

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6561043号  
(P6561043)

(45) 発行日 令和1年8月14日(2019.8.14)

(24) 登録日 令和1年7月26日(2019.7.26)

(51) Int.Cl.		F I			
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N	33/53		N
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N	33/53		U
CO 7 K 16/42	(2006.01)	GO 1 N	33/543	5 O 1 A	
		CO 7 K	16/42		

請求項の数 12 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2016-503644 (P2016-503644)	(73) 特許権者	591003013
(86) (22) 出願日	平成26年3月19日 (2014.3.19)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公表番号	特表2016-514831 (P2016-514831A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	平成28年5月23日 (2016.5.23)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/055462		T
(87) 国際公開番号	W02014/147101		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(87) 国際公開日	平成26年9月25日 (2014.9.25)		グレンツァーヘルストラツセ124
審査請求日	平成29年3月2日 (2017.3.2)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	13160143.7		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成25年3月20日 (2013.3.20)	(74) 代理人	100102118
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		弁理士 春名 雅夫
前置審査		(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】 マウス血清中のラット抗体の特異的検出

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

マウスから得られた血清または血漿試料中のラット抗体を検出する方法であって、

(a) 分析すべき試料を用意する工程；

(b) 該血清または血漿試料を、ラットIgGに特異的に結合するがマウスIgGには特異的に結合しない抗体とインキュベートする工程であって、該抗体が、

(i) ラット 軽鎖に結合するモノクローナル抗体およびラット 軽鎖に結合するモノクローナル抗体の混合物、または

(ii)  $4.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラットIgG1に結合するモノクローナル抗体、

$8.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラットIgG2aに結合するモノクローナル抗体、

$6.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラットIgG2bに結合するモノクローナル抗体、

および  $9.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラットIgG2cに結合するモノクローナル抗体の混合物である、

工程；ならびに

(c) (b) において形成された複合体を、該試料中の該ラット抗体の濃度と関連づける工程

を含む、方法。

【請求項2】

マウスから得られた血清または血漿試料中のラット抗体を検出する方法であって、

(a) 該血清または血漿試料を、固相にコンジュゲートされた捕捉抗体とインキュベートし、それにより、捕捉抗体-ラット抗体複合体を形成させる工程；

10

20

(b) (a)において形成された複合体をトレーサー抗体とインキュベートし、それにより、(a)において形成された複合体を該ラット抗体の存在または濃度と関連づける工程を含み、

該捕捉抗体が、ラットIgGに特異的に結合するがマウスIgGには特異的に結合しない抗体であり、

(i) ラット 軽鎖に結合するモノクローナル抗体およびラット 軽鎖に結合するモノクローナル抗体の混合物、または

(ii)  $4.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG1に結合するモノクローナル抗体、 $8.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG2aに結合するモノクローナル抗体、 $6.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG2bに結合するモノクローナル抗体、および $9.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG2cに結合するモノクローナル抗体の混合物である、方法。

10

【請求項3】

マウスから得られた血清または血漿試料中のラット抗体を検出する方法であって、

(a) 該血清または血漿試料を、固相にコンジュゲートされた捕捉抗体とインキュベートし、それにより、捕捉抗体-ラット抗体複合体を形成させる工程；

(b) (a)において形成された複合体をトレーサー抗体とインキュベートし、それにより、(a)において形成された複合体を該ラット抗体の存在または濃度と関連づける工程を含み、

該トレーサー抗体が、ラットIgGに特異的に結合するがマウスIgGには特異的に結合しない抗体であり、

20

(i) ラット 軽鎖に結合するモノクローナル抗体およびラット 軽鎖に結合するモノクローナル抗体の混合物、または

(ii)  $4.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG1に結合するモノクローナル抗体、 $8.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG2aに結合するモノクローナル抗体、 $6.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG2bに結合するモノクローナル抗体、および $9.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG2cに結合するモノクローナル抗体の混合物である、方法。

【請求項4】

前記トレーサー抗体および捕捉抗体は、互いに独立して、

30

(i) ラット 軽鎖に結合するモノクローナル抗体およびラット 軽鎖に結合するモノクローナル抗体の混合物、または

(ii)  $4.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG1に結合するモノクローナル抗体、 $8.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG2aに結合するモノクローナル抗体、 $6.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG2bに結合するモノクローナル抗体、および $9.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG2cに結合するモノクローナル抗体の混合物であることを特徴とする、請求項2に記載の方法。

【請求項5】

抗原ブリッジングイムノアッセイであることを特徴とする、請求項1~4のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項6】

前記イムノアッセイがサンドイッチイムノアッセイであることを特徴とする、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記捕捉抗体が、ビオチンにコンジュゲートされており、かつ、固定化されたアビジンまたはストレプトアビジンを介して固定化されることを特徴とする、請求項2~4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記トレーサー抗体が、ジゴキシゲニンにコンジュゲートされており、かつ、ジゴキシゲニンに対する抗体を介して検出可能な標識に結合されることを特徴とする、請求項2ま

50

たは3に記載の方法。

【請求項 9】

前記ラット抗体がFabであることを特徴とする、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

マウスから得られた血清または血漿試料中の総ラット抗体、活性ラット抗体、または抗原に結合したラット抗体の濃度を測定するためのイムノアッセイにおける、捕捉抗体としての、

(i) ラット 軽鎖に結合するモノクローナル抗体およびラット 軽鎖に結合するモノクローナル抗体の混合物、または  
 (ii)  $4.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラットIgG1に結合するモノクローナル抗体、 $8.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラットIgG2aに結合するモノクローナル抗体、 $6.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラットIgG2bに結合するモノクローナル抗体、および $9.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラットIgG2cに結合するモノクローナル抗体の混合物  
 の使用であって、  
 該捕捉抗体が、ラットIgGに特異的に結合するがマウスIgGには特異的に結合しない抗体である、使用。

10

【請求項 11】

マウスから得られた血清または血漿試料中の総ラット抗体、活性ラット抗体、または抗原に結合したラット抗体の濃度を測定するためのイムノアッセイにおける、捕捉抗体およびトレーサー抗体のそれぞれとしての、

(i) ラット 軽鎖に結合するモノクローナル抗体およびラット 軽鎖に結合するモノクローナル抗体の混合物、または  
 (ii)  $4.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラットIgG1に結合するモノクローナル抗体、 $8.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラットIgG2aに結合するモノクローナル抗体、 $6.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラットIgG2bに結合するモノクローナル抗体、および $9.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラットIgG2cに結合するモノクローナル抗体の混合物  
 の使用であって、  
 該捕捉抗体およびトレーサー抗体が、ラットIgGに特異的に結合するがマウスIgGには特異的に結合しない抗体である、使用。

20

30

【請求項 12】

マウスから得られた血清または血漿試料中の総ラット抗体、活性ラット抗体、または抗原に結合したラット抗体の濃度を測定するための、ラット抗体に結合するがマウスのイムノグロブリンには結合しない抗体の使用であって、該抗体が、

(i) ラット 軽鎖に結合するモノクローナル抗体およびラット 軽鎖に結合するモノクローナル抗体の混合物、または  
 (ii)  $4.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラットIgG1に結合するモノクローナル抗体、 $8.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラットIgG2aに結合するモノクローナル抗体、 $6.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラットIgG2bに結合するモノクローナル抗体、および $9.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラットIgG2cに結合するモノクローナル抗体の混合物  
 である、使用。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、マウスから得られた試料中の総ラット抗体、活性ラット抗体、または抗原に結合したラット抗体の濃度を測定するためのイムノアッセイにおける、捕捉抗体およびトレーサー抗体としてのモノクローナル抗体の混合物の使用を報告する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

50

非常に多くのモノクローナル抗体が研究されており、ヒトを最初の試験目的で考慮することができる前に、実験動物で試験される必要がある。重要な基準（それらの2つだけ述べると、バイオアベイラビリティおよび抗体クリアランスなど）が試験される必要がある。これらの試験の多くは、実験動物自身の抗体のバックグラウンドでの抗体の定量化を必要とする。多くの場合、実験動物として哺乳類が使用される。毒性は初めに、マウスまたはラットなどの齧歯類で評価されることが多い。

【0003】

哺乳類は、通常、循環血中に約10～約30mg/mlの抗体を有する。モノクローナル抗体は、典型的に、約1ng/ml～約100μg/mlの範囲の血清レベルで試験される必要がある。したがって、問題となる抗体は、約100倍～約1000万倍過剰に存在する実験動物の抗体のバックグラウンドに対して検出される必要がある。

10

【0004】

実験動物の抗体のバックグラウンドにおける、実験動物とは異なる種に由来する抗体の検出は、薬理学者に極めて重要な課題を提示する。

【0005】

国際公開公報第2008/031532号（特許文献1）において、抗薬物抗体アッセイが報告されている。実験動物における治療抗体の検出は、国際公開公報第2006/066912号（特許文献2）において報告されている。US 5,332,665号（特許文献3）において、種特異的な高アフィニティのモノクローナル抗体が報告されている。非交差反応性抗IgG抗体は、国際公開公報第2011/048043号（特許文献4）において報告されている。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】国際公開公報第2008/031532号

【特許文献2】国際公開公報第2006/066912号

【特許文献3】US 5,332,665号

【特許文献4】国際公開公報第2011/048043号

【発明の概要】

【0007】

本明細書において報告される一局面は、マウスから得られた試料中の総ラット抗体、活性ラット抗体、または抗原に結合したラット抗体の濃度を測定するためのイムノアッセイにおける、捕捉抗体およびトレーサー抗体としてのモノクローナル抗体の混合物の使用である。

30

【0008】

本明細書において報告される一局面は、マウス由来の（マウスから得られた）血清または血漿試料中のラット抗体を検出する方法であって、

(a) 分析すべき試料を用意する工程；

(b) 該血清および血漿試料を、ラットIgGに特異的に結合するがマウスIgGには特異的に結合しない抗体（例えばMAR(K+L)またはMRGCOC-1）とインキュベートする工程；

(c) 任意で、該試料を、総ラット抗体、活性ラット抗体、または抗原に結合したラット抗体の選択的検出に適した試薬とインキュベートする工程；ならびに

40

(d) (b)または(c)において形成された複合体を、該試料中の該ラット抗体の濃度と関連づける工程

を含む、方法である。

【0009】

本明細書において報告される一局面は、マウス由来の（マウスから得られた）血清または血漿試料中のラット抗体を検出する方法であって、

(a) 分析すべき試料を用意する工程；

(b) 該血清および血漿試料を、ラットIgGに特異的に結合するがマウスIgGには特異的に結合しない抗体とインキュベートする工程であって、該抗体が、

50

(i) ラット 軽鎖に結合する抗体およびラット 軽鎖に結合する抗体の混合物、または

(ii)  $4.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラットIgG1に結合する抗体、 $8.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラットIgG2aに結合する抗体、 $6.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラットIgG2bに結合する抗体、および $9.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラットIgG2cに結合する抗体の混合物

である、工程；

(c) 任意で、該試料を、総ラット抗体、活性ラット抗体、または抗原に結合したラット抗体の選択的検出に適した試薬とインキュベートする工程；ならびに

(d) (b) または (c) において形成された複合体を、該試料中の該ラット抗体の濃度と関連づける工程

を含む、方法である。

【0010】

本明細書において報告される一局面は、マウス由来の（マウスから得られた）血清または血漿試料中のラット抗体を検出する方法であって、

(a) 該血清または血漿試料を、抗体MAR(K+L)または抗体MRGCOC-1と同じエピトープに結合する抗体とインキュベートする工程；

(b) 任意で、該血清または血漿試料を、総治療抗体、活性治療抗体、または抗原に結合した治療抗体の選択的検出に適した試薬とインキュベートする工程；ならびに

(c) (a) または (b) において形成された複合体を該治療抗体の存在および/または濃度と関連づける工程

を含む、方法である。

【0011】

本明細書において報告される一局面は、マウス由来の（マウスから得られた）血清または血漿試料中のラット抗体を検出する方法であって、

(a) 該血清または血漿試料を、少なくとも2つの異なるエピトープに結合するモノクローナル抗体の混合物である抗体とインキュベートする工程；

(b) 任意で、該血清または血漿試料を、総治療抗体、活性治療抗体、または抗原に結合した治療抗体の選択的検出に適した試薬とインキュベートする工程；ならびに

(c) (a) または (b) において形成された複合体を該治療抗体の存在および/または濃度と関連づける工程

を含む、方法である。

【0012】

本明細書において報告される一局面は、マウス由来の（マウスから得られた）血清または血漿試料中のラット抗体を検出する方法であって、

(a) 該血清または血漿試料を、固相にコンジュゲートされた捕捉抗体とインキュベートし、それにより、捕捉抗体-ラット抗体複合体を形成させる工程；

(b) (a) において形成された複合体をトレーサー抗体とインキュベートし、それにより、(a) において形成された複合体を該ラット抗体の存在または濃度と関連づける工程

を含み、該捕捉抗体が、少なくとも2つの異なるエピトープに結合するモノクローナル抗体の混合物である、方法である。

【0013】

全局面の一態様において、捕捉抗体およびトレーサー抗体は、それぞれ、少なくとも2つの異なるエピトープに結合するモノクローナル抗体の混合物である。

【0014】

全局面の一態様において、捕捉抗体は、抗体MAR(K+L)または抗体MRGCOC-1と同じエピトープに結合するモノクローナル抗体の混合物である。

【0015】

全局面の一態様において、捕捉抗体は、

(i) ラット 軽鎖に結合する抗体およびラット 軽鎖に結合する抗体の混合物、または

10

20

30

40

50

(ii)  $4.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラット IgG1 に結合する抗体、 $8.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラット IgG2a に結合する抗体、 $6.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラット IgG2b に結合する抗体、および  $9.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラット IgG2c に結合する抗体の混合物である。

【0016】

全局面の一態様において、トレーサー抗体は、抗体 MAR(K+L) または抗体 MRGCOC-1 と同じエピトープに結合するモノクローナル抗体の混合物である。

【0017】

全局面の一態様において、トレーサー抗体は、  
(i) ラット 軽鎖に結合する抗体およびラット 軽鎖に結合する抗体の混合物、または  
(ii)  $4.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラット IgG1 に結合する抗体、 $8.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラット IgG2a に結合する抗体、 $6.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラット IgG2b に結合する抗体、および  $9.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラット IgG2c に結合する抗体の混合物である。

【0018】

全局面の一態様において、トレーサー抗体および捕捉抗体は、互いに独立して、抗体 MAR(K+L) または抗体 MRGCOC-1 と同じエピトープに結合するモノクローナル抗体の混合物である。

【0019】

全局面の一態様において、トレーサー抗体および捕捉抗体は、互いに独立して、  
(i) ラット 軽鎖に結合する抗体およびラット 軽鎖に結合する抗体の混合物、または  
(ii)  $4.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラット IgG1 に結合する抗体、 $8.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラット IgG2a に結合する抗体、 $6.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラット IgG2b に結合する抗体、および  $9.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラット IgG2c に結合する抗体の混合物である。

【0020】

本明細書において報告される一局面は、マウスから得られた血清または血漿試料中のラット抗体を検出する方法であって、  
(a) 該血清または血漿試料を、固相にコンジュゲートされた捕捉抗体とインキュベートし、それにより、捕捉抗体-ラット抗体複合体を形成させる工程；  
(b) (a) において形成された複合体をトレーサー抗体とインキュベートし、それにより、(a) において形成された複合体を該ラット抗体の存在または濃度と関連づける工程を含み、該捕捉抗体が、抗体 MAR(K+L) または抗体 MRGCOC-1 と同じエピトープに結合するモノクローナル抗体の混合物である、方法である。

【0021】

本明細書において報告される一局面は、マウス由来の(マウスから得られた)血清または血漿試料中のラット抗体を検出する方法であって、  
(a) 該血清または血漿試料を、固相にコンジュゲートされた捕捉抗体とインキュベートし、それにより、捕捉抗体-ラット抗体複合体を形成させる工程；  
(b) (a) において形成された複合体をトレーサー抗体とインキュベートし、それにより、(a) において形成された複合体を該ラット抗体の存在または濃度と関連づける工程を含み、該捕捉抗体が、  
(i) ラット 軽鎖に結合する抗体およびラット 軽鎖に結合する抗体の混合物、または  
(ii)  $4.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラット IgG1 に結合する抗体、 $8.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラット IgG2a に結合する抗体、 $6.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラット IgG2b に結合する抗体、および  $9.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラット IgG2c に結合する抗体の混合物

10

20

30

40

50

である、方法である。

【 0 0 2 2 】

本明細書において報告される一局面は、マウスから得られた血清または血漿試料中のラット抗体を検出する方法であって、

(a) 該血清または血漿試料を、固相にコンジュゲートされた捕捉抗体とインキュベートし、それにより、捕捉抗体-ラット抗体複合体を形成させる工程；

(b) (a)において形成された複合体をトレーサー抗体とインキュベートし、それにより、(a)において形成された複合体を該ラット抗体の存在または濃度と関連づける工程を含み、該トレーサー抗体が、抗体MAR(K+L)または抗体MRGCOC-1と同じエピトープに結合するモノクローナル抗体の混合物である、方法である。

10

【 0 0 2 3 】

本明細書において報告される一局面は、マウス由来の(マウスから得られた)血清または血漿試料中のラット抗体を検出する方法であって、

(a) 該血清または血漿試料を、固相にコンジュゲートされた捕捉抗体とインキュベートし、それにより、捕捉抗体-ラット抗体複合体を形成させる工程；

(b) (a)において形成された複合体をトレーサー抗体とインキュベートし、それにより、(a)において形成された複合体を該ラット抗体の存在または濃度と関連づける工程を含み、該トレーサー抗体が、

(i) ラット 軽鎖に結合する抗体およびラット 軽鎖に結合する抗体の混合物、または  
(ii)  $4.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG1に結合する抗体、 $8.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG2aに結合する抗体、 $6.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG2bに結合する抗体、および $9.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG2cに結合する抗体の混合物

20

である、方法である。

【 0 0 2 4 】

全局面の一態様において、方法は、抗原ブリッジングイムノアッセイである。

【 0 0 2 5 】

一態様において、イムノアッセイは、サンドイッチイムノアッセイである。

【 0 0 2 6 】

本明細書において報告される一局面は、捕捉抗体およびトレーサー抗体を含む抗原ブリッジングイムノアッセイを使用して、マウスから得られた試料中のラット抗体を免疫学的に決定する方法であって、該捕捉抗体およびトレーサー抗体が、いずれも独立して、抗体MAR(K+L)または抗体MRGCOC-1と同じエピトープに結合する抗体から選択される、方法である。

30

【 0 0 2 7 】

本明細書において報告される一局面は、捕捉抗体およびトレーサー抗体を含む抗原ブリッジングイムノアッセイを使用して、マウス由来(マウスから得られた)試料中のラット抗体を免疫学的に決定する方法であって、該捕捉抗体およびトレーサー抗体が、いずれも独立して、

(i) ラット 軽鎖に結合する抗体およびラット 軽鎖に結合する抗体の混合物、または  
(ii)  $4.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG1に結合する抗体、 $8.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG2aに結合する抗体、 $6.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG2bに結合する抗体、および $9.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG2cに結合する抗体の混合物

40

から選択される、方法である。

【 0 0 2 8 】

一態様において、抗体のその結合パートナーに対する結合は、N末端および/または -アミノ基(リジン)、異なるリジンの -アミノ基、抗体のアミノ酸骨格のカルボキシ-、スルフヒドリル-、ヒドロキシル-、および/またはフェノール官能基、ならびに/または抗体の糖鎖構造の糖アルコール基を介する化学結合によって行われる。

50

## 【0029】

一態様において、捕捉抗体は、特異的結合対を介して固定化される。一態様において、捕捉抗体はビオチンにコンジュゲートされており、固定化は、固定化されたアビジンまたはストレプトアビジンを介して行われる。

## 【0030】

一態様において、トレーサー抗体は、特異的結合対を介して検出可能な標識にコンジュゲートされる。一態様において、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ており、検出可能な標識への結合は、ジゴキシゲニンに対する抗体を介して行われる。

## 【0031】

全局面の別の態様において、ラット抗体はFabである。

10

## 【0032】

全局面の一態様において、ラット抗体はモノクローナル抗体である。

## 【0033】

一態様において、総治療抗体が検出され、別の場合に、活性治療抗体が検出され、さらなる場合に、その抗原に結合した治療抗体が検出される。

## 【0034】

本明細書において報告される一局面は、マウスから得られた試料中の総ラット抗体、活性ラット抗体、または抗原に結合したラット抗体の濃度を決定するための、ラット抗体に特異的に結合するがマウスのイムノグロブリンには結合しない抗体の使用であって、該抗体が抗体MAR(K+L)または抗体MRGCOC-1と同じエピトープに結合する、使用である。

20

## 【0035】

本明細書において報告される一局面は、マウスから得られた試料中の総ラット抗体、活性ラット抗体、または抗原に結合したラット抗体の濃度を決定するための、ラット抗体に特異的に結合するがマウスのイムノグロブリンには結合しない抗体の使用であって、該抗体が、

(i) ラット 軽鎖に結合する抗体およびラット 軽鎖に結合する抗体の混合物、または  
(ii)  $4.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラットIgG1に結合する抗体、 $8.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラットIgG2aに結合する抗体、 $6.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラットIgG2bに結合する抗体、および $9.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラットIgG2cに結合する抗体の混合物

30

である、使用である。

## 【0036】

本明細書において報告される一局面は、マウスから得られた血清または血漿試料中の総ラット抗体、活性ラット抗体、または抗原に結合したラット抗体の濃度を測定するためのイムノアッセイにおける、捕捉抗体としての、ラット抗体の少なくとも2つの異なるエピトープに結合するモノクローナル抗体の混合物の使用である。

## 【0037】

本明細書において報告される一局面は、マウスから得られた血清または血漿試料中の総ラット抗体、活性ラット抗体、または抗原に結合したラット抗体の濃度を測定するためのイムノアッセイにおける、捕捉抗体およびトレーサー抗体としての、ラット抗体の少なくとも2つの異なるエピトープに結合するモノクローナル抗体の混合物の使用である。

40

## [本発明1001]

マウスから得られた血清または血漿試料中のラット抗体を検出する方法であって、  
(a) 該血清または血漿試料を、少なくとも2つの異なるエピトープに結合するモノクローナル抗体の混合物である抗体とインキュベートする工程；  
(b) 任意で、該血清または血漿試料を、総治療抗体、活性治療抗体、または抗原に結合した治療抗体の選択的検出に適した試薬とインキュベートする工程；ならびに  
(c) (a) または (b) において形成された複合体を、該治療抗体の存在および/または濃度と関連づける工程  
を含む、方法。

50

[本発明1002]

マウスから得られた血清または血漿試料中のラット抗体を検出する方法であって、  
(a) 該血清または血漿試料を、固相にコンジュゲートされた捕捉抗体とインキュベートし、それにより、捕捉抗体-ラット抗体複合体を形成させる工程；  
(b) (a)において形成された複合体をトレーサー抗体とインキュベートし、それにより、(a)において形成された複合体を該ラット抗体の存在または濃度と関連づける工程を含み、該捕捉抗体が、少なくとも2つの異なるエピトープに結合するモノクローナル抗体の混合物である、方法。

[本発明1003]

マウスから得られた血清または血漿試料中のラット抗体を検出する方法であって、  
(a) 該血清または血漿試料を、固相にコンジュゲートされた捕捉抗体とインキュベートし、それにより、捕捉抗体-ラット抗体複合体を形成させる工程；  
(b) (a)において形成された複合体をトレーサー抗体とインキュベートし、それにより、(a)において形成された複合体を該ラット抗体の存在または濃度と関連づける工程を含み、該トレーサー抗体が、少なくとも2つの異なるエピトープに結合するモノクローナル抗体の混合物である、方法。

10

[本発明1004]

前記混合物が、  
(i) ラット 軽鎖に結合する抗体およびラット 軽鎖に結合する抗体の混合物、または  
(ii)  $4.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG1に結合する抗体、 $8.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG2aに結合する抗体、 $6.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG2bに結合する抗体、および $9.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG2cに結合する抗体の混合物  
であることを特徴とする、本発明1001～1003のいずれかの方法。

20

[本発明1005]

前記トレーサー抗体が、  
(i) ラット 軽鎖に結合する抗体およびラット 軽鎖に結合する抗体の混合物、または  
(ii)  $4.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG1に結合する抗体、 $8.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG2aに結合する抗体、 $6.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG2bに結合する抗体、および $9.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG2cに結合する抗体の混合物  
であることを特徴とする、本発明1002または1004の方法。

30

[本発明1006]

前記トレーサー抗体および前記捕捉抗体が、互いに独立して、  
(i) ラット 軽鎖に結合する抗体およびラット 軽鎖に結合する抗体の混合物、または  
(ii)  $4.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG1に結合する抗体、 $8.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG2aに結合する抗体、 $6.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG2bに結合する抗体、および $9.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG2cに結合する抗体の混合物  
であることを特徴とする、本発明1003または1004の方法。

40

[本発明1007]

抗原ブリッジングイムノアッセイであることを特徴とする、本発明1001～1006のいずれかの方法。

[本発明1008]

前記イムノアッセイがサンドイッチイムノアッセイであることを特徴とする、本発明1007の方法。

[本発明1009]

前記捕捉抗体が、ビオチンにコンジュゲートされており、かつ、固定化されたアビジンまたはストレプトアビジンを介して固定化されることを特徴とする、本発明1002～1008のいずれかの方法。

50

[本発明1010]

前記トレーサー抗体が、ジゴキシゲニンにコンジュゲートされており、かつ、ジゴキシゲニンに対する抗体を介して検出可能な標識に結合されることを特徴とする、本発明1002~1009のいずれかの方法。

[本発明1011]

前記ラット抗体がFabであることを特徴とする、本発明1001~1010のいずれかの方法。

[本発明1012]

マウスから得られた血清または血漿試料中の総ラット抗体、活性ラット抗体、または抗原に結合したラット抗体の濃度を測定するためのイムノアッセイにおける、捕捉抗体としての、ラット抗体の少なくとも2つの異なるエピトープに結合するモノクローナル抗体の混合物の使用。

10

[本発明1013]

マウスから得られた血清または血漿試料中の総ラット抗体、活性ラット抗体、または抗原に結合したラット抗体の濃度を測定するためのイムノアッセイにおける、捕捉抗体およびトレーサー抗体のそれぞれとしての、ラット抗体の少なくとも2つの異なるエピトープに結合するモノクローナル抗体の混合物の使用。

[本発明1014]

マウスから得られた血清または血漿試料中の総ラット抗体、活性ラット抗体、または抗原に結合したラット抗体の濃度を測定するための、ラット抗体に結合するがマウスのイムノグロブリンには結合しない抗体の使用であって、該抗体が、

20

(i) ラット 軽鎖に結合する抗体およびラット 軽鎖に結合する抗体の混合物、または (ii)  $4.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラットIgG1に結合する抗体、 $8.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラットIgG2aに結合する抗体、 $6.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラットIgG2bに結合する抗体、および $9.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上のアビディティでラットIgG2cに結合する抗体の混合物

である、使用。

【発明を実施するための形態】【0038】発明の詳細な説明

「ラット抗体」なる用語は、各抗原による免疫後のラットに由来する抗体を意味する。ラット抗体は「治療抗体」であるように修飾され得、ここで、「治療抗体」とは、ヒト治療としての承認のために臨床試験で試験されることを意図されたものであり、疾患の治療のために個体に投与され得るものである。一態様において、ラット抗体はモノクローナル抗体である。治療抗体は、腫瘍性疾患（例えば、非ホジキンリンパ腫、乳癌、および結腸直腸癌を含む、血液学的悪性腫瘍および固形悪性腫瘍）、免疫疾患、中枢神経疾患、血管疾患、または感染性疾患などの様々な疾患の治療のために広く使用されている。そのような抗体は、例えば、CD20、CD22、HLA-DR、CD33、CD52、EGFR、G250、GD3、HER2、PSMA、CD56、VEGF、VEGF2、CEA、ルイスY抗原、IL-6受容体（IL6R）、またはIGF-1受容体（IGF1R）に対する抗体である。

30

【0039】

「抗体」なる用語は、抗体全体および抗体断片を含む、様々な形態の抗体構造を含む。抗体の遺伝子操作は、例えば、Morrison, S.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; US 5,202,238号およびUS 5,204,244号; Riechmann, L. et al., Nature 332 (1988) 323-327; Neuberger, M.S. et al., Nature 314 (1985) 268-270; Lonberg, N., Nat. Biotechnol. 23 (2005) 1117-1125に記載されている。

40

【0040】

本明細書において使用される「モノクローナル抗体」なる用語は、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体を指し、すなわち、当該集団を構成する個々の抗体は、わずかな量で存在する可能性のある天然に生じる変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原部位に対するものである。さらに、異なる抗原部位（決

50

定基またはエピトープ)に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体の調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の抗原部位に対するものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の抗体による混入無しで合成され得るという利点がある。「モノクローナル」という修飾語句は、実質的に均質な抗体集団から得られたという抗体の特徴を示すものであり、抗体を何らかの特定の方法によって生産しなければならないと解釈されるものではない。

【0041】

本明細書において使用される「モノクローナル抗体の混合物」なる用語は、各々が同じ抗原の異なるエピトープに結合する2種以上の異なるモノクローナル抗体からなる抗体組成物を意味する。一態様において、当該混合物は、同じ抗原の2種以上の異なるエピトープに結合する抗体を含む。一態様において、当該混合物は、同じ抗原の2~10種の異なるエピトープに結合する抗体を含む。一態様において、当該混合物は、同じ抗原の2~4種の異なるエピトープに結合する抗体を含む。

10

【0042】

「試料」なる用語は、実験動物から採取された任意の組織または液体試料を意味する。一態様において、試料は、唾液、尿、全血、血漿、または血清などの液体試料である。さらなる態様において、試料は、全血、血漿、または血清である。

【0043】

「ラット抗体に結合するがマウスの抗体には結合しない抗体」は、少なくとも $10^{-9}$  mol/lの解離定数(= $K_{Diss}$ )でラット抗体に結合する。一態様において、 $K_{Diss}$ は、少なくとも $10^{-10}$  mol/lである。同時に、マウスの抗体に結合しないという特性は、 $10^{-7}$  mol/l以下の $K_{Diss}$ によって保証される。一態様において、ラット抗体に結合するがマウスの抗体には結合しない抗体は、マウスのクラスGのイムノグロブリンに対するその反応性とラットのクラスGのイムノグロブリンに対するその反応性の間の $K_{Diss}$ の差が少なくとも100倍である。

20

【0044】

概して、「に結合する」なる用語は、抗体が、その抗原または対応する抗体受容体に、(それぞれの状況のいずれであっても) $10^{-9}$  mol/l以下の解離定数(= $K_D=K_{Diss}$ )で結合することを意味し、別の態様においては、少なくとも $10^{-10}$  mol/lの $K_D$ で結合することを意味する。同時に、結合しないという特性は、 $10^{-7}$  mol/l以上(例えば $10^{-5}$  mol/l)の $K_D$ によって保証される。また一態様において、第一の抗体に結合するが第二の抗体には結合しない抗体は、第一のクラスGのイムノグロブリンに対するその反応性と第二のクラスGのイムノグロブリンに対するその反応性の間の $K_D$ の差が少なくとも100倍である。

30

【0045】

一態様において、抗体の結合特性、特に $K_{Diss}$ は、BIAcore(登録商標)装置上の表面プラズモン共鳴によって評価される。この方法において、結合特性は、表面プラズモン共鳴(SPR)の変化によって評価される。研究において、抗体を固相(チップと呼ばれる)に結合させて、このコーティングされたチップへのモノクローナル抗体の結合、ポリクローナル抗体の結合、またはさらにはIgGを含む血清の結合を評価することは、都合がよい。

【0046】

マウスにおけるラット抗体の利用に関する様々な局面が、評価される必要がある場合がある。特定の設定において、存在するラット抗体の総量を分析することが関係する場合があり、またはラット抗体の特定の断片、ラット抗体の特定の修飾、抗原に結合したラット抗体の濃度、もしくは抗原に依然として結合可能なラット抗体のフラクションを分析することが重要である場合がある。一態様において、本明細書において報告される抗体および方法は、マウスにおいて総ラット抗体、活性ラット抗体、または抗原に結合したラット抗体を検出するために使用され得る。

40

【0047】

「総抗体」なる用語は、抗体が活性であるか(すなわち、その抗原と依然として反応性を有するか)、不活性であるか、および/または抗原に結合しているかに関わらず、検出

50

される任意の抗体を意味する。

【0048】

「活性抗体」なる用語は、マウス内に存在する、その抗原に依然として結合可能なラット抗体を意味する。例えば、そのような抗体は、その抗原結合部位で、その抗原または他の分子に結合していない。

【0049】

「抗原に結合した抗体」なる用語は、マウスの循環血中に存在する、その抗原に結合したラット抗体を意味する。

【0050】

先に定義されたような、総（ラット）抗体、活性（ラット）抗体、または抗原に結合した（ラット）抗体は、本明細書において報告される方法において、抗体によって直接的に検出され得る。加えて、抗薬物抗体、抗イディオタイプ抗体、または特に抗薬物中和抗体（例えば、内因性の抗薬物抗体（ADA））によって結合されたラット抗体などの、他の形態の非活性ラット抗体を検出することが可能である。

【0051】

さらに、任意の「不活性抗体」を間接的に評価することも可能である。そのような不活性（ラット）抗体は、例えば、その抗原に結合したラット抗体、交差反応性抗原に結合したラット抗体、またはラット抗体に対する自己抗体もしくは抗イディオタイプ抗体によってブロックされたラット抗体であり得る。総抗体の量が活性抗体と抗原に結合した抗体の和よりも多い場合、その対応する抗原に結合していない不活性抗体を含むさらなる抗体フラクションが存在することになる。

【0052】

例えば、総（ラット）抗体は、いわゆる競合イムノアッセイシステムまたはいわゆるサンドイッチ型アッセイシステムにおいて検出され得る。そのようなアッセイは、洗浄工程無しの一態様（均一系イムノアッセイ）または洗浄工程有りの別の態様（不均一系イムノアッセイ）において実施され得る。

【0053】

一態様において、総（ラット）抗体は、サンドイッチ型イムノアッセイ法において検出され、ラット抗体に結合するがマウスの抗体には結合しない抗体が、そのようなサンドイッチアッセイの両側で使用される。そのようなサンドイッチの一方の側で使用される抗体は、固相に結合されるかまたは結合可能であり（しばしば捕捉抗体と呼ばれる）、一方、そのようなサンドイッチの他方の側での抗体は、直接的検出または間接的検出が促進されるような方式で標識される（いわゆるトレーサーまたは検出抗体）。そのようなサンドイッチアッセイ手法において結合したトレーサー/検出抗体の量は、調査される試料中のラット抗体の量と直接的に関連づけられる。

【0054】

試料中の活性（ラット）抗体の検出は、都合の良い現状技術の手法によって達成され得る。しかしながら、総（ラット）抗体の検出またはその抗原に結合した（ラット）抗体のフラクションの検出は幾分複雑であり、全く異なるアッセイ設計を必要とし、特に、それぞれの異なるアッセイに対してオーダーメイドの試薬を必要とする。本明細書において報告するラット抗体に結合するがマウスの抗体には結合しない抗体によって、活性ラット抗体、総ラット抗体、または抗原に結合したラット抗体のフラクションを、互いに類似する試験システムにおいて評価することが可能である。総ラット抗体、活性ラット抗体、または抗原に結合したラット抗体のこの種の比較評価は、一旦、治療抗体のこれらの様々なフラクションの間で定量比較が行われると、有利である。

【0055】

一態様において、活性（ラット）抗体を検出するために、サンドイッチ型アッセイフォーマットが設計される。さらなる態様において、ラット抗体に結合するがマウスの抗体には結合しない抗体が捕捉抗体として使用され、そのようなサンドイッチアッセイの検出側は、標識された形態の抗原を使用するか、または抗原の結合後、ラット抗体によって認識

10

20

30

40

50

されるエピトープに結合しないかもしくは該エピトープと競合しない第二の抗体を使用するかのいずれかであり、該第二の抗体は、特異的に検出可能であり、かつ/または直接的検出もしくは間接的検出が促進されるような方式で標識される。

**【0056】**

一態様において、抗原に結合した(ラット)抗体が、ラット抗体に結合するがマウスの抗体には結合しない抗体を捕捉試薬として使用するサンドイッチ型アッセイフォーマットにおいて検出される。一態様における検出において、第二の抗体は、ラット抗体のエピトープと競合しないエピトープで抗原に結合するものが使用される。一態様において、第二の抗体は、直接検出または間接的検出が促進されるような方式で標識される。

**【0057】**

直接的検出のために、標識基は、任意の公知の検出可能なマーカー基、例えば、色素、化学発光基などの発光標識基(例えば、アクリジニウムエステルまたはジオキセタン)、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)から選択され得る。標識基の他の例は、ルテニウム複合体またはユーロピウム複合体などの発光金属複合体、酵素(例えば、ELISAまたはCEDIA(Cloned Enzyme Donor Immunoassay)のために使用されるものとして)、および放射性同位体である。一態様において、電気化学発光によって検出され得る金属キレートもまた、ルテニウムキレートに与えられる特定の傾向を伴う検出可能標識として使用されるシグナル放出基である。一態様において、標識基は、ルテニウム(ビスピリジル)<sub>3</sub><sup>2+</sup>キレートである。

**【0058】**

間接的検出システムは、例えば、検出試薬(例えば、トレーサー/検出抗体)が結合対の第一のパートナーで標識されることを含む。適した結合対の例には、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)がある。一態様において、第一の結合対メンバーは、ハプテン、抗原、およびホルモンから選択される。一態様において、ハプテンは、ジゴキシンおよびビオチン、ならびにそれらの類似体から選択される。そのような結合対の第二のパートナー(例えば、抗体、ストレプトアビジンなど)は、通常、例えば上述の標識によって、直接的検出を可能にするように標識される。

**【0059】**

上述の免疫学的検出法の全てにおいて、使用される試薬の結合を可能にする(例えば、抗体とその対応する抗原との結合を可能にする)試薬条件が選択される。そのような結合事象の結果物を、当業者は複合体なる用語を用いて呼ぶ。本明細書において報告されるアッセイ法において形成された複合体は、現状技術の手法によって、治療抗体の対応する濃度と関連づけられる。そのような関連づけは、例えば、当該複合体を、本明細書において報告する方法による対応する複合体の希釈系列にて調製および決定し、ならびに得られた結果を個々の複合体構成要素の濃度と関連づけることによって、実施することができる。この関連づけ工程は、使用される検出試薬に応じて、総治療抗体、活性治療抗体、または抗原に結合した治療抗体の濃度をもたらす。

**【0060】**

当業者は、本明細書において報告される方法が、総(ラット)抗体、抗原に結合した(ラット)抗体、活性(ラット)抗体、またはさらに不活性(ラット)抗体の濃度を明らかにするだけではないことを認識するであろう。1つの同じ試薬(ラット抗体に結合するがマウスの抗体には結合しない抗体)を異なるアッセイ法において使用するため、得られる値は互いに容易に比較され得、さらにその割合も評価され得る。さらなる態様において、本方法は、総(ラット)抗体に対する活性(ラット)抗体の割合に関する。この割合は、(ラット)抗体の有効性の指標として有用であり得る。

**【0061】**

同じまたは重複するエピトープへの結合を決定するために、例えば、同じ標的抗原に結合する2つの抗体のエピトープの重複を競合試験システムを用いて決定する方法が使用され得る。この目的のために、例えば、酵素免疫アッセイを用いて、固定化された標的抗原への結合について問題の抗体と公知の抗体とが競合する程度が、例えば本明細書において報告される細胞系の1つによって産生される抗体を使用して試験される。この目的のために、適切に固定化された標的抗原は、公知の抗体（標識化形態）および問題の抗体（過剰量）と共にインキュベートされる。結合標識を検出することにより、公知の抗体の結合が問題の抗体に置き換えられる程度を容易に確認することができる。濃度が同じ場合に20%を超える置き換え、別の態様では30%を超える置き換えがある場合、または濃度がより高い場合（一態様において、公知の抗体を基準として問題の抗体が $10^3 \sim 10^5$ 倍過剰である場合）に70%を超える置き換え、別の態様では80%を超える置き換えがある場合に、エピトープの重複が存在し、両抗体は同じエピトープの同じまたは重複する部分に結合する。

#### 【0062】

抗体の特異性は、各抗体のビオチン化バリエーションおよびジゴキシゲニン化バリエーションの両方と、異なる種に由来する血清とを使用するサンドイッチ-ELISAにおいて示され得る。マウス血清中のラットIgGの検出および定量化のための汎用的なアッセイとするためには、そのようなアッセイは、任意の第二の抗体修飾（例えば、グリコシル化または脱アミド化）から独立した結合部位を有する抗ラットIgG抗体を必要とする。他の場合には、検出および定量化される新規の各ラット抗体に対してアッセイを最適化することが必要とされる。

#### 【0063】

抗体の特異性はまた、BIAcore技術を用いる表面プラズモン共鳴実験において示され得る。

#### 【0064】

本明細書において報告される一局面は、捕捉抗体としてのモノクローナル抗体のビオチン化混合物およびトレーサー抗体としてのモノクローナル抗体のジゴキシゲニン化混合物を含む、マウスから得られた試料中のラット抗体またはFab断片などのその誘導体を定量化するためのアッセイである。抗体MARGCOC-1または抗体MRGCOC-1（これらの名称は互換的に利用され得る）は、 $4.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG1に結合する抗体、 $8.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG2aに結合する抗体、 $6.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG2bに結合する抗体、および $9.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上のアビディティでラットIgG2cに結合する抗体の混合物である。

#### 【0065】

抗体MAR(K+L)は、ラット 軽鎖に結合する抗体およびラット 軽鎖に結合する抗体の混合物である。

#### 【0066】

「アフィニティ」は、分子（例えば抗体）の単一の結合部位とその結合パートナー（例えば抗原）との間の非共有相互作用の強さの合計を指す。別に示されない限り、本明細書において使用される限りでは、「結合アフィニティ」は、結合対のメンバー（例えば、抗体と抗原）間の1:1相互作用を反映する固有の結合アフィニティを指す。分子XのそのパートナーYに対するアフィニティは、一般的に、解離定数によって（同様に、KdまたはKDまたは平衡定数によって）示され得る。アフィニティは、当技術分野に公知の一般的方法によって測定され得る。

#### 【0067】

「アビディティ」は、抗原-抗体相互作用などの個々の非共有結合相互作用の複数のアフィニティの累積された強さを指す。したがって、アビディティは、抗原-抗体複合体の全体の強さのための尺度を提供する。

#### 【0068】

本明細書において報告される一局面は、ラットIgGの異なるドメイン上のエピトープに特異的に結合する捕捉抗体およびトレーサー抗体を含むアッセイである。このアッセイに

10

20

30

40

50

において、インタクトなラット抗体のみが、陽性のアッセイ結果および検出可能なシグナルを生じさせる。一態様において、捕捉抗体およびトレーサー抗体は、独立して、本明細書において報告される抗体から選択される。

【0069】

本明細書において報告される一局面は、参照標準および/または陽性対照（抗薬物抗体（ADA）を模倣する）として抗ラットIgG抗体を使用するアッセイである。これは、最適なアッセイ条件を見出し、該アッセイのロバスト性を試験するため、すなわち、異なる標準試薬/陽性対照を用いてアッセイ能力を確認するためのアッセイを開発する際に有用であり得る。特に、ADAがポリクローナルであり、恐らくFab断片およびFc部分の両方に対するものであるという事実を考慮すると、この設計は特に有利である。

10

【0070】

本明細書において報告される一局面は、マウスから得られた試料中の総ラット抗体、活性ラット抗体、または抗原に結合したラット抗体の濃度を測定するための、ラット抗体に結合するがマウスの抗体には結合しない抗体の使用に関する。

【0071】

本明細書において報告される一局面は、マウスから得られた試料中の総ラット抗体、活性ラット抗体、または抗原に結合したラット抗体の濃度を測定するための、両方がラット抗体に結合するがマウスの抗体には結合しない2つの抗体の使用であって、当該抗体のうち1つが捕捉抗体であり、当該抗体のうち1つがトレーサー抗体である、使用に関する。一態様において、ラット抗体はFab断片である。

20

【0072】

本明細書において報告される方法においてはまた、完全抗体、F(ab')<sub>2</sub>断片、Fab断片、またはさらに単一鎖抗体などの異なる捕捉分子が使用され得る。

【0073】

本明細書において報告される方法は、国際公開公報第2005/023872号（参照によって本明細書に組み入れられる）において報告されているように、IL-1R受容体に対する抗体（抗IL1R抗体）に対する抗体によって例示される。

【0074】

以下の実施例および図面は、本発明を理解する助けとなるように提供されるが、真の範囲は特許請求の範囲に記載されている。本発明の精神から逸脱することなく、記載された手法において改変が行われ得ることが理解される。

30

【図面の簡単な説明】

【0075】

【図1】異なる抗ラットIgG抗体と幾つかの動物種の血清との反応性；左のバー：MAR(K+L)、右のバー：Pab抗ラット-HRP（Cell Signaling Technology）。

【図2】本明細書において報告される方法を使用した、総治療抗体の定量化のための例示的なSA-MTP ELISAの概略アッセイ設計。

【図3】総治療抗体の定量化についての、モノクローナル抗体の混合物の例としてのMARGCOC-1およびMAR(K+L)の、ポリクローナル抗体との比較；上の曲線（三角）：Pab抗ラットIgG-HRP（Cell Signaling Technology）；下の曲線（菱形）：MAR(K+L)。

40

【実施例】

【0076】

実施例1

MTP ELISAにおける異なる抗ラットIgG抗体と幾つかの動物種の血清との反応性

マイクロタイタープレート（MTP）（Maxisorb（登録商標）、Nunc）を、室温（RT）で1時間、リン酸緩衝食塩水で10%に希釈した異なる種の血清でそれぞれコーティングした。ラット、マウス、ウサギ、カニクイザル、ハムスター、およびモルモット由来の血清を使用した。PBS-Tween（登録商標）20で3回洗浄した後、MTPの全てのウェルを、室温で1時間、PBS/3%BSAでブロックした。その後、MTPのウェルを異なる抗ラットIgG抗体（ジゴキシゲニン・コンジュゲートまたは西洋ワサビペルオキシダーゼ・コンジュゲート（HRP）

50

(POD))とインキュベートした(1h; RT)。抗ラット抗体は、対応する製造業者によって推奨されるように使用した。

【0077】

ウェルを上記のように3回洗浄した。PODコンジュゲートとインキュベートされたウェルは、結合した抗ラットイムノグロブリンの酵素反応/検出のために、直接的に処理した。他のウェルは、抗DIGコンジュゲートと適切にインキュベートし(1h; RT)(全ての試薬はRoche Diagnostics, Germany由来)、その後、洗浄工程を行った。PODコンジュゲートに含まれるPODは、ABTS基質の呈色反応を触媒する。シグナルを405 nmの波長(参照波長: 490 nm)でELISAリーダーによって測定した(図1参照)。全ての抗ラットIgG抗体について、ラット抗体に対するシグナルの、他の血清のシグナルに対する割合を算出した。これらの値を抗ラットIgG抗体の特異性の評価のために使用した。高い割合は、ラットイムノグロブリンとの強い反応性と言い換えられ、同時に、他の種に由来するイムノグロブリンとの低い(交差)反応性と言い換えられる(以下の表を参照のこと)。

【0078】

(表)

	MAR(K+L)-DIG		pAb抗ラットHRP -	
	シグナル [OD405nm]	シグナル 割合 ラット/ 他の種	シグナル [OD405nm]	シグナル 割合 ラット/ 他の種
ラット血清	3.074	1.0	2.292	1.0
マウス血清	0.061	50.8	0.261	8.8
ウサギ血清	0.062	50.0	0.099	23.3
ハムスター血清	0.055	56.4	0.470	4.9
モルモット血清	0.094	32.9	0.266	8.6
カニクイザル血清	0.074	41.8	0.279	8.2

【0079】

実施例2

総治療抗体の定量化のための捕捉抗体およびトレーサー抗体としてのモノクローナル抗体の混合物の使用

第一の工程において、(異なるエピトープに結合する4種のモノクローナル抗体を含む混合物の例として)ピオチン化MARGCOC-1を、ストレプトアビジンでコーティングされたマイクロタイタープレート(SA-MTP)に結合させた。余分な未結合抗体を洗浄によって除去した。その後、試料/標準物質(例えば、マウス血清中にスパイクされたラット抗CD47抗体)を添加し、1時間インキュベートした。洗浄後、ウェルを(異なるエピトープに結合する2種のモノクローナル抗体を含む混合物の例として)ジゴキシゲニン化MAR(K+L)またはHRP標識化pAb抗ラットIgG(Cell Signaling Technology)とインキュベートした。洗浄後、結合したジゴキシゲニン化MAR(K+L)を、抗ジゴキシゲニン抗体HRP複合体により検出した。抗体-酵素複合体のHRPは、ABTS基質の呈色反応を触媒する。シグナルは、405 nm波長(参照波長: 490 nm)でELISAリーダーによって測定される(図3参照)。各血清試料の吸光度値を三回、決定した。

【0080】

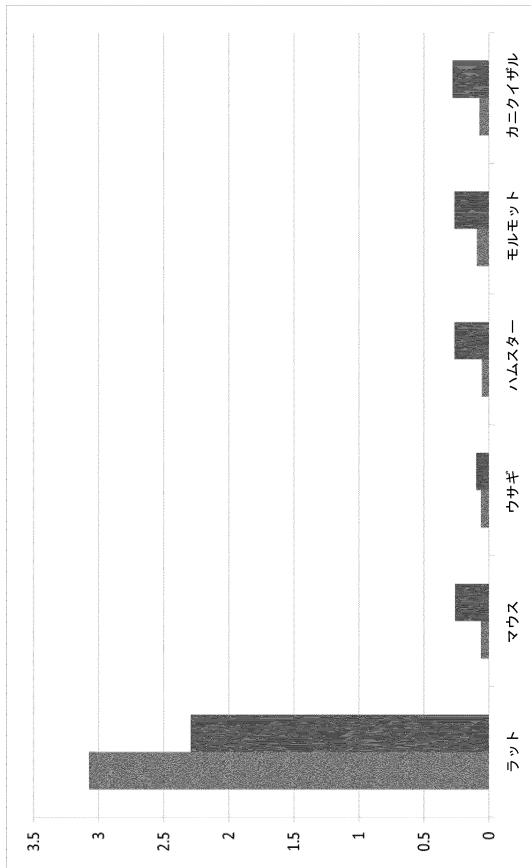
実施例3

総治療抗体の定量化のための捕捉抗体およびトレーサー抗体としてのモノクローナル抗体の同じ混合物の使用

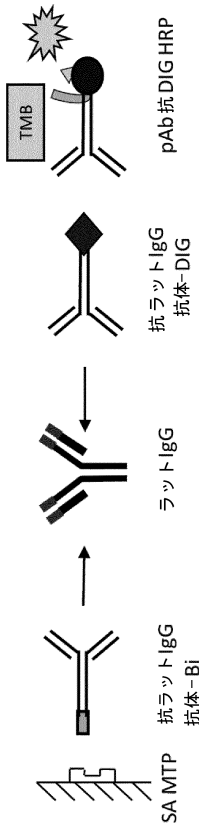
第一の工程において、マイクロタイタープレート(MTP)(Maxisorb(登録商標)、Nunc)を、10 µg/mlのMAR(K+L)およびPab抗ラットIgG(Molecular Probes # A10536)でコーティングした。過剰な未結合抗体を洗浄によって除去した。その後、試料/標準物質(例

えば、マウス血清中にスパイクされ緩衝液で希釈されたmAb抗CD47ラットIgG)を添加し、1時間インキュベートした。洗浄後、ウェルをジゴキシゲニン化MAR(K+L)またはHRP標識化Pab抗ラットIgG (Molecular Probes # A10549)とインキュベートした。洗浄後、結合したジゴキシゲニン化MAR(K+L)を、抗ジゴキシゲニン抗体HRP複合体により検出した。他の検出抗体は既にHRP標識を有していたため、基質インキュベーションの前に第二の検出抗体は必要とされなかった。抗体-酵素複合体のHRPは、ABTS基質の呈色反応を触媒する。シグナルは、405 nm波長(参照波長:490 nm)でELISAリーダーによって測定される。各血清試料の吸光度値を三回、決定した。

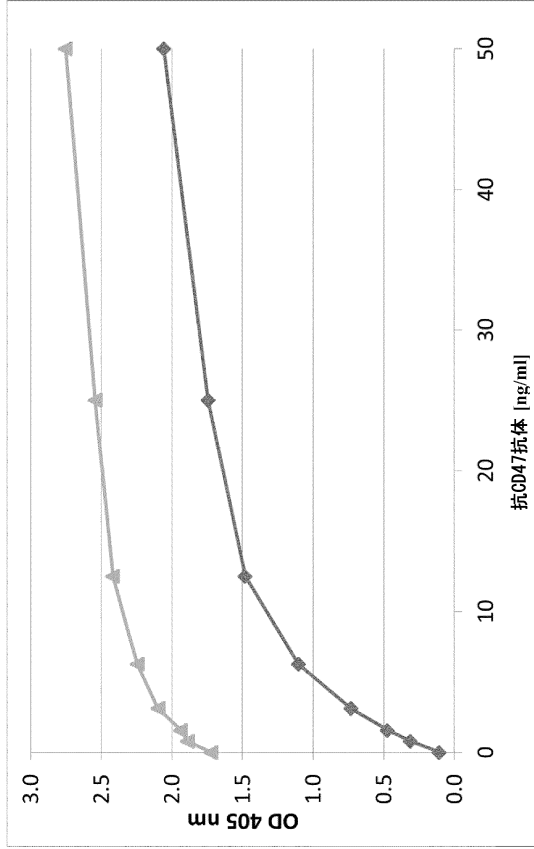
【図1】



【図2】



【 図 3 】



## フロントページの続き

- (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 スタベンラッチ ケイ - グンナー  
ドイツ連邦共和国 ペンツベルク パークストラッセ 1 エー .
- (72)発明者 ウェセルス ウベ  
ドイツ連邦共和国 ペンツベルク シンデルスドルファー ストラッセ 6 0 エフ

審査官 北条 弥作子

- (56)参考文献 特開 2 0 1 1 - 0 3 9 0 7 2 ( J P , A )  
特開平 1 1 - 1 8 0 8 9 3 ( J P , A )  
特開昭 6 2 - 2 5 7 3 9 5 ( J P , A )  
特表 2 0 1 3 - 5 0 8 7 0 0 ( J P , A )  
特表平 0 7 - 5 0 2 0 1 9 ( J P , A )  
特表 2 0 1 2 - 5 2 6 8 4 6 ( J P , A )  
HANSEN R J , An ELISA for quantification of murine IgG in rat plasma: application to the pharmacokinetic characterization of AP-3, a murine anti-glycoprotein IIIa monoclonal antibody, in the rat , J Pharm Biomed Anal , 1 9 9 9 年 1 2 月 , Vol.21 No.5 , Page.1011-1016  
小室勝利 , 感染症の予防、治療、臨床免疫 , 1 9 8 6 年 , Vol.18 Suppl.10 , Page.193-201  
佐藤義一 , スンクス I g G に対するポリクローナル抗体ならびにモノクローナル抗体の作製 , 重井医学年報 , 2 0 1 0 年 , Vol.32 , Page.3-13

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

专利名称(译)	特异性检测小鼠血清中的大鼠抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP6561043B2</a>	公开(公告)日	2019-08-14
申请号	JP2016503644	申请日	2014-03-19
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
当前申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	スタベンラッチケイグナー ウエセルスウベ		
发明人	スタベンラッチ ケイ-グナー ウエセルス ウベ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 C07K16/42		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/6803 G01N33/6854 G01N33/686 G01N33/94		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/53.U G01N33/543.501.A C07K16/42		
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		
审查员(译)	北条Yasakuko		
优先权	2013160143 2013-03-20 EP		
其他公开文献	JP2016514831A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本文报道的一个方面是用于检测来自小鼠的血清或血浆样品(获得)中的大鼠抗体的方法,包括以下步骤:a)提供待分析的样品,b)将所述血清或血浆样品与抗体一起孵育。特异性结合大鼠IgG并且不与小鼠IgG特异性结合,其中抗体是i)结合大鼠κ轻链的抗体和结合大鼠λ轻链的抗体的混合物,或ii)抗体的混合物结合大鼠IgG1,亲和力为 $4.1 \times 10^{10} M^{-1}$ 或更高,抗体结合大鼠IgG2a,亲和力为 $8.6 \times 10^9 M^{-1}$ 或更高,抗体结合大鼠IgG2b,亲和力为 $6.4 \times 10^{10} M^{-1}$ 或更高的抗体与大鼠IgG2c结合,亲和力为 $9.5 \times 10^{10} M^{-1}$ 或更高,c)任选地将所述样品与适于选择性检测总抗体,活性或抗原结合的大鼠抗体的试剂一起温育,和d)将(b)或(c)中形成的复合物与浓度相关联在样品中测定大鼠抗体。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6561043号 (P6561043)
(45) 発行日 令和1年8月14日(2019.8.14)	(24) 登録日 令和1年7月26日(2019.7.26)	
(51) Int. Cl.	F I	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 N	
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/53 U	
C O 7 K 16/42 (2006.01)	G O 1 N 33/543 S O 1 A	
	C O 7 K 16/42	
請求項の数 12 (全 19 頁)		
(21) 出願番号 特願2016-503644(P2016-503644)	(73) 特許権者 581003013	
(86) (22) 出願日 平成26年3月19日(2014.3.19)	エフ.ホフマン-ラ ロシュ アーゲー	
(65) 公表番号 特願2016-514831(P2016-514831A)	F. HOFFMANN-LA ROCH	
(43) 公表日 平成28年5月23日(2016.5.23)	E AKTIENGESELLSCHAFT	
(88) 国際出願番号 PCT/EP2014/055462	スイス・シーエイチ-407オーバーゼル・	
(87) 国際公開番号 W02014/147101	グレンツァーヘルストラッツセ124	
(87) 国際公開日 平成26年9月25日(2014.9.25)	(74) 代理人 100102978	
審査請求日 平成29年3月2日(2017.3.2)	弁理士 清水 初志	
(31) 優先権主張番号 13160143.7	(74) 代理人 100102118	
(32) 優先日 平成25年3月20日(2013.3.20)	弁理士 香名 雅夫	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁(EP)	(74) 代理人 100160923	
前置審査	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】 マウス血清中のラット抗体の特異的検出