

(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2016-536587

(P2016-536587A)

(43) 公表日 平成28年11月24日(2016.11.24)

(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 N	4 C 0 8 5
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/53 U	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 1 1 H	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 1 1 D	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-527452 (P2016-527452)
 (86) (22) 出願日 平成26年10月30日 (2014.10.30)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年6月15日 (2016.6.15)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/063034
 (87) 国際公開番号 WO2015/066259
 (87) 国際公開日 平成27年5月7日 (2015.5.7)
 (31) 優先権主張番号 61/898,046
 (32) 優先日 平成25年10月31日 (2013.10.31)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507302748
 リジェネロン・ファーマシューティカルズ
 ・インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 タリタ
 ウン オールド ソー ミル リバー ロ
 ード 777
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

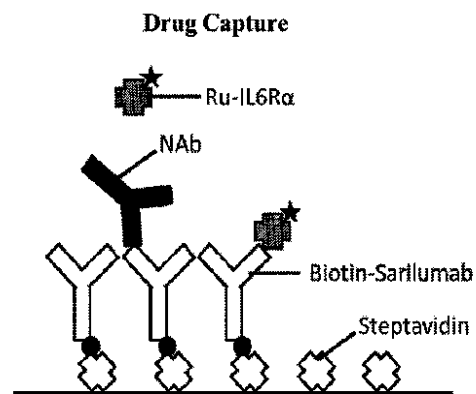
(54) 【発明の名称】 中和抗体を検出するための競合リガンド結合アッセイ

(57) 【要約】

以下の段階を含む、必要とする患者に投与された生物学的治療タンパク質に対する中和抗体の存在を検出するための免疫原性アッセイ：

- (a) 患者から試料を得る段階；
- (b) 捕捉試薬存在下で、該試料をインキュベートする段階；および
- (c) 検出試薬を加える段階であって、対照試料と比較して低いシグナルが、生物学的治療剤に対する中和抗体の存在を示す、段階。

FIGURE 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の段階を含む、必要とする患者に投与された生物学的治療タンパク質に対する中和抗体の存在を検出するための方法：

(a) 患者試料を捕捉試薬と混ぜ合わせる段階、および

(b) 検出試薬を加える段階であって、対照試料と比較して低いシグナルが、生物学的治療剤に対する中和抗体の存在を示す、段階。

【請求項 2】

前記生物学的治療タンパク質がモノクローナル抗体である、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記生物学的治療タンパク質が抗インターロイキン-6受容体 (IL-6R) モノクローナル抗体である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

前記生物学的治療タンパク質がサリルマブまたはトシリズマブである、請求項1~3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記生物学的治療タンパク質がサリルマブである、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

前記患者がIL-6依存性疾患について処置される、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

前記IL-6依存性疾患が、関節リウマチ、糖尿病、アテローム性動脈硬化症、アルツハイマー病、全身性エリテマトーデス、多発性骨髄腫、結合組織障害、キャスルマン病、および前立腺がんのうちの一つである、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

前記IL-6依存性疾患が関節リウマチである、請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

前記捕捉試薬が、標識された生物学的治療タンパク質を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記捕捉試薬が、標識されたサリルマブである、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記標識されたサリルマブがビオチン化サリルマブである、請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

前記ビオチン化サリルマブがアビジンコーティングプレートに結合している、請求項11に記載の方法。

【請求項 13】

前記検出試薬が、標識された可溶性IL-6受容体である、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記検出試薬が、ルテニウム標識された可溶性IL-6受容体である、請求項13に記載の方法。

【請求項 15】

前記患者試料が、段階(b)の前に低pHによる処理に供される、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記患者試料が、段階(b)の前に酢酸による処理に供される、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

前記低pHによる処理の後に中和が続く、請求項15または16に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 18】

前記アッセイが、約150ng/mLの感度公差、約500ng/mLの薬物耐容性、および約1 μg/mLの標的干渉耐容性を示す、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

以下の段階を含む、必要とする患者に投与されたサリルマブに対する中和抗体の存在を検出するための方法：

(a) 患者の血清試料を、ビオチン化サリルマブを含む捕捉試薬と混ぜ合わせる段階、および

(b) 混ぜ合わせた血清試料と捕捉試薬を低pHによる処置に供した後、中和段階を行う段階、

(d) 検出試薬を加える段階であって、該検出試薬が、標識された可溶性IL-6受容体を含み、対照試料と比較して低いシグナルが、生物学的治療剤に対する中和抗体の存在を示す、段階。

【請求項 20】

前記検出試薬が、ルテニウム標識された可溶性IL-6受容体である、請求項19に記載の方法。

【請求項 21】

前記患者が関節リウマチに罹患している、請求項19または20に記載の方法。

【請求項 22】

前記アッセイが、約150ng/mLの感度公差、約500ng/mLの薬物耐容性、および約1 μg/mLの標的干渉耐容性を示す、請求項19～21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

前記請求項のいずれか一項に記載の捕捉試薬および検出試薬、並びに使用のための指示書を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

分野

本願発明は、生物学上の生物学的治療物質に対する中和抗体(NAb)の存在を検出するためのアッセイ方法に関する。

【背景技術】

【0002】

背景

中和抗体(Nab)などの抗体の検出は、生物学的治療剤で処置された患者について実施される免疫原性評価の一部である。中和抗体は、薬物の機能を中和し、それによって薬物の効果に負の影響を及ぼす。特定の生物学的治療剤で処置された患者におけるNAbの存在は、いくつかの免疫アッセイ方法、たとえば比色分析酵素結合免疫吸着法(ELISA)、免疫蛍光ベースの受容体結合アッセイ、可溶性固相放射免疫測定法、およびセンサーベースのアッセイなどを使って検出できる。

【0003】

NAbは、細胞ベースのアッセイを用いても検出できる。これらの細胞ベースのアッセイでは、NAbの存在は、生物学的治療剤の生物学的作用、たとえば標的細胞における生物学的プロセスの調節をそれらが阻害する能力によって、検出できる。これらのアッセイは、たとえば、ルシフェラーゼやベータガラクトシダーゼなどのレポーター遺伝子の活性化を伴いうる。しかし、これらの現行の検出方法には、感度のレベル、特異度のレベル、マトリックス干渉の問題、アッセイのばらつき、限られたダイナミックレンジ、および非常に長いアッセイ期間を含む、いくつかの欠点がある。

【0004】

サリルマブは、臨床開発における、インターロイキン-6(IL6)受容体を標的とする最初の完全ヒトモノクローナル抗体である。IL-6は、免疫細胞および非免疫細胞によって産

10

20

30

40

50

出される多面的なサイトカインで、免疫応答の調節、急性期反応、および造血において重要な役割を担っている。これは、可溶性の細胞膜結合型IL-6R（鎖）に結合して二元複合体を形成し、この複合体は細胞膜結合型gp130（鎖）と相互作用でき、IL-6、IL-6R、およびgp130のうちのそれぞれ2つを含むシグナル伝達複合体の形成を誘導する。

【発明の概要】

【0005】

概要

臨床試料のNab活性を検出する高感度かつ再現可能なアッセイを開発することが、規制上必要である。Nabを検出するための細胞ベースのアッセイは当技術分野で知られているが、細胞ベースでない競合リガンド結合（CLB）アッセイは、より優れたダイナミックレンジと感度を提供するので、より良い代替手段として機能することができる。しかしながら、CLBアッセイは、さまざまなアッセイおよびマトリックス成分からの干渉に関わる問題も有している。出願人は、患者における生物学的治療薬分子に対する中和抗体（NAb）応答を検出可能である、高感度で信頼性の高いCLBアッセイを開発した。

10

【0006】

一つの局面において、生物学的治療物質で処置された患者における、生物学的治療物質に対する中和抗体（NAb）の評価のための方法が提供される。本方法は、生物学的治療剤で処置された患者の処置中および/または処置後のNAbの存在の評価を含む。

【0007】

一つの態様において、生物学的治療タンパク質を必要としかつ該タンパク質で処置された患者における、生物学的治療タンパク質に対する中和抗体の存在を検出するための方法は、（a）患者試料を捕捉試薬と混ぜ合わせる段階、および（b）検出試薬を加える段階であって、対照試料と比較して低いシグナルが生物学的治療剤に対する中和抗体の存在を示す、段階を含む。一つの態様において、該生物学的治療タンパク質は、モノクローナル抗体（mAb）、好ましくは抗インターロイキン-6受容体（IL-6R）モノクローナル抗体である。一つの態様において、生物学的治療タンパク質mAbはサリルマブまたはトシリズマブである；より具体的には、生物学的治療タンパク質mAbはサリルマブである。

20

【0008】

試料は、IL-6依存性疾患について処置されている患者から得る。患者から得られる試料には、例えば、組織、唾液、乳汁、血液、血漿、血清、または、抗体を検出できる他の任意の関連する生物学的液体が含まれる。一つの態様において、試料は、そのような患者から得られる血清試料である。

30

【0009】

IL-6依存性疾患の例には、関節リウマチ、糖尿病、アテローム性動脈硬化症、アルツハイマー病、全身性エリテマトーデス、多発性骨髄腫、すべての混合性結合組織障害、キャッスルマン病、および前立腺がんが含まれる。特定の態様において、血清試料は、関節リウマチに罹患している患者から得る。

【0010】

本方法のある態様において、捕捉試薬は、標識された生物学的治療タンパク質を含む。患者がサリルマブで処置されている場合、捕捉試薬は標識されたサリルマブである。いくつかの態様において、捕捉試薬は、マトリックス、表面、または対標識（counter-labeled）分子への結合を促進するための標識でタグ付けされる。標識は、例えば、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、ポリアルギニン、ポリヒスチジン、FLAG、c-myc、HAT（天然のヒスチジンアフィニティタグ）、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、グルタチオン、RNaseAのS,S断片、マルトース結合タンパク質、キチン結合ドメイン、キチン、カルモジュリン、カルモジュリン結合ペプチドなどを含む。Terpe, K., 「Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems」, Appl. Microbiol. Biotechnol. (2003) 60:523-533を参照されたい。本発明の方法の一つの態様において、捕捉試薬はビオチン化サリルマブである。

40

【0011】

50

本発明の方法のある態様において、検出試薬は標識された可溶性IL-6受容体 である。別の態様において、検出試薬は、検出を可能にするための標識を含む。標識は、例えば、ユーロピウムのようなキレート化ランタニド系金属、ルテニウムのような白金族金属、とりわけフルオロセインやローダミンのようなキサンテン誘導体を含む蛍光色素、緑色蛍光タンパク質（GFP）およびその誘導体である黄色蛍光タンパク質（YFP）や赤色蛍光タンパク質（RFP）などの蛍光タンパク質、ヨウ素125およびアクチニウム225のような放射性標識、ならびにその他の検出可能な標識である。より具体的な態様において、検出試薬はルテニウム標識された可溶性IL-6受容体 である。

【0012】

一つの態様において、混ぜ合わされた患者試料と捕捉試薬は、低pH（酸性）による処理に供される。具体的な態様において、処理には酢酸を用い、続いて中和段階を行う。

10

【0013】

一つの態様において、生物学的治療タンパク質で処置されている患者における中和抗体の存在を検出するための本願のアッセイ法は、約150ng/mLの感度、約500ng/mLの薬物耐容性（tolerance）、および約1 μg/mLの標的干渉耐容性を示す。

【0014】

別の局面において、上述の捕捉試薬および検出試薬とそれらを使用するための指示書を含むキットが提供される。

【図面の簡単な説明】

【0015】

20

【図1】薬物捕捉アッセイ形式を図示し、図2と比較している。該アッセイ形式において、NAb非存在下でシグナルが生じ、NAb存在下ではシグナルの阻害が生じる。阻害% = NAbの存在によって生じるバックグラウンド（NQC）シグナルの減少%。

【図2】標的捕捉アッセイ形式を図示し、図1と比較している。該アッセイ形式において、NAb非存在下でシグナルが生じ、NAb存在下ではシグナルの阻害が生じる。阻害% = NAbの存在によって生じるバックグラウンド（NQC）シグナルの減少%。

【図3】薬物捕捉アッセイ形式の薬物耐容性に対する低pH処理の効果を示す棒グラフである。黒塗り = 低pH処理；白塗り = 低pH処理なし。

【図4】標的捕捉アッセイ形式の薬物耐容性に対する低pH処理の効果を示す棒グラフである。黒塗り = 低pH処理；白塗り = 低pH処理なし。

30

【図5】薬物捕捉アッセイ形式における薬物干渉の影響を示す。

【図6】標的捕捉アッセイ形式における薬物干渉の影響を示す。

【図7】偽陽性の発生に対するIL6R 干渉の影響のグラフである。薬物捕捉形式と標的捕捉形式の両方の結果を示す。

【図8】偽陽性の発生に対するIL6R 干渉の影響のグラフである。薬物捕捉形式を用いた抗標的抗体の存在下での標的干渉の結果を示す。

【図9】NAbの検出に干渉するヒト試料における高シグナル応答の軽減についての薬物捕捉形式の試験における結果を示す。選択されたリウマチ因子陽性（RF+）個体における高シグナル応答の結果を示す。

40

【図10】NAbの検出に干渉するヒト試料における高シグナル応答の軽減についての薬物捕捉形式の試験における結果を示す。高シグナルRF+個体のNAb回復における結果を示す。

【図11】標準ストレプトアビジン（黒塗りバー）または高結合アビジン（白塗りバー）プレートでの、高シグナルRF+個体のスクリーニングで得られた結果の棒グラフである。

【図12】選択された高シグナルRF+個体または正常シグナルRF+個体において得られた結果を示す棒グラフである。黒塗りバー = 添加なしの試料；白塗りバー = LQCを添加された試料。

【発明を実施するための形態】

【0016】

詳細な説明

本願発明を説明する前に、方法や条件は変更されうるので本発明は特定の方法や詳述す

50

る実験条件に限定されないことが、理解されるべきである。また、本願発明の範囲は、添付の特許請求の範囲だけに限定されるので、本明細書で使用される専門用語は、特定の態様のみを記載する目的であり、制限を意図するものではないということも理解されるべきである。

【0017】

特に明記しない限り、本願明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は本発明が属する分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を持つ。本願明細書で使用される場合、「たとえば」という用語は、特定の引用された数値に関連して使用されるとき、その値は、その引用された数値から1%以下で変動し得ることを意味する。たとえば、本願明細書で使用される場合、「約100」なる表現は、99と101、およびその間のすべての数字を含む（例えば、99.1、99.2、99.3、99.4など）。

10

【0018】

本願明細書に記載されたものと類似するかまたは同等である任意の方法や材料を本願発明の実施において使用することができるが、好ましい方法および材料をこれから記載する。本願明細書で言及するすべての刊行物は、記載されたその全文が参照により本明細書に組み入れられる。他の態様は、後述の詳細な説明を検討することにより明らかになる。

【0019】

本願明細書に記載の発明が完全に理解され得るように、以下に詳細な説明を記載する。

【0020】

本明細書で開発されたCLBアッセイは、Meso Scale Discovery (MSD) のプラットフォームに基づいた。図1および2は、試験した2つのアッセイ形式を図示している。図1は、ヒト血清試料中のNAbを、ビオチニル化サリルマブとともにインキュベートし、続いてストレプトアビジンまたはアビジンでコーティングされたマイクロプレート上で捕捉した、薬物捕捉形式を図示している。ルテニウム化IL-6R を次に加えることにより、NAbの非存在下ではシグナルが生じ、NAbの存在下ではシグナルの障害が生じた。この原理は、ルテニウム化サリルマブがプレート上のビオチニル化IL-6R 標的によって捕捉される点を除いて、標的捕捉形式においても同じである。高感度で信頼性の高いアッセイの開発には、薬物、標的、標識、pH、およびインキュベート時間の最適化が含まれた。この2つのアッセイ形式を比較し、次により良い形式を最適化して、妥当性を実証した。

20

【0021】

最初の特性評価では、薬物捕捉形式はより高い非特異的シグナルをもたらす一方で標的捕捉は薬物干渉の影響をより受けやすいことが示唆された。いくつかの最適化戦略を調べた後に、このプログラムにとって最良のアッセイを選択するための比較評価が実施された。RF+血清由来の偽陰性結果をもたらす高いバックグラウンドシグナルは、アビジンコーティングマイクロプレートの別の固相基板に替えることによって、効果的に除去された。標的と薬物の間の相互作用を特異的に遮断する抗標的抗体により標的干渉が軽減された一方で、低pH処理により薬物耐容性が改善された。結果は、薬物捕捉形式が、標的または薬物からの干渉が最小限である高感度の強固なアッセイを提供することを示した。妥当性が実証されたアッセイは、次の特性と共に、1~8%の範囲にわたる精度を示した：

30

感度 = 約150ng/mL、薬物耐容性 = 約500ng/mL、標的干渉 = 約1 μ g/mL。

40

【0022】

標的捕捉形式および薬物捕捉形式のどちらもCLB NAbアッセイを確立するために成功裏に使用可能であるが、感度、薬物耐容性、および標的干渉軽減についての成功戦略を考案するためには、薬物と標的の対の特異的な結合特性を試験することが重要である。得られた結果に基づくと、薬物捕捉形式のほうが優れていたため、薬物捕捉形式を臨床試料の生物分析に関する妥当性の実証および使用に供した。

【0023】

本発明は、生物学的治療タンパク質に対する中和抗体の検出についての免疫原性アッセイを特徴とする。一つの態様において、生物学的治療タンパク質はモノクローナル抗体 (mAb) である；より具体的には、生物学的治療タンパク質は、インターロイキン-6受容体

50

アルファ (IL-6R) に特異的に結合するmAbである ; より具体的には、生物学的治療物質はサリルマブである。サリルマブ (REGN88ともいう) は関節リウマチの処置のために開発された。したがって、特定の態様において、本発明は、サリルマブを用いて関節リウマチについて処置された患者における中和抗体の検出についての免疫原性アッセイを提示する。他の抗IL-6R モノクローナル抗体、例えばヒト化抗IL-6R トセリズマブを本願発明の方法において使用できることが、想定される。

【0024】

定義

「中和抗体 (NAb)」とは、生物学的治療分子を中和する能力を有する抗薬物抗体である。一つの態様において、生物学的治療分子は抗IL6R 抗体サリルマブであり、NAbはIL6R 抗体と結合して、それがIL6R に結合することを妨げる。

10

【0025】

「分析物」なる用語は、分析される物質を、すなわち、品質対照中に存在するマウス抗REGN88モノクローナル抗体 (REGN575) またはヒト血清試料中のヒト抗REGN88 NAbを指して用いられる。

【0026】

「カットポイント」とは、アッセイにおけるNAb陰性応答とNAb陽性応答を区別するために使用される閾値 (すなわち、阻害%) を指す用語である。それは、薬物未投与の罹患ヒト試料一式のアッセイ応答を分析することによって統計的に決定される一定値である。

20

【実施例】

【0027】

以下の実施例は、本発明の方法および組成物の作製および使用の方法の完全な開示および説明を当業者に提供するために提示するものであり、本発明者が本発明とみなしている範囲を限定することを意図するものではない。使用される数値 (例えば、量、温度など) に関して正確さが保証されるよう努力がなされたが、いくつかの実験誤差および偏差は考慮されるべきである。特に明記しない限り、部分は重量部分であり、分子量は平均的な分子量であり、温度はセ氏温度であり、圧力は大気圧かほぼ大気圧である。

【0028】

実施例1 : REGN88 (サリルマブ) に対するNAbを検出するための競合リガンド結合アッセイ

30

REGN88は、ヒトインターロイキン-6受容体 (IL-6R) に特異的なヒトモノクローナル抗体 (IgG1サブクラス) である。競合リガンド結合アッセイ形式を用いた抗REGN88中和抗体 (NAb) を検出するための方法は、次のように開発された。

【0029】

アッセイの手順は、陽性対照としてマウス抗REGN88モノクローナル抗体 (REGN575) を、捕捉試薬としてビオチン化REGN88 (ビオチニル化REGN88) を、ルテニウム標識された可溶性hIL-6R (ルテニウム-REGN78) を検出試薬として、および、リガンド干渉を軽減するためにREGN17 (抗ヒトIL-6R モノクローナル抗体) を用いる。

【0030】

簡潔には、試料および対照を、低pH条件下で (酢酸により) 希釈した後、ビオチニル化REGN88およびREGN17を含有するトリス塩基溶液で中和する。低pH処理により、血清試料中に存在するNAb : 薬物複合体および薬物 : 標的複合体の解離が起こり、これによって、血清中の過剰な薬物の存在下におけるNAbの検出を改善することができる。標的干渉を軽減する目的で、REGN17が、低pH処理によって解放された遊離標的に結合させるために使用される。インキュベーションの間、陽性対照 (REGN575) または試料中に存在する任意のNAbが、ビオチニル化REGN88に結合する。低pH処理された試料は、次に、あらかじめアビジンでコーティングされたマイクロプレートに加えられ、ここでアビジンは、ビオチニル化REGN88を、それに結合しているNAbとともに捕捉した。

40

【0031】

インキュベーションおよび洗浄の後、ルテニウム-REGN78をマイクロプレートに加えた

50

。試料中にNAbがなければ、アビジンで捕捉されたビオチニル化REGN88はルテニウム-REGN78に結合し、マイクロプレートの表面上で、ビオチニル化REGN88：ルテニウム-REGN78複合体を形成する。トリプロピルアミン（TPA）ベースのリード緩衝液をマイクロプレートに加え、Meso Scale Discovery（MSD）の電気化学発光リーダーで読み取りを行った。NAb存在下ではNAbがビオチニル化REGN88に結合し、それによりビオチニル化REGN88：ルテニウム-REGN78複合体の形成を妨げ、これが次に、電気化学発光シグナルを減少させる。それゆえ、測定された電気化学発光（つまり、カウント）は、試料中のNAbの量に反比例する。

【0032】

投薬を受けていない患者80名の試料を、カットポイントを決定するために分析された。選択された阻害%カットポイントは40であり、これは、0.1%偽陽性率に基づくパラメトリック法を用いて計算された。阻害率（阻害%）はNAbの存在に起因するシグナルの減少として計算された。陽性品質対照（PQC）は、NQCで調製された、既知量のREGN575を有する対照試料であり、アッセイの性能を検証するために使用された：HQC = 高品質対照；20 × HQC：4 μg/mL；MQC = 中品質対照；20 MQC：0.4 μg/mL；LQC = 低品質対照；20 × LQC：0.2 μg/mL。陰性品質対照（NQC）は、分析物を有さない対照試料（純ヒト血清）であり、阻害%を計算するために使用された。添加ありの陰性品質対照（SNQC）は、NQCで調製された、既知量のREGN78を有する対照試料であり、REGN17の性能を検証するために使用された。CV% - 百分率で表される変動係数。検出の限界（LOD）は、カットポイントより高い阻害%を有する陽性対照（REGN575）の最低濃度であった。純血清中のアッセイのLODは、マウス抗REGN88モノクローナル抗体（REGN575）約150ng/mLであった。カウント = 電気化学発光シグナルの単位。

【0033】

材料と装置

試薬：マウス抗REGN88モノクローナル抗体（Regeneron、REGN575）、抗REGN88mAbとも呼ばれる；ビオチン化REGN88（ビオチン-REGN88またはビオチニル化REGN88）；ルテニウム標識されたhIL-6R（Ru(bpy)₃ REGN78またはルテニウム-REGN78）；マウス抗ヒトIL-6Rモノクローナル抗体（抗hIL-6R mAbとも呼ばれる）；hIL-6R（REGN78）；5% BSAブロッキング緩衝液；pH7.2のリン酸緩衝生理食塩水（1 × PBS）；アビジンコーティングマイクロプレート - MULTI-ARRAY（登録商標）96ウェルアビジンゴールドプレート；300mM酢酸；1.5Mトリズマ塩基溶液（トリスまたはトリスベース）；リード緩衝液 - 界面活性剤含有MSDリード緩衝液T（4 ×）（4 × リード緩衝液）；1 × 洗浄緩衝液；精製水；プールされたヒト血清。

【0034】

計器および実験器具

96ウェルポリプロピレンプレート（ディープウェルプレートまたはブロック）；Sector Imager 2400（Meso Scale Discovery、モデル1250）MSDディスクバリエーション付き；マイクロソフトエクセル；SoftMax（登録商標）Proアプリケーション、バージョン5.2またはそれ以上（Molecular Devices）。

【0035】

手順

インキュベーション段階の間、プレート振とうを実施した。すべての体積移動には最低限10 μLが使用された。ヒト血清を扱うときには、バイオセーフティーレベル2の予防策に準拠した。品質対照（QC）：QCは、最大10サイクルの凍結融解、室温での少なくとも4時間（4時間32分）の保存、または4 冷蔵室での最長23時間（23時間20分）の保存で安定であることが示された。QC安定性は試験試料安定性の代理として使用された。陰性品質対照（NQC）：市販の正常ヒト血清プールが、NQCとして使用するのに適切であった。ヒト血清プール（NQC）のアリコートは-80 冷凍庫に保管する。

【0036】

PQC -（HQC、MQC、LQC）の調製

調製日以降の試料分析における使用を目的とする場合、PQCが適切であった。NQCにマウス抗REGN88モノクローナル抗体（REGN575）を添加することにより、下記の表に列挙された濃度で20×PQCを調製した。各PQCの調製のための一つの例として、次のものを使用してもよい：例：10μLのREGN575（0.88mg/mL）を、166μLのNQCに加えて混合し、50μg/mL REGN575溶液（QC前駆物質A）を得た。10μLの50μg/mL REGN575溶液を、490μLのNQCに加えて混合し、1μg/mLのREGN575溶液（QC前駆物質B）を得た。PQCは同日に使用してもよいし、等分割して-80℃冷凍庫に保管してもよい。

品質対照	20X QC 濃度	1X アッセイ濃度	QC前駆物質 の量(μL)	NQC の量 (μL)
HQC	4 μg/mL	200 ng/mL	40 (前駆物質A)	460
MQC	0.4 μg/mL	20 ng/mL	200 (前駆物質B)	300
LQC	0.2 μg/mL	10 ng/mL	100 (前駆物質B)	400

10

【0037】

添加ありの陰性品質対照（SNQC）

SNQCは、調製日以降の試料分析における使用のために適切であった。0.6μg/mLのhIL-6R（REGN78）の溶液をNQCで調製した。SNQCの調製のための一つの例として、次のものを使用してもよい：例：10μLのREGN78（2.3mg/mL）を、220μLのNQCに加えて混合し、100μg/mLのREGN78溶液を得た。10μLの100μg/mL REGN78溶液を90μLのNQCに加えて混合し、10μg/mL REGN78溶液を得た。30μLの10μg/mL REGN78溶液を470μLのNQCに加えて混合し、0.6μg/mLのREGN78溶液（SNQC）を得た。該SNQCは同日に使用されたか、または等分割されて-80℃冷凍庫に保管された。

20

【0038】

アッセイ手順

QCを取り出して解凍し、試験試料を氷上または4℃冷蔵室で保存した。ディープウェルポリプロピレンプレート（試料プレート）中で、各QCおよび試験試料の10倍希釈物を300mM酢酸で調製し、混合した。例：10μLの各QC/試料を90μLの300mM酢酸に加えて混合した。試料プレートに蓋をして、室温で45±15分間インキュベートした。1% BSAを含む1×PBS溶液を調製して混合した。例：8mLの5% BSAブロッキング緩衝液を32mLの1×PBSに加えて混合した。10ng/mLのビオチニル化REGN88および50μg/mLのREGN17および0.2Mトリスを含有する1% BSAを含む溶液を調製し、混合した。例：10μLのビオチニル化REGN88（3.8mg/mL）を、370μLの1% BSAに加えて混合し、100μg/mLビオチニル化REGN88溶液を得た。10μLの100μg/mLビオチニル化REGN88を190μLの1% BSAに加えて混合し、5μg/mLビオチニル化REGN88溶液を得た。15μLの5μg/mLビオチニル化REGN88、19.3μLの19.5mg/mL REGN17、および1mLの1.5M トリズマ塩基を、6.5mLの1% BSAに加えて混合し、10ng/mLビオチニル化REGN88および50μg/mL REGN17および0.2Mトリスを含有する1% BSA溶液を得た。ディープウェルポリプロピレンプレート（試料プレート）中で、QCと試験試料の最終2倍希釈物（合計で20倍希釈）を、10ng/mLビオチニル化REGN88および50μg/mL REGN17および0.2Mトリスを含有する1% BSA溶液で調製し、混合した。例：10ng/mLビオチニル化REGN88および50μg/mL REGN17および0.2Mトリスを含有する1% BSA溶液100μLを、100μLの酸性化したQC/試料に加えて混合した。試料プレートに蓋をして、400rpmで振とうしながら室温で60±15分間インキュベートした。アッセイプレート3×を、MSDプレート3×洗浄プログラムを用いて、300μL/ウェルの1×洗浄緩衝液で洗浄した。50μLのQCおよび試験試料それぞれを試料プレートからアッセイプレートに2つ組で加えた。アッセイプレートに蓋をして、400rpmで振とうしながら室温で60±15分間インキュベートした。2μg/mLルテニウム-REGN78含有1% BSAを含む溶液を調製し、混合した。例：10μLのルテニウム-REGN78（2.9mg/mL）を280μLの1% BSAに加え、混合して、100μg/mLルテニウム-REGN78溶液を得る。140μL

30

40

50

の100 µg/mLルテニウム-REGN78を7mLの1% BSA中に移し、混合して、2 µg/mLルテニウム-REGN78含有1% BSA溶液を得た。アッセイプレート3×を、MSD_プレート_3×洗浄プログラムを用いて、300 µL/ウェルの1×洗浄緩衝液で洗浄した。50 µL/ウェルの2 µg/mLルテニウム-REGN78含有1% BSA溶液をアッセイプレートに加えた。アッセイプレートに蓋をして、400rpmで振とうしながら室温で60 ± 15分間インキュベートした。

【0039】

マイクロプレート調製

300 µL/ウェルの5% BSAブロッキング緩衝液をアビジンコーティングマイクロプレート（アッセイプレート）に加えた。該マイクロプレートを密封し、1~4時間、室温でインキュベートした。2×リード緩衝液を調製し、混合した。例：10mLの4×リード緩衝液を10 mLの精製水に加えて混合した。アッセイプレート3×を、MSD_プレート_3×洗浄プログラムを用いて、300 µL/ウェルの1×洗浄緩衝液で洗浄した。150 µL/ウェルの2×リード緩衝液をアッセイプレートに加えた。アッセイプレートを、2×リード緩衝液を加えた後10分以内に、Sector Imager 2400での読み取りに供した。

10

【0040】

データ分析

プレートの読み取りデータをSoftMax Proファイルフォーマットに転送した。SoftMaxファイルでは、マスクウェルが必要な場合、ウェルは変換データ区画でマスクされた。これにより、マスクされた値を見ることができるようになったが、計算には使用しなかった。次に、平均カウント、阻害%、およびCV%カウントを各QCと試験試料について計算した。

20

阻害% = $100 \times [(NQCの平均カウント - PQCまたは試料の平均カウント) / NQCの平均カウント]$

【0041】

アッセイ性能基準値

LQC阻害%はカットポイントを上回らなければならない；SNQC阻害%はカットポイント未満でなければならない；HQC阻害%はMQC阻害%を上回らなければならない；MQC阻害%はLQC阻害%を上回らなければならない；各PQCおよびSNQCのCV%カウントは20%以下でなければならない；NQCのCV%カウントは15%以下でなければならない。

【0042】

試験試料許容基準

アッセイ性能 - すべてのアッセイ性能基準値が満たされ、そうでなければ試験試料を再度作成して再分析した。精度 - CV%カウントは20%以下でなければならず、そうでなければ試験試料を再度作成して再分析した。カットポイントより高い阻害%を有する任意の試験試料は、陽性と報告された。カットポイントより低いまたは等しい阻害%を有する任意の試験試料は、陰性と報告された。

30

【0043】

実施例2 薬物耐容性に対する低pH処理の影響

薬物捕捉形式および標的捕捉形式の両方で薬物耐容性に対する低pH処理の効果を調べるために実験が実施された。1 µg/mLのサリルマブを、ヒト血清に、陽性対照の示された濃度で添加した。これらの試料を、両方のアッセイ形式において低pH処理あり又はなしで調べた。QCおよび試料は、作業ストック濃度の酢酸で希釈し、インキュベートした。これらを次に適切なルテニウム化検出試薬を含有するトリス中和緩衝液で希釈した。結果を図3および図4に示す。

40

【0044】

結果

低pH処理は過剰な薬物からの干渉を効果的に軽減し、それにより両方のアッセイ形式においてNAbの検出を改善する。

【0045】

実施例3 薬物干渉

薬物がNAb非存在下で偽陽性応答を生じる能力は、薬物干渉として定義される。両アッ

50

セイ形式におけるNAbの非存在下での薬物の干渉を比較するために試験が実施された。

【0046】

方法

正常ヒト血清に、示された濃度のサリルマブを添加した。すべての試料を、低pHで処理し、薬物捕捉形式および標的捕捉形式の両方で調べた。

【0047】

結果

標的捕捉形式： より高濃度の遊離サリルマブは、ビオチニル化IL6R との結合に関してルテニウム化サリルマブを打ち負かし、これが偽陽性応答をもたらす(図5)。

薬物捕捉形式： NAb非存在下のサリルマブは、プレート上で捕捉用サリルマブに結合することができず、したがってこれはアッセイにおいて干渉することができない(図6)。

【0048】

偽陽性結果の軽減に対する特定の標的IL6R の効果について上記のように試験した。正常ヒト血清に、示された濃度のIL6R を添加し、両方のアッセイ形式において低pH処理で調べた(図7)。類似の試料を、抗標的(IL6R)抗体を加えて又は加えずに調べた(図8)。標的干渉由来の偽陽性応答が両方のアッセイ形式で観察された。IL6R : サリルマブ複合体を調べたときに、類似の結果が観察された。抗標的抗体の追加は、薬物捕捉形式における干渉を軽減した。しかし、抗標的抗体は捕捉を妨害するので、標的捕捉形式には加えることができない。薬物捕捉形式が選択され、この時点以降に使用された。

【0049】

標的(IL6R)によって引き起こされる偽陽性結果を軽減するために試験が実施された。正常ヒト血清に、示された濃度のIL6R を添加し、両方のアッセイ形式において低pH処理で調べた。類似の試料を抗標的(IL6R)抗体を加えて又は加えずに調べた。

【0050】

標的干渉由来の偽陽性応答が、両方のアッセイ形式で観察された(図7)。類似の結果が、IL6R : サリルマブ複合体を調べたときに観察された(図8)。抗標的抗体の追加は、薬物捕捉形式における干渉を軽減した。しかし、抗標的抗体は捕捉を妨害するので、標的捕捉形式には加えることができない。薬物捕捉形式が選択され、この時点以降に使用された。

【0051】

実施例4 ヒト血清のマトリックス干渉の軽減

次に、RF+血清を低pH中で処理し、薬物捕捉形式でスクリーニングした。選択された高シグナルRF+個体 対 正常シグナルRF+個体の間での比較を行った。LQCレベルの陽性対照をこれらの薬物未処理血清に添加した後に低pH処理を行い、次にアッセイで実験した。

【0052】

結果

特定のRF+個体により生じたシグナルはNQCのシグナルより強く、高い負の阻害%を生じた。これらの個体においては、陽性対照を添加してもなお偽陰性の結果が生じた(図9および10)。

【0053】

試験が実施され、標準ストレプトアビジンコーティングプレートと高結合アビジンコーティングプレートとが比較された。2つの高シグナルRF+個体を低pHで処理し、アッセイで調べた。次に、選択された高シグナルRF+個体と正常シグナルRF+個体との比較を実施した。LQCレベルの陽性対照をこれら薬物未処理血清に添加した後に、低pH処理を行い、次に高結合アビジンコーティングプレート上で実験した。

【0054】

結果

高シグナルRF+個体は、高結合アビジンコーティングプレートに変えることにより標準化することができた(図11)。シグナルを標準化することにより、これらのプレートは、これら「高シグナル」RF+個体中のNAbの検出を可能にした(図12)。

10

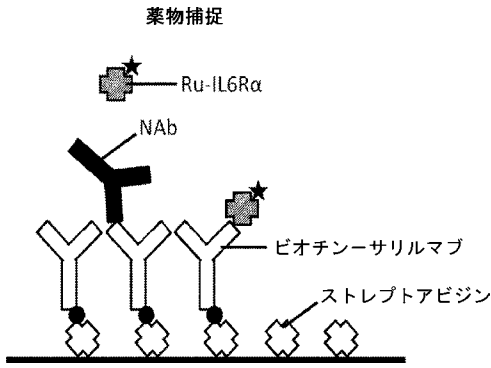
20

30

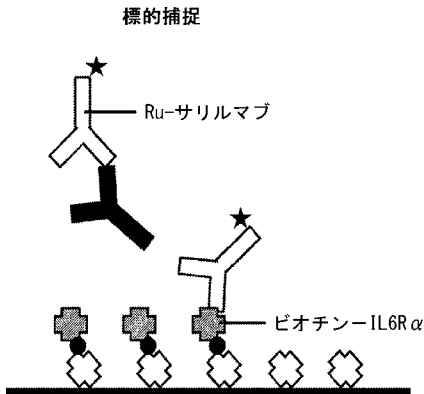
40

50

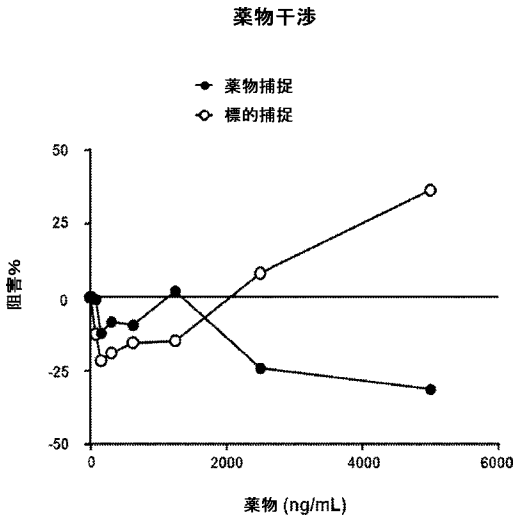
【 図 1 】



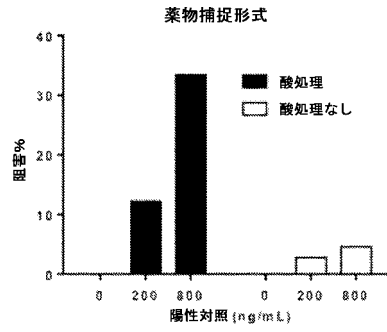
【 図 2 】



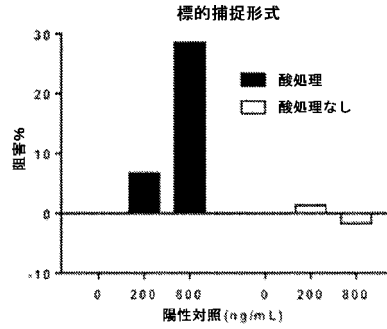
【 図 5 】



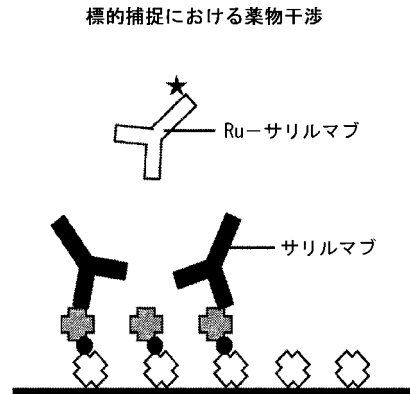
【 図 3 】



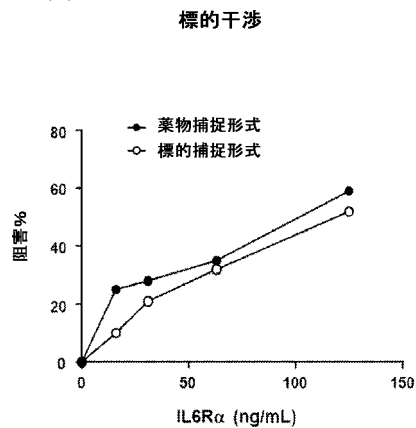
【 図 4 】



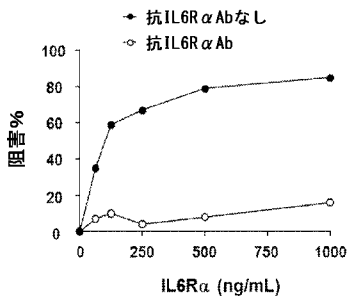
【 図 6 】



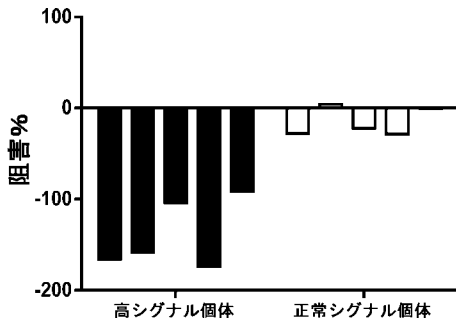
【 図 7 】



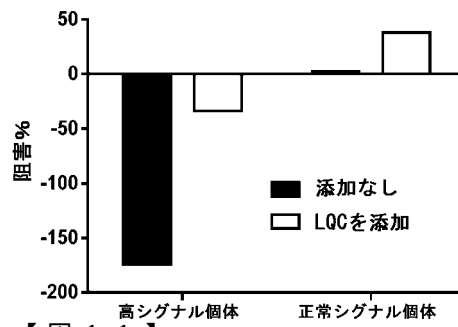
【 図 8 】
薬物捕捉形式を用いた標的干渉



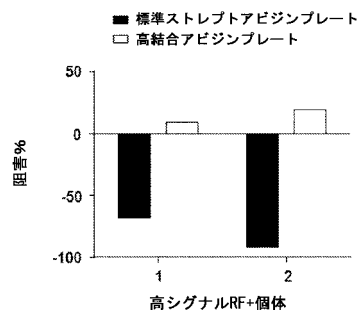
【 図 9 】
A) 選択RF+個体における
高シグナル応答



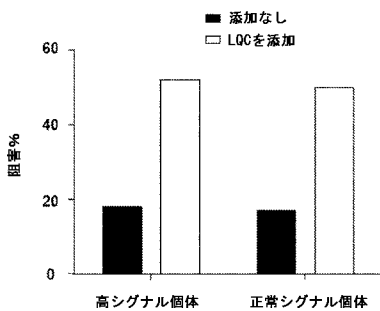
【 図 10 】
B) 高シグナルRF+個体における
NAb回復



【 図 11 】
高シグナルRF+個体の
スクリーニング



【 図 12 】
高シグナルRF+個体における
NAb回復



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2014/063034

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. 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 practicable, 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	SPENGLER M ET AL: "Immuno-PCR assays for immunogenicity testing", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 387, no. 2, 18 September 2009 (2009-09-18), pages 278-282, XP026434618, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2009.07.001 [retrieved on 2009-07-03]	1-14,23
A	abstract, fig 1 C and D, p. 280, par. bridging col. 1 and 2, fig. 4, p. 281, col. 2, par. 2 and 3 ----- -/--	15-22
<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		*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
E earlier application or patent but published on or after the international filing date		*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
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)		*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
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 20 January 2015		Date of mailing of the international search report 02/02/2015
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 Hoese1, Heidi

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2014/063034

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LOYET K M ET AL: "Technology comparisons for anti-therapeutic antibody and neutralizing antibody assays in the context of an anti-TNF pharmacokinetic study", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 345, no. 1-2, 30 June 2009 (2009-06-30), pages 17-28, XP026132872, ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/J.JIM.2009.03.012 [retrieved on 2009-04-02]	1-14,23
A	abstract, p. 19/20, items 2.8, 2.9, p. 23 - 25, item, 3.3 -----	15-22
X	US 2010/209926 A1 (ALAOUI HICHAM [US] ET AL) 19 August 2010 (2010-08-19)	1,23
A	Example 1, claims -----	2-22
A	ALVYDAS MIKULSKIS ET AL: "Solution ELISA as a platform of choice for development of robust, drug tolerant immunogenicity assays in support of drug development", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 365, no. 1, 10 November 2010 (2010-11-10), pages 38-49, XP028141184, ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/J.JIM.2010.11.011 [retrieved on 2010-12-01] the whole document -----	15-22
A	STUBENRAUCH K ET AL: "Subset analysis of patients experiencing clinical events of a potentially immunogenic nature in the pivotal clinical trials of tocilizumab for rheumatoid arthritis: Evaluation of an antidrug antibody ELISA using clinical adverse event-driven immunogenicity testing", CLINICAL THERAPEUTICS, EXCERPTA MEDICA, PRINCETON, NJ, US, vol. 32, no. 9, 1 August 2010 (2010-08-01), pages 1597-1609, XP027437165, ISSN: 0149-2918, DOI: 10.1016/J.CLINTHERA.2010.07.021 [retrieved on 2010-08-01] the whole document -----	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2014/063034

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2010209926 A1	19-08-2010	AU 2008307674 A1	09-04-2009
		CA 2700831 A1	09-04-2009
		EP 2193368 A1	09-06-2010
		JP 2010539932 A	24-12-2010
		US 2010209926 A1	19-08-2010
		US 2014162273 A1	12-06-2014
		WO 2009045321 A1	09-04-2009

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 7
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 13/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
	A 6 1 P 35/00	
	A 6 1 P 21/00	
	A 6 1 P 13/08	

(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

(74) 代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74) 代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 ラジャディアクシャ マノジ

アメリカ合衆国 コネチカット州 コルチェスター ナツメグ サークル 3 2

(72) 発明者 シュー ゲーリー

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 スリーピー ホロウ ピークマン アベニュー 9 5 アパートメント 1 2 7 エム

(72) 発明者 ゲオルガロス カミール

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 ブルーミングデール ラフカインド ロード 9 7

(72) 発明者 パートリッジ マイケル

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 イーストチェスター フェアウェイ ドライブ 6 0

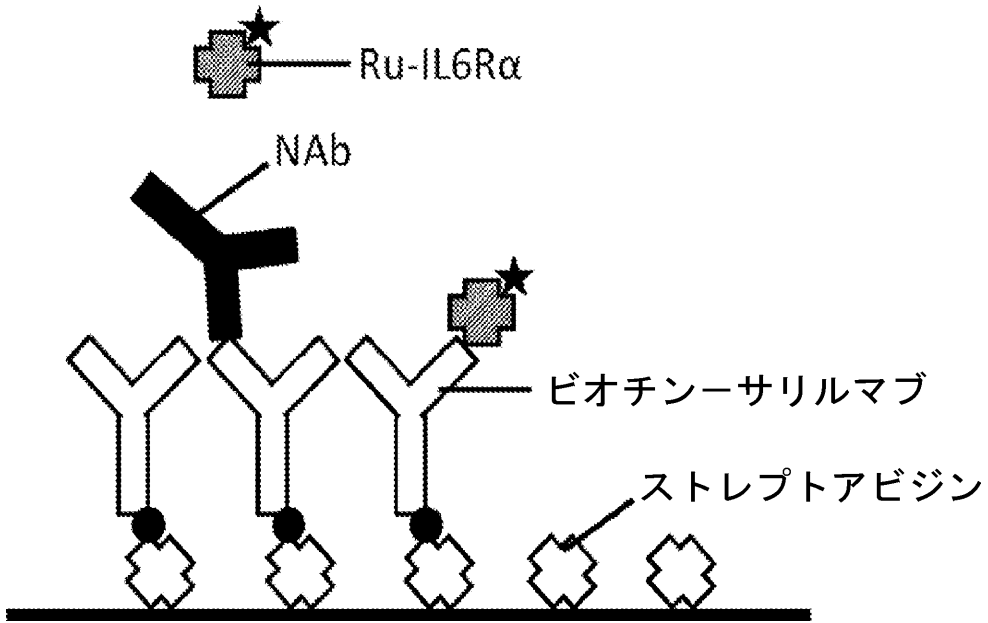
(72) 発明者 トーリ アルバート

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ラグレンジヴィル ドリー レーン 3 2

F ターム(参考) 4C085 AA14 CC23 DD62 EE01

【要約の続き】

薬物捕捉



专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2016536587A5	公开(公告)日	2017-12-07
申请号	JP2016527452	申请日	2014-10-30
[标]申请(专利权)人(译)	再生元医药公司		
申请(专利权)人(译)	Regeneron公司制药公司		
[标]发明人	ラジャディアクシャマノジ シューゲーリー ゲオルガロスカミール パートリッジマイケル トリアルバート		
发明人	ラジャディアクシャマノジ シューゲーリー ゲオルガロスカミール パートリッジマイケル トリアルバート		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 A61K39/395 A61P43/00 A61P29/00 A61P3/10 A61P9/10 A61P25/28 A61P37/02 A61P35/00 A61P21/00 A61P13/08		
CPC分类号	A61P3/10 A61P9/10 A61P13/08 A61P21/00 A61P25/28 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00 G01N33/6854 A61K39/395 A61K39/3955 A61K2039/505 G01N33/58 G01N33/6869 G01N2333/5412 G01N33/5306 G01N33/68 G01N2333/705		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/53.U G01N33/543.575 G01N33/543.511.H G01N33/543.511.D A61K39/395.N A61P43/00.117 A61P29/00.101 A61P3/10 A61P9/10 A61P25/28 A61P37/02 A61P35/00 A61P21/00 A61P13/08		
F-TERM分类号	4C085/AA14 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/898046 2013-10-31 US		
其他公开文献	JP2016536587A		

摘要(译)

一种免疫原性测定法，用于检测向有需要的患者给药的针对生物治疗蛋白的中和抗体的存在，包括以下步骤：(a)从病人身上取得样本；(b)在捕获剂存在下孵育样品；和(c)添加检测试剂，相对于对照样品的信号低，表明存在针对生物治疗剂的中和抗体。

