용체와의 상호작용을 억제하는 것에 의해, TNF α 단백질 생산을 억제하는 것에 의해, TNF α 유전자 발현을 억제하는 것에 의해, 세포로부터의 TNF α 분비를 억제하는 것에 의해, 대상체 내의 TNF α 활성을 감소시키는 TNF α 수용체 신호전달 또는 다른 임의의 수단을 억제시키는 것에 의해, TNF α 활성을 억제시키는 작용제를 포함한다. 상기 용어 "항-TNF α 약물" 또는 "TNF α 억제제"는 바람직하게는 TNF α 활성을 방해하는 작용제를 포함한다. TNF α 억제제의 예는 인플릭시마브 (REMICADE™, Johnson and Johnson), 인간 항-TNF 모노클로날 항체 아달리무마브 (D2E7/HUMIRA™, Abbott Laboratories), 에타네르셉트 (ENBREL™, Amgen),

세르톨리주마브 페골 (CIMZIA®, UCB, Inc.), 골림무마브 (SIMPONI®; CNT0148), CDP 571 (Celltech), 및 CDP 870 (Celltech), 뿐만 아니라 TNF α 활성이 유해한 장애 (예를 들면, RA)로 고생하고 있거나 고생할 위험이 있는 대상체에 투여시, 장애가 치료되도록 하는, TNF α 활성을 억제하는 다른 화합물들을 포함한다.

[0109] 용어 "TNF α" 는 17 kDa 의 분비된 형태 및, 26 kDa 의 막 결합 형태로서 존재하는, 비공유적으로 결합된 17 kDa 분자들의 삼량체로 이루어지 생물학적 활성 형태인 인간 싸이토카인을 포함하는 것을 의도로 한다. TNF α 의 구조는 예를 들어 문헌 [Jones 등, Nature, 338:225-228 (1989)] 에 추가로 기재되어 있다. 용어 TNF α 는 인간 TNF α, 재조합 인간 TNF α (rhTNF-α), 또는 인간 TNF α 단백질과 약 80% 이상 동일한 TNF α 를 포함하는 것을 의도로 한다. 인간 TNF α 는 35 아미노산 (aa) 세포질 도메인, 21 aa 막통과 분절, 및 177 aa 세포외 도메인 (ECD) 으로 이루어진다 (Pennica, D. 등 (1984) Nature 312:724). ECD 에서는, 인간 TNF α 는 붉은털원숭이 TNF α 와는 97% aa 서열 동일성을, 소, 개, 코튼 랫트, 말, 고양이, 마우스, 돼지 및 래트 TNF α 와는 71% 내지 92% 의 동일성을 공유한다. TNF α 는 표준 재조합 발현 방법으로 제조될 수 있거나 또는 시판하여 입수가 가능하다 (R & D Systems, Catalog No. 210-TA, Minneapolis, Minn.).

[0110] 특정 구현예에서, "TNF α" 는 "항원" 으로서, 항-TNF-α 약물이 결합될 수 있는 분자 또는 그 분자의 일부분을 포함하는 것이다. TNF α 는 하나 이상의 에피토프를 가질 수 있다. 특정한 경우, TNF α 는 매우 선별적인 방식으로 항-TNF α 항체와 반응한다. 항-TNF α 항체의 항체, 절편 및 영역에 결합하는 바람직한 항원은 인간 TNF α 의 5 개 이상의 아미노산을 포함한다. 특정한 경우, TNF α 는 항-TNF α 항체, 그의 절편 및 영역에 결합할 수 있는 TNF α 의 에피토프를 갖는 충분한 길이의 것이다.

[0111] 용어 "크기 배제 크로마토그래피" 또는 "SEC" 는 용액 내의 분자들이 그들의 크기 및/또는 유체역학적 부피를 바탕으로 분리되는 크로마토그래피 방법을 포함하는 것이다. 그것은 단백질 및 그들의 컨주게이트와 같은 큰 분자 또는 거대분자 복합체에 적용된다. 통상적으로, 수용액이 컬럼을 통한 시료의 이동에 사용되는 경우, 상기 기술은 겔 여과 크로마토그래피로 알려져 있다.

[0112] 용어 "복합체 (complex)", "면역-복합체 (immuno-complex)", "컨주게이트 (conjugate)", 및 "면역컨주게이트 (immunoconjugate)"는 항-TNF α 약물에 (예를 들면, 비-공유결합 수단에 의해) 결합된 TNF α, 항-TNF α 약물에 대한 자가항체에 (예를 들면, 비-공유결합 수단에 의해) 결합된 항-TNF α 약물, 및 TNF α 및 항-TNF α 약물에 대한 자가항체에 (예를 들면, 비-공유결합 수단에 의해) 결합된 항-TNF α 약물을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0113] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "표지된 (labeled)" 에 의해 변형된 개체는 임의의 개체, 분자, 단백질, 효소, 항체, 항체 단편, 싸이토카인, 또는 경험적으로 검출가능한 다른 분자 또는 화합물질과 컨주게이트된 관련 종을 포함한다. 표지된-개체의 표지물질로서 적합한 화학 종은 형광 염료, 예를 들면 Alexa Fluor® 647 와 같은 Alexa Fluor® 염료, 양자점, 광학 염료, 발광 염료, 및 방사선, 예를 들면 ¹²⁵I 를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0114] 어구 "형광 표지 검출 (fluorescence label detection)" 은 형광 표지물질을 검출하기 위한 수단을 포함한다. 검출 수단은 예를 들면, Agilent-1200 HPLC System이 있으나, 이에 제한되지 않는, 예를 들면, 크기 배제-고성능 액체 크로마토그래피가 있으나, 이에 제한되는 것은 아닌, 크로마토그래피 기구에 공통적으로 통합된, 분광광도계, 형광계, 광도계, 검출기구를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0115] 어구 "치료요법의 최적화 (optimize therapy)" 는 특정 치료요법의 투여용량 (예를 들면, 유효량 또는 수준) 및/또는 유형을 최적화하는 것을 포함한다. 예를 들면, 항-TNF α 약물의 투여용량의 최적화는 대상체에 후속적으로 투여되는 항-TNF α 약물의 양을 증가시키거나 감소시키는 것을 포함한다. 특정 예에서, 항-TNF α 약물의 유형의 최적화는 하나의 약물로부터의 상이한 약물 (예를 들면, 상이한 항-TNF α 약물)로 전환하는 것을 포함한다. 다른 예에서, 치료요법의 최적화는 하나 이상의 면역억제성 약물과 함께, 투여용량의 항-TNF α 약물 (예를 들면, 이전의 투여량에 비해 증가되거나, 감소되거나, 또는 동일한 투여용량으로) 을 병용-투여하는 것을 포함한다.

[0116] 용어 "병용-투여 (co-administer)" 는 하나의 활성 작용제의 생리학적으로 유효한 기간이 제 2 활성 작용제의 생리학적으로 유효한 기간과 겹쳐지도록, 하나 이상의 작용제를 투여하는 것을 포함한다.

[0117] 용어 "대상체 (subject)", "환자 (patient)", 또는 "개체 (individual)"는 통상적으로 인간을 의미하는 것이지만, 다른 동물 예를 들면, 다른 영장류, 설치류, 개과, 고양이과, 말과, 양과, 돼지와 등을 포함한다.

- [0118] 용어 "치료요법 과정(course of therapy)"은 질병 또는 장애와 연관된 하나 이상의 증상을 완화 또는 예방하도록 취한 치료적 접근법을 포함한다. 상기 용어는 질환 또는 장애를 가진 개체의 건강을 개선하기에 유용한 임의의 화합물, 약물, 절차, 및/또는 요법의 적용을 포함하는 것으로, 본 명세서에 기술된 임의의 치료제를 포함한다. 비제한적인 예로서, 치료요법 과정 또는 현 치료요법 과정의 용량은 TNF α , 항-TNF α 약물 및/또는 항-약물 항체의 존재 또는 농도 수준에 따라 (예, 본 발명의 방법을 이용해 측정된 중화 및/또는 비중화 항-약물 항체의 존재, 수준 또는 백분율) 바뀔 수 있다 (예, 증가되거나 감소될 수 있음).
- [0119] 용어 "면역억제성 약물" 또는 "면역억제제"는 면역억제 효과 예를 들면, 방사선 또는 항-대사산물, 항-림프구 혈청 항체 등과 같은 약물의 투여에 의해 면역 반응의 예방 또는 경감을 달성할 수 있는 임의의 성분들을 포함한다. 면역억제성 약물의 예는 아자티오프린 (AZA) 과 같은 티오푸린 약물 및 그것의 대사산물; 메토티렉세이트 (MTX)와 같은 항-대사산물; 시클로무스 (라파마이신); 템시로리무스; 에베로리무스; 타크로리무스 (FK-506); FK-778; 항-림프구 글로불린 항체, 항-흉선 글로불린 항체, 항-CD3 항체, 항-CD4 항체, 및 항체-독성 컨쥬게이트; 시클로스포린; 마이코페놀레이트; 미조리빈 모노포스페이트; 스코파론; 글라티라머 아세테이트; 그것의 대사산물; 그것의 약제학적으로 허용가능한 염; 그것의 유도체; 그것의 전구약물; 및 그것의 조합물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0120] 용어 "티오푸린 약물 (thiopurine dug)"은 아자티오프린 (AZA), 6-머캅토푸린 (6-MP), 또는 치료적 효능을 갖는 임의의 대사산물로서의 6-티오구아닌 (6-TG), 6-메틸머캅토푸린 리보사이드, 6-티오인노신 뉴클레오티드 (예를 들면, 6-티오이노신 모노포스페이트, 6-티오이노신 디포스페이트, 6-티오이노신 트리포스페이트), 6-티오구아닌 뉴클레오티드 (예를 들면, 6-티오구아노신 모노포스페이트, 6-티오구아노신 디포스페이트, 6-티오구아노신 트리포스페이트), 6-티오산토신 뉴클레오티드 (예를 들면, 6-티오산토신 모노포스페이트, 6-티오산토신 디포스페이트, 6-티오산토신 트리포스페이트), 그것의 유도체, 그것의 유사체, 및 그것의 조합물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0121] 용어 "시료"는 개체로부터 수득되는 임의의 생물학적 시편을 포함한다. 시료에는 전혈, 혈청, 혈장, 적혈구, 백혈구 (예를 들어, 말초혈 단핵 세포 (PBMC), 다형상성핵 (PMN) 세포), 도관 세정액, 유두 흡입물, 림프 (예를 들어, 림프절의 유포된 종양 세포), 골수 흡입물, 타액, 뇨, 변 (예를 들어, 대변), 담, 기관지 세정액, 눈물, 세침 흡입물 (예를 들어, 무작위적인 유선염 세침 흡입물), 임의의 기타 체액, 조직 시료, 예컨대 염증 부위의 생검 (예를 들어, 천자 생검), 그의 세포 추출물 및 하나 이상의 상기 체액 또는 조직으로부터 유도된 면역글로불린 풍부화 분획을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 시료는 전혈, 그의 부분 성분, 예컨대 혈장, 혈청 또는 세포 펠릿 또는 그의 면역글로불린 풍부한 분획이다. 당업자는 혈청 시료와 같은 적절한 시료가 분석 전에 희석될 수 있음을 알 수 있을 것이다. 특정 구현예에서, 시료는 당업계에 공지된 임의의 기법을 이용해 PBMC 및/또는 PMN 세포를 분리함으로써 수득된다. 특정화 다른 구현예에서, 시료는 예를 들어 위장관 또는 운할 조직의 일부분과 같은 염증 부위 유래의 것과 같은 조직 생검이다.
- [0122] 본 발명의 방법의 단계들은 그들이 제시된 특별한 순서로 수행되어야 하는 것은 아니다. 당업자는 본 발명의 방법의 단계들의 다른 순서배치들도 본 발명의 범위에 포함된다는 것을 이해할 것이다.
- [0123] 괄호 "[]"는 괄호 내부의 종들에 대한 그들의 농도를 의미한다.
- [0124] **III. 구현예의 설명**
- [0125] 본 발명은 시료 내 항-TNF α 약물 치료제와 같은 생물체제에 대한 중화 및 비중화 자가항체의 존재 또는 수준을 검출 및 측정하기 위한 검정법을 제공한다. 본 발명은 대상체가 생물체제 치료요법 중 (예, 항-TNF α 약물 치료요법)인 동안 시간 경과에 따른 중화 및/또는 비중화 항-약물 항체의 형성을 모니터링하기에 유용하다. 본 발명은 또한 대안적인 생물학적 치료요법 (예, 대안적인 항-TNF α 치료요법)으로 대상체의 시료 내 중화 항-약물 항체의 교차-반응성을 예측 및/또는 결정하기에 유용하다. 이로써, 본 발명은 생물학적 체제로의 치료요법을 수여받은 대상체를 위한 치료 결정의 안내 정보를 제공하고, 치료요법을 최적화하고, 독성을 경감시키고 및/또는 생물학적 치료요법에 대한 치료요법적 치료의 효능을 모니터링하는데 있어서 정확도를 개선시킨다.
- [0126] 한 측면에서, 본 발명은 하기를 포함하는, 시료 내 생물체제에 대한 중화 및/또는 비중화 형태의 자가항체의 존재를 검출하는 방법을 제공한다:

- [0127] (a) 시료를, 표지된 생물체제 및 표지된 생물학적 결합 부분과 접촉시켜 하기를 형성시킴;
- [0128] (i) 표지된 생물체제 및 자가항체의 제 1 의 표지된 복합체 (즉, 면역-복합체 또는 컨주게이트) (즉, 제 1 의 표지된 복합체의 성분들은 서로 공유 결합되지 않음); 및/또는
- [0129] (ii) 표지된 생물체제, 표지된 생물학적 결합 부분 및 자가항체의 제 2 의 표지된 복합체 (즉, 면역-복합체 또는 컨주게이트) (즉, 제 2 의 표지된 복합체의 성분들은 서로 공유 결합되지 않음);
- [0130] (b) 제 1 의 표지된 복합체 및/또는 제 2 의 표지된 복합체를 크기 배제 크로마토그래피에 적용해 이들을 자유 (즉, 비결합된) 표지된 생물학적 결합 부분, 자유 표지된 생물체제, 및/또는 표지된 생물체제 및 표지된 생물학적 결합 부분의 복합체로부터 분리함;
- [0131] (c) 크기 배제 크로마토그래피 이후 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준을 측정함 (예, 크기 배제 크로마토그래피 (SEC) 후 자유 표지된 생물학적 결합 부분 피크의 곡선하 면적 (AUC) 을 측정하는 것에 의함); 및
- [0132] (d) 단계 (c) 에서 측정된 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준을, 대조군 시료 내 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준과 비교하고 (예, 오로지 자유 표지된 생물학적 결합 부분만을 함유하는 기준 시료의 SEC 후 자유 표지된 생물학적 결합 부분 피크의 AUC 를 측정하는 것에 의함), 이로써 중화 및/또는 비중화 형태의 자가항체의 존재를 검출함.
- [0133] 일부 구현예에서, 중화 형태의 자가항체는 생물체제 및 생물학적 결합 부분 사이의 결합을 방해한다. 기타 구현예에서, 비중화 형태의 자가항체는 생물체제 및 생물학적 결합 부분 사이의 결합을 방해하지 않는다.
- [0134] 일부 예에서, 자유 표지된 생물학적 결합 부분은 결합된 생물체제 (예, 표지된 및/또는 비표지된 생물체제) 가 실질적으로 없는 표지된 생물학적 결합 부분으로 이루어진다.
- [0135] 특정 구현예에서, 중화 형태의 자가항체는 단계 (c) 에서 측정된 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준이 대조군 시료 내 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 경우에 검출된다. 특정 기타 구현예에서, 비중화 형태의 자가항체는, 단계 (c) 에서 측정된 자유 표지된 생물학적 결합 부분이 대조군 시료 내 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준과 비교시 감소되거나 (예, 실질적으로 감소됨) 또는 부재인 (예, 검출되지 않음) 경우에, 검출된다.
- [0136] 특정 구현예에서, 단계 (c) 에서 측정된 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준은, 이것이 대조군 시료 내 측정된 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준의 적어도 약 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 인 경우에, 대조군 내 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준과 실질적으로 동일한 것으로 간주된다. 특정 구현예에서, 단계 (c) 에서 측정된 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준은, 이것이 대조군 시료 내 측정된 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준보다 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95% 미만인 경우에, 대조군 시료 내 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준과 비교시 실질적으로 감소된 것으로 간주된다.
- [0137] 일부 구현예에서, 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준은, 크기 배제 크로마토그래피 (예, SEC-HPLC) 로부터의 용출 시간의 함수로서, 신호 강도의 플롯으로부터, 자유 표지된 생물학적 결합 부분 피크의 곡선하 면적 (AUC) 을 적분함으로써 측정된다.
- [0138] 일부 구현예에서, 생물체제는 항체 (예, 항-TNF α 모노클로날 항체), 항체 단편, 단백질 (예, 사이토카인, 예컨대 인터류킨), 폴리펩티드, 펩티드, 융합 단백질, 다가 결합 단백질, 항체-약물 컨주게이트, 백신, 핵산, 당, 그의 재조합 형태, 그의 가공된 형태, 및 그의 조합물을 포함한다.
- [0139] 기타 구현예에서, 시료는 시료는 전혈, 혈청 또는 혈장 시료, 예를 들어 생물학적 치료요법을 수여받은 대상체의 전혈, 혈청 또는 혈장 시료이다. 바람직한 구현예에서, 시료는 혈청이다. 특정 구현예에서, 대상체는 자가면역 질환 (예, 류마티스 관절염), 염증성 질환 (예, 염증성 장질환 (IBD), 예컨대 크론병 (CD) 또는 궤양대장염 (UC)), 또는 암 등의 질환 또는 장애가 있다.
- [0140] 특정 구현예에서, 시료는 생물체제에 대한 자가항체를 갖거나 또는 갖는 것으로 의심된다. 기타 구현예에서, 생물학적 자가항체는 이에 제한되는 것은 아니나, 인간 항-키메라성 항체 (HACA), 인간 항-인간화 항체 (HAHA), 및 인간 항-마우스 항체(HAMA) 뿐 아니라 이의 조합물을 포함한다.
- [0141] 또 다른 측면에서, 본 발명은 하기를 포함하는 시료 내 생물체제에 대한 중화 형태의 자가항체의 수준 또는 백

분율을 측정하는 방법을 제공한다:

[0142] (a) 시료를, 표지된 생물체제 및 표지된 생물학적 결합 부분과 접촉시켜 하기를 형성시킴:

[0143] (i) 표지된 생물체제 및 자가항체의 제 1 의 표지된 복합체 (즉, 면역-복합체 또는 컨쥬게이트) (즉, 제 1 의 표지된 복합체의 성분들은 서로 공유 결합되지 않음); 및/또는

[0144] (ii) 표지된 생물체제, 표지된 생물학적 결합 부분 및 자가항체의 제 2 의 표지된 복합체 (즉, 면역-복합체 또는 컨쥬게이트) (즉, 제 2 의 표지된 복합체의 성분들은 서로 공유 결합되지 않음);

[0145] (b) 제 1 의 표지된 복합체 및/또는 제 2 의 표지된 복합체를 크기 배제 크로마토그래피에 적용해 이들을 자유 (즉, 비결합된) 표지된 생물학적 결합 부분, 자유 표지된 생물체제, 및/또는 표지된 생물체제 및 표지된 생물학적 결합 부분의 복합체로부터 분리함;

[0146] (c) 크기 배제 크로마토그래피 이후 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준을 측정함 (예, 크기 배제 크로마토그래피 (SEC) 후 자유 표지된 생물학적 결합 부분 피크의 곡선하 면적 (AUC) 을 측정하는 것에 의함); 및

[0147] (d) 단계 (c) 에서 측정된 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준을, 대조군 시료 내 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 정규화된 수준 또는 백분율과 비교함 (예, 오로지 자유 표지된 생물학적 결합 부분만을 함유하는 기준 시료의 SEC 후 자유 표지된 생물학적 결합 부분 피크의 AUC 를 측정 및 정규화하는 것에 의함), 이때 대조군 시료 내 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 정규화된 수준 또는 백분율은 중화 형태의 자가항체의 수준 또는 백분율에 상응함.

[0148] 일부 구현예에서, 대조군 시료 내 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 정규화된 수준 또는 백분율과 단계 (c) 에서 측정된 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준간 차이는 비중화 형태의 자가항체의 수준 또는 백분율에 상응한다.

[0149] 일부 예시에서, 자유 표지된 생물학적 결합 부분은 결합된 생물체제 (예, 표지 및/또는 비표지된 생물체제) 가 실질적으로 부재인 표지된 생물체제 결합 부분으로 이루어진다.

[0150] 특정 구현예에서, 대조군 시료 내 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준 또는 백분율은 표지된 생물체제와 표지된 생물학적 결합 부분 사이에서 형성된 복합체 (예, "표지된 복합체") 의 피크 면적을 측정하고 (예, AUC 측정에 의함), 이후, 표지된 복합체의 측정된 피크 면적을, 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 피크 면적 (예, 자유 표지된 생물학적 결합 부분 피크의 AUC 를 측정하는 것에 의함) 에서 차감함으로써 정규화된다.

[0151] 특정 구현예에서, 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준은, 크기 배제 크로마토그래피 (예, SEC-HPLC) 로부터 용출 시간의 함수로서 신호 강도의 플롯으로부터 자유 표지된 생물학적 결합 부분 피크의 곡선하 면적 (AUC) 을 적분함으로써 측정된다. 기타 구현예에서, 표지된 생물체제와 표지된 생물학적 결합 부분 사이에서 형성된 복합체의 수준은, 크기 배제 크로마토그래피 (예, SEC-HPLC) 로부터 용출 시간의 함수로서 신호 강도의 플롯으로부터 자유 표지된 생물학적 결합 부분 피크의 AUC 를 적분함으로써 측정된다.

[0152] 특정 구현예에서, 생물체제에 대한 자가항체 (예, ADA) 의 부분 모집단은 중화 형태의 자가항체 (예, NAb) 이다. 일부 구현예에서, 시료 내 생물체제에 대한 자가항체의 총 수준은, 본 발명의 방법에 따라 측정된, 중화 형태의 자가항체의 수준 및 비중화 형태의 자가항체의 수준을 모두 더함으로써 산출될 수 있다.

[0153] 일부 구현예에서, 단계 (c) 에서 측정된 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준은 음성 대조군, 양성 대조군 또는 그의 조합물과 추가 비교된다. 추가 구현예에서, 단계 (d) 에서 결정된 중화 형태의 자가항체 (예, NAb) 의 백분율은 건강한 대조군 (예, 정상 인간 혈청) 으로부터 확립된 컷오프 (cutoff) 값 또는 기준 범위와 비교된다. 일부 구현예에서, 컷오프 값 또는 기준 범위는 시료가 NAb 에 대해 양성인 것으로 고려되기 위해 반드시 가져야 하는 NAb 의 역치 퍼센트로서 표시된다. 이러한 구현예에서, 시료는, 단계 (d) 에서 결정된 NAb 의 백분율이 건강한 대조군에서 확립된 컷오프 값 또는 기준 범위 이상인 경우, NAb 에 대해 양성이다. 다른 구현예에서, 시료는, 단계 (d) 에서 결정된 NAb 의 백분율이 건강한 대조군에서 확립된 컷오프 값 또는 기준 범위 미만인 경우, NAb 에 대해 음성이다. 컷오프 값 또는 기준 범위의 비제한적인 예에는 예를 들어 적어도 약 0.25%, 0.50%, 0.75%, 1.00%, 1.50%, 2.00%, 2.50%, 2.60%, 2.70%, 2.80%, 2.90%, 3.00%, 3.01%, 3.02%, 3.03%, 3.04%, 3.05%, 3.06%, 3.07%, 3.08%, 3.09%, 3.10%, 3.20%, 3.30%, 3.40%, 3.50%, 4.00%, 4.50%, 5.00%, 5.50%, 6.00%, 6.50%, 7.00%, 7.50%, 8.00%, 8.50%, 9.00%, 9.50%, 10.00% NAb, 또는 임의의 그 내부의 범위가 포함된다.

- [0154] 일부 구현예에서, 생물제제에 대한 자가항체 모두는 중화 항체이고, 시료는 100% 중화 항-약물 항체 (NAb) 및/또는 0% 비중화 항-약물 항체 (비-NAb) 를 갖는 것으로서 정의된다. 일부 구현예에서, 단계 (c) 에서 측정된 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준은 일반적으로, 대조군 시료 내 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준과 동일하고, 자가항체는 생물제제 및 생물학적 결합 부분 간 결합을 완전히 차단 또는 방해하는 것으로 예측된다.
- [0155] 기타 구현예에서, 생물제제에 대한 자가항체의 어떤 것도 중화 항체가 아니며, 시료는 100% 비-NAb 및/또는 0% NAb 를 갖는 것으로 정의된다. 이들 구현예에서, 단계 (c) 에서 측정된 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준은 일반적으로 대조군 시료 내 자유 표지된 생물학적 결합 부분의 수준과 비교시 부재이고 (예, 검출불가능함), 자가항체는 생물제제 및 생물학적 결합 부분 간 결합을 완전히 차단 또는 방해하는 것은 아닌 것으로 예측된다.
- [0156] 추가 구현예에서, 중화 및 비중화 형태 모두의 자가항체가 시료에 존재하는 경우, 각 종들의 백분율은 그 자체 단독으로 (예, 50% NAb 또는 50% 비-NAb 는 시료 내 NAb 및 비-NAb 의 등비로서 정의됨) 또는 비율로서 표시될 수 있다. 특정 예에서, 상기 비율은 NAb 의 백분율을 비-NAb 의 백분율로 또는 그 반대로 나눔으로써 산출된다. 기타 예에서, 상기 비율은 NAb 의 수준을 비-NAb 의 수준으로 나누거나 또는 그 반대로 나눔으로써 산출된다.
- [0157] 일부 구현예에서, 생물제제에는, 항체 (예, 항-TNF α 모노클로날 항체), 항체 단편, 단백질 (예, 사이토카인, 예컨대 인터류킨), 폴리펩티드, 펩티드, 융합 단백질, 다가 결합 단백질, 항체-약물 컨쥬게이트, 백신, 핵산, 당, 그의 제조합 형태, 그의 가공된 형태, 및 그의 조합물이 포함된다.
- [0158] 기타 구현예에서, 시료는 전혈, 혈청 또는 혈장 시료, 예를 들어 생물학적 치료요법을 수여받은 대상체의 전혈, 혈청 또는 혈장 시료이다. 바람직한 구현예에서, 시료는 혈청이다. 특정 구현예에서, 대상체는 자가면역 질환 (예, 류마티스 관절염), 염증성 질환 (예, 염증성 장질환 (IBD), 예컨대 크론병 (CD) 또는 궤양대장염 (UC)), 또는 암 등의 질환 또는 장애가 있다.
- [0159] 특정 구현예에서, 시료는 생물제제에 대한 자가항체를 갖거나 또는 이를 갖는 것으로 의심된다. 기타 구현예에서, 생물학적 자가항체에는 이에 제한되는 것은 아니나 인간 항-키메라성 항체 (HACA), 인간 항-인간화 항체 (HAHA), 및 인간 항-마우스 항체 (HAMA) 뿐 아니라 그의 조합물이 포함된다.
- [0160] 또 다른 측면에서, 본 발명은 하기를 포함하는, 제 1 의 생물제제에 대한 중화 형태의 자가항체가 제 2 의 (즉, 상이한) 생물제제와 교차-반응성인지 여부를 결정하는 방법을 제공한다:
- [0161] (a) 본원에서 기재된 검정법에 준수하여 시료 내 중화 형태의 자가항체의 존재, 수준 또는 백분율을 검출 또는 측정하여, 시료가 중화 형태의 자가항체에 대해 양성 또는 음성인지 여부를 결정함; 및
- [0162] 시료가 중화 형태의 자가항체에 대해 양성인 경우, 이때:
- [0163] (b) 시료를, 표지된 제 2 의 생물제제와 접촉시켜, 표지된 제 2 의 생물제제 및 중화 형태의 자가항체의 표지된 복합체를 형성함 (즉, 표지된 복합체의 성분들은 서로 공유 결합되지 않음);
- [0164] (c) 표지된 복합체를 크기 배제 크로마토그래피에 적용시켜, 표지된 복합체를 분리시킴 (예, 자유 표지된 제 2 의 생물제제로부터); 및
- [0165] (d) 표지된 복합체를 검출시켜, 이로써 제 1 의 생물제제에 대한 중화 형태의 자가항체가 제 2 의 생물제제와 교차-반응성인지 여부를 결정함.
- [0166] 특정 구현예에서, 표지된 복합체의 존재는 제 1 의 생물제제에 대항하는 중화 자가항체가 제 2 의 생물제제와 교차-반응성이라는 점을 지시하고, 즉, 중화 자가항체는 제 1 의 생물학적 약물 및 제 2 의 생물학적 약물 양자 모두의 활성을 억제할 것이다.
- [0167] 특정 기타 구현예에서, 표지된 복합체의 부재는 제 1 의 생물제제에 대항하는 중화 자가항체가 제 2 의 생물제제와 교차-반응성이 아니라는 점을 지시자로, 즉 중화 자가항체는 제 2 의 생물학적 약물의 활성을 억제하지 않을 것이다.
- [0168] 일부 구현예에서, 제 1 및 제 2 의 생물제제는 독립적으로 항체 (예, 항-TNF α 모노클로날 항체), 항체 단편, 단백질 (예, 사이토카인, 예컨대 인터류킨), 폴리펩티드, 펩티드, 융합 단백질, 다가 결합 단백질, 항체-약물 컨쥬게이트, 백신, 핵산, 당, 그의 제조합 형태, 그의 가공된 형태, 및 그의 조합물로 이루어진 군으로부터 선

택된다.

- [0169] 기타 구현예에서, 시료는 전혈, 혈청 또는 혈장 시료, 예를 들어 생물학적 치료요법을 수여받은 대상체의 전혈, 혈청 또는 혈장 시료이다. 바람직한 구현예에서, 시료는 혈청이다. 특정 구현예에서, 대상체는 자가면역 질환 (예, 류마티스 관절염), 염증성 질환 (예, 염증성 장질환 (IBD), 예컨대 크론병 (CD) 또는 궤양대장염 (UC)), 또는 암 등의 질환 또는 장애가 있다.
- [0170] 특정 구현예에서, 시료는 생물제제에 대한 자가항체를 갖거나 또는 이를 갖는 것으로 의심된다. 기타 구현예에서, 생물학적 자가항체에는 이에 제한되는 것은 아니나 인간 항-키메라성 항체 (HACA), 인간 항-인간화 항체 (HAHA), 및 인간 항-마우스 항체 (HAMA) 뿐 아니라 그의 조합물이 포함된다.
- [0171] 특정 측면에서, 본 발명의 검정법은 시료를 표지된 생물제제 및 표지된 생물학적 결합 부분과 접촉하기 이전, 동안 및/또는 이후에, 상기 시료를 산과 접촉하는 것을 포함하는 산 해리 단계를 추가로 포함한다.
- [0172] 특정 기타 측면에서, 본 발명의 검정법은 시료 내 생물제제에 대한 중화 및/또는 비중화 형태의 자가항체의 하나 이상의 아형의 존재 또는 수준을 검출하는 것을 포함한다.
- [0173] 하나의 특정 측면에서, 본 발명은 하기를 포함하는 시료 내 항-TNF α 약물에 대한 중화 및/또는 비중화 형태의 자가항체의 존재를 검출하는 방법을 제공한다:
- [0174] (a) 시료를, 표지된 항-TNF α 약물 및 표지된 TNF α 와 접촉시켜 하기를 형성시킴:
- [0175] (i) 표지된 항-TNF α 약물 및 자가항체의 제 1의 표지된 복합체 (즉, 면역-복합체 또는 컨쥬게이트), (즉, 제 1의 표지된 복합체의 성분들은 서로 공유 결합되지 않음); 및/또는
- [0176] (ii) 표지된 항-TNF α 약물, 표지된 TNF α 및 자가 항체의 제 2의 표지된 복합체 (즉, 면역-복합체 또는 컨쥬게이트) (즉, 제 2의 표지된 복합체의 성분들은 서로 공유 결합되지 않음);
- [0177] (b) 제 1의 표지된 복합체 및/또는 제 2의 표지된 복합체를 크기 배제 크로마토그래피에 적용시켜, 이들을 자유 (즉, 비결합된) 표지된 TNF α , 자유 표지된 항-TNF α 약물 및/또는 표지된 항-TNF α 약물 및 표지된 TNF α 의 복합체로부터 분리시킴;
- [0178] (c) 자유 표지된 TNF α 의 수준을 크기 배제 크로마토그래피 이후 측정함 (예, 크기 배제 크로마토그래피 (SEC) 후 자유 표지된 TNF α 피크의 곡선하 면적 (AUC)을 측정하는 것에 의함); 및
- [0179] (d) 단계 (c)에서 측정된 자유 표지된 TNF α 의 수준을, 대조군 시료 내 자유 표지된 TNF α 의 수준과 비교해 (예, 오로지 자유 표지된 TNF α 만을 함유하는 기준 시료의 SEC 후, 자유 표지된 TNF α 피크의 AUC를 측정하는 것에 의함), 이로써 중화 및/또는 비중화 형태의 자가항체의 존재를 검출함.
- [0180] 일부 구현예에서, 중화 형태의 자가항체는 항-TNF α 약물과 TNF α 간 결합을 방해한다. 기타 구현예에서, 비중화 형태의 자가항체는 항-TNF α 약물과 TNF α 간 결합을 방해하지 않는다.
- [0181] 일부 경우에서, 자유 표지된 TNF α 는 결합된 항-TNF α 약물 (예, 표지된 및/또는 비표지된 항-TNF α 약물)이 실질적으로 부재한 표지된 TNF α 로 이루어진다.
- [0182] 특정 구현예에서, 중화 형태의 자가항체는 단계 (c)에서 측정된 자유 표지된 TNF α 의 수준이 대조군 시료 내 자유 표지된 TNF α 의 수준과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 경우에 검출된다. 특정 기타 구현예에서, 비중화 형태의 자가항체는 단계 (c)에서 측정된 자유 표지된 TNF α 의 수준이 대조군 시료 내 자유 표지된 TNF α 의 수준과 비교시 감소 (예, 실질적으로 감소)되거나, 또는 부재인 (예, 검출되지 않음) 경우에 검출된다.
- [0183] 특정 구현예에서, 단계 (c)에서 측정된 자유 표지된 TNF α 의 수준은, 이것이 대조군 시료에서 측정된 자유 표지된 TNF α 수준의 적어도 약 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%인 경우에, 대조군 시료 내 자유 표지된 TNF α 수준과 실질적으로 동일한 것으로 고려된다. 특정 구현예에서, 단계 (c)에서 측정된 자유 표지된 TNF α 의 수준은, 이것이 대조군 시료 내 측정된 자유 표지된 TNF α 의 수준보다 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95% 미만인 수준인 경우, 대조군 시료 내 자유 표지된 TNF α 의 수준과 비교시 실질적으로 감소된 것으로 고려된다.
- [0184] 특정 구현예에서, 자유 표지된 TNF α 의 수준은 크기 배제 크로마토그래피 (예, SEC-HPLC)로부터 용출 시간의 함수로서 신호 강도의 플롯으로부터 자유 표지된 TNF α 피크의 곡선하 면적 (AUC)을 적분함으로써 측정된다.

- [0185] 일부 구현예에서, 항-TNF α 약물은 REMICADE™(인플릭시마브), ENBREL™(에타네르셉트), HUMIRA™(아달리무마브), CIMZIA®(세르톨리주마브 페글), SIMPONI®(골리무마브; CNTO 148), 및 그의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0186] 기타 구현예에서, 시료는 전혈, 혈청 또는 혈장 시료, 예를 들어 항-TNF α 약물 치료요법을 수여받은 대상체의 전혈, 혈청 또는 혈장 시료이다. 바람직한 구현예에서, 시료는 혈청이다. 특정 구현예에서, 대상체는 자가면역 질환 (예, 류마티스 관절염), 염증성 질환 (예, 염증성 장질환 (IBD), 예컨대 크론병 (CD) 또는 궤양 대장염 (UC)), 또는 암 등의 TNF α -매개성 질환 또는 장애가 있다.
- [0187] 특정 구현예에서, 시료는 항-TNF α 약물에 대한 자가항체를 갖거나 또는 이를 갖는 것으로 의심된다. 기타 구현예에서, 항-TNF α 약물 자가항체에는 이에 제한되는 것은 아니나 인간 항-키메라성 항체 (HACA), 인간 항-인간화 항체 (HAHA), 및 인간 항-마우스 항체 (HAMA) 뿐 아니라 그의 조합물이 포함된다.
- [0188] 또 다른 특정 측면에서, 본 발명은 하기를 포함하는 시료 내 항-TNF α 약물에 대한 중화 형태의 자가항체의 수준 또는 백분율을 측정하는 방법을 제공한다:
- [0189] (a) 시료를, 표지된 항-TNF α 약물 및 표지된 TNF α 과 접촉시켜 하기를 형성시킴:
- [0190] (i) 표지된 항-TNF α 약물 및 자가항체의 제 1 의 표지된 복합체 (즉, 면역-복합체 또는 컨쥬게이트) (즉, 제 1 의 표지된 복합체의 성분들은 서로 공유 결합되지 않음); 및/또는
- [0191] (ii) 표지된 항-TNF α 약물, 표지된 TNF α 및 자가항체의 제 2 의 표지된 복합체 (즉, 면역-복합체 또는 컨쥬게이트) (즉, 제 2 의 표지된 복합체의 성분들은 서로 공유 결합되지 않음);
- [0192] (b) 제 1 의 표지된 복합체 및/또는 제 2 의 표지된 복합체를 크기 배제 크로마토그래피에 적용해 이들을 자유 (즉, 비결합된) 표지된 TNF α , 자유 표지된 항-TNF α 약물, 및/또는 표지된 항-TNF α 약물 및 표지된 TNF α 의 복합체로부터 분리함;
- [0193] (c) 크기 배제 크로마토그래피 이후 자유 표지된 TNF α 의 수준을 측정함 (예, 크기 배제 크로마토그래피 (SEC) 후 자유 표지된 TNF α 피크의 곡선하 면적 (AUC) 을 측정하는 것에 의함); 및
- [0194] (d) 단계 (c) 에서 측정된 자유 표지된 TNF α 의 수준을, 대조군 시료 내 자유 표지된 TNF α 의 정규화된 수준 또는 백분율과 비교함 (예, 오로지 자유 표지된 TNF α 만을 함유하는 기준 시료의 SEC 후 자유 표지된 TNF α 피크의 AUC 를 측정 및 정규화하여 자유 표지된 TNF α 의 수준 또는 백분율을 산출하는 것에 의함), 이때, 대조군 시료 내 자유 표지된 TNF α 의 정규화된 수준 또는 백분율은 중화 형태의 자가항체의 수준 또는 백분율에 상응함.
- [0195] 일부 구현예에서, 대조군 시료 내 자유 표지된 TNF α 의 정규화된 수준 또는 백분율과 단계 (c) 에서 측정된 자유 표지된 TNF α 의 수준간 차이는 비중화 형태의 자가항체의 수준 또는 백분율에 상응한다.
- [0196] 일부 경우에서, 자유 표지된 TNF α 는 결합된 항-TNF α 약물 (예, 표지된 및/또는 비표지된 항-TNF α 약물) 이 실질적으로 부재인 표지된 TNF α 로 이루어진다.
- [0197] 특정 구현예에서, 대조군 시료 내 자유 표지된 TNF α 의 수준 또는 백분율은 표지된 항-TNF α 약물과 표지된 TNF α 사이에서 형성된 복합체 (예, "표지된 복합체") 의 피크 면적을 측정하고 (예, AUC 측정에 의함), 이후, 표지된 복합체의 측정된 피크 면적을, 자유 표지된 TNF α 의 피크 면적 (예, 자유 표지된 TNF α 피크의 AUC 를 측정하는 것에 의함) 에서 차감함으로써 정규화된다.
- [0198] 특정 구현예에서, 자유 표지된 자유 표지된 TNF α 의 수준은, 크기 배제 크로마토그래피 (예, SEC-HPLC) 로부터 용출 시간의 함수로서 신호 강도의 플롯으로부터 자유 표지된 TNF α 피크의 곡선하 면적 (AUC) 을 적분함으로써 측정된다. 기타 구현예에서, 표지된 항-TNF α 약물과 표지된 TNF α 사이에서 형성된 복합체의 수준은, 크기 배제 크로마토그래피 (예, SEC-HPLC) 로부터 용출 시간의 함수로서 신호 강도의 플롯으로부터 자유 표지된 TNF α 피크의 곡선하 면적 (AUC) 을 적분함으로써 측정된다.
- [0199] 특정 구현예에서, TNF α 약물에 대한 자가항체 (예, ADA) 의 부분 모집단은 중화 형태의 자가항체 (예, NAb) 이다. 일부 구현예에서, 시료 내 항-TNF α 약물에 대한 자가항체의 총 수준은, 본 발명의 방법에 따라 측정된, 중화 형태의 자가항체의 수준 및 비중화 형태의 자가항체의 수준을 모두 더함으로써 산출될 수 있다.
- [0200] 일부 구현예에서, 단계 (c) 에서 측정된 자유 표지된 TNF α 의 수준은, 음성 대조군, 양성 대조군 또는 그의 조

합물과 추가로 비교된다. 음성 대조군의 비제한적인 예에는, 마우스 모노클로날 항-인간 IgG₁ Fc 시료 및/또는 토끼 모노클로날 항-인간 IgG₁ Fc 시료가 포함된다. 양성 대조군의 비제한적인 예에는 항-TNF α 약물의 F(ab')₂ 단편에 대한 토끼 다클론성 항체의 시료 및/또는 풀링된 (pooled) ADA-양성 환자 혈청 시료가 포함된다.

[0201] 추가 구현예에서, 단계 (d) 에서 결정된 중화 형태의 자가항체 (예, NAb) 의 백분율은 건강한 대조군 (예, 정상 인간 혈청) 으로부터 확립된 컷오프 값 또는 기준 범위와 비교된다. 특정 구현예에서, 컷오프 값 또는 기준 범위는 시료가 NAb 에 대해 양성인 것으로 고려되기 위해 반드시 가져야 하는 NAb 의 역치 퍼센트로서 표시된다. 이러한 구현예에서, 시료는, 단계 (d) 에서 결정된 NAb 의 백분율이 건강한 대조군에서 확립된 컷오프 값 또는 기준 범위 이상인 경우, NAb 에 대해 양성이다. 다른 구현예에서, 시료는, 단계 (d) 에서 결정된 NAb 의 백분율이 건강한 대조군에서 확립된 컷오프 값 또는 기준 범위 미만인 경우, NAb 에 대해 음성이다. 컷오프 값 또는 기준 범위의 비제한적인 예에는, 예를 들어 적어도 약 0.25%, 0.50%, 0.75%, 1.00%, 1.50%, 2.00%, 2.50%, 2.60%, 2.70%, 2.80%, 2.90%, 3.00%, 3.01%, 3.02%, 3.03%, 3.04%, 3.05%, 3.06%, 3.07%, 3.08%, 3.09%, 3.10%, 3.20%, 3.30%, 3.40%, 3.50%, 4.00%, 4.50%, 5.00%, 5.50%, 6.00%, 6.50%, 7.00%, 7.50%, 8.00%, 8.50%, 9.00%, 9.50%, 10.00% NAb, 또는 그 내부의 임의의 범위가 포함된다. 일부 구현예에서, 컷오프 값 또는 기준 범위는 약 3.00% NAb 또는 약 3.06% NAb 또는 약 3.00%-3.10% NAb 사이이다.

[0202] 일부 구현예에서, 항-TNF α 약물에 대한 자가항체 모두는 중화 항체이고, 시료는 100% 중화 항-약물 항체 (NAb) 및/또는 0% 비중화 항-약물 항체 (비-NAb) 를 갖는 것으로서 정의된다. 이들 구현예에서, 단계 (c) 에서 측정된 자유 표지된 TNF α 의 수준은 일반적으로, 대조군 시료 내 자유 표지된 TNF α 의 수준과 동일하고, 자가항체는 항-TNF α 약물과 TNF α 간 결합을 완전히 차단 또는 방해하는 것으로 예측된다.

[0203] 특정 기타 구현예에서, 항-TNF α 약물에 대한 자가항체의 어떤 것도 중화 항체가 아니며, 시료는 100% 비-NAb 및/또는 0% NAb 를 갖는 것으로 정의된다. 이들 구현예에서, 단계 (c) 에서 측정된 자유 표지된 TNF α 의 수준은 일반적으로 대조군 시료 내 자유 표지된 TNF α 의 수준과 비교시 부재이고 (예, 검출불가능함), 자가항체는 항-TNF α 약물과 TNF α 간 결합을 완전히 차단 또는 방해하는 것은 아닌 것으로 예측된다.

[0204] 추가의 구현예에서, 중화 및 비중화 형태의 자가항체 양자 모두가 시료 내 존재하는 경우, 각 종들의 백분율은 그 자체 단독으로 (예, 50% NAb 또는 50% 비-NAb 는 시료 내 NAb 및 비-NAb 의 등비로서 정의됨) 또는 비율로서 표시될 수 있다. 특정 예에서, 상기 비율은 NAb 의 백분율을 비-NAb 의 백분율로 또는 그 반대로 나눔으로써 산출된다. 기타 경우에서, 상기 비율은 NAb 의 수준을 비-NAb 의 수준으로 나누거나 또는 그 반대로 나눔으로써 산출된다.

[0205] 일부 구현예에서, 항-TNF α 약물은 REMICADE™ (인플릭시마브), ENBREL™ (에타네르셉트), HUMIRA™ (아달리무마브), CIMZIA® (세르톨리주마브 페글), SIMPONI® (골리무마브; CNTO 148), 및 그의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다

[0206] 기타 구현예에서, 시료는 전혈, 혈청 또는 혈장 시료, 예를 들어 항-TNF α 약물 치료요법을 수여받은 대상체의 전혈, 혈청 또는 혈장 시료이다. 바람직한 구현예에서, 시료는 혈청이다. 특정 구현예에서, 대상체는 자가면역 질환 (예, 류마티스 관절염), 염증성 질환 (예, 염증성 장질환 (IBD), 예컨대 크론병 (CD) 또는 궤양 대장염 (UC)) 등의 TNF α -매개성 질환 또는 장애가 있다.

[0207] 특정 구현예에서, 시료는 항-TNF α 약물에 대한 자가항체를 갖거나 또는 이를 갖는 것으로 의심된다. 기타 구현예에서, 항-TNF α 약물 자가항체에는 이에 제한되는 것은 아니나 인간 항-키메라성 항체 (HACA), 인간 항-인간화 항체 (HAHA), 및 인간 항-마우스 항체 (HAMA) 뿐 아니라 그의 조합물이 포함된다.

[0208] 또 다른 특정 측면에서, 본 발명은 하기를 포함하는 제 1 의 항-TNF α 약물에 대한 중화 형태의 자가항체가 제 2 의 (즉, 상이한) 항-TNF α 약물과 교차-반응성인지 여부를 판단하는 방법을 제공한다:

[0209] (a) 본원에서 기재된 검정법에 준수하여 시료 내 중화 형태의 자가항체의 존재, 수준 또는 백분율을 검출 또는 측정해 중화 형태의 자가항체에 대해 시료가 양성 또는 음성인지 여부를 판단함; 및

[0210] 시료가 중화 형태의 자가항체에 대해 양성인 경우, 이때:

[0211] (b) 시료를, 표지된 제 2 의 항-TNF α 약물과 접촉시켜, 표지된 제 2 의 항-TNF α 약물 및 중화 형태의 자가항체의 표지된 복합체를 형성함 (즉, 표지된 복합체의 성분들은 서로 공유 결합되지 않음);

- [0212] (c) 표지된 복합체를 크기 배제 크로마토그래피에 적용시켜, 표지된 복합체를 분리시킴 (예, 자유 표지된 제 2 의 항-TNF α 약물로부터); 및
- [0213] (d) 표지된 복합체를 검출시켜, 이로써 제 1 의 항-TNF α 약물에 대한 중화 형태의 자가항체가 제 2 의 항-TNF α 약물과 교차-반응성인지 여부를 결정함.
- [0214] 특정 구현예에서, 표지된 복합체의 존재는 제 1 의 항-TNF α 약물에 대항하는 중화 자가항체가 제 2 의 항-TNF α 약물과 교차-반응성이라는 점을 지시하고, 즉, 중화 자가항체는 제 1 의 항-TNF α 약물 및 제 2 의 항-TNF α 약물 양자 모두의 활성을 억제할 것이다.
- [0215] 특정 기타 구현예에서, 표지된 복합체의 부재는 제 1 의 항-TNF α 약물에 대항하는 중화 자가항체가 제 2 의 항-TNF α 약물과 교차-반응성이 아니라는 점의 지시자로, 즉 중화 자가항체는 제 2 의 항-TNF α 약물의 활성을 억제하지 않을 것이다.
- [0216] 특정 구현예에서, 제 1 및 제 2 의 항-TNF α 약물은 독립적으로 REMICADE™(인플릭시마브), ENBREL™(에타네르셉트), HUMIRA™(아달리무마브), CIMZIA®(세르톨리주마브 페골), SIMPONI®(골리무마브; CNTO 148), 및 그의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0217] 기타 구현예에서, 시료는 전혈, 혈청 또는 혈장 시료, 예를 들어 항-TNF α 약물 치료요법을 수여받은 대상체의 전혈, 혈청 또는 혈장 시료이다. 바람직한 구현예에서, 시료는 혈청이다. 특정 구현예에서, 대상체는 자가면역 질환 (예, 류마티스 관절염), 염증성 질환 (예, 염증성 장질환 (IBD), 예컨대 크론병 (CD) 또는 궤양 대장염 (UC)) 등의 TNF α -매개성 질환 또는 장애가 있다.
- [0218] 특정 구현예에서, 시료는 항-TNF α 약물에 대한 자가항체를 갖거나 또는 이를 갖는 것으로 의심된다. 기타 구현예에서, 항-TNF α 약물 자가항체에는 이에 제한되는 것은 아니나 인간 항-키메라성 항체 (HACA), 인간 항-인간화 항체 (HAHA), 및 인간 항-마우스 항체 (HAMA) 뿐 아니라 그의 조합물이 포함된다.
- [0219] 특정 측면에서, 본 발명의 검정법은 시료를 표지된 항-TNF α 약물 및 표지된 TNF α 와 접촉하기 이전, 동안 및/또는 이후에, 상기 시료를 산과 접촉하는 것을 포함하는 산 해리 단계를 추가로 포함한다.
- [0220] 산 해리를 이용하는 항-약물 항체의 검출 방법은 본원에서 및 본원에서 어떤 목적이든지 간에 그 전문이 참조로서 혼입되어 있는 2012 년 2 월 16 일자에 제출된 PCT 출원 번호 PCT/US2012/025437 에 기재되어 있다.
- [0221] 특정 기타 측면에서, 본 발명의 검정법은 시료 내 항-TNF α 약물에 대한 중화 및/또는 비중화 형태의 자가항체의 하나 이상의 아형의 존재 또는 수준을 검출하는 것을 포함한다. 비제한적인 예로서, 본 발명의 검정은 REMICADE™(인플릭시마브) 또는 HUMIRA™(아달리무마브) 와 같은 항-TNF α 약물을 수여받은 ADA-양성 환자로부터의 시료 내 상이한 중화 및/또는 비중화 ADA 아형을 결정하는데 사용할 수 있다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 아형은 복수의 적어도 2, 3, 4, 5 이상의 아형을 포함한다. 기타 구현예에서, 하나 이상의 아형은 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM 아형, 그의 하부부류, 및 그의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 구현예에서, 각 자가항체 아형은 그의 체류 시간에 의해 특성화, 동정 및/또는 검출된다. 기타 구현예에서, 각 자가항체 아형은 상이한 항체 아형에 대해 특이적인 표지된 항-Ig 항체 및 표지된 항-TNF α 약물과 같은 검출자 부분의 근접 결합에 의해 나타난 신호로 특성화, 동정 및/또는 검출된다. 특정 경우에서, 신호는 형광 공명 에너지 전달 (FRET) 에 의해 검출될 수 있는 형광 신호를 포함한다.
- [0222] 항-약물 항체 (ADA) 아형의 검출 방법은 추가로 PCT 공보 제 WO 2012/054532 호에 추가 기재되어 있으며, 이의 개시물은 본원에서 그 전문이 어떤 목적이든간에 참조로서 삽입되어 있다.
- [0223] 생물제제 (예, 항-TNF α 약물) 또는 생물학적 결합 부분 (예, TNF α) 은 각종 탐지가 가능한 기(들) 중 임의의 것으로 표지될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 생물제제 (예, 항-TNF α 약물) 및 생물학적 결합 부분 (예, TNF α) 은 상이한 표지를 포함한다. 특정 구현예에서, 생물제제 (예, 항-TNF α 약물) 또는 생물학적 결합 부분 (예, TNF α) 은 형광단 또는 형광 염료로 표지된다. 형광단 또는 형광 염료의 비제한적인 예에는, 본원에서 참조로서 삽입된 Molecular Probes Catalogue 에서 열거된 것이 포함된다 (R. Haugland, *The Handbook-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 10th Edition, Molecular probes, Inc. (2005) 참조). 상기 예의 형광단 또는 형광 염료에는 이에 제한되는 것은 아니나 하기가 포함된다: Alexa Fluor®염료, 예컨대 Alexa Fluor®350, Alexa Fluor®405, Alexa Fluor®430, Alexa Fluor®488, Alexa Fluor®514, Alexa Fluor®532, Alexa Fluor®546, Alexa Fluor®555, Alexa Fluor®568, Alexa Fluor®594, Alexa Fluor®

[®]610, Alexa Fluor[®] 633, Alexa Fluor[®] 635, Alexa Fluor[®] 647, Alexa Fluor[®] 660, Alexa Fluor[®] 680, Alexa Fluor[®] 700, Alexa Fluor[®] 750, 및/또는 Alexa Fluor[®] 790, 및 이에 제한되는 것은 아니나 하기를 비롯한 기타 형광단: Dansyl 클로라이드 (DNS-Cl), 5-(요오도아세타미드)플루오로세인 (5-IAF), 플루오로세인 5-이소티오시아네이트 (FITC), 테트라메틸로다민 5- (및 6-)이소티오시아네이트 (TRITC), 6-아크릴로일-2-디메틸아미노나프탈렌 (아크릴로단), 7-니트로벤조-2-옥사-1,3,-디아졸-4-일 클로라이드 (NBD-Cl), 에티뎀 브로마이드, 루시퍼 옐로우 (Lucifer Yellow), 5-카르복시로다민 6G 히드로클로라이드, 리싸민 (Lissamine) 로다민 B 술폰닐 클로라이드, Texas Red[™] 술폰닐 클로라이드, BODIPY[™], 나프탈아민 술폰산 (예, 1-아닐리노나프탈렌-8-술폰산 (ANS), 6-(p-톨루이디닐)나프탈렌-e-2-술폰산 (TNS), 등), 안트로일 지방산, DPH, 파리나르산, TMA-DPH, 플루오레닐 지방산, 플루오레세인-포스파티딜에탄올아민, Texas Red-포스파티딜에탄올아민, 피레닐-포스파티딜콜린, 플루오레닐-포스파티딜콜린, 메로시아닌 540, 1-(3-술포나토프로필)-4-[β-[2[(디-n-부틸아미노)-6 나프틸]비닐]피리디늄 베타인 (나프틸 스티릴), 3,3'디프로필티아디카르보시아닌 (DiS-C₃-(5)), 4-(p-디펜틸 아미노스티릴)-1-메틸피리디늄 (디-5-ASP), Cy-3 요오도 아세타미드, Cy-5-N-히드로록시숙신이미드, Cy-7-이소티오시아네이트, 로다민 800, IR-125, 티아졸 오렌지, Azure B, Nile Blue, Al 프탈로시아닌, 옥색신 1, 4', 6-디아미디노-2-페닐인돌 (DAPI), Hoechst 33342, TOTO, 아크리딘 오렌지, 에티뎀 Homodimer, N(에톡시카르보닐메틸)-6-메톡시퀴놀리늄 (MQAE), Fura-2, 칼슘 그린, 카르복시 SNARF-6, BAPTA, 쿠마린, 피토플루오르 (phytofluors), 코로넨 (Coronene), 금속-리간드 복합체, IRDye[®] 700DX, IRDye[®] 700, IRDye[®] 800RS, IRDye[®] 800CW, IRDye[®] 800, Cy5, Cy5.5, Cy7, DY 676, DY680, DY682, DY780, 및 그의 혼합물. 추가 적합한 형광단에는 효소-공동인자; 란타니드, 그린 형광 단백질, 옐로우 형광 단백질, 레드 형광 단백질, 또는 그의 돌연변이 및 유도체가 포함된다. 본 발명의 한 구현예에서, 특이적 결합쌍의 제 2 일원은 그에 부착된 탐지가능한 기를 갖는다.

[0224] 전형적으로, 형광기는 폴리메틴, 프탈로시아닌, 시아닌, 잔텐, 플루오렌, 로다민, 쿠마린, 플루오레세인 및 BODIPY[™] 을 포함하는 염료 카테고리로부터 선택된 형광단이다.

[0225] 한 구현예에서, 형광기는 약 650 내지 약 900 nm 범위에서 발광하는 근-적외선 (NIR) 형광단이다. 근적외선 형광 기술의 이용은 그것이 실질적으로 생체기질의 자동 형광으로부터 배경 (background) 을 없애거나 경감시키기 때문에 생물학적 검정에서 이점을 가진다. 근-IR 형광 기술의 다른 이점은 산란 강도가 파장의 여기원으로부터의 산란된 빛의 역 4 제곱에 비례하기 때문에, 여기원으로부터 산란된 빛이 크게 감소된다는 점이다. 낮은 배경 형광 및 낮은 산란은 높은 민감도 검출에 필수적인, 높은 신호 대 노이즈 비율을 제공한다. 더욱이, 생물학적 조직 내의 근-IR 영역 (650 nm 내지 900 nm)에서 시각적으로 투명한 창은 NIR 형광을 생물학적 성분을 통한 빛의 통과를 요구하는 생체내 이미지 및 세포아세포 검출 적용하기에 유용하다. 상기 구현예의 측면에서, 형광기는 바람직하게 IRDye[®] 700DX, IRDye[®] 700, IRDye[®] 800RS, IRDye[®] 800CW, IRDye[®] 800, Alexa Fluor[®] 660, Alexa Fluor[®] 680, Alexa Fluor[®] 700, Alexa Fluor[®] 750, Alexa Fluor[®] 790, Cy5, Cy5.5, Cy7, DY 676, DY680, DY682, 및 DY780 로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 구현예에서, 근 적외선 기는 IRDye[®] 800CW, IRDye[®] 800, IRDye[®] 700DX, IRDye[®] 700, 또는 Dynamic DY676 이다.

[0226] 형광 표지는 형광단의 화학적 반응성 유도체를 사용하여 달성된다. 통상적인 반응기는 FITC 및 TRITC와 같은 이소티오시아네이트 유도체 (플루오레세인 및 로다민의 유도체), NHS-플루오레세인과 같은 아민 반응성 숙시니미드 에스테르, 및 플루오레세인-5-말레이미드와 같은 술포히드릴 반응성 말레이미드 활성화된 플루오르를 포함하는 것으로, 상기 물질들은 시판중이다. 생물체제 (예, 항-TNF α 약물) 또는 생물학적 결합 부분 (예, TNF α) 과 임의의 이들 반응성 염료의 반응은 형광단과 생물체제 (예, 항-TNF α 약물) 또는 생물학적 결합 부분 (예, TNF α) 사이에 형성되는 안정한 공유 결합을 초래한다.

[0227] 특정 예에서, 형광 표지 반응 이후에, 종종 표지된 표적 분자들로부터 임의의 비반응된 형광단을 제거하는 것이 요구된다. 이것은 종종 형광단과 표지된 단백질 사이의 크기 차이의 이점을 갖는, 크기 배제 크로마토그래피에 의해 달성된다.

[0228] 반응성 형광 안료는 많은 공급원으로부터 이용가능하다. 그들은 표적 분자 내부의 다양한 관능기에 부착하기 위해 다수의 반응기로 수득될 수 있다. 그들은 또한 표지 반응을 수행하기 위해 모든 성분들을 함유하는 표지 키트에서 이용가능하다. 한 바람직한 국면에서, Invitrogen로부터의 Alexa Fluor[®] 647 C2 말레이미드가 사용된다 (Cat. No. A-20347).

- [0229] 중화 및/또는 비중화 항-약물 항체 (예, NAb 및/또는 비-NAb) 의 생물제제 (예, 항-TNF α 약물) 및/또는 생물학적 결합 부분 (예, TNF α) 와의 특이적 면역 결합은 직접적으로 또는 간접적으로 검출될 수 있다. 직접적 표지는 항체에 부착하는, 형광 또는 발광 태그, 금속, 염료, 방사성핵종 등을 포함한다. 특정 예에서, 상이한 방사성핵종으로 표지된 생물제제 (예, 항-TNF α 약물) 또는 생물학적 결합 부분 (예, TNF α) 이 시료 중의 NAb 및/또는 비-NAb 의 존재 또는 수준을 측정하는데 사용될 수 있다. 다른 예에서, 화학발광 생물제제 (예, 항-TNF α 약물) 및 생물학적 결합 부분 (예, TNF α) 을 이용한 화학발광 검정은 시료 중 NAb 및/또는 비-NAb 의 존재 또는 수준의 민감하고, 비-방사성인 검출에 적합하다. 특정 사례에서, 상이한 형광색소로 표지된 생물제제 (예, 항-TNF α 약물) 및 생물학적 결합 부분 (예, TNF α) 은 시료 중 NAb 및/또는 비-NAb 의 존재 또는 수준의 검출에 적합하다. 형광색소의 예에는 제한 없이 하기가 포함된다: Alexa Fluor[®] 염료, DAPI, 플루오레세인, Hoechst 33258, R-피코시아닌, B-피코에리트린, R-피코에리트린, 로다민, Texas red, 및 리싸민. 형광색소에 연결된 2차 항체는 시중에서 입수가 가능하며, 예를 들어 염소 F(ab')₂ 항-인간 IgG-FITC 가 Tago Immunologicals (Burlingame, CA) 로부터 이용가능하다.
- [0230] 간접 표지에는 당업계에 널리 공지된 각종 효소, 예컨대 호스래디쉬 (horseradish) 퍼옥시다아제 (HRP), 알칼리 포스파타아제 (AP), β -갈락토시다아제, 우레아제 등이 포함된다. 호스래디쉬-퍼옥시다아제 검출 시스템은, 예를 들어 450 nm 에서 검출가능한 과산화수소의 존재 하에서 가용성 생성물을 생성하는 발색 기질 테트라메틸 벤지딘 (TMB) 이 사용될 수 있다. 알칼리 포스파타아제 검출 시스템은, 예를 들어 405 nm 에서 용이하게 검출가능한 가용성 생성물을 생성하는 발색 기질 p-니트로페닐 포스페이트가 사용될 수 있다. 유사하게, β -갈락토시다아제 검출 시스템은 410 nm 에서 검출가능한 가용성 생성물을 생성하는 발색 기질 o-니트로페닐- β -D-갈락토포라노시드 (ONPG) 가 사용될 수 있다. 우레아제 검출 시스템은 우레아-브로모크레졸 퍼플 (Sigma Immunochemicals; St. Louis, MO) 과 같은 기질이 사용될 수 있다. 효소에 연결된 유용한 2차 항체는 다수의 상업적 공급원으로부터 취득될 수 있으며, 예를 들어 염소 F(ab')₂ 항-인간 IgG-알칼리 포스파타아제는 Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA.) 로부터 입수될 수 있다.
- [0231] 직접 또는 간접 표지로부터의 신호는, 예를 들어 발색 기질로부터 색을 검출하는 분광광도계; 방사선을 검출하는 방사선 계수기, 예컨대 ¹²⁵I 의 검출용 감마 계수기; 또는 특정 파장의 빛의 존재 하에서 형광을 검출하는 형광계를 사용하여 분석될 수 있다. 효소-연결 항체의 검출을 위하여, NAb 및/또는 비(非)-NAb 수준의 정량적 분석이 제조업자의 지시에 따라 분광광도계, 예컨대 EMAX 마이크로플레이트 판독기 (Molecular Devices; Menlo Park, CA) 를 사용하여 수행될 수 있다. 원하는 경우, 본 발명의 검정은 자동화되거나 또는 로봇식으로 수행될 수 있고, 다수의 시료로부터의 신호가 동시에 검출될 수 있다.
- [0232] 특정 구현예에서, 크기 배제 크로마토그래피가 사용된다. SEC 의 기본 원리는 상이한 크기의 입자들이 상이한 속도로 고정상을 통하여 용리 (여과) 될 수 있다는 것이다. 이는 크기를 기준으로 입자의 용액을 분리한다. 모든 입자들이 동시에 또는 거의 동시에 로딩되면, 동일한 크기의 입자들이 함께 용리된다. 각각의 크기 배제 컬럼은 분리될 수 있는 분자량의 범위를 갖는다. 배제 한도는 분자가 고정상에서 포획되기에 너무 큰 범위의 상한에서의 분자량을 제한한다. 투과 한계는 충분히 작은 크기의 분자가 고정상의 공극으로 완전히 투과될 수 있는 분리 범위의 하한에서 분자량을 제한하고, 이러한 분자량 미만의 모든 분자들은 단일 밴드로 용출되기에는 너무 작다.
- [0233] 특정 측면에서, 용리액은 일정한 부피, 또는 분획으로 수집된다. 입자들의 크기가 보다 유사할수록, 이들은 동일한 분획 내에 존재하고 개별적으로 검출되지 않는 경향이 있다. 바람직하게는, 수집된 분획을 분광 기술로 평가하여, 용리된 입자들의 농도를 측정한다. 통상적으로, 본 발명에서 유용한 분광 검출 기술에는, 비제한적으로, 형광분석법, 굴절율 (RI) 및 자외선 (UV) 이 포함된다. 특정 예에서, 용리 부피는 분자의 유체역학적 부피의 로그에 대략 선형으로 감소한다 (즉, 무거운 부분이 먼저 나온다).
- [0234] 추가의 측면에서, 본 발명은 생물제제로의 치료요법 과정을 받는 대상에서 생물제제에 대한 치료요법을 모니터링 및/또는 최적화하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기를 포함한다:
- [0235] (a) 치료요법 과정에 걸쳐 다수의 시간 지점에서 본원에 기재된 검정에 따라 생물제제에 대한 중화 형태의 자가 항체의 존재, 수준 또는 백분율을 검출 또는 측정함;
- [0236] (b) 시간 경과에 따른 중화 형태의 자가항체의 존재, 수준 또는 백분율의 변화를 검출함; 및
- [0237] (c) 시간 경과에 따른 중화 형태의 자가항체의 존재, 수준 또는 백분율의 변화를 기준으로 대상을 위한 치료요

법 과정의 후속 투여용량 또는 상이한 과정의 치료요법이 대상에게 투여되어야 하는지의 여부를 결정함.

- [0238] 특정 구현예에서, 상기 다수의 시간 지점은 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 또는 그 이상의 시간 지점을 포함한다.
- [0239] 일 특정 측면에서, 본 발명은 생물제제로의 치료요법 과정을 받는 대상에서 생물제제에 대한 치료요법을 모니터링 및/또는 최적화하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기를 포함한다:
- [0240] (a) 시간 지점 t_0 에서, 본원에 기재된 바와 같은 대상으로부터의 제1 시료 내 생물제제에 대한 중화 형태의 자가항체의 수준 또는 백분율을 측정함;
- [0241] (b) 시간 지점 t_1 에서, 본원에 기재된 바와 같은 대상으로부터의 제2 시료 내 생물제제에 대한 중화 형태의 자가항체의 수준 또는 백분율을 측정함;
- [0242] (c) 시간 지점 t_{n+1} 에서, 대상으로부터의 n 개의 추가적인 시료로 단계 (b) 를 임의로 반복함, 여기서 n 은 1 내지 약 25 (예를 들어, n 은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25, 또는 그 안의 임의의 범위임) 의 정수임;
- [0243] (d) t_0 에서 t_1 까지의 시간 지점 또는 t_0 에서 t_{n+1} 까지의 시간 지점의 중화 형태의 자가항체의 수준 또는 백분율의 변화를 검출함; 및
- [0244] (e) 시간 경과에 따른 중화 형태의 자가항체의 존재, 수준 또는 백분율의 변화를 기준으로 대상을 위한 치료요법 과정의 후속 투여용량 또는 상이한 치료요법 과정이 대상에게 투여되어야 하는지의 여부를 결정함.
- [0245] 다른 특정 구현예에서, 상기 중화 형태의 자가항체 (예를 들어, NAb) 의 수준 또는 백분율은 생물제제 약물 치료요법의 과정 중 하나 이상의 (예를 들어, 복수) 하기 주에서 측정된다: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 80, 90, 100 등.
- [0246] 일부 구현예에서, 상기 대상을 위한 치료요법 과정의 후속 용량의 결정은 대상을 위한 치료요법 과정의 후속 용량을 유지, 증가 또는 감소시키는 것을 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 대상을 위한 상이한 과정의 치료요법의 결정은 상이한 생물제제 약물로의 치료를 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 대상을 위한 상이한 과정의 치료요법의 결정은 또 다른 치료제와 함께 현 과정의 치료요법으로의 치료를 포함한다. 추가 구현예에서, 상기 대상을 위한 상이한 과정의 치료요법의 결정은 현 과정의 치료요법을 변화시키는 것 (예를 들어, 상이한 생물제제 또는 상이한 메카니즘을 표적으로 하는 약물로의 변경) 를 포함한다.
- [0247] 특정한 구현예에서, 상기 시간에 따른 중화 형태의 자가항체 (예를 들어, NAb) 의 수준 또는 백분율의 증가는 대상을 위해 치료 조정이 권장되어야 한다는 것을 의미한다. 다른 특정 구현예에서, 상기 시간에 따른 중화 형태의 자가항체 (예를 들어, NAb) 의 부재에서 이의 존재로의 변화는 대상을 위해 치료 조정이 권장되어야 한다는 것을 의미한다. 이러한 구현예에서, 상기 대상은 하나 이상의 다른 치료제와 함께 현 과정의 치료요법 (예를 들어, 기존의 생물제제를 택함) 으로 치료될 수 있다. 특정한 대안적인 구현예에서, 상기 대상은 상이한 생물제제로 변경될 수 있다. 다른 특정한 대안적인 구현예에서, 상기 대상은 상이한 메카니즘을 표적으로 하는 약물 (예를 들어, 생물제제 및/또는 비(非)-생물제제) 로 변경될 수 있다.
- [0248] 추가적인 측면에서, 본 발명은 제1 생물제제로의 치료요법 과정을 받는 대상에서 치료요법의 최적화 및/또는 독성을 감소시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기를 포함한다:
- [0249] (a) 본원에 기재된 검정에 따라 대상으로부터의 시료 내 중화 형태의 자가항체의 존재, 수준 또는 백분율을 검출 또는 측정함으로써 제1 생물제제에 대한 중화 형태의 자가항체가 제2 (즉, 상이한) 생물제제와 교차반응을 일으킬 수 있는지의 여부를 결정함; 및
- [0250] (b) 상기 중화 형태의 자가항체가 제2 생물제제와 교차반응을 일으킬 수 있는 경우, 상이한 과정의 치료요법이 대상에게 투여되어야 하는지를 결정함.
- [0251] 특정 구현예에서, 상기 상이한 과정의 치료요법이 투여되어야 하는지의 결정은 상이한 메카니즘을 표적으로 하는 약물 (예를 들어, 생물제제 및/또는 비-생물제제) 로 변경하는 것을 포함한다.
- [0252] 일부 구현예에서, 상기 중화 형태의 자가항체가 제2 생물제제와 교차반응을 일으킬 수 없는 경우, 상기 방법은

추가로 현 과정의 치료요법의 후속 용량이 증가 또는 감소되어야 하는지 또는 상기 대상에게 상이한 과정의 치료요법이 투여되어야 하는지를 결정하는 것을 포함한다. 특정 예에서, 상기 상이한 과정의 치료요법은 제2 생물제제로의 치료를 포함한다. 다른 특정 예에서, 상기 상이한 과정의 치료요법은 하나 이상의 다른 치료제와 함께 제1 또는 제2 생물제제로의 치료를 포함한다.

- [0253] 하나의 특정 측면에서, 본 발명은 항-TNF α 약물로의 치료요법 과정을 받는 대상에서 항-TNF α 약물에 대한 치료요법을 모니터링 및/또는 최적화하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기를 포함한다:
- [0254] (a) 치료요법의 과정에 걸쳐 다수의 시간 지점에서 본원에 기재된 검정에 따라 항-TNF α 약물에 대한 중화 형태의 자가항체의 존재, 수준 또는 백분율을 검출 또는 측정함;
- [0255] (b) 시간에 따른 중화 형태의 자가항체의 존재, 수준 또는 백분율의 변화를 검출함; 및
- [0256] (c) 시간에 따른 중화 형태의 자가항체의 존재, 수준 또는 백분율의 변화를 기준으로 대상을 위한 치료요법 과정의 후속 용량 또는 상이한 과정의 치료요법이 대상에게 투여되어야 하는지의 여부를 결정함.
- [0257] 특정 구현예에서, 상기 다수의 시간 지점은 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 또는 그 이상의 시간 지점을 포함한다.
- [0258] 또 다른 특정 측면에서, 본 발명은 항-TNF α 약물로의 치료요법 과정을 받는 대상에서 항-TNF α 약물에 대한 치료요법을 모니터링 및/또는 최적화하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기를 포함한다:
- [0259] (a) 시간 지점 t_0 에서, 본원에 기재된 바와 같은 대상으로부터의 제1 시료 내 항-TNF α 약물에 대한 중화 형태의 자가항체의 수준 또는 백분율을 측정함;
- [0260] (b) 시간 지점 t_1 에서, 본원에 기재된 바와 같은 대상으로부터의 제2 시료 내 중화 형태의 자가항체의 수준 또는 백분율을 측정함;
- [0261] (c) 시간 지점 t_{n+1} 에서, 대상으로부터의 n 개의 부가적인 시료로 단계 (b) 를 임의로 반복함, 여기서 n 은 1 내지 약 25 (예를 들어, n 은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25, 또는 그 안의 임의의 범위임) 의 정수임;
- [0262] (d) t_0 에서 t_1 까지의 시간 지점 또는 t_0 에서 t_{n+1} 까지의 시간 지점의 중화 형태의 자가항체의 수준 또는 백분율의 변화를 검출함; 및
- [0263] (e) 시간에 따른 중화 형태의 자가항체의 존재, 수준 또는 백분율의 변화를 기준으로 대상을 위한 치료요법 과정의 후속 용량 또는 상이한 과정의 치료요법이 대상에게 투여되어야 하는지의 여부를 결정함.
- [0264] 다른 특정 구현예에서, 상기 중화 형태의 자가항체 (예를 들어, NAb) 의 수준 또는 백분율은 항-TNF α 약물 치료요법의 과정 중 하나 이상의 (예를 들어, 복수) 하기 주에서 측정된다: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 80, 90, 100 등.
- [0265] 일부 구현예에서, 상기 대상을 위한 치료요법 과정의 후속 용량의 결정은 대상을 위한 치료요법 과정의 후속 용량을 유지, 증가 또는 감소시키는 것을 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 대상을 위한 상이한 과정의 치료요법의 결정은 상이한 항-TNF α 약물로의 치료를 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 대상을 위한 상이한 과정의 치료요법의 결정은, 비제한적으로, 항-TNF 치료요법, 면역억제제, 코르티코스테로이드, 상이한 메카니즘을 표적으로 하는 약물, 영양 치료요법 및 다른 조합 치료를 포함하는 또 다른 치료제와 함께 현 과정의 치료요법으로의 치료를 포함한다. 추가 구현예에서, 상기 대상을 위한 상이한 과정의 치료요법의 결정은 현 과정의 치료요법을 변화시키는 것 (예를 들어, 상이한 항-TNF α 약물 또는 상이한 메카니즘을 표적으로 하는 약물, 예컨대 IL-6 수용체-억제 모노클로날 항체, 항-인테그린 분자 (예를 들어, 티사브리 (Tysabri), 베달루자마브 (Vedolizumab)), JAK-2 억제제 및 티로신 키나아제 억제제, 또는 영양 치료요법 (예를 들어, 특정한 탄수화물 식이) 으로 변경) 을 포함한다.
- [0266] 특정 구현예에서, 상기 시간에 따른 중화 형태의 자가항체 (예를 들어, NAb) 의 수준 또는 백분율의 증가는 대상을 위해 치료 조정이 권장되어야 한다는 것을 의미한다. 다른 특정 구현예에서, 상기 시간에 따른 중화 형태의 자가항체 (예를 들어, NAb) 의 부재에서 이의 존재로의 변화는 대상을 위해 치료 조정이 권장되어야 한다는 것을 의미한다. 이러한 구현예에서, 상기 대상은 하나 이상의 면역억제제, 예컨대 메토트렉세이트

(methotrexate (MTX)) 또는 아자티오프린 (azathioprine (AZA)) 과 함께 현 과정의 치료요법 (예를 들어, 기존의 항-TNF α 약물을 택함) 으로 치료될 수 있다. 특정한 대안적인 구현예에서, 상기 대상은 상이한 항-TNF α 약물로 변경될 수 있다. 다른 특정한 대안적인 구현예에서, 상기 대상은 상이한 메카니즘을 표적으로 하는 약물 (예를 들어, 비(非)항-TNF α 약물) 로 변경될 수 있다.

[0267] 또 다른 특정 측면에서, 본 발명은 제1 항-TNF α 약물로의 치료요법 과정을 받는 대상에서 치료요법의 최적화 및/또는 독성을 감소시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기를 포함한다:

[0268] (a) 본원에 기재된 검정에 따라 대상으로부터의 시료 내 중화 형태의 자가항체의 존재, 수준 또는 백분율을 검출 또는 측정함으로써 제1 항-TNF α 약물에 대한 중화 형태의 자가항체가 제2 (즉, 상이한) 항-TNF α 약물과 교차반응을 일으킬 수 있는지의 여부를 결정함; 및

[0269] (b) 상기 중화 형태의 자가항체가 제2 항-TNF α 약물과 교차반응을 일으킬 수 있는 경우, 상이한 과정의 치료요법이 대상에게 투여되어야 하는지를 결정함.

[0270] 특정 구현예에서, 상기 상이한 과정의 치료요법이 투여되어야 하는지의 결정은 상이한 메카니즘을 표적으로 하는 약물 (예를 들어, 비-항-TNF α 약물) 로 변경하는 것을 포함한다. 상기과 같은 약물의 비제한적 예로는 IL-6 수용체-억제 모노클로날 항체, 항-인테그린 분자 (예를 들어, 티사브리 (Tysabri), 베달루자마브 (Vedolizumab)), JAK-2 억제제, 티로신 키나아제 억제제, 영양 치료요법 (예를 들어, 특정한 탄수화물 식이) 및 이의 혼합물이 포함된다.

[0271] 일부 구현예에서, 상기 중화 형태의 자가항체가 제2 항-TNF α 약물과 교차반응을 일으킬 수 없는 경우, 상기 방법은 추가로 현 과정의 치료요법의 후속 용량이 증가 또는 감소되어야 하는지 또는 상기 대상에게 상이한 과정의 치료요법이 투여되어야 하는지를 결정하는 것을 포함한다. 특정 예에서, 상기 상이한 과정의 치료요법은 제2 항-TNF α 약물로의 치료를 포함한다. 다른 특정 예에서, 상기 상이한 과정의 치료요법은 하나 이상의 면역억제제, 예컨대 MTX 또는 AZA 와 함께 제1 또는 제2 항-TNF α 약물로의 치료를 포함한다.

[0272] 항-TNF α 약물 및 항-약물 항체의 검출 방법은 추가로 PCT 공보 제 WO 2011/056590 호에 기재되어 있고, 이의 개시는 모든 목적을 위해 이의 전체가 본원에 참조로서 인용된다.

[0273] 특정 예에서, 본 발명은 추가로 TNF α 매개 질환 또는 장애 (예를 들어, CD 또는 UC 와 같은 IBD) 와 관련된 하나 이상의 증상을 치료하는데 유용한 상이한 메카니즘을 표적으로 하는 약물 (예를 들어, 비-항-TNF α 약물) 또는 항-TNF α 약물과 같은 치료요법 과정의 치료적 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 치료적 적용을 위하여, 치료요법 과정은 단독으로 투여되거나 또는 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 부가적인 제제와 조합으로 공동 투여될 수 있다. 상기와 같이, 본 발명은 유리하게는 올바른 약물이 올바른 시간에 올바른 환자에게 제공되도록 하기 위하여, 치료 결정의 안내 및 항-TNF α 약물에 대한 치료요법 선택 및 최적화에 대한 정보를 제공함으로써 임상가가 "개인 맞춤형 약" 을 실행하는 것을 가능하게 한다.

[0274] IV. 산 해리

[0275] 특정 측면에서, 본 발명의 검정 방법은 추가로, 예를 들어 항-TNF α 약물과 같은 생물제제에 대항하여 생성되는 중화 자가항체 (NAb), 비(非)-중화 자가항체 (non-NAb) 및/또는 이의 아형의 존재 또는 수준을 측정하기 위한 면역 복합체의 평형을 가능하게 하는 산 해리 단계를 포함한다. 그 결과, 이를 필요로 하는 대상에게 투여되는 생물제제 (예를 들어, 항-TNF α 약물) 에 대한 NAb 및/또는 비-NAb 의 존재 또는 수준은 대상의 시료 내 또한 존재하는 투여된 생물제제로부터의 유의한 개입 없이 측정될 수 있다. 특히, 대상의 시료는 높은 생물제제 약물 수준으로부터의 유의한 개입 없이, 생물제제 (예를 들어, 항-TNF α 약물) 존재 하에서의 NAb 및/또는 비-NAb 의 존재 또는 수준을 측정하기 위해 제공되는 충분한 양의 산으로 인큐베이션될 수 있다.

[0276] 일부 구현예에서, 본 발명의 검정 방법의 단계 (a) 는 하기를 포함할 수 있다:

[0277] (a') 자가항체 (예를 들어, 중화 및/또는 이의 비-중화 형태 포함) 및 생물제제 (예를 들어, 항-TNF α 약물) 의 사전형성 복합체를 해리하기 위하여 시료를 산과 접촉시킴;

[0278] (b') 사전형성 복합체의 해리 후, 시료를 표지된 생물제제 (예를 들어, 항-TNF α 약물) 및 표지된 생물제제 결합 부분 (예를 들어, TNF α) 와 접촉시킴; 및

[0279] (c') 시료 내 산을 중화시켜 하기를 형성함:

[0280] (i) 표지된 생물제제 (예를 들어, 항-TNF α 약물) 및 자가항체의 제 1 의 표지된 복합체; 및/또는

- [0281] (ii) 표지된 생물제제 (예를 들어, 항-TNF α 약물), 표지된 생물제제 결합 부분 (예를 들어, TNF α) 및 자가항체의 제 2 의 표지된 복합체.
- [0282] 일부 대안적인 구현예에서, 단계 (a') 및 (b') 는 동시에 수행되며, 예를 들어 상기 시료가 산, 표지된 생물제제 (예를 들어, 항-TNF α 약물) 및 표지된 생물제제 결합 부분 (예를 들어, TNF α) 와 동시에 접촉된다. 다른 대안적인 구현예에서, 단계 (b') 는 단계 (a') 전에 수행되며, 예를 들어 상기 시료는 우선 표지된 생물제제 (예를 들어, 항-TNF α 약물) 및 표지된 생물제제 결합 부분 (예를 들어, TNF α) 와 접촉된 후, 산과 접촉된다. 추가 구현예에서, 단계 (b') 및 (c') 는 동시에 수행되며, 예를 들어 상기 시료는 표지된 생물제제 (예를 들어, 항-TNF α 약물) 및 표지된 생물제제 결합 부분 (예를 들어, TNF α) 와 접촉되고, 동시에 중화된다 (예를 들어, 시료를 하나 이상의 중화 제제와 접촉시킴).
- [0283] 특정 구현예에서, 상기 표지된 생물제제 결합 부분 (예를 들어, TNF α), 표지된 생물제제 (예를 들어, 항-TNF α 약물), 비표지된 생물제제 (예를 들어, 항-TNF α 약물) 및 생물제제 (예를 들어, 항-TNF α 약물) 에 대한 자가항체가 평형을 이루고 이들 사이에 복합체를 형성할 수 있도록, 상기 시료는 자가항체 및 생물제제 (예를 들어, 항-TNF α 약물) 의 사전형성 복합체를 해리하기에 충분한 양의 산과 접촉된다. 특정 구현예에서, 상기 시료는 높은 수준의 생물제제 (예를 들어, 항-TNF α 약물) 의 존재 하에서의 자가항체의 검출 및/또는 측정을 가능하게 하는 충분한 양의 산과 접촉될 수 있다.
- [0284] 일부 구현예에서, 용어 "높은 수준의 생물제제", 예컨대 높은 수준의 항-TNF α 약물에는 약 10 내지 약 100 $\mu\text{g/mL}$, 약 20 내지 약 80 $\mu\text{g/mL}$, 약 30 내지 약 70 $\mu\text{g/mL}$, 또는 약 40 내지 약 80 $\mu\text{g/mL}$ 의 약물 수준이 포함된다. 다른 구현예에서, 용어 "높은 수준의 생물제제", 예컨대 높은 수준의 항-TNF α 약물에는 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 약물 수준이 포함된다.
- [0285] 일부 구현예에서, 상기 산은 유기산을 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 산은 무기산을 포함한다. 추가 구현예에서, 상기 산은 유기산 및 무기산의 혼합물을 포함한다. 유기산의 비제한적인 예로는 시트르산, 이소시트르산, 글루탐산, 아세트산, 락트산, 포름산, 옥살산, 요산, 트리플루오로아세트산, 벤젠 술폰산, 아미노메탄술폰산, 캄퍼-10-술폰산, 클로로아세트산, 브로모아세트산, 요오도아세트산, 프로판산, 부탄산, 글리세린산, 숙신산, 말산, 아스파르트산 및 이의 조합물이 포함된다. 무기산의 비제한적인 예로는 염산, 질산, 인산, 황산, 붕산, 불화수소산, 브롬화수소산 및 이의 조합물이 포함된다.
- [0286] 특정 구현예에서, 상기 산의 양은 산 또는 산의 혼합물의 약 0.01M 내지 약 10M, 약 0.1M 내지 약 5M, 약 0.1M 내지 약 2M, 약 0.2M 내지 약 1M, 또는 약 0.25M 내지 약 0.75M 의 농도에 해당한다. 다른 구현예에서, 상기 산의 양은 산 또는 산의 혼합물의 약 0.01M, 0.05M, 0.1M, 0.2M, 0.3M, 0.4M, 0.5M, 0.6M, 0.7M, 0.8M, 0.9M, 1M, 2M, 3M, 4M, 5M, 6M, 7M, 8M, 9M 또는 10M 이상의 농도에 해당한다. 상기 산의 pH 는, 예를 들어 약 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 또는 6.5 일 수 있다.
- [0287] 일부 구현예에서, 상기 시료는 자가항체 및 생물제제 (예를 들어, 항-TNF α 약물) 의 사전형성 복합체를 해리하기에 충분한 시간 동안 산과 접촉된다. 특정 예에서, 상기 시료는 약 0.1 시간 내지 약 24 시간, 약 0.2 시간 내지 약 16 시간, 약 0.5 시간 내지 약 10 시간, 약 0.5 시간 내지 약 5 시간, 또는 약 0.5 시간 내지 약 2 시간 범위의 시간 기간 동안 산과 접촉된다 (예를 들어, 인큐베이션된다). 다른 예에서, 상기 시료는 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 시간 이상의 시간 기간 동안 산과 접촉된다 (예를 들어, 인큐베이션된다). 상기 시료는 4°C, 실온 (RT) 또는 37°C 에서 산과 접촉될 수 있다.
- [0288] 특정 구현예에서, 상기 산의 중화 단계는 본원에 기재된 제1 및/또는 제2 표지된 복합체의 형성이 가능하도록 시료의 pH 를 증가시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 산은 하나 이상의 중화제, 예컨대 강염기, 약염기, 완충 용액 및 이의 조합물의 첨가에 의해 중화된다. 당업계의 기술자는 중화 반응이 반드시 수득된 pH 가 7 을 의미하는 것이 아니라는 것을 이해할 것이다. 일부 예에서, 산 중화는 염기성인 시료를 결과로 얻는다. 다른 예에서, 산 중화는 산성인 (하지만, 중화제 첨가 전 시료의 pH 보다 더 높음) 시료를 결과로 얻는다. 특정 구현예에서, 상기 중화제는 pH 약 7.3 의 완충액, 예컨대 인산 완충 식염수 (예를 들어, 10x PBS) 를 포함한다.
- [0289] 일부 구현예에서, 단계 (b') 는 추가로 내부 대조군을 표지된 생물제제 (예를 들어, 항-TNF α 약물) 및 표지된 생물제제 결합 부분 (예를 들어, TNF α) (예를 들어, 사전형성 복합체의 해리 전에, 중에 또는 후에) 과 함께 시료와 접촉시키는 것을 포함한다. 특정 예에서, 상기 내부 대조군은 표지된 내부 대조군, 예를 들어

Biocytin-Alexa 488 을 포함한다. 다른 특정 예에서, 상기 표지된 내부 대조군의 양은 분석된 시료의 100 μ L 당 약 1 ng 내지 약 25 ng, 약 5 ng 내지 약 25 ng, 약 5 ng 내지 약 20 ng, 약 1 ng 내지 약 20 ng, 약 1 ng 내지 약 10 ng, 또는 약 1 ng 내지 약 5 ng 범위이다. 추가의 예에서, 상기 표지된 내부 대조군의 양은 분석된 시료의 100 μ L 당 약 1 ng, 5 ng, 10 ng, 15 ng, 20 ng 또는 25 ng 이상이다.

[0290] 본 발명의 방법의 비제한적인 일례로서, 시료, 예컨대 혈청 시료 (예를 들어, 레미케이드 (IFX) 와 같은 항-TNF α 약물로의 치료요법을 받는 대상으로부터의 혈청) 은 0.5M 시트르산, pH 3.0 으로 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션될 수 있다. (비표지된) 항-TNF α 약물 및 항-TNF α 약물에 대한 자가항체 (예를 들어, 항-IFX 항체 (ATI) 와 같은 항-약물 항체) 사이의 사전형성 복합체의 해리 후, 표지된 항-TNF α 약물 (예를 들어, IFX-Alexa 488), 표지된 TNF α (예를 들어, TNF α Alexa 532) 및 임의로 내부 대조군이 첨가되고, 상기 반응 혼합물 (예를 들어, 즉시) 은 중화제, 예컨대 10x PBS, pH 7.3 으로 중화될 수 있다. 중화 후, 상기 반응 혼합물을 실온에서 (예를 들어, 플레이트 진탕기 상에서) 또 다른 1 시간 동안 인큐베이션시켜 평형을 이루게하고, 표지된 TNF α , 표지된 항-TNF α 약물, 비표지된 항-TNF α 약물, 및/또는 항-TNF α 약물에 대한 자가항체 사이의 면역 복합체의 재형성을 완결할 수 있다. 그 후, 상기 시료는 여과되어, 본원에 기재된 바와 같은 SEC-HPLC 로 분석될 수 있다.

[0291] 특정 구현예에서, 본 발명의 방법 (예를 들어, 산 해리 후 균일한 용액상 결합 키네틱 포함) 은 NAb 및/또는 비-NAb ATI 가 약 60 μ g/mL 이하의 IFX 의 존재 하에서 측정될 수 있도록 하기 위하여, IFX 약물 내성을 유의하게 증가시킨다. 다시 말해서, 본 발명의 방법은 ATI 와 같은 항-TNF α 약물에 대한 NAb 및/또는 비-NAb 의 존재 또는 수준 뿐 아니라 높은 수준의 항-TNF α 약물 (예를 들어, IFX) 의 존재 하에서, 이로부터의 유의한 개입 없이, 다른 항-TNF α 약물에 대한 자가항체의 존재 또는 수준을 검출할 수 있다.

[0292] 산 해리를 사용하는 항-약물 항체의 검출 방법은 추가로 2012 년 2 월 16 일자 제출된 PCT 출원 제 PCT/US2012/025437 호에 기재되어 있고, 이의 개시는 모든 목적을 위하여 본원에 참조로서 인용된다.

[0293] V. 생물제제 치료요법

[0294] 본 발명의 검정은 대상 (예를 들어, 생물제제 치료요법을 받는 대상) 으로부터의 시료 내 임의의 생물제제에 대한 중화 및/또는 비-중화 자가항체의 존재 또는 부재 (예를 들어, 양성 또는 음성), 수준 또는 백분율의 검출 및/또는 측정에 적합하다. 생물제제의 비제한적인 예로는 항체, 항체 단편, 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 융합 단백질 (예를 들어, Ig 융합 단백질 또는 Fc 융합 단백질), 다가 결합 단백질 (예를 들어, DVD Ig), 항체-약물 컨쥬게이트, 백신, 핵산, 당류, 이의 재조합 형태, 이의 가공된 형태 및 이의 조합물이 포함된다.

[0295] 항체-기반 생물제제의 예로는, 비제한적으로, 치료적 모노클로날 항체 및 이의 항원-결합 단편이 포함된다. 특정 구현예에서, 상기 항체는 항-TNF α 약물, 예컨대 REMICADETM (인플릭시마브), HUMIRATM (아달리무마브 (adalimumab)), CIMZIA[®] (세르톨리주마브 페골 (certolizumab pegol)), SIMPONI[®] (골리무마브 (golimumab); CNTO 148) 또는 이의 조합물을 포함한다. 항체-기반 생물제제의 부가적인 예로는 항체-약물 컨쥬게이트, 예컨대 AdcetrisTM (아드세트리스) (브렌투시마브 베도틴 (brentuximab vedotin)) 가 포함된다. 표 1 은 승인되었거나 또는 현재 개발 중인 치료적 모노클로날 항체의 대표적인 목록을 제공한다. 임상 개발 중인 및 승인된 제품 중 모노클로날 항체 치료제의 광범위한 목록은 2006 PhRMA 보고서, "418 Biotechnology Medicines in Testing Promise to Bolster the Arsenal Against Disease" 에 제공되어 있고, 이의 개시는 모든 목적을 위하여 본원에 참조로서 인용된다.

표 1		
치료적 모노클로날 항체		
상품명	제조사	증상(들)
염증성 질환		
Remicade™ (인플릭시마브 (infliximab))	Janssen Biotech, Inc.	크론병
ABT 874	Abbott Laboratories	크론병
Stelara® (우스테키누마브 (ustekinumab))	Janssen Biotech, Inc.	크론병
Humira™ (아달리무마브 (adalimumab))	Abbott Laboratories	크론병
MDX-1100	Millennium Pharmaceuticals	궤양성 대장염
Nuvion® (비실리주마브 (visilizumab))	PDL BioPharma	I.V. 스테로이드-저항성 궤양성 대장염 및 크론병
Tysabri® (나탈리주마브 (natalizumab))	Biogen Idec	크론병
Simponi® (골리무마브 (golimumab))	Janssen Biotech, Inc.	포도막염
자가면역 장애		
Humira™ (아달리무마브)	Abbott Laboratories	류마티스 관절염, 강직성 척추염, 소아 류마티스 관절염, 건선
Remicade™ (인플릭시마브)	Janssen Biotech, Inc.	류마티스 관절염
Simponi® (골리무마브)	Janssen Biotech, Inc.	류마티스 관절염, 강직성 척추염, 건선성 관절염
Rituxan® (리툽시마브 (rituximab))	Genentech Biogen Idec	류마티스 관절염, 루푸스, 1차 진행성 다발성 경화증, SLE, 재발 경감 다발성 경화증

[0296]

표 1		
치료적 모노클로날 항체		
상품명	제조사	증상(들)
Tysabri® (나탈리무마브)	Biogen Idec	다발성 경화증
Stelara® (유스테키누마브)	Janssen Biotech, Inc.	관상형 건선, 다발성 경화증
ART 874	Abbott Laboratories	다발성 경화증
Actemra	Roche	류마티스 관절염
AME 527	Applied Molecular	류마티스 관절염
AMG 108	Amgen	류마티스 관절염
AMG 714	Amgen	류마티스 관절염
항-CD16 MAb	MacroGenics	면역성 혈소판감소증
다클리주마브 (daclizumab) (항-CD25 MAb)	PDL BioPharma Biogen Idec	다발성 경화증
데노수마브 (denosumab) (AMG 162)	Amgen	류마티스 관절염
ETI-201	Elusys Therapeutics	SLE
HuMax-CD20 (오파투마브 (ofatumumab))	Genmab	류마티스 관절염
HuZAF™ (폰톨리주마브 (fontolizumab))	PDL BioPharma Biogen Idec	류마티스 관절염
IMMU-106 (hCD20)	Immunomedics	자가면역 질환
LymphoStat-B™ (벨리주마브 (belimumab))	Human Genome Sciences	류마티스 관절염, SLE
MEDI-545 (MDX-1103)	Medarex MedImmune	루푸스
시플리주마브 (siplizumab) (MEDI-507)	MedImmune	건선
MLN 1202	Millennium Pharmaceuticals	다발성 경화증
오크렐리주마브 (ocrelizumab) (항-CD20)	Genentech Biogen Idec	다발성 경화증, 류마티스 관절염

[0297]

표 1		
치료적 모노클로날 항체		
상품명	제조사	증상(들)
(R1594)	Roche	
OKT3-감마-1	Johnson & Johnson	건선성 관절염
TRX 1 (항-CD4)	TolerRx	피부 홍반성 루푸스
TRX 4	TolerRx	건선
감염성 질환		
Synagis® (팔리비주마브 (palivizumab))	MedImmune	호흡기 세포융합 바이러스 (RSV) 방지
MDX-066 (CDA-1)	Medarex	C. 디피실레 (<i>C. difficile</i>) 질환
항-HIV-1 MAb	Polymun Scientific	HIV 감염
CCR5 MAb	Hunan Genome Sciences	HIV 감염
Cytolin® (항-CD8 MAb)	CytoDyn	HIV 감염
NM01	SRD Pharmaceuticals	HIV 감염
PRO 140	Progenics Pharmaceuticals	HIV 감염
TNX-355	Tanox	HIV 감염
ABthrax™ (락시바쿠마브 (raxibacumab))	Human Genome Sciences	탄저병
Anthim™(ETI-204)	Elusys Therapeutics	탄저병
항-hsp90 MAb	NeuTec Pharma	칸디다증
항-staph MAb	MedImmune	스타필로코쿠스 감염 방지
Aurexis (테피바주마브 (tefibazumab))	Inhibitex	S. 오레우스 (<i>S. aureus</i>) 균혈증 예방 및 치료
바비투시마브 (bavituximab)	Peregrine Pharmaceuticals	C 형 감염
MDX-1303	Medarex PharmAthene	탄저병
Numax™ (모타비주마브 (motavizumab))	MedImmune	RSV
Tarvacin™	Peregrine Pharmaceuticals	C 형 감염

[0298]

표 1		
치료적 모노클로날 항체		
상품명	제조사	증상(들)
XTL 6865	XTL Biopharmaceuticals	C 형 감염
암		
Avastin™ (베바시주마브 (bevacizumab))	Genentech	전이성 직장암
Bexxar® (토시투모마브 (tositumomab))	GlaxoSmithKline	비-호지킨 림프종
Campath® (알렘투주마브 (alemtuzumab))	Berlex Laboratories Genzyme	B-세포 만성 림프구성 백혈병
Erbitux™ (세투시마브 (cetuximab))	Bristol-Myers Squibb Medarex	직장암, 두경부 편평세포 암
Herceptin® (트라스투주마브 (trastuzumab))	Genentech	HER2-과발현 초기 단계 또는 전이성 유방암
Mylotarg™ (젬투주마브 오조가미신 (gemtuzumab ozogamicin))	Wyeth	급성 골수성 백혈병
Rituxan® (리투시마브)	Genentech Biogen Idec	B-세포 비-호지킨 림프종, 지연형 비-호지킨 림프종 유도 요법, 재발 또는 내화성 CLL
Zevalin™ (이브리투모마브 티옥세탄 (ibritumomab tiuxetan))	Biogen Idec	비-호지킨 림프종
131I-huA33	Life Science Pharmaceuticals	직장암
1D09C3	GPC Biotech	재발/내화성 B-세포 림프종
AGS PSCA MAb	Agensys Merck	전립선암
AMG 102	Amgen	암

[0299]

표 1		
치료적 모노클로날 항체		
상품명	제조사	증상(들)
AMG 479	Amgen	암
AMG 623	Amgen	B-세포 만성 림프구성 백혈병 (CLL)
AMG 655	Amgen	암
AMG 706	Amgen	이마티니브 (imatinib)-저항성 GIST, 진행된 갑상선암
AMG 706	Amgen	이마티니브-저항성 GIST, 진행된 갑상선암
항-CD23 MAb	Biogen Idec	CLL
항-CD80 MAb	Biogen Idec	비-호지킨 B-세포 림프종
항-유전자형 암 백신	Viventia Biotech	악성 흑색종
항-림프독소 베타 수용체 MAb	Biogen Idec	고형 종양
항-PEM MAb	Somanta Pharmaceuticals	암
항-Tac(Fv)-E38 면역독소	National Cancer Institute	백혈병, 림프종
Avastin® (베바시주마브)	Genentech	재발된 전이성 직장암, 제 1 선 전이성 유방암, 제 1 선 비-편평 NSCLC 암
AVE 9633 메이탄신-로딩된 항-CD33 MAb	Sanofi Aventis	AML
바비톡시마브	Peregrine Pharmaceuticals	고형 암
CAT 3888	Cambridge Antibody Technology	모발상 세포 백혈병
키메라 MAb	National Cancer Institute	신경모세포종
실톡시마브 (siltuximab) (CNTO 328)	Janssen Biotech, Inc.	신장암, 전립선암, 다발성 골수종
Cotara TM	Peregrine Pharmaceuticals	뇌암
비바투주마브 (bivatuzumab)	Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals	암

[0300]

표 1		
치료적 모노클로날 항체		
상품명	제조사	증상(들)
CP-751871 (피지투무마브 (figitumumab))	Pfizer	부신피질암, 비-소세포 폐암
CS-1008 (티가투주마브 (tigatuzumab))	Daiichi Sankyo	췌장암, 직장암, 비-소세포 폐암, 난소암
BrevaRex™	ViRexx	유방암, 다발성 골수종
테노수마브	Amgen	유방암 또는 전립선암에 대한 호르몬 질제 요법에 의해 유도된 골 손실, 골 전이가 없는 생존 연장, 유방암에서의 골 전이
에크로멕시마브 (ecromeximab)	Kyowa Hakko USA	악성 흑색종
EMD 273063	EMD Lexigen	고형 종양, 악성 흑색종, 신경모세포종, SCLC
Erbix™	Bristol Myers Squibb	두경부암, 제 1 선 췌장암, 제 1 선 NSCLC, 제 2 선 NSCLC, 제 1 선 직장암, 제 2 선 직장암
GMK	Progenies Pharmaceuticals	고위험군 환자에서 1 차 흑색종을 제거하는 수술 후 재발 방지
Campath® (알렘투주마브)	National Cancer Institute Berlex Laboratories	백혈병, 림프종
HGS-ETR1	Human Genome Sciences	혈액암 및 고형 종양
HGS ETR2 (마파투무마브 (mapatumumab))	Human Genome Sciences	혈액암 및 고형 종양
HGS-TR2J	Human Genome Sciences	진전된 고형 종양
HuC242-DM4	ImmunoGen	대장암, 소화관암, NSCLC, 췌장암

[0301]

표 1		
치료적 모노클로날 항체		
상품명	제조사	증상(들)
HuMax-CD4 (자놀리무마브 (zanolimumab))	Genmab Serono	피부 T-세포 림프종, 비-피부 T-세포 림프종
HuMax CD20 (오파투무마브)	Gemnab	CLL, 비-호지킨 림프종
HuMax-EGFr	Genmab	두경부암
huN901-DM1	ImmunoGen	SCLC 다발성 골수종
이필리무마브 (ipilimumab)	Bristol-Myers Squibb Medarex	흑색종 단일치료요법, 백혈병, 림프종, 난소암, 전립선암, 신세포암, 흑색종 (MCX-010 +/- DTIC), 제 2 선 전이성 흑색종 (MDX-010 디소모티드 (disomotide)/오버모티드 (overmotide) MDX-1379)
M195-비스무트 213 킨쥬게이트	Actinium Pharmaceuticals	AML
M200 (볼로식시마브 (volociximab))	PDL BioPharma Fremont, CA Biogen Idec Cambridge, MA	진전된 고형 종양
MAb HeFi-1	National Cancer Institute Bethesda, MD	림프종, 비-호지킨 림프종
MDX-060 (이라투무마브 (iratumumab))	Medarex	호지킨병, 역형성 대세포-림프종
MDX-070	Medarex	전립선암
MDX-214	Medarex	ECFR-발현 암
MEDI-522	MedImmune	T-세포 림프종, 흑색종, 전립선암, 고형 종양
MORAb 003	Morphotek	난소암
MORAb 009	Morphotek	메소텔린-발현 종양
뉴라디아브 (neuradiab)	Bradmer Pharmaceuticals	교모세포종

[0302]

표 1		
치료적 모노클로날 항체		
상품명	제조사	증상(들)
니모투주마브 (nimotuzumab)	YM Biosciences	두경부의 편평 세포 암 종, 재발 또는 내화성 고 도 악성 신경교종, 역형 성 성상세포종, 교모세포 종 및 미만 내인성 교뇌 신경교종
Omnitarg™ (퍼투주마브 (pertuzumab))	Genentech	난소암
OvaRex® (오레고보마브 (oregovomab))	ViRexx MAb	난소암
PAM 4	Merck	췌장암
파니투무마브 (panitumumab) (rIIuMAb EGFr)	Abgenix	직장암
PSMA-ADC	Progenics Pharmaceuticals	전립선암
R1550 RadioTheraCIM	Roche YM BioSciences	전이성 유방암, 신경교종
RAV 12	Raven Biotechnologies	암
Rencarex® G250	Wilex AG	신장암
SGN30	Seattle Genetics	피부 역형성 대세포 MAb 림프종, 전신 역형 성 대세포 림프종, 호지 킨병
SGN-33 (린투주마브 (lintuzumab))	Seattle Genetics	AML, 골수이형성 증후 군 CLL 다발성 골수종, 비-호지킨 림프종
SGN-40	Seattle Genetics	AML, 골수이형성 증후 군 CLL 다발성 골수종, 비-호지킨 림프종
시브로투르투마브 (sibroturtumab)	Life Science Pharmaceuticals	결장암, 두경부암, 폐암

[0303]

표 1		
치료적 모노클로날 항체		
상품명	제조사	증상(들)
Tarvacin™ (타비톡시마브)	Peregrine Pharmaceuticals	고형 종양
트레멜리무마브 (tremelimumab)	Pfizer	전이성 흑색종, 전립선암
TNX-650	Tanox	내화성 호지킨 림프종
Zevalin™ (이브리투모마브 티옥세탄)	Spectrum Pharmaceuticals	비-호지킨 림프종
혈액 장애		
ReoPro® (아브식시마브)	Eli Lilly	심장 허혈성 합병증의 방지를 위한 경피적 관상동맥 중재술에 대한 부속물
유르톡사주마브 (urtioxazumab)	Teijin Pharma	용혈성 요독증
아펠리모마브 (afelimomab)	Abbot Laboratories	폐혈증, 폐혈증성 쇼크
에쿨리주마브 (eculizumab)	Alexion Pharmaceuticals	발작야간혈색소뇨증
심혈관 질환		
MLN 1202	Millennium Pharmaceuticals	죽상동맥경화증
펙셀리주마브 (pexelizumab)	Alexion Pharmaceuticals Procter & Gamble Pharmaceuticals	급성 심근경색증, 심폐 바이패스
당뇨병 및 관련 병상		
항-CD3 MAb	MacroGenics	1-형 당뇨병
OKT3-감마-1	Johnson & Johnson	1-형 당뇨병
TRX 4 (항-CD3)	TolerRx	1-형 당뇨병
유전 장애		

[0304]

표 1		
치료적 모노클로날 항체		
상품명	제조사	증상(들)
Soliris™ (에쿨리주마브)	Alexion Pharmaceuticals	발작야간혈색소뇨증 (PNH)
신경 장애		
RN624	Rinat Neuroscience	골관절염 통증
RN1219	Rinat Neuroscience	알츠하이머병
호흡기 장애		
ABN 912	Novartis Pharmaceuticals	천식, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD)
ABX-IL8	Amgen	COPD
AMG 317	Amgen	천식
다클리주마브 (항-CD25 MAb)	Protein Design Labs Roche	천식
MEDI-528 (항-TL-9 MAb)	MedImmune	천식
메폴리주마브 (mepolizumab) (항-TL5 MAb)	GlaxoSmithKline	천식 및 비염
TNX-832	Tanox Houston, TX	호흡기 질환
Xolair® (오말리주마브 (omalizumab))	Genentech Novartis Pharmaceuticals	소아 천식
이식		
ORTHOCLONE OKT® 3 (무로모마브 (muromomab)-CD3)	Ortho Biotech	급성 콩팥 이식 거부, 심장 및 간 이식 거부의 역전
Simulect® (바실릭시마브 (basiliximab))	Novartis Pharmaceuticals	신장 이식 거부의 방지
Zenapax® (다클리주마브)	Roche	급성 콩팥 이식 거부의 예방

[0305]

표 1		
치료적 모노클로날 항체		
상품명	제조사	증상(들)
OKT3-감마-1	Protein Design Labs Johnson & Johnson	신장 이식 거부
기타		
CR 0002	CuraGen	콩팥 염증
데노수마브 (AMG 162)	Amgen	폐경기후 골다공증
메폴리주마브 (항-IL5 MAb)	GlaxoSmithKline	과호산구 증후군, 호산구 성 식도염
Xolair® (오말리주마브)	Genentech Tanox	땅콩 알레르기

[0306]

[0307]

단백질-기체 또는 폴리펩티드-기체 생물체제의 비제한적 예는 사이토카인 (예를 들어, 인터류킨), 케모카인, 성장 인자, 혈액-생성 자극 단백질 (예를 들어, 에리트로포이에틴), 호르몬 (예를 들어, Elonva® (여포 자극 호르몬 유사체))

르몬), 성장 호르몬), 효소 (예를 들어, Pulmozyme® (도르나아제 알파)), 응혈 인자, 인슐린, 알부민, 이의 단편, 이의 보존적 개질 변이체, 이의 유사체, 및 이의 조합을 포함한다.

[0308] 사이토카인의 예는 비제한적으로, TNF α , 세포자멸사의 TNF-관련 약한 유도제 (TWEAK), 오스테오프로테게린 (OPG), IFN- α , IFN- β , IFN- γ 인터류킨 (예를 들어, IL-1 α , IL-1 β , IL-1 수용체 길항제 (IL-1ra), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, 가용성 IL-6 수용체 (sIL-6R), IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-23 및 IL-27), 아디포사이토카인 (예를 들어, 렙틴, 아디포넥틴, 레시스틴, 활성 또는 전체 플라즈미노겐 활성화제 저해제-1 (PAI-1), 비스파틴 및 레티놀 결합 단백질 4 (RBP4)) 및 이의 조합을 포함한다. 특정 구현 예에서, 인터류킨은 IL-2 예컨대 Proleukin® (알테스류킨; 재조합체 IL-2) 을 포함한다.

[0309] 케모카인의 예는 비제한적으로, CXCL1/GRO1/GRO α , CXCL2/GRO2, CXCL3/GRO3, CXCL4/PF-4, CXCL5/ENA-78, CXCL6/GCP-2, CXCL7/NAP-2, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC, CXCL12/SDF-1, CXCL13/BCA-1, CXCL14/BRAK, CXCL15, CXCL16, CXCL17/DMC, CCL1, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CCL6/C10, CCL7/MCP-3, CCL8/MCP-2, CCL9/CCL10, CCL11/에오타신, CCL12/MCP-5, CCL13/MCP-4, CCL14/HCC-1, CCL15/MIP-5, CCL16/LEC, CCL17/TARC, CCL18/MIP-4, CCL19/MIP-3 β , CCL20/MIP-3 α , CCL21/SLC, CCL22/MDC, CCL23/MP1F1, CCL24/에오타신-2, CCL25/TECK, CCL26/에오타신-3, CCL27/CTACK, CCL28/MEC, CL1, CL2, CX₃CL1, 및 이의 조합을 포함한다.

[0310] 성장 인자의 비제한적 예는 상피 성장 인자 (EGF), 헤파린-결합 상피 성장 인자 (HB-EGF), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 색소 상피-유래 인자 (PEDF; 또한 SERPINF1 로도 공지됨), 엠피레굴린 (AREG; 또한 신경초종-유래 성장 인자 (SDGF) 로도 공지됨), 염기성 섬유모세포 성장 인자 (bFGF), 헤파토사이트 성장 인자 (HGF), 형질전환 성장 인자- α (TGF- α), 형질전환 성장 인자- β (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 등), 엔도텔린-1 (ET-1), 케라티노사이트 성장 인자 (KGF; 또한 FGF7 로도 공지됨), 골 형성 단백질 (예를 들어, BMP1-BMP15), 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 신경 성장 인자 (NGF), β -신경 성장 인자 (β -NGF), 신경영양 인자 (예를 들어, 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF), 뉴로트로핀 3 (NT3), 뉴로트로핀 4 (NT4) 등), 성장 분화 인자-9 (GDF-9), 과립구-콜로니 자극 인자 (G-CSF), 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 마이오스타틴 (GDF-8), 에리트로포이에틴 (EPO), 트롬보포이에틴 (TPO), 및 이의 조합을 포함한다.

[0311] 수용체 구성물-기재 또는 융합 단백질-기재 생물체제의 예는 비제한적으로, 면역글로불린 프레임에 연결된 자연 발생적 수용체, 예를 들어, Orencia® (아바타셉트 (abatacept); 면역글로빈 CTLA-4 융합 단백질), Amevive® (알레파셉트 (alefacept); IgG1 융합 단백질), ENBREL™ (에타네르셉트 (etanercept); 재조합 인간 TNF-수용체 융합 단백질), 두 가지 상이한 폴리펩티드 종류를 조합한 조작 단백질 (예를 들어, Ontak® (데니류킨 디프티톡스 (denileukin diftotox); 인터류킨-2 및 디프테리아 (diphtheria) 독소를 포함하는 조작 단백질), 및 이의 조합을 포함한다.

[0312] 그러므로 본 발명은 하기 중 하나 이상을 포함하는, 본원 및 표 1 에서 나타낸 질환 또는 장애 중 하나 이상에 대한 생물학적 치료요법을 받는 대상으로부터의 시료에서의 항-TNF α 약물 치료제와 같은 생물체제에 대한 중화 및 비-중화 자가항체의 존재 또는 수준을 검출 및 측정하는 방법에서 사용될 수 있다:

[0313] 염증성 질환, 예컨대 염증성 장 질환 (IBD) (예를 들어, 크론병 (CD) 및 궤양성 대장염 (UC)), 포도막염, 유육종증, 베게너 육아종증 및 중심 특징으로서 염증을 갖는 기타 질환;

[0314] 자가면역 질환, 예컨대 류마티스 관절염 (RA), 다발성 경화증 (MS), 전신 홍반성 낭창 (SLE), 강직성 척추염 (베크테레프병 (Bechterew's disease)), 루푸스, 건선성 관절염, 소아 특발성 관절염, 건선 및 홍반;

[0315] 암, 예컨대 소화기 및 위장암 (예를 들어, 직장암, 소장 (작은 창자) 암; 위장관 기질 종양, 위장관 유암종, 결장암, 직장암, 항문암, 담관암, 위암 (gastric (stomach) cancer); 식도암; 충수암 등); 쓸개암; 간암; 췌장암; 유방암; 폐암 (예를 들어, 비-소세포 폐암); 전립선암; 난소암; 신장암 (예를 들어, 신세포암); 중추신경계 암; 피부암; 용모암; 두경부암; 혈액학상 악성종양 (예를 들어, 백혈병, 림프종 예컨대 B-세포 비-호지킨 림프종); 골육종 (예를 들어, 에빙 육종); 연조직 육종 (예를 들어, 용기성 피부섬유육종 (DFSP), 횡문근육종); 기타 연조직 악성종양 및 유두상 갑상선암;

[0316] 감염성 질환, 예컨대 C. 디피실레 (C. difficile) 질환, 호흡기 세포융합 바이러스 (RSV), HIV, 탄저병, 칸디다증, 스타필로코쿠스 감염 및 C 형 감염;

[0317] 혈액 장애, 예컨대 패혈증, 패혈증성 쇼크, 발작야간혈색소뇨증 및 용혈성 요독증 증후군;

- [0318] 심혈관 질환, 예컨대 죽상동맥경화증, 급성 심근경색증, 심폐 바이패스 및 협심증;
- [0319] 대사 장애, 예컨대 당뇨병, 예를 들어, I 형 당뇨병;
- [0320] 유전 장애, 예컨대 발작야간혈색소뇨증 (PNH);
- [0321] 신경 장애, 예컨대 골관절염 통증 및 알츠하이머병;
- [0322] 호흡기 장애, 예컨대 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 비용종 (nasal polyposis) 및 소아 천식;
- [0323] 피부 질환, 예컨대 만성 중등도에서 중증 판상형 건선을 포함하는 건선;
- [0324] 이식 거부, 예컨대 급성 콩팥 이식 거부, 심장 및 간 이식 거부의 역전 (reversal), 신장 이식 거부의 방지, 급성 콩팥 이식 거부의 예방, 및 신장 이식 거부; 및/또는
- [0325] 기타 장애, 예컨대 콩팥 염증, 폐경기후 골다공증 (골 장애), 과호산구 증후군, 호산구성 식도염 및 땅콩 알레르기.
- [0326] 특정 구현예에서, 대상은 TNF α -매개 질환 또는 장애, 예를 들어, 자가면역 질환 (예를 들어, 류마티스 관절염) 또는 염증성 질환 (예를 들어, 염증성 장 질환 (IBD) 예컨대 크론병 (CD) 또는 궤양성 대장염 (UC)) 을 갖는다.
- [0327] **VI. 실시예**
- [0328] 본 발명을 특정 실시예에 의해 보다 상세히 기재할 것이다. 하기 실시예는 설명의 목적으로 제공되며, 어떠한 식으로도 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 당업자는 본질적으로 동일한 결과를 제공하도록 변화되거나 변형될 수 있는 중요하지 않은 다양한 매개변수를 쉽게 인지할 것이다.
- [0329] 2012 년 2 월 16 일에 출원한 PCT 출원 번호 PCT/US2012/025437 은 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로 본원에 포함된다.
- [0330] **실시예 1. IBD 환자에서의 중화 항-약물 항체 형성을 모니터링하기 위한 신규한 검정의 개발**
- [0331] 이 실시예는 표지된 (예를 들어, 형광 표지된) 항-TNF α 약물 및 표지된 TNF α 의 존재 하 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 환자 시료 (예를 들어, 혈청) 에서의 중화 및/또는 비-중화 항-약물 자가항체 (ADA) 의 존재 또는 수준을 검출 또는 측정하기 위한 신규한 동질 검정을 설명한다. 특정 구현예에서, 상기 검정이 유리한데, 저 친화성 ADA 를 제거하는 세정 단계를 필요 없게 하고, 가시 및/또는 IR 스펙트럼에서의 검출을 가능하게 하는 별개의 표지 (예를 들어, 형광단) 를 사용하여 배경 및 혈청 간섭 문제를 감소시키고, 형광 표지 검출의 높은 민감도로 인해 낮은 역가로 환자에서의 중화 및/또는 비-중화 ADA 를 검출하는 능력을 증가시키고, 액체상 반응으로서 발생하여, 그에 따라 ELISA 플레이트와 같은 고체 표면에 대한 부착에 의한 에피토프에 있어서의 어떠한 변화 기회도 감소시키기 때문이다.
- [0332] 인플릭시마브 (IFX) 및 아달리무마브 (ADL) 는 염증성 장 질환 (IBD) 의 치료를 위해 처방되는 항-TNF 모노클로날 항체이다. 항-약물 항체 (ADA) 는 종종 치료요법 과정 동안 발달된다. 이들 ADA 의 부분은 중화 항체 (NAb) 이다. ADA 가 약물 약동학에 부정적으로 영향을 주는 한편, NAb 의 존재는 약물의 결합 부위의 차폐를 통한 약물 효능의 손실을 추가적으로 유발할 것이다. 이 실시예는 동질 이동성 변동 검정 (homogenous mobility shift assay (HMSA)) 플랫폼을 기제로 하여 IFX 치료를 받는 IBD 환자에서의 NAb 의 발달을 모니터링하는 검정을 기술하며, 항체-대-인플릭시마브 (ATI) 성숙 및 NAb 형성 사이의 상관관계를 나타낸다.
- [0333] **방법:** IFX 및 ATI 의 혈청 농도를, 예를 들어 2012 년 2 월 16 일에 출원한 PCT 출원 번호 PCT/US2012/025437 및 PCT 공개 번호 WO 2011/056590 (이들 개시 내용 전체는 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함됨) 에서 기재된 바와 같이 HMSA 에 의해 측정하였다. NAb 검정을 위해서, ATI 를 함유하는 환자 혈청을 먼저 산 해리시킨 후, 2 개의 표지된 단백질 (예를 들어, IFX-Alexa488 및 TNF 알파-Alexa532) 을 추가한 후 중화시켰다. 용액을 2% 혈청으로 희석하고, 크기 배제 컬럼 상에 HPLC 에 의해 주입하고, 형광에 의해 복합체를 모니터링하였다. 각각의 스펙트럼에서의 자유 TNF-Alexa532 피크의 곡선 하 면적 (AUC) (예를 들어, 플롯 또는 크로마토그램) 을 대조군 및 환자 시료에 대해 계산한 후, NAb 퍼센트를 계산하였다. 항원 결합을 완전히 차단하는 ATI 를 100% NAb 로서 정의하고, 50% 는 시료에서 동일 비율의 ATI 가 비-NAb 라는 것을 의미하고, 0% 는 모든 ATI 가 비-NAb 라는 것을 의미한다. 75 명의 건강한 자원자로부터의 혈청을 사용하여 기준 범위를 확립하였다. IFX 및 ATI 수준에 대해 스크리닝한 132 명의 남은 IBD 환자 혈청으로부터의 ATI 양성 혈청 시료 (>3.13 U/mL) 을 NAb 에 대해 분석하였다. 풀링한 (pooled) ATI 양성 환자 혈청을 사용하여 양성 대조군을

제작하였다.

[0334] 데이터 분석을 위해, 피크 검출 알고리즘을 실험 당 각각의 스펙트럼에서의 모든 피크 및 트로프 (trough) 를 발견하는데 사용한다. 입방체 평활 스플라인 (cubic smoothing spline) 을 각각의 스펙트럼에 맞추고, 피크 및 트로프를 신호의 제 1 파생물에서의 변화로서 정의한다. 피크는 양성에서 음성으로의 스펙트럼의 기울기의 사인 변화이다. 반대로, 트로프는 음성에서 양성으로의 사인에서의 변화로서 정의된다. 자유 TNF-Alexa532 피크의 예측 부위에서의 윈도우 내 최고 피크 (예를 들어, 11.5 내지 13 분) 는 자유 피크 자체인 것으로 선택된다. 검출된 자유 피크 바로 위 및 아래의 트로프는 피크 자체의 상한치 및 하한치를 정의한다. 결합된, 자유 (TNF 및 IFX) 및 음성 대조군 피크 하 면적은 사다리꼴 (trapezoid) 규칙을 사용하여 상기 기재한 한계치 내의 피크 영역을 적분함으로써 발견된다. TNF-Alexa532 피크 영역의 % 를 이후 하기 식을 사용하여 각 시료에 대해 계산한다:

[0335] $\% = [(a-b)/c]*100$

[0336] 상기 식 중에서 a = 미상의 시료에서의 TNF-Alexa532 피크의 AUC 이고, b = NAb 음성 대조군으로부터의 TNF-Alexa532 피크의 AUC 이고 (예를 들어, 정상 인간 혈청에서의 IFX-Alexa488 + TNF-Alexa532), c = 정상 인간 혈청에서의 자유 TNF-Alexa532 의 AUC 이다. 계산을 위해서는, 반응 조건을 기준으로 가변적일 수 있으나 "c" 는 100% 로 설정하고 "b" 는 최대한 0% 에 가깝다. "b" 와 "c" 사이의 범위는 민감도의 최대 윈도우를 정의한다.

[0337] **결과:** 본 발명의 NAb 검정은 높은 재현성, 정확도 및 정밀도를 입증한다. 검정 내 및 검정 간 정밀도는 CV 의 20% 미만이고, 검정의 정확도는 25% 미만이다. 본 발명의 NAb 검정으로 수득한 정밀도 및 정확도는 실질적으로 세포-기반 검정 또는 ELISA 보다 양호하다. IFX 약물 내성은 ~6 $\mu\text{g/mL}$ 인 한편, TNF α 는 1.0 ng/mL 초과에서 간섭한다. 폴링한 ATI 양성 환자 혈청으로부터의 양성 대조군을 40-5% NAb 로부터 선형으로 희석한다. 건강한 대조군의 분석은, $\geq 3\%$ (예를 들어, 3.06%) 의 값으로 복귀하는 시료가 NAb 양성으로 간주된다는 것을 나타낸다. 30 개 초과 ATI 양성 환자 혈청 시료 (3.12-199.43 U/mL) 을 NAb 에 대해 스크리닝하였고, 132 개의 ATI 양성 환자 혈청 시료 중에서 26 개 (19.7%) 가 NAb 양성이었다 (평균 22.47%, 범위 3.29-51.63%). 60 U/mL 초과 ATI 수준은 고도 중화 Ab 에 상응한다. NAb 양성 시료의 추가 분석으로, ATI 역가와 NAb 양성률 (positivity) 사이의 선형 상관관계가 밝혀진다. 특히, 도 1 은 NAb % (y-축) 와 ATI 수준 사이에 명백한 관계가 있었다는 것을 설명한다 (스피어만 순위 상관관계수 (Spearman Rank Correlation), $\rho=0.564$, $p \ll 0.0001$). 도 2 는 60 U/ml 이상의 ATI 농도로 NAb 양성률 (NAb+) 이 예측된다는 것을 설명한다. 민감도 = 77.8%; 특이성 = 98.1%; 오즈비 = 63.6, $p \ll 0.0001$, 피셔 정확 검정 (Fisher's Exact Test). 도 3 은 ATI 컷오프 (cutoff) 분석을 설명하며 ATI 가 0.931 의 ROC AUC 를 갖는 NAb 를 예측한다는 것을 입증한다. 진양성률 (TPR) = 민감도; 위양성률 (FPR) = 1 - 특이성.

[0338] **결론:** 약물 및 ADA 수준 이외에, NAb 의 모니터링은 ADA 응답성에 대한 필수 정보를 제공하여 조기 치료 개입의 안내를 도와준다. 이 방법은 임의의 생물학적 치료요법에 대한 ADA 의 특성화에 적용될 수 있다.

[0339] **실시예 2. 시간에 따른 중화 항-약물 항체의 형성을 모니터링하기 위한 환자 케이스 연구**

[0340] 이 실시예는 표지된 (예, 형광 표지된) 항-TNF α 약물 및 표지된 TNF α 의 존재 하에 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 환자 시료 (예, 혈청) 에서 중화 및/또는 비중화 항-약물 자가항체 (ADA) 의 존재 또는 수준을 검출 또는 측정하기 위한 신규한 균일 검정의 추가적인 구현예를 나타낸다. 또한, 이 실시예는 환자가 치료요법으로 진행 중일 때 중화 및/또는 비중화 항-약물 항체의 형성 및/또는 비중화로부터 중화 항-약물 항체로의 변동을 모니터링하기 위한 항-TNF α 약물 치료요법에 대한 IBD 환자의 시간 경과 케이스 연구를 증명한다.

[0341] 1. 약물 및 항-약물 항체 검정

[0342] 도 4 는 본원에 기재된 유체 상 이동성 변동 검정에 의해 ATI (즉, IFX 에 대한 항체; "HACA") 의 검출을 나타낸다. 예를 들어, 444 ng 의 Alexa488 표지된 IFX (100% 혈청 중 18.8 $\mu\text{g/ml}$) 를 시료 내에 스파이크하여 자유 IFX 를 완패시킨다 (outcompete). 특정 구현예에서, IFX 및 ATI 의 복합체를 함유하는 환자 혈청 시료는 산 해리에 적용될 수 있으며, 산 해리에 의한 평형화 및 표지 첨가 이후 중화가 수행된다.

[0343] 도 5 는 본 발명의 예시적인 ATI/IFX 유체 상 이동성 변동 검정을 나타낸다. 예를 들어, 형광 표지된 인플릭시마브 (IFX-488) 로 평형화된 각종 농도의 ATI (표준물 또는 미지의 것) 를 함유하는 시료를 2% 혈청 중에서 크기 배제 칼럼 상에 주입하였다. 도 5 는 대형 IFX-488/ATI 복합체가 먼저 용출된 후, 이어서 보다 작은 복합체 및 그 다음 미결합된 IFX-488 및 Alexa-488 로딩 대조군이 용출되었음을 나타낸다. 미지의 농도는

표준 곡선으로부터 내삽 (interpolation) 에 의해 구하였다. IFX 의 검출은 유사한 방법론을 따랐다.

[0344] 2. 중화 및 비중화 항-약물 항체 검정

[0345] 도 6 및 7 은 형광 표지된 TNF α 의 존재 하에 형광 표지된 항-TNF α 약물에의 이들 자가항체의 결합을 검출하기 위하여 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 ATI 등의 항-약물 항체가 중화 또는 비중화 자가항체인지 여부를 결정하기 위한 본 발명의 검정을 나타낸다. 한 예시적 구현예에서, 항-TNF α 약물, 예컨대 IFX 은 형광단 "F1" 로 표지되며, 이때 형광단은 가시 및 IR 스펙트럼 중 어느 하나 또는 둘 모두에서 검출될 수 있다. 유사하게, TNF α 는 형광단 "F2" 로 표지되며, 이때 형광단은 가시 및 IR 스펙트럼 중 어느 하나 또는 둘 모두에서 검출될 수 있고, 여기서 "F1" 및 "F2" 는 상이한 형광단이다. 표지된 항-TNF α 약물 및 표지된 TNF α 를 액상 반응으로 인간 혈청과 함께 인큐베이션하여 혈청 내에 존재하는 표지된 항-TNF α 약물 (예, IFX), 표지된 TNF α , 및/또는 항-약물 항체 (예, ATI) 간에 복합체 (예, 면역 복합체) 가 형성되도록 한다.

[0346] 인큐베이션 후, 시료를 크기 배제 칼럼 상에 직접 로딩하고, HPLC 이동성 변동 검정에 적용한다. 도 6 은 표지된 항-TNF α 약물 (예, Alexa488 표지된 IFX; "IFX-488") 에의 항-약물 항체 (예, ATI) 및 표지된 TNF α (예, Alexa532 표지된 TNF α ; "TNF-532") 둘 모두의 결합 결과 자유 TNF-532 수준이 저하되는 본 발명의 비중화 항-약물 항체 (ADA) 검정을 나타낸다. 도 7 은 표지된 TNF α (예, TNF-532) 의 결합 없이 표지된 항-TNF α 약물 (예, IFX-488) 에의 항-약물 항체 (예, ATI) 의 결합 결과 TNF-532 대조군과 실질적으로 동량의 자유 TNF-532 수준이 얻어짐을 나타낸다.

[0347] 3. 중화 및 비중화 항-약물 항체의 모니터링을 위한 시간 경과 연구

[0348] 도 8 - 11 은 본 발명의 이동성 변동 검정을 이용하여 항-약물 항체, 예컨대 ATI 가 중화 또는 비중화 자가항체인지 여부를 결정하기 위한 UC 환자 케이스 연구로부터의 데이터를 나타낸다. 예를 들어, 도 8 은 1, 2 또는 3 개월째에 취한 5 가지 시료의 시간 경과에 따른 IFX 및 ATI 의 수준을 나타낸다. 도 9 는 시간 경과에 따른 자유 TNF α 의 백분율을 결정하기 위한 피크 분석을 나타낸다. 특히, TNF-532/IFX-488 복합체의 피크 면적을 모든 시료의 자유 표지된 TNF α 면적으로부터 뺀 다음, 자유 TNF α 의 % 를 산출하였다. 특히, 도 9 는 1, 2 또는 3 개월째에 취한 5 가지 시료의 시간 경과에 따른 자유 TNF α 의 수준의 증가를 나타내고 있는데, 이는 중화 자가항체 수준의 증가를 시사한다. 도 10 은 2 또는 3 개월째에 취한 IFX 로 스파이크된 3 가지 시료에서 예시되는 바와 같이 시간에 따른 비중화 자가항체의 존재로부터 중화 자가항체로의 변동을 나타낸다. "제 1 년 11 월" 시료의 경우, 비중화 항체는 스파이크된 IFX 에 결합하여 TNF-532 피크의 감소를 보인다. "제 2 년 1 월" 시료의 경우, 중화 항체 (NAb)/비중화 항체 (Ab) 의 혼합물은 초기 복합체의 수준에 비하여 TNF-532 피크에서 약간의 감소를 나타낸다. ATI 가 거의 완전히 중화됨에 따라 ("제 2 년 4 월" 시료), 높은 IFX 수준은 IFX 에의 ATI 결합을 극복할 수 없어, 모든 TNF α 결합을 막는다. 이와 같이, 도 10 은 IFX 치료요법 과정에 걸치는 동안 ATI 프로파일의 비중화 ATI 프로파일로부터 중화 ATI 와 비중화 ATI 의 혼합물을 함유하는 프로파일 다음 중화 ATI 프로파일로 변동하는 UC 환자 ATI 프로파일을 나타낸다. 도 11 은 IFX 로 스파이크된 시료에서 시간에 따른 자유 TNF α 의 백분율을 결정하기 위한 피크 분석을 나타낸다. 특히, TNF-532/IFX-488 복합체의 피크 면적을 모든 시료의 자유 TNF α 면적으로부터 뺀 후, 자유 TNF α 의 퍼센트 (%) 를 산출하였다. 특히, 도 11 은 UC 환자로부터 취한 시료의 시간 경과에 따른 자유 TNF α 의 수준의 증가를 나타내고 있는데, 이는 환자가 IFX 치료요법으로 진행 중일 때 중화 자가항체 수준의 증가 및 비중화 ATI 로부터 중화 ATI 로의 변동을 시사한다.

[0349] 도 12 -14 는 본 발명의 이동성 변동 검정을 이용하여 수행된 각종 대조군을 나타낸다. 특히, 도 12 는 비중화 항체 (Ab) 대조군으로서의 토끼 항-인간 IgG1 Fc 의 용도를 나타낸다. 도 13 은 혼합 중화 항체 (NAb)/비중화 항체 (Ab) 대조군으로서의 ATI 양성 혈청의 용도를 나타낸다. 도 14 는 ATI 양성 혈청으로부터의 ATI 정제 결과 약 친화성 NAb 의 손실을 나타낸다. 도 15 는 이들 각종 대조군에서 자유 TNF α 의 백분율을 결정하기 위한 UC 환자 케이스 연구로부터의 피크 분석을 나타낸다. 특히, TNF-532/IFX-488 복합체의 피크 면적을 모든 시료의 자유 TNF α 면적으로부터 뺀 다음 자유 TNF α 의 퍼센트 (%) 를 산출하였다.

[0350] 도 16 - 18 은 본 발명의 이동성 변동 검정을 이용하여 항-약물 항체, 예컨대 ATI 가 중화 또는 비중화 자가항체인지 여부를 결정하기 위한 CD 환자 케이스 연구로부터의 데이터를 나타낸다. 예를 들어, 도 16 은 30 주 기간 동안 7 또는 8 주째 취한 4 가지 시료의 시간 경과에 따른 자유 TNF α 의 백분율을 결정하기 위한 CD 환자 케이스 연구로부터의 피크 분석을 나타낸다. 또한, 도 17 은 50 주 기간 동안 취한 3 가지 시료의 시간 경과에 따른 자유 TNF α 의 백분율을 결정하기 위한 또 다른 CD 환자 케이스 연구로부터의 피크 분석을 나타낸다. 또한, 도 18 은 치료요법의 유도 또는 유지 동안 또는 이후 특정 주에 시료 내 자유 TNF α 의 백분율을 결정

하기 위한 4 가지 추가 CD 환자 케이스 연구로부터의 피크 분석을 나타낸다.

[0351] **실시예 3: HPLC 이동성 변동 경쟁적 리간드-결합 검정을 통한 중화 항체 (NAb) 활성의 검출**

[0352] 이 실시예는 HPLC 크기 배제 크로마토그래피 검정을 이용한 환자 시료 (예, 혈청) 내 중화 및/또는 비중화 항-약물 자가항체 (ADA) 의 존재 또는 수준을 검출 또는 결정하기 위한 신규한 균일 검정의 또다른 추가적인 구현 예를 나타낸다. 또한, 이 실시예는 다른 항-TNF 약물 등의 대안적인 생물학적 약물과의 NAb 의 교차-반응성을 예측 및/또는 결정하기 위한 방법을 나타낸다.

[0353] 일부 구현예에서, 면역원성 시험에 대한 다중 단계 (multi-tiered) 접근법은 우선 신속하고 민감한 스크리닝 검정에 의해 약물 및 항-약물 항체 둘 모두를 스크리닝하는 것을 포함한다. 이러한 접근법은 FDA 및 EMEA 둘 모두에 의해 추천되며, 환자 1 명당 대규모 임상 시험 및 다중의 시점을 위한 유용한 관리 수단이다. ADA, 예컨대 ATI 의 존재를 확인한 후, 환자 시료를 상당히 부정적인 임상적 결과를 가질 수 있는 중화 항체의 존재에 관해 추가 조사한다. 중화 항체는 활성 부위에 또는 그 근방에 결합함으로써 또는 구조 변화를 유발함으로써 생물학적 활성을 방해하여, 효능 손실을 야기한다. ATI 를 포함하는 시료는 또한 아형 및 에피토프 특이성에 대하여 스크리닝될 수 있다. 환자들의 임상적 응답성을 ADA 발달 전후에 제품과 비교하는 것은 ADA 발달 (및 항체 특이성) 및 임상적 응답성 간의 상호관계에 관한 정보를 제공할 수 있다.

[0354] HPLC 이동성 변동 검정을 이용하는 NAb 검정은 본원에 개시된 바와 같이 발달되었다. 특정 구현예에서, 다중 단계 접근법 또는 시험은 이하의 단계 중 임의의 1 개, 2 개, 또는 3 개 모두를 포함하거나 이로 이루어진다: (1) 시료가 NAb 양성 (정상 인간 혈청의 분석으로부터 확립된 절단점 (cutpoint) 에 기초하는 예/아니오) 인지 여부를 정성적으로 결정하기 위한 스크리닝; (2) 시료가 NAb 양성인지를 예컨대 면역경쟁 및/또는 면역결핍을 이용하여 확인하는 것; 및/또는 (3) 대안적인 생물학적 약물과의 NAb 의 교차-반응성을 예측 및/또는 결정하는 것.

[0355] **I. 스크리닝 단계**

[0356] 환자 시료는 ADA 에 대해 양성으로서 확인된 후, NAb 에 대해 스크리닝될 수 있다. 특정 양태에서, ADA 의 하위집단은 NAb 이다. 특정 구현예에서, ADA (예, IFX 에 대한 항체, 또한 "ATI" 또는 "HACA" 로서도 알려짐) 를 함유하는 환자 혈청을 먼저 HPLC 물 중에서 1 시간 동안 실온 (RT) 에서 0.5 M 시트르산으로 산 해리시킨다. 시료를 96 웰 플레이트에서 제조하여 플레이트 진탕기 상에서 암소에서 인큐베이션을 수행한다. 다음으로, 2 개의 표지된 단백질 (예, 0.1% BSA 를 함유하는 HPLC 물 중의 약물-Alexa488 (예, IFX-Alexa488) 및 TNF α -Alexa532) 을 첨가한다. 시료를 10X PBS, pH 7.3 를 첨가함으로써, 및 플레이트 셰이커 상에서 1 시간 동안 RT 에서 암소에서 인큐베이션함으로써 중화한다. 시료를 추가의 10X 완충액 및 HPLC 물을 이용해 2% 혈청으로 희석한다. 그 후, 시료를 크기 배제 칼럼 상의 HPLC 에 의해 주입한다. 상이한 크기의 복합체 또는 중을 분리하여 형광에 의해 예컨대 자유 TNF α -Alexa532 ("TNF532"), 자유 IFX-Alexa488 ("IFX488"), TNF532/IFX488 복합체, TNF532/IFX488/ATI 복합체 (비중화 Ab), 및 ATI/IFX488 복합체 (NAb) 를 모니터링한다. 결과를 정상 인간 혈청으로부터 확립된 컷오프 (예, 3.06% NAb 의 기준 범위) 에 따라 음성 (예, 도 12, 19 참조) 및 양성 (예, 도 13 참조) 대조군과 비교한 후, 시료를 NAb 에 대한 양성 또는 음성으로서 지정할 수 있고, 역가를 구할 수 있다.

[0357] 도 19 는 이동성 변동 검정을 통한 비중화 항체 활성의 검출을 나타낸다. TNF532 와 IFX488 의 조합시, 대략 8 분의 체류 시간으로의 변동이 존재하는데, 이는 고분자량 복합체의 형성을 시사한다. 자유 IFX-488 피크 (대략 10.5 분) 는 완전히 사라지고, 자유 TNF-532 피크 (대략 12 분) 도 또한 거의 완전히 사라진다 (ATI/IFX/TNF 3 원 복합체의 형성을 시사함). IFX 의 활성 부위로부터 결합해 나간 비중화 Ab 는 유사한 패턴을 따른다. 마우스 모노클로날 항체 (예, 대략 7 분) 는 경우에 따라 수행한다.

[0358] 도 13 은 이동성 변동 검정을 통한 중화 항체 활성의 검출을 나타낸다. 완전 중화 Ab 는 (예컨대 활성 부위의 차단에 인해) IFX 의 TNF 에의 결합 능력을 막는다. 이는 크로마토그램에서 고분자량 중의 형성과 함께 IFX-488 피크의 사라짐으로서 확인된다. TNF-532 피크는 변하지 않을 것이다. 실제로, 대부분의 환자들은 도 13 에서의 환자 혈청 풀에서 보이는 바와 같이 비중화/중화 Ab 의 조합을 경험한다 (ATI 양성 혈청 (Pos. Serum), 검은색 실선). 개선된 NAb 양성 대조군으로서의 IFX/Humira의 F(ab')₂ 단편에 대한 항 토키 다중클론 항체가 또한 유용하다.

[0359] 도 8 은 IFX 치리 과정에서 환자에 있어서 시간에 따른 NAb 응답성의 발달을 나타낸다. 이들은 모든 시점에서 ATI 에 대해 양성이나, NAb 가 발달되는 제 2 년 1 월 (밝은 회색 화살표, 위에서 3 번째 ~12 분) 시점까지

그런 것은 아니다. ATI/IFX-488 복합체는 약간 상이한 체류 시간 (~7.8 분) 으로 변동하는데, 이는 TNF532/IFX488/ATI 의 복합체 (~8.2 및 8.8 분) 와 비교하여 크기가 상이한 복합체를 시사한다. 무관한 단백질에 대비한 추가 IFX 존재 하의 중화 활성의 확인 (면역경쟁) 이 또한 행해질 수 있다. 이러한 환자는 치료 조정을 위한 이상적인 후보일 수 있다.

[0360] 도 9 는 자유 TNF 피크의 잔존물 % 의 AUC 의 바 그래프로서 데이터를 플롯팅한 것으로서, 시간에 따라 환자가 NAb 를 발달시키고 있는지를 명확히 입증해준다. 심지어 이른 시점에서 관찰된 낮은 수준의 NAb 발달은 질 환 재발을 예측할 수 있는데; 이러한 활성을 나타내는 환자에 대해서는 치료 조정이 요구된다. 예를 들어, 환자는 기존의 항-TNF 약물을 섭취하면서 메토크세이트 (MTX) 또는 아자티오프린 (AZA) 등의 하나 이상의 면역억제제로 다루어져야 하고/하거나 상이한 항-TNF 약물로 교체되어야 한다.

[0361] II. 확인 단계

[0362] 확인 단계에서, 약물 (예, 항-TNF α 항체) 을 각종 농도 (예, 1 - 50 $\mu\text{g/mL}$) 의 시료에 스파이크하여 시료의 중화 능력을 결정한다. 병행하여, 비-특이적 IgG 를 유사한 수준으로 스파이크한다. 약물로 스파이크된 시료는 약물에 대한 투여량 응답을 나타내어야 하며, NAb 의 EC50 이 산출될 수 있다. 비-특이적 IgG 는 효과를 갖지 않아야 한다. 필요한 경우, 매트릭스의 효과를 배제시키기 위하여 면역결핍이 또한 수행될 수 있다.

[0363] 도 10 은 IFX 로 스파이크된 2 또는 3 개월째에 취한 3 가지 시료에서 예시되는 바와 같이 시간에 따른 비중화 자가항체로부터의 중화 자가항체로의 존재 변동을 나타낸다. 각 시점으로부터의 환자 혈청은 스파이크된 IFX 에 응답하는데, 이는 반응의 특이성을 나타낸다. 시간에 따라, NAb 는 더욱 중화되어, 마침내 > 20 $\mu\text{g/mL}$ IFX 를 중화할 수 있다 (제 2 년 4 월 시료는 IFX 가 스파이크되지 않을 경우 저하되지 않는다). 각 시점에서의 NAb 의 EC50 을 결정하기 위해 완전 적정이 수행될 수 있다.

[0364] III. 교차-반응성 단계

[0365] 교차-반응성 단계는 환자가 예컨대 항-TNF α 약물 또는 치료요법과 같은 약물 또는 치료요법에 응답할 것인지 여부를 예측하는데 있어서 특히 유용하다.

[0366] 일부 구현예에서, 본 발명은 항-약물 항체 (ADA) 의 일련의 상이한 항-TNF 치료제와 교차-반응하는 능력에 기초 하여 환자 (예, 크론병, 궤양성 대장염, 또는 류마티스 관절염 환자) 에 있어서 치료 약물이 작용할 것인지 작용하지 않을 것인지를 빠르게 결정하는 방법을 제공한다. 비제한적 예로서, 하나 이상의 이하의 약물을 Remicade (인플릭시마브); Enbrel (에타네르셉트); Humira (아달리무마브); Cimzia (세르톨리주마브 페골); 및 Simponi (골리무마브) 에 대한 NAb 를 갖는 환자 (예, 크론병, 궤양성 대장염, 또는 류마티스 관절염 환자) 에 서 시험할 수 있다. 특정 약물 (예, IFX) 에 의한 NAb 에 대한 양성 시험 후, 상기 기재된 초기 NAb 시험 방법을 이용하여 일련의 다른 약물 (예, 형광-표지된 약물) 에 의해 NAb 검정을 수행할 수 있다.

[0367] 본 발명의 예측 시험은 환자의 항체에 의해 중화되어질 약물 (예, 항-TNF α 약물) 의 사용을 막음으로써 환자 치료의 관리에 있어 유용하다. 임의의 특정 이론에 구속됨 없이, 중화 ADA 의 결합 부위의 순서는 아마도 TNF α 와 유사한 방식으로 발달되었을 것이다 (도 20 참조). NAb 가 임의의 다른 항-TNF 약물을 중화한다면, 다른 항-TNF 약물 이외의 것들은 아마도 환자가 면역 응답성을 가질 것이기 때문에 이미 투여된 약물의 불량한 대안일 것이다. 일부 구현예에서, 정상 인간 혈청으로부터 확립된 컷오프는 환자로부터의 시험 시료가 양성 또는 음성인지 여부를 결정하는데 이용될 수 있다. 상기 시험은 실험실내 세팅으로 빠르고 비용-효과적인 방식으로 실시될 수 있다.

[0368] 이하의 비제한적 케이스 연구는 Remicade (인플릭시마브) 로 치료되었으나, 이후 Remicade 에 대한 응답성이 결 실된 환자 1 및 2 를 포함하였다. 환자 1 은 UC 환자였고, 환자 2 는 CD 환자였다. 본원에 기재된 이동 성 변동 검정은 명백히 항-Remicade 항체 (예, ATI) 를 발달시킴에 따라 환자 1 및 2 가 Remicade에 대한 응답 성이 결실되었음을 나타내었다. 이후, 이들 항-Remicade 항체는 중화 항체 (예, NAb) 인 것으로 확인되었다.

[0369] 도 21 은 환자 1 및 2 가 중화 항체 (NAb) 를 발달시켰음을 예시한다. 이들 NAb 는 Remicade 결합 부위에 대하여 TNF α 와 경쟁한다. 중요하게, 이들 NAb 는 다른 항-TNF 치료제와 교차-반응할 수 있다. NAb 가 다른 항-TNF 치료제와 교차-반응할 경우, 또 다른 항-TNF 치료제로 변경하는 것은 이들 환자에게 도움이 되지 않을 것이다. 이와 같이, 본 발명의 예측적인 검정은, 또 다른 항-TNF 제제로 변경함으로써 양성 HACA (검 출가능한 항체) 가 관리되고 있는, Remicade 에 대한 응답성이 결실된 환자를 관리하는 현 방법에 비하여 이점

을 제공한다 (예컨대, Afif et al., *Am. J. Gastroenterol.*, 105(5):1133-9 (2010) 참조).

[0370] 하나의 항-TNF 약물에 응답하여 생성된 NAb 의 다른 항-TNF 약물과의 교차-반응성을 결정하기 위하여, 환자가 Remicade (IFX) 로 치료 중일 경우에 발달된 NAb 를 Humira (아달라무마브) 에 대해 시험하였다. 도 21 에 제시된 데이터는 명백히 IFX 에 대해 발생된 NAb 가 Humira 와 교차-반응한다는 것을 입증한다. 도 21 은 자유 Humira 피크 (10 과 11 분 사이, 각 환자 연구의 하단 패널) 가 NAb 를 함유하는 환자 혈청이 첨가될 때 (~12 분, 환자 연구 #1; ~12 분, 환자 연구 #2; 각 환자 연구의 하단 패널) 보다 높은 분자량으로 완전히 변동 된다는 것을 나타낸다. 이들 결과는, 어느 정도 TNF α 가 Humira 의 항원-결합 부위에 접근하는 것을 NAb 가 막는 방식으로 Humira 에 결합한다는 것을 시사한다. 도 22 는 이것을 NAb 및 비-NAb 측정 둘 모두에 대하여 개략적으로 나타낸다.

[0371] 특정 구현예에서, 본 발명의 검정 방법은 이들 환자가 Humira 또는 임의의 다른 항-TNF 치료제에 응답하지 않을 것을 예측한다. 환자는 항-TNF 치료요법으로 치료되어서는 안 되며, 류마티즘 관절염 (RA) 의 경우 악테트라 (Actemra), 기케레트 (Kineret), 오렌시아 (Orencia), 리툭산 (Rituxan), 및/또는 아즈레라 (Arzerra), 또는 크론병 (CD) 의 경우 타이사브리 (Tysabri) 및/또는 스테로이드제를 포함하지만 이에 제한되지는 않는 대안적인 치료제 방안으로 교체되어야 한다.

[0372] 따라서, 본 발명의 방법은 특히 환자로부터의 시료 중에 중화 항체 (NAb) 및/또는 비-NAb 의 존재 및/또는 농도 수준을 결정 또는 측정함으로써 항-TNF α 치료요법에 응답할지 여부를 예측하는 데 있어 유리하다. 한 구현예에서, 시료가 하나의 항-TNF 약물에 대한 NAb 를 함유할 경우, 이들 NAb 는 다른 항-TNF α 약물과 교차-반응하여 중화될 것이므로, 환자에게 추천되는 치료 조정은 상이한 작용 기작을 갖는 약물 (예, 비-항-TNF 제제) 로 교체하는 것이 될 것이다. 또다른 구현예에서, 시료가 하나의 항-TNF α 약물에 대한 비중화 ADA 를 함유할 경우에는, 환자에게 추천되는 치료 조정이 또다른 항-TNF α 약물로 교체하는 것이 될 것이다.

[0373] **실시예 4: 중화 항-약물 항체 (NAb) 의 존재 및 교차-반응성을 검출하기 위한 검정**

[0374] 이 실시예는 시료가 NAb 양성인지 여부를 결정하기 위한 스크리닝 및 NAb 의 대안적인 생물학적 약물과의 교차-반응성을 예측 및/또는 측정하는 것 (예, 실시예 3 참조) 에 대한 본 발명의 검정 방법에 관한 추가적인 구현예를 나타낸다. 특정 구현예에서, 본원에 기재된 검정 방법은 대상체로부터 수득된 시료가 NAb 에 대하여 양성 또는 음성인지 여부를 결정함으로써 제 1 의 항-TNF α 약물을 수여받은 대상체가 대안적인 항-TNF α 치료요법에 응답할지 여부를 예측하는데 있어 유용하다. 시료가 NAb 에 대하여 양성일 경우, 상기 방법은 NAb 가 제 2 의 항-TNF α 약물과 교차-반응할지 여부를 결정하는 것 및 NAb 가 제 2 의 TNF α 약물과 교차-반응하는 경우 대상체가 비-항-TNF α 약물로 교체되는 것을 추천하는 것을 포함한다. 시료가 NAb 에 대하여 음성일 경우에는, 상기 방법은 대상체가 제 2 의 항-TNF α 약물로 교체되는 것을 추천하는 것을 포함한다.

[0375] 도 23 은 본 발명의 예시적인 NAb 표준 곡선의 제작 및 용도를 나타낸다. 형광 표지된 TNF-532/IFX-488 로 평형화된 각종 농도의 토끼 (Rb) 항-IFX 항체 (ATI) 혈청 (즉, 표준물 또는 미지의 것) 을 함유하는 시료를 2% 혈청 중에서 크기 배제 칼럼 상에 주입하였다. 대형 면역 복합체가 먼저 용출된 후, 보다 작은 복합체 및 이어서 미결합 IFX-488 및 TNF-532 가 용출된다. 미지의 농도는 표준 곡선으로부터 내삽에 의해 구할 수 있다. NAb 및 비-NAb 의 상이한 혼합물을 함유하는 토끼 혈청을 조합하여 대조군을 만들 수 있다. 본원에 기재된 NAb 검정은 11.63% 의 과거의 컷-오프에 비하여 2.72% 의 개선된 컷-오프를 가진다 (N = 50 정상 시료). 표 2 는 환자에 의한 NAb 임상적 연구의 요약을 제공한다.

표 2

[0376]

NAb 임상적 요약 - 환자에 의한				
	연구 1 n=154 (290 개의 시료)	연구 2 n=328 (952 개의 시료)	연구 3 n=64 (812 개의 시료)	연구 4
ATI+ (% 전체)	43 (28%)	73 (22%)	58 (91%)	30
NAB + (% ATI + 시험)	12 (28%)	9 (64%)	3 (23 개의 시료) (60%)	5 (17%)

고 Nab 활성 (20 μ g/mL)	4	4	2	4
(% 전체)	(2.6%)	(1.2%)	(3.1%)	
(% NAB+)	(33%)	(44%)	(66%)	(80%)

[0377] 본 발명의 교차-반응성 검정 방법은 특히 또 다른 생물학적 치료로 교체하는 것이 유익할지 여부를 예측하는데 있어 유용하다. 환자가 하나의 약물에 대하여 NAb 양성인 것을 발견 후, 형광-표지된 대안적인 약물이 검정에 사용될 수 있다. 환자 혈청이 여전히 중화 능력을 보이는 경우, 새로운 약물은 성공적이지 않을 것이다.

이러한 방법은 최선의 치료 방안의 제시 또는 시사를 가능하게 하는 비용-효과적 및 적시의 방식으로 약물의 패널을 스크리닝하는데 유용하게 될 것이기 때문에 유리하다.

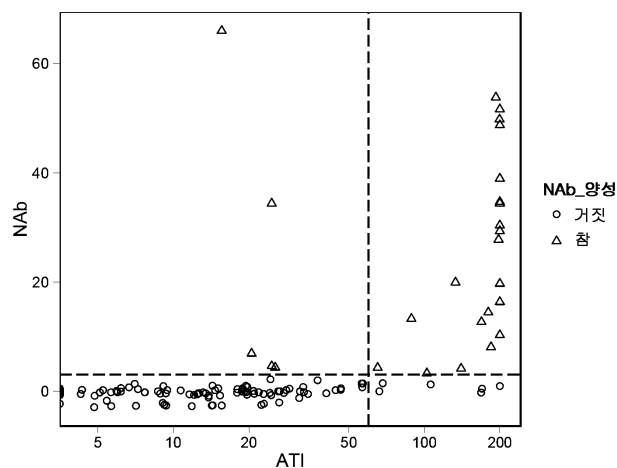
[0378] 도 24 및 25 는 실시예 3 에 기재된 및 도 21 에 제시된 환자 연구에 대한 추가 케이스 연구를 제공한다. 특히, Remicade (인플릭시마브, IFX) 로 치료되었지만 이후 IFX 에 대한 응답성이 결실된 환자 3 및 4 는, 환자가 IFX 로 진행 중일 경우 발달된 NAb 가 ADL 과 교차-반응성인 것으로 결정되었기 때문에 환자는 Humira (아달리우마브, ADL) 에 응답하지 않을 것으로서 동정되었다.

[0379] 도 26 은 ATI 친화도 성숙 및 교차-반응성 ATI 의 발달을 증명하는 환자 연구의 비제한적 예시를 나타낸다.

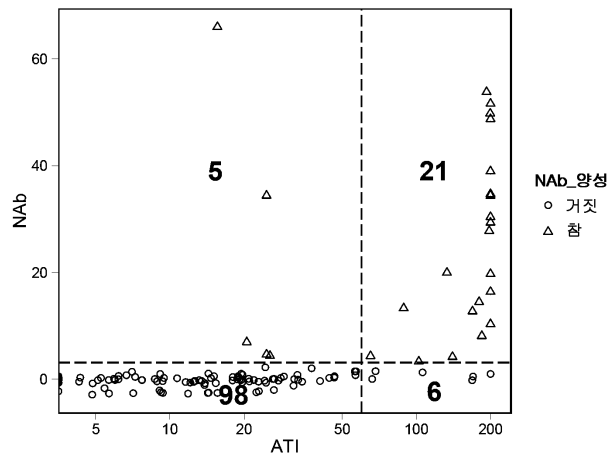
[0380] 이전의 본 발명은 이해의 명확성을 위하여 설명 및 예시를 들어 어느 정도 상세히 설명하였지만, 당업자는 특정 변경 및 수정이 첨부된 청구범위의 범위 내에서 실시될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 또한, 본원에 제시된 각 참고문헌은 각 참고문헌이 개별적으로 본원에 참고로 포함된 것과 동일한 정도로 그 전체 내용이 참조로 포함된다.

도면

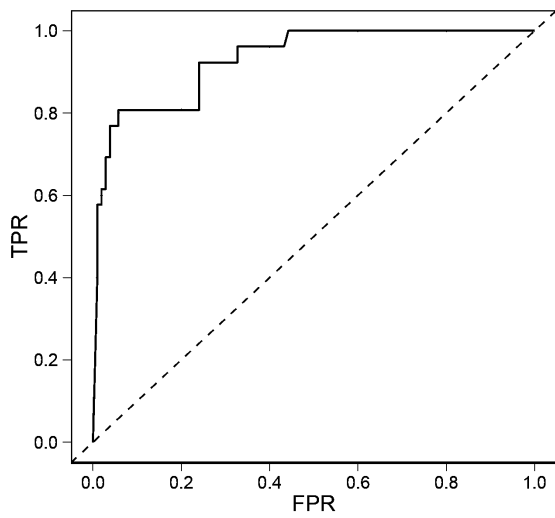
도면1



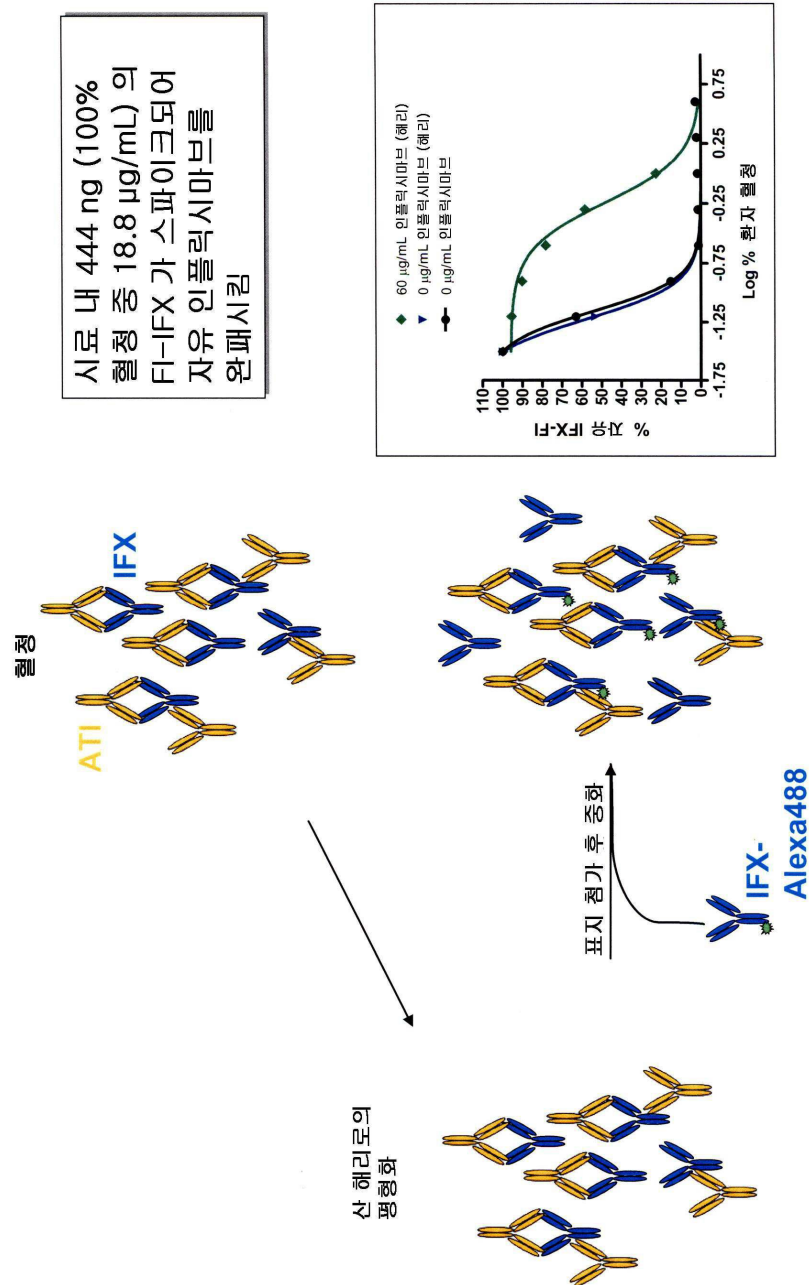
도면2



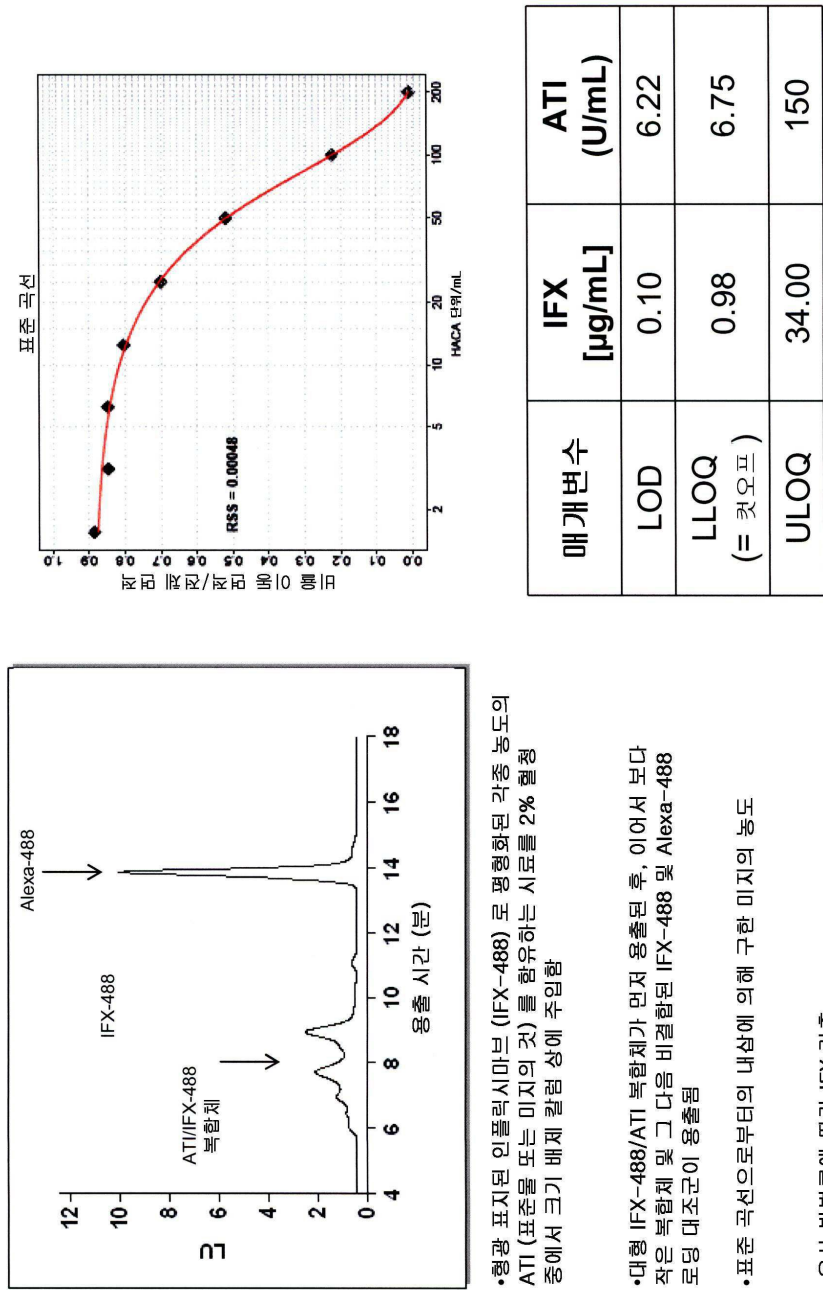
도면3



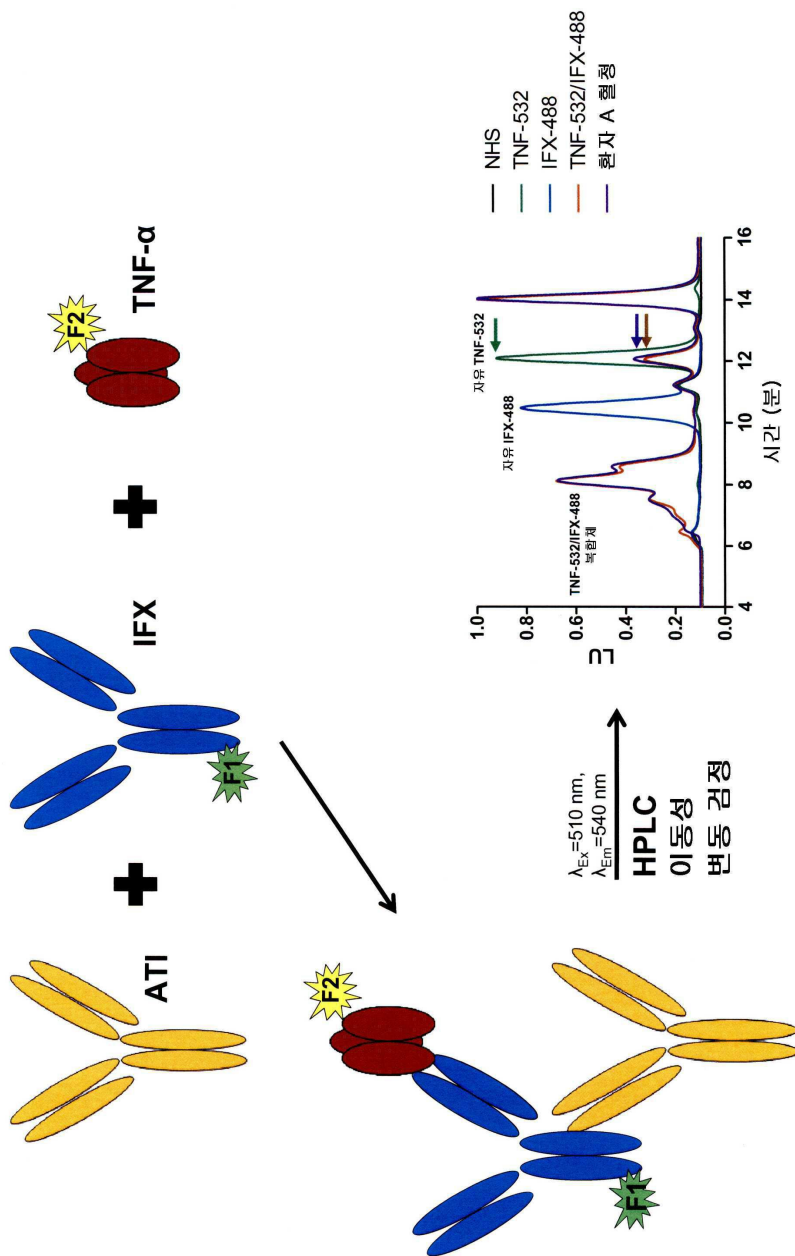
도면4



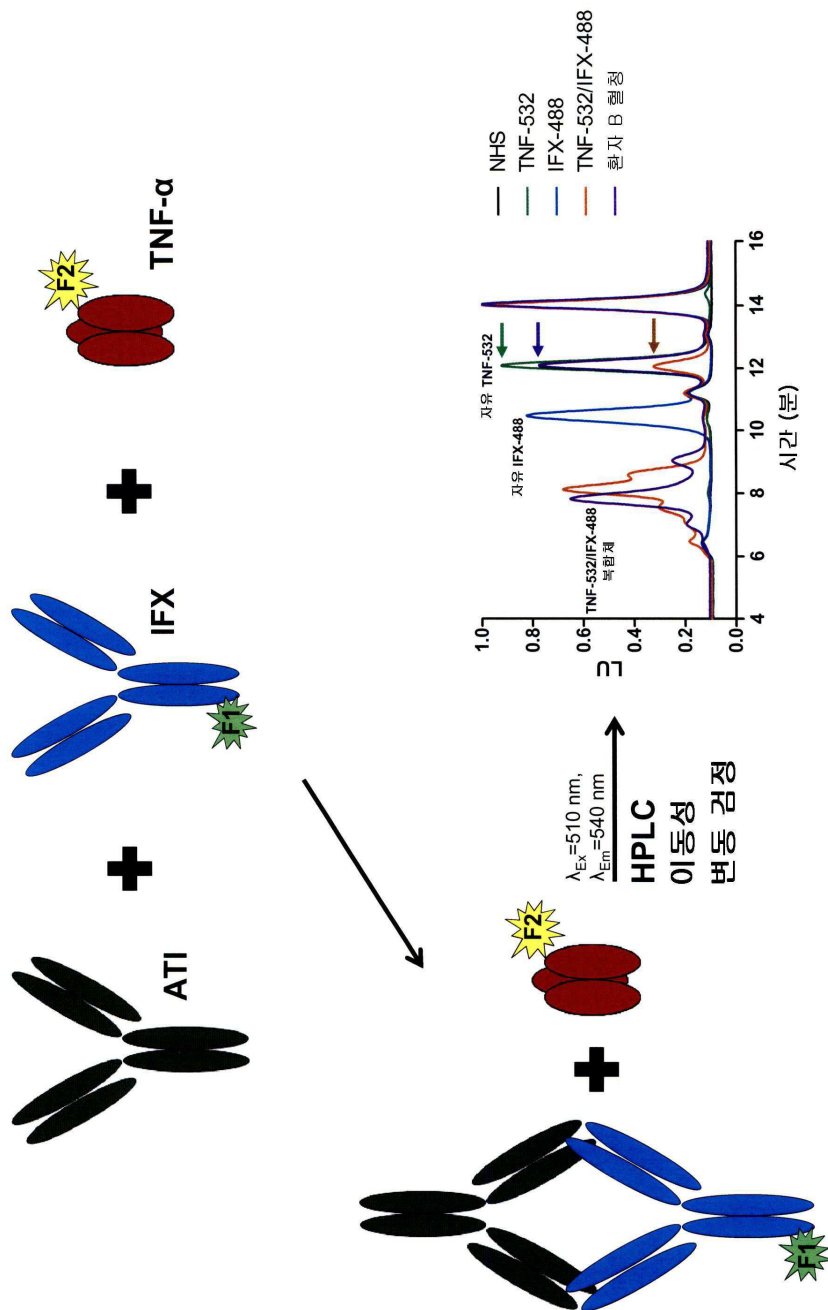
도면5



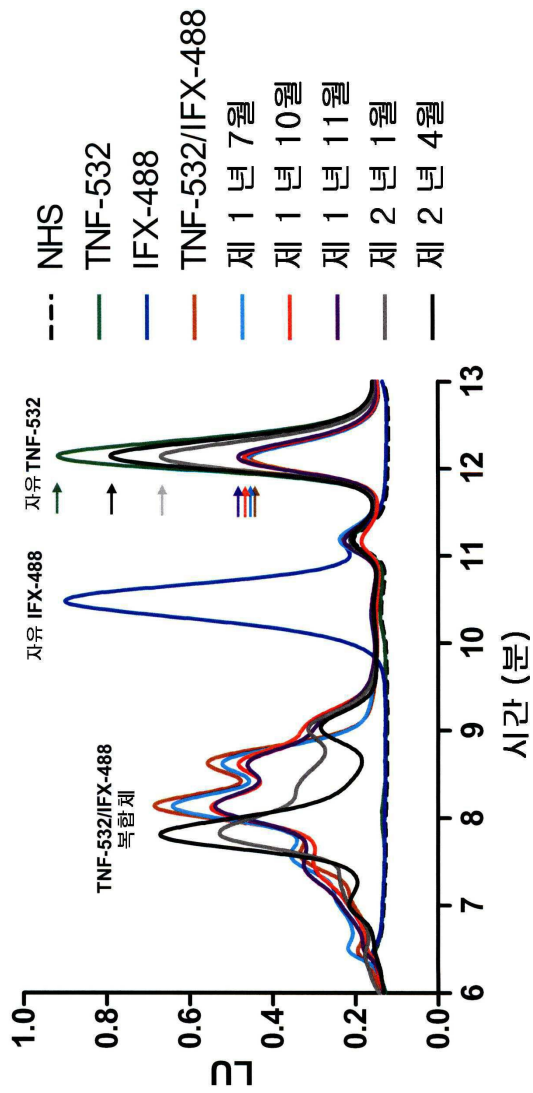
도면6



도면7

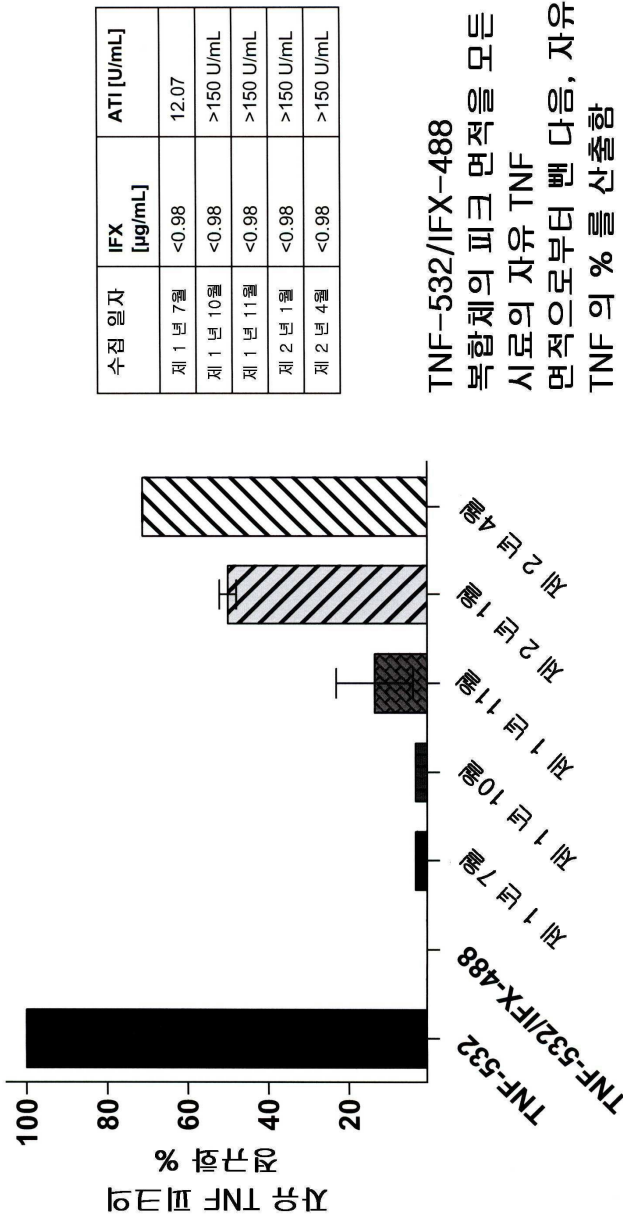


도면8

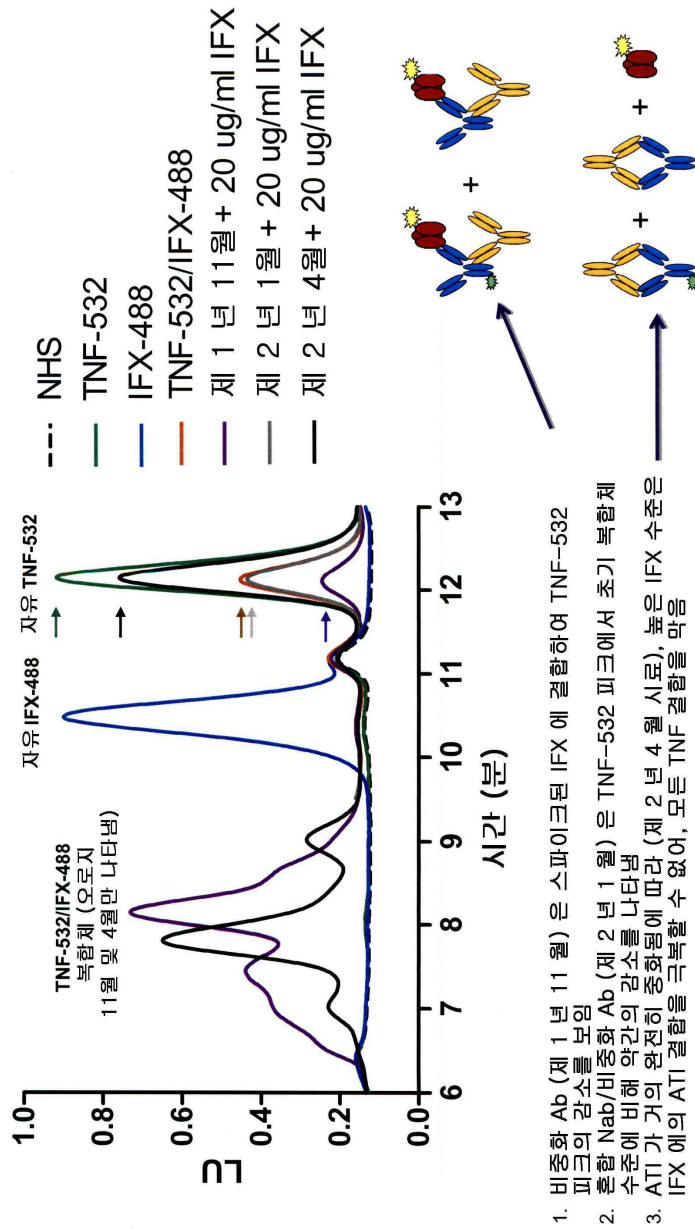


수집 일자	IFX [μg/mL]	ATI [U/mL]	수집 일자	IFX [μg/mL]	ATI [U/mL]
제 1 년 7월	<0.98	12.07	제 2 년 1월	<0.98	>150 U/mL
제 1 년 10월	<0.98	>150 U/mL	제 2 년 4월	<0.98	>150 U/mL
제 1 년 11월	<0.98	>150 U/mL			

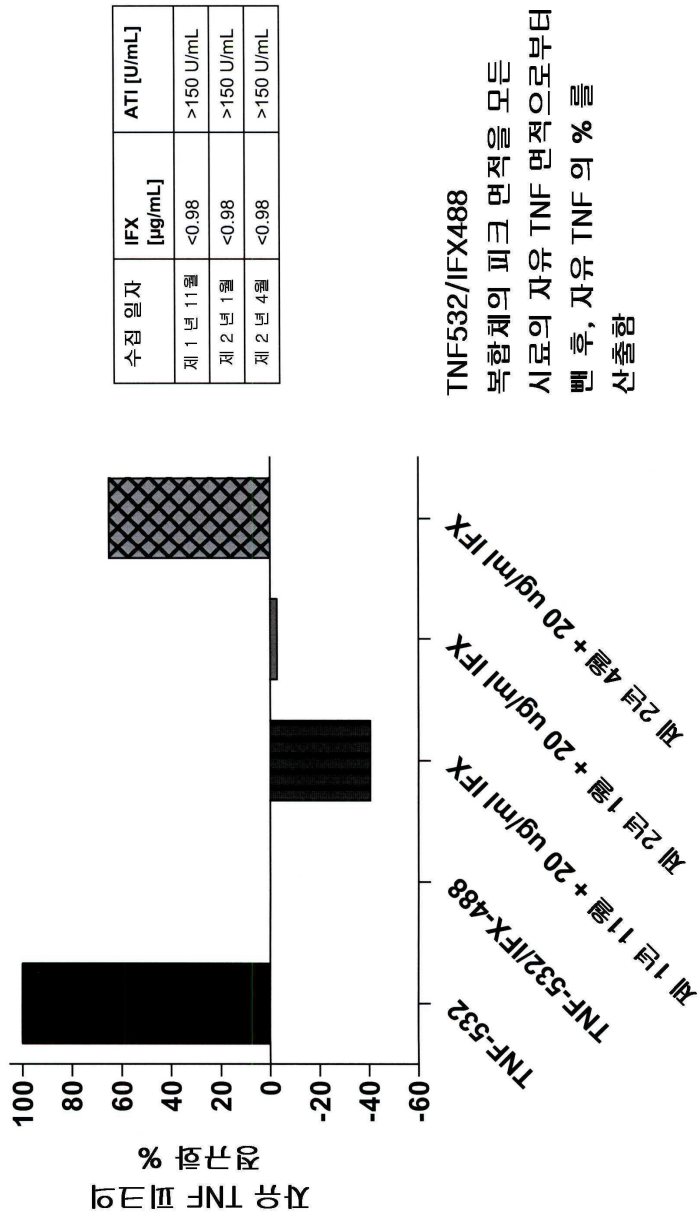
도면9



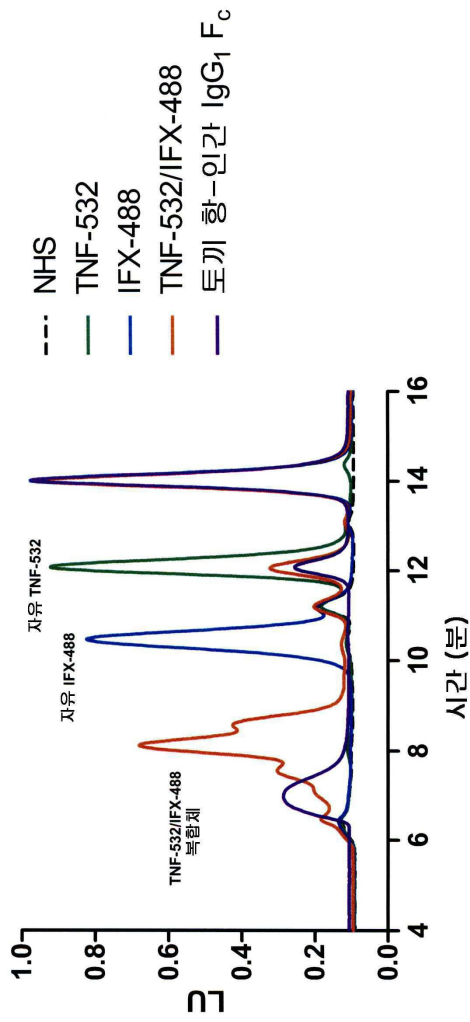
도면10



도면11

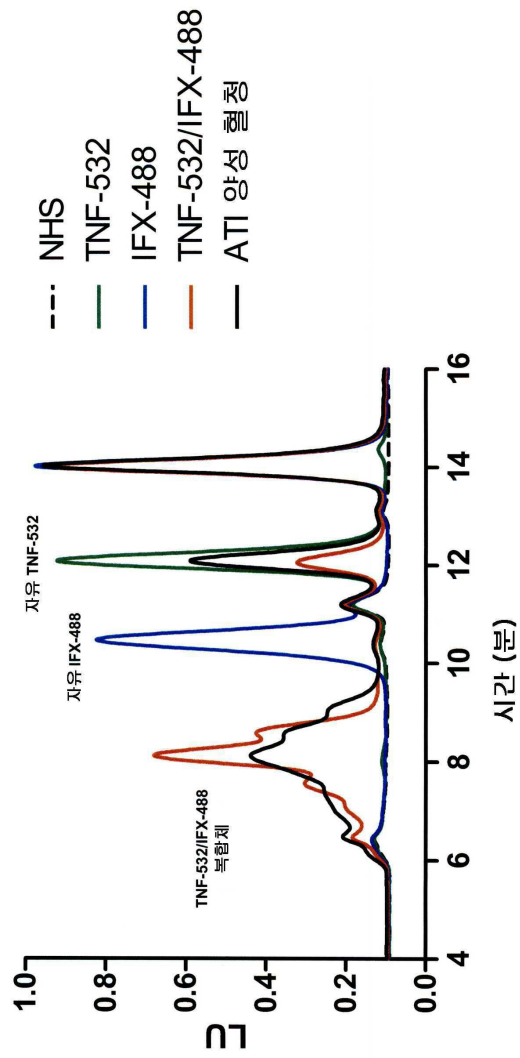


도면12



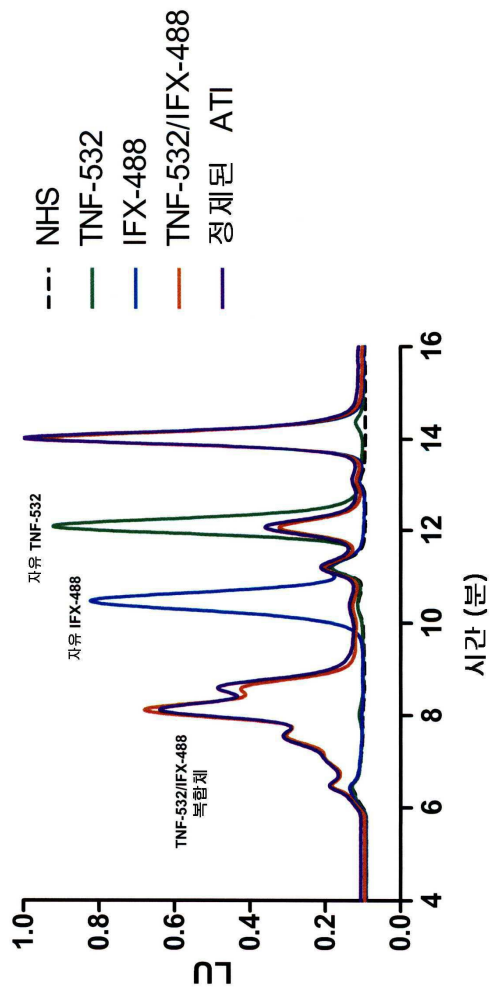
토끼 항-인간 IgG₁ F_c: 비중화 Ab 대조군

도면13



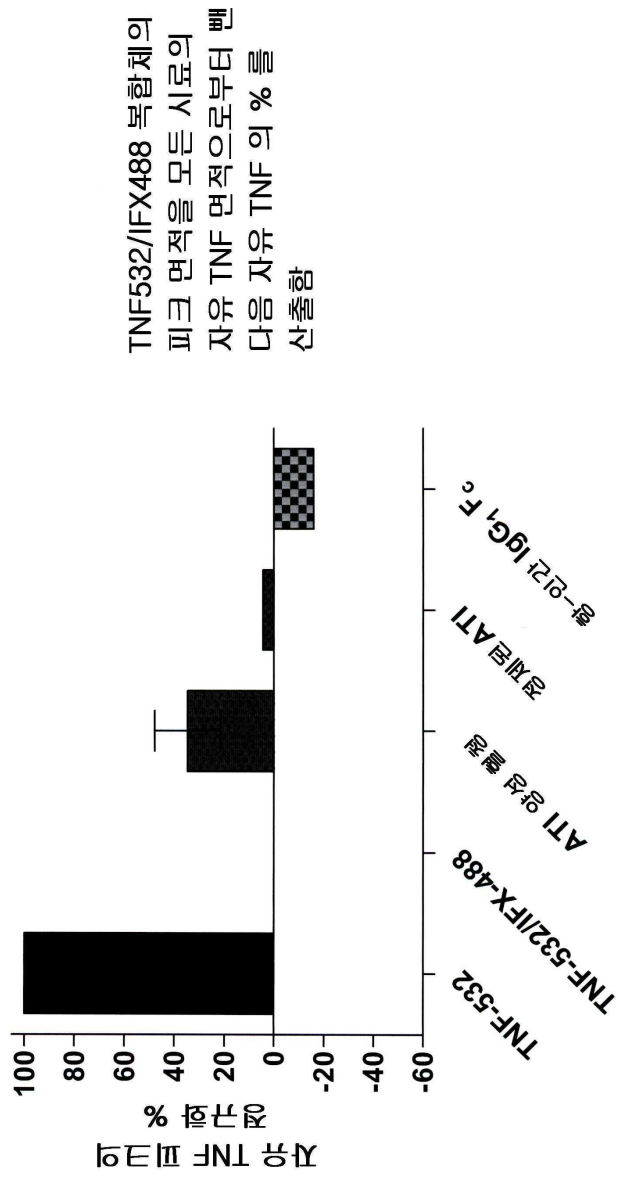
ATI 양성 혈청 : 혼합된 Nab/비중화 Ab 대조군

도면14



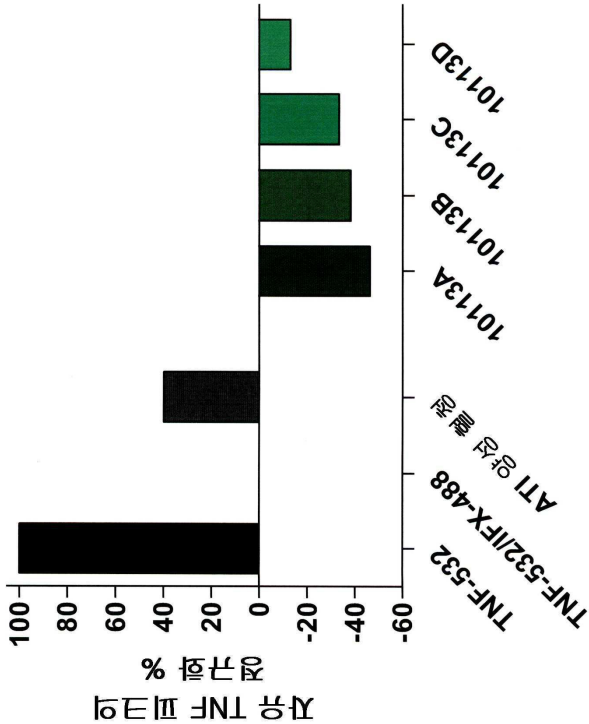
ATI 양성 혈청으로부터의 ATI의 정제 결과
약 친화성 Nab의 손실이 야기됨

도면15



도면16

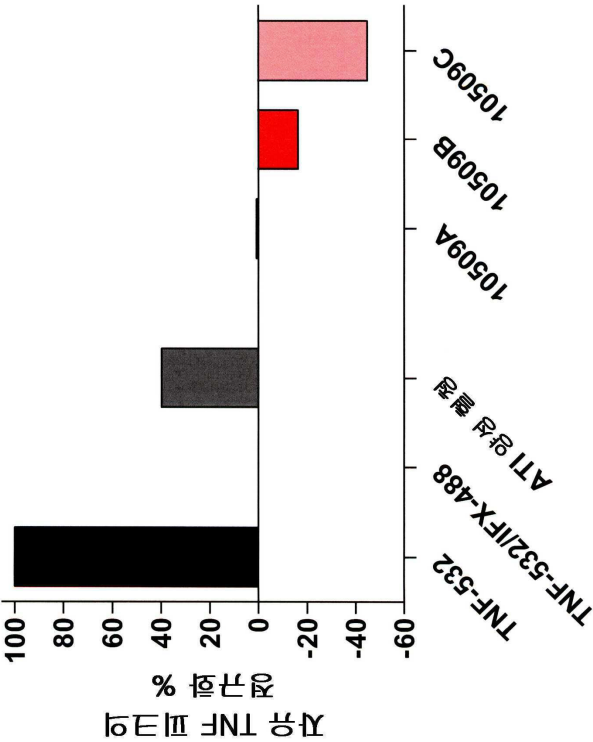
시료 ID	주 #	IFX [μg/mL]	ATI [U/mL]
10113A	7	26.14	17.09
10113B	14	19.26	14.37
10113C	22	17.09	15.12
10113D	30	7.22	10.16



유도: 주 1-14
유지: 주 22-50
TNF532/IFX488 복합체의 피크
면적을 모든 시료로부터 빼 다음
자유 TNF 의 % 를 산출함

도면17

시험 ID	주 #	IFX [μg/mL]	ATI [U/mL]
10509A	22	12.77	11.42
10509B	46	5.63	10.15
10509C	50	27.24	17.57

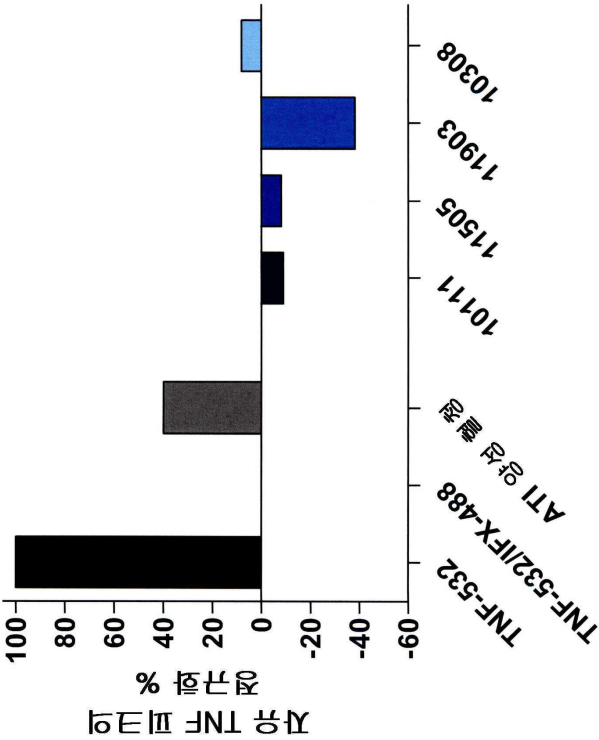


양도: 주 1-14
양지: 주 22-50

TNF532/IFX488 복합체의 피크
면적을 모든 시험의 자유 TNF
면적으로부터 빼 다음 자유 TNF의
%를 산출함

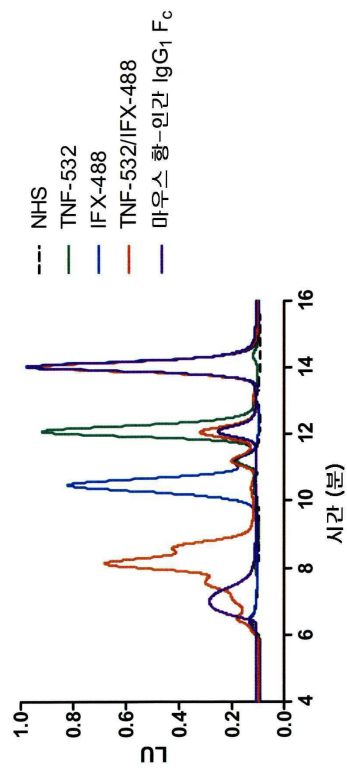
도면18

시료 ID	주 #	IFX [μg/mL]	ATI [U/mL]
10111	46	8.76	13.59
11505	14	11.42	12.66
11903	60	20.95	11.79
10308	14	1.09	54.64

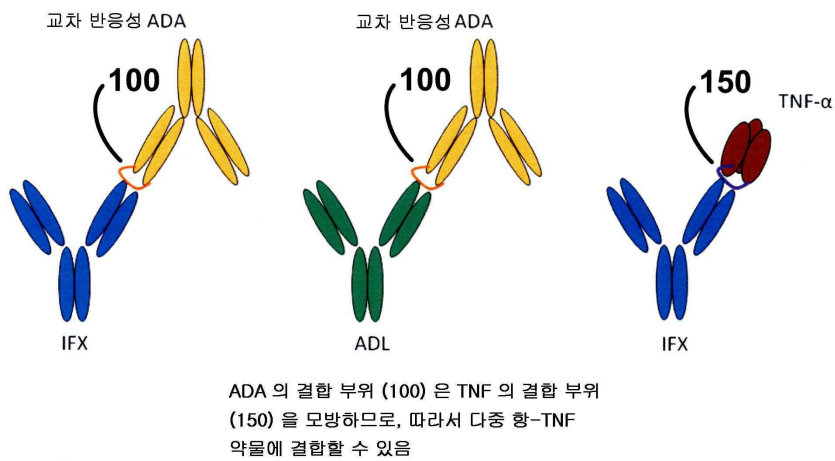


유도: 주 1-14
유지: 주 22-50
TNF532/IFX488 복합체의 피크
면적을 모든 시료의 자유 TNF
면적으로부터 뺀 다음 자유 TNF 의
%를 산출함

도면19

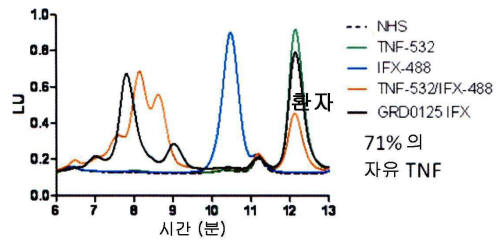


도면20

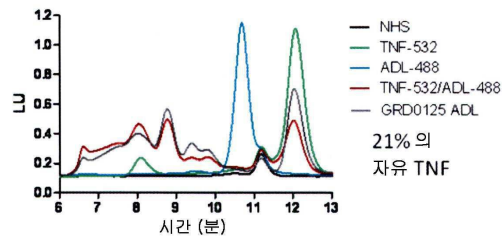


도면21

환자 연구 #1 – UC 환자

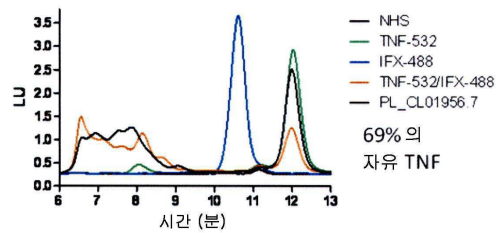


수집 일자	IFX [μg/mL]	ATI [U/mL]	양성으로 확인 (>20 μg/mL Nab 양성)
GRD0125	<0.98	>150 U/mL	예

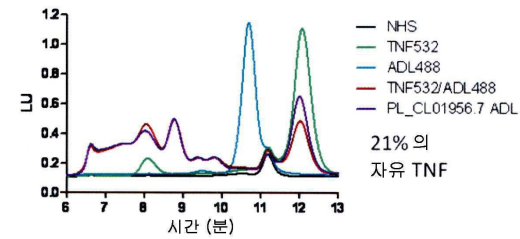


환자는
아달리무마브에
반응하지 않을
것임

환자 연구 #2 – CD 환자



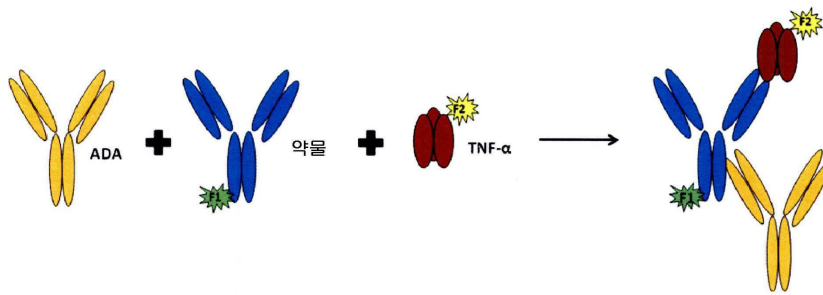
수집 일자	IFX [μg/mL]	ATI [U/mL]	양성으로 확인 (>20 μg/mL Nab 양성)
PL_CL01956.7	<0.98	356.82 U/mL	예



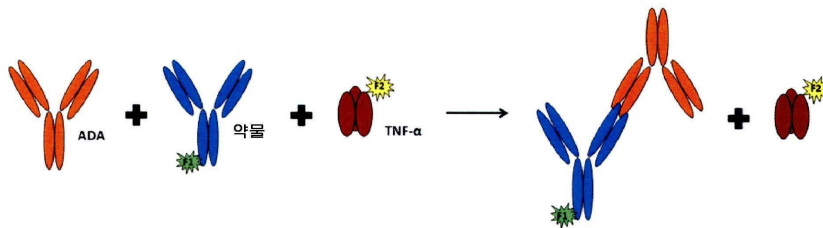
환자는
아달리무마브에
반응하지 않을
것임

도면22

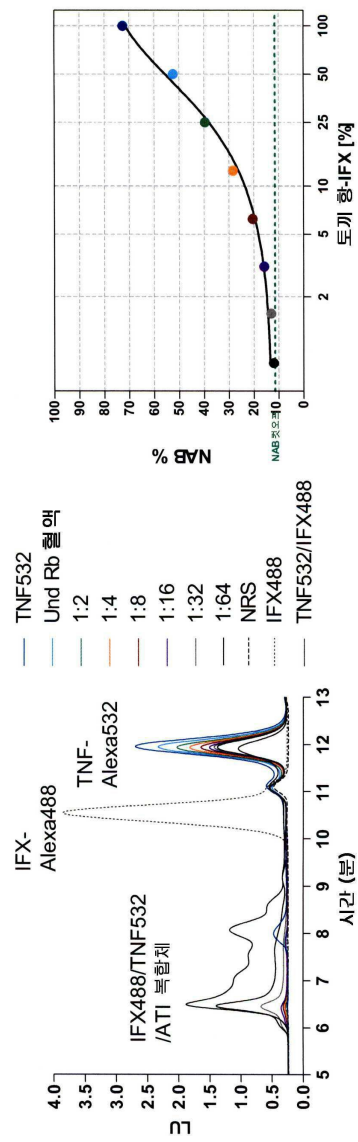
결합 (비-NAB) 항체



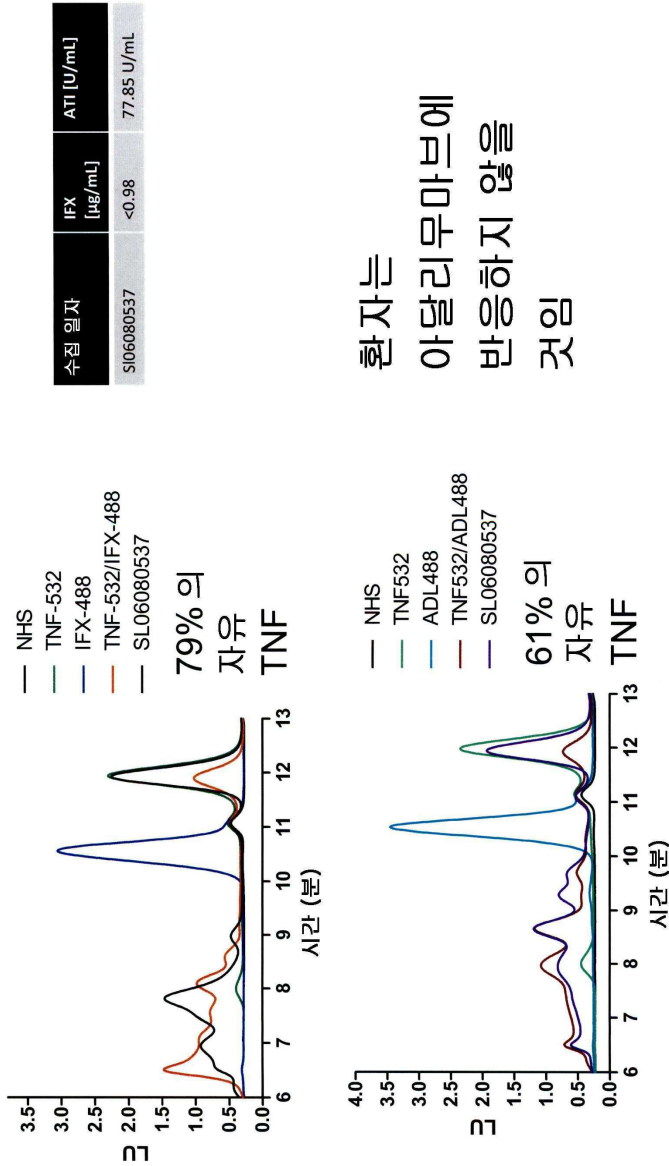
중화 항체 (NAB)



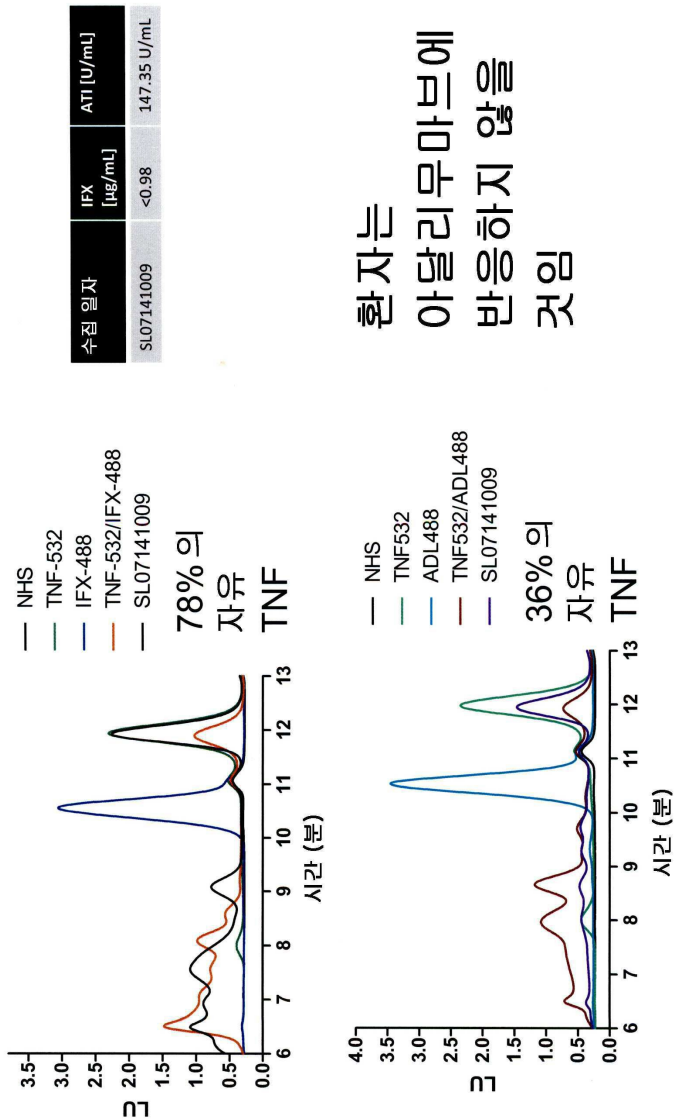
도면23



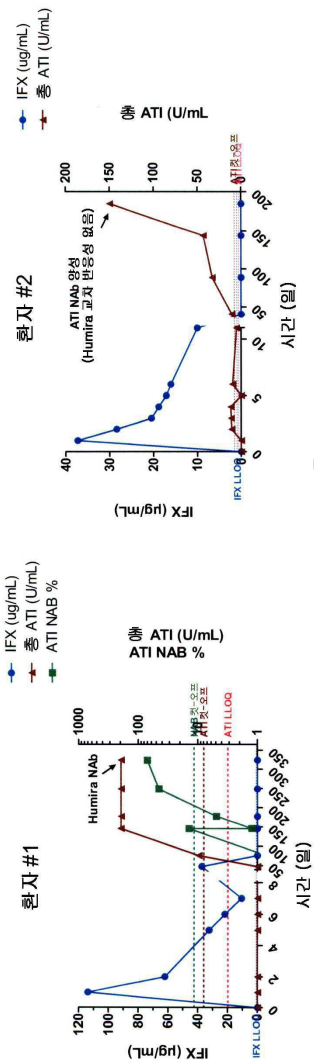
도면24



도면25

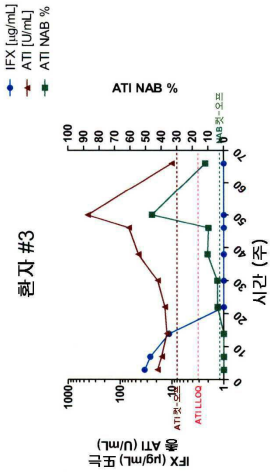


도면26



주: NA의 결과를 갖는 모든 IFX 시료는 0으로 분류됨
<3.13 U/mL의 모든 총 ATI 시료는 0으로 분류됨

주: NA의 결과를 갖는 모든 IFX 시료는 0으로 분류됨
<3.13 U/mL의 모든 총 ATI 시료는 0으로 분류됨



주: NA의 결과를 갖는 모든 IFX 시료는 0으로 분류됨
<3.13 U/mL의 모든 총 ATI 시료는 0으로 분류됨