

(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2013-537971

(P2013-537971A)

(43) 公表日 平成25年10月7日(2013.10.7)

(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 M
 GO 1 N 33/53 D

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2013-528381 (P2013-528381)</p> <p>(86) (22) 出願日 平成23年9月13日 (2011. 9. 13)</p> <p>(85) 翻訳文提出日 平成25年4月26日 (2013. 4. 26)</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/US2011/051356</p> <p>(87) 国際公開番号 W02012/037095</p> <p>(87) 国際公開日 平成24年3月22日 (2012. 3. 22)</p> <p>(31) 優先権主張番号 61/382, 413</p> <p>(32) 優先日 平成22年9月13日 (2010. 9. 13)</p> <p>(33) 優先権主張国 米国 (US)</p>	<p>(71) 出願人 512212195 アッヴィ・インコーポレイテッド アメリカ合衆国、イリノイ・60064、 ノース・シカゴ、ノース・ワウキガン・ロ ード・1</p> <p>(74) 代理人 110001173 特許業務法人川口国際特許事務所</p> <p>(72) 発明者 ヤン, リーホワ アメリカ合衆国、イリノイ・60064- 6008、アボット・パーク、アボット・ パーク・ロード・100</p> <p>(72) 発明者 ラマスブラマニアン, ナタラジヤン アメリカ合衆国、イリノイ・60064- 6008、アボット・パーク、アボット・ パーク・ロード・100</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
--	---

(54) 【発明の名称】 高感度なモノクローナル抗体残留物検出アッセイ

(57) 【要約】

本発明は、バイオテクノロジー生成物の製造において、生成物キャリアオーバーをモニタリングする時にバイオテクノロジー生成物残留物を検出するための、および/または洗浄確認のための組成物および高感度な方法に関する。特に、本発明は、1つまたは複数の捕捉抗体またはこの抗原結合断片が、バイオテクノロジー生成物の生成に伴う残留物を検出するのに使用される免疫アッセイを対象とする。

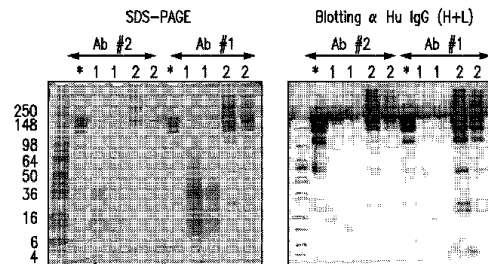


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

バイオテクノロジー生成物残留物を検出する方法であって、テスト試料が、生成物残留物に特異的な捕捉抗体またはこの抗原結合断片を含む基質と接触し、抗体 - 抗原複合体の検出がバイオテクノロジー生成物残留物の存在を示す方法。

【請求項 2】

抗体 - 抗原複合体の検出が、抗体 - 抗原複合体を結合することができる標識された検出抗体の結合をモニタリングすることにより達成される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

バイオテクノロジー生成物残留物の存在が生成物キャリーオーバーを示す、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 4】

バイオテクノロジー生成物残留物の量が洗浄工程の有効性を示す、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

生成物残留物が核酸生成物に由来する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

生成物残留物がタンパク質生成物に由来する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

タンパク質生成物が、酵素、ペプチドホルモン、ポリクローナル抗体、ヒトモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体、単鎖抗体、F a b 抗体断片、F (a b ') 2 抗体断片、F d 抗体断片、F v 抗体断片、単離された C D R、ダイアボディおよび免疫接着物からなる群から選択される、請求項 6 に記載の方法。

20

【請求項 8】

捕捉抗体またはこの抗原結合部分が、抗ヒト I g G (H + L) 抗体、抗ヒト I g G F (a b ') 2 抗体、抗ヒト I g G カッパ抗体、抗ヒト I g G ラムダ抗体、抗マウス I g G (H + L) 抗体およびこれらの組み合わせ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】

基質が、別個の結合特異性を有する 2 つ以上の捕捉抗体またはこの抗原結合断片を含む、請求項 1 に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、全体が本明細書に参照により組み込まれている、2010年9月13日に出版された米国仮出願第 61 / 382 , 413 号からの優先権の利益を主張するものである。

【0002】

本発明は、バイオテクノロジー生成物の製造において、生成物キャリーオーバーをモニタリングする時にバイオテクノロジー生成物残留物を検出するための、および / または洗浄確認のための、組成物および高感度な方法に関する。特に、本発明は、1 つまたは複数の捕捉抗体またはこの抗原結合断片が、バイオテクノロジー生成物の生成に伴う残留物を検出するのに使用される免疫アッセイを対象とする。

40

【背景技術】

【0003】

工程装置の洗浄確認は、医薬品の製造管理および品質管理基準 (「GMP」) 遵守に必要とされ、このような遵守は、治療薬が有すると主張する、または有すると示される品質特性および純度特性を、治療薬が満たすことを確保することを目的としている。GMP 遵守の一環として、全有機炭素 (「TOC」) アッセイが、バイオテクノロジー生成物残留物を除去するための洗浄手順の有効性を検証するのに伝統的に使用されている。TOCア

50

ッセイは、個々の生成実行の間のほか、生成場所が別個の生成物の間で交換される場合に使用することができる。しかし、TOCアッセイの重要な限界は、検出限界、 $< 0.1 \text{ ppm}$ が、最大許容キャリアオーバー限界がTOC検出限界より低い、特定の抗体治療薬などの極低用量生成物に関する生成物キャリアオーバーのモニタリングおよび/または洗浄確認に適さない場合があることである。

【0004】

極低用量生成物の遵守に関する問題に加えて、2001年に米国食品医薬品局に採択された日米欧医薬品規制調和国際会議(International Conference On Harmonization Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use) (「ICH」)文書ICH Q7A、およびカナダ保健省ガイド-0028(Health Canada Guide-0028)はいずれも、生成物キャリアオーバーのモニタリングおよび/または洗浄確認のための原薬(「API」)特異的アッセイの開発を推奨している。TOCアッセイはAPI特異的ではなく、むしろ源を問わず全有機炭素を測定することから、このような推奨に適合しない。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】日米欧医薬品規制調和国際会議(「ICH」)文書ICH Q7A

【非特許文献2】カナダ保健省ガイド-0028

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

TOCアッセイに固有の限界を考慮すると、より感度の高い、API特異的なアッセイが、生成物キャリアオーバーをモニタリングする時にバイオテクノロジー生成物残留物を検出するための、および/または洗浄確認のための代替方法または補助的方法として望ましいであろう。本発明は、生成物キャリアオーバーのモニタリングおよび/または洗浄確認に使用することができる、モノクローナル抗体残留物を含む、微量の核酸またはタンパク質残留物を検出する一般的な分析アッセイを導入することにより、この必要性を満たすものである。

30

【課題を解決するための手段】

【0007】

(発明の要旨)

特定の実施形態において、本発明は、バイオテクノロジー生成物残留物を検出する方法であって、テスト試料が、捕捉抗体またはこの抗原結合断片を含む基質と接触し、抗体-抗原複合体の検出がバイオテクノロジー生成物残留物の存在を示す方法を対象とする。

【0008】

特定の実施形態において、本発明は、バイオテクノロジー生成物残留物を検出する方法であって、テスト試料が、捕捉抗体またはこの抗原結合断片を含む基質と接触し、抗体-抗原複合体の検出がバイオテクノロジー生成物残留物の存在を示し、抗体-抗原複合体の検出が、抗体-抗原複合体を結合することができる標識された検出抗体の結合をモニタリングすることにより達成される方法を対象とする。

40

【0009】

特定の実施形態において、本発明は、バイオテクノロジー生成物残留物を検出する方法であって、テスト試料が、捕捉抗体またはこの抗原結合断片を含む基質と接触し、抗体-抗原複合体の検出がバイオテクノロジー生成物残留物の存在を示し、バイオテクノロジー生成物残留物の存在が生成物キャリアオーバーを示す方法を対象とする。

【0010】

特定の実施形態において、本発明は、バイオテクノロジー生成物残留物を検出する方法であって、テスト試料が、捕捉抗体またはこの抗原結合断片を含む基質と接触し、抗体-

50

抗原複合体の検出がバイオテクノロジー生成物残留物の存在を示し、バイオテクノロジー生成物残留物の存在が不十分な洗浄工程を示す方法を対象とする。

【0011】

特定の実施形態において、本発明は、バイオテクノロジー生成物残留物を検出する方法であって、テスト試料が、捕捉抗体またはこの抗原結合断片を含む基質と接触し、抗体-抗原複合体の検出がバイオテクノロジー生成物残留物の存在を示し、抗原が核酸生成物に由来する方法を対象とする。

【0012】

特定の実施形態において、本発明は、バイオテクノロジー生成物残留物を検出する方法であって、テスト試料が、捕捉抗体またはこの抗原結合断片を含む基質と接触し、抗体-抗原複合体の検出がバイオテクノロジー生成物残留物の存在を示し、抗原が、酵素、ペプチドホルモン、ポリクローナル抗体、ヒトモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体、単鎖抗体、F a b 抗体断片、F (a b ') 2 抗体断片、F d 抗体断片、F v 抗体断片、単離されたC D R、ダイアボディおよび免疫接着物 (i m m u n o a d h e s i o n) に由来する方法を対象とする。

10

【0013】

特定の実施形態において、本発明は、バイオテクノロジー生成物残留物を検出する方法であって、テスト試料が、捕捉抗体またはこの抗原結合断片を含む基質と接触し、抗体-抗原複合体の検出がバイオテクノロジー生成物残留物の存在を示し、抗原が抗体生成物に由来する方法を対象とする。

20

【0014】

特定の実施形態において、本発明は、バイオテクノロジー生成物残留物を検出する方法であって、テスト試料が、捕捉抗体またはこの抗原結合断片を含む基質と接触し、抗体-抗原複合体の検出がバイオテクノロジー生成物残留物の存在を示し、捕捉抗体またはこの抗原結合部分が、抗ヒトI g G (H + L) 抗体、抗ヒトI g G F (a b ') 2 抗体、抗ヒトI g G カッパ抗体、抗ヒトI g G ラムダ抗体、抗マウスI g G (H + L) 抗体およびこれらの組み合わせからなる群から選択される方法を対象とする。

【0015】

特定の実施形態において、本発明は、バイオテクノロジー生成物残留物を検出する方法であって、テスト試料が、別個の結合特異性を有する2つ以上の捕捉抗体またはこの抗原結合断片を含む基質と接触し、抗体-抗原複合体の検出が、基質が含むバイオテクノロジー生成物残留物の存在を示す方法を対象とする。特定の実施形態において、別個の特異性を有する捕捉抗体は、特定の比で基質上に存在する。

30

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】選択された検出抗体 (H R P コンジュゲート) が、S D S - P A G E およびウェスタンブロッティングを用いて2つの生成物：この試験における主な標的であるA b # 1 および洗浄剤に曝露後の認識をテストするためのモデルとしてのA b # 2 の認識についてテストされた実験の結果を示す図である。ストリンジেন্টな設備洗浄条件を模倣するために、A b # 1 およびA b # 2 は、75 で30分間、C I P - 1 0 0 (2 . 5 %) およびC I P - 2 0 0 (2 . 5 %) と共にインキュベートされた。インキュベーション後、テスト試料は中和された。インタクトな分子および中和処理された試料がS D S - P A G E に添加され、抗ヒトI g G (H + L) と比較してプロットされた。図は、インタクトな (*)、C I P - 1 0 0 処理 (1) またはC I P - 2 0 0 処理 (2) されたA b # 2 およびA b # 1 の抗ヒトI g G (H + L) のS D S - P A G E およびウェスタンブロッティングを具体的に表している。

40

【図2】下記のS D S - P A G E 分離を示す図である：S e e B l u e P l u s 2 S T D (レーン1) ; A b # 1 (レーン3) ; A b # 2 (レーン4) ; A b # 1 1 (レーン5) ; A b # 3 (レーン6) ; A b # 1 3 (レーン7) ; A b # 9 (レーン8) ; およびS e e B l u e P l u s 2 S T D (レーン10) 。 レーン3 および9 は空白であ

50

る。

【図3】抗ヒトIgG (H+L)抗体を用いた、図2に概説されているように実施されたSDS-PAGE分離のウェスタンブロット分析を示す図である。

【図4】抗ヒトIgG F(ab')₂抗体を用いた、図2に概説されているように実施されたSDS-PAGE分離のウェスタンブロット分析を示す図である。

【図5】抗ヒトIgGラムダ抗体を用いた、図2に概説されているように実施されたSDS-PAGE分離のウェスタンブロット分析を示す図である。

【図6】抗ヒトIgG kappa抗体を用いた、図2に概説されているように実施されたSDS-PAGE分離のウェスタンブロット分析を示す図である。

【図7】抗マウスIgG (H+L)抗体を用いた、図2に概説されているように実施されたSDS-PAGE分離のウェスタンブロット分析を示す図である。

【図8】Ab # 1、Ab # 2およびAb # 11を検出するための組み合わせの感受性および適合性に基づき組み合わせられたAb (下の表5に概説されているような)に基づく参照標準曲線を示す図である。曲線は全て、二次フィットと0.9999の相関係数を有し、各曲線範囲は0.25から8 ng/mLであった。

【図9】本明細書で使用される分析方法の直線性の確立に向けた実験を示す図である。分析方法の「直線性」は、目的とする分析物の濃度に正比例する、または十分に定義された数学的変換により目的とする分析物の濃度に比例するテスト結果を導く該方法の能力である。0.25から8 ng/mLの範囲の標準物質は、Ab # 1薬剤物質から調製された。標準物質および緩衝液ブランクがプレートに添加され、テストされた。プロットは図9に示されている：Ab # 1標準曲線 (プレート1、上段；プレート# 2、中段およびプレート# 3、下段)。二次フィットの相関係数は、0.999より大きかった。結果は、標準物質の吸光反応が二次フィットによるタンパク質濃度に比例することを示している。

【図10】本明細書で使用される分析方法の範囲の確立に向けた実験を示す図である。分析方法の「範囲」は、分析物の上位と下位の間であり、該区間は、書かれているような方法を用いて適切なレベルの精度、正確度および直線性により決定することができる。アッセイの範囲は、直線性、正確度、精度および定量限界に基づき0.25から8 ng/mLとして確立された。二次フィットの相関係数値は、0.999より大きかった。これは、0.25から8 ng/mLの範囲において、吸光反応が二次フィットによるタンパク質濃度に比例することを示している。スパイク回収試験は、2つの異なる工程内試料中の1.0、2.0および4.0 ng/mLレベルの標準物質で実施された。回収率は100 ± 7.9%であった。これは、アッセイが推定範囲において厳密および正確であることを示している。結果は表17にまとめられており、第1および第2ロットからの参照標準曲線は図10に示されている：第1 (上段) および第2ロット (下段) Abを用いたAb # 1標準曲線。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明は、バイオテクノロジー生成物の製造において、生成物キャリアオーバーをモニタリングする時にバイオテクノロジー生成物残留物を検出するための、および/または洗浄確認のための組成物および高感度な方法に関する。特に、本発明は、1つまたは複数の捕捉抗体またはこの抗原結合断片が、バイオテクノロジー生成物の生成に伴う残留物を検出するのに使用される免疫アッセイを対象とする。

【0018】

5.1 キャリーオーバーモニタリングおよび洗浄確認

本発明の組成物および方法によるキャリーオーバーモニタリングおよび洗浄確認は、材料の汚染またはキャリーオーバーがAPI品質に最大のリスクをもたらす状況および工程段階に対して行うことができる。しかし、本発明の組成物および方法は、API品質に最小限のリスクをもたらすか直接のリスクをもたらさない状況および工程段階に同様に適用できるが、その他の点では本発明の組成物および方法の使用は望ましいこのような実施の望ましさに影響を与える要因には、従業員の健康および安全性、工程装置保守、効率的な

10

20

30

40

50

工程開発最適化の必要性、ならびにバイオテクノロジー生成物の生成に使用される設備および/または工程装置に関する環境条件を含むが、これらに限定されない。

【0019】

特定の実施形態において、本発明の組成物および方法を用いたキャリアオーバーのモニタリングおよび/または洗浄手順の確認は、実際の装置使用パターンを反映するように設計される。限定するものではないが、例えば、1つを超えるAPIが同じ装置を用いて製造され、および装置が同じ工程により洗浄される状況では、代表的なAPIが本発明の組成物および方法によるバリデーションに選択され得る。代替の実施形態において、同じ装置を用いて製造された1つもしくは複数のAPIの組み合わせ、または全てのAPIの組み合わせが、本発明の組成物および方法によるバリデーションに選択され得る。特定の実施形態において、APIまたはAPIの組み合わせの選択は、APIの溶解度および洗浄の困難さなどの(ただし、これらに限定されない)要因に基づく。さらに、特定の実施形態において、残留限界の計算は、APIの効力、毒性および安定性などの(ただし、これらに限定されない)要因に基づく。

10

【0020】

特定の実施形態において、本発明の方法は、キャリアオーバーをモニタリングおよび/または洗浄手順を確認するために、特定の工程段階での試料採取を伴う。特定の実施形態において、試料採取には、スワブ法(swabbing)、リンス法(rinsing)、およびテスト材料を得るための当業者に公知の任意の代替方法(例えば、直接抽出)が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、試料採取は、不溶性残留物を検出するために実施される。代替の実施形態において、試料採取は、可溶性残留物を検出するために使用される。特定の実施形態において、試料採取は、不溶性および可溶性残留物の両方を検出するために使用される。

20

【0021】

特定の実施形態において洗浄手順は、手順が日常的な生成の中で使用される場合に依然として有効であることを確保するために、最初のバリデーション後特定の間隔でモニタリングされる。特定の実施形態において、該間隔は各生成実行後となる。しかし、代替の間隔、例えば(ただし、これらに限定されない)、特定の回数生成実行後、フィルターもしくはベントなどの特定の工程装置が交換された後、または培地などの特定の生成構成要素が導入された後は、当技術分野で公知である。

30

【0022】

5.2 バイオテクノロジー生成物残留物の検出アッセイ

本発明は、目的とする生成物残留物を結合することができる1つまたは複数の捕捉抗体またはこの抗原結合断片を含む、バイオテクノロジー生成物残留物検出アッセイに関する。特定の実施形態において、捕捉抗体またはこの抗原結合断片は、免疫アッセイとの関連で使用される。このような免疫アッセイには、サンドイッチELISA、阻害ELISA、放射免疫アッセイ、蛍光免疫アッセイおよび化学発光免疫アッセイが含まれるが、これらに限定されない。本発明の具体的な実施形態において、サンドイッチELISAが使用される。

【0023】

本発明の特定の実施形態において、サンドイッチELISAが、バイオテクノロジー生成物残留物の試料をアッセイするために使用される。一般的に言えば、サンドイッチELISAでは、表面は最初に、多量の捕捉抗体が結合され得るように調製される。調製された表面上のいずれの非特異的結合部位も、次いでブロックされる。このようなブロックは、ウシ血清アルブミンなどの(ただし、これに限定されない)ブロッキングタンパク質に表面を曝露させることを含む(ただし、これに限定されない)、当技術分野で一般的に公知の方法により達成することができる。非特異的結合部位のブロック後、表面はテスト試料と接触する。表面は、生成物残留物と捕捉抗体の間の結合を可能にするためにテスト試料と共にインキュベートされ、任意の生成物残留物が存在するはずである。インキュベーション期間が完了すると、表面は、非結合分子を除去するために洗浄される。特定の実施

40

50

形態において、生成物残留物を結合することができる第二の非標識抗体が、次いで添加される。このような実施形態において、二次抗体の定常領域に特異的な第三の酵素結合抗体、またはさもなければ標識抗体が添加される。表面は次いで、非結合抗体 - 標識コンジュゲートが洗い流されるように洗浄される。標識からのシグナル、例えば、測定することができるカラーシグナルまたは電気化学的シグナルを誘発するために、化学薬品が次いで添加される。シグナルは、標的断片の存在および量の指標として測定される。代替の実施形態において二次抗体は、これ自体が標識されまたは酵素に結合され、これにより三次抗体の必要性を現実的に意味のないものにする。

【0024】

特定の実施形態において、免疫アッセイが実施される表面として使用される固相は、表面、粒子、多孔性マトリックス等の形態での支持体/担体を含む、本質的に水不溶性である任意の不活性支持体または担体であってもよい。例示的な支持体/担体には、小シート、セファデックス(商標)、ポリ塩化ビニル、プラスチックビーズ、および96ウェルマイクロタイタープレートを含む、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン等から製造されるアッセイプレートまたは試験管のほか、濾紙、アガロース、架橋デキストランおよび他の多糖類などの粒子材料が含まれる。あるいは、臭化シアン活性化炭水化物などの反応性水不溶性マトリックスおよび反応性基質が、捕捉試薬固定化に適切に使用されてもよい。

【0025】

具体的な実施形態において、固定化捕捉抗体は、マイクロタイタープレートにコーティングされる。限定するものではなく、例えば、固相は、いくつかの試料を同時に分析するのに使用することができるマルチウェルマイクロタイタープレートであってもよい。マイクロタイタープレートの例には、Maxisorb(商標)またはImmulon(商標)(Nunc、ロスキレ、デンマーク)などの96ウェルElisaプレートが含まれる。さらに、Luminex(商標)技術などの多重ELISA技術は、数百のELISAを同時に行うのに使用することができる(Millipore)。このような多重ELISAアッセイ法は、当技術分野でよく知られており、Luminex(商標)技術のほかに、多数の分析物を同時に調べるための複数の捕捉および/または検出抗体の使用を伴うさまざまな技術を含む。このような多重アッセイにおけるさまざまな検出抗体の識別は、複数の別個の標識の使用を伴う。代替の多重アッセイ技術には、LiquiChip(商標)システム(Qiagen)およびBD(商標)Cytometric Bead Array(BD Bioscience)が含まれる。

【0026】

本発明は、本明細書に記載された必要とされる特徴を示す全ての捕捉抗体を包含する。限定するものではないが、例えば、本明細書に例証された反応性のパターンを有する抗体は、該抗体が属する免疫グロブリンクラスまたはサブクラスにかかわらず本発明の範囲内である。特定の実施形態において適切なモノクローナル抗体は、クラスIgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、またはクラスIgM、IgA、または任意の他の公知のIgクラスもしくはサブクラスの抗体であり得る。

【0027】

本発明の選択された捕捉抗体またはこの抗原結合断片は、当業者に利用可能な任意の方法により適切な基質に固定化される。特定の実施形態において抗体または抗原結合断片は、基質上の選択された官能基に直接結合される。あるいは、抗体または抗原結合断片は、リンカーまたはスペーサーを介して基質に間接的に結合される。特定の実施形態において、結合は、捕捉抗体またはこの抗原結合断片をストレプトアビジン(またはビオチン)に共有結合させて達成することができ、次いで、基質に共有結合されたビオチン(またはストレプトアビジン)部分を介して基質への結合が間接的に生じる。あるいは、チオール末端シランが基質表面のコーティングに使用されてもよく、ヘテロ二官能性架橋剤、例えば、N-ガンマ-マレイミドブチリルオキシスクシンイミドエステル(GMBS)が、抗体または抗原結合断片結合に使用されてもよい。米国特許第5,077,210

10

20

30

40

50

号を参照のこと。この方法により、抗体またはこの抗原結合断片は、高密度（例えば、 2 ng/mm^2 ）で固定化され得る。

【0028】

別の種類の表面固定化法は、ポリマーヒドロゲルマトリックスを使用する。これらの材料は、典型的には大量の水を含有し、柔らかく、生体不活性である。例には、ポリ（ビニルアルコール）の架橋ポリマーフィルムおよびカルボキシメチルデキストランの架橋ポリマーフィルムが含まれる。Kobayashi, J. および Y. Ikada, 「Covalent Immobilization of Proteins Onto the Surface of Poly(vinyl alcohol) Hydrogel」、*Biomaterials*、12、(1991)、747-751頁；Johnsson, B.ら、「Immobilization of Proteins to a Carboxymethyl dextran-Modified Gold Surface for Biospecific Interaction Analysis in Surface Plasmon Resonance Sensors」、*Anal. Biochem.*、196、(1991)、268-277頁；Lofas, S. および B. Johnsson, 「A Novel Hydrogel Matrix on Gold Surfaces in Surface Plasmon Resonance Sensors for Fast and Efficient Covalent Immobilization of Ligands」、*J. Chem. Soc. Commun.*、(1990)、1526-1528頁）を参照のこと。

10

20

【0029】

本発明の捕捉抗体には、Hu IgG (H+L)、Hu IgG F(ab')₂、Hu IgG、Hu IgG および Ms IgG (H+L) が含まれるが、これらに限定されない。

【0030】

さらに、捕捉抗体またはこの抗原結合断片により提供される機能、例えば、基質表面への特定のバイオテクノロジー生成物残留物の結合は、伝統的なモノクローナル抗体の代替物を用いて達成されてもよい。伝統的なモノクローナル抗体の代替物には、アフイボディ、ドメイン抗体、ナノボディおよびユニボディなどの抗体模倣体が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0031】

特定の実施形態において、別個の結合特異性を有する複数の捕捉抗体またはこの抗原結合断片が、基質表面に結合される。複数の捕捉抗体またはこの抗原結合断片の包含は、複数のバイオテクノロジー生成物残留物を同時に検出することを可能にする。このようなバイオテクノロジー生成物残留物は、同じまたは異なる生成物から得ることができる。限定するものではないが、例えば、単一のモノクローナル抗体生成物の生成は、重鎖残留物、軽鎖残留物、可変領域残留物、および定常領域残留物を含むが、これらに限定されないさまざまな生成物残留物をもたらす得る。特定の実施形態において、さまざまな捕捉抗体またはこの抗原結合断片は、特定の比で存在する。捕捉抗体の混合物のような1つの非限定的な例は、下の表5に概説されており、下記の抗体：Hu IgG (H+L)、Hu IgG F(ab')₂、Hu IgG、Hu、および Ms IgG (H+L) が、下記の比：1 : 2 : 16 : 8 : 8 で存在している。

40

【0032】

選択された捕捉抗体またはこの抗原結合断片を適切な基質に固定化し、およびこの捕捉抗体またはこの抗原結合断片を、キャリアオーバーのモニタリングおよび/または洗浄確認のための試料に曝露させた後、バイオテクノロジー生成物残留物の結合を可視化することが必要である。このような可視化は、バイオテクノロジー生成物残留物上のエピトープを特異的に結合する検出抗体の添加により、一般に達成される。

【0033】

検出抗体は、蛍光色素、化学発光および放射性標識などの部分を通じて直接検出されて

50

もよく、または酵素などの、反応もしくは誘導体化されなければならない部分を通じて間接的に検出されてもよい。直接検出することができる部分の例には、放射性同位体、希土類キレートまたはフルオレセインおよびこの誘導体；ローダミンおよびこの誘導体などのフルオロフォアが含まれる。反応または誘導体化されなければならない部分の例には、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ；アルカリホスファターゼ、b-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカライドオキシダーゼ、ヘテロサイクリックオキシダーゼ、ビオチン/アビジン、ビオチン/ストレプトアビジン、ビオチン/ストレプトアビジン-HRP、スピン標識、パセリオファージ (*bacერიophage*) 標識、安定なフリーラジカル等が含まれるが、これらに限定されない。これらの検出可能な部分を検出抗体に共有結合するには、従来の方法が利用可能である。例えば、ジアルデヒド、カルボジイミド、ジマレイミド、ビス-イミデート、ビス-ジアゾ化ベンキシジン (*bis-diazotized benzidine*) 等のカップリング剤が、抗体を上記標識でタグ付けするのに使用されてもよい。

10

20

30

40

50

【0034】

サンドイッチアッセイにおいて2つの抗体は、各々が標的抗原を結合し、しかし互いに相互作用または結合しない場合に最も有効に作動するため、検出抗体による反応性について、固定化捕捉抗体もしくはこの抗原結合断片がテストされ、または3つの抗体系の場合、二次抗体および検出抗体がテストされる。標的抗原に対する高い親和性を保持しつつ、捕捉抗体またはこの抗原結合断片と検出抗体の間では低い反応性が好ましい。さらに、抗体対は、各々が別個の位置で標的バイオテクノロジー生成物残留物を結合する場合に最も有効に作動する。したがって、抗体は、重複する結合特異性を有する抗体の対形成を避けるように評価されるべきである。

【0035】

バイオテクノロジー生成物残留物に対する捕捉抗体またはこの抗原結合断片の使用は、キャリアオーバーをモニタリングする、および/または洗浄をバリデーションするための有利なアプローチである。モノクローナル抗体の高い特異性および感受性のため、本発明の組成物および方法は、TOCアッセイの現在の限界よりはるかに低い極低用量のバイオテクノロジー生成物残留物を検出することができる。さらに、このような抗体検出方法は、目的とするAPIの存在を特異的に同定することができ、故にICH Q7Aおよびカナダ保健省ガイド-0028の推奨範囲に入る。

【0036】

5.3 抗体生成のキャリアオーバーモニタリングおよび洗浄確認

特定の実施形態において、本発明は、APIが抗体である医薬品の生成との関連で、生成物キャリアオーバーのモニタリングおよび/または洗浄確認のための組成物および方法を対象とする。特定の実施形態において、抗体は、裸の抗体として、(毒素または標識などの、ただし、これらに限定されない) パートナー分子にコンジュゲートされた抗体として医薬品との関連で使用されてもよく、またはさもなければ修飾されてもよい(修飾アミノ酸の包含、または炭水化物側鎖の付加、欠失もしくは修飾によるなど(ただし、これらに限定されない))。特定の実施形態において、このような生成物キャリアオーバーのモニタリングおよび/または洗浄確認は、ポリクローナル抗体の生成との関連においてのものである。特定の実施形態においてこのような生成物キャリアオーバーのモニタリングおよび/または洗浄確認は、研究または診断用途で使用する抗体の生成との関連においてのものである。特定の実施形態において、このような生成物キャリアオーバーのモニタリングおよび/または洗浄確認は、治療用途の抗体の生成との関連においてのものである。

【0037】

特定の実施形態において生成物キャリアオーバーのモニタリングおよび/または洗浄確認は、治療用途のモノクローナル抗体の生成との関連においてのものである。商業的生成

では現在、治療的モノクローナル抗体分子の3つの幅広いカテゴリー：完全ヒト抗体、ヒト化抗体およびキメラ抗体がある。完全ヒト抗体分子は、ヒト細胞に由来、またはヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する非ヒト細胞に由来する抗体である。対照的に、ヒト化抗体は、マウスなどのヒト以外の動物において得られる抗体であるが、ヒト抗体配列を反映するようにこの後に修飾されている。この修飾は主に、抗体の投与に対する免疫学的応答を最小化するように生じる。しかし、特定の実施形態において、ヒト化抗体は、1つまたは複数の最初の非ヒト配列を保持する。非ヒト配列のこのような保持は、一般に、抗体の治療的に有効な活性を保存するために実施される。最後に、キメラ抗体分子は、ヒト化定常領域および非ヒト可変領域からなる。キメラ抗体は、一般に、ヒト以外の動物で生成された抗体の可変（抗原結合）領域を、ヒト抗体の定常（免疫系エフェクター）領域に作動可能に結合するための組換えDNA技術を用いて生成される。

10

【0038】

特定の実施形態において、本発明は、完全ヒト抗体生成との関連で、生成物キャリアーのモニタリングおよび/または洗浄確認のための組成物および方法を対象とする。代替の実施形態において、本発明は、ヒト化抗体生成との関連で、生成物キャリアーのモニタリングおよび/または洗浄確認のための組成物および方法を対象とする。代替の実施形態において、本発明は、キメラ抗体生成との関連で、生成物キャリアーのモニタリングおよび/または洗浄確認のための組成物および方法を対象とする。特定の実施形態、具体的には、複数の抗体が同じ設備および/または工程装置を用いて生成されている実施形態において、本発明は、完全ヒトおよびヒト化、完全ヒトおよびキメラ、ヒト化およびキメラ、または完全ヒト、ヒト化およびキメラ抗体生成との関連で、生成物キャリアーのモニタリングおよび/または洗浄確認のための組成物および方法を対象とする。

20

【0039】

治療的抗体を含むがこれに限定されない抗体の間のさらなる多様性は、特定の抗体を含む特異的重鎖および軽鎖に関連して生じる。免疫グロブリン分子は、ジスルフィド結合により相互接続された4つのポリペプチド鎖、2つの重（H）鎖および2つの軽（L）鎖からなる。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではHCVRまたはVHと略される）および重鎖定常領域（CH）からなる。重鎖定常領域は、3つのドメイン、CH1、CH2およびCH3からなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではLCVRまたはVLと略される）および軽鎖定常領域からなる。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、CLからなる。VHおよびVL領域は、フレームワーク領域（FR）と呼ばれるより保存された領域が散在した、相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変性の領域にさらに細分することができる。各VHおよびVLは、3つのCDRおよび4つのFRからなり、アミノ末端からカルボキシ末端に下記の順番：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4で並んでいる。例えば、ヒト抗体は、重鎖のアミノ酸配列に基づき下記の特定のアイソタイプ：IgA₁、IgA₂、IgD、IgE、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄およびIgMに分類することができる。さらに、抗体は、軽鎖の配列がカッパ（ κ ）またはラムダ（ λ ）軽鎖配列かどうかに応じて、2つの群に分類することができる。

30

【0040】

特定の実施形態において、本発明は、IgA₁、IgA₂、IgD、IgE、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄およびIgM抗体生成との関連で、生成物キャリアーのモニタリングおよび/または洗浄確認のための組成物および方法を対象とする。代替の実施形態において、本発明は、カッパまたはラムダ抗体生成との関連で、生成物キャリアーのモニタリングおよび/または洗浄確認のための組成物および方法を対象とする。特定の実施形態、具体的には、複数の抗体が同じ設備および/または工程装置を用いて生成されている実施形態において、本発明は、抗体アイソタイプおよび軽鎖利用の任意の組み合わせを有する抗体の生成との関連で、生成物キャリアーのモニタリングおよび/または洗浄確認のための組成物および方法を対象とする。

40

【0041】

50

完全長抗体に加えて、特定の抗体断片が、研究、開発においておよび治療薬としてしばしば使用される。限定するものではないが、例えば、このような抗体断片は、完全長抗体またはこの部分の抗原結合部分全体を含むことができる。用語、抗体の「抗原結合部分」内に包含される結合断片の例には、(i) VL、VH、CLおよびCH1ドメインを含む一価断片、Fab断片、(ii) ヒンジ領域でジスルフィド架橋により結合された2つのFab断片を含む二価断片、F(ab')₂断片、(iii) VHおよびCH1ドメインを含むFd断片、(iv) 抗体の単一アームのVLおよびVHドメインを含むFv断片、(v) VHドメインを含むdAb断片(Wardら、(1989) Nature 341: 544-546頁、この教示全体が参照により本明細書に組み込まれている)、および(vi) 単離された相補性決定領域(CDR)が含まれる。さらに、Fv断片の2つのドメイン、VLおよびVHは、別々の遺伝子によりコードされるが、これらは、VLおよびVH領域が対になって一価分子を形成する単一のタンパク質鎖として作製できるようにする合成リンカーにより、組換え方法を用いて連結することができる(単鎖Fv(scFv))として知られる; 例えば、Birdら(1988) Science 242: 423-426頁; およびHoustonら(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883頁(これらの教示全体が参照により本明細書に組み込まれている)を参照のこと)。このような単鎖抗体も、用語、抗体の「抗原結合部分」内に包含されることが意図される。ダイアボディなどの、単鎖抗体の他の形態もまた包含される。ダイアボディは、VHおよびVLドメインが単一のポリペプチド鎖上に発現される二価の二重特異性抗体であるが、同じ鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするには短すぎるリンカーを用い、これによりドメインを別の鎖の相補性ドメインと対形成させ、2つの抗原結合部位を作る(例えば、Holliger, P.ら(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448頁; Poljak, R. J.ら(1994) Structure 2: 1121-1123頁(これらの教示全体が参照により本明細書に組み込まれている)を参照のこと)。さらに、抗体またはこの抗原結合部分は、1つまたは複数の他のタンパク質またはペプチドとの抗体または抗体部分の共有または非共有結合性会合により形成される、より大きな免疫接着分子の部分であってもよい。このような免疫接着分子の例には、四量体scFv分子を作製するためのストレプトアビジンコア領域の使用(Kipriyanov, S. M.ら(1995) Human Antibodies and Hybridomas 6: 93-101頁)、ならびに二価およびビオチン化scFv分子を作製するためのシステイン残基、マーカーペプチドおよびC末端ポリヒスチジンタグの使用(Kipriyanov, S. M.ら(1994) Mol. Immunol. 31: 1047-1058頁)が含まれる。FabおよびF(ab')₂断片などの抗体部分は、それぞれ、抗体全体のパインまたはペプシン消化などの従来手法を用いて、抗体全体から調製することができる。さらに、抗体、抗体部分および免疫接着分子は、標準的組換えDNA法を用いて得ることができる。1つの態様において、抗原結合部分は、完全なドメインまたは完全なドメインの対である。

【0042】

特定の実施形態において、本発明は、下記の非限定的な群: Fab、F(ab')₂、Fd、Fv、scFv、単離されたCDR、ダイアボディ、および免疫接着物から選択される1つもしくは複数の、または任意の組み合わせの抗体断片および抗体断片含有分子を検出するための組成物および方法を含む。

【0043】

5.4 捕捉および検出抗体の生成

用語「捕捉抗体」および「検出抗体」は、本セクションで使用されるとき、インタクトな抗体またはこの抗原結合断片を指す。本開示の捕捉および検出抗体は、目的とする抗原による動物の免疫化と、これに続く従来のモノクローナル抗体の方法(例えば、KohlerおよびMilstein(1975) Nature 256: 495頁の標準的体細胞ハイブリダイゼーション法)を含むさまざまな手法により得ることができる。原則とし

10

20

30

40

50

て、体細胞ハイブリダイゼーション手順が好ましいが、モノクローナル抗体を生成するための他の手法が使用されてもよい（例えば、Bリンパ球のウイルス形質転換または発がん性形質転換）。

【0044】

ハイブリドーマを調製するための1つの好ましい動物系は、ネズミ系である。ハイブリドーマ生成は、極めて十分に確立された手順である。融合のために免疫化脾細胞を単離する免疫化プロトコルおよび手法は、当技術分野で公知である。融合パートナー（例えば、ネズミ骨髄腫細胞）および融合手順も公知である。

【0045】

抗体は、好ましくは、ヒト、キメラまたはヒト化抗体であってもよい。本開示のキメラまたはヒト化抗体は、上記のように調製された非ヒトモノクローナル抗体の配列に基づき調製することができる。重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードするDNAは、目的とする非ヒトハイブリドーマから得ることができ、標準的分子生物学手法を用いて、非ネズミ（例えば、ヒト）免疫グロブリン配列を含有するように改変することができる。例えば、キメラ抗体を作るには、ネズミ可変領域が、当技術分野で公知の方法を用いてヒト定常領域に結合されてもよい（例えば、Cabillyらに対する米国特許第4,816,567号を参照のこと）。ヒト化抗体を作るには、ネズミCDR領域が、当技術分野で公知の方法を用いてヒトフレームワークに挿入されてもよい（例えば、Winterに対する米国特許第5,225,539号、ならびにQueenらに対する米国特許第5,530,101号；第5,585,089号；第5,693,762号および第6,180,370号を参照のこと）。

10

20

【0046】

特定の実施形態において、本発明は、生成されている特定のバイオテクノロジー生成物に対する適切な捕捉および/または検出抗体またはこの抗原結合断片を同定するための、捕捉および/または検出抗体またはこの抗原結合断片のパネルの評価を伴う。例示的だが非限定的なパネルには、抗ヒトIgG(H+L)抗体、抗ヒトIgG F(ab')₂抗体、抗ヒトIgG kappa抗体、抗ヒトIgGラムダ抗体および抗マウスIgG(H+L)抗体が含まれる。抗ヒトIgG(H+L)は、(完全ヒト/ヒト化抗体)生成物分子全体を捕捉および/または検出するために使用され；抗ヒトIgG F(ab')₂、抗ヒトIgG kappaおよび抗ヒトIgGラムダは、生成物結合部位がヒトまたはヒト化されている場合、生成物結合部位を捕捉および/または検出し、抗マウスIgG(H+L)は、キメラ生成物に対する特異性を提供する。特定の実施形態、特に、装置洗浄後に生じるような実施形態において、残留生成物が断片化され、分解されまたはさもなければ変性される可能性がある場合、さまざまな捕捉および/または検出抗体の組み合わせが、できる限り多くの生成物残留物の検出を確保する。

30

【実施例】

【0047】

6.1 ELISA検出アッセイ

本発明は、特定の実施形態において、1つまたは複数の捕捉抗体またはこの結合断片が、バイオテクノロジー生成物の生成に伴う残留物を検出するのに使用される免疫アッセイを対象とする。表1に示されているように、5つの市販の捕捉抗体を、最初のアッセイ開発に関連して評価した。西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)とコンジュゲートしたこれらの同じ5つの抗体(「Ab」)も、検出抗体としてこの試験において評価した。

40

【0048】

【表 1】

表1 捕捉抗体

Ab特異性	ベンダー	捕捉Ab (カタログ#)	検出Ab (カタログ#)
α Hu IgG (H+L)	Pierce	31119	31412
α Hu IgG F(ab') ₂	Pierce	31122	31414
α Hu IgG μ	Southern Biotech	2070-01	2070-05
α Hu IgG μ	Southern Biotech	2060-01	2060-05
α Ms IgG (H+L)	Pierce	31164	31430

10

【0049】

選択した検出抗体（HRPコンジュゲート）を、ウェスタンブロットティングを用いて2つの生成物：この試験における主な標的であるAb#1および洗浄剤に曝露後の認識をテストするためのモデルとしてのAb#2の認識についてテストした。ストリンジেন্টな設備洗浄条件を模倣するために、Ab#1およびAb#2を、75°Cで30分間、CIP-100（2.5%）およびCIP-200（2.5%）と共にインキュベートした。インキュベーション後、テスト試料を中和した。インタクトな分子および中和処理した試料をSDS-PAGEに添加し、抗ヒトIgG（H+L）と比較してプロットした。

【0050】

図1に示されているように、Ab#1およびAb#2残留物は、抗ヒトIgG（H+L）により検出された。CIP-100処理した試料が最も分解されていた。分解された生成物は検出されなかったが、残留生成物は依然として検出された。CIP-200処理した試料からいくつかの凝集物およびかなりの量のAb残留物が生じた。凝集物および残留生成物は、抗ヒトIgG（H+L）により検出された。抗ヒトIgG（H+L）は、モノクローナル抗体生成物を検出するのに適している。洗浄溶液にスパイクした抗体濃度は、生成切り替えからの実際の洗浄試料より約1000倍高いことが予測された。より高いタンパク質濃度が、アッセイ開発のためのELISA検出試薬を選択するのに必要とされた。

20

【0051】

一般的なmAb分子の検出Ab認識をさらに試験するために、完全ヒト、ヒト化、キメラ、カッパおよびラムダ軽鎖モノクローナル抗体を、表1の5つの市販の検出Abに対してテストした。結果を図2から図7に示す。

30

【0052】

全ての5つの検出Abは、予測された生成物を認識した（表2）。抗ヒトIgG（H+L）および抗ヒトIgG F(ab')₂は、全ての生成物を認識した（図3および図4）。抗ヒトIgGラムダのみが、ラムダ軽鎖を有するAb#1およびAb#3を認識した（図5）。抗ヒトIgGカッパは、カッパ軽鎖を有するAb#2、Ab#11、Ab#13およびAb#9を強く認識したが、他の分子ともわずかに交差反応性があった（図6）。抗マウスIgG（H+L）は、マウスおよびヒトキメラ生成物、Ab#11を強く認識したが、他のヒト生成物もわずかに検出した（図7）。このわずかな交差反応性現象は、ウェスタンブロットでは、この方法が定量的でないことから用量依存的であり、無負荷量試験（no load quantity study）を実施した。テスト分子間の交差反応性を識別するためのさらなる試験を以下に記載する。

40

【0053】

【表 2】

表2 ABCで生成されたmAb生成物

分子	アイソタイプ	種	軽鎖
Ab #2	IgG1	完全ヒト	κ
Ab #3			λ
Ab #4 (Ab#3の予備)		ヒト化	κ
Ab #5			κ
Ab #6			κ
Ab #7			κ
Ab #8 (Ab#7の予備)			κ
Ab #9 (DVD, Ab #2および Ab #14)			κ
Ab #10 (DVD AB #3および AB #7)			κ
Ab #1		ヒト化H、 キメラL (ヒトおよびラット)	λ
Ab #11		キメラ	κ
Ab #12		ヒト化	κ
Ab #13			κ

10

20

【 0 0 5 4 】

各単一捕捉および検出 A b を、最初の評価のため個々に E L I S A により個々に評価した。プレートに 10 μ g / m L 捕捉 A b でコーティングし、2 および 5 μ g / m L 検出 A b で検出した。これらのスクリーニング結果に基づき、関連生成物に対し、各 A b を 3 つの捕捉条件および 6 つの検出条件でテストする実験を実施して、各単一 A b 量をさらに試験した。A b # 1 が本プロジェクトにおける主な標的であることから、抗ヒト I g G (H + L) および I g G F (a b ') 2 を A b # 1 に適用した。条件および実験結果を表 3 に示す。

30

【 0 0 5 5 】

【表 3】

表3 単一Ab DOEおよび結果

抗体	分子	捕捉Ab ($\mu\text{g/mL}$)	検出Ab ($\mu\text{g/mL}$)	曲線範囲 (ng/mL)	最小 シグナル (AU)	最大 シグナル (AU)
α Hu IgG (H+L)	Ab #1	0.5	0.125	0.25 - 8.0	0.134	3.909
			0.25	0.125 - 4.0	0.124	3.135
		1.0	0.25	0.25 - 8.0	0.182	3.873
			0.5	0.125 - 4.0	0.305*	3.101
		2.0	0.5	0.125 - 8.0	0.137	3.836
			1.0	0.125 - 2.0	0.207	3.756
α Hu IgG F(ab') ₂	Ab #1	0.5	0.125	0.125 - 8.0	0.068	2.964
			0.25	0.125 - 8.0	0.340*	3.902
		1.0	0.25	0.25 - 8.0	0.105	3.918
			0.5	0.25 - 8.0	0.273	3.896
		2.0	0.5	0.25 - 8.0	0.134	3.892
			1.0	0.125 - 4.0	0.132	3.177
α Hu IgGラムダ	Ab #1	8.0	1	1.0-32	0.129	3.157
			4	0.25-8	0.105	3.789
α Hu IgGカップ	Ab #2	2.0	0.5	0.5 - 16	0.103	2.931
			1.0	0.25 - 8.0	0.199	2.861
		4.0	1.0	0.25 - 16	0.117	3.374
			2.0	0.25 - 8.0	0.284	3.362
		8.0	2.0	0.5 - 8.0	0.205	3.242
			4.0	0.5 - 8.0	1.344	3.179
α Ms IgG (H+L)	Ab #11	1.0	0.25	2.0 - 64	0.162	2.372
			0.5	1.0 - 32	0.173	2.988
		2.0	0.5	0.5 - 16	0.096	2.650
			1.0	0.5 - 16	0.179	3.255
		4.0	1.0	0.5 - 16	0.172	3.227
			2.0	0.25 - 8.0	0.141	3.168

* 外れ値 プレートウェルが汚染されており、値は評価に使用されなかった。

【0056】

単一Abテストの目的は、各Abについて最高の感受性を達成する最適な組み合わせを見出すことであった。表3の太字にした条件は、0.25から8ng/mLのダイナミックレンジにおいて、最小シグナルはバックグラウンドを上回る信頼できる測定値である0.1を超え、最大シグナルはプレートリーダーの最大値に達したことを示した。これらの条件下で、アッセイは、必要とされるAb #1より10倍を超える感受性に達した。表4は、Ab #1の許容可能キャリーオーバー限界を列挙している。

【0057】

10

20

30

40

【表4】

表4 Ab#1が求める感受性

単位	試料採取	感受性(ng/mL)
全体の工程	スワブ	4
	リンス	7
上流	スワブ	12
	リンス	13
下流	スワブ	8
	リンス	7

10

^aELISA定量限界は0.25ng/mLである。

^bウエスタンブロットィングスクリーニングの間に観察された用量依存的交差反応性は、恐らくはテストした試料のより低い濃度のためELISAでは観察されなかった(データ不図示)。

【0058】

表5に示されているように、5つの単一Abを上記実験結果に従って組み合わせた。

【0059】

【表5】

表5 Ab組み合わせ

Ab	捕捉Ab ($\mu\text{g/mL}$)	捕捉比	検出Ab ($\mu\text{g/mL}$)	プローブ比
α Hu IgG (H+L)	0.5	1	0.125	1
α Hu IgG F(ab') ₂	1	2	0.25	2
α Hu IgG λ	8	16	4	32
α Hu κ	4	8	1	8
α Ms IgG (H+L)	4	8	2	16

20

30

【0060】

組み合わせたAbを、Ab#1、Ab#2およびAb#11検出のための感受性および適合性について再確認した。図8は、これらの生成物に関する標準曲線を示している。曲線は全て、二次フィットと0.9999の相関係数を有し、各曲線範囲は0.25から8ng/mLであった。

【0061】

コーティングおよび検出Abプールを調製する目的は、1000個のプレートに対して十分であるようにするためである。組み合わせ比に基づき、大きな捕捉および検出Abプールを、表6および表7に従って調製した。Abプールは、アッセイ適格性確認に使用した。

40

【0062】

【表 6】

表6 捕捉Abプール

捕捉Ab	ストック濃度 (mg/mL)	添加Ab量 (μ L)	最終量 (mL)	最終濃度 (μ g/mL)	プールAb量 (μ L)
α Hu IgG (H+L)	1.8	2.22	8	0.5	566.7
α Hu IgG F(ab') ₂	2.4	3.33	8	1	850.0
α Hu IgG \square λ	1	64.0	8	8	16320.0
α Hu IgG κ	1	32.0	8	4	8160.0
α Ms IgG (H+L)	1.8	17.78	8	4	4533.3
合計Ab量 (μ L)	データなし	119.3	データなし	データなし	30430.0
1プレート量 (μ L)	24				
合計 プレート数	1275				

10

20

【 0 0 6 3 】

【表 7】

表7 検出Abプール

検出Ab	ストック濃度 (mg/mL)	添加Ab量 (μ L)	最終量 (mL)	最終濃度 (μ g/mL)	プールAb量 (μ L)
α Hu IgG (H+L)	0.8	1.25	8	0.125	400.0
α Hu IgG F(ab') ₂	0.8	2.50	8	0.25	800.0
α Hu IgG λ	1.0	32	8	4	10240.0
α Hu IgG κ	1.0	8	8	1	2560.0
α Ms IgG (H+L)	0.8	20	8	2	6400.0
合計Ab	データなし	63.8	データなし	データなし	20400.0
1プレート量 (μ L)	13				
合計 プレート数	1600				

30

40

【 0 0 6 4 】

アッセイの信頼性を確認するために、Ab # 1スケールアップ実行からのSP溶出液および最終限外濾過/透析濾過(「UF/DF」)をアッセイ適格性確認に使用した。これらの試料は約5mg/mLであることが報告され、したがってこの試験のために希釈された。

【 0 0 6 5 】

通常の条件下で、薬剤物質試料をテスト前に-80で貯蔵した。見込まれる実験室環境を網羅するために、4時間、周囲温度、48時間、2から8、3回の凍結/解凍サイクルでの貯蔵条件を検証した。結果を表8にまとめる。タンパク質結果は、異なる貯蔵条

50

件により著しい影響を受けなかった (< 10%)。

【0066】

【表8】

表8 試料貯蔵の影響

試料貯蔵条件	Ab#1タンパク質濃度(ng/mL)	
	SP溶出液	UF/DF
-80℃貯蔵	2.22	2.08
4時間、周囲温度	2.11	1.89
48時間、2-8℃	2.06	2.2
3回の凍結/解凍サイクル	2.06	1.88

10

【0067】

ELISA基質発色時間は14分間を予定した。時間変動性を評価するために、14 ± 1分間をテストした。結果は、1分のウィンドウ中に影響を受けなかった(表9)。

【0068】

【表9】

表9 基質発色時間

試料	Ab#1タンパク質濃度(ng/mg)		
	13分	14分	15分
SP溶出液	2.12	2.06	2.06
UF/DF	2.16	2.02	2.08

20

【0069】

テストプレートを、2Mリン酸の添加後すぐに読み取って反応を止め、次いで周囲温度に30分間放置した後、再び読み取った。著しい差は観察されなかった (< 10%) (表10)。

【0070】

【表10】

表10 プレートインキュベーション時間

試料	Ab#1タンパク質濃度(ng/mg)	
	初回	30分
SP溶出液	2.06	2.02
UF/DF	1.95	1.91

30

【0071】

分析方法の「精度」は、方法が均一試料の複数回の試料採取に反復して適用される場合、個々のテスト結果の一致度である。

40

【0072】

「アッセイ反復性」は、分析手順が一様な分析条件下で複数回実施される場合、該手順の精度を測定する。SP溶出液および最終UF/DFの6アリコートをもつ1つのプレート内でテストした。タンパク質濃度はアリコートごとに計算した。濃度値のパーセント相対標準偏差は、全ての6つの測定値を用いて計算した。結果を表11にまとめる。タンパク質測定値の相対標準偏差は< 7%であった。

【0073】

【表 1 1】

表11 アッセイ反復性

アリコート#	Ab#1タンパク質濃度(ng/mL)	
	SP	UF/DF
1	2.082	1.967
2	2.186	2.117
3	2.293	2.179
4	2.466	2.086
5	2.014	2.203
6	2.304	1.908
平均	2.224	2.077
標準偏差	0.150	0.107
% RSD	6.75	5.15

10

【0074】

「中間精度」は、分析手順が、異なる日または異なる分析者により実施される場合、実験室内でもたらされたテスト結果の分散の測定値である。

【0075】

SP溶出液および最終UF/DFそれぞれの3アリコートをテストした。この実験は、異なる日に異なる分析者によりさらに2回反復された。試験のアッセイ反復部からの最初の3つの結果を、この試験の1日目に使用した。結果を表12に示す。タンパク質測定値のパーセント相対標準偏差は、< 5%であり、20%の予測された精度範囲内であった。

20

【0076】

【表 1 2】

表12 中間精度

日	分析者	Ab#1タンパク質濃度(ng/mL)				
		再現#	SP溶出液	平均	UF/DF	平均
1	2	1	2.082	2.19	1.967	2.09
		2	2.186		2.117	
		3	2.293		2.179	
2	1	1	1.992	2.06	2.059	2.02
		2	2.042		1.999	
		3	2.137		2.009	
3	2	1	2.011	2.01	2.116	2.06
		2	2.007		2.074	
		3	1.989		1.979	
平均			2.08	2.08	2.06	2.06
標準偏差			0.10	0.09	0.07	0.03
% RSD			4.97	4.48	3.53	1.59

30

40

【0077】

標準曲線の最低点、定量化限界 (quantification limit) を推定するために、8 ng/mL Ab#1標準物質の2倍連続希釈を6回調製し、6つの異なるプレートに添加した。結果を表13に示す。ICHガイドラインによれば、アッセイの定量化限界は、シグナル対ノイズ比が10:1より高い最低濃度、および相対標準偏差が20%未満である。ブランク測定値のノイズは、0.004 AUであった。0.25 ng/mL標準物質の平均シグナルは、0.122 AUであった。0.125 ng/mLは基準を満たすが、0.25を、アッセイ頑健性を確保するためのLOQとして選択した。定

50

量限界は、シグナル対ノイズ比30.5:1、および相対標準偏差14%の0.25 ng/mLに設定した。

【0078】

【表13】

表13 定量限界試験

Ab#1 標準濃度 (ng/mL)	OD値						平均	標準偏 差	%RS D
	曲線 #1	曲線 #2	曲線 #3	曲線 #4	曲線 #5	曲線 #6			
0.031	0.018	0.025	0.010	0.019	0.021	0.013	0.018	0.005	31
0.063	0.036	0.038	0.020	0.027	0.031	0.041	0.032	0.008	24
0.125	0.066	0.069	0.053	0.051	0.058	0.053	0.058	0.008	13
0.25	0.151	0.110	0.130	0.110	0.106	0.125	0.122	0.017	14
0.50	0.234	0.239	0.240	0.235	0.225	0.242	0.236	0.006	3
1.00	0.483	0.451	0.461	0.454	0.454	0.450	0.459	0.012	3
2.00	0.951	0.934	0.951	0.909	0.893	0.891	0.922	0.028	3
4.00	2.431	1.870	1.741	1.697	1.715	1.693	1.890	0.310	16
8.00	3.880	2.982	2.765	3.880	2.772	2.733	3.169	0.558	18
ノイズ=0.004, 10Xノイズ=0.04									

10

20

【0079】

分析方法の「直線性」は、目的とする分析物の濃度に正比例する、または十分に定義された数学的変換により目的とする分析物の濃度に比例するテスト結果を導く該方法の能力である。

【0080】

0.25から8 ng/mLの範囲の標準物質をAb#1薬剤物質から調製した。標準物質および緩衝液ブランクをプレートに添加し、テストした。プロットを図9に示す。二次フィットの相関係数は、0.999より大きかった。結果は、標準物質の吸光反応が二次フィットによるタンパク質濃度に比例することを示している。

【0081】

アッセイの正確度は、スパイクおよび回収方法を用いて試験した。SP溶出液および最終UF/DFを、1.0、2.0および4.0 ng/mLの最終標準レベルでスパイクした。アッセイは、回収されたタンパク質の濃度をスパイクの実験濃度で割った比として計算し、パーセンテージとして表した。この試験の結果を表14に示す。スパイクの回収率は、全てのスパイクレベルについて100±7.9%の範囲にあった。

30

【0082】

【表14】

表14 スパイクおよび回収

試料	A4#1タンパク質濃度(ng/mL)				回収率%
	スパイク レベル (ng/mL)	スパイク レベル (ng/mL)	スパイク した試料	スパイク溶液 の実験値	
SP溶出液	1	0.965	1.907	0.940	100.2
	2	0.954	2.901	2.021	96.3
	4	0.976	4.509	3.896	90.7
UF/DF	1	0.945	1.916	1.010	96.1
	2	0.952	2.920	2.077	94.8
	4	0.925	4.524	3.906	92.1

40

50

【 0 0 8 3 】

S P 溶出液および最終 U F / D F 試料を、参照標準曲線校正範囲で 2 倍連続希釈して試料希釈直線性を評価した。表 1 5 に示されているように、試料希釈は結果に影響を与えなかった。変数は 1 0 % 未満であった。3 つの希釈点のみは、未知試料テストについて試料希釈を確認する必要があった。

【 0 0 8 4 】

【表 1 5 】

表15 試料希釈直線性

SP溶出液(ng/mL)			UF/DF (ng/mL)		
反応	希釈倍数	結果	反応	希釈倍数	結果
6.278	1	6.278	8.022	1	8.022
3.363	2	6.726	4.146	2	8.292
1.679	4	6.716	2.202	4	8.808
0.804	8	6.432	1.027	8	8.216
0.356	16	5.696	0.484	16	7.744
平均	データなし	6.37	データなし	データなし	8.22
標準偏差	データなし	0.42	データなし	データなし	0.39
% CV	データなし	6.63	データなし	データなし	4.78

10

20

【 0 0 8 5 】

分析方法の「範囲」は、分析物の上位と下位の間の区間であり、該区間は、書かれているような方法を用いて適切なレベルの精度、正確度および直線性により決定することができる。アッセイの範囲は、直線性、正確度、精度および定量限界に基づき 0 . 2 5 から 8 n g / m L として確立した。二次フィットの相関係数値は、0 . 9 9 9 より大きかった。これは、0 . 2 5 から 8 n g / m L の範囲において、吸光反応が二次フィットによるタンパク質濃度に比例することを示している。スパイク回収試験は、2 つの異なる工程内試料中の 1 . 0、2 . 0 および 4 . 0 n g / m L レベルの標準物質で実施した。回収率は 1 0 0 ± 7 . 9 % であった。これは、アッセイが推定範囲において厳密および正確であることを示している。

30

【 0 0 8 6 】

商業的供給のさらなる必要性をカバーするため、各抗体の第 2 ロットを評価した。表 1 6 は、大きいプールに使用した第 1 ロットおよび比較のための第 2 ロットを示している。

【 0 0 8 7 】

【表 1 6 】

表16 結果比較に使用したAbロット

Ab	ベンダー	捕捉		検出	
		第1ロット	第2ロット	第1ロット	第2ロット
α Hu IgG (H+L)	Pierce	JL1176621	JG1151545	JL1181032, 1	JG1151545
α Hu IgG F(ab) ₂	Pierce	JL1179911	JK1177611	JK1176627, 1	JH1165881
α Hu IgG λ	Southern Biotech	D1908-M509 D1908-M409	D1908-WL38	G8902- YE27D, 11	G8902-YE27B
α Hu IgG κ	Southern Biotech	A5007-M399	A5007-ZA98	C5406-P687C, 3	A5007-PP28B
α Ms IgG (H+L)	Pierce	JK1177612	LA1185962	JJ127078, 4	JJ127078

40

50

【0088】

結果を表17にまとめ、第1および第2ロットからの参照標準曲線を図10に示す。第2ロットは結果に影響を与えなかった。

【0089】

【表17】

表17 第2ロットAb比較

試料	タンパク質濃度(ng/mL)	
	第1ロット	第2ロット
SP溶出液	2.10	2.01
UF/DF	2.08	2.06

10

【0090】

装置リンス液 (r i n s a t e) 中の残留生成物タンパク質レベルを検出するためのアッセイ適合性を評価するために、装置表面からのタンパク質の回収率を試験した。生成装置は、ステンレス鋼、ハスタロイ (h a s t a l l o y) またはガラス製であった。各材料の代表的クーポン (すなわち、スワブ、リンス液、または他の試料形態などの代表的試料) を2および3 ppmに希釈した40 mLのAb # 1薬剤物質でスポッティングした。表面を3から4時間空気乾燥させ、次いで40 mLのMilli Q水ですすいだ。リンス液を回収した。表面からのタンパク質回収率は、リンス液中のタンパク質の濃度をスパイクの濃度で割った比として計算し、パーセンテージとして表した。

20

【0091】

表18に示されているように、平均回収率は、ガラス表面が76%、ステンレス鋼が87%およびハスタロイが76%である。結果は、合格基準 (50 - 150%) を満たし、アッセイが生成装置すぎ試料テストに適していることを実証した。

【0092】

【表 18】

表18 表面すすぎ回収率

試験濃度		2 ppm			3 ppm		
表面材料	代表的#	スパイクレベル (ng/mL)	リンス液レベル (ng/mL)	回収率 (%)	スパイクレベル (ng/mL)	リンス液レベル (ng/mL)	回収率 (%)
ガラス	1	3.15	2.18	69	5.37	4.05	75
	2		2.08	66		4.59	85
	3		2.17	69		4.79	89
	平均回収率 (%)	76					
ステンレス鋼	1	3.15	*6.48	データなし	5.37	4.80	90
	2		2.39	76		5.03	94
	3		2.68	85		4.84	90
	平均回収率 (%)	87					
ハスタロイ	1	3.15	2.35	75	5.37	4.26	79
	2		2.01	64		4.55	85
	3		1.90	60		5.03	94
	平均回収率 (%)	76					

10

20

【0093】

A b # 1 工程バリデーションは、生成物キャリアオーバーを評価するための生成物工程実行後のブランク実行を含む。ブランク実行は、プロテイン A、S P セファロースおよび Q セファロースクロマトグラフィーおよび U F / D F 操作を含む。生成物 A から A のキャリアオーバーは B r a d f o r d アッセイを用いて評価されるが、生成物 A から B の残留物キャリアオーバー限界 (R C L) は、B r a d f o r d アッセイ L O Q (1 . 2 5 u g / m L) より低い 4 n g / m L (V R - 2 2 4 9、V R - 2 2 5 0 および V R - 2 2 5 1) である。m A b アッセイは、A b # 1 A から B へのキャリアオーバー試験を裏付けるための適合性について評価した。アッセイへの工程緩衝液干渉は、緩衝液スパイクおよび回収実験を実施して評価した。未希釈および 5 倍希釈 (十分な希釈緩衝液による) での各工程緩衝液を、1 . 0、2 . 0 および 4 . 0 n g / m L の最終標準レベルでスパイクした。

30

【0094】

表 1 9 に示されているように、回収率は、Q セファロース溶出緩衝液 S R - 4 8 8 および S P セファロース溶出 (e l u a t i o n) 緩衝液 S R - 6 1 0 について約 7 0 % であり、これは合格基準 (5 0 から 1 5 0 %) 内であったが、プロテイン A 溶出緩衝液 S R - 4 9 3 のみは、抗原および抗体結合を妨げる酸性条件のため 1 . 1 % を回収した。

40

【0095】

【表 19】

表19 未希釈Ab#1工程緩衝液に関するスパイクおよび回収率

単位操作	緩衝液	Ab#1タンパク質濃度(ng/mL)			回収率%	平均回収率
		スパイクレベル (ng/mL)	スパイク溶液 の実験値	スパイク した試料		
Qセファロー ス	SR-488, pH 7.4	1	0.958	0.669	69.8	68.0
		2	1.745	1.096	62.8	
		4	3.21	2.291	71.4	
SPセファロー ス	SR-610, pH 6.9	1	0.958	0.632	66	70.3
		2	1.745	1.245	71.3	
		4	3.21	2.364	73.6	
タンパク質A	タンパク 質 SR-493, pH 3.5	1	1.087	0.017	1.6	1.1
		2	2.174	0.021	1	
		4	4.179	0.03	0.7	

10

【0096】

希釈緩衝液のスパイクおよび回収結果を表20にまとめる。タンパク質回収率は、5倍に希釈した場合、許容可能な110.3から121.9%であった。アッセイ定量限界は、5倍希釈で1.25 ng/mLである。したがって、頑健なアッセイ操作には、5倍希釈が3種類の工程緩衝液全てに推奨される。1.25 ng/mLのLOQによるこのアッセイフォーマットは、生成物AからBのキャリアオーバーを評価するのに適している。

20

【0097】

【表 20】

表20 5倍希釈Ab#1工程緩衝液に関するスパイクおよび回収率

単位操作	緩衝液	Ab#1タンパク質濃度(ng/mL)			回収率%	平均回収率
		スパイクレベル (ng/mL)	スパイク溶液 の実験値	スパイク した試料		
Qセファロー ス	SR-488, pH 7.4	1	0.958	1.154	120.5	110.3
		2	1.745	1.827	104.7	
		4	3.21	3.399	105.9	
SPセファロー ス	SR-610, pH 6.9	1	1.087	1.34	123.3	121.9
		2	2.174	2.608	120.0	
		4	4.179	5.12	122.5	
タンパク質A	タンパク質 SR-493, pH 3.5	1	1.087	1.287	118.4	117.7
		2	2.174	2.535	116.6	
		4	4.179	4.936	118.1	

30

40

【0098】

全体的な残留mAb関連生成物を検出するための新たなアッセイフォーマットおよび条件を開発した。上記結果は、アッセイの再現性(reproducibility)を実証するものである。新たなアッセイは、Ab#1については0.25 ng/mLの定量限界で微量レベルのmAbタンパク質を定量化することができる。故に、新たに開発されたmAb ELISAは、設備切り換えおよび洗浄確認のために残留mAb関連分子を定量化する貴重なツールを提供する。

【0099】

50

工程内試料におけるA b # 1生成物定量化のためのアッセイの性能は、適格とされた。アッセイ頑健性、精度、定量化限界、直線性、正確度、試料希釈直線性、範囲、第2ロット市販試薬を試験した。全ての上記の結果は、E L I S Aの予測された正確度および精度内である。アッセイ条件を表21にまとめる。さらに、回収試験は、このアッセイがリンス液試験およびA b # 1工程キャリアオーバー試験に適していることを証明した。しかし、ブランク実行については、緩衝液干渉を排除するために5倍希釈が必要とされる。

【0100】

【表21】

表21 アッセイ条件

コーティングAb量	24 μ LカクテルAb
コーティングインキュベーション	4°Cで一晩
ブロッキング	PBS中カゼイン、37°Cで60分間
プレート洗浄サイクル	5サイクル
試料インキュベーション	37°Cで60分間
検出Ab量	12.8 μ LカクテルAb
検出Abインキュベーション	37°Cで60分間
K-blue基質発色	室温で14分間

10

【0101】

上記アッセイを、G M P - 1後に抗体#1工程中間体を含有するバイオリアクター、回収および下流工程タンク、フレックスホースならびにフィルターハウジングで実施した洗浄サイクルからの最終すすぎをテストするのに使用した。最終すすぎは全てL O Qより低かった。さらに、中間すすぎを、バイオリアクターZ - 3 2 0 0およびタンクT K - 2 8 3 0について試料採取した。表23に示されているように、Z - 3 2 0 0およびT K - 2 8 3 0からの最初のU S P水すすぎのみが、極めて低いレベルでタンパク質残留物を検出した。結果は、上記アッセイの感受性および特異性をさらに証明した。

20

【0102】

【表 2 2】

表23 GMP-1*のための装置リンス液に関する洗浄結果

装置の種類	試料ID	TRX4 残留レベル
1 1/2インチ フレックスホース	最終すすぎ	<LOQ
	陰性対照	<LOQ
フィルター ハウジング	F-8190-2, 最終すすぎ	<LOQ
	F-8190-3, 最終すすぎ	<LOQ
	F-8190-3, 陰性対照	<LOQ
バイオリアクター	第1回すすぎ-最初のUSF水すすぎ	1.86 µg/mL
	第2回すすぎ-CIP-100後の熱いUSP水すすぎ	<LOQ
	第3回すすぎ-CIP-200後の熱いUSP水すすぎ	<LOQ
	第4回-WFIすすぎ	<LOQ
	第5回-最終WFIすすぎ	<LOQ
回収タンク	最終すすぎ	<LOQ
200L工程タンク	最終すすぎ	<LOQ
700L工程タンク	最終すすぎ	<LOQ
フィルター基材	F-8190 最終すすぎ	<LOQ
1100L TK-2830	第1回すすぎ-最初のUSP水すすぎ	0.54 µg/mL
	第2回すすぎ-CIP-100後の熱いUSP水すすぎ	<LOQ
	第3回すすぎ-CIP-200後の熱いUSP水すすぎ	<LOQ
	第4回-WFIすすぎ	<LOQ
	第5回-最終WFIすすぎ	<LOQ
	第6回すすぎ-WFIすすぎ	<LOQ
	最終すすぎ-最終WFIすすぎ	<LOQ
3/4インチ フレックスホース	最終すすぎ	<LOQ

*: LOQ = 0.25 ng/mL.

【 0 1 0 3】

工程バリデーション実行に関連した装置からの最終すすぎ試料を、上記アッセイによりテストした。テストした全ての試料はLOQより低かった。工程バリデーション実行1(「PV-1」)からの結果を表24に列挙する。洗浄後、報告対象の抗体#1レベル(0.25 ng/mL)は、最大許容キャリーオーバー限界(4-13 ng/mL)より少なくとも16倍低い。

【 0 1 0 4】

10

20

30

40

【表 2 3】

表24 PV-1のための装置リンス液に関する洗浄結果

記述	ELISA結果
クロマトグラフィースキッドZ-2340	<LOQ
バイオリアクター Z-3200	<LOQ
Z-3200回収移送ライン	<LOQ
フィルター基材F-8190-4, F-8190-1, F-7665, F-7666	<LOQ
F-7665 ドーム	<LOQ
F-7666 ドーム	<LOQ
F-8190-1 ドーム(またはF-8190-4)	<LOQ
回収タンクTK-3210	<LOQ
TK-3210生成物移送ライン	<LOQ
1100LサージタンクTK-2060	<LOQ
200L工程タンクTK-4170	<LOQ
1.5インチフレックスホース	<LOQ
700L捕捉クロマトグラフィー溶出液 プールタンクTK-2665	<LOQ
1100L SPセファロース添加タンク TK-2830	<LOQ
200L SPセファロース溶出液タンク TK-2138	<LOQ
クロマトグラフィースキッド Z-2330	<LOQ
200L Qセファロース添加タンク TK-3224	<LOQ
UFスキッドZ-2815	<LOQ
200L QセファロースFTWタンク TK-3226	<LOQ
900Lウイルス濾液タンクTK-2845	<LOQ
流量計FI-7565	<LOQ
3/4 インチフレックスホース	<LOQ
バルブ 11/2インチ	<LOQ
バルブ 3/4インチ	<LOQ
バルブ 1インチ	<LOQ
ポートバルブ 11/2x1インチ	<LOQ
バルブ 11/2 x 1/2インチを備えるティー	<LOQ
T型継手 11/2x3/4インチ	<LOQ
T型継手 11/2x11/2インチ	<LOQ
T型継手 3/4x3/4インチ	<LOQ

10

20

30

40

T型継手 1x1インチ	<LOQ
T型継手 11/2x1インチ	<LOQ
L型継手 1/1/2インチ	<LOQ
径違い継手 2x11/2インチ	<LOQ
径違い継手 1x3/4インチ	<LOQ
のぞき窓 1/1/2インチ	<LOQ
ガasket 2インチ	<LOQ
クランプ 2インチ	<LOQ
トッププレート 12インチハウジング	<LOQ
ボトムプレート 12インチハウジング	<LOQ
従動管 12インチハウジング	<LOQ
シールナット 12インチハウジング	<LOQ
圧縮バネ 12インチハウジング	<LOQ
中柱 12インチハウジング	<LOQ
Oリング 11/2インチ12	<LOQ
Oリング 3/4インチ	<LOQ
トッププレート 18インチハウジング	<LOQ
ボトムプレート 18インチハウジング	<LOQ
従動管 18インチハウジング	<LOQ
シールナット 18インチハウジング	<LOQ
圧縮バネ 18インチハウジング	<LOQ
中柱 18インチハウジング	<LOQ
大ビン	<LOQ
大ビン蓋	<LOQ
小ビン	<LOQ
小ビン蓋	<LOQ
十字継手 1インチ	<LOQ
径違い継手 11/2x1インチ	<LOQ
スプールピース 1インチx5.2インチ	<LOQ
スプールピース 1インチx17.4インチ	<LOQ
バルブ 1x1/2インチ	<LOQ
F-7282ドーム	<LOQ
F-7282基材	<LOQ
浸漬管 - 11/2インチDT-2060	<LOQ
浸漬管 - 3/4インチDT-9238	<LOQ
浸漬管 - 1インチDT-3224	<LOQ
1x1x11/2インチ器具T型継手	<LOQ
1インチL型継手	<LOQ
1インチのぞき窓	<LOQ

10

20

30

40

【 0 1 0 5 】

高いアッセイ感受性のため、実験室で日常的に一緒に作業される m A b 生成物は、このアッセイでは汚染の潜在的な原因になり得る。したがって、試料テスト中に使用される装置および環境ができる限り清浄であることを確保するための予防措置が講じられることが推奨される。

【 0 1 0 6 】

50

さまざまな刊行物が本明細書で引用されており、その内容は全体が本明細書に組み込まれている。

【 図 1 】

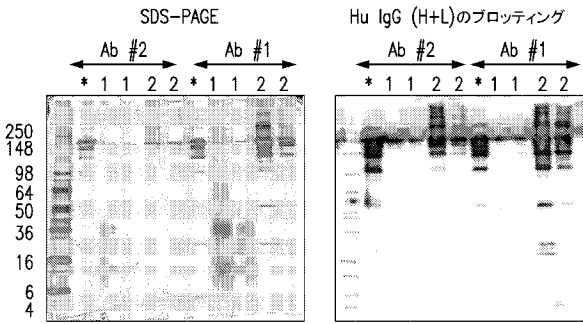
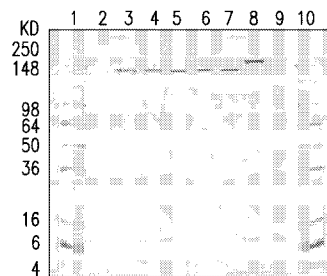


FIG. 1

【 図 2 】



- レーン 1: SeeBlue Plus2 STD
- レーン 2: ブランク
- レーン 3: Ab #1
- レーン 4: Ab #2
- レーン 5: Ab #11
- レーン 6: Ab #3
- レーン 7: Ab #13
- レーン 8: Ab #9
- レーン 9: ブランク
- レーン 10: SeeBlue Plus2 STD

FIG. 2

【 図 3 】

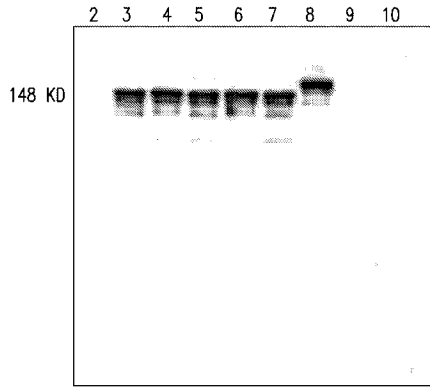


FIG. 3

【 図 4 】

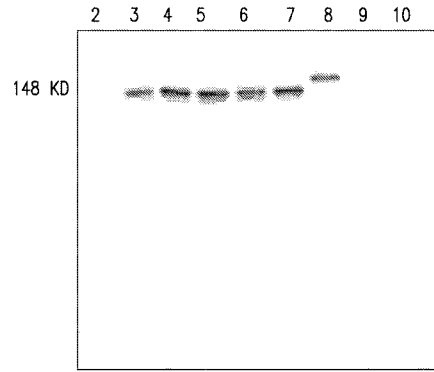


FIG. 4

【 図 5 】

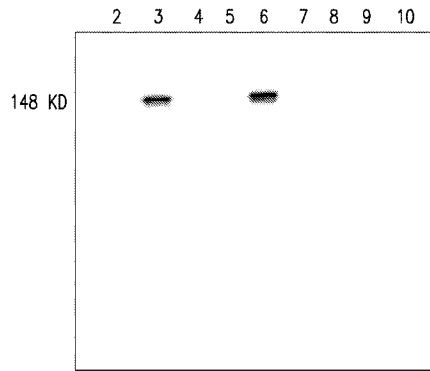


FIG. 5

【 図 6 】

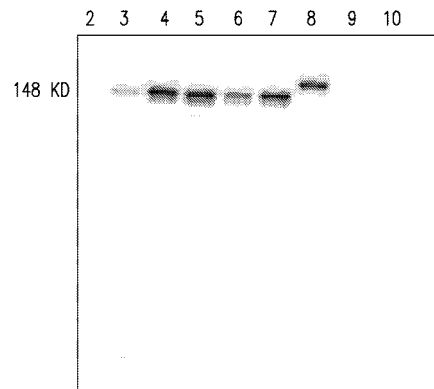


FIG. 6

【 図 7 】

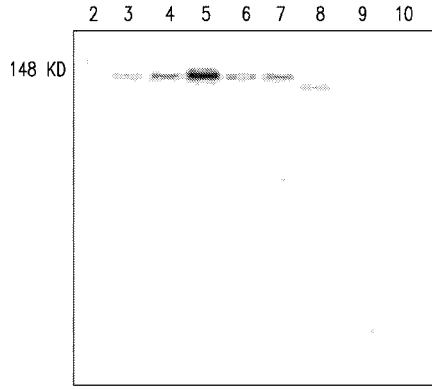


FIG. 7

【 図 8 】

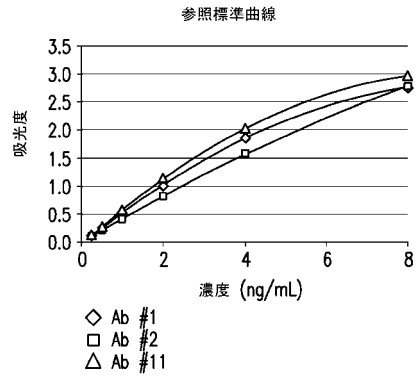


FIG. 8

【 図 9 】

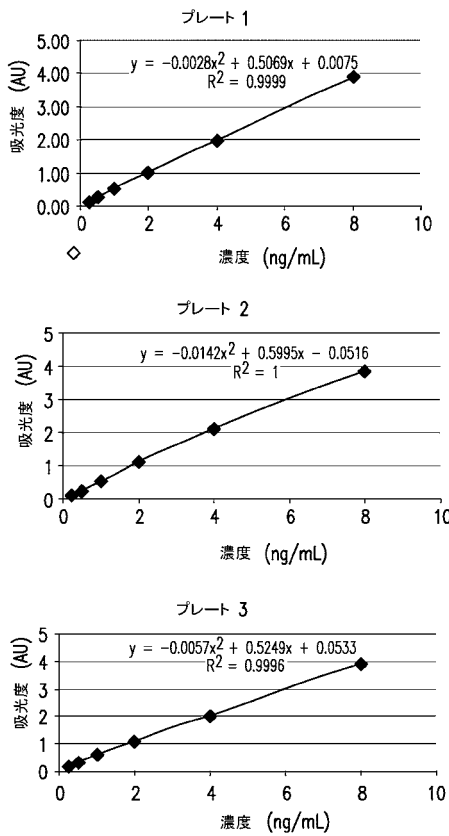


FIG. 9

【 図 10 】

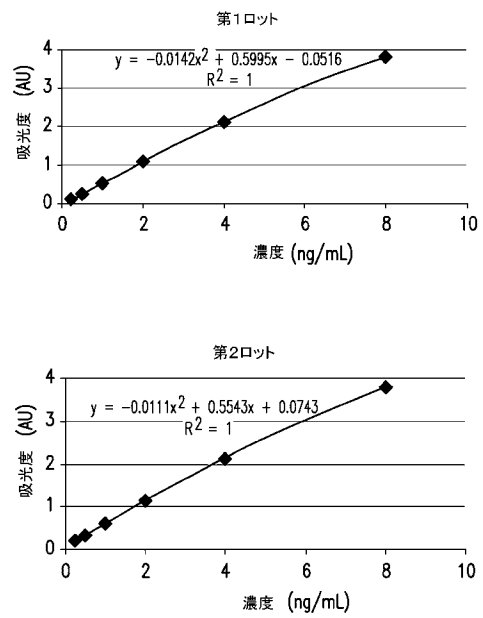


FIG. 10

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2011/051356

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/53 G01N33/68 ADD.		
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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2008/135490 A1 (LI YANBIN [US] ET AL) 12 June 2008 (2008-06-12) abstract; claims 1,8,11,15,18,24,25,33,44; figures 2,3; examples 1,5,6,7,8 paragraph [0044]	1-9
X	EP 1 207 393 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD [JP] JAPAN ENVIRO CHEMICALS LTD [JP]) 22 May 2002 (2002-05-22) abstract; claims 1,7,8,14,15,16 paragraph [0014] paragraph [0030] - paragraph [0033]	1-3,6-8
X	US 5 429 925 A (VANDERLAAN MARTIN [US] ET AL) 4 July 1995 (1995-07-04) abstract; claim 5; examples 2,4 column 9-10 section "Immunoassay"	1-3,8
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
31 October 2011		08/11/2011
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 Mulder, Lonneke

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/051356

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/029072 A2 (CAPRION PHARMACEUTICALS INC [CA]; CASHMAN NEIL [CA]; PARAMITHIOTIS EUS) 8 April 2004 (2004-04-08) abstract; claims 48, 59; figure 1 page 23, line 25 - line 30 page 27, line 10 - line 31 -----	1-4,6-8
X	WO 2006/086799 A2 (CHIRON CORP [US]; MICHELITSCH MELISSA [US]; HU CELINE YUAN-HWEI [US];) 17 August 2006 (2006-08-17) abstract; claims 48,49; figure 4; example 2 -----	1-4,6-8
X	WO 93/20443 A1 (ABBOTT LAB [US]) 14 October 1993 (1993-10-14) abstract page 12, line 15 - page 15, paragraph 28; figures 26-28 -----	1,2,4-8
X	US 5 618 681 A (FRIEDMAN STEPHEN B [US] ET AL) 8 April 1997 (1997-04-08) abstract; claim 1 -----	1,2
X	US 2003/054424 A1 (ALLEN RANDY L [US] ET AL) 20 March 2003 (2003-03-20) abstract; examples 2,4 paragraph [0004] - paragraph [0006] -----	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/051356

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2008135490	A1	12-06-2008	NONE
EP 1207393	A1	22-05-2002	CA 2379127 A1 01-02-2001 WO 0107913 A1 01-02-2001 JP 2001041958 A 16-02-2001
US 5429925	A	04-07-1995	NONE
WO 2004029072	A2	08-04-2004	AT 467124 T 15-05-2010 AU 2003272695 A1 19-04-2004 CA 2500120 A1 08-04-2004 EP 1575989 A2 21-09-2005 JP 4533750 B2 01-09-2010 JP 2006507484 A 02-03-2006 US 2004072236 A1 15-04-2004 US 2006183156 A1 17-08-2006
WO 2006086799	A2	17-08-2006	EP 1858537 A2 28-11-2007 JP 2008529537 A 07-08-2008
WO 9320443	A1	14-10-1993	AU 3934393 A 08-11-1993 CA 2129368 A1 14-10-1993 DE 69330785 D1 25-10-2001 DE 69330785 T2 20-06-2002 EP 0634016 A1 18-01-1995 ES 2164071 T3 16-02-2002 JP 2769245 B2 25-06-1998 JP H07505475 A 15-06-1995
US 5618681	A	08-04-1997	AU 1083695 A 23-05-1996 US 5449611 A 12-09-1995
US 2003054424	A1	20-03-2003	NONE

フロントページの続き

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

专利名称(译)	高灵敏度单克隆抗体残留检测试验		
公开(公告)号	JP2013537971A	公开(公告)日	2013-10-07
申请号	JP2013528381	申请日	2011-09-13
[标]申请(专利权)人(译)	阿布维公司		
申请(专利权)人(译)	AVVI公司		
[标]发明人	ヤンリーホワ ラマスプラマニアンナタラジャン		
发明人	ヤン,リーホワ ラマスプラマニアン,ナタラジャン		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53 C07K16/42 G01N33/6854		
FI分类号	G01N33/53.M G01N33/53.D		
优先权	61/382413 2010-09-13 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于在生物技术产品的制造中监测产品携带和/或用于清洁验证时检测生物技术产品残留物的组合物和高度灵敏的方法。特别地，本发明涉及免疫测定，其中一种或多种捕获抗体或其抗原结合片段用于检测与生物技术产品的生产相关的残留物。

