

(19) 日本国特許庁 ( J P )

(12) 特 許 公 報 ( B 2 )

(11) 特許番号

特許第3515101号

( P 3 5 1 5 1 0 1 )

(45) 発行日 平成16年4月5日 ( 2 0 0 4 . 4 . 5 )

(24) 登録日 平成16年1月23日 ( 2 0 0 4 . 1 . 2 3 )

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53 D
33/15		33/15 Z
33/50		33/50 Z
33/543	5 9 5	33/543 5 9 5
33/563		33/563

請求項の数21(全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-506106(P2002-506106)	(73) 特許権者	000003311 中外製薬株式会社 東京都北区浮間5丁目5番1号
(86) (22) 出願日	平成13年6月27日(2001.6.27)	(72) 発明者	田中 めぐみ 日本国静岡県御殿場市駒門一丁目135番地 中外製薬株式会社内
(86) 国際出願番号	P C T / J P 0 1 / 0 5 5 0 1	(72) 発明者	角田 正也 日本国東京都豊島区高田三丁目41番8号 中外製薬株式会社内
(87) 国際公開番号	W O 0 2 / 0 0 1 2 2 4	(72) 発明者	古賀 明子 日本国静岡県御殿場市駒門一丁目135番地 中外製薬株式会社内
(87) 国際公開日	平成14年1月3日(2002.1.3)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔 (外1名)
審査請求日	平成14年7月30日(2002.7.30)	審査官	宮澤 浩
(31) 優先権主張番号	特願2000-192829(P2000-192829)		
(32) 優先日	平成12年6月27日(2000.6.27)		
(33) 優先権主張国	日本 ( J P )		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リガンドとリガンド結合蛋白質との結合活性を評価する方法

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】リガンドとリガンド結合蛋白質との結合活性を評価する方法であって、リガンドとリガンド結合蛋白質との結合活性値を測定するとともに、該リガンドと、該リガンド結合蛋白質との結合部位以外の該リガンドの部位に結合する第二のリガンド結合物質との結合活性値を測定することを特徴とする方法。

【請求項2】リガンドまたはリガンド結合蛋白質のどちらか一方が固定されていることを特徴とする請求の範囲第1項記載の方法。

【請求項3】リガンドが、抗原またはその抗体、酵素またはその基質蛋白質、または種々の受容体に対するリガンドであることを特徴とする請求の範囲第1項または第2項記載の方法。

【請求項4】リガンドが抗体であり、リガンド結合蛋白質

2

質が抗原ペプチドであることを特徴とする請求の範囲第1項または第2項記載の方法。

【請求項5】第二のリガンド結合物質が、抗体の定常領域または糖鎖に特異的に結合する物質であることを特徴とする請求の範囲第4項記載の方法。

【請求項6】抗体の定常領域が、Fc部分、L鎖κ領域またはL鎖λ領域であることを特徴とする請求の範囲第5項記載の方法。

10 【請求項7】第二のリガンド結合物質が、抗体のFc部分に特異的に結合する物質であることを特徴とする請求の範囲第5項記載の方法。

【請求項8】抗体のFc部分に特異的に結合する物質が、プロテインA、プロテインG、プロテインL、Fcレセプターまたはレクチンである請求の範囲第6項または第7項に記載の方法。

【請求項9】リガンドにFLAG蛋白質を結合させ、第二のリガンド結合蛋白質として該FLAG蛋白質に特異的に結合する物質を用いることを特徴とする、請求の範囲第1項乃至第4項のいずれかに記載の方法。

【請求項10】リガンド結合蛋白質および第二のリガンド結合物質を、各々固定させ、リガンドを含む同一試料をそれぞれ反応させて、それぞれの結合活性値を測定することを特徴とする請求の範囲第1項乃至第9項のいずれかに記載の方法。

【請求項11】第二のリガンド結合物質がプロテインA\*10

$$\text{抗体の結合活性比(\%)} = \frac{\text{抗体と抗原ペプチドとの結合活性値}}{\text{抗体と第二のリガンド結合物質との結合活性値}} \times 100 \quad (\text{I})$$

【請求項14】抗体と抗原ペプチドとの結合活性値が下記の計算式(II)で算出され、抗体と第二のリガンド結合

$$\frac{\text{抗体と抗原ペプチドとの結合活性値}}{\text{抗体と第二のリガンド結合物質との結合活性値}} = \frac{\text{未知試料の抗体と抗原ペプチドとの結合濃度}}{\text{標準試料の抗体と抗原ペプチドとの結合濃度}} \times 100 \quad (\text{II})$$

$$\frac{\text{抗体と第二のリガンド結合物質との結合活性値}}{\text{抗体と第二のリガンド結合物質との結合活性値}} = \frac{\text{未知試料の抗体と第二のリガンド結合物質との結合濃度}}{\text{標準試料の抗体と第二のリガンド結合物質との結合濃度}} \times 100 \quad (\text{III})$$

【請求項15】リガンドとリガンド結合蛋白質との結合濃度およびリガンドと第二のリガンド結合物質との結合濃度が、表面プラズモン共鳴、蛍光偏光度測定法、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素標識固相免疫測定法(ELISA)、HPLC、超遠心分析法または滴定型熱量測定により測定される請求の範囲第1項乃至第14項のいずれかに記載の方法。

【請求項16】リガンドとリガンド結合蛋白質との結合濃度およびリガンドと第二のリガンド結合物質との結合濃度が表面プラズモン共鳴により測定される請求の範囲第15項記載の方法。

【請求項17】リガンドがモノクローナル抗体である請求の範囲第1項乃至第16項のいずれかに記載の方法。

【請求項18】モノクローナル抗体がヒト型化されたものである請求の範囲第17項記載の方法。

【請求項19】モノクローナル抗体が副甲状腺ホルモン関連ペプチドに対する抗体である請求の範囲第17項または第18項に記載の方法。

【請求項20】リガンド結合蛋白質および第二のリガンド結合物質を含む、リガンドとリガンド結合蛋白質との結合活性を評価するためのキット。

【請求項21】リガンド結合蛋白質が抗原ペプチドであることを特徴とする請求の範囲第20項記載のキット。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、リガンドとリガンド結合蛋白質との結合活性を評価する方法に関する。

背景技術

抗体と抗原の相互作用の測定には、ラジオイムノアッ

\*であることを特徴とする請求の範囲第4項記載の方法。

【請求項12】抗原ペプチドと抗体との結合活性値を、抗体と第二のリガンド結合物質との結合活性値で補正することを特徴とする請求の範囲第4項乃至第11項のいずれかに記載の方法。

【請求項13】下記の計算式(I)で算出される抗体の結合活性比で抗体と抗原ペプチドとの結合活性を評価する請求の範囲第4項乃至第12項のいずれかに記載の方法。

※物質との結合活性値が下記の計算式(III)で算出される請求の範囲第13項記載の方法。

セイ(RIA)、酵素標識固相免疫測定法(ELISA)などが従来用いられてきた。最近、表面プラズモン共鳴(surface plasmon resonance, 以下「SPR」と記す。)という光学現象を利用して、抗体と抗原の相互作用を標識なしでリアルタイムにモニターすることができるようになった。その一例として、BIACORE™と呼ばれる表面プラズモン共鳴センサーにより抗体と抗原の相互作用を解析する装置が市販されている(BIACORE社:旧ファルマシアバイオテック社)。

BIACORE™の基本構造には、光源とプリズム、ディテクターとマイクロ流路から成っている。実際には、カセット式のセンサーチップ上にリガンドを固定化し、そこにアナライトをインジェクションする。両者に親和性があれば、その結合量が光学的に検出される。

その検出原理は表面プラズモン共鳴と呼ばれる現象である。すなわち、ガラスと金属薄膜との界面に全反射するように入射した光のうち、ある角度の入射光は表面プラズモンの励起に使われ減衰してしまう。その角度が金属薄膜(センサー)に接している溶媒の濃度変化に依存して変動する。BIACORE™はこの変動を検出するというものである。

BIACORE™ではこの変化を共鳴シグナル(SPR signal)と呼び、0.1度の変化を1000RU(resonance units)としている。1000RUは表面積1mm<sup>2</sup>の薄金センサー上に約1ngの蛋白質が結合した場合の変化量であり、蛋白質であれば50RU(50pg)程度の変化を十分検出することができる。

検出されたシグナルは、BIACORE™に付属しているコンピュータがセンサーグラムと呼ばれる結合曲線に変

換し、リアルタイムにコンピューターディスプレイ上に描き出される(夏目徹 他、(1995) 実験医学、13、p563-569.)(Karlsson, R. et al., (1991) J.Immunol.Meth ods 145,p229-240.)。

BIACORE™によって、抗体のカイネティクスパラメーター、すなわち解離定数(KD)、解離速度定数(Kdis s)および結合速度定数(Kass)を測定することができる。

しかし、上記のようなBIACORE™による抗原抗体反応の速度論的解析は条件検討等に時間を要するため、多検体の処理に適当ではない。そのため、BIACORE™の有する特異性を保持しつつも、抗体の品質設計及び処方設計検討に適当な、簡便且つ精度の高い抗体の生物活性の測定が可能な方法が必要である。

発明の開示

本発明は、簡便且つ精度の高いリガンド(特に、抗体)の生物活性測定法を提供することを目的とする。

本発明者らは、速度論的解析なしに簡便にin vitroで抗体の生物活性評価を行うことを目的として、抗体の抗原に対する結合量の定量による結合活性測定法の検討を行ったところ、プロテインAと抗体の結合量の定量系で抗体濃度の補正を行うことにより、精度が高く且つ簡便な抗体の活性評価試験法を確立することに成功し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は、リガンドとリガンド結合蛋白質との結合活性を評価する方法であって、リガンドとリガンド結合蛋白質との結合活性値を測定するとともに、該リガンドと、該リガンド結合蛋白質との結合部位以外の該リガンドの部位に結合する第二のリガンド結合物質との結合活性値を測定することを特徴とする方法を提供する。

\* リガンドまたはリガンド結合蛋白質のどちらか一方は固定されていてもよい。

リガンドは、抗原またはその抗体、酵素またはその基質蛋白質、または種々の受容体に対するリガンドであるといふ。

上記の方法において、リガンドが抗体であり、リガンド結合蛋白質が抗原ペプチドであってもよい。

第二のリガンド結合物質は、抗体の定常領域(Fc部分、L鎖κ領域、L鎖λ領域等)、糖鎖などの抗原結合部位以外の部分に特異的に結合する物質から選択することができ、特に、抗体のFc部分に特異的に結合する物質であってもよい。

抗体のFc部分に特異的に結合する物質は、プロテインA、プロテインG、プロテインL、Fcレセプターまたはレクチンであるといふ。

本発明の方法においては、リガンドにFLAG蛋白質を結合させ、第二のリガンド結合蛋白質として該FLAG蛋白質に特異的に結合する物質を用いてもよい。

リガンド結合蛋白質および第二のリガンド結合物質を、各々固定させ、リガンドを含む同一試料をそれぞれ反応させて、それぞれの結合活性値を測定してもよい。

本発明の好ましい一態様において、リガンドが抗体であり、リガンド結合蛋白質が抗原ペプチドであり、第二のリガンド結合物質がプロテインAである。

本発明の方法により抗原ペプチドと抗体との結合活性を評価する場合、抗原ペプチドと抗体との結合活性値を、抗体と第二のリガンド結合物質との結合活性値で補正するとよい。

例えば、下記の計算式(I)で算出される抗体の結合活性比で抗体と抗原ペプチドとの結合活性を評価することができる。

$$\text{抗体の結合活性比(\%)} = \frac{\text{抗体と抗原ペプチドとの結合活性値}}{\text{抗体と第二のリガンド結合物質との結合活性値}} \times 100 \quad (I)$$

抗体と抗原ペプチドとの結合活性値は下記の計算式(II)で、抗体と第二のリガンド結合物質との結合活性値は下記※記の計算式(III)で算出することができる。

$$\frac{\text{抗体と抗原ペプチドとの結合活性値}}{\text{抗体と抗原ペプチドとの結合濃度}} = \frac{\text{未知試料の抗体と抗原ペプチドとの結合濃度}}{\text{標準試料の抗体と抗原ペプチドとの結合濃度}} \times 100 \quad (II)$$

$$\frac{\text{抗体と第二のリガンド結合物質との結合活性値}}{\text{抗体と第二のリガンド結合物質との結合濃度}} = \frac{\text{未知試料の抗体と第二のリガンド結合物質との結合濃度}}{\text{標準試料の抗体と第二のリガンド結合物質との結合濃度}} \times 100 \quad (III)$$

抗体と抗原ペプチドとの結合濃度および抗体と第二のリガンド結合物質との結合濃度は、表面プラズモン共鳴、蛍光偏光度測定法、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素標識固相免疫測定法(ELISA)、HPLC、超遠心分析法または滴定型熱量測定により測定することが

★できるが、特に、表面プラズモン共鳴により測定することが好ましい。

上記の方法の一例として、下記の計算式(I')で算出される抗体の結合活性比で未知試料の抗体の抗原に対する結合活性を評価することができる。

$$\text{抗体の結合活性比(\%)} = \frac{\text{抗体と抗原ペプチドとの結合活性値}}{\text{抗体とプロテインAとの結合活性値}} \times 100 \quad (I')$$

抗原に対する抗体の結合活性値は下記の計算式(II) \* 算式(III')で算出することができる。  
 で、プロテインAに対する抗体の結合活性値は下記の計\*

$$\frac{\text{抗体と抗原ペプチドとの結合活性値}}{\text{抗体と抗原ペプチドとの結合濃度}} = \frac{\text{未知試料の抗体と抗原ペプチドとの結合濃度}}{\text{標準試料の抗体と抗原ペプチドとの結合濃度}} \times 100 \text{ (II)}$$

$$\frac{\text{抗体とプロテインAとの結合活性値}}{\text{抗体とプロテインAとの結合濃度}} = \frac{\text{未知試料の抗体とプロテインAとの結合濃度}}{\text{標準試料の抗体とプロテインAとの結合濃度}} \times 100 \text{ (III')}$$

抗体と抗原ペプチドとの結合濃度および抗体とプロテインAとの結合濃度は、表面プラズモン共鳴、蛍光偏光  
 10 度測定法、ラジオイムノアッセイ (RIA)、酵素標識固相免疫測定法 (ELISA)、HPLC、超遠心分析法、滴定型熱量計等により測定することができる。このうち、表面プラズモン共鳴による測定は、抗体と抗原の相互作用を標識なしでリアルタイムにモニターすることができるので、便利である。

本発明の方法の対象となる抗体は、いかなる抗原に対する抗体であってもよく、副甲状腺ホルモン関連ペプチド (Parathyroid Hormone related Peptide、以下、「PTHrP」という。) に対する抗体 (以下、「抗PTHrP抗体」  
 20 いう。)、IL-6レセプターに対する抗体、HML-24抗原に対する抗体、組織因子 (TF) に対する抗体などを例示することができる。

抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体のいずれであってもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。

抗体のクラスは、IqM、IqD、IqG、IqA、IqEのいずれであってもよいが、IqGが望ましい。またH鎖のサブクラスは、IqG1、IqG2、IqG3、IqG4のいずれであってもよいが、IqG1及びIqG4が望ましく、L鎖のサブクラスは  
 30  $\kappa$ 、 $\lambda$ のいずれであってもよい。

モノクローナル抗体は、ヒト化、ヒト型化あるいはキメラ化されたものであってもよい。

また、本発明の測定方法で測定できるものとしては、Fab、(Fab')<sub>2</sub>などの抗体断片や、一本鎖Fvなどの再構成されたものも含まれる。

抗体は、ダイマーなどのオリゴマーを形成しないか、あるいはオリゴマーの形成量が少ない (好ましくは5%以下の) ものであることが望ましい。

本明細書において、「第二のリガンド結合物質」と  
 40 は、リガンド結合蛋白質 (「第一のリガンド結合物質」といえる。) との結合部位以外の部位でリガンドと結合する物質をいう。リガンドが抗体である場合、第二のリガンド結合物質とは、抗体の定常領域 (Fc部分、L鎖 $\kappa$ 領域、L鎖 $\lambda$ 領域等)、糖鎖などの抗原結合部位以外の部分に特異的に結合する物質をいう。Fc部分に結合する物質としては、プロテインA、プロテインG、Fcレセプター等が挙げられる。L鎖 $\kappa$ 領域に結合する物質としてはプロテインL、抗 $\kappa$ 抗体等が挙げられる、L鎖 $\lambda$ 領域に結合する物質としては抗 $\lambda$ 抗体等が挙げられ  
 50

る。糖鎖に結合する物質としては、RCA、LCA、ConA等のレクチンなどが挙げられる。

抗体の抗原結合部位以外の部分に結合する物質としては、プロテインA、プロテインG、Fcレセプター、プロテインL、RCA、LCA、ConA等のレクチンが好ましく、さらに好ましくは、プロテインA、プロテインG、プロテインLであり、もっとも好ましくはプロテインAである。

また、本発明は、リガンド結合蛋白質および第二のリガンド結合物質を含む、リガンドとリガンド結合蛋白質との結合活性を評価するためのキットを提供する。リガンド結合蛋白質は抗原ペプチドであってもよい。本発明のキットは、さらに、他の試薬などを含んでもよい。例えば、抗原に対する抗体の結合活性の測定に表面プラズモン共鳴を利用する場合には、本発明のキットは、抗原及び抗体の抗原結合部位以外に結合する物質をセンサーチップに固定するための試薬 (抗原の、アミノ基、チオール基、アルデヒド基などの官能基を活性化させてチップ上に結合させるための試薬であればいかなる試薬でもよく、例えば、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドヒドロクロリド、N-ヒドロキシコハク酸イミド、エタノールアミン塩酸、2-(2-ピリジニルジチオ)エタンアミンヒドロクロリド、システイン、ピオチンヒドラジド)などをさらにも含んでもよい。

本発明のリガンド (例えば、抗体) 活性の評価法およびキットは、仮に試料溶液中に異種タンパク質が不純物  
 50 或いは培地や安定化剤として存在していても、精製操作を加えることなしにリガンド (例えば、抗体) 分子としての結合活性比を評価する事が可能である。したがって製造過程にある或いは精製された原薬としての抗体の品質管理やインプロセスコントロール、処方設計の検討に利用することができる。

また、本発明のリガンド (例えば、抗体) 活性の評価法およびキットにより最終的に得られる結合活性比は、試料溶液中の活性成分の濃度ではなく、リガンド (例えば、抗体) の第二のリガンド結合活性に対するリガンド結合活性の比活性である。したがってその値が100%以上であれば、抗体の抗原結合部位以外の部分 (例えばFc部分) に何らかの分解が、100%以下であれば抗体の抗原結合部位に何らかの分解が生じている可能性が示唆される。このことから他の物性評価法と併用することにより

安定性試験及び使用期限の設定にも利用することができる。

さらに、本発明のリガンド（例えば、抗体）活性の評価法およびキットは、高活性な蛋白質（特に、変異蛋白質、種々のモノクローナル抗体など）の選抜に利用することもできる。特にポイントミューテーション等による高い生物活性あるいは安定性を示す変異タンパク質の選抜に有効である。抗体では、天然の抗体から、キメラ抗体、ヒト型化抗体等の再構成された抗体の選抜に特に有用である。

また、抗体等のタンパク質医薬品の製造承認申請を行う際に必要とされる、タンパク質原体中に検出される複数の電荷的ヘテロ成分（タンパク質原体をイオン交換クロマトグラフィーにかけたときに検出される複数のマイナーピーク）が「Product-Related Substances」であるか否かの評価方法としても有効である。

また、本発明のリガンド（例えば、抗体）活性の評価法およびキットを利用することにより、血液、血清等の体液中の高活性な蛋白質（特に、血中因子、変異蛋白質、種々のモノクローナル抗体、Fabや(Fab')<sub>2</sub>などの抗体断片、一本鎖F<sub>v</sub>など）の定量や結合活性を、簡便且つ高い精度で測定することができる。

図面の簡単な説明

図1は、PTHrP(1-34+Cys)固定化時のセンサーグラムを示す。

図2は、抗PTHrP抗体a(2.0μg/mL)測定時のセンサーグラム(1Cycle)を示す。

図3は、PTHrP結合量の定量における検量線(Duplicate)を示す。

図4は、センサーグラムの乱れよりデータから無視されたサイクルを示す。

図5は、プロテインA固定化時のセンサーグラムを示す。

図6は、抗PTHrP抗体a(2.0μg/mL)測定時のセンサーグラム(1Cycle, プロテインA)を示す。

図7は、プロテインA結合量の定量における検量線(Duplicate)を示す。

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願2000-192829号の明細書に記載された内容を包含する。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の方法の一例として、BIACORE™により抗PTHrP抗体のPTHrPおよびプロテインAに対する結合量をそれぞれ測定し、PTHrPに対する抗PTHrP抗体の結合量の測定値をプロテインAに対する抗PTHrP抗体の結合量の測定値で補正することによって、PTHrPに対する抗PTHrP抗体の結合活性を評価する方法について説明する。

まず、抗PTHrP抗体はW098/13388に記載の方法に従って製造する。

抗PTHrP抗体を水で希釈し、適当な濃度（例えば、1

00~500μg/mL)の抗PTHrP抗体の溶液を調製する。これを一般試験法の吸光度法(日局)により定量後、HBS緩衝液(HBS-EP Buffer(BIACORE社))で適当な濃度(例えば、10~50μg/mL)に希釈した溶液を3回調製する。それぞれの溶液にHBS緩衝液を加え、ある濃度(例えば、1~5μg/mL)の溶液を調製する。これらを、未知試料液1、2および3とする。

上記の操作を抗PTHrP抗体の標準品についても行い、標準試料溶液1、2、3を用意する。

10 また、別に抗PTHrP抗体を水で希釈し、適当な濃度(例えば、100~500μg/mL)の抗PTHrP抗体の溶液を調製して、この溶液をHBS緩衝液で希釈して、種々の濃度(例えば、0~5μg/mL)の抗PTHrP抗体の溶液を調製し、これらを検量線用標準溶液A、B、C、D、E、Fとする。

次に、PTHrPおよびプロテインA固定化チップを用意する。まず、BIACORE™にセンサーチップCM5(BIACORE社、Code#BR-1000-14)をセットし、流速5~20μL/minでHBS緩衝液を流す。これにEDC(N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミドヒドロクロリド)溶液とNHS(N-ヒドロキシコハク酸イミド)溶液をそれぞれ等量ずつ混合した溶液を例えば、150μL、PDEA(2-(2-ピリジニルジチオ)エタンアミンヒドロクロリド)のホウ酸緩衝液溶液を例えば150μL、PTHrP(1-34+Cys)(PTHrPの1-34ペプチドのC末端にCysを付加した合成ペプチド)の酢酸緩衝液溶液を例えば40μL、システイン-塩化ナトリウムのギ酸緩衝液溶液を例えば150μL、グリシン-塩酸緩衝液を例えば10μL、10mM塩酸水溶液を例えば10μLを順次流すことにより、PTHrP(1-34+Cys)をチップ上に固定化する。フローセルを変え同様に、流速5~20μL/minでHBS緩衝液を流す。これにEDC溶液とNHS溶液をそれぞれ等量ずつ混合した溶液を例えば100μL、プロテインAの酢酸緩衝液溶液例えば40μL、エタノールアミン-塩酸緩衝液を例えば100μL、グリシン-塩酸緩衝液を例えば10μL、10mM塩酸水溶液を例えば10μLを順次流すことにより、プロテインAをチップ上に固定化する。

PTHrP固定化チップ及びプロテインA固定化チップそれぞれについて、検量線用標準溶液A、B、C、D、E、F、標準試料溶液1、2、3及び未知試料溶液1、2、3を流し、同一バッチから二回測定を行う。分析は、標準試料溶液及び未知試料溶液を1~100μL好ましくは10μL注入する2分間を結合相とし、その後HBS緩衝液に切り換え、20~60秒後のレゾナンス・ユニット(RU)と、ベースラインとの差を結合量とする。その後、15mM塩酸溶液を注入し、センサーチップの洗浄、再生を行う。この結合、洗浄、再生を分析の1サイクルとし、センサーグラムを得、付属のソフトを用いて検量線を作成し、それぞれの結合濃度を算出する。その結合濃度から、結合活性比(%)を次の式で算出する。

$$\begin{aligned}
 & \text{11} & \text{12} \\
 & \text{抗 PTHrP 抗体} & \text{抗 PTHrP 抗体と PTHrP との結合活性値} \\
 & \text{の結合活性} & \text{} \\
 & \text{比 (\%)} & = \frac{\text{抗 PTHrP 抗体と PTHrP との結合活性値}}{\text{抗 PTHrP 抗体とプロテインAとの結合活性値}} \times 100 \\
 & \text{PTHrP に対する抗 PTHrP} & \text{未知試料の抗 PTHrP 抗体と PTHrP 固定化チップとの結合濃度} \\
 & \text{抗体の結合活性値} & = \frac{\text{未知試料の抗 PTHrP 抗体と PTHrP 固定化チップとの結合濃度}}{\text{標準試料の抗 PTHrP 抗体と固定化チップとの結合濃度}} \times 100 \\
 & \text{抗 PTHrP 抗体とプロテ} & \text{未知試料の抗 PTHrP 抗体とプロテインA固定化チップ} \\
 & \text{インAとの結合活性値} & = \frac{\text{未知試料の抗 PTHrP 抗体とプロテインA固定化チップとの結合濃度}}{\text{標準試料の抗 PTHrP 抗体とプロテインA固定化チップとの結合濃度}} \times 100
 \end{aligned}$$

本発明を以下の実施例により具体的に説明する。これらの実施例は説明のためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

[実施例 1]

I. 実験材料

本実施例で使用した装置、試薬および試料は以下の通りである。

(1) 装置

BIACORE™ upgrade : (BIACORE社製)

Sensor Chip : Sensor Chip CM5 : (BIACORE社製)

分光光度計 : DU-640(BECKMAN社製)

(2) 試薬

Running Buffer: HBS buffer BIA Certified(0.01M HEPE S pH7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005%(v/v) Surfactant P20) (BIACORE社) Code # BR-1001-88

NHS: 0.05 M N-hydroxysuccinimide, アミンカップリングキット (BIACORE社) Code # BR-1000-50

EDC: 0.2M N-ethyl-N'-(3-dimethyl aminopropyl)-carbodiimide hydrochloride, アミンカップリングキット (BIACORE社) Code # BR-1000-50

Ethanolamine-HCl(pH8.5) : アミンカップリングキット \*

\* (BIACORE社) Code # BR-1000-50

PDEA : チオールカップリングキット (BIACORE社) Code # BR-1000-58

PTHrP(1-34+Cys) : サワデー社による合成品 (custom peptide JH 365, 21/11/94, B-CAL 35a.a.)

プロテイン A : (CAPPEL社) Cat # 55832, Lot # 40690

L-Cystein, NaCl, HCl

0.1 M Borate-Na Buffer(pH8.5)

20 10 mM Acetate-Na Buffer(pH4.0, 5.0)

0.1 M Na-Formate Buffer(pH4.3)

0.1 M Gly-HCl Buffer (pH2.5)

(3) 試料

抗PTHrP抗体 a, b, c, d, e, f: in house ただし、

いずれも研究用ロット

II. 実験

(I) 抗原PTHrP(1-34+Cys)固定化チップに対する抗PTHrP抗体結合量定量の検討

i) センサーチップへの抗原PTHrP(1-34+Cys)の固定化流速を5μL/minに設定し、表1に従って試薬をインジェクトし、チオールカップリング法による抗原PTHrP(1-34+Cys)の固定化を行った。

表 1. PTHrP (1-34+Cys) の固定化条件

試薬	インジェクション量
NHS/EDC	100 μL
PDEA (5.4mg/250 μL 0.1M Na-Borate Buffer (pH8.5))	100 μL
PTHrP (1-34+Cys) (10 μg/mL 10mM Na-Acetate Buffer (pH5.0))	20 μL
50mM Cys / 1M NaCl (0.1M Na-Formate Buffer (pH4.3))	100 μL
0.1M Gly-HCl (pH2.5)	10 μL
10mM HCl	10 μL

ii) 複数ロット間差のPTHrP結合活性実測

i)の条件で作成したチップを用い、抗PTHrP抗体4ロット

ト a, b, c, dについて以下の操作でPTHrPの結合量の測定を行い、ロット間差を検討した。a, b, c, dの試料原

液を精製水で希釈して約500 $\mu$ g/mL溶液を調製後、吸光度法により濃度を決定した。その濃度をもとに、標準試料としたaは、検量線用に0, 1, 2, 3, 4, 5 $\mu$ g/mL(n=1)及びコントロールとして2 $\mu$ g/mL(n=3)、未知試料であるb, c, dは、2 $\mu$ g/mL(n=3)のHBS溶液をそれぞれ調製した。まず、流速を5 $\mu$ L/minに設定し、試料溶液を10 $\mu$ Lインジェクトする2分間を結合相とし、その後ランニングバッファーに切り換え、30秒後のレゾナンス・ユニット(RU)と、インジェクト直前のベースラインとの差を結合量とした。その後、15mM HClをインジェクトすることによりセンサーチップの洗浄、再生を行った。この結合、再生を分析の1サイクルとし、それぞれの試料溶液について二回測定を行い、センサーグラム及び結合量を得た。

\*

表2. プロテインAの固定化条件

試薬	インジェクション量
NHS/EDC	150 $\mu$ L
プロテインA (50 $\mu$ g/mL 0.1 M Na-Borate Buffer (pH4.0))	50 $\mu$ L
Ethanolamine	150 $\mu$ L
0.1 M Gly-HCl (pH2.5)	10 $\mu$ L
10 mM HCl	10 $\mu$ L

iii) 抗PTHrP抗体 e のPTHrP/プロテインA結合活性実測

標準試料である a は、吸光度法での濃度をもとに検量線用に0, 1, 2, 3, 4, 5 $\mu$ g/mL(n=1)及びコントロールとして2 $\mu$ g/mL(n=3)のHBS溶液を調製した。未知試料である e は、試料原液を1000倍希釈した溶液(n=3)を調製した。まず、(1)と同様の操作でPTHrP結合量の測定を行った。次に、プロテインA固定化チップに対しても同様の測定を行い、センサーグラム及び結合量を得た。

(3) 本測定法を用いた繰り返し精度の測定

吸光度法での濃度をもとに標準試料であるaは、検量線用に0, 1, 2, 3, 4, 5 $\mu$ g/mL(n=1)及びコントロールとして2 $\mu$ g/mL(n=3)、未知試料であるfは、2 $\mu$ g/mL(n=3)のHBS溶液をそれぞれ調製した。(2)-iii)と同様に、PTHrP固定化チップ、プロテインA固定化チップそれぞれについて、0~5 $\mu$ g/mLの検量線用サンプル(n=1)、2 $\mu$ g/mLの未知試料サンプル(n=3)をインジェクトし結合量を二回測定することを一回の測定とした。この試料調製からの一連の操作を計7回同様に行い、繰り返し精度を検討した。

### III. 結果及び考察

(1) 抗原PTHrP(1-34+Cys)固定化チップに対する、結合量定量の検討

PTHrPの固定化の様子を図1に示す。作製したPTHrP(1-34+Cys)固定化チップの評価、適切な検量線の濃度範

\* (2) プロテインA固定化チップに対する結合量(抗体濃度)定量の検討

i) 抗PTHrP抗体 e のPTHrP結合活性実測

抗PTHrP抗体a, e の試料原液を精製水で希釈して約100 $\mu$ g/mL溶液を調製後、吸光度法により濃度を決定した。その濃度をもとに、標準試料である a は、検量線用に0, 1, 2, 3, 4, 5 $\mu$ g/mL(n=1)及びコントロールとして2 $\mu$ g/mL(n=3)、未知試料である e は、2 $\mu$ g/mL(n=3)のHBS溶液をそれぞれ調製した。(1)と同様の操作でPTHrP結合量の測定を行った。

ii) センサーチップへのプロテインAの固定化

流速を5 $\mu$ L/minに設定し、表2に従って試薬をインジェクトし、アミンカップリング法によるプロテインAの固定化を行った。

30

囲及び試料の濃度を設定するために、ほぼ同等の品質が保証されている抗PTHrP抗体の4ロットについて、PTHrPとの結合量の測定を行った。得られたセンサーグラムの代表例を図2に示す。

得られた結合量からBIACORE™ 付属の濃度定量用計算ソフトを用いて検量線の作成を行った(図3)。その結果、センサーグラム上(図2)で結合相がほぼ直線であり且つ解離がみられないこと、この濃度範囲で検量線(図3)が直線性を保っていることから考えて、定量系に用いることのできるリガンド固定化量であると判断した。よってPTHrP(1-34+Cys)固定化チップに対する結合量定量の試料濃度は、この実験で用いた条件、すなわち検量線用標準試料の濃度を0, 1, 2, 3, 4, 5 $\mu$ g/mLの6点、未知試料の濃度をおよそ半分の2 $\mu$ g/mLに設定した。

40

ii) 複数ロット間差の解析

次にこの検量線を用いて、センサーグラムから得られた結合量から付属のソフトを用いて実サンプルである4ロットの結合濃度の算出を行った。なお、この際センサーグラムが乱れ適切な結合量が得られなかったサイクルについては値を無視した(図4)。この結合濃度をもとにPTHrP結合活性を(eq. 1)に定義し4ロットの結果をまとめた(表3)。その結果、n=3のばらつきが、3%以内という、高い精度の測定系であることがわかった。この実験からは4ロットのPTHrP結合活性に有意差はないと判断された。

50

$$\text{PTHrP 結合活性比 (BIACORE) (\%)} = \frac{\text{未知試料の結合濃度}}{\text{標準試料の結合濃度}} \times 100 \quad (\text{eq. 1})$$

表 3. PTHrP 結合活性測定 (ロット間差) 結果

試料	n	結合量 (RU)		検量線から算出された結合濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )				三回測定		結合活性比%
		1st. cycle	2nd. cycle	1st. cycle	2nd. cycle	平均 dupli	%cv.	平均	%cv	
b	1	966.4	979.7	1.99	2.01	2.00	0.71	2.01	0.90	99.2
	2	979.0	957.8	2.01	1.97	1.99	1.42			
	3	981.4	987.2	2.02	2.03	2.03	0.35			
c	1	951.7	1008.7	1.96	2.07	2.02	3.86	2.05	1.73	101
	2	987.5	985.5	2.06	2.02	2.04	1.39			
	3	1014.7	1019.2	2.08	2.09	2.09	0.34			
d	1	967.8	971.1	1.99	2.00	2.00	0.35	1.99	2.06	98.2
	2	974.2	913.9	2.00	1.88	1.94	4.37			
	3	983.4	981.7	2.02	2.02	2.02	0.00			
a	1	985.6	985.2	2.02	2.02	2.02	0.00	2.02	0.14	100
	2	982.4	982.1	2.02	2.02	2.02	0.00			
	3	984.4	990.2	2.02	2.03	2.03	0.35			

(2) プロテインA固定化チップに対する結合量(抗体濃度)定量の検討

i) プロテインA固定化チップの評価及び試料濃度の検討

抗PTHrP抗体eについて、吸光度法をもとに試料濃度を調製しPTHrP(1-34-Cys)固定化チップとの結合濃度を測定(I-(2)-i))した。その結果、標準試料である a と比較してPTHrP結合活性が46%となった(表 4)。この原因と

して生物活性の低下が懸念されたが、280nm に吸収を持つ夾雑物の混入も否定できず、結果として吸光度法による濃度が抗体濃度を反映しておらず蛋白含量の低下が起こったことも考えられた。そこで、BIACORE™を用いた抗体濃度定量系として、プロテインA固定化チップとの結合量定量系を取り入れ、抗体濃度の補正を行い精度及び正確さを高めることを試みた。

表4. 抗PTHrP抗体eのPTHrP結合活性測定結果

試料	n	結合量 (RU)		検量線から算出された 結合濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )				三回測定		結合 活性 比%
		1st. cycle	2nd. cycle	1st. cycle	2nd. cycle	平均	%cv. dupli	平均	%cv	
a	1	986.7	1011.0	2.01	2.06	2.04	1.74	2.05	0.49	100
	2	996.1	1020.6	2.03	2.08	2.06	1.72			
	3	992.5	1009.6	2.03	2.06	2.05	1.04			
e	1	438.2	446.0	0.95	0.97	0.96	1.47	0.95	1.59	46.2
	2	428.6	428.6	0.93	0.93	0.93	0.00			
	3	429.4	435.0	0.94	0.95	0.95	0.75			

プロテインAの固定化の様子を図5に示す。作製したプロテインA固定化チップから得られたセンサーグラム及び検量線(図6、7)の直線性から、定量系に用いることのできるリガンド固定化量であると判断した。またPTHrP(1-34-Cys)固定化チップでの測定に用いられる濃度範囲0~5 $\mu\text{g/mL}$ で、十分に検量線が直線性を示すことを確認した。よって、プロテインA固定化チップに対する結合量定量の試料濃度は、検量線試料及び未知試料ともPTHrP(1-34-Cys)固定化チップと同条件に設定した。

ii) e 結合活性の解析

次に PTHrP、プロテインAそれぞれの検量線を用い \*

にて、センサーグラムから得られた結合量から附属のソフトを用いて結合濃度の算出を行い、結果をまとめた(表5)。PTHrPに対する結合活性を、プロテインAとの結合量から算出された濃度で補正し、抗PTHrP抗体結合活性を(eq.2)に新たに定義し結果をまとめた(表6)。その結果、eは、aに比較して結合活性が94%であり、若干の活性の低下が示唆された。

以上のように、プロテインAとの結合量の定量により、PTHrPとの結合量の測定時と同じ試料濃度で抗体濃度を確認することで、より正確な抗PTHrP抗体結合活性を測定することが可能となった。

$$\text{抗 PTHrP 抗体結合活性比 (BIACORE) (\%)} = \frac{\text{PTHrP に対する結合活性}}{\text{プロテインAに対する結合活性}} \times 100 \quad (\text{eq. 2})$$

$$\text{PTHrP に対する結合活性値} = \frac{\text{PTHrP 固定化チップと未知試料との結合濃度}}{\text{PTHrP 固定化チップと標準試料との結合濃度}} \times 100$$

$$\text{プロテインAに対する結合活性値} = \frac{\text{プロテインA固定化チップと未知試料との結合濃度}}{\text{プロテインA固定化チップと標準試料との結合濃度}} \times 100$$

表5. 抗PTHrP抗体eのPTHrP及びプロテインA結合活性測定結果

Ligand: PTHrP

試料	n	結合量 (RU)		検量線から算出された 結合濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )				三回測定	
		1st.	2nd.	1st.	2nd.	平均	%cv.	平均	%cv
		cycle	cycle	cycle	cycle		dupli		
a	1	760.9	779.2	1.98	2.03	2.01	1.76	2.02	0.50
	2	768.8	788.3	2.00	2.05	2.03	1.75		
	3	763.2	783.2	1.99	2.04	2.02	1.75		
e	1	824.4	852.5	2.14	2.21	2.18	2.28	2.17	0.70
	2	819.0	838.5	2.13	2.18	2.16	1.64		
	3	834.0	849.7	2.17	2.20	2.19	0.97		

Ligand: プロテインA

試料	n	結合量 (RU)		検量線から算出された 結合濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )				三回測定	
		1st.	2nd.	1st.	2nd.	平均	%cv.	平均	%cv
		cycle	cycle	cycle	cycle		dupli		
a	1	770.5	786.7	2.00	2.04	2.02	1.40	2.03	0.43
	2	770.9	785.2	2.00	2.04	2.02	1.40		
	3	776.4	790.4	2.02	2.05	2.04	1.04		
e	1	875.9	886.0	2.27	2.30	2.29	0.93	2.31	0.99
	2	876.5	894.0	2.28	2.32	2.30	1.23		
	3	887.6	909.6	2.30	2.36	2.33	1.82		

表6. e結合活性測定結果

sample	結合濃度		結合活性比 %
	PTHrP	プロテイン A	
a	2.02	2.03	100
e	2.17	2.31	94.7

(3) 本測定法を用いた繰り返し精度の測定と実測

これまでの結果をもとに設定した、プロテインAによる濃度補正を含めたPTHrPとの結合活性測定法の評価のために、標準品を a にして f の測定を行った。1回の測定中、同じバッチからの Dupli のバラツキはすべて4%未満(全測定サイクル中の83%は2%未満)、n=3のバラつきはすべて3%未満(全測定サイクル中の90%は2%未満)であったが、7回の繰り返し実験のバラつきは1%未満(0.95

%)であり、かなり精度の高い実験系であることがわかった(表7, 8)。

eq.3を用いてCAL結合活性を計算し表にまとめた(表8)。aの生物活性を100%とした時、fは97.0%であった。7回繰り返し精度の%cv値は0.95%であったことから、この差は有意な差でfは若干抗原との活性が低下していることが示唆された。

抗 PTHrP 抗体結合活性比 (BIACORE) (%)

$$= \frac{\text{PTHrP 固定化チップと f との結合濃度 / PTHrP 固定化チップと a との結合濃度}}{\text{プロテインA固定化チップと f との結合濃度 / プロテインA固定化チップと a との結合濃度}} \times 100$$

(eq. 3)

表7. 抗 PTHrP 抗体 f 結合活性 7 回測定結果のまとめ

N	リガンド	試料	結合濃度 Dupli の平均値 ( $\mu\text{g/mL}$ )			三回測定の平均値	%cv
			n=1	n=2	n=3		
1	プロテインA	a	2.02	2.06	2.05	2.04	1.02
		f	2.20	2.22	2.21	2.21	0.35
	PTHrP	a	2.04	2.05	2.02	2.04	0.89
		f	2.14	2.14	2.12	2.13	0.41
2	プロテインA	a	2.04	2.03	2.12	2.06	2.25
		f	2.24	2.26	2.24	2.24	0.46
	PTHrP	a	2.05	2.05	2.05	2.05	0.14
		f	2.17	2.17	2.20	2.18	0.80
3	プロテインA	a	1.96	2.01	2.02	2.00	1.52
		f	2.19	2.20	2.24	2.21	1.25
	PTHrP	a	2.16	2.19	2.19	2.18	0.87
		f	2.33	2.34	2.39	2.35	1.29
4	プロテインA	a	2.03	2.04	2.05	2.04	0.62
		f	2.38	2.37	2.44	2.40	1.58
	PTHrP	a	1.99	2.05	2.02	2.02	1.49
		ef	2.27	2.26	2.29	2.27	0.79
5	プロテインA	a	2.03	2.02	2.02	2.02	0.38
		f	2.44	2.45	2.39	2.43	1.29
	PTHrP	a	2.04	2.04	2.05	2.04	0.28
		f	2.41	2.42	2.42	2.41	0.32
6	プロテインA	a	1.97	2.02	2.05	2.01	2.01
		f	2.73	2.73	2.78	2.74	1.00
	PTHrP	a	2.15	2.23	2.21	2.20	2.02
		f	2.86	2.89	2.96	2.90	1.67
7	プロテインA	a	1.98		1.97	1.98	0.36
		f	2.41	2.42	2.44	2.42	0.62
	PTHrP	a	2.03	2.05	2.01	2.03	0.87
		f	2.38	2.39	2.42	2.40	0.75

表8. fの結合活性7回測定結果のまとめ

N	Lot No.	結合濃度		結合活性比
		PTHrP	プロテインA	%
1	a	2.04	2.04	100
	f	2.13	2.21	96.4
2	a	2.05	2.06	100
	f	2.18	2.24	97.8
3	a	2.18	2.00	100
	f	2.35	2.21	97.6
4	a	2.02	2.04	100
	f	2.27	2.40	95.5
5	a	2.04	2.02	100
	f	2.41	2.43	98.2
6	a	2.20	2.01	100
	f	2.90	2.74	96.7
7	a	2.03	1.98	100
	f	2.40	2.42	96.7
Average	f	-	-	97.0

0.95 (%cv)

$$\text{抗 PTHrP 抗体結合活性比 (BIACORE) (\%)} = \frac{\text{PTHrP に対する結合活性}}{\text{プロテインAに対する結合活性}} \times 100$$

$$\text{PTHrP に対する結合活性値} = \frac{\text{PTHrP 固定化チップと未知試料との結合濃度}}{\text{PTHrP 固定化チップと標準試料との結合濃度}} \times 100$$

$$\text{プロテインAに対する結合活性値} = \frac{\text{プロテインA固定化チップと未知試料との結合濃度}}{\text{プロテインA固定化チップと標準試料との結合濃度}} \times 100$$

## IV. まとめ

この測定系は、抗体をインジェクションした後バッファーに切り換え一定時間を経過した時点での結合量を単純にPTHrP結合活性量と定義しており、解離の影響を無視しているため厳密な意味での生物活性とはいえない。しかしながら、センサーグラムの形状から結合速度に比較して解離速度が十分に小さいことが観測された試料に関しては、速度論的解析を要さない簡便な活性評価として、この方法で十分であると判断した。

以上、BIACORE™を用いて、速度論的解析なしに精度が高く簡便にin vitroでCAL 生物活性評価が可能な試験

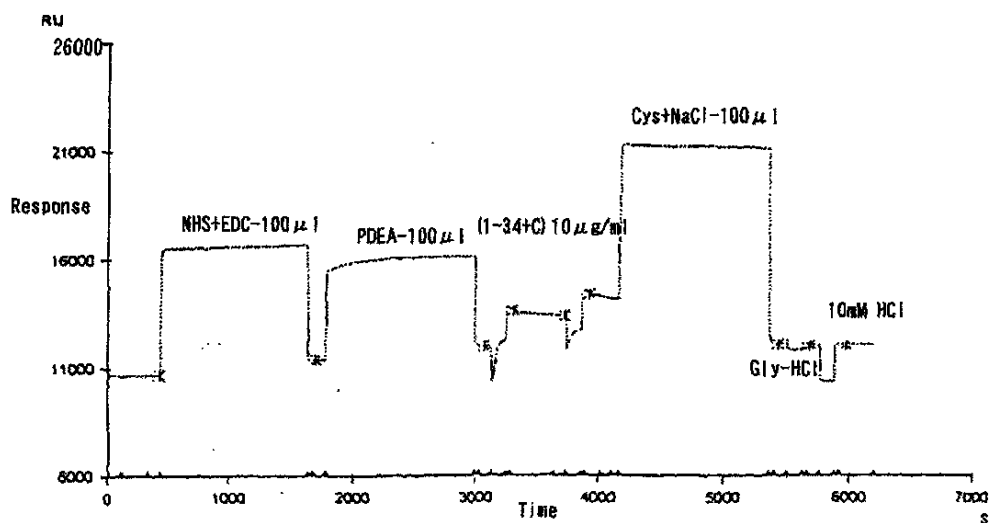
法を発明した。本法は、他の生物活性試験法を適宜組み合わせ、BIACORE™の原理から生じる問題点を補うことで、より正確で生体内を反映した試験法になるものと考えられる。

本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

## 40 産業上の利用の可能性

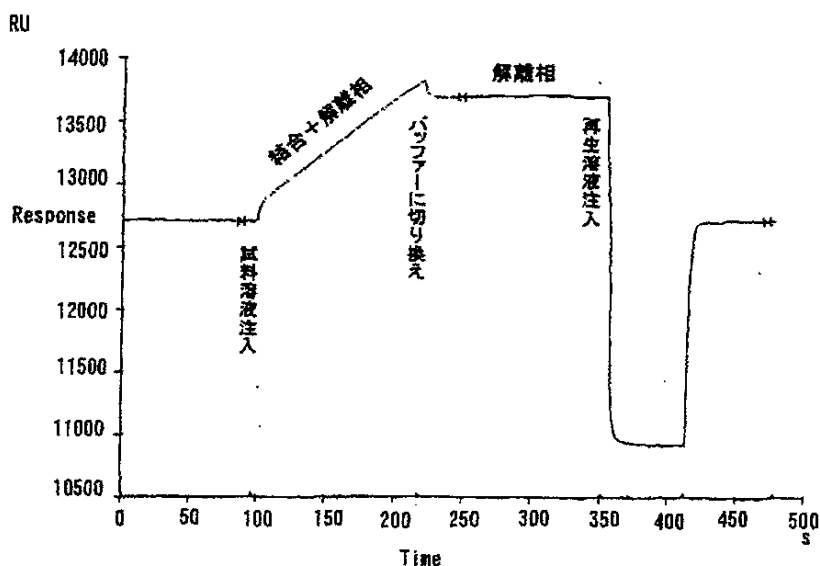
本発明により、簡便且つ精度の高いリガンドの生物活性測定法が提供された。

【図1】



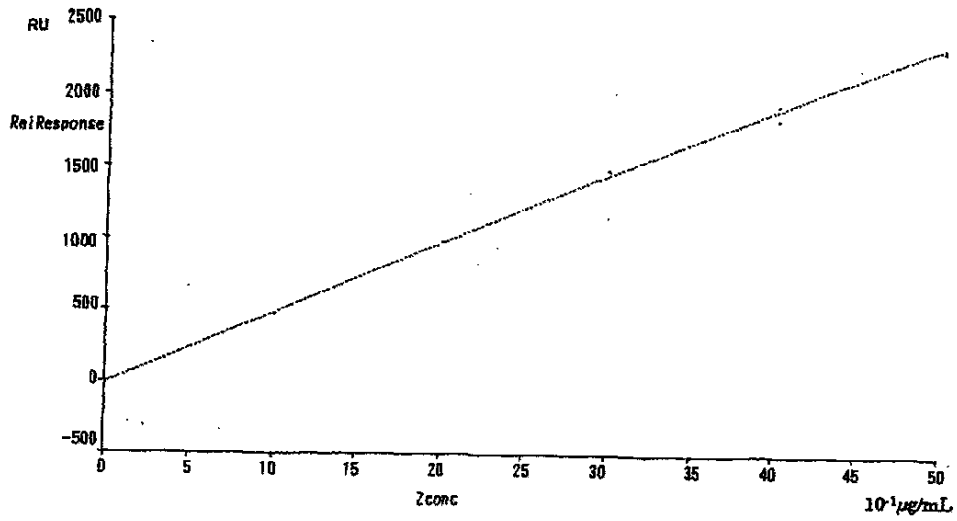
Fc	Time	Window	AbsResp	SD	Slope	Baseline	RelResp	Id
2	476.5	5.0	10681.1	0.08	-0.01	Yes	0 pre	
2	1707.5	5.0	11383.3	1.20	-0.61	Yes	702.3 NHS+EDC-100 μl	
2	3066.5	5.0	12018.1	0.73	-0.38	No	834.7 PDEA-100 μl	
2	3304.5	5.0	13674.1	3.83	-2.10	No	2290.8 (1-34+C)10 μg/ml-10 μl-pH5.0	
2	3721.5	5.0	13422.1	0.43	-0.22	No	2038.7 pre	
2	3914.5	5.0	14417.1	3.38	-1.81	No	3033.8 (1-34+C)10 μg/ml-10 μl-pH5.0	
2	5423.5	5.0	12123.3	0.50	-0.28	No	740.0 Cys+NaCl-100 μl	
2	5677.5	5.0	12114.9	0.27	-0.21	No	731.6 Gly-HCl-10 μl	
2	5967.5	5.0	12102.2	0.19	-0.10	No	718.9 10mM HCl-10 μl	

【図2】

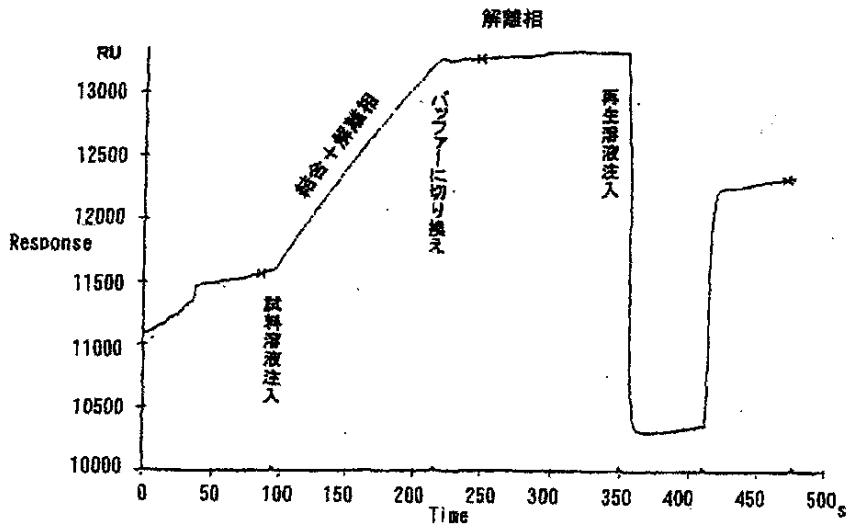


Fc	APROG	Time	AbsResp	Slope	Baseline	RelResp	Id	Zid	Zconc
2	injection	87.5	12704.9	-0.03	Yes	0	baseline	unk-9	CAL98C01-2.0
2	injection	247.5	13695.1	0.21	No	990.2	bound	unk-9	CAL98C01-2.0
2	injection	471.5	12715.7	0.02	No	10.8	Reg.	unk-9	CAL98C01-2.0

【図3】

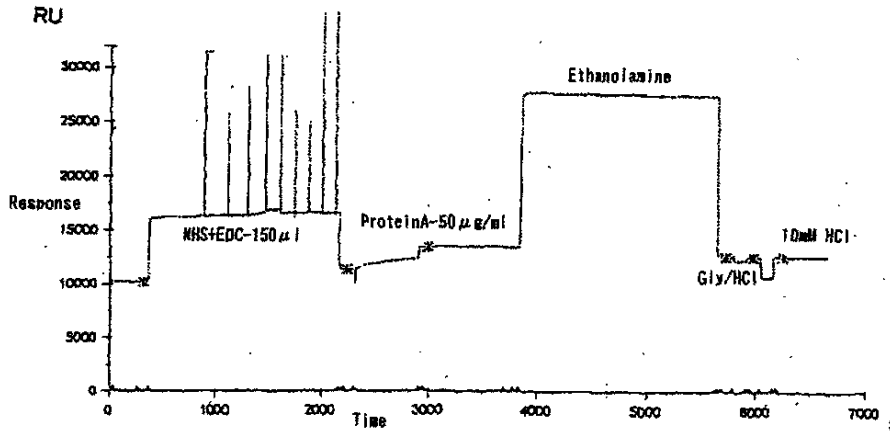


【図4】



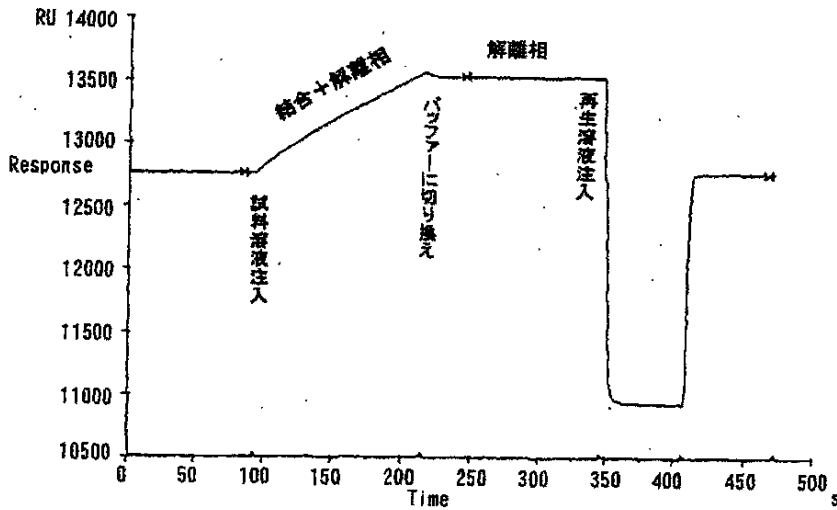
Fc	APROG	Time	AbsResp	Slope	Baseline	RelResp	Id	Zid	Zconc
2	injection	85.5	11567.7	3.70	Yes	0	baseline	98C01	3.0
2	injection	245.5	13274.3	0.38	No	1706.6	bound	98C01	3.0
2	injection	469.5	12328.3	1.32	No	760.5	Reg.	98C01	3.0

【図5】



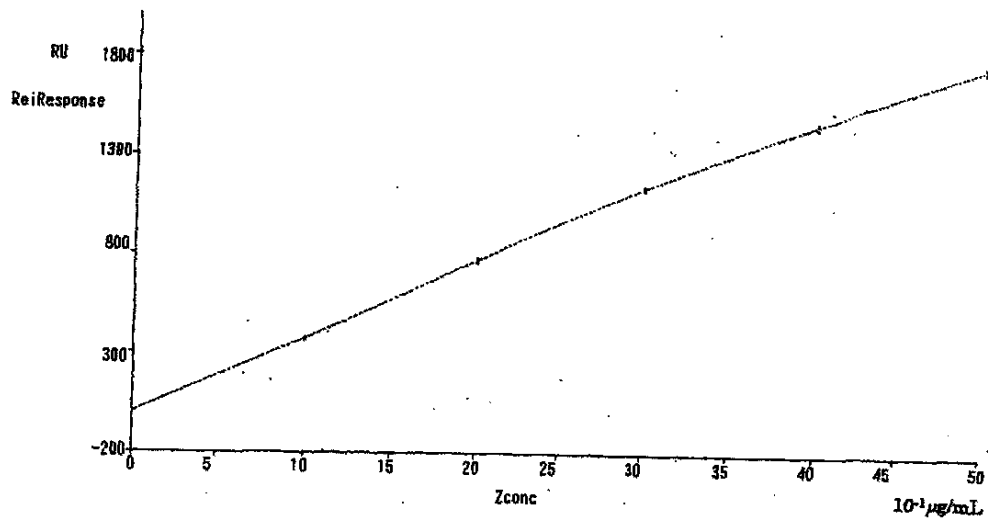
Fc	Time	Window	AbsResp	SD	Slope	Baseline	RelResp	Id
1	319.5	5.0	10229.1	0.09	0.01	Yes	0 pre	
1	2236.5	5.0	11395.8	1.60	-0.85	Yes	1166.7	NHS+EDC-150 μl
1	2992.5	5.0	13507.9	0.30	0.15	No	2112.1	ProteinA-50 μg/ml(pH4.0)-50 μl
1	5711.5	5.0	12863.1	0.59	-0.30	No	1267.3	Ethanolamine
1	5967.5	5.0	12665.3	0.15	-0.02	No	1269.5	Gly/HCl(pH2.5)-10 μl
1	6249.5	5.0	12870.0	0.05	0.02	No	1274.2	10mM HCl-10 μl

【図6】



Fc	APROG	Time	AbsResp	Slope	Baseline	RelResp	Id	Zid	Zconc
1	injection	84.5	12763.5	0.03	Yes	0 baseline	unk-3	GAL98C01-2.0 μg/ml	
1	injection	244.5	13534.4	-0.18	No	770.9 bound	unk-3	GAL98C01-2.0 μg/ml	
1	injection	466.5	12766.3	-0.01	No	2.8 Reg.	unk-3	GAL98C01-2.0 μg/ml	

【図7】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	
G 0 1 N 33/577		G 0 1 N 33/577	B
// C 0 7 K 16/26		C 0 7 K 16/26	

(72)発明者 江崎 圭子  
 日本国静岡県御殿場市駒門一丁目135番  
 地 中外製薬株式会社内

(56)参考文献 特表 平9-504859 (J P, A)  
 特表2000-512131 (J P, A)

(58)調査した分野(Int.Cl.<sup>7</sup>, D B名)

G01N 33/53  
 G01N 33/15  
 G01N 33/50  
 G01N 33/543 595  
 G01N 33/563  
 G01N 33/577  
 C07K 16/26

专利名称(译)	评估配体和配体结合蛋白之间结合活性的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP3515101B2</a>	公开(公告)日	2004-04-05
申请号	JP2002506106	申请日	2001-06-27
申请(专利权)人(译)	中外制药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	中外制药有限公司		
[标]发明人	田中めぐみ 角田正也 古賀明子 江崎圭子		
发明人	田中 めぐみ 角田 正也 古賀 明子 江崎 圭子		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/557 G01N33/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/563 G01N33/577 C07K16/26		
CPC分类号	G01N33/6857 G01N33/53 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/543.595 G01N33/563 G01N33/577.B C07K16/26		
审查员(译)	宮澤浩		
优先权	2000192829 2000-06-27 JP		
其他公开文献	JPWO2002001224A1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种用于测量配体的生物学活性的简单且高精度的方法。即，一种评估配体与配体结合蛋白之间的结合活性的方法，该方法包括测量所述配体与所述配体结合蛋白之间的结合活性值，以及在除结合位点之外的其他位置处测量所述配体与配体结合蛋白之间的结合活性。提供了一种用于测量与待结合的第二配体结合物质的结合活性值的方法。

表 3. PTHrP 結合活性測定 (ロット間差) 結果

試料	n	結合量 (U)		検量線から算出された結合濃度 (µg/ml)				三回測定		結合活性比%
		1st. cycle	2nd. cycle	1st. cycle	2nd. cycle	平均 dupli	%cv	平均	%cv	
b	1	966.4	979.7	1.99	2.01	2.00	0.71	2.01	0.90	98.2
	2	979.0	957.8	2.01	1.97	1.99	1.42			
	3	981.4	987.2	2.02	2.08	2.03	0.85			
c	1	951.7	1008.7	1.96	2.07	2.02	3.88	2.05	1.73	101
	2	987.5	985.5	2.06	2.02	2.04	1.39			
	3	1014.7	1019.2	2.08	2.09	2.09	0.34			
d	1	967.8	971.1	1.99	2.00	2.00	0.35	1.99	2.05	98.2
	2	974.2	913.9	2.00	1.88	1.94	4.37			
	3	983.4	981.7	2.02	2.02	2.02	0.00			
a	1	985.6	985.2	2.02	2.02	2.02	0.00	2.02	0.14	100
	2	982.4	982.1	2.02	2.02	2.02	0.00			
	3	984.4	990.2	2.02	2.03	2.03	0.35			