

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-57582
(P2014-57582A)

(43) 公開日 平成26年4月3日(2014.4.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	2 G O 4 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	4 B O 6 3
G O 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15 Z	
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50 Z	

審査請求 未請求 請求項の数 17 O L (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2013-189692 (P2013-189692)	(71) 出願人	000004455 日立化成株式会社 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号
(22) 出願日	平成25年9月12日 (2013.9.12)	(71) 出願人	500294958 ヒタチ ケミカル リサーチ センター インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 926 17 アーバイン ヘルズ サイエンス ズ ロード 1003
(31) 優先権主張番号	61/702, 147	(71) 出願人	510097747 独立行政法人国立がん研究センター 東京都中央区築地五丁目1番1号
(32) 優先日	平成24年9月17日 (2012.9.17)	(74) 代理人	100088155 弁理士 長谷川 芳樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞傷害活性を予測するための方法及びキット

(57) 【要約】

【課題】細胞傷害活性、特にA D C C活性を、より簡便に、迅速にかつ高精度に予測する手段及び方法を提供すること。

【解決手段】細胞傷害活性を予測する方法であって、(a)動物から採取された白血球を含む生体試料を準備するステップと、(b)該生体試料と抗体とを接触させるステップと、(c)該白血球における、腫瘍壊死因子スーパーファミリー15、ケモカインCXCL3、及びインターロイキン6からなる群より選択される少なくとも1つの発現を検出するステップと、(d)該抗体を接触させた場合の発現レベルと接触させていない場合の発現レベルとを比較するステップと、(e)該抗体を接触させた場合の発現レベルが、接触させていない場合の発現レベルより高い場合に、細胞傷害活性が存在すると予測するステップと、を含む方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞傷害活性を予測する方法であって、

- (a) 動物から採取された白血球を含む生体試料を準備するステップと、
 - (b) 該生体試料と抗体とを接触させるステップと、
 - (c) 該白血球における、腫瘍壊死因子スーパーファミリー 15、ケモカイン C X C L 3、及びインターロイキン 6 からなる群より選択される少なくとも 1 つの発現を検出するステップと、
 - (d) 該抗体を接触させた場合の発現レベルと接触させていない場合の発現レベルとを比較するステップと、
 - (e) 該抗体を接触させた場合の発現レベルが、接触させていない場合の発現レベルより高い場合に、細胞傷害活性が存在すると予測するステップと、
- を含む方法。

10

【請求項 2】

前記細胞傷害活性が抗体依存性細胞傷害活性である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記抗体が熱凝集 I g G である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記抗体が抗体医薬である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記抗体医薬が、アブシキシマブ、アダリムマブ、アレムツズマブ、バシリキシマブ、ベバシズマブ、セツキシマブ、ダクリズマブ、エクリズマブ、エファリズマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン、イブリツモマブチウキセタン、インフリキシマブ、ムロモナブ、ナタリズマブ、オマリズマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、ラニビズマブ、リツキシマブ、トシツモマブ、トシリズマブ、ゴリムマブ、カナキヌマブ、ウステキヌマブ、オフアツムマブ、デノスマブ、モタビズマブ、ラクシバクマブ、ベリムマブ、イピリムマブ、ブレンツキシマブベドチン、及びトラスツズマブからなる群より選択される、請求項 4 に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記抗体を、熱変性させて、又は該抗体に対する抗原との複合体として、前記生体試料と接触させる、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 7】

前記発現の検出が m R N A の検出である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記発現の検出が、腫瘍壊死因子スーパーファミリー 15 の発現の検出である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

抗体医薬に対する患者の薬剤応答性の評価方法であって、

- (a) 患者から採取された白血球を含む生体試料を準備するステップと、
 - (b) 該生体試料と抗体とを接触させるステップと、
 - (c) 該白血球における、腫瘍壊死因子スーパーファミリー 15、ケモカイン C X C L 3、ケモカイン C X C L 1 及び腫瘍壊死因子スーパーファミリー 2 からなる群より選択される少なくとも 1 つの発現を検出するステップと、
 - (d) 該抗体を接触させた場合の発現レベルと接触させていない場合の発現レベルとを比較して、細胞傷害活性を予測するステップと、
 - (e) 該患者の細胞傷害活性が高い場合に、該患者の抗体医薬に対する薬剤応答性が高いと評価するステップと、
- を含む方法。

40

【請求項 10】

前記生体試料と接触させる前記抗体が、熱凝集 I g G、抗癌剤、抗ウイルス剤、抗炎症

50

剤、拒絶反応抑制剤及び抗腫瘍剤からなる群から選択される１種以上である、請求項９に記載の方法。

【請求項１１】

前記抗体医薬が、抗癌剤、抗ウイルス剤、抗炎症剤、拒絶反応抑制剤及び抗腫瘍剤からなる群から選択される、請求項９又は１０に記載の方法。

【請求項１２】

前記抗体医薬がトラスツマブである、請求項１１に記載の方法。

【請求項１３】

前記患者におけるHER2タンパク質抗原の発現を検出するステップをさらに含む、請求項９～１２のいずれか１項に記載の方法。

10

【請求項１４】

細胞傷害活性を有する抗体をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検抗体と動物から採取された白血球とを接触させるステップと、

(b) 該白血球における腫瘍壊死因子スーパーファミリー１５、ケモカインCXCL3、及びインターロイキン６からなる群より選択される少なくとも１つの発現を検出するステップと、

(c) 被検抗体を接触させた場合の発現レベルが、接触させていない場合の発現レベルと比較して高い場合に、該被検抗体を、細胞傷害活性を有するものとして選択するステップと、

を含む方法。

20

【請求項１５】

腫瘍壊死因子スーパーファミリー１５、ケモカインCXCL3、及びインターロイキン６からなる群より選択される少なくとも１つの発現を検出するための手段を含む、細胞傷害活性を予測するためのキット。

【請求項１６】

発現を検出するための手段が、プライマー及び／又はプローブである、請求項１５に記載のキット。

【請求項１７】

抗体医薬に対する患者の薬剤応答性を評価するためのデータ分析方法であって、

(a) 患者から得られた白血球を含む生体試料を取得するステップと、

(b) 該生体試料と抗体とを接触させるステップと、

(c) 該白血球における、腫瘍壊死因子スーパーファミリー１５、ケモカインCXCL3、ケモカインCXCL1及び腫瘍壊死因子スーパーファミリー２からなる群より選択される少なくとも１つの発現を検出し、発現レベルのデータを取得するステップと、

(d) 該抗体を接触させた場合の前記発現レベルのデータと接触させていない場合の前記発現レベルのデータとを比較するステップと、

(e) 該抗体を接触させた場合の発現レベルが、接触させていない場合の発現レベルより高い場合に、該患者の抗体医薬に対する薬剤応答性が高いとの評価基準に基づき、該抗体を接触させた場合の前記発現レベルのデータを分析するステップと、

を含む方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、細胞傷害活性、特に抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性を予測するための方法及びキットに関する。具体的には、特定の遺伝子の発現を検出することによって細胞傷害活性を予測する方法及びキットに関する。本発明は、患者の薬剤応答性を評価する方法、及び細胞傷害活性を有する抗体のスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【０００２】

抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性とは、標的細胞に結合した抗体が、ナチュラルキ

50

ラー細胞（NK細胞）及びマクロファージ等のエフェクター細胞上のFc受容体と結合することで、抗体依存的に誘導される細胞傷害活性である（Mitsuo, S. et al., Trends in Glycoscience and Glycotechnology 18: 129-136, 2006）。

【0003】

ADCC活性に関しては、抗癌抗体医薬であるリツキシマブ（商品名Rituxian（登録商標））、トラスツズマブ（商品名Herceptin（登録商標））、セツキシマブ（商品名Erbbitux（登録商標））等の抗腫瘍メカニズムの1つがADCC活性であることが報告されている（Mitsuo, S. et al., Trends in Glycoscience and Glycotechnology 18: 129-136, 2006; Reff, M.E. et al., Blood 83: 435-445, 1994; Kurai, J. et al., Clin. Cancer Res. 13: 1552-1561, 2007; Clynes, R.A. et al., Nature Medicine 6: 443-446, 2000）。そのため、より高い臨床効果を期待して、高いADCC活性を示す抗体医薬を開発する試みがなされている（Mitsuo, S. et al., Trends in Glycoscience and Glycotechnology 18: 129-136, 2006）。

10

【0004】

ある個体におけるADCC活性は、抗体医薬に対するその個体の応答とも相関することが知られている。例えば、抗HER2ヒト化抗体であるトラスツズマブの乳癌患者に対する治療の効果は、その患者のADCC活性と相関している（Gennari, R. et al., Clin. Cancer Res. 10: 5650-5655, 2004; Beano, A. et al., Journal of Translational Medicine 6: 25, 2008）。そのため、抗体医薬を使用する前に患者のADCC活性を測定することによって、その抗体医薬の効果が予測できる可能性がある。

20

【0005】

上述のようにADCC活性の概念は確立されているが、ADCC活性の臨床応用における生理学的役割、病理学的役割は理解されておらず、ADCC活性のメカニズムにどのような遺伝子が関与しているかは具体的に明らかにされていない。

30

【0006】

ADCC活性の測定は、様々な方法で行われており、例えば、抗体及びエフェクター細胞の存在下における標的細胞からの放射性同位体（クロム等）（Reff, M.E. et al., Blood 83: 435-445, 1994; Kurai, J. et al., Clin. Cancer Res. 13: 1552-1561, 2007; Clynes, R.A. et al., Nature Medicine 6: 443-446, 2000; Gennari, R. et al., Clin. Cancer Res. 10: 5650-5655, 2004; Beano, A. et al., Journal of Translational Medicine 6: 25, 2008）又は蛍光色素（カルセイン等）の放出を測定することによって行われている。しかしながら、従来の方法では、生存細胞の培養が必要であるため、測定に時間がかかること、培養条件等によって測定結果が変動すること等の問題点があった。

40

【0007】

一方、抗体による刺激に応答して発現される遺伝子として腫瘍壊死因子（TNF）スーパーファミリー及びケモカインが存在することが報告されている（国際公開第06/133399号）。国際公開第06/133399号には、熱凝集したヒトIgG（熱凝集ヒトIgG、HAG）抗体による標的細胞への刺激に応答してTNFスーパーファミリー亜群2、8、14、15及び18、並びに、ケモカインCCL-3、CCL-20、CXCL-10、CXCL-12、CXCL-13、CXCL-14、CXCL-16、CXCL-17、CXCL-18、CXCL-20、CXCL-21、CXCL-22、CXCL-23、CXCL-24、CXCL-25、CXCL-26、CXCL-27、CXCL-28、CXCL-29、CXCL-30、CXCL-31、CXCL-32、CXCL-33、CXCL-34、CXCL-35、CXCL-36、CXCL-37、CXCL-38、CXCL-39、CXCL-40、CXCL-41、CXCL-42、CXCL-43、CXCL-44、CXCL-45、CXCL-46、CXCL-47、CXCL-48、CXCL-49、CXCL-50、CXCL-51、CXCL-52、CXCL-53、CXCL-54、CXCL-55、CXCL-56、CXCL-57、CXCL-58、CXCL-59、CXCL-60、CXCL-61、CXCL-62、CXCL-63、CXCL-64、CXCL-65、CXCL-66、CXCL-67、CXCL-68、CXCL-69、CXCL-70、CXCL-71、CXCL-72、CXCL-73、CXCL-74、CXCL-75、CXCL-76、CXCL-77、CXCL-78、CXCL-79、CXCL-80、CXCL-81、CXCL-82、CXCL-83、CXCL-84、CXCL-85、CXCL-86、CXCL-87、CXCL-88、CXCL-89、CXCL-90、CXCL-91、CXCL-92、CXCL-93、CXCL-94、CXCL-95、CXCL-96、CXCL-97、CXCL-98、CXCL-99、CXCL-100、CXCL-101、CXCL-102、CXCL-103、CXCL-104、CXCL-105、CXCL-106、CXCL-107、CXCL-108、CXCL-109、CXCL-110、CXCL-111、CXCL-112、CXCL-113、CXCL-114、CXCL-115、CXCL-116、CXCL-117、CXCL-118、CXCL-119、CXCL-120、CXCL-121、CXCL-122、CXCL-123、CXCL-124、CXCL-125、CXCL-126、CXCL-127、CXCL-128、CXCL-129、CXCL-130、CXCL-131、CXCL-132、CXCL-133、CXCL-134、CXCL-135、CXCL-136、CXCL-137、CXCL-138、CXCL-139、CXCL-140、CXCL-141、CXCL-142、CXCL-143、CXCL-144、CXCL-145、CXCL-146、CXCL-147、CXCL-148、CXCL-149、CXCL-150、CXCL-151、CXCL-152、CXCL-153、CXCL-154、CXCL-155、CXCL-156、CXCL-157、CXCL-158、CXCL-159、CXCL-160、CXCL-161、CXCL-162、CXCL-163、CXCL-164、CXCL-165、CXCL-166、CXCL-167、CXCL-168、CXCL-169、CXCL-170、CXCL-171、CXCL-172、CXCL-173、CXCL-174、CXCL-175、CXCL-176、CXCL-177、CXCL-178、CXCL-179、CXCL-180、CXCL-181、CXCL-182、CXCL-183、CXCL-184、CXCL-185、CXCL-186、CXCL-187、CXCL-188、CXCL-189、CXCL-190、CXCL-191、CXCL-192、CXCL-193、CXCL-194、CXCL-195、CXCL-196、CXCL-197、CXCL-198、CXCL-199、CXCL-200、CXCL-201、CXCL-202、CXCL-203、CXCL-204、CXCL-205、CXCL-206、CXCL-207、CXCL-208、CXCL-209、CXCL-210、CXCL-211、CXCL-212、CXCL-213、CXCL-214、CXCL-215、CXCL-216、CXCL-217、CXCL-218、CXCL-219、CXCL-220、CXCL-221、CXCL-222、CXCL-223、CXCL-224、CXCL-225、CXCL-226、CXCL-227、CXCL-228、CXCL-229、CXCL-230、CXCL-231、CXCL-232、CXCL-233、CXCL-234、CXCL-235、CXCL-236、CXCL-237、CXCL-238、CXCL-239、CXCL-240、CXCL-241、CXCL-242、CXCL-243、CXCL-244、CXCL-245、CXCL-246、CXCL-247、CXCL-248、CXCL-249、CXCL-250、CXCL-251、CXCL-252、CXCL-253、CXCL-254、CXCL-255、CXCL-256、CXCL-257、CXCL-258、CXCL-259、CXCL-260、CXCL-261、CXCL-262、CXCL-263、CXCL-264、CXCL-265、CXCL-266、CXCL-267、CXCL-268、CXCL-269、CXCL-270、CXCL-271、CXCL-272、CXCL-273、CXCL-274、CXCL-275、CXCL-276、CXCL-277、CXCL-278、CXCL-279、CXCL-280、CXCL-281、CXCL-282、CXCL-283、CXCL-284、CXCL-285、CXCL-286、CXCL-287、CXCL-288、CXCL-289、CXCL-290、CXCL-291、CXCL-292、CXCL-293、CXCL-294、CXCL-295、CXCL-296、CXCL-297、CXCL-298、CXCL-299、CXCL-300、CXCL-301、CXCL-302、CXCL-303、CXCL-304、CXCL-305、CXCL-306、CXCL-307、CXCL-308、CXCL-309、CXCL-310、CXCL-311、CXCL-312、CXCL-313、CXCL-314、CXCL-315、CXCL-316、CXCL-317、CXCL-318、CXCL-319、CXCL-320、CXCL-321、CXCL-322、CXCL-323、CXCL-324、CXCL-325、CXCL-326、CXCL-327、CXCL-328、CXCL-329、CXCL-330、CXCL-331、CXCL-332、CXCL-333、CXCL-334、CXCL-335、CXCL-336、CXCL-337、CXCL-338、CXCL-339、CXCL-340、CXCL-341、CXCL-342、CXCL-343、CXCL-344、CXCL-345、CXCL-346、CXCL-347、CXCL-348、CXCL-349、CXCL-350、CXCL-351、CXCL-352、CXCL-353、CXCL-354、CXCL-355、CXCL-356、CXCL-357、CXCL-358、CXCL-359、CXCL-360、CXCL-361、CXCL-362、CXCL-363、CXCL-364、CXCL-365、CXCL-366、CXCL-367、CXCL-368、CXCL-369、CXCL-370、CXCL-371、CXCL-372、CXCL-373、CXCL-374、CXCL-375、CXCL-376、CXCL-377、CXCL-378、CXCL-379、CXCL-380、CXCL-381、CXCL-382、CXCL-383、CXCL-384、CXCL-385、CXCL-386、CXCL-387、CXCL-388、CXCL-389、CXCL-390、CXCL-391、CXCL-392、CXCL-393、CXCL-394、CXCL-395、CXCL-396、CXCL-397、CXCL-398、CXCL-399、CXCL-400、CXCL-401、CXCL-402、CXCL-403、CXCL-404、CXCL-405、CXCL-406、CXCL-407、CXCL-408、CXCL-409、CXCL-410、CXCL-411、CXCL-412、CXCL-413、CXCL-414、CXCL-415、CXCL-416、CXCL-417、CXCL-418、CXCL-419、CXCL-420、CXCL-421、CXCL-422、CXCL-423、CXCL-424、CXCL-425、CXCL-426、CXCL-427、CXCL-428、CXCL-429、CXCL-430、CXCL-431、CXCL-432、CXCL-433、CXCL-434、CXCL-435、CXCL-436、CXCL-437、CXCL-438、CXCL-439、CXCL-440、CXCL-441、CXCL-442、CXCL-443、CXCL-444、CXCL-445、CXCL-446、CXCL-447、CXCL-448、CXCL-449、CXCL-450、CXCL-451、CXCL-452、CXCL-453、CXCL-454、CXCL-455、CXCL-456、CXCL-457、CXCL-458、CXCL-459、CXCL-460、CXCL-461、CXCL-462、CXCL-463、CXCL-464、CXCL-465、CXCL-466、CXCL-467、CXCL-468、CXCL-469、CXCL-470、CXCL-471、CXCL-472、CXCL-473、CXCL-474、CXCL-475、CXCL-476、CXCL-477、CXCL-478、CXCL-479、CXCL-480、CXCL-481、CXCL-482、CXCL-483、CXCL-484、CXCL-485、CXCL-486、CXCL-487、CXCL-488、CXCL-489、CXCL-490、CXCL-491、CXCL-492、CXCL-493、CXCL-494、CXCL-495、CXCL-496、CXCL-497、CXCL-498、CXCL-499、CXCL-500、CXCL-501、CXCL-502、CXCL-503、CXCL-504、CXCL-505、CXCL-506、CXCL-507、CXCL-508、CXCL-509、CXCL-510、CXCL-511、CXCL-512、CXCL-513、CXCL-514、CXCL-515、CXCL-516、CXCL-517、CXCL-518、CXCL-519、CXCL-520、CXCL-521、CXCL-522、CXCL-523、CXCL-524、CXCL-525、CXCL-526、CXCL-527、CXCL-528、CXCL-529、CXCL-530、CXCL-531、CXCL-532、CXCL-533、CXCL-534、CXCL-535、CXCL-536、CXCL-537、CXCL-538、CXCL-539、CXCL-540、CXCL-541、CXCL-542、CXCL-543、CXCL-544、CXCL-545、CXCL-546、CXCL-547、CXCL-548、CXCL-549、CXCL-550、CXCL-551、CXCL-552、CXCL-553、CXCL-554、CXCL-555、CXCL-556、CXCL-557、CXCL-558、CXCL-559、CXCL-560、CXCL-561、CXCL-562、CXCL-563、CXCL-564、CXCL-565、CXCL-566、CXCL-567、CXCL-568、CXCL-569、CXCL-570、CXCL-571、CXCL-572、CXCL-573、CXCL-574、CXCL-575、CXCL-576、CXCL-577、CXCL-578、CXCL-579、CXCL-580、CXCL-581、CXCL-582、CXCL-583、CXCL-584、CXCL-585、CXCL-586、CXCL-587、CXCL-588、CXCL-589、CXCL-590、CXCL-591、CXCL-592、CXCL-593、CXCL-594、CXCL-595、CXCL-596、CXCL-597、CXCL-598、CXCL-599、CXCL-600、CXCL-601、CXCL-602、CXCL-603、CXCL-604、CXCL-605、CXCL-606、CXCL-607、CXCL-608、CXCL-609、CXCL-610、CXCL-611、CXCL-612、CXCL-613、CXCL-614、CXCL-615、CXCL-616、CXCL-617、CXCL-618、CXCL-619、CXCL-620、CXCL-621、CXCL-622、CXCL-623、CXCL-624、CXCL-625、CXCL-626、CXCL-627、CXCL-628、CXCL-629、CXCL-630、CXCL-631、CXCL-632、CXCL-633、CXCL-634、CXCL-635、CXCL-636、CXCL-637、CXCL-638、CXCL-639、CXCL-640、CXCL-641、CXCL-642、CXCL-643、CXCL-644、CXCL-645、CXCL-646、CXCL-647、CXCL-648、CXCL-649、CXCL-650、CXCL-651、CXCL-652、CXCL-653、CXCL-654、CXCL-655、CXCL-656、CXCL-657、CXCL-658、CXCL-659、CXCL-660、CXCL-661、CXCL-662、CXCL-663、CXCL-664、CXCL-665、CXCL-666、CXCL-667、CXCL-668、CXCL-669、CXCL-670、CXCL-671、CXCL-672、CXCL-673、CXCL-674、CXCL-675、CXCL-676、CXCL-677、CXCL-678、CXCL-679、CXCL-680、CXCL-681、CXCL-682、CXCL-683、CXCL-684、CXCL-685、CXCL-686、CXCL-687、CXCL-688、CXCL-689、CXCL-690、CXCL-691、CXCL-692、CXCL-693、CXCL-694、CXCL-695、CXCL-696、CXCL-697、CXCL-698、CXCL-699、CXCL-700、CXCL-701、CXCL-702、CXCL-703、CXCL-704、CXCL-705、CXCL-706、CXCL-707、CXCL-708、CXCL-709、CXCL-710、CXCL-711、CXCL-712、CXCL-713、CXCL-714、CXCL-715、CXCL-716、CXCL-717、CXCL-718、CXCL-719、CXCL-720、CXCL-721、CXCL-722、CXCL-723、CXCL-724、CXCL-725、CXCL-726、CXCL-727、CXCL-728、CXCL-729、CXCL-730、CXCL-731、CXCL-732、CXCL-733、CXCL-734、CXCL-735、CXCL-736、CXCL-737、CXCL-738、CXCL-739、CXCL-740、CXCL-741、CXCL-742、CXCL-743、CXCL-744、CXCL-745、CXCL-746、CXCL-747、CXCL-748、CXCL-749、CXCL-750、CXCL-751、CXCL-752、CXCL-753、CXCL-754、CXCL-755、CXCL-756、CXCL-757、CXCL-758、CXCL-759、CXCL-760、CXCL-761、CXCL-762、CXCL-763、CXCL-764、CXCL-765、CXCL-766、CXCL-767、CXCL-768、CXCL-769、CXCL-770、CXCL-771、CXCL-772、CXCL-773、CXCL-774、CXCL-775、CXCL-776、CXCL-777、CXCL-778、CXCL-779、CXCL-780、CXCL-781、CXCL-782、CXCL-783、CXCL-784、CXCL-785、CXCL-786、CXCL-787、CXCL-788、CXCL-789、CXCL-790、CXCL-791、CXCL-792、CXCL-793、CXCL-794、CXCL-795、CXCL-796、CXCL-797、CXCL-798、CXCL-799、CXCL-800、CXCL-801、CXCL-802、CXCL-803、CXCL-804、CXCL-805、CXCL-806、CXCL-807、CXCL-808、CXCL-809、CXCL-810、CXCL-811、CXCL-812、CXCL-813、CXCL-814、CXCL-815、CXCL-816、CXCL-817、CXCL-818、CXCL-819、CXCL-820、CXCL-821、CXCL-822、CXCL-823、CXCL-824、CXCL-825、CXCL-826、CXCL-827、CXCL-828、CXCL-829、CXCL-830、CXCL-831、CXCL-832、CXCL-833、CXCL-834、CXCL-835、CXCL-836、CXCL-837、CXCL-838、CXCL-839、CXCL-840、CXCL-841、CXCL-842、CXCL-843、CXCL-844、CXCL-845、CXCL-846、CXCL-847、CXCL-848、CXCL-849、CXCL-850、CXCL-851、CXCL-852、CXCL-853、CXCL-854、CXCL-855、CXCL-856、CXCL-857、CXCL-858、CXCL-859、CXCL-860、CXCL-861、CXCL-862、CXCL-863、CXCL-864、CXCL-865、CXCL-866、CXCL-867、CXCL-868、CXCL-869、CXCL-870、CXCL-871、CXCL-872、CXCL-873、CXCL-874、CXCL-875、CXCL-876、CXCL-877、CXCL-878、CXCL-879、CXCL-880、CXCL-881、CXCL-882、CXCL-883、CXCL-884、CXCL-885、CXCL-886、CXCL-887、CXCL-888、CXCL-889、CXCL-890、CXCL-891、CXCL-892、CXCL-893、CXCL-894、CXCL-895、CXCL-896、CXCL-897、CXCL-898、CXCL-899、CXCL-900、CXCL-901、CXCL-902、CXCL-903、CXCL-904、CXCL-905、CXCL-906、CXCL-907、CXCL-908、CXCL-909、CXCL-910、CXCL-911、CXCL-912、CXCL-913、CXCL-914、CXCL-915、CXCL-916、CXCL-917、CXCL-918、CXCL-919、CXCL-920、CXCL-921、CXCL-922、CXCL-923、CXCL-924、CXCL-925、CXCL-926、CXCL-927、CXCL-928、CXCL-929、CXCL-930、CXCL-931、CXCL-932、CXCL-933、CXCL-934、CXCL-935、CXCL-936、CXCL-937、CXCL-938、CXCL-939、CXCL-940、CXCL-941、CXCL-942、CXCL-943、CXCL-944、CXCL-945、CXCL-946、CXCL-947、CXCL-948、CXCL-949、CXCL-950、CXCL-951、CXCL-952、CXCL-953、CXCL-954、CXCL-955、CXCL-956、CXCL-957、CXCL-958、CXCL-959、CXCL-960、CXCL-961、CXCL-962、CXCL-963、CXCL-964、CXCL-965、CXCL-966、CXCL-967、CXCL-968、CXCL-969、CXCL-970、CXCL-971、CXCL-972、CXCL-973、CXCL-974、CXCL-975、CXCL-976、CXCL-977、CXCL-978、CXCL-979、CXCL-980、CXCL-981、CXCL-982、CXCL-983、CXCL-984、CXCL-985、CXCL-986、CXCL-987、CXCL-988、CXCL-989、CXCL-990、CXCL-991、CXCL-992、CXCL-993、CXCL-994、CXCL-995、CXCL-996、CXCL-997、CXCL-998、CXCL-999、CXCL-1000、CXCL-1001、CXCL-1002、CXCL-1003、CXCL-1004、CXCL-1005、CXCL-1006、CXCL-1007、CXCL-1008、CXCL-1009、CXCL-1010、CXCL-1011、CXCL-1012、CXCL-1013、CXCL-1014、CXCL-1015、CXCL-1016、CXCL-1017、CXCL-1018、CXCL-1019、CXCL-1020、CXCL-1021、CXCL-1022、CXCL-1023、CXCL-1024、CXCL-1025、CXCL-1026、CXCL-1027、CXCL-1028、CXCL-1029、CXCL-1030、CXCL-1031、CXCL-1032、CXCL-1033、CXCL-1034、CXCL-1035、CXCL-1036、CXCL-1037、CXCL-1038、CXCL-1039、CXCL-1040、CXCL-1041、CXCL-1042、CXCL-1043、CXCL-1044、CXCL-1045、CXCL-1046、CXCL-1047、CXCL-1048、CXCL-1049、CXCL-1050、CXCL-1051、CXCL-1052、CXCL-1053、CXCL-1054、CXCL-1055、CXCL-1056、CXCL-1057、CXCL-1058、CXCL-1059、CXCL-1060、CXCL-1061、CXCL-1062、CXCL-1063、CXCL-1064、CXCL-1065、CXCL-1066、CXCL-1067、CXCL-1068、CXCL-1069、CXCL-1070、CXCL-1071、CXCL-1072、CXCL-1073、CXCL-1074、CXCL-1075、CXCL-1076、CXCL-1077、CXCL-1078、CXCL-1079、CXCL-1080、CXCL-1081、CXCL-1082、CXCL-1083、CXCL-1084、CXCL-1085、CXCL-1086、CXCL-1087、CXCL-1088、CXCL-1089、CXCL-1090、CXCL-1091、CXCL-1092、CXCL-1093、CXCL-1094、CXCL-1095、CXCL-1096、CXCL-1097、CXCL-1098、CXCL-1099、CXCL-1100、CXCL-1101、CXCL-1102、CXCL-1103、CXCL-1104、CXCL-1105、CXCL-1106、CXCL-1107、CXCL-1108、CXCL-1109、CXCL-1110、CXCL-1111、CXCL-1112、CXCL-1113、CXCL-1114、CXCL-1115、CXCL-1116、CXCL-1117、CXCL-1118、CXCL-1119、CXCL-1120、CXCL-1121、CXCL-1122、CXCL-1123、CXCL-1124、CXCL-1125、CXCL-1126、CXCL-1127、CXCL-1128、CXCL-1129、CXCL-1130、CXCL-1131、CXCL-1132、CXCL-1133、CXCL-1134、CXCL-1135、CXCL-1136、CXCL-1137、CXCL-1138、CXCL-1139、CXCL-1140、CXCL-1141、CXCL-1142、CXCL-1143、CXCL-1144、CXCL-1145、CXCL-1146、CXCL-1147、CXCL-1148、CXCL-1149、CXCL-1150、CXCL-1151、CXCL-1152、CXCL-1153、CXCL-1154、CXCL-1155、CXCL-1156、CXCL-1157、CXCL-1158、CXCL-1159、CXCL-1160、CXCL-1161、CXCL-1162、CXCL-1163、CXCL-1164、CXCL-1165、CXCL-1166、CXCL-1167、CXCL-1168、CXCL-1169、CXCL-1170、CXCL-1171、CXCL-1172、CXCL-1173、CXCL-1174、CXCL-1175、CXCL-1176、CXCL-1177、CXCL-1178、CXCL-1179、CXCL-1180、CXCL-1181、CXCL-1182、CXCL-1183、CXCL-1184、CXCL-1185、CXCL-1186、CXCL-1187、CXCL-1188、CXCL-1189、CXCL-1190、CXCL-1191、CXCL-1192、CXCL-1193、CXCL-1194、CXCL-1195、CXCL-1196、CXCL-1197、CXCL-1198、CXCL-1199、CXCL-1200、CXCL-1201、CXCL-1202、CXCL-1203、CXCL-1204、CXCL-1205、CXCL-1206、CXCL-1207、CXCL-1208、CXCL-1209、CXCL-1210、CXCL-1211、CXCL-1212、CXCL-1213、CXCL-1214、CXCL-1215、CXCL-1216、CXCL-1217、CXCL-1218、CXCL-1219、CXCL-1220、CXCL-1221、CXCL-1222、CXCL-1223、CXCL-1224、CXCL-1225、CXCL-1226、CXCL-1227、CXCL-1228、CXCL-1229、CXCL-1230、CXCL-1231、CXCL-1232、CXCL-1233、CXCL-1234、CXCL-1235、CXCL-1236、CXCL-1237、CXCL-1238、CXCL-1239、CXCL-1240、CXCL-1241、CXCL-1242、CXCL-1243、CXCL-1244、CXCL-1245、CXCL-1246、CXCL-1247、CXCL-1248、CXCL-1249、CXCL-1250、CXCL-1251、CXCL-1252、CXCL-1253、CXCL-1254、CXCL-1255、CXCL-1256、CXCL-1257、CXCL-1258、CXCL-1259、CXCL-1260、CXCL-1261、CXCL-1262、CXCL-1263、CXCL-1264、CXCL-1265、CXCL-1266、CXCL-1267、CXCL-1268、CXCL-1269、CXCL-1270、CXCL-1271、CXCL-1272、CXCL-1273、CXCL-1274、CXCL-1275、CXCL-1276、CXCL-1277、CXCL-1278、CXCL-1279、CXCL-1280、CXCL-1281、CXCL-1282、CXCL-1283、CXCL-1284、CXCL-1285、CXCL-1286、CXCL-1287、CXCL-1288、CXCL-1289、CXCL-1290、CXCL-1291、CXCL-1292、CXCL-1293、CXCL-1294、CXCL-1295、CXCL-1296、CXCL-1297、CXCL-1298、CXCL-1299、CXCL-1300、CXCL-1301、CXCL-1302、CXCL-1303、CXCL-1304、CXCL-1305、CXCL-1306、CXCL-1307、CXCL-1308、CXCL-1309、CXCL-1310、CXCL-1311、CXCL-1312、CXCL-1313、CXCL-1314、CXCL-1315、CXCL-1316、CXCL-1317、CXCL-1318、CXCL-1319、CXCL-1320、CXCL-1321、CXCL-1322、CXCL-1323、CXCL-1324、CXCL-1325、CXCL-1326、CXCL-1327、CXCL-1328、CXCL-1329、CXCL-1330、CXCL-1331、CXCL-1332、CXCL-1333、CXCL-1334、CXCL-1335、CXCL-1336、CXCL-1337、CXCL-1338、CXCL-1339、CXCL-1340、CXCL-1341、CXCL-1342、CXCL-1343、CXCL-1344、CXCL-1345、CXCL-1346、CXCL-1347、CXCL-1348、CXCL-1349、CXCL-1350、CXCL-1351、CXCL-1352、CXCL-1353、CXCL-1354、CXCL-1355、CXCL-1356、CXCL-1357、CXCL-1358、CXCL-1359、CXCL-1360、CXCL-1361、CXCL-1362、CXCL-1363、CXCL-1364、CXCL-1365、CXCL-1366、CXCL-1367、CXCL-1368、CXCL-1369、CXCL-1370、CXCL-1371、CXCL-1372、CXCL-1373、CXCL-1374、CXCL-1375、CXCL-1376、CXCL-1377、CXCL-1378、CXCL-1379、CXCL-1380、CXCL-1381、CXCL-1382、CXCL-1383、CXCL-1384、CXCL-1385、CXCL-1386、CXCL-1387、CXCL-1388、CXCL-1389、CXCL-1390、CXCL-1391、CXCL-1392、CXCL-1393、CXCL-1394、CXCL-1395、CXCL-1396、CXCL-1397、CXCL-1398、CXCL-1399、CXCL-1400、CXCL-1401、CXCL-1402、CXCL-1403、CXCL-1404、CXCL-1405、CXCL-1406、CXCL-1407、CXCL-1408、CXCL-1409、CXCL-1410、CXCL-1411、CXCL-1412、CXCL-1413、CXCL-1414、CXCL-1415、CXCL-1416、CXCL-1417、CXCL-1418、CXCL-1419、CXCL-1420、CXCL-1421、CXCL-1422、CXCL-1423、CXCL-1424、CXCL-1425、CXCL-1426、CXCL-1427、CXCL-1428、CXCL-1429、CXCL-1430、CXCL-1431、CXCL-1432、CXCL-1433、CXCL-1434、CXCL-1435、CXCL-1436、CXCL-1437、CXCL-1438、CXCL-1439、CXCL-1440、CXCL-1441、CXCL-1442、CXCL-1443、CXCL-1444、CXCL-1445、CXCL-1446、CXCL-1447、CXCL-1448、CXCL-1449、CXCL-1450、CXCL-1451、CXCL-1452、CXCL-1453、CXCL-1454、CXCL-1455、CXCL-1456、CXCL-1457、CXCL-1458、CXCL-1459、CXCL-1460、CXCL-1461、CXCL-1462、CXCL-1463、CXCL-1464、CXCL-1465、CXCL-1466、CXCL-1467、CXCL-1468、CXCL-1469、CXCL-1470、CXCL-1471、CXCL-1472、CXCL-1473、CXCL-1474、CXCL-1475、CXCL-1476、CXCL-1477、CXCL-1478、CXCL-1479、CXCL-1480、CXCL-1481、CXCL-1482、CXCL-1483、CXCL-1484、CXCL-1485、CXCL-1486、CXCL-1487、CXCL-1488、CXCL-1489、CXCL-1490、CXCL-1491、CXCL-1492、CXCL-1493、CXCL-1494、CXCL-1495、CXCL-1496、CXCL-1497、CXCL-1498、CXCL

L-1、CXCL-2、CXCL-3、IL-8及びIL-1Bの遺伝子の発現が誘導されることが記載されている。この文献には、TNFスーパーファミリー遺伝子又はケモカイン遺伝子の発現レベルの変化から腫瘍の予後が予測できることが記載されている。そのほか、炎症性腸疾患（例えばクローン病）に対する免疫応答、医薬に対する応答に関して、抗体による標的細胞への刺激に応答して発現される遺伝子として、TNFスーパーファミリー（TNFSF）、ケモカイン及びインターロイキンをコードする遺伝子が報告されている（Mitsuhashi, M. and Targan, S.R., *Inflamm. Bowel Dis.* 14: 1061-1067, 2008; Mitsuhashi, M. et al., *Pharm. Res.* 25: 1116-1124, 2008）。しかしながら、このような遺伝子がADCC活性と関連していることについては記載されていない。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】国際公開第06/133399号

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Mitsuo, S. et al., *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 18: 129-136, 2006

20

【非特許文献2】Reff, M.E. et al., *Blood* 83: 435-445, 1994

【非特許文献3】Kurai, J. et al., *Clin. Cancer Res.* 13: 1552-1561, 2007

【非特許文献4】Clynes, R.A. et al., *Nature Medicine* 6: 443-446, 2000

【非特許文献5】Gennari, R. et al., *Clin. Cancer Res.* 10: 5650-5655, 2004

【非特許文献6】Beano, A. et al., *Journal of Translational Medicine* 6: 25, 2008

30

【非特許文献7】Mitsuhashi, M. and Targan, S.R., *Inflamm. Bowel Dis.* 14: 1061-1067, 2008

【非特許文献8】Mitsuhashi, M. et al., *Pharm. Res.* 25: 1116-1124, 2008

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、細胞傷害活性、特にADCC活性を、より簡便に、迅速にかつ高精度に予測する手段及び方法を提供することを目的とする。本発明は、細胞傷害活性に基づいた作用機序の薬剤に対する応答性を評価する方法又は細胞傷害活性を有する抗体のスクリーニング方法を提供することを目的とする。

40

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意検討を行った結果、白血球における腫瘍壊死因子スーパーファミリー15（TNFSF15）、ケモカインCXCL3（CXCL3）、又はインターロイキン6（IL-6）の抗体刺激に応答した発現レベルの変化が、細胞傷害活性、特にADCC活性と相関することを見出した。このような知見は、従来ADCC活性に関連した遺伝子が報告されていないことから、予想外であり驚くべきものであった。本発明者らは、がん患者の末梢血中の白血球における上記の腫瘍壊死因子スーパーファミリー15（TNFSF15）、ケモカインCXCL3（CXCL3）に加えてケモ

50

カインC X C L 1 (C X C L 1) 及び腫瘍壊死因子スーパーファミリー2 (T N F S F 2) の抗体刺激に应答した遺伝子発現の変化が、細胞傷害活性に基づいた作用機序の薬剤による患者の治療結果と関連があることを見出し、細胞傷害活性の予測が様々な用途に応用できるという知見を得た。

【 0 0 1 2 】

すなわち、本発明は、以下の(1)~(4)に関する。

(1) 細胞傷害活性を予測する方法であって、

(a) 動物から採取された白血球を含む生体試料を準備するステップと、

(b) 該生体試料と抗体とを接触させるステップと、

(c) 該白血球における、腫瘍壊死因子スーパーファミリー15、ケモカインC X C L 3、及びインターロイキン6からなる群より選択される少なくとも1つの発現を検出するステップと、

(d) 該抗体を接触させた場合の発現レベルと接触させていない場合の発現レベルとを比較するステップと、

(e) 該抗体を接触させた場合の発現レベルが、接触させていない場合の発現レベルより高い場合に、細胞傷害活性が存在すると予測するステップと、

を含む方法。

【 0 0 1 3 】

上記方法において、細胞傷害活性は抗体依存性細胞傷害活性であってもよい。

【 0 0 1 4 】

上記方法において、抗体としては、例えば熱凝集I g G、及び抗体医薬を用いることができる。かかる抗体医薬は、限定されるものではないが、例えばアブシキシマブ、アダリムマブ、アレムツズマブ、パシリキシマブ、ベバシズマブ、セツキシマブ、ダクリズマブ、エクリズマブ、エファリズマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン、イブリットモマブチウキセタン、インフリキシマブ、ムロモナブ、ナタリズマブ、オマリズマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、ラニビズマブ、リツキシマブ、トシツモマブ、トシリズマブ、ゴリムマブ、カナキヌマブ、ウステキヌマブ、オファツムマブ、デノスマブ、モタビズマブ、ラクシバクマブ、ベリムマブ、イピリムマブ、プレントキシマブベドチン、及びトラスツズマブからなる群より選択されるものがある。

【 0 0 1 5 】

上記方法において、抗体は、熱変性させて、又は該抗体に対する抗原との複合体として、生体試料と接触させることができる。

【 0 0 1 6 】

上記方法において、発現の検出は、m R N A の検出によって行うことができる。

【 0 0 1 7 】

上記方法では、腫瘍壊死因子スーパーファミリー15の発現を検出してよい。

【 0 0 1 8 】

(2) 抗体医薬に対する患者の薬剤応答性の評価方法であって、

(a) 患者から採取された白血球を含む生体試料を準備するステップと、

(b) 該生体試料と抗体とを接触させるステップと、

(c) 該白血球における、腫瘍壊死因子スーパーファミリー15、ケモカインC X C L 3、ケモカインC X C L 1 及び腫瘍壊死因子スーパーファミリー2からなる群より選択される少なくとも1つの発現を検出するステップと、

(d) 該抗体を接触させた場合の発現レベルと接触させていない場合の発現レベルとを比較して、細胞傷害活性(例えばA D C C 活性)を予測するステップと、

(e) 該患者の細胞傷害活性が高い場合に、該患者の抗体医薬に対する薬剤応答性が高いと評価するステップと、

を含む方法。

【 0 0 1 9 】

上記方法において、生体試料と接触させる抗体としては、例えば熱凝集I g G、抗癌剤

、抗ウイルス剤、抗炎症剤、拒絶反応抑制剤及び抗腫瘍剤からなる群から選択される１種以上を用いることができる。

【 0 0 2 0 】

上記方法において、抗体医薬は、例えば抗癌剤、抗ウイルス剤、抗炎症剤、拒絶反応抑制剤及び抗腫瘍剤からなる群から選択されるものである。具体的な抗体医薬としては、例えばトラスツズマブがある。

【 0 0 2 1 】

上記方法は、さらに患者における H E R 2 タンパク質抗原の発現を検出するステップを含んでもよい。

【 0 0 2 2 】

(3) 細胞傷害活性 (例えば A D C C 活性) を有する抗体をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検抗体と動物から採取された白血球とを接触させるステップと、

(b) 該白血球における腫瘍壊死因子スーパーファミリー 1 5、ケモカイン C X C L 3、及びインターロイキン 6 からなる群より選択される少なくとも 1 つの発現を検出するステップと、

(c) 被検抗体を接触させた場合の発現レベルが、接触させていない場合の発現レベルと比較して高い場合に、該被検抗体を、細胞傷害活性を有するものとして選択するステップと、

を含む方法。

【 0 0 2 3 】

(4) 腫瘍壊死因子スーパーファミリー 1 5、ケモカイン C X C L 3、及びインターロイキン 6 からなる群より選択される少なくとも 1 つの発現を検出するための手段を含む、細胞傷害活性 (例えば A D C C 活性) を予測するためのキット。

【 0 0 2 4 】

上記キットにおいて、発現を検出するための手段としては、例えばプライマー及び / 又はプローブを用いることができる。

【 0 0 2 5 】

さらに本発明は、以下の (5) に関する。

【 0 0 2 6 】

(5) 抗体医薬に対する患者の薬剤応答性を評価するためのデータ分析方法であって、

(a) 患者から得られた白血球を含む生体試料を取得するステップと、

(b) 該生体試料と抗体とを接触させるステップと、

(c) 該白血球における、腫瘍壊死因子スーパーファミリー 1 5、ケモカイン C X C L 3、ケモカイン C X C L 1 及び腫瘍壊死因子スーパーファミリー 2 からなる群より選択される少なくとも 1 つの発現を検出し、発現レベルのデータを取得するステップと、

(d) 該抗体を接触させた場合の前記発現レベルのデータと接触させていない場合の前記発現レベルのデータとを比較するステップと、

(e) 該抗体を接触させた場合の発現レベルが、接触させていない場合の発現レベルより高い場合に、該患者の抗体医薬に対する薬剤応答性が高いとの評価基準に基づき、該抗体を接触させた場合の前記発現レベルのデータを分析するステップと、

を含む方法。

【 発明の効果 】

【 0 0 2 7 】

本発明により、特定の遺伝子の発現を検出することによって、細胞傷害活性 (特には A D C C 活性) を予測するための方法及び手段が提供される。本発明に係る方法及び手段では、遺伝子発現の検出という簡便な操作のみで細胞傷害活性を予測することができるため、従来の問題点なく、簡便、迅速かつ高精度に細胞傷害活性を予測することができ、多くの分野 (特に臨床分野) において有用である。

【 0 0 2 8 】

10

20

30

40

50

本発明に従って細胞傷害活性（特にA D C C活性）を予測することによって、患者の抗体医薬に対する薬剤応答性を評価することができ、特に臨床分野において有用である。さらに本発明に従って細胞傷害活性を予測することによって、細胞傷害活性を有する抗体をスクリーニングすることが可能となり、抗体医薬の探索及び開発の分野に有用である。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】TNFSF15、CXCL3及びIL-6の遺伝子の発現量と、A D C C活性との相関関係を示すグラフである。

【図2】乳癌患者に対する術前化学療法による治療効果と、TNFSF15、CXCL3、CXCL1及びTNFSF2の遺伝子の発現量との相関関係を示すグラフである。

10

【発明を実施するための形態】

【0030】

本発明者らは、細胞傷害活性と相関して、抗体刺激に应答して発現レベルの変化を示す遺伝子を特定することに成功した。そのため、本発明においては、抗体刺激に应答した当該遺伝子の発現レベルの変化を測定することによって、細胞傷害活性、特に抗体依存性細胞傷害活性（A D C C活性）を予測することが可能である。

【0031】

本発明において、「細胞傷害活性」は、細胞傷害性又は細胞傷害活性とも呼ばれる。「細胞傷害活性」は、細胞を構成する物質又は構造の破壊、細胞の生存に必須な活動の阻害、細胞周期又は細胞内シグナル伝達への影響等によって、細胞に対して死、機能障害若しくは増殖傷害等の影響を与える性質又は作用を意味する。「細胞傷害活性」の1つに抗体依存性細胞傷害活性（A D C C活性）がある。「抗体依存性細胞傷害活性」又は「A D C C活性」とは、標的細胞に結合した抗体がエフェクター細胞（NK細胞、マクロファージ等）上のFc受容体と結合することで、抗体依存的に誘導される細胞傷害活性を意味し、この技術用語は当技術分野では十分に理解されている。

20

【0032】

本発明に係る細胞傷害活性の予測は、白血球を含む生体試料（biological sample）を準備し、該生体試料と抗体とを接触させ、該白血球における、腫瘍壊死因子スーパーファミリー15（TNFSF15）、ケモカインCXCL3（CXCL3）、及びインターロイキン6（IL-6）からなる群より選択される少なくとも1つの発現を検出し、該抗体を接触させた場合の発現レベルと接触させていない場合の発現レベルとを比較することによって行われる。ここで「発現レベル」とは、対象遺伝子の発現の程度を示す指標である。「発現レベル」は、例えば、対象遺伝子そのものの発現量及び対象遺伝子がコードするタンパク質の産生量によって表される。対象遺伝子自身の発現量を測定する方法としては、例えば、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、リアルタイムRT-PCR及びノーザンブロットが挙げられる。対象遺伝子自身の発現レベルを定量する方法としては、例えば、対照遺伝子に対応するRNAを増幅することが挙げられる。対象遺伝子がコードするタンパク質の産生量を測定する方法としては、例えば、ウエスタンブロッティング、定量的免疫細胞化学法（quantitative immunocytochemistry）、酵素免疫測定吸着法（ELISA法）、抗体アレイ法、蛍光活性化細胞分類法（FACS法）、マススペクトロメトリー法、及びタンパク質活性分析法等が挙げられる。

30

40

【0033】

本発明に係る方法においては、まず、白血球を含む生体試料を準備する。生体試料は、白血球を含むものであれば特に限定されるものではなく、血液（全血等）、体液（尿、髄液、腹水等）、組織等が挙げられる。採取の容易性及び白血球の存在量の観点から、血液を生体試料として用いることが好ましい。このような生体試料は、当技術分野で公知の方法に従って調製することができる。採取源は、細胞傷害活性を予測しようとする動物であれば特に限定されるものではなく、哺乳動物、例えばヒト、マウス、ラット、サル、ウシ及びウマが挙げられ、好ましくはヒトである。採取された生体試料は、そのまま使用してもよいし、又は白血球を含む画分を更に単離して使用してもよい。

50

【 0 0 3 4 】

接触させる抗体は、エフェクター細胞上のFc受容体と結合することができる抗体であれば特に限定されるものではない。抗原抗体反応は動物種に特異的に生じることが多いため、使用する抗体が白血球の採取源の動物に対して反応性である必要がある。そのような抗体の選択は、当業者であれば容易に理解することができる。例えば、ヒト患者から採取した生体試料と接触させることを意図する場合には、ヒト由来の抗体、又はキメラ抗体若しくはヒト化抗体を使用することが好ましい。用いることができる抗原非特異的な抗体として、例えば、免疫グロブリンIgA、IgM、IgD、IgE及びIgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4等）が挙げられる。抗原非特異的な抗体を用いて細胞傷害活性を予測した場合には、生体試料（すなわち白血球）が由来する動物個体又は患者の総体的な細胞傷害活性を予測することができる。特定の抗原に対して特異的な抗体、例えば公知の抗体医薬（抗癌剤、抗ウイルス剤、抗炎症剤、拒絶反応抑制剤、抗腫瘍剤等）も使用することができる。米国食品医薬品局（FDA）において現在承認されている抗体医薬を下記表1及び表2に列挙する。

10

【 0 0 3 5 】

【表1】

抗体名	医薬名	抗体の種類	標的/適応症
アブシキシマブ	ReoPro（登録商標）	キメラ抗体	糖タンパク質（GP）IIb/IIIa 急性心虚血性合併症、不安定狭心症、血栓症
アダリムマブ	Humira（登録商標）	ヒト抗体	TNF- α 炎症（関節リウマチ）、乾癬
アレムツズマブ	Campath（登録商標）	ヒト化抗体	CD52 慢性リンパ急性白血病（CLL）
バシリキシマブ	Simulect（登録商標）	キメラ抗体	IL-2受容体 α 拒絶反応抑制
ベバシズマブ	Avastin（登録商標）	ヒト化抗体	血管内皮細胞増殖因子（VEGF） 大腸癌、非小細胞肺癌、乳癌
セツキシマブ	Erbix（登録商標）	キメラ抗体	上皮細胞増殖因子受容体（EGFR） 大腸癌、頭頸部癌
ダクリズマブ	Zenapax（登録商標）	ヒト化抗体	CD25 拒絶反応抑制
エクリズマブ	Soliris（登録商標）	ヒト化抗体	補体系タンパク質C5 発作性夜間血色素尿症
エファリズマブ	Raptiva（登録商標）	ヒト化抗体	CD11a 乾癬
ゲムツズマブオゾガマイシン	Mylotarg（登録商標）	ヒト化抗体	CD33 急性骨髄性白血病（AML）
イブリツモマブチウキセタン	Zevalin（登録商標）	マウス抗体	CD20 非ホジキンリンパ腫（NHL）
インフリキシマブ	Remicade（登録商標）	キメラ抗体	TNF 炎症（関節リウマチ）
ムロモナブ	Orthoclone（登録商標）	マウス抗体	CD3受容体 拒絶反応抑制
ナタリズマブ	Tysabri（登録商標）	ヒト化抗体	VLA-4受容体 多発性硬化症、クローン病
オマリズマブ	Xolair（登録商標）	ヒト化抗体	IgE 喘息
パリビズマブ	Synagis（登録商標）	ヒト化抗体	RSVのFタンパク質エピトープ ウイルス感染

20

30

40

【 0 0 3 6 】

【表 2】

抗体名	医薬名	抗体の種類	標的/適応症
パニツムマブ	Vectibix (登録商標)	ヒト抗体	上皮細胞増殖因子受容体 (EGFR) 大腸癌
ラニビズマブ	Lucentis (登録商標)	ヒト化抗体	血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 大腸癌、非小細胞肺癌、加齢黄斑変性症
リツキシマブ	Rituxan (登録商標), Mabthera (登録商標)	キメラ抗体	CD20 非ホジキンリンパ腫 (NHL)
トシツモマブ	Bexxar (登録商標)	マウス抗体	CD20 非ホジキンリンパ腫 (NHL)
トシリズマブ	Tocilizumab (登録商標)	ヒト化抗体	IL-6 受容体 自己免疫疾患
ゴリムマブ	Simponi (登録商標)	ヒト抗体	TNF- α 自己免疫疾患
カナキヌマブ	Ilaris (登録商標)	ヒト抗体	IL-1 b 炎症
ウステキヌマブ	Stelara (登録商標)	ヒト抗体	IL-12/IL-23 自己免疫疾患
オフアツムマブ	Arzerra (登録商標)	ヒト抗体	CD20 癌
デノスマブ	Prolia (登録商標)	ヒト抗体	RANK リガンド 骨粗鬆
モタビズマブ	Numax (登録商標)	ヒト化抗体	RSV 抗感染症
ラクシバクマブ	ABThrax (登録商標)	ヒト抗体	Anthrax toxin 抗感染症
ベリムマブ	Benlysta (登録商標)	ヒト抗体	BLyS (B 細胞活性化因子) 自己免疫疾患
イピリムマブ	Yervoy (登録商標)	ヒト抗体	CTLA-4 癌
ブレンツキシマブベドチン	Adcetris (登録商標)	キメラ抗体	CD30 癌
トラスツズマブ	Herceptin (登録商標)	ヒト化抗体	Her2/neu 乳癌

10

20

30

【0037】

抗体（例えば、上記表 1 及び表 2 で列挙されている抗体等）は、従来から知られている手法によって投与が可能である。投与形態としては、例えば、皮内投与、皮下投与、経皮投与、静脈内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、動脈内投与、脳内投与、くも膜下投与及び硬膜外投与が挙げられる。

抗体は、その Fc 領域が Fc 受容体と結合することによってエフェクター細胞を活性化して、細胞傷害活性（すなわち ADCC 活性）を発揮する。そのため、抗体の Fc 領域が露出した状態で白血球と接触させることが好ましい。

40

【0038】

本発明においては、抗体として、熱凝集 IgG (HAG) を用いることが好ましい。HAG は、IgG 1、IgG 2、IgG 3、IgG 4 等の全てのサブクラスを含む免疫複合体のモデルであり、HAG に対する細胞傷害活性（すなわち ADCC 活性）は、あらゆる種の抗体に対する細胞傷害活性といえるためである。HAG は、当技術分野で公知の方法に従って調製することができる。例えば、ヒト IgG を 63 にて 15 分間加熱することによって調製することができる (Ostreiko, K. K. et al., Immunol. Lett. 15: 311-316, 1987)。調製後の HAG は

50

、使用するまで - 20 で保存することができる。

【0039】

次に、白血球を含む生体試料と抗体とを接触させる。本発明において「接触」とは、抗体が生体試料に含まれる白血球を活性化するように、抗体と白血球とを近接させることを意味する。例えば、生体試料と抗体を含有する溶液（抗体含有溶液）とを混合すること、生体試料に抗体含有溶液を添加すること、抗体含有溶液に生体試料を浸漬すること等の操作が含まれる。接触は、例えば4～42（好ましくは約37）にて、1分～24時間（好ましくは約2～8時間）行う。

【0040】

続いて、白血球における、腫瘍壊死因子スーパーファミリー15（TNFSF15）、ケモカインCXCL3（CXCL3）、及びインターロイキン6（IL-6）からなる群より選択される少なくとも1つの発現を検出する。本明細書中では、これらの遺伝子を総称的に「対象遺伝子」ともいう。ここで「検出」とは、対象遺伝子の発現レベルを絶対量として測定することだけではなく、相対的な量又は比として測定することも意味する。

【0041】

TNFSF15は、TNFファミリーのメンバーであり、その受容体TNFRSF25に結合して、アポトーシスを誘導することが知られている（Kitson, J. et al. Nature 384: 372-375, 1996）。TNFSF15の遺伝子配列は、GenBankに、mRNAの塩基配列がアクセッション番号NM_005118として、TNFSF15の塩基配列を含むゲノムDNAの塩基配列がアクセッション番号NG_011488として、それぞれ登録されている。CXCL3はケモカインの1種であるが、その機能は十分に解明されていない。CXCL3の遺伝子配列は、GenBankに、mRNAの塩基配列がアクセッション番号NM_002090として、CXCL3の塩基配列を含むゲノムDNAの塩基配列がアクセッション番号NC_000004として、それぞれ登録されている。IL-6は炎症性サイトカインの1つである。IL-6の遺伝子配列は、GenBankに、mRNAの塩基配列がアクセッション番号NM_000600として、IL6の塩基配列を含むゲノムDNAの塩基配列がアクセッション番号NG_011640として、それぞれ登録されている。CXCL1は、好中球における化学遊走物質として機能し、炎症反応等に関与していると言われている。CXCL1の遺伝子配列は、GenBankに、mRNAの塩基配列がアクセッション番号NM_001511として、CXCL1の塩基配列を含むゲノムDNAの塩基配列がアクセッション番号NC_000004として、それぞれ登録されている。TNFSF2はTNFファミリーのメンバーであり、その受容体TNFR1A及びTNFR1Bと結合して、アポトーシスの誘導又は炎症を引き起こす。TNFSF2の遺伝子配列は、GenBankに、mRNAの塩基配列がアクセッション番号NM_000594として、TNFSF2の塩基配列を含むゲノムDNAの塩基配列がアクセッション番号NG_007462として、それぞれ登録されている。

【0042】

対象遺伝子の発現の検出は、遺伝子レベルで又はタンパク質レベルで行うことができ、いずれも当業者に公知の技術を用いて行うことができる。タンパク質レベルでの検出には、抗体刺激に応答したタンパク質の産生までに時間がかかることを考慮すると、遺伝子レベルで発現を検出することが好ましい。なお、発現の検出前に白血球を単離及び溶解することが好ましいが、使用した生体試料が白血球のみを含む分画である場合には生体試料をそのまま使用することも可能である。白血球の単離及び溶解は、当技術分野で公知の方法を用いて行うことができる。

【0043】

遺伝子レベルで発現を検出する方法としては、例えば、対象遺伝子のmRNA又は対応するcDNAを、プライマー又はプローブを用いて検出する方法が挙げられる。具体的には、白血球の総RNAからmRNAを精製し、プライマーを用いて対象遺伝子に特異的なmRNAを増幅させ、その増幅産物を検出してもよい（RT-PCR法）。あるいは、総

10

20

30

40

50

R N A 若しくは m R N A、又は総 R N A 若しくは m R N A に基づいて合成された c D N A から、プローブを用いて対象遺伝子に特異的な総 R N A 若しくは m R N A 又は c D N A を検出してもよい（ハイブリダイゼーション法）。

【 0 0 4 4 】

総 R N A 又は m R N A の調製は、当技術分野で公知の方法によって行うことができる。例えば、総 R N A は、グアニジン - 塩化セシウム超遠心法、A G P C (a c i d q u a n i d i u m - p h e n o l - c h l o r o f o r m) 法等によって調製することができる。m R N A はオリゴ d T を利用して単離することができる。総 R N A 又は m R N A から c D N A の合成は、逆転写酵素を用いて行うことができ、この方法も当技術分野で公知である。これらの方法は市販のキットを用いて簡便に行うことが可能である。

10

【 0 0 4 5 】

プライマー又はプローブは、当業者に公知の手法に従って、対象遺伝子の塩基配列に基づいて設計することができる。プライマー又はプローブの設計時には、以下の点を考慮することが知られている。プライマーとして機能を有する長さとしては、10塩基以上が好ましく、より好ましくは15～50塩基であり、さらに好ましくは20～30塩基である。プローブとして機能を有する長さとしては、10塩基以上が好ましく、より好ましくは15～50塩基であり、さらに好ましくは20～30塩基である。プライマー又はプローブの融解温度 (T m) が適切であることを確認する。T m の確認には、公知のプライマー又はプローブ設計用ソフトウェアを利用することができ、本発明で利用可能なソフトウェアとしては、例えば Primer Express (登録商標) (Applied Biosystems, Foster City, CA)、HYB simulator (商標) (RNA nature, Irvine, CA) 等が挙げられる。プライマー又はプローブとして対象遺伝子に特異的なアニーリング又はハイブリダイズが可能な条件としては、その他にも G C 含量等があり、そのような条件は当業者に周知である。

20

【 0 0 4 6 】

本発明においては、例えば、以下のプライマー配列を用いることができる：

【表 3】

遺伝子名	フォワードプライマー	リバースプライマー
TNFSF15	TGCGAAGTAGGTAGCAACTGGTT (配列番号 1)	CCATTAGCTTGTCCTTCTTG (配列番号 2)
CXCL3	GGAATTCACCTCAAGAACATCCA (配列番号 3)	GTGGCTATGACTTCGGTTTGG (配列番号 4)
IL-6	TCATCACTGGTCTTTTGGAGTTTG (配列番号 5)	TCTGCACAGCTCTGGCTTGT (配列番号 6)
CXCL1	CCACTGCGCCCAAACC (配列番号 7)	GCAGGATTGAGGCAAGCTTT (配列番号 8)
TNFSF2	GGAGAAGGGTGACCGACTCA (配列番号 9)	TGCCCAGACTCGGCAAAG (配列番号 10)

30

40

【 0 0 4 7 】

上述のように設計したプライマー及びプローブは、当業者に公知の方法に従って調製することができる。さらに、当業者には周知のように、プライマー又はプローブには、アニーリング又はハイブリダイズする部分以外の配列、例えばタグ配列等の付加配列が含まれていてもよい。プライマー又はプローブは、フィルター、メンブレン、スライドグラス、

50

マイクロタイタープレート等の適当な固相に固定化されていてもよい。

【0048】

白血球における対象遺伝子の発現を検出するには、上記プライマー又はプローブをそれぞれ増幅反応又はハイブリダイゼーションにおいて用い、その増幅産物又はハイブリダイゼーション産物を検出する。

【0049】

プライマーを用いてmRNAから対象遺伝子に特異的な増幅を行う場合、任意の増幅手法を用いることができる。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法の原理を利用した公知の方法を挙げることができる。増幅手法として競合PCR法、リアルタイムPCR法等の定量的PCR法等を採用することによって、定量的な検出が可能となる。増幅反応の最適条件は、当業者であれば容易に決定することができる。

10

【0050】

増幅産物を検出するには、例えば、増幅反応の過程で取り込まれるdNTPに、放射性同位体、蛍光物質、発光物質等の標識物質を導入し、この標識物質を検出する方法を用いることができる。放射性同位体としては、 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^{35}S 等を用いることができる。蛍光物質としては、例えば、SYBR Green、フルオレセイン(FITC)を用いることができる。発光物質としてはルシフェリン等を用いることができる。標識物質は、当技術分野で公知の方法又は市販のキットを用いて導入することができる。増幅産物に取り込まれた標識物質の検出も、当技術分野で公知の方法で行うことができる。例えば、標識物質として放射性同位体を用いた場合には、放射活性を、例えば液体シンチレーションカウンター、 β -カウンター等によって計測することができる。標識物質として蛍光物質を用いた場合には、蛍光物質の蛍光を蛍光顕微鏡、蛍光プレートリーダー等を用いて検出することができる。

20

【0051】

プローブを用いて総RNA若しくはmRNA、又はそれから合成したcDNAに対するハイブリダイゼーションを行い、その特異的結合(ハイブリッド)を検出することによって、対象遺伝子の発現を検出することもできる。ハイブリダイゼーションは、プローブが対象遺伝子に由来するRNA又はDNAのみと特異的に結合するような条件、すなわちストリンジェントな条件下で行う必要がある。そのようなストリンジェントな条件は当技術分野で周知である。ストリンジェントな条件としては、例えば、J. Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001), Chapter 7の8項"Northern Hybridization"に記載の条件等が挙げられる。より具体的な条件としては、例えば、約45において6.6xSSCでハイブリダイゼーションを行った後に、50で2.0xSSCで洗浄する条件が挙げられる。ストリンジェンシーの選択のため、洗浄工程における塩濃度を、例えば低ストリンジェンシーとしての約2.0xSSC、50から、高ストリンジェンシーとしての約0.2xSSC、50まで選択することができる。さらに、洗浄工程の温度を低ストリンジェンシー条件の室温、約22から、高ストリンジェンシー条件の約65まで高くすることができる。

30

40

【0052】

ハイブリダイゼーションを行う場合には、プローブに蛍光標識(フルオレセイン、ローダミン等)、放射性標識(^{32}P 等)、酵素標識(アルカリホスファターゼ、西洋ワサビパーオキシダーゼ等)、ビオチン標識等の適当な標識物質を付加して、ハイブリダイゼーションによる産物を検出することができる。

【0053】

上述のようにして、プライマー又はプローブを用いて増幅反応又はハイブリダイゼーションによる産物を検出することによって、対象遺伝子の発現を検出することが可能である。

【0054】

50

本発明者の研究グループは、白血球における遺伝子の発現（遺伝子発現）のわずかな変化を簡便かつ迅速に定量することができる系（Hem(A)⁺システム）を開発している（米国特許第6,844,158号、米国特許第7,258,976号、WO99/32654号、米国特許出願第10/698967号及び米国特許出願第10/796298号に対応する米国特許第7,745,180号、WO03/091407号、Mitsushashi, M. et al., Clin. Chem. 52: 634-642, 2006等）。本発明においては、そのような系を用いることも可能である。

【0055】

Hem(A)⁺システムを簡単に説明する。まず、全血をフィルタープレートに添加して、白血球を捕捉する。ここで、本発明に係る方法における抗体との接触ステップは、全血のまま行ってもよいし、白血球を捕捉した後に行ってもよい。生体に近い条件での反応という点では、全血と抗体とを接触させた後、白血球を捕捉することが好ましい。次いで、フィルタープレート上で白血球を溶解させ、標準RNA及び対象遺伝子に対するアンチセンス（リバーズ）プライマーを添加する。得られた細胞溶解液を、次にオリゴdT固相化プレートに移し、ハイブリダイゼーションを行う。オリゴdT固相化プレートに捕捉されたmRNAは、細胞溶解液に含まれるアンチセンスプライマーによって逆転写され、対応するcDNAが合成される。合成されたcDNAの量に基づいて、白血球における対象遺伝子の発現レベルを求めることができる。詳細に関しては、上記文献を参照されたい。

【0056】

タンパク質レベルを測定する方法としては、対象遺伝子によってコードされるタンパク質を、例えば抗体を用いて検出する方法等が挙げられる。抗体を用いる検出方法は当技術分野で公知であり、例えば酵素免疫アッセイ（EIA）、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、蛍光免疫アッセイ、放射性免疫アッセイ（RIA）、免疫沈降法、ウエスタンブロット法等が挙げられる。抗体を用いるタンパク質の検出は、例えば、Ausubel, F.M.ら編, Short Protocols in Molecular Biology, Chapter 11 “immunology” John Wiley & Sons, Inc. 1995の記載に従って行うことができる。

【0057】

検出に用いる抗体は、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体である。上記抗体は、それぞれ対象遺伝子によってコードされるタンパク質のエピトープに結合することができる全体分子及びフラグメント等である。このような抗体は、例えばポリクローナル抗体の場合には、抗原ポリペプチド又はその一部断片を免疫原として動物に免疫した後、血清から得ることができる。あるいは、対象遺伝子又はその部分配列が挿入された発現ベクターを注射又は遺伝子銃によって、動物の筋肉又は皮膚に導入した後、血清を採取することによって作製することができる。免役する動物としては、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ニワトリ等が挙げられる。モノクローナル抗体は、公知のモノクローナル抗体作製法（「単クローン抗体」、長宗香明、寺田弘共著、廣川書店、1990年；“Monoclonal Antibody” James W. Goding, third edition, Academic Press, 1996）に従い作製することができる。

【0058】

目的のタンパク質と抗体との結合は、周知の方法に従って測定しうる。当業者であれば、採用する免疫アッセイの種類及び形式、使用する標識物質の種類及び標識の対象等に応じて、有効かつ最適な測定方法を決定することができる。例えば、白血球における対象遺伝子によってコードされるタンパク質と、それに対する抗体との反応を容易に検出するために、抗体を標識物質で標識することによってその反応を直接検出するか、又は標識二次抗体若しくはビオチン-アビジン複合体等を用いることによって間接的に検出することができる。そのような標識も当技術分野で公知であり、酵素免疫アッセイの場合には、例えばペルオキシダーゼ、-ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等を用いることができる。蛍光免疫アッセイの場合には、例えばフルオレセインイソチオシアネート（F

10

20

30

40

50

I T C) 等を用いることができる。放射性免疫アッセイの場合には、例えばトリチウム、ヨウ素^{1 2 5}等を用いることができる。このような標識物質の検出も当技術分野で公知の方法に従って行うことができる。抗体は、固相（膜、フィルター、ビーズ、プレート等）に固定されていてもよいし（固相系）、溶液として用いてもよい（液相系）。

【 0 0 5 9 】

抗体を、例えば標識物質で直接標識して標識抗体とする場合には、白血球から調製したサンプルを標識抗体と接触させて、目的のタンパク質と抗体とを結合させる。そして未結合の標識抗体を分離して、結合した標識抗体の量又は未結合の標識抗体の量からその白血球における対象遺伝子の発現量を測定することができる。例えば標識二次抗体を用いる場合には、抗体と白血球から調製したサンプルとを反応させ（1次反応）、得られた複合体に更に標識二次抗体を反応させる（2次反応）。未結合の標識二次抗体を分離して、結合した標識二次抗体の量又は未結合の標識二次抗体の量からその白血球における対象遺伝子の発現量を測定することができる。

10

【 0 0 6 0 】

上述のようにして対象遺伝子の発現を検出した後、抗体と接触させた場合の発現レベルと接触させない場合との発現レベルとを比較する。抗体と接触させた場合との発現レベルが接触させない場合の発現レベルと比較して高い場合には、細胞傷害活性が存在することになる。具体的には、抗体と接触させた場合と接触させない場合との発現レベルの比から、細胞傷害活性を予測することができる。例えば、抗体と接触させない場合の遺伝子発現量を1として、抗体を接触させた場合の遺伝子発現量の比が、1.2以上、好ましくは2.0以上である場合、細胞傷害活性が存在すると予測する。

20

【 0 0 6 1 】

本発明はまた、細胞傷害活性、特にA D C C活性を予測するためのキットにも関する。かかるキットは、腫瘍壊死因子スーパーファミリー15（T N F S F 1 5）、ケモカインC X C L 3（C X C L 3）、及びインターロイキン6（I L - 6）からなる群より選択される少なくとも1つの発現を検出するための手段を含む。そのような発現を検出するための手段は、上述したように遺伝子レベル又はタンパク質レベルで対象遺伝子の発現を検出することができる手段であれば特に限定されるものではなく、例えばプライマー若しくはプローブ、又は抗体である。キットは、対象遺伝子の発現の検出に役立つ他の成分を含んでいてもよい。例えば、キットには、生体試料を調製するための試薬、バッファー、標識物質、反応液、説明書等を含めることができる。このようなキットを利用することによって、本発明に係る細胞傷害活性の予測を更に簡便に行うことが可能となる。

30

【 0 0 6 2 】

細胞傷害活性（A D C C活性）は抗体の生体細胞に対する細胞傷害性を表すため、本発明は、細胞傷害活性を指標とする様々な用途に応用することができる。

【 0 0 6 3 】

例えば細胞傷害活性は、抗体医薬に対する患者の薬剤応答性を示す（例えば、G e n n a r i , R . e t a l . , C l i n . C a n c e r R e s . 1 0 : 5 6 5 0 - 5 6 5 5 , 2 0 0 4 ; B e a n o , A . e t a l . , J o u r n a l o f T r a n s l a t i o n a l M e d i c i n e 6 : 2 5 , 2 0 0 8等）。そのため、患者における細胞傷害活性を予測することによって、抗体医薬に対する患者の薬剤応答性を評価することができる。具体的には、まず、患者からの白血球を含む生体試料を準備し、該生体試料と抗体とを接触させる。次に、該白血球における、T N F S F 1 5、C X C L 3、C X C L 1及びT N F S F 2の少なくとも1つの発現を検出し、該抗体を接触させた場合の発現レベルと接触させていない場合の発現レベルとを比較して、細胞傷害活性を予測する。このとき、該患者の細胞傷害活性が高い場合に、該患者の抗体医薬に対する薬剤応答性が高いと評価する。別の言い方をすると、該抗体を接触させた場合の発現レベルが、接触させていない場合の発現レベルより高い場合に、該患者の抗体医薬に対する薬剤応答性が高いと評価する。例えば、抗体と接触させない場合の遺伝子発現量を1として、抗体を接触させた場合の遺伝子発現量の比が、1.2以上、好ましくは2.

40

50

0以上である場合、該患者の細胞傷害活性が高いと予測し、該患者の抗体医薬に対する薬剤応答性が高いと評価する。生体試料と接触させる抗体は、患者に投与する予定の抗体医薬であってもよいし、あるいはH A G等の抗原非特異的な抗体であってもよい。

【0064】

一例として、トラスツズマブ（商品名Herceptin（登録商標））に対する患者の薬剤応答性を評価する場合を説明する。患者は、乳癌患者であり、既にトラスツズマブによる治療及び/又は他の治療（外科手術、放射線治療、化学療法、免疫療法等）を行っていても行っていなくてもよい。患者は、原発性及び/又は転移性乳癌を患うもの、更には乳癌から他の組織へ転移した癌を患うものとする事ができる。患者からの白血球を含む生体試料（例えば全血）を準備し、それに抗体を接触させる。接触させる抗体は、抗原非特異的な抗体（例えばH A G）であってもよいし又はトラスツズマブそのものであってもよい。抗体と接触させた後、白血球におけるTNFSF15、CXCL3、CXCL1及びTNFSF2の少なくとも1つの発現を検出する。その後、該抗体を接触させた場合の発現レベルと接触させていない場合の発現レベルを比較する。該抗体を接触させた場合の発現レベルが接触させていない場合の発現レベルに比べて有意に高い場合には、トラスツズマブ（又は抗原非特異的な抗体を用いた場合には抗体医薬全般）に対するその患者の薬剤応答性が高いと評価することができる。例えば、抗体と接触させない場合の遺伝子発現量を1として、抗体を接触させた場合の遺伝子発現量の比が、1.2以上、好ましくは2.0以上である場合、トラスツズマブ（又は抗原非特異的な抗体を用いた場合には抗体医薬全般）に対するその患者の薬剤応答性が高いと評価することができる。

10

20

【0065】

トラスツズマブに対する薬剤応答性は、現在、ヒト上皮細胞増殖因子受容体タイプ2（HER2タンパク質）抗原の発現の有無に基づいて評価され投与対象が決定される。しかしながら、トラスツズマブに不応の患者も多い。従って、本発明においては、細胞傷害活性の予測と、HER2抗原（又はそのHer2/neu遺伝子）の発現の有無とを組み合わせ、患者のトラスツズマブに対する薬剤応答性を評価することも可能である。HER2抗原の発現の検出は、当技術分野で公知の免疫組織化学染色（IHC）法、蛍光insituハイブリダイゼーション（FISH）法等によって行うことができ、検出用キットも販売されている（例えば、IHC法に基づくHercept Test, DAKO社）。一般的には、HER2抗原を過剰発現する患者が、トラスツズマブに対する薬剤応答性が高いと評価されている。

30

【0066】

細胞傷害活性（ADCC活性）は、抗体医薬そのものの効力を示すともいえる。従って、新たな抗体医薬を開発したり、既存の抗体医薬を改変する際に、本発明に従って抗体の細胞傷害活性を予測して、細胞傷害活性を有する、好ましくは高い細胞傷害活性を有する抗体をスクリーニングすることができる。具体的には、まず被検抗体を準備し、白血球と接触させる。白血球は、被検抗体の効力を試験しようとする動物種に由来するものである。白血球は、単離されていたものであってもよいし又は白血球を含む試料（例えば全血試料）であってもよい。被検抗体と接触させた後、該白血球におけるTNFSF15、CXCL3及びIL-6の少なくとも1つの発現を検出する。その結果、被検抗体を接触させた場合の発現レベルが、接触させていない場合の発現レベルと比較して高い場合に、該被検抗体を、細胞傷害活性を有するものとして選択することができる。例えば、抗体と接触させない場合の遺伝子発現量を1として、抗体を接触させた場合の遺伝子発現量の比が、1.2以上、好ましくは2.0以上である場合、該被検抗体を、細胞傷害活性を有するものとして選択することができる。

40

【実施例】

【0067】

実施例 1

以下の実施例によって本発明を更に説明するが、これは本発明を例示するものであって、限定することを意図するものではない。

50

【0068】

試料及び試薬類

試料には健常人8名の血液を使用した。採血は、真空採血管（テルモ製、ヘパリンナトリウム含有、商品名ベノジェクト（登録商標）II真空採血管）を用いて行った。採取した血液（以下、単に血液という場合がある）と反応させる抗体として、Human IgG Purified Immunoglobulin（シグマ社製、製品番号I 4506）を用いた。上記抗体は、20 mg/mLの濃度になるようにPBS（-）（和光純薬製、製品番号531-16615）に溶解した。溶解した上記抗体の溶液（抗体溶液）は、63にて30分間加熱後、上記PBS（-）を更に加えて5 mg/mLになるように調製した。得られた溶液には熱凝集した抗体が溶解していた。この溶液を熱凝集IgG溶液とした。

10

【0069】

試料と試薬との反応

上記血液と上記熱凝集IgG溶液と反応には、200 µL容のマイクロチューブを使用した。チューブ内で、血液70 µLと上記PBS（-）2.8 µLとをピペットの吸引吐出によって穏やかに混和させた。別のチューブ内において、血液70 µLを5 mg/mLの熱凝集IgG溶液2.8 µLとピペットの吸引吐出によって穏やかに混和させた。各条件において、n = 3になるように実施した。血液と熱凝集IgG溶液との混合液及び血液とPBS（-）との混合液は、37の恒温器内に4時間静置した。以下、上記混合液を血液試料という場合がある。

20

【0070】

mRNAの精製、cDNAの合成

上述した4時間静置培養を行った後の血液試料から、50 µLを採り、mRNAの精製（mRNA精製）及びcDNAの合成（cDNA合成）に用いた。mRNA精製及びcDNA合成には、Mitsushashi M. et al., Clin Chem 52, 4: 634-642, 2006に記載されているHem(A)⁺システムを使用して、上記血液試料からcDNAの試料（cDNA試料）を得た。

【0071】

遺伝子の発現量の測定

得られた上記cDNAを試料として、定量PCR法によって遺伝子の発現量（遺伝子発現量）を測定した。定量PCR法の検出は、SYBR greenによる検出方法を用いた。検出試薬には、i Taq SYBR green Supermix with ROX（バイオラッド社製、製品番号172-5853）を用いた。プライマーとしては、配列番号1~6に示される配列をそれぞれ有するプライマーを、それぞれ終濃度500 nMになるように調製して用いた。定量PCR法に用いる機器として、ABI PRISM 7900 HTリアルタイムPCRシステム（商品名、アプライドバイオシステムズ社製）を使用した。

30

【0072】

ADCC活性（抗体依存性細胞障害活性）の測定

ADCC活性は、カルセイン（Calcein）を用いた測定方法で行った。標的細胞にはMCF7細胞を用いた。上記MCF7細胞を、10 µg/mLのCalcein AM溶液にて37下で30分間培養した。エフェクター細胞には、血中から得た末梢血単核球（PBMC）を用いた。以下4種類の組み合わせの反応系を作製した。下記熱処理PBMCは、PBMCを56で、30分間加熱することによって作製した。下記NP40は、ポリオキシエチレン（9）オクチルフェニルエーテルを意味する。（1）実験群（Experimental）：PBMC（ 1×10^5 個）+ MCF7細胞（ 1×10^4 個）+ トラストマブ（終濃度5 µg/mL）、（2）自発放出群（Spontaneous release）：熱処理PBMC（ 1×10^5 個）+ MCF7細胞（ 1×10^4 個）+ トラストマブ（終濃度5 µg/mL）、（3）最大放出群（Maximum release）：0.1質量% NP40 + MCF7細胞（ 1×10^4 個）、（4）対照群（C

40

50

control) : MCF7細胞(1×10⁴個)+トラスツマブ(終濃度5μg/mL)

【0073】

上記(1)~(4)の反応系による反応は4時間行った。それぞれの反応後に得られた上清の蛍光強度を測定(励起490nm/吸収515nm)した。ADCCの活性を示す値(ADCC活性値)は、(実験群の蛍光強度-自発放出群の蛍光強度)/(最大放出群の蛍光強度-対照群の蛍光強度)の式に従って算出した。

【0074】

ADCC活性と相関する挙動を示す遺伝子

上述の方法によって算出したADCC活性値と、定量PCR法によって測定した遺伝子発現量の変化との相関をみた。その相関を図1に示す。図1中、X軸はADCC活性を、Y軸はHem(A)+法を用いて測定した遺伝子発現量を示す。その結果、TNFSF15、IL-6及びCXCL3の3つの遺伝子において良好な相関が得られた。

10

【0075】

実施例 2

乳癌患者の末梢血を試料として、末梢血中の白血球の遺伝子発現量と術前化学療法の治療結果との関係について検討した。まず、熱凝集IgG溶液と上記末梢血とを接触させた場合と、熱凝集IgG溶液の溶媒(PBS(-))のみと上記末梢血とを接触させた場合と、の遺伝子発現量の差を求めた。次に得られた上記遺伝子発現量の差と、術前化学療法による治療結果との関係について比較検討した。上記比較検討の実施に当たっては、実施施設の倫理委員会における検討実施の承認を得た後、当検討に同意を頂いた患者から末梢血である血液試料を提供頂いた。

20

【0076】

対象となる症例

対象となる症例(対象症例)は、以下の(1)から(5)の4項目すべてを満たす乳癌患者とした。(1)手術可能なステージIIからIIIAで、腫瘍径が3cmを超える症例。(2)HER2検査において、免疫組織化学法(IHC法)による判定が陽性(HER2染色強度が3+)である、又は、蛍光in situハイブリダイゼーション法(FISH法)による判定で、HER2シグナル総数とCEP17シグナル総数との比率が2.0を超える症例。(3)術前化学療法として、エピルピシン、シクロフォスファミド、5FUに続いてパクリタキセルとトラスツマブとによる治療を行った症例。(4)患者が20歳以上である症例。(5)Eastern Cooperative Oncology GroupのPerformance Statusが0から2である症例(参考文献:Oken, M.M., Creech, R.H., Tormey, D.C., Horton, J., Davis, T.E., McFadden, E.T., Carbone, P.P.: Toxicity And Response Criteria Of The Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Clin Oncol 5:649-655, 1982)。

30

【0077】

他の腫瘍の併発、鬱血性心疾患、制御できない狭心症、不整脈、症候性感染症、重篤な下痢、心嚢水の兆候、脳転移の兆候がある症例は、対象症例から除外した。

40

【0078】

試料及び試薬類

試料には乳癌患者18名の血液を使用した。採血は、術前化学療法の実施前に、真空採血管(テルモ製、ヘパリンナトリウム含有、商品名ベノジェクト(登録商標)II真空採血管)を用いて行った。抗体溶液及び熱凝集IgG溶液は、実施例1と同じものをそれぞれ用いた。

【0079】

試料と試薬との反応

50

試料と試薬との反応は、実施例 1 と同様の操作を行った。

【0080】

mRNA の精製、cDNA の合成

mRNA の精製及び cDNA の合成は、実施例 1 と同様の操作を行った。

【0081】

遺伝子発現量の測定

プライマーとして配列番号 1 ~ 4 及び 7 ~ 10 に示される配列を有するプライマーをそれぞれ用いたこと以外は、実施例 1 と同様の方法によって、各血液試料における TNFSF15、CXCL3、CXCL1 及び TNFSF2 の遺伝子発現量を測定した。抗体（熱凝集 IgG）を接触させた場合の遺伝子発現量と接触させていない場合の遺伝子発現量とを比較して、遺伝子発現量の差異を求めた。

10

【0082】

患者の治療効果の判定

術前化学療法による治療の前後の腫瘍病変の増減を測定し、治療効果を腫瘍が縮小する効果（腫瘍縮小効果）で判定した。腫瘍縮小効果の判定は、RECIST ガイドライン（Response Evaluation Criteria in Solid Tumors、参考文献：Journal of the National Cancer Institute, 2000, Vol 92, No. 3, 205-216）に基づいて行った。RECIST の判定基準においては、完全奏効（CR: Complete Response）、部分奏効（PR: Partial Response）、進行（PD: Progressive Disease）、安定（SD: Stable Disease）の 4 種類の評価がある。本実施例では、RECIST ガイドラインによる判定のうち、完全奏効と部分奏効の症例を術前化学療法による治療効果を認めた症例（pCR）とした。その結果、治療効果を認めた症例（pCR）は 11 例であり、治療効果を認めなかった症例（non-pCR）は 7 例であった。

20

【0083】

治療結果と関連がある遺伝子

上記によって判定した治療効果と、定量 PCR 法によって測定した遺伝子発現量の変化（遺伝子発現量の差異）との関連性をみた。その結果を図 2 に示す。図 2 中、X 軸は治療結果（pCR、non-pCR）を示し、Y 軸は Hem (A) + 法を用いて測定した遺伝子発現量に基づいた相対発現量比（Fold Increase）を示す。上記相対発現量比は、抗体に接触させていない場合の遺伝子発現量を 1 としたときの、抗体を接触させた場合の遺伝子発現量として示した。その結果、TNFSF15、TNFSF2、CXCL1、及び CXCL3 の 4 種類の遺伝子において、治療効果を認めた症例（pCR）の相対発現量比と、治療効果を認めなかった症例（non-pCR）の相対発現量比との間に、有意な差異が認められた。

30

【産業上の利用可能性】

【0084】

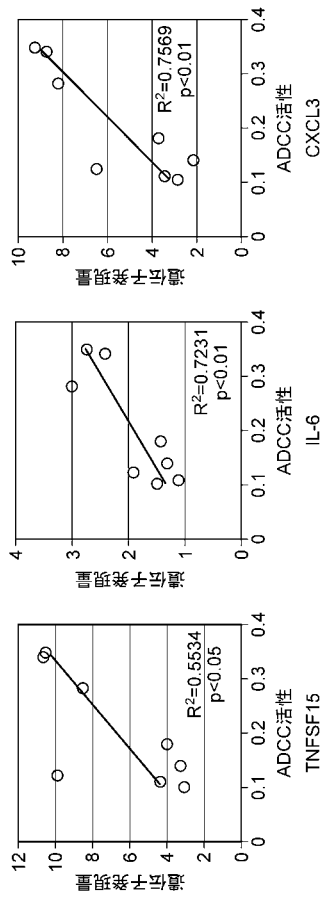
本発明によって、特定の遺伝子の発現を検出することによって細胞傷害活性、特に A DC 活性を予測するための方法及び手段が提供される。本発明に係る方法及び手段では、遺伝子発現の検出という簡便な操作のみで細胞傷害活性を予測することができる。そのため、従来の問題点がなく、簡便、迅速かつ高精度に細胞傷害活性を予測することができ、多くの分野（特に臨床分野）において有用である。

40

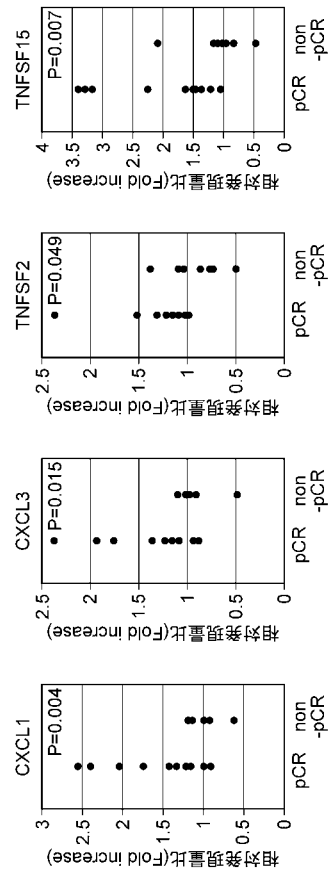
【0085】

本発明に従って細胞傷害活性を予測することによって、患者の抗体医薬に対する薬剤応答性を評価することができ、特に臨床分野において有用である。さらに本発明に従って細胞傷害活性を予測することによって、細胞傷害活性を有する抗体をスクリーニングすることが可能となり、抗体医薬の探索及び開発の分野に有用である。

【 図 1 】



【 図 2 】



【 配列表 】

2014057582000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100128381
弁理士 清水 義憲
- (74)代理人 100162352
弁理士 酒巻 順一郎
- (72)発明者 小原 和彦
茨城県日立市東町四丁目13番1号 日立化成株式会社内
- (72)発明者 井筒 浩
東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 日立化成株式会社内
- (72)発明者 三橋 将人
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 92617, アーバイン, ヘルズ サイエンシーズ
ロード 1003, ヒタチ ケミカル リサーチ センター インコーポレイテッド内
- (72)発明者 小泉 史明
東京都中央区築地五丁目1番1号 独立行政法人国立がん研究センター内
- (72)発明者 田村 研治
東京都中央区築地五丁目1番1号 独立行政法人国立がん研究センター内
- (72)発明者 温泉川 真由
東京都中央区築地五丁目1番1号 独立行政法人国立がん研究センター内
- (72)発明者 小寺 康夫
東京都中央区築地五丁目1番1号 独立行政法人国立がん研究センター内
- (72)発明者 田口 史子
東京都中央区築地五丁目1番1号 独立行政法人国立がん研究センター内
- Fターム(参考) 2G045 AA24 DA14 DA36
4B063 QA01 QA05 QA18 QA19 QQ03 QQ53 QQ79 QQ96 QR08 QR32
QR42 QR48 QR55 QR62 QS15 QS25 QS33 QS34 QX02

专利名称(译)	用于预测细胞毒活性的方法和试剂盒		
公开(公告)号	JP2014057582A	公开(公告)日	2014-04-03
申请号	JP2013189692	申请日	2013-09-12
[标]申请(专利权)人(译)	日立化成工业株式会社 日立化成研究中心公司 NAT癌症CENT		
申请(专利权)人(译)	日立化成株式会社 日立化成研究中心公司 美国国家癌症研究中心研究所		
[标]发明人	小原和彦 井筒浩 三橋将人 小泉史明 田村研治 温泉川真由 小寺康夫 田口史子		
发明人	小原 和彦 井筒 浩 三橋 将人 小泉 史明 田村 研治 温泉川 真由 小寺 康夫 田口 史子		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/15 G01N33/50		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q1/6883 C12Q2600/106 C12Q2600/158		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N33/53.M G01N33/15.Z G01N33/50.Z C12Q1/68.AZN.A C12Q1/6883.C C12Q1/6883.Z C12Q1/6886.C C12Q1/6886.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/DA14 2G045/DA36 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS15 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	长谷川良树 清水义 小泉纯酒卷		
优先权	61/702147 2012-09-17 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题提供预测细胞毒活性，特别是ADCC活性的手段和方法，更方便，快速和高度准确。一种预测细胞毒活性的方法，包括步骤：(a) 制备含有从动物收集的白细胞的生物样品；(b) 使生物样品与抗体接触；(c) 检测白细胞中选自肿瘤坏死因子超家族15，趋化因子CXCL3和白细胞介素6中的至少一种的表达，和(d) 检测表达水平比较表达水平与不与抗体表达水平接触时的表达水平，和(e) 接触抗体时的表达水平高于不存在接触时的表达水平，如果存在细胞毒活性；并预测。【选择图】无

抗体名	医薬名	抗体の種類	標的/適応症
アブシキシマブ	ReoPro (登録商標)	キメラ抗体	糖タンパク質 (GP) IIb/IIIa 急性心虚血性合併症、不安定狭心症、血栓症
アダリムマブ	Humira (登録商標)	ヒト抗体	TNF- α 炎症 (関節リウマチ)、乾癬
アレムツズマブ	Campath (登録商標)	ヒト化抗体	CD52 慢性リンパ急性白血病 (CLL)
バシリキシマブ	Simulect (登録商標)	キメラ抗体	IL-2 受容体 α 拒絶反応抑制
ペバシズマブ	Avastin (登録商標)	ヒト化抗体	血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 大腸癌、非小細胞肺癌、乳癌
セツキシマブ	Erbilux (登録商標)	キメラ抗体	上皮細胞増殖因子受容体 (EGFR) 大腸癌、頭頸部癌
ダクリズマブ	Zenapax (登録商標)	ヒト化抗体	CD25 拒絶反応抑制
エクリズマブ	Soliris (登録商標)	ヒト化抗体	補体系タンパク質 C5 発作性夜間血色素尿症
エファリズマブ	Raptiva (登録商標)	ヒト化抗体	CD11a 乾癬
ゲムツズマブオゾガマイシン	Mylotarg (登録商標)	ヒト化抗体	CD33 急性骨髄性白血病 (AML)
イブリツモマブテウキセタン	Zevalin (登録商標)	マウス抗体	CD20 非ホジキンリンパ腫 (NHL)
インフリキシマブ	Remicade (登録商標)	キメラ抗体	TNF 炎症 (関節リウマチ)
ムロモナブ	Orthoclone (登録商標)	マウス抗体	CD3 受容体 拒絶反応抑制
ナタリズマブ	Tysabri (登録商標)	ヒト化抗体	VLA-4 受容体 多発性硬化症、クローン病
オマリズマブ	Xolair (登録商標)	ヒト化抗体	IgE 喘息
バリビズマブ	Synagis (登録商標)	ヒト化抗体	RSV の F タンパク質エピトープ ウイルス感染