

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002年10月24日 (24.10.2002)

PCT

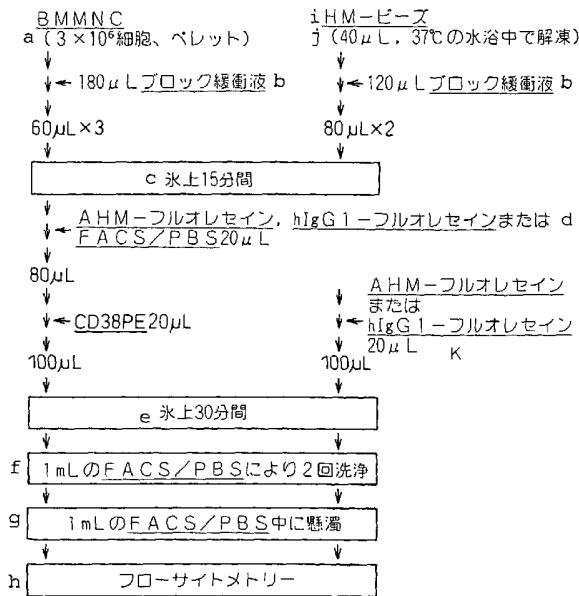
(10) 国際公開番号
WO 02/084290 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/536, 33/53, 33/574, 21/64
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/03703
- (22) 国際出願日: 2002年4月12日 (12.04.2002)
- (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2001-115889 2001年4月13日 (13.04.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都 北区浮間 5丁目 5番 1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 川合 重人 (KAWAI, Shigeto) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県 御殿場市 駒門 1丁目 135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 飯田 真一郎 (IIIDA, Shinichiro) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県 御殿場市 駒門 1丁目 135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 小石原 保夫 (KOISHIHARA, Yasuo) [JP/JP]; 〒104-8301 東京都 中央区 京橋 2丁目 1番 9号 中外製薬株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 石田 敬, 外 (ISHIDA, Takashi et al.); 〒105-8423 東京都 港区 虎ノ門 三丁目 5番 1号 虎ノ門 37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF QUANTIFYING ANTIGEN EXPRESSION

(54) 発明の名称: 抗原の発現量を定量する方法



(57) Abstract: A novel method of quantifying the expression of an antigen. For example, a method of formulating the correlation between the expression dose of a desired antigen and the fluorescent intensity which involves: (a) the step of preparing a plural number of cell groups wherein the expression of the antigen has been preliminarily quantified; (b) the step of preparing a fluorescence-labeled antibody binding specifically to the antigen; (c) the step of measuring the fluorescent intensity of each cell group prepared in (a) by using the fluorescence-labeled antibody prepared in (b); and (d) analyzing the correlation between the expression dose of the antigen having been preliminarily quantified and the fluorescent intensities measured in (c).

- a...3X10⁶ CELLS, PELLETS
- b...BLOCK BUFFER
- c...PLACED ON ICE FOR 15 MIN
- d...AHM-FLUORESCHEIN, hIgG1-FLUORESCHEIN OR FACS/PBS 20μL
- e...PLACED ON ICE FOR 30 MIN
- f...WASHING WITH 1 mL PORTIONS OF FACS/PBS TWICE
- g...SUSPENDING IN 1 mL OF FACS/PBS
- h...FLOW CYTOMETRY
- i...HM-BEADS
- j...THAWING IN WATER BATH (40 μL, 37 ° C)
- K...AHM-FLUORESCHEIN OR hIgG1-FLUORESCHEIN 20μL

[続葉有]



WO 02/084290 A1



(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特

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。

(57) 要約:

抗原の発現量を定量するための新規な方法の提供。

例えば、所望の抗原の発現量と蛍光強度との相関式を公式化する方法であって、

(a) 該抗原の発現量が予め定量された複数の細胞群を用意する工程；

(b) 該抗原に特異的に結合する、蛍光標識された抗体を用意する工程；

(c) (b) の蛍光標識された抗体を用いて、(a) の細胞群の蛍光強度をそれぞれ測定する工程；及び

(d) 予め定量されている該抗原の発現量と(c) で測定された蛍光強度との相関関係を解析する工程；

を含む方法。

明 細 書

抗原の発現量を定量する方法

発明の分野

本発明は、抗原の発現量を定量する方法、及びその応用に関する。

背景技術

Goto, Tらはヒト形質細胞を免役して得られた、B細胞系列に特異的に発現する分子量が29～33 kDaの抗原を認識するマウスモノクローナル抗体（マウス抗HM1.24抗体）を報告している（Blood（1994）84, 1922-1930）。また、マウス抗HM1.24抗体によって認識される抗原をHM1.24抗原と呼んでいる。ヒト骨髄腫細胞を移植したマウスに抗HM1.24抗体を投与すると、この抗体が腫瘍組織に特異的に集積したこと（小阪昌明ら、日本臨床（1995）53,627-635）から、抗HM1.24抗体はラジオアイソトープ標識による腫瘍局在の診断や、ラジオイムノセラピーなどのミサイル療法に応用することが可能であることが示唆されている。

また、上記Blood（1994）84, 1922-1930には、抗HM1.24抗体が、*in vitro*において、ヒト骨髄腫細胞株RPMI 8226に対して細胞傷害活性を有することが述べられている。また、マウス抗HM1.24抗体の定常領域をヒト抗体の定常領域と置き換えたキメラ抗HM1.24抗体、およびマウス抗HM1.24抗体のCDR（相補性決定領域）をヒト抗体に移植し、さらに幾つかのFRアミノ酸の置換を行ったヒト型化抗HM1.24抗体（再構成ヒトHM1.24抗体）も作製されている（WO 98/14580）。また、キメラ抗HM1.24抗体やヒト型化抗HM1.24抗体が、骨髄腫

細胞に特異的に結合すること、さらには細胞傷害活性を有することが示されている (Blood (1999) 93, 3922-3930)。

一方、リンパ球系腫瘍に関しても、抗HM1.24抗体が認識する抗原タンパク質 (HM1.24抗原) がリンパ球系腫瘍に発現していること、および抗HM1.24抗体がリンパ球系腫瘍に対し、補体依存性細胞傷害活性 (CDC活性) や抗体依存性細胞介在性細胞傷害活性 (ADCC活性) による細胞傷害活性を有し、抗腫瘍効果を発現することが示されている (WO 98/35698)。

この様に、HM1.24抗原は、終末分化B細胞である骨髄腫細胞のみならず、リンパ球系腫瘍においても高発現しており、HM1.24抗原を認識する抗HM1.24抗体、特にヒト型化抗HM1.24抗体は、多発性骨髄腫を含む骨髄腫やリンパ球系腫瘍の治療剤として有用であることが示されている。

抗HM1.24抗体は、標的細胞表面上に発現しているHM1.24抗原に結合し、CDC活性やADCC活性を介して殺細胞活性を発揮することから、当該活性は標的細胞表面上のHM1.24抗原の発現量に依存する。従って、抗HM1.24抗体、特に、ヒト型化抗HM1.24抗体の多発性骨髄腫患者やリンパ球系腫瘍患者での効果を予測する際に、対象患者の腫瘍細胞上に発現するHM1.24抗原の発現量を定量することができれば、治療効果を精度よく予測することが可能となる。

発明の開示

一般に、細胞表面上に存在する抗原量を定性的に測定する方法としてフローサイトメトリーが広く用いられている。フローサイトメトリーは、細胞上の分子の発現量を、蛍光強度として簡便に測定することができる。しかし、その蛍光強度は相対値であり、異なる測定日、測定機器で得られた蛍光強度に関するデータを直接比較する

ことはできない。従って、蛍光標識された抗HM1.24抗体を用いてHM1.24抗原の発現量を定量するには、得られた蛍光強度を標準化する必要がある。

課題を解決するための手段

本発明者らは鋭意研究の結果、細胞に発現する抗原量を蛍光標識抗体を用いて定量する方法を見いだした。また、蛍光標識された抗体による蛍光強度と抗原の発現量との相関式を公式化する方法を見いだした。これらの方法を用いることで、患者の診断、薬物療法に対する感受性の予測をおこなうことが可能になった。より具体的には、被験細胞を、フルオレセイン標識された、所望の抗原特異的抗体またはフルオレセイン標識された対照抗体と反応させ、その蛍光強度をフローサイトメーターにて測定し、SPHERO（商標）Rainbow Calibration Particlesを用いた検量線により、細胞の蛍光強度をLog MEFL値として標準化した。

さらに、一定量の抗原を結合させたビーズを作製し、このビーズを陽性対照とすることにより、アッセイ系および試薬の標準化、および品質管理を行うことが可能となった。実際に、ヒト型化抗HM1.24抗体を用いて6つの血球系腫瘍細胞株(RPMI8226、U266B1、ARH-77、KPMM2、IM-9、HS-Sultan)、さらに健常人末梢血単核球および5例の骨髄腫患者由来腫瘍細胞を測定したところ、全ての細胞においてHM1.24抗原の発現が確認され、その発現量を定量化することが可能であった。さらに、Log MEFL値とHM1.24抗原の発現量、およびLog MEFL値とヒト型化抗HM1.24抗体によるADCC活性の相関を検討した。

その結果、HM1.24抗原発現量とLog MEFL値の相関係数は0.9936であり、高い相関のあることが明らかになった。また、これらの細胞を標的細胞として、ヒト末梢血単核球を介したヒト型化抗HM1.24抗

体のADCC活性を測定したところ、標的細胞上のHM1.24抗原発現量に応じたADCC活性が誘導され、患者のヒト型化抗HM1.24抗体に対する応答性を予測することが可能であることを明らかにした。

従って、本発明は、所望の抗原の発現量と蛍光強度との相関式を公式化する方法であって、

(a) 該抗原の発現量が予め定量された複数の細胞群を用意する工程；

(b) 該抗原に特異的に結合する、蛍光標識された抗体を用意する工程；

(c) (b) の蛍光標識された抗体を用いて、(a) の細胞群の蛍光強度をそれぞれ測定する工程；及び

(d) 予め定量されている該抗原の発現量と(c) で測定された蛍光強度との相関関係を解析する工程；

を含む方法を提供する。

上記の方法において、抗原の発現量が予め定量された複数の細胞群を用意する工程は、好ましくは、該抗原の発現量が異なる複数の細胞群を用意し、該抗原に特異的に結合する、放射性同位体で標識された抗体を用いて該抗体の発現量を定量する工程を含む。前記抗原の発現量が異なる複数の細胞群は、好ましくは、該抗原の発現量が少なくとも10倍以上異なる複数の細胞群である。

本発明はまた、被験細胞に発現する所望の抗原の発現量を測定する方法であって、

(a) 該抗原に特異的に結合する、蛍光標識された抗体を用意する工程；

(b) 該抗原の発現量と(a) の蛍光標識された抗体による蛍光強度との相関式を用意する工程；

(c) 被験細胞と(a) の蛍光標識された抗体とを接触させ、該細

胞の蛍光強度を測定する工程；及び

(d) 上記(c)で測定された蛍光強度から、(b)の相関式を用いて、被験細胞に発現する該抗原の発現量を算出する工程；を含む方法を提供する。

上記の方法において、前記抗原の発現量と(a)の蛍光標識された抗体による蛍光強度との相関式は、前記の公式化方法により得られる。

本発明はまた、所望の薬物療法と該薬物療法に対する患者の感受性の相関を公式化する方法であって、

(a) 一群の被験患者を選択する工程；
(b) 前記薬物療法に対する患者の感受性に影響を与えると推定される抗原を選択する工程；
(c) 前記抗原に特異的に結合する、蛍光標識された抗体を用意する工程；
(d) 前記抗原の発現量と(c)の蛍光標識された抗体による蛍光強度との相関式を用意する工程；
(e) 被験患者由来の被験細胞と(c)の蛍光標識された抗体とを接触させ、該細胞の蛍光強度を測定する工程；
(f) 上記(e)で測定された蛍光強度から、(d)の相関式を用いて、被験細胞に発現する該抗原の発現量を算出する工程；及び
(g) 上記(f)で算出された該抗原の発現量と患者の薬物療法に対する効果とを比較し、相関を解析する工程；を含む方法を提供する。

本発明はまた、所望の薬物療法に対する患者の感受性を予測する方法であって、

(a) 疾患において特異的に発現量が増加する抗原を選択する工程；

(b) 前記抗原に特異的に結合する、蛍光標識された抗体を用意する工程；

(c) 前記抗原の発現量と (b) の蛍光標識された抗体による蛍光強度との相関式を用意する工程；

(d) 患者由来の被験細胞と (b) の蛍光標識された抗体とを接触させ、該細胞の蛍光強度を測定する工程；

(e) 上記 (d) で測定された蛍光強度から、(c) の相関式を用いて、被験細胞に発現する該抗原の発現量を算出する工程；及び

(f) 上記 (e) で算出された該抗原の発現量と該薬物療法に対する患者の感受性の相関とを比較する工程；

を含む方法を提供する。

本発明はさらに、患者を診断する、および／または疾患を特定する方法であって、

(a) 疾患において特異的に発現量が増加する抗原を選択する工程；

(b) 前記抗原に特異的に結合する、蛍光標識された抗体を用意する工程；

(c) 前記抗原の発現量と (b) の蛍光標識された抗体による蛍光強度との相関式を用意する工程；

(d) 患者由来の被験細胞と (b) の蛍光標識された抗体とを接触させ、該細胞の蛍光強度を測定する工程；

(e) 上記 (d) で測定された蛍光強度から、(c) の相関式を用いて、被験細胞に発現する該抗原の発現量を算出する工程；及び

(f) 上記 (e) で算出された該抗原の発現量と健常人の該抗原の発現量とを比較する工程；

を含む方法を提供する。

本発明はさらに、抗体を有効成分として含有する医薬組成物、お

よび該抗体および／または該医薬組成物に対する患者の感受性の相関を記載した指示書、を含むキットを提供する。

このキットにおいて、抗体は、好ましくはADCC活性および／またはCDC活性を有する抗体である。前記抗体を有効成分として含有する医薬組成物は、例えば、抗HM1.24抗体を有効成分として含有する造血器腫瘍治療用医薬組成物ある。前記造血器腫瘍は、例えば、骨髄腫および／またはリンパ球系腫瘍である。前記骨髄腫は、例えば、多発性骨髄腫である。前記該抗体および／または前記医薬組成物に対する患者の感受性の相関は、患者由来の被験細胞において細胞あたり一定量以上の抗原発現量がある場合に有効である。

本発明はさらに、抗体を有効成分として含有し、患者由来の被験細胞上に発現する抗原の発現量が細胞あたり一定量以上である場合に該患者に投与されることを特徴とする医薬組成物を提供する。前記抗体は、例えばADCC活性および／またはCDC活性を有する抗体である。前記医薬組成物は例えば、抗体が抗HM1.24抗体である造血器腫瘍治療用医薬組成物である。前記造血器腫瘍は、例えば骨髄腫および／またはリンパ球系腫瘍である。この骨髄腫は、例えば多発性骨髄腫である。

図面の簡単な説明

図1は、ヒト骨髄由来単核球(BMMNC)の染色方法を模式示した図である。

図2は、HM1.24抗原の定量方法を確立する際に使用したフローサイトメトリーの蛍光測定の結果および蛍光強度との相関式を示した図である。

図3は、単球とリンパ球におけるHM1.24抗原の発現を測定したフローサイトメトリーの図である。

図4は、種々のヒト細胞株におけるHM1.24抗原の発現を測定したフローサイトメトリーの図である。

図5は、骨髄腫患者から得られたミエローマ細胞におけるHM1.24抗原の発現を測定したフローサイトメトリーの図である。

図6は、骨髄腫患者から得られたミエローマ細胞におけるHM1.24抗原の発現を測定したフローサイトメトリーの図である。

図7は、骨髄腫患者から得られたミエローマ細胞におけるHM1.24抗原の発現を測定したフローサイトメトリーの図である。

図8は、種々のHM1.24抗原発現CHO細胞株におけるスク্যাッチャードプロットを示す図である。

図9は、種々のHM1.24抗原発現CHO細胞株におけるスク্যাッチャードプロットを示す図である。

図10は、種々のHM1.24抗原発現CHO細胞株におけるスク্যাッチャードプロットを示す図である。

図11は、種々のHM1.24抗原発現CHO細胞株におけるHM1.24抗原の発現を測定したフローサイトメトリーの図である。

図12は、HM1.24抗原数とlog MEFL値の相関を示した図である。

図13は、種々のHM1.24抗原発現CHO細胞株におけるヒト型化抗HM1.24抗体(AHM)のADCC活性を示した図である。

図14は、種々のHM1.24抗原発現CHO細胞株におけるヒト型化抗HM1.24抗体(AHM)のADCC活性を示した図である。

図15は、HM1.24抗原の発現量とヒト型化抗HM1.24抗体(AHM)によるADCC活性との相関を示した図である。

図16は、HM1.24抗原の発現量とヒト型化抗HM1.24抗体(AHM)によるADCC活性との相関を示した図である。

図17は、種々のHM1.24抗原発現CHO細胞株におけるE/T比の変化に伴う、ヒト型化抗HM1.24抗体(AHM)によるADCC活性の変化を示し

た図である。

図18は、種々のHM1.24抗原発現CHO細胞株におけるE/T比の変化に伴う、ヒト型化抗HM1.24抗体(AHM)によるADCC活性の変化を示した図である。

図19は、種々の細胞株におけるヒト型化抗HM1.24抗体(AHM)によるADCC活性を示した図である。

図20は、種々の細胞株におけるヒト型化抗HM1.24抗体(AHM)によるADCC活性を示した図である。

図21は、種々の細胞株におけるヒト型化抗HM1.24抗体(AHM)によるADCC活性を示した図である。

発明の実施の形態

本発明の方法は、抗原性を有するいかなる分子にも使用することができる。抗原性とは抗体によって認識される部位を有する特性、あるいは抗体と結合する部位を有する特性である。別の言い方をすれば、エピトープを有する分子である。本発明に使用される抗原は、免疫原性を有している必要はない。免疫原性とは、生体において特異抗体の産生を惹起する特性である。

従って、本発明に使用できる抗原は少なくとも抗原性を有する分子であって、免疫原性を有していてもよいし、免疫原性を有してなくてもよいが、抗原に対する抗体の作製が容易である点で、抗原が免疫原性を有することが好ましい。免疫原性を有さない抗原であっても、免疫原性を有する分子との複合体を作製し、当該複合体を用いて免疫すれば、抗原に対する特異抗体を取得することが可能である。複合体の作製に使用される、免疫原性を有する分子としては、免疫される動物と異種の動物のタンパク質、例えばマウスに免疫する場合には、ヒトアルブミンやラットアルブミンを用いることが

できる。

本発明に使用される抗原は抗体によって認識される部位（エピトープ）を有する限り如何なる種類の分子であってもよく、タンパク質、糖鎖、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、糖タンパク質、プロテオグリカンあるいは有機化合物であってもよい。ポリヌクレオチドにはDNA、RNAが含まれる。有機化合物とは、炭素、水素、酸素を主要構成原子とし、アミノ酸や核酸をその構成単位としてない全ての分子であり、好ましくは分子量500以上、より好ましくは分子量1000以上、さらに好ましくは分子量2000以上の分子である。

抗原は細胞内に存在してもよいし、細胞膜に存在していてもよいが、抗体による検出が容易である点で、細胞膜表面上に発現している、あるいは細胞外領域を有する分子であることが望ましい。細胞内に発現する抗原を抗体と接触させる方法としては、ホルムアルデヒド処理等、公知の方法を用いることができる。抗原として特に好ましくは、細胞外に露出した領域を有する巨大分子である。巨大分子には、タンパク質、糖蛋白質、プロテオグリカン等が含まれ、分子量が10kD以上、好ましくは50kD以上、さらに好ましくは100kD以上の分子である。

細胞外領域を有する巨大分子には、細胞膜表面上に発現する生理活性物質の受容体が含まれる。例えば、造血因子受容体ファミリー、サイトカイン受容体ファミリー、リンホカイン受容体ファミリー、TNF受容体ファミリー、Gタンパク質共役型受容体ファミリー、チロシンキナーゼ型受容体ファミリー、セリン/スレオニン型受容体ファミリー、チロシンフォスファターゼ型受容体ファミリー、接着因子ファミリー、ホルモン受容体ファミリー等がある。

癌特異抗原あるいは癌関連抗原も細胞外領域を有する巨大分子に

含まれる。癌特異抗原とは、腫瘍の発生母細胞とは質的、量的に異なる性質を腫瘍細胞に与える分子である。例えば、正常とは異なる糖鎖構造、正常とは異なる立体構造、正常とは異なる大量発現等である。より具体的には、癌特異抗原とは、正常細胞では全く発現していないか、あるいは発現量が低い抗原であるが、癌細胞においては発現が増大している抗原等、が癌特異抗原に含まれる。多くの場合、酵素、ホルモン、胎児タンパク質、ガングリオシドであり、プロテオグリカン、糖タンパク質、糖脂質または糖鎖を有さないタンパク質である。

本発明においては、特に、細胞が癌化した場合に、正常の母細胞における発現量よりも発現量が増大する、あるいは、正常細胞では発現していないが、癌化することによって発現が新たに誘導される抗原が好ましい。本発明における癌とは、正常の増殖分化の制御をのがれ、自律的に増殖する細胞であり、悪性の腫瘍でもよいし、良性の腫瘍であってもよい。

また、由来する組織、臓器は問わず、血球細胞由来の癌細胞であってもよいし、肝臓、腎臓、肺、前立腺、甲状腺等の各臓器に由来する癌細胞であってもよい。さらに、上皮細胞由来であるか、間質細胞由来であるか、あるいは、腺細胞由来であるかも問わない。例えば、HM1.24抗原は、骨髄腫細胞において発現が増大していることが知られており、癌特異抗原に含まれる。また、大腸癌におけるCEA抗原とZCE-025抗体、卵巣癌におけるCA125とIMACIS-2抗体、悪性黒色種におけるp97抗原と96.5抗体等を用いることができる。

本発明の方法に使用される抗体は、所望の抗原と結合する限り特に制限はなく、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヒツジ抗体、キメラ抗体、ヒト型化抗体、ヒト抗体等を適宜用いることができる。抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体で

あってもよいが、均質な抗体を安定に生産できる点でモノクローナル抗体が好ましい。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は当業者に周知の方法により作製することができる。

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、所望の抗原や所望の抗原を発現する細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞（ハイブリドーマ）をスクリーニングすることによって作製できる。ハイブリドーマの作製は、たとえば、ミルステインらの方法（Kohler, G. and Milstein, C., *Methods Enzymol.* (1981) 73: 3-46）等に準じて行うことができる。抗原の免疫原性が低い場合には、アルブミン等の免疫原性を有する巨大分子と結合させ、免疫を行えばよい。

また、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた遺伝子組換え型抗体を用いることができる（例えば、Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, *THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES*, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。具体的には、ハイブリドーマのmRNAから逆転写酵素を用いて抗体の可変領域（V領域）のcDNAを合成する。

目的とする抗体のV領域をコードするDNAが得られれば、これを所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体のV領域をコードするDNAを、抗体C領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでもよい。発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで

発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ (Chimeric) 抗体、ヒト型化 (Humanized) 抗体などを使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体であり、マウス抗体の可変領域をコードするDNA をヒト抗体の定常領域をコードするDNA と連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることができる。

ヒト型化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域 (CDR; complementarity determining region) をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウス抗体のCDR とヒト抗体のフレームワーク領域 (framework region; FR) を連結するように設計したDNA 配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR 法により合成する。

得られたDNA をヒト抗体定常領域をコードするDNA と連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる (欧州特許出願公開番号EP 239400 、国際特許出願公開番号WO 96/02576 参照)。CDR を介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K. et al., Cancer Res. (1

993) 53, 851-856)。

キメラ抗体、ヒト型化抗体の場合には、細胞傷害活性を有するヒト抗体C領域を適宜使用することができる。例えば、ヒト抗体C領域として、ヒトC γ 例えば、C γ 1, C γ 2, C γ 3, C γ 4を使用することができる。これらのうち、特にC γ 1, C γ 3を有する抗体が強力な細胞傷害活性、すなわち、ADCC活性、CDC活性を有することが知られている。

また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球をin vitroで所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878参照）。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる（国際特許出願公開番号W0 93/12227, W0 92/03918, W0 94/02602, W0 94/25585, W0 96/34096, W0 96/33735参照）。

さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体（scFv）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を含む適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に衆知であり、W0 92/01047, W0 92/20791, W0 93/06213, W0 93/11236, W0 93/19172, W0 95/01438, W0 95/15388を参考にすることができる。

抗体遺伝子を一旦単離し、適当な宿主に導入して抗体を作製する場合には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。真核細胞を宿主として使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いることができる。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば、CHO, COS, ミエローマ、BHK (baby hamster kidney), HeLa, Vero, (2) 両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば、sf9, sf21, Tn5などが知られている。

植物細胞としては、ニコチアナ (*Nicotiana*) 属、例えばニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) などが知られている。原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌が知られている。これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより抗体が得られる。

例えば、HM1.24抗原に対するモノクローナル抗体を取得するには、Goto, T.らの方法 (Blood (1994) 84, 1922-1930) を用いることができる。また、HM1.24抗原発現細胞として、ヒト多発性骨髄腫細胞株であるKPMM2やKPC-32 (Goto, T. et al., Jpn. J. Clin. Hematol. (1991) 32, 1400) を用いて免疫することができる。KPMM2は、平成6年(1994年)2月22日に、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)に、国際寄託番号FERM BP-7419としてブダペスト条約に基づき

国際寄託されている。

また、HM1.24抗原を免疫してもよい。HM1.24抗原は配列番号1に示す塩基配列によってコードされ、配列番号2に示すアミノ酸配列を有する蛋白質であり、cDNAはpUC19ベクターのXbaI切断部位の間に挿入されて、プラスミドpRS38-pUC19として調製されている。このプラスミドpRS38-pUC19を含む大腸菌(E. coli)は、平成5年(1993年)10月5日付で独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)に、Escherichia coli DH5 α (pRS38-pUC19)として、受託番号FERM BP-4434としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている(特開平7-196694参照)。

また、HM1.24抗原に対するマウスモノクローナル抗体(マウス抗HM1.24抗体)を産生するハイブリドーマは、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)に、平成7年(1995年)4月27日にFERM BP-5233としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

また、寄託番号FERM BP-5233として寄託されているHM1.24抗原に対するマウスモノクローナル抗体のヒト型化抗体を作製した。ヒト型化抗HM1.24抗体は、CDRの置換に加え、FR領域のアミノ酸置換を行うことで、幾つかのバージョンを作製し、その活性を確認した。最も好ましい活性を有するヒト型化抗HM1.24抗体のバージョンは、軽鎖がバージョンaであり、重鎖はバージョンsであった(国際公開番号W0 99/18212を参照)。軽鎖バージョンaの塩基配列およびアミノ酸配列は配列番号3および4にそれぞれ記載した。また、重鎖バージョンsの塩基配列およびアミノ酸配列は配列番号5および6にそれぞれ記載した。

尚、ヒト型化抗HM1.24抗体の軽鎖バージョンaを含むプラスミド

を有する大腸菌は、Escherichia coli DH5 α (pUC19-RVLa-AHM-gk) として、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6) に、平成8年(1996年)8月29日に、FERM BP-5645としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。また、ヒト型化抗HM1.24抗体の重鎖バージョン s を含むプラスミドを有する大腸菌は、Escherichia coli DH5 α (pUC19-RVHs-AHM-g γ 1) として、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6) に、平成9年(1997年)9月29日に、FERM BP-6127としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。尚、本明細書においては、軽鎖バージョン a および重鎖バージョン s を有するヒト型化抗HM1.24抗体を特にAHMと称する。

蛍光標識された抗体は市販の試薬によって適宜作製することができる。たとえば、FITC、Fluorescein、AMCA、TRITC、Texas Red (いずれもPierce Chemical Companyから入手可能) 等を使用することができる。フローサイトメトリー解析は周知の方法であり、特に説明を要するものではないが、例えば、以下の方法により測定することができる。被験細胞をPBS(-)で洗浄した後、FACS/PBS (0.1%ウシ胎児血清、0.1%アジ化ナトリウム含有PBS(-)) で所定の濃度に希釈した蛍光標識抗体あるいはコントロール抗体を加え、氷温化30分インキュベートする。FACS/PBSで洗浄した後、0.5mlから1 mlのFACS/PBSに懸濁し、FACScan (Becton Dickinson製) または、EPICS XL (BECKMAN COULTER製) で細胞の蛍光強度を測定すればよい。

本発明の態様のひとつは、所望の抗原の発現量と蛍光強度との相関式を公式化する方法に関する。すなわち、蛍光標識された抗体を用いて、該抗体が結合する抗原の発現量を算出するための相関式を

導く方法に関する。所望の抗原に特異的に結合する抗体は、市販の抗体であってもよいし、上述した方法により作製したものであってもよい。また、蛍光標識された市販の抗体であってもよいし、蛍光標識試薬を用いて蛍光標識された抗体であってもよい。さらに、所望の抗原に結合する抗体（一次抗体）が蛍光標識されていてもよいし、所望の抗原に結合する抗体（一次抗体）に結合する二次抗体が蛍光標識されていてもよい。

蛍光標識された一次抗体を用いる場合には、被験細胞は一次抗体と反応させ、蛍光強度を測定すればよい。蛍光標識された二次抗体を用いる場合には、蛍光標識されていない一次抗体と被験細胞を反応させ、ついで、蛍光標識された二次抗体と反応させ、蛍光強度を測定すればよい。測定誤差が少なくなる点で、蛍光標識された一次抗体を用いることが好ましい。発現量が少ない抗原を測定する場合には、二次抗体として、蛍光標識されたポリクローナル抗体を使用することができる。

蛍光標識抗体の力価は、標準試薬を用いて一定に保つことができる。蛍光標識抗体の力価とは、抗体の抗原結合力（抗原親和性）と蛍光標識体の抗体への結合率に依存する。例えば、抗原結合活性が等しい抗体であっても、蛍光標識体の結合率が異なれば、蛍光標識抗体の力価は異なるし、蛍光標識体の結合率が同じであっても、抗原結合活性が異なれば、蛍光標識抗体の力価は異なる。

本発明においては、相関式の公式化に使用した蛍光標識抗体の力価と、抗原発現量の定量に使用する蛍光標識抗体の力価が同じである限り使用することができる。好ましくは、相関式の公式化に使用した蛍光標識抗体と、抗原発現量の定量に使用する蛍光標識抗体が同一の蛍光標識抗体である。通常の場合、精製された抗体を用いて、発売元の指示に従って蛍光標識体でラベルする限り、同じ力価を

有する蛍光標識抗体を作製することができる。

新たに作製した蛍光標識抗体の力価が、それまでに使用していた蛍光標識抗体の力価と等しいことを確認するには、抗原を結合したビーズ（抗原ビーズ）を用いて、それぞれの蛍光標識抗体による抗原ビーズの蛍光強度を測定し、比較すればよい。また、抗原を発現することが明らかになっている細胞を抗原ビーズの代わりに使用することもできる。新旧の蛍光標識抗体による測定を同時並行で行う限り、抗原ビーズに結合している抗原量や細胞に発現している抗原量の経時的変化は無視することができる。

抗原ビーズは市販のビーズを用いて作製することができる。例えば、市販のEZ-Link（商標） Sulfo-NHS-LC-Biotin（PIERCE）やStrep tavidin Coated Carboxylated Microspheres（Polysciences）を使用することができる。抗原ビーズの作製に使用する抗原は全長であってもよし、部分断片であってもよく、抗体との結合活性が保持されている限り、アミノ酸配列の長さは制限はない。抗原の部分断片としては、細胞外領域を有し、細胞内領域及び膜貫通領域を有さない分泌型抗原を好適に使用することができる。

一組の抗原ビーズと蛍光標識抗体を作製できれば、どちらか一方を標準品として、新たに作製した抗原ビーズまたは蛍光標識抗体の力価を確認、調製することができる。抗原ビーズの力価は、ビーズひとつあたりに結合している抗原数に依存する。ビーズあたりの抗原結合数が等しければ、抗原ビーズの力価は等しい。通常は、使用する抗原のアミノ酸配列、ビーズとの結合反応に使用する抗原の濃度、反応液の組成、温度が等しければ、同じ力価の抗原ビーズを作製することができる。

所望の抗原の発現量が予め定量された複数の細胞群は遺伝的背景がことなる細胞群であってもよいし、遺伝的背景が同じである細胞

群であってもよい。例えば、蛍光標識された抗体が、所望の抗原以外には結合する分子が存在しない限り、異なる遺伝的背景であってもよい。また、細胞群を構成する細胞は、細胞株であってもよいし、細胞株でなくてもよい。例えば、生体から分離した細胞でもよいし、プライマリー培養細胞であってもよい。遺伝的背景が異なる細胞群としては、例えば、所望の抗原の発現量が異なる細胞株A、細胞株B、細胞株Cを使用してもよい。また、細胞株Aを抗原の発現量に応じて細胞株A-high expression、細胞株A-moderate expression、細胞株A-low expressionに分離して使用してもよい。これらの細胞は同一の遺伝的背景を有する細胞群である。

好ましくは、遺伝的背景が同じであり、当該抗原の発現量のみが異なる複数の細胞群を用意する。例えば、抗原をコードする遺伝子を適当な発現ベクターに導入する。次いで、当該抗原が発現していない宿主細胞を選択し、当該細胞に上記発現ベクターを導入する。この様にして作製した形質転換細胞を、蛍光標識された抗体と反応させ、フローサイトメーターを用いて蛍光強度の異なる複数の細胞群に分取する。たとえば、強い蛍光強度を示す細胞群、中程度の蛍光強度を示す細胞群、弱い蛍光強度を示す細胞群に分けることができる。

分取した細胞は、限界希釈法等により単一の細胞株とし、拡大培養することで均質な細胞群とすることができる。拡大培養した形質転換細胞の蛍光強度を測定し、当該抗原の発現量が異なる複数の細胞群を適宜選択すればよい。選択された複数の細胞群は、抗原の発現量が異なる複数の細胞群として相関式を公式化する際の標準細胞として使用することができる。標準細胞とは、抗原の発現量と蛍光強度の相関式を公式化する際、相関解析を行うために使用する、予め抗原発現量が決定されている細胞群を意味する。

標準細胞として用いる複数の細胞群は、細胞群の数が多ければ多いほど正確な相関式を公式化することができる。通常は2から10の細胞群を用いることができ、好ましくは2つの細胞群、より好ましくは3つの細胞群、さらに好ましくは4つの細胞群、最も好ましくは5つの細胞群を標準細胞として用いることができる。相関式の公式化に用いる標準細胞に発現する抗原量は、その差異が検出できる程度に異なることが好ましい。複数の標準細胞群において、最小の発現量を示す細胞群と最大の発現量を示す細胞群との抗原の発現量は、少なくとも5倍以上異なることが望ましく、より好ましくは10倍以上、更に好ましくは100以上、最も好ましくは1000倍以上である。

抗原の発現量が異なる複数の細胞群に発現する抗原量を予め定量するには、放射性同位元素で標識された抗体を用いたスキャッチャードプロット法を用いることができる。放射性同位元素としては最も一般的にはヨウ素125が用いられる。本法は当業者には既に公知の方法であるが、例えば、「新生化学実験講座12 分子免疫学I 株式会社 東京化学同人」(pp170-176)を参考にすることができる。

予め定量されている抗原の発現量と蛍光強度との相関関係を解析する方法には特に制限はないが、蛍光強度をLog MEFL値に換算して抗原発現量との相関を解析することができる。MEFL (Molecules of equivalent fluorescein)とは、Spherotech社が販売している、フローサイトメトリーのキャリブレーションに使用されるSPHERO (商標) Rainbow Calibration Particles (8 peaks) (SPHERO-beads) に使用されている蛍光強度の単位で、8つのビーズについて、それぞれ330000, 140000, 40000, 15000, 4700, 1800, 600, 100のMEFL値が与えられている。従って、当該8つのMEFL値とフローサイトメ

トリーから測定される蛍光強度パターンの平均値をプロットすることで検量線を作製することができ、当該検量線を用いれば、未知資料の蛍光強度パターンからMEFL値を算出することができる。

蛍光強度パターンから得られる蛍光強度の平均値としては、MeanあるいはGeo Meanの2種類の平均値の求め方がある。Meanでは、蛍光強度をLogスケールで計算するのに対し、Geo Meanでは目盛りの解像度で計算する。従って、より正確な蛍光強度の平均値はMeanで得られるが、細胞集団の平均的位置に近い値はGeo Meanとして得られる。いずれの値も大きな違いは与えないが、本発明の方法においては、Geo Meanを用いることが好ましい。Geo MeanやMeanの算出方法は、フローサイトメーター解析ソフトを用いて、簡単に求めることができる。

例えばSPHERO-beadsを用いて細胞の蛍光強度とMEFL値との検量線を求めるには、一滴のSPHERO-beadsを1 mLのFACS/PBSに添加し、蛍光強度ヒストグラムを測定する。各ピークのGeo Meanの対数(Log Geo Mean値)を計算する。一方、各ビーズに与えられたMEFL値の対数(Log MEFL値)を計算し、Log MEFL値をLog Geo Mean値に対してプロットすることにより、検量線を作成すればよい。Log Geo Mean値をx、Log MEFL値をyとすると、その関係は一般に $y = Ax + B$ で表すことができる(A、Bは定数)。従って、被験細胞のフローサイトメトリー測定によって得られたLog Geo Mean値をxに代入することにより、被験細胞のLog MEFL値を得ることができる。

Log MEFL値と抗原量との相関式を求めるには、予め抗原の発現量が定量されている複数の細胞群について、おのおの蛍光強度のGeo Meanを求め、Log Geo Mean値を算出する。次に検量線から得られるLog MEFL値を求め、抗原発現量との相関式を求めればよい。具体的には、予め抗原の発現量が定量されている複数の細胞群を被験細胞

として、フローサイトメトリーにより蛍光強度のGeo Meanを求める。この際、抗原に特異的に反応する蛍光標識された抗体を用いて測定した値、および蛍光標識されたコントロール抗体を用いた値を求め、両Geo Meanの差を抗原に特異的なGeo Meanとする。

Log Geo Mean値を計算し、検量線からLog MEFL値を求める。次に、Log MEFL値をX軸に、放射性同位元素等を用いて測定した抗原の発現量をY軸にプロットする。一般に、相関式として

$$y=Ae^{Bx}$$

として公式化することができる（A,Bはそれぞれ抗原と抗体の組み合わせによって決定される定数）。従って、未知の試料のLog MEFL値が得られれば、

$$y=Ae^{Bx}$$

の相関式を用いて、抗原発現量を定量することができる。相関係数は好ましくは0.8以上であり、より好ましくは0.9以上、さらに好ましくは0.95以上、最も好ましくは0.98以上である。

一旦、蛍光標識された抗体が用意され、かつ、当該蛍光標識された抗体を用いた抗原の発現量と蛍光強度との上記相関式が明らかになれば、任意の細胞について蛍光標識された抗体を用いてフローサイトメトリーにより蛍光強度を測定し、得られたLog MEFL値から細胞に発現する抗原量を算出することができる。

被験細胞は、任意の細胞を使用することができる。例えば、細胞株であってもよいし、健常人や患者から採取した細胞であってもよい。健常人や患者から採取した細胞は、一旦培養した後に測定に使用しても良いし、培養せずに使用してもよい。また、一旦凍結した細胞を解凍して使用することもできる。被験細胞として用いる細胞は、フローサイトメトリーで測定できるように細胞が分離されている限り特に制限はない。

例えば、健常人や患者から細胞や組織を採取し、所望の細胞を分離して被験細胞とすることができる。組織や細胞集団から所望の細胞を分離して調製する方法は周知の方法を用いることができる。例えば、肝臓、腎臓等の臓器から組織を採取し、得られた組織を酵素処理等により適宜単一の細胞に分離して被験細胞とすることができる。また、末梢血や骨髄から採取した血球細胞集団の場合には、比重分離法等により適宜血球細胞を分離して、所望の細胞を被験細胞として分離して使用することができる。

抗原の発現量を測定するためのキットとしては、少なくとも、蛍光標識された抗体、および、蛍光強度から抗原量を算出する指示書がふくまれていればよい。蛍光強度から抗原量を算出する指示書には、抗原の発現量と蛍光強度との相関式が記載されていることが好ましい。蛍光標識された抗体は、溶液状態で供給されてもよいし、凍結乾燥品であってもよい。

溶液状態で供給される場合には、抗体濃度としては、特に制限はないが、安定性の点から、好ましくは0.01mg/ml~100mg/ml、より好ましくは0.1mg/ml~10mg/ml、さらに好ましくは0.5mg/ml~5mg/ml、最も好ましくは1mg/ml~3mg/mlである。凍結乾燥品の場合は、用時に溶解して使用することができる。従って、キットには溶解方法、好ましくは溶解する溶液の組成、及び量が記載された指示書が含まれていることが望ましい。より好ましくは、凍結乾燥された蛍光標識抗体と溶解液を含むキットである。また、蛍光標識された抗体と被験細胞を接触するために使用する反応液をキットに含めてもよい。

本発明の別の態様は、特定の疾患において発現が誘導される、あるいは、発現が増大する抗原を測定対象として、患者の薬物療法あるいは食事療法に対する感受性との相関式を作製する方法、および

、患者の薬物療法あるいは食事療法に対する感受性を予測する方法、さらに、患者の疾患を特定する方法、または患者を診断する方法に関する。

薬物療法あるいは食事療法と当該治療法に対する患者の感受性の相関を公式化する方法においては、任意の抗原を選定することができる。例えば、患者の感受性に影響すると思われる抗原を複数選択し、薬物療法の感受性と相関のある抗原を決定してもよいし、予め相関が予想される抗原を選択し、当該抗原が患者も感受性に相関していることを確認してもよい。

薬物療法あるいは食事療法と当該治療法に対する患者の感受性の相関を公式化する方法においては、複数の患者からなる一群の被験患者（患者群）を選択する。患者群とは、特定の疾患に分類される患者が複数含まれる集団である。好ましくは、5人以上であり、より好ましくは10人以上、さらに好ましくは30人以上、最も好ましくは50人以上の患者を含む集団である。蛍光標識された抗体を用いて、患者群に含まれる個々の患者から採取した細胞に発現する抗原量を測定する。

次いで、同じ患者に薬物療法を施し、当該患者における薬物療法の治療効果を定量化あるいは定性化すればよい。定性化は患者に対する薬物療法の効果の分類であってもよい。例えば、当該薬物療法に著効を示した患者群、効果のあった患者群、全く効果の無かった患者群の3つに分類してもよい。分類する患者群は、少なくとも2段階であり（効果あり、効果なし）、好ましくは3段階、さらに好ましくは4段階、最も好ましくは5段階の評価で分類する。

ついで、各分類に属する患者における抗原の発現量と当該薬物療法による治療効果を比較し、相関を解析する。相関解析においては、各分類に属する患者の抗原の発現量の平均を用いてもよいし、分

散分布を用いてもよい。相関解析により得られた結果を相関として公式化することができる。薬物療法と当該薬物療法に対する患者の感受性の相関は、ある程度の幅をもった数値として示される。例えば、「抗原の発現量が10000以上の患者の80%は当該薬物療法に対して極めて良好な反応を示す」、「抗原の発現量が1000から10000である患者は、当該薬物療法で中程度の治療効果が期待できる」を例示することができる。

患者由来の細胞に発現する抗原量と任意の薬物療法に対する患者の感受性の相関が明らかになれば、当該相関を用いて、薬物療法に対する患者の感受性を予測することが可能になる。具体的には、被験患者から細胞を採取し、当該細胞と蛍光標識された抗体を反応させ、蛍光強度をフローサイトメトリーにより測定する。得られた蛍光強度からLog Geo Mean値を算出し、log MEFL値を求め、抗原の発現量を算出する。得られた抗原の発現量を薬物療法と当該薬物療法に対する患者の感受性の相関にあてはめることで、被験患者の当該薬物療法に対する感受性を予測することができる。すなわち、当該薬物療法が当該患者に対してどの程度の効果があるかを予測することができる。

薬物療法に含まれる治療方法は、薬剤を用いる治療法である限り特に制限はないが、好ましくは薬剤として抗体を用いる抗体療法である。抗体療法に対する患者の感受性を予測する相関式を公式化する場合には、当該抗体療法に用いる抗体が結合する抗原の発現量と治療効果との相関を公式化することが好ましい。抗体療法に用いることができる抗体としては、抗体は完全な抗体であってもよいし、抗体断片であってもよい。抗原との結合活性を保持している限り、どのような抗体断片であってもよいが、好ましくは抗原結合部位を含む断片である。

抗原結合部位を含む断片としては、F a b、F (a b) ' 2、F v、一本鎖F v、一本鎖F v 2分子が結合して構成されたdiabodyであってもよい。抗体療法に用いられる抗体や抗体断片は、抗体自体が治療効果を有する薬剤である必要はなく、治療効果を有する薬剤を適切な部位に運ぶために使用されていてもよい。例えば、抗癌剤と抗体の複合体から構成される、いわゆるミサイル療法も本発明の抗体療法に含まれる。ミサイル療法では、抗体と各種抗癌剤を共有結合で結合した複合体であってもよいし、殺細胞作用を有する放射性同位体を結合させた抗体であってもよい。

また、抗癌剤や放射性同位体を含むマイクロカプセル、あるいはナノカプセルを作製し、当該カプセルの表面上に抗体を結合させてもよい。ミサイル療法に用いられる抗体は、標的細胞に特異的に発現する抗原に対する抗体であり、患者における抗原の発現量と抗体療法の治療効果、すなわち当該抗体療法に対する患者の感受性とはよい相関を示すことが期待される。従って、当該抗原の発現量を定量的に測定することができ、患者の感受性との相関が明らかになれば、当該抗体療法の効果を治療前に予測することが可能となる。

また、抗体療法には、抗体自体が細胞傷害活性を有する抗体を投与する治療方法が含まれる。細胞傷害活性にはA D C C活性、C D C活性、アポトーシス誘導活性等が含まれる。細胞傷害活性を有する抗体を用いる抗体療法は、主に癌治療に使用される。例えば、抗H e r 2抗体を用いる癌の治療方法が挙げられる。さらに、中和活性を有する抗体を治療目的に用いる抗体療法も本発明に含まれる。例えば、生理活性物質に対する中和活性を有する抗体は、当該生理活性物質に起因する疾患の治療に用いることができる。

中和活性を有する抗体は生理活性物質の細胞内への取り込みや、生理活性物質の細胞上の受容体への結合を阻害することで治療効果

が期待される。生理活性物質にはサイトカインやリンホカイン、ホルモン等、分泌タンパクが含まれ、例えば、TNF α 受容体に対する中和抗体を使用したりウマチ治療が挙げられる。これらの抗体療法では、H e r 2 や T N F α 受容体は細胞表面上に発現した抗原であり、患者の細胞の表面上に発現している H e r 2 分子や T N F α 受容体分子の発現量を測定することができれば、患者の抗体療法に対する感受性を予測することができる。

抗体療法と当該抗体療法に対する患者の感受性の相関を公式化する方法、および患者の感受性を予測する方法において使用される蛍光標識された抗体は、抗体療法に使用する抗体と同一の抗体であることが望ましいが、抗体の力価、あるいは抗原結合活性が等しい限り異なる抗体であっていてもよい。例えば、蛍光標識抗体としてマウス抗体を用いて相関を公式化し、患者由来の被験細胞に発現する抗原量を測定する。一方、抗体療法においては当該マウス抗体のキメラ抗体、あるいはヒト型化抗体を使用することができる。一般に、キメラ抗体においては同一の抗原結合を有していることが知られているし、ヒト型化抗体もマウス抗体とほぼ等しい抗原結合活性を有することが知られている。

抗体のADCC活性は、一般に次のようにして測定することができる。まず、ヒトの末梢血より比重遠心法で単核球を分離し、エフェクター細胞 (Effector cell:E)として調製する。一方、標的細胞 (Target cell:T)を ^{51}Cr により標識して調製する。次いで、標識した標的細胞にADCC活性を測定する抗体を加えインキュベートし、その後、標的細胞に対し適切な比のエフェクター細胞を加えインキュベートする。

インキュベートした後上清を取り、ガンマカウンターで放射活性を測定する。その際、最大遊離放射能測定用に、1%のNP-40を用

いることができる。細胞傷害活性 (%) は、 $(A-C) / (B-C) \times 100$ で計算することができる。なお、A は抗体存在下において遊離された放射活性 (cpm)、B はNP-40 により遊離された放射活性 (cpm)、C は抗体を含まず培養液のみで遊離された放射活性 (cpm) である。

さらに、抗体 C 領域のアミノ酸を一部付加、改変、修飾することにより、より強力なADCC活性、あるいはCDC 活性を誘導することができる。例えば、アミノ酸置換によるIgG のIgM 様ポリマー化 (Smith, R. I. F. & Morrison, S. L. BIO/TECHNOLOGY(1994) 12, 683-688)、アミノ酸付加によるIgG のIgM 様ポリマー化 (Smith, R. I. F. et al., J. Immunology (1995) 154, 2226-2236)、L 鎖をコードする遺伝子の直列連結での発現 (Shuford, W. et al., Science (1991) 252, 724-727)、アミノ酸置換によるIgG の二量体化 (Caron, P. C. et al., J. Exp. Med. (1992) 176, 1191-1195, Shopes, B., J. Immunology (1992) 148, 2918-2922)、化学修飾によるIgG の二量体化 (Wolff, E. A. et al., Cancer Res. (1993) 53, 2560-2565)、および抗体ヒンジ領域のアミノ酸改変によるエフェクター機能の導入 (Norderhaug, L. et al., Eur. J. Immunol. (1991) 21, 2379-2384) が挙げられる。これらは、プライマーを利用したオリゴマー部位特異的変異導入法、制限酵素切断部位を利用した塩基配列の付加、共有結合をもたらす化学修飾剤を使用することによって達成される。

アポトーシス誘導活性は、プログラムされた細胞死を誘導する活性であり、annexin Vの結合、DNAの断片化、細胞萎縮 (cell shrinkage)、アポトーシス体 (apoptotic body) を用いて検出することができる。

本発明の方法は、HM1.24抗原に対する抗体 (抗HM1.24抗体) を用

いる抗体療法に好適に使用することができる。抗HM1.24抗体としては、ヒト型化抗HM1.24抗体が好ましい。HM1.24抗原は骨髄腫細胞上に多量に発現している抗原であり、抗HM1.24抗体の有するADCC活性を介した骨髄腫の治療が期待される。従って、本発明の好ましい態様のひとつは、ヒト定常領域としてC γ 1を有するヒト型化抗HM1.24抗体を用いる抗体療法において、患者の骨髄腫細胞上に発現するHM1.24抗原の発現量を定量し、患者のヒト型化抗HM1.24抗体を用いる抗体療法に対する感受性を予測する方法である。

患者の骨髄腫細胞上に発現するHM1.24抗原の発現量の定量、およびHM1.24抗原の発現量と蛍光強度との相関式を公式化する際に使用される抗体は、抗体療法に使用するヒト型化抗HM1.24抗体、あるいは、ヒト型化の基本としたマウス抗HM1.24抗体を使用することができるが、ヒト型化抗HM1.24抗体を用いることが好ましい。

ヒト型化抗HM1.24抗体を用いて得られた蛍光強度(log MEFL)と抗原数の相関式は、抗原発現量をYとすると、

$$Y=2.53e^{2.151 \log \text{MEFL}}$$

で表される。当該相関式を用いれば、蛍光標識されたヒト型化抗HM1.24抗体による被験細胞の蛍光強度から、HM1.24抗原の発現量を算出することができる。また、当該相関式が記載された指示書と蛍光標識されたヒト型化抗HM1.24抗体を含むキットにより、ヒト型化抗HM1.24抗体による抗体療法に対する感受性を予測することができる。また、HM1.24抗原は、正常細胞に比べ、骨髄腫細胞で発現が増大することから、骨髄腫の診断にも利用することができる。

ヒト型化抗HM1.24抗体は造血器腫瘍全般に対して効果を有する可能性があるが、特に、リンパ球系腫瘍、形質細胞腫瘍、骨髄腫、特に多発性骨髄腫に対して効果を有することから、これらの患者のヒト型化抗HM1.24抗体を用いる抗体療法に対する感受性の予測、疾患

の診断、あるいは、疾患の進行度の推定に利用することができる。リンパ球系腫瘍としては、急性Bリンパ性白血病（B-ALL）、慢性Bリンパ性白血病（B-CLL）、pre-Bリンパ腫、Burkittリンパ腫、濾胞性リンパ腫、濾胞外套リンパ腫、びまん性リンパ腫、急性Tリンパ性白血病（T-ALL）、慢性Tリンパ性白血病（T-CLL）、成人T細胞白血病（ATL）、非ATL末梢性Tリンパ腫（PNTL）等が挙げられる。

ヒト型化抗HM1.24抗体の抗腫瘍効果は、被験細胞あたり2000個以上のHM1.24抗原の発現が確認できれば、ヒト型化抗HM1.24抗体による抗体療法が効果を有すると予測され、より好ましくは細胞あたり1000個以上発現している場合、さらに好ましくは5000個以上、最も好ましくは10000個以上HM1.24抗原が発現している場合には、ヒト型化抗HM1.24抗体による抗体療法が有効であると予測することができる。

患者の診断に使用する場合には、抗原の発現量が疾患に関連していることが明らかになっていることが必要である。抗原の発現量が疾患に関連しているとは、健常人においては発現されていないが、疾患に罹患した場合に特定の抗原が発現すること、または、健常人における発現量と比較して、疾患に罹患した患者では発現量が増大している場合を意味する。発現量の増大は、好ましくは10倍以上、さらに好ましくは100倍以上、最も好ましくは1000倍以上である。

本発明では、抗原の発現量と疾患との関連を明らかにすることも可能である。一群の患者を選択する工程、一群の健常人を選定する工程、任意の複数の抗原を選定する工程を経て、患者および健常人から被験細胞を採取し、当該抗原の発現量を患者、および健常人の両群で測定し、患者と健常人で発現量の強弱に相関のある抗

原を選定すればよい。抗原の発現量は、健常人で高く患者で低くてよく、あるいは、健常人で低く患者で高くてもよい。好ましくは、患者群と健常人群で発現量に有意差があることが望ましい。有意差の測定は、通常の統計解析により算出することができるが、好ましくは、Student's T-testでp valueが0.2以下、更に好ましくは0.1以下、最も好ましくは0.05以下である。

抗原の発現量と疾患の進行度が明らかになっていれば、患者から採取した細胞を被験細胞として、蛍光標識された抗体を用いて当該被験細胞に発現する抗原の発現量を測定し、ついで、当該抗原の発現量から疾患の進行度を推定することができる。例えば、癌細胞において特異的に発現する抗原（癌抗原）を標的分子として、当該抗原に対する蛍光標識された抗体を用いて当該癌抗原の発現量を測定することで、癌の進行度を推定することが可能である。

本発明の抗体を有効成分として含有する医薬組成物は、非経口的に全身あるいは局所的に投与することができる。例えば、点滴などの静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射を選択することができる。患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。有効投与量は、抗体については一回につき体重1 Kgあたり0.01 mg から100 mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり1～1000 mg、好ましくは5～300 mg、より好ましくは10～100mgの投与量を選ぶことができる。また、投与経路次第で医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。

このような担体および添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペク

チン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン（HSA）、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤などが挙げられる。使用される添加物は、剤型に応じて上記の中から適宜あるいは組合せて選択されるが、これらに限定されるものではない。

実施例

次に、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

実施例 1 : HM1.24抗原量のフローサイトメトリー解析

(1) 実験材料

ヒト造血器腫瘍細胞株としてKPM2（国際寄託番号FERM BP-7419）、RPMI8226（ATCC CCL-155）、U266B1（ATCC TIB-196）（以上multiple myeloma）、ARH-77（ATCC CRL-1621）（plasma cell leukemia）、IM-9（ATCC CCL-159）（B lymphoblast）、HS-Sultan（ATCC CRL-1484）（plasmacytoma）を使用した。

これらの細胞株の継代培養には、10% ウシ胎児血清（FBS、Cat. No. SH30071.03、Lot No. AHK9081、HyClone laboratories）、55 $\mu\text{mol/L}$ 2-メルカプトエタノール（Cat. No. 21985-023、GIBCO BRL）、0.1 mg力価/mL硫酸カナマイシン（硫酸カナマイシン注射液明治、明治製菓株式会社）を含むRPMI1640培地（Cat. No. 31800、GIBCO BRL）（以下、10% FBS/RPMI培地）を用いた。なお、KPM2細胞の継代培養には、20% FBSを含むRPMI1640培地を用い、終濃度4 ng/mLで組換えヒトIL-6 を添加した。

健康人由来末梢血単核球（PBMC）は試験時に用時調製して用

いた。すなわち、1000単位/mLのヘパリン溶液(ノボ・ヘパリン注1000、ヘキスト・マリオン・ルセル株式会社)約5 mLをあらかじめ注入した注射器を用い、健康人ボランティアより末梢血約50 mLを採取した。この末梢血を室温のDulbecco's phosphate buffered saline (-) (PBS(-)、Code No. 05913、日水製薬株式会社)で2倍希釈した後、12本に分注した。

末梢血と混合しないように、それぞれのチューブにFicoll-Paque (商標) PLUS (Code No. 17-1440-02、Amersham Pharmacia Biotech AB)約2.5 mLを注入した。これを遠心(500×g、30分間、20℃)した後、単核球画分である中間層を分取し、5% FBS、0.1 mg力価/mL硫酸カナマイシンを含むMEM培地(Cat. No. M2645、SIGMA)で2回洗浄した。得られた細胞ペレットを同培地に懸濁しPBMCとした。

骨髓腫患者由来ヒト骨髓由来単核球(bone marrow mononuclear cell、BMMNC)は以下の様に調製した。すなわち、骨髓腫患者からヘパリン処理した骨髓穿刺サンプル3 mLを採取し、ここに7 mLの無血清Hanks' balanced salt solution (HBSS)を加え希釈した。これを3 mLのFicoll-Paque (商標) PLUSに重層し、遠心(1500 rpm、30分間、20℃)した。単核球画分である中間層を分取し、7 mLの無血清HBSSに懸濁後、遠心(1500 rpm、5分間、20℃)した。得られた細胞ペレットを、10% FBSを含むRPMI1640培地に懸濁しBMMNCとした。

また、別法として以下の方法を用いた。すなわち、ヘパリン処理した骨髓穿刺サンプル10 mLに、10 mLの無血清HBSSおよび200 μLのRed-Out (Cat. No. 1069-00-0、Robbins Scientific)を加え、室温にて5分間放置した。これをFicoll-Paque (商標) Research grade (Cat. No. 17-0840-02、Amersham Pharmacia Biotech AB)に重層し、遠心(1600~1800 rpm、20分間)した。中間層を分取し、5% FBSを含むHBSSに懸濁後、遠心(1500 rpm、5分間)した。得られた細胞

ペレットを、20% FBSを含むIMDM培地に懸濁しBMMNCとした。

本実施例に使用したヒト型化抗HM1.24抗体は、軽鎖がバージョン a であり、重鎖はバージョン s であり（国際公開番号W0 99/18212を参照）、軽鎖バージョン a の塩基配列およびアミノ酸配列は配列番号 3、4 にそれぞれ記載されている（FERM BP-5645）。また、重鎖バージョン s の塩基配列およびアミノ酸配列は配列番号 5、6 にそれぞれ記載されている（FERM BP-6127）。なお、本明細書においては、当該アミノ酸配列を有するヒト型化抗HM1.24抗体をAHMと称する。

対照抗体であるヒトIgG1(hIgG1)抗体は、Human IgG1, Kappa (Cat. No. I3889、ロット番号：109H9179、供給元：SIGMA)を用いた。供給元の指示に従いPBS(-)にて1.0 mg/mLの濃度に溶解しhIgG1溶液とした。これを分注し、-25℃にて保存し、用時解凍して用いた。尚、本対照抗体は、ヒト型化抗HM1.24抗体とアイソタイプ的一致したヒト抗体でありかつ保存料を含まない。

可溶性ヒトHM1.24抗原は、Biochemical and Biophysical Research Communications 258, 583-591 (1999)に記載の方法により作製した。アミノ酸配列は、配列番号2に記載のアミノ酸配列において、49位のAsnから180位のGlnを有するアミノ酸配列を有する。

Bicarbonate Bufferは、0.210 gのNaHCO₃（特級、Code No. 312-13、ナカライテスク株式会社）および0.265 gのNa₂CO₃（特級、Code No. 313-11、ナカライテスク株式会社）を、それぞれ50 mLのミリQ水に溶解し、NaHCO₃水溶液50 mLとNa₂CO₃水溶液1 mLを混合し50 mmol/LのBicarbonate Bufferとして調製した。pHは8.61であった。調製した溶液は5℃で保存した。

NHS-フルオレセイン溶液は、NHS-フルオレセイン（Cat. No. 46100、PIERCE）をDMSO（特級、Cat. No. 35535-0330、純正化学株式会

社)にて1 mg/mLの濃度に溶解して調製した。

FACS/PBSは、1 gのウシ血清アルブミン(BSA、RIA Grade、Cat. No. A7888、SIGMA)を1 LのCellWASH (0.1% NaN₃含有PBS(-)、Cat. No. 349524、Becton Dickinson)に溶解して調製した。保存は5°Cで行った。

Blocking Bufferは、human IgG (Code No. 55908、ICN)をFACS/PBSにて5 mg/mLの濃度に希釈して調製した。保存は5°Cで行った。

蛍光標識ビーズは、SPHERO (商標) Rainbow Calibration Particles (8 peaks), 3.0-3.4 μm (Cat. No. RCP-30-5A, Spherotech)(SPHERO-beads)をそのまま使用した。尚、SPHERO (商標) Rainbow Calibration Particlesは8つの異なる蛍光強度を示すビーズの混合物であり、フローサイトメーターのキャリブレーションに使用される。各ビーズの蛍光強度は、MEFL (molecules of equivalent fluorescein)単位で規定されており、その値は、330,000、140,000、40,000、15,000、4,700、1,800、600、および100である。

ヒト型化抗HM1.24抗体-フルオレセインは、通常の方法により作製した。すなわち、555.6 μLのヒト型化抗HM1.24抗体原液(18.0 mg/mL)を1444.4 μLのBicarbonate Bufferにて希釈し、ヒト型化抗HM1.24抗体濃度を5 mg/mLとした。これに200 μLのNHS-フルオレセイン溶液を加え、氷上にて2時間反応させることによりヒト型化抗HM1.24抗体をフルオレセイン標識した。

続いて、PBS(-)にて平衡化したPD-10カラム(Cat. No. 17-0851-01、Amersham Pharmacia Biotech AB)を用いて、ゲルろ過による脱塩を行った。Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Cat. No. 500-0006、BIO-RAD)にてタンパク濃度を測定後、FACS/PBSにて1 mg/mLに希釈し、設定温度5°Cにて保存した。この溶液の一部をFACS/PBSにて200 μg/mLに希釈しヒト型化抗HM1.24抗体-フル

オレセインとし、1 mLずつ、設定温度 -80°C にて分注保存した。使用時には解凍後、設定温度 5°C にて保存した。

蛍光標識された対照抗体 (hIgG1-フルオレセイン) は以下の方法により調製した。すなわち、4 mgのヒトIgG1 (hIgG1, Human IgG1, Kappa, Cat. No. I3889, SIGMA)を4 mLのPBS(-)にて溶解後、MILLEX-GV 0.22 μm Filter Unit (Cat. No. SLGV025LS, MILLIPORE)にてろ過した。これに400 μL のNHS-フルオレセイン溶液を加え、氷上にて2時間反応させることによりhIgG1をフルオレセイン標識した。続いて、ヒト型化抗HM1.24抗体-フルオレセインと同様にして脱塩を行った。タンパク濃度を測定後、FACS/PBSにて200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し、BSAを最終濃度0.1%となるように添加した。

これをhIgG1-フルオレセインとし、1 mLずつ、 -80°C にて分注保存した。使用時には解凍後、 5°C にて保存した。なお、ヒト型化抗HM1.24抗体-フルオレセインおよびhIgG1-フルオレセインについては、凍結融解回数が0回と1回のサンプルを、それぞれKPM2細胞と反応させ、細胞の蛍光強度に差がないことを確認し、凍結保存が可能であることを確認した。また、hIgG1-フルオレセインと反応させたKPM2細胞と、反応させなかった細胞では、同様に蛍光強度に差がみられず、hIgG1-フルオレセインが細胞に結合しないことを確認した。

HM1.24抗原結合ビーズ(HM-beads)の調製は以下の方法により行った。すなわち、2 mLの可溶性ヒトHM1.24抗原溶液 (HM1.24抗原として0.764 mg)を解凍後、1 mmol/LのEZ-Link (商標) Sulfo-NHS-LC-Biotin (Cat. No. 21335, PIERCE)水溶液を109 μL 添加した。HM1.24抗原とビオチンのモル比は1:2とした。氷上にて2時間反応させた後、200 μL の1 mol/L Tris buffered saline (Code No. T903, 宝酒造株式会社)を添加することによりビオチン化反応を停止した。

続いて、脱塩カラム(SMART (商標) SYSTEM、Fast Desalting Column HR 10/10、Code No. 17-0591-01、Pharmacia Biotech)にて、ビオチン化HM1.24抗原を回収した。溶媒にはPBS(-)を用いた。回収したビオチン化HM1.24抗原に1 mLのStreptavidin Coated Carboxylated Microspheres, 6.0 Micron (1.25% Solids-Latex, Cat. No. 24158、Polysciences)を加え、室温にて1時間反応させた。FACS/PBSにて2回洗浄後、20 mLのFACS/PBSに懸濁した。これをHM-beadsとし、40 μ Lずつ、-80 $^{\circ}$ Cにて分注保存し、用時解凍した。

なお、凍結融解回数が0回と1回のHM-beadsを、ヒト型化抗HM1.24抗体-フルオレセインおよびhIgG1-フルオレセインと反応させ、フローサイトメトリーにて解析し、二者は同等の蛍光強度を示すことを確認し、HM-beadsの凍結保存が可能であることを確認した。また、hIgG1-フルオレセインと反応させたビーズと、反応させなかったビーズは同じ蛍光強度を示し、抗体が非特異的に結合しないことを確認した。

(2) フローサイトメトリー測定・解析方法

約 $0.5\sim 1\times 10^6$ 個の細胞を60 μ LのBlocking Bufferに懸濁し、氷上にて15分間静置した。静置後、ヒト型化抗HM1.24抗体-フルオレセイン、hIgG1-フルオレセインまたはFACS/PBSを20 μ L添加した。更に20 μ LのFACS/PBSを加え全量を100 μ Lとし、氷上にて30分間反応させた。HM-beadsの場合には、20 μ Lのビーズを60 μ LのBlocking Bufferに懸濁し、氷上にて15分間静置後、ヒト型化抗HM1.24抗体-フルオレセインまたはhIgG1-フルオレセインを20 μ L添加し、氷上にて30分間反応させた。

反応後、これらの細胞およびビーズをFACS/PBSにて2回洗浄し、1 mLのFACS/PBSに懸濁しフローサイトメトリーに供した。フローサイトメーターにはEPICS XL (BECKMAN COULTER)またはEPICS ELITE

(BECKMAN COULTER)を用いた。サンプル中の死細胞の割合が高い場合、前方散乱光(forward scatter、FS) vs 側方散乱光(side scatter、SS)ヒストグラムにて、生細胞集団にゲートを設定した。なお、死細胞はPI染色により確認した。

PBMC中の単球を同定する場合、20 μ LのPE標識抗CD14抗体(Cat. No. 347497、Becton Dickinson)を加え、全量を100 μ Lとした。また、BMMNC中の骨髓腫細胞を同定する場合、20 μ LのPE標識抗CD38抗体(CD38PE、Cat. No. 347687、Becton Dickinson)を加え、全量を100 μ Lとした(図1及び表1)。

表1 BMMNC染色に用いたサンプル

	AHM- フルオレ セイン	hIgG1- フルオレ セイン	非フルオレ セイン Ab	CD38PE
HM-beads	+	-	-	-
HM-beads	-	+	-	-
BMMNC	+	-	-	+
BMMNC	-	+	-	+
BMMNC	-	-	+	+
SPHERO-beads	-	-	-	-

BMMNCを測定する場合、以下の様にフローサイトメーターの機器設定を調整した。まず、RPMI8226細胞をヒト型化抗HM1.24抗体-フルオレセインのみ(1×10^6 個、最終容量1 mL、これをAとした)、CD38PEのみ(1×10^6 個、最終容量1 mL、これをBとした)、または抗体を加えずに(2×10^6 個、最終容量2 mL、これをCとした)、調製した。A、B、Cを混合し、フローサイトメーターにて測定した。

FS vs SSヒストグラムで、細胞集団がややスケールアウトするようにFSを調整した。SSは、細胞集団がヒストグラムの下半分に収まるように調整した。 fluorescein vs PEヒストグラムで、Bの細胞

集団がPE軸の上方1/2に収まるようにPEを調整した。また、Aの細胞集団がフルオレセイン軸の上方1/3に収まるようにフルオレセインを調整した。さらに、AとCの細胞集団のPE蛍光強度が等しくなるように、蛍光補正(color compensation) (PE - % フルオレセイン)を行った。蛍光補正(フルオレセイン - %PE)は0%とした。

(3) 蛍光標識ビーズ (SPHERO-beads) による蛍光強度の標準化
KPM2細胞を用いて、細胞上のHM1.24抗原を測定した。まず、KPM2細胞をヒト型化抗HM1.24抗体-フルオレセインおよびhIgG1-フルオレセインと反応後、フローサイトメーターにて蛍光強度を測定し、フルオレセインヒストグラムから平均の蛍光強度を求めた(図2のB)。細胞集団の蛍光強度の平均値を求める場合、MeanおよびGeo Meanの2種類の値が算出可能である。これらは、平均値を算出する際の、蛍光強度の目盛りの取り方が異なる。

Meanでは、蛍光強度をLogスケールで計算するのに対し、Geo Meanでは目盛りの解像度(1024)にて計算する。従って、より正確な蛍光強度の平均値はMeanで得られるが、細胞集団の平均的位置に近い値はGeo Meanとして得られる。そこでKPM2細胞の蛍光強度のGeo Meanを求めたところ、ヒト型化抗HM1.24抗体-フルオレセインと反応させた細胞では1114.97、hIgG1-フルオレセインと反応させた細胞では17.28であった。HM1.24抗原に特異的な蛍光強度を求めるため、これらのGeo Meanの差(1097.69)を求め、さらにその対数値(Log Geo Mean、3.04)を計算し、KPM2細胞の蛍光強度を表す値とした。

フローサイトメーターにより求められる蛍光強度は相対値である為、HM1.24抗原発現量を定量する場合、既知の蛍光強度を有する物質を用いて、データを標準化する必要がある。そこで、SPHERO-beadsを標準物質とし、細胞の蛍光強度の標準化を行った。まず、一滴のSPHERO-beadsを1 mLのFACS/PBSに添加し、フルオレセインヒスト

グラムを測定した(図2のC)。各ピークのGeo Meanの対数(Log Geo Mean)を計算し、Log MEFLをLog Geo Meanに対してプロットすることにより、検量線を作成した(図2のD)。

Log Geo Meanをx、Log MEFLをyとすると、その関係は $y = 0.9997x + 1.9179$ で表され、xにKPMM2細胞のLog Geo Mean (3.04)を代入することにより、Log MEFL値として4.96を得た。さらに、測定日時を変えて14回測定したところ、Log MEFLはそれぞれ、4.85、4.95、4.92、4.95、4.96、4.90、4.94、4.96、4.95、4.92、4.94、4.89、4.91、4.93であり非常にバラツキが少なかった。以上の結果から、SPHERO-beadsを標準物質として用いることにより、細胞表面上のHM 1.24抗原の発現量をLog MEFLとして標準化することが可能となった。

SPHERO-beadsにて蛍光強度を標準化する場合、測定系および試薬の品質管理の為、陽性対照物質が必要である。そこで、一定量のHM 1.24抗原が結合しているビーズ(HM-beads)を作製し(上記試験方法参照)、ヒト型化抗HM1.24抗体-フルオレセインあるいはhIgG1-フルオレセインと反応させ、Log MEFLを測定した。その結果、異なる測定日、測定機器でも同じ結果が得られた(表2)。また、別ロットのHM-beadsについて測定日時を変えて4回測定したところ、Log MEFLは5.09(図2のF)、5.07、5.11、5.13であり、非常にバラツキが少なかった。

表 2 異なる測定機器を用いて異なる日時にて測定された

HM-beadsのLog MEFL値

日 付	装 置	Log Geo Mean	Log MEFL
Apr 12, 2000	EPICS XL*	2.78	4.91
Apr 21, 2000	EPICS XL*	2.72	4.88
Apr 12, 2000	FACScan*	2.35	4.90
Apr 21, 2000	FACScan*	2.32	4.86
Apr 14, 2000	EPICS XL**	2.87	4.88

* 中外製薬（株）富士御殿場研究所

** 徳島大学医学部

(4) 結果

(4-1) 健常人のPBMC

上記方法により構築した測定系を用いて、単球およびリンパ球のHM1.24抗原を定量した(図3)。健常人ボランティア末梢血から調製したPBMCをサンプルに用い、単球とリンパ球はFS vs SSヒストグラムにて同定した。2名の健常人ボランティアについて、計4回の実験を行ったところ、単球のLog MEFLは、4.00、3.97、3.96（以上ボランティアA）、3.90（ボランティアB）、リンパ球のLog MEFLは、3.25、3.16、3.20（以上ボランティアA）、3.04（ボランティアB）であった。HM1.24抗原が少ない場合でも、バラツキの少ない測定値を得ることができた。

(4-2) 造血器腫瘍細胞株

造血器腫瘍細胞株として、ヒト骨髄腫細胞株(KPMM2、RPMI8226、U266B1)、plasma cell leukemia細胞株(ARH-77)、B lymphoblast細胞株(IM-9)、plasmacytoma細胞株(HS-Sultan)を用いた。これらの細胞のHM1.24抗原発現量を定量した(図4)。その結果、RPMI8226細胞が最も高い値を示し(Log MEFL; 5.21)、以下、U266B1 (Log MEFL

; 5.08)、ARH-77 (5.02)、KPM2 (4.90)、IM-9 (4.85)、HS-Sultan (4.63)であった。これらの造血器腫瘍細胞株ではPBMCに比べ、HM1.24抗原が高発現していることが示された。

(4-3) 患者由来骨髄腫細胞の測定

骨髄腫細胞はCD38を高発現しており、これをマーカーとして同定することができる。そこで、骨髄腫患者の骨髄穿刺サンプルから調製したBMMNCをCD38PEにて染色し、PE vs SSヒストグラムにてCD38強陽性細胞を骨髄腫細胞とした(図5のB)。この細胞のHM1.24抗原発現量を測定したところ、Log MEFLは3.98であった(図5のC)。

凍結細胞を用いても同様の結果が得られるか検討した。異なる2施設で得られた合計4サンプルの凍結BMMNCを同様に測定した結果、腫瘍細胞はいずれもHM1.24抗原を発現しており、Log MEFLは、4.69、4.51、4.22、4.11と算出された(図6及び図7)。凍結細胞においても、患者腫瘍細胞上のHM1.24抗原の定量が可能であることが確認された。

実施例2 : HM1.24抗原量の標識抗体による測定とADCC活性

実験材料

[¹²⁵I]標識ヒト型化抗HM1.24抗体 (¹²⁵I-ヒト型化抗HM1.24抗体) は、IODINE-125 (SODIUM IODIDE IN pH10 SODIUM HYDROXIDE)、Cat.No.NEZ033A、(NEN Life Science Products, Inc.)およびChloramine T (Cat.No.032-02182、和光純薬工業株式会社) を使用して、供給元の指示に従って作製した。

得られた¹²⁵I-ヒト型化抗HM1.24抗体 (抗体濃度9.47 μg/mL、比放射能0.0912 MBq/μg、放射化学的純度96.1%) は、0.05% Tween20 (東京化成工業株式会社)を含むPBS(-)を溶媒として含み、4℃で保存した。

ヒト腫瘍細胞株は、KPM2 (国際寄託番号FERM BP-7419)、RPMI82

26 (ATCC CCL-155)、U266B1 (ATCC TIB-196) (以上 multiple myeloma)、ARH-77 (ATCC CRL-1621)(plasma cell leukemia)、IM-9 (ATCC CCL-159)(B lymphoblast)、HS-Sultan (ATCC CRL-1484)(plasmacytoma)、CCRF-SB (ATCC CCL-120)(acute lymphoblastic leukemia (B lymphoblastoid))、EB-3 (ATCC CCL-85)(Burkitt's lymphoma)、CCRF-CEM (ATCC CCL-119)(acute lymphoblastic leukemia (T cell))、Daudi (ATCC CCL-213)(Burkitt's lymphoma (B lymphoblast))、MOLT-4 (ATCC CRL-1582)(acute lymphoblastic leukemia (T cell))を用いた。

HM1.24抗原発現CHO細胞 (CHO/HM21、CHO/HM25、CHO/HM31、CHO/HM32、CHO/HM34、CHO/HM36、CHO/HM37、CHO/HM39)は、Biochemical and Biophysical Research Communications 258, 583-591 (1999)に記載の方法により作製した。すなわち、HM1.24抗原をコードするベクターをCHO細胞にトランスフェクトし、HM1.24抗原発現CHO親細胞を得た。得られた細胞を単細胞にして培養し、単一の発現量を示す複数の細胞株を60株樹立した。これらの樹立細胞株から、HM1.24抗原の発現量の異なる複数の細胞株を選択した。

CHO細胞株の培養には10% FBS、500 μ g/mL Geneticin (Cat. No. 10131-035、GIBCO BRL)、0.1 mg力価/mL硫酸カナマイシンを含む α -MEM培地 (Cat. No. 11900、GIBCO BRL) (以下10%FBS/ α MEM培地)を用いた。

ADCC活性の測定に用いる標的細胞浮遊液は、試験時に用時調製した。CHO細胞の場合、細胞を60 mmディッシュにて2~3日間培養し、ディッシュ当たりの細胞数を約 1×10^6 個とした。細胞数は、実験に用いないディッシュにて確認した。上清を吸引除去後、500 μ Lの10%FBS/ α MEM培地および5.55 MBqのChromium-51 (Code No. CJS4、Amersham Pharmacia Biotech)を加え、5%炭酸ガスインキュベーター

中で37℃にて1時間培養した。この細胞を10%FBS/ α MEM培地で2回、PBS(-)で1回洗浄した後、300 μ LのEDTA (0.02% EDTA溶液、Code No. 382-14、ナカライテスク株式会社)を用いてディッシュから剥離し、10%FBS/RPMI培地にて細胞密度を 2×10^5 /mLに調整し、標的細胞浮遊液とした。

その他の細胞株の場合、 1×10^6 個を遠心し、細胞ペレットを約200 μ Lの10%FBS/RPMI培地および5.55 MBqのChromium-51 (Code No. CJS4、Amersham Pharmacia Biotech)に懸濁し、5%炭酸ガスインキュベーター中で37℃にて1時間培養した。この細胞を10%FBS/RPMI培地で3回洗浄した後、10%FBS/RPMI培地にて細胞密度を 2×10^5 /mLに調整し、標的細胞浮遊液とした。

その他、健常人由来末梢血単核球(PBMC)等、特に記載していない材料、方法は、実施例1に用いたものと同様のものを用いた。

(2) 125 I-ヒト型化抗HM1.24抗体を用いたHM1.24抗原量の測定

125 I-ヒト型化抗HM1.24抗体を10%FBS/RPMI培地により1.38 nmol/Lの濃度に希釈し、 125 I-ヒト型化抗HM1.24抗体溶液とした。放射性同位体で標識されていないヒト型化抗HM1.24抗体を10%FBS/RPMI培地により1.38、4.13、9.63、20.6、42.6、1375 nmol/Lの濃度に希釈し、非標識ヒト型化抗HM1.24抗体溶液とした。CHO細胞を10%FBS/RPMI培地で洗浄後、CHO/HM36およびCHO/HM39は 1.1×10^6 /mL、CHO/HM21は 4.4×10^6 /mL、CHO/HM31およびCHO/HM32は 5.5×10^6 /mLの細胞濃度に調整し、1.5 mL容のマイクロチューブに200 μ Lずつ分注した。これに 125 I-ヒト型化抗HM1.24抗体溶液および非標識ヒト型化抗HM1.24抗体溶液を10 μ Lずつ添加し氷上にて3時間反応させた。

この間30分毎に攪拌した。各チューブから200 μ Lを分取し、150 μ LのFBSをあらかじめ注入した0.4 mL容のマイクロチューブ(アシストチューブ、Cat. No. 72.701、株式会社アシスト)に静かに重層

した。これを遠心(10,000 rpm、3分間、4℃)後、設定温度 -80℃にて凍結した。細胞に結合した抗体は細胞ペレットに、遊離の抗体は上清に分画されるため、マイクロチューブを切断することにより細胞ペレットと上清とに分離した。それぞれの放射活性をガンマカウンター(COBRA II AUTO-GAMMA、MODEL D5005、Packard Instrument Company)で測定し、細胞ペレットの放射活性をBound (cpm)と、上清の放射活性をFree (cpm)とした。

抗体は以下の様に添加した。

^{125}I -ヒト型化抗HM1.24抗体は終濃度0.0625 nmol/Lになるように加えた。 ^{125}I -ヒト型化抗HM1.24抗体と非標識ヒト型化抗HM1.24抗体を合わせた総抗体濃度をTotal (nmol/L)とした。Total (nmol/L)が(1) 2 nmol/L、(2) 1 nmol/L、(3) 0.5 nmol/L、(4) 0.25 nmol/L、(5) 0.125 nmol/L、(6) 0.0625 nmol/Lとなるように非標識ヒト型化抗HM1.24抗体を加えた。また、 ^{125}I -ヒト型化抗HM1.24抗体(終濃度0.0625 nmol/L)の1000倍濃度の非標識ヒト型化抗HM1.24抗体を添加したものをcold inhibition ((7))とした。実験はduplicateにて行った。なお抗体の分子量は148 kDaとして計算した。

cold inhibition ((7))のBound (cpm)をNon Specific Bound (cpm)と定め、(1) ~ (6)のBound (cpm)からNon Specific Bound (cpm)を減じた値をSpecific Bound (cpm)とした。

ヒト型化抗HM1.24抗体結合部位数はスキッチャード分析により算出した。すなわち、抗原に特異的に結合した抗体濃度B(nmol/L)は、 $\text{Total (nmol/L)} \times \text{Specific Bound} / (\text{Bound} + \text{Free})$ から求めた。遊離の抗体濃度F(nmol/L)は、 $\text{Total (nmol/L)} \times \text{Free} / (\text{Bound} + \text{Free})$ から求めた。

全結合部位濃度をBmax(nmol/L)、ヒト型化抗HM1.24抗体の解

離定数をKd (nmol/L)とすると、

$$B/F = - (1/Kd)B + (1/Kd)B_{max}$$

の関係式が成り立つ。B/FをY軸、BをX軸にとり、勾配からKdを、X切片からB_{max}を求めた。細胞当たりのヒト型化抗HM1.24抗体結合部位数を、B_{max}から算出した。また、ヒト型化抗HM1.24抗体はモノクローナル抗体であることから、結合部位数=抗原数として算出した。

(3) クロム遊離試験

ヒト型化抗HM1.24抗体およびhIgG1溶液を10%FBS/RPMI培地にて希釈し、抗体溶液とした。96ウェルU底プレートに、抗体溶液および標的細胞浮遊液を50 μLずつ添加し、氷上にて15分間静置した。続いて、各ウェルにエフェクター細胞としてPBMCを100 μLずつ添加し5%炭酸ガスインキュベーター中に37°Cで4時間静置した。最終的なエフェクター細胞/標的細胞比(E/T)は50/1、20/1、8/1とした。遠心(1000 rpm、5分間、4°C)後、各ウェルより上清を100 μLずつ回収し、ガンマカウンター(COBRA II AUTO-GAMMA、MODEL D5005、Packard Instrument Company)にて放射活性を測定した。下式により特異的クロム遊離率を求めた。

$$\text{特異的クロム遊離率(\%)} = (A-C) \times 100 / (B-C)$$

Aは各ウェルにおける放射活性(cpm)、Bは標的細胞浮遊液を50 μL、10% NP-40水溶液(Nonidet (商標) P-40、Code No.252-23、ナカライテスク株式会社)を20 μL、10%FBS/RPMI培地を130 μL添加したウェルにおける放射活性(cpm)の平均値、Cは標的細胞浮遊液を50 μL、10%FBS/RPMI培地を150 μL添加したウェルにおける放射活性(cpm)の平均値を示す。

試験はtriplicateにて行い、特異的クロム遊離率について平均値及び標準誤差を算出した。さらに、CHO細胞を標的細胞とした場合

、抗体存在下の特異的クロム遊離率から、非存在下の特異的クロム遊離率を減じ、ADCC活性(%)を求めた。

なお、エフェクター細胞を添加せず、ヒト型化抗HM1.24抗体（終濃度10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を添加したウェルにおける特異的クロム遊離率を測定し、ヒト型化抗HM1.24抗体による直接的な傷害活性がないことを確認した。

結果

(4-1) Log MEFLとHM1.24抗原発現量およびADCC活性との相関
Log MEFLとHM1.24抗原発現量との相関を検討した。まず、HM1.24抗原発現CHO細胞におけるHM1.24抗原の発現量を、 ^{125}I -ヒト型化抗HM1.24抗体を用いた試験により求めた。CHO/HM21、CHO/HM31、CHO/HM32、CHO/HM36、CHO/HM39の5つのCHO細胞株におけるHM1.24抗原量は、抗原数としてそれぞれ、 2.50×10^4 、 9.14×10^3 、 5.51×10^3 、 1.72×10^5 および 1.35×10^5 と算出された(図8～図10)。次に、これらの細胞株について、Log MEFL値を求めたところ、それぞれ、4.20、3.81、3.64、5.17および5.12であった(図11)。Log MEFLをX軸、HM1.24抗原数をY軸にプロットしたところ、その関係は

$$y=2.53e^{2.15x}$$

で表された(図12)。相関係数(R^2)は0.994であり、高い相関が認められた。

次いで、Log MEFLとADCC活性の相関を検討した。まず、HM1.24抗原発現CHO細胞株である、CHO/HM21、CHO/HM25、CHO/HM31、CHO/HM34、CHO/HM36を標的細胞とし、クロム遊離試験によりヒト型化抗HM1.24抗体のADCC活性を測定した。エフェクター細胞にはヒトPBMCを用い、E/T比は50/1とした。実験は異なる健常人ボランティアPBMCをエフェクター細胞に用いて3回行い(Exp.1、Exp.2、Exp.3)、3回の実験の平均値および標準誤差を求めた(図13及び図14)。その

結果、いずれのCHO細胞でも、ヒト型化抗HM1.24抗体濃度に依存してADCC活性が誘導された。なお、HM1.24抗原を発現しないCHO/HM37では、ADCC活性はみられなかった。標的細胞に使用したこれらのCHO細胞について、Log MEFLを測定し、3回の実験の平均値および標準誤差を求めた(表3)。

表3 種々のHM1.24発現CHO細胞株におけるLog MEFL値とHM1.24抗原数(AHM結合部位数)

	Log MEFL					AHM結合部位*
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	平均	標準誤差	
CHO/HM36	5.27	5.30	5.24	5.27	0.02	2.11×10^5
CHO/HM21	4.31	4.34	4.30	4.32	0.01	2.73×10^4
CHO/HM31	3.82	3.82	3.78	3.81	0.01	9.13×10^3
CHO/HM34	3.69	3.67	3.61	3.66	0.02	6.62×10^3
CHO/HM25	3.37	3.32	3.29	3.33	0.02	3.25×10^3

* 式から計算 ; $y = 2.53e^{2.15x}$ ($x = \text{Log MEFL}$ 、 $y = \text{AHM結合部位}$)

CHO細胞のHM1.24抗原発現量は高い順に、CHO/HM36 (Log MEFL; 5.27)、CHO/HM21 (4.32)、CHO/HM31 (3.81)、CHO/HM34 (3.66)、CHO/HM25 (3.33)であった。また、図12の式から、HM1.24抗原数を算出した(表3)。各CHO細胞に対するADCC活性をLog MEFLに対してプロットしたところ、 $10 \mu\text{g/mL}$ 、 $1 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.1 \mu\text{g/mL}$ のヒト型化抗HM1.24抗体濃度で高い相関がみられた(図15及び図16)。次に、E/T比を50/1、20/1、8/1とし、CHO細胞に対するADCC活性を比較した(図17及び図18)。

その結果、いずれのE/T比でも、Log MEFLに相関してADCC活性が誘導された。また、抗原発現量の低い細胞、例えば、CHO/HM25 (HM1.24抗原数が細胞あたり約3千個)においても、ヒト型化抗HM1.24抗体濃度を高くすればADCCが誘導されることが示された。一方、HM1.

24抗原を多く発現する細胞、例えば、CHO/HM36 (HM1.24抗原数が細胞あたり約20万個)では、低いヒト型化抗HM1.24抗体濃度(0.01 μ g/mL)でもADCCが誘導された。これらの結果は、抗原の発現量を測定することで、抗体療法に対する感受性を予測することができることを示す。

さらに、骨髓腫細胞を含む11個の造血器腫瘍細胞株について、Log MEFLとADCC活性を測定した(図19～図21)。細胞株のHM1.24抗原発現量は高い順に、RPMI8226 (Log MEFL; 5.16)、U266B1 (5.14)、CCRF-SB (5.04)、ARH-77 (4.93)、KPMM2 (4.91)、IM-9 (4.81)、HS-Sultan (4.75)、EB-3 (4.74)、CCRF-CEM (4.38)、Daudi (3.83)、MO LT-4 (3.08)であった。Log MEFL値をHM1.24抗原数に換算すると、それぞれ、 1.66×10^5 、 1.59×10^5 、 1.29×10^5 、 1.01×10^5 、 9.72×10^4 、 7.84×10^4 、 6.89×10^4 、 6.75×10^4 、 3.11×10^4 、 9.53×10^3 、 1.90×10^3 であった。すべての細胞株でADCC活性が確認されたことから、少なくとも 1.90×10^3 個以上のHM1.24抗原が発現していれば、ヒト型化抗HM1.24抗体による造血器腫瘍の治療が可能であることが示された。

(5) 考察

細胞上のHM1.24抗原発現量に関して、 125 I-ヒト型化抗HM1.24抗体を用いた試験にてHM1.24抗原数を測定し、フローサイトメトリーにて求めたLog MEFLとの相関を検討した結果、両者に高い相関が確認された。Log MEFLをxとすると、HM1.24抗原数は

$$2.53e^{2.15x}$$

で表され相関式によって公式化された。本相関式をもちいれば、フローサイトメトリーにより簡便にHM1.24抗原の発現量を定量できる。骨髓腫患者由来腫瘍細胞のLog MEFLは、4.69、4.51、4.22、4.11、3.98であり、これをHM1.24抗原数に換算すると、 6.06×10^4 、4

$.11 \times 10^4$ 、 2.21×10^4 、 1.74×10^4 、 1.32×10^4 となり、骨髄腫患者由来の腫瘍細胞には、少なくとも1万個のHM1.24抗原が存在すると考えられた。

HM1.24抗原発現CHO細胞を標的細胞として、ヒトPBMCを介したヒト型化抗HM1.24抗体のADCC活性を測定した結果、 $10 \mu\text{g/mL}$ 、 $1 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.1 \mu\text{g/mL}$ のヒト型化抗HM1.24抗体濃度において、ADCC活性とLog MEFLに高い相関がみられた。また、いずれのCHO細胞でも、ヒト型化抗HM1.24抗体濃度、およびE/T比に応じたADCC活性が誘導された。HM1.24抗原の発現量が細胞あたり約3千個のCHO細胞(CHO/HM25)でも、ヒト型化抗HM1.24抗体濃度およびE/T比が高い場合にはADCCが観察された。

骨髄腫患者由来腫瘍細胞の場合、そのLog MEFLはおおよそ4~4.7であり、図15から推測すると、 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 以上のヒト型化抗HM1.24抗体の血中濃度を達成することができれば、ADCCが誘導され、骨髄腫の治療が可能である。

請 求 の 範 囲

1. 所望の抗原の発現量と蛍光強度との相関式を公式化する方法であって、

(a) 該抗原の発現量が予め定量された複数の細胞群を用意する工程；

(b) 該抗原に特異的に結合する、蛍光標識された抗体を用意する工程；

(c) (b) の蛍光標識された抗体を用いて、(a) の細胞群の蛍光強度をそれぞれ測定する工程；及び

(d) 予め定量されている該抗原の発現量と(c) で測定された蛍光強度との相関関係を解析する工程；

を含む方法。

2. 前記抗原の発現量が予め定量された複数の細胞群を用意する工程が、該抗原の発現量が異なる複数の細胞群を用意し、該抗原に特異的に結合する、放射性同位体で標識された抗体を用いて該抗体の発現量を定量する工程を含む工程である、請求項1に記載の方法。

3. 前記抗原の発現量が異なる複数の細胞群が、該抗原の発現量が少なくとも10倍以上異なる複数の細胞群である、請求項2に記載の方法。

4. 被験細胞に発現する所望の抗原の発現量を測定する方法であって、

(a) 該抗原に特異的に結合する、蛍光標識された抗体を用意する工程；

(b) 該抗原の発現量と(a) の蛍光標識された抗体による蛍光強度との相関式を用意する工程；

(c) 被験細胞と (a) の蛍光標識された抗体とを接触させ、該細胞の蛍光強度を測定する工程；及び

(d) 上記 (c) で測定された蛍光強度から、(b) の相関式を用いて、被験細胞に発現する該抗原の発現量を算出する工程；を含む方法。

5. 前記抗原の発現量と (a) の蛍光標識された抗体による蛍光強度との相関式が、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法により得られる相関式である、請求項 4 に記載の方法。

6. 前記抗原の発現量と (a) の蛍光標識された抗体による蛍光強度との相関式が、予め用意された相関式である請求項 4 に記載の方法。

7. 所望の薬物療法と該薬物療法に対する患者の感受性の相関を公式化する方法であって、

(a) 一群の被験患者を選択する工程；

(b) 前記薬物療法に対する患者の感受性に影響を与えると推定される抗原を選択する工程；

(c) 前記抗原に特異的に結合する、蛍光標識された抗体を用意する工程；

(d) 前記抗原の発現量と (c) の蛍光標識された抗体による蛍光強度との相関式を用意する工程；

(e) 被験患者由来の被験細胞と (c) の蛍光標識された抗体とを接触させ、該細胞の蛍光強度を測定する工程；

(f) 上記 (e) で測定された蛍光強度から、(d) の相関式を用いて、被験細胞に発現する該抗原の発現量を算出する工程；及び

(g) 上記 (f) で算出された該抗原の発現量と患者の薬物療法に対する効果とを比較し、相関を解析する工程；を含む方法。

8. 所望の薬物療法に対する患者の感受性を予測する方法であって、

(a) 疾患において特異的に発現量が増加する抗原を選択する工程；

(b) 前記抗原に特異的に結合する、蛍光標識された抗体を用意する工程；

(c) 前記抗原の発現量と (b) の蛍光標識された抗体による蛍光強度との相関式を用意する工程；

(d) 患者由来の被験細胞と (b) の蛍光標識された抗体とを接触させ、該細胞の蛍光強度を測定する工程；

(e) 上記 (d) で測定された蛍光強度から、(c) の相関式を用いて、被験細胞に発現する該抗原の発現量を算出する工程；及び

(f) 上記 (e) で算出された該抗原の発現量と該薬物療法に対する患者の感受性の相関とを比較する工程；

を含む方法。

9. 患者を診断する、および／または疾患を特定する方法であって、

(a) 疾患において特異的に発現量が増加する抗原を選択する工程；

(b) 前記抗原に特異的に結合する、蛍光標識された抗体を用意する工程；

(c) 前記抗原の発現量と (b) の蛍光標識された抗体による蛍光強度との相関式を用意する工程；

(d) 患者由来の被験細胞と (b) の蛍光標識された抗体とを接触させ、該細胞の蛍光強度を測定する工程；

(e) 上記 (d) で測定された蛍光強度から、(c) の相関式を用いて、被験細胞に発現する該抗原の発現量を算出する工程；及び

(f) 上記(e)で算出された該抗原の発現量と健常人の該抗原の発現量とを比較する工程；
を含む方法。

10. 健常人の前記抗原の発現量が、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法で得られる、請求項9に記載の方法。

11. 前記抗原が細胞表面上に発現する抗原である請求項1から10のいずれか一項に記載の方法。

12. 細胞表面上に発現する前記抗原が癌細胞の細胞表面上に特異的に発現する抗原である請求項11に記載の方法。

13. 癌細胞の細胞表面上に特異的に発現する前記抗原が配列番号1に記載されたHM1.24抗原である請求項12に記載の方法。

14. 前記抗原に特異的に結合する、蛍光標識された抗体が、抗体依存性細胞介在性細胞傷害活性(ADCC活性)または補体依存性細胞傷害活性(CDC活性)を有する抗体を蛍光標識した抗体である請求項1から13のいずれか一項に記載の方法。

15. 前記抗原に特異的に結合する、蛍光標識された抗体が、フルオレセイン(fluorescein)で蛍光標識された抗体である請求項1から14のいずれか一項に記載の方法。

16. 前記抗原に特異的に結合する、蛍光標識された抗体が、抗HM1.24抗体を蛍光標識した抗体である請求項1から15のいずれか一項に記載の方法。

17. 抗HM1.24抗体がヒト型化抗HM1.24抗体である請求項16に記載の方法。

18. 蛍光強度を測定する工程がフローサイトメトリーを用いて測定する工程である請求項1から17のいずれか一項に記載の方法。

19. さらに、蛍光強度と抗原数の相関式が

$$\text{抗原数} = 2.53e^{2.15 \text{Log MEFL}}$$

で表される相関式である請求項4から18のいずれか一項に記載の方法。

20. 薬物療法が抗体療法である請求項7または8に記載の方法。

21. さらに、所望の抗原が、前記抗体療法に用いる抗体が結合する抗原である請求項20に記載の方法。

22. 前記抗体療法に用いる抗体が、ADCC活性および／またはCDC活性を有する抗体である請求項21に記載の方法。

23. 前記ADCC活性および／またはCDC活性を有する抗体が、抗HM1.24抗体である請求項22に記載の方法。

24. 前記抗HM1.24抗体が、ヒト型化抗HM1.24抗体である請求項23に記載の方法。

25. 前記患者が造血器腫瘍を有する請求項7から9のいずれか一項に記載の方法。

26. 前記造血器腫瘍が骨髄腫および／またはリンパ球系腫瘍である請求項25に記載の方法。

27. 前記骨髄腫が多発性骨髄腫である請求項26に記載の方法。

28. 抗体を有効成分として含有する医薬組成物、および該抗体および／または該医薬組成物に対する患者の感受性の相関を記載した指示書、を含むキット。

29. 前記抗体が、ADCC活性および／またはCDC活性を有する抗体である請求項28に記載のキット。

30. 前記抗体を有効成分として含有する医薬組成物が、抗HM1.24抗体を有効成分として含有する造血器腫瘍治療用医薬組成物ある請求項28に記載のキット。

31. 前記造血器腫瘍が、骨髄腫および／またはリンパ球系腫瘍である請求項30に記載のキット。

32. 前記骨髄腫が、多発性骨髄腫である請求項31に記載のキット。

33. 前記抗体および／または前記医薬組成物に対する患者の感受性の相関が、患者由来の被験細胞において細胞あたり一定量以上の抗原発現量がある場合に有効である、請求項29から32のいずれか一項に記載のキット。

34. 前記一定量が2000個である請求項33に記載の方法。

35. 抗体を有効成分として含有し、患者由来の被験細胞上に発現する抗原の発現量が細胞あたり一定量以上である場合に該患者に投与されることを特徴とする医薬組成物。

36. 前記抗体が、ADCC活性および／またはCDC活性を有する抗体である請求項35に記載の医薬組成物。

37. 前記抗体が、抗HM1.24抗体である請求項35に記載の造血器腫瘍治療用医薬組成物。

38. 前記造血器腫瘍が、骨髄腫および／またはリンパ球系腫瘍である請求項37に記載の医薬組成物。

39. 前記骨髄腫が、多発性骨髄腫である請求項38に記載の医薬組成物。

40. 前記一定量が、2000個である請求項35から39のいずれか一項に記載の医薬組成物。

Fig.1

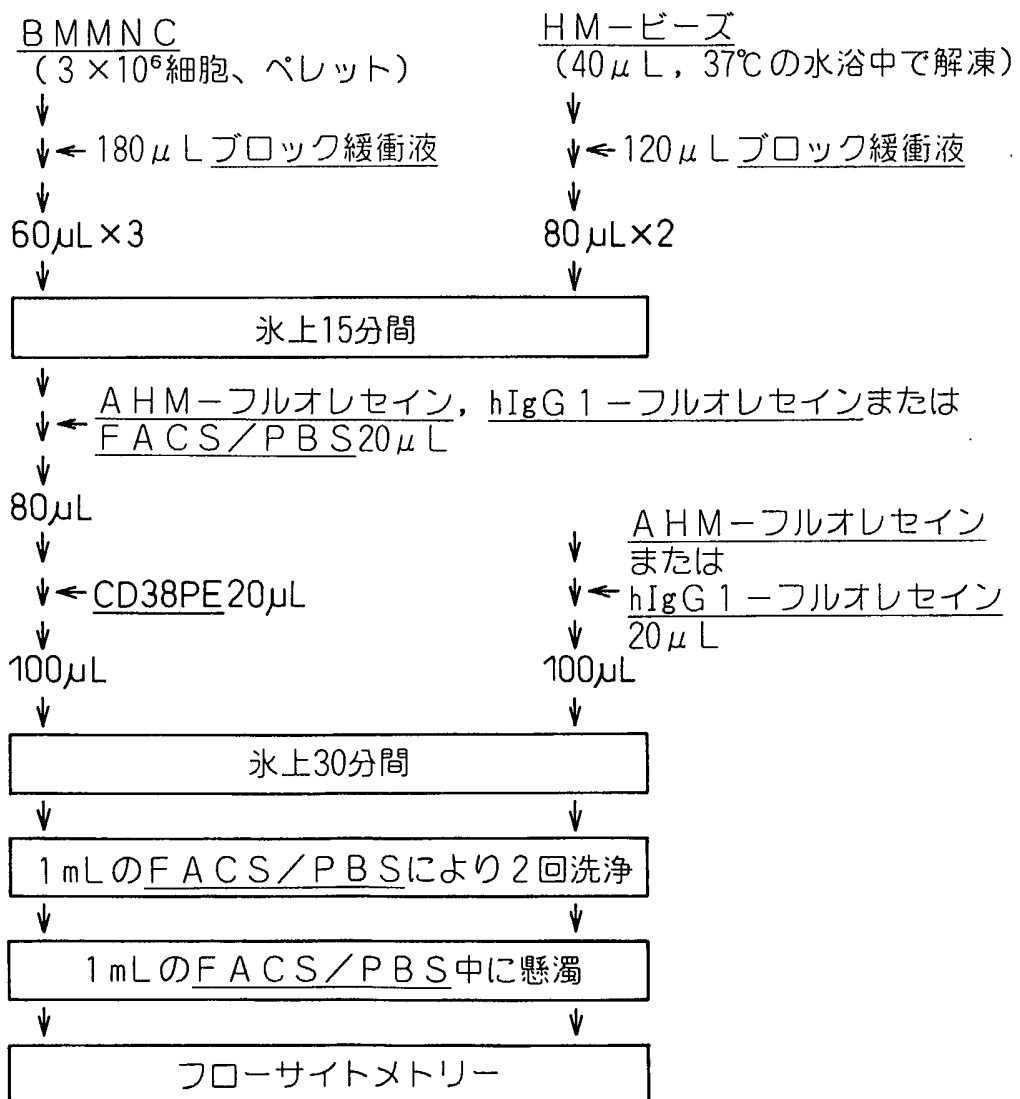


Fig.2

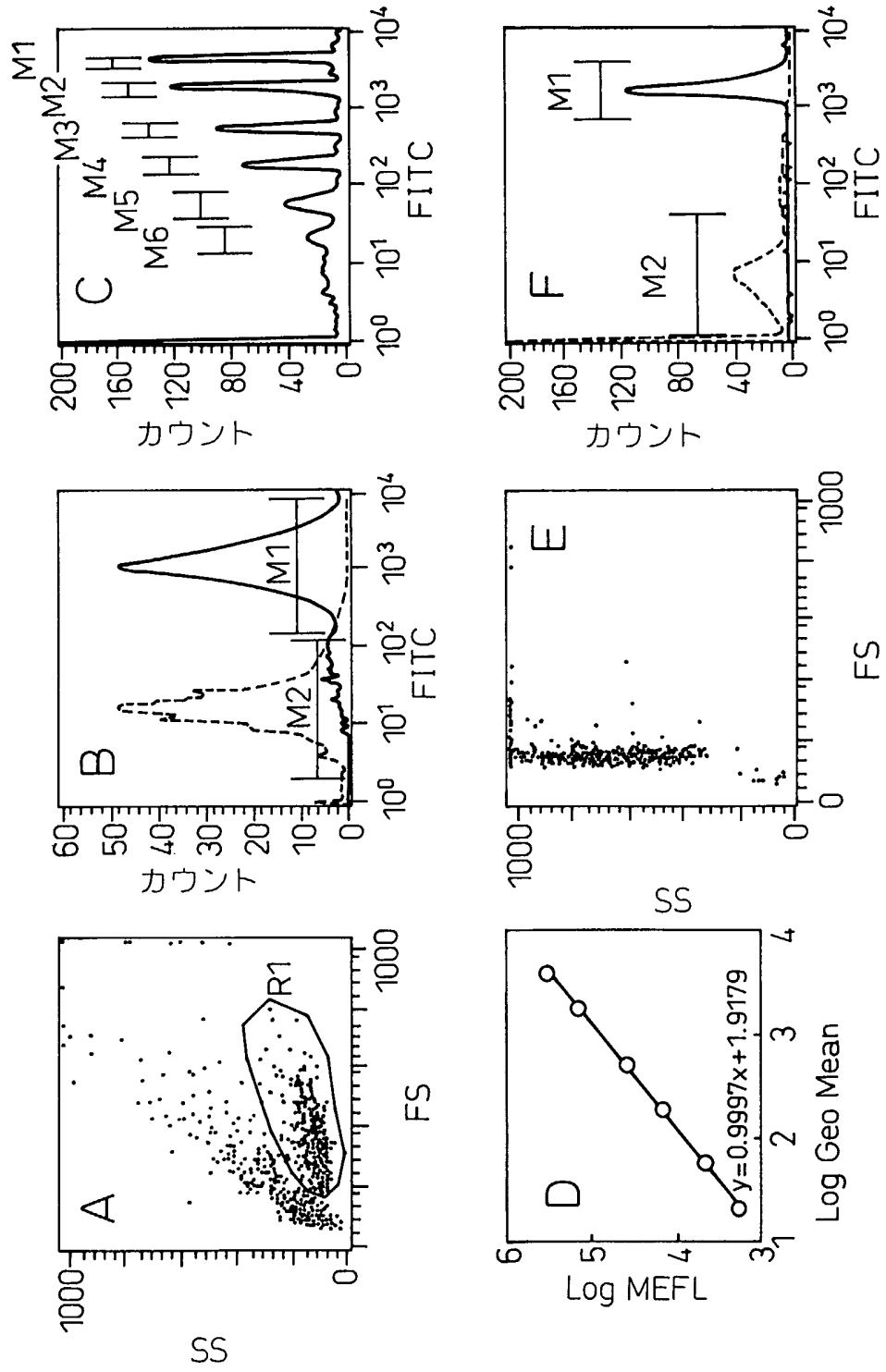


Fig.3

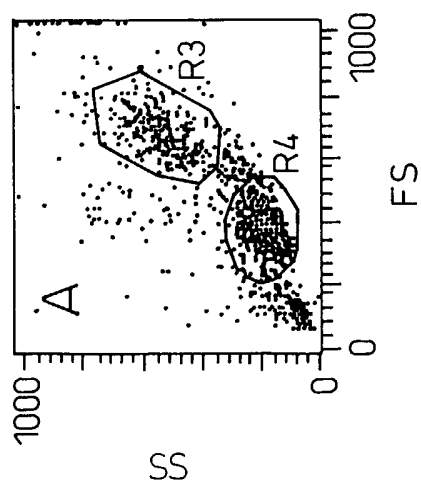
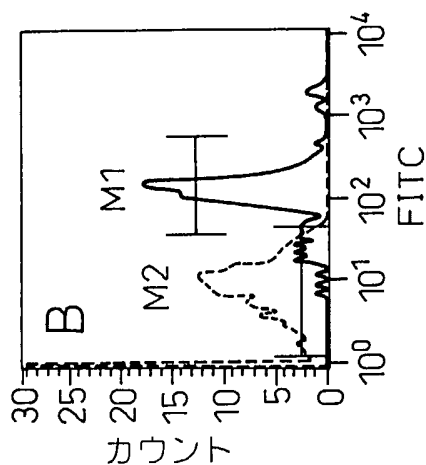
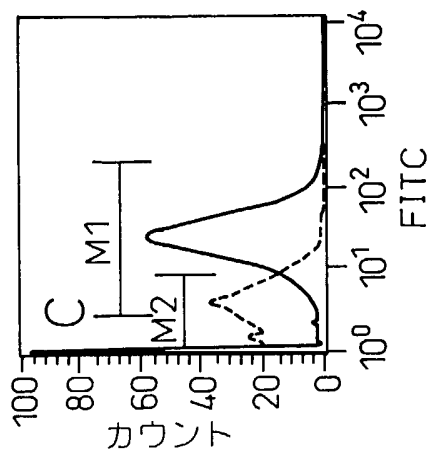


Fig.4

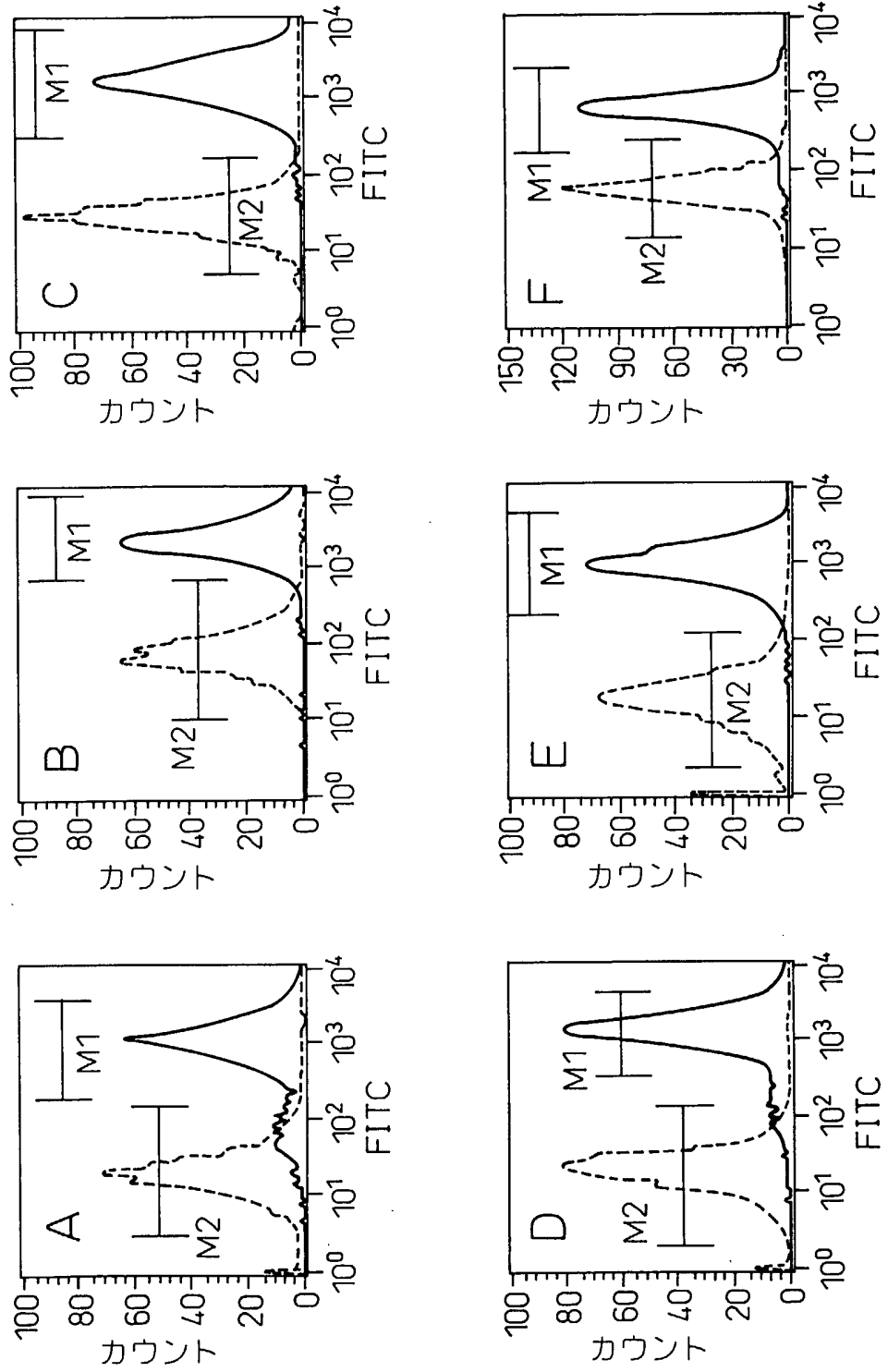


Fig.5

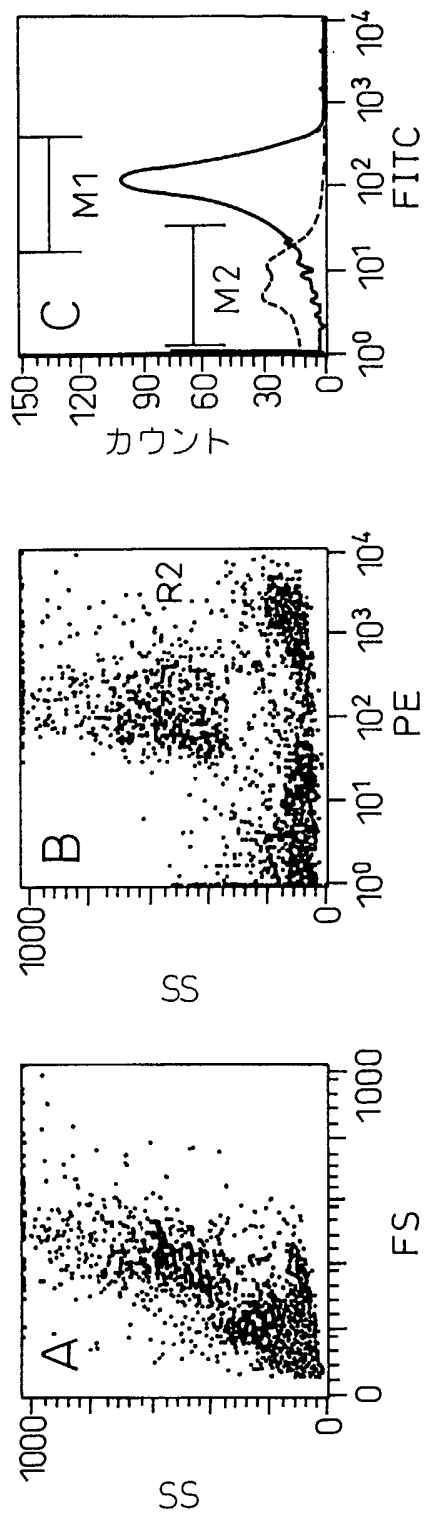


Fig.6

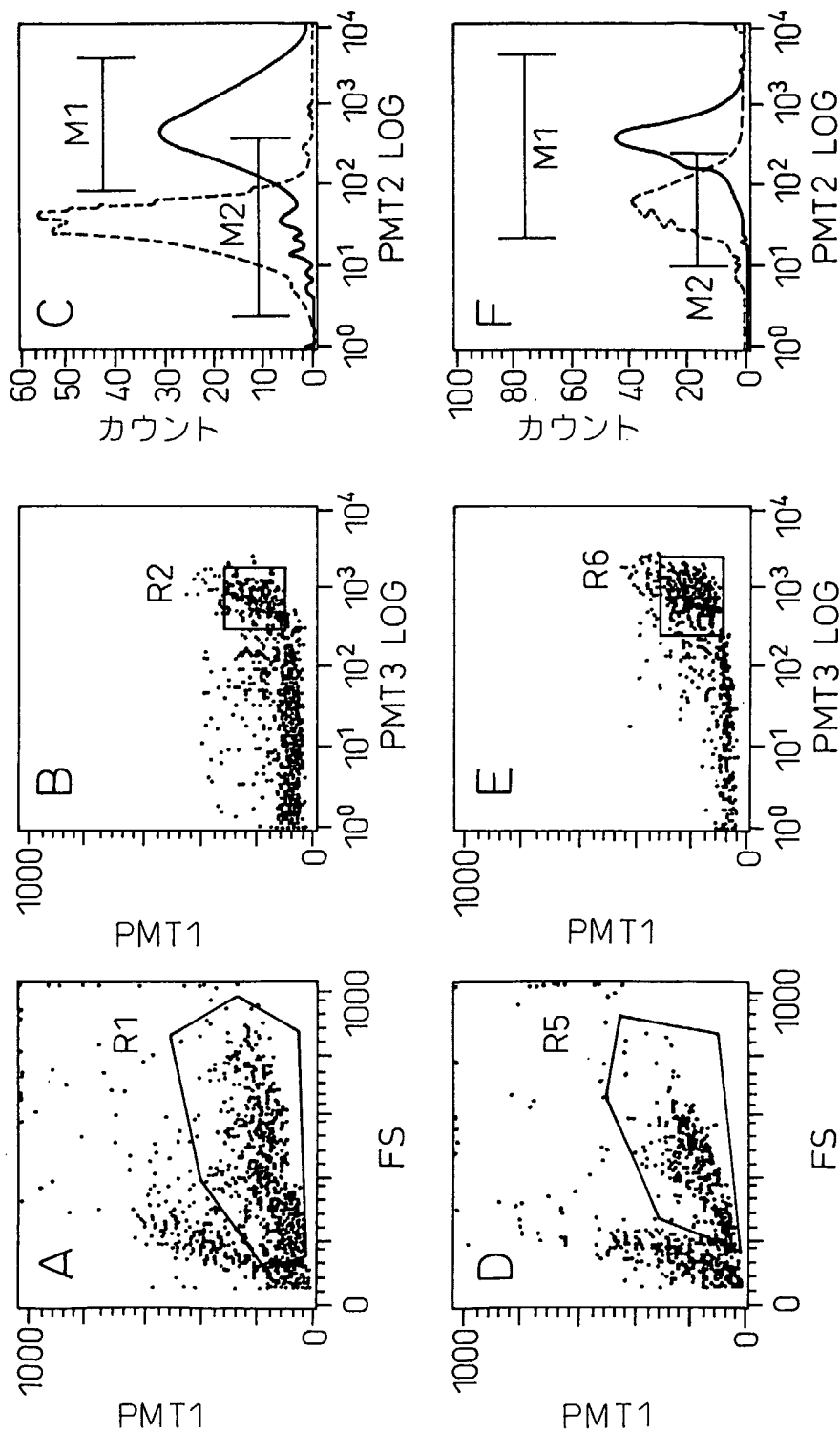


Fig.7

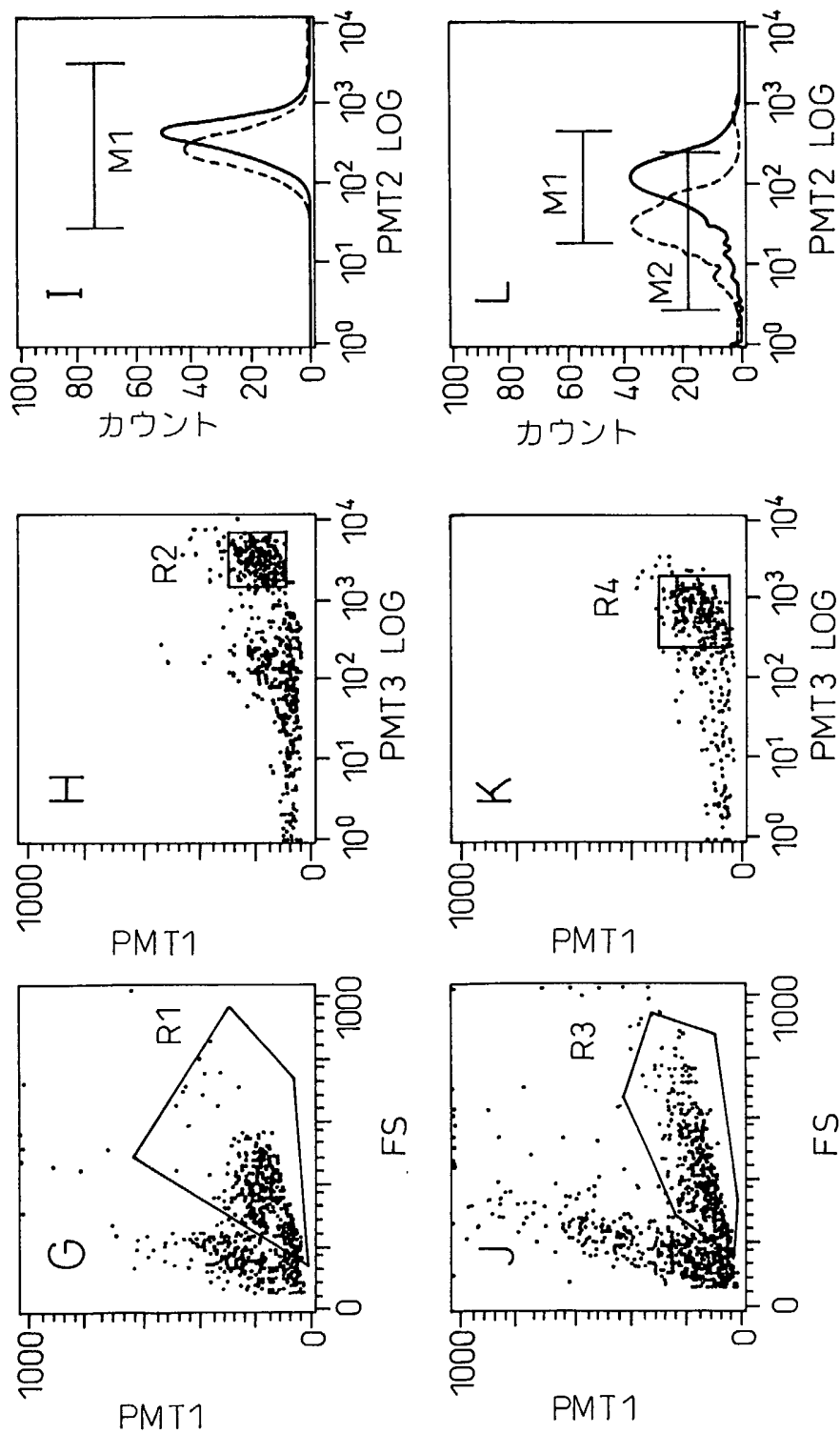


Fig. 8

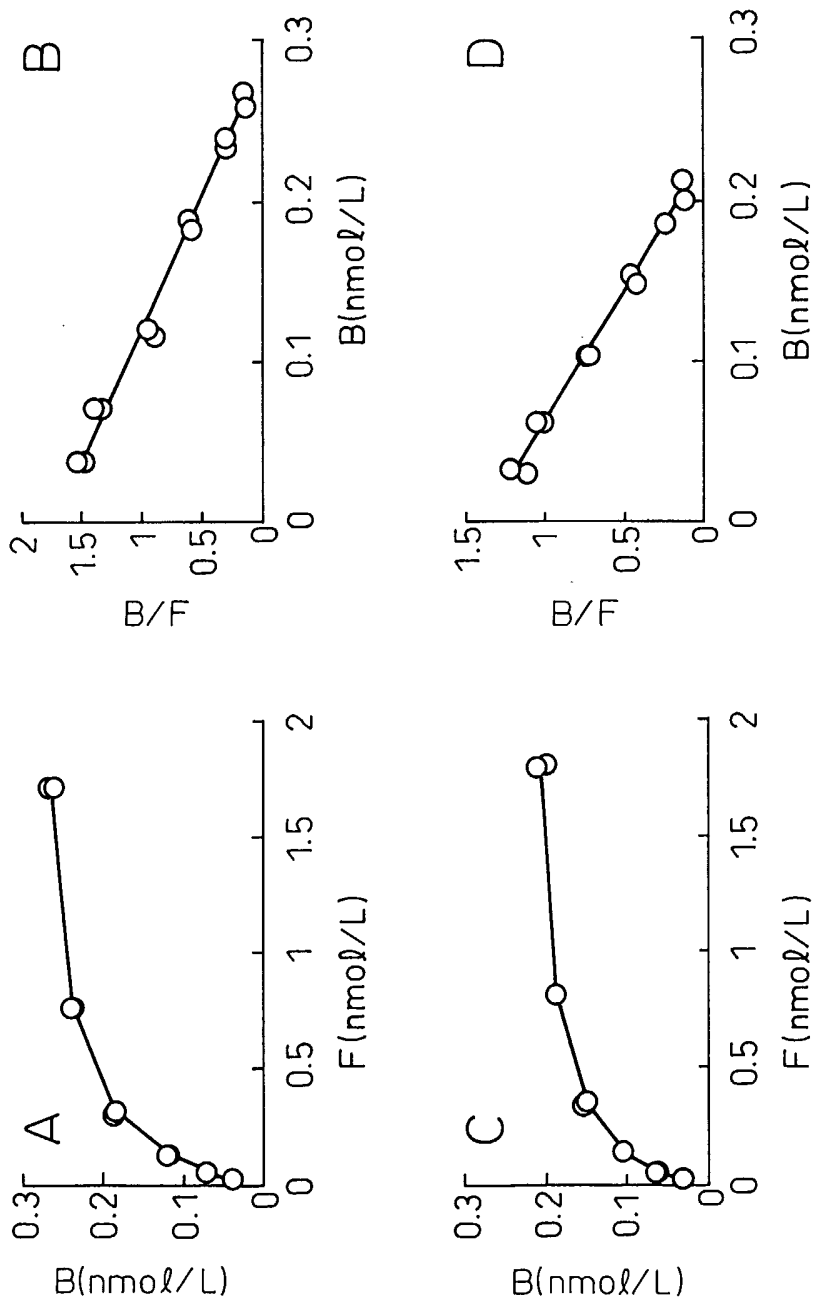


Fig.9

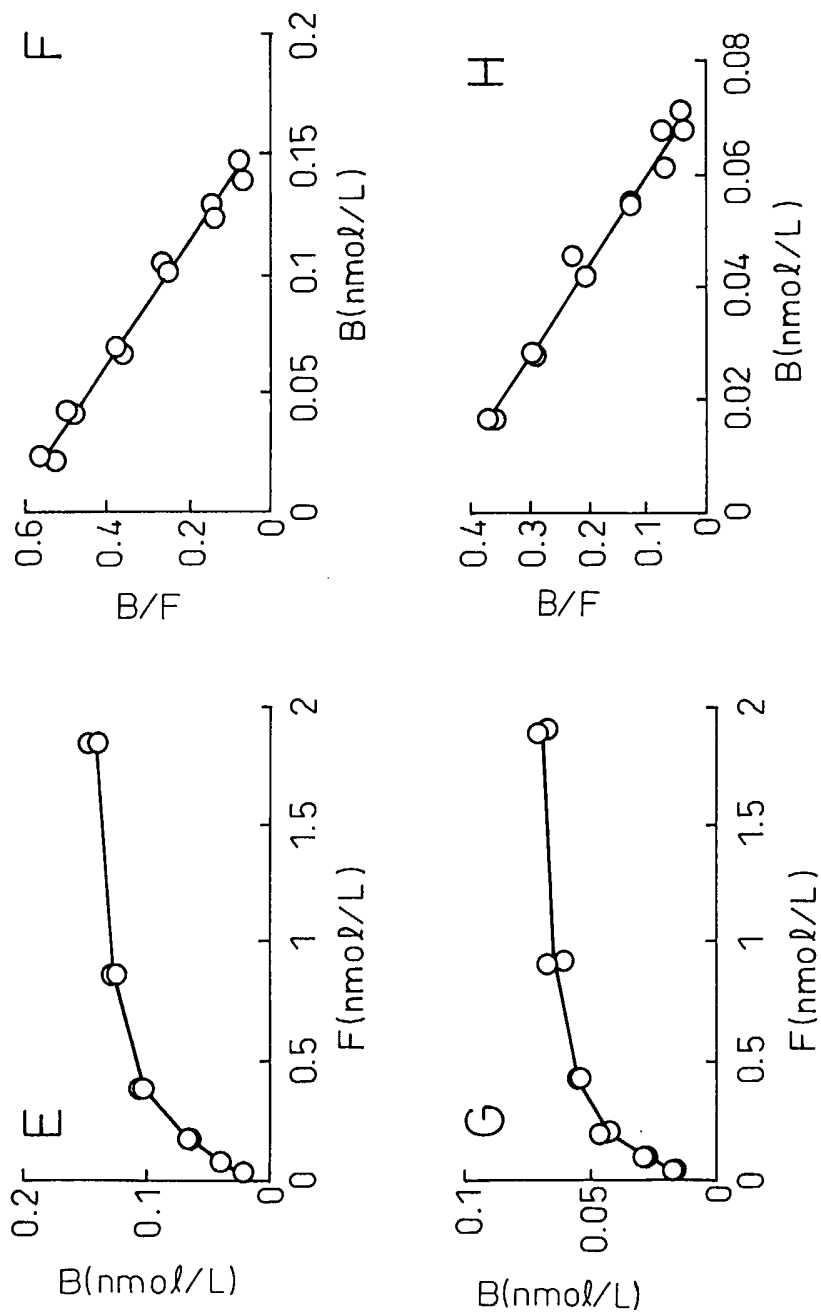


Fig.10

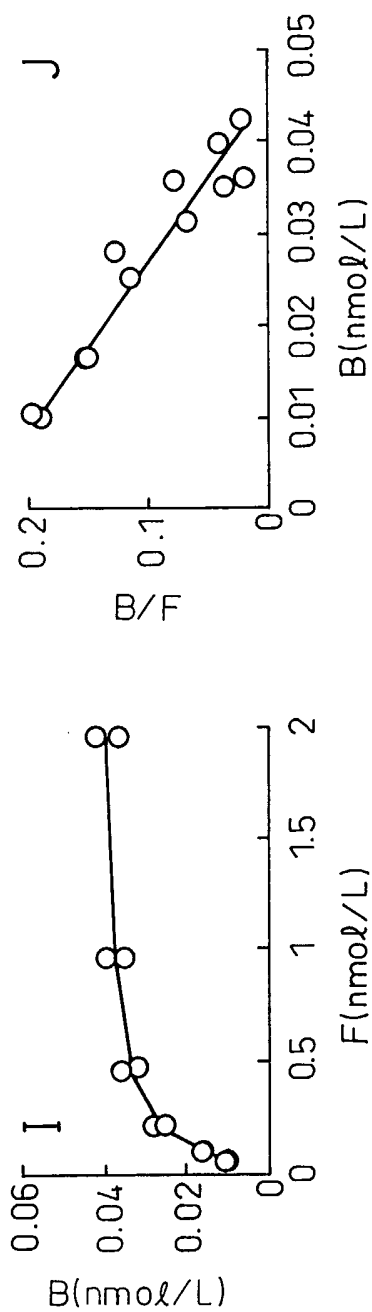


Fig.11

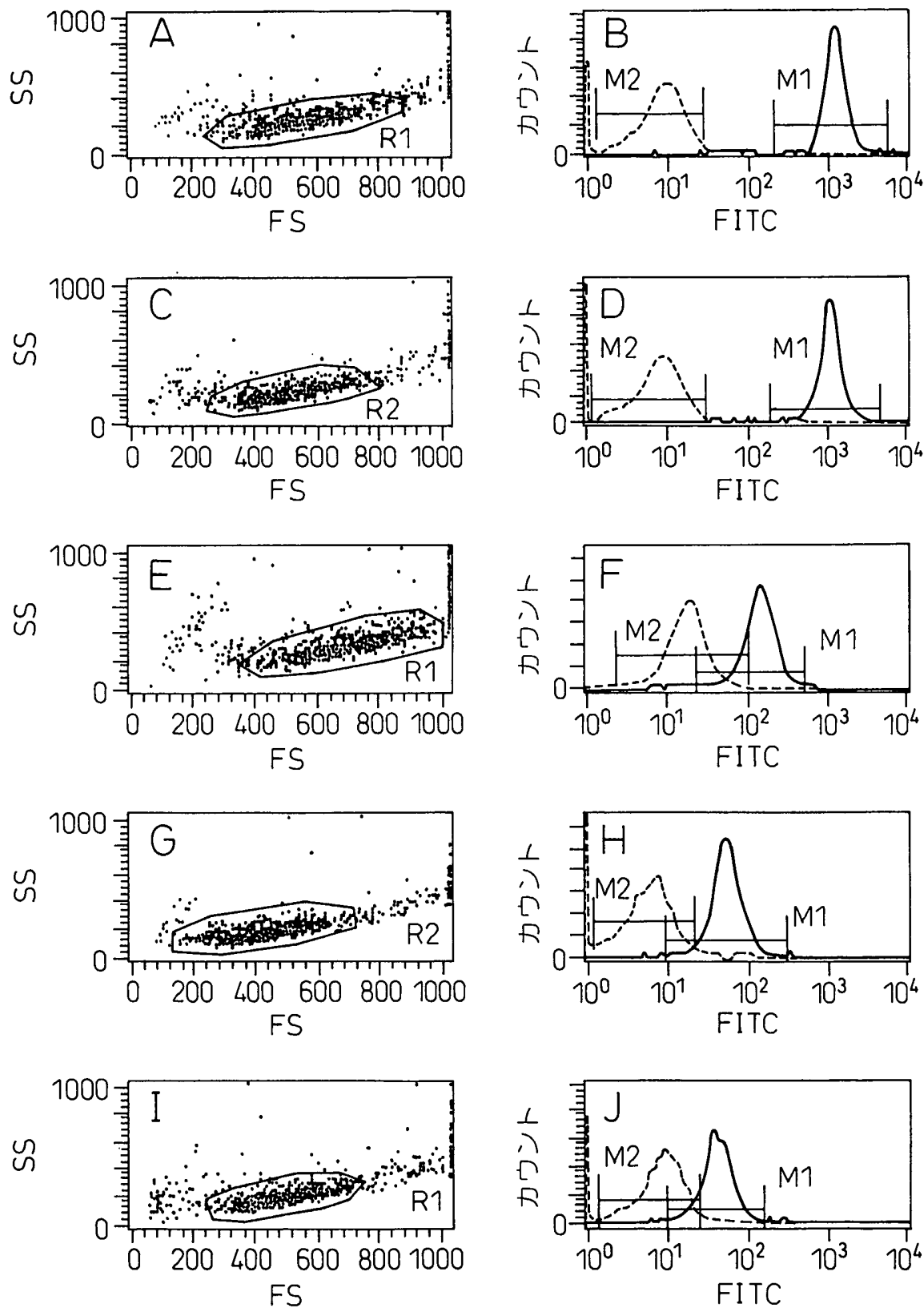


Fig.12

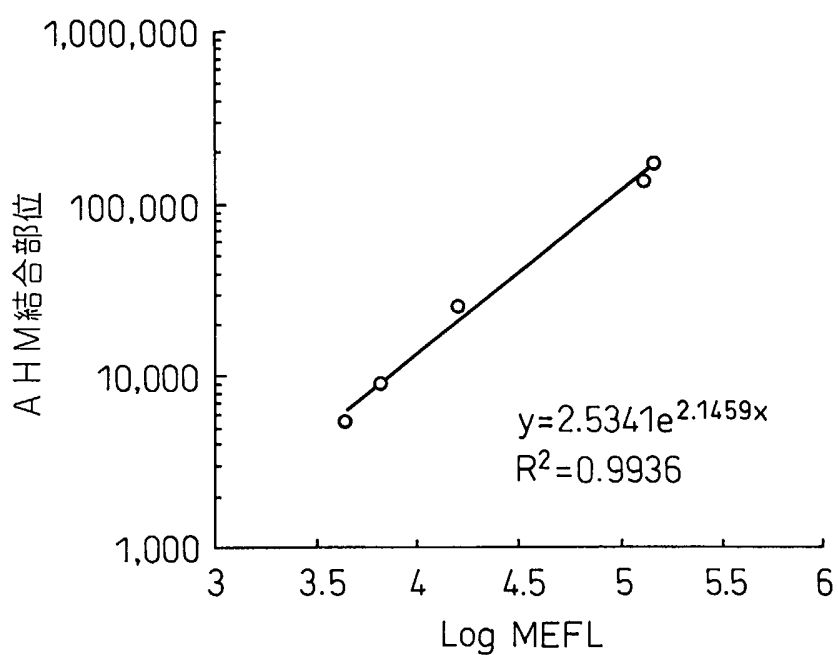


Fig.13

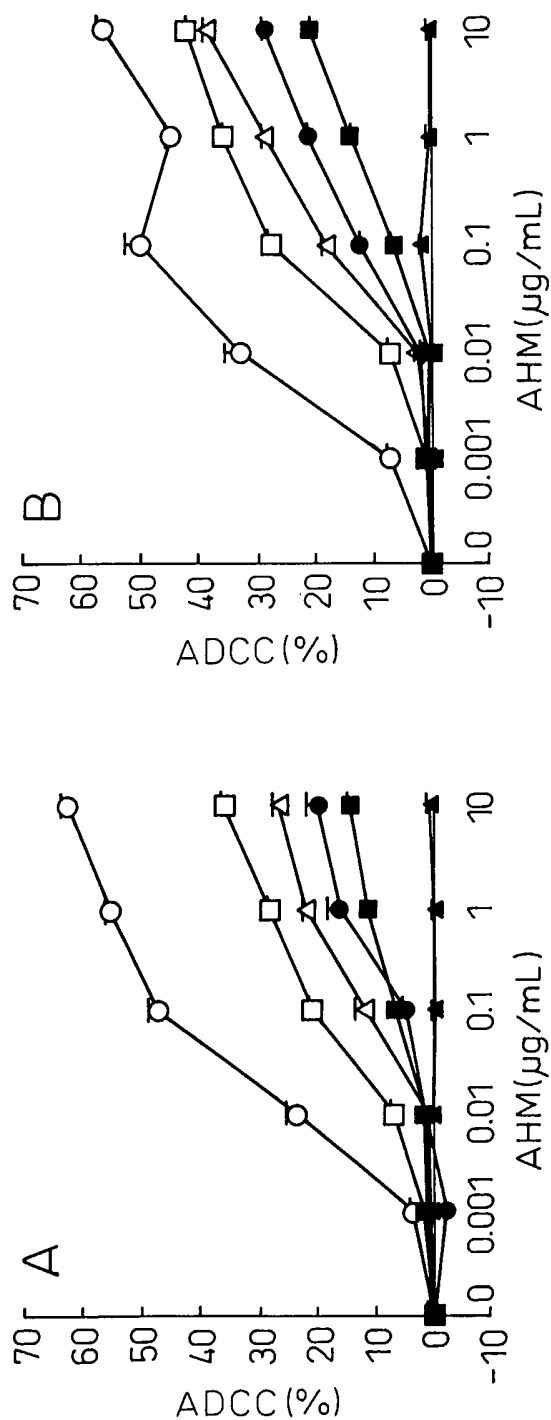


Fig.14

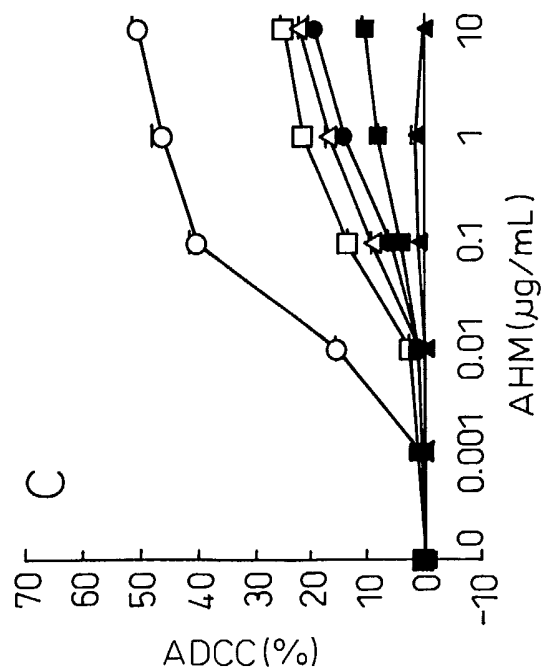
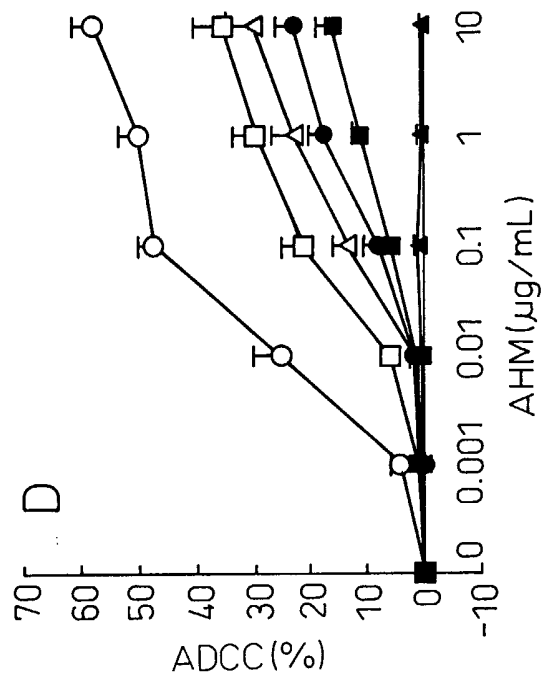


Fig.15

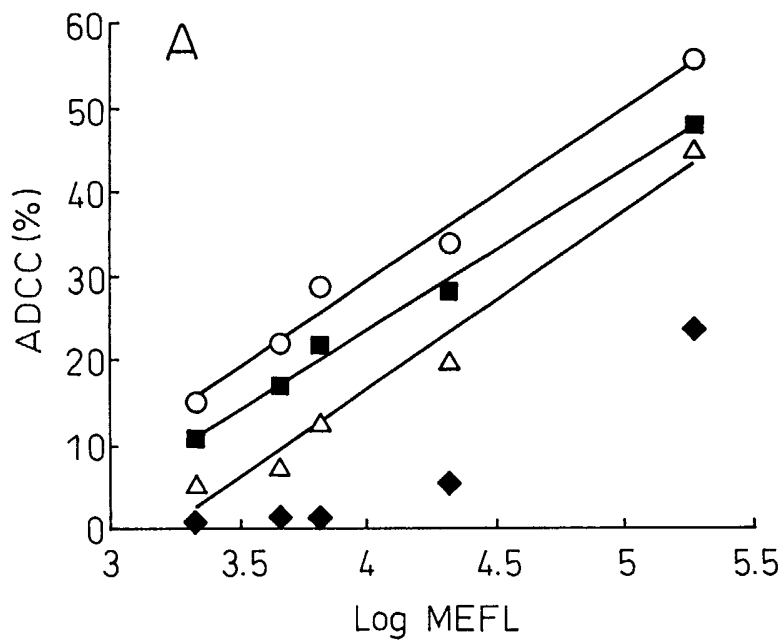


Fig.16

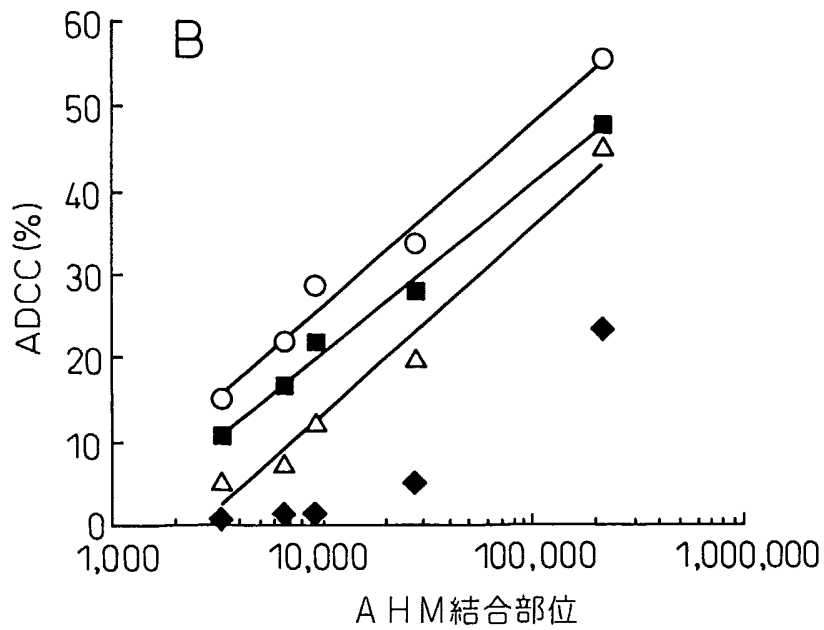


Fig.17

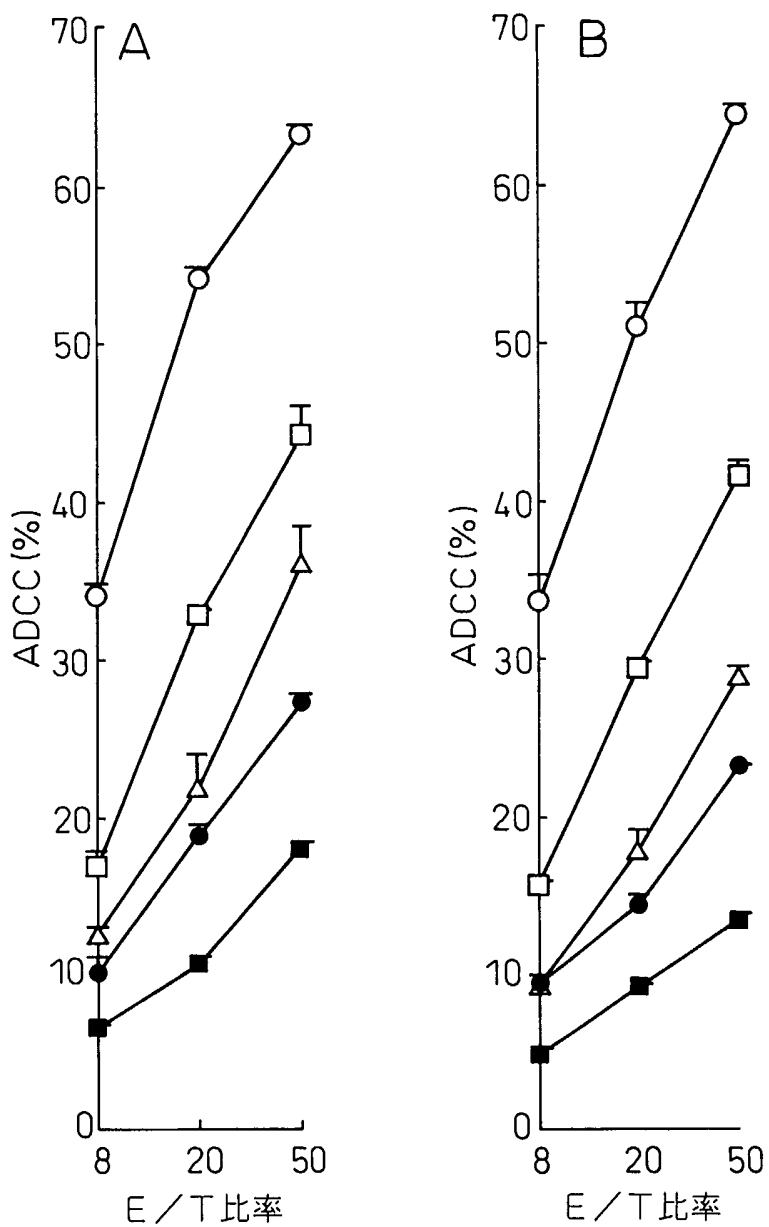


Fig.18

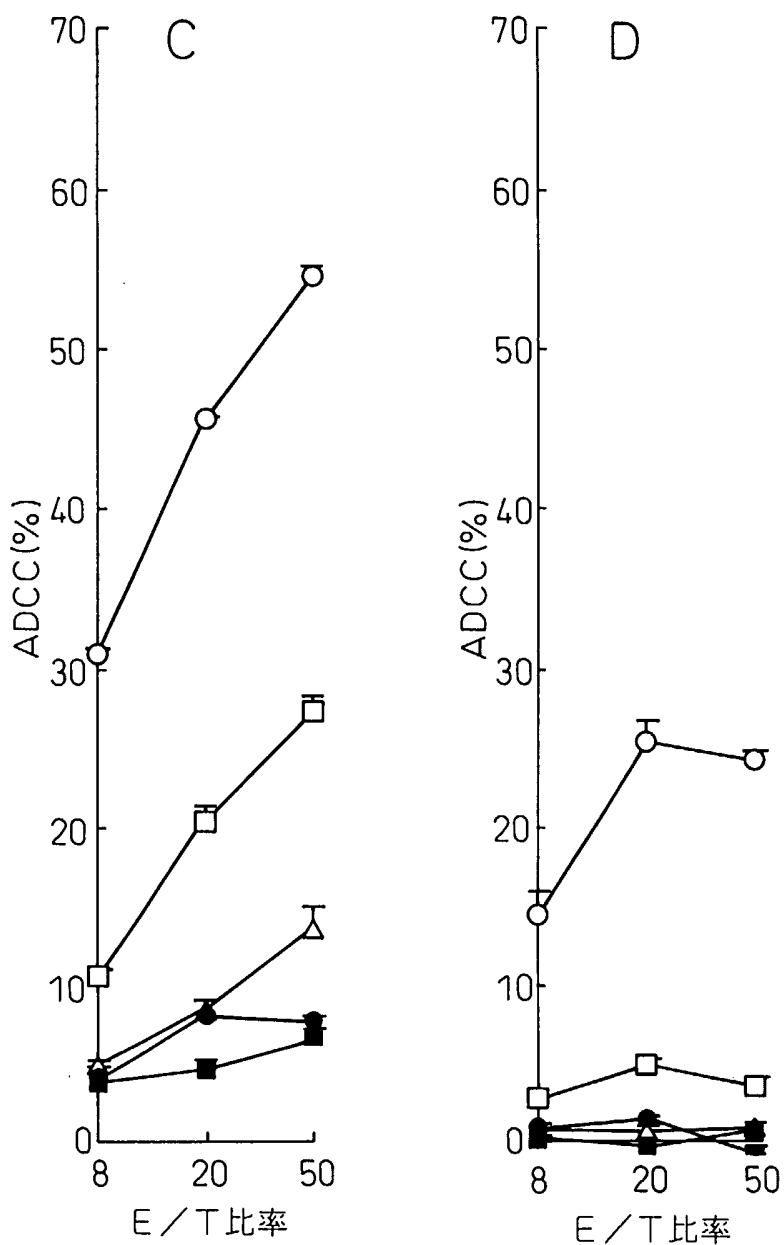


Fig.19

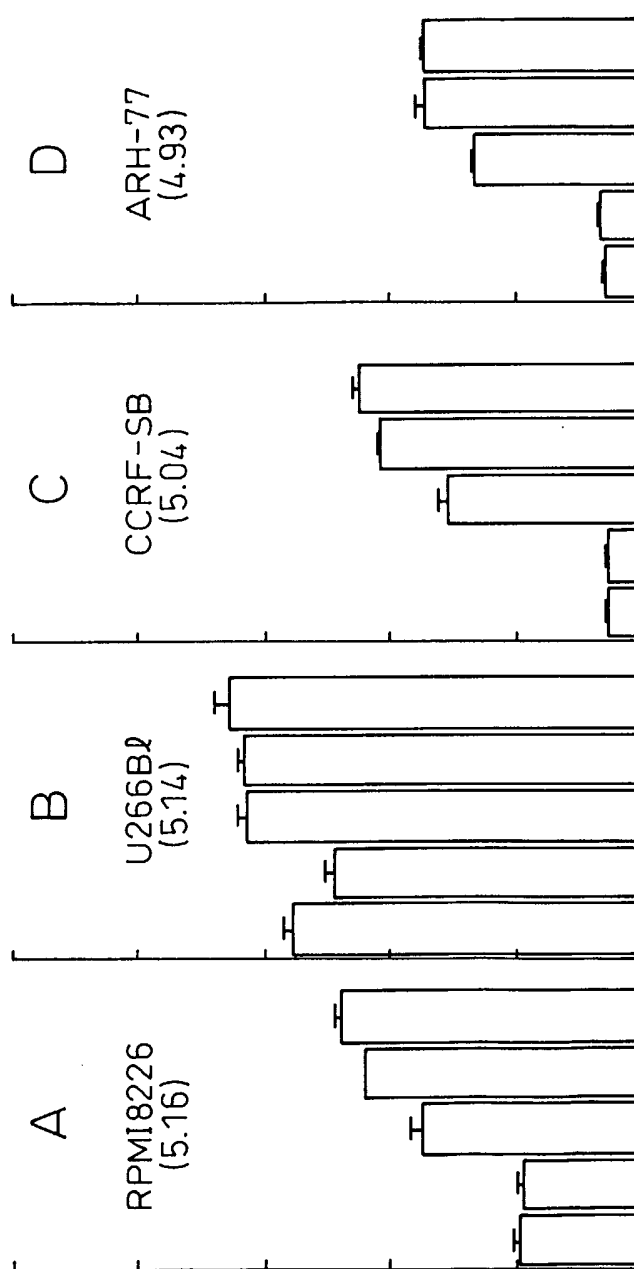


Fig. 20

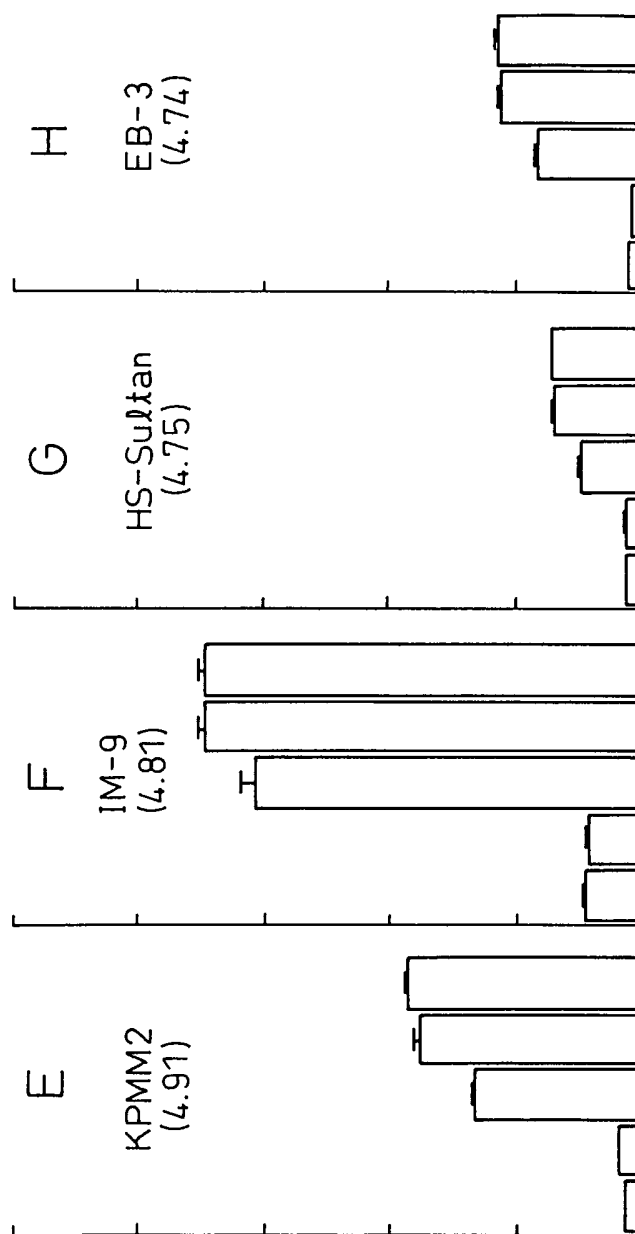
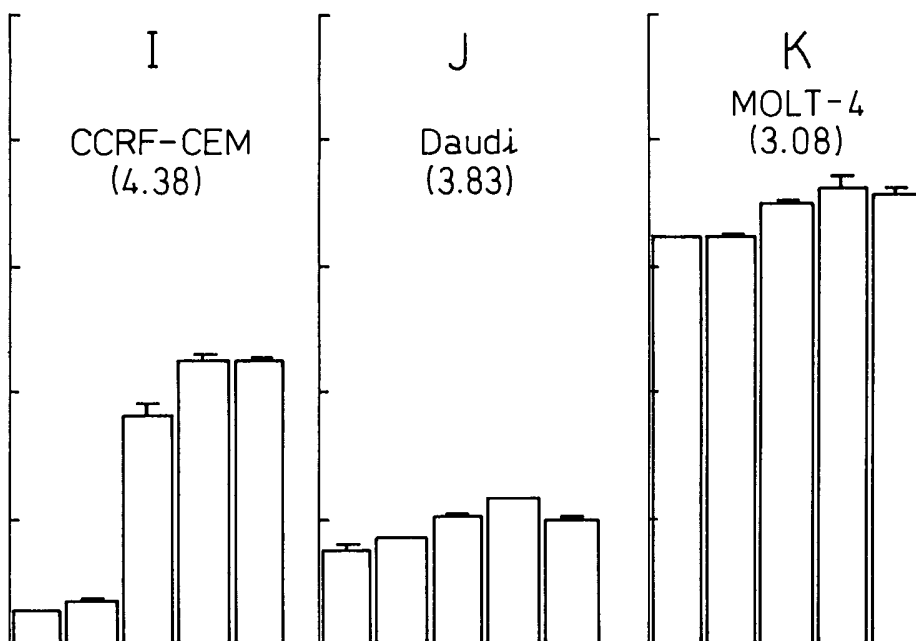


Fig.21



SEQUENCE LISTING

<110> Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha

<120> Method for Quantitating Amount of Expressed antigen

<130> K730

<150> JP 2001-115889

<151> 2001-04-13

<160> 6

<210> 1

<211> 1013

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleotide sequence coding for HM 1.24 antigen

<400> 1

gaattcggca cgagggatct gg atg gca tct act tcg tat gac tat tgc 49

Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys

1 5

aga gtg ccc atg gaa gac ggg gat aag cgc tgt aag ctt ctg ctg ggg 97

Arg Val Pro Met Glu Asp Gly Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly

10 15 20 25

ata gga att ctg gtg ctc ctg atc atc gtg att ctg ggg gtg ccc ttg 145

Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu

30 35 40

att atc ttc acc atc aag gcc aac agc gag gcc tgc cgg gac ggc ctt 193

Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu

45 50 55

cgg gca gtg atg gag tgt cgc aat gtc acc cat ctc ctg caa caa gag 241
 Arg Ala Val Met Glu Cys Arg Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu
 60 65 70
 ctg acc gag gcc cag aag ggc ttt cag gat gtg gag gcc cag gcc gcc 289
 Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala
 75 80 85
 acc tgc aac cac act gtg atg gcc cta atg gct tcc ctg gat gca gag 337
 Thr Cys Asn His Thr Val Met Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu
 90 95 100 105
 aag gcc caa gga caa aag aaa gtg gag gag ctt gag gga gag atc act 385
 Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr
 110 115 120
 aca tta aac cat aag ctt cag gac gcg tct gca gag gtg gag cga ctg 433
 Thr Leu Asn His Lys Leu Gln Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu
 125 130 135
 aga aga gaa aac cag gtc tta agc gtg aga atc gcg gac aag aag tac 481
 Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr
 140 145 150
 tac ccc agc tcc cag gac tcc agc tcc gct gcg gcg ccc cag ctg ctg 529
 Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu
 155 160 165
 att gtg ctg ctg ggc ctc agc gct ctg ctg cag tga gatcccagga 575
 Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser Ala Leu Leu Gln ***
 170 175 180
 agctggcaca tcttgaagg tccgtcctgc tcggcttttc gcttgaacat tcccttgatc 635
 tcatcagttc tgagcgggtc atggggcaac acggttagcg gggagagcac ggggtagccg 695
 gagaagggcc tctggagcag gtctggaggg gccatggggc agtcctgggt ctggggacac 755

```

agtcggggtg acccagggtg gtctccctcc agagcctccc tccggacaat gagtcccccc 815
tcttgtctcc caccctgaga ttgggcatgg ggtgcggtgt ggggggcatg tgctgcctgt 875
tgttatgggt tttttttgcg gggggggttg cttttttctg gggcttttga gctccaaaaa 935
aataaacact tcctttgagg gagagcacac cttaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 995
aaaattcggg cggccgcc

```

1013

<210> 2

<211> 180

<212> PRT

<213> Homosapiens

<220>

<223> Amino acid sequence of HM 1.24 antigen

<400> 2

```

Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys Arg Val Pro Met Glu Asp Gly
  1           5           10           15
Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu
          20           25           30
Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala
          35           40           45
Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys Arg
          50           55           60
Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly
          65           70           75           80
Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val Met
          85           90           95
Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys
          100          105          110

```

Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu Gln

115 120 125

Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu

130 135 140

Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser

145 150 155 160

Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser

165 170 175

Ala Leu Leu Gln

180

<210> 3

<211> 379

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleotide sequence coding for reshaped human anti-HM 1.24 antibod

y L chain V region version a

<400> 3

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc tcc ttg gta gca aca gct aca ggt 48

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

-15 -10 -5

gtc cac tcc gac atc cag atg acc cag agc cca agc agc ctg agc gcc 96

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala

-1 1 5 10

agc gtg ggt gac aga gtg acc atc acc tgt aag gct agt cag gat gtg 144

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val

15 20 25

aat act gct gta gcc tgg tac cag cag aag cca gga aag gct cca aag 192
 Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 30 35 40 45
 ctg ctg atc tac tcg gca tcc aac cgg tac act ggt gtg cca agc aga 240
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg
 50 55 60
 ttc agc ggt agc ggt agc ggt acc gac ttc acc ttc acc atc agc agc 288
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser
 65 70 75
 ctc cag cca gag gac atc gct acc tac tac tgc cag caa cat tat agt 336
 Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser
 80 85 90
 act cca ttc acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa c 379
 Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 95 100 105

<210> 4

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Amino acid sequence of reshaped human anti-HM1.24 antibody L chain V region version a

<400> 4

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 -15 -10 -5

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
 -1 1 5 10
 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val
 15 20 25
 Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 30 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg
 50 55 60
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser
 65 70 75
 Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser
 80 85 90
 Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 95 100 105

<210> 5

<211> 418

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleotide sequence coding for reshaped human anti-HM 1.24 antibody H chain V region version s

<400> 5

atg gac tgg acc tgg agg gtc ttc ttc ttg ctg gct gta gct cca ggt 48
 Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
 -15 -10 -5

gct cac tcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag 96
 Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 -1 1 5 10
 cct ggg gcc tca gtg aag gtt tcc tgc aag gca tct gga tac acc ttc 144
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 15 20 25
 act ccc tac tgg atg cag tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 192
 Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 30 35 40 45
 gag tgg atg gga tct att ttt cct gga gat ggt gat act agg tac agt 240
 Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser
 50 55 60
 cag aag ttc aag ggc aga gtc acc atc acc gca gac aag tcc acg agc 288
 Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 65 70 75
 aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg 336
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 80 85 90
 tat tac tgt gcg aga gga tta cga cga ggg ggg tac tac ttt gac tac 384
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 95 100 105
 tgg ggg caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca g 418
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120

<210> 6

<211> 139

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Amino acid sequence of reshaped human anti-HM 1.24 antibody H chain

n V region version s

<400> 6

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
 -15 -10 -5
 Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 -1 1 5 10
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 15 20 25
 Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 30 35 40 45
 Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser
 50 55 60
 Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 65 70 75
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 80 85 90
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 95 100 105
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 100 115 120

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/03703

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G01N33/536, 33/53, 33/574, 21/64

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.Cl⁷ G01N33/50-33/98, 21/64

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2002
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2002 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2002

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 10-286088 A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 27 October, 1998 (27.10.98), & WO 98/035698 A1 & AU 5956398 A	35-40
Y	& EP 997152 A1 & BR 9811094 A & SK 110099 A	1-34
Y	JP 61-223559 A (Sekisui Fine Chemical Co., Ltd.), 04 October, 1986 (04.10.86), (Family: none)	1-34
Y	WO 00/017395 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 30 March, 2000 (30.03.00), & AU 5303699 A	1-34

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)
 "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
09 July, 2002 (09.07.02)

Date of mailing of the international search report
23 July, 2002 (23.07.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/03703

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 10-155494 A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 16 June, 1998 (16.06.98), & WO 98/014580 A1 & EP 960936 A1 & BR 9712488 A & AU 4399297 A	1-40
A	JP 63-36151 A (Showa Denko Kabushiki Kaisha), 16 February, 1988 (16.02.88), (Family: none)	1-34

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/536, 33/53, 33/574, 21/64

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 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/50-33/98, 21/64

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 1971-2002年
- 日本国登録実用新案公報 1994-2002年
- 日本国実用新案登録公報 1996-2002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)

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	JP 10-286088 A(中外製薬株式会社)1998. 10. 27 & W098/035698 A1 & AU 5956398 A & EP 997152 A1 & BR 9811094 A & SK 110099 A	35-40
Y		1-34
Y	JP 61-223559 A(積水ファインケミカル株式会社)1986. 10. 04(ファミリーなし)	1-34
Y	W000/017395 A1(中外製薬株式会社)2000. 03. 30 & AU 5303699 A	1-34

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。

<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>	<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p>
--	---

国際調査を完了した日 09. 07. 02

国際調査報告の発送日 23.07.02

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/JJP)
 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)
 松本 征二 
 2 J 9 2 1 2
 電話番号 03-3581-1101 内線 3250

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
Y	JP 10-155494 A(中外製薬株式会社)1998.06.16 & W098/014580 A1 & EP 960936 A1 & BR 9712488 A & AU 4399297 A	1-40
A	JP 63-36151 A(昭和電工株式会社)1988.02.16 (ファミリーなし)	1-34