

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2019年2月14日 (14.02.2019)



(10) 国際公開番号

W O 2019/031444 A 1

- (51) 国際特許分類 : 福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP).
GW N 33/53 (2006.01) *A6 IP* 35/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
- (21) 国際出願番号 : PCT/JP20 18/029390
- (22) 国際出願日 : 2018年8月6日 (06.08.2018)
- (25) 国際出願の言語 : 日本語
- (26) 国際公開の言語 : 日本語
- (30) 優先権データ :
特願 2017-152735 2017年8月7日 (07.08.2017) JP
- (71) 出願人 : 国立大学法人九州大学 (KYUSHU UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION) [JP/JP] ; 〒812858 1 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 Fukuoka (JP).
- (72) 発明者 : 松元 幸一郎 (MATSUMOTO Koichiro) ; 〒812858 1 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 柳原 豊史 (YANAGIHARA Toyoshi) ; 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 田中 謙太郎 (TANAKA Kentaro) ; 〒812858 1 福岡県
- (74) 代理人 : 棚井 澄雄 , 外 (TANAI Sumio et al.) ; 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,

(54) Title: METHOD FOR MEASURING OCCUPANCY RATE OF SPECIFIC BINDING SUBSTANCES IN CELL POPULATION

(54) 発明の名称 : 細胞集団における特異的結合物質の占有率を測定する方法

(57) Abstract: Provided is a method for measuring the occupancy rate of a first specific binding substance in a cell population, the method including causing the cell population to come into contact with second and third specific binding substances, and measuring the number of cells to which the second and third specific binding substances are bonded, wherein the first, second, and third specific binding substances all bond to a target cell surface protein, the occupancy rate is the proportion of cells, from among cells expressing the target cell surface protein, to which the first specific binding substance binds, the second specific binding substance competes with the first specific binding substance, the third specific binding substance does not compete with the first specific binding substance, and the occupancy rate (%) is the value calculated by the formula: (1- (the number of cells to which the second specific binding substance is bonded/the number of the cells to which the third specific binding substance is bonded)) × 100.

(57) 要約 : 細胞集団における第1の特異的結合物質の占有率を測定する方法であって、細胞集団に第2及び第3の特異的結合物質を接触させることと、第2及び第3の特異的結合物質が結合した細胞数を計測することと、を含み、第1、第2及び第3の特異的結合物質はいずれも対象細胞表面タンパク質に結合するものであり、占有率は、対象細胞表面タンパク質発現細胞のうち、第1の特異的結合物質が結合した細胞の割合であり、第2の特異的結合物質は、第1の特異的結合物質と競合するものであり、第3の特異的結合物質は、第1の特異的結合物質と競合しないものであり、式 : (1 - (第2の特異的結合物質が結合した細胞数 / 第3の特異的結合物質が結合した細胞数)) × 100 により計算される値が占有率 (%) である、方法。



WO 2019/031444 A1

— 国劍調呈繼呈 (条約第21条(3))
添付公開書籤:

Q % Q % 33 33 F1 F % OS OS H % HU HI IS11,
LT, LU, LV, MC, M%, MT, NL, N, O, PL, PT, e, R, S,
% s si, s % su, Ta), o vpi (BF, a, CF, CG, 31, CM,
OV, GN, GQ, GW, M, ML, M% NE, s, N, T, T, G).

明 細 書

発明の名称 :

細胞集団における特異的結合物質の占有率を測定する方法

技術分野

[0001] 本発明は、細胞集団における特異的結合物質の占有率を測定する方法に関する。より具体的には、特異的結合物質に接触した細胞集団における前記特異的結合物質の占有率を測定する方法、特異的結合物質に接触した細胞集団における前記特異的結合物質の占有率を測定するためのキット、患者への抗体医薬の投与間隔又は投与量を最適化するためのデータを取得する方法、患者へのニボルマブ又はペムプロリズマブの投与間隔若しくは投与量を最適化するためのデータを取得する方法に関する。本願は、2017年8月7日に、日本に出願された特願2017-152735号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] ニボルマブは、細胞表面に存在するprogrammed death-1 (PD-1) に特異的に結合する抗体医薬である。ニボルマブに代表される免疫チェックポイント阻害薬は、悪性黒色腫や非小細胞肺癌、腎細胞がん、ホジキンリンパ腫、頭頸部がんに対して承認され、高い治療効果を持つことから社会的注目を浴びている。

[0003] 一方で、免疫チェックポイント阻害薬は、非常に高額な薬剤費がかかること、一部の患者に重篤な免疫関連有害事象を引き起こすことが知られている。このため、免疫チェックポイント阻害薬の動態を解析する技術が求められている。例えば、非特許文献1には、ニボルマブの体内動態を検討した結果が報告されている。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1 :Brahmer U. R., Phase I study of single-agent anti-progra

mmed death - 1 (MDX-1 106) in refractory solid tumors : safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. , J. Clin. Oncol ., 28 (19), 3167-3175, 2010.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、非特許文献 1 に記載された方法は煩雑であり、また、高価な抗体製剤を使用する必要があることから、一般的な普及は困難であると考えられる。そこで、本発明は、特異的結合物質の動態を簡便に測定する技術を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明は以下の態様を含む。

[1] 細胞集団における第 1 の特異的結合物質の占有率を測定する方法であつて、前記細胞集団に、第 2 の特異的結合物質を接触させることと、前記細胞集団に、第 3 の特異的結合物質を接触させることと、前記第 2 の特異的結合物質が結合した細胞数を計測することと、前記第 3 の特異的結合物質が結合した細胞数を計測することと、を含み、前記第 1、前記第 2 及び前記第 3 の特異的結合物質は、いずれも対象細胞表面タンパク質に結合する特異的結合物質であり、前記占有率は、前記対象細胞表面タンパク質を発現した細胞のうち、前記第 1 の特異的結合物質が結合した細胞の割合であり、前記第 2 の特異的結合物質は、前記第 1 の特異的結合物質と競合する特異的結合物質であり、前記第 3 の特異的結合物質は、前記第 1 の特異的結合物質と競合せずに前記対象細胞表面タンパク質に結合する特異的結合物質であり、下記式 (1) により計算される値が、前記占有率である、方法。

第 1 の特異的結合物質の占有率 (%) = (1 - (前記第 2 の特異的結合物質が結合した細胞数 / 前記第 3 の特異的結合物質が結合した細胞数)) × 100 … (1)

[2] 前記第 2 の特異的結合物質を接触させること、及び前記第 3 の特異的結合物質を接触させることを同時に行う、 [1] に記載の方法。

[3] 前記第 2 の特異的結合物質が結合した細胞数を計測すること、及び前記第 3 の特異的結合物質が結合した細胞数を計測することを同時に行う、 [1] 又は [2] に記載の方法。

[4] 前記第 1 の特異的結合物質が抗体である、 [1] ~ [3] のいずれかに記載の方法。

[5] 前記対象細胞表面タンパク質がヒト programmed death - 1 (P D _ 1) であり、前記第 1 の特異的結合物質が抗ヒト P D _ 1 抗体である、 [4] に記載の方法。

[6] 前記第 1 の特異的結合物質がニボルマブ又はペムプロリズマブであり、前記第 2 の特異的結合物質が抗ヒト P D _ 1 モノクローナル抗体 (クローン E H 1 2 . 2 H 7) であり、前記第 3 の特異的結合物質が抗ヒト P D _ 1 モノクローナル抗体 (クローン M I H 4) である、 [5] に記載の方法。

[7] 細胞集団における第 1 の特異的結合物質の占有率を測定するためのキットであって、第 2 の特異的結合物質及び第 3 の特異的結合物質を含み、前記第 1、前記第 2 及び前記第 3 の特異的結合物質は、いずれも対象細胞表面タンパク質に結合する特異的結合物質であり、前記占有率は、前記対象細胞表面タンパク質を発現した細胞のうち、前記第 1 の特異的結合物質が結合した細胞の割合であり、前記第 2 の特異的結合物質は、前記第 1 の特異的結合物質と競合する特異的結合物質であり、前記第 3 の特異的結合物質は、前記第 1 の特異的結合物質と競合せずに前記対象細胞表面タンパク質に結合する特異的結合物質である、キット。

[8] 前記第 1 の特異的結合物質が抗体である、 [7] に記載のキット。

[9] 前記対象細胞表面タンパク質がヒト P D _ 1 であり、前記第 1 の特異的結合物質が抗ヒト P D _ 1 抗体である、 [8] に記載のキット。

[1 0] 前記第 1 の特異的結合物質がニボルマブ又はペムプロリズマブであり、前記第 2 の特異的結合物質が抗ヒト P D _ 1 モノクローナル抗体 (クローン E H 1 2 . 2 H 7) であり、前記第 3 の特異的結合物質が抗ヒト P D _ 1 モノクローナル抗体 (クローン M I H 4) である、 [9] に記載のキット

。

[1 1] 患者への抗体医薬の投与間隔又は投与量を最適化するためのデータを取得する方法であって、抗体医薬が投与された患者由来の細胞に第 2 の特異的結合物質を接触させることと、抗体医薬が投与された患者由来の前記細胞に第 3 の特異的結合物質を接触させることと、前記第 2 の特異的結合物質が結合した細胞数を計測することと、前記第 3 の特異的結合物質が結合した細胞数を計測することと、を含み、前記第 2 及び前記第 3 の特異的結合物質は、いずれも前記抗体医薬の標的タンパク質に結合する特異的結合物質であり、前記第 2 の特異的結合物質は、前記抗体医薬と競合する特異的結合物質であり、前記第 3 の特異的結合物質は、前記抗体医薬と競合せずに前記抗体医薬の標的タンパク質に結合する特異的結合物質であり、下記式 (2) により計算される前記抗体医薬の占有率が、患者への前記抗体医薬の投与間隔又は投与量を最適化するためのデータである、方法。

$$\text{前記抗体医薬の占有率 (\%)} = (1 - (\text{前記第 2 の特異的結合物質が結合した細胞数} / \text{前記第 3 の特異的結合物質が結合した細胞数})) \times 100 \quad \dots$$

(2)

[1 2] 前記第 2 の特異的結合物質を接触させること、及び前記第 3 の特異的結合物質を接触させることを同時に行う、 [1 1] に記載の方法。

[1 3] 前記第 2 の特異的結合物質が結合した細胞数を計測すること、及び前記第 3 の特異的結合物質が結合した細胞数を計測することを同時に行う、 [1 1] 又は [1 2] に記載の方法。

[1 4] 前記占有率が基準値よりも高いことが、患者への前記抗体医薬の投与間隔を長くすべきこと又は投与量を減少させるべきことを示し、前記占有率が基準値よりも低いことが、患者への前記抗体医薬の投与間隔を短くすべきこと又は投与量を増大させるべきことを示す、 [1 1] ～ [1 3] のいずれかに記載の方法。

[1 5] 患者へのニボルマブ又はペムプロリズマブの投与間隔若しくは投与量を最適化するためのデータを取得する方法であって、ニボルマブ又はペム

プロリズマブが投与された患者由来の細胞に第2の特異的結合物質を接触させることと、ニボルマブ又はペムプロリズマブが投与された患者由来の前記細胞に第3の特異的結合物質を接触させることと、前記第2の特異的結合物質が結合した細胞数を計測することと、前記第3の特異的結合物質が結合した細胞数を計測することと、を含み、前記第2及び前記第3の特異的結合物質は、いずれもヒトPD-1に結合する特異的結合物質であり、前記第2の特異的結合物質は、ニボルマブ又はペムプロリズマブと競合する特異的結合物質であり、前記第3の特異的結合物質は、ニボルマブ又はペムプロリズマブと競合せずにヒトPD-1に結合する特異的結合物質であり、下記式(3)により計算されるニボルマブ又はペムプロリズマブの占有率が、患者へのニボルマブ又はペムプロリズマブの投与間隔若しくは投与量を最適化するためのデータである、方法。

ニボルマブ又はペムプロリズマブの占有率 (%) = (1 - (前記第2の特異的結合物質が結合した細胞数 / 前記第3の特異的結合物質が結合した細胞数)) × 100 … (3)

[16] 前記第2の特異的結合物質を接触させること、及び前記第3の特異的結合物質を接触させることを同時に行う、[15]に記載の方法。

[17] 前記第2の特異的結合物質が結合した細胞数を計測すること、及び前記第3の特異的結合物質が結合した細胞数を計測することを同時に行う、[15]又は[16]に記載の方法。

[18] 前記占有率が基準値よりも高いことが、患者へのニボルマブ又はペムプロリズマブの投与間隔を長くすべきこと若しくは投与量を減少させるべきことを示し、前記占有率が基準値よりも低いことが、患者へのニボルマブ又はペムプロリズマブの投与間隔を短くすべきこと若しくは投与量を増大させるべきことを示す、[15]～[17]のいずれかに記載の方法。

[19] 前記第2の特異的結合物質が抗ヒトPD-1モノクローナル抗体(クローンEH12.2H7)であり、前記第3の特異的結合物質が抗ヒトPD-1モノクローナル抗体(クローンMIH4)である、[15]～[18]

] のいずれかに記載の方法。

発明の効果

[0007] 本発明によれば、特異的結合物質の動態を簡便に測定する技術を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]実験例1において、抗PD-1抗体（クローンEH12.2H7）の反応性を解析した結果を示すグラフである。

[図2]実験例1において、抗PD-1抗体（クローンMIH4）の反応性を解析した結果を示すグラフである。

[図3]実験例1において、抗PD-1抗体（クローンEH12.2H7又はクローンMIH4）のニボルマブとの競合率を計算した結果を示すグラフである。

[図4]実験例2において、様々な濃度の抗PD-1抗体（クローンMIH4）で前処置した後の、抗PD-1抗体（クローンEH12.2H7）の反応性を評価した結果を示すグラフである。

[図5]実験例3において、様々な濃度の抗PD-1抗体（クローンEH12.2H7）で前処置した後の、抗PD-1抗体（クローンMIH4）の反応性を評価した結果を示すグラフである。

[図6]（a）～（e）は、実験例4において、MIT9細胞株におけるニボルマブの占有率を測定した結果を示すグラフである。

[図7]実験例4において測定されたニボルマブの占有率と、実際のニボルマブの占有率を示すグラフである。

[図8]（a）～（e）は、実験例5において、ニボルマブの占有率が、0、25、50、75、100%となるように調製した健常人由来のT細胞への、抗PD-1抗体（クローンEH12.2H7）の結合を測定した結果を示すグラフである。

[図9]実験例5において測定されたニボルマブの占有率と、実際のニボルマブの占有率を示すグラフである。

[図10] (a) ~ (c) は、実験例6において、ニボルマブの投与を受けている患者の体腔液由来のT細胞におけるニボルマブの占有率を測定した結果を示すグラフである。

[図11] (a) ~ (e) は、実験例7において、MIT9細胞株におけるペムプロリズマブの占有率を測定した結果を示すグラフである。

[図12] 実験例7において測定されたペムプロリズマブの占有率と、実際のペムプロリズマブの占有率を示すグラフである。

[図13] (a) ~ (d) は、実験例8において、ニボルマブの投与を受けていない患者の末梢血T細胞におけるニボルマブの占有率を測定した結果を示すグラフである。

[図14] (a) 及び (b) は、実験例9において、ニボルマブの投与を受けた腎癌患者の末梢血T細胞におけるニボルマブの占有率を測定した結果を示すグラフである。

[図15] (a) 及び (b) は、実験例10において、ペムプロリズマブの投与を受けた肺癌患者の末梢血T細胞におけるペムプロリズマブの占有率を測定した結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0009] [細胞集団における第1の特異的結合物質の占有率を測定する方法]

1実施形態において、本発明は、細胞集団における第1の特異的結合物質の占有率を測定する方法であって、前記細胞集団に、第2の特異的結合物質を接触させる工程と、前記細胞集団に、第3の特異的結合物質を接触させる工程と、前記第2の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程と、前記第3の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程と、を含み、前記第1、前記第2及び前記第3の特異的結合物質は、いずれも対象細胞表面タンパク質に結合する特異的結合物質であり、前記占有率は、前記対象細胞表面タンパク質を発現した細胞のうち、前記第1の特異的結合物質が結合した細胞の割合であり、前記第2の特異的結合物質は、前記第1の特異的結合物質と競合する特異的結合物質であり、前記第3の特異的結合物質は、前記第

1の特異的結合物質と競合せずに前記対象細胞表面タンパク質に結合する特異的結合物質であり、下記式(1)により計算される値が、前記占有率である方法を提供する。

第1の特異的結合物質の占有率(%) = (1 - (前記第2の特異的結合物質が結合した細胞数 / 前記第3の特異的結合物質が結合した細胞数)) × 100 … (1)

[001 0] 実施例において後述するように、発明者らは、本実施形態の方法により、特異的結合物質の動態を簡便に測定することができることを明らかにした。

[001 1] (特異的結合物質)

本明細書において、特異的結合物質とは、対象物質に特異的に結合する物質を意味し、例えば、抗体、抗体断片、アプタマー等が挙げられる。対象物質としては、例えば細胞表面タンパク質等が挙げられる。特異的結合物質は、ヒト又は非ヒト動物に投与される医薬であってもよい。

[001 2] 抗体は、マウス等の動物を免疫することによって作製したものであってもよく、ファージライブラリ等の抗体ライブラリのスクリーニングにより作製したものであってもよい。抗体断片としては、F(a b')₂、F a b'、F a b、F v、s c F v等が挙げられる。

[001 3] 抗体又は抗体断片が、ヒト型抗体又はその断片であれば、ヒトに投与しても免疫原性が低いため、アナフィラキシーショック等の副作用を抑制することができる。ヒト型抗体としては、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体等が挙げられる。ここで、キメラ抗体とは、可変領域が非ヒト動物由来の抗体であり、定常領域の少なくとも一部がヒト由来の抗体である抗体を意味する。また、ヒト化抗体とは、重鎖及び軽鎖の相補性決定領域のみが非ヒト動物由来の抗体であり、定常領域及びフレームワーク領域がヒト由来の抗体である抗体を意味する。また、完全ヒト抗体とは、相補性決定領域を含めて全体がヒト由来の抗体を意味する。

[0014] アプタマーとしては、対象物質に対する特異的結合能を有する物質であれば特に限定されず、核酸アプタマー、ペプチドアプタマー等が挙げられる。

[001 5] (第 1 の特異的結合物質)

本実施形態の方法において、第 1 の特異的結合物質とは、動態を測定する対象であり、対象細胞表面タンパク質に結合する特異的結合物質である。第 1 の特異的結合物質の具体的な例としては、抗体が挙げられる。抗体は、抗体医薬であってもよい。抗体医薬は、例えば、ニボルマブ、ペムプロリズマブ等の免疫チェックポイント阻害薬であってもよいがこれらに限定されない。ここで、第 1 の特異的結合物質がニボルマブ、ペムプロリズマブ等である場合、対象細胞表面タンパク質はヒトPD-1である。すなわち、対象細胞表面タンパク質がヒトPD-1であり、第 1 の特異的結合物質が抗ヒトPD-1抗体であってもよい。

[001 6] (細胞集団)

実施例において後述するように、本実施形態の方法により、第 1 の特異的結合物質の動態を簡便に測定することができる。本実施形態の方法において、第 1 の特異的結合物質の動態とは、細胞集団における第 1 の特異的結合物質の占有率である。ここで、占有率とは、対象細胞表面タンパク質を発現した細胞のうち、着目する特異的結合物質 (第 1 の特異的結合物質) が結合した細胞の割合 (%) をいう。

[001 7] 本実施形態の方法において、細胞集団とは、第 1 の特異的結合物質の占有率を測定する対象とする細胞集団を意味する。細胞集団は、通常は、第 1 の特異的結合物質に接触した細胞である。例えば、第 1 の特異的結合物質が抗体医薬である場合、細胞集団としては、当該抗体医薬を投与された患者由来の細胞集団が挙げられる。

[001 8] 細胞集団としては、第 1 の特異的結合物質が結合する細胞が含まれる細胞集団が挙げられ、第 1 の特異的結合物質の結合対象に応じて適宜設定される。具体的な細胞集団としては、例えば、末梢血リンパ球、胸水由来のリンパ球、肺胞洗浄液由来のリンパ球等が挙げられるがこれらに限定されない。

[001 9] (第 2 の特異的結合物質)

第 2 の特異的結合物質は、第 1 の特異的結合物質が結合する細胞表面タン

パク質に結合する特異的結合物質である。また、第2の特異的結合物質は、対象細胞表面タンパク質への結合において、第1の特異的結合物質と競合する。すなわち、対象細胞表面タンパク質に第1の特異的結合物質が結合している場合、第2の特異的結合物質は対象細胞表面タンパク質に結合することが実質的にできない。

[0020] ここで、「実質的にできない」とは、対象細胞表面タンパク質に第1の特異的結合物質が結合していても、第1の特異的結合物質を解離させて、第2の特異的結合物質が対象細胞表面タンパク質に結合する場合がわずかに存在することを許容することを意味する。しかしながら、対象細胞表面タンパク質に第1の特異的結合物質が結合している場合、第2の特異的結合物質は対象細胞表面タンパク質に結合することができないことが好ましい。

[0021] いいかえると、第2の特異的結合物質のエピトープは、第1の特異的結合物質のエピトープと同一であるか近接しており、第1の特異的結合物質の対象細胞表面タンパク質に対する解離定数 (K_d) は、第2の特異的結合物質の対象細胞表面タンパク質に対する解離定数 (K_d) よりも小さいことが好ましい。なお、解離定数は小さいほど親和性が高い。

[0022] (第3の特異的結合物質)

第3の特異的結合物質は、第1の特異的結合物質が結合する細胞表面タンパク質に結合する特異的結合物質である。また、第3の特異的結合物質は、対象細胞表面タンパク質への結合において、第1の特異的結合物質と競合しない。すなわち、対象細胞表面タンパク質に第1の特異的結合物質が結合していても、第3の特異的結合物質は対象細胞表面タンパク質に結合することができる。

[0023] いいかえると、第3の特異的結合物質のエピトープは、第1の特異的結合物質のエピトープと離れており、第3の特異的結合物質の対象細胞表面タンパク質への結合は、第1の特異的結合物質の対象細胞表面タンパク質への結合にほとんど影響しない。

[0024] (第1、第2、第3の特異的結合物質の組み合わせの具体例)

例えば、第1の特異的結合物質がニボルマブ又はペムプロリズマブであり、第2の特異的結合物質が抗ヒトPD-1モノクローナル抗体（クローンE H 1 2 . 2 H 7）であり、前記第3の特異的結合物質が抗ヒトPD-1モノクローナル抗体（クローンM I H 4）であってもよい。実施例において後述するように、これらの抗体の組み合わせを用いることにより、ニボルマブ又はペムプロリズマブの動態を簡便に測定することができる。

[0025] （第2の特異的結合物質を接触させる工程）

本工程において、細胞集団に、第2の特異的結合物質を接触させる。その結果、対象細胞表面タンパク質に第1の特異的結合物質が既に結合していた場合には、第2の特異的結合物質は結合しない。また、対象細胞表面タンパク質に第1の特異的結合物質が結合していなかった場合には、第2の特異的結合物質が結合する。後述するように、本工程を実施するタイミングは適宜変更してもよい。

[0026] （第3の特異的結合物質を接触させる工程）

本工程において、細胞集団に、第3の特異的結合物質を接触させる。その結果、対象細胞表面タンパク質に第1の特異的結合物質が結合していても、結合していなくても、第3の特異的結合物質は対象細胞表面タンパク質結合する。したがって、第3の特異的結合物質は、細胞集団中の、対象細胞表面タンパク質を発現した細胞全てに結合することになる。後述するように、本工程を実施するタイミングは適宜変更してもよい。

[0027] （第2の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程）

本工程において、第2の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する。例えば、第2の特異的結合物質を蛍光色素で標識しておき、フローサイトメトリーにより第2の特異的結合物質が結合した細胞数を計測することが簡便である。本工程は、第2の特異的結合物質を接触させる工程の後に実施すればよく、後述するように、本工程を実施するタイミングは適宜変更してもよい。

[0028] （第3の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程）

本工程において、第3の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する。第3の特異的結合物質が結合した細胞数を計測することにより、対象細胞表面タンパク質を発現した細胞数を計測することができる。例えば、第3の特異的結合物質を蛍光色素で標識しておき、フローサイトメトリーにより第3の特異的結合物質が結合した細胞数を計測することが簡便である。本工程は、第3の特異的結合物質を接触させる工程の後に実施すればよく、後述するように、本工程を実施するタイミングは適宜変更してもよい。

[0029] (占有率の算出)

本工程において、細胞集団における第1の特異的結合物質の占有率を算出する。占有率は、下記式(1)により計算される値である。

第1の特異的結合物質の占有率 (%) = (1 - (前記第2の特異的結合物質が結合した細胞数 / 前記第3の特異的結合物質が結合した細胞数)) × 100 … (1)

[0030] 例えば、占有率が100%であることは、細胞集団中の、対象細胞表面タンパク質を発現した細胞の全てに第1の特異的結合物質が結合していることを意味する。この場合、対象細胞表面タンパク質には第1の特異的結合物質が結合しているため、第2の特異的結合物質は結合することができない。

[0031] また、例えば、占有率が80%であることは、細胞集団中の、対象細胞表面タンパク質を発現した細胞のうちの80%に第1の特異的結合物質が結合していることを意味する。この場合、対象細胞表面タンパク質を発現した細胞のうち、残りの20%には、第1の特異的結合物質が結合しておらず、第2の特異的結合物質が結合することになる。

[0032] (上記各工程の実施の順序)

第2の特異的結合物質を接触させる工程、第3の特異的結合物質を接触させる工程は、いずれを先に実施してもよい。例えば、第2の特異的結合物質を接触させる工程を実施した後に第3の特異的結合物質を接触させる工程を実施してもよく、逆の順序であってもよい。あるいは、第2の特異的結合物質を接触させる工程及び前記第3の特異的結合物質を接触させる工程を同時

に実施してもよい。例えば、同一の試験管内に、細胞集団、第2の特異的結合物質及び第3の特異的結合物質を入れて接触させることにより、第2の特異的結合物質を接触させる工程及び前記第3の特異的結合物質を接触させる工程を同時に行うことができる。

[0033] また、第2の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程、第3の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程は、いずれを先に実施してもよい。例えば、第2の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程を実施した後に第3の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程を実施してもよく、逆の順序であってもよい。

[0034] あるいは、第2の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程及び第3の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程を同時に実施してもよい。例えば、第2の特異的結合物質及び第3の特異的結合物質をそれぞれ識別可能に標識しておき、第2の特異的結合物質及び第3の特異的結合物質に接触した細胞集団をフローサイトメトリーで解析すること等により、第2の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程及び第3の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程を同時に実施することができる。

[0035] あるいは、第2の特異的結合物質を接触させる工程、第2の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程、第3の特異的結合物質を接触させる工程、第3の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程をこの順に実施してもよい。

[0036] あるいは、第3の特異的結合物質を接触させる工程、第3の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程、第2の特異的結合物質を接触させる工程、第2の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程をこの順に実施してもよい。この場合、第3の特異的結合物質が結合した細胞を、セルソーター等を用いることにより回収し、その後、回収した細胞に対して第2の特異的結合物質を接触させる工程、第2の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程を実施してもよい。

[0037] (他の特異的結合物質)

また、第2の特異的結合物質、第3の特異的結合物質の他にも、例えば、抗CD3抗体等の他の特異的結合物質を接触させる工程を実施し、当該他の特異的結合物質が結合した細胞集団について、第1の特異的結合物質の占有率を測定してもよい。例えば、他の特異的結合物質が結合した細胞集団に対してゲートをかけたうえで、第1の特異的結合物質の占有率を算出してもよい。

[0038] 他の特異的結合物質としては、抗CD3抗体に限られず、あらゆる抗原に対する特異的結合物質を使用することができる。他の特異的結合物質を反応させることにより、第1の特異的結合物質の占有率を測定すると同時に特定抗原の発現を解析することもできる。

[0039] 本実施形態の方法は、例えば、患者への抗体医薬の投与間隔若しくは投与量を最適化するためのデータを取得する方法に適用することができる。具体的には、細胞集団として、抗体医薬が投与された患者由来の細胞を使用して上述した方法を実施するとよい。

[0040] この場合、第1の特異的結合物質が抗体医薬となる点以外は上述した方法と同様である。その結果、患者由来の細胞における抗体医薬の占有率を計算することが可能になる。そして、患者由来の細胞における抗体医薬の占有率に基づいて、患者への抗体医薬の投与間隔若しくは投与量を最適化することができる。

[0041] 例えば、占有率が基準値よりも高い場合には、患者への抗体医薬の投与間隔を長くするか、又は投与量を減少させるとよい。また、占有率が基準値よりも低い場合には、患者への抗体医薬の投与間隔を短くするか、又は投与量を増大させるとよい。

[0042] [細胞集団における第1の特異的結合物質の占有率を測定するためのキット]

1実施形態において、本発明は、細胞集団における第1の特異的結合物質の占有率を測定するためのキットであって、第2の特異的結合物質及び第3の特異的結合物質を含み、前記第1、前記第2及び前記第3の特異的結合物

質は、いずれも対象細胞表面タンパク質に結合する特異的結合物質であり、前記占有率は、前記対象細胞表面タンパク質を発現した細胞のうち、前記第1の特異的結合物質が結合した細胞の割合であり、前記第2の特異的結合物質は、前記第1の特異的結合物質と競合する特異的結合物質であり、前記第3の特異的結合物質は、前記第1の特異的結合物質と競合せずに前記対象細胞表面タンパク質に結合する特異的結合物質である、キットを提供する。

[0043] 本実施形態のキットにおいて、細胞集団、第1、第2及び第3の特異的結合物質、対象細胞表面タンパク質については上述したものと同様である。すなわち、第1の特異的結合物質の具体的な例としては、抗体が挙げられる。

[0044] また、対象細胞表面タンパク質がヒトPD-1であり、第1の特異的結合物質が抗ヒトPD-1抗体であつてもよい。

[0045] 更に、第1の特異的結合物質がニボルマブ又はペムプロリズマブであり、第2の特異的結合物質が抗ヒトPD-1モノクローナル抗体（クローンEH12.2H7）であり、第3の特異的結合物質が抗ヒトPD-1モノクローナル抗体（クローンMIH4）であつてもよい。このようなキットにより、細胞集団におけるニボルマブ又はペムプロリズマブの動態を簡便に測定することができる。

[0046] [患者への抗体医薬の投与間隔又は投与量を最適化するためのデータを取得する方法]

1 実施形態において、本発明は、患者への抗体医薬の投与間隔又は投与量を最適化するためのデータを取得する方法であつて、抗体医薬が投与された患者由来の細胞に第2の特異的結合物質を接触させる工程と、抗体医薬が投与された患者由来の前記細胞に第3の特異的結合物質を接触させる工程と、前記第2の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程と、前記第3の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程と、を含み、前記第2及び前記第3の特異的結合物質は、いずれも前記抗体医薬の標的タンパク質に結合する特異的結合物質であり、前記第2の特異的結合物質は、前記抗体医薬と競合する特異的結合物質であり、前記第3の特異的結合物質は、前記抗体

医薬と競合せずに前記抗体医薬の標的タンパク質に結合する特異的結合物質であり、下記式 (2) により計算される前記抗体医薬の占有率が、患者への前記抗体医薬の投与間隔又は投与量を最適化するためのデータである方法を提供する。

$$\text{前記抗体医薬の占有率 (\%)} = (1 - (\text{前記第 2 の特異的結合物質が結合した細胞数} / \text{前記第 3 の特異的結合物質が結合した細胞数})) \times 100 \quad \dots$$

(2)

[0047] 本実施形態の方法により、抗体医薬の動態を簡便に測定し、患者への抗体医薬の投与間隔又は投与量を最適化するためのデータを取得することができる。本実施形態の方法は、医師が判断する工程を含まない。

[0048] 本実施形態の方法において、抗体医薬の投与間隔又は投与量の最適化とは、抗体医薬の投与間隔又は投与量の個別化といいかえることができる。すなわち、本実施形態の方法により、個々の患者に応じて最適な抗体医薬の投与間隔又は投与量を決定するためのデータを提供することができる。これにより、例えば、患者が重篤な免疫関連有害事象を発症した場合に、有害事象がどれくらい遷延するリスクがあるかを予測することが可能になる。また、適切な量の抗体医薬の使用を可能にすることにより、高額な抗体医薬の費用を抑制すること等が可能になる。

[0049] (患者由来の細胞)

本実施形態の方法において、患者由来の細胞は、抗体医薬の特性に応じて適切な細胞を適宜選択する。患者由来の細胞としては、例えば、末梢血リンパ球、胸水由来のリンパ球、肺胞洗浄液由来のリンパ球等が挙げられるがこれらに限定されない。

[0050] (第 2 及び第 3 の特異的結合物質)

本実施形態の方法において、第 2 及び第 3 の特異的結合物質としては、上述した細胞集団における第 1 の特異的結合物質の占有率を測定する方法」の実施形態における第 1 の特異的結合物質が抗体医薬である場合の第 2 及び第 3 の特異的結合物質と同様のものを用いることができる。

[0051] (第2、第3の特異的結合物質を接触させる工程、及び、第2、第3の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程)

上述した細胞集団における第1の特異的結合物質の占有率を測定する方法」の実施形態における第1の特異的結合物質が抗体医薬である場合と同様に、本実施形態の方法において、第2の特異的結合物質を接触させる工程、第3の特異的結合物質を接触させる工程は、いずれを先に実施してもよい。例えば、第2の特異的結合物質を接触させる工程を実施した後に第3の特異的結合物質を接触させる工程を実施してもよく、逆の順序であってもよい。あるいは、第2の特異的結合物質を接触させる工程及び前記第3の特異的結合物質を接触させる工程を同時に実施してもよい。例えば、同一の試験管内に、患者由来の細胞、第2の特異的結合物質及び第3の特異的結合物質を入れて接触させることにより、第2の特異的結合物質を接触させる工程及び前記第3の特異的結合物質を接触させる工程を同時に行うことができる。

[0052] また、第2の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程、第3の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程は、いずれを先に実施してもよい。例えば、第2の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程を実施した後に第3の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程を実施してもよく、逆の順序であってもよい。

[0053] あるいは、第2の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程及び第3の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程を同時に実施してもよい。例えば、第2の特異的結合物質及び第3の特異的結合物質をそれぞれ識別可能に標識しておき、第2の特異的結合物質及び第3の特異的結合物質に接触した患者由来の細胞をフローサイトメトリーで解析すること等により、第2の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程及び第3の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程を同時に実施することができる。

[0054] あるいは、第2の特異的結合物質を接触させる工程、第2の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程、第3の特異的結合物質を接触させる工程、第3の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程をこの順に実施

してもよい。

[0055] あるいは、第3の特異的結合物質を接触させる工程、第3の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程、第2の特異的結合物質を接触させる工程、第2の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程をこの順に実施してもよい。この場合、第3の特異的結合物質が結合した細胞を、セルソーター等を用いることにより回収し、その後、回収した細胞に対して第2の特異的結合物質を接触させる工程、第2の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程を実施してもよい。

[0056] (他の特異的結合物質)

また、第2の特異的結合物質、第3の特異的結合物質の他にも、例えば、抗CD3抗体等の他の特異的結合物質を接触させる工程を実施し、当該他の特異的結合物質が結合した細胞集団について、抗体医薬の占有率を測定してもよい。例えば、他の特異的結合物質が結合した細胞集団に対してゲートをかけたうえで、抗体医薬の占有率を算出してもよい。

[0057] 他の特異的結合物質としては、抗CD3抗体に限られず、あらゆる抗原に対する特異的結合物質を使用することができる。他の特異的結合物質を反応させることにより、抗体医薬の占有率を測定すると同時に特定抗原の発現を解析することもできる。

[0058] (患者への抗体医薬の投与間隔又は投与量を最適化するためのデータ)

本実施形態の方法では、抗体医薬の占有率が、患者への抗体医薬の投与間隔又は投与量を最適化するためのデータである。そして、占有率が基準値よりも高いことが、患者への抗体医薬の投与間隔を長くすべきこと又は投与量を減少させるべきことを示す。

[0059] ここで、占有率の基準値は、例えば、予め設定した占有率の最適値である。占有率の最適値とは、例えば、抗体医薬による疾患の治療効果が最大となり、免疫関連有害事象等の副作用を最小となる占有率である。

[0060] 本実施形態の方法により、抗体医薬の占有率が基準値よりも高いことが示された場合、抗体医薬の投与量が十分であるか過剰であることを意味する。

そこで、このような場合には、患者への抗体医薬の投与間隔を長くするか、又は患者への抗体医薬の投与量を減少させることにより、患者の細胞における抗体医薬の占有率を基準値に近づけることができる。

[0061] あるいは、本実施形態の方法により、抗体医薬の占有率が基準値よりも低いことが示された場合、抗体医薬の投与量が不十分であることを意味する。そこで、このような場合には、患者への抗体医薬の投与間隔を短くするか、又は患者への抗体医薬の投与量を増大させることにより、患者の細胞における抗体医薬の占有率を基準値に近づけることができる。

[0062] [患者へのニボルマブ又はペムプロリズマブの投与間隔若しくは投与量を最適化するためのデータを取得する方法]

1実施形態において、本発明は、患者へのニボルマブ又はペムプロリズマブの投与間隔若しくは投与量を最適化するためのデータを取得する方法であって、ニボルマブ又はペムプロリズマブが投与された患者由来の細胞に第2の特異的結合物質を接触させる工程と、ニボルマブ又はペムプロリズマブが投与された患者由来の前記細胞に第3の特異的結合物質を接触させる工程と、前記第2の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程と、前記第3の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程と、を含み、前記第2及び前記第3の特異的結合物質は、いずれもヒトPD-1に結合する特異的結合物質であり、前記第2の特異的結合物質は、ニボルマブ又はペムプロリズマブと競合する特異的結合物質であり、前記第3の特異的結合物質は、ニボルマブ又はペムプロリズマブと競合せずにヒトPD-1に結合する特異的結合物質であり、下記式(3)により計算されるニボルマブ又はペムプロリズマブの占有率が、患者へのニボルマブ又はペムプロリズマブの投与間隔若しくは投与量を最適化するためのデータである方法を提供する。

ニボルマブ又はペムプロリズマブの占有率 (%) = (1 - (前記第2の特異的結合物質が結合した細胞数 / 前記第3の特異的結合物質が結合した細胞数)) × 100 … (3)

[0063] 本実施形態の方法により、ニボルマブ又はペムプロリズマブの動態を簡便

に測定し、患者へのニボルマブ又はペムプロリズマブの投与間隔又は投与量を最適化するためのデータを取得することができる。本実施形態の方法は、医師が判断する工程を含まない。

[0064] 本実施形態の方法において、ニボルマブ又はペムプロリズマブの投与間隔又は投与量の最適化とは、ニボルマブ又はペムプロリズマブの投与間隔又は投与量の個別化といいかえることができる。すなわち、本実施形態の方法により、個々の患者に応じて最適なニボルマブ又はペムプロリズマブの投与間隔又は投与量を決定するためのデータを提供することができる。これにより、例えば、患者が重篤な免疫関連有害事象を発症した場合に、有害事象がどれくらい遷延するリスクがあるかを予測することが可能になる。また、適切な量のニボルマブ又はペムプロリズマブの使用を可能にすることにより、高額な抗体医薬の費用を抑制すること等が可能になる。

[0065] (患者由来の細胞)

本実施形態の方法において、患者由来の細胞としては、例えば、末梢血リンパ球、胸水由来のリンパ球、肺胞洗浄液由来のリンパ球等が挙げられる。

[0066] (第2及び第3の特異的結合物質)

本実施形態の方法において、第2及び第3の特異的結合物質としては、上述した細胞集団における第1の特異的結合物質の占有率を測定する方法」の実施形態における第1の特異的結合物質がニボルマブ又はペムプロリズマブである場合の第2及び第3の特異的結合物質と同様のものを用いることができる。

[0067] より具体的な例としては、第2の特異的結合物質として、抗ヒトPD-1モノクローナル抗体(クローンEH12.2H7)が挙げられる。また、第3の特異的結合物質として、抗ヒトPD-L1モノクローナル抗体(クローンM1H4)が挙げられる。実施例において後述するように、発明者らは、これらの抗体を用いることにより、ニボルマブ及びペムプロリズマブの占有率を測定することができることを明らかにした。

[0068] (第2、第3の特異的結合物質を接触させる工程、及び、第2、第3の特異

的結合物質が結合した細胞数を計測する工程)

上述した 細胞集団における第 1 の特異的結合物質の占有率を測定する方法」の実施形態における第 1 の特異的結合物質がニボルマブ又はペムプロリズマブである場合と同様に、本実施形態の方法において、第 2 の特異的結合物質を接触させる工程、第 3 の特異的結合物質を接触させる工程は、いずれを先に実施してもよい。例えば、第 2 の特異的結合物質を接触させる工程を実施した後に第 3 の特異的結合物質を接触させる工程を実施してもよく、逆の順序であってもよい。あるいは、第 2 の特異的結合物質を接触させる工程及び前記第 3 の特異的結合物質を接触させる工程を同時に実施してもよい。例えば、同一の試験管内に、患者由来の細胞、第 2 の特異的結合物質及び第 3 の特異的結合物質を入れて接触させることにより、第 2 の特異的結合物質を接触させる工程及び前記第 3 の特異的結合物質を接触させる工程を同時に行うことができる。

[0069] また、第 2 の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程、第 3 の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程は、いずれを先に実施してもよい。例えば、第 2 の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程を実施した後に第 3 の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程を実施してもよく、逆の順序であってもよい。

[0070] あるいは、第 2 の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程及び第 3 の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程を同時に実施してもよい。例えば、第 2 の特異的結合物質及び第 3 の特異的結合物質をそれぞれ識別可能に標識しておき、第 2 の特異的結合物質及び第 3 の特異的結合物質に接触した患者由来の細胞をフローサイトメトリーで解析すること等により、第 2 の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程及び第 3 の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程を同時に実施することができる。

[0071] あるいは、第 2 の特異的結合物質を接触させる工程、第 2 の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程、第 3 の特異的結合物質を接触させる工程、第 3 の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程をこの順に実施

してもよい。

[0072] あるいは、第3の特異的結合物質を接触させる工程、第3の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程、第2の特異的結合物質を接触させる工程、第2の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程をこの順に実施してもよい。この場合、第3の特異的結合物質が結合した細胞を、セルソーター等を用いることにより回収し、その後、回収した細胞に対して第2の特異的結合物質を接触させる工程、第2の特異的結合物質が結合した細胞数を計測する工程を実施してもよい。

[0073] (他の特異的結合物質)

また、第2の特異的結合物質、第3の特異的結合物質の他にも、例えば、抗CD3抗体等の他の特異的結合物質を接触させる工程を実施し、当該他の特異的結合物質が結合した細胞集団について、抗体医薬の占有率を測定してもよい。例えば、他の特異的結合物質が結合した細胞集団に対してゲートをかけたうえで、ニボルマブ又はペムプロリズマブの占有率を算出してもよい。

[0074] 他の特異的結合物質としては、抗CD3抗体に限られず、あらゆる抗原に対する特異的結合物質を使用することができる。他の特異的結合物質を反応させることにより、ニボルマブ又はペムプロリズマブの占有率を測定すると同時に特定抗原の発現を解析することもできる。

[0075] (患者へのニボルマブ又はペムプロリズマブの投与間隔又は投与量を最適化するためのデータ)

本実施形態の方法では、ニボルマブ又はペムプロリズマブの占有率が、患者へのニボルマブ又はペムプロリズマブの投与間隔又は投与量を最適化するためのデータである。そして、占有率が基準値よりも高いことが、患者へのニボルマブ又はペムプロリズマブの投与間隔を長くすべきこと又は投与量を減少させるべきことを示す。

[0076] ここで、占有率の基準値は、例えば、予め設定した占有率の最適値である。占有率の最適値とは、例えば、ニボルマブ又はペムプロリズマブによる疾

患の治療効果が最大となり、免疫関連有害事象等の副作用が最小となる占有率である。ニボルマブ又はペムプロリズマブ占有率の最適値は、患者の症状等により適宜設定することができ、例えば90%であってもよく、例えば95%であってもよく、例えば98%であってもよい。

[0077] 本実施形態の方法により、ニボルマブ又はペムプロリズマブの占有率が基準値よりも高いことが示された場合、ニボルマブ又はペムプロリズマブの投与量が十分であるか過剰であることを意味する。そこで、このような場合には、患者へのニボルマブ又はペムプロリズマブの投与間隔を長くするか、又は患者へのニボルマブ又はペムプロリズマブの投与量を減少させることにより、患者の細胞におけるニボルマブ又はペムプロリズマブの占有率を基準値に近づけることができる。

[0078] あるいは、本実施形態の方法により、ニボルマブ又はペムプロリズマブの占有率が基準値よりも低いことが示された場合、ニボルマブ又はペムプロリズマブの投与量が不十分であることを意味する。そこで、このような場合には、患者への抗体医薬の投与間隔を短くするか、又は患者への抗体医薬の投与量を増大させることにより、患者の細胞における抗体医薬の占有率を基準値に近づけることができる。

[0079] [その他の実施形態]

1 実施形態において、本発明は、患者への抗体医薬の投与間隔又は投与量を最適化する方法であって、抗体医薬が投与された患者由来の細胞に第2の特異的結合物質を接触させることと、抗体医薬が投与された患者由来の前記細胞に第3の特異的結合物質を接触させることと、前記第2の特異的結合物質が結合した細胞数を計測することと、前記第3の特異的結合物質が結合した細胞数を計測することと、を含み、前記第2及び前記第3の特異的結合物質は、いずれも前記抗体医薬の標的タンパク質に結合する特異的結合物質であり、前記第2の特異的結合物質は、前記抗体医薬と競合する特異的結合物質であり、前記第3の特異的結合物質は、前記抗体医薬と競合せずに前記抗体医薬の標的タンパク質に結合する特異的結合物質であり、下記式(2)に

より計算される前記抗体医薬の占有率が、基準値よりも高い場合に、患者への前記抗体医薬の投与間隔を長くし、前記占有率が基準値よりも低い場合に、患者への前記抗体医薬の投与間隔を短くする、方法を提供する。

$$\text{前記抗体医薬の占有率 (\%)} = (1 - (\text{前記第2の特異的結合物質が結合した細胞数} / \text{前記第3の特異的結合物質が結合した細胞数})) \times 100 \quad \dots$$

(2)

[0080] 本実施形態の方法において、前記第2の特異的結合物質を接触させること、及び前記第3の特異的結合物質を接触させることを同時に行ってもよい。また、前記第2の特異的結合物質が結合した細胞数を計測すること、及び前記第3の特異的結合物質が結合した細胞数を計測することを同時に行ってもよい。

[0081] 1実施形態において、本発明は、患者へのニボルマブ又はペムプロリズマブの投与間隔若しくは投与量を最適化する方法であって、ニボルマブ又はペムプロリズマブが投与された患者由来の細胞に第2の特異的結合物質を接触させることと、ニボルマブ又はペムプロリズマブが投与された患者由来の前記細胞に第3の特異的結合物質を接触させることと、前記第2の特異的結合物質が結合した細胞数を計測することと、前記第3の特異的結合物質が結合した細胞数を計測することと、を含み、前記第2及び前記第3の特異的結合物質は、いずれもヒトPD-1に結合する特異的結合物質であり、前記第2の特異的結合物質は、ニボルマブ又はペムプロリズマブと競合する特異的結合物質であり、前記第3の特異的結合物質は、ニボルマブ又はペムプロリズマブと競合せずにヒトPD-1に結合する特異的結合物質であり、下記式(3)により計算されるニボルマブ又はペムプロリズマブの占有率が、基準値よりも高い場合に、患者へのニボルマブ又はペムプロリズマブの投与間隔を長くし、前記占有率が基準値よりも低い場合に、患者へのニボルマブ又はペムプロリズマブの投与間隔を短くする、方法を提供する。

$$\text{ニボルマブ又はペムプロリズマブの占有率 (\%)} = (1 - (\text{前記第2の特異的結合物質が結合した細胞数} / \text{前記第3の特異的結合物質が結合した細胞})) \times 100$$

数)) X 1 0 0 … (3)

[0082] 本実施形態の方法において、前記第2の特異的結合物質を接触させること、及び前記第3の特異的結合物質を接触させることを同時に行ってもよい。また、前記第2の特異的結合物質が結合した細胞数を計測すること、及び前記第3の特異的結合物質が結合した細胞数を計測することを同時に行ってもよい。

実施例

[0083] 次に実施例を示して本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0084] [実験例1]

(抗PD-1抗体の評価1)

《クローンEH12.2H7》

ヒトPD-1を強制発現させたマウス線維芽細胞由来の細胞株であるMIT9細胞を用いて抗PD-1抗体(クローンEH12.2H7、Biolegend社)の反応性を評価した。

[0085] まず、MIT9細胞株を 2×10^5 個ずつチューブに分注した。続いて、分注した各細胞に抗PD-1抗体医薬であるニボルマブを、0, 0.11, 0.33, 1, 3.3, $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ずつ添加し、 4°C で30分間反応させた。

[0086] 続いて、各細胞を、 $600 \mu\text{L}$ のリン酸バッファー(PBS)で2回洗浄した。続いて、各細胞に、PE標識抗PD-1抗体(クローンEH12.2H7、Bio1696社)を $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ずつ添加し、 4°C で20分間反応させた。

[0087] 続いて、各細胞を、 $600 \mu\text{L}$ のPBSで2回洗浄した。続いて、各細胞へのPE標識抗PD-1抗体(クローンEH12.2H7)の結合を、フローサイトメーター(型式「FACS Verse」、BDバイオサイエンス社)を用いて解析した。

[0088] 図1は、解析結果を示すグラフである。その結果、最初に反応させたニボ

ルマップの濃度が高くなるにしたがって、PE標識抗PD-1抗体（クローンEH12.2H7）のMIT9細胞への結合量が低下することが明らかとなった。

[0089] この結果から、抗PD-1抗体（クローンEH12.2H7）がニボルマップと競合することが明らかとなった。

[0090] 《クローンMIH4》

PE標識抗PD-1抗体（クローンEH12.2H7、Biolegend社）の代わりにPE標識抗PD-1抗体（クローンMIH4、eBioscience社）を用いた点以外は上記と同様にして、抗PD-1抗体（クローンMIH4）の反応性を評価した。

[0091] まず、MIT9細胞株を 2×10^5 個ずつチューブに分注した。続いて、分注した各細胞に抗PD-1抗体医薬であるニボルマップを、0, 0.11, 0.33, 1, 3.3, $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ずつ添加し、 4°C で30分間反応させた。

[0092] 続いて、各細胞を、 $600 \mu\text{L}$ のPBSで2回洗浄した。続いて、各細胞に、PE標識抗PD-1抗体（クローンMIH4、eBioscience社）を $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ずつ添加し、 4°C で20分間反応させた。

[0093] 続いて、各細胞を、 $600 \mu\text{L}$ のPBSで2回洗浄した。続いて、各細胞へのPE標識抗PD-1抗体（クローンMIH4）の結合を、フローサイトメーター（型式「FACS Verse」、BDバイオサイエンス社）を用いて解析した。

[0094] 図2は、解析結果を示すグラフである。その結果、最初に反応させたニボルマップの濃度に関わらず、PE標識抗PD-1抗体（クローンMIH4）がMIT9細胞に結合することが明らかとなった。

[0095] この結果から、抗PD-1抗体（クローンMIH4）は、ニボルマップと競合せずにPD-1に結合することが明らかとなった。

[0096] 図3は、図1及び図2に示した解析結果に基づいて、抗PD-1抗体（クローンEH12.2H7又はクローンMIH4）のニボルマップとの競合率を

計算した結果を示すグラフである。競合率は下記式 (4) により算出した。

$$\text{競合率 (\%)} = (\text{全細胞数} - \text{抗PD-1抗体 (クローンEH12.2H7 又はクローンMIH4) 陽性細胞数}) / \text{全細胞数} \times 100 \quad \dots (4)$$

[0097] [実験例2]

(抗PD-1抗体の評価2)

抗PD-1抗体 (クローンEH12.2H7) と抗PD-1抗体 (クローンMIH4) との競合性を評価した。

[0098] まず、MIT9細胞株を 2×10^5 個ずつチューブに分注した。続いて、分注した各細胞に、PE標識抗PD-1抗体 (クローンMIH4、eBioscience社) を、0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ずつ添加し、4℃で20分間反応させた。

[0099] 続いて、各細胞を、600 μL のPBSで2回洗浄した。続いて、各細胞に、AlexaFluor488標識抗PD-1抗体 (クローンEH12.2H7、Biolegend社) を4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ずつ添加し、4℃で20分間反応させた。

[0100] 続いて、各細胞を、600 μL のPBSで2回洗浄した。続いて、各細胞へのAlexaFluor488標識抗PD-1抗体 (クローンEH12.2H7) の結合を、フローサイトメーター (型式「FACS Verse」、BDバイオサイエンス社) を用いて解析した。

[0101] 図4は、解析結果を示すグラフである。その結果、最初に反応させたPE標識抗PD-1抗体 (クローンMIH4) の濃度に関わらず、AlexaFluor488標識抗PD-1抗体 (クローンEH12.2H7) がMIT9細胞に結合することが明らかとなった。

[0102] この結果から、抗PD-1抗体 (クローンEH12.2H7) は抗PD-1抗体 (クローンMIH4) と競合せずにPD-1に結合することが明らかとなった。

[0103] [実験例3]

(抗PD-1抗体の評価3)

実験例 2 とは抗体を反応させる順序を逆にして、抗 PD-1 抗体（クローン EH12.2H7）と抗 PD-1 抗体（クローン MIH4）との競合性を評価した。

[01 04] まず、MIT9 細胞株を 2×10^5 個ずつチューブに分注した。続いて、分注した各細胞に、Alexa Fluor 488 標識抗 PD-1 抗体（クローン EH12.2H7、Biolegend 社）を、0, 0.5, 1, 2, 4, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ずつ添加し、4 $^{\circ}\text{C}$ で 20 分間反応させた。

[01 05] 続いて、各細胞を、600 μL の PBS で 2 回洗浄した。続いて、各細胞に、PE 標識抗 PD-1 抗体（クローン MIH4、eBioscience 社）を 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ずつ添加し、4 $^{\circ}\text{C}$ で 20 分間反応させた。

[01 06] 続いて、各細胞を、600 μL の PBS で 2 回洗浄した。続いて、各細胞への PE 標識抗 PD-1 抗体（クローン MIH4）の結合を、フローサイトメーター（型式「FACS Verse」、BD バイオサイエンス社）を用いて解析した。

[01 07] 図 5 は、解析結果を示すグラフである。その結果、最初に反応させた Alexa Fluor 488 標識抗 PD-1 抗体（クローン EH12.2H7）の濃度に関わらず、PE 標識抗 PD-1 抗体（クローン MIH4）が MIT9 細胞に結合することが明らかとなった。

[01 08] この結果は、抗 PD-1 抗体（クローン EH12.2H7）が抗 PD-1 抗体（クローン MIH4）と競合せずに PD-1 に結合することを更に支持するものである。

[01 09] [実験例 4]

（ニボルマブの占有率の測定 1）

抗 PD-1 抗体（クローン EH12.2H7）及び抗 PD-1 抗体（クローン MIH4）を使用して、MIT9 細胞株におけるニボルマブの占有率を測定した。

[01 10] まず、MIT9 細胞株に 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のニボルマブを添加し、4 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間反応させた。続いて、細胞を 600 μL の PBS で 3 回洗浄した。続

いて、ニボルマブと反応させたMIT9細胞株に、ニボルマブと反応させていないMIT9細胞株を、ニボルマブと反応させたMIT9細胞株の割合が0, 25, 50, 75, 100%となるように混合し、 2×10^5 個ずつチューブに分注した。これにより、ニボルマブの占有率が、それぞれ、0, 25, 50, 75, 100%であるMIT9細胞株が得られた。

[01 11] 続いて、各細胞に、それぞれ、AlexaFluor488標識抗PD-1抗体（クローンEH12.2H7、BioLegend社）4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及びPE標識抗PD-1抗体（クローンMIH4、eBioscience社）10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を添加し、4℃で20分間反応させた。

[01 12] 続いて、各細胞を、600 μL のPBSで2回洗浄した。続いて、各細胞へのAlexaFluor488標識抗PD-1抗体（クローンEH12.2H7）及びPE標識抗PD-1抗体（クローンMIH4）の結合を、フローサイトメーター（型式「FACS Verse」、BDバイオサイエンス社）を用いて解析した。

[01 13] 図6(a)～(e)は、解析結果を示すグラフである。図6(a)～(e)は、それぞれ、ニボルマブの占有率が、0, 25, 50, 75, 100%となるように調製したMIT9細胞株の結果である。図6(a)～(e)中、縦軸はAlexaFluor488の蛍光強度を示し、横軸はPEの蛍光強度を示す。

[01 14] その結果、ニボルマブの占有率が上昇するにつれて、AlexaFluor488の蛍光強度が低下する傾向が認められた。一方、ニボルマブの占有率が変化してもPEの蛍光強度は変化しない傾向が認められた。

[01 15] 続いて、図6(a)～(e)の結果に基づいて、下記式(3A)によりニボルマブの占有率を計算した。

$$\text{ニボルマブの占有率 (\%)} = (1 - (\text{抗PD-1抗体 (EH12.2H7) が結合した細胞の割合} / \text{抗PD-1抗体 (クローンMIH4) が結合した細胞の割合})) \times 100 \quad \dots (3A)$$

[01 16] 図7は、上記式(3A)により計算されたニボルマブの占有率と、実際の

ニボルマブの占有率を示すグラフである。その結果、上記式 (3 A) により計算されたニボルマブの占有率が実際のニボルマブの占有率によく一致することが確認された。この結果は、本実験例の方法により、ニボルマブの占有率を測定できることを示す。

[01 17] [実験例 5]

(ニボルマブの占有率の測定 2)

抗 P D _ 1 抗体 (クローン E H 1 2 . 2 H 7) 及び抗 P D - 1 抗体 (クローン M I H 4) を使用して、健常人の末梢血リンパ球中の T 細胞におけるニボルマブの占有率を測定した。

[0118] まず、末梢血リンパ球に $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ のニボルマブを添加し、 4°C で 30 分間反応させた。続いて、ニボルマブと反応させた末梢血リンパ球に、ニボルマブと反応させていない末梢血リンパ球を、ニボルマブと反応させた末梢血リンパ球の割合が 0 , 25 , 50 , 75 , 100 % となるように混合し、 5×10^5 個ずつチューブに分注した。これにより、ニボルマブの占有率が、それぞれ、0 , 25 , 50 , 75 , 100 % である末梢血リンパ球が得られた。

[0119] 続いて、各細胞に H u m a n B D F c B l o c k ($0.5 \mu\text{g} / \text{mL}$ 、BD バイオサイエンス社) を添加して、 4°C で 10 分間反応させた。続いて、a l l o p h y c o c y a n i n (A P C) 標識抗ヒト C D 3 抗体 $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ 、A l e x a F l u o r 4 8 8 標識抗 P D - 1 抗体 (クローン E H 1 2 . 2 H 7、B i o l e g e n d 社) $4 \mu\text{g} / \text{mL}$ 及び P E 標識抗 P D - 1 抗体 (クローン M I H 4、e B i o s c i e n c e 社) $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ を添加し、 4°C で 20 分間反応させた。

[0120] 続いて、各細胞を、 $600 \mu\text{L}$ の P B S で 2 回洗浄した。続いて、各細胞への A l e x a F l u o r 4 8 8 標識抗 P D - 1 抗体 (クローン E H 1 2 . 2 H 7) 及び P E 標識抗 P D _ 1 抗体 (クローン M I H 4) の結合を、フローサイトメーター (型式 「F A C S V e r s e」、BD バイオサイエンス社) を用いて解析した。

[01 21] 図 8 (a) ~ (e) は、解析結果を示すグラフである。図 8 (a) ~ (e) では、C D 3 陽性細胞にゲートをかけて、T 細胞のみの解析結果を示した。図 8 (a) ~ (e) は、それぞれ、ニボルマブの占有率が、0 , 2 5 , 5 0 , 7 5 , 1 0 0 % となるように調製した末梢血リンパ球の結果である。図 8 (a) ~ (e) 中、縦軸は細胞数を示し、横軸は A l e x a F l u o r 4 8 8 の蛍光強度を示す。

[01 22] その結果、ニボルマブの占有率が上昇するにつれて、A l e x a F l u o r 4 8 8 の蛍光強度が低下する傾向が認められた。

[01 23] また、フローサイトメーターによる解析結果に基づいて、下記式 (3 A) によりニボルマブの占有率を計算した。

$$\text{ニボルマブの占有率 (\%)} = (1 - (\text{抗 P D } _ { 1 } \text{ 抗体 (E H 1 2 . 2 H 7) が結合した細胞の割合} / \text{抗 P D } - 1 \text{ 抗体 (クローン M I H 4) が結合した細胞の割合})) \times 1 0 0 \quad \dots (3 A)$$

[01 24] 図 9 は、上記式 (3 A) により計算されたニボルマブの占有率と、実際のニボルマブの占有率を示すグラフである。その結果、上記式 (3 A) により計算されたニボルマブの占有率が実際のニボルマブの占有率によく一致することが確認された。この結果は、本実験例の方法により、ヒトの T 細胞におけるニボルマブの占有率を測定できることを示す。

[01 25] [実験例 6]

(ニボルマブの占有率の測定 3)

抗 P D _ 1 抗体 (クローン E H 1 2 . 2 H 7) 及び抗 P D - 1 抗体 (クローン M I H 4) を使用して、ニボルマブの投与を受けている患者の体腔液由来のリンパ球中の T 細胞におけるニボルマブの占有率を測定した。体腔液としては、胸水及び肺胞洗浄液を使用した。

[01 26] まず、ニボルマブの投与を受けてから 1 2 日後の患者の胸水由来のリンパ球、ニボルマブの投与を受けてから 2 1 日後の患者の肺胞洗浄液由来のリンパ球を採取した。また、比較のために、ニボルマブの投与を受けていない患者の胸水由来のリンパ球も採取した。続いて、各リンパ球を 5×10^5 個ずつ

チューブに分注した。

[01 27] 続いて、各細胞に Human B D F c B l o c k (0 . 5 μ g / m L、B D バイオサイエンス社) を添加して、4 $^{\circ}$ C で 1 0 分間反応させた。続いて、A P C 標識抗ヒト C D 3 抗体 1 μ g / m L、A l e x a F l u o r 4 8 8 標識抗 P D _ 1 抗体 (クローン E H 1 2 . 2 H 7、B i o l e g e n d 社) 4 μ g / m L 及び P E 標識抗 P D _ 1 抗体 (クローン M I H 4、e B i o s c i e n c e 社) 1 0 μ g / m L を添加し、4 $^{\circ}$ C で 2 0 分間反応させた。

[01 28] 続いて、各細胞を、6 0 0 μ L の P B S で 2 回洗浄した。続いて、各細胞への A l e x a F l u o r 4 8 8 標識抗 P D - 1 抗体 (クローン E H 1 2 . 2 H 7) 及び P E 標識抗 P D _ 1 抗体 (クローン M I H 4) の結合を、フローサイトメーター (型式 「 F A C S V e r s e 」、B D バイオサイエンス社) を用いて解析した。

[01 29] 図 1 0 (a) ~ (c) は、解析結果を示すグラフである。図 1 0 (a) ~ (c) では、C D 3 陽性細胞にゲートをかけて、T 細胞のみの解析結果を示した。図 1 0 (a) はニボルマブの投与を受けていない患者の胸水由来の T 細胞の解析結果であり、図 1 0 (b) はニボルマブの投与を受けてから 1 2 日後の患者の胸水由来の T 細胞の解析結果であり、図 1 0 (c) はニボルマブの投与を受けてから 2 1 日後の患者の肺胞洗浄液由来の T 細胞の解析結果である。図 1 0 (a) ~ (c) 中、縦軸は A l e x a F l u o r 4 8 8 の蛍光強度を示し、横軸は P E の蛍光強度を示す。

[01 30] また、フローサイトメーターによる解析結果に基づいて、下記式 (3 A) によりニボルマブの占有率を計算した。

$$\text{ニボルマブの占有率 (\%)} = (1 - (\text{抗 P D _ 1 抗体 (E H 1 2 . 2 H 7) が結合した細胞の割合} / \text{抗 P D _ 1 抗体 (クローン M I H 4) が結合した細胞の割合})) \times 1 0 0 \quad \cdots (3 A)$$

[01 31] その結果、図 1 0 (a) に示すように、ニボルマブの投与を受けていない患者の胸水由来の T 細胞では、ニボルマブの占有率は 1 % と算出された。こ

の値は誤差であると考えられた。これに対し、図 10 (b) に示すように、ニボルマブの投与を受けてから 12 日後の患者の胸水由来の T 細胞では、ニボルマブの占有率は 99.9% と算出された。また、図 10 (c) に示すように、ニボルマブの投与を受けてから 21 日後の患者の肺胞洗浄液由来の T 細胞では、ニボルマブの占有率は 96.0% と算出された。

[01 32] この結果は、本実験例の方法により、実際の治療中の患者の T 細胞におけるニボルマブの占有率を測定できることを示す。

[01 33] [実験例 7]

(ペムプロリズマブの占有率の測定)

抗 PD-1 抗体 (クローン EH12.2H7) 及び抗 PD-1 抗体 (クローン MIH4) を使用して、MIT9 細胞株におけるペムプロリズマブの占有率を測定した。

[01 34] まず、MIT9 細胞株に 10⁶ g/mL のペムプロリズマブを添加し、4℃ で 30 分間反応させた。続いて、細胞を 600 μL の PBS で 3 回洗浄した。続いて、ペムプロリズマブと反応させた MIT9 細胞株に、ペムプロリズマブと反応させていない MIT9 細胞株を、ペムプロリズマブと反応させた MIT9 細胞株の割合が 0, 25, 50, 75, 100% となるように混合し、2 × 10⁵ 個ずつチューブに分注した。これにより、ペムプロリズマブの占有率が、それぞれ、0, 25, 50, 75, 100% である MIT9 細胞株が得られた。

[01 35] 続いて、各細胞に、それぞれ、Alexa Fluor 488 標識抗 PD-1 抗体 (クローン EH12.2H7、BioLegend 社) 4 μg/mL 及び PE 標識抗 PD-1 抗体 (クローン MIH4、eBioscience 社) 10 μg/mL を添加し、4℃ で 20 分間反応させた。

[01 36] 続いて、各細胞を、600 μL の PBS で 2 回洗浄した。続いて、各細胞への Alexa Fluor 488 標識抗 PD-1 抗体 (クローン EH12.2H7) 及び PE 標識抗 PD-1 抗体 (クローン MIH4) の結合を、フローサイトメーター (型式「FACS Verse」、BD バイオサイエンス

社)を用いて解析した。

[0137] 図11(a)～(e)は、解析結果を示すグラフである。図11(a)～(e)は、それぞれ、ペムプロリズマブの占有率が、0、25、50、75、100%となるように調製したMIT9細胞株の結果である。図11(a)～(e)中、縦軸はAlexaFluor488の蛍光強度を示し、横軸はPEの蛍光強度を示す。

[0138] その結果、ペムプロリズマブの占有率が上昇するにつれて、AlexaFluor488の蛍光強度が低下する傾向が認められた。一方、ペムプロリズマブの占有率が変化してもPEの蛍光強度は変化しない傾向が認められた。

[0139] 続いて、図11(a)～(e)の結果に基づいて、下記式(3B)によりペムプロリズマブの占有率を計算した。

$$\text{ペムプロリズマブの占有率 (\%)} = (1 - (\text{抗PD-1抗体 (EH12.2H7) が結合した細胞の割合} / \text{抗PD-1抗体 (クローンMIH4) が結合した細胞の割合})) \times 100 \quad \dots (3B)$$

[0140] 図12は、上記式(3B)により計算されたペムプロリズマブの占有率と、実際のペムプロリズマブの占有率を示すグラフである。その結果、上記式(3B)により計算されたペムプロリズマブの占有率が実際のペムプロリズマブの占有率によく一致することが確認された。この結果は、本実験例の方法により、ペムプロリズマブの占有率を測定できることを示す。

[0141] [実験例8]

(ニボルマブの占有率の測定4)

抗PD-1抗体(クローンEH12.2H7)及び抗PD-1抗体(クローンMIH4)を使用して、ニボルマブの投与を受けていない肺癌患者2例(以下、「患者1」、「患者2」という。)の血液サンプルを試料として、末梢血リンパ球中のT細胞におけるニボルマブの占有率を測定した。

[0142] まず、各患者の血液サンプルから、それぞれ末梢血リンパ球を回収した。続いて、各リンパ球を 5×10^5 個ずつチューブに分注した。

[0143] 続いて、各細胞に Human BD Fc Block (0.5 μ g/mL、BD バイオサイエンス社) を添加して、4 $^{\circ}$ C で 10 分間反応させた。続いて、APC 標識抗ヒト CD3 抗体 1 μ g/mL、Alexa Fluor 488 標識抗 PD-1 抗体 (クローン EH12.2H7、Biolegend 社) 4 μ g/mL 及び PE 標識抗 PD-1 抗体 (クローン MIH4、eBioscience 社) 10 μ g/mL を添加し、4 $^{\circ}$ C で 20 分間反応させた。

[0144] 続いて、各細胞を、600 μ L の PBS で 2 回洗浄した。続いて、各細胞への Alexa Fluor 488 標識抗 PD-1 抗体 (クローン EH12.2H7) 及び PE 標識抗 PD-1 抗体 (クローン MIH4) の結合を、フローサイトメーター (型式「FACS Verse」、BD バイオサイエンス社) を用いて解析した。

[0145] 図 13 (a) ~ (d) は、解析結果を示すグラフである。図 13 (a) は患者 1 の末梢血リンパ球の解析結果を示し、図 13 (b) は患者 2 の末梢血リンパ球の解析結果を示す。また、図 13 (c) は、CD3 陽性細胞にゲートをかけて、患者 1 の T 細胞のみの解析結果を示したグラフである。また、図 13 (d) は、CD3 陽性細胞にゲートをかけて、患者 2 の T 細胞のみの解析結果を示したグラフである。図 13 (a) ~ (d) 中、縦軸は Alexa Fluor 488 の蛍光強度を示し、横軸は PE の蛍光強度を示す。

[0146] 続いて、図 13 (c) 及び (d) の結果に基づいて、上記式 (3A) によりニボルマブの占有率を計算した。その結果、いずれの患者においても、T 細胞におけるニボルマブの占有率は 0% と算出された。

[0147] この結果は、本実験例の方法により、血液サンプルを試料として、患者の T 細胞におけるニボルマブの占有率を測定できることを示す。

[0148] [実験例 9]

(ニボルマブの占有率の測定 5)

抗 PD-1 抗体 (クローン EH12.2H7) 及び抗 PD-1 抗体 (クローン MIH4) を使用して、ニボルマブの投与を受けた腎癌患者の血液サン

プルを試料として、末梢血リンパ球中の τ 細胞におけるニボルマブの占有率を測定した。この患者は、ニボルマブの投与による治療を9コース受けたが、薬剤性肺炎を発症し、ニボルマブの投与を中止した患者であった。ニボルマブを1回投与して2週間が1コースに相当する。

[0149] まず、9回目のニボルマブの投与後3週間経過した時に、患者から血液サンプルを採取した。続いて、血液サンプルから末梢血リンパ球を回収した。続いて、各リンパ球を 5×10^5 個ずつチューブに分注した。

[0150] 続いて、各細胞にHuman BD Fc Block ($0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、BDバイオサイエンス社)を添加して、 4°C で10分間反応させた。続いて、APC標識抗ヒトCD3抗体 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、AlexaFluor488標識抗PD-1抗体(クローンEH12.2H7、Biolegend社) $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 及びPE標識抗PD-1抗体(クローンMIH4、eBioscience社) $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ を添加し、 4°C で20分間反応させた。

[0151] 続いて、細胞を、 $600 \mu\text{L}$ のPBSで2回洗浄した。続いて、細胞へのAlexaFluor488標識抗PD-1抗体(クローンEH12.2H7)及びPE標識抗PD-1抗体(クローンMIH4)の結合を、フローサイトメーター(型式「FACS Verse」、BDバイオサイエンス社)を用いて解析した。

[0152] 図14(a)及び(b)は、解析結果を示すグラフである。図14(a)は末梢血リンパ球の解析結果を示す。また、図14(b)は、CD3陽性細胞にゲートをかけて、患者のT細胞のみの解析結果を示したグラフである。図13(a)及び(b)中、縦軸はAlexaFluor488の蛍光強度を示し、横軸はPEの蛍光強度を示す。

[0153] 続いて、図14(b)の結果に基づいて、上記式(3A)によりニボルマブの占有率を計算した。その結果、T細胞におけるニボルマブの占有率は 5.47% と算出された。

[0154] この結果は、本実験例の方法により、血液サンプルを試料として、患者の

τ 細胞におけるニボルマブの占有率を測定できることを更に支持するものである。

[01 55] [実験例 10]

(ペムプロリズマブの占有率の測定 2)

抗 PD-1 抗体 (クローン EH12.2H7) 及び抗 PD-1 抗体 (クローン MIH4) を使用して、ペムプロリズマブの投与を受けた肺癌患者の血液サンプルを試料として、末梢血リンパ球中の T 細胞におけるペムプロリズマブの占有率を測定した。この患者は、ペムプロリズマブの投与による治療を 2 コース受けたが、薬剤性肺炎を発症し、ペムプロリズマブの投与を中止した患者であった。ペムプロリズマブを 1 回投与して 3 週間が 1 コースに相当する。

[01 56] まず、2 回目のペムプロリズマブの投与後 3 週間経過した時に、患者から血液サンプルを採取した。続いて、血液サンプルから末梢血リンパ球を回収した。続いて、各リンパ球を 5×10^5 個ずつチューブに分注した。

[01 57] 続いて、各細胞に Human BD Fc Block ($0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、BD バイオサイエンス社) を添加して、 4°C で 10 分間反応させた。続いて、APC 標識抗ヒト CD3 抗体 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、Alexa Fluor 488 標識抗 PD-1 抗体 (クローン EH12.2H7、Biolegend 社) $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 及び PE 標識抗 PD-1 抗体 (クローン MIH4、eBioscience 社) $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ を添加し、 4°C で 20 分間反応させた。

[01 58] 続いて、細胞を、 $600 \mu\text{L}$ の PBS で 2 回洗浄した。続いて、細胞への Alexa Fluor 488 標識抗 PD-1 抗体 (クローン EH12.2H7) 及び PE 標識抗 PD-1 抗体 (クローン MIH4) の結合を、フローサイトメーター (型式「FACS Verse」、BD バイオサイエンス社) を用いて解析した。

[01 59] 図 15 (a) 及び (b) は、解析結果を示すグラフである。図 15 (a) は末梢血リンパ球の解析結果を示す。また、図 15 (b) は、CD3 陽性細

胞にゲートをかけて、患者の τ 細胞のみの解析結果を示したグラフである。

図15(a)及び(b)中、縦軸はAlexaFluor488の蛍光強度を示し、横軸はPEの蛍光強度を示す。

[0160] 続いて、図15(b)の結果に基づいて、上記式(3B)によりペムプロリズマブの占有率を計算した。その結果、T細胞におけるペムプロリズマブの占有率は39.66%と算出された。

[0161] この結果は、本実験例の方法により、血液サンプルを試料として、患者のT細胞におけるペムプロリズマブの占有率を測定できることを示す。

産業上の利用可能性

[0162] 本発明によれば、特異的結合物質の動態を簡便に測定する技術を提供することができる。

請求の範囲

- [請求項 1] 細胞集団における第 1 の特異的結合物質の占有率を測定する方法であって、
- 前記細胞集団に、第 2 の特異的結合物質を接触させることと、
- 前記細胞集団に、第 3 の特異的結合物質を接触させることと、
- 前記第 2 の特異的結合物質が結合した細胞数を計測することと、
- 前記第 3 の特異的結合物質が結合した細胞数を計測することと、を
- 含み、
- 前記第 1、前記第 2 及び前記第 3 の特異的結合物質は、いずれも対象細胞表面タンパク質に結合する特異的結合物質であり、
- 前記占有率は、前記対象細胞表面タンパク質を発現した細胞のうち、前記第 1 の特異的結合物質が結合した細胞の割合であり、
- 前記第 2 の特異的結合物質は、前記第 1 の特異的結合物質と競合する特異的結合物質であり、
- 前記第 3 の特異的結合物質は、前記第 1 の特異的結合物質と競合せずに前記対象細胞表面タンパク質に結合する特異的結合物質であり、
- 下記式 (1) により計算される値が、前記占有率である、方法。
- 第 1 の特異的結合物質の占有率 (%) = (1 - (前記第 2 の特異的結合物質が結合した細胞数 / 前記第 3 の特異的結合物質が結合した細胞数)) × 100 … (1)
- [請求項 2] 前記第 2 の特異的結合物質を接触させること、及び前記第 3 の特異的結合物質を接触させることを同時に行う、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項 3] 前記第 2 の特異的結合物質が結合した細胞数を計測すること、及び前記第 3 の特異的結合物質が結合した細胞数を計測することを同時に行う、請求項 1 又は 2 に記載の方法。
- [請求項 4] 前記第 1 の特異的結合物質が抗体である、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項 5] 前記対象細胞表面タンパク質がヒト programmed dea

t h - 1 (P D - 1) であり、前記第 1 の特異的結合物質が抗ヒト P D - 1 抗体である、請求項 4 に記載の方法。

[請求項6]

前記第 1 の特異的結合物質がニボルマブ又はペムプロリズマブであり、前記第 2 の特異的結合物質が抗ヒト P D - 1 モノクローナル抗体 (クローン E H 1 2 . 2 H 7) であり、前記第 3 の特異的結合物質が抗ヒト P D - 1 モノクローナル抗体 (クローン M I H 4) である、請求項 5 に記載の方法。

[請求項7]

細胞集団における第 1 の特異的結合物質の占有率を測定するためのキットであって、

第 2 の特異的結合物質及び第 3 の特異的結合物質を含み、

前記第 1、前記第 2 及び前記第 3 の特異的結合物質は、いずれも対象細胞表面タンパク質に結合する特異的結合物質であり、

前記占有率は、前記対象細胞表面タンパク質を発現した細胞のうち、前記第 1 の特異的結合物質が結合した細胞の割合であり、

前記第 2 の特異的結合物質は、前記第 1 の特異的結合物質と競合する特異的結合物質であり、

前記第 3 の特異的結合物質は、前記第 1 の特異的結合物質と競合せずに前記対象細胞表面タンパク質に結合する特異的結合物質である、キット。

[請求項8]

前記第 1 の特異的結合物質が抗体である、請求項 7 に記載のキット。

[請求項9]

前記対象細胞表面タンパク質がヒト P D - 1 であり、前記第 1 の特異的結合物質が抗ヒト P D - 1 抗体である、請求項 8 に記載のキット。

[請求項 10]

前記第 1 の特異的結合物質がニボルマブ又はペムプロリズマブであり、前記第 2 の特異的結合物質が抗ヒト P D - 1 モノクローナル抗体 (クローン E H 1 2 . 2 H 7) であり、前記第 3 の特異的結合物質が抗ヒト P D - 1 モノクローナル抗体 (クローン M I H 4) である、請

求項 9 に記載のキット。

[請求項 11]

患者への抗体医薬の投与間隔又は投与量を最適化するためのデータを取得する方法であって、

抗体医薬が投与された患者由来の細胞に第 2 の特異的結合物質を接触させることと、

抗体医薬が投与された患者由来の前記細胞に第 3 の特異的結合物質を接触させることと、

前記第 2 の特異的結合物質が結合した細胞数を計測することと、

前記第 3 の特異的結合物質が結合した細胞数を計測することと、を含み、

前記第 2 及び前記第 3 の特異的結合物質は、いずれも前記抗体医薬の標的タンパク質に結合する特異的結合物質であり、

前記第 2 の特異的結合物質は、前記抗体医薬と競合する特異的結合物質であり、

前記第 3 の特異的結合物質は、前記抗体医薬と競合せずに前記抗体医薬の標的タンパク質に結合する特異的結合物質であり、

下記式 (2) により計算される前記抗体医薬の占有率が、患者への前記抗体医薬の投与間隔又は投与量を最適化するためのデータである、方法。

$$\text{前記抗体医薬の占有率 (\%)} = (1 - (\text{前記第 2 の特異的結合物質が結合した細胞数} / \text{前記第 3 の特異的結合物質が結合した細胞数})) \times 100 \quad \dots (2)$$

[請求項 12]

前記第 2 の特異的結合物質を接触させること、及び前記第 3 の特異的結合物質を接触させることを同時に行う、請求項 11 に記載の方法。

[請求項 13]

前記第 2 の特異的結合物質が結合した細胞数を計測すること、及び前記第 3 の特異的結合物質が結合した細胞数を計測することを同時に行う、請求項 11 又は 12 に記載の方法。

[請求項 14] 前記占有率が基準値よりも高いことが、患者への前記抗体医薬の投与間隔を長くすべきこと又は投与量を減少させるべきことを示し、前記占有率が基準値よりも低いことが、患者への前記抗体医薬の投与間隔を短くすべきこと又は投与を増大させるべきことを示す、請求項 11～13 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項 15] 患者へのニボルマブ又はペムプロリズマブの投与間隔若しくは投与量を最適化するためのデータを取得する方法であって、

ニボルマブ又はペムプロリズマブが投与された患者由来の細胞に第 2 の特異的結合物質を接触させることと、

ニボルマブ又はペムプロリズマブが投与された患者由来の前記細胞に第 3 の特異的結合物質を接触させることと、

前記第 2 の特異的結合物質が結合した細胞数を計測することと、

前記第 3 の特異的結合物質が結合した細胞数を計測することと、を
含み、

前記第 2 及び前記第 3 の特異的結合物質は、いずれもヒト PD-1 に結合する特異的結合物質であり、

前記第 2 の特異的結合物質は、ニボルマブ又はペムプロリズマブと競合する特異的結合物質であり、

前記第 3 の特異的結合物質は、ニボルマブ又はペムプロリズマブと競合せずにヒト PD-1 に結合する特異的結合物質であり、

下記式 (3) により計算されるニボルマブ又はペムプロリズマブの占有率が、患者へのニボルマブ又はペムプロリズマブの投与間隔若しくは投与量を最適化するためのデータである、方法。

ニボルマブ又はペムプロリズマブの占有率 (%) = (1 - (前記第 2 の特異的結合物質が結合した細胞数 / 前記第 3 の特異的結合物質が結合した細胞数)) × 100 … (3)

[請求項 16] 前記第 2 の特異的結合物質を接触させること、及び前記第 3 の特異的結合物質を接触させることを同時に行う、請求項 15 に記載の方法

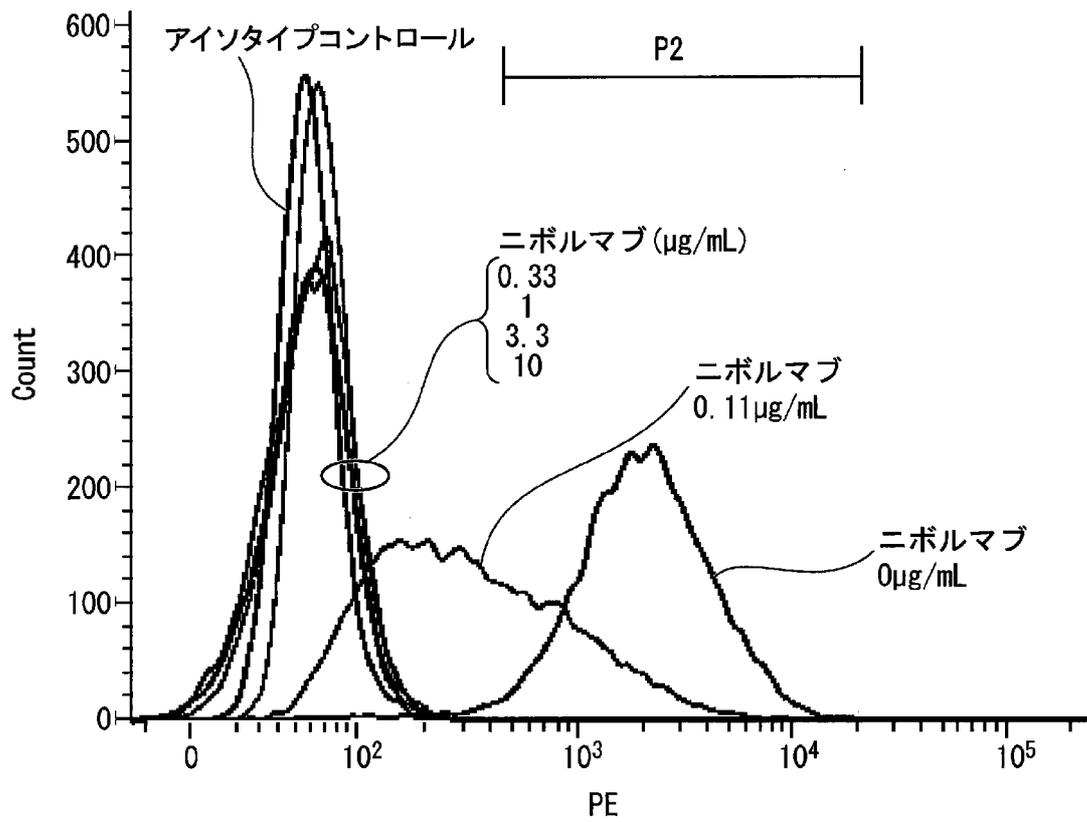
。

[請求項17] 前記第2の特異的結合物質が結合した細胞数を計測すること、及び前記第3の特異的結合物質が結合した細胞数を計測することを同時に行う、請求項15又は16に記載の方法。

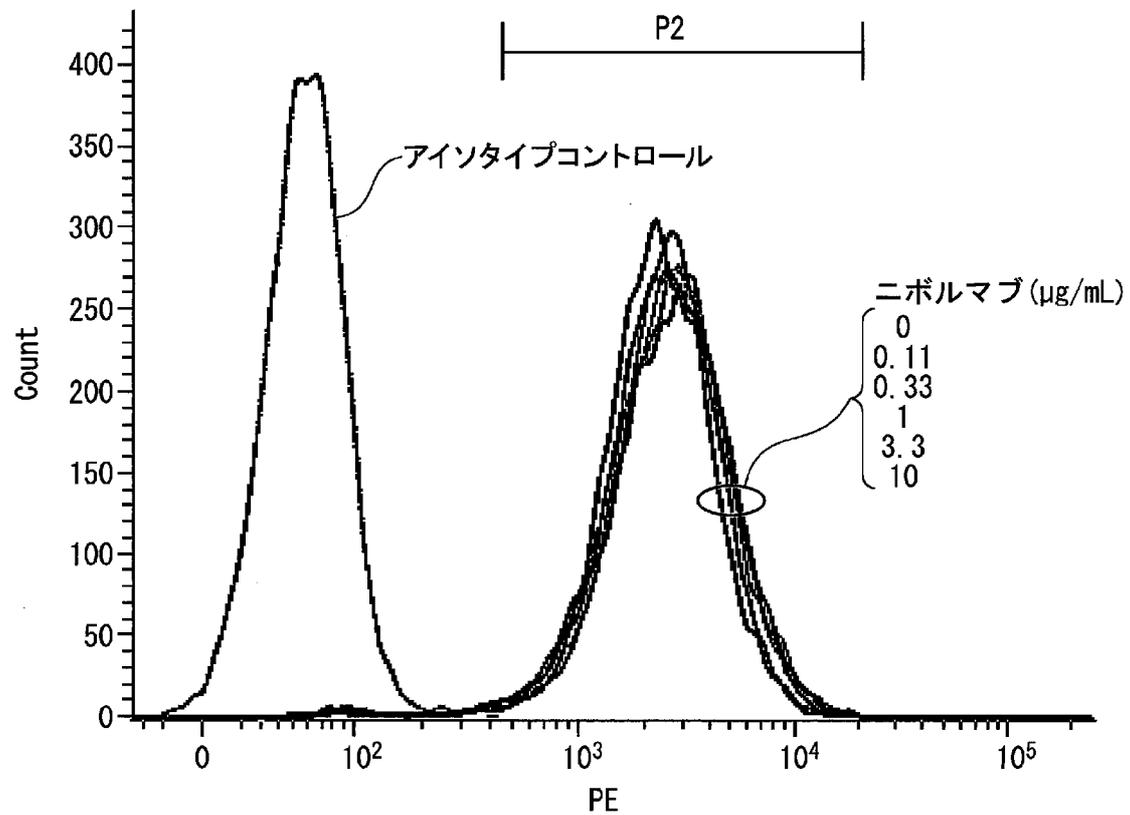
[請求項18] 前記占有率が基準値よりも高いことが、患者へのニボルマブ又はペムプロリズマブの投与間隔を長くすべきこと若しくは投与量を減少させるべきことを示し、前記占有率が基準値よりも低いことが、患者へのニボルマブ又はペムプロリズマブの投与間隔を短くすべきこと若しくは投与量を増大させるべきことを示す、請求項15～17のいずれか一項に記載の方法。

[請求項19] 前記第2の特異的結合物質が抗ヒトPD-1モノクローナル抗体（クローンEH12.2H7）であり、前記第3の特異的結合物質が抗ヒトPD-1モノクローナル抗体（クローンMIH4）である、請求項15～18のいずれか一項に記載の方法。

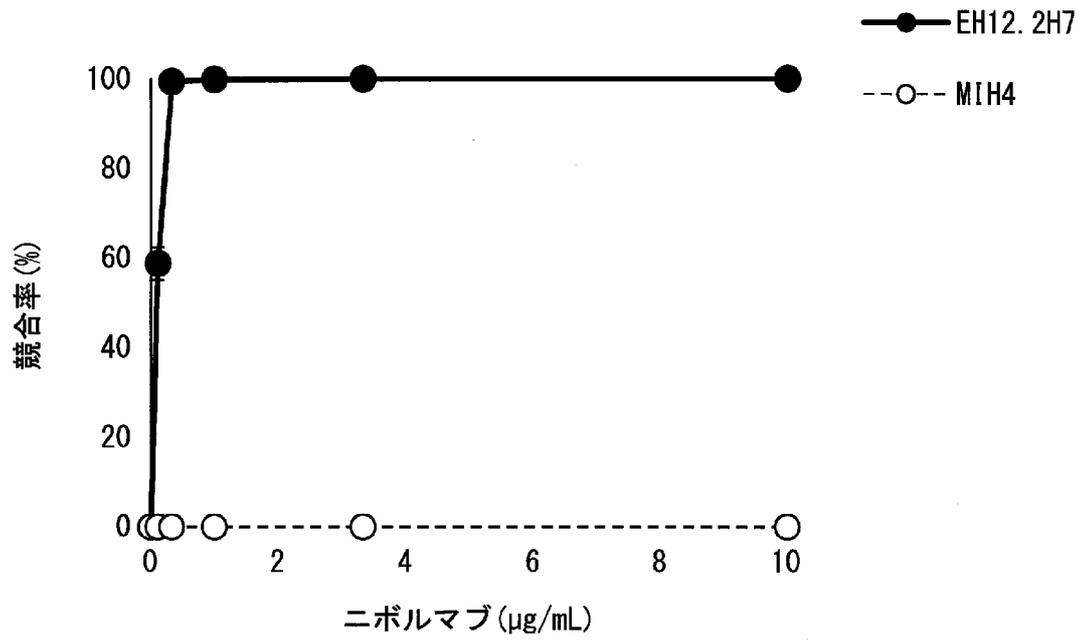
[図1]



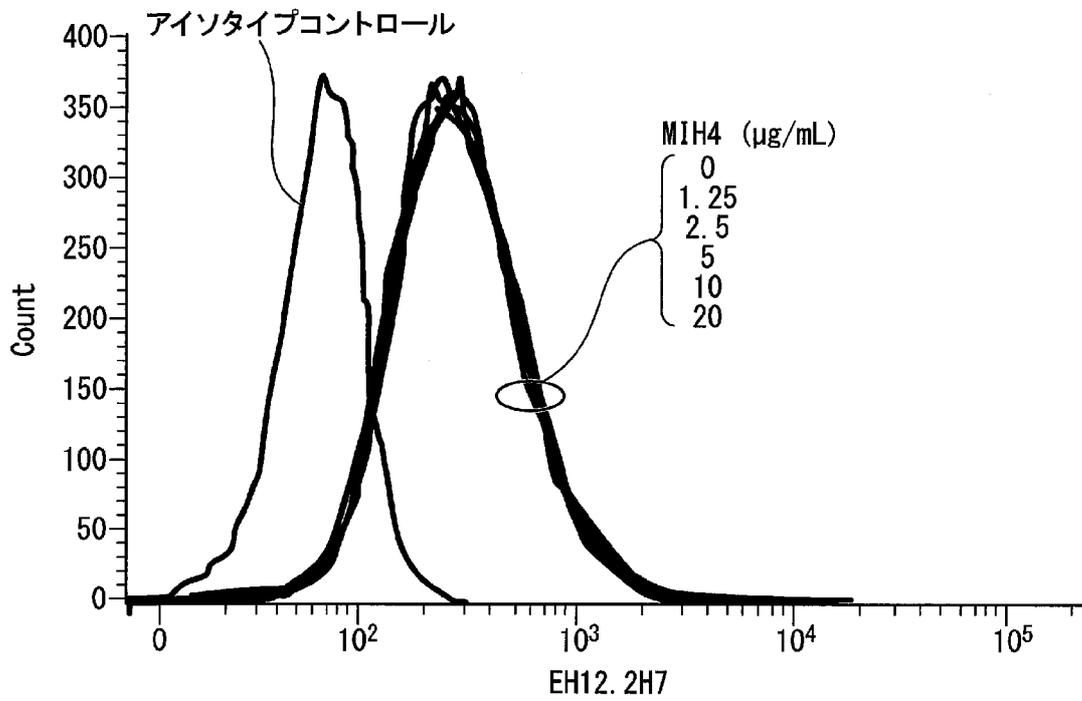
[図2]



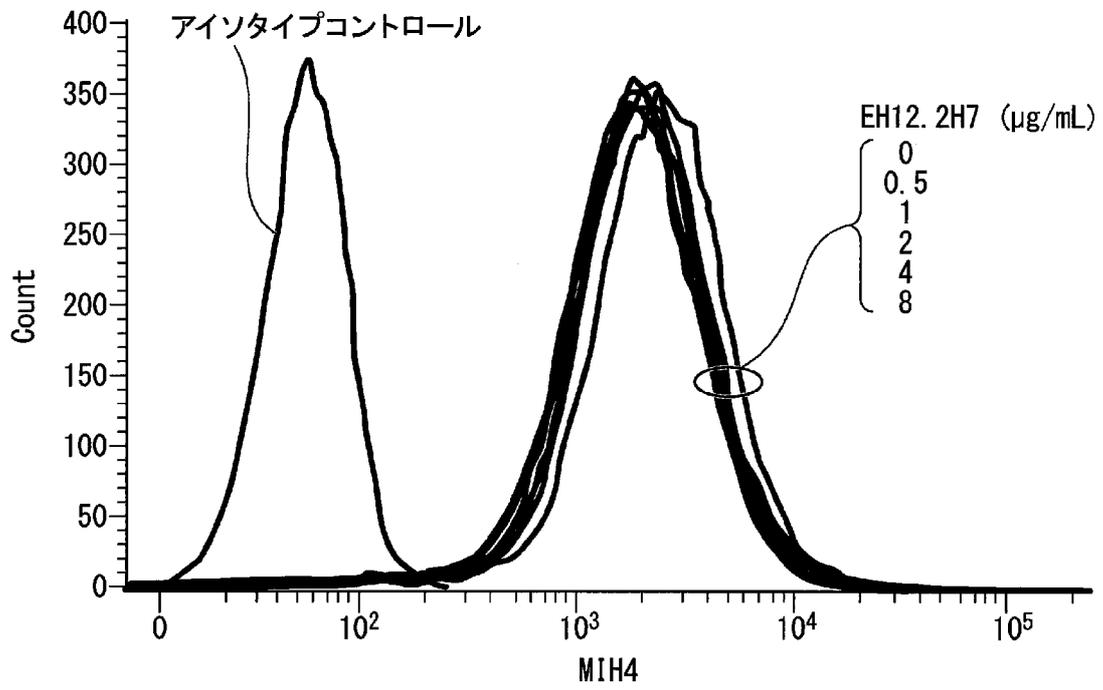
[図3]



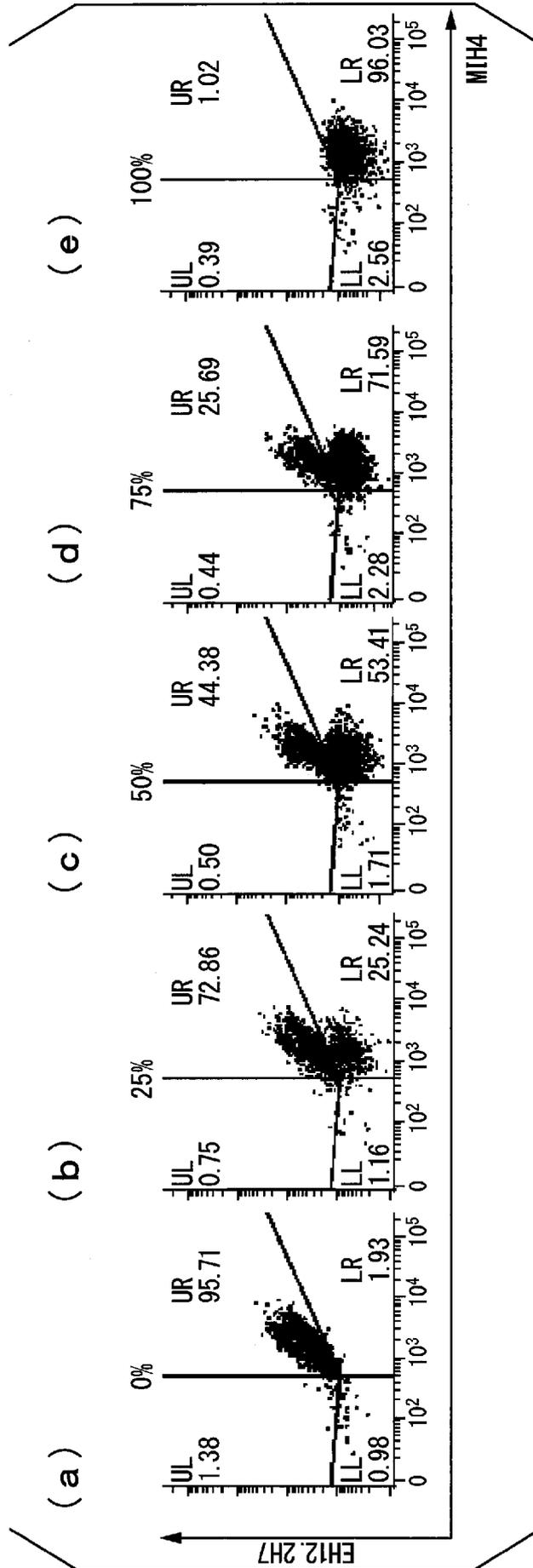
[図4]



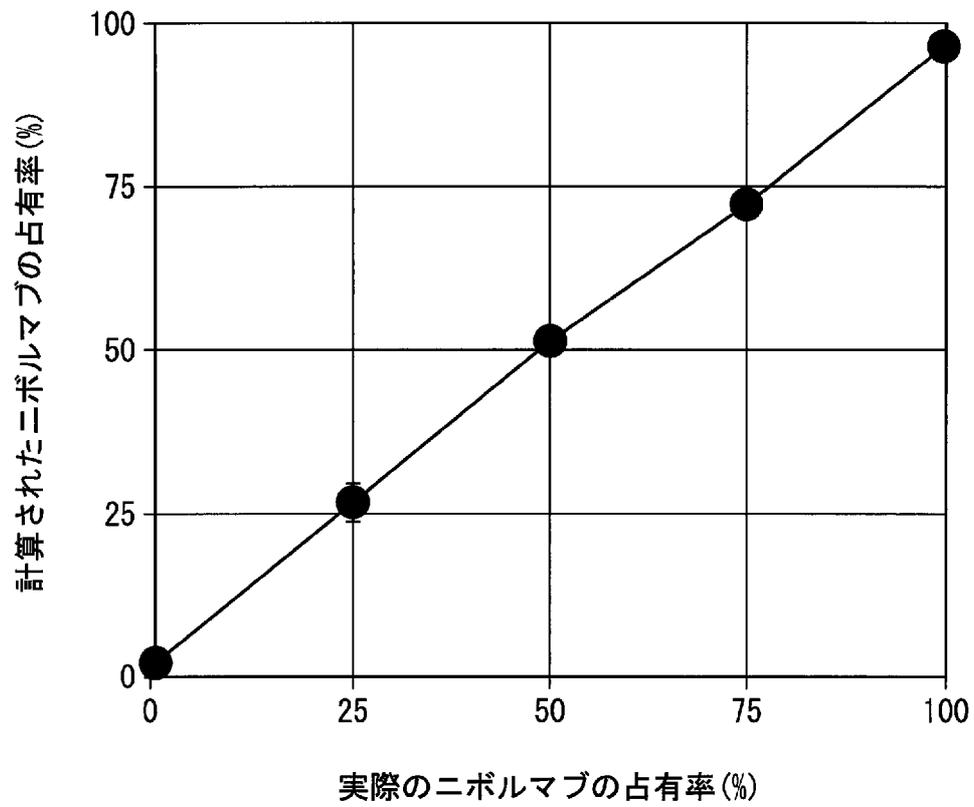
[図5]



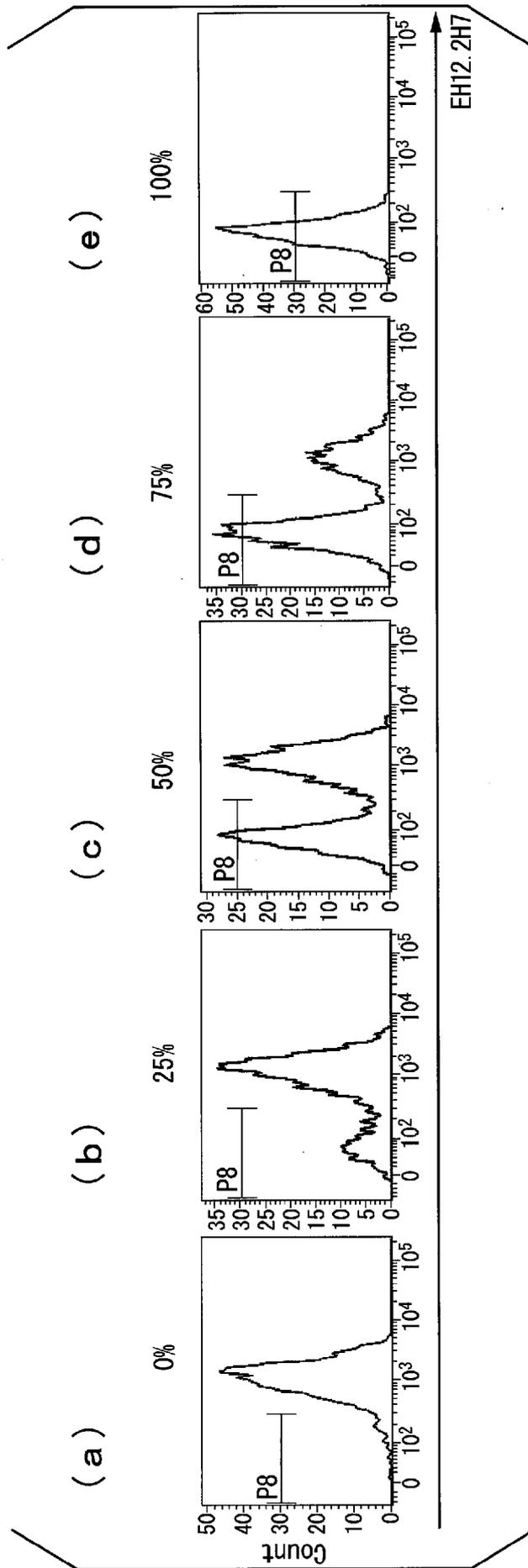
[図6]



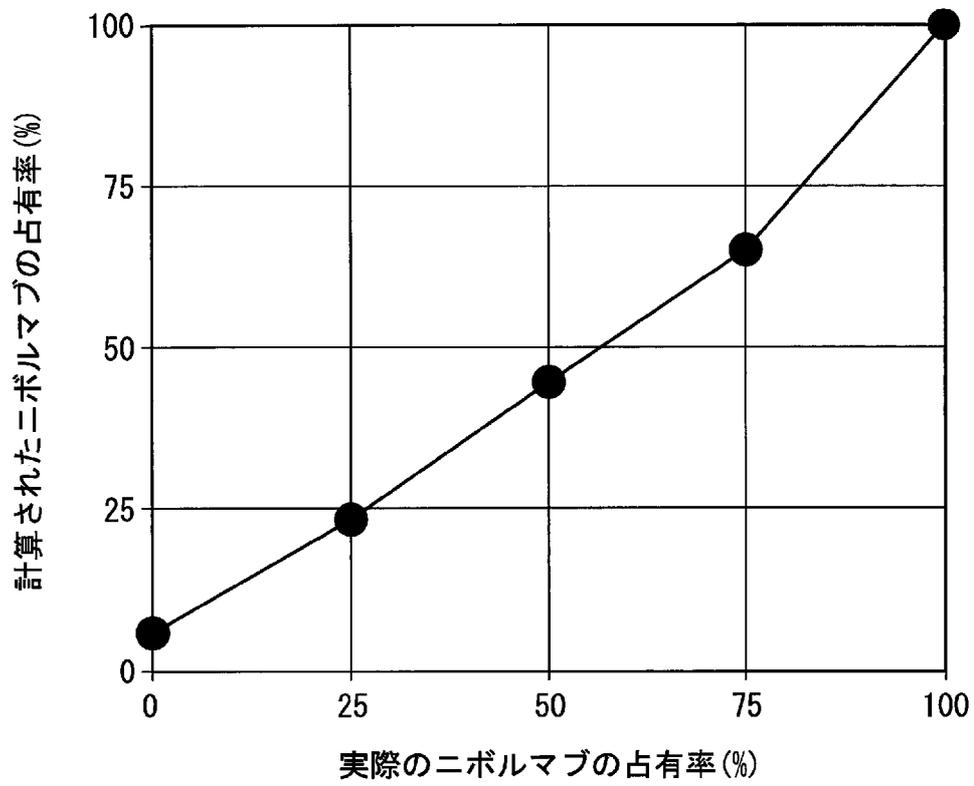
[図7]



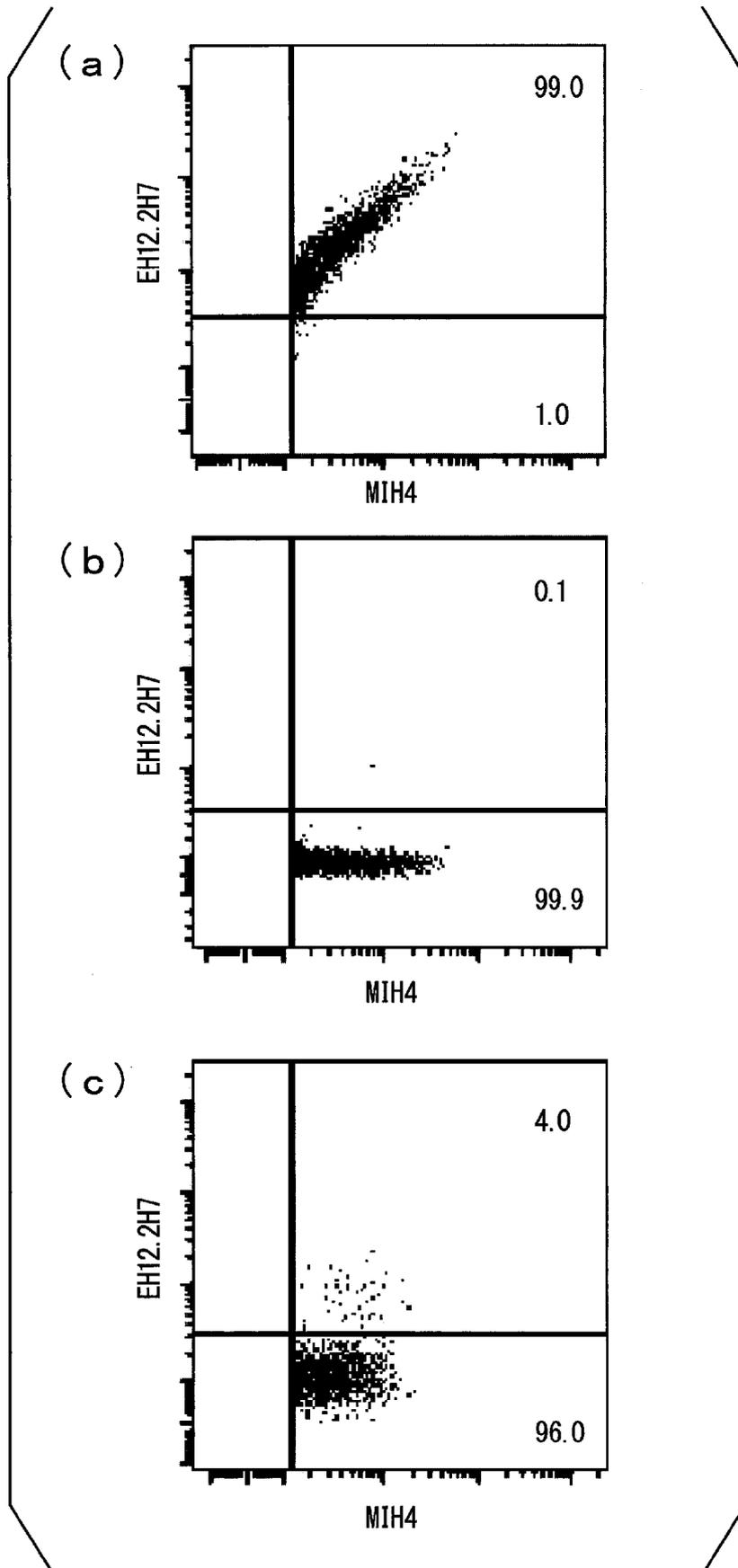
[8]



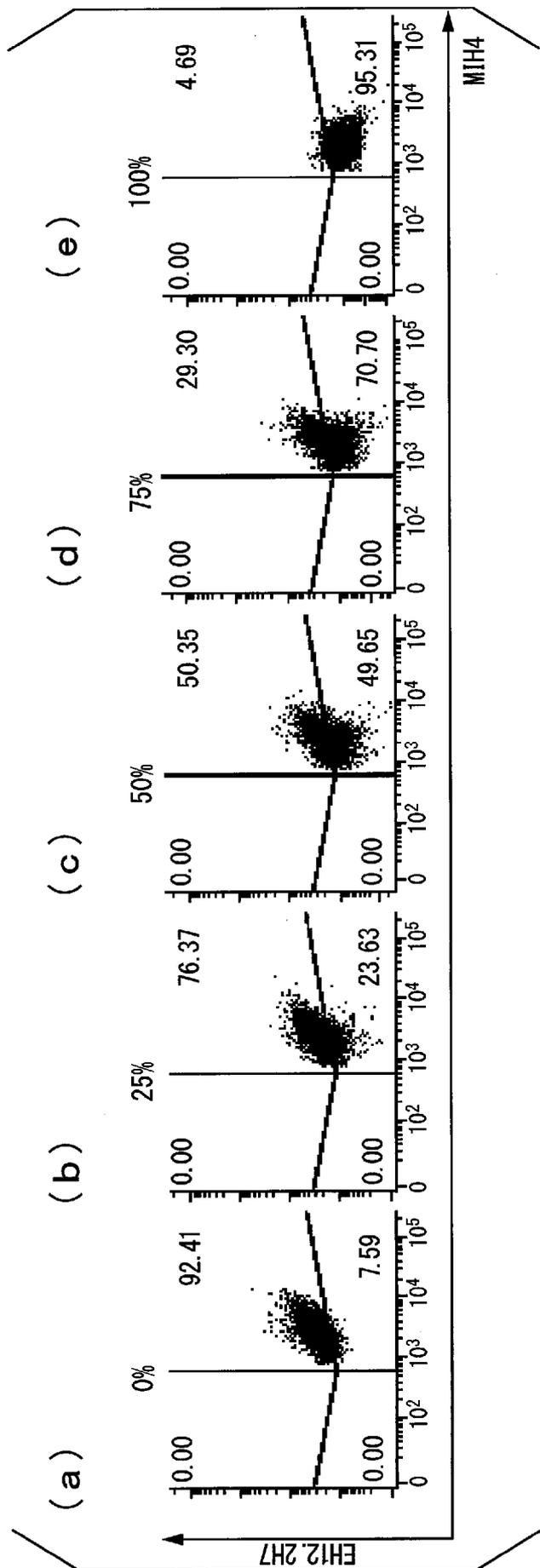
[図9]



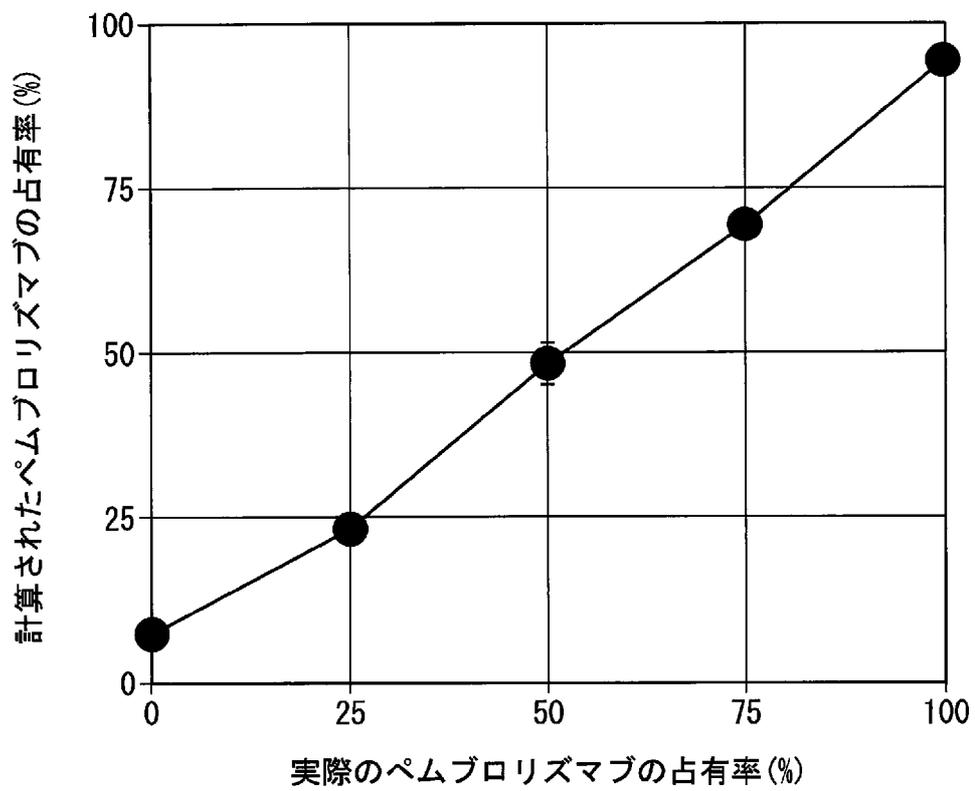
[図10]



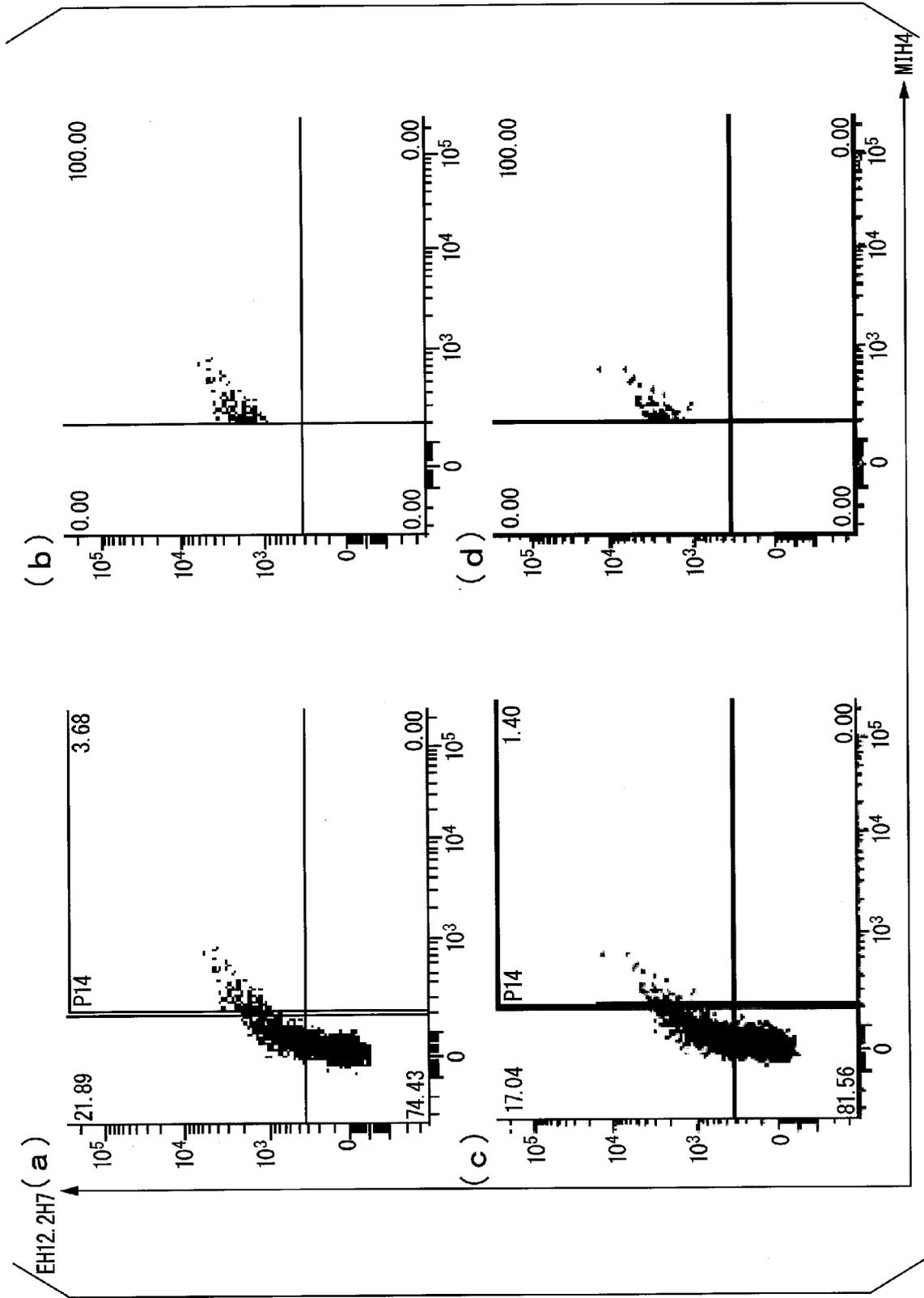
[11]



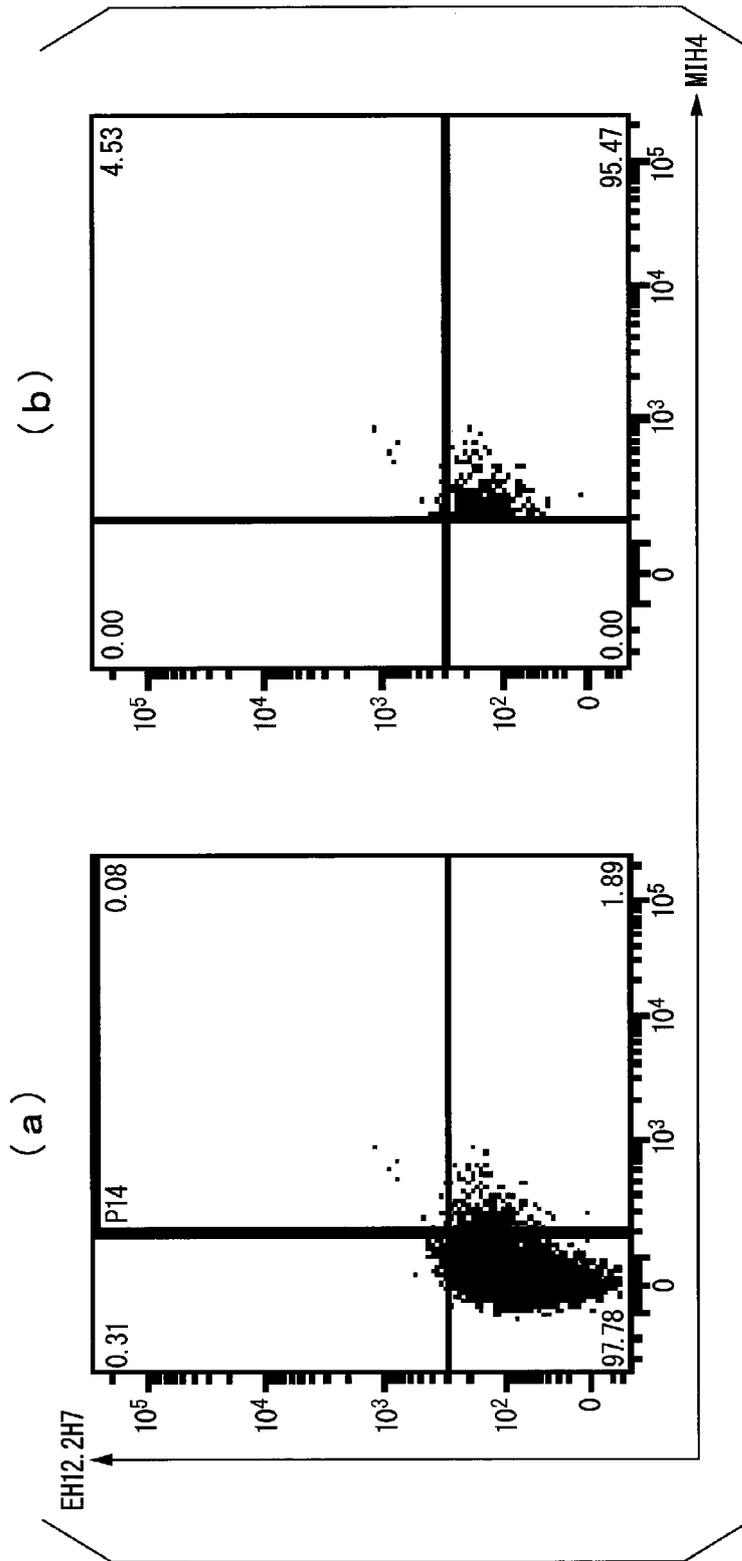
[図12]



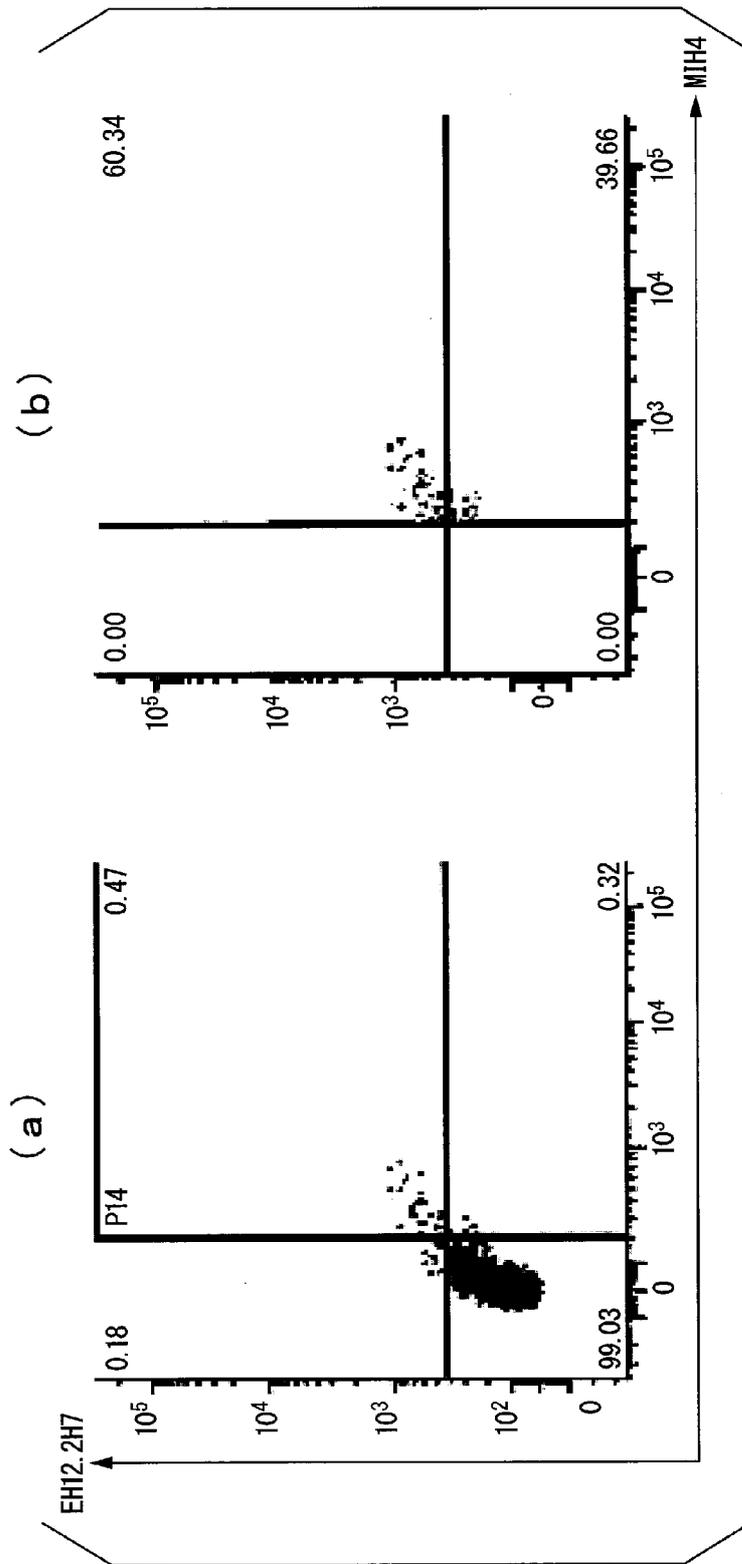
[図13]



[図14]



[圖15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT / JP2018 / 029390

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int . Cl . G01N33/53 (2006.01) i , A61K39/395 (2006.01) i , A61P35/00 (2006.01) i

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)

Int . Cl . G01N33/53 , A61K39/395 , A61P35/00

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018

Registered utility model specifications of Japan 1996-2018

Published registered utility model applications of Japan 1994-2018

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

JSTP lus / JMEDP lus / JST7580 (JDreaml ll)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category: *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	JP 2016-536314 A (SANOFI) 24 November 2016, paragraph s [0153]-[0192] & US 2015/0118251 A1, paragraph s [0156]-[0195] & WO 2015/066450 A1	1-4, 7-8, 11-14 5, 9, 15-18 6, 10, 19
X Y	WO 2004/054616 A1 (ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 01 July 2004, claims 9-12, examples 2, 5 & US 2006/0251651 A1, claims 9-12, examples 2, 5 & EP 1570860 A1	1-3, 7 4-5, 8-9, 11-18
Y	BRAHMER, J. R. et al., "Phase I Study of Single-Agent Anti-Programmed Death-1 (MDX-1106) in Refractory Solid Tumors: Safety, Clinical Activity, Pharmacodynamics, and Immunologic Correlations", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, 2010, vol. 28, no. 19, pp. 3167-3175	4-5, 8-9, 11-18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" 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
24 October 2018 (24.10.2018)Date of mailing of the international search report
06 November 2018 (06.11.2018)Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, JapanAuthorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT / JP2018 / 029390

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2015-534949 A (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.) 07 December 2015, paragraph [0056] & US 2015/0273056 A1, paragraph [0071] & WO 2014/059251 A1	1-19
A	US 2016/0251436 A1 (AMIRINA, N. et al.) 01 September 2016, table 3 & WO 2016/106159 A1	1-19
A	SIGURSKJOLD, B. W., "Exact Analysis of Competition Ligand Binding by Displacement Isothermal Titration Calorimetry", Analytical Biochemistry, 2000, vol. 277, pp. 260-266	1-19f

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N33/53 (2006. 01) i, A61K39/395 (2006. 01) i, A61P35/00 (2006. 01) i

B. 一 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N33/53, A61K39/395, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1	⁹	—	
日本国公開実用新案公報	1	⁹	—	1
日本国実用新案登録公報	1		—	1
日本国登録実用新案公報	1		— ²	1

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称⁹、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreaml II)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y A	J P 2016-536314 A (サノフィ) 2016. 11. 24, [0153] - [0192] & US 2015/0118251 A1, [0156] - [0195] & W O 2015/066450 A 1	1-4, 7-8, 11-1 4 5, 9, 15-18 6, 10, 19
X Y A	W O 2004/054616 A 1 (小野薬品工業株式会社) 2004. 07. 01, [請求項 9] - [請求項 12], 実施例 2, 実施例 5 & US 2006/0251651 A1, Claims9-12, EXAMPLE2, EXAMPLE5 & EP 1570860 A 1	1-3, 7 4-5, 8-9, 11-1 8 6, 10, 19

C 欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「I」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「B」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「Z」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 4 . 1 0 . 2 0 1 8

国際調査報告の発送日

0 6 . 1 1 . 2 0 1 8

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA / JP)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

2 J

9 8 1 2

大瀧 真理

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 2

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	BRAHMER, J. R. et al. , Phase I Study of Single-Agent Anti-Programmed Death-1 (MDX-1106) in Refractory Solid Tumors : Safety, Clinical Activity, Pharmacodynamics, and Immunologic Correlates, JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, 2010, Vol. 28, No. 19, pp. 3167-3175	4-5, 8-9, 11-18
A	JP 2015-534949 A (ザ ブリガム アンド ウイメンズ ホスピタル インコーポレイテッド) 2015. 12. 07, [0056] & US 2015/0273056 AI, [0071] & wo 2014/059251 AI	1-19
A	US 2016/0251436 AI (AMIRINA, N. et al.) 2016. 09. 01, TABLE3 & wo 2016/106159 AI	1-19
A	SIGURSKJOLD B. W. , Exact Analysis of Competition Ligand Binding by Displacement Isothermal Titration Calorimetry, Analytical Biochemistry, 2000, Vol. 277, pp. 260-266	1-19