

(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2008-545145

(P2008-545145A)

(43) 公表日 平成20年12月11日(2008.12.11)

(51) Int.Cl.

GO 1 N 33/53 (2006.01)  
 GO 1 N 33/543 (2006.01)  
 GO 1 N 33/574 (2006.01)

F 1

GO 1 N 33/53  
 GO 1 N 33/543  
 GO 1 N 33/574

テーマコード (参考)

D  
5 4 5 A  
A

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 24 頁)

(21) 出願番号 特願2008-519853 (P2008-519853)  
 (86) (22) 出願日 平成18年7月5日 (2006.7.5)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年3月4日 (2008.3.4)  
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2006/006524  
 (87) 國際公開番号 WO2007/003420  
 (87) 國際公開日 平成19年1月11日 (2007.1.11)  
 (31) 優先権主張番号 05014618.2  
 (32) 優先日 平成17年7月6日 (2005.7.6)  
 (33) 優先権主張国 歐州特許庁 (EP)  
 (31) 優先権主張番号 06004447.6  
 (32) 優先日 平成18年3月6日 (2006.3.6)  
 (33) 優先権主張国 歐州特許庁 (EP)

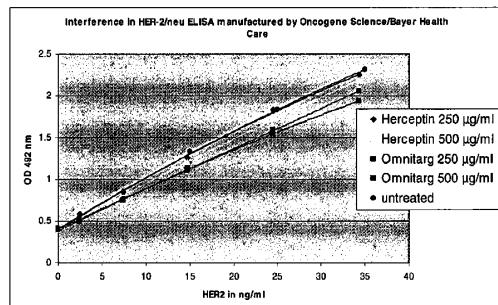
(71) 出願人 591003013  
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー  
 F. HOFFMANN-LA ROCHE  
 E AKTIENGESELLSCHAFT  
 T  
 スイス・シーエイチ-4070バーゼル・  
 グレンツアーヘルストラツセ124  
 (74) 代理人 100099759  
 弁理士 青木 篤  
 (74) 代理人 100077517  
 弁理士 石田 敏  
 (74) 代理人 100087871  
 弁理士 福本 積  
 (74) 代理人 100087413  
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】対応治療抗体の有無を問わない標的抗原の検出

## (57) 【要約】

本発明は治療抗体の分野に関する。本発明は特に、サンプル中の治療抗体の標的抗原を検出する方法であって、a) 解析すべきサンプルを準備する工程、b) 前記サンプルと治療抗体とを、前記治療抗体を前記標的抗原に結合させるのに適切な条件下でインキュベートし、それにより標的抗原-治療抗体複合体を形成させる工程、及びc) 工程 (b) で形成した複合体を検出する工程、を含んで成る方法、に関する。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

サンプル中の治療抗体の標的抗原を検出する方法であって、  
a ) 解析すべきサンプルを準備する工程、  
b ) 前記サンプルと治療抗体とを、前記治療抗体を前記標的抗原に結合させるのに適切な条件下でインキュベートし、それにより標的抗原 - 治療抗体複合体を形成させる工程、及び  
c ) 工程 ( b ) で形成した複合体を検出する工程、  
を含んで成る方法。

**【請求項 2】**

前記検出が、イムノアッセイにより実施される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記イムノアッセイがサンドイッチャイムノアッセイであることを更に特徴とする、請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記治療抗体がヒト又はヒト化抗体であることを更に特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記ヒト又はヒト化抗体がモノクローナル抗体であることを更に特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記治療抗体が Avastin (登録商標)、Herceptin (登録商標)、Mabthera (登録商標)、Omnitarg (登録商標)、及びZenapax (登録商標) から成る群から選択される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記標的抗原が、HER2、CD20、及びインターロイキン - 2 受容体から成る群から選択される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 8】**

治療抗体が存在しているサンプル中の当該治療抗体の標的抗原を検出する方法であって、

a ) 解析すべきサンプルを準備する工程、  
b ) 前記サンプルと治療抗体とを、前記治療抗体を前記標的抗原に結合させるのに適切な条件下でインキュベートし、それにより標的抗原 - 治療抗体複合体を形成させる工程、及び  
c ) 工程 ( b ) で形成した複合体を検出する工程、  
を含んで成る方法。

**【請求項 9】**

治療抗体による治療を受けている患者から得たサンプル中の当該治療抗体の標的抗原を検出する方法であって、

a ) 解析すべきサンプルを準備する工程、  
b ) 前記サンプルと治療抗体とを、前記治療抗体を前記標的抗原に結合させるのに適切な条件下でインキュベートし、それにより標的抗原 - 治療抗体複合体を形成させる工程、及び  
c ) 工程 ( b ) で形成した複合体を検出する工程、  
を含んで成る方法。

**【請求項 10】**

患者のフォローアップにおける請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法の使用。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

10

20

30

40

50

本発明は、対応治療抗体の有無に関係なく標的抗原を検出する方法に関する。本発明は特に、相当の治療抗体の存在下での標的抗原の測定に関する。本発明は、サンプル中の治療抗体の標的抗原を検出する方法であって、a) 解析すべきサンプルを準備する工程、b) 前記サンプルと治療抗体とを、前記治療抗体を前記標的抗原に結合させるのに適切な条件下でインキュベートし、それにより標的抗原-治療抗体複合体を形成させる工程、及びc) 工程(b)で形成した複合体を検出する工程、を含んで成る方法、を開示する。本発明はまた、患者のフォローアップにおける前記方法の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

1974年のKohlerとMilsteinによる最初のモノクローナル抗体の開発以来、ヒトの治療にとって適切な抗体の開発に多大な努力が傾けられてきた。利用可能になった最初のモノクローナル抗体は、マウス及びラットで開発された。これらの抗体は、ヒトの治療に使用する場合、抗げっ歯類抗体に起因する不所望な副作用をもたらした。かかる不所望な副作用の軽減、また、更にはその除去に対して、多大な努力が傾けられてきた。

10

【0003】

過去10年間、益々多くのヒトモノクローナル抗体又はヒト化モノクローナル抗体が市場に届けられている。周知の例としては、例えば、Hoffmann-La Roche社(バーゼル)のHerceptin(登録商標)及びMabthera(登録商標)がある。

20

【0004】

極めて多くの数のヒトモノクローナル抗体又はヒト化モノクローナル抗体が開発中であり、そして、ヒトへの参加が最初の試験目的について考慮することができる前に、実験動物で研究される必要がある。

【0005】

治療用のモノクローナル抗体は、典型的には、約1ng/ml～約100μg/mlに及ぶ血清レベルで使用されなければならない。従って、治療抗体は、治療計画の間の少なくとも幾つかの時点で、極めて高濃度、例えば対応する標的抗原の濃度と同程度の高さ又はそれよりも高い濃度で存在する。

30

【0006】

標的抗原自体の正確な測定は、治療後、特に対応治療抗体による治療後の患者のフォローアップにおいて特に、非常に重要であると考えられている。治療計画の経過中治療抗体の濃度は大幅に変化するので、かかる治療抗体についての、その対応する標的抗原の測定のために設定されているアッセイにおけるあらゆる干渉は前記標的抗原についての偽の測定結果をもたらすことがあり、そしてその可能性が非常に高い。

【0007】

標的抗原のレベルは、任意の適切な方法によって検出されうる。臨床ルーチンにおいて、かかる方法は、多くの場合、標的抗原に対する抗体を利用してあり、これはいわゆるイムノアッセイである。高濃度及び/又は可変濃度の治療抗体は、その標的抗原のレベルを測定するために使用されるイムノアッセイに干渉することがある。

40

【0008】

当業者が容易に理解するように、治療抗体自体をその対応する標的抗原の検出において使用することは、可能ではないか、若しくは少なくとも容易な仕事ではない。治療抗体及びイムノアッセイで使用される抗体の少なくとも1つが標的抗原の同一エピトープと結合する場合、この様な困難にしばしば直面する。この事実が周知であり、且つ広く受け入れられているのに対し、今回、驚くべきことに、治療抗体が、対応する標的抗原についてのイムノアッセイに使用される1又は複数の抗体と結合されないエピトープと結合する場合であっても、標的抗原のイムノアッセイが治療抗体の存在又は不在によって損なわれることがあるということが明らかとなった。

【0009】

Jilaniらは(Jilani, I., et al., Blood 1032 (2003) 3514-3520)、細胞表面上

50

でリツキシマブを検出するために、リツキシマブのマウス配列を特異的に検出し、且つヒト IgG と交差反応しない抗体を使用したことを報告した。WO 03/024993においては、治療抗体：抗原の複合体、可溶性抗原、遊離している治療抗体及び可溶性の総合的な治療抗体を検出し、モニタリングする方法が報告されている。

## 【0010】

本発明の課題は、サンプル中の治療抗体の標的抗原を検出する方法が改善されうるかを調査することである。そのような方法は、対応治療抗体が存在するか否かに關係なく標的抗原の濃度についての真正な値をもたらすはずであり、そして連続測定、例えば患者のフォローアップにおける連続測定に役に立つはずである。

## 【0011】

かかる課題は、以下の項目及び実施例で説明し、特許請求の範囲に記載の発明によって解決された。

## 【0012】

## 本発明の要約

本発明は、サンプル中の治療抗体の標的抗原を検出する方法であって、

a) 解析すべきサンプルを準備する工程、

b) 前記サンプルと治療抗体とを、前記治療抗体を前記標的抗原に結合させるのに適切な条件下でインキュベートし、それにより標的抗原-治療抗体複合体を形成させる工程、及び

c) 工程b)で形成した複合体を検出する工程、

を含んで成る方法、を含んで成る。

## 【0013】

## 本発明の詳細な説明

第一の態様において、本発明は、サンプル中の治療抗体の標的抗原を検出する方法であって、a) 解析すべきサンプルを準備する工程、b) 前記サンプルと治療抗体とを、前記治療抗体を前記標的抗原に結合させるのに適切な条件下でインキュベートし、それにより標的抗原-治療抗体複合体を形成させる工程、及びc) 工程b)で形成した複合体を検出する工程、を含んで成る方法、に関する。

## 【0014】

用語「標的抗原」は、その対応治療抗体と結合している生体分子に関する。例としては、HER2 (= Erbb2 又は p185<sup>new</sup>)に対する治療抗体、例えばHerceptin (登録商標) 又はOmnitarg (登録商標)の標的抗原はHER2であり、CD52に対する治療抗体、例えばCampath (登録商標)の標的抗原はCD52であり、EGFrに対する治療抗体、例えばErbitux (登録商標)の標的抗原はEGFrであり、CD33に対する治療抗体、例えばMylotarg (登録商標)の標的抗原はCD33であり、Tag-72に対する治療抗体、例えばOncosint (登録商標)の標的抗原はTag-72であり、17-1Aに対する治療抗体、例えばPanorex (登録商標)の標的抗原は17-1Aであり、CD20に対する治療抗体、例えばRituxan (登録商標)、MabThera (登録商標)、又はZevalin (登録商標)の標的抗原はCD20であり、CD25に対する治療抗体、例えばZenapax (登録商標)の標的抗原はCD25である。標的抗原は、可溶性の、すなわち分泌又は流出(shed)される、標的抗原でも、又は(細胞)膜結合型標的抗原でもよい。

## 【0015】

別の態様において、工程b)で形成した前記標的抗原-治療抗体複合体は、その総合的な標的抗原が前記治療抗体により複合体化されることにより形成される。

## 【0016】

用語「可溶性標的抗原」は、本願において使用する場合、治療抗体の膜結合型標的抗原の可溶性型、すなわち分泌型又は流出(shed)型を表す。治療抗体は、大部分、細胞表面抗原、例えば癌細胞の細胞表面抗原であって、それらが結合するもの、に対するものである。細胞表面抗原の膜結合型変異体に加え、当該抗原の、分泌型又は流出型、すなわち可溶

10

20

30

40

50

性の変異体は、細胞によって産生されうる。可溶性標的抗原は、罹患者の体液で見ることができる。「可溶性標的抗原」は、膜結合型抗原の分泌型又は流出型変異体であり、それにより、この可溶性変異体は膜結合型抗原の細胞外ドメインの少なくとも一部と同一のアミノ酸配列及び同一の二次構造を有しており、そのため、(膜結合型)標的抗原の細胞外ドメインに対する抗体は前記可溶性標的抗原に結合することができる。

## 【0017】

別の態様において、前記標的抗原は可溶性標的抗原である。

## 【0018】

用語「エピトープ」は、本発明で使用する場合、抗体と特異的に結合することができるタンパク質の決定基を表す。エピトープは、通常、アミノ酸又は糖の側鎖等の化学的に活性な表面分子群から成り、そして特異的な電荷特性同様、通常特異的な三次元構造特性を有する。コンフォーメーションアルエピトープとノンコンフォーメーションアルエピトープとは、前者との結合は変性溶媒の存在下失われるが、後者とはそうではない点で区別される。エピトープが属する抗原のサイズにより、抗原1つ当たり複数のエピトープが利用可能なことがあります、これにより、同様に抗原1つ当たり複数の抗体結合部位(=エピトープ)の可能性も生じる。

10

## 【0019】

「サンプル」とは、本発明によれば、実験動物、好ましくは哺乳類から取り出した任意の組織又は液体であってもよい。好ましくは、サンプルは、唾液、尿、全血、血漿又は血清のような液体である。好ましくは、サンプルは、無細胞サンプル、すなわち、膜結合型標的抗原を有する細胞を含まないサンプルである。

20

## 【0020】

標的抗原がその対応「治療抗体」と結合するのに適切な条件は当業者に周知であるか、又は容易に決定することができる。これらの条件のもと、治療抗体は、膜結合型又は可溶性変異体のいずれかの標的抗原と結合し、そして標的抗原と治療抗体との免疫学的複合体が形成され、標的抗原-治療抗体-複合体が生じる。この複合体は、任意の適当な手段によって検出することができる。

20

## 【0021】

好ましい態様において、標的抗原-治療抗体-複合体は、イムノアッセイを用いて検出される。使用されるイムノアッセイは、好ましくは異種イムノアッセイである。標的抗原-治療抗体-複合体の検出を競合イムノアッセイ又はいわゆるサンドイッチイムノアッセイを用いて実施することも好ましい。

30

## 【0022】

当業者は、全く問題なくイムノアッセイをセットアップして、標的抗原-治療抗体-複合体に存在するような標的抗原を検出することができる。一例として、かかる検出は、抗体が捕捉抗体として使用され、これが治療抗体のエピトープと重複しないエピトープにおいて標的抗原と結合する、サンドイッチタイプのイムノアッセイにおいて実施されうる。標的抗原-治療抗体-複合体の検出のために、標的抗原に対する二次抗体又は検出抗体であって、前記治療抗体でも捕捉抗体でも認識されないエピトープと結合する抗体を使用するのが好ましい。

40

## 【0023】

好ましくは、検出抗体-標的抗原-治療抗体-複合体のサンドイッチを形成することができる検出抗体が使用される。前記第二抗体又は検出抗体は、好ましくは、直接的又は間接的な検出が容易となるように標識される。

## 【0024】

直接検出のために、標識基は、任意の既知の検出マーカー基、例えば色素、蛍光標識基、例えばケミルミネセンス基、例えばアクリジニウムエステル又はジオキセタン、あるいは蛍光色素、例えばフルオレセイン、クマリン、ローダミン、オキサジン、レゾルフィン、シアニン及びそれらの誘導体から選択することができる。他の標識基の例として、発光金属複合体、例えばルテニウム又はユーロピウム複合体、酵素、例えばE L I S A又はC

50

EDIA(クローン化酵素ドナーイムノアッセイ、例えばEP0061888)に使用されるものがある。

【0025】

間接的な検出系には、例えば検出試薬、例えば検出抗体が、バイオアフィン(bioaffine)結合対の第一のパートナーで標識されるものが含まれる。適当な結合対の例には、ハプテン又は抗原/抗体、ビオチン又はビオチン類自体、例えばアミノビオチン、イミノビオチン又はデスチオビオチン/アビジン又はストレプトアビジン、糖/レクチン、核酸又は核酸類自体/相補核酸、及び受容体/リガンド、例えばステロイドホルモン受容体/ステロイドホルモンがある。好ましい第一結合対のメンバーは、ハプテン、抗原及びホルモンを含んで成る。特に好ましいのは、ハプテン、例えばジゴキシン、ジゴキシゲニン及びビオチン並びにそれらの類似体である。かかる結合対の第二のパートナー、例えば抗体、ストレプトアビジン等が、通常直接検出を可能にするために、上文で言及した標識で標識される。

10

【0026】

イムノアッセイは当業者に周知である。かかるアッセイを実施するための方法並びに実際の適用及び手順は、関連の教科書に要約されている。関連の教科書の例には、Tijssen, P., Preparation of enzyme- antibody or other enzyme-macromolecule conjugates, in: Practice and theory of enzyme immunoassays, Burdon, R.H. and v. Knippenberg, P.H. (eds.), Elsevier, Amsterdam (1990) pp. 221-278; 及び免疫学的検出方法を扱っているMethods in Enzymology, Colowick, S.P. and Caplan, N.O. (eds.), Academic Pressの各種の巻、特にvolume 70, 73, 74, 84, 92及び121、がある。

20

【0027】

上記の全ての免疫学的検出方法において、試薬条件は、用いる試薬の結合を、例えば抗体がその対応する抗原に結合するのを可能にするものが選択される。本発明により検出される標的抗原-治療抗体-複合体は、技術水準の手順により、膜結合型又は可溶性型のいずれかの相当の濃度に補正される。

20

【0028】

治療抗体によって認識されないエピトープにおいて標的抗原と結合する1又は複数の抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、これらの抗体のフラグメント、並びに前記抗体の結合ドメインを含んで成る遺伝子コンストラクト、であってもよい。適切な抗体フラグメントも使用することができる。抗体並びに抗体フラグメントは、技術水準の手順、例えばTijssenにより記載されているもの(Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassays 11 (1990)の全体、特にpp. 43-78(Elsevier, Amsterdam))によって生成される。

30

【0029】

用語「治療抗体」は、ヒトに使用することが意図されている任意の抗体調製物に関する。好ましくは、そのような治療抗体はモノクローナル抗体である。更に好ましくは、そのようなモノクローナル抗体は、大型類人猿から得られるか、あるいはヒトモノクローナル抗体又はヒト化抗体である。好ましくは、ヒトモノクローナル抗体である。そのような治療用モノクローナル抗体はヒト化モノクローナル抗体であることが更に好ましい。

40

【0030】

用語「モノクローナル抗体」は、本明細書で使用する場合、実質的に同種抗体群から得られる抗体を指し、すなわち、当該群が含んで成る個々の抗体は、僅かな量存在することがある、可能性のある天然の突然変異を除き同一である。モノクローナル抗体は、一つの抗原部位に対して高度に特異的である。更に、異なる抗原決定基(エピトープ)に対し異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物と対照的に、各モノクローナル抗体は、その抗原上の1つの決定基に対するものである。それらの特異性に加え、モノクローナル抗体は、他の抗体により汚染されていない状態で作ることができる点で遊離である。「モノクローナル」の修飾語は、実質的に同種の抗体群から得られるような抗体の特徴を指し、そして何か特別の方法により抗体を産生することを要件とするとは解されない。例えば、本発

50

明に使用するモノクローナル抗体は、Kohler, G., et al., *Nature* 256 (1975) 495-497に最初に記載されたハイブリドーマ法によって作られることもあるが、組換えDNA法により作られることもある（例えば、US 4,816,567を参照のこと）。「モノクローナル抗体」は、例えば、Clackson, T., et al., *Nature*, 352 (1991) 624-628 and Marks, J. D., et al., *J. Mol. Biol.* 222 (1991) 581-597に記載の技術を用いて、ファージ抗体ライブラリーから単離してもよい。

#### 【0031】

非ヒト（例えばげっ歯類）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒトイムノグロブリン及びヒトイムノグロブリン由来の部分配列を含むキメラ抗体である。その大部分について、ヒト化抗体は、ヒトイムノグロブリン（レシピエント抗体）由来であり、当該レシピエントの超可変領域由来の残基は、ヒト以外の種（ドナー抗体）、例えばマウス、ラット、ウサギ又はヒト以外の靈長類の超可変領域由来の残基であって、所望の特異性及び親和性を有するものに置換されている。場合によって、ヒトイムノグロブリンのフレームワーク領域（FR）残基は、相当の非ヒト残基によって置換されている。更に、ヒト化抗体は、追加の修飾、例えば、レシピエント抗体又はドナー抗体には見られないアミノ酸残基を含んで成ることもある。かかる修飾は、相当の親配列と相同であるが同一ではない、レシピエント又はドナー抗体の変異体をもたらす。これらの修飾は、抗体の性能を更に洗練させるために行われる。通常、ヒト化抗体は、少なくとも1つの、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含んで成り、ここで、超可変ループの全て又は実質的に全てが、非ヒトドナー抗体のものに対応し、そしてRFの全て又は実質的に全てがヒトレシピエント抗体のものである。ヒト化抗体は任意に、イムノグロブリンの定常領域（Fc）、典型的にはヒトイムノグロブリンの定常領域の少なくとも一部も含んで成る。

10

20

30

#### 【0032】

非ヒト抗体をヒト化する方法は当業界で説明されている。好ましくは、ヒト化抗体は、ヒト以外の供給源から導入された1又は複数のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「輸入」残基と称され、これは、典型的には「輸入」可変ドメインから取られる。ヒト化は、本質的には、Winter及びその共同研究者の方法（Jones, P. T., et al., *Nature* 321 (1986) 522-525; Riechmann, L., et al., *Nature* 332 (1988) 323-327; Verhoeyen, M., et al., *Science* 239 (1988) 1534-1536; 及びPresta, L. G., *Curr. Op. Struct. Biol.* 2 (1992) 593-596）に従い、超可変領域に相当のヒト抗体配列を置き換えることで実施することができる。従って、かかる「ヒト化」抗体はキメラ抗体であり（US 4,816,567）、ここで、実質的に無傷でないヒト可変ドメインは、ヒト以外の種由来の対応する配列によって置換されている。実際には、ヒト化抗体は典型的にヒト抗体であって、幾つかの超可変領域残基、場合により幾つかのFR残基が、げっ歯類抗体の類似部位由来の残基によって置換されているものである。

30

#### 【0033】

ヒト化抗体をつく得るのに使用される、ヒト可変ドメインの選択は、軽鎖及び重鎖とともに、抗原性を減少させるのに非常に重要である。いわゆる「ベストフィット」法によると、げっ歯類抗体の可変ドメインの配列は、既知のヒト可変ドメイン配列の全ライブラリーに対しスクリーニングされる。このげっ歯類のものに最も近いヒト配列が、ヒト化抗体のためのヒトフレームワーク領域として受け入れられる（Sims, M. J., et al., *J. Immunol.* 151 (1993) 2296-2308; Chothia, C, et al., *J. Mol. Biol.* 196 (1987) 901-917）。別の方法は、軽鎖又は重鎖の特定の亜集団の全てのヒト抗体の共通配列由来の特定のフレームワーク領域を使用する。同一のフレームワークを複数の異なるヒト化抗体に使用してもよい（Carter, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; Presta, L. G., et al., *J. Immunol.* 151 (1993) 2623-2632）。

40

#### 【0034】

イムノグロブリンは、例えば、ヒト、マウス、又はラットポリペプチドに対し生成することができる。標的抗原を特異的に認識する、ポリクローナルであるか、又はモノクローナルである、イムノグロブリンは本発明の範囲内である。かかるイムノグロブリンは、当

50

業者に既知の標準的な免疫学的技術を用いて產生される。イムノグロブリンは、ポリクローナルでもモノクローナルでもよく、あるいは、ヒト化抗体のために、組換え的に產生してもよい。抗体が既知の治療抗体と同一のエピトープに結合していないことを確認することは競合試験系で容易に決定することができる。

【0035】

同一の標的抗原と結合する2つの抗体が、可能性としてエピトープを重複していることは、競合試験系を用いて検出することができる。このために、例えば、酵素イムノアッセイを用いて、新規抗体が、固定化標的抗原との結合について機知の抗体と競合する程度に試験される。この目的のために、適切に固定化された標的抗原は、標識された基地の抗体及び且つ過剰の問題の抗体と一緒にインキュベートされる。結合した標識の検出により、問題の抗体が既知の抗体を結合部位(=エピトープ)から置換することができる程度にまで容易に確認することができる。既知の抗体と称される、問題の抗体と同一濃度又はより高濃度で、好ましくは10<sup>5</sup>倍過剰の濃度で、多くて20%、好ましくは多くて10%の置換がある場合、エピトープ重複は存在しない。

10

【0036】

ヒト化治療抗体の周知の例には、いわゆるErbb2抗体、例えばhuMab4D5-1、huMab4D5-2、huMab4D5-3、huMab4D5-4、huMab4D5-5、huMab4D5-6、huMab4D5-7及びhuMab4D5-8(HERCEPTIN(登録商標))であって、明示的に本明細書に援用されるUS5,821,337の表3に記載のもの；並びにヒト化520C9(WO93/21319に記載のもの)及びPCT/US03/21590に記載のヒト化2C4抗体がある。

20

【0037】

好ましくは、本発明の方法で使用する治療抗体は、Campath(登録商標)、Erbitux(登録商標)、Herceptin(登録商標)、MabThera(登録商標)、Mylotarg(登録商標)、Oncoscent(登録商標)、Omnitarg(登録商標)、Panorex(登録商標)、Rituxan(登録商標)、Zevalin(登録商標)及びZenapax(登録商標)から成る群から選択され、好ましくはHerceptin(登録商標)、MabThera(登録商標)、Omnitarg(登録商標)及びZenapax(登録商標)から成る群から選択される。

30

【0038】

Zevalin(登録商標)は、イブリツモマブとして知られている治療抗体の商品名である。この治療抗体は、CD20と結合するモノクローナル抗体をベースとするものであり、B細胞非ホジキンリンパ腫の治療についてFDAに認可されている。

【0039】

Rituxan(登録商標)は、リツキシマブとして知られている治療抗体の商品名である。この治療抗体は、CD20と結合するモノクローナル抗体をベースとするものであり、B細胞非ホジキンリンパ腫の治療についてFDAに認可されている。

40

【0040】

Panorex(登録商標)は、エドレコロマブとして知られている治療抗体の商品名である。この治療抗体は、17-1A抗原(Ep-CAM)と結合するものであり、結腸直腸癌の治療について認可されている。

【0041】

Oncoscent(登録商標)は、サツモマブとして知られている治療抗体の商品名である。この治療抗体は、汎性癌抗原Tag-72と結合するものであり、結腸及び卵巣癌の治療について認可されている。

【0042】

Mylotarg(登録商標)は、ゲムツズマブとして知られている治療抗体の商品名である。この治療抗体は、CD33と結合するモノクローナル抗体をベースとするものであり、骨髓性白血病の治療についてFDAに認可されている。

【0043】

50

Erbitux (登録商標) は、セツキシマブとして知られている治療抗体の商品名である。この治療抗体は、上皮増殖因子受容体因子受容体 (E F T r) と結合するものであり、結腸直腸癌の治療について認可されている。

【0044】

Campath (登録商標) は、アレムツズマブとして知られている治療抗体の商品名である。この治療抗体は、CD52と結合するモノクローナル抗体をベースとするものであり、慢性リンパ性白血病の治療についてFDAに認可されている。

【0045】

Herceptin (登録商標) は、トラスツズマブとして知られている治療抗体の商品名である。この治療抗体は、モノクローナル抗体4D5をベースとするものである。これはHER2と結合する。HER2はerbB2又はp185<sup>neu</sup>としても知られている。Herceptin (登録商標) は、肺癌を有するHER2-陽性患者の生存に陽性の結果を有することが証明されている(De Laurentiis, M., et al., Ann. Oncol. 16 (2005) iv7-iv13)。

10

【0046】

MabThera (登録商標) は、リツキシマブとして知られている治療抗体の商品名である。この治療抗体は、CD20と結合するモノクローナル抗体をベースとするものである。MabThera (登録商標) は、緩慢性で且つ侵攻性の非ホジキンリンパ腫に罹患している患者の生存に陽性の結果を有することが証明されている(Di Bella, N., et al., Cancer 103 (2005) 978-984)。

20

【0047】

Omnitarg (登録商標) は、HERと結合する新規治療抗体ペルツズマブの商品名である。これはモノクローナル抗体2C4をベースとするものである。2C4及び4D5は、HER2の異なるエピトープと結合する。Omnitarg (登録商標) は現在臨床試験中である。これは、肺癌を有するHER2-過剰発現陰性患者の生存に陽性の結果を有することが期待されている(Badache, A., et al., Cancer Cell 5 (2004) 299-301)。

。

【0048】

Zenapax (登録商標) は、インターロイキン-2と結合する治療抗体の商品名である。これは、腎移植のレシピエントの拒絶が低下、及び患者の生存の向上に関連している(Morris, J.A., et al., Clin. Transplant. 19 (2005) 340-345)。

30

【0049】

本発明の方法で検出される標的抗原は、HER2、インターロイキン-2受容体、IGF-1R、EGFr、Tag-72、17-1A、CD52、CD25、CD33又はCD20から成る群、好ましくはHER2、インターロイキン-2受容体、IGF-1R、及びCD20から成る群、好ましくはHER2、インターロイキン-2受容体、又はCD20から成る群から選択される。

【0050】

上文で言及したように、本発明者は、エピトープと結合する治療抗体だけでなく、当該エピトープと結合する、対応する標的抗原を検出するためのアッセイにおいて使用される抗体も当該アッセイを干渉することを見出した。干渉は、標的抗原上の非重複エピトープに対する抗体を用いるアッセイ方法においては生じても差し支えなく、観察されている。本実施例の項目で提示した具体的な観察は、HER2抗原と、この標的抗原と結合する2つの異なる治療抗体についてのアッセイにより行われてきた。しかしながら、他の標的抗原の正確な定量においても同様であることが予想されなければならない。実施例は、HER2に対する異なる抗体、すなわちHerceptin (登録商標) 及びOmnitarg (登録商標) の両方について、本発明の方法が適用でき、そして標的抗原HER2は、研究されるサンプル中の対応治療抗体の存在又は不在とは無関係に容易に測定することができるることを証明する。

40

【0051】

50

1つの態様において、治療抗体は Herceptin (登録商標) であり、捕捉抗体は Omnitarg (登録商標) であり、そして検出抗体は抗 ErbB2 抗体 7C2 である。

【0052】

別の態様において、治療抗体は Omnitarg (登録商標) であり、捕捉抗体は Herceptin (登録商標) であり、そして検出抗体は抗 ErbB2 抗体 7C2 である。

【0053】

Herceptin (登録商標)、Omnitarg (登録商標)、及び抗 ErbB2 抗体 7C2 は、HER2 抗原の異なるエピトープと結合する、抗 ErbB2 抗体 7C2 は、例えば、ErbB2 の N 末端の領域にあるエピトープを認識する (例えば、WO 98/17797 を参照のこと)。 10

【0054】

本発明の方法の一態様において、工程 b ) で形成した標的抗原 - 治療抗体複合体が形成されると、サンプル中の標的抗原がすべて前記治療抗体と複合体化される。

【0055】

本発明は、サンプル中の治療抗体の標的抗原を検出する方法であって、

a ) 解析すべきサンプルを準備する工程、

b ) 前記サンプルと治療抗体とを、前記治療抗体を前記標的抗原に結合させるのに適切な条件下でインキュベートし、それにより標的抗原 - 治療抗体複合体を形成させる工程、及び 20

c ) 工程 b ) で形成した複合体を検出する工程、

を含んで成る方法、を含んで成る。

【0056】

標的抗原の信頼性のある測定は、干渉治療抗体を含んで成るあらゆるサンプルについて非常に有利なものである。従って、好ましい態様において、本発明は、治療抗体が存在しているサンプル中の当該治療抗体の標的抗原を検出する方法であって、a ) 解析すべきサンプルを準備する工程、b ) 前記サンプルと治療抗体とを、前記治療抗体を前記標的抗原に結合させるのに適切な条件下でインキュベートし、それにより標的抗原 - 治療抗体複合体を形成させる工程、及び c ) 工程 b ) で形成した複合体を検出する工程、を含んで成る方法、に関する。 30

【0057】

本発明の方法はまた、治療抗体を受ける患者のフォローアップに非常に有益なものである。従って、好ましい態様において、本発明は、治療抗体による治療を受けている患者から得たサンプル中の治療抗体の標的抗原を検出する方法であって、a ) 解析すべきサンプルを準備する工程、b ) 前記サンプルと治療抗体とを、前記治療抗体を前記標的抗原に結合させるのに適切な条件下でインキュベートし、それにより標的抗原 - 治療抗体複合体を形成させる工程、及び c ) 工程 b ) で形成した複合体を検出する工程、を含んで成る方法、に関する。

【0058】

対応する標的抗原の正確な決定は、好ましい態様において、治療の有効性を評価するのに有用であろう。更に好ましい態様において、本発明の方法は、基礎疾患の再発を評価するのに役立つであろう。 40

【0059】

概して、臨床医は、治療抗体による治療を受けている患者のフォローアップの有益な情報を、本明細書で提示する方法を使用することで導き出することもできる。従って、本発明はまた、上文で提示したような方法を、患者のフォローアップにおいて使用することにも関連する。

【0060】

提案する説明に縛られることを望むものではないが、治療抗体がその標的抗原に結合することが、例えば、他のエピトープの立体構造、及び / 又は、標的抗原 - 治療抗体複合体 50

に存在するようなこれらのエピトープに対する他の抗体の結合特性、に影響することもある。好ましくは、本発明の方法は、イムノアッセイにおいて使用されるような抗体及び治療抗体の標的抗原上のエピトープが、それぞれ重複しない場合であっても、使用される。

【0061】

1つの態様において、本発明の方法はチップ上で実施される。

【0062】

「チップ」は、固体の非多孔性材料、例えば金属、ガラス又はプラスチックである。当該材料は、任意に、全体的に、又はある領域においてコーティングしてもよい。前記材料の表面上で、任意のスポットアレイが、可視で又は座標内に存在することもあれば、あるいは存在している。各スポット上に、既定のポリペプチドが、前記材料へのリンカー又はスペーサーと一緒に、又はそれら無しで、固定化されうる。好ましくは、固定化されたポリペプチドは、標的抗原と結合することができる抗体の少なくともフラグメントである。

10

【0063】

以下の実施例及び図面は、本発明の理解を助けるために提供するものであり、この真の範囲は請求の範囲に記載されている。本発明の精神を逸脱することなく、記載した手順を変更することもできると解される。

【0064】

略語

B i	ビオチン	
E D T A	エチレンジアミン四酢酸	20
E L I S A	酵素結合性免疫吸着アッセイ	
F c y ( = F c )	イムノグロブリンの F c ガンマ - フラグメント	
D I G ( D i g )	ジゴキシゲニン	
h u , H	ヒト	
I g G	イムノグロブリン G	
n . d .	規定されていない	
N S C L C	非小細胞肺癌	
O D	光学密度	
M A K ( = M a b )	モノクローナル抗体	
P A K ( = P a b )	ポリクローナル抗体	30
R	ウシ ( R i n d )	
R P L A	ウシ血漿アルブミン	
R T	室温	
T A P S	N - トリス ( ヒドロキシメチル ) メチル - 3 - アミノプロパン	
スルホン酸		
V E G F	血管内皮細胞増殖因子	

【実施例】

【0065】

H E R 2 の市販のアッセイ

a ) Oncogene Science / Bayer Health Care LLC によって製造された H E R - 2 / neu E L I S A ( カタログ番号 DAKO Cytom ation E L 5 0 1 1 )

40

インキュベーション及び洗浄工程は、取り扱い説明書に従い実施した。35、25、15、7.5、2.5、及び 0 ng / ml の H E R 2 のスタンダードを、500、250、0 μg / ml の Herceptin ( 登録商標 ) でスパイクし、あるいはそれらを 500、250、0 μg / ml のの Omnitarg ( 登録商標 ) でそれぞれスパイクした。これらのサンプルを、コーティングされたマイクロタイプレート上でインキュベートした。検出抗体を添加してインキュベートした後、基質を添加し、そして吸光度を 492 nm で読み取った。結果を表 1 に示す。

50

【0066】

表 1

干渉治療抗体を用いて、又は用いずに測定したサンプル中の光学密度(OD)

【表 1】

スパイク用スタンダード	c (HER2) (ng/ml)	OD 492nm	ブランクで 補正したOD	未スパイクの スタンダード との差異
Herceptin (登録商標) 250 μg/ml	34.3	2.246	1.833	3.5%
Herceptin (登録商標) 250 μg/ml	24.5	1.829	1.416	0.1%
Herceptin (登録商標) 250 μg/ml	14.7	1.263	0.850	7.8%
Herceptin (登録商標) 250 μg/ml	7.4	0.853	0.440	-3.0%
Herceptin (登録商標) 250 μg/ml	2.5	0.580	0.167	-25.6%
Herceptin (登録商標) 250 μg/ml	0	0.396	-0.017	n. d.
Herceptin (登録商標) 500 μg/ml	33.6	2.184	1.771	6.8%
Herceptin (登録商標) 500 μg/ml	24	1.726	1.313	7.3%
Herceptin (登録商標) 500 μg/ml	14.4	1.204	0.791	14.2%
Herceptin (登録商標) 500 μg/ml	7.2	0.798	0.385	9.8%
Herceptin (登録商標) 500 μg/ml	2.4	0.514	0.101	24.1%
Herceptin (登録商標) 500 μg/ml	0	0.395	-0.018	n. d.
Omnitarg (登録商標) 250 μg/ml	34.3	2.056	1.643	13.5%
Omnitarg (登録商標) 250 μg/ml	24.5	1.591	1.178	16.9%
Omnitarg (登録商標) 250 μg/ml	14.7	1.106	0.693	24.8%
Omnitarg (登録商標) 250 μg/ml	7.4	0.762	0.349	18.3%
Omnitarg (登録商標) 250 μg/ml	2.5	0.524	0.111	16.5%
Omnitarg (登録商標) 250 μg/ml	0	0.401	-0.012	n. d.
Omnitarg (登録商標) 500 μg/ml	33.6	1.939	1.526	-6.0%
Omnitarg (登録商標) 500 μg/ml	24	1.544	1.131	-15.7%
Omnitarg (登録商標) 500 μg/ml	14.4	1.128	0.715	-34.3%
Omnitarg (登録商標) 500 μg/ml	7.2	0.754	0.341	-38.1%
Omnitarg (登録商標) 500 μg/ml	2.4	0.493	0.080	-19.4%
Omnitarg (登録商標) 500 μg/ml	0	0.395	-0.018	n. d.
未スパイク	35	2.313	1.900	
未スパイク	25	1.830	1.417	
未スパイク	15	1.335	0.922	
未スパイク	7.5	0.840	0.427	
未スパイク	2.5	0.546	0.133	
未スパイク (ブランク)	0	0.413	0.000	

10

20

30

40

## 【0067】

治療抗体Omnitarg (登録商標)をスパイクすることに起因するHER2抗原の回収の差異は最大38.1%であり、そしてHerceptin (登録商標)のスパイクに起因するのは最大25.6%である。Omnitarg (登録商標)及びHerceptin (登録商標)による干渉は図1からも自明である。

## 【0068】

b) Bender MedSystemsにより製造されたsp185<sup>HER-2</sup>モジュールセット(カタログ番号BMS207MST)

インキュベーション及び洗浄工程は、取り扱い説明書に従い実施した。20、10、5

50

、2.5、及び0 ng / mlのHER2のスタンダードを、500、250、0 µg / mlのHerceptin（登録商標）でスパイクし、あるいはそれらを500、250、0 µg / mlのOmnitarg（登録商標）でそれぞれスパイクした。これらのサンプルを、コーティングされたマイクロタイプレート上でインキュベートした。検出抗体を添加してインキュベートした後、基質を添加し、そして吸光度を405 nmで読み取った。結果を表2に示す。

## 【0069】

表2

干渉治療抗体を用いて、又は用いずに測定したサンプル中の光学密度(OD)

【表2】

10

20

30

40

スパイク用スタンダード	c (HER2) (ng/ml)	OD 405nm	プランクで 補正したOD	未スパイクの スタンダード との差異
Herceptin（登録商標）250 µg / ml	20	0.043	0.001	98.6%
Herceptin（登録商標）250 µg / ml	10	0.043	0.001	97.1%
Herceptin（登録商標）250 µg / ml	5	0.043	0.001	95.0%
Herceptin（登録商標）250 µg / ml	2.5	0.044	0.002	77.8%
Herceptin（登録商標）250 µg / ml	0	0.044	0.002	n. d.
Herceptin（登録商標）500 µg / ml	20	0.044	0.002	97.1%
Herceptin（登録商標）500 µg / ml	10	0.044	0.002	94.3%
Herceptin（登録商標）500 µg / ml	5	0.043	0.001	95.0%
Herceptin（登録商標）500 µg / ml	2.5	0.044	0.002	77.8%
Herceptin（登録商標）500 µg / ml	0	0.044	0.002	n. d.
Omnitarg（登録商標）250 µg / ml	20	0.105	0.063	10.0%
Omnitarg（登録商標）250 µg / ml	10	0.071	0.029	17.1%
Omnitarg（登録商標）250 µg / ml	5	0.058	0.016	20.0%
Omnitarg（登録商標）250 µg / ml	2.5	0.051	0.009	0.0%
Omnitarg（登録商標）250 µg / ml	0	0.043	0.001	n. d.
Omnitarg（登録商標）500 µg / ml	20	0.103	0.061	12.9%
Omnitarg（登録商標）500 µg / ml	10	0.067	0.025	28.6%
Omnitarg（登録商標）500 µg / ml	5	0.059	0.017	15.0%
Omnitarg（登録商標）500 µg / ml	2.5	0.050	0.008	11.1%
Omnitarg（登録商標）500 µg / ml	0	0.044	0.002	n. d.
未スパイク	20	0.112	0.070	
未スパイク	10	0.077	0.035	
未スパイク	5	0.062	0.020	
未スパイク	2.5	0.051	0.009	
未スパイク（プランク）	0	0.042	0.000	

## 【0070】

治療抗体Herceptin（登録商標）をスパイクすることに起因するHER2抗原の回収の差異は最大98.6%であり、そしてOmnitarg（登録商標）のスパイクに起因するのは最大28.6%である。このことは図2にも表されている。

## 【0071】

## 実施例2

Omnitarg（登録商標）の存在下でのHER2の検出のためのアッセイ

50

当該アッセイは、ストレプトアビジンでコーティングしたポリスチレン製チップ上で実施した。HER2に対する抗体は、約10の250pLの液滴のラインとしてチップに適用された。MAK<Her2>H-4D5-IgG-Bi(=HER2に対するクローニー4D5由来のビオチン化されたモノクローナル抗体)を捕捉抗体として使用して、Omnitarg(登録商標)による干渉のないアッセイを確立した。前記ビオチン化抗体の濃度は100μg/mlであった。前記チップは4で保存した。

## 【0072】

MAK<Her2>M-7C2-IgG-Dig(クローニー7C2由来のジゴキシゲニン化されたモノクローナル抗体)をコンジュゲート抗体として使用した。このコンジュゲートのストック溶液を-20で保存した。

10

## 【0073】

HER2標準タンパク質sp185(HER-2)(sHER2)は市販の製品(Biozol#MGS207MST-S)であり、そして1000ng/mlの濃度で-20で保存した。

## 【0074】

その基礎的なサンプル及びコンジュゲート緩衝液として、リン酸緩衝生理食塩水(50mMのリン酸二水素ナトリウム-一水和物、150mM NaCl、pH7)に、防腐剤としてのアジ化ナトリウム(0.09% Na-アジド)、及び追加の添加物(0.035%EDTA、0.05%Tween20(登録商標)、2.00%RPLA4(Roche Nr.1726544001)、0.10%PAK<->R-IgG(Roche Nr.1108750001)、100μg/mlのマウス-MAK-33-IgG-ポリ(Roche Nr.1939661001))を含んで成るものを使用した。前記サンプル及びコンジュゲート緩衝液は濾過して(0.2μmの孔径)、そして使用前に4で保存した。

20

## 【0075】

Roche Diagnostics GmbHにより製造された治療抗体であるOmnitarg(登録商標)ヒト変異体Mab2C4 G186CP R9805Xのストック溶液は25mg/mlの濃度を有しており、これを-20で保存した。

## 【0076】

検出抗体として、110nmの蛍光標識ラテックス粒子とコンジュゲートしたMAK<Dig>M19-11-IgGを使用した。当該検出抗体のコンジュゲートは4で保存した。

30

## 【0077】

検出緩衝液として、50mMのTAPS及び1MのNaCl緩衝液(pH8.5)に、防腐剤としてのアジ化ナトリウム(0.09% Na-アジド)、及び追加の添加物(0.05%Tween20(登録商標)、0.50%RPLA4(Roche Nr.1726544001)、10μg/mlのマウス-MAK-33-IgG-ポリ(Roche Nr.1939661001))を含んで成るものを使用した。当該検出緩衝液は濾過して(0.2μmの孔径)、そして使用前に4で保存した。

40

## 【0078】

洗浄緩衝液には、0.001%のオキシピリオン(Oxypyrrion)、0.001%MIT、及び0.01%Thesitを含んで成る10mMのTris/HCl緩衝液を使用した。当該洗浄緩衝液は、濾過して(0.2μmの孔径)、そして使用前に4で保存した。

## 【0079】

a)Omnitarg(登録商標)による潜在的な干渉の検出

本アッセイは室温で実施した。全ての試薬は、アッセイを実際に実施する前に室温に戻した。

## 【0080】

20ng/mlのHER2を含むサンプルを種々の量のOmnitarg(登録商標)と一緒にインキュベートすることで、図3に示す濃度にした。これらのサンプルは、サン

50

プル緩衝液中で 1 : 5 に希釈した。それぞれ 40  $\mu$ l の、二組の希釈サンプルをチップに添加し、そして室温で 10 分間インキュベートする。その後、チップを自動洗浄工程で洗浄する。コンジュゲート抗体 M A K < H e r 2 > M - 7 C 2 - I g G - D i g をコンジュゲート緩衝液中 3  $\mu$ g / ml に希釈した。40  $\mu$ l の希釈コンジュゲート抗体を各チップに添加し、そして 5 分間インキュベートし、続けて自動洗浄工程にかけた。標識検出抗体を標識（＝検出）緩衝液中で 1 : 5 に希釈した。40  $\mu$ l の希釈した検出抗体を各チップに添加し、そして 5 分間インキュベートする。最終洗浄工程の後、結合した標識は、633 nm の励起光によるレーザーを用いて定量する。デジタル画像を適切なソフトウェアによりカウントに変換する。図 3 から分かるように、O m n i t a r g (登録商標) (終濃度 25  $\mu$ g / ml 超) は、上記アッセイにおいて一定の範囲で干渉した。

10

## 【0081】

## b) O m n i t a r g (登録商標) の存在下での H E R 2 の測定

O m n i t a r g (登録商標) により干渉を示すことがあるサンプルの測定の場合、この薬物 (r h u M a b 2 C 4 G 1 8 6 C P R 9 8 0 5 A X) をサンプル緩衝液に 6.25  $\mu$ g / ml の終濃度で添加した（＝サンプル緩衝液 (A)）。

## 【0082】

人工サンプルの調製のために、H E R 2 のスタンダードの材料を 500、200、100、50、20、10、5、2.5、1 及び 0 ng / ml にそれぞれマウス血清中で希釈した。これらのサンプルはサンプル緩衝液 (A) 中で 1 : 5 に希釈した。それぞれ 40  $\mu$ l の、二組の希釈サンプルをチップに添加し、そして室温で 10 分間インキュベートする。その後、チップを自動洗浄工程で洗浄する。コンジュゲート抗体 M A K < H e r 2 > M - 7 C 2 - I g G - D i g をコンジュゲート緩衝液中 3  $\mu$ g / ml に希釈した。40  $\mu$ l の希釈コンジュゲート抗体を各チップに添加し、そして 5 分間インキュベートし、続けて自動洗浄工程にかけた。標識検出抗体を標識（＝検出）緩衝液中で 1 : 5 に希釈した。最終洗浄工程の後、結合した標識は、633 nm の励起光によるレーザーを用いて定量する。デジタル画像を適切なソフトウェアによりカウントに変換する。カウントを図 3 に示す。

20

## 【0083】

## 表 3

M A K < H e r 2 > M - 4 D 5 - I g G - B i スポットにより得られたカウント  
(サンプル緩衝液 (A) 中での検量線)

30

## 【表 3】

sH E R 2 (ng / ml)	B i (4D5) 上のカウント
0	4
1	205
2.5	503
5	1064
10	3197
20	5201
50	16316
100	25107
200	38368
500	50449

40

## 【0084】

表 3 から分かるように、基礎レベルの O m n i t a r g (登録商標) の存在下で検量線

50

を確立することは容易であった。

【0085】

実施例3

Herceptin(登録商標)の存在下でのHER2の検出のためのアッセイ

当該アッセイは、ストレプトアビシンでコーティングしたポリスチレン製チップ上で実施した。HER2に対する抗体は、約10の250pLの液滴のラインとしてチップに適用された。MAK<Her2>H-2C4-IgG-Bi(=HER2に対するクローニング2C4由来のビオチン化されたモノクローナル抗体)を使用して、Herceptin(登録商標)による干渉のないアッセイを確立した。前記ビオチン化抗体の濃度は100μg/mlであった。前記チップは4で保存した。

10

【0086】

MAK<Her2>M-7C2-IgG-Dig(クローニング7C2由来のジゴキシゲニン化されたモノクローナル抗体)をコンジュゲート抗体として使用した。このコンジュゲートのストック溶液を-20で保存した。

【0087】

HER2標準タンパク質sp185(HER-2)(sHER2)は市販の製品(Biozol#MG5207MST-S)であり、そして1000ng/mlの濃度で-20で保存した。

【0088】

その基礎的なサンプル及びコンジュゲート緩衝液として、リン酸緩衝生理食塩水(50mMのリン酸二水素ナトリウム-水和物、150mM NaCl、pH7)に、防腐剤としてのアジ化ナトリウム(0.09% Na-アジド)、及び追加の添加物(0.035%EDTA、0.05%Tween20(登録商標)、2.00%RPLA4(Roche Nr.1726544001)、0.10%PAK<->R-IgG(Roche Nr.1108750001)、100μg/mlのマウス-MAK-33-IgG-ポリ(Roche Nr.1939661001))を含んで成るものを使用した。前記サンプル及びコンジュゲート緩衝液は濾過して(0.2μmの孔径)、そして使用前に4で保存した。

20

【0089】

Roche Diagnostics GmbHにより製造された治療抗体であるHerceptinヒト変異体Mab4D5のストック溶液は25mg/mlの濃度を有しており、これを-20で保存した。

30

【0090】

検出抗体として、110nmの蛍光標識ラテックス粒子とコンジュゲートしたMAK<Dig>M19-11-IgGを使用した。当該検出抗体のコンジュゲートは4で保存した。

【0091】

検出緩衝液として、50mMのTAPS及び1MのNaCl緩衝液(pH8.5)に、防腐剤としてのアジ化ナトリウム(0.09% Na-アジド)、及び追加の添加物(0.05%Tween20(登録商標)、0.50%RPLA4(Roche Nr.1726544001)、10μg/mlのマウス-MAK-33-IgG-ポリ(Roche Nr.1939661001))を含んで成るものを使用した。当該検出緩衝液は濾過して(0.2μmの孔径)、そして使用前に4で保存した。

40

【0092】

洗浄緩衝液には、0.001%のオキシピリオン(Oxypyrrion)、0.001%MIT、及び0.01%Thesitを含んで成る10mMのTris/HCl緩衝液を使用した。当該洗浄緩衝液は、濾過して(0.2μmの孔径)、そして使用前に4で保存した。

【0093】

a) Herceptin(登録商標)による潜在的な干渉の検出

本アッセイは室温で実施した。全ての試薬は、アッセイを実際に実施する前に室温に戻

50

した。

【0094】

20 ng / ml の HER 2 を含むサンプルを種々の量の Herceptin (登録商標) と一緒にインキュベートすることで、図4に示す濃度にした。これらのサンプルは、サンプル緩衝液中で 1 : 5 に希釈した。それぞれ 40 μl の、二組の希釈サンプルをチップに添加し、そして室温で 10 分間インキュベートする。その後、チップを自動洗浄工程で洗浄する。コンジュゲート抗体 MAK < Her 2 > M - 7 C 2 - IgG - Dig をコンジュゲート緩衝液中 3 μg / ml に希釈した。40 μl の希釈コンジュゲート抗体を各チップに添加し、そして 5 分間インキュベートし、続けて自動洗浄工程にかけた。標識検出抗体を標識 (= 検出) 緩衝液中で 1 : 5 に希釈した。最終洗浄工程の後、結合した標識は、633 nm の励起光によるレーザーを用いて定量する。デジタル画像を適切なソフトウェアによりカウントに変換する。図4から分かるように、Herceptin (登録商標) (終濃度 25 μg / ml 超) は、上記アッセイにおいて一定の範囲で干渉した。

【0095】

b) Herceptin (登録商標) の存在下での HER 2 の測定

Herceptin (登録商標) により干渉を示すことがあるサンプルの測定の場合、この薬物 (MAK < Herceptin > 7.4.04) をサンプル緩衝液に 6.25 μg / ml の終濃度で添加した (=サンプル緩衝液 (B))。サンプル緩衝液 (B) は、濾過して (0.2 μm の孔径)、そして使用前に 4℃ で保存した。

【0096】

人工サンプルの調製のために、HER 2 のスタンダードの材料を 500、200、100、50、20、10、5、2.5、1 及び 0 ng / ml にそれぞれマウス血清中で希釈した。これらのサンプルはサンプル緩衝液 (B) 中で 1 : 5 に希釈した。それぞれ 40 μl の、二組の希釈サンプルをチップに添加し、そして室温で 10 分間インキュベートする。その後、チップを自動洗浄工程で洗浄する。コンジュゲート抗体 MAK < Her 2 > M - 7 C 2 - IgG - Dig をコンジュゲート緩衝液中 3 μg / ml に希釈した。40 μl の希釈コンジュゲート抗体を各チップに添加し、そして 5 分間インキュベートし、続けて自動洗浄工程にかけた。標識検出抗体を検出緩衝液中で 1 : 5 に希釈した。40 μl の希釈した検出抗体を各チップに添加し、そして 5 分間インキュベートする。最終洗浄工程の後、結合した標識は、633 nm の励起光によるレーザーを用いて定量する。デジタル画像を適切なソフトウェアによりカウントに変換する。カウントを図4に示す。

【0097】

表4

MAK < Her 2 > H - 2 C 4 - IgG - Bi スポットにより得られたカウント  
(サンプル緩衝液 (B) 中での検量線)

10

20

30

## 【表4】

sHER2 (ng/ml)	Bi (2C4) 上のカウント
0	4
1	116
2.5	286
5	788
10	1975
20	3522
50	11541
100	18984
200	33293
500	48428

10

## 【0098】

表4から分かるように、基礎レベルのHerceptin（登録商標）の存在下でHER2についての検量線を確立することは容易であった。 20

## 【0099】

## 実施例4

## 治療抗体を含む試料、及び治療抗体を含まない試料中のHER2の測定

腫瘍KPL-4（HER2を産生しているもの）を有するマウスの血清プールを調製し、そして4つのアリコートに分けた。

## 【0100】

アリコート1及び2をサンプル緩衝液（B）及び（A）においてそれぞれ1:5に希釈した（=未処理サンプル）。

## 【0101】

アリコート3に対し、追加のHerceptin（登録商標）を添加して、終濃度を2000μg/mlにした。これをサンプル緩衝液（B）で希釈して、これも最終的に1:5に希釈してアリコート1とした（=処理サンプル3）。

30

## 【0102】

アリコート4に対し、追加のOmnitarg（登録商標）を添加して、終濃度を2000μg/mlにした。これをサンプル緩衝液（A）で希釈して、これも最終的に1:5に希釈してアリコート2とした（=処理サンプル4）。

## 【0103】

前記サンプルはそれぞれ実施例2b）及び3b）に記載のようにそくていした。結果を表5に示す。

40

## 【0104】

## 表5

## 高レベルの治療抗体の存在下でのサンプルの測定

【表5】

サンプル/ “処理”	サンプル緩衝液	2C4スポット上の カウント	4D5上のスポット	“未処理”サンプル (1)と(2)、そして “処理”サンプル (3)と(4)との差異
1/未処理	B	23613		100%
2/未処理	A		22758	100%
3/Herceptin (登録商標)	B	21383		90%=-10%の差異
4/Omnitarg (登録商標)	A		21238	93%=-7%の差異

10

20

30

## 【0105】

大量の治療抗体が添加されたのにも拘わらず、未処理サンプルと処理サンプルとの間の差異は10%を超えていない。従って、両薬物Omnitarg(登録商標)及びHerceptin(登録商標)の場合、大量の対応治療抗体の存在下でさえ機能するアッセイを確立することができた。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0106】

【図1】Oncogene Sciencesによって販売されている商業的アッセイを用いたHER2-検出における2つの異なる治療抗体の干渉。

【図2】Benderによって販売されている商業的アッセイを用いたHER2-検出における2つの異なる治療抗体の干渉。

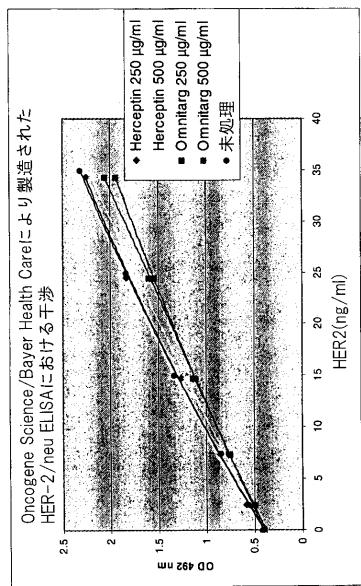
【図3】治療抗体Omnitarg(登録商標)の干渉の最大値の決定。

【図4】治療抗体Herceptin(登録商標)の干渉の最大値の決定。

【図5】Omnitarg(登録商標)及びHerceptin(登録商標)、それぞれによる干渉を欠くアッセイを用いたHER2-検出の較正曲線。

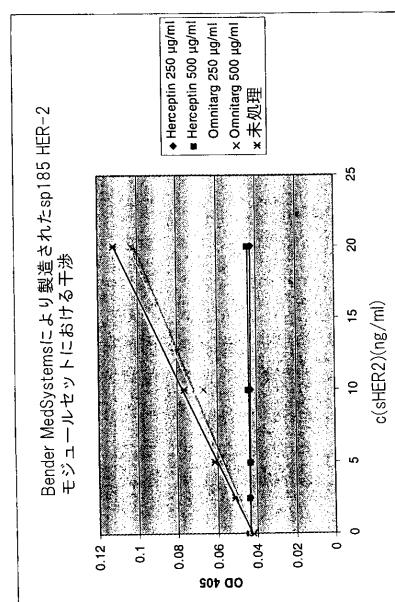
【図 1】

Fig. 1



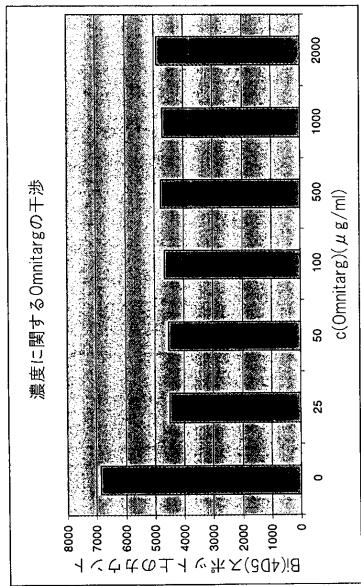
【図 2】

Fig. 2



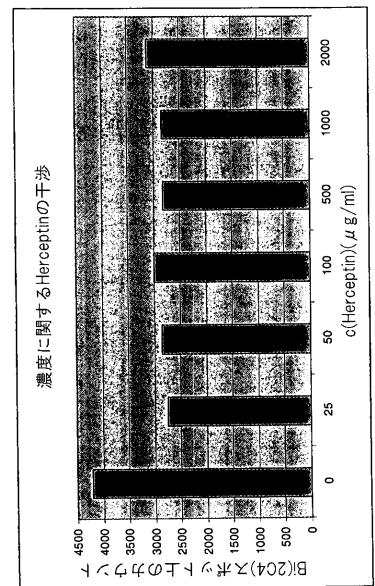
【図 3】

Fig. 3



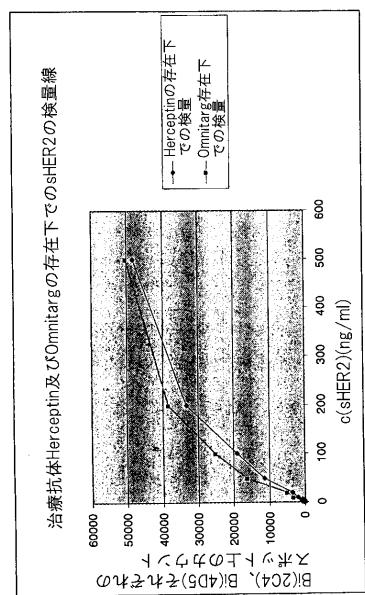
【図 4】

Fig. 4



【図5】

Fig.5



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2006/006524

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. GO1N33/53

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)  
GO1N

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/024993 A (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM; ALBITAR, MAHER; KEAT) 27 March 2003 (2003-03-27) the whole document	1-10
X	JILANI IMAN ET AL: "Transient down-modulation of CD20 by rituximab in patients with chronic lymphocytic leukemia." BLOOD. 15 NOV 2003, vol. 102, no. 10, 15 November 2003 (2003-11-15), pages 3514-3520, XP002348930 ISSN: 0006-4971 the whole document	1-10

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 document 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)
- "C" 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
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 September 2006

Date of mailing of the international search report

22/09/2006

Name and mailing address of the ISA/  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL-2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Rosin, Oliver

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No  
PCT/EP2006/006524

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03024993	A 27-03-2003	AU 2002327037 A1 EP 1438583 A2 JP 2005533236 T	01-04-2003 21-07-2004 04-11-2005

---

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),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,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,L,C,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100108903

弁理士 中村 和広

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(72)発明者 レンツ,ヘルムート

ドイツ連邦共和国, 8 2 3 2 7 トゥーツィンク, フォン - クエールマン - シュトラーセ 1 4

(72)発明者 ショイアー,ベルナー

ドイツ連邦共和国, 8 2 3 7 7 ペンツベルク, プリメルシュトラーセ 3

(72)発明者 ティアー,マルティナ

ドイツ連邦共和国, 8 3 6 4 6 パート テルツ, スペトマンシュトラーセ 1 4