

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4918556号
(P4918556)

(45) 発行日 平成24年4月18日(2012.4.18)

(24) 登録日 平成24年2月3日(2012.2.3)

(51) Int.Cl.	F 1
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 D
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N

請求項の数 1 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2008-542594 (P2008-542594)	(73) 特許権者	508161805
(86) (22) 出願日	平成18年11月29日(2006.11.29)		シュトローナー・パヴェル
(65) 公表番号	特表2009-517667 (P2009-517667A)		ドイツ連邦共和国、13187 ベルリン
(43) 公表日	平成21年4月30日(2009.4.30)		、ヴォランクストラーセ、133
(86) 国際出願番号	PCT/DE2006/002107	(74) 代理人	100069556
(87) 国際公開番号	W02007/062628		弁理士 江崎 光史
(87) 国際公開日	平成19年6月7日(2007.6.7)	(74) 代理人	100111486
審査請求日	平成21年10月13日(2009.10.13)		弁理士 鍛冶澤 實
(31) 優先権主張番号	102005057920.5	(72) 発明者	シュトローナー・パヴェル
(32) 優先日	平成17年12月2日(2005.12.2)		ドイツ連邦共和国、13187 ベルリン
(33) 優先権主張国	ドイツ(DE)		、ヴォランクストラーセ、133
		審査官	白形 由美子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サンプル中の被検体（抗原）および該被検体を標的とする治療用抗体を同時に免疫化学的に測定するためのイムノアッセイ（リカバリー・イムノアッセイ（Recovery Immunoassay））

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被検体および該被検体を標的とする治療用抗体を同時に免疫化学的に測定する方法であって、以下：

- 表面に結合し、場合により標識された捕捉抗体（Faengerantikoerper）、
 - 標識された治療用抗体、または前記治療用抗体と同様の結合エピトープを示す標識抗体、
 - 異なるエピトープにおいて捕捉抗体および治療用抗体と結合し、それによって免疫化学的サンドイッチを形成する抗原、
 - 既知濃度の標識されていない治療用抗体の溶液、および
 - サンプルの増量（Aufstockung）のための抗原溶液、
- を提供することを含み、

以下：

- 前記標識されていない治療用抗体の2～5つの異なる濃度でサンドイッチ・イムノアッセイ標準曲線を作成すること、
- 治療用抗体の添加と再計算された抗原濃度（標準濃度）の減少との関係を、統計的評価を用いて求めること、
- 未知の抗原濃度を有するサンプルを2～3つの既知抗原濃度で増量し、回復を測定すること、

- 標準曲線の回復値に基づいてサンプルで算出した回復値を用いて、治療用抗体の濃度および実質的な抗原全濃度を推量すること、
を特徴とする、前記の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、被検体（抗原）および該被検体を標的とする治療用抗体を同時に免疫化学的に測定するためのイムノアッセイに関する。本発明は、医学的診断、治療のコントロールおよびおよび薬理学的研究の分野に適用することができる。

【背景技術】

【0002】

以下の技術が既に知られている：

A) イムノアッセイに関して

イムノアッセイは、サンプル物質、例えば血清、血漿、組織サンプル、残留調製物（Rückstandspräparationen）、細胞培養液の上清等における、未知濃度の関連物質（被検体）の分析的または診断的測定のために非常に広く用いられている技術である。イムノアッセイ（ラジオイムノアッセイ（RIA）、エンザイムイムノアッセイ（EIA）、蛍光イムノアッセイ（LIA）およびそれに関連して使用されるアッセイ変法）は、ある被検体濃度を標準として定め、これに対して、標識された化合物を含む中で抗体を反応させた後に、結合した標識抗原もしくは抗体の応答（カウント（Impulsrate）、吸光度、相対発光量）を測定することに基づくものである。応答と標準の被検体濃度との関係を数学的な標準関数を用いるかまたはグラフにより標準曲線の形で記載する。

【0003】

未知のサンプルの被検体濃度は、被験体濃度に応じて変化させた標準関数を使用して未知サンプルの応答から算出するか、またはグラフとして作成された標準曲線上で読み取る。標準曲線を用いる検量では、通常、測定における外部物質による影響を避けるために、サンプルの個別的な前処理（例えば抽出、添加物質の添加）またはアッセイ成分の個別的な前処理（0-血清における標準の導入、蛋白質の添加等）を行う。回復実験（Wiederfindexperimenten）を用いて、このように改変されたアッセイ成分またはサンプルでの測定の正確性が調べられる。測定装置（ガンマカウンター、吸光度リーダー、蛍光測定装置）のソフトウェアパッケージがイムノアッセイ評価を担っており、これはイムノアッセイに関する研究および通常の研究所の標準装備となっている。さらに、種々の製造者によるイムノアッセイ研究用自動化装置が市販されており、これらでは、イムノアッセイの操作（Abarbeitung）もその測定および評価も自動装置に一体化されている。今日でもアッセイ技術、種々のアッセイの過程用に保存された標準関数または2つの標準濃度に換算された標準直線の使いやすさから、通常、これらの評価ソフトウェアパッケージおよび研究用自動化装置の全てが定量方法の基礎となっている。

B) 治療用抗体

近年、多くの治療用抗体が開発され、または今なお開発されている。これらによって主に、炎症、自己免疫疾患および癌の治療が達成される。これらの多くの治療用抗体は最初にモノクローナル抗体として生産され、しかしながらその多くが、該治療用抗体に対する患者の免疫防御を回避するために、遺伝子技術的にヒト抗体に変えられる。これらの一部は、ヒト抗体およびモノクローナル抗体のキメラであるか、またはモノクローナル抗体である。

【0004】

表1は、既に医薬品として承認されているか、または認可中の治療用抗体を選び出したものを示す。

【0005】

これらの治療用抗体は、疾患特異的なヒト蛋白質に対して向けられたものである。サンドイッチ・イムノアッセイに基づいて、関連する疾患特異的な抗原としてのヒト蛋白質を

10

20

30

40

50

測定することが可能であるが、これらの測定は治療用抗体によって精度が低下し、遊離した抗原および全抗原を測定するためには特別なアッセイ概念が必要である（「Hamilton, R.G. et.al.」参照）。

【 0 0 0 6 】

表1

【 0 0 0 7 】

【表1】

治療用抗体の名称	開発者；製造者	抗体の型	抗原；適用
オマリズマブ (Xolair)	Genentech; Novartis; Tanox	ヒト化	IgE; アレルギー性喘息
インフリキシマブ (Remicade)	Centocor	キメラ	TNF- α ; リウマチ; クローン病 (Morbus Crohn)
アダリムマブ (Humira)	Cambridge Antibody Technology; Abbott	ヒト化	TNF- α ; リウマチ
ムロモマブ-CD3	Ortho Biotech; Johnson&Johnson	モノクローナル	CD3; 臓器移植の拒絶反応の防止
ダクリズマブ (Zenapax)	Protein Design Labs	ヒト化	CD25; 腎移植の拒絶反応の防止
バシリキシマブ (Simulect)	Novartis	キメラ	CD25; 腎移植の拒絶反応の防止
ラブティバ	Genentech; Serono, Xoma	ヒト化	BLA ^a , CD11a; 乾癬
ナタリズマブ (Antegren)	Elan, Biogen	ヒト化	VLA-4 β 1 ^b ; クローン病; 多発性硬化症
CDP-870	Celltech; Pfizer	ヒト化	TNF- α ; リウマチ、クローン病
トラスツズマブ (Herceptin)	Genentech	ヒト化	HER-2/neu (p183 ^{neu}); 乳癌、肺癌、膵臓癌
ダクリズマブ (Zenapax)	Protein Design Labs	キメラ	IL-2R; 白血病
エンドレコロマブ (Panorex)	Johnson&Johnson	ヒト化	17-A1; 大腸癌

10

20

【 0 0 0 8 】

特許文献1には、イムノアッセイにおいてサンプルを二次元で測定する方法を用いる方法が記載されており、これは交差反応性物質およびマトリックス効果の影響を解析することができ、抗原濃度を適切に修正することができる。

【 0 0 0 9 】

現在、抗原および該抗原に向けられた治療用抗体を同時に正確に測定できる方法は存在しない。

30

【特許文献1】欧州特許第0850416号明細書

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 0 】

本発明の課題は、簡単および迅速に実施される方法であって、抗原およびそれに向けられた治療用抗体を溶液中で同時に測定することができる方法を開発することにある。好ましくは、これは治療のコントロールに使用することができる。前記の課題は、特異的なイムノアッセイおよびこのイムノアッセイの使用方法が記載された特許請求の範囲の記載に従って解決される。

40

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 1 】

本発明のイムノアッセイは以下を含む：

- 表面に結合し、場合により標識された捕捉抗体 (Faengerantikoerper)
- 標識された治療用抗体、または前記治療用抗体と同様の結合エピトープを示す標識抗体
- 異なるエピトープにおいて捕捉抗体および治療用抗体と結合し、それによって免疫化学的サンドイッチを形成する抗原
- 既知濃度の標識されていない治療用抗体の溶液、および
- サンプルの増量 (Aufstockung) のための抗原溶液。

【 0 0 1 2 】

50

本発明の基本的原理

前記アッセイは、通常のサンドイッチ・イムノアッセイに由来する。治療用抗体、または同一の結合エピトープに結合する抗体が標識された形態で検出抗体 (Nachweisantikörper) または捕捉抗体として使用され、正確に測定されるサンドイッチ・イムノアッセイにおいては、サンプル中の治療用抗体の存在により、測定される抗原の回復が系統的に減少し、これは治療用抗体の濃度と相関する。未知の濃度の治療用抗体を測定するために、ならびに遊離のおよび全体の抗原濃度を測定するためにこの相関を利用することができる。このような理由から、このイムノアッセイを簡潔に回復イムノアッセイ (Wiederfinde-Immunoassay) またはリカバリー・イムノアッセイと呼ぶこともできる。

【0013】

手順：

検出すべき抗原用に通常のサンドイッチアッセイを開発する。このサンドイッチ・イムノアッセイは以下の構成を有する：

- a) マイクロタイタープレートまたはバイオチップ表面に固定化された捕捉抗体。
- b) 被験体は蛋白質または別のバイオポリマーであり、これは結合エピトープによって捕捉抗体に結合し、標準またはサンプルとしてイムノアッセイで測定される。
- c) 検出抗体は、放射性のまたは非放射性の標識がなされており、捕捉抗体とは別の結合エピトープにおいて被験体と結合する治療用抗体である。非放射性標識としては、イムノアッセイにおいて慣用の方法 (ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、発光もしくは蛍光ラベル) を全て利用することができる。

【0014】

ここでは、2~5つの異なる抗体濃度の標識されていないヒト化治療用抗体を添加することなく、または前記抗体を添加して、サンドイッチ・イムノアッセイが実施される。この場合に、標識されていないヒト化治療用抗体を用いないサンドイッチ・イムノアッセイに関しては、アッセイが調べるサンプルの抗原濃度を正確に再現することが重要である。

【0015】

ここではこのことを念頭において、2~6つのイムノアッセイの測定値を解析し、この測定においては、ヒト化治療用抗体の添加により測定値が減少し、同時に標準曲線における抗原濃度の回復が減少する。測定値の減少 = 再計算した抗原濃度 (標準濃度) の減少とヒト化治療用抗体との関係は、統計的評価を用いて適当な数学的関数でまとめられる。この関数 (回復関数 : Wiederfindefunktion) を用いることにより、イムノアッセイにおける抗原の回復と治療用抗体の濃度との関係が得られる。捕捉抗体および標識された治療用抗体が大幅に過剰な場合には、イムノアッセイにおける抗原の回復の逆数と治療用抗体の濃度との間の関係は単純な一次関数である。測定値の偽性 (Verfälschungen) をサンプルにおけるマトリックス効果により排除することが、この関数を適用できる前提条件である。このような理由により、標準溶液およびサンプルの反応培地が比較可能でなければならない。

【0016】

2~3つの既知抗原濃度 (標準) を用いて未知のサンプルを増量する。ここでイムノアッセイにおいて、増量された既知抗原濃度の回復が未知サンプル中においてどの程度であるかを確認する。回復が100%周辺になる場合には、サンプルに治療用抗体は含まれない。回復が少ない場合には、サンプル中の治療用抗体の濃度および実質的な抗原全濃度を、回復関数を用いて間接的に推量することができる。

【0017】

全体のおよび遊離のIgEの測定に利用できる方法としては非常に費用のかかる方法のみが存在する。Hamilton R.G等の文献では、測定のために2つの別々のElisaが必要であり、有効な抗体濃度の測定は行われぬ。本発明の方法を用いることにより、例えばアレルギー性喘息および他の自己免疫疾患へのオマリズマブの使用において、治療コントロールを非常に容易に行うことができる。

【実施例】

10

20

30

40

50

【 0 0 1 8 】

以下の2つの実施例により、前記の方法を詳細に説明する：

実施例1：

ストレプトアビジンコーティングマイクロタイタープレートでのIgEエンザイムイムノアッセイにおける、バッファーへの治療用抗体オマリズマブ (Xolair=E-25) の添加の効果

材料：

1. ストレプトアビジンコーティングマイクロタイタープレート (BioTeZ Berlin-Buch GmbHの最大ビオチン結合能に関するコーティング法による (MCコーティング))
2. ビオチン化抗体B 216 / 290702のストレプトアビジンコーティングマイクロタイタープレートに固定化するための捕捉抗体：抗ヒトIgE, mAb E411
3. IgE - 標準：OEMからのIgE
4. POD標識検出抗体PD 08/110501 (ヒト由来のPODで標識されたmAk E25：Novartis製)
5. Novartis製のヒト化モノクローナル治療用抗体オマリズマブ (Xolair) =E-25
6. コーティングバッファー (PBS 0.05M、pH=7.2 (0.1% RSAを含む))
7. 反応バッファー (PBS / 0.33 %カゼイン+ 0.0125 % TWEEN 20)
8. 洗浄溶液 (0.9% NaCl / 0.1% Tween)
9. 酵素基質：オルトフェニレンジアミン (OPD)

表2にマイクロタイタープレート上での試験の構成を示し、表3に試験結果を示す。

【 0 0 1 9 】

試験手順：

1. マイクロタイタープレートの全てのウェルにおける捕捉抗体の固定化。捕捉抗体溶液 (4 µg/ml) 200 µlの添加。4 で一晚インキュベーション
2. 翌日にMTP-Washerで洗浄溶液を用いて2回洗浄
3. 試験構成に従ったIgE標準系列 0 / 3.125 / 6.25 / 12.5 / 25 / 50 / 100/ 200 ng / mlの作製
4. 試験構成に従ったE-25希釈系 0 / 0.0625 / 0.125 / 0.25 / 0.5 / 1 µg/mlの作製
5. 開始溶液へ3および4をそれぞれ50 µlずつ混合
6. 開始溶液 (100 µl) の検出用コンジュゲート (PD08、100 ng/ml、100 µl) との混合
7. 開始溶液および検出用コンジュゲートからなる混合物200 µlのマイクロタイタープレートへの添加
8. 混合物を室温で3時間以上インキュベーション
9. MTP-Washerで洗浄溶液を用いて2回洗浄
10. OPD (20 mlのSoerensenバッファーに14 mgのOPD + 80 µlの3% H₂O₂) での酵素検出、200 µlのOPD溶液の添加、および30分後に50 µlのH₂SO₄ [5M]による酵素反応の停止。

【 0 0 2 0 】

表2：マイクロタイタープレート上における試験構成

【 0 0 2 1 】

【表 2】

	全測定とも2回ずつ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
細胞	E-25 量 (µg/ml) ⇒	0	0	0.033	0.033	0.063	0.063	0.125	0.125	0.25	0.25	0.5	0.5
段	TgF 濃度 ng/ml ↓												
A	0												
B	1.5625												
C	3.125												
D	6.25												
E	12.5												
F	25												
G	50												
H	100												

【 0 0 2 2 】

表3：試験結果

吸光度としての2回の測定の平均値 (O.D. : 光学密度)

【 0 0 2 3 】

【表 3】

	E-25 量 (μg/ml) ⇒	0	31.250	62.5	125	250	500
	IgE 濃度 (ng/ml) ↓	O. D.	O. D.	O. D.	O. D.	O. D.	O. D.
A	0	0.070	0.064	0.054	0.054	0.052	0.064
B	1.563	0.154	0.149	0.143	0.112	0.102	0.104
C	3.125	0.201	0.192	0.169	0.145	0.127	0.119
D	6.25	0.277	0.266	0.256	0.186	0.156	0.146
E	12.5	0.493	0.501	0.434	0.365	0.290	0.244
F	25	0.984	0.879	0.805	0.707	0.585	0.382
G	50	1.482	1.257	1.198	0.948	0.751	0.587
H	100	2.378	2.285	2.216	1.927	1.432	1.134

10

【 0 0 2 4 】

図1は、E-25の添加に依存したIgE-ELISAを示す。

【 0 0 2 5 】

ここで、異なるE-25を添加した場合のIgE-標準曲線の測定結果 (O.D.) をE-25を添加しない場合のIgE-標準曲線にあてはめると、以下の非常に単純な直線関係になる (表4) :

表4:

【 0 0 2 6 】

【表 4】

IgE 標準溶液への E-25 の添加 (μg/ml)	0	0.03125	0.0625	0.125	0.25	0.5
E-25 を添加しない場合の、標準領域に対する直線関係の決定係数	1.000	0.994	0.993	0.984	0.990	0.981
測定値 (O.D.) における IgE 標準の回復	100.00%	93.05%	90.32%	77.62%	57.77%	44.06%

20

【 0 0 2 7 】

従ってこれは、E-25を添加した場合のIgE-標準曲線の全ての測定値が非常に直線的に、E-25を添加していないIgE-標準曲線と相関することを示す。ELISAに使用されるIgE-標準溶液の回復は、E-25量が増加するほど系統的に減少する。それにより、E-25量とIgE標準の回復との間の以下の簡単な関係が得られる:

30

【 0 0 2 8 】

$1 / \text{回復} = 1 + 2.626 * \text{E-25量}$ (式1)

E-25濃度に対する回復の相関値の直線関係の決定係数 (Bestimmtheitsmass) は0.9907であった。

【 0 0 2 9 】

しかしながら、イムノアッセイは未知の抗原濃度の測定のためのものであると考えられる。このような理由から、既知の抗原濃度の標準希釈に関してイムノアッセイの測定値をいわゆる標準曲線として算出する。既知の抗原濃度と測定値との関係を、イムノアッセイにおいて回帰により慣用の数学的関数として求め、イムノアッセイにおけるその測定値から未知サンプルの抗原濃度を算出するために利用する。

40

【 0 0 3 0 】

$\text{Logit}(E) = \ln((E - \text{NSB}) / (E_{\text{max}} - E + \text{NSB})) = a + b * \ln(X)$ (式2)

ln: 自然対数

E: 吸光度 (エンザイムイムノアッセイ)

NSB: 非特異的結合

E_{max} : 最大吸光度

a, ; b: 回帰関数のパラメーター。

50

【 0 0 3 1 】

直線回帰により、以下の標準曲線の評価関数が得られた：

$$\text{Logit}(E) = 0.892 \cdot \ln(\text{IgE}) - 5.30775 \quad (\text{式3})。$$

【 0 0 3 2 】

直線関係に関する決定係数は99.292%であった。この評価関数 (Auswertefunktion) は、測定値とhedgehog濃度との関係が99.3%まで正確であることを示し、0.7%の測定値のみがそこから偶発的に外れる。

【 0 0 3 3 】

評価関数から導き出される逆関数：

$$\ln(\text{IgE}) = (5.30775 + \text{Logit}(E)) / 0.892 \quad (\text{式4})$$

を、非常に小さい誤差で測定値 (ここでは吸光度) から未知サンプルを算出するために用いることができる。

【 0 0 3 4 】

ここでこの逆関数を用いることにより、測定値 (吸光度) から、E-25を添加した場合の標準曲線におけるIgE濃度が得られた (表5)：

表5：

【 0 0 3 5 】

【 表 5 】

E-25 量 (μ g/ml)	0	0.03125	0.0625	0.125	0.25	0.5
IgE ng/ml	IgE, rekalk.	IgE, rekalk.	IgE, rekalk.	IgE, rekalk.	IgE, rekalk.	IgE, rekalk.
1.56	1.81	1.69	1.56	0.82	0.62	0.66
3.13	3.02	2.77	2.20	1.61	1.17	0.99
6.25	5.09	4.78	4.49	2.63	1.87	1.62
12.50	11.61	11.87	9.74	7.63	5.46	4.17
25.00	29.25	25.19	22.41	18.85	14.64	8.14
50.00	50.74	40.55	38.03	27.82	20.43	14.72
100.00	99.60	93.84	89.64	73.20	48.41	35.32
決定係数		0.994	0.994	0.985	0.988	0.993
回復		92.23%	88.50%	71.91%	47.86%	34.74%

IgE-rekalk.： 評価関数の逆関数により測定された IgE 濃度

IgE-rekalk.： 評価関数の逆関数により測定された IgE 濃度

【 0 0 3 6 】

測定値と同様に、ここでも予測どおりに、測定されたIgE濃度が標準サンプルにおけるE-25量に依存して減少した。測定値と同様に、E-25を添加しない場合のIgE値と添加した場合のIgE値との間で簡単な直線関係を示した (全ての決定係数が98.5%以上であった)。

【 0 0 3 7 】

既知標準濃度におけるE-25量とIgE濃度の回復との関係は簡単な関数によって示すことができ (図2)、ここで、 $1/WF = 0.9606 + 3,932 \cdot X$ (式5)；WF：回復；X：E-25量 (μ g/ml)；この関数に関する決定係数は98.74 %であった。

【 0 0 3 8 】

この関数の逆関数により、回復値からサンプル中のE-25量を評価することができる。

【 0 0 3 9 】

この実施例1においては、既知サンプル中の治療用抗体E-25 (Xoiair) 濃度の測定の基本原理のみを示した。また、イムノアッセイはバッファー溶液においてのみ行った。

【 0 0 4 0 】

実施例2では、同一の方法により、未知の血清サンプルにおいても、イムノアッセイにおける簡単な増量実験によってE-25量の測定が可能であることを示す。標準の反応溶液と未知血清サンプルの比較可能性を担保するために、イムノアフィニティークロマトグラフ

イーを通してIgE不含血清を調製し、ここにイムノアッセイのIgE標準を加えた。

【0041】

実施例2:

ストレプトアビジンコーティングマイクロタイタープレート上でのIgE-エンザイムイムノアッセイにおける未知の血清サンプルの回復での治療用抗体オマリズマブ (Xolair=E-25) の添加の効果、ならびに、E-25と混合した未知の血清サンプルにおけるE-25量の測定

材料:

- 10. ストレプトアビジンコーティングマイクロタイタープレート (BioTeZ Berlin-Buch GmbHの最大ビオチン結合能に関するコーティング法による (MCコーティング))
- 11. ビオチン化抗体B 216 / 290702のストレプトアビジンコーティングマイクロタイタープレートに固定化するための捕捉抗体: 抗ヒトIgE, mAb E-411
- 12. IgE - 標準: OEMからのIgE
- 13. POD標識検出抗体PD 08/110501 (ヒト由来のPODで標識されたmAb E25: Novartis製)
- 14. Novartis製のヒト化モノクローナル治療用抗体オマリズマブ (Xolair) =E-25
- 15. コーティングバッファー (PBS 0.05M, pH=7.2 (0.1% RSAを含む))
- 16. 反応培地による標準曲線 (PBSにおいて1:10-希釈したIgE不含の血清 / 0.33%カゼイン + 0.0125% TWEEN 20)
- 17. PBSにおいて1:10希釈したサンプル / 0.33%カゼイン + 0.0125% TWEEN 20
- 18. 洗浄溶液 (0.9% NaCl / 0.1% Tween)
- 19. 酵素基質: オルトフェニレンジアミン (OPD)

10

20

表6および7にマイクロタイタープレート (1. および2. で半分づつ) 上における試験構成を示し、表8にイムノアッセイの結果を示す。

【0042】

表6: マイクロタイタープレート上の試験構成 (1. 最初の半分)

【0043】

【表6】

		標準曲線					
全測定とも2回ずつ		1	2	3	4	5	6
細胞	E-25 量 ($\mu\text{g/ml}$) \Rightarrow	0	0	0.125	0.125	0.5	0.5
段	IgE 濃度 (ng/ml) \downarrow						
A	0						
B	1.5625						
C	3.125						
D	6.25						
E	12.5						
F	25						
G	50						
H	100						

30

【0044】

表7: マイクロタイタープレート上の試験構成 (2番目の半分)

【0045】

【表7】

		未知サンプル					
全測定とも2回ずつ		7	8	9	10	11	12
細胞	IgE (ng/ml) による未知サンプルの増量 \Rightarrow	0	0	6.25	6.25	25	25
段	未知サンプル						
A	血清サンプル3						
B	血清サンプル5						
C	血清サンプル6						
D	血清サンプル7						
E	血清サンプル3 + 0.031 $\mu\text{g/ml}$ E-25						
F	血清サンプル5 + 0.063 $\mu\text{g/ml}$ E-25						
G	血清サンプル6 + 0.125 $\mu\text{g/ml}$ E-25						
H	血清サンプル7 + 0.25 $\mu\text{g/ml}$ E-25						

40

【0046】

50

試験手順：

1. マイクロタイタープレートの全てのウェルにおける捕捉抗体の固定化。捕捉抗体溶液 (4 µg/ml) 200 µl の添加。4 で一晩インキュベーション
2. 翌日にMTP-Washerで洗浄溶液を用いて2回洗浄
3. 標準の系列

A~H行、1~6列に関して：反応バッファーで1:10希釈したIgE不含血清における 0 / 3.125 / 6.25 / 12.5 / 25 / 50 / 100 / 200 ng IgE/ml、および0 / 0.125 / 0.5 µg/ml E-25。

4. サンプル

【0047】

【表8】

段 7-12, A-D 血清3, 5, 6, 7, バッファーで1:10希釈 0 / 6.25 / 25 ng/ml IgEで増量
 段 7-12, E 血清3 バッファーで1:10希釈 + 0.031 µg/ml E-25 0 / 6.25 / 25 ng/ml IgEで増量
 段 7-12, F 血清5 バッファーで1:10希釈 + 0.063 µg/ml E-25 0 / 6.25 / 25 ng/ml IgEで増量
 段 7-12, G 血清6 バッファーで1:10希釈 + 0.125 µg/ml E-25 0 / 6.25 / 25 ng/ml IgEで増量
 段 7-12, H 血清7 バッファーで1:10希釈 + 0.25 µg/ml E-25 0 / 6.25 / 25 ng/ml IgEで増量

10

【0048】

5. 混合物を室温で3時間以上インキュベーション
6. MTP-Washerで洗浄溶液を用いて2回洗浄
7. OPD (20 mlのSoerensenバッファーに14 mgのOPD + 80 µlの3% H₂O₂) での酵素検出、200 µlのOPD溶液の添加、および30分後に50 µlのH₂SO₄[5M]による酵素反応の停止。

20

【0049】

表8：イムノアッセイの結果：

a) 標準曲線 (吸光度)

【0050】

【表9】

ng/ml IgE ↓	E-25 添加 (µg/ml) ⇒		
	0	0.125	0.5
	0. D.	0. D.	0. D.
0	0.045	0.039	0.050
1.5625	0.098	0.096	0.074
3.125	0.121	0.102	0.084
6.25	0.170	0.150	0.110
12.5	0.281	0.264	0.195
25	0.546	0.439	0.282
50	0.921	0.827	0.421
100	1.602	1.316	0.798
決定係数		0.9968	0.9856
回復	1	0.8283	0.4671

30

0. D. : エンザイムイムノアッセイの測定値；光学密度 (吸光度)

【0051】

予測されるとおりに、E-25を添加したIgE不含血清での標準曲線においても、測定値の回復の系統的な減少が見られた。

【0052】

既知抗原濃度と測定値との関係を、E-25添加なしの標準曲線において、ここでもイムノアッセイに関して慣用のLogit-Log関数による回帰を用いて求め、E-25と混合したIgE標準を算出するために、およびイムノアッセイにおける測定値から未知サンプルのIgE濃度を算出するために使用した。

50

【 0 0 5 3 】

$\text{Logit}(E) = 0.8984 \cdot \ln(\text{IgE}) - 5.9079$ (式6)。

【 0 0 5 4 】

ここで、この評価関数の逆関数 ($\ln(\text{IgE}) = (5.39079 + \text{Logit}(E)) / 0.8984$) (式7)を用いて、E-25と混合した標準および未知サンプルの測定値からIgE濃度を算出した。

【 0 0 5 5 】

E-25の添加ありおよびなしの標準曲線に関して、以下のIgE濃度が得られた(表9)：
表9：

【 0 0 5 6 】

【表 1 0】

E-25 添加 ($\mu\text{g/ml}$)	0	0.0625	0.25
既知 IgE 標準濃度 (ng/ml)	再計算された IgE 濃度 (ng/ml)	再計算された IgE 濃度 (ng/ml)	再計算された IgE 濃度 (ng/ml)
0			
1.5625	1.91	1.82	0.88
3.125	2.95	2.08	1.30
6.25	5.29	4.29	2.42
12.5	11.02	10.11	6.54
25	26.48	20.02	11.10
50	51.62	44.98	18.93
100	101.94	81.97	43.01
IgE 標準の回復	102.709%	83.349%	42.050%
決定係数	99.938%	99.721%	99.464%

10

20

【 0 0 5 7 】

標準曲線において、エンザイムイムノアッセイにおけるIgE濃度の系統的な減少が確認された。E-25の添加とIgE回復との関係は、以下の簡単な一次関数で表すことができ(図3)、 $W_f = 0.99 - 2.291 \cdot X$ (式8)； W_f ：IgE濃度の回復； X ：E-25の添加は $\mu\text{g/ml}$ である。この直線関係の決定係数は99.84%であった。

30

【 0 0 5 8 】

未知血清サンプルに関して、以下の結果がELISAにおいて得られた(表10)：

表10：E-25を添加したまたは添加していない匿名患者の血清

【 0 0 5 9 】

【表 1 1】

増量 IgE (ng/ml)	E-25 添 加 (μ g/ml)	0.00	6.25	25.00	回復	初期値	決定係 数	E-25 量 理論値 (μ g/ml)
血清 3								
測定 IgG (ng/ml)	0.000	10.54	20.97	38.60	108.04%	12.114	0.982	
理論値		12.11	16.79	35.54				
測定 IgG (ng/ml)	0.031	7.46	12.86	32.84	102.68%	7.021	0.998	0.01
理論値		7.02	13.71	32.46				
血清 5								
測定 IgG (ng/ml)	0.000	14.70	23.92	41.06	102.19%	15.915	0.988	
理論値		15.92	20.95	39.70				
測定 IgG (ng/ml)	0.063	12.28	15.86	29.91	71.54%	11.897	0.998	0.08
理論値		11.9	18.53	37.28				
血清 6								
測定 IgG (ng/ml)	0.000	4.08	9.63	27.98	96.14%	3.880	1.000	
理論値		3.88	10.33	29.08				
測定 IgG (ng/ml)	0.125	3.39	8.00	16.52	50.89%	4.002	0.988	0.18
理論値		4.00	10.64	29.39				
血清 7								
測定 IgG (ng/ml)	0.000	3.67	7.36	26.82	95.20%	2.700	0.991	
理論値		2.70	9.92	28.67				
測定 IgG (ng/ml)	0.250	2.97	5.36	12.94	40.00%	2.924	1.000	0.27
理論値		2.94	9.22	27.97				

10

20

30

【 0 0 6 0 】

考察：

アッセイには、4人の健康な匿名の献血患者からの血清を用いた。全ての血清を既知のIgE濃度6.25および25 ng/mlで増量し、測定を行った。治療用抗体含有血清の模擬実験を行うために、同一の血清において、種々のE-25濃度を加えた。標準曲線として適用可能な評価関数の逆関数 ($\ln(\text{IgE}) = (5.39079 + \text{Logit}(E))/0.8984$) を用いて、測定値から各IgE濃度の算出を行った。

40

【 0 0 6 1 】

以下の結果において詳細を示す：

1. 血清3：

血清3を6.25および25 ng/ml IgEで増量した。E-25を添加しない場合に、加えられたIgE濃度の12 ng/ml (1:10希釈) の血清初期値付近での回復は108%程度であった。これは予想される100%の回復から有意に外れてはいなかった。

【 0 0 6 2 】

0.031 μg/ml E-25 (Xolair) の添加は、IgE濃度の回復を有意に変化させなかった。

【 0 0 6 3 】

50

2. 血清5:

血清5を6.25および25 ng/ml IgEで増量した。E-25を添加しない場合に、加えられたIgE濃度の15.9 ng/ml (1:10希釈)の血清初期値付近での回復は102%程度であった。これは予想される100%の回復から有意に外れてはいなかった。

【0064】

0.063 μ g/ml E-25 (Xolair)の添加により、IgE濃度の回復が72%に有意に減少した。標準曲線から得られた関係(式8)から、E-25濃度を0.08 μ g/mlと推量することができ、これは実際に加えられたE-25濃度の0.063 μ g/mlと近いものであった。

【0065】

3. 血清6:

血清6を6.25および25 ng/ml IgEで増量した。E-25を添加しない場合に、加えられたIgE濃度の3.9 ng/ml (1:10希釈)の血清初期値付近での回復は96%程度であった。これは予想される100%の回復から有意に外れてはいなかった。

【0066】

0.125 μ g/ml E-25 (Xolair)の添加により、IgE濃度の回復が50%に有意に減少した。標準曲線から得られた関係(式8)から、E-25濃度を0.18 μ g/mlと推量することができ、これは実際に加えられたE-25濃度の0.125 μ g/mlと近いものであった。

【0067】

4. 血清7:

血清7を6.25および25 ng/ml IgEで増量した。E-25を添加しない場合に、加えられたIgE濃度の2.7 ng/ml (1:10希釈)の血清初期値付近での回復は95%程度であった。これは予想される100%の回復から有意に外れてはいなかった。

【0068】

0.125 μ g/ml E-25 (Xolair)の添加により、IgE濃度の回復が40%に有意に減少した。標準曲線から得られた関係(式8)から、E-25濃度を0.27 μ g/mlと推量することができ、これは実際に加えられたE-25濃度の0.25 μ g/mlと近いものであった。

【0069】

全体のおよび遊離のIgEの測定に利用できる方法としては非常に費用のかかる方法のみが存在する。Hamilton R.G等の文献では、測定のために2つの別々のElisaが必要であり、有効な抗体濃度の測定は行われたい。本発明の方法を用いることにより、例えばアレルギー性喘息および他の自己免疫疾患へのオマリズマブの使用において、治療コントロールを非常に容易に行うことができる。

【0070】

文献

Rodbard D., Ratford P.L., Cooper J. and Ross G.T. (1968). Statistical quality control of radioimmunoassays. J. Clin. Endocrinol. Metab. 29, 352.

【0071】

Azizadeh A., Pellequer J.L. and Van Regenmortel M.H.V. (1992). Operational aspects of antibody affinity constants measured by liquid-phase and solid-phase assays. J. Molecular Recognition. 5, 9.

【0072】

Goldberg M.E. and Djavadi-Ohanian L. (1993). Methods for measurement of antibody/antigen affinity based on ELISA and RIA. Current Opinion in Immunology 5, 278.

【0073】

Hamilton R.G., Marcotte G.V., Saini S.S.: Immunological methods for quantifying free and total serum IgE levels in allergy patients receiving omalizumab (Xolair) therapy. J. Immunol. Methods. 2005, 303 (1-2):81-91.

【0074】

2001年8月1日の欧州特許第0850416号明細書。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0075】

【図1】 図1は、E-25の添加に依存したIgE-ELISAを示す。

【図2】 図2は、既知標準濃度におけるE-25量とIgE濃度の回復との関係を示す。

【図3】 図3は、E-25の添加とIgE回復との関係を示す。

【図1】

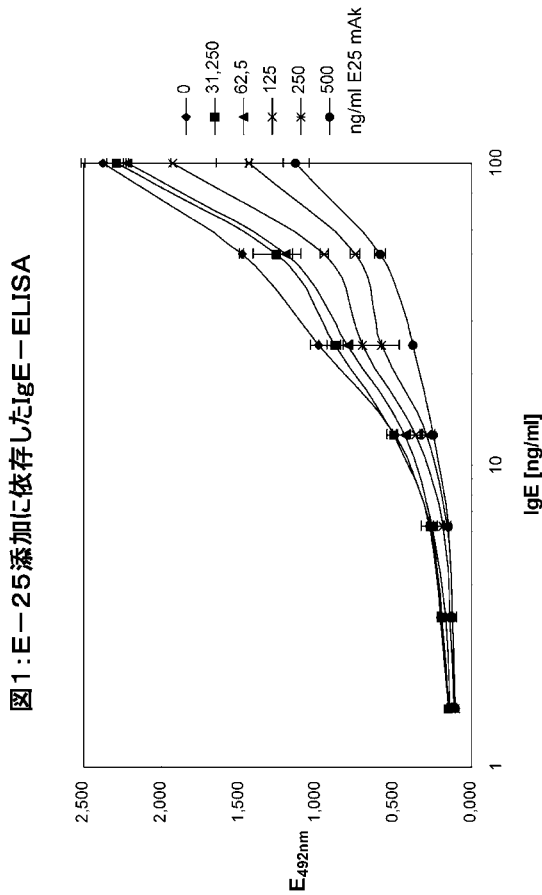


図1: E-25添加に依存したIgE-ELISA

【図2】

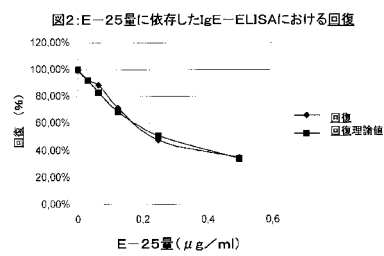


図2: E-25量に依存したIgE-ELISAにおける回復

$1/WF = 0.9606 + 3.932 \cdot X$ (式5)

WF: 回復

X: E-25量 (μg/ml)

この関係に関する決定係数は98.74%であった。

【図3】

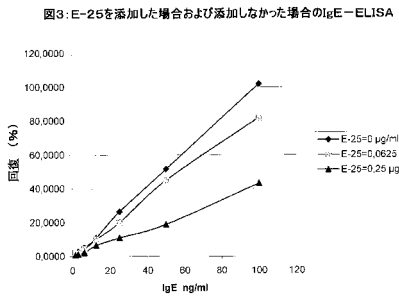


図3: E-25を添加した場合および添加しなかった場合のIgE-ELISA

$WF = 0.99 - 2.291 \cdot X$ (式8)

WF: IgE濃度の回復

X: E-25添加 (μg/ml)

この直線関係に関する決定係数は99.84%であった。

フロントページの続き

(56)参考文献 国際公開第2006/119942(WO, A1)

特開2002-350447(JP, A)

HAMILTON, R.G. et al., Immunological methods for quantifying free and total serum IgE levels in allergy patients receiving Omalizumab (Xolair) therapy, J.Immunol.Methods, 2005年, Vol.303, No.1-2, p.81-91

BEUM, P.V. et al., Three new assays for rituximab based on its immunological activity or antigenic properties: analyses of sera and plasmas of RTX-treated patients with chronic lymphocytic leukemia and other B cell lymphomas, J.Immunol.Methods, 2004年, Vol.289, No.1/2, p.97-109

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - G01N 33/98

(54)【発明の名称】サンプル中の被検体(抗原)および該被検体を標的とする治療用抗体を同時に免疫化学的に測定するためのイムノアッセイ(リカバリー・イムノアッセイ(Recovery Immunoassay))

专利名称(译)	免疫测定 (Recovery Immunoassay) , 用于同时免疫化学测量样品中的分析物 (抗原) 和靶向分析物的治疗性抗体 ,		
公开(公告)号	JP4918556B2	公开(公告)日	2012-04-18
申请号	JP2008542594	申请日	2006-11-29
[标]申请(专利权)人(译)	施特劳宾罗娜过帕维尔		
申请(专利权)人(译)	Shutorona - 帕维		
当前申请(专利权)人(译)	Shutorona - 帕维		
[标]发明人	シュトロナーパヴェル		
发明人	シュトロナーパヴェル		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/54306		
FI分类号	G01N33/543.501.D G01N33/53.N		
审查员(译)	白形 由美子		
优先权	102005057920 2005-12-02 DE		
其他公开文献	JP2009517667A JP2009517667A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

免疫分析法 (同时免疫测定法) 技术领域本发明涉及用于同时免疫化学测定样品中分析物 (抗原) 和针对分析物的治疗性抗体的免疫分析法 (同时免疫分析法) 。本发明结合到表面上 , 任选地标记的捕获抗体 , 标记的治疗性抗体或表示类似治疗性抗体结合表位的标记的抗体的免疫测定;从所述捕获抗体和治疗性抗体的表位不同结合在相同细胞中的抗原 , 从而形成免疫化学三明治;已知浓度的未标记治疗性抗体溶液和用于增加样品的抗原溶液。本发明的应用领域是医学诊断 , 治疗控制和药理学研究。

治療用抗体名称	開発者;製造者	抗体型	抗原;適用
オマリズマブ (Kolair)	Genentech; Novartis; Tanox	ヒト化	IgE; アレルギー性喘息
インフリキシマブ (Remicade)	Centocor	キメラ	TNF- α ; リウマチ; クロウン病 (Morbus Crohn)
アダリムマブ (Humira)	Cambridge Antibody Technology; Abbott	ヒト化	TNF- α ; リウマチ
ムロモマブ-CD3	Ortho Biotech; Johnson&Johnson	モノクローナル	CD3; 臓器移植の拒絶反応の防止
ダクリズマブ (Zenapax)	Protein Design Labs	ヒト化	CD25; 腎移植の拒絶反応の防止
バシリキシマブ (Simlect)	Novartis	キメラ	CD25; 腎移植の拒絶反応の防止
ラプティバ	Genentech; Sorono; Xoma	ヒト化	BLA ² , CD11a; 乾癬
ナタリズマブ (Antegren)	Elan, Biogen	ヒト化	VLA-4 β 1 ² ; クロウン病; 多発性硬化症
CDP-870	Celltech; Pfizer	ヒト化	TNF- α ; リウマチ; クロウン病
トラスツズマブ (Herceptin)	Genentech	ヒト化	HER-2/neu (p185 ^{HER2}); 乳癌; 肺癌; 脳腫瘍
ダクリズマブ (Zenapax)	Protein Design Labs	キメラ	IL-2R; 白血病
エンドレロマブ (Panorex)	Johnson&Johnson	ヒト化	17-A1; 大腸癌