(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2008-537595
(P2008-537595A)
(43)公表日　平成20年9月18日(2008.9.18)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	N	4C084
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02		
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	45/00		
A61P 25/00	(2006.01)	A61P	25/00		
A61P 29/00	(2006.01)	A61P	29/00	101	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 49 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2008-505451 (P2008-505451)
(86)(22)出願日　平成18年4月4日 (2006.4.4)
(85)翻訳文提出日　平成19年11月30日 (2007.11.30)
(86)国際出願番号　PCT/US2006/012493
(87)国際公開番号　WO2006/107962
(87)国際公開日　平成18年10月12日 (2006.10.12)
(31)優先権主張番号　60/668,404
(32)優先日　平成17年4月4日 (2005.4.4)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　504370427
バイオジェン　アイデック　エムエイ　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１４２、ケンブリッジ、ケンブリッジ　センター　１４
(71)出願人　399013971
エラン　ファーマシューティカルズ，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０８０，サウス　サンフランシスコ，ゲイトウェイ　ブールバード　８００
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】治療タンパク質に対する免疫反応を評価するための方法および生成物

(57)【要約】
本発明は、治療タンパク質により処置された被験体における臨床的に有意な免疫反応を特定するための方法及び産物に関する。本発明の第１の態様は、治療量のＶＬＡ４結合抗体（例えば、ナタリズマブ）により処置された被験体における臨床的に有意な免疫反応を特定するための方法及び組成物に関する。本発明の第２の態様は、治療タンパク質に対する抗体の力価を測定するための試料収集（例えば、２つの異なる時点における少なくとも２つの試料の収集）の経時的詳細に関する。本発明の第３の態様は、この対照抗体力価の標準偏差の２倍に増大した未処置患者の抗体力価に対応する臨界閾値レベルの選択に関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
被験体におけるＶＬＡ－４結合抗体に対する臨床的に有意な免疫反応を検出する方法であって、ＶＬＡ－４結合抗体が投与されている被験体の生物学的試料が、前記ＶＬＡ－４結合抗体に結合する可溶性抗体の臨床的に有意な閾値レベルを含むかどうかを決定することを含み、前記可溶性抗体の少なくとも前記閾値レベルの存在により、前記ＶＬＡ－４結合抗体に対する臨床的に有意な免疫反応が示される、方法。
【請求項２】
前記ＶＬＡ－４結合抗体に対する臨床的に有意な免疫反応が、異なる時点に前記被験体から採取される少なくとも２つの生物学的試料における前記ＶＬＡ－４結合抗体に対する可溶性抗体の少なくとも前記閾値レベルの存在によって示される、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記時点が、少なくとも１ヶ月の間隔が空いている、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記ＶＬＡ－４結合抗体に結合する可溶性抗体の少なくとも前記閾値レベルが、２つの連続する時点に前記被験体から採取される２つの生物学的試料に存在する、請求項２に記載の方法。
【請求項５】
前記ＶＬＡ－４結合抗体に結合する可溶性抗体のレベルが、
前記ＶＬＡ－４結合抗体に対する可溶性結合活性のレベルを前記生物学的試料の第１アリコートで決定すること；及び
前記可溶性結合活性が前記ＶＬＡ－４結合抗体に対して特異的であるかどうかを決定すること
によって決定される、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
前記可溶性結合活性の特異性が前記生物学的試料の第２アリコートで決定される、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記生物学的試料における、前記ＶＬＡ－４結合抗体に結合する可溶性抗体のレベルが、２種類以上の異なる量の非標識ＶＬＡ－４結合抗体の存在下で測定した標識ＶＬＡ－４結合抗体に対する結合活性のレベルを比較することによって決定される、請求項１に記載の方法。
【請求項８】
前記生物学的試料における、前記ＶＬＡ－４結合抗体に結合する可溶性抗体のレベルが、２種類以上の異なる量の可溶性ＶＬＡ－４結合抗体の存在下で測定した固定化ＶＬＡ－４結合抗体に対する結合活性のレベルを比較することによって決定される、請求項１に記載の方法。
【請求項９】
第１の量の非標識ＶＬＡ－４の存在下で測定した標識ＶＬＡ－４結合抗体に対する結合活性の第１レベルが、第２の量の非標識ＶＬＡ－４結合抗体の存在下で測定した標識ＶＬＡ－４結合抗体に対する結合活性の第２レベルと比較される、請求項７に記載の方法。
【請求項１０】
結合活性の前記第１及び第２レベルが、前記生物学的試料の第１及び第２アリコートで決定される、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記ＶＬＡ－４結合抗体に対する可溶性抗体の量が、架橋ＥＬＩＳＡアッセイを使用して決定される、請求項１に記載の方法。
【請求項１２】
前記ＶＬＡ－４結合抗体に対する結合活性の第１レベルが、前記生物学的試料の第１ア

リコートの第１イムノアッセイで決定され、前記ＶＬＡ－４結合抗体に対する結合活性の第２レベルが、前記生物学的試料の第２アリコートの第２イムノアッセイで決定され、ここで前記第２イムノアッセイには、前記第１イムノアッセイよりも多い量の可溶性非標識ＶＬＡ－４結合抗体が加えられ、前記結合活性の第１レベルが基準レベルよりも高く、結合活性の前記第２レベルが前記結合活性の第１レベルの所定の割合よりも低い場合に、前記ＶＬＡ－４結合抗体に対する可溶性抗体の少なくとも閾値レベルが前記生物学的試料に存在することが示される、請求項１に記載の方法。

【請求項１３】

前記基準レベルが、前記ＶＬＡ－４結合抗体に対する可溶性抗体の基準量について測定した結合活性のレベルである、請求項１２に記載の方法。

【請求項１４】

前記基準量が約５００ｎｇ／ｍｌである、請求項１３に記載の方法。

【請求項１５】

前記ＶＬＡ－４結合抗体が、ＶＬＡ－４に対するヒト化マウスモノクローナル抗体である、請求項１又は１２に記載の方法。

【請求項１６】

前記ＶＬＡ－４結合抗体が、マウス抗体ｍＡｂ　２１．６のヒト化形態である、請求項１５に記載の方法。

【請求項１７】

前記ＶＬＡ－４結合抗体がナタリズマブである、請求項１６に記載の方法。

【請求項１８】

前記第１及び第２イムノアッセイが架橋ＥＬＩＳＡアッセイである、請求項１２に記載の方法。

【請求項１９】

前記第１及び第２アッセイが、固定化した非標識ＶＬＡ－４結合抗体及び可溶性標識ＶＬＡ－４結合抗体を含み、前記可溶性標識ＶＬＡ－４結合抗体が酵素、蛍光マーカー又は放射性マーカーにより標識される、請求項１２に記載の方法。

【請求項２０】

前記第１及び第２イムノアッセイが単一の反応基質における並列反応体積部で行われる、請求項１８又は１９に記載の方法。

【請求項２１】

前記生物学的試料が血清試料である、請求項１又は１２に記載の方法。

【請求項２２】

前記被験体がヒト患者である、請求項１又は１２に記載の方法。

【請求項２３】

前記患者が多発性硬化症を有する、請求項２２に記載の方法。

【請求項２４】

前記患者が関節リウマチを有する、請求項２２に記載の方法。

【請求項２５】

前記患者がクローン病を有する、請求項２２に記載の方法。

【請求項２６】

少なくとも２つ以上の生物学的試料を前記被験体から得る時点が、少なくとも１５日、３０日、４５日又は６０日の間隔が空いている、請求項２に記載の方法。

【請求項２７】

前記ＶＬＡ－４結合抗体に結合する可溶性抗体の閾値レベルが前記被験体の少なくとも２つの前記生物学的試料で決定される場合に、前記被験体のための治療レジメンを選択することを更に含む、請求項２に記載の方法。

【請求項２８】

治療レジメンを選択することが、前記被験体の現在の治療を評価すること、前記被験体のための新しい治療を決定すること、前記被験体の現在の治療を変更すること、又は前記

被験体の現在の治療を中断することを含む、請求項２７に記載の方法。
【請求項２９】
現在の治療が、前記ＶＬＡ－４結合抗体を前記患者に投与することを含む、請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
被験体のための治療レジメンを選択する方法であって、
第１及び第２の時点に、前記ＶＬＡ－４結合抗体に対する陽性免疫反応の存在について、ＶＬＡ－４結合抗体が投与されている患者をアッセイし、前記第１及び第２の時点におけるアッセイ結果に基づいて前記患者のための治療レジメンを選択することを含み、
ある時点における陽性免疫反応の存在が、前記時点に前記被験体から得る生物学的試料における少なくとも臨床的に有意な閾値量の結合活性の存在によって示される、
方法。
【請求項３１】
前記第１及び第２の時点が、臨床的に有意な期間が空いている、請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
前記臨床的に有意な期間が少なくとも３０日である、請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
陰性免疫反応が前記第２の時点で検出される場合に、ＶＬＡ－４結合抗体治療が継続される、請求項３０に記載の方法。
【請求項３４】
陽性免疫反応が前記第１及び第２の両方の時点で検出される場合に、ＶＬＡ－４結合抗体治療以外の治療が選択される、請求項３０に記載の方法。
【請求項３５】
前記被験体が多発性硬化症を有する、請求項３０に記載の方法。
【請求項３６】
前記被験体がクローン病を有する、請求項３０に記載の方法。
【請求項３７】
前記被験体が関節リウマチを有する、請求項３０に記載の方法。
【請求項３８】
被験体のための治療レジメンを選択する方法であって、被験体から得た少なくとも２つの生物学的試料における、ＶＬＡ－４結合抗体に対する臨床的に有意な免疫反応の存在を検出する工程であって、ここで、前記被験体にはＶＬＡ－４結合抗体が投与されており、少なくとも２つの前記生物学的試料は、少なくとも臨床的に有意な時間を空けた時点に前記被験体から得られる、工程、および少なくとも２つの前記生物学的試料の前記時点に行われた、前記被験体における前記ＶＬＡ－４結合抗体に対する臨床的に有意な免疫反応の検出に基づいて、治療レジメンを選択することを含む、方法。
【請求項３９】
前記試料を前記被験体から得る前記時点の間に空ける前記臨床的に有意な間隔が、少なくとも１５日、３０日、４５日又は６０日である、請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
治療レジメンを選択することが、前記被験体の現在の治療を評価すること、前記被験体のための新しい治療を決定すること、前記被験体の現在の治療を変更すること、又は前記被験体の現在の治療を中断することを含む、請求項３８に記載の方法。
【請求項４１】
現在の治療が、前記ＶＬＡ－４結合抗体を前記患者に投与することを含む、請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
ＶＬＡ－４結合抗体に対する臨床的に有意な免疫反応の存在を検出することが、
ＶＬＡ－４結合抗体が投与されている被験体の生物学的試料が、前記ＶＬＡ－４結合抗

体に結合する可溶性抗体の閾値レベルを含むかどうかを決定することを含み、前記可溶性抗体の少なくとも前記閾値レベルの存在により、前記ＶＬＡ－４結合抗体に対する臨床的に有意な免疫反応が示される、
請求項３８に記載の方法。
【請求項４３】
前記ＶＬＡ－４結合抗体に結合する可溶性抗体の少なくとも前記閾値レベルが、２つの連続する時点に前記被験体から採取される２つの生物学的試料に存在する、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記ＶＬＡ－４結合抗体に結合する可溶性抗体のレベルが、
前記ＶＬＡ－４結合抗体に対する可溶性結合活性のレベルを前記生物学的試料の第１アリコートで決定すること；及び
前記可溶性結合活性が前記ＶＬＡ－４結合抗体に対して特異的であるかどうかを決定すること
によって決定される、請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
前記可溶性結合活性の特異性が前記生物学的試料の第２アリコートで決定される、請求項４４に記載の方法。
【請求項４６】
前記生物学的試料における、前記ＶＬＡ－４結合抗体に結合する可溶性抗体のレベルが、２種類以上の異なる量の非標識ＶＬＡ－４結合抗体の存在下で測定した標識ＶＬＡ－４結合抗体に対する結合活性のレベルを比較することによって決定される、請求項４２に記載の方法。
【請求項４７】
前記生物学的試料における、前記ＶＬＡ－４結合抗体に結合する可溶性抗体のレベルが、２種類以上の異なる量の可溶性ＶＬＡ－４結合抗体の存在下で測定した固定化ＶＬＡ－４結合抗体に対する結合活性のレベルを比較することによって決定される、請求項４２に記載の方法。
【請求項４８】
第１の量の非標識ＶＬＡ－４の存在下で測定した標識ＶＬＡ－４結合抗体に対する結合活性の第１レベルが、第２の量の非標識ＶＬＡ－４結合抗体の存在下で測定した標識ＶＬＡ－４結合抗体に対する結合活性の第２レベルと比較される、請求項４７に記載の方法。
【請求項４９】
結合活性の前記第１及び第２レベルが、前記生物学的試料の前記第１及び第２アリコートで決定される、請求項４８に記載の方法。
【請求項５０】
前記ＶＬＡ－４結合抗体に対する可溶性抗体の量が、架橋ＥＬＩＳＡアッセイを使用して決定される、請求項４２に記載の方法。
【請求項５１】
前記ＶＬＡ－４結合抗体に対する結合活性の第１レベルが、前記生物学的試料の第１アリコートの第１イムノアッセイで決定され、前記ＶＬＡ－４結合抗体に対する結合活性の第２レベルが、前記生物学的試料の第２アリコートの第２イムノアッセイで決定され、ここで前記第２イムノアッセイには、前記第１イムノアッセイよりも多い量の可溶性非標識ＶＬＡ－４結合抗体が加えられ、結合活性の前記第１レベルが基準レベルよりも高く、結合活性の前記第２レベルが結合活性の前記第１レベルの所定の割合よりも低い場合に、前記ＶＬＡ－４結合抗体に対する可溶性抗体の少なくとも閾値レベルが前記生物学的試料に存在することが示される、請求項４２に記載の方法。
【請求項５２】
前記基準レベルが、前記ＶＬＡ－４結合抗体に対する可溶性抗体の基準量について測定した結合活性のレベルである、請求項５１に記載の方法。

【請求項５３】
前記基準量が約５００ｎｇである、請求項５２に記載の方法。
【請求項５４】
前記ＶＬＡ－４結合抗体が、ＶＬＡ－４に対するヒト化マウスモノクローナル抗体である、請求項３８に記載の方法。
【請求項５５】
前記ＶＬＡ－４結合抗体が、マウス抗体ｍＡｂ　２１．６のヒト化形態である、請求項５４に記載の方法。
【請求項５６】
前記ＶＬＡ－４結合抗体がナタリズマブである、請求項５５に記載の方法。
【請求項５７】
前記第１及び第２イムノアッセイが架橋ＥＬＩＳＡアッセイである、請求項５１に記載の方法。
【請求項５８】
前記第１及び第２アッセイが、固定化した未標識ＶＬＡ－４結合抗体及び可溶性標識ＶＬＡ－４結合抗体を含み、前記可溶性標識ＶＬＡ－４結合抗体が酵素、蛍光マーカー又は放射性マーカーにより標識される、請求項５１に記載の方法。
【請求項５９】
前記第１及び第２イムノアッセイが単一の反応基質における並列反応体積部で行われる、請求項５７又は５８に記載の方法。
【請求項６０】
前記生物学的試料が血清試料である、請求項３８に記載の方法。
【請求項６１】
前記被験体がヒト患者である、請求項３８に記載の方法。
【請求項６２】
前記患者が多発性硬化症を有する、請求項６１に記載の方法。
【請求項６３】
前記患者が関節リウマチを有する、請求項６１に記載の方法。
【請求項６４】
前記患者がクローン病を有する、請求項６１に記載の方法。
【請求項６５】
障害を有する患者についてタンパク質治療剤に対する抗体反応の臨床的に有意な閾値レベルを同定する方法であって、
前記障害を有するが、前記薬剤により処置されていない患者の対照集団における抗薬剤抗体のレベルを評価すること；及び
前記対照集団における、抗薬剤抗体の前記レベルを少なくとも２倍上回る標準偏差のレベルを、前記障害を有し、前記薬剤により処置されている患者の抗体反応の臨床的に有意な閾値レベルとして選択すること
を含む、方法。
【請求項６６】
前記タンパク質治療剤が、治療抗体又はその抗原結合フラグメントである、請求項６５に記載の方法。
【請求項６７】
治療タンパク質に対する臨床的に有意な抗体反応を有する患者を同定する方法であって、障害を有し、前記治療タンパク質が投与されている患者から得る生物学的試料における、前記治療タンパク質に特異的に結合する抗体の閾値レベルの存在をアッセイすることを含み、前記閾値レベルは、前記障害を有する患者の対照非処置集団における、前記治療タンパク質に特異的に結合する抗体のレベルを少なくとも２倍上回る標準偏差である、方法。
【請求項６８】

前記タンパク質治療剤が、治療抗体又はその抗原結合フラグメントである、請求項６７に記載の方法。

【請求項６９】

アッセイウェルをナタリズマブにより被覆する工程；

対照試料、スクリーニング試料及び競合試料を個別のアッセイウェルでインキュベートする工程；

ビオチン化されたナタリズマブを前記アッセイウェル内の前記試料に加える工程；及び

前記ビオチン化されたナタリズマブを、西洋ワサビペルオキシダーゼアッセイを使用して検出する工程

を含む、請求項１に記載の方法。

【請求項７０】

０．２５μｇ／ｍｌの濃度のナタリズマブが、前記アッセイウェルを被覆するために使用される、請求項６９に記載の方法。

【請求項７１】

前記競合試料が、可溶性非標識ナタリズマブを約１００μｇ／ｍｌの最終濃度で含有する、請求項６９に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願

本願は、米国特許法第１１９条（ｅ）の下で米国仮特許出願番号第６０／６６８，４０４号（２００５年４月４日出願）からの優先権を主張し、この仮特許出願の全体が参考として本明細書に援用される。

【０００２】

発明の分野

本発明は、治療剤、具体的には、治療タンパク質（例えば、ＶＬＡ－４結合抗体（例えば、ナタリズマブ））に対する免疫反応について患者を評価することに関する。

【背景技術】

【０００３】

発明の背景

現在、様々な生物学的治療剤が、様々な疾患及び障害（例えば、移植片拒絶、白血病、乳癌、関節炎、多発性硬化症及びクローン病等）の処置に利用可能であり、更なるタンパク質系治療剤が数多く開発中である。現在利用可能な生物学的治療薬には、ＡＭＥＶＩＶＥ（登録商標）（アレファセプト）、ＺＥＶＡＬＩＮ（登録商標）（イブリツモマブチウキセタン）、ＯＲＴＨＯＣＬＯＮＥ（登録商標）（ムロモナブ－ＣＤ３）、ＥＮＢＲＥＬ（登録商標）（エタネルセプト）、ＲＥＯＰＲＯ（登録商標）（アブキシマブ）、ＲＩＴＵＸＡＮ（登録商標）（リツキシマブ）、ＳＩＭＵＬＥＣＴ（登録商標）（バシリキシマブ）、ＲＥＭＩＣＡＤＥ（登録商標）（インフリキシマブ）、ＳＹＮＡＧＩＳ（登録商標）（パリビズマブ）、ＨＥＲＣＥＰＴＩＮ（登録商標）（トラスツズマブ）、ＺＥＮＡＰＡＸ（登録商標）（ダクリズマブ）、ＣＡＭＰＡＴＨ（登録商標）（アレムツズマブ）、ＭＹＬＯＴＡＲＧ（登録商標）（ゲムツズマブオゾガミシン）、ＨＵＭＩＲＡ（登録商標）（アダリムマブ）、ＡＶＯＮＥＸ（登録商標）（インターフェロンβ－１ａ）及びＴＹＳＡＢＲＩ（登録商標）（ナタリズマブ）が含まれる。ナタリズマブはα４β１インテグリン（ＶＬＡ－４）に対するヒト化モノクローナル抗体である。ナタリズマブは、α４β１及びα４β７インテグリンのα４サブユニットに結合する。ナタリズマブは、多発性硬化症、クローン病及び関節リウマチを含めた特定の炎症性疾患及び病態の処置に有用である。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００４】

生物学的治療剤に対する免疫反応は様々な臨床予後を有する場合があるため、免疫原性アッセイの開発及び妥当性評価は、生物学的治療剤の分野において極めて重要である。

【課題を解決するための手段】

【０００５】

発明の要旨

本発明は、治療剤、例えば、治療タンパク質（例えば、治療抗体）に対する免疫反応を特定、監視及び／又は評価するための方法及び組成物を提供する。患者が治療剤（例えば、治療タンパク質又は治療抗体）に対する任意の抗体を発達させるという事実は、その治療剤に対する臨床反応と相関する場合もあれば、相関しない場合もある。本発明の種々の態様は、治療剤に対する臨床的に有意な反応を検出するための閾値として使用できる抗体反応の予想外のレベルの発見に一部基づいている。幾つかの実施形態において、閾値レベルは、治療剤が投与されていない患者の統計的分析を使用して予測するよりも高い。臨床的に有意な閾値は一般的に、患者における免疫反応の検出可能な最低レベルよりも高い。例えば、臨床的に有意な閾値レベルは一般的に、陰性対照レベル（例えば、未処置患者集団の平均前処置レベル）を少なくとも２倍上回る標準偏差である。幾つかの実施形態において、本発明の方法で使用されるより高い閾値レベルは、その閾値レベルが、治療剤が投与されていない患者で測定される免疫反応の５％カットオフ（例えば、平均を１．６４５倍上回る標準偏差）に基づく場合に特定されるよりも、偽陽性者が少なくなる。本発明の種々の態様によれば、患者試料における検出可能な免疫反応の存在は、免疫反応が少なくとも所定の閾値レベルに達しない限り、臨床的に有意でない。本発明はとりわけ、治療剤（例えば、治療タンパク質（例えば、治療抗体））に対する抗体反応の臨床的に有意な閾値レベルを同定する方法、並びに治療剤に対する臨床的に有意な抗体反応を有する患者を同定する方法を提供する。本発明は又、被験体における臨床的に有意な抗体を特定するための閾値レベルも一部提供する。本発明の種々の態様によれば、治療剤（例えば、ナタリズマブ）に対する免疫反応は、その免疫反応の大きさが、（例えば、異なる患者群について得られた免疫反応に基づいて）事前に決定することができる閾値レベルに達しない限り、臨床的に有意でない場合がある（例えば、低下した臨床効果との有意な関連性を示さない場合がある）。驚いたことに、本明細書に記載の方法は、処置の前後に各患者から得る試料を比較することに依らず、治療剤に対する検出可能な免疫反応の単なる存在を特定することにも依らない。対照的に、本発明の種々の方法は、治療剤に対する免疫反応の少なくとも閾値レベルを検出することに関しており、この閾値レベルは、免疫反応の検出可能な最低レベルよりも高い場合があり、アッセイでは関連する臨床的有意性を有さない偽陽性者が回避されることもあり、このアッセイの陽性結果は臨床的に有意である。

【０００６】

現在、治療タンパク質に対する臨床的に有意な抗体反応を検出するための一般的に適用される技法又は標準は存在しない。異なる治療タンパク質は異なる種類の抗体を誘導する場合があり、このような抗体の存在は、治療タンパク質の安全性、薬物動態及び／又は効果に影響を及ぼす場合もあれば、及ぼさない場合もある。治療抗体に対する患者の反応を監視する現在の方法は一般的に、各患者の処置の前後における血清抗体のレベルを比較する、検出可能な免疫反応の存在を特定する、並びにその検出可能な免疫反応が安全性、薬物動態及び／又は効果の何れかの問題と相関するかどうかを決定するために患者を評価することを伴う。対照的に、本発明の方法は、臨床的に有意な閾値レベルの反応を検出するためのスクリーニングアッセイを提供することによって、臨床的に有意な免疫反応を有する患者を同定するのに有用である。

【０００７】

本発明によれば、治療剤に対する臨床的に有意な免疫反応は、患者における１つ以上の臨床パラメータ、並びに／或いは治療剤の薬物動態及び／又は効果に影響を及ぼす可能性がある抗体反応である。一般的に、臨床的に有意な免疫反応は、治療剤の効果の低下若しくは効果の喪失、又は治療剤に対する有害反応を示す。例えば、多発性硬化症の場合、治療タンパク質に対する臨床的に有意な免疫反応には、以下の１つ以上が含まれる：（ａ）

患者における再発の回数、重篤度又は割合を低下させる治療剤の効果の喪失、或いはこのような効果の少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％又はそれ以上の低下；（ｂ）総合障害度評価尺度（ＥＤＳＳ）又は多発性硬化症機能複合（ＭＳＦＣ）尺度において身体障害の進行を遅らせる治療剤の効果の喪失、或いはこのような効果の少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％又はそれ以上の低下；（ｃ）脳ＭＲＩでの新しい若しくは新しく拡大したＴ２超強度病変部の数若しくは体積を減少させる、又は脳ＭＲＩでのＴ２超強度病変部体積の増加を減衰する効果の喪失、或いはこのような効果の少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％又はそれ以上の低下；（ｅ）視覚機能を改善する効果の喪失、或いはこのような効果の少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％又はそれ以上の低下；（ｆ）重篤な有害事象（例えば、過敏性反応（例えば、アナフィラキシー））の存在。（ｆ）を除いて、このような反応は、薬剤投与後の所定期間内、例えば、３ヶ月、６ヶ月、９ヶ月又は少なくとも１年以内に評価される。

【０００８】

一態様において、本発明は、治療剤（例えば、治療タンパク質（例えば、治療抗体））に対する抗体反応の臨床的に有意な閾値レベルを同定する方法を提供する。この方法には、（ａ）障害を有する患者の対照集団における抗薬剤抗体のレベルを評価する（例えば、障害を有するが、少なくとも３ヶ月、６ヶ月又はそれ以上の期間にわたって被験体治療剤により処置されていない、少なくとも２名、３名、５名、１０名、２０名、３０名、５０名、１００名又はそれ以上の患者の集団における抗薬剤抗体の平均又は中央レベルを求めること）；及び（ｂ）対照集団における抗薬剤抗体のレベルを少なくとも２倍（例えば、２．５倍、３倍、４倍、５倍又は６倍）上回る標準偏差の閾値レベルを選択することが含まれる。治療剤が投与されている患者（処置患者）における抗薬剤抗体の少なくとも閾値レベルの存在は、処置患者における臨床的に有意な反応と相関する。好ましくは、対照集団における抗薬剤抗体のレベルの特定に使用されるのと同じ検出試薬（例えば、標識抗薬剤抗体）が、処置患者の評価に使用される。一実施形態において、治療剤は、治療抗体、例えば、ヒト化２１．６抗ＶＬＡ－４抗体（例えば、ナタリズマブ）である。一実施形態において、障害は多発性硬化症である。幾つかの実施形態において、障害は、中枢神経系の炎症（例えば、多発性硬化症に加えて又はこれの代わりに、髄膜炎、視神経脊髄炎、神経サルコイドーシス、ＣＮＳ脈管炎、脳炎又は横断脊髄炎）、組織若しくは臓器の移植片拒絶又は移植片対宿主病、急性ＣＮＳ傷害（例えば、脳卒中又は脊髄傷害）；慢性腎臓疾患；アレルギー（例えば、アレルギー性喘息）；１型糖尿病；炎症性腸障害（例えば、クローン病又は潰瘍性大腸炎）；重症筋無力症；線維筋痛；関節炎障害（例えば、関節リウマチ又は乾癬性関節炎）；炎症性／免疫性皮膚障害（例えば、乾癬、白斑、皮膚炎又は扁平苔癬）；全身性エリテマトーデス；シェーグレン症候群；血液癌（例えば、多発性骨髄腫、白血病又はリンパ腫）；固形癌、例えば、（例えば、肺、乳房、前立腺又は脳の）肉腫又は癌腫；又は線維性障害（例えば、肺線維症、骨髄線維症、肝硬変、メサンギウム増殖性糸球体腎炎、半月体形成性糸球体腎炎、糖尿病性腎症又は腎臓間質性線維症）である。幾つかの実施形態において、障害は、α４β１及び／又はα４β７サブユニットの調節を伴う疾患である。

【０００９】

別の態様において、本発明は、治療タンパク質（例えば、治療抗体）に対する臨床的に有意な抗体反応を有する患者を同定する方法を提供する。この方法には、疾患を有し、治療タンパク質が投与されている被験体から得た生物学的試料において、治療タンパク質に特異的に結合する１つ以上の抗体の閾値レベルの存在を特定することが含まれ、この閾値レベルは、対照集団（例えば、障害を有するが、直前の３ヶ月、６ヶ月又はそれ以上の期間内に治療タンパク質が投与されていない患者の集団）における、治療タンパク質に特異的に結合する抗体のレベルを少なくとも２倍（例えば、２．５倍、３倍、４倍、５倍又は６倍）上回る標準偏差である。一実施形態において、治療タンパク質は、治療抗体、例えば、ヒト化２１．６（ＡＮ１００２２６とも称する）抗ＶＬＡ－４抗体（例えば、ナタリ

ズマブ）である。一実施形態において、障害は多発性硬化症である。幾つかの実施形態において、障害は関節リウマチである。特定の実施形態において、障害はクローン病である。一実施形態において、この方法には更に、治療タンパク質に対する臨床的に有意な抗体反応を有するものとしてこのように特定される患者の処置
レジメンを変更することが含まれる。

【００１０】

一態様において、本発明は、被験体から得る生物学的試料において、被験体に投与されたＶＬＡ－４結合治療抗体に特異的に結合する１つ以上の抗体の臨床的に有意なレベルの存在を特定するための方法及び組成物を提供する。本発明の種々の態様には、ＶＬＡ－４結合治療抗体の投与に対する被験体の臨床的に有意な免疫反応を示す、誘導抗体のレベルの検出にＥＬＩＳＡアッセイを使用することが含まれる。一実施形態において、本発明は、ナタリズマブを少なくとも１回服用している被験体のナタリズマブに対する免疫反応を示す、抗ナタリズマブ抗体の臨床的に有意なレベルを特定するための方法及びキットを提供する。

【００１１】

一態様において、本発明は、ＶＬＡ－４結合抗体に対する被験体の免疫反応に基づいて治療レジメンを評価及び／又は変更するための方法を提供する。

【００１２】

本発明の一態様によれば、ＶＬＡ－４結合抗体に対する被験体の臨床的に有意な免疫反応を検出する方法が提供される。これらの方法には、ＶＬＡ－４結合抗体が投与されている被験体の生物学的試料が、ＶＬＡ－４結合抗体に結合する可溶性抗体の臨床的に有意な閾値レベルを含むかどうかを決定することが含まれ、この場合、可溶性抗体の少なくとも閾値レベルの存在により、ＶＬＡ－４結合抗体に対する臨床的に有意な免疫反応が示される。幾つかの実施形態において、ＶＬＡ－４結合抗体に対する臨床的に有意な免疫反応は、異なる時点に被験体から採取される少なくとも２つの生物学的試料における、ＶＬＡ－４結合抗体に対する可溶性抗体の少なくとも閾値レベルの存在によって示される。特定の実施形態において、このような時点は、少なくとも１ヶ月の間隔が空いている。幾つかの実施形態において、ＶＬＡ－４結合抗体に結合する可溶性抗体の少なくとも閾値レベルは、２つの連続する時点に被験体から採取する２つの生物学的試料に存在する。幾つかの実施形態において、ＶＬＡ－４結合抗体に結合する可溶性抗体のレベルは、ＶＬＡ－４結合抗体に対する可溶性結合活性のレベルを生物学的試料の第１アリコートで決定する；及び可溶性結合活性がＶＬＡ－４結合抗体に対して特異的であるかどうかを決定することによって求められる。特定の実施形態において、可溶性結合活性の特異性は、生物学的試料の第２アリコートで求められる。幾つかの実施形態において、生物学的試料における、ＶＬＡ－４結合抗体に結合する可溶性抗体のレベルは、２種類以上の異なる量の非標識ＶＬＡ－４結合抗体の存在下で測定した標識ＶＬＡ－４結合抗体に対する結合活性のレベルを比較することによって求められる（例えば、非標識ＶＬＡ－４結合抗体の非存在下で測定したレベルは、競合量の非標識ＶＬＡ－４結合抗体の存在下で測定したレベルと比較される場合がある）。特定の実施形態において、生物学的試料における、ＶＬＡ－４結合抗体に結合する可溶性抗体のレベルは、２種類以上の異なる量の可溶性ＶＬＡ－４結合抗体の存在下で測定した固定化ＶＬＡ－４結合抗体に対する結合活性のレベルを比較することによって求められる（例えば、可溶性ＶＬＡ－４結合抗体の非存在下で測定したレベルは、競合量の可溶性ＶＬＡ－４結合抗体の存在下で測定したレベルと比較される場合がある）。幾つかの実施形態において、第１の量の非標識ＶＬＡ－４の存在下で測定した標識ＶＬＡ－４結合抗体に対する結合活性の第１レベルは、第２の量の非標識ＶＬＡ－４結合抗体の存在下で測定した標識ＶＬＡ－４結合抗体に対する結合活性の第２レベルと比較される。幾つかの実施形態において、結合活性の第１及び第２レベルは、生物学的試料の第１及び第２アリコートで求められる。特定の実施形態において、ＶＬＡ－４結合抗体に対する可溶性抗体の量は、架橋ＥＬＩＳＡアッセイを使用して求められる。幾つかの実施形態において、ＶＬＡ－４結合抗体に対する結合活性の第１レベルは、生物学的試料の第１アリコ

ートの第１イムノアッセイで決定され、ＶＬＡ－４結合抗体に対する結合活性の第２レベルは、生物学的試料の第２アリコートの第２イムノアッセイで決定され、この場合、第２イムノアッセイには、第１イムノアッセイよりも多い量の可溶性非標識ＶＬＡ－４結合抗体が加えられ、生物学的試料における、ＶＬＡ－４結合抗体に対する可溶性抗体の少なくとも閾値レベルの存在は、結合活性の第１レベルが基準レベルよりも高く、結合活性の第２レベルが結合活性の第１レベルの所定の割合よりも低い場合に示される。特定の実施形態において、基準レベルは、ＶＬＡ－４結合抗体に対する可溶性抗体の基準量について測定した結合活性のレベルである。幾つかの実施形態において、基準量は、ＶＬＡ－４結合抗体に対する可溶性抗体の（例えば、血清試料における）約５００ｎｇ／ｍｌである。例えば、基準量は、約４００ｎｇ／ｍｌ～約６００ｎｇ／ｍｌ（例えば、約４００ｎｇ／ｍｌ、約４２５ｎｇ／ｍｌ、約４５０ｎｇ／ｍｌ、約４７５ｎｇ／ｍｌ、約５００ｎｇ／ｍｌ、約５２５ｎｇ／ｍｌ、約５５０ｎｇ／ｍｌ、約５７５ｎｇ／ｍｌ、又は約６００ｎｇ／ｍｌ）である場合がある。基準量に対応する結合活性の基準レベルは、希釈試料（例えば、１０倍希釈に対応し、ＶＬＡ－４結合抗体に結合する可溶性抗体の約４０ｎｇ／ｍｌ～約６０ｎｇ／ｍｌ（例えば、約５０ｎｇ／ｍｌ）を含有する試料）で測定される場合があることを理解するはずである。アッセイにおける結合活性の基準レベルは、基準量の適切な希釈に対応する、ＶＬＡ－４結合抗体に対する可溶性抗体の所定量により提供される場合がある。特定の実施形態において、ＶＬＡ－４結合抗体は、ＶＬＡ－４に対するヒト化マウスモノクローナル抗体である。幾つかの実施形態において、ＶＬＡ－４結合抗体は、マウス抗体ｍＡｂ　２１．６（例えば、ＡＮ１００２２６）のヒト化形態である。幾つかの実施形態において、ＶＬＡ－４結合抗体はナタリズマブである。幾つかの実施形態において、ＶＬＡ－４結合抗体に対する可溶性抗体は、ナタリズマブに高親和的に結合する基準抗体である。幾つかの実施形態において、基準抗体は、ナタリズマブとＶＬＡ－４の間の相互作用を遮断する。特定の実施形態において、第１及び第２イムノアッセイは架橋ＥＬＩＳＡアッセイである。幾つかの実施形態において、第１及び第２アッセイは、固定化した非標識ＶＬＡ－４結合抗体、及び可溶性標識ＶＬＡ－４結合抗体を含み、この場合、この可溶性標識ＶＬＡ－４結合抗体は、酵素、蛍光マーカー、ビオチンマーカー（例えば、ＶＬＡ－４結合抗体はビオチン化される場合がある）、又は放射性マーカーにより標識される。幾つかの実施形態において、第１及び第２イムノアッセイは、単一の反応基質における並列反応体積部で行われる。幾つかの実施形態において、生物学的試料は血清試料である。特定の実施形態において、被験体はヒト患者である。幾つかの実施形態において、患者は多発性硬化症を有する。幾つかの実施形態において、患者は関節リウマチを有する。特定の実施形態において、患者はクローン病を有する。幾つかの実施形態において、被験体から少なくとも２つ以上の生物学的試料を得る時点は、少なくとも１５日、３０日、４５日、６０日、９０日又はそれ以上の間隔が空いている。特定の実施形態において、この方法には又、ＶＬＡ－４結合抗体に結合する可溶性抗体の臨床的に有意な閾値レベルが、被験体から得る少なくとも２つの生物学的試料に検出される場合に、被験体の治療レジメンを選択することが含まれる。幾つかの実施形態において、治療レジメンを選択することには、被験体の現在の治療を評価する、被験体のための新しい治療を決定する、被験体の現在の治療を変更する、又は被験体の現在の治療を中断することが含まれる。幾つかの実施形態において、現在の治療には、ＶＬＡ－４結合抗体を被験体に投与することが含まれる。

【００１３】

本発明の別の態様によれば、被験体のための治療レジメンを選択する方法が提供される。これらの方法には、第１及び第２の時点に、ＶＬＡ－４結合抗体に対する陽性免疫反応の存在について、ＶＬＡ－４結合抗体が投与されている被験体をアッセイし、第１及び第２の時点におけるアッセイ結果に基づいて被験体のための治療レジメンを選択することが含まれ、この場合、ある時点における陽性免疫反応の存在は、その時点に被験体から得る生物学的試料における少なくとも臨床的に有意な閾値量の結合活性の存在によって示される。幾つかの実施形態において、第１及び第２の時点は、臨床的に有意な期間が空いてい

る。特定の実施形態において、臨床的に有意な期間は少なくとも３０日である。幾つかの実施形態において、第２の時点で陰性免疫反応が検出される場合は、ＶＬＡ－４結合抗体治療が継続される。幾つかの実施形態において、第１及び第２の両方の時点で陽性免疫反応が検出される場合は、ＶＬＡ－４結合抗体治療以外の治療が選択される。幾つかの実施形態において、被験体は多発性硬化症を有する。特定の実施形態において、被験体はクローン病を有する。幾つかの実施形態において、被験体は関節リウマチを有する。

【００１４】

本発明の更に別の態様によれば、被験体のための治療レジメンを選択する方法が提供される。これらの方法には、被験体から得る少なくとも２つの生物学的試料における、ＶＬＡ－４結合抗体に対する臨床的に有意な免疫反応の存在を検出し（この場合、被験体にはＶＬＡ－４結合抗体が投与されており、少なくとも２つの生物学的試料は、少なくとも臨床的に有意な時間を空けた時点に被験体から採取される）、少なくとも２つの生物学的試料が被験体から得られる各時点に行われた、被験体におけるＶＬＡ－４抗体に対する臨床的に有意な免疫反応の検出に基づいて、治療レジメンを選択することが含まれる。幾つかの実施形態において、試料を被験体から得る時点の間に空ける臨床的に有意な間隔は、少なくとも１５日、３０日、４５日、６０日、９０日又はそれ以上である。特定の実施形態において、治療レジメンを選択することには、被験体の現在の治療を評価する、被験体のための新しい治療を決定する、被験体の現在の治療を変更する、又は被験体の現在の治療を中断することが含まれる。幾つかの実施形態において、現在の治療には、被験体にＶＬＡ－４抗体を投与することが含まれる。幾つかの実施形態において、ＶＬＡ－４結合抗体に対する臨床的に有意な免疫反応を検出することは、ＶＬＡ－４結合抗体が投与されている被験体から得る生物学的試料が、ＶＬＡ－４結合抗体に結合する可溶性抗体の閾値レベルを含むかどうかを決定することを含み、この場合、可溶性抗体の少なくとも閾値レベルの存在により、ＶＬＡ－４結合抗体に対する臨床的に有意な免疫反応が示される。特定の実施形態において、ＶＬＡ－４結合抗体に結合する可溶性抗体の少なくとも閾値レベルは、２つの連続する時点に被験体から採取される２つの生物学的試料に存在する。幾つかの実施形態において、ＶＬＡ－４結合抗体に結合する可溶性抗体のレベルは、ＶＬＡ－４結合抗体に対する可溶性結合活性のレベルを生物学的試料の第１アリコートで決定する；及び可溶性結合活性がＶＬＡ－４結合抗体に対して特異的であるかどうかを決定することによって求められる。幾つかの実施形態において、可溶性結合活性の特異性は、同じ生物学的試料の第２アリコートで求められる。特定の実施形態において、生物学的試料における、ＶＬＡ－４結合抗体に結合する可溶性抗体のレベルは、２種類以上の異なる量の非標識ＶＬＡ－４結合抗体の存在下で測定した標識ＶＬＡ－４結合抗体に対する結合活性のレベルを比較することによって求められる（例えば、非標識ＶＬＡ－４結合抗体の非存在下で測定したレベルは、競合量の非標識ＶＬＡ－４結合抗体の存在下で測定したレベルと比較される場合がある）。幾つかの実施形態において、生物学的試料における、ＶＬＡ－４結合抗体に結合する可溶性抗体のレベルは、２種類以上の異なる量の可溶性ＶＬＡ－４結合抗体の存在下で測定した固定化ＶＬＡ－４結合抗体に対する結合活性のレベルを比較することによって求められる（例えば、可溶性ＶＬＡ－４結合抗体の非存在下で測定したレベルは、競合量の可溶性ＶＬＡ－４結合抗体の存在下で測定したレベルと比較される場合がある）。幾つかの実施形態において、第１の量の非標識ＶＬＡ－４の存在下で測定した標識ＶＬＡ－４結合抗体に対する結合活性の第１レベルは、第２の量の非標識ＶＬＡ－４結合抗体の存在下で測定した標識ＶＬＡ－４結合抗体に対する結合活性の第２レベルと比較される。特定の実施形態において、結合活性の第１及び第２レベルは、同じ生物学的試料の第１及び第２アリコートで求められる。幾つかの実施形態において、ＶＬＡ－４結合抗体に対する可溶性抗体の量は、架橋ＥＬＩＳＡアッセイを使用して求められる。幾つかの実施形態において、ＶＬＡ－４結合抗体に対する結合活性の第１レベルは、生物学的試料の第１アリコートの第１イムノアッセイで決定され、ＶＬＡ－４結合抗体に対する結合活性の第２レベルは、生物学的試料の第２アリコートの第２イムノアッセイで決定され、この場合、第２イムノアッセイには、第１イムノアッセイよりも多い量の可溶性非標識ＶＬ

Ａ－４結合抗体が加えられ、生物学的試料における、ＶＬＡ－４結合抗体に対する可溶性抗体の少なくとも閾値レベルの存在は、結合活性の第１レベルが基準レベルよりも高く、結合活性の第２レベルが結合活性の第１レベルの所定の割合よりも低い場合に示される。幾つかの実施形態において、基準レベルは、ＶＬＡ－４結合抗体に対する可溶性抗体の基準量のための測定した結合活性のレベルである。特定の実施形態において、基準量は約５００ｎｇである。幾つかの実施形態において、ＶＬＡ－４結合抗体は、ＶＬＡ－４に対するヒト化マウスモノクローナル抗体である。幾つかの実施形態において、ＶＬＡ－４結合抗体はマウス抗体ｍＡｂ　２１．６のヒト化形態である。幾つかの実施形態において、ＶＬＡ－４結合抗体はナタリズマブである。特定の実施形態において、第１及び第２イムノアッセイは架橋ＥＬＩＳＡアッセイである。幾つかの実施形態において、第１及び第２のアッセイは、固定化した非標識ＶＬＡ－４結合抗体及び可溶性標識ＶＬＡ－４結合抗体を含み、この場合、この可溶性標識ＶＬＡ－４結合抗体は、酵素、蛍光マーカー、ビオチンマーカー（例えば、ＶＬＡ－４結合抗体はビオチン化される場合がある）、又は放射性マーカーにより標識される。幾つかの実施形態において、第１及び第２イムノアッセイは、単一の反応基質における並列反応体積部で（例えば、マルチウェルプレートの個別のウェルにて）行われる。特定の実施形態において、生物学的試料は血清試料である。幾つかの実施形態において、被験体はヒト患者である。幾つかの実施形態において、患者は多発性硬化症を有する。幾つかの実施形態において、患者は関節リウマチを有する。特定の実施形態において、患者はクローン病を有する。

【００１５】

本発明の別の態様によれば、障害を有する患者についてタンパク質治療剤に対する抗体反応の臨床的に有意な閾値レベルを同定する方法が提供される。これらの方法には、（ａ）障害を有するが、薬剤により処置されていない患者の対照集団における抗薬剤抗体のレベルを評価する、及び（ｂ）対照集団における、抗薬剤抗体のレベルを少なくとも２倍上回る標準偏差のレベルを、障害を有し、薬剤により処置されている患者の抗体反応の臨床的に有意な閾値レベルとして選択することが含まれる。幾つかの実施形態において、タンパク質治療剤は、治療抗体又はその抗原結合フラグメントである。

【００１６】

本発明の更に別の態様によれば、治療タンパク質に対する臨床的に有意な抗体反応を有する患者を同定する方法が提供される。これらの方法は、障害を有し、治療タンパク質が投与されている患者から得る生物学的試料における、治療タンパク質に特異的に結合する抗体の閾値レベルの存在をアッセイすることが含まれ、この場合、この閾値レベルは、障害を有する患者の対照非処置集団における、治療タンパク質に特異的に結合する抗体のレベルを少なくとも２倍上回る標準偏差である。幾つかの実施形態において、治療タンパク質は、治療抗体又はその抗原結合フラグメントである。従って、本発明の態様は、ＶＬＡ－４結合抗体が投与されている被験体の生物学的試料が、ＶＬＡ－４結合抗体に結合する可溶性抗体の閾値レベルを含むかどうかを決定することによって、被験体におけるＶＬＡ－４結合抗体に対する臨床的に有意な免疫反応を検出する方法を提供し、この場合、可溶性抗体の少なくとも閾値レベルの存在により、ＶＬＡ－４結合抗体に対する臨床的に有意な免疫反応が示される。

【００１７】

本発明の各制限事項は本発明の種々の実施形態を包含する可能性がある。従って、何れか１つの要素又は要素の組み合わせを伴う本発明の各制限事項が本発明の各態様に含まれる可能性があることが予想される。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１８】

発明の詳細な説明

本発明は、被験体に投与される治療タンパク質（例えば、治療抗体）に対する免疫反応を検出及び監視するための方法、組成物及びキットに一部関する。一態様において、本発明は、治療抗体に対する臨床的に有意な免疫反応を有する患者を同定する方法を提供する

。本発明によれば、検出可能な免疫反応の存在は、免疫反応が臨床的に有意な閾値レベルに達しない限り、臨床的に有意でない。例えば、ナタリズマブの臨床研究において、免疫反応の臨床的に有意な閾値レベルは、驚いたことに、治療剤が投与されていない被験体で測定される免疫反応の対照レベルを１．６４５倍上回る標準偏差（例えば、約２倍を超える標準偏差）であった。

【００１９】

本発明の特定の態様は、被験体に投与されるＶＬＡ－４結合治療抗体に対する臨床的に有意な免疫反応を検出する方法に関する。本発明の態様は、ＶＬＡ－４結合抗体を少なくとも１回（例えば、１回の治療量）服用している被験体における免疫反応を検出及び監視するのに特に有用である。本発明の態様には、ＶＬＡ－４結合治療抗体に対する臨床的に有意な免疫反応を有する被験体を特定及び／又は監視する、免疫反応を評価する、並びに／或いは適切な臨床処置（例えば、特定の治療レジメン）を免疫反応の性質及び／又は程度に基づいて決定することが含まれる。ＶＬＡ－４結合抗体の投与に対する被験体の反応に関する情報は、被験体のための治療レジメンを調節、設計及び／又は最適化するのに使用される場合がある。従って、本発明の一態様は、ＶＬＡ－４結合治療抗体に対する臨床的に有意な免疫反応を有する被験体を特定することに関する。本発明の別の態様は、ＶＬＡ－４結合治療抗体に対する被験体の免疫反応を監視することに関する。本発明の更なる態様は、特定の疾患（例えば、多発性硬化症、クローン病又は関節リウマチ等）の処置に適切な治療方針を、ＶＬＡ－４結合治療抗体に対する被験体の免疫反応に基づいて決定することに関する。

【００２０】

ＶＬＡ－４結合抗体は、炎症を伴う幾つかの疾患及び障害の処置に使用される場合がある。このような障害には、例えば、中枢神経系の炎症（例えば、多発性硬化症に加えて、髄膜炎、視神経脊髄炎、神経サルコイドーシス、ＣＮＳ脈管炎、脳炎、及び横断脊髄炎）、組織若しくは臓器の移植片拒絶又は移植片対宿主病、急性ＣＮＳ傷害（例えば、脳卒中又は脊髄傷害）；慢性腎臓疾患；アレルギー（例えば、アレルギー性喘息）；１型糖尿病；炎症性腸障害（例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎）；重症筋無力症；線維筋痛；関節炎障害（例えば、関節リウマチ、乾癬性関節炎）；炎症性／免疫性皮膚障害（例えば、乾癬、白斑、皮膚炎、扁平苔癬）；全身性エリテマトーデス；シェーグレン症候群；血液癌（例えば、多発性骨髄腫、白血病、リンパ腫）；固形癌、例えば、（例えば、肺、乳房、前立腺又は脳の）肉腫又は癌腫；及び線維性障害（例えば、肺線維症、骨髄線維症、肝硬変、メサンギウム増殖性糸球体腎炎、半月体形成性糸球体腎炎、糖尿病性腎症及び腎臓間質性線維症）が含まれる。幾つかの実施形態において、障害は、α４β１及び／又はα４β７サブユニットの調節によってもたらされる疾患である。

【００２１】

一実施形態において、ＶＬＡ－４結合抗体は、マウスｍＡｂ　２１．６のヒト化型（例えば、ナタリズマブ）である。従って、本発明の種々の態様は、ナタリズマブに対する被験体の反応を評価すること、並びにナタリズマブによる処置が可能な多発性硬化症及びその他の炎症性病態又は疾患に適切な処置を決定することに関する。

【００２２】

本発明は、被験体におけるＶＬＡ－４結合抗体（例えば、マウスｍＡｂ　２１．６のヒト化型（例えば、ナタリズマブ）、即ちＡＮ１００２２６）に対する免疫反応を特定する、及び反応が臨床的に有意であるかどうかを決定することに一部関する。

【００２３】

本明細書で使用される、「（免疫反応を有する被験体を）特定する」とは、被験体における免疫反応の存在を検出又は診断することを意味する。従って、臨床的に有意な免疫反応を有する被験体を特定することは、被験体における臨床的に有意な免疫反応の存在を検出又は診断することを意味する。

【００２４】

本明細書で使用される、「（治療タンパク質に対する抗体反応の」臨床的に有意な閾値

」とは、対照基準レベルを少なくとも２倍上回る標準偏差である。一実施形態において、治療タンパク質に対する臨床的に有意な免疫反応の閾値レベルは、対照レベルを３倍～６倍（例えば、約４倍又は５倍）上回る標準偏差である場合がある。対照レベルは、治療タンパク質にさらされる前の患者集団（例えば、疾患又は病態（例えば、多発性硬化症、クローン病又は関節リウマチ）を有する被験体の集団）に存在する結合活性の平均又は中央レベルである場合がある。一実施形態において、抗ナタリズマブ抗体の臨床的に有意な閾値は、５００ｎｇ／ｍｌの患者血清である（例えば、１０倍希釈血清のアッセイにおける５０ｎｇ／ｍｌの閾値）。

【００２５】

本明細書で使用される免疫反応とは、治療タンパク質を結合する１つ以上の抗体の被験体におけるレベルの増大によって特徴付けられる、治療タンパク質に対する免疫原性反応である。従って、免疫反応は、治療タンパク質、例えば、ＶＬＡ－４結合抗体（例えば、ナタリズマブ）を認識し（例えば、特異的に認識し）、それに結合する可溶性抗体のレベル増大の誘導によって特徴付けられる場合がある。一般的な免疫反応はポリクローナルであり、これには、治療タンパク質に対する異なる親和性（従って、異なる程度の特異性）を有する抗体が含まれる場合がある。従って、本発明の種々の方法は、被験体に投与された治療タンパク質（例えば、ＶＬＡ－４結合抗体）に結合する１つ以上の誘導抗体の被験体における存在を検出することを伴う場合がある。幾つかの実施形態において、誘導抗体は、生物学的試料（例えば、血清試料）に存在する可溶性抗体として検出される場合がある。

【００２６】

本発明の種々の態様は、患者から得る生物的試料における結合活性の臨床的に有意な閾値レベルを検出するためのアッセイに関する。この閾値レベルとは、それよりも低い場合に検出可能な結合活性が臨床的に有意でないと見なされるレベルを表す。本明細書で使用される「結合活性」とは、生物学的試料で検出される、治療タンパク質への結合量を示す。本明細書に記載の通り、生物学的試料における結合活性の存在は、治療タンパク質の投与に対するポリクローナル反応を反映する場合がある。従って、結合量は、タンパク質に対する異なる親和性を有する異なる抗体による結合の凝集を反映する場合がある。特定の実施形態においては、結合のレベルが、治療タンパク質に対する特異的な抗体の存在のためであるか、又はその他の因子（例えば、リウマチ因子）のためであるかを、より強い自身をもって決定するために、結合活性が更に分析される。結合活性の特異性は、本明細書に記載の通り競合アッセイで評価される場合がある。

【００２７】

本発明の一態様において、被験体から得る１つ以上の試料が本発明のアッセイで陽性であると試験される場合にのみ、被験体は陽性として（即ち、治療タンパク質に対する臨床的に有意な免疫反応を有するものとして）特定される。陽性試験結果は、被験体から得る試料が、治療タンパク質（例えば、ＶＬＡ－４結合抗体）に対する少なくとも臨床的に有意な閾値レベルの結合活性を含有する時に、求められる。驚いたことに、治療抗体に対する任意の検出可能な免疫反応の存在は、臨床的に有意でない。本発明によれば、治療抗体に対する免疫反応のレベルを検出するために患者をスクリーニングする方法では、多くの偽陽性患者が特定されることから、臨床的に有意な免疫反応を有さない患者の不必要な追加の臨床モニタリング及び潜在的な懸念事項を生じることになる。例えば、治療抗体が投与されていない被験体に存在する結合活性の平均レベルを１．６４５倍上回る標準偏差よりも高い、治療抗体に対する免疫反応に基づいて、患者が陽性であると特定される場合には、極めて多くの偽陽性者が検出される。本発明によれば、１．６４５倍の標準偏差のカットオフを使用した理論上の５％の偽陽性率は、偽陽性者数の過小評価となる。何故なら、この５％は、任意の免疫反応の偽検出率を表すものであり、臨床的に有意な免疫反応の偽陽性率を表していないためである。驚いたことに、カットオフレベル（それよりも低い場合に反応が陰性であると見なされるレベル）を、対照基準レベルを１．６４５倍上回る標準偏差にまで上げることによって、臨床的に有意な免疫反応を有する被験体の特定に影

響を及ぼすことなく、偽陽性者数は減少する。この閾値は、臨床的に有意な免疫反応を有する患者の許容される検出率をもたらすレベルで設定されなければならないことが理解されるはずである。従って、たとえ、臨床的に有意な閾値が、免疫前の基準レベルを１．６４５倍上回る標準偏差のレベルよりも高く設定されなければならないとしても、閾値は、実際の陽性者の検出効率を低下させるほど高く設定してはならない。

【００２８】

本発明の一態様において、被験体から得る試料が本発明のアッセイで陽性であると試験されない場合、例えば、被験体から得る試料が抗体反応の臨床的に有意な閾値レベルに達しない場合は、被験体の免疫反応が陰性として分類される場合がある。対照的に、単一のアッセイにおける結合活性の陽性レベル（臨床的に有意な閾値レベルの、又はこのレベルを超えるレベル）に基づき被験体が陽性として特定される場合、患者は「一時的な」又は「永続的な」陽性者の何れとなる場合がある。一時的な陽性者とは、指定期間の間に治療抗体に対する陽性免疫反応を有し、その期間の後に陰性になる患者である。対照的に、永続的な陽性者とは、指定期間よりも長い期間にわたって免疫反応の臨床的に有意なレベルが陽性である患者である。「一時的」及び「永続的」とは相対的な用語であることが理解されるはずである。従って、患者が、臨床的に有意な時間を隔てた２つ以上の時点で（例えば、３、４、５、６、７、８、９、１０又はそれ以上の時点で）免疫反応が陽性であると試験された場合、患者は永続的として最初に分類される場合がある。しかしながら、患者がその後のアッセイで免疫反応が陰性であると試験された場合、患者はその後一時的として再分類される場合がある。臨床的に有意な時間間隔は、少なくとも１週間、１ヶ月、１年又はそれ以上である場合がある。例えば、閾値の時間間隔は、３０日～１８０日、約６０日、約４２日等である場合がある。一時的な免疫反応の存在により、治療効果の一時的な低下が示される場合がある。永続的な免疫反応の存在により、永続的に低下した治療効果が示される場合がある。従って、一時的又は永続的な免疫反応の存在が臨床的に関係する場合があり、一時的な陽性又は永続的な陽性として特定される被験体における治療レジメンの性質に影響を及ぼす場合がある。永続的な免疫反応では、被験体の治療レジメンの変更が必要となる場合がある。

【００２９】

本明細書で使用される「治療レジメン」という用語は、被験体の１クールの処置を意味する。治療レジメンには、医薬品の投与及び／又は治療の適用が含まれる場合がある。レジメンの選択には、服用量、服用時期、服用頻度、処置期間、１つ以上の医薬品又は治療との併用治療、並びに医学及び治療の業者によって使用される処置決定のその他何れかの態様の選択が含まれる場合がある。治療レジメンには又、疾患又は障害の防止又は処置のために被験体に施される、又は被験体に使用される治療（例えば、手技又はデバイス）の使用が含まれる場合もある。治療手技の例には、限定することを意図するわけではないが、医療デバイス又は手術の使用が含まれる。従って、ＶＬＡ－４結合抗体による治療レジメンを決定又は変更することには、被験体に投与されるＶＬＡ－４結合治療抗体の服用量、投与頻度、投与経路、処置期間（例えば、施される服用回数）；ＶＬＡ－４結合抗体処置を１つ以上の追加の処置と組み合わせるか否か；ＶＬＡ－４結合抗体処置を中断するか否か；異なるＶＬＡ－４結合抗体を使用するか否か、及び／又はＶＬＡ－４結合抗体の組み合わせを使用するか否か等を伴う場合がある。一実施形態において、本発明は、ＶＬＡ－４結合抗体に代わる治療薬を使用するかどうか、例えば、β－インターフェロンを使用するか否かを決定することを伴う場合がある。

【００３０】

本発明の種々の態様は、ヒト（例えば、ヒト患者）におけるＶＬＡ－４結合抗体に対する免疫反応を検出及び／又は監視することに関する。従って、本明細書で使用される被験体とは、ヒト被験体である場合がある。被験体は、炎症性疾患又は病態を有するヒト患者である場合がある。被験体は、ＶＬＡ－４結合抗体（例えば、ナタリズマブ）を少なくとも１回服用している患者である場合がある。被験体は、ＶＬＡ－４結合抗体（例えば、ナタリズマブ）により長期間処置されている（又は長期間処置された）患者である場合があ

る。被験体は、ＶＬＡ－４結合抗体（例えば、ナタリズマブ）により繰り返し処置されている（又は繰り返し処置された）患者である場合がある。本明細書で使用される「長期間の処置」は、（例えば、炎症性疾患又は病態の症状を長期間にわたって抑制又は管理するために）ＶＬＡ－４結合抗体を長期間にわたって投与することを伴う場合がある。対照的に、反復処置は、（例えば、炎症性疾患の症状が悪化又は「突発」した時にそれらの症状を処置するために）必要に応じてＶＬＡ－４結合抗体による１クールの処置（例えば、一定期間の投与）を繰り返すことを伴う場合がある。一実施形態において、患者は、被験体が初めてＶＬＡ－４結合治療抗体により再処置される時、反復処置を受けていると見なされる。被験体は又、ＶＬＡ－４結合抗体による処置との組み合わせた、又はＶＬＡ－４結合抗体による処置とは別個の治療又は手技による処置を受ける又は受けている場合もあることが当業者によって理解されるであろう。本発明の態様はヒト被験体に限定されないことが理解されるはずである。従って、被験体は、非ヒト霊長類、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、齧歯類又は他の非ヒト被験体である場合がある。

【００３１】

免疫反応の特定及び／又は監視

一態様において、本発明は、被験体におけるＶＬＡ－４結合抗体に対する免疫反応を特定及び／又は監視することを伴う。特定の実施形態において、特定及び／又は監視することが、被験体から得る生物学的試料（好ましくは、血液）を、本明細書に記載の通り、投与されたＶＬＡ－４結合抗体に結合する誘導抗体の存在についてアッセイすることによって行われる。

【００３２】

本発明の一態様においては、被験体から得る生物学的試料で定性アッセイが行われ、生物学的試料が、閾値量よりも多い量でＶＬＡ－４結合抗体に対する抗体を含有する場合に、免疫反応の存在が特定される。一実施形態において、閾値量は、それを超える場合に免疫反応が臨床的に関連するものとして特定される量であり、例えば、閾値レベルは本明細書に記載の通り決定される。臨床的に関連する免疫反応が臨床的意義を有する場合があり、例えば、投与されたＶＬＡ－４結合抗体の投薬量が変更されなければならないかどうかを決定するために、又は患者の他の生理学的パラメータが監視されなければならないかどうかを決定するために、又は免疫反応についての更なるアッセイが行われなければならないかどうかを決定するために、又は何らかの代替的工程若しくは更なる工程が、被験体を処置若しくは監視するために取られなければならないかどうかを決定するために、又はその他のために、被験体が評価されなければならないことを示す。臨床的に関連する免疫反応は、１つ以上のその他の要因と共に評価される場合がある。臨床的に関連する免疫反応の特定は、それ自体、患者の治療又は処置療法の変更を必要としないことが理解されるはずである。

【００３３】

本発明の別の態様において、被験体に投与されたＶＬＡ－４結合抗体に対する抗体の量（例えば、抗体力価）を定量するために、生物学的試料で定量アッセイが行われる場合がある。定量結果は又、免疫反応が臨床的に有意な閾値レベルを超えているかどうかを決定するために分析される場合もある。

【００３４】

本発明によれば、ＶＬＡ－４結合抗体（例えば、ナタリズマブ）に対する免疫反応は、異なる時点に被験体から得る試料でアッセイを行うことにより、被験体にて経時的に評価される場合がある。このような多角的評価法では、ＶＬＡ－４結合抗体に対する被験体の免疫反応の監視が可能であり、ＶＬＡ－４結合治療抗体による療法を被験体の治療上の要求に合わせて個別に調節できる場合がある。例えば、被験体から試料を得て、被験体に投与されているＶＬＡ－４結合抗体に対する免疫反応を試験する場合があり、その後第２の時点で、別の試料をその被験体から得て、同様に試験する場合がある。所定の時間間隔での逐次的な測定による経時的な被験体の試料における抗体反応の存在の検出及び確認は、ＶＬＡ－４結合治療抗体の処置に対する免疫反応の監視を可能にする。投与されたＶＬＡ

－４結合抗体に対する免疫反応の検出及び監視は又、被験体の全体的な処置における調節を、例えば、ＶＬＡ－４結合抗体の処置を調節すること（例えば、変更又は一時中断すること）によって、及び／又は更なる治療（例えば、被験体の免疫反応を調節する治療）を調節することによって可能にする。

【００３５】

治療レジメンの選択又は調節は、ＶＬＡ－４結合抗体が投与されている被験体から異なる時点に得られる少なくとも２つの試料におけるＶＬＡ－４結合抗体に対する臨床的に有意な免疫反応を明らかにすることに基づく場合がある。ＶＬＡ－４結合抗体に対する被験体の臨床的に有意な免疫反応を明らかにすることにより、特定の医薬用薬剤及び／又は治療を被験体に施すことを開始、継続、調節又は停止することが有益であることを示す場合がある。例えば、被験体から得る少なくとも２つの生物学的試料におけるＶＬＡ－４結合抗体に対する臨床的に有意な免疫反応を明らかにすることは、現在の治療レジメンの一部として被験体に投与される医薬用薬剤の服用量を変更するための基礎となる場合がある。処置は、更なる医薬用薬剤又は治療を含める、或いは現在施されている薬剤又は治療の服用を増減させるために変化させる場合がある。例えば、被験体におけるＶＬＡ－４結合抗体に対する免疫反応を特定することにより、免疫抑制的な医薬用薬剤等による処置を開始又は継続することが示唆される場合がある。幾つかの実施形態において、最初の治療レジメンは、ＶＬＡ－４結合抗体により処置されている被験体から得る１つの生物学的試料におけるＶＬＡ－４結合抗体に対する最初の免疫反応を明らかにすることに基づいて選択される場合がある。選択を行い、選択した治療レジメンを施した後、被験体から得る１つ以上のその後の生物学的試料におけるＶＬＡ－４結合抗体に対する免疫反応をその後明らかにする場合があり、これにより治療レジメンを調節するための基礎を得る場合がある。

【００３６】

異なる時点に被験体から得る２つ以上の生物学的試料におけるＶＬＡ－４結合抗体に対する臨床的に有意な免疫反応の決定は、ＶＬＡ－４結合抗体治療に対する被験体における免疫反応の開始、進行又は退行を評価又は測定するために比較されてもよい。被験体におけるＶＬＡ－４結合抗体に対する免疫反応の開始は、ＶＬＡ－４結合抗体に結合する少なくとも１つの抗体のレベルの増大によって特徴付けられる場合があり、被験体における１つ以上の生理学的変化又は症状の開始を伴う場合がある。ＶＬＡ－４結合治療抗体に対する免疫反応の進行は、ＶＬＡ－４結合治療抗体に結合する少なくとも１つの抗体のレベルにおける更なる増大によって特徴付けられる場合がある。しかしながら、免疫反応の進行には、少なくとも１つの更なる抗体のレベルにおける増大、及び／又は免疫反応の開始と共に増大した抗体の少なくとも１つのレベルにおける減少を伴う場合がある。例えば、最初の免疫反応が主としてＩｇＭ反応である場合がある。免疫反応が進行するに従い、優勢な抗体がＩｇＭ抗体からＩｇＧ抗体に切り替わる場合がある。免疫反応の進行には又、最初の生理学的変化又は症状の１つ以上の進行（例えば、増大、低下又は変更）、或いは１つ以上の更なる生理学的変化又は症状の開始が付随する場合もある。ＶＬＡ－４結合治療抗体に対する被験体における免疫反応の退行は、ＶＬＡ－４結合治療抗体に結合する１つ以上の抗体のレベルの低下によって特徴付けられる場合がある。免疫反応の退行には又、幾つかの生理学的変化又は症状の低下が付随する場合がある。しかしながら、ＶＬＡ－４結合治療抗体に対する免疫反応の開始、進行及び／又は退行は、抗体レベルにおける検出可能なレベルとは異なって、臨床的に無症候性である場合があることが理解されるはずである。

【００３７】

ＶＬＡ－４結合抗体に対する臨床的に有意な免疫反応の進行及び退行は一般的に、経時的な被験体の試料における、ＶＬＡ－４結合抗体と結合する抗体のレベルの増大又は低下によってそれぞれ示される場合がある。例えば、ＶＬＡ－４結合抗体と特異的に結合する抗体又は抗体の臨床的に有意なレベルが、被験体の第１試料に存在することが明らかにされず、ＶＬＡ－４結合抗体と特異的に結合する抗体の臨床的に有意な閾値が、被験体の第２又はその後の試料に存在することが明らかにされる場合は、それによって、被験体にお

けるＶＬＡ－４結合抗体に対する免疫反応の開始が示される場合がある。被験体におけるＶＬＡ－４結合抗体に対する免疫反応の進行は、被験体の最初又は前回の試料に存在するレベルに比べて、被験体の第２又はその後の試料における、ＶＬＡ－４結合抗体と特異的に結合する抗体がより高レベルで存在することにより示される場合がある。ＶＬＡ－４結合抗体に対する免疫反応の退行は、被験体の最初又は前回の試料に存在するレベルに比べて、被験体の第２又はその後の試料における、ＶＬＡ－４結合抗体と特異的に結合する抗体がより低レベルで存在することによって示される場合がある。

【００３８】

本発明の一態様において、免疫反応は、ＶＬＡ－４結合治療抗体に対する抗体のレベルが所定の臨床的に有意な閾値を超えているかどうかに基づいて、陽性又は陰性の何れかとして分類される場合がある。幾つかの実施形態において、臨床的に有意な閾値は、免疫前の被験体（即ち、ＶＬＡ－４結合治療抗体の服用を何ら受けていない被験体）において測定された結合活性の平均レベルを１．６４５倍（例えば、２倍、３倍、４倍、５倍又は６倍）上回る標準偏差を超える。幾つかの実施形態において、被験体は健康な被験体であり、特定の実施形態において、被験体は疾患患者（例えば、多発性硬化症、クローン病又は関節リウマチの患者）である。一実施形態において、閾値レベルは１ｍｌの血清当たり０．５マイクログラムを超える。幾つかの実施形態において、閾値レベルは１ｍｌの血清当たり約０．５マイクログラムに等しい。

【００３９】

一実施形態において、ＶＬＡ－４結合抗体が投与されている被験体は、少なくとも３つのカテゴリーの１つに含まれるものとして分類される場合がある。１つのカテゴリーは本明細書で「陰性」と称され、これには、結合活性が臨床的に有意な閾値レベルであるか、又はそれよりも低い被験体（例えば、ＶＬＡ－４結合抗体に対する抗体が、被験体から得る生物学的試料（例えば、血清）において少なくとも約５００ｎｇ／ｍｌの濃度で検出されない被験体）が含まれる。第２のカテゴリーは本明細書で「一時的な陽性」と称され、これには、結合活性が、限られた回数でのみ、例えば、１回、２回、３回、４回、５回の時点で閾値レベルを上回って検出される被験体（例えば、ＶＬＡ－４結合抗体に対する抗体が、最後の時点から少なくとも３０日間隔てたその後の時点では検出されない被験体）が含まれる。第３のカテゴリーは本明細書で「永続的な陽性」と称され、これには、結合活性が、所定の回数で、例えば、最小限の閾値時間の間隔を空けた２回、３回、４回、５回、６回、７回又はそれ以上の時点で閾値レベルを上回って検出される被験体（例えば、ＶＬＡ－４結合抗体に対する抗体が、少なくとも閾値間隔を空けた時点に被験体から得る２個、３個、４個、５個、６個、７個又はそれ以上の生物学的試料において少なくとも約５００ｎｇ／ｍｌの濃度で検出される被験体）が含まれる。幾つかの実施形態において、閾値間隔は、少なくとも約１０日、２０日、３０日、４０日、５０日、６０日、７０日、８０日、９０日又はそれ以上の日数である。「永続的な陽性」である患者は、ＶＬＡ－４抗体治療から効果が喪失する場合がある一方で、「一時的な陽性」の患者は、効果がごく一時的に低下した後に効果が完全に回復する。

【００４０】

陰性被験体は一時的な陽性者になる場合があることが理解されるはずである。又、陽性免疫反応が発達し、指定された数の時点（例えば、少なくとも２つの時点）にわたり持続する場合には、何れかが永続的な陽性者になる場合がある。

【００４１】

一実施形態においては、単一の陽性結果の決定に基づいて治療を変更する場合があり、別の実施形態においては、被験体が一時的な陽性被験体であることの決定に基づいて治療を変更する場合。更に別の実施形態においては、被験体が永続的な陽性被験体であることの決定に基づいて治療を変更する場合がある。

【００４２】

上で考察した通り、一時的及び永続的という用語は相対的な用語であり、永続的な陽性であると思われる患者が後の時点で陰性になる場合があることが、理解されるはずである

。従って、陽性反応を有する患者は、陽性反応の持続、治療の有効性、及び／又は陽性免疫反応の他の臨床的発現の存在を評価するために定期的に監視されなければならない。

【００４３】

本発明によれば、治療効果における低下の危険性（例えば、再発の危険性）が、陽性免疫反応が持続する時間の長さと共に増大する。従って、本発明の一態様において、患者が陽性と試験される回数は、その患者が陽性のままである期間の長さよりも重要でない。一実施形態において、陽性結果がＶＬＡ－４結合治療抗体の最初の３ヶ月以内に検出される場合に、患者は治療効果が低下する危険性（例えば、再発の危険性）があるものとして特定される場合がある。一実施形態において、この危険性は、陽性免疫反応が３ヶ月～６ヶ月にわたって持続する場合に増大し、陽性免疫反応が６ヶ月～９ヶ月にわたって持続する場合に更に増大し、この持続がＶＬＡ－４結合治療抗体の最初の投与から９ヶ月～１２ヶ月にわたる場合に尚更に増大する。１年間を超える持続は、再発の可能性を尚更に増大させることが理解されるはずである。従って、異なる治療レジメンが、永続的に陽性免疫反応を有する患者については適切となる場合がある。しかしながら、永続的に陽性免疫反応が存在する場合でさえ、治療抗体の治療は、その治療が無効になるまで（例えば、実質的に全ての効果の喪失）、又は他の好ましくない臨床的発現を引き起こすまで、中断される必要がないことが理解されるはずである。

【００４４】

幾つかの実施形態において、ＶＬＡ－４結合治療抗体による処置が、閾値レベル未満の免疫反応を有する患者において無効であるか、又は効果を失いつつある場合に、この処置は中断される場合がある。臨床的に有意な免疫反応の非存在下での効果の欠如（又は効果における低下）により、処置が効果的でないことが、治療剤に対する患者の免疫反応以外の１つ以上の要因のためであることを示す場合がある。陽性反応が検出されなければ、患者は一時的な陽性者でない。従って、代わりの処置が検討される場合がある。

【００４５】

結合活性又は抗体レベルは、免疫前の活性又はレベル（即ち、ＶＬＡ－４結合抗体の初回投与前に測定する活性又はレベル）と比較される場合があることが理解されるはずである。しかしながら、免疫前の量との比較は、本明細書で考察される通り必ずしも必要なわけではない。何故なら、臨床的に有意な閾値量（又は閾値を超える量）の結合活性又は抗体レベルが患者の試料に存在する時に、陽性免疫反応が特定される場合があるためである。

【００４６】

アッセイ及び検出方法

本発明の態様によれば、抗体反応の閾値量がアッセイされる。本明細書で考察される通り、定性アッセイが行われる場合がある。或いは、定量アッセイが行われる場合があり、一実施形態において、定量データは定性出力（例えば、抗体の量が閾値量よりも多いかどうか）に変換してもよい。

【００４７】

抗体量又は結合活性が少なくとも閾値量又は閾値の活性であるかどうかの決定には、抗体量又は結合活性を明らかにする任意の好適な方法が使用される場合がある。検出アッセイには、指定の治療タンパク質（例えば、ＶＬＡ－４結合抗体）又はそのフラグメントに特異的に結合する抗体を検出、確認、結合、精製、除去、定量化及び／又はその他の方法で一般的に検出する、何れかの既知の免疫検出方法が含まれる場合がある。例えば、免疫検出法には、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）（標準サンドイッチＥＬＩＳＡ又は架橋ＥＬＩＳＡを含むがこれらに限定されない）、放射イムノアッセイ（ＲＩＡ）、免疫放射測定アッセイ、蛍光イムノアッセイ、化学発光測定、生物発光アッセイ、放射免疫沈殿アッセイ（ＲＩＰＡ）及びウエスタンブロットが含まれ得るが、これらに限定されない。加えて、免疫検出法には、光学センサーに基づく方法（例えば、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ））、又は導波モード共鳴フィルター（ＢＩＮＤ）が含まれ得る。本明細書に示される特定の例は、表面に結合させた固定化ＶＬＡ－４結合抗体を利用するアッセイ（例

えば、ＥＬＩＳＡ）に関連するが、当業者は、幾つかの態様における本発明では、ＶＬＡ－４結合抗体の表面結合を伴わないアッセイ（例えば、フローサイトメトリーアッセイ等）が含まれ得ることを認識する。その他の免疫検出法には、免疫放射測定アッセイ（ＩＲＭＡ）、時間分解蛍光測定法（ＴＲＦ）又は電気化学発光測定法（ＥＣＬ）が含まれ得る。数多くの有用な免疫検出方法が科学的文献（例えば、それぞれが参考として本明細書に組み入れられている、Ｄｏｏｌｉｔｔｌｅ Ｍ Ｈ ａｎｄ Ｂｅｎ－Ｚｅｅｖ ０，１９９９；Ｇｕｌｂｉｓ Ｂ ａｎｄ Ｇａｌａｎｄ Ｐ，１９９３；Ｄｅ Ｊａｇｅｒ Ｒ，ｅｔ．ａｌ．，１９９３；及びＮａｋａｍｕｒａ，ｅｔ．ａｌ．，１９８７）に記載されている。

【００４８】

一態様において、アッセイが、生物学的試料におけるＶＬＡ－４結合抗体についての結合活性の存在を検出するために行われる。一実施形態において、結合活性の特異性は、測定された結合活性がＶＬＡ－４結合抗体に対して特異的であるかどうか、又は測定された結合活性が、生物学的試料に存在する場合がある妨害因子（例えば、リウマチ因子又はその他の結合性因子）によるものであるかどうかを決定することによって評価される場合がある。

【００４９】

本発明の態様には、生物学的試料を、生物学的試料に存在する何らかの結合活性を固定化するための固定化成分と接触させることを伴うアッセイが含まれる場合がある。固定化した結合活性は、検出成分を使用して検出される場合がある。固定化成分及び検出成分はそれぞれ、本明細書に記載の通り、固定化した非標識ＶＬＡ－４結合抗体及び固定化していない標識ＶＬＡ－４結合抗体である場合がある。一実施形態において、固定化成分は、固体基質又は表面（例えば、マルチウェルプレートのウェル、ＥＬＩＳＡプレートの表面等）に結合する場合がある。別の実施形態において、固定化成分は、共有結合性の連結又はその他の連結を介してビーズ（例えば、磁石ビーズ）に結合する場合がある（例えば、固定化成分はビオチン分子にコンジュゲートし、ビオチン－ストレプトアビジン相互作用を介してストレプトアビジンで被覆されたビーズに結合する場合がある）。幾つかの実施形態において、このビーズは、表面又はマトリックスに結合する場合がある。例えば、磁石ビーズは磁石表面に固定化される場合がある。同様に、荷電ビーズは荷電表面（例えば、電極）に固定化される場合がある。

【００５０】

陽性結果は、結合活性の検出された量（例えば、固定化成分によって捕獲される結合活性の量）が所定の閾値を上回っている場合に決定される場合がある。検出された結合活性の特異性は、競合成分をアッセイに含めることによって評価される場合がある。競合成分は、アッセイの固定化及び／又は検出工程と競合させるために含められる場合がある固定化していない非標識ＶＬＡ－４結合抗体である場合がある。競合成分の存在が結合活性を少なくとも所定の割合又はカットオフの分低下させる場合は、その結合活性が特異的であると決定され、陽性結果が確認される。競合成分の存在が結合活性を少なくとも所定の割合又はカットオフの分低下させない場合は、その結合活性が非特異的であると決定され、最初の陽性結果が、この場合、免疫反応の陰性結果であると決定される。

【００５１】

本発明の態様によれば、所定量の固定化成分、検出成分及び／又は競合成分が使用される場合がある。同様に、結合活性の最初の閾値レベルは、ＶＬＡ－４結合抗体に結合することが知られている抗体の所定量を含有する試料を使用して確立される場合がある。例えば、閾値レベルは、１ｍｌのアッセイ当たり１０ｎｇ～１，０００ｎｇ（例えば、約５０ｎｇ又は約５００ｎｇ）の対照抗体を使用して確立される場合がある。閾値レベルの決定に使用される抗体の量により、アッセイの感度が決定される。一般的に、アッセイの感度は、最初の閾値を決定するために使用される抗体量に類似すると見なされる場合がある。対照における結合の量は、閾値を決定するために使用される基準として役立ち得ることが理解されるはずである（例えば、閾値量は、対照において得られるシグナルの倍数値又は

分数値である場合がある）。しかしながら、一実施形態において、対照アッセイで得られたシグナルが閾値量として使用される。アッセイ感度は、対照抗体の親和性及び特異性を含めて、数多くの要因によって影響を受け得ることも又理解しなければならない。

【００５２】

一実施形態において、結合活性の特異性は、結合の閾値レベルを決定するために使用した対照抗体の量と類似する量の競合成分をアッセイに加えることによって評価される場合がある。例えば、アッセイには、１ｍｌのアッセイ当たり約１０ｎｇ～１，０００ｎｇ（例えば、約５０ｎｇ又は約５００ｎｇ）の可溶性非標識ＶＬＡ－４結合抗体が加えられる場合がある。しかしながら、その他の量の競合成分が使用される場合もある。

【００５３】

従って、本発明の幾つかの実施形態において、ＶＬＡ－４結合抗体に対する生物学的試料における結合活性の第１レベルは、生物学的試料の第１アリコートの第１イムノアッセイで決定され、ＶＬＡ－４結合抗体に対する結合活性の第２レベルは、生物学的試料の第２アリコートの第２イムノアッセイで決定され；この場合、第２イムノアッセイには、第１イムノアッセイよりも多い量の可溶性非標識ＶＬＡ－４結合抗体が加えられ；この場合、結合活性の第１レベルが基準レベルよりも高く、結合活性の第２レベルが結合活性の第１レベルの所定の割合よりも低い場合に、ＶＬＡ－４結合抗体に対する可溶性抗体の少なくとも閾値レベルが存在することが示される。

【００５４】

当業者は、種々の方法が、治療抗体（例えば、ＶＬＡ－４結合抗体）により処置されている被験体における免疫反応を評価及び／又は監視するために使用できることを認識する。例えば、上述の通り、単一レベルの「カットオフ」を使用してＶＬＡ－４結合抗体に特異的に結合する抗体の量を決定することによって、評価及び／又は監視が行われる場合がある。本明細書で使用される「（結合の）カットオフレベル」は、そのようなレベルに又はレベルを超えて増大した検出が有意及び／又は陽性と評価されるレベルであり、生物学的試料における可溶性結合活性のレベルの検出が、試料におけるＶＬＡ－４結合抗体に特異的に結合する抗体のレベルを反映する確認のための決定である。他の実施形態においては、被験体の生物学的試料における、ＶＬＡ－４結合抗体に特異的に結合する抗体の力価を決定するために、ＶＬＡ－４結合治療抗体に対する免疫反応の特定が定量的に行われる場合がある。

【００５５】

本発明の一態様において、免疫検出アッセイはＥＬＩＳＡである場合がある。当業者によって理解されるように、用語「ＥＬＩＳＡ」は免疫検出のための数多くのプロトコルを包含する。例えば、ＥＬＩＳＡ法には、サンドイッチＥＬＩＳＡ、架橋ＥＬＩＳＡ等が含まれる。本発明の幾つかの実施形態において、ＥＬＩＳＡイムノアッセイは手作業によるアッセイである。しかしながら、本発明の幾つかの実施形態において、ＥＬＩＳＡの全て又は一部はロボットにより行われる場合がある。

【００５６】

本発明の幾つかの実施形態において、ＥＬＩＳＡアッセイでは、ＶＬＡ－４結合抗体を、ＥＬＩＳＡプレートが被覆される固定化した標的成分として使用することが含まれる。被覆されたＥＬＩＳＡプレートはその後、ＶＬＡ－４結合抗体と特異的に結合する被験体抗体のレベルを決定するために、生物学的試料と接触させる場合がある。本発明の幾つかの実施形態において、生物学的試料の第１アリコートが、固定化した標的ＶＬＡ－４結合抗体に対する結合の閾値量の存在又は非存在を明らかにするために、ＥＬＩＳＡアッセイを使用してアッセイされ、同じ生物学的試料の第２アリコートも又、固定化した標的ＶＬＡ－４結合抗体に対する結合の閾値レベル（又は閾値を超えるレベル）により、ＶＬＡ－４結合抗体に特異的な抗体が示されるか否かを確認するために、ＥＬＩＳＡを使用してアッセイされる。本発明の一態様において、アリコートにおける可溶性結合活性の閾値レベルは、ＶＬＡ－４結合抗体に結合する基準抗体の少なくとも約５０ｎｇ、１００ｎｇ、２００ｎｇ、３００ｎｇ、４００ｎｇ、５００ｎｇ、６００ｎｇ、７００ｎｇ、８００ｎｇ

、９００ｎｇ又は１，０００ｎｇを１ｍｌ当たり含有する対照試料又は基準試料に存在する結合活性のレベルにほぼ等しい。一実施形態において、閾値レベルは、ＶＬＡ－４結合抗体に結合する基準抗体を約５００ｎｇ／ｍｌで含有する対照試料又は基準試料における結合活性のレベルにほぼ等しいとして決定される。基準抗体はポリクローナル又はモノクローナルの何れかである場合がある。基準抗体はマウスの抗ナタリズマブ抗体（例えば、参考として本明細書に組み入れられている、Ｓｈｅｒｅｍａｔａ，ｅｔ．ａｌ．，１９９９，Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ，５２，ｐａｇｅｓ　１０７２－１０７４に記載される１２Ｃ４）である場合がある。本明細書に記載の通り、固定化した標的ＶＬＡ－４結合抗体に対する結合のレベルが少なくとも閾値レベルであり、可溶性結合活性が、ＶＬＡ－４結合抗体に特異的に結合する抗体の結合活性であると決定される場合に、それによって、被験体におけるＶＬＡ－４結合抗体に対する免疫反応が特定される。

【００５７】

一般的に、本発明の方法において有用なＥＬＩＳＡ方法には、生物学的試料を、治療抗体（例えば、ＶＬＡ－４結合抗体（例えば、ナタリズマブ等））が投与されている被験体から得ること、及び試料のアリコートを固定化抗体と接触させることが含まれる場合がある。幾つかの実施形態において、固定化抗体は、被験体に投与された同じＶＬＡ－４結合抗体である場合がある。固定化抗体により、抗体に結合する試料中の分子又は化合物が捕獲され、試料は、捕獲される分子又は化合物と特異的に結合できる、或いは捕獲される分子又は化合物を特異的に検出できる第２の検出成分（例えば、第２標識抗体）と接触させる。複合体と特異的に結合できる、又は複合体を特異的に検出できる成分の例には、種々のマーカーを使用して標識することができる抗体又はその他のリガンド（例えば、当該技術分野で既知の通りビオチン／アビジンのリガンド結合配置）が含まれるが、これらに限定されない。当業者は又、第３標識抗体を使用する場合がある。好ましい実施形態において、第２成分は固定化抗体の標識形態である。

【００５８】

本発明の幾つかの実施形態において、ＥＬＩＳＡアッセイでは、ＶＬＡ－４結合治療抗体を、ＥＬＩＳＡプレートが被覆される固定化した標的成分として使用することが含まれる。被覆されたＥＬＩＳＡプレートはその後、ＶＬＡ－４結合治療抗体と特異的に結合する被験体抗体のレベルを決定するために、生物学的試料と接触させる場合がある。本発明の幾つかの実施形態において、生物学的試料の第１アリコートが、固定化した標的ＶＬＡ－４結合抗体についての結合活性の閾値量の存在又は非存在を明らかにするために、ＥＬＩＳＡアッセイを使用してアッセイされ、同じ生物学的試料の第２アリコートが、固定化した標的ＶＬＡ－４結合抗体に対する結合の閾値レベル（又は閾値を超えるレベル）により、ＶＬＡ－４結合抗体に特異的な抗体が示されるか否かを確認するために、ＥＬＩＳＡを使用してアッセイされる。本発明の一態様において、アリコートにおける可溶性結合活性の閾値レベルは、ＶＬＡ－４結合抗体に結合する基準抗体の少なくとも約５０ｎｇ、１００ｎｇ、２００ｎｇ、３００ｎｇ、４００ｎｇ、５００ｎｇ、６００ｎｇ、７００ｎｇ、８００ｎｇ、９００ｎｇ又は１，０００ｎｇを１ｍｌ当たり含有する対照試料又は基準試料に存在する結合活性のレベルにほぼ等しい。一実施形態において、閾値レベルは、ＶＬＡ－４結合抗体に結合する基準抗体を約５００ｎｇ／ｍｌで含有する対照試料又は基準試料における結合活性のレベルにほぼ等しいとして決定される。基準抗体はポリクローナル又はモノクローナルの何れかである場合がある。基準抗体はマウスの抗ナタリズマブ抗体（例えば、Ｓｈｅｒｅｍａｔａ，ｅｔ．ａｌ．，１９９９，Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ　５２，ｐａｇｅ　１０７２に記載される１２Ｃ４）である場合がある。

【００５９】

ＶＬＡ－４結合抗体に結合する基準抗体は、ナタリズマブに結合する基準抗体（例えば、ナタリズマブに高親和的に（例えば、ナノモル親和性で）結合する抗体）である場合がある。幾つかの実施形態において、ナタリズマブに結合する基準抗体は、ＶＬＡ－４結合抗体に対するナタリズマブの結合を阻止する場合がある（例えば、ＶＬＡ－４結合抗体に対するナタリズマブの結合を、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％

、少なくとも８０％、少なくとも９０％又はそれ以上阻害する場合がある）。基準抗体をマウスのモノクローナル抗体である場合がある。基準抗体は、ナタリズマブに対して特異的な抗イディオタイプ抗体である場合がある。幾つかの実施形態において、基準抗体は１２Ｃ４抗体である（Ｍａｉｎｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，Ｉｎｃ．［米国メイン州ポートランド］から入手可能；例えば、Ｓｈｅｒｅｍａｔａ，ｅｔ．ａｌ．，１９９９，Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ ５２，ｐａｇｅ １０７２を参照）。１２Ｃ４は、ナタリズマブがＶＬＡ－４に結合することを阻止する阻止抗体である。幾つかの実施形態において、基準抗体は、ナタリズマブに対する結合について１２Ｃ４と競合する。抗体結合の競合は、ＶＬＡ－４に対するナタリズマブの結合を阻止する１２Ｃ４抗体の能力を競合的に阻害する抗体の能力を評価する標準的な方法を使用して実証される場合がある。幾つかの実施形態において、ＶＬＡ－４結合抗体に特異的に結合する抗体の存在が、架橋ＥＬＩＳＡを使用して明らかにされる。架橋ＥＬＩＳＡにおいて、ＶＬＡ－４結合抗体に特異的に結合する抗体（例えば、生物学的試料に由来する抗体）が、ＥＬＩＳＡプレートに被覆されたＶＬＡ－４結合抗体と、溶液中の検出可能に標識されたＶＬＡ－４結合抗体（例えば、非固定化）との間における架橋として作用する。従って、標準的な処理の後でのＥＬＩＳＡシグナルにより、検出可能な標識が固相に連結されていること、及び可溶性結合活性が生物学的試料に存在することが示される。

【００６０】

生物学的試料のアリコートを、効果的な条件で、且つ免疫複合体（一次免疫複合体）の形成を可能にするために十分な期間にわたって固定化抗体と接触させることは一般的に、生物学的試料のアリコートを固定化抗体（例えば、ＥＬＩＳＡプレートに固定化したＶＬＡ－４結合抗体）に加え、混合物を、固定化抗体が、生物学的試料のアリコートに存在する可溶性結合活性を有する分子又は化合物との免疫複合体を形成するために（例えば、このような分子又は化合物に結合するために）十分に長い期間にわたってインキュベートすることが重要である。可溶性結合活性を有する分子又は化合物は、ＶＬＡ－４結合抗体に特異的に結合する誘導抗体である場合があるか、又はＶＬＡ－４結合抗体に結合する誘導されない内因性抗体又は受容体（例えば、リウマチ因子［ＲＦ］又は抗Ｆａｂ抗体）である場合がある。この後、試料－抗体混合物（例えば、ＥＬＩＳＡプレート、ドットブロット又はウエスタンブロット）は一般的に、結合していない抗体種及び／又は物質をアッセイ混合物から除くために洗浄される。

【００６１】

閾値レベルの結合活性が検出される場合、更なる工程は、結合活性により、ＶＬＡ－４結合治療抗体に特異的に結合する誘導抗体が示されるか否かを確認することを伴う場合がある。このような確認工程のため、生物学的試料の第２アリコートを、第１アリコートについて記載された通りに（但し、所定量の非固定化非標識競合ＶＬＡ－４結合抗体もアッセイ（例えば、ＥＬＩＳＡアッセイ）に加えられることを除く）、調製及び評価される場合がある。例えば、競合抗体の所定量は、特異的なシグナルを対照アッセイにおいて約５０％以上減少させる非標識量である場合がある。非標識ＶＬＡ－４結合抗体の存在がシグナルを予想割合量よりも大きく減少させる場合、閾値の結合活性（又は閾値を超える結合活性）は、ＶＬＡ－４結合治療抗体に特異的に結合する抗体の存在についての陽性指標として判断される。対照的に、非標識ＶＬＡ－４結合抗体の存在がシグナルを予想割合量よりも小さく減少させる場合、閾値結合活性（又は閾値を超える結合活性）は、ＶＬＡ－４結合治療抗体に特異的に結合する抗体について陰性として判断される。非特異的なシグナルは、ＶＬＡ－４結合抗体に結合する抗体以外の血清因子に起因し得ることが理解されるはずである。本明細書で使用される「加える」又は「加えられた」という用語は、標識されていない（又は異なって標識された）可溶性競合ＶＬＡ－４結合抗体を試料又はアッセイに添加することを示す。

【００６２】

本明細書で使用される「減少割合」とは、第１アリコートで求められた結合レベルの割合を示す。従って、例えば、結合活性を有する分子又は化合物の約５００ｎｇ／ｍｌ当量

が第１アリコートに示され、非標識ＶＬＡ－４結合抗体が第２アリコートに含まれることにより、シグナルの量が４０％～９０％よりも多く（例えば、約５０％以上、約５５％以上、約６０％以上、約６５％以上、約７０％以上、約７５％以上、約８０％以上、約８５％以上、約９０％以上）減少する場合、生物学的試料における結合活性は、ＶＬＡ－４結合治療抗体に特異的に結合する誘導抗体の存在を示すと見なされる。しかし、非標識ＶＬＡ－４結合抗体が第２アリコートに含まれることにより、シグナルの量が２０％～４０％よりも小さく減少する場合、生物学的試料における結合活性は、ＶＬＡ－４結合治療抗体に特異的に結合する誘導抗体の存在を示すとは見なされない。幾つかの実施形態において、競合抗体は、可溶性非標識ナタリズマブである場合がある。幾つかの実施形態において、可溶性非標識ナタリズマブは、約１００μｇ／ｍｌの最終濃度で使用される場合がある。しかしながら、対照量の基準抗体を含有する対照試料の得られたシグナルの所定の減少（例えば、約４０％、約５０％又はそれ以上）をもたらす場合に、遊離の非標識ナタリズマブの任意の濃度が使用される場合がある。例えば、対照試料は、約５００ｎｇ／ｍｌ、約３μｇ／ｍｌ又は任意の他の好適な量の基準抗体（例えば、１２Ｃ４）を含有する場合がある。本明細書に示す通り、ＶＬＡ－４結合抗体に特異的に結合する抗体が患者由来の生物学的試料に存在することにより、その被験体が、ＶＬＡ－４結合抗体に対する臨床的に有意な免疫反応を有することが示される。

【００６３】

例示的な「サンドイッチ」ＥＬＩＳＡにおいて、ＶＬＡ－４結合治療抗体（例えば、ナタリズマブ）は標的抗体として使用される場合があり、タンパク質親和性を示す選択された表面（例えば、ポリスチレン製マイクロタイタープレートにおけるウェル）に固定化される場合がある。その後、ＶＬＡ－４結合治療抗体（例えば、ナタリズマブ）を少なくとも１回服用している被験体の試料がウェルに添加される。結合及び／又は非結合物質を除去するための洗浄の後、標的抗体に結合する結合分子又は化合物が検出される場合がある。検出は、検出可能な標識に連結される第２抗体を添加するによって達成される場合がある。加えて、ＶＬＡ－４結合抗体に特異的に結合する抗体としての、結合分子又は化合物の同一性は、本明細書において上に記載する通り確認される場合がある。

【００６４】

当業者によって理解される通り、個々の特徴（例えば、本明細書に記載の確認工程）にもかかわらず、一般的に、ＥＬＩＳＡは幾つかの特徴を共通して有する（例えば、被覆、インキュベート及び結合する、非特異的に結合した化学種を除くために洗浄する、並びに結合免疫複合体を検出する）。

【００６５】

プレートを抗体又は抗体の何れかで被覆することにおいて、プレートのウェルは一般的に、一晩又は指定期間の何れかで標的抗体の溶液とインキュベートされる。被覆用緩衝液は、リン酸ナトリウム／ＢＳＡの被覆用緩衝液、又はこの分野で知られている別の好適な被覆用緩衝液である場合がある。その後、プレートのウェルは、完全に吸着していない物質を除くために洗浄される。その後、ウェルの何らかの残存する利用可能な表面が、試験試料に関して抗原的に中性である非特異的タンパク質により「被覆」される。このようなタンパク質は、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、カゼイン、又は粉ミルクの溶液等である場合がある。被覆により、固定化用表面における非特異的な吸着部位を阻止することが可能になり、従って、表面への抗血清の非特異的な結合によって引き起こされるバックグラウンドが減少する。

【００６６】

ＥＬＩＳＡにおいては、二次又は三次検出手段が使用される場合もあれば、直接検出手段が使用される場合もある。二次又は三次検出方法を使用する時には、タンパク質又は抗体をウェルに結合させ、バックグランドを減少させるために非反応性の物質（例えば、ブロッキング緩衝液、例えば、Ｔｒｉｓ－スクロースのブロッキング緩衝液、又はこの分野で認識されているその他のブロッキング緩衝液）により被覆し、非結合物質を除去するために洗浄した後で、固定化用表面は、免疫複合体（抗原／抗体）の形成を可能にするのに

効果的な条件で試験される生物学的試料と接触させる。その後、免疫複合体の検出では、標識二次結合性リガンド又は抗体、及び標識三次抗体又は第３結合性リガンドと一緒での二次結合性リガンド又は抗体が必要となる。本発明の好ましい実施形態において、第２結合性リガンドはＶＬＡ－４結合抗体である（例えば、標的抗体に使用されたのと同じＶＬＡ－４結合抗体）。

【００６７】

本明細書で使用される「免疫複合体の形成を可能にするために効果的な条件のもと」という用語は、その条件が、好ましくは、抗原及び／又は抗体を溶液（ＢＳＡ、ウシガンマグロブリン（ＢＧＧ）、リン酸塩緩衝化生理的食塩水（ＰＢＳ）／Ｔｗｅｅｎ、カゼイン及びＴｗｅｅｎ２０を伴うＰＢＳ、又はＴｗｅｅｎ２０を伴うＰＢＳ／ＢＳＡ緩衝液）により希釈することを含むことを意味する。アッセイ希釈剤は、当該技術分野で既知のその他種々のものを本発明の方法で使用してもよい。これらの添加する薬剤は又、非特異的なバックグラウンドの減少を助ける傾向があり、最高０．５ＭのＮａＣｌを含む場合がある。

【００６８】

本明細書で使用される「好適な」条件は又、インキュベーションが、効果的な結合を可能にするために十分な温度又は期間であることを意味する。インキュベーション工程は一般的に、好ましくは２５℃～２７℃の程度での温度で、約１時間～２時間～４時間等であるか、又は約４℃で一晩である場合がある。アッセイ温度及び時間パラメータは、当該技術分野で既知のその他種々のものを本発明の方法で使用してもよい。

【００６９】

ＥＬＩＳＡにおけるインキュベーション工程の後、接触させられた表面は、非結合物質を除去するために洗浄される。好ましい洗浄法には、例えば、ＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ、ＴＢＳ／Ｔｗｅｅｎ又はホウ酸塩緩衝液等の溶液（最高０．５ＭのＮａＣｌも含まれる場合がある）により洗浄することが含まれる場合がある。試験試料と標的抗体の間の特異的な免疫複合体の形成、並びにその後の洗浄の後、更に微少量の免疫複合体の存在を明らかにされる場合がある。洗浄緩衝液配合物は、当該技術分野で既知の更に他のものを本発明の方法で使用してもよいことが理解される。

【００７０】

検出手段を提供するために、第２又は第３の抗体は、結合させられた検出可能な標識を有する。特定の実施形態において、検出可能な標識は、適切な発色性基質とのインキュベーションの時に色の発生を生じさせる酵素である。従って、例えば、第１及び第２の免疫複合体を、更なる免疫複合体の形成の発達を有利にする期間及び条件（例えば、ＰＢＳ含有溶液（例えば、ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ）における室温での２時間のインキュベーション）のもと、ウレアーゼコンジュゲート抗体、グルコースオキシダーゼコンジュゲート抗体、アルカルホスファターゼコンジュゲート抗体、ハイドロジェンペルオキシダーゼコンジュゲート抗体、又はその他のコンジュゲート抗体と接触させる又はインキュベートする場合がある。

【００７１】

１つ以上の陽性及び陰性品質対照が本発明の方法において利用され得ることも又当業者によって理解される。陽性品質管理試料は、ＶＬＡ－４結合抗体に結合することが知られている抗体の所定量を含有する正常血清試料である場合がある。品質管理試料は、アッセイの生物学的試料及び対照試料と同じ条件で、アッセイの生物学的試料及び対照試料と並行して反応させ、アッセイの機能の指標となる場合がある。陰性品質対照試料は、ＶＬＡ－４結合抗体に結合することが知られている抗体を含まないことが知られている血清試料である場合がある。当業者は、陽性及び陰性対照反応及び試料を、アッセイで使用される溶液及び／又は基質及び／又はプロトコルの機能性を確認及び妥当性評価するためにＥＬＩＳＡでどのように利用するかを理解するであろう。例えば、陽性対照は、ＶＬＡ－４結合抗体と特異的に結合する抗体の既知量を含む場合があり、従って、試験試料（例えば、生物学的試料）と同じ条件で処理された時、アッセイが予想のパラメータの範囲内で機能

することを示す。陰性対照の一例には、ＶＬＡ－４結合抗体に特異的に結合する抗体を含まないことが知られている試料を挙げられる場合がある。このような陰性対照は、試験試料（例えば、生物学的試料）と同じ条件で処理された時、生物学的試料で検出された結合が生物学的試料から生じ、生物学的試料に関連しないアッセイ成分又は他の因子の混入のためでないことを明らかにする。本発明の方法により包含されるアッセイの非限定的な例は、以下の工程を伴う場合がある。ＥＬＩＳＡプレートのウェルを緩衝液における約０．２５μｇ／ｍＬのナタリズマブ基準標準物の溶液により被覆し、被覆されたプレートを周囲温度で一晩インキュベートする；プレートのウェルを洗浄緩衝液により少なくとも１回洗浄し、プレートのウェルをブロッキング緩衝液と周囲温度で少なくとも１時間インキュベートする；対照試料及びスクリーニング試料をアッセイ希釈剤にて約１：１０で希釈する；競合試料及びナタリズマブ（約１ｍｇ／ｍｌでの）を一緒にアッセイ希釈剤で約１００μｇ／ｍＬのナタリズマブの最終濃度及び競合試料の約１：１０の最終希釈度に希釈する；対照試料、スクリーニング試料及び競合試料を周囲温度で約１時間インキュベートし、プレートのウェルを洗浄緩衝液により少なくとも１回洗浄する；プレートのウェル内の試料を周囲温度で約６０分～１５０分の間インキュベートし、プレートのウェルを洗浄緩衝液により少なくとも３回洗浄すること；アッセイ希釈剤で約１：１０００に希釈された約１００μＬ／ウェルのビオチン化ナタリズマブを添加し、プレートを周囲温度で約６０分間～９０分間インキュベートし、次いで、プレートのウェルを洗浄緩衝液により少なくとも３回洗浄する；アッセイ希釈剤で約１：５０００で希釈されたストレプトアビジン－西洋ワサビペルオキシダーゼをプレートのウェル内の試料に添加し、プレートを周囲温度で約６０分間～９０分間インキュベートし、次いで、プレートのウェルを洗浄緩衝液により少なくとも３回洗浄する；十分な量の発色性基質を、抗体の結合を可視化するためにプレートのウェルに添加し、プレートを周囲温度で数分間にわたって発色させ、１Ｎ　H_2SO_4をプレートのウェルに添加することによって発色を停止させる；及びプレートのウェルを読み取り、結果を得る。

【００７２】

本明細書に記載のＥＬＩＳＡ試薬は、本明細書に記載のような生物学的試料における、ＶＬＡ－４結合抗体と特異的に結合する抗体の存在を検出する、及び／又はこのような抗体を測定するために商業生産される場合があるキットにパッケージ化される場合がある。

【００７３】

本発明で使用される対照は、所定値（例えば、特定の治療タンパク質について本明細書に記載の通り特定された臨床的に有意な閾値レベル）に加えて、実験材料と並行して試験される物質の試料を含む場合があることも又考慮される。例には、実験材料と並行して試験する陰性対照試料（例えば、製造を通して作製された陰性対照試料）が含まれる。

【００７４】

本明細書で使用される生物学的試料は以下の何れかである場合があるが、これらに限定されない：被験体の体液、例えば、血液、血清、血漿、尿、唾液、胸水、便、滑液、脳脊髄液、粘液及び組織浸潤物。好ましい体液には、血液、血清及び血清が含まれる。本明細書で使用される「生物学的試料」は、関連する医療技術分野の当業者に周知の方法を使用して得られる場合がある。生物学的試料は被験体から直接得る場合もあれば、細胞、組織又はその他の培養物から得る場合もある。生物学的試料は新鮮な場合もあれば、本発明の方法での使用前に好適な条件（例えば、凍結、冷凍等）で保存されている場合もある。

【００７５】

生物学的試料は治療剤投与後の種々の時間間隔で被験体から得られる場合があることが理解されるはずである。しかしながら、治療剤は特徴的なｉｎ　ｖｉｖｏ半減期を有する場合があるため、生物学的試料に存在する遊離治療剤の量は一般的に、薬剤が被験体に投与された後の時間の関数として減少する。生物学的試料における（非標識及び非固定化）遊離治療剤の存在により、本発明の結合反応及び検出反応が妨害される場合がある。従って、生物学的試料は、治療剤投与からできる限り後に、例えば、処置サイクルの「谷」の時に得なければならない。「谷」は、処置サイクルの期間中において被験体に存在する遊

離治療剤の最も低い量を表す。谷は、例えば、１回の治療剤投与のかなり後、及びその後の治療剤投与の直前に生じる場合がある。谷の時期は、投与される薬剤の量、薬剤の半減期、投与頻度等を含めた多くの要因によって影響を受ける場合があることが理解されるはずである。例えば、ＶＬＡ－４結合抗体（例えば、３００ｍｇのナタリズマブ）の毎月の投与は、１回の投与の約３０日後、及びその後の投与の直前に谷を生じる。しかしながら、本発明のアッセイは、そのアッセイが生物学的試料における治療剤の存在に対して比較的感受性が低いか、或いはこの存在を明らかにする限り、処置投与後の種々の時点に採取される試料で行われる場合があることが理解されるはずである。異なる時点に採取される異なる試料の結合活性のレベルが比較される時には、それぞれの試料を処置サイクルの類似する段階（例えば、治療的投与後の類似する期間）から得て、生物学的試料における遊離治療剤のレベルの差を補正する必要なく、結果を解釈できるようにすることが特に重要となる場合がある。

【００７６】

生物学的試料は、アッセイの前に希釈される（例えば、２倍、５倍、１０倍、５０倍、１００倍、及びより高い倍数値若しくはより低い倍数値、又はこれらの間の任意の倍数値）場合があることが理解されるはずである。一実施形態において、臨床的に有意な閾値量の基準抗体を含有する基準試料は、試験中の生物学的試料と同じ量で希釈され、生物学的試料の得られたシグナルを基準試料の得られたシグナルと直接比較できるようにする場合がある。

【００７７】

本発明の幾つかの実施形態においては、生物学的試料の１つ以上のアリコートが使用される。本明細書で使用される「アリコート」という用語は、生物学的試料の一定割合又は一部を意味する。幾つかの実施形態においては、２つ以上のアリコートが、被験体から得る生物学的試料から採取される場合があり、それらのアリコートを、被験体におけるＶＬＡ－４結合抗体に対する免疫反応の存在を明らかにするために、本発明の方法を使用して試験してもよい。例えば、２つの実質的に等しいアリコートが、ＶＬＡ－４結合抗体（例えば、ナタリズマブ）が投与されている被験体から得る生物学的試料から採取されてもよく、可溶性結合活性のレベルが１つのアリコート（例えば、「第１」のアリコート）で検出されてもよい。加えて、他方のアリコート（例えば、「第２」のアリコート）を本発明の方法を使用して評価し、第１アリコートで検出された（それらの試料起源が共通することから第２アリコートにも又存在すると考えられる）可溶性結合活性が、ＶＬＡ－４結合抗体と特異的に結合する抗体であるかどうかを決定する場合がある。幾つかの実施形態において、少なくとも閾値レベルの結合が第１アリコートに存在し、可溶性結合活性が、ＶＬＡ－４結合抗体と特異的に結合する抗体の活性であると決定される場合は、それによって、ＶＬＡ－４結合抗体に対する免疫反応が被験体に存在することが特定される。

【００７８】

ＶＬＡ－４結合抗体

本発明の態様は、被験体に投与される１つ以上のＶＬＡ－４結合治療抗体に対する免疫反応を特定及び／又は監視するための検出アッセイに関する。本発明の特定の態様において、検出アッセイは固定化成分及び検出成分の両方を伴う。幾つかの実施形態において、検出アッセイは又競合成分を含む場合もある。本明細書に記載の通り、固定化成分は、ＶＬＡ－４結合抗体に結合する誘導抗体（例えば、血清抗体）を固定化するために使用される場合がある。検出成分は、固定化した抗体を検出するために使用される場合がある。競合成分は、誘導抗体に対する結合の特異性を明らかにする目的で、誘導抗体に結合するための固定化成分及び／又は検出成分の何れかと競合させるために使用される場合がある。固定化成分及び検出成分は、ＶＬＡ－４結合抗体に対する免疫反応に特徴的である１つ以上の抗体に独立して結合させることができる。従って、固定化成分及び検出成分は、被験体に投与された同じＶＬＡ－４結合抗体である場合がある（例えば、固定化成分は、被験体に投与されたＶＬＡ－４結合治療抗体の固定化形態である場合があり、検出成分は、被験体に投与されたＶＬＡ－４結合治療抗体の標識形態である場合がある）。しかしながら

、他の実施形態において、固定化成分及び検出成分が、ＶＬＡ－４結合治療抗体に対する１つ以上の誘導抗体（例えば、血清抗体）を検出するのに好適な親和性で結合する場合、固定化成分及び検出成分はそれぞれ独立して、被験体に投与されたＶＬＡ－４結合治療抗体の変異体である場合がある。競合成分とは一般的に、固定化成分又は検出成分の可溶性の標識されていない（又は異なって標識された）形態である。しかしながら、競合成分が、アッセイで検出された結合活性の特異性を明らかにするためにＶＬＡ－４結合治療抗体に対する結合について十分に競合する場合に、競合成分が固定化成分又は検出成分の変異体である場合がある。

【００７９】

本発明の態様によれば、何れか１つ以上のＶＬＡ－４結合抗体（ナタリズマブ及び／又は関連するＶＬＡ－４結合抗体を含む）が治療的に使用される場合がある。従って、ＶＬＡ－４結合抗体の何れか１つ以上を、固定化成分、検出成分及び／又は競合成分として本発明の検出アッセイで使用される場合がある。一実施形態において、ＶＬＡ－４結合抗体は、ＩｇＧ抗体（例えば、ＩｇＧ４抗体）である場合がある。別の実施形態において、ＶＬＡ－４結合抗体は、ポリクローナル又はモノクローナルである場合がある。更に別の実施形態において、ＶＬＡ－４結合抗体は、マウス抗体のヒト化型である場合がある。

【００８０】

ナタリズマブ及び関連するＶＬＡ－４結合抗体が、例えば、米国特許第５，８４０，２９９号に記載される。ｍＡｂ　２１．６及びＨＰ１／２が、ＶＬＡ－４と結合する例示的なマウスモノクローナル抗体である。ナタリズマブはマウスｍＡｂ　２１．６のヒト化型である（例えば、米国特許第５，８４０，２９９号を参照）。ＨＰ１／２のヒト化型も又記載されている（例えば、米国特許第６，６０２，５０３号を参照）。幾つかの更なるＶＬＡ－４結合性モノクローナル抗体（例えば、ＨＰ２／１、ＨＰ２／４、Ｌ２５及びＰ４Ｃ２）が記載される（例えば、米国特許第６，６０２，５０３号；Ｓａｎｃｈｅｚ－Ｍａｄｒｉｄ，ｅｔ．ａｌ．，１９８６，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１６：１３４３－１３４９；Ｈｅｌｍｅｒ，ｅｔ．ａｌ．，１９８７，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２：１１４７８－１１４８５；Ｉｓｓｅｋｕｔｚ　ａｎｄ　Ｗｙｋｒｅｔｏｗｉｃｚ，１９９１，Ｊ．Ｉｍｍｍｕｎｏｌ．，１４７：１０９　（ＴＡ－２　ｍａｂ）；Ｐｕｌｉｄｏ，ｅｔ．ａｌ．，１９９１，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６６（１６）：１０２４１－１０２４５；及び米国特許第５，８８８，５０７号）。多くの有用なＶＬＡ－４結合抗体は細胞（例えば、リンパ球）上のＶＬＡ－４と相互作用するが、細胞凝集を引き起こさない。しかしながら、他の抗ＶＬＡ－４結合抗体は、このような凝集を引き起こすことが見出されている。ＨＰ１／２は細胞凝集を引き起こさない。ＨＰ１／２　ＭＡｂ（Ｓａｎｃｈｅｚ－Ｍａｄｒｉｄ，ｅｔ．ａｌ．，１９８６，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１６：１３４３－１３４９）は極めて大きい効果を有し、ＶＣＡＭ１及びフィブロネクチンの両方とのＶＬＡ－４の相互作用を遮断し、ＶＬＡ－４におけるエピトープＢについての特異性を有する。この抗体及び他のＢエピトープ特異的抗体（例えば、Ｂ１エピトープ結合抗体又はＢ２エピトープ結合抗体；Ｐｕｌｉｄｏ，ｅｔ．ａｌ．，１９９１，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６６（１６）：１０２４１－１０２４５）は有用なＶＬＡ－４結合抗体の１つのクラスを表す。

【００８１】

例示的なＶＬＡ－４結合抗体は、１つ以上のＣＤＲを有する（例えば、本明細書に開示される特定の抗体の３つ全てのＨＣ　ＣＤＲ及び／又は３つ全てのＬＣ　ＣＤＲ、或いは要約するとこのような抗体（例えば、ナタリズマブ）との少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％の同一性を有するＣＤＲ）。一実施形態において、Ｈ１及びＨ２の超可変ループは、本明細書で開示される抗体のこのような超可変領域と同じ極限構造を有する。一実施形態において、Ｌ１及びＬ２の超可変ループは、本明細書で開示される抗体のこのような超可変領域と同じ極限構造を有する。

【００８２】

一実施形態において、ＨＣ可変ドメイン配列及び／又はＬＣ可変ドメイン配列のアミノ酸配列は、本明細書に記載の抗体（例えば、ナタリズマブ）のＨＣ可変ドメイン及び／又はＬＣ可変ドメインのアミノ酸配列に対する少なくとも７０％、８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有する。ＨＣ可変ドメイン配列及び／又はＬＣ可変ドメイン配列のアミノ酸配列は、本明細書に記載の抗体（例えば、ナタリズマブ）の対応する配列の少なくとも１個のアミノ酸、但し多くても１０個、８個、６個、５個、４個、３個又は２個のアミノ酸が異なってもよい。例えば、このような違いは、主に又は専らフレームワーク領域に存在する場合がある。

【００８３】

ＨＣ可変ドメイン配列及びＬＣ可変ドメイン配列のアミノ酸配列は、本明細書に記載の核酸配列、又は可変ドメインをコードする核酸配列、又は本明細書に記載のアミノ酸配列をコードする核酸に高ストリンジェントな条件でハイブリダイズする配列によってコードされてもよい。一実施形態において、ＨＣ可変ドメイン及び／又はＬＣ可変ドメインの１つ以上のフレームワーク領域（例えば、ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３及び／又はＦＲ４）のアミノ酸配列は、本明細書に記載の抗体のＨＣ可変ドメイン及びＬＣ可変ドメインの対応するフレームワーク領域に対する少なくとも７０％、８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有する。一実施形態において、１つ以上の重鎖フレームワーク領域又は軽鎖フレームワーク領域（例えば、ＨＣのＦＲ１、ＦＲ２及びＦＲ３）は、ヒト生殖系列の抗体に由来する対応するフレームワーク領域の配列に対する少なくとも７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％又は１００％の同一性を有する。

【００８４】

２つの配列の間での「相同性」又は「配列同一性」（これらの用語は本明細書で交換可能に使用される）の計算は以下のように行われる。配列が最適な比較目的のためにアラインメントされる（例えば、ギャップを最適なアラインメントのために第１及び第２のアミノ酸配列又は核酸配列の一方又は両方に導入してもよく、非相同的な配列を比較のために無視してもよい）。最適なアラインメントが、Ｂｌｏｓｓｕｍ６２スコア化行列を、１２のギャップペナルティー、４のギャップ伸張ペナルティー及び５のフレームシフトギャップペナルティーと共に用いてＧＣＧソフトウエアパッケージにおけるＧＡＰプログラムを使用して最も良いスコアとして決定される。その後、対応するアミノ酸位置又はヌクレオチド位置におけるアミノ酸残基又はヌクレオチドが比較される。第１の配列における位置が第２の配列における対応する位置と同じアミノ酸残基又はヌクレオチドによって占められる時、これらの分子はその位置において同一である（本明細書で使用されるアミノ酸又は核酸の「同一性」はアミノ酸又は核酸の「相同性」と等価である）。これら２つの配列の間における同一率は、これらの配列によって共有される同一位置の数の関数である。

【００８５】

当業者であれば、ＶＬＡ－４結合抗体の機能的に等価な変異体をもたらすために、保存的アミノ酸置換がＶＬＡ－４結合抗体でなされる場合がある、即ち、このような変異体がＶＬＡ－４ポリペプチドの機能的能力を保持することを認識するであろう。本明細書で使用される「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸置換がなされるタンパク質の相対的な電荷特徴又はサイズ特徴を変化させないアミノ酸置換を指す。種々の変異体は、当業者に既知のポリペプチド配列を改変する方法（例えば、このような方法についてまとめた参考文献（例えば、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ： Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｊ．Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ．ａｌ．，ｅｄｓ．，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８９、又はＣｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｌｏｇｙ，Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌ，ｅｔ．ａｌ．，ｅｄｓ．，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ）に記載の方法）に従って調製してもよい。ＶＬＡ－４結合抗体の例示的な機能的に等価な変異体は、本明細書で開示されるタンパク質のアミノ酸配列の保存的ア

ミノ酸置換を含む。アミノ酸の保存的置換には、以下の群内のアミノ酸の間でなされる置換が含まれる：（ａ）Ｍ、Ｉ、Ｌ、Ｖ；（ｂ）Ｆ、Ｙ、Ｗ；（ｃ）Ｋ、Ｒ、Ｈ；（ｄ）Ａ、Ｇ；（ｅ）Ｓ、Ｔ；（ｆ）Ｑ、Ｎ；及び（ｇ）Ｅ、Ｄ。

【００８６】

本明細書で使用される「高ストリンジェントな条件でハイブリダイズする」という用語は、ハイブリダイゼーション及び洗浄の条件を説明したものである。ハイブリダイゼーション反応を行うための指針は、参考として本明細書に組み入れられている、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｎ．Ｙ．（１９８９），６．３．１－６．３．６に記載されている。水性及び非水性の方法がこの参考文献には記載されており、何れを使用してもよい。高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件には、約４５℃での６Ｘ ＳＳＣにおけるハイブリダイゼーションの後、６５℃での０．２Ｘ ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ、又は実質的に類似する条件における１回以上の洗浄が含まれる。

【００８７】

抗体は、例えば、米国特許第６，６０２，５０３号に記載の通り、機能的性質（例えば、ＶＬＡ－４の結合）について試験を行ってもよい。

【００８８】

抗体の作製

ＶＬＡ－４に結合する抗体は、例えば、動物を使用して、免疫化により作製してもよい。ＶＬＡ－４の全て又は一部は免疫原として使用してもよい。例えば、アルファ－４サブユニットの細胞外領域は免疫原として使用してもよい。一実施形態において、免疫化された動物は、天然の、ヒトの免疫グロブリン遺伝子座又は部分的にヒトの免疫グロブリン遺伝子座を有する免疫グロブリン産生細胞を含有する。一実施形態において、非ヒト動物はヒト免疫グロブリン遺伝子の少なくとも一部を含む。例えば、マウス抗体の産生において欠陥があるマウス系統をヒトＩｇ遺伝子座の大きいフラグメントにより操作することが可能である。ハイブリドーマ技術を使用して、所望の特異性を有する遺伝子由来の抗原特異的なモノクローナル抗体が産生及び選択される場合がある。例えば、ＸｅｎｏＭｏｕｓｅ™、Ｇｒｅｅｎ，ｅｔ．ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ７：１３－２１（１９９４）、米国特許出願公開第２００３－００７０１８５号、米国特許第５，７８９，６５０号、及び国際特許出願公開ＷＯ９６／３４０９６を参照されたい。ＶＬＡ－４に対する非ヒト抗体も又、例えば、齧歯類で産生してもよい。非ヒト抗体は、例えば、米国特許第６，６０２，５０３号、欧州特許ＥＰ２３９４００、米国特許第５，６９３，７６１号及び米国特許第６，４０７，２１３号に記載の通りヒト化してもよい。

【００８９】

欧州特許ＥＰ２３９４００（Ｗｉｎｔｅｒ，ｅｔ．ａｌ．）は、抗体を、１つの種のその相補性決定領域（ＣＤＲ）を別の種の相補性決定領域で（所与の可変領域の内部で）置換することによって変化させることを記載する。ＣＤＲ置換された抗体は、真のキメラ抗体と比較して、ヒトにおいて免疫反応を誘発する可能性がほとんどないことが予測される。これは、ＣＤＲ置換された抗体は相当により少ない非ヒト成分を含有するからである（Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ，ｅｔ．ａｌ．，１９８８，Ｎａｔｕｒｅ ３３２，３２３－３２７；Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎ，ｅｔ．ａｌ．，１９８８，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３９，１５３４－１５３６）。一般的に、マウス抗体のＣＤＲが、所望する置換された抗体をコードする配列を作製するために組換え核酸技術を使用することによってヒト抗体における対応する領域の中に置換される。所望のイソタイプのヒト定常領域遺伝子セグメント（通常、ＣＨの場合γＩ、ＣＬの場合κ）が付加されてもよく、可溶性のヒト化抗体を産生させるためにヒト化重鎖及び軽鎖遺伝子が哺乳動物細胞で同時発現させられる。

【００９０】

Ｑｕｅｅｎ，ｅｔ．ａｌ．，１９８９，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，Ｄｅｃ；８６（２４）：１００２９－３３、及び国際特許出願公開ＷＯ９０／０７８６１は、ヒトＶフレームワーク領域を、元のマウス抗体のＶ領域フレームワークに対する

最適なタンパク質配列相同性についてのコンピューター分析によって選ぶこと、及びマウスのＣＤＲと相互作用すると考えられるフレームワークアミノ酸残基を可視化するためにマウスＶ領域の三次構造をモデル化することを含むプロセスを記載している。これらのマウスアミノ酸残基は、その後、相同的なヒトフレームワークに重ねられる。米国特許第５，６９３，７６２号、同第５，６９３，７６１号、同第５，５８５，０８９号及び同第５，５３０，１０１号も又参照されたい。Ｔｅｍｐｅｓｔ，ｅｔ．ａｌ．，１９９１，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　９，２６６－２７１）は、基準として、マウス残基の徹底的な導入を伴わないＣＤＲグラフト化のためにＮＥＷＭ及びＲＥＩの重鎖及び軽鎖にそれぞれ由来するＶ領域フレームワークを利用する。ＮＥＷＭ及びＲＥＩに基づくヒト化抗体を構築するためにＴｅｍｐｅｓｔ等の手法を使用する利点は、ＮＥＷＭ及びＲＥＩの可変領域の三次元構造がｘ線結晶学から知られており、従って、ＣＤＲとＶ領域フレームワーク残基の間の特異的な相互作用をモデル化してもよいという点である。

【００９１】

非ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列、例えば、コンセンサスなヒトアミノ酸残基を特定の位置、例えば、以下の位置の１つ以上（好ましくは、少なくとも５、１０、１２又は全て）において挿入する置換を含むように改変してもよい：（軽鎖の可変領域のＦＲでは）４Ｌ、３５Ｌ、３６Ｌ、３８Ｌ、４３Ｌ、４４Ｌ、５８Ｌ、４６Ｌ、６２Ｌ、６３Ｌ、６４Ｌ、６５Ｌ、６６Ｌ、６７Ｌ、６８Ｌ、６９Ｌ、７０Ｌ、７１Ｌ、７３Ｌ、８５Ｌ、８７Ｌ、９８Ｌ、並びに／或いは（重鎖の可変領域のＦＲでは）２Ｈ、４Ｈ、２４Ｈ、３６Ｈ、３７Ｈ、３９Ｈ、４３Ｈ、４５Ｈ、４９Ｈ、５８Ｈ、６０Ｈ、６７Ｈ、６８Ｈ、６９Ｈ、７０Ｈ、７３Ｈ、７４Ｈ、７５Ｈ、７８Ｈ、９１Ｈ、９２Ｈ、９３Ｈ及び／又は１０３Ｈ（Ｋａｂａｔの番号付けに順ずる）。例えば、米国特許第６，４０７，２１３号を参照されたい。

【００９２】

当業者に明らかであるように、本発明は又、Ｆ（ａｂ’）２フラグメント、Ｆａｂフラグメント及びＦｄフラグメント；Ｆｃ領域及び／又はＦＲ領域及び／又はＣＤＲ１領域及び／又はＣＤＲ２領域及び／又は軽鎖ＣＤＲ３領域が相同的なヒト配列又は非ヒト配列によって置換されているキメラ抗体；ＦＲ領域及び／又はＣＤＲ１領域及び／又はＣＤＲ２領域及び／又は軽鎖ＣＤＲ３領域が相同的なヒト配列又は非ヒト配列によって置換されているキメラなＦ（ａｂ’）２フラグメント抗体；ＦＲ領域及び／又はＣＤＲ１領域及び／又はＣＤＲ２領域及び／又は軽鎖ＣＤＲ３領域が相同的なヒト配列又は非ヒト配列によって置換されているキメラなＦａｂフラグメント抗体；及びＦＲ領域及び／又はＣＤＲ１領域及び／又はＣＤＲ２領域が相同的なヒト配列又は非ヒト配列によって置換されているキメラなＦｄフラグメント抗体を提供する。

【００９３】

特定の実施形態において、ＶＬＡ－４結合抗体は、ＶＬＡ－４の単鎖抗体、単一ドメイン抗体又はＮａｎｏｂｏｄｙ™である場合がある。これらの抗体タイプのそれぞれの特徴、及びそれらの使用についての方法は、当該技術分野で周知である。Ｎａｎｏｂｏｄｙ™は抗体の最小の機能的フラグメントであり、天然に存在する単鎖抗体に由来する（Ａｂｌｙｎｘ（ベルギー）；ａｂｌｙｎｘ．ｃｏｍを参照）。Ｎａｎｏｂｏｄｙ™技術は、ラクダ科（ラクダ及びラマ）が、軽鎖を有さない完全に機能的な抗体の特有のレパートリーを有するという発見に続いて開発された。Ｎａｎｏｂｏｄｙ™）の構造は、１つの可変ドメイン（ＶＨＨ）と、ヒンジ領域と、２つの定常ドメイン（ＣＨ２及びＣＨ３）とからなる。クローン化及び単離されたＶＨＨドメインは、元の重鎖の完全な抗原結合能を有する安定なポリペプチドである。Ｎａｎｏｂｏｄｙ™では、従来の抗体の特徴が小さい分子薬物の特徴と組み合わされる。Ｎａｎｏｂｏｄｙ™は大きい標的特異性及び低い固有的毒性を示す。加えて、Ｎａｎｏｂｏｄｙ™は非常に安定しており、注射以外の手段によって投与されてもよく、製造が容易である。特定の実施形態において、ＶＬＡ－４結合治療抗体、固定化成分及び／又は検出成分は、ヒト化Ｎａｎｏｂｏｄｙ™である場合がある。

【００９４】
抗体の産生
ＶＬＡ－４に結合する完全にヒトのモノクローナル抗体は、例えば、Ｂｏｅｒｎｅｒ，ｅｔ．ａｌ．，１９９１，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４７，８６－９５）に記載の通り、ｉｎ ｖｉｔｒｏプライム処理されたヒト脾臓細胞を使用して産生させてもよい。このようなモノクローナル抗体は、Ｐｅｒｓｓｏｎ，ｅｔ．ａｌ．，１９９１，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８８：２４３２－３４３６、又はＨｕａｎｇ ａｎｄ Ｓｔｏｌｌｅｒ，１９９１，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １４１，２２７～２３６に記載の通り、レパートリークローニングによって調製される場合がある（米国特許第５，７９８，２３０号）。大きな非免疫化ヒトファージディスプレーライブラリーも又、標準的なファージ技術を使用してヒト治療剤として開発することができる高親和性抗体を単離するために使用される場合がある（例えば、Ｖａｎｇｈａｎ，ｅｔ．ａｌ．，１９９６，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，Ｍａｒ；１４（３）：３０９－１４；Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ，ｅｔ．ａｌ．，（１９９８） Ｉｍｍｕｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ４：１－２０；及びＨｏｏｇｅｎｂｏｏｍ，ｅｔ．ａｌ．，（２０００），Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｔｏｄａｙ ２：３７１－８；米国特許出願公開第２００３－０２３２３３３号を参照）。抗体は原核生物細胞及び真核生物細胞で産生させてもよい。一実施形態において、抗体（例えば、ｓｃＦｖ）は、酵母細胞において、例えば、ピキア属（例えば、Ｐｏｗｅｒｓ，ｅｔ．ａｌ．，（２００１），Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ，２５１：１２３－３５を参照）、ハンセヌラ属又はサッカロミセス属等において発現させられる。一実施形態において、抗体、具体的には、完全長の抗体（例えば、様々なＩｇＧ）が哺乳動物細胞において産生される。組換え発現のための例示的な哺乳動物宿主細胞には、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ細胞）（Ｕｒｌａｕｂ ａｎｄ Ｃｈａｓｉｎ （１９８０），Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７７：４２１６－４２２０に記載されるｄｈｆｒ⁻ＣＨＯ細胞を含む；これは、例えば、Ｋａｕｆｍａｎ ａｎｄ Ｓｈａｒｐ （１９８２），Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５９：６０１－６２１に記載の通り、ＤＨＦＲ選択マーカーと共に使用される）、リンパ球系細胞株（例えば、ＮＳ０ミエローマ細胞及びＳＰ２細胞）、ＣＯＳ細胞、Ｋ５６２、及びトランスジェニック動物（例えば、トランスジェニック哺乳動物）由来の細胞が含まれる。例えば、このような細胞は哺乳動物の上皮細胞である。

【００９５】
免疫グロブリンのドメインをコードする核酸配列に加えて、組換え発現ベクターは、更なる配列（例えば、宿主細胞におけるベクターの複製を調節する配列（例えば、複製起点）、及び選択マーカー遺伝子）を有する場合がある。選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞の選抜を容易にする（例えば、米国特許第４，３９９，２１６号、同第４，６３４，６６５号及び同第５，１７９，０１７号を参照）。例示的な選択マーカー遺伝子には、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）遺伝子（メトトレキサート選抜／増幅と共にｄｈｆｒ⁻の宿主細胞における使用のために）、及びｎｅｏ遺伝子（Ｇ４１８選抜のために）が含まれる。

【００９６】
抗体（例えば、完全長の抗体又はその抗原結合フラグメント）の組換え発現のための例示的なシステムにおいて、抗体重鎖及び抗体軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターがリン酸カルシウム媒介のトランスフェクションによってｄｈｆｒ⁻ＣＨＯ細胞に導入される。組換え発現ベクター内において、抗体の重鎖遺伝子及び軽鎖遺伝子はそれぞれが、遺伝子の高レベルの転写を行わせるために、エンハンサー／プロモーター調節エレメント（例えば、ＳＶ４０、ＣＭＶ及びアデノウイルス等に由来する；例えば、ＣＭＶエンハンサー／ＡｄＭＬＰプロモーター調節エレメント、又はＳＶ４０エンハンサー／ＡｄＭＬＰプロモーター調節エレメント）に機能的に連結される。組換え発現ベクターは又、ベクターによりトランスフェクションされているＣＨＯ細胞の選抜を、メトトレキサート選抜／増幅を使用して可能にするＤＨＦＲ遺伝子を有する。選抜された形質転換体宿主細胞は、

抗体の重鎖及び軽鎖の発現を行わせるために培養され、無傷の抗体が培養培地から回収される。標準的な分子生物学技法が、組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞をトランスフェクションし、形質転換体について選抜し、宿主細胞を培養し、抗体を培養培地から回収するために使用される。例えば、プロテインＡ又はプロテインＧによるアフィニティークロマトグラフィーによって幾つかの抗体を単離してもよい。米国特許第６，６０２，５０３号は又、ＶＬＡ－４結合抗体を発現及び精製するための例示的な方法を記載する。

【００９７】

抗体は又、様々な修飾、例えば、Ｆｃ受容体又はＣ１ｑ又はその両方との相互作用を低下又は除去するようにＦｃ機能を改変する修飾を含む場合もある。例えば、ヒトＩｇＧ１の定常領域を、１つ以上の残基で、例えば、米国特許第５，６４８，２６０号の番号付けに従った残基２３４及び残基２３７の１つ以上で変異させてもよい。その他の例示的な修飾には、米国特許第５，６４８，２６０号に記載の修飾が含まれる。

【００９８】

Ｆｃドメインを含む幾つかの抗体の場合、Ｆｃ領域がグリコシル化される抗体を合成するように抗体産生システムが設計される場合がある。例えば、ＩｇＧ分子のＦｃドメインはＣＨ２ドメイン内のアスパラギン２９７でグリコシル化される。このアスパラギンが、二分岐型のオリゴ糖による修飾のための部位である。このグリコシル化は、Ｆｃγ受容体及び補体Ｃ１ｑによって媒介されるエフェクター機能に関係する（Ｂｕｒｔｏｎ ａｎｄ Ｗｏｏｆ （１９９２），Ａｄｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．５１：１－８４；Ｊｅｆｆｅｒｉｓ，ｅｔ．ａｌ．，（１９９８），Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖ．１６３：５９－７６）。Ｆｃドメインは、アスパラギン２９７に対応する残基を適切にグリコシル化する哺乳動物発現システムで産生させてもよい。Ｆｃドメインは又、真核生物のその他の翻訳後修飾を含んでもよい。

【００９９】

抗体は又、トランスジェニック動物によって産生させてもよい。例えば、米国特許第５，８４９，９９２号は、抗体をトランスジェニック哺乳動物の乳腺において発現させるための方法を記載する。乳汁特異的なプロモーターと、目的とする抗体及び分泌のためのシグナル配列をコードする核酸と含む導入遺伝子が構築される。このようなトランスジェニック哺乳動物のメスによって産生される乳汁には、目的とする抗体が、その中に分泌されて含まれる。抗体は乳汁から精製してもよければ、幾つかの用途では直接使用してもよい。

【０１００】

本明細書で使用される、本発明のＶＬＡ－４結合抗体は実質的に完全長のＶＬＡ－４結合抗体又はその機能的なフラグメントである場合がある。例えば、ＶＬＡ－４結合抗体のフラグメントが、ＶＬＡ－４結合抗体と特異的に結合する抗体による特異的な結合を可能するのに十分な場合、これは機能的なＶＬＡ－４結合抗体であり、本発明の方法及びキットで使用される場合がある。当業者であればＶＬＡ－４結合抗体のフラグメントを特定することができ、ＶＬＡ－４結合抗体フラグメントが機能的なＶＬＡ－４結合抗体フラグメントであるかどうかを、日常的な手法及び結合アッセイのみを使用して決定することができるであろう。従って、本明細書で示される固定化ＶＬＡ－４結合抗体及び未固定化ＶＬＡ－４結合抗体を使用する方法の記載及び例は又、機能的な固定化ＶＬＡ－４結合抗体フラグメント及び未固定化ＶＬＡ－４結合抗体フラグメントの使用にも適用される。

【０１０１】

標識及び検出

本発明の態様には、非固定化抗治療タンパク質抗体（例えば、ＶＬＡ－４結合抗体）を、治療タンパク質（例えば、標的ＶＬＡ－４結合抗体）に対する固定化抗体に結合する可溶性結合活性の存在及び／又はレベルを評価するための検出成分として使用することが含まれる。可溶性結合活性の存在及び／又はレベルを評価する方法には、１つ以上の標識検出成分（例えば、検出可能な標識を含有するＶＬＡ－４結合抗体、又は検出可能な標識に結合したＶＬＡ－４結合抗体）の使用が含まれる場合がある。検出可能な標識は、アッセ

イを使用して検出することができる任意の成分として定義される。本発明の抗体及び機能的な抗体フラグメントは、標準的なカップリング手法に従って、結合を検出するための特異的な標識剤にカップリングされてもよい。検出可能な標識は、例えば、直接的な検出をもたらす検出可能な標識（例えば、放射性標識、蛍光団［例えば、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、赤色蛍光タンパク質（ＲＦＰ）等］、発色団、光学的標識又は高電子密度標識等）、又は間接的な検出をもたらす検出可能な標識（例えば、酵素タグ、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ等）等、広範なものを使用してもよい。抗体に結合させられているか、又は抗体に組み込まれている検出可能な標識の限定されない例には、酵素、放射性標識、蛍光性標識、リン光性分子、化学発光性分子、発色団、発光性分子、光親和性分子、及び着色された粒子、又はリガンド（例えば、ビオチン等）等が含まれる。加えて、本発明の検出方法には電気化学発光測定法（ＥＣＬ）が含まれる場合がある。

【０１０２】

標識の検出には、標識の性質及びその他のアッセイ要素に応じて、様々な方法が使用される場合がある。標識は、光学的又は電子密度、放射性の放出体、非放射性のエネルギー移動体によって直接検出される場合もあれば、抗体コンジュゲート体、ストレプトアビジン－ビオチンコンジュゲート体等によって間接的に検出される場合もある。追加の検出可能な標識は、抗体へのそれらの結合方法と同じく、数多くのものが当該技術分野で既知である。

【０１０３】

本発明の標識抗体は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで、例えば、イムノアッセイ（例えば、ＥＬＩＳＡ）で使用される抗体である場合がある。このような検出可能に標識された抗体は、抗体に組み込まれた検出可能な標識を有する抗体である場合もあれば、二次結合性リガンドに、及び／又は発色性基質と接触した時に有色生成物を生じさせる酵素（酵素タグ）に連結される抗体である場合もある。好適な酵素の例には、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、（西洋ワサビ）ハイドロジェンペルオキシダーゼ、又はグルコースオキシダーゼが含まれる。好ましい二次結合性リガンドがビオチン化合物及び／又はアビジン化合物及びストレプトアビジン化合物である。このような標識の使用は当業者には広く知られており、例えば、米国特許第３，８１７，８３７号、同第３，８５０，７５２号、同第３，９３９，３５０号、同第３，９９６，３４５号、同第４，２７７，４３７号、同第４，２７５，１４９号及び同第４，３６６，２４１号に記載される（それぞれが参考として本明細書に組み入れられている）。

【０１０４】

抗体をその検出可能な標識に結合又はコンジュゲートする方法は、数多くが当該技術分野で既知である。結合方法には、例えば、抗体に結合させた有機キレート化剤（例えば、ジエチレントリアミン五酢酸無水物（ＤＴＰＡ）、エチレントリアミン四酢酸、Ｎ－クロロ－ｐ－トルエンスルホンアミド、及び／又はテトラクロロ－３α－６α－ジフェニルグリコウリル－３）を使用する金属キレート錯体の使用が含まれる場合がある（それぞれ参考として本明細書に組み入れられている、米国特許第４，４７２，５０９号及び同第４，９３８，９４８号）。モノクローナル抗体は又、カップリング剤（例えば、グルタルアルデヒド又は過ヨウ素酸塩）の存在下で酵素と反応させる場合もある。抗体は、これらのカプリング剤の存在下で、又はイソチオシナート化合物との反応によって、フルオレセインマーカーにより標識される場合がある。他の実施形態において、抗体は、誘導体化によって、例えば、抗体認識部位を変化させない反応条件を使用してスルフヒドリル基を抗体のＦｃ領域に選択的に導入することによって、標識される場合がある。

【０１０５】

本発明のアッセイにおける検出可能な標識の検出は又、本明細書において「シグナル」検出とも呼ばれる。イムノアッセイでシグナルを検出する種々の方法が、当該技術分野で周知である。本発明の幾つかの重要な実施形態において、アッセイシグナルは、シグナルの量及び／又は存在場所を評価するためにマルチウェルプレートリーダー（例えば、マイクロプレートリーダー）と共に使用して検出してもよい。シグナル検出は、本発明で利用

される検出可能な標識を検出するのに好適な光学的検出又はその他の検出手段であってもよい。標識を検出する更なる方法が当該技術分野分野で公知であり、本発明の方法で使用されてもよい。本発明の方法では、ＶＬＡ－４結合抗体に特異的に結合する抗体を検出するための感度を有するＥＬＩＳＡが含まれ、この場合、感度は、少なくとも約１０００ｎｇ、５００ｎｇ又は５０ｎｇである。好ましい実施形態において、ＶＬＡ－４結合抗体に特異的に結合する抗体を検出するためのＥＬＩＳＡ感度は少なくとも５００ｎｇである。

【０１０６】

一般的に、免疫複合体形成の検出は、数多くの手法の適用によって達成される場合がある。これらの方法は一般的に、標識又はマーカー（例えば、このような放射性タグ、蛍光性タグ、生物学的タグ及び酵素的タグの何れか）の検出に基づいている。このような標識の使用に関する米国特許には、米国特許第３，８１７，８３７号、同第３，８５０，７５２号、同第３，９３９，３５０号、同第３，９９６，３４５号、同第４，２７７，４３７号、同第４，２７５，１４９号及び同第４，３６６，２４１号が含まれる（それぞれが参考として本明細書に組み入れられている）。当然のことではあるが、当該技術分野で既知の通り、二次結合性リガンド（例えば、第２抗体及び／又はビオチン／アビジンリガンド結合配置）を使用することで、更なる利点が見出される場合がある。

【０１０７】

ＶＬＡ－４結合抗体（例えば、ナタリズマブ）を得る及び産生する本明細書に記載の技法は又、ＶＬＡ－４結合抗体に高親和的に結合する基準抗体（例えば、高親和性ナタリズマブ結合抗体（例えば、１２Ｃ４））を得る及び産生するために使用される場合があることが理解されるはずである。

【０１０８】

キット

本発明は又、試料におけるＶＬＡ－４結合抗体に対する免疫反応の存在をアッセイするためにキットにも一部関する。このようなキットの例には、上記抗体（ナタリズマブ又は他のＶＬＡ－４結合抗体（これらに限定されない）を含む）又はそのフラグメントが含まれる場合がある。キットは、検出可能に標識された抗体及び／又は非標識抗体を含む場合があり、又、抗体を検出可能に標識するための溶液及び化合物を含む場合がある。本発明のキットは又、以下の構成要素の１つ以上を含む場合がある：プレート、ピペット、バイアル、検出可能な標識、溶液（例えば、ブロッキング緩衝液、洗浄緩衝液、結合用溶液、希釈液等）、陽性及び／又は陰性対照試料及び溶液。本発明のキットは又、生物学的試料におけるＶＬＡ－４結合抗体に対する免疫反応を特定するために本キットを使用するための文書による説明書を含む場合がある。本発明のキットは又、陽性及び／又は陰性ＥＬＩＳＡ対照アッセイを行うことにおいて有用な更なる構成要素を含む場合もある。本発明のキットは又、本発明の方法で使用される装置（例えば、プレートリーダー）及び／又はロボット計装化を含む場合もある。

【実施例】

【０１０９】

実施例１　ナタリズマブの免疫原性アッセイ

アッセイの形式及び設計は架橋酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）に基づいていた。架橋アッセイのために好適な標準的な試薬及び工程を使用した。簡単に記載すると、標準的な工程を使用して、ナタリズマブをマイクロタイタープレートの表面に吸着させ、その後、血清抗体の非特異的な結合を最小限に抑えるための遮断工程を行った。対照及び試料を希釈し、ウェルに加えた。標準的な工程を使用して、結合した抗ナタリズマブ抗体の検出を、プレートをビオチン－ナタリズマブとインキュベートし、続いて、ストレプトアビジン－アルカリホスファターゼ（ＳＡ－ＡＰ）とインキュベートすることによって達成した。発色は、結合した抗ナタリズマブ抗体の量に比例していた。

【０１１０】

ナタリズマブをプレート被覆緩衝液において特定の濃度に希釈し、９６ウェルマイクロタイターＥＬＩＳＡプレートにおいて周囲温度で一晩インキュベートした。推奨される体

積は１００μｌ／ウェルであった。プレートを洗浄緩衝液により洗浄し、その後、ブロッキング緩衝液と周囲温度で１時間以上インキュベートした。ブロッキング緩衝液の体積は２００μｌ／ウェルであった。プレートを洗浄緩衝液により洗浄し、その後、添加されたナタリズマブ（１００μｇ／ｍｌの最終濃度）を有するアッセイ希釈液又は有さないアッセイ希釈液において１：１０で希釈された品質管理及び被験体（患者）試料と周囲温度で２時間±１５分にわたってインキュベートした。添加されたナタリズマブを含有するアッセイ希釈液は確認工程を表した。アッセイ希釈液についての体積は１００μｌ／ウェルであった。その後、プレートを洗浄緩衝液で洗浄し、次いで、ＳＡ－ＡＰと周囲温度で３０分間～３５分間インキュベートした。ＳＡ－ＡＰとのインキュベーションのための体積は１００μｌ／ウェルであった。その後、プレートを洗浄緩衝液で洗浄し、次いで、ＡＰ基質のｐ－ニトロフェニルホスファート（ＰＮＰＰ）と周囲温度で４５分間～５０分間インキュベートした。ＡＰ基質でのインキュベーションのための体積は１００μｌ／ウェルであった。その後、停止溶液（例えば、Ｈ２ＳＯ４等）を基質反応混合物に直接加え、光学濃度（ＯＣ）を４０５ｎｍで読み取った。

【０１１１】

アッセイ許容性については、陽性対照及び陰性対照は結果を所定の値及び精度の範囲内でもたらさなければならなかった。被験体（患者）試料の結果の評価のために、試料は、そのＯＤ値が規定の陰性カットオフ品質管理試料よりも低くなれば、陰性と判断された。試料は又、そのＯＤ値が規定の陰性カットオフ品質管理試料を超え、確認工程でナタリズマブを添加することによる被験体（患者）試料のシグナルの阻害が所定の割合よりも小さかった場合に、陰性と判断された。試料は、そのＯＤ値が規定の陰性カットオフ品質管理試料を超え、確認工程でナタリズマブを添加することによる被験体（患者）試料のシグナルの阻害が所定の割合よりも大きかった又は等しかった場合に、陽性と判断された。

【０１１２】

実施例２　ＶＬＡ－４抗体に対する免疫反応についてのスクリーニングアッセイ

（上述の）スクリーニングアッセイを、ナタリズマブが投与されている被験体から得る試料で行った。ＶＬＡ－４抗体に対する免疫反応の存在を、ナタリズマブの投与を受けている患者で調べた。

【０１１３】

ナタリズマブが投与されている被験体から得る生物学的試料を、実施例１に記載される方法を使用して、ナタリズマブと特異的に結合する可溶性抗体の存在について試験した。

【０１１４】

試験では、陽性対照としての高親和性ｍＡｂの使用が含まれた。この高親和性ｍＡｂは、被験体から得る生物学的試料に存在する結合抗体（例えば、ナタリズマブと結合した抗体）を検出した。陰性カットオフレベルが、許容される正確性／精度（２５％／２５％）をもたらした最も低い濃度（１０％血清での５０ｎｇ／ｍＬ）に決定された。このｍＡｂの感度は正味（非希釈）血清において５００ｎｇ／ｍＬであった。感度については、このｍＡｂが、様々な抗ナタリズマブＡｂを検出するが、関連性のないヒトモノクローナル抗体に対する感度がないことが明らかにされた。試料の他の分子又は成分によるｍＡｂへの妨害は、１：２を超えるｍＡｂ：薬物比での遊離薬物による妨害が含まれることが明らかにされた。図１は、抗ナタリズマブ抗体のイムノアッセイに対する遊離ナタリズマブによる妨害の影響を例示する。リウマチ因子も又、アッセイを妨害することが見出された。

【０１１５】

実施例１及び実施例２に記載されるスクリーニングアッセイに加えて、このようなスクリーニングアッセイにおける結合を評価するための特徴付けアッセイも又行った。ナタリズマブが投与されている被験体から得る生物学的試料を、フローサイトメトリー遮断アッセイを使用して、ナタリズマブと特異的に結合する可溶性抗体の存在について試験した。高親和性ｍＡｂを陽性対照として使用した。本アッセイでは、阻止抗体が検出された。使用されたｍＡｂについての陰性カットオフレベルは、非服用患者から得る血清における測定レベルの平均値を３倍～４倍上回る標準偏差のレベルで決定された。５％の偽陽性率が

存在し、本アッセイの感度は１ｍｌの正味血清当たり５００ｎｇであった。ｍＡｂの特異性を試験し、このｍＡｂは、抗ナタリズマブ抗体を検出することが明らかにされ、しかし、関連性のないヒトモノクローナル抗体に対する感度がないことが見出された。アッセイに対する遊離薬物の妨害も又調べた。本アッセイでは、遊離薬物による妨害の存在が示された。図２には、遊離薬物による遮断アッセイ妨害の評価の結果が示されている。

【０１１６】

ナタリズマブの遮断アッセイ

結果

スクリーニングアッセイ及び遮断アッセイの陽性結果を比較した。２１７個の遮断アッセイ陽性及び２２２個のスクリーニングアッセイ陽性が存在した。従って、５％の差が存在し、９８％の一致率であった。従って、スクリーニングアッセイにより、ＶＬＡ－４結合治療抗体に対する被験体の免疫反応の正確な測定がもたらされる。

【０１１７】

実施例３

（実施例１及び実施例２に記載の）スクリーニングアッセイを、ナタリズマブが投与されている６２５名の被験体から得る試料で行った。ＶＬＡ－４抗体に対する免疫反応の存在を、ナタリズマブの投与を受けている患者で調べた。調査した患者におけるナタリズマブに対する抗体の発生率は、任意の時点で、９１％（５６９例）が抗体陰性であり、９％（５６例）が「結合抗体」陽性であり、この場合、３％（１９例）が「一時的に」陽性であり、６％（３７例）が「永続的に」陽性であった。一時的な陽性患者は、（０．５μｇ／ｍｌを超える濃度の）検出可能な抗体を１回の時点で有したが、全ての他の時点では抗体について陰性であった。永続的な陽性患者は、検出可能な抗体を、少なくとも４２日の間隔が空いた２つ以上の時点に、又は追跡調査試料が試験されていない単一の時点で有した。

【０１１８】

図３は、何らかの抗体を発達させた患者における最初の陽性結果の時間を示す。６％の患者がナタリズマブに対する「永続的な」抗体を発達させた。９０％を超える永続的な陽性患者は最初、検出可能な抗体を第１２週で有した。どの被験体も、第３６週の後では、永続的な抗体について陽性とならなかった。一時的陽性患者は検出可能な抗体を第１２週で有したが、その後は抗体陰性であった。

【０１１９】

結果は、処置患者の最初の障害の再発率における抗体の効果の存在を明らかにするために分析した。図４は、再発率に対する抗体の全体的な影響を例示する。再発率は又、ナタリズマブの投与から経過した時間に関して被験体について評価された。図５Ａ～図５Ｄは、０ヶ月～３ヶ月、３ヶ月～６ヶ月、６ヶ月～９ヶ月、及び９ヶ月～１２ヶ月での再発率をそれぞれ示す。

【０１２０】

結果

結果は、抗体の明らかな影響が最初の３ヶ月の処置の期間中にはないことを示した。３ヶ月～６ヶ月まで、「一時的な」抗体陽性患者はナタリズマブ処置の効果における減少を示した。「永続的な」抗体陽性患者はナタリズマブ処置の効果の喪失を示した。６ヶ月～１２ヶ月まで、完全な効果が「一時的な」抗体陽性患者において回復したが、「永続的な」抗体陽性患者では回復しなかった。従って、一時的な抗体陽性患者を、継続したＶＬＡ－４結合抗体治療のための標的集団として特定することは重要である。

【０１２１】

等価物

当業者は、ごく日常的な実験を使用して、本明細書に記載の本発明の具体的な実施形態の多くの等価物を認識するか、又は確認できるであろう。このような等価物は、以下の特許請求の範囲に包含されるものとして意図される。

【０１２２】

本明細書で開示される全ての参考文献は、特許文書を含め、それらの全体が参考として組み入れられている。矛盾する場合には、本明細書の何れの定義も含め、本出願が優先される。

【０１２３】

以上で使用された用語及び表現は、限定する用語ではなく、説明する用語として使用され、このような用語及び表現の使用においては、示した及び説明した特徴又はそれらの一部の何れかの等価物を除外するものとして意図されず、従って、様々な改変が本発明の適用範囲内で可能であることが認識される。

【図面の簡単な説明】

【０１２４】

【図１】図１は、イムノアッセイにおける遊離ナタリズマブの妨害を図示する。

【図２】図２は、遮断アッセイにおける遊離ナタリズマブの妨害を図示する。

【図３】図３は、ナタリズマブの最初の投与後における時間を関数とした、臨床的に有意な免疫反応の確率を示す。

【図４】図４は、再発率に対する陽性免疫反応の全体的な影響を図示する。Ｐ＝プラセボ、ｎ＝３１５。ＡＮ＝抗体陰性、ｎ＝５６９。ＴＰ＝一時的陽性、ｎ＝１９。ＰＰ＝持続的陽性、ｎ＝３７。

【図５Ａ】図５は、ナタリズマブの最初の投与後における特定の時間間隔にわたる、再発率に対する陽性免疫反応の影響を図示する（Ａ：０～３ヶ月、Ｂ：３～６ヶ月、Ｃ：６～９ヶ月、及びＤ：９～１２ヶ月）。Ｐ＝プラセボ、ｎ＝３１５。ＡＮ＝抗体陰性、ｎ＝５６９。ＴＰ＝一時的陽性、ｎ＝１９。ＰＰ＝持続的陽性、ｎ＝３７。

【図５Ｂ】図５は、ナタリズマブの最初の投与後における特定の時間間隔にわたる、再発率に対する陽性免疫反応の影響を図示する（Ａ：０～３ヶ月、Ｂ：３～６ヶ月、Ｃ：６～９ヶ月、及びＤ：９～１２ヶ月）。Ｐ＝プラセボ、ｎ＝３１５。ＡＮ＝抗体陰性、ｎ＝５６９。ＴＰ＝一時的陽性、ｎ＝１９。ＰＰ＝持続的陽性、ｎ＝３７。

【図５Ｃ】図５は、ナタリズマブの最初の投与後における特定の時間間隔にわたる、再発率に対する陽性免疫反応の影響を図示する（Ａ：０～３ヶ月、Ｂ：３～６ヶ月、Ｃ：６～９ヶ月、及びＤ：９～１２ヶ月）。Ｐ＝プラセボ、ｎ＝３１５。ＡＮ＝抗体陰性、ｎ＝５６９。ＴＰ＝一時的陽性、ｎ＝１９。ＰＰ＝持続的陽性、ｎ＝３７。

【図５Ｄ】図５は、ナタリズマブの最初の投与後における特定の時間間隔にわたる、再発率に対する陽性免疫反応の影響を図示する（Ａ：０～３ヶ月、Ｂ：３～６ヶ月、Ｃ：６～９ヶ月、及びＤ：９～１２ヶ月）。Ｐ＝プラセボ、ｎ＝３１５。ＡＮ＝抗体陰性、ｎ＝５６９。ＴＰ＝一時的陽性、ｎ＝１９。ＰＰ＝持続的陽性、ｎ＝３７。

【図１】

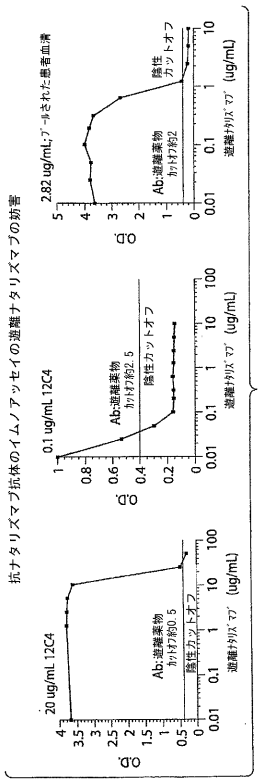

Fig. 1

【図２】

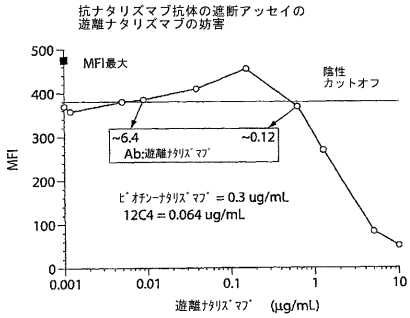

Fig. 2

【図３】

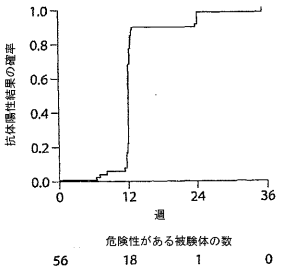

Fig. 3

【図４】

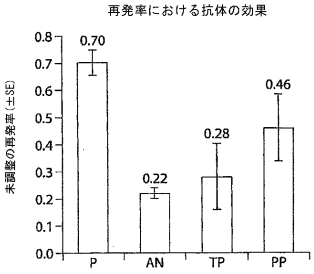

Fig. 4

【図５Ａ】

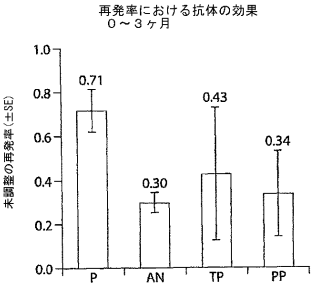

Fig. 5A

【図５Ｂ】

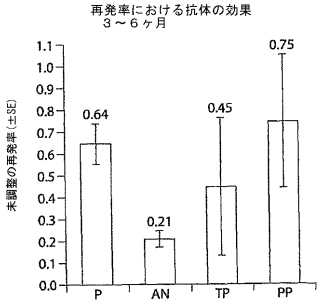

Fig. 5B

【図５Ｃ】

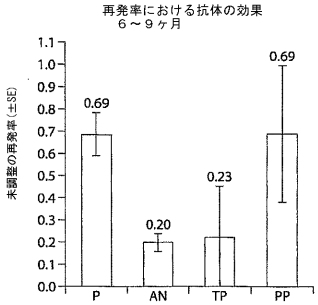

Fig. 5C

【図５Ｄ】

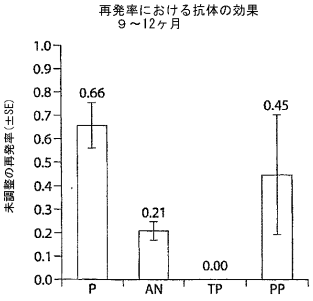
再発率における抗体の効果
９～12ヶ月
未調整の再発率（±SE）
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0.66
0.21
0.00
0.45
P
AN
TP
PP

Fig. 5D

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/012493

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/68

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)
G01N

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 practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	GIOVANNONI ET AL: "Sa.32. The Immunogenicity of Natalizumab in Patients with Multiple Sclerosis" CLINICAL IMMUNOLOGY, ACADEMIC PRESS,, US, vol. 119, 2006, page S116, XP005438506 ISSN: 1521-6616 abstract	1-29, 69-71

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"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)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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
"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
"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.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
9 January 2007	16/01/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Fausti, Simone

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/012493

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; April 2004 (2004-04), SANDS BRUCE E ET AL: "Safety and tolerability of natalizumab in patients concurrently receiving infliximab in a phase 2 study of active Crohn's disease" XP002401100 Database accession no. PREV200600085330'	1-29, 69-71
Y	abstract & GASTROENTEROLOGY, vol. 126, no. 4, Suppl. 2, April 2004 (2004-04), page A463, DIGESTIVE DISEASE WEEK/105TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-GASTROENTEROLOGICAL-ASSOCIATION; NEW ORLEANS, LA, USA; MAY 16 20, 2004 ISSN: 0016-5085	1-64, 69-71
X	CALABRESI PETER A ET AL: "Safety and tolerability of natalizumab: Results from the SENTINEL trial" NEUROLOGY, vol. 64, no. 6, Suppl. 1, March 2005 (2005-03), page A277, XP009073089 & 57TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ACADEMY-OF-NEUROLOGY; MIAMI BEACH, FL, USA; APRIL 09 -19, 2005 ISSN: 0028-3878	1-29, 69-71
Y	abstract	1-64, 69-71
X	WO 03/016909 A (LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH) 27 February 2003 (2003-02-27)	65-68
Y	page 3, line 14 - line 17; examples 2,3	1-64, 69-71
A	BAERT F ET AL: "INFLUENCE OF IMMUNOGENICITY ON THE LONG-TERM EFFICACY OF INFLIXIMAB IN CROHN'S DISEASE" NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, MASSACHUSETTS MEDICAL SOCIETY, BOSTON, MA, US, vol. 348, no. 7, 13 February 2003 (2003-02-13), pages 601-608, XP009037271 ISSN: 1533-4406 abstract; paragraph bridging pages 602 and 603	1-64, 69-71

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/012493

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEUNG NAI-KONG V ET AL: "Anti-GD2 antibody treatment of minimal residual stage 4 neuroblastoma diagnosed at more than 1 year of age" JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, vol. 16, no. 9, September 1998 (1998-09), pages 3053-3060, XP009073135 ISSN: 0732-183X abstract; page 3056, right-hand column, lines 5-8	30-64
A	VAN CLEAVE V H: "Vallidation of immunoassays for anti-drug antibodies." DEVELOPMENTS IN BIOLOGICALS. 2003, vol. 112, 2003, pages 107-112, XP009073111 ISSN: 1424-6074 abstract; table 2	
X	ROSKOS L K ET AL: "HUMAN ANTIGLOBULIN RESPONSES" MEASURING IMMUNITY, ELSEVIER,, NL, December 2004 (2004-12), pages 172-186, XP008058931 paragraph bridging left- and right-hand columns on page 178; page 178, right-hand column, second paragraph; figure 13.3; page 181, right-hand column, second full paragraph	65-68
X	HOESEL W ET AL: "Development and evaluation of a new ELISA for the detection and quantification of antierythropoietin antibodies in human sera" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 294, no. 1-2, November 2004 (2004-11), pages 101-110, XP004679759 ISSN: 0022-1759 paragraphs 3.2 and 3.3 on page 105; figure 5	65-68
A	BERTHELOT-RUFF ET AL: "Immunisation apres immunoscintigraphies par anticorps monoclonaux murins; analyse de 692 dossiers" IMMUNO ANALYSE ET BIOLOGIE SPECIALISE, ED. SCIENTIFIQUES ELSEVIER, PARIS, FR, vol. 14, no. 5, September 1999 (1999-09), pages 308-314, XP005029695 ISSN: 0923-2532 abstract; paragraph bridging pages 310 and 311	

International Application No. PCT/US2006 /012493

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 30-64 are directed to methods of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the analytical assay.
As no explicit reference to samples, nor to in vitro procedures, is made in claims 65-68, the claims might also be directed to diagnostic methods practised on the human/animal body. The search of these claims has been based on the procedure for the threshold definition and the corresponding alleged effects.

International application No.
PCT/US2006/012493

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. [X] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[X] No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2006 /012493

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-64,69-71

   Methods involving the detection of anti-VLA-4 antibodies.

   ---

2. claims: 65-68

   Methods for evaluating an immune response to a therapeutic protein by determining a threshold level of the antibody titre on the basis of the mean and the standard deviation in untreated patients.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2006/012493

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03016909 A	27-02-2003	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			ＦＩ		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*1/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/00	
Ａ６１Ｐ	*37/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/00	
Ｇ０１Ｎ	*33/543*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/543	５５１Ａ

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

(74)代理人 100062409
弁理士 安村 高明
(74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
(72)発明者 スブラマニャム， ミーナ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１８０， ストーナム， コーリー アベニュー ３
(72)発明者 アマラバディ， ラクシュミ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１７６０， ナティック， サウス メイン ストリート １８９
(72)発明者 ワクシュル， エリック
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１５４１， プリンストン， ホイッタカー レーン １３
(72)発明者 リン， フランシス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４３， サマービル， ロウェル ストリート １５７， アパートメント ２
(72)発明者 パンザラ， マイケル
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１８９０， ウィンチェスター， バコン ストリート ７３
(72)発明者 バーバー， ロビン マクデイド
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４５９８， ウォールナット クリーク， ノルマンディー レーン ２５０
(72)発明者 テイラー， ジュリー エリザベス
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４１２２， サンフランシスコ， ７ティーエイチ アベニュー １５０６

Ｆターム(参考) 4C084 AA02 AA17 AA19 BA44 NA05 ZA02 ZA66 ZB15

专利名称(译)	用于评估对治疗性蛋白质的免疫应答的方法和产品		
公开(公告)号	JP2008537595A	公开(公告)日	2008-09-18
申请号	JP2008505451	申请日	2006-04-04
[标]申请(专利权)人(译)	伊兰制药公司		
申请(专利权)人(译)	Biogen Idec公司Emuei公司 伊兰制药公司		
[标]发明人	スブラマニャムミーナ アマラバディラクシュミ ワクシュルエリック リンフランシス パンザラマイケル バーバーロビンマクデイド テイラージュリーエリザベス		
发明人	スブラマニャム, ミーナ アマラバディ, ラクシュミ ワクシュル, エリック リン, フランシス パンザラ, マイケル バーバー, ロビン マクデイド テイラー, ジュリー エリザベス		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K45/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P1/00 A61P37/00 G01N33/543		
CPC分类号	A61P1/00 A61P13/12 A61P17/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 G01N33/686 G01N2333/70546 G01N2800/065 G01N2800/102 G01N2800/285 C07K16/2839 G01N33/6854 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.N A61K37/02 A61K45/00 A61P25/00 A61P29/00.101 A61P1/00 A61P37/00 G01N33/543.551.A		
F-TERM分类号	4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/AA19 4C084/BA44 4C084/NA05 4C084/ZA02 4C084/ZA66 4C084/ZB15		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/668404 2005-04-04 US		
其他公开文献	JP2008537595A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于鉴定用治疗性蛋白质治疗的受试者中临床显着免疫应答的方法和产品。本发明的第一方面涉及用于鉴定用治疗量的VLA4结合抗体（例如那他珠单抗）治疗的患者中临床上显着的免疫应答的方法和组合物。本发明的第二方面涉及用于确定针对治疗性蛋白质的抗体滴度的样品收集的时间顺序细节，例如，在两个不同的时间点收集至少两个样本。本发明的第三方面涉及临界阈值水平的选择，其对应于未治疗患者的抗体滴度增加该对照抗体滴度的标准偏差的两倍。

【図５Ｃ】

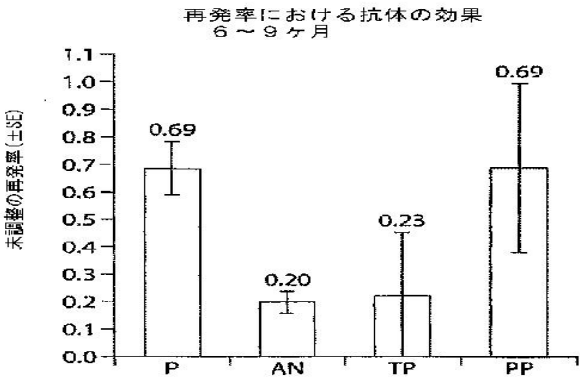
再発率における抗体の効果
６～９ヶ月
未調整の再発率(±SE)
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0.69
0.20
0.23
0.69
P
AN
TP
PP

Fig. 5C