

(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2017-513002

(P2017-513002A)

(43) 公表日 平成29年5月25日(2017.5.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	D
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543	5 0 1 D
<b>GO 1 N 33/573 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/573	A
<b>GO 1 N 33/574 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/574	A
	GO 1 N 33/543	5 7 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 33 頁)

(21) 出願番号 特願2016-559913 (P2016-559913)  
 (86) (22) 出願日 平成27年2月27日 (2015. 2. 27)  
 (85) 翻訳文提出日 平成28年11月29日 (2016. 11. 29)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/000469  
 (87) 国際公開番号 W02015/149903  
 (87) 国際公開日 平成27年10月8日 (2015. 10. 8)  
 (31) 優先権主張番号 14001200.6  
 (32) 優先日 平成26年3月31日 (2014. 3. 31)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 591032596  
 メルク パテント ゲゼルシャフト ミッ  
 ト ベシュレンクテル ハフツング  
 Merck Patent Gesell  
 schaft mit beschrae  
 nkter Haftung  
 ドイツ連邦共和国 デー-64293 ダ  
 ルムシュタット フランクフルター シュ  
 トラーセ 250  
 Frankfurter Str. 25  
 0, D-64293 Darmstadt  
 , Federal Republic o  
 f Germany  
 (74) 代理人 100102842  
 弁理士 葛和 清司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 修飾特異的バインダーを使用することによる分析物を分析するための方法

## (57) 【要約】

同一サンプル中の修飾分析物の定量化のために、分析物の濃度を決定するための、種々の色素へ結合している分析物（対象とするその特異的修飾部位を持つ）に結合する修飾部位特異抗体を、別の色素へ結合している非修飾分析物に特異的な抗体と同時に使用して、修飾について分析物を分析するための方法、キットおよび組成物。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

タンパク質またはポリペプチドを含む分析されるべきサンプルの分析物中の該タンパク質またはポリペプチドの修飾部位を検出するための方法であって、修飾部位が、リン酸化、自己リン酸化、メチル化、ヒドロキシル化、グリコシル化、ユビキチン化、アセチル化、プレニル化、アミド化またはN末端メチオニン検出からなる群から選択され、方法が、

( a ) 該修飾部位に特異的であるかまたはそれへ結合し、かつ、検出マーカーとして働く色素と接合されているかまたはそれに結び付けられている、一次捕捉抗体を提供すること、

ならびに、

( b ) 該修飾部位とは異なる部位またはエピトープにおいて、該タンパク質に特異的であるかまたはそれへ結合し、かつ、ステップ ( a ) の該色素とは識別可能な検出マーカーと接合されているかまたはそれに結び付けられている、二次抗体を提供すること、

( c ) ( a ) で使用されたのとは別の修飾部位に特異的であるかまたはそれへ結合し、かつ、ステップ ( a ) および ( b ) の該色素とは識別可能な検出マーカーとして働く色素と接合されているかまたはそれに結び付けられている、三次捕捉抗体を提供することを含む、前記方法。

## 【請求項 2】

キナーゼインヒビターの存在下における、請求項 1 に記載の方法によって検出される 1 以上のキナーゼのリン酸化および自己リン酸化を、該キナーゼインヒビターの不在下と比較して、分析するための方法であって、方法は以下のステップ：

( a ) 血清枯渇によって細胞を飢餓にすること、

( b ) キナーゼインヒビターの存在下および不在下において、血清、成長因子および / またはサイトカインを加えることによって、キナーゼの自己リン酸化活性を誘導すること、

( c ) 細胞を可溶化すること、それによって、細胞ライセートをそこから放出させること、

( d ) 種々のホスホチロシン、ホスホセリン、ホスホスレオニンと、種々の色素と接合された非修飾部位特異的結合タンパク質とを加えることによって、サンプル中のキナーゼを捕捉すること、

ここで、種々の各結合タンパク質は、特有の色素に結び付けられており、

( e ) 読出し標識と直接接合されているかまたはビオチンと直接カップリングされているキナーゼ上の非修飾部位特異的領域へ結合する抗体によって、特有の色素を有する自己リン酸化されたチロシンキナーゼを、d) から同定すること、ここで、抗体が、d) で使用された結合タンパク質とは別の、キナーゼ中の非修飾部位特異的領域へ結合する必要がある、

( f ) キナーゼインヒビターの存在下での誘導の結果として生じる e) からのリン酸化されたかまたは自己リン酸化されたチロシンキナーゼを、該キナーゼインヒビターの不在下での誘導の場合と比較すること、ならびに、個々のキャピティにおける非修飾キナーゼレベルとの直接比較において、e) からのリン酸化された / 自己リン酸化されたキナーゼを比較すること、これにより、個々の分析物の規格化が可能となること

を含む、前記方法。

## 【請求項 3】

分析された修飾が、MetAP1 および MetAP2 酵素活性の確認を検出する、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

診断および腫瘍の病期分類のための、

キナーゼインヒビターの不在下で、チロシンキナーゼのリン酸化状態をプロファイリングするための方法であって、

請求項 2 の c) のライセートが、腫瘍試料、疾患に冒された組織、または、同等な動物材料に由来する、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 5】

10

20

30

40

50

ステップ ( b ) において、キナーゼアクチベーターを試験する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

色素が、蛍光色素またはルミネセンス色素である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

マーカーが、蛍光マーカーまたはルミネセンスマーカーである、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

細胞が、対象の分析物を表すポリペプチドをコードする核酸で、細胞飢餓 ( a ) に先立ち形質転換され、前記分析物が、過剰発現によるかまたは該細胞中のキナーゼそれ自体の組み換えペプチドにおける自己活性化突然変異のため、リン酸化を誘導することができる、請求項 2 に記載の方法。

10

【請求項 9】

細胞が、真核細胞である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 10】

真核細胞が、哺乳動物細胞である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 11】

キナーゼインヒビターを、キナーゼに結合するというそれらの特異性について、プロファイリングするための、請求項 1 または 2 に記載の方法の使用。

20

【請求項 12】

キナーゼアクチベーターを、キナーゼに結合するというそれらの特異性について、プロファイリングするための、請求項 1 または 2 に記載の方法の使用。

【請求項 13】

キナーゼインヒビターの特異性をプロファイリングするための請求項 11 または 12 に記載の方法における使用のためのキットであって、以下：

( a ) リン酸化されたキナーゼに結合する種々の捕捉抗ホスホ抗体に結び付けられている 1 ~ 500 個の特有の色素を持つマイクロスフェアの組成物、および、

( b ) リン酸化されたキナーゼの同定のための a ) における色素とは識別可能な色素で標識されたキナーゼに特異的な抗体

30

を含む、前記キット。

【請求項 14】

キナーゼアクチベーターの特異性をプロファイリングするための請求項 13 に記載の方法における使用のためのキットであって、以下：

( a ) リン酸化されたチロシンキナーゼに結合する種々の捕捉抗ホスホ抗体に結び付けられている 1 ~ 500 個の特有の色素を持つマイクロスフェアの組成物、および、

( b ) リン酸化されたキナーゼの同定のための a ) における色素とは識別可能な色素で標識されたキナーゼに特異的な抗体

を含む、前記キット。

【請求項 15】

キナーゼインヒビターの特異性をプロファイリングするための請求項 13 に記載の方法における使用のためのキットであって、以下：

( a ) 種々の抗ホスホ抗体に結び付けられている 1 ~ 500 個の特有の色素の組成物、

( b ) a ) における色素とは識別可能な色素で標識された抗キナーゼ抗体

を含む、前記キット。

40

【請求項 16】

キナーゼアクチベーターの特異性をプロファイリングするための請求項 13 に記載の方法における使用のためのキットであって、以下：

( a ) 種々の抗ホスホ抗体に結び付けられている 1 ~ 500 個の特有の色素の組成物、

( b ) a ) における色素とは識別可能な色素で標識された抗キナーゼ抗体

50

を含む、前記キット。

【請求項 17】

色素が、蛍光色素またはルミネセンス色素である、請求項 13 ~ 16 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 18】

種々の抗キナーゼ抗体に各々結び付けられている 1 ~ 500 個の特有の色素を含有する組成物であって、前記抗体が、リン酸化されたキナーゼに特異的に結合する抗体によって捕捉された、一定のキナーゼに特異的に結合する、前記組成物。

【請求項 19】

1 ~ 100 個の特有の蛍光色素で着色されたマイクロスフェアを持つ、請求項 18 に記載の組成物。

10

【請求項 20】

1 ~ 200 個の特有の蛍光色素で着色されたマイクロスフェアを持つ、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 21】

1 ~ 300 個の特有の蛍光色素で着色されたマイクロスフェアを持つ、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 22】

1 ~ 400 個の特有の蛍光色素で着色されたマイクロスフェアを持つ、請求項 18 に記載の組成物。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の分野

本発明の主題は、特異的な分析物の検出のためのサンドイッチ ELISA 技法を、種々のサンプルマトリックス（例として細胞ライセート (lysate)、組織ホモジネート、体液）中の微量 (rare amounts) の分析物の同定のための Luminex-xMAP 検出技術と組み合わせるアッセイである。検出システムによって、1 キャピティ中、最大 500 個までの異なる分析物の測定が可能になる。

【背景技術】

30

【0002】

本発明の背景

急成長している配列データベースを使用できるようになったことに伴い、ゲノムへの適用によって、細胞中のタンパク質発現のグローバルスクリーニングのための、より早く、かつ、より効率的な方法が要求されている。しかしながら、細胞プロテオームの複雑性は、タンパク質の翻訳後修飾も考慮すると、実質的に拡大している。

【0003】

タンパク質翻訳後の動的 (dynamic) 修飾は、タンパク質の構造および機能を維持し、調節するために重要である。今日までに特徴付けられている翻訳後修飾の数百もの異なるタイプのうち、タンパク質のリン酸化は大きな役割を果たしている。酵素に触媒されるタンパク質のリン酸化および脱リン酸化は、生細胞において、肝要な調節事象である。細胞周期、細胞成長、細胞分化および代謝などの複雑な生物学的プロセスは、タンパク質の活性、安定性、相互作用および局在化を調整する可逆的リン酸化事象によって、組織化され、厳しく制御されている。例として恒常的に活性があるかまたは不活性であるタンパク質キナーゼおよびホスファターゼを生成する突然変異による、タンパク質のリン酸化状態における混乱は、発がんに大きな役割を果たしている。ホスホタンパク質におけるリン酸化部位の正確な局在化と組み合わせられた、それらのタンパク質の総合的な分析および同定（「ホスホプロテオミクス」）は、複雑な生物学的システムと、疾患に繋がる分子的特徴とを理解するのに必須の要件である。

40

【0004】

50

タンパク質のリン酸化は、共有結合修飾において最も高頻度で見られるメカニズムの1つに代表されるものである。哺乳動物細胞に存在する全タンパク質の3分の1がリン酸化されており、そのリン酸化の原因となるキナーゼ、酵素が、発現されたゲノムのうち約1~3%を構成すると推定される。生物は、タンパク質の可逆的リン酸化を使用することで、シグナル伝達、遺伝子発現、細胞周期、細胞骨格調節およびアポトーシスを含む多くの細胞プロセスを制御する。ホスファート基は、セリン、トレオニン、チロシン、ヒスチジン、アルギニン、リシン、システイン、グルタミン酸およびアスパラギン酸残基を修飾し得る。しかしながら、セリン(90%)、トレオニン(10%)またはチロシン(0.05%)残基におけるヒドロキシル基のリン酸化が最も高頻度で見られ、代謝、細胞分裂、細胞成長および細胞分化における他のプロセスの中にも関わっている。生命の調節においてリン酸化が中心的役割を占めるため、タンパク質リン酸化を特徴付けるための方法の開発に、多くの努力が注ぎ込まれてきた。これらのリン酸化部位の多くが、重大な生物学的プロセスを調節し、分子医学に重要な診断標的または治療標的であることを証明し得る。例えば、今日までに同定されている100個を超える優性がん遺伝子のうち、46個がタンパク質キナーゼである。

10

## 【0005】

多くのがんは、がん性細胞の無制御な成長および増殖に繋がる細胞シグナリング経路における崩壊によって特徴付けられる。受容体チロシンキナーゼ(RTK)は、これらのシグナリング経路において極めて重要な役割を果たし、細胞外分子シグナルを、細胞の細胞質および/または核の中へ送る。事実上すべての組織タイプの細胞は、チロシンキナーゼ活性を内在する膜貫通受容体分子を発現し、それを通じて、様々な成長因子および分化因子が、広範な生物学的効果を仲介する(Aaronson, Science 254: 1146-52 (1991)の総説)

20

## 【0006】

チロシンキナーゼの触媒活性は頻繁に、活性化セグメントと呼ばれるキナーゼドメイン領域内の自己リン酸化によって刺激され(Weinmaster et al. (1984) Cell 37, 559-568)、実際にこれは、主要なメカニズム(これを通して、RTKが活性化される)と見なされてきた(Hubbard and Till (2000) Annu. Rev. Biochem. 69, 373-398 and Hubbard, (1997) EMBO J. 16, 5572-5581)。数種の受容体の単離されたキナーゼドメインの構造分析によって、活性化セグメントがキナーゼ活性をいかにして抑制するかと、リン酸化がこの自己阻害を解除する手段とが明らかとなった。不活性化インスリン受容体の場合、活性化セグメント中のTyr1162は、活性部位中へ突き出ており、活性化セグメントは、ATP結合部位へのアクセスをブロックする(Hubbard et al., (1994) Nature 372, 746-754)。

30

## 【0007】

Tyr1162および2つの近接したチロシン残基の自己リン酸化は、活性化セグメントを再配置し、それによって外来基質を引き込むための活性部位を自由にして、触媒作用に必要な残基を機能的コンホメーション中へ認識させる。対照的に、線維芽細胞成長因子(FGF)受容体の活性化セグメントは、相対的に動きやすく、受容体活性化の際にリン酸化されるチロシンは、活性部位を占有しない。しかしながら、FGFR1の活性化セグメントのC末端は、基質へのアクセスをブロックするように見える(Mohammadi et al. (1996) Cell 86, 577-587)。

40

## 【0008】

本発明の範囲内の受容体チロシンキナーゼは、これらに限定されないが、上皮成長因子受容体(EGFR)、PDGF受容体、インスリン受容体チロシンキナーゼ(IRK)、Met受容体チロシンキナーゼ、線維芽細胞成長因子(FGF)受容体、インスリン受容体、インスリン成長因子(IGF-1)受容体、TrkA受容体、TIE-1、Tek/Tie2、Flt-1、Flk、VEGFR3、EGFR(HER-1、ERBB2(HER-2)、ERBB3(HER-3)、ERBB4(HER-4)、Ret、Kit、Alk、Axl1、FGFR1、FGFR2、FGFR3およびEph受容体を含む。

50

## 【 0 0 0 9 】

様々なヒト悪性腫瘍と成長因子 - R T Kシグナル経路の崩壊との間に、生物学的な関連性が存在することが知られている。例えば、E G F Rファミリー受容体の過剰発現は頻繁に、乳癌、膀胱癌、肺癌および胃癌などの侵襲性の強いさまざまなヒト上皮癌で観察される（例としてNeal et al., Lancet 1: 366-68 (1985) ; Sainsbury et al., Lancet 1: 1398-1402 (1987)を参照）。同様に、H E R 2の過剰発現はまた、胃癌、子宮内膜癌、唾液腺癌、膀胱癌および肺癌を含む他のヒト癌とも相関がある（例としてYokota et al., Lancet 1: 765-67 (1986) ; Fukushima et al., Mol. Cell. Biol. 6: 955-58 (1986)を参照）。

## 【 0 0 1 0 】

かかるR T Kのリン酸化は、それらの細胞質ドメインキナーゼ機能を活性化し、それによって下流のシグナリング分子が順に活性化される。R T Kはしばしば、個別のチロシン残基などの複数の異なる部位にてリン酸化される。これらの酵素は、がんの処置に対する潜在的な薬物標的として評判になりつつある。例えばE G F RのインヒビターであるIressa（商標）は近頃、乳がんの処置に対する臨床試験に入った。同様に、B C R / A B LのインヒビターであるGleevec（商標）は今や、C M Lの処置のために広く使用されている。従来の化学毒性治療または放射線治療(chemotoxic or radiation therapies)に対する、単一のタンパク質の活性を変えようとする標的治療法(targeted therapeutics)の大きな利点は、それらが、調節解除された細胞を特異的に標的にすることであり、したがって、それらは、広い細胞毒性も、現在の治療に見られる有害な副作用も有するべきではない。細胞の異常な増殖、分化および/または機能不全は、多くの疾患の要因と考えられている。タンパク質キナーゼおよび関連分子は、それらが大変重要な薬物標的となるように、これらの細胞を制御するのに重要な役割を果たす。

## 【 0 0 1 1 】

タンパク質キナーゼは、細胞増殖および外部刺激に対する他の応答を制御する細胞のシグナリングカスケードの極めて重要な構成要素である。これらのシグナリングカスケードをキナーゼの阻害を通して調整することは、がん、炎症、糖尿病および脳卒中を含む多くの疾患および状態に影響を及ぼす可能性がある。

## 【 0 0 1 2 】

がんは、西欧諸国において、死因の第2位である。診断および処置の進歩にかかわらず、患者の全生存は不良のままである。近年の科学の進歩によって、がんの生物学の我々の理解が深まりつつある。ヒトタンパク質チロシンキナーゼ（P T K）は、ヒト発癌において中心的役割を果たし、有望な新しい標的として浮上してきた。チロシンキナーゼを阻害するためのいくつかのアプローチが開発されている。これらの剤は、前臨床研究における優れた抗がん効果を示し、臨床において有望な剤として現れつつある。慢性骨髄性白血病の処置における、B C R - A B Lチロシンキナーゼインヒビターであるイマチニブ（Gleevec（商標））の目覚ましい成功によって、この分野の精力的な研究がとくに刺激された。少なくとも30個のインヒビターが、がんの臨床開発の様々なステージにあり、約120の臨床試験が世界中で行われている。これらの剤の可能性を十分に評価するための革新的なアプローチが必要とされており、願わくは近い将来、国際的な協力が、がん治療におけるこれらのインヒビターを完全なものにするのに役立つであろう。

## 【 0 0 1 3 】

タンパク質キナーゼは結果として、創薬にとって最も大きな標的ファミリーの1つとなっている。それ故に、患者の転帰を改善するより新しくより効果的な治療を開発する差し迫ったニーズがある。

## 【 0 0 1 4 】

近年の急速な科学の進歩は、がんの生物学の我々の理解を深めた。その結果、いくつかの新規標的が同定された。チロシンキナーゼが、がん治療の新しい有望な標的として浮上した。多くの小分子キナーゼインヒビターが現在開発中であり、Gleevec（商標）（Novartis；白血病、胃腸腫瘍）およびIressa（商標）（AstraZeneca；肺がん）は、キナーゼの

10

20

30

40

50

阻害を非常に有望な治療戦略として、正当なものとして認めた(validated)。

【0015】

ヒトゲノム配列分析は、約518個のヒトタンパク質キナーゼ(全ヒト遺伝子の約1.7%を構成する)を同定した。この大きなタンパク質キナーゼ補集合(complement)内で、少なくとも90個のチロシンキナーゼ遺伝子が同定された(58個の受容体チロシンキナーゼ(RTK、表1)および32個の非受容体チロシンキナーゼ(NRTK、表2))。それらが開始する細胞シグナリング経路は複雑である(Schlessinger J. et al. Cell 103 (2000), pp. 211-225)。簡潔には、受容体チロシンキナーゼ(RTK)は、アミノ末端の細胞外リガンド結合ドメイン(通常グリコシル化されている)、疎水性膜貫通ヘリックスおよび細胞質ドメイン(保存的タンパク質チロシンキナーゼのコアおよび追加の調節配列(極めて重要なC末端チロシン残基および受容体調節モチーフを含有する))を含有する。

10

【0016】

細胞外ドメイン(ECD)へ結合するリガンド(HGF、IGF、EGF、TGF-、またはその他のもの)は、受容体の二量体化/オリゴマー化をもたらして、細胞質チロシンキナーゼ活性の活性化およびチロシン残基のリン酸化に繋がる(Schlessinger et al., Neuron (1992) 9:383-391)。自己リン酸化されたチロシン残基は、多様な細胞シグナリング応答を調整する一連の特異的なシグナル伝達タンパク質(SH2 (Src homology 2) およびPTB (ホスホチロシン結合)ドメインを含有するタンパク質など)の認識および動員のためのプラットフォームとして働く。非受容体チロシンキナーゼは、一般的な保存的触媒ドメイン(RTKと類似する)を、種々のアダプタータンパク質モチーフを有するモジュール式のN末端に有する。

20

【0017】

チロシンキナーゼは、細胞の発生、分化、増殖、生存、成長、アポトーシス、細胞形状、接着、移動、細胞周期制御、T細胞およびB細胞の活性化、血管新生、細胞外刺激に対する応答、神経伝達物質シグナリング、血小板活性化、転写およびグルコースの取り込みを含む、基本的な細胞プロセスの調節において、重大な役割を果たす(Hunter T. Philos. Trans. R. Soc. Lond., B Biol. Sci. 353 (1998), pp. 583-605)。正常なホメオスタシスにおけるそれらの極めて重要な役割を考えると、それらが、発生異常(頭蓋骨癒合症候群など)、免疫不全(重症複合型免疫不全症(SCID)、遺伝性の無ガンマグロブリン血症)、インスリン非依存性糖尿病(NIDDM)、アテローム性動脈硬化、乾癬、腎疾患、神経学的障害、白血病および固形腫瘍を含む、いくつかのヒト障害に關与していることは、おそらく驚くべきことではない(Madhusudan S. and Ganesan TS. Clin Biochem. 2004 Jul;37(7):618-35)。

30

【0018】

## 【表 1 - 1】

## 表1

## 受容体チロシンキナーゼおよびがん

チロシンキナーゼ	がんへの関連	
EGFRファミリー EGFR(HER-1)	乳房、卵巣、肺、 多形性膠芽腫など	
ERBB2(HER-2)	乳房、卵巣、胃、肺、 結腸など	10
ERBB3(HER-3)	乳房	
ERBB4(HER-4)	乳房、顆粒膜細胞腫瘍	
インスリンRファミリー IGF-1R	子宮頸、腎臓(明細胞)、 肉腫など	
IRR、INSR PDGFRファミリー PDGFR- $\alpha$ PDGFR- $\beta$	神経膠腫、膠芽細胞腫、卵巣 慢性骨髄単球性 白血病(CMML)、神経膠腫	20
CSF-1R	CMML、悪性組織球増殖症、 神経膠腫、子宮内膜	
KIT/SCFR	GIST、AML、骨髄異形成、 肥満細胞症、精上皮腫、肺	
FLK2/FLT3	急性骨髄性白血病(AML)	

【 0 0 1 9 】

## 【表 1 - 2】

VEGFRファミリー VEGFR1 VEGFR2 VEGFR3	腫瘍の血管新生 腫瘍の血管新生 腫瘍の血管新生、カポジ 肉腫、血管肉腫	
FGFRファミリー FGFR-1	AML、リンパ腫、いくつかの固 形	10
腫瘍 FGFR-2 FGFR-3 FGFR-4 KLG/CCKファミリー(CCK4)	胃、乳房、前立腺 多発性骨髄腫 -	
NGFRファミリー TRKA	乳頭様甲状腺がん、 神経芽細胞腫	
TRKB TRKC	先天性線維肉腫、急性 骨髄性白血病	20
HGFRファミリー MET	乳頭様甲状腺、 横紋筋肉腫、肝臓、腎臓 結腸、肝臓	
RON		
EPHRファミリー EPHA2 EPHA1、3、4、5、6、7および8 EPHB2 EPHB4 EPHB1、3、5および6	黒色腫 - 胃、食道、結腸 乳房 -	30
AXLファミリー AXL MER、TYRO3	AML -	
TIEファミリー TIE	胃、毛管の 血管芽細胞腫	
TEK	腫瘍の血管新生	
RYKファミリー(RYK) DDRファミリー(DDR1 およびDDR2) 【 0 0 2 0 】	卵巣がん 乳がん、卵巣がん	40

## 【表 1 - 3】

RETファミリー(RET)	甲状腺(乳頭および髓様)、多発性内分泌新生物	
ROSファミリー(ROS)	膠芽細胞腫、星状細胞腫	
LTKファミリー ALK LTK	非ホジキンリンパ腫 -	
RORファミリー(ROR1 およびROR2)	-	10
MUSKファミリー(MUSK)	-	
LMRファミリー(AATYK, AATYK2および3)	-	
RTK106	-	

## 【 0 0 2 1】

## 【表 2 - 1】

表2.		20
非受容体チロシンキナーゼ およびがん		

チロシンキナーゼ	がんへの関連	
ABLファミリー ABL1	慢性骨髄性白血病(CML), AML、ALL、CMML	
ARG	AML	
FRKファミリー BRK FRK SRMS	乳房 - -	30
JAKファミリー JAK1 JAK2	白血病 AML、ALL、T細胞幼児期 (childhood)ALL, 非定型CML	
JAK3 JAK4	白血病、B細胞悪性腫瘍 -	
SRC-Aファミリー FGR	AML、CLL、EBV関連の リンパ腫	40

## 【 0 0 2 2】

## 【表 2 - 2】

FYN	—	
SRC	—	結腸、乳房、膵臓、 神経芽細胞腫
YES1	—	結腸、黒色腫
SRC-Bファミリー		
BLK	—	
HCK	—	
LCK	—	T細胞ALL、CLL
LYN	—	
		10
SYKファミリー		
SYK	—	乳房
ZAP70	—	
FAKファミリー		
FAK	—	いくつかの腫瘍の 接着、浸潤および転移
PYK2	—	いくつかの腫瘍の 接着、浸潤および転移
		20
ACKファミリー		
ACK1	—	
TNK1	—	
CSKファミリー		
CSK	—	
MATK	—	
FESファミリー		
FER	—	
FES	—	
		30
TECファミリー		
BMX	—	
BTK	—	
ITK	—	
TEC	—	
TXK	—	

## 【 0 0 2 3 】

チロシンキナーゼは、細胞の発がん性形質転換において中心的役割を果たす。これは、いくつかのやり方で達成される (Blume-Jensen P. et al. Nature 411 (2001), pp. 355-365)。PTKの遺伝子増幅および/または過剰発現 (例としていくつかのがんにおいて一般的に見られるEGFRおよびHER-2の過剰発現) は、定量的かつ定性的に変えられた下流のシグナリングによって高められたチロシンキナーゼ活性を引き起こす。ゲノム再編成 (染色体転座など) は、恒常的に活性のあるキナーゼ活性を持つ融合タンパク質 (例として慢性骨髄性白血病に見られるp210BCR-ABL融合タンパク質) をもたらし得る。PTKのキナーゼドメイン中または細胞外ドメイン中の機能獲得型 (GOF) 突然変異または欠失は、恒常的に活性のあるチロシンキナーゼをもたらし (例として細胞外ドメインのアミノ酸6~273個を欠くEGFRvIII突然変異体は、恒常的に活性があり、固形腫瘍中に見られる)。リガンドの過剰発現による自己分泌-傍分泌 (autocrine-paracrine) 刺激は、持続性のチロシンキナーゼ刺激をもたらし (例としてTGF-βは、膠芽細胞腫および頭頸部がんで過剰発現される (Grandis J.R. et al. J. Cell. Biochem. 69 (1998), pp. 55-62))。最終的に、PTKに対応するがん原遺伝子のレトロウイルス形

質導入によって、構造的変化の調節解除が付随するが、それは高頻度に見られるメカニズムであり、それによって発がん性の形質転換が動物（齧歯動物およびニワトリ）に生じる（Blume-Jensen P. et al. Nature 411 (2001), pp. 355-365）。

#### 【0024】

相当数のチロシンキナーゼ（受容体および非受容体の両方のタイプ）が、がんに関連する。臨床研究により、チロシンキナーゼの過剰発現／調節解除が、患者の予後／予測に価値があり得る（すなわち、侵襲性の強い腫瘍生物学を示し得るか、または、治療に対する反応不良およびより短期間の生存を予測し得る）ことが示唆される。チロシンキナーゼのEGFRファミリーは、最も広く調査されている。EGFR（HER-1）過剰発現は、卵巣の、頭頸部の、食道の、子宮頸の、膀胱の、乳房の、結腸直腸の、胃の、および、子宮内膜のがんにおける予後不良に関連する（Nicholson R.I et al. Eur. J. Cancer 37 Suppl. 4 (2001), pp. S9-S15）。HER-2過剰発現は、乳房の（Tandon A.K. et al. A. K. Clin. Oncol. 7 (1989), pp. 1120-1128）、卵巣の（Meden H. et al. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 71 (1997)）、前立腺の（Sadasivan R. et al. J. Urol. 150 (1993), pp. 126-131）、肺の（Selvaggi G. et al. Cancer 94 (2002), pp. 2669-2674）および骨の（Zhou H. et al. J. Pediatr. Hematol. Oncol. 25 (2003), pp. 27-32）がんを持つ患者の転帰がより不良であることと関連する。

10

#### 【0025】

C-KITチロシンキナーゼの突然変異は、消化管間質腫瘍を持つ患者の劣った生存と関連し（Taniguchi M. et al. Cancer Res. 59 (1999), pp. 4297-43）、急性骨髄性白血病の再発率に有害な影響を与える（Care R. S. et al. Br. J. Haematol. 121 (2003), pp. 775-777）。小細胞肺癌において、C-KIT発現は、生存の不良と繋がりがあった（Naeem M. et al. Hum. Pathol. 33 (2002), pp. 1182-1187）。IGF-1およびIGF-2と一緒のIGF-1Rの発現は、直腸結腸がん患者の下位群の予後に価値を有し得る（Peters G. et al. Virchows Arch. (2003)）。急性骨髄性白血病において、FLT3突然変異によって、より高い再発率およびより短期間の無症候生存が予測される（Schnitger S. et al. Blood 100 (2002), pp. 59-66）。VEGFは、腫瘍の血管新生に至らせる中心的な成長因子であり、固形腫瘍において重要な予後マーカーである（Fox S. B. et al. Lancet Oncol. 2 (2001), pp. 278-289）。近頃の研究によって、肺がんにおけるVEGFR3発現が、有意に低い生存率と関連すること（Arinaga M. et al. Cancer 97 (2003), pp. 457-464）、および、結腸直腸がんにおいて、それが予後的意義を有し得ること（Parr C. et al. Int. J. Oncol. 23 (2003), pp. 533-539）が示唆される。

20

30

#### 【0026】

Trkチロシンキナーゼは、神経芽細胞腫（NB）に重要なマーカーである。TrkAは、有利な生物学的特徴を持つNB中に存在し、患者生存と非常に相関がある一方で、TrkBは主に、MYCN増幅を持つ不利で侵襲性の強いNBに発現される（Eggert A. et al. Klin. Padiatr. 212 (2000), pp. 200-205）。HGFR（Met）過剰発現は、疾患の進行、再発と関連し、早期浸潤子宮頸がんにおける劣った生存（Baycal C. et al. Gynecol. Oncol. 88 (2003), pp. 123-129）は、滑膜肉腫の予後不良と相関があり（Oda Y. et al. Hum. Pathol. 31 (2000), pp. 185-192）、肝細胞の癌の5年生存が有意に短期間であることを予測する（Ueki T. et al. Hepatology 25 (1997), pp. 862-866）。Ax1チロシンキナーゼ発現は、急性骨髄性白血病の不良転帰と関連した（Rochlitz C. et al. Leukemia 13 (1999), pp. 1352-1358）。Tie-1キナーゼ発現は、胃がん（Lin W. C. et al. Clin. Cancer Res. 5 (1999), pp. 1745-1751）および初期の慢性期の慢性骨髄性白血病（Verstovsek S. et al. Cancer 94 (2002), pp. 1517-1521）の生存と逆相関がある。

40

#### 【0027】

可溶性Tie-2受容体レベルは単独で、頭頸部の扁平上皮細胞の局所領域の再発を予測する（Homer J.J. et al. Head Neck 24 (2002), pp. 773-778）。ALKタンパク質発現は、生存の独立予測因子であり、未分化大細胞リンパ腫のスペクトル(spectrum)内で特

50

定の疾病の有用な生物学的マーカーとして働く (ALCL, Gascoyne R. D. et al. Blood 93 (1999), pp. 3913-3921)。Srcチロシンキナーゼは、全ステージのヒト結腸癌における臨床予後不良の独立した指標である (Aligayer H. et al. Cancer 94 (2002), pp. 344-351)。BCR-ABLチロシンキナーゼは、予後に価値があり、慢性骨髄性白血病 (Olavarria E. et al. Blood 97 (2001), pp. 1560-1565 および O'Dwyer M., et al. Oncologist 7 Suppl. 1 (2002), pp. 30-38) および急性リンパ芽球性白血病 (Gleissner B. et al. Blood 99 (2002), pp. 1536-1543) を含む血液悪性腫瘍の治療に対する応答を予測する。FAK過剰発現は、食道扁平上皮細胞癌における腫瘍の浸潤性およびリンパ節転移と相関があり (Miyazaki, T. et al. Br. J. Cancer 89 (2003), pp. 140-145)、Syk遺伝子の発現減少は、乳がんの予後不良と相関がある (Toyama T. et al. Cancer Lett. 189 (2003), pp. 97-102)。

10

**【0028】**

チロシンキナーゼを標的にするいくつかのアプローチが開発されている。チロシンキナーゼドメインインヒビター、チロシンキナーゼ受容体ブロッカー (例としてモノクローナル抗体)、リガンドモジュレーター (例としてモノクローナル抗体)、RNA干渉およびアンチセンス技術、遺伝子治療戦略、チロシンキナーゼのインヒビター、BCR-ABLインヒビター、下流のシグナル伝達経路インヒビターは、がん治療の潜在的な戦略である。かかるインヒビターの、それらの作用様式に基づく分類は、表3に要約される。受容体チロシンキナーゼは、マルチドメインタンパク質である。触媒ドメイン (Mg-ATP複合体結合部位) は近年、薬物設計に最も有望な標的として浮上してきた。化合物ライブラリーのランダムスクリーニングは最初、触媒ドメインの小分子の化学的インヒビターを同定した。

20

**【0029】**

コンビナトリアル・ケミストリー、in-silicoクローニング、構造に基づく薬物設計および計算科学は今や、リード化合物の同定およびこれらのインヒビターの最適化における必須のツールとなっている。インヒビターをスクリーニングするための高感度で正確かつ確実なハイスループットアッセイが開発された (シンチレーション近接アッセイ、蛍光偏光アッセイ、ホモジニアス時間分解蛍光アッセイおよびヘテロジニアス時間分解解離強化 (dissociation-enhanced) 蛍光技術 (F.A. Al-Obeidi および K.S. Lam, Oncogene 19 (2000), pp. 5690-5701) を含む)。タンパク質キナーゼの三次構造についての知識が拡張され、50を超えるタンパク質キナーゼについてX線結晶学的構造が解決した。「ATP結合部位」の様々な部分 (アデニン領域、糖領域、疎水性ポケット、疎水性チャネルおよびホスファート結合領域) の分子相互作用への理解によって創薬が加速した (Fabbro D. et al. Pharmacol. Ther. 93 (2002), pp. 79-98)。

30

**【0030】**



## 【表 3 - 2】

PD166326 (BCR-ABL  
もまた標的にする)  
PD1173952 (BCR-ABL

Angiozyme  
IGF-1Rを標的にする  
INX-4437 (アンチセンスオリ  
ゴヌクレオチド)

もまた標的にする)

FLT3を標的にする  
CT53518

その他  
APC8024 (HER-2を  
過剰発現する細胞  
に対するワクチン)

GTP14564  
PKC412

AP22408 (Src SH2ドメイン  
インヒビター)

Srcを標的にする  
PP1 (C-KIT、  
BCR-ABLもまた阻害する)

B43-ゲニステイン接合体  
AG538 (IGF-1Rインヒビター)

PD116285

CGP77675

CGP76030

TRKを標的にする

CEP-701 (Flt3もまた標的にする)

CEP2583

## 【 0 0 3 2 】

A T P 結合部位はチロシンキナーゼの間で高度に保存されているが、キナーゼドメインアーキテクチャーの小さな差は、高度に選択的なインヒビターの開発を可能にした (Levitzki A. Eur. J. Cancer 38 Suppl. 5 (2002), pp. S11-S18)。E G F R の、そのインヒビター O S I - 7 7 4 (Tarceva (登録商標)) との共結晶化のデータが近頃公開され、この化合物の作用メカニズムへの有益な洞察を提供する (Stamos J. et al. J. Biol. Chem. 277 (2002), pp. 46265-46272)。臨床開発中のほとんどの小分子は、それらの足場 (scaffold) の一部を使用することで A T P のアデニン部分の結合を模倣して、それらの標的キナーゼの A T P 結合部位の近くに結合する。A T P のかかる模倣は、触媒ドメイン内の基質結合部位の競合インヒビターであり (Laird A.D. et al. Expert Opin. Invest. Drugs 12 (2003), pp. 51-64 および Fry D.W. Exp. Cell Res. 284 (2003), pp. 131-139)、結合のために内因性 A T P (細胞中ミリモラーレベルでしばしば存在する) と競合する。

## 【 0 0 3 3 】

初期の有力なリード化合物は可溶性が低く、最適な標的阻害を必要とする患者において適切な血漿レベルを達成かつ維持するために延長された複数の投薬スケジュールを必要とするものであった。可溶性を上げるため、新しい化合物が生成されたが、それらはキナーゼドメインへの親和性を低下させた。これらの問題を回避するため、選択的インヒビターのキナーゼドメインへの共有結合的付着が完全に触媒活性を消失させ、かつ有力な薬物に転換するであろうという希望を抱きつつ、不可逆的インヒビターは今も開発中である (Denny W.A. et al. Pharmacol. Ther. 93 (2002), pp. 253-261)。かかる 2 つのインヒビターは、開発が進んだ段階にあり、E G F R および H E R - 2 夫々に不可逆的に結合する C I - 1 0 3 3 (Pfizer) および E K B - 5 6 9 (Wyeth) である。

## 【 0 0 3 4 】

1 以上のチロシンキナーゼを標的にする小分子もまた開発され、それらは、複数の経路をブロックし、かつ強化された抗がん効果を生む可能性がある (表 3)。P K I - 1 6 6 は E G F R を阻害し、H E R - 2 (Mellinghoff I.K. et al. Cancer Res. 62 (2002), pp. 5254-5259) CI-1033 は、汎 E r b B インヒビターであり (Slichenmyer, W.J. et al. Semin. Oncol. 28 (2001), pp. 80-85)、S U 6 6 6 8 は、V E G F R、P D G F R および F G F R を阻害し (Hoekman K. et al. 7 Cancer J. Suppl. 3 (2001), pp. S134-S13

10

20

30

40

50

)、STI571は、BCR - ABL、C - KIT、PDGFRおよびARGを阻害する (Buchdunger, E. et al. Eur. J. Cancer 38 Suppl. 5 (2002), pp. S28-S36.およびNishimura N. et al. Oncogene 22 (2003), pp. 4074-4082)。

#### 【0035】

1980年代に、最初の天然チロシンキナーゼインヒビターであるケルセチンおよびゲニステインが報告された (Akiyama T. et al. J. Biol. Chem. 262 (1987), pp. 5592-5595およびJ. Mendelsohn J. J. Clin. Oncol. 20 (2002), pp. 1S-13S)。

それ以来、圧倒的な数の天然および合成の小分子インヒビターが記載されている。チロシンキナーゼインヒビターは、天然の産物および関連誘導体 (ケルセチン、ゲニステイン、スタウロスポリン、エルバスタチン(erbastatins)、クラビラクトン(clavilactones) ; キナゾリン、ピリドピリミジンおよび関連複素環 (例としてZD1839) ; フェニルアミノ - ピリミジン (例としてSTI571) ; チロホスチンおよび類似体 (例としてSU1498、SU101、SU0020) ; インドールおよびオキシインドール (例としてSU5416、SU6668、SU5402 ; F.A. Al-ObeidiおよびK.S. Lam, Oncogene 19 (2000), pp. 5690-5701) へ、広範囲に分類され得る。

#### 【0036】

小分子キナーゼインヒビターの開発における大きな差の1つは、特異性である (McMahon et al. (1998) Curr. Op. in Drug Discovery and Dev.1(2), 131-146)。ほとんどの化合物は現在、キナーゼの高度に保存されたATP結合部位を標的にしており、したがって、クラスの1種類を超える酵素に結合し阻害する傾向にある。なぜなら、ヒトタンパク質キナーゼは500個超もあり (Manning et al., Science (2002) 298, 1912)、複数のキナーゼ (または「誤った」キナーゼ) の阻害が有害な結果に繋がり得ることから、化合物の特異性を査定することは重大である。しかしながら、ほとんどの「オフ・ターゲット」相互作用が予測不能であり、キナーゼのための従来の実験的活性アッセイの開発が大変時間がかかり、資源集約的であるという問題が存在する。結果として、化合物の特異性が査定に重大に重要であるとしても、包括的かつ体系的にそうすることは、不可能でないとしても、極端に困難である。

#### 【0037】

タンパク質キナーゼは、真核細胞中の最も多くの細胞シグナリング経路の肝要な調節因子である。多くのタンパク質キナーゼインヒビターは、シグナリング経路中のかつ潜在的な治療剤としてのキナーゼの特異的な機能を研究するために開発された (Cohen, P. (2002) Nat. Rev. Drug Discov. 1, 309-315)。大きなサイズのタンパク質キナーゼスーパーファミリー (> 500 ヒト) およびほとんどのキナーゼインヒビターが高度に保存されたATP結合ポケット中に結合するという事実のため、キナーゼインヒビターは、1個を超える標的を阻害することが広く認められる (Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M. & Cohen, P. (2000) Biochem. J. 351, 95-105)。結果として、ほとんどよく理解されていないシグナリング経路中のキナーゼの役割を探るための化学的ツールとして使用されるインヒビターは逆説的に、不完全に特徴付けされた特異性がある。同じことがキナーゼアクチベーターにも当てはまる。本発明はまた、1キャピティ中の複数のキナーゼのキナーゼアクチベーターの並行するプロファイリングにも使用可能である。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0038】

本発明の好ましい態様

上で留意された困難性は、ヒトキナーゼの大変大きな一団 (1キャピティ中、最大500個まで) に対して多くの化合物を試験することを可能にするアッセイ形式(format)によって解決される。キャピティは、マイクロタイタープレート、バイアル、ペトリディッシュまたは方法に記載のアッセイが実施され得る別の容器であり得る。アッセイによって、特異性を効率的、定量的、包括的および体系的に査定することが可能になる。たった少数のキナーゼに対する試験に基づき化合物の特異性を著しく見積もることは、もはや不要である。特異性プロファイリングは、創薬プロセスの早期におよび開発全体の経路に沿って

10

20

30

40

50

組み込まれ得、特異性は、多くのより多くの化合物に対して体系的かつ迅速に査定され得る。この空前の技量(ability)によって、医薬品化学と分子試験との間の密接なフィードバックが可能となる。有効性および特異性が並行して最適化され得ることで、より短い時間でより質の高い前臨床候補がもたらされる。

【0039】

既存の後期候補または薬物について包括的に特異性を評価することはまた、証明されたこれらの化合物に対する、今まで知られていなかった標的をも明らかにし得る。いくつかのケースにおいては、新しい標的の同定が、新しい適応症を示唆し得るが、他のケールにおいては、知られている当初の標的によって説明されない副作用の原因を明らかにし得る。

10

【0040】

本発明の主題は、小分子キナーゼインヒビターまたはアクチベーターの開発における主要なボトルネックの1つに対処し、かつ、新しい薬物のこの重要なクラスの開発に主要な影響を及ぼす見込みがある、特異性プロファイリングに対する新規なアプローチである。

本発明の主題は、チロシンキナーゼの自己リン酸化の検出のためのサンドイッチELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)技法を、組織サンプル中の特定タンパク質の同定のためのLuminex(商標)-xMAP検出システムと組み合わせるアッセイである。組織サンプルは、これらに限定されないが、細胞ライセート、生検ホモジネート、腫瘍生検ホモジネート、疾患組織ホモジネート、血液細胞のライセートを意味する。

20

【0041】

Luminex-xMAP技術は、3種の蛍光色素の正確な比率を使用することで、各々別の色素を保有し、特有の内部蛍光色素比率により特徴付けられる、500個の異なるビーズセットまたはマイクロスフェアセットを作り出す、実績のある多重化プラットフォームである。この色素比率は、各マイクロスフェアセットにつき同定コードとして使用される。この理由によって、各マイクロスフェアセットは、個別に測定され得、したがって、特有の分析物を同時に同定するために使用され得る。これは、理想的な場合において、500種の分析物が、1キャピティ中または1サンプル中、同じ時点で測定され得ることを意味する。

【0042】

ビーズまたはマイクロスフェアは、分析物に特異的な特有の捕捉分子(例として抗体、ペプチド、受容体タンパク質)とその表面上で結合し得る固相として使用される。分析物が、特異的な捕捉分子へ結合した後、分析物の別の結合部位を標的にする第2分析物特異的な分子が、検出のために使用される。この第2分子は直接、読出し標識と接合され得るか、または、高度に特異的なストレプトアビジンが接合された読出し標識によってさらに検出されるビオチンとカップリングされ得る。第4蛍光色素(フィコエリトリン)は一般に、マイクロスフェア同定のための内部色素と区別され得る読出し標識として使用される。

30

【0043】

アッセイによって、例として1キャピティ中の細胞ライセートからのリン酸化されていないキナーゼの総量(the total amount)を含む、種々のキナーゼ中の最大500個までの異なるリン酸化部位に対する潜在的キナーゼインヒビターの存在下で、RTKまたはNTKの自己リン酸化の存否を検出することが可能となる。アッセイ形式によって、1キャピティ内のリン酸化状態を検出することによる、種々のチロシンキナーゼ中の最大500個までの異なるリン酸化部位に対する潜在的キナーゼインヒビターのプロファイリングが可能となる。例えばアッセイによって、96ウェルプレート中サンドイッチELISAにおいて、1ウェルあたり種々のキナーゼ中の最大500個までの異なるリン酸化部位の組み合わせに対するHTSからの、96個の異なる潜在的キナーゼインヒビターについてプロファイリングを実施することが可能となる。例えば最大8個までの異なるリン酸化部位は、1キナーゼにおいて同時に測定され得る。

40

【0044】

対象のチロシンキナーゼの活性化(すなわち自己リン酸化)を測定するためのアッセイは、EP0730740に記載されており、以下のステップを含む：

50

a) 第1固相が、細胞培養物または動物材料からの実質的に均一な細胞集団を用いて、細胞が第1固相へ付着するように、コートされる。細胞は、内因性チロシンキナーゼを有しているか、あるいは、チロシンキナーゼコンストラクトが細胞膜中または細胞の細胞質中に提示されるように、チロシンキナーゼをコードするDNAで形質転換されてDNAが発現されているか、のいずれかである。b) 次いでリガンドが、チロシンキナーゼがリガンドに露出されるように、付着している細胞を有する固相へ加えられる。c) リガンドへの露出の後、付着細胞が可溶化され、それによって細胞ライセートが放出される。d) 第2固相が、チロシンキナーゼに対してまたは受容体コンストラクトの場合はポリペプチドエピトープタグに対して特異的に結合する特異抗体としての捕捉剤でコートされる。e) ステップc) で得られた細胞ライセートが、付着している捕捉剤を含有するウェルへ、チロシンキナーゼを捕捉するためにウェルへ加えられる。f) 次いで洗浄ステップが、結合しない細胞ライセートを除去するために行われ、捕捉されたチロシンキナーゼが放出される。g) 捕捉されたチロシンキナーゼコンストラクトは、チロシンキナーゼ中のリン酸化された残基を同定する標識抗ホスホチロシン抗体へ露出される。h) 抗ホスホチロシン抗体の、捕捉されたチロシンキナーゼへの結合が測定される。

10

20

30

40

50

#### 【0045】

1ウェル中の最大500個までのチロシンキナーゼの自己リン酸化状態の並行検出を可能にする本発明に使用される捕捉剤は、Luminex(商標)-xMap技術に由来するものであった。捕捉剤は、結合タンパク質がコートされたビーズまたはマイクロスフェアであり得る。結合タンパク質は、ほとんどの場合、典型的には、タンパク質またはポリヌクレオチドなどの生体分子であろう。生体分子は任意に、天然の、組み換えの、または、合成の生体分子であってもよい。抗体または抗体フラグメントは、タンパク質捕捉剤として非常に好適である。結合タンパク質はまた、アプタマーまたはアンチカリンまたはいずれか他の結合分子でもあり得る。Luminex(商標)-xMap技術は、2つの蛍光色素の正確な比率を使用することで、2つの蛍光色素の比率によって特徴付けられ各々別の色素を保有する100個の異なるビーズセットまたはマイクロスフェアセットを作り出す、実績のある多重化プラットフォームである。各セットは、2つの異なる色素の内部蛍光色素比率に基づき区別され、したがって、特定のチロシンキナーゼに対する特異抗体またはモノクローナル抗体としての特有の生物学的試薬に結合し得る。ビーズまたはマイクロスフェアの表面に結合された抗体は、前述のサンドイッチELISA試験において捕捉試薬として働く。種々のキナーゼに特異的な種々の抗体は、各特異抗体-マイクロスフェア複合体に対し種々の色をもたらす種々の蛍光色素比率で、ビーズ表面と境を接する。蛍光色は、一定のキナーゼの特定のエピトープを認識かつ結合する特異抗体に対する抗原として働く特定のキナーゼに割り当てられ得る。

#### 【0046】

リン酸化されたチロシンを認識するホスホ特異抗体は一般に、チロシンキナーゼの自己リン酸化の測定のために使用された。ホスホ特異抗体は、ビオチン化されており、マイクロスフェアの蛍光色素とは区別され得る、ストレプトアビジンとカップリングされた第2蛍光標識(例としてフィコエリトリン)によって検出され得る。

#### 【0047】

修飾部位および非修飾部位の特異抗体は広く市販されており(例として、Cell Signaling Technology、Epitomics、R&D Systems、; BioSource, Inc.; Santa Cruz; Biotechnology, Inc.; Merck Milliporeから)、当該技術分野において周知の技法によってもまた産生されてもよい。ウサギおよびマウスからのモノクローナル抗体は、それらの特有な標的特異性のため、捕捉抗体として好ましいはずである。

#### 【0048】

未処理サンプルからの修飾分析物(例としてリン酸化されている、メチル化されている)の検出のための、これまでに唯一の利用可能なアッセイ形式(「標準アッセイ形式」と表される)は、マイクロスフェア上の総分析物に特異的な抗体(非修飾分析物および修飾分析物に対し等しく結合する)による捕捉と、対象の修飾部位に特異的な抗体または標的に

非特異的な汎ホスホチロシン検出抗体による検出とを使用するものである。このアッセイ形式における検出閾値は、サンプル中の分析物の総濃度と、非修飾分析物と修飾分析物との間の比率との組み合わせである。ほとんどのサンプル中において修飾分析物が少量(low abundance)であるせいで、結合された分析物の大多数は、非修飾状態にある。この理由から、捕捉された少量(small amount)の修飾分析物は、測定され得なかった。捕捉分子が、修飾分析物または非修飾分析物ともに同一であるという事実から、分析物のことなる形態の測定は、2つの独立したキャビティまたはアッセイにおいて実施される必要がある。つまり、1サンプルにおける同時測定は不可能であり、結果は、2つの異なるアッセイ設定(希釈、操作)によって影響を受けることもあり得る。

#### 【0049】

好ましい逆(inverse)アッセイ形式は、マイクロスフェアに対して特異的である対象の修飾部位を持つ分析物にしか結合しない修飾部位特異抗体を使用する。別の修飾部位を持つ同じ分析物または非修飾分析物は、このビーズセット上では捕捉されない。マイクロスフェア上に捕捉された分析物を検出するために、分析物上の非修飾部位特異的領域へ結合する抗体が使用されるが、該抗体は、直接的に読出し標識へ接合され得るかまたはビオチンヘカップリングされ得る。前記の標準アッセイ形式におけるように、ビオチンはさらに、ストレプトアビジンと接合された読出し標識によって検出される。この第4蛍光色素(フィコエリトリン)は一般に、読出し標識として使用され、マイクロスフェア同定のための内部色素とは識別可能である。修飾部位特異的分子による特異的な捕捉によって、同一であるが非修飾である分析物に結合する別の同定コードを持つ第2マイクロスフェアとの組み合わせが可能である。

#### 【0050】

この逆アッセイ形式の理由から、非修飾分析物および修飾分析物は、サンプルを処理する必要なく、1キャビティ中で同時に測定され得る。その上、この同じ分析物上の他の修飾部位は、第3の、第4のまたはそれ以上のマイクロスフェアセット上で同等に測定され得、同一サンプルにおいて互いに区別され得る。これによって将来、個別の分析物の異なる修飾部位に厳密に依存する活性化状態に関し、そのより複雑な分析が可能となる。特有の多重化の可能性に加えて、修飾分析物のための新しい逆アッセイ形式の感度は、従前の標準アッセイ形式と直接比較すると、劇的に向上されている。この改善された検出閾値は、EP0730740およびUS7981699B1に記載の先行技術の標準アッセイ形式(「標準アッセイ形式」と表される)においては現在不可能な針生検等の大変小さいサンプルサイズの測定を将来可能にするであろう。

#### 【0051】

捕捉された各キナーゼの自己リン酸化は、特有の蛍光色素で着色された全マイクロスフェアと、ビオチン化された抗ホスホチロシン抗体に結合するストレプトアビジンがカップリングした蛍光マーカ-とを検出することが可能である機器によって分析される。これらの機器は、先行技術分野において周知である。Luminex(商標)機器は、種々の蛍光レポーターシグナルを検出する。Luminex(商標)機器において、ビーズは、2つのレーザービームを速やかに通過するが、ここで高速デジタルシグナルプロセッサは、2つの蛍光シグナル(マイクロスフェアからのシグナルと抗ホスホチロシン抗体のシグナル)または1つの蛍光シグナル(マイクロスフェアからのシグナルのみ)を持つビーズ間を区別する。

#### 【0052】

自己リン酸化事象の場合、ホスホ特異抗体は、特定のビーズに結び付けられた特異抗体によって捕捉されたリン酸化されたキナーゼに結合することが可能であり、2つの蛍光シグナルが検出され得る。自己リン酸化事象を欠く場合、マイクロスフェアシグナルのみが、レーザーによって検出可能である。3つの異なる利用可能なLuminex(商標)機器内において、最大500個までの異なるマイクロスフェアセットの測定のためのFlexMAP 3Dが、高性能アナライザー中に築かれる。この機器はまた、標準96ウェルプレートに加えて384ウェルプレートを検出するために作り出される。初代Luminex-200(商標)機器は、100個の異なるマイクロスフェアセット間を区別することができるが、MAGPIXは、50個

10

20

30

40

50

の異なる磁性マイクロスフェアセットにしか適さない。この新しい卓上アナライザーは、例えば臨床研究における、より小さなアッセイ形式に好適である。

【0053】

自己リン酸化をブロックするであろう加えられた特定のキナーゼインヒビターによって阻害される試験細胞ライセート中の全キナーゼは、マイクロスフェアシグナルのみを示し、試験されたキナーゼインヒビターによって阻害されるチロシンキナーゼとして認識される。試験されたキナーゼインヒビターは、両シグナル（マイクロスフェアからのシグナルと抗ホスホチロシン抗体のシグナル）を示すキナーゼを阻害しない。キナーゼインヒビターのない同一の対照細胞ライセートにおいて、試験ライセートにおいてたった1つのシグナルしか示さないキナーゼが、両シグナルを示す。これらのキナーゼは、試験された特定のインヒビターによって阻害される細胞ライセート中のキナーゼ群である。

10

【0054】

細胞中のキナーゼの活性化は、組織培養研究所において広く使用される周知の技法である。ウシ胎仔血清または他の血清の枯渇によって、細胞が飢餓になるであろう。飢餓の後、ウシ胎仔血清（FCS）または他の血清によって、キナーゼの活性化が誘導される。活性化はまた、例としてEGF、VEGF、PDGF、HGF、TGF、NGF、FGF、インスリン、様々なインターロイキンおよびインターフェロンなどの成長因子およびサイトカインによっても誘導され得る。成長因子およびサイトカインは、複数キナーゼ誘導のためのカクテルとして適用される必要がある。活性化によって、種々のキナーゼの自己リン酸化がもたらされる。

20

【発明の概要】

【0055】

主要な態様は、タンパク質またはポリペプチドを含む分析されるべきサンプルの分析物中の該タンパク質またはポリペプチドの修飾部位を検出するための方法であって、修飾部位が、リン酸化、自己リン酸化、メチル化、ヒドロキシル化、グリコシル化、ユビキチン化、アセチル化、プレニル化、アミド化またはN末端メチオニン検出からなる群から選択され、方法が、

(a) 該修飾部位に特異的であるかまたはそれへ結合し、かつ、検出マーカーとして働く色素と接合されているかまたはそれに結び付けられている、一次捕捉抗体を提供すること、ならびに、

30

(b) 該修飾部位とは異なる部位またはエピトープにおいて、該タンパク質に特異的であるかまたはそれへ結合し、かつ、ステップ(a)の該色素とは識別可能な検出マーカーと接合されているかまたはそれに結び付けられている、二次抗体を提供すること、

(c) (a)で使用されたのとは別の修飾部位に特異的であるかまたはそれへ結合し、かつ、ステップ(a)および(b)の該色素とは識別可能な検出マーカーとして働く色素と接合されているかまたはそれに結び付けられている、三次捕捉抗体を提供すること。

【0056】

別の好ましい態様は、本発明によって分析される修飾が、これらに限定されないが、MetAP1およびMetAP2酵素活性の確認に関する、リン酸化、自己リン酸化、メチル化、ヒドロキシル化、グリコシル化、ユビキチン化、アセチル化、プレニル化、アミド化またはN末端メチオニン検出である。本発明によって分析される修飾は、これらに限定されないが、リン酸化、メチル化、ヒドロキシル化、グリコシル化、ユビキチン化、アセチル化、プレニル化またはアミド化である。

40

【0057】

本発明の別の好ましい態様は、キナーゼインヒビターの存在下における、上の方法による1以上のキナーゼの自己リン酸化を、該キナーゼインヒビターの不在下と比較して、分析するための方法であって、方法は以下のステップ：

(a) 血清枯渇によって細胞を飢餓にすること、

(b) キナーゼインヒビターの存在下および不在下において、血清、成長因子および/またはサイトカインを加えることによって、キナーゼの自己リン酸化活性を誘導すること、

50

- (c) 細胞を可溶化すること、それによって、細胞ライセートをそこから放出させること、
- (d) 種々のホスホチロシン、ホスホセリン、ホスホスレオニンと、種々の色素と接合された非修飾部位特異的結合タンパク質とを加えることによって、細胞ライセート中のキナーゼを捕捉すること、

【0058】

ここで、種々の各結合タンパク質は、特有の色素に結び付けられており、

- (e) 読出し標識と直接接合されているかまたはビオチンと直接カップリングされているキナーゼ上の非修飾部位特異的領域へ結合する抗体によって、特有の色素を有する自己リン酸化されたチロシンキナーゼを、d) から同定すること、ここで、抗体が、d) で使用された結合タンパク質とは別の、キナーゼ中の非修飾部位特異的領域へ結合する必要がある、

10

- (f) キナーゼインヒビターの存在下での誘導の結果として生じる e) からの自己リン酸化されたチロシンキナーゼを、該キナーゼインヒビターの不在下での誘導の場合と比較すること、ならびに、個々のキャピティにおける非修飾キナーゼレベルとの直接比較において、e) からの自己リン酸化されたキナーゼを比較すること、これにより、個々の分析物の規格化が可能となる。

【0059】

別の好ましい態様は、分析された修飾が、MetAP1およびMetAP2酵素活性の確認を検出する、上記方法である。

20

使用される色素は好ましくは、これらに限定さないが、蛍光色素またはルミネセンス色素である。

本発明の別の部分は、ステップb)の下で、キナーゼインヒビターの代わりにキナーゼアクチベーターが試験される方法である。

【0060】

本発明のさらなる態様は、受容体チロシンキナーゼの下流の1以上のタンパク質キナーゼのリン酸化を測定するための方法である。これらのリン酸化は、上流キナーゼの自己リン酸化またはリン酸化である。キナーゼは、これらに限定されないが、セリンキナーゼ、トレオニンキナーゼまたはヒスチジンキナーゼであり得る。

【0061】

本発明のさらなる態様は、キナーゼインヒビターの存在下で、受容体チロシンキナーゼの下流の1以上のタンパク質キナーゼのリン酸化および/または自己リン酸化を、該キナーゼインヒビターの不在下と比較して測定するための方法であって、方法は以下のステップを含む：

30

- (a) 血清枯渇によって細胞を飢餓にすること、
- (b) キナーゼインヒビターの存在下および不在下において、血清、成長因子および/またはサイトカインを加えることによって、キナーゼの自己リン酸化活性を誘導すること、
- (c) 細胞を可溶化すること、それによって、細胞ライセートをそこから放出させること、

- (d) 種々のホスホチロシン、ホスホセリン、ホスホスレオニンと、種々のマイクロスフェアと接合された非修飾部位特異的結合タンパク質とを加えることによって、細胞ライセート中のキナーゼを捕捉すること、

40

【0062】

ここで、種々の各結合タンパク質は、特有の色素に結び付けられており、

- (e) 読出し標識と直接接合されているかまたはビオチンと直接カップリングされているキナーゼ上の非修飾部位特異的領域へ結合する抗体によって、特有の色素を有する自己リン酸化されたチロシンキナーゼを、d) から同定すること、ここで、抗体が、d) で使用された結合タンパク質とは別の、キナーゼ中の非修飾部位特異的領域へ結合する必要がある。

- (f) キナーゼインヒビターの存在下での誘導の結果として生じる e) からの自己リン酸

50

化されたチロシンキナーゼを、該キナーゼインヒビターの不在下での誘導の場合と比較すること、ならびに、個々のキャピティにおける非修飾キナーゼレベルとの直接比較において、e)からの自己リン酸化されたキナーゼを比較すること、これにより、個々の分析物の規格化が可能となる。

【0063】

色素およびマーカーは夫々、ルミネセンスおよび/または蛍光の色素あるいはマーカーである。

キナーゼインヒビターの不在下で、チロシンキナーゼのリン酸化状態をプロファイリングするための上述の方法であって、

ここで請求項1c)のライセートは、腫瘍試料、疾患に冒された組織、または、同等な動物材料に由来するが、

前記方法は、診断および腫瘍の病期分類のためのものである。

【0064】

本発明の別の態様は、細胞飢餓に先立ち、細胞中リン酸化を誘導することができるタンパク質またはキナーゼそれ自体のポリペプチドをコードする核酸で形質転換することである。

細胞は真核細胞であり得、好ましい態様において細胞は、哺乳動物細胞である。

別の好ましい態様は、キナーゼインヒビターおよびキナーゼアクチベーターを、特定のキナーゼに結合するというそれらの特異性についてプロファイリングするための上の方法の使用である。

【0065】

別の好ましい態様は、キナーゼインヒビターの特異性をプロファイリングするための上述の方法のためのキットであって、以下を含む：

(a) リン酸化されたキナーゼに結合する種々の捕捉抗ホスホ抗体に結び付けられている1~500個の特有の色素を持つマイクロスフェアの組成物、および、

(b) リン酸化されたキナーゼの同定のためのa)における色素とは識別可能な色素で標識されたキナーゼに特異的な抗体。

【0066】

本発明の別の部分は、キナーゼインヒビターの代わりにキナーゼアクチベーターをプロファイリングするための上述のキットである。

本発明の別の部分は、キナーゼインヒビターの特異性をプロファイリングするための上述の方法における使用のためのキットであって、以下を含む：

(a) 種々の抗ホスホ抗体に結び付けられている1~500個の特有の色素の組成物、

(b) a)における色素とは識別可能な色素で標識された抗キナーゼ抗体。

【0067】

本発明の別の部分は、キナーゼアクチベーターの特異性をプロファイリングするための上述の方法における使用のためのキットであって、以下を含む：

(a) 種々の抗ホスホ抗体に結び付けられている1~500個の特有の色素の組成物、

(b) a)における色素とは識別可能な色素で標識された抗キナーゼ抗体。

キットに使用される色素およびマーカーは夫々、ルミネセンスおよび/または蛍光の色素あるいはマーカーである。

【0068】

本発明の別の側面は、種々のリン酸化部位と組み合わせて1~500個の種々のキナーゼからの自己リン酸化を並行して測定するための、捕捉抗体が特異的に結合するエピトープを有するキナーゼ中の一定の修飾または非修飾部位へ特異的に結合する1つの異なる捕捉抗体に各々結び付けられている1~500個の特有の色素を含有する組成物である。

特有の色素の数は、種々のリン酸化部位と組み合わせて1~500個の種々のキナーゼからの自己リン酸化を並行して測定するために、1個と500個との間であり得る。

【0069】

並行して測定され得る個別のキナーゼの好ましい数は、1~20個、1~40個、1~

10

20

30

40

50

60個および1～80個のキナーゼ等である。代わりに、キナーゼA中の3個の異なる部位、キナーゼB中の5個の異なる部位、キナーゼC中の6個の異なる部位は、キナーゼY中のさらなるX個の異なる部位と組み合わせられ得るが、キナーゼ中の標的部位は、タンパク質中の種々の位置にて非修飾または修飾され得る。

本発明の別の態様は、1～100個または1～200個または1～300個または1～400個の特有の蛍光色素で着色されたマイクロスフェアを持つ上述の組成物である。

#### 【0070】

方法、キットおよび組成物は、キナーゼインヒビターの不在下1～500個の異なるキナーゼからの自己リン酸化を並行して測定することと比較して、キナーゼインヒビターの存在下1～500個の異なるキナーゼからの自己リン酸化を並行して測定することによって、各潜在的キナーゼインヒビターの特異性をプロファイリングするために使用され得る。

Luminex(商標)機器は、自己リン酸化の測定のために使用され得る。キナーゼインヒビターは、キナーゼインヒビターの不在下でしか自己リン酸化を示さないキナーゼを阻害し得る。

#### 【0071】

方法は、マイクロタイタープレートにおいて実施され得る。

本発明の方法のための別の使用は、腫瘍試料中の様々なキナーゼの自己リン酸化状態のプロファイリングである。様々なキナーゼからの活性の状態によって、診断と、患者を治すための好適な治療戦略とに対する思慮深いヒントが与えられる(Espina V. et al. (2005) Cancer Invest, 23(1), pp.36-46)。この特定の場合において、分析される必要のあるサンプルは、腫瘍試料または疾患に冒された組織(生検またはレーザー捕捉顕微解剖)または同様に同等な動物材料からのライセートであろう。分析は、キナーゼインヒビターの不在下で上記のとおりになされ得る。

#### 【0072】

例

##### 例1:細胞のアッセイの説明

腫瘍細胞株を、24ウェルプレートに1ウェルあたり100000～200000細胞の密度で播き、成長培地中で24時間培養した。その期間の後、細胞を、0.05%BSAを含有する飢餓培地で2回洗浄して、成長培地中に存在するすべての成長因子を除去した。細胞を、飢餓培地(一般にいずれの添加物もない基本培地)の存在下で、もう20時間終夜培養して、対象の標的分析物のリン酸化状態を低減させた。インヒビターをインキュベーションするため、飢餓培地を、指示濃度のインヒビターを含有する飢餓培地に変え、細胞培養インキュベーター中24にて1時間インキュベートする。対象の標的分析物のリン酸化を誘導するために、細胞を、事前にインキュベートされたインヒビターの存在下でその活性化を誘導することができる最適濃度の成長因子またはサイトカインで刺激した。必要な刺激時間は、各経路に特異的であり、予め見積もる必要がある。刺激後、インキュベーション培地を完全に除去し、細胞を、種々のプロテアーゼおよびホスファターゼインヒビターを含有する溶解緩衝液中4にて溶解させた。細胞ライセートを収集し、最終分析まで、少量のアリコートで-80にて保管した。細胞の最大刺激/リン酸化の算出のため、インヒビターとともにインキュベートせず、かつ、未処置のままかまたは刺激物のみで刺激する対照を、個別の24ウェルプレート上に含ませた。

#### 【0073】

c-Metの分析のため、種々の細胞株を、組み換えヒトHGFで刺激して、c-Metリン酸化を誘導した。細胞を、刺激前に、インヒビターの濃度を1時間上昇させることで処置した。対照細胞を溶媒のみで処置し、対照(HGFで刺激した)の%を算出するために使用する。飢餓期間後のリン酸化の低減した基礎レベルを実証するために、溶媒で処置された細胞を、HGFではさらに刺激しなかった(インヒビターなし/HGFなし)。かかる対照は、自己分泌細胞株をこのセッティングで分析する場合、絶対に必要なものである。なぜなら、これらの細胞は、インヒビターインキュベーション前に有意なリン酸化

レベルを誘導し得る HGF を産出することができるからである。

【0074】

例2：c-Met の逆Luminex多重化アッセイの説明

c-Met キナーゼのために説明する逆アッセイ形式は、3または4個の異なる蛍光色素で着色されたマイクロスフェアとカップリングした3または4個の異なる捕捉抗体を使用する。これらの抗体の1つは、受容体チロシンキナーゼc-Metの細胞外ドメイン(ECD)に対して向けられたものであるが、他の抗体は、細胞内キナーゼドメイン中の種々のリン酸化部位(例としてY<sup>1234</sup>Y<sup>1235</sup>、Y<sup>1349</sup>およびY<sup>1003</sup>)に結合する。代わりに、c-Metの細胞内ドメイン(ICD)に対して向けられた抗体はまた、この抗体がICD中のリン酸化部位を検出する抗体を妨害しない場合、総(total)c-Met量の検出のためにも使用し得る。

10

【0075】

このアプローチによって、異なるリン酸化部位の検出により、同一サンプル中のc-Metの総量を、その活性化状態とともに、並行して測定することが可能となる。捕捉するために、サンプルを、高濃度および低濃度の分析物の同時測定を可能にする連続希釈において(測定のダイナミックレンジが十分でない場合)マイクロプレートシェーカー上で連続的にかき混ぜながら、マイクロスフェアとカップリングされた種々の抗体の混合物とともに4にて20時間インキュベートする。マイクロプレートウォッシャーによる3回の洗浄サイクルの後、分析物が捕捉されたマイクロスフェアを、検出抗体とともに、マイクロプレートシェーカー上で連続的にかき混ぜながら22にて1時間インキュベートする。この検出抗体は、c-MetのECDへ向けられるものであるが、総c-Metのために使用された捕捉抗体とは異なるエピトープへ結合する。したがって、これら2つの抗体間の競合効果は避けられる。

20

【0076】

代わりに、c-MetのECDに対するポリクローナル抗体を使用することもできる。なぜならそれが、種々のエピトープへ結合し、かつ、既に結合した捕捉ECD特異抗体を介して影響を受けないからである。最終的に、使用された検出抗体は、ビオチンと接合される必要がある。なぜなら抗種(species)抗体接合体は、異なる種からの捕捉抗体に対して交差反応する可能性があるせいで、有用な選択肢ではない。検出抗体とともにインキュベーションした後、マイクロスフェアを、前に説明したように再度3回洗浄し、ストレプトアビジン-フィコエリトリン接合体とともにインキュベートする。ストレプトアビジンは高親和性を持って、ビオチンと、レポーター色素フィコエリトリンを持つ結合した検出抗体を持つすべての標識マイクロスフェアとへ結合する。

30

【0077】

もう2回の洗浄ステップの後、取得(acquisition)緩衝液を、測定のためのマイクロスフェアへ加える。結合したフィコエリトリンの量は、個々のマイクロスフェア上の結合した検出抗体および分析物の量と等しく、Luminexアナライザーにおいて測定し得る。測定の間、個別のマイクロスフェアは、結合した分析物の量に依存して、個々のフィコエリトリンレポーターシグナルを示し、他の蛍光色素で着色されたマイクロスフェアとはその個々の分類シグナルにより区別され得る。

40

【0078】

サンプル中の測定されたc-Metレベルの正確な定量化のため、組み換えc-Met標準タンパク質を、総c-Met濃度を決定するために使用する。この標準タンパク質を、サンプルを持つ隣り合った希釈系列(個々のプレート上)で測定し、アッセイの全ダイナミックレンジを定義する。サンプル希釈におけるc-Metの測定された濃度に基づき、異なるリン酸化部位の値を、1ng c-MetあたりのMFI(蛍光強度の中央値=Luminex機器からの読出し)に対して規格化し得る。

【0079】

説明したアッセイを、50または25μLサンプル体積を使用する96ウェルプレート形式に基づき開発した。FlexMAP 3D Luminexアナライザー上での測定のための384ウェ

50

ルプレート形式へのアッセイの移動の後、サンプル体積をさらに、限定的なヒト生検サンプル材料の測定を初めて可能にする総量で10～12 $\mu$ Lまで低減させることができた。加えて、捕捉マイクロスフェア、検出抗体および接合体以外のすべての試薬もまた、このダウンスケールリングによって確保される。

【図面の簡単な説明】

【0080】

図の説明

【図1a】c-Metキナーゼインヒビターを持つアッセイ設定の比較。U87-MG神経膠腫細胞が、組み換えヒトHGFでin vitroで刺激されて、c-Metリン酸化が誘導された。細胞が刺激前に、2つのc-Metキナーゼインヒビター（黒丸/黒三角）の濃度を上昇させて1時間処置された。対照細胞が、溶媒のみで処置され、対照の%を算出するために使用された（黒四角）。細胞ライセートが、2つの異なるアッセイ設定における同一希釈で分析された。標準一重化(single plex)設定（上のグラフ）は、ホスホc-Met検出抗体とともにc-Met捕捉抗体を使用するが、逆アッセイ設定は、リン酸化部位Y<sup>1234</sup>Y<sup>1235</sup>、Y<sup>1349</sup>およびY<sup>1003</sup>へ向けられた3つの異なるホスホc-Met捕捉抗体、ならびに、受容体の細胞外ドメインに特異的な、総タンパク質(total protein)c-Met捕捉抗体、ならびに、検出のための別の異なるECD特異的c-Met抗体、を含有する四重化アッセイである（下のグラフ）。標準アッセイ設定における2つの異なるホスホc-Met抗体は、隣り合った2つの異なるアッセイ（1分析物=1キャピティ）により測定される必要があるが、逆アッセイ設定を持つ四重化形式（4分析物=1キャピティ）と同じホスホc-Met抗体は、1アッセイにおいて測定された。両方のc-Metキナーゼインヒビターの非常に同等なIC<sub>50</sub>値が、2つのc-Metリン酸化部位であるc-MetのY<sup>1234</sup>Y<sup>1235</sup>（図1a）およびc-MetのY<sup>1349</sup>（図1b）のための両方のアッセイ設定から見出されたが、リン酸化部位Y<sup>1003</sup>の検出は、U87-MGのc-Met発現レベルが低いため、不可能であった。並行して測定されたc-Met総タンパク質は、c-Metキナーゼインヒビターのすべての濃度にて影響がないことを示す。加えて、これらのc-Met値は、測定されたホスホc-Met値を規格化するために使用され得た。

【図1b】c-Metキナーゼインヒビターを持つアッセイ設定の比較。U87-MG神経膠腫細胞が、組み換えヒトHGFでin vitroで刺激されて、c-Metリン酸化が誘導された。細胞が刺激前に、2つのc-Metキナーゼインヒビター（黒丸/黒三角）の濃度を上昇させて1時間処置された。対照細胞が、溶媒のみで処置され、対照の%を算出するために使用された（黒四角）。細胞ライセートが、2つの異なるアッセイ設定における同一希釈で分析された。標準一重化(single plex)設定（上のグラフ）は、ホスホc-Met検出抗体とともにc-Met捕捉抗体を使用するが、逆アッセイ設定は、リン酸化部位Y<sup>1234</sup>Y<sup>1235</sup>、Y<sup>1349</sup>およびY<sup>1003</sup>へ向けられた3つの異なるホスホc-Met捕捉抗体、ならびに、受容体の細胞外ドメインに特異的な、総タンパク質(total protein)c-Met捕捉抗体、ならびに、検出のための別の異なるECD特異的c-Met抗体、を含有する四重化アッセイである（下のグラフ）。標準アッセイ設定における2つの異なるホスホc-Met抗体は、隣り合った2つの異なるアッセイ（1分析物=1キャピティ）により測定される必要があるが、逆アッセイ設定を持つ四重化形式（4分析物=1キャピティ）と同じホスホc-Met抗体は、1アッセイにおいて測定された。両方のc-Metキナーゼインヒビターの非常に同等なIC<sub>50</sub>値が、2つのc-Metリン酸化部位であるc-MetのY<sup>1234</sup>Y<sup>1235</sup>（図1a）およびc-MetのY<sup>1349</sup>（図1b）のための両方のアッセイ設定から見出されたが、リン酸化部位Y<sup>1003</sup>の検出は、U87-MGのc-Met発現レベルが低いため、不可能であった。並行して測定されたc-Met総タンパク質は、c-Metキナーゼインヒビターのすべての濃度にて影響がないことを示す。加えて、これらのc-Met値は、測定されたホスホc-Met値を規格化するために使用され得た。

【0081】

10

20

30

40

50

【図2 a】異なる経路のキナーゼインヒビターによる阻害後のc-Metホスホタンパク質検出の特異性。A431癌細胞が、組み換えヒトHGFによりin vitroで刺激されて、図1に記載のようにc-Metリン酸化が誘導され、図1に記載の種々の特異的キナーゼインヒビターとともにインキュベートされた。細胞ライセートが、経路特異的インヒビターの影響を評価するために総c-Met（黒丸）、ホスホc-MetのY<sup>1234</sup>Y<sup>1235</sup>（黒四角）、ホスホc-Met Y<sup>1349</sup>（白上三角）およびホスホc-MetのY<sup>1003</sup>（白逆三角）を含むc-Met四重化アッセイにおいて分析された。c-Metキナーゼインヒビターのみが、すべてのc-Metリン酸化部位Y<sup>1234</sup>Y<sup>1235</sup>、Y<sup>1349</sup>およびY<sup>1003</sup>の用量依存的阻害を示すが（図2 aの上のグラフ）、PI3K（ホスホイノシチド3-キナーゼ；図2 aの下のグラフ）およびMeK（MAPKキナーゼまたはErkキナーゼ；図2 bの上のグラフ）、Src（細胞および肉腫のキナーゼ；図2 bの下のグラフ）のインヒビターは、c-Metのリン酸化に対して効果がない。

【図2 b】異なる経路のキナーゼインヒビターによる阻害後のc-Metホスホタンパク質検出の特異性。A431癌細胞が、組み換えヒトHGFによりin vitroで刺激されて、図1に記載のようにc-Metリン酸化が誘導され、図1に記載の種々の特異的キナーゼインヒビターとともにインキュベートされた。細胞ライセートが、経路特異的インヒビターの影響を評価するために総c-Met（黒丸）、ホスホc-MetのY<sup>1234</sup>Y<sup>1235</sup>（黒四角）、ホスホc-Met Y<sup>1349</sup>（白上三角）およびホスホc-MetのY<sup>1003</sup>（白逆三角）を含むc-Met四重化アッセイにおいて分析された。c-Metキナーゼインヒビターのみが、すべてのc-Metリン酸化部位Y<sup>1234</sup>Y<sup>1235</sup>、Y<sup>1349</sup>およびY<sup>1003</sup>の用量依存的阻害を示すが（図2 aの上のグラフ）、PI3K（ホスホイノシチド3-キナーゼ；図2 aの下のグラフ）およびMeK（MAPKキナーゼまたはErkキナーゼ；図2 bの上のグラフ）、Src（細胞および肉腫のキナーゼ；図2 bの下のグラフ）のインヒビターは、c-Metのリン酸化に対して効果がない。

#### 【0082】

【図3 a】異なる経路キナーゼインヒビターによる阻害後のEGF-Rホスホタンパク質検出の特異性。A431癌細胞が、図1に記載のように、組み換えヒトEGFによりin vitroで刺激されて、EGF-Rリン酸化が誘導され、図1に記載の種々のキナーゼインヒビターとともにインキュベートされた。細胞ライセートが、経路特異的インヒビターの影響を評価するために総EGF-R（黒丸）およびEGF-Rリン酸化部位Y<sup>845</sup>（黒逆三角）、Y<sup>998</sup>（黒四角）、Y<sup>1086</sup>（白四角）およびY<sup>1173</sup>（白逆三角）を含むEGF-R五重化アッセイにおいて分析された。EGF-R（図3 aの上のグラフ）およびEGF-R/Erk二重インヒビター（図3 bの上のグラフ）は、すべてのEGF-Rリン酸化部位Y<sup>845</sup>、Y<sup>998</sup>、Y<sup>1086</sup>およびY<sup>1173</sup>の用量依存的阻害を示すが、MeK（MAPKまたはErkキナーゼ；図3 aの下のグラフ）およびPI3K（ホスホイノシチド3-キナーゼ；図3 bの下のグラフ）のインヒビターは効果がない。Src（細胞および肉腫キナーゼ；図3 c）インヒビターもまた、標的特異的インヒビターとして、明確により高い濃度範囲において、EGF-Rリン酸化に対して阻害効果がなく、EGF-RとSrcとの間の側面(lateral)シグナリングにより十分に説明可能である（Dulak et al.: 2011; Oncogene. 2011 August 18; 30(33): 3625-3635）。使用されたすべてのインヒビターは、五重化アッセイにおいて、総EGF-Rの測定に対する影響を示さず、総EGF-Rレベルは、リン酸化部位の値の正確な規格化のために使用され得た。

【図3 b】異なる経路キナーゼインヒビターによる阻害後のEGF-Rホスホタンパク質検出の特異性。A431癌細胞が、図1に記載のように、組み換えヒトEGFによりin vitroで刺激されて、EGF-Rリン酸化が誘導され、図1に記載の種々のキナーゼインヒビターとともにインキュベートされた。細胞ライセートが、経路特異的インヒビターの影響を評価するために総EGF-R（黒丸）およびEGF-Rリン酸化部位Y<sup>845</sup>（黒逆三角）、Y<sup>998</sup>（黒四角）、Y<sup>1086</sup>（白四角）およびY<sup>1173</sup>（白逆三角）を含むEGF-R五重化アッセイにおいて分析された。EGF-R（図3 aの上のグラフ）お

10

20

30

40

50

よびEGF-R/ErbbB2二重インヒビター(図3bの上のグラフ)は、すべてのEGF-Rリン酸化部位Y<sup>845</sup>、Y<sup>998</sup>、Y<sup>1086</sup>およびY<sup>1173</sup>の用量依存的阻害を示すが、MeK(MAPKまたはErkキナーゼ;図3aの下のグラフ)およびPI3K(ホスホイノシチド3-キナーゼ;図3bの下のグラフ)のインヒビターは効果がない。Src(細胞および肉腫キナーゼ;図3c)インヒビターもまた、標的特異的インヒビターとして、明確により高い濃度範囲において、EGF-Rリン酸化に対して阻害効果がなく、EGF-RとSrcとの間の側面(lateral)シグナリングにより十分に説明可能である(Dulak et al.: 2011; Oncogene. 2011 August 18; 30(33): 3625-3635)。使用されたすべてのインヒビターは、五重化アッセイにおいて、総EGF-Rの測定に対する影響を示さず、総EGF-Rレベルは、リン酸化部位の値の正確な規格化のために使用され得た。

10

【図3c】異なる経路キナーゼインヒビターによる阻害後のEGF-Rホスホタンパク質検出の特異性。A431癌細胞が、図1に記載のように、組み換えヒトEGFによりin vitroで刺激されて、EGF-Rリン酸化が誘導され、図1に記載の種々のキナーゼインヒビターとともにインキュベートされた。細胞ライセートが、経路特異的インヒビターの影響を評価するために総EGF-R(黒丸)およびEGF-Rリン酸化部位Y<sup>845</sup>(黒逆三角)、Y<sup>998</sup>(黒四角)、Y<sup>1086</sup>(白四角)およびY<sup>1173</sup>(白逆三角)を含むEGF-R五重化アッセイにおいて分析された。EGF-R(図3aの上のグラフ)およびEGF-R/ErbbB2二重インヒビター(図3bの上のグラフ)は、すべてのEGF-Rリン酸化部位Y<sup>845</sup>、Y<sup>998</sup>、Y<sup>1086</sup>およびY<sup>1173</sup>の用量依存的阻害を示すが、MeK(MAPKまたはErkキナーゼ;図3aの下のグラフ)およびPI3K(ホスホイノシチド3-キナーゼ;図3bの下のグラフ)のインヒビターは効果がない。Src(細胞および肉腫キナーゼ;図3c)インヒビターもまた、標的特異的インヒビターとして、明確により高い濃度範囲において、EGF-Rリン酸化に対して阻害効果がなく、EGF-RとSrcとの間の側面(lateral)シグナリングにより十分に説明可能である(Dulak et al.: 2011; Oncogene. 2011 August 18; 30(33): 3625-3635)。使用されたすべてのインヒビターは、五重化アッセイにおいて、総EGF-Rの測定に対する影響を示さず、総EGF-Rレベルは、リン酸化部位の値の正確な規格化のために使用され得た。

20

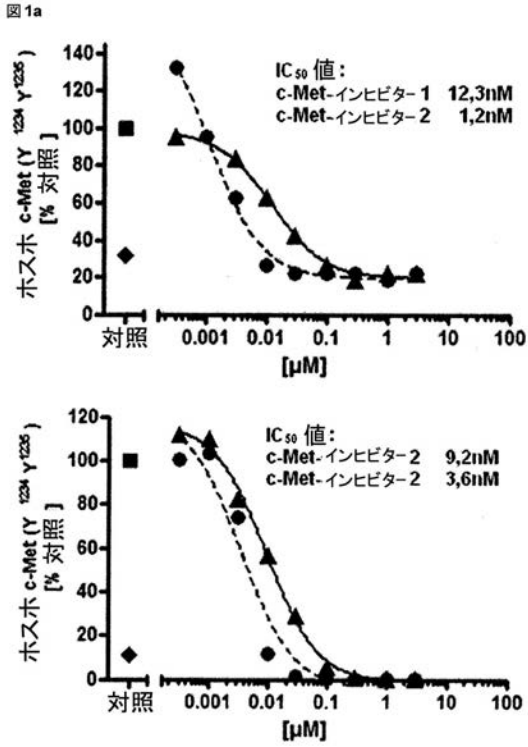
#### 【0083】

30

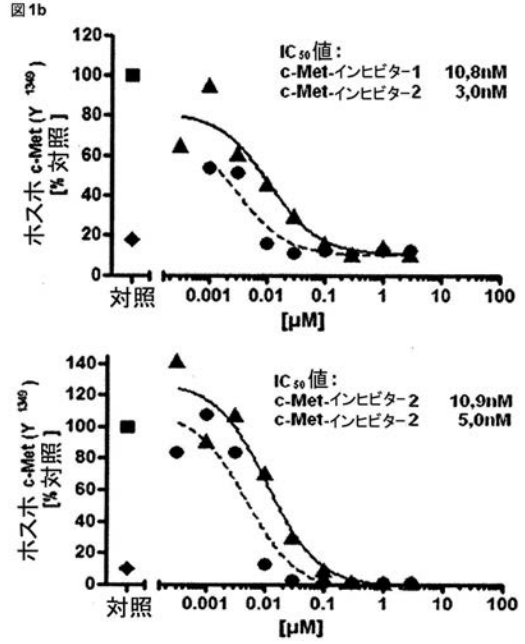
【図4】腫瘍生検中のホスホc-Met阻害。ホスホc-Metレベルが、384ウェル形式における逆三重化c-Metアッセイを使用して、患者の処置前および処置中の腫瘍生検サンプルにおいて定量的に測定された。縮小化によって、0.5mgより小さい生検材料の1サンプル中での、3つの異なる標的特異的アッセイの測定が可能になる。2つのc-Metリン酸化部位Y<sup>1234</sup>Y<sup>1235</sup>およびY<sup>1349</sup>が分析され、同一サンプル中で測定された総c-Met濃度により定量的に規格化された。自己リン酸化部位Y<sup>1234</sup>Y<sup>1235</sup>の結果が示されるが、下流のシグナル部位Y<sup>1349</sup>は、標的阻害がわずかに低いという同等な結果を示す。この標的阻害は、評価可能な患者の19/21名において観察された。R3(かつて毎日連続的に投薬した)における用量300mgにより、90%のホスホc-Met阻害が、全生検-評価可能な患者において観察された。

40

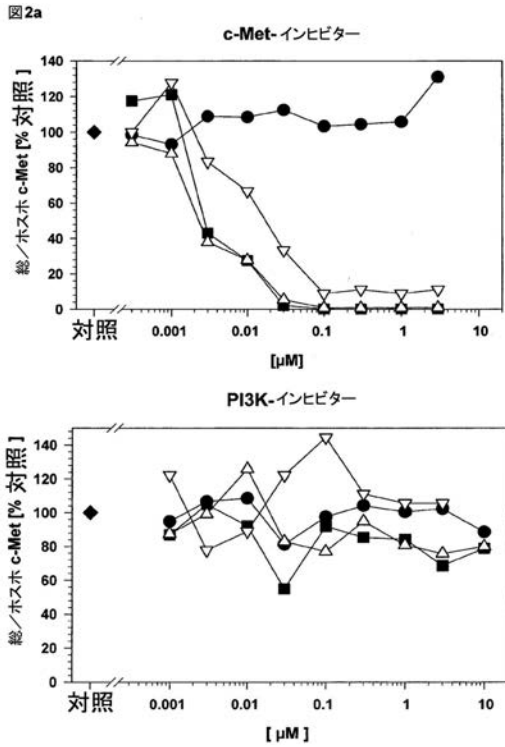
【 図 1 a 】



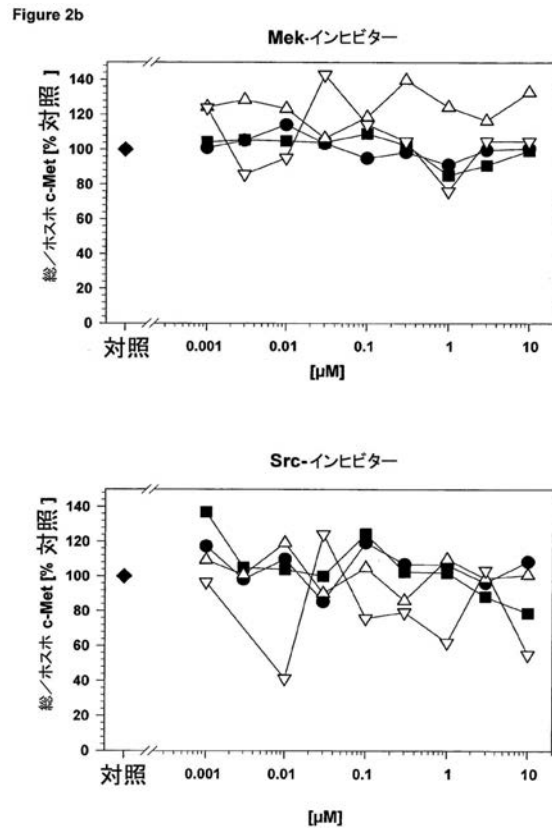
【 図 1 b 】



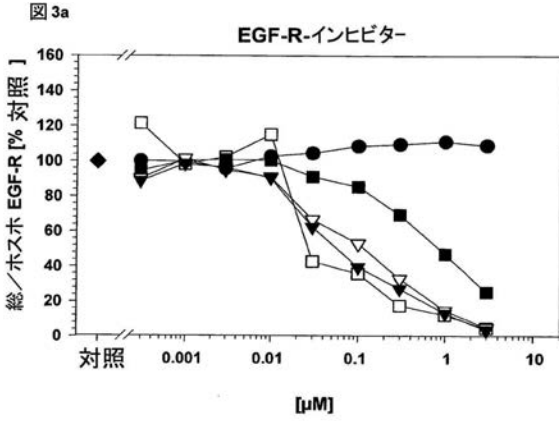
【 図 2 a 】



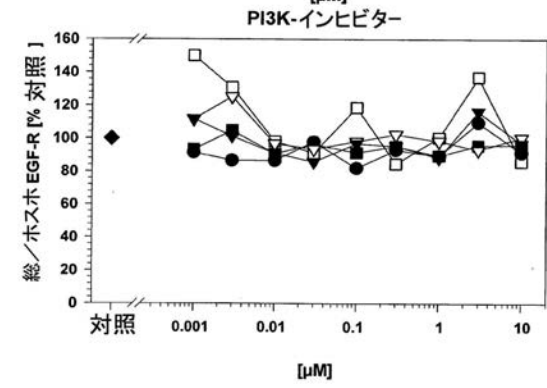
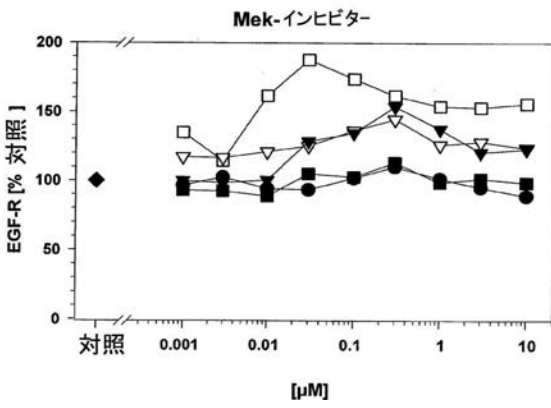
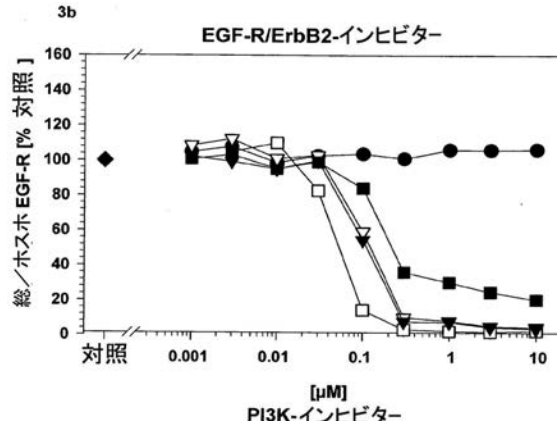
【 図 2 b 】



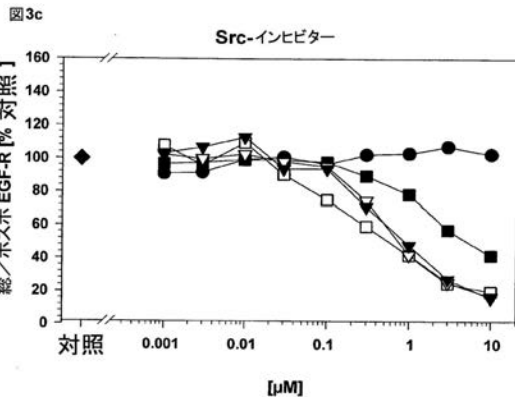
【 図 3 a 】



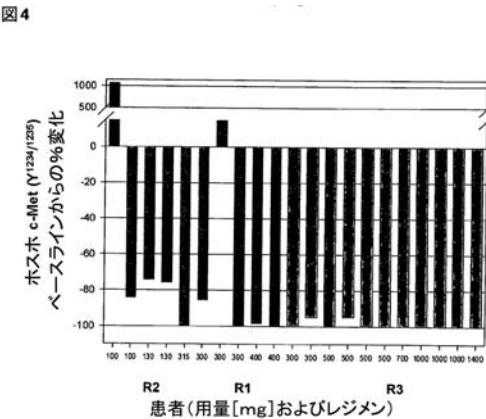
【 図 3 b 】



【 図 3 c 】



【 図 4 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2015/000469

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/573 G01N33/58 G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, PAJ, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Sherry A. Dunbar and Dan Li: "Introduction to Lumine-xMAP", Asiabiotec (World Publishing Company), vol. 14 1 October 2010 (2010-10-01), pages 26-30, XP055189224, Singapore Retrieved from the Internet: URL: <a href="http://www.asiabiotec.com/publication/apbn/14/english/preserved-docs/1410/0026_0030.pdf">http://www.asiabiotec.com/publication/apbn/14/english/preserved-docs/1410/0026_0030.pdf</a> [retrieved on 2015-05-13] page 26, third column, second paragraph - page 27, first column, second paragraph, line 11; page 27, figure 1 ----- -/--	1-22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
Date of the actual completion of the international search 13 May 2015		Date of mailing of the international search report 22/05/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Van Bohemen, Charles

3

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/000469
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>Raybiotech Inc: "Human RTK Phosphorylation Antibody Array G-series 1 For Simultaneously Detecting the Relative Level of Tyrosin Phosphorylation of Human Receptor Tyrosine Kinases (RTKs)) (Cat#: AAH-PRTK-G1-4 and AAH-PRTK-G1-8)",</p> <p><sup>3</sup> 12 March 2008 (2008-03-12), pages 1-22, XP055189257, Norcross, GA USA Retrieved from the Internet: URL:<a href="http://www.raybiotech.com/files/manual/Antibody-Array/AAH-PRTK-G1.pdf">http://www.raybiotech.com/files/manual/Antibody-Array/AAH-PRTK-G1.pdf</a> [retrieved on 2015-05-13] page 2, first paragraph; page 3, the figure; page 15, the table</p> <p>-----</p>	1-22
A	<p>WO 95/14930 A1 (GENENTECH INC [US]) 1 June 1995 (1995-06-01) page 44, line 28 - line 29; claims 38g,38h; figures 6b,9b,11b,18b</p> <p>-----</p>	1-22
T	<p>Reaction Biology Corporation: "KINASE PROFILING &amp; SCREENING",</p> <p><sup>3</sup> 1 June 2014 (2014-06-01), pages 1-4, XP055189017, Malvern, PA, USA Retrieved from the Internet: URL:<a href="http://www.reactionbiology.com/webapps/site/Documents/KinaseProfilingAndScreening.pdf">http://www.reactionbiology.com/webapps/site/Documents/KinaseProfilingAndScreening.pdf</a> [retrieved on 2015-05-12]</p> <p>-----</p>	1-22

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/000469

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9514930	A1	01-06-1995	
		AT 163231 T	15-02-1998
		AU 698975 B2	12-11-1998
		AU 1210895 A	13-06-1995
		CA 2175892 A1	01-06-1995
		DE 69408541 D1	19-03-1998
		DE 69408541 T2	06-08-1998
		DK 0730740 T3	28-09-1998
		EP 0730740 A1	11-09-1996
		ES 2116066 T3	01-07-1998
		GR 3026430 T3	30-06-1998
		HK 1008440 A1	07-05-1999
		JP 3442784 B2	02-09-2003
		JP H09505889 A	10-06-1997
		US 5891650 A	06-04-1999
		US 5914237 A	22-06-1999
		US 6025145 A	15-02-2000
		WO 9514930 A1	01-06-1995

-----

---

 フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, KM, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72) 発明者 ヤーリンク, フランク

ドイツ連邦共和国 6 4 3 6 7 ミュールタール、アム グリュネン ヴェーク 7

(72) 発明者 ブラット, フリードヘルム

ドイツ連邦共和国 6 9 1 2 0 ハイデルベルク、ヴェルダースシュトラッセ 3 6

(72) 発明者 クア, ジェシカ

ドイツ連邦共和国 6 4 4 0 7 フレンキシシュ - クラムバッハ、シラーシュトラッセ 3 1

专利名称(译)	通过使用修饰特异性结合物分析分析物的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2017513002A</a>	公开(公告)日	2017-05-25
申请号	JP2016559913	申请日	2015-02-27
申请(专利权)人(译)	默克专利GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	ヤーリンクフランク ブラットフリードヘルム クアジェシカ		
发明人	ヤーリンク,フランク ブラット,フリードヘルム クア,ジェシカ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/573 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/6803 C12Y207/10001 C12Y304/11018 G01N33/573 G01N33/574 G01N33/582 G01N33/6839 G01N2333/912 G01N2333/948 G01N2440/14		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.501.D G01N33/573.A G01N33/574.A G01N33/543.575		
优先权	2014001200 2014-03-31 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)  
与分析物结合的修饰物(具有特定的特定修饰位点)与各种染料结合,以确定分析物的浓度,以定量同一样品中的修饰物方法,试剂盒和组合物,用于同时使用位点特异性抗体和对结合到另一种染料的未修饰分析物具有特异性的抗体,分析待修饰的分析物。

(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2017-513002 (P2017-513002A) (43) 公表日 平成29年5月25日(2017.5.25)
(51) Int. Cl.	FI	テーマコード(参考)
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 D	
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543 501D	
GO1N 33/573 (2006.01)	GO1N 33/573 A	
GO1N 33/574 (2006.01)	GO1N 33/574 A	
	GO1N 33/543 575	
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁)	
(21) 出願番号 (22) 出願日 (53) 翻訳文提出日 (86) 国際出願番号 (87) 国際公開番号 (87) 国際公開日 (31) 優先権主張番号 (32) 優先日 (33) 優先権主張国	特願2016-559913(P2016-559913) 平成27年2月27日(2015.2.27) 平成28年11月29日(2016.11.29) PCT/EP2015/000469 W02015/149903 平成27年10月8日(2015.10.8) 14001200.6 平成26年3月31日(2014.3.31) 欧州特許庁(EP)	(71) 出願人 591032596 メルク パテント ゲゼルシャフト ミット バシュレンクテル ハフツング Merck Patent Gesell schaft mit beschrae nkter Haftung ドイツ連邦共和国 テーメ64293ダ ルムシュタット フランクフルター シュ トラッセ 250 Frankfurter Str. 25 0, D-64293 Darmstadt , Federal Republic o f Germany (74) 代理人 100102842 弁理士 葛和 清司

(54) 【発明の名称】 修飾特異的のバインダーを使用することによる分析物を分析するための方法

最終頁に続く