

(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2010-525326

(P2010-525326A)

(43) 公表日 平成22年7月22日 (2010.7.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A	2 G O 4 5
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536 E	4 C O 8 4
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/536 D	4 C O 8 5
GO 1 N 33/577 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5	4 C O 8 6
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/577 B	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-504181 (P2010-504181)	(71) 出願人	503317500
(86) (22) 出願日	平成20年4月15日 (2008.4.15)		ウェルスタット バイオロジックス コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成21年11月25日 (2009.11.25)		アメリカ合衆国 メリーランド 20878, ガイザーズバーグ, クロッパーロード 930
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/060317	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開番号	W02008/130910		弁理士 山本 秀策
(87) 国際公開日	平成20年10月30日 (2008.10.30)	(74) 代理人	100062409
(31) 優先権主張番号	60/912, 833		弁理士 安村 高明
(32) 優先日	平成19年4月19日 (2007.4.19)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 分離されていない循環癌細胞由来の Her-2/neu タンパク質の上昇したレベルの検出および治療

(57) 【要約】

血液または末梢血単核細胞 (PBMC) サンプル中の循環癌細胞上における Her-2/neu タンパク質の発現を感受性 Her-2/neu 免疫測定により検出する。免疫測定の実施前に癌細胞を分離する必要はない。陽性の結果は、血液サンプル中の癌細胞上における Her-2/neu の発現を示す。この方法を用いて Her-2/neu を標的とするトラスツズマブ (HERCEPTIN)、ラパチニブ、CP-724, 714、NKI-272、および BMS-599626 等の抗癌剤での治療から利益を得る可能性が高い癌患者を同定することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

全血サンプル中の循環癌細胞上における $Her-2/neu$ タンパク質の発現を検出する方法であって、該方法は、癌細胞関連 $Her-2/neu$ の検出が可能な免疫測定を該血液サンプルに対して実施する工程であって、免疫測定の陽性の結果は該癌細胞上の $Her-2/neu$ の存在を示す、工程を包含し、

該免疫測定の実施前に該全血から該循環癌細胞を分離せず、
該免疫測定は、

a) 血液 1 ミリリットルあたり $SK-BR-3$ 細胞 100 個以下の濃度で血液中に加えた場合、 $SK-BR-3$ 乳癌細胞から $Her-2/neu$ を検出することが可能であり

10

b) 少なくとも 100 万個のヒト末梢血単核細胞の存在下でアッセイを行った場合、10 個の $SK-BR-3$ 乳癌細胞から $Her-2/neu$ を検出することが可能である、方法。

【請求項 2】

血液サンプル中の循環癌細胞上における $Her-2/neu$ タンパク質の発現を検出する方法であって、該方法は、癌細胞関連 $Her-2/neu$ の検出が可能な免疫測定を該血液サンプルに対して実施する工程であって、免疫測定の陽性の結果は該癌細胞上の $Her-2/neu$ の存在を示す、工程を包含し、

該免疫測定の実施前に末梢血単核細胞から該循環癌細胞を分離せず、
該免疫測定は、

20

a) 血液 1 ミリリットルあたり $SK-BR-3$ 細胞 100 個以下の濃度で血液中に加えた場合、 $SK-BR-3$ 乳癌細胞から $Her-2/neu$ を検出することが可能であり

、
少なくとも 100 万個のヒト末梢血単核細胞の存在下でアッセイを行った場合、10 個の $SK-BR-3$ 乳癌細胞から $Her-2/neu$ を検出することが可能である、方法。

【請求項 3】

前記免疫測定は溶液に基づく免疫測定である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

30

前記免疫測定は、電気化学発光、化学発光、蛍光発生化学発光、蛍光偏光、および時間分解蛍光からなる群より選択される検出技術を用いる、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記免疫測定はサンドイッチ免疫測定である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 6】

前記免疫測定は、電気化学発光、化学発光、および蛍光発生化学発光からなる群より選択される検出技術を用いる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記免疫測定は前記血液サンプル中の癌細胞関連 $Her-2/neu$ 分子の数に比例したシグナルを生成する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

40

【請求項 8】

前記免疫測定は $Her-2/neu$ の細胞質領域と選択的に結合する 1 つまたは 2 つの抗体を用いる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 9】

前記免疫測定は $Her-2/neu$ の細胞質領域と選択的に結合する 2 つの抗体を用いる、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記免疫測定は $Her-2/neu$ に対するポリクローナル抗体を用いる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 11】

50

前記免疫測定は前記ポリクローナル抗体に対する二次抗体を用いる、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記免疫測定は $Her-2/neu$ に対するモノクローナル抗体を用いる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 13】

前記免疫測定は前記モノクローナル抗体に対する二次抗体を用いる、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記モノクローナル抗体はヒト化マウスモノクローナル抗体である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

前記モノクローナル抗体はトラスツズマブである、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

$Her-2/neu$ を標的とする抗癌剤での治療から利益を得る可能性が高い癌患者を同定する方法であって、請求項 1 に記載の方法を包含し、該癌細胞を含有する血液サンプルを該患者から採取する、方法。

【請求項 17】

前記患者の腫瘍生検組織は、 $Her-2/neu$ の組織アッセイにより $Her-2/neu$ 発現に関して陰性であると予め決定されている、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記組織アッセイは免疫組織化学法および FISH 解析からなるリストから選択される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

$Her-2/neu$ を標的とする抗癌剤での治療から利益を得る可能性が高い癌患者を治療する方法であって、 $Her-2/neu$ 標的抗癌剤を請求項 16～18 のいずれか 1 つに記載の方法により同定される患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 20】

前記抗癌剤はトラスツズマブ；ラパチニブ；CP-724, 714；HKI-272；および BMS-599626 からなるリストから選択される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

$Her-2/neu$ を標的とする抗癌剤での治療から利益を得る可能性が高い癌患者を同定する方法であって、請求項 2 に記載の方法を包含し、該癌細胞を含有する血液サンプルを該患者から採取する、方法。

【請求項 22】

前記患者の腫瘍生検組織は、 $Her-2/neu$ の組織アッセイにより $Her-2/neu$ 発現に関して陰性であると予め決定されている、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記組織アッセイは免疫組織化学法および FISH 解析からなるリストから選択される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

$Her-2/neu$ を標的とする抗癌剤での治療から利益を得る可能性が高い癌患者を治療する方法であって、 $Her-2/neu$ 標的抗癌剤を請求項 21～23 のいずれか 1 つに記載の方法により同定される患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 25】

前記抗癌剤はトラスツズマブ；ラパチニブ；CP-724, 714；HKI-272；および BMS-599626 からなるリストから選択される、請求項 24 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

10

20

30

40

50

Her-2/neu (Her2/neu; HER2; c-erbB-2、およびerbB2とも呼ばれる) タンパク質または関連遺伝子を癌細胞から検出するために現在市販されているテストは煩雑で、多大な時間を要するものである。さらに、乳癌患者の25~30%のみが、自身の原発腫瘍の生検材料中のHer-2/neu (Her2/neu; HER2; c-erbB-2、およびerbB2とも呼ばれる) タンパク質または遺伝子レベルが上昇しているという所見に基づいてHer-2/neuに関する治療を受ける。このデータは文字通り、原発腫瘍の生検においてHer2/neuに関して陰性の結果が出た女性の多く(被検者26人中11人)は、その後、循環癌細胞がHer2/neu陽性となることを示唆している(非特許文献1; 非特許文献2)。また、かなりの数の女性乳癌患者は、Her-2-neuの状態をテストするために容易に利用できる生検材料を有さない。Hayesら、およびMengらによる論文で用いられたアプローチは煩雑で、時間を要するものであり、迅速でより便利なテストが必要とされており、特に、診療所で行うことができるものが必要である。Hayesらの方法はフローサイトメトリー解析を必要とし、Mengらの方法は、蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)を必要としており、これらは、本発明で説明するような直接的な(例えば、ECLによる)Her-2/neuタンパク質の検出よりも複雑で、より多くの時間を要する。さらに、Mengら、およびHayesらの方法は、腫瘍細胞を濃縮するために免疫磁気ビーズを必要とした。対称的に(in constast)、本発明と同様に、そのような分離工程を必要とすることなく行うことができる迅速な方法は、全血または末梢血単核細胞のいずれかから癌細胞を分離するために用いられる工程に見られる損失を回避することで、感度の改善に関するさらなる利点を提供する。

【0002】

Her2/neuおよびHer-2/neuを標的とした治療: 女性乳癌患者の生検サンプルのおよそ25%においてHer2/neu癌遺伝子の過剰発現が観察されており、これは予後不良に関連する。トラスツズマブ(HERCEPTIN)は、Her2/neu受容体の細胞外領域(ECD)に対するヒト化モノクローナル抗体であり、この受容体を過剰に発現するヒト乳癌細胞の増殖を阻害する(最近の総説に関しては、非特許文献3を参照されたい)。乳癌細胞上でのHer-2/neuのタンパク質発現は、SK-BR-3と呼ばれるヒト乳癌細胞株を過剰に発現するHer-2/neuの場合と同様に、1つの細胞あたり分子500,000個以上のレベルに容易に達し得る。Her2/neuに関する現在のテストは、タンパク質過剰発現または遺伝子増幅に関する患者の生検組織切片のテストに依存する。遺伝子増幅、または当該タンパク質に対する少なくとも2つ以上の免疫染色を行った女性においては、トラスツズマブ単剤またはトラスツズマブとパクリタキセル等の化学療法薬との組み合わせで有意な反応が示された。最近では、Her-2/neu陽性の女性乳癌患者の治療に関して、ラパチニブ(GW-572016とも呼ばれる)が米国食品医薬品局(FDA)により承認された。Her-2/neuは、乳癌以外に、卵巣癌を含む他の癌細胞上でも過剰発現する。

【0003】

医療の現場では、血流中乳癌細胞上でHer-2/neuタンパク質が過剰発現したためHer-2/neuを標的とした療法、例えば、トラスツズマブ、ラパチニブ、または他の抗Her-2/neu関連療法が有効である可能性が高い女性乳癌患者を同定するために十分な感度および特異性を有する全血またはPBMCサンプルから迅速かつ直接的に行うことが可能な便利なアッセイに対する要望が大きい。現在トラスツズマブまたはラパチニブ治療の対象外である数千人の女性乳癌患者がHer-2/neuが過剰発現した血流中腫瘍細胞を有し、Her-2/neuに対して陰性に見なされた原発腫瘍を有することを示す証拠が文献として存在するため、これはさらに重要である。そのような女性は、最初に同定された場合には、抗Her-2/neu標的剤が有効であり得る。

【0004】

分離した循環癌細胞上のHer-2/neuタンパク質の発現を検出する方法が特許文献1(Wellstat Biologies Corp.)に記載されている。最初に

循環癌細胞を分離する必要性をなくすことは、テストの簡便さ、アッセイの迅速さ、および、最も重要である、広範囲にわたるサンプル操作の低減による癌細胞の喪失の予防に関して大きな利点となる。しかしながら、当該分野では、全血サンプル中の低レベルの血流中乳癌細胞から、またはヒト末梢血単核細胞のサンプルからHer-2/neuを検出するために十分な感度および特異性を有する免疫測定の実現には大きな障害が存在すると考えられている。

【0005】

非特許文献4および非特許文献2はともに、それらの循環癌細胞のHer-2/neuに関するアッセイにおいて濃縮の使用を必要としていた。フローサイトメトリーを用いて循環癌細胞上のHer-2/neuを検出すること(Hayesら)は、そのような濃縮が必要な感度を得るために「必要」かつ「不可欠」であることを示す(1112ページ、最終行、および1113ページ、1行目参照)。さらに、非特許文献5は、Her-2/neu転写物およびタンパク質がともに正常な末梢血単核細胞(PMBC)中において低レベルで発現することを示す。Leoneらにより示されるそのようなHer-2/neuの発現は、PMBC数が高い場合には、循環癌細胞中におけるHer-2/neuの発現の検査を困難にすることが予期される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】国際公開第2006/041959号パンフレット

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Hayes DFら、Int J Oncol 21:1111-7

【非特許文献2】Meng Sら、Proc Natl Acad Sci USA (2004) 101:9393-98

【非特許文献3】Esteve FJ、The Oncologist (2004) 9 (Suppl 3):4~9ページ

【非特許文献4】Hayesら、Int J Oncol (2002) 21:1111-7

【非特許文献5】Leoneら、J Leukocyte Biol (2003) 74:593-601

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、全血サンプル中の循環癌細胞上におけるHer-2/neuタンパク質の発現を検出する方法であって、該方法は、癌細胞関連Her-2/neuの検出が可能な免疫測定を上記血液サンプルに対して実施する工程であって、免疫測定の陽性の結果は上記癌細胞上のHer-2/neuの存在を示す、工程を包含し、上記免疫測定の実施前に上記全血から上記循環癌細胞を分離せず、上記免疫測定は、a) 血液1ミリリットルあたりSK-BR-3細胞100個以下の濃度で血液中に加えたSK-BR-3乳癌細胞からHer-2/neuを検出することが可能であり、b) 少なくとも100万個のヒト末梢血単核細胞の存在下でアッセイを行った場合、10個のSK-BR-3乳癌細胞からHer-2/neuを検出することが可能である、方法を提供する。

【0009】

本発明は、血液サンプル中の循環癌細胞上におけるHer-2/neuタンパク質の発現を検出する方法であって、該方法は、癌細胞関連Her-2/neuの検出が可能な免疫測定を上記血液サンプルに対して実施する工程であって、免疫測定の陽性の結果は上記癌細胞上のHer-2/neuの存在を示す、工程を包含し、上記免疫測定の実施前に末梢血単核細胞から上記循環癌細胞を分離せず、上記免疫測定は、a) 血液1ミリリットルあたりSK-BR-3細胞100個以下の濃度で血液中に加えたSK-BR-3乳癌細胞

からHer-2/neuを検出することが可能であり、少なくとも100万個のヒト末梢血単核細胞の存在下でアッセイを行った場合、10個のSK-BR-3乳癌細胞からHer-2/neuを検出することが可能である、方法を提供する。

【0010】

本発明は、循環癌細胞上のHer-2/neuタンパク質の発現を検出するためにそのような細胞を分離する必要があるという知見に基づく。最初に循環癌細胞を分離する必要性をなくすことは、テストの簡便さ、アッセイの迅速さ、および、最も重要である、広範囲にわたるサンプル操作の低減による癌細胞の喪失の予防に関して大きな利点である。工程数を少なくすることで本発明の方法をより速く、安価に行うことができる。また、工程数を少なくすることで本発明の方法をより容易に自動化することができる。さらに、本発明の改良されたアッセイは、血液サンプル中の循環癌細胞からのHer-2/neuの検出感度に深刻な悪影響を及ぼし得る分離工程をなくすことにより癌細胞の喪失を防ぐ。

10

【0011】

本発明は、Her-2/neuを標的とする抗癌剤での治療から利益を得る可能性が高い癌患者を同定する方法であって、上記の検出法を包含する、方法を提供する。そのような患者の同定に用いる場合、上記癌細胞を含有する血液サンプルを上記患者から採取する。本発明は、同定した癌患者を治療する方法であって、上記Her-2/neu標的抗癌剤を上記患者に投与する工程を包含する、方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0012】

20

【図1】溶解物中のHer-2/neuの免疫測定検出のためのECLシグナルに関するSK-BR-3乳癌細胞（Her-2/neu過剰発現に関する陽性対照）とMDA-MB-468（Her-2/neu過剰発現に関する陰性対照）の比較。1個のウェルあたり1、2、および10個の細胞の溶解物を用いたデータを示す。

【図2】溶解物中のHer-2/neuの免疫測定検出のためのECLシグナルに関するSK-BR-3乳癌細胞（Her-2/neu過剰発現に関する陽性対照）とMDA-MB-468（Her-2/neu過剰発現に関する陰性対照）のさらなる比較。この図では図1に示すものと同じ実験データを用いているが、X軸の値の増加を示すために、このグラフには1個のウェルあたり50個および250個の細胞の溶解物材料から得たデータも含まれている。

30

【発明を実施するための形態】

【0013】

本明細書で用いる「包含する」という移行句は非制限的用語である。この用語を用いる請求項は、そのような請求項に記載される以外の構成要件を含むようにすることができる。よって、例えば、請求の範囲には、記載する構成要件またはそれらの同等物が存在する限り、特に明記していない他の工程も含む方法が含まれ得る。

【0014】

「非分離癌細胞」または「分離されていない癌細胞」という用語：本明細書で用いる「非分離癌細胞」または「分離されていない癌細胞」という用語は、アッセイによるテストのための抗原を有する癌細胞について言及する場合、サンプル1mlあたり少なくとも100,000個の非癌細胞の存在下で、より好ましくは、サンプル1mlあたり少なくとも500,000個の非癌細胞の存在下で、さらにより好ましくは、サンプル1mlあたり少なくとも100万個の非癌細胞の存在下で、最も好ましくは、サンプル1mlあたり少なくとも200万個の非癌細胞の存在下で抗原に関してテストされる癌細胞を指す。例えば、血流中ヒト癌細胞上に見られる抗原に関してアッセイを行う場合、および1mlあたり500,000個のヒト末梢血単核細胞が存在するアッセイサンプル中に血流中ヒト癌細胞がある場合、サンプル中の血流中ヒト癌細胞は、分離されていない癌細胞であり、非分離癌細胞である。

40

【0015】

本発明の1つの実施形態では、上記免疫測定は溶液に基づく免疫測定である。溶液に基

50

づく免疫測定：本明細書で用いる「溶液に基づく免疫測定」という用語は、抗原に対する少なくとも1つの抗体を用いた抗原溶液の免疫測定を指す。溶液に基づく免疫測定に適した検出技術は、電気化学発光、化学発光、蛍光発生化学発光、蛍光偏光、および時間分解蛍光 (time-resolved fluorescence) を含む。

【0016】

本発明の他の実施形態では、上記免疫測定はサンドイッチ免疫測定である。本明細書で用いる「サンドイッチ免疫測定」という用語は、それぞれ抗原または当該抗原の一部に対する一対の抗体（例えば、抗体“A”および抗体“B”）を用いて抗原を検出するアッセイを指す。一対の抗体については、抗体“A”には、レポーター分子（例えば、電気化学発光を可能にする分子、または蛍光を可能にする分子）との共有結合または非共有結合のいずれかにより標識を付す。抗体“A”の非共有結合標識の例としては、抗体“A”に対する二次標識抗体を抗体“A”に結合させることが挙げられる。抗体“B”は、アッセイプレート、磁石、または電極のような固体支持体相 (solid support phase) に直接付着させる（または間接的に付着させることができる）。サンドイッチ免疫測定に適した検出技術は、電気化学発光、化学発光、および蛍光発生化学発光を含む。

【0017】

本発明は、血液サンプル中の血流中乳癌細胞上のHer-2/neuタンパク質のレベルの定量化に十分な感度を有する方法を提供するとともに、トラスツズマブ、ラパチニブ、またはHer-2/neuを標的とした他の薬剤を用いた療法が有効な女性乳癌患者を同定する方法を提供する。Her-2/neuを標的とすることが可能な他の薬剤が開発中であり、本発明に対してトラスツズマブまたはラパチニブと同様に適用可能である。これらは、Genentechが開発中のOMNITARG（ペルツズマブ）、Pfizerが開発中のCP-724, 714、およびCP-654577（Munsterら、2007, Clin Cancer Res 13: 1238-45; Barbacciら、2003, Cancer Res 63: 4450-4459）、Wyethが開発中のHKI-272（Wongら、2006, J Clin Oncol 24 (June 20 Supplement): 3018; Rabindranら、2004, Cancer Res 2004, 64: 3958-65）、およびBristol-Myers-Squibbが開発中のBMS-599626を含むがそれらに限定されない。それらの特異性にHer-2/neuを含む他の抗癌剤がSpectorら、2007 (Breast Cancer Res 9, 205ページから)、ならびJanmaatおよびGiaccone, 2003 (The Oncologist 8: 576-86)に記載されている。Her-2/neuを標的とするさらなる抗癌剤としては、Her2標的ナノ粒子バイオコンジュゲート (Alexis Fら、2007; Abstract #4181, 2007 American Association for Cancer Research Annual Meeting 参照)、および化学療法薬を含有する抗Her2イムノリポソーム (Noble COら、2004, Expert Opin Ther Targets 8: 335-53 参照) が挙げられる。

【0018】

本発明に従って用いられる免疫測定は、血液1ミリリットルごとに加えた少なくとも100個のSK-BR-3乳癌細胞からHer-2/neuを検出するに十分な感度、好ましくは、血液1ミリリットルごとに加えた少なくとも30個のSK-BR-3乳癌細胞の検出に十分な感度、より好ましくは、血液1ミリリットルごとに加えた少なくとも10個のSK-BR-3乳癌細胞の検出に十分な感度、より好ましくは、血液1ミリリットルごとに加えた少なくとも3個のSK-BR-3乳癌細胞の検出に十分な感度、および最も好ましくは、血液1ミリリットルごとに加えた少なくとも1個のSK-BR-3乳癌細胞の検出に十分な感度を有する。本発明に従って用いられる免疫測定は、少なくとも100万個のヒト末梢血単核細胞の存在下で測定した場合、10個のSK-BR-3乳癌細胞からHer-2/neuを検出できるような耐干渉性を有する。

【0019】

好適な実施形態では、上記免疫測定は上記血液サンプル中の癌細胞関連H e r - 2 / n e u分子の数に比例したシグナルを生成する。

【0020】

癌患者、特に、乳癌患者の血液サンプル（通常、およそ8～20mlの範囲）を採取する。工程の詳細は下記の通りである：

1. 赤血球および好中球の選択的減少。好適な実施形態にはこの工程が含まれる。

【0021】

2. 血流中カルシノーマ細胞中のH e r - 2 / n e uタンパク質の検出および定量化

1. 赤血球および好中球の選択的減少。好適な方法では、抗凝血剤（EDTAまたはクエン酸塩）を入れたBD Vacutainer CPTチューブを用いる。これらのチューブには、正確な遠心分離（1, 100xg、10分間、スイング型ローター）時に、赤色血液細胞および好中球の除去を可能にする材料が入っている。遠心分離の後、チューブの底には赤血球（赤色血液細胞）および好中球の細胞ペレットが含まれる。細胞ペレットの上にはゲルバリアがあり、ゲルバリアの上には単核細胞（腫瘍細胞、リンパ球、および単球）が血漿の下バンドとして存在する。そして、腫瘍細胞、リンパ球、および単球は、ゲルバリアより上の上部から容易に回収することができる。この方法は、赤色血液細胞だけでなく好中球も取り除くため好ましい。

【0022】

2. 血流中カルシノーマ細胞のH e r - 2 / n e uタンパク質の検出および定量化

次いで、検出分子と直接または間接的に結合したHERCEPTIN等のモノクローナル抗体（mAb）またはH e r - 2 / n e uに対するポリクローナル抗体（例えば、R & D systemsのヤギポリクローナル抗体商品番号AF1129）の使用によりH e r - 2 / n e uの検出を行うことができる。電気化学発光（ECL）の場合、上記検出分子はルテニウムである。トリプロピルアミンを含有する溶液中の電磁ビーズ上における抗原のECL検出の後にルテニウムと抗体を結合するために十分に有用な方法を提供する公知文献が多く存在する（例えば、Leeら、Am J Trop Med Hyg 2001, 65: 1-9）。電位差を与えることにより、ルテニウム標識を励起し、発光させ、その光をECL検出器（ORIGEN分析器、またはBIOVERIS Corporation, Gaithersburg, MDのM-Series（登録商標）384等の市販器具）を用いて検出する。

【0023】

本発明に従って用いる免疫測定は、少なくとも1つの抗体、好ましくは、2セットの抗体からなる。これらの抗体は、H e r - 2 / n e uに対するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれかとすることができる。好ましくは、上記モノクローナル抗体は、ヒト化マウスモノクローナル抗体、例えば、トラスツズマブである。トラスツズマブは、本発明による免疫測定および治療法の好適な実施形態である。

【0024】

本発明のさらなる実施形態では、H e r - 2 / n e uを標的とする上記抗体の1つに対する二次抗体を用いる。本発明の好適な実施形態では、上記二次抗体には、レポーター分子（例えば、電気化学発光を可能にする分子、または蛍光を可能にする分子）との共有結合または非共有結合のいずれかにより標識を付す。本発明の他の好適な実施形態では、ECLを用いるとともに、上記二次抗体をビオチン化し、ストレプトアビジン被覆電磁ビーズに対する二次抗体の付着を可能にする。

【0025】

H e r - 2 / n e uの検出のために、細胞外領域および細胞質領域に対する抗体を含むH e r - 2 / n e uに対する各種のモノクローナルおよびポリクローナル抗体がR & D Systems (Minneapolis, MN Biosource (Camarillo, CA)、およびBD Biosciences, San Diego, CA)等の供給業者より市販されている。ウサギポリクローナル抗体もLABVISION Corp, Fremont, CA; neu Ab-21等)、およびUPSTATE CELL

SIGNALING SOLUTIONS (Lake Placid, NY; 商品番号 06-562 等) から入手可能である。Her-2/neu の細胞外領域に対するヤギポリクローナル抗体は、R&D systems (商品番号 AF1129) から入手可能である。完全長組み換え体 Her-2/neu に対するヤギポリクローナル抗体は、EXALPHA BIOLOGICS (Rosedale, MA; 商品番号 M100P) から入手可能である。そのような完全長 Her-2/neu に対するポリクローナル抗体は、Her-2/neu の細胞外および細胞質領域に結合可能であり、細胞外領域に対して特異的ではないと予想される; そのような抗体はなおも有用であるが、Her-2/neu に対してより特異的な抗体と組み合わせることが好ましい。モノクローナル抗体は、細胞外領域 (例えば、R&D Systems 商品番号 MAB1129)、および C 末端ペプチド (例えば、LABVISION neuAB-15) を含む細胞質領域 (例えば、LABVISION neuAB-8) の両方に対して利用可能である。Her-2/neu に対するモノクローナル抗体はまた、Hudziak ら (1997、米国特許第 5,677,171 号) に開示されている。1 つの改良された実施形態では HERCEPTIN を用いるが、これは、この抗体との結合により、患者の治療のための HERCEPTIN の結合を最もよく予測できるためである。他の有利な実施形態では、ポリクローナル抗体、または Her-2/neu タンパク質上の多数のエピトープと結合する抗体の混合物を用いることでより高い感度を可能にする。

【0026】

本発明の 1 つの実施形態では、上記サンプルが細胞溶解する前に上記 Her-2/neu に対する抗体の 1 つを癌細胞と結合させることにより上記免疫測定の一工程を無傷の癌細胞に対して行う。無傷の癌細胞との結合に用いられるそのような抗体は、Her-2/neu の細胞外領域に対するものでなければならない。代替的には、上記癌細胞を溶液に基づく免疫測定の全工程の前に溶解させることができ、当該免疫測定を細胞溶解物に対して行う。この場合、上記免疫測定は、Her-2/neu の細胞外または細胞質領域のいずれかに選択的に結合する抗体を利用することができる。本発明のより具体的な実施形態では、上記免疫測定は Her-2/neu の細胞質領域と選択的に結合する 1 つまたは 2 つの抗体を用いる。

【0027】

本発明の溶液に基づく免疫測定の好適な実施形態では、上記抗原に対する抗体を用いて上記溶液中の抗原を磁石、電極、またはアッセイプレート等の固体支持体に間接的に付着させる。溶液に基づく免疫測定の一例としては、電気化学発光 (ECL) により抗原に対する 2 つの抗体を用いて当該抗原を検出する例があり、上記抗体の一方にルテニウムで標識を付し、他方を電極と付着可能な電磁ビーズに付着させる。本用途に必要な感受性を得ることが可能な他の溶液に基づく免疫測定は、電気化学発光以外に、

- a) Liu Y ら、2003 (J Food Protection 66:512-7) に記載されるような化学発光、
- b) Yu H ら、2000 (Biosens Bioelectron 14:829-40) に記載されるような蛍光発生化学発光 (FCL)、
- c) 蛍光偏光免疫測定 (Howanitz JH, 1988 Arch Pathol Lab Med 112:775-9 参照)、
- d) 時間分解蛍光免疫測定 (Butcher H ら、2003、J Immunol Methods 272:247-56; Soukka ら、2001, Clin Chem 47:1269-78; Howanitz JH, 1988 Arch Pathol Lab Med 112:775-9) を含むがこれらに限定されない。

【0028】

本発明のサンドイッチ免疫測定の好適な実施形態では、上記抗体の一方にルテニウムで標識を付し、他方の抗体を電極に付着可能な電磁ビーズに付着させる電気化学発光 (ECL) を用いる。

【0029】

10

20

30

40

50

本発明によるHer-2/neuを標的とする抗癌剤での治療から利益を得る可能性が高い患者を同定する方法は、その感度のために、腫瘍生検組織がHer-2/neuの組織アッセイによりHer-2/neu発現に関して陰性であると（例えば、免疫組織化学法またはFISH解析により）予め判定された患者に効果的に適用することができる。

【0030】

本発明は以下の実施例を参照することにより容易に理解できるが、それらの実施例は本明細書に記載の発明を例示するものであり、なんら限定するものではない。

【実施例】

【0031】

（実施例1）

転移性乳癌患者は診察室に入り、血液サンプル（8～40mL）をクエン酸塩等の抗凝血剤を入れたBD Vacutainer CPTチューブ内に直接採血される。この材料を20分間、1500～1800RCF（相対遠心力）で遠心分離機にかける。ゲルバリアの上の細胞層を取り除き、すでにHer-2/neuに対する抗体（例えば、ポリクローナル抗体またはHERCEPTIN（トラスツズマブ））を入れた異なる容器（例えば、チューブ）内に入れる。そのような抗体には予めルテニウム標識を付している。抗体にルテニウム標識する常法は当該分野ではLeeら、Am J Trop Med Hyg 2001, 65:1-9に記載されている。次いで、サンプル中の細胞を溶解させる。溶解は当該分野で記載される任意の数の細胞溶解試薬（例えば、溶解緩衝液A [1%NP-40、20mMトリス（pH8.0）、137mMのNaCl、10%グリセロール、2mMのEDTA、1mMオルトバナジウム酸ナトリウム、10ug/mLアプロチニン、10Ug/mLロイペプチン] が挙げられるがこれら限定されない）を用いて行うことができる。この溶解物に、ビオチン化したHer-2/neuに対する第2の抗体を加える。例えば、この第2の抗体は、例えば、R&D systems製のHer-2/neuに対するビオチン化ポリクローナル抗体（商品番号BAF1129）である。次に、上記2つの抗体の各々と結合抗原を電極に近づけるストレプトアビジン被覆電磁ビーズとともに、トリプロピルアミン溶液をその細胞溶解物に加える。電流を印加し、市販されるようなECL検出装置（BIOVERIS Corporation）を用いて電気化学発光（ECL）を検出する。これらの器具内では、効率的な光捕捉のために光電子増倍管（PMT）が作用電極のすぐ上に配置される。作用電極の下には、標的抗原で覆われたビーズを回収する磁石が配置される。シグナルは、血流中腫瘍細胞の表面に結合するHer-2/neuの量に比例する。

【0032】

（実施例2）

Her-2/neuに対する2つのポリクローナル抗体を検出に用いる以外は実施例1で用いたものと同じ方法を提供する。

【0033】

（実施例3）

上記一対の抗体の各々を加える前にPBMCサンプルを溶解させる以外は実施例1および2で用いた方法と同じである。

【0034】

（実施例4）

PBMCサンプルの代わりに全血サンプルを直接用いる以外は実施例1および3と同じ方法である。

【0035】

（実施例5）

患者の原発腫瘍の分析に基づいて当該患者に対して事前にHer-2/neuに関する陰性の結果が出ているか、または患者が分析に容易に利用できる腫瘍組織を有さないこと以外は実施例1～4で用いたものと同じ方法を提供する。

【0036】

(実施例 6)

実施例 1～5 に示すような対照サンプルよりも Her-2/neu のレベルが高い患者は、Her-2/neu 陽性の腫瘍細胞を有するものとみなし、トラスツズマブ等の Her-2/neu に対するモノクローナル抗体を含むレジメンを用いて治療する。好適な治療では、初期負荷用量 4 mg/kg、90 分間注入、および週間維持用量 2 mg/kg、30 分間注入でトラスツズマブを投与する。

【0037】

(実施例 7)

実施例 1～5 に示すような対照サンプルよりも Her-2/neu のレベルが高い患者は、Her-2/neu 陽性の腫瘍細胞を有するものとみなし、ラパチニブを含むレジメンを用いて治療する。ラパチニブを用いた投与レジメンの一例では、この薬剤を 1～21 日目には 1 日に 1 回、1,2500 mg (各々 250 mg を 5 錠) 経口投与するとともに、1 日あたりカペシタビン 2000 mg/m² を投与する (21 日周期における 1～14 日目におよそ 12 時間間隔で 2 回経口投与)。

【0038】

(実施例 8)

実施例 1～5 に示すような対照サンプルよりも Her-2/neu のレベルが高い患者は、Her-2/neu 陽性の腫瘍細胞を有するものとみなし、CP-724,714 を含むレジメンを用いて治療する。CP-724,714 を用いた投与レジメンの一例では、この薬剤を 1 日に 2 回、250 mg で経口投与する。

【0039】

(実施例 9)

実施例 1～5 に示すような対照サンプルよりも Her-2/neu のレベルが高い患者は、Her-2/neu 陽性の腫瘍細胞を有するものとみなし、HKI-272 を含むレジメンを用いて治療する。HKI-272 を用いた投与レジメンの一例では、この薬剤 240～320 mg を 1 日目に 1 回経口投与するとともに、8 日目から 1 日 1 回経口投与する。

【0040】

(実施例 10)

本実施例では、精製組み換え体 Her-2/neu (細胞外領域) を標準として用いて電気化学発光を用いる溶液に基づく免疫測定 of 感度を調べた。この標準を 1% ウシ血清アルブミン (BSA) を用いて PBS (リン酸緩衝食塩水; pH=7.2) に希釈した。

【0041】

1 つのアッセイ緩衝液を調製した:

●アッセイ緩衝液 1: 0.5% Tween-20 および 0.5% ウシ血清アルブミン (BSA) の PBS (リン酸緩衝食塩水) 溶液

Her-2/neu 標準 (組み換え Her-2/neu 細胞外領域) を Oncogene Science; 製品番号 EL541) から入手した。ヤギ抗ヒト Her-2/neu ポリクローナル抗体を R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN 55413 USA) からビオチン化および非ビオチン化形態 (それぞれ、商品番号 BAF1129 および AF1129) の両方で入手した。ポリクローナル抗体 AF1129 に、Lorence & Lu (PCT 国際公開第 WO2006/041959A2 号) に示される手順を用いてルテニウム標識 (「TAG 標識」) を付した。

【0042】

これ以降、本実施例および以下の実施例では、ルテニウム標識ポリクローナル抗体 AF1129 およびビオチン化ポリクローナル抗体 BAF1129 を「TAG-pAb」および「ビオチン-pAb」と呼ぶ。

【0043】

電気化学発光アッセイを以下のように行った:

●Her-2/neu 標準を 25 μl/ウェルで、TAG-Ab とビオチン-Ab の混

10

20

30

40

50

合物〔2セットの濃度の一方：（A）50 μ lにそれぞれ1 μ g/ml（最終濃度0.2 μ g/ml、最終アッセイ容量250 μ l/ウェル）；および（B）50 μ l中、ビオチン-pAb 0.7 μ g/ml（最終濃度0.14 μ g/ml、最終アッセイ容量250 μ l/ウェル）；および50 μ l中、TAG-pAb 1.2 μ g/ml（最終濃度0.24 μ g/ml、最終アッセイ容量250 μ l/ウェル）〕を50 μ l/ウェルで順に4つのPBSアッセイ緩衝液に希釈し、96ウェルU底ポリプロピレンプレートのウェルに加え、常時振盪しながら室温で培養した（例えば、2時間）。

【0044】

●10 μ gの電磁ストレプトアビジンビーズ（例えば、Dynabeads M-280ストレプトアビジン、BioVeris, Corporation, Gaithersburg, MD）を含む25 μ l溶液を各ウェルに加え、常時振盪しながら培養した（例えば、30分間）。

【0045】

●アッセイ緩衝液1を各ウェルに加えて、最終容量250 μ l/ウェルにした。このアッセイにおける検体（組み換えHer-2/neu細胞外領域）の量は、16～160、～1600 pg/ウェルの範囲とした。検体を含まない対照ウェルも含めた。全ての条件について少なくとも二重に重複させたウェルにおいてテストを行った。次いで、M-Series（登録商標）384分析器（BioVeris, Corporation, Gaithersburg, MD）を用いて96ウェルプレートの電気化学発光について分析した。

【0046】

その結果、溶液に基づく免疫測定とTAG-pAbおよびビオチン-pAbとを両方の使用条件で用いてテストを行った全てのレベルの組み換えHer-2/neu細胞外領域（16、160、および1600 pg/ウェル）が検出可能であるとともに、ベースラインよりも上であることが示された（表1）。

【0047】

【表1】

表1. ルテニウム標識ポリクローナル(TAG-pAb)およびビオチン化ポリクローナル抗体(ビオチン-pAb)を用いた免疫測定法による組み換えHer-2/neuの電気化学発光(ECL)検出

	平均ECLシグナル(バックグラウンドより上)*	
Her-2/neu (pg/ウェル)	最終濃度0.2 μ g/ml のTAG-pAbおよび 0.2 μ g/mlのビオチン- pAbを使用した場合	最終濃度0.24 μ g/mlの TAG-pAbおよび0.14 μ g /mlのビオチン-pAbを使用 した場合
16	85	54
160	473	510
1600	4404	6041

* 抗原を含まない対照ウェルからの平均シグナルを越える平均ECLシグナル

（実施例11）

●SK-BR-3乳癌細胞（Her-2/neu過剰発現に関して陽性の対照細胞）およびMDA-MB-468乳癌細胞（Her-2/neu過剰発現に関して陰性）からの細胞抽出物を分析したこと以外は、実施例10で用いたものと同じ方法を用いた。

【0048】

SK-BR-3およびMDA-MB-468細胞(ATCC製、Manassas, VA)を6ウェル組織培養プレートでATCCが推奨する条件どおりに増殖させ、PBSで2回洗浄し、血球計を用いてアリコートを計数した。(Lorence & Lu [PCT国際公開第WO2006/041959A2号]に記載されるようなPierce Lysis Bufferを用いてSK-BR-3細胞を溶解し、上清を得た。ウェルごとの溶解上清量は抽出物と異なりSK-BR-3またはMDA-MB-468細胞1~250個の範囲であり、最終アッセイ濃度0.2 μg/mlのTAG-pAbおよび0.2 μg/mlのビオチン-pAbを用いて実験10に記載の免疫測定によりHer-2/neuの分析を行った。

【0049】

この実験の結果を図1および図2に示す。図1は、このアッセイの低細胞数におけるHer-2/neu検出能力が最も分かりやすくなるようにデータセットの低い側をグラフに示す。図1は、1つのウェルにつき細胞数が最大で10個までの細胞範囲のデータのみを含んでいる。図2は、データセット全体(1つのウェルにつき細胞数が最大で250個)をグラフで示す。

【0050】

本実験において最低量のSK-BR-3溶解物を用いるウェルを含む本実験のSK-BR-3細胞の溶解物(ウェルごとに細胞1個ずつ増やした場合の溶解物;図1)では、Her-2/neuを検出可能であり、ベースラインの上にあった。さらに、1つのウェルにつき細胞数が1~250個のテスト範囲全体において、このSK-BR-3細胞(Her-2/neu過剰発現に関して陽性の対照)の溶解物は、Her-2/neuに関する免疫測定において、MDA-MB-468細胞(Her-2/neu過剰発現に関して陰性)の溶解物よりも著しく高いシグナルを発生しており、Her-2/neuの検出結果(図1および図2)の特異性が高いことを示している。

【0051】

(実施例12)

本実験では、ヒト末梢血単核細胞(PBMC)を商業製品供給業者(Cellular Technology Ltd.; Cleveland, Ohio; 製品番号CTL-UP1)から入手し、実施例11の乳癌細胞と同じ方法で溶解物を調製したこと以外は実施例10と同じ免疫測定法を用いた。

【0052】

各ウェルに下記を加えてテストサンプルを調製した:

●10 SK-BR-3細胞または対照PBSアッセイ緩衝液(PBS、pH=7.2、0.5%BSA、および0.5%Tween 20)の細胞溶解物

●625, 000個のヒトPBMCまたは対照PBSアッセイ緩衝液(PBS、pH=7.2、0.5%BSA、および0.5%Tween 20)の細胞溶解物

これらの複合溶解物に下記を加えた:

●各ウェルにTAG-pAbおよびビオチン-pAb(各抗体の最終アッセイ濃度0.2 μg/ml)を加え、96ウェルプレートを常時振盪しながら2時間室温で培養した。

【0053】

●10 μgの電磁ストレプトアビジンビーズ(例えば、Dynabeads M-280ストレプトアビジン、商品番号110028、BioVeris, Corporation, Gaithersburg, MD)の25 μl溶液を各ウェルに加え、常時振盪しながら30分間培養した。

【0054】

●PBSアッセイ緩衝液(PBS、pH=7.2、0.5%BSA、および0.5%Tween 20)を各ウェルに加え、各ウェルの最終容量を250 μlにした。次いで、96ウェルプレートを実施例10に示すように電気化学発光に関して分析した。

【0055】

10

20

30

40

50

この実験結果を表2に示す。625,000個のヒトPBMCからはHer-2/neuは検出できなかった(表2)。対照的に、SK-BR-3乳癌細胞溶解物に関しては、使用量が最小(1つのウェルにつきSK-BR-3細胞数が10個の場合の溶解物;表6参照)の場合でもHer-2/neuを検出することができた。さらに、625,000個のヒトPBMCの細胞溶解物を加えても乳癌細胞中のHer-2/neuの検出に影響はなかった(表2)。

【0056】

【表2】

表2. ECL免疫測定によるヒトPBMCの溶解物が存在する/しない場合のSK-BR-3乳癌細胞溶解物中のHer-2/neuの検出

SK-BR-3細胞溶解物 (SK-BR-3細胞数/ウェル)	平均ECLシグナル(バックグラウンドより上)*	
	PBMCの溶解物が存在しない場合	PBMC数/ウェルが625,000個の溶解物の場合
0	0	陰性**
10	608	388

*これらの値のバックグラウンドはアッセイ緩衝液からのシグナルのみである

**陰性:バックグラウンドレベル未満のECLシグナル

(実施例13)

これら2つの実験では、実施例10と同様のHer-2/neuタンパク質標準、および実施例11と同様のSK-BR-3溶解物を用いて免疫測定を行ったが、ビオチン-pAbの代わりにヒト化モノクローナル抗体トラスツズマブ(Herceptin)を用いたこと、および下記の4つのECL免疫測定条件についてテストを行ったことが異なる:

●条件#1:トラスツズマブにルテニウムを用いて直接標識を付した。実施例10に示すような最終アッセイ濃度が0.2μg/mlのビオチン化ポリクローナル抗体を用いた。

【0057】

●条件#2:トラスツズマブにビオチンを用いて直接標識を付した。実施例10に示すような最終アッセイ濃度が0.2μg/mlのルテニウム標識ポリクローナル抗体を用いた。

【0058】

●条件#3および#4:これらの2つの条件に関しては、トラスツズマブに直接標識を付さない代わりに、二次抗体(ビオチン標識抗ヒトIgG)を代用した。

【0059】

○条件#3:まず、トラスツズマブ(250μl/ウェルでECLを行う場合の最終濃度0.2μg/ml)を細胞溶解物を直接用いて50分間培養した。次いで、この工程の後に、ビオチン標識抗ヒトIgG(最終濃度0.2μg/ml;eBioscience, San Diego, CA;商品番号13-4998、ヒトIgGに対するビオチン標識ヤギ抗体)およびTAG-pAb(最終濃度0.2μg/ml)を加え、これらのアッセイ構成成分を1時間室温で培養した後、(前述の実施例10で使用したような)ストレプトアビジンビーズを加えた。

【0060】

○条件#4:濃度は条件#3と同様であるが、試薬の添加順序を変更した。条件#4では、まず、トラスツズマブおよびルテニウム標識pAb(TAG-pAb)を細胞溶解物を用いて50分間培養した。次いで、この工程の後に、ビオチン標識抗ヒトIgGを

10

20

30

40

50

加え、これらのアッセイ構成成分を1時間室温で培養した後、（前述の実施例10で使用したような）ストレプトアビジンビーズを加えた。

【0061】

トラスツズマブを用いた最初の実験では、Her-2/neu陽性対照サンプルのアッセイにおいて条件#1および#2に関してテストを行った。この実験では、条件#1に関して、1600 pg/ウェルのHer-2/neuを用いてバックグラウンドを越えるシグナルウェルが得られ、条件#2よりも感度が高かった。

【0062】

【表3-1】

10

表3A. 条件#1および#2による標識トラスツズマブを用いたECL免疫測定法によるSK-BR-3乳癌細胞溶解物中のHer-2/neu標準の検出(上記2つの条件の詳細については本実施例13の本文を参照されたい)

	平均ECLシグナル(バックグラウンドより上)	
Her-2/neu (pg/ウェル)	条件1	条件2
1	陰性*	陰性*
4	14	2
16	11	1
160	21	陰性*
1600	81	14

20

*陰性: バックグラウンドレベル未満のECLシグナル

トラスツズマブを用いた次の実験では、条件#1および#2に対して感度を向上させるために条件#3および#4を考案し、SK-BR-3細胞溶解物のHer-2/neuのアッセイに用いた。その結果、条件#3および#4では、溶液に基づくアッセイにおいてトラスツズマブをポリクローナル抗体とともに用いて、1つのウェルにつき少なくとも1個のSK-BR-3細胞溶解物のHer-2/neuを検出できることが分かった（表3B）。条件#4は、小数のSK-BR-3細胞の検出感度が条件#3Aよりも高かった。

30

【0063】

【表 3 - 2】

表3B. 非標識トラスツズマブ、ビオチン標識抗ヒトIgG、およびTAG-pAbを用いたECL免疫測定法によるSK-BR-3乳癌細胞溶解物中のHer-2/neu標準の検出。2つの異なる免疫測定条件(条件#3および#4)に関して、本実施例13の本文中に定義するとおりにテストを行った

	平均ECLシグナル(バックグラウンドより上)	
SK-BR-3 細胞溶解物 (SK-BR-3 細胞数 / ウェル)	条件3	条件4
0	0	0
1	156	290
2	213	311
10	841	758
50	3455	3481
250	15065	15147

10

20

本例の結果では、トラスツズマブを用いてテストを行った4つの条件のうち、トラスツズマブに対する二次抗体を用いた条件#3および#4については、トラスツズマブを直接標識するとともに、二次抗体を用いなかった条件#1および#2に対して有利な結果が得られた。

【0064】

(実施例14)

本実験では、TAG-pAbおよびビオチン-pAbを用いる免疫測定法は実施例12で用いたものと同じであり、トラスツズマブを用いる免疫測定法は実施例13の条件#4のものと同様である。さらに6人のドナーのヒト末梢血単核細胞(PBMC)をCellular Technology Ltd.; Cleveland, Ohio; 製品番号CTL-UP1)から入手し、実施例12と同様にして溶解物を調製した。本例では、PBMCの溶解物について、1つのウェルにつき500,000~1,000,000個の細胞に対するテストを、SK-BR-3細胞溶解物(1つのウェルにつき10個の細胞をテスト)をそれらのPBMC溶解物中に加えた場合と、加えない場合に関して行った。

30

【0065】

TAG-pAbおよびビオチン-pAbを用いた場合の結果を個々のPBMCドナーについては表4~表9に示し、全てのドナーの平均については表10に示す。表4~表9に示すとともに、表10に要約するように、全てのドナーPBMCに関して非常に一貫した結果が得られた。1,000,000個という多量のPBMCの場合でも、溶解物は全て、Her-2/neuについて、わずか10個のSK-BR-3細胞の場合の溶解物よりも著しく低いシグナルを発した。10個のSK-BR-3細胞溶解物では、1,000,000個という多量のPBMC溶解物が存在する場合でも高いシグナルが得られた。これらの結果は、ヒトPBMCがこの免疫測定のHer-2/neuを過剰に発現する小数の乳癌細胞からHer-2/neuを検出する能力に影響しなかったことを示す。

40

【0066】

トラスツズマブ、ビオチン標識抗ヒトIgG、およびTAG-pAbを用いた場合の結果を個々のPBMCドナーについては表11~表16に示し、全てのドナーの平均については表17に示す。これらの抗体を用いた溶液に基づく免疫測定を用いた場合、ポリクロ

50

ーナル抗体をT A G 標識およびビオチン標識の両方に用いた場合に得られる結果と非常に類似した結果が得られた。同様に、これらの結果は、全てのドナーP B M C に関して非常に一貫していた。全てのドナーについて、P M B C が 1 , 0 0 0 , 0 0 0 個の場合の溶解物は、H e r - 2 / n e u についてベースラインを越えるシグナルを発しなかったが、対照的に、S K - B R - 3 細胞がわずかに 1 0 個の場合の溶解物からは高いシグナルが得られた。これらの結果は、同様に、ヒトP B M C が本アプローチのH e r - 2 / n e u を過剰に発現する小数の乳癌細胞からH e r - 2 / n e u を検出する能力に影響しなかったことを示す。

【 0 0 6 7 】

【表 4】

10

表4. (ビオチン-pAbおよびTAG-pAbを用いた)ECL免疫測定法によるドナー#0706のヒトPBMCの溶解物が存在する/しない場合のSK-BR-3乳癌細胞溶解物中のHer-2/neuの検出

SK-BR-3 細胞 溶解物 (SK-BR-3 細胞数 /ウェル)	平均ECLシグナル(バックグラウンドより上)*	
	PBMCの溶解物が 存在しない場合	PBMC数/ウェルが1, 000, 000 個の溶解物が存在する場合
0	0	177
10	789	1174

*これらの値のバックグラウンドはアッセイ緩衝液からのシグナルのみである

【 0 0 6 8 】

【表 5】

20

表5. (ビオチン-pAbおよびTag-pAbを用いた)ECL免疫測定法によるドナー#0920のヒトPBMCの溶解物が存在する/しない場合のSK-BR-3乳癌細胞溶解物中のHer-2/neuの検出

SK-BR-3 細胞 溶解物 (SK-BR-3 細胞数 /ウェル)	平均ECLシグナル(バックグラウンドより上)*		
	PBMCの溶解物が 存在しない場合	PBMC数/ウェルが 500, 000個の溶解 物が存在する場合	PBMC数/ウェルが 1, 000, 000個の溶解 物が存在する場合
0	0	77	87
10	789	1008	800

*これらの値のバックグラウンドはアッセイ緩衝液からのシグナルのみである

【 0 0 6 9 】

30

40

【表 6】

表6. (ビオチン-pAbおよびTag-pAbを用いた)ECL免疫測定法によるドナー
#1026のヒトPBMCの溶解物が存在する/しない場合のSK-BR-3乳癌
細胞溶解物中のHer-2/neuの検出

SK-BR-3 細胞 溶解物 (SK-BR-3 細胞数 /ウェル)	平均ECLシグナル(バックグラウンドより上)*		
	PBMCの溶解物 が存在しない場合	PBMC数/ウェルが 500, 000個の溶解 物が存在する場合	PBMC数/ウェルが 1, 000, 000個の溶解 物が存在する場合
0	0	162	137
10	789	895	865

* これらの値のバックグラウンドはアッセイ緩衝液からのシグナルのみである

【 0 0 7 0 】

【表 7】

表7. (ビオチン-pAbおよびTag-pAbを用いた)ECL免疫測定法によるドナー
#0711のヒトPBMCの溶解物が存在する/しない場合のSK-BR-3乳癌
細胞溶解物中のHer-2/neuの検出

SK-BR-3 細胞 溶解物 (SK-BR-3 細胞数 /ウェル)	平均ECLシグナル(バックグラウンドより上)*		
	PBMCの溶解物 が存在しない場合	PBMC数/ウェルが 500, 000個の溶解 物が存在する場合	PBMC数/ウェルが 1, 000, 000個の溶解 物が存在する場合
0	0	167	75
10	789	805	1052

* これらの値のバックグラウンドはアッセイ緩衝液からのシグナルのみである

【 0 0 7 1 】

10

20

30

【表 8】

表8. (ビオチン-pAbおよびTAG-pAbを用いた)ECL免疫測定法によるドナー
#0524のヒトPBMCの溶解物が存在する/しない場合のSK-BR-3乳癌
細胞溶解物中のHer-2/neuの検出

SK-BR-3 細胞 溶解物 (SK-BR-3 細胞数 /ウェル)	平均ECLシグナル(バックグラウンドより上)*		
	PBMCの溶解物 が存在しない場合	PBMC数/ウェルが 500, 000個の溶解 物が存在する場合	PBMC数/ウェルが 1, 000, 000個の溶解 物が存在する場合
0	0	210	340
10	789	683	1180

*これらの値のバックグラウンドはアッセイ緩衝液からのシグナルのみである

【 0 0 7 2 】

【表 9】

表9. (ビオチン-pAbおよびTag-pAbを用いた)ECL免疫測定法によるドナー
#0116GのヒトPBMCの溶解物が存在する/しない場合のSK-BR-3乳癌
細胞溶解物中のHer-2/neuの検出

SK-BR-3 細胞 溶解物 (SK-BR-3 細胞数 /ウェル)	平均ECLシグナル(バックグラウンドより上)*		
	PBMCの溶解物 が存在しない場合	PBMC数/ウェルが 500, 000個の溶解 物が存在する場合	PBMC数/ウェルが 1, 000, 000個の溶解 物が存在する場合
0	0	121	86
10	789	618	1137

*これらの値のバックグラウンドはアッセイ緩衝液からのシグナルのみである

【 0 0 7 3 】

10

20

30

【表 1 0】

表10. 表4～表9のデータ平均:(ビオチン-pAbおよびTAG-pAbを用いた)ECL免疫測定法によるヒトPBMCの溶解物が存在する/しない場合のSK-BR-3乳癌細胞溶解物中のHer-2/neuの検出。全てのドナーPBMCのデータを用いた平均値を示す

SK-BR-3 細胞 溶解物 (SK-BR-3 細胞数 /ウェル)	平均ECLシグナル(バックグラウンドより上)*		
	PBMCの溶解物が存在しない場合	PBMC数/ウェルが500, 000個の溶解物が存在する場合	PBMC数/ウェルが1, 000, 000個の溶解物が存在する場合
0	0	147	150
10	789	678	1035

* これらの値のバックグラウンドはアッセイ緩衝液からのシグナルのみである

【 0 0 7 4】

【表 1 1】

表11. (トラスツズマブ、ビオチン標識抗ヒトIgG、およびTAG-pAbを用いた)ECL免疫測定法によるドナー#0706のヒトPBMCの溶解物が存在する/しない場合のSK-BR-3乳癌細胞溶解物中のHer-2/neuの検出

SK-BR-3 細胞 溶解物 (SK-BR-3 細胞数 /ウェル)	平均ECLシグナル(バックグラウンドより上)*	
	PBMCの溶解物が存在しない場合	PBMC数/ウェルが1, 000, 000個の溶解物が存在する場合
0	0	陰性**
10	428	314

* これらの値のバックグラウンドはアッセイ緩衝液からのシグナルのみである

** 陰性: わずかにバックグラウンドレベル未満のECLシグナル

【 0 0 7 5】

10

20

30

【表 1 2】

表12. (トラスツズマブ、ビオチン標識抗ヒトIgG、およびTAG-pAbを用いた)ECL
免疫測定法によるドナー#0920のヒトPBMCの溶解物が存在する/しない
場合のSK-BR-3乳癌細胞溶解物中のHer-2/neuの検出

SK-BR-3 細胞 溶解物 (SK-BR-3 細胞数 /ウェル)	平均ECLシグナル(バックグラウンドより上)*		
	PBMCの溶解物 が存在しない場合	PBMC数/ウェルが 500, 000個の溶解 物が存在する場合	PBMC数/ウェルが 1, 000, 000個の溶解 物が存在する場合
0	0	陰性**	陰性**
10	428	492	269

* これらの値のバックグラウンドはアッセイ緩衝液からのシグナルのみである

**陰性: わずかにバックグラウンドレベル未満のECLシグナル

【0 0 7 6】

【表 1 3】

表13. (トラスツズマブ、ビオチン標識抗ヒトIgG、およびTag-pAbを用いた)ECL
免疫測定法によるドナー#1026のヒトPBMCの溶解物が存在する/しない
場合のSK-BR-3乳癌細胞溶解物中のHer-2/neuの検出

SK-BR-3 細胞 溶解物 (SK-BR-3 細胞数 /ウェル)	平均ECLシグナル(バックグラウンドより上)*		
	PBMCの溶解物 が存在しない場合	PBMC数/ウェルが 500, 000個の溶解 物が存在する場合	PBMC数/ウェルが 1, 000, 000個の溶解 物が存在する場合
0	0	陰性**	陰性**
10	428	452	311

* これらの値のバックグラウンドはアッセイ緩衝液からのシグナルのみである

**陰性: わずかにバックグラウンドレベル未満のECLシグナル

【0 0 7 7】

10

20

30

40

【表 1 4】

表14. (トラスツズマブ、ビオチン標識抗ヒトIgG、およびTag-pAbを用いた)ECL
免疫測定法によるドナー#0711のヒトPBMCの溶解物が存在する/しない
場合のSK-BR-3乳癌細胞溶解物中のHer-2/neuの検出

SK-BR-3 細胞 溶解物 (SK-BR-3 細胞数 /ウェル)	平均ECLシグナル(バックグラウンドより上)*		
	PBMCの溶解物 が存在しない場合	PBMC数/ウェルが 500, 000個の溶解 物が存在する場合	PBMC数/ウェルが 1, 000, 000個の溶解 物が存在する場合
0	0	陰性**	陰性**
10	428	397	525

*これらの値のバックグラウンドはアッセイ緩衝液からのシグナルのみである

** 陰性: わずかにバックグラウンドレベル未満のECLシグナル

10

【0 0 7 8】

【表 1 5】

表15. (トラスツズマブ、ビオチン標識抗ヒトIgG、およびTag-pAbを用いた)ECL
免疫測定法によるドナー#0524のヒトPBMCの溶解物が存在する/しない
場合のSK-BR-3乳癌細胞溶解物中のHer-2/neuの検出

SK-BR-3 細胞 溶解物 (SK-BR-3 細胞数 /ウェル)	平均ECLシグナル(バックグラウンドより上)*		
	PBMCの溶解物 が存在しない場合	PBMC数/ウェルが 500, 000個の溶解 物が存在する場合	PBMC数/ウェルが 1, 000, 000個の溶解 物が存在する場合
0	0	79	陰性**
10	428	468	496

*これらの値のバックグラウンドはアッセイ緩衝液からのシグナルのみである

** 陰性: わずかにバックグラウンドレベル未満のECLシグナル

30

【0 0 7 9】

40

【表 16】

表16. (トラスツズマブ、ビオチン標識抗ヒトIgG、およびTag-pAbを用いた)ECL免疫測定法によるドナー#0116GのヒトPBMCの溶解物が存在する/しない場合のSK-BR-3乳癌細胞溶解物中のHer-2/neuの検出

SK-BR-3 細胞溶解物 (SK-BR-3 細胞数/ウェル)	平均ECLシグナル(バックグラウンドより上)*		
	PBMCの溶解物が存在しない場合	PBMC数/ウェルが500,000個の溶解物が存在する場合	PBMC数/ウェルが1,000,000個の溶解物が存在する場合
0	0	陰性**	陰性**
10	428	217	545

*これらの値のバックグラウンドはアッセイ緩衝液からのシグナルのみである

**陰性:わずかにバックグラウンドレベル未満のECLシグナル

【0080】

【表 17】

表17. 表11～表16のデータ平均: (トラスツズマブ、ビオチン標識抗ヒトIgG、およびTAG-pAbを用いた)ECL免疫測定法によるヒトPBMCの溶解物が存在する/しない場合のSK-BR-3乳癌細胞溶解物中のHer-2/neuの検出。全てのドナーPBMCのデータを用いた平均値を示す

SK-BR-3 細胞溶解物 (SK-BR-3 細胞数/ウェル)	平均ECLシグナル(バックグラウンドより上)*		
	PBMCの溶解物が存在しない場合	PBMC数/ウェルが500,000個の溶解物が存在する場合	PBMC数/ウェルが1,000,000個の溶解物が存在する場合
0	0	陰性**	陰性**
10	428	362	410

*これらの値のバックグラウンドはアッセイ緩衝液からのシグナルのみである

**陰性:わずかにバックグラウンドレベル未満のECLシグナル

【 図 1 】

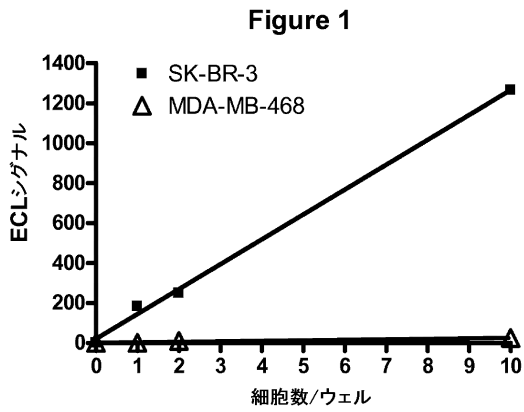


Figure 1

【 図 2 】

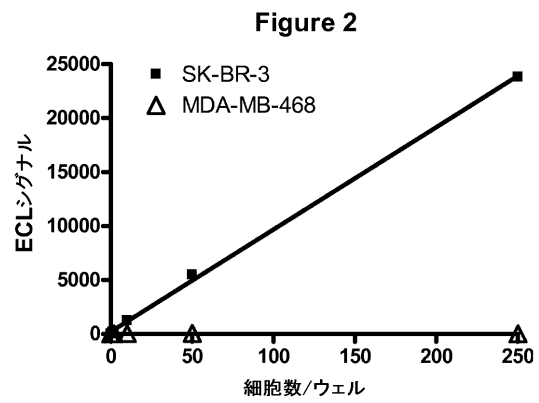


Figure 2

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/60317

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/574 (2008.04) USPC - 435/7.23 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) USPC: 435/7.23 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 435/7.23, 7.21, 7.2, 7.1 (text search) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Electronic Data Bases: USPT,PGPB,EPAB,JPAB; DialogPRO(Engineering/Life Science Research); Google Scholar Search Terms Used: diagnosis, immunoassay, breast cancer, HER-2/Neu, Neu, antibody, herceptin, trastuzumab, lapatinib, CP-724,714, NKI-272, BMS-599626, whole blood, plasma, PBMC		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2006/041959 A2 (LORENCE et al.) 20 April 2006 (20.04.2006). Entire document, especially pg 6 in 26-30, pg 7 in 18-29, pg 8 in 25-27, pg 9 in 15-17, pg 13 in 23-29, pg 16 pg 9-12, fig 2-4, claims 12-17 and 20-24.	1-25
Y	US 5,604,107 A (CARNEY et al.) 18 February 1997 (18.02.1997). Entire document especially col 5 in 52-55	1-25
Y	Oxford Immunotec. Technical Bulletin 001: Blood Sample Collection and Viable PBMC Preparation, 2005. Retrieved from the Internet at <URL: http://www.oxfordimmunotec.com/downloads/bulletin001.pdf > Entire document, especially pg 3 Table 1.	1-25
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* 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 19 June 2008 (19.06.2008)		Date of mailing of the international search report 07 JUL 2008
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

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/48 (2006.01)		G 0 1 N 33/50		Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/48		P
A 6 1 K 45/00 (2006.01)		G 0 1 N 33/53		Y
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		G 0 1 N 33/53		M
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 K 45/00		
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 P 35/00		
A 6 1 K 31/517 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 1 1	
		A 6 1 K 39/395	N	
		A 6 1 K 31/517		

(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,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,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,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,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,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

(72)発明者 ローレンス, ロバート エム.

アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 1 7, ベセスダ, メイデン レーン 6 3 0 8

(72)発明者 ルー, ミン

アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 5 4, ポトマック, ブロードフィールド ドライブ
1 3 5 1 8

F ターム(参考) 2G045 AA26 BA10 BB10 BB24 CA17 CA25 CB01 DA78 FB02 FB03
FB05 FB07 FB12 FB13
4C084 AA17 NA05 ZB262 ZC422
4C085 AA14 BB01 CC23 DD63 EE01
4C086 AA01 AA02 BC46 MA01 MA04 NA05 ZB26 ZC42

专利名称(译)	检测和治疗未分离的循环癌细胞中升高水平的Her-2 / neu蛋白		
公开(公告)号	JP2010525326A	公开(公告)日	2010-07-22
申请号	JP2010504181	申请日	2008-04-15
[标]申请(专利权)人(译)	病毒防御公司		
申请(专利权)人(译)	那么统计生物公司		
[标]发明人	ローレンスロバートエム ルーミン		
发明人	ローレンス, ロバート エム. ルー, ミン		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/536 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/50 G01N33/48 G01N33/53 A61K45/00 A61P35/00 A61P43/00 A61K39/395 A61K31/517		
CPC分类号	G01N33/57415 G01N2333/71 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/536.E G01N33/536.D G01N33/543.575 G01N33/577.B G01N33/50.Z G01N33/ /48.P G01N33/53.Y G01N33/53.M A61K45/00 A61P35/00 A61P43/00.111 A61K39/395.N A61K31/517		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/BA10 2G045/BB10 2G045/BB24 2G045/CA17 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/ /DA78 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/FB13 4C084/AA17 4C084/NA05 4C084/ZB262 4C084/ZC422 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/CC23 4C085/DD63 4C085/ /EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC46 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA05 4C086/ZB26 4C086/ZC42		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/912833 2007-04-19 US		
其他公开文献	JP2010525326A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

通过易感Her-2 / neu免疫测定检测Her-2 / neu蛋白在血液或外周血单核细胞 (PBMC) 样品中的循环癌细胞中的表达。在进行免疫测定之前不需要分离癌细胞。阳性结果表明血样中癌细胞的Her-2 / neu表达。使用这种方法，可能受益于抗癌药物治疗的癌症患者，如Her-2 / neu靶向曲妥珠单抗 (HERCEPTIN) ，拉帕替尼，CP-724,714，NKI-272和BMS-599626可以识别。

表1. ルテニウム標識ポリクローナル(TAG-pAb)およびビオチン化ポリクローナル抗体(ビオチン-pAb)を用いた免疫測定法による組み換えHer-2/neuの電気化学発光(ECL)検出

Her-2/neu (pg/ウェル)	平均ECLシグナル(バックグラウンドより上)*	
	最終濃度0. 2 μ g/ml のTAG-pAbおよび 0. 2 μ g/mlのビオチン -pAbを使用した場合	最終濃度0. 24 μ g/mlの TAG-pAbおよび0. 14 μ g /mlのビオチン-pAbを使用 した場合
16	85	54
160	473	510
1600	4404	6041

* 抗原を含まない対照ウェルからの平均シグナルを越える平均ECLシグナル