



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110402391 A

(43)申请公布日 2019.11.01

(21)申请号 201880013679.4

(22)申请日 2018.02.02

(30)优先权数据

2017-036438 2017.02.28 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.08.23

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2018/003599 2018.02.02

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/159212 JA 2018.09.07

(71)申请人 柯尼卡美能达株式会社

地址 日本东京

(72)发明人 高桥优 白石武嗣 小山升

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

代理人 何杨

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

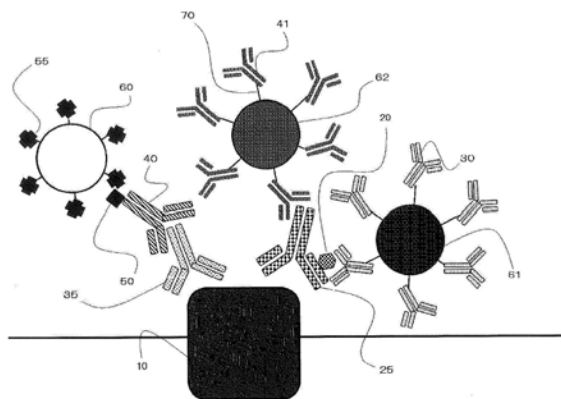
权利要求书1页 说明书22页 附图2页

(54)发明名称

抗体-药物复合体的构成成分的检测方法

(57)摘要

本发明涉及检测抗体-药物复合体的手段、以及通过定量的手段确定抗体-药物复合体的靶细胞中的靶分子的表达和它们的相互作用来高精度地判定抗体-药物复合体的有效性的方法。根据该方法,通过使用荧光体集成粒子的免疫染色法使作为抗体-药物复合体的构成成分的药物和/或作为抗体-药物复合体的构成成分的抗体可视化,从而可以检测抗体-药物复合体和其构成成分。



1. 一种基于使用荧光体集成粒子的免疫染色法的抗体-药物复合体的构成成分的检测方法,其包含下述 (a) 和 (b) 中的至少一者: (a) 使作为抗体-药物复合体的构成成分的药物可视化的工序; (b) 使作为抗体-药物复合体的构成成分的抗体可视化的工序。

2. 根据权利要求1所述的检测方法,其中,还包含 (c) 使抗体-药物复合体的靶分子可视化的工序。

3. 根据权利要求2所述的检测方法,其中,所述靶分子为在细胞中表达的蛋白质。

4. 根据权利要求2或3所述的检测方法,其中,所述靶分子为在细胞表面表达的受体或配体。

5. 根据权利要求3或4所述的检测方法,其中,所述细胞为癌细胞或免疫细胞。

6. 根据权利要求2~5中任一项所述的检测方法,其中,所述靶分子选自由癌细胞中的免疫系蛋白、癌细胞生长因子、转移控制因子、血管生长因子、细胞因子、癌细胞生长控制因子受体、转移控制因子受体、血管生长因子受体和细胞因子受体组成的组。

7. 根据权利要求2~5中任一项所述的检测方法,其中,所述靶分子选自由免疫细胞中的免疫系蛋白、生长因子、生长控制因子、生长刺激因子、免疫细胞转移因子、细胞因子、免疫控制因子、信号转导相关蛋白和它们的受体组成的组。

8. 一种用于疾病的诊断或治疗的信息取得方法,其利用权利要求1~7中任一项所述的检测方法确定采集自给药了抗体-药物复合体的人或人以外的动物的被检体中的下述信息中的至少一者: (i) 抗体-药物复合体的定位、(ii) 与所述抗体-药物复合体发生了结合的靶分子相对于所述靶分子的总量的比率、(iii) 所述靶分子、作为所述抗体-药物复合体的构成成分的抗体、作为所述抗体-药物复合体的构成成分的药物间的距离。

9. 根据权利要求8所述的信息取得方法,其中,所述用于诊断或治疗的信息是关于癌症、神经疾病、感染性疾病或遗传性疾病的信息。

10. 根据权利要求8或9所述的信息取得方法,其中,所述被检体为源自肿瘤组织的被检体。

抗体-药物复合体的构成成分的检测方法

技术领域

[0001] 本发明主要涉及作为抗体-药物复合体的构成成分的抗体和/或药物的检测方法。

背景技术

[0002] 癌症是与以心肌梗塞、脑梗塞为代表的血管系统疾病一起各占成人死亡原因一半的疾病。日本人中,例如乳腺癌罹患率低于欧美各国,但近年有增加倾向,1998年超过了胃癌罹患率而成为女性罹患率的第1位。根据最近的报道、即2005年厚生劳动省统计,每年罹患乳腺癌的人数超过了5万人。在全世界范围内,该数字也同样在逐年增加,根据2008年的WHO报告,在男女合计的情况下乳腺癌的罹患率也占第一位,每年罹患人数超过138万人,占女性全部癌症的约23%。

[0003] 作为癌症的治疗药,以往广泛使用小分子药物,近年开发了数量众多的选择性和治疗效果更好且副作用少的抗体药物,并且已用于临床。另外,最近,兼具小分子药物和抗体药物的优点的抗体-药物复合体(ADC;Antibody-drug-conjugate)药物的开发已经展开并被认为是癌症治疗中有吸引力的开发领域。

[0004] 抗体-药物复合体具有借助合适的接头将单克隆抗体和小分子药物等药物结合而成的结构。当与在靶细胞表面表达的细胞表面抗原、受体或配体等抗原特异性结合并通过内吞作用被摄入细胞内时,在细胞内的pH环境、酶的作用下,接头、抗体发生分解,药物从抗体中释放出来,从而可以选择性杀伤目标细胞。

[0005] 为了在将抗体-药物复合体用于临床时构建有效的给药计划,而且为了能够扩大给药对象,期望确定给药后的各时点的抗体-药物复合体的药代动力学。但是,从灵敏度的角度来看,通过以往的方法难以检测抗体-药物复合体。

[0006] 另外,作为判定抗体-药物复合体的有效性的方法,期望确定与靶细胞的相互作用等信息。例如,为了使抗体-药物复合体对肿瘤显示出药效,需要使抗体-药物复合体的靶分子在患者的肿瘤细胞表面充分表达、进一步通过抗体-药物复合体适当地识别靶分子并相互作用而被摄入细胞内。因此可以说,通过对成为抗体-药物复合体的靶标的生物体物质的表达量进行定量评价,可以有效地确定分子靶标药对每位患者的适用性。

[0007] 在抗体药物中作为乳腺癌的代表性抗癌剂-曲妥珠单抗(商品名;赫赛汀(Herceptin)注册商标)的有效性的判定方法,广泛使用靶分子HER2蛋白的表达信息分析,作为其方法,例如在临床上广泛使用对靶标生物体物质的蛋白质进行染色的免疫组织染色(Immunohistochemistry;IHC)法和对靶标生物体物质的基因进行染色的FISH(Fluorescence in situ hybridization,荧光原位杂交)法等。

[0008] 在此,IHC法是将被检体中所含的HER2蛋白用DAB(3,3'-Diaminobenzidine;3,3'-二氨基联苯胺)染色而进行检测的方法。但是,其判定基准为仅将染色水平设为0~3分的4阶段的粗略判定基准,因此缺乏定量性,进一步地判定基准还受病理医的熟练度影响,在临床上成为问题。

[0009] 另一方面,FISH法是使用检测17号染色体上的编码HER2蛋白的基因的探针、对该

基因进行荧光染色的方法。FISH法虽然为一种定量检查法,但是并不是直接评价HER2蛋白的量和细胞内定位的方法。

[0010] 近年来,为了更准确地评价蛋白质的表达量、细胞内定位,提出了用纳米尺寸的荧光粒子、例如以树脂等为母体且集成了荧光色素或量子点等荧光体的粒子(荧光体集成粒子、Phosphor Integrated Dot:PID)标记目标蛋白的染色方法,其实用化正在推进中。使用荧光体集成粒子(其它文献中有时也称为“荧光物质集成纳米粒子”、“荧光体内包粒子”等。)标记目标蛋白并且照射与粒子内所集成的荧光物质相应的激发光,从而能够以高亮度的亮点形式观察目标蛋白,另外由于不易褪色,因此能够较长期地观察、拍摄。例如,专利文献1、专利文献2记载了使用荧光体集成粒子来进行免疫染色的方法。另外,专利文献3记载了一种免疫组织染色法,其中,将由荧光体集成粒子标记的抗体药物中所使用的抗体(曲妥单抗等)利用荧光体集成粒子进行标记、使该抗体药物与作为靶标的抗原(HER2等)结合,还记载了可以用于判定抗体药物的有效性的方法中等等。

[0011] 现有技术文献

[0012] 专利文献

[0013] 专利文献1:国际公开第2013/035703号

[0014] 专利文献2:国际公开第2012/029752号

[0015] 专利文献3:国际公开第2012/133047号

发明内容

[0016] 发明要解决的课题

[0017] 本发明是鉴于上述课题作出的,目的在于,提供检测抗体-药物复合体的手段,并且提供通过使用定量手段确定抗体-药物复合体的靶细胞中的靶分子的表达和它们的相互作用、从而高精度地判定抗体-药物复合体的有效性的方法。

[0018] 用于解决课题的手段

[0019] 本发明人发现,通过使用特异性识别作为抗体-药物复合体的构成成分的药物、抗体的抗体和荧光体集成粒子等荧光纳米粒子来进行免疫染色从而可以使抗体-药物复合体的体内动态可视化。

[0020] 进一步地,在另一方式中提供一种用于诊断或治疗的信息的取得方法,其确定下述信息:例如,抗体-药物复合体所靶向的细胞中表达的靶分子在每个细胞中的平均表达量、抗体-药物复合体的定位(是否内化到靶细胞中)、与上述抗体-药物复合体发生结合的靶分子相对于上述靶分子的总量的比率等。

[0021] 即,本发明提供下述的抗体-药物复合体的检测方法和信息取得方法。

[0022] [项1]一种基于使用荧光体集成粒子的免疫染色法的抗体-药物复合体的构成成分的检测方法,其包含下述(a)和(b)中的至少一者:(a)使作为抗体-药物复合体的构成成分的药物可视化的工序;(b)使作为抗体-药物复合体的构成成分的抗体可视化的工序。

[0023] [项2]根据项1所述的检测方法,其中,还包含(c)使抗体-药物复合体的靶分子可视化的工序。

[0024] [项3]根据项2所述的检测方法,其中,上述靶分子为在细胞中表达的蛋白质。

[0025] [项4]根据项2或3所述的检测方法,其中,上述靶分子为在细胞表面表达的受体或

配体。

[0026] [项5]根据项3或4所述的检测方法,其中,上述细胞为癌细胞或免疫细胞。

[0027] [项6]根据项2~5中任一项所述的检测方法,其中,上述靶分子选自自由癌细胞中的免疫蛋白、癌细胞生长因子、转移控制因子、血管生长因子、细胞因子、癌细胞生长控制因子受体、转移控制因子受体、血管生长因子受体和细胞因子受体组成的组。

[0028] [项7]根据项2~5中任一项所述的检测方法,其中,上述靶分子选自自由免疫细胞中的免疫系蛋白、生长因子、生长控制因子、生长刺激因子、免疫细胞转移因子、细胞因子、免疫控制因子、信号转导相关蛋白和它们的受体组成的组。

[0029] [项8]一种用于疾病的诊断或治疗的信息取得方法,其利用项1~7中任一项所述的检测方法确定采集自给药了抗体-药物复合体的人或人以外的动物的被检体中的下述信息中的至少一者:(i)抗体-药物复合体的定位;(ii)与上述抗体-药物复合体结合的靶分子相对于上述靶分子的总量的比率;(iii)上述靶分子、作为上述抗体-药物复合体的构成成分的抗体、作为上述抗体-药物复合体的构成成分的药物间的距离。

[0030] [项9]根据项8所述的信息取得方法,其中,上述用于诊断或治疗的信息是关于癌症、神经疾病、感染性疾病或遗传性疾病的信息。

[0031] [项10]根据项8或9所述的信息取得方法,其中,上述被检体为源自肿瘤组织的被检体。

[0032] 发明的效果

[0033] 本发明的1个侧面中,用优选荧光体集成粒子等将抗体-药物复合体高精度且定量地可视化,因此能够确定使用DAB等的以往评价方法所无法获知的抗体-药物复合体的组织内定位、药代动力学,可以对抗体-药物复合体与规定种类的细胞进行相互作用、内化这一点进行确认。

[0034] 另外,本发明的另1个侧面中,通过将抗体-药物复合体在组织内的定位、规定种类的细胞中的规定种类的蛋白质的表达量等信息组合,从而可以取得癌症等相关疾病中的、使用抗体-药物复合体的诊断或治疗中的有用的信息。进一步地,通过组合上述以外的信息(因子),能够更准确地选出适合给药的患者,另外能够构建合适的给药计划。

附图说明

[0035] 图1是实施例2中进行的三重染色的示意图。

[0036] 图2是实施例2中进行的三重染色的流程图。

具体实施方式

[0037] 本发明的“抗体-药物复合体的检测方法”包括下述方法:使用从给药了抗体-药物复合体的人或人以外者所取得的被检体来定量抗体-药物复合体在被检体上的定位的方法。

[0038] <抗体-药物复合体>

[0039] “抗体-药物复合体”至少包含“抗体”、“药物”和“接头”作为其构成成分且药物借助接头与抗体结合。抗体与接头之间、或接头与药物之间可以任选存在间隔物,典型情况下采取(抗体)-(任意的间隔物)-(接头)-(任意的间隔物)-(药物)这种结构。

[0040] “抗体-药物复合体”没有特别限定,选自在血液或非靶标组织中不易被清除和代谢、进一步地限制向非靶标细胞内输送的抗体-药物复合体。

[0041] “抗体-药物复合体”具体可列举:在人源化HER2抗体-曲妥珠单抗(赫赛汀)上结合有细胞毒性物质-美坦新(日语:エムタンシン;英语:emtansine)的曲妥珠单抗-美坦新(商品名:Kadcycla)、在抗CD30单克隆(小鼠人嵌合)抗体上结合有微管抑制剂-单甲基澳瑞他汀E的维汀-布仑妥昔单抗(商品名:Adcetris)、吉妥单抗(商品名:Mylotarg)等。

[0042] 就作为抗体-药物复合体的构成成分的“抗体”(本说明书中,有时称为ADC构成抗体)而言,可以使用以抗体-药物复合体的靶分子为抗原且特异性识别而结合的一抗(IgG)。另外,也可以使用特异性识别而结合一抗的二抗(IgG)作为抗体-药物复合体的构成成分,这种情况下需要与一抗一起进行给药。

[0043] 作为抗体-药物复合体的构成成分的“药物”(本说明书中,有时称为ADC构成药物)没有特别限定,优选为具有抗肿瘤效果、细胞杀伤性、抗血管形成效果、或抗炎症治疗活性的药物。

[0044] 上述药物可列举例如化合物、多肽、蛋白质、核酸、抗生素和病毒等,可具有靶(例如受体)或者细胞外或细胞内作用部位。其还可以包含穿透肽序列、例如美国专利申请第10/231,889号说明书中记载的序列。例如,药物可包括具有抗肿瘤治疗活性的选自下述药物组中的药物:长春花碱,如长春新碱、长春碱、长春地辛、长春瑞滨;紫杉烷或紫杉烷类,如紫杉醇、多西紫杉醇、10-脱乙酰基紫杉醇(10-deacetyl taxol)、7-表-紫杉醇(taxol)、浆果赤霉素III、木糖基紫杉醇;烷基化剂,例如异环磷酰胺、苯丙氨酸氮芥、氯氨基酚(Chloro Amino Phene)、丙卡巴肼、苯丁酸氮芥、硫代磷酰胺、白消安、达卡巴嗪(DTIC)、包括丝裂霉素C在内的丝裂霉素、亚硝基脲以及它们的衍生物(例如、雌氮芥、BCNU、CCNU、福莫司汀);铂衍生物,例如顺铂(例如卡铂、奥沙利铂);代谢拮抗物质,例如甲氨蝶呤、氨基蝶呤、5-氟尿嘧啶、6-巯基嘌呤、雷替曲塞、阿糖胞苷(或阿糖胞嘧啶)、阿糖腺苷、吉西他滨、克拉屈滨、喷司他丁、磷酸氟达拉滨、羟基脲;拓扑异构酶I或II抑制剂,例如喜树碱衍生物(例如伊立替康和托泊替康,或9-二甲基氨基甲基-羟基-喜树碱盐酸盐)、表鬼臼毒素(例如依托泊苷、替尼泊苷)、安吡啶;米托蒽醌;L-刀豆氨酸;抗生素剂,例如蒽环霉素,以及阿霉素或阿霉素(doxorubicin)、THP-阿霉素、柔红霉素、伊达比星、柔红苯胺、吡柔比星、佐柔比星和阿克拉霉素、蒽环霉素类似物和例如表阿霉素(4'-表阿霉素或表柔比星)和米托蒽醌、博来霉素、包括放线菌素D在内的放线菌素、链脲佐菌素、卡利奇霉素、倍癌霉素、考布他汀;L-天冬酰胺酶;激素;芳香酶的单一抑制剂;雄激素、LH-RH的类似物拮抗剂;细胞因子,例如干扰素 α (IFN- α)、干扰素 γ (IFN- γ)、白细胞介素1(IL-1)、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、IL-15、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IGF-1拮抗剂(胰岛素样生长因子);蛋白酶体抑制剂;法呢基转移酶抑制剂(FTI)、埃博霉素;美登木素(Maytansinoid);圆皮海绵内酯(discodermolide);福司曲星(fostriecin);抗体;酪氨酸激酶抑制剂,例如STI571(甲磺酸伊马替尼);内皮抑素;蛋白质、肽和抗炎细胞因子;这些的药学上可接受的碱加成盐或酸加成盐、水合物、溶剂化物、前体、代谢物或立体异构体。

[0045] “接头”没有特别限定,优选为能够被靶细胞内的至少1种酶切断的肽链。本发明中,可使用具有各种长度的接头,优选具有至少3个氨基酸的接头,特别优选3~8个氨基酸的接头。

[0046] “间隔物”没有特别限定,可列举独立地选自下述中的2官能性和多官能性有机自由基:取代型或非取代型烷基、取代型或非取代型杂烷基、取代型或非取代型芳基、取代型或非取代型杂芳基、醛、酸、酯、醚、硫醚、酸酐、巯基(日语:スルフィドリル)或羧基、例如马来酰亚胺衍生物、马来酰亚胺环己烷衍生物、马来酰亚胺苯甲酸衍生物、马来酰亚胺己酸衍生物和琥珀酰亚胺衍生物。或者,可以由溴化氰或氯化氰、琥珀酰亚胺基酯或磺酸卤化物等衍生。

[0047] <抗体-药物复合体的检测方法>

[0048] 本发明的抗体-药物复合体的构成成分的检测方法通过能够使每1分子发出对于表现为亮点而言强度足够的荧光的、使用荧光体集成粒子(PID)的免疫染色法进行,所述检测方法包含(a)使作为抗体-药物复合体的构成成分的药物可视化的工序和(b)使作为抗体-药物复合体的构成成分的抗体可视化的工序中的至少一者。

[0049] 作为工序(a)的、使作为抗体-药物复合体的构成成分的药物(ADC构成药物)可视化的工序可以使用在特异性识别、结合该药物的IgG(本说明书中记作抗体A)上结合有PID的抗体、利用常规的免疫染色的方法来进行。例如,在对具有微管蛋白聚合抑制剂-美坦新作为构成成分的抗体-药物复合体进行检测的情况下,可以使用PID标记抗美坦新抗体作为染色剂利用常规的方法进行免疫染色。

[0050] 作为工序(b)的、使作为抗体-药物复合体的构成成分的抗体(ADC构成抗体)可视化的工序,可以使用在以ADC构成抗体为抗原并特异性识别而结合的IgG(本说明书中记作抗体B)上结合有作为标记物质的PID的抗体,以其为染色剂进行免疫染色。

[0051] <靶分子的定量方法>

[0052] 本发明优选还包含(c)使抗体-药物复合体的靶分子可视化的工序。本说明书中,靶分子为在抗体-药物复合体的靶细胞中表达的蛋白质,作为靶细胞,可列举例如癌细胞、免疫细胞、间质细胞(成纤维细胞、内皮细胞、白细胞(淋巴细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞)等等)。靶分子只要是在靶细胞中表达的蛋白质即可,没有特别限定,优选为在癌细胞和免疫细胞中表达的蛋白质,进一步优选为在细胞表面表达的受体或配体。

[0053] 作为在癌细胞中表达的蛋白质,可列举例如免疫蛋白、癌细胞生长因子、转移控制因子、血管生长因子、细胞因子、癌细胞生长控制因子受体、转移控制因子受体、血管生长因子受体和细胞因子受体。

[0054] 作为在癌细胞中表达的蛋白质,具体可列举例如CD40、TL1A、GITR-L、4-188-L、CX4D-L、CD70、HHLA2、ICOS-L、CD85、CD86、CD80、MHC-II、PDL1、PDL2、VISTA、BTNL2、B7-H3、B7-H4、CD48、HVEM、CD40L、TNFRSF25、GITR、4-188、OX40、CD27、TMIGD2、ICOS、CD28、TCR、LAG3、CTLA4、PD1、CD244、TIM3、BTLA、CD160、LIGHT、EGFR(HER1)、HER2、HER3、HER4、IGFR、HGFR、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、PIGF-1、PIGF-2、G-CSF、M-CSF、EPO、SCF、EGF、FGF、IGF、NGF、PDGF、TGF、ACTG2、ALDOA、APC、BRMS1、CADM1、CAMK2A、CAMK2B、CAMK2D、CCL5、CD82、CDKN1A、CDKN2A、CHD4、CNN1、CST7、CTSL、CXCR2、YBB、DCC、DENR、DLC1、EGLN2、EGLN3、EIF4E2、EIF4EBP1、ENO1、ENO2、ENO3、ETV4、FGFR4、GSN、HK2、HK3、HKDC1、HLA-DPB1、HUNKIL11、KDM1A、KISS1、LDHA、LIFR、MED23、MET、MGAT5、MAP2K4、MT3、MTA1、MTBP、MTOR、MYCL、MYH11、NDRG1、NF2、NFKB1、NME1、NME4、NOS2、NR4A3、PDK1、PEBP4、PFKFB1、PFKFB4、

PGK1、PLAUR、PTTG1、RB1、RORB、SET、SLC2A1、SNRPF、SSTR2、TCEB1、TCEB2、TCF20、TF、TLR4、TNFSF10、TP53、TSHR、MMP、MMP2、MMP10、HIF1等。

[0055] 作为在免疫细胞中表达的蛋白质,可列举例如免疫蛋白、生长因子、生长控制因子、生长刺激因子、免疫细胞转移因子、细胞因子、免疫控制因子、信号转导相关蛋白和它们的受体。

[0056] 作为在免疫细胞中表达的蛋白质,具体可列举例如PD-1、CTLA-4、TIM3、Foxp3、CD3、CD4、CD8、CD25、CD27、CD28、CD70、CD40、CD40L、CD80、CD86、CD160、CD57、CD226、CD112、CD155、OX40 (CD134)、OX40L (CD252)、ICOS (CD278)、ICOSL (CD275)、4-1BB (CD137)、4-1BBL (CD137L)、2B4 (CD244)、GITR (CD357)、B7-H3 (CD276)、LAG-3 (CD223)、BTLA (CD272)、HVEM (CD270)、GITRL、半凝乳素-9 (Galectin-9)、B7-H4、B7-H5、PD-L2、KLRG-1、E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白、R-钙粘蛋白和IDO、TDO、CSF-1R、HDAC、CXCR4、FLT-3、TIGIT。

[0057] 作为在间质细胞中表达的蛋白质,可列举例如生长因子、细胞粘附因子、细胞分化因子、凝血因子、酶、调控因子、细胞诱导因子、蛋白质诱导因子和它们的受体。

[0058] 作为在间质细胞中表达的蛋白质,具体可列举例如CD140a、CD106、CD109、CD140a、CD140b、CD141、CD142、CD143、CD144、CD145、CD146、CD147、CD201、CD202、CD280、CD299、CD309、CD322、CD331、CD332、CD333、CD334、CD339。

[0059] 从不是“定性”而是能够“定量”观察抗体-药物复合体的靶分子的观点出发,优选利用使用荧光体集成粒子的免疫染色法进行本发明的工序(c),可以使用在特异性识别、结合抗体-药物复合体的靶分子的IgG(本说明书中记作抗体C)上结合有PID的抗体作为染色剂,也可以使用在特异性识别、结合抗体C的IgG(抗体C')上结合有PID的抗体作为染色剂。

[0060] “定性”的方法是指下述的方法:虽然与蛋白质的表达量、表达细胞数等相关,但是不是对它们的数量或与该数量密切相关的指标值进行直接处理,而是将在规定范围内的数或指标值总括地以一个评分来示出,这样的评分为数个左右,例如2~5个左右,典型情况下依赖于观察者的主观性和经验性要素。例如以在乳腺癌细胞等的细胞膜上表达的HER2蛋白为对象、使用DAB染色的IHC法,该方法基于癌细胞膜的染色性及其染色强度(染色图案)按照下述4阶段的评分来进行评价:3+(有强烈且完整的细胞膜的阳性染色的癌细胞>30%时:阳性)、2+(有弱~中等程度的完整的细胞膜的阳性染色的癌细胞 \geq 10%、或有强烈且完整的细胞膜的阳性染色的癌细胞 \geq 10%~ \leq 30%时:存疑)、1+(有几乎无法辨别的微弱的细胞膜染色的癌细胞 \geq 10%且癌细胞仅细胞膜局部被染色时:阴性)和0(细胞膜无阳性染色或有细胞膜的阳性染色的癌细胞>10%时(局限于细胞膜的阳性染色排除在判定对象外):阴性) (“HER2检查指南第三版”,曲妥珠单抗病理部会作成,2009年9月),该方法相当于“定性”方法。另外,Jager et al.,Patient-derived bladder cancer xenografts in the preclinical development of novel target therapies.Oncotarget,Vol.6,No.25,21522-21532的21527页、Figure 3中使用的、基于利用IHC法的染色图像以4阶段的评分来表示蛋白质的表达量的方法也相当于“定性”的方法。

[0061] 另一方面,“定量”的方法是指:对蛋白质的表达量、表达细胞数或与它们密切相关的指标值进行直接处理的方法,典型地为基于使用装置得到的客观测定结果的方法。作为代表,使用利用荧光纳米粒子、即量子点(未集成化的)或荧光体集成粒子(PID)之类的直径为纳米尺寸的粒子对目标蛋白进行标记、定量的方法,其中,特别优选使用荧光体集成粒子

进行的定量方法(本说明书中有时称为“PID法”)。通过专利文献1、专利文献2或其它的专利文献或非专利文献,PID法的基本实施方式是公知的。本发明中,例如在基于使用标本玻片进行病理诊断的情况的实施方式中,可以使用PID法。

[0062] ADC构成抗体、抗体A、抗体B、抗体C和抗体C'均优选为单克隆抗体。产生抗体的动物(免疫动物)的种类没有特别限定,可以与以往同样地从小鼠、大鼠、天竺鼠、兔、山羊、绵羊等中选择。

[0063] ADC构成抗体、抗体A、抗体B、抗体C和抗体C'只要是具有特异性识别、结合特定的目标物质(例如ADC构成抗体的情况下为抗体-药物复合体的靶分子、抗体A的情况下为ADC构成药剂)的能力的抗体即可,也可以不是天然的全长抗体、而是抗体片段或衍生物。即,本说明书中的“抗体”这一术语不仅包括全长的抗体,还包括Fab、F(ab)'₂、Fv、scFv等抗体片段和嵌合抗体(人源化抗体等)、多功能抗体等衍生物。

[0064] 通过工序(a)和/或(b),可以测定抗体-药物复合体在被检体内的定位。另外,通过本发明的工序(c),可以确定抗体-药物复合体的靶细胞中以何种程度表达靶分子,进一步地,通过测定抗体-药物复合体与其靶分子的距离,可以评价抗体-药物复合体和其靶分子实际以何种程度发生相互作用。例如,可以将能在后述的图像处理中测定的标记ADC构成药物和/或ADC构成抗体的PID染色剂(PID的亮点等)、与标记抗体-药物复合体的靶蛋白的PID染色剂的亮点间的距离视为抗体-药物复合体与靶细胞间的距离。在实施该工序的情况下,可以对同一被检体(组织切片等)进行用于前一荧光标记的免疫染色处理和用于后一荧光标记的免疫染色处理(多重免疫染色),为了相互区分,优选使用具有发出不同波长的荧光的荧光体集成粒子的PID染色剂。

[0065] <荧光体集成粒子>

[0066] 本发明中所使用的荧光体集成粒子(PID)为具有下述结构的纳米尺寸的粒子,所述结构为:以由有机物或无机物形成的粒子为母体,在其中内包有多个荧光体(例如,荧光色素)和/或在其表面吸附有多个荧光体(例如,荧光色素)。这种情况下,优选母体(例如,树脂)与荧光物质具有带有彼此相反的电荷的取代基或部位、静电相互作用起作用。

[0067] 需要说明的是,本说明书中的“荧光体”是指下述物质:照射规定波长的电磁波(X射线、紫外线或可见光线)而吸收其能量、使得电子激发、在从其激发态回到基态时以电磁波形式将过剩的能量释放、也即发出“荧光”、并且可以直接或间接地结合生物体物质识别物质(能特异性识别生物体物质的物质、例如生物素、亲和素、抗体等)的物质。另外,“荧光”具有广义上的意思,包括即使用于激发的电磁波的照射已经停止也会持续发光的发光寿命长的磷光、以及发光寿命短的狭义的荧光。

[0068] 在制作荧光体集成粒子的母体中,作为有机物,可例示:三聚氰胺树脂、脲树脂、苯胺树脂、胍胺树脂、酚醛树脂、二甲苯树脂、呋喃树脂等通常归类于热固化性树脂的树脂;苯乙烯树脂、丙烯酸类树脂、丙烯腈树脂、AS树脂(丙烯腈-苯乙烯共聚物)、ASA树脂(丙烯腈-苯乙烯-丙烯酸甲酯共聚物)等通常归类于热塑性树脂的树脂;聚乳酸等其它树脂;多糖,作为无机物,可例示二氧化硅、玻璃等。

[0069] • 半导体集成纳米粒子

[0070] 半导体集成纳米粒子具有在上述记载的母体中内包有作为荧光体的半导体纳米粒子和/或在其表面吸附有作为荧光体的半导体纳米粒子的结构。构成半导体纳米粒子的

原料没有特别限定,可列举例如包含II-VI族化合物、III-V族化合物或IV族元素的化合物,例如CdSe、CdS、CdTe、ZnSe、ZnS、ZnTe、InP、InN、InAs、InGaP、GaP、GaAs、Si、Ge等。另外,当半导体内包于母体时,可以分散在母体内部,也可以与母体本身化学键合或不化学键合。

[0071] • 荧光色素集成纳米粒子

[0072] 荧光色素集成纳米粒子具有在上述中记载的母体中内包有作为荧光体的荧光色素和/或在其表面吸附有作为荧光体的荧光色素的结构。荧光色素没有特别限定,可例示例如:罗丹明系色素分子、方鎏系色素分子、花青系色素分子、芳香环系色素分子、噁嗪系色素分子、carbopyronine系色素分子、吡咯基甲撑 (pyrromethene) 系色素分子等。或者,可以使用Alexa Fluor (注册商标,Invitrogen公司制) 系色素分子、BODIPY (注册商标,Invitrogen公司制) 系色素分子、Cy (注册商标,GE Healthcare公司制) 系色素分子、DY (注册商标,DYOMICS公司制) 系色素分子、HiLyte (注册商标,AnaSpec公司制) 系色素分子、DyLight (注册商标,Thermo Fisher公司制) 系色素分子、ATTO (注册商标,ATTO-TEC公司制) 系色素分子、MFP (注册商标,Mobitec公司制) 系色素分子等。需要说明的是,这样的色素分子的总称是基于化合物中的主要结构(骨架)或注册商标而命名的,本领域技术人员无需过度尝试即可恰当把握属于各个类别的荧光色素的范围。另外,在荧光色素内包于母体的情况下,荧光色素可以分散在母体内部,也可以与母体本身化学键合或不化学键合。

[0073] 荧光体集成粒子可以按照公知的方法(例如,参照日本特开2013-57937号公报)来制作。

[0074] 更具体而言,例如以二氧化硅为母体、且其中内包有荧光物质的内包荧光物质型二氧化硅粒子可以如下制作:将溶解有无机半导体纳米粒子、有机荧光色素等荧光物质和四乙氧基硅烷之类的二氧化硅前体的溶液滴加到溶解有乙醇和氨的溶液中,使二氧化硅前体水解。

[0075] 另一方面,以树脂为母体、且在树脂粒子的表面吸附有荧光物质或在树脂粒子中内包有荧光物质的荧光物质集成树脂粒子可以如下制作:事先准备上述树脂的溶液或微粒的分散液,向其中添加无机半导体纳米粒子、有机荧光色素等荧光物质并搅拌。或者,在向树脂原料的溶液中添加荧光色素后,进行聚合反应,从而也可以制作内包有荧光物质的树脂粒子。例如,在使用三聚氰胺树脂之类的热固化性树脂作为成为母体的树脂的情况下,可以将含有该树脂的原料(单体或低聚物或预聚物、例如作为三聚氰胺与甲醛的缩合物的羟甲基三聚氰胺)、有机荧光色素、优选还有表面活性剂和聚合反应促进剂(酸等)的混合物加热,通过乳液聚合法进行聚合反应,从而可以制作内包有机荧光色素的树脂粒子。另外,在使用苯乙烯系共聚物之类的热塑性树脂作为成为母体的树脂的情况下,可以将含有该树脂的原料、有机荧光色素(也可以使用预先以共价键等结合有有机荧光色素的单体作为树脂的原料单体)、聚合引发剂(过氧化苯甲酰、偶氮双异丁腈等)的反应混合物加热,通过自由基聚合法或离子聚合法进行聚合反应,从而可以制作内包有机荧光色素的树脂粒子。

[0076] 作为内包于荧光体集成粒子的荧光物质,除了上述的半导体纳米粒子、荧光色素以外还可以列举例如以 Y_2O_3 、 Zn_2SiO_4 等为母体且以 Mn^{2+} 、 Eu^{3+} 等作为活化剂的“长余辉荧光体”。

[0077] 荧光体集成粒子(特别是通过上述之类的制造方法得到的内包有荧光色素的树脂粒子)的平均粒径只要为适合于标本玻片的免疫染色的粒径则没有特别限定,考虑到亮点

的检测容易性等,通常为10~500nm,优选为50~200nm。另外,表示粒径偏差的变异系数通常为20%以下,优选为5~15%。可以通过调整制造条件来制造满足这种条件的荧光体集成粒子。例如,在通过乳液聚合法制作荧光体集成粒子的情况下,可以通过所添加的表面活性剂的量来调整粒径,通常有下述倾向:表面活性剂的量相对于荧光体集成粒子的母体原料的量相对地越多则粒径越小,该量相对地越少则粒径越大。

[0078] 需要说明的是,荧光体集成粒子的粒径可以如下计算:使用扫描型电子显微镜(SEM)拍摄电子显微镜照片,计测荧光体集成粒子的截面面积,计算假设其截面形状为圆形时与该截面面积相当的圆的直径。关于包含多个荧光体集成粒子的粒子团的平均粒径和变异系数,在对于数量足够多(例如1000个)的荧光物质集成纳米粒子如上所述地计算粒径后,计算其平均粒径作为其算术平均,变异系数则通过式:100×粒径的标准偏差/平均粒径来计算。

[0079] <PID染色剂的构成>

[0080] 作为用于对ADC构成药物、ADC构成抗体、抗体-药物复合体的靶分子进行荧光标记的PID染色剂的一例,可列举[抗体]~[荧光体集成粒子]。例如,作为用于对ADC构成药物进行染色的PID染色剂,可使用[抗ADC构成药物抗体]~[荧光体集成粒子]。在此,作为“~”所示的结合方式,没有特别限制,可列举例如共价键、离子键、氢键、配位键、物理吸附或化学吸附等,根据需要还可以借助接头分子。

[0081] 对于[抗体]~[荧光体集成粒子]而言,如果期望的抗体上预先结合有期望的荧光体集成粒子的[抗体]~[荧光体集成粒子]本身有售,则也可以利用该市售品。另外,可以基于能在期望的抗体(蛋白质)上结合期望的荧光色素的公知方法利用例如市售的荧光标记试剂(试剂盒)来制作。

[0082] 例如,可以使用为使无机物与有机物结合而广泛使用的化合物即硅烷偶联剂。该硅烷偶联剂是在分子的一端具有通过水解来提供硅烷醇基的烷氧基甲硅烷基且在另一端具有羧基、氨基、环氧基、醛基等官能团的化合物,借助上述硅烷醇基的氧原子而与无机物结合。具体而言,可列举巯基丙基三乙氧基硅烷、环氧丙氧基丙基三乙氧基硅烷、氨基丙基三乙氧基硅烷、具有聚乙二醇链的硅烷偶联剂(例如Gelest公司制PEG-silane no. SIM6492.7)等。在使用硅烷偶联剂时,可以将两种以上组合使用。

[0083] 可以使用公知的方法进行荧光体集成粒子与硅烷偶联剂的反应步骤。例如,使得到的内包有荧光物质的二氧化硅纳米粒子分散在纯水中,添加氨基丙基三乙氧基硅烷,在室温下反应12小时。反应结束后,通过离心分离或过滤,可以得到表面修饰有氨基丙基的内包有荧光物质的二氧化硅纳米粒子。接着,通过使氨基与抗体中的羧基反应,从而可以借助酰胺键使抗体与内包有荧光物质的二氧化硅纳米粒子键合。根据需要,还可以使用EDC(1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐;Pierce公司制)之类的缩合剂。

[0084] 根据需要,可以使用具有可与经有机分子修饰的内包荧光物质的二氧化硅纳米粒子直接结合的部位、和可与分子靶标物质结合的地部位的接头化合物。作为具体例子,使用具有与氨基选择性地反应的部位和与巯基选择性地反应的部位这两者的sulfo-SMCC(磺基琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺甲基]环己烷-1-羧酸酯;Pierce公司制)时,使被氨基丙基三乙氧基硅烷修饰的内包有荧光物质的二氧化硅纳米粒子的氨基与抗体中的巯基键合,从而得到键合有抗体的内包有荧光物质的二氧化硅纳米粒子。

[0085] 在使生物体物质识别物质(能特异性识别生物体物质的物质,例如生物素、亲和素、抗体等)结合于内包荧光物质的聚苯乙烯纳米粒子时,不论荧光物质为荧光色素还是为半导体纳米粒子,均可以应用同样的步骤。即,通过使具有氨基等官能团的聚苯乙烯纳米粒子浸渗半导体纳米粒子或荧光有机色素,可以得到具有官能团的荧光物质集成聚苯乙烯粒子,此后使用EDC或sulfo-SMCC,从而可以形成键合有抗体的荧光体集成聚苯乙烯粒子。

[0086] 作为PID染色剂的另一例,可列举[亲和素]-[荧光体集成粒子](在此,“-”表示通过根据需要可借助接头分子的共价键而键合。)。在使用这种PID染色剂的情况下,需要预先使[针对目标物质的抗体(一抗)]-[生物素]与目标物质反应或使[针对目标物质的一抗(一抗)]与目标物质反应,然后再与[针对对目标物质的一抗的抗体(二抗)]-[生物素]反应。

[0087] 例如,染色后,目标物质与荧光体集成粒子以[目标物质]…[针对目标生物体物质的一抗]…[针对一抗的抗体(二抗)]-[生物素]/[亲和素]-[荧光体集成粒子](在此,“…”表示通过抗原抗体反应结合,“-”表示通过根据需要可借助接头分子的共价键而键合,“/”表示通过亲和素-生物素反应而结合。)的方式间接连接。

[0088] 抗体-生物素结合体(生物素修饰抗体)可以如下制作:基于可以在期望的抗体(蛋白质)上结合生物素的公知方法,利用例如市售的生物素标记试剂(试剂盒)来制作。另外,如果在期望的抗体上预先结合有生物素的生物素修饰抗体本身有售,则也可以利用该市售品。

[0089] 荧光体集成粒子-亲和素结合体(亲和素修饰荧光体集成粒子)也可以基于能在荧光体集成粒子上结合亲和素的公知方法利用例如市售的亲和素标记试剂(试剂盒)来制作。这种情况下的亲和素,也可以是与生物素之间的结合力比亲和素高的链霉亲和素、中性亲和素等改良型。

[0090] 若列举荧光体集成粒子-亲和素结合体的制作方法的具体例子,则如下所示。在荧光体集成粒子是以树脂为母体的荧光体集成粒子的情况下,其树脂所具有的官能团与亲和素(蛋白质)所具有的官能团可以根据需要借助在分子的两末端具有官能团的PEG等接头分子而结合。例如,如果是三聚氰胺树脂,则可以利用氨基等官能团;如果是丙烯酸类树脂、苯乙烯树脂等,则可以使侧链具有官能团(例如环氧基)的单体共聚、从而利用该官能团本身或由该官能团衍生的官能团(例如,通过与氨水反应而生成的氨基),另外还可以利用它们的官能团进一步导入其它官能团。另外,在荧光纳米粒子是以二氧化硅为母体的荧光体集成粒子或无机半导体纳米粒子的情况下,可以通过用硅烷偶联剂进行表面修饰来导入期望的官能团,例如,如果使用氨基丙基三甲氧基硅烷则可以导入氨基。另一方面,对于亲和素,通过使例如N-琥珀酰亚胺基S-乙酰基硫代乙酸酯(SATA)与亲和素的氨基反应,可以导入硫醇基。然后利用在聚乙二醇(PEG)链的两端具有与氨基有反应性的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯和与硫醇基有反应性的马来酰亚胺基的交叉型接头试剂,可以将具有氨基的荧光体和导入有硫醇基的亲和素连接。

[0091] 另外,本发明中,使用通过稀释液对上述PID染色剂进行稀释而成的PID染色液来进行染色。关于稀释液的选择和稀释倍率,可以根据目标物质和免疫染色剂的亲和力来进行优化。

[0092] <免疫染色方法>

[0093] 以下,作为本发明中的实施例的1例,使用来自肿瘤组织的被检体、具体为组织切

片(标本玻片),对癌细胞的使用荧光体集成粒子的免疫染色法的一例进一步进行详细说明。

[0094] 本发明中使用的免疫染色法的“目标物质”是作为抗体-药物复合体的构成成分的药物(ADC构成药物)和作为抗体-药物复合体的构成成分的抗体(ADC构成抗体)中的至少一者,优选为两者。另外,优选抗体-药物复合体的靶分子也作为免疫染色法的“目标物质”。

[0095] “肿瘤组织”可以来自人(癌症患者)的肿瘤,也可以来自人以外的动物的肿瘤。

[0096] “来自肿瘤组织的被检体”是采集自肿瘤组织的病变部、对所采集的病变部中所含的肿瘤细胞进行培养而得的细胞等,通常采取如通过免疫染色法评价目标蛋白的表达量时等所惯用的、按照规定步骤制作的标本玻片的形态。使用这样的被检体,在人或人以外的动物的生物体外实施本发明的检测方法。

[0097] 组织切片(本说明书中也简称为“切片”,作为也包括例如病理切片等切片的术语来使用。)和载置有组织切片的标本玻片的制作方法没有特别限制,可以使用通过公知步骤制作的组织切片和标本玻片。

[0098] (1. 标本玻片前处理工序)

[0099] (1-1. 脱石蜡处理)

[0100] 将切片浸渍在装有二甲苯的容器中,从而除去石蜡。温度没有特别限定,可以在室温下进行。浸渍时间优选为3分钟以上且30分钟以下。另外,根据需要,可以在浸渍过程中进行二甲苯更换。

[0101] 然后将切片浸渍在装有乙醇的容器中,除去二甲苯。温度没有特别限定,可以在室温下进行。浸渍时间优选为3分钟以上且30分钟以下。另外,根据需要,可以在浸渍过程中进行乙醇更换。

[0102] 将切片浸渍在装有水的容器中,除去乙醇。温度没有特别限定,可以在室温下进行。浸渍时间优选为3分钟以上且30分钟以下。另外,根据需要,可以在浸渍过程中进行水的更换。

[0103] (1-2. 活化处理)

[0104] 按照公知的方法进行目标物质的活化处理。活化条件没有特别限定,作为活化液,可以使用0.01M的柠檬酸缓冲液(pH6.0)、1mM的EDTA溶液(pH8.0)、5%尿素、0.1M的Tris盐酸缓冲液等。加热设备可以使用高压釜、微波、压力锅、水浴等。温度没有特别限定,可以在室温下进行。可以在温度50~130℃、时间5~30分钟的条件下进行。

[0105] 然后,将活化处理后的切片浸渍在装有PBS的容器中,进行洗涤。温度没有特别限定,可以在室温下进行。浸渍时间优选为3分钟以上且30分钟以下。另外,根据需要,可以在浸渍过程中进行PBS更换。

[0106] (2. 免疫染色工序)

[0107] 免疫染色工序中,为了将抗体-药物复合体和其靶分子染色,可以将稀释液中分散有具有可以与目标物质直接或间接结合的部位染色剂的免疫染色液置于组织切片,进行与目标物质的反应。免疫染色剂或用于稀释其的稀释液以及其它成分如前所述,可以在该工序前预先制备。

[0108] 例如,在使用[亲和素]-[荧光体集成粒子]作为免疫染色剂、进而在染色后目标物质和标记物质形成[目标物质]…[针对目标物质的一抗]…[针对一抗的抗体(二抗)]-[生

物素]/[亲和素]-[荧光体集成粒子] (这里“…”表示通过抗原抗体反应结合,“-”表示通过根据需要可借助接头分子的共价键而键合,“/”表示通过亲和素-生物素反应而结合。) 的实施方式的情况下,可以首先进行在一抗溶液中浸渍标本玻片的处理(1次反应处理),接着进行在二抗-生物素结合体溶液中浸渍病理标本的处理(2次反应处理),最后进行在PID染色液中浸渍作为病理标本的组织切片的处理(PID标记处理)。

[0109] 关于进行免疫染色工序时的条件、例如1次反应处理、2次反应处理和荧光标记处理各自中的在规定的溶液(试剂)中浸渍标本玻片时的各自的温度和浸渍时间,可以基于以往的免疫染色并按照可得到合适的信号的方式适当调整。

[0110] 温度没有特别限定,可以在室温下进行。反应时间优选为30分钟以上且24小时以下。

[0111] 在进行如上所述的1次反应处理前,优选滴加含有BSA的PBS等公知的封闭剂、Tween20等表面活性剂。

[0112] (3. 标本后处理工序)

[0113] 对于完成免疫染色工序后的标本玻片,优选进行固定化和脱水、透明、封片等处理,使得适合进行观察。

[0114] 关于固定化和脱水处理,可以将标本玻片浸渍于固定处理液(福尔马林、多聚甲醛、戊二醛、丙酮、乙醇、甲醇等交联剂)。关于透明,可以将完成了固定化和脱水处理的标本玻片浸渍于透明液(二甲苯等)。关于封片处理,可以将完成了透明处理的标本玻片浸渍于封片液。关于进行这些处理时的条件、例如将标本玻片浸渍于规定处理液时的温度和浸渍时间,可以基于以往的免疫染色法并按照可得到合适的信号的方式适当调整。

[0115] (4. 任选工序)

[0116] 本发明中,如有需要,也可以包含形态观察染色工序,用于可以在明视野中观察细胞、组织、脏器等的形态。形态观察染色工序可以按照常规方法进行。关于组织标本的形态观察,可以按照标准方法使用将细胞质、间质、各种纤维、红细胞、角化细胞染成红色~深红色的使用伊红的染色。另外,可以按照标准方法使用将细胞核、钙化部和软骨组织·细菌和粘液染成青蓝色~淡蓝色的使用苏木精的染色(同时进行这两种染色的方法作为苏木精-伊红染色(HE染色)而被所知)。在包含形态观察染色工序的情况下,可以在免疫染色工序后进行,也可以在免疫染色工序前进行。

[0117] (5. 评价工序)

[0118] (5-1. 观察·拍摄)

[0119] 在观察·拍摄工序中,在期望倍率的显微镜的同一视野中,对标本样品分别照射与免疫染色工序中使用的对目标物质进行荧光标记的荧光体集成粒子相对应的激发光所对应的激发光,分别观察·拍摄由它们的荧光体集成粒子发出的荧光所形成的免疫染色图像。关于这些激发光的照射,例如可以使用荧光显微镜所具备的激光光源、根据需要使用可使规定波长选择性地透过的激发光用滤光器来进行照射。在使用包含彼此不同的荧光体集成粒子的多种免疫染色剂进行免疫染色的情况下,可以边切换与各荧光体集成粒子对应的多种滤光器套件边进行观察。免疫染色图像的拍摄例如可以通过荧光显微镜所具备的数码相机来进行。在拍摄免疫染色图像时,可以根据需要使用可使规定波长选择性地透过的荧光用滤光器,从而可以拍摄到仅包含目标荧光、排除了目标外的荧光、成为噪声的激发光

和其它光的免疫染色图像。

[0120] (5-2. 图像处理·信号计测)

[0121] 在图像处理·计测工序中,对于所拍摄的关于目标物质的免疫染色图像,基于图像处理计测与目标物质相对应的荧光标记信号所对应的荧光标记信号,确定与位于细胞膜区域内的上述目标生物体物质相对应的荧光标记信号。优选将荧光标记信号作为荧光的亮点数来处理。

[0122] 作为图像处理中可以使用的软件,可列举例如“ImageJ”(开源)。通过利用这样的图像处理软件,可以半自动且迅速地进行从免疫染色图像中抽取规定波长(颜色)的亮点并计算其亮度的总和、或者计测规定亮度以上的亮点的数量的处理、特别是用于进行上述实施方式的处理。

[0123] 另外,亮点来自于1个荧光纳米粒子,因此大小一定且通过显微镜观察可识别。大小比一定值(例如所观测到的荧光纳米粒子的平均值)大的信号则判断为聚集亮点。使用软件可以半自动且迅速地对该亮点和聚集亮点进行区分。

[0124] <信息取得方法>

[0125] 本发明的信息取得方法包含下述工序:使用从给药抗体-药物复合体后的人或人以外的动物采集的被检体,确定关于抗体-药物复合体、其靶分子、被检体中所含的细胞等的信息。

[0126] 被检体为从患有疾病的人或人以外的动物采集的病变部、对所采集的病变部中所含的肿瘤细胞进行培养而得的细胞等,通常采取按照规定步骤制作的标本玻片的形态。

[0127] “疾病”没有特别限定,为例如神经疾病、感染性疾病、遗传性疾病、肿瘤(癌症),典型地为肿瘤(癌症)。肿瘤没有特别限定,可列举例如:细胞瘤、黑素瘤、肉瘤、脑瘤、头颈部癌、胃癌、肺癌、乳腺癌、肝癌、结直肠癌、子宫颈癌、前列腺癌、膀胱癌等实体癌;白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤等。

[0128] 作为“人以外的动物”,可使用例如实验动物、典型地为荷瘤动物、优选为荷瘤小鼠。

[0129] 荷瘤小鼠大致可分为自然诱发肿瘤小鼠、培养癌细胞移植小鼠、患者肿瘤组织移植小鼠这3类(参照下表;Kohrt et al.,Defining the optimal murine models to investigate immune checkpoint blockers and their combination with other immunotherapies. Annals of Oncology 00:1-9,2016)。

[0130] [表1]

[0131]

	癌细胞	免疫细胞	模型
自然诱发肿瘤小鼠	小鼠	小鼠	移植化合物的经典模型 *Genetic-engineered 小鼠模型 *Human KI mice
培养癌细胞移植小鼠	小鼠	小鼠	(3) 同源鼠模型
	人	小鼠	(4) 源自细胞系的异种移植 (CDX)
患者肿瘤组织移植小鼠	人	小鼠	(5) 源自患者的异种移植 (PDX) (6) 免疫替身小鼠 (7) 人造血-淋巴系统小鼠 (Hemato-lymphoid humanized mice) (8) Immune-PDX

[0132] *基因敲除小鼠

[0133] 包括移植了在第n-1代的实验动物的体内生长的肿瘤组织或生长的肿瘤细胞的第n代 ($n \geq 1$) 实验动物, 其中, 所述在第n-1代的实验动物的体内生长的肿瘤组织或生长的肿瘤细胞的起源为: 采自人 (癌症患者) 的肿瘤 (癌症) 组织或肿瘤细胞、或者移植了作为培养细胞株而建立的人源肿瘤细胞的第0代实验动物和移植到这种第0代中的肿瘤组织或肿瘤细胞。这类实验动物可以使用公知的方法制作。也可形成如下环境: 例如, 如果是小鼠, 除了CDX (Cell-line derived xenograft, 源自细胞系的异种移植) 模型小鼠、PDX (Patient derived xenograft, 源自患者的异种移植) 模型小鼠以外, 还可以制作Immune-PDX模型小鼠、人造血-淋巴系统 (Hemato-lymphoid humanized) 模型小鼠、Immune-PDX模型小鼠等各种荷瘤小鼠模型, 还可以购买制作后的荷瘤小鼠模型。另一方面, 移植有源于取自患者的肿瘤细胞的培养细胞的荷瘤小鼠模型更为经典也容易制作。

[0134] 本发明中的“用于诊断或治疗的信息”的内容没有特别限定, 可以是靶分子的表达量通过抗体-药物复合体的给药产生何种变化、例如该疾病的进展 (疾病的分期等) 发生何种程度的变化之类的与诊断相关的信息、抗体-药物复合体对该疾病有何种程度的效果之类的与治疗有关的信息。

[0135] 本发明中的用于疾病的诊断或治疗的信息的取得方法 (本说明书中, 有时简称为“本发明的信息取得方法”。) 中, 可以确定下述信息中的至少一种、优选为两种以上的信息并组合使用: 在被检体中抗体-药物复合体的定位、抗体-药物复合体的靶分子的定位·表达量、抗体-药物复合体与其靶分子的平均距离、表达靶分子的细胞的种类·数量·形态、组织·病变部内·细胞上的靶分子在每单元面积中的表达量·表达部位·分布·占有面积、由靶分子在每个细胞中的表达量与对应于此的细胞数表示的直方图·曲线、肿瘤等病变部的大小等。

[0136] (i) 抗体-药物复合体的定位可如下确定: 对被检体 (标本玻片) 进行针对作为抗

体-药物复合体的构成成分的抗体和/或药剂的免疫染色,边照射具有对应于荧光体集成粒子的规定波长的激发光边进行暗视野中的观察和拍摄,从而取得以亮点来表示染色剂中所含的、对作为抗体-药物复合体的构成成分的抗体和/或药剂进行标记的荧光体集成粒子的图像。

[0137] 此时,可以一并利用形态观察用染色剂(例如伊红)进行可以确定细胞的形状的染色。

[0138] 取得上述暗视野图像,并通过明视野的观察和拍摄取得进行了染色从而示出了细胞的形状的图像,将这两个图像通过图像处理而叠加,从而可以观察图像整体中所包含的、或者图像中的特定区域(例如仅肿瘤组织)中所包含的、各细胞与抗体-药物复合体的位置关系。

[0139] (ii) 为了确定与上述抗体-药物复合体结合的靶分子相对于上述靶分子的总量的比率,首先通过与(i)同样的方法取得以亮点来表示对靶分子进行标记的荧光体集成粒子的图像,计测该图像中所包含的、或者图像中的特定区域(例如仅肿瘤组织)中所包含的细胞中表示所表达的靶分子的亮点数。再将该图像与以亮点来表示对作为抗体-药物复合体的构成成分的抗体和/或药剂进行标记的荧光体集成粒子的图像通过图像处理而叠加,计测表示对作为抗体-药物复合体的构成成分的抗体和/或药剂进行标记的荧光体集成粒子的亮点、与表示对靶分子进行标记的荧光体集成粒子的亮点一致的数量,计算出相对于表示靶分子的亮点数的比例,从而可以确定与上述抗体-药物复合体结合的靶分子相对于靶分子的总量的比率。

[0140] (iii) 另外,还可以分别取得以亮点来表示对靶分子进行标记的荧光体集成粒子的图像、以亮点来表示作为抗体-药物复合体的构成成分的抗体的图像和以亮点来表示对作为抗体-药物复合体的构成成分的药剂进行标记的荧光体集成粒子的图像,进行叠加,从而分别观察图像整体中所包含的、或者图像中的特定区域(例如仅肿瘤组织)中所包含的靶分子、作为抗体-药物复合体的构成成分的抗体和作为抗体-药物复合体的构成成分的药物间的距离。

[0141] 除了(i)~(iii)以外,例如,还可以通过与靶分子的荧光免疫染色一起进行形态观察染色,从而对图像中所含的全部细胞来定量靶分子在每个细胞中的平均表达量。这种情况下,在与(ii)同样地求出表达量后,将其除以图像中的特定区域中所含的细胞数即可。此时,可以使用对靶分子进行标记的荧光体集成粒子的亮点数作为亮点靶分子的表达量的指标值,也可以除以预先另行测定某一个亮点的明亮度(亮度、荧光强度)而得的荧光体集成粒子每一个的明亮度,从而算出该亮点中所含的荧光体集成粒子的数量,使用所得到的粒子数作为靶分子的表达量的指标值。进一步地,在制作由表达量和对应的细胞数表示的直方图或曲线时,每个细胞的靶分子表达量可以在横轴上每隔规定的数量或者在横轴连续地绘制,计测与各表达量相对应的细胞数(频度)并绘制其于纵轴,从而来制作。

[0142] 从上述直方图和曲线中可以得到以下等信息:靶分子的分布(直方图或曲线的形状、峰的个数)为何种、平均值或中值、变异系数(CV)为何种值等,此外特别是在直方图的情况下,可得到每个细胞的亮点数或粒子数最多的区域中细胞数(频度)为多少。

[0143] 通过将抗体-药物复合体给药前后的这类信息与抗体-药物复合体的药效(例如给药所引起的病变部的大小、状态的变化)、其定位、抗体-药物复合体与靶分子的距离等试验

结果进行对照,从而可以分析、把握例如抗体-药物复合体的药效与哪些信息最相关,换言之,在预测药效等时基于哪些信息来进行预测最妥当。

[0144] 实施例

[0145] (生物素修饰抗兔IgG抗体的制作)

[0146] 向50mM Tris溶液中溶解用作二抗的抗兔IgG抗体50 μ g。向该溶液中,按照最终浓度为3mM的方式添加DTT(二硫苏糖醇)溶液并混合,在37 $^{\circ}$ C下反应30分钟。然后,将反应溶液通入脱盐柱“Zeba Desalt Spin Columns”(Thermo Fisher公司、Cat.#89882),对被DTT还原的二抗进行纯化。将纯化后的抗体总量中的200 μ L溶解于50mM Tris溶液,从而制备抗体溶液。另一方面,将接头试剂“Maleimide-PEG2-Biotin”(Thermo Fisher公司、制品编号21901)用DMSO调整为0.4mM。将该接头试剂溶液8.5 μ L添加到上述抗体溶液中并混合,在37 $^{\circ}$ C下反应30分钟,从而使生物素介由PEG链结合在抗兔IgG抗体上。将该反应溶液通入脱盐柱而进行纯化。对于脱盐后的反应溶液,使用分光光度计(日立制“F-7000”)测定波长300nm下的吸光度,计算反应溶液中的蛋白质(生物素修饰IgG抗体)的浓度。使用50mM Tris溶液将生物素修饰IgG抗体的浓度调整为250 μ g/mL,将所得溶液作为生物素修饰二抗溶液。

[0147] [制作例1]红色PID染色剂制作工序

[0148] (德克萨斯红色素集成三聚氰胺树脂粒子的制作)

[0149] 将德克萨斯红色素分子“Sulforhodamine 101”(Sigma Aldrich公司)2.5mg溶解于纯水22.5mL后,利用加热搅拌器在使溶液的温度维持于70 $^{\circ}$ C并搅拌20分钟。向搅拌后的溶液中加入三聚氰胺树脂“NIKALAC MX-035”(日本Carbide工业株式会社)1.5g,进一步在相同条件下加热搅拌5分钟。向搅拌后的溶液中加入甲酸100 μ L,在使溶液的温度维持于60 $^{\circ}$ C并搅拌20分钟后,将该溶液放置冷却到室温。将冷却后的溶液分注到多个离心管中,在12,000rpm下离心分离20分钟,使以混合物形式包含于溶液的内包德克萨斯红色素的三聚氰胺树脂粒子沉淀。除去上清液,将沉淀下来的粒子用乙醇和水洗涤。对于得到的树脂粒子中的1000个,进行SEM观察并如上所述地测定平均粒径,结果平均粒径为152nm。按照下述步骤对如此制作的内包有德克萨斯红色素的三聚氰胺树脂粒子进行表面修饰。

[0150] <结合有链霉亲和素的内包德克萨斯红色素的三聚氰胺树脂粒子的制作>

[0151] 将得到的粒子0.1mg分散在EtOH 1.5mL中,加入胺丙基三甲氧基硅烷LS-3150(信越化学工业公司制)2 μ L,反应8小时而进行表面氨基化处理。

[0152] 接着用含有EDTA(乙二胺四乙酸)2mM的PBS(磷酸缓冲生理盐水)将上述进行了表面氨基化处理的粒子调整为3nM,向该溶液中按照最终浓度为10mM的方式混合SM(PEG)₁₂(Thermo Fisher公司制、琥珀酰亚胺基-[N-马来酰亚胺基丙酰胺基]-十二乙二醇)酯,反应1小时。将该混合液在10,000G下离心分离20分钟,除去上清后,加入含有EDTA 2mM的PBS而使沉降物分散,再次进行离心分离。将同样步骤的洗涤进行3次,从而得到末端带有马来酰亚胺基的德克萨斯红集成三聚氰胺粒子。

[0153] 另一方面,将链霉亲和素(和光纯药公司制)用N-琥珀酰亚胺基S-乙酰基硫代乙酸酯(SATA)进行硫醇基添加处理后,利用凝胶过滤柱进行过滤,得到能够与德克萨斯红集成三聚氰胺粒子结合的链霉亲和素溶液。

[0154] 将上述德克萨斯红集成三聚氰胺粒子和链霉亲和素在含有EDTA 2mM的PBS中混合,在室温下反应1小时。添加10mM巯基乙醇使反应停止。将得到的溶液用离心过滤器浓缩

后,用纯化用凝胶过滤柱除去未反应的链霉亲和素等,将得到的结合有链霉亲和素的德克萨斯红集成三聚氰胺粒子作为参考例1和实施例1~4中的红色PID染色剂来使用。

[0155] [制作例2]绿色PID染色剂制作工序

[0156] 基于上述(结合有链霉亲和素的德克萨斯红集成三聚氰胺树脂粒子的制作)的步骤,使用FITC来代替德克萨斯红色素分子“Sulforhodamine 101”(Sigma Aldrich公司),从而制作平均粒径159nm的FITC色素集成三聚氰胺树脂粒子。关于所得到的粒子的表面修饰,按照上述步骤且使用抗本妥昔单抗抗体(将纯化的本妥昔单抗添加于兔脾脏而制作抗体)代替链霉亲和素,从而制作结合有抗体的内包FITC色素的三聚氰胺树脂粒子,作为实施例2~4中的绿色PID染色剂来使用。

[0157] [制作例3]蓝色PID染色剂制作工序

[0158] 基于上述(结合有链霉亲和素的内包德克萨斯红色素的三聚氰胺树脂纳米粒子的制作)的步骤,使用苯基香豆素代替德克萨斯红色素分子“Sulforhodamine 101”(Sigma Aldrich公司),从而制作平均粒径132nm的内包苯基香豆素色素的三聚氰胺树脂粒子。关于得到的粒子的表面修饰,按照上述的步骤且使用抗单甲基澳瑞他汀E(MMAE)小鼠单克隆抗体(“clone 2E2”;Epitope Diagnostics公司)代替链霉亲和素,从而制作结合有抗体的内包苯基香豆素色素的三聚氰胺树脂粒子,作为实施例2~4中的蓝色PID来使用。

[0159] [参考例1]CD30的表达量的评价

[0160] 标本制作工序

[0161] 从SofiaBio公司购入采自14名恶性淋巴瘤患者的组织被检体,移植到获得性免疫缺陷小鼠,从而制作PDX模型小鼠。将与各患者对应的2mm见方的肿瘤组织移植到皮下,1个月月在肿瘤组织长到约300mm³时,进行维汀-布仑妥昔单抗(商品名:Adcetris(注册商标))的尾静脉内给药,以100mg/kg一天一次给药,共计1次,计测初次给药前和给药100天后的肿瘤体积而进行药效判定。另外,给药3天后,通过针吸活检采集肿瘤的一部分,对各小鼠分别制作数片FFPE(福尔马林固定石蜡包埋)组织玻片。

[0162] (标本的前处理)

[0163] 对所制作的FFPE组织玻片进行脱石蜡处理后,进行置换为水的洗涤。将洗涤后的组织玻片在10mM柠檬酸缓冲液中(pH6.0)进行121℃、15分钟高压釜处理,从而进行抗原的活化处理。将活化处理后的组织玻片用PBS洗涤,对于所得到的标本玻片,用含有BSA 1%的PBS进行1小时封闭处理。

[0164] (免疫染色的1次反应处理)

[0165] 关于涉及目标生物体物质CD30的第1免疫染色用的1次反应处理,使用含有BSA 1W/W%的PBS将抗CD30兔多克隆抗体(“GTX55557”;GeneTex公司)制备成以0.05nM的浓度来含有的1次反应处理液并使用。在该1次反应处理液中浸渍标本前处理工序中所制作的标本,在4℃下反应1晚。

[0166] (免疫染色的2次反应处理)

[0167] 将上述“生物素修饰抗兔IgG抗体的制作”的部分所制作的生物素修饰抗兔IgG抗体的溶液进一步用含有BSA 1W/W%的PBS稀释成6μg/mL,从而制备2次反应处理液。将完成了1次反应处理的标本用PBS洗涤后,浸渍于该2次反应处理液,在室温下反应30分钟。

[0168] (免疫染色的标记处理-1:DAB标记处理)

[0169] 将完成2次反应处理的标本用PBS洗涤后,浸渍链霉亲和素-HRP (Thermo-Fisher公司、21130),在室温下反应60分钟。然后用PBS洗涤标本,在DAB(3,3'-Diaminobenzidine;3,3'-二氨基联苯胺)溶液中浸渍1分钟。

[0170] (免疫染色的标记处理-2:PID标记处理)

[0171] 将上述“红色PID染色剂制作工序”的部分所制作的链霉亲和素修饰内包德克萨斯红色素的三聚氰胺树脂粒子,用将酪蛋白(组成= α -酪蛋白(Sigma公司c6780):50W/W%、 β -酪蛋白(Sigma公司c6905):50W/W%)和BSA的含有率分别调整为1%、3%的荧光纳米粒子用稀释液稀释为0.02nM,从而分别制备荧光标记反应处理液。将完成2次反应处理的标本浸渍在该荧光标记处理液中,在室温下反应3小时。

[0172] 需要说明的是,对各标本玻片(彼此重叠的组织切片为邻接切片,视为同一标本样品)进行DAB标记处理和PID标记处理。下述的作为DAB染色阳性细胞率和荧光亮点数的结果而示于表2的数据为关于对应的同一患者的组织的数据。

[0173] (形态观察用染色处理)

[0174] 将进行了荧光染色处理的标本玻片用Mayer苏木精液染色5分钟而进行苏木精染色后,用45℃的流水洗涤3分钟。

[0175] (标本的后处理)

[0176] 对于完成免疫染色的标本玻片,进行4次在纯乙醇中浸渍5分钟的操作,从而进行固定化·脱水处理。接着,进行4次在二甲苯中浸渍5分钟的操作,从而进行透明处理。最后,在标本上载置封片剂“Entellan new”(默克公司),进行覆盖盖玻片的封入处理,将其作为观察中使用的标本。

[0177] 评价工序

[0178] (荧光亮点数)

[0179] 在荧光发光的观察中,使用荧光显微镜“BX-53”(奥林巴斯株式会社),在免疫染色图像(400倍)的拍摄中,使用安装在该荧光显微镜上的显微镜用数码相机“DP73”(奥林巴斯株式会社)。

[0180] 首先,对标本照射对应于CD30的荧光标记中所使用的德克萨斯红的激发光,使其发出荧光,拍摄该状态的免疫染色图像。此时,使用荧光显微镜所具备的激发光用滤光器将激发光的波长设为575~600nm,使用荧光用滤光器将要观察的荧光的波长设为612~692nm。荧光显微镜观察和图像拍摄时的激发光强度调整为使视野中心部附近的照射能量为900W/cm²。在不使图像的亮度饱和的范围内调节图像拍摄时的曝光时间,例如设为4000 μ 秒。

[0181] 在同一视野中进行这种免疫染色图像的拍摄后,改变视野重复进行相同操作,对1个标本各观察合计5个视野(第1~第5视野)。在该工序中的图像处理中,使用图像处理软件“ImageJ”(开源)。

[0182] 计测免疫染色图像中的表示对CD30进行荧光标记的德克萨斯红集成三聚氰胺粒子的亮点中的、亮度达到规定值以上的亮点的数量。对其进行计数,作为CD30的表达量的评价指标。

[0183] 然后,通过荧光显微镜的明视野观察和图像拍摄来拍摄DAB染色所形成的染色图像、细胞的形态观察用的苏木精染色所形成的染色图像。

[0184] 在同一视野中进行这种免疫染色图像和形态观察用染色图像的拍摄后,改变视野重复相同的操作,对于1个标本玻片均进行5视野的拍摄。

[0185] 将参考例1的结果示于表2。确认到下述倾向:PID的阳性率越高,通过Adcetris的给药使得肿瘤尺寸越大幅减小、Adcetris的药效(肿瘤尺寸的减少效果)越大。另一方面,利用以往的DAB标记进行的、通过CD30表达率进行的评价与Adcetris的药效之间未确认到相关性。

[0186] [表2]

[0187]

	利用 DAB 的评价 (DAB 染色阳性细胞率)	利用 PID 的评价 (PID 阳性细胞率)	药的效果判定
被检体 A	0	0	PD
被检体 B	0	15	PR
被检体 C	0	60	PR
被检体 D	10	20	PD
被检体 E	10	80	SD
被检体 F	30	50	SD
被检体 G	40	60	PR
被检体 H	50	80	PR
被检体 I	60	100	CR
被检体 J	80	100	PR
被检体 K	80	100	SD
被检体 L	80	100	PD
被检体 M	100	100	PR
被检体 N	100	100	CR

[0188] CR(效果显著):全部病变消失持续4周以上

[0189] PR(有效):预计30%以上的缩小持续4周以上

[0190] PD(进展):预计20%以上的增大或者出现新病变

[0191] SD(不变):不属于PR也不属于PD的变化

[0192] [实施例1]抗体-药物复合体的定量评价

[0193] 使用参考例1中准备的数个组织玻片进行试验。在1次反应处理中使用抗本妥昔单抗抗体代替抗CD30兔多克隆抗体,除此以外与参考例1同样地进行各小鼠的给药前后的标本玻片的染色和评价。

[0194] 需要说明的是,对各标本玻片进行DAB标记处理、针对CD30的PID荧光标记处理和针对Adcetris的PID荧光标记处理。下述的作为DAB染色阳性细胞率和荧光亮点数的结果的、表2所示的数据是关于对应的同一患者的组织数据。

[0195] 在此,将进行了针对Adcetris的荧光标记处理的玻片中,将细胞膜上的亮点计数

为5以上的细胞定义为Adcetris到达细胞。

[0196] 将实施例1的结果示于表3。

[0197] [表3]

[0198]

	给药前利用 PID 的评价 (PID 阳性细 胞率)	给药后利用 PID 的评价 (PID 阳性细 胞率)	给 药 后 Adcetris 到 达细胞率	药的效果判 定
被检体 A	0	0	0	PD
被检体 B	15	10	10	PR
被检体 C	60	20	40	PR
被检体 D	20	10	0	PD
被检体 E	80	0	40	SD
被检体 F	50	10	30	SD
被检体 G	60	20	30	PR
被检体 H	80	30	50	PR
被检体 I	100	0	100	CR
被检体 J	100	30	60	PR
被检体 K	100	60	20	SD
被检体 L	100	100	0	PD
被检体 M	100	40	60	PR
被检体 N	100	0	100	CR

[0199] <考察>

[0200] 被检体A中,肿瘤中不表达Adcetris的靶蛋白即CD30,因此即使给予药物,也可想到药物不能到达、被摄入癌细胞。该小鼠中,肿瘤也进展,看不到Adcetris的药效。被检体B、C中,虽然用DAB未能检测CD30、但是用PID时能够检测到,可知其表达CD30。而且可知,药也到达细胞,Adcetris对肿瘤有效。被检体D中,CD30为低表达但可检测到,但是药物未到达癌细胞。另外,被检体E中,CD30分布较广,此外药也到达,但是给药后表达CD30的细胞消失。因此认为,即使对于被检体E的小鼠给药在此以上的Adcetris也得不到效果。被检体F中表达CD30,药也到达。对于被检体F的小鼠,在测定肿瘤的给药后第100天的时点,对于肿瘤的大小看不出效果变化,但是仍有CD30表达细胞残留,因此可期待以通过进一步持续给药而表现出药效。获知在被检体G~J中,药分别到达细胞,Adcetris有效地发挥作用。被检体L中,虽然CD30强表达,但药未到达癌细胞,在肿瘤的大小方面也看不出药的效果。在被检体M、N中,可以确认CD30强表达且药也到达,可以观察到的药效也显著。

[0201] 由以上的结果可知,表明通过PID法测定的CD30的表达量、药所到达的细胞的比例、以及药效评价之间有相关性。因此可知,通过利用PID法,可以高精度地定量免疫细胞中所表达的规定蛋白质的表达量,进一步地,由该结果可以取得可用于构建用于癌症的诊断

或治疗的给药计划的信息。

[0202] 需要说明的是,本实施例中,基于细胞形态的观察信息计测存在于细胞膜区域的Adcetriss的亮点,但也可以为下述方法:进一步分别计测存在于细胞内区域的Adcetriss的亮点和存在于细胞外的Adcetriss的亮点,得到关于位于各区域的亮点的数量、位置的信息并对其进行分析。

[0203] [实施例2]

[0204] 对参考例1中制作的各玻片,分别通过与实施例1相同的方法进行前处理。通过与参考例1相同的方法进行1次反应工序、2次反应工序,进一步将制作例1中制作的红色PID染色剂用含有1%BSA的PBS稀释至0.1nM,将所得溶液置于标本玻片并放置一晚后,在装有PBS的容器中浸渍染色后的组织标本15分钟。对于用红色PID染色后的玻片,进一步将制作例2中制作的绿色PID染色剂用含有1%BSA的PBS稀释至0.1nM,然后使其置于标本玻片并放置一晚后,在装有PBS的容器中浸渍染色后的组织标本15分钟。进一步地,对于该玻片,将制作例3中制作的蓝色PID染色剂用含有1%BSA的PBS稀释至0.1nM,将所得的溶液置于标本玻片并放置一晚后,在装有PBS的容器中浸渍染色后的组织标本30分钟。

[0205] 需要说明的是,也可以使用下述方法:上述工序中,也可以在进行了2次反应工序后,将用含有1%BSA的PBS将最终浓度调制为0.1nM的红色PID染色剂、绿色PID染色剂、蓝色PID染色剂同时置于标本玻片并放置一晚后,在装有PBS的容器中浸渍染色后的组织标本15分钟。

[0206] 然后,与参考例1同样地进行标本的后处理,将免疫染色后的组织标本设置于载台,使用绿色用、红色用、蓝色用的下述3种滤光器套件(Semrock公司)进行各种颜色的亮点的观察。

[0207] 图1中示出实施例2中所进行的三重染色的示意图,图2中示出其流程图。

[0208] [表4]

[0209]

滤光器套件	滤光器波长的激发波长、发行波长		
	红色用(德克萨 斯红)	绿色用(FITC)	蓝色用(苯基香 豆素)
激发滤光器	586nm(波长宽 度 20nm)	470nm(波长宽 度 30nm)	438nm(波长宽 度 24nm)
荧光滤光器	628nm(波长宽 度 32nm)	525nm(波长宽 度 50nm)	483nm(波长宽 度 32nm)

[0210] 每次切换各过滤器套件则进行组织标本的荧光图像的荧光亮点数的观察·拍摄·图像处理。将三种颜色的亮点分别一致的细胞膜上出现的情况定义为Adcetriss到达细胞。表明Adcetriss到达细胞与药效评价有相关性。即,3种亮点一致的位置表示CD30的存在位置和尚未分离的(抗体-药物复合体的状态的)Adcetriss的存在位置,认为通过规定已排除Adcetriss的非特异性检测、已分离后的Adcetriss的检测的、正确的Adcetriss到达细胞,从而药效判定的准确性进一步增加。

[0211] 需要说明的是,在观察使用ADC药的抗药物抗体得到的亮点的分布时,细胞内分布

有10个以上的亮点的情况均对应于CR(效果显著)。

[0212] 进一步地,还获知可以以亮点间距离的形式来对表达CD30的癌细胞与Adcetris的距离进行定量。因此可知,通过基于PID法来定量规定蛋白质的表达量,可以定量癌细胞上的靶分子的表达量并且测定靶分子与抗体-药物复合体的距离,可以取得复合化的信息。

[0213] 符号说明

[0214] 10 . . . CD30

[0215] 20 . . . Adcetris构成药物(单甲基澳瑞他汀E)

[0216] 25 . . . Adcetris构成抗体(本妥昔单抗)

[0217] 30 . . . 抗单甲基澳瑞他汀E抗体

[0218] 35 . . . 抗CD30抗体

[0219] 40 . . . 抗IgG抗体

[0220] 41 . . . 抗本妥昔单抗抗体

[0221] 50 . . . 生物素

[0222] 55 . . . 链霉亲和素

[0223] 60 . . . 德克萨斯红

[0224] 61 . . . 苯基香豆素

[0225] 62 . . . FITC

[0226] 70 . . . 接头

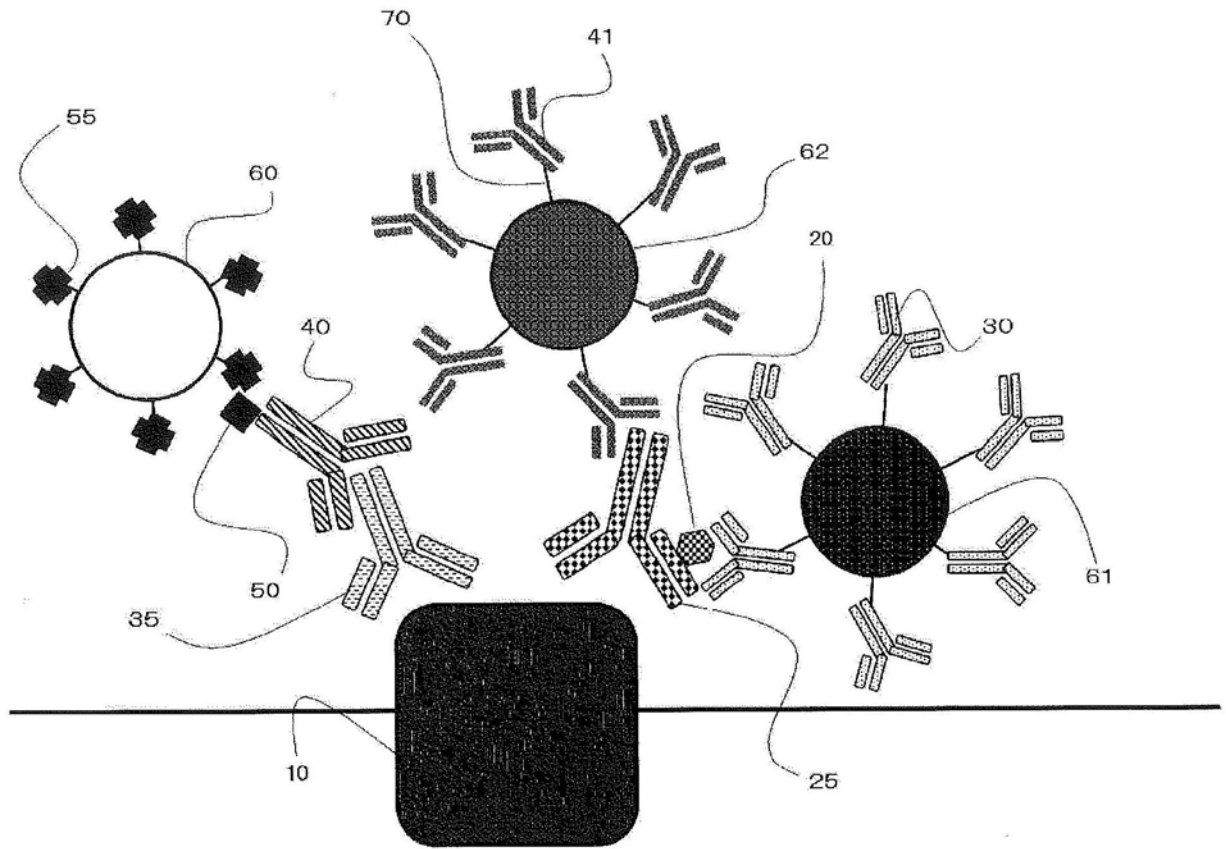


图1

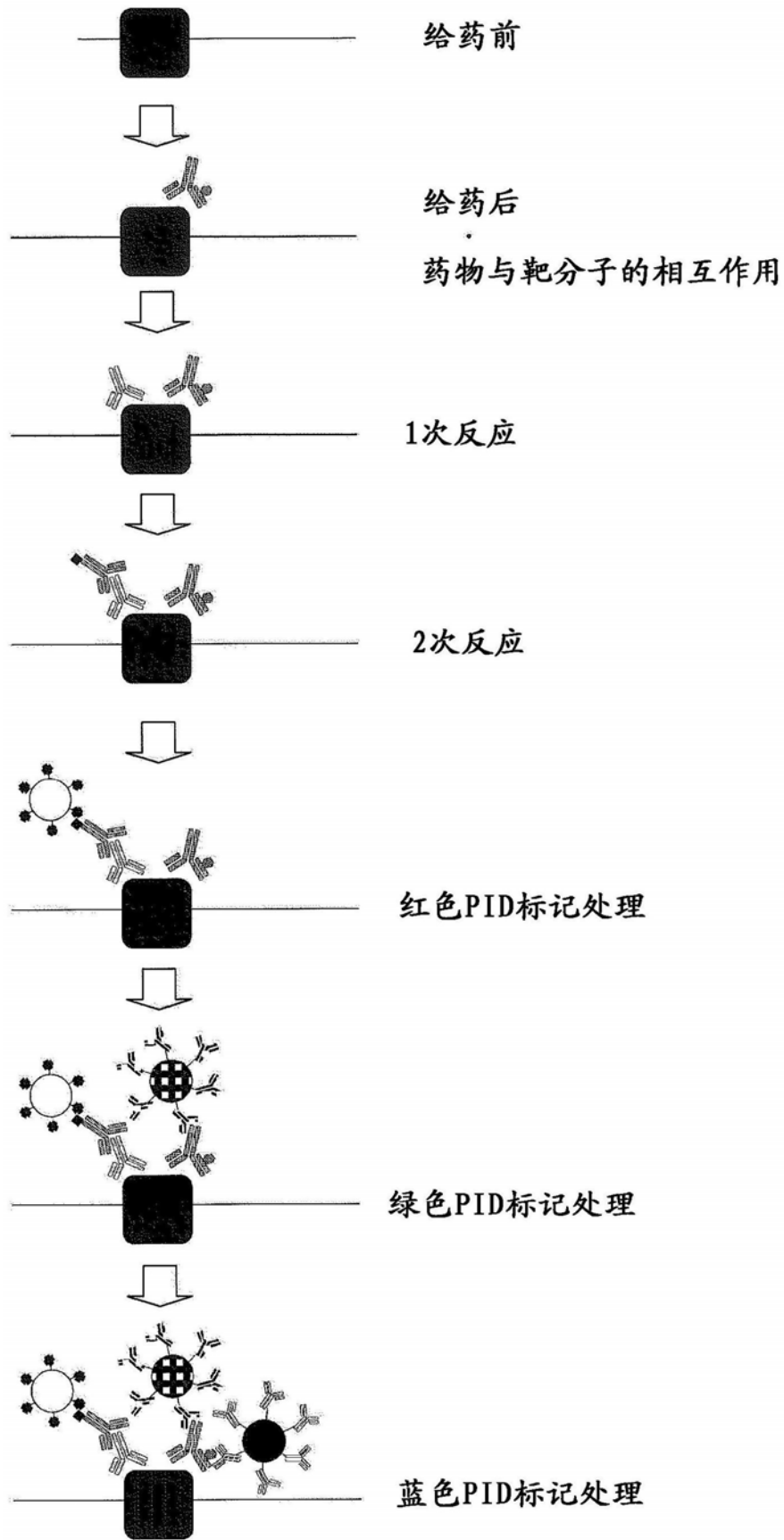


图2

专利名称(译)	抗体-药物复合体的构成成分的检测方法		
公开(公告)号	CN110402391A	公开(公告)日	2019-11-01
申请号	CN201880013679.4	申请日	2018-02-02
[标]申请(专利权)人(译)	柯尼卡株式会社		
申请(专利权)人(译)	柯尼卡美能达株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	柯尼卡美能达株式会社		
[标]发明人	高桥优 小山升		
发明人	高桥优 白石武嗣 小山升		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/574 G01N33/582 G01N33/587		
代理人(译)	何杨		
优先权	2017036438 2017-02-28 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及检测抗体-药物复合体的手段、以及通过定量的手段确定抗体-药物复合体的靶细胞中的靶分子的表达和它们的相互作用来高精度地判定抗体-药物复合体的有效性的方法。根据该方法，通过使用荧光体集成粒子的免疫染色法使作为抗体-药物复合体的构成成分的药物和/或作为抗体-药物复合体的构成成分的抗体可视化，从而可以检测抗体-药物复合体和其构成成分。

