

(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2010-530975

(P2010-530975A)

(43) 公表日 平成22年9月16日(2010.9.16)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 B 0 6 3
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 5	4 C 0 8 4
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 0 1 A	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-513409 (P2010-513409)
 (86) (22) 出願日 平成20年6月19日 (2008. 6. 19)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年1月21日 (2010. 1. 21)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/067508
 (87) 国際公開番号 W02008/157697
 (87) 国際公開日 平成20年12月24日 (2008. 12. 24)
 (31) 優先権主張番号 60/945, 488
 (32) 優先日 平成19年6月21日 (2007. 6. 21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 508134441
 モメンタ ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ウェスト ケンドール ストリート 675
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コポリマーアッセイ

(57) 【要約】

本発明は、アミノ酸コポリマーの1つ以上の特性を評価する方法および組成物を提供する。

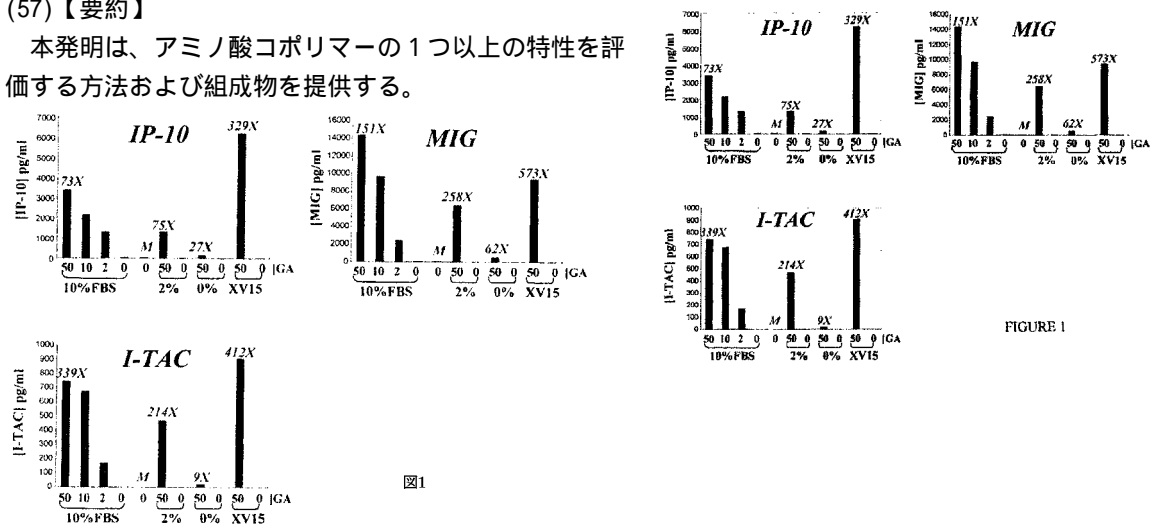


図1

FIGURE 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) サイトカインによって誘導されるタンパク質を発現できる少なくとも 1 つの細胞を提供するステップと、

(b) サイトカインによって誘導される 1 つ以上のタンパク質を細胞が発現するのを誘導させるのに十分な濃度と期間で、少なくとも 1 つの細胞と、一定量のアミノ酸コポリマーおよびサイトカインとを接触させるステップと、

(c) 誘導タンパク質を検出して、アミノ酸コポリマーの特性を評価するステップとを含む、アミノ酸コポリマーの特性を評価する方法。

【請求項 2】

(a) サイトカインによって誘導されるタンパク質を発現できる少なくとも 1 つの細胞を提供するステップと、

(b) 誘導タンパク質を細胞が発現するのを誘導させるのに十分な濃度と期間で、少なくとも 1 つの細胞と、一定量のアミノ酸コポリマーおよびサイトカインとを接触させるステップと、

(c) 誘導タンパク質の発現、分泌、誘導、存在またはレベルを測定するステップと、

(d) 誘導タンパク質の、測定された発現、分泌、誘導、存在またはレベルと、酢酸グラチラマーの市販医薬品の基準値、サイトカイン誘導プロフィールまたは医薬品規格とを比較して、アミノ酸コポリマーの特性を評価するステップと

を含む、アミノ酸コポリマーを評価する方法。

【請求項 3】

サイトカインが炎症性サイトカインである、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

サイトカインが、腫瘍壊死因子アルファ (TNF)、インターフェロン (IFN)、インターロイキン - 1 ベータ (IL - 1)、インターロイキン - 6 (IL - 6)、およびインターロイキン - 8 (IL - 8) からなる群から選択される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

サイトカインが IFN である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

1 つ以上の IFN 調節性タンパク質が IFN 調節性ケモカインである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

コポリマーが、アミノ酸であるアラニン、リジン、グルタミン酸、およびチロシンを含むコポリマーである、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 8】

コポリマーが酢酸グラチラマーである、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 9】

誘導タンパク質の生成、分泌、誘導、存在またはレベルの値と、酢酸グラチラマーの市販医薬品の基準値、サイトカイン誘導プロフィールまたは医薬品規格とを比較するステップである、ステップ (d) をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

酢酸グラチラマーの市販医薬品の基準値、サイトカイン誘導プロフィールまたは医薬品規格特性が、効力、特異性、安定性、活性、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される特性に相当する値である、請求項 2 または請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

ステップ (d) が、印刷またはコンピュータ可読媒体で値を記録するステップを含む、請求項 2 または請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

少なくとも 1 つの細胞が、骨髓性細胞系および初代骨髓性細胞からなる群から選択され

10

20

30

40

50

る、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 13】

少なくとも 1 つの細胞がヒト骨髄性白血病細胞系である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

ヒト骨髄性白血病細胞系が、ヒト急性単球性白血病細胞系 (THP-1)、ヒト白血病性単球リンパ腫細胞系 (U937)、およびヒト前骨髄球性白血病細胞系 (HL-60) からなる群から選択される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

少なくとも 1 つの細胞がヒト末梢血単核細胞 (PBMC) および単球由来樹状細胞からなる群から選択される初代細胞である、請求項 12 に記載の方法。

10

【請求項 16】

少なくとも 1 つの細胞が、自己免疫性、炎症性、神経変性性、または脱髄性の、疾患、障害または機能不全を有する対象に由来する、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 17】

疾患が、多発性硬化症、関節リウマチ、および炎症性腸疾患からなる群から選択される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

1 つ以上の細胞が、無血清アッセイ培地に懸濁される、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 19】

前記サイトカインによって調節される 1 つ以上のタンパク質が、 γ -インターフェロン-誘導性タンパク質 10 (IP-10)、インターフェロン-誘導性 T 細胞-化学誘引物質 (I-TAC)、および γ -インターフェロンによって誘導されるモノカイン (MIG) からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 20】

アミノ酸コポリマーの濃度が $0.05 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 1 \text{mg}/\text{mL}$ である、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 21】

アミノ酸コポリマーの濃度が $0.1 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 500 \mu\text{g}/\text{mL}$ である、請求項 20 に記載の方法。

30

【請求項 22】

アミノ酸コポリマーの濃度が $0.5 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

ステップ (b) のサイトカイン濃度が、(i) サイトカイン不在下で細胞をアミノ酸コポリマーと接触させた場合のタンパク質発現、および (ii) アミノ酸コポリマー不在下で細胞をサイトカインと接触させた場合のタンパク質発現の合計よりも大きいレベルでタンパク質発現を誘導する、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 24】

サイトカインの濃度が $0.01 \text{ng}/\text{mL} \sim 100 \text{ng}/\text{mL}$ である、請求項 23 に記載の方法。

40

【請求項 25】

サイトカインの濃度が $1 \text{ng}/\text{mL} \sim 50 \text{ng}/\text{mL}$ である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

サイトカインの前記濃度が約 $10 \text{ng}/\text{mL}$ である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

期間が 1 時間 ~ 48 時間である、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 28】

期間が 6 時間 ~ 36 時間である、請求項 27 に記載の方法。

50

【請求項 29】

期間が12時間～24時間である、請求項27に記載の方法。

【請求項 30】

アミノ酸コポリマーの濃度が0.5 μg/mL～100 μg/mLであり、サイトカインが1 ng/mL～50 ng/mLで存在し、期間が12時間～24時間であり、細胞がTHP-1細胞であり、コポリマーが酢酸グラチラマーであり、サイトカインがIFNである、請求項1または請求項2に記載の方法。

【請求項 31】

ステップ(c)における検出が抗体ベースの方法を含む、請求項1または請求項2に記載の方法。

10

【請求項 32】

抗体ベースの方法が免疫沈降法を含む、請求項31に記載の方法。

【請求項 33】

前記抗体ベースの方法が酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)を含む、請求項31に記載の方法。

【請求項 34】

(a) サイトカインによって誘導されるタンパク質を発現できる型の少なくとも1つの細胞を提供するステップと、

(b) 前記細胞型の少なくとも1つの細胞を

(i) サイトカインによって誘導されるタンパク質を細胞が発現するのを誘導させるのに十分な濃度と期間で、一定量のアミノ酸コポリマーの第1のサンプルと、

20

(ii) サイトカインによって誘導されるタンパク質を細胞が発現するのを誘導させるのに十分な濃度と期間で、一定量のアミノ酸コポリマーの第2のサンプルと別々に接触させるステップと、

(c) ステップ(b)(i)の少なくとも1つの細胞によって発現されるサイトカイン誘導タンパク質を検出して、アミノ酸コポリマーの第1のサンプルの特性を評価するステップと、

(d) ステップ(b)(ii)の少なくとも1つの細胞によって発現されるサイトカイン誘導タンパク質を検出して、アミノ酸コポリマーの第2のサンプルの特性を評価するステップと、

30

(e) アミノ酸コポリマーの第1のサンプルの特性と、アミノ酸コポリマーの第2のサンプルの特性とを比較して、第1および第2のサンプル間の類似性を判定するステップを含む、アミノ酸コポリマーの少なくとも2つのサンプルを比較する方法。

【請求項 35】

アミノ酸コポリマーサンプルの少なくとも1つが参照標準である、請求項34に記載の方法。

【請求項 36】

アミノ酸コポリマーサンプルの少なくとも1つが酢酸グラチラマーである、請求項34に記載の方法。

【請求項 37】

少なくとも1つの細胞が、骨髄性細胞系および初代骨髄性細胞からなる群から選択される、請求項34に記載の方法。

40

【請求項 38】

骨髄性細胞系がヒト骨髄性白血病細胞系を含む、請求項37に記載の方法。

【請求項 39】

ヒト骨髄性白血病細胞系がヒト急性単球性白血病細胞系(THP-1)、ヒト白血病性単球リンパ腫細胞系(U937)、およびヒト前骨髄球性白血病細胞系(HL-60)からなる群から選択される、請求項37に記載の方法。

【請求項 40】

初代骨髄性細胞がヒト末梢血単核細胞(PBMC)および単球由来樹状細胞からなる群

50

から選択される、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 41】

少なくとも 1 つの細胞が、自己免疫性、炎症性、神経変性性または脱髄性の疾患を有する対象に由来する、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 42】

疾患が、多発性硬化症、関節リウマチ、および炎症性腸疾患からなる群から選択される、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

1 つ以上の細胞がアッセイ培地に懸濁される、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 44】

アッセイ培地が無血清アッセイ培地である、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 45】

前記サイトカインによって調節される 1 つ以上のタンパク質が、 γ -インターフェロン - 誘導性タンパク質 10 (IP-10)、インターフェロン - 誘導性 T 細胞 - 化学誘引物質 (I-TAC)、および γ -インターフェロンによって誘導されるモノカイン (MIG) からなる群から選択される、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 46】

アミノ酸コポリマーの第 1 のサンプルおよびアミノ酸コポリマーの第 2 のサンプルの濃度が $0.05 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 1 \text{mg}/\text{mL}$ である、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 47】

アミノ酸コポリマーの濃度が $0.1 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 500 \mu\text{g}/\text{mL}$ である、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

アミノ酸コポリマーの濃度が $0.5 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ である、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

前記サイトカインが炎症性サイトカインである、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 50】

サイトカインが、腫瘍壊死因子アルファ (TNF α)、インターフェロン γ (IFN γ)、インターロイキン - 1 ベータ (IL-1 β)、インターロイキン - 6 (IL-6)、およびインターロイキン - 8 (IL-8) からなる群から選択される、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

サイトカインがインターフェロン γ である、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 52】

サイトカインの濃度が $0.01 \text{ng}/\text{mL} \sim 100 \text{ng}/\text{mL}$ である、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 53】

サイトカインの濃度が $1 \text{ng}/\text{mL} \sim 50 \text{ng}/\text{mL}$ である、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

サイトカインの前記濃度が約 $10 \text{ng}/\text{mL}$ である、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 55】

期間が 1 時間 ~ 48 時間である、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 56】

期間が 6 時間 ~ 36 時間である、請求項 55 に記載の方法。

【請求項 57】

期間が 12 時間 ~ 24 時間である、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 58】

ステップ (d) の前記検出するステップが抗体ベースの方法を含む、請求項 34 に記載

10

20

30

40

50

の方法。

【請求項 59】

抗体ベースの方法が免疫沈降法を含む、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 60】

前記免疫学的方法が酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) を含む、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 61】

アミノ酸コポリマーの第 1 のサンプルおよびアミノ酸コポリマーの第 2 のサンプルの少なくとも 1 つが、自己免疫性、脱髄性、神経変性性または炎症性の疾患の治療を必要とする対象において、それを治療する既知の有効性を有する、請求項 34 に記載の方法。

10

【請求項 62】

疾患が、多発性硬化症、関節リウマチ、および炎症性腸疾患からなる群から選択される、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 63】

アミノ酸コポリマーの第 1 のサンプルの特性が、アミノ酸コポリマーの第 2 のサンプルの特性の 80% ~ 120% の範囲内である、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 64】

(a) 酢酸グラチラマーのバッチを提供するステップと、
 (b) 請求項 1 ~ 31 のいずれか一項に従ってバッチの特性を評価するステップと、
 (c) サイトカインによって調節される 1 つ以上のタンパク質のレベルが、酢酸グラチラマーの基準値に一致する場合、バッチが医薬用途のために許容可能であることを判定するステップと
 を含む、酢酸グラチラマーの医薬組成物を調製する方法。

20

【請求項 65】

基準値が、酢酸グラチラマーの市販医薬品の効力、特異性、安定性、および / または生物学的活性に関する、サイトカイン誘導プロファイル、等価性範囲または医薬品規格である、請求項 64 に記載の方法。

【請求項 66】

(a) 骨髄性細胞を提供するステップと、
 (b) 細胞が IFN - 誘導タンパク質を発現するのを誘導させるのに十分な濃度と期間で、細胞と、(i) 一定量のアミノ酸コポリマー、および (ii) IFN とを接触させるステップと、
 (c) IFN - 誘導タンパク質の存在、レベル、生成、分泌、誘導と、酢酸グラチラマーの基準値とを比較するステップと
 を含む、アミノ酸コポリマー調製品の活性、効力、特異性または安定性を評価する方法。

30

【請求項 67】

基準値が、酢酸グラチラマーの市販医薬品の活性、効力、特異性または安定性に関するサイトカイン誘導プロファイル、等価性範囲または医薬品規格である、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 68】

比較するステップが、1 つ以上の誘導タンパク質の測定された発現、分泌、誘導、存在またはレベルと、酢酸グラチラマーの市販医薬品の基準値、サイトカイン誘導プロファイルまたは医薬品規格との差が、所定の範囲内であるかどうかを判定するステップを含む、請求項 2 または請求項 8 に記載の方法。

40

【請求項 69】

差が所定の範囲内であれば、コポリマーを分類し、選択し、承認し、廃棄し、リリースし、または保留するステップと、コポリマーを製剤に加工し、コポリマーを含む製品を送送し、コポリマーを新しい場所に移動させるステップ、またはコポリマーを商業目的のために配合し、ラベルし、包装し、販売し、売りに出し、またはリリースするステップをさらに含む、請求項 67 に記載の方法。

50

【請求項 70】

L - アラニンの N - カルボキシ無水物、ベンジル保護 L - グルタミン酸、トリフルオロ酢酸 (T F A) 保護 L - リジン、および L - チロシンを重合して、保護されるコポリマーを生成するステップと、保護されるコポリマーを処理して、保護されるコポリマーを部分的に解重合し、ベンジル保護基を脱保護し、 T F A 保護リジンを脱保護して、酢酸グラチラマーを生成するステップと、酢酸グラチラマーを単離するステップとを含み、サイトカインおよび単離された酢酸グラチラマーのサンプル存在下で、骨髄性細胞または初代骨髄性細胞系中のサイトカイン誘導タンパク質の発現を測定すること、および発現と基準値とを比較することを含む、酢酸グラチラマーを含む医薬組成物を調製する方法。

【請求項 71】

サイトカインが I F N である、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 72】

測定される発現と基準値との差が所定の範囲内であれば、医薬組成物の調製で使用するための精製酢酸グラチラマーを選択するステップをさらに含む、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 73】

選択された精製酢酸グラチラマーの少なくとも一部を含む医薬組成物を調製するステップをさらに含む、請求項 71 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

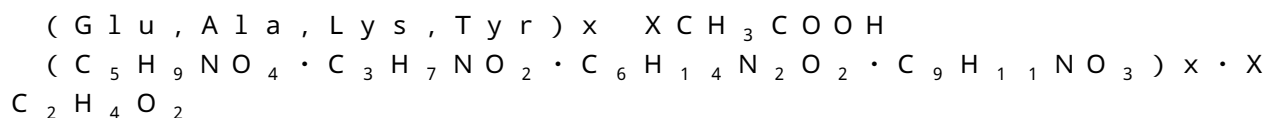
【0001】

ここで開示される主題は、一般に複合ペプチドまたはポリペプチド混合物を特性決定する方法に関する。より詳しくは、ここで開示される主題は、アミノ酸コポリマーの 1 つ以上の特性を評価するための細胞ベースの方法に関する。

【背景技術】

【0002】

コポリマー 1 は、アミノ酸であるグルタミン酸、リジン、アラニン、およびチロシンの重合から調製されるポリペプチドの複合混合物である。コポリマー 1 はまた、酢酸グラチラマーとしても知られており、次の構造式を有する。



【0003】

酢酸グラチラマー (G A) は Teva Pharmaceutical Industries Ltd. , Israel からの COPAXONE (登録商標) の活性成分であり、報告された平均モル濃度画分がそれぞれ 0 . 141、0 . 427、0 . 095、および 0 . 338 である、L - グルタミン酸、L - アラニン、L - チロシン、および L - リジンの 4 つの天然アミノ酸を含有する合成ポリペプチドの酢酸塩を含む。

【0004】

酢酸グラチラマーは、再発寛解型多発性硬化症 (R R M S) の治療において使用される。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、候補薬剤 (例えばコポリマー 1 などのアミノ酸コポリマー、例えば酢酸グラチラマー) の 1 つ以上の特性を評価する方法および組成物を提供する。一態様では、本発明は、例えば自己免疫性および / または炎症性の疾患、障害または機能不全の治療のための医薬品としての適合性について、効力、特異性、安定性、生物学的活性を含むが、これに限定されるものではない、生理学、薬力学、薬物動態学、または薬学的特性について、アミノ酸コポリマー調製品を評価する多様な実施態様を提供する。

10

20

30

40

50

【0006】

一実施態様では、本明細書に記載の方法またはアッセイは、(a)細胞が調節性タンパク質を生成するのを誘導させるのに十分な濃度と時間で、(i)炎症促進性分子によって調節される1つ以上のタンパク質を生成または分泌する少なくとも1つの細胞と、(ii)一定量のアミノ酸コポリマー、および(iii)炎症促進性分子とを接触させるステップを含む。1つ以上の調節性タンパク質の生成、分泌、誘導、存在またはレベル(または1つ以上の調節性タンパク質のレポーター遺伝子)が検出でき、アミノ酸コポリマーの特性と関連付けることができる。別の実施態様では、アミノ酸コポリマーを評価する方法は、(a)サイトカインによって誘導されるタンパク質を発現できる少なくとも1つの細胞を提供するステップと、(b)誘導タンパク質を細胞が発現するのを誘導させるのに十分な濃度と期間で、少なくとも1つの細胞と、一定量のアミノ酸コポリマーおよびサイトカインとを接触させるステップと、(c)誘導タンパク質の発現、分泌、誘導、存在またはレベルを測定するステップと、(d)誘導タンパク質の測定された発現、分泌、誘導、存在またはレベルと、酢酸グラチラマーの市販医薬品の基準値、サイトカイン誘導プロフィールまたは医薬品規格とを比較してアミノ酸コポリマーの特性を評価するステップとを含む。サイトカインによって誘導されるタンパク質を発現できる細胞は、十分なレベルのサイトカインに曝された際に、サイトカイン不在で細胞が発現するよりもタンパク質をより多く発現する細胞である。当然ながら、細胞は、サイトカイン不在でタンパク質を発現してもよい。細胞は、サイトカインによって誘導される2つ以上のタンパク質を発現できる。タンパク質を生成または分泌する細胞は、タンパク質を発現する細胞である。

10

20

【0007】

(a)サイトカインによって誘導されるタンパク質を発現できる少なくとも1つの細胞を提供するステップと、(b)サイトカインによって誘導される1つ以上のタンパク質を細胞が発現するのを誘導させるのに十分な濃度と期間で、少なくとも1つの細胞と、一定量のアミノ酸コポリマーおよびサイトカインとを接触させるステップと、(c)誘導されたタンパク質を検出して、アミノ酸コポリマーの特性を評価するステップとを含む、アミノ酸コポリマーの特性を評価する方法についてもまた、述べられている。

【0008】

(a)サイトカインによって調節される1つ以上のタンパク質を分泌または生成できる少なくとも1つの細胞を提供するステップと、(b)サイトカインによって調節される1つ以上のタンパク質を細胞が分泌または生成するのを誘導するのに十分な濃度および期間で、少なくとも1つの細胞と、一定量のアミノ酸コポリマーおよび前記サイトカインとを接触させるステップと、(c)1つ以上の調節性タンパク質を検出して、アミノ酸コポリマーの特性を評価するステップとを含むアミノ酸コポリマーの特性を評価する方法についてもまた述べられている。

30

【0009】

効力、特異性、安定性、および/または生物学的活性などのアミノ酸コポリマー調製品の(例えば試験アミノ酸コポリマー調製品の)1つ以上の特性は、アッセイの結果(例えば調節性タンパク質の誘導、生成、分泌、存在またはレベルに対応する定性的または定量的試験値)と、例えばコポリマーの特定レベルの効力、特異性、安定性、および/または生物学的活性に対応する所定の値など、例えば本明細書に記載の疾患、障害、または機能不全を治療するのに有用な医薬品に適したコポリマーの効力、特異性、安定性、および/または生物学的活性のレベルに対応する所定の値などである基準値とを比較することで、評価できる。一実施態様では、基準値は酢酸グラチラマーの市販医薬品の効力、特異性、安定性、および/または生物学的活性に関する、サイトカイン誘導プロフィール、等価性範囲または医薬品規格である。別の実施態様では、基準値は、例えば参照酢酸グラチラマー調製品などの基準化合物の特性の直接測定によって判定される値である。一実施態様では、基準値よりも25%、20%、15%、10%、5%、2%、1%少ない範囲であれば、試験値は基準値に匹敵するとみなされる。

40

【0010】

50

一実施態様では、アッセイで使用される細胞は白血球、例えば骨髄性細胞など、例えば骨髄性細胞系または初代細胞など、例えば血液単核細胞（例えばT細胞、ナチュラルキラー細胞、単球、マクロファージなど）、血液多形核細胞（例えば好酸球、好塩基球、好中球、巨核球など）、樹状細胞、および胸腺細胞である。細胞は、THP-1、U937、SiHa、またはHL-60などの腫瘍形成性骨髄性細胞系であることができる。さらに哺乳類の末梢血単核細胞ならびに骨髄由来単球および単球を使用してもよい。

【0011】

一実施態様では、炎症促進性分子は、例えば腫瘍壊死因子アルファ（TNF）、インターフェロン（IFN）、インターロイキン-1ベータ（IL-1）、インターロイキン-6（IL-6）、およびインターロイキン-8（IL-8）からなる群から選択される、炎症促進性サイトカインである。別の実施態様では、炎症促進性分子はLPSである。

10

【0012】

一実施態様では、（その誘導、生成、分泌、存在またはレベルがアッセイ中で検出される）炎症促進性分子によって調節されるタンパク質は、例えばIFN-調節性ケモカインなどのケモカインである。一実施態様では、ケモカインは、インターフェロン-誘導性タンパク質10（IP-10）、インターフェロン-誘導性T細胞-化学誘引物質（I-TAC）、インターフェロンによって誘導されるモノカイン（MIG）からなる群から選択される。IFN-によって誘導されるその他の可溶性タンパク質またはサイトカインとしては、表1に示されるものが挙げられる。調節性タンパク質の誘導、生成、分泌、存在またはレベルは、例えばELISAなどの抗体ベースの方法によって直接検出でき、または例えばタンパク質の転写物を検出する技術分野で既知の技術によって、またはレポーター遺伝子アッセイの使用によって、間接的に検出できる。

20

【0013】

いくつかの実施態様では、細胞のアミノ酸コポリマーおよび炎症性サイトカインへの曝露は、1つ以上のサイトカイン調節性タンパク質の相乗的誘導をもたらす。一例では、骨髄性細胞のアミノ酸コポリマー（例えば酢酸グラチラマー）およびIFNへの曝露は、1つ以上のIFN調節性ケモカインまたはサイトカインの（例えばIP-10、I-TAC、MIG、および/またはその他のCXCR3リガンドの）相乗的誘導をもたらす。一実施態様では、調節性サイトカインの誘導は、（例えば炎症促進性分子なしおよび/またはコポリマーなしの負の対照と比べて）対照値よりも少なくとも5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、75倍、100倍、150倍、200倍、300倍以上高くあることができる。

30

【0014】

本発明は、サイトカインによって調節される1つ以上のタンパク質の少なくとも所定のレベルが検出され、および/または調節性タンパク質が基準値の80%~125%（例えば少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、100%、110%、115%、120%、125%）以内のレベルに誘導される場合に、酢酸グラチラマーのバッチを調製するステップと、本明細書に記載の方法によって、組成物の効力、特異性、生物学的活性および/または安定性を評価するステップと、酢酸グラチラマーが医薬用途のために許容可能であることを判定するステップを含む、酢酸グラチラマーの医薬組成物を調製する方法をさらに提供する。

40

【0015】

L-アラニンのN-カルボキシ無水物、ベンジル保護L-グルタミン酸、トリフルオロ酢酸（TFA）保護L-リジン、およびL-チロシンを重合して、保護されるコポリマーを生成するステップと、保護されるコポリマーを処理して、保護されるコポリマーを部分的に解重合し、ベンジル保護基を脱保護し、TFA保護リジンを脱保護して、酢酸グラチラマーを生成するステップと、酢酸グラチラマーを単離するステップを含み、サイトカインおよび単離された酢酸グラチラマーのサンプル存在下で、骨髄性細胞または初代骨髄性細胞系中のサイトカイン誘導タンパク質の発現を測定して、発現と基準値とを比較するス

50

テップを含む、酢酸グラチラマーを含む医薬組成物を調製する方法についてもまた述べられている。この調製法の様々な実施態様では、サイトカインはIFN であり、測定された発現と基準値との差が所定の範囲内であれば、医薬組成物の調製で使用するための精製酢酸グラチラマーを選択するステップをさらに含み、選択された精製酢酸グラチラマーの少なくとも一部を含む医薬組成物を調製するステップをさらに含む。

【0016】

ここで開示される主題によって全部または一部が対処される、上述の開示される主題の特定の態様、その他の態様は、下で最も良く説明されている添付の実施例および図との関連で、説明の進行と共に明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

10

【0017】

【図1】一定のIFN 濃度(10 ng/ml)での様々な血清含有または無血清培地中における、およそ24時間にわたるIP-10、I-TAC、およびMIGの分泌を例示する。10% FBS条件は、50、10、2、および0 μg/mlの酢酸グラチラマー(GA)で試験された。2% FBS、0% FBS、およびX-VIVO15の条件は、50および0 μg/ml GAで分析された。Mは100 μg/mlでアッセイされたマンニトール対照キャリアを表す。棒グラフ上の番号は、対照(0 μg/ml)と比較した倍数的増加を表す。

【発明を実施するための形態】

【0018】

20

詳細な説明

ここで開示される主題のいくつかの、しかし全てではない実施態様が示される添付図を参照して、下文において、ここで開示される主題についてより詳細に述べる。ここで述べられる開示される主題の多数の修正とその他の実施態様は、前述の説明で提示される教示および関連図の利益を受ける、ここで開示される主題に関係する当業者であれば想到されるであろう。したがってここで開示される主題は開示される特定の態様に限定されず、修正およびその他の実施態様は、添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図されると理解される。ここで特定の用語が用いられるが、それらはあくまで一般的な記述の意味で使用され限定は意図されない。

【0019】

30

長年にわたる特許法の慣例に従って、「a」、「an」、および「the」という用語は、特許請求の範囲を含めて本明細書での使用では「1つ以上」を指す。したがって例えば「サンプル(a sample)」への言及は、特に明白に断りのない限り、複数のサンプル(例えば複数のサンプル)などを含む。

【0020】

全ての出版物、特許出願、特許、およびその他の参考文献は、それぞれの個々の出版物、特許出願、特許、およびその他の参考文献を具体的かつ個別に参照によって援用したのと同程度に、参照によって本明細書に援用する。いくつかの特許出願、特許、およびその他の参考文献についてここで言及されるが、このような参考文献は、これらの文献のいずれかが当該技術分野の一般常識の一部をなすことを認めることではないものと理解される。

40

【0021】

概説

本発明は、例えば自己免疫性、神経変性性、脱髄性または炎症性の障害を治療する治療剤として有用かもしれない、コポリマー調製品の1つ以上の特性を評価するための方法および組成物を提供する。ここで述べられるアッセイは、細胞培養アッセイ、臓器培養アッセイ、または生体外アッセイを含む、当該技術分野で知られている任意の形式であってもよい。

【0022】

ここでの用法では、「コポリマー」、「アミノ酸コポリマー」または「アミノ酸コポリ

50

マー調製品」とは、規定の複数の異なるアミノ酸（例えば3～6個など、典型的に2～10個の異なるアミノ酸）からなるポリペプチドの異種性混合物である。コポリマーは、個々のアミノ酸の重合から調製されてもよく、または組み換式的に生成されてもよい。「アミノ酸」という用語は天然アミノ酸に限定されないが、アミノ酸誘導体および/またはアミノ酸類似体を含むことができる。例えばチロシンアミノ酸を含むアミノ酸コポリマー中では、アミノ酸の1つ以上はホモチロシンであることができる。さらに2つの隣接する残基の間に、1つ以上の非ペプチドまたはペプチド模倣結合を有するアミノ酸コポリマーが、この定義に含まれる。コポリマーは、混合物内のポリペプチドの各化学種の分子量に関して不均一である。

【0023】

本発明の一実施態様では、アミノ酸コポリマーは、アミノ酸Y、E、A、およびK；Y、F、A、およびK；V、Y、A、およびK；V、W、A、およびK；V、E、A、およびK；Y、F、A、およびK；V、W、A、およびK；W、E、A、およびKまたはF、E、A、およびKを含むポリペプチドの混合物である。別の本発明の実施態様では、アミノ酸コポリマーは、それぞれが(a)リジンおよびアルギニン、(b)グルタミン酸およびアスパラギン酸、(c)アラニンおよびグリシン、(d)チロシンおよびトリプトファンの4群の異なる1群からのものである、4つの異なるアミノ酸を含有する。本発明のこの実施態様に従って特定のコポリマーは、アラニン、グルタミン酸、リジン、およびチロシンを含むポリペプチドの混合物を含む。一実施態様では、コポリマーは、コポリマー1 (Cop 1) または酢酸グラチラマーとも称される、アミノ酸Y、E、A、およびKからなるポリペプチドの混合物を含む。別の実施態様では、アミノ酸コポリマーは、それぞれが、例えばY、A、およびK；Y、E、およびK；K、E、およびA；またはY、E、およびAなど、前述の(a)～(d)の内3群の異なる1群からのものである、3つの異なるアミノ酸を含有する。

【0024】

別の実施態様では、アミノ酸コポリマーは、アラニン - グルタミン酸 - リジン - チロシン - アラニン (A - E - K - Y - A)、アラニン - グルタミン酸 - リジン - バリン - アラニン (A - E - K - V - A)、アラニン - グルタミン酸 - リジン - フェニルアラニン - アラニン (A - E - K - F - A)、アラニン - リジン - チロシン - アラニン - グルタミン酸 (A - K - Y - A - E)、グルタミン酸 - アラニン - リジン - チロシン - アラニン (E - A - K - Y - A)、アラニン - リジン - バリン - アラニン - グルタミン酸 (A - K - V - A - E)、およびグルタミン酸 - アラニン - リジン - バリン - アラニン (E - A - K - V - A)、アラニン - リジン - フェニルアラニン - アラニン - グルタミン酸 (A - K - F - A - E)、およびグルタミン酸 - アラニン - リジン - フェニルアラニン - アラニン (E - A - K - F - A) からなる群から選択されるアミノ酸を含む。

【0025】

「炎症促進性分子」とは、炎症性免疫応答の増幅または伝播をもたらす、白血球、上皮細胞、または間質細胞の活性化を刺激する分子である。炎症促進性分子は、CD4T細胞、CD8T細胞、B細胞、NK細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞、好中球、好塩基球、好酸球、および肥満細胞などの免疫細胞からの活性化マーカー（例えばCD69、CD25、CD54、CD40リガンド、CD11b、CD62L、CD83、CD95）の生成、および/またはその他の炎症促進性サイトカインおよび/またはケモカインの分泌を誘導できる。炎症性サイトカインは、例えばIFN-などの、本明細書に記載のような炎症促進性分子の特性を有する小型分泌タンパク質である。この定義は、文脈によっては、抗炎症活性もまた有してもよい分子を除外しない。

【0026】

「ケモカイン」は、化学走性活性があるサイトカインである。ケモカインの例としては、IL-8、RANTES、MIP-1a、MCP-1、IP-10、Mig、I-TAC、TARC、I-309が挙げられる。

【0027】

10

20

30

40

50

ここで述べられる様々な方法を使用して、試験コポリマー調製品と、酢酸グラチラマーの効力、特異性、安定性、および生物学的活性などに関する医薬品規格値などの1つ以上の所定の基準値との比較によって、効力、特異性、安定性、純度、および生物学的活性などの試験コポリマー調製品の1つ以上の特性を評価できる。場合によっては、基準値は既知の薬剤との比較によって判定できる。この既知の薬剤は、ここでは「参照薬剤」または「基準化合物」と称される。本発明の好ましい参照薬剤は医薬品として使用するのに適したアミノ酸コポリマー（例えば酢酸グラチラマーの医薬品）であり、例えばそれは、1つ以上の自己免疫性、変性、脱髄性および/または炎症性の障害または病状において、治療効果を有することが示されている。「治療効果」とは、薬剤が障害または病状に付随する症状を予防、治療、または寛解できることが意図される。

10

【0028】

一実施態様では、基準値は酢酸グラチラマーに関する所定の医薬品規格値である。一実施態様では、基準化合物は酢酸グラチラマーの医薬品である。一実施態様では、外来性に提供されるサイトカインおよびコポリマー1が同時投与された際の、様々な細胞型におけるサイトカイン調節性タンパク質の相乗的誘導が観察されている。ここでの用法では「相乗的」とは、各単一薬剤単独での個々の効果の合計よりも、併用においてより効果的である、2つ以上の薬剤（例えば酢酸グラチラマーおよびサイトカイン）を指す。このサイトカイン調節性タンパク質の相乗的誘導を使用して、酢酸グラチラマーに匹敵する生物学的活性を含む特性について、試験コポリマー調製品をスクリーンできる。

20

【0029】

酢酸グラチラマーは、再発寛解型多発性硬化症がある患者における再発頻度の低下のために認可されている。多発性硬化症は自己免疫疾患に分類される。酢酸グラチラマーはその他の自己免疫疾患、炎症性非自己免疫疾患の治療で使用するために、神経再生を促進するためおよび/または一次神経系傷害に続けて起きるかもしれない二次変性を予防または抑制するために開示されている。さらに酢酸グラチラマーは、免疫媒介疾患ならびに脱髄と関連付けられている疾患のための治療として開示されている。本明細書に記載の方法を使用して、これらのいずれかの障害のための医薬品としての適合性に関して、酢酸グラチラマー調製品の活性を評価できる。

【0030】

生体外アッセイ

本発明の方法および組成物は、候補薬剤（例えばアミノ酸コポリマー）の1つ以上の特性を評価するのに有用なアッセイを含む。一実施態様では、炎症性サイトカインによって調節される1つ以上のタンパク質の生成および/または分泌に対するコポリマー調製品の効果を評価する生体外アッセイを使用して、試験コポリマー調製品がスクリーンされる。試験コポリマー調製品の存在下におけるタンパク質の炎症性サイトカイン調節性誘導のレベルは、同一細胞型中での参照薬剤存在下におけるタンパク質の炎症性サイトカイン調節性誘導のレベルと比較される。誘導のレベル（すなわち定性的または定量的なレベル）および性質（すなわちタンパク質種）は、ここで「サイトカイン誘導プロファイル」と称される。サイトカイン誘導プロファイルを使用して、効力、安定性、特異性、および生物学的活性などのアミノ酸コポリマーの1つ以上の特性を評価できる。一実施態様では、試験コポリマー調製品のサイトカイン誘導プロファイル（例えば誘導レベルまたは誘導された類似タンパク質の数、または双方）が、コポリマー医薬組成物（例えばCOPAXONE（登録商標）のロット）の基準値またはプロファイルの約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約100%、約105%、約110%、約115%、約120%、約125%までを含む、約80%～約125%の間であれば、試験コポリマー調製品は医薬組成物として適切であると言われる。別の実施態様では、試験コポリマー調製品のサイトカイン誘導プロファイル（例えば誘導レベルまたは誘導された類似タンパク質の数、または双方）が、参照コポリマー調製品の約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約100%、約105%、約110%

30

40

50

、約 115%、120%、約 125%までを含む、約 80%～約 125%の間であれば、試験コポリマー調製品は参照コポリマー調製品（例えば COPAXONE（登録商標））と実質的に同じ特性を有すると言われる。

【0031】

一実施態様では、参照は、1つ以上の自己免疫または炎症性の障害において既知の治療効果がある、アミノ酸コポリマーである。特定の実施態様では、参照薬剤は酢酸グラチラマーである。基準値は、酢酸グラチラマーの特定レベルの効力、純度、安定性またはその他の活性に対応する所定の値であることができる。

【0032】

サイトカイン調節性タンパク質の誘導に十分な濃度と時間で、サイトカイン調節性タンパク質を生成または分泌できる1つ以上の細胞と、候補薬剤または参照薬剤とを接触させる。アッセイは、初代細胞、細胞系、またはそれらの組み合わせであってもよい、2つ以上の細胞型を含んでなってもよい。サイトカイン調節性タンパク質の誘導に十分な濃度と時間は、（例えばサイトカインによって調節されるタンパク質のベースラインレベルを超える）候補または参照薬剤の不在下におけるタンパク質レベルを超える、サイトカイン調節性タンパク質の検出可能な生成または分泌をもたらすものである。濃度が細胞毒性である濃度に達しさえしなければ、少なくとも約 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも約 3、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、約 10、約 15、約 20、約 25、約 30、約 40、約 50、約 60、約 70、約 80、約 90、約 100、約 110、約 125、約 150、約 175、約 200、約 225、約 250、約 275、約 300、約 375、約 400、約 425、約 450、約 475、少なくとも約 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で、一定濃度の候補薬剤がアッセイ培地中に存在してもよい。

10

20

【0033】

候補薬剤または参照薬剤は、少なくとも約 1 時間、少なくとも約 1.5 時間、少なくとも約 2 時間、少なくとも約 3 時間、少なくとも約 4 時間、約 5 時間、約 6 時間、約 7、約 8、約 9、約 10、約 11、約 12、約 13、約 14、約 15、約 16、約 17、約 18、約 19、約 20、約 21、約 22、約 23、約 24、約 25、約 26、約 27、約 28、約 29、約 30、約 31、約 32、約 33、約 34、約 35、約 36、約 40、約 45、約 48 以上時間にわたり、サイトカイン調節性タンパク質を分泌または生成できる細胞と共にインキュベート（すなわち「接触」）されてもよい。

30

【0034】

一実施態様では、上述のタンパク質の発現を調節する量の炎症性サイトカインが、アッセイ培地に外来性に添加されてもよい。サイトカインは、試験または参照コポリマー調製品の添加前、同時、または後に添加できる。一実施態様では、サイトカインは試験または参照コポリマー調製品と同時に添加される。サイトカインは、濃度が細胞毒性である濃度に達しさえしなければ、少なくとも約 1 ng/mL 、少なくとも約 2 ng/mL 、少なくとも約 3、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、約 10、約 15、約 20、約 25、約 30、約 40、少なくとも約 50 ng/mL 以上の濃度でアッセイ培地中に存在できる。いくつかの実施態様では、サイトカインは、アッセイ宿主細胞中で異種性に発現させることができる。異種性遺伝子は、構成的または誘導性プロモーターの制御下にあることができる。

40

【0035】

本発明の様々な態様では、本明細書に記載の1つ以上のタンパク質の生成および分泌を調節するサイトカインは、炎症性サイトカインである。炎症性サイトカインは、典型的に Th1 T細胞応答と関連付けられている。一実施態様では、炎症性サイトカインは、TNF、インターフェロン（IFN）、インターロイキン-1（IL-1）、インターロイキン-1ベータ（IL-1 β ）、インターロイキン-1（IL-2）、インターロイキン-6（IL-6）、インターロイキン-4（IL-4）、インターロイキン-8（IL-8）、インターロイキン-10（IL-10）、インターロイキン-13（IL-13）

50

13)、インターロイキン-17(IL-17)、インターロイキン-18(IL-18)、インターロイキン-23(IL-23)、およびリンホトキシン-を含む群から選択されるが、これに限定されるものではない。本明細書に記載のアッセイでは、サイトカインは、サイトカインによって調節される1つ以上のタンパク質の生成または分泌を誘導するのに十分な濃度で存在する。一実施態様では、サイトカイン調節性タンパク質は、
 - インターフェロン-誘導性タンパク質10(IP-10)、インターフェロン-誘導性T細胞-化学誘引物質(I-TAC)、および-インターフェロンによって誘導されるモノカイン(MIG)を含む、インターフェロンによって調節されるタンパク質(例えばケモカイン)を含む。IP-10、MIG、およびI-TACは、実験的自己免疫性脳炎(EAE)および多発性硬化症(MS)の双方においてCNS病変内で発現され、症状悪化の際に、これらのリガンドに結合する受容体、CXCR3は、EAEおよびMS病変に浸潤するT細胞上、ならびにMS患者の脳脊髄液および末梢中のT細胞上に発現される(Klein et al. (2004) J Immunol 172:550-559で概説されている)。

10

【0036】

細胞

ここで述べられるサイトカインによって調節される1つ以上のタンパク質を生成できさえすれば、多数の細胞型が本発明の方法において有用である。例えば骨髄性細胞系または初代細胞など、例えば血液単核細胞(例えばT細胞、ナチュラルキラー細胞、単球、マクロファージなど)、血液多形核細胞(例えば好酸球、好塩基球、好中球、巨核球など)、および樹状細胞などの炎症反応に関与する細胞と、胸腺上皮細胞とが挙げられるがこれらに限定されるものではない。THP-1、U937、SiHa、およびHL-60などの腫瘍形成性細胞系もまた挙げられる。その他の有用な細胞としては、上皮細胞、間質細胞、および例えば初代の微小血管系、HUEC、大動脈内皮細胞などの内皮細胞も挙げられる。さらに哺乳類の末梢血単核細胞ならびに骨髄由来単球および水簸または負磁気ビーズ単離によって単離された単球もまた使用してもよい。

20

【0037】

細胞培養条件

細胞培地の調合物については文献でよく知られており、数多く市販されている。一実施態様では、アッセイ中の細胞は、無血清培地内で培養される。無血清培地を調製する方法については、当該技術分野でよく知られている。成分は、グルタミン、アラニン、アルギニン、アスパラギン、シスチン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリン、およびそれらの誘導體などのアミノ酸(Dおよび/またはL-アミノ酸の双方)と、チアミン、アスコルビン酸、第二鉄化合物、第一鉄化合物、プリン、グルタチオンおよびリン酸二水素ナトリウムなどの酸可溶性下位群とを含んでもよい。

30

【0038】

追加的成分としては、糖、デオキシリボース、リボース、ヌクレオシド、水溶性ビタミン、リボフラビン、塩、微量金属、脂質、酢酸塩、リン酸塩、HEPES、フェノールレッド、ピルビン酸塩、および緩衝液が挙げられる。

40

【0039】

培地調合物中で使用されることが多いその他の成分としては、(ビタミンA、D、E、およびKを含む)脂溶性ビタミン、ステロイドおよびそれらの誘導體、コレステロール、脂肪酸および脂質、ツイーン(Tween)80、2-メルカプトエタノールピリミジン、ならびに血清(胎児の、ウマ、ウシなど)を含む多様な栄養補給剤、タンパク質(インシュリン、トランスフェリン、成長因子、ホルモンなど)、抗生物質(ゲンタマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン、アンホテリシンBなど)、全卵限界濾液、および付着因子(フィブロネクチン、ピトロネクチン、コラーゲン、ラミニン、テネイシンなど)が挙げられる。本発明の方法で有用な細胞を増殖させる適切な条件を判定することは、十分

50

に当業者の能力範囲内である。

【0040】

細胞は、懸濁状態、単層内、ビーズ上または三次元を含む当該技術分野で知られている任意の様式で培養されてもよい。細胞および組織を培養する方法については当該技術分野でよく知られており、例えばCell & Tissue Culture: Laboratory Procedures; Freshney (1987), Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniquesで述べられている。

【0041】

本発明の実施では、特に断りのない限り、技術分野の範囲内である、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、遺伝子組み換え生物学、微生物学、組み換えDNA、および免疫学の従来技術を用いる。このような技術については、文献で詳細に説明されている。例えば Sambrook et al., ed. (2001) Molecular Cloning A Laboratory Manual (3rd Lab Edition; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Wu et al., eds., Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155; Mayer and Walker, eds. (1988) Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Academic Press, London); Herzenberg, Weir and Blackwell, eds., (1996) Weir's Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I - IVを参照されたい。

【0042】

タンパク質誘導の測定

本明細書に記載のようなサイトカイン調節性タンパク質の誘導は、当業者にそれぞれ知られている多様な異なる方法で評価できる。測定がサンプル中で、目的とするサイトカイン調節性タンパク質のレベルが、基準値であり、基準値を超え、または基準値未満であるかどうかを指示できさえすれば、測定は定量的または定性的のどちらであってもよい。サイトカイン調節性タンパク質の1つ以上の誘導のレベル、ならびに誘導される特定タンパク質(ここで「サイトカイン誘導プロフィール」と称される)は、参照サイトカイン誘導プロフィール(例えば特定の活性または活性レベルに相当するように予め定められたプロフィール)と、または参照薬剤および負の対照薬剤の1つ以上のサイトカイン誘導プロフィールと比較できる。負の対照薬剤は、例えばアッセイで利用される細胞型中において、効力または活性を有さないもの、またはサイトカイン調節性タンパク質生成を誘導しないもの、または双方であることができる。

【0043】

サイトカイン誘導プロフィールは、生物学的特性または活性の指標として使用できる。効力、特異性、および安定性などの特性は、サイトカイン誘導プロフィールを使用して評価できる。本発明の目的では、効力および生物学的活性は、1つ以上のサイトカイン調節性タンパク質の誘導レベルを評価することで評価される。「特異性」は、例えば結果に基づいて試験された調製品を酢酸グラチラマーである、または酢酸グラチラマーでないと同定または識別することで評価される。安定性は、候補薬剤のサイトカイン誘導プロフィールを参照薬剤と経時的に比較することで、評価できる。いくつかの実施態様では、サイトカイン誘導プロフィールは参照薬剤との等価性の指標として使用できる。

【0044】

一実施態様では、サイトカイン調節性タンパク質の誘導は、免疫学的方法を使用して検出される。サイトカイン調節性タンパク質の誘導を検出するのに使用できる免疫学的方法としては、ウエスタンブロットなどの免疫ベースの技術を使用した競合的および非競合的アッセイシステム、放射免疫測定法、ELISA(酵素結合免疫吸着測定法)、マルチプレックスELISA、「サンドイッチ」免疫測定法、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル

10

20

30

40

50

拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射線測定法、蛍光免疫測定法、プロテインA免疫測定法などが挙げられるが、これに限定されるものではない。このようなアッセイは、日常的であり当該技術分野で知られている（例えばここでその全体を参照によって援用する Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York を参照されたい）。例示的な免疫測定法については、下で簡単に述べられている（しかし限定は意図されない）。

【0045】

免疫沈降法プロトコルは、一般に（任意に例えばエチレンジアミンテトラ酢酸（EDTA）、フェニルメタンスルホニルフッ化物（PMSF）、アプロチニン、バナジン酸ナトリウムなどのタンパク質ホスファターゼおよび/またはプロテアーゼ阻害剤が添加された）アッセイ培地から上清を得るステップと、目的とする結合分子（すなわち目的とするサイトカイン調節性タンパク質と特異的に結合する抗体などの分子）を上清に添加して、約4℃で一定期間（例えば1～4時間）インキュベートするステップと、プロテインAおよび/またはプロテインGセファロースビーズを細胞溶解産物に添加して、約4℃で約1時間以上インキュベートして、ビーズを緩衝液で洗浄して、ビーズをドデシル硫酸ナトリウム（SDS）/サンプル緩衝液に再懸濁するステップを含む。目的とする結合分子が特定の抗原を免疫沈降させる能力は、例えばウエスタンブロット分析によって評価できる。当業者は、結合分子のサイトカイン調節性タンパク質への結合を増大させ、バックグラウンドを低下させるために修正できるパラメーター（例えばセファロースビーズを用いた上清の事前クリーニング）についての知識があるであろう。免疫沈降法プロトコルに関するさらなる考察については、例えばここでその全体を参照によって本明細書に援用する Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York 10.16.1 を参照されたい。

【0046】

ウエスタンブロット分析は、一般にタンパク質サンプルをアッセイ上清から調製するステップと、タンパク質サンプルをポリアクリルアミドゲル（例えば抗原の分子量に応じて8%～20% SDS-PAGE）中で電気泳動するステップと、タンパク質サンプルをポリアクリルアミドゲルからニトロセルロース、PVDFまたはナイロンなどの膜に転移して、膜をブロッキング溶液（例えば3%のBSAまたは脱脂乳添加PBS）中でブロックして、膜を洗浄緩衝液（例えばPBS-ツイーン（Tween）20）液で洗浄するステップと、膜を緩衝液で希釈された目的とする分子（例えば目的とするサイトカイン調節性タンパク質に対して特異的な抗体）によってブロックして、膜を洗浄緩衝液で洗浄するステップと、膜をブロッキング緩衝液で希釈された酵素基質（例えばホースラディッシュペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）または放射性分子（例えば³²Pまたは¹²⁵I）に結合する抗体（結合分子を認識する、例えば二次抗体など）によってブロックして、膜を洗浄緩衝液で洗浄するステップと、サイトカイン調節性タンパク質の存在を検出するステップを含む。当業者は、検出シグナルを増大させ、バックグラウンドノイズを低下させるために修正できるパラメーターについての知識があるであろう。ウエスタンブロットプロトコルに関するさらなる考察については、例えばここでその全体を参照によって本明細書に援用する Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York 10.8.1 を参照されたい。

【0047】

ELISAは、サイトカイン調節性タンパク質を調製するステップと、目的とするサイトカイン調節性タンパク質、または目的とするサイトカイン調節性タンパク質を含むアッセイ上清で、96ウェルマイクロタイタープレートのウェルを被覆するステップと、酵素

基質（例えばホースラディッシュペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）などの検出可能な化合物と結合する、目的とする結合分子をウェルに添加して、一定期間インキュベートするステップと、サイトカイン調節性タンパク質の存在を検出するステップを含む。ELISAでは、目的とする結合分子は検出可能な化合物と結合していなくてもよく、代わりに検出可能な化合物と結合する（目的とする結合分子を認識する）抗体をウェルに添加してもよい。さらに目的とするサイトカイン調節性タンパク質、または目的とするサイトカイン調節性タンパク質を含むアッセイ上清でウェルを被覆する代わりに、結合分子でウェルを被覆してもよい。この場合、目的とするサイトカイン調節性タンパク質、または目的とするサイトカイン調節性タンパク質を含むアッセイ上清を被覆されたウェルに添加するのに続いて、検出可能な化合物に結合する抗体を添加してもよい。当業者は、検出シグナルを増大させるために修正できるパラメーター、ならびに当該技術分野で知られているELISAのその他の変法についての知識があるであろう。ELISAに関するさらなる考察については、例えばここでその全体を参照によって本明細書に援用する Ausubel et al, eds., 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York 11.2.1を参照されたい。様々なELISAキットは、BioSource International (Montreal, Canada)、BD Biosciences (San Jose, CA)、R&D Systems (Minneapolis, MN)、Millipore Corp. (Bedford, MA)、およびPierce (Rockville, IL)などの商業的供給元から得てもよい。

10

20

【0048】

測定されるサイトカイン調節性タンパク質と特異的に結合する分子（抗体またはアプタマーなどの「親和性試薬」）を利用した親和性ベースの測定もまた使用してもよく、ならびに分光法ベースの技術（例えばマトリックス支援レーザー脱離イオン化法 - 飛行時間型 (MALDI-TOF) 分光法）などのその他の技術についても同様である。

【0049】

親和性ベースの技術としては、抗体ベースのアッセイ（上述のような免疫測定法）およびELONAなどのアプタマー（その他の分子と特異的に結合する核酸分子）を用いたアッセイが挙げられる。さらに抗体およびアプタマーの双方を用いたアッセイ（例えば捕捉のための抗体および検出のためのアプタマーを用いたサンドイッチ形式アッセイ）もまた考えられる。一般にアプタマーは、ほぼ全ての免疫測定形式で抗体に置き換えてもよいが、アプタマーは追加的なアッセイ形式（PCRなどの核酸増幅技術を使用した結合アプタマーの増幅（米国特許第4,683,202号明細書）など）または複合材プライマーによる等温増幅（米国特許第6,251,639号明細書および同第6,692,918号明細書）を可能にする。

30

【0050】

親和性ベースのアッセイは、サンドイッチ型の形式を利用した競合または直接反応形式であってもよく、さらに異種性（例えば固体担体を利用する）または均質（例えば単一相内で起きる）であってもおよび/または免疫沈降法を利用してもよい。ほとんどのアッセイは標識された親和性試薬（例えば抗体、ポリペプチド、またはアプタマー）の使用を伴い、標識は、例えば酵素的、蛍光性、化学発光性、放射性、または染料分子であってもよい。プローブからのシグナルを増幅するアッセイについてもまた知られており、その例は、ビオチンおよびアビジンを利用するアッセイ、およびELISAおよびELONAアッセイなどの酵素標識および酵素媒介免疫測定法である。

40

【0051】

異種性形式では、アッセイは2相（典型的に水性液および固体）を利用する。典型的にサイトカイン調節性タンパク質に特異的な親和性試薬は固体担体に結合して、サンプルの大半からのサイトカイン調節性タンパク質の分離を促進する。親和性試薬/サイトカイン調節性タンパク質複合体の形成に十分な時間の反応後、典型的に、結合ポリペプチドの検

50

出に先だって、抗体を含有する固体担体または表面を洗浄する。サイトカイン調節性タンパク質を測定するアッセイでは、親和性試薬を担体（例えば固体または半固体）上に提供してもよく、あるいはサンプル中のポリペプチドを担体または表面上に固定化できる。使用できる担体の例は、ニトロセルロース（例えば膜またはマイクロタイターウェル形態）、ポリ塩化ビニル（例えばシートまたはマイクロタイターウェル形態）、ポリスチレンラテックス（例えばビーズまたはマイクロタイタープレート形態）、フッ化ポリビニリデン、ジアゾ化紙、ナイロン膜、活性化ビーズ、ガラス、およびプロテインAビーズである。これらのアッセイについては、標準および競合形態の双方が当該技術分野で知られている。

【0052】

複数のサイトカイン調節性タンパク質を用いて本発明の方法を実施する場合には、アレイ型異種性アッセイがサイトカイン調節性タンパク質のレベルを測定するのに適する。本発明の方法の実施において使用されるアレイ型アッセイは、基材に所定のパターン（例えば格子）で結合する、異なるサイトカイン調節性タンパク質に対して特異的な2つ以上の捕捉試薬がある固体基材を一般に利用する。サンプル（例えばアッセイ上清）は基材に塗布され、サンプル中のサイトカイン調節性タンパク質が捕捉試薬によって捕捉される。サンプルの除去（および適切な洗浄）後、様々なサイトカイン調節性タンパク質に特異的に結合する適切な検出試薬の混合物を使用して、結合サイトカイン調節性タンパク質を検出する。検出試薬の結合は、一般に蛍光染料ベースのシステムなどの視覚的システムを使用して達成される。捕捉試薬は基材上に所定のパターンで配列されるので、アレイ型アッセイは、多重検出システムの必要なしに複数のサイトカイン調節性タンパク質を検出する利点を提供する。

【0053】

均質形式では、アッセイは単一相（例えば水性液相）内で行われる。典型的にサンプルは、溶液中のサイトカイン調節性タンパク質に対して特異的な親和性試薬と共にインキュベートされる。例えばそれは、形成する任意の親和性試薬/抗体複合体を沈殿させる条件下であってもよい。これらのアッセイについては、標準および競合的形式の双方が当該技術分野で知られている。

【0054】

標準（直接反応）形式では、サイトカイン調節性タンパク質/親和性試薬複合体のレベルは、直接モニターされる。これは例えば結合中でサイトカイン調節性タンパク質/親和性試薬複合体を形成する、標識された検出試薬の量を判定することで達成されてもよい。競合的形式では、サンプル中のサイトカイン調節性タンパク質の量は、複合体中における、既知量の標識されたサイトカイン調節性タンパク質（またはその他の競合リガンド）の結合に対する競合効果をモニターすることによって、推定される。結合または複合体形成の量は、定性的にまたは定量的に判定できる。

【0055】

免疫測定法に加えて、サイトカイン調節性タンパク質をコードする遺伝子の、またはレポーター遺伝子の発現パターンを評価することにより誘導が測定できる。例えば発現パターンは、ノーザン分析、PCR、RT-PCR、TaqMan分析、リボヌクレアーゼプロテクションアッセイ、FRET検出、1つ以上の分子ビーコンのモニタリング、オリゴヌクレオチド配列とのハイブリダイゼーション、cDNA配列とのハイブリダイゼーション、ポリヌクレオチド配列とのハイブリダイゼーション、液体マイクロアレイとのハイブリダイゼーション、微小電気アレイとのハイブリダイゼーション、cDNA配列決定、クローンハイブリダイゼーション、cDNA断片フィンガープリント法などによって評価できる。選ばれる特定の方法は、回収されたRNAの量、当業者の好み、入手できる試薬、および機材、検出器などの要因に左右されるであろう。

【0056】

当業者によって理解されるであろうように、シグナルの検出様式は、アッセイで利用される正確な検出システムに依存する。例えば放射標識された検出試薬が利用される場合、

10

20

30

40

50

シグナルは、シンチレーション測定、（典型的にスキャニングデンシトメトリーと併用される）オートラジオグラフィなど、サンプルからのシグナルを定量でき、またはサンプルからのシグナルと参照サンプルからのシグナルとを比較できる技術を使用して測定される。化学発光検出システムが使用される場合、信号は典型的に照度計を使用して検出される。検出システムからシグナルを検出する方法は当該技術分野でよく知られており、ここでさらに詳しく述べる必要はない。

【0057】

2つ以上のサイトカイン調節性タンパク質を測定する場合、サンプルをいくつかのアリコートに分割し、別々のアリコートを使用して異なるサイトカイン調節性タンパク質を測定してもよい（特定のサンプル中のサイトカイン調節性タンパク質レベルの多重判定を可能にする、サンプルの複数のアリコートへの分割もまた考察される）。あるいは、アレイ型アッセイまたは多重検出技術を用いるアッセイ（例えば異なる蛍光染料マーカで標識された検出試薬を用いるアッセイ）など、単一アッセイ中で異なるサイトカイン調節性タンパク質の個々のレベルを測定できるアッセイを使用して、サンプル（またはそれからのアリコート）を試験し、単一反応中の複数のサイトカイン調節性タンパク質のレベルを判定してもよい。

10

【0058】

当該技術分野では、「反復」測定を実施することが一般的である。反復測定は、通常、サンプルを複数のアリコートに分割し、同一アッセイシステムの別々の反応中でバイオマーカーを別々に測定して得られる。反復測定値は本発明の方法にとって必ずしも必要でないが、本発明の多くの実施態様は、反復試験、特に二連および三連試験を利用する。いくつかの実施態様では、参照薬剤および候補薬剤は、同一細胞培養から得られた細胞の別々のアリコートを使用してアッセイされる。別の実施態様では、参照薬剤（および/または負の対照）および候補薬剤は、同一バッチの細胞を使用してアッセイされる。この実施態様では、各薬剤を異なる時点でアッセイし、アッセイ培地を測定ごとに入れ替えて、各測定に続いて細胞が適切な細胞濃度を回復できるようにする。

20

【0059】

ここで述べられる方法を実行でき、および/または結果を記録できる任意の装置を使用して、方法を実行し、および/または結果を記録してもよい。使用してもよい装置の例としては、任意のタイプのコンピュータを含む電子的計算装置が挙げられるが、これに限定されるものではない。ここで述べられる方法をコンピュータ内で実行し、および/または記録する場合、コンピュータが方法のステップを遂行するよう設定するのに使用してもよいコンピュータプログラムは、コンピュータプログラムを含有できる任意のコンピュータ可読媒体に含有されてもよい。使用してもよいコンピュータ可読媒体の例としては、ディスク、CD-ROM、DVD、ROM、RAM、およびその他のメモリー、およびコンピュータの記憶装置が挙げられるが、これに限定されるものではない。コンピュータが方法のステップを遂行し、および/または結果を記録するよう設定するのに使用してもよいコンピュータプログラムは、例えばインターネット、イントラネット、またはその他のネットワーク経由など、電子ネットワーク経由で提供されてもよい。

30

【0060】

測定される値と基準値とを比較する過程は、測定される値と件のサイトカイン調節性タンパク質基準値とのタイプに適した任意の都合のよい様式で実施できる。上で考察したように、「測定」は定量的または定性的測定技術を使用して実施でき、測定される値と基準値との比較様式は用いられる測定技術に応じて変動できる。例えば定性的比色分析アッセイを使用してサイトカイン調節性タンパク質レベルを測定する場合、着色反応生成物の強度を視覚的に比較することで、または着色反応生成物の濃度測定または分光測定からのデータを比較することで（例えば測定装置に由来する数値データまたは棒グラフなどのグラフデータを比較することで）、レベルを比較してもよい。しかし本発明の方法で使用される測定される値は、最も一般的には、定量値であることが予期される（例えばサンプル1ミリリットル当たりのサイトカイン調節性タンパク質のナノグラムなどの濃度、または絶

40

50

対量の定量的測定)。その他の例では、測定される値は定性的である。定性的測定と同様に、数値データを調べることで、またはデータの表示を調べる(例えば棒グラフまたは折れ線グラフなどのグラフ表示を調べる)ことで比較ができる。

【0061】

測定される値は、それが基準値の約80%~約125%であれば、一般に基準値と実質的に類似していると思なされる。

【0062】

比較過程は、手動(方法実行者による外観検査など)であってもよく、またはそれは自動化されてもよい。例えばアッセイ装置(化学発光シグナルを測定する照度計など)は、測定される値とサイトカイン調節性タンパク質の基準値とを比較できるようにする回路網およびソフトウェアを含んでもよい。あるいは、別個の装置(例えばデジタルコンピュータ)を使用して、測定される値と基準値とを比較してもよい。比較のための自動化装置は、測定されるサイトカイン調節性タンパク質に関する記憶された基準値を含んでもよく、またはそれらは測定される値と、同時に測定される参照サンプル(例えば酢酸グラチラマーサンプル)に由来する基準値とを比較してもよい。

10

【0063】

当業者には明らかであるように、試験されるバイオマーカーについて反復測定値を採用する場合、基準値と比較される測定される値は、反復測定値を考慮に入れた値である。反復測定値は、測定される値の平均値または中央値のどちらかを「測定される値」として使用することで、考慮に入れてもよい。

20

【0064】

酢酸グラチラマーを調製する方法

本発明の方法および組成物は、酢酸グラチラマーのバッチの1つ以上の特性を評価するのに有用である。方法は、酢酸グラチラマーのバッチを調製するステップと、本明細書に記載のアッセイを使用して、安定性、特異性、効力、および生物学的活性の1つ以上を評価するステップと、酢酸グラチラマーのバッチの特性と、基準化合物(例えば酢酸グラチラマーの標準化バッチ、例えば治療用途のために認可されたもの)の特性、または基準化合物の基準値(例えば酢酸グラチラマーに関する医薬品規格)とを比較するステップを含む。少なくとも所定のレベルの1つ以上のサイトカイン調節性タンパク質が検出されれば、酢酸グラチラマーのバッチは医薬用途のために許容可能であると言われる。「所定のレベル」とは、基準化合物を使用して検出できるもの、または酢酸グラチラマーに関する医薬品規格で規定されたものである。

30

【0065】

以下の実施例は、ここで開示される主題の代表的な実施態様を実施するための指針を当業者に提供するために含まれる。本開示および当該技術分野の一般技術レベルに照らして、当業者は、以下の実施例があくまで例示を意図し、ここで開示される主題の範囲を逸脱することなく、多数の変形、修正、および変更が用いられることを理解できるであろう。したがって以下の実施例は、限定のための手段ではなく、例示のための手段として提供される。

40

【実施例】

【0066】

実施例1:コポリマーアッセイ

方法

THP-1細胞(ATCC、TIB-202)は、American Type Culture Collection(ATCC)から入手された。THP-1細胞は、指標細胞-DNA蛍光色素染色アッセイ(cat.#M-250, Bionique Testing Laboratories, Inc., Saranac Lake, NY)と組み合わせられた複数培地直接培養アッセイを使用して、マイコプラズマ汚染を含まないことが示された。細胞を完全な増殖培地内で成育させ、37、5%CO₂の恒温器内でインキュベートした。

50

【0067】

アッセイ培地をアッセイ当日に新鮮に調製した。アッセイ培地は、X - V I V O 15 無血清培地 (Cambrex, 04 - 418Q) 中の2mMのGlutamax I Supplement (Invitrogen, 35050 - 79) を含有した。これらの試薬は、0.2ミクロンの酢酸セルロースフィルターユニット (Nalgene, 156 - 4020) 内で濾過された。濾過後、瓶をホイルで覆って培地を光から保護した。

【0068】

COPAXONE (登録商標) (酢酸グラチラマー; Teva Pharmaceuticals) は、4 で製造業者のシリンジ内に保存した。サンプルを無菌シリコン処理微量遠心管内で、2 x IFN - アッセイ培地中に2 x 濃度で調製した。アッセイでは、0 μg / ml ~ 400 μg / ml の最終濃度を試験した。

10

【0069】

ヒトIFN - (R&D Systems, 285 - IF - 100) をリン酸緩衝食塩水 (PBS) 中の無菌0.2%ウシ血清アルブミン (BSA) (Chemicon, 3225 - 80) で戻した。

【0070】

アッセイの1日前に、THP - 1細胞を2 x 10⁵ 細胞 / ml (20ml最終体積) で播種した。これらの細胞を18 において400 x gで5分間の遠心分離によって収集した。細胞をアッセイ培地 (IFN - なし) で1回洗浄し、アッセイ培地 (IFN - なし) に再懸濁して計数した。THP - 1細胞をアッセイ培地 (最終濃度0、1、10、および100 ng / mlのIFN -) 中に5 x 10⁵ 細胞 / mlで再懸濁した。マルチチャンネルピペッターを用いて、細胞をウェル当たり50 μlで、低濃度から高濃度の酢酸グラチラマー (50、10、2、および0 ng / ml) に播種した。アッセイプレートを37 で5%CO₂の恒温器内で0~23時間インキュベートした。

20

【0071】

馴化培地を非無菌シリコン処理管内に採取した。管を400 x gで5分間4 で遠心分離した。上清を新しいシリコン処理管に移し、液体窒素内で急速冷凍した。Searchlight多重サイトカイン分析 (Pierce Endogen, Woburn, MA) に供されるまで、冷凍順化培地を - 80 で保存した。

30

【0072】

結果

タンパク質の広範なパネルに対するCOPAXONE (登録商標) の効果:

THP - 1細胞からのサイトカイン、ケモカイン、可溶性受容体、およびプロテアーゼの幅広いパネルの分泌に対する、IFN - と組み合わせさせたCOPAXONE (登録商標) の効果を調べた。COPAXONE (登録商標) の添加は、ケモカインIP - 10の分泌に著しい増大を誘導した (表1)。IP - 10はCXCR3受容体に結合するIFN - 調節性ケモカインである。IFN - は実験開始時に外来性に添加されたにも関わらず、COPAXONE (登録商標) 処理はまた、興味深いことに、24時間目に培地中で観察された、より高レベルのIFN - をもたらした。IFN - 生成に対するCOPAXONE (登録商標) の効果が、ある程度、IP - 10分泌に対するその相乗作用の原因であるかもしれない。それぞれCCR2およびCCR4受容体に結合するMCP - 1およびMDCなどのその他のケモカインもまたCOPAXONE (登録商標) に対する強い分泌応答を示したが、誘導の規模は、IP - 10 (表1) によって観察されたものほど高くなかった。同様に、IL6などのその他のサイトカインは、COPAXONE (登録商標) およびIFN - に対する相乗的応答を示した。RANTESおよびTARCなどのいくつかのケモカイン、およびIL - 10、IL12、p70、TNFアルファ、TIMP1、およびMMP9などのサイトカインは、COPAXONE (登録商標) 処置による小さな増加を示した。

40

【0073】

(表1) THP-1からのケモカインおよびサイトカイン分泌に対するCOPAXONE (登

50

録商標) 処置の効果

ケモカイン	IP10	MCP1	MDC	I309	IL-8	MIP1 α	RANTES	TARC
IFN γ 単独 (10 ng/ml)	17.9*	32.3*	2.2*	1.6*	25.6*	10.5*	96.7*	11.7*
IFN γ + 50 μ g/ml I356	4060.5*	688.2*	23.6*	15.6*	217.1*	73.9*	352.2*	35.2*
倍数的増加	226.3	21.3	10.6	9.7	8.5	7.1	3.6	3.0

サイトカイン	IFN γ	IL-6	IL1 β	IL-10	IL12p70	TNF α
IFN γ 単独 (10 ng/ml)	470.9*	0.2*	0.2*	0.4*	4.6*	33.3*
IFN γ + 50 μ g/ml I356	4575.9*	3.8*	0.5*	0.7*	8.9*	61.3*
倍数的増加	9.7	19.0	2.4	2.0	1.9	1.8

10

レセプター/プロテアーゼ	ICAM1	MMP2	TNFR1	TNFR2	TIMP1	MMP9
IFN γ 単独 (10 ng/ml)	46.4*	158.2*	6.9*	11.0*	3848.4*	39.1*
IFN γ + 50 μ g/ml I356	279.9*	915.9*	35.8*	34.4*	6364.3*	8.9*
倍数的増加	6.0	5.8	5.2	3.1	1.7	0.2

* pg/ml

【 0 0 7 4 】

相乗効果：

アッセイのいくつかの実施態様は、相乗効果を示す。図1は、IP-10およびその他のケモカインの分泌に対するCOPAXONE（登録商標）およびIFN- γ の相乗効果を例示する。IFN- γ 単独で処理されたTHP-1細胞は、IP-10、I-TAC、およびMIG（全てCXCR3リガンド）のわずかな生成のみを示した。IFN- γ と併用されたCOPAXONE（登録商標）の添加は、3つの全ケモカインの分泌に対する著しい濃度依存効果を誘導した。50 μ g/mlのCOPAXONE（登録商標）および10 ng/mlのIFN- γ の存在下で分泌されたIP-10、I-TAC、およびMIGのレベルは、IFN- γ を単独で含有するベースラインよりもそれぞれ329-、412-、および573倍高かった。24時間目に測定されたIFN- γ レベルは、COPAXONE（登録商標）処理による濃度依存性増大もまた示した。THP-1細胞は、様々な濃度のウシ胎仔血清（FBS）の存在下で、またはX-VIVO15無血清培地で培養された。COPAXONE（登録商標）は全ての条件において、3つのケモカイン、IP-10、MIG、およびI-TAC全ての強い分泌、ならびにIFN- γ の分泌を誘導したが、X-VIVO15無血清合成培地中で培養された細胞が、ベースラインからの最も高い倍数的増加を示した。同様の応答は、その他の2つのヒト骨髄性細胞系U-937およびHL-60、および初代ヒト樹状細胞についても見られた。

20

30

【 0 0 7 5 】

表2は、23時間目のIFN- γ 単独と比べたCOPAXONE（登録商標）およびIFN- γ 処理によるIP-10、I-TAC、およびMIGの倍数的増加を示す。ベースラインからの倍数的増加は、1~10 ng/mlのIFN- γ で最大である。重要なことにTHP-1細胞は、IFN- γ 不在下においてCOPAXONE（登録商標）で処理されるといかなる顕著な量のIP-10も生成せず、IFN- γ 単独（COPAXONE（登録商標）不在下で）は、少量のケモカイン分泌のみを誘導する。COPAXONE（登録商標）およびIFN- γ の相乗効果は、表2で明らかに例示される。より低レベルのIP-10、I-TAC、およびMIGは、COPAXONE（登録商標）とより高いIFN- γ 濃度を用いた、3~6時間程度の処理のアッセイで検出できる。しかしダイナミックレンジは18~24時間目により良くなり、より低いIFN- γ 濃度が使用できる。

40

【 0 0 7 6 】

(表2) 23時間目のケモカイン誘導(対照(0)の倍数的増加で表される)

	IP-10			I-TAC			MIG		
	GA (µg/ml)			GA (µg/ml)			GA (µg/ml)		
	0	2	10	0	2	10	0	2	10
IFN γ 0 ng/ml	0	0	0	1	1	4	1	1	1
IFN γ 10 ng/ml	1	72	233	1	10	51	1	21	284
IFN γ 100 ng/ml	1	49	67	1	46	113	1	39	333
IFN γ 1000 ng/ml	1	13	14	1	23	49	1	23	160

【 0 0 7 7 】

用量依存性：

表 3 は、アッセイの濃度依存性を示す。酢酸グラチラマー（GA）の各濃度における、IFN- γ （10 ng/ml）が媒介する IP-10、I-TAC、および MIG の誘導について、pg/ml 値を標準偏差と共に示す。各値は、それぞれ 22～24 時間のインキュベーションで測定された、二連の点がある 6 つの独立した THP-1 アッセイからの 12 個のサンプルを表す。この場合、読み取りは Endogen Searchlight 多重 ELISA アッセイであった。絶対 pg/ml 数は検出法に応じて異なる。例えば Endogen Searchlight 多重 ELISA アッセイと標準 ELISA との間で、5～10 倍の差が見られるかもしれない。絶対数は、インキュベーション時間と IFN- γ の濃度に応じて異なる。それにもかかわらず同一アッセイ形式および方法内では、試験調製品を用いて得られた値を比較するために、アッセイを使用して、2 つ以上のコポリマー調製品を比較し、および/または基準値（例えば等価性範囲）を判定できる。

【 0 0 7 8 】

（表 3）酢酸グラチラマー（GA）の用量依存性

[GA] mg/ml	IP-10 pg/ml + 標準偏差		I-TAC pg/ml + 標準偏差		MIG pg/ml + 標準偏差	
0	13.5	2.8	3.2	0.8	13.6	2.3
0.78	259.2	69.1	16.5	5.2	149.7	33.2
1.56	483.7	87	42.1	12.8	345.6	69.3
3.13	580.8	107	82.6	9.1	933.6	132.9
6.25	581.4	124.7	105.9	15	2704.5	650.9
12.5	782.6	179.9	179.2	21.9	3608	635.2
25	829	135.2	247.1	41	4480.6	726.4
50	2150.8	840.1	532.6	129.4	13771.2	5694
100	12865.1	1839.5	2444	238.4	45353.3	8983.7
200	10899	1933.7	2091.2	250.9	37897.5	8052.1
400	6111.3	976.7	1560.5	220.8	27574.5	4725.5

【 0 0 7 9 】

概要

この実施例は、炎症促進性サイトカイン（例えば IFN- γ ）からの刺激に応えた、酢酸グラチラマーが媒介する例えばケモカイン IP-10、MIG、および I-TAC、などのサイトカイン誘導が、酢酸グラチラマーの活性（例えば効力、純度、経時的安定性、生物学的活性または参照標準との等価性の 1 つ以上）を評価するのに使用できることを示す。一般に比較アッセイ中により大きな増強を有するサンプルは、より大きな効力または安定性と関連付けられる。

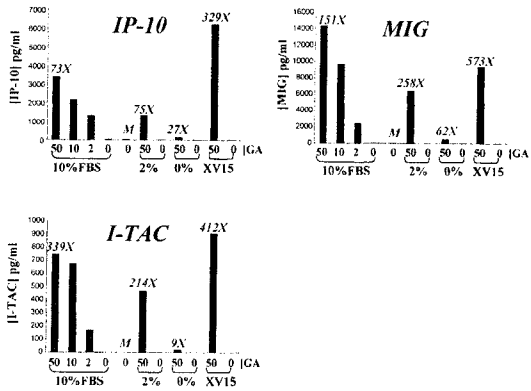
【 0 0 8 0 】

IFN- γ の存在下における、酢酸グラチラマーが媒介する IP-10、MIG、および I-TAC の分泌の増強は意外な結果である。これらの 4 つの可溶性因子は、典型的に Th1 炎症促進性サイトカイン応答と関連付けられており、酢酸グラチラマーは、Th1 応答を抑制し Th2 応答を促進することで、ある程度作用すると考えられている。

【 0 0 8 1 】

酢酸グラチラマーの正確な作用機序は複雑であり、依然として完全に理解されていないが、本方法は試験または候補コポリマー調製品の（例えばCOPAXONE（登録商標）の等価性または医薬品規格範囲の等価性などの）活性、効力、安定性、特異性について、サンプルコポリマー調製品を測定する方法を提供する。

【 図 1 】



【手続補正書】

【提出日】平成22年3月15日(2010.3.15)

【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】

(a) 少なくとも1つの骨髄性細胞を提供するステップと、(b) IFN- γ によって誘導される1つ以上のタンパク質を細胞が発現するのを誘導させるのに十分な濃度と期間で、少なくとも1つの細胞と、一定量のコポリマー1およびIFN- γ とを接触させるステップと、(c) IFN- γ によって誘導されるタンパク質を検出して、コポリマー1の活性を評価するステップとを含むコポリマー1の活性を評価する方法。

【請求項2】

(a) 少なくとも1つの骨髄性細胞を提供するステップと、(b) IFN- γ によって誘導される1つ以上のタンパク質を細胞が発現するのを誘導させるのに十分な濃度と期間で、少なくとも1つの骨髄性細胞と、一定量のコポリマー1およびIFN- γ とを接触させるステップと、(c) 誘導タンパク質の発現、分泌、誘導、存在またはレベルを測定するステップと、(d) 誘導タンパク質の、測定された発現、分泌、誘導、存在またはレベルと、酢酸グラチラマーの市販医薬品の基準値、サイトカイン誘導プロフィールまたは医薬品規格とを比較して、コポリマー1の特性を評価するステップと、を含む、コポリマー1の活性を評価する方法。

【請求項3】

誘導タンパク質がIFN- γ - 調節性ケモカインである、請求項1または請求項2に記載の方法。

【請求項4】

誘導タンパク質の生成、分泌、誘導、存在またはレベルの値と、酢酸グラチラマーの市販医薬品の基準値、サイトカイン誘導プロフィールまたは医薬品規格とを比較するステップである、ステップ(d)をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

酢酸グラチラマーの市販医薬品の基準値、サイトカイン誘導プロフィールまたは医薬品規格特性が、効力、特異性、安定性、活性、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される特性に相当する値である、請求項2または請求項4に記載の方法。

【請求項6】

ステップ(d)が、印刷またはコンピュータ可読媒体で値を記録するステップを含む、請求項2または請求項4に記載の方法。

【請求項7】

少なくとも1つの骨髄性細胞が、骨髄性細胞系および初代骨髄性細胞からなる群から選択される、請求項1または請求項2に記載の方法。

【請求項8】

IFN- γ によって誘導される1つ以上のタンパク質が、 α -インターフェロン-誘導性タンパク質10(IP-10)、インターフェロン-誘導性T細胞-化学誘引物質(ITAC)、および β -インターフェロンによって誘導されるモノカイン(MIG)からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

コポリマー1の濃度が、 $0.05 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 1 \text{mg}/\text{mL}$ 、 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 50$

0 μg/mL、または0.5 μg/mL ~ 100 μg/mLである、請求項1または請求項2に記載の方法。

【請求項10】

ステップ(b)のIFN-濃度が、(i) IFN-不在下で細胞をコポリマー1と接触させた場合のタンパク質発現、および(ii) コポリマー1不在下で細胞をIFN-と接触させた場合のタンパク質発現の合計よりも大きいレベルでタンパク質発現を誘導する、請求項1または請求項2に記載の方法。

【請求項11】

IFN-の濃度が、0.01 ng/mL ~ 100 ng/mL、1 ng/mL ~ 50 ng/mL、または約10 ng/mLである、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

期間が、1時間 ~ 48時間、6時間 ~ 36時間または12時間 ~ 24時間である、請求項1または請求項2に記載の方法。

【請求項13】

コポリマー1の濃度が0.5 μg/mL ~ 100 μg/mLであり、IFN-が1 ng/mL ~ 50 ng/mLで存在し、期間が12時間 ~ 24時間であり、細胞がTHP-1細胞である、請求項1または請求項2に記載の方法。

【請求項14】

(a) 少なくとも1つの骨髓性細胞を提供するステップと、

(b) 少なくとも1つの骨髓性細胞を

(i) IFN-によって誘導されるタンパク質を細胞が発現するのを誘導させるのに十分な濃度と期間で、一定量のコポリマー1の第1のサンプルおよびIFN-と、

(ii) IFN-によって誘導されるタンパク質を細胞が発現するのを誘導させるのに十分な濃度と期間で、一定量のコポリマー1の第2のサンプルおよびIFN-と別々に接触させるステップと、

(c) ステップ(b)(i)の少なくとも1つの骨髓性細胞によって発現されるIFN-誘導タンパク質を検出して、コポリマー1の第1のサンプルの活性を評価するステップと、

(d) ステップ(b)(ii)の少なくとも1つの骨髓性細胞によって発現されるIFN-誘導タンパク質を検出して、コポリマー1の第2のサンプルの活性を評価するステップと、

(e) コポリマー1の第1のサンプルの活性と、コポリマー1の第2のサンプルの活性とを比較するステップと

を含む、コポリマー1の少なくとも2つのサンプルを比較する方法。

【請求項15】

コポリマー1のサンプルの少なくとも1つが参照標準である、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

コポリマー1のサンプルの少なくとも1つが酢酸グラチラマーである、請求項14に記載の方法。

【請求項17】

少なくとも1つの骨髓性細胞が、骨髓性細胞系および初代骨髓性細胞からなる群から選択される、請求項14に記載の方法。

【請求項18】

IFN-によって誘導される1つ以上のタンパク質が、-インターフェロン-誘導性タンパク質10 (IP-10)、インターフェロン-誘導性T細胞-化学誘引物質 (I-TAC)、および-インターフェロンによって誘導されるモノカイン (MIG)からなる群から選択される、請求項14に記載の方法。

【請求項19】

コポリマー1の第1のサンプルの濃度およびコポリマー1の第2のサンプルの濃度が0

． 0 5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ~ 1 mg / mL である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 0】

コポリマー 1 の濃度が 0 . 1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ~ 5 0 0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

コポリマー 1 の濃度が 0 . 5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ~ 1 0 0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

I F N - の濃度が 0 . 0 1 ng / mL ~ 1 0 0 ng / mL である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 3】

I F N - の濃度が 1 ng / mL ~ 5 0 ng / mL である、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

コポリマー 1 の濃度が約 1 0 ng / mL である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

期間が 1 時間 ~ 4 8 時間、6 時間 ~ 3 6 時間、1 2 時間 ~ 2 4 時間 である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

コポリマー 1 の第 1 のサンプルの活性が、コポリマー 1 の第 2 のサンプルの活性の 8 0 % ~ 1 2 0 % の範囲内である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 7】

(a) 酢酸グラチラマーのバッチを提供するステップと、

(b) 請求項 1 または請求項 2 のいずれか一項に従ってバッチの特性を評価するステップと、

(c) サイトカインによって調節される 1 つ以上のタンパク質のレベルが、酢酸グラチラマーの基準値に一致する場合、バッチが医薬用途のために許容可能であることを判定するステップと

を含む、酢酸グラチラマーの医薬組成物を調製する方法。

【請求項 2 8】

基準値が、酢酸グラチラマーの市販医薬品の効力、特異性、安定性、および / または生物学的活性に関する、サイトカイン誘導プロフィール、等価性範囲または医薬品規格である、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

(a) 骨髄性細胞を提供するステップと、

(b) 細胞が I F N - 誘導タンパク質を発現するのを誘導させるのに十分な濃度と期間で、細胞と、(i) 一定量の コポリマー 1 および (i i) I F N - とを接触させるステップと、

(c) I F N - - 誘導タンパク質の存在、レベル、生成、分泌、誘導と、酢酸グラチラマーの基準値とを比較するステップと

を含む、コポリマー 1 調製品の活性、効力、特異性または安定性を評価する方法。

【請求項 3 0】

基準値が、酢酸グラチラマーの市販医薬品の活性、効力、特異性または安定性に関するサイトカイン誘導プロフィール、等価性範囲または医薬品規格である、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

比較するステップが、1 つ以上の誘導タンパク質の測定された発現、分泌、誘導、存在またはレベルと、酢酸グラチラマーの市販医薬品の基準値、サイトカイン誘導プロフィールまたは医薬品規格との差が、所定の範囲内であるかどうかを判定するステップを含む、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 2】

差が所定の範囲内であれば、コポリマーを分類し、選択し、承認し、廃棄し、リリースし、または保留するステップと、コポリマーを製剤に加工し、コポリマーを含む製品を送り、コポリマーを新しい場所に移動させるステップ、またはコポリマーを商業目的のために配合し、ラベルし、包装し、販売し、売りに出し、またはリリースするステップをさらに含む、請求項30に記載の方法。

【請求項33】

L-アラニンのN-カルボキシ無水物、ベンジル保護L-グルタミン酸、トリフルオロ酢酸(TFA)保護L-リジン、およびL-チロシンを重合して、保護されるコポリマーを生成するステップと、保護されるコポリマーを処理して、保護されるコポリマーを部分的に解重合し、ベンジル保護基を脱保護し、TFA保護リジンを脱保護して、酢酸グラチラマーを生成するステップと、酢酸グラチラマーを単離するステップとを含み、

IFN- α および単離された酢酸グラチラマーのサンプル存在下で、骨髓性細胞または初代骨髓性細胞系中のサイトカイン誘導タンパク質の発現を測定すること、および発現と基準値とを比較することを含む、

酢酸グラチラマーを含む医薬組成物を調製する方法。

【請求項34】

測定される発現と基準値との差が所定の範囲内であれば、医薬組成物の調製で使用するための精製酢酸グラチラマーを選択するステップをさらに含む、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

選択された精製酢酸グラチラマーの少なくとも一部を含む医薬組成物を調製するステップをさらに含む、請求項33に記載の方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0016】

ここで開示される主題によって全部または一部が対処される、上述の開示される主題の特定の態様、その他の態様は、下で最も良く説明されている添付の実施例および図との関連で、説明の進行と共に明らかになるであろう。

[請求項101]

(a) サイトカインによって誘導されるタンパク質を発現できる少なくとも1つの細胞を提供するステップと、

(b) サイトカインによって誘導される1つ以上のタンパク質を細胞が発現するのを誘導させるのに十分な濃度と期間で、少なくとも1つの細胞と、一定量のアミノ酸コポリマーおよびサイトカインとを接触させるステップと、

(c) 誘導タンパク質を検出して、アミノ酸コポリマーの特性を評価するステップとを含む、アミノ酸コポリマーの特性を評価する方法。

[請求項102]

(a) サイトカインによって誘導されるタンパク質を発現できる少なくとも1つの細胞を提供するステップと、

(b) 誘導タンパク質を細胞が発現するのを誘導させるのに十分な濃度と期間で、少なくとも1つの細胞と、一定量のアミノ酸コポリマーおよびサイトカインとを接触させるステップと、

(c) 誘導タンパク質の発現、分泌、誘導、存在またはレベルを測定するステップと、

(d) 誘導タンパク質の、測定された発現、分泌、誘導、存在またはレベルと、酢酸グラチラマーの市販医薬品の基準値、サイトカイン誘導プロフィールまたは医薬品規格とを比較して、アミノ酸コポリマーの特性を評価するステップとを含む、アミノ酸コポリマーを評価する方法。

[請求項103]

サイトカインが炎症性サイトカインである、請求項101または請求項102に記載の方法。

[請求項104]

サイトカインが、腫瘍壊死因子アルファ(TNF)、インターフェロン(IFN)、インターロイキン-1ベータ(IL-1)、インターロイキン-6(IL-6)、およびインターロイキン-8(IL-8)からなる群から選択される、請求項103に記載の方法。

[請求項105]

サイトカインがIFNである、請求項104に記載の方法。

[請求項106]

1つ以上のIFN調節性タンパク質がIFN調節性ケモカインである、請求項105に記載の方法。

[請求項107]

コポリマーが、アミノ酸であるアラニン、リジン、グルタミン酸、およびチロシンを含むコポリマーである、請求項101または請求項102に記載の方法。

[請求項108]

コポリマーが酢酸グラチラマーである、請求項101または請求項102に記載の方法。

[請求項109]

誘導タンパク質の生成、分泌、誘導、存在またはレベルの値と、酢酸グラチラマーの市販医薬品の基準値、サイトカイン誘導プロフィールまたは医薬品規格とを比較するステップである、ステップ(d)をさらに含む、請求項101に記載の方法。

[請求項110]

酢酸グラチラマーの市販医薬品の基準値、サイトカイン誘導プロフィールまたは医薬品規格特性が、効力、特異性、安定性、活性、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される特性に相当する値である、請求項102または請求項109に記載の方法。

[請求項111]

ステップ(d)が、印刷またはコンピュータ可読媒体で値を記録するステップを含む、請求項102または請求項109に記載の方法。

[請求項112]

少なくとも1つの細胞が、骨髄性細胞系および初代骨髄性細胞からなる群から選択される、請求項101または請求項102に記載の方法。

[請求項113]

少なくとも1つの細胞がヒト骨髄性白血病細胞系である、請求項112に記載の方法。

[請求項114]

ヒト骨髄性白血病細胞系が、ヒト急性単球性白血病細胞系(THP-1)、ヒト白血病性単球リンパ腫細胞系(U937)、およびヒト前骨髄球性白血病細胞系(HL-60)からなる群から選択される、請求項113に記載の方法。

[請求項115]

少なくとも1つの細胞がヒト末梢血単核細胞(PBMC)および単球由来樹状細胞からなる群から選択される初代細胞である、請求項112に記載の方法。

[請求項116]

少なくとも1つの細胞が、自己免疫性、炎症性、神経変性性、または脱髄性の、疾患、障害または機能不全を有する対象に由来する、請求項101または請求項102に記載の方法。

[請求項117]

疾患が、多発性硬化症、関節リウマチ、および炎症性腸疾患からなる群から選択される、請求項116に記載の方法。

[請求項118]

1つ以上の細胞が、無血清アッセイ培地に懸濁される、請求項101または請求項102に記載の方法。

[請求項119]

前記サイトカインによって調節される1つ以上のタンパク質が、 -インターフェロン-誘

導性タンパク質10(IP-10)、インターフェロン-誘導性T細胞 -化学誘引物質(I-TAC)、および -インターフェロンによって誘導されるモノカイン(MIG)からなる群から選択される、請求項101に記載の方法。

[請求項120]

アミノ酸コポリマーの濃度が0.05 µg/mL ~ 1mg/mLである、請求項101または請求項102に記載の方法。

[請求項121]

アミノ酸コポリマーの濃度が0.1 µg/mL ~ 500 µg/mLである、請求項120に記載の方法。

[請求項122]

アミノ酸コポリマーの濃度が0.5 µg/mL ~ 100 µg/mLである、請求項121に記載の方法。

[請求項123]

ステップ(b)のサイトカイン濃度が、(i)サイトカイン不在で細胞をアミノ酸コポリマーと接触させた場合のタンパク質発現、および(ii)アミノ酸コポリマー不在で細胞をサイトカインと接触させた場合のタンパク質発現の合計よりも大きいレベルでタンパク質発現を誘導する、請求項101または請求項102に記載の方法。

[請求項124]

サイトカインの濃度が0.01ng/mL ~ 100ng/mLである、請求項123に記載の方法。

[請求項125]

サイトカインの濃度が1ng/mL ~ 50ng/mLである、請求項124に記載の方法。

[請求項126]

サイトカインの前記濃度が約10ng/mLである、請求項125に記載の方法。

[請求項127]

期間が1時間 ~ 48時間である、請求項101または請求項102に記載の方法。

[請求項128]

期間が6時間 ~ 36時間である、請求項127に記載の方法。

[請求項129]

期間が12時間 ~ 24時間である、請求項127に記載の方法。

[請求項130]

アミノ酸コポリマーの濃度が0.5 µg/mL ~ 100 µg/mLであり、サイトカインが1ng/mL ~ 50ng/mLで存在し、期間が12時間 ~ 24時間であり、細胞がTHP-1細胞であり、コポリマーが酢酸グラチラーであり、サイトカインがIFN である、請求項101または請求項102に記載の方法。

[請求項131]

ステップ(c)における検出が抗体ベースの方法を含む、請求項101または請求項102に記載の方法。

[請求項132]

抗体ベースの方法が免疫沈降法を含む、請求項131に記載の方法。

[請求項133]

前記抗体ベースの方法が酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)を含む、請求項131に記載の方法。

[請求項134]

(a)サイトカインによって誘導されるタンパク質を発現できる型の少なくとも1つの細胞を提供するステップと、

(b)前記細胞型の少なくとも1つの細胞を

(i)サイトカインによって誘導されるタンパク質を細胞が発現するのを誘導させるのに十分な濃度と期間で、一定量のアミノ酸コポリマーの第1のサンプルと、

(ii)サイトカインによって誘導されるタンパク質を細胞が発現するのを誘導させるのに十分な濃度と期間で、一定量のアミノ酸コポリマーの第2のサンプルと

別々に接触させるステップと、

(c)ステップ(b)(i)の少なくとも1つの細胞によって発現されるサイトカイン誘導タンバ

ク質を検出して、アミノ酸コポリマーの第1のサンプルの特性を評価するステップと、
(d)ステップ(b)(iii)の少なくとも1つの細胞によって発現されるサイトカイン誘導タンパク質を検出して、アミノ酸コポリマーの第2のサンプルの特性を評価するステップと、
(e)アミノ酸コポリマーの第1のサンプルの特性と、アミノ酸コポリマーの第2のサンプルの特性とを比較して、第1および第2のサンプル間の類似性を判定するステップと
を含む、アミノ酸コポリマーの少なくとも2つのサンプルを比較する方法。

[請求項135]

アミノ酸コポリマーサンプルの少なくとも1つが参照標準である、請求項134に記載の方法。

[請求項136]

アミノ酸コポリマーサンプルの少なくとも1つが酢酸グラチラマーである、請求項134に記載の方法。

[請求項137]

少なくとも1つの細胞が、骨髄性細胞系および初代骨髄性細胞からなる群から選択される、請求項134に記載の方法。

[請求項138]

骨髄性細胞系がヒト骨髄性白血病細胞系を含む、請求項137に記載の方法。

[請求項139]

ヒト骨髄性白血病細胞系がヒト急性単球性白血病細胞系(THP-1)、ヒト白血病性単球リンパ腫細胞系(U937)、およびヒト前骨髄球性白血病細胞系(HL-60)からなる群から選択される、請求項137に記載の方法。

[請求項140]

初代骨髄性細胞がヒト末梢血単核細胞(PBMC)および単球由来樹状細胞からなる群から選択される、請求項137に記載の方法。

[請求項141]

少なくとも1つの細胞が、自己免疫性、炎症性、神経変性性または脱髄性の疾患を有する対象に由来する、請求項134に記載の方法。

[請求項142]

疾患が、多発性硬化症、関節リウマチ、および炎症性腸疾患からなる群から選択される、請求項141に記載の方法。

[請求項143]

1つ以上の細胞がアッセイ培地に懸濁される、請求項134に記載の方法。

[請求項144]

アッセイ培地が無血清アッセイ培地である、請求項142に記載の方法。

[請求項145]

前記サイトカインによって調節される1つ以上のタンパク質が、 γ -インターフェロン-誘導性タンパク質10(IP-10)、インターフェロン-誘導性T細胞-化学誘引物質(I-TAC)、および γ -インターフェロンによって誘導されるモノカイン(MIG)からなる群から選択される、請求項135に記載の方法。

[請求項146]

アミノ酸コポリマーの第1のサンプルおよびアミノ酸コポリマーの第2のサンプルの濃度が $0.05 \mu\text{g/mL} \sim 1\text{mg/mL}$ である、請求項135に記載の方法。

[請求項147]

アミノ酸コポリマーの濃度が $0.1 \mu\text{g/mL} \sim 500 \mu\text{g/mL}$ である、請求項146に記載の方法。

[請求項148]

アミノ酸コポリマーの濃度が $0.5 \mu\text{g/mL} \sim 100 \mu\text{g/mL}$ である、請求項147に記載の方法。

[請求項149]

前記サイトカインが炎症性サイトカインである、請求項135に記載の方法。

[請求項150]

サイトカインが、腫瘍壊死因子アルファ(TNF α)、インターフェロン γ (IFN γ)、インタ

ーロイキン-1ベータ(IL-1)、インターロイキン-6(IL-6)、およびインターロイキン-8(IL-8)からなる群から選択される、請求項149に記載の方法。

[請求項151]

サイトカインがインターフェロン である、請求項150に記載の方法。

[請求項152]

サイトカインの濃度が0.01ng/mL ~ 100ng/mLである、請求項134に記載の方法。

[請求項153]

サイトカインの濃度が1ng/mL ~ 50ng/mLである、請求項152に記載の方法。

[請求項154]

サイトカインの前記濃度が約10ng/mLである、請求項153に記載の方法。

[請求項155]

期間が1時間 ~ 48時間である、請求項134に記載の方法。

[請求項156]

期間が6時間 ~ 36時間である、請求項155に記載の方法。

[請求項157]

期間が12時間 ~ 24時間である、請求項156に記載の方法。

[請求項158]

ステップ(d)の前記検出するステップが抗体ベースの方法を含む、請求項134に記載の方法。

[請求項159]

抗体ベースの方法が免疫沈降法を含む、請求項158に記載の方法。

[請求項160]

前記免疫学的方法が酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)を含む、請求項158に記載の方法。

[請求項161]

アミノ酸コポリマーの第1のサンプルおよびアミノ酸コポリマーの第2のサンプルの少なくとも1つが、自己免疫性、脱髄性、神経変性性または炎症性の疾患の治療を必要とする対象において、それを治療する既知の有効性を有する、請求項134に記載の方法。

[請求項162]

疾患が、多発性硬化症、関節リウマチ、および炎症性腸疾患からなる群から選択される、請求項161に記載の方法。

[請求項163]

アミノ酸コポリマーの第1のサンプルの特性が、アミノ酸コポリマーの第2のサンプルの特性の80% ~ 120%の範囲内である、請求項134に記載の方法。

[請求項164]

(a)酢酸グラチラマーのバッチを提供するステップと、
(b)請求項101 ~ 131のいずれか一項に従ってバッチの特性を評価するステップと、
(c)サイトカインによって調節される1つ以上のタンパク質のレベルが、酢酸グラチラマーの基準値に一致する場合、バッチが医薬用途のために許容可能であることを判定するステップと

を含む、酢酸グラチラマーの医薬組成物を調製する方法。

[請求項165]

基準値が、酢酸グラチラマーの市販医薬品の効力、特異性、安定性、および/または生物学的活性に関する、サイトカイン誘導プロファイル、等価性範囲または医薬品規格である、請求項164に記載の方法。

[請求項166]

(a)骨髄性細胞を提供するステップと、
(b)細胞がIFN -誘導タンパク質を発現するのを誘導させるのに十分な濃度と期間で、細胞と、(i)一定量のアミノ酸コポリマー、および(ii)IFN とを接触させるステップと、
(c)IFN -誘導タンパク質の存在、レベル、生成、分泌、誘導と、酢酸グラチラマーの基準値とを比較するステップと

を含む、アミノ酸コポリマー調製品の活性、効力、特異性または安定性を評価する方法。

[請求項167]

基準値が、酢酸グラチラマーの市販医薬品の活性、効力、特異性または安定性に関するサイトカイン誘導プロフィール、等価性範囲または医薬品規格である、請求項166に記載の方法。

[請求項168]

比較するステップが、1つ以上の誘導タンパク質の測定された発現、分泌、誘導、存在またはレベルと、酢酸グラチラマーの市販医薬品の基準値、サイトカイン誘導プロフィールまたは医薬品規格との差が、所定の範囲内であるかどうかを判定するステップを含む、請求項102または請求項108に記載の方法。

[請求項169]

差が所定の範囲内であれば、コポリマーを分類し、選択し、承認し、廃棄し、リリースし、または保留するステップと、コポリマーを製剤に加工し、コポリマーを含む製品を送り、コポリマーを新しい場所に移動させるステップ、またはコポリマーを商業目的のために配合し、ラベルし、包装し、販売し、売りに出し、またはリリースするステップをさらに含む、請求項167に記載の方法。

[請求項170]

L-アラニンのN-カルボキシ無水物、ベンジル保護L-グルタミン酸、トリフルオロ酢酸(TFA)保護L-リジン、およびL-チロシンを重合して、保護されるコポリマーを生成するステップと、保護されるコポリマーを処理して、保護されるコポリマーを部分的に解重合し、ベンジル保護基を脱保護し、TFA保護リジンを脱保護して、酢酸グラチラマーを生成するステップと、酢酸グラチラマーを単離するステップとを含み、
サイトカインおよび単離された酢酸グラチラマーのサンプル存在下で、骨髄性細胞または初代骨髄性細胞系中のサイトカイン誘導タンパク質の発現を測定すること、および発現と基準値とを比較することを含む、酢酸グラチラマーを含む医薬組成物を調製する方法。

[請求項171]

サイトカインがIFN である、請求項169に記載の方法。

[請求項172]

測定される発現と基準値との差が所定の範囲内であれば、医薬組成物の調製で使用するための精製酢酸グラチラマーを選択するステップをさらに含む、請求項169に記載の方法。

[請求項173]

選択された精製酢酸グラチラマーの少なくとも一部を含む医薬組成物を調製するステップをさらに含む、請求項171に記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/067508

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/50 C07K14/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LI Q Q ET AL: "Glatiramer acetate inhibition of tumor necrosis factor-alpha-induced RANTES expression and release from U-251 MG human astrocytic cells." JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY JUN 2001, vol. 77, no. 5, June 2001 (2001-06), pages 1208-1217, XP002494417 ISSN: 0022-3042	1-4,7-11
Y	figures 1-4 ----- -/--	12-29, 31-50, 52-63
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *D* 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. *B* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 3 September 2008		Date of mailing of the international search report 28/01/2009
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 Hohwy, Morten

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/067508

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>MILO R ET AL: "Additive effects of copolymer-1 and Interferon beta-1b on the immune response to myelin basic protein." September 1995 (1995-09), JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY SEP 1995, VOL. 61, NR. 2, PAGE(S) 185 - 193 , XP002494420 ISSN: 0165-5728 page 189 abstract</p>	<p>1-4, 7-29, 31-50, 52-63</p>
Y	<p>FARINA C ET AL: "Treatment of multiple sclerosis with Copaxone (COP): Elispot assay detects COP-induced interleukin-4 and interferon-gamma response in blood cells." BRAIN : A JOURNAL OF NEUROLOGY APR 2001, vol. 124, no. Pt 4, April 2001 (2001-04), pages 705-719, XP002494418 ISSN: 0006-8950 pages 708-709 abstract</p>	<p>1-4, 7-29, 31-50, 52-63</p>
Y	<p>BEN ABDELAZIZ HALIM ET AL: "Inhibition of TNF-alpha production in THP-1 macrophages by glatiramer acetate does not alter their susceptibility to infection by Listeria monocytogenes and does not impair the efficacy of ampicillin or moxifloxacin against intracellular bacteria" JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY, vol. 54, no. 1, July 2004 (2004-07), pages 288-289, XP002494419 ISSN: 0305-7453 page 288</p>	<p>1-4, 7-29, 31-50, 52-63</p>

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/067508**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

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

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

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

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

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

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

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

1-4, 7-29, 31-50, 52-63 (all partly)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2008 /067508

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-4,7-29,31-50,52-63 (all partly)

A method for analysing an amino acid copolymer by contacting a cell with said amino acid copolymer and a cytokine, which induces the expression of a protein in the cell, and detecting said protein to evaluate a property of said amino acid copolymer, wherein the cytokine is TNF-alpha.

2. claims: 1-4,7-29,31-50,52-63 (all partly), and 5-6,30,51,66-69 (all entirely)

A method for analysing an amino acid copolymer by contacting a cell with said amino acid copolymer and a cytokine, which induces the expression of a protein in the cell, and detecting said protein to evaluate a property of said amino acid copolymer, wherein the cytokine is IFN-gamma.

3. claims: 1-4,7-29,31-50,52-63 (all partly)

A method for analysing an amino acid copolymer by contacting a cell with said amino acid copolymer and a cytokine, which induces the expression of a protein in the cell, and detecting said protein to evaluate a property of said amino acid copolymer, wherein the cytokine is IL-1beta.

4. claims: 1-4,7-29,31-50,52-63 (all partly)

A method for analysing an amino acid copolymer by contacting a cell with said amino acid copolymer and a cytokine, which induces the expression of a protein in the cell, and detecting said protein to evaluate a property of said amino acid copolymer, wherein the cytokine is IL-6.

5. claims: 1-4,7-29,31-50,52-63 (all partly)

A method for analysing an amino acid copolymer by contacting a cell with said amino acid copolymer and a cytokine, which induces the expression of a protein in the cell, and detecting said protein to evaluate a property of said amino acid copolymer, wherein the cytokine is IL-8.

6. claims: 1-4,7-29,31-50,52-63 (all partly)

International Application No. PCT/US2008 /067508

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A method for analysing an amino acid copolymer by contacting a cell with said amino acid copolymer and a cytokine, which induces the expression of a protein in the cell, and detecting said protein to evaluate a property of said amino acid copolymer, wherein the cytokine is different from those covered by inventions 1-5.

7. claims: 64-65 and 70-73

A method for preparing a pharmaceutical composition of glatiramer acetate.

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 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 1/04	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	A 6 1 P 1/04	
		A 6 1 K 37/02	

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

(74) 代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74) 代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74) 代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 ダレサンドロ ジョセフィン エス .

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 マーブルヘッド シービュー アベニュー 1 6

(72) 発明者 キシモト タカシ ケイ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 レキシントン クーリッジ アベニュー 4 6

(72) 発明者 ヒーリー アイリーン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 メドフォード クーリッジ ロード 3 3

F ターム (参考) 4B063 QA01 QQ61 QR48 QR77 QS31

4C084 AA01 AA02 AA17 BA01 CA59 NA14 ZA011 ZA681 ZA961 ZB151

专利名称(译)	共聚物测定		
公开(公告)号	JP2010530975A	公开(公告)日	2010-09-16
申请号	JP2010513409	申请日	2008-06-19
[标]申请(专利权)人(译)	动量制药公司		
申请(专利权)人(译)	动量制药公司		
[标]发明人	ダレサンドロ ジョセフィン エス キシモト タカシ ケイ ヒーリー アイリーン		
发明人	ダレサンドロ ジョセフィン エス. キシモト タカシ ケイ ヒーリー アイリーン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 C12Q1/02 A61K45/00 A61P25/00 A61P19/02 A61P29/00 A61P1/04 A61K38/00		
CPC分类号	A61P1/04 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 C07K14/001 G01N33/5008 G01N2333/52		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.585 G01N33/543.501.A C12Q1/02 A61K45/00 A61P25/00 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P1/04 A61K37/02		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QQ61 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QS31 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/CA59 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA681 4C084/ZA961 4C084/ZB151		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 渡边真一 正人大关		
优先权	60/945488 2007-06-21 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于评估氨基酸共聚物的一种或多种性质的方法和组合物。