

(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2019-502914  
(P2019-502914A)

(43) 公表日 平成31年1月31日(2019.1.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 H	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 U	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁)

(21) 出願番号 特願2018-531563 (P2018-531563)  
 (86) (22) 出願日 平成28年12月14日 (2016.12.14)  
 (85) 翻訳文提出日 平成30年7月26日 (2018.7.26)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2016/080887  
 (87) 国際公開番号 W02017/102786  
 (87) 国際公開日 平成29年6月22日 (2017.6.22)  
 (31) 優先権主張番号 15200446.1  
 (32) 優先日 平成27年12月16日 (2015.12.16)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

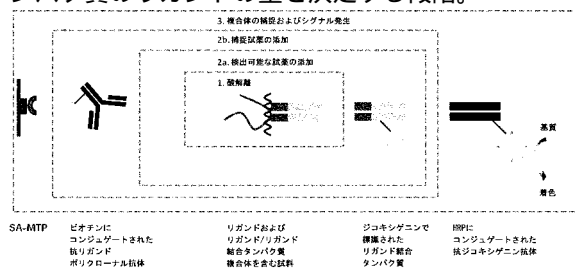
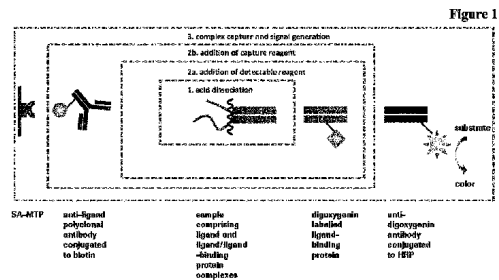
(71) 出願人 591003013  
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー  
 F. HOFFMANN-LA ROCH  
 E AKTIENGESELLSCHAFT  
 スイス・シーエイチ-4070バーゼル・  
 グレンツアーヘルストラツセ124  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫  
 (74) 代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝  
 (74) 代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 3段階酸解離酵素結合免疫吸着 (TADELIS) アッセイ法

(57) 【要約】

本明細書において、以下の順序で以下の段階を含む、試料中のリガンド結合タンパク質(治療物質)のリガンドの(すべての、すなわち結合能力のある)量を決定するための方法が報告される: 試料を酸処理に供する段階; 抗リガンド抗体および標識リガンド結合タンパク質を試料に添加することによって、(i)抗リガンド抗体、(ii)リガンド、および(iii)標識リガンド結合タンパク質を含む非共有結合複合体を溶液中で形成させる段階、ならびに複合体の量を決定し、それによって、リガンド結合タンパク質のリガンドの量を決定する段階。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の順序で以下の段階を含む、試料中のリガンド結合タンパク質(治療物質)のリガンドの(総)量を決定するための方法:

- 該試料を酸処理に供する段階;
- 最初に標識リガンド結合タンパク質を該試料に添加して、標識リガンド結合タンパク質-リガンド二元複合体を形成させ、かつ該二元複合体の形成後に抗リガンド抗体を該試料に添加して、標識リガンド結合タンパク質-リガンド-抗リガンド抗体三元複合体を形成させることによって、

(i) 抗リガンド抗体、

(ii) リガンド、および

(iii) 標識リガンド結合タンパク質

を含む該三元複合体を溶液中で形成させる段階; ならびに

- 該三元複合体の量を決定し、それによって、該リガンド結合タンパク質のリガンドの量を決定する段階。

## 【請求項 2】

リガンド結合タンパク質に(特異的に)結合することができるリガンドの量を決定するためのものである、請求項1記載の方法。

## 【請求項 3】

試料が、血漿試料または血清試料である、請求項1または2記載の方法。

## 【請求項 4】

試料が、酸処理の前に希釈されない、請求項1~3のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 5】

複合体を形成させる段階が、酸処理した試料を、過剰量の標識リガンド結合タンパク質と共にインキュベーションすることによる、請求項1~4のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 6】

複合体を形成させる段階が、酸処理した試料を、最初に過剰量の標識リガンド結合タンパク質と共に、次に抗リガンド抗体と共にインキュベーションすることによる、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 7】

複合体を形成させる段階において、標識リガンド結合タンパク質が、検出可能な標識にコンジュゲートされている、請求項1~6のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 8】

抗リガンド抗体が、結合対の第1のメンバーにコンジュゲートされている、請求項1~7のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 9】

三元複合体を形成させる段階の後に、形成された該三元複合体を固体支持体上に固定化する段階を含む、請求項1~8のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 10】

固体支持体が、(抗リガンド抗体にコンジュゲートされた結合対の第1のメンバーと複合体を形成することができる)結合対の第2のメンバーにコンジュゲートされている、請求項9記載の方法。

## 【請求項 11】

抗リガンド抗体がポリクローナル抗体である、請求項1~10のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 12】

以下の順序で以下の段階を含む、請求項1~11のいずれか一項記載の方法:

- 試料を酸処理に供する段階;
- 検出可能な標識にコンジュゲートされている標識リガンド結合タンパク質と共に該試料をインキュベーションする段階;

10

20

30

40

50

- 結合対の第1のメンバーにコンジュゲートされているポリクローナル抗リガンド抗体と共に該試料をインキュベーションする段階；
- 該結合対の第1のメンバーと共に非共有結合複合体を形成する結合対の第2のメンバーにコンジュゲートされている固体支持体に、該試料を添加する段階；および
- 固相に固定化された標識リガンド結合タンパク質の量を決定することによって、リガンド結合タンパク質のリガンドの量を決定する段階。

【請求項13】

リガンド結合タンパク質が抗体である、請求項1～12のいずれか一項記載の方法。

【請求項14】

結合対の第1のメンバーがビオチンであり、結合対の第2のメンバーがストレプトアビジンである、請求項10～13のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項15】

添加される標識リガンド結合タンパク質と添加される抗リガンド抗体の比が、分子量に基づいて、約8～9:1である、請求項1～14のいずれか一項記載の方法。

【請求項16】

三元複合体が非共有結合複合体である、請求項1～15のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、イムノアッセイ法の分野に関する。3段階酸解離酵素結合免疫吸着アッセイ法(TADELISアッセイ法)が、本明細書において報告される。本明細書において報告される方法は、酸解離段階および溶液中での複合体形成段階を含む、リガンド結合タンパク質治療物質の循環リガンドの量を決定するためのものである。

20

【背景技術】

【0002】

発明の背景

Moxness, M. et al. (Ann. N. Y. Acad. Sci. USA 1005 (2003) 265-268) (非特許文献1)は、全インスリン抗体(IAB)およびIgクラスのインスリン抗体(IAB)に対する放射性リガンド結合アッセイ法を報告した。最初に、試験血清および対照血清を酸性にして、結合されたインスリンを解離させ、木炭を添加して血清インスリンを吸着させた。中和後、結合されたインスリンを含む木炭を遠心分離によって血清から除去した。各アッセイ法において、インスリンを抜き取った血清試料を、高レベルの非標識インスリンの存在下および非存在下で、放射性標識インスリンと共にインキュベーションして、それぞれ非特異的結合および全結合を決定した。

30

【0003】

Patton, A. et al. (J. Immunol. Meth. 304 (2005) 189-195) (非特許文献2)は、酸解離段階と組み合わせて、共有結合した高密度抗原表面を使用して、ヒト血清中の抗原の存在下での、すなわち、過剰な抗原を事前に除去せずに抗体検出を可能にするブリッジングELISAを報告した。

【0004】

Lee, J.W. et al. (AAPS J. 13 (2011) 99-110) (非特許文献3)は、薬物開発を支援する際の生物分析を顕著に推進するものは、データの意図された使用であることを報告している。血液循環中のmAbおよびその標的リガンド(L)を測定するための信頼性が高い方法論は、有効性および安全性の評価、ならびに用量選択を支援する曝露-応答関係を評価するために非常に重要である。リガンド結合アッセイ法(LBA)は、薬物動態/薬力学(PK/PD)および安全性の評価を支援するために、タンパク質生物学的治療物質および標的リガンド(L)の解析に広く使用されている。特に、Lに非共有結合的に結合するモノクローナル抗体医薬(mAb)の場合、遊離mAb、遊離L、ならびにmAbおよびLの一価複合体および/または二価複合体を含む、複数の形態のmAbおよびLがインビボで存在し得る。投薬後に体内で起こる動的結合平衡が複雑であることおよび生物分析の間に平衡が乱れる多くの原因があることを

40

50

考慮すれば、関心対象の形態（遊離型のmAbおよびL、結合型のmAbおよびL、または全mAbおよびL）のエクスピボの定量は、インスピボでの実際のものとは異なり得ることが明らかである。LBA試薬およびアッセイ法の形式は、原理的には、全mAbおよびLまたは遊離型のmAbおよびLを測定するように設計することができる。しかし、指定された条件下でそれらの形態が測定されるのを確認することは、技術的に困難であり得る。

【0005】

Kelly, M. et al. (AAPS J., 15 (2013) 646-658) (非特許文献4)は、最近になって注目が高まっている1つの分野は、「遊離」および「全」分析物の評価ならびにそれらの評価にアッセイ法形式が与える影響に関連していることを報告している。この筆者らは、入手可能な文献の批判的批評を提供し、PKアッセイ法測定に対する抗薬物抗体の潜在的影響を軽減するための方法を、将来を見通して探求している。さらに、ADA(anti-drug antibody)アッセイ法において薬物抵抗性を高めるための方法を、免疫複合体を分解し薬物を抜き取るための予備段階を通常は用いて、PKアッセイ法におけるADA抵抗性を評価するか、または高めるように目的を変えることができる。このような困難な操作の実行は、後期の臨床的生物分析にとってルーチンとはみなされないと思われるが、それらの解釈のための薬物動態学に対して、方法開発の調査段階の早い時期に価値ある情報を提供するであろうことに注目しなければならない。最終的に、薬物を定量するのを助けるのに使用される任意の抽出プロセスが、「全体」評価をもたらす可能性が高いであろう。

10

【0006】

Davis, R. A. et al. (J. Pharm. Biomed. Anal. 48 (2008) 897-901) (非特許文献5)は、捕捉/酸溶出形式で単一の非競合的MoAbを用いて、高レベルの治療的MoAbの存在下で全（遊離型および結合型）バイオマーカの濃度を定量するための方法を報告した。このアッセイ法は、200 µ/mlまたはそれ以上の治療的MoAbの存在下で、循環バイオマーカレベル (ng/ml) を正確に検出し定量する能力を有している。

20

【0007】

Salimi-Moosavi, H. et al. (J. Pharm. Biomed. Anal. 51 (2010) 1128-1133) (非特許文献6)は、タンパク質結合を解離させ、ThAを優先的に変性させるためのアルカリおよび酸/グアニジン処理を報告した。中和された標的タンパク質は、ELISAによって決定することができる。これらの方法は、ThAに干渉されない、全標的タンパク質の再現可能な測定を提供する。血清試料、標的タンパク質を含む標準物質およびQC、ならびにThAが、カゼインを含むアルカリ性緩衝液 (pH>13) または酸/グアニジン緩衝液 (pH<1) で処理された。2種の異なるThA系における全標的タンパク質が首尾良く測定され、これらの処理によって干渉は完全に排除されていた。これらの方法は、前臨床血清試料における解析に首尾良く応用された。

30

【0008】

US2015/226758 (特許文献1)では、試料中の抗薬物抗体の存在を検出するための方法およびキット、ならびにより具体的には、試料中に薬物が存在する場合に抗薬物抗体を検出するための方法およびキットが報告されている。

【0009】

US2012/269728 (特許文献2)では、試料中の標的作用物質をリアルタイム検出するための装置および方法が報告されている。これらの装置は、追跡技術および選択的結合を利用して、試料中、および好ましくは生物試料中の1種または複数種の標的作用物質の同定を可能にする。

40

【0010】

Li, J. et al.は、低親和性抗薬物抗体の検出を報告し、Octet (登録商標) バイオレイヤー干渉法によって、免疫原性試験における薬物抵抗性を改善した (J. Pharm. Biomed. Anal. 54 (2011) 286-294) (非特許文献7)。

【0011】

Mikulskis, A. et al.は、薬物開発を支援する、状況に左右されず薬物抵抗性のある免疫原性アッセイ法を開発するための最適なプラットフォームとして溶液ELISAについて報

50

告した(J. Immunol. Meth. 365 (2010) 38-49) (非特許文献8)。

【0012】

Qiu, Z.J. et al.は、自己免疫血清中のヒト抗治療物質抗体を検出するための、ビオチン-ジゴキシゲニンに基づく新規な均一系アッセイ法を報告した(J. Immunol. Meth. 362 (2010) 101-111) (非特許文献9)。

【0013】

Zhong, Z.D. et al.は、免疫原性アッセイ法における薬物標的の干渉の確認および阻害を報告した(J. Immunol. Meth. 355 (2010) 21-28) (非特許文献10)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0014】

【特許文献1】US2015/226758

【特許文献2】US2012/269728

【非特許文献】

【0015】

【非特許文献1】Moxness, M. et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. USA 1005 (2003) 265-268.

【非特許文献2】Patton, A. et al., J. Immunol. Meth. 304 (2005) 189-195.

【非特許文献3】Lee, J.W. et al., AAPS J. 13 (2011) 99-110.

【非特許文献4】Kelly, M. et al., AAPS J. 15 (2013) 646-658.

【非特許文献5】Davis, R. A. et al., J. Pharm. Biomed. Anal. 48 (2008) 897-901.

【非特許文献6】Salimi-Moosavi, H. et al., J. Pharm. Biomed. Anal. 51 (2010) 1128-1133.

【非特許文献7】Li, J. et al., J. Pharm. Biomed. Anal. 54 (2011) 286-294.

【非特許文献8】Mikulskis, A. et al., J. Immunol. Meth. 365 (2010) 38-49.

【非特許文献9】Qiu, Z.J. et al., J. Immunol. Meth. 362 (2010) 101-111.

【非特許文献10】Zhong, Z.D. et al., J. Immunol. Meth. 355 (2010) 21-28.

【発明の概要】

【0016】

発明の概要

酸解離段階および溶液中での複合体形成段階を含むイムノアッセイ法(3段階酸解離酵素結合免疫吸着アッセイ法(TADELISアッセイ法))を用いて、タンパク質治療物質の(可溶性として分泌されるか、または流し出された)循環リガンド/標的を決定するための方法が、本明細書において報告される。TADELISアッセイ法において、初めて、酸解離/組換え段階が、循環リガンドの量を決定するためのイムノアッセイ法で使用された。

【0017】

本明細書において報告される方法を用いると、リガンド結合タンパク質の循環リガンド/標的を決定するためのイムノアッセイ法の薬物抵抗性を改善できることが、判明している。本明細書において報告される方法は、(例えば投与が原因で)試料中に存在するリガンド結合タンパク質とイムノアッセイ法の間には添加される標識されたりリガンド結合タンパク質との間の干渉という問題に取り組むものである。

【0018】

したがって、本明細書において報告される方法は、薬物動態学的実験および/または薬力学的実験に由来する試料の解析に適している。

【0019】

さらに、リガンド結合タンパク質を試薬として使用することにより、「リガンド結合タンパク質に特異的な」リガンド濃縮物の選択的検出が可能になることが、判明している。すなわち、本明細書において報告される方法は、リガンド結合タンパク質に実際に結合することができる循環リガンドの量だけを決定する。本明細書において報告される方法を用いると、例えば、結合特異性を有しているリガンド結合タンパク質それ自体が含まれるた

10

20

30

40

50

め、リガンドのアイソフォームまたは改変型は、決定される量に含まれないと考えられる。さらに、市販の、または様々な抗体/クローンに基づく「バイオマーカー」アッセイ法が活性標的のみを実際に決定するかどうかを明らかにするためのさらなる努力は必要とされない。したがって、リガンド結合タンパク質治療物質に実際に結合することができる循環リガンド画分のみが、検出される。

【0020】

使用する酸解離段階において、すべての結合リガンドは、例えば、リガンド/リガンド結合タンパク質複合体から放出される。したがって、本明細書において報告される方法を用いると、試料中のリガンド結合タンパク質に特異的なリガンドの総量が決定される。

【0021】

pH調整後に過剰の標識リガンド結合タンパク質と共に（酸解離段階後に）溶液中でインキュベーションすることにより、リガンド/標識リガンド結合タンパク質複合体側に平衡が移動する。したがって、親和性が同程度であるリガンド結合タンパク質間の競合は、標識リガンド結合タンパク質の濃度（試料中のリガンド結合タンパク質と添加された標識リガンド結合タンパク質の比）に基づいて克服することができる。これを用いて、薬物抵抗性の調整を行うことができる。

【0022】

さらに、標識リガンド結合タンパク質の標識は、固定化に使用される（抗リガンド抗体の）結合対のメンバーとは異ならなければならない。この前提条件によって、（標識リガンド結合タンパク質と比べて）低濃度の抗リガンド抗体を使用できること（例えば、試料中の予測されるリガンド量と比べて少しだけ過剰な量が必要とされる）が保証される。これは、遊離（すなわち、複合体を形成していない）標識リガンド結合タンパク質によって固相が飽和するのを防ぐ。したがって、本明細書において報告される方法において、試料中に存在するリガンドに対して過剰量の標識リガンド結合タンパク質が使用される。この過剰量は、試料中に存在するリガンドに対する（固定化）抗リガンド抗体の過剰量より少ない。

【0023】

1つの態様において、希釈されていない試料中のリガンド結合タンパク質の濃度は、150  $\mu\text{g/mL}$  またはそれ以下である。1つの態様において、試料中のリガンドの濃度は、75  $\mu\text{g/mL}$  ~ 0.06  $\mu\text{g/mL}$  の間である。

【0024】

本明細書において報告される方法は、一般に使用されるイムノアッセイ法と比べて逆の形式を使用する。（標識型の）リガンド結合タンパク質それ自体が、その循環リガンドの決定に使用される。これにより、確定的な読取りが確実になる。さらに、TADELISアッセイ法におけるリガンドの回収は、定量にまさに適していると予想され得る/適している。

【0025】

捕捉試薬の非存在下で過剰量の検出試薬と共にインキュベーションすることにより、本明細書において報告される方法（アッセイ法）の、より高度な/改善された薬物抵抗性が実現した。

【0026】

本明細書において報告される1つの局面は、以下の順序で以下の段階を含む、試料中のリガンド結合タンパク質（治療物質/薬物）のリガンドの量を決定するための方法である：

- 試料を酸処理に供する段階、
- 抗リガンド抗体および標識リガンド結合タンパク質を試料に添加することによって、
  - (i) 抗リガンド抗体、
  - (ii) リガンド、および
  - (iii) 標識リガンド結合タンパク質

を含む非共有結合複合体を溶液中で形成させる段階、ならびに

- 複合体の量を決定し、それによって、リガンド結合タンパク質のリガンドの量を決定する段階。

10

20

30

40

50

## 【0027】

1つの態様において、この方法は、以下の順序で以下の段階を含む：

- 試料を酸処理に供する段階、
- 最初に標識リガンド結合タンパク質を試料に添加（およびインキュベーション）して、標識リガンド結合タンパク質-リガンド二元複合体を形成させ、かつ二元複合体の形成後に抗リガンド抗体を試料に添加（およびインキュベーション）して、標識リガンド結合タンパク質-リガンド-抗リガンド抗体三元複合体を形成させることによって、
  - (i) 抗リガンド抗体、
  - (ii) リガンド、および
  - (iii) 標識リガンド結合タンパク質

を含む（非共有結合）三元複合体を溶液中で形成させる段階、ならびに

- （非共有結合）三元複合体の量を決定し、それによって、リガンド結合タンパク質のリガンドの量を決定する段階。

## 【0028】

1つの態様において、この方法は、リガンド結合タンパク質に（特異的に）結合することができるリガンドの量を決定するためのものである。

## 【0029】

1つの態様において、この方法は、試料中のリガンド結合タンパク質のリガンドの総量を決定するためのものである。

## 【0030】

1つの態様において、試料は、血漿試料または血清試料である。

## 【0031】

1つの態様において、試料は、動物に由来する。1つの態様において、動物は、ヒトおよび実験動物より選択される。1つの態様において、試料は、試料を得る前にリガンド結合タンパク質が投与されていた動物に由来する。1つの態様において、試料は、試料を得る前にリガンド結合タンパク質が投与されていた、リガンド結合タンパク質による治療を必要とする患者に由来する。試料を用いて方法を実施した後に、その試料が生物に再度適用されることは決してない。

## 【0032】

1つの好ましい態様において、試料は、酸処理の前に希釈されない。

## 【0033】

1つの態様において、非共有結合複合体を形成させる段階は、酸処理した試料を、過剰量の標識リガンド結合タンパク質と共にインキュベーションすることによる。1つの態様において、過剰量は、重量に基づいて5倍またはそれ以上の過剰量である。1つの態様において、過剰量は、重量に基づいて10倍またはそれ以上の過剰量である。1つの態様において、過剰量は、5倍～1000倍の過剰量である。1つの態様において、過剰量は、5倍～700倍の過剰量である。1つの態様において、過剰量は、25倍～700倍の過剰量である。1つの態様において、過剰量は、約27倍の過剰量である。1つの態様において、過剰量は、約665倍の過剰量である。

## 【0034】

1つの態様において、試料中のリガンド結合タンパク質に対する、方法において使用される標識リガンド結合タンパク質の質量比は、0.1またはそれ以上である。1つの態様において、試料中のリガンド結合タンパク質に対する、方法において使用される標識リガンド結合タンパク質の質量比は、0.1～300の範囲である。1つの態様において、試料中のリガンド結合タンパク質に対する、方法において使用される標識リガンド結合タンパク質の質量比は、0.15～500の範囲である。1つの好ましい態様において、試料中のリガンド結合タンパク質に対する、方法において使用される標識リガンド結合タンパク質の質量比は、0.2～250の範囲である。

## 【0035】

1つの態様において、試料中のリガンド結合タンパク質に対する、方法において使用さ

10

20

30

40

50

れる抗リガンド抗体の質量比は、0.05またはそれ以上である。1つの態様において、試料中のリガンド結合タンパク質に対する、方法において使用される抗リガンド抗体の質量比は、0.05~1の範囲である。

【0036】

1つの態様において、抗リガンド抗体に対する標識リガンド結合タンパク質の質量比は、2またはそれ以上である。1つの態様において、抗リガンド抗体に対する標識リガンド結合タンパク質の質量比は、2~70の範囲である。1つの態様において、抗リガンド抗体に対する標識リガンド結合タンパク質の質量比は、5~50の範囲である。1つの態様において、抗リガンド抗体に対する標識リガンド結合タンパク質の質量比は、5~25の範囲である。1つの態様において、抗リガンド抗体に対する標識リガンド結合タンパク質の質量比は、約8~9である。

10

【0037】

1つの態様において、非共有結合複合体は、酸処理した試料を、最初に過剰量の標識リガンド結合タンパク質と共に、次に抗リガンド抗体と共にインキュベーションすることによって形成される。

【0038】

1つの態様において、標識リガンド結合タンパク質は、検出可能な標識にコンジュゲートされている。

【0039】

1つの態様において、抗リガンド抗体は、結合対の第1のメンバーにコンジュゲートされている。

20

【0040】

1つの態様において、方法は、非共有結合複合体を形成させる段階の後に、形成された非共有結合複合体を固体支持体上に固定化する段階を含む。1つの好ましい態様において、固体支持体は、非共有結合複合体の抗リガンド抗体にコンジュゲートされた結合対の第1のメンバーと複合体を形成することができる結合対の第2のメンバーにコンジュゲートされている。

【0041】

1つの態様において、抗リガンド抗体は、ポリクローナル抗体である。

【0042】

1つの態様において、この方法は、以下の順序で以下の段階を含む：

- 試料を酸処理に供する段階、
- (検出可能な標識にコンジュゲートされている) 標識リガンド結合タンパク質と共に試料をインキュベーションする段階、
- 結合対の第1のメンバーにコンジュゲートされている(ポリクローナル)抗リガンド抗体と共に試料をインキュベーションする段階、
- (非共有結合複合体が、固体支持体の結合対の第1のメンバーを介してコンジュゲート/固定化されるように) 結合対の第2のメンバーにコンジュゲートされている固体支持体に、試料を添加する段階、および
- 固相に固定化された標識リガンド結合タンパク質の量を決定することによって、リガンド結合タンパク質のリガンドの量を決定する段階。

30

40

【0043】

1つの態様において、リガンド結合タンパク質は、抗体または抗体断片もしくは抗体コンジュゲートである。

【0044】

1つの態様において、リガンド結合タンパク質は、外因性リガンド結合タンパク質である。

【0045】

1つの態様において、リガンドは、抗体ではない。

【0046】

50

1つの態様において、結合対の第1のメンバーはビオチンであり、結合対の第2のメンバーはストレプトアビジンである。

【0047】

1つの態様において、添加される標識リガンド結合タンパク質と添加される抗リガンド抗体の比は、分子量に基づいて、約8~9:1である。

【0048】

1つの態様において、標識リガンド結合タンパク質とのインキュベーション時間は、少なくとも20分間である。1つの態様において、インキュベーション時間は、20分~120分(20分および120分を含む)である。1つの態様において、インキュベーション時間は、40分~80分(40分および80分を含む)である。1つの態様において、インキュベーション時間は、約60分である。

10

【0049】

1つの態様において、抗リガンド抗体とのインキュベーション時間は、最長で60分である。1つの態様において、インキュベーション時間は、10分~45分(10分および45分を含む)である。1つの態様において、インキュベーション時間は、15分~30分(15分および30分を含む)である。1つの態様において、インキュベーション時間は、約20分である。

【0050】

1つの態様において、リガンドは、抗体ではなく、特に抗薬物抗体ではない。

【0051】

1つの態様において、方法は、別のリガンド結合体および/またはリガンド結合タンパク質結合体、例えば、抗リガンド抗体または抗リガンド結合タンパク質抗体の非存在下で実施される。

20

【発明を実施するための形態】

【0052】

#### 発明の詳細な説明

インビトロまたはインビボ起源の試料中の治療的抗体(tmAb)ならびに治療的mAbの各リガンド(tmAbのリガンドまたは短いリガンド)を解析するために、各アッセイ法が、特にtmAb開発の初期段階で必要である。しかし、初期の開発段階では、多くの場合、必要とされる特異的結合試薬、例えば、tmAbを決定するための抗イディオタイプ抗体またはtmAbリガンドを決定するためのリガンドの様々なエピトープに結合する抗体が入手可能であることはめったにない。

30

【0053】

特に、試料中のtmAbリガンドの決定は、重要であり、かつ大変な労力を要する。tmAbは、そのリガンドに結合し(インビトロおよびインビボ)、それぞれ、遊離tmAbと遊離リガンドの間で、ならびにモノ複合体化tmAbとジ複合体化tmAb(二価の単特異性tmAbを想定)の間で、平衡が形成される。この平衡は動的である。すなわち、この平衡に参与している1つの構成要素の濃度が変化すると、この平衡に参与している他のすべての構成要素の濃度も変化する。例えば、リガンド濃度を用いて、生物学的に活性なtmAbの画分を決定すること、tmAb(結合型および遊離型)とリガンド(結合型および遊離型)の関係を詳しく説明すること、ならびに必要な用量および治療計画を予測/特定することができる。

40

【0054】

より詳細には、リガンド、またはさらには遊離リガンドの結合とtmAbの臨床応答との相関が証明され得る場合には、リガンドの結合および捕捉、ならびにそれに応じて遊離リガンドの画分が、それぞれ薬物動態学的予測および薬力学的予測、ならびに治療計画決定/選択のための潜在的マーカーとして役立つ。遊離、すなわち結合していないtmAbの画分が、リガンド結合(すなわち治療作用)のためのtmAb有効性およびそのリガンドに対するインビボでのtmAbの結合能力に関連しているものの、全tmAbの決定を用いて、tmAbとそのリガンドとの相互作用を特徴付けることができる。

【0055】

例えばtmAbを薬物動態学的に十分に評価するためには、血漿/血清試料中の可溶性標的

50

濃度を知ることが重要である。典型的には、可溶性リガンド/標的は、潜在的バイオマーカーとして評価される。薬物が試料中に存在する場合、立体障害または薬物と免疫アッセイ法試薬の重複するエピトープが原因で、しばしば、これらのアッセイ法は顕著に干渉される。可溶性標的には変種がある場合がある（例えば、スプライス変異体、ヘテロ二量体およびホモ二量体）。これらは、バイオマーカー目的には重要であり得るが、薬物動態学的評価のためには、薬物に結合することができるか、または結合している標的画分のみが、重要である。

#### 【0056】

本明細書における「抗体」という用語は、最も広い意味で使用され、限定されるわけではないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体(例えば二重特異性抗体)、および所望の抗原結合活性を示す限りにおいて抗体断片を含む、様々な抗体構造体を包含する。

10

#### 【0057】

一定の態様において、抗体は、多重特異性抗体、例えば二重特異性抗体である。多重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる部位に対する結合特異性を有しているモノクローナル抗体である。一定の態様において、結合特異性の内の一方は、第1の抗原に対するものであり、他方は、異なる第2の抗原に対するものである。一定の態様において、二重特異性抗体は、同じ抗原の2つの異なるエピトープに結合し得る。二重特異性抗体は、完全長抗体または抗体断片として調製することができる。1つの態様において、抗体は、第1の抗原および第2の抗原に特異的に結合する二重特異性抗体である。1つの態様において、二重特異性抗体は、(i)第1の抗原または抗原上の第1のエピトープに特異的に結合する第1の結合特異性、および(ii)第2の抗原または(同じ)抗原上の第2のエピトープに特異的に結合する第2の結合特異性を有している。1つの態様において、同じ抗原上の第2のエピトープは、重複しないエピトープである。

20

#### 【0058】

多重特異性抗体は、WO2009/080251、WO2009/080252、WO2009/080253、WO2009/080254、WO2010/112193、WO2010/115589、WO2010/136172、WO2010/145792、またはWO2010/145793において説明されている。

#### 【0059】

そのコンジュゲーション相手へのトレーサー抗体および/または捕捉抗体のコンジュゲーションは、化学結合または特異的結合対を介した結合など様々な方法によって実施することができる。本明細書において使用される「コンジュゲーション相手」という用語は、例えば、固体支持体、ポリペプチド、検出可能な標識、特異的結合対のメンバーを意味する。

30

#### 【0060】

1つの態様において、そのコンジュゲーション相手への捕捉抗体および/またはトレーサー抗体のコンジュゲーションは、抗体のアミノ酸骨格のN末端基および/もしくは -アミノ基(リジン)、異なるリジンの -アミノ基、カルボキシ官能基、スルフヒドリル官能基、ヒドロキシル官能基、および/もしくはフェノール官能基、ならびに/または抗体の炭水化物構造の糖アルコール基を介した化学的結合によって行われる。1つの態様において、捕捉抗体および/またはトレーサー抗体は、特異的結合対を介してそのコンジュゲーション相手にコンジュゲートされる。好ましくは、捕捉抗体はビオチンにコンジュゲートされ、固体支持体に固定されたアビジンまたはストレプトアビジンを介して、固体支持体への固定化が行われる。好ましくは、トレーサー抗体は、ジゴキシゲニンにコンジュゲートされ、検出可能な標識への連結は、ジゴキシゲニンに対する抗体を介して行われる。

40

#### 【0061】

本明細書において使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に同種の抗体集団から得られた抗体を意味する。すなわち、この集団を構成する個々の抗体は、存在し得る変異体抗体(例えば、天然に存在する変異を含むか、またはモノクローナル抗体調製物を作製する間に発生し、このような変異体は、通常、少量で存在する)を除いて、同

50

一であり、かつ/または同じエピトープに結合する。様々な決定基(エピトープ)を対象とする様々な抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を対象とする。したがって、「モノクローナル」という修飾語は、実質的に同種の抗体集団から得られたものであるという抗体の特徴を示し、いずれかの特定の方法による抗体の作製を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って使用するためのモノクローナル抗体は、限定されるわけではないが、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、およびヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部または一部分を含むトランスジェニック動物を使用する方法を含む、様々な技術によって作製することができ、モノクローナル抗体を作製するためのこのような方法および他の例示的な方法は、本明細書において説明される。

10

**【0062】**

様々なイムノアッセイ法の原理が、例えば、Hage, D.S. (Anal. Chem. 71 (1999) 294R-304R)によって説明されている。Lu, B.ら(Analyst 121 (1996) 29R-32R)は、イムノアッセイ法において使用するための抗体の方向付けられた固定を報告している。アビジン-ビオチンを媒介としたイムノアッセイ法は、例えばWilchek, M., and Bayer, E.A., in Methods Enzymol. 184 (1990) 467-469によって報告されている。

**【0063】**

ポリペプチドならびにモノクローナル抗体およびそれらの定常ドメインは、結合対のメンバー、例えば、ポリペプチド/タンパク質、ポリマー(例えば、PEG、セルロース、もしくはポリスチロール)、または酵素にコンジュゲートするためのいくつかの反応性アミノ酸側鎖を含む。アミノ酸の化学的反応性基は、例えば、アミノ基(リジン、 $\epsilon$ -アミノ基)、チオール基(シスチン、システイン、およびメチオニン)、カルボン酸基(アスパラギン酸、グルタミン酸)、ならびに糖アルコール基である。このような方法は、例えば、Aslam M., and Dent, A., in "Bioconjugation", MacMillan Ref. Ltd. 1999, pages 50-100によって説明されている。

20

**【0064】**

ポリペプチドおよび抗体の最も一般的な反応性基の内の1つは、アミノ酸リジンの脂肪族  $\epsilon$ -アミンである。一般に、ほぼすべてのポリペプチドおよび抗体が、豊富なリジンを含んでいる。リジンのアミンは、pH8.0(pKa=9.18)より上でかなり良い求核剤であり、したがって、様々な試薬と容易に、かつすんなり反応して、安定な結合を形成する。アミン反応性の試薬は、リジンおよびタンパク質の  $\epsilon$ -アミノ基と主に反応する。反応性エステル、特にN-ヒドロキシ-スクシンイミド(NHS)エステルは、アミン基の修飾のために最も一般的に使用される試薬の1つである。水性環境における反応のための最適pHは、pH8.0~9.0である。イソチオシアナートは、アミン修飾試薬であり、タンパク質とチオ尿素結合を形成する。これらは、(最適には、pH9.0~9.5で)水溶液中のタンパク質アミンと反応する。アルデヒドは、穏やかな水性条件下で脂肪族および芳香族のアミン、ヒドラジン、およびヒドラジドと反応して、イミン中間体(シッフ塩基)を形成する。シッフ塩基は、穏やかな還元剤または強力な還元剤(水素化ホウ素ナトリウムまたはシアノ水素化ホウ素ナトリウムなど)を用いて選択的に還元して、安定なアルキルアミン結合を誘導することができる。アミンを修飾するのに使用されている他の試薬は、酸無水物である。例えば、ジエチレントリアミン五酢酸無水物(DTPA)は、2つのアミン反応性無水物基を含む、二官能性キレート剤である。これは、アミノ酸のN末端基および  $\epsilon$ -アミノ基と反応してアミド結合を形成することができる。無水物環が開いて、配位化合物中の金属にしっかりと結合することができる多価の金属キレート化アームを作り出す。

30

40

**【0065】**

ポリペプチドおよび抗体中の別の一般的な反応性基は、硫黄含有アミノ酸シスチンおよびその還元生成物システイン(またはハーフシスチン)に由来するチオール残基である。システインは、アミンよりも求核性が高く、通常、タンパク質中の最も反応性の高い官能基である、遊離チオール基を含む。通常、チオールは中性pHにおいて反応性であり、したがって、アミンの存在下で選択的に他の分子と結合し得る。遊離スルフヒドリル基は比較的

50

よく反応するため、これらの基を有しているタンパク質はしばしば、それらがジスルフィド基またはジスルフィド結合として酸化型である状態で、存在する。このようなタンパク質では、反応性の遊離チオールを生じさせるために、ジチオスレイトール(DTT)のような試薬を用いてジスルフィド結合を還元することが必要とされる。チオール反応性試薬は、ポリペプチド上のチオール基に結合して、チオエーテル結合生成物を形成するものである。これらの試薬は、微酸性～中性pHで迅速に反応し、したがって、アミン基の存在下で選択的に反応させることができる。反応性アミノ基を介して複数のスルフヒドリル基を導入する効率的な方法を提供するためにトラウト試薬(2-イミノチオラン)、スクシンイミジル(アセチルチオ)アセタート(SATA)、およびスルホスクシンイミジル6-[3-(2-ピリジルジチオ)プロピオンアミド]ヘキサノアート(スルホ-LC-SPDP)などのいくつかのチオール化架橋試薬を使用することが、文献で報告されている。ハロアセチル誘導体、例えばヨードアセトアミドは、チオエーテル結合を形成し、これらもまた、チオール修飾用の試薬である。さらなる有用な試薬はマレイミドである。マレイミドとチオール反応性試薬との反応は、ヨードアセトアミドと本質的に同じである。マレイミドは、微酸性から中性pHで迅速に反応する。

10

20

30

40

50

#### 【0066】

ポリペプチドおよび抗体中の別の一般的な反応性基は、カルボン酸である。ポリペプチドおよび抗体は、C末端位に、ならびにアスパラギン酸およびグルタミン酸の側鎖内にカルボン酸基を含む。カルボン酸の水中での反応性は比較的低いため、ポリペプチドおよび抗体を選択的に改変するためにこれらの基を使用することは、通常、困難である。これを行う場合、通常は、水溶性カルボジイミドの使用によってカルボン酸基を反応性エステルに変換し、アミン、ヒドラジド、またはヒドラジンなどの求核試薬と反応させる。より高塩基性のリジンの - アミンの存在下で活性化カルボン酸と選択的に反応させて安定なアミド結合を形成させるために、アミン含有試薬は弱塩基性であるべきである。pHを8.0より高く上げると、タンパク質の架橋が起こり得る。

#### 【0067】

過ヨウ素酸ナトリウムは、抗体に結合した炭水化物部分内の糖のアルコール部分を酸化してアルデヒドにするために使用することができる。各アルデヒド基は、カルボン酸について説明したように、アミン、ヒドラジド、またはヒドラジンと反応させることができる。炭水化物部分は抗体の結晶化可能な断片(Fc)領域に主に存在するため、抗原結合部位から離れた炭水化物を部位特異的に改変することによってコンジュゲーションを実現することができる。シッフ塩基中間体が形成され、水溶性還元剤のシアノ水素化ホウ素ナトリウム(穏やかで選択的)または水素化ホウ素ナトリウム(強力)を用いてこの中間体を還元することによって、アルキルアミンに還元することができる。

#### 【0068】

「実験動物」という用語は、飼育動物および家畜、ならびに高等霊長類を含むが、ヒトを除く、任意の哺乳動物を意味する。1つの態様において、本明細書において報告される方法は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ならびにキツネザル、サル、マーモセット、および類人猿のような霊長類を含む群より選択される実験動物から得られた試料を用いて実施される。実験動物が小型類人猿である場合、人類に最も近い近縁種、大型類人猿、特に、チンパンジー、ボノボ、ゴリラ、およびオランウータンの群は除外される。

#### 【0069】

「試料」という用語は、生物または元は生物であったものに由来する任意の量の物質を含むが、それに限定されるわけではない。このような生物には、ヒト、マウス、サル、ラット、ウサギ、および他の動物が含まれるが、それらに限定されるわけではない。1つの態様において、試料は、サル、特にカニクイザル、またはウサギ、またはマウス、またはラット、またはヒトから取得される。1つの態様において、このような物質には、個体由来の全血、血漿、または血清が含まれ、これらは臨床ルーチンにおいて最も広く使用される試料源であるが、それらに限定されるわけではない。

## 【0070】

「固相」という用語は、非流動性物質を意味し、ポリマー、金属(常磁性粒子、強磁性粒子)、ガラス、およびセラミックなどの材料から作製された粒子(微粒子およびビーズを含む);シリカ、アルミナ、およびポリマーゲルなどのゲル物質;ポリマー、金属、ガラス、および/またはセラミック製であり得るキャピラリー;ゼオライトおよび他の多孔性物質;電極;マイクロタイタプレート;ソリッドストリップ;ならびにキュベット、チューブ、または他の分光計用試料容器を含む。「固相」が、試料中のある物質と相互作用すると意図される少なくとも1つの部分をその表面に含むという点で、固相構成要素は、不活性な固体表面と区別される。固相は、チューブ、ストリップ、キュベット、もしくはマイクロタイタプレートなどの静止構成要素であってよく、またはビーズおよび微粒子などの非静止構成要素であってよい。タンパク質および他の物質の非共有結合または共有結合のいずれかを可能にする様々な微粒子が、使用され得る。このような粒子には、ポリスチレンおよびポリ(メチルメタクリレート)などのポリマー粒子;金ナノ粒子および金コロイドなどの金粒子;ならびにシリカ、ガラス、および金属酸化物粒子などのセラミック粒子が含まれる。例えば、Martin, C.R., et al., Analytical Chemistry-News & Features, 70 (1998) 322A-327AまたはButler, J.E., Methods 22 (2000) 4-23を参照されたい。

10

## 【0071】

色素原(蛍光性または発光性の基および色素)、酵素、NMR活性基、または金属粒子、ハプテン、例えばジゴキシゲニンは、「検出可能な標識」の例である。また、検出可能な標識は、光で活性化され得る架橋基、例えばアジド基またはアジリン基であってもよい。電気化学発光に基づいて検出できる金属キレートもまた、好ましいシグナル放出基であり、ルテニウムキレート、例えばルテニウム(ピスピリジル)<sub>3</sub><sup>2+</sup>キレートが特に好ましい。適切なルテニウム標識基は、例えば、EP0580979、WO90/05301、WO90/11511、およびWO92/14138において説明されている。直接的検出の場合、標識基は、色素、化学発光基のような発光性標識基、例えば、アクリジニウムエステルもしくはジオキセタン、または蛍光色素、例えば、フルオレセイン、クマリン、ローダミン、オキサジン、レゾルフィン、シアニン、およびそれらの誘導体など任意の公知の検出可能マーカース基より選択され得る。標識基の他の例は、ルテニウム錯体またはユーロピウム錯体などの発光性金属錯体、例えばELISAまたはCEDIA(Cloned Enzyme Donor Immunoassay、例えばEP-A-0061888)のために使用される酵素、および放射性同位体である。

20

30

## 【0072】

間接的検出系は、例えば、検出試薬を含み、例えば、検出抗体は、生物親和性結合対の第1の相手で標識されている。適切な結合対の例は、ハプテンまたは抗原/抗体、ビオチンまたはビオチン類似体(例えば、アミノビオチン、イミノビオチン、もしくはデスチオビオチン)/アビジンまたはストレプトアビジン、糖/レクチン、核酸または核酸類似体/相補的核酸、および受容体/リガンド、例えばステロイドホルモン受容体/ステロイドホルモンである。好ましい第1の結合対メンバーには、ハプテン、抗原、およびホルモンが含まれる。ジゴキシンのようなハプテンならびにビオチンおよびそれらの類似体が、特に好ましい。このような結合対の第2の相手、例えば、抗体、ストレプトアビジンなどは、通常、例えば前述の標識によって、直接的検出を可能にするために標識される。

40

## 【0073】

「タンパク質」は、ペプチド結合によって連結されたアミノ酸からなるポリマーであり、天然に産生されるか、または合成的に作製されるかを問わない。約20個未満のアミノ酸残基からなるタンパク質は、「ペプチド」と呼ばれ得るのに対し、50個未満のアミノ酸残基を含む分子は、「ポリペプチド」と呼ばれ得る。また、タンパク質は、炭水化物基、金属イオン、またはカルボン酸エステルなどの非アミノ酸構成要素を含んでもよい。非アミノ酸構成要素は、タンパク質が発現される場の細胞によって付加されてよく、細胞のタイプによって様々であり得る。本明細書において、タンパク質は、それらのアミノ酸骨格構造またはそれをコードする核酸の観点から定義される。通常、炭水化物基などの付加は詳述されないが、それでもなお存在してよい。

50

## 【0074】

「試料中のリガンド結合タンパク質のリガンドの総量」という用語は、遊離型の循環リガンド、すなわち他の任意の構成要素に結合していないリガンドと、結合型の循環リガンド、すなわち他の任意の構成要素に酸分離可能な形態で結合しているリガンドの合計を意味する。

## 【0075】

本明細書において報告される方法

本明細書において報告される方法を用いると、「薬物特異的」標的濃度を検出することが可能である。「バイオマーカー」アッセイ法（市販されているか、または様々な抗体/クローンに基づく）が同じ標的を検出するかどうかを明らかにするためのさらなる努力は、必要ではない。さらに、必要とされる試薬は、プロジェクトの早期に入手可能であり、これにより、プロジェクトを早期に支援することが可能になる（薬物は入手可能であり、ポリクローナル抗体は、適度なスケジュールの範囲内で入手可能である）。したがって、本明細書において報告される方法(=TADELISアッセイ法)は、広く応用できる。

10

## 【0076】

本明細書において報告される方法で決定される循環リガンドは、リガンド結合タンパク質の標的である。リガンド結合タンパク質は、疾患を治療するためにヒトにおいて使用することが意図される治療的タンパク質である。したがって、リガンドは、リガンドがその内因性対応物に結合することによって発揮される、生物(ヒトまたは非ヒト)内部での特異的機能を有している。したがって、リガンドは、外因性リガンド結合タンパク質のほかに、1種または複数種の実体に結合することができる。

20

## 【0077】

さらに、リガンドは、様々な形態、例えば、様々なアイソフォーム、改変型で、インビボで存在することができ、その内のごく限られた数、またはさらには、ただ1つの形態が、リガンド結合タンパク質の標的である。したがって、この/これらの形態のみが、決定されるべきである。

## 【0078】

インビボでリガンド結合タンパク質が実際に認識し結合することができる、リガンド結合タンパク質の循環リガンドを決定するための方法が、本明細書において報告される。この方法は、治療的リガンド結合タンパク質の、結合能力のある循環リガンドの総量を決定するためのものである。

30

## 【0079】

通常、リガンド結合タンパク質の、そのリガンド、すなわち標的への結合は、それらの各濃度ならびにリガンドに対するリガンド結合タンパク質の親和性および/または結合活性の影響を受ける動的平衡であると考えられる。したがって、インビボでのこの平衡を理解するため、すなわち、リガンド結合タンパク質の薬物動態学的特徴および薬力学的特徴を決定するためには、血漿試料または血清試料中の両者（リガンドおよびリガンド結合タンパク質）の濃度、すなわち量を決定しなければならない。

## 【0080】

リガンド結合タンパク質がインビボで存在することが原因で、リガンドの濃度は変動/変化し得る。リガンド結合タンパク質がリガンドに結合すると、リガンドは、潜在的に不活性型に変換される。この結果、循環リガンド濃度が低下するか（例えば、結合されたリガンドが、リガンド結合タンパク質と共に循環から除去される場合）、循環リガンド濃度がほぼ一定になるか（例えば、リガンド結合タンパク質によって引き起こされるリガンド濃度低下に対抗するために、リガンド産生が増加する場合）、または循環リガンド濃度が上昇する（例えば、リガンド産生が増加するか、もしくはリガンドが蓄積するか、もしくはリガンドのクリアランスが減少する場合）。後者の場合、遊離リガンドおよび全リガンドが、投与後に増加する。これにより、リガンド結合タンパク質の意図した治療効果が相殺され得るか、または副反応が引き起こされ得る。

40

## 【0081】

50

循環リガンドの総量を用いて、投与されるリガンド結合タンパク質のインピボでの効果  
を特徴付けることができる。

【0082】

本明細書において報告される方法で使用されるTADELISアッセイ法形式により、薬物抵抗性(=リガンド結合タンパク質抵抗性)が実現する。

【0083】

この方法で使用されるTADELISアッセイ法形式により、薬物抵抗性(=リガンド結合タンパク質抵抗性)を高めた、リガンド結合タンパク質を検出するための効率的な方法が実現する。

【0084】

逆TADELISアッセイ法形式を用いることにより、すなわち、異なるコンジュゲーション相手を捕捉試薬として含むように検出試薬を改変することにより、方法の薬物抵抗性を高められることが、判明している。その結果、捕捉試薬を最低限の必要濃度で使用して、感度を有効にする/高めることができる。これは、薬物抵抗性にとって必須ではない。その結果、数ある中でも、同様に改変した捕捉試薬および検出試薬(例えば、どちらもビオチン標識されている)を用いる従来の「ADA様ブリッジング」形式と比べて少ない試薬消費が実現され得る。さらに、本明細書において報告される方法で使用されるTADELISアッセイ法では、(多段階の複合体形成の寄与により)、例えば1段階形式において見られるような同じエピトープを得るための試薬競合が起こらない。

【0085】

さらに、捕捉試薬は、ポリクローナル抗体であってよい。標識リガンド結合タンパク質がリガンドに結合することにより、各エピトープはマスクされる。捕捉試薬のポリクローナル性質が原因で、リガンド上の他のエピトープもまた、認識され、複合体の形成に使用される。さらに、完全に形成された複合体は固定化されるため、結合された抗リガンド抗体(捕捉試薬)による立体障害が原因となって固体支持体表面の結合部位が失われることはない。したがって、他のアッセイ法の設定と比べて、固体表面の有効積載量が増加する。

【0086】

(単に)1つの態様において、常法によって決定されたりガンド結合タンパク質の解離速度定数は、インキュベーション時間に関連しており、例えば、同じエピトープに対する捕捉試薬と検出試薬の競合を最小限にするために、インキュベーション時間を決定するのに使用することができる。ポリクローナル抗体が使用される場合の捕捉試薬の結合特徴(エピトープ分布、親和性)は、関連しておらず、明らかにしなくてもよい。これにより、アッセイ法の薬物抵抗性に影響を及ぼさずに(アッセイ法の頑健性の上昇)、様々な供給源または様々なチャージ(charge)に由来するポリクローナル捕捉試薬を使用することが可能になる。

【0087】

本発明において報告される方法を、以下に例示する。したがって、特定の試薬が使用されなければならない。しかし、これは、本明細書において報告される方法の制約として解釈する必要はない。これは、単なる例証にすぎない。本発明の本当の範囲は、特許請求の範囲において設定される。

【0088】

実施例を実施するのに使用される構成要素：  
リガンド結合タンパク質：シュードモナス菌外毒素にコンジュゲートされた抗メソテリン抗体  
抗リガンド抗体：ポリクローナル抗メソテリン抗体

【0089】

TADELISアッセイ法は、以下の段階を用いて実施された：  
- 酸解離(試料10 μL、0.1mol/Lグリシン溶液50 μL、pH2、30分)、  
- ジゴキシゲニンにコンジュゲートされたモノクローナル抗メソテリン抗体を含むTris/Lo wCross緩衝液(登録商標)50 μLの添加および1時間のインキュベーション

10

20

30

40

50

- マルチウェルプレートのウェルへの添加および1時間のインキュベーション、
- ビオチンにコンジュゲートされたポリクローナル抗メソテリン抗体調製物を含むLowCross緩衝液（登録商標）200 μLの添加および20分間のインキュベーション、
- ストレプトアビジンでコーティングされたマルチウェルプレートのウェルへの溶液の添加および30分間のインキュベーション、
- 上清を除去し、ウェルを洗浄する段階、
- HRPにコンジュゲートされた抗ジゴキシゲニン抗体を含む溶液(50mU)を添加する段階、
- プレートを40分間インキュベーションする段階、
- 上清を除去し、ウェルを洗浄する段階、
- 読み取り値を生じさせるために基質溶液を添加する段階、
- プレートをインキュベーションする段階、
- 吸光度の値の決定、
- 検量線を用いて、分析物濃度を決定する段階。

10

## 【0090】

アッセイ法は、交差反応性のメソテリンを含有していないウサギ血漿を用いて実施した。検量線を作成した（図6に示す）。アッセイ範囲は、0.16nM～25nM(血漿中濃度)である。

## 【0091】

アッセイ法における回収率は、以下の式に示すように、残存薬物に対する検出薬物の比と定義される。

20

$$\text{回収率} = \frac{\text{薬物の検出量}}{(\text{薬物の検出量} + \text{薬物の残存量})}$$

## 【0092】

捕捉抗体の濃度を一定に保ち、トレーサー抗体の濃度(およびそれによって比)を変えることによって、または同様にトレーサー抗体の濃度を一定に保ち、捕捉抗体の濃度を変えることによって、第1の濃度の捕捉抗体またはトレーサー抗体で得られる回収率から始めて、アッセイ法の回収率を良くすることができる。

## 【0093】

捕捉抗体に対する検出抗体の重量比が約1.7の場合、このアッセイ法の平均標的回収率は、75 μg/mLの薬物濃度において約24%、15 μg/mLの薬物濃度において約56%、3 μg/mLの薬物濃度において約86%、および0.6 μg/mLの薬物濃度において約92%である。

30

## 【0094】

比を大きくした第2の実施例においても、検量線を作成した（図7に示す）。アッセイ範囲は、0.78nM～50nMである。

## 【0095】

捕捉抗体に対する検出抗体の重量比が約8.86の場合、このアッセイ法の平均標的回収率は、75 μg/mLの薬物濃度において約67%、15 μg/mLの薬物濃度において約82%、3 μg/mLの薬物濃度において約88%、および0.6 μg/mLの薬物濃度において約98%である。

## 【0096】

さらに比を大きくした第3の実施例においても、検量線を作成した（図8に示す）。アッセイ範囲は、1.56nM～50nMである。

40

## 【0097】

捕捉抗体に対する検出抗体の重量比が約44.3の場合、このアッセイ法の平均標的回収率は、75 μg/mLの薬物濃度において約83%、15 μg/mLの薬物濃度において約83%、3 μg/mLの薬物濃度において約86%、および0.6 μg/mLの薬物濃度において約90%である。

## 【0098】

80%またはそれ以上の回収率が、例えば、前臨床試験または臨床試験において薬物含有試料を解析する際に本明細書において報告されるアッセイ法を使用する場合の目標であるとしても、それは必須ではない。それでもなお、上記に提供したデータは、捕捉抗体に対する検出抗体の重量比とは無関係に、回収率が80%またはそれ以上である動作範囲が確認

50

できること、すなわち存在することを、明らかに示している。この動作範囲は、例えば、量を段階的に減らしたりリガンド(=分析物)がその中に添加された(すなわち、試料中に存在する)試料系列の解析を実施することにより、過度の負担を伴わずに当業者は容易に決定することができる。

【0099】

さらに、本明細書において報告されるアッセイ法は、その結果が「あり」または「なし」であろう場合、すなわちリガンド結合タンパク質(治療物質)のリガンドが存在するか否かである場合、任意の回収率で実施することができる。この場合、アッセイ法は、検出限界より上で行われる必要があるだけである。

【0100】

さらに、本明細書において報告されるアッセイ法は、分析物の定量に使用される他の任意のアッセイ法と同様に、検証されなければならない。この検証の間に、標的回収率に基づく各動作範囲を決定する。

【0101】

さらに、本明細書において報告されるアッセイ法のための検量線を確立することができる。この検量線を用いて、試料中に存在する分析物の量と分析物の回収量の関係を明らかにする。この関係を用いて、アッセイ結果を計算する間に任意の回収率を補正し、それによって低回収率に対処する。

【0102】

したがって、1つの態様において、本明細書において報告される方法は、以下の段階を含む：

(a)

- 試料を酸処理に供する段階、
- 抗リガンド抗体および標識リガンド結合タンパク質を試料に添加することによって、
  - (i) 抗リガンド抗体、
  - (ii) リガンド、および
  - (iii) 標識リガンド結合タンパク質

を含む非共有結合複合体を溶液中で形成させる段階、ならびに

- 複合体の量を決定する段階、

(b)

- リガンドを含まない試料(すなわち、段階(a)の検出限界より少ない量のリガンドを含む)に、定められているが異なる量のリガンドを添加することによって得られる少なくとも2種の試料を用いて段階(a)を実施することによって、検量線を定める段階、

(c)

- 段階(a)および段階(b)の結果を用いて、リガンド結合タンパク質のリガンドの量を決定する段階。

【0103】

したがって、1つの態様において、本明細書において報告される方法は、以下の条件で実施される：

- 捕捉抗体に対する検出抗体の重量比が約1.7であり、薬物濃度が5 µg/mLもしくはそれ以下、1つの態様においては5 µg/mL ~ 0.01 µg/mLの範囲、別の態様においては3 µg/mL ~ 0.6 µg/mLの範囲である、および/または
- 捕捉抗体に対する検出抗体の重量比が約8.85であり、薬物濃度が18 µg/mLもしくはそれ以下、1つの態様においては18 µg/mL ~ 0.01 µg/mLの範囲、別の態様においては15 µg/mL ~ 0.6 µg/mLの範囲である、および/または
- 捕捉抗体に対する検出抗体の重量比が約44であり、薬物濃度が80 µg/mLもしくはそれ以下、1つの態様においては80 µg/mL ~ 0.01 µg/mLの範囲、別の態様においては75 µg/mL ~ 0.6 µg/mLの範囲である。

【0104】

したがって、1つの態様において、本明細書において報告される方法は、以下の条件で

10

20

30

40

50

実施される：

- 捕捉抗体に対する検出抗体の重量比が約1.7であり、検出抗体濃度が約14nMであり、薬物濃度が5 µg/mLもしくはそれ以下、1つの態様においては5 µg/mL ~ 0.01 µg/mLの範囲、別の態様においては3 µg/mL ~ 0.6 µg/mLの範囲である、および/または
- 捕捉抗体に対する検出抗体の重量比が約8.85であり、薬物濃度が18 µg/mLもしくはそれ以下、1つの態様においては18 µg/mL ~ 0.01 µg/mLの範囲、別の態様においては15 µg/mL ~ 0.6 µg/mLの範囲である、および/または
- 捕捉抗体に対する検出抗体の重量比が約44であり、検出抗体濃度が約338nMであり、薬物濃度が80 µg/mLもしくはそれ以下、1つの態様においては80 µg/mL ~ 0.01 µg/mLの範囲、別の態様においては75 µg/mL ~ 0.6 µg/mLの範囲である。

10

【0105】

リガンド結合タンパク質の血清濃度が10 µg/ml ~ 150 µg/mLの間であると想定して、通常、以下の表に列挙した比が、TADELISアッセイ法において使用される。

	試料中の リガンド結合 タンパク質の 濃度 →	150 µg/ml	75 µg/ml	10 µg/ml
検出試薬に対する 重量比	低	0.15	0.3	2.3
	中	1.87	3.74	28.1
	高	2.68	5.36	40.2
捕捉試薬に対する 重量比		0.06	0.12	0.9

20

【0106】

したがって、1つの態様において、本明細書において報告される方法は、検出抗体に対する試料中のリガンド結合タンパク質の重量比が0.1 ~ 45であり、試料中のリガンド結合タンパク質濃度が150 µg/mLまたはそれ以下、1つの態様においては150 µg/mL ~ 10 µg/mLの範囲である条件で、実施される。

【0107】

したがって、1つの態様において、本明細書において報告される方法は、検出抗体に対する試料中のリガンド結合タンパク質の重量比が1.75 ~ 45であり、試料中のリガンド結合タンパク質濃度が150 µg/mLまたはそれ以下、1つの態様においては150 µg/mL ~ 10 µg/mLの範囲である条件で、実施される。

30

【0108】

したがって、1つの態様において、本明細書において報告される方法は、検出抗体に対する試料中のリガンド結合タンパク質の重量比が2.5 ~ 45であり、試料中のリガンド結合タンパク質濃度が150 µg/mLまたはそれ以下、1つの態様においては150 µg/mL ~ 10 µg/mLの範囲である条件で、実施される。

【0109】

したがって、1つの態様において、本明細書において報告される方法は、捕捉抗体に対する試料中のリガンド結合タンパク質の重量比が0.05 ~ 0.15であり、試料中のリガンド結合タンパク質濃度が150 µg/mLまたはそれ以下、1つの態様においては150 µg/mL ~ 10 µg/mLの範囲である条件で、実施される。

40

【0110】

TADELISアッセイ法の総実行時間は、約3.5時間である。

【0111】

比較アッセイ形式

以下で、一般に公知である3種の異なるアッセイ形式を、できる限りTADELISアッセイ法に合わせた。特に、今までに報告されていない、リガンド検出アッセイ法における酸解離段階の使用を、これらのアッセイ法に含めた。

50

## 【0112】

## 1 市販のメソテリンアッセイ法

Fujirebio Diagnostics, Inc. (Malvern, PA, USA) 社製の市販のメソテリンアッセイ法 Mesomark (登録商標) を、製造業者の取扱い説明書に従って実施した。

## 【0113】

Mesomark (登録商標) アッセイ法は、可溶性メソテリン関連ペプチド (SMRP) を定量測定するための手動式酵素結合免疫吸着測定法である。SMRPは、中皮腫細胞によって血流中に放出されるバイオマーカーである。血液試料を患者から採取し、次いで、血液中に存在する SMRP のレベルを決定するために試験する。SMRP に特異的に結合することが公知であるモノクローナル抗体を用いることによって、血液中に存在する SMRP の量の決定を行う。結合した抗体の量を測定することにより、患者の血液中に存在する SMRP の量を算出することができる (情報は、製造業者のウェブサイトから得られる)。

10

## 【0114】

検出は、標準的な ELISA マイクロプレートサンドイッチアッセイ法を用いる比色反応によって行う。2種の異なるモノクローナル抗体を使用する：SMRP分子の捕捉のためのもの、および SMRP分子の検出のためのもの。比色反応は、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗体と反応する発色基質を添加することによる。

## 【0115】

このアッセイ法は、以下の段階を含む：

- 血清試料の希釈 (1:101、試料 10  $\mu$ L および緩衝液 1mL)、
- 捕捉モノクローナル抗体でコーティングしたマイクロタイタープレートのウェルに希釈試料 (100  $\mu$ L) を添加する段階、
- 振盪しながら (700rpm) プレートを室温で約60分間インキュベーションする段階、
- 上清を除去し、ウェルを入念に洗浄する段階、
- HRP にコンジュゲートされた第2のモノクローナル抗体を含む溶液 100  $\mu$ L を添加する段階、
- 振盪しながら (700rpm) プレートを室温で約60分間インキュベーションする段階、
- 上清を除去し、ウェルを入念に洗浄する段階、
- 読み取り値を生じさせるために基質溶液 100  $\mu$ L を添加する段階、
- 振盪しながら (700rpm) プレートを室温で約15分間インキュベーションする段階、
- 塩酸 (100  $\mu$ L、1%(w/v)) の添加によって反応を停止させる段階、
- 吸光度の値の決定、
- 検量線を用いて、分析物濃度を決定する段階。

20

30

## 【0116】

アッセイ法は、キットの較正プローブおよび品質管理試料を用いて、ウサギ血清を用いて実施した。ウサギ血清はウサギメソテリンを含んでいるが、提供される抗体はウサギメソテリンに結合しないため、これはこのアッセイ法では交差反応性ではない。したがって、ヒトメソテリンを添加された試料のみを決定することができる。

## 【0117】

メソテリン濃度 0nM ~ 32nM にまたがる検量線を作成した (図3に示す)。アッセイ範囲は、2nM ~ 32nM である。

40

## 【0118】

このアッセイ法の標的回収率は、較正試料に対して 96% ~ 104% の間であり、平均して約 100% である。品質管理試料の場合、回収率は 93% ~ 96% の間である。

## 【0119】

Mesomark (登録商標) アッセイ法の総実行時間は、約 2.5 時間である。このアッセイ法は、カニクイザルメソテリンを検出しない。

## 【0120】

## 2 ADA形式

この比較例では、TADELIS アッセイ法の場合と同じ試薬を使用した。

50

## 【 0 1 2 1 】

このアッセイ法は、以下の段階を含む：

- 酸解離 (試料10  $\mu$ L、0.1mol/Lグリシン溶液50  $\mu$ L、pH2、30分)、
- 1つはビオチンにコンジュゲートされ、1つはジゴキシゲニンにコンジュゲートされている、標的の異なるエピトープに結合する2種の抗体溶液 (mAbおよびpAb)を含むTris/LowCross緩衝液 (登録商標) 50  $\mu$ L (LowCross緩衝液 (登録商標) 2100  $\mu$ L + 0.5M Tris-HCl (pH8.5)900  $\mu$ L)およびLowCross緩衝液 (登録商標) 200  $\mu$ Lの、酸解離物への添加、ならびに1時間のインキュベーション、
- ストレプトアビジンでコーティングされたマルチウェルプレートのウェルへの添加および1時間のインキュベーション、
- 上清を除去し、ウェルを洗浄する段階、
- HRPにコンジュゲートされた抗ジゴキシゲニン抗体を含む溶液 (50mU)を添加する段階、
- プレートを約1時間インキュベーションする段階、
- 上清を除去し、ウェルを洗浄する段階、
- 読み取り値を生じさせるために基質溶液を添加する段階、
- プレートをインキュベーションする段階、
- 吸光度の値または蛍光単位の決定、
- 検量線を用いて、分析物濃度を決定する段階。

10

## 【 0 1 2 2 】

アッセイ法は、交差反応性のメソテリンを含有していないウサギ血漿を用いて実施した。検量線を作成した (図5に示す)。アッセイ範囲は、0.78nM ~ 50nMである。

20

## 【 0 1 2 3 】

このアッセイ法の平均標的回収率は、75  $\mu$ g/mLの薬物濃度において約54%、15  $\mu$ g/mLの薬物濃度において約80%、3  $\mu$ g/mLの薬物濃度において約91%、および0.6  $\mu$ g/mLの薬物濃度において約98%である。

## 【 0 1 2 4 】

ADA形式アッセイ法の総実行時間は、約4時間である。

## 【 0 1 2 5 】

通常、ADA形式は、標的上の異なるエピトープに結合するが種交差反応性が同じである少なくとも2種のモノクローナル抗体を必要とする。同じ種交差反応性/親和性を有しており、干渉しないエピトープに結合する2種の抗体を提供できるかどうかは疑わしい。

30

## 【 0 1 2 6 】

## 3 段階的メソテリンアッセイ法

この比較例では、TADELISアッセイ法の場合と同じ試薬を使用した。

## 【 0 1 2 7 】

このアッセイ法は、以下の段階を含む：

- ストレプトアビジンでコーティングされたマルチウェルプレートのウェルを、ビオチン標識ポリクローナル抗メソテリン抗体と共にインキュベーションした (500ng/mL; 1.25時間)、
- 上清を除去し、ウェルを洗浄する段階、
- 酸解離 (試料10  $\mu$ L、0.1mol/Lグリシン溶液50  $\mu$ L、pH2、30分)、
- Tris/LowCross緩衝液 (登録商標) 50  $\mu$ L (LowCross緩衝液 (登録商標) 2100  $\mu$ L + 0.5M Tris-HCl (pH8.5)900  $\mu$ L)およびLowCross緩衝液 (登録商標) 200  $\mu$ Lの、酸解離物への添加ならびにマルチウェルプレートのウェルへの添加、ならびに1時間のインキュベーション、
- 上清を除去し、ウェルを洗浄する段階、
- ジゴキシゲニン標識モノクローナル抗メソテリン抗体を含む溶液 (500ng/mL)の添加および1時間のインキュベーション、
- 上清を除去し、ウェルを洗浄する段階、
- HRPにコンジュゲートされた抗ジゴキシゲニン抗体を含む溶液 (50mU)を添加する段階、

40

50

- プレートを約1時間インキュベーションする段階、
- 上清を除去し、ウェルを洗浄する段階、
- 読み取り値を生じさせるために基質溶液を添加する段階、
- プレートをインキュベーションする段階、
- 吸光度の値の決定、
- 検量線を用いて、分析物濃度を決定する段階。

## 【0128】

アッセイ法は、交差反応性のメソテリンを含有していないウサギ血漿を用いて実施した。メソテリン濃度0nM~25nMにまたがる検量線を作成した(図4に示す)。アッセイ範囲は、0.39nM~25nMである。

10

## 【0129】

このアッセイ法の平均標的回収率は、9 $\mu$ g/mLの薬物濃度において約20%、3 $\mu$ g/mLの薬物濃度において約44%、および1 $\mu$ g/mLの薬物濃度において約71%である。

## 【0130】

捕捉抗体に対する検出抗体の比を5倍増やして、このアッセイ法を再度実施した。この場合の平均標的回収率は、75 $\mu$ g/mLの薬物濃度において約10%、15 $\mu$ g/mLの薬物濃度において約12%、3 $\mu$ g/mLの薬物濃度において約34%、および0.6 $\mu$ g/mLの薬物濃度において約69%である。

## 【0131】

段階的アッセイ法の総実行時間は、約5時間である。

20

## 【0132】

概要:

下記の表から認めることができるように、本明細書において報告されるTADELISアッセイ法は、他のアッセイ形式と比較して、使用試薬の(プロジェクトの継続期間における)早期の入手しやすさ、薬物を含有する試料の平均回収率、扱われる種の範囲、および時間の点で、有利である。

アッセイ形式	種交差反応性	種交差反応性		薬物を含有する試料の平均回収率	75 $\mu$ g/mLの薬物を含有する試料の平均回収率	アッセイ時間
		捕捉試薬	検出試薬			
Mesomark (登録商標)	なし	モノクローナル	モノクローナル	カニクイザルメソテリンは検出不可である	--	約2.5時間
ADA形式	あるかもしれない	モノクローナル/ ポリクローナル	モノクローナル	約80%	約54%	約4時間
段階的アッセイ法	あり	ポリクローナル	モノクローナル	約30%	約10%	約5時間
TADELISアッセイ法	あり	ポリクローナル	モノクローナル	約85%	約83%	約3.5時間

30

## 【0133】

以下の実施例および図面は、本発明の理解を助けるために提供され、本発明の真の範囲は添付の特許請求の範囲において説明される。本発明の精神から逸脱することなく、説明される手順に修正を加えてよいことが理解される。

40

## 【図面の簡単な説明】

## 【0134】

【図1】実施例1で使用される化合物を用いて例示される本明細書において報告される方法の全体的な図解である。

【図2】実施例1で使用される化合物を用いて例示される本明細書において報告される方法のフローチャートである。

【図3】Mesomark(登録商標)アッセイ法の検量線である(x軸:標的濃度;y軸:光学濃

50

度)。

【図4】段階的メソテリンアッセイ法の薬物抵抗性(x軸:標的濃度;y軸:[FU]);1:薬物なし;2:1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の薬物;3:3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の薬物;4:9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の薬物。

【図5】ADA形式アッセイ法の検量線である(x軸:標的濃度;y軸:光学濃度)。

【図6】捕捉抗体に対する検出抗体の重量比が約1.7の場合のTADELIS形式アッセイ法の検量線である(x軸:標的濃度;y軸:光学濃度)。

【図7】捕捉抗体に対する検出抗体の重量比が約8.86の場合のTADELIS形式アッセイ法の検量線である(x軸:標的濃度;y軸:光学濃度)。

【図8】捕捉抗体に対する検出抗体の重量比が約44.3の場合のTADELIS形式アッセイ法の検量線である(x軸:標的濃度;y軸:光学濃度)。

10

【実施例】

【0135】

#### 実施例1

本明細書において報告される方法

ヒトメソテリンを用いて100%のウサギプール血漿中で陽性対照標準物質を調製して、50nM~0nMの濃度範囲(50.0nM、21.45nM、9.21nM、3.95nM、1.70nM、0.73nM、0.31nM、および0nM)の検量線を作成した。較正物質最終濃度は、ウサギプール血漿を用いる一対一の希釈によって実現した(希釈倍率=2)。次の濃度、すなわち25nM、17.5nM、12.5nM、0.469nM、および0.156nMの追加の品質管理試料を、100%ウサギプール血漿中で調製した(個別希釈)。

20

【0136】

陽性試験試料は、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、および1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の薬物を含むウサギプール血漿の一対一の希釈によって調製した(希釈倍率=2)。

【0137】

10 $\mu\text{L}$ の試験試料、品質管理試料、ブランク試料、および各陽性対照標準物質を、50 $\mu\text{L}$ の0.1Mグリシン-HCl(pH2.0)溶液と30分間、混合した。その後、50 $\mu\text{L}$ のDIGをコンジュゲートされた検出試薬(DIGをコンジュゲートされた検出試薬(c=4.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )を含むLowCross(登録商標)緩衝液2,100 $\mu\text{L}$ および0.5Mトリス緩衝液(pH=8.5)900 $\mu\text{L}$ )を添加することによって、混合物を中和した。中和した試料を60分間インキュベーションした。濃度450ng/mLでビオチン標識捕捉試薬(ビオチン標識ポリクローナル抗ヒトメソテリン抗体)200 $\mu\text{L}$ を添加することによって、免疫複合体の伸張を可能にし、20分間インキュベーションした。試料の総体積は、3.2%血漿を含む310 $\mu\text{L}$ である。

30

【0138】

ストレプトアビジンでコーティングしたマイクロタイタープレートに2つ1組で各試料100 $\mu\text{L}$ を添加し、マイクロタイタープレート振盪機上で30分間インキュベーションした。このプレートを、0.05%Tween-20を含むリン酸緩衝化生理食塩水で3回洗浄する。最終濃度が50mU/mLの西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)にコンジュゲートされた抗ジゴキシゲニン抗体Fab断片(ポリ)100 $\mu\text{L}$ を各ウェルに添加し、40分間インキュベーションした。その後、このプレートを、0.05%Tween-20を含むリン酸緩衝化生理食塩水で3回洗浄した。

【0139】

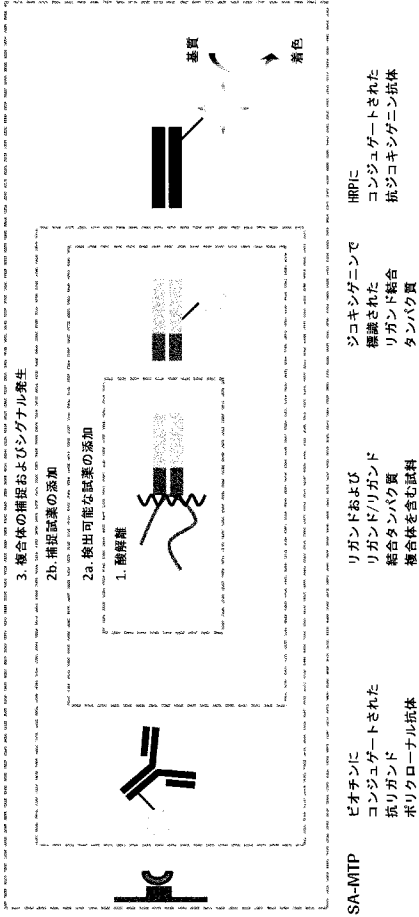
150 $\mu\text{L}$ のHPPA(3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸溶液(3.75 $\mu\text{L}$ の30% $\text{H}_2\text{O}_2$ を添加した25mLの0.1Mトリス緩衝液pH=8.5に83mgのHPPAを溶かしたもの)を各ウェルに添加し、発光波長405nm(励起波長320nm)で発光を決定した。

40

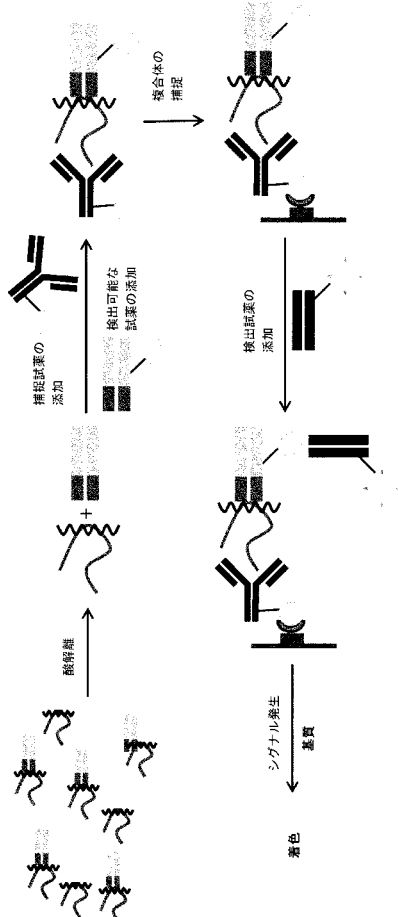
【0140】

標準検量線は、ウィマー-ロドバード関数を用いた非線形4変数当てはめによって作成した。品質管理試料の回収率が公称濃度の20%以内である場合、測定は許容されると定められた。この実験において、回収率は、83%~108%の範囲であった。

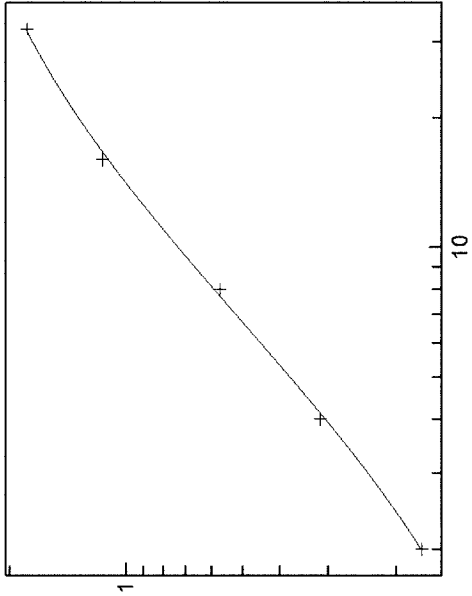
【図 1】



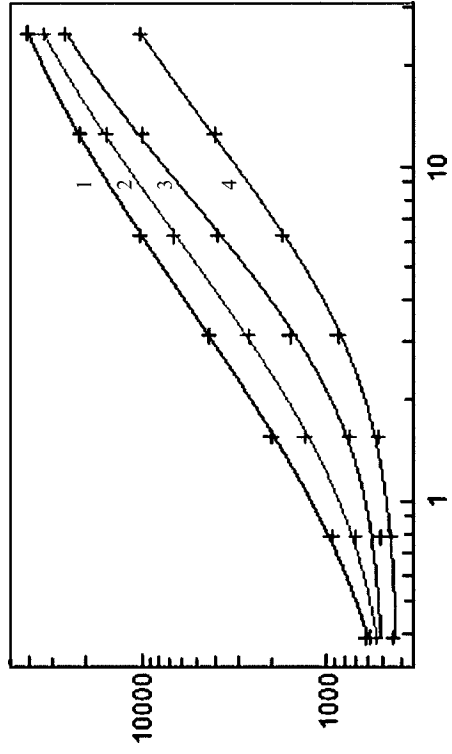
【図 2】



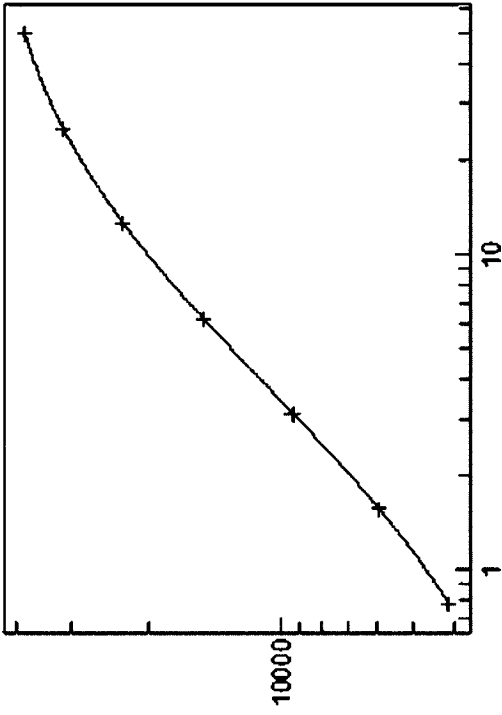
【図 3】



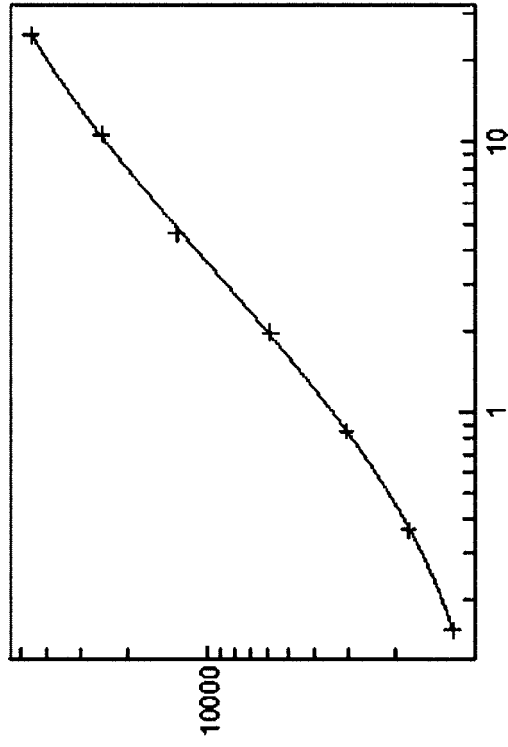
【図 4】



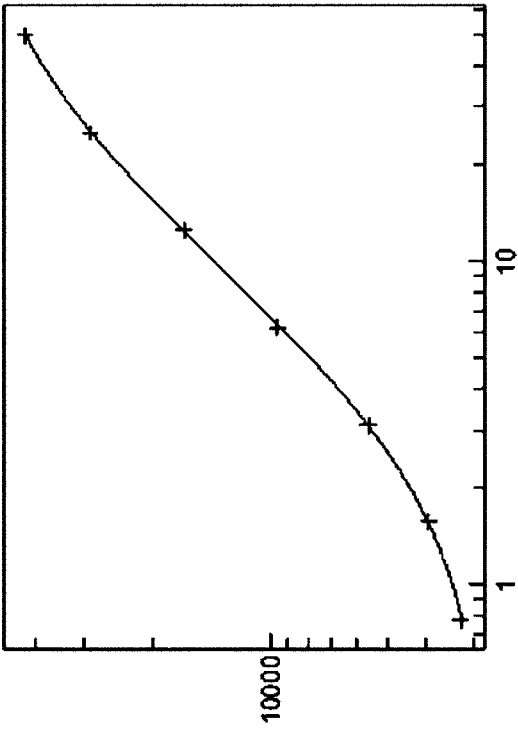
【 図 5 】



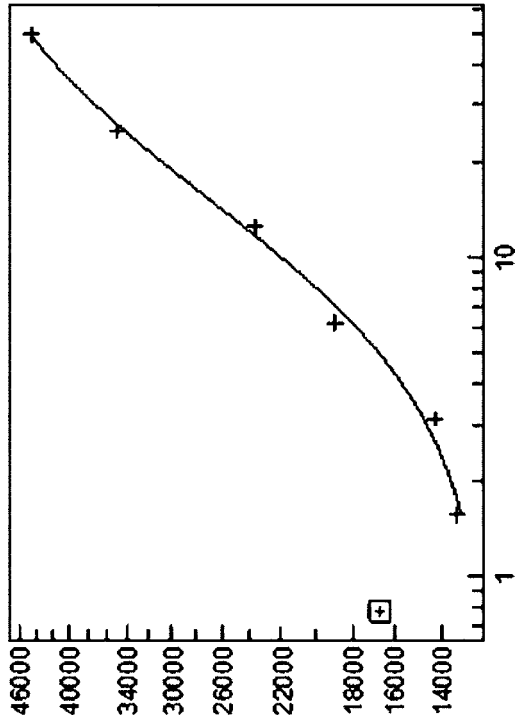
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/080887
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/536 G01N33/68 G01N33/94 ADD.		
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) 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, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZHANDONG D. ZHONG ET AL: "Identification and inhibition of drug target interference in immunogenicity assays", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS., vol. 355, no. 1-2, 24 February 2010 (2010-02-24), pages 21-28, XP055262753, NL ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/j.jim.2010.02.008 whole document, in particular p. 22, col. 2, par. 3 - p. 23, col. 1, par. 2; p. 24, col. 1, par. 1 - col. 2, par. 1; fig. 1 ----- -/--	1-16
<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 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		Date of mailing of the international search report
8 March 2017		27/03/2017
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  Chrétien, Eva Maria

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/080887
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>QIU Z J ET AL: "A novel homogeneous Biotin-digoxigenin based assay for the detection of human anti-therapeutic antibodies in autoimmune serum", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 362, no. 1-2, 31 October 2010 (2010-10-31), pages 101-111, XP027509596, ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/J.JIM.2010.09.013 [retrieved on 2010-09-22] whole document, in particular p. 102, col. 2 - p.103, col. 1, bridging par.; p. 103, col. 1, par. 2; fig. 1</p> <p>-----</p>	1-16
Y	<p>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] whole document, in particular p. 40, col. 1-2, bridging par.; p. 41, col. 1, par. 2 - col. 2, par. 1; p. 43, col. 2, bridging par. - p. 45, col. 1, bridging par.; fig. 3; table 1</p> <p>-----</p>	1-16
A	<p>HAGE D S: "IMMUNOASSAYS", ANALYTICAL CHEMISTRY.A, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. COLUMBUS, US, vol. 71, no. 12, 15 June 1999 (1999-06-15), pages 294R-304R, XP002216005, DOI: 10.1021/A1999901+ the whole document</p> <p>-----</p>	1-16
A	<p>LI J ET AL: "Detection of low-affinity anti-drug antibodies and improved drug tolerance in immunogenicity testing by Octet(&gt;R) biolayer interferometry", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS, NEW YORK, NY, US, vol. 54, no. 2, 25 January 2011 (2011-01-25), pages 286-294, XP027427185, ISSN: 0731-7085, DOI: 10.1016/J.JPBA.2010.08.022 [retrieved on 2010-09-24] the whole document</p> <p>-----</p>	1-16
	-----	-/--

1

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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/EP2016/080887

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2012/269728 A1 (JEN I-MIN M [US] ET AL) 25 October 2012 (2012-10-25) the whole document	1-16
A	----- US 2015/226758 A1 (GRABERT RYAN [US] ET AL) 13 August 2015 (2015-08-13) the whole document	1-16
A	----- WO 2015/000865 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; HOFFMANN LA ROCHE [US]) 8 January 2015 (2015-01-08) the whole document	1-16
	-----	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/080887

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2012269728	A1	25-10-2012	NONE
-----			
US 2015226758	A1	13-08-2015	AU 2015217261 A1 08-09-2016
			CA 2939080 A1 20-08-2015
			CN 106164670 A 23-11-2016
			EP 3105592 A1 21-12-2016
			SG 11201606291V A 30-08-2016
			US 2015226758 A1 13-08-2015
			WO 2015123315 A1 20-08-2015
-----			
WO 2015000865	A1	08-01-2015	CA 2913687 A1 08-01-2015
			CN 105378480 A 02-03-2016
			EP 3017303 A1 11-05-2016
			HK 1217759 A1 20-01-2017
			JP 2016530495 A 29-09-2016
			KR 20160029034 A 14-03-2016
			US 2016313322 A1 27-10-2016
			WO 2015000865 A1 08-01-2015
-----			

## 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, DJ, 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, KH, KN, KP, KR, KW, 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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(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 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(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 ジョルダン グレゴール

ドイツ連邦共和国 8 2 1 9 4 グレーベンツェル フーベルトウスシュトラッセ 1 5

(72)発明者 スタック ローランド

ドイツ連邦共和国 8 0 6 8 7 ミュンヘン アグネス - ベルナウアー - シュトラッセ 1 3 7 エ

ー

专利名称(译)	三步酸解离的酶联免疫吸附试验 (TADELIS)		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019502914A</a>	公开(公告)日	2019-01-31
申请号	JP2018531563	申请日	2016-12-14
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	ジョルダングレゴール スタックローランド		
发明人	ジョルダン グレゴール スタック ローランド		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/543.501.H G01N33/53.U		
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	2015200446 2015-12-16 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本文描述了一种用于确定样品中配体结合蛋白 (治疗剂) 的 (总的, 即具有结合能力的) 配体的量的方法, 该方法包括以下步骤, 其顺序如下: 使样品经受酸处理; 非共价复合物, 其通过向样品中添加抗配体抗体和标记的配体结合蛋白而包含 (i) 抗配体抗体, (ii) 配体和 (iii) 标记的配体结合蛋白。在溶液中形成人体, 并确定复合物的量, 从而确定配体结合蛋白的配体量。

