

(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2017-513030

(P2017-513030A)

(43) 公表日 平成29年5月25日 (2017.5.25)

(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 J	4 B O 6 3
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1	4 H O 4 5
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/553	
CO 7 K 16/16 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 D	
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	CO 7 K 16/16 Z N A	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 53 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2017-503803 (P2017-503803)
 (86) (22) 出願日 平成27年4月6日 (2015.4.6)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年12月1日 (2016.12.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/024578
 (87) 国際公開番号 W02015/154091
 (87) 国際公開日 平成27年10月8日 (2015.10.8)
 (31) 優先権主張番号 61/975,386
 (32) 優先日 平成26年4月4日 (2014.4.4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/051,757
 (32) 優先日 平成26年9月17日 (2014.9.17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 515113156
 オートテリック エルエルシー
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 1
 7 4 8, シティ オブ インダストリー,
 スイート 2 5 0, 1 7 8 7 0 キャッス
 トン ストリート
 (74) 代理人 100108855
 弁理士 蔵田 昌俊
 (74) 代理人 100103034
 弁理士 野河 信久
 (74) 代理人 100153051
 弁理士 河野 直樹
 (74) 代理人 100179062
 弁理士 井上 正

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 パクリタキセルの薬物動態ガイド下投薬のための血漿中パクリタキセル濃度のモニタリングのための方法、デバイス、および試薬

(57) 【要約】

治療剤をアッセイするための方法、デバイス、および組成物。1つの側面においては、パクリタキセルの治療薬モニタリングガイド下治療を提供するためにパクリタキセルをアッセイするための方法、デバイス、および組成物。

【選択図】 図 5 A

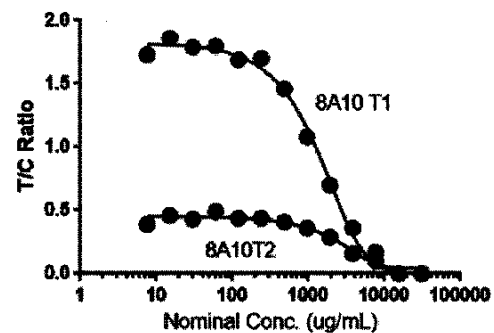


FIG. 5A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

液体試料中のパクリタキセルをアッセイするための方法であって、

(a) パクリタキセルを含む液体試料をラテラルフローアッセイデバイスに適用することであって、前記デバイスが

(i) 前記液体試料を受容するための試料受容ゾーン、

(i i) 前記試料受容ゾーンと液通し、前記試料受容ゾーンから流れ方向下流にある検出試薬ゾーンであって、

前記検出試薬ゾーンがその上に堆積した検出試薬を含み、

前記検出試薬が、検出可能なレポート基で標識された、パクリタキセルと結合するパクリタキセル抗体またはその断片もしくは誘導体であり、

前記パクリタキセル抗体またはその断片もしくは誘導体が、約 $10^4 \sim 10^7$ の K_{on} および約 $10^{-3} \sim 10^{-7}$ の K_{off} を有する検出試薬ゾーン、および

(i i i) 前記検出試薬ゾーンと液通し、前記検出試薬ゾーンから流れ方向下流にある捕捉ゾーン

を含み、

前記捕捉ゾーンがその上に固定化された第 1 および第 2 の捕捉試薬を含み、

前記第 1 の捕捉試薬が前記検出試薬と結合可能なパクリタキセル材料であり（試験ライン）、

前記第 2 の捕捉試薬が前記検出試薬と結合可能な抗体であり（対照ライン）、

前記第 1 の捕捉試薬が前記捕捉ゾーンの上流端から流れ方向下流の第 1 の距離に位置し、

前記第 2 の捕捉試薬が前記捕捉ゾーンの上流端から流れ方向下流の第 2 の距離に位置し、

前記第 2 の距離が前記第 1 の距離より大きく、

前記 K_{on} が約 2.0×10^5 より大きく前記 K_{off} が約 1.0×10^{-3} より小さい場合には前記第 1 の距離対前記第 2 の距離の比は約 0.0 ～ 約 0.4 であり、

前記 K_{on} が約 2.0×10^4 より大きく前記 K_{off} が約 2.0×10^{-4} より小さい場合には前記第 1 の距離対前記第 2 の距離の比は約 0.2 ～ 約 1.0 であること、

(b) 前記試料を前記試料受容ゾーンから前記検出試薬ゾーンに流動させて検出試薬にパクリタキセルを供給すること、

(c) 前記検出試薬をパクリタキセルとともに前記捕捉ゾーンに流動させることであって

、前記第 1 の捕捉試薬（試験ライン）が前記検出試薬との結合に関して分析物質（パクリタキセル）と競合し、

前記第 2 の捕捉試薬（対照ライン）が過剰の検出試薬と結合すること、ならびに

(d) 前記第 2 の捕捉試薬（対照ライン）と比較して前記第 1 の捕捉試薬（試験ライン）に結合した検出試薬の量を観測すること

を含む、方法。

【請求項 2】

対照ラインおよび試験ラインにおいて結合した検出試薬の量を定量することによって前記試料中のパクリタキセルの量を決定することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記捕捉試薬に結合した検出試薬の量を定量することが光学密度の測定を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記検出可能なレポート基が金コロイドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記パクリタキセル抗体が 3 C 6 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記パクリタキセル抗体が 8 A 1 0 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

10

20

30

40

50

前記パクリタキセル材料が前記検出試薬への結合に関してパクリタキセルと競合するパクリタキセル抗原である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記パクリタキセル材料がパクリタキセルタンパク質コンジュゲートである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記検出試薬と結合可能な抗体がヤギ抗マウス抗体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記試料受容ゾーンと前記第 1 の捕捉試薬との間の距離を変化させて、パクリタキセルの検出感度を最適化する、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 11】

前記試料受容ゾーンと前記第 1 の捕捉試薬との間の距離を最小化して、パクリタキセルの検出感度を最適化する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記第 2 の捕捉試薬（対照ライン）に結合した過剰の検出試薬の量を観測することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記第 2 の捕捉試薬に結合した過剰の検出試薬の量を定量することによって前記試料中のパクリタキセルの量を決定することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

20

前記第 1 および第 2 の捕捉ゾーンの中間の第 3 の捕捉ゾーンをさらに含み、前記第 3 の捕捉ゾーンが前記検出試薬と結合可能なパクリタキセル材料を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記第 3 の捕捉試薬に結合した検出試薬の量を定量することによって前記試料中のパクリタキセルの量を決定することを含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記第 3 の捕捉試薬に結合した検出試薬の量を定量することが光学密度の測定を含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

30

前記ラテラルフローデバイスが、前記捕捉試薬ゾーンと液通し、前記捕捉試薬ゾーンから流れ方向下流にある吸収ゾーンをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

LFA を SPR または他の固相イムノアッセイに置きかえることができる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

第 1 および第 2 の抗体を用い、前記第 1 の抗体が 10^4 より大きい K_{on} を有し、前記第 2 の抗体が 10^{-3} より小さい K_{off} を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

再現性を増大させダイナミックレンジを拡大させるために 2 本または 3 本のラインを用いて同一試料について複数の読み取りを生成することができる、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 21】

癌と診断された患者におけるパクリタキセル療法の有効性をモニターするための方法であって、

(a) 第 1 の時点で癌患者をパクリタキセルで処置すること、

(b) 第 1 の時点で前記患者におけるパクリタキセルの第 1 の濃度を決定することであって、前記濃度を決定することが請求項 1 から 20 の何れか一項に記載の方法を含むこと、

(c) 第 2 の時点で前記患者をパクリタキセルで処置すること、

(d) 第 2 の時点で前記患者におけるパクリタキセルの第 2 の濃度を決定することであって、前記濃度を決定することが請求項 1 から 20 の何れか一項に記載の方法を含むこと

50

、および

(e) 癌処置の有効性を決定するために前記患者におけるパクリタキセルの前記第 1 の濃度と第 2 の濃度を比較することを含む、方法。

【請求項 2 2】

癌と診断された患者におけるパクリタキセル療法の PK ガイド下投薬のための方法であって、

(a) 第 1 の時点で前記癌患者をパクリタキセルで処置すること、
第 1 の時点で前記患者におけるパクリタキセルの 1 つ以上の薬物動態パラメーターを決定することであって、前記 1 つ以上の薬物動態パラメーターを決定することが請求項 1 から 20 の何れか一項に記載の方法によってパクリタキセルの濃度を測定することを含むこと、

(b) 前記第 1 の投薬からの PK 情報を用いて第 2 の時点で前記患者をパクリタキセルで処置すること、

(c) 第 2 の時点で前記患者におけるパクリタキセルの 1 つ以上の薬物動態パラメーターを決定することであって、前記 1 つ以上の薬物動態パラメーターを決定することが請求項 1 から 20 の何れか一項に記載の方法によってパクリタキセルの濃度を測定することを含むこと、および

(d) 適切な投薬が達成されたことを確認するために、前記第 1 の時点における対象のパクリタキセルの 1 つ以上の薬物動態パラメーターを前記第 2 の時点におけるレベルと比較することを含む、方法。

【請求項 2 3】

前記薬物動態パラメーターが、最大濃度までの時間 (T_{max})、濃度最大値 (C_{max})、曲線下面積 (AUC)、クリアランス (CL)、分布体積 (V_d)、最終相の間の見かけの分布体積 (V_z)、定常状態の間の見かけの分布体積 (V_{ss}) およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

(a) 液体試料を受容するための試料受容ゾーン、

(b) 前記試料受容ゾーンと液通し、前記試料受容ゾーンから流れ方向下流にある検出試薬ゾーンであって、

その上に堆積した 1 つ以上の検出試薬を含む検出試薬ゾーン、

(c) 前記検出試薬ゾーンと液通し、前記検出試薬ゾーンから流れ方向下流にある捕捉ゾーンであって、

その上に固定化された 1 つ以上の捕捉試薬を含む捕捉ゾーン、および

(d) 前記捕捉ゾーンと液通し、前記捕捉試薬ゾーンから流れ方向下流にある吸収ゾーンを含む、ラテラルフローデバイス。

【請求項 2 5】

前記検出試薬が検出可能なレポート基で標識された抗体である、請求項 2 4 に記載のデバイス。

【請求項 2 6】

前記検出試薬が治療薬に第 1 の親和性を有する第 1 の抗体および前記治療薬に第 2 の親和性を有する第 2 の抗体を含み、前記第 1 の親和性が前記第 2 の親和性より大きい、請求項 2 4 に記載のデバイス。

【請求項 2 7】

前記捕捉試薬が前記検出試薬への結合に関して前記治療薬と競合する抗原である、請求項 2 4 に記載のデバイス。

【請求項 2 8】

前記捕捉試薬が前記検出試薬と結合可能な抗体である、請求項 2 4 に記載のデバイス。

【請求項 2 9】

10

20

30

40

50

前記捕捉試薬が前記検出試薬への結合に関して前記治療薬と競合する抗原である第 1 の捕捉試薬と、前記検出試薬と結合可能な抗体である第 2 の捕捉試薬とを含む、請求項 2 4 に記載のデバイス。

【請求項 3 0】

前記第 1 の捕捉試薬が、前記第 2 の捕捉試薬から流れ方向上流に固定化されている、請求項 2 4 に記載のデバイス。

【請求項 3 1】

前記試料受容ゾーンと前記第 1 の捕捉試薬との間の距離を変化させて、前記治療薬の検出を最適化する、請求項 3 0 に記載のデバイス。

【請求項 3 2】

前記第 1 および第 2 の捕捉試薬の中間に固定化された第 3 の捕捉試薬をさらに含み、前記第 3 の捕捉試薬が、前記検出試薬への結合に関して前記治療薬と競合する抗原である、請求項 3 0 に記載のデバイス。

【請求項 3 3】

前記治療薬がパクリタキセルであり、前記検出試薬が 8 A 1 0 および 3 C 6 から選択されるモノクローナル抗体またはその断片もしくは誘導体を含み、前記抗体、または断片もしくは誘導体がパクリタキセルに結合する、請求項 2 4 に記載のデバイス。

【請求項 3 4】

試料中の治療薬をアッセイするための方法であって、

(a) 請求項 2 4 から 3 3 の何れか一項に記載のデバイスの試料受容ゾーンに試料を適用すること、および

(b) 前記 1 つ以上の固定化された捕捉試薬に結合した検出試薬の量を観測することを含む方法。

【請求項 3 5】

前記 1 つ以上の固定化された捕捉試薬に結合した検出試薬の量を定量することによって前記試料中の治療薬の量を決定することをさらに含む、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

検出試薬が第 1 の捕捉位置において捕捉試薬に結合する、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 7】

検出試薬が第 2 の捕捉位置において捕捉試薬に結合する、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 8】

検出試薬が第 1 および第 2 の捕捉位置において捕捉試薬に結合する、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記治療薬がパクリタキセルである、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記検出試薬が 8 A 1 0 および 3 C 6 から選択されるモノクローナル抗体またはその断片もしくは誘導体を含み、前記抗体、または断片もしくは誘導体がパクリタキセルに結合する、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 4 1】

疾患または状態と診断された患者における治療処置の有効性をモニターするための方法であって、

(a) 第 1 の時点で患者を治療剤で処置すること、

(b) 第 1 の時点で前記患者における前記治療剤の第 1 の濃度を決定することであって、前記濃度を決定することが請求項 3 4 から 4 0 の何れか一項に記載の方法を含むこと、

(c) 第 2 の時点で前記患者を前記治療剤で処置すること、

(d) 第 2 の時点で前記患者における前記治療剤の第 2 の濃度を決定することであって、前記濃度を決定することが請求項 3 4 から 4 0 の何れか一項に記載の方法を含むこと、および

(e) 前記治療処置の有効性を決定するために前記患者における前記第 1 および第 2 の濃

10

20

30

40

50

度を比較すること
を含む、方法。

【請求項 4 2】

前記疾患または状態の処置が治療薬モニタリングから利益を受ける、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記疾患または状態が癌、炎症、高血圧、心臓血管、または疼痛である、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記治療剤がパクリタキセル、ドセタキセル、7-エピパクリタキセル、ト-アセチルパクリタキセル、10-デスアセチル-パクリタキセル、10-デスアセチル-7-エピパクリタキセル、7-キシロシルパクリタキセル、10-デスアセチル-7-グルタリルパクリタキセル、7-N, N-ジメチルグリシルパクリタキセル、および7-L-アラニルパクリタキセルからなる群から選択される、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 5】

疾患または状態と診断された患者における治療処置の PK ガイド下投薬のための方法であって、

(a) 第 1 の時点で前記患者を治療剤で処置すること、
第 1 の時点で前記患者における前記治療剤の 1 つ以上の薬物動態パラメーターを決定することであって、前記 1 つ以上の薬物動態パラメーターを決定することが請求項 3 4 から 40 の何れか一項に記載の方法によって前記治療剤をアッセイすることを含むこと、

(b) 前記第 1 の投薬から得られた PK データを用いて第 2 の時点で前記患者を前記治療剤で処置すること、

(c) 第 2 の時点で前記患者における前記治療剤の 1 つ以上の薬物動態パラメーターを決定することであって、前記 1 つ以上の薬物動態パラメーターを決定することが請求項 3 4 から 40 の何れか一項に記載の方法によって前記治療剤をアッセイすることを含むこと、および

(d) 適切な投薬が達成されたことを確認するために、前記第 1 の時点における前記対象の前記治療薬剤の 1 つ以上の薬物動態パラメーターを前記第 2 の時点におけるレベルと比較すること

を含む方法。

【請求項 4 6】

前記薬物動態パラメーターが、最大濃度までの時間 (T_{max})、濃度最大値 (C_{max})、曲線下面積 (AUC)、クリアランス (CL)、分布体積 (V_d)、最終相の間の見かけの分布体積 (V_z)、定常状態の間の見かけの分布体積 (V_{ss}) およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記疾患または状態が癌、炎症、高血圧、心臓血管、または疼痛である、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記治療剤がパクリタキセル、ドセタキセル、7-エピパクリタキセル、ト-アセチルパクリタキセル、10-デスアセチル-パクリタキセル、10-デスアセチル-7-エピパクリタキセル、7-キシロシルパクリタキセル、10-デスアセチル-7-グルタリルパクリタキセル、7-N, N-ジメチルグリシルパクリタキセル、および7-L-アラニルパクリタキセルからなる群から選択される、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 9】

パクリタキセルに結合する、8A10 および 3C6 から選択されるモノクローナル抗体、またはその断片もしくは誘導体。

【請求項 5 0】

前記抗体、抗体断片、または抗体誘導体が配列番号 2、4、6、または 8 に含まれる相

10

20

30

40

50

補性決定領域（CDR）と少なくとも95%のホモロジーを有する1つ以上のCDRを含む、請求項49に記載のモノクローナル抗体、抗体断片、または抗体誘導体。

【発明の詳細な説明】

【発明の背景】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は2014年4月4日に提出した米国特許出願第61/975386号および2014年9月17日に提出した米国特許出願第62/051757号の利益を主張する。これらの出願はそれぞれ参照により全体として明示的にここに組み込まれる。

配列表に関する陳述

本出願に付随する配列表は紙コピーの代わりにテキストフォーマットで提供され、参照によりここに組み込まれる。配列表を含むテキストファイルの名称は53634__SEQ.txtである。テキストファイルは11KBであり、2015年4月6日に作成され、EFS-Webを通して本明細書の出願とともに提出されている。

【0002】

パクリタキセルはもともとタイヘイヨウイチイの樹皮から分離され、肺癌、卵巣癌、および乳癌等の様々な癌種の最も効果的な化学療法剤の1つとして確立されてきた。パクリタキセルの主な限界はその溶解性が低く、有毒な有機溶媒、典型的にはポリオキシエチル化ひまし油と脱水エタノールの混合物（Taxol（登録商標）として知られている）の中で製剤化する必要があることである。溶媒の毒性を防止するために、パクリタキセルは種々の賦形剤を用いて、またパクリタキセル等の疎水性薬剤の溶解性を改善することができるナノ粒子送達システムを用いて製剤化されてきた。

【0003】

パクリタキセルとアルブミンが結合したナノ粒子製剤であるAbraxane（登録商標）は2005年にFDAによって承認され、現在のところ化学療法のためのパクリタキセルの最良の製剤の1つである。その他、たとえばポリマーナノ粒子、脂質系ナノ粒子製剤、ポリマーコンジュゲート、無機ナノ粒子、カーボンナノチューブ、ナノ結晶、またはシクロデキストリンナノ粒子を用いるシステムがパクリタキセルの送達のために研究され、または開発中である（たとえばPing Maら、2013、J Nanomed. Nanotechnol. 4:2を参照）。

【0004】

Abraxane（登録商標）は広く用いられる化学療法剤であり、全ての癌種に実用的に適用可能であるが、Abraxane（登録商標）に対する反応性は20%と低いことがある。一部の患者において見られるパクリタキセルへの相対的な非感受性は、反応性が低いことに寄与する因子であり得る。しかし、この非感受性は反応性が低いことの一次的な理由ではないこともある。承認された種々の用量（転移乳癌で260mg/m²、膵臓癌で125mg/m²、肺癌で100mg/m²）で投与した場合、患者の臨床試料でモニターしたパクリタキセルの血中濃度には10倍までの変動がある（Nyman DWら、2005、J Clin. Oncol. 23、7785-93）。この変動は、大部分の患者がおそらく不適当な投薬を受けており、パクリタキセルの投与濃度が過大で治療を取りやめなければならなかったか、または投与量が過小で治療から利益が得られなかったかを示唆している。患者がパクリタキセルに感受性を有していたとしても、薬剤濃度が不十分であれば患者は非反応性になり、治療は無効になる。低用量グループは、彼らがパクリタキセルに非感受性なのか、十分なパクリタキセルの投与を受けなかったのかを判断することが難しいので、最も脆弱な患者集団である。そのような場合において、個別の薬物動態変動に基づいて妥当な薬物用量のための指針を提供するためには、完全な薬物動態（PK）プロファイルが唯一の手段である。

【0005】

現在のところ、患者を包括的な臨床試験に登録することなくパクリタキセルの完全な薬物動態定量化を実施する利用可能な方法はなく、そのためには入院が必要である。そのよ

10

20

30

40

50

うな薬物動態試験の典型的な期間は48時間を超えることがあり、繰り返して採血する必要がある。現在のところ、パクリタキセルの血中濃度を分析するためには液体クロマトグラフィー／マススペクトル(LC/MS)法等の複雑な実験装置を使用する必要がある。これらの方法は極めて高価であり、現在のところ試料あたり120ドルを超え、装置のコストは1台あたり15万ドル～20万ドルを超える範囲である。またそれぞれの特定の患者について薬物動態パラメーターを適切に特徴づけるためには、48～72時間にわたって最低4つのデータ点の収集が必要であることも示されている。薬物動態試験のために患者を入院させておくことは、患者あたりのコストを優に約1万ドルに押し上げることになる。PKガイド下投薬の臨床的有効性を証明するための十分に力のある第III相臨床試験は500名の患者を必要とするであろう(BSAの投薬に250名、およびPKガイド下投薬に250名)。生体分析コストだけで150万ドルになろう(500点×化学療法6サイクル×薬物動態解析のための採血4回×試料分析あたり120ドル)。その他の試験の要素が患者あたり約10万ドルとして、合計5千万ドルとなる。これは、最適な腫瘍反応性およびデバイスの規制承認を得るための用量調整をガイドするために必要な意味のある臨床データを得ることに対する顕著な障害となる。したがって、分析および装置のコストが高いことは、比較的狭い治療レンジを有する多くの薬剤の治療薬モニタリング(TDM)の確立を不可能にするほどの結果をもたらす。

【0006】

したがって、患者におけるパクリタキセルの薬物動態をモニターする単純、有効、かつ安価な手段およびそれにより投薬ストラテジーの調節に関する情報を提供することによって個々の患者への治療を適切に個別化することへのニーズが存在する。本発明はこのニーズを満たし、関連する利点をさらに提供する。

【発明の概要】

【0007】

本発明は治療剤をアッセイするための方法、デバイス、および組成物を提供する。1つの側面においては、パクリタキセルをアッセイするための方法、デバイス、および組成物が提供される。

【0008】

1つの側面においては、本発明は液体試料中のパクリタキセルをアッセイするための方法を提供する。1つの態様においては、本方法は、

(a) パクリタキセルを含む液体試料をラテラルフローアッセイデバイスに適用することであって、デバイスが

(i) 液体試料を受容するための試料受容ゾーン、

(i i) 試料受容ゾーンと液通し、試料受容ゾーンから流れ方向下流にある検出試薬ゾーンであって、

検出試薬ゾーンがその上に堆積した検出試薬を含み、

検出試薬が、検出可能なレポート基で標識された、パクリタキセルと結合するパクリタキセル抗体またはその断片もしくは誘導体であり、

パクリタキセル抗体またはその断片もしくは誘導体が、約 10^4 ～約 10^7 の K_{on} および約 10^{-3} ～約 10^{-7} の K_{off} を有する検出試薬ゾーン、および

(i i i) 検出試薬ゾーンと液通し、検出試薬ゾーンから流れ方向下流にある捕捉ゾーンを含み、

捕捉ゾーンがその上に固定化された第1および第2の捕捉試薬を含み、

第1の捕捉試薬が検出試薬と結合可能なパクリタキセル材料であり(試験ライン)、

第2の捕捉試薬が検出試薬と結合可能な抗体であり(対照ライン)、

第1の捕捉試薬が捕捉ゾーンの上流端から流れ方向下流の第1の距離に位置し、

第2の捕捉試薬が捕捉ゾーンの上流端から流れ方向下流の第2の距離に位置し、

第2の距離が第1の距離より大きく、

K_{on} が約 2.0×10^5 より大きく K_{off} が約 1.0×10^{-3} より小さい場合には第1の距離対第2の距離の比は約0.0～約0.4であり、

K_{on} が約 2.0×10^4 より大きく K_{off} が約 2.0×10^{-4} より小さい場合には第1の距離対第2の距離の比は約0.2～約1.0であること、

(b) 試料を試料受容ゾーンから検出試薬ゾーンに流動させて検出試薬にパクリタキセルを供給すること、

(c) 検出試薬をパクリタキセルとともに捕捉ゾーンに流動させることであって、第1の捕捉試薬(試験ライン)が検出試薬との結合に関して分析物質(パクリタキセル)と競合し、

第2の捕捉試薬(対照ライン)が過剰の検出試薬と結合すること、ならびに

(d) 第2の捕捉試薬(対照ライン)と比較して第1の捕捉試薬(試験ライン)に結合した検出試薬の量を観測すること

を含む。

【0009】

ある態様においては、本方法は第1の捕捉試薬に結合した検出試薬の量を定量することによって試料中のパクリタキセルの量を決定することをさらに含む。第1の捕捉試薬に結合した検出試薬の量を定量することは光学密度の測定を含んでよい。

【0010】

1つの態様においては、パクリタキセル抗体は3C6である。別の態様においては、パクリタキセル抗体は8A10である。ある態様においては、パクリタキセルに結合する2つのパクリタキセル抗体、またはその断片もしくは誘導体を用いられる(たとえば3C6および8A10)。

【0011】

本方法において、パクリタキセル材料は検出試薬への結合に関してパクリタキセルと競合するパクリタキセル抗原である。1つの態様においては、パクリタキセル材料はパクリタキセルタンパク質コンジュゲートである。

【0012】

本発明の方法において、試料受容ゾーンと第1の捕捉試薬との間の距離を変化させて、パクリタキセルの検出感度を最適化することができる。ある態様においては、試料受容ゾーンと第1の捕捉試薬との間の距離を最小化して、パクリタキセルの検出感度を最適化する。

【0013】

ある態様においては、本方法は第2の捕捉試薬(対照ライン)に結合した過剰の検出試薬の量を観測することをさらに含む。これらの態様においては、本方法は第2の捕捉試薬に対する検出試薬の量を定量することによって試料中のパクリタキセルの量を決定することをさらに含んでもよい。

【0014】

感度およびダイナミックレンジを増大させるため、本方法は第1および第2の捕捉ゾーンの中間の第3の捕捉ゾーンをさらに含んでもよく、第3の捕捉ゾーンは検出試薬と結合可能なパクリタキセル材料を含む。これらの態様においては、パクリタキセルの量の決定は、第3の捕捉試薬に結合した検出試薬の量を定量することによって決定することができる。第3の捕捉試薬に結合した検出試薬の量を定量することは、光学密度の測定を含んでよい。

【0015】

本発明の方法は、たとえば表面プラズモン共鳴(SPR)アッセイを含む他の固相アッセイに応用できることが理解されよう。

【0016】

上記のように、本方法においては2つ以上の抗体、断片、またはその誘導体を用いることができる。これらの態様においては、第1の抗体は比較的高い K_{on} (たとえば 1×10^4 より大きい)を有してよく、第2の抗体は比較的低い K_{off} (たとえば 1×10^{-3} より小さい)を有してよい。

【0017】

10

20

30

40

50

さらに、ある態様においては、捕捉ゾーンは再現性を増大させダイナミックレンジを拡大させるために同一試料について複数の読み取りを提供する複数の捕捉位置（たとえば2本または3本のライン、T1、T2、T3）を含んでもよい。

【0018】

別の側面においては、本発明は治療薬モニタリング（TDM）ガイド下パクリタキセル療法のための方法を提供する。1つの態様においては、本発明は癌と診断された患者におけるパクリタキセル療法の有効性をモニターするための方法を提供し、本方法は、

- (a) 第1の時点で癌患者をパクリタキセルで処置すること、
- (b) 第1の時点で患者におけるパクリタキセルの第1の濃度を決定することであって、濃度を決定することがパクリタキセルをアッセイするための上記の方法を含むこと、
- (c) 第2の時点で患者をパクリタキセルで処置すること、
- (d) 第2の時点で患者におけるパクリタキセル薬の第2の濃度を決定することであって、濃度を決定することがパクリタキセルをアッセイするための上記の方法を含むこと、および
- (e) 癌処置の有効性を決定するために患者におけるパクリタキセルの第1および第2の濃度を比較することを含む。

10

【0019】

関連する態様においては、本発明は癌と診断された患者におけるパクリタキセル療法のPKガイド下投薬のための方法を提供し、本方法は、

20

- (a) 第1の時点で癌患者をパクリタキセルで処置すること、
- 第1の時点で患者におけるパクリタキセルの1つ以上の薬物動態パラメーターを決定することであって、1つ以上の薬物動態パラメーターを決定することがパクリタキセルをアッセイするための上記の方法を含むこと、
- (b) 第1の投薬からのPK情報を用いて第2の時点で患者をパクリタキセルで処置すること、
- (c) 第2の時点で患者におけるパクリタキセルの1つ以上の薬物動態パラメーターを決定することであって、1つ以上の薬物動態パラメーターを決定することがパクリタキセルをアッセイするための上記の方法を含むこと、および
- (d) 適切な投薬が達成されたことを確認するために、第1の時点における対象のパクリタキセルの1つ以上の薬物動態パラメーターを第2の時点におけるレベルと比較することを含む。

30

【0020】

ある態様においては、薬物動態パラメーターは、最大濃度までの時間（ T_{max} ）、濃度最大値（ C_{max} ）、曲線下面積（AUC）、クリアランス（CL）、分布体積（ V_d ）、最終相の間の見かけの分布体積（ V_z ）、定常状態の間の見かけの分布体積（ V_{ss} ）およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。

【0021】

さらなる側面においては、本発明はパクリタキセルについて上述したものと同様であるが他の治療剤をアッセイするために有用なデバイスおよび方法を提供する。

40

【0022】

1つの態様においては、本発明はラテラルフローデバイスを提供し、ラテラルフローデバイスは、

- (a) 液体試料を受容するための試料受容ゾーン、
- (b) 試料受容ゾーンと液通し、試料受容ゾーンから流れ方向下流にある検出試薬ゾーンであって、その上に堆積した1つ以上の検出試薬を含む検出試薬ゾーン、
- (c) 検出試薬ゾーンと液通し、検出試薬ゾーンから流れ方向下流にある捕捉ゾーンであって、その上に固定化された1つ以上の捕捉試薬を含む捕捉ゾーン、および
- (d) 捕捉ゾーンと液通し、捕捉試薬ゾーンから流れ方向下流にある吸収ゾーンを含む。

50

【0023】

上記のように、本方法においては2つ以上の抗体、断片、またはその誘導体を用いることができる。これらの態様においては、第1の抗体は比較的高い K_{on} （たとえば 1×10^4 より大きい）を有してよく、第2の抗体は比較的低い K_{off} （たとえば 1×10^{-3} より小さい）を有してよい。1つの態様においては、検出試薬は治療薬に第1の親和性を有する第1の抗体および治療薬に第2の親和性を有する第2の抗体を含み、第1の親和性は第2の親和性より大きい。さらに、ある態様においては、捕捉ゾーンは再現性を増大させダイナミックレンジを拡大させるために同一試料について複数の読み取りを提供する複数の捕捉位置（たとえば2本または3本のライン、T1、T2、T3）を含んでもよい。

【0024】

本方法において、検出試薬は検出可能なレポート基で標識された抗体であり、捕捉試薬は検出試薬への結合に関して治療薬と競合する抗原であるか、または捕捉試薬は検出試薬と結合可能な抗体である。ある態様においては、捕捉試薬は検出試薬への結合に関して治療薬と競合する抗原である第1の捕捉試薬と、検出試薬と結合可能な抗体である第2の捕捉試薬とを含む。第1の捕捉試薬は、第2の捕捉試薬から流れ方向上流に固定化されている。試料受容ゾーンと第1の捕捉試薬との間の距離は、治療薬の検出を最適化するために変化させることができる。

【0025】

ある態様においては、デバイスは第1および第2の捕捉試薬の中間に固定化された第3の捕捉試薬をさらに含む。この態様においては、第3の捕捉試薬は、検出試薬への結合に関して治療薬と競合する抗原である。

【0026】

ある態様においては、治療剤はパクリタキセルであり、検出試薬は8A10および3C6から選択されるモノクローナル抗体またはその断片もしくは誘導体を含み、抗体、または断片もしくは誘導体はパクリタキセルに結合する。

【0027】

別の態様においては、本発明は試料中の治療薬をアッセイするための方法を提供し、本方法は、

(a) 上記のデバイスの試料受容ゾーンに試料を適用すること、および

(b) 1つ以上の固定化された捕捉試薬に結合した検出試薬の量を観測することを含む。

【0028】

本方法は、1つ以上の固定化された捕捉試薬に結合した検出試薬の量を定量することによって試料中の治療薬の量を決定することをさらに含んでもよい（たとえば、検出試薬は第1の捕捉位置において捕捉試薬に結合する。検出試薬は第2の捕捉位置において捕捉試薬に結合する。検出試薬は第1および第2の捕捉位置において捕捉試薬に結合する。検出試薬は第1、第2および第3の捕捉位置において捕捉試薬に結合する）。

【0029】

さらなる態様においては、TDMガイド下治療法が提供される。

【0030】

1つの態様においては、本発明は疾患または状態と診断された患者における治療処置の有効性をモニターするための方法を提供し、本方法は、

(a) 第1の時点で患者を治療剤で処置すること、

(b) 第1の時点で患者における治療剤の第1の濃度を決定することであって、濃度を決定することがここに記載した方法を含むこと、

(c) 第2の時点で患者を治療剤で処置すること、

(d) 第2の時点で患者における治療剤の第2の濃度を決定することであって、濃度を決定することがここに記載した方法を含むこと、および

(e) 治療処置の有効性を決定するために患者における第1および第2の濃度を比較すること

10

20

30

40

50

を含む。

【0031】

別の態様においては、本発明は疾患または状態と診断された患者における治療処置のPKガイド下投薬のための方法を提供し、本方法は、

(a) 第1の投薬からの薬物動態情報を用いて第1の時点で患者を治療剤で処置すること、

(b) 第1の時点で患者における治療剤の1つ以上の薬物動態パラメーターを決定することであって、1つ以上の薬物動態パラメーターを決定することがここに記載した方法に従って治療剤をアッセイすることを含むこと、

(c) 第2の時点で患者を治療剤で処置すること、

(d) 第2の時点で患者における治療剤の1つ以上の薬物動態パラメーターを決定することであって、1つ以上の薬物動態パラメーターを決定することがここに記載した方法に従って治療剤をアッセイすることを含むこと、および

(e) 適切な投薬が達成されたことを確認するために、第1の時点における対象の治療剤の1つ以上の薬物動態パラメーターを第2の時点におけるレベルと比較することを含む。

【0032】

ある態様においては、薬物動態パラメーターは、最大濃度までの時間 (T_{max})、濃度最大値 (C_{max})、曲線下面積 (AUC)、クリアランス (CL)、分布体積 (V_d)、最終相の間の見かけの分布体積 (V_z)、定常状態の間の見かけの分布体積 (V_{ss}) およびそれらの組み合わせの1つ以上である。

上記の方法は、治療薬モニタリングから利益を受ける疾患または状態の処置に適用可能である。代表的な疾患または状態としては、癌、炎症、高血圧、心臓血管、および疼痛が挙げられる。代表的な治療剤としては、パクリタキセル、ドセタキセル、7-エピパクリタキセル、t-アセチルパクリタキセル、10-デスアセチル-パクリタキセル、10-デスアセチル-7-エピパクリタキセル、7-キシロシルパクリタキセル、10-デスアセチル-7-グルタリルパクリタキセル、7-N, N-ジメチルグリシルパクリタキセル、および7-L-アラニルパクリタキセルが挙げられる。

【0033】

さらなる側面においては、本発明はパクリタキセル抗体を提供する。1つの態様においては、本発明は8A10および3C6から選択されるモノクローナル抗体またはその断片もしくは誘導体を提供し、抗体、抗体断片または抗体誘導体はパクリタキセルに結合する。ある態様においては、モノクローナル抗体、抗体断片または抗体誘導体は、配列番号2、4、6、または8に含まれる相補性決定領域 (CDR) と少なくとも95%のホモロジーを有する1つ以上のCDRを含む。

【0034】

本発明の上記の側面および付随する利点の多くは、添付した図面と併せて以下の詳細な説明を参照することによってより良く理解できるとともに、より容易に認識することができよう。

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】図1は、本発明の代表的なシステムおよび方法を用いる薬物動態ガイド下投薬コンセプトおよびプロセスの概略図である。

【図2A】図2Aは、本発明による治療薬モニタリングデバイスの代表的な作業の流れの説明図である。

【図2B】図2Bは、本発明によるラテラルフローイムノアッセイの代表的なテストストリップの説明図である。

【図2C】図2Cは、本発明によるパクリタキセルのラテラルフローイムノアッセイの代表的なテストストリップの説明図である。

【図3】図3は、本発明によるアッセイ条件に供した代表的なテストストリップの画像で

あり、代表的な分析物質（パクリタキセル）の量は変動している。このアッセイ構成において、テストストリップは3つの捕捉ゾーンを含んでいる。試験ライン1および試験ライン2は、第1の捕捉材料としての固定化抗原（固定化BSA－パクリタキセルの形態のパクリタキセル）を用いる捕捉を示す。対照ラインは第2の捕捉材料としての固定化抗体（ヤギ抗マウス抗体、GAM）を用いる捕捉を示す。このアッセイにおいて検出試薬は金コロイドで標識した抗パクリタキセル抗体（8A10）であった。

【図4】図4は、本発明の未変性IgG（8A10および3C6）のBSA－パクリタキセル抗原へのELISAにおける直接結合を示すグラフである。

【図5A】図5Aおよび図5Bは、図2Cに概略図を示し、例3で説明したデバイスを用いて実施した本発明の代表的なラテラルフローアッセイにおいてラインT1およびT2に結合した8A10の曲線を示す。図5Aは標準曲線、即ち対照ラインに対する試験ラインの比（ T/C ）とパクリタキセル濃度の関係を示す。低濃度において8A10の比がT1とT2で大きく異なっていることは、分析物質の濃度がより高いと思われる試料ポートに近い位置に置かれたときに、このクラスの抗体の感度がずっと高いことを示している。図5Bは、リーダーデバイスによって得られたテストストリップのスキャンにおける出力強度と位置の測定値との関係を示す。

10

【図5B】図5Aおよび図5Bは、図2Cに概略図を示し、例3で説明したデバイスを用いて実施した本発明の代表的なラテラルフローアッセイにおいてラインT1およびT2に結合した8A10の曲線を示す。図5Aは標準曲線、即ち対照ラインに対する試験ラインの比（ T/C ）とパクリタキセル濃度の関係を示す。低濃度において8A10の比がT1とT2で大きく異なっていることは、分析物質の濃度がより高いと思われる試料ポートに近い位置に置かれたときに、このクラスの抗体の感度がずっと高いことを示している。図5Bは、リーダーデバイスによって得られたテストストリップのスキャンにおける出力強度と位置の測定値との関係を示す。

20

【図6A】図6Aおよび図6Bは、図2Cに概略図を示し、例3で説明したデバイスを用いて実施した本発明の代表的なラテラルフローアッセイにおいてラインT1およびT2に結合した3C6の曲線を示す。図6Aは標準曲線、即ち対照ラインに対する試験ラインの比（ T/C ）とパクリタキセル濃度の関係を示す。低濃度において3C6の比がT1とT2であまり相違していないことは、分析物質の濃度がより高いと思われる試料ポートに近い位置に抗体を置いたときのこのクラスの抗体の感度の改善が比較的少ないことを示している。このクラスの抗体は、シグナルが試料ポートからの位置に影響されないという特徴を有する。図6Bは、リーダーデバイスによって得られたテストストリップのスキャンにおける出力強度と位置の測定値との関係を示す。

30

【図6B】図6Aおよび図6Bは、図2Cに概略図を示し、例3で説明したデバイスを用いて実施した本発明の代表的なラテラルフローアッセイにおいてラインT1およびT2に結合した3C6の曲線を示す。図6Aは標準曲線、即ち対照ラインに対する試験ラインの比（ T/C ）とパクリタキセル濃度の関係を示す。低濃度において3C6の比がT1とT2であまり相違していないことは、分析物質の濃度がより高いと思われる試料ポートに近い位置に抗体を置いたときのこのクラスの抗体の感度の改善が比較的少ないことを示している。このクラスの抗体は、シグナルが試料ポートからの位置に影響されないという特徴を有する。図6Bは、リーダーデバイスによって得られたテストストリップのスキャンにおける出力強度と位置の測定値との関係を示す。

40

【図7A】図7Aおよび図7Bは、図2Cに概略図を示し、例3で説明したデバイスを用いて実施した本発明の代表的なラテラルフローアッセイにおいてラインT1およびT2に結合した8A10および3C6の組み合わせの曲線を示す。図7Aは標準曲線、即ち対照ラインに対する試験ラインの比（ T/C ）とパクリタキセル濃度の関係を示す。コンジュゲートパッドにおいて2つのクラスの抗体（8A10および3C6）を組み合わせることによって、T1およびT2の高い感度が得られた。これにより、アッセイのダイナミックレンジが改善された。図7Bは、リーダーデバイスによって得られたテストストリップのスキャンにおける出力強度と位置の測定値との関係を示す。

50

【図 7 B】図 7 A および図 7 B は、図 2 C に概略図を示し、例 3 で説明したデバイスを用いて実施した本発明の代表的なラテラルフローアッセイにおいてライン T 1 および T 2 に結合した 8 A 1 0 および 3 C 6 の組み合わせの曲線を示す。図 7 A は標準曲線、即ち対照ラインに対する試験ラインの比 (T/C) とパクリタキセル濃度の関係を示す。コンジュゲートパッドにおいて 2 つのクラスの抗体 (8 A 1 0 および 3 C 6) を組み合わせることによって、T 1 および T 2 の高い感度が得られた。これにより、アッセイのダイナミックレンジが改善された。図 7 B は、リーダーデバイスによって得られたテストストリップのスキャンにおける出力強度と位置の測定値との関係を示す。

【発明の詳細な説明】

【0036】

10

今日、臨床使用中または開発中の多くの治療剤がある。困難さは治療のための薬剤の発見にあるのではなく、患者に適合するように治療を調整するところにある。薬物動態 (PK) の変動を考慮しない個人別医療は、投薬量を少なくすれば利益が得られたであろう患者に毒性をもたらす過多の薬剤曝露によって、またはおそらく感受性のある患者集団への過少の薬剤曝露によって、ある患者を誤って分類することにつながる。治療薬モニタリング (TDM) による個人別医療によって、薬物動態の変動を除去し、患者のバイオマーカーに従って患者を正しく分類することができる。

【0037】

本発明は、治療薬の薬物動態 (PK) ガイド下投薬のための、ポイントオブケア (POC) 治療薬モニタリング (TDM) の方法、デバイス、および関連する組成物を提供する。

20

【0038】

図 1 は、デバイスのシステム特性、利点ならびに病院情報システムおよび／または検査室情報システムと接続してデータを医師に伝達し、究極的に投薬の決定を補助することができるデバイスについて説明している。本発明の方法およびデバイスは、24～48 時間にわたって指先穿刺で血液試料を採取することによって、患者の治療薬 (たとえばパクリタキセル) の薬物動態データを収集し、医師は薬物動態データにアクセスしてデータを解析し、治療薬用量を改変すべきかを決定することができる。

【0039】

1 つの側面においては、本発明は一般にイムノアッセイのための方法およびデバイス、特にパクリタキセルのイムノアッセイのための方法およびデバイスを提供する。時には、生物学的試料中のパクリタキセル濃度が低いことは対象へのパクリタキセルの用量を増加する必要があることを示し、生物学的試料中のパクリタキセル濃度が高いことは対象へのパクリタキセルの用量を減少する必要があることを示す。本発明の方法およびデバイスは、対象への治療計画を調節するために有用な情報を提供する。

30

【0040】

ここに提供するアッセイ方法およびデバイスは、パクリタキセルの検出およびモニタリングのための組成物、方法、およびデバイスに関連して記述している。しかし、記述した組成物、方法、およびデバイスのフォーマットはこれに限定されず、選択した任意の分析物質をモニターするためにより一般的に容易に適用できることが認識される。

40

【0041】

代表的なアッセイ方法およびデバイス

本発明は、試料中の分析物質 (たとえばパクリタキセル) を検出し、または定量するためのアッセイ方法およびデバイスを提供する。

【0042】

本方法およびデバイスは、状態の処置のための治療剤 (たとえばパクリタキセル) を受けた対象 (患者) から得た試料等の生物学的試料をアッセイするために用いることができる。アッセイに用いる試料は、究極的には液体試料 (たとえば血液、血漿、尿) である。

【0043】

本発明の方法は固相アッセイであり、したがって他の固相アッセイ構成への適合化にも

50

適している。本発明を例示するため、本方法およびデバイスを、ラテラルフローアッセイ構成を用いて説明する。当技術分野で既知の他の固相アッセイも、本発明の方法およびデバイスに従って構成可能であることが理解されよう。

【0044】

ラテラルフローアッセイの方法およびデバイスは、本発明に従って用いることができる。ラテラルフローアッセイの方法およびデバイスのフォーマットにより、アッセイ試薬はある構成に配置することができる。そのような態様において、ある試薬は「検出試薬」として作用し、別の試薬は「捕捉試薬」として作用する。このフォーマットの中では、検出試薬は一般にコンジュゲートパッド上で、試料ポートと捕捉試薬が堆積された場所との間の場所に堆積される。検出試薬は一般に検出可能なラベルを含み、捕捉試薬はパッド上のその場所に固定化される。したがって、操作の間、試料ポートに導入された液体試料はパッドに沿って流れることができる。試料はまず検出試薬と接触し、次いで捕捉試薬の上を流れる。

10

【0045】

本発明に従ってラテラルフローアッセイを行なうための代表的なデバイスを図2Aに示す。図2Aを参照して、デバイス100は試料ポート120、読み取り窓130、およびテストストリップ200（図2B参照）を有するハウジング110を含むカセットである。操作の際、分析すべき液体試料はポート120を通してテストストリップに導入され、流れ方向（試料パッド210から吸収パッド240へ）に示されるようにテストストリップに沿って流れる。検査結果は、読み取り窓130を通してテストストリップを観察することによって見る可以看到。

20

【0046】

テストストリップは、アッセイを行なうためのいくつかのゾーンおよび試薬を含む。図2Aおよび図2Bを参照して、代表的なテストストリップ200は試料パッド210、コンジュゲートパッド220、膜230、および吸収パッド240を含む。試料パッド210、コンジュゲートパッド220、膜230、および吸収パッド240は液通しており、試料パッドに導入された液体試料はコンジュゲートパッドおよび膜を通して、またはこれらを横切って吸収パッドへ流れる。テストストリップ部品の大きさおよび構成は、実施すべき特定のアッセイに適応するように変化させることができる。たとえば、1つの部品から次の部品への最適な流れを可能にするために、部品パッドおよび膜の1つ以上を重ねてもよい（図2Aに示すように、試料パッド210をコンジュゲートパッド220と重ねてもよく、コンジュゲートパッド220を膜230と重ねてもよく、膜230を吸収パッド240と重ねてもよい）。テストストリップゾーンの性質は特に重要ではなく、これらの部品のための材料は当技術分野で既知である。

30

【0047】

代表的なデバイスの操作を以下に述べる。試料パッド210は検査すべき液体試料を受容する。試料は試料パッドからコンジュゲートパッド220へ流れる。

【0048】

コンジュゲートパッド220は1つ以上の検出試薬（たとえばアッセイすべき試料中の分析物質と親和性を有し、アッセイ中の抗体の検出を容易にするように標識されている抗体）を含む。

40

【0049】

ある態様においては、単一の検出試薬がコンジュゲートパッド上に堆積されている。他の態様においては、2つ以上の検出試薬（たとえばアッセイすべき分析物質と異なった親和性、異なった K_{on} 速度、および／または異なった K_{off} 速度を有する第1の抗体および第2の抗体等の、2つの異なった抗体）が、コンジュゲートパッド上に堆積されている。第1の親和性と第2の親和性は同じではない。1つの態様においては、第1の K_{on} は第2の K_{on} より大きい。別の態様においては、第2の K_{off} は第1の K_{off} より大きい。パクリタキセルのアッセイに関連して以下に述べる抗体の親和性、 K_{on} および K_{off} の速度の説明および規格は、一般に治療剤のアッセイに適用可能である。堆積させる第1の抗体およ

50

び第2の抗体の量は変化させてよく、同一でなくてよい。

【0050】

コンジュゲートパッド220に堆積した検出試薬は液体試料によって流動化し、試料とともに膜230へ流れる。試料中に分析物質が存在する場合は、いったん試料が検出試薬と接触すれば、分析物質と検出試薬との結合が起こり始める。いくらかが結合した分析物質を含み、いくらかが含まない検出試薬の捕捉が、膜230で起こる。

【0051】

膜230は少なくとも2つの捕捉ゾーン、即ち結合した分析物質を含まない検出試薬を捕捉するための第1の捕捉ゾーン（試験ライン）（図2A、図2B、および図2Cにおける232を参照）および結合した分析物質を含む過剰の検出試薬を捕捉するための第2の捕捉ゾーン（対照ライン）（図2A、図2B、および図2Cにおける238を参照）を含む。第1の捕捉ゾーンは、結合した分析物質を含まない検出試薬（即ち遊離検出試薬）を捕捉するために有効な第1の捕捉材料（たとえば固定化抗原）を含む。第2の捕捉ゾーンは、結合した分析物質を含み、または含まない検出試薬を捕捉するために有効な第2の捕捉材料（たとえば固定化抗体）を含む。第1および第2の捕捉材料によって捕捉された検出試薬の量は、それぞれ試料中に存在する分析物質の量に依存する。上記のアッセイは、検出試薬への親和性結合に関して分析物質と第1の捕捉材料が競合する競合アッセイである。試料中に存在する分析物質の量が増加すれば、第1の捕捉材料によって捕捉される検出試薬の量が減少する。捕捉材料の枯渇により、試料中に存在する分析物質の量が減少すれば、より多くの検出試薬が第1の捕捉材料によって捕捉され、したがって第2の捕捉材料によって捕捉される量が減少する。第1および第2の捕捉ラインの強度の比が、分析物質の定量のための最良の値を与える。

【0052】

ある態様においては、捕捉ゾーンは結合した分析物質を含まない検出試薬を捕捉するための2つ以上の第1の捕捉ゾーン（たとえば図2Bおよび図2Cにおける232および234）を含む。ある態様においては、捕捉ゾーンは検出試薬を捕捉するための2つ以上の第2の捕捉ゾーン（たとえば図2Bにおける236および238）を含む。

【0053】

ラテラルフローカセットの説明した手段には、フローカセットからのシグナルの検出のための適切な感度およびそのようなシグナルを校正し、定量する能力を有する任意の適応したリーダーを用いることができる。いずれのリーダーの有益な特色としても、タッチスクリーン、統合RFIDまたは統合バーコードリーダー等の使いやすい特色、ならびに結果をメモリーカードまたはUSBスティック等へ簡単にエクスポートできる能力が挙げられる。リーダーは、好ましくは言語の選択においてインターフェースを容易にするプレインストールされたソフトウェアを有する。リーダーは、好ましくは多重（1000を超える等）の結果を保存できる大きなメモリー容量を有し、100を超える異なった検査方法のプロトコルを保存することができる。リーダーは、LANまたはWLAN接続を通したLISへの統合、またはクラウド系データ保存およびマネジメントシステムへの統合など、より大きなシステムへの統合を容易にするための接続を含んでもよい。最後に、外部プリンター等への接続を容易にするため等の追加的な接続容量のために、多重USBポートが望ましい。

【0054】

代表的なリーダーとしてはQiagen's Reader ESEQuant LF R（ドイツQiagen社から市販）が挙げられ、これはここに記載したラテラルフローカセットを納めるための適応性のある有効なリーダーであることが示されている。このリーダーは小型で携帯型のデバイスで、充電可能なバッテリーを内蔵しており、戸外で操作でき、ポイントオブケア（POC）デバイスの要求事項を満たしている。ラテラルフローカセットは、リーダーに埋め込まれた共焦点カメラシステムを用いて走査される。搭載された画像解析システムはラテラルフローカセットのバーコードリーダーとともに完全に機能し、分析方法は容易にデバイスにアップロードできる。

10

20

30

40

50

【0055】

検出試薬

ある態様においては、検出試薬は、ここに述べたように少なくとも1つの抗体、抗体断片、または抗体誘導体である。検出試薬は試料中の分析物質（たとえばパクリタキセル）と結合することができ、検出試薬が試料中のパクリタキセルと結合しない場合には、検出試薬は捕捉試薬に結合する。

【0056】

検出試薬は信頼性のある定量が可能な検出可能なシグナルを提供することができる部分または標識を含む。好適な部分としては、イムノアッセイ技術で既知の、比色法、蛍光法、化学発光法、酵素法、または放射性シグナルを提供する部分が挙げられる。代表的な部分としては、目視可能で読み取りに装置を必要としない検出可能なシグナルを提供するもの（たとえば着色部分、または、着色部分もしくは酵素を発生する酵素）が挙げられる。定量は典型的には検出可能なシグナルの機器分析によって達成される。1つの態様においては、検出試薬は金コロイドで標識した抗体であり、これは目視観察できる。

【0057】

金コロイドは単分散性の塩化金の還元によって生成し、これは40nm等の制御された均一な直径を有する単分散コロイドである。抗体は受動的吸収によって金コロイドにコンジュゲートされる。

【0058】

上記のように、好ましい態様においては、多種（即ち2種以上）の抗体、抗体断片、または抗体誘導体を用いられる。ある態様においては、多種の（異なった）抗体、抗体断片、または抗体誘導体が組み合わされ、テストストリップの同じ場所（即ちコンジュゲートパッド）に堆積される。

【0059】

ここで、2つの異なった抗パクリタキセル抗体、3C6および8A10について述べる。3C6抗体はパクリタキセル特異性が高い抗体であるが、8A10抗体はパクリタキセル特異性が比較的強く、概してタキサン類に広い親和性を有する。従来の競合ELISAにおいては2つの抗体は同様の挙動を示すが、固相ラテラルフローアッセイにおいては驚くべきことに、8A10が提供するシグナルは、場所（T1またはT2）に依存しない3C6と比較して、第1の捕捉試薬（たとえばT1の場所）を試料ポートに近い場所に移すことによって改善されることが分かった。試料の適用位置に近いT1はより高い濃度の分析物質に曝露され、試料の適用位置から遠いT2はより低い濃度の分析物質に曝露される。捕捉ラインの最適配置が本方法で用いる抗体の K_{on} および K_{off} の値に関連することは驚くべき発見である。3C6は入手しやすいので、 K_{on} が大きい抗体（たとえば8A10）をできるだけ試料開始位置の近くに堆積させ、 K_{off} が小さい抗体（たとえば3C6）をパッドに沿って堆積させて第2／第3／第4等の読み取りをする多重のラインデバイスを構築することができる。

【0060】

したがって、ラテラルフローカセットデバイスに種々の改変を加えて、種々の検出特性を容易にし、または与えることができる。たとえば、デバイスのダイナミックレンジを拡張するため、多重親和性を有する抗体を用いた多重試験ライン（T1、T2等）、ダイナミックレンジおよび／またはアッセイの再現性を拡張することができる。代表的なパクリタキセルのアッセイに関連して以下に述べるテストストリップの上での捕捉試薬の位置決め（T／C）についての説明および規格は、一般に本発明のアッセイにおける捕捉試薬の位置決めに応用可能である。

【0061】

本発明のアッセイに有用な代表的な検出試薬（たとえばパクリタキセル抗体－金コロイドコンジュゲート）の調製については、例1で述べる。

【0062】

捕捉試薬

10

20

30

40

50

捕捉試薬は検出試薬を捕捉してアッセイ中の検出可能なシグナルの観察および定量を可能にするために作用する。上記のように、アッセイ方法およびデバイスは、それぞれ第1および第2の捕捉ゾーンに固定化された第1および第2の捕捉材料を含む。

【0063】

1つの態様においては、検出試薬が抗体である場合には、捕捉試薬は結合した分析物質を含まない検出試薬を捕捉する固定化抗原である固定化分析物質（たとえばパクリタキセル複合体）である。固定化分析物質はテストストリップに直接固定化してよい。あるいは、固定化分析物質はリンカーまたはキャリア材料を介して固定化してもよい（たとえばアルブミン等のキャリアタンパク質にコンジュゲートした分析物質）。そのような態様においては、捕捉試薬は上述のように第1の捕捉材料である。

10

【0064】

1つの態様においては、捕捉試薬は結合した分析物質を含み、または含まない検出試薬を捕捉する固定化抗体である。検出試薬がマウスモノクローナル抗体である態様においては、捕捉試薬は抗マウス抗体（たとえばヤギ抗マウス抗体、GAM抗体）である。そのような態様においては、捕捉試薬は上述のように第2の捕捉材料である。

【0065】

本発明のアッセイに有用な代表的な捕捉試薬（たとえばBSA-パクリタキセル）の調製については、例1で述べる。

【0066】

代替のアッセイ構成

ここに記載した発明のラテラルフローアッセイは固相イムノアッセイである。アッセイのフォーマットおよびデバイスを上述のフォーマットと逆にして、検出試薬を標識抗原（たとえば検出可能な標識を有するBSA-パクリタキセル）とし、捕捉試薬を1つ以上の抗体、抗体断片、または抗体誘導体（即ち、捕捉ゾーンに固定化された）としてもよいことは認識されよう。そのようなフォーマットの操作においては、試料は堆積された標識抗原を通して／横切って流れ、その後、固定化抗体、抗体断片、または抗体誘導体と接触する。その点において、試料中に当初存在していた遊離分析物質（たとえばパクリタキセル）は、固定化抗体、抗体断片、または抗体誘導体への結合に関して標識抗原と競合する。上記のように、デバイスは同一または異なった場所に固定化された複数の異なった抗体、抗体断片、または抗体誘導体を含み得る。捕捉試薬は同一または異なった場所にある。テストストリップの複数の場所に捕捉試薬が固定化された全ての態様においては、それらの場所におけるシグナルを検出できる好適なリーダーが用いられる。

20

30

【0067】

ここでは本発明のデバイス、システム、組成物、および方法はラテラルフローアッセイに関して一般的に述べていることに注意されたい。しかしここに述べたように、選択した抗原をモニターするための一般的な戦略はラテラルフローアッセイフォーマットに限定する必要はなく、当技術分野において一般に周知の他の固相イムノアッセイ（表面プラスモン共鳴アッセイ）等の他のアッセイフォーマットに適用できる。したがって、ラテラルフローフォーマットについて述べた説明に関わらず、本開示は任意の既知のアッセイフォーマットを組み込んだデバイス、システム、組成物、および方法をも包含する。ある態様においては、アッセイフォーマットは抗原コンジュゲート（たとえばパクリタキセルコンジュゲート）または抗原結合試薬（たとえば抗パクリタキセル抗体、断片、誘導体）等の捕捉試薬の基材への固定化を含む。基材はニトロセルロースまたはガラス等の、アッセイフォーマットのための任意の既知の好適な基材でよい。ある態様においては、基材はナノ構造である。ある態様においては、基材は捕捉試薬を固定化できるカーボンナノチューブ等のカーボンナノ構造を含み、またはこれからなっている。

40

【0068】

代表的なパクリタキセルアッセイ

図2Cは、本発明によるパクリタキセルのラテラルフローイムノアッセイのための代表的なテストストリップの説明図である。図2Cを参照して、代表的なテストストリップ2

50

00は試料パッド210、コンジュゲートパッド220、第1の捕捉ゾーン232および234(T1およびT2)と第2の捕捉ゾーン238(C)を有する膜230、ならびに吸収パッド240を含む。図2Aおよび図2Bに関して上記したように、試料パッド210、コンジュゲートパッド220、膜230、および吸収パッド240は液通しており、それにより試料パッドに導入された液体試料はコンジュゲートパッドおよび膜を通して、またはこれらを横切って吸収パッドへ流れる。テストストリップ部品の大きさおよび構成は、実施すべきパクリタキセルのアッセイに適応するように変化させることができる(たとえば図2Aに示すように、1つの部品から次の部品への最適な流れを可能にするために、部品パッドおよび膜の1つ以上を重ねてもよい)。

【0069】

1つの態様においては、本発明は液体試料中のパクリタキセルをアッセイするための方法を提供し、本方法は、

(a) パクリタキセルを含む液体試料をラテラルフローアッセイデバイスに適用することであって、デバイスが

(i) 液体試料を受容するための試料受容ゾーン、

(ii) 試料受容ゾーンと液通し、試料受容ゾーンから流れ方向下流にある検出試薬ゾーンであって、

検出試薬ゾーンがその上に堆積した検出試薬を含み、

検出試薬が、検出可能なレポート基で標識された、パクリタキセルと結合するパクリタキセル抗体またはその断片もしくは誘導体である、検出試薬ゾーン、および

(iii) 検出試薬ゾーンと液通し、検出試薬ゾーンから流れ方向下流にある捕捉ゾーンを有し、

捕捉ゾーンがその上に固定化された第1および第2の捕捉試薬を含み、

第1の捕捉試薬が第2の捕捉試薬から流れ方向上流に位置し、

第1の捕捉試薬が検出試薬と結合可能なパクリタキセル材料であり、

第2の捕捉試薬が検出試薬と結合可能な抗体であること、

(b) 試料を試料受容ゾーンから検出試薬ゾーンに流動させて検出試薬にパクリタキセル(たとえば検出試薬と結合したパクリタキセルの組み合わせ、任意に遊離検出試薬、および任意に遊離パクリタキセル)を供給すること、

(c) 検出試薬をパクリタキセルとともに捕捉ゾーンに流動させることであって、

第1の捕捉試薬が遊離検出試薬と結合して第1の捕捉試薬に結合した検出試薬を提供し、第2の捕捉試薬が結合したパクリタキセルを含み、または含まない検出試薬と結合すること、ならびに

(d) 第2の捕捉試薬に結合した検出試薬の量に対する第1の捕捉試薬に結合した検出試薬の量を観測すること

を含む。

【0070】

ある態様においては、本方法は第1の捕捉試薬に結合した検出試薬の量を定量することによって試料中のパクリタキセルの量を決定することをさらに含む。第1の捕捉試薬に結合した検出試薬の量を定量することは、中でも光学密度の測定を含む。

【0071】

好適な検出可能なレポート基については上述した。1つの態様において、検出可能なレポート基は金コロイドである。

【0072】

本方法において有用なパクリタキセル抗体、またはその断片もしくは誘導体は、約 1×10^4 より大きい K_{on} を有する。代表的な K_{on} の値は約 2×10^4 、 4×10^4 、 8×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、および 1×10^7 より大きい。好ましい範囲は約 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$ である。

【0073】

本方法において有用なパクリタキセル抗体、またはその断片もしくは誘導体は、約 $1 \times$

10

20

30

40

50

10^{-3} より小さい K_{off} を有する。代表的な K_{off} の値は約 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、および 1×10^{-7} より小さい。好ましい K_{off} 値の範囲は約 $1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-7}$ である。

【0074】

ある態様においては、パクリタキセル抗体、またはその断片もしくは誘導体は約 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ の K_{on} および約 $1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-4}$ の K_{off} を有する。

【0075】

K_{on} の値および K_{off} の値を決定する方法については例4で述べる。

【0076】

1つの態様においては、抗体は高い K_{on} および低い K_{off} を有する（たとえば、最小の K_{on} は 2.0×10^5 であり、最大の K_{off} は 1.0×10^{-3} である）。この態様においては、捕捉ラインは $0.0 \sim 0.4$ T/Cに置かれる。このクラスについて、モノクローナル抗体の工学では K_{off} を一定に保ち、 K_{on} をできるだけ大きくすることが重視される。 K_{on} が大きければ、抗体検出がより良くなる。

10

【0077】

別の態様においては、抗体は低い K_{on} および高い K_{off} を有する（たとえば、最小の K_{on} は 2.0×10^4 であり、最大の K_{off} は 2.0×10^{-4} である）。この態様においては、捕捉ラインは $0.2 \sim 1.0$ T/Cに置かれる。このクラスについて、モノクローナル抗体の工学では K_{on} を一定に保ち、 K_{off} をできるだけ小さくすることが重視される。オフレートが小さければ、抗体検出がより良くなる。

20

【0078】

ある態様においては、パクリタキセル抗体は3C6である。他の態様においては、パクリタキセル抗体は8A10である。さらなる態様においては、パクリタキセル抗体の組み合わせを用いることができる（たとえば3C6および8A10）。これらの抗体については以下に詳細に述べる。

【0079】

アッセイにおいて、第1の捕捉ゾーンは検出試薬への結合に関してパクリタキセルと競合するパクリタキセル抗原として作用する固定化パクリタキセル材料を含む。第1の捕捉ゾーンは、結合したパクリタキセルを含まない検出試薬（即ち、遊離検出試薬）を捕捉する。ある態様においては、パクリタキセル材料はパクリタキセルタンパク質コンジュゲートである。好適なタンパク質コンジュゲートは、BSA-パクリタキセル等の血清アルブミンコンジュゲートを含む。

30

【0080】

アッセイにおいて、第2の捕捉ゾーンは検出試薬と結合可能な固定化抗体を含む。ある態様においては、抗体はヤギ抗マウス抗体である。

【0081】

上記のように、アッセイにおけるパクリタキセル検出の感度は、ラテラルフローデバイスに試料を導入する点（たとえば試料受容ゾーン）と第1の捕捉試薬との間の距離を変化させることによって最適化できる。ある態様においては、試料受容ゾーンと第1の捕捉試薬との間の距離を最小化して、パクリタキセル検出の感度を最適化する。ある態様においては、その距離は20 mm未満、10 mm未満、5 mm未満、3 mm未満、2 mm未満、または1 mm未満である。ある態様においては、その距離は20～1 mm、10～1 mm、5～1 mm、3～1 mm、または2～1 mmである。

40

【0082】

最適化はT（試験ライン）とC（対照ライン）の相対位置、即ちT/Cによって記述することができ、T/Cは比（始点からTまでの距離／始点からCまでの距離）として定義され、ここで始点は捕捉ゾーンの上流端（図2A～図2Cにおける膜230の上流端）として定義される。T/Cは約0.0（即ち、第1の捕捉試薬が捕捉ゾーンの上流端に位置する）、もしくは約0.01、約0.02、約0.04、約0.08、約0.10、約0.20、約0.40、約0.80より大きく、または約1.0未満（即ち、第1の捕捉試

50

薬が捕捉ゾーンの下流端に位置し、第2の捕捉試薬が第1の捕捉試薬と捕捉ゾーンの下流端との中間に位置する)であってよい。好ましくは、 T/C は約0.2～約0.7である。

【0083】

ある態様においては、第1の距離対第2の距離の比は、約0.0～約0.40である。他の態様においては、第1の距離対第2の距離の比は、約0.20～約1.0である。

【0084】

ある態様においては、第2の捕捉試薬に結合した過剰の検出試薬の量が観測および測定される。ある態様においては、試料中のパクリタキセルの量の決定は、最終の捕捉試薬(試験ライン)を第2の捕捉試薬(対照ライン)に関連付けることによって決定される。

10

【0085】

上記のように、本発明の代表的なアッセイは2つ以上の第1の捕捉ゾーンの中の2つ以上の第1の捕捉試薬を含む。これらのある態様においては、本方法は第1(図2CのT1、232)および第2(図2CのC、238)の捕捉ゾーンの中間の第3の捕捉ゾーン(図2CのT2、234を参照)をさらに含み、ここで第3の捕捉ゾーンは検出試薬と結合可能なパクリタキセル材料を含む。第1および第3のゾーン中のパクリタキセル材料は同じでも異なってもよい。これらのある態様においては、試料中のパクリタキセルの量は、第1および第2の捕捉試薬に結合した検出試薬の量を定量することによって決定される。第1および第2の捕捉試薬に結合した検出試薬の量を定量することは、光学密度の測定を含んでよい。

20

【0086】

本方法のある態様においては、ラテラルフローデバイスは、捕捉試薬ゾーンと液通し、捕捉試薬ゾーンから流れ方向下流にある吸収ゾーンをさらに含む。

【0087】

図3は、代表的な分析物質(パクリタキセル)の量を変化させたアッセイ条件に供した代表的なテストストリップの画像である。これらのアッセイ構成において、膜230は3つの捕捉ゾーンを含む。試験ライン1および試験ライン2は第1の捕捉材料として固定化抗原(固定化BSA-パクリタキセルの形態のパクリタキセル)を用いた捕捉を示す。対照ラインは第2の捕捉材料として固定化抗体(ヤギ抗マウス抗体)を用いた捕捉を示す。このアッセイにおいて、検出試薬は金コロイドで標識した抗パクリタキセル抗体(8A10)であった。

30

【0088】

本発明の方法およびデバイスは、生物学的試料中のパクリタキセルまたはパクリタキセルプロドラッグの任意の製剤を含むパクリタキセルの濃度を検出するために有用であることが注目される。パクリタキセルの製剤としては、ポリマーナノ粒子、脂質系ナノ粒子製剤、ポリマーコンジュゲート、無機ナノ粒子、カーボンナノチューブ、ナノ結晶、およびシクロデキストリンナノ粒子等の、パクリタキセルの送達を促進する任意の既知の薬剤が挙げられる。

【0089】

本発明の方法およびデバイスによる代表的なラテラルフローイムノアッセイの説明については例3で述べる。

40

【0090】

パクリタキセル抗体

別の側面においては、本発明はパクリタキセルと結合する抗体(たとえばモノクローナル抗体またはmAb)を提供する。8A10および3C6と称されるmAbは、抗体に富む回収培地からMab Select (GE Healthcare, Pittsburgh, PA)を用いて精製した。mAbは、J-G. Leuら、Cancer Res. (1993) 53:1388-1391に記載されているようにして調製したBSA-パクリタキセルへの結合に基づいて選択した。

【0091】

50

1つの側面において、本発明は8A10、3C6、およびその断片または誘導体から選択したモノクローナル抗体を提供し、ここで抗体、抗体断片、または抗体誘導体はバクリタキセルと結合する。

【0092】

ここで用いる「抗体」という用語は、任意の抗体産生哺乳類（たとえばマウス、ラット、ウサギ、ラクダ類、およびヒトを含む霊長類）から誘導された、または合成もしくは組み換えによって製造された、対象のターゲット（たとえばバクリタキセル）またはその部分に特異的に結合する、抗体およびその抗体断片を包含する。例示的な抗体としては、ポリクローナル、モノクローナル、および組み換え抗体、多重特異性抗体（たとえば二重特異性抗体）、ヒト化抗体、マウス抗体、キメラ、マウスーヒト、マウスー霊長類、霊長類ーヒトモノクローナル抗体、および抗イディオタイプ抗体が挙げられ、任意の未変性分子またはその抗原結合断片等の断片であってよい。ここに記載したように、治療薬（たとえばバクリタキセル）等の選択した抗原の結合における特異性が増大することから、モノクローナル抗体が好ましい。

【0093】

ここで用いる「抗原結合断片」という用語は、完全長抗体からの、もしくはそれに関連する、抗原結合領域または可変領域を意味する。抗体断片の説明の例としては、Fab、Fab'、F(ab)₂、F(ab')₂、およびFv断片、scFv断片、二重特異性抗体、ナノ抗体、直鎖状抗体、一本鎖抗体分子、ならびに抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられる。

【0094】

ここで用いる「一本鎖Fv」または「scFv」抗体断片は抗体のV_HおよびV_Lドメインを含み、これらのドメインは一本鎖ポリペプチド中に存在している。一般に、FvポリペプチドはV_HおよびV_Lドメインの間にポリペプチドリinkerをさらに含み、それによりscFvが抗原と結合するための所望の構造を形成することができる。

【0095】

ここで用いる「キメラ抗体」は、非ヒト種（たとえば齧歯類）抗体から誘導された可変ドメインと相補性決定領域を含む組み換えタンパク質であり、抗体分子の残りの部分はヒト抗体から誘導されている。

【0096】

ここで用いる「ヒト化抗体」は、非ヒトイムノグロブリンから誘導された特定の相補性決定領域に一致し、ヒト抗体フレームワークに移植される最小の配列を含むキメラ抗体である。ヒト化抗体は典型的には抗体の相補性決定領域のみが非ヒト起源である組み換えタンパク質である。

【0097】

ここで用いる「誘導体」という用語は、抗体または抗体断片がリファレンス抗体から作成されたことを示す。たとえば、時としてリファレンス抗体の結合特性を改変または増強することが望ましい場合がある。したがって、結合特性を変化させるために、エンコードするDNAに施す変異などの種々の改変を抗体に施すことができる。それによって得られる特性が変化した抗体は、リファレンス抗体の「誘導体」と称される。たとえば、抗体誘導体はリファレンス抗体（またはリファレンス抗体をエンコードする核酸）に適用した親和性成熟プロセスに起因する変異を含む抗体であり得る。そのような変異によって、抗体の結合親和性、選択性等を変化させる（たとえば改善する）ことができる。

【0098】

ある態様においては、抗体、抗体断片、または抗体誘導体は、配列番号2、4、6、または8に含まれる相補性決定領域（CDR）と少なくとも95%のホモロジーを有する1つ以上のCDRを含む。配列番号2および4は、以下に詳細に述べるが、それぞれ8A10の軽鎖および重鎖の可変領域のアミノ酸配列である。配列番号6および8は、これも以下に詳細に述べるが、それぞれ3C6の軽鎖および重鎖の可変領域のアミノ酸配列である。それぞれの可変領域は、以下に示す3つの相補性決定領域（CDR）を含む。ある態様

においては、抗体、抗体断片、または抗体誘導体は、配列番号 2、4、6、または 8 の何れかに含まれる相補性決定領域 (CDR) の 1 つ、2 つまたは 3 つ全てと少なくとも 95 % のホモロジーを有する CDR の 1 つ、2 つまたは 3 つ全てを含む。ある態様においては、抗体、抗体断片、または抗体誘導体は、8 A 1 0 の可変軽鎖領域および重鎖領域 (配列番号 2 および 4) によって提供される CDR 領域の 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つまたは 6 つ全てを含む重鎖および軽鎖を有する。ある態様においては、抗体、抗体断片、または抗体誘導体は、3 C 6 の可変軽鎖領域および重鎖領域 (配列番号 6 および 8) によって提供される CDR 領域の 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つまたは 6 つ全てを含む重鎖および軽鎖を有する。

【0099】

10

ある態様においては、1 つ以上の CDR は配列番号 2、4、6、または 8 の何れかにおける 1 つ以上の CDR と少なくとも 95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % のホモロジーを有する配列同一性を有する。ここで用いる「%ホモロジー」または「%相同」という用語は、本発明の実施において用いるポリペプチドに関連して用いる場合には、最大の %ホモロジーが得られるように配列を配列させた後の、特定したポリペプチドのアミノ酸配列と相同であるポリペプチド配列におけるアミノ酸残基の百分率として定義される。比較する際には、最良の配列を得るためにバイオマーカー配列の間にはギャップを導入しない。アミノ酸配列のホモロジーは、たとえば以下のようにして決定することができる。ポリペプチドのアミノ酸配列を用いて、BLASTP プログラムを用いる GenBank データベース等のタンパク質配列データベースを検索する。プログラムはギャップのない様式で用いる。デフォルトフィルタリングを用いて、複雑度の低い領域による配列ホモロジーを除去する。BLASTP のデフォルトパラメーターを用いる。

20

【0100】

本発明のアッセイ方法に有用な代表的なパクリタキセル抗体 (3 C 6 および 8 A 1 0) の産生、プロセッシング、精製、特性解析、および最適化については例 2 に述べる。本発明の抗体は K L H にコンジュゲートした Taxol (登録商標) またはバッカチンでマウスを免疫することによって産生された。抗体は以下のように要約される。3 C 6 抗 Taxol (登録商標) Ig G_{2a,k}、3 H 5 抗バッカチン I I I Ig G₁、8 A 1 0 抗タキサン Ig G_{2a}。3 C 6、3 H 5、および 8 A 1 0 抗体の交差反応性を、種々のタキサンに対する IC₅₀ 値によって表 1 に示す。

30

【0101】

表 1. パクリタキセル抗体の交差反応性

【0102】

【表 1】

タキサン	3C6	3H5	8A10
パクリタキセル (Taxol (登録商標) ®)	10 nM	>316 nM	7 nM
10-デアセチルタキソール	15 nM	>333 nM	10 nM
7-エピ-10-デアセチルタキソール	25 nM	>333 nM	15 nM
7-キシロシル-10-デアセチルタキソール	30 nM	>286 nM	17 nM
7-エピ-タキソール	80 nM	>316 nM	50 nM
セファロマニン	220 nM	>325 nM	8 nM
バッカチン III	>511 nM	10 nM	12 nM
バッカチン V	>460 nM	10 nM	10 nM
10-デアセチルバッカチン III	>551 nM	230 nM	21 nM
7-エピ-10-デアセチルバッカチン III	>469 nM	150 nM	27 nM
Taxotere(登録商標)	>318 nM	>318 nM	10 nM
2-デベンゾイル-2-(p-トリフルオロメチルベンゾイル)タキソール	>293 nM	>293 nM	>293 nM
20-アセトキシ-4-デアセチル-5-エピ-20,0-セコタキソール	>310 nM	>310 nM	>293 nM

【0103】

診断用途において抗体を効果的に利用し、ダイナミック検出レンジを達成するため、最適化を成功させることが必要な2つの重要な要素は、抗体の特異性および目標の抗原に対する親和性である。3C6および8A10モノクローナル抗体はパクリタキセルに対して高い特異性と親和性を有し、これらが高度に均一な様式で目標のパクリタキセル抗原の単一のエпитープに特異的に結合することを示している。この特異性は、検出アッセイにおける交差反応の問題を除去することにも役立っている。特異性と相まって、モノクローナル抗体は、親和性成熟の過程によって達成される診断テストにおけるダイナミック検出レンジを達成するための、抗原に対する最適化され、改善された親和性をも有することができる。さらに、迅速な K_{on} を迅速なフローアッセイに適合させるようにmAbを選択することができる。

【0104】

図4に示すように、3C6および8A10の両方のモノクローナル抗体は、約10 nMの見掛け K_d 値および約100~200 ng/mLの感度限界を有する。

【0105】

以下の例は説明のために提供され、本発明を限定するためではない。

【0106】

[実施例]

例 1アッセイ試薬

本例においては、本発明のアッセイ方法およびデバイスに有用な代表的な検出試薬および捕捉試薬の調製について述べる。

【0107】

検出試薬：抗体－金コロイドコンジュゲート

簡略には、抗体（例 2 参照）を 0.5 倍 PBS で 1 mg/mL に希釈して、以下の工程を実施した。（1）沈降した金を再懸濁するために金を振盪または渦流状に攪拌し、0.5 mL のネイキッドゴールドゾルを 10 本の清潔な個別の試験管に入れる。（2）準備した pH チャートからそれぞれの試験管に pH 値（または 1～10）をラベルした。（3）pH チャートを用いてそれぞれの試験管に種々の量の緩衝液を μL 単位で加え、振盪して混合した。（4）それぞれの試験管を低速ボルテクサーに入れ、抗体溶液を加え、十分に攪拌する（約 2～3 秒）。20 nm の金に対しては抗体またはタンパク質の 2 mg/mL 溶液 14 μL が最適である。（5）数本の試験管における紫色の濃色化および／または黒色の沈殿は、抗体またはタンパク質がその等電点以下であり、個別の金溶液が架橋することになることを示す（架橋した溶液は免疫アッセイに使用できず、廃棄する。濃紫色の溶液も大部分不活性である。淡紫色または色の変化がない試験管のみが免疫アッセイに有用である）。（6）反応を全部で 30 分間、継続させる。（7）50 μL のブロッキング溶液を加えることによって反応を停止させる。

【0108】

捕捉試薬：パクリタキセル－アルブミンコンジュゲート

パクリタキセル－アルブミンコンジュゲート（たとえば、BSA－パクリタキセル）は、J-G Leuら、Cancer Res. (1993) 53:1388～1391 の記載された常法に従って調製した。2'-ヘミスクシニルタキソールの合成については、結晶がキャリアタンパク質へのタキソールのコンジュゲート化のための出発物質である。タキソール（20 mg）および無水コハク酸（36 mg）を室温、真空下に P_2O_5 上で 4 時間乾燥し、乾燥ピリジン 480 μL に溶解した。室温で一夜放置した後、真空下にピリジンを除去し、残渣を蒸留水 2 mL で 1 回洗浄した。アセトン（1 mL）を加え、いくらかの結晶（2'-ヘミスクシニルタキソール）が出現するまでアセトン溶液に蒸留水を滴下した。混合物を 4℃ に 3 時間保持し、濾過により結晶を回収し、真空下に乾燥した。生成物の収率は 70% であった。

【0109】

透析工程によりコンジュゲートしていないタキソールを除去する。2'-ヘミスクシニルタキソール（10 mg）を DMSO 1 mL とアセトニトリル 300 μL に溶解し、50 μL （35 mg、0.19 mmol）の n-トリブチルアミンを加えた。混合物を氷浴中で 4℃ に冷却し、25 μL （25 mg、0.18 mmol）のイソブチルクロロフォルメートを混合物に加え、混合物を氷上に 30 分保持した。溶液を BSA 溶液（蒸留水 3 mL 中 25 mg（ 3.73×10^{-4} mmol）、pH 9.5、4℃）中に滴下した。直ちに 1 N HCl で pH を 7.5 に調整し、混合物を 4℃ で一夜保持し、PBS に対して 4℃ で一夜透析した。

【0110】

ある例示的な態様において、ラテラルフローシステムを評価した。0.5 mg/mL の BSA－パクリタキセル（試験ライン）および 0.5 mg/mL のヤギ抗マウス抗体（対照ライン）を、システムの膜の上に縞状に載せた。パクリタキセル抗体－金コロイドコンジュゲートをシステムに流した。BSA－パクリタキセルに結合した抗体－金コロイドコンジュゲートは膜に固定化され、強いシグナルを生成した。試料にパクリタキセルをスバ

イクして加えるとシグナルの減少が見られたので、シグナルはパクリタキセルに特異的であった。

【0111】

例 2

パクリタキセル抗体

本例においては、本発明の方法およびデバイスに有用な代表的なパクリタキセル抗体の産生、プロセッシング、精製、特製解析、および最適化について述べる。

【0112】

抗体産生およびプロセッシング

5～10%のFBSおよび1倍のPen/Strepを加えたCCM1 (Hyclone) で細胞を培養した。細胞の密度が 1×10^6 個/mLを超えれば、細胞を1:4に分割した。次いで細胞を凍結し、予備として2つの別々の液体窒素低温容器に保存した。細胞密度が 1×10^6 個/mLに達するまで、ローラーボトルで細胞を培養した。この時点で、培養液の補給を止め、細胞の生存率を毎日モニターした。細胞の生存率が50%未満に減少すれば、細胞を除去して抗体に富む培地を回収した。

【0113】

抗体のアフィニティ精製

pH 7.4のPBSを用いて濾過透析を行ない、回収した抗体を、50Kdカットオフ膜を用いて10倍に濃縮した。アフィニティ精製にはMabSelect (GE Healthcare、Pittsburgh、PA)を用いた。容量およびスループットの両方について最適化された親水性、高流量のアガロースビーズと、rプロテインAリガンドの配向されたカップリングにより、純度および収率の高い生成物のプールが得られる。

【0114】

精製実行のプログラム

カラム：XK16/40 (内径16mm、ベッド高さ20cm)

試料：澄清化したハイブリドーマの使用済み培地

装填緩衝液A：20mM NaH_2PO_4 、0.15M NaCl、pH 7.2

溶出緩衝液B：0.1M Na_3 -クエン酸塩、pH 3.6

抗体親和性

未変性IgG (8A10および3C6)のBSA-パクリタキセル抗原への直接結合の結果のプロットを図4に示す。1倍PBS中の濃度 $3.5 \mu\text{g/mL}$ のBSA-パクリタキセル抗原50 μL をプレートに結合させ、4℃で一夜インキュベートした。プレートをPBS/0.05%Tween 20で4回洗浄した。プレートをPBS/0.05%Tween 20中の1%BSAで、室温で2時間、ブロックした。プレートをPBS/0.05%Tween 20で4回洗浄した。抗体試料(8A10および3C6)50 μL を結合させた(300nMで開始し、タイターを3sで低下させる)。プレートをPBS/0.05%Tween 20で4回洗浄した。ヤギ抗mIgGホースラディッシュペルオキシダーゼ(5000倍希釈)50 μL を結合させ、次いで基質溶液TMB50 μL を加え、放置して発色させた。50 μL の1M HClで反応を停止し、450nmで光学密度を測定した。未変性IgG (8A10および3C6)のBSA-パクリタキセル抗原への直接結合の結果を図4に示す。

【0115】

抗体の最適化

親和性成熟を含む抗体の最適化を行なった。この手法には、(1)ハイブリドーマ細胞株から産生された抗体を配列決定することによって抗体の特性を解析すること、(2)CDR領域に着目して抗体ライブラリーを構築すること、(3)良性変異をスクリーニングすること、および(4)良性変異を組み合わせたことが含まれる。

【0116】

工程1：抗パクリタキセルmAbのFabとしてのクローニングおよび発現

A. ハイブリドーマ細胞から産生された抗体(8A10および3C6)の可変領域の配

列決定

i. 全RNA抽出およびmRNA変性

Q I A G E N R N e a s y M i n i K i tを用いて、2つのハイブリドーマ細胞（8 A 1 0および3 C 6）から全RNAを抽出した。mRNA混合物（以下に述べる）を72℃で3分間インキュベートし、次いで42℃に2分間冷却した。冷却後、チューブを10秒間14,000×gで簡略に遠心し、内容物を底に集めた。

【0117】

mRNA混合物

RNAテンプレート（0.2～0.4 μg） 1～2.75 μL

5'-RAGEプライマーA 1 μL

RNaseを含まない水 3.75 μLまで

10

ii. cDNA合成および5'RAGE反応

cDNA合成および5'RAGE反応は以下に示すように行なった。

【0118】

【表2】

cDNA 合成5' RAGE 反応

SMARTer II A オリゴ	1 uL	2 倍 PCR 混合物	10 uL
5 倍 First-ストランド緩衝液	2 uL	cDNA	1 uL
DTT (20 mM)	1 uL	10 倍 Universal Primer 混合物	2 uL
dNTP 混合物 (10 mM)	1uL	リバースプライマー	1 uL
RNase インヒビター	0.25 uL	RNase を含まない水	6 uL
SMARTScribe RT	1 uL		
mRNA 混合物 after dent	3.75 uL		
総量	10 uL		20 uL

20

30

【0119】

iii. アガロースゲル電気泳動によるPCR反応の解析

8 A 1 0および3 C 6 mMAbの軽鎖および重鎖可変領域に対応するアンプリコンの存在を確認するため、PCR増幅の生成物をアガロースゲル上で電気泳動した。

【0120】

iv. クローニング、配列決定およびCDRの解析

PCR陽性バンドをベクターにクローン化し、配列決定を行なった。抗体配列解析により、8 A 1 0および3 C 6について1つの軽鎖および1つの重鎖が同定された。3 C 6については当初、ただ1つの軽鎖が同定され、重鎖は同定されなかった（異常配列）。このため、N-末端配列決定結果から得られた配列によって設計された特異的プライマーを用いて、重鎖を再PCRした。その結果、3 C 6の重鎖の同定が達成された。

40

【0121】

8 A 1 0 ハイブリドーマ

8 A 1 0 ハイブリドーマの配列決定の結果を以下に説明する。

【0122】

8 A 1 0 の可変軽鎖核酸配列は配列番号1である。

G A C	A T T	G T G	A T G	A C C	C A G	T C T	C A A	A A A	T T C
A T G	T C C	A T A	A C A	C T A	G G A	G A G	A G G	G T C	A G C
A T C	A C C	T G C	A A G	C C C	A G T	C A G	A A T	G T G	G G T
T C T	G C T	G T A	A C C	T G G	T G G	C A A	C A G	A A A	C C A

50

G G A C A A T C T C C C T A A A C T A C T G A T T T A C C T C A
 G C T T C C A A T C G G T A T A C T G G A G T C C C T G A T
 C G C T T C A C A G G C A G T G G A T C T G G G A C A G A T
 T T C A C T C T C A C C A T T A G T A A T G T G C A G T C T
 G A A G A C C T G G C A G A T T A T T T C T G T C A A C A A
 T A T A G C A G C T A T C C G T A C A C G T T C G G A G G G
 G G G A C C A A G C T G G A A T A A A C G (配列番号1)。

【0123】

CDR領域をエンコードする配列には下線を付している。

【0124】

対応する8A10可変軽鎖アミノ酸配列は配列番号2である。

D I V M T Q S Q K F M S I T L G E R V S I T C K P S Q N V G S A V T W W Q Q K P
 G Q S P K L L I Y S A S N R Y T G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S N V Q S
 E D L A D Y F C Q Q Y S S Y P Y T F G G T K L E I K R (配列番号2)。

【0125】

3つのCDR領域に下線を付している(即ちCDRL1はKPSQNVGSAVT、CDRL2はSASNRYT、CDRL3はQQYSSYPYTである)。

【0126】

8A10の可変重鎖核酸配列は配列番号3である。

G A G G T C C A G C T G C A A C A A T C T G G A C C T G A A
 C T G G T G A A G C C T G G G G C T T C A G T G A A G A T T
 T C C T G T A A G G C T T C T G G A T A C A C G T T C A C T
 G A C T C C A C C A T G A A C T G G G T G A A G C A G A G C
 C A T G G A A A G A G C C T T G A G T G G A T T G G A G A G
 A T T G A T C C T A A C A A T G G T G G T A C T A A C T A C
 A A T C A G A A G T T C A A G G G C A A G G C C A C A T T G
 A C T G T A G A C A A G T C C T C C A G C A C A G C C T A T
 A T G G A G C T C C G C A G C C T G A C A T C T G A G G A C
 T C T G C A G T C T A T T A C T G T G C A A G A G G G G T C
 T G G G G C C A A G G C A C C A C T C T C A C A G T C T C C
 T C A (配列番号3)。

【0127】

CDR領域をエンコードする配列には下線を付している。

【0128】

対応する8A10可変重鎖アミノ酸配列は配列番号4である。

E V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S C K A S G Y T F T D S T M N W V K Q S
 H G K S L E W I G E I D P N N G G T N Y N Q K F K G K A T L T V D K S S S T A Y
 M E L R S L T S E D S A V Y Y C A R G V W G Q G T T L T V S S (配列番号4)。

【0129】

3つのCDR領域に下線を付している(即ちCDRH1はGYTFSTDSTMN、CDRH2はEIDPNNGGTNYNQKFKG、CDRH3はGVである)。

【0130】

3C6ハイブリドーマ

3C6ハイブリドーマの配列決定の結果を以下に説明する。

【0131】

3C6の可変軽鎖核酸配列は配列番号5である。

G A T G T T G T G A T G A C C C A A A C T C C A C T C T C C
 C T G C C T G T C A G T C T G G G A G A T C A A G C C T C C
 A T C T C T T G C A G A T C T C G T C A G A G C C T T G T A
 C A C A G T A A T G G A A A C A C C T A T T T A C A T T G G

10

20

30

40

50

T A C C T G C A G A A G C C A G G C C A G T C T C C A A A G
 C T C C T G A T C T A C A A A G T T T C C A A C C G A T T T
T C T G G G G T C C C A G A C A G G T T C A G T G G T A G T
 G G A T C A G G G A C A G A A T T C A C A C T C G A G A T C
 A G C A G A G T G G A G G C T G A G G A T C T G G G A G T T
 T A T T T C T G C T C T C A A A G T A C A C A T G T T C C T
C C G A C G T T C G G T G G A G G C A C C A A G C T G G A A
 A T C A A A C (配列番号5)。

【0132】

C D R領域をエンコードする配列には下線を付している。

10

【0133】

対応する3C6可変軽鎖アミノ酸配列は配列番号6である。

D V V M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S R Q S L V H S N G N T Y L H W
 Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G S G T E F T L E I
 S R V E A E D L G V Y F C S Q S T H V P P T F G G G T K L E I K (配列番号6)。

【0134】

3つのC D R領域に下線を付している(即ちC D R L 1はR S R Q S L V H S N G N T Y L H、C D R L 2はK V S N R F S、C D R L 3はS Q S T H V P P Tである)。

【0135】

3C6の可変重鎖核酸配列は配列番号7である。

20

G A G G T G C A G C T T C A G G A G T C G G G A C C T A G T
 C T C G T G A A A C C T T C T C A G A C T C T G T C C C T C
 A C C T G T T C T G T C A C T G G C G A C T C C A T C A C C
A G T G G T T A C T G G A A C T G G A T C C G G A A A T T C
 C C A G G G A A T A G A C T T G A G T A C A T G G G G T A C
 A T A A G C T A C A G T G G T A G C A C T T A C T A C A A T
C C G T C T C T C A A A A G T C G A A T C T C C A T C A C T
 C G A G A C A C A T C C A A G A A C C A G T A C T A C C T A
 C A T T T G A C T T C T G T G A C T A C T G A G G A C A C A
 G C C A C A T A T T A C T G T G C C C A A G G G G A T G G C
G C C T A C T G G G G C C A A G G C A C C A C T C T C A C A
 G T C T C C T C A (配列番号7)。

30

【0136】

C D R領域をエンコードする配列には下線を付している。

【0137】

対応する3C6可変重鎖アミノ酸配列は配列番号8である。

E V Q L Q E S G P S L V K P S Q T L S L T C S V T G D S I T S G Y W N W I R K P
 G N R L E Y M G Y I S Y S G S T Y Y N P S L K S R I S I T R D T S K N Q Y Y L H
 L T S V T T E D T A T Y Y C A Q G D G A Y W G Q G T T L T V S S (配列番号8)。

【0138】

40

3つのC D R領域に下線を付している(即ちC D R H 1はG D S I T S G Y W N、C D R H 2はY I S Y S G S T Y Y N P S L K S、C D R H 3はG D G A Yである)。

【0139】

表2. 8A10および3C6mAbについてのN-末端配列決定の結果とハイブリドーマ配列決定の結果の比較

【0140】

【表 3】

8A10				3C6			
N-末端配列決定データ		ハイブリドーマ配列決定データ		N-末端配列決定データ		ハイブリドーマ配列決定データ	
残基	コール	可変軽鎖	可変重鎖	残基	コール	可変軽鎖	可変重鎖
1	D, Q, F, (S, H, M)	D		1	D, E	D	E
2	H, I, L, (V)	I		2	V	V	V
3	V, S, Q, (T, K)	V		3	Q, (V)	V	Q
4	M, E, N, F	M	E	4	M, L	M	L
5	T, Q, V, (R)	T	V	5	Q, T	T	Q
6	Q, Q, N, Y	Q	Q	6	Q, E	Q	E
7	S, L, F, E	S	L	7	T, S	T	S
8	Q, Q, Y, D	Q	Q	8	G, P	P	G
9	K, F, N, Q	K	Q	9	L, P	L	P
10	S, D, F, L	F	S	10	S	S	S
11	M, N, L, G	M	G	11	L	L	L
12	S, P, L	S	P	12	V, P	P	V
13	I, T, E, L, (V)	I	E	13	K, V	V	K
14	(T, G)	T	L	14	S, P	S	P
15	V, K, L	L	V	15	S, L	L	S
16	K, P, G	G	K	16	Q, G	G	Q
17	E, P	E	P	17	D, T	D	T
18	R, (H, G)	R	G	18	Q, L	Q	L
19	V, A, (L)	V	A	19	A, S	A	S
20	S, S, H, (R, L)	S	S	20	L, S	S	L
21	I	I	V	21	T, I	I	T
22	K, T, R	T	K	22	S, (R)	S	C
23	I	C*	I	23	(S)	C	S
24	S, K	K	S	24	R, V	R	V
25	P	P	C*	25	T	S	T
26	K, (A), (S)	S	K	26	G, (R)	R	G
27	Q, (A)	Q	A	27	D, Q	Q	D
28	N	N	S	28	(S)	S	S
29	V, (G)	V	G	29	I, (L)	L	I
30	(Y), (T), (G)	G	Y	30	(T, V)	V	T

* システイン配列はN-末端配列決定によって決定できない。

～強調した領域はN-末端配列決定の結果とハイブリドーマ配列決定の結果に不一致がある残基を示す。

【0141】

B. mAbの可変領域のM13エンジニアリングベクターへのクローニング

PCRを用いて配列特異的プライマーにより、mAb（即ち8A10および3C6）のVL、Cカップ、およびVH領域をコードするDNAを増幅した。得られたPCR生成物をゲルにより精製し、lacZプロモーターの制御の下にM-13系ファージベクター内の特異的部位について制限消化した。8A10および3C6 mAbのVL、Cカップ、およびVH領域をコードする二本鎖DNAを、ヒトIgG1のCH1領域の定常領域の遺伝子を含むファージ系ベクターに連結した。DNAを大腸菌（E. coli）に導入し、得られたファージ含有プラークを詳細に検討した。プラークを無作為に取り出し、そのDNAを分離して配列を決定した。クローン8A10_1はmAb 8A10（示していない）と同じVL、Cカップ、およびVH領域の配列を有していることが決定された。3C6のクローニングプロセスも同じプロトコルに従って行なうことができる。

【0142】

C. M13エンジニアリングベクターから生成したFabのパクリタキセル結合活性の証明

クローン8A10_1のXL1-Blue大腸菌（E. coli）（グラム陰性）のファージ感染培養物をIPTGで誘導しながら増殖させて遠心により回収し、浸透圧ショックによってペリプラズム内容物を放出させた（ペリプレップ）。放出されたFab生成物を培養液から分離した。ELISAによってFab濃度を定量し、未変性のIgG（示していない）とともにパクリタキセルELISAを用いてFabの抗原特異的結合を行なった。2つの未変性IgGの K_d 値（両方の抗体について約10 nM）は以前報告した値と同程度であった（図3参照）。Fab 8A10の K_d 値も10 nMと決定され、これは未変性のIgG 8A10の値と同じである。これらの結果より、このFab 8A10には親抗体8A10の可変領域配列が正しく存在しており、M13エンジニアリングベクターからのFabフォーマットにおいて正しく折り畳まれ、発現していることが示唆される。

【0143】

F a b はペリプラズム調製物中で十分に発現し、B S A－パクリタキセルコンジュゲートで被覆されたウェルに濃度依存的に結合することが示された。

【0144】

例 3

代表的な固相競合アッセイ

本例においては、固相競合アッセイの有効性を示す代表的なアッセイについて述べる。このアッセイは、試料中のパクリタキセルの存在に関する情報を含むシグナルを提供するためのこのような検出フォーマットにおいてここに記載した抗パクリタキセル抗体を用いることの有用性を証明する。その結果から、抗体の位置の変化によってアッセイ性能を向上させられることが証明される。

10

【0145】

パクリタキセルラテラルフローシステム

1. 2 m g / m L の B S A－パクリタキセル（試験ライン、T）および 0. 2 m g / m L のヤギ抗マウス抗体（対照ライン、C）を膜カード（高流量プラス H F 1 8 0 膜カード、M i l l i p o r e）の上に縞状に塗布した。抗パクリタキセル抗体－金コロイドコンジュゲートをコンジュゲートパッド（ガラス繊維パッド、M i l l i p o r e）に吸収させ、乾燥した。パクリタキセル（1 0 μ L）を加えたウシ胎児血清（F B S）に 8 0 μ L の P B S T w e e n を追加し、アッセイに流した。

【0146】

タンデム抗体アッセイ

蒸留水を用いて抗体－金コンジュゲートを再構成し、相互に添加して適当な濃度とする。このタンデム抗体溶液をアッセイコンジュゲートパッドに塗布して乾燥する。

20

【0147】

リーダーアウトプット：強度対位置

テストストリップの走査結果の読み取り。ストリップは Q i a g e n リーダー（Q i a g e n、ドイツ）を用いて読み取る。

【0148】

パクリタキセル標準曲線

試験ラインと対照ラインとの比と、パクリタキセル濃度との関係の標準曲線を作成した。

30

【0149】

図 5 A および図 5 B に、ライン T 1 および T 2 に結合した 8 A 1 0 の曲線を示す。図 5 A は標準曲線、即ち試験ラインと対照ラインとの比（T / C）と、パクリタキセル濃度との関係を示す。8 A 1 0 について低濃度における比が T 1 と T 2 で大きく相違することは、分析物質の濃度が比較的高いと思われる試料ポートに近い場所に置かれた場合に抗体の感度がずっと高いことを示している。図 5 B は、リーダーデバイスによって得られた、走査したテストストリップの出力強度と位置の読み取りとの関係を示す。

【0150】

図 6 A および図 6 B に、ライン T 1 および T 2 に結合した 3 C 6 の曲線を示す。図 6 A は標準曲線、即ち試験ラインと対照ラインとの比（T / C）と、パクリタキセル濃度との関係を示す。3 C 6 について低濃度における比が T 1 と T 2 であまり大きく相違しないことは、分析物質の濃度が比較的高いと思われる試料ポートに近い場所に抗体が置かれた場合に得られる感度の改善が比較的小さいことを示している。しかし、T 2 においてシグナル強度の改善が見られた。図 6 B は、リーダーデバイスによって得られた、走査したテストストリップの出力強度と位置の読み取りとの関係を示す。

40

【0151】

図 7 A および図 7 B に、ライン T 1 および T 2 に結合した 8 A 1 0 と 3 C 6 の組み合わせの曲線を示す。図 7 A は標準曲線、即ち試験ラインと対照ラインとの比（T / C）と、パクリタキセル濃度との関係を示す。高感度の 8 A 1 0 を試料ポートの近くに置き、より感度が高く位置に依存しない 3 C 6 を T 2 に置く組み合わせによって、アッセイをより確

50

実にすることができた。図 7 B は、リーダーデバイスによって得られた、走査したテストストリップの出力強度と位置の読み取りとの関係を示す。

【0152】

上記の分析（および図 5～図 7）において、図 5 B、図 6 B、および図 7 B における T 1、T 2、および C の位置（Pos [mm]）の測定はテストストリップの流れ方向下流端から行なった（たとえば試料は 55 mm 点に導入、T 2 は約 45 mm、T 1 は約 40 mm、C は約 35 mm）。

【0153】

例 4

抗体結合特性の決定方法

本例においては、抗体特性の決定方法について述べる。方法は Biacore Assay を用いて Precision Antibody Inc.（Columbia、MD）によって行なった。本例はまた、本発明の LFA アッセイ（ラテラルフローアッセイ）が表面プラズモン共鳴（SPR）アッセイ等の他の固相アッセイにいかにか適合できるかを示す。

【0154】

結合実験は Biacore 3000 装置（GE、Pittsburgh、PA）によって 25℃ で行なった。約 13,000 RU の抗 BSA 抗体（Life Technologies、A11133、lot 1637270）をアミンカップリング（EDC/NHS）により CM5 チップのフローセル 2 に直接固定化した。110～120 RU の BSA-パクリタキセル（BSA-Ag）が捕捉された。フローセル 1 を同様に、しかしリガンドなしで処理し、参照を差し引くためのブランク表面として用いた。占拠されていない部位を 1 M のエタノールアミンでブロックした。分析物質 Ab1（8A10）および Ab2（3C6）を種々の濃度でチップの上に流した。リアルタイムで抗原の抗体への結合をモニターしてオン（ k_a ）およびオフ（ k_d ）の速度を求めた。観察された k_a および k_d から平衡定数（ K_D ）を計算した。

【0155】

2 倍の連続希釈で示される分析物質濃度を用いて完全な動力学解析を行なった。出発濃度を 200 nM とし、続いて 100、50、25、12.5、および 0 nM とした。アッセイの再現性を確認するため、100 nM 濃度を 2 回実験した。完全な動力学解析の結果を表 3 に示す。

【0156】

アッセイ用緩衝液は 10 mM HEPES 緩衝液（pH 7.4）、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.05% P20（ポリオキシエチレンソルビタン）であった。再生用緩衝液は 10 mM グリシン緩衝液（pH 2.0）であった。コンジュゲーション用緩衝液は 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）であった。リガンドを捕捉するために用いた流量は 1 μ L/分であった。動力学解析のための流量は 50 μ L/分であった。

【0157】

分析の精度を決定するため、実際のセンサグラムと BIA Analysis ソフトウェアから生成したセンサグラムとの間でカイ二乗（ χ^2 ）解析を行なった。1～2 以内の χ^2 値は有意（正確）と考えられ、1 未満は高度に有意（高度に正確）である。

【0158】

3 回の独立の SPR 実験の概要を表 4 に示す。

【0159】

表 3. 完全な動力学解析

【0160】

10

20

30

40

【表 4】

リガンド	分 析 物質	k_a (1/Ms)	K_d (1/s)	R_{max}	K_A (1/M)	K_D (M)	Con (nM)	χ^2
BSA-Ag (110RU)	Ab1	4.70×10^5	3.04×10^{-4}	4.01	1.55×10^9	6.45×10^{-10}	0-100	0.173
BSA-Ag (110RU)	Ab2	2.05×10^4	9.67×10^{-4}	15.6	2.12×10^7	4.72×10^{-8}	0-200	0.179

10

【0161】

表 4. S P R の 概 要

【0162】

【表 5】

抗体	装置	チップ上	オン レート	オフ レート	K_d	R_{max}	注
8A10	Biacore 3000	抗体	1.6×10^6	2.0×10^{-3}	1.3×10^{-9}	3.6	
	Biacore T-200	抗体	2.4×10^5	8.7×10^{-4}	3.6×10^{-9}	8.6	
	Biacore 3000	抗原	4.7×10^5	3.0×10^{-4}	6.5×10^{-10}	4.0	
3C6	Biacore 3000	抗体	2.8×10^4	2.9×10^{-4}	1.0×10^{-8}	54.4	単一点
	Biacore T-200	抗体	1.8×10^4	2.2×10^{-4}	1.2×10^{-8}	112	
	Biacore 3000	抗原	2.1×10^4	9.7×10^{-4}	4.7×10^{-8}	15.6	

20

30

【0163】

説明のための態様を図示し記述してきたが、本発明の精神および範囲から逸脱することなく本発明において種々の変更が可能であることが理解されよう。

【0164】

排他的な権利または特権を請求する本発明の態様は以下のように定義される。

【図 1】

図1

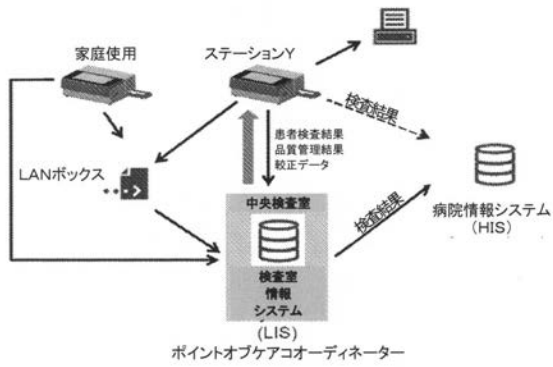


FIG. 1

【図 2 A】

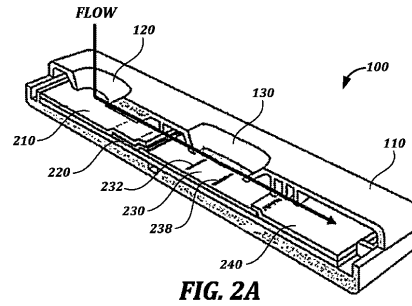


FIG. 2A

【図 2 B】

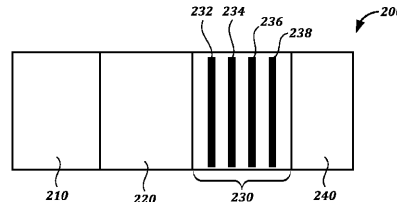


FIG. 2B

【図 2 C】

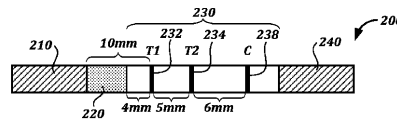


FIG. 2C

【図 3】

図3

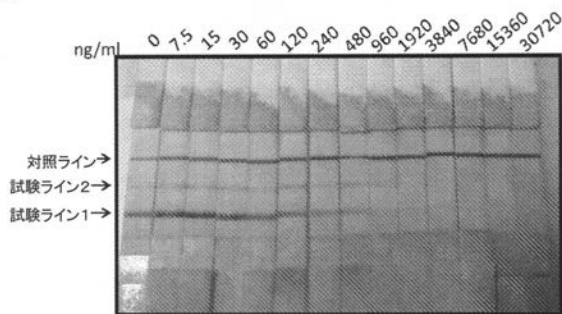


FIG. 3

【図 4】

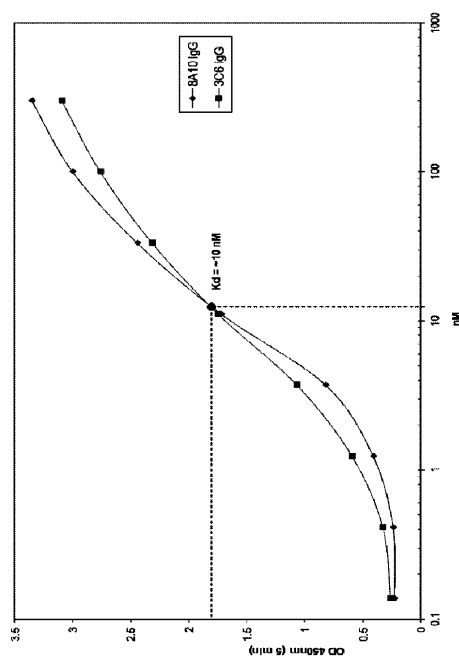


FIG. 4

【図 5 A】

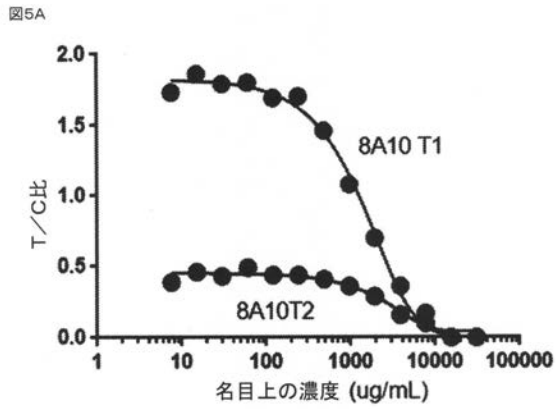
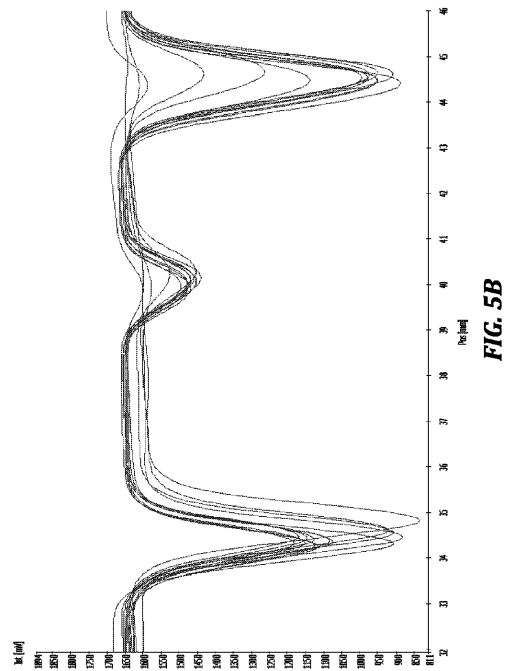


FIG. 5A

【図 5 B】



【図 6 A】

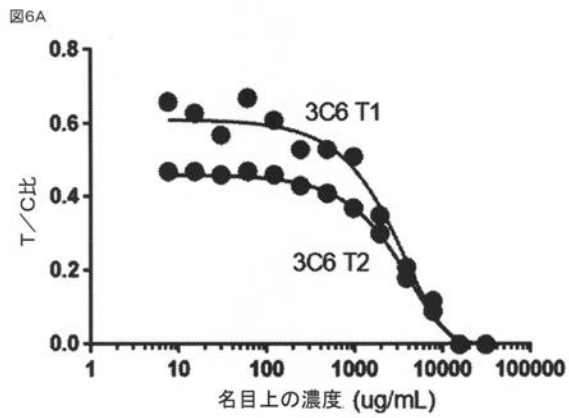
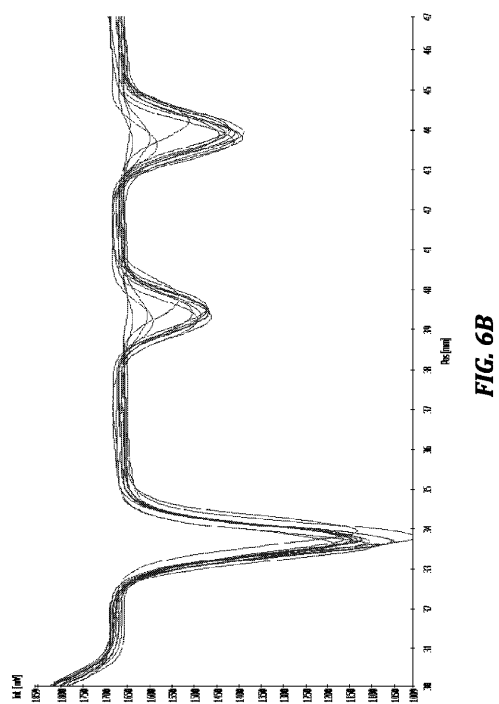
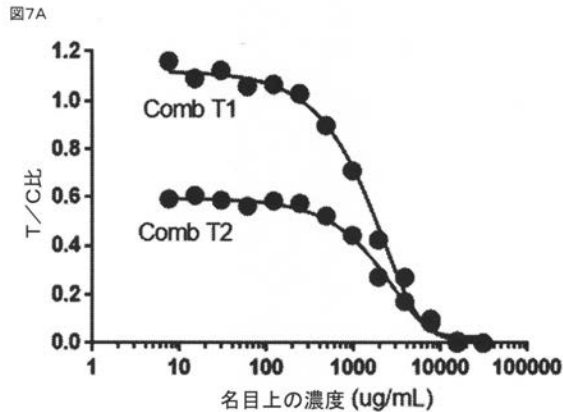


FIG. 6A

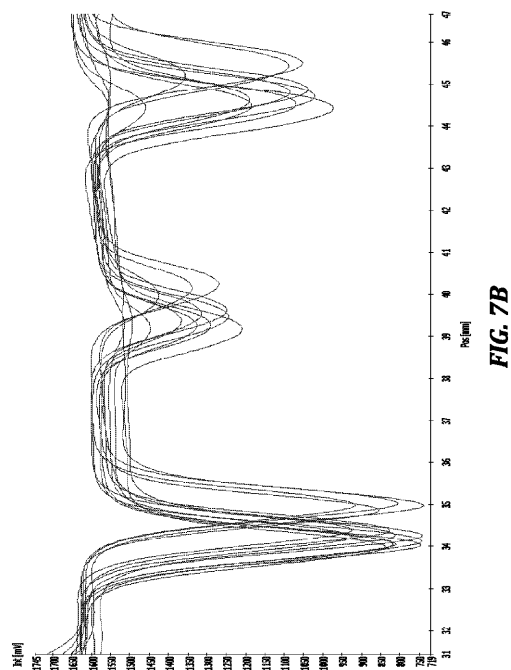
【図 6 B】



【図 7 A】



【図 7 B】



【配列表】

2017513030000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成28年12月6日(2016.12.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

液体試料中のパクリタキセルをアッセイするための方法であって、

(a) パクリタキセルを含む液体試料をラテラルフローアッセイデバイスに適用することであって、前記デバイスが

(i) 前記液体試料を受容するための試料受容ゾーン、

(i i) 前記試料受容ゾーンと液通し、前記試料受容ゾーンから流れ方向下流にある検出試薬ゾーンであって、

前記検出試薬ゾーンがその上に堆積した検出試薬を含み、

前記検出試薬がパクリタキセルと結合するパクリタキセル抗体、その機能的断片または機能的誘導体であり、前記パクリタキセル抗体、その機能的断片または機能的誘導体は検出可能なレポート基で標識され、

前記パクリタキセル抗体、その機能的断片または機能的誘導体が、約 10^4 ~ 約 10^7 の会合速度定数 (K_{on}) および約 10^{-3} ~ 約 10^{-7} の解離速度定数 (K_{off}) を有する検出試薬ゾーン、および

(i i i) 前記検出試薬ゾーンと液通し、前記検出試薬ゾーンから流れ方向下流にある捕

捉ゾーンであって、

前記捕捉ゾーンがその上に固定化された第1、第2および第3の捕捉試薬を含み、

前記第1の捕捉試薬が前記検出試薬と結合可能なパクリタキセル材料であり（第1の試験ライン）、

前記第2の捕捉試薬が前記検出試薬と結合可能なパクリタキセル材料であり（第2の試験ライン）、

前記第3の捕捉試薬が前記検出試薬と結合可能な抗体であり（対照ライン）、

前記第1の捕捉試薬が前記捕捉ゾーンの上流端から流れ方向下流の第1の距離に位置し

、

前記第2の捕捉試薬が前記捕捉ゾーンの上流端から流れ方向下流の第2の距離に位置し

、

前記第3の捕捉試薬が前記捕捉ゾーンの上流端から流れ方向下流の第3の距離に位置し

、

前記第2の距離が前記第1の距離より大きく、

前記第3の距離が前記第1の距離および第2の距離より大きく、

前記検出試薬の K_{on} が約 2.0×10^5 より大きく前記検出試薬の K_{off} が約 1.0×10^{-3} より小さい場合には前記第1の距離対前記第2の距離の比は約0.0超～約0.4であり、または

前記 K_{on} が約 2.0×10^4 より大きく前記 K_{off} が約 2.0×10^{-4} より小さい場合には前記第1の距離対前記第2の距離の比は約0.2～約1.0である、上記捕捉ゾーン、
を含み、

（b）前記試料を前記試料受容ゾーンから前記検出試薬ゾーンに流動させて検出試薬にパクリタキセルを供給すること、

（c）前記検出試薬をパクリタキセルとともに前記捕捉ゾーンに流動させることであって

、

前記第1及び第2の捕捉試薬（第1及び第2の試験ライン）が前記検出試薬との結合に関してパクリタキセルと競合し、

前記第3の捕捉試薬（対照ライン）が過剰の検出試薬と結合すること、ならびに

（d）前記第3の捕捉試薬（対照ライン）と比較して前記第1及び第2の捕捉試薬（第1及び第2の試験ライン）に結合した検出試薬の量を観測すること

を含む、方法。

【請求項2】

対照ラインおよび試験ラインにおいて結合した検出試薬の量を定量することによって前記試料中のパクリタキセルの量を決定することをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記捕捉試薬に結合した検出試薬の量を定量することが光学密度の測定を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記検出可能なレポート基が金コロイドである、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記パクリタキセル抗体が3C6である、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記パクリタキセル抗体が8A10である、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記パクリタキセル材料が前記検出試薬への結合に関してパクリタキセルと競合するパクリタキセル抗原である、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

前記パクリタキセル材料がパクリタキセルタンパク質コンジュゲートである、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

前記検出試薬と結合可能な抗体がヤギ抗マウス抗体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記試料受容ゾーンと前記第 1 及び第 2 の捕捉試薬との間の距離を変化させて、パクリタキセルの検出感度を最適化する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記試料受容ゾーンと前記第 1 及び第 2 の捕捉試薬との間の距離を最小化して、パクリタキセルの検出感度を最適化する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記第 3 の捕捉試薬（対照ライン）に結合した過剰の検出試薬の量を観測することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記第 3 の捕捉試薬に結合した検出試薬の量を定量することによって前記試料中のパクリタキセルの量を決定することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記第 3 の捕捉試薬に結合した検出試薬の量を定量することが光学密度の測定を含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記ラテラルフローデバイスが、前記捕捉試薬ゾーンと液通し、前記捕捉試薬ゾーンから流れ方向下流にある吸収ゾーンをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

LFA を SPR または他の固相イムノアッセイに置きかえることができる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

第 1 および第 2 の抗体を用い、前記第 1 の抗体が 10^4 より大きい K_{on} を有し、前記第 2 の抗体が 10^{-3} より小さい K_{off} を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

再現性を増大させダイナミックレンジを拡大させるために 2 本または 3 本のラインを用いて同一試料について複数の読み取りを生成することができる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

癌と診断された患者におけるパクリタキセル療法の有効性をモニターするための方法であって、

（a）第 1 の時点で癌患者をパクリタキセルで処置すること、

（b）第 1 の時点で治療薬の投与後の前記患者におけるパクリタキセルの第 1 の濃度を決定することであって、前記濃度を決定することが請求項 1 から 18 の何れか一項に記載の方法を含むこと、

（c）第 2 の時点で前記患者をパクリタキセルで処置すること、

（d）第 2 の時点で治療薬の投与後の前記患者におけるパクリタキセル薬の第 2 の濃度を決定することであって、前記濃度を決定することが請求項 1 から 18 の何れか一項に記載の方法を含むこと、および

（e）癌処置の有効性を決定するために前記患者におけるパクリタキセルの前記第 1 の濃度と第 2 の濃度を比較することを含む、方法。

【請求項 20】

癌と診断された患者におけるパクリタキセル療法の PK ガイド下投薬のための方法であって、

（a）第 1 の時点で前記癌患者をパクリタキセルで処置すること、

（b）第 1 の時点で治療薬の投与後の前記患者におけるパクリタキセルの 1 つ以上の薬物動態パラメーターを決定することであって、前記 1 つ以上の薬物動態パラメーターを決定することが請求項 1 から 18 の何れか一項に記載の方法によってパクリタキセルの濃度を測定することを含むこと、

(c) 前記第 1 の投薬からの P K 情報を用いて第 2 の時点で前記患者をパクリタキセルで処置すること、

(d) 第 2 の時点で治療薬の投与後の前記患者におけるパクリタキセルの 1 つ以上の薬物動態パラメーターを決定することであって、前記 1 つ以上の薬物動態パラメーターを決定することが請求項 1 から 18 の何れか一項に記載の方法によってパクリタキセルの濃度を測定することを含むこと、および

(e) 適切な投薬が達成されたことを確認するために、前記第 1 の時点における治療薬の投与後の対象のパクリタキセルの 1 つ以上の薬物動態パラメーターを前記第 2 の時点における治療薬の投与後のレベルと比較することを含む、方法。

【請求項 21】

前記薬物動態パラメーターが、最大濃度までの時間 (T_{max})、濃度最大値 (C_{max})、曲線下面積 (AUC)、クリアランス (CL)、分布体積 (V_d)、最終相の間の見かけの分布体積 (V_z)、定常状態の間の見かけの分布体積 (V_{ss}) およびそれらの組み合わせから選択される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

(a) 液体試料を受容するための試料受容ゾーン、

(b) 前記試料受容ゾーンと液通し、前記試料受容ゾーンから流れ方向下流にある検出試薬ゾーンであって、

前記検出試薬ゾーンがその上に堆積した 1 つ以上の検出試薬を含み、

前記検出試薬がパクリタキセルと結合するパクリタキセル抗体、その機能的断片または機能的誘導体であり、前記パクリタキセル抗体、その機能的断片または機能的誘導体は検出可能なレポート基で標識され、

前記パクリタキセル抗体、その機能的断片または機能的誘導体が、約 $10^4 \sim 10^7$ の会合速度定数 (K_{on}) および約 $10^{-3} \sim 10^{-7}$ の乖離速度定数 (K_{off}) を有する検出試薬ゾーン；

(c) 前記検出試薬ゾーンと液通し、前記検出試薬ゾーンから流れ方向下流にある捕捉ゾーンであって、

前記捕捉ゾーンがその上に固定化された第 1、第 2 および第 3 の捕捉試薬を含み、

前記第 1 の捕捉試薬が前記検出試薬と結合可能なパクリタキセル材料であり (第 1 の試験ライン)、

前記第 2 の捕捉試薬が前記検出試薬と結合可能なパクリタキセル材料であり (第 2 の試験ライン)、

前記第 3 の捕捉試薬が前記検出試薬と結合可能な抗体であり (対照ライン)、

前記第 1 の捕捉試薬が前記捕捉ゾーンの上流端から流れ方向下流の第 1 の距離に位置し

、

前記第 2 の捕捉試薬が前記捕捉ゾーンの上流端から流れ方向下流の第 2 の距離に位置し

、

前記第 3 の捕捉試薬が前記捕捉ゾーンの上流端から流れ方向下流の第 3 の距離に位置し

、

前記第 2 の距離が前記第 1 の距離より大きく、

前記第 3 の距離が前記第 1 の距離および第 2 の距離より大きく、

前記検出試薬の K_{on} が約 2.0×10^5 より大きく前記検出試薬の K_{off} が約 1.0×10^{-3} より小さい場合には前記第 1 の距離対前記第 2 の距離の比は約 0.0 超 $\sim$ 約 0.4 であり、または

前記 K_{on} が約 2.0×10^4 より大きく前記 K_{off} が約 2.0×10^{-4} より小さい場合には前記第 1 の距離対前記第 2 の距離の比は約 0.2 $\sim$ 約 1.0 である、上記捕捉ゾーンおよび

(d) 前記捕捉ゾーンと液通し、前記捕捉試薬ゾーンから流れ方向下流にある吸収ゾーンを含む、ラテラルフローデバイス。

【請求項 2 3】

前記検出試薬が治療薬に第 1 の親和性を有する第 1 の抗体および前記治療薬に第 2 の親和性を有する第 2 の抗体を含み、前記第 1 の親和性が前記第 2 の親和性より大きい、請求項 2 2 に記載のデバイス。

【請求項 2 4】

前記試料受容ゾーンと前記第 1 の捕捉試薬との間の距離を変化させて、前記治療薬の検出を最適化する、請求項 2 2 に記載のデバイス。

【請求項 2 5】

前記治療薬がパクリタキセルであり、前記検出試薬が 8 A 1 0 および 3 C 6 から選択されるモノクローナル抗体またはその断片もしくは誘導体を含み、前記抗体、または断片もしくは誘導体がパクリタキセルに結合する、請求項 2 2 に記載のデバイス。

【請求項 2 6】

試料中の治療薬をアッセイするための方法であって、

(a) 請求項 2 2 から 2 5 の何れか一項に記載のデバイスの試料受容ゾーンに試料を適用すること、および

(b) 前記 1 つ以上の固定化された捕捉試薬に結合した検出試薬の量を観測することを含む方法。

【請求項 2 7】

前記 1 つ以上の固定化された捕捉試薬に結合した検出試薬の量を定量することによって前記試料中の治療薬の量を決定することをさらに含む、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

検出試薬が第 1 の捕捉位置において捕捉試薬に結合する、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 9】

検出試薬が第 2 の捕捉位置において捕捉試薬に結合する、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 3 0】

検出試薬が第 1 および第 2 の捕捉位置において捕捉試薬に結合する、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記治療薬がパクリタキセルである、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記検出試薬が 8 A 1 0 および 3 C 6 から選択されるモノクローナル抗体またはその断片もしくは誘導体を含み、前記抗体、または断片もしくは誘導体がパクリタキセルに結合する、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 3 3】

疾患または状態と診断された患者における治療処置の有効性をモニターするための方法であって、

(a) 第 1 の時点で患者を治療剤で処置すること、

(b) 第 1 の時点で治療薬の投与後の前記患者における前記治療剤の第 1 の濃度を決定することであって、前記濃度を決定することが請求項 2 6 から 3 2 の何れか一項に記載の方法を含むこと、

(c) 第 2 の時点で前記患者を前記治療剤で処置すること、

(d) 第 2 の時点で治療薬の投与後の前記患者における前記治療剤の第 2 の濃度を決定することであって、前記濃度を決定することが請求項 2 6 から 3 2 の何れか一項に記載の方法を含むこと、および

(e) 前記治療処置の有効性を決定するために前記患者における前記第 1 および第 2 の濃度を比較することを含む、方法。

【請求項 3 4】

前記疾患または状態の処置が治療薬モニタリングから利益を受ける、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記疾患または状態が癌、炎症、高血圧、心臓血管、または疼痛である、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記治療剤がパクリタキセル、ドセタキセル、7-エピパクリタキセル、ト-アセチルパクリタキセル、10-デスアセチル-パクリタキセル、10-デスアセチル-7-エピパクリタキセル、7-キシロシルパクリタキセル、10-デスアセチル-7-グルタリルパクリタキセル、7-N, N-ジメチルグリシルパクリタキセル、および7-L-アラニルパクリタキセルからなる群から選択される、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 7】

疾患または状態と診断された患者における治療処置のPKガイド下投薬のための方法であって、

(a) 第1の時点で前記患者を治療剤で処置すること、
第1の時点で治療薬の投与後の前記患者における前記治療剤の1つ以上の薬物動態パラメーターを決定することであって、前記1つ以上の薬物動態パラメーターを決定することが請求項 2 6 から 3 2 の何れか一項に記載の方法によって前記治療剤をアッセイすることを含むこと、

(b) 前記第1の投薬から得られたPKデータを用いて第2の時点で前記患者を前記治療剤で処置すること、

(c) 第2の時点で治療薬の投与後の前記患者における前記治療剤の1つ以上の薬物動態パラメーターを決定することであって、前記1つ以上の薬物動態パラメーターを決定することが請求項 2 6 から 3 2 の何れか一項に記載の方法によって前記治療剤をアッセイすることを含むこと、および

(d) 適切な投薬が達成されたことを確認するために、前記第1の時点における前記対象の前記治療薬剤の1つ以上の薬物動態パラメーターを前記第2の時点におけるレベルと比較することを含む方法。

【請求項 3 8】

前記薬物動態パラメーターが、最大濃度までの時間 (T_{max})、濃度最大値 (C_{max})、曲線下面積 (AUC)、クリアランス (CL)、分布体積 (V_d)、最終相の間の見かけの分布体積 (V_z)、定常状態の間の見かけの分布体積 (V_{ss}) およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記疾患または状態が癌、炎症、高血圧、心臓血管、または疼痛である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記治療剤がパクリタキセル、ドセタキセル、7-エピパクリタキセル、ト-アセチルパクリタキセル、10-デスアセチル-パクリタキセル、10-デスアセチル-7-エピパクリタキセル、7-キシロシルパクリタキセル、10-デスアセチル-7-グルタリルパクリタキセル、7-N, N-ジメチルグリシルパクリタキセル、および7-L-アラニルパクリタキセルからなる群から選択される、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 1】

8 A 1 0 および 3 C 6 から選択されるモノクローナル抗体、またはその断片もしくは誘導体であって、配列番号 2、4、6、または 8 に含まれる相補性決定領域 (CDR) と少なくとも 95% のホモロジーを有する 1 つ以上の CDR を含む、上記抗体、抗体断片、または抗体誘導体。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 6 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0164】

排他的な権利または特権を請求する本発明の態様は以下のように定義される。

以下に、出願当初の特許請求の範囲に記載された発明を付記する。

[1]

液体試料中のパクリタキセルをアッセイするための方法であって、

(a) パクリタキセルを含む液体試料をラテラルフローアッセイデバイスに適用することであって、前記デバイスが

(i) 前記液体試料を受容するための試料受容ゾーン、

(i i) 前記試料受容ゾーンと液通し、前記試料受容ゾーンから流れ方向下流にある検出試薬ゾーンであって、

前記検出試薬ゾーンがその上に堆積した検出試薬を含み、

前記検出試薬が、検出可能なレポート基で標識された、パクリタキセルと結合するパクリタキセル抗体またはその断片もしくは誘導体であり、

前記パクリタキセル抗体またはその断片もしくは誘導体が、約 10^4 ~ 約 10^7 の K_{on} および約 10^{-3} ~ 約 10^{-7} の K_{off} を有する検出試薬ゾーン、および

(i i i) 前記検出試薬ゾーンと液通し、前記検出試薬ゾーンから流れ方向下流にある捕捉ゾーン

を含み、

前記捕捉ゾーンがその上に固定化された第1および第2の捕捉試薬を含み、

前記第1の捕捉試薬が前記検出試薬と結合可能なパクリタキセル材料であり（試験ライン）、

前記第2の捕捉試薬が前記検出試薬と結合可能な抗体であり（対照ライン）、

前記第1の捕捉試薬が前記捕捉ゾーンの上流端から流れ方向下流の第1の距離に位置し、

前記第2の捕捉試薬が前記捕捉ゾーンの上流端から流れ方向下流の第2の距離に位置し、

前記第2の距離が前記第1の距離より大きく、

前記 K_{on} が約 2.0×10^5 より大きく前記 K_{off} が約 1.0×10^{-3} より小さい場合には前記第1の距離対前記第2の距離の比は約0.0 ~ 約0.4であり、

前記 K_{on} が約 2.0×10^4 より大きく前記 K_{off} が約 2.0×10^{-4} より小さい場合には前記第1の距離対前記第2の距離の比は約0.2 ~ 約1.0であること、

(b) 前記試料を前記試料受容ゾーンから前記検出試薬ゾーンに流動させて検出試薬にパクリタキセルを供給すること、

(c) 前記検出試薬をパクリタキセルとともに前記捕捉ゾーンに流動させることであって、

前記第1の捕捉試薬（試験ライン）が前記検出試薬との結合に関して分析物質（パクリタキセル）と競合し、

前記第2の捕捉試薬（対照ライン）が過剰の検出試薬と結合すること、ならびに

(d) 前記第2の捕捉試薬（対照ライン）と比較して前記第1の捕捉試薬（試験ライン）に結合した検出試薬の量を観測すること

を含む、方法。

[2]

対照ラインおよび試験ラインにおいて結合した検出試薬の量を定量することによって前記試料中のパクリタキセルの量を決定することをさらに含む、[1]に記載の方法。

[3]

前記捕捉試薬に結合した検出試薬の量を定量することが光学密度の測定を含む、[2]に記載の方法。

[4]

前記検出可能なレポート基が金コロイドである、[1]に記載の方法。

[5]

前記パクリタキセル抗体が3C6である、[1]に記載の方法。

[6]

前記パクリタキセル抗体が 8 A 1 0 である、[1] に記載の方法。

[7]

前記パクリタキセル材料が前記検出試薬への結合に関してパクリタキセルと競合するパクリタキセル抗原である、[1] に記載の方法。

[8]

前記パクリタキセル材料がパクリタキセルタンパク質コンジュゲートである、[1] に記載の方法。

[9]

前記検出試薬と結合可能な抗体がヤギ抗マウス抗体である、[1] に記載の方法。

[1 0]

前記試料受容ゾーンと前記第 1 の捕捉試薬との間の距離を変化させて、パクリタキセルの検出感度を最適化する、[1] に記載の方法。

[1 1]

前記試料受容ゾーンと前記第 1 の捕捉試薬との間の距離を最小化して、パクリタキセルの検出感度を最適化する、[1] に記載の方法。

[1 2]

前記第 2 の捕捉試薬（対照ライン）に結合した過剰の検出試薬の量を観測することをさらに含む、[1] に記載の方法。

[1 3]

前記第 2 の捕捉試薬に結合した過剰の検出試薬の量を定量することによって前記試料中のパクリタキセルの量を決定することをさらに含む、[1] に記載の方法。

[1 4]

前記第 1 および第 2 の捕捉ゾーンの中間の第 3 の捕捉ゾーンをさらに含み、前記第 3 の捕捉ゾーンが前記検出試薬と結合可能なパクリタキセル材料を含む、[1] に記載の方法。

[1 5]

前記第 3 の捕捉試薬に結合した検出試薬の量を定量することによって前記試料中のパクリタキセルの量を決定することを含む、[1 4] に記載の方法。

[1 6]

前記第 3 の捕捉試薬に結合した検出試薬の量を定量することが光学密度の測定を含む、[1 5] に記載の方法。

[1 7]

前記ラテラルフローデバイスが、前記捕捉試薬ゾーンと液通し、前記捕捉試薬ゾーンから流れ方向下流にある吸収ゾーンをさらに含む、[1] に記載の方法。

[1 8]

L F A を S P R または他の固相イムノアッセイに置きかえることができる、[1] に記載の方法。

[1 9]

第 1 および第 2 の抗体を用い、前記第 1 の抗体が 10^4 より大きい K_{on} を有し、前記第 2 の抗体が 10^{-3} より小さい K_{off} を有する、[1] に記載の方法。

[2 0]

再現性を増大させダイナミックレンジを拡大させるために 2 本または 3 本のラインを用いて同一試料について複数の読み取りを生成することができる、[1] に記載の方法。

[2 1]

癌と診断された患者におけるパクリタキセル療法の有効性をモニターするための方法であって、

(a) 第 1 の時点で癌患者をパクリタキセルで処置すること、

(b) 第 1 の時点で前記患者におけるパクリタキセルの第 1 の濃度を決定することであって、前記濃度を決定することが [1] から [2 0] の何れかーに記載の方法を含むこと、

(c) 第2の時点で前記患者をパクリタキセルで処置すること、

(d) 第2の時点で前記患者におけるパクリタキセル薬の第2の濃度を決定することであって、前記濃度を決定することが〔1〕から〔20〕の何れ一に記載の方法を含むこと、および

(e) 癌処置の有効性を決定するために前記患者におけるパクリタキセルの前記第1の濃度と第2の濃度を比較すること

を含む、方法。

〔22〕

癌と診断された患者におけるパクリタキセル療法のPKガイド下投薬のための方法であって、

(a) 第1の時点で前記癌患者をパクリタキセルで処置すること、

第1の時点で前記患者におけるパクリタキセルの1つ以上の薬物動態パラメーターを決定することであって、前記1つ以上の薬物動態パラメーターを決定することが〔1〕から〔20〕の何れ一に記載の方法によってパクリタキセルの濃度を測定することを含むこと

(b) 前記第1の投薬からのPK情報を用いて第2の時点で前記患者をパクリタキセルで処置すること、

(c) 第2の時点で前記患者におけるパクリタキセルの1つ以上の薬物動態パラメーターを決定することであって、前記1つ以上の薬物動態パラメーターを決定することが〔1〕から〔20〕の何れ一に記載の方法によってパクリタキセルの濃度を測定することを含むこと、および

(d) 適切な投薬が達成されたことを確認するために、前記第1の時点における対象のパクリタキセルの1つ以上の薬物動態パラメーターを前記第2の時点におけるレベルと比較すること

を含む、方法。

〔23〕

前記薬物動態パラメーターが、最大濃度までの時間 (T_{max})、濃度最大値 (C_{max})、曲線下面積 (AUC)、クリアランス (CL)、分布体積 (V_d)、最終相の間の見かけの分布体積 (V_z)、定常状態の間の見かけの分布体積 (V_{ss}) およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、〔22〕に記載の方法。

〔24〕

(a) 液体試料を受容するための試料受容ゾーン、

(b) 前記試料受容ゾーンと液通し、前記試料受容ゾーンから流れ方向下流にある検出試薬ゾーンであって、

その上に堆積した1つ以上の検出試薬を含む検出試薬ゾーン、

(c) 前記検出試薬ゾーンと液通し、前記検出試薬ゾーンから流れ方向下流にある捕捉ゾーンであって、

その上に固定化された1つ以上の捕捉試薬を含む捕捉ゾーン、および

(d) 前記捕捉ゾーンと液通し、前記捕捉試薬ゾーンから流れ方向下流にある吸収ゾーンを含む、ラテラルフローデバイス。

〔25〕

前記検出試薬が検出可能なレポート基で標識された抗体である、〔24〕に記載のデバイス。

〔26〕

前記検出試薬が治療薬に第1の親和性を有する第1の抗体および前記治療薬に第2の親和性を有する第2の抗体を含み、前記第1の親和性が前記第2の親和性より大きい、〔24〕に記載のデバイス。

〔27〕

前記捕捉試薬が前記検出試薬への結合に関して前記治療薬と競合する抗原である、〔24〕に記載のデバイス。

[2 8]

前記捕捉試薬が前記検出試薬と結合可能な抗体である、[2 4] に記載のデバイス。

[2 9]

前記捕捉試薬が前記検出試薬への結合に関して前記治療薬と競合する抗原である第 1 の捕捉試薬と、前記検出試薬と結合可能な抗体である第 2 の捕捉試薬とを含む、[2 4] に記載のデバイス。

[3 0]

前記第 1 の捕捉試薬が、前記第 2 の捕捉試薬から流れ方向上流に固定化されている、[2 4] に記載のデバイス。

[3 1]

前記試料受容ゾーンと前記第 1 の捕捉試薬との間の距離を変化させて、前記治療薬の検出を最適化する、[3 0] に記載のデバイス。

[3 2]

前記第 1 および第 2 の捕捉試薬の中間に固定化された第 3 の捕捉試薬をさらに含み、前記第 3 の捕捉試薬が、前記検出試薬への結合に関して前記治療薬と競合する抗原である、[3 0] に記載のデバイス。

[3 3]

前記治療薬がパクリタキセルであり、前記検出試薬が 8 A 1 0 および 3 C 6 から選択されるモノクローナル抗体またはその断片もしくは誘導体を含み、前記抗体、または断片もしくは誘導体がパクリタキセルに結合する、[2 4] に記載のデバイス。

[3 4]

試料中の治療薬をアッセイするための方法であって、

(a) [2 4] から [3 3] の何れかに記載のデバイスの試料受容ゾーンに試料を適用すること、および

(b) 前記 1 つ以上の固定化された捕捉試薬に結合した検出試薬の量を観測することを含む方法。

[3 5]

前記 1 つ以上の固定化された捕捉試薬に結合した検出試薬の量を定量することによって前記試料中の治療薬の量を決定することをさらに含む、[3 4] に記載の方法。

[3 6]

検出試薬が第 1 の捕捉位置において捕捉試薬に結合する、[3 4] に記載の方法。

[3 7]

検出試薬が第 2 の捕捉位置において捕捉試薬に結合する、[3 4] に記載の方法。

[3 8]

検出試薬が第 1 および第 2 の捕捉位置において捕捉試薬に結合する、[3 4] に記載の方法。

[3 9]

前記治療薬がパクリタキセルである、[3 4] に記載の方法。

[4 0]

前記検出試薬が 8 A 1 0 および 3 C 6 から選択されるモノクローナル抗体またはその断片もしくは誘導体を含み、前記抗体、または断片もしくは誘導体がパクリタキセルに結合する、[3 4] に記載の方法。

[4 1]

疾患または状態と診断された患者における治療処置の有効性をモニターするための方法であって、

(a) 第 1 の時点で患者を治療剤で処置すること、

(b) 第 1 の時点で前記患者における前記治療剤の第 1 の濃度を決定することであって、前記濃度を決定することが [3 4] から [4 0] の何れかに記載の方法を含むこと、

(c) 第 2 の時点で前記患者を前記治療剤で処置すること、

(d) 第 2 の時点で前記患者における前記治療剤の第 2 の濃度を決定することであって、

前記濃度を決定することが〔34〕から〔40〕の何れかーに記載の方法を含むこと、および

(e) 前記治療処置の有効性を決定するために前記患者における前記第1および第2の濃度を比較することを含む、方法。

〔42〕

前記疾患または状態の処置が治療薬モニタリングから利益を受ける、〔41〕に記載の方法。

〔43〕

前記疾患または状態が癌、炎症、高血圧、心臓血管、または疼痛である、〔41〕に記載の方法。

〔44〕

前記治療剤がパクリタキセル、ドセタキセル、7-エピパクリタキセル、t-アセチルパクリタキセル、10-デスアセチル-パクリタキセル、10-デスアセチル-7-エピパクリタキセル、7-キシロシルパクリタキセル、10-デスアセチル-7-グルタリルパクリタキセル、7-N, N-ジメチルグリシルパクリタキセル、および7-L-アラニルパクリタキセルからなる群から選択される、〔41〕に記載の方法。

〔45〕

疾患または状態と診断された患者における治療処置のPKガイド下投薬のための方法であって、

(a) 第1の時点で前記患者を治療剤で処置すること、
第1の時点で前記患者における前記治療剤の1つ以上の薬物動態パラメーターを決定することであって、前記1つ以上の薬物動態パラメーターを決定することが〔34〕から〔40〕の何れかーに記載の方法によって前記治療剤をアッセイすることを含むこと、

(b) 前記第1の投薬から得られたPKデータを用いて第2の時点で前記患者を前記治療剤で処置すること、

(c) 第2の時点で前記患者における前記治療剤の1つ以上の薬物動態パラメーターを決定することであって、前記1つ以上の薬物動態パラメーターを決定することが〔34〕から〔40〕の何れかーに記載の方法によって前記治療剤をアッセイすることを含むこと、および

(d) 適切な投薬が達成されたことを確認するために、前記第1の時点における前記対象の前記治療薬剤の1つ以上の薬物動態パラメーターを前記第2の時点におけるレベルと比較することを含む方法。

〔46〕

前記薬物動態パラメーターが、最大濃度までの時間 (T_{max})、濃度最大値 (C_{max})、曲線下面積 (AUC)、クリアランス (CL)、分布体積 (V_d)、最終相の間の見かけの分布体積 (V_z)、定常状態の間の見かけの分布体積 (V_{ss}) およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、〔45〕に記載の方法。

〔47〕

前記疾患または状態が癌、炎症、高血圧、心臓血管、または疼痛である、〔45〕に記載の方法。

〔48〕

前記治療剤がパクリタキセル、ドセタキセル、7-エピパクリタキセル、t-アセチルパクリタキセル、10-デスアセチル-パクリタキセル、10-デスアセチル-7-エピパクリタキセル、7-キシロシルパクリタキセル、10-デスアセチル-7-グルタリルパクリタキセル、7-N, N-ジメチルグリシルパクリタキセル、および7-L-アラニルパクリタキセルからなる群から選択される、〔45〕に記載の方法。

〔49〕

パクリタキセルに結合する、8A10および3C6から選択されるモノクローナル抗体

、またはその断片もしくは誘導体。

[5 0]

前記抗体、抗体断片、または抗体誘導体が配列番号 2、4、6、または 8 に含まれる相補性決定領域 (CDR) と少なくとも 95 % のホモロジーを有する 1 つ以上の CDR を含む、[4 9] に記載のモノクローナル抗体、抗体断片、または抗体誘導体。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 15/24578																											
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/00, G01N 33/53 (2015.01) CPC - A61K 38/00, B01J 19/0006, G01N 33/78, G01N 33/564 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) IPC(8): G01N 33/00, G01N 33/53 (2015.01) CPC: A61K 38/00, B01J 19/0006, G01N 33/78, G01N 33/564 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 435/7.1, 435/7.92, 435/7.93, 436/34, 436/501 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google Scholar, Google Web, search terms: lateral flow device, lateral flow assay, paclitaxel, detect, SPR, Kon, Koff, guided dosing, administer, detectable antibody, antigen, BSA, fusion, colloidal gold, monoclonal, 8A10, 3C6, conjugate, immobilized, test line, control line, absorbant, load, sample, liquid, compete, sample																													
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 2014/0017812 A1 (SMITH et al.) 16 January 2014 (16.01.2014) para [0007], [0010], [0020], [0021], [0072], [0080], [0083], [0085], [0087], [0090], [0091], [0099], [0100], [0101], [0106], [0108], [0109], [0110], Fig. 1</td> <td>24-32, (34-39)/(24-32) 1-23, 33, (34-39)/33, 40</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td></td> <td>49</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 5,955,621 A (DURZAN et al.) 21 September 1999 (21.09.1999) col 2, ln 36-40</td> <td>5, 6, (21-23)/(5, 6), 33, (34-39)/33, 40</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2010/0166746 A1 (CHOWDHURY et al.) 01 July 2010 (01.07.2010) para [0003], [0007], [0010], [0011], [0082], [0083]</td> <td>1-23</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2012/166795 A1 (TRIEU) 06 December 2012 (06.12.2012) pg 2, ln 29-35, pg 3, ln 1-7, ln 14-16, pg 5, ln 35, pg 6, ln 1, pg 8, ln 12-13, pg 11, ln 27-29, pg 13, ln 19-31</td> <td>21-23</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2012/0029172 A1 (RENNER et al.) 02 February 2012 (02.02.2012) abstract, SEQ ID NO: 53</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2014/0010829 A1 (BIGNER et al.) 09 January 2014 (09.01.2014) abstract, SEQ ID NO: 11</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 2014/0017812 A1 (SMITH et al.) 16 January 2014 (16.01.2014) para [0007], [0010], [0020], [0021], [0072], [0080], [0083], [0085], [0087], [0090], [0091], [0099], [0100], [0101], [0106], [0108], [0109], [0110], Fig. 1	24-32, (34-39)/(24-32) 1-23, 33, (34-39)/33, 40	X		49	Y	US 5,955,621 A (DURZAN et al.) 21 September 1999 (21.09.1999) col 2, ln 36-40	5, 6, (21-23)/(5, 6), 33, (34-39)/33, 40	A		50	Y	US 2010/0166746 A1 (CHOWDHURY et al.) 01 July 2010 (01.07.2010) para [0003], [0007], [0010], [0011], [0082], [0083]	1-23	Y	WO 2012/166795 A1 (TRIEU) 06 December 2012 (06.12.2012) pg 2, ln 29-35, pg 3, ln 1-7, ln 14-16, pg 5, ln 35, pg 6, ln 1, pg 8, ln 12-13, pg 11, ln 27-29, pg 13, ln 19-31	21-23	A	US 2012/0029172 A1 (RENNER et al.) 02 February 2012 (02.02.2012) abstract, SEQ ID NO: 53	50	A	US 2014/0010829 A1 (BIGNER et al.) 09 January 2014 (09.01.2014) abstract, SEQ ID NO: 11	50
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																											
X	US 2014/0017812 A1 (SMITH et al.) 16 January 2014 (16.01.2014) para [0007], [0010], [0020], [0021], [0072], [0080], [0083], [0085], [0087], [0090], [0091], [0099], [0100], [0101], [0106], [0108], [0109], [0110], Fig. 1	24-32, (34-39)/(24-32) 1-23, 33, (34-39)/33, 40																											
X		49																											
Y	US 5,955,621 A (DURZAN et al.) 21 September 1999 (21.09.1999) col 2, ln 36-40	5, 6, (21-23)/(5, 6), 33, (34-39)/33, 40																											
A		50																											
Y	US 2010/0166746 A1 (CHOWDHURY et al.) 01 July 2010 (01.07.2010) para [0003], [0007], [0010], [0011], [0082], [0083]	1-23																											
Y	WO 2012/166795 A1 (TRIEU) 06 December 2012 (06.12.2012) pg 2, ln 29-35, pg 3, ln 1-7, ln 14-16, pg 5, ln 35, pg 6, ln 1, pg 8, ln 12-13, pg 11, ln 27-29, pg 13, ln 19-31	21-23																											
A	US 2012/0029172 A1 (RENNER et al.) 02 February 2012 (02.02.2012) abstract, SEQ ID NO: 53	50																											
A	US 2014/0010829 A1 (BIGNER et al.) 09 January 2014 (09.01.2014) abstract, SEQ ID NO: 11	50																											
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐																													
* 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 20 August 2015 (20.08.2015)		Date of mailing of the international search report 08 SEP 2015																											
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774																											

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 15/24578

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2012/0064547 A1 (DEMUTH et al.) 15 March 2012 (15.03.2012) abstract, SEQ ID NO: 58	50
A	US 2012/0270338 A1 (UEDA et al.) 25 October 2012 (25.10.2012) para [0013], SEQ ID NO: 12	50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/24578

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.: 41-48
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 Supplemental Sheet to continue *****

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 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.:

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. 4

PCT/US 15/24578

Continuation of Box No. III, Observations where unity of invention is lacking:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claims 1-23, directed to a method for assaying paclitaxel in a liquid sample.

Group II, claims 24-40, directed to a lateral flow device.

Group III, claims 49-50, directed to a monoclonal antibody that binds to paclitaxel.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features

Group I has the special technical feature of a method for assaying paclitaxel in a liquid sample, and a method for monitoring the efficacy of a paclitaxel therapy in a patient diagnosed with cancer, that is not required by Groups II or III.

Groups I and III have the special technical feature of an anti-paclitaxel antibody, that is not required by Group II.

Group II has the special technical feature of a lateral flow device comprising an absorbent zone, that is not required by Groups I or III.

Group III has the special technical feature of a monoclonal antibody selected from 8A10 and 3C6, or fragment or derivative thereof, wherein the antibody, antibody fragment, or antibody derivative comprises one or more complementary determining regions (CDRs) with at least 95% homology to a CDR contained in SEQ ID NOS: 2, 4, 6, or 8, that is not required by Groups I or II.

Common technical features:

Groups I and II share the common technical feature of a method for assaying a therapeutic drug in a sample, comprising applying a sample to a sample receiving zone of a lateral flow device; and observing the amount of detection reagent bound to the one or more immobilized capture reagents, wherein the device comprises (b) a detection reagent zone in liquid communication with the sample receiving zone and downstream in flow direction from the sample receiving zone, wherein the detection reagent zone comprises one or more detection reagents deposited thereon; and (c) a capture zone in liquid communication with the detection reagent zone and downstream in flow direction from the detection reagent zone, wherein the capture zone comprises one or more capture reagents immobilized thereon.

Groups I and III share the common feature of a paclitaxel antibody, or fragment or derivative thereof that binds paclitaxel.

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because these shared technical features are obviated by US 2014/0017812 A1 to Smith et al., (hereinafter Smith).

Smith teaches a method for assaying paclitaxel in a liquid sample, comprising

(a) applying a liquid sample comprising paclitaxel to a lateral flow assay device, the device comprising

(i) a sample receiving zone for receiving the liquid sample (para [0007] "antineoplastic drugs assayed ... include ... paclitaxel", para [0005] "Methods of detecting antineoplastic drug contamination ... include ... generating a fluid test sample; assaying the antineoplastic drug in the fluid test sample by lateral flow assay", para [0021] "A lateral flow assay device for detecting an antineoplastic drug ... includes a sample pad", para [0020] "A fluid test sample which contains or is suspected of containing an antineoplastic drug is added to a sample pad");

(ii) a detection reagent zone [e.g. conjugate pad] in liquid communication with the sample receiving zone and downstream in flow direction from the sample receiving zone (para [0020] "A lateral flow assay device ... includes a sample pad disposed adjacent the conjugate pad such that the fluid test sample flows in the direction of the adjacent conjugate pad.", see Fig. 1),

wherein the detection reagent zone comprises a detection reagent deposited thereon (para [0021] "the conjugate pad comprises a diffusibly bound detectably labeled antineoplastic drug binding agent", see Fig. 1),

wherein the detection reagent is a paclitaxel antibody that binds paclitaxel, labeled with a detectable reporting group (para [0080] "a lateral flow assay device is provided including ... a conjugate pad where detectably labeled anti-paclitaxel antibody ... is diffusibly bound", see Fig. 1),

(iii) a capture zone in liquid communication with the detection reagent zone [conjugate pad] and downstream in flow direction from the detection reagent zone, wherein the capture zone comprises first and second capture reagents immobilized thereon (para [0080] "a lateral flow assay device is provided including 1) a conjugate pad where detectably labeled anti-paclitaxel antibody ... is diffusibly bound, 2) a solid or semi-solid porous support which allows for lateral flow of the fluid test sample and which has at least one test detection zone including a non-diffusibly bound detection reagent and at least one control zone including a non-diffusibly bound control reagent, and 3) a wicking pad that allows for the capillary flow of the fluid test sample." See Fig. 1.),

wherein the first capture reagent is a paclitaxel material capable of binding the detection reagent (test line) (para [0085] "A lateral flow assay monitor device according to aspects of the present invention includes: 1) an antibody specific for the antineoplastic drug to be assayed, ... in the conjugate pad and 2) a predetermined amount of the same antineoplastic drug conjugated to BSA is present at the test line", see Fig. 1), wherein the second capture reagent is an antibody capable of binding the detection reagent (control line) (para [0085] "A control line is also included ... The control line employs a different antibody interaction than the test line and provides a positive control for the lateral flow assay," Fig. 1 shows the control line antibody").

--continued in next sheet--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/24578

—continued from previous sheet—

wherein the first capture reagent is positioned at a first distance downstream in flow direction from the upstream end of the capture zone, wherein the second capture reagent is positioned at a second distance downstream in flow direction from the upstream end of the capture zone (Fig. 1 shows schematically the first capture reagent, or test line, a space or strip, and the second capture reagent, or control line. The length of each line and the space appear equal);

(b) allowing the sample to flow from the sample receiving zone through the detection reagent zone to provide detection reagent with paclitaxel (para [0083] "A fluid test sample which contains or is suspected of containing an antineoplastic drug [e.g. paclitaxel] is added to a sample pad ... such that the fluid test sample flows in the direction of the adjacent conjugate pad. ... The antineoplastic drug and first detectably labeled binding agent capable of specific binding to the antineoplastic drug form a complex at the conjugate pad." illustrated in Fig. 1);

(c) allowing the detection reagent with paclitaxel to flow through the capture zone, whereby the first capture reagent (test line) competes with the analyte (paclitaxel) for binding with the detection reagent, and whereby the second capture reagent (control line) binds excess detection reagent (para [0083] "The complex, along with any unbound first detectably labeled binding agent is moved by lateral flow in the direction of the test zone and control zone. The test zone contains antineoplastic drug non-diffusibly affixed to the test zone. The control zone contains a second binding agent specific for the first detectably labeled binding agent. Excess first detectably labeled binding agent capable of specific binding to the antineoplastic drug moves by lateral flow to the test and control zones", illustrated in Fig. 1); and

(d) observing the amount of detection reagent bound to the first capture reagent (test line) relative to the second capture reagent (control line) (para [0083] "If excess first detectably labeled binding agent binds to the antineoplastic drug in the test zone, a detectable signal is present indicative which varies directly with the amount of the antineoplastic drug in the fluid test sample, where strongly detectable signal is indicative of little or no antineoplastic drug in the sample and where undetectable signal in the test zone is indicative of the presence of the antineoplastic drug in the fluid test sample. ... Interaction of the first detectably labeled binding agent with the second binding agent specific for the first detectably labeled binding agent produces a detectable signal indicative of a properly working assay.").

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Groups I-III lack unity of invention under PCT Rule 13.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 Q 1/04

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100189913

弁理士 鵜飼 健

(74)代理人 100199565

弁理士 飯野 茂

(72)発明者 リ、イエ・ジュン

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 1 7 5 5、モントレイ・パーク、サウス・オレンジ・アベニュー 5 2 6 ナンバー・ビー

(72)発明者 パク、チュルホ

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 2 1 2 9、サン・ディエゴ、グレースランド・ウェイ 9 7 3 0

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ79 QR48 QS33

4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74 GA26