

(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2014-516944

(P2014-516944A)

(43) 公表日 平成26年7月17日(2014.7.17)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 N	4 B O 2 4
<b>C 0 7 K 16/18 (2006.01)</b>	C 0 7 K 16/18 Z N A	4 B O 6 4
<b>C 1 2 N 15/02 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 C	4 B O 6 5
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 1 O 2	4 C O 8 5
<b>A 6 1 P 37/06 (2006.01)</b>	A 6 1 P 37/06	4 H O 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 62 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-508600 (P2014-508600)  
 (86) (22) 出願日 平成24年4月27日 (2012. 4. 27)  
 (85) 翻訳文提出日 平成25年12月19日 (2013. 12. 19)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/035457  
 (87) 国際公開番号 W02012/149320  
 (87) 国際公開日 平成24年11月1日 (2012. 11. 1)  
 (31) 優先権主張番号 61/480, 938  
 (32) 優先日 平成23年4月29日 (2011. 4. 29)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 391015708  
 ブリストル・マイヤーズ スクイブ カン  
 パニー  
 BRISTOL-MYERS SQUIB  
 B COMPANY  
 アメリカ合衆国ニューヨーク州 1015  
 4 ニューヨーク パーク アベニュー  
 345  
 (74) 代理人 100100158  
 弁理士 鮫島 睦  
 (74) 代理人 100068526  
 弁理士 田村 恭生  
 (74) 代理人 100126778  
 弁理士 品川 永敏

最終頁に続く

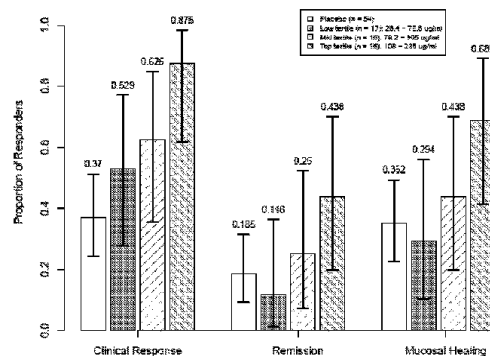
(54) 【発明の名称】 I P 1 0 抗体の用量漸増計画

(57) 【要約】

ある実施態様において、本発明は、( a ) 所定量の抗 I P 1 0 抗体を対象に投与し、 ; ( b ) 対象の試料中の抗 I P 1 0 抗体のレベルを検出し ; 次いで ( c ) 工程 ( b ) からの抗 I P 1 0 抗体のレベルが閾値曝露レベル以下である場合、対象の I P 1 0 関連疾患が治療されるように対象における抗 I P 1 0 抗体の用量を増加させることを特徴とする、対象における I P 1 0 関連疾患の治療方法を提供する。

FIG. 1

E-R Relationship of Clinical Response, Clinical Remission and Mucosal Healing Rates Stratified by Cminss of BMS-936557 at Study Day 57



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

(a) 所定用量の抗 I P 1 0 抗体を対象に投与し；  
 (b) 前記対象の試料中の抗 I P 1 0 抗体のレベルを検出し；次いで  
 (c) 工程 (b) からの抗 I P 1 0 抗体のレベルが、閾値曝露レベル以下である場合、  
 対象における I P 1 0 関連疾患が治療されるように、対象における抗 I P 1 0 抗体の用量  
 を増加させること；

を特徴とする、治療を必要とする対象における I P 1 0 関連疾患の治療方法。

## 【請求項 2】

前記抗 I P 1 0 抗体が、ヒト I P 1 0 に特異的に結合し、ヒト M I G またはヒト I T A  
 C と交差反応しないものである、請求項 1 に記載の方法。 10

## 【請求項 3】

前記抗 I P 1 0 抗体が、M D X - 1 1 0 0 である、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記抗 I P 1 0 抗体が、  
 (a) 配列番号：2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および  
 (b) 配列番号：7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域  
 を含むものである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記抗 I P 1 0 抗体が、 20  
 (a) 配列番号：3 を含む重鎖可変領域 C D R 1 ；  
 (b) 配列番号：4 を含む重鎖可変領域 C D R 2 ；  
 (c) 配列番号：5 を含む重鎖可変領域 C D R 3 ；  
 (d) 配列番号：8 を含む軽鎖可変領域 C D R 1 ；  
 (e) 配列番号：9 を含む軽鎖可変領域 C D R 2 ；および  
 (f) 配列番号：10 を含む軽鎖可変領域 C D R 3  
 を含むものである、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

工程 (b) における抗 I P 1 0 抗体のレベルが、前記試料を、抗体抗原複合体の形成に  
 適する条件下において、抗 I P 1 0 抗体に結合する抗体と接触させ、次いで、前記抗体抗  
 原複合体の形成を検出することを特徴とする方法によって検出されるものである、請求項  
 1 に記載の方法。 30

## 【請求項 7】

前記抗 I P 1 0 抗体に結合する抗体が、抗イディオタイプ抗体である、請求項 6 に記載  
 の方法。

## 【請求項 8】

前記抗イディオタイプ抗体が、M D X - 1 1 0 0 の 1 つまたはそれ以上の C D R に結合  
 するものである、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記抗イディオタイプ抗体が、1 0 C 8、6 C 9、2 F 5 および 2 3 H 1 0 から選択さ  
 れるものである、請求項 8 に記載の方法。 40

## 【請求項 10】

前記抗イディオタイプ抗体が、1 0 C 8 である、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記抗イディオタイプ抗体が、2 3 H 1 0 である、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記検出が、E I A、E L I S A、R I A、間接競合免疫アッセイ、直接競合免疫アッ  
 セイ、非競合免疫アッセイ、サンドウィッチ免疫アッセイおよび凝集アッセイからなる群  
 から選択される方法によって行われるものである、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記 I P 1 0 関連疾患が、炎症または自己免疫疾患である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記炎症または自己免疫疾患が、多発性硬化症、関節リウマチ、炎症性腸疾患（例えば、潰瘍性大腸炎、クローン病）、全身性エリテマトーデス、1型糖尿病、炎症性皮膚障害（例えば、乾癬、扁平苔癬）、自己免疫性甲状腺疾患（例えば、グレーブス疾患、橋本甲状腺炎）、シェーグレン症候群、肺の炎症（例えば、喘息、慢性閉塞性肺疾患、肺サルコイドーシス、リンパ性肺炎）、移植拒絶反応、脊髄損傷、脳傷害（例えば、脳卒中）、神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病）、歯肉炎、遺伝子治療誘発性炎症、血管形成の疾患、炎症性腎臓疾患（例えば、I g A 腎障害、膜性増殖性糸球体腎炎、急速進行性糸球体腎炎）およびアテローム性動脈硬化症から選択されるものである、請求項 1 3 に記載の方法。

10

【請求項 1 5】

前記炎症または自己免疫疾患が、炎症性腸疾患である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記炎症性腸疾患が、潰瘍性大腸炎である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記炎症性腸疾患が、クローン病である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 8】

抗 I P 1 0 抗体に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

20

【請求項 1 9】

前記抗体が、抗イディオタイプ抗体である、請求項 1 8 に記載の抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 2 0】

前記抗 I P 1 0 抗体が、M D X - 1 1 0 0 である、請求項 1 8 に記載の抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 2 1】

前記抗体が、M D X - 1 1 0 0 の 1 つまたはそれ以上の C D R に結合するものである、請求項 2 0 に記載の抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 2 2】

前記抗体が、1 0 C 8、6 C 9、2 F 5 および 2 3 H 1 0 から選択されるものである、請求項 2 1 に記載の抗体またはその抗原結合部分。

30

【請求項 2 3】

請求項 1 8 に記載のモノクローナル抗体を産生する、ハイブリドーマ細胞株。

【請求項 2 4】

( 1 ) 抗 I P 1 0 抗体に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分；および ( 2 ) 抗体抗原複合体の形成を容易にするために必要な試薬を含む、キット。

【請求項 2 5】

( a ) 抗 I P 1 0 抗体を対象に投与し；

( b ) 前記対象の試料中の抗 I P 1 0 抗体のレベルを免疫アッセイによって検出し；次いで

40

( b ) 抗 I P 1 0 抗体のレベルが、閾値曝露レベル以下である場合、対象における抗 I P 1 0 抗体の用量を増加させ；抗 I P 1 0 抗体のレベルが、閾値曝露レベルまたはそれ以上である場合、対象における抗 I P 1 0 抗体の用量を増加させないことを特徴とする、治療を必要とする対象における I P 1 0 関連疾患の治療方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

インターフェロンガンマ誘導タンパク質 1 0 ( I P 1 0 ) ( C X C L 1 0 と知られる ) は、I F N ガンマに応答して、様々な細胞 ( 内皮細胞、単球、線維芽細胞およびケラチ

50

ノサイトが挙げられる)で分泌される10kDaのケモカインである。IP10は、ヒトの遅延型過敏性(DTH)応答時に真皮マクロファージおよび内皮細胞にも存在する。IP10は、元々、IFNガンマによって誘発されるものとして同定されたが、例えば、樹状細胞においては、IFNアルファによっても誘発されるものである。IP10の発現はまた、IFNガンマ、ウイルスおよびリポ多糖類などの刺激によって、アストロサイトおよびミクログリアのような中枢神経系の細胞でも生じうる。

#### 【背景技術】

##### 【0002】

IP10の受容体は、7回膜貫通型受容体であるCXCR3として同定された。CXCR3は、活性化されたTリンパ球上で発現されるが、他のTリンパ球、あるいはBリンパ球、単球または顆粒球上では発現されない。CXCR3の発現は、TGF-ベータ1による刺激によってNK細胞で上方調節される。CXCR3に対する2つの他のリガンド、MIGおよびITACが同定されている。IP10のCXCR3に対する結合は、活性化されたT細胞において、カルシウム動員および走化性を介在する。走化性および細胞内カルシウム動員はまた、活性化されたNK細胞上でIP10がCXCR3に結合することによって誘導される。胸腺内においては、IP10は、TCR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞、TCR<sup>+</sup>T細胞およびNK型細胞に対する走化性因子である。

10

##### 【0003】

IP10またはその受容体CSCR3は、多発性硬化症、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、肝炎、脊髄損傷、全身性エリテマトーデス、移植拒絶反応、シェーグレン症候群を含む様々な異なる炎症および自己免疫疾患中で同定されてきた。よって、IP10関連疾患(例えば、炎症および自己免疫疾患)の治療剤(例えば、抗IP10抗体)ならびに治療方法についての必要性が存在している。

20

#### 【発明の概要】

##### 【0004】

ある実施態様において、本発明は、治療を必要な対象におけるIP10関連疾患の治療方法を提供する。このような方法は、(a)所定用量の抗IP10抗体を対象に投与し；(b)前記対象の試料中の抗IP10抗体のレベルを検出し；次いで(c)工程(b)からの抗IP10抗体のレベルが、閾値曝露レベル以下である場合、対象のIP10関連疾患が治療されるように、対象における抗IP10抗体の用量を増加させることを特徴とする。適宜、前記方法に用いられる抗IP10抗体は、ヒトIP10に特異的に結合し、ヒトMIGまたはヒトITACと交差反応しないものであってもよい。好ましくは、前記抗IP10抗体は、MDX-1100(完全なヒトモノクローナル抗体)である。典型的な抗IP10抗体には、(a)配列番号：2のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および(b)配列番号：7のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域が含まれる。別の典型的な抗IP10抗体には、(a)配列番号：3を含む重鎖可変領域CDR1；(b)配列番号：4を含む重鎖可変領域CDR2；(c)配列番号：5を含む重鎖可変領域CDR3；(d)配列番号：8を含む軽鎖可変領域CDR1；(e)配列番号：9を含む軽鎖可変領域CDR2；および(f)配列番号：10を含む軽鎖可変領域CDR3が含まれる。

30

##### 【0005】

ある態様において、上記に記載の方法の工程(b)は、抗体抗原複合体の形成に適する条件下において、抗IP10抗体に結合する抗体と接触させ、前記抗体抗原複合体の形成を検出することを特徴とする方法により抗IP10抗体のレベルを検出することによって行われる。好ましくは、抗IP10抗体に結合する抗体は、抗イディオタイプ抗体である。例えば、抗イディオタイプ抗体は、MDX-1100の1つまたはそれ以上のCDRに結合する。典型的な抗イディオタイプ抗体としては、以下に限定されないが、実施例に記載の10C8、6C9、2F5および23H10が挙げられる。具体的な例において、前記検出方法には、捕捉抗体および検出可能抗体(「検出抗体」としても示される)として、それぞれ2種類の抗イディオタイプ抗体(すなわち、10C8および23H10)を使用する。必要に応じて、検出は、EIA、ELISA、RIA、間接競合免疫アッセイ、

40

50

直接競合免疫アッセイ、非競合免疫アッセイ、サンドウィッチ免疫アッセイおよび凝集アッセイからなる群から選択される方法によって行われる。

【0006】

ある態様において、上記に記載の方法のIP10関連疾患は、炎症または自己免疫疾患である。炎症または自己免疫疾患の例としては、以下に限定されないが、多発性硬化症、関節リウマチ、炎症性腸疾患（例えば、潰瘍性大腸炎、クローン病）、全身性エリテマトーデス、1型糖尿病、炎症性皮膚障害（例えば、乾癬、扁平苔癬）、自己免疫性甲状腺疾患（例えば、グレーブス疾患、橋本甲状腺炎）、シェーグレン症候群、肺の炎症（例えば、喘息、慢性閉塞性肺疾患、肺サルコイドーシス、リンパ性肺炎）、移植拒絶反応、脊髄損傷、脳傷害（例えば、脳卒中）、神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病）、歯肉炎、遺伝子治療誘発性炎症、血管形成の疾患、炎症性腎臓疾患（例えば、IgA腎障害、膜性増殖性糸球体腎炎、急速進行性糸球体腎炎）およびアテローム性動脈硬化症が挙げられる。IP10関連疾患の具体的な例は、炎症性腸疾患（例えば、潰瘍性大腸炎またはクローン病）である。

10

【0007】

ある実施態様において、本発明は、抗IP10抗体に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体（例えば、抗イディオタイプ抗体）またはその抗原結合部分を提供する。好ましくは、抗IP10抗体は、MDX-1100である。典型的な抗IP10抗体には、(a)配列番号：2のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および(b)配列番号：7のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域が含まれる。別の典型的な抗IP10抗体には、(a)配列番号：3を含む重鎖可変領域CDR1；(b)配列番号：4を含む重鎖可変領域CDR2；(c)配列番号：5を含む重鎖可変領域CDR3；(d)配列番号：8を含む軽鎖可変領域CDR1；(e)配列番号：9を含む軽鎖可変領域CDR2；および(f)配列番号：10を含む軽鎖可変領域CDR3が含まれる。典型的な抗イディオタイプ抗体としては、以下に限定されないが、実施例に記載されるような、10C8、6C9、2F5および23H10が挙げられる。

20

【0008】

ある実施態様において、本発明は、抗IP10抗体（例えば、MDX-1100）に特異的に結合するモノクローナル抗体（例えば、抗イディオタイプ抗体）またはその抗原結合部分を産生するハイブリドーマ細胞株を提供する。

30

【0009】

ある実施態様において、本発明は、(1)抗IP10抗体（例えば、MDX-1100）に特異的に結合するモノクローナル抗体（例えば、抗イディオタイプ抗体）またはその抗原結合部分、および(2)医薬的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。

【0010】

ある実施態様において、本発明は、試料中の治療用抗IP抗体（例えば、MDX-1100）の検出方法を提供する。このような方法は、前記試料を、抗体抗原複合体の形成に適する条件下において、抗IP10抗体に対する抗体（例えば、抗イディオタイプ抗体）またはその抗原結合部分と接触させ、続いて前記複合体の形成を検出することを特徴とする。例えば、前記抗イディオタイプ抗体は、MDX-1100の1つまたはそれ以上のCDRに結合する。典型的な抗イディオタイプ抗体としては、以下に限定されないが、実施例に記載されるように、10C8、6C9、2F5および23H10が挙げられる。具体的な例において、前記検出方法は、捕捉抗体および検出可能抗体（「検出抗体」とも称される）として、それぞれ2種類の抗イディオタイプ抗体（すなわち、10C8および23H10）を使用する。必要に応じて、検出は、EIA、ELISA、RIA、間接競合免疫アッセイ、直接競合免疫アッセイ、非競合免疫アッセイ、サンドウィッチ免疫アッセイおよび凝集アッセイからなる群から選択される方法によって行われる。

40

【0011】

ある実施態様において、本発明は、(1)抗IP10抗体（例えば、MDX-1100）に特異的に結合するモノクローナル抗体（例えば、抗イディオタイプ抗体）またはその

50

抗原結合部分、および(2)抗体抗原複合体の形成を容易にするために必要な試薬を含むキットを提供する。

【0012】

ある実施態様において、本発明は、(a)抗IP10抗体を対象に投与し；(b)前記対象の試料中の抗IP10抗体のレベルを免疫アッセイにより検出し；次いで(c)抗IP10抗体のレベルが、閾値曝露レベル以下である場合、対象における抗IP10抗体の用量を増加させ；抗IP10抗体のレベルが、閾値曝露レベルまたはそれ以上である場合、対象における抗IP10抗体の用量を増加させないことを特徴とする、治療を必要とする対象におけるIP10関連疾患の治療方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1は、実験57日目におけるMDX-1100の $C_{min}$ によって分類した臨床反応、臨床的寛解および粘膜治癒率の曝露-応答(E-R)関係を示す。

【図2】図2は、実験57日目における臨床応答率とMDX-1100の $C_{min}$ とのロジスティック回帰分析を示す。

【図3】図3は、実験57日目における臨床的寛解率とMDX-1100の $C_{min}$ とのロジスティック回帰分析を示す。

【図4】図4は、実験57日目における粘膜治癒率とMDX-1100の $C_{min}$ とのロジスティック回帰分析を示す。

【図5】図5は、可能性のある標的曝露としての異なる $C_{min}$ に対する負のlog 10で変換したp値を示す。

【図6】図6Aおよび6Bは、2種類の抗イディオタイプクローン10C8および6C9の結合活性の分析を示す。

【図7】図7は、2種類の抗イディオタイプクローン2F5および23H10の結合活性の分析を示す。

【図8】図8は、10C8のサブクローンの結合活性の分析を示す。

【図9】図9は、C9、2F5および23H10のサブクローンの結合活性の分析を示す。

【図10】図10は、IP10に対するクローン10C8競合の結合活性の分析を示す。

【図11】図11は、IP10に対するクローン2F5および23H10競合の結合活性の分析を示す。

【図12】図12Aは、6A5ヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域のヌクレオチド配列(配列番号：1)およびアミノ酸配列(配列番号：2)を示す。CDR1(配列番号：3)、CDR2(配列番号：4)およびCDR3(配列番号：5)領域を図示し、V、DおよびJ生殖系列誘導を示す。図12Bは、6A5ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列(配列番号：6)およびアミノ酸配列(配列番号：7)を示す。CDR1(配列番号：8)、CDR2(配列番号：9)およびCDR3(配列番号：10)領域を図示し、VおよびJ生殖系列誘導を示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

(発明の詳細な説明)

本発明は、IP10に特異的に結合し、IP10の機能的特性を阻害する、単離されたモノクローナル抗体、特に、ヒトモノクローナル抗体(本明細書では「IP10抗体」または「抗IP10抗体」ともいう。)に関する。ある実施態様において、本発明は、IP10抗体に結合する抗イディオタイプ抗体を提供する。ある実施態様において、本発明は、このような抗イディオタイプ抗体を用いる生物学的試料中のIP10抗体の検出方法を提供する。さらなる実施態様において、本発明は、(a)抗IP10抗体を対象に投与し；(b)前記対象の試料中の抗IP10抗体のレベルを検出し；次いで(c)工程(b)からの抗IP10抗体のレベルが、対象におけるIP10関連疾患が治療されるようなレベル以下である場合、対象に対する抗IP10抗体の用量を増加させることを特徴とする

10

20

30

40

50

、新規かつ有効な I P 1 0 関連疾患（例えば、炎症または自己免疫疾患）の治療方法を提供する。さらなる実施態様において、本発明は、（ a ）抗 I P 1 0 抗体を対象に投与し；（ b ）前記対象の試料中の抗 I P 1 0 抗体のレベルを免疫アッセイによって検出し；次いで（ b ）抗 I P 1 0 抗体のレベルが閾値曝露レベル以下である場合、対象における抗 I P 1 0 抗体の用量を増加させ；抗 I P 1 0 抗体のレベルが閾値曝露レベルまたはそれ以上である場合、対象における抗 I P 1 0 抗体の用量を増加させないことを特徴とする、治療を必要とする対象における I P 1 0 関連疾患の治療方法を提供する。

【 0 0 1 5 】

本発明がより容易に理解されうるために、特定の用語は、最初に定義されている。さらなる定義は、詳細な説明で説明される。

10

【 0 0 1 6 】

用語「インターフェロンガンマ誘導タンパク質 1 0」、「I P 1 0」および「C X C L 1 0」は、相互に同一の意味で用いられ、ヒト I P 1 0 の変異型、アイソフォームおよびホモログが含まれる。よって、本発明のヒト I P 1 0 抗体は、ある場合において、ヒト以外の種に由来する I P 1 0 と交差反応しうる。他の場合において、前記抗体は、ヒト I P 1 0 に完全に特異的であってもよく、種または他のタイプの交差反応性を示し得ない。ヒト I P 1 0 の全アミノ酸配列は、G E N B A N K（登録商標）受入番号 N P \_ 0 0 1 5 5 6 である。アカゲザル I P 1 0 の全アミノ酸配列は、G E N B A N K（登録商標）受入番号 A A K 9 5 9 5 5 である。マウス I P 1 0 の全アミノ酸配列は、G E N B A N K（登録商標）受入番号 N P \_ 0 6 7 2 4 9 である。

20

【 0 0 1 7 】

用語「C X C R 3」は、I P 1 0 の受容体（C X C L 1 0）を意味する。ヒト C X C R 3 の全アミノ酸配列は、G E N B A N K（登録商標）受入番号 N P \_ 0 0 1 4 9 5 である。

【 0 0 1 8 】

用語「M I G」は、I P 1 0 とは異なり、ガンマインターフェロンによって誘導されるモノカインとしても知られる C X C R 3 のリガンドを意味する。ヒト M I G の全アミノ酸配列は、G E N B A N K（登録商標）受入番号 N P \_ 0 0 2 4 0 7 である。

【 0 0 1 9 】

用語「I T A C」は、I P 1 0 とは異なり、インターフェロン誘導 T 細胞アルファ走化性因子としても知られる C X C R 3 のリガンドを意味する。ヒト I T A C の全アミノ酸配列は、G E N B A N K（登録商標）受入番号 N P \_ 0 0 5 4 0 0 である。

30

【 0 0 2 0 】

本明細書で用いられる用語「抗体」には、抗体全体およびその抗原結合フラグメント（すなわち、「抗原結合部分」）または単一鎖が含まれる。「抗体」は、ジスルフィド結合で相互接続された少なくとも 2 つの重（H）鎖および 2 つの軽（L）鎖を含む糖タンパク質またはその抗原結合部分を意味する。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書では、V<sub>H</sub> と略記する）および重鎖定常領域からなる。前記重鎖定常領域は、3 つのドメイン、C<sub>H1</sub>、C<sub>H2</sub> および C<sub>H3</sub> からなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書では、V<sub>L</sub> と略記する）および軽鎖定常領域からなる。軽鎖定常領域は、1 つのドメイン、C<sub>L</sub> からなる。前記 V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> 領域は、相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変領域にさらに分けられ、この領域はフレームワーク領域（FR）と呼ばれる比較的保存されている領域に組み入れられている。各 V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> は、下記の順序：FR 1、CDR 1、FR 2、CDR 2、FR 3、CDR 3、FR 4 でアミノ末端からカルボキシ末端に配列された 3 つの CDR および 4 つの FR からなる。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、その免疫グロブリンと、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的補体系の最初の補体（C 1 q）を含む宿主組織または因子との結合を介在しうる。

40

【 0 0 2 1 】

抗体の用語「抗原結合部分」（または単に「抗体部分」）は、本明細書で用いられるよ

50

うに、抗原（例えば、I P 1 0 または I P 1 0 抗体）に特異的に結合する能力を保持する抗体の1つまたはそれ以上のフラグメントを意味する。抗体の抗原結合機能は、全長抗体のフラグメントによっても発揮することができることが示されている。抗体の用語「抗原結合部分」に含まれる結合フラグメントの例としては、(i) F a b フラグメント、 $V_H$ 、 $V_L$ 、 $C_L$  および  $C_{H1}$  ドメインからなる一価フラグメント；(ii)  $F(a b')$ <sub>2</sub> フラグメント、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結されている2つのF a b フラグメントを含む二価フラグメント；(iii)  $V_H$  および  $C_{H1}$  ドメインからなるF d フラグメント；(iv) 抗体の単一腕の $V_L$  および  $V_H$  ドメインからなるF v フラグメント；(v)  $V_H$  ドメインからなるd A b フラグメント (Ward et al., Nature, 341:544-546 (1989))；および(vi) 単離された相補性決定領域(C D R)が挙げられる。さらに、F v フラグメント、 $V_L$  および  $V_H$  の2つのドメインは、別々の遺伝子によってコードされているが、 $V_L$  および  $V_H$  領域が対をなして一価分子を形成して単一タンパク質鎖とすることができる合成リンカーによって組み換え法を用いて連結することができる(単鎖F v (s c F v)として知られる；例えば、Bird et al., Science, 242:423-426 (1988)；およびHuston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883 (1988)を参照のこと)。このような単鎖抗体はまた、抗体の用語「抗原結合部分」の範囲内に含まれるものとされる。これらの抗体フラグメントは、当業者に公知の従来技術を用いて得られ、前記フラグメントは、そのままの抗体と同様にして有用性についてスクリーニングされる。

10

#### 【0022】

20

「単離された抗体」は、本明細書で用いられるように、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含んでいない抗体を意味するものとされる(例えば、I P 1 0 に特異的に結合する単離された抗体は、I P 1 0 以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含んでいない)。しかしながら、I P 1 0 に特異的に結合する単離された抗体は、他の種に由来するI P 1 0 分子などの他の抗原に対する交差反応を有していてもよい。さらに、単離された抗体は、他の細胞物質および/または化学物質を実質的に含み得ない。

#### 【0023】

本明細書で用いられる用語「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」は、単一の分子組成の抗体分子の調製物を意味する。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対する単一の結合特異性および親和性を示す。

30

#### 【0024】

本明細書で用いられる用語「ヒト抗体」は、フレームワークおよびC D R領域の両方がヒト生殖系列免疫グロブリン配列から生じる可変領域を有する抗体を含むものとされる。さらに、抗体が定常領域を含有する場合、前記定常領域はまた、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列から生じるものである。本発明のヒト抗体には、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされていないアミノ酸残基が含まれてもよい(例えば、インビトロでのランダムまたは部位特異的突然変異またはインビボでの体細胞突然変異によって導入された変異)。しかしながら、本明細書で用いられる用語「ヒト抗体」は、マウスなどの別の哺乳類の生殖系列に由来するC D R配列がヒトのフレームワーク配列に移植された抗体を含むものではない。

40

#### 【0025】

用語「ヒトモノクローナル抗体」は、フレームワークおよびC D R領域の両方がヒト生殖系列の免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する、単一の結合特異性を示す抗体を意味する。ある実施態様において、ヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞と融合された、ヒト重鎖導入遺伝子および軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニック非ヒト動物(例えば、トランスジェニックマウス)から得たB細胞を含むハイブリドーマによって産生される。

#### 【0026】

本明細書で用いられる用語「組み換えヒト抗体」には、(a)ヒト免疫グロブリン遺伝子についての導入遺伝子または導入染色体を有する動物(例えば、マウス)または(下記

50



にさらに記載される) これらから作成したハイブリドーマから単離された抗体、(b) ヒト抗体を発現するように形質転換された宿主細胞(例えば、トランスフェクト-マ(transfectoma))から単離された抗体、(c) 組み換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体、および(d) ヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他のDNA配列へのスライシングに関連する他の方法によって調製され、発現され、作出され、または単離された抗体などの組み換え方法によって調製され、発現され、作出され、または単離される全てのヒト抗体が含まれる。このような組み換えヒト抗体は、そのフレームワークおよびCDR領域がヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有するものである。しかしながら、ある実態様において、このような組み換えヒト抗体は、インビトロ変異誘発にかけられ(あるいは、ヒトIg配列についての動物トランスジェニックが用いられる場合、インビボ体細胞変異誘発)、それにより、組み換え抗体のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>に由来し、関連する一方で、インビボにおけるヒト抗体生殖系列レパートリー内で天然に存在し得ない配列でありうる。

10

#### 【0027】

##### 抗IP抗体に結合する抗体

ある態様において、本発明は、抗IP10抗体に特異的なモノクローナルまたはポリクローナル抗体(例えば、MDX-1100)を提供する。好ましくは、このような抗体は、抗イデオタイプ(抗Id)抗体である。抗イデオタイプ(抗Id)抗体は、抗体の抗原結合部位に一般に結合するユニークな決定因子を認識する抗体である。Id抗体は、抗Idが作成される抗体で動物を免疫化することによって調製することができる。免疫化された動物は、これらのイデオタイプ決定因子に対する抗体(抗Id抗体)を産生することによって免疫化抗体のイデオタイプ決定因子を認識し、応答する。例えば、米国特許第4,699,880号を参照のこと。抗IP10抗体に結合するモノクローナル抗体の産生のための典型的な技術は、以下に提供される。

20

#### 【0028】

モノクローナル抗体は、実質的に均一な抗体の集団から取得されうる(すなわち、前記集団を含む各抗体は、少量で存在しうる可能性のある天然に存在する変異体を除いて同一である)。よって、修飾語「モノクローナル」は、別個の抗体の混合物にはないような抗体の特性を示す。例えば、このモノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)に最初に記載されたハイブリドーマ法を用いて作出されうるか、あるいは、組み換えDNA法(米国特許第4,816,567号)によって作出されうる。ハイブリドーマ法では、マウスまたは他の適切な宿主動物(例えば、ハムスター)は、上記に記載されるように免疫化されて、免疫化に用いられるタンパク質に特異的に結合する抗体を産生し、または産生することができるリンパ球を誘発する。あるいは、リンパ球は、インビトロで免疫化されうる。次いで、リンパ球は、適切な融合剤(例えば、ポリエチレングリコール)を用いて骨髓腫細胞と融合されて、ハイブリドーマ細胞を形成する(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103, Academic Press (1986))。

30

#### 【0029】

それにより調製されたハイブリドーマ細胞は、好ましくは、融合されていない親骨髓腫細胞の増殖または生存を阻害する1つまたはそれ以上の物質を含有する適切な培地中で撒種され、増殖される。例えば、親骨髓腫細胞が酵素ヒポキサンチン・グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPR TまたはHPR T)を欠乏する場合、ハイブリドーマの培地には、典型的に、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン(HAT培地)が含まれ、これらの物質がHGPR T欠失細胞の増殖を阻害する。好ましい骨髓腫細胞は、効率的に融合し、選択した抗体産生細胞によって抗体の安定で高いレベルの産生をサポートし、HAT培地などの培地に感受性を有するものである。これらの中で、典型的な骨髓腫細胞株は、マウス骨髓腫細胞株(例えば、米国、カリフォルニア州、サンディエゴのSalk Institute Cell Distribution Centerから入手可能なMOPC-21およびMPC-11マウス腫瘍、ならびに米国、バージニア州、マナサスのAmerican Type Culture Collectionか

40

50

ら入手可能なSP-2、P3X63Ag.U.1またはX63-Ag8-653細胞に由来する細胞株)である。ヒト骨髓腫およびマウスヒトヘテロ骨髓腫細胞もまた、ヒトモノクローナル抗体の産生について記載されている(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York (1987))。

#### 【0030】

ハイブリドーマ細胞が増殖する培地は、目的の抗体に対するモノクローナル抗体の産生についてアッセイされる。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈殿法またはインビトロ結合アッセイ(例えば、放射免疫アッセイ(RIA)またはELISA)によって決定される。このようなクローンはまた、捕捉試薬および/または検出可能抗体として用いられる場合、アッセイにおいてバックグラウンドノイズの少ないものについてスクリーニングされる。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980)のスキッチャード分析によって決定することができる。所望の特異性、親和性および/または活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が同定された後、前記クローンは、限界希釈法によってサブクローン化され、標準的な方法によって増殖されてもよい(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103, Academic Press (1986))。このための適切な培地には、例えば、D-MEMまたはRPMI-1640培地が含まれる。さらに、ハイブリドーマ細胞は、動物内の腹水腫瘍としてインビボで増殖されてもよい。サブクローンから分泌されたモノクローナル抗体は、例えば、プロテインA-SEPHAROSE(登録商標)アガロスクロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析またはアフィニティークロマトグラフィーなどの従来の免疫グロブリン精製法によって、培地、腹水または血清から適切に分離される。

10

20

#### 【0031】

ハイブリドーマ技術を用いる1つの具体的な精製技術としては、例えば、アジュバント(例えば、モノホスホリル脂質A/トレハロースジコリノミコレート)中の目的の抗体を用いて、あるいはキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)またはリムルスヘモシアニンを有する目的の抗体の抱合体として、足蹠または脾臓中に注射することによって、CAF1マウスまたはBalb/cなどのマウスを免疫化することが含まれる。注射は、必要に応じて何度でも行われる。マウスは屠殺され、免疫化されたマウスから取り出した膝窩リンパ節または脾臓(特に高い力価を有するもの)は、SP2/0またはP3X63Ag.U.1(American Type Culture Collection(バージニア州, マナサスのATCC))などのマウス骨髓腫細胞株と融合される。得られたハイブリドーマは、異なる抗原に結合する他の抗体ではなく、目的の抗体について結合親和性を有する抗体についてスクリーニングされる。このスクリーニングは、固定化した目的の抗体に結合する抗体の分泌に対して、または約95%以上の阻害能(目的の抗体のタンパク質抗原への結合の阻害)を有するIgGの産生に対して、従来のELISAによって行われる。このスクリーニングは、目的の抗体に対してわずかな、またはより高い反応性ならびに選択性を有する抗体の集団を明確にする。ELISAに特に好ましい特性を有する抗体を同定するためにさらなる選択が行われてもよい。好ましい抗イディオタイプ抗体を選択するために用いられる判断基準としては、それが比較的高い親和性( $K_d < 約 10^{-8} M$ )をもって目的の抗体に結合すること、ならびにその目的抗体への結合が分析膜貫通型タンパク質への結合と相互排他的であるべきことが挙げられる。最も少ないバックグラウンドノイズで最も鮮明なアッセイをも提供すべきである。

30

40

#### 【0032】

陽性クローンは、(そのオフ率に反映されるような)目的の抗体に対する抗イディオタイプ抗体の親和性およびその結合相互排他性を測定するために、BIACORE(登録商標)装置を用いて表面プラズモン共鳴法で再度スクリーニングされてもよい。ウサギ抗マウスIgG(Fc)は、バイオセンサー表面上に固定化され、ハイブリドーマ培養上澄み液から抗イディオタイプ抗体を捕捉するために用いられてもよい。目的の抗体は、0.2

50

n M単独および0.9 n MのC反応性タンパク質(CRP)の存在中で、固定化された抗イディオタイプ抗体およびその比較される相対物質蓄積物の表面上に注入されうる。選択されるハイブリドーマ細胞は、限界希釈法によってクローン化されて、所望のクローンが得られる。続いて、抗イディオタイプ抗体は、これらのクローンから精製され、単離されうる。例えば、抗イディオタイプ抗体を調製するための例について米国公開番号第2002/0142356号および第2008/0176257号、ならびにDurrant et al., *Int. J. Cancer*, 1:92(3):414-420 (2001)およびBhattacharya-Chatterjee, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 3(1):63-69 (2001)を参照のこと。

#### 【0033】

ある実施態様において、モノクローナル抗体はまた、組み換えて産生されうる。モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来的手法を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを用いて)、容易に単離され、配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源として供する。単離されると、前記DNAは、発現ベクターに組み込まれ、次いで免疫グロブリンタンパク質を他に産生することのないE. coli細胞、サルCOS細胞、チャニーズハムスター卵巣(CHO)細胞または骨髓腫細胞などの宿主細胞にトランスフェクトさせて、組み換え宿主細胞中でモノクローナル抗体の合成が得られてもよい。抗体をコードするDNAの細菌における組み換え発現についての総説として、Skerra et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 5:256-262 (1993)およびPluckthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992)が挙げられる。

#### 【0034】

さらなる実施態様において、抗体または抗体フラグメントは、McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990)に記載の技術を用いて作成した抗体ファージライブラリーから単離することができる。Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)およびMarks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)は、それぞれ、ファージライブラリーを用いたマウスおよびヒト抗体の単離を記載する。その後の文献には、鎖シャッフリング法(chain shuffling)(Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992))、ならびに非常に大きいファージライブラリーを構築するための方策としてのコンビトリアル感染およびインビボ組み換え(Waterhouse et al., *Nucl. Acids Res.*, 21:2265-2266 (1993))による高親和性(n M範囲)ヒト抗体の産生が記載される。よって、これらの技術は、モノクローナル抗体の単離のための従来のモノクローナル抗体ハイブリドーマ技術の代わりに実施することができる。

#### 【0035】

前記DNAはまた、例えば、相同なマウス配列の代わりにヒト重鎖および軽鎖定常ドメインのコーディング配列を置き換えることによって(例えば、米国特許第4,816,567号;Morrison, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984))、あるいは免疫グロブリンコーディング配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコーディング配列の全部または一部を共有結合で結合することによって改変されてもよい。

#### 【0036】

本明細書で詳細に記載されているか、または記載されていない本発明を実施するために有用な方法の多くは、分子生物学、生化学、免疫学および薬学の当業者にとって周知である。目的の抗体が同定されると、抗IP10抗体に結合する抗体の作成は、当該技術分野の当業者の技術範囲内であろう。

#### 【0037】

##### 検出アッセイの方法

ある実施態様において、本発明の抗IP10抗体(例えば、MDX-1100)に対する抗体またはその抗原結合部分は、対象における治療用抗IP10抗体(例えば、MDX-1100)ならびにそのフラグメントおよび誘導体の検出方法に用いることができる。好ましくは、このような抗体は、抗イディオタイプ(抗Id)抗体である。例えば、試験対象からの体液(例えば、血液、血清または血漿)または組織試料は、抗体抗原複合体の

10

20

30

40

50

形成に適する条件下において、本発明の抗MDX-1100モノクローナル抗体またはその抗原結合部分と接触される。次いで、このような複合体の存在または量は、本明細書に記載され、あるいは当該技術分野で公知である方法によって決定することができ（例えば、O'Connor et al., Cancer Res., 48:1361-1366 (1988)を参照のこと）、試験試料中で検出される複合体の存在または量は、公知の抗原の量を含む一連の標準試料または対照試料中で検出される複合体の存在または量と比較される。よって、本発明は、生物学的試料（例えば、血液、血清、血漿、尿、脳脊髄液、粘液または）中のMDX-1100（またはそのフラグメントおよび/または誘導体）などの抗IP10抗体の検出方法に関する。

#### 【0038】

記載される検出アッセイのいずれにおいても、前記方法は、免疫アッセイ、例えば、酵素免疫アッセイ（EIA）、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、放射免疫アッセイ（RIA）、間接競合免疫アッセイ、直接競合免疫アッセイ、非競合免疫アッセイ、サンドウィッチ免疫アッセイ、凝集アッセイまたは本明細書に記載され、当該技術分野で知られている他の免疫アッセイ（例えば、Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158, CRC Press, Inc. (1987)を参照のこと）を用いることができる。免疫アッセイは、不均一系または均一系で測定されてもよい。不均一系による免疫アッセイは、結合分析物を結合していない分析物から、または結合標識物を結合していない標識物から固相分離を取り入れることによって区別する。固相は、以下に限定されないが、チューブ、プレート、ビーズおよびストリップ（strip）を含む当該技術分野で周知の様々な形態をとりうる。ある特定の形態は、マイクロタイタープレートである。前記固相物質は、様々なガラス、ポリマー、プラスチック、紙または膜からなりうる。ポリスチレンなどのプラスチックが特に好ましい。不均一系による免疫アッセイは、競合または非競合であってもよい（すなわち、サンドウィッチ系）（例えば、米国特許第7,195,882号を参照）。

#### 【0039】

具体的な実施態様において、本発明は、下記の工程を特徴とする、対象からの生物学的試料中のMDX-1100の検出方法を提供する（下記を参照）。

#### 【0040】

アッセイの第1の工程において、生物学的試料は、MDX-1100に対する抗イデオタイプ抗体などの固定化された捕捉抗体と接触され、インキュベートされる。これらの抗イデオタイプ抗体は、好ましくは、モノクローナル抗体であり、いずれの種に由来してもよいが、好ましくは、げっ歯類、より好ましくは、マウス（例えば、実施例に記載されるような10C8、6C9、2F5および23H10）。固定化は、水不溶性マトリックスまたは表面への吸着（米国特許第3,720,760号）または非共有結合もしくは共有結合（例えば、例えば、硝酸および米国特許第3,645,852号またはRotmans et al., J. Immunol. Methods, 57:87-98 (1983)）に記載されるような還元剤を含む担体の活性化前もしくは活性化なしでグルタルアルデヒドまたはカルボジイミド架橋結合を用いる）によるようなアッセイ法の前、あるいはその後（例えば、免疫沈殿法による）に捕捉抗体を不溶化することによって従来技術を用いて行われる。

#### 【0041】

固定化に用いられる固相は、本質的に水不溶性であり、免疫アッセイに有用である不活性な担体または担体のいずれかであってもよく、例えば、表面、粒子、多孔性マトリックスなどの形態中の担体が含まれる。担体として一般的に用いられる例としては、小さなシート、SEPHADEX（登録商標）ゲル、ポリ塩化ビニル、プラスチックビーズ、ならびにポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレンから製造されたアッセイプレートまたは試験管（96ウェルのマイクロタイタープレートを含む）、ならびに濾紙、アガロース、交差結合デキストランおよび他の多糖類などの粒子状物質が挙げられる。あるいは、臭化シアン活性化炭水化物などの反応性水不溶性アトリックスおよび米国特許第3,969,287号；第3,691,016号；第4,195,128号；第4,247,64

10

20

30

40

50

2号；第4，229，537号；および第4，330，440号に記載の反応性物質は、捕捉剤の固定化に適切に用いられる。具体的な実施態様において、固定化された捕捉抗体は、マイクロタイタープレート上にコーティングされ、特に、用いられる固相は、一度に数種類の試料を分析するために用いることができるマルチウェルマイクロタイタープレートである。最も好ましくは、NUNC（登録商標）MaxiSorbまたはIMMULON（登録商標）として販売されるものなどのMICROTEST（登録商標）またはMaxiSorb 96ウェルELISAプレートである。前記固相は、上記に定義される捕捉抗体でコーティングされ、必要に応じて非共有または共有の相互作用または物理的結合によって連結されうる。結合技術としては、米国特許第4，376，110号および当該文献に列挙される参考文献に記載のものが挙げられる。共有結合である場合、プレートまたは他の固相は、室温で1時間などの当該技術分野で周知の条件下で捕捉抗体とともに架橋剤と共にインキュベートされる。捕捉剤を固相物質に結合させるために一般に用いられる架橋剤としては、例えば、1，1-ビス（ジアゾアセチル）-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル類、例えば、4-アジドサリチル酸とのエステル、ホモ二官能性イミドエステル（3，3'-ジチオビス（サクシニミジルプロピオネート）などのジサクシニミジルエステル類を含む）およびビス-N-マレイミド-1，8-オクタンなどの二官能性マレイミド類が挙げられる。誘導体化剤（例えば、メチル-3-（（p-アジドフェニル）-ジチオ）プロピオイミデート）は、光の存在下で架橋を形成することができる光活性化可能な中間体を生じる。

#### 【0042】

続いて、コーティングされたプレートは、典型的に、遊離のリガンドのプレートのウェル上における過剰な部位への望ましくない結合を妨げるために、結合部位に非特異的に結合し、飽和させるブロッキング試薬で処理される。このための適当なブロッキング試薬の例としては、例えば、ゼラチン、ウシ血清アルブミン、卵アルブミン、カゼインおよび無脂肪乳が挙げられる。ブロッキング処理は、典型的に、約1～4時間、好ましくは、約1.5～3時間周囲温度の条件下で行う。

#### 【0043】

試料および固定化した捕捉抗体のインキュベーションのための条件は、アッセイの感受性を最大にし、解離を最小にし、ならびに試料中に存在する目的の抗体が固定化した捕捉抗体に結合することを確実にするように選択される。好ましくは、前記インキュベーションは、ほぼ一定温度、約0～約40の範囲、好ましくは、およそ室温で行われる。インキュベーション時間は、一般に、約10時間以下である。好ましくは、インキュベーション時間は、目的の抗体の捕捉抗体への結合を最大にするために、約0.5～3時間、より好ましくは、約1.5～3時間またはおよそ室温で行われる。インキュベーション期間は、プロテアーゼ阻害剤が生物学的液体中のプロテアーゼを目的の抗体の分解から防ぐために加えられる場合、より長くなってもよい。

#### 【0044】

任意の本明細書に記載のアッセイ方法の第2の工程において、生物学的試料は、捕捉されなかった目的の抗体（例えば、MDX-1100）を除去するために、固定化した捕捉抗体から（好ましくは、洗浄により）分離される。前記洗浄は3回またはそれ以上行われる。洗浄の温度は、一般に、アッセイ期間中に一定温度で維持しながら、冷蔵庫中の温度から適度な温度、典型的に、約0～40、より好ましくは、約4～30である。架橋剤または他の適切な薬剤はまた、捕捉された目的の抗体が後の段階である程度解離される可能性がある場合に、現在結合している目的の抗体を捕捉試薬に共有結合させるために、この段階で加えられてもよい。

#### 【0045】

第3の工程において、目的の抗体（例えば、MDX-1100）が結合した固定化された捕捉抗体は、検出可能な抗体と、好ましくは、約20～40、より好ましくは、約36～38の温度で接触される。検出可能な抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体であり得るが、好ましくは、モノクローナル抗体であり、より好ましくは、げっ歯

10

20

30

40

50

類、さらにより好ましくはマウスのものである。具体的な実施例において、本明細書に記載のアッセイの検出可能な抗体は、実施例に記載されるようなMDX - 1100、10C8、6C9、2F5および23H10に対する抗イディオタイプ抗体である。適宜、検出可能な抗体は、直接検出することができ、例えば、ビオチン化される。ビオチン化標識のための検出方法は、好ましくは、アビジンまたはストレプトアビジン - HRPであり、検出方法の読み取りは、好ましくは、蛍光または比色分析である。

#### 【0046】

同一の抗イディオタイプ抗体は、アッセイにおけるコーティング（捕捉）および検出に用いることができるか、あるいは、異なる抗体は、コーティング（捕捉）および検出に用いることができる。これらは、好ましくは、バックグラウンドノイズが最小となるように選択される。

10

#### 【0047】

アッセイ方法の第4の工程において、捕捉抗体に現在結合している試料から遊離した目的の抗体（例えば、MDX - 1100）のレベルは、検出可能抗体のための検出方法を用いて測定される。生物学的試料が臨床患者に由来するものである場合、前記測定工程には、好ましくは、上記の3つの工程の結果として生じる反応を、標準曲線と比較して、公知の量と比較した目的の抗体のレベルを決定することが含まれる。

#### 【0048】

検出可能抗体（本明細書では、「第1の抗体」ともいう）は、過剰量の第1の抗体を洗浄して除去した後、第1の抗体の動物種のIgGに対する第2の標識抗体を加えることによって、直接標識されるか、または間接的に検出される。後者の間接アッセイの場合、第1の抗体に対する標識抗血清は、生体内で標識抗体を産生させるために試料に加えられる。第1または第2の抗体のいずれかに用いられる標識物質は、遊離した目的抗体の抗イディオタイプ抗体への結合を妨げることなく検出可能な官能性を有する。適切な標識物質の例は、蛍光色素、化学発光標識および放射性標識などの直接検出されうる部分、ならびに検出されるように反応され、誘導体化されるべき酵素などの部分を含む免疫アッセイにおける使用に知られている多くの標識物質である。このような標識物質の例としては、放射性同位体<sup>32</sup>P、<sup>14</sup>C、<sup>125</sup>I、<sup>3</sup>Hおよび<sup>131</sup>I、フルオロフォア、例えば、希土類キレートまたはフルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、例えば、蛍ルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ（例えば、米国特許第4,737,456号）、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、HRP、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼリゾチーム、糖オキシダーゼ、例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、およびグルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ヘテロ環オキシダーゼ、例えば、HPRなどの標識前駆物質を酸化するために過酸化水素を用いる酵素と連結させたウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ、またはミクロペルオキシダーゼ、ビオチン（例えば、アビジン、ストレプトアビジン、ストレプトアビジン - HRPおよびMUGを伴うストレプトアビジン -  $\alpha$ -ガラクトシダーゼによる検出可能）、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定なフリーラジカルなどが挙げられる。具体的な実施態様において、標識物質は、ビオチンであり、検出手段は、アビジンまたはストレプトアビジン - HRPである。

20

30

40

#### 【0049】

従来の方法は、タンパク質またはポリペプチドにこれらの標識物質に共有結合で結合させるために利用できる。例えば、カップリング剤（ジアルデヒド、カルボジイミド、ジマレイミド、ビス-イミデート、ビス-ジアゾ化ベンジジンなど）は、上記に記載の蛍光、化学発光および酵素標識で抗体にタグを付けるために用いられうる。例えば、米国特許第3,940,475号（蛍光）および第3,645,090号（酵素）；Hunter et al., Nature, 144:945 (1962)；David et al., Biochemistry, 13:1014-1021 (1974)；Pain et al., J. Immunol. Methods, 40:219-230 (1981)；およびNygren, J. Histochem. Cytochem., 30:407-412 (1982)を参照のこと。典型的な標識物質は、検出のためにストレプト

50

アビジン - H R Pを用いるビオチンである。このような標識物質（酵素を含む）の抗体への抱合は、免疫アッセイ技術における分野のための標準的な操作手順である。例えば、O' Sullivan et al., "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," in Methods in Enzymology, Langone, J.J. and Van Vunakis, H., eds. Vol.73, pp.147-166, Academic Press, New York, N.Y.(1981)を参照のこと。

#### 【 0 0 5 0 】

最後の標識抗体を加えた後、結合した抗体の量は、過剰量の結合していない標識抗体を洗浄により除去し、次いで標識物質に適当な検出方法を用いて結合した標識物質の量を測定し、測定した量を生物学的試料中の目的の抗体の量との相互関係を比較することによって決定される。例えば、酵素の場合、発色させ、測定した量は、存在する目的の抗体の量の直接的な測定である。具体的には、H R Pが標識物質である場合、色は、基質O P Dを490 nmの吸光度で用いて検出される。別の例において、第1の標識されていない抗体に対する酵素標識された第2の抗体が固定化された相から洗浄された後、色または化学発光は、固定化された捕捉試薬を酵素の基質とインキュベートすることによって発色され、測定される。続いて、目的の抗体の濃度は、標準的な目的の抗体によって平行して作成された色または化学発光との比較によって算出される。

10

#### 【 0 0 5 1 】

##### キット

ある実施態様において、本発明は、目的の抗I P 1 0抗体（例えば、M D X - 1 1 0 0）に対する1つまたはそれ以上の抗体（モノクローナルまたはポリクローナル）またはその抗原結合部分ならびに抗体抗原複合体の形成および/または検出を容易にするために必要な試薬を含む、上記に記載のアッセイで用いることができるキットを提供する。好ましくは、このようなキットの抗体は、抗イディオタイプ抗体である。例えば、本発明のキットは、( a ) M D X - 1 1 0 0に対する少なくとも1つの抗イディオタイプ抗体（本明細書では、「捕捉抗体」と称される）を含む捕捉剤；( b ) M D X - 1 1 0 0における異なるエピトープに結合する少なくとも1つの検出可能（標識され、または標識されていない）抗イディオタイプ抗体；および( c ) これらの試薬を用いてアッセイ方法を実施する方法についての説明書の基本的な構成要素を含むパッケージされた組み合わせである。

20

#### 【 0 0 5 2 】

適宜、キットには、別個の構成要素として提供され、または捕捉抗体がすでに固定化されている捕捉抗体のための固相担体がさらに含まれていてもよい。よって、キット中の捕捉抗体は、固相担体上に固定化されていてもよく、あるいは、それらは、キットに含まれるか、またはキットとは別に提供される担体上に固定化されうる。例えば、捕捉抗体は、マイクロタイプレート上にコーティングされる。検出可能な抗体は、直接検出される標識された抗体、または異なる種中で生じる標識されていない抗体に対する標識された抗体によって検出される標識されていない抗体でありうる。キットには、通常、標識物質が酵素である場合、酵素に必要とされる基質および共因子が含まれ、標識物質がフルオロフォアである場合、検出可能な発色団を供する色素前駆体が含まれ、ならびに、標識物質がビオチンである場合、アビジンなどのアビジン、ストレプトアビジン、またはM U Gを伴うH R Pもしくは - ガラクトシダーゼに抱合されたストレプトアビジンが含まれる。

30

40

#### 【 0 0 5 3 】

具体的な実施例において、捕捉抗体は、実施例に記載されるような1 0 C 8、6 C 9、2 F 5および2 3 H 1 0から選択される抗イディオタイプ抗体である。また、具体的な実施例において、検出可能な抗体は、1 0 C 8、6 C 9、2 F 5および2 3 H 1 0から選択される抗イディオタイプであり、捕捉抗体および検出可能な抗体は、M D X - 1 1 0 0上の異なるエピトープに結合する。

#### 【 0 0 5 4 】

前記キットには、陽性コントロールとして、抗イディオタイプ抗体に結合する目的の抗体（例えば、精製されたM D X - 1 1 0 0）またはそのフラグメントがさらに含まれてい

50

てもよい。前記キットには、陰性コントロールとして、抗イディオタイプ抗体と反応しない抗体がさらに含まれていてもよい。このキットには、安定化剤、洗浄およびインキュベーション緩衝液などの他のさらなる物質が含まれていてもよい。キットの構成物は、アッセイの感受性を実質的に最大にする試薬の溶液中の濃度を提供するために適切に変化される様々な試薬の相対量を用いて、所定の比率で提供される。特に、試薬は、通常、凍結乾燥されている乾燥粉末（賦形剤を含む）として提供されてもよく、溶解され、試験される試料と合わせるのに適当な濃度の試薬溶液を提供する。

#### 【0055】

##### 治療方法

ある実施態様において、本発明は、(a) 所定用量の抗IP10抗体を対象に投与し；(b) 前記対象の試料中の抗IP10抗体のレベルを検出し；次いで(c) 工程(b)からの抗IP10抗体のレベルが閾値曝露レベル以下である場合、対象のIP10関連疾患が治療されるように、対象における抗IP10抗体の用量を増加させ（例えば、治療上の有効な用量まで）；次いで、抗体(b)からの抗IP10抗体のレベルが閾値曝露レベルまたはそれ以上である場合、対象における抗IP10抗体の用量を増加さかないことを特徴とする、新規かつ有効なIP10関連疾患（例えば、炎症または自己免疫疾患）の治療方法を提供する。特に、試料中の抗IP10抗体のレベルは、上記に記載されるアッセイのいずれかによって検出することができる。

10

#### 【0056】

用語「治療する」には、IP10関連疾患の症状の発症、合併症または生化学的な兆候を予防し、もしくは遅延させ、前記症状を軽減させ、または前記疾患のさらなる発症（例えば、炎症または自己免疫疾患）を妨げ、もしくは阻害するための抗IP10抗体の投与が含まれる。治療は、疾患の兆候後の症状の予防上（疾患の発症を予防し、または遅延させるため、あるいは臨床的症状またはその亜臨床的症状の兆候を予防するため）または治療上の抑制または軽減でありうる。

20

#### 【0057】

本明細書で用いられる用語「用量」または「投与量」は、対象に投与される抗IP10抗体の量を意味する。

#### 【0058】

本明細書で用いられる用語「治療上有効な用量」は、好ましくは、疾患症状の重症度の低下、疾患症状のない期間の頻度および持続時間の増加、または疾患による欠損または障害の予防を生じる抗IP10抗体の用量を意味する。当該技術分野における通常の技術により、対象の大きさ、対象の症状の重症度および選択された投与の特定の組成物または経路などの因子に基づいて、このような量を決定することができる。

30

#### 【0059】

本明細書で用いられる用語「閾値曝露レベル」は、誘導期および/または維持期中に抗IP10抗体を対象に投与した後、疾患の寛解の臨床的に意義のある誘導および/または維持を可能にする最小の曝露レベルを意味する。閾値曝露レベルは、実施例に記載される曝露応答分析などによって容易に決定することができる。例えば、閾値曝露レベルは、40 ~ 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ （例えば、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）の範囲のトラフ濃度でありうる。

40

#### 【0060】

本発明は、少なくとも一部は、下記に記載されるような炎症性腸疾患（IBD）を治療する際に、ヒト抗IP10抗体（すなわち、MDX-1100）の臨床試験中に行われた観察に基づくものである。前記試験は、MDX-1100で治療した患者におけるMDX-1100の薬物動態的（PK）パラメータの変動を示す。一方、前記試験は、この試験中でMDX-1100の極めて低い免疫原性を示す。さらに、前記試験は、トラフ薬物レベルが有効性に直接関連したことによる強い薬物曝露/応答関連性を示す。

#### 【0061】

多くの炎症または自己免疫疾患（例えば、IBD）については、治療として、従来、（

50



1) 急性疾患を抑えるために比較的高い薬物用量を用いる誘導期；および(2) 疾患の再発を予防するために比較的低い用量を用いる維持期(または治療期)(例えば、米国公開第2006/0009385号)が含まれる。上記に記載される臨床試験の結果は、誘導期に得られたが、これらの観察(例えば、PKパラメータの変動、非常に低い免疫原性および強い曝露/応答関連性)は、分子および/またはその作用メカニズムの特性に対する内因性のものでありうる。よって、出願人は、維持期においても同様に観察されることを予想する。

#### 【0062】

本発明のある態様は、患者に対する薬物の過剰投与を最小にし、同時に、(例えば、維持期において)有効性を最適にするものである。具体的な例において、本発明は、(1) 抗IP10抗体の維持用量(例えば、所定用量)で患者に投与し；(2) 対象が応答を維持できない場合(「応答性を失う」または「再発する」ともいう)、診断アッセイは、対象における抗IP10抗体の曝露レベル(例えば、血液濃度)を測定するために用いられ；(3) 抗IP10抗体の曝露レベルが閾値曝露レベル以下である場合、薬物応答が対象中で維持されるように、対象における用量を増加させることを特徴とする、IP10関連疾患の治療方法を提供する。このことは、慢性的な療法中に、臨床的な評価および客観的な薬物濃度測定によって測定されるように、患者が個別の用量(例えば、必要な時にのみ多くの薬物を受けるなど)を摂取することを可能にする。

#### 【0063】

##### 1. 抗IP10抗体

ある態様において、本発明は、特定の機能的な特徴または特性によって特徴付けられる抗IP10抗体の使用に関する。例えば、抗体は、ヒトIP10に特異的に結合する。また、抗体は、アカゲザルなどの1種類またはそれ以上の非ヒト霊長類からのIP10と交差反応しうる。好ましくは、抗体は、マウスIP10と交差反応しない。さらに、MIGおよびITACがCXCR3受容体のリガンドでもある場合、本発明の抗体は、好ましくは、ヒトMIGまたはヒトITACと交差反応しないものである。また、本発明の抗体は、IP10の1つまたはそれ以上の機能的な活性を阻害することができる。例えば、ある実施態様において、抗体は、IP10のCXCR3への結合を阻害する。別の態様において、抗体は、IP10で誘導されるカルシウム流入を阻害する。なお別の実施態様において、抗体は、IP10で誘導される細胞遊走(走化性)を阻害する。抗IP10抗体の他の機能的な特徴または特性は、出典明示によりその内容が本明細書に取り込まれる米国公開第2005/0191293号に記載される。

#### 【0064】

典型的な抗IP10抗体は、出典明示によりその内容が本明細書に取り込まれる米国公開第2005/0191293号に記載されるモノクローナル抗体1D4、1E1、2G1、3C4、6A5、6A8、6B10、7C10、8F6、10A12および13C4である。

#### 【0065】

好ましい態様において、抗IP10抗体には、(a) 配列番号：2のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および(b) 配列番号：7のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域が含まれる。

#### 【0066】

別の好ましい実施態様において、抗IP10抗体には、(a) 配列番号：3を含む重鎖可変領域CDR1；(b) 配列番号：4を含む重鎖可変領域CDR2；(c) 配列番号：5を含む重鎖可変領域CDR3；(d) 配列番号：8を含む軽鎖可変領域CDR1；(e) 配列番号：9を含む軽鎖可変領域CDR2；および(f) 配列番号：10を含む軽鎖可変領域CDR3が含まれる。

#### 【0067】

本明細書で定義されるように、本発明の抗IP10抗体には、重鎖および軽鎖可変領域が本明細書に記載の好ましい抗体のアミノ酸配列に相同であるアミノ酸配列が含まれるも

10

20

30

40

50

のであって、前記抗体は、本発明の抗 I P 1 0 抗体の望ましい機能的な特性を保持するものである。例えば、抗 I P 1 0 抗体には、( a ) 配列番号：2 からなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも 8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 8 % または 9 9 % 同一であるアミノ酸を含む重鎖可変領域；( b ) 配列番号：7 からなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも 8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 8 % または 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域が含まれる抗体が挙げられる。別の例において、抗 I P 1 0 抗体として、( a ) 配列番号：3 に少なくとも 8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 8 % または 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む、重鎖可変領域 C D R 1；( b ) 配列番号：4 に少なくとも 8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 8 % または 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む、重鎖可変領域 C D R 2；( c ) 配列番号：5 に少なくとも 8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 8 % または 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む、重鎖可変領域 C D R 3；( d ) 配列番号：8 に少なくとも 8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 8 % または 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む、軽鎖可変領域 C D R 1；( e ) 配列番号：9 に少なくとも 8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 8 % または 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む、軽鎖可変領域 C D R 2；および ( f ) 配列番号：1 0 に少なくとも 8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 8 % または 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む、軽鎖可変領域 C D R 3；を含む抗体が含まれる。この相同な抗体のいずれかは、I P 1 0 に特異的に結合し、下記の機能的な特性のうちの少なくとも 1 つを示す：( i ) 前記抗体は、I P 1 0 の C X C R 3 への結合を阻害し；( i i ) 前記抗体は、I P 1 0 で誘導されるカルシウム流入を阻害し；( i i i ) 前記抗体は、I P 1 0 で誘導される細胞遊走を阻害し；( i v ) 前記抗体は、アカゲザル I P 1 0 と交差反応し；( v ) 前記抗体は、マウス I P 1 0 と交差反応せず；( v i ) 前記抗体は、ヒト M I G と交差反応せず；( v i i ) 前記抗体は、ヒト I T A C と交差反応しない。相同な抗 I P 1 0 抗体はまた、出典明示によりその内容が本明細書に取り込まれる米国公開第 2 0 0 5 / 0 1 9 1 2 9 3 号に記載される。

#### 【 0 0 6 8 】

本明細書で定義されるように、本発明の抗 I P 1 0 抗体としては、細胞毒素、薬物（例えば、免疫抑制剤）または放射性毒素などの治療上の部分に抱合された抗 I P 1 0 抗体またはそのフラグメントが挙げられる。このような抱合体は、本明細書では「免疫抱合体」という。1 つまたはそれ以上の細胞毒素を含む免疫抱合体は、本明細書では「免疫毒素」という。細胞毒素または細胞毒性剤には、細胞に有害である（例えば、死滅させる）薬剤が含まれる。例として、タキソール（登録商標）、サイトカラシン B、グラミシジン D、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テニポシド（tenoposide）、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラセンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシン D、1 - デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロールおよびピューロマイシンおよびその類似体またはホモログが挙げられる。治療剤としては、例えば、代謝拮抗剤（例えば、メトトレキサート、6 - メルカプトプリン、6 - チオグアニン、シタラビン、5 - フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオテパ（thioepa）、クロランブシル、メルファラン、カルムスチン（B S N U）およびロムスチン（C C N U）、シクロホスファミド（cyclophosphamide）、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシン C およびシス - ジクロロジアミン白金（I I）（D D P）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルピシン（以前は、ダウノマイシンと呼ばれていた）およびドキシソルピシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前は、アクチノマイシンと呼ばれていた）、プレオマイシン、ミトラマイシンおよびアントラマイシン（A M C））および有糸分裂阻害剤（例えば、ピンクリスチンおよびピンブラスチン）が挙げられる。本発明の抗体に抱合することができる治療上の細胞毒素の他の好ましい例としては、デュオカルマイシン、カリケアマイシン、メイタンシンおよびオーリスタチン、およびその誘導体が挙げられる。カリケアマイシン抗体抱合体の一例として、市販品として入手可能である（M Y L O T A R G（登録商標）；W y e t h - A y e r s t）。抗 I P

10 抗体の免疫抱合体はまた、出典明示によりその内容が取り込まれる米国公開第2005/0191293号に記載される。

【0069】

本明細書で定義されるように、本発明の抗IP10抗体としては、抗IP10抗体またはそのフラグメントを含む二特異性分子がさらに挙げられる。抗IP10抗体またはその抗原結合部分は、少なくとも2種類の異なる結合部位または標的分子に結合する二特異性分子を作成するために、別の機能性分子、例えば、別のペプチドまたはタンパク質（例えば、受容体に対する別の抗体またはリガンド）から誘導体化され、または連結することができる。抗IP10抗体またはそのフラグメントは、実際に、2つ以上の異なる結合部位および/または標的分子に結合する多特異性分子を作成するために1つ以上の他の機能性分子から誘導体化され、または連結されていてもよく；このような多特異性分子もまた、本明細書で用いられる用語「二特異性分子」に包含されるものとされる。二特異性分子を作り出すために、抗IP10抗体は、二特異性分子を生じるように、（例えば、化学カップリング、遺伝学的融合、非共有結合または他の手段によって）別の抗体、抗体フラグメント、ペプチドまたは結合模倣物（binding mimetic）などの1つまたはそれ以上の他の結合分子に機能的に連結することができる。二特異性抗IP10抗体はまた、出典明示によりその内容が本明細書に取り込まれる米国公開第2005/0191293号に記載される。

10

【0070】

2. IP10関連疾患の治療方法

20

ある態様において、本発明は、対象におけるIP10関連疾患を治療するための抗IP10抗体（免疫抱合体および二特異性分子）の使用に関する。本明細書で用いられる用語「対象」には、ヒトおよび非ヒト動物が含まれるものとされる。非ヒト動物としては、全ての脊椎動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ニワトリ、両生類および爬虫類などの哺乳類および非哺乳類が挙げられる。前記方法は、異常なIP10発現に関連する疾患にかかっているヒト患者を治療するために特に適当である。IP10に対する抗体が別の薬剤と共に投与される場合、この2つの薬剤は、順番に、または同時に投与することができる。

【0071】

用語「IP10関連疾患または障害」または「IP10介在性疾患または障害」は、IP10が障害の兆候を引き起こす主な原因となっている局所および/または全身の生理障害を意味する。典型的なIP10関連疾患としては、以下に限定されないが、多発性硬化症、関節リウマチ、炎症性腸疾患（例えば、潰瘍性大腸炎、クローン病）、全身性エリテマトーデス、1型糖尿病、炎症性皮膚障害（例えば、乾癬、扁平苔癬）、自己免疫性甲状腺疾患（例えば、グレーブス疾患、橋本甲状腺炎）、シェーグレン症候群、肺の炎症（例えば、喘息、慢性閉塞性肺疾患、肺サルコイドーシス、リンパ性肺炎）、移植拒絶反応、脊髄損傷、脳傷害（例えば、脳卒中）、神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病）、歯肉炎、遺伝子治療誘発性炎症、血管形成の疾患、炎症性腎臓疾患（例えば、IgA腎障害、膜性増殖性糸球体腎炎、急速進行性糸球体腎炎）およびアテローム性動脈硬化症を含む、炎症または自己免疫疾患が挙げられる。IP10関連障害はまた、出典明示によりその内容が本明細書に取り込まれる米国公開第2005/0191293号に記載される。

30

40

【0072】

3. 医薬組成物および投与経路

ある態様において、本発明は、医薬的に許容される担体と共に製剤化される抗IP10モノクローナル抗体またはその抗原結合部分のうちの1つまたは組み合わせを含有する組成物（例えば、医薬組成物）に関する。このような組成物として、本発明の（例えば、2種類またはそれ以上の異なる）抗体、または免疫抱合体もしくは二特異性分子のうちの1つまたは組み合わせが含まれていてもよい。例えば、医薬組成物には、標的抗原上の異なるエピトープに結合するか、または相補的な活性を有する抗体（または免疫抱合体もしく

50

は二特異性分子)の組み合わせが含まれる。適宜、本発明は、抗IP10抗体を他の薬剤と組み合わせて含む医薬組成物を使用することによる併用療法を提供する。例えば、併用療法としては、少なくとも1つの他の抗炎症剤または免疫抑制剤と組み合わせた抗IP10抗体を挙げることができる。併用療法に用いることができる治療剤の例は、出典明示によりその内容が取り込まれる米国公開第2005/0191293号に詳細に記載される。

#### 【0073】

本明細書で用いられるように、「医薬的に許容される担体」としては、生理学的に適合性を有するいずれか全ての溶媒、分散媒質、コーティング剤、抗菌薬および抗真菌薬、等張および吸収遅延剤などが挙げられる。好ましくは、前記担体は、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄または上皮投与(例えば、注射または点滴による)に適する。投与経路に応じて、活性な化合物(すなわち、抗体、免疫複合体または二特異性分子)は、酸の作用および前記化合物を不活性化しうる他の自然条件から前記化合物を保護するための物質でコーティングされていてもよい。前記医薬化合物には、1つまたはそれ以上の医薬的に許容される塩が含まれる。医薬組成物の他の成分は、出典明示によりその内容が取り込まれる米国公開第2005/0191293号に詳細に記載される。

10

#### 【0074】

投薬計画は、最適な所望の応答(例えば、治療上の応答)を生じるように調整される。例えば、単回ボラスが投与されてもよく、数回分割投薬量が長期間にわたり投与されてもよく、あるいはこの投薬量は、治療状況の危急により示されるように比例的に減少され、もしくは増加されてもよい。投与の利便性および投薬の均一性のために非経口組成物を投薬単位形態中に製剤化するのに特に有利である。本明細書で用いられる投薬単位形態は、治療される対象の単位用量として適する物理的に分離した単位を意味し;各単位は、必要な医薬担体と組み合わせて所望の治療効果を生じるように算出された抗IP10抗体の所定の量を含む。投薬単位形態の特定は、(a)抗IP10抗体の独特の特徴および達成される特定の治療効果、および(b)各対象における治療感度に対する抗IP10抗体などを配合する技術分野における固有の限界によって決定され、直接左右される。

20

#### 【0075】

抗IP10抗体の投与に関して、前記用量は、宿主の体重の約1~50mg/kgの範囲である。例えば、用量は、体重の1mg/kg、3mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、35mg/kg、40mg/kg、45mg/kgまたは50mg/kgでありうる。典型的な治療計画は、1日に1回、1週間に3回、1週間に2回、1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回、4週間に1回、1月に1回、3月に1回または3~6月に1回の投与を伴う。一例において、抗IP10抗体の投薬計画としては、下記の投薬スケジュールのうちの1つを用いて投与される抗体の静脈内投与による1mg/kg体重または3mg/kg体重が挙げられる:(i)4週間ごとに6回の投薬、次いで3月ごと;(ii)3週間ごと;(iii)1回の3mg/kg体重、続いて3週間ごとに1回の1mg/kg体重。

30

#### 【0076】

具体的な実施態様において、抗IP10抗体の投与は、誘導期中の静脈内吸入によるものであり、維持期中の皮下注射によるものである。投与頻度は、1日に1回から1月に1回まで変動しうる。対象が維持期中に応答を維持できない場合(「応答を失う」または「再発」ともいう)、診断アッセイは、抗IP10抗体の対象の曝露レベル(例えば、血中レベル)を測定するために用いられ;(3)抗IP10抗体の曝露レベルが閾値曝露レベル以下である場合、対象における用量を増加させる。適宜、前記用量は、投与頻度を増加させることによって、対象において増加させることができる(例えば、1週間に1回から1週間に2回の頻度に増加させる)。

40

#### 【0077】

ある実施態様において、異なる結合特異性を有する2つまたはそれ以上のモノクローナル抗体は、同時に投与され、この場合、投与される各抗体の用量は、示される範囲内に含

50

まれる。抗 I P 抗体は、通常、複数回で投与される。投与間の間隔は、例えば、1 週間ごと、1 月ごと、3 月または 1 年ごとでありうる。間隔はまた、患者における I P 1 0 抗体の血中レベルを測定することによって示されるように、不規則であってもよい。ある態様において、用量は、約 1 ~ 6 0 0  $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、ある方法では、約 2 5 ~ 3 0 0  $\mu\text{g} / \text{ml}$  の血漿濃度を達成するように調整される。

#### 【 0 0 7 8 】

あるいは、抗 I P 1 0 抗体は、持続放出性製剤として投与することができ、この場合、頻度の低い投与が必要となる。用量および頻度は、患者内における抗体の半減期によって変動しうる。一般に、ヒト抗体が最も長い半減期を示し、続いて、ヒト化抗体、キメラ化抗体および非ヒト抗体と続く。用量および投与頻度は、治療が予防上であるか、または治療上であるかに応じて変動しうる。予防上に用いる場合、比較的低い用量が、長期間にわたり比較的少ない頻度の間隔で投与される。ある患者は、人生の残りについて治療を受け続ける。治療上に用いる場合、病気の進行が減少し、または終結するまで、好ましくは、患者が病気の症状の部分的または完全な軽減を示すまで、比較的短い間隔で比較的高い用量が必要とされることもある。その後、患者は、予防的な計画で投与することができる。

10

#### 【 0 0 7 9 】

医薬組成物中の抗 I P 1 0 抗体の実際の用量レベルは、患者に対して毒性であることなく、一定の患者、組成物および投与様式について所望の治療応答を達成するのに有効である活性成分の量を得るために変動されうる。選択される用量レベルは、用いられる抗 I P 1 0 抗体またはそのエステル、塩もしくはアミドの活性、投与経路、投与期間、用いられる抗 I P 1 0 抗体の排出速度、治療期間、用いられる特定の組成物と組み合わせて使用される他の薬物、化合物および/または物質、年齢、性別、体重、条件、治療される患者の総合的な健康および既往歴を含む様々な薬物動態的因子ならびに医薬分野で周知の因子などに依存する。

20

#### 【 0 0 8 0 】

本発明は、限定するものと解釈されるべきではない下記の実施例によってさらに例示される。本願を通して引用される全ての図面および全ての参考文献、特許文献および公開された特許出願の内容は、出典明示により本明細書に取り込まれるものである。

#### 【 実施例 】

#### 【 0 0 8 1 】

30

#### ( 実施例 1 )

潰瘍性大腸炎患者における M D X - 1 1 0 0 の曝露量 - 応答分析、および潰瘍性大腸炎患者の治療のための M D X - 1 1 0 0 に対する標的曝露量の同定

第 I I 相二重盲検プラセボ対照ランダム化多施設反復投与臨床実験において、M D X - 1 1 0 0 を、プラセボと比較した、中等度から重度の活動性潰瘍性大腸炎 ( U C ) 患者における臨床応答の誘発について実験した。臨床データの曝露量 - 応答 ( E - R ) 分析を行って、U C 患者の治療において安全かつ有効となるであろう M D X - 1 1 0 0 に対する標的曝露量を同定した。

#### 【 0 0 8 2 】

#### 方法

40

#### 1 . E - R 分析における患者集団

7 カ国の 4 0 の地区の全部で 1 0 9 人の U C 患者を、1 週間おきに全部で 4 用量 ( 用量は、実験 1、1 5、2 9、および 4 3 日目に投与された )、静脈内注入によって、1 0 m g / k g のプラセボ ( N = 5 4 ) または M D X - 1 1 0 0 ( N = 5 5 ) を投与するようにランダム化した。

#### 【 0 0 8 3 】

研究は、日米 E U 医薬品規制調和国際会議によって規定された医薬品の臨床試験の実施の基準に従って、欧州連合指令 2 0 0 1 / 2 0 / E C および米国連邦規制基準第 2 1 章、第 5 0 部 ( 2 1 C F R 5 0 ) の根本にある倫理原則に従って、ヘルシンキ宣言に端を発する倫理原則に従って行った。研究のプロトコル、修正、および被験者のインフォームドコ

50

ンセントは、現場での研究の開始の前に、治験審査委員会（IRB）/独立倫理委員会（IEC）によって適切な認可を受けた。研究の開始に先立って、研究者は、各被験者に、IRB/IECの文書による認可/文書によるインフォームドコンセントフォームの好意的意見およびあらゆる他の関連する情報を提供した。研究における被験者の適格性を確認するために行われるあらゆるスクリーニング手順についてのインフォームドコンセントを含む、自由に提供された文書によるインフォームドコンセントを、各被験者から、またはインフォームドコンセントが被験者から得ることができなかった状況では被験者の法的に認められる代表者から、研究への参加の前に得た。

【0084】

全患者は、内視鏡検査で中等度から重度の活動性疾患を伴う6～10のMayoスコア（2のMayo内視鏡サブスコア）として定義される活動性UCを有していた。全ての患者は、5-アミノサリチレート（5-ASA）、コルチコステロイド、アザチオプリン（AZA）、および/または6-メルカプトプリン（6-MP）を継続して投薬されていた。

10

【0085】

これらの109人の患者は包括解析（ITT）集団として定義され、有効性の測定を評価するための一次集団であった。109人の患者のうち、2人の患者（共にプラセボ群に割り当てられた）は、ランダム化されたが治療は受けなかった。したがって、残りの107人の患者が、安全性についての母集団として定義され、少なくとも1回の完全なまたは部分的な用量のプラセボ（N=52）またはMDX-1100（N=55）を投与された全患者を含んでいた。患者の内訳および人口統計を、表1および2にまとめる。

20

表1

患者の内訳（ITT集団）

【表1】

	患者数, N(%)		
	プラセボ N=54	MDX-1100 N=55	合計 N=109
ITT集団	54 (100.0)	55 (100.0)	109 (100.0)
完了日 57日	49 (90.7)	49 (89.1)	98 (89.9)
57日前に中止した主な理由			
有害事象	0	2 (3.6)	2 (1.8)
プロトコル違反	1 (1.9)	2 (3.6)	3 (2.8)
不満足な治療効果	1 (1.9)	0	1 (0.9)
患者の同意の取り下げ	2 (3.7)	0	2 (1.8)
死亡	0	0	0
追跡不可	0	0	0
その他	1 (1.9)	2 (3.6)	3 (2.8)

30

表2

患者の統計（ITT集団）

40

【表 2】

	患者数, N(%)		
	プラセボ N=54	MDX-1100 N=55	合計 N=109
年齢 (年)			
平均 (SD)	41.8 (14.2)	44.7 (12.8)	43.2 (13.5)
中央値	37.0	45.0	43.0
範囲	18-75	25-73	18-75
性別, n(%)			
男性	31 (57.4)	37 (67.3)	68 (62.4)
女性	23 (42.6)	18 (32.7)	41 (37.6)
人種, n(%)			
白人	54 (100.0)	53 (96.4)	107 (98.2)
黒人	0	2 (3.6)	2 (1.8)
アジア人	0	0	0
その他	0	0	0
体重(kg)			
平均 (SD)	74.5 (18.1)	81.9 (16.1)	78.2 (17.4)
中央値	71.3	79.0	75.0
範囲	50.0-139.1	52.0-124.1	50-139.1

10

20

## 【0086】

## 2. UC患者におけるMDX-1100の薬物動態学的分析

MDX-1100の薬物動態学的評価のための血清試料を、実験1、15、29、および43日目、ならびに実験57日目の各投薬の60分前までに各患者から採取した。MDX-1100の血清濃度を、パリテーションされたELISAアッセイ法を用いてアッセイした。実験57日目のMDX-1100の血清トラフ濃度を、MDX-1100治療を受けた各患者の定常状態トラフ濃度 ( $C_{minss}$ ) として導き出した。

30

## 【0087】

## 3. 有効性および安全性の測定のE-R分析ならびにMDX-1100に対する標的曝露量の同定

E-R分析において判定された曝露量の測定は、実験57日目でのMDX-1100の  $C_{minss}$  であった。E-R分析において判定された有効性の測定は、(1) 実験57日目に、患者の少なくとも30%で総Mayoスコアがベースラインから少なくとも3点減少していること(スクリーニング)に加え、直腸出血についてのサブスコアが少なくとも1点減少しているかまたは直腸出血についての絶対サブスコアが0もしくは1減少しているものとして定義された、臨床応答(臨床応答率は、各治療群における、臨床応答を有していた患者の割合として定義された); (2) 実験57日目に、総Mayoスコアが2点であり、1点を超える個別のサブスコアがなく、かつ患者の便に血液が見られないものとして定義された、臨床的寛解(臨床的寛解率は、各治療群における、臨床的寛解にあった患者の割合として定義された); および(3) 実験57日目に、患者における内視鏡検査サブスコアが0または1であるとして定義された、粘膜治癒(粘膜治癒率は、各治療群における、粘膜の治癒を有していた患者の割合として定義された)であった。E-R分析において判定された安全性の測定は、死亡、重篤有害事象(SAE)、治療に関連するSAE、SAEに起因する中断、有害事象(AE)、治療に関連するAE、およびAEに起因する中断であった。

40

## 【0088】

E-R分析のために、実験57日目にMDX-1100の  $C_{minss}$  値を有していた

50

全ITT患者を、それらの患者のC<sub>min</sub>値、すなわち(1)低(26.4~78.6 μg/mL);(2)中(79.2~105 μg/mL);および高(108~235 μg/mL)に基づく三分位数に階層化した。臨床応答率、臨床的寛解率、および粘膜治癒率を、C<sub>min</sub>の三分位数のそれぞれについて計算し、フィッシャーの正確検定法を用いて95%CIを提供した。ロジスティック回帰を用いて、C<sub>min</sub>と有効性の測定とのそれぞれの間の曝露量-応答関係を別々に実験した。その95%CIとともに、曝露量の倍加に伴うオッズ比を計算した。P値もまた報告した。安全性の測定を、プラセボを投与された全患者、DX-1100を投与された全患者、およびDX-1100を投与されC<sub>min</sub>が最高の三分位数(108 μg/mL)であった全患者について表にした。

10

【0089】

4. UC患者の治療のためのMDX-1100に対する標的曝露量の同定

MDX-1100への最適な標的曝露量を、全体的な有効性に関して、曝露量が標的曝露量未満である患者と曝露量が標的曝露量を超える患者との間の最大の分離をもたらすように選択した。MDX-1100に対する標的曝露量は、以下のアルゴリズムに基づいて決定した。すなわち、いかなる所与の曝露量cについても、フィッシャーの正確検定を行って、曝露量がc未満である患者と曝露量がcを超える患者との間で、臨床応答率、臨床的寛解率、および粘膜治癒率について差があるかどうかを決定した。最小対応p値を有する曝露量を、標的曝露量として選択した。

20

【0090】

結果

1. UC患者におけるMDX-1100の薬物動態学

ELISAによる全ての報告されたヒト血清中のMDX-1100濃度は、事前に確立された許容基準を満たし、分析の時点で用いられている適用可能なSOPに従って実行された、適切な検量線および品質管理試料を用いる分析ランにおいて調製した。アッセイ成績の概要を表3に示す。

表3

ヒト血清中のMDX-1100についてのアッセイおよび能力の概要

【表3】

分析物	LLOQ (μg/mL)	ULOQ (μg/mL)	サンプル間の %CV <sup>a</sup>	理論濃度からの平均%誤差 <sup>a</sup>
MDX-1100	1	40	≤ 12.6	± 3.35

30

<sup>a</sup> 分析QCからの最大値

【0091】

4回の投薬後、MDX-1100のトラフ濃度(C<sub>min</sub>)は、15日目の42.2 μg/mLから57日目の91.3 μg/mLまで増大した(表4)。実験57日目のC<sub>min</sub>が、ヒトにおけるMDX-1100の半減期がおよそ8日であったこと、およびQ2weekの投与計画に基づいて、C<sub>min</sub>であると考えられた。MDX-1100のC<sub>min</sub>の変動係数(CV%)は、実験57日目に44.2%であり、他の生物学的療法に類似していた(例えば、Fasanmade AA, et al., Int J Clin Pharmacol Ther. 2010, 48(5):297-308; Nestorov I, Semin Arthritis Rheum. 2005 Apr;34(5 Suppl1):12-8. Reviewを参照されたい)。

40

表4

MDX-1100のC<sub>min</sub>(μg/mL)の統計の概要



【表 4】

実験日数	1	15	29	43	57	
C <sub>min</sub> <sup>a</sup>	幾何平均		42.2	72.0	84.0	91.3
	CV%		50.1	73.6	58.4	44.2
	N		50	50	49	49

<sup>a</sup> 注入用量の投与前の前投与量で収集したトラフ濃度

## 【0092】

2. 臨床応答率、臨床的寛解率、粘膜治癒率対 MDX - 1100 の C<sub>min</sub> の曝露量 - 応答関係

E - R 分析により、より高い MDX - 1100 の C<sub>min</sub> が、臨床応答率、臨床的寛解率、および粘膜治癒率の顕著な増加に関連することが実証された (図 1)。MDX - 1100 の C<sub>min</sub> が最高の三分位数サブグループ (C<sub>min</sub> : 108 ~ 235 μg / mL) にあった患者は、プラセボ治療を受けた患者または MDX - 1100 の C<sub>min</sub> が2つのより低い三分位数にあった患者と比較して、最も高い臨床応答率、臨床的寛解率、および粘膜治癒率を達成した。臨床応答率、臨床的寛解率、および粘膜治癒率は、最高の三分位数サブグループにある MDX - 1100 の C<sub>min</sub> を達成した患者対プラセボ治療を受けた患者で、それぞれ、87.5%対37%、43.8%対18.5%、および68.8%対35.2%であった。また、C<sub>min</sub> が最高の三分位数サブグループにあった患者における Mayoスコアは、プラセボで治療した患者または MDX - 1100 の C<sub>min</sub> が2つのより低い三分位数にあった患者と比較して顕著に向上し、ベースラインからの Mayoスコアの減少の平均は、2.8と比較して、4.7であった。

## 【0093】

臨床応答率、臨床的寛解率、および粘膜治癒率のロジスティック回帰分析により、UC患者を MDX - 1100 で治療すると、患者が、MDX - 1100 の C<sub>min</sub> の増加を達成すれば、臨床応答率、臨床的寛解率、および粘膜治癒率の増加を達成することが実証された。臨床応答率、臨床的寛解率、および粘膜治癒率のオッズ比は、それぞれ3.77 (P = 0.017)、2.85 (P = 0.071)、および3.08 (P = 0.03) であった。言い換えると、患者によって達成される MDX - 1100 の C<sub>min</sub> が2倍増加すると、患者が臨床応答、臨床的寛解、および粘膜治癒を達成するオッズは、それぞれ、3.77、2.85、および3.08倍増加する (図2~4)。

## 【0094】

3. 曝露量 - 安全性関係

MDX - 1100 で治療し、最高の三分位数サブグループにある C<sub>min</sub> を達成した患者の安全性プロファイルは、MDX - 1100 の安全性についての母集団全体に匹敵するものであった (表5)。MDX - 1100 の安全性についての母集団全体においては55人の患者のうち22人 (40%) であったのに対し、MDX - 1100 の C<sub>min</sub> が最高の三分位数サブグループにあった16人の患者のうち6人 (37.5%) が、少なくとも1つのAEを経験した。MDX - 1100 の安全性についての母集団全体においては55人のうち11人 (20.0%) であったのに対し、前記16人の患者のうち2人 (12.5%) のみが経験したAEは、実験療法に関連すると考えられた。MDX - 1100 の C<sub>min</sub> が最高の三分位数サブグループにあり、少なくとも1つのAEを経験していた患者の数もまた、プラセボ群のそれに匹敵するものであった (それぞれ、6 / 16 [37.5%] 対 17 / 52 [32.7%])。

## 【0095】

MDX - 1100 の安全性についての母集団全体においては4人の患者 (7.3%) であったのに対し、MDX - 1100 の C<sub>min</sub> が最高の三分位数サブグループにあった16人の患者では、SAEは報告されなかった。AEに起因して中断された、MDX -

1100の安全性についての母集団全体における2人の患者は、 $C_{minss}$ の最高の三分位数サブグループにはなかった。さらに、MDX-1100の安全性についての母集団全体における、感染が報告された患者(55人の患者のうち7人、12.7%)のいずれも、 $C_{minss}$ の最高の三分位数サブグループにはなかった。

【0096】

要するに、本研究における限られた数の患者に基づくと、MDX-1100の $C_{minss}$ の増加に関連するAEの増加はなかった。

表5

有害事象の概要<sup>a</sup> ( $C_{minss}$ サブグループ)

【表5】

	患者数, N(%)		
	プラセボ N=52	MDX-1100 安全な集団 N=55	MDX-1100 $C_{minss} \geq 108 \mu\text{g/mL}$ サ ブグループ N=16
死亡	0	0	0
SAE <sup>b</sup>	1 (1.9)	4 (7.3)	0
SAE関連 <sup>c</sup>	0	0	0
SAEによる中止	0	1 (1.8)	0
AE	17 (32.7)	22 (40.0)	6 (37.5)
AE関連	7 (13.5)	11 (20.0)	2 (12.5)
AEによる中止	0	2 (3.6)	0

<sup>a</sup> AEは、前治療がないものを含む治療の間もしくは治療の最終投薬の70日以内に現れる、または前治療の状態と比較して悪化した、症候の兆候、およびタイミングに関わらず、治療に関連するあらゆるAEとして定義される。

<sup>b</sup> SAEは、治験薬の70日後までに研究者によって重篤であると考えられる、全てのグレード3(重度)以上の事象(または重症度の分からない事象)を含む。グレードレベルは、USA NCI AEの解明ガイドラインに基づく。

<sup>c</sup> もしかすると、おそらく、または確実に、治験薬に関連している(関連が不明なものは、関連していると推定された)

【0097】

4. UC患者の治療のためのMDX-1100に対する標的曝露量

3つの有効性の測定(臨床応答率、臨床的寛解率、および粘膜の治癒率)の全てを用いて、MDX-1100に対する標的曝露量を同定した。図5の結果に基づくと、約100 $\mu\text{g/mL}$ の $C_{minss}$ で、 $-\log_{10}$ 変換されたp値は最大に達し、これは、最小対応p値、すなわち、曝露量がこの標的曝露量を超える患者と曝露量がこの標的曝露量未満の患者との間で最大に有効性が異なることを示した。曝露量-安全性の分析は、MDX-1100が安全であり、本研究において最高の三分位数(108~235 $\mu\text{g/mL}$ )にある $C_{minss}$ を有するUC患者において良好な耐容性を示すことを示唆した。したがって、100 $\mu\text{g/mL}$ の $C_{minss}$ 値は、MDX-1100でのUC患者の治療にとって安全かつ有効なMDX-1100に対する標的曝露量と同定した。

【0098】

5. 免疫原性の分析

本研究において、MDX-1100の免疫原性の判定を、バリデーションされた電気化学発光(ELISA)アッセイで、1、29、57、および85日目(治験薬の最終投薬の42日後)に、安全性についての母集団の試料を用いて行った。MDX-1100に対するヒト抗ヒト抗体は、このELISAアッセイで、いずれの患者においても検出されなかった。

【0099】

(実施例2)

10

20

30

40

50

## マウス抗MDX - 1100イディオタイプ抗体の作成

## 材料および方法

## 1. 免疫原

本明細書において6A5とも呼ばれるMDX - 1100は、ヒト抗IP10抗体である(例えば、米国公開第2005/0191293号を参照されたい)。MDX - 1100(10mg/ml)を、Fabの調製に用いた。MDX - 1100のFab断片(2.92mg/ml)を、抗体作成における免疫原として用いた。

## 【0100】

## 2. マウスおよび免疫化手順

以下のマウスを用いて、少数のハイブリドーマ、例えば10C8、6C9、2F5、および23H10を生成した。以下の表6は、ハイブリドーマおよびそれらの産生に用いられた相当するマウスをまとめている。

表6

ハイブリドーマおよびそれらの作成に用いられた対応するマウスのリスト

## 【表6】

ハイブリドーマ	マウスID	マウスの雌雄	マウスの遺伝型
10C8	135878	オス	BALB/C
6C9	135879	メス	BALB/C
2F5	222587	メス	BALB/C
23H10	222587	メス	BALB/C

## 【0101】

約25~30μgのMDX - 1100のFabを用いて、ip注射、sc注射、および足底注射を介してマウスを免疫化した。このような免疫化は、5日の別の日に行った。その後、脾臓およびリンパ節を採取した。

## 【0102】

## 3. ハイブリドーマの作成

Sp2/0骨髓腫細胞株は、融合するために用いた。細胞を1ヶ月間にわたり培養で維持し、1週間に2回継代した。P388D1(ATCC、TIB-63FL)細胞の上清を、ハイブリドーマのための馴化培地として用いた。簡潔に述べると、細胞を成長させ、200mlまで増殖させた。静置培養物を約7日間にわたり成長させた。枯渇上清を遠心沈殿させ、0.2μmの無菌フィルターを介して濾過した。この細胞株を1ヶ月間にわたり継代し、次いで、新たなバイアルを融解した。

## 【0103】

10%FBS(HYCLONE(登録商標)、カタログ番号SH30071.03;ロット番号ASL31024)を含有するDMEM(Gibco番号12382-024)を用いて、骨髓腫融合パートナーおよびP388D1細胞を培養した。追加の培地補充物をハイブリドーマ成長培地に添加し、これは、5%Origen-ハイブリドーマクロニング因子(IGEN(登録商標)、カタログ番号210001)、15%P388D1馴化培地、β-メルカプトエタノール(Gibcoカタログ番号1019091)、Hepes(CELLGRO(登録商標)番号25060037)、およびHAT(Sigma、H0262;1.0×10<sup>-4</sup>Mのヒポキサンチン、4.0×10<sup>-7</sup>Mのアミノプテリン、1.6×10<sup>-5</sup>Mのチミジン)またはHT(Sigma、H0137;1.0×10<sup>-4</sup>Mのヒポキサンチン、1.6×10<sup>-5</sup>Mのチミジン)を含んでいた。

## 【0104】

融合のための3匹のマウスの脾臓およびリンパ節から得られた生存細胞を、以下の表7に列挙した。電極融合を脾細胞に行った。得られたハイブリドーマを、200μl/ウェルで播種された96ウェルCOSTAR(登録商標)組織培養物処理済プレート内に全てプレートングした。

10

20

30

40

50

表 7

マウスの脾臓およびリンパ節から生じた融合物のリスト

【表 7】

融合物 ID	マウス ID	脾臓細胞およびリンパ球の総数
925	135878	1.8e8
926	135879	2.1e8
2431	222587	2.1e8

## 【0105】

## 結果

## 1. 融合体のスクリーニング、サブクローニング、および増殖

融合体を、MDX 1100 6A5 (6A5 全体、6A5 - ビオチン、または 6A5 Fab) に直接的に結合する抗体についてまずスクリーニングし、次いで、他の抗 IP 10 ヒト抗体 (例えば 1D4 および 10A12) およびプールされたヒト IgG に対する特異的結合を追跡した。

## 【0106】

図 6A は、ハイブリドーマの上清を ELISA によって MDX 1100 6A5 特異的抗体についてスクリーニングすると、クローン 10C8 および 6C9 が陽性であったことを示す。図 6B は、クローン 10C8 および 6C9 が 6A5 に特異的に結合することを示す。図 7 は、クローン 2F5 および 23H10 が 6A5 に特異的に結合することを示す。

## 【0107】

さらに、10C8、6C9、2F5、および 23H10 のサブクローンを同様に分析し、6A5 に特異的に結合することが見出された (図 8 ~ 9)。

## 【0108】

## 2. 抗体の選択

抗体の選択は、6A5 に特異的な MDX 1100 6A5 対、無関係な抗体である 1D4 および 10A12 ならびにプールされたヒト IgG への直接的な結合、さらに 6A5 - IP 10 相互作用との抗イディオタイプ抗体の競合に基づくものであった。ELISA での競合結合アッセイにおいて、1 μg/ml、50 μl のヤギ抗マウス IgG ガンマをプレート上に被覆した。予め混合された 6A5 および IP 10 (抗原: 抗体比 = 5:1)、または 6A5 全体のみを添加した。1 μg/ml、50 μl の希釈された抗イディオタイプ抗体を同様に添加した。次いで、ヤギ抗ヒト IgG Fc ガンマ - HRP を、検出のために添加した。

## 【0109】

図 10 は、クローン 10C8 が競合結合アッセイにおいて IP 10 と競合することを示す。図 11 は、クローン 2F5 および 23H10 が競合結合アッセイにおいて IP 10 と競合しないことを示す。

## 【0110】

## (実施例 3)

Meso Scale Discovery (MSD) 電気化学発光免疫アッセイによるヒト血清における MDX - 1100 の定量的決定

Meso Scale Discovery (MSD) 電気化学発光免疫アッセイは、ヒト血清における MDX - 1100 の定量的ために開発された。MSD 法が採用する技術は、2% ヒト血清中の MDX - 1100 を捕捉するために、ビオチン化された抗 MDX - 1100 マウスモノクローナル抗体 (クローン 10C8) が、ストレプトアビジンで被覆された 96 ウェルプレート上に被覆されているものであった。捕捉された MDX - 1100 を、次いで、sulfo-tag で標識された抗 MDX - 1100 マウスモノクローナル抗体 (クローン 23H10) を用いて検出した。2% ヒト血清において作成された標準曲線は、5 ng/mL ~ 300 ng/mL (100% ヒト血清において 250 ~ 15,0

10

20

30

40

50

00 ng/mL)の範囲であり、250 ng/mLがアンカーポイントである4パラメータロジスティック回帰モデルに適合した。QCでのアッセイ内精度は7.2%以内であり、アッセイ間精度は10.9%以内であった。参照標準でのアッセイ内精度は6.7%以内であり、アッセイ間精度は6.4%以内であった。QCの正確性は、理論値の±15.6%以内であった。参照標準の正確性は、理論値の±5.4%以内であった。500 ng/mLの定量下限(LLoQ)では、10の潰瘍性大腸炎患者の血清試料のうち10についての理論値からの予測濃度の偏差は、±6.7%以内であった。アッセイ成績は、それぞれ最大100 ng/mLおよび5000 ng/mLのプレインキュベートされたIP10およびヘパリン硫酸によって影響されなかったが、35~40%の干渉が、HQC、MQC、およびLQCにおいて1000 ng/mLのIP-10および50000 ng/mLのヘパリン硫酸で観察された。MDX-1100およびIsoAsp-MDX-1100の回収率は差を示さなかった。

10

## 【0111】

## 材料および方法

## A. 溶液および試薬の調製

1. アッセイバッファー(DPBS中1%BSAおよび0.05%Tween-20) 50 mLの10%BSA溶液および2.5 mLの10%Tween-20溶液を500 mLのDPBSに移す。2~8 で保管する。調製の3ヶ月以内に使用する。

## 【0112】

2. ブロッキングバッファー(DPBS中5%BSAおよび0.05%Tween-20) :

20

250 mLの10%BSA溶液および2.5 mLの10%Tween-20溶液を250 mLのDPBSに添加する。2~8 で保管する。調製の3ヶ月以内に使用する。

## 【0113】

3. PBS洗浄バッファー(0.05%v/vのTween20を含有する、PBS乾燥粉末パッケージ、pH7.4±0.2)

1つのPBSパッケージの内容物を1リットルのdH<sub>2</sub>O中に溶解し、溶液を室温で保管した。調製の1ヶ月以内に使用する。

## 【0114】

4. アッセイバッファー/2%ヒト血清

30

60 μLのヒト血清を2940 μLのアッセイバッファーに添加する。この溶液は、使用する日に調製する。

## 【0115】

5. ビオチン化されたマウス抗イディオタイプIP10 6A5 MA b 10C8

-70 でアリコートに保管した。使用する前に、各アリコートを室温で融解した。アッセイバッファー中で最終的に1 μg/mLを調製し、アッセイのためのプレートの被覆に用いた。この試薬の新たなロットのそれぞれは、以前のロットに対して滴定されなくてはならず、以前のロットで観察された結果に等しい結果をもたらす希釈度でアッセイにおいて用いられなくてはならない。

## 【0116】

40

6. Sulfo-Tagで標識されたマウス抗イディオタイプIP10 6A5 MA b 23H10

試薬をアリコートに分け、-70 で保管した。アッセイバッファー中のSulfo-Tagで標識されたマウス抗イディオタイプIP10 6A5 MA b 23H10の最終濃度25 ng/mLの溶液を、アッセイのために調製した。この試薬の新たなロットのそれぞれは、以前のロットに対して滴定しなくてはならず、以前のロットで観察された結果に等しい結果をもたらす希釈度でアッセイにおいて用いなくてはならない。

## 【0117】

7. MSD読み取りバッファーT(2倍)

50

試薬を室温で保管した。最終的な2倍溶液を、使用前に5 mLのdIH<sub>2</sub>O中に5 mL

のMSD読み取りバッファ-T(4倍)を希釈することによって調製した。

【0118】

B. 標準の調製

1. MDX-1100 希釈標準溶液の調製

20 $\mu$ Lの0.99mg/mLのストック溶液を178 $\mu$ Lのヒト血清に添加して、100 $\mu$ g/mLを含有する溶液を得た。アッセイバッファ-中でのさらなる50倍希釈を行い、2%ヒト血清中2000ng/mLの溶液(希釈標準溶液1)を得、2000ng/mLの溶液を2%ヒト血清中にさらに20倍希釈して、100ng/mL(希釈標準溶液2)を得た。この希釈標準溶液は、調製した日に使用した。過剰量の溶液は廃棄した。

【0119】

2. 2%ヒト血清における校正標準曲線の作成

標準曲線を、以下に記載するように、アッセイバッファ- / 2%ヒト血清において作成した。

注：容量は1プレートについての十分量である。比例的な容量を必要に応じて調製した。

表 8

検量線の作成

【表 8】

MDX-1100 (ng/mL)* の理論濃度	ワーキング溶液の体積( $\mu$ L)	アッセイ緩衝液/2%ヒト血清の体積( $\mu$ L)
15000	30 (ワーキング溶液1)	170
10000	20 (ワーキング溶液1)	180
8000	16 (ワーキング溶液1)	184
6000	12 (ワーキング溶液1)	188
5000	200 (ワーキング溶液2)	0
4000	160 (ワーキング溶液2)	40
3000	120 (ワーキング溶液2)	80
2000	80 (ワーキング溶液2)	120
1000	40 (ワーキング溶液2)	160
500	20 (ワーキング溶液2)	180
250	10 (ワーキング溶液2)	190

\* 記載されるMDX-1100濃度は、100% ヒト血清中のものである。

【0120】

3. 品質管理試料の調製

(1) 100%ヒト血清中のMDX-1100 QC試料の調製

20 $\mu$ Lの0.99mg/mLのMDX-1100ストック溶液を970 $\mu$ Lのヒト血清で希釈して、20000ng/mLを含有する溶液を得た。15000、10000、6000、1000、および500ng/mL(ULOQ、高、中、低、およびLLOQ)のQC試料を得るための、ヒト血清での20000ng/mLの溶液の適切な希釈液を調製した。QC試料を、25 $\mu$ Lのアリコート中で、-70 で保管した。

表 9

品質管理サンプルの調製

10

20

30

40

【表 9】

サンプル	MDX-1100の濃度 (ng/mL)*	20000 ng/mLのMDX-1100の体積 (μL)	100% ヒト血清の体積 (μL)
ULOQ	15000	210	70
HQC	10000	150	150
MQC	6000	90	210
LQC	1000	20	380
LLOQ	5000	15	585

\* 記載される MDX - 1100 の濃度は、100% ヒト血清中である。

10

## 【0121】

(2) 2% ヒト血清中の QC 試料 (高、中、低、LLOQ、および希釈液) の調製  
 アッセイの範囲内で、アッセイの最小必要希釈度まで、QC 試料を調製するために、各 QC 試料の 1 : 50 希釈液を、上記で調製された 10 μL の 100% ヒト血清 QC 試料を 490 μL のアッセイバッファーに添加することによって調製して、2% ヒト血清中に 15000、10000、6000、1000、および 500 ng/mL を含有する QC 試料を提供した。これらの希釈液は、分析日に調製した。

## 【0122】

## 4. アッセイ手順

特定しない限り、全ての工程は、200 rpm の速度の振とう機上で、22℃で行った。プレートは、別段の記載がない限り、覆ってインキュベートした。

20

1) 96 ウェルのストレプトアビジンで被覆された MSD プレートを、ブロッキングバッファー (DPBS 中 5% BSA および 0.05% Tween-20) で少なくとも 30 分にわたり 22℃で振とう機上でブロックした。

2) 50 μL のビオチン化された 10C8 (アッセイバッファー中 1 μg/mL) をプレートに添加した。プレートをプレート密封剤で覆い、22℃で 60 ± 30 分間にわたり振とう機上でインキュベートした。

3) プレートを、300 μL の PBST で 3 回洗浄した。

4) アッセイバッファー / 2% ヒト血清バッファー中 50 μL の標準、QC、および試料をプレートに添加した。プレートを、22℃で 120 ± 30 分間にわたり振とう機上でインキュベートした。

30

5) プレートを、300 μL の PBST で 3 回洗浄した。

6) 50 μL の sulfo-tag 23H10 (アッセイバッファー中 25 ng/mL) をプレートに添加した。プレートを、60 ± 30 分間にわたり振とう機上でインキュベートした。

7) プレートを、300 μL の PBST で 3 回洗浄した。

8) 150 μL の MSD 読み取りバッファー T (dIH2O 中で 2 倍) を添加した。プレートを、10 分間以内に MSD Sector Imager 2400 で読み取った。

## 【0123】

## 結果

40

## 1. 標準曲線範囲

2% ヒト血清中の MDX - 1100 の 250 ~ 15000 ng/mL の範囲の 11 点の校正標準曲線を、各分析ランにおいて 2 回ずつアッセイした。250 ng/mL の標準はアンカーポイントであり、許容基準に従うものではない (データは示さず)。

## 【0124】

## 2. 正確性および精度

方法の正確性を、その理論値からの予測濃度の偏差を計算することによって判定した。SAS における一元配置 ANOVA を用いて得られた、3 つの分析参照標準および QC に基づく正確性および精度の情報を、表 10 および 11 に列挙する。QC でのアッセイ内精度は 7.2% 以内であり、アッセイ間精度は 10.9% 以内であった。参照標準でのアッ

50

セイ内精度は 6.7% 以内であり、アッセイ間精度は 6.4% 以内であった。QC の正確性は、理論値の  $\pm 15.6\%$  以内であった。参照標準の正確性は、理論値の  $\pm 5.4\%$  以内であった。

表 10

MDX - 1100 についての QC 正確度および精度

【表 10】

理論濃度	LLOQ (500 ng/mL)	LQC (1000 ng/mL)	MQC (6000 ng/mL)	HQC (10000 ng/mL)	ULOQ (15000 ng/mL)
測定された 平均濃度	507.67	957.25	6935.21	10357.59	18008.13
%誤差	1.5	-4.3	15.6	3.6	20.1
サンプル間 の精度 (%CV )	7.7	10.9	1.9	0.0	4.8
サンプル内 の精度 (%CV )	4.1	3.9	7.2	5.9	4.6
全変動 (%CV )	8.7	11.6	7.5	5.9	6.7
n	17	18	18	18	20
サンプル数	5	5	5	5	5

10

20

100% ヒト血清中の濃度 ng/mL



【表 1 1】

表 1 1  
MDX-1100 についての参照標準の正確度および精度

調製濃度 ng/mL	250	500	1000	2000	3000	4000	5000	6000	8000	10000	15000
測定された平均濃度	322.79	500.26	946.44	1910.46	3027.34	4179.29	4989.81	5876.65	7966.40	10053.42	15009.72
%誤差	29.1	0.1	-5.4	-4.5	0.9	4.5	-0.2	-2.1	-0.4	0.5	0.1
サンプル間の精度 (%CV)	19.9	0.0	6.4	4.3	0.0	2.6	2.7	3.4	0.0	0.0	0.0
サンプル内の精度 (%CV)	2.7	6.7	2.0	1.5	3.1	2.6	2.6	3.4	3.0	2.5	2.5
全変動 (%CV)	20.1	6.7	6.7	4.6	3.1	3.9	3.7	4.8	3.0	2.5	2.5
n	13	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14
サンプル数	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7

100%ヒト血清中の濃度 ng/mL

10

20

30

40

50

## 【 0 1 2 5 】

## 2. 選択性およびマトリックス干渉

方法における選択性およびマトリックス干渉を、10の個別の潰瘍性大腸炎患者の血清を用いて評価した。スパイクされていないものおよびスパイクされたものの両方の各マトリックスロットを、500 ng/mL (LLOQ) で、アッセイにおいてランした。スパイクされていないマトリックスロットは全て、定量レベルを下回って定量されたが、10

のスパイクされたマトリックスロットの逆算された濃度は全て、LLQCの6.7%以内であった。表12は、このアッセイにおいてマトリックス干渉が観察されないことを示す。

【表12-1】

表12  
10個の潰瘍性大腸炎患者の血清ロットの選択性/マトリックス干渉

患者 血清名	500ng/mLの薬物で処理					処理なし		
	RLU	逆算した濃度 (ng/mL)	平均値	%誤差	RLU	平均RLU	マトリックス ブランクによ る%誤差	
UC 1	452	504.16	489.35	-2.1	92	91.00	-16.7	
	402	474.53			90			
UC 2	520	544.04	533.51	6.7	115	116.00	6.2	
	484	522.99			117			
UC 3	430	491.16	499.14	-0.2	103	100.50	-8.0	
	457	507.11			98			
UC 4	453	504.75	525.56	5.1	95	95.00	-13.0	
	524	546.37			95			
UC 5	455	505.93	510.05	2.0	82	87.00	-20.4	
	469	514.18			92			
UC 6	402	474.53	475.12	-5.0	80	86.00	-21.3	
	404	475.72			92			

10

20

30

40

【表 1 2 - 2】

患者 血清名	500ng/mL の薬物で処理				処理なし		
	RLU	逆算した濃度 (ng/mL)	平均値	%誤差	RLU	平均 RLU	マトリックス ブランクによ る%誤差
UC 7	439	496.49	495.01	-1.0	89	89.00	-18.5
	434	493.53			89		
UC 8	427	489.38	498.54	-0.3	93	93.50	-14.4
	458	507.70			94		
UC 9	472	515.94	526.19	5.2	107	106.00	-3.0
	507	536.45			105		
UC 10	493	528.26	528.26	5.7	116	118.00	8.0
					120		
LLOQ	478	519.46	513.87	2.8	106	109.25	NA
	488	525.33			110		
	457	507.11			115		
	451	503.57			106		

10

20

30

40

## 【 0 1 2 6 】

## 3. ヒト血清中の希釈度の直線性

MDX-1100の希釈度の直線性を、2.5 mg/mLのQC試料をアッセイバッファでまず50倍希釈し、次いで、アッセイバッファ/2%ヒト血清中で10倍連続希釈することによって判定した。これらの個別の希釈度を、標準曲線およびQC試料で分析した。表13にまとめた結果は、個別に希釈された試験試料の予測濃度が公称値の±10%以内であったことを示した。データは、研究試料が、アッセイの正確性および精度に悪

50

影響を及ぼすことなく、アッセイバッファー / 2 % ヒト血清中で少なくとも 50,000 倍希釈され得たことを実証した。

表 13

MDX - 1100 の希釈の直線性

【表 13】

理論濃度 mg/mL	希釈率	サンプル数 17	
		測定された平均濃度	%誤差
2.5	500	> ULOQ	
2.5	5,000	> ULOQ	
2.5	50,000	2.25	10%
2.5	500,000	< LLOQ	
2.5	5,000,000	< LLOQ	

10

【0127】

4. 特異性

IP10 およびヘパラン硫酸を、次の濃度、すなわち (a) 0、10、100、1000 ng/mL の IP10 ; および (b) 0、500、5000、50000 ng/mL のヘパラン硫酸で組み合わせ、低QC、中QC、および高QCの定量との考えられる推定を試験するために用いた。

【0128】

潜在的な干渉試薬の組み合わせのそれぞれを、マトリックスブランク、HQC、MQC、およびLQCにおいて試験した。試料を1時間にわたり室温でインキュベートした。表14にまとめた結果は、50000 ng/mL のヘパラン硫酸 + 1000 ng/mL のIP10 でスパイクすると、QCの全ては、スパイクされていないものと比較して25%以上の差を示し; 一方、5000 ng/mL のヘパラン硫酸 + 100 ng/mL のIP10、および500 ng/mL のヘパラン硫酸 + 10 ng/mL のIP10 でスパイクすると、QCの全ては、スパイクされていないQCと比較して14.5%以下の差を示すことを示し、ここで、差のパーセントは、スパイクされたものとスパイクされていないものとの間のものである。

20

【表 1 4】

表 1 4  
MDX-1100 の特異性

	HQC 10,000 ng/mL		MQC 6,000 ng/mL		LQC 1,000 ng/mL		マトリックスブランク	
	測定された平均濃度	%誤差	測定された平均濃度	%誤差	測定された平均濃度	%誤差	測定された平均濃度	%誤差
No interference	18910	NA	11464	NA	1078	NA	92	NA
50000 ng/mL ヘパラン	12211	-35.4	6840	-40.3	690	-36.0	89	-3.0
硫酸+1000 ng/mL IP10								
5000 ng/mL ヘパラン硫酸	16652	-11.9	9798	-14.5	956	-11.3	89	-3.3
酸+100 ng/mL IP10								
500 ng/mL ヘパラン硫酸	19155	1.3	11454	-0.1	1026	-4.8	94	2.2
酸+10 ng/mL IP10								

100% ヒト血清中の濃度 ng/mL

## 5. イソAsp-MDX-1100の回収率

異性化はMDX-1100において年間6%の割合で生じるため、アッセイの回収率を、10000、5000、2500 ng/mLのレベルの融解したばかりのMDX-1100と精製されたイソAsp-MDX-1100とを比較することによって評価した。表15にまとめた結果は、3つのレベルで、2つの形態の薬剤の回収率の差が観察されないことを示した。

## 【0130】

結論として、ヒト血清中のMDX-1100の定量のための特異的な、精度の高い、かつ正確なMSD免疫アッセイが、希釈されていないヒト血清中で250 ng/mL ~ 15,000 ng/mLの範囲の標準曲線濃度にわたって開発された。

表15

MDX-1100およびイソAsp-MDX-1100のスパイク回収の比較

## 【表15】

薬物濃度 (ng/mL)	MDX-1100		イソAsp-MDX-1100		%相違
	測定された平均濃度 (ng/mL)	回収%	測定された平均濃度 (ng/mL)	回収%	
10,000	8705.66	87.1	8294.31	82.9	-4.7
5,000	4220.66	84.4	4521.15	90.4	7.1
2,500	2250.96	90.0	2335.67	93.4	3.8

## 【0131】

(実施例4)

正常なヒト血清中のMDX-1100の定量的決定のための酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)

方法の説明

この酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) は、ヒト血清中のMDX-1100を検出するために設計されている。NeutrAvidinで被覆されたプレートを、アッセイバッファー中1.5 µg/mLの濃度のビオチン化された抗MDX-1100マウスモノクローナル抗体 (クローン10C8) で被覆する。校正物質、対照および試料を、アッセイバッファー中でアッセイMRD (1:1000) まで希釈し、プレート上でインキュベートして、MDX-1100を捕捉する。次いで、捕捉されたMDX-1100を、アッセイバッファー中で0.25 µg/mLの濃度のHRPで標識された抗MDX-1100マウスモノクローナル抗体 (クローン23H10) を用いて検出する。TMBをHRP基質として添加する。停止溶液を添加した後にプレートをSpectramax Plusプレートリーダーで読み取り、測定された光学密度 (OD) は、プレート上のMDX-1100の濃度に直接比例する。

## 【0132】

分析物の濃度は、重み係数1/応答2を伴う5パラメータロジスティック回帰モデルを用いて適合している標準曲線からの内挿によって決定する。最小必要試料容量は10.0 µLである。MRDは1:1000である。校正範囲は1.25 ~ 320 µg/mLであり、定量範囲は2.5 µg/mL ~ 320 µg/mLである。試料は約-80で保存する。

## 【0133】

直線性および校正標準

10の校正標準を、1.25 ~ 320 µg/mLの範囲にわたって、このバリデーション実験に利用した。標準曲線は、重み係数1/応答2を伴う5パラメータロジスティック方程式と適合するものであった。適合の良好性は、許容可能なランから得られた13の標準曲線の平均から0.9972であると計算された。

## 【0134】

### 精度および正確性

精度および正確性を、定量下限 ( L L O Q ) から定量上限 U L O Q ) までの範囲の濃度で品質管理 ( Q C ) を分析することによって判定した。以下の Q C レベルを分析した： L L O Q ( Q C 4 = 2 . 5 0 μ g / m L )、バックアップ L L O Q ( Q C 5 ; 5 . 0 0 μ g / m L )、低 Q C ( Q C 1 ; 7 . 5 0 μ g / m L )、中 Q C ( Q C 2 ; 1 2 0 μ g / m L )、高 Q C ( Q C 3 ; 2 0 0 μ g / m L )、バックアップ U L O Q ( Q C 6 ; 2 4 0 μ g / m L )、および U L O Q ( Q C 7 ; 3 2 0 μ g / m L )。精度は、各プールの変動係数パーセント ( P C V ) として表した。正確性は、理論値からの差のパーセント ( P D T ) として表した。これらの式を以下に示す ( 式を参照されたい )。全ての精度および正確性の値は、データの許容性を判定する前に、四捨五入して最も近い整数とした。

変動係数パーセント ( P C V ) :

$$P C V = ( \text{標準偏差} / \text{平均} ) \times 1 0 0$$

理論値からの差のパーセント ( P D T ) :

$$P D T = [ 1 0 0 \times ( ( \text{計算された濃度の平均} - \text{理論的濃度} ) / \text{理論的濃度} ) ]$$

差のパーセント :

$$\text{差のパーセント} = 1 0 0 \times [ | \text{値} 1 - \text{値} 2 | / ( ( \text{値} 1 + \text{値} 2 ) / 2 ) ]$$

【 0 1 3 5 】

#### 正常なヒト血清におけるアッセイ内の精度および正確性

各 Q C レベル ( Q C 1 ~ 7 ) のレプリケート ( 1 2 ウェル ) 6 セットを個別のランにおいて分析して、各 Q C のアッセイ内の精度および正確性を決定した。精度の許容基準を満たすために、Q C 1 ~ 3 および 5 ~ 7 のアッセイ内試料は 2 0 % の全体的な P C V 値を有すると予想され、Q C 4 は 2 5 % の全体的な P C V 値を有すると予想された。正確性の許容基準を満たすために、Q C 1 ~ 3 および Q C 5 ~ 7 のアッセイ内試料は ± 2 0 % 以内の全体的な P D T 値を有すると予想され、Q C 4 は ± 2 5 % 以内の全体的な P D T 値を有すると予想された。

【 0 1 3 6 】

アッセイ内の精度および正確性の分析は、ラン 1 J H X 2 ( Q C 1 ~ 3 )、2 J H X 2 ( Q C 4 ~ 6 )、および 6 J H X 2 ( Q C 7 ) において行った。全 Q C レベルでのアッセイ内試料での P C V 値が許容可能であり、Q C 4 ( L L O Q ) での 3 % から Q C 5 ( バックアップ L L O Q ) での 1 4 % までの範囲であった。全 Q C レベルについてのアッセイ内の精度および正確性の試料での P D T 値もまた許容基準内にあり、- 8 % ( Q C 7 ; U L O Q ) ~ 1 3 % ( Q C 1 および Q C 2 ) までの範囲であった。これらのデータを表 1 6 に示す。

【 0 1 3 7 】

#### 正常なヒト血清におけるアッセイ間の精度および正確性

各 Q C レベル ( Q C 1 ~ 7 ) の 2 つのレプリケートをそれぞれ含有する 7 つの許容可能なラン ( 1 ~ 6 J H X 2 および 8 J H X 2 ) からのデータを用いて、アッセイ間の精度および正確性を決定した。精度基準を満たすために、Q C 1 ~ 3 および Q C 5 ~ 7 のアッセイ間試料は 2 0 % の全体的な P C V 値を有すると予測され、Q C 4 は 2 5 % の全体的な P C V 値を有すると予想された。全 Q C レベルでの P C V 値が許容可能であり、9 % ( Q C 2 および Q C 3 ) ~ 1 4 % ( Q C 5 ) までの範囲であった。正確性の許容基準を満たすために、Q C 1 ~ 3 および Q C 5 ~ 7 のアッセイ間試料は ± 2 0 % 以内の P D T 値を有すると予想され、Q C 4 は ± 2 5 % 以内の P D T 値を有すると予想された。全 Q C レベルについての P D T 値が許容可能であり、- 3 % ( Q C 1 および Q C 7 ) ~ 2 % ( Q C 2 および Q C 3 ) までの範囲であった。アッセイ間の精度および正確性についてのこれらのデータを表 1 7 に示す。バリデーション校正物質および Q C を用いる全てのバリデーションランから得られた Q C 1 ~ 7 についてのデータの完全なリストを表 1 8 に提供する。

【表 16】

表 16. アッセイ内正確度および精度データ

ランID	QC 1 ( $\mu\text{g/mL}$ )	QC 2 ( $\mu\text{g/mL}$ )	QC 3 ( $\mu\text{g/mL}$ )	QC 4 ( $\mu\text{g/mL}$ )	QC 5 ( $\mu\text{g/mL}$ )	QC 6 ( $\mu\text{g/mL}$ )	QC 7 ( $\mu\text{g/mL}$ )	
1JHX2	7.34	112	201	NRR	NRR	NRR	NRR	10
	8.49	140	242	NRR	NRR	NRR	NRR	
	8.77	137	193	NRR	NRR	NRR	NRR	
	9.13	153	198	NRR	NRR	NRR	NRR	
	8.56	137	233	NRR	NRR	NRR	NRR	
	8.70	135	243	NRR	NRR	NRR	NRR	
2JHX2	NRR	NRR	NRR	2.85	3.72	255	NRR	
	NRR	NRR	NRR	2.75	5.16	258	NRR	
	NRR	NRR	NRR	2.75	4.67	235	NRR	
	NRR	NRR	NRR	2.59	4.27	254	NRR	
	NRR	NRR	NRR	2.69	5.21	267	NRR	
6JHX2	NRR	NRR	NRR	2.80	5.35	274	NRR	20
	NRR	NRR	NRR	NRR	NRR	NRR	267	
	NRR	NRR	NRR	NRR	NRR	NRR	302	
	NRR	NRR	NRR	NRR	NRR	NRR	275	
	NRR	NRR	NRR	NRR	NRR	NRR	307	
	NRR	NRR	NRR	NRR	NRR	NRR	294	
NRR	NRR	NRR	NRR	NRR	NRR	318		
N	6	6	6	6	6	6	6	
理論濃度	7.50	120	200	2.50	5.00	240	320	
平均	8.50	135	218	2.74	4.73	257	294	
S.D.	0.611	13.4	23.4	0.0903	0.638	13.3	19.6	
PCV (%)	7	10	11	3	14	5	7	30
PDT (%)	13	13	9	9	-5	7	-8	

表の説明 :

NRR 記録された結果なし  
PCV パーセント変動係数  
PDT 理論値からのパーセント差異



## 【表 17】

表 17. 許容可能な変動サンプルについてのQCアッセイ内データ

サンプル I D	QC 1 ( $\mu\text{g/mL}$ )	QC 2 ( $\mu\text{g/mL}$ )	QC 3 ( $\mu\text{g/mL}$ )	QC 4 ( $\mu\text{g/mL}$ )	QC 5 ( $\mu\text{g/mL}$ )	QC 6 ( $\mu\text{g/mL}$ )	QC 7 ( $\mu\text{g/mL}$ )
1JHX2	7.12	115	210	2.29	5.69	228	303
	8.56	136	243	2.84	6.15	314	394
2JHX2	6.94	129	219	2.69	5.31	205	304
	7.64	129	207	2.85	5.65	244	329
3JHX2	7.95	119	190	2.65	5.32	232	314
	7.81	121	214	2.97	5.80	262	366
4JHX2	8.44	136	210	2.87	5.32	213	275
	7.43	114	214	2.46	5.62	250	330
5JHX2	7.02	145	170	2.28	4.15	221	266
	6.36	110	203	2.28	3.98	259	297
6JHX2	6.80	121	182	1.92	4.29	242	290
	7.39	120	195	2.22	4.45	248	282
8JHX2	6.91	118	197	2.25	4.46	204	293
	5.38	106	197	2.45	4.46	247	299
N	14	14	14	14	14	14	14
理論濃度	7.50	120	200	2.50	5.00	240	320
平均	7.27	123	204	2.5	5.05	241	310
S.D.	0.828	11	17.6	0.314	0.716	28.3	34.9
PCV (%)	11	9	9	13	14	12	11
PDT (%)	-3	2	2	0	1	0	-3

表の説明 :

PCV

パーセント変動係数

PDT

理論値からのパーセント差異

10

20

30

## 【表 18】

表 18. 変動QCを用いた全てのサンプルについてのアッセイ内データ

サンプルID	QC 1 ( $\mu\text{g/mL}$ )	QC 2 ( $\mu\text{g/mL}$ )	QC 3 ( $\mu\text{g/mL}$ )	QC 4 ( $\mu\text{g/mL}$ )	QC 5 ( $\mu\text{g/mL}$ )	QC 6 ( $\mu\text{g/mL}$ )	QC 7 ( $\mu\text{g/mL}$ )	
1JHX2	7.12	115	210	2.29	5.69	228	303	
	8.56	136	243	2.84	6.15	314	394	
2JHX2	6.94	129	219	2.69	5.31	205	304	10
	7.64	129	207	2.85	5.65	244	329	
3JHX2	7.95	119	190	2.65	5.32	232	314	
	7.81	121	214	2.97	5.8	262	366	
4JHX2	8.44	136	210	2.87	5.32	213	275	
	7.43	114	214	2.46	5.62	250	330	
5JHX2	7.02	145	170	2.28	4.15	221	266	
	6.36	110	203	2.28	3.98	259	297	
6JHX2	6.80	121	182	1.92	4.29	242	290	
	7.39	120	195	2.22	4.45	248	282	
7JHX2	6.64	89.6	192	2.63	5.17	253	310	
	7.20	89.4	199	2.11	4.07	172	441	20
8JHX2	6.91	118	197	2.25	4.46	204	293	
	5.38	106	197	2.45	4.46	247	299	
9JHX2	6.85	112	203	NRR	NRR	NRR	NRR	
	6.57	116	202	NRR	NRR	NRR	NRR	
10JHX2	7.04	127	227	NRR	NRR	NRR	NRR	
	6.79	134	214	NRR	NRR	NRR	NRR	
11JHX2	7.49	122	197	NRR	NRR	NRR	NRR	
	7.35	121	194	NRR	NRR	NRR	NRR	
12JHX2	6.32	111	217	NRR	NRR	NRR	NRR	
	6.80	130	219	NRR	NRR	NRR	NRR	
13JHX2	8.39	118	220	NRR	NRR	NRR	NRR	30
	7.26	118	200	NRR	NRR	NRR	NRR	
N	26	26	26	16	16	16	16	
理論濃度	7.50	120	200	2.50	5.00	240	320	
平均	7.17	119	205	2.49	4.99	237	318	
S.D.	0.705	12.7	15.0	0.310	0.711	31.7	46.2	
PCV (%)	10	11	7	13	14	13	15	
PDT (%)	-4	0	3	-1	0	-1	-1	

表の説明:

PDT 理論値からのパーセント差異  
 PCV パーセント変動係数  
 NRR 記録された結果なし

40

## 【0138】

## アッセイ感度

アッセイ感度を、QC 4 ( L L O Q ) の正確性および精度を判定することによって評価した。QC 4 が 25 % 未満の PCV 値および  $\pm 25$  % 以内の PDT 値を有するであろうことが予想された。QC 4 の 2 つのレプリケートを、ラン 1 J H X 2 ~ 8 J H X 2 においてプレティングし、これらのランの 1 つ ( 7 J H X 2 ) は、中 QC ( QC 2 ; 120  $\mu\text{g} / \text{mL}$  ) の許容不可能な QC 定量に起因して拒絶された。7 つの許容可能なランにおいて

50

、QC4は、許容可能限界内に十分に収まる13%の平均PCV値および0%の平均PDT値を有していた(表17)。これらのデータは、ICD426のアッセイ感度がLLOQで許容可能であることを示す。

#### 【0139】

希釈度の直線性およびフック効果

標準曲線の上限を元々超える試料を希釈する能力を、曲線の上にあるQCプール(QC8)から調製された一連の希釈液を評価することによって判定した。QC8は、MDX-1100ストック(10, 200 μg/mL)を、プールされた正常なヒト血清中に1:20で希釈して、510 μg/mLの濃度を達成することによって調製した。この濃度は、PPD's Standard Operating Procedure (SOP No.: LP-PAL-1013)のガイドラインに従ってQC8で少なくとも95%の血清を維持するために達成され得た、最も高い濃度であったことに留意されたい。510 μg/mL、408 μg/mL (Dil 1.25)、136 μg/mL (Dil 3.75)、45.3 μg/mL (Dil 11.25)、15.1 μg/mL (Dil 33.75)、5.04 μg/mL (Dil 101.25)、および1.68 μg/mL (Dil 303.75)を含む、定量範囲を上回る、定量範囲の間の、および定量範囲を下回る最終濃度を有するQC8の希釈液を調製した。各希釈レベルの2つのレプリケートをラン8 JHX2において分析した(n=2、4ウェル)。

10

#### 【0140】

Dil 3.75 ~ Dil 101.25 (定量範囲内)の範囲の希釈係数を有する試料は-16% ~ -2%の範囲のPDT値を有し、PDTが±20%以内であるという許容基準を満たした。定量範囲を超える(Dil 1およびDil 1.25)または下回る(Dil 303.75)希釈された分析物濃度を有する試料は、それぞれ、>ULOQまたは<LLOQの応答を有していた。したがって、希釈度の直線性は、このアッセイに許容可能であると考えられる。

20

#### 【0141】

プロゾン効果またはフック効果は、QC8試料(510 μg/mL)およびQC8 Dil 1.25試料(408 μg/mL)の応答を、CAL10(320 μg/mL; ULOQ)の応答に対して比較することによって調べた。各希釈液の両レプリケートは、CAL10で記録された値よりも大きなO.D.値を有していたが、ULOQを超える検量線を外挿することによっては定量されなかった。したがって、320 μg/mLのULOQを超え510 μg/mLを含むMDX-1100濃度では、フック効果はなかった。

30

#### 【0142】

選択性(マトリックス効果)

選択性は、分析方法の、生体マトリックスにおける他の成分の存在下で目的の分析物を区別および定量する能力である。選択性を、正常なヒト血清、ならびに2つの疾患状態、すなわち潰瘍性大腸炎およびクローン病において試験した。正常集団および疾患状態集団のそれぞれで、選択性を、少なくとも10人の個別のドナー(5人の男性および5人の女性)から得た血清を低QC(QC1、7.5 μg/mL)およびブランクレベルで分析することによって判定した。スパイクされたおよびスパイクされていない試料それぞれの1つのレプリケートを分析した(n=1、2ウェル)。各ドナー集団(正常、潰瘍性大腸炎、およびクローン病)で、低スパイクの80%が基準を満たし(理論値で、理論値の20%以内の定量)、スパイクされていないマトリックスのロットはLLOQを下回って定量することが予想された。

40

#### 【0143】

選択性を、ラン3 JHX2において、正常なヒト血清で試験した。ブランクの正常な血清の選択性試料(SP1~10)の全ては、LLOQを下回ってスクリーニングした。低QCレベル(7.5 μg/mL)でスパイクされると、強化された正常なヒト血清試料(SPF1~10)の10個全ては、±20%以内のPDT値で定量し、0%~20%の範囲であった。これらのデータを表19Aにまとめる。

50

## 【 0 1 4 4 】

選択性を、ラン 4 J H X 2 において、10 人の潰瘍性大腸炎個体から得られた血清で試験した。ブランクの潰瘍性大腸炎血清試料 ( S P 1 1 ~ 2 0 ) の全ては、L L O Q を下回って定量した。低 Q C レベル ( 7 . 5  $\mu$  g / m L ) でスパイクされると、強化された潰瘍性大腸炎個体 ( S P F 1 1 ~ 2 0 ) の 1 0 人全ては、 $\pm 2 0$  % 以内の P D T 値で定量し、 $- 2$  % ~  $1 8$  % の範囲であった。これらのデータを表 1 9 B にまとめる。

## 【 0 1 4 5 】

選択性を、ラン 1 2 J H X 2 において、10 人のクローン病個体から得られた血清で試験した。ブランクのクローン病血清試料 ( S P 2 1 ~ 3 0 ) の全ては、L L O Q を下回って定量した。低 Q C レベル ( 7 . 5  $\mu$  g / m L ) でスパイクされると、強化されたクローン病個体 ( S P F 2 1 ~ 3 0 ) の 1 0 人全ては、 $\pm 2 0$  % 以内の P D T 値で定量し、 $- 1 5$  % ~  $6$  % の範囲であった。これらのデータを表 1 9 C にまとめる。

## 【 0 1 4 6 】

全体として、正常および疾患状態から得られた選択性試料の 1 0 0 % が、ブランクレベルおよび低 Q C レベルで許容基準を満たした。これらの選択性のデータの全てを表 1 9 にまとめる。

【表 1 9 - 1】

表 1 9. 選択性データ

A. 正常なヒト血清 (3JHX2)

ブランクの個体

SP 1 (µg/mL)	SP 2 (µg/mL)	SP 3 (µg/mL)	SP 4 (µg/mL)	SP 5 (µg/mL)	SP 6 (µg/mL)	SP 7 (µg/mL)	SP 8 (µg/mL)	SP 9 (µg/mL)	SP 10 (µg/mL)
<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ

低QCで処理された個体 (7.5 µg/mL)

SPF 1 (µg/mL)	SPF 2 (µg/mL)	SPF 3 (µg/mL)	SPF 4 (µg/mL)	SPF 5 (µg/mL)	SPF 6 (µg/mL)	SPF 7 (µg/mL)	SPF 8 (µg/mL)	SPF 9 (µg/mL)	SPF 10 (µg/mL)
7.49	8.90	9.03	8.18	8.45	8.85	8.67	8.58	8.54	8.31
PDI (%)	0	19	20	9	13	18	15	14	11

B. 潰瘍性大腸炎患者の血清 (4JHX2)

ブランクの個体

SP 11 (µg/mL)	SP 12 (µg/mL)	SP 13 (µg/mL)	SP 14 (µg/mL)	SP 15 (µg/mL)	SP 16 (µg/mL)	SP 17 (µg/mL)	SP 18 (µg/mL)	SP 19 (µg/mL)	SP 20 (µg/mL)
<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ

低QCで処理された個体 (7.5 µg/mL)

SPF 11 (µg/mL)	SPF 12 (µg/mL)	SPF 13 (µg/mL)	SPF 14 (µg/mL)	SPF 15 (µg/mL)	SPF 16 (µg/mL)	SPF 17 (µg/mL)	SPF 18 (µg/mL)	SPF 19 (µg/mL)	SPF 20 (µg/mL)
8.83	7.62	7.57	7.47	7.58	7.43	8.2	7.86	8.06	8.01
PDI (%)	18	2	1	0	-2	-1	5	7	7

【表 1 9 - 2】

表 1 9 . 選択性データ (続き)

C. クローン病患者の血清 (12JHX2)

ブランクの個体		SP 21	SP 22	SP 23	SP 24	SP 25	SP 26	SP 27	SP 28	SP 29	SP 30
		( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )
<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
低QCで処理された個体 (7.5 $\mu\text{g/mL}$ )		SPF 21	SPF 22	SPF 23	SPF 24	SPF 25	SPF 26	SPF 27	SPF 28	SPF 29	SPF 30
		( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )
7.55	7.27	7.36	6.84	6.66	7.03	7.13	7.97	7.5	6.37		
1	-3	-2	-9	-11	-6	-5	6	0	-15		
PDI (%)											

10

20

30

【0 1 4 7】

干渉 (溶血)

研究試料の定量に対する溶血の影響を、溶血した血清中で調製されたブランク試料およびスパイクされた (低および高QC) 試料を分析することによって評価した。低レベルの溶血 (販売者によって特定されるところによると、およそ70 mg/dLのヘモグロビン濃度) を示す10人の個別のドナー、および高レベルの溶血 (販売者によって特定されるところによると、およそ550 mg/dLのヘモグロビン濃度) を示す10人の個別のドナーを、正常なヒト血清において作成された、作成したばかりの検量線を用いて評価した。ブランク試料、低QC試料、および高QC試料の単一のレプリケート (n = 1、2ウェル) を、各溶血した試料から調製し、分析した。スパイクされた溶血試料のそれぞれについての溶血データは、< 20%のPCV値を有すると予想され、平均値の正確性は、そのプールの理論値の $\pm 20\%$ 以内であると予想された。ブランク試料は、20%未満のPCVを有すると予想され、LLOQ未満で定量する。各レベルの溶血試料の少なくとも80%が許容基準を満たす必要があった。

40

50

## 【 0 1 4 8 】

低レベルの溶血を示す試料における干渉

低レベルの溶血を示す10の個別の試料を、ラン10 J H X 2において分析した。ブランクレベルで分析された10の個別の試料(H S 1 ~ 1 0)の1つは33%のレプリケート P C V 値を有し、許容基準を満たさなかったが、この試料についての二重反復測定の間方は、C A L 1 (アンカー)およびL L O Qを下回って定量した。残りの9のブランク個体はL L O Qを下回って定量し、P C V 値は13%以下であった。低Q C レベルでスパイクされた個別の試料(H E M Q C 1 ~ 1 0)の10個全ては、0% ~ 6%の範囲の許容可能なP C V 値および-18% ~ -1%の範囲の許容可能なP D T 値を有していた。高Q C レベルでスパイクされた10の個体(H E M Q C 1 1 ~ 2 0)の1つは、許容可能なP D T で定量できなかった(H E M Q C 1 2 ; P D T = - 2 3 %)。高Q C レベルでスパイクされた残りの9の個体は、0% ~ 5%の範囲の許容可能なP C V 値および-7% ~ 16%の範囲の許容可能なP D T 値を有していた。全体として、低レベルの溶血を示す試料の許容基準は、ブランク(90%許容可能)、低(100%許容可能)、および高(90%許容可能)Q C レベルで満たされた。これらのデータを表20Aにまとめる。

【表 2 0 - 1】

表 2 0 . 溶血干渉データ

A. 低レベルの溶血を生じる個体サンプルの干渉 (10JHX2)

ブランク溶血サンプル

	HS 1	HS 2	HS 3	HS 4	HS 5	HS 6	HS 7	HS 8	HS 9	HS 10
(µg/mL)	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	RCV	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
平均	13	13	0	0	0	0	33	0	0	0
PCV (%)										

低いQC(7.5 µg/mL)で処理した溶血サンプル(ヘモグロビン<70 mg/dL)

	HEMQC 1	HEMQC 2	HEMQC 3	HEMQC 4	HEMQC 5	HEMQC 6	HEMQC 7	HEMQC 8	HEMQC 9	HEMQC 10
(µg/mL)	6.49	6.59	7.44	7.14	7.44	6.14	6.19	6.14	6.99	6.29
平均	3	3	0	2	6	2	1	0	5	1
PCV (%)	-13	-12	-1	-5	-1	-18	-18	-18	-7	-16
PDT (%)										

高いQC(200 µg/mL)で処理した溶血サンプル(ヘモグロビン<70 mg/dL)

	HEMQC 11	HEMQC 12**	HEMQC 13	HEMQC 14	HEMQC 15	HEMQC 16	HEMQC 17	HEMQC 18	HEMQC 19	HEMQC 20
(µg/mL)	203	154**	221	218	211	199	204	186	201	231
平均	0	2	3	1	1	5	4	3	1	1
PCV (%)	2	-23**	11	9	5	0	2	-7	0	16
PDT (%)										

10

20

30

【 0 1 4 9】

高レベルの溶血を示す試料における干渉

高レベルの溶血を示す10の個別の試料を、ラン11JHX2において分析した。ブランクレベルで分析された10の個別の試料(HS101~110)の1つは24%のレブリケートPCV値を有し、許容基準を満たさなかったが、この試料についての二重反復測定の間方は、CAL1(アンカー)およびLLOQを下回って定量した。残りの9のブランク個体はLLOQを下回って定量し、PCV値は16%以下であった。低QCレベルでスパイクされた個別の試料(HEMQC101~110)の10個全ては、1%~6%の範囲の許容可能なPCV値および-15%~8%の範囲の許容可能なPDT値を有していた。高QCレベルでスパイクされた個体(HEMQC111~120)の10個全ては、0%~6%の範囲の許容可能なPCV値および-7%~12%の範囲の許容可能なPDT

40

50



値を有していた。全体として、高レベルの溶血を示す試料の許容基準は、ブランク（90%許容可能）、低（100%許容可能）、および高（90%許容可能）QCレベルで満たされた。これらのデータを表20Bにまとめる。

【表20-2】

表20. 溶血干渉データ (続き)  
B. 高いレベルの溶血を生じた個体サンプルの干渉 (11JHX2)

ブランク溶血サンプル(ヘモグロビン<math>\sim 550\text{ mg/dL}</math>)											
	HS 101	HS 102	HS 103	HS 104	HS 105	HS 106	HS 107	HS 108	HS 109	HS 110	
	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )
平均	<math>\text{<LLOQ}</math>	<math>\text{<LLOQ}</math>	<math>\text{<LLOQ}</math>	<math>\text{<LLOQ}</math>	<math>\text{<LLOQ}</math>	<math>\text{<LLOQ}</math>	RCV	<math>\text{<LLOQ}</math>	<math>\text{<LLOQ}</math>	<math>\text{<LLOQ}</math>	<math>\text{<LLOQ}</math>
PCV (%)	0	11	13	0	0	16	24	0	0	0	13
低いQC(7.5 $\mu\text{g/mL}$ )で処理した溶血サンプル(ヘモグロビン<math>\sim 550\text{ mg/dL}</math>)											
	HEMQC 101	HEMQC 102	HEMQC 103	HEMQC 104	HEMQC 105	HEMQC 106	HEMQC 107	HEMQC 108	HEMQC 109	HEMQC 110	
	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )
平均	6.40	7.40	6.59	8.01	7.54	7.40	8.11	6.54	7.54	6.73	
PCV (%)	1	2	1	6	5	2	3	4	1	2	
PDI (%)	-15	-1	-12	7	1	-1	8	-13	1	-10	
高いQC(200 $\mu\text{g/mL}$ )で処理した溶血サンプル(ヘモグロビン<math>\sim 550\text{ mg/dL}</math>)											
	HEMQC 111	HEMQC 112	HEMQC 113	HEMQC 114	HEMQC 115	HEMQC 116	HEMQC 117	HEMQC 118	HEMQC 119	HEMQC 120	
	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )
平均	203	186	213	208	224	218	213	224	214	204	
PCV (%)	2	3	2	2	1	0	6	1	5	2	
PDI (%)	2	-7	7	4	12	9	7	12	7	2	

表の説明

PDI 理論値からのパーセント差異  
 RCV 反復分析物の許容されない変動係数  
 \*\* PDIが20%を超え、許容基準を満たしていない

【0150】

マトリックスにおける分析物の安定性

2~8での融解されたマトリックスの安定性

融解されたマトリックスにおけるMDX-1100の安定性を2~8で評価して、一定期間にわたり融解状態で試料を保持することが正常なヒト血清における分析物の安定性に悪影響を及ぼすかどうかを決定した。低QCおよび高QCの6つのレプリケート(n=6、12ウェル)を融解し、冷蔵庫内におよそ24時間置き、その後5JHX2において分析した。安定性試料のデータが許容可能であると考えられるために、反復測定(PCV)は20%を超えないと予想され、各レベルについての平均値の正確性は理論的濃度の20%以内であると予想された。低安定性および高安定性のQCの全体的なPCVは、それぞ

10

20

30

40

50

れ4%および5%であった。低および高QCの理論値からの差のパーセントは、それぞれ-11%および10%であった。これらのデータは、MDX-1100が2~8でおよそ24時間にわたり安定であることを示す。

#### 【0151】

##### 室温での安定性

室温(ベンチトップ)での安定性を決定するために、低QCおよび高QCの6つのレプリケート(n=6、12ウェル)を融解し、室温でおよそ24時間置き、その後6JHX2において分析した。許容基準を満たすために、安定な試料は、20%のPCVを有し、理論濃度の20%以内で定量するはずであった。低安定性および高安定性のQCの全体的なPCVは、それぞれ9%および8%であった。低および高QCの理論値からの差のパーセントは、それぞれ-12%および6%であった。これらのデータは、MDX-1100が融解されたマトリックスにおいて室温でおよそ24時間にわたり安定であることを示す。

10

#### 【0152】

##### 凍結融解の安定性

凍結融解の安定性を、低および高QCを5回サイクルした後に判定した。各サイクルは、試料を凍結状態(第1のサイクルでは少なくとも24時間、および全てのその後のサイクルでは少なくとも12時間にわたる)に維持し、次いで、試料を周囲室温で少なくとも30分間、しかし2時間未満にわたり維持することからなるものであった。サイクルされた低QCおよび高QCの6つのレプリケート(n=6、12ウェル)を、9JHX2において分析した。許容基準を満たすために、凍結融解試料は、20%のPCVを有すること、および理論的濃度の20%以内で定量することが予想された。低安定性および高安定性のQCの全体的なPCVは、それぞれ4%および8%であった。低および高QCの理論値からの差のパーセントは、それぞれ-13%および-8%であり、したがって、5回の凍結融解サイクルでの安定性が確立される。

20

#### 【0153】

##### -20 および -80 での短期間の安定性

凍結された校正標準の使用をバリデーションするために、凍結されたヒト血清中でのMDX-1100の安定性を、バリデーションの間に使用される最も古い校正標準またはQCプールの古さに及ぶ期間にわたり実証した(15日間)。これを試験するために、-20 および -80 で15日間にわたり凍結されたLQCおよびHQCを、作成したばかりの検量線および許容QCと比較した。各温度でのLQC試料およびHQC試料の6つのレプリケート(n=6、12ウェル)を、14JHX2においてアッセイした。許容基準を満たすために、両温度で保管された短期間安定性試料は、20%でなくてはならないPCV値を有さなくてはならず、PDT値は±20%以内でなくてはならない。-80での低および高の短期間安定性試料の全体的なPCVは、それぞれ16%および5%であり、PDT値はそれぞれ0%および13%であった。-20の短期間安定性試料では、全体的なPCV値はそれぞれ7%および4%であり、PDT値はそれぞれ-6%および4%であった。これらのデータは、MDX-1100が、-80 または -20 でおよそ15日間にわたり保管された場合に、正常なヒト血清中で安定であることを示す。

30

40

#### 【0154】

##### ICD426とICD274とのクロスバリデーション

方法の変更を評価し、方法ICD426を用いて得られた結果が方法ICD274を用いて得られた結果と一致するかどうかを決定するために、高い、中程度の、および低い実験濃度の代表であったBMS研究IM129-004(PPD Project Code:NDT)において分析された試料をプールして(プール当たり3の個別の試料)、15の試験試料プールを生成した。各プールされた試料の1つのレプリケート(n=1、2ウェル)、ならびに方法ICD274において列挙されている各許容QC(QC1:3μg/mL; QC2:7.5μg/mL; QC3:25μg/mL)の2つのレプリケート(n=2、4ウェル)を、方法ICD426およびICD274を用いて分析した。方

50

法がクロスバリデーションされたと考えられるために、プールされた試料についての結果の2/3、およびQCレベルの3/4が、20%の差のパーセント(DIFF%) (ICD426を用いて得られた値対、ICD274を用いて得られた値)を有すると予想された。別個のプロジェクトコードであるJHX4は、以前にバリデーションされた方法(ICD274)を用いて得られたデータをAssistにインポートするために生成された。

【0155】

クロスバリデーションのランは、ラン13 JHX2および1 JHX4において最初に行った。15の試料プールのうち、13(87%)は許容基準を満たし、%DIFF値は3%~18%の範囲であった。2つの残りのプールは、29%および38%のDIFF値%を有していた。全体として、プールされた試料の87%が、クロスバリデーションの許容基準を満たした。

10

【0156】

QC1~3をまた、13 JHX2および1 JHX4において分析した。QC2およびQC3は、それぞれ13%および7%のDIFF%を有し、許容基準を満たした。QC1は許容基準を満たすことができず、%DIFF値は35%であった。QC1のための方法の間の第2の比較を、ラン14 JHX2および2 JHX4においてQC1の4つのレプリケート(n=4、8ウェル)をプレティングすることによって行った。1つの異常値が14 JHX2において同定され、比較のために除去された。QC1のこの第2の比較でのDIFF%は18%であった。総合すると、プールされた試料とQCとの比較のための全ての許容基準は、方法ICD426とICD274とをクロスバリデーションするために満たされた。

20

【0157】

SOP偏差

バリデーションの間にSOP偏差は認められなかった。

【0158】

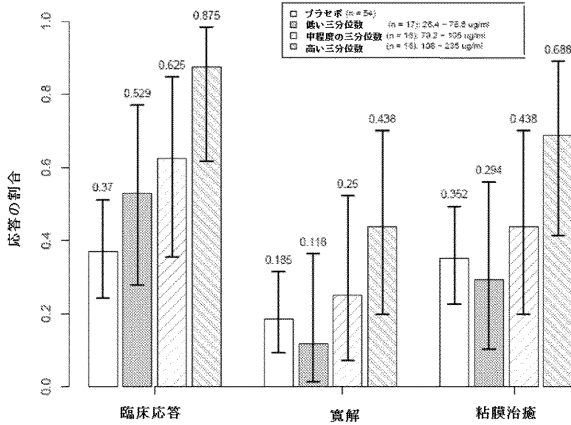
均等物

当業者は、通常の実験を用いるだけで、本明細書において記載された本発明の具体的な実施形態の多くの均等物を認識するか、または確認することができよう。このような均等物は、以下の特許請求の範囲によって包含されるものである。

30

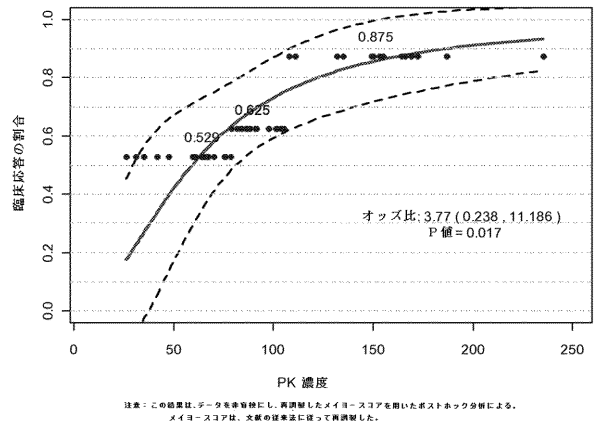
【 図 1 】

図 1  
実験 5 7 日目における BMS-936557 の C<sub>min</sub> s s によって分類した臨床応答、臨床的寛解および粘膜治癒速度の E-R 関連性



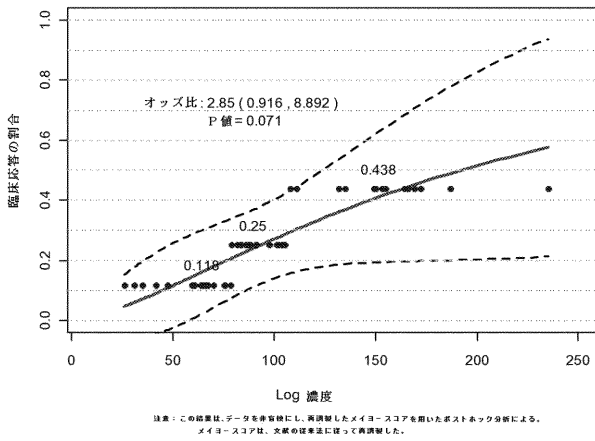
【 図 2 】

図 2  
実験 5 7 日目における BMS-936557 の臨床応答率と C<sub>min</sub> s s のロジスティック回帰分析



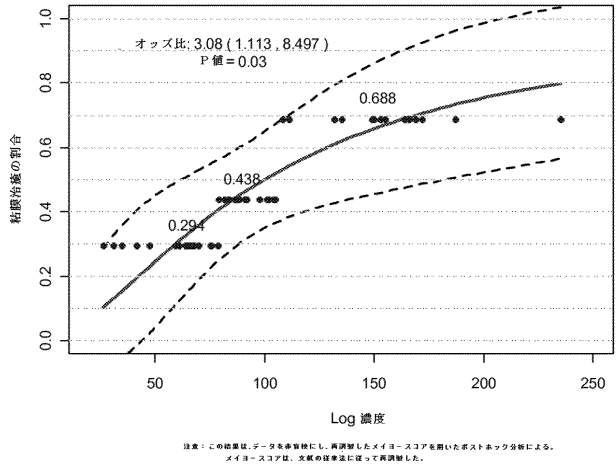
【 図 3 】

図 3  
実験 5 7 日目における BMS-936557 の臨床寛解率と C<sub>min</sub> s s のロジスティック回帰分析



【 図 4 】

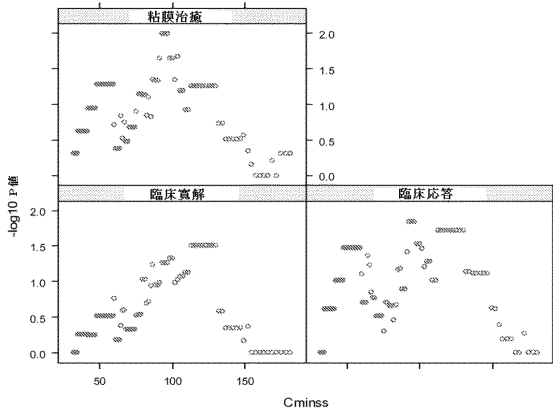
図 4  
実験 5 7 日目における BMS-936557 の粘膜治癒率と C<sub>min</sub> s s のロジスティック回帰分析



【 図 5 】

図 5

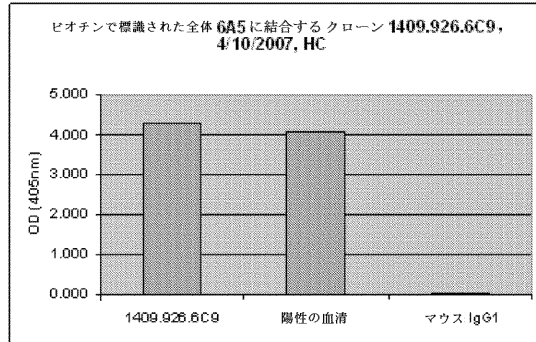
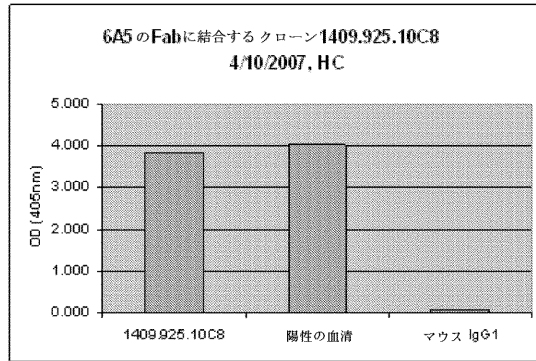
可能性のある標的曝露としての異なるCminssに対する負のLog10で変換したP値



【 図 6 A 】

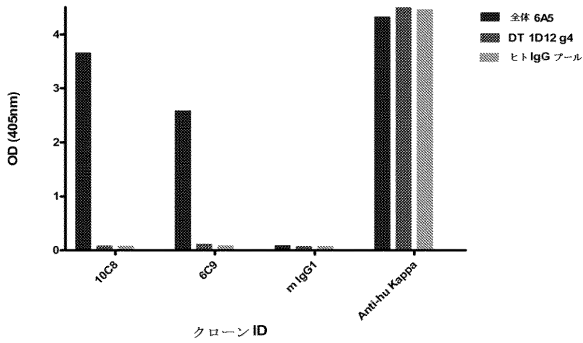
図 6 A

クローン10C8および6C9の結合分析



【 図 6 B 】

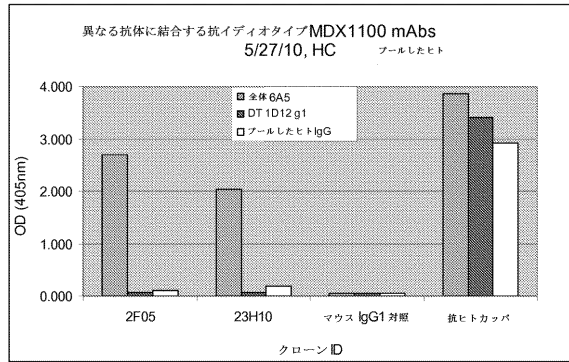
ELISAによるマウス抗MDX1100 6A5 mAbsの結合データ  
 コーディング: 1 ug/ml, 50 ul/ウェルの全体6A5 ; ヒトIgG フール;  
 抗-DT 1D12 g4 (ト IgG4 アイソタイプ制御);  
 50 ul/ウェルの 融合 925 および 926 からの上澄み液  
 検出: ヤギ抗マウスIgG カンマ-HRP  
 4/27/10, HC



【 図 7 】

図 7

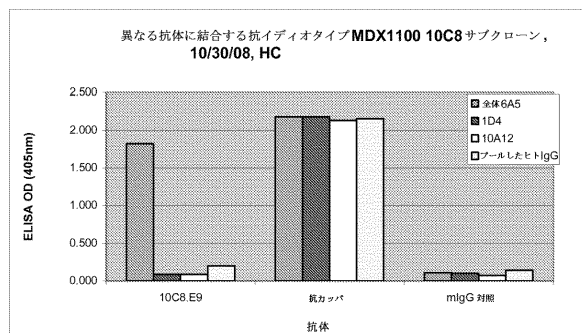
クローン2F5および23H10の結合分析



【 図 8 】

図 8

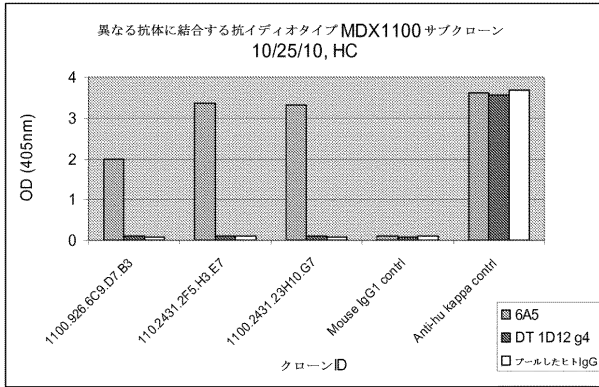
10C8のサブクローンの結合分析



【 図 9 】

図 9

6C9, 2F5 および 23H10 のサブクローンの結合分析



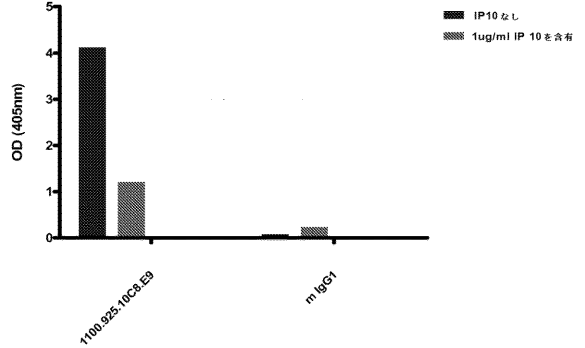
【 図 1 0 】

図 1 0

IP10 とクローン10C8 との競合の結合分析

ELISAによる異なる抗IDs 6A5 mAbsに結合する抗IP10 6A5

- 1) 1ug/ml, 50ulのヤギ抗マウスIgGガンマでコーティング
  - 2) 1uc/ml, 50ulの希釈した抗体を添加
  - 3) 6A5をIP10 (Aa:Ab 比率=5:1)と前もって混合し、または全体6A5のみを添加
  - 4) ヤギ抗ヒトIgG Fcガンマ-HRPを検出
- 6/15/10, HC



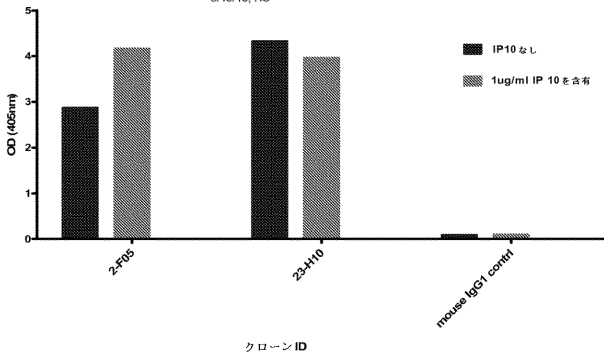
【 図 1 1 】

図 1 1

IP10 とのクローン2F5 および 23H10 との競合の結合分析

ELISAにおいて異なる抗IDs 6A5 mAbsに結合する抗IP10 6A5

- 1) 1ug/ml, 50ulのヤギ抗マウスIgGガンマでコーティング
  - 2) 70ulの24ウェルプレートからの溶液なしの濃縮増強させた上澄み液
  - 3) 6A5をIP10 (Aa:Ab 比率=5:1)と前もって混合し、または全体6A5のみを添加
  - 4) ヤギ抗ヒトIgG Fcガンマ-HRPを検出
- 6/15/10, HC



【 図 1 2 A 】

図 1 2 A

抗-IP10 6A5 VH

V 領域 : 3-33  
D 領域 : 3-10  
J 領域 : JH5b

```

1  Q M Q L V E S G G G V V Q P G R S L
   CAA ATG CRG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTC
                                     CDR1
55  R L S C T A S G F T F S N N G M H W
   AGA CTC TCC TGT ACA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC AAT GGC ATG CAC TGG
                                     CDR2
109 V R Q A P G K G L E W V R A V I W F D
   GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG TTT GAT
                                     CDR2
163 G M N K F Y V D S V K G R F T I S R
   GGA ATG AMT AAA TTC TAT GTA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA
217 D N S K N T L Y L E M N S L R A E D
   GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG GAA ATG AAC ACG CTG AGA GCC GAG GAC
                                     CDR3
271 T A I Y Y C A R E G D G S G I Y Y Y
   ACG GCT ATA TAT TAC TGT GCG AGA GAA GGG GAT GGT TCG GGG ATT TAT TAC TAC
325 Y G M D V W G Q G T T V T V S S
   TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

## 【 図 1 2 B 】

図 1 2 B

抗-IP10 6A5 VK

V 領域 : A27  
J 領域 : JK3

```

1   R I V L T Q S P G T L S L S F G E R
   GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

           CDR1
55   A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
   GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAT TTA GCC TGC

           CDR2
109  Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
   TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

           CDR2
163  R A T G I F D R F S G S G S G T D F
   AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

           CDR 3
217  T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
   ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

           CDR3
271  Q Y G S S P I F T F G P G T K V D I
   CAG TAT GGT AGC TCA CCT ATA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC

325  K
     AAA

```

## 【 手続補正書 】

【 提出日 】平成25年12月19日 (2013.12.19)

## 【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】明細書

【 補正対象項目名 】配列表

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 配列表 】

[2014516944000001.app](#)

## 【 手続補正書 】

【 提出日 】平成26年2月5日 (2014.2.5)

## 【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

抗 IP 1 0 抗体を含む IP 1 0 関連疾患の治療剤であって、

( a ) 所定用量の抗 IP 1 0 抗体を治療を必要とする対象に投与し；

( b ) 前記対象の試料中の抗 IP 1 0 抗体のレベルを検出し；次いで

( c ) 工程 ( b ) からの抗 IP 1 0 抗体のレベルが、閾値曝露レベル以下である場合、  
対象における IP 1 0 関連疾患が治療されるように、対象における抗 IP 1 0 抗体の用量  
を増加させること；

を特徴とする、治療剤。

## 【請求項 2】

前記抗 I P 1 0 抗体が、

- ( a ) 配列番号：2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および
  - ( b ) 配列番号：7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域
- を含むものである、請求項 1 に記載の治療剤。

## 【請求項 3】

前記抗 I P 1 0 抗体が、

- ( a ) 配列番号：3 を含む重鎖可変領域 C D R 1 ；
  - ( b ) 配列番号：4 を含む重鎖可変領域 C D R 2 ；
  - ( c ) 配列番号：5 を含む重鎖可変領域 C D R 3 ；
  - ( d ) 配列番号：8 を含む軽鎖可変領域 C D R 1 ；
  - ( e ) 配列番号：9 を含む軽鎖可変領域 C D R 2 ；および
  - ( f ) 配列番号：10 を含む軽鎖可変領域 C D R 3
- を含むものである、請求項 1 に記載の治療剤。

## 【請求項 4】

工程 ( b ) における抗 I P 1 0 抗体のレベルが、前記試料を、抗体抗原複合体の形成に適する条件下において、抗 I P 1 0 抗体に結合する抗体と接触させ、次いで、前記抗体抗原複合体の形成を検出することを特徴とする方法によって検出されるものである、請求項 1 ~ 3 のいずれか に記載の治療剤。

## 【請求項 5】

前記抗 I P 1 0 抗体に結合する抗体が、抗イディオタイプ抗体である、請求項 1 ~ 4 のいずれか に記載の治療剤。

## 【請求項 6】

前記抗イディオタイプ抗体が、10C8、6C9、2F5 および 23H10 から選択されるものである、請求項 5 に記載の治療剤。

## 【請求項 7】

前記検出が、E I A、E L I S A、R I A、間接競合免疫アッセイ、直接競合免疫アッセイ、非競合免疫アッセイ、サンドウィッチ免疫アッセイおよび凝集アッセイからなる群から選択される方法によって行われるものである、請求項 4 に記載の治療剤。

## 【請求項 8】

前記 I P 1 0 関連疾患が、炎症または自己免疫疾患である、請求項 1 ~ 7 のいずれか に記載の治療剤。

## 【請求項 9】

前記炎症または自己免疫疾患が、炎症性腸疾患である、請求項 8 に記載の治療剤。

## 【請求項 10】

抗 I P 1 0 抗体に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分であって、

前記抗 I P 1 0 抗体が、

- ( a ) 配列番号：3 を含む重鎖可変領域 C D R 1 ；
  - ( b ) 配列番号：4 を含む重鎖可変領域 C D R 2 ；
  - ( c ) 配列番号：5 を含む重鎖可変領域 C D R 3 ；
  - ( d ) 配列番号：8 を含む軽鎖可変領域 C D R 1 ；
  - ( e ) 配列番号：9 を含む軽鎖可変領域 C D R 2 ；および
  - ( f ) 配列番号：10 を含む軽鎖可変領域 C D R 3
- を含むものである、モノクローナル抗体またはその抗原結合部位。

## 【請求項 11】

前記抗体が、抗イディオタイプ抗体である、請求項 10 に記載の抗体またはその抗原結合部分。

## 【請求項 12】

前記抗体が、10C8、6C9、2F5 および 23H10 から選択されるものである、



請求項 10 に記載の抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 13】

請求項 10 に記載のモノクローナル抗体を産生する、ハイブリドーマ細胞株。

【請求項 14】

(1) 請求項 10 に記載の抗体またはその抗原結合部分；および (2) 抗体抗原複合体の形成を容易にするために必要な試薬を含む、キット。

【請求項 15】

試料中の治療用抗 I P 抗体の検出方法であって、前記試料を、抗体抗原複合体の形成に適する条件下において、抗 I P 10 抗体に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部位と接触させ、次いで前記複合体の形成を検出することを特徴とし、

前記抗 I P 10 抗体が、

- (a) 配列番号：3 を含む重鎖可変領域 C D R 1 ；
  - (b) 配列番号：4 を含む重鎖可変領域 C D R 2 ；
  - (c) 配列番号：5 を含む重鎖可変領域 C D R 3 ；
  - (d) 配列番号：8 を含む軽鎖可変領域 C D R 1 ；
  - (e) 配列番号：9 を含む軽鎖可変領域 C D R 2 ；および
  - (f) 配列番号：10 を含む軽鎖可変領域 C D R 3
- を含むものである、方法。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2012/035457

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K16/24 C07K16/42 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
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) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LLOYD MAYER ET AL: "A Randomized, Placebo-Controlled Trial of MDX-1100, an Anti-IP-10 Antibody, for Moderately to Severely Active Ulcerative Colitis", GASTROENTEROLOGY, vol. 139, no. 1, 1 July 2010 (2010-07-01), pages E17-E18, XP55033836, ISSN: 0016-5085, DOI: 10.1053/j.gastro.2010.05.065	1,25
Y	the whole document ----- -/--	1-25
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 application or patent 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  25 July 2012		Date of mailing of the international search report  03/08/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Gruber, Andreas

2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2012/035457
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PAN YING ET AL: "Anti-idiotypic antibodies: Biological function and structural studies", FASEB JOURNAL, FED. OF AMERICAN SOC. FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, US, vol. 9, no. 1, 1 January 1995 (1995-01-01) , pages 43-49, XP002526815, ISSN: 0892-6638 the whole document	1-25
A	WO 2005/058815 A2 (MEDAREX INC [US]; DESHPANDE SHRIKANT [US]; HUANG HAICHUN [US]; SRINIVA) 30 June 2005 (2005-06-30) the whole document	1-25
A	MOHAMMAD TABRIZI ET AL: "Application of Quantitative Pharmacology in Development of Therapeutic Monoclonal Antibodies", THE AAPS JOURNAL, vol. 12, no. 4, 24 July 2010 (2010-07-24), pages 592-601, XP55033835, DOI: 10.1208/s12248-010-9220-2 the whole document	1-25
T	MICHAEL YELLIN ET AL: "A phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled study evaluating the efficacy and safety of MDX-1100, a fully human anti-CXCL10 monoclonal antibody, in combination with methotrexate in patients with rheumatoid arthritis", ARTHRITIS & RHEUMATISM, 1 January 2011 (2011-01-01), pages N/A-N/A, XP55033834, ISSN: 0004-3591, DOI: 10.1002/art.34330 the whole document	1-25

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/035457

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005058815 A2	30-06-2005	AU 2004298492 A1	30-06-2005
		BR PI0417429 A	03-04-2007
		CA 2548338 A1	30-06-2005
		CN 1889979 A	03-01-2007
		EP 1691837 A2	23-08-2006
		EP 2383295 A1	02-11-2011
		JP 4942487 B2	30-05-2012
		JP 2007514419 A	07-06-2007
		JP 2012100667 A	31-05-2012
		KR 20060135690 A	29-12-2006
		KR 20120030602 A	28-03-2012
		MX PA06005941 A	23-08-2006
		NZ 547499 A	30-04-2009
		US 2005191293 A1	01-09-2005
		US 2010077497 A1	25-03-2010
		WO 2005058815 A2	30-06-2005
		ZA 200604620 A	31-10-2007
-----			

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/577	B
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

(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, T M), 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, R S, 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, 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, I D, 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, 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, VN, ZA

(74) 代理人 100150500

弁理士 森本 靖

(72) 発明者 アリソン・ワイ・ルオ

アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州プリンストン、ルート 2 0 6 アンド・プロビンス・ライン・ロード、プリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72) 発明者 ウェンディ・エル・トリゴナ

アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州プリンストン、ルート 2 0 6 アンド・プロビンス・ライン・ロード、プリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72) 発明者 ジンシャン・シェン

アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州プリンストン、ルート 2 0 6 アンド・プロビンス・ライン・ロード、プリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72) 発明者 シュ・リ・アン

アメリカ合衆国 0 8 5 3 4 ニュージャージー州ペニントン、ペニントン・ロッキー・ヒル・ロード 3 1 1 番、プリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72) 発明者 ヤン・ジャン

アメリカ合衆国 0 8 5 3 4 ニュージャージー州ペニントン、ペニントン・ロッキー・ヒル・ロード 3 1 1 番、プリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72) 発明者 ブルース・ストーファー

アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州プリンストン、ルート 2 0 6 アンド・プロビンス・ライン・ロード、プリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72) 発明者 ハイビン・チェン

アメリカ合衆国 9 5 0 3 5 カリフォルニア州ミルピタス、コットンウッド・ドライブ 5 2 1 番、プリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72) 発明者 ハイチュン・ファン

アメリカ合衆国 9 5 0 3 5 カリフォルニア州ミルピタス、コットンウッド・ドライブ 5 2 1 番、プリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72) 発明者 タオ・シャオル

アメリカ合衆国 0 8 5 3 4 ニュージャージー州ペニントン、ペニントン・ロッキー・ヒル・ロード 3 1 1 番、プリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72) 発明者 キャサリン・ブロッカス

アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州プリンストン、ルート 2 0 6 アンド・プロビンス・ライン・ロード、プリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 DA02 GA05 HA01 HA06 HA15  
4B064 AG27 CA20 CC24 DA01 DA13  
4B065 AA91X AA91Y AB01 AC14 BA08 CA25 CA44 CA46  
4C085 AA14 AA15 CC23 DD63 EE01  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 EA50 FA72

专利名称(译)	IP 10抗体的剂量递增计划		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014516944A</a>	公开(公告)日	2014-07-17
申请号	JP2014508600	申请日	2012-04-27
[标]申请(专利权)人(译)	百时美施贵宝公司		
申请(专利权)人(译)	布里斯托尔 - 迈尔斯宝公司		
[标]发明人	アリソンワイルオ ウェンディエルトリゴナ ジンシャンシエン シュリアン ヤンジャン ブルースストーファー ハイビンチェン ハイチュンフアン タオシャオル キャサリンブロッカス		
发明人	アリソン・ワイルオ ウェンディ・エル・トリゴナ ジンシャン・シエン シュ・リ・アン ヤン・ジャン ブルース・ストーファー ハイビン・チェン ハイチュン・フアン タオ・シャオル キャサリン・ブロッカス		
IPC分类号	A61K39/395 C07K16/18 C12N15/02 C12N5/10 A61P37/06 A61P29/00 A61P1/04 A61P1/00 G01N33/53 G01N33/577 C12P21/08		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/00 A61P1/04 A61P29/00 A61P37/06 C07K16/24 C07K16/4208 C07K2317/21 C07K2317/76 C07K2317/90 A61K39/3955 G01N33/686		
FI分类号	A61K39/395.N C07K16/18.ZNA C12N15/00.C C12N5/00.102 A61P37/06 A61P29/00 A61P1/04 A61P1/00 G01N33/53.N G01N33/577.B C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/DA02 4B024/GA05 4B024/HA01 4B024/HA06 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085/CC23 4C085/DD63 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72		
代理人(译)	品川EiSatoshi		
优先权	61/480938 2011-04-29 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

在某些实施方案中，本发明提供了一种在受试者中治疗与IP10相关的疾病的方法，该方法包括：(a) 向受试者施用预定剂量的抗IPIO抗体；(b) 检测受试者样品中抗IPIO抗体的水平；(c) 如果来自步骤(b)的抗IPIO抗体的水平低于阈值暴露水平，则增加抗IPIO抗体在受试者中的剂量，从而治疗受试者中与IP-10相关的疾病。

FIG. 1

I-R Relationship of Clinical Response, Clinical Remission and Mucosal Healing Rat Stratified by Cmins of BMS-936557 at Study Day 57

