

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-506918

(P2015-506918A)

(43) 公表日 平成27年3月5日 (2015. 3. 5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 K 16/44 (2006.01)	C O 7 K 16/44	4 H O 4 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D
G O 1 N 30/88 (2006.01)	G O 1 N 30/88	2 O 1 R
	G O 1 N 30/88	J

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2014-546705 (P2014-546705)	(71) 出願人	506292941
(86) (22) 出願日	平成24年12月12日 (2012.12.12)		バイオコン・リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成26年8月4日 (2014.8.4)		インド国、バンガロア 560100、エ
(86) 国際出願番号	PCT/IB2012/057200		レクトロニクス・シティ、トゥエンティ
(87) 国際公開番号	W02013/088348		ス・ケイエム・ホスール・ロード
(87) 国際公開日	平成25年6月20日 (2013.6.20)	(74) 代理人	100101454
(31) 優先権主張番号	4333/CHE/2011		弁理士 山田 卓二
(32) 優先日	平成23年12月12日 (2011.12.12)	(74) 代理人	100062144
(33) 優先権主張国	インド (IN)		弁理士 青山 稔
		(74) 代理人	100106518
			弁理士 松谷 道子
		(74) 代理人	100138911
			弁理士 櫻井 陽子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 前臨床および臨床マトリクス中のペプチドポリマーの薬物動態評価のための特異的免疫アッセイ
関連試薬の開発

(57) 【要約】

本発明は、臨床および前臨床マトリクス中の、Copolymer 1、Copolymer-1、Cop 1またはCopとしても知られる酢酸グラチラマー (G A) を包含するペプチド、ペプチドオリゴマーおよびポリマーの薬物動態評価のための特異的免疫アッセイを開発する方法を提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

酢酸グラチラマー（G A）に対する抗体を産生および取得する方法であって、下記を含んで成る方法：

- a．哺乳動物を酢酸グラチラマーで免疫化して、G Aに対する抗体を産生するように免疫反応を起こすこと；
- b．免疫化から所定の時間後に、免疫化された哺乳動物から、産生された抗体を含む血清を採取し、産生された抗体を精製するために、抗体を含む血清をプロテイン A カラムに通して、抗 G A 抗体の第 1 プール、および場合により G A を含むフロースルーを得ること；
- c．前記抗 G A 抗体を用いて、抗 G A 抗体カラムを調製し、
i．抗体を含む血清を抗 G A 抗体カラムに通して、抗 G A 抗体の第 2 プールを得るか、または
ii．ステップ（b）のプロテイン A 精製カラムからのフロースルーを通して、抗体の第 2 プール、および場合により G A を含むフロースルーを得ること；
- d．場合により各段階のフロースルーで哺乳動物を再免疫化し、場合により抗体の第 1 および第 2 プールを混合して、酢酸グラチラマーに対する抗体を取得すること。

10

【請求項 2】

抗体がポリクローナル抗体である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 3】

生物学的サンプル中の酢酸グラチラマー（G A）を薬物動態評価するためのアッセイであって、下記を含んで成るアッセイ：

- a．酢酸グラチラマーに対する抗体を産生および取得し、該抗体を用いて、上記のサンプルの薬物動態評価のための抗 G A 抗体カラムを調製する方法；
- b．酢酸グラチラマー - ウシ血清アルブミン（G A - B S A）コンジュゲートアフィニティカラムを得、該カラムを用いて、
i．前記薬物動態評価のために、サンプル中の抗 G A 抗体をポジティブアフィニティ精製するか、または
ii．前記薬物動態評価のために、G A 血清結合タンパク質をポジティブアフィニティ精製する
方法；
- c．前記薬物動態評価のために、G A 血清結合タンパク質をネガティブ精製するために、B S A または H S A アフィニティカラムを用いる方法；または
- d．前記薬物動態評価のために、G A、精製 G A 血清結合タンパク質または抗 G A 抗体を用いて E L I S A を行う方法；または
- e．上記方法の組み合わせ。

30

【請求項 4】

生物学的サンプルが、前臨床もしくは臨床マトリクスまたはそれらの組み合わせである、請求項 3 に記載のアッセイ。

【請求項 5】

酢酸グラチラマーに対する抗体を産生および取得する方法が、請求項 1 に記載の方法である、請求項 3 に記載のアッセイ。

40

【請求項 6】

酢酸グラチラマー - ウシ血清アルブミン（G A - B S A）コンジュゲートアフィニティカラムを得る方法が、

- a．B S A および G A の N 末端アミン基をグルタルアルデヒドに共有結合させて、前記 G A - B S A コンジュゲートを得ること；および
- b．p H 7．4 のリン酸緩衝食塩液中で G A - B S A コンジュゲートをアフィゲルにカップリングして、前記 G A - B S A コンジュゲートアフィニティカラムを得ることを含む、請求項 3 に記載のアッセイ。

【請求項 7】

50

E L I S A がサンドイッチ E L I S A である、請求項 3 に記載のアッセイ。

【請求項 8】

薬物動態評価が、酵素免疫アッセイ、ラジオイムノアッセイ、ウエスタンブロット分析、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A)、免疫沈降および免疫蛍光から成る群から選択される方法またはその組み合わせによって行われる、請求項 3 に記載のアッセイ。

【請求項 9】

薬物動態評価が、サンプル中の G A の $T_{1/2}$ 、 T_{max} および C_{max} の情報を与える、請求項 3 に記載のアッセイ。

【請求項 10】

生物学的サンプル中の G A ペプチドの分子サイズ範囲を調べるために、G A および参照対照のコパキソンを S D S P A G E ゲルで分離する、請求項 3 に記載のアッセイ。

10

【請求項 11】

サンプル中の抗 G A 抗体のポジティブアフィニティ精製を、抗 G A 抗体のポジティブ結合のためにサンプルを G A - B S A コンジュゲートアフィニティカラムに通し、精製抗体を得るために前記結合抗体を溶離させることによって行う、請求項 3 に記載のアッセイ。

【請求項 12】

サンプル中の G A 血清結合タンパク質のポジティブアフィニティ精製を、G A 血清結合タンパク質のポジティブ結合のためにサンプルを G A - B S A コンジュゲートアフィニティカラムに通し、精製タンパク質を得るために前記結合タンパク質を溶離させることによって行う、請求項 3 に記載のアッセイ。

20

【請求項 13】

サンプル中の G A 血清結合タンパク質のネガティブ精製を、G A 血清結合タンパク質以外の不純物のネガティブ結合のために、ポジティブアフィニティ精製において得られた溶出液もしくはフロースルーまたはそれらの組み合わせを、B S A または H S A アフィニティカラムに通し、精製 G A 血清結合タンパク質を得ることによって行う、請求項 3 に記載のアッセイ。

【請求項 14】

アッセイにおける各方法が、生物学的サンプル中の G A の特異性、交差反応性および濃度に関する情報を与える、請求項 3 に記載のアッセイ。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

本発明は、臨床および前臨床マトリクスにおける、Copolymer 1、Copolymer-1、Cop 1 または Cop としても知られる酢酸グラチラマー (G A) を包含するペプチド、ペプチドオリゴマーおよびポリマーの薬物動態を評価するための、特異的な免疫アッセイを開発する方法を提供する。本発明はまた、哺乳動物において酢酸グラチラマー (G A) に対する p A b (ポリクローナル抗体) を作製する方法を提供する。

【背景技術】

【0002】

多発性硬化症の処置に現在用いられている酢酸グラチラマーは、ミエリン塩基性タンパク質中に存在する 4 つのアミノ酸、すなわちグルタミン酸、リジン、アラニンおよびチロシンのランダムコポリマーである。1 日 1 回 20 m g の酢酸グラチラマーを注射により皮下投与すると、T 細胞集団が、炎症性 T h 1 細胞から、炎症反応を抑制する制御性 T h 2 細胞側にシフトする。作用機序は、グラチラマーがミエリン塩基性タンパク質に似ていることによっており、グラチラマーは in vivo でデコイとして働き、ミエリンに対する自己免疫反応を回避させる。G A は皮下注射されると、投与量の一部がリンパ循環に、一部が全身循環に入り得ると考えられるが、血液脳関門のような免疫学的寛容部位を通過するようではないと考えられる。G A のランダムポリマーは、注射部位で局所的に、小オリゴペプチドおよび遊離アミノ酸に加水分解されることが知られており、したがってエпитープが絶えず変化するので、ヒトでは注射後 1 時間を超えて、イヌでは注射後 6 時間を超えて

40

50

は、薬物動態プロファイルの決定のために免疫アッセイを用いることができなかった (CD ER Application: NDA 20-622/S015参照)。

【発明の概要】

【0003】

G A の可能なすべてのエピトープに対応する恐らくは高親和性の p A b の作製、抗体のアフィニティ精製、および G A 結合血清結合タンパク質の分離の本発明の新規アプローチにより、前臨床および臨床マトリクス中の血清タンパク質結合 G A の検出における実際的困難を克服する、非常に特異的で高感度のアッセイの開発が可能となった。

【0004】

本発明は、前臨床および臨床マトリクスにおける酢酸グラチラマー薬物動態評価のための特異的免疫アッセイを開発する方法に関する。この方法は、下記ステップを含む：

- a) ウサギにおいて酢酸グラチラマーに対する p A b を作製する方法。
- b) G A と B S A とをコンジュゲート化し、抗 G A p A b をアフィニティ精製する方法。
- c) 前臨床および臨床マトリクスから G A 結合タンパク質を精製する方法。
- d) 免疫アッセイにおいて G A の検出または定量のために G A 結合血清タンパク質または B S A もしくは H S A をキャプチャー試薬として使用すること。
- e) 前臨床および臨床マトリクス中の G A を定量するための、多重フォーマットの特異的で高感度の免疫アッセイを開発すること。
- f) G A の *in vivo* 半減期を延長する新規 G A 製剤を開発するためのタンパク質担体を同定すること。

【0005】

本発明の一態様においては、G A 原薬中に存在するランダムポリマーに対する抗体を産生するために、抗原混合物に対する抗体の産生に一般に用いられるカスケード免疫化スキームを応用した。

【0006】

本発明は他の一態様において、ネガティブおよびポジティブアフィニティ精製カラムを調製するための、B S A および B S A - G A コンジュゲートのようなアフィニティリガンドの調製に関する。

【0007】

本発明の他の一態様においては、アフィニティ精製抗 G A 抗体の特異性を、E L I S A において、ポジティブ結合のためには G A 、B S A - G A コンジュゲートを用いて、ネガティブ結合のためには B S A 、H S A 、前臨床および臨床マトリクスからの G A 結合血清タンパク質を用いて評価した。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】図1は、銀染色によって染色した S D S P A G E において分子量に基づいて分離された Biocon の G A および市販の G A の比較を示す (G A - グラチラマー) 。 L 1 - タンパク質ラダー； L 2 - 市販 G A 5 μ g / レーン； L 3 - Biocon G A 5 μ g / レーン。

【図2】図2は、プロテイン A 精製抗 Biocon G A ウサギポリクローナル抗体を用いた ウエスタンブロッティングによる Biocon G A のアイデンティティを示す。 S D S P A G E で分離した Biocon G A および市販 G A (5 μ g) を P V D F 膜にプロットし、プロテイン A 精製抗 Biocon G A ウサギポリクローナル抗体 (5 5 μ g / m l) で探り、二次抗 ウサギポリクローナル I g G A L P コンジュゲート (希釈 - 1 / 2 5 0 0 0) で検出した。 L 1 - タンパク質ラダー； L 2 - 市販 G A 5 μ g / レーン； L 3 - Biocon G A 5 μ g / レーン。

【図3】図3は、抗原アフィニティ精製抗 Biocon G A ウサギポリクローナル抗体を用いた ウエスタンブロッティングによる Biocon G A のアイデンティティを示す。 S D S P A G E で分離した Biocon G A および市販 G A (5 μ g) を P V D F 膜にプロットし、抗

原アフィニティ精製抗Biocon G A ウサギポリクローナル抗体 (5 μ g / m l) で探り、抗ウサギ I g G A L P コンジュゲート (希釈 - 1 / 2 5 0 0 0) で検出した。L 1 - タンパク質ラダー ; L 2 - 市販 G A 5 μ g / レーン ; L 3 - Biocon G A 5 μ g / レーン。

【図 4】図 4 は、カスケード免疫化スキームを示す。

【図 5】図 5 は、ウサギにおいて抗グラチラマー抗体を産生させるカスケード免疫化においてデブリーションされたグラチラマー (G A) の S D S P A G E プロファイリングを示す。レーン S M : タンパク質分子量マーカー ; レーン B : ブランク ; レーン G A : グラチラマー ; レーン d G A 1 ~ 4 : イムノデブリーションされたグラチラマー抗原。

【図 6】図 6 は、プレ採血 (B 1) 、試験採血 (B 2) 、試験採血 (B 3) 、産物採血 (B 4) および最終採血 (B 5) から精製された抗グラチラマー抗体による酢酸グラチラマーのウェスタンブロット分析を示す。

【図 7】図 7 は、G A - B S A アフィニティカラムの調製を示す。

【図 8】図 8 は、グルタルアルデヒドを架橋剤として用いる酢酸グラチラマーとウシ血清アルブミンとの架橋を示す。レーン 1 - タンパク質サイズマーカー ; レーン 2 - B S A ; レーン 3 - グラチラマー ; レーン 4 - コンジュゲート化された B S A - グラチラマー (1) 。

【図 9】図 9 は、活性化セファロースマトリクス (アフィゲル (affigel) 1 5) への酢酸グラチラマー - B S A コンジュゲートのカップリングの有効性を示す。レーン 1 - タンパク質サイズマーカー ; レーン 2 - カップリング後 (1 μ g / レーン) ; レーン 3 - カップリング前 (1 μ g / レーン) (2) 。

【図 1 0】図 1 0 は、B S A - G A アフィニティカラムを用いた、マトリクスからの G A 結合タンパク質の精製、およびヒト血清からの G A 結合タンパク質の S D S P A G E 銀染色プロファイルを示す。

【図 1 1】図 1 1 は、G A 結合血清タンパク質の特異性 / 交差反応性を示す。

【図 1 2】図 1 2 は、G A キャプチャー試薬として前臨床および臨床マトリクスから得た G A 結合血清タンパク質を用いる免疫アッセイフォーマットを示す。

【図 1 3】図 1 3 は、ヒトマトリクス中の G A を検出するための、さまざまな G A キャプチャー試薬を用いて開発された薬物動態アッセイフォーマットを示す。

【図 1 4】図 1 4 は、ラットマトリクス中の G A を検出するための、さまざまな G A キャプチャー試薬を用いて開発された薬物動態アッセイフォーマットを示す。

【図 1 5】図 1 5 は、イヌマトリクス中の G A を検出するための、さまざまな G A キャプチャー試薬を用いて開発された薬物動態アッセイフォーマットを示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 0 9 】

本発明は、前臨床および臨床マトリクスにおける酢酸グラチラマー薬物動態評価のための特異的免疫アッセイを開発する方法に関する。この方法は、下記ステップを含む：

- a) ウサギにおいて酢酸グラチラマーに対する p A b を作製する方法。
- b) G A と B S A とをコンジュゲート化し、抗 G A p A b をアフィニティ精製する方法。
- c) 前臨床および臨床マトリクスから G A 結合タンパク質を精製する方法。
- d) 免疫アッセイにおいて G A の検出または定量のために抗 G A 抗体、G A 結合血清タンパク質または B S A もしくは H S A をキャプチャー試薬として使用すること。
- e) 前臨床および臨床マトリクス中の G A を定量するための、多重フォーマットの特異的で高感度の免疫アッセイを開発すること。
- f) G A の in vivo 半減期を延長する新規 G A 製剤を開発するためのタンパク質担体を同定すること。

【 0 0 1 0 】

本発明の一態様においては、D P (酢酸グラチラマー製剤) 中のペプチドの分子サイズ範囲を調べるために、G A のランダムポリマーおよび参照対照コバキソンを S D S P A

10

20

30

40

50

G E ゲルで分離した。D P の抗原 / ペプチドの免疫反応性が、ウエスタンブロット法により証明された。分離された G A およびコパキソンの抗原 / ペプチドのほぼ全てが、「プロテイン A」精製 p A b および G A アフィニティ精製抗 G A p A b に対し反応性であった。G A およびコパキソンの S D S P A G E およびウエスタンブロットプロファイルから得られたデータの比較により、分子量ならびにプロテイン A p A b および抗 G A p A b に対する免疫反応性から、それらが同様 / 同一であることが示唆される。

【 0 0 1 1 】

他の一態様においては、G A 原薬中に存在するランダムポリマーに対する抗体を産生するために、抗原混合物に対する抗体の産生に一般に用いられるカスケード免疫化スキームを応用した。この方法において、ウサギを G A のプライマリーおよびブースター投与により免疫化した後、各試験採血の高度免疫血清中の抗 G A 抗体を、プロテイン A カラムを用いて精製した。プロテイン A 精製ウサギ抗 G A 抗体を用いて、アフィニティ抗体カラムを調製して、同種タンパク質抗原を選択的にデブリーションし、それによってアフィニティカラムのフロースルーにおいて抗原プールに濃縮した。濃縮された抗原は、先のサイクルでは免疫反応を起こさなかったもので、それをその後のブースター注射において免疫原として用いた。デブリーションされた免疫反応性の抗原およびフロースルー中に存在する濃縮された免疫反応性の低い抗原は、免疫細胞をプライミングして一次抗体（免疫反応性の低いタンパク質用）および二次抗体（免疫反応性に親和性の成熟した A b）を産生させるのに役立つ。抗 G A 抗体の精製、免疫反応性抗原のデブリーション、免疫反応性の低い抗原の濃縮、およびブースター注射、のサイクルを繰り返すことにより、G A 原薬中の全ての可能な免疫原性 / 抗原性タンパク質集団に対応する抗体を作製した。

10

20

【 0 0 1 2 】

本発明のさらに別の一態様においては、アフィニティカラム（B S A および B S A - G A コンジュゲートカラム）の調製は下記ステップを含む：

- a) アフィゲル 1 5 を用いて B S A アフィニティカラムを調製する。p H 7 . 4 の P B S 中で B S A のアフィゲルへのカップリングを行う。
- b) B S A と G A とを、各タンパク質の N 末端アミノ基に共有結合するグルタルアルデヒド化学を用いてコンジュゲート化した。
- c) 抗 G A 高度免疫血清からのウサギ抗体を、プロテイン A カラムを用いて精製し、透析により得た溶出液を B S A - G A アフィニティカラムに通し、0 . 2 5 M グリシン（p H 2 . 5）を用いて抗体をアフィニティ溶離させ、溶出液を 1 M T r i s（p H 9）で中和し、P B S（p H 7 . 4）に対し透析した。精製段階の 1 つにおいて、B S A カラムを用いてネガティブ精製を行った。

30

【 0 0 1 3 】

酢酸グラチマーおよび B S A をグルタルアルデヒドで架橋反応が完了するまで処理し、G A - B S A コンジュゲートの有効性を確かめるために、反応混合物を透析して過剰の未反応グルタルアルデヒドを除去し、S D S P A G E、次いで銀染色に付した。

【 0 0 1 4 】

本発明のさらに別の一態様においては、アフィニティ精製抗 G A A b の特異性を、E L I S A において、ポジティブ結合のためには G A、B S A - G A コンジュゲートを用いて、ネガティブ結合のためには B S A、H S A、前臨床および臨床マトリクスからの G A 結合血清タンパク質を用いて評価した。同様に、ビオチニル化アフィニティ精製抗 G A A b も、同様の特異性結果を示した。

40

【 0 0 1 5 】

以下の実施例および添付の図面によって本発明をさらに詳しく説明する。ただし、実施例は本発明の範囲を制限するものと解釈すべきではない。

【 実施例 1 】

【 0 0 1 6 】

前臨床および臨床血清マトリクスからの G A 血清結合タンパク質の精製

異なる血清（ヒト、サル、ラット、イヌ、ウサギ）を個別に、G A - B S A コンジュゲ

50

ートアフィニティカラムに通し、未結合タンパク質をカラムから洗い流した後、0.25 M グリシン (pH 2.5) を用いて G A 結合血清タンパク質を溶離し、溶出液を 1 M T r i s (pH 9) で中和し、P B S (pH 7.4) に対し透析した。G A 結合タンパク質のマトリクスからの精製に用いた方法、およびその S D S P A G E プロファイルを示す。

【実施例 2】

【0017】

a) G A 結合血清タンパク質の特異性 / 交差反応性

精製した G A 結合タンパク質で E L I S A プレートにコーティングし、G A 直接コーティングを対照として、ビオチニル化 G A アフィニティ p A b との交差反応性を調べた (実験 2)。精製抗原プールは、アフィニティ精製抗 G A p A b に対し交差反応性を示さないという結果が示された。

10

【0018】

b) キャプチャー試薬としての直接コーティングされた G A および精製 G A 結合タンパク質、およびビオチニル化 G A アフィニティ p A b による G A の検出は、明らかなシグナル対ノイズ比を示した (実験 3)。G A 検量線に見られるグラデーションを図に表すことにより、血清マトリクス中の G A の検出および定量的ための薬物動態評価方法の開発が可能となった。

【実施例 3】

【0019】

前臨床および臨床マトリクス中の G A を検出するための、精製した特異 G A 結合血清抗原を用いる P K E L I S A 法の開発

20

ヒト、サル、ラット、ウサギおよびイヌ血清からの G A 特異的抗体プールの精製を前記のように行い、各マトリクスにおける P K 法開発のためのコーティング試薬として使用した。各マトリクスについて 30000 ~ 7 ng / ml の検量線を作成し、5 倍 M R D で各コーティング抗体に加え、室温で 1 時間インキュベートした。抗原により捕捉された薬物を、ビオチニル化アフィニティ精製抗 G A p A b、次いでストレプトアビジン - H R P コンジュゲートにより検出した。結果 (グラフ) は、各マトリクスにおいてマトリクス毎に異なる感度で (200 ~ 7 ng / ml) 明らかなシグナル対ノイズ比を示した。ニートのヒトのマトリクスでは、約 7 ng / ml の感度が達成された。

30

【実施例 4】

【0020】

P K アッセイフォーマットの使用可能性の評価

血清タンパク質に結合した G A を捕捉する異なる固定化試薬を用いる、全部で 7 つの異なる E L I S A 法を、ヒト、イヌおよびラットのマトリクスを用いて試験した。予備的な結果に基づけば、アフィニティ精製抗 G A 抗体およびアフィニティ精製 G A 結合タンパク質を用いるサンドイッチ E L I S A が、感度がより一層高いロバスタなアッセイの開発に理想的である。本発明者らは、G A 特異抗原、および E L I S A アッセイにおけるキャプチャー試薬としての、G A により親和性の抗体が、サンプル (液相) 中の血清タンパク質に結合した G A の分離 (固相抽出) を促進にし、前臨床および臨床血清マトリクス中の低濃度の G A の測定を可能にすると考える。

40

【実施例 5】

【0021】

ウサギポリクローナル抗コパキソン抗体を用いる、Sprague Dawley ラット血清中のコパキシソンの検出

特定の種の血清サンプル中のコパキソンを定量するための検量線を作成するために、それぞれ既知の濃度でスパイクされたコパキソンを含有する、一組の校正標準を形成する、一連の血清サンプルを、ニート血清中 1000000 ng / ml、3000000 ng / ml、4000 ng / ml、2000 ng / ml、1000 ng / ml、500 ng / ml、250 ng / ml、125 ng / ml、62.5 ng / ml、31.3 ng / ml、7

50

． 8 n g / m l および 3 . 9 n g / m l のレベルのコパキソンを用いて血清中に調製した。

【 0 0 2 2 】

E L I S A プレートをポリクロールウサギ抗コパキソン抗体で予めコーティングし、適切に希釈された、校正標準を構成する血清サンプル、および分析用サンプルを、コーティングされた抗コパキソン抗体に結合するようインキュベートし、未結合の、および結合の弱い血清成分を、P B S T (0 . 1 % tween 20 を含有するリン酸緩衝食塩液) による洗浄によって分離した。ビオチン標識ポリクロールウサギ抗コパキソン抗体およびストレプトアビジンアルカリ性ホスファターゼコンジュゲートを用いて、結合コパキソンを検出した。基質をウェルに入れ、試験サンプルについて 6 4 0 n m で得られた青色シグナルを、校正標準の濃度 - 反応相関から作成した検量線と比較して、血清サンプル中の未知コパキソン濃度を決定する。

10

【 実施例 6 】

【 0 0 2 3 】

ウサギポリクロール抗コパキソン抗体の特異的結合の証明

血清中にスパイクされたコパキソンを特異的に検出し、コパキソン血清タンパク質複体の検出を回避するように、ポリクロールウサギ抗コパキソン抗体を、固定化 B S A (ウシ血清アルブミン) および B S A - コパキソンを含む活性化アガロースカラムを用いて特異的に精製した。

20

【 0 0 2 4 】

ステップ 1 : アフィゲル 1 5 (Biorad) を用いて B S A アフィニティカラムを調製した。アフィゲルへの B S A の結合を、p H 7 . 4 の P B S 中で行った。

ステップ 2 : グルタルアルデヒド化学を用いて、B S A と G A とを、各タンパク質の N 末端アミノ基への共有結合により化学的にコンジュゲート化した。

【 実施例 7 】

【 0 0 2 5 】

Sprague Dawley ラットにおけるパイロット P K 試験

3 匹の雄 Sprague Dawley ラットに、コパキソンを 2 0 m g / k g 体重で、投与体積 1 m l および投与濃度 2 0 m g / k g / 日で投与した。与えられた強度 2 0 m g / k g に対し、可能な最小用量 (1 m l / k g の投与体積に基づく) に基づいて投与量を選択した。各動物の体重を測定し、2 0 m g / k g 体重でコパキソンを投与した。5 分、1 0 分、1 5 分、2 0 分、3 0 分、4 5 分、1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、6 時間、1 0 時間および 2 4 時間の時点で、各動物からの血液サンプルを、1 0 μ l のプロテアーゼ阻害剤中に採集した。血清分離のために、血液サンプルを氷上に保存した。血清を分離し、搬出まで - 8 0 で保存した。2 4 時間までのサンプルの輸送はドライアイス中で行った (- 4 4) 。

30

【 0 0 2 6 】

ラットパイロット試験における P K プロファイルの概要

ラット	T _{1/2}	T _{max}	C _{max}	AUC _{0-t} (min*ng/ml)	AUC _{0-inf} (min*ng/ml)	AUC % Extrapol_obs
	(min)	(min)	(ng/ml)			(5%未満であるべき)
1	31.18	15	968.69	25491.53	25654.06	0.63
2	23.39	10	510.79	15411.63	15705.6	1.87
3	27.79	10	3992.88	34732.28	35161.34	1.22
平均	27.45	11.67	1824.12	25211.81	25507	1.24
SD	3.91	2.89	1892.1	9663.36	9728.7	0.62

40

【 図 1 】

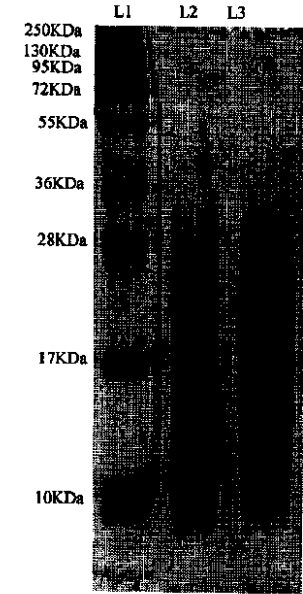


Fig. 1

【 図 2 】

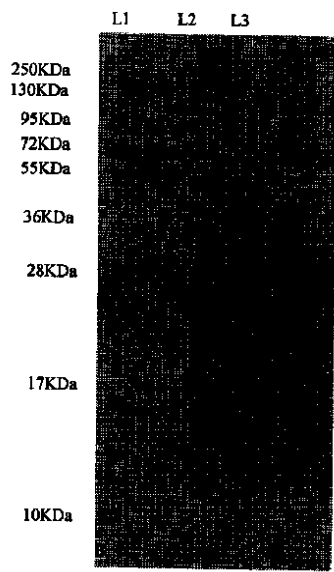


Fig. 2

【 図 3 】

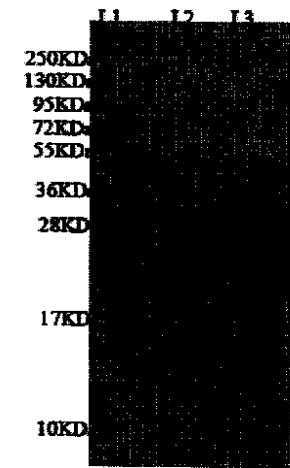


Fig. 3

【 図 4 】

カスケード免疫化スキーム			
ウサギ: ニューランド白ウサギ4匹			日
プライマリー投与	Blocon GA抗原 — CFAと共に注射	0	
ブースター投与I	Blocon GA抗原 — IFAと共に注射	21	
試験採血1 (29日目) に採血)	試験採血1から得たプロテインA精製抗体を用いて、アフィニティカラム1を調製した。Blocon GA抗原をカラムに通した。アフィニティカラム1のフロースルーを採集した (FT1)。	29日目	
試験採血2 (40日目) に採血)	試験採血2から得たプロテインA精製抗体を用いて、アフィニティカラム2を調製した。Blocon GA抗原をカラムに通した。アフィニティカラム2のフロースルーを採集した (FT2)。	40日目	
	イムノデフレーションされた抗原をブールした。FT1 + FT2 = FT3		
ブースター投与II	FT3 — 注射	42	
試験採血3 (51日目) に採血)	試験採血3から得たプロテインA精製抗体を用いて、アフィニティカラム3を調製した。FT3抗原ブールをカラムに通した。アフィニティカラム3のフロースルーを採集した (FT4)。	51	
ブースター投与III	FT4 — IFAと共に注射	52	
試験採血4 (70日目) に採血)	試験採血4から得たプロテインA精製抗体を用いて、アフィニティカラム4を調製した。FT4抗原ブールをカラムに通した。アフィニティカラム4のフロースルーを採集した (FT5)。	70	
ブースター投与IV	FT5 — 注射	84	
試験採血5 (103日目) に採血)	試験採血5から得たプロテインA精製抗体を用いて、アフィニティカラム5を調製した。FT5抗原ブールをカラムに通した。アフィニティカラム5のフロースルーを採集した (FT6)。	103	
ブースター投与V	FT6 — 注射	105	
産物採血 (6回目の試験採血)	各ウサギから10ml	126	
最終採血	ウサギから得た高度免疫血清 (各ウサギから50ml) — < -60°Cで貯蔵	136	

Fig. 4

【図 5】

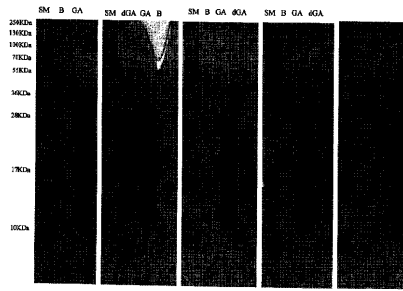


Fig. 5.

【図 6】

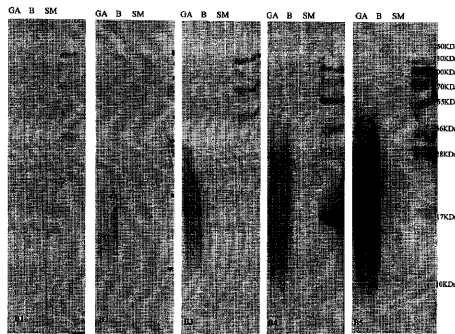


Fig. 6.

【図 8】

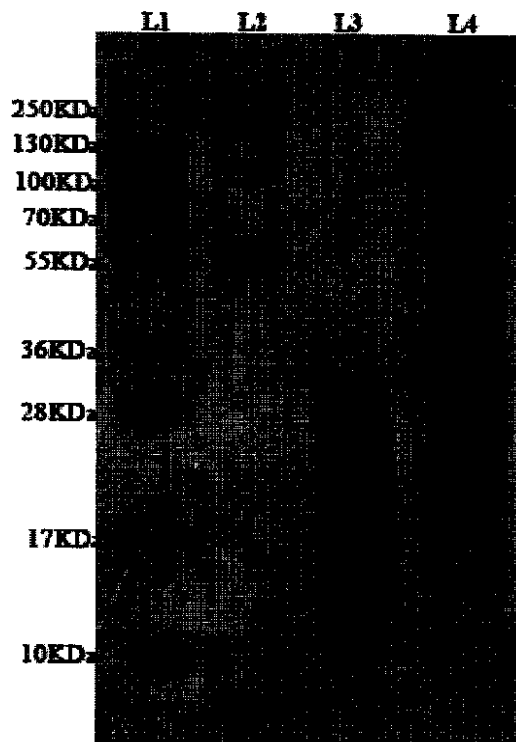
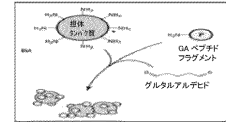


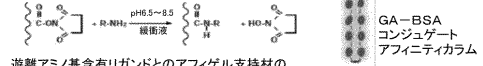
Fig. 8

【図 7】

計画: GA-BSAアフィニティカラムの調製
 ステップ1: BSAへのGAのコンジュゲート化
 (グルタルアルデヒド化学を用いる)



ステップ2: アフィゲル15へのGA-BSAコンジュゲートの
 カップリングによるアフィニティカラムの調製



遊離アミノ基含有リガンドとのアフィゲル支持材の
 カップリング反応

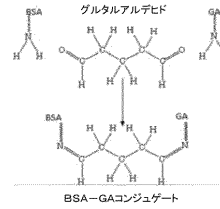


Fig. 7

【図 9】

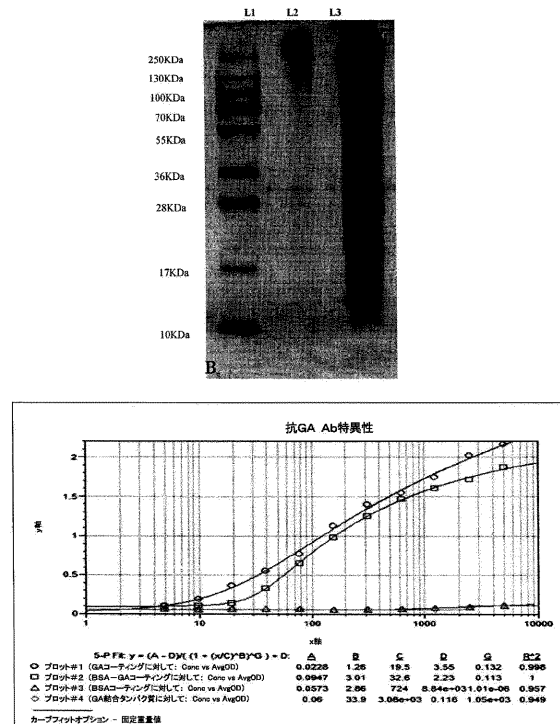


Fig. 9

【図 10】

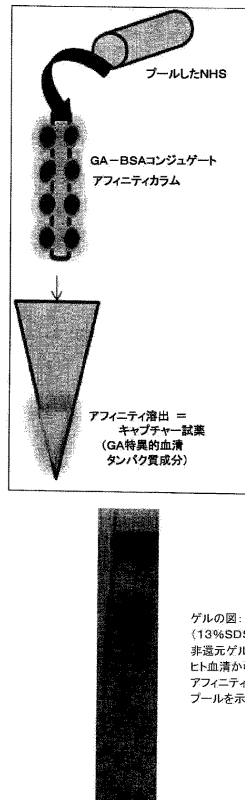


Fig. 10

【図 12】

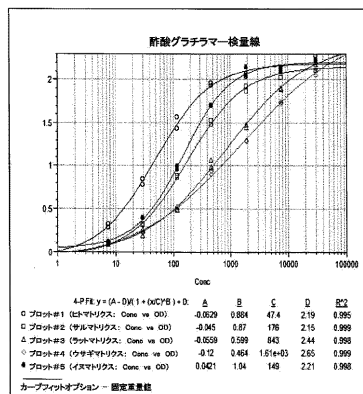
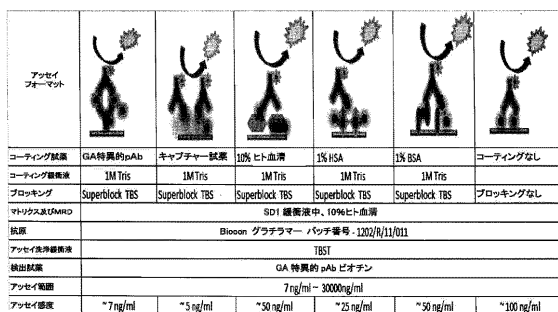


Fig. 12

【図 11】

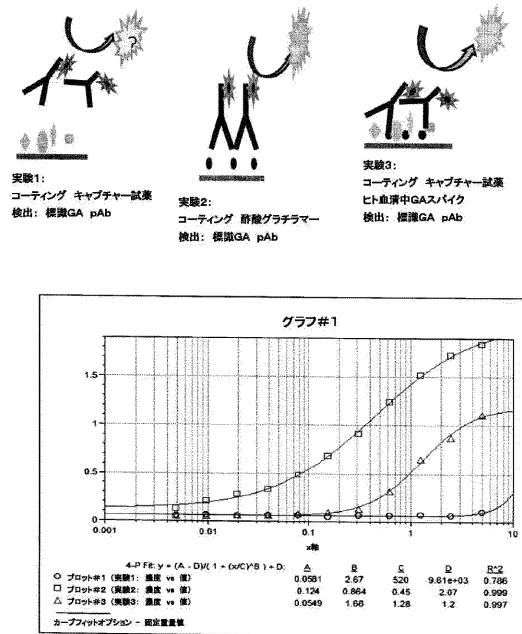


Fig. 11

【図 13】

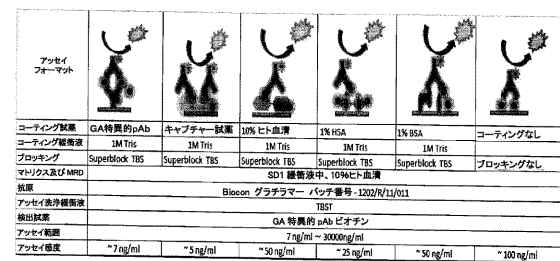


Fig. 13

【図 14】

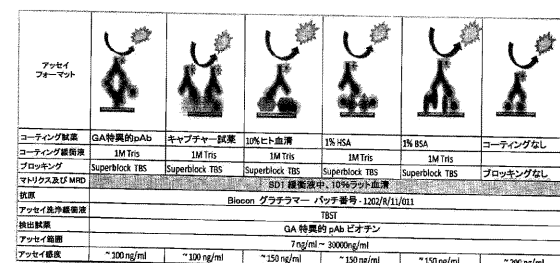


Fig. 14

【図 15】

アッセイ フォーマット						
コーティング試薬	GA specific pAb	Capture reagent	10% Human serum	1% HSA	1% BSA	コーティングなし
コーティング緩衝液	1M Tris	1M Tris	1M Tris	1M Tris	1M Tris	
ブロッキング	Superblock TBS	Superblock TBS	Superblock TBS	Superblock TBS	Superblock TBS	ブロッキングなし
マトリクス及び MRD	SDI 標準液中、10%ビーズグルタール大造粒					
抗原	Biotin グラチラマー ハッチ番号-1202/R/11/011					
アッセイ後処理試薬	TBS					
検出試薬	GA 特異的 pAb ビオタン					
アッセイ範囲	7 ng/ml ~ 3000 ng/ml					
アッセイ感度	~125 ng/ml	~150 ng/ml	~150 ng/ml	~150 ng/ml	~200 ng/ml	~250 ng/ml

Fig. 15

【図 16】

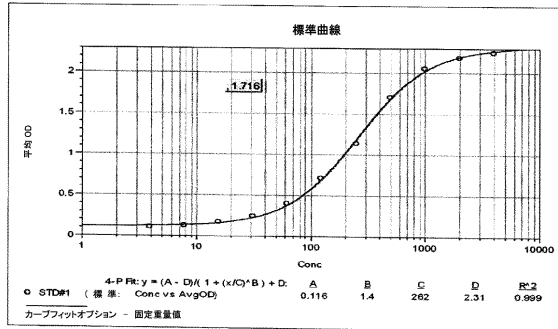


Fig 16. 本発明の方法を用いて、コバキソンを15. 625ng/mlの最低濃度で、許容できる精度および正確さで定量することができた。

【図 17】

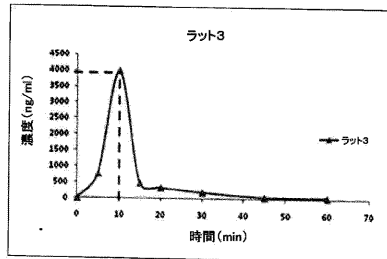
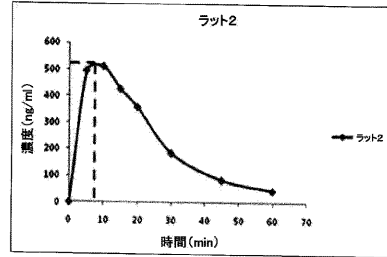
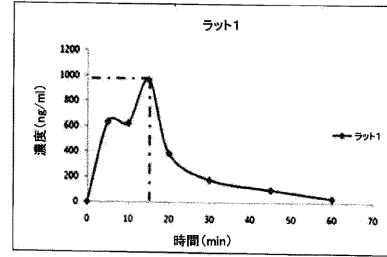


Fig 17. 上記グラフは、本発明の試験におけるコバキソンの時間-濃度プロファイルを示す。

【図 18】

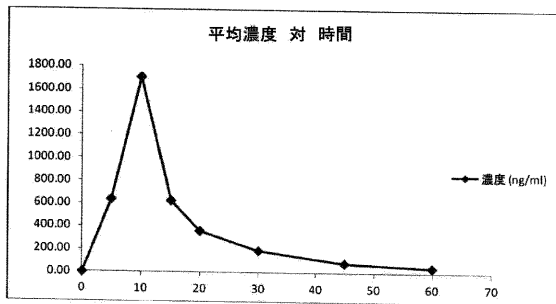


Fig 18

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB2012/057200
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 33/50 (2006.01) C07K 16/06 (2006.01) C07K 16/44 (2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
WPI, MEDLINE, EPDOC, HCAPLUS, BIOSIS, EMBASE, GOOGLE: glatiramer acetate, copolymer -1, copaxone, antibody, immunoglobulin, pAb, Ab, protein A, protein G, BSA, bovine serum albumin, human serum albumin, BSA, HSA, ELISA, enzyme linked immunosorbent assay, affinity column, purification column, binding column, pharmacokinetic and like terms		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C ☒ See patent family annex		
* "A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"B"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 14 June 2013		Date of mailing of the international search report 14 June 2013
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustalia.gov.au Facsimile No.: +61 2 6283 7999		Authorised officer Baahini Sivakumar AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. 0262256168

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/IB2012/057200
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	URE et al; Polyreactive antibodies to glatiramer acetate promote myelin repair in murine model of demyelinating disease, FASEB Journal. 2002 Aug;16(10):1260-2. Epub 2002 Jun 7.	1 and 2
Y	page 4 "glatiramer acetate immunization generate polyreactive antibodies"; page 6 :antibody purification"	3-14
X	US 2002/0182210 A1 (RODRIGUEZ et al) 05 December 2002	1 and 2
Y	Example 3	3-14
Y	MELCHIOR F : Generation and purification of rabbit or goat polyclonal antibodies, Rubicon at http://www.rubiconnet.org/data/file/716_EN_generationandpurificationofrabbitorgoatpolyclonalantibodies.pdf pages 3-6	3-14
Y	HAGE D: Affinity chromatography: a review of clinical applications, Clin Chem. 1999 May;45(5):593-615 pages 596-606	3-14
Y	LAFHEY B; Monoclonal Antibodies to Bovine Serum Albumin: Affinity Purification and Physicochemical Characterization, Massachusetts Institute of Technology (1995) Chapter 2 and Chapter 3	3-14
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/IB2012/057200	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
US 2002/0182210 A1	05 Dec 2002	AU 7295601 A	02 Jan 2002
		AU 2001272956 B2	21 Dec 2006
		CA 2413324 A1	27 Dec 2001
		EP 1301206 A1	16 Apr 2003
		HU 0301235 A2	28 Aug 2003
		JP 2003535909 A	02 Dec 2003
		PL 365458 A1	10 Jan 2005
		US 2002182210 A1	05 Dec 2002
		US 6800285 B2	05 Oct 2004
		US 2005019322 A1	27 Jan 2005
		WO 0197846 A1	27 Dec 2001
		WO 02076503 A1	03 Oct 2002
		ZA 200210240 A	28 Apr 2004
End of Annex			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

(72)発明者 アルムガム・ムルガナンダム

インド 5 6 0 1 0 3 バンガロール、ベラントウル(ポスト)、アウター・リング・ロード、ネクスト・トゥ・インテル、デバラビーサナハリ、アダルシュ・パーム・リトリート、ビラ・ナンバー 4 2 1

(72)発明者 ビンドゥ・チッケゴウダ

インド 5 6 0 0 7 8 バンガロール、ジェイ・ピー・ナガー、フィフス・フェイズ、ナンジュンデシュワラ・レイアウト、フィフティーンズ・メイン・ロード、バルシャ、ナンバー 3 9

(72)発明者 コンダ・ベンカタ・ナラシムハ・ラジュ

インド 5 2 3 1 5 7 アンドラ・プラデシュ、チララ、プラカシャム・ディストリクト、ベララ、ポスト・オフィス、サンカバリ・ペタ、ブトゥクリバリ・ストリート、ハウス・ナンバー 1 2 - 6 - 6

(72)発明者 スリカント・スリパドラオ

インド 5 6 0 0 5 7 バンガロール、チッカサンドラ、ヘサラガッタ・ロード、“スリ・ラクシュミナラシムハ・ニラヤ”・ニア・ムネシュワラ・テンプル、ナンバー 2 6

(72)発明者 サントラム・ムリダラン

インド 6 2 3 7 0 7 パラマクディ、タミル・ナドゥ、ラマナタプラム・ディストリクト、ベダントマダム・ストリート、ナンバー 1 2 / 1 3 4

(72)発明者 タンガマ・クンジラ・サブ라마ニ

インド 5 7 1 2 1 8 ビラージペット、サウス・クールグ、ミタディ・ビレッジ・アンド・ポスト

(72)発明者 ナブヤ・シバナ

インド 5 7 1 4 2 2 マンディヤ・ディストリクト、マドゥル・タルク、バラティ・ナガラ、ドダナ・ビルディング、2 4 1 / 4

Fターム(参考) 4H045 AA20 BA10 DA75 EA20 EA50 FA71 GA26

专利名称(译)	开发用于临床前和临床基质中肽聚合物的药代动力学评估的特异性免疫测定相关试剂		
公开(公告)号	JP2015506918A	公开(公告)日	2015-03-05
申请号	JP2014546705	申请日	2012-12-12
[标]申请(专利权)人(译)	拜康有限公司		
申请(专利权)人(译)	Biocon公司		
[标]发明人	アルムガムムルガナンダム ビンドウチッケゴウダ コンダベンカタナラシムハラジュ スリカントスリパドラオ サンタラムムラリダラン タンガマクンジラサブ라마ニ ナブヤシバナ		
发明人	アルムガム・ムルガナンダム ビンドウ・チッケゴウダ コンダ・ベンカタ・ナラシムハ・ラジュ スリカント・スリパドラオ サンタラム・ムラリダラン タンガマ・クンジラ・サブ라마ニ ナブヤ・シバナ		
IPC分类号	C07K16/44 G01N33/53 G01N30/88		
CPC分类号	G01N33/9493 C07K16/44 C07K2317/20 G01N33/531 G01N33/6893 G01N2333/001		
FI分类号	C07K16/44 G01N33/53.D G01N30/88.201.R G01N30/88.J		
F-TERM分类号	4H045/AA20 4H045/BA10 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/GA26		
代理人(译)	山田卓司 櫻井洋子		
优先权	4333CHE2011 2011-12-12 IN		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开内容提供了开发用于肽，肽寡聚物和聚合物的药代动力学评估的特异性免疫测定的方法，所述聚合物包括醋酸格拉替雷（GA），在临床和临床前基质中也称为共聚物1，共聚物-1，Cop 1或Cop。

ラットパイロット試験におけるPKプロファイルの概要

ラット	T _{1/2}	T _{max}	C _{max}	AUC _{0-t}	AUC _{0-inf}	AUC
	(min)	(min)	(ng/ml)	(min*ng/ml)	(min*ng/ml)	% Extrapol_obs (5%未満であるべき)
1	31.18	15	968.69	25491.53	25654.06	0.63
2	23.39	10	510.79	15411.63	15705.6	1.87
3	27.79	10	3992.88	34732.28	35161.34	1.22
平均	27.45	11.67	1824.12	25211.81	25507	1.24
SD	3.91	2.89	1892.1	9663.36	9728.7	0.62