

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第6部門第1区分
 【発行日】令和3年3月11日(2021.3.11)

【公表番号】特表2020-506395(P2020-506395A)
 【公表日】令和2年2月27日(2020.2.27)
 【年通号数】公開・登録公報2020-008
 【出願番号】特願2019-543232(P2019-543232)
 【国際特許分類】

G 0 1 N 33/543 (2006.01)

【F I】

G 0 1 N 33/543 5 1 1 A
 G 0 1 N 33/543 5 1 1 D
 G 0 1 N 33/543 5 4 5
 G 0 1 N 33/543 5 7 5

【手続補正書】

【提出日】令和3年1月27日(2021.1.27)

【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】

(a) 標識競合物質の存在下で、固相捕捉剤を提示する表面を試料に曝露する工程であって、前記競合物質と標的検体の両方が前記捕捉剤に結合可能である、工程と、

(b) 前記標識競合物質由来のシグナルを測定する工程であって、前記標識競合物質由来のシグナルが、(A)前記捕捉剤に結合した標識競合物質の量に比例し、(B)前記試料中の標的検体の量に反比例する、工程と、それに続いて、

(c) 前記表面を標識検出剤に曝露する工程であって、前記標識検出剤が、前記標的検体に結合可能であるが前記標識競合物質には結合不能である、工程と、

(d) 前記標識検出剤由来のシグナルを測定する工程であって、前記標識検出剤由来のシグナルが、(A)前記標的検体に結合した標識検出剤の量に比例し、(B)前記試料中の標的検体の量に比例する、工程と、

を含む、方法。

【請求項2】

イムノアッセイの工程(a)~(d)が、同一の試料において、同一の物理的位置で、同一の標的検体に対して実施される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

イムノアッセイが、既知量の標識競合物質及び未知量の標的検体を使用して実施され、任意に、前記方法が、

(e) 前記標識競合物質由来のシグナル及び/又は前記標識検出剤由来のシグナルを、既知量の標的検体を用いて調整した基準値と比較して、前記試料中の標的検体の量を測定する工程、又は

(e) 前記標識競合物質由来のシグナルと前記標識検出剤由来のシグナルの比率を測定して無次元量を生成する工程、

を更に含み、任意に、前記方法が、

(f) 前記無次元量を、既知量の標的検体を用いて調整した基準比率と比較して、前記試料中の標的検体の量を測定する工程、

を更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記標識競合物質及び前記標識検出剤が、検出可能に異なる標識を含むか、又は前記標識競合物質及び前記標識検出剤が同一の標識を含み、工程 (a) 由来の前記シグナルが工程 (b) において実質的に検出されないように、前記方法が工程 (a) と工程 (b) の間に前記標識の阻害剤を添加する工程を更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記標識競合物質の標識が、検出可能な活性を有する酵素を含み、任意に、前記阻害剤が、前記酵素との基質結合を防止するか、又は前記阻害剤が、前記酵素による基質代謝回転を防止する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記標的検体が、標的抗体であり、任意に、前記捕捉剤が、前記標的抗体用のエピトープを提示する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記標識競合物質が、前記標的抗体用のエピトープに結合可能な F (a b)₂フラグメントを含み、任意に、前記検出剤が、前記標的抗体の F c 部分に結合可能であるが前記 F (a b)₂フラグメントには結合不能な抗 F c 抗体を含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

(a) 標識競合物質の存在下で、固相捕捉剤を提示する表面を試料に曝露する工程であって、前記捕捉剤が、標的抗体用のエピトープを含み、前記競合物質が、F (a b)₂フラグメント及び第 1 の検出可能標識を含み、前記標的抗体用のエピトープに結合可能である、工程と、

(b) 前記第 1 の検出可能標識由来のシグナルを測定する工程であって、前記第 1 の検出可能標識由来のシグナルが、(A) 前記捕捉剤に結合した標識競合物質の量に比例し、(B) 前記試料中における標的抗体の量に反比例する、工程と、

(c) 前記第 1 の検出可能標識の阻害剤を添加する工程であって、前記阻害剤が、前記標識競合物質の前記第 1 の検出可能標識に結合して、前記標識競合物質の前記第 1 の検出可能標識に由来するその後のシグナル検出を防止する、工程と、

(d) 前記阻害標識競合物質と前記捕捉剤に結合した前記標的抗体を有する前記表面を標識検出剤に曝露する工程であって、前記標識検出剤が、抗 F c 抗体及び第 2 の検出可能標識を含み、前記標的抗体に結合可能であるが前記標識競合物質には結合不能である、工程と、

(e) 前記第 2 の検出可能標識由来の第 2 のシグナルを測定する工程であって、前記第 2 の検出可能標識由来の第 2 のシグナルが、(A) 前記標的検体に結合した標識検出剤の量に比例し、(B) 前記試料中における標的検体の量に比例する、工程と、を含む方法であって、

任意に、前記方法が、工程 (c) と工程 (d) の間に、前記試料中の非結合阻害剤を洗浄除去する工程を更に含むか、又は前記第 1 の検出可能標識及び前記第 2 の検出可能標識が、同一タイプの標識である、方法。

【請求項 9】

標的検体を検出するためのイムノアッセイを実施するための試薬を含むシステムであって、

(a) 前記標的検体が安定的に結合可能な捕捉剤を提示する表面と、

(b) 第 1 の検出可能標識を含み、前記捕捉剤に結合可能な標識競合物質と、

(c) 第 2 の検出可能標識を含み、前記標的検体に結合可能であるが前記競合物質には結合不能な検出剤と、

を含み、

任意に、前記表面が、スライドガラス、チューブの内側、プレート、又はマイクロウェルの内側である、システム。

【請求項 10】

前記標的検体が、標的抗体であり、任意に、前記標的抗体が、治療抗体である、請求項 9 に記載のシステム。

【請求項 11】

前記捕捉剤が、前記標的抗体のエピトープを含み、任意に、前記競合物質が、前記標的抗体用のエピトープに結合可能な $F(a b)_2$ フラグメントを含む、請求項 10 に記載のシステム。

【請求項 12】

前記第 1 の検出可能標識が、蛍光色素、検出可能な活性を有する酵素、及び蛍光タンパク質から選択され、任意に、前記第 1 の検出可能標識が酵素であり、前記検出可能な活性が発光である、請求項 11 に記載のシステム。

【請求項 13】

前記検出剤が、前記標的抗体の Fc 部分に結合可能であるが $F(a b)_2$ フラグメントには結合不能な抗 Fc 抗体を含み、任意に、前記第 2 の検出可能標識が、蛍光色素、検出可能な活性を有する酵素、及び蛍光タンパク質から選択されるか、又は前記第 1 の検出可能標識が酵素であり、前記検出可能な活性が発光である、請求項 9 に記載のシステム。

【請求項 14】

前記第 1 の標識及び前記第 2 の標識が、検出可能に異なる標識であるか、又は前記第 1 の標識及び前記第 2 の標識が同一の標識であり、前記システムが前記標識の阻害剤を更に含む、請求項 9 に記載のシステム。

【請求項 15】

前記第 1 の検出可能標識及び前記第 2 の検出可能標識が、酵素であり、任意に、前記阻害剤が、前記酵素との基質結合を防止するか、又は前記阻害剤が、前記酵素による基質代謝回転を防止する、請求項 14 に記載のシステム。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0053

【補正方法】変更

【補正の内容】

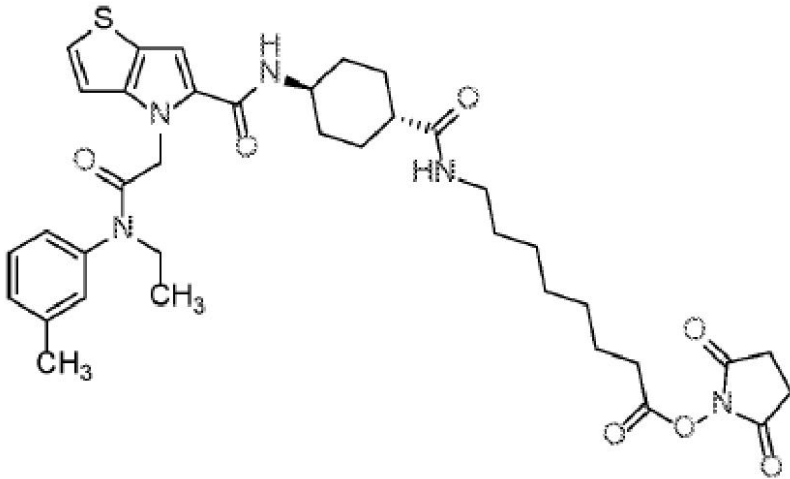
【0053】

実施例 2

単一レポーターイムノアッセイ

単一レポーターシステムを使用して抗 EGF R 治療抗体であるセツキシマブを検出するための組み合わせアッセイを設計し実施した(図 4 B)。NANOLUC で標識した Id S 開裂セツキシマブ $F(a b)_2$ を標識競合物質として使用した。上記のとおり、一定濃度の NANOLUC 標識セツキシマブ $F(a b)_2$ の存在下で、増加量のセツキシマブを、表面固相 EGF R を含有するプレートに加えることにより、第 1 の検出工程を実施した。次に、NANOLUC 阻害剤である JRW - 0552 を使用して、NANOLUC 標識セツキシマブ $F(a b)_2$ 由来のシグナルを除去した。それからプレートを洗浄し、NANOLUC で標識した抗ヒト Fc 二次抗体(標識検出試薬)を用いてインキュベートした。図 2 に示した 2 レポーターシステムのシグナル比率と共に、本アッセイにおける 2 回の検出工程(標識競合物質の検出と標識検出試薬の検出)に由来するシグナルの比率をセツキシマブに対してプロットした(図 3)。本明細書の実施形態の開発中に行った実験に由来するデータは、組み合わせイムノアッセイの高ダイナミックレンジを示している。

JRW - 0552



本発明の好ましい態様は、下記の通りである。

〔1〕(a) 標識競合物質の存在下で、固相捕捉剤を提示する表面を試料に曝露する工程であって、前記競合物質と標的検体の両方が前記捕捉剤に結合可能である、工程と、

(b) 前記標識競合物質由来のシグナルを測定する工程であって、前記標識競合物質由来のシグナルが、(A) 前記捕捉剤に結合した標識競合物質の量に比例し、(B) 前記試料中の標的検体の量に反比例する、工程と、それに続いて、

(c) 前記表面を標識検出剤に曝露する工程であって、前記標識検出剤が、前記標的検体に結合可能であるが前記標識競合物質には結合不能である、工程と、

(d) 前記標識検出剤由来のシグナルを測定する工程であって、前記標識検出剤由来のシグナルが、(A) 前記標的検体に結合した標識検出剤の量に比例し、(B) 前記試料中の標的検体の量に比例する、工程と、

を含む、方法。

〔2〕イムノアッセイの工程(a)～(d)が、同一の試料において、同一の物理的位置で、同一の標的検体に対して実施される、前記〔1〕に記載の方法。

〔3〕イムノアッセイが、既知量の標識競合物質及び未知量の標的検体を使用して実施される、前記〔1〕に記載の方法。

〔4〕(e) 前記標識競合物質由来のシグナル及び/又は前記標識検出剤由来のシグナルを、既知量の標的検体を用いて調整した基準値と比較して、前記試料中の標的検体の量を測定する工程、

を更に含む、前記〔3〕に記載の方法。

〔5〕(e) 前記標識競合物質由来のシグナルと前記標識検出剤由来のシグナルの比率を測定して無次元量を生成する工程、

を更に含む、前記〔3〕に記載の方法。

〔6〕(f) 前記無次元量を、既知量の標的検体を用いて調整した基準比率と比較して、前記試料中の標的検体の量を測定する工程、

を更に含む、前記〔5〕に記載の方法。

〔7〕前記標識競合物質及び前記標識検出剤が、検出可能に異なる標識を含む、前記〔1〕に記載の方法。

〔8〕前記標識競合物質及び前記標識検出剤が同一の標識を含み、工程(a)由来の前記シグナルが工程(b)において実質的に検出されないように、工程(a)と工程(b)の間に前記標識の阻害剤を添加する工程を更に含む、前記〔1〕に記載の方法。

〔9〕前記標識競合物質の標識が、検出可能な活性を有する酵素を含む、前記〔8〕に記載の方法。

〔10〕前記阻害剤が、前記酵素との基質結合を防止する、前記〔9〕に記載の方法。

〔11〕前記阻害剤が、前記酵素による基質代謝回転を防止する、前記〔9〕に記載の方法。

〔12〕前記標的検体が、標的抗体である、前記〔1〕に記載の方法。

〔 1 3 〕 前記捕捉剤が、前記標的抗体用のエピトープを提示する、前記〔 1 2 〕に記載の方法。

〔 1 4 〕 前記標識競合物質が、前記標的抗体用のエピトープに結合可能な F (a b)₂フラグメントを含む、前記〔 1 3 〕に記載の方法。

〔 1 5 〕 前記検出剤が、前記標的抗体の F c 部分に結合可能であるが前記 F (a b)₂フラグメントには結合不能な抗 F c 抗体を含む、前記〔 1 4 〕に記載の方法。

〔 1 6 〕 標的検体を検出するためのイムノアッセイを実施するための試薬を含むシステムであって、

（ a ） 前記標的検体が安定的に結合可能な捕捉剤を提示する表面と、

（ b ） 第 1 の検出可能標識を含み、前記捕捉剤に結合可能な標識競合物質と、

（ c ） 第 2 の検出可能標識を含み、前記標的検体に結合可能であるが前記競合物質には結合不能な検出剤と、を含む、システム。

〔 1 7 〕 前記表面が、スライドガラス、チューブの内側、プレート、又はマイクロウェルの内側である、前記〔 1 6 〕に記載のシステム。

〔 1 8 〕 前記標的検体が、標的抗体である、前記〔 1 6 〕に記載のシステム。

〔 1 9 〕 前記標的抗体が、治療抗体である、前記〔 1 8 〕に記載のシステム。

〔 2 0 〕 前記捕捉剤が、前記標的抗体のエピトープを含む、前記〔 1 8 〕に記載のシステム。

〔 2 1 〕 前記競合物質が、前記標的抗体用のエピトープに結合可能な F (a b)₂フラグメントを含む、前記〔 2 0 〕に記載のシステム。

〔 2 2 〕 前記第 1 の検出可能標識が、蛍光色素、検出可能な活性を有する酵素、及び蛍光タンパク質から選択される、前記〔 2 1 〕に記載のシステム。

〔 2 3 〕 前記第 1 の検出可能標識が酵素であり、前記検出可能な活性が発光である、前記〔 2 2 〕に記載のシステム。

〔 2 4 〕 検出剤が、前記標的抗体の F c 部分に結合可能であるが前記 F (a b)₂フラグメントには結合不能な抗 F c 抗体を含む、前記〔 1 6 〕に記載のシステム。

〔 2 5 〕 前記第 2 の検出可能標識が、蛍光色素、検出可能な活性を有する酵素、及び蛍光タンパク質から選択される、前記〔 2 4 〕に記載のシステム。

〔 2 6 〕 前記第 1 の検出可能標識が酵素であり、前記検出可能な活性が発光である、前記〔 2 4 〕に記載のシステム。

〔 2 7 〕 前記第 1 の標識及び前記第 2 の標識が、検出可能に異なる標識である、前記〔 1 6 〕に記載のシステム。

〔 2 8 〕 前記第 1 の標識及び前記第 2 の標識が同一の標識であり、前記システムが前記標識の阻害剤を更に含む、前記〔 1 6 〕に記載のシステム。

〔 2 9 〕 前記第 1 の検出可能標識及び前記第 2 の検出可能標識が、酵素である、前記〔 2 8 〕に記載のシステム。

〔 3 0 〕 前記阻害剤が、前記酵素との基質結合を防止する、前記〔 2 9 〕に記載の方法。

〔 3 1 〕 前記阻害剤が、前記酵素による基質代謝回転を防止する、前記〔 2 9 〕に記載の方法。

〔 3 2 〕 （ a ） 標識競合物質の存在下で、固相捕捉剤を提示する表面を試料に曝露する工程であって、前記捕捉剤が、標的抗体用のエピトープを含み、前記競合物質が、 F (a b)₂フラグメント及び第 1 の検出可能標識を含み、前記標的抗体用のエピトープに結合可能である、工程と、

（ b ） 前記第 1 の検出可能標識由来のシグナルを測定する工程であって、前記第 1 の検出可能標識由来のシグナルが、（ A ） 前記捕捉剤に結合した標識競合物質の量に比例し、

（ B ） 前記試料中における標的検体の量に反比例する、工程と、

（ c ） 前記標識競合物質と前記捕捉剤に結合した前記標的抗体を有する前記表面を標識検出剤に曝露する工程であって、前記標識検出剤が、抗 F c 抗体及び第 2 の検出可能標識を含み、前記標的検体に結合可能であるが前記標識競合物質には結合不能であり、前記第

2の検出可能標識のシグナルが、前記第1の検出可能標識のシグナルと識別可能である、工程と、

(d)前記第2の検出可能標識由来のシグナルを測定する工程であって、前記第2の検出可能標識由来のシグナルが、(A)前記標的検体に結合した標識検出剤の量に比例し、(B)前記試料中の標的検体の量に比例する、工程と、を含む、方法。

[33](a)標識競合物質の存在下で、固相捕捉剤を提示する表面を試料に曝露する工程であって、前記捕捉剤が、標的抗体用のエピトープを含み、前記競合物質が、F(ab)₂フラグメント及び第1の検出可能標識を含み、前記標的抗体用のエピトープに結合可能である、工程と、

(b)前記第1の検出可能標識由来のシグナルを測定する工程であって、前記第1の検出可能標識由来のシグナルが、(A)前記捕捉剤に結合した標識競合物質の量に比例し、(B)前記試料中における標的検体の量に反比例する、工程と、

(c)前記第1の検出可能標識の阻害剤を添加する工程であって、前記阻害剤が、前記標識競合物質の前記第1の検出可能標識に結合して、前記標識競合物質の前記第1の検出可能標識に由来するその後のシグナル検出を防止する、工程と、

(d)前記阻害標識競合物質と前記捕捉剤に結合した前記標的抗体を有する前記表面を標識検出剤に曝露する工程であって、前記標識検出剤が、抗Fc抗体及び第2の検出可能標識を含み、前記標的検体に結合可能であるが前記標識競合物質には結合不能である、工程と、

(e)前記第2の検出可能標識由来の第2のシグナルを測定する工程であって、前記第2の検出可能標識由来の第2のシグナルが、(A)前記標的検体に結合した標識検出剤の量に比例し、(B)前記試料中における標的検体の量に比例する、工程と、を含む、方法。

[34]工程(c)と工程(d)の間に、前記試料中の非結合阻害剤を洗浄除去する工程を更に含む、前記[33]に記載の方法。

[35]前記第1の検出可能標識及び前記第2の検出可能標識が、同一タイプの標識である、前記[33]に記載の方法。