

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2006年10月12日 (12.10.2006)

PCT

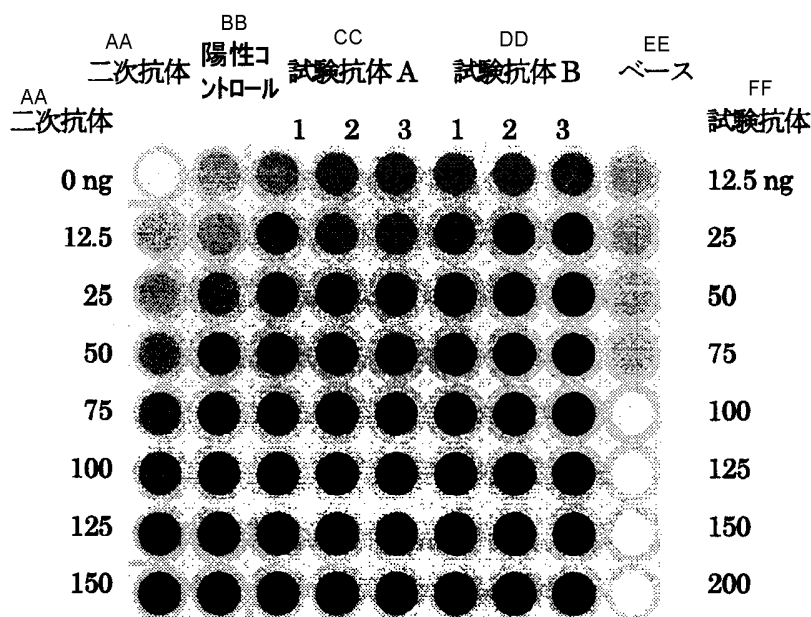
(10) 国際公開番号
WO 2006/106976 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/566 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/306948
- (22) 国際出願日: 2006年3月31日 (31.03.2006)
- (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2005-103072 2005年3月31日 (31.03.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人 大阪大学 (OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP). 国立大学法人 鳥取大学 (TOTTORI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6808550 鳥取県鳥取市湖山町南四丁目101 Tottori (JP). バイオメディクス株式会社 (BIOMEDICS INC.) [JP/JP]; 〒1120004 東京都文京区後楽一丁目1番10号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 内山 進 (UCHIYAMA, Susumu) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人 大阪大学内 Osaka (JP). 福井 希一 (FUKUI, Kiichi) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人 大阪大学内 Osaka (JP). 鈴木 定彦 (SUZUKI, Sadahiko) [JP/JP]; 〒6808550 鳥取県鳥取市湖山町南四丁目101 国立大学法人 鳥取大学内 Tottori (JP).
- (74) 代理人: 川口 嘉之, 外 (KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 アクロボリス21ビル6階 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF ASSAYING ANTIBODY AGAINST CELL MEMBRANE SURFACE ANTIGEN

(54) 発明の名称: 細胞膜表面抗原に対する抗体のアッセイ法

AA SECONDARY ANTIBODY
BB POSITIVE CONTROL
CC TEST ANTIBODY ADD TEST ANTIBODY B
EE BASE
FF TEST ANTIBODY

(57) Abstract: A method of measuring the affinity of an antibody that binds to a membrane surface antigen; and a method of assaying or screening the antigen-binding antibody with the use of the measuring method. In the measuring of the affinity between antigen and antibody, not only are floating cells presenting the antigen on the cell membrane surface employed but also B/F separation is carried out by centrifugation or through a filter blocking the passage of cells.

(57) 要約: 膜表面抗原に対して結合する抗体の親和性を測定する方法、および、その測定方法を利用して、該抗原に対して結合する抗体をアッセイまたはスクリーニングする方法を提供する。抗原と抗体との親和性の測定において、抗原を細胞膜表面に提示する浮遊細胞を用いるとともに、B/F分離を遠心分離又は細胞を通さないフィルターにより行う。



IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

明 細 書

細胞膜表面抗原に対する抗体のアッセイ法

技術分野

- [0001] 本発明は、細胞膜表面抗原に対して結合する抗体をアッセイまたはスクリーニングする方法に関する。

背景技術

- [0002] 受容体や接着分子などの細胞膜上に発現する分子には、その性状や発現様式により自然な立体構造を保持した抗原を調製することが必ずしも容易ではないものがある。例えば、細胞膜抗原分子は、単量体ではなく複合体を形成することが多い。また、細胞膜抗原には不溶性の膜貫通部分ばかりでなく細胞外ドメインについても不溶性または可溶化し難いものがある。通常のELISAは、こうした抗原に対する抗体のアッセイ又はスクリーニング法として適していないことが多い。これは免疫抗原として細胞外ドメインの立体構造を自然な状態で調製することが難しいばかりでなく、プレートに付着させることによりさらに立体構造の変化が起こる可能性があるためである。
- [0003] 例えば、白血球抗原に対するも抗体の場合一般にはアイソトープ標識をした二次抗体を用いたScatchard Analysisでそのアッセイを行うが、一度に試験できる検体数が少なく又準備・試験に時間がかかる。このため、多数の抗体クローンのスクリーニングには不向きであり、より簡便で、多数の試験が行える方法の確立が望まれる。

発明の開示

- [0004] 本発明の課題は、浮遊細胞の膜表面抗原に対して結合する抗体の親和性を測定する方法、および、その測定方法を利用して、膜表面抗原に対して結合する抗体をアッセイまたはスクリーニングする方法を提供することである。
- [0005] (1) (a)ヒト造血系浮遊細胞の膜表面抗原に被測定抗体を結合させ、(b)該膜表面抗原に結合した被測定抗体と遊離の被測定抗体を分離し、(c)該膜表面抗原に結合した被測定抗体に、被測定抗体の抗原認識部位とは異なる部位で被測定抗体に結合する物質であって標識された物質を結合させ、(d)該膜表面抗原に結合した被測定抗体に結合した該物質と、遊離の該物質を分離し、(e)該物質の標識を検出す

ることを含む、被測定抗体と膜表面抗原との結合親和性を測定する方法であって、(b)及び(d)の分離を、それぞれ、遠心分離又は細胞を通さないフィルターにより行うことを特徴とする前記方法。

(2) (b) 及び(d) の分離を、遠心分離により行う(1)に記載の方法。

(3) (b) 及び(d) の分離を、細胞を通さないフィルターにより行う(1)に記載の方法。

(4) 細胞が正常動物細胞、ライン化した動物細胞株または遺伝子操作された動物細胞株である(1)～(3)のいずれか1項に記載の方法。

(5) (1)～(4)のいずれか1項に記載の方法を利用して細胞膜表面抗原に対して結合するモノクローナル抗体をアッセイする方法。

(6) (1)～(4)のいずれか1項に記載の方法を利用して細胞膜表面抗原に対して結合するモノクローナル抗体をスクリーニングする方法。

図面の簡単な説明

[0006] [図1]イメージアナライザーによる測定結果(中間調画像の写真)を示す。

[図2]飽和曲線を示す。(X軸:添加抗体量(ng)、Y軸:蛍光強度)

[図3]スキャッチャード解析結果を示す。(X軸:結合量nM、Y軸:結合量 / 遊離量)

発明を実施するための最良の形態

[0007] <1> 本発明の親和性測定法

(1) 本発明の親和性測定法は、(a)ヒト造血系浮遊細胞の膜表面抗原に被測定抗体を結合させ、(b)該膜表面抗原に結合した被測定抗体と遊離の被測定抗体を分離し、(c)該膜表面抗原に結合した被測定抗体に、被測定抗体の抗原認識部位とは異なる部位で被測定抗体に結合する物質であって標識された物質を結合させ、(d)該膜表面抗原に結合した被測定抗体に結合した該物質と、遊離の該物質を分離し、(e)該物質の標識を検出することを含む、被測定抗体と膜表面抗原との結合親和性を測定する方法であって、(b)及び(d)の分離を、それぞれ、遠心分離又は細胞を通さないフィルターにより行うことを特徴とする。

[0008] 本発明の親和性測定法は、造血系浮遊細胞の膜表面抗原に対するものであること、被測定抗体の抗原認識部位とは異なる部位で被測定抗体に結合する物質であって標識された物質を用いること、結合したものと遊離のものの分離(B/F分離)を遠心

分離又は細胞を通さないフィルターにより行うことの他は、抗原と抗体との親和性を測定する通常の方法と同様でよいが、本測定系において浮遊細胞数は1チューブ当たり 5×10^5 個前後にすることが好ましい。また、抗体を直接ラジオアイソトープ標識せずに、二次抗体を用いて測定することが可能である。

[0009] たとえば、被測定抗体の抗原認識部位とは異なる部位で被測定抗体に結合する物質としては、被測定抗体に対する抗体(たとえば、Fc部位に対する抗体)、プロテインAやプロテインGなどが挙げられる。標識としては、蛍光物質、磁気ビーズなどが挙げられる。

[0010] 本発明の親和性測定法においては、分離方法が同じであることが好ましい。

[0011] 用いる細胞は、標的とする抗原を細胞膜表面に提示する浮遊細胞である限り、特に限定されないが、正常動物細胞、ライン化した動物細胞株または遺伝子操作された動物細胞株であることが好ましい。

[0012] 具体的な手順の例としては、次のものが挙げられる。(1)浮遊細胞とマウスモノクローナル抗体(一次抗体)を反応後、(2)遊離(フリー)の一次抗体を洗浄および遠心により除去し、(3)蛍光標識された抗マウス二次抗体を反応させ、(4)洗浄および遠心により遊離の二次抗体を除去し、その後(5)細胞に一次抗体を介して結合した二次抗体の蛍光量を蛍光イメージアナライザーで測定する。さらに(6)用いた蛍光標識二次抗体について濃度と蛍光量を測定することで検量線を作成し、測定値を濃度に換算することで結合した二次抗体量を求め、添加抗体量から結合量を引くことで遊離の抗体量を算出する。

[0013] より具体的な手順の例としては、以下に記載するステップよりなる方法が挙げられる。1) 細胞膜上の抗原発現量が多い細胞または細胞株を選択し、十分な細胞数が得られる

まで培養する。

2) 遠心により該細胞を回収し洗浄する。

3) 被検モノクローナル抗体又は陽性コントロール抗体を含む溶液中に細胞を懸濁する。4) 一定時間振とう反応させた後、遠心して細胞を回収し、すばやく洗浄する。

5) 回収した細胞を蛍光標識二次抗体を含む溶液中に懸濁する。

- 6) 一定時間振とう反応させた後、遠心して細胞を回収し、洗浄する。
- 7) 細胞を再度懸濁して96ウェルプレートのウェルに移し、蛍光強度をイメージアナライザーで検出する。
- 8) 検出後、結合した抗体量とフリーの抗体量を画像から数値化し、スキャッチャード・プロットから解離定数(Kd値)を求める。

- [0014] 本方法においては、細胞をホルムアルデヒドなどの架橋剤で固定せずに用いるため、細胞表面上の立体構造を維持したままの標的とする細胞膜表面抗原とモノクローナル抗体との結合親和性を測定することが可能である。
- [0015] 本発明の親和性測定法を利用して、膜表面抗原に対して結合するモノクローナル抗体のアッセイやスクリーニングが可能である。アッセイ及びスクリーニングの方法は、親和性測定法として本発明の親和性測定法を利用する他は、通常の、親和性測定方法を利用して、細胞膜表面抗原に対して結合するモノクローナル抗体をアッセイする方法、及び、細胞膜表面抗原に対して結合するモノクローナル抗体をスクリーニングする方法と同様でよい。
- [0016] 本発明の効果が得られる理由は、以下の説明によって拘束されるものではないが、以下のように考えられる。
- [0017] 親和性測定において、浮遊細胞を用いることにより感度が上昇する理由としては、固定化すると固相表面の面積により細胞量が限定される一方、浮遊細胞では細胞数を多くすることができるためと考えられる。また浮遊状態での細胞には表面全体の抗原に抗体が結合可能であるのに対し、固定化すると抗体が結合可能な細胞表面積が減少することも理由の一つである。加えて、細胞を架橋して固相化する場合には、固相化に伴いエピトープが消滅したり、その立体構造が変化したりする可能性があり、ナチュラルな状態の抗原に対する親和性が測定できなかつたり、親和性が低く評価される恐れがあるが、本発明の親和性測定法においてはこのような恐れがない。

実施例 1

- [0018] CD20分子に対するモノクローナル抗体の結合親和性の定量的測定を実施例を参照して説明する。
- [0019] 目的とする抗原を細胞表面で発現しているヒトB細胞株Raji及び、CD20抗原を発現

していない細胞としてJurkat細胞株を用いた。共にRPMI1640(ナカライ、Cat.No.30264-85、Lot L4K2844)に10%ウシ胎仔血清FCS(BIOLOGICAL IND. Cat.No.04-001-1A、Lot 815242、補体成分を非働化するためあらかじめ56度30分加温したもの)を添加した培地で37度CO₂濃度5%のCO₂インキュベーター(SANYO MCO-175M)で培養、週2回の継代により維持した。

[0020] 細胞数の測定は、Burker-Turk血球計算盤(エルマ販売(株)Cat.No.03-303-1)を用いて行った。

[0021] 継代後3～4日目のコンフルエントな細胞の培養液を多本架冷却遠心機LX-120(TOMY)で室温、3000r.p.m.で3分間遠心し、上清を除き、細胞を回収した。ここで用いた回転数と時間は遠心分離と上清除去を繰り返し行っても細胞数が変化しない条件である。細胞の表面に残った培地及びFCSを除くため(洗浄)、回収した細胞をDulbecco's Phosphate Buffered Saline(-) without Ca and Mg [PBS(-)、(NaCl:Wako、Cat.No.191-01665、NaH₂PO₄:Wako、Cat.No.197-02865、Lot ASF2635、KCl:Wako、Cat.No.163-0334T、Lot CEQ7122、KH₂PO₄:Wako、Cat.No.169-0425、Lot ELG7616)]で懸濁後、3000 r.p.m.で3分間遠心して上清を除く操作を2回行った。洗浄を終えた細胞を1%BSA(Wako Cat No.013-07492 Lot PKH3483)-PBS溶液で懸濁し、細胞密度を5x10⁶個/mlに調整した。

[0022] 一次抗体として、試験抗体又はリツキサン(陽性コントロール) 15, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 200 ng (1.5～5 μl)を各々、1.5mlチューブ(ビーエム機器、BMリングロックチューブ Cat.No.BM-15)に分注し、同時に抗体を入れないチューブも4本用意した。また、各々の試験抗体あたり3点のサンプルを準備した。そこに、1%BSA(Wako Cat No.013-07492 Lot PKH3483)-PBS溶液で懸濁液を100 μl(細胞数5x10⁵個)ずつ加えて混和し、室温で1時間振とう反応させた。

[0023] 反応後、微量高速冷却遠心機MX-100(TOMY)で室温、3000 r.p.m.3分間遠心分離し、細胞を回収後、細胞の表面に残った未反応の一次抗体を除くため200 μlのPBSで懸濁し、3000 r.p.m.で3分間遠心し上清を除く操作を2回行った。

[0024] 次に細胞に結合した一次抗体を検出するため、細胞と結合した一次抗体に対して過剰量(500ng)のFITC標識抗マウスIgG(H&L)二次抗体[GOAT Anti-mouse IgG(

H&L) Fluorescein conjugated, affinity purified Secondary antibody, Chemicon, Cat. No.AP124F, Lot 24021014] 1% BSA-PBS溶液100 μ l(500ng/100 μ l) を上記細胞に添加・懸濁し、遮光、室温のもと1時間振とう反応した。反応後、3000 r.p.m.で3分間遠心し、細胞を回収後、細胞の表面に残った未反応のFITC標識抗マウスIgG (H&L) 抗体を除くため、200 μ lのPBSで懸濁し3000 r.p.m.で3分間遠心し上清を除く操作を2回行った。

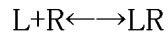
[0025] こうして得た細胞を100 μ l PBSで懸濁し、96ウェル平底プレート(住友ベークライトELISA PLATE Cat.No.8496F)へ移した。二次抗体の蛍光量をTyphoon9210イメージアナライザー(Amersham Bioscience)を用いて、Fluorescence mode, 600v, 526SP/green(532nm)、Focus底面+3mmの検出条件で測定した。この際、FITC標識二次抗体を0, 12.5, 25, 50, 75, 100, 125, 150 ng添加したPBS溶液100 μ lを検量線作成用のコントロールとして用いた。

[0026] 検出後、画像を画像解析ソフトImage Quant (Amersham Bioscience)を使用し、数値化を行った後、Excel (Microsoft)で解析を行った。この際、プレート、PBS溶液、および細胞に非特異的に結合したFITC標識二次抗体に由来するバックグラウンド値として、細胞とFITC標識二次抗体のみを反応させたものの測定値を求め、その4点の平均値を各サンプルの蛍光強度の値から差し引いた。こうして、細胞に結合したFITC標識二次抗体の蛍光量を得た。更に、コントロールとして用いた各濃度のFITC標識二次抗体での蛍光量を測定することで検量線を作成し、細胞に結合している二次抗体の量(モル数または重量)を求めた。各一次抗体とFITC標識二次抗体が1:2の割合で反応していると仮定し、結合している一次抗体量を算出した。また遊離の一次抗体量は添加量から結合量を差し引いて求めた。抗体濃度をモル濃度に換算する際、モノクローナル抗体の分子量を150000とした。

[0027] 添加する一次抗体の増加に伴い結合反応が飽和して蛍光強度が一定量に達することを確認するとともに、細胞表面の抗原数及び解離定数(Kd値)を算出するため、スキッチャード解析(Scatchard, G.; Ann.N.Y.Acad.Sci., 51: 660-672, 1949、分子生物学研究のための新培養細胞実験法; 羊土社、実験医学別冊バイオマニュアルUPシリーズ改訂第2版、212-217参照)を行った。このとき、数値は各サンプルについて3

点の値の平均値を用いた。

[0028] 試験抗体:リガンド(L)と細胞表面抗原:レセプター(R)の結合はリガンド・レセプター複合体(LR)と次の反応式で示される。



遊離リガンド濃度[L]、非結合型レセプター濃度[R]、レセプターと結合したリガンド濃度[LR]として、平衡下での解離定数Kdは

$$Kd = [L][R] / [LR] \cdots I$$

用いるリガンドの全量[L total]は遊離型とレセプターに結合したものとの和になる。

$$[L \text{ total}] = [L] + [LR] \cdots II$$

一方、レセプターも総量[R total]はリガンドに結合していないものと結合したものとの和になる。

$$[R \text{ total}] = [R] + [LR] \cdots III$$

このレセプターの数[R total] (試験抗体の最大結合量)とレセプターとリガンドとの親和性をScatchard解析で推定する。上記I,II,IIIの式を変形、代入すると、

$$[LR] / [L] = - 1 / Kd [LR] + [R \text{ total}] / Kd$$

[LR]をB (bound)、[L]をF (free) で表し、[R total]をB max (定数)で示すと

$$B / F = - 1 / Kd B + Bmax / Kd$$

が得られる。この式はB/Fをy軸にBをx軸にとる一次関数となる。直線の傾きからKd値を

得、y切片からBmaxを得ることができる。Kd値は濃度の次元をもち、低い値ほど高い親和

性を示す。(結合定数Ka = 1/ Kd)

[0029] <結果>

陽性コントロールである市販の抗CD20モノクローナル抗体リツキサン、試験抗体A及び試験抗体Bを用いて親和性測定を行った場合の、イメージアナライザー画像を図2に、飽和曲線を図3に、スキャッチャード(Scatchard)解析の結果を図4に示す。また、上記スキャッチャード解析より

得られた一次関数の傾きより、解離定数(Kd値)を求めた。同様の実験を繰り返し行

い、得られたKd値(平均)は以下のとおりであった。

[0030] [表1]

表1

被検測定抗体	陽性コントロール リツキサン	試験抗体A	試験抗体B
Kd 値 (nM)	6.8	1.3	0.4

産業上の利用分野

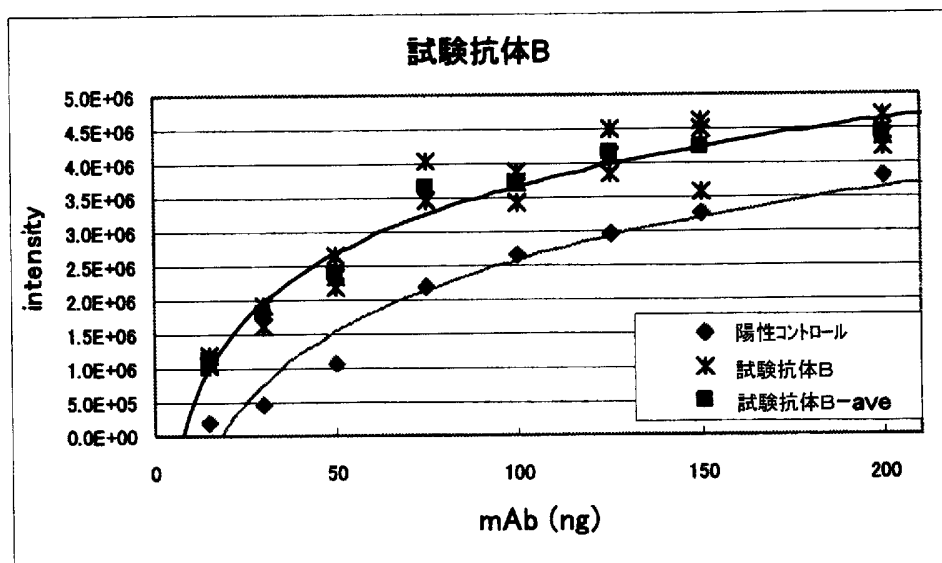
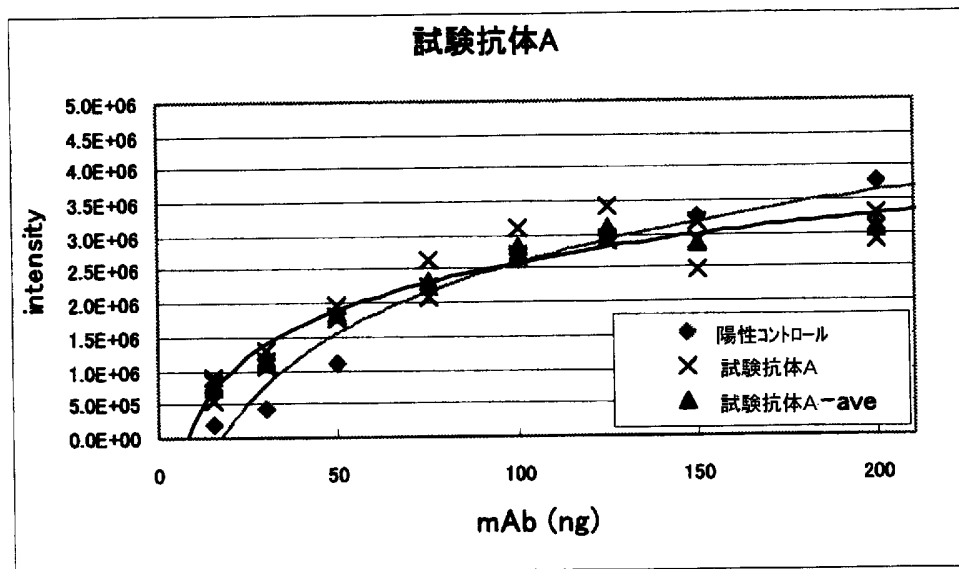
[0031] 本発明の測定法を用いることにより細胞膜表面抗原に対する抗体の親和性を高感度で測定でき、また、これを利用して抗体をアッセイまたはスクリーニングすることができる。本発明の測定法は、造血系細胞の膜表面抗原に結合するモノクローナル抗体の親和性の測定に適しており、ラジオアイソトープ標識を利用した方法に較べて簡便で且つ短時間で試験ができる。

請求の範囲

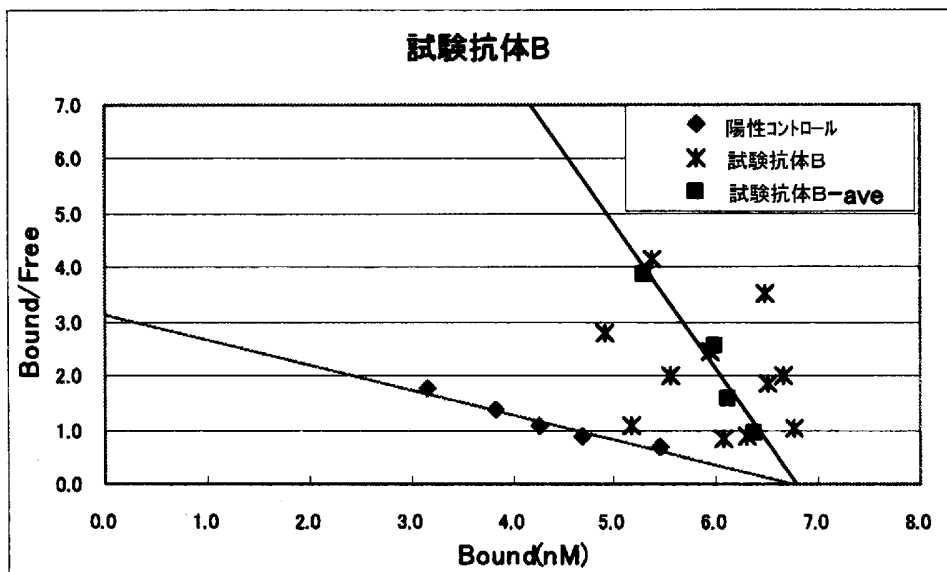
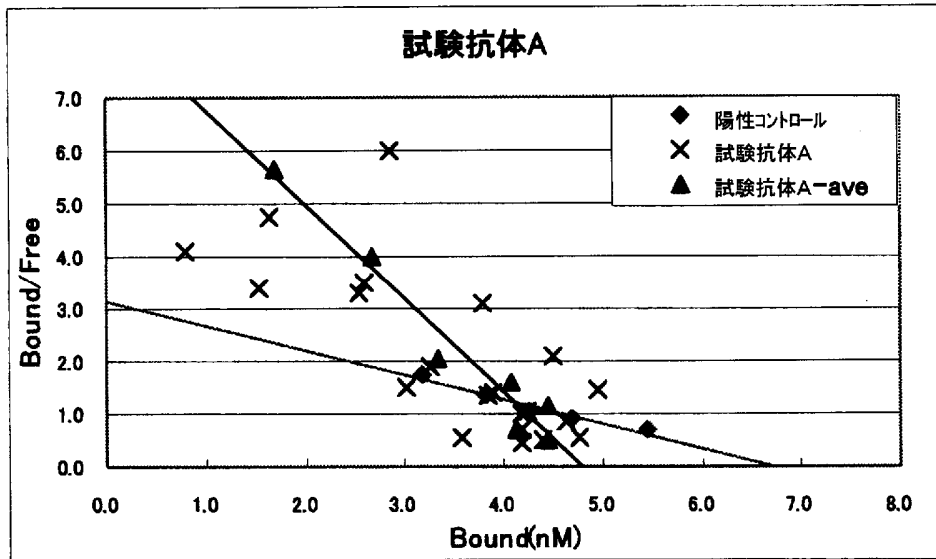
- [1] (a)ヒト造血系浮遊細胞の膜表面抗原に被測定抗体を結合させ、(b)該膜表面抗原に結合した被測定抗体と遊離の被測定抗体を分離し、(c)該膜表面抗原に結合した被測定抗体に、被測定抗体の抗原認識部位とは異なる部位で被測定抗体に結合する物質であって標識された物質を結合させ、(d)該膜表面抗原に結合した被測定抗体に結合した該物質と、遊離の該物質を分離し、(e)該物質の標識を検出することを含む、被測定抗体と膜表面抗原との結合親和性を測定する方法であって、(b)及び(d)の分離を、それぞれ、遠心分離又は細胞を通さないフィルターにより行うことを特徴とする前記方法。
- [2] (b)及び(d)の分離を、遠心分離により行う請求項1に記載の方法。
- [3] (b)及び(d)の分離を、細胞を通さないフィルターにより行う請求項1に記載の方法。
- [4] 細胞が正常動物細胞、ライン化した動物細胞株または遺伝子操作された動物細胞株である請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。
- [5] 請求項1～4のいずれか1項に記載の方法を利用して細胞膜表面抗原に対して結合するモノクローナル抗体をアッセイする方法。
- [6] 請求項1～4のいずれか1項に記載の方法を利用して細胞膜表面抗原に対して結合するモノクローナル抗体をスクリーニングする方法。

[illegible]

[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/306948

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/566(2006.01), **G01N33/15**(2006.01), **G01N33/50**(2006.01)

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)

G01N33/53-33/579(2006.01), **G01N33/15**(2006.01), **G01N33/50**(2006.01)

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2006	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2006

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

JSTPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HONG, K., Simple quantitative live cell and anti-idiotypic antibody based ELISA for humanized antibody directed to cell surface protein CD20, J.Immunol.Methods, Vol.294, No.1 to 2, 2004.11, pages 189 to 197, Materials and methods	1-6
X	GRISWOLD, W.R., Theoretical aspects of screening for high affinity monoclonal antibody to cell surface antigens, Hybridoma, Vol.6, No.2, 1987, pages 191 to 196, RESULTS	1-6
A	JOHNSTONE, R.W., The effect of temperature on the binding kinetics and equilibrium constants of monoclonal antibodies to cell surface antigens, Mol.Immunol., Vol.27, No.4, 1990, pages 327 to 333	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
02 May, 2006 (02.05.06)Date of mailing of the international search report
23 May, 2006 (23.05.06)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/306948

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	JP 2005-185281 A (MBL Venture Capital Co., Ltd.), 14 July, 2005 (14.07.05), (Family: none)	1-6
A	JP 11-332594 A (Asahi Kasei Corp.), 07 December, 1999 (07.12.99), & EP 1083226 A & WO 1999/061629 A	1-6
A	JP 3515101 B2 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 05 April, 2004 (05.04.04), & EP 1296140 A & US 2003/0138870 A1	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N33/566(2006.01), G01N33/15(2006.01), G01N33/50(2006.01)

B. 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 (I P C))

Int.Cl. G01N33/53-33/579(2006.01), G01N33/15(2006.01), G01N33/50(2006.01)

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	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2006年
日本国実用新案登録公報	1996-2006年
日本国登録実用新案公報	1994-2006年

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、調査に使用した用語)

JSTPlus(JDream2)

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 請求の範囲の番号
X	HONG, K., Simple quantitative live cell and anti-idiotypic antibody based ELISA for humanized antibody directed to cell surface protein CD20, J. Immunol. Methods, Vol.294, No.1-2, 2004.11, Page.189-197 Materials and methods	1-6

☒ 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
「L」 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)
「O」 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

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.05.2006

国際調査報告の発送日

23.05.2006

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号100-8915

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

3312

竹中 靖典

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

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 請求の範囲の番号
X	GRISWOLD, W.R., Theoretical aspects of screening for high affinity monoclonal antibody to cell surface antigens, Hybridoma, Vol.6, No.2, 1987, Page.191-196 RESULTS	1-6
A	JOHNSTONE, R.W., The effect of temperature on the binding kinetics and equilibrium constants of monoclonal antibodies to cell surface antigens, Mol. Immunol., Vol.27, No.4, 1990, Page.327-333	1-6
P, A	JP 2 0 0 5 - 1 8 5 2 8 1 A (エムビーエルベンチャーキャピタル株式会社) 2 0 0 5 . 0 7 . 1 4 (ファミリーなし)	1-6
A	JP 1 1 - 3 3 2 5 9 4 A (旭化成工業株式会社) 1 9 9 9 . 1 2 . 0 7 & EP 1083226 A & WO 1999/061629 A	1-6
A	JP 3 5 1 5 1 0 1 B2 (中外製薬株式会社) 2 0 0 4 . 0 4 . 0 5 & EP 1296140 A & US 2003/0138870 A1	1-6