

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4369234号
(P4369234)

(45) 発行日 平成21年11月18日(2009.11.18)

(24) 登録日 平成21年9月4日(2009.9.4)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02

C O 7 K 14/00 (2006.01)

C O 7 K 14/00

G O 1 N 33/53 (2006.01)

G O 1 N 33/53

P

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 K 37/02

A 6 1 P 37/00 (2006.01)

A 6 1 P 37/00

請求項の数 25 (全 44 頁)

(21) 出願番号 特願2003-549881 (P2003-549881)
 (86) (22) 出願日 平成14年12月4日(2002.12.4)
 (65) 公表番号 特表2005-511060 (P2005-511060A)
 (43) 公表日 平成17年4月28日(2005.4.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/038859
 (87) 国際公開番号 W02003/048735
 (87) 国際公開日 平成15年6月12日(2003.6.12)
 審査請求日 平成17年2月21日(2005.2.21)
 (31) 優先権主張番号 60/338,767
 (32) 優先日 平成13年12月4日(2001.12.4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 501079705
 テバ ファーマシューティカル インダス
 トリーズ リミティド
 イスラエル国, 4 9 1 3 1 ペターーティ
 クバ, ピー. オー. ボックス 3 1 9 0,
 バーゼル ストリート 5
 (74) 代理人 100058479
 弁理士 鈴江 武彦
 (74) 代理人 100091351
 弁理士 河野 哲
 (74) 代理人 100088683
 弁理士 中村 誠
 (74) 代理人 100108855
 弁理士 蔵田 昌俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グラチラマー・アセテートの強度の測定のための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

グラチラマー・アセテートの試験バッチの強度を参照スタンダードバッチの既知の強度と比較して測定するための方法であって、

a) 参照スタンダードバッチからのグラチラマー・アセテートの規定量で免疫された 8 および 1 2 週齢の間の雌性(SJLXBALB/C)F1マウスから免疫後 9 ~ 1 1 日にリンパ節細胞の初代培養を調製することと；

b) 少なくとも 5 つの参照サンプル(その各々は、工程(a)の初代培養からの規定細胞数と参照スタンダードバッチからの 1 μg/ml および 25 μg/ml の間のグラチラマー・アセテートの規定量とを含有する)を別々にインキュベートすることと；

c) 少なくとも 2 つのサンプル(その各々は、工程(a)の初代培養からの規定細胞数と試験バッチからのグラチラマー・アセテートの規定量とを含有する)をインキュベートすることと；

d) 工程(b)および(c)における各サンプルに関して、各サンプルの細胞により分泌されたインターロイキン-2の量を、かかるサンプルのインキュベーションの 1 8 ~ 2 1 時間後に決定することと；

e) グラチラマー・アセテートの試験バッチとインキュベーションしたサンプルにより分泌されたインターロイキン-2の量と、グラチラマー・アセテートの参照スタンダードバッチとインキュベーションしたサンプルにより分泌されたインターロイキン-2の量とを、グラチラマー・アセテートの試験バッチのグラチラマー・アセテートの参照ス

10

20

タンダードバッチと比較した強度を決定するために、相関させることと；を含み、

工程（b）および（c）の各サンプルの前記規定細胞数は実質的に同一であり、および試験バッチからのグラチラマー・アセテートの規定量を含有している各サンプルに対し、参照スタンダードバッチからの実質的に同一のグラチラマー・アセテートの規定量を含有している対応する参照サンプルが存在する方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であって、6 つの参照サンプルが工程（b）において別々にインキュベーションされる方法。

【請求項 3】

グラチラマー・アセテートの試験バッチの強度を参照スタンダードバッチの既知の強度と比較して測定するための方法であって、

a) 参照スタンダードバッチからのグラチラマー・アセテートの規定量で免疫された試験する哺乳類からの細胞の初代培養を免疫後の規定時間に調製することと；

b) 少なくとも 2 つの参照サンプル（その各々は、工程（a）の初代培養からの規定細胞数と参照スタンダードバッチからのグラチラマー・アセテートの規定量とを含有する）を別々にインキュベートすることと；

c) 少なくとも 2 つのサンプル（その各々は、工程（a）の初代培養からの規定細胞数と試験バッチからのグラチラマー・アセテートの規定量とを含有する）をインキュベートすることと；

d) 工程（b）および（c）における各サンプルに関して、各サンプルの細胞により分泌されたサイトカインの量を、かかるサンプルのインキュベーションの規定期間後に決定することと；

e) グラチラマー・アセテートの試験バッチとインキュベーションしたサンプルにより分泌されたサイトカインの量と、グラチラマー・アセテートの参照スタンダードバッチとインキュベーションしたサンプルにより分泌されたサイトカインの量とを、グラチラマー・アセテートの試験バッチのグラチラマー・アセテートの参照スタンダードバッチと比較した強度を決定するために、相関させることと；を含み、

工程（b）および（c）の各サンプルの前記規定細胞数は実質的に同一であり、および試験バッチからのグラチラマー・アセテートの規定量を含有している各免疫サンプルに対し、参照スタンダードバッチからの実質的に同一のグラチラマー・アセテートの規定量を含有している対応する参照サンプルが存在する方法。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の方法であって、前記サイトカインがインターロイキンである方法。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の方法であって、前記インターロイキンがインターロイキン—2 である方法。

【請求項 6】

請求項 4 に記載の方法であって、前記インターロイキンがインターロイキン—6 である方法。

【請求項 7】

請求項 4 に記載の方法であって、前記インターロイキンがインターロイキン—10 である方法。

【請求項 8】

請求項 3 に記載の方法であって、前記サイトカインがインターフェロン—ガンマである方法。

【請求項 9】

請求項 3 ~ 8 の何れか一項に記載の方法であって、前記哺乳類はグラチラマー・アセテート参照スタンダード（reference standard）に特異的な T 細胞を産生する方法。

【請求項 10】

請求項 3 ~ 9 の何れか一項に記載の方法であって、前記哺乳類が齧歯類である方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

請求項10に記載の方法であって、前記齧歯類がマウスである方法。

【請求項 1 2】

請求項 1 1 に記載の方法であって、前記マウスが雌(SJLXBALB/C)F1マウスである方法。

【請求項 1 3】

請求項 3 ～ 12の何れか一項に記載の方法であって、前記哺乳類が約 8 ～ 約 1 2 週齢である方法。

【請求項 1 4】

請求項 3 ～ 13の何れか一項に記載の方法であって、前記細胞がリンパ節細胞である方法

10

【請求項 1 5】

請求項 3 ～ 13の何れか一項に記載の方法であって、前記細胞が脾臓細胞である方法。

【請求項 1 6】

グラチラマー・アセテートのバッチを薬学的な使用に許容されるように調製するための方法であって、

a) グラチラマー・アセテートのバッチを調製することと；

b) 請求項 1 ～ 2の何れか一項に記載の方法に従ってバッチの相対強度を測定することと；および

c) そのように測定された相対強度がグラチラマー・アセテートの参照スタンダードバッチの80%および125%の間である場合、前記バッチを薬学的な使用に許容されると認定することと；を含む方法。

20

【請求項 1 7】

薬学的な使用に許容されるグラチラマー・アセテートを調製するための方法であって、

a) グラチラマー・アセテートのバッチを調製することと；

b) 請求項3～15の何れか一項に記載の方法に従ってバッチの相対強度を測定することと；および

c) そのように測定された相対強度がグラチラマー・アセテートの参照スタンダードバッチの80%および125%の間である場合、前記バッチを薬学的な使用に許容されると認定することと；を含む方法。

【請求項 1 8】

30

グラチラマー・アセテートを含有している薬学的組成物を調製するための方法において、本方法の間にグラチラマー・アセテートのバッチは、グラチラマー・アセテートのバッチが規定強度を有するかどうかを決定するために試験され、その改善に以下を備える方法：

グラチラマー・アセテートの参照スタンダードバッチの一定量 (defined amount) で免疫された雌性(SJLXBALB/C)F1マウスからのT-細胞の初代培養により分泌されたインターロイキン-2の量を別々に測定することと、

i) ここで、かかる細胞の規定数を含有している少なくとも2つのサンプルは、参照スタンダードバッチの規定量の存在下で別々にインキュベーションされ、

ii) ここで、実質的に同一の規定数の細胞を含有している少なくとも2つのサンプルは、試験されるグラチラマー・アセテートのバッチの同じ規定量の存在下で別々にインキュベーションされる；

40

そのように測定された、分泌されたインターロイキン-2の量を比較して、試験されるグラチラマー・アセテートのバッチの強度を決定することと；および

前記薬学的組成物に、前記強度が参照スタンダードバッチの80%および125%の間である場合のみ、そのように試験されたバッチを含ませること。

【請求項 1 9】

グラチラマー・アセテートを含有している薬学的組成物を調製するための方法であって、以下を備える方法：

試験されるグラチラマー・アセテートのバッチを取得することと；

50

雌性(SJLXBALB/C)F1マウスをグラチラマー・アセテートの参照スタンダードバッチの一定量 (defined amount) で免疫することと、

グラチラマー・アセテートの参照スタンダードバッチの一定量 (defined amount) で免疫された雌性(SJLXBALB/C)F1マウスからのT-細胞の初代培養により分泌されたインターロイキン-2の量を別々に測定することと、

i) ここで、かかる細胞の規定数を含有している少なくとも2つのサンプルは、参照スタンダードバッチの規定量の存在下で別々にインキュベーションされ、

ii) ここで、実質的に同一の規定数の細胞を含有している少なくとも2つのサンプルは、試験されるグラチラマー・アセテートのバッチの同じ規定量の存在下で別々にインキュベーションされる；

そのように測定された、分泌されたインターロイキン-2の量を比較して、試験されるグラチラマー・アセテートのバッチの強度を決定することと；および

前記薬学的組成物にバッチを、そのように測定されたその強度が参照スタンダードバッチの80%および125%の間である場合のみ、含ませること。

【請求項 2 0】

グラチラマー・アセテートのバッチの強度を決定するための方法であって、以下を備える方法：

グラチラマー・アセテートの参照スタンダードバッチの一定量 (defined amount) で免疫された雌性(SJLXBALB/C)F1マウスからのT-細胞の初代培養により分泌されたインターロイキン-2の量を別々に測定することと、

i) ここで、かかる細胞の規定数を含有している少なくとも2つのサンプルは、参照スタンダードバッチの規定量の存在下で別々にインキュベーションされ；

ii) ここで、実質的に同一の規定数の細胞を含有している少なくとも2つのサンプルは、グラチラマー・アセテートのバッチの同じ規定量の存在下で別々にインキュベーションされる；

そのように測定された、分泌されたインターロイキン-2の量を比較して、前記バッチの強度を決定すること。

【請求項 2 1】

グラチラマー・アセテートのバッチが薬学的組成物に包含するために認容できる規定強度を有するかどうかを決定するための方法であって、以下を備える方法：

グラチラマー・アセテートの参照スタンダードバッチの一定量 (defined amount) で免疫された雌性(SJLXBALB/C)F1マウスからのT-細胞の初代培養により分泌されたインターロイキン-2の量を別々に測定することと、

i) ここで、かかる細胞の規定数を含有している少なくとも2つのサンプルは、参照スタンダードバッチの規定量の存在下で別々にインキュベーションされ、

ii) ここで、実質的に同一の規定数の細胞を含有している少なくとも2つのサンプルは、グラチラマー・アセテートのバッチの同じ規定量の存在下で別々にインキュベーションされる；

そのように測定された、分泌されたインターロイキン-2の量を比較して、前記バッチの強度を決定することと；および

そのように測定された前記強度を参照スタンダードバッチの規定強度と比較して、前記バッチが前記薬学的組成物に含有するために認容されるかどうかを決定すること。

【請求項 2 2】

請求項1、または3~21の何れか一項に記載の方法であって、前記参照スタンダードバッチが7000 Daの平均分子量を有しているグラチラマー・アセテートのバッチである方法。

【請求項 2 3】

グラチラマー・アセテートを含有している薬学的組成物を調製するための方法であって、グラチラマー・アセテートのバッチを調製することと；およびグラチラマー・アセテートのバッチの強度をグラチラマー・アセテートの参照スタンダードの強度と比較して測定することと；を備え、以下によってなされる方法：

10

20

30

40

50

a) 前記参照スタンダードの規定量で免疫された8および12週齢の間の雌性(SJLXBALB/C)F1マウスからT-細胞の初代培養を調製することと；

b) 少なくとも5つの参照サンプル（その各々は、工程（a）の初代培養からの規定細胞数と1 μ g/mlおよび25 μ g/mlの間の参照スタンダードの規定量とを含有する）を別々にインキュベートすることと；

c) 少なくとも2つのサンプル（その各々は、工程（a）の初代培養からの規定細胞数とグラチラマー・アセテートの規定量とを含有する）をインキュベートすることと；

d) 工程（b）および（c）における各サンプルに関して、各サンプルの細胞により分泌されたインターロイキン-2の量を、かかるサンプルのインキュベーションの18～21時間後に決定することと； 10

e) グラチラマー・アセテートでインキュベーションしたサンプルにより分泌されたインターロイキン-2の量と、参照スタンダードでインキュベーションしたサンプルにより分泌されたインターロイキン-2の量とを、グラチラマー・アセテートのバッチの参照スタンダードと比較した強度を決定するために、相関させることと、

ここで、工程（d）および（e）の各サンプルの前記規定細胞数は実質的に同一であり、およびグラチラマー・アセテートの規定量を含有している各サンプルに対し、実質的に同一の規定量の参照スタンダードを含有している対応する参照サンプルが存在する；および

そのように測定された相対強度が参照スタンダードの強度の80%および125%の間である場合、グラチラマー・アセテートのバッチを薬学的組成物への使用に許容されると認定すること。 20

【請求項24】

請求項3～23の何れか一項に記載の方法であって、前記細胞がリンパ節細胞である方法

。

【請求項25】

請求項3～23の何れか一項に記載の方法であって、前記細胞が脾臓細胞である方法。

【発明の詳細な説明】

【関連文献】

【0001】

本出願は、2001年12月4日に出版された米国仮出願番号60/338,767の優先権を主張するものであり、この出願の内容は本明細書中に参照によって援用される。この出願の全体で、様々な文献が、括弧内の短い引用文を用いて参照される。これら文献の完全なる書誌的事項は、本明細書の「図面の簡単な説明」の前に記載される。これら公開文献の開示の全体は、本明細書中に引用することにより本出願に援用され、当該発明が属する技術の状況をより完全に記載する。

【発明の分野】

【0002】

本発明は、グラチラマー・アセテートのT細胞による特異的な認識に基づく、グラチラマー・アセテートの強度の測定を標準化（standardizing）する方法に関する。 40

【背景】

【0003】

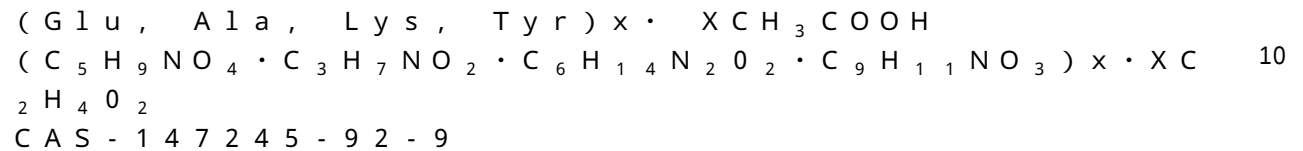
活性成分の最適な強度（potency）および品質を得るために、薬学的組成物の強度の測定を標準化することが望まれている。

グラチラマー・アセテート（GA、コポリマー-1（医師用卓上参考書）、コポリマー1、Cop-1またはCOPAXONE（登録商標）としても知られる）は、多発性硬化症（MS）を治療するための認可された薬物である。

グラチラマー・アセテートは、合成ポリペプチドの酢酸塩（acetate salts）からなり、4つの天然のアミノ酸を含有している（医師用卓上参考書）：L-グルタミ 50

ン酸、L - アラニン、L - チロシン、およびL - リジン（医師用卓上参考書）、それぞれL - グルタミン酸：0.129 ~ 0.153；L - アラニン：0.392 ~ 0.462；L - チロシン：0.086 ~ 0.100；L - リジン：0.300 ~ 0.374の平均モル分率を有する。グラチラマー・アセテートの平均分子量は、4,700 ~ 11,000ダルトン（医師用卓上参考書）である。

化学的に、グラチラマー・アセテートは、L - アラニン、L - リジンおよびL - チロシン、アセテート（塩）（医師用卓上参考書）を有するL - グルタミン酸ポリマーと明示される。その構造式は：



（医師用卓上参考書）。また、グラチラマー・アセテートは、次のように記載される：ポリ[L - Glu¹³⁻¹⁵, L - Ala³⁹⁻⁴⁶, L - Tyr⁸⁻⁶⁻¹⁰, L - Lys³⁰⁻³⁷] nCH₃COOH。

グラチラマー・アセテートが、実験的な自己免疫性の脳脊髄炎（EAE）——多様な動物種における多発性硬化症（MS）に対する実験モデル、を抑制することが示された（Landora, 1979；Aharoni, 1993）。マウスのEAEの研究は、EAEに対する防御がT細胞活性により媒介されることを示唆した（Aharoni, 1993）。EAEの積極的な誘導からのマウス脊髄ホモジネートによる、この防御（いくつかの自己抗原が関与する）は、正常なレシピエントにグラチラマー・アセテート特異的なTサプレッサー細胞の注射により養子性に（adoptively）伝達できた（Aharoni, 1993）。フェーズIII臨床試験において、グラチラマー・アセテートの毎日の皮下注射により、能力障害（disability）の進行を緩徐にさせるようになり、多発性硬化症の増悪（exacerbating）——軽減（remitting）における再発率（relapse rate）を減少させる（Johnson, 1987）。グラチラマー・アセテートを製造する方法は、米国特許第3,849,550および5,800,808並びにPCT国際公開番号WO 00/05250に記載されている。

【0004】

高いレベルの抗原特異性がT細胞活性化の特性であることは一般に認識されている。免疫系のT細胞は、主要組織適合複合体（MHC）クラスIIまたはI分子（抗原提示細胞（APC）上に発現される）と複合体形成した免疫原性ペプチドを認識する。T細胞による抗原認識の特異性は、いくつかのパラメーターにより規定される：1）MHCペプチド複合体に対するT細胞受容体の親和性；2）抗原性ペプチドの一次配列；および3）抗原性ペプチド内の特定のアミノ酸の組み合わせの相乗効果。グラチラマー・アセテートの作用機構における現在の知識に基づいて、MSにおけるグラチラマー・アセテートの生物学的な活性がT細胞活性の免疫調節（immunomodulation）により媒介されることが信じられている。

【発明の概要】

【0005】

本発明は次の方法を提供する、即ち、グラチラマー・アセテートの試験バッチの強度をグラチラマー・アセテートの参照バッチの既知の強度と比較して測定するための方法であって、

- 雌性（SJLXBALB/C）F1マウスを8および12週齢の間に参照バッチからのグラチラマー・アセテートの規定量で免疫することと；
- 工程（a）のマウスから免疫後9 ~ 11日後にリンパ節細胞の初代培養を調製することと；
- 少なくとも5つの参照サンプル（その各々は、工程（b）の初代培養からの規定細胞数と参照バッチからの1 μg/mlおよび25 μg/mlの間のグラチラマー・アセテ-

トの規定量とを含有する)を別々にインキュベートすることと;

d. 少なくとも2つのサンプル(その各々は、工程(b)の初代培養からの規定細胞数と試験バッチからのグラチラマー・アセテートの規定量とを含有する)をインキュベートすることと;

e. 工程(c)および(d)における各サンプルに関して、各サンプルの細胞により分泌されたインターロイキン-2の量を、かかるサンプルのインキュベーションの18~21時間後に決定することと;

f. グラチラマー・アセテートの試験バッチとインキュベーションしたサンプルにより分泌されたインターロイキン-2の量と、グラチラマー・アセテートの参照バッチとインキュベーションしたサンプルにより分泌されたインターロイキン-2の量とを、グラチラマー・アセテートの試験バッチのグラチラマー・アセテートの参照バッチと比較した強度を決定するために、相関させることと;を含み、

工程(c)および(d)の各サンプルの前記規定細胞数は実質的に同一であり、および試験バッチからのグラチラマー・アセテートの規定量を含有している各サンプルに対し、参照バッチからの実質的に同一のグラチラマー・アセテートの規定量を含有している対応する参照サンプルが存在する方法。

また、本発明は次の方法を提供する、即ち、グラチラマー・アセテートの試験バッチの強度をグラチラマー・アセテートの参照バッチの既知の強度と比較して測定するための方法であって、

a. 試験する哺乳類を参照バッチからのグラチラマー・アセテートの規定量で免疫することと;

b. 工程(a)の試験する哺乳類からの細胞の初代培養を免疫後の規定時間に調製することと;

c. 少なくとも2つの参照サンプル(その各々は、工程(b)の初代培養からの規定細胞数と参照バッチからのグラチラマー・アセテートの規定量とを含有する)を別々にインキュベートすることと;

d. 少なくとも2つのサンプル(その各々は、工程(b)の初代培養からの規定細胞数と試験バッチからのグラチラマー・アセテートの規定量とを含有する)をインキュベートすることと;

e. 工程(c)および(d)における各サンプルに関して、各サンプルの細胞により分泌されたサイトカインの量を、かかるサンプルのインキュベーションの規定期間後に決定することと;

f. グラチラマー・アセテートの試験バッチとインキュベーションしたサンプルにより分泌されたサイトカインの量と、グラチラマー・アセテートの参照バッチとインキュベーションしたサンプルにより分泌されたサイトカインの量とを、グラチラマー・アセテートの試験バッチのグラチラマー・アセテートの参照バッチと比較した強度を決定するために、相関させることと;を含み、

工程(c)および(d)の各サンプルの前記規定細胞数は実質的に同一であり、および試験バッチからのグラチラマー・アセテートの規定量を含有している各免疫サンプルに対し、参照バッチからの実質的に同一のグラチラマー・アセテートの規定量を含有している対応する参照サンプルが存在する方法。

【詳細な記載】

【0006】

本発明は次の方法を提供する、即ち、グラチラマー・アセテートの試験バッチの強度をグラチラマー・アセテートの参照バッチの既知の強度と比較して測定するための方法であって、

a. 雌性(SJLXBALB/C)F1マウスを8および12週齢の間に参照バッチからのグラチラマー・アセテートの規定量で免疫することと;

b. 工程(a)のマウスから免疫後9~11日にリンパ節細胞の初代培養を調製することと;

c．少なくとも5つの参照サンプル（その各々は、工程（b）の初代培養からの規定細胞数と参照バッチからの $1\mu\text{g}/\text{ml}$ および $25\mu\text{g}/\text{ml}$ の間のグラチラマー・アセテートの規定量とを含有する）を別々にインキュベートすることと；

d．少なくとも2つのサンプル（その各々は、工程（b）の初代培養からの規定細胞数と試験バッチからのグラチラマー・アセテートの規定量とを含有する）をインキュベートすることと；

e．工程（c）および（d）における各サンプルに関して、各サンプルの細胞により分泌されたインターロイキン-2の量を、かかるサンプルのインキュベーションの18～21時間後に決定することと；

f．グラチラマー・アセテートの試験バッチとインキュベーションしたサンプルにより分泌されたインターロイキン-2の量と、グラチラマー・アセテートの参照バッチとインキュベーションしたサンプルにより分泌されたインターロイキン-2の量とを、グラチラマー・アセテートの試験バッチのグラチラマー・アセテートの参照バッチと比較した強度を決定するために、関連させることと；を含み、

工程（c）および（d）の各サンプルの前記規定細胞数は実質的に同一であり、および試験バッチからのグラチラマー・アセテートの規定量とを含有している各サンプルに対し、参照バッチからの実質的に同一のグラチラマー・アセテートの規定量とを含有している対応する参照サンプルが存在する方法。

一態様において、6つの参照サンプルが工程（d）において別々にインキュベーションされる。

また、本発明は次の方法を提供する、即ち、グラチラマー・アセテートの試験バッチの強度をグラチラマー・アセテートの参照バッチの既知の強度と比較して測定するための方法であって、

a．試験する哺乳類を参照バッチからのグラチラマー・アセテートの規定量で免疫することと；

b．工程（a）の試験する哺乳類からの細胞の初代培養を免疫後の規定時間に調製することと；

c．少なくとも2つの参照サンプル（その各々は、工程（b）の初代培養からの規定細胞数と参照バッチからのグラチラマー・アセテートの規定量とを含有する）を別々にインキュベートすることと；

d．少なくとも2つのサンプル（その各々は、工程（b）の初代培養からの規定細胞数と試験バッチからのグラチラマー・アセテートの規定量とを含有する）をインキュベートすることと；

e．工程（c）および（d）における各サンプルに関して、各サンプルの細胞により分泌されたサイトカインの量を、かかるサンプルのインキュベーションの規定期間後に決定することと；

f．グラチラマー・アセテートの試験バッチとインキュベーションしたサンプルにより分泌されたサイトカインの量と、グラチラマー・アセテートの参照バッチとインキュベーションしたサンプルにより分泌されたサイトカインの量とを、グラチラマー・アセテートの試験バッチのグラチラマー・アセテートの参照バッチと比較した強度を決定するために、関連させることと；を含み、

工程（c）および（d）の各サンプルの前記規定細胞数は実質的に同一であり、および試験バッチからのグラチラマー・アセテートの規定量とを含有している各免疫サンプルに対し、参照バッチからの実質的に同一のグラチラマー・アセテートの規定量とを含有している対応する参照サンプルが存在する方法。

一態様において、前記サイトカインは、インターロイキンである。

好適な態様において、前記インターロイキンはインターロイキン-2である。

【0007】

別の態様において、前記インターロイキンはインターロイキン-6である。

【0008】

10

20

30

40

50

更なる一態様において、前記インターロイキンはインターロイキン—１０である。

【０００９】

付加された態様において、前記サイトカインはインターフェローン—ガンマである。

一態様において、前記哺乳類はグラチラマー・アセテート参照スタンダードに特異的なＴ細胞を産生する。

別の態様において、前記哺乳類は齧歯類である。

更に別の態様において、前記齧歯類はマウスである。

付加的な態様において、前記マウスは雌（ＳＪＬ×ＢＡＬＢ／Ｃ）Ｆ１マウスである。

更なる一態様において、前記哺乳類は約８～約１２週齢である。

一態様において、前記細胞は、リンパ節細胞である。

10

一態様において、前記細胞は、脾臓細胞である。

本発明は更に次の方法を提供する、即ち、グラチラマー・アセテートのバッチを薬学的な使用に許容されるように調製するための方法であって、

a．グラチラマー・アセテートのバッチを調製することと；

b．請求項１に記載の方法に従ってバッチの相対強度を測定することと；および

c．そのように測定された相対強度がグラチラマー・アセテートの参照バッチの８０％および１２５％の間である場合、前記バッチを薬学的な使用に許容されると認定することと；を含む方法。

付加的に、本発明は次の方法を提供する、即ち、薬学的な使用に許容されるグラチラマー・アセテートを調製するための方法であって、

20

a．グラチラマー・アセテートのバッチを調製することと；

b．請求項３に記載の方法に従ってバッチの相対強度を測定することと；および

c．そのように測定された相対強度がグラチラマー・アセテートの参照バッチの８０％および１２５％の間である場合、前記バッチを薬学的な使用に許容されると認定することと；を含む方法。

従って、本発明は、ＧＡの強度の測定の標準化（standardization）を提供する。強度試験は、定量的にＧＡの生物活性を決定する。これは、これまでにない試験を初めて示すものである。この標準化方法は、ＤＳおよびＤＰの強度および品質に関してバッチ間の再現性を示すために必須である。この出願の関連において、ＤＳは活性成分を意味する（即ち、ＧＡ）。ＤＰは、最終製品を示すために使用される（即ち、C o p a x o n e（登録商標））。ＲＳは、約７０００Ｄａの平均分子量を有するグラチラマー・アセテートのバッチを意味する。

30

本発明は、サイトカイン（例えば、ＩＬ－２）とインキュベートしたＴ細胞が、そのサイトカインと反応して増殖するとの観察を利用する（L i s a k e t a l . , 1974）。

以下に記載される実施例は、如何に発明のある特定の代表的な態様が作り出されるかに関して発明の詳細を記載するが、材料、装置および方法の工程は例示の目的でのみを意図している。特に、本発明は、本明細書中に特に記載される方法、材料、条件、方法のパラメータ、装置などに限定されない。

【実施例】

40

【００１０】

実験的な実施例

一般的な手順の概要

マウスをＣＦＡ中の２５０μｇ　ＧＡ　ＲＳで免疫した。ＧＡ　ＲＳは、米国特許第５，８００，８０８またはＰＣＴ国際公開番号ＷＯ　００／０５２５０に記載のとおり生産された。ＧＡ　ＲＳは、上記に記載のＣ o p a x o n e（登録商標）の中央範囲（midrange）における化学的および生物学的な特性に基づいて選択された。９～１１日後、ＬＮ細胞の初代培養を調製し、そして細胞を様々な濃度のＧＡ　ＲＳおよび試験サンプルとインキュベートした。加湿したＣＯ₂インキュベーターにおける３７　でのインキュベーションの１８～２１時間後、培養液を集め、ＩＬ－２のレベルをＥＬＩＳＡにより測

50

定した。各DSバッチに対するT細胞応答を2つの濃度(直線範囲内)で試験し、そしてDSバッチの%強度をGARSバッチのものと比較して計算した。

[実施例1] 標準の手順

目的

この手順の目的は、GARS特異的T細胞を用いて、インビトロにおけるGARSバッチの相対強度を決定することである。

設備

層状フード(Laminar hood)、血球計算器(hemocytometer)、使い捨てのカバーガラス、細胞カウンター遠心機、温度制御振盪インキュベーター、加湿され温度制御された5%CO₂インキュベーター、光学倒立顕微鏡、ELISAリーダー(450nmフィルター)、フリーザー、冷蔵庫、ハサミ、ピンセット、ステッパー(stepper)、ピペットマン40~200μl、ピペットマン200~1000μl、ピペットマン5~400μl、パワーペット(powerpette)、無菌ガラス注射器およびルアーブリッジ(luer bridges)。

10

使い捨て品(Disposables)

クリオチューブ(Cryotubes)、96ウェル増強結合ELISAプレート(Nunc, Cat.#442404)、96ウェル未滅菌マイクロテストプレート(Falcon Cat.#3911)、24ウェル平底無菌組織培養プレート(Nunc, Cat.#143982)、ペトリ皿、エッペンドルフチューブ(ポリプロピレン)、滅菌ピペットチップ200-1000μl、ピペット:2, 5 & 10ml、白衣(laboratory coat)、手袋、0.2μセルロースアセテートフィルター、フィルターシステム200ml(Corning, Cat.#430767)、キムワイプ(Kimwipes)、サポートプラットフォーム(support platform)、10ml注射器、21Gx1 1/2"注射針、インシュリン注射器およびコンビチップ(combipips)5ml。

20

材料及び方法

免疫操作に関して

95%エタノール(Bio Lab, Cat.#13680605、または均等物)、70%エタノール(95%エタノールから蒸留水で希釈して調製された)、リン酸緩衝塩類溶液(PBS)x1(SIGMA, Cat.#3813、または均等物)、CFA(1mgのmycobacterium tuberculosis(MT)(H37Ra, ATCC 255177)、(SIGMA, Cat.#F-5881、または均等物)を含有している)およびGARSバッチ。

30

インビトロ・バイオアッセイ処置に関して

95%エタノール(Bio Lab, Cat.#13680605、または均等物)、70%エタノール(95%エタノールから蒸留水で希釈して調製された)、トリパンブルー(BDH, Cat.#3407)、DCCM1(Defined Cell Culture Media)(Beit Haemek, Cat.#05-010-1A、または均等物)、RPMI 1640(Roswell Park Memorial Institute)(Beit Haemek, Cat.#01-100-1A)、滅菌L-グルタミン 2mMx100(Bio Lab, Cat.#13.015)、滅菌MEM(最小必須培地)-非必須アミノ酸x100(Bio Lab, Cat.#11.080)、滅菌塩化ピルベート(steriled sodium pyruvate)1mMx100(Bio Lab, Cat.#13.016)、抗生物質/抗真菌物質(antimycotic)溶液1(Bio Lab, Cat.#13.020)、2-メルカプトエタノール(SIGMA, Cat.#M-7154)、PBS(SIGMA, Cat.#3813)、コンカナバリンA(ConA)(SIGMA, Cat.#C-5275)、MBP(Myelin Basic Protein; ミエリン塩基性蛋白質)ペプチド(87-99)(BACHEM, Cat.#H-1964、または均等物)、およびGARS。

40

50

E L I S A に関して

I L - 2 を E L I S A キットにより測定した：O p t E I A ^{T M} セット：マウス I L - 2 (P h a r m i n g e n , C a t . # 2 6 1 4 K I 、 または均等物) 。

動物

8 ~ 1 2 週 齢 の 雌 (S J L X B A L B / C) F 1 マウス (J a c k s o n L a b o r a t o r i e s , B a r H a r b o r , M E) を使用したが、他の供給源からの 8 ~ 1 2 週 齢 の 雌 (B A L B / C) F 1 マウスを使用し得る。動物の飼育 (h o u s i n g) および世話 (c a r e) の条件は、特定病原体除去の (S P F) 条件で維持した。

溶液

【表 1 - 1】

表1: 溶液を作出するための手順

滅菌したPBS	PBS の1パッケージの内容物を1リットルの二重蒸留水(ddH ₂ O)に溶解した。緩衝液を 0.2 μ セルロース・アセテート・フィルターを通して濾過し、冷蔵庫(2~8℃)で1週間まで維持した。	
2 % (w/v)トリパンブルー (PBS 中)	約 0.5g のトリパンブルーを 25ml の濾過したPBS中に溶解し、冷蔵庫で6ヶ月まで保存した。	10
0.1 % (v/v)トリパンブルー (PBS 中)	0.1%トリパンブルー溶液を 2%トリパンブルーストック溶液から調製し、0.2 μ セルロース・アセテート・フィルターを通して濾過した。0.1%トリパンブルー溶液を 1ヶ月まで室温で保存した。	
滅菌した 2-メルカプトエタノール	10 μ l のメルカプトエタノールを 9.99ml の滅菌したPBSに添加し、0.2 μ セルロース・アセテート膜を通して濾過し、冷蔵庫で3ヶ月まで維持した。	20
1mg/ml の GA RSストック溶液	約 10mg のグラチラマー・アセテート RSを正確に秤量し、ddH ₂ O 中で約 1.2mg/ml の濃度まで溶解した。前記RS溶液の光学濃度(OD)を 275 nmで測定した。ODを凡そ 1.03 にddH ₂ O で調整し、1mg/ml のGA RSのストック溶液を得た。溶液をよく混合し、作業アリクウォット(200~500 μ l)に分けて、使用するまで-20℃で保存した。	30
滅菌した MEM x 100	滅菌した溶液を各 5ml のアリクウォットに分け、使用するまで-20℃で維持した。融解後、作業(working)アリクウォットを 1ヶ月まで冷蔵庫で維持した。	
抗生物質／抗真菌物質 溶液1	オリジナルの 20ml パッケージを 20℃で維持した。パッケージを開けて、全ての内容物を各 2ml のアリクウォットに分け、使用するまで-20℃で保存した。作業アリクウォットは、安定であり、何回かの凍結融解サイクルを受けることが可能であった。	40

【表 1 - 2】

滅菌した L-グルタミン 2mM x 100	開けたパッケージの内容物を各 2ml のアリク ウォットに分け、使用するまで-20℃で維持し た。	
富化した DCCM1 培地	100ml の滅菌し富化した DCCM1 に対し、次 の成分を共に混合した、即ち：1ml の L-グルタ ミン(2mM)、1ml MEM、1ml 塩化ピルベート (1mM)、200 μ l 抗生物質／抗真菌物質 溶 液 1、400 μ l 2-メルカプトエタノールおよび 96.4ml DCCM1である。富化したDCCM1を 0.2 μ セルロースアセテートフィルターを通し て濾過し、1 週まで冷蔵庫で保存した。	10
MBPペプチド	<u>プライマリーバンク</u> ：10mg/ml(ddH ₂ O 中)の ストック溶液を調製し、作業アリクウォットに分 け、20℃に維持した。 <u>セカンダリーバンク</u> ：前記プライマリーバンク (10mg/ml)の1アリクウォットを融解し、 ddH ₂ O で1mg/mlに希釈した。 プライマリーバンク溶液を各 50 μ l の作業アリ クウォットに分け、-20℃に維持した。使用に 際し、セカンダリーバンクからのアリクウォット を融解し、富化した DCCM1 で希釈して 20 μ g/ml の溶液を得た。	20
ConA溶液	<u>プライマリーバンク</u> ：5mg/ml Conの1バイア ルの内容物を1 ml のPBSに溶解し、よく混合 し、そして各 50 μ l のアリクウォットに分けた。 アリクウォットを製造者により設定された有効 期限まで-20℃で維持した。 <u>セカンダリーバンク</u> ：前記プライマリーバンク (5mg/ml)の1アリクウォットを融解し、4.95 ml の富化した DCCM1 培養液で希釈して 50 μ g/ml の溶液を得た。前記溶液を各 100 μ l の 作業アリクウォットに分け、-20℃に維持した。 使用に際し、セカンダリーバンクからの1アリ クウォットを融解し、1mlにまで(10 倍希釈)富 化した DCCM1 で希釈して 5 μ g/ml Con A の溶液を得た。	30 40

免疫化

CFA中でGA RSエマルジョンを無菌条件下で調製した(即ち、層状フード中で無菌
の設備および材料を用いて)。

GA RS 溶液の調製

約 15 mg の GA RS を正確に秤量し、無菌の PBS に溶解して 5 mg / ml の濃度にした。

GA RS エマルジョンの調製

GA RS 溶液 (5 mg / ml) および CFA の等容量を混合した。混合物を無菌のガラス注射器に移した、この注射器はルアーブリッジ (luer bridge) を通して第 2 のガラス注射器に連結されている。混合物を、1つの注射器から別の注射器に移して、混合物がよく乳化するまで攪拌した。安定なエマルジョンが確認された (エマルジョンの液滴が拡散することなく水上で浮いた場合) 。

注射

GA RS エマルジョンをインシュリン・シリンジに移した。

次に、100 μ l のエマルジョン (250 μ g GA / マウス) を各末処置マウス (各足蹠に約 25 μ l) の 4 つの足蹠に注射した。免疫したマウスをインビトロ試験のために使用した (免疫後 9 ~ 11 日) 。

LN 細胞の初代培養の調製

次の手順にしたがって、LN 細胞の初代培養を免疫後 9 ~ 11 日に調製した。

LN 細胞の除去のための外科的な処置

層状フードにおいて作業を開始する 20 分前に UV ランプを点灯し、作業開始時に消灯した。前記フード下で何らかの試薬を配置する前に、作業台表面を 70 % エタノール溶液で清潔にした。富化 (Enriched) した DCCM1 培地を調製した。富化した DCCM1 および RPMI 培地を使用前に 37 で予め温めた。マウスを頸部脱臼により屠殺した。各マウスの背部を配置し、サポートプラットフォームに固定した。腹部に 70 % アルコールを噴霧し、中央切開を施した (2 cm 長の切開で通常十分であった) 。皮膚を後肢に向かって分離させ (intersected) 、LN を後肢および前肢から取った (LN was located from the hind and fore legs) 。LN を約 5 ml の無菌 RPMI 培地を含有している無菌のペトリ皿に移し、LN 細胞を無菌の注射器プランジャーで細かくした (teased out) 。無菌注射器を使用して細胞懸濁液をペトリ皿から採取した (組織破片が採取されることを無菌針を用いることにより回避した) 。細胞懸濁液を 50 ml 無菌チューブに移した。

細胞計数：5匹の免疫したマウスに由来する LN 細胞を計数するための処置例細胞チューブを 40 ml までの RPMI 培地で満たした。LN 細胞を 200 $\times$ g で 10 分間、室温 (15 ~ 25) で遠心分離した。ペレットを 40 ml の RPMI で再懸濁した。50 μ l の 2 つのアリクウォットを、それぞれ、マイクロテストウェル中で 150 μ l の 0.1 % トリパンブルーで 4 倍に希釈した細胞懸濁液からとった。アリクウォットを上下に穏やかにピペティングすることでよく混合した。血球計算器をカバーガラスでカバーした。50 ~ 200 μ l のピペットマンを使用して両方のアリクウォットを血球計算器の上部および下部チャンバーにロードした (各チャンバーに 1 懸濁液) 。混合物を約 2 分間チャンバー内に定着 (settle) させた。チャンバーに泡が入らないように注意した。混合物 (細胞懸濁液 + トリパンブルー) をチャンバーの表面全体に行き渡らせた。泡がチャンバーに存在した場合、またはオーバーロードした場合、血球計算器は完全に洗浄され、拭いて乾燥され、チャンバーは再ロードされた。

生細胞を上部および下部チャンバーの中心部の四角 (各々 16 小四角の 25 大四角から構成される) において計数した。生細胞はトリパンブルーを吸収しないので、透明な外観で特徴づけられた。

しかし、死細胞は、トリパンブルーを浸透させ、青色を呈した。中央の四角の境界に出現している細胞は、細胞の一部が実際に中央の四角内にある場合のみ計数された。細胞が境界にあり、中央の四角内にない場合、細胞は計数されなかった。細胞密度は、下記の式を用いて計算された：

平均数 生細胞 (両方のチャンバー) $\times 4 \times 10^4$ = 細胞 / ml

細胞を 200 $\times$ g で 10 分間、室温で遠心分離した。細胞を富化した DCCM1 で 1 $\times$ 1

10

20

30

40

50

0.7 細胞 / ml の密度に再懸濁した。

インビトロ・バイオアッセイ

インビトロ・バイオアッセイを 24 ウェル、平底組織培養試験プレートで 1 ml の終容量 (final volume) で実施した。

GA RS キャリブレーション曲線の調製

1 mg / ml の GA RS ストックの 1 アリクウォットを解凍した。GA RS ストック溶液を富化した DCCM1 培地で $100 \mu\text{g} / \text{ml}$ (10 倍) に希釈し、 $0.2 \mu\text{m}$ セルロースアセテートフィルターを通して濾過した。GA RS 溶液の 6 つの段階希釈 (富化した DCCM1 培地による) を $2 \sim 50 \mu\text{g} / \text{ml}$ の間で調製した (表 2 の例により記載されるとおり)。

【表 2】

表 2: GA RS 希釈の調製のための例

GA RS 濃度 ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	GA RS ストック溶液の容量(μl) ($100 \mu\text{g} / \text{ml}$)	富化された DCCM1 の容量(μl)
50	1000	1000
30	600	1400
20	500	1600
10	200	1800
5	100	1900
2	40	1960

【0011】

GA DS 希釈の調製

試験するバッチから約 $10 \sim 20 \text{ mg}$ の GA DS を正確に秤量し、 $1.2 \text{ mg} / \text{ml}$ にまで ddH₂O で溶解した。OD マイナス溶液のブランク (The OD minus blank of the solution) を 275 nm で測定した。サンプルの OD を凡そ 1.03 に ddH₂O で調整して、 $1 \text{ mg} / \text{ml}$ の GA のストック溶液を得た。 $100 \mu\text{g} / \text{ml}$ のストック溶液を富化した DCCM1 培地で調製し、 $0.2 \mu\text{m}$ セルロースアセテートフィルターを通して濾過した。ストック溶液を 10 および $20 \mu\text{g} / \text{ml}$ に希釈した (RS バッチに関して、表 2 に記載の通り)。

アッセイ反応

以下を 24 ウェル平底組織培養プレートに添加した (下記のプレートテンプレートの例を参照されたい) :

GA RS

0.5 ml の LN 細胞 (最終密度、例えば、 5×10^6 細胞 / ウェル)。

0.5 ml の各 GA RS 希釈、したがってウェルの GA RS の最終濃度は 25 、 15 、 10 、 5 、 2.5 および $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ であった。

GA DS サンプル

0.5 ml の LN 細胞 (最終密度、例えば、 5×10^6 細胞 / ウェル)。

0.5 ml の各サンプル希釈、したがってウェルにおける試験サンプルの最終濃度は 5 および $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ であった。

各試験は、以下のコントロールを含んでいた :

1) ネガティブコントロール — コントロールペプチドとインキュベートした LN 細胞 :

0.5 ml の LN 細胞 (最終密度、 5×10^6 細胞 / ウェル)

0.5 ml の MBP ペプチド溶液 ($20 \mu\text{g} / \text{ml}$)、富化した DCCM1 中、(終濃度

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

2) ポジティブコントロール — Con A (非特異的なT細胞刺激因子)で刺激したLN細胞:

0.5 mlのLN細胞(最終密度、 5×10^6 細胞/ウェル)

0.5 mlのCon A ($5 \mu\text{g}/\text{ml}$)、富化したDCCM1中、(終濃度 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$)

【表2-1】

プレートテンプレートのための例

GA RS * 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	GA RS * 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	GA RS * 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	GA RS * 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	GA RS * 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$	GA RS * 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$
サンプル1 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	サンプル1 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$				
サンプル2 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	サンプル2 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$				
サンプル3 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	サンプル3 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$			ネガティブ コントロール	ポジティブ コントロール

10

GA RS * — グラチラマーアセテート 参照スタンダード

細胞の密度は、GAに対するそれらの応答に応じて変化した。培養物を37℃で加湿した5%CO₂インキュベーター中で18~21hrs維持した。プレートを200xgで10分間、室温で遠心分離した。上清をクリオチューブ(cryotubes)に採取した。上清を作業アリクウォット(working aliquots)に分けてサンプルの繰り返しの凍結/解凍を避けた。上清を1週間まで-20℃で保存した。フードを70%エタノール溶液で清潔にし、キムワイプで乾燥させた。手袋をはずし、手を消毒薬ですぐに洗浄した。

20

IL-2検出のためのELISA

全サンプルをトリプリケート(triplicate)で試験した。各プレート・ラン(plate run)は、以下を含んでいた:

1) IL-2検量線(standard curve) — 少なくともIL-2の6つの非ゼロ濃度を含む。

30

【0012】

2) ブランク

+1次抗体、IL-2スタンダードなし、+2次抗体(ゼロポイント)。

3) サンプル

GA RSの培養液、試験サンプルおよびコントロールを富化したDCCM1で以下のとおり希釈した:

a) 1および2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のGA RSサンプルの及びネガティブコントロールサンプルの2倍希釈;

b) 5~25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のGA RSサンプルの及び試験サンプルの5~10倍希釈; 並びに

40

c) ポジティブコントロールサンプル(Con A)の15~20倍希釈。

IL-2レベルを測定するためのELISAプロトコルを、製造者の推奨にしたがって実施した。任意のサンプルの光学濃度がプレートリーダーの上/下限に達した場合、サンプルをそれぞれ高/低希釈で再解析した。

計算および受諾判定基準(acceptance criteria)

ELISA測定平均値吸光度は、スタンダード、サンプルおよびコントロールの吸光度からブランクサンプル(ゼロIL-2スタンダードポイント)を減じたものであり、トリプリケートの各セットに関して、平均(吸光度-ブランク)、標準偏差(SD; standard deviation)、および相対標準偏差(RSD; relative s

50

t a n d a r d d e v i a t i o n) が計算された。

サンプル・リプリケート

全体的な結果に影響し得る任意の潜在的な問題を解明するため、疑わしいアウトライアー (o u t l i e r) が存在した場合は常に、そのアウトライアーが統計学に基づいていることを満たす必要があった。トリプリケート測定値間の R S D が 10 % を超え及び平均 O D ブランクが > 0.300 の場合、アウトライアー棄却 (r e j e c t i o n) をディクソン Q - 試験を用いて適用した。信頼性のある受諾判定基準がリプリケート (r e p l i c a t e s) に基づく試験において満たされない場合、ディクソン Q - 試験を存在しえる (p o s s i b l e) アウトライアーを棄却するために使用した。アウトライアー試験は、同じ標準液 (s t a n d a r d s o l u t i o n) のリプリケート測定 (r e p l i c a t e m e a s u r e m e n t s) のみに適用可能であった。10 回未満の観察に対し、ただ 1 つのアウトライアーを決定および除外することができた。この操作は、3 および 7 の間のリプリケート測定の任意の数からアウトライアーを棄却 (95 % の信頼水準で) することにおいて、ディクソン Q - 試験の使用を拡大した。

10

操作

疑われるアウトライアーを X_1 と呼称した。全ての他の測定を疑わしいアウトライアーを参照してラベルした、例えば、 X_2 は疑わしいアウトライアーの次の (n e x t t o) 値であり、 X_3 は疑わしいアウトライアーの第 2 の値であり、 X_k は疑わしいアウトライアーから最も離れた値であり、及び X_{k-1} は最も離れた値から第 2 の値、等々、であった。

20

【 0 0 1 3 】

3 ~ 7 リプリケート (r e p l i c a t e s) に対して、次の式が使用された： $X_2 - X_1 / X_k - X_1$ 。

【 0 0 1 4 】

適切な k 値を表 3 を用いて計算された分数 (f r a c t i o n) から決定した。

【表 3】

表3:K値

観察数 (k)	P ₉₅ の値
3	0.94
4	0.76
5	0.642
6	0.560
7	0.507

30

【 0 0 1 5 】

アウトライアーがディクソン Q - 試験により同定されないが、3 回のリプリケートのうち 2 回の間の % 差異 (% d i f f e r e n c e) が 10 % を超えない場合、最も近接する 2 つのリプリケートを % 強度を計算するために使用した。或いは、E L I S A 試験をこのサンプルに関して繰り返した。

40

$OD < 0.300$ (ブランク、ネガティブコントロールおよび低いスタンダードポイント) を有するサンプルからのアウトライアー棄却を適用した。アウトライアーが確認された (l o c a t e d) 場合、アウトライアーが棄却された場合、報告される。二重の (D u p l i c a t e ; デュプリケート) 測定値を % 強度の計算に関して使用した。

ブランク・サンプル

ブランク・サンプルの各々の吸光度は、I L - 2 スタンダードの最大濃度の平均吸光度の 10 % であった。ブランク・リプリケートの 1 つが上記の限界 (l i m i t s) を超え

50

た場合、それは棄却され、二重 (d u p l i c a t e) のサンプルが使用された。

IL - 2 検量線

IL - 2 検量線を、製造者の推奨にしたがってグラフにした。曲線に 6 つの非ゼロ濃度 IL - 2 スタンドの最小値が残っていた場合、低い感受性 (p o o r s e n s i t i v i t y) またはサンプル処理エラー (s a m p l e p r o c e s s i n g e r r o r) を提示する IL - 2 スタンドを棄却することは可能であった。逆算 (b a c k - c a l c u l a t e d) したスタンダード濃度は、20 % (低いキャリブレーションポイントに関して) および $\pm 15 \%$ (全ての他の濃度に関して) を超える相対誤差 (r e l a t i v e e r r o r ; R E) を有していた。IL - 2 キャリブレーション曲線を、少なくとも 6 つの非ゼロ濃度ポイント (少なくとも 17 キャリブレーションポイント) から構築した、これは予想される濃度の範囲をカバーしている。高または低濃度が失敗した場合、検量線範囲を切り捨てる (t r u n c a t e d) ことが可能であった。直線回帰曲線の R^2 は、0.97 であった。

10

アッセイ・コントロール

IL - 2 の濃度を、全てのサンプルにおいて、IL - 2 スタンドの直線回帰プロットから、直線回帰曲線の式を利用して計算した。IL - 2 の終濃度は、全てのサンプルにおいて、サンプルの希釈係数を乗じることによって計算された。

ネガティブコントロール (M B P ペプチド)

ネガティブコントロールサンプルの 3 リプリケートのうち少なくとも 2 つにおいて、IL - 2 の終濃度は、GA RS 曲線の最低のキャリブレーションポイントに対して測定された IL - 2 のレベル以下であった。

20

ポジティブコントロール (C o n A)

ポジティブコントロールサンプルの 3 リプリケートのうち少なくとも 2 つにおいて、IL - 2 の終濃度は、GA RS 曲線の最大のキャリブレーションポイントにおける IL - 2 のレベルと同様のレベルまたは超えるレベルであった。

GA DS バッチの相対強度の計算

GA RS 曲線

GA RS 曲線を $\log - \log$ スケールでプロットした (y 軸に $\log$ IL - 2 濃度 および x - 軸に $\log$ GA RS 濃度)。キャリブレーション曲線を少なくとも 5 つの非ゼロ濃度 (少なくとも 14 キャリブレーションポイント) から構築した。

30

キャリブレーションポイントを IL - 2 スタンドポイントに関して記載のとおり棄却した。最良適合回帰曲線 (b e s t - f i t r e g r e s s i o n c u r v e) をスタンダードポイントで計算した。 R^2 は 0.97 であった。傾き (β) は、0.77 であった。

並行性分析 (P a r a l l e l i s m a n a l y s i s)

各試験サンプルの用量反応曲線を $\log - \log$ スケールでプロットした (y 軸に $\log$ IL - 2 濃度 および x - 軸に $\log$ GA DS 濃度)。最良適合回帰曲線 (b e s t - f i t r e g r e s s i o n c u r v e) をサンプルポイントで計算した。傾き (β^*) は、次の範囲内であった：

$$\beta \times 0.635 \quad \beta^* \times 1.365.$$

40

β^* が限界外 (o u t o f l i m i t) であった場合、インビトロ試験を二重 (2 つの別々のサンプル調製) に繰り返した。1 つの再試験における β^* が失敗 (f a i l e d) した場合、そのバッチは棄却された。両方の再試験における β^* が限界内であった場合、% 強度および 95 % 信頼限界が決定された。

% 強度および信頼限界の推定 (E s t i m a t i o n)

信頼限界 (「 真の % 強度 (t r u e % p o t e n c y) 」 を含む 95 % の確率を有する) を決定するために使用される偶然誤差 (r a n d o m e r r o r) の推定を ANOVA を用いることにより取得した。この統計学的なテクニックは、観察された反応間のトータル変動を、別々の成分 (c o m p o n e n t s) に分ける、即ち：

【表 3 - 1】

1. 直線的な用量反応による	}	モデル
2. 標本モデル(preparation Model)の平均効果による		
3. 並行性からの偏差による	}	ランダム エラー
4. 直線性からの偏差による		
5. リプリケート変動間の残差(residual)による		

10

成分 3 および 4 は、それぞれ直線性 (l i n e a r i t y) および並行性 (p a r a l l e l i s m) からの非有意偏差 (n o n - s i g n i f i c a n t d e v i a t i o n s) による偶然誤差項 (t h e r a n d o m e r r o r t e r m) に含まれた。総平方和 (t o t a l s u m o f s q u a r e s) は、3 成分 (S S - 回帰、S S - 標本および S S - 誤差)、適切な自由度および有意差に関する F - 検定に分けられた (p a r t i t i o n e d) 。

試験バッチの % 強度を計算し、推定された強度に対する 9 5 % 信頼限界を以下に記載のと
おりに計算した：

20

相対強度および 9 5 % 信頼限界の計算のためのコンピュータアルゴリズム。

工程 1：特定データ (G A . バッチおよび G A . R S .) の $\log_{10}$ スケールへの変換を計算する：

$Y_{ki} = \log_{10} (\text{応答 } k1) ; i = 1, \dots, n_k$

$X_{ki} = \log_{10} (\text{用量 } k1) ; i = 1, \dots, n_k$

式中の $k = 1, 2$ は、それぞれ G A . バッチおよび G A . R S の標本インデックス (a p p r e p a r a t i o n i n d e x) であり； n_1 および n_2 は、それぞれ G A . バッチおよび G A . R S に関して実施された測定の総数である。

従って、 $N = n_1 + n_2$ は観察の全体総数 (a n o v e r a l l t o t a l n u m b e r) である。

30

工程 2：次の式によって、全ての測定されたデータポイントに基づく直線回帰に対する共通の傾き (c o m m o n s l o p e) を計算する：

【数 1】

$$\beta = \frac{\sum_{j=1}^N (y_j - \bar{Y}) \cdot (x_j - \bar{X})}{\sum_{j=1}^N (x_j - \bar{X})^2};$$

40

【0016】

式中、 Y は $\log_{10}$ (反応) の全体の平均値であり；

X は $\log_{10}$ (用量) の全体の平均値である。

工程 3： $\log_{10}$ (用量) における回帰による平方和を計算する、即ち：

【数 2】

$$SS_{REG} = \beta^2 \cdot \sum_{j=1}^N (x_j^1 - \bar{X})^2;$$

50

【 0 0 1 7 】

工程 4 : 平方和の偶然誤差を計算する、即ち :

【 数 3 】

$$SS_{ERR} = \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} [Y_{ki} - \bar{Y}_k - \beta \cdot (X_{ki} - \bar{X}_k)]^2;$$

【 0 0 1 8 】

式中、 Y_k 、 X_n は、それぞれ標本 k の平均の $\log_{10}$ (反応) および $\log_{10}$ (用量) 値である。 10

【 0 0 1 9 】

工程 5 : 平均平方誤差項 (Mean Square Error term) を次のとおり計算する :

DF_{ERR} (random error degrees of freedom ; 偶然誤差自由度) = $N - 3$;

$MS_{ERR} = SS_{ERR} / DF_{ERR}$ 。

工程 6 : t - 統計 (t - statistic) の適切な値を発見するために t - 分布の統計テーブルを使用する :

$t = t(0.975, DF_{ERR})$ 。

20

【 0 0 2 0 】

工程 7 : 相対強度の点推定 (point estimate) を次のとおり計算する :

【 数 4 】

$$\% \text{強度} = 10^{\frac{\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2}{\beta} - (\bar{X}_1 - \bar{X}_2)} \cdot 100\%;$$

【 0 0 2 1 】

工程 8 : 次の式によって、 C で表示される表式 (expression) を計算する :

30

【 数 5 】

$$C = \frac{SS_{REG}}{SS_{REG} - MS_{ERR} \cdot t^2};$$

【 0 0 2 2 】

工程 9 : 95 % 信頼限界の低および上限の対数を計算する :

【数 6】

 Log_{10} (下限)

$$= C \cdot \frac{\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2}{\beta} - (\bar{X}_1 - \bar{X}_2) - \frac{\sqrt{MS_{ERR} \cdot C \cdot t}}{\beta} \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} + \frac{(\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2)^2}{SS_{REG} - MS_{ERR} \cdot t^2}}$$

 Log_{10} (上限)

$$= C \cdot \frac{\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2}{\beta} - (\bar{X}_1 - \bar{X}_2) + \frac{\sqrt{MS_{ERR} \cdot C \cdot t}}{\beta} \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} + \frac{(\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2)^2}{SS_{REG} - MS_{ERR} \cdot t^2}}$$

10

【0023】

工程10：前の工程において計算した値を、最初のスケール(original scale)に、生じたlog-限界(log-limits)の真数(anti-logarithms)を取り、そして100%を乗じることにより、変換する。

GA DSバッチの推定強度(The estimated potency)は、規定された強度(the stated potency)の80%以上、125%以下であった。推定強度の誤差の信頼限界(P=0.95)は、規定された強度の70%未満、143%以下であった。バッチが上記限界の外側(outside)であった場合、インビトロ試験は二重に繰り返された。両方の再試験の結果が規格(specifications)内であった場合、バッチは承認(acceptable)された。1つの再試験(re-test)が失敗した場合、バッチは棄却された。

20

ドキュメンテーション

LN細胞カウントおよびELISAプレートテンプレートを記録した。最初の(original)ELISAリーダーの記録および結果フォーム(the result form)をファイルした。

30

【実施例2】 実施例1の標準手順の開発

実験2A：GA RS特異的T細胞から分泌されるサイトカインのプロフィール

9~11日前にCFA中の250μg GA RSで免疫した雌(SJL x BALB/C)F1マウス由来のLN細胞を、様々な濃度のGA RSの存在下で培養した。細胞をGA RSと共に5%CO₂ 加湿恒温器により37℃で18~24時間インキュベートした。次に、培養物を遠心分離し、上清を集め、ELISAによってサイトカインをアッセイした。

ELISAはサイトカインに特異的なビオチン化抗体を用いて行ない、そしてストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)抱合体を検出に用いた。各々のプレートランには、ブランクコントロール(サイトカインスタンダードを含まない1次および2次抗体)を含めた。また、各々のプレートランには、品質管理(QC)のサンプル(アッセイの直線範囲中のサイトカインスタンダードの3濃度)を含めた。各インビトロ試験には、ポジティブコントロール(Con A、非特異的T細胞刺激因子)とネガティブコントロール(GAおよび他のいかなる抗原もない)を含めた。全てのサイトカインは、18~24時間のインキュベーション後に測定された。TGF-β、IL-10およびIL-4のレベルを72時間のインキュベーション後に再び試験した。結果を表4に示す。

40

【表 4】

表4:サイトカインプロファイル

サイトカイン	分泌レベル
IL-2	++
INF- γ	++
IL-6	+
L-10	+
L-13	-
TGF- β	-
IL-4	-
TNF- α	-

10

【0024】

20

表4では、各サイトカインに関して測定した最大値は、任意の単位 (arbitrary units) で提示される：(-) < 検出限界；(+) ~ 400 pg/ml まで；および (++) > 400 pg/ml。表4は培養でのGA-RSに対する反応を示している。LN細胞は、IL-2、INF- γ 、IL-10およびIL-6を分泌したが、一方TNF- α 、IL-4、IL-13およびTGF- β は培養液中で検出されなかった。これらの結果は、GA-RS特異的T細胞によって造り出されるサイトカインが、Th₀タイプのものであることを示している。

注目されるべきはTh₀プロファイルが異なった免疫プロトコール（すなわち、IFAでの又は低投与量のGAでの免疫）でも見られたことである。

【0025】

30

IL-2がT細胞活性化のための良いマーカーであり、GA-RSに反応したIL-2分泌がきわめて再現可能であり、直線的用量反応相関があったので、IL-2はT細胞活性化を測定する最適なサイトカインであるように思えた。

実験2B：免疫操作の最適化

いくつかの実験が、最適の免疫プロトコールを確立するために行われた。最初の実験は、GA-RS（免疫する抗原）用量のLNおよび脾臓におけるT細胞反応への効果を試験した。2群のそれぞれ10匹のマウスを、CFAに250 μ g GA（グループ1）（EAEブロックテストのように）またはCFAに10 μ g GA（グループ2）で免疫した。初代培養は、免疫されたマウスのLNおよび脾臓の両方から調製された。

培養物を様々な用量のGA-RSと共に一晩インキュベートし、その後培養液を実験2Aのように集めてIL-2に関してアッセイした。図4の結果は、両方の免疫プロトコールにおいて、LN細胞から分泌されるIL-2のレベルが、脾臓細胞から分泌されるそれらと比べて、高いことを明確に示している。これらの結果に基づいて、アッセイにはLN細胞の初代培養を使用することが決定された。加えて、マウスに注射されるGA-RSの用量は培養でのT細胞応答に影響しなかった。LNおよび脾臓細胞の両方は、GA-RSの免疫用量にかかわらず同様のIL-2を分泌した。これは、免疫手順が確固としており (robust)、GA-RS免疫用量の大きな変動でさえ免疫結果に影響しないことを示している。

40

免疫プロトコールのさらなる最適化のために、第一のグループはCFA中の250 μ gのGA-RSを注射され、第二のグループはICFA中の10 mgのGAが注射された。2

50

番目のグループにおける G A R S の用量がより高かったため、より弱いアジュバントである I C F A が用いられた。10 日後に、両グループからの L N 細胞の G A R S に対する反応が、インビトロで試験された。図 5 は、C F A 中の 250 μ g G A R S での免疫が、より少ない用量の抗原が使用されたにもかかわらず、培地中でより強力な反応を誘発したことを示している。

これらの所見、および C F A 中の 250 μ g / マウスの G A が E A E をブロックするのに大変効果的である（このマウス系統において、少なくとも 80 % の E A E のブロック）ことに基くと、C F A 中の 250 μ g / マウスの G A が最適用量であるように思われる。

特異的 T 細胞は C F A で単回免疫された後、通常は約 10 日以内に産生された。図 6 は培地中での L N 細胞の G A R S への反応を示している（免疫後 9、10 および 11 日に調製された）。I L - 2 分泌の用量反応がすべての日数で同様であったので、免疫期間は 9 ~ 11 日間継続し得る。

実験 2 C : インビトロ試験条件の最適化

いくつかの実験をインビトロ反応での最適プロトコルを確立するために実施した。これらの研究は、培養条件の最適化、インキュベーション時間、試験サンプル中の I L - 2 の安定性および G A R S の - 20 °C での安定性を含んでいた。

【 0 0 2 6 】

i) 培養液

マウスリンパ球系細胞の培養は、1 % 正常マウス血清を添加した R P M I 中で通常は維持される。正常マウス血清は、E L I S A キットで使用されている抗マウス I L - 2 モノクローナル抗体によって検出可能な内因性 I L - 2 を含む可能性がある。加えて、異なるロットの正常血清の使用は、インビトロ試験の日変動 (i n t e r - d a y v a r i a t i o n s) を増加させる可能性がある。内因性マウス I L - 2 の相互汚染を避けるために、および、この方法の日変動を減少させるために、G A 特異的 T 細胞の応答は 4 つの異なる培養液において試験された：即ち、1) R P M I + 1 % 正常マウス血清 (N M S) ; 2) R P M I + 1 % の胎児ウシ血清 (F B S) (ウシ I L - 2 は E L I S A キットで使用されている抗マウス I L - 2 によって認識されない) ; 3) バイオターゲット (B i o t a r g e t) (独占的にイスラエルの B e i t H a e m e k 社で製造されている無血清培地) ; 4) D C C M 1 (様々な製造者によって生産された無血清培地) である。

図 7 は異なる培地で L N 細胞の G A R S に対する反応を比較した代表的な実験の結果を示している。無血清培地が使用されたときに最も良い反応が観測された。用量反応範囲は無血清の時、左方に変位した。G A がアルブミンおよび他の血清タンパク質に結合するのを示した先の研究によってこのことは説明できる。

この結合は、A P C s と相互作用する培養基中での G A の有効性を減らす可能性があり、その結果、より高濃度の G A が T 細胞を刺激するのに必要となる。これらの結果に基づけば、最も適した培地は、D C C M - 1 培地であるように思える。

i i) I L - 2 分泌の速度論

I L - 2 は、クローン的な T 細胞増殖と B 細胞およびマクロファージの機能特性とに必須の自己分泌およびパラ分泌成長因子である。G A R S による培養への刺激後に、I L - 2 は活性化された G A 特異的 T 細胞によって分泌され、次に、L N 細胞によって消費される。I L - 2 分泌の速度論研究は、G A 刺激後の上清を回収するための最適 (ピーク) 時間を決定するために実施された。L N 細胞は、37 °C の加湿 C O ₂ 恒温器の中で、様々な濃度の G A R S とともに培養およびインキュベートされた。図 8 に示される間隔をとって、アリコットが採取され、そして細胞は遠心分離で除去された。上清は、20 °C で保たれ、実験の最後に E L I S A によって I L - 2 がアッセイされた。

図 8 は、培養液中での I L - 2 レベルのピークが、18 ~ 21 時間の間であることを示している。24 ~ 48 時間に採取されたサンプルの I L - 2 レベルの減少は、L N 細胞による I L - 2 の消費によって説明することができる。したがって、上清採取のための最適な時間は、インキュベーションの 18 ~ 21 時間後であるように思われる。

10

20

30

40

50

i i i) サイトカインの測定

この方法は、G A R S サンプルおよび試験サンプル中の I L - 2 が正確に測定できるかに依存している。この実験の間、I L - 2 のレベルはマウス I L - 2 測定のために特化した E L I S A キットである O p t E I A (ファージン、C a t . # 2 6 1 4 K I) によって測定された。

i v) I L - 2 の試験サンプル中 - 2 0 での安定性

実施された実験のほとんどでは、E L I S A によって分析される前に、培養液は採取され - 2 0 に保たれた。

培養液中の I L - 2 の安定性をみる予備検討では、サイトカインは - 2 0 で 1 週間安定なことが示されている (図 9)。

したがって、インビトロ試験サンプルの培地は、I L - 2 を測定するのに先だつ 1 週間までは - 2 0 で維持できる。また、この実験結果は、E L I S A の結果がきわめて再現可能であることを示した - 1 週間離れた別々の日に行われた 2 つの E L I S A プレートのサンプル中の I L - 2 レベルの測定結果は、事実上同一であった。

v) G A R S 溶液の - 2 0 での安定性

G A R S 溶液の - 2 0 での安定性をテストするために、調製後直ちに、および - 2 0 で 5 カ月保存後に、G A R S 溶液の用量反応性を試験した。

【 0 0 2 7 】

図 1 0 は、実際に、- 2 0 で 5 カ月の保存した前後で、G A R S 溶液の用量反応曲線には事実上違いがないことを示している。したがって、少なくとも使用の 5 カ月前から、G A R S 溶液のアリコットを調製して - 2 0 で保持しておくことができる。

実験 2 D : G A R S 検量線の直線範囲の決定

計算された G A R S キャリブレーション曲線に基づいて統計的なバリデーションが行われ、分析のために認められた 2 1 のプレートの各自が別々に評価された。これらの 2 1 のサンプルは、およそ 4 カ月の期間をかけて異なる時に集められた。割り当てられたプレートの G A 濃度範囲は、0 . 2 5 ~ 5 0 μ g / m l の間で変動していた。G A R S キャリブレーション曲線から得られた、以下のバリデーションの特性は、分析における主な関心事を構成していた。

- 1 . より広い直線範囲の限界を確保するための最適な変換 ;
- 2 . 直線範囲限界 (l i n e a r r a n g e l i m i t s) の決定 ;
- 3 . キャリブレーション曲線を承認するための総合的な評価基準 ;
- 4 . アッセイの正確度 (a c c u r a c y) および精度 (p r e c i s i o n) の推定 ;
- 5 . 二重信頼性 (d u p l i c a t e r e l i a b i l i t y) の評価 (以下のパラグラフを参照されたい) 。

実験の性質 (n a t u r e) は、各キャリブレーションポイントで典型的には 3 リプリケート (トリプリケート) を行うというものであった。しかしながら、いくつかの例では、トリプリケート測定を用意できなかった場合、二重 (d u p l i c a t e) の信頼性の評価が必須となった。

G A 用量反応相関の直線性

以下に提示されたバリデーションの検討において、多くの面での基礎は直線回帰モデルであった。それは I L - 2 濃度 (p g / m l) を G A 濃度 (μ g / m l) と関連づけた。この相関 (r e l a t i o n s h i p) の直線性の仮定 (a s s u m p t i o n) は、直線回帰モデルを適切に当てはめるのに必要であった。データは L i n e a r - L i n e a r スケールでプロットされた。この同じ相関は、L o g - L o g スケール、同様に L o g - L i n e a r スケール、および L o g - S q u a r e R o o t スケールに変換された。L o g - L o g 変換が最も適切な直線の特徴を示した。したがって、回帰モデルから選択された形式は L o g - L o g スケールであった :

$$\text{Log}_{10} (\text{I L - 2 conc}) = a + \beta * \text{Log}_{10} (\text{G A conc}) + \text{誤差}$$

反応変数 (r e s p o n s e v a r i a b l e) は、各キャリブレーションポイントで

測定された3リプリケートのLog変換平均(a log-transformed mean)であった。このモデルを各キャリブレーションサンプルに適合(fitted)させ、そして適切な統計値(R^2 、切片、および傾き)を各々の適合させた曲線から計算した。

R^2 の値は、残差変動(RSS; residual sum of squares)の、総平方和(TSS)に対する比率を次の式を介して反映したものであった：

$$R^2 = 1 - \text{RSS} / \text{TSS}$$

直線範囲決定

直線範囲を以下の評価基準に基づいて決定した：

1. プロットされた $\text{Log}_{10}(\text{IL-2 conc})$ vs. $\text{Log}_{10}(\text{GA conc})$ の目視による検査； 10
2. クックの当該技術において知られる距離統計(distance statistic)のような回帰影響診断(regression influence diagnostics)；
3. いくつかの潜在的な直線範囲を定義するキャリブレーション曲線について計算された精度および正確度の値の変異を評価することにより、相関の直線性の目視による評価が提供された。選択された直線範囲 $1 \sim 25 \mu\text{g/ml}$ の内側での相関が非直線性であるという証拠はなかった。

実験2E：GA RS標準曲線に関する評価基準の決定

GA RSキャリブレーション曲線から導かれ、直線範囲の中で選択された限界($1 \sim 25 \mu\text{g/ml}$)内に適合していた、バリデーションパラメータは以下であると決定された：

1. この研究における各プレートの、 $\text{Log}_{10}(\text{IL-2 conc})$ から $\text{Log}_{10}(\text{GA conc})$ への直線回帰適合の R^2 ；
2. これらの直線適合(straight line fits)のための傾き(slopes)および切片(intercepts)；
3. 各々のプレートに関して各々のキャリブレーションポイントで計算された正確度；および
4. すべてのプレートのために各々のキャリブレーションポイントで計算された精度。 30

正確度および精度を計算するために、それぞれのキャリブレーション曲線を使用してIL-2濃度の値を与えるGA濃度をキャリブレーション(逆算)した：

$$X_{i-\text{back}} = 10^{(\log_{10}(\text{IL-2 Conc})_i - \alpha) / \beta}$$

$i = 1, 2, 3$ - トリプリケートインデックス。

使用された(不)正確度の基準的尺度(basic measure)は、トリプリケートサンプルにおいて、濃度の推定の平均値と真の濃度との間の、パーセント相違(percent difference)であった：

$$\text{不正確度}(\text{inaccuracy}) = ([\text{平均値}(X_{i-\text{back}}) - \text{GA conc.}] / \text{GA conc.}) * 100\%.$$

使用された精度の基準的尺度は、濃度のトリプリケート推定値の相対標準偏差(RSDまたはCV)であった： 40

$$\text{精度} = \text{CV}((X_{i-\text{back}})) = [\text{Std. Dev.}(X_{i-\text{back}}) / \text{平均値}(X_{i-\text{back}})] * 100\%$$

分析のゴールは、方法の正確度および精度が適切であったことを保証する、適合させたキャリブレーション曲線のための受諾判定基準を提案することであった。受諾判定基準は、GA RSキャリブレーション曲線の R^2 および傾きに基づいていた。小さい不正確度値($< 13\%$)および良好な(good)精度($1.1\% \sim 6.7\%$)によってプレートの約80%を特徴付けることができた。

これらの16の「行儀のよい(well behaved)」標準曲線に関して、以下の結果が得られた：

1. 高い R^2 値 (> 0.98) ;
2. 用量反応相関を反映している、比較的高い傾きの値 (16枚のうち15枚のプレートにおいて > 0.78)。

キャリブレーション曲線の大部分が比較的高い R^2 (平均 = 0.99) および比較的急な傾き (平均 = 0.87) によって特徴づけられていたので、〔除外されたプレートが比較的低い R^2 (平均 = 0.94) 及びかなり平坦な傾き (平均 = 0.72) の両方を持っていたのとは対照的に〕、キャリブレーション曲線のための総合的な受諾判定基準は R^2 および傾きに関して考慮された。承認パラメータを定義する簡単な規則は、傾きと R^2 とで別々のカット - オフポイントの計算に基づいており、拒絶された曲線のための最大値 ($\max_R^2 = 0.95$ $\max_傾き = 0.77$) と承認された曲線のための最小値 ($\min_R^2 = 0.98$ $\min_傾き = 0.77$) との間の中途 ($mid - way$) にそれらの位置を定めた。したがって、受諾判定基準は以下の通り導かれた：

1. R^2 0.97 ;
2. 傾き 0.77。

【0028】

これらの評価基準は、GA濃度の範囲1 ~ 25 $\mu g / ml$ の中でキャリブレーション曲線に適合させるために、少なくとも5つの異なった (トリプリケート) 濃度に適用された。さらに、切片の値の範囲は1.42 ~ 1.78の間にあり、平均 = 1.58であった。この範囲は、16の適格な ($eligible$) 及び5つの除外されたプレートに関して類似していた。

正確度および精度を、各曲線のために、およびプレート上の各濃度のために計算した。また、これらの個別値 (各曲線と濃度のための) も下記の要素に対して平均された：

1. それぞれの曲線に関する異なった濃度；
2. それぞれの濃度に関する異なった曲線；および
3. 全ての曲線および濃度。

これに関連した結論は次のようなことであった、直線範囲1 ~ 25 $\mu g / ml$ で少なくとも5つの異なるキャリブレーションポイントに基づいたGA RSキャリブレーション曲線に対して、キャリブレーション曲線が R^2 0.97および傾き 0.77であるように制限された場合、結果として生じた平均の正確度および精度は以下のように推定された：

1. この方法に関する平均正確度値 ($\pm SD$) は、8.0% $\pm$ 2.3%であった
2. この方法に関する平均精度値 ($\pm SD$) は2.9% $\pm$ 1.7%であった。

二重測定に基づくGA RSキャリブレーション曲線の信頼性評価 ($Reliability Assessment$)

アッセイの正確度および精度の記述統計の比較を、それぞれのキャリブレーションポイントで二重測定を用いて適合したGA RSキャリブレーション曲線の信頼性を評価するために実施した。加えて、個々の正確度および精度の値 (各々の曲線および濃度に関する) を、二重測定のすべての3つの可能な選択に関して (特定のトリプリケートに由来する) 、研究した。前のセクションに記載された受諾判定基準を満たす及び規定された直線範囲1 ~ 25 $\mu g / ml$ の限界内で適合された、それらの曲線に集中する ($concentrating$) 場合、トリプリケート測定がいくつかの理由で用意することができないとき、二重測定によって首尾よくその代用にできることは明白であった。

【表 5】

表5:正確度および精度 記述統計学サマリー

	トリプリケート		デュプリケート (1,2)		デュプリケート (1,3)		デュプリケート (2,3)	
	正確度	精度	正確度	精度	正確度	精度	正確度	精度
Mean	8.00	2.93	8.13	2.53	7.98	2.88	8.40	2.40
S.D.	2.31	1.72	2.80	1.66	2.45	2.13	2.79	1.53
Min	5.23	1.10	4.93	0.95	5.21	0.93	4.97	0.81
Max	12.79	6.67	12.51	6.33	12.44	9.24	13.41	5.99

10

【0029】

トリプリケートに基づく方法の平均 (±SD) 正確度および精度は、それぞれ 8.0% ± 2.3% および 2.9% ± 1.7% であった (表 5)。

20

二重測定に基づく方法の平均 (±SD) 正確度および精度は：

1. 正確度：8.1% ± 2.8%； 精度：2.5% ± 1.7%；
2. 正確度：8.0% ± 2.5%； 精度：2.9% ± 2.1%；および
3. 正確度：8.4% ± 2.8%； 精度：2.4% ± 1.5%。

実験 2 F：統計的な相関の決定

この方法の平均 (不) 正確度 (the mean (in) accuracy) は、8.0% (SD = 2.3%) であることが分かった。目的は 2 つの log (用量) - log (反応) 直線の新しい GA バッチ VS. GA RS の傾き比較のための信頼できるテストを開発することであった。前記テストは、上記の方法の (不) 正確度を考慮に入れたものであった。この方法の平均 (不) 正確度のための概算 95% 個体許容領域 (the approximate 95% individual tolerance region) の最大限界は、閾値として利用された：平均値 + 2 * SD = 12.6%。したがって、前記範囲 ± 12.6% 内の変化は非有意 (non-significant) であると考えられた。

30

β* (バッチ線の傾き)、β (標準線の傾き) 及び許容された最大の (不) 正確度の値の間にある相関の完全な数学的な説明は後に続く。一般性を失うことなく、β* > β のケースのみ、詳細が証明される (既存の対称による、β* < β が明白であるケースに関する証明の拡大)。特定の log (反応) のための逆算された用量値は、以下のものであった：

40

$X_{i-back} = 10^{(Y - \alpha) / \beta}$ 、式中の $Y = \log_{10} (IL - 2 \text{ 濃度})$ 。

(不) 正確度の計算のための式は、以下のものであった：

(不) 正確度 = $[(10^{(Y - \alpha) / \beta} - X_{true}) / X_{true}] * 100\%$ 。

Y_{low} と Y_{high} は、± 12.6% の最大許容 (不) 正確度によって容認される最低および最大の log (反応) 値であった。

したがって、傾きの同等性 (equality) の仮説が承認される領域は、以下の通りであった。

【数 7】

$$\left\{ \begin{array}{l} [(10^{(Y_{low} - \alpha)/\beta} - X_1)/X_1] * 100\% \geq -12.6\% \\ [(10^{(Y_{high} - \alpha)/\beta} - X_2)/X_2] * 100\% \leq -12.6\% \end{array} \right.$$

$$\left\{ \begin{array}{l} 10^{(Y_{low} - \alpha)/\beta}/X_1 \geq 0.874 \\ 10^{(Y_{high} - \alpha)/\beta}/X_2 \leq 1.126 \end{array} \right.$$

10

従って、傾きの同等性の境界は、以下のとおりであった：

$$\left\{ \begin{array}{l} Y_{low} = \alpha + \beta \cdot \log(X_1 \cdot 0.874) \\ Y_{high} = \alpha + \beta \cdot \log(X_2 \cdot 1.126) \end{array} \right.$$

【0030】

20

直線 (straight line) の傾きは、以下の通りである：

$$\beta^* = (Y_{high} - Y_{low}) / (\log X_2 - \log X_1) = [\beta \cdot \log([X_2 / X_1] \cdot [1.126 / 0.874])] / \log(X_2 / X_1)$$

$$\beta = [\beta \cdot \log(1.288)] / \log(X_2 / X_1) = \beta \cdot (1 + \log(1.288) / \log(X_2 / X_1))$$

特定のケースとして $X_2 / X_1 = 2$ (5 および 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の用量レベルに関して) であると仮定して、 β^* は以下の通り計算された：

$$\beta^* = \beta \cdot (1 + \log(1.288) / \log 2) = \beta \cdot 1.365$$

この結果と $\beta^* < \beta$ の対称のケースが得られたものとを組み合わせ、限界が以下のとおり計算された：

30

【数 8】

$$\left\{ \begin{array}{l} \beta^* \leq \beta \cdot 1.365 \\ \beta^* \geq \beta \cdot 0.635 \end{array} \right.$$

【0031】

特定のデータにおいて、全ての傾き値は、適合している臨界限界 (the matching critical limits) 内であり、並行性仮定 (the parallelism assumption) からの偏差が観測されなかったことを意味している。

40

バッチがいったん統計的に有効 (valid) であると承認されると (直線性および並行性の存在が立証された)、試験標本のスタンダードと比較した強度比 (potency ratio) が推定された。

これは、データに対して直線の平行線を適合させること及びそれらの間の水平距離を決定する平行線アッセイによって行われた：

【数 9】

$$M = \log \rho = \frac{\bar{Y}_T - \bar{Y}_S}{B} - (\bar{X}_T - \bar{X}_S) ;$$

【0032】

式中 ρ は強度を表し、 Y_S 、 Y_T 、 X_S 、 X_T はそれぞれスタンダードおよび試験標本の平均の $\log$ (反応) および $\log$ (用量) であった。B は、スタンダードおよび試験の $\log$ (用量) - $\log$ (反応) 線に関する共通の傾きであった。共通の傾き - B の最小 2 乗推定値は、別々に標準線 (standard line) および試験線 (test line) からの 2 つの傾きの最小 2 乗推定値の加重平均であった。上記の式の真数を取ることで、そのスタンダードと比較した、試験標本の「真の % 強度」の点推定値を得ることができた：

10

【数 10】

$$\text{強度} = \frac{\bar{Y}_T - \bar{Y}_S}{10 \cdot B} - (\bar{X}_T - \bar{X}_S) \cdot 100\%$$

【0033】

[実施例 3] 実施例 1 の標準手順のバリデーション

20

以下に提示された分析の目標は、GA バッチの相対強度のためのバリデートされた放出の規格 (release specifications) を確立することであった。統計的推測 (statistical inference) に基づく以下の評価基準が満たされた場合、GA バッチは有効であると考えられた：

1. バイオアッセイ分析アプローチにかかわる仮定に違反 (violations) はない：

(a) $\log$ (反応) の独立性 (Independence) および正常性 (normality) ；

(b) $\log$ (反応) の分散の均等性 (Homogeneity) ；

(c) アウトライアーなし ；

30

(d) 並行性 (スロープ比率テストの非有意) ；

2. 相対強度の点推定値は、事前に指定された範囲：80% ~ 125% 内であった；および

3. 「真の相対強度 (true relative potency)」値に関する 95% 信頼限界は、より広い既定の信頼範囲 (confidence range)：70% ~ 143% 内であった。

モデルは、スタンダードおよび試験標本が、あたかも一方が他方の単純な希釈 (dilution) であるかのように振舞うべきであることを仮定した。

このことは、2 つの標本の $\log$ (用量) - 反応線 (the $\log$ (dose) - response lines) が、直線性および並行性から有意に逸脱すべきでないことを意味している。したがって、これらの直線間の一定の水平移動の真数は、強度比の推定として利用することができた。これらの 2 つの要件 (直線性および並行性) が、アッセイの有効性の概念を構成した。

40

有効性のチェックは、相対強度及びその信頼限界の推定に対する必須条件であった。

偶然誤差の推定が、相対強度の真値の信頼限界の計算に必要であった。この測定は、「分散分析」(ANOVA) として知られている統計的手法の実施によって得られた。したがって、ANOVA の古典的な統計的な仮定は、満たされなければならない。平行 - 線バイオアッセイモデルの統計的分析のための必要条件 (requirements) は以下の通りであった：

1. 反応は、それらの期待値について独立に正規に分布した；

50

2. 反応の分散は、平均反応値によって影響されなかった；
3. アウトライアーが存在しなかった；
4. $\log$ （用量）と反応との間の相関は、用量の範囲上の直線で表すことができた；
および

5. 試験標本の直線は、スタンダードのそれと平行であった。

バッチ分析データは、異なった日に異なったオペレータによって実施された異なった実験から得られた。実施例1の標準手順のバリデーション試験は一連の実験により実行され、各々は以下を伴っていた：

- 1) $250 \mu\text{g}$ の G A R S (C F A 中) によるマウスの免疫；
- 2) 免疫に続く 9 ~ 11 日の L N 細胞からの初代培養の調製；
- 3) 様々な濃度の G A R S と及び試験サンプルとともに行われる L N 細胞のインキュベーション；
- 4) 培養液の収集と E L I S A による I L - 2 レベルの分析；
- 5) $1 \sim 25 \mu\text{g} / \text{ml}$ の 6 つの用量レベルで得られた、トリプリケートの I L - 2 測定値に基づいて G A R S 曲線をプロットすること；
- 6) 直線範囲（5 および $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ ）内の 2 つの濃度での R S バッチ（トリプリケート）への反応に対する各試験サンプルの T 細胞応答の比較。また、トリプリケート間の変異性に関連している任意の問題を検出するため、各トリプリケートの % C V を計算した（通常、トリプリケート間の % C V は 10 ~ 15 % を超えるべきではない）。与えられたデータに関しては、条件の違反は検出されなかった。

分析手法の性能に関する総合的な知識を提供するのに使用されたバリデーションの特性は：直線性、範囲、正確度、精度、特異性および頑健性（*robustness*）であった。バリデーション評価基準および分析は、I C H コンセンサスガイドライン、「分析手法の妥当性：方法論」、1996 年 11 月（C P M P / I C H / 281 / 95）に基づいた。

「ヨーロッパ薬局方（*European Pharmacopoeia*）」ガイドラインで推薦される統計的方法が、分析目的に関して与えられたデータに適合された。

実験 3 A：直線性および範囲

各インビトロ試験において、G A R S バッチの用量 - 反応曲線を使用して、細胞の試験したサンプルに対する相対反応（*relative response*）を計算した。各キャリブレーション曲線は、少なくとも 5 ポイント（ゼロのない）を含んでいた。開発およびバリデーション段階の間に行われた、異なったインビトロ試験からの 21 キャリブレーション曲線が、各プレートについてプロットされ、評価された。

データの統計的分析は、 $\log_{10}$ （I L - 2 濃度）対 $\log_{10}$ （G A R S 濃度）のプロットが最も良く直線的に適合したことを明らかにした。直線範囲は、目視検査と、キャリブレーションポイントの正確度および精度の評価とによって主に現れた（*emerged*）。トリプリケート間の変異性に関連している任意の問題を検出するため、各トリプリケートの % R S D を計算した（通常、トリプリケート間の % R S D は 10 ~ 15 % を超えるべきではない）。G A R S 曲線の範囲は、 $1 \sim 25 \mu\text{g} / \text{ml}$ の間で特定された。

これらの分析に基づいて、G A R S 曲線は、少なくとも 6 つのキャリブレーションポイント、1 つは濃度ゼロ（ネガティブコントロール）から、および $1 \sim 25 \mu\text{g} / \text{ml}$ の間の範囲における少なくとも 5 つの濃度の G A R S から、構成されるべきである。 $\log_{10}$ （I L - 2 濃度）に対する $\log_{10}$ （G A R S 濃度）の直線回帰は、 $R^2 = 0.97$ および傾き 0.77 を有するべきである。

実験 3 B：正確度

この方法の正確度は、G A R S 曲線の指定された直線範囲と交差（*across*）して達成された。データの統計的分析は、この方法の平均値正確度が $8.0\% \pm 2.3\%$ であることを明らかにした。

実験 3 C：精度

使用された精度の基準的尺度 (basic measure) は、濃度のリプリケート (通常はトリプリケート) 推定値の相対標準偏差 (RSD) であった。

RSD は GA DS 曲線の直線範囲と交差して達成された。

データの統計的分析は、この方法の平均値精度が $2.9\% \pm 1.7\%$ であることを明らかにした。二重測定の信頼性は、トリプリケートのものと同等であった。それゆえ、3つのリプリケートの1つがアウトライアーとして特定されたとき、該アウトライアーが無視 (omitted) され、二重測定の結果が承認された。

実験 3 D : 方法の反復性 (repeatability)

GA DS バッチへの GA 特異的な T 細胞応答は、同じインビトロ試験で、3 回繰り返して測定された。同じバッチの 3 つの重量を、それぞれ 5 および $10 \mu\text{g/ml}$ に希釈して、GA 特異的 T 細胞とインキュベートした。試験サンプルの及び GA DS サンプルの培養液の中の IL - 2 のレベルは、ELISA でトリプリケートに測定された。各リプリケートに対する細胞の % 強度および 95 % 信頼限界は、GA DS と比較して計算された。表 6 は、各リプリケートに関して計算された % 反応を示す。

【表 6】

表6:方法再現性

サンプル #	GA DS 濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	%強度			AVG N=6	SD	RSD	95%信頼限界 (下限-上限)
1	5	75	80	74	77	3.3	4.2	67-89
	10	73	79	81				
2	5	83	83	92	84	5.0	5.9	73-97
	10	80	79	88				
3	5	72	74	71	76	5.2	5.2	65-88.
	10	80	78	79				

【0034】

実験 3 E : 中等度精度 (Intermediate precision)

GA DS バッチの % 反応は、3 つの異なったインビトロ試験で、異なった日に、同じ実験室の 3 人の異なった研究者によって試験された。表 7 に、このバッチのために 3 回の繰り返し実験で決定した % 強度と 95 % 信頼限界とを要約する。

【表 7】

表7:中等度精度

試験 #	GA DS 濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	%強度			AVG N=6	SD	RSD	95%信頼限界 (下限－上限)
1	5	85	86	83	83	3.1	3.7	71-97
	10	77	84	84				
2	5	90	86	87	86	3.0	3.7	79-94
	10	82	84	89				
3	5	75	80	74	77	3.3	4.2	65-88
	10	73	79	81				

10

【 0 0 3 5 】

20

実験 3 F : 方法の再現性 (r e p r o d u c i b i l i t y)

この方法の再現性は、研究室間での研究の平均によって評価された。%反応 GA DS バッチは、2つの異なった実験室で、異なった分析者、機器、および試薬を用いて実施される2つの異なった実験でテストされた。表 8 に両方の実験室の結果を要約する。

【表 8】

表8:方法再現性

	Lab 1	Lab 2
平均%強度 $\pm$ RSD	86 $\pm$ 3.5	83 $\pm$ 5.0
95%信頼限界	79-94	78-90

30

【 0 0 3 6 】

上記の実験に基づいて、インビトロ試験が再現可能であると結論づけることができる。

実験 3 G : 特異性

この方法の識別 (d i s c r i m i n a t i o n) は3つのレベルでテストされた：

1) GA RS の有 / 無でインキュベーションされたサンプルの間の識別 (マトリックス効果) ；

40

2) GA RS と、GA DS を含む他の関連する及び非関連のタンパク質およびペプチドとの間の識別；並びに

3) GA RS と、ペプチド配列が意識的に修飾された GA 関連のコポリマーとの間の識別。

i) GA RS 特異的 T 細胞 (マトリックス効果) による GA RS の認識

GA 特異的 T 細胞は、CFA 中の 250 g の GA RS による雌 (S J L $\times$ B A L B / C) F 1 マウスの免疫によって引き起こされた。この用量の GA は、このマウス系統で E A E ブロッキングテストを用いて、GA バッチの生物活性をテストするのに通常使用されている。この実験におけるコントロール群は、CFA 単独を注射された。

50

免疫10日後、LN細胞を両群のマウスから除去した。細胞をGA-RSと共に5%CO₂加湿恒温器により37℃で18~24時間インキュベートした。

次に、培養物を遠心分離し、上清を採取し、そして、検出のためにIL-2に特異的なビオチン化抗体とストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)のコンジュゲートとを用いるELISAで、インターロイキン-2(IL-2、活性化T細胞から分泌されたサイトカイン)をアッセイした(図1)。各々のプレートラン(plate run)には、ブランクコントロール(サイトカインスタンダードを含まない1次および2次抗体)を含めた。また、各々のプレートランには、品質管理(QC)のサンプル(アッセイの直線範囲中のサイトカインスタンダードの3濃度)を含めた。各インビトロ試験には、ポジティブコントロール(Con-A、非特異的T細胞刺激因子)およびネガティブコントロール(GAおよび他のいかなる抗原もない)を含めた。図2は、コントロール・マウスのLN細胞は培養中GA-RSに反応しないが、GA-RSで免疫されたマウスのLN細胞は培養中GA-RSに反応して用量依存的にIL-2を分泌することを示す。通常、ネガティブコントロールサンプルのIL-2のレベルは、ELISAの検出限界(およそ3pg/ml)未満か又はそれに近似する。これらのIL-2レベルは、常にGA-RS(1μg/ml)の最小キャリブレーションポイントによって分泌されるレベル未満である。これらの結果は、GA特異的T細胞によるIL-2の分泌がGA依存的であることを示す、

i i) 関連および非関連の抗原間の識別

関連および非関連の抗原(タンパク質および単一のペプチド)間の識別は、GA-RS特異的T細胞の様々な抗原に対する応答をインビトロで試験することによって示された。LN細胞の初代培養は、9~11日前にCFA中の250μgのGA-RSで免疫された雌(SJLxBALB/C)F1マウスに由来した。初代培養は、5%CO₂の加湿インキュベータで37℃でGA-RSと及び他の様々な抗原とともに一晩インキュベートされた。次に、培養物を遠心分離して、上清を採取し、実験3G(i)のようにELISAでIL-2をアッセイした。

表9は、この実験システムでは、GA特異的T細胞が、ヒトMBP(ミエリン塩基性タンパク質)、MBP免疫優性ペプチドpp.87-99(脳炎誘発性のペプチド)、またはその類似物pp.87-99_{Ala96}(EAE抑制ペプチド)の何れとも反応しなかったことを示す。

また、リゾチーム(非関連の塩基性タンパク質)は、GA特異的T細胞によって認識されなかった。TV-35およびTV-109は、それぞれ分子量3757および11727の分子量を有するペプチドであった(PCR国際公開番号WO 00/18794)。これらのペプチドは、GAと同じモル比で、GAと同じ4つのアミノ酸(Ala、Glu、Lys、Tyr)から構成される特定配列を有していた。GA-RS特異的なLN細胞は、TV-35とは反応せず、またTV-109とは非常に低い交叉反応性を有していた。GA-RSでの免疫が、GAに存在する複数のT細胞エピトープに対して異なった特異性を有する、T細胞の混合物の形成を誘導したという観察によって、これらの結果を説明することができる。TV-35およびTV-109はGAと共通の配列を共有し得る、しかし、GA特異的T細胞を単独のペプチドでインキュベーションすることは、おそらく培養中のGA特異的細胞の少ない割合に僅かな部分的な刺激を引き起こしたであろう。したがって、全体的なT細胞応答(IL-2の分泌)は、検出限界未満か又はそれに近似するものであった。

10

20

30

40

【表 9】

表9:GA RS 特異的 LN 細胞の特異性

抗原	%強度 ¹
GA RS	100
リゾチーム	0
ヒト MBP	0
MBP pp.87-99	0
MBP pp.87-99 _{Ala 96}	0
TV-35	0
TV-109	17

$$^1\% \text{強度} = \frac{\text{抗原X100の培養液におけるIL-2濃度}}{\text{GA RSの培養液におけるIL-2濃度}}$$

【0037】

インビトロ試験は、GA バッチの平均分子量 (MW) に感受性があった。図 11 は、GA RS 特異的な細胞の GA RS (MW = 7900) への及び平均 MW の異なる GA DS バッチへの応答を示す。見られるように、一般に応答は、平均 MW に関連する；平均 MW が高いほど、反応は大きくなる。しかしながら、平均 MW の GA DS の放出の規格は 4700 ~ 10000 の間であること、また同様なレベルの IL-2 が規格内の平均 MW を有する DS バッチに応答して分泌されたことに注目すべきである (図 11)。これらの結果は、この方法が GA に非常に特異的であり、GA の平均 MW の変化に感受性があったことを示している。

【0038】

iii) GA 製剤原料 (DS; drug substance) および Copaxone (登録商標) 医薬品製剤 (DP; drug product) の GA RS 特異的 T 細胞による認識

250 µg の GA RS (CFA 中) による雌 (SJL x BALB / C) F1 マウスの免疫後に続く 9 ~ 11 日間で、LN 細胞は取りだされ、様々な用量の GA RS バッチ (免疫抗原) と及び DS バッチと培養された

IL-2 を実験 3G (i) のように測定した。図 12 A は、LN 細胞が両方のスタンダードバッチと交叉反応したことを示す。両方のバッチによる IL-2 分泌 (上記の ELISA によって測定された) の用量反応曲線は、類似しており、テストされたバッチが同様な T 細胞エピトープを共有したことを示している。GA RS および Copaxone (登録商標) バッチの間の比較は、GA RS 特異的 T 細胞も DP バッチと交叉反応したこと、またマンニトール (Copaxone (登録商標) の製剤における賦形剤) が T 細胞応答に影響または干渉しなかったことを示す (図 12 B)。したがって、この方法はバッチとバッチの再現性の指標を提供する。

v) GA と関連するコポリマーとの間の識別

実験 3G (ii) では、それらの平均 MW の異なる GA DS バッチを用いて、インビトロ試験が GA ペプチドの平均 MW に感受性であることが示された。実験は GA 特異的 T 細胞による GA の生物学的認識に基づいており、特異的に直線配列 (linear sequences) に応答したので、この方法が GA ペプチド配列の変動 (variations) / 修飾 (modifications) に感受性があるだろうことが予想された。こ

れは以下を使用することによって、示された：

- 1) G Aを含む4つのアミノ酸のうちの3つのみから合成されたコポリマー；
- 2) 製造条件で意図的な修飾から生じたG Aバッチ (X X)、すなわち過剰量の遊離アミノ酸のG Aモノマーへの合成中の添加。このバッチの平均MWは、高く規格外であった (MW = 1 1 1 5 0 D a) ；
- 3) トリプシンとキモトリプシンによるタンパク質分解によって得られるG A R Sの分解生成物。

表10は、G A特異的T細胞が、リジン、アラニンまたはチロシンを欠いている3アミノ酸コポリマーに応答しなかったことを示す。

さらに、細胞のバッチX Xへの%応答が、比較的高く、方法の規格 (1 0 0 ± 3 0 %) を超えていた、このことは方法が生産プロセスでの修飾に感受性があるかもしれないことを示している。また、示されたように、テストのG AペプチドのMWに対する感度によって、高い%反応について説明することができる。

【表10】

表10:方法特異性

コポリマー	修飾	平均%強度 ± RSD
Tyr-Lys-Glu	アラニンの欠損	0
Tyr-Ala-Glu	リジンの欠損	0
Ala-Glu-Lys	チロシンの欠損	0
バッチXX	重合ステージにおける過剰な遊離アミノ酸	170 ± 4.7

【0039】

トリプシンとキモトリプシンによるG A R Sタンパク質分解の速度論研究は、インビトロ試験がG Aペプチドの分解に感受性であったことを示す。図13と15は、細胞によるIL - 2の分泌がタンパク質分解時間に応じて減少し、タンパク質分解されたペプチドへの細胞の%強度が、この方法の規格を超えていた (1 0 0 ± 3 0 %) ことを示す (表11)。分解サンプル (図14と16) のオーバレイクロマトグラム (R P - H P L C) は、それぞれトリプシンとキモトリプシンのタンパク質分解の動態を示した。すべての特異性研究の累積結果は、この方法がG Aに対して非常に特異的であり、G Aと密接に関連する抗原とを識別したことを明らかにした。

【表 1 1】

表11:方法特異性ータンパク質分解の効果

酵素	タンパク質分解の時間 (分)	平均%強度
トリプシン	1	40
	5	36
	15	19
	30	7
	一晩	0
キモトリプシン	5	11
	20	0

10

【 0 0 4 0 】

20

実験 3 G : 頑健性 (R o b u s t n e s s)

i) 受諾判定基準の頑健性

定義された受入基準の一貫性および頑健性は、繰り返された G A バッチから得られる相対強度の推定を比較することによって、調べられた。バッチ分析データは、多くの繰り返された G A バッチを含んでいた。2つのバッチは、異なった3日間に異なったオペレータによって測定された。また、1つのバッチが異なった2日間に、異なったオペレータによってテストされた

繰り返された G A バッチの並行性試験において、すべての G A バッチの傾きの値は、並行性スロープ比率試験のための適切な臨境界内であった。すべての G A バッチが 9 5 % の信頼限界に従った相対強度値の点推定値のための受入基準を満たした (推定された % 強度は 8 0 % ~ 1 2 5 % の限界内であり、また 9 5 % 信頼限界は 7 0 % ~ 1 4 3 % の範囲内であった) 。繰り返された G A バッチの分析データに関して、それらの有効性 (v a l i d i t y) は実験日やテストを行ったオペレータによらなかった。このデータは、確立した規格の頑健性を支持する。

30

i i) 免疫手順およびインビトロ反応のクリティカルパラメータの頑健性

免疫手順およびインビトロ反応の両方のクリティカルパラメータの頑健性が、評価された。簡単に、以下のことが示された :

- 1) L N 細胞の免疫応答は G A R S の免疫量によって影響されなかった ;
- 2) 免疫期間は 9 ~ 1 1 日間であった ;
- 3) G A R S への L N 細胞の反応は、脾臓細胞反応と比べて、より高かった ;
- 4) G A R S + C F A による免疫は、I C F A による免疫と比較して強い応答を有する L N 細胞を生じた ;
- 5) 培養液における血清の存在は、強く G A 特異的 T 細胞応答に影響し、その結果、インビトロ反応は無血清培地で実施された ;
- 6) 培養液を集めるための最適時間フレーム (o p t i m a l t i m e f r a m e) は、G A R S と試験サンプルとのインキュベーションに続く 1 8 ~ 2 1 時間であった ;

40

および
7) 培地を、E L I S A でテストする 1 週間前までは - 2 0 で保つことができる。

かくして、この方法が頑健であることが示された。

相対強度の点推定値および 9 5 % の信頼限界に関するサマリー統計

50

平均相対強度に関する 95% 許容限界 (T o l e r a n c e L i m i t s)

新しいバッチの推定された相対強度の受託限界 (a c c e p t a n c e l i m i t s)

を評価するため、個々の $\log$ (強度) の推定値の平均および標準偏差が計算された :

平均値 (M_i) = 0 . 0 0 7 4 ;

$S D (M_i) = 0 . 0 4 0 2 .$

分析データに基づく、平均相対強度値に関するおおよその 95% 許容範囲は以下の通りであった :

$[1 0 \text{ Mean } (M_i \pm 2 * S D (M_i))] * 1 0 0 \% = [8 4 \% , 1 2 2 \%] .$

相対強度の 95% 信頼限界の範囲

個々の相対強度の推定値に関する 95% 信頼限界の最小および最大値は以下の通りであった :

最小 (下限) = 7 9 . 3 %

最大 (上限) = 1 4 7 . 3 %

受諾判定基準の充足 (S a t i s f a c t i o n)

分析に基づいて、受諾判定基準を以下のように決定した :

1 . 1 . バイオアッセイ分析アプローチにかかわる仮定を満たす、すなわち :

a . $\log$ (反応) の独立性 (I n d e p e n d e n c e) および正常性 (n o r m a l i t y) ;

b . $\log$ (反応) の分散の均等性 (H o m o g e n e i t y) ;

c . アウトライアーなし ; および

d . 並行性 (スロープ比率テストの非有意) .

2 . 2 . 推定された相対強度は、標準強度の 80% 以上、125% 以下であった ; および

3 . 推定される相対強度の誤差の 95% 信頼限界は、標準強度の 70% 以上、143% 以下であった。

実施例 3 の考察

インビトロ試験のバリデーションは、この方法が再現可能であること並びに正確度および精度の平均は許容できる範囲にあることを明らかにした。この方法は、GA ペプチドに非常に特異的であって、作用物質の品質に感受性があった。

概要および考察

インビトロ法は GA DS および Copaxone (登録商標) バッチのために開発された。

この方法は GA RS 特異的 T 細胞による T 細胞エピートープ (直線配列) の生物学的認識に基づいていた。GA RS 特異的 T 細胞は、培地中の GA に反応して Th₀ サイトカインを分泌する。この方法では、T 細胞による GA バッチの認識は、ELISA で培養液の IL-2 のレベルを測定することによって、モニターされる。GA RS 特異的 T 細胞が DS および DP バッチの両方と交差反応することは、これらのバッチが RS バッチと類似配列を共有することを示しており、またマニトール (DP 製剤における賦形剤) が反応に干渉しないことが示された。

前記方法は、GA ペプチドに非常に特異的であり、ペプチド混合物の平均 MW に感受性がある。MBP は、GA 特異的 T 細胞によって認識されなかった。MBP 免疫優性ペプチド (脳炎誘発性と抑制型ペプチドの両方) 、同様に GA のものと類似するアミノ酸組成を有する単一ペプチドは、T 細胞を刺激しなかった。免疫手順における、同様にインビトロ反応におけるクリティカルパラメータは、この実験の間に最適化された。この実験は、前記方法が非常に再現性があり、頑健であることを示した。

前記方法は、薬学的組成物における使用に関して、他の T 細胞抗原を標準化するために適用することができる。GA RS の代わりに抗原 RS に特異的な T 細胞の初代培養は、抗原 RS に対して免疫された動物から作出することができる。この培養物の、抗原 RS に応答した及びサンプル抗原に応答したサイトカイン産生は測定可能である。抗原 RS に応答したサイトカイン産生を、抗原 RS 濃度に対してプロットして標準曲線を作成することが

10

20

30

40

50

できる。サンプル抗原に応答したサイトカイン産生を、その抗原が許容できる強度範囲内にあるかどうかを決定するために、標準曲線と比較することができる。

モニターするために最適なサイトカインは、実験 2 A のように決定することができる。免疫およびインビトロ試験のための条件は、実験 2 B および C のように最適化し得る。

【参考文献】

【0041】

参考文献

U.S. Patent No. 3,849,550, issued November 19, 1974 (Teitelbaum, et al.).

10

U.S. Patent No. 5,800,808, issued September 1, 1998 (Konfino, et al.).

PCT International Publication No. WO 00/05250, published February 3, 2000 (Aharoni et al.).

PCT International Publication No. WO 00/18794

Aharoni, R. et al., T suppressor hybridomas and interleukin-2-dependent lines induced by copolymer 1 or by spinal cord homogenate down-regulate experimental allergic encephalomyelitis, Eur. J. Immunol., (1993), 23: 17-25.

20

Bornstein, et al., New Eng. J. Med., 1987, 317(7), 408-414.

Johnson, K.P., Neurology, 1:65-70 (1995).

Lando et al., Effect of cyclophosphamide on suppressor cell activity in mice unresponsive to EAE, J. Immunol. (1979) 123(5): 2156-2160.

Lisak et al., In vitro and in-vivo immune responses to homologous myelin basic protein in EAE, Cell. Immunol. (1974) 11:212-220.

"Copaxone" in Physician's Desk Reference, 2000, Medical Economics Co., Inc., Montvale, NJ, 3115.

30

"Validation of Analytical Procedures: Methodology", Nov. 1996 (CPMP/ICH/281/95).

European Pharmacopoeia, 1997.

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】図1：GA R S（参照スタンダード）での免疫化LN細胞の初代培養ELISAによるIL-2検出

【図2】図2：GA - 特異的なT細胞の誘導。250 μgのGA R S + CFAまたはCFA単独で免疫したマウスに由来するLN細胞の初代培養を、GA R Sの増加濃度（increasing concentrations）の存在下で培養した。37 °Cでの一晩のインキュベーション後、培養液を採取し、ELISAによりIL-2に関してアッセイした。

40

【図3】図3：血球計算器の図

【図4】図4：免疫プロトコルの最適化 — 培養供給源およびGA 参照スタンダード（RS）用量効果。リンパ節（LN）および脾臓細胞の初代培養は、10または250 μgのGA R S + 完全フロイントアジュバント（CFA）で免疫したマウスから由来した。細胞をGA R Sの増加濃度の存在下で培養した。37 °Cでの一晩のインキュベーション後、培養液を採取し、酵素結合免疫ソルベント検定法（ELISA）によりIL-

50

2 に関してアッセイした。

【図5】図5：免疫プロトコルの最適化 — アジュバントおよび用量効果 250 µg の GA RS + CFA で又は 10 mg の GA RS + 不完全フロイントアジュバント (ICFA) で免疫したマウスに由来する LN 細胞の初代培養を、GA RS の増加濃度 (increasing concentrations) の存在下で培養した。37 °C での一晩のインキュベーション後、培養液を採取し、ELISA によりインターロイキン-2 (IL-2) に関してアッセイした。

【図6】図6：免疫期間の効果マウスを 250 µg の GA RS (CFA 中) で免疫し、LN を 9、10 および 11 日後に除去した。異なるグループからの LN 細胞の、様々な濃度の GA RS に対する反応を、インビトロにおいて IL-2 分泌を ELISA で測定することにより試験した。

10

【図7】図7：GA - 特異的な T 細胞応答における培養液の効果 LN 細胞の初代培養を、1% 正常マウス血清 (NMS)、1% ウシ胎児血清 (FBS) または規定された細胞培養液 (DCCM1; defined cell culture media) の何れかを含有している異なる培養液で培養した。細胞を GA RS の増加濃度で 21 時間、37 °C でインキュベートした。次に、培養液を採取し、ELISA により IL-2 に関してアッセイした。

【図8】図8：GA RS に応答した IL-2 分泌の速度論 (Kinetics)。LN 細胞の初代培養を 250 µg の GA RS + CFA で免疫したマウスから調製した。細胞を 0、0.5、2.5 および 5 µg/ml の GA RS で 37 °C で明示したインターバルでインキュベートした。各タイムポイントで、 5×10^6 細胞のアリクウォットを遠心し、上清を -20 °C に維持した。全てのサンプルを IL-2 に関して ELISA で同時にアッセイした。

20

【図9】図9：培養液中での IL-2 の安定性。LN 細胞の初代培養を 250 µg の GA RS + CFA で免疫したマウスから調製した。細胞を様々な濃度の GA RS と 37 °C でインキュベートした。一晩インキュベーションした後、上清を採取し、2つのアリクウォットに分けた。第一のアリクウォットを ELISA で即時にアッセイし、第二をアッセイする前に 7 日間、-20 °C で保持した。

【図10】図10：GA RS 溶液の -20 °C での安定性。1 mg/ml の GA RS 溶液を調製し、アリクウォットに分け、そして -20 °C で保持した。

30

【0043】

GA 特異的細胞の GA RS 溶液に対する用量反応をゼロ時間 (第1日) および 5 ヶ月後 (-20 °C で) に試験した。

【図11】図11：GA RS - 特異的 T 細胞応答における平均分子量 (MW) の効果。LN 細胞の初代培養を 250 µg の GA RS + CFA で免疫したマウスから調製した。細胞を、異なる分子量の GA RS の及び GA 製剤原料 (DS; Drug Substance) の2つの異なる濃度の存在下で培養した。37 °C での一晩のインキュベーション後、培養液を採取し、ELISA により IL-2 に関してアッセイした。

【図12A】図12 (A)：GA RS - 特異的 T 細胞の GA DS および製剤 (DP; Drug Product) バッチとの交差反応性。LN 細胞の初代培養を 250 µg の GA RS + CFA で免疫したマウスから調製した。GA RS - 特異的 T 細胞の、別の GA DS バッチ (図12A) に対する反応を、GA RS バッチに対する反応と比較した。培養液における IL-2 レベルを ELISA で測定した。

40

【図12B】図12 (B)：GA RS - 特異的 T 細胞の GA DS および製剤 (DP; Drug Product) バッチとの交差反応性。LN 細胞の初代培養を 250 µg の GA RS + CFA で免疫したマウスから調製した。GA RS - 特異的 T 細胞の、GA DP バッチに対する及びマンニトール (図12B) に対する反応を、GA RS バッチに対する反応と比較した。培養液における IL-2 レベルを ELISA で測定した。

【図13】図13：トリプシンによる GA RS タンパク質分解の速度論。GA RS をトリプシンにより明示したタイムポイントでタンパク質分解した。タンパク質分解された

50

サンプルの活性を、インビトロの強度試験で試験した。

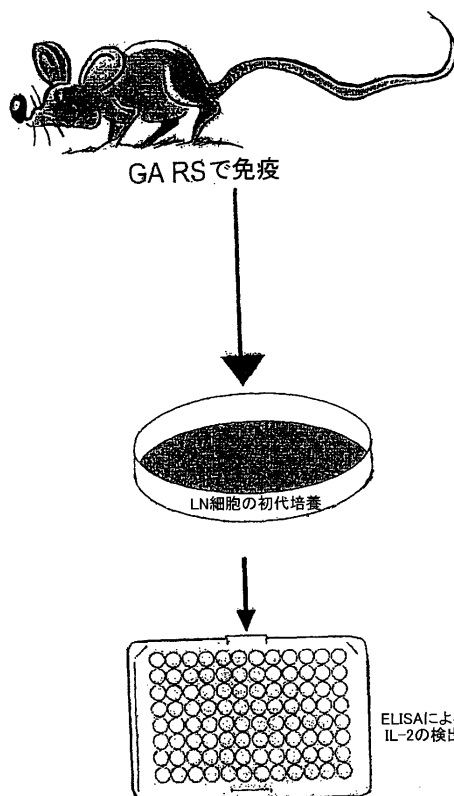
【図14】図14：GAの逆相高圧液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）（トリプシンによるタンパク質分解の前後）。GA-RSをトリプシンでタンパク質分解し、サンプルのクロマトグラフィープロファイルをRP-HPLCにより試験した。

【図15】図15：キモトリプシンによるGA-RSタンパク質分解の速度論。GA-RSをキモトリプシンにより明示したタイムポイントでタンパク質分解した。タンパク質分解されたサンプルの活性を、インビトロの強度試験で試験した。

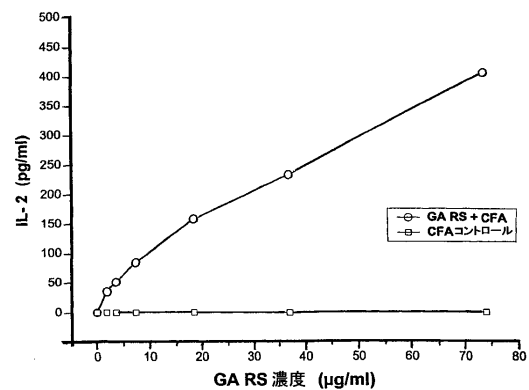
【図16】図16：GAのRP-HPLC（キモトリプシンによるタンパク質分解の前後）。GA-RSをキモトリプシンでタンパク質分解し、サンプルのクロマトグラフィープロファイルをRP-HPLCで試験した。

10

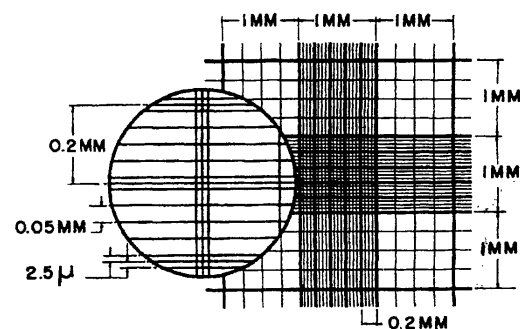
【図1】



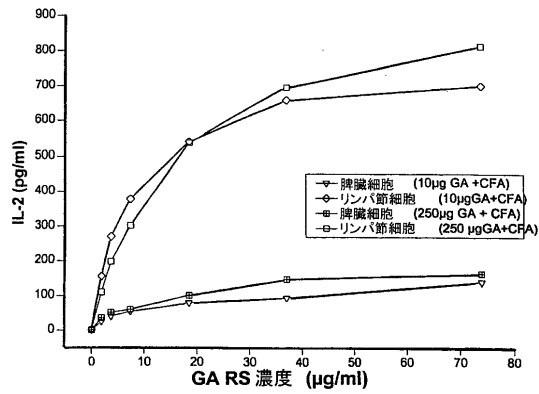
【図2】



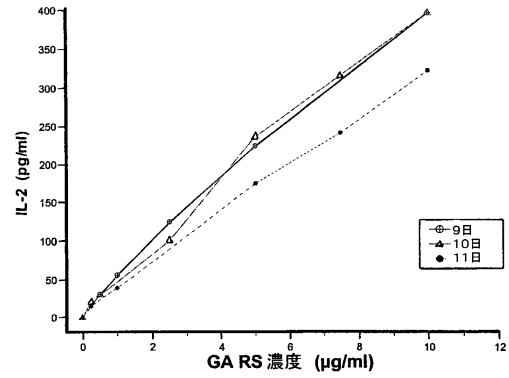
【図3】



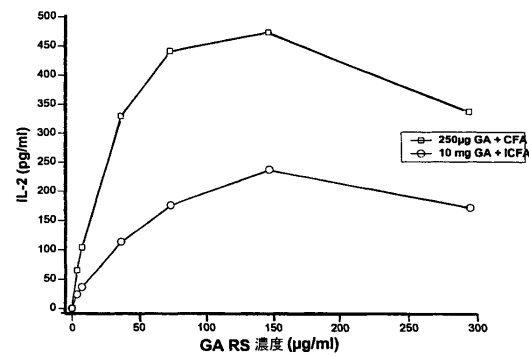
【図 4】



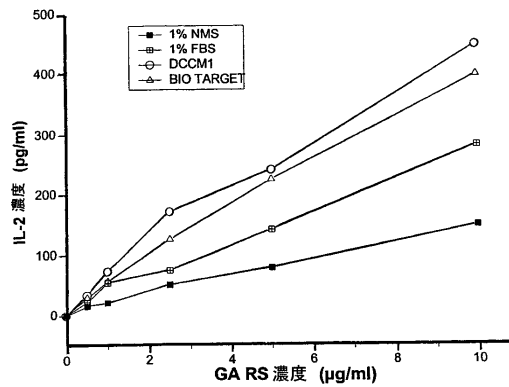
【図 6】



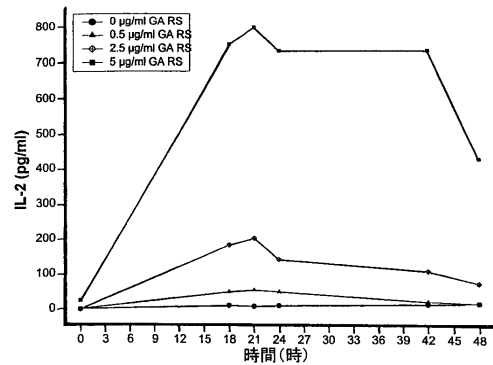
【図 5】



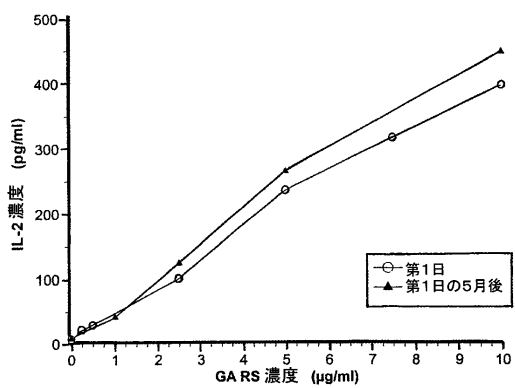
【図 7】



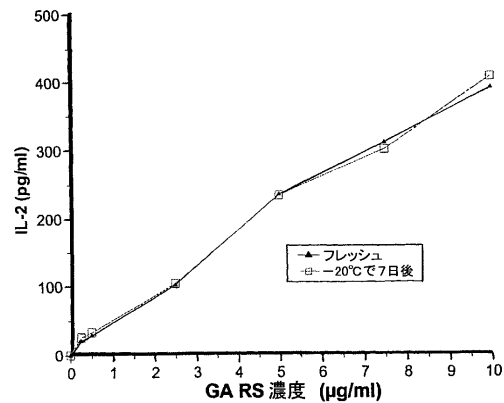
【図 8】



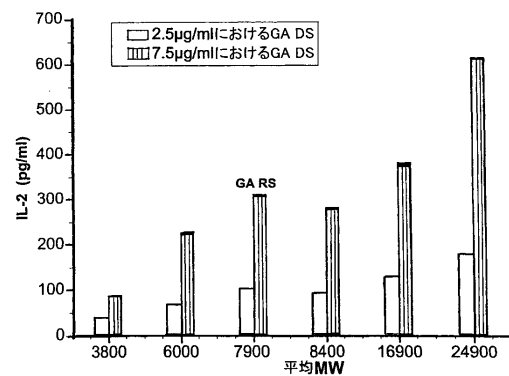
【図 10】



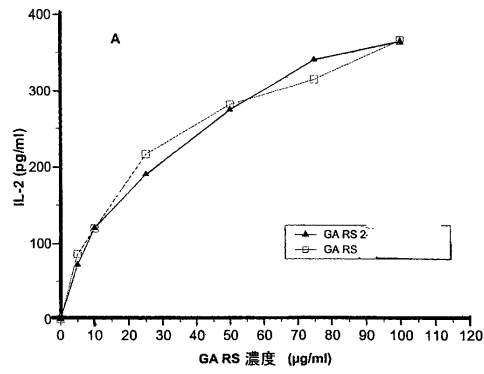
【図 9】



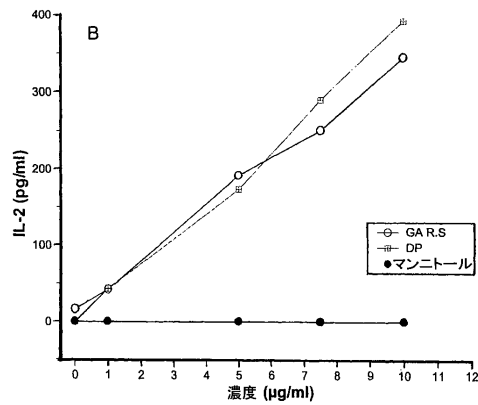
【図 11】



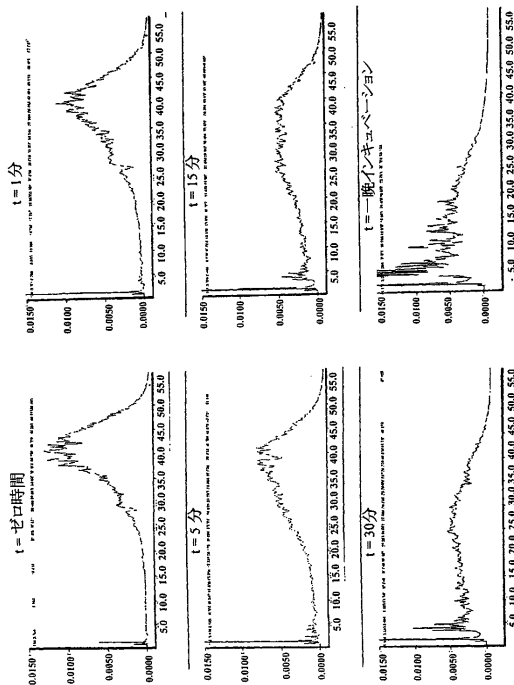
【図 1 2 A】



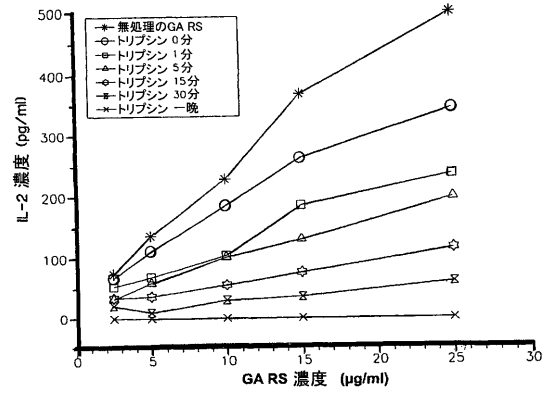
【図 1 2 B】



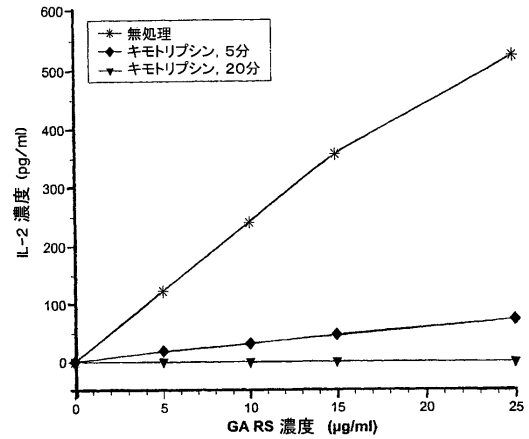
【図 1 4】



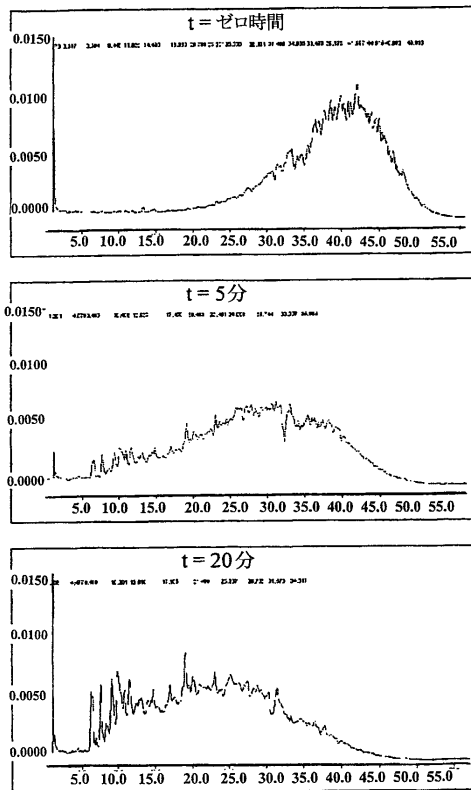
【図 1 3】



【図 1 5】



【図 16】



フロントページの続き

(74)代理人 100075672

弁理士 峰 隆司

(74)代理人 100109830

弁理士 福原 淑弘

(74)代理人 100084618

弁理士 村松 貞男

(74)代理人 100092196

弁理士 橋本 良郎

(72)発明者 クリンジャー、エティ

イスラエル国、 3 9 9 3 0 テル・アビブ、アガダティ・ストリート 1 6

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1997), Vol. 94, p. 10821-10826

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12Q 1/02

C07K 14/00

G01N 33/53

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed

专利名称(译)	测量醋酸格拉替雷强度的方法		
公开(公告)号	JP4369234B2	公开(公告)日	2009-11-18
申请号	JP2003549881	申请日	2002-12-04
[标]申请(专利权)人(译)	泰瓦药品工业有限公司		
申请(专利权)人(译)	梯瓦制药工业Rimitido		
当前申请(专利权)人(译)	梯瓦制药工业Rimitido		
[标]发明人	クリンジャーエティ		
发明人	クリンジャー、エティ		
IPC分类号	C12Q1/02 C07K14/00 G01N33/53 A61K38/00 A61P37/00 A61K38/16 C12N5/00 G01N33/50 G01N33/531 G01N33/537 G01N33/68		
CPC分类号	A61K31/198 A61K38/02 A61P25/00 G01N33/5008 G01N33/502 G01N33/5047 G01N33/505 G01N33/6866 G01N33/6869 G01N2333/52 G01N2333/54 G01N2333/555 G01N2333/5412 G01N2333/5428 G01N2333/55 G01N2333/57 G01N33/6863 G01N33/5038 G01N33/5044		
FI分类号	C12Q1/02 C07K14/00 G01N33/53.P A61K37/02 A61P37/00		
代理人(译)	河野 哲 中村 诚		
审查员(译)	三罗·哈马达		
优先权	60/338767 2001-12-04 US		
其他公开文献	JP2005511060A JP2005511060A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了测量醋酸格拉默试验批次的相对效力的方法。此外，本发明提供了一种制备一批药用可接受的乙酸格拉默的方法。

滅菌したPBS	PBS の1パッケージの内容物を1リットルの二重蒸留水(ddH ₂ O)に溶解した。緩衝液を 0.2 μ セルロース・アセテート・フィルターを通して濾過し、冷蔵庫(2〜8℃)で1週間まで維持した。
2 % (w/v)トリパンブルー (PBS 中)	約 0.5g のトリパンブルーを25mlの濾過したPBS中に溶解し、冷蔵庫で6ヶ月まで保存した。
0.1 % (v/v)トリパンブルー (PBS 中)	0.1%トリパンブルー溶液を 2%トリパンブルーストック溶液から調製し、0.2 μ セルロース・アセテート・フィルターを通して濾過した。0.1%トリパンブルー溶液を 1 ヶ月まで室温で保存した。
滅菌した 2-メルカプトエタノール	10 μ lのメルカプトエタノールを9.99mlの滅菌したPBSに添加し、0.2 μ セルロース・アセテート膜を通して濾過し、冷蔵庫で3ヶ月まで維持した。
1mg/ml の GA RSストック溶液	約 10mg のグラチラマー・アセテート RSを正確に秤量し、ddH ₂ O 中で約 1.2mg/ml の濃度まで溶解した。前記RS溶液の光学濃度(OD)を 275 nmで測定した。ODを凡そ 1.03 にddH ₂ O で調整し、1mg/ml のGA RSのストック溶液を得た。溶液をよく混合し、作業アリクウォット(200〜500 μ l)に分けて、使用するまで-20℃で保存した。
滅菌した MEM x 100	滅菌した溶液を各 5ml のアリクウォットに分け、使用するまで-20℃で維持した。融解後、作業(working)アリクウォットを 1 ヶ月まで冷蔵庫で維持した。
抗生物質／抗真菌物質 溶液1	オリジナルの20ml パッケージを20℃で維持した。パッケージを開けて、全ての内容物を各 2ml のアリクウォットに分け、使用するまで-20℃で保存した。作業アリクウォットは、安定であり、何回かの凍結融解サイクルを受けることが可能であった。