

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02016/052584

発行日 平成29年7月13日(2017.7.13)

(43) 国際公開日 平成28年4月7日(2016.4.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53</b> (2006.01)	GO 1 N 33/53 P	2 G O 4 5
<b>GO 1 N 33/48</b> (2006.01)	GO 1 N 33/48 B	4 H O 4 5
<b>CO 7 K 14/565</b> (2006.01)	CO 7 K 14/565 Z N A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁)

出願番号 特願2015-551083 (P2015-551083)	(71) 出願人 000003159 東レ株式会社 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2015/077662	
(22) 国際出願日 平成27年9月30日(2015.9.30)	
(31) 優先権主張番号 特願2014-201559 (P2014-201559)	(72) 発明者 山下 祐二 静岡県三島市4845番地 東レ株式会社 三島工場内
(32) 優先日 平成26年9月30日(2014.9.30)	(72) 発明者 成見 英樹 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東 レ株式会社 基礎研究センター内
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	(72) 発明者 名黒 利恵子 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東 レ株式会社 基礎研究センター内
	(72) 発明者 浅野 智美 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東 レ株式会社 基礎研究センター内 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリエチレングリコール修飾インターフェロン- $\beta$ の検出及び定量に使用する試料液の前処理方法、ポリエチレングリコール修飾インターフェロン- $\beta$ の検出方法及び定量方法

## (57) 【要約】

本発明は、ポリエチレングリコール修飾インターフェロン- とポリエチレングリコール非修飾のインターフェロン- とが共存する試料液中のポリエチレングリコール修飾インターフェロン- を検出及び定量するための試料液の前処理方法を提供することを目的としている。本発明は、ポリエチレングリコール修飾インターフェロン- の検出及び定量に使用する試料液の前処理方法であり、上記試料液に酸を加えて該試料液のpHをpH-0.10~pH0.50の範囲に調整する酸処理工程と、上記酸処理工程で凝集したタンパク質を上記試料液から除去する凝集タンパク質除去工程と、を備える、前処理方法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ポリエチレングリコール修飾インターフェロン - の検出及び定量に使用する試料液の前処理方法であり、

前記試料液に酸を加えて該試料液の pH を pH - 0 . 1 0 ~ pH 0 . 5 0 の範囲に調整する酸処理工程と、

前記酸処理工程で凝集したタンパク質を前記試料液から除去する凝集タンパク質除去工程と、

を備える、前処理方法。

## 【請求項 2】

前記試料液を糖鎖結合性タンパク質固定化担体と接触させ、該糖鎖結合性タンパク質固定化担体に結合する物質を除去する糖鎖修飾物質除去工程を備える、請求項 1 記載の前処理方法。

## 【請求項 3】

前記糖鎖結合性タンパク質は、レクチンである、請求項 2 項記載の前処理方法。

## 【請求項 4】

前記ポリエチレングリコール修飾インターフェロン - は、糖鎖を有しないポリエチレングリコール修飾インターフェロン - である、請求項 2 又は 3 記載の前処理方法。

## 【請求項 5】

前記試料液は、血液、血漿、血清又は腹水である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載の前処理方法。

## 【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の前処理方法で試料液を前処理する前処理工程と、

前記前処理工程で前処理した前記試料液中のポリエチレングリコール修飾インターフェロン - を免疫学的又は生物学的に検出する検出工程と、

を備える、試料液中のポリエチレングリコール修飾インターフェロン - の検出方法。

## 【請求項 7】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の前処理方法で試料液を前処理する前処理工程と、

前記前処理工程で前処理した前記試料液中のポリエチレングリコール修飾インターフェロン - を免疫学的又は生物学的に検出し、該ポリエチレングリコール修飾インターフェロン - の含有量を測定する測定工程と、

を備える、試料液中のポリエチレングリコール修飾インターフェロン - の定量方法。

## 【請求項 8】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の酸処理工程で試料液を酸処理するために使用する酸と、

請求項 6 又は 7 記載の検出工程での試料液中のポリエチレングリコール修飾インターフェロン - を検出するために使用する、抗インターフェロン - 抗体、インターフェロン感受性細胞に感染能を持つウイルス、インターフェロン刺激応答領域の制御下にレポーター遺伝子が組み込まれた発現ベクター及びインターフェロン刺激応答領域の制御下のレポーター遺伝子が染色体に組み込まれた形質転換細胞からなる群から選択される 1 以上のキット構成成分と、

を備える、ポリエチレングリコール修飾インターフェロン - 検出キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ポリエチレングリコール修飾インターフェロン - の検出及び定量に使用する試料液の前処理方法、検出方法及び定量方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

10

20

30

40

50

インターフェロン - (以下「IFN - 」と言う)は、抗ウイルス活性、抗腫瘍活性や免疫調節活性等を有するタンパク質であり、慢性B型肝炎治療薬、慢性C型肝炎治療薬、癌治療薬及び多発性硬化症治療薬としての用途が広く知られている。

【0003】

また、IFN - とポリエチレングリコール(以下「PEG」と言う)を共有結合することにより、ポリエチレングリコール修飾インターフェロン - (以下「PEG修飾IFN - 」と言う)が得られることが報告されており(特許文献1及び2並びに非特許文献1)、PEG修飾IFN - は、生体内持続性が高いため、PEG修飾されていないIFN - (以下「PEG非修飾のIFN - 」と言う)と比べて少ない投与頻度で効果を発揮することが報告されている(特許文献2~4)。

10

【0004】

ここで、試料液中のPEG修飾IFN - の含有量を測定する方法としては、従来のIFN - の含有量を測定する方法と同じ方法で実施できることが知られており、例えば、IFN - を特異的に認識する抗体を用いたELISA法(酵素免疫測定方法)又は、抗ウイルス活性を指標としたCPE法(細胞変性効果測定方法)等で試料液中のIFN - を検出できることが報告されている(特許文献3及び非特許文献2)。

【0005】

一方、タンパク質は、酸の添加やpHの変化により変性することが知られている。そのため、そのタンパク質の性質を利用して、試料液中に含まれるさまざまな夾雑タンパク質を除去し、試料液中の不要なタンパク質を低減するために、試料液を酸やアルカリ等で処理して精製を行う方法が知られており、また、目的のタンパク質を残して不要なタンパク質を低減させるためには、適切なpHを選択する必要があることが知られている。例えば、IFN - では、中性緩衝液で夾雑タンパク質を除去した後、pH1.5~3の酸性緩衝液にて溶出を行う方法が報告されている(特許文献5)。さらに、PEG修飾IFN - では、約pH3~6の緩衝液中にて安定であることが報告されている(特許文献6)。

20

【0006】

また、糖鎖を有するタンパク質の除去方法としては、糖鎖結合性タンパク質であるレクチンを固定化した担体に糖鎖を有するタンパク質を吸着させて除去する方法が報告されている(非特許文献3)。

【先行技術文献】

30

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】米国特許第4917888号

【特許文献2】特許第4850514号

【特許文献3】国際公開第1999/055377号

【特許文献4】国際公開第2000/023114号

【特許文献5】特開昭61-242593号

【特許文献6】特許第4658961号

【非特許文献】

【0008】

40

【非特許文献1】Pepinskyら、The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics、2001年、第297巻、p.1059-1066

【非特許文献2】Huら、The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics、2011年、第338巻、p.984-996

【非特許文献3】Ogataら、The Journal of Biochemistry、1975年、第78巻、p.687-696

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

50

## 【0009】

このように、特許文献2～4にはPEG修飾IFN- $\gamma$ を医療用途に用いることが記載されているが、実際にPEG修飾IFN- $\gamma$ を医療用途に用いるにあたって、具体的な用量や用法を設定するためには、臨床試験において被験者に投与後、被験者から採取された試料液中のPEG修飾IFN- $\gamma$ の濃度、特に血中濃度の時間推移を把握することが重要である。そのためには、臨床試験で生体から採取された多数の試料液に対して、高感度かつ多検体処理が可能なPEG修飾IFN- $\gamma$ の含有量を測定する方法が必須となる。

## 【0010】

しかしながら、PEG修飾IFN- $\gamma$ を生体に投与した後、分析のために生体から採取された試料液には、投与されたPEG修飾IFN- $\gamma$ 以外に、PEG修飾IFN- $\gamma$ のPEGが投与後に外れることにより生じたPEG非修飾のIFN- $\gamma$ 及び生体由来のPEG非修飾のIFN- $\gamma$ が共存した状態となっている。そのため、特許文献3及び非特許文献2に記載される測定方法を用いた場合、PEG非修飾のIFN- $\gamma$ とPEG修飾IFN- $\gamma$ を区別して測定できないために、試料液中のPEG修飾IFN- $\gamma$ の含有量を正確に測定することは困難である。

10

## 【0011】

さらに、特許文献5及び非特許文献3では、不要なタンパク質を除去する方法が記載されているが、PEG修飾IFN- $\gamma$ とPEG非修飾のIFN- $\gamma$ が共存する試料液から、PEG修飾IFN- $\gamma$ の検出に影響を及ぼすPEG非修飾のIFN- $\gamma$ を取り除く方法についての記載はなく、その方法に適した適切なpHについての記載もない。

20

## 【0012】

すなわち、従来において、PEG修飾IFN- $\gamma$ とPEG非修飾のIFN- $\gamma$ が共存する試料液から、試料液中に含まれるPEG修飾IFN- $\gamma$ を検出してその含有量を正確に測定する測定方法及び、そのために必要な、試料液からPEG修飾IFN- $\gamma$ の検出に影響を及ぼすPEG非修飾のIFN- $\gamma$ を取り除く前処理方法はこれまで知られていなかった。

## 【0013】

そこで本発明は、PEG修飾IFN- $\gamma$ とPEG非修飾のIFN- $\gamma$ とが共存する試料液中に存在するPEG修飾IFN- $\gamma$ を検出及び定量するための試料液の前処理方法を提供することを目的とする。

30

## 【課題を解決するための手段】

## 【0014】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、PEG修飾IFN- $\gamma$ とPEG非修飾のIFN- $\gamma$ とが共存する試料液に酸を加え、試料液のpHをpH-0.10～pH0.50の範囲に調整した後に凝集したタンパク質を除去することにより、PEG修飾IFN- $\gamma$ に対してIFN- $\gamma$ を選択的に低減させる前処理方法を見出し、本発明を完成するに至った。

## 【0015】

すなわち、本発明は、PEG修飾IFN- $\gamma$ の検出及び定量に使用する試料液の前処理方法であり、上記試料液に酸を加えて該試料液のpHをpH-0.10～pH0.50の範囲に調整する酸処理工程と、上記酸処理工程で凝集したタンパク質を上記試料液から除去する凝集タンパク質除去工程とを備え、PEG修飾IFN- $\gamma$ の検出に影響を及ぼすPEG非修飾のIFN- $\gamma$ を取り除くことを可能とする前処理方法を提供する。

40

## 【0016】

上記の前処理方法は、上記試料液を糖鎖結合性タンパク質固定化担体と接触させ、上記糖鎖結合性タンパク質固定化担体に結合する物質を除去する糖鎖修飾物質除去工程を備えていてもよく、上記の糖鎖結合性タンパク質は、レクチンであることが好ましく、レクチンはコンカナバリンAであることがより好ましい。

## 【0017】

上記の糖鎖修飾物質除去工程を備えることで、PEG修飾IFN- $\gamma$ の検出感度が上が

50

り、正確な定量を実現できる。

【0018】

上記の糖鎖修飾物質除去工程を備える前処理方法において、PEG修飾IFN- は、糖鎖を有しないPEG修飾IFN- であることが好ましい。

【0019】

上記の試料液は、生体試料液であることが好ましく、さらに、生体試料液については、血液、血漿、血清又は腹水であることがより好ましい。

【0020】

本発明は、上記前処理方法で試料液を前処理する前処理工程と、上記前処理工程で前処理した上記試料液中のPEG修飾IFN- を免疫学的又は生物学的に検出する検出工程とを備える、試料液中のPEG修飾IFN- の検出方法を提供する。

10

【0021】

上記のPEG修飾IFN- の検出方法によれば、高い感度でPEG修飾IFN- を特異的に検出することができる。

【0022】

また本発明は、上記前処理方法で試料液を前処理する前処理工程と、上記前処理工程で前処理した上記試料液中のPEG修飾IFN- を免疫学的又は生物学的に検出し、上記PEG修飾IFN- の含有量を測定する測定工程とを備える、試料液中のPEG修飾IFN- の定量方法を提供する。

【0023】

上記のPEG修飾IFN- の定量方法によれば、高い感度でPEG修飾IFN- を特異的に検出し、PEG非修飾IFN- の影響を受けることなく正確にPEG修飾IFN- を定量できる。

20

【0024】

さらに本発明は、上記酸処理工程で試料液を酸処理するために使用する酸と、上記検出工程で試料液中のPEG修飾IFN- を検出するために使用する、抗IFN- 抗体、IFN感受性細胞に感染能を持つウイルス、IFN刺激応答領域の制御下にレポーター遺伝子が組み込まれた発現ベクター及びIFN刺激応答領域の制御下にレポーター遺伝子が組み込まれた形質転換細胞からなる群から選択される1以上のキット構成成分と、を備える、PEG修飾IFN- 検出キットを提供する。

30

【0025】

また、本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、PEG修飾IFN- とPEG非修飾のIFN- とが共存する試料液に酸を加え、試料液のpHを3以下に調整した後に凝集したタンパク質を除去することにより、PEG修飾IFN- に対してIFN- を選択的に低減させる前処理方法を見出し、本発明を完成するに至った。

【0026】

すなわち、本発明は、PEG修飾IFN- の検出及び定量に使用する試料液の前処理方法であり、上記試料液に酸を加えて該試料液のpHを3以下に調整する酸処理工程と、上記酸処理工程で凝集したタンパク質を上記試料液から除去する凝集タンパク質除去工程とを備え、PEG修飾IFN- の検出に影響を及ぼすPEG非修飾のIFN- を取り除くことを可能とする前処理方法を提供する。

40

【発明の効果】

【0027】

本発明の前処理方法は、PEG修飾IFN- とPEG非修飾のIFN- とが共存する試料液中から、PEG修飾IFN- の検出に影響を及ぼすPEG非修飾のIFN- を取り除くことができるため、PEG修飾IFN- を特異的に検出でき、含有量を正確に定量することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】血清中のPEG修飾IFN- 、天然型IFN- 及びリコンビナントIFN-

50

に対する、酸処理工程を備える前処理による効果を示す図である。

【図2】血清中のPEG修飾IFN- $\gamma$ 、天然型IFN- $\gamma$ 及びリコンビナントIFN- $\gamma$ に対する、酸処理工程及び糖鎖修飾物質除去工程を備える前処理による効果を示す図である。

【図3】血清中のPEG修飾IFN- $\gamma$ に対する、酸処理工程を備える前処理による効果を示す図である。

【図4】血清中のPEG修飾IFN- $\gamma$ に対する、各容量の酸処理工程を備える前処理による効果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0029】

10

本発明のPEG修飾IFN- $\gamma$ の検出及び定量に使用する試料液の前処理方法は、上記試料液に酸を加えて該試料液のpHをpH-0.10~pH0.50の範囲に調整する酸処理工程と、上記酸処理工程で凝集したタンパク質を上記試料液から除去する凝集タンパク質除去工程とを備え、PEG修飾IFN- $\gamma$ の検出に影響を及ぼすPEG非修飾のIFN- $\gamma$ を取り除くことを可能とすることを特徴とする。

【0030】

本明細書においては、「PEG非修飾のIFN- $\gamma$ 」とは、PEG修飾されていないIFN- $\gamma$ を意味し、「PEG修飾IFN- $\gamma$ 」とは区別して用いる。上記のPEG非修飾のIFN- $\gamma$ は、天然に存在するIFN- $\gamma$ （以下「天然型IFN- $\gamma$ 」と言う）のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を持つものだけでなく、天然型IFN- $\gamma$ のアミノ酸配列に1個又は数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、IFN- $\gamma$ としての生物活性（以下「IFN活性」と言う）を有するIFN- $\gamma$ のアミノ酸変異体を包含する。PEG非修飾のIFN- $\gamma$ のアミノ酸変異体としては、例えば、ヒトIFN- $\gamma$ のアミノ酸配列の第1番目メチオニンが欠失し、かつ第17番目のシステインがセリンに置換されたIFN- $\gamma$ 変異体であるベタフェロン（登録商標）が挙げられる。さらに、上記のPEG非修飾のIFN- $\gamma$ は、糖鎖を有するPEG非修飾のIFN- $\gamma$ （天然型IFN- $\gamma$ の糖鎖が改変されたIFN- $\gamma$ も含む）及び糖鎖を有しないPEG非修飾のIFN- $\gamma$ をも包含する。また、上記のPEG非修飾のIFN- $\gamma$ は、天然型IFN- $\gamma$ のアミノ酸配列又は塩基配列に基づいて、遺伝子組換え技術により作製されたりリコンビナントIFN- $\gamma$ も包含する。

20

30

【0031】

「PEG修飾IFN- $\gamma$ 」とは、上記のPEG非修飾のIFN- $\gamma$ の1分子に対してPEGの1分子又は2分子以上が共有結合したものであり、かつ、IFN活性を有しているもの、又は、PEGの1分子に対して上記のPEG非修飾のIFN- $\gamma$ の1分子又は2分子以上が共有結合したものであり、かつ、IFN活性を有しているもの、を意味するが、上記のPEG非修飾のIFN- $\gamma$ の1分子に対してPEGの1分子又は2分子以上が共有結合したものであり、かつ、IFN活性を有しているものが好ましい。PEG修飾IFN- $\gamma$ は、上記IFN- $\gamma$ とPEGとが直接結合したものであっても、リンカー等を介して結合したものであってもよい。

【0032】

40

PEG修飾IFN- $\gamma$ は、IFN- $\gamma$ とPEGとの共有結合体、PEGで化学修飾したIFN- $\gamma$ 、PEG化IFN- $\gamma$ 又はPEG結合IFN- $\gamma$ とも呼ばれるものである。

【0033】

PEG修飾IFN- $\gamma$ の、IFN- $\gamma$ とPEGとの共有結合部位としては、例えば、IFN- $\gamma$ のアミノ基、チオール基、N末端、C末端又は糖鎖が挙げられ、また、公知の遺伝子組換え技術を用いてIFN- $\gamma$ に導入した非天然アミノ酸も共有結合部位とすることができる。

【0034】

PEG修飾IFN- $\gamma$ が、PEG非修飾のIFN- $\gamma$ の1分子に対してPEGの1分子又は2分子以上が共有結合したものである場合、IFN- $\gamma$ の1分子に結合するPEGの

50

分子量の合計は、5,000以上240,000以下が好ましく、10,000以上80,000以下がより好ましく、39,000以上45,000以下がさらに好ましい。ただし、IFN- $\gamma$ の1分子に分子量20,000のPEGの2分子が共有結合したPEG修飾IFN- $\gamma$ である場合は、IFN- $\gamma$ の1分子に分子量40,000のPEGが共有結合していることを意味する。

【0035】

また、PEG修飾IFN- $\gamma$ が、PEGの1分子に対して、IFN- $\gamma$ の1分子又は2分子以上が共有結合したものである場合であっても、PEGの1分子の分子量は、5,000以上520,000以下が好ましく、10,000以上200,000以下がより好ましく、39,000以上45,000以下がさらに好ましい。

10

【0036】

なお、PEGは、1個の分子が多数の繰り返しユニットからできており、PEGの分子量は個々の分子により異なるのが一般的であるため、平均分子量で表される。したがって、本明細書におけるPEGの分子量とは、平均分子量の意味である。

【0037】

PEG修飾IFN- $\gamma$ の、PEGに結合したIFN- $\gamma$ は、組織からの抽出、遺伝子組換え技術を用いたタンパク質合成、IFN- $\gamma$ を発現する天然細胞又は組換え細胞を用いた生物学的製造等の公知の方法を用いて得られたものであってよい。また、IFN- $\gamma$ として、市販のIFN- $\gamma$ であってよい。

20

【0038】

酸処理工程及び凝集タンパク質除去工程を備えた、試料液の前処理方法は、試料液中のPEG修飾IFN- $\gamma$ 以外のタンパク質{PEG非修飾のIFN- $\gamma$ （糖鎖を有するPEG非修飾のIFN- $\gamma$ 及び糖鎖を有しないPEG非修飾のIFN- $\gamma$ の両方）を含む}を低減できる。ここで、PEG修飾IFN- $\gamma$ は、糖鎖を有していても、糖鎖を有していなくてもよい。

【0039】

また、試料液の前処理方法は、さらに試料液を糖鎖結合性タンパク質固定化担体と接触させ、糖鎖結合性タンパク質固定化担体に結合する物質を除去する糖鎖修飾物質除去工程を備えることが好ましい。

30

【0040】

酸処理工程及び凝集タンパク質除去工程に加えて、糖鎖修飾物質除去工程を備えることにより、試料液中に含まれる糖鎖を有するPEG非修飾のIFN- $\gamma$ を除去することができるため、試料液中のPEG修飾IFN- $\gamma$ の含有量に対するPEG非修飾のIFN- $\gamma$ の含有量の比率をさらに低下させることができる。ここで、糖鎖修飾物質除去工程は、試料液から糖鎖を有するタンパク質を除去するため、糖鎖修飾物質除去工程を行う場合、PEG修飾IFN- $\gamma$ は、糖鎖を有しないPEG修飾IFN- $\gamma$ であることが好ましい。

【0041】

糖鎖を有するPEG修飾IFN- $\gamma$ としては、天然型IFN- $\gamma$ とPEGとの共有結合体、又は、動物細胞（例えば、CHO細胞）にて発現させたIFN- $\gamma$ とPEGとの共有結合体が挙げられる。糖鎖を有しないPEG修飾IFN- $\gamma$ としては、大腸菌にて発現させたIFN- $\gamma$ とPEGとの共有結合体が挙げられる。

40

【0042】

PEG修飾IFN- $\gamma$ は、以下の方法で作製されたものであってよい。例えば、IFN- $\gamma$ のアミノ基にPEGを共有結合する方法（例えば、米国特許第4917888号及び国際公開第1987/00056号に記載の方法）、IFN- $\gamma$ のチオール基にPEGを共有結合する方法（例えば、国際公開第1999/55377号に記載の方法）、IFN- $\gamma$ のN末端に高分子を共有結合する方法（例えば、国際公開第2000/23114号及び特開平9-25298号に記載の方法）、IFN- $\gamma$ の糖鎖にPEGを共有結合する方法（例えば、*Makromolekulare Chemie*、1978年、第179巻、p.301、米国特許第4101380号又は米国特許第4179337号に記

50

載の方法)、IFN- に導入した非天然アミノ酸にPEGを共有結合する方法(例えば、Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters、2004年、第14巻、p. 5743-5745に記載の方法)、IFN- のC末端にPEGを共有結合する方法(IFN- のC末端又はその近傍にシステインや非天然アミノ酸を導入することで可能)が挙げられる。なお、上記のPEG修飾IFN- のPEGは、IFN- との共有結合反応に使用する際には、その結合の方法に応じて、PEGの末端を活性化する必要があるが、PEGの末端がヒドロキシスクシンイミドエステル、ニトロベンゼンスルホネートエステル、マレイミド、オルトピリジルジスルフィド、ビニル sulfon、マレイミド、ヨードアセトアミド、カルボン酸、アジド、ホスフィン又はアミン構造で活性化されたPEG誘導体であってよい。

10

**【0043】**

PEG修飾IFN- の好ましい例としては、ヒト・IFN- とPEGとの共有結合体を挙げることができ、例えば、特許第4850514号に記載された方法により作製されたPEG修飾IFN- が挙げられる。ヒト・IFN- におけるPEGの結合部位としては、ヒト・IFN- のアミノ酸配列の第19番目又は第134番目のリジンのアミノ基が好ましく、この部位にPEGが1分子共有結合したPEG修飾IFN- がより好ましい。具体的には、ヒト・IFN- のアミノ酸配列の134番目のリジンのアミノ基に分子量40,000以上(好ましくは、分子量42,000)のPEGが1分子共有結合したPEG修飾IFN- を例示できる。

**【0044】**

ここで、「ヒト・IFN- のアミノ酸配列の134番目のリジン」とは、166アミノ酸からなるヒト・IFN- のアミノ酸配列(配列番号1)のN末端のアミノ酸(メチオニン)を1番としたときに、134番目に位置するアミノ酸であるリジンを意味する。すなわち、本明細書では、IFN- のN末端のアミノ酸を1番として、IFN- のアミノ酸残基の位置を表す。

20

**【0045】**

「試料液」とは、水又は有機溶剤を主たる溶媒とする液体状の試料を意味する。試料液は、酸を加えることによりpHをpH-0.10~pH0.50の範囲に調整できるものであればよく、生物由来の物質を含まなくてもよいし、含んでもよい。生物由来の物質を含まない試料液としては、緩衝液が好ましく、例えば、生理食塩水、リン酸緩衝液、クエン緩衝液、酢酸緩衝液又はリン酸緩衝生理食塩水等が挙げられる。生物由来の物質を含む試料液としては、生体試料液が好ましい。「生体試料液」とは、哺乳動物から採取される組織、血液や排泄物から調製される水を主たる溶媒とした液体状の試料を意味する。例えば、血液、血漿、血清、腹水、リンパ液、尿や、腹腔等の体腔や消化管等の洗浄液や、糞、組織片等のホモジネートの遠心分離後上清等が挙げられる。好ましくは、血液、血漿、血清又は腹水であり、さらに好ましくは、血漿又は血清である。

30

**【0046】**

また、生体試料液の由来である哺乳動物としては、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ又はサル等が挙げられるが、特にヒトが好ましい。

**【0047】**

上記の試料液の前処理方法において、「酸処理工程」とは、試料液に酸を加える工程であり、酸処理工程で使用する酸は、試料液に加えた時に、pH-0.10~pH0.50の範囲に調整でき、PEG修飾IFN- 以外の試料液中のタンパク質を凝集又は析出させることができる酸であればよく、例えば、塩酸若しくは硫酸等の無機酸、スルホフタル酸若しくはスルホサリチル酸クエン酸等の強酸性有機酸、又はクエン酸、酢酸(氷酢酸を含む)若しくはギ酸等の弱酸性有機酸が挙げられるが、塩酸、硝酸又は硫酸が好ましい。また、上記の酸は、酸そのもの又は希釈された酸であってもよく、希釈された酸としては、例えば、2M~6Mの塩酸が挙げられる。さらに、上記の酸は、該酸を含む酸性緩衝液又は該酸の塩であってもよい。

40

**【0048】**

50

上記の前処理方法において、酸処理工程は、試料液のpHをpH - 0.10 ~ pH 0.50の範囲に調整することが好ましく、試料液のpHをpH - 0.10 ~ pH 0.32の範囲に調整することがより好ましく、試料液のpHを0.17に調整することが特に好ましい。

【0049】

上記の前処理方法において、酸処理工程は、塩酸を加えて、試料液のpHをpH - 0.10 ~ pH 0.50の範囲に調整することが好ましく、試料液のpHをpH - 0.10 ~ pH 0.32の範囲に調整することがより好ましく、試料液のpHを0.17に調整することが特に好ましい。

【0050】

上記の前処理方法において、酸処理工程によって発生する試料液中タンパク質の凝集は、試料液中のタンパク質が多い場合は一般的には白濁することにより確認でき、試料液に酸を加え混合した直後に白濁する場合もある。試料液中のタンパク質が少ない場合は白濁を確認できない場合もある。試料液中のタンパク質の凝集は、試料液に酸を加えた後、数分~数十分間程度のインキュベーションにより誘導することも可能である。この場合、白濁する場合もあれば白濁を確認できない場合もある。インキュベーションの時間は、1秒~2時間程度であり、1秒~30分間程度が好ましく、1秒~15分間程度がより好ましい。酸処理工程により凝集したタンパク質は、試料液中のPEG修飾IFN-以外のタンパク質であり、それには、PEG非修飾のIFN-（糖鎖を有するPEG非修飾のIFN-及び糖鎖を有しないPEG非修飾のIFN-の両方）が含まれ、さらに生体試料液を用いた場合、生体試料液由来の夾雑タンパク質が凝集したタンパク質に含まれる。

【0051】

上記の前処理方法において、酸処理工程で凝集したタンパク質を試料液から除去する凝集タンパク質除去工程は、凝集したタンパク質を除去できる方法であればどのような方法でもよく、公知の一般的な方法を用いることができる。例えば、試料液を遠心分離して沈降物を除去（上清を回収）する方法（ペレットリング（*pelleting*）法）又は試料液を凝集したタンパク質（固体）と液体とを分離できるフィルターに通して濾過（濾液を回収）する方法等が挙げられるが、遠心分離して沈降物を除去（上清を回収）する方法が好ましい。遠心分離は、10,000~40,000×gの遠心力で5~10分間程度行えばよい。

【0052】

上記の前処理方法において、酸処理工程後の試料液のpHはpH - 0.10 ~ pH 0.50の範囲に調整されているため、試料液のpHを中性付近（具体的にはpH 5~8、好ましくはpH 5~7、より好ましくはpH 5~6、さらに好ましくはpH 6）に調整する中和工程を行うことが好ましい。中和工程は、凝集タンパク質除去工程の前に行う工程であってもよいし後に行う工程であってもよい。また、糖鎖修飾物質除去工程を備える場合、中和工程は、糖鎖修飾物質除去工程の後に行う工程であってもよい。

【0053】

すなわち、上記の前処理方法は、凝集タンパク質除去工程の前に中和工程を備える前処理方法、凝集タンパク質除去工程の後に中和工程を備える前処理方法、又は、糖鎖修飾物質除去工程の後に中和工程を備える前処理方法であることが好ましく、凝集タンパク質除去工程の後に中和工程を備える前処理方法であることがより好ましい。

【0054】

試料液のpHを中性付近（具体的にはpH 5~8、好ましくはpH 5~7、より好ましくはpH 5~6、さらに好ましくはpH 6）に調整する際に使用するアルカリとしては、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム若しくは水酸化リチウム等のアルカリ金属若しくはアルカリ土類金属の水酸化物、炭酸（水素）ナトリウム、炭酸（水素）カリウム等の炭酸（水素）塩、アンモニア、炭酸アンモニウム、尿素、酢酸ナトリウム又は酢酸カリウム等が挙げられる。また、PEG修飾IFN-の安定性や溶解性に影響しないものであれば、上記のアルカリは、該アルカリを含むアルカリ性緩衝液又は該アルカリの塩であ

10

20

30

40

50

ってもよい。

【0055】

上記の前処理方法で前処理した試料液は、試料液中のPEG修飾IFN- $\alpha$ の安定性や溶解性を維持することを目的として、適当な緩衝液で希釈することができる。緩衝液は、PEG修飾IFN- $\alpha$ の安定性や溶解性に影響しないものであればよく、例えば、リン酸緩衝液や酢酸緩衝液が好ましい。緩衝液には、界面活性剤等を添加することができ、界面活性剤としては、陰イオン性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤及び両イオン性界面活性剤から選択される任意のものを用いることができる。例えば、陰イオン性界面活性剤としてはエマル20C（登録商標）及びエマルNC35（登録商標）等、陽イオン性界面活性剤としては、コータミン86W（登録商標）及びコータミン24P（登録商標）等、非イオン性界面活性剤としては、Tween20（登録商標）、NP-40（登録商標）、TritonX-100（登録商標）、Brij58（登録商標）、Brij721（登録商標）、MEGA-8、レオコールSC70（登録商標）、レオコールTD90（登録商標）及びレオドールTW-0120（登録商標）等、両イオン性界面活性剤としては、CHAPS（登録商標）、CHAPSO（登録商標）、アンヒトール20N（登録商標）及びアンヒトール24B（登録商標）等が挙げられる。

10

【0056】

上記の糖鎖修飾物質除去工程に用いる糖鎖結合性タンパク質としては、例えば、レクチンが挙げられる。レクチンとは、動植物、真菌、細菌又はウイルス等に存在するタンパク質又は糖タンパク質のうち、糖に対する特異的結合活性をもった物質である。レクチンは、リシンB鎖スーパーファミリーに属する「R型レクチン」、糖タンパク質のフォールディングに関与する「カルネキシン」及び「カルレティキュリン」、「セレクチン」又は「コレクチン」等の代表的なレクチンを含むカルシウム要求性の「C型レクチン」、ガラクトースに親和性を示す「ガレクチン」、植物豆科で大きな家系を形成する「豆科レクチン」、豆科レクチンと構造類似性を持ち動物細胞内輸送に関わる「L型レクチン」、リソソーム酵素の細胞内輸送に関わるマンノース6リン酸結合性の「P型レクチン」、グリコサミノグリカンをはじめとする酸性糖鎖に結合する「アネキシン」、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する「I型レクチン」等に分類される。

20

【0057】

レクチンは、具体的には、実施例で使用したコンカナバリンA（タチタナ豆レクチン；以下「ConA」と言う）の他、ACA（センニコクレクチン）、BPL（ムラサキモクワンジュレクチン）、DBA（Horsegramレクチン）、DSA（ヨウシュチョウセンアサガオレクチン）、ECA（デイゴマメレクチン）、EEL（Spindle Treeレクチン）、GNA（ユキノハナレクチン）、GSL-I（グリフォニアマメレクチン）、GSL-II（グリフォニアマメレクチン）、HHL（アマリリスレクチン）、ジャカリン（ジャックフルーツレクチン）、LBA（リママメレクチン）、LCA（レンズマメレクチン）、LEL（トマトレクチン）、LTL（ロータスマメレクチン）、MPA（アメリカハリグワレクチン）、NPA（ラップズイセンレクチン）、PHA-E（インゲンマメレクチン）、PHA-L（インゲンマメレクチン）、PNA（ピーナッツレクチン）、PSA（エンドウレクチン）、PTL-I（シカクマメレクチン）、PTL-II（シカクマメレクチン）、PWM（ヨウシュヤマゴボウレクチン）、RCA120（ヒママメレクチン）、SBA（ダイズレクチン）、SJA（エンジュレクチン）、SNA（セイヨウニワトコレクチン）、SSA（ニホンニワトコレクチン）、STL（ジャガイモレクチン）、TJA-I（キカラスウリレクチン）、TJA-II（キカラスウリレクチン）、UDA（Common Stinging Nettleレクチン）、UEA-I（ハリエニシダレクチン）、VFA（ソラマメレクチン）、VVA（ヘアリーベッチレクチン）、WFA（ノダフジレクチン）又はWGA（パンコムギレクチン）等が挙げられる。好ましくは、幅広い種類の糖鎖を認識する、ConA（タチタナ豆レクチン）、LCA（レンズマメレクチン）、WGA（パンコムギレクチン）又はPNA（ピーナッツレクチン）であり、より好ましくは、ConA（タチタナ豆レクチン）である。

30

40

50

## 【 0 0 5 8 】

上記の糖鎖修飾物質除去工程に用いる糖鎖結合性タンパク質固定化担体は、上記の糖鎖結合性タンパク質と支持担体とを含む。支持担体を構成する材料としては、糖鎖結合性タンパク質を結合させることのできるものであればよく、例えば、実施例で使用したセファロース（登録商標）の他、アガロース、セルロース、デキストラン、ポリアクリレート、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、スチレンとジビニルベンゼンのコポリマー、ポリアミド、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリエチレンオキシド、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリ塩化ビニル、ポリメチルアクリレート、ポリスチレンとポリスチレンとのコポリマー、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、コラーゲン、アルギン酸カルシウム、ラテックス、ポリスルホン、シリカ、ジルコニア、アルミナ、チタニア又はセラミックス等が挙げられるが、セファロース（登録商標）又はアガロースが好ましい。また支持担体の構造としては、例えば、多孔質構造、繊維状構造、ゲル状構造又は膜構造等を挙げることができる。アフィニティーカラムを用いる場合は、ゲル状構造が好ましい。

10

## 【 0 0 5 9 】

糖鎖結合性タンパク質は上記の支持担体に対して、支持担体に応じた常法を用いて固定化することができる。固定化する糖鎖結合性タンパク質の量は、通常、 $0.0001\text{ mg} \sim 100\text{ mg/mL}$ 、好ましくは $0.01\text{ mg} \sim 20\text{ mg/mL}$ である。担体がアガロースゲルの場合、それをCNBr等で活性化してから糖鎖結合性タンパク質とカップリングさせることができる。活性化スパーサーを導入したゲルに糖鎖結合性タンパク質を固定化してもよい。さらには、ホルミル基を導入したゲルに糖鎖結合性タンパク質を固定化してから $\text{NaCNBH}_3$ で還元してもよい。また、NHS-セファロース（GEヘルスケアバイオサイエンス社製）のような市販の活性化ゲルを使用してもよい。また、糖鎖結合性タンパク質固定化担体は市販のもの、例えば、ConA Sepharose 4B（GEヘルスケアバイオサイエンス社製）又はGlycoprotein Isolation Kit, WGA（サーモサイエンティフィック社製）等を使用することもできる。

20

## 【 0 0 6 0 】

上記の糖鎖修飾物質除去工程において、試料液を糖鎖結合性タンパク質固定化担体と接触させると、試料液中の糖鎖を有するタンパク質が糖鎖結合性タンパク質固定化担体に結合するため、試料液中から除去できる。この糖鎖修飾物質除去工程で除去できる糖鎖を有するタンパク質には、生体由来の糖鎖を有するPEG非修飾のIFN- $\gamma$ が含まれる。したがって、この工程を加えることにより、特に生体試料液を用いた場合、PEG修飾IFN- $\gamma$ の含有量に対するPEG非修飾のIFN- $\gamma$ の含有量の比率をさらに低下させることができる。一方で、この糖鎖修飾物質除去工程は、糖鎖を有するPEG修飾IFN- $\gamma$ の検出及び含有量を測定するための前処理としては、適さない。なお、糖鎖を有するタンパク質の除去率を向上させるために、糖鎖結合性タンパク質固定化担体は、複数種の糖鎖結合性タンパク質固定化担体を組み合わせ用いてもよい。また、1種の糖鎖結合性タンパク質固定化担体に複数回、試料液を接触させてもよい。例えば、ConA固定化担体に2回、試料液を接触させることが好ましい。

30

## 【 0 0 6 1 】

糖鎖修飾物質除去工程で用いられる、試料液を糖鎖結合性タンパク質固定化担体と接触させ、試料液中の糖鎖修飾物を除去する方法は、公知の一般的な方法で実施できるが、例えば、担体を充填できる使い捨てのポリプロピレンスピンカラムにConA固定化セファロースを充填したConAアフィニティーカラムに、試料液を添加し、室温で約10～30分間、転倒混和した後、遠心分離して得られた濾液を回収する方法が挙げられる。また、市販の糖鎖結合性タンパク質固定化担体又はそのキットを使用する場合は、添付の説明書に従って行えばよい。

40

## 【 0 0 6 2 】

上記の前処理方法に必要な試料液の量は、使用する試料液中のPEG修飾IFN- $\gamma$ の含有量及びその検出及び測定の方法に依存するが、 $1\text{ }\mu\text{L} \sim 10\text{ mL}$ であればよい。

50

## 【0063】

また、本発明のPEG修飾IFN- $\gamma$ の検出方法は、上記の前処理方法で試料液を前処理する前処理工程と、前処理工程で前処理した試料液中のPEG修飾IFN- $\gamma$ を免疫学的又は生物学的に検出する検出工程とを備えることを特徴としており、本発明のPEG修飾IFN- $\gamma$ の定量方法は、試料液中のPEG修飾IFN- $\gamma$ の検出方法を包含するとともに、上記前処理方法で試料液を前処理する前処理工程と、前処理工程で前処理した試料液中のPEG修飾IFN- $\gamma$ を免疫学的又は生物学的に検出し、PEG修飾IFN- $\gamma$ の含有量を測定する測定工程とを備えることを特徴としている。

## 【0064】

上記の前処理方法により前処理した試料液は、試料液中のPEG修飾IFN- $\gamma$ を免疫学的又は生物学的に検出する前に上記の中和工程を行なってもよいし、適当な緩衝液等（例えば、免疫学的に検出する系で使用する緩衝液、生物学的に検出する系で使用する細胞培養培地等）で希釈してもよい。これは、PEG修飾IFN- $\gamma$ を免疫学的に検出又は生物学的に検出する方法の特性を考慮し、適宜行えばよい。

10

## 【0065】

上記の前処理方法により前処理した試料液中のPEG修飾IFN- $\gamma$ を検出する方法及び含有量を測定方法としては、具体的には以下の方法が挙げられる。

## 【0066】

免疫学的に検出する方法及び含有量を測定する方法としては、IFN- $\gamma$ を特異的に認識する抗体を用いたELISA法（酵素免疫測定方法）等が挙げられる。ELISA法は、例えば以下の方法で実施できる。抗IFN- $\gamma$ ポリクローナル抗体を固相化したプレートのウェルに、上記の前処理方法により前処理した試料液を添加し、試料液中のPEG修飾IFN- $\gamma$ とポリクローナル抗体とを結合させる。Horseradish Peroxidase（以下「HRP」と言う）などの酵素で標識した抗IFN- $\gamma$ モノクローナル抗体をプレートのウェルに添加し、PEG修飾IFN- $\gamma$ と結合させる。TMBなどの発色基質を加え、酵素と反応させ発色させることにより、試料中液のPEG修飾IFN- $\gamma$ を検出するとともに、得られた発色量を指標としてPEG修飾IFN- $\gamma$ の含有量を測定する。また、ELISA法は、市販のキット、例えば、ヒトインターフェロン- $\gamma$  ELISAキット（鎌倉テクノサイエンス社製）等を用いることでも実施できる。

20

## 【0067】

生物学的に検出する方法及び含有量を測定する方法としては、例えば、IFN- $\gamma$ の抗ウイルス活性を指標としてIFN活性を測定できる、CPE法（細胞変性効果測定方法）が挙げられる。具体的には、IFNに感受性の高い細胞（以下「IFN感受性細胞」と言う）（例えば、FL細胞）に対して、上記の前処理方法により前処理した試料液を作用させた後に、これら細胞に感染能を持つシンドビスウイルス（Sindbis virus）又は水ぼうそう性口内炎ウイルス（Vesicular stomatitis virus；VSVと略される）等を一定量添加して感染させ、IFN- $\gamma$ により誘導されたウイルス抵抗性の程度、すなわち、抗ウイルス活性を測定することで、IFN活性を測定することにより試料中液のPEG修飾IFN- $\gamma$ を検出する。さらに、このIFN活性の数値を指標としてPEG修飾IFN- $\gamma$ の含有量を測定する。抗ウイルス活性は、ウイルス増殖の抑制を指標に測定されるものであり、ウイルス増殖の結果として細胞を破壊させる細胞変性効果（Cytopathic Effect；CPEと略される）を50%阻止する検体の希釈倍率から、IFN力価（U）が算出される（小林ら、「免疫生化学実験法（続生化学実験講座5）」、日本生化学会編、東京化学同人、1986年、p.245）。

30

40

## 【0068】

また、その他の生物学的に検出する方法及び含有量を測定する方法としては、例えば、レポーターアッセイと呼ばれる方法が挙げられる。具体的には、インターフェロン応答遺伝子15（Interferon-Stimulated Gene 15；ISG15と略される）のプロモーター領域に存在するインターフェロン刺激応答領域（IFN Sensitive Response Element；ISREと略される）の制御下で

50

ルシフェラーゼが発現するレポーター遺伝子を導入した細胞が発現するルシフェラーゼの量を指標にして、IFN活性を測定することにより試料中液のPEG修飾IFN-を検出する。さらに、このIFN活性の数値を指標としてPEG修飾IFN-の含有量を測定する。これは市販のキットを用いることができる。

【0069】

上記の前処理方法により前処理した試料液中のPEG修飾IFN-を検出する方法及び含有量を測定する方法としては、上記のELISA法又はCPE法が好ましく、キット化された簡便な測定試薬として提供されているELISA法がより好ましい。

【0070】

さらに、本発明のPEG修飾IFN-キットは、酸処理工程で試料液のpHをpH-0.10~pH0.50の範囲にするために使用する酸と、検出工程での試料液中のPEG修飾IFN-を検出するために使用する、抗IFN-抗体、IFN感受性細胞に感染能を持つウイルス、IFN刺激応答領域の制御下にレポーター遺伝子が組み込まれた発現ベクター及びIFN刺激応答領域の制御下のレポーター遺伝子が染色体に組み込まれた形質転換細胞からなる群から選択される1以上のキット構成成分と、を備えることを特徴としている。上記のPEG修飾IFN-キットには、さらに、中和工程で試料液のpHを中性付近に調整するために使用するアルカリ及び糖鎖結合性タンパク質固定化担体が含まれていてもよい。また、IFN感受性細胞又はIFN刺激応答領域の制御下にレポーター遺伝子が組み込まれた発現ベクターを導入するための宿主細胞を構成成分として含んでいてもよい。

【実施例】

【0071】

以下、実施例を示して本発明を具体的に詳述するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0072】

(実施例1) PEG修飾IFN-の作製:

PEG修飾IFN-として、リコンビナント・ヒト・IFN-とPEGとの共有結合体を作製した。「リコンビナント・ヒト・IFN-」は、Nucleic Acid Research、1980年、第8巻、p.4057-4074に記載の方法に従って作製した(以下「リコンビナントヒトIFN-」と言う)。このリコンビナントヒトIFN-は、大腸菌で発現させているため、糖鎖を有しない。

【0073】

また、特許第4850514号の実施例6に記載の方法に従って、リコンビナントヒトIFN-のアミノ酸配列(配列番号1)の134番目のリジンのアミノ基に分子量42,000のPEGが1分子共有結合した「リコンビナントヒトIFN-とPEGとの共有結合体」を調製した(以下「PEG修飾ヒトIFN-」と言う)。具体的には、まず、0.5M塩化ナトリウムを含む100mM酢酸緩衝液(pH5.0)に溶解したリコンビナントヒトIFN-(最終濃度200µg/mL)に、エチレングリコールを(最終濃度20%)添加した後、1Mリン酸水素二ナトリウム溶液を用いてpHを7.6に調整した。これに、ヒドロキシスクシンイミドエステル活性化PEG(分子量42,000、日油株式会社製;品番61G99122B01)を加え混合し、4で一晩、結合反応させた。この結合反応溶液に5倍容の10mM酢酸緩衝液(pH4.5)を添加し、10mM酢酸緩衝液(pH4.5)で平衡化した陽イオン交換カラム(TOYOPEARL CM650(S);東ソー株式会社製)に供した。下記の展開溶媒で、タンパク質を溶出及び分画した。

【0074】

展開溶媒

溶媒A: 10mM酢酸緩衝液(pH4.5)

溶媒B: 1M塩化ナトリウムを含む10mM酢酸緩衝液(pH4.5)

【0075】

10

20

30

40

50

上記溶媒 A、B の混合液を陽イオン交換カラムの樹脂量に対して 40 倍量通液させる間に溶媒 B の送液比率を 0 % から 65 % に連続的に上昇させて溶出を行った。溶出された分画は、さらに、SP-5PW カラム（東ソー株式会社製）に供し、リコンビナントヒト IFN- $\gamma$  のアミノ酸配列（配列番号 1）の 134 番目のリジンのアミノ基に分子量 42,000 の PEG が 1 分子共有結合した「PEG 修飾ヒト IFN- $\gamma$ 」を単離した。得られた PEG 修飾ヒト IFN- $\gamma$  は、糖鎖を有しない。

【0076】

（実施例 2） 酸処理工程及び糖鎖修飾物質除去工程を備える前処理による PEG 非修飾の IFN- $\gamma$  の除去：

1. 実験手法

健康成人より血液を採取し、常法により血清を調製した。血清に、天然型ヒト IFN- $\gamma$  {フエロン（登録商標；東レ社製）} 又は、実施例 1 で作製したリコンビナントヒト IFN- $\gamma$  若しくは PEG 修飾ヒト IFN- $\gamma$  を、それぞれ加え、血清試料を調製した。

【0077】

各血清試料 400  $\mu$ L に、6M 塩酸 100  $\mu$ L（全容量の 20%）を添加した（酸処理工程）。酸処理工程後の血清試料の pH を pH メータ（D-54、HORIBA 社製）及び pH 電極（9618-10D、HORIBA 社製）で測定した値は 0.17（約 0.2）であった。

【0078】

酸処理工程により形成された凝集物を、冷却遠心機（MX-150、トミー精工社製、ローター型式：TMP-11）にて遠心分離し {4, 15, 000 rpm（37, 740  $\times$  g）、5 分間}、沈降させた（凝集タンパク質除去工程）。回収した上清 300  $\mu$ L に 8M 水酸化ナトリウムと、pH 調整用リン酸溶液 {150 g/L リン酸水素 2 ナトリウム・12 水和物、30 g/L リン酸 2 水素カリウム、0.005% Tween 20（登録商標）を含む水溶液（pH 6.0）} とを添加し、pH を中性付近に調整した（中和工程）。これらを、測定試料 A とした。また、酸処理工程を備える前処理を行わない血清試料を対照試料（天然型ヒト IFN- $\gamma$ 、リコンビナントヒト IFN- $\gamma$  又は PEG 修飾ヒト IFN- $\gamma$  を含む）とした。

【0079】

糖鎖結合性タンパク質固定化担体として、ConA 固定化担体を用いた。懸濁させた ConA Sepharose 4B（GEヘルスケアバイオサイエンス社製）250  $\mu$ L をフィルターカップ（バイオ・ラッド社製）に添加した後、PBS にて ConA Sepharose 4B を 2 回洗浄し、溶媒置換を行ったものを ConA アフィニティーカラムとして用いた。250  $\mu$ L の測定試料 A を ConA アフィニティーカラムに添加し、ローターにて室温で約 30 分間、転倒混和した後、低速冷却遠心機（RLX-135、トミー精工社製、ローター型式：TS-39）を用いて、遠心分離 {4, 5, 000 rpm（5, 340  $\times$  g）、5 分間} し、濾液を得た（糖鎖修飾物質除去工程）。得られた濾液を、測定試料 B とした。

【0080】

96 ウェルマイクロプレート（NUNC 社製）に、ヤギ由来抗ヒト IFN- $\gamma$  ポリクローナル抗体（天然型 IFN- $\gamma$  を抗原としてヤギに免疫して血清を得た後、抗原に対するアフィニティー精製により作製した）を PBS で希釈した溶液を 135 ng / 100  $\mu$ L / ウェルにて添加し、室温で約 2 時間又は冷蔵（温度範囲：4  $\pm$  3  $^{\circ}$ C）にて一晚（15 ~ 26 時間）静置した。PBS にてウェル内を洗浄した後、1 g / L BSA を含む洗浄緩衝液 {11.7 g / L 塩化ナトリウム、7.44 g / L リン酸水素 2 ナトリウム・12 水和物、12.4 g / L リン酸 2 水素ナトリウム・2 水和物、及び、0.05% Tween 20（登録商標）を含む水溶液} に置換して室温で約 2 時間又は冷蔵（温度範囲：4  $\pm$  3  $^{\circ}$ C）にて一晚（15 ~ 26 時間）ブロッキングした。ブロッキング後は冷蔵（温度範囲：4  $\pm$  3  $^{\circ}$ C）にて保管し、ブロッキングを行った日から 5 日間以内に使用した。使用時、ウェル内の水分を取り除き、これを ELISA プレートとして用いた。

10

20

30

40

50

## 【0081】

測定試料A、B及び対照試料に対し、ヤギ由来抗ヒトIFN- $\gamma$ ポリクローナル抗体の血清中タンパク質への非特異的結合をブロッキングする目的でヤギIgG（ベックマン・コールター社製）を添加した（最終濃度125 $\mu$ g/mL）後、測定試料A、B及び対照試料を100 $\mu$ L/ウェルにてELISAプレートに添加し、室温にて約1時間静置した。なお、バックグラウンドウェルとして、血清（IFN- $\gamma$ は添加しない）を添加したウェルを設けた。洗浄緩衝液によるウェル内の洗浄を2回繰り返した後、抗ヒトIFN- $\gamma$ モノクローナル抗体（ヤマサ醤油社製）をHRPで標識化したHRP標識化抗ヒトIFN- $\gamma$ モノクローナル抗体を5ng/100 $\mu$ L/ウェルにてELISAプレートに添加し、室温で約1時間静置した。洗浄緩衝液によるウェル内の洗浄を3回繰り返した後、ウェル内の水分を取り除いた。

10

## 【0082】

PEG修飾IFN- $\gamma$ の検出及び定量は発光量を指標として行った。基質溶液は、SuperSignal ELISA Femto Luminol/Enhancer Solution（Pierce Biotechnology社製）及びSuperSignal ELISA Femto Stable Peroxidase Solution（Pierce Biotechnology社製）を等量混合したものをを用いた。基質溶液を100 $\mu$ L/ウェルにてELISAプレートに添加し、発光光度計（E6521、プロメガ社製）にて積分時間2分間あたりの光強度（単位：カウント）を測定した。各試料を添加したウェルのカウントから、バックグラウンドウェルのカウントを差し引いた値を、各試料の発光量とした。

20

## 【0083】

## 2. 結果

結果を図1及び2に示す。図の縦軸は、発光量（カウント）を示し、横軸は、血清試料に加えた天然型ヒトIFN- $\gamma$ 、リコンビナントヒトIFN- $\gamma$ 又はPEG修飾ヒトIFN- $\gamma$ の濃度（pg/mL）を示す。酸処理工程を備える前処理による効果を図1に示し、酸処理工程及び糖鎖修飾物質除去工程を備える前処理による効果を図2に示す。図中の、「対照試料（天然型ヒトIFN- $\gamma$ ）」、「対照試料（リコンビナントヒトIFN- $\gamma$ ）」又は「対照試料（PEG修飾ヒトIFN- $\gamma$ ）」はそれぞれ、天然型ヒトIFN- $\gamma$ 、リコンビナントヒトIFN- $\gamma$ 又はPEG修飾ヒトIFN- $\gamma$ を含む対照試料を示す。図中の「測定試料A」、「測定試料B」の括弧内の記載についても、「対照試料」の括弧内の記載と同じ意味である。

30

## 【0084】

測定試料A（天然型ヒトIFN- $\gamma$ ）及び測定試料A（リコンビナントヒトIFN- $\gamma$ ）の発光量は、それぞれ、対照試料の20%以下、10%以下にまで低下した。これに対して、測定試料A（PEG修飾ヒトIFN- $\gamma$ ）の発光量の低下は認められなかった（図1）。したがって、酸処理工程を備える前処理によって、血清中の天然型ヒトIFN- $\gamma$ 及びリコンビナントヒトIFN- $\gamma$ は低減するが、PEG修飾ヒトIFN- $\gamma$ は変化ないことが示された。

40

## 【0085】

測定試料B（天然型ヒトIFN- $\gamma$ ）及び測定試料B（リコンビナントヒトIFN- $\gamma$ ）の発光量は、それぞれ、対照試料の1%以下、5%以下にまで低下した。これに対して測定試料B（PEG修飾ヒトIFN- $\gamma$ ）の発光量の低下はほとんど認められなかった（図2）。したがって、酸処理工程及び糖鎖修飾物質除去工程を備える前処理によって、血清中の天然型ヒトIFN- $\gamma$ 及びリコンビナントヒトIFN- $\gamma$ は著しく低減するが、PEG修飾ヒトIFN- $\gamma$ は変化ないことが示された。

## 【0086】

この結果から、PEG修飾IFN- $\gamma$ とPEG非修飾のIFN- $\gamma$ とが共存する試料液に対して酸処理工程を備える前処理を行うことにより、PEG修飾IFN- $\gamma$ の検出に影響を及ぼすPEG非修飾のIFN- $\gamma$ を低減し、取り除くことができることが明らかとな

50

った。また、その効果は、さらに糖鎖修飾物質除去工程を行うことにより、高まることが明らかとなった。

【0087】

(実施例3) 酸処理工程及び糖鎖修飾物質除去工程を備える前処理による、PEG修飾IFN- $\gamma$ とPEG非修飾のIFN- $\gamma$ とが共存する試料液中のPEG非修飾のIFN- $\gamma$ の低減：

1. 実験手法

健康成人より血液を採取し、常法により血清を調製した。血清に天然型ヒトIFN- $\gamma$  {フエロン(登録商標; 東レ社製)} (最終濃度333 pg/mL)と実施例1で作製したPEG修飾ヒトIFN- $\gamma$  (最終濃度0、40、240 pg/mL)とを加えた血清試料(I)、及び、実施例1で作製したリコンビナントヒトIFN- $\gamma$  (最終濃度100 pg/mL)とPEG修飾ヒトIFN- $\gamma$  (最終濃度0、40、240 pg/mL)とを加えた血清試料(II)を調製した。

10

【0088】

各血清試料400  $\mu$ Lに、6M 塩酸100  $\mu$ L (全容量の20%)を添加した(酸処理工程)。酸処理工程後の血清試料のpHをpHメータ(D-54、HORIBA社製)及びpH電極(9618-10D、HORIBA社製)で測定した値は0.17(約0.2)であった。

【0089】

酸処理工程により形成された凝集物を、冷却遠心機(MX-150、トミー精工社製、ローター型式:TMP-11)にて遠心分離し{4、15、000 rpm(37、740  $\times$  g)、5分間}、沈降させた(凝集タンパク質除去工程)。回収した上清300  $\mu$ Lに8M 水酸化ナトリウムと、pH調整用リン酸溶液{150 g/L リン酸水素2ナトリウム・12水和物、30 g/L リン酸2水素カリウム、0.005% Tween 20(登録商標)を含む水溶液(pH6.0)}とを添加し、pHを中性付近に調整した(中和工程)。これらを、酸処理後試料とした。

20

【0090】

実施例2と同じ方法で作製したConAアフィニティーカラムに250  $\mu$ Lの酸処理後試料を添加し、ローターにて室温で約30分間、転倒混和した後、低速冷却遠心機(RLX-135、トミー精工社製、ローター型式:TS-39)を用いて、遠心分離{4、5、000 rpm(5、340  $\times$  g)、5分間}し、濾液を得た。得られた濾液全量を、別のConAアフィニティーカラムに添加し、上記と同様に遠心分離し、濾液を得た(糖鎖修飾物質除去工程)。得られた濾液を、測定試料とした。

30

【0091】

測定試料に対し、ネガティブコントロールヤギIgG(ベックマン・コールター社製)を添加した(最終濃度125  $\mu$ g/mL)後、測定試料を100  $\mu$ L/ウェルにて、実施例2と同じ方法で作製したELISAプレートに添加し、冷蔵(温度範囲:4 $\pm$ 3)にて一晚(15~26時間)静置した。また、血清に実施例1で作製したPEG修飾ヒトIFN- $\gamma$ を、最終濃度20、40、80、160、320 pg/mLとなるように加え、酸処理工程及び糖鎖修飾物質除去工程を備える前処理を行った血清試料を、検量線作成用の標準試料として同時に測定した。洗浄緩衝液{11.7 g/L 塩化ナトリウム、7.44 g/L リン酸水素2ナトリウム・12水和物、12.4 g/L リン酸2水素ナトリウム・2水和物、及び、0.05% Tween 20(登録商標)を含む水溶液}によるウェル内の洗浄を2回繰り返した後、抗ヒトIFN- $\gamma$ モノクローナル抗体(ヤマサ醤油社製)をHRPで標識化したHRP標識化抗ヒトIFN- $\gamma$ モノクローナル抗体を5 ng/100  $\mu$ L/ウェルにてELISAプレートに添加し、室温で約1時間静置した。洗浄緩衝液によるウェル内の洗浄を3回繰り返した後、ウェル内の水分を取り除いた。

40

【0092】

PEG修飾ヒトIFN- $\gamma$ の検出及び定量は、発光量を指標として行った。基質溶液は、SuperSignal ELISA Femto Luminol/Enhance

50

r Solution (Pierce Biotechnology社製)及びSuperSignal ELISA Femto Stable Peroxidase Solution (Pierce Biotechnology社製)を等量混合したものを  
用いた。基質溶液を100 $\mu$ L/ウェルにてELISAプレートに添加し、発光光度計  
(E6521、プロメガ社製)にて積分時間2分間あたりの光強度(単位:カウント)を測  
定した。

【0093】

解析ソフトSOFTmaxPRO(ver3.1.2、日本モレキュラーデバイス社製)  
を用い、標準試料の光強度から、4パラメーターのロジスティック回帰によって検量線  
を作成した。各試料に含まれるPEG修飾ヒトIFN- $\beta$ 濃度(測定値)は、検量線を用  
いた逆回帰濃度として算出した。さらに、理論値に対する真度(正確性)の指標であるR  
.E.(Relative Error)を下記の式1に従って求めた。

$$R.E.(%) = \{ (測定値 - 理論値) / 理論値 \} \times 100 \dots \text{式1}$$

【0094】

2. 結果

結果を表1に示す。表中の血清試料(I)は、天然型ヒトIFN- $\beta$ (最終濃度333  
pg/mL)とPEG修飾ヒトIFN- $\beta$ (最終濃度0、40、240pg/mL)とを  
加えた血清試料であり、血清試料(II)は、リコンビナントヒトIFN- $\beta$ (最終濃度  
100pg/mL)とPEG修飾ヒトIFN- $\beta$ (最終濃度0、40、240pg/mL)  
とを加えた血清試料である。理論値は、血清試料に加えたPEG修飾ヒトIFN- $\beta$ の  
濃度を示し、測定値は、酸処理工程及び糖鎖修飾物質除去工程を備える前処理を行った測  
定試料のPEG修飾ヒトIFN- $\beta$ 濃度をELISAによって求めた濃度を示す。

【0095】

【表1】

【表1】

		PEG修飾ヒトIFN- $\beta$ 濃度		R. E. (%)
		理論値 (pg/mL)	測定値 (pg/mL)	
血清試料 (I)	天然型 ヒトIFN- $\beta$ (333pg/mL)	0	0	
		40	40.0	-0.100
		240	250	4.17
血清試料 (II)	リコンビナント ヒトIFN- $\beta$ (100pg/mL)	0	0	
		40	45.8	14.4
		240	250	4.14

【0096】

いずれの血清試料においても、PEG修飾ヒトIFN- $\beta$ 濃度の測定値のR.E.が2  
0%未満であった。したがって、血清試料に、酸処理工程及び糖鎖修飾物質除去工程を備  
える前処理を行うことにより、ELISAによって、PEG修飾ヒトIFN- $\beta$ の含有量  
を高い正確性で測定できることが示された。

【0097】

この結果から、PEG修飾IFN- $\beta$ とPEG非修飾のIFN- $\beta$ とが共存する試料液  
であっても、酸処理工程及び糖鎖修飾物質除去工程を備える前処理を行うことにより、P  
EG修飾IFN- $\beta$ の検出に影響を及ぼすPEG非修飾のIFN- $\beta$ を取り除き、PEG  
修飾ヒトIFN- $\beta$ の含有量を高い正確性で測定できることが明らかとなった。

## 【0098】

(比較例1) PEG修飾されたヒトIFN- $\alpha$  に対する酸処理工程を備える前処理の影響:

## 1. 実験手法

血清(Gemini Bio-Products社製、ロットナンバー:H15L03Z)に、リコンビナントヒトIFN- $\alpha$  2aとPEGとの共有結合体{ペガシス(中外製薬社製);以下「PEG修飾ヒトIFN- $\alpha$ 」と言う}を加え、血清試料を調製した(最終濃度10ng/mL)。

## 【0099】

血清試料に、0.375M、1.5M又は6Mの塩酸を全容量の20%になるよう添加した(酸処理工程)。0.375M、1.5M又は6Mの塩酸で酸処理後の血清試料のpHをpHメータ(D-54、HORIBA社製)及びpH電極(9618-10D、HORIBA社製)で測定した値は、それぞれ、3.25、0.76、0.17であった。

10

## 【0100】

酸処理により形成された凝集物を、冷却遠心機(MX-150、トミー精工社製、ローター型式:TMP-11)にて遠心分離し{4、15、000rpm(37,740xg)、5分間}、沈降させた(凝集タンパク質除去工程)。回収した上清に8M水酸化ナトリウムと、pH調整用リン酸溶液{150g/Lリン酸水素2ナトリウム・12水和物、30g/Lリン酸2水素カリウム、0.005% Tween20(登録商標)を含む水溶液(pH6.0)}とを添加し、pHを中性付近に調整した(中和工程)。これらを、測定試料とした。また、酸処理工程を備える前処理を行わない血清試料を対照試料(PEG修飾ヒトIFN- $\alpha$ を含む)とした。

20

## 【0101】

測定試料及び対照試料中のPEG修飾ヒトIFN- $\alpha$ を、ELISAにより測定した。ELISAは、VeriKine(登録商標) Human Interferon Alpha ELISA Kit(PBL社製)を用い、操作はキットに添付のプロトコールに従った。検出は、マイクロプレートリーダー(Benchmark、バイオ・ラッド社製)にて測定した吸光度(測定波長450nm)を指標として行った。

## 【0102】

## 2. 結果

結果を図3に示す。図は、対照試料、及び、0.375M、1.5M又は6Mの塩酸で酸処理工程を行った測定試料の吸光度(450nm)を示す。

30

## 【0103】

いずれの濃度の塩酸で酸処理工程を行った測定試料においても、対照試料の15%未満にまで吸光度が低下した。したがって、血清中のPEG修飾IFN- $\alpha$ は、PEG修飾IFN- $\alpha$ と異なり、酸処理工程を備える前処理によって著しく低減することが示された。

## 【0104】

(実施例4) 酸処理工程におけるpHの下限:

## 1. 実験手法

血清(コージンバイオ社製、ロットナンバー:BJ4734A)に、実施例1で作製したPEG修飾ヒトIFN- $\alpha$  (最終濃度4000pg/mL)を加えた血清試料を調製して試料液とした。

40

## 【0105】

血清試料300 $\mu$ Lに、6M塩酸75 $\mu$ L(全容量の20%)、130 $\mu$ L(全容量の30%)、200 $\mu$ L(全容量の40%)、300 $\mu$ L(全容量の50%)又は900 $\mu$ L(全容量の75%)を添加した(酸処理工程)。酸処理工程後の各血清試料のpHをpHメータ(D-54、HORIBA社製)及びpH電極(9618-10D、HORIBA社製)で測定した値は、それぞれ、0.17、0.03、-0.10、-0.20、-0.41であった。

## 【0106】

50

酸処理工程により形成された凝集物を、冷却遠心機（MX - 307、トミー精工社製、ローター型式：AR015 - 24）にて遠心分離し（4、15、000 rpm（20、400 × g）、5分間）、沈降させた（凝集タンパク質除去工程）。回収した上清225 μLに8 M 水酸化ナトリウムと、pH調整用リン酸溶液（150 g/L リン酸水素2ナトリウム・12水和物、30 g/L リン酸2水素カリウム、0.005% Tween 20（登録商標）を含む水溶液（pH 6.0））とを添加し、pHを中性付近に調整した（中和工程）。これらを、測定試料とした。また、各測定試料と容量が揃うように蒸留水を添加した、酸処理工程を備える前処理を行わない血清試料を対照試料（PEG修飾ヒトIFN-を含む）とした。

#### 【0107】

測定試料に対し、ネガティブコントロールヤギIgG（日本バイオテスト研究所社製）を添加した（最終濃度134 μg/mL）後、測定試料を100 μL/ウェルにて、実施例2と同じ方法で作製したELISAプレートに添加し、冷蔵（温度範囲：4 ± 3）にて一晚（15 ~ 26時間）静置した。なお、バックグラウンドウェルとして、血清（IFN-は添加しない）を添加したウェルを設けた。洗浄緩衝液（11.7 g/L 塩化ナトリウム、7.44 g/L リン酸水素2ナトリウム・12水和物、12.4 g/L リン酸2水素ナトリウム・2水和物、及び、0.05% Tween 20（登録商標）を含む水溶液）によるウェル内の洗浄を3回繰り返した後、抗ヒトIFN-モノクローナル抗体（ヤマサ醤油社製）をHRPで標識化したHRP標識化抗ヒトIFN-モノクローナル抗体を5 ng/100 μL/ウェルにてELISAプレートに添加し、室温で約1時間静置した。洗浄緩衝液によるウェル内の洗浄を3回繰り返した後、ウェル内の水分を取り除いた。

#### 【0108】

PEG修飾ヒトIFN-の検出及び定量は、吸光度を指標として行った。ELISA POD基質TMB溶液（Easy）（ナカライテスク社製）を100 μL/ウェルにてELISAプレートに添加し、室温で15 ~ 45分間静置した後、0.5 M 硫酸を100 μL/ウェルにてELISAプレートに添加して、発色を停止させた。マイクロプレートリーダー（Model 680 Microplate Reader、バイオ・ラッド社製）にて吸光度（測定波長450 nm）を測定し、各試料を添加したウェルの測定値から、バックグラウンドウェルの測定値を差し引いた値を、各試料の吸光度とした。

#### 【0109】

対照試料と比較した、測定試料の吸光度低下度を式2に従って求めた。

$$\text{吸光度低下度 (\%)} = (\text{測定試料の吸光度} / \text{対照試料の吸光度}) \times 100 \quad \dots \text{式 2}$$

#### 【0110】

さらに、6 M 塩酸を全容量の20%になるよう添加し酸処理工程を行った測定試料を基準試料とし、基準試料の吸光度低下度を0%と設定した場合の相対的な吸光度低下度（%）を式3に従って求めた。

$$\text{相対的な吸光度低下度 (\%)} = 100 - \text{測定試料の吸光度低下度} / \text{基準試料の吸光度低下度} \times 100 \quad \dots \text{式 3}$$

#### 【0111】

### 2. 結果

結果を図4及び表2に示す。図は、6 M 塩酸を全容量の30%、40%、50%又は75%になるよう添加し酸処理工程を行った場合の、相対的な吸光度低下度（%）を示す。

#### 【0112】

10

20

30

40

【表 2】

【表 2】

6 M 塩酸添加率 (%)	血清試料 pH	相対的な 吸光度低下度 (%)
20	0.17	—
30	0.03	14.0
40	-0.10	10.0
50	-0.20	35.7
75	-0.41	72.6

10

【0113】

6 M 塩酸を全容量の30%及び40%になるよう添加し、酸処理工程を行った場合、相対的な吸光度低下度(%)はそれぞれ14.0%及び10.0%であり、20%未満であった。したがって、6 M 塩酸添加量が全容量の40%以下であれば、酸処理工程によってPEG修飾ヒトIFN- $\gamma$ の含有量に概ね影響を与えないことが示された。一方、6 M 塩酸を全容量の50%及び75%になるよう添加し、酸処理工程を行った場合、相対的な吸光度低下度(%)はそれぞれ35.7%及び72.6%であり、酸処理工程によってPEG修飾ヒトIFN- $\gamma$ の含有量が低下することが示された。

20

【0114】

この結果から、血清試料のpHが-0.10以上の場合、酸処理工程を備える前処理によってPEG修飾ヒトIFN- $\gamma$ の含有量に概ね影響を与えず、PEG修飾ヒトIFN- $\gamma$ の含有量を高い正確性で測定できることが明らかとなった。

【0115】

(実施例5) 酸処理工程におけるpHの上限:

1. 実験手法

血清(コージンバイオ社製、ロットナンバー:BJ4734A)に、実施例1で作製したリコンビナントヒトIFN- $\gamma$ (最終濃度1500pg/mL)とPEG修飾ヒトIFN- $\gamma$ (最終濃度1500pg/mL)とを加えた血清試料を調製して試料液とした。

30

【0116】

血清試料300 $\mu$ Lに、6 M 塩酸75 $\mu$ L(全容量の20%)、65 $\mu$ L(全容量の17.5%)、56 $\mu$ L(全容量の15%)又は47 $\mu$ L(全容量の12.5%)を添加した(酸処理工程)後、全ての試料の容量が375 $\mu$ Lになるよう、蒸留水を添加した。酸処理工程後の各血清試料のpHをpHメータ(D-54、HORIABA社製)及びpH電極(9618-10D、HORIABA社製)で測定した値は、それぞれ、0.17、0.21、0.27、0.32であった。

40

【0117】

酸処理工程により形成された凝集物を、冷却遠心機(MX-307、トミー精工社製、ローター型式:AR015-24)にて遠心分離し{4、15、000rpm(20、400 $\times$ g)、5分間}、沈降させた(凝集タンパク質除去工程)。回収した上清225 $\mu$ Lに8 M 水酸化ナトリウムと、pH調整用リン酸溶液{150g/Lリン酸水素2ナトリウム・12水和物、30g/Lリン酸2水素カリウム、0.005% Tween 20(登録商標)を含む水溶液(pH6.0)}とを添加し、pHを中性付近に調整した(中和工程)後、全ての試料の容量が364 $\mu$ Lになるよう、蒸留水を添加した。これらを、測定試料とした。

【0118】

測定試料に対し、ネガティブコントロールヤギIgG(日本バイオテスト研究所社製)

50

を添加した（最終濃度 134  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）後、測定試料を 100  $\mu\text{L}$ /ウェルにて、実施例 2 と同じ方法で作製した ELISA プレートに添加し、冷蔵（温度範囲：4  $\pm$  3）にて一晩（15 ~ 26 時間）静置した。また、血清に実施例 1 で作製した PEG 修飾ヒト IFN- $\beta$  を、最終濃度 400、800、1600、3200、4800、6400  $\text{pg}/\text{mL}$  となるように加え、6M 塩酸を全容量の 20%、17.5%、15% 又は 12.5% になるよう添加することによる酸処理工程を備える前処理を行った血清試料を、検量線作成用の標準試料として同時に測定した。洗浄緩衝液 { 11.7  $\text{g}/\text{L}$  塩化ナトリウム、7.44  $\text{g}/\text{L}$  リン酸水素 2 ナトリウム・12 水和物、12.4  $\text{g}/\text{L}$  リン酸 2 水素ナトリウム・2 水和物、及び、0.05% Tween 20（登録商標）を含む水溶液 } によるウェル内の洗浄を 3 回繰り返した後、抗ヒト IFN- $\beta$  モノクローナル抗体（ヤマサ醤油社製）を HRP で標識化した HRP 標識化抗ヒト IFN- $\beta$  モノクローナル抗体を 5  $\text{ng}/100 \mu\text{L}$ /ウェルにて ELISA プレートに添加し、室温で約 1 時間静置した。洗浄緩衝液によるウェル内の洗浄を 3 回繰り返した後、ウェル内の水分を取り除いた。

10

20

30

40

50

## 【0119】

PEG 修飾ヒト IFN- $\beta$  の検出及び定量は、吸光度を指標として行った。ELISA POD 基質 TMB 溶液（Easy）（ナカライテスク社製）を 100  $\mu\text{L}$ /ウェルにて ELISA プレートに添加し、室温で 15 ~ 45 分間静置した後、0.5M 硫酸を 100  $\mu\text{L}$ /ウェルにて ELISA プレートに添加して、発色を停止させた。マイクロプレートリーダー（Model 680 Microplate Reader、バイオ・ラッド社製）にて吸光度（測定波長 450  $\text{nm}$ ）を測定した。

## 【0120】

Microsoft Excel 2010 を使い、標準試料の吸光度から、4 パラメーターのロジスティック回帰によって検量線を作成した。各試料に含まれる PEG 修飾ヒト IFN- $\beta$  濃度（測定値）は、対応する検量線を用いて、逆回帰濃度として算出した。さらに、理論値に対する真度（正確性）の指標である R.E.（Relative Error）を実施例 3 にて使用した式 1 に従って求めた。

## 【0121】

## 2. 結果

結果を表 3 に示す。理論値は、血清試料に加えた PEG 修飾ヒト IFN- $\beta$  の濃度を示し、測定値は、酸処理工程を備える前処理を行った測定試料の PEG 修飾ヒト IFN- $\beta$  濃度を ELISA によって求めた濃度を示す。

## 【0122】

## 【表 3】

【表 3】

6M 塩酸添加率 (%)	血清試料 pH	リコンビナント ヒト IFN- $\beta$ 濃度 ( $\text{pg}/\text{mL}$ )	PEG 修飾ヒト IFN- $\beta$ 濃度		R. E. (%)
			理論値 ( $\text{pg}/\text{mL}$ )	測定値 ( $\text{pg}/\text{mL}$ )	
20	0.17	1500	1500	1548	3.17
17.5	0.21			1605	6.97
15	0.27			1723	14.9
12.5	0.32			1799	19.9

## 【0123】

6M 塩酸を全容量の 20%、17.5%、15% 及び 12.5% になるよう添加し酸処理工程を行った場合の、PEG 修飾ヒト IFN- $\beta$  濃度の測定値の R.E. は、それぞれ

れ 3.17%、6.97%、14.9%及び19.9%であり、20%未満であった。

【0124】

この結果から、血清試料のpHが0.50以下の場合、PEG修飾IFN- $\gamma$ とPEG非修飾のIFN- $\gamma$ とが共存する試料液中において、PEG非修飾のIFN- $\gamma$ が選択的に低減し、PEG修飾ヒトIFN- $\gamma$ の含有量を高い正確性で測定できることが明らかとなった。

【0125】

(実施例6) 複数種の酸を用いた酸処理工程を備える前処理による、PEG修飾IFN- $\gamma$ とPEG非修飾のIFN- $\gamma$ とが共存する試料液中のPEG非修飾のIFN- $\gamma$ の低減：

1. 実験手法

血清(コージンバイオ社製、ロットナンバー:BJ4734A)に、実施例1で作製したリコンビナントヒトIFN- $\gamma$ (1500pg/mL)とPEG修飾ヒトIFN- $\gamma$ (最終濃度1500pg/mL)とを加えた血清試料を調製して試料液とした。

【0126】

血清試料300 $\mu$ Lに、6M硝酸、硫酸、酢酸又はリン酸75 $\mu$ L(全容量の20%)を添加した(酸処理工程)。酸処理工程後の各血清試料のpHをpHメータ(D-54、HORIABA社製)及びpH電極(9618-10D、HORIABA社製)で測定した値は、それぞれ、0.14、0.26、3.33、0.85であった。

【0127】

6M酢酸又はリン酸を用いた酸処理工程では、凝集物の形成は目視で確認されなかった。凝集物の形成が目視で確認された、6M硝酸又は硫酸を用いた酸処理工程後の血清試料を、冷却遠心機(MX-307、トミー精工社製、ローター型式:AR015-24)にて遠心分離し(4、15,000rpm(20,400 $\times$ g)、5分間)、沈降させた(凝集タンパク質除去工程)。回収した上清225 $\mu$ Lに8M水酸化ナトリウムと、pH調整用リン酸溶液{150g/Lリン酸水素2ナトリウム・12水和物、30g/Lリン酸2水素カリウム、0.005%Tween20(登録商標)を含む水溶液(pH6.0)}とを添加し、pHを中性付近に調整した(中和工程)。これらを、測定試料とした。

【0128】

測定試料に対し、ネガティブコントロールヤギIgG(日本バイオテスト研究所社製)を添加した(最終濃度134 $\mu$ g/mL)後、測定試料を100 $\mu$ L/ウェルにて、実施例2と同じ方法で作製したELISAプレートに添加し、冷蔵(温度範囲:4 $\pm$ 3)にて一晩(15~26時間)静置した。また、血清に実施例1で作製したPEG修飾ヒトIFN- $\gamma$ を、最終濃度400、800、1600、3200、4800、6400pg/mLとなるように加え、6M硝酸又は硫酸を用いた酸処理工程を備える前処理を行った血清試料を、検量線作成用の標準試料として同時に測定した。洗浄緩衝液{11.7g/L塩化ナトリウム、7.44g/Lリン酸水素2ナトリウム・12水和物、12.4g/Lリン酸2水素ナトリウム・2水和物、及び、0.05%Tween20(登録商標)を含む水溶液}によるウェル内の洗浄を3回繰り返した後、抗ヒトIFN- $\gamma$ モノクローナル抗体(ヤマサ醤油社製)をHRPで標識化したHRP標識化抗ヒトIFN- $\gamma$ モノクローナル抗体を5ng/100 $\mu$ L/ウェルにてELISAプレートに添加し、室温で約1時間静置した。洗浄緩衝液によるウェル内の洗浄を3回繰り返した後、ウェル内の水分を取り除いた。

【0129】

PEG修飾ヒトIFN- $\gamma$ の検出及び定量は、実施例5に従った。

【0130】

各試料に含まれるPEG修飾ヒトIFN- $\gamma$ 濃度(測定値)及び理論値に対する真度(正確性)の指標であるR.E.(Relative Error)の算出は、実施例5に従った。

10

20

30

40

50

【0131】

## 2. 結果

結果を表4に示す。理論値は、血清試料に加えたPEG修飾ヒトIFN- $\beta$ の濃度を示し、測定値は、酸処理工程を備える前処理を行った測定試料のPEG修飾ヒトIFN- $\beta$ 濃度をELISAによって求めた濃度を示す。

【0132】

【表4】

【表4】

酸種 (6M, 20%)	血清試料 pH	リコンビナント ヒトIFN- $\beta$ 濃度 (pg/mL)	PEG修飾ヒトIFN- $\beta$ 濃度		R. E. (%)
			理論値 (pg/mL)	測定値 (pg/mL)	
硝酸	0.14	1500	1500	1651	10.1
硫酸	0.26			1603	6.86
酢酸	3.33				
リン酸	0.85				

10

20

【0133】

6M 酢酸又はリン酸を全容量の20%になるよう添加し酸処理工程を行った場合、酸処理工程後の血清試料のpHは、実施例3及び4にて明らかとなった、PEG修飾ヒトIFN- $\beta$ の含有量を高い正確性で測定できるpH-0.10~pH0.50の範囲外であった。一方、6M 硝酸又は硫酸を全容量の20%になるよう添加し酸処理工程を行った場合、酸処理工程後の血清試料のpHは、pH-0.10からpH0.32の範囲内であり、さらに、PEG修飾ヒトIFN- $\beta$ 濃度の測定値のR.E.が20%未満であったことから、PEG修飾ヒトIFN- $\beta$ の含有量を高い正確性で測定できることが示された。

【0134】

この結果から、pH-0.10~pH0.50の範囲内で酸処理工程を備える前処理を行った場合、酸種によらず、PEG修飾ヒトIFN- $\beta$ の含有量を高い正確性で測定できることが明らかとなった。

30

【産業上の利用可能性】

【0135】

本発明の前処理方法は、PEG修飾IFN- $\beta$ とPEG非修飾のIFN- $\beta$ とが共存する試料液中から、PEG修飾IFN- $\beta$ の検出に影響を及ぼすPEG非修飾のIFN- $\beta$ を取り除くことができる。また、本発明のPEG修飾IFN- $\beta$ の検出方法及び定量方法並びにPEG修飾IFN- $\beta$ 検出キットは、PEG修飾IFN- $\beta$ 投与後に生体から採取された試料液中のPEG修飾IFN- $\beta$ の含有量の測定に使用できる。

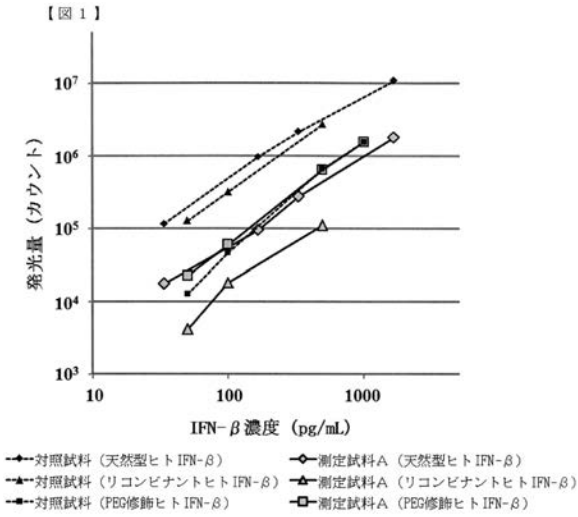
【配列表フリーテキスト】

40

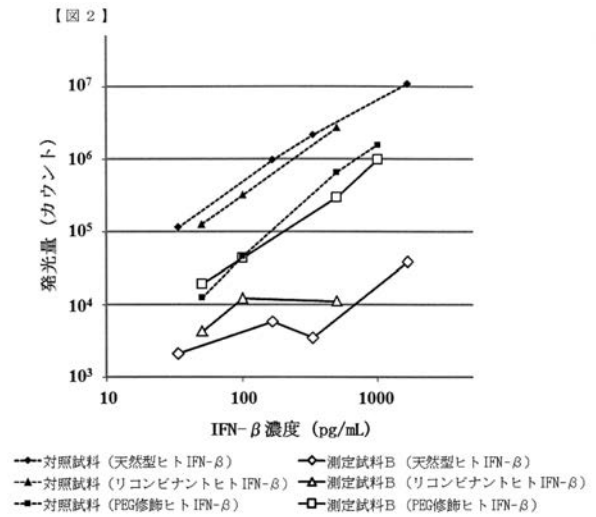
【0136】

配列番号1: ヒト・IFN- $\beta$ のアミノ酸配列

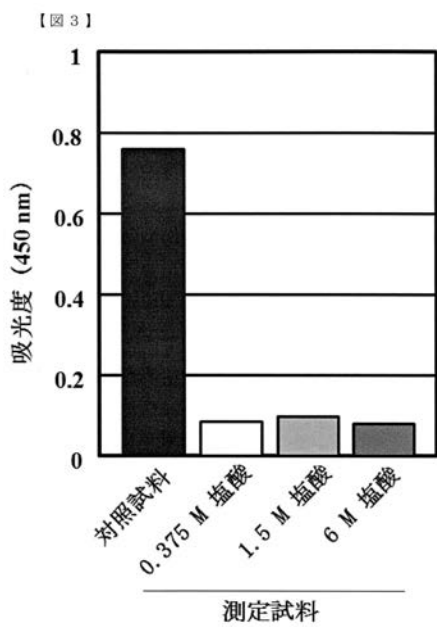
【 図 1 】



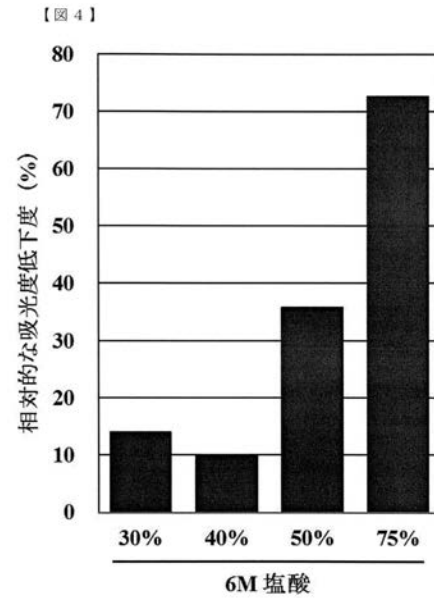
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【配列表】

2016052584000001.app

## 【国際調査報告】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/JP2015/077662
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> G01N33/48(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/48, G01N33/53  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), PubMed		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2004-529917 A (Chiron Corp.), 30 September 2004 (30.09.2004), claims; paragraph [0060] & US 2002/0172661 A1 claims; paragraph [0084] & WO 2002/080976 A2 & EP 1381432 A2	1-8
A	JP 61-050925 A (Toray Industries, Inc.), 13 March 1986 (13.03.1986), claims (Family: none)	1-8
<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 application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 October 2015 (22.10.15)		Date of mailing of the international search report 02 November 2015 (02.11.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer  Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2015/077662

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2007-526317 A (Enzon Pharmaceuticals, Inc.), 13 September 2007 (13.09.2007), claims & US 2009/0214472 A1 claims & WO 2005/084303 A2      & EP 1734988 A2	1-8
A	JP 2011-506562 A (Merck Serono S.A.), 03 March 2011 (03.03.2011), entire text & US 2010/0239529 A1 entire text & WO 2009/080699 A2      & EP 2234645 A2	1-8

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2015/077662									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/48(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/48, G01N33/53											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2015年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2015年	日本国実用新案登録公報	1996-2015年	日本国登録実用新案公報	1994-2015年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2015年										
日本国実用新案登録公報	1996-2015年										
日本国登録実用新案公報	1994-2015年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), PubMed											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
A	JP 2004-529917 A (カイロン コーポレイション) 2004.09.30, 特許請求の範囲、段落 0060 & US 2002/0172661 A1, 特許請求の範囲、段落[0084] & WO 2002/080976 A2 & EP 1381432 A2	1-8									
A	JP 61-050925 A (東レ株式会社) 1986.03.13, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-8									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの									
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 22.10.2015		国際調査報告の発送日 02.11.2015									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 赤坂 祐樹	2 J 3316								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3252									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 7 7 6 6 2
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2007-526317 A (エンゾン ファーマスーティカルズ インコーポレイテッド) 2007.09.13, 特許請求の範囲 & US 2009/0214472 A1, 特許請求の範囲 & WO 2005/084303 A2 & EP 1734988 A2	1-8
A	JP 2011-506562 A (メルク セローノ ソシエテ アノニム) 2011.03.03, 全文 & US 2010/0239529 A1, 全文 & WO 2009/080699 A2 & EP 2234645 A2	1-8

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

Fターム(参考) 2G045 AA13 BB12 BB36 CA25 CA26 DA36  
4H045 AA30 CA40 DA17 EA20 EA50

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	用于聚乙二醇修饰的干扰素-β的检测和定量的样品液的预处理方法，聚乙二醇修饰的干扰素-β的检测方法和定量方法		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2016052584A1</a>	公开(公告)日	2017-07-13
申请号	JP2015551083	申请日	2015-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	东丽株式会社		
申请(专利权)人(译)	东丽株式会社		
[标]发明人	山下祐二 成見英樹 名黒利恵子 浅野智美		
发明人	山下 祐二 成見 英樹 名黒 利恵子 浅野 智美		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48 C07K14/565		
CPC分类号	G01N33/48 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/53.P G01N33/48.B C07K14/565.ZNA		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/BB12 2G045/BB36 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA36 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA17 4H045/EA20 4H045/EA50		
优先权	2014201559 2014-09-30 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种样品溶液的预处理方法，该样品溶液用于检测和定量存在其中聚乙二醇改性的干扰素-β和聚乙二醇未改性的干扰素-β的样品溶液中的聚乙二醇改性的干扰素-β。用于。本发明是用于检测和定量聚乙二醇修饰的干扰素-β的样品溶液的预处理方法，其中将酸添加到样品溶液中以将样品溶液的pH调节至pH-0.10至pH0.50的范围。提供一种预处理方法，其包括调节的酸处理步骤和从蛋白质溶液中除去在酸处理步骤中聚集的蛋白质的聚集蛋白质去除步骤。

(19) 日本国特許庁 (JP)	再公表特許 (A1)	(11) 国際公開番号
発行日 平成29年7月13日 (2017. 7. 13)		WO2016/052584
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/53 (2006. 01)	G O 1 N 33/53 P	2 G 0 4 5
G O 1 N 33/48 (2006. 01)	G O 1 N 33/48 B	4 H 0 4 5
C O 7 K 14/565 (2006. 01)	C O 7 K 14/565 Z N A	
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁)	
出願番号 特願2015-551083 (P2015-551083)	(71) 出願人 000003159	
(21) 国際出願番号 PCT/JP2015/077662	東レ株式会社	
(22) 国際出願日 平成27年9月30日 (2015. 9. 30)	東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号	
(31) 優先権主張番号 特願2014-201559 (P2014-201559)	山下 祐二	
(32) 優先日 平成26年9月30日 (2014. 9. 30)	静岡県三島市4845番地 東レ株式会社	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	三島工場内	
	(72) 発明者 成見 英樹	
	神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内	
	(72) 発明者 名黒 利恵子	
	神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内	
	(72) 発明者 浅野 智美	
	神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 ポリエチレングリコール修飾インターフェロン-βの検出及び定量に使用する試料液の前処理方法、ポリエチレングリコール修飾インターフェロン-βの検出方法及び定量方法		