

(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2009-529133

(P2009-529133A)

(43) 公表日 平成21年8月13日(2009.8.13)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)		GO 1 N 33/53	N	
GO 1 N 33/543 (2006.01)		GO 1 N 33/543	5 7 5	
		GO 1 N 33/543	5 1 1 F	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2008-557782 (P2008-557782)	(71) 出願人	507331379 バイエル シェーリング ファーマ オイ フィンランド国、エフアイー20210 ツルク、パンシオンティエ 47
(86) (22) 出願日	平成19年3月6日 (2007.3.6)	(74) 代理人	100116838 弁理士 渡邊 潤三
(85) 翻訳文提出日	平成20年8月19日 (2008.8.19)	(72) 発明者	ピーロネン、ティモ フィンランド国、エフアイー21350 イルマリネン、マティンティエ 13
(86) 国際出願番号	PCT/FI2007/050120		
(87) 国際公開番号	W02007/101913		
(87) 国際公開日	平成19年9月13日 (2007.9.13)		
(31) 優先権主張番号	20065152		
(32) 優先日	平成18年3月7日 (2006.3.7)		
(33) 優先権主張国	フィンランド (FI)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞膜受容体に結合した抗体を検出するための新規なアッセイ方法

(57) 【要約】

本発明は、CD52結合性のヒト化抗体、即ち、カンパス-1H(アレムツズマブ)、の定量に特異的な新規なイムノアッセイの設計に関する。この方法は、薬物動態学的研究およびモニタリングに使用することができる。本発明は、従来から使用されている方法よりも特異性と感受性を高めるための改善点を開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生物試料中に存在する、CD52細胞膜受容体結合性のヒト化抗体カンパス - 1 H (アレムツズマブ) をアッセイするための競合アッセイ方法であって、

(a) 抗体の存在を分析するための試験試料を提供し、

(b) CD52受容体含有細胞またはCD52受容体含有細胞膜調製物をフィルタープレートメンブロンに結合し、

(c) 検出可能な標識で標識した検出用抗体と試験試料を該フィルタープレートメンブロンと接触させて、フィルタープレートメンブロン上の細胞膜受容体との結合に対して、試験試料中の抗体と標識した抗体とを競合させ、

(d) 未結合の試薬がフィルタープレートメンブロンを通過するように除去し、そして

(e) 標識した抗体の存在を検出し、標準検量曲線を参照してカンパス - 1 H (アレムツズマブ) を定量する

ことを包含する方法。

【請求項 2】

標識した抗体が、蛍光標識を付したカンパス - 1 Hであることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

標識した抗体が、Eu標識カンパス - 1 Hであることを特徴とする、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

生物試料が血清試料、血漿試料、全血試料、脊髄液試料または滑液試料であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれかの方法を使用した、薬物動態学的研究またはモニタリング。

【請求項 6】

CD52細胞膜受容体結合性のヒト化抗体カンパス - 1 H (アレムツズマブ) をアッセイするための試験キットであって、適切な容器に入った以下の成分を包含する試験キット

- 検出用抗体であるカンパス - 1 H に結合した、検出可能な標識、
- フィルタープレートメンブロン、および
- (凍結乾燥または凍結した) 細胞または細胞膜。

【請求項 7】

Eu標識カンパス - 1 を包含することを特徴とする、請求項 6 に記載の試験キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト化抗体、即ち、カンパス - 1 H (アレムツズマブ)、の定量に特異的な新規な免疫アッセイの設計、および新規アッセイの、例えば、薬物動態学的研究およびモニタリングにおける使用に関する。免疫アッセイによる測定に適した生物試料は生体液、例えば、血清試料である。本発明は、従来から使用されている方法よりも特異性と感受性を高めるための改善点を開示する。

【背景技術】

【0002】

カンパス - 1 H (アレムツズマブ) とは、細胞膜に提示されたCD52分子との結合に特異的なヒト化モノクローナル抗体 (IgG1) である。CD52抗原は、リンパ球といくつかの他の種類の細胞が多量に発現する脂質アンカー型糖タンパク質である。成熟抗原はわずか12個のアミノ酸からなるタンパク質成分を含有する。カンパス - 1 Hの認識する抗原エピトープは、C末端のいくつかのアミノ酸と脂質アンカーの一部を含んでおり、この構造ゆえに、カンパス - 1 Hの解析は難しい。従って、カンパス - 1 Hとの高親和性

10

20

30

40

50

結合には完全な細胞膜受容体が必要である。更に、一般的に使用されている二次抗生物種抗体試薬は、生物試料中の余分な非特異的ヒト抗体と交差反応するため、選択性に乏しく、可変率が高い。

【0003】

カンパス - 1 H (アテムツズマブ) は、補体仲介細胞毒性および抗体依存性細胞仲介細胞毒性によって、正常および悪性リンパ球の融解を引き起こす。カンパス - 1 H は、慢性リンパ性白血病 (CLL) の治療や、移植のための免疫抑制剤や、更には自己免疫疾患の治療のために開発された。

【0004】

カンパス - 1 H のアッセイに関する出版物はわずかであり、それらは細胞に基づく蛍光活性化セルソーター (FACS) 解析法 [Rebello and Hale, J Imm Meth 2002, 260; 285-302]、または最近になって報告された酵素結合免疫吸着法 (ELISA) [Jilani et al., Leukemia Res 2004, 28; 1255-62] であり、いずれのアッセイ法も、薬物動態学的研究またはモニタリングに必要な選択率と感受性を満たすものではない。Rebello and Hale および Jilani et al. の報告にある LLOQ (定量下限値) はそれぞれ $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ と $0.25 \mu\text{g}/\text{mL}$ だった。更に、選択率と感受性が不十分である点に加え、FACS 解析は手間と時間がかかり、Jilani et al. の方法は、追試が成功していない。

【0005】

発明の概要と好ましい態様

我々は、標識抗体および市販のフィルタープレートを用いる競合アッセイフォーマットの使用に基づいて、ヒト試料中のヒト化抗体であるカンパス - 1 H (アテムツズマブ) の高感度および特異的な検出を可能にする新規な競合アッセイを設計し、そのバリデーションを実施した。

【0006】

従って、本発明の目的の1つは、生物試料中に存在する、CD52 細胞膜受容体結合性のヒト化抗体カンパス - 1 H (アテムツズマブ) をアッセイするための競合アッセイ方法であって、

(a) 抗体の存在を分析するための試験試料を提供し、

(b) CD52 受容体含有細胞または CD52 受容体含有細胞膜調製物をフィルタープレートメンブランに結合し、

(c) 検出可能な標識で標識した検出用抗体 (カンパス - 1 H) と試験試料を該フィルタープレートメンブランと接触させて、フィルタープレートメンブラン上の細胞膜受容体との結合に対して、試験試料中の抗体と標識した抗体とを競合させ、

(d) 未結合の試薬がフィルタープレートメンブランを通過するように除去し、そして

(e) 標識した抗体の存在を検出し、標準検量曲線を参照して検出用抗体を定量することを包含する方法である。

【0007】

本発明の好ましい競合アッセイは、蛍光標識、好ましくは Eu 標識、で標識したカンパス - 1 H に基づくものである。

【0008】

本発明の更なる目的は、カンパス - 1 H (アテムツズマブ) をアッセイするための試験キットであって、適切な容器に入った以下の成分を包含する試験キットである。

- 検出用抗体であるカンパス - 1 H に結合した、検出可能な標識、

- フィルタープレートメンブラン、および

- CD52 受容体を含有する (凍結乾燥または凍結した) 細胞または細胞膜。

所望により、試験キットは試験に必要な適切なバッファーを更に包含してもよい。

【0009】

好ましくは、試験キットは Eu 標識カンパス - 1 H を包含する。本発明の方法および試験キットに使用するフィルタープレートメンブランとしては、例えば、市販のアクロウェル 96 フィルタープレート (Pall Life Sciences) が挙げられる。

【 0 0 1 0 】

以下、添付の図面に参照しながら本発明をより詳細に説明する。

【 0 0 1 1 】

発明の詳細な説明

本発明の方法でアッセイする抗体はカンパス - 1 H (アテムツズマブ) である。しかし、細胞膜受容体に結合する全ての動物抗体、ヒト抗体またはヒト化抗体をそれに対応する方法でアッセイすることができる。このような抗体としては、例えば、ゲムツズマブ・オゾガマイシン (マイロターゲット) およびリツキシマブ (リツキサン / マブセラ) が挙げられ、これらに対応する細胞膜受容体は CD 3 3 と CD 2 0 である。本発明の方法でアッセイすることのできる他のモノクローナル抗体としては、アブシキシマブ (レオプロ / セントリクス)、バシリキシマブ (シムレクト)、ベパシズマブ (アバスチン)、セツキシマブ (アーピタックス)、ダクリズマブ (ゼナバックス)、エファリズマブ (ラブティバ)、インフリキシマブ (レミケード / アパカイン)、リンツズマブ (ザミル)、ナタリズマブ (タイサブリ)、オマリズマブ (ゾレア)、パリビズマブ (シナギス)、パニツムマブ (ベクチピックス)、トシツモマブ (ベキサール)、トラスツズマブ (ハーセプチン)、および他のキメラモノクローナル抗体が挙げられる。

10

【 0 0 1 2 】

分析する生体液は、例えば、血清試料、血漿試料、全血試料、脊髄液試料または滑液試料であり、血清試料が好ましい。

【 0 0 1 3 】

本発明の競合アッセイ方法においては、細胞または細胞膜調製物をフィルタープレートメンブランに結合する。必要な細胞膜受容体 CD 5 2 を発現する細胞株およびその細胞培養用培地は市販されているものを使用するか、当業者に周知の技術に基づいて調製することができる。細胞膜調製物は、当業者に周知の技術に基づいたホモジェナイゼーションとそれに続く遠心分離工程によって調製することができる。

20

【 0 0 1 4 】

適切なフィルタープレートメンブランは市販されており、一例として Pall Life Sciences から入手可能なアクロウエル フィルタープレートメンブランが挙げられる。

【 0 0 1 5 】

本発明の目的に適した検出可能な標識は、蛍光標識である。適切な場合には、代わりに、酵素標識や放射性標識、あるいは磁気粒子を使用することもできる。好ましい蛍光標識としては、一般的に使用される蛍光標識、例えば、ユーロピウム (Eu) が挙げられる。抗体の標識は、例えば、未修飾のアミノ基を標識することで達成される。問題となる標識の検出に適した標識計測基を用いて標識を検出することができる。

30

【 0 0 1 6 】

検量標準曲線は、検出用抗体の検量用標準を作製し、シグナルを測定して得られたデータを標準曲線に (好ましくは適切な評価用ソフトウェアを用いて) あてはめることで作製する。

【 0 0 1 7 】

まとめると、我々は、生物試料 (例えば血清) 中の、受容体結合性抗体であるカンパス - 1 H (アテムツズマブ) を高感度且つ特異的に検出するための新規な技術概念を確立した。以下に示す、既に報告されているカンパス - 1 H のアッセイ方法よりも定量下限値 (LL O Q) が 1 0 倍超に改良された方法が、注意深く最適化したアッセイデザインにおいて優れた技術性能を発揮する試薬の使用によって達成された。カンパス - 1 H アッセイの優れた特異性、特に豊富に存在する循環非特異的ヒト抗体との交差反応に関する特異性は、主として競合アッセイ法の採用 (従って、2 次抗ヒト抗体試薬の不使用) とフィルタープレートの使用によって達成することができた。

40

【 0 0 1 8 】

本発明の更なる態様においては、患者の薬物動態学的研究またはモニタリングが必要な場合に、本発明を患者由来の試料に適応することが最も有望な用途である。

50

【実施例】

【0019】

1. 材料と方法1.1 抗体、細胞株、試薬および装置

カンパス - 1 H (アテムツズマブ/マブカンパス、ドイツ国、Schering AG) の 10 mg / mL 点滴用溶液を薬局から入手した。CD 5 2 受容体を発現する T - 細胞リンパ球皮膚リンパ腫細胞株 Hu T 7 8 (カタログ番号 T I B - 1 6 1) および細胞培養用培地は A T C C (米国、バージニア州、マナサス) から入手した。アクロウエル 9 6 フィルタープレート (製品番号 5 0 2 0) は Pall Life Sciences (米国、ミシガン州、アン・アーバー) から入手した。Superdex 7 5 カラム、200 HR 10/30 FPLC カラムと N A P - 5 カラムは、Amersham Pharmacia Biotech (スウェーデン国、ウブサラ) から入手した。Victor マルチラベルカウンター、MultiCalc 評価ソフトウェア、DELFI A E u 標識キット、LxR 結合アッセイバッファー、LxR 洗浄溶液と増強用溶液は Perkin-Elmer Life Sciences (フィンランド国、ツルク) 製を使用した。マルチスクリーン真空洗浄マニフォールドは Millipore (米国、マサチューセッツ州、ピレリカ) から入手した。

10

【0020】

1.2 カンパス - 1 H の E u 標識

約 2 ~ 3 E u / カンパス - 1 H になるように、カンパス - 1 H を E u - キレートで標識した。簡単に説明すると、後から添加する E u - キレートと反応しうるアミノ基を有するトリスバッファーを除去するために、カンパス - 1 H 抗体溶液を N A P - 5 カラムに添加し、0.05 M 炭酸バッファー (pH 9.8) で溶出した。抗体溶液をモル量で 120 倍過剰量の N¹ - E u⁺³ キレート (N¹ - (p - イソチオシアナトベンジル) - ジエチレントリアミン N¹, N², N³, N³ - テトラ酢酸 E u) に添加し、4 で一晩インキュベートした。E u 標識したカンパス - 1 H と遊離 E u - キレートとの分離は、DELFI A E u 標識キットの取扱説明書に従い、Superdex 200 HR 10/30 カラムを使用したサイズ排除クロマトグラフィーと T S A バッファー (pH 7.8) による溶出で行った。

20

【0021】

1.3 アッセイデザイン

本発明においては、完全な細胞または細胞膜、E u 標識カンパス - 1 H およびフィルタープレートの使用に基づいて、ヒト血清中のカンパス - 1 H を測定するための新規な競合アッセイを設計し、そのバリデーションを実施した。

30

【0022】

1.4 アッセイのバリデーション1.4.1 選択率

選択率は、健康な献血者と最小 6 人の個別の対照患者からなる血清プールを試験することで検討した。

【0023】

1.4.2 精度と真度

アッセイ内およびアッセイ間の精度と真度は、ヒト血清マトリクス内で作製した 5 種の異なる品質評価サンプル濃縮物について、2 人の異なる研究員が数日間にわたって 6 回の繰り返し測定 (各測定は 2 つの結果の平均値である) で解析する (従って、一人につき 3 回の解析を行う) ことにより評価した。

40

【0024】

1.4.3 定量下限と定量上限

精度が 25% 未満、真度が 75 ~ 125% の最低品質管理レベルを、定量下限 (L L O Q) とした。精度が 20% 未満、真度が 80 ~ 120% の最高品質管理レベルを、定量上限 (U L O Q) とした。

【0025】

50

2 結果

2.1 アッセイデザイン

アッセイデザインの模式図を図1に示した。

【0026】

2.1.1 細胞培養と細胞膜の調製

CD52受容体を発現するT-細胞リンパ球皮膚リンパ腫細胞株HuT78は、溶液（イスコフの変性ダルベッコ培地+20%胎児ウシ血清）中で培養した。膜ストック溶液は氷冷TMEバッファー（50mM Tris-HCl、10mM MgCl₂と1mM EDTA）中で調製し、ビーズミルホモジェナイザーでホモジェナイズした。核と壊れた細胞を、4℃、約220gで10分の遠心分離で除去した。上清を再度、4℃、約4000gで45分の遠心分離に付した。最終的なペレットをTMEバッファーに懸濁し、使用するまで-70℃で保存した。

10

【0027】

2.1.2 競合アッセイ

LxR結合バッファーで希釈した全細胞または膜ストック調製物をフィルタープレートに添加し（50μL/ウェル）、室温で1時間インキュベートした。次に、濃度範囲が0.005~3μg/mLであるヒト血清を用いて作製した検量用標準試料、ヒト血清で作成した品質管理試料、および検討用試料（30μL/ウェル）をそれぞれ2つずつのウェルに添加し、室温で2時間インキュベートした。最後に、LxR結合バッファーで希釈したEu標識カンパス-1H（2.5ng/ウェル/50μL）を加え、4℃で一晩インキュベートした。LxR洗浄バッファーを用いて、Millipore真空マニフォールドでプレートを6回洗浄し、次にDELTA増強溶液（200μL/ウェル）を加えた。蛍光（Eu）は、振とう下、室温で15分のインキュベーションの後に測定した。標準値のあてはめと濃度データの作製には、MultiCalc評価ソフトウェアを用いた。3つのアッセイセットのための検量標準曲線を図2に示した。

20

【0028】

2.2 アッセイのバリデーション

2.2.1 選択率

試験したヒト対照血清のプール（n=2）と6人の試験した個別の健常試料の全てにおいて、濃度はLLOQ（0.02μg/mL）未満だった。

30

【0029】

2.2.2 精度と真度

ヒト血清濃度が0.02、0.03、0.05、0.1および0.5μg/mLである品質管理（QC）試料に対する本発明の方法のアッセイ内精度（CV）は、4.2~28.2%（表1）だった。ヒト血清濃度が0.02、0.03、0.05、0.1および0.5μg/mLである品質管理試料に対する本発明の方法のアッセイ内真度（AC）は、88~117%（表1）だった。

【0030】

40

【表 1】

アッセイ内の精度と真度

品質管理試料－アッセイ内データ：カンパス－1H [$\mu\text{g}/\text{mL}$]

QC 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1	2	3	4	5	6	N	平均	SD	CV [%]	AC [%]	偏り [%]
セット1	0.018	0.019	0.017	[0.017]	0.027	0.027	5	0.022	0.005	23.1	108	8
セット2	0.021	0.022	0.018	0.021	0.020	0.020	6	0.020	0.001	6.7	102	2
セット3	[0.015]	0.017	0.017	0.020	0.020	0.021	5	0.019	0.002	9.8	95	-5

[...] = 重複した測定 of CV が 3.0 を超えたため、拒否された結果

QC 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1	2	3	4	5	6	N	平均	SD	CV [%]	AC [%]	偏り [%]
セット1	0.034	0.034	0.034	0.037	[0.031]	0.037	5	0.035	0.002	4.7	117	17
セット2	0.034	0.03	[0.033]	0.03	0.031	0.033	5	0.032	0.002	5.7	105	5
セット3	[0.016]	0.017	0.022	0.026	0.031	0.036	5	0.026	0.007	28.2	88	-12

[...] = 重複した測定 of CV が 3.0 を超えたため、拒否された結果

QC 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1	2	3	4	5	6	N	平均	SD	CV [%]	AC [%]	偏り [%]
セット1	0.050	0.052	0.051	0.056	0.054	0.056	6	0.053	0.003	4.8	106	6
セット2	0.058	0.060	0.056	0.057	0.054	0.050	6	0.056	0.003	6.2	112	12
セット3	0.041	0.045	0.045	0.053	0.047	0.048	6	0.047	0.004	8.6	93	-7

QC 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1	2	3	4	5	6	N	平均	SD	CV [%]	AC [%]	偏り [%]
セット1	0.094	0.115	0.108	0.102	0.108	0.097	6	0.104	0.008	7.5	104	4
セット2	0.114	0.121	0.117	0.114	0.109	0.103	6	0.113	0.006	5.6	113	13
セット3	0.101	0.105	0.105	0.121	0.115	0.110	6	0.110	0.007	6.8	110	10

QC 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1	2	3	4	5	6	N	平均	SD	CV [%]	AC [%]	偏り [%]
セット1	0.533	0.541	0.482	0.503	0.530	0.544	6	0.522	0.024	4.7	104	4
セット2	0.521	0.538	0.583	0.607	0.568	0.545	6	0.560	0.032	5.7	112	12
セット3	0.445	0.494	0.468	0.490	0.497	0.470	6	0.477	0.020	4.2	95	-5

ヒト血清濃度が0.02、0.03、0.05、0.1および0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である品質管理(QC)試料に対する本発明の方法のアッセイ間精度(CV)は、7.1~18.1%(表2)だった。ヒト血清濃度が0.02、0.03、0.05、0.1および0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である品質管理試料に対する本発明の方法のアッセイ間真度(AC)は、102~109%(表2)だった。

【0032】

【表 2】

アッセイ間の精度と真度

品質管理試料－アッセイ間データ：カンパス－1H						
セット no.	QC no.	単位	QC 0.02	QC 0.03	QC 0.05	QC 0.1
セット1	1	µg/mL	0.018	0.034	0.050	0.094
	2	µg/mL	0.019	0.034	0.052	0.115
	3	µg/mL	0.017	0.034	0.051	0.108
	4	µg/mL	[0.017]	0.037	0.056	0.102
	5	µg/mL	0.027	[0.031]	0.054	0.108
	6	µg/mL	0.027	0.037	0.056	0.097
セット2	1	µg/mL	0.021	0.034	0.058	0.114
	2	µg/mL	0.022	0.030	0.060	0.121
	3	µg/mL	0.018	[0.033]	0.056	0.117
	4	µg/mL	0.021	0.030	0.057	0.114
	5	µg/mL	0.020	0.031	0.054	0.109
	6	µg/mL	0.020	0.033	0.050	0.103
セット3	1	µg/mL	[0.015]	[0.016]	0.041	0.101
	2	µg/mL	0.017	0.017	0.045	0.105
	3	µg/mL	0.017	0.022	0.045	0.105
	4	µg/mL	0.020	0.026	0.053	0.121
	5	µg/mL	0.020	0.031	0.047	0.115
	6	µg/mL	0.021	0.036	0.048	0.110
N			16	15	18	18
調製濃度		µg/mL	0.020	0.030	0.050	0.100
実験平均		µg/mL	0.020	0.031	0.052	0.109
SD		µg/mL	0.003	0.006	0.005	0.008
CV		%	15.0	18.1	9.9	7.1
AC		%	102	104	104	109
偏り		%	2	4	4	9

[...] = 重複した測定のCVが30を超えたため、拒否された結果

2.2.2.1 定量下限と定量上限

最低品質管理濃度の精度を25%未満、真度を75~125%とした、表2に示したアッセイ間品質管理データに基づいて決定した定量下限(LLOQ)は、0.02 μg/mLだった。

【0034】

最高品質管理濃度の精度を20%未満、真度を80~120%とした、表2に示したアッセイ間品質管理データに基づいて決定した定量上限(ULOQ)は、0.5 μg/mLだった。

【図面の簡単な説明】

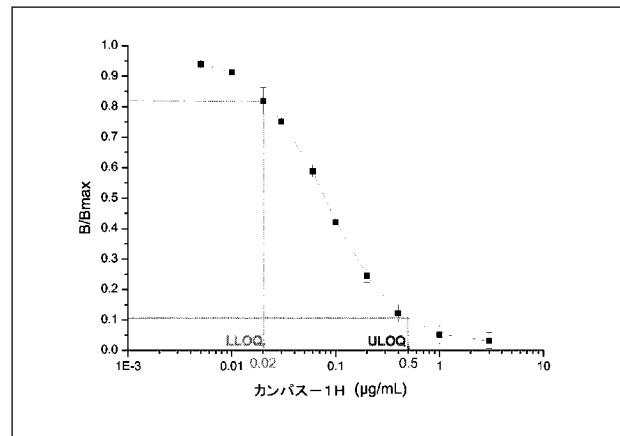
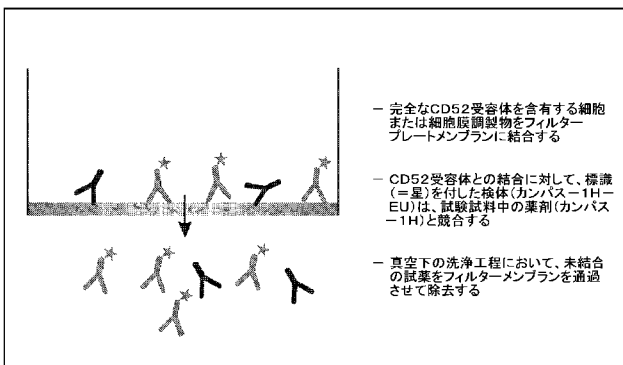
【0035】

【図1】本発明に基づく、カンパス-1Hを分析するためのアッセイデザインの模式図。

【図2】ヒト血清の競合カンパス-1Hアッセイのための、アッセイ用標準検量曲線(平均+SD)であり、LLOQとULOQ(定量上限)を示す。

【図1】

【図2】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI2007/050120

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER See extra sheet 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) IPC8: G01N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched FI, SE, NO, DK Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-internal, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, Chemical Abstracts	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.
Y	ISAACS J.D. et al. CAMPATH-1H in rheumatoid arthritis-an intravenous dose-ranging study. Br. J. Rheumatol., March 1996, Vol. 35, No. 3, pages 231-240, see page 233, left column, lines 1-17 1-7
Y	US 2001/0055776 A1 (GREENWALT DALE) 27 December 2001 (27.12.2001), see page 1, paragraphs [0007] and [0009], page 2, paragraphs [0020]-[0022], page 3, paragraphs [0032]-[0033], page 4, paragraph [0039], pages 6-7, example 5, and claims 1, 7, 12, 27, 30, 33, and 42 1-7
Y	VALENZANO, K.J. et al. Development of a fluorescent ligand-binding assay using the AcroWell filter plate. J. Biomol. Screen., December 2000, Vol. 5, No. 6, pages 455-461, see the whole document 1-5
Y	TUMOSA, N. and KAHAN, L. Fluorescent EIA screening of monoclonal antibodies to cell surface antigens. J. Immunol. Methods., January 1989, Vol. 116, No. 1, pages 59-63, see pages 60-61 1, 4-5
<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: "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 "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 24 May 2007 (24.05.2007)	Date of mailing of the international search report 08 June 2007 (08.06.2007)
Name and mailing address of the ISA/FI National Board of Patents and Registration of Finland P.O. Box 1160, FI-00101 HELSINKI, Finland Facsimile No. +358 9 6939 5328	Authorized officer Pia Niinimäki Telephone No. +358 9 6939 500

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI2007/050120

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LIEBERT, M. et al. A semi-automated fluorescent (SAF) assay using viable, whole cells for screening hybridoma supernatants. J. Immunol. Methods., July 1987, Vol. 101, No. 1, pages 85-90, see pages 86-87	1, 4-5
A	VATER, C.A. et al. Characterization of antibody binding to cell surface antigens using a plasma membrane-bound plate assay. Anal. Biochem., January 1995, Vol. 224, No.1, pages 39-50, see page 41	
A	REBELLO, P. and HALE, G. Pharmacokinetics of CAMPATH-1H: assay development and validation. J. Immunol. Methods., February 2002, Vol. 260, No. 1-2, pages 285-302, see the whole publication	
A	JILANI, I. et al. Alemtuzumab: validation of a sensitive and simple enzyme-linked immunosorbent assay. Leuk. Res., December 2004, Vol. 28, No. 12, pages 1255-1262, see the whole publication	
A	WO 94/02604 A1 (WELLCOME FOUND) 03 February 1994 (03.02.1994), see page 10, lines 23-34, pages 20-21, example 4, claims 10-12	
A	WO 2005/003767 A2 (MDS INC) 13 January 2005 (13.01.2005), see pages 15-16, 35-36, claims 3, 4, 21, and 35	
A	US 2002/0187517 A1 (MARSH ANTOINETTE) 12 December 2002 (12.12.2002), see page 7, paragraphs [0076]-[0077]	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/FI2007/050120

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members(s)	Publication date
US 2001/0055776 A1	27/12/2001	None	
.....			
WO 94/02604 A1	03/02/1994	US 5786176 A PT 650523T T JP 3537140B2 B2 JP 7508888T T ES 2213142T T3 EP 0650523 A1 DK 650523T T3 DE 69333364T T2 DE 69333364D D1 AT 256737T T	28/07/1998 31/03/2004 14/06/2004 05/10/1995 16/08/2004 03/05/1995 19/04/2004 07/10/2004 29/01/2004 15/01/2004
.....			
WO 2005/003767 A2	13/01/2005	US 2004072250 A1	15/04/2004
.....			
US 2002/0187517 A1	12/12/2002	None	
.....			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FI2007/050120

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

专利名称(译)	用于检测与细胞膜受体结合的抗体的新型测定方法		
公开(公告)号	JP2009529133A	公开(公告)日	2009-08-13
申请号	JP2008557782	申请日	2007-03-06
[标]申请(专利权)人(译)	拜耳先灵医药Oy公司		
申请(专利权)人(译)	拜耳先灵医药Oy公司		
[标]发明人	ピーロネン, テイモ		
发明人	ピーロネン, テイモ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N2333/705		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/543.575 G01N33/543.511.F		
优先权	2006005152 2006-03-07 FI		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及特异于定量CD52结合人源化抗体即Campath-1H (alemtuzumab) 的新型免疫测定的设计。该方法可用于药代动力学研究和监测。本发明公开了改进以增强特异性和灵敏度，而不是常规使用的方法。

品質管理材料-アツセイ内子-カンス-1H [µg/mL]										
QC 0.02 µg/mL	1	2	3	4	5	6	N	平均	SD	CV [%]
セフ1	0.018	0.019	0.017	0.017	0.027	0.027	5	0.022	0.005	23.1
セフ2	0.021	0.022	0.018	0.021	0.020	0.020	6	0.020	0.001	6.7
セフ3	0.015	0.015	0.017	0.017	0.020	0.020	5	0.019	0.002	9.8
[] = 標本と標準のCVの0.01倍または、標本は未検										
QC 0.03 µg/mL	1	2	3	4	5	6	N	平均	SD	CV [%]
セフ1	0.034	0.034	0.034	0.037	0.037	0.037	5	0.035	0.002	4.7
セフ2	0.034	0.030	0.030	0.030	0.031	0.033	5	0.032	0.002	5.7
セフ3	0.016	0.017	0.022	0.026	0.031	0.036	5	0.026	0.007	26.2
[] = 標本と標準のCVの0.02倍または、標本は未検										
QC 0.05 µg/mL	1	2	3	4	5	6	N	平均	SD	CV [%]
セフ1	0.050	0.052	0.051	0.056	0.054	0.056	6	0.053	0.003	4.8
セフ2	0.058	0.060	0.058	0.067	0.054	0.050	6	0.056	0.003	6.2
セフ3	0.041	0.045	0.045	0.053	0.047	0.048	6	0.047	0.004	8.6
QC 0.1 µg/mL	1	2	3	4	5	6	N	平均	SD	CV [%]
セフ1	0.094	0.115	0.108	0.102	0.106	0.097	6	0.104	0.008	7.5
セフ2	0.114	0.121	0.117	0.114	0.109	0.103	6	0.113	0.006	5.6
セフ3	0.101	0.105	0.105	0.121	0.115	0.110	6	0.110	0.007	6.8
QC 0.5 µg/mL	1	2	3	4	5	6	N	平均	SD	CV [%]
セフ1	0.533	0.541	0.482	0.503	0.530	0.544	6	0.522	0.024	4.7
セフ2	0.521	0.538	0.533	0.607	0.558	0.545	6	0.560	0.032	5.7
セフ3	0.445	0.494	0.488	0.480	0.497	0.470	6	0.477	0.020	4.2