

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-502356

(P2015-502356A)

(43) 公表日 平成27年1月22日(2015.1.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/44 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/44 Z N A	4 B O 2 4
<b>G01N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 G	4 H O 4 5
<b>G01N 33/543 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/543 5 1 1 D	
<b>G01N 33/553 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/553	
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/543 5 7 5	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 59 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-544935 (P2014-544935)	(71) 出願人	512295316
(86) (22) 出願日	平成24年11月30日 (2012.11.30)		ウェルスタット ダイアグノスティクス、
(85) 翻訳文提出日	平成26年7月24日 (2014.7.24)		エルエルシー
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/067353		アメリカ合衆国 メリーランド州 208
(87) 国際公開番号	W02013/082463		78 ゲイサーズバーグ クロッパー ロ
(87) 国際公開日	平成25年6月6日 (2013.6.6)		ード 930
(31) 優先権主張番号	61/665,686	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成24年6月28日 (2012.6.28)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	61/565,281		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成23年11月30日 (2011.11.30)	(74) 代理人	100181674
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 5-FUに関連するアッセイ、抗体、免疫原および組成物

(57) 【要約】

本発明は、5-フルオロウラシルの結合体、5-フルオロウラシル免疫原、5-FUおよび/または別の分子に結合体化している5-FUを結合する抗体に関し、ならびに試料中、例えば血漿中、の5-フルオロウラシルの量を検出、定量およびモニターするためのアッセイに関する。一局面において、5-FUに結合し、かつ競合アッセイにおいてウラシルとの2.4%もしくはそれより小さい交差反応性を有する抗体が提供される。別の局面において、5-FUに結合する上記抗体が、競合アッセイにおいてチミンとの3%未満の交差反応性を有する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

5 - F U に結合し、かつ競合アッセイにおいてウラシルとの 2 . 4 % もしくはそれより小さい交差反応性を有する抗体。

## 【請求項 2】

5 - F U に結合する前記抗体が、競合アッセイにおいてチミンとの 3 % 未満の交差反応性を有する、請求項 1 に記載の抗体。

## 【請求項 3】

5 - F U に結合し、かつ競合アッセイにおいてチミンとの 3 % 未満の交差反応性を有する抗体。

## 【請求項 4】

競合アッセイにおいてテガフルとの 15 % より高い交差反応性を有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体。

## 【請求項 5】

カペシタピン、ウラシル、ウリジン、チミン、チミジン、フォリン酸、オキサリプラチン、イリノテカン、メトトレキサートおよびシスプラチンからなる群より選択される 1 つ以上の化合物との 1 % 未満の交差反応性を有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体。

## 【請求項 6】

5 , 6 - ジヒドロ - 5 - フルオロウラシルとの 3 % 未満の交差反応性を有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体。

## 【請求項 7】

5 - F U を結合する単離された抗体またはその断片であって、前記抗体が重鎖および軽鎖を含み、ここで前記重鎖のアミノ酸配列が、配列番号 3、4 および 5 を含み、かつ前記軽鎖のアミノ酸配列が、配列番号 7、8 および 9 を含むものである、抗体またはその断片。

## 【請求項 8】

前記重鎖アミノ酸配列が、配列番号 2 のアミノ酸 20 - 477 を含む、請求項 7 に記載の抗体またはその断片。

## 【請求項 9】

前記軽鎖アミノ酸配列が、配列番号 6 のアミノ酸 21 - 234 を含む、請求項 7 または 8 に記載の抗体またはその断片。

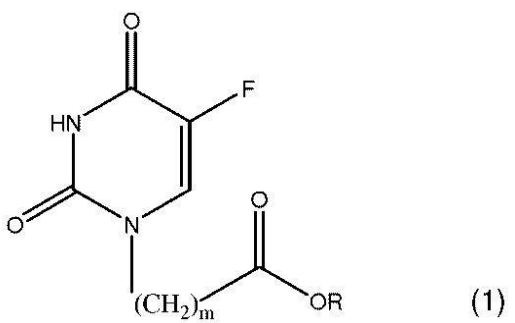
## 【請求項 10】

前記抗体が、モノクローナル抗体；ヒト化抗体；キメラ抗体；一本鎖 F v ( s c F v ) ； F a b 断片；F ( a b ' ) 断片；および合成抗体からなる群より選択される、請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体またはその断片。

## 【請求項 11】

式 ( 1 ) :

## 【化 2 1】



の化合物であって、式中、

R は、タンパク質、N - ヒドロキシスクシンイミド ( N H S )、検出標識であるか、ま

10

20

30

40

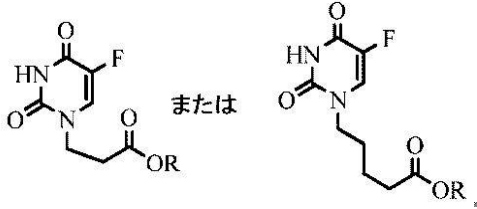
50

たは R に結合している酸素原子と一緒に反応性エステルを形成し、かつ  
m は、1、2、3 または 4 である、  
化合物。

【請求項 1 2】

前記式が、

【化 2 2】



10

である、請求項 1 1 に記載の化合物。

【請求項 1 3】

R が、反応性エステルを形成する、請求項 1 1 または 1 2 に記載の化合物。

【請求項 1 4】

形成される前記エステルが、低級アルキルエステル、イミドエステルまたはアミドエステルである、請求項 1 1 または 1 2 に記載の化合物。

【請求項 1 5】

前記タンパク質が、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH) および血清アルブミンからなる群より選択される、請求項 1 1 または 1 2 に記載の化合物。

20

【請求項 1 6】

前記標識が、電気化学発光標識、酵素標識、フルオロフォア、ラテックス粒子、磁性粒子、放射性元素、リン光色素、色素結晶子、金粒子、銀コロイド粒子、セレンコロイド粒子、金属キレート、補酵素、電気活性基、オリゴヌクレオチドおよび安定なラジカルからなる群より選択される、請求項 1 1 または 1 2 に記載の化合物。

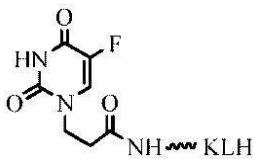
【請求項 1 7】

前記金属キレートが、ルテニウムまたはオスミウム金属キレートである、請求項 1 6 に記載の化合物。

【請求項 1 8】

前記化合物が、

【化 2 3】

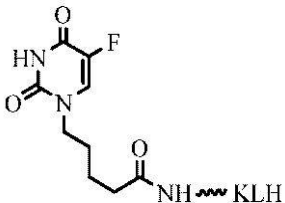


である、請求項 1 1 に記載の化合物。

【請求項 1 9】

前記化合物が、

【化 2 4】



40

である、請求項 1 1 に記載の化合物。

【請求項 2 0】

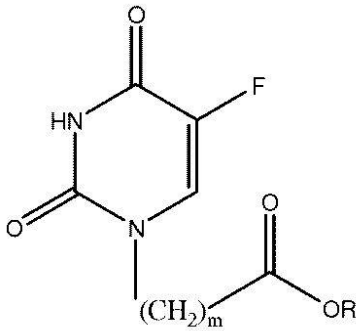
5 - フルオロウラシル (5 - FU) に選択的に結合する抗体を生産する方法であって、

50

前記方法は：

a) 動物を式(1)：

【化25】



(1)

10

の少なくとも1つの化合物で免疫化する工程であって、式中、

Rは、タンパク質、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、タンパク質、検出標識であるか、またはRに結合している酸素原子と一緒に反応性エステルを形成し、かつ

mは1、2、3または4である、工程と、

b) 前記抗体を単離する工程と

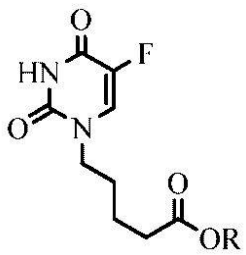
を含む、方法。

20

【請求項21】

前記哺乳動物を、式：

【化26】



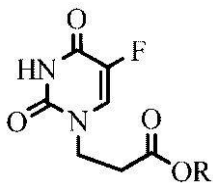
30

の化合物で免疫化する、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

前記哺乳動物を、式：

【化27】



40

の化合物で免疫化する、請求項20に記載の方法。

【請求項23】

前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記抗体が、5-FUに結合し、かつ競合アッセイにおいてウラシルとの2.4%もしくはそれより小さい交差反応性を有する、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記抗体が、5-FUに結合し、かつ競合アッセイにおいてチミンとの3%未満の交差反応性を有する、請求項23または24に記載の方法。

【請求項26】

前記抗体が、5-FUに結合し、かつ競合アッセイにおいてテガフルとの15%より

50

高い交差反応性を有する、請求項 22 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

前記抗体が、カペシタビン、ウラシル、ウリジン、チミン、チミジン、フォリン酸、オキサリプラチン、イリノテカン、メトトレキサートおよびシスプラチンからなる群より選択される 1 つ以上の化合物との 1 % 未満の交差反応性を有する、請求項 22 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記抗体が、5, 6 - ジヒドロ - 5 - フルオロウラシルとの 3 % 未満の交差反応性を有する、請求項 22 ~ 27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記抗体が、マウス IgG2b 抗体である、請求項 22 ~ 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

請求項 20 ~ 29 に記載の方法のいずれか 1 つによって生産される抗体。

【請求項 31】

試料中の 5 - フルオロウラシル (5 - FU) を検出する方法であって、前記方法は：少なくとも前記試料と第一の結合分子およびディテクター分子を溶液中で併せる工程であって、ここで、前記第一の結合分子は、前記ディテクター分子を結合でき、かつ 5 - FU は、前記第一の結合分子の前記ディテクター分子への結合を競合的に阻害する、工程と、前記第一の結合分子の前記ディテクター分子への結合を検出する工程とを含む、方法。

【請求項 32】

前記試料が、哺乳動物からの血清試料である、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記第一の結合分子が、抗体またはその断片である、請求項 31 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

前記抗体またはその断片が、5 - FU に結合し、かつ競合アッセイにおいてウラシルとの 2 . 4 % もしくはそれより小さい交差反応性を有する、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記抗体が、5 - FU に結合し、かつ競合アッセイにおいてチミンとの 3 % 未満の交差反応性を有する、請求項 33 ~ 34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

前記抗体が、競合アッセイにおいてテガフルとの 15 % より高い交差反応性を有する、請求項 33 ~ 35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

前記抗体が、カペシタビン、ウラシル、ウリジン、チミン、チミジン、フォリン酸、オキサリプラチン、イリノテカン、メトトレキサートおよびシスプラチンからなる群より選択される 1 つ以上の化合物との 1 % 未満の交差反応性を有する、請求項 33 ~ 36 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

前記抗体が、5, 6 - ジヒドロ - 5 - フルオロウラシルとの 3 % 未満の交差反応性を有する、請求項 33 ~ 37 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

前記試料を前記第一の結合分子と併せる前に希釈する、請求項 31 ~ 38 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

前記試料を前記第一の結合分子と併せる前に希釈しない、請求項 31 ~ 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

前記試料が、血漿である、請求項 31 ~ 40 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 4 2】  
 少なくとも前記第一の結合分子または前記ディテクター分子が、前記試料で再水和される凍結乾燥組成物からのものである、請求項 3 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 4 3】  
 前記第一の結合分子が、凍結乾燥組成物からのものである、請求項 3 1 ~ 4 2 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 4 4】  
 前記ディテクター分子が、凍結乾燥組成物からのものである、請求項 3 1 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 4 5】 10  
 前記第一の結合分子および前記ディテクター分子を別々の組成物中で凍結乾燥させる、請求項 3 1 ~ 4 2 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 4 6】  
 前記別々の凍結乾燥組成物を前記試料で再水和させる、請求項 4 5 に記載の方法。
- 【請求項 4 7】  
 < 5 . 0 n g / m L の検出下限を有する、請求項 3 1 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 4 8】  
 1 0 ~ 3 0 , 0 0 0 n g / m L のダイナミックレンジを有する、請求項 3 1 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の方法。 20
- 【請求項 4 9】  
 3、5、7、10、12 または 15 分未満で完了する、請求項 3 1 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 5 0】  
 前記試料が患者からのものであり、前記方法が、前記試料において検出される 5 - F U の量に基づいて患者の 5 - F U 用量を調整する工程をさらに含む、請求項 3 1 ~ 4 9 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 5 1】 30  
 前記溶液が、G P R P - N H <sub>2</sub> (配列番号 1) を含む、請求項 3 1 ~ 5 0 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 5 2】  
 前記第一の結合分子が表面に結合される、請求項 3 1 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 5 3】  
 前記溶液を一定の期間インキュベートした後に、前記第一の結合分子が表面に結合される、請求項 3 1 ~ 5 2 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 5 4】  
 前記第一の結合分子および前記表面各々が、結合ペアの対応するメンバーから成る、請求項 5 3 に記載の方法。
- 【請求項 5 5】 40  
 前記結合ペアが、ストレプトアビジンおよびビオチンである、請求項 5 4 に記載の方法。
- 【請求項 5 6】  
 前記第一の結合分子が、ビオチンを含む、請求項 5 5 に記載の方法。
- 【請求項 5 7】  
 前記表面が、ビーズである、請求項 5 2 ~ 5 6 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 5 8】  
 前記ビーズが、常磁性ビーズである、請求項 5 7 に記載の方法。
- 【請求項 5 9】 50  
 少なくとも 1 つの検出標識が、電気化学発光標識、酵素標識、フルオロフォア、ラテッ

クス粒子、磁性粒子、放射性元素、リン光色素、色素結晶子、金粒子、銀コロイド粒子、セレンコロイド粒子、金属キレート、補酵素、電気活性基、オリゴヌクレオチドおよび安定なラジカルから選択される、請求項 31 から 58 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 60】

前記金属キレートが、ルテニウムまたはオスミウム金属キレートである、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 61】

前記哺乳動物が、ヒトである、請求項 31 から 60 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 62】

試料中の 5 - F U を検出するための E C L 検出キットであって、前記キットは：

- ( i ) 必要に応じて表面に固定化または結合される結合分子と、
- ( i i ) 標識されたディテクター分子と

を含み、前記結合分子が、前記ディテクター分子に結合でき、かつ 5 - F U が、前記結合分子の前記ディテクター分子への結合を競合的に阻害するものである、キット。

【請求項 63】

可搬型 E C L 分析器の使用をさらに含む、請求項 62 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この出願は、2011年11月30日に提出された米国仮出願第 61 / 565 , 281 号および 2012年6月28日に提出された同第 61 / 665 , 686 号（これらの各々は、それらの全体が参考として本明細書に援用される）に対する優先権を主張する。

【0002】

分野

本開示は、生体試料中の 5 - フルオロウラシル（5 - F U）の存在を検出する、該 5 - F U を定量する、または該 5 - F U の量をモニターするためのアッセイに関する。

【背景技術】

【0003】

背景

5 - フルオロウラシル（5 - F U）は、癌患者において結腸直腸、頭頸部、胃および乳癌腫をはじめとする（しかしこれらに限定されない）腫瘍を処置するために広範に使用されている。5 - F U は、殆どの場合、全身投与されるが、一部の形態の前癌性および癌性皮膚障害を処置するために局所適用もされる。5 - F U のプロドラッグも癌処置に使用される。

【0004】

5 - F U 薬物動態が広い患者間および患者内変動性を有することが示されている。患者間の調整用量間の差を含めて、個体間の 5 - F U の代謝率をめぐる幾つかの不確定要素がまだ存在する。例えば、個体ごとに算出された体表面積に基づいて調製された同等の用量の 5 - F U を異なる患者に投与したとき、全身曝露に顕著な差が生ずる。（Bertino ら、Clin. Colorectal Cancer、6 : 407 - 426、(2007)）。これは、一部の患者では過剰投薬の結果として毒性をもたらすことがあり、または他の患者では過少投薬に起因して効力低減をもたらすことがある。加えて、一部の患者は、ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ（DPD）欠損症を有し、この欠損症は、5 - F U 曝露から非常に重篤な、ことによると致死性の、毒性副作用の原因になり得る。実際、一部の患者、特に老人患者は、低下した 5 - F U 血漿クリアランスを有し、これは、より高い毒性リスクにつながる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献 1】Bertino ら、Clin. Colorectal Cancer (

10

20

30

40

50

2007)6:407~426

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

したがって、5-FUの投与および体内の5-FUレベルのモニタリングのための有効な常用治療薬管理システムを、患者における一切の望ましくない副作用を制限および回避するために時宜に応じて毒性用量または有効でない用量を調整することができるように設計することは、重要である。例えば、目標血漿レベルへの5-FUの用量調整を個別化する能力は、体表面積に基づく投薬方法より正確であろうし、好ましいであろう。個別化された投薬は、毒性の発生の減少、生存率改善、および5-FU処置に対する患者の全体的な応答増大にもつながるであろう。5-FU用量を調整して最適な血漿濃度を達成できるように5-FUレベルをモニターするための改善された抗体、イムノアッセイおよび方法が必要とされている。

10

【課題を解決するための手段】

【0007】

本開示は、5-ウラシルの結合体、5-フルオロウラシル免疫原、5-FUを結合する抗体、および/または別の分子に結合体化している5-FUを結合する抗体、ならびに試料中、例えば血漿中、の5-フルオロウラシルの量を検出、定量およびモニターするためのアッセイに、一般に関する。

20

【0008】

本開示は、5-FUに結合し、かつ競合アッセイにおいてウラシルとの2.4%もしくはそれより小さい交差反応性を有する抗体に、一般に関する。

【0009】

一部の実施形態において、本開示は、5-FUに結合し、かつ競合アッセイにおいてウラシルとの2.4%もしくはそれより小さい交差反応性を有する抗体であって、5-FUに結合し、かつ競合アッセイにおいてチミンとの3%未満の交差反応性を有するものである抗体に、一般に関する。

【0010】

本開示は、5-FUに結合し、かつ競合アッセイにおいてチミンとの3%未満の交差反応性を有する抗体に、一般に関する。

30

【0011】

一部の実施形態において、本開示は、本開示の抗体であって、競合アッセイにおいてテガフル(tegafur)との15%より高い交差反応性を有するものである抗体に、一般に関する。

【0012】

一部の実施形態において、本開示は、本開示の抗体であって、カペシタビン、ウラシル、ウリジン、チミン、チミジン、フォリン酸、オキサリプラチン、イリノテカン、メトトレキサートおよびシスプラチンからなる群より選択される1つ以上の化合物との1%未満の交差反応性を有するものである抗体に、一般に関する。

【0013】

一部の実施形態において、本開示は、本開示の抗体であって、5,6-ジヒドロ-5-フルオロウラシルとの3%未満の交差反応性を有するものである抗体に、一般に関する。

40

【0014】

本開示は、5-FUを結合する単離された抗体またはその断片であって、該抗体が重および軽鎖を含み、その重鎖アミノ酸配列が、配列番号3、4および5を含み、ならびにその軽鎖アミノ酸配列が、配列番号7、8および9を含むものである、抗体またはその断片に、一般に関する。

【0015】

一部の実施形態において、本開示は、5-FUを結合する単離された抗体またはその断片であって、その重鎖アミノ酸配列が配列番号2のアミノ酸20-477を含むものであ

50

る、単離された抗体またはその断片に、一般に関する。

【0016】

一部の実施形態において、本開示は、5-FUを結合する単離された抗体またはその断片であって、その軽鎖アミノ酸配列が配列番号6のアミノ酸21-234を含むものである、単離された抗体またはその断片に、一般に関する。

【0017】

一部の実施形態において、本開示は、5-FUを結合する単離された抗体またはその断片であって、該抗体が、モノクローナル抗体；ヒト化抗体；キメラ抗体；一本鎖Fv (scFv)；Fab断片；F(ab')断片；および合成抗体からなる群より選択されるものである、単離された抗体またはその断片に、一般に関する。

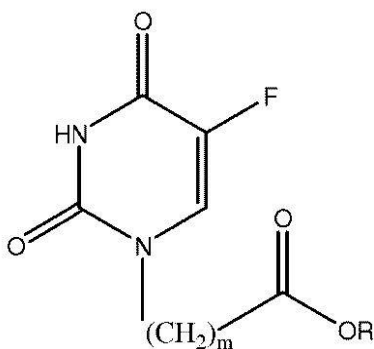
10

【0018】

本開示は、式(1)の化合物：

【0019】

【化1】



20

(1)

(式中、Rは、タンパク質、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、検出標識であるか、またはRに結合している酸素原子と一緒に反応性エステルを形成し、およびm = 1、2、3または4である)

に、一般に関する。

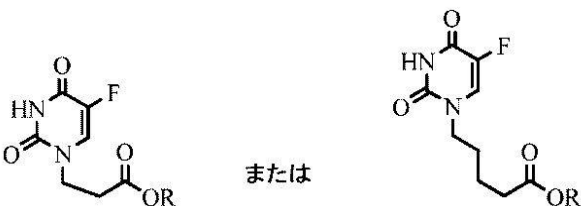
30

【0020】

一部の実施形態において、本開示は、式(1)の化合物であって、該式が、

【0021】

【化2】



40

である化合物に、一般に関する。

【0022】

一部の実施形態において、本開示は、Rが反応性エステルを形成する、式(1)の化合物に、一般に関する。

【0023】

一部の実施形態において、本開示は、形成されるエステルが、低級アルキルエステル、イミドエステルまたはアミドエステルである、式(1)の化合物に、一般に関する。

【0024】

一部の実施形態において、本開示は、前記タンパク質が、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)および血清アルブミンからなる群より選択される、式(1)の化合物に

50

、一般に関する。

【0025】

一部の実施形態において、本開示は、前記標識が、電気化学発光標識、酵素標識、フルオロフォア、ラテックス粒子、磁性粒子、放射性元素、リン光色素、色素結晶子 (dye crystalite)、金粒子、銀コロイド粒子、セレンコロイド粒子、金属キレート、補酵素、電気活性基、オリゴヌクレオチドおよび安定なラジカルからなる群より選択される、式(1)の化合物に、一般に関する。

【0026】

一部の実施形態において、本開示は、前記金属キレートが、ルテニウムまたはオスミウム金属キレートである、式(1)の化合物に、一般に関する。

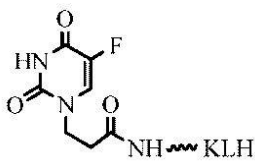
10

【0027】

一部の実施形態において、本開示は、

【0028】

【化3】



である、式(1)の化合物に、一般に関する。

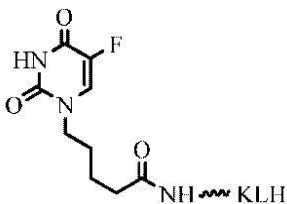
20

【0029】

一部の実施形態において、本開示は、

【0030】

【化4】



30

である、式(1)の化合物に、一般に関する。

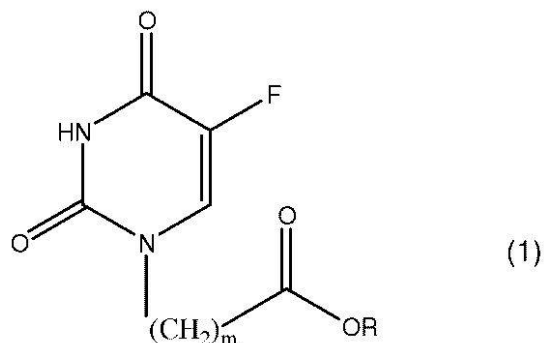
【0031】

本開示は、5-フルオロウラシル(5-FU)に選択的に結合する抗体を生産する方法であって、

a) 動物を式(1) :

【0032】

【化5】



40

の少なくとも1つの化合物で免疫化する工程であって、式中、Rは、タンパク質、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、タンパク質、検出標識であるか、またはRに結合している酸素原子と一緒に反応性エステルを形成し、およびm = 1、2、3または4

50

である、工程と、

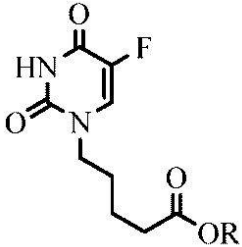
b) 前記抗体を単離する工程と  
を含む方法に、一般に関する。

【0033】

一部の実施形態において、本開示は、哺乳動物を式：

【0034】

【化6】



10

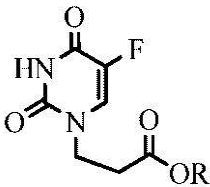
の化合物で免疫化する、5-フルオロウラシル(5-FU)に選択的に結合する抗体を生産する方法に、一般に関する。

【0035】

一部の実施形態において、本開示は、哺乳動物を式：

【0036】

【化7】



20

の化合物で免疫化する、5-フルオロウラシル(5-FU)に選択的に結合する抗体を生産する方法に、一般に関する。

【0037】

一部の実施形態において、本開示は、5-フルオロウラシル(5-FU)に選択的に結合する抗体を生産する方法であって、前記抗体がモノクローナル抗体である方法に、一般に関する。

30

【0038】

一部の実施形態において、本開示は、5-フルオロウラシル(5-FU)に選択的に結合する抗体を生産する方法であって、前記抗体が、5-FUに結合し、かつ競合アッセイにおいてウラシルとの2.4%もしくはそれより小さい交差反応性を有するものである方法に、一般に関する。

【0039】

一部の実施形態において、本開示は、5-フルオロウラシル(5-FU)に選択的に結合する抗体を生産する方法であって、前記抗体が、5-FUに結合し、かつ競合アッセイにおいてチミンとの3%未満の交差反応性を有するものである方法に、一般に関する。

40

【0040】

一部の実施形態において、本開示は、5-フルオロウラシル(5-FU)に選択的に結合する抗体を生産する方法であって、前記抗体が、5-FUに結合し、かつ競合アッセイにおいてテガフルとの15%より高い交差反応性を有するものである方法に、一般に関する。

【0041】

一部の実施形態において、本開示は、5-フルオロウラシル(5-FU)に選択的に結合する抗体を生産する方法であって、前記抗体が、カペシタピン、ウラシル、ウリジン、チミン、チミジン、フォリン酸、オキサリプラチン、イリノテカン、メトトレキサートお

50

よびシスプラチンからなる群より選択される1つ以上の化合物との1%未満の交差反応性を有するものである方法に、一般に関する。

【0042】

一部の実施形態において、本開示は、5-フルオロウラシル(5-FU)に選択的に結合する抗体を生産する方法であって、前記抗体が、5,6-ジヒドロ-5-フルオロウラシルとの3%未満の交差反応性を有するものである方法に、一般に関する。

【0043】

一部の実施形態において、本開示は、5-フルオロウラシル(5-FU)に選択的に結合する抗体を生産する方法であって、前記抗体がマウスIgG2b抗体である方法に、一般に関する。

【0044】

本開示は、本開示の方法のいずれか1つによって生産される抗体に、一般に関する。

【0045】

本開示は、試料中の5-フルオロウラシル(5-FU)を検出する方法であって、少なくとも前記試料と第一の結合分子およびディテクター分子を溶液中で併せる工程(ここで、前記第一の結合分子は、前記ディテクター分子を結合でき、および5-FUは、前記第一の結合分子の前記ディテクター分子への結合を競合的に阻害する)と、前記第一の結合分子の前記ディテクター分子への結合を検出する工程とを含む方法に、一般に関する。

【0046】

一部の実施形態において、本開示は、試料中の5-フルオロウラシル(5-FU)を検出する方法であって、前記試料が、哺乳動物からの血清試料である方法に、一般に関する。

【0047】

一部の実施形態において、本開示は、試料中の5-フルオロウラシル(5-FU)を検出する方法であって、前記第一の結合分子が、抗体またはその断片である方法に、一般に関する。

【0048】

一部の実施形態において、本開示は、試料中の5-フルオロウラシル(5-FU)を検出する方法であって、前記抗体またはその断片が、5-FUに結合し、かつ競合アッセイにおいてウラシルとの2.4%もしくはそれより小さい交差反応性を有するものである方法に、一般に関する。

【0049】

一部の実施形態において、本開示は、試料中の5-フルオロウラシル(5-FU)を検出する方法であって、前記抗体が、5-FUに結合し、かつ競合アッセイにおいてチミンとの3%未満の交差反応性を有するものである方法に、一般に関する。

【0050】

一部の実施形態において、本開示は、試料中の5-フルオロウラシル(5-FU)を検出する方法であって、前記抗体が、競合アッセイにおいてテガフルとの15%より高い交差反応性を有するものである方法に、一般に関する。

【0051】

一部の実施形態において、本開示は、試料中の5-フルオロウラシル(5-FU)を検出する方法であって、前記抗体が、カペシタピン、ウラシル、ウリジン、チミン、チミジン、フォリン酸、オキサリプラチン、イリノテカン、メトトレキサートおよびシスプラチンからなる群より選択される1つ以上の化合物との1%未満の交差反応性を有するものである方法に、一般に関する。

【0052】

一部の実施形態において、本開示は、試料中の5-フルオロウラシル(5-FU)を検出する方法であって、前記抗体が、5,6-ジヒドロ-5-フルオロウラシルとの3%未満の交差反応性を有するものである方法に、一般に関する。

【0053】

10

20

30

40

50

一部の実施形態において、本開示は、試料中の5 - フルオロウラシル ( 5 - F U ) を検出する方法に概して関し、ここで前記試料を第一の結合分子と併せる前に希釈する。

【 0 0 5 4 】

一部の実施形態において、本開示は、試料中の5 - フルオロウラシル ( 5 - F U ) を検出する方法に概して関し、ここで前記試料を第一の結合分子と併せる前に希釈しない。

【 0 0 5 5 】

一部の実施形態において、本開示は、試料中の5 - フルオロウラシル ( 5 - F U ) を検出する方法であって、前記試料が血漿である方法に、一般に関する。

【 0 0 5 6 】

一部の実施形態において、本開示は、試料中の5 - フルオロウラシル ( 5 - F U ) を検出する方法であって、少なくとも前記第一の結合分子または前記ディテクター分子が、前記試料で再水和される凍結乾燥組成物からのものである方法に、一般に関する。

【 0 0 5 7 】

一部の実施形態において、本開示は、試料中の5 - フルオロウラシル ( 5 - F U ) を検出する方法であって、前記第一の結合分子が、凍結乾燥組成物からのものである方法に、一般に関する。

一部の実施形態において、本開示は、試料中の5 - フルオロウラシル ( 5 - F U ) を検出する方法であって、前記ディテクター分子が、凍結乾燥組成物からのものである方法に、一般に関する。

【 0 0 5 8 】

一部の実施形態において、本開示は、試料中の5 - フルオロウラシル ( 5 - F U ) を検出する方法であって、前記第一の結合分子および前記ディテクター分子を別々の組成物中で凍結乾燥させるものである方法に、一般に関する。

【 0 0 5 9 】

一部の実施形態において、本開示は、試料中の5 - フルオロウラシル ( 5 - F U ) を検出する方法であって、前記別々の凍結乾燥組成物を前記試料で再水和させるものである方法に、一般に関する。

【 0 0 6 0 】

一部の実施形態において、本開示は、試料中の5 - フルオロウラシル ( 5 - F U ) を検出する方法であって、 $< 5 . 0 \text{ ng / mL}$ の検出下限を有する方法に、一般に関する。

【 0 0 6 1 】

一部の実施形態において、本開示は、試料中の5 - フルオロウラシル ( 5 - F U ) を検出する方法であって、 $10 \sim 30, 000 \text{ ng / mL}$ のダイナミックレンジを有する方法に、一般に関する。

【 0 0 6 2 】

一部の実施形態において、本開示は、試料中の5 - フルオロウラシル ( 5 - F U ) を検出する方法であって、3、5、7、10、12または15分未満で完了する方法に、一般に関する。

【 0 0 6 3 】

一部の実施形態において、本開示は、試料中の5 - フルオロウラシル ( 5 - F U ) を検出する方法に概して関し、前記試料が患者からのものであり、この方法は、その試料において検出される5 - F Uの量に基づいて患者の5 - F U用量を調整する工程をさらに含む。

【 0 0 6 4 】

一部の実施形態において、本開示は、試料中の5 - フルオロウラシル ( 5 - F U ) を検出する方法であって、前記溶液が、 $\text{GPRP-NH}_2$  ( 配列番号 1 ) を含むものである方法に、一般に関する。

【 0 0 6 5 】

一部の実施形態において、本開示は、試料中の5 - フルオロウラシル ( 5 - F U ) を検出する方法であって、前記第一の結合分子が表面に結合されるものである方法に、一般に

10

20

30

40

50

関する。

【0066】

一部の実施形態において、本開示は、試料中の5-フルオロウラシル(5-FU)を検出する方法であって、前記溶液を一定の期間インキュベートした後、前記第一の結合分子が表面に結合されるものである方法に、一般に関する。

【0067】

一部の実施形態において、本開示は、試料中の5-フルオロウラシル(5-FU)を検出する方法であって、前記第一の結合分子および前記表面各々が、結合ペアの対応するメンバーから成るものである方法に、一般に関する。

【0068】

一部の実施形態において、本開示は、試料中の5-フルオロウラシル(5-FU)を検出する方法であって、前記結合ペアが、ストレプトアビジンおよびビオチンである方法に、一般に関する。

【0069】

一部の実施形態において、本開示は、試料中の5-フルオロウラシル(5-FU)を検出する方法であって、前記第一の結合分子がビオチンを含むものである方法に、一般に関する。

【0070】

一部の実施形態において、本開示は、試料中の5-フルオロウラシル(5-FU)を検出する方法であって、前記表面がビーズである方法に、一般に関する。

【0071】

一部の実施形態において、本開示は、試料中の5-フルオロウラシル(5-FU)を検出する方法であって、前記ビーズが常磁性ビーズである方法に、一般に関する。

【0072】

一部の実施形態において、本開示は、試料中の5-フルオロウラシル(5-FU)を検出する方法であって、前記少なくとも1つの検出標識が、電気化学発光標識、酵素標識、フルオロフォア、ラテックス粒子、磁性粒子、放射性元素、リン光色素、色素結晶子、金粒子、銀コロイド粒子、セレンコロイド粒子、金属キレート、補酵素、電気活性基、オリゴヌクレオチドおよび安定なラジカルから選択されるものである方法に、一般に関する。

【0073】

一部の実施形態において、本開示は、試料中の5-フルオロウラシル(5-FU)を検出する方法であって、前記金属キレートが、ルテニウムまたはオスミウム金属キレートである方法に、一般に関する。

【0074】

一部の実施形態において、本開示は、試料中の5-フルオロウラシル(5-FU)を検出する方法であって、前記哺乳動物がヒトである方法に、一般に関する。

【0075】

本開示は、試料中の5-FUを検出するためのECL検出キットであって、表面に任意に固定化または結合される結合分子と、標識されたディテクター分子とを含み、前記結合分子が、前記ディテクター分子に結合でき、および5-FUが、前記結合分子の前記ディテクター分子への結合を競合的に阻害するものであるキットに、一般に関する。前記キットは、可搬型ECL分析器の使用も含み得る。

【0076】

本開示は、試料中の5-FUを検出するためのアッセイに、一般に関する。一部の実施形態において、本開示のアッセイは、試料(例えば、血漿)中の5-FUを正確にモニターして、広いダイナミックレンジにわたり結果を提供することができる。本開示のアッセイは、5-FUプロドラッグの注入中および/または経口投与後の5-FUのモニタリングを可能にする。DPD欠損症または他のクリアランス問題のために5-FUに過剰曝露された患者の同定にこのアッセイを用いることができる。加えて、効力の改善および副作用の減少をもたらす得る個別化5-FU処置に本開示のアッセイを用いることができる。

10

20

30

40

50

【0077】

配列の簡単な説明

配列番号1は、アミノ酸配列GPRPである。

【0078】

配列番号2は、モノクローナル抗体61C6(mab 61C6)の重鎖のアミノ酸配列である。

【0079】

配列番号3、4および5は、mab 61C6の重鎖の、それぞれ、CDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列である。

【0080】

配列番号6は、mab 61C6の軽鎖のアミノ酸配列である。

【0081】

配列番号7、8および9は、mab 61C6の軽鎖の、それぞれ、CDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列である。

【0082】

配列番号10は、mab 61C6の重鎖をコードしているヌクレオチド配列である。

【0083】

配列番号11は、mab 61C6の軽鎖をコードしているヌクレオチド配列である。

【発明を実施するための形態】

【0084】

本開示は、5-FUに選択的に結合する様々な抗体を提供する。これらの抗体は、下に示す式(1)の化合物または免疫原に由来する。前記抗体は、生体試料中の5-FUの量を有利に検出、定量およびモニターすることができるイムノアッセイにおいて使用する。生体試料中の5-FUを測定するための前記イムノアッセイは、迅速であり、感度がよく、および正確であり、それによって処置中に5-FUの投薬を最適化する。

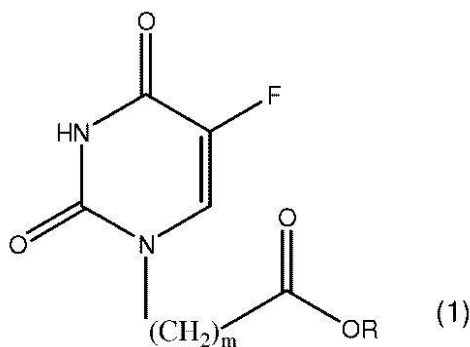
【0085】

免疫原

本開示は、式(1)：

【0086】

【化8】



の化合物に概して関し、式中、Rは、タンパク質、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、検出標識であるか、またはRに結合している酸素原子と一緒に反応性エステルを形成し、ここでm=1、2、3または4である。式(1)の化合物は、本開示の抗体上の結合部位について試料中の5-FUと競合するように設計されている、5-FUの結合体である。今般開示する免疫原化合物は、式(1)の化合物の1置換5-FU誘導体である。

【0087】

本開示の一定の実施形態において、式(1)の化合物は、以下：

【0088】

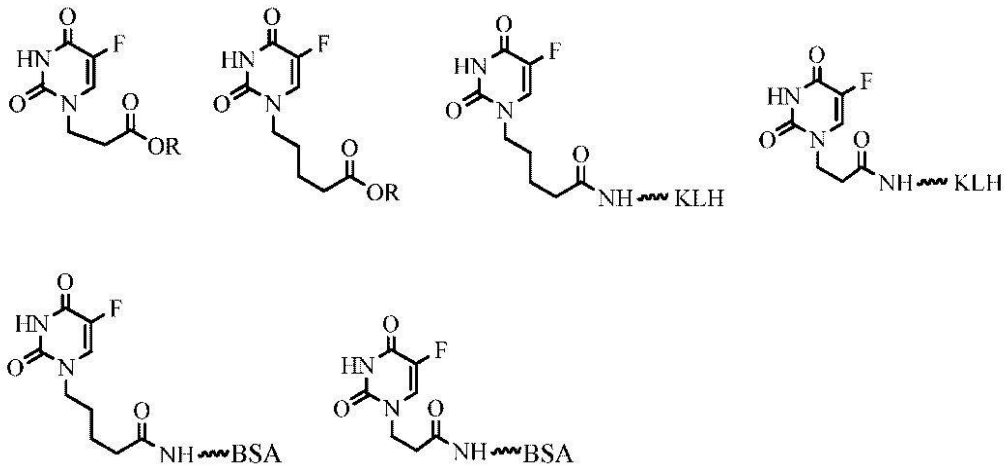
10

20

30

40

## 【化9】



10

20

のうちのいずれか1つであり得、これらの式中、Rは、タンパク質、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、検出標識であるか、またはRに結合している酸素原子と一緒に反応性エステルを形成する。一定の実施形態において、形成されるエステルは、低級アルキルエステル、イミドエステルまたはアミドエステルであり得る。さらなる他の実施形態において、タンパク質は、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)および/または血清アルブミン、例えばウシ血清アルブミン(BSA)などであり得る。タンパク質および/または検出標識を、NHSとの反応によるものをはじめとする任意の手段によって化合物に連結させることができる。前記検出標識をタンパク質に、例えばBSAまたはKLHに、付着または結合させることができることを企図している。前記タンパク質への結合または付着は、2、3、4または5炭素鎖、および直鎖、分岐、飽和または不飽和炭素鎖をはじめとする(しかしこれらに限定されない)様々な長さおよび配置の炭素リンカーを用いて果たすことができる。炭素に加えて他の原子をこれらのリンカーに含めることもでき、それらの原子としては、例えば、酸素、窒素および硫黄が挙げられる。

## 【0089】

一部の実施形態において、検出標識は、電気化学発光標識、酵素標識、フルオロフォア、ラテックス粒子、磁性粒子、放射性元素、リン光色素、色素結晶子、金粒子、銀コロイド粒子、セレンコロイド粒子、金属キレート、補酵素、電気活性基、オリゴヌクレオチドおよび安定なラジカルからなる群より選択される。適する金属キレートの例としては、ルテニウムまたはオスミウム金属キレートが挙げられるが、これらに限定されない。

30

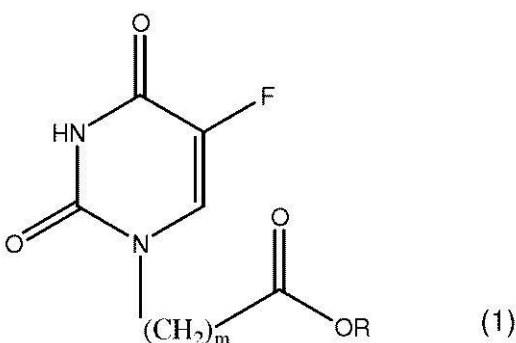
## 【0090】

抗5-Fu抗体の生産

5-FUに選択的に結合する本開示の抗体は、式(1)：

## 【0091】

## 【化10】



40

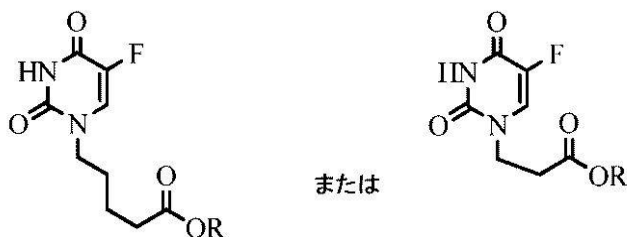
(式中、Rはタンパク質であり、および $m = 1, 2, 3$ または4である)の少なくとも1つの化合物で動物を免疫化し、その後、その抗体を単離することによって生産することができる。NHSとの反応によるものをはじめとする任意の手段によって、

50

タンパク質を前記化合物に連結させることができる。本発明の抗体を、より短いリンカーを有する 5 - F U の 1 位修飾結合体から産生させる（例えば、実施例 4 および 6 を参照のこと）。一部の実施形態では、動物を式：

【 0 0 9 2 】

【 化 1 1 】



の少なくとも一方の化合物で免疫化する。

【 0 0 9 3 】

一定の実施形態では上記化合物両方を使用して動物を免疫化することができることを企図している。他の実施形態ではこれら 2 つの上記化合物の一方のみを使用して動物を免疫化することをさらに企図している。

【 0 0 9 4 】

本開示の抗体を生産する方法は、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を作製するためのものを含む。免疫化される動物は、鳥類または哺乳類であり得、該哺乳類は、マウス、ラット、ウサギ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、ヤギ、ヒツジおよびブタからなる群より選択されるものを含む。

【 0 0 9 5 】

一定の実施形態において、本開示の抗体を生産する方法は、本開示の化合物、例えば、タンパク質に連結した 5 - F U を用いて適切な免疫化スケジュールに従って動物を免疫化する工程を含む。一部の実施形態では、5 - F U を、担体分子、例えば、B S A、ヒト血清アルブミン ( H S A )、K L H、オボアルブミン ( O V A )、サイログロブリン ( T G )、破傷風毒素、または合成担体、例えば多抗原性ペプチド ( m u l t i p l e a n t i g e n i c p e p t i d e ) ( M A P S ) にカップリングさせる。適切な期間の後、抗体をその動物から抽出および/または単離する。例えば、抗体を腹水、血液または血清から得ることができ、モノクローナル抗体を脾細胞とパートナー細胞系の融合から得ることができる。抗体は、カップリング反応に使用され得る多くのアミノ基、カルボキシル基およびスルフヒドリル基を有する。実施例セクションにより、本開示の抗体の一部を生産させるための例示的、非限定的方法を提供する。

【 0 0 9 6 】

一定の他の実施形態では、本開示の抗体を、配列番号 1 0 および 1 1 によりコードされている重および軽鎖アミノ酸配列をそれぞれ発現させることによって生産することができる。

【 0 0 9 7 】

抗体

本開示の一部の実施形態において、第一の結合分子は、5 - F U をおよび/または別の分子 ( 単数もしくは複数 ) に結合体化している 5 - F U を結合する抗体またはその断片であり得る。例えば、前記抗体は、5 - F U への結合体化を伴わない同じ分子と比較して、5 - F U に結合体化している分子に選択的に結合する。抗体を、5 - F U に結合していると記載するとき、これは、5 - F U への結合体化を伴わない同じ分子と比較して、5 - F U に結合体化している分子を選択的に結合する抗体も含むと解する。

【 0 0 9 8 】

本開示の抗体は、モノクローナル抗体であってもよいし、またはポリクローナル抗体であってもよい。調製方法に依存して、一定の実施形態における本開示の抗体は、凍結乾燥状態であり得る。本質的に任意のタイプの抗体を、本開示の実施形態に従って結合分子と

10

20

30

40

50

して使用することができる。かかる抗体の適する例としては、合成抗体、モノクローナル抗体、組換え生産された抗体、細胞内抗体 ( i n t r a b o d y )、多重特異性抗体、二重特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、合成抗体、前述のもののいずれかの一本鎖 F V ( s c F v )、F a b 断片、F ( a b ' ) 断片、ジスルフィド連結 F v ( s d F v ) およびエピトープ結合断片が挙げられるが、これらに限定されない。本開示において使用する抗体は、所望の結合部位を結合できる免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の部分を含み得る。本開示の免疫グロブリン分子は、本質的に、免疫グロブリン分子の任意のクラスまたはアイソタイプ (例えば、I g G、I g E、I g M、I g D、I g A および I g Y) またはサブクラス (例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1 および I g A 2) であってよい。天然に軽鎖を欠くラクダ科動物 ( c a m e l i d ) 抗体も使用することができる。加えて、同族結合部位を結合することが公知の抗体の単一または複数の C D R を含むポリペプチドを含めて、ナノボディーおよびドメイン抗体として公知の構造を使用することができるが、但し、有効量の結合能力を保持することを条件とする。

10

20

30

40

50

#### 【0099】

一定の実施形態において、本開示の抗体は、5 - F U および / または別の分子に結合体化している 5 - F U を選択的に結合し、ならびに次の特性のうちの 1 つ以上を有する： ( i ) 競合アッセイにおけるウラシルとの 3 % もしくはそれより小さい交差反応性； ( i i ) 競合アッセイにおけるチミンとの 3 % 未満の交差反応性； ( i i i ) 競合アッセイにおけるテガフルとの 15 % より高い交差反応性； ( i v ) カペシタピン、ウラシル、ウリジン、チミン、チミジン、フォリン酸、オキサリプラチン、イリノテカン、メトトレキサートおよびシスプラチンからなる群より選択される 1 つ以上の化合物との 1 % 未満の交差反応性；または ( v ) 5 , 6 - ジヒドロ - 5 - フルオロウラシルとの 3 % 未満の交差反応性。

#### 【0100】

一定の他の実施形態において、抗体は、5 - F U および / または別の分子に結合体化している 5 - F U を選択的に結合し、ならびに ( i ) ~ ( v ) の特性のすべてを有する。さらに他の実施形態において、抗体は、5 - F U および / または別の分子に結合体化している 5 - F U を選択的に結合し、ならびに競合アッセイにおけるウラシルとの 3 % もしくはそれより小さい交差反応性および競合アッセイにおけるチミンとの 3 % 未満の交差反応性、両方を有する。

#### 【0101】

本開示の一部の抗体は、競合アッセイにおいてウラシルとの < 2 . 5 %、< 2 %、< 1 . 5 % または < 1 % 交差反応性を有し得る。詳細には、一部の抗体は、競合アッセイにおいてウラシルとの 0 . 8 1 % 以下、1 . 4 % 以下、または 2 . 4 % もしくはそれより小さい交差反応性を有し得る。他の抗体は、競合アッセイにおいてチミンとの < 2 . 5 %、< 2 %、< 1 . 5 % または < 1 % 交差反応性を有し得る。本開示のさらに他の抗体は、競合アッセイにおいて 5 , 6 - ジヒドロ - 5 - フルオロウラシルとの < 2 . 5 %、< 2 %、< 1 . 5 % または < 1 % 交差反応性を有し得る。一定の抗体は、競合アッセイにおいてテガフルとの > 1 2 %、> 1 3 %、> 1 5 %、> 1 7 . 5 %、> 2 0 %、> 2 5 %、または > 3 0 % 交差反応性を有し得る。

#### 【0102】

本開示は、5 - F U および / または別の分子に結合体化している 5 - F U を結合する単離された抗体またはその断片であって、前記抗体が、重鎖および軽鎖を含み、その重鎖アミノ酸配列が配列番号 3、4 および 5 を含み、ならびにその軽鎖アミノ酸配列が配列番号 7、8 および 9 を含むものである、抗体またはその断片を提供する。一定の実施形態において、重鎖アミノ酸配列は、配列番号 2 を含み、および / または軽鎖アミノ酸配列は、配列番号 6 を含む。一部の実施形態において、重鎖アミノ酸配列は、配列番号 2 のアミノ酸 2 0 - 4 7 7 を含み、および / または軽鎖アミノ酸配列は、配列番号 6 のアミノ酸 2 1 - 2 3 4 を含む。さらに他の実施形態において、抗体またはその断片は、モノクローナル抗

体、ヒト化抗体、キメラ抗体、一本鎖Fv ( s c F v )、F a b断片、F ( a b ' )断片、および合成抗体からなる群より選択される。

【0103】

本開示の一部の実施形態において、抗体は、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つまたは少なくとも6つの、本明細書に開示するCDR、例えば、配列番号3～5および7～9を有することがある。本開示の一定の実施形態は、5-FUおよび/または別の分子に結合体化している5-FUに特異的に結合する抗体であって、本明細書に記載される可変重鎖(VH)CDRおよび/または可変軽鎖(VL)CDRの誘導体を含むものである抗体を含む。当業者に公知の標準的技法を用いて、本発明の抗体をコードしているヌクレオチド配列に突然変異(例えば、付加、欠失および/または置換)を導入することができ、前記標準的技法には、アミノ酸置換を生じさせるために慣例的に用いられる部位特異的突然変異誘発およびPCR媒介突然変異誘発が含まれる。一定の実施形態において、前記VHおよび/またはVL CDR誘導体は、元のVHおよび/またはVL CDRと比較して25未満のアミノ酸置換、20未満のアミノ酸置換、15未満のアミノ酸置換、10未満のアミノ酸置換、5未満のアミノ酸置換、4未満のアミノ酸置換、3未満のアミノ酸置換、または2未満のアミノ酸置換を含み得る。あるいは、突然変異をVHおよび/またはVL CDRコーディング配列のすべてまたは一部に沿ってランダムに、例えば飽和突然変異誘発によって、導入することができ、結果として生ずる突然変異体を生物学的活性についてスクリーニングして、活性を保持する突然変異体を同定することができる。突然変異誘発後、コードされている抗体を発現させることができ、その抗体の活性を決定することができる。

10

20

【0104】

本開示の抗体は、適切な免疫化スケジュール(例えば、下の実施例において説明するもの)に従ってB a l b / cマウスを免疫化し、その後、腹腔内(i p)または静脈内(i v)注射によりおおよそ100 μLから200 μLの免疫原をそのマウスに注射することによって、生産することもできる。当業者に周知の他のプロトコルも利用できることを企図している。本明細書に記載する免疫化方法は、5-FU抗体に対する所望の血清抗体応答を生じさせることができる。

【0105】

その後、マウスB細胞ハイブリドーマを生成するための標準的な融合プロトコルに従って融合を行うことができる。本開示の所望のモノクローナル抗体を産生できるハイブリドーマは、B細胞リンパ球を骨髄腫細胞などの不死細胞系と融合させることによって得る。例えば、マウス骨髄腫細胞を、上で説明したものなどの免疫原で免疫化したマウスからの脾細胞と融合させることができる。それらの細胞を、ハイブリドーマが出現するまで、播種することができる。そのハイブリドーマの上清を、クローニングに使用することとなる所望の陽性細胞の免疫グロブリン生産について、公知の技法を用いてモニターすることができる。その後、公知の手順に従って、所望のクローンを増幅させることができ、モノクローナル抗体を採取することができる。

30

【0106】

5-FU抗体の細胞系を生産できる3つの例示的ハイブリドーマが、36H11、27F9および72B9と呼ばれる細胞系で、2012年11月12日にAmerican Type Culture Collection (A.T.C.C.、アメリカ合衆国20110-2209、バージニア州マナッサス、University Blvd. 10801)に寄託された。36H11のA.T.C.C.受託番号は、\_\_\_\_\_であり、27F9のA.T.C.C.受託番号は、\_\_\_\_\_であり、および72B9のA.T.C.C.受託番号は、\_\_\_\_\_である。これら3つの寄託ハイブリドーマの各々は、マウス骨髄腫細胞系P3X63Ag8.653(ATCC)と融合しているB a l b / cマウス脾細胞に由来した。これらの寄託物は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の条項に従って管理されることになる。

40

【0107】

50

## 5 - F U アッセイ

上で詳細に説明した抗体を本開示のアッセイにおいて使用することができる。一定の例示的实施形態において、本開示は、試料（例えば、血漿または血清）中の5 - F Uを検出および測定でき、かつ広いダイナミックレンジにわたり結果を提供できるアッセイを提供する。本開示のアッセイは、融合中および/または5 - F Uプロドラッグの経口投与後の5 - F Uのモニタリングを可能にすることができる。本開示は、D P D欠損症または他のクリアランス問題のために5 - F Uに過剰曝露された患者の同定に用いることができるアッセイも提供する。加えて、効力の改善および副作用の減少をもたらし得る個別化5 - F U処置に本開示のアッセイを用いることができる。一部の实施形態では、式（1）の化合物および本開示の抗体を、本明細書に提供するアッセイにおいて使用することができる。

10

### 【0108】

本開示の一部の实施形態は、試料中の5 - フルオロウラシル（5 - F U）を検出する方法であって、（i）少なくとも前記試料と第一の結合分子およびディテクター分子を溶液中で併せる工程を含む方法も提供し、ここで、前記第一の結合分子は、前記ディテクター分子を結合し、5 - F Uは、前記第一の結合分子の前記ディテクター分子への結合を競合的に阻害する、および/または前記第一の結合分子の前記ディテクター分子への結合と競合する。前記方法は、（ii）前記第一の結合分子の前記ディテクター分子への結合を検出する工程も含む。一部の实施形態において、前記方法は、試料をD P D阻害剤と接触させる工程をさらに含む。前記試料を結合分子とインキュベートする前におよび/もしくはインキュベートする間に、または前記アッセイ中の任意の時点で、その試料をD P D阻害剤と接触させることができる。

20

### 【0109】

一部の实施形態において、前記試料は、ヒトなどの哺乳動物からの血清試料であり得る。

### 【0110】

一定の实施形態において、前記結合分子は、上で説明したものなどの抗体であり得る。本開示の他の实施形態において、結合分子（例えば、第一の結合分子）は、凍結乾燥組成物からのものであり得、および/またはディテクター分子は、凍結乾燥組成物からのものであり得る。さらに他の实施形態において、結合分子およびディテクター分子を、別々の組成物中で凍結乾燥させることができる。例えば、一部のアッセイ形式は、前記試料と結合分子をディテクター分子の添加前に併せる、または3つすべてを本質的に同時に併せる場合により良好に作用することができる。一定の实施形態において、ディテクター分子および結合分子は、前記試料が存在しない限り、同じ溶液中にはない。一部の状況では、ディテクター分子と結合分子を試料の添加前に溶液中で併せないほうがよい。他の实施形態では、（第一の）結合分子と試料をディテクター分子の添加前に併せる。例えば、試料と第一の結合分子とを含む溶液をディテクター分子の添加前に一定期間インキュベートしてもよい。

30

### 【0111】

前記アッセイの一部の实施形態では、結合分子もしくはディテクター分子または両方を含有する凍結乾燥組成物を前記試料で再水和する。この实施形態は、前記試料がそのアッセイ中に本質的に希釈されず、その結果、希釈された試料と比較して、同じ体積の未希釈試料中により多くの5 - F Uが存在するため、より高レベルの感度をもたらすことができる点で有利である。一部の实施形態では、試料を結合分子と併せる前に希釈する。一部の实施形態では、試料を結合分子と併せる前に希釈しない。

40

### 【0112】

本開示のアッセイの例示的实施形態において使用する成分/試薬を、標準的な凍結乾燥方法を用いて凍結乾燥させることができる。例えば、前記成分および試薬を、所望の成分（単数または複数）、例えばディテクター分子または結合成分、を含有する溶液を作ることによって凍結乾燥させることができる。その後、その溶液を使用して液滴を形成することができる、それらの液滴を凍結媒体（例えば、液体窒素）に落下させ、典型的には凍結し

50

た球体を形成させ、その後、それらの凍結した球体またはペレットを凍結乾燥させる。

【0113】

他の例示的实施形態では、第一の結合分子を本開示のアッセイまたは方法中に表面に結合させる。この結合は、第一の結合分子を試料と接触させる前または接触させた後に行うことができる。前記第一の結合分子を表面に直接（例えば、共有結合で）または間接的に（例えば、結合ペアを使用して）結合させることができる。適する結合パートナーの例としては、ビオチン/ストレプトアビジン；抗体/抗原；抗体/Fc受容体；第一の種の抗体と、第一の種の抗体に対する第二の種の抗体；Fc/Fc受容体；ポリA/オリゴdT；6-His/Ni<sup>2+</sup>；6-His/コバルト；6-His/二価カチオン樹脂；相補的DNA鎖；リンホトキシン-アルファ（LT-アルファ）/LT-アルファ受容体；リンホトキシン-ベータ（LT-ベータ）/LT-ベータ受容体；T細胞抗原gp39（CD40L）/CD40；CD30L/CD30；FASL/FAS；4-1BBL/4-1BBL受容体；OX40L/OX40L受容体；およびTNF関連アポトーシス誘導性リガンド（TRAIL）/TRAIL受容体が挙げられるが、これらに限定されない。一定の例示的实施形態において、結合パートナーを結合する結合ペアは、ストレプトアビジンおよびビオチン、または互いに結合する2つの抗体、例えば、別の抗体のFc部分を結合する抗体であり得る。他の実施形態では、第一の結合分子を多数の結合ペアの相互作用によって表面に結合させることができる。さらに他の実施形態では、結合分子および表面は、各々、結合ペアの対応するメンバーであり得る。例えば、直接または間接的に表面に結合している結合分子をもたらず本質的に任意の方法を使用できることを企図している。一部の实施形態では、第一の結合分子がビオチンを含み、表面がストレプトアビジンを含む、または第一の結合分子がストレプトアビジンを含み、表面がビオチンを含む。

10

20

【0114】

一定の例示的实施形態では、第一の結合分子および試料を一定期間インキュベートし、その後、その第一の結合分子を表面に結合させる、本発明のアッセイまたは方法を行うことができる。他の実施形態では、第一の結合分子を試料と接触させる前に表面に結合させる。本開示の一部の例示的实施形態は、表面（例えば、ビーズ）に結合させた第一の結合分子を凍結乾燥状態で提供する。

【0115】

本開示のアッセイおよび方法において使用する試料は、例えば、患者からの血漿または血清であり得る。

30

【0116】

本開示の適する表面の例としては、ビーズ、プレート、ガラス表面（例えば、スライドガラスもしくはガラスビーズ）、プラスチック表面、金属表面、ポリスチレン表面（例えば、ビーズもしくはプレート）、ニトロセルロース表面、またはナノ粒子表面が挙げられるが、これらに限定されない。例示的实施形態において、前記ビーズは、常磁性ビーズ、例えば、Invitrogenから入手できるもの、例えばM270およびM280関連ビーズであり得る。

【0117】

本開示のディテクター分子は、第一の結合分子を結合する、および5-FUが第一の結合分子へのディテクター分子の結合を競合的に阻害するものであり得る。したがって、一定の例示的实施形態において、ディテクター分子は、検出可能な標識を有する場合があります、その標識を本明細書では検出標識とも呼ぶ。一部の实施形態において、本開示のアッセイまたは方法は、非標識ディテクター分子と、検出標識を有する第二の結合分子とを使用し、ここで、前記第二の結合分子は、前記ディテクター分子を結合するが、前記ディテクター分子の第一の結合分子への結合を実質的に阻害しない、または前記ディテクター分子の第一の結合分子への結合と実質的に競合しない。例えば、前記ディテクター分子を直接標識せず、検出標識を有する第二の結合分子への結合の結果として間接的に標識する。

40

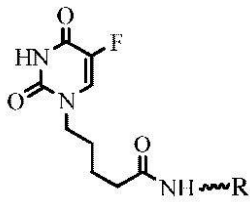
【0118】

本開示の一定の例示的实施形態において、ディテクター分子は、式：

50

【 0 1 1 9 】

【 化 1 2 】

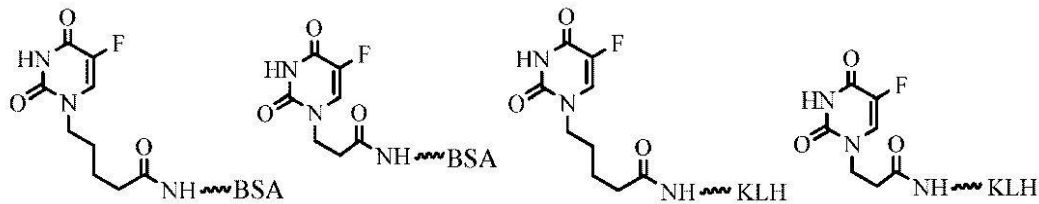


を有し、この式中の R は、タンパク質および / または検出標識を含む。一部の実施形態において、R は、1 つ以上の検出標識に結合されるタンパク質であり得る。一部の例示の実施形態において、ディテクター分子は、以下：

10

【 0 1 2 0 】

【 化 1 3 】



のうちの 1 つであり得る。

20

【 0 1 2 1 】

本開示の例示の実施形態では、1 つ以上の検出標識をディテクター分子に付着させる、例えば、BSA または KLH タンパク質に付着させることができる。本開示のディテクター分子の適する例は、下の実施例 15 において説明するものも含む。

【 0 1 2 2 】

有利には、本開示の抗体および / またはアッセイは、非常に低濃度の 5 - FU の検出を可能にすることができる。例えば、前記アッセイは、5 - FU について、血清または血漿などの試料中、 $< 5.0 \text{ ng/mL}$  ;  $< 10.0 \text{ ng/mL}$  ;  $< 25.0 \text{ ng/mL}$  ;  $< 35 \text{ ng/mL}$  ;  $< 50 \text{ ng/mL}$  ;  $< 100 \text{ ng/mL}$  ;  $< 150 \text{ ng/mL}$  ; または  $< 200 \text{ ng/mL}$  の検出下限を有することができる。本開示の一部のアッセイは、10 ~ 30,000 ng/mL のダイナミックレンジを有する。

30

【 0 1 2 3 】

本開示は、試料中の 5 - FU の検出に比較的短い期間しか要しない方法も提供する。例えば、本開示の一部のアッセイまたは方法は、試料中の 5 - FU を検出することができ、結合分子が試料に接触する時から始まって 3、5、7、10、12、15、20、30、45 または 60 分未満で完了することができる。

【 0 1 2 4 】

本開示において使用する検出標識は、アッセイ形式と適合性であるものであり得、電気化学発光標識、酵素標識、フルオロフォア、ラテックス粒子、磁性粒子、放射性元素、リン光色素、色素結晶子、金粒子、銀コロイド粒子、セレンコロイド粒子、金属キレート、補酵素、電気活性基、オリゴヌクレオチドおよび安定なラジカルを含むが、これらに限定されない。適する金属キレートの例としては、ルテニウムまたはオスミウム金属キレート（例えば、米国特許第 5,310,687 号を参照のこと）が挙げられるが、これらに限定されない。適する酵素標識としては、ホースラディッシュペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に記載する一部のアッセイ形式では、「TAG」または「TAG Plus」を例示的なタイプの検出標識として使用する。しかし、任意の適合性標識タイプがこれらのアッセイにおいて使用され得ることを企図している。

40

【 0 1 2 5 】

本開示のアッセイ形式と適合性である任意のアッセイタイプ、例えば、電気化学発光（

50

ECL) アッセイまたは酵素結合イムノソルベント検定法 (ELISA) アッセイを用いて、本開示のアッセイを行うことができることをさらに企図している。ECLアッセイは、より安定したアッセイ技法であり、それらはより高い感度を生じ、より広いダイナミックレンジ (低~高) を有するので有利である。

【0126】

ECLアッセイの概説は、Mathewら (Kathmandu University Medical Journal, 2005, 3: 91 - 93) およびForsterら (Annu Rev Anal Chem, 2009, 2: 359 - 85) に提供されている。ECLを検出に用いることができる。ECLまたは電気発生化学発光は、電気化学反応が、光を放出する化学発光反応に先行する形態の化学発光である。

10

【0127】

本発明の一部のECLベースのアッセイは、組み込まれた電極を有する表面に結合もしくは付着しているまたは結合もしくは付着させることができる結合分子 (捕捉剤) の使用を含む捕捉工程と、ECL標識に直接的にまたは間接的にカップリングさせた検出分子を使用する検出工程とを含み得る。ECL標識は、電気化学反応によって刺激された化学発光反応から発生される発光を提供する、例えば、米国特許第5,068,088号、同第5,093,268号、同第5,061,445号、同第5,238,808号、同第5,147,806号、同第5,247,243号、同第5,296,191号、同第5,310,687号、同第5,221,605号および同第6,673,533号を参照のこと。ECL標識は、一般に、TAGとも呼ばれる。通常使用されるECL標識としては、Ru含有およびOs含有有機金属化合物、例えば、Ru(2,2'-ビピリジン)<sub>3</sub><sup>2+</sup>部分 (「Rubby」または「TAG1」とも呼ばれる; 例えば米国特許5,238,808号を参照のこと) を含む、金属が例えば第VII族貴金属からのものである有機金属化合物が挙げられるが、これらに限定されない。また、TAG1およびRubbyの誘導体をECL標識として使用することができる。ECLベースの検出システムは、電気的ポテンシャルを利用して、ECL標識を励起させて、光を放出する。一部の実施形態では、検出方法中にシュウ酸塩またはトリプロピルアミンなどの分子を添加し、それにより化学反応が促進され、その結果、ECL標識から測定可能な光が放出される。

20

【0128】

ECLを使用する一定の例示的实施形態では、ピオチンおよび/またはルテニウム (例えば、BV-TAG PlusまたはBV-TAG) 修飾タンパク質 (例えば、抗体) 結合体の調製物を使用し、例えば、NHS-エステルピオチンおよびBV-TAG Plus NHSエステルまたはBV-TAG NHSエステルを使用する第一級アミン基 (-NH<sub>2</sub>) の修飾によってその調製物を得ることができる。一部のECL分析器は、電圧を印加したときに (例えば、フローセル内の) その白金電極上のルテニウムにカップリングされた常磁性ビーズから放出される光を検出する。光ダイオード検出器を使用して光を検出し、その強度は、ビーズ表面のルテニウム標識の量に比例する。

30

【0129】

本開示の一部の実施形態において、検出方法 (例えば、ECLベースの方法) は、洗浄工程を、例えば、結合分子の添加後、試料の添加後、またはディテクター分子の添加後に含むことがある。一部の実施形態では、洗浄工程を前記検出方法の各工程後に行う。他の実施形態では、洗浄工程を検出前に最終工程として行い、さらに他の実施形態では、それが唯一の洗浄工程である。洗浄工程を用いて、あらゆる未結合分子/成分、例えば、捕捉結合分子、試料の成分/分子、または標識された検出分子を除去するまたは洗い流すことができる。洗浄工程は、典型的には洗浄緩衝液を使用して行う。一部の実施形態において、洗浄緩衝液としては、界面活性剤、酸、塩基性塩溶液、またはこれらの任意の組み合わせが挙げられる。

40

【0130】

加えて、アッセイ試薬、例えば、緩衝液 (例えば、試料緩衝液) および/または洗浄緩衝液は、例えば、100 mMリン酸ナトリウム (pH 7.1); 150 mM塩化ナトリウ

50

△ (NaCl) ; 0.03% Tween - 20 ; 0.05% Proclin 300 ; 0.5% ウシ血清アルブミン (BSA) ; 0.025 mg/mL HRB1 ; 0.5% ウシIgG (BG G) ; 0.05 mg/mL MAK - 33 IgG Poly ; 15% トレハロース ; および 2% PEG を含有する試料緩衝液中に、さらなる分子を含有することがある。

#### 【0131】

本開示の方法において使用する試料は、患者からのものであり得、前記方法は、その試料中で検出された 5 - FU の量に基づいて患者の 5 - FU 用量を調整する工程をさらに含み得る。例えば、最良の処置転帰 (treatment outcome) をもたらす結果となる患者の血清 / 血液中の 5 - FU の範囲は公知であるか、または決定することができるので、処置を最適化するように患者に与える用量を調整することができる。

10

#### 【0132】

一部の実施形態において、前記アッセイまたは方法は、Gly - Pro - Arg - Pro アミド (GPRP - NH<sub>2</sub> ; 配列番号 1) の使用を含む。他の実施形態では、ビーズを使用するものなどの特定のアッセイタイプまたは形式に干渉し得るフィブリンネットワークの形成を阻止するために、GPRP - NH<sub>2</sub> (配列番号 1) を使用する。

#### 【0133】

本開示の方法またはアッセイの一定の例示的实施形態は、小体積の試薬を使用して、ならびに一部のケースでは凍結乾燥された第一の結合分子および / もしくはディテクター分子または両方を使用して、小さい試料体積で 5 - FU を有利に検出することができる。これらの特徴が、前記方法またはアッセイのポイント・オブ・ケア設定での使用を可能にし得る。

20

#### 【0134】

本開示の結合分子は、所望の部位に結合することができる分子であり、抗体、ペプチド、レクチン、アプタマーおよびモノボディー (ADNECTINS (商標) としても公知) を含むが、これらに限定されない。

#### 【0135】

##### キット

本開示は、様々なキットに一般に関する。前記キットは、前記アッセイまたは方法において使用することができる化合物または試薬、例えば結合分子およびディテクター分子を含み、前記結合分子は抗体であり得る。前記抗体は、本開示に記載するものを含み得る。前記ディテクター分子は、検出標識、例えば ECL 標識を含み得る。一部の実施形態において、前記結合分子および / または前記ディテクター分子は、凍結乾燥状態である。他の実施形態において、前記結合分子およびディテクター分子は、別々に凍結乾燥された組成物に含有される。

30

#### 【0136】

本開示は、試料中の 5 - FU を検出するための ECL 検出キットにも、一般に関する。一部の実施形態において、キットは、(i) 表面 (例えば、ビーズ) に必要に応じて固定化または結合されている結合分子 (例えば、抗体) と、(ii) 標識されたディテクター分子とを含み、前記結合分子は、前記ディテクター分子に結合することができ、および 5 - FU は、前記結合分子の前記ディテクター分子への結合を競合的に阻害する。一部の実施形態では、前記キットを可搬型 ECL 分析器と併用することができる。使用することができる ECL 分析器の例としては、M - SERIES (登録商標) MIM 分析器 (Bio Veris、メリーランド州ゲーサーズバーグ) および Meso Scale Discovery の Sector Imager 6000、Sector Imager 2400、Sector PR 400 および Sector PR 100 が挙げられるが、これらに限定されない。

40

#### 【0137】

本明細書に記載する任意の方法または組成物を本明細書に記載する任意の他の方法または組成物について実行できることを企図している。特許請求の範囲および / または本明細

50

書において用語「含むこと (comprising)」に関連して用いるときの語「a」および「an」の使用は、「1つの」を意味し得るが、「1つ以上の」、「少なくとも1つの」および「1つまたは1つより多くの」とも一致する。リストに伴って用いるときの用語/句「および/または」の使用は、リストされている用語の1つ以上を利用できることを意味する、例えば、それはそれらの要素の1つまたはすべてに限定されない。

【0138】

本明細書において用いる場合、移行句「含むこと (comprising)」は、非限定的である。この用語を用いている請求項は、かかる請求項の中で列挙されているものに加えて要素を含有し得る。したがって、例えば、特許請求の範囲は、列挙されている要素またはそれらの等価物が存在する限り、そこに具体的に列挙されていない他の段階も含む方法を包含し得る。

10

【0139】

本明細書中の参考文献の引用または論述は、そのようなものが本発明の先行技術であるという承認と解釈してはならない。本明細書において言及するすべての出版物、特許および特許出願は、本願では、各々の個々の出版物、特許または特許出願が参照により本明細書に援用されていると具体的にかつ個々に示されているのと同程度にそれら全体が参照により本明細書に援用されている。上述の出版物、特許および特許出願のいずれかと共に発表された任意の補足情報も参照により援用されている。例えば、一部の雑誌論文は、概してオンラインで入手できる補足情報とともに発表される。

20

【実施例】

【0140】

以下の実施例は、非限定的でありかつ単に説明のためであることを意図したものである。

【0141】

本発明の特定の実施形態を、説明を目的として本明細書に記載してきたが、添付の特許請求の範囲に記載の本発明から逸脱することなく、それらの詳細の非常に多くの変形が可能であることは当業者には理解されるであろう。

【0142】

ここに記載する実施例の一部またはすべてを通して、以下の材料および装置を使用した：

30

ウシ血清アルブミン (BSA) (Roche Diagnostics); Tween (登録商標) 20 (Sigma); 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン塩酸塩 (MIT) (Sigma); Amicon Ultra 30Kフィルタ (15mL) (Millipore); Slide-A-Lyzer (登録商標) 透析カセット (Thermo Scientific); フロイントアジュバント、不完全および完全 (Sigma); BV-TAG Plus NHSエステル (BioVeris); EZ-Link Sulfo-NHS-LC-ビオチン (Thermo Scientific); Dynabeads M280-SA (Invitrogen); Megathura crenulata (キーホールリンペット) からのヘモシアニン KLH (Sigma); Pierce Protein A Plus Agarose (Thermo Science); 5-フルオロウラシル (5-FU) およびウラシル (Sigma); 5-フルオロジヒドロピリミジン-2, 4-ジオン (DH-5-FU) (Medical Isotopes); フトラフル (テガフル) (Acros Organics); ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (1x) (Invitrogen); UltraDOMA無血清ハイブリドーマ培地 (Lonza); Pierce (登録商標) Rapid Isotyping Kits-Mouse (Thermo); OPI培地サプリメント-Hybri-Max (商標) (Sigma); ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 Hybri-Max (商標) (pen/strep) (Sigma); IL-6組換えマウス (Invitrogen); ウシ胎仔血清、超低IgG (Invitrogen); ウシ胎仔血清 (ATCC); 規定された (defined) ウシ胎仔血清 (HyClone)

40

50

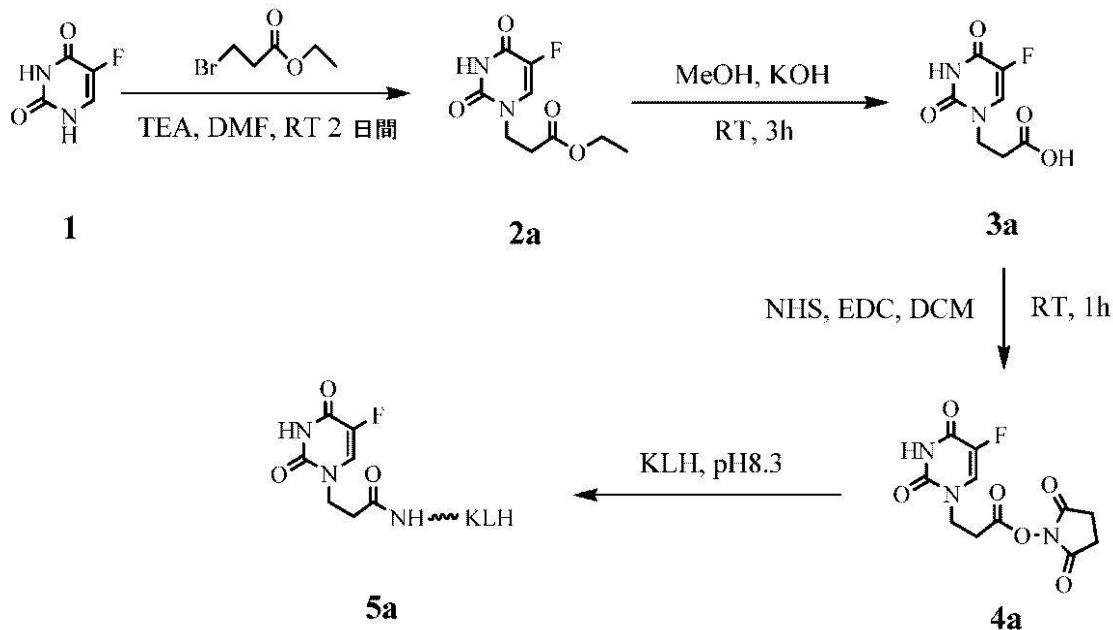
e) ; L - グルタミン 200 mM ( Lonza ) ; L - グルタミン - 200 mM ( Invitrogen ) ; HT サプリメント ( 100x ) 、液体 ( Invitrogen ) ; HAT サプリメント ( 50x ) 、液体 ( Invitrogen ) ; ハイブリドマ・クロニング・サプリメント ( PAA Laboratories Inc ) ; ジメチルスルホキシド - Hybri - Max ( 商標 ) ( Sigma ) ; ポリエチレングリコール 1500 ( Roche Applied Science ) ; トリパンブルー溶液 - 0.4% ( Sigma ) ; P3X63Ag8.653 ( ATCC ) ; 赤血球溶解緩衝液 Hybri - Max ( 商標 ) ( Sigma ) ; M384 分析器 ( BioVeris ) ; および M1MR 分析器 ( BioVeris ) 。

【0143】

実施例 1 5 - FU に基づく免疫原の合成

【0144】

【化14】



上に提示したスキームを用いて、本開示の例示的な 5 - FU に基づく免疫原の 1 つを合成した。このスキームについての工程は、次のとおりである：

[ 2 a ] 16 mL のジメチルホルムアミド ( Sigma - Aldrich 、 Cat # 27056 - 100 mL ) 中の 5 - フルオロウラシル ( [ 1 ] 、 1.8 g 、 Sigma - Aldrich 、 Cat . # 858471 - 5 G ) の溶液をトリエチルアミン ( 2.8 g 、 Sigma - Aldrich 、 Cat # T0886 - 1 L ) と混合し、30 で攪拌した。上の混合物にエチル - 3 - プロモプロピオナート ( 2.95 g 、 Sigma - Aldrich 、 Cat # 128163 - 25 G ) を滴下した。得られた混合物を 48 時間、室温で攪拌した。溶媒を減圧下で除去した。残留物を水で取りあげ、酢酸エチル ( 3 × 100 mL ) で抽出した。併せた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濃縮した。その生成物を、フラッシュカラムによりジクロロメタン中の 1 ~ 3 % メタノールを利用して精製した。所望の生成物をジクロロメタン / ヘキサンから再結晶させて、2.3 g の化合物を得た。

【0145】

[ 3 a ] 4 mL のメタノール ( Sigma - Aldrich 、 Cat # 322415 - 2 L ) 中の [ 2 a ] ( 220 mg ) の溶液に、20% 水酸化カリウム ( EMD 、 Cat # PX1480 - 11 ) 水溶液 ( 0.4 mL ) を添加した。得られた混合物を室温で 12 時間攪拌し、濃縮した。残留物を 10 mL の水で取りあげ、2 N HCl 溶液で pH 2 ~ 3 に調整した。その混合物を酢酸エチル ( 3 × 20 mL ) で抽出した。有機相を併せ、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濃縮して 198 mg の化合物を得た。

## 【0146】

[4a] 20 mL のジクロロメタン (Sigma - Aldrich、Cat # 270997 - 1L) 中の [3a] (198 mg) と N - ヒドロキシスクシンイミド (260 mg、Sigma - Aldrich、Cat # 220051 - 5G) との混合物に、の 1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノ) プロピルカルボジイミド (900 mg、Sigma - Aldrich、Cat. # E7750 - 25G) を添加した。得られた混合物を 1.5 時間、室温、アルゴン下で攪拌した。得られた混合物を 0.05 N HCl (20 mL)、水 (2 x 20 mL) で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濃縮して 67 mg の化合物を得た。

## 【0147】

[5a] キーホールリンペットヘモシアニン (KLH) の 1 - 3C - 5 - FU - NHS エステルでの修飾。KLH を先ず 15 mL Amicon Ultra 30 K フィルタで濃縮し、緩衝液を、10.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  と 139.5 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  と 150.6 mM NaCl とを含有するリン酸緩衝食塩水、pH 7.7 ~ 7.9 (典型的には pH 7.8) に交換した。その後、KLH を、DMSO に新しく溶解した 1 - 3C - 5 - FU - NHS を 100 : 1 の負荷比 (1 - 3C - 5 - FU - NHS の KLH に対するモル比、FW = 150 kD) で用いて修飾した。修飾後、1 - 3C - 5 - FU - KLH を透析カセットで緩衝液交換し、1 x PBS 中、-80 で保存した。

## 【0148】

実施例 2 Balb/c マウスの免疫化 (1 - 3C - 5 - FU - KLH 結合体を使用するマウスにおける 5 - FU 抗体の生産)

初回免疫化および追加免疫化のためにそれぞれ完全フロイントアジュバント (CFA) および不完全フロイントアジュバント (IFA) に 1 - 3C - 5 - FU - KLH を乳化させることによって、5 - FU 免疫原を調製した。ボルテックスミキサーをその最高速度で用いて 15 分間、抗原とアジュバントを混合することによって、エマルジョンを調製した。

## 【0149】

Balb/c マウスを免疫化するために、8 匹のマウス各々に、その初回免疫化については 200  $\mu\text{L}$  中に 50  $\mu\text{g}$  タンパク質と CFA とを含有する 200  $\mu\text{L}$  の免疫原を腹腔内 (IP) 注射によって与え、そして追加免疫化については 25  $\mu\text{g}$  タンパク質と IFA を 200  $\mu\text{L}$  で背部の複数の位置への皮下接種によって与えた。初回免疫化に関しては第 1 日に腹腔内 (IP) 注射として 1 - 3C - 5 - FU - KLH (フロイントアジュバント、完全) を用いてマウスを免疫化した。第 1 回から第 4 回の追加抗原量をそれぞれ第 15、29、56 および 83 日に皮下投与し、この時、1 - 3C - 5 - FU - KLH (フロイントアジュバント、不完全) でマウスを免疫化した。

## 【0150】

実施例 3 マウスにおける抗 5 - FU 抗体応答の分析

この実施例は、5 - FU および関連化学物質に対する血清 5 - FU 抗体応答および抗体特異性の分析を記載する。

## 【0151】

血清試料を第 2 回の追加免疫化後に採取し、1 x PBS と 0.5% の BSA と 0.3% Tween (登録商標) 20 と 0.1% MIT とを含有する抗体アッセイ緩衝液または 5 - FU 抗体スクリーン緩衝液の様々な希釈度で分析した。血清試料を「架橋アッセイ (bridging assay)」によって分析し、このアッセイでは抗 5FU 抗体の存在が免疫複合体を生じさせ、この免疫複合体は、Bi - 1 - 3C - 5 - FU - BSA、5 - FU 抗体および TAG Plus - 1 - 3C - 5 - FU - BSA を含有し、前記抗 5 - FU 抗体の一方の結合部位への Bi - 3C - 5 - FU - BSA の結合および前記抗体の他方の結合部位への TAG Plus - 1 - 3C - 5 - FU - BSA の結合によって形成される。この免疫複合体を、前記 Bi - 1 - 3C - 5 - FU - BSA に結合している M280 - SA ビーズにより捕捉することができ、それによってその M280 - SA ビーズに T

10

20

30

40

50

AG Plus 標識を連結させることができる。

【0152】

200 µg/mL の M280-SA ビーズ中の 100 ng/mL の Bi-1-3C-5-FU-BSA と 100 ng/mL の TAG Plus 1-3C-5-FU とを含有する 5-FU 抗体アッセイ試薬マスターミックスを用いて希釈試料を試験した。典型的な実験では、血清試料を先ず前記アッセイ緩衝液で所望の希釈度に希釈し、25 µL の希釈血清試料を 50 µL の抗体検出マスターミックスと混合し、30 分間、96 ウェルプレートにおいて振盪しながらインキュベートした。そのインキュベーション後、>2 分間にわたりそのプレートにプレート磁石 (Life Sep (商標) 96F、Dexter Magnetic Technologies Inc.、60007 イリノイ州エルク・グロープ・ビレッジ) を付着させ、プレートを素早く反転させて反応マトリックスを除去することにより、M280-SA ビーズを回収した。回収した M280-SA ビーズを 150 µL 希釈液に再懸濁させた。この希釈液は、1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> と、10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> と、120 mM NaCl と、2.7 mM KCl と、0.033% Tween 20 と、0.10% KATHON (登録商標) CG/ICP II (Cat: 48178-U、Sigma、ミズーリ州セントルイス) とを含有する PBS 系緩衝溶液である。M1MR または M384 ECL 分析器のいずれかにおいて 96 ウェル標準プロトコルを用いて 100 µL 吸引体積で前記試料の ECL シグナル (ECL カウント) を読取った。

10

【0153】

競合抗体アッセイ形式を用いて抗体特異性をさらに分析した。これらのアッセイを 5-FU および 5-FU と構造的に関連する他の化学物質の存在下で行った。

20

【0154】

二匹のマウスを、それらの抗 5-FU 血清力価、5-FU に対する特異性、ならびにウラシルおよび 5-フルオロジヒドロピリミジン-2,4-ジオン (DH-5-FU) に対する交差反応性に基いて、ハイブリドーマ融合のために選択した。

【0155】

実施例 4 Balb/c マウスの免疫化 (1-3C-5-FU-KLH および 1-5C-5-FU-KLH 結合体を使用するマウスにおける 5-FU 抗体の生産)

初回免疫化および追加免疫化のためにそれぞれ完全フロイントアジュバント (CFA) および不完全フロイントアジュバント (IFA) 中で 5-FU-KLH 結合体 1-3C-5-FU-KLH および 1-5C-5-FU-KLH を乳化させることによって、5-FU 免疫原を調製した。ボルテックスミキサーをその最高速度で 15 分間、抗原とアジュバントを混合することによって、またはその混合物を乳化針 (emulsifying needle) に 50 回より多く通過させることによって、エマルジョンを調製した。

30

【0156】

5~6 週齢メス Balb/c マウスに、典型的には、1 回の初回免疫化については 200 µL 中に 50 µg のタンパク質と CFA とを含有する 200 µL の免疫原を腹腔内 (IP) 注射によって与え、そして複数の追加免疫化については 25 µg タンパク質と IFA を 200 µL で背部の複数の位置への皮下接種によって与えた。追加免疫化を典型的には初回免疫化の約 2 週間後に行い、2~6 週間隔で複数回投与した。

40

【0157】

それらのマウスにおけるポリクローナル 5-FU 抗体を分析するために、第 2 回の追加免疫化後に複数の血清試料を採取し、1 × PBS と、0.5% の BSA と、0.3% Tween (登録商標) 20 と、0.1% MIT とを含有する抗体アッセイ緩衝液での様々な希釈度で分析した。5-FU に対して最高の感度を有する抗体応答を発生させたマウスを選択するために、捕捉された 5-FU 特異的抗体を標識抗マウス抗体で検出する典型的な間接的抗体アッセイを含む様々な抗体検出アッセイを用いて、ならびに ELISA および ECL 技術、ならびに ECL ベースの「架橋アッセイ」を用いて、血清試料を分析した。

50

## 【0158】

ECL技術での間接的抗体検出アッセイについては、25 $\mu$ Lの希釈血清試料を、先ず、競合化学物質を有するまたは有さない25 $\mu$ Lのアッセイ緩衝液と混合し、そして次に、5ngの捕捉試薬（これは、前記捕捉試薬は、5 $\mu$ gの常磁性M280-ストレプトアビジンビーズ（M280-SAビーズ）に事前結合された、3炭素リンカーを有するビオチン化1位修飾5-FU BSA結合体（Bi-1-3C-5-FU BSA）または5炭素リンカーを有するビオチン化1位修飾5-FU BSA結合体（Bi-1-5C-5-FU BSA）であった）を含有する25 $\mu$ Lのアッセイ緩衝液と振盪しながら10分間インキュベートした。そのインキュベーション後、M280-SAビーズを150 $\mu$ Lのアッセイ緩衝液で2回洗浄した。各洗浄中にプレート磁石（LifeSep（商標）96F、Dexter Magnetic Technologies Inc.、60007イリノイ州エルク・グローブ・ビレッジ）を付着させることによってビーズを回収した。M280-SAビーズに結合した5-FU特異的抗体を、さらに10分間インキュベートしたアッセイ緩衝液中の100 $\mu$ Lの0.5 $\mu$ g/mL TAG Plus 結合体化ヤギ抗マウスIgG、Fc断片特異的抗体（Jackson ImmunoResearch Lab. Cat: 115-005-071）（TAG Plus GAM）で検出した。そのインキュベーション後、ビーズを1回洗浄し、150 $\mu$ L希釈液に再懸濁させた。この希釈液は、1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>と、10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>と、120mM NaClと、2.7mM KClと、0.033% Tween20と、0.10% KATHON（登録商標）CG/ICP II（Cat: 48178-U、Sigma、ミズーリ州セントルイス）とを含有するPBS系緩衝液である。M1MRまたはM384 ECL分析器のいずれかにおいて96ウェル標準プロトコルを用いて100 $\mu$ L吸引体積で前記試料のECLシグナル（ECLカウント）を読取った。

10

20

## 【0159】

各試料におけるECLシグナルは、捕捉試薬結合ビーズに結合した5-FU抗体に比例し、5-FUおよび5-FUと構造的に関連する化学物質の量に、該抗体が該化学物質に交差反応性である場合、反比例した。5-FUの50%阻害濃度（5-FU IC<sub>50</sub>）を、ECLアッセイの50%減少をもたらす濃度と定義した。曲線フィッティングプログラム（SoftMax Pro GxP v5.2、Molecular Devices Inc.）において連続希釈5-FU曲線において抗体反応性を分析することにより、IC<sub>50</sub>値を計算した。より低い5-FU IC<sub>50</sub>は、より高い5-FU抗体感度を反映する。5-FUと構造的に関連する化学物質の抗体交差反応性を、5-FUのIC<sub>50</sub>と競合化学物質のIC<sub>50</sub>との百分率比と定義した。表1は、5-FUとの5-FUポリクローナル抗体反応性およびテガフルとの交差反応性を要約するものである。

30

## 【0160】

各群における5匹のマウスからの血清試料の同等の部分から成る、2つのプールされた5-FUポリクローナル抗体を、この間接的ECL抗体アッセイでの5-FUに対するそれらの特異性（5-FU IC<sub>50</sub>）およびテガフルとの交差反応性のために選択した。3炭素リンカー5-FU結合体で免疫化したマウスにおいて生じた5-FU抗体は、12.4 $\mu$ g/mLの5-FU IC<sub>50</sub>を有し、これは、5炭素5-FU結合体でのマウスにおける抗体の5-FU IC<sub>50</sub>より実質的に低かった。3炭素リンカー5-FU結合体で免疫化されたマウスは、テガフルとの低交差反応性（16.4%対29.72%）も有し、したがって、5-FU抗体応答を惹起するための好ましい免疫原であった。

40

## 【0161】

## 【表 1】

表1. 5-FUとの5-FUポリクローナル抗体反応性およびテガフルとの交差反応性

1位で修飾された5-FU 結合体のリンカー	5-FU との IC50 (ng/mL)	テガフルとの 交差反応性
3炭素リンカー	12,402	164%
5炭素リンカー	420,138	2972%

10

抗体検出用のより迅速かつ簡便なアッセイである「架橋アッセイ」でも抗体応答を分析した。典型的には、200 µg/mLのM280-SAビーズ中の100 ng/mLのBi-1-3C-5-FU-BSAと100 ng/mLのTAG Plus 1-3C-5-FUとを含有する5-FU抗体アッセイ用試薬マスターミックスを用いて、希釈試料を試験した。典型的な実験では、血清試料を、先ず、アッセイ緩衝液で所望の希釈度に希釈し、25 µLの希釈血清試料を50 µLの抗体検出マスターミックスと混合し、30分間、96ウェルプレートで振盪しながらインキュベートした。そのインキュベーション後、プレート磁石(LifeSep(商標)96F、Dexter Magnetic Technologies Inc.、60007イリノイ州エルク・グローブ・ビレッジ)をプレートに2分未満、付着させ、そのプレートを素早く反転させて反応マトリックスを除去することによって、M280-SAビーズを回収した。回収したM280-SAビーズを150 µL希釈液に再懸濁させた。

20

## 【0162】

実施例5 5-FU抗体産生ハイブリドーマの生成、スクリーニングおよびアイソタイプ決定

組織培養培地、OPI培地サプリメント-Hybri-Max(商標)、を調製するために、1リットルのDMEMに対して10 mL滅菌水(0.2 µm濾過H<sub>2</sub>O)でバイアルの内容物を再構成した。マウスIL-6(mIL-6)の調製のために、希釈ストックをDMEMで100 ng/mLの濃度に調製し、80 で保持した。mIL-6の最終濃度は、10 pg/mLであった。500 mLの「基本組織培養培地」を作るために、390 mL DMEM、5 mL OPI、5 mL Pen/Strep、50 µL mIL-6(100 ng/mL)および50 mL FBSを混合し、0.2 µmフィルタに通して濾過した。HT培地は、1×HTを補足した基本組織培養培地であった。HAT培地は、2×HATと20%のハイブリドーマ・クロニング・サプリメントとを補足した基本組織培養培地であった。細胞凍結培地は、10%ジメチルスルホキシド(DMSO)を補足したFBSから調製した。

30

## 【0163】

融合パートナーの調製では、P3X63Ag8.653細胞を $< 1 \times 10^6$ 細胞/mLに増殖させて、約1億個の細胞を得た。細胞を複数の50 mLチューブの中で、200 gでの3分間の遠心分離によってペレットにした。細胞を50 mLコニカルチューブの中で20 mLの予め温めたDMEM培地で3回洗浄した。

40

## 【0164】

選択されたマウス脾臓を採取し、10 mLの氷冷DMEM中で保存した。1~2 mLの氷冷DMEMが入っている100 mmペトリ皿の中で、滅菌シリンジプランジャの平坦な端部を用いてその脾臓組織を裂いて開き、粉碎した。脾細胞懸濁物を含むDMEMを70 µmセルストレーナに通して濾過した。脾細胞を400 gで5分間の遠心分離によってペレットにした。それらのペレットをほぐし、赤血球(RBC)を1 mLのRBC溶解緩衝液で1分間、溶解した。14 mLの氷冷DMEMを添加した。細胞を400 gで5分間、

50

採取した。10 mLのDMEMを各チューブに、約 $10 \times 10^6$ 細胞/mLの濃度を目標とするように添加した。30  $\mu$ LのDMEMおよび15  $\mu$ Lの0.4%トリパンブルー（最終希釈度 = 1 : 4）中で15  $\mu$ Lの細胞懸濁物を混合し、顕微鏡でカウントすることにより、細胞を顕微鏡でカウントした。

#### 【0165】

脾細胞およびP3X63Ag8.653細胞を50 mLコニカルチューブにおいてDMEM培地中1 : 3から3 : 1の比で混合し、400 gで5分間、遠心分離した。細胞ペレットを乱さないように上清を除去した。そのチューブを穏やかにタッピングし、回旋させることによって、細胞ペレットをほぐした。1.0 mLの37 PEG 1500を、ピペットで穏やかに攪拌しながら1.0分にわたって滴下した。PEGを添加した後、チューブ(tub)にキャップをかぶせ、1.0分間、穏やかに回旋させた。15 mLのDMEMをそのチューブに、5分にわたっての穏やかな滴下で、一滴ずつゆっくりと添加し、その後、37 水浴内で5分間、細胞をインキュベートした。30 mLの温かい基本組織培養培地を穏やかな滴下でゆっくりとそのチューブに添加し、その後、37 水浴内で15分間インキュベートした。その細胞融合懸濁物を400 gで5分間、遠心分離した。上清を除去し、細胞ペレットを50 mL基本組織培養培地に穏やかに再懸濁させた。50  $\mu$ Lの細胞懸濁物を96ウェルプレートの各ウェルに移し、その後、一晚、37、5% CO<sub>2</sub>組織培養インキュベーターの中に置いた。翌日、50  $\mu$ Lの2x HAT培地を各ウェルに添加し、その後、それらのプレートを組織培養インキュベーターに戻した。各ウェルに50  $\mu$ Lの1x HAT培地を第3および7日に添加し、100  $\mu$ Lの1x HT培地を第9から11日に添加した。必要な場合には、新たな培地を添加する前に各ウェル内の一定の体積の培地を除去した。

10

20

#### 【0166】

ハイブリドーマを第10~14日の間、上で説明した5-FU抗体アッセイ（架橋アッセイ）によって5-FU抗体の分泌についてスクリーニングした。25  $\mu$ Lの培養上清をアッセイプレートに移し、200  $\mu$ g/mLのM280-SAビーズ中の100 ng/mLの各Bi-1-3C-5-FU-BSAおよびTAG Plus 1-3C-5-FU-BSAを含有する50  $\mu$ Lの5-FU抗体アッセイ・マスター・ミックスと混合した。試料を30分間、振盪しながらインキュベートした。ビーズを回収し、150  $\mu$ Lの希釈液に再懸濁させ、M384分析器において100  $\mu$ L吸引体積で読取った。20%より多い増殖ウェルを有するプレートから同定されたハイブリドーマを、96ウェルプレートにおいて0.3および1.0細胞/ウェルで制限希釈することによって再クローニングした。

30

#### 【0167】

5-FU結合について陽性と同定されたハイブリドーマに関して5-FU抗体特異性および交差反応性を試験した。ハイブリドーマ培養上清を、抗体特異性および交差反応性について、5-FUおよび他の構造的に類似した化学物質（ウラシル、DH-5-FUおよびテガフルを含む）の存在下での競合アッセイによって試験した。一部の実験では、ハイブリドーマ培養上清を1 : 5の連続希釈で試験して、後続の競合試験のための最適濃度を決定した。

40

#### 【0168】

典型的には、25  $\mu$ Lの培養上清を、競合化学物質を有するまたは有さない200  $\mu$ g/mLのM280-SAビーズ中の100 ng/mLの各Bi-1-3C-5-FU-BSAおよびTAG Plus 1-3C-5-FU-BSAを含有する50  $\mu$ Lの5-FUアッセイ・マスター・ミックスと混合した。試料を30分間インキュベートした。ビーズを回収し、150  $\mu$ Lの希釈液に再懸濁させ、M384分析器において100  $\mu$ L吸引体積で読取った。

#### 【0169】

X<sub>RC</sub>T = 交差反応（算出5-FU濃度 / 10  $\mu$ g/mL）。ハイブリドーマ26H7、27F4、27F9、36H11、49D8、61C6および72B9は、5-FU

50

に対するより良好な特異性を示し（シグナルが低レベルの5-FUの存在下で減少し）、それらを増幅、および制限希釈によるクローニングのために選択した。

#### 【0170】

抗体アイソタイプをPierce Rapid Antibody Isotyping Kit plus Kappa and Lambda-Mouse (Thermo Fisher Scientific)で決定した。ハイブリドーマ細胞系26H7および27F4についてのアイソタイプおよび軽鎖は、決定できなかった。27F9、36H11、49D8および72B9ハイブリドーマについてのアイソタイプは、IgG1であると決定され、すべて、軽鎖を有した。61C6についてのアイソタイプは、IgG2bであり、軽鎖を有した。

10

#### 【0171】

##### 実施例6 5-FU抗体産生ハイブリドーマの生成およびスクリーニング

マウスB細胞ハイブリドーマの生成についての一般的な融合プロトコルに従って融合を行った。選択されたレスポナーからマウス脾臓を採取し、10mLの氷冷DMEM中で保存した。単離された脾細胞とP3X63Ag8.653細胞とをプレーンDMEM培地中1:3から3:1の比で混合することによって融合マウスB細胞を調製し、1%OPI、1%Pen/Strep、10pg/mLのマウスrIL-6および10%FBSを1xのHATと共に含有するDMEM培地中で7~10日間、培養した。1xHTを伴う同じDMEM培地をそれらの培養物に供給した。ハイブリドーマを、通常、第10~14日の間、5-FU抗体の分泌について、前に説明した5-FU抗体アッセイ（架橋アッセイ）によってスクリーニングした。陽性ハイブリドーマを、典型的には、前記抗体アッセイで10より大きいシグナルバックグラウンドで同定し、特徴付けし、その後、0.3および1.0細胞/ウェルの制限希釈プレートのうちの、20%より多い増殖ウェルを有するプレートから単離した。陽性増殖ウェルを増幅させ、培養上清を抗体の特徴付けのために採取した。

20

#### 【0172】

実施例7 5炭素リンカーに対して3炭素リンカーを有する5-FU結合体で免疫化したマウスに由来するモノクローナル5-FU抗体の間接的ELISAアッセイでの分析

この実験における抗体捕捉試薬は、5-FUの1位が3炭素または5炭素リンカーで修飾されている5-FU BSA結合体であった。10.5mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ と、139.5mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ と、150.6mM  $\text{NaCl}$ とを含有するリン酸緩衝食塩水を含有するリン酸緩衝液、 $\text{pH}7.7\sim7.9$ （典型的には $\text{pH}7.8$ ）中で1-5C-5-FU-NHSエステルとBSAとを12:1の負荷比（1-5C-5-FU-NHS対BSAのモル比）で混合し、室温で1時間以上にわたりインキュベーション（典型的には室温で1時間インキュベーション）することによって、5-FUをBSAに結合体化させた。そのインキュベーション後、未結合1-5C-5-FU-NHSエステルを、Amicon Ultra 4-30Kフィルタ（Millipore、Cat#UFC803024）での3回の緩衝液交換によって除去した。5-FUと結合体化しているBSA（5-FU-BSA）を濃縮し、同じリン酸緩衝液（ $\text{pH}7.8$ ）中で保存した。

30

#### 【0173】

1-3C-5-FU-BSAまたは1-5C-5-FU-BSAのいずれかを抗体捕捉試薬として、およびホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）結合体化ヤギ抗マウス抗体を抗体ディテクター試薬として使用して、この間接的抗体ELISAアッセイ5-FUアッセイを構築した。3,3,5,5-テトラメチルベンジジン（TMB）をHRP酵素基質として用いて、5-FU抗体の結合を検出した。5-FU ELISAアッセイシグナル（ $\text{OD}_{450}$ ）は、5-FUの漸増濃度に比例して減少した。5-FU IC50およびテガフル交差反応性を、前のセクションにおけるように決定した。

40

#### 【0174】

3炭素リンカー結合体を伴う5-FU結合体、および5炭素リンカー結合体を伴う5-FU結合体それぞれで免疫化したマウスから、モノクローナル5-FU抗体を得た。モノ

50

クローナル抗体をそれらの最高の5-FU感度(例えば、最低の5-FU IC50)についてスクリーニングした。3炭素および5炭素リンカー結合体で免疫化したマウスにおける5-FUとの選択したモノクローナルの抗体特異性およびテガフルとの交差反応性を表2に要約した。

【0175】

3炭素5-FU結合体で免疫化したマウスからのモノクローナル抗体は、実質的により低い5-FU IC50を示した。注目に値することとして、抗体クローン36H11および61C6は、約56~57 ng/mLで並外れて低い5-FU IC50を有し、それぞれ、7.6%および28%のテガフル交差反応性で検出された。

【0176】

表1および表2に提示する結果は、5炭素リンカーではなく、より短いリンカーである3炭素リンカーを有する1位修飾5-FU結合体が、5-FUに特異的なアッセイ抗体を生産するために好ましい免疫原であることを実証した。この5-FU結合体は、5-FUに対して感度がよくかつテガフルに対して低い(12%以下の)交差反応性を有する抗体を生産した。

【0177】

【表2】

表2. 5炭素リンカーに対して3炭素リンカーを有する5-FUハプテンで免疫化したマウスにおいて産生されたモノクローナル抗体の5-FU反応性およびテガフルに対する交差反応性。

5-FU mAb クローン	5-FU 免疫原	プレートにコーティングする5-FU結合体	5-FU IC50* (ng/mL)	テガフル交差反応性**
26H7	3炭素リンカーを有する1置換5-FU結合体化KLH	3炭素リンカーを有する1置換5-FU結合体化BSA	2,303	41%
27F9			7,370	30%
36H11			56	7.6%
61C6			57	28%
72B9			4,082	16%
1B10	5炭素リンカーを有する1置換5-FU結合体化KLH	3炭素リンカーを有する1置換5-FU結合体化BSA	32,741	2400%
3H10			69,741	5895%
11A7			27,928	991%
12E11			292,035	6625%

\*IC50: 全応答の50%を生じさせる阻害剤の濃度

\*\* 交差反応性 = (5-FUについてのIC50 / 試験化学物質についてのIC50) %

テガフルに加えて、幾つかの5-FUと構造的に関連する化学物質も、3炭素リンカーを有する5-FU結合体を用いて産生された抗体に対するそれらの交差反応性について評価し、下の表3に要約した。殆どの抗体は、テガフルを除き、DH-5-FU、ウラシル、シトシンおよびチミンと有意に交差反応性ではなかった(例えば、<10%交差反応性を有した)。しかし、抗体36H11は、5-FUに対して特異性が高く、テガフルとの約12%もしくはそれより小さい交差反応性が検出された。

【0178】

10

20

30

40

## 【表 3】

表3. 5-FUモノクローナル抗体交差反応性

5-FU mAb クローン	交差反応性					
	5-FU	テガフル	DH-5-FU	ウラシル	シトシン	チミン
61C6	100%	28%	1.4%	1.4%	0.57%	検出不能
36H11	100%	7.6%	0.41%	0.81%	0.11%	検出不能
26H7	100%	41%	2.5%	3.6%	検出不能	42%
27F9	100%	30%	<2.4%	<2.4%	検出不能	6.7%
49D8	100%	13%	<2.4%	<2.4%	検出不能	3.6%
72B9	100%	16%	2.1%	<2.4%	検出不能	1.3%

交差反応性=(5-FUについてのIC50/試験化学物質についてのIC50)%

実施例 8 5-FU結合体のリンカー長を選択することによる5-FUアッセイ感度およびダイナミックレンジの調整

ある5-FU結合体を用いて産生された5-FU抗体は、典型的に、異なるリンカーを有する異なる5-FU結合体と様々な程度に反応性である。ある5-FU抗体は、異なる5-FU結合体に対してより高い感度を有することもあり、またはより低い感度を有することもある。5-FU抗体は、通常、より短いリンカーを有する5-FU結合体を用いるとより高いアッセイ感度を有し、およびより希釈された試料の検出により望ましいだろう。逆に、例えば未希釈試料に関しては、より長いリンカーを有する5-FU結合体は、より高い5-FU濃度の検出により適しているだろう。5-FU抗体のパネルの様々な5-FU反応性を間接的ELISAによって決定し、表4に要約した。

【0179】

## 【表 4】

表4. 3炭素リンカーに対して5炭素リンカーを有する5-FU結合体に関する5-FU mAbアッセイ感度

5-FU mAb クローン	3炭素リンカーに対して5炭素リンカーを有する5-FU結合体に関するIC50の比
1B10	3.2
11A7	4.0
26H7	2.9
27F9	1.7
36H11	4.8
49D8	0.4
61C6	4.7
72B9	2.7

すべてのモノクローナル抗体は、5炭素リンカーでより低いIC50を有したクローン49D8を除き、より長いリンカー(5炭素)で1.7から4.8倍増加にわたるより高い5-FU IC50を呈示した。それにもかかわらず、5-FUアッセイ感度およびダイナミックレンジを、様々な長さを有するリンカーを選択することによって調整することができる。

【0180】

実施例 9 ECLアッセイによる5-FU検出のための抗体61C6の試験

5-FU抗体スクリーン緩衝液およびヒトヘパリンリチウム血漿中で作成した5-FU曲線の性能に基づき、ECLアッセイにおいて5-FU抗体をアッセイ捕捉試薬およびアッセイディテクター試薬として評価した。キャリブレーター曲線は、ヘパリンLi中のチ

10

20

30

40

50

ヤコール処理ヒト血漿を使用して作成した。すべての精製抗体をTAG Plus NHSエステルと15:1の負荷比でおよびEZ-Link Sulfo-NHS-LC-ビオチンと10:1の負荷比で結合体化させた。

【0181】

ビオチン化5-FU BSA事前結合M280-SAビーズを用いて捕捉試薬を評価することに加えて、この実験により、M270-アミンビーズに共有結合で結合体化させた5-FUも捕捉試薬として評価した。

【0182】

別段の具体的な言及がない限り、同体積の試料を先ずは捕捉試薬と、そしてその後、ディテクター試薬と96ウェルプレートにおいて混合することによって、5-FUイムノアッセイを構成した。試薬を添加した後、試料を5分間、室温で振盪しながら混合した。そのインキュベーション後、プレート磁石を2分間、アッセイプレートに付着させ、150μLの希釈液に再懸濁させることによって、ビーズを回収した。試料を、96標準ラウンド・プレート・プロトコルに従って100μL吸引体積で、M384分析器において読取るか、M1MR分析器において読取った。

10

【0183】

アッセイディテクター試薬としてのTAG Plus 結合体化抗体61C6の性能を研究した。アッセイ性能を5-FU抗体スクリーニング緩衝液中で、5-FUキャリブレーター(試料)として150μg/mLから9.6ng/mLの5倍5-FU連続希釈曲線を用いて評価した。

20

【0184】

合計5つの捕捉試薬をこの実験で評価した。3つの捕捉試薬は、1mgのビーズ(200μg/mL)につき1.0μgの捕捉試薬の比でM280-SAビーズに事前結合させたBi-1-3C-5-FU-BSA、Bi-1-5C-5-FU-BSAおよびBi-3-5C-5-FU-HSAを含む、ビオチン化BSAを介してM280-SAビーズに結合されている5-FUであった。他の2つの捕捉試薬は、200μg/mLの最終濃度になるように緩衝液中のM270アミンビーズに5-FUを直接結合体化させた、1-5C-5-FU-M270および1-3C-5-FU-M270であった。

【0185】

使用したアッセイディテクター試薬は、2.0μg/mLの濃度でのTAG Plus 5-FU mAb 61C6であった。アッセイを次のように行った: 25μLの捕捉試薬を各ウェルに添加した。25μLの5-FUキャリブレーター(試料)を各ウェルに添加し、捕捉試薬とともに短時間混合した。混合された試料および捕捉試薬に25μLのディテクター試薬を添加した。そのプレートを5分間、MicroMix 5シェーカーにおいてForm8およびAmp6で振盪しながらインキュベートした。ビーズを回収し、150μL希釈液に再懸濁させた。そのプレートをM384 ECL分析器において100μLの吸引体積で96標準プレートプロトコルに従って読取った。

30

【0186】

同じ5-FUキャリブレーター曲線を、TAG Plus 結合体化抗体とペアにした各捕捉試薬を捕捉試薬として用いて試験した。ディテクター抗体としてのTAG Plus 結合体化61C6抗体と各5-FUアッセイ捕捉試薬のために2つのアッセイプレートを設定した。

40

【0187】

各キャリブレーター曲線(例えば、事前結合ビーズまたは結合体化M270ビーズのいずれかを伴うもの)の平均シグナルおよび%TB(全結合の百分率=5-FU濃度によるシグナル/緩衝液中でのシグナル)を評価した。抗体mAb 61C6と、捕捉試薬としてのBi-1-5C-5-FU-BSA事前結合M280-SAビーズを用いて、9.6および48ng/mLの5-FUで高い%TBを示した結果は、ECL分析器M384の限界を超える、より高いシグナルを生じさせた、過剰量のディテクター抗体に起因する可能性が高かった。

50

## 【0188】

実験の1つは、1位ではなく3位が修飾されている5-FU誘導体である3-5C-5-FU-HSAを捕捉抗体として使用した。しかし、61C6抗体は、この3位修飾5-FUに対して反応性であった。実施例5において選択した他の抗体も3-5C-5-FU-HSAと様々なレベルに反応性であった。

## 【0189】

一部のキャリブレーターは、1-5C-5-FU-M270を用いる実験においてmAb 61C6により%TB増大を呈示した。これは、その最適濃度を超える抗体濃度に起因する可能性が高い。

## 【0190】

抗体61C6は、アッセイ捕捉試薬としての1位修飾5-FU誘導体と3位修飾5-FU誘導体の両方に関して十分なアッセイ感度を一貫して実証した。

## 【0191】

実施例10 mAb 61C6のアッセイ性能

この実施例は、mAb 61C6でのアッセイ性能の評価を説明するものである。前記アッセイ性能を、プールされたヒトヘパリンリチウム血漿(血漿)において評価した。ヘパリンLi中のチャコール処理ヒト血漿を使用して、キャリブレーター曲線を作成した。5-FUキャリブレーター曲線は、150 µg/mLから9.6 ng/mLの血漿中の5倍5-FU連続希釈曲線であった。試験する化学物質をその血漿にスパイクして10 µg/mLの最終濃度にした。捕捉試薬は、200 µg/mL(25 µL/ウェル)の最終濃度になるように5FU抗体スクリーン緩衝液に再懸濁させた1-5C-5FU-M270ビーズであった。ディテクター試薬は、5-FU抗体スクリーン緩衝液中のTAG Plus mAb 61C6(0.5 µg/mL)であった。

## 【0192】

25 µLの捕捉試薬を各ウェルに添加した。25 µLの試料、5-FUキャリブレーターまたは競合化学物質、を各ウェルに添加し、捕捉試薬とともに短時間混合した。その混合された試料および捕捉試薬に25 µLのディテクター試薬を添加した。そのプレートを5分間、MicroMix 5シェーカーで振盪しながらインキュベートした。そのプレートをM1MR分析器において100 µLの吸引体積で96標準プレートプロトコルに従って読取った。

## 【0193】

データを、SoftMax Proデータ解析ソフトウェアパッケージの内蔵5パラメータ曲線フィッティング・アルゴリズム・プログラムで解析した。キャリブレーター%TBは、Cal1(0.0 ng/mL 5-FU)シグナル(アッセイバックグラウンド)で割ったキャリブレーターシグナルの比であった。検出下限(LDL)は、24のCal1反復物の2×標準偏差を引いた24のCal1反復物の平均シグナルの5-FU濃度であった。LDLは、2.7 ng/mLであると決定した。

## 【0194】

実施例11 5-FUの存在および不在下での5-FUに構造的に類似した化学物質に対するおよび選択化学療法薬に対する抗体61C6の交差反応性

化学物質および化学療法薬に対するmAb 61C6の交差反応をヒト血漿において5-FU不在下および目標400 ng/mLの5-FU存在下で試験した。構造的に類似した化学物質および化学療法薬に対する交差反応性をそれぞれ10 µg/mLおよび100 µg/mLで試験した。

## 【0195】

臨床および実験室の標準機関(clinical and Laboratory Standard Institute)は、「干渉物質の交差反応性を、治療範囲の上限付近の濃度の分析物の不在下および存在下両方で試験すべきである」と推奨している(EP07A2の72頁)。

## 【0196】

10

20

30

40

50

交差反応性の計算は、次の方程式で示される：

$$\% \text{交差反応性} = 100 \times (\text{測定値} - \text{真の値}) \div (\text{干渉物質の濃度})$$

【0197】

次のものは、実施例の一部で使用したアッセイ試薬である。捕捉試薬：100 mMリン酸ナトリウム (pH 7.2) と、150 mM塩化ナトリウム (NaCl) と、0.5% ウシ血清アルブミン (BSA) と、0.5% ウシ IgG (BG G) と、0.1% 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン塩酸塩 (MIT) と、0.33% Brij-35 と、0.05 mg/mL MAK-33 IgG Poly (Roche Diagnostics) と、0.025 mg/mL ヘテロ親和性ブロック試薬-1 (HRB-1, Scantibodies Laboratory, Inc., 92071 カリフォルニア州サンティー) とを含有する抗体希釈液中の 250 µg/mL の 1-5C-5-FU-M270 (30 µL/ウェル)。ディテクター試薬：抗体希釈液中の 1.5 µg/mL TAG Plus mAb61C6 (30 µL/ウェル)。5-FU キャリブレーター曲線は、9.6 ng/mL から 150 µg/mL にわたるヘパリンリチウム中のチャコール処理ヒト血漿での 5-FU の 1:5 連続希釈であった。

10

【0198】

それぞれ 10 および 100 µg/mL の化学物質および化学療法薬のアッセイ試料を、5-FU なし、および 5-FU あり (400 ng/mL 目標濃度) の同じヒト血漿にスパイクした。

【0199】

交差反応性について試験した化学物質および化学療法薬は、次のものを含んだ：DMSO 中の 1.0 mg/mL テガフル (Teg)；DMSO 中の 1.0 mg/mL カペシタピン (Cap)；1.0 mg/mL ウラシル (Urc) DMSO；DMSO 中の 1.0 mg/mL DH5FU；1.0 mg/mL ウリジン (Urd) H<sub>2</sub>O；H<sub>2</sub>O 中の 1.0 mg/mL チミン；1.0 mg/mL チミジン (Thymd) H<sub>2</sub>O；10 mg/mL フォリン酸 (FolA) H<sub>2</sub>O；10 mg/mL オキサリプラチン (Oxp) H<sub>2</sub>O；10 mg/mL イリノテカン (Irt) DMSO；10 mg/mL メトトレキサート (Mtx) DMSO；および 10 mg/mL シスプラチン (Csp) DMSO。

20

【0200】

30 µL のアッセイ試料および 5-FU キャリブレーターをプレートに添加し、続いて 30 µL の捕捉試薬を添加した。MicroMix 5 シェーカーを Form 8 および Amp 6 で用いて振盪しながら 60 秒間そのプレートをインキュベートし、その後、30 µL のディテクター試薬を添加した。MicroMix 5 シェーカーを Form 8 および Amp 6 で用いて振盪しながら 6 分間そのプレートをインキュベートした。ビーズを回収し、150 µL 希釈液に再懸濁させた。そのプレートを、M1MR 分析器において 100 µL の吸引体積で 96 標準プレートのためのプロトコルに従って読取った。

30

【0201】

【表 5】

表 5 - 抗体 mAb 61C6 との交差反応性

化学物質/薬物	試験した濃度	5-FUなし		5-FUあり (379 ng/mL)	
		測定値	交差反応性 (%)	測定値	交差反応性 (%)
テガフル	10 µg/mL	1624	16.2	1927	15.5
カペシタビン	10 µg/mL	0.00	0.00	366	-0.13
ウラシル	10 µg/mL	94.0	0.94	390	0.11
DH5FU	10 µg/mL	262	2.62	553	1.74
ウリジン	10 µg/mL	21.0	0.21	395	0.16
チミン	10 µg/mL	59.0	0.59	459	0.80
チミジン	10 µg/mL	5.00	0.05	392	0.13
フォリン酸	100 µg/mL	0.00	0.000	368	-0.01
オキサリプラチン	100 µg/mL	0.00	0.000	385	0.01
イリノテカン	100 µg/mL	0.00	0.000	363	-0.02
メトトレキサート	100 µg/mL	0.00	0.000	357	-0.02
シスプラチン	100 µg/mL	0.90	0.001	340	-0.04

10

5-FUあり、およびなしでこの実験において決定したテガフル、ウラシル、DH-5-FUおよびカペシタビンに対する交差反応性は、実施例5における結果に匹敵した。ウリジン、チミンおよびチミジンに対する交差反応性は、5-FUあり、およびなしで1.0%未満であった。フォリン酸、オキサリプラチン、イリノテカン、メトトレキサートおよびシスプラチンを含む100 µg/mLの化学療法薬に対する交差反応性は、5-FUあり、およびなしで本質的に検出不能であった。テガフルに対する交差反応性は、このアッセイが、主として、テガフルを含有しない試料において5-FUを検出するために用いられる場合、重要ではない。例えば、このアッセイは、テガフルの投与を受けなかった患者からの試料中の5-FUについて試験するために用いられる。

20

## 【0202】

試験した化学物質および化学療法薬に対する抗体61C6についての交差反応性プロフィールは、5-FU検出アッセイに許容され得る。

## 【0203】

実施例12 5-FUアッセイ形式、試料混合順序、アッセイインキュベーション時間設定およびアッセイ試薬濃度の評価

30

この実施例では、25、30、40および50 µLを含む様々なアッセイ試料、捕捉およびディテクター試薬体積で5-FUアッセイを構成したが、試料、捕捉およびディテクター試薬体積を1実験内で同一に保った。アッセイインキュベーション後、プレート磁石を2分間、アッセイプレートに付着させ、150 µLの希釈液に再懸濁させることによって、ビーズを回収した。試料を、96標準ラウンドプレートプロトコルの100 µL吸引体積で、M384分析器において読取るか、M1MR分析器において読取った。

## 【0204】

アッセイディテクター試薬としてTAG Plus 結合体化5-FU-BSAおよびTAG Plus-5-FU、ならびにアッセイ捕捉試薬としてmAb 61C6での、5-FUアッセイ性能を、次のように評価した：5-FUキャリブレーター曲線は、150 µg/mLから9.6 ng/mLのヒトヘパリンリチウム血漿中で作成した5倍連続希釈曲線であった。ヘパリンLi中のチャコール処理ヒト血漿を使用して、キャリブレーター曲線を作成した。捕捉試薬は、125 µg/mLの最終濃度になるように5-FU抗体スクリーン緩衝液に再懸濁させた、Bi-mAb 61C6事前結合M280-SAビーズ(M280-SAビーズ1 mgにつき5.0 µgの抗体)(30 µL/ウェル)であった。試験したディテクター試薬は、TAG Plus 1-5C-5-FU、TAG Plus 1-5C-5-FU-BSAおよびTAG Plus 1-3C-5-FU-BSAであった。

40

## 【0205】

50

30  $\mu$ L の試料を各ウェルに添加し、短時間、30  $\mu$ L の捕捉試薬と混合した。その混合された試料および捕捉試薬に30  $\mu$ L のディテクター試薬を添加した。そのプレートを、Micro Mix 5シェーカーにおいてForm 8およびAmp 6で振盪しながら5分間インキュベートした。ビーズを回収し、150  $\mu$ L 希釈液に再懸濁させた。そのプレートをM384 ECL分析器において100  $\mu$ L の吸引体積で96標準プレートのためのプロトコルに従って読取った。

【0206】

3炭素および5炭素エチル鎖リンカーを有する漸増濃度のTAG Plus 結合体化5-FU-BSAを用いてアッセイを行った。

【0207】

ディテクター試薬としてTAG Plus 1-3C-5-FU BSAを使用する有効な5-FUの検出範囲は、おおよそ9.6から30,000 ng/mLであった。9.6 ng/mLの5-FUでの%TBは、0.5、0.75および1.0  $\mu$ g/mLのTAG Plus 1-3C-5-FU-BSAでそれぞれ70%、75%および78%であった。これは、低いディテクター濃度ほど高い感度を有することを示唆する。

10

【0208】

TAG Plus 1-5C-5-FU BSAでの全体的なアッセイ性能は、TAG Plus 1-3C-5-FU BSAのものに類似していた。9.6 ng/mLの5-FUでの%TBは、0.5、0.75および1.0  $\mu$ g/mLのTAG Plus 1-5C-5-FU-BSAでそれぞれ82%、87%および88%であった。これは、低いディテクター濃度ほど高いアッセイ感度を有することを示唆する。

20

【0209】

TAG Plus 1-5C-5-FU (直接5炭素リンカーを介してTAG Plus に結合体化している5-FU誘導体)での全体的なアッセイ感度は、TAG Plus 1-5C-5-FU BSAおよびTAG Plus 1-3C-5-FU BSAでのアッセイより低かった。0.050および0.10  $\mu$ g/mLでのより低い濃度のTAG Plus 1-5C-5-FUが、5-FUを検出する上でより感度が良かった。このアッセイディテクター試薬は、48 ng/mLで5-FUを検出することができた。他の点では、TAG Plus 1-3C-5-FU BSAは、低いディテクター濃度ほど高いアッセイ感度を有するという、より好適な結果を示した。

30

【0210】

mAb 61C6をアッセイ捕捉試薬として使用し、およびTAG Plus と直接結合体化しているか担体タンパク質を介して結合体化している5-FUをディテクター試薬として使用して、5-FUを検出することは、有効であった。抗体61C6を捕捉試薬として使用し、およびmAb 61C6をディテクター試薬として使用して、同様のアッセイ性能を得た。

【0211】

実施例13 5-FUアッセイ・ディテクター・インキュベーション時間設定

アッセイシグナルは、第一のアッセイインキュベーション時間設定を1分から4分に延長したときにわずかに減少することが明らかになった。この実験により、3分から15分の第二のアッセイインキュベーション時間設定を評価した。

40

【0212】

5-FUキャリブレーターは、プールされたヒトヘパリンリチウム血漿(40  $\mu$ L/ウェル)にスパイクされた5-FUを含んだ。ヘパリンLi中のチャコール処理ヒト血漿を使用してキャリブレーター曲線を作成した。使用した捕捉試薬は、125  $\mu$ g/mLの最終濃度になるように抗体希釈液に再懸濁させた、事前結合されたBi 1-5C-5-FU BSA (M280-SAビーズ1mgにつき2.0  $\mu$ gのBi 1-5C-5-FU BSA) (40  $\mu$ L/ウェル)であった。使用したディテクター試薬は、抗体希釈液中の0.5  $\mu$ g/mLのTAG Plus 61C6 (40  $\mu$ L/ウェル)であった。

【0213】

50

捕捉試薬を、先ず、5-FUキャリブレーターと混合し、30秒間、振盪しながらインキュベートした(第一のインキュベーション)。その第一のインキュベーション後、ディテクター試薬をその混合物に添加し、3から15分の追加のインキュベーションのためにインキュベートした(第二のインキュベーション)。そのインキュベーション後、ビーズを120 $\mu$ Lの希釈液で2回洗浄し、120 $\mu$ Lの希釈液に再懸濁させた。そのプレートを、M1MR分析器において70 $\mu$ Lの吸引体積で96標準プレートのためのプロトコルに従って読取った。

#### 【0214】

それらの結果により、1つのキャリブレーター(150,000 5-FU ng/mLでのCal 8)を除き、第二のインキュベーション時間が延びるにつれてアッセイシグナルが増加することが明らかになった。5-FUなしの緩衝液中の全結合のパーセント(%TB)は、より長いインキュベーション時間による影響を受けないようであった。これは、5-FUアッセイには3分のインキュベーションで十分であることを示す。

10

#### 【0215】

実施例14 5-FUアッセイの様々なパラメータの試験の要約

アッセイシグナルは、0.5~1.2 $\mu$ g/mLへのディテクター抗体濃度に比例して増加した。それらの結果は、5-FU分析物が、少なくとも4時間、氷上の抗体スクリーン緩衝液中およびヒトヘパリンLi血漿中で安定していること、ならびに5-FUディテクターTAG Plus mAb 61C6が、少なくとも4日間、2~8 で、抗体希釈液中で安定していることを実証した。

20

#### 【0216】

捕捉試薬1-5C-5-FU-M270ビーズは、2~8 で少なくとも40時間、安定しているように見えた。抗体61C6での5-FUアッセイ性能の研究からの結果は、7分未満で得られ、抗体61C6での5-FUアッセイが10~30,000ng/mLのダイナミックレンジ、およびLDL<5.0ng/mLを有することを示した。その機能性感度は、おおよそ10ng/mL(これは、キャリブレーター曲線に基づく機能性感度の推定値である)であると決定された。抗体61C6での5-FUアッセイは、ウラシル、DH-5-FU、カペシタピン、ウリジン、チミン、チミジン、フォリン酸、オキサリプラチン、イリノテカン、メトトレキサート、シスプラチンおよび5-エチニルウラシルに対して3.0%未満の交差反応性、ならびにテガフルに対して12%未満の交差反応性を有した。

30

#### 【0217】

実施例15 様々な5-FUアッセイのための試薬の合成および調製

1-5C-5-FU-BSAの調製

10.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>と、139.5mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>と、150.6mM NaClとを含有するリン酸緩衝食塩水を含有するリン酸緩衝液、=pH7.7~7.9(典型的にはpH7.8)中で1-5C-5-FU-NHSエステルとBSAを12:1の負荷比(1-5C-5-FU-NHS 対 BSAのモル比)で混合し、室温で1時間以上にわたりインキュベーション(典型的には室温で1時間インキュベーション)することによって、5-FUを先ずBSAに結合体化させた。そのインキュベーション後、未結合1-5C-5-FU-NHSエステルを、AmiconUltra4-30Kフィルタ(Millipore、Cat# UFC803024)での3回の緩衝液交換によって除去した。5-FUと結合体化しているBSA(5-FU-BSA)を濃縮し、同じリン酸緩衝液(pH7.8)中で保存した。

40

#### 【0218】

ビオチン1-5C-5-FU-BSA(Bi-5C-5-FU-BSA)を調製するために、5-FU-BSAを、EZ-Link Sulfo-NHS-LC-ビオチン、No-Weight Format(Thermo Scientific、Cat# 21327)とともに10:1の負荷比(EZ-Link Sulfo-NHS-LC-ビオチン 対 1-5C-5-FU-BSAのモル比)で、pH7.8リン酸緩衝液中で1時

50

間より長く、室温でインキュベートした。そのインキュベーション後、未結合EZ-Link Sulfo-NHS-LC-ビオチンを、Amicon Ultra 4-30Kフィルタ(Millipore、Cat# UFC803024)での、37.5mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ と、112.5mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ と、150.6mM  $\text{NaCl}$ と、0.10% 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン塩酸塩(MIT)とを含有するpH7.2リン酸緩衝食塩水(PBS)への3回の緩衝液交換によって除去した。

【0219】

TAG Plus 1-5C-5-FU-BSAを調製するために、5-FU-BSAを、TAG Plus NHSエステルとともに12:1の負荷比(TAG Plus NHSエステル 対 1-5C-5-FU-BSAのモル比)で、pH7.8リン酸緩衝液中で典型的には1時間、室温でインキュベートした。そのインキュベーション後、未結合TAG Plus NHSエステルを、Amicon Ultra 4-30Kフィルタ(Millipore、Cat# UFC803024)での、37.5mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ と、112.5mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ と、150.6mM  $\text{NaCl}$ と、0.10% 2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン塩酸塩(MIT)とを含有するpH7.2リン酸緩衝食塩水(PBS)への3回の緩衝液交換によって除去した。

10

【0220】

TAG Plus 1-3C-5-FU-BSAおよびビオチン 1-3C-5-FU-BSA(Bi-1-3C-5-FU-BSA)の調製は、TAG Plus 1-5C-5-FU-BSAおよびビオチン 1-5C-5-FU-BSAの調製に類似していた。1-3C-5-FU-NHSエステルをBSAとともにインキュベートすることによって、3炭素リンカーを有する5-FUを、先ず、BSAに結合体化させた。次に、その1-3C-5-FU-BSAをTAG Plus NHSエステルと、およびEZ-Link Sulfo-NHS-LC-ビオチンと、それぞれ12:1および10:1の負荷比で結合体化させた。

20

【0221】

TAG Plus 3-5C-5-FU-HSAおよびビオチン 3-5C-5-FU-HSA(Bi-3-5C-5-FU-HSA)の調製は、TAG Plus 1-5C-5-FU-BSAおよびビオチン 1-5C-5-FU-BSAについて説明したのと本質的に同じであった。ヒト血清アルブミン(HSA)を先ず5-FU 3位修飾NHSエステル(3-5C-5-FU NHSエステル)と結合体化させたこと、および3-5C-5-FU-BSAをEZ-Link Sulfo-NHS-LC-ビオチンおよびTAG Plus NHSエステルでさらに修飾したことを除く。

30

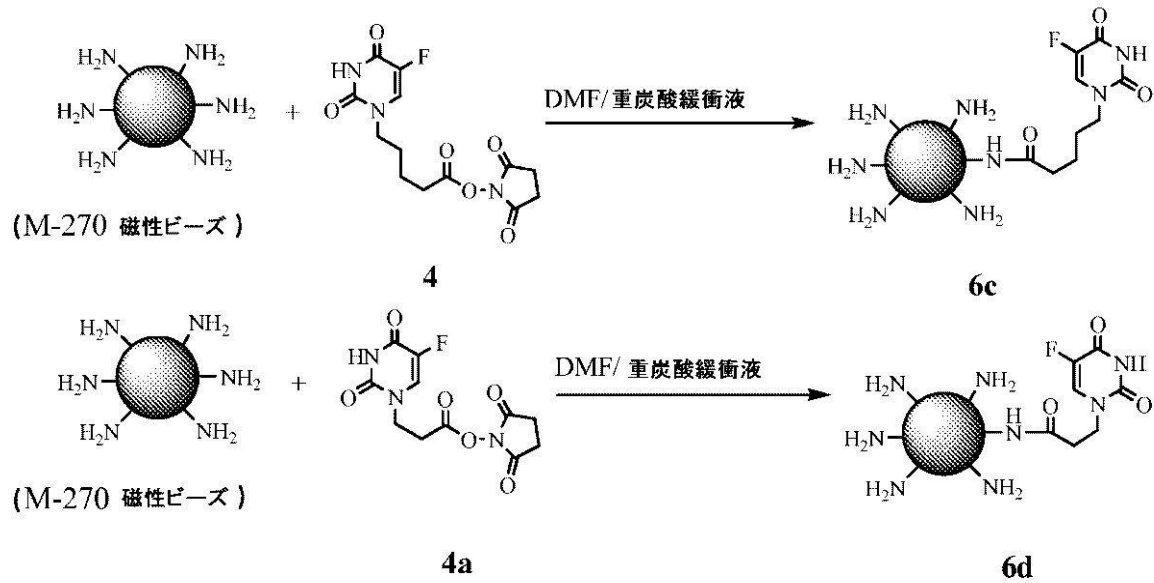
【0222】

Bi-1-3C-5-FU-BSA、Bi-1-5C-5-FU-BSAおよびBi-3-5C-5-FU-HSA(ビオチン化5-FU結合体化血清アルブミンまたはビオチン化タンパク質)事前結合ビーズを調製するために、1.0mg M280-SAビーズ(Invitrogen)を5-FU抗体スクリーン緩衝液または抗体希釈剤中で2.0 $\mu\text{g}$  ビオチン化タンパク質とともに1時間を超えて室温でインキュベートした。そのインキュベーション後、M280-SAビーズを1.0mg/mLのビーズ濃度で再懸濁させ、同じ緩衝液で3回洗浄した。

40

【0223】

## 【化 1 5】



10

1 - 5 C - 5 - F U - M 2 7 0 ビーズおよび 1 - 3 C - 5 - F U - M 2 7 0 ビーズを調製するために、次のスキームに従った。[ 6 c ] Dynabeads M - 2 7 0 Amine ( 1 5 m g 、 5 0 0  $\mu$  L 、 Invitrogen 、 Cat # 1 4 3 0 7 D ) を 1 . 5 m L マイクロチューブにピペットで移し、3  $\times$  1 0 0 0  $\mu$  L の 0 . 2 N 炭酸 - 重炭酸 ( Thermo Scientific 、 Cat # 2 8 3 8 2 ) 緩衝液 ( p H 9 . 4 ) で洗浄し、0 . 7 5 m L の炭酸 - 重炭酸緩衝液に懸濁させた。[ 4 ] ( 0 . 2 5 m L の無水 N , N ' - ジメチルホルムアミド中 1 2 m g ) の溶液を前処理したビーズに添加し、得られた混合物を室温で 4 時間、振盪した。磁石下で上清を除去し、1  $\times$  1 0 0 0  $\mu$  L の N , N ' - ジメチルホルムアミドおよび 2  $\times$  1 0 0 0  $\mu$  L の P B S T 緩衝液で洗浄した。得られたビーズを 5 0 0  $\mu$  L の P B S T 緩衝液で再構成した。[ 6 d ] [ 6 c ] に関して説明したのと同じ手順を [ 6 d ] の調製に用いた。

20

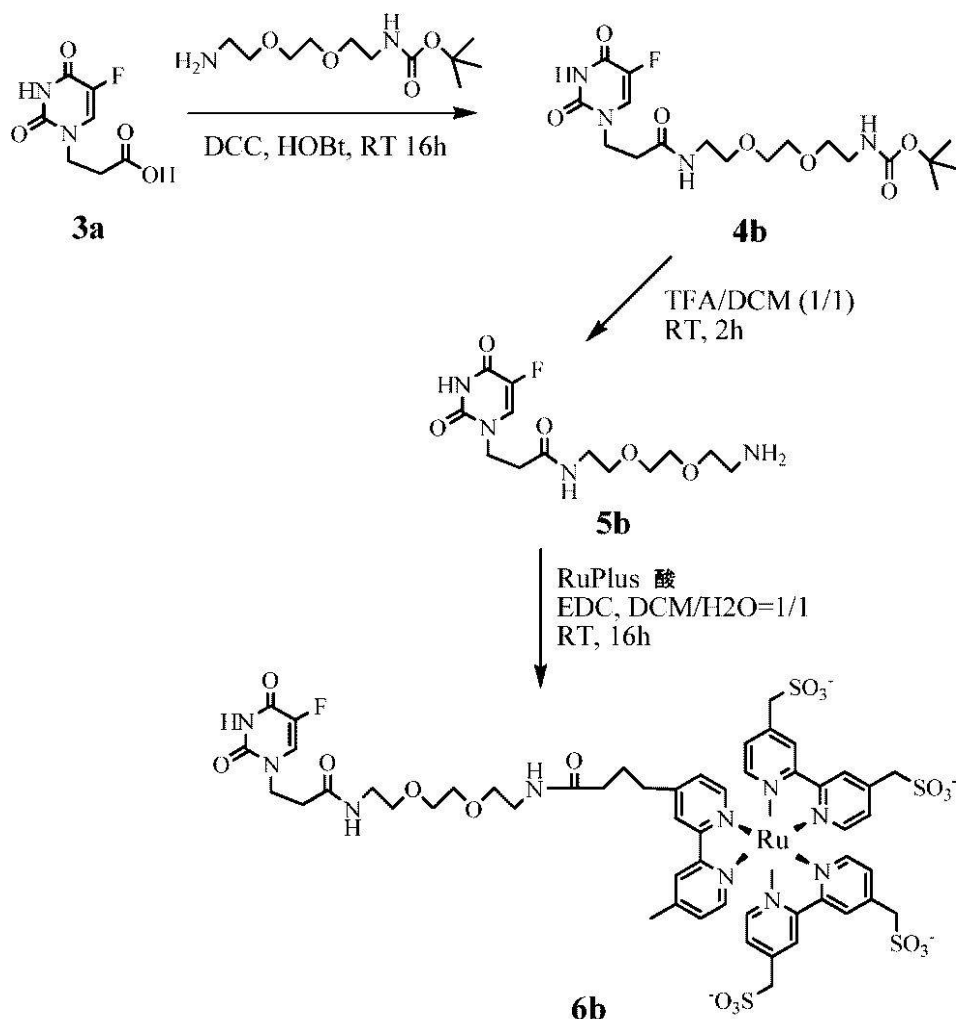
## 【 0 2 2 4 】

T A G Plus 1 - 3 C - 5 - F U の調製のためのスキームは、次のとおりであった：

30

## 【 0 2 2 5 】

## 【化 1 6】



10

20

【4b】60 mL のジクロロメタン (Sigma - Aldrich、Cat # 270997 - 1 L) 中の【3a】(350 mg) の混合物に、アルゴン下で N - Boc - 2, 2' - (エチレンジオキシ) ジエチルアミン (376 mg、Sigma - Aldrich、Cat # 89761 - 1 G) を添加した。ジシクロヘキシルカルボジイミド (315 mg、Sigma - Aldrich、Cat # D80002 - 25 G) および 1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール (186 mg、Sigma - Aldrich、Cat # 362441 - 50 G) を上記混合物に添加した。得られた混合物を室温、アルゴン下で一晩攪拌した。完了したら、その混合物を濃縮し、ジクロロメタン中の 0 ~ 3 % メタノールを溶離液として利用してフラッシュカラムで精製して、600 mg の生成物を得た。

30

## 【0226】

【5b】ジクロロメタン (2 mL、Sigma - Aldrich、Cat # 270997 - 1 L) 中の【4b】(56 mg) に、2 mL のトリエチルアミン (Sigma - Aldrich、Cat # T0886 - 1 L) を添加した。得られた混合物を室温で 3 時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去した。2 x 30 mL のジクロロメタン (1 % トリエチルアミンを含有) を添加し、溶媒を減圧下で除去して 50 mg の生成物を得た。

40

## 【0227】

【6b】4 mL のジクロロメタン / 水 (1 / 1) 中の 50 mg の【5b】の混合物に、55 mg の RuPlus 酸 (BioVeris) を添加した。1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノ) プロピルカルボジイミド (25 mg、Sigma - Aldrich、Cat # E7750 - 25 G) および 1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBT、15 mg、Sigma - Aldrich、Cat # 362441 - 50 G) を添加し、得られた混合物を室温、アルゴン下で 16 時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去した。その反応混

50

合物を水に再溶解し、1) 1.0 M トリエチルアンモニウム緩衝液 (TEAB、Sigma - Aldrich、Cat # T7408) (pH 7.6、50 mL)、2) 1.0 M 重炭酸ナトリウム (25 mL) および 3) 0.1 M TEAB (pH 7.6、50 mL) で平衡させた DEAE Sephadex A-25 (Sigma - Aldrich、Cat # A25120-100G) イオン交換カラム (2.5 cm x 10 cm) に適用した。そのカラムを 0.1 M (pH 7.6) から 0.4 M の TEAB (pH 7.6) の勾配で溶離して、所望の生成物を得た。

#### 【0228】

モノクローナル 61C6 を精製するために、モノクローナル抗体 61C6 の培養上清 (約 100 mL) を採取し、50 mL コニカルチューブの中で保存した。その上清を卓上遠心分離機における 3,500 g での 10 分間の遠心分離によって清澄化し、0.2 μm フィルタユニットに通して濾過し、100 mL の IgG プロテイン A 結合緩衝液で希釈した。その希釈された上清を、15 mL コニカルチューブの中で 5.0 mL のプロテイン A 結合緩衝液 (Thermo Science) を用いて 1 回洗浄した 2.0 mL のプロテイン A 樹脂スラリー (Thermo Science) と、一晚、2~8 °C で混合した。そのインキュベーション後に、プロテイン A 樹脂を 15 mL コニカルチューブに移し、5 mL プロテイン A IgG 結合緩衝液で 4 回洗浄し、2 mL スピンカラムに移した。抗体をそのカラムから IgG 溶離緩衝液中に溶出させ、溶出液を直ちに 1.0 M Tris - HCl pH 8 (1.0 mL の溶出に対して 0.15 mL) で中和した。溶出させた抗体は、リン酸緩衝液 pH 7.8 へ緩衝液交換した。

#### 【0229】

Bi mAb 61C6 を調製するために、精製 mAb 61C6 を EZ - Link Sulfo - NHS - LC - ビオチン、No - Weigh Format (Thermo Scientific、Cat # 21327) とともに 8 : 1 の負荷比 (EZ - Link Sulfo - NHS - LC - ビオチン 対 mAb 61C6 のモル比) で、pH 7.8 リン酸緩衝液中、典型的には 1 時間、室温でインキュベートした。そのインキュベーション後、未結合 EZ - Link Sulfo - NHS - LC - ビオチンを、Amicon Ultra 4 - 30K フィルタ (Millipore、Cat # UFC803024) での、37.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  と、112.5 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  と、150.6 mM NaCl と、0.10% 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オン塩酸塩 (MIT) とを含有する pH 7.2 リン酸緩衝食塩水 (PBS) への 3 回の緩衝液交換によって除去した。

#### 【0230】

TAG Plus mAb 61C6 を調製するために、精製 mAb 61C6 を TAG Plus NHS エステルとともに 15 : 1 の負荷比 (TAG Plus NHS エステル 対 mAb 61C6 のモル比) で、pH 7.8 リン酸緩衝液中、典型的には 1 時間、室温でインキュベートした。そのインキュベーション後、未結合 TAG Plus NHS エステルを、Amicon Ultra 4 - 30K フィルタ (Cat : UFC803024。Millipore、マサチューセッツ州ビルリカ) での、37.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  と、112.5 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  と、150.6 mM NaCl と、0.10% 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オン塩酸塩 (MIT) とを含有する pH 7.2 リン酸緩衝食塩水 (PBS) への 3 回の緩衝液交換によって除去した。

#### 【0231】

M280 - ストレプトアビジンビーズ (M280 - SA) に事前結合された ビオチン抗 5 - FU 61C6 モノクローナル抗体を調製するために、1.0 mg M280 - SA ビーズ (Invitrogen、Cat # 112 - 05D) を 8.0 μg Bi 抗 5 - FU 61C6 モノクローナル抗体とともに試料緩衝液 (下で説明) 中で 1 時間、室温でインキュベートした。1 時間のインキュベーション後、その ビオチン抗 5 - FU 61C6 モノクローナル抗体 - M280 - SA ビーズ複合体を試料緩衝液で 3 回洗浄し、試料緩衝液に 1.0 mg / mL で再懸濁させた。その事前結合 Bi 抗 5 - FU 61C6 モノク

10

20

30

40

50

ーナル抗体 - M 2 8 0 - ストレプトアビジンビーズを 2 ~ 8 で保存した。

【 0 2 3 2 】

実施例 1 6 5 - F U E C L アッセイにおける 5 - F U 試薬濃度の最適化

捕捉試薬 ( capture ) としてのビオチン化抗 5 - F U 6 1 C 6 モノクローナル抗体 - ストレプトアビジンビーズ ( B i - m A b - ビーズ )、およびディテクターとしての T A G P l u s 1 - 5 C - 5 - F U - B S A というアッセイ形式を用いてこの実験を行って、5 - F U 試薬の濃度を最適化した。

【 0 2 3 3 】

8 点キャリブレーション曲線と、0 . 2  $\mu$  g / m L のディテクター試薬 ( T A G P l u s 1 - 5 C - 5 - F U - B S A ) 濃度ならびに 0 . 1、0 . 1 5、0 . 2 および 0 . 2 5 m g / m L の捕捉試薬 ( B i - m A b - ビーズ ) 濃度での交差力価測定 ( c h e c k e r b o a r d t i t r a t i o n ) とを用いて、前記最適化を行った。

10

【 0 2 3 4 】

次のプロトコルを用いてアッセイを調製した。5 - F U 捕捉試薬は、B i - m A b - ビーズであり、それを試料緩衝液中 0 . 1、0 . 1 5、0 . 2 および 0 . 2 5 m g / m L という様々な濃度で試験した。ディテクター試薬は、T A G P l u s 1 - 5 C - 5 - F U - B S A であり、それを試料緩衝液中 0 . 2  $\mu$  g / m L の濃度で試験した。5 - F U 試薬 ( 捕捉およびディテクター ) をこの実験では水性形態として使用した。

【 0 2 3 5 】

試料緩衝液を次の成分濃度で調合した：0 . 0 3 % T w e e n - 2 0 を伴う 1 0 0 m M リン酸ナトリウム；0 . 0 5 % P r o c l i n 3 0 0 を伴う 1 5 0 m M 塩化ナトリウム ( N a C l )；0 . 0 2 5 m g / m L H R B 1 を伴う 0 . 5 % ウシ血清アルブミン ( B S A )；0 . 0 5 m g / m L M A K - 3 3 I g G P o l y を伴う 0 . 5 % ウシ I g G ( B G G )；2 % P E G を伴う 1 5 % トレハロース；および 1 0  $\mu$  g / m L ヤギ抗マウス I g G を伴う 2 . 5 m g / m L サリチル酸。

20

【 0 2 3 6 】

次の材料をアッセイ調製に使用した：M i l l i - Q 水 ( M i l l i Q )；リン酸二水素ナトリウム ( N a H <sub>2</sub> P O <sub>4</sub> ) ( S i g m a )；リン酸水素ナトリウム ( N a <sub>2</sub> H P O <sub>4</sub> ) ( S i g m a )；塩化ナトリウム ( N a C l ) ( S i g m a )；トレハロース ( F i s h e r )；P E G ( S i g m a )；ヤギ抗マウス I g G ( T h e r m o S c i e n t i f i c )；M A K 3 3 - I g G P o l y ( R o c h e )；H B R - 1 ( S c a n t i b o d i e s )；P r o c l i n 3 0 0 ( S i g m a )；0 . 2  $\mu$  m 使い捨てフィルタユニット ( V W R )；ウシ血清アルブミン ( B S A ) ( S e r a C a r e )；ウシ I g G ( B G G ) ( M i l l i p o r e )；T w e e n - 2 0 ( B i o C h e m )；サリチル酸 ( S i g m a )；1 . 0 N N a O H ( J T B a k e r )；p H 4 緩衝液 ( V W R )；p H 7 緩衝液 ( V W R )。

30

【 0 2 3 7 】

清浄な 1 0 0 0 m L 使い捨てビーカーにおおよそ 3 0 0 m L ( 3 0 0 g ) の D I 水を満たした。攪拌棒をビーカーに加え、そのビーカーを攪拌プレートに載せて中速で混合した。

40

【 0 2 3 8 】

以下の材料をそのビーカーに添加し、すべての固形物が見かけ上、溶解されるまで混合した：N a H <sub>2</sub> P O <sub>4</sub>、N a <sub>2</sub> H P O <sub>4</sub>、N a C l、トレハロース、P E G。次に、以下の材料をそのビーカーに添加して、見かけ上、溶解されるまで混合し続けた：B S A、B G G、T w e e n - 2 0、P r o c l i n 3 0 0、サリチル酸、マウス I g G、M A K 3 3 - I g G p o l y、H B R - 1。4 ~ 7 範囲に較正された p H メータを使用することにより、1 . 0 N N a O H を使用してその溶液の p H を 7 . 1  $\pm$  0 . 1 に調整した。メスシリンダーを使用してその溶液を 5 0 0 m L の最終体積にし、最低 1 0 分間混合した。アスピレータポンプを使用して、その溶液を 0 . 2  $\mu$  m 滅菌フィルタユニットに通して濾過した。

50

## 【0239】

チャコール処理ヘパリンリチウムヒト血漿 (BioReclamation、Cat # HMP L L I H P - S T R P D) 中、0.0、50、100、250、625、2500、10000および20000 ng/mLの濃度での5-FU抗原 (Sigma Aldrich、Cat # 858471) を用いて定式化されたキャリブレーター曲線を調製した。4.1%リン酸二水素カリウム；2.14%トリプロピルアミン (TPA)；0.88%塩化ナトリウム；0.02%ポリドカノール [Thesit]；および0.1%オキサパン-A (保存薬) を用いて、GLO溶液を調製した。0.02%ポリドカノール [Thesit] および0.12% Kathon CG-ICPを用いて、STORE溶液を調製した。

10

## 【0240】

次の装置をアッセイ手順の中で使用した：LifeSep 96Fプレート磁石 (Dexter Magnetic Technologies)；Vortex Genie (VWR)；Picofuge遠心分離機 (VWR)；タイマー (VWR)；96ウェル丸底プレート (Greiner (Cat # 650201))；デジタル・ヒート・ブロック (VWR)；Micromixプレートシェーカー (Siemens/DPC)。

## 【0241】

電気化学発光 (ECL) ベースの検出分析器、BioVeris M1M (Cat # 310806) を試料体積について変更して用いて、下記のアッセイを実行した。変更は、次のとおりである。該当する場合には管系の長さを短縮した。フローセル入口孔直径ならびに測定面積および体積を低減させる。前記分析器で使用したソフトウェアは、パラメータが調節可能である研究バージョンのソフトウェアである。この研究用ソフトウェアで試料体積についての動作パラメータのシーケンスも変更した。これらの変更を伴う計器をMeM1と呼んだ。

20

## 【0242】

下記のアッセイは、競合形式アッセイであり、例えば、検出される分析物の濃度が増加するにつれてこのアッセイからのシグナルは減少する。アッセイ手順は次のとおりであった。37±2 に設定したデジタル・ヒート・ブロックの金属プレートホルダー上で、50 μLの各キャリブレーター、続いて26 μLの捕捉試薬および26 μLのディテクター試薬を二連でプレートウェルに直接添加した。Form 8およびAmp 6に設定したMicromixシェーカーに30秒間それらのプレートを載せて混合した。その後、プレートを、37±2 に設定したデジタル・ヒート・ブロックの金属プレートホルダー内に配置した。プレートをプレートカバーで覆い、5±0.5分間インキュベートした。そのアッセイインキュベーション後、アッセイプレートを150 μL/ウェルのGLO溶液で2回洗浄した。各プレートウェル内の磁性ビーズ複合体をプレート磁石で2±0.5分間ベレットにした。各ウェルからの液体内容物を適切な廃棄物容器へデカントし、プレートをペーパータオルの束に素早く打ちつけることによって残留する液体を除去した。150 μLのGLO溶液を各ウェルに添加した。プレートを再懸濁させ、Form 8およびAmp 6に設定したMicromixシェーカーで2±0.5分間洗浄した。上記の工程の各々をもう1回繰り返した。その2回目の洗浄後、洗浄されたビーズ複合体を100 μL/ウェルのGLO溶液に再懸濁させた。そのプレートを、Form 8および振幅6に設定したMicromixシェーカーに2±0.5分間載せて、ビーズを完全に再懸濁させた。単一緩衝液系 (GLO溶液) を使用してMeM1分析器でそれらのプレートの評価した。Wasabiバージョン2.02.0039を使用してプレートを評価した。

30

40

## 【0243】

0.2 μg/mL TAG Plus 1-5C-5-FU-BSA研究についての結果は、0.25 mg/mL 捕捉試薬および0.2 μg/mL ディテクター試薬の抗体構成が、他の試験した条件 (例えば、0.15 mg/mL 捕捉試薬、0.1 mg/mL 捕捉試薬) と比較して、最高平均ECLカウント、およびECLについての%CV、および6%未満の定量に関してより良好なデータを生じさせることを示した。この抗体構成

50

は、5-FUイムノアッセイに許容され得ることが見出された。5-FUイムノアッセイについての非ゼロキャリブレーター(CAL2~CAL8)は、50 ng/mLから20,000 ng/mL(具体的には、50、100、250、625、2500、10000、20000 ng/mL)の範囲にわたった。

#### 【0244】

##### 実施例17 交差反応性評価

この実験は、5-FU類似体、プロドラッグおよび干渉試薬に対するモノクローナル抗体61C6の特異性を試験するために行った。5-FUアッセイの成分(捕捉試薬、ディテクター)を水性形態で評価し、実施例16でも使用した。この実施例では、5-FUアッセイの成分(捕捉試薬、ディテクター試薬)を凍結乾燥させ、試料(キャリブレーター、対照、およびスパイクした血漿試料)を凍結乾燥試薬ペレットに直接添加した。

10

#### 【0245】

前記化学物質、プロドラッグおよび干渉試薬ならびにそれらの試験濃度は、次のとおりであった:各々10 µg/mLのウラシル、ウリジン、チミン、チミジン、DH5FU、テガフル、カペシタピンおよびヘモグロビン;各々100 µg/mLのフォリン酸、オキサリプラチン、イリノテカン、メトトレキサートおよびシスプラチン;0.6 mg/mLのピリルビン;ならびに30 mg/mLのイントラリピッド。

#### 【0246】

次のプロトコルを用いてアッセイを調製した。5FU捕捉試薬は、試料緩衝液中0.325 mg/mLの濃度のBi-mAb-ビーズを有した(実施例16)。ディテクター試薬は、試料緩衝液中0.26 µg/mLの濃度のTAG Plus 1-5C-5-FU-BSAを有した(実施例16)。捕捉溶液およびディテクター溶液を分注(20 µL)し、凍結乾燥した。チャコール処理ヘパリンリチウムヒト血漿中、0.0、25、100、250、625、2500、10000および20000 ng/mLの濃度での5-FU抗原を用いて定式化されたキャリブレーター曲線を作成した。チャコール処理ヘパリンリチウムヒト血漿において5-FU抗原を用いて調合した3つのレベル(高、中および低)の対照試料(15000、1500および75 ng/mL)を調製した。アッセイ抗体との交差反応性を有し得る可能性がある15の化合物を試験して、その反応性の程度および性質を確認した。化合物を(内因性については10,000 ng/mL、外因性については100,000 ng/mLの濃度で)5-FUを含まない試料、75 ng/mL スパイクした5-FU試料および1,000 ng/mL スパイクした5-FU試料にスパイクした。

20

30

#### 【0247】

次の化合物をアッセイに使用した:ウラシル(Sigma Aldrich、#019K0033);ウリジン(Sigma Aldrich、#030M5309V);チミン(Sigma Aldrich、#0001438242);DH5FU(Medical Isotopes、#10310);テガフル(Acros Organics、#A001543501);カペシタピン(Toronto Research Chemicals、Inc.、#TRC-040306);フォリン酸(Sigma Aldrich、#BCBC4176V);オキサリプラチン(Sigma Aldrich、#O9512);イリノテカン(Sigma Aldrich、#050M1580V);メトトレキサート(MP Biomedicals、LLC、#R27204);シスプラチン(Sigma Aldrich、#479306);ピリルビン(Sigma Aldrich、#106K1562);ヘモグロビン(Sigma Aldrich、#069K7545);イントラリピッド(Sigma Aldrich、#028K0740)。

40

#### 【0248】

次の装置をアッセイ手順の中で使用した:Lifeseep 96Fプレート磁石(Dexter Magnetic Technologies);Vortex Genie(VWR);PicoFuge遠心分離機(VWR);タイマー(VWR);96ウェル

50

丸底プレート (Greiner (Cat # 650201)) ; デジタル・ヒート・ブロック (VWR) ; Micromix プレートシェーカー (Siemens / DPC)。

【0249】

アッセイ手順は、次のとおりであった。使用前にマイクロプレートの表面の静電気を、Zerostat 静電気除去デバイスを使用して低下させた。そのデバイスをマイクロプレートの表面に向け、数回、引金を引いてそのマイクロプレートを横断して引金を放した。真空ピックアップシステム (Vacuum Pick-Up System) を使用して、各捕捉試薬およびディテクター試薬について1つの凍結乾燥ペレットをプレートウェルに移した。中空針先端をピックアップペンに取り付け、フィンガー制御真空をペレットのピックアップ (人差し指を穴の上に置いて、針に真空を引いた) および解放 (その穴から人差し指を上げる) に用いた。37 ± 2 に設定したデジタル・ヒート・ブロックの金属プレートホルダー上で、50 µL の各キャリブレーター、対照および試料 (この場合は交差反応性パネル) を、2個の凍結乾燥ペレットが入っているプレートウェルに二連で直接添加した。Form 8 および Amp 6 に設定した Micromix シェーカーに30秒間プレートを載せて混合した。その後、37 ± 2 に設定したデジタル・ヒート・ブロックの金属プレートホルダー内にそのプレートを配置した。プレートをプレートカバーで覆い、5 ± 0.5 分間インキュベートした。そのアッセイインキュベーション後、実施例 16 に関して説明したようにアッセイプレートを洗浄して評価した。

10

【0250】

【表6】

20

表6ーデータ要約

化学物質	試験した濃度	5-FUなし		75 ng/mLのスパイクした5-FUを含む		1000 ng/mLのスパイクした5-FUを含む	
		測定値 (ng/mL)	%交差反応性	測定値 (ng/mL)	%交差反応性	測定値 (ng/mL)	%交差反応性
ウラシル	10 µg/mL	186	1.9	419	3.4	1258	2.6
ウリジン	10 µg/mL	48	0.5	234	1.6	1094	0.9
チミン	10 µg/mL	99	1.0	322	2.5	1224	2.2
チミジン	10 µg/mL	17	0.2	178	1.0	1131	1.3
DH5FU	10 µg/mL	NT	NT	NT	NT	1095	1.0
テガフル	10 µg/mL	4229	42	5723	56	5543	45
カペシタビン	10 µg/mL	1.9	0.0	143	0.7	1058	0.6
フォリン酸	100 µg/mL	0.8	0.0	129	0.1	965	0.0
オキサリプラチン	100 µg/mL	NT	NT	NT	NT	971	0.0
イリノテカン	100 µg/mL	4.8	0.0	139	0.1	1266	0.3
メトトレキサート	100 µg/mL	1.1	0.0	108	0.0	1106	0.1
シスプラチン	100 µg/mL	NT	NT	NT	NT	1116	0.1
ビリルビン	60 mg/dL または 0.6 mg/mL	96	0.0	220	0.0	968	0.0
ヘモグロビン	10 mg/mL	234	0.0	322	0.0	950	-0.1
イントラリピッド	3000 mg/dL または 30 mg/mL	17	0.0	129	0.0	825	0.0

30

40

NT = 試験していない ; 交差反応性は、2つの化合物を除いて2%を超えなかった ; ウラシル : 2.6% およびテガフル : 47.7%

50

結果は、凍結乾燥 5 - F U 試薬がよく作用すること、およびニート血漿 ( 1 0 0 % マトリックス ) を凍結乾燥 5 - F U 試薬で試験できることを明示した。

【 0 2 5 1 】

実施例 1 8 5 - F U 凍結乾燥試薬の精度の評価

この実験により、2つの異なる M e M 1 分析器での 5 回の試行にわたり 5 - F U 凍結試薬の精度を評価した。使用した材料および装置は、実施例 1 7 に関して説明したものと同じであった。用いたプロトコルは、実施例 1 7 に関して説明したものと同じであった。

【 0 2 5 2 】

全体として、キャリブレーターおよび対照試料は、予想許容基準 :  $C V \% < 1 0 \% ; \% A R =$  目標値の  $\pm 2 0 \%$  を満たし、過剰定量 ( 1 5 1 % ) された 1 つの高い対照の例外が存在したが、3つの対照のうち 2 つは公称値の 2 0 % 以内で仕様を満たした。5 - F U キャリブレーターおよび品質管理 ( *q u a l i t y c o n t r o l* ) についての 5 回の試行からの結果は、次のものを含んだ : E C L についての平均  $\% C V$  ( キャリブレーターおよび対照 ) = 3 . 5 % ; および定量についての平均  $\% C V$  ( キャリブレーターおよび対照 ) = 4 . 6 % 。 5 回の試行からの一貫した結果は、前記 5 - F U イムノアッセイが低い  $\% C V$  によって示される申し分のない精度を有することを示した。

【 0 2 5 3 】

実施例 1 9 アッセイ検出下限 ( L D L ) 評価

この実験を行って、2回の試行にわたっての C A L 1 ( ゼロキャリブレーター ) の 8 0 点から検出下限 ( L D L ) を評価することにより 5 - F U アッセイ感度を評価した。この評価は、8点キャリブレーター曲線およびトリレベル対照に基づいた。使用した材料および装置は、実施例 1 6 に関して説明したものと同じであった。用いたプロトコルは、実施例 1 7 に関して説明したものと同じであった。

【 0 2 5 4 】

2 回の試行からの平均 L D L 値は、2 . 5 4 n g / m L であると決定され、E C L についての平均  $\% C V = 3 . 3 9 \%$  であった。

【 0 2 5 5 】

実施例 2 0 アッセイ時間設定の評価

この実験を行って、5 - F U イムノアッセイインキュベーション時間設定を評価した。3 7 で 5、1 0 および 1 5 分のアッセイインキュベーション時間を試験し、該アッセイインキュベーション時間は、8点キャリブレーター曲線およびトリレベル対照に基づいた。使用した材料および装置は、実施例 1 7 に関して説明したものと同じであった。用いたプロトコルは、各アッセイプレートを  $5 \pm 0 . 5$  分、 $1 0 \pm 1$  分、および  $1 5 \pm 1 . 5$  分で逐次的にインキュベートしたことを除き、実施例 1 7 に関して説明したものと同じであった。1 台の M e M 1 と、調製し、凍結させた 1 ロットのキャリブレーターおよび対照とをこの研究に用いた。

【 0 2 5 6 】

E C L シグナルは、3 7 でアッセイインキュベーション時間が 5 から 1 5 分に延びるにつれて漸進的に増加した。1 5 分のインキュベーションで、E C L カウントは約 1 0 0 万カウントであった。シグナルが計器の飽和範囲に達してしまうので、このインキュベーションは推奨しない。

【 0 2 5 7 】

アッセイ感度は、3 7 でアッセイインキュベーション時間が 5 から 1 5 分に延びるにつれて顕著に減少した ( C A L 1 ( 0 . 0 g m / m L 5 - F U、ゼロキャリブレーター ) と比較した各キャリブレーターのシグナルの  $\%$  差 ) 。 5 分のインキュベーションで、E C L シグナルは、2 5 n g / m L の 5 - F U をチャコール処理血漿にスパイクしたとき ( C A L 2、2 5 n g / m L 5 - F U )、C A L 1 と比較して 6 1 % に降下したが、同レベルのスパイクした 5 - F U を用いて、E C L シグナルは、他のインキュベーション時間設定では C A L 1 と比較して 7 8 % にしか降下しなかった。これは、この 5 - F U イムノアッセイが、より短いインキュベーション時間がより良好な感度を達成することを示す。

結果は、37 で5分が5-FUイムノアッセイの最適なアッセイ時間設定であることを実証した。

【0258】

実施例21 5-FU試料緩衝液の評価

これらの実験を行って、5-FU試料緩衝液へのサリチル酸および/またはヤギ抗マウスの添加が、例えば、一部の正常血漿試料における高い5-FUカウントの検出の低減を助長するために、必要であるかどうかを評価した。これらの実験は、5-FU試料緩衝液の4つの異なる調合物を使用し、2人の異なるオペレーターがこれらの実験を評価した。

【0259】

5-FU試料緩衝液の前記4つの異なる調合物は、成分およびそれらの濃度については実施例16の試料緩衝液を参照して次のとおりであった：調合物I-サリチル酸なし（他の点では実施例16における試料緩衝液と同じ）；調合物II-ヤギ抗マウスIgGなし（他の点では実施例16における試料緩衝液と同じ）；調合物III-サリチル酸なし、かつヤギ抗マウスIgGなし（他の点では実施例16における試料緩衝液と同じ）；および調合物IV-実施例16における試料緩衝液と同じ、すなわち、サリチル酸とヤギ抗マウスIgGの両方を含有する。使用した材料および装置は、実施例16に関して説明したものと同じであった。用いたプロトコルは、実施例16に関して説明したものと同じであった。

10

【0260】

5-FU試料緩衝液の評価のために結果を収集し、二人のオペレーターが行うアッセイで分析して、キャリブレーターおよびスパイクしたヒト血漿試料についての平均ECLカウントおよび平均濃度を調べた。それらの結果のすべては、キャリブレーターおよび対照については2つのウェルの平均、ならびに正常血漿試料およびスパイクした血漿試料については3つのウェルの平均を表す。

20

【0261】

スパイクした試料の定量は、8点キャリブレーター曲線およびトリレベル対照試料に基づいた。合計32のアッセイプレートを2人のオペレーター（オペレーター1人あたり16のアッセイプレート）が2台の異なるMeM1分析器で評価した。各アッセイプレートは、8点キャリブレーター曲線、トリレベル対照、およびスパイクした正常ヒト血漿試料から成った。正常ヒト血漿試料（合計15）を3レベル（0、500および5000ng/mL）の5-FU分析物で各々スパイクした。試験中、前記15の試料を、3または4試料の群で、各々緩衝液調合物を用いて試行した。15のスパイクした正常ヒト血漿試料を評価するために、各緩衝液調合物に4つのプレートが必要であった。

30

【0262】

すべてのプレート（2人のオペレーター間で32プレート）からのキャリブレーター曲線は、5-FUイムノアッセイについての次の例示的許容基準を満たした：7つのキャリブレーター、Ca12~Ca18（それぞれ、25、100、250、500、1000、2500、10000ng/mL）のうち6つは、カウントおよび定量について許容可能な%変動係数(%CV)を有する。Ca12およびCa18については、カウントおよび定量について%CV 20%が許容可能である。Ca13~Ca17（それぞれ、100、250、500、1000、2500ng/mL）については、カウントおよび定量について%CV 15%が許容可能である。Ca13~Ca17は、目標濃度の±15%以内にバックフィット(backfit)する。Ca12およびCa18は、目標濃度の±20%以内にバックフィットする。これらの制限により、キャリブレーター曲線フィットの質は、試料および対照の正確な定量が実行可能であるようなものであることが保証される。バックフィットまたは%CVが前記許容可能基準外である場合には、Ca12~Ca18間の1つのキャリブレーターの最大値を除去して、6つのキャリブレーターの最小値を残して4パラメータロジスティック曲線フィットを生成することができる。

40

【0263】

3つの対照のうち2つは、目標値の±20%以内で定量された。すべてのプレートが

50

らのカウントおよび定量についてのキャリブレーター%CVは、15%であった。キャリブレーターバックフィットもまた、キャリブレーター3~7については±20%、ならびにCal 2およびCal 8については±15%のバックフィットの例示的許容基準を満たした。すべてのプレートからのカウントおよび定量についての対照%CVは、20%であった。対照バックフィットもまた、目標の20%以内のバックフィットの許容基準を満たした。

## 【0264】

5-FU試料緩衝液の異なる調合物を使用するキャリブレーターおよび対照試料についてのECLシグナルは、ECLおよび定量についての%CVの点で同等であった。オペレーター#2の実験から得たECLシグナルは、オペレーター#1の実験からのものと比較して10~15%低かった。理論により拘束されることを望まないが、ECLシグナルのこの低減は、(1)オペレーター#2が試験を完了したときは3週間経っていた液体形態の捕捉試薬および/または(2)分析器間の差に起因する可能性が高かった。この低減されたECLシグナルは、スパイクした血漿試料の定量に影響を及ぼさなかった。

10

## 【0265】

5-FU試料緩衝液の異なる調合物を使用してスパイクしたヒト血漿試料から定量した5-FU値もまた、互いに同様の結果を有した。

## 【0266】

この研究からの結果全体は、5-FU試料緩衝液へのサリチル酸およびヤギ抗マウスIgGの添加が、正常ヒト血漿試料における5-FUのバックグラウンド定量を有意に低下させないことを明示した。

20

## 【0267】

本明細書に開示する5-FUイムノアッセイの大部分は、検出方法としてECL技術を用いてMeM1分析器計器で試行した。インキュベーション時間は、37で約5分であった。試料は、50μLの試料体積で抗凝固処置された、ヒト血漿、ヘパリンリチウムと、次の対照を含有した：75ng/mL、1500ng/mL、15000ng/mL 5-FU。0.0~20,000ng/mL 5-FUのキャリブレーター範囲を5パラメータロジスティック、1/(シグナル)<sup>2</sup>の重み付け、キャリブレーター曲線で使用した。

## 【0268】

実施例22 mAb 61C6のアミノ酸およびヌクレオチド配列  
mAb 61C6の重鎖  
mAb 61C6の重鎖をコードしているヌクレオチド配列を、配列番号10であると決定した。

30

## 【0269】

mAb 61C6の重鎖のアミノ酸配列を、次のものであると決定した：

## 【0270】

## 【化17】

MDWLWNLFLMAAAQSIQAQIQLVQSGPELKKPGETVTISCKASGYTLTNYGMNWVKQAP  
CDR-H1

40

GKGLKWMGWINTNSGEPTYVEEFKGRFAFSLETSVSTVYLQISDLKHEDTATYFCARWGP  
CDR-H2 CDR-H3

HFNAYGWFAYWGQGLVTVSAAKTTPPSVYPLAPGCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPESVTV  
CDR-H3

TWNSGSLSSSVHTFPALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTTVDKKLEP  
SGPISTINPCPPCKECKCPAPNLEGGPSVFIFPNIKDVLMISLTPKVTCVVVDVSEDD  
PDVQISWVFNVEVHTAQTQTHREDYNSTIRVVSTLPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPS  
PIERTISKIKGLVRAPQVYILPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISVEWTSNGHTEEN  
YKDTAPVLDSGYSYFIYSKLNMKTSKWEKTDSFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK

(配列番号2)

50

m a b 6 1 C 6 の重鎖のアミノ酸配列（配列番号 2）は、推定シグナルペプチド（1 - 19）、CH1（142 - 238）およびCH2（261 - 370）領域（下線を引いた）を含有する。ヒンジ領域（239 - 370）は、斜体である。CDR - H1（45 - 54）（配列番号 3）、CDR - H2（69 - 85）（配列番号 4）およびCDR - H3（118 - 130）（配列番号 5）領域にも下線を引いた。

【0271】

m a b 6 1 C 6 の軽鎖をコードしているヌクレオチド配列を、配列番号 11 におけるとおりであると決定した。

【0272】

m a b 6 1 C 6 の軽鎖のアミノ酸配列を、次のものであると決定した：

10

【0273】

【化18】

MMSSAQFLGLLLLCFQGTRCYIQMTQTASSLSASLGDRVTISCRASQDIWNYLNWYQOKPDG  
 TIKLLIYYKSRLHSGVPSRFSGSGSGIDFSLTISNLEQEDFATYFCQQGHTLPWTFFGGGSKL  
 EIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQ  
 DSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC（配列番号 6）

m a b 6 1 C 6 の軽鎖のアミノ酸配列（配列番号 6）は、推定シグナルペプチド（1 - 20）、CDR - L1（44 - 54）（配列番号 7）、CDR - L2（70 - 76）（配列番号 8）およびCDR - L3（109 - 117）（配列番号 9）を含有し、これらのすべてに下線を引いた。

20

【0274】

【化 1 9】

配列配列番号 1

GPRP

配列番号 2 - mab 61C6の重鎖のアミノ酸配列

MDWLWNLFLMAAAQSIQAQIQLVQSGPELKKPGETVTISCKASGYTLTNYGMNWVKQAPGK  
 GLKWMGWINTNSGEPTYVEEFKGRFAFSLETSVSTVYLQISDLKHEDTATYFCARWGPWFNA  
 YGWFAYWGQGLTVTSAAKTTPPSVYPLAPGCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPESVTVTWNSGS  
 LSSSVHTFPALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTTVDKKLEPSGPISTIN  
 PCPPCKECHKCPAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMISLTPKVT CVVVDVSEDDPDVQISWTFVN  
 NVEVHTAQTQTHREDYNSTIRVVSTLPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTISKIKGL  
 VRAPQVYILPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSY  
 FIYSKLNMKTSKWEKTDSFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK

10

配列番号 3 - mab 61C6の重鎖CDR1のアミノ酸配列

GYTLTNYGMN

配列番号 4 - mab 61C6の重鎖CDR2のアミノ酸配列

WINTNSGEPTYVEEFKG

20

配列番号 5 - mab 61C6の重鎖CDR3のアミノ酸配列

WGPHFNAYGWFAF

配列番号 6 - mab 61C6の軽鎖のアミノ酸配列

MMSSAQFLGLLLLLCFQGRICYIQMTQTASSLSASLGDRVTISCRASQDIWNYLNWYQQKPDG  
 TIKLLIYYKSRLHSGVPSRFSGSGSGIDFSLTISNLEQEDFATYFCQQGHTLPWTFGGGSKL  
 EIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNMFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQ  
 DSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSSTPIVKSFNRNEC

配列番号 7 - mab 61C6の軽鎖CDR1のアミノ酸配列

RASQDIWNYLN

30

配列番号 8 - mab 61C6の軽鎖CDR2のアミノ酸配列

YKSRLHS

配列番号 9 - mab 61C6の軽鎖CDR3のアミノ酸配列

QQGHTLPWT

配列番号 10 - mab 61C6の重鎖をコードするヌクレオチド配列

ATGGATTGGCTGTGGAACCTTGCTATTCCTGATGGCAGCTGCCCAAAGTATCCAAG  
 CACAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCACGA  
 TCTCCTGCAAGGCTTCTGGATATACCCTCACAACTATGGAATGAACTGGGTGAAGCAGG  
 CTCCAGGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCAATTCTGGAGAACCAACAT  
 ACGTTGAAGAGTTCAAGGGACGGTTTGCCCTTCTCTTTGGAAACCTCTGTCAGCACTGTCT  
 ATTTGCAAATCAGTGACCTCAAACATGAGGACACGGCTACATATTTCTGTGCAAGATGGG  
 GCCCCATTTCAACGCCTACGGGTGGTTTGCTTATGGGGCCAAGGCACTCTGGTCACTG  
 TCTCTGCAGCCAAAACAACACCCCCATCAGTCTATCCACTGGCCCTGGGTGTGGAGATA  
 CAACTGGTTCCCTCCGTGACTCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTACTTCCCTGAGTCAGTGA

40

【 0 2 7 5】

## 【化 2 0】

CTGTGACTTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCAGTGTGCACACCTTCCCAGCTCTCCTGC  
 AGTCTGGACTCTACACTATGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCAAGTC  
 AGACCGTCACCTGCACCGTTGCTCACCCAGCCAGCAGCACCACGGTGGACAAAAAAGTTC  
 AGCCCAGCGGGCCCATTTCAACAATCAACCCCTGTCTCCATGCAAGGAGTGTCACAAAT  
 GCCCAGCTCCTAACCTCGAGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAATATCAAGG  
 ATGTACTCATGATCTCCCTGACACCCAAGGTCACGTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGG  
 ATGACCCAGACGTCCAGATCAGCTGGTTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGA  
 CACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTATCCGGGTGGTCAGCACCCCTCCCCATCC  
 AGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCC  
 CATCACCCATCGAGAGAACCATCTCAAAAATTAAGGGCTAGTCAGAGCTCCACAAGTAT  
 ACATCTTGCCGCCACCAGCAGAGCAGTTGTCCAGGAAAGATGTCAGTCTCACTTGCCTGG  
 TCGTGGGCTTCAACCCTGGAGACATCAGTGTGGAGTGGACCAGCAATGGGCATACAGAGG  
 AGAACTACAAGGACACCGCACCAGTCTGGACTCTGACGGTCTTACTTTCATATATAGCA  
 AGCTCAATATGAAAACAAGCAAGTGGGAGAAAACAGATTCTTCTCATGCAACGTGAGAC  
 ACGAGGGTCTGAAAAATTACTACCTGAAGAAGACCATCTCCCGGTCTCCGGGTAAATGA

10

配列番号 11 - mab 61C6の軽鎖をコードするヌクレオチド配列

ATGATGTCCTCTGCTCAGTTCCTTGGTCTCCTGTTGCTCTGTTTTCAAGGTACCAGATGTTA  
 TATCCAGATGACACAGACTGCATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCA  
 GTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTTGGAATTATTTAAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGA  
 ACTATTTAACTCCTGATCTACTATAAATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGTTTCAG  
 TGCCAGTGGGTCTGGAATAGATTTTTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAACAAGAAGATTTG  
 CCACTTACTTTTGCCAACAGGGTCATACGCTTCCGIGGACGTTCCGGTGGAGGCTCCAAACTG  
 GAGATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTT  
 AACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTACCCCAAAGACATCAATG  
 TCAAGTGGAAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAACAGTTGGACTGATCAG  
 GACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGA  
 ACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAAGACATCAACTTCACCCATTTGTCAGA  
 GCTTCAACAGGAATGAGTGTTAG

20

## 【配列表】

30

2015502356000001.xml

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 12/67353
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C07K 16/00; G01N 33/00 (2013.01) USPC - 530/388.9; 530/389.8, 435/7.93 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC- 530/388.9; 530/389.8, 435/7.93		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC- 530/350, 530/387.1, 435/7.1; 435/7.92		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB); Google Patents; Google Scholar: 5-FU, 5-fluorouracil, uracil, thymine, tegafur, cross-reactivity, anti 5-FU, antibody, "1,(2-tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil", tegafur and uracil", "tegafur + uracil", "tegafur/uracil" GenCore 6.4:SEQ ID NO: 2-9		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	White, et al. Point-of-care (POC) diagnostic assay for 5-fluorouracil (5-FU) quantitation to enable dose adjustment and detect dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency. <i>Journal of Clinical Oncology</i> May 2011, 29(15 suppl):e19562; in entirety	1-2
X	Beumer, et al. Multicenter evaluation of a novel nanoparticle immunoassay for 5-fluorouracil on the Olympus AU400 analyzer. <i>Ther Drug Monit.</i> 2009, 31(6):688-94; Abstract, pg 3, col 1	3
A	US 7,767,794 B2 (Salamone et al.) 03 August 2010 (03.08.2010) Scheme 1, col 21, ln 25-35, Table 1	4
A	US 2008/0138343 A1 (Law, et al.) 12 June 2008 (12.06.2008) SEQ ID NO 6	7, 8
A	US 2003/0031664 A1 (Reed) 13 February 2003 (13.02.2003) SEQ ID NO 13, amino acids 69-85	7, 8
A	US 2009/0130114 A1 (Qian, et al.) 21 May 2009 (21.05.2009) SEQ ID NO 12, amino acids 20-476).	8
A	US 2010/0239575 A1 (Banchereau, et al.) 23 September 2010 (23.09.2010) SEQ ID NO 4, amino acids 22-234	9
A	US 2011/0034488 A1 (Roa, et al.) 10 February 2011 (10.02.2011)	1-4 and 7-9
A	US 2010/0204456 A1 (Salamone, et al.) 12 August 2010 (12.08.2010) Abstract, para [0018]-[0020], [0057], [0075], [0079]	1-4 and 7-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 04 June 2013 (04.06.2013)		Date of mailing of the international search report <b>19 JUN 2013</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/67353

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 7,205,116 B2 (Salamone, et al.) 17 April 2007 (17.04.2007) Abstract, claims 1-6	1-4 and 7-9
A	Salif, et al. Pharmacokinetically Guided Dose Adjustment of 5-Fluorouracil: A Rational Approach to Improving Therapeutic Outcomes. J Natl Cancer Inst 2009, 101(22):1543-1552	1-4 and 7-9
A	Honda, et al. Development and characterization of a monoclonal antibody with cross-reactivity towards uracil and thymine, and its potential use in screening patients treated with 5-fluorouracil for possible risks. Clin Chim Acta 2002, 322(1-2):59-66.	1-4 and 7-9
A	Myriad Genetic Laboratories, Inc. OnDose. Technical Specifications. 03 November 2011 [according to document properties for posted document]. [Retrieved from the Internet 04 June 2013: < <a href="http://www.myriad.com/lib/technical-specifications/OnDose%20Tech%20Specs_6_10.pdf">http://www.myriad.com/lib/technical-specifications/OnDose%20Tech%20Specs_6_10.pdf</a> >]	1-4 and 7-9

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/67353

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: 5, 6, 10, 26-31, 35-61  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

Group I: claims 1-4 and 7-9, drawn to an antibody that binds to 5-FU.

Group II: claims 11-25, drawn to a compound of the formula (1), and a method of using the compound for producing an antibody that binds selectively to 5-fluorouracil (5-FU).

Group III: claims 31-34, drawn to a method of detecting 5-fluorouracil (5-FU) in a sample comprising: combining in a solution at least said sample with a first binding molecule and a detector molecule, wherein the first binding molecule can bind the detector molecule and wherein 5-FU competitively inhibits the binding of the first binding molecule to the detector molecule and detecting the binding of the first binding molecule to the detector molecule.

\*\*\*\*\* See Supplemental Sheet to continue \*\*\*\*\*

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-4 and 7-9

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/67353

\*\*\*\*\* Supplemental Sheet \*\*\*\*\*

In Continuation of Box III. Observations where unity of invention is lacking:

Group IV: claims 62-63, drawn to an ECI detection kit for detecting 5-FU in a sample, the kit comprising:

(i) a binding molecule optionally immobilized or bound to a surface; and (ii) a labeled detector molecule, wherein the binding molecule can bind the detector molecule and wherein 5-FU competitively inhibits binding of the binding molecule to the detector molecule.

The inventions listed as Groups I-IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The inventions of Groups I-III do not include the inventive concept of an ECI detection kit for detecting 5-FU in a sample, the kit comprising: (i) a binding molecule optionally immobilized or bound to a surface; and (ii) a labeled detector molecule, wherein the binding molecule can bind the detector molecule and wherein 5-FU competitively inhibits binding of the binding molecule to the detector molecule, as required by Group IV.

The inventions of Groups I-II do not include the inventive concept of a method of detecting 5-FU in a sample, as required by Group III.

The inventions of Group I do not include the inventive concept of a compound of the formula (1), and a method of using the compound for producing an antibody that binds selectively to 5-FU, as required by Group II.

The inventions of Groups I-IV share the technical feature of an antibody that binds to 5-FU. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being anticipated by an article titled "Multicenter evaluation of a novel nanoparticle immunoassay for 5-fluorouracil on the Olympus AU400 analyzer" by Beumer, et al. (Ther Drug Monit. 2009, 31(6):688-94) (hereinafter "Beumer") (pg 2, col 1, monoclonal antibody selective for 5-FU). As said antibody was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

In addition, Beumer anticipates claim 3 and discloses an anti-5-FU antibody that has 3% or less cross-reactivity with thymine in a competitive assay (pg 4, col 1 to col 2, The percentage cross-reactivity in the assay for thymine was 2.0%).

Finally, Beumer further discloses claim 31, i.e. a method of detecting 5-FU in a sample comprising: combining in a solution at least said sample with a first binding molecule and a detector molecule, wherein the first binding molecule can bind the detector molecule and wherein 5-FU competitively inhibits the binding of the first binding molecule to the detector molecule and detecting the binding of the first binding molecule to the detector molecule (pg 2, col 1, "The 5-FU immunoassay is based upon the principle of measuring changes in scattering of light or absorbance that occur when nanoparticles aggregate. The assay is a 2-reagent system in which reagent 1 is comprised of a multivalent 5-FU derivative polymer conjugate in a buffer, and reagent 2 is a suspension of 200-nm particles with a monoclonal antibody selective for 5-FU attached to the surface. The agglutination is measured at a wavelength of 600 nm. ... In the absence of 5-FU, this reaction creates large aggregates, resulting in a solution that scatters incident light and leads to an increase in the observed absorption of the solution. When a sample containing 5-FU is introduced, the agglutination reaction is partially inhibited. Antibody bound to sample drug is no longer available to promote nanoparticle aggregation, resulting in less scattering of incident light and lower observed absorption of light by the solution. Thus, a classic inhibition curve with respect to 5-FU concentration is obtained, with the maximum absorption occurring at low concentrations of drug and minimum absorption occurring at high concentrations of drug. Monitoring the changes in scattered light or absorbance as a function of drug concentrations results in a concentration-dependent curve").

Groups I-IV therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
C 1 2 N 15/00 A

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 フー, ポール キュー.

アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 7 0 4, フレデリック, ベルベディア ドライブ 9 1  
2 4

(72)発明者 フアン, シャオフェン

アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 7 8, ゲイザーズパーク, ウェスト サイド ドライブ 3 7 5, ナンバー 3 0 1

(72)発明者 ボン ボルステル, リード ダブリュー.

アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 5 4, ポトマック, ソレル アベニュー 1 0 0 1 7

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA01 GA05 HA01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 DA75 DA76 EA50 FA71

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015502356A5</a>	公开(公告)日	2016-01-21
申请号	JP2014544935	申请日	2012-11-30
[标]申请(专利权)人(译)	那么统计诊断有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	好吧统计诊断, LLC		
[标]发明人	フーポールキュー ファンシャオフエン ボンボルステルリードダブリュー		
发明人	フー, ポール キュー. ファン, シャオフエン ボン ボルステル, リード ダブリュー.		
IPC分类号	C07K16/44 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/553 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/5308 C07K16/44 C07K2317/33 G01N33/53 G01N33/94 G01N2430/00 G01N2800/52		
FI分类号	C07K16/44.ZNA G01N33/53.G G01N33/543.511.D G01N33/553 G01N33/543.575 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/GA05 4B024/HA01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA71		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	61/665686 2012-06-28 US 61/565281 2011-11-30 US		
其他公开文献	JP2015502356A		

#### 摘要(译)

本发明涉及5-氟尿嘧啶, 5-氟尿嘧啶免疫原, 结合5-FU和/或与另一分子结合的5-FU的抗体的偶联物, 以及用于检测, 定量和监测样品中5-氟尿嘧啶的量的测定如血浆中。