

(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2020-505583

(P2020-505583A)

(43) 公表日 令和2年2月20日(2020.2.20)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	2 G O 4 5
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 5 1 A	4 B O 6 3
GO 1 N 33/483 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 1 A	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	GO 1 N 33/483 C	
	C 1 2 Q 1/02	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 41 頁)		

(21) 出願番号	特願2019-536040 (P2019-536040)	(71) 出願人	519231832
(86) (22) 出願日	平成29年11月28日 (2017.11.28)		エッセン インストラメンツ, インコーポ
(85) 翻訳文提出日	令和1年7月16日 (2019.7.16)		レイテッド ディー/ビー/エー エッセ
(86) 国際出願番号	PCT/US2017/063516		ン バイオサイエンス, インコーポレイテ
(87) 国際公開番号	W02018/136152		ッド
(87) 国際公開日	平成30年7月26日 (2018.7.26)		アメリカ合衆国, ミシガン州 4 8 1 0 8
(31) 優先権主張番号	62/447,772		, アナーバー, 3 0 0 ウェスト モーガ
(32) 優先日	平成29年1月18日 (2017.1.18)		ン ロード
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100114775
			弁理士 高岡 亮一
		(74) 代理人	100121511
			弁理士 小田 直
		(74) 代理人	100202751
			弁理士 岩堀 明代
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 生物学的サンプルから免疫グロブリンγ (I g G) 抗体アイソタイプの濃度を決定するための方法および試薬

(57) 【要約】

生物学的サンプルから免疫グロブリンγ (I g G) 抗体アイソタイプの濃度を決定するための、および I g G 抗体の産生について複数の細胞サンプルを分析するための、方法と試薬が本出願で開示される。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

生物学的サンプルから免疫グロブリン γ (I g G) 抗体アイソタイプの濃度を決定するための方法であって、

(a) マイクロタイタープレート内の複数のウェルにおいて、 I g G 抗体を含む生物学的サンプルを検出試薬と共にインキュベートするステップであって、前記検出試薬は、1種以上の検出可能なように標識された標的 I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントを含み、前記インキュベートは、前記検出可能なように標識された標的 I g G タンパク質またはそのフラグメントとその I g G 抗体との均一な混合を促進して前記複数のウェルの各ウェルにおいて I g G 抗体 - 標的 I g G タンパク質混合物を生成するような時間と条件下で行われる、ステップと、

10

(b) 前記複数のウェルの各ウェルにおいて前記 I g G 抗体 - 標的 I g G タンパク質混合物を1種以上の I g G アイソタイプ特異的捕捉試薬集団と共にインキュベートするステップであって、各 I g G アイソタイプ特異的捕捉試薬集団は、異なる特定の I g G タンパク質アイソタイプに選択的に結合する結合分子を含み、各 I g G アイソタイプ特異的捕捉試薬集団中の結合分子は、表面に結合しており、前記インキュベートは、前記 I g G アイソタイプ特異的捕捉試薬集団に対する前記1種以上の検出可能なように標識された標的 I g G タンパク質またはそのフラグメントおよび前記 I g G 抗体の結合を促進して I g G アイソタイプ特異的結合複合体を生成するような時間と条件下で行われる、ステップと、

(c) 前記 I g G アイソタイプ特異的結合複合体からのシグナルを検出して、前記生物学的サンプル中に存在する1種以上の I g G 抗体アイソタイプの濃度を決定するステップであって、前記生物学的サンプル中に存在する I g G 抗体アイソタイプの量は、検出された関連する I g G アイソタイプ特異的結合複合体からのシグナルに反比例する、ステップと、

20

を含む方法。

【請求項 2】

(d) 対照サンプルの段階希釈物を前記検出試薬と共にインキュベートして対照混合物を生成するステップであって、前記対照サンプルの段階希釈物の各希釈物は、マイクロタイタープレートの別々のウェルに存在し、前記対照サンプルは、前記検出試薬中の1種以上の異なる検出可能なように標識された標的 I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントに対応する1種以上の異なる非標識 I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントを含み、前記インキュベートは、前記対照サンプル中の非標識 I g G タンパク質アイソタイプと前記1種以上の異なる検出可能なように標識された標的 I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントとの混合を促進するような時間と条件下で行われる、ステップと、

30

(e) 前記対照混合物を前記1種以上の I g G アイソタイプ特異的捕捉試薬集団と共にインキュベートするステップであって、前記インキュベートは、1種以上の I g G アイソタイプ特異的捕捉試薬集団に対する前記1種以上の検出可能なように標識された標的 I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントおよび前記1種以上の異なる非標識 I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントの競合的結合を促進して対照 I g G アイソタイプ特異的結合複合体を生成するような時間と条件下で行われる、ステップと、

40

(f) 前記 I g G アイソタイプ特異的結合複合体からのシグナルの分析によって各 I g G タンパク質アイソタイプについての標準曲線を作成するステップであって、各生物学的サンプルにおける1種以上の I g G 抗体アイソタイプの濃度は、各 I g G タンパク質アイソタイプについての標準曲線を参照することによって測定される、ステップと、

をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

生物学的サンプルから免疫グロブリン γ (I g G) アイソタイプ抗体の濃度を決定するための方法であって、

50

(a) マイクロタイタープレート内の複数のウェルにおいて、IgG抗体を発現する複数の生物学的サンプルを1種以上のIgGアイソタイプ特異的捕捉試薬集団と共にインキュベートするステップであって、各IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬集団は、異なる特定のIgGタンパク質アイソタイプに選択的に結合する結合分子を含み、各IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬集団中の結合分子は、表面に結合しており、前記インキュベートは、前記IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬に対する前記IgG抗体の結合を促進してIgG抗体-IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬複合体を生成するような時間と条件下で行われる、ステップと、

(b) 前記IgG抗体-IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬複合体を検出試薬と共にインキュベートするステップであって、前記検出試薬は、1種以上の検出可能なように標識された標的IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントを含み、前記インキュベートは、前記IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬複合体上の未占有部位に対する前記検出可能なように標識された標的IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントの結合を促進して検出可能なように標識された標的IgGタンパク質-IgG抗体-IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬複合体を生成するような時間と条件下で行われる、ステップと、

(c) 前記検出可能なように標識された標的IgGタンパク質-IgG抗体-IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬複合体上の検出可能なように標識された標的IgGタンパク質からのシグナルを検出して1種以上のIgG抗体アイソタイプの濃度を決定するステップであって、前記生物学的サンプル中に存在するIgG抗体アイソタイプタンパク質の量は、検出されたシグナルに反比例する、ステップと、を含む方法。

【請求項4】

(d) 対照サンプルの段階希釈物を1種以上のIgGアイソタイプ特異的捕捉試薬集団と共にインキュベートして対照混合物を生成するステップであって、前記対照サンプルの段階希釈物の各希釈物は、マイクロタイタープレートの別々のウェルに存在し、前記対照サンプルは、前記検出試薬中の1種以上の異なる検出可能なように標識された標的IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントに対応する1種以上の異なる非標識IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントを含み、前記インキュベートは、前記IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬に対する前記1種以上の異なる非標識IgGタンパク質アイソタイプの結合を促進して対照複合体を生成するような時間と条件下で行われる、ステップと、

(e) 前記対照複合体を前記検出試薬と共にインキュベートするステップであって、前記インキュベートは、前記IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬上の未占有部位に対する1種以上の検出可能なように標識されたIgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントの結合を促進するような時間と条件下で行われる、ステップと、

(f) 前記IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬集団に結合した検出可能なように標識されたIgGアイソタイプからのシグナルの分析によって各IgGタンパク質アイソタイプについての標準曲線を作成するステップであって、各生物学的サンプルにおける1種以上のIgGアイソタイプの濃度は、各IgGタンパク質アイソタイプについての標準曲線を参照することによって測定される、ステップと、をさらに含む、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記検出試薬は、規定比率の2種以上の異なる検出可能なように標識された標的IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントを含み、各生物学的サンプルにおいて2種以上のIgG抗体アイソタイプの濃度が決定される、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

前記検出試薬は、規定比率の3種以上の異なる検出可能なように標識された標的IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントを含み、各生物学的サンプルにおいて3

10

20

30

40

50

種以上の I g G 抗体アイソタイプの濃度が決定される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記検出試薬は、規定比率の 4 種以上の異なる検出可能なように標識された標的 I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントを含み、各生物学的サンプルにおいて 4 種以上の I g G 抗体アイソタイプの濃度が決定される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記検出試薬は、検出可能な細胞生存マーカーをさらに含み、前記方法は、各生物学的サンプルにおいて細胞生存率および / または細胞数を測定することをさらに含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 9】

前記結合分子が結合している表面は、ビーズを含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

各捕捉試薬集団は、別々に識別可能である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記結合分子は、抗体、アフィマー、アプタマーおよび / または F c 受容体を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 12】

各生物学的サンプルにおいて総 I g G 抗体濃度を決定することをさらに含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記生物学的サンプルは、細胞サンプルを含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

前記生物学的サンプルは、未希釈サンプルを含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

30

いかなる洗浄ステップも含まない、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

前記生物学的サンプルは、マウス B 細胞、または細胞を含むか含まないマウスハイブリドーマ上清、を含み、異なる I g G アイソタイプが、マウスの I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b および I g G 3 からなる群より選択される、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

前記生物学的サンプルは、ヒト細胞を含み、異なる I g G アイソタイプが、ヒトの I g G 1、I g G 2、I g G 3 および I g G 4 からなる群より選択される、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 18】

前記生物学的サンプルは、ラット細胞を含み、異なる I g G アイソタイプが、ラットの I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b、I g G 2 c からなる群より選択される、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

(i) 前記生物学的サンプルは、ウサギ細胞またはヒツジ細胞を含み、異なる I g G アイソタイプが、ウサギまたはヒツジの I g G からなる群より選択される；

(i i) 前記生物学的サンプルは、ヤギ細胞、ブタ細胞またはウシ細胞を含み、異なる I g G アイソタイプが、ヤギ、ブタまたはウシの I g G 1 および I g G 2 からなる群より選択される；

50

(i i i) 前記生物学的サンプルは、ウマ細胞を含み、異なる I g G アイソタイプが、ウマの I g G a、I g G b、I g G t からなる群より選択される；または

(i v) 前記生物学的サンプルは、サル細胞を含み、異なる I g G アイソタイプが、サルの I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4 からなる群より選択される、請求項 1 ～ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

(a) 規定比率の 2 種以上の異なる検出可能なように標識された標的 I g G タンパク質アイソタイプまたはその抗原性フラグメントを含む、検出試薬と、

(b) 2 種以上の捕捉試薬集団であって、各捕捉試薬集団は、異なる I g G 抗体アイソタイプに選択的に結合する結合分子を含み、各捕捉試薬集団中の結合分子は表面に結合している、2 種以上の捕捉試薬集団と、を含むキット。

【請求項 21】

前記表面は、ビーズを含む、請求項 20 に記載のキット。

【請求項 22】

各捕捉試薬集団は、別々に識別可能である、請求項 20 または 21 に記載のキット。

【請求項 23】

前記結合分子は、抗体を含む、請求項 20 ～ 22 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 24】

(c) 前記検出試薬中の 2 種以上の異なる検出可能なように標識された標的 I g G タンパク質アイソタイプまたはその抗原性フラグメントに対応する規定比率の 2 種以上の異なる非標識 I g G タンパク質アイソタイプまたはその抗原性フラグメントを含む、対照サンプル

をさらに含む、請求項 20 ～ 23 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 25】

前記検出試薬は、規定比率の 3 種以上の異なる検出可能なように標識された標的 I g G タンパク質アイソタイプまたはその抗原性フラグメントを含む、

前記捕捉試薬は、3 種以上の捕捉試薬集団を含む、請求項 20 ～ 24 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 26】

前記検出試薬は、規定比率の 4 種以上の異なる検出可能なように標識された標的 I g G タンパク質アイソタイプまたはその抗原性フラグメントを含む、

前記捕捉試薬は、4 種以上の捕捉試薬集団を含む、請求項 20 ～ 24 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 27】

前記対照サンプルは、前記検出試薬中の 3 種以上または 4 種以上の異なる検出可能なように標識された標的 I g G タンパク質アイソタイプまたはその抗原性フラグメントに対応する規定比率の 3 種以上または 4 種以上の異なる非標識 I g G タンパク質アイソタイプまたはその抗原性フラグメントを含む、請求項 25 ～ 26 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 28】

前記検出試薬は、I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b および I g G 3 からなる群より選択される規定比率の 2 種、3 種または 4 種の異なる検出可能なように標識された標的マウス I g G タンパク質アイソタイプまたはその抗原性フラグメントを含み、

前記捕捉試薬は、2 種、3 種または 4 種の捕捉試薬集団を含み、各捕捉試薬集団が、I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b および I g G 3 からなる群より選択される異なるマウス I g G 抗体アイソタイプに選択的に結合する結合分子を含む、請求項 20 ～ 27 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 29】

前記検出試薬は、I g G 1、I g G 2、I g G 3 および I g G 4 からなる群より選択される規定比率の 2 種、3 種または 4 種の異なる検出可能なように標識された標的ヒト I g

10

20

30

40

50

Gタンパク質アイソタイプまたはその抗原性フラグメントを含み、

前記捕捉試薬は、2種、3種または4種の捕捉試薬集団を含み、各捕捉試薬集団が、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4からなる群より選択される異なるヒトIgG抗体アイソタイプに選択的に結合する結合分子を含む、
請求項20～27のいずれか1項に記載のキット。

【請求項30】

前記検出試薬は、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2cからなる群より選択される規定比率の2種、3種または4種の異なる検出可能なように標識された標的ラットIgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントを含み、

前記捕捉試薬は、2種、3種または4種の捕捉試薬集団を含み、各捕捉試薬集団が、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2cからなる群より選択される異なるラットIgG抗体アイソタイプに選択的に結合する結合分子を含む、
請求項20～27のいずれか1項に記載のキット。

【請求項31】

(A) 前記検出試薬は、規定比率の、

(i) IgG1、IgG2からなる群より選択される2種の異なる検出可能なように標識された標的ヤギ、ブタまたはウシIgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメント；

(ii) IgGa、IgGb、IgGtからなる群より選択される2種または3種の異なる検出可能なように標識された標的ウマIgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメント；あるいは

(iii) IgG1、IgG2、IgG3、IgG4からなる群より選択される2種、3種または4種の異なる検出可能なように標識された標的サルIgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメント；

を含み、

(B) 前記捕捉試薬は、

(i) 各捕捉試薬集団が、IgG1、IgG2からなる群より選択される異なる標的ヤギ、ブタまたはウシIgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントに選択的に結合する結合分子を含む、2種の捕捉試薬集団；

(ii) 各捕捉試薬集団が、IgGa、IgGb、IgGtからなる群より選択される異なるウマIgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントに選択的に結合する結合分子を含む、2種または3種の捕捉試薬集団；あるいは

(iii) 各捕捉試薬集団が、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4からなる群より選択される異なるサルIgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントに選択的に結合する結合分子を含む、2種、3種または4種の捕捉試薬集団；

を含む、

請求項20～27のいずれか1項に記載のキット。

【請求項32】

免疫グロブリンγ(IgG)抗体の産生について複数の細胞サンプルを分析するための方法であって、

(a) 複数のサンプルウェルを有するアッセイプレートに複数の細胞サンプルを移すステップであって、各サンプルウェルが、標的IgG抗体を発現する未希釈の細胞培養物である細胞サンプルを含む、ステップ、および前記複数の細胞サンプルを分析試薬と混合して複数の分析混合物を生成するステップであって、前記分析試薬が、

(i) IgG抗体に結合する捕捉ビーズ、および

(ii) (A) 対照IgG抗体またはそのフラグメントと、(B) 第1の検出可能部分と、を含む第1の検出分子、
を含む、ステップ；

(b) 前記捕捉ビーズに対する前記標的IgG抗体および前記第1の検出分子の結合を促進するような時間と条件下で前記複数の分析混合物をインキュベートするステップ；な

10

20

30

40

50

らびに

(c) フローサイトメトリー分析によって前記複数の分析混合物の各分析混合物において前記標的 I g G 抗体の濃度を決定するステップ；
を含む方法。

【請求項 33】

前記細胞培養物は、単一のクローンから増殖させる、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記捕捉ビーズは、共有結合でプロテイン G またはプロテイン A と連結されている、請求項 32 または請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記捕捉ビーズは、磁気ビーズまたはアガロースビーズである、請求項 32 ~ 34 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 36】

前記複数のサンプルが移される前に、前記アッセイプレートは、凍結乾燥された分析試薬を含む、請求項 32 ~ 35 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 37】

前記分析試薬を前記複数のサンプルと混合することは、前記ウェル中の細胞サンプルに前記分析試薬を添加することを含む、請求項 32 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 38】

前記アッセイプレートは、フローサイトメーターにおいて前記アッセイプレート内の複数の分析混合物を読み取る前に遠心分離される、請求項 32 ~ 37 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 39】

前記混合は、前記複数の細胞サンプルと全ての分析試薬とを同時に混合することを含み、前記第 1 の検出分子は、前記捕捉ビーズへの結合に関して前記標的 I g G 抗体と競合し、各分析混合物における前記捕捉ビーズに結合した第 1 の検出分子の量が、所与の分析混合物における前記標的 I g G 抗体の濃度の尺度を提供する、請求項 32 ~ 38 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 40】

前記混合は、前記捕捉ビーズと前記第 1 の検出分子の段階的添加を含み、

前記段階的添加は、

まず、前記捕捉ビーズに対する前記標的 I g G 抗体の結合を促進して複数の第 1 の混合物を生成するような時間と条件下で前記複数の細胞サンプルを前記捕捉ビーズと混合してから、前記捕捉ビーズに対する前記第 1 の検出分子の結合を促進して前記複数の分析混合物を生成するような時間と条件下で前記複数の第 1 の混合物に前記第 1 の検出分子を添加すること

を含む、

各分析混合物における前記捕捉ビーズに結合した第 1 の検出分子の量が、所与の分析混合物における前記標的 I g G 抗体の濃度の尺度を提供する、
請求項 32 ~ 38 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 41】

免疫グロブリン γ (I g G) 抗体の産生について複数の細胞サンプルを分析するための方法であって、

(a) 複数のサンプルウェルを有するアッセイプレートに複数の細胞サンプルを移すステップであって、各サンプルウェルが、標的 I g G 抗体を発現する未希釈の細胞培養物である細胞サンプルを含む、ステップ、および前記複数の細胞サンプルを分析試薬と混合して複数の分析混合物を生成するステップであって、前記分析試薬が、

(i) I g G 抗体に結合する捕捉ビーズ、および

(ii) 第 1 の検出可能部分を含む第 1 の検出分子、

を含む、ステップ；

10

20

30

40

50

(b) 前記捕捉ビーズに対する前記標的 I g G 抗体および前記第 1 の検出分子の結合を促進するような時間と条件下で前記複数の分析混合物をインキュベートするステップ；ならびに

(c) フローサイトメトリー分析によって前記複数の分析混合物の各分析混合物において前記標的 I g G 抗体の濃度を決定するステップ；を含む方法。

【請求項 4 2】

前記第 1 の検出分子は、免疫グロブリン軽鎖を欠いており且つ前記捕捉ビーズに結合することが可能である、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記捕捉ビーズに結合した標的 I g G 抗体に対する第 2 の検出分子の結合を促進するような時間と条件下で前記複数の分析混合物を前記第 2 の検出分子と接触させることをさらに含む、請求項 4 2 に記載の方法であって、

前記第 2 の検出分子は、前記第 1 の検出分子と光学的に区別できる検出可能なように標識された抗 I g G 軽鎖抗体を含み、

各分析混合物における前記標的 I g G 抗体に結合した第 2 の検出分子の量が、所与の分析混合物におけるインタクトな標的 I g G 抗体の濃度の尺度を提供する、方法。

【請求項 4 4】

前記標識された抗軽鎖抗体が添加される前に、前記複数の分析混合物が、遠心分離され、洗浄ステップに供される、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記分析試薬は、細胞生存染料、細胞表面バイオマーカーまたはアポトーシスのマーカーのうちの 1 つ以上をさらに含む、請求項 3 2 ~ 4 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 6】

(i) 各分析混合物における細胞の数；

(i i) 各分析混合物における生存細胞のパーセンテージ；

(i i i) 各分析混合物における細胞あたりの標的 I g G 抗体の濃度；および / または

(i i i i) 各分析混合物における生存細胞あたりの標的 I g G 抗体の濃度；

のうちの 1 つ以上を決定することをさらに含む、請求項 3 1 ~ 4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 7】

(a) アッセイプレート、および

(b) (i) I g G 抗体に結合する捕捉ビーズと、(i i) 第 1 の検出可能部分を含む第 1 の検出分子と、を含む分析試薬、を含むキット。

【請求項 4 8】

前記第 1 の検出分子は、対照 I g G 抗体またはそのフラグメントを含む、請求項 4 7 に記載のキット。

【請求項 4 9】

前記第 1 の検出分子と光学的に区別できる検出可能なように標識された抗軽鎖抗体をさらに含む、請求項 4 7 または請求項 4 8 に記載のキット。

【請求項 5 0】

前記分析試薬は、細胞生存染料、細胞表面バイオマーカーまたはアポトーシスのマーカーのうちの 1 つ以上をさらに含む、請求項 4 7 ~ 4 9 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 5 1】

前記捕捉ビーズは、共有結合でプロテイン G またはプロテイン A と連結されている、請求項 4 7 ~ 5 0 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 5 2】

前記捕捉ビーズは、磁気ビーズまたはアガロースビーズである、請求項 4 7 ~ 5 1 のい

10

20

30

40

50

ずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 53】

前記アッセイプレートは、凍結乾燥された分析試薬を含む、請求項 47～52 のいずれか 1 項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

本出願は、その全体が参照により本出願に組み込まれる 2017 年 1 月 18 日に出願された米国仮特許出願第 62/447772 号に対する優先権を主張する。

10

【背景技術】

【0002】

背景

タンパク質バイオ医薬品は、最も急成長している治療様式である。これらの薬物は通常、患者に投与されて疾患に関与する特定の生理学的プロセスを変化させるタンパク質（すなわち、IgG）分子である。タンパク質バイオ医薬品の商業的製造プロセスは、時間のかかる高価で困難なプロセスである。これは、殆どのタンパク質バイオ医薬品が、細菌、酵母、昆虫および哺乳動物の細胞など、生きた細胞株の中で製造されるためである。これらの細胞株は、典型的には、目的のタンパク質バイオ医薬品を産生して細胞外環境（細胞培養上清）に分泌するように遺伝子操作されている。バイオ医薬品が分泌されたら、それは、商業的利用のために回収および精製される。このプロセスには高額な費用がかかるため、非常に高レベルの目的のタンパク質を産生するように産生細胞株を操作することが望ましい。

20

【発明の概要】

【0003】

発明の概要

一態様では、生物学的サンプルから免疫グロブリン γ（IgG）抗体アイソタイプの濃度を決定するための方法であって、

（a）マイクロタイタープレート内の複数のウェルにおいて、IgG 抗体を含む生物学的サンプルを検出試薬と共にインキュベートするステップであって、検出試薬は、1 種以上の検出可能なように標識された標的 IgG タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントを含み、インキュベートは、検出可能なように標識された標的 IgG タンパク質またはそのフラグメントとその IgG 抗体との均一な混合を促進して複数のウェルの各ウェルにおいて IgG 抗体 - 標的 IgG タンパク質混合物を生成するような時間と条件下で行われる、ステップと、

30

（b）複数のウェルの各ウェルにおいて IgG 抗体 - 標的 IgG タンパク質混合物を 1 種以上の IgG アイソタイプ特異的捕捉試薬集団と共にインキュベートするステップであって、各 IgG アイソタイプ特異的捕捉試薬集団は、異なる特定の IgG タンパク質アイソタイプに選択的に結合する結合分子を含み、各 IgG アイソタイプ特異的捕捉試薬集団中の結合分子は、表面に結合しており、インキュベートは、IgG アイソタイプ特異的捕捉試薬集団に対する 1 種以上の検出可能なように標識された標的 IgG タンパク質またはそのフラグメントおよび IgG 抗体の結合を促進して IgG アイソタイプ特異的結合複合体を生成するような時間と条件下で行われる、ステップと、

40

（c）IgG アイソタイプ特異的結合複合体からのシグナルを検出して、生物学的サンプル中に存在する 1 種以上の IgG 抗体アイソタイプの濃度を決定するステップであって、生物学的サンプル中に存在する IgG 抗体アイソタイプの量は、検出された関連する IgG アイソタイプ特異的結合複合体からのシグナルに反比例する、ステップと、を含む方法が提供される。

【0004】

一実施形態において、方法は、

50

(d) 対照サンプルの段階希釈物を検出試薬と共にインキュベートして対照混合物を生成するステップであって、対照サンプルの段階希釈物の各希釈物は、マイクロタイタープレートの別々のウェルに存在し、対照サンプルは、検出試薬中の1種以上の異なる検出可能なように標識された標的IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントに対応する1種以上の異なる非標識IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントを含み、インキュベートは、対照サンプル中の非標識IgGタンパク質アイソタイプと1種以上の異なる検出可能なように標識された標的IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントとの混合を促進するような時間と条件下で行われる、ステップと、

(e) 対照混合物を1種以上のIgGアイソタイプ特異的捕捉試薬集団と共にインキュベートするステップであって、インキュベートは、1種以上のIgGアイソタイプ特異的捕捉試薬集団に対する1種以上の検出可能なように標識された標的IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントおよび1種以上の異なる非標識IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントの競合的結合を促進して対照IgGアイソタイプ特異的結合複合体を生成するような時間と条件下で行われる、ステップと、

(f) IgGアイソタイプ特異的結合複合体からのシグナルの分析によって各IgGタンパク質アイソタイプについての標準曲線を作成するステップであって、各生物学的サンプルにおける1種以上のIgG抗体アイソタイプの濃度は、各IgGタンパク質アイソタイプについての標準曲線を参照することによって測定される、ステップと、
をさらに含む。

【0005】

別の態様では、生物学的サンプルから免疫グロブリンγ(IgG)アイソタイプ抗体の濃度を決定するための方法であって、

(a) マイクロタイタープレート内の複数のウェルにおいて、IgG抗体を発現する複数の生物学的サンプルを1種以上のIgGアイソタイプ特異的捕捉試薬集団と共にインキュベートするステップであって、各IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬集団は、異なる特定のIgGタンパク質アイソタイプに選択的に結合する結合分子を含み、各IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬集団中の結合分子は、表面に結合しており、インキュベートは、IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬に対するIgG抗体の結合を促進してIgG抗体-IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬複合体を生成するような時間と条件下で行われる、ステップと、

(b) IgG抗体-IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬複合体を検出試薬と共にインキュベートするステップであって、検出試薬は、1種以上の検出可能なように標識された標的IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントを含み、インキュベートは、IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬複合体上の未占有部位に対する検出可能なように標識された標的IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントの結合を促進して検出可能なように標識された標的IgGタンパク質-IgG抗体-IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬複合体を生成するような時間と条件下で行われる、ステップと、

(c) 検出可能なように標識された標的IgGタンパク質-IgG抗体-IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬複合体上の検出可能なように標識された標的IgGタンパク質からのシグナルを検出して1種以上のIgG抗体アイソタイプの濃度を決定するステップであって、生物学的サンプル中に存在するIgG抗体アイソタイプタンパク質の量は、検出されたシグナルに反比例する、ステップと、
を含む方法が提供される。

【0006】

一実施形態において、方法は、

(d) 対照サンプルの段階希釈物を1種以上のIgGアイソタイプ特異的捕捉試薬集団と共にインキュベートして対照混合物を生成するステップであって、対照サンプルの段階希釈物の各希釈物は、マイクロタイタープレートの別々のウェルに存在し、対照サンプルは、検出試薬中の1種以上の異なる検出可能なように標識された標的IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントに対応する1種以上の異なる非標識IgGタンパク質

10

20

30

40

50

アイソタイプまたはそのフラグメントを含み、インキュベートは、I g Gアイソタイプ特異的捕捉試薬に対する1種以上の異なる非標識I g Gタンパク質アイソタイプの結合を促進して対照複合体を生成するような時間と条件下で行われる、ステップと、

(e) 対照複合体を検出試薬と共にインキュベートするステップであって、インキュベートは、I g Gアイソタイプ特異的捕捉試薬上の未占有部位に対する1種以上の検出可能なように標識されたI g Gタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントの結合を促進するような時間と条件下で行われる、ステップと、

(f) I g Gアイソタイプ特異的捕捉試薬集団に結合した検出可能なように標識されたI g Gアイソタイプからのシグナルの分析によって各I g Gタンパク質アイソタイプについての標準曲線を作成するステップであって、各生物学的サンプルにおける1種以上のI g Gアイソタイプの濃度は、各I g Gタンパク質アイソタイプについての標準曲線を参照することによって測定される、ステップと、
をさらに含む。

10

【0007】

いずれかの態様の様々な実施形態において、検出試薬は、規定比率の2種、3種、4種または5種以上の異なる検出可能なように標識された標的I g Gタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントを含み、2種、3種、4種または5種以上のI g G抗体アイソタイプの濃度が各生物学的サンプルにおいて決定される。

【0008】

さらなる実施形態では、検出試薬は、検出可能な細胞生存マーカーをさらに含んでよく、方法は、各生物学的サンプルにおいて細胞生存率および/または細胞数を測定することをさらに含む。別の実施形態では、結合分子が結合している表面は、ビーズを含んでよい。一実施形態において、各捕捉試薬集団は、別々に識別可能である。さらなる実施形態では、結合分子は、抗体、アフィマー (affimer)、アプタマーおよび/またはFc受容体を含む。別の実施形態では、方法は、各生物学的サンプルにおいて総I g G抗体濃度を決定することをさらに含む。さらなる実施形態では、生物学的サンプルは、細胞サンプルを含む。一実施形態において、生物学的サンプルは、未希釈サンプルである。別の実施形態では、方法は、いかなる洗浄ステップも含まない。

20

【0009】

一実施形態において、生物学的サンプルは、マウスB細胞、または細胞を含むか含まないマウス細胞ハイブリドーマ上清、を含み、異なるI g Gアイソタイプは、マウスのI g G 1、I g G 2 a、I g G 2 bおよびI g G 3からなる群より選択される。別の実施形態では、生物学的サンプルは、ヒト細胞を含み、異なるI g Gアイソタイプは、ヒトのI g G 1、I g G 2、I g G 3およびI g G 4からなる群より選択される。さらなる実施形態では、生物学的サンプルは、ラット細胞を含み、異なるI g Gアイソタイプは、ラットのI g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b、I g G 2 cからなる群より選択される。他の実施形態では、

30

(i) 生物学的サンプルは、ウサギ細胞またはヒツジ細胞を含み、異なるI g Gアイソタイプは、ウサギまたはヒツジのI g Gからなる群より選択される；

(i i) 生物学的サンプルは、ヤギ細胞、ブタ細胞またはウシ細胞を含み、異なるI g Gアイソタイプは、ヤギ、ブタまたはウシのI g G 1およびI g G 2からなる群より選択される；

40

(i i i) 生物学的サンプルは、ウマ細胞を含み、異なるI g Gアイソタイプは、ウマのI g G a、I g G b、I g G tからなる群より選択される；または

(i v) 生物学的サンプルは、サル細胞を含み、異なるI g Gアイソタイプは、サルのI g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4からなる群より選択される。

【0010】

別の態様では、

(a) 規定比率の2種、3種、4種または5種以上の異なる検出可能なように標識された標的I g Gタンパク質アイソタイプまたはその抗原性フラグメント (antigenic fragme

50

nt)を含む、検出試薬と、

(b) 2種、3種、4種または5種以上の捕捉試薬集団であって、各捕捉試薬集団は、異なるIgG抗体アイソタイプに選択的に結合する結合分子を含み、各捕捉試薬集団中の結合分子は表面に結合している、2種、3種、4種または5種以上の捕捉試薬集団と、を含むキットが提供される。

【0011】

一実施形態において、表面は、ビーズを含む。別の実施形態では、各捕捉試薬集団は、別々に識別可能である。さらなる実施形態では、結合分子は、抗体を含む。別の実施形態では、キットは、検出試薬中の2種以上の異なる検出可能なように標識された標的IgGタンパク質アイソタイプまたはその抗原性フラグメントに対応する規定比率の2種以上の異なる非標識IgGタンパク質アイソタイプまたはその抗原性フラグメントを含む、対照サンプルをさらに含む。一実施形態において、対照サンプルは、検出試薬中の3種以上または4種以上の異なる検出可能なように標識された標的IgGタンパク質アイソタイプまたはその抗原性フラグメントに対応する規定比率の3種以上または4種以上の異なる非標識IgGタンパク質アイソタイプまたはその抗原性フラグメントを含む。

【0012】

一実施形態において、検出試薬は、IgG1、IgG2a、IgG2bおよびIgG3からなる群より選択される規定比率の2種、3種または4種の異なる検出可能なように標識された標的マウスIgGタンパク質アイソタイプまたはその抗原性フラグメントを含み、捕捉試薬は、2種、3種または4種の捕捉試薬集団を含み、各捕捉試薬集団は、IgG1、IgG2a、IgG2bおよびIgG3からなる群より選択される異なるマウスIgG抗体アイソタイプに選択的に結合する結合分子を含む。別の実施形態では、検出試薬は、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4からなる群より選択される規定比率の2種、3種または4種の異なる検出可能なように標識された標的ヒトIgGタンパク質アイソタイプまたはその抗原性フラグメントを含み、捕捉試薬は、2種、3種または4種の捕捉試薬集団を含み、各捕捉試薬集団は、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4からなる群より選択される異なるヒトIgG抗体アイソタイプに選択的に結合する結合分子を含む。さらに他の実施形態では、検出試薬は、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2cからなる群より選択される規定比率の2種、3種または4種の異なる検出可能なように標識された標的ラットIgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントを含み、捕捉試薬は、2種、3種または4種の捕捉試薬集団を含み、各捕捉試薬集団は、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2cからなる群より選択される異なるラットIgG抗体アイソタイプに選択的に結合する結合分子を含む。様々な他の実施形態において、

(A) 検出試薬は、規定比率の、

(i) IgG1、IgG2からなる群より選択される2種の異なる検出可能なように標識された標的ヤギ、ブタまたはウシIgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメント；

(ii) IgGa、IgGb、IgGtからなる群より選択される2種または3種の異なる検出可能なように標識された標的ウマIgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメント；あるいは

(iii) IgG1、IgG2、IgG3、IgG4からなる群より選択される2種、3種または4種の異なる検出可能なように標識された標的サルIgGタンパク質アイソタイプまたはその抗原性フラグメント；
を含み、

(B) 捕捉試薬は、

(i) 各捕捉試薬集団が、IgG1、IgG2からなる群より選択される異なる標的ヤギ、ブタまたはウシIgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントに選択的に結合する結合分子を含み、2種の捕捉試薬集団；

(ii) 各捕捉試薬集団が、IgGa、IgGb、IgGtからなる群より選択される異なるウマIgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントに選択的に結合する

10

20

30

40

50

結合分子を含む、2種または3種の捕捉試薬集団；あるいは

(i i i) 各捕捉試薬集団が、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4 からなる群より選択される異なるサル I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントに選択的に結合する結合分子を含む、2種、3種または4種の捕捉試薬集団；を含む。

【 0 0 1 3 】

別の態様では、免疫グロブリン γ (I g G) 抗体の産生について複数の細胞サンプルを分析するための方法であって、

(a) 複数のサンプルウェルを有するアッセイプレートに複数の細胞サンプルを移すステップであって、各サンプルウェルが、標的 I g G 抗体を発現する未希釈の細胞培養物である細胞サンプルを含む、ステップ、および複数の細胞サンプルを分析試薬と混合して複数の分析混合物を生成するステップであって、分析試薬が、

(i) I g G 抗体に結合する捕捉ビーズ、および

(i i) (A) 対照 I g G 抗体またはそのフラグメントと、(B) 第 1 の検出可能部分と、を含む第 1 の検出分子、を含む、ステップ；

(b) 捕捉ビーズに対する標的 I g G 抗体および第 1 の検出分子の結合を促進するような時間と条件下で複数の分析混合物をインキュベートするステップ；ならびに

(c) フローサイトメトリー分析によって複数の分析混合物の各分析混合物において標的 I g G 抗体の濃度を決定するステップ；

を含む方法が提供される。

【 0 0 1 4 】

一実施形態において、細胞培養物は、単一のクローンから増殖させる。別の実施形態では、捕捉ビーズは、共有結合でプロテイン G またはプロテイン A と連結されている。さらなる実施形態では、捕捉ビーズは、磁気ビーズまたはアガロースビーズである。別の実施形態では、複数のサンプルが移される前に、アッセイプレートは、凍結乾燥された分析試薬を含む。一実施形態において、分析試薬を複数のサンプルと混合することは、ウェル中の細胞サンプルに分析試薬を添加することを含む。別の実施形態では、アッセイプレートは、フローサイトメーターにおいてアッセイプレート内の複数の分析混合物を読み取る前に遠心分離される。さらなる実施形態では、混合は、複数の細胞サンプルと全ての分析試薬とを同時に混合することを含み、ここで、第 1 の検出分子は、捕捉ビーズへの結合に関して標的 I g G 抗体と競合し、各分析混合物における捕捉ビーズに結合した第 1 の検出分子の量は、所与の分析混合物における標的 I g G 抗体の濃度の尺度を提供する。別の実施形態では、混合は、捕捉ビーズと第 1 の検出分子の段階的添加を含み、ここで、段階的添加は、

まず、捕捉ビーズに対する標的 I g G 抗体の結合を促進して複数の第 1 の混合物を生成するような時間と条件下で複数の細胞サンプルを捕捉ビーズと混合してから、捕捉ビーズに対する第 1 の検出分子の結合を促進して複数の分析混合物を生成するような時間と条件下で複数の第 1 の混合物に第 1 の検出分子を添加すること

を含み、各分析混合物における捕捉ビーズに結合した第 1 の検出分子の量は、所与の分析混合物における標的 I g G 抗体の濃度の尺度を提供する。

【 0 0 1 5 】

別の態様では、免疫グロブリン γ (I g G) 抗体の産生について複数の細胞サンプルを分析するための方法であって、

(a) 複数のサンプルウェルを有するアッセイプレートに複数の細胞サンプルを移すステップであって、各サンプルウェルが、標的 I g G 抗体を発現する未希釈の細胞培養物である細胞サンプルを含む、ステップ、および複数の細胞サンプルを分析試薬と混合して複数の分析混合物を生成するステップであって、分析試薬が、

(i) I g G 抗体に結合する捕捉ビーズ、および

(i i) 第 1 の検出可能部分を含む第 1 の検出分子、

を含む、ステップ；

(b) 捕捉ビーズに対する標的 IgG 抗体および第 1 の検出分子の結合を促進するような時間と条件下で複数の分析混合物をインキュベートするステップ；ならびに

(c) フローサイトメトリー分析によって複数の分析混合物の各分析混合物において標的 IgG 抗体の濃度を決定するステップ；

を含む方法が提供される。

【0016】

一実施形態において、第 1 の検出分子は、免疫グロブリン軽鎖を欠いており、且つ捕捉ビーズに結合することが可能である。別の実施形態では、方法は、捕捉ビーズに結合した標的 IgG 抗体に対する第 2 の検出分子の結合を促進するような時間と条件下で複数の分析混合物を第 2 の検出分子と接触させることをさらに含み、ここで、

第 2 の検出分子は、第 1 の検出分子と光学的に区別できる検出可能なように標識された抗 IgG 軽鎖抗体を含み、

各分析混合物における標的 IgG 抗体に結合した第 2 の検出分子の量は、所与の分析混合物におけるインタクトな標的 IgG 抗体の濃度の尺度を提供する。

【0017】

別の実施形態では、標識された抗軽鎖抗体が添加される前に、複数の分析混合物は、遠心分離され、洗浄ステップに供される。さらなる実施形態では、分析試薬は、細胞生存染料 (cell viability dye)、細胞表面バイオマーカーまたはアポトーシスのマーカーのうちの 1 つ以上をさらに含む。様々な実施形態において、方法は、

(i) 各分析混合物における細胞の数；

(ii) 各分析混合物における生存細胞のパーセンテージ；

(iii) 各分析混合物における細胞あたりの標的 IgG 抗体の濃度；および / または

(iiii) 各分析混合物における生存細胞あたりの標的 IgG 抗体の濃度；

のうちの 1 つ以上を決定することをさらに含む。

【0018】

別の態様では、

(a) アッセイプレート、および

(b) (i) IgG 抗体に結合する捕捉ビーズと、(ii) 第 1 の検出可能部分を含む第 1 の検出分子と、を含む分析試薬、を含むキットが提供される。

【0019】

一実施形態において、第 1 の検出分子は、対照 IgG 抗体またはそのフラグメントを含む。別の実施形態では、キットは、第 1 の検出分子と光学的に区別できる検出可能なように標識された抗軽鎖抗体をさらに含む。さらなる実施形態では、分析試薬は、細胞生存染料、細胞表面バイオマーカーまたはアポトーシスのマーカーのうちの 1 つ以上をさらに含む。別の実施形態では、捕捉ビーズは、共有結合でプロテイン G またはプロテイン A と連結されている。さらなる実施形態では、捕捉ビーズは、磁気ビーズまたはアガロースビーズである。別の実施形態では、アッセイプレートは、凍結乾燥された分析試薬を含む。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図 1】図 1 は、4 種の異なる IgG アイソタイプを捕捉するための 4 種の捕捉ビーズを用いたマルチプレックス競合アッセイフォーマットの図である。

【図 2】図 2 は、マイクロタイタープレートにおける標準ウェルの例示的なセットアップの図である。

【発明を実施するための形態】

【0021】

詳細な説明

引用される参考文献は全て、その全体が参照により本出願に組み込まれる。

【0022】

10

20

30

40

50

本出願で使用される場合、単数形「a」、「an」および「the」は、そうではないことを文脈が明らかに指示しない限り、複数の指示対象を包含する。「および (and)」は、本出願で使用される場合、そうではないことが明記されない限り、「または (or)」と同じ意味で使用される。

【0023】

本発明の任意の態様の全ての実施形態は、そうではないことを文脈が明らかに指示しない限り、組み合わせて使用できる。

【0024】

文脈上明らかに別段の要求がない限り、説明および特許請求の範囲の全体にわたって、「含む (comprise)」、「含む (comprising)」等の単語は、排他的または網羅的な意味ではなく、包括的な意味で（すなわち、「～を包含するがそれに限定されない (including, but not limited to)」という意味で）解釈されるべきである。単数形または複数形を用いる単語は、それぞれ複数形および単数形も包含する。さらに、単語「本出願で (herein)」、「上記 (above)」および「以下 (below)」ならびに同様の意味の単語は、本出願において使用される場合、本出願の特定の部分を指すのではなく、本出願全体を指すものとする。

【0025】

本開示の実施形態の説明は、網羅的であることを意図するものでも、開示される形態そのものに開示を限定することを意図するものでもない。説明を目的として本開示の特定の実施形態と例が本出願で説明されているが、当業者であれば認識するように、本開示の範囲内で様々な同等の改変が可能である。

【0026】

第1の態様では、生物学的サンプルから免疫グロブリン γ (IgG) 抗体アイソタイプの濃度を決定するための方法であって、

(a) マイクロタイタープレート内の複数のウェルにおいて、IgG抗体を含む生物学的サンプルを検出試薬と共にインキュベートするステップであって、検出試薬は、1種以上の検出可能なように標識された標的IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントを含み、インキュベートは、検出可能なように標識された標的IgGタンパク質またはそのフラグメントとそのIgG抗体との均一な混合を促進して複数のウェルの各ウェルにおいてIgG抗体 - 標的IgGタンパク質混合物を生成するような時間と条件下で行われる、ステップと、

(b) 複数のウェルの各ウェルにおいてIgG抗体 - 標的IgGタンパク質混合物を1種以上のIgGアイソタイプ特異的捕捉試薬集団と共にインキュベートするステップであって、各IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬集団は、異なる特定のIgGタンパク質アイソタイプに選択的に結合する結合分子を含み、各IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬集団中の結合分子は、表面に結合しており、インキュベートは、IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬集団に対する1種以上の検出可能なように標識された標的IgGタンパク質またはそのフラグメントおよびIgG抗体の結合を促進してIgGアイソタイプ特異的結合複合体を生成するような時間と条件下で行われる、ステップと、

(c) IgGアイソタイプ特異的結合複合体からのシグナルを検出して、生物学的サンプル中に存在する1種以上のIgG抗体アイソタイプの濃度を決定するステップであって、生物学的サンプル中に存在するIgG抗体アイソタイプの量は、検出された関連するIgGアイソタイプ特異的結合複合体からのシグナルに反比例する、ステップと、を含む方法が提供される。

【0027】

当該方法は、生物学的サンプル中に存在するIgG抗体アイソタイプが、検出された関連するIgGアイソタイプ特異的結合複合体からのシグナルに反比例する、という逆相関に基づいて、生物学的サンプル中に存在する1種以上のIgG抗体アイソタイプの濃度を決定することを可能にする。

【0028】

10

20

30

40

50

単離された I g G 抗体分泌細胞、I g G 抗体分泌細胞の集団、そのような細胞の上清、それらの細胞抽出物、血清、血清抽出物、体液（血液を包含するがこれに限定されない）および体液抽出物（血液抽出物を包含するがこれに限定されない）を包含するがこれらに限定されない、I g G 抗体を含む任意の好適な生物学的サンプルが使用されてよい。非限定的な実施形態において、生物学的サンプルは、抗体分泌 B 細胞、ハイブリドーマ細胞、その上清（すなわち、細胞成分を含むか含まない、細胞またはハイブリドーマが培養された細胞培養培地）、またはその細胞抽出物を含んでよい。特定の実施形態では、生物学的サンプルは、単一のクローンから増殖させた細胞を含む。他の実施形態では、生物学的サンプルは、未定義の細胞集団を含む。一実施形態において、生物学的サンプルは、細胞 / ハイブリドーマ培養物からの未希釈サンプルなど、未希釈サンプルである。本発明の方法は、細胞 / ハイブリドーマ培養物サンプルの希釈を伴わない I g G 抗体アイソタイプの定量化を可能にするが、これは、以前の抗体濃度検出技術を用いては不可能であり、希釈係数の主観的推測を必要とする可能性がある中間のサンプル希釈ステップを除外することによってアッセイのワークフローを大幅に単純化する。

10

【 0 0 2 9 】

生物学的サンプルは、ヒト、げっ歯類（すなわち、マウス、ラット、ハムスター等）、ウサギ、ブタ、ヤギ、サル、ヒツジ、ウマ、ウシ等を包含するがこれらに限定されない、任意の起源のものであってよい。

【 0 0 3 0 】

本出願で使用される場合、生物学的サンプル中の I g G 抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であってよい。特定の実施形態では、生物学的サンプル中の I g G 抗体は、モノクローナル抗体、そのフラグメント、またはその免疫学的結合等価物（immunological binding equivalent）である。そのような抗体には、細胞が発現し得るか発現するように操作され得る任意のタイプの抗体が包含され、当該任意のタイプの抗体は、モノクローナル抗体（m A b）、ヒト化抗体またはキメラ抗体、単鎖抗体（s c F v）、F a b フラグメント、F（a b'）₂ フラグメント、ジスルフィド連結型 F v（disulfide-linked Fv）（s d F v）フラグメント、抗イデオタイプ（抗 I d）抗体、細胞内抗体（intra-body）、合成抗体、上記のいずれかのエピトープ結合フラグメント、および I g G の F c 領域に相当する領域を含む融合タンパク質を包含するが、これらに限定されない。

20

30

【 0 0 3 1 】

検出試薬は、1 種以上の検出可能なように標識された標的 I g G タンパク質アイソタイプ、または対応する I g G 抗体アイソタイプに結合する能力を保持するそのフラグメント、を含む。様々な実施形態において、検出試薬は、2 種、3 種、4 種、5 種または 6 種以上の検出可能なように標識された標的 I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントを含む。そのような I g G タンパク質は、B D B i o s c i e n c e s、S i g m a C h e m i c a l C o m p a n y、M i l l i p o r e および T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c を含むいくつかの業者から商業的に入手可能である。各標的 I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントは、特定の I g G 抗体アイソタイプに結合する能力を有する。非限定的な一実施形態において、生物学的サンプルは、マウス B 細胞またはマウス細胞ハイブリドーマ上清（細胞を含むか含まない）を含み、異なる I g G アイソタイプは、マウスの I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b および I g G 3 からなる群より選択される。この実施形態では、検出試薬は、1 種、2 種、3 種または 4 種の検出可能なように標識された標的 I g G タンパク質アイソタイプ（すなわち、I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b および / または I g G 3）またはそのフラグメントを含む。別の非限定的な実施形態では、生物学的サンプルは、ヒト抗体分泌細胞を含み、異なる I g G アイソタイプは、ヒトの I g G 1、I g G 2、I g G 3 および I g G 4 からなる群より選択される。この実施形態では、検出試薬は、1 種、2 種、3 種または 4 種の検出可能なように標識された標的 I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントを含む。さらなる非限定的な実施形態では、生物学的サンプルは、ラット抗体分泌細胞を含み、異な

40

50

る I g G アイソタイプは、ラットの I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b、I g G 2 c からなる群より選択される。この実施形態では、検出試薬は、1 種、2 種、3 種または 4 種の検出可能なように標識された標的 I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントを含む。様々なさらなる実施形態では、

(i) 生物学的サンプルは、ウサギまたはヒツジの抗体を分泌する細胞を含み、唯一の I g G アイソタイプは、ウサギまたはヒツジの I g G である；

(i i) 生物学的サンプルは、ヤギ、ブタまたはウシの抗体を分泌する細胞を含み、異なる I g G アイソタイプは、ヤギ、ブタまたはウシの I g G 1 および I g G 2 からなる群より選択される。この実施形態では、検出試薬は、1 種または 2 種の検出可能なように標識された標的 I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントを含む；

(i i i) 生物学的サンプルは、ウマの抗体を分泌する細胞を含み、異なる I g G アイソタイプは、ウマの I g G a、I g G b、I g G t からなる群より選択される。これらの実施形態では、検出試薬は、1 種、2 種または 3 種の検出可能なように標識された標的 I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントを含む；あるいは

(i v) 生物学的サンプルは、抗体を分泌するサル細胞を含み、異なる I g G アイソタイプは、サルの I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4 からなる群より選択される。この実施形態では、検出試薬は、1 種、2 種、3 種または 4 種の検出可能なように標識された標的 I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントを含む。

【 0 0 3 2 】

様々な実施形態において、検出試薬は、規定比率の 2 種、3 種、4 種または 5 種以上の異なる検出可能なように標識された標的 I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントを含む。この実施形態は、生物学的サンプルにおける 2 種、3 種、4 種または 5 種以上の I g G 抗体アイソタイプの濃度の、より迅速な定量化を可能にする。その比率が分かっている限り、任意の規定比率の検出可能なように標識された標的 I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントが使用されてよい。非限定的な一実施形態において、検出可能なように標識された標的 I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントの各々は、ほぼ同じ濃度で存在する。別の非限定的な実施形態では、検出可能なように標識された標的 I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントの各々は、ほぼ同じ量（すなわち、3 種の異なる検出可能なように標識された標的 I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントが存在する場合には約 1 : 1 : 1）で存在する。

【 0 0 3 3 】

任意の好適な濃度の標的 I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントがアッセイで使用されてよい。非限定的な一実施形態において、検出試薬中の各標的 I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントは、約 1 n g / m l ~ 約 1 0 m g / m l で存在する。様々な他の実施形態では、検出試薬中の各標的 I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントは、約 1 0 n g / m l ~ 約 1 m g / m l、約 1 0 0 n g / m l ~ 約 7 5 0 μ g / m l、約 5 0 0 n g / m l ~ 約 5 0 0 μ g / m l、約 1 μ g / m l ~ 約 2 5 0 μ g / m l、または少なくとも 1 2 5 μ g / m l で存在する。

【 0 0 3 4 】

蛍光標識、ハプテン、比色標識 (colorimetric label)、様々な放射性標識、酵素、補欠分子族 (prosthetic group)、蛍光マーカー、発光マーカー、生物発光マーカー、標識された粒子 (シリコン、ガラスまたは金属の粒子)、タンパク質 - タンパク質結合ペア、タンパク質 - 抗体結合ペア等を包含するがこれらに限定されない、任意の好適な検出可能標識が使用されてよい。蛍光標識の例としては、黄色蛍光タンパク質 (Y F P)、緑色蛍光タンパク質 (G F P)、シアン蛍光タンパク質 (C F P)、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン (dichlorotriazinylamine fluorescein)、シアニン、塩化ダンシル、フィコシアニン、アロフィコシアニン (A P C)、ブリリアントバイオレット染料 (brilliant violet dye)、ブリリアントウルトラバイオレット染料 (brilliant ultraviolet dye) およびフィコエリトリンが挙げられるが、これらに限定されない。生物発光マーカー

10

20

30

40

50

ーの例としては、ルシフェラーゼ（例えば、細菌のもの、ホタルのもの、コメツキムシ（click beetle）のもの等）、ルシフェリン、エクオリン等が挙げられるが、これらに限定されない。視覚的に検出可能なシグナルを有する酵素システムの例としては、ガラクトシダーゼ、グルコリニダーゼ（glucorinidase）、ホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、コリンエステラーゼ等が挙げられるが、これらに限定されない。検出可能標識は、様々な供給元から商業的に入手可能である。特定の実施形態では、検出標識は、フルオロフォアまたは蛍光タンパク質を含む。検出試薬が、2種、3種、4種または5種以上の異なる検出可能なように標識された標的 I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントを含む場合、異なる検出可能なように標識された標的 I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントの集団の各々は、目的の検出アッセイに応じて、同じ標識または区別可能な標識を有してよい。

10

【0035】

さらなる実施形態では、検出試薬は、検出可能な細胞生存マーカーをさらに含み、方法は、各生物学的サンプルにおいて細胞生存率および/または細胞数を測定することをさらに含む。任意の好適な細胞生存マーカーが使用されてよい。細胞生存染料は、サンプルにおける非生存細胞の検出を可能にし得る。例えば、細胞生存染料は、細胞内の標的について細胞調製物がフローサイトメトリーによって分析されている場合でさえ、死細胞を恒久的に標識して分析からそれらを除外することを可能にし得る（例えば、F i x a b l e V i a b i l i t y D y e e F l o u r（登録商標）、ヨウ化プロピジウム（P I）は、一般的に生存細胞から排除される膜不透過性染料である）。細胞生存染料はまた、生細胞を標識することもできる。例えば、非蛍光化合物は、生細胞に自由に侵入し、細胞内のエステラーゼがそれを蛍光色素に変換する。そのような例では、固定または透過処理の後に当該色素が細胞内に保持されず、従って、細胞内染色プロトコルには有用でない。一部の実施形態において、分析試薬は、細胞表面バイオマーカーまたはアポトーシスのマーカーをさらに含む。当業者であれば、細胞表面マーカーが、細胞の表面上に発現されるタンパク質であり、しばしば特定の細胞型のマーカーとして便利に役立ち得る、ということを確認するであろう。例えば、T細胞およびB細胞の表面マーカーは、分化プロセスにおけるそれらの系列と段階を特定する。

20

【0036】

インキュベートは、検出可能なように標識された標的 I g G タンパク質またはそのフラグメントとその I g G 抗体との均一な混合を促進して複数のウェルの各ウェルにおいて I g G 抗体 - 標的 I g G タンパク質混合物を生成するような時間と条件下で行われる。そのような均一な混合を促進する任意の好適な条件が用いられてよく、温度、湿度レベル、インキュベートの長さ、攪拌または他の混合の力の適用、使用される培地等などの適切な条件を決定することは十分に当技術分野における通常の知識のレベルの範囲内である。

30

【0037】

方法は、複数のウェルの各ウェルにおいて I g G 抗体 - 標的 I g G タンパク質混合物を1種以上の I g G アイソタイプ特異的捕捉試薬集団と共にインキュベートすることを含み、ここで、各 I g G アイソタイプ特異的捕捉試薬集団は、異なる特定の I g G タンパク質アイソタイプに選択的に結合する結合分子を含む。各捕捉試薬集団は、異なる特定の I g G タンパク質アイソタイプに対して特異的であり、従って、I g G アイソタイプに基づいて I g G 抗体 - 標的 I g G タンパク質混合物を分離するために使用することができる。特定の I g G タンパク質アイソタイプに選択的に結合する任意の好適な結合分子が使用されてよい。様々な非限定的な実施形態において、結合分子は、抗体、アフィマー、アプタマー、Fc受容体もしくは他のタンパク質/糖/脂質または組み合わせ分子を含む。特定の一実施形態では、結合分子は、I g G タンパク質アイソタイプに選択的に結合する抗体を含む。そのような I g G アイソタイプ選択的抗体は、B D B i o s c i e n c e s、S i g m a C h e m i c a l C o m p a n y、M i l l i p o r e および T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c を含むいくつかの業者から商業的に入手可能である。

40

。

50

【0038】

各IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬集団中の結合分子は、表面に結合している。ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン支持体、磁気ビーズもしくは常磁性ビーズ、アガロースビーズおよび濾過媒体(NHS-activated SepharoseまたはCNBr-activated Sepharoseなど)を包含するがこれらに限定されない、任意の好適な表面が用いられてよい。特定の一実施形態では、各IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬集団中の結合分子は、磁気ビーズまたは常磁性ビーズなどのビーズに結合している。磁気捕捉ビーズまたは常磁性捕捉ビーズは、典型的には、直径約1mm以下であり、沈降または目詰まりを防ぐのに十分なほど、十分に小さい。好適なビーズは、当業者に知られており、種々の供給元から入手できる(例えば、Invitrogen Dynal(ノルウェー)のDynabeads My-One(商標)、またはMerck(フランス)のEstapore)。ビーズは、抗体または抗原の受動的または能動的なカップリングのために、結合分子と予めカップリングされてよいか結合分子でコーティングされてよい。他の実施形態では、捕捉ビーズは、アガロースビーズであってよい。典型的には、アガロースビーズは、直径約20 μ m~350 μ mである。別の特定の実施形態では、各IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬集団中の結合分子は、マイクロタイタープレートのウェル内のプリントされたアレイで存在する。

10

【0039】

任意の好適な密度の捕捉試薬がアッセイにおいて使用されてよい。非限定的な一実施形態において、各捕捉試薬集団は、1ミリリットルあたり約1万個~約1億個の捕捉試薬という密度で存在する。様々なさらなる実施形態では、各捕捉試薬集団は、1ミリリットルあたり約10万個~約5000万個、約25万個~約2500万個、約50万個~約1000万個または約75万個~約500万個の捕捉試薬という密度で存在する。

20

【0040】

インキュベートは、IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬集団に対する1種以上の検出可能なように標識された標的IgGタンパク質またはそのフラグメントおよびIgG抗体の結合を促進してIgGアイソタイプ特異的結合複合体を生成するような時間と条件下で行われる。そのような均一な混合を促進する任意の好適な条件が用いられてよく、温度、湿度レベル、インキュベートの長さ、攪拌または他の混合の力の適用、使用される培地等などの適切な条件を決定することは十分に当技術分野における通常の知識のレベルの範囲内である。

30

【0041】

生物学的サンプル中に存在する1種以上のIgG抗体アイソタイプの濃度を決定するためにIgGアイソタイプ特異的結合複合体からシグナル(すなわち、検出可能なように標識された標的IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントからのもの)が検出される。これは競合アッセイであるため、生物学的サンプル中に存在するIgG抗体アイソタイプの量は、検出された関連するIgGアイソタイプ特異的結合複合体からのシグナルに反比例する。利用される検出可能な標識に応じて、IgGアイソタイプ特異的結合複合体からのシグナルを検出するための任意の好適な技術が用いられてよく、それらには、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、フローサイトメトリー、プレートリーダー、Mesoscale Discoveryプラットフォームおよび蛍光顕微鏡法が含まれるが、これらに限定されない。特定の一実施形態では、検出は、IgGアイソタイプ特異的結合複合体を流体の流れに懸濁させてそれらを電子的検出装置に通すことによるフローサイトメトリーを伴い、これは、1秒あたり最大数万個の複合体の物理的および化学的な特性を同時にマルチパラメータ分析することを可能にする。

40

【0042】

一実施形態において、方法は、各IgGタンパク質アイソタイプについての標準曲線を作成することをさらに含み、ここで、各生物学的サンプルにおける1種以上のIgG抗体アイソタイプの濃度は、各IgGタンパク質アイソタイプについての標準曲線を参照する

50

ことによって測定される。一つのそのような実施形態において、方法は、

(d) 対照サンプルの段階希釈物を検出試薬と共にインキュベートして対照混合物を生成するステップであって、対照サンプルの段階希釈物の各希釈物は、マイクロタイタープレートの別々のウェルに存在し、対照サンプルは、検出試薬中の1種以上の異なる検出可能なように標識された標的IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントに対応する1種以上の異なる非標識IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントを含み、インキュベートは、対照サンプル中の非標識IgGタンパク質アイソタイプと1種以上の異なる検出可能なように標識された標的IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントとの混合を促進するような時間と条件下で行われる、ステップと、

(e) 対照混合物を1種以上のIgGアイソタイプ特異的捕捉試薬集団と共にインキュベートするステップであって、インキュベートは、1種以上のIgGアイソタイプ特異的捕捉ビーズ集団に対する1種以上の検出可能なように標識された標的IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントおよび1種以上の異なる非標識IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントの競合的結合を促進して対照IgGアイソタイプ特異的結合複合体を生成するような時間と条件下で行われる、ステップと、

(f) IgGアイソタイプ特異的結合複合体からのシグナルの分析によって各IgGタンパク質アイソタイプについての標準曲線を作成するステップであって、各生物学的サンプルにおける1種以上のIgG抗体アイソタイプの濃度は、各IgGタンパク質アイソタイプについての標準曲線を参照することによって測定される、ステップと、

をさらに含む。

【0043】

この実施形態では、1種以上の検出可能なように標識された標的IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントと1種以上の異なる非標識IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントは、IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬集団への結合に関して競合する。生物学的サンプル中に存在するIgG抗体アイソタイプの量は、検出された関連するIgGアイソタイプ特異的結合複合体からのシグナルに反比例し、IgGアイソタイプ固有の標準曲線から補間でき、非標識IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントの濃度がゼロである対照ウェルから算出されたベースライン量を超える正の量によって定量化できる。

【0044】

第2の態様では、生物学的サンプルから免疫グロブリンγ(IgG)アイソタイプ抗体の濃度を決定するための方法であって、

(a) マイクロタイタープレート内の複数のウェルにおいて、IgG抗体を発現する複数の生物学的サンプルを1種以上のIgGアイソタイプ特異的捕捉試薬集団と共にインキュベートするステップであって、各IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬集団は、異なる特定のIgGタンパク質アイソタイプに選択的に結合する結合分子を含み、各IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬集団中の結合分子は、表面に結合しており、インキュベートは、IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬に対するIgG抗体の結合を促進してIgG抗体-IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬複合体を生成するような時間と条件下で行われる、ステップと、

(b) IgG抗体-IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬複合体を検出試薬と共にインキュベートするステップであって、検出試薬は、1種以上の検出可能なように標識された標的IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントを含み、インキュベートは、IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬複合体上の未占有部位に対する検出可能なように標識された標的IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントの結合を促進して検出可能なように標識された標的IgGタンパク質-IgG抗体-IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬複合体を生成するような時間と条件下で行われる、ステップと、

(c) 検出可能なように標識された標的IgGタンパク質-IgG抗体-IgGアイソタイプ特異的捕捉試薬複合体上の検出可能なように標識された標的IgGタンパク質からのシグナルを検出して1種以上のIgG抗体アイソタイプの濃度を決定するステップであ

10

20

30

40

50

って、生物学的サンプル中に存在する I g G 抗体アイソタイプタンパク質の量は、検出されたシグナルに反比例する、ステップと、
を含む方法が提供される。

【 0 0 4 5 】

この態様では、方法は、プレインキュベーションプロトコルに従う。

【 0 0 4 6 】

マウスハイブリドーマ培養物などのハイブリドーマ培養物の場合、完全競合アッセイプロトコルが好ましい可能性がある。このプロトコルは、マウスハイブリドーマ培養物で一般に見られる I g G 範囲 (1 ~ 5 0 μ g / m L) の定量化を処理できる。

【 0 0 4 7 】

B 細胞培養物の場合、プレインキュベーションアッセイプロトコルが好ましい可能性がある。このプロトコルは、調整された競合のプロトコルである。I g G のレベルが低いサンプルの場合、検出 / 競合試薬の添加前の捕捉試薬と生物学的サンプルとのプレインキュベーションにより、サンプル中の低レベルの I g G がより良好に検出される可能性がある。このプロトコルは、例えばマウス B 細胞培養物で一般に見られるマウス I g G 範囲 (0 . 1 ~ 2 μ g / m L) の定量化をより良好に処理できる。

【 0 0 4 8 】

本発明の第 1 の態様の全ての実施形態は、本発明の第 2 の態様における使用に適している。一実施形態において、方法は、各 I g G タンパク質アイソタイプについての標準曲線を作成することをさらに含み、ここで、各生物学的サンプルにおける 1 種以上の I g G 抗体アイソタイプの濃度は、各 I g G タンパク質アイソタイプについての標準曲線を参照することによって測定される。一つのそのような実施形態において、方法は、

(d) 対照サンプルの段階希釈物を 1 種以上の I g G アイソタイプ特異的捕捉試薬集団と共にインキュベートして対照混合物を生成するステップであって、対照サンプルの段階希釈物の各希釈物は、マイクロタイタープレートの別々のウェルに存在し、対照サンプルは、検出試薬中の 1 種以上の異なる検出可能なように標識された標的 I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントに対応する 1 種以上の異なる非標識 I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントを含み、インキュベートは、I g G アイソタイプ特異的捕捉試薬に対する 1 種以上の異なる非標識 I g G タンパク質アイソタイプの結合を促進して対照複合体を生成するような時間と条件下で行われる、ステップと、

(e) 対照複合体を検出試薬と共にインキュベートするステップであって、インキュベートは、I g G アイソタイプ特異的捕捉試薬上の未占有部位に対する 1 種以上の検出可能なように標識された I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントの結合を促進するような時間と条件下で行われる、ステップと、

(f) I g G アイソタイプ特異的捕捉試薬集団に結合した検出可能なように標識された I g G アイソタイプからのシグナルの分析によって各 I g G タンパク質アイソタイプについての標準曲線を作成するステップであって、各生物学的サンプルにおける 1 種以上の I g G アイソタイプの濃度は、各 I g G タンパク質アイソタイプについての標準曲線を参照することによって測定される、ステップと、
をさらに含む。

【 0 0 4 9 】

この実施形態では、1 種以上の検出可能なように標識された標的 I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントと 1 種以上の異なる非標識 I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントは、I g G アイソタイプ特異的捕捉試薬集団への結合に関して競合する。生物学的サンプル中に存在する I g G 抗体アイソタイプの量は、検出された関連する I g G アイソタイプ特異的結合複合体からのシグナルに反比例し、I g G アイソタイプ固有の標準曲線から補間でき、非標識 I g G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントの濃度がゼロである対照ウェルから算出されたベースライン量を超える正の量によって定量化できる。

【 0 0 5 0 】

本発明の第1または第2の態様の一実施形態において、方法は、各生物学的サンプルにおける総IgG抗体濃度を決定することをさらに含む。総IgG抗体濃度を決定するための任意の好適な方法が使用されてよい。生物学的サンプル中に存在する各IgGアイソタイプの量が決定される実施形態では、この実施形態は、総IgG抗体濃度に到達するために個々のIgGアイソタイプの濃度の各々の量を加算することを単に必要とするだけである可能性がある。

【0051】

本発明の第1または第2の態様の別の実施形態では、方法は、いかなる洗浄ステップも含まず、これは、労働集約的な処理時間を排除するとともに、細胞、ビーズまたはその両方のカウントなどの洗浄に関連した読み取りの変動を低減することによってデータの完全性を改善する。

【0052】

第3の態様では、本開示は、免疫グロブリンγ(IgG)抗体の産生について複数の細胞サンプルを分析するための方法であって、

(a) 複数のサンプルウェルを有するアッセイプレートに複数の細胞サンプルを移すステップであって、各サンプルウェルが、標的IgG抗体を発現する未希釈の細胞培養物である細胞サンプルを含む、ステップ、および複数の細胞サンプルを分析試薬と混合して複数の分析混合物を生成するステップであって、分析試薬が、

(i) IgG抗体に結合する捕捉ビーズ、および

(ii) (A) 対照IgG抗体またはそのフラグメントと、(B) 第1の検出可能部分と、を含む第1の検出分子、を含む、ステップ；

(b) 捕捉ビーズに対する標的IgG抗体および第1の検出分子の結合を促進するような時間と条件下で複数の分析混合物をインキュベートするステップ；ならびに

(c) フローサイトメトリー分析によって複数の分析混合物の各分析混合物において標的IgG抗体の濃度を決定するステップ；

を含む方法を提供する。一部の実施形態において、分析試薬と複数のサンプルとの混合は、ウェル中の細胞サンプルに分析試薬を添加することを含む。他の実施形態では、混合は、複数の細胞サンプルと全ての分析試薬とを同時に混合することを含み、ここで、第1の検出分子は、捕捉ビーズへの結合に関して標的IgG抗体と競合し、各分析混合物における捕捉ビーズに結合した第1の検出分子の量は、所与の分析混合物における標的IgG抗体の濃度の尺度を提供する。さらに別の実施形態では、方法は、捕捉ビーズと第1の検出分子の段階的添加を含み、ここで、段階的添加は、

まず、捕捉ビーズに対する標的IgG抗体の結合を促進して複数の第1の混合物を生成するような時間と条件下で複数の細胞サンプルを捕捉ビーズと混合してから、捕捉ビーズに対する第1の検出分子の結合を促進して複数の分析混合物を生成するような時間と条件下で複数の第1の混合物に第1の検出分子を添加すること

を含み、各分析混合物における捕捉ビーズに結合した第1の検出分子の量は、所与の分析混合物における標的IgG抗体の濃度の尺度を提供する。

【0053】

特定の実施形態では、細胞培養物は、単一のクローンから増殖させる。他の実施形態では、細胞集団は、定義されていない。典型的には、目的の遺伝子が、候補産生細胞の集団に導入される。宿主染色体への染色体組込みは稀な事象であり、従って、通常、安定にトランスフェクトされた細胞は、様々な方法で選択および培養されなければならない。例えば、安定にトランスフェクトされた細胞の選択のために、選択マーカーが、目的の遺伝子と共発現される。G418に対する耐性を付与するネオマイシンホスホトランスフェラーゼなどの抗生物質に対する耐性、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)またはグルタミンシンターゼを含め、トランスフェクトされた細胞を選択するための様々な系が存在する。そのような系は、当業者に周知である。遺伝子導入の後、細胞は、選択剤を含む培地において培養される。薬物耐性遺伝子を含むプラスミドが組み込まれた細胞のみが生き残

10

20

30

40

50

る。目的の遺伝子が組み込まれた細胞の集団は、各ウェルに1つの細胞のみが配置されるように、希釈されてマルチウェル「マイクロタイター」プレートのウェルに分配される。これを行うための方法は、当技術分野において十分に説明されており、当業者に知られている。1ウェルあたり1つの細胞は、実際には、達成が困難な目標である。殆どのウェルは、1つの細胞を含むが、細胞がゼロのウェルおよび複数の細胞を含むウェルが数多く存在する。一般に、高レベルのタンパク質を分泌する少数の細胞株を見つけるには何十万ものウェルをスクリーニングする必要がある。

【0054】

この第3の態様で使用される場合、用語「捕捉ビーズ」は、目的のIgG分子またはタンパク質への結合のための支持体を提供することができる任意の分子を指す。特定の実施形態では、捕捉ビーズは、目的のIgG分子またはタンパク質に特異的に結合する分子と共有結合で連結されている。例えば、プロテインGおよびプロテインAは、Fab領域とFc領域を介して抗体に選択的に結合する。プロテインGもしくはプロテインAまたは他の免疫グロブリン結合性細菌タンパク質（プロテインA/GおよびプロテインLなど）を用いて免疫グロブリンを結合/検出することができる。他の実施形態では、捕捉ビーズは、IgG抗体を特異的に認識する抗体、または標的抗体が特異的に結合する分子、と共有結合で連結されてよい。一部の実施形態において、捕捉ビーズは、磁気ビーズまたはアガロースビーズである。磁気捕捉ビーズまたは常磁性捕捉ビーズは、典型的には、直径約1mm以下であり、沈降または目詰まりを防ぐのに十分なほど、十分に小さい。好適なマイクロビーズは、当業者に知られており、種々の供給元から入手できる（例えば、Invitrogen Dynal（ノルウェー）のDynabeads My-One、またはMerck（フランス）のEstepore）。上記のように、ビーズは、抗体または抗原の受動的または能動的なカップリングのために、（プロテインGなどの特異的親和性試薬と）予めカップリングされてよい種々の分子でコーティングされてよい。他の実施形態では、捕捉ビーズは、アガロースビーズであってよい。典型的には、アガロースビーズは、直径約350μm~20μmである。

【0055】

この第3の態様で使用される場合、用語「検出分子」は、目的の標的IgG分子またはタンパク質の検出を可能にする任意の分子を指す。特定の実施形態では、検出分子は、フルオロフォアまたは蛍光タンパク質などの検出可能部分を含む。検出可能部分を用いて検出分子を標識することができる。検出可能部分には、例えば、蛍光部分、ハプテン、比色部分（colorimetric moiety）、様々な放射性部分、酵素、補欠分子族、蛍光マーカー、発光マーカー、生物発光マーカー、金属粒子、タンパク質-タンパク質結合ペア、タンパク質-抗体結合ペア等が包含されてよい。蛍光部分の例としては、黄色蛍光タンパク質（YFP）、緑色蛍光タンパク質（GFP）、シアン蛍光タンパク質（CFP）、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、シアニン、塩化ダンシル、フィコシアニン、フィコエリトリンが挙げられるが、これらに限定されない。生物発光マーカーの例としては、ルシフェラーゼ（例えば、細菌のもの、ホタルのもの、コメツキムシのもの等）、ルシフェリン、エクオリン等が挙げられるが、これらに限定されない。視覚的に検出可能なシグナルを有する酵素システムの例としては、ガラクトシダーゼ、グルコリニダーゼ、ホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、コリンエステラーゼ等が挙げられるが、これらに限定されない。検出可能部分は、様々な供給元から商業的に入手可能である。

【0056】

特定の実施形態では、アッセイプレートは、凍結乾燥された分析試薬を含む。凍結乾燥は、高真空下での凍結物の急速な凍結と脱水による物質の安定調製物の創製である。凍結乾燥された生物材料は、インタクトであるとともに活性を有するはずであり、さらには、溶解が迅速であり実験室プロセスの自動化に理想的に適していること、ならびに製品の保管、輸送および最終使用者による貯蔵に望ましい、周囲温度での長い貯蔵寿命という利点を有する。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 7 】

第 4 の態様では、本開示は、免疫グロブリン γ (I g G) 抗体の産生について複数の細胞サンプルを分析するための方法であって、

(a) 複数のサンプルウェルを有するアッセイプレートに複数の細胞サンプルを移すステップであって、各サンプルウェルが、標的 I g G 抗体を発現する未希釈の細胞培養物である細胞サンプルを含む、ステップ、および複数の細胞サンプルを分析試薬と混合して複数の分析混合物を生成するステップであって、分析試薬が、

(i) I g G 抗体に結合する捕捉ビーズ、および

(i i) 第 1 の検出可能部分を含む第 1 の検出分子、を含む、ステップ；

(b) 捕捉ビーズに対する標的 I g G 抗体および第 1 の検出分子の結合を促進するような時間と条件下で複数の分析混合物をインキュベートするステップ；ならびに

(c) フローサイトメトリー分析によって複数の分析混合物の各分析混合物において標的 I g G 抗体の濃度を決定するステップ；

を含む方法を提供する。特定の実施形態では、第 1 の検出分子は、免疫グロブリン軽鎖を欠いており、且つ捕捉ビーズに結合することが可能である。一部の実施形態において、方法は、捕捉ビーズに結合した標的 I g G 抗体に対する第 2 の検出分子の結合を促進するような時間と条件下で複数の分析混合物を第 2 の検出分子と接触させることをさらに含み、ここで、第 2 の検出分子は、第 1 の検出分子と光学的に区別できる検出可能なように標識された抗 I g G 軽鎖抗体を含み、各分析混合物における標的 I g G 抗体に結合した第 2 の検出分子の量は、所与の分析混合物におけるインタクトな標的 I g G 抗体の濃度の尺度を提供する。特定の実施形態では、標識された抗軽鎖抗体が添加される前に、複数の分析混合物は、遠心分離され、洗浄ステップに供される。

【 0 0 5 8 】

一部の実施形態において、分析試薬は、細胞生存染料、細胞表面バイオマーカーまたはアポトーシスのマーカーのうちの 1 つ以上をさらに含む。細胞生存染料は、サンプルにおける非生存細胞の検出を可能にし得る。例えば、細胞生存染料は、細胞内の標的について細胞調製物がフローサイトメトリーによって分析されている場合でさえ、死細胞を恒久的に標識して分析からそれらを除外することを可能にし得る（例えば、F i x a b l e V i a b i l i t y D y e e F l o u r（登録商標）、ヨウ化プロピジウム（P I）は、一般的に生存細胞から排除される膜不透過性染料である）。細胞生存染料はまた、生細胞を標識することもできる。例えば、非蛍光化合物は、生細胞に自由に侵入し、細胞内のエステラーゼがそれを蛍光色素に変換する。そのような例では、固定または透過処理の後に当該色素が細胞内に保持されず、従って、細胞内染色プロトコルには有用でない。一部の実施形態において、分析試薬は、細胞表面バイオマーカーまたはアポトーシスのマーカーをさらに含む。当業者であれば、細胞表面マーカーが、細胞の表面上に発現されるタンパク質であり、しばしば特定の細胞型のマーカーとして便利に役立ち得る、ということ認識するであろう。例えば、T 細胞および B 細胞の表面マーカーは、分化プロセスにおけるそれらの系列と段階を特定する。

【 0 0 5 9 】

特定の実施形態では、方法は、各分析混合物における細胞の数、各分析混合物における生存細胞のパーセンテージ、各分析混合物における細胞あたりの標的 I g G 抗体の濃度、および / または各分析混合物における生存細胞あたりの標的 I g G 抗体の濃度のうちの 1 つ以上を決定することをさらに含む。一部の実施形態において、方法は、既知のユーザー定義の標準品から濃度曲線をプロットし、それらのプロットを使用して、分泌タンパク質の濃度を決定する、分析ソフトウェアを伴ってよい。他の実施形態では、サンプル中に存在する産生細胞の数が決定される。ソフトウェアは、細胞数に対する分泌タンパク質の比率を自動的に決定し、細胞あたりの分泌タンパク質の濃度を算出し、細胞あたりの分泌タンパク質の値が最も高いウェルを特定する。ハイスループットフローサイトメトリーシステムがセルソーターと共に使用される場合、ソフトウェアはまた、高分泌細胞のウェルが

ら個々の細胞を選別して所望の細胞株をさらに精製するようにシステムを制御する。

【0060】

特定の実施形態では、本出願で開示される方法は、フローサイトメトリー分析に依存する。一部の実施形態において、フローサイトメトリー用のサンプルは、希釈されていない。他の例では、サンプルは、希釈されておらず、洗浄ステップを経ない。特定の実施形態では、サンプルは、フローサイトメーター（glow cytometer）で分析される前に洗浄されてよい。フローサイトメトリーは、細胞を流体の流れに懸濁させてそれらを電子的検出装置に通すことにより、細胞の計数、細胞選別、バイオマーカーの検出およびタンパク質工学において利用され得る。

【0061】

第4の態様では、本発明は、

（a）規定比率の2種以上の異なる検出可能なように標識された標的IgGタンパク質アイソタイプまたはその抗原性フラグメントを含む、検出試薬と、

（b）2種以上の捕捉試薬集団であって、各捕捉試薬集団は、異なるIgG抗体アイソタイプに選択的に結合する結合分子を含み、各捕捉試薬集団中の結合分子は表面に結合している、2種以上の捕捉試薬集団と、を含むキットを提供する。

【0062】

この態様のキットは、例えば、本出願で説明される方法を実施するために使用されてよい。第1および第2の態様の検出試薬と捕捉試薬の実施形態は全て、この態様のキットにおいて用いられてよい。検出試薬は、2種以上の異なる検出可能なように標識された標的IgGタンパク質アイソタイプ、または対応するIgG抗体アイソタイプに結合する能力を保持するそのフラグメント、を含む。様々な実施形態において、検出試薬は、3種、4種、5種または6種以上の検出可能なように標識された標的IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントを含む。各標的IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントは、特定のIgG抗体アイソタイプに結合する能力を有する。検出試薬は、規定比率の2種、3種、4種または5種以上の異なる検出可能なように標識された標的IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントを含む。この実施形態は、生物学的サンプルにおける2種、3種、4種または5種以上のIgG抗体アイソタイプの濃度の、より迅速な定量化を可能にする。その比率が分かっている限り、任意の規定比率の検出可能なように標識された標的IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントが使用されてよい。非限定的な一実施形態において、異なる検出可能なように標識された標的IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントの各々は、ほぼ同じ濃度で存在する。別の非限定的な実施形態では、検出可能なように標識された標的IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントの各々は、ほぼ同じ量（すなわち、3種の異なる検出可能なように標識された標的IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントが存在する場合には約1：1：1）で存在する。任意の好適な濃度の標的IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントが検出試薬中に存在してよい。非限定的な一実施形態において、検出試薬中の各標的IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントは、約1 ng/ml～約10 mg/mlで存在する。様々な他の実施形態では、検出試薬中の各標的IgGタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントは、約10 ng/ml～約1 mg/ml、約100 ng/ml～約750 μg/ml、約500 ng/ml～約500 μg/ml、約1 μg/ml～約250 μg/ml、または少なくとも125 μg/mlで存在する。蛍光標識、ハプテン、比色標識、様々な放射性標識、酵素、補欠分子族、蛍光マーカー、発光マーカー、生物発光マーカー、金属粒子、タンパク質-タンパク質結合ペア、タンパク質-抗体結合ペア等を包含するがこれらに限定されない、任意の好適な検出可能標識が使用されてよい。蛍光標識の例としては、黄色蛍光タンパク質（YFP）、緑色蛍光タンパク質（GFP）、シアン蛍光タンパク質（CFP）、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、シアニン、塩化ダンシル、フィコシアニン、フィコエリトリンが

10

20

30

40

50

挙げられるが、これらに限定されない。生物発光マーカーの例としては、ルシフェラーゼ（例えば、細菌のもの、ホタルのもの、コメツキムシのもの等）、ルシフェリン、エクオリン等が挙げられるが、これらに限定されない。視覚的に検出可能なシグナルを有する酵素システムの例としては、ガラクトシダーゼ、グルコリニダーゼ、ホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、コリンエステラーゼ等が挙げられるが、これらに限定されない。検出可能標識は、様々な供給元から商業的に入手可能である。特定の実施形態では、検出標識は、フルオロフォアまたは蛍光タンパク質を含む。異なる検出可能なように標識された標的 Ig G タンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントの集団の各々は、目的の検出アッセイに応じて、同じ標識または区別可能な標識を有してよい。

【0063】

各捕捉試薬集団は、異なる特定の Ig G タンパク質アイソタイプに対して特異的であり、従って、Ig G アイソタイプに基づいて Ig G 抗体 - 標的 Ig G タンパク質混合物を分離するために使用することができる。特定の Ig G タンパク質アイソタイプに選択的に結合する任意の好適な結合分子が使用されてよい。様々な非限定的な実施形態において、結合分子は、抗体、アフィマー、アプタマー、Fc 受容体もしくは他のタンパク質 / 糖 / 脂質または組み合わせ分子を含む。特定の一実施形態では、結合分子は、Ig G タンパク質アイソタイプに選択的に結合する抗体を含む。

【0064】

各 Ig G アイソタイプ特異的捕捉試薬集団中の結合分子は、表面に結合している。ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン支持体、磁気ビーズもしくは常磁性ビーズ、アガロースビーズおよび濾過媒体（NHS - activated Sepharose または CNBr - activated Sepharose など）を包含するがこれらに限定されない、任意の好適な表面が用いられてよい。特定の一実施形態では、各 Ig G アイソタイプ特異的捕捉試薬集団中の結合分子は、磁気ビーズまたは常磁性ビーズなどのビーズに結合している。磁気捕捉ビーズまたは常磁性捕捉ビーズは、典型的には、直径約 1 mm 以下であり、沈降または目詰まりを防ぐのに十分なほど、十分に小さい。好適なビーズは、当業者に知られており、種々の供給元から入手できる（例えば、Invitrogen Dynal（ノルウェー）の Dynabeads My - One（商標）、または Merck（フランス）の Estapore）。ビーズは、抗体または抗原の受動的または能動的なカップリングのために、結合分子と予めカップリングされてよいか結合分子でコーティングされてよい。他の実施形態では、捕捉ビーズは、アガロースビーズであってよい。典型的には、アガロースビーズは、直径約 350 μm ~ 20 μm である。別の特定の実施形態では、各 Ig G アイソタイプ特異的捕捉試薬集団中の結合分子は、マイクロタイタープレートのウェル内のプリントされたアレイで存在する。

【0065】

任意の好適な密度の捕捉試薬がキット中に存在してよい。非限定的な一実施形態において、各捕捉試薬集団は、1 ミリリットルあたり約 1 万個 ~ 約 1 億個の捕捉試薬という密度で存在する。様々なさらなる実施形態では、各捕捉試薬集団は、1 ミリリットルあたり約 10 万個 ~ 約 5000 万個、約 25 万個 ~ 約 2500 万個、約 50 万個 ~ 約 1000 万個または約 75 万個 ~ 約 500 万個の捕捉試薬という密度で存在する。一実施形態において、異なる検出可能なように標識された標的 Ig G タンパク質アイソタイプまたはその抗原性フラグメントの数は、捕捉試薬の数と同じである。

【0066】

特定の一実施形態では、検出試薬は、Ig G 1、Ig G 2 a、Ig G 2 b および Ig G 3 からなる群より選択される規定比率の 2 種、3 種または 4 種の異なる検出可能なように標識された標的マウス Ig G タンパク質アイソタイプまたはその抗原性フラグメントを含み、捕捉試薬は、2 種、3 種または 4 種の捕捉試薬集団を含み、各捕捉試薬集団は、Ig G 1、Ig G 2 a、Ig G 2 b および Ig G 3 からなる群より選択される異なるマウス Ig G 抗体アイソタイプに選択的に結合する結合分子を含む。

10

20

30

40

50

【0067】

別の特定の実施形態では、検出試薬は、I g G 1、I g G 2、I g G 3およびI g G 4からなる群より選択される規定比率の2種、3種または4種の異なる検出可能なように標識された標的ヒトI g Gタンパク質アイソタイプまたはその抗原性フラグメントを含み、捕捉試薬は、2種、3種または4種の捕捉試薬集団を含み、各捕捉試薬集団は、I g G 1、I g G 2、I g G 3およびI g G 4からなる群より選択される異なるヒトI g G抗体アイソタイプに選択的に結合する結合分子を含む。

【0068】

さらなる特定の実施形態では、検出試薬は、I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b、I g G 2 cからなる群より選択される規定比率の2種、3種または4種の異なる検出可能なように標識された標的ラットI g Gタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントを含み、捕捉試薬は、2種、3種または4種の捕捉試薬集団を含み、各捕捉試薬集団は、I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b、I g G 2 cからなる群より選択される異なるラットI g G抗体アイソタイプに選択的に結合する結合分子を含む。

【0069】

様々なさらなる特定の実施形態において、

(A) 検出試薬は、規定比率の、

(i) I g G 1、I g G 2からなる群より選択される2種の異なる検出可能なように標識された標的ヤギ、ブタまたはウシI g Gタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメント；

(i i) I g G a、I g G b、I g G tからなる群より選択される2種または3種の異なる検出可能なように標識された標的ウマI g Gタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメント；あるいは

(i i i) I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4からなる群より選択される2種、3種または4種の異なる検出可能なように標識された標的サルI g Gタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメント；

を含み、

(B) 捕捉試薬は、

(i) 各捕捉試薬集団が、I g G 1、I g G 2からなる群より選択される異なる標的ヤギ、ブタまたはウシI g Gタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントに選択的に結合する結合分子を含む、2種の捕捉試薬集団；

(i i) 各捕捉試薬集団が、I g G a、I g G b、I g G tからなる群より選択される異なるウマI g Gタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントに選択的に結合する結合分子を含む、2種または3種の捕捉試薬集団；あるいは

(i i i) 各捕捉試薬集団が、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4からなる群より選択される異なるサルI g Gタンパク質アイソタイプまたはそのフラグメントに選択的に結合する結合分子を含む、2種、3種または4種の捕捉試薬集団；

を含む。これらの実施形態では、捕捉試薬は、検出試薬中に存在するI g Gタンパク質アイソタイプの種類に結合する結合分子を含む。

【0070】

別の実施形態では、キットは、検出試薬中の2種以上の異なる検出可能なように標識された標的I g Gタンパク質アイソタイプまたはその抗原性フラグメントに対応する規定比率の2種以上(2種、3種、4種または5種以上)の異なる非標識I g Gタンパク質アイソタイプまたはその抗原性フラグメントを含む、対照サンプルをさらに含む。第1および第2の態様において開示されるような対照の実施形態は全て、この態様のキットにおいて用いられてよい。

【0071】

キットは、意図される用途に適切である任意の追加的な構成要素をさらに含んでよい。一実施形態において、キットは、検出可能な細胞生存マーカーをさらに含む。

【0072】

第5の態様では、

(a) アッセイプレート、および

(b) (i) IgG抗体に結合する捕捉ビーズと、(ii) 第1の検出可能部分を含む第1の検出分子と、を含む分析試薬、を含むキットが提供される。

【0073】

第3の態様において開示される実施形態は全て、この第5の態様において用いられてよい。一部の実施形態において、第1の検出分子は、対照IgG抗体またはそのフラグメントを含む。他の実施形態では、キットは、第1の検出分子と光学的に区別できる検出可能なように標識された抗軽鎖抗体をさらに含む。キットはまた、細胞生存染料、細胞表面バイオマーカーまたはアポトーシスのマーカーのうちの1つ以上をさらに含んでもよい。一実施形態において、捕捉ビーズは、共有結合でプロテインGまたはプロテインAと連結されている。別の実施形態では、捕捉ビーズは、磁気ビーズまたはアガロースビーズである。特定の態様では、キットは、凍結乾燥された分析試薬を含むアッセイプレートを含む。

【0074】

例示的な方法と系が本出願で説明される。単語「例(example)」、「例示的(exemplary)」および「例示的(illustrative)」は、本出願では、「例、実例、または例証として役立つこと」を意味するために使用される、ということが理解されるべきである。本出願において「例(example)」、「例示的(exemplary)」または「例示的(illustrative)」であると説明される実施形態または特徴はいずれも、他の実施形態または特徴よりも好ましいか有利であると解釈されるべきであるというわけではない。本出願で説明される例示的な実施形態は、限定的であることを意味するものではない。本出願において一般的に説明されるような、および図面において示されるような、本開示の態様は、多種多様な異なる構成で配置する、置換する、組み合わせる、分離する、および設計することができ、それらの全てが、本出願において明示的に企図される、ということが容易に理解されるであろう。

【実施例】

【0075】

実施例1

【0076】

例示的な試薬の調製

(1) 検出試薬混合物の調製：同じチューブ/リザーバーにおいて、リン酸緩衝食塩水(PBS)中の0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)の十分量にフルオレセインイソチオシアネート(FITC) - マウスIgG1、FITC - マウスIgG2a、FITC - マウスIgG2bおよびFITC - マウスIgG3ならびに赤色蛍光細胞膜完全性染料(red fluorescent cell membrane integrity dye)を加えて混合する。この混合物において、最終的なFITC - マウスIgGの濃度は、各アイソタイプ(IgG1、IgG2a、IgG2bおよびIgG3)について125 μg/mLであってよい。この混合物中の最終的な赤色蛍光FL4細胞膜完全性染料(IntelliCyt Corporation)は、当該チューブ/リザーバーにおいて1:200で希釈されていてよい。

(2) マウスIgG標準品混合物の調製：予め混合したマウスIgG標準品ストックのバイアルを用意する：同じバイアルに、標識されていないマウスのIgG1タンパク質、IgG2aタンパク質、IgG2bタンパク質およびIgG3タンパク質を加えて混合する。この混合物において、各アイソタイプは、例えば200 μg/mLの濃度を有してよい。予め混合されたマウスIgGの連続的タイトレーション(serial titration)は、新鮮な細胞培養培地(生物学的サンプルが由来する培養プレートまたは培養フラスコで使用されているのと同じ培地)を用いて実施されてよい。これらの段階希釈された標準品をアッセイのセットアップにおいて後で使用して4つの標準曲線(各マウスIgGアイソタイプについて1つの標準曲線)を作成してよい。

(3) 捕捉試薬混合物の調製：同じチューブ/リザーバーにおいて、PBS中の0.1%

10

20

30

40

50

B S A の十分量にマウス I g G 1 捕捉ビーズ、マウス I g G 2 a 捕捉ビーズ、マウス I g G 2 b 捕捉ビーズおよびマウス I g G 3 捕捉ビーズを加えて混合する。最終的なマウス I g G 捕捉ビーズの密度は、各アイソタイプ (I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b および I g G 3) について 1 m L あたり 1 0 0 万個の捕捉ビーズである。

【 0 0 7 7 】

これで、ユーザーは、例えば、完全競合プロトコルまたはブレインキュベーションプロトコルのいずれかに従ってマウス I g G の定量化 / アイソタイプ決定アッセイを実行することができる。

【 0 0 7 8 】

マウス I g G の定量化 / アイソタイプ決定アッセイ (完全競合プロトコル)

10

完全競合プロトコルのためのアッセイのセットアップ :

このアッセイは、洗浄なしのワークフローを使用し、I g G の濃度 (例えば、 $\mu\text{g} / \text{mL}$) に関して結果を提供し得る。それは、4 種のマウス I g G アイソタイプについて濃度を決定するために使用される 4 つの標準曲線を作成するために基準タンパク質混合物の段階希釈物を調製することを伴う。捕捉ビーズ上の F I T C 検出シグナルは、マウス I g G の濃度と逆相関を有する。4 種の捕捉ビーズがアッセイにおいて使用されてよく、各ビーズは、単一のマウス I g G アイソタイプに対して特異的である。4 種のマウス I g G アイソタイプの濃度を合計することによって F o r e C y t (商標) (I n t e l l i c y t) ソフトウェアにより各ウェルにおいて総マウス I g G 濃度が算出されてよい。サンプルが、マウス I g G 上清に加えて細胞を有する場合、細胞数と細胞生存率も分析されてよい。

20

【 0 0 7 9 】

一つの例示的なプロトコルでは :

(1) 検出試薬混合物 (マウス F I T C - I g G および F L 4 膜完全性染料) を加える (マイクロタイタープレートのウェル 1 つあたり $5\mu\text{L}$) ;

(2) I g G サンプル / I g G 標準品を加える ($20\mu\text{L}$ / ウェル) ; クイックスピン (500g 、5 秒) 。混合 ($2,000\text{rpm}$ 、20 秒) 。

(3) 調製された 4 種混合 (4-plex) 捕捉ビーズを加える ($5\mu\text{L}$ / ウェル) ; クイックスピン (500g 、5 秒) 。混合 ($2,000\text{rpm}$ 、20 秒) 。室温 60 分。

【 0 0 8 0 】

30

これで、プレートは、i Q u e (商標) S c r e e n e r フローサイトメトリープラットフォーム上でのサンプリングなどによるシグナル検出の準備が整っている。

【 0 0 8 1 】

ブレインキュベーションプロトコルのマウス I g G の定量化 / アイソタイプ決定アッセイ :

ブレインキュベーションプロトコルのためのアッセイのセットアップ :

このアッセイは、洗浄なしのワークフローを使用し、I g G の濃度 (例えば、 $\mu\text{g} / \text{mL}$) に関して結果を提供し得る。それは、4 種のマウス I g G アイソタイプについて濃度を決定するために使用される 4 つの標準曲線を作成するために基準タンパク質混合物の段階希釈物を調製することを伴う。捕捉ビーズ上の F I T C 検出シグナルは、マウス I g G の濃度と逆相関を有する。4 種の捕捉ビーズがアッセイにおいて使用されてよく、各ビーズは、単一のマウス I g G アイソタイプに対して特異的である。4 種のマウス I g G アイソタイプの濃度を合計することによって、例えば F o r e C y t (商標) ソフトウェアにより、各ウェルにおいて総マウス I g G 濃度が算出されてよい。サンプルが、マウス I g G 上清に加えて細胞を有する場合、細胞数と細胞生存率も分析されてよい。

40

【 0 0 8 2 】

一つの例示的なプロトコルでは :

(1) 調製された 4 種混合捕捉ビーズを加える ($5\mu\text{L}$ / ウェル) ;

(2) I g G サンプル / I g G 標準品を加える ($20\mu\text{L}$ / ウェル) ; クイックスピン (500g 、5 秒) 。混合 ($2,000\text{rpm}$ 、20 秒) 。室温 30 分。

50

(3) 検出試薬混合物(マウスFITC-IgGおよびFL4膜完全性染料)を加える(5 μ L/ウェル); クイックスピン(500g、5秒)。混合(2,000rpm、20秒)。暗所で室温60分。

【0083】

これで、プレートは、iQue(商標) Screenerフローサイトメトリープラットフォーム上でのサンプリングなどによるシグナル検出の準備が整っている。

【0084】

捕捉ビーズの1つのタイプが特定のマウスIgGアイソタイプを特異的に捕捉する、マルチプレックスの4種の捕捉ビーズは、一般的な抗マウスIgG抗体でコーティングされた従来のシングルプレックスの捕捉ビーズにおける一貫性のない定量化を解決するであろう。4種の異なるマウスIgGアイソタイプは、ビーズ上にコーティングされた一般的な抗マウスIgGに対する僅かに異なる結合親和性を生じさせた僅かに異なるタンパク質構造を有する。マウスハイブリドーマまたはB細胞の培養物のスクリーニングプレートにおいて、異なるウェルが、4種のアイソタイプのうちの1つを有してよい。プレートの各ウェルにおいてマウスIgGを捕捉するためにシングルプレックスの抗マウスIgG捕捉ビーズを使用したのであれば、同じ量ではあるが異なるウェルにおいてアイソタイプの異なるマウスIgGは、IgGアイソタイプに依存した結合親和性の違いに起因して、異なる結合シグナルをビーズ上で生じさせる可能性があり、標準品として精製マウスIgG(天然の、4種のアイソタイプの混合物)を用いた標準曲線に基づく定量化は、異なるマウスIgG量を外挿することになる。これは、不正確な量を導入することになる。4種の異なる捕捉ビーズ(各アイソタイプについて1種)を用いたマルチプレックスアッセイは、この問題を解決することになる。例えば、マイクロタイタープレート内のA1のウェルがマウスIgG1を有する場合、マウスIgG1は、混合された4種の捕捉ビーズ中のマウスIgG1捕捉ビーズ上にのみ捕捉されることになる。蛍光シグナルは、マウスIgG1の標準曲線を用いることによってマウスIgG1の量に外挿されることになる。A2のウェルがマウスIgG2aを有する場合、マウスIgG2aは、混合された4種の捕捉ビーズ中のマウスIgG2a捕捉ビーズ上にのみ捕捉されることになり、マウスIgG2a捕捉ビーズ上の蛍光シグナルは、マウスIgG2aの標準曲線を用いることによってマウスIgG2aの量に外挿されることになる。

【0085】

ここで、我々は、4種の異なるアイソタイプを捕捉するための4種の捕捉ビーズと、4種のFITC-マウスIgGアイソタイプと、を反応において用いるマルチプレックス競合アッセイフォーマットを確立した(図1を参照のこと)。細胞を含むか含まない、アイソタイプが不明であるサンプルが、正しい順序で反応に加えられると、不明であり且つ標識されていないマウスIgGアイソタイプが、4種の捕捉ビーズのうちの1種のみに対して4種のFITC-マウスIgGアイソタイプのうちの1種と競合することになる。マウスIgGのアイソタイプと量の測定において、このようなアッセイは存在しないようである。このアッセイは、洗浄および希釈を必要とせず、通常は1~50 μ g/mLのマウスIgG濃度を有するハイブリドーマ上清からマウスIgGの量/アイソタイプを測定できる。

【0086】

当該アッセイはまた、ユーザーが、同じマルチプレックスアッセイにおいて細胞数と細胞生存率を測定することも可能にし得る。ユーザーは、サンプル上清または細胞を含むサンプルのいずれかをを用いることができる。後者の場合、細胞数および細胞生存率ならびにマルチプレックスビーズは、ハイスループットフローサイトメトリーで同時に測定されるであろう。

【0087】

当該アッセイは、捕捉ビーズ上のアイソタイプ特異的捕捉抗体および検出試薬および標準タンパク質をマウス種から他の種(ヒトまたはラット等など)に変更することによって、マウス種に加えて異なる種について同じ評価項目(IgGのアイソタイプ、各アイソタ

10

20

30

40

50

イブについての I g G 量、細胞数および細胞の健康状態) を測定するように拡張 / 改変できる。

【 0 0 8 8 】

図 2 は、マイクロタイタープレートにおける標準ウェルの例示的なセットアップを示す。ここでは、96 ウェルマイクロタイタープレートにおける I g G 標準ウェルの例示的なデザインが示されている。特定のウェルの各々は、4 種のアイソタイプタンパク質を有し、ここで、各マウス I g G アイソタイプ (マウスの I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b および I g G 3) は同じ量である。右側 (A 1 2 と B 1 2) の最高濃度のウェル (2 連のウェル) は、各アイソタイプについて $50 \mu\text{g} / \text{mL}$ という最高濃度を有する。1 : 2 の連続的タイトレーションを右から左に適用した。例えば、A 1 1 と B 1 1 のウェルは、各アイソタイプについて $25 \mu\text{g} / \text{mL}$ を有することになる。A 1 と B 1 のウェルは、新鮮 / ブランク培地を含むがいかなるマウス I g G タンパク質標準品も含まない、陰性対照として使用される。ユーザーは、新しい最高濃度もしくは希釈係数または希釈ステップの回数を決定することについて柔軟性を有する。例えば、ユーザーは、最高濃度についてアイソタイプ 1 種あたり $100 \mu\text{g} / \text{mL}$ を用いることができ、1 : 3 の連続的タイトレーションを用いることができ、図 2 の標準品デザインにおいて示されるような 11 回の希釈ステップではなく 6 回の希釈ステップを用いることができる。ユーザーは、384 ウェルプレートなどの他のプレートのタイプで同じ標準品デザインを用いることができる。標準品を伴わない同じプレート (例えば、図 2 の列 C ~ H) に関して、ユーザーは、細胞を含むか含まない未知のマウス I g G サンプルを実行できる。

10

20

【 0 0 8 9 】

1 つの例示的な技術では、細胞およびビーズは、サイズ (前方散乱、F S C) および / または粒度 (側方散乱、S S C) に基づいて、2 D 散乱プロットにおける分離によって検出できる。2 D プロット (F S C - H e i g h t 対 F S C - A r e a) を用いることによって、ダブレットのビーズではなくシングレットのビーズをゲーティングすることができる。シングレットのビーズは、2 D プロット (F S C - H e i g h t 対 F S C - A r e a) において 45 度で右側の集団となる。ダブレットまたは凝集物は、左側となる。シングレットのビーズは、2 D プロット (赤色蛍光チャネル R L 1 - H e i g h t 対 F S C - H e i g h t) において 4 種の捕捉ビーズ集団へとさらに分離することができる。生細胞は、赤色蛍光チャネル R L 1 - H e i g h t の 1 D ヒストグラムにおいて全細胞からゲーティングすることができる。生細胞は、蛍光染色の少ない左側の集団となる。死細胞または死にかけの細胞は、より多くの染料を吸収し、右側の細胞集団となる (ゲーティングされない)。

30

【 0 0 9 0 】

4 種のマウス I g G アイソタイプについて、プロトコルごとにアイソタイプ 1 種あたり 1 つの標準曲線が作成されてよい。検出のダイナミックレンジと線形検出レンジを表 1 にまとめる。試験される濃度の各々について、二連のウェルで実行した。F o r e C y t (商標) ソフトウェア (I n t e l l i c y t) の使用により、各点が平均 $\pm$ 標準偏差を表す標準曲線が自動的に作成される。検出のダイナミックレンジと線形検出レンジを表 1 に示す (m I g G 1 はマウス I g G 1 であり、m I g G 2 a はマウス I g G 2 a であり、他にも同様である)。

40

【 0 0 9 1 】

【表 1】

表 1：検出のダイナミックレンジと線形検出レンジ

プロトコル	レンジ	mIgG1	mIgG2a	mIgG2b	mIgG3
完全競合プロトコル (ハイブリドーマ培養物の場合： 1~50 μ g/mL IgG)	検出のダイナミックレンジ	0.05~100 μ g/mL	0.8~100 μ g/mL	0.025~100 μ g/mL	0.025~100 μ g/mL
	線形レンジ	0.9~100 μ g/mL	0.8~49 μ g/mL	0.4~14 μ g/mL	0.8~87 μ g/mL
ブレインキューベーションプロトコル (B細胞サンプルの場合： 0.1~2 μ g/mL IgG)	検出のダイナミックレンジ	0.006~100 μ g/mL	0.006~25 μ g/mL	0.01~12.5 μ g/mL	0.01~100 μ g/mL
	線形レンジ	0.1~4.6 μ g/mL	0.2~3 μ g/mL	0.07~1 μ g/mL	0.5~59 μ g/mL

【0092】

標準曲線において試験される最高濃度は、アイソタイプ1種あたり100 μ g/mLであった。このアッセイでは、100 μ g/mL超は試験されなかった。標準品は、10%ウシ胎仔血清を含むDMEM培養培地で希釈された。試験では、19ポイントの1:2の連続的タイトレーションが実行された。

20

【0093】

曲線の当てはめに関して：線形レンジを自動的に検出して線形レンジを提示する、重みをフィッティングするための1/Y平方での4PLフィッティング方法を伴うForeCyt（商標）ソフトウェア（Intelligence）を用いた。線形レンジは、それについて電子増幅器が入力信号の直接的な線形関数である出力信号を生成した入力値または出力値の範囲である。すなわち、出力は、式：出力=入力×ゲインで表すことができる。線形レンジは、未知のサンプルのシグナルがこの範囲に入る場合、正確/高感度な定量化をもたらす。

【0094】

使用される検出レンジは、下限検出限界（IgGが0 μ g/mLであるブランクの標準偏差の3倍であるシグナルを伴う最小濃度）と上限検出限界（ForeCyt（商標）ソフトウェアによって決定された飽和シグナルの標準偏差の3倍であるシグナルを伴う最大濃度）との間の範囲を意味する。標準曲線が飽和に達しないのであれば、最も高い試験濃度（ここでは100 μ g/mL）が使用される。

30

【0095】

ハイブリドーマ培養物からのサンプルについては、完全競合プロトコルが推奨される可能性がある。マウスB細胞培養物からのサンプルについては、ブレインキューベーションプロトコルが推奨される可能性がある。

【0096】

実施例2

以下では、高レベルの分泌タンパク質またはIgG抗体を産生する細胞を特定するための特定の態様のアッセイの例示的なプロトコルが説明される。

(1) 各ウェルに1つの細胞のみが配置されるように、候補産生細胞を希釈してマルチウェル「マイクロタイター」プレートのウェルに分配する。これを行うための方法は、当技術分野において十分に説明されている。1ウェルあたり1つの細胞は、実際には、達成が困難な目標である。殆どのウェルは、1つの細胞を含むが、細胞がゼロのウェルおよび複数の細胞を含むウェルが数多く存在する。一般に、高レベルのタンパク質を分泌する少数の細胞株を見つけるには何十万ものウェルをスクリーニングする必要がある。

(2) 細胞を増殖させて各ウェルの細胞数を増加させる。増殖は、有糸分裂を介して起こ

40

50

っているため、各ウェルの娘細胞は、そのウェルに配置された元の細胞（複数可）の正確なコピーとなる。

（３）細胞が増殖するにつれて、それらはタンパク質バイオ医薬品（すなわち、IgG抗体）を産生し、それを培養上清中に分泌する。

（４）代表的量の分泌タンパク質と産生細胞とを含む、各ウェルの未希釈アリコート、凍結乾燥されたアッセイプレートの新しいウェルに移す。凍結乾燥されたアッセイプレートの各ウェルは、凍結乾燥された試薬を含み、当該試薬は、存在する分泌タンパク質の量を定量化するために使用されると同時に、サンプル中に存在する産生細胞の数をアッセイするために使用され得る。試薬キットから凍結乾燥されていない形態に調製された定量化試薬が分析のために使用される可能性もある。凍結乾燥されたアッセイプレートまたは当該試薬キットは、以下のアイテムを含んでよい：

10

（a）捕捉ビーズ - 例えば、分泌タンパク質上の特定の部位に結合して分泌タンパク質をミクロスフェアの表面上に捕捉する分子でコーティングされた蛍光ミクロスフェア。

（b）蛍光プローブで標識されている検出分子であって、ミクロスフェア表面上に捕捉された分泌タンパク質上の異なる領域に結合する検出分子。そのため、各ミクロスフェアに関連する蛍光の強度は、サンプル中に存在する捕捉された分泌タンパク質分子の数と直接関連する。

（５）インキュベーション時間の後、サンプルをハイスループットフローサイトメトリーによって分析する。ハイスループットフローサイトメトリーシステムの一例は、数千のサンプルを数分で分析できるフローサイトメーターと組み合わせたHyperCyt（商標）HTFCシステムである。

20

（６）ハイスループットフローサイトメトリー検出システムは、標準曲線から分泌タンパク質の濃度を算出するために使用される、ビーズと結合した検出分子の蛍光強度を報告するようにセットアップされる。さらに、サンプル中に存在する産生細胞の数を同時に決定できる。専売のソフトウェア解析パッケージが、細胞数に対する分泌タンパク質の比率を自動的に決定し、細胞あたりの分泌タンパク質の濃度を算出する。ハイスループットフローサイトメトリーシステムがセルソーターと共に使用される場合、ソフトウェアはまた、高分泌細胞のウェルから個々の細胞を選別して所望の細胞株をさらに精製するようにシステムを制御する。

【0097】

30

第1のプロトコル---IgG定量アッセイ - 段階的プロトコル（例示）：

（１）プロテインGでコーティングされたビーズ（6～8 μmのサイズ、0.5 % v / v）をボルテックスする。ビーズをリン酸緩衝食塩水（PBS）中の0.1 % ウシ血清アルブミン（BSA）で1：15希釈する。希釈したビーズを混合し、マイクロタイターアッセイプレート（96ウェルプレートまたは384ウェルプレートのいずれか）の各ウェルにビーズを5 μL / ウェルで加える。

（２）アッセイプレートの各ウェルに、20 μLのIgGサンプル（IgGの標準曲線を作成するためのIgG標準品または懸濁CHO細胞培養物 / 分泌IgG混合物もしくは懸濁CHO細胞培養物からのIgG上清のみのいずれか）を加える。

（３）アッセイプレートを短時間スピンしてサンプルをウェルの底に沈める（500 g × 8秒）。プレートシェーカー上でプレート内のサンプルを混合する（2000 rpm × 20秒）。

40

（４）アッセイプレートを室温で30分間インキュベートする。光からプレートを保護する。

（５）混合検出試薬を調製する：同じチューブ内においてPBS中の0.1 % BSAで20 μg / mLのFITC - Fcフラグメント（Jackson ImmunoResearch Laboratory Inc.）と20 nMのFL4膜完全性染料（IntelliCyt Corporation）を作製する。

（６）アッセイプレートの各ウェルに5 μLの混合検出試薬を加える。

（７）アッセイプレートを短時間スピンしてサンプルをウェルの底に沈める（500 g ×

50

8 秒)。プレートシェーカー上でプレート内のサンプルを混合する(2000rpm×20 秒)。

(8) アッセイプレート室温で30 分間インキュベートする。光からプレートを保護する。

(9) IntelliCyt iQue (商標) Screener プラットフォームなどのハイスループットフローサイトメーターによってアッセイプレートからサンプルを取得する。

【0098】

実施例2：第2のプロトコル---IgG 定量アッセイ - 同時プロトコル：

(1) 混合検出試薬を調製する：同じチューブ内においてPBS 中の0.1%BSA で20 μg/mL のFITC - Fc フラグメント(Jackson ImmunoResearch Laboratory Inc.)と20 nM のFL4 膜完全性染料(IntelliCyt Corporation)を作製する。

(2) マイクロタイターアッセイプレート(96 ウェルプレートまたは384 ウェルプレートのいずれか)の各ウェルに5 μL の混合検出試薬を加える。

(3) アッセイプレートの各ウェルに、20 μL のIgG サンプル(IgG の標準曲線を作成するためのIgG 標準品または懸濁CHO 細胞培養物/分泌IgG 混合物もしくは懸濁CHO 細胞培養物からのIgG 上清のみのいずれか)を加える。

(4) アッセイプレートを短時間スピンしてサンプルと混合検出試薬混合物をウェルの底に沈める(500g×8 秒)。プレートシェーカー上でプレート内のサンプルを混合する(2000rpm×20 秒)。

(5) プロテインG でコーティングされたビーズ(6~8 μm のサイズ、0.5%v/v)をボルテックスする。ビーズをリン酸緩衝食塩水(PBS)中の0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)で1:15 希釈する。希釈したビーズを混合し、サンプル/検出混合物を伴うアッセイプレートの各ウェルにビーズを5 μL /ウェルで加える。

(6) アッセイプレートを短時間スピンして液体をウェルの底に沈める(500g×8 秒)。プレートシェーカー上でプレート内のサンプルを混合する(2000rpm×20 秒)。

(7) アッセイプレートを室温で60 分間インキュベートする。光からプレートを保護する。

(8) IntelliCyt iQue (商標) Screener プラットフォームなどのハイスループットフローサイトメーターによってアッセイプレートからサンプルを取得する。

【0099】

第3のプロトコル---IgG 定量と軽鎖検出のアッセイ - 段階的プロトコル(例示)：

(1) プロテインG でコーティングされたビーズ(6~8 μm のサイズ、0.5%v/v)をボルテックスする。ビーズをリン酸緩衝食塩水(PBS)中の0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)で1:15 希釈する。希釈したビーズを混合し、マイクロタイターアッセイプレート(96 ウェルプレートまたは384 ウェルプレートのいずれか)の各ウェルにビーズを5 μL /ウェルで加える。

(2) アッセイプレートの各ウェルに、20 μL のIgG サンプル(IgG の標準曲線を作成するためのIgG 標準品または懸濁CHO 細胞培養物/分泌IgG 混合物もしくは懸濁CHO 細胞培養物からのIgG 上清のみのいずれか)を加える。

(3) アッセイプレートを短時間スピンしてサンプルをウェルの底に沈める(500g×8 秒)。プレートシェーカー上でプレート内のサンプルを混合する(2000rpm×20 秒)。

(4) アッセイプレートを室温で30 分間インキュベートする。光からプレートを保護する。

(5) 混合検出試薬を調製する：同じチューブ内においてPBS 中の0.1%BSA で20 μg/mL のFITC - Fc フラグメント(Jackson ImmunoResearch

10

20

30

40

50

rch Laboratory Inc.)と $10\mu\text{g}/\text{mL}$ のPE-F(ab')₂抗ヒトIgκ軽鎖(ThermoFisher)と 20nM のFL4膜完全性染料(IntelliCyt Corporation)を作製する。

(6)アッセイプレートの各ウェルに $5\mu\text{L}$ の混合検出試薬を加える。

(7)アッセイプレートを短時間スピンしてサンプルをウェルの底に沈める($500\text{g}\times 8\text{秒}$)。プレートシェーカー上でプレート内のサンプルを混合する($2000\text{rpm}\times 20\text{秒}$)。

(8)アッセイプレートを室温で30分間インキュベートする。光からプレートを保護する。

(9)IntelliCyt iQue Screenerプラットフォームなどのハイスループットフローサイトメーターによってアッセイプレートからサンプルを取得する。

10

【0100】

実施例4：第4のプロトコル---IgG定量と軽鎖検出のアッセイ - 同時プロトコル：

(1)混合検出試薬を調製する：同じチューブ内においてPBS中の0.1%BSAで $20\mu\text{g}/\text{mL}$ のFITC-Fcフラグメント(Jackson ImmunoResearch Laboratory Inc.)と $10\mu\text{g}/\text{mL}$ のPE-F(ab')₂抗ヒトIgκ軽鎖(ThermoFisher)と 20nM のFL4膜完全性染料(IntelliCyt Corporation)を作製する。

(2)マイクロタイターアッセイプレート(96ウェルプレートまたは384ウェルプレートのいずれか)の各ウェルに $5\mu\text{L}$ の混合検出試薬を加える。

20

(3)アッセイプレートの各ウェルに、 $20\mu\text{L}$ のIgGサンプル(IgGの標準曲線を作成するためのIgG標準品または懸濁CHO細胞培養物/分泌IgG混合物もしくは懸濁CHO細胞培養物からのIgG上清のみのいずれか)を加える。

(4)アッセイプレートを短時間スピンしてサンプルと混合検出試薬混合物をウェルの底に沈める($500\text{g}\times 8\text{秒}$)。プレートシェーカー上でプレート内のサンプルを混合する($2000\text{rpm}\times 20\text{秒}$)。

(5)プロテインGでコーティングされたビーズ($6\sim 8\mu\text{m}$ のサイズ、0.5%v/v)をボルテックスする。ビーズをリン酸緩衝食塩水(PBS)中の0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)で1:15希釈する。希釈したビーズを混合し、サンプル/検出混合物を伴うアッセイプレートの各ウェルにビーズを $5\mu\text{L}$ /ウェルで加える。

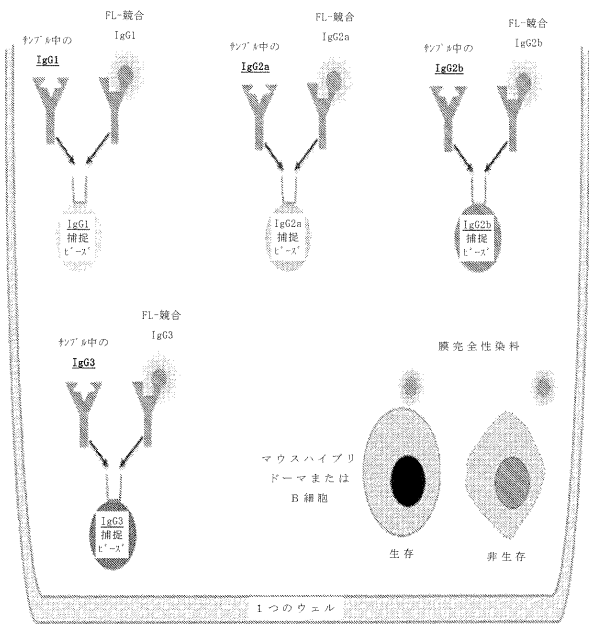
30

(6)アッセイプレートを短時間スピンして液体をウェルの底に沈める($500\text{g}\times 8\text{秒}$)。プレートシェーカー上でプレート内のサンプルを混合する($2000\text{rpm}\times 20\text{秒}$)。

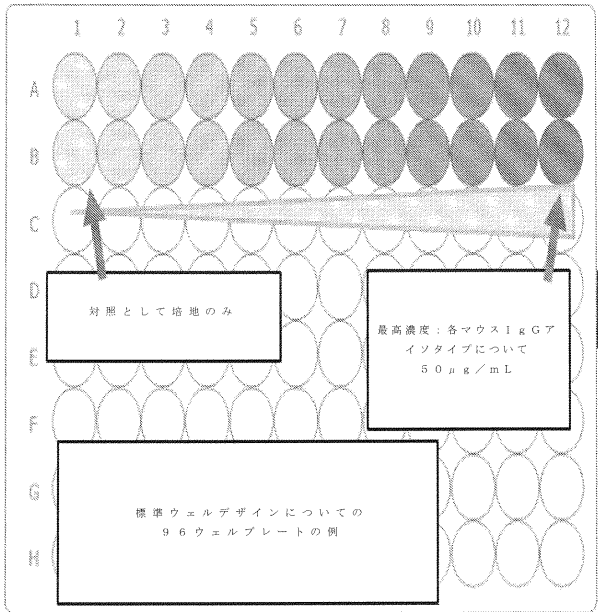
(7)アッセイプレートを室温で60分間インキュベートする。光からプレートを保護する。

(8)IntelliCyt iQue Screenerプラットフォームなどのハイスループットフローサイトメーターによってアッセイプレートからサンプルを取得する。

【図 1】



【図 2】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/063516**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-31

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2017/063516

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/68 G01N33/543
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARAÑÓN F ET AL: "A competitive enzyme immunoassay Subclass for the determination of total IgG-subclass levels in human serum. Comparison with single radial immunodiffusion.", JOURNAL OF IMMUNOASSAY MAY 1994, vol. 15, no. 2, May 1994 (1994-05), pages 147-156, XP002777739, ISSN: 0197-1522 abstract page 148, paragraph 2 page 149, last paragraph ----- -/--	1-31

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ 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

29 January 2018

Date of mailing of the international search report

16/04/2018

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

Luis Alves, Dulce

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2017/063516

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AUCOUTURIER P ET AL: "Distribution of IgG subclass levels in normal adult sera as determined by a competitive enzyme immunoassay using monoclonal antibodies.", DIAGNOSTIC IMMUNOLOGY 1985, vol. 3, no. 4, 1985, pages 191-196, XP002777740, ISSN: 0735-3111 abstract -----	1-31
A	ANDERSEN NANCY J ET AL: "Detection of immunoglobulin isotypes from dried blood spots.", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS FEB 2014, vol. 404, February 2014 (2014-02), pages 24-32, XP002777741, ISSN: 1872-7905 abstract Section 2.3; figure 4 -----	1-31

International Application No. PCT/US2017/063516

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-31

Assay methods for IgG antibody isotype (subclass) making use of a microtiter plate for incubating the samples, detections reagents which comprise labelled IgG isotype proteins and capture reagents which comprise a population of immobilised molecules, each molecule in the said population being specific for a different IgG isotype (subclass); corresponding kits.

2. claims: 32-53

Assay method for parallel analysis of a plurality of cell samples by flow cytometry, the samples being undiluted, involving incubation with (i) a capture bead which binds to IgG antibody and (ii) a labelled detection molecule which comprises a control IgG antibody; corresponding kits.

フロントページの続き

(81)指定国・地域 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,JO,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

(74)代理人 100191086

弁理士 高橋 香元

(72)発明者 リュウ, チャオビン

アメリカ合衆国, ニューメキシコ州 87113, アルバカーキ, 5700 パサディナ アベニュー ノースイースト, インテリサイト コーポレーション内

(72)発明者 ダンシング, トーマス

アメリカ合衆国, ニューメキシコ州 87113, アルバカーキ, 5700 パサディナ アベニュー ノースイースト, インテリサイト コーポレーション内

F ターム(参考) 2G045 AA40

4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ79 QR48 QR56 QS32 QX02

专利名称(译)	用于确定生物样品中免疫球蛋白γ (igg) 抗体同种型浓度的方法和试剂		
公开(公告)号	JP2020505583A	公开(公告)日	2020-02-20
申请号	JP2019536040	申请日	2017-11-28
发明人	リュウ,チャオビン ダンシング,トーマス		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/483 C12Q1/02		
CPC分类号	G01N33/54326 G01N33/686 G01N33/542 G01N33/6854		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/543.551.A G01N33/543.541.A G01N33/483.C C12Q1/02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QS32 4B063/QX02		
代理人(译)	Iwahori明代		
优先权	62/447772 2017-01-18 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文公开了用于确定来自生物样品的免疫球蛋白γ (IgG) 抗体同种型的浓度和用于分析多个细胞样品以产生IgG抗体的方法和试剂。 [选择图]无

(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2020-505583 (P2020-505583A) (43) 公表日 令和2年2月20日 (2020. 2. 20)
(51) Int. Cl. G 0 1 N 33/53 (2006.01) G 0 1 N 33/543 (2006.01) G 0 1 N 33/483 (2006.01) C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	F I G O 1 N 33/53 N G O 1 N 33/543 5 5 1 A G O 1 N 33/543 5 4 1 A G O 1 N 33/483 C C 1 2 Q 1/02	テーマコード (参考) 2 G 0 4 5 4 B 0 6 3
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 41 頁)		
(21) 出願番号 特願2019-536040 (P2019-536040) (86) (22) 出願日 平成29年11月28日 (2017.11.28) (85) 翻訳文提出日 令和1年7月16日 (2019.7.16) (86) 国際出願番号 PCT/US2017/063516 (87) 国際公開番号 W02018/136152 (87) 国際公開日 平成30年7月26日 (2018.7.26) (31) 優先権主張番号 62/447,772 (32) 優先日 平成29年1月18日 (2017.1.18) (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)	(71) 出願人 519231832 エッセン インストラメンツ、インコーポ レイテッド デイー/ビー/エー エッセ ン バイオサイエンス、インコーポレイテ ッド アメリカ合衆国、ミシガン州 48108 、アナーバー、300 ウェスト モーガ ン ロード (74) 代理人 100114775 弁理士 高岡 亮一 (74) 代理人 100121511 弁理士 小田 直 (74) 代理人 100202751 弁理士 岩堀 明代	最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 生物学的サンプルから免疫グロブリンγ (I g G) 抗体アイソタイプの濃度を決定するための方法および試薬		