

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6648842号
(P6648842)

(45) 発行日 令和2年2月14日(2020.2.14)

(24) 登録日 令和2年1月20日(2020.1.20)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 G
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/48 P
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D
	GO 1 N 33/574 D

請求項の数 19 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-568978 (P2018-568978)	(73) 特許権者 000001270 コニカミノルタ株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号
(86) (22) 出願日 平成30年2月2日(2018.2.2)	(74) 代理人 110001070 特許業務法人 S S I N P A T
(86) 国際出願番号 PCT/JP2018/003599	(72) 発明者 高橋 優 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コ ニカミノルタ株式会社内
(87) 国際公開番号 W02018/159212	(72) 発明者 白石 武嗣 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コ ニカミノルタ株式会社内
(87) 国際公開日 平成30年9月7日(2018.9.7)	(72) 発明者 小山 昇 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コ ニカミノルタ株式会社内
審査請求日 平成30年12月28日(2018.12.28)	
(31) 優先権主張番号 特願2017-36438 (P2017-36438)	
(32) 優先日 平成29年2月28日(2017.2.28)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP)	
早期審査対象出願	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体-薬物複合体の構成成分の検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗体-薬物複合体の構成成分である薬物を可視化する工程(a)と、前記抗体-薬物複合体の構成成分である抗体を可視化する工程(b)とを含む、蛍光体集積粒子を用いた染色法による抗体-薬物複合体の構成成分の検出方法。

【請求項2】

抗体-薬物複合体の標的分子を可視化する工程(c)を更に含む、請求項1に記載の検出方法。

【請求項3】

前記工程(a)においては、前記抗体-薬物複合体の構成成分である抗体を可視化するための蛍光集積粒子とは異なる波長の蛍光を発する蛍光集積粒子を用いて、前記抗体-薬物複合体の構成成分である薬物を可視化する、請求項1または2に記載の検出方法。

【請求項4】

前記工程(c)においては、前記抗体-薬物複合体の構成成分である抗体を可視化するための蛍光集積粒子とは異なる波長の蛍光を発し、且つ前記抗体-薬物複合体の構成成分である薬物を可視化するための蛍光集積粒子とも異なる波長の蛍光を発する蛍光集積粒子を用いて、前記抗体-薬物複合体の標的分子を可視化する、請求項2に記載の検出方法。

【請求項5】

前記標的分子が、細胞に発現するタンパク質である請求項2または4に記載の検出方法。

【請求項 6】

前記標的分子が、細胞表面に発現している、受容体またはリガンドである請求項 2、4、または 5 に記載の検出方法。

【請求項 7】

前記細胞が、がん細胞または免疫細胞である請求項 5 または 6 に記載の検出方法。

【請求項 8】

前記標的分子が、がん細胞における、免疫系タンパク質、がん細胞増殖因子、転移制御因子、血管増殖因子、サイトカイン、がん細胞増殖制御因子受容体、転移制御因子受容体、血管増殖因子受容体、およびサイトカイン受容体からなる群より選ばれる請求項 2、4 ~ 7 のいずれか一項に記載の検出方法。

10

【請求項 9】

前記標的分子が、免疫細胞における、免疫系タンパク質、成長因子、増殖制御因子、増殖刺激因子、免疫細胞移動因子、サイトカイン、免疫制御因子、シグナル伝達関連タンパク質、およびそれらの受容体からなる群より選ばれる請求項 2、4 ~ 7 のいずれか一項に記載の検出方法。

【請求項 10】

前記抗体 - 薬物複合体の構成成分である薬物の可視化、および前記抗体 - 薬物複合体の構成成分である抗体の可視化は、それぞれ前記薬物をあらわす蛍光体集積粒子の発光および前記抗体をあらわす蛍光体集積粒子の発光によるものである、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の検出方法。

20

【請求項 11】

前記蛍光体集積粒子は、有機物又は無機物からなり、複数の蛍光体を有する粒子である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の検出方法。

【請求項 12】

請求項 2 および 4 ~ 9 のいずれか一項に記載の検出方法によって、抗体 - 薬物複合体を投与したヒトまたはヒト以外の動物から採取した検体における、(i) 抗体 - 薬物複合体の局在、(i i) 前記標的分子の全体量に対する、前記抗体 - 薬物複合体と結合している標的分子の比率、(i i i) 前記標的分子、前記抗体 - 薬物複合体の構成成分である抗体、前記抗体 - 薬物複合体の構成成分である薬物間の距離、

に関する情報の少なくとも一つを特定する、疾患の診断または治療のための情報取得方法。

30

【請求項 13】

前記診断または治療のための情報が、がん、神経疾患、感染性疾患、または遺伝性疾患に係るものである、請求項 12 に記載の情報取得方法。

【請求項 14】

前記検体が腫瘍組織由来の検体である請求項 12 または 13 に記載の情報取得方法。

【請求項 15】

抗体 - 薬物複合体の構成成分である抗体と、前記抗体 - 薬物複合体の構成成分である薬物とが可視化された画像を生成する工程を含む、画像生成方法。

【請求項 16】

前記画像は、前記抗体 - 薬物複合体の標的分子も可視化されたものであることを特徴とする、請求項 15 に記載の画像生成方法。

40

【請求項 17】

前記画像において、前記抗体 - 薬物複合体の構成成分である薬物は、前記抗体 - 薬物複合体の構成成分である抗体とは異なる色により可視化されていることを特徴とする、請求項 15 または 16 に記載の画像生成方法。

【請求項 18】

前記画像において、前記抗体 - 薬物複合体の標的分子は、前記抗体 - 薬物複合体の構成成分である抗体とは異なり、且つ前記抗体 - 薬物複合体の構成成分である薬物とも異なる色により可視化されていることを特徴とする、請求項 16 に記載の画像生成方法。

50

【請求項 19】

前記可視化は、前記抗体 - 薬物複合体の構成成分である薬物、前記抗体 - 薬物複合体の構成成分である抗体、または前記抗体 - 薬物複合体の標的分子をあらわす蛍光体集積粒子の発光によるものである、請求項 15 ~ 18 のいずれか一項に記載の画像生成方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、主に抗体 薬物複合体の構成成分である抗体および / または薬物の検出方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

がんは、心筋梗塞や脳梗塞に代表される血管系疾患とともに成人の死亡原因を二分する疾患である。例えば、乳がん罹患率は、日本人では欧米諸国に比べて低い、近年では増加傾向にあり、1998年には胃がんの罹患率を抜いて女性罹患率の第1位となった。最近の報告である2005年の厚生労働省統計によれば、乳がんの年間罹患数は5万人を超えている。世界でも同様にその数は年々増加しており、2008年のWHOの報告によれば、乳がんは男女合わせても第1位の罹患率となっており、その年間罹患数は138万人を超え、女性のがん全体の約23%を占めている。

【0003】

20

がんの治療薬としては従来から低分子医薬品が広く用いられてきたが、近年ではより選択性や治療効果が高く副作用の少ない抗体医薬が数多く開発され、臨床に用いられている。さらに最近では、低分子医薬品と抗体医薬の長所を併せ持つ抗体 - 薬物複合体 (ADC; Antibody - drug - conjugate) 医薬の開発が始まり、がん治療における魅力的な開発領域として認知されている。

【0004】

抗体 - 薬物複合体はモノクローナル抗体と低分子医薬等の薬物が適切なリンカーを介して結合している構造を持つ。標的細胞表面において発現している細胞表面抗原、受容体、又はリガンド等の抗原と特異的に結合し、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれると、細胞内のpH環境や酵素によってリンカーや抗体が分解されて薬物が抗体から解放されることで、目的の細胞を選択的に殺傷することができる。

30

【0005】

抗体 - 薬物複合体を臨床的に用いる際において有効な投薬計画を構築し、また投与対象の拡張を可能にするためには、投与後における種々の時点における抗体 - 薬物複合体の薬物動態を特定することが望まれる。しかし、従来の手法によっては抗体 薬物複合体の検出は感度の点から困難であった。

【0006】

また、抗体 薬物複合体の有効性を判定する方法として、標的細胞に対する相互作用等の情報を特定することが望まれる。例えば、抗体 - 薬物複合体が、腫瘍に対して薬効を示すためには、患者の腫瘍細胞表面において抗体 - 薬物複合体の標的分子が十分に発現しており、さらに抗体 - 薬物複合体が標的分子を適切に認識し相互作用することで細胞内に取り込まれる必要がある。したがって、抗体 - 薬物複合体の標的となる生体物質の発現量を定量的に評価することにより、患者ごとの分子標的薬の適用可否を効率的に行うことができるといえる。

40

【0007】

抗体医薬においても、乳がんの代表的な抗がん剤であるトラスツズマブ (商品名; ハーセプチン (Herceptin) 登録商標) の有効性の判定方法として、標的分子であるHER2タンパク質の発現情報の解析が広く用いられており、その方法としては、例えば、標的生体物質のタンパク質を染色する免疫組織染色 (Immunohistochemistry; IHC) 法および、標的生体物質遺伝子を染色するするFISH (Fluo

50

rescence in situ hybridization)法などが臨床の場で広く用いられている。

【0008】

ここで、IHC法は、検体に含まれるHER2タンパク質をDAB(3,3'-Diaminobenzidine; 3,3'-ジアミノベンジジン)を用いて染色して検出する方法である。しかし、その判定基準は染色レベルをスコア0~3とした4段階のみによる大雑把な判定基準であるため、定量性に欠けており、さらに病理医の熟練度により判定基準が左右されることから、臨床的に問題となっている。

【0009】

他方、FISH法は、17番染色体上のHER2タンパク質をコードする遺伝子を検出するプローブを用いて、当該遺伝子を蛍光染色する方法である。FISH法は定量的検査法ではあるが、HER2タンパク質の量や細胞内局在を直接評価する方法ではない。

【0010】

近年、タンパク質の発現量や細胞内局在をより正確に評価するため、ナノサイズの蛍光粒子、例えば樹脂等を母体として蛍光色素や量子ドットなどの蛍光体を集積させた粒子(蛍光体集積粒子、Phosphor Integrated Dot:PID)を用いて目的タンパク質を標識する染色方法が提案され、実用化が進められている。蛍光体集積粒子(他の文献において「蛍光物質集積ナノ粒子」、「蛍光体内包粒子」等と呼ばれることもある。)を用いて目的とするタンパク質を標識し、粒子内に集積している蛍光物質に適合する励起光を照射することで目的タンパク質を、輝度の高い輝点として観察することが可能であり、また褪色しにくいいため比較的長時間にわたって観察や撮像が可能となる。例えば、特許文献1、特許文献2には、蛍光体集積粒子を用いた免疫染色を行う方法が記載されている。さらに特許文献3には、蛍光体集積粒子により標識化した抗体医薬に用いられている抗体(トラスツズマブ等)を蛍光体集積粒子により標識化して、当該抗体医薬が標的とする抗原(HER2等)に結合させる免疫組織染色法が記載されており、抗体医薬の有効性を判定する方法に応用することができることなども記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】国際公開第2013/035703号

【特許文献2】国際公開第2012/029752号

【特許文献3】国際公開第2012/133047号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明は、上記課題に鑑みてなされたものであり、抗体薬物複合体を検出する手段を提供するとともに、抗体薬物複合体の標的細胞における標的分子の発現やそれらの相互作用を定量的な手段を用いて特定することで、抗体薬物複合体の有効性を高精度に判定する方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明者は、抗体薬物複合体の構成成分である薬物や抗体を特異的に認識する抗体および蛍光体集積粒子などの蛍光ナノ粒子を用いた免疫染色を行うことにより、抗体薬物複合体の体内動態が可視化できることを見出した。

【0014】

さらに、別の様態では、例えば抗体薬物複合体が標的とする細胞に発現している標的分子の細胞あたりの平均発現量や、抗体薬物複合体の局在(標的細胞に内在化しているかどうか)、前記標的分子の全体量に対する、前記抗体薬物複合体と結合している標的分子の比率等に関する情報を特定する、診断または治療のための情報の取得方法を提供する。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 5 】

すなわち、本発明は次のような抗体 薬物複合体の検出方法および情報取得方法を提供する。

[項 1]

下記 (a) および (b) の少なくとも一方を含む、蛍光体集積粒子を用いた免疫染色法による抗体 薬物複合体の構成成分の検出方法： (a) 抗体 薬物複合体の構成成分である薬物を可視化する工程； (b) 抗体 薬物複合体の構成成分である抗体を可視化する工程。

[項 2]

さらに (c) 抗体 薬物複合体の標的分子を可視化する工程を含む、項 1 に記載の検出方法。

10

[項 3]

前記標的分子が、細胞に発現するタンパク質である項 2 に記載の検出方法。

[項 4]

前記標的分子が、細胞表面に発現している、受容体またはリガンドである項 2 または 3 に記載の検出方法。

[項 5]

前記細胞が、がん細胞または免疫細胞である項 3 または 4 に記載の検出方法。

[項 6]

前記標的分子が、がん細胞における、免疫系タンパク質、がん細胞増殖因子、転移制御因子、血管増殖因子、サイトカイン、がん細胞増殖制御因子受容体、転移制御因子受容体、血管増殖因子受容体、およびサイトカイン受容体からなる群より選ばれる項 2 ~ 5 のいずれか一項に記載の検出方法。

20

[項 7]

前記標的分子が、免疫細胞における、免疫系タンパク質、成長因子、増殖制御因子、増殖刺激因子、免疫細胞移動因子、サイトカイン、免疫制御因子、シグナル伝達関連タンパク質、およびそれらの受容体からなる群より選ばれる項 2 ~ 5 のいずれか一項に記載の検出方法。

[項 8]

項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の検出方法によって、抗体 薬物複合体を投与したヒトまたはヒト以外の動物から採取した検体における、 (i) 抗体 薬物複合体の局在、 (i i) 前記標的分子の全体量に対する、前記抗体 薬物複合体と結合している標的分子の比率、 (i i i) 前記標的分子、前記抗体 薬物複合体の構成成分である抗体、前記抗体 薬物複合体の構成成分である薬物間の距離、

30

に関する情報の少なくとも一つを特定する、疾患の診断または治療のための情報取得方法。

[項 9]

前記診断または治療のための情報が、がん、神経疾患、感染性疾患、または遺伝性疾患に係るものである、項 8 に記載の情報取得方法。

[項 1 0]

前記検体が腫瘍組織由来の検体である、項 8 または 9 に記載の情報取得方法。

40

【 発明の効果 】

【 0 0 1 6 】

本発明の 1 つの側面は、抗体 薬物複合体を、好ましくは蛍光体集積粒子等を用いて高い精度で定量的に可視化するため、DAB等を用いた従来の評価手法では分からなかった、抗体 薬物複合体の組織内局在や薬物動態を特定することが可能になり、抗体 薬物複合体が所定の種類の細胞と相互作用し、内在化することを確認することができる。

【 0 0 1 7 】

また、本発明のもう 1 つの側面においては、抗体 薬物複合体の組織内における局在や、所定の種類の細胞における所定の種類のタンパク質の発現量等の情報を組み合わせるこ

50

とで、がん等が関係する疾患における、抗体 薬物複合体を用いた診断または治療のための有用な情報を取得できるようになる。さらに、上記以外の情報（因子）を組み合わせることで、投与適応患者をより正確に選定することが可能となり、また適切な投薬計画を構築することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】図1は実施例2において行った三重染色の模式図である。

【図2】図2は実施例2において行った三重染色のフローチャートである。

【発明を実施するための形態】

【0019】

本発明による「抗体 薬物複合体の検出方法」は、抗体 薬物複合体を投与したヒトまたはヒト以外から取得した検体を使用して、検体上の抗体 薬物複合体の局在を定量する方法を含む。

<抗体 薬物複合体>

「抗体 薬物複合体」は、その構成成分として少なくとも「抗体」、「薬物」および「リンカー」を含み、薬物はリンカーを介して抗体に結合される。抗体とリンカーとの間、またはリンカーと薬物との間には任意でスペーサーが存在していてもよく、典型的には（抗体）-（任意のスペーサー）-（リンカー）-（任意のスペーサー）-（薬物）のような構造を取る。

【0020】

「抗体 薬物複合体」は、特に限定されるものではないが、血液又は非標的組織中においてはクリアランス及び代謝されにくく、さらに非標的細胞内への輸送が制限されるものから選択される。

【0021】

「抗体 薬物複合体」は、具体的には、ヒト化HER2抗体トラスツズマブ（ハーセプチン）に細胞毒性物質エムタンシンを結合させたトラスツズマブ エムタンシン（商品名；カドサイラ（Kadcycla））、抗CD30モノクローナル（マウスヒトキメラ）抗体に微小管阻害薬のモノメチルアウリスタチンEが結合したプレントキシマブ ベドチン（商品名；アドセトリス（Adcetris））、ゲムツズマブオゾガマイシン（商品名；マイロタグ（Mylotarg））等を挙げることができる。

【0022】

抗体-薬物複合体の構成成分である「抗体」（本明細書においてはADC構成抗体と呼ぶことがある）としては、抗体-薬物複合体の標的分子を抗原として特異的に認識して結合する一次抗体（IgG）を用いることができる。また一次抗体を特異的に認識して結合する二次抗体（IgG）を抗体-薬物複合体の構成成分として用いることもできるが、この場合は一次抗体と共に投与することが必要となる。

【0023】

抗体-薬物複合体の構成成分である「薬物」（本明細書においてはADC構成薬物と呼ぶことがある）は、特に限定されるものではなく、好ましくは抗腫瘍効果、細胞傷害性能、抗血管形成効果、又は抗炎症治療活性を有する薬物である。

【0024】

前記薬物は、例えば、化合物、ポリペプチド、タンパク質、核酸、抗生物質、およびウイルス等を挙げることができ、標的（例えば受容体）又は細胞外又は細胞内作用部位を有し得る。これは、透過ペプチド配列、例えば米国特許出願第10/231,889号明細書に記載された配列をふくむこともできる。例えば薬物は、抗腫瘍治療活性を有する下記薬物群から選択される薬物を含んでいてもよい：ピンカ・アルカロイド、例えばピンクリスチン、ピンブラスチン、ピンデシン、ピノレルピン；タキサン又はタキソイド、例えばパクリタキセル、ドセタキセル、10-デアセチルタキソール、7-エピ-タキソール、バッカチンIII、キシロシルタキソール；アルキル化剤、例えばイフォスファミド、メルファラン、クロロアミノフェン、プロカルバジン、クロラムブシル、チオホフォルアミ

10

20

30

40

50

ド、ブスルファン、ダカルバジン (DTIC)、マイトマイシンCを含むマイトマイシン、ニトロソ-尿素、及びこれらの誘導体 (例えばエストラムスチン、BCNU、CCNU、フォテムスチン); 白金誘導体、例えばシスプラチンなど (例えばカルボプラチン、オキサリプラチン); 代謝拮抗物質、例えばメトトレキサート、アミノプテリン、5-フルオロウラシル、6-メルカプトプリン、ラルチトレキセド、シトシンアラビノシド (又はシタラビン)、アデノシンアラビノシド、ゲムシタピン、クラドリピン、ペントスタチン、フルダラピンホスフェート、ヒドロキシ尿素; トポイソメラーゼI又はIIの阻害剤、例えばカンプトテシン誘導体 (例えばイニノテカン及びトポテカン又は9-ジメチルアミノメチル-ヒドロキシ-カンプトテシンヒドロクロリド)、エピポドフィロトキシシン (例えばエトポシド、テニポシド)、アムサクリン; ミトキサントロン; L-カナバニン; 抗生物質剤、例えばアントラサイクリン、及び例えばアドリアマイシン又はドキシソルピシン、THP-アドリアマイシン、ダウノルピシン、イダルピシン、ルビダゾン、ピラルピシン、ゾルピシン、及びアクリラルピシン、アントラサイクリンの類似体、及び例えばエピアドリアマイシン (4'-エピアドリアマイシン又はエピルピシン) 及びミトキサントロン、プレオマイシン、アクチノマイシンDを含むアクチノマイシン、ストレプトゾトシン、カリケアマイシン、デュオカルマイシン、コンプレタスタチン; L-アスパラギナーゼ; ホルモン; アロマターゼの純粋阻害剤; アンドロゲン、LH-RHの類似アンタゴニスト; サイトカイン、例えばインターフェロン・アルファ (IFN-アルファ)、インターフェロン・ガンマ (IFN-ガンマ)、インターロイキン1 (IL-1)、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、IL-15、腫瘍壊死因子-アルファ (TNF-アルファ)、IGF-1アンタゴニスト (インスリン様成長因子); プロテアソーム阻害剤; ファルネシル-トランスフェラーゼ阻害剤 (FTI)、エボチロン; マイタンシノイド; ディスコデルモリド; フォストリエシン; 抗体; チロシンキナーゼの阻害剤、例えばSTI571 (メシル酸イマチニブ); エンドスタチン; タンパク質、ペプチド、及び抗炎症サイトカイン; これらの医薬的に許容し得る塩基付加塩又は酸付加塩、水和物、溶媒和物、前駆体、代謝物、又は立体異性体。

【0025】

「リンカー」は、特に限定されないが、標的細胞内の少なくとも1つの酵素により切断可能なペプチド鎖であることが好ましい。本発明では、種々の長さを有するリンカーが使用可能であるが、少なくとも3アミノ酸を有するリンカーが好ましく、3~8アミノ酸のリンカーが特に好ましい。

【0026】

「スペーサー」は特に限定されるものではないが、置換型又は無置換型アルキル、置換型又は無置換型ヘテロアルキル、置換型又は無置換型アリール、置換型又は無置換型ヘテロアリール、アルデヒド、酸、エステル、エーテル、チオエーテル、無水物、スルフィドリル又はカルボキシル基、例えばマレイミド誘導体、マレイミドシクロヘキサン誘導体、マレイミド安息香酸誘導体、マレイミドカプロン酸誘導体、及びスクシニミド誘導体から独立して選択される2官能性及び多官能性有機ラジカルが挙げられる。或いは、臭化シアノゲン又は塩化シアノゲン、スクシニミジルエステル又はスルホン酸ハロゲン化物等から誘導してもよい。

<抗体 薬物複合体の検出方法>

本発明の抗体 薬物複合体の構成成分の検出方法は、1分子ずつ輝点として表すのに十分な強度の蛍光を発することができる蛍光体集積粒子 (PID) を用いた免疫染色法によりおこなわれ、(a) 抗体 薬物複合体の構成成分である薬物を可視化する工程および (b) 抗体 薬物複合体の構成成分である抗体を可視化する工程の少なくとも一方を含む。

【0027】

工程 (a) である抗体 薬物複合体の構成成分である薬物 (ADC構成薬物) を可視化する工程は、その薬物を特異的に認識して結合するIgG (本明細書においては抗体Aと記載する) に、PIDを結合させたものを用いて、一般的な免疫染色の手法によりおこなうことができる。たとえば、チューブリン重合阻害剤であるエムタンシンを構成成分とし

10

20

30

40

50

て有する抗体 - 薬物複合体を検出する場合は P I D 標識抗エムスタンシン抗体を染色剤として用いて一般的な手法により免疫染色をおこなえばよい。

【 0 0 2 8 】

工程 (b) である抗体 薬物複合体の構成成分である抗体 (A D C 構成抗体) を可視化する工程は、 A D C 構成抗体を抗原として特異的に認識して結合する I g G (本明細書においては抗体 B と記載する) に P I D を標識物質として結合させたものを染色剤として用いて免疫染色をおこなえばよい。

< 標的分子の定量方法 >

本発明は、好ましくはさらに、 (c) 抗体 薬物複合体の標的分子を可視化する工程、も含む。本明細書において標的分子は、抗体 薬物複合体の標的細胞に発現するタンパク質であり、標的細胞としては、例えば、がん細胞、免疫細胞、間質細胞 (線維芽細胞、内皮細胞、白血球 (リンパ球、単球、好中球、好酸球、好塩基球) 等) などが挙げられる。標的分子は標的細胞に発現するタンパク質であれば、特に限定されるものではないが、好ましくはがん細胞および免疫細胞に発現するタンパク質であることが好ましく、さらに細胞表面に発現している、受容体またはリガンドであることが好ましい。

【 0 0 2 9 】

がん細胞に発現するタンパク質には、例えば、免疫系タンパク質、がん細胞増殖因子、転移制御因子、血管増殖因子、サイトカイン、がん細胞増殖制御因子受容体、転移制御因子受容体、血管増殖因子受容体、およびサイトカイン受容体が挙げられる。

【 0 0 3 0 】

がん細胞に発現するタンパク質としては具体的には、例えば、 C D 4 0、 T L 1 A、 G I T R - L、 4 - 1 8 8 - L、 C X 4 D - L、 C D 7 0、 H H L A 2、 I C O S - L、 C D 8 5、 C D 8 6、 C D 8 0、 M H C - I I、 P D L 1、 P D L 2、 V I S T A、 B T N L 2、 B 7 - H 3、 B 7 - H 4、 C D 4 8、 H V E M、 C D 4 0 L、 T N F R S F 2 5、 G I T R、 4 - 1 8 8、 O X 4 0、 C D 2 7、 T M I G D 2、 I C O S、 C D 2 8、 T C R、 L A G 3、 C T L A 4、 P D 1、 C D 2 4 4、 T I M 3、 B T L A、 C D 1 6 0、 L I G H T、 E G F R (H E R 1)、 H E R 2、 H E R 3、 H E R 4、 I G F R、 H G F R、 V E G F - A、 V E G F - B、 V E G F - C、 V E G F - D、 V E G F - E、 P I G F - 1、 P I G F - 2、 G - C S F、 M - C S F、 E P O、 S C F、 E G F、 F G F、 I G F、 N G F、 P D G F、 T G F、 A C T G 2、 A L D O A、 A P C、 B R M S 1、 C A D M 1、 C A M K 2 A、 C A M K 2 B、 C A M K 2 D、 C C L 5、 C D 8 2、 C D K N 1 A、 C D K N 2 A、 C H D 4、 C N N 1、 C S T 7、 C T S L、 C X C R 2、 Y B B、 D C C、 D E N R、 D L C 1、 E G L N 2、 E G L N 3、 E I F 4 E 2、 E I F 4 E B P 1、 E N O 1、 E N O 2、 E N O 3、 E T V 4、 F G F R 4、 G S N、 H K 2、 H K 3、 H K D C 1、 H L A - D P B 1、 H U N K I L 1 1、 K D M 1 A、 K I S S 1、 L D H A、 L I F R、 M E D 2 3、 M E T、 M G A T 5、 M A P 2 K 4、 M T 3、 M T A 1、 M T B P、 M T O R、 M Y C L、 M Y H 1 1、 N D R G 1、 N F 2、 N F K B 1、 N M E 1、 N M E 4、 N O S 2、 N R 4 A 3、 P D K 1、 P E B P 4、 P F K F B 1、 P F K F B 4、 P G K 1、 P L A U R、 P T T G 1、 R B 1、 R O R B、 S E T、 S L C 2 A 1、 S N R P F、 S S T R 2、 T C E B 1、 T C E B 2、 T C F 2 0、 T F、 T L R 4、 T N F S F 1 0、 T P 5 3、 T S H R、 M M P、 M M P 2、 M M P 1 0、 H I F 1 などが挙げられる。

【 0 0 3 1 】

免疫細胞に発現するタンパク質としては、例えば、免疫系タンパク質、成長因子、増殖制御因子、増殖刺激因子、免疫細胞移動因子、サイトカイン、免疫制御因子、シグナル伝達関連タンパク質、およびそれらの受容体が挙げられる。

【 0 0 3 2 】

免疫細胞に発現するタンパク質としては具体的には、例えば、 P D - 1、 C T L A - 4、 T I M 3、 F o x p 3、 C D 3、 C D 4、 C D 8、 C D 2 5、 C D 2 7、 C D 2 8、 C D 7 0、 C D 4 0、 C D 4 0 L、 C D 8 0、 C D 8 6、 C D 1 6 0、 C D 5 7、 C D 2 2 6、 C D 1 1 2、 C D 1 5 5、 O X 4 0 (C D 1 3 4)、 O X 4 0 L (C D 2 5 2)、 I

10

20

30

40

50

COS (CD278)、ICOSL (CD275)、4-1BB (CD137)、4-1BBL (CD137L)、2B4 (CD244)、GITR (CD357)、B7-H3 (CD276)、LAG-3 (CD223)、BTLA (CD272)、HVEM (CD270)、GITRL、ガレクチン-9 (Galectin-9)、B7-H4、B7-H5、PD-L2、KLRG-1、E-Cadherin、N-Cadherin、R-CadherinおよびIDO、TDO、CSF-1R、HDAC、CXCR4、FLT-3、TIGITが挙げられる。

【0033】

間質細胞に発現するタンパク質としては、例えば、成長因子、細胞接着因子、細胞分化因子、血液凝固因子、酵素、調節因子、細胞誘導因子、タンパク質誘導因子、およびそれらの受容体が挙げられる。

10

【0034】

間質細胞に発現するタンパク質としては具体的には、例えば、CD140a、CD106、CD109、CD140b、CD141、CD142、CD143、CD144、CD145、CD146、CD147、CD201、CD202、CD280、CD299、CD309、CD322、CD331、CD332、CD333、CD334、CD339が挙げられる。

【0035】

本発明の工程(c)は、抗体薬物複合体の標的分子を「定性的」ではなく「定量的」に観察できるという観点から、蛍光体集積粒子を用いた免疫染色法により行うことが好ましく、抗体薬物複合体の標的分子を特異的に認識して結合するIgG(本明細書においては抗体Cと記載する)に、PIDを結合させたものを染色剤として用いてもよいし、抗体Cを特異的に認識して結合するIgG(抗体C')にPIDを結合させたものを染色剤として用いてもよい。

20

【0036】

「定性的」な手法とは、タンパク質の発現量や発現細胞数等と関連しているものの、それらの数またはそれと密接に関連する指標値を直接的に取り扱うのではなく、所定の範囲内にある数または指標値をまとめて一つのスコアで表し、そのようなスコアは数個程度、例えば2~5個程度であり、典型的には観察者の主観的・経験的な要素に依拠する手法をいう。例えば、乳がん細胞等の細胞膜に発現するHER2タンパク質を対象とし、DAB染色を用いるIHC法であって、がん細胞の膜における染色性およびその染色強度(染色パターン)に基づいて、3+(強く完全な細胞膜の陽性染色があるがん細胞>30%である場合:陽性)、2+(弱~中程度の完全な細胞膜の陽性染色があるがん細胞10%、または強い完全な細胞膜の陽性染色があるがん細胞10%~30%である場合:equivocal)、1+(ほとんど識別できないほどかすかな細胞膜の染色があるがん細胞10%で、がん細胞は細胞膜のみが部分的に染色されている場合:陰性)および0(細胞膜に陽性染色がない、あるいは細胞膜の陽性染色がある癌細胞>10%である場合(細胞膜に限局する陽性染色は判定対象外):陰性)のように4段階のスコアで評価する方法(「HER2検査ガイド第三版」,トラスツズマブ病理部会作成,2009年9月より)は「定性的」な手法に該当する。また、Jager et al., Patient-derived bladder cancer xenografts in the preclinical development of novel target therapies. Oncotarget, Vol.6, No. 25, 21522-21532の21527ページ、Figure 3で用いられている、IHC法による染色像に基づいてタンパク質の発現量を4段階のスコアで表す手法も「定性的」な手法に該当する。

30

40

【0037】

一方、「定量的」な手法とは、タンパク質の発現量や発現細胞数またはそれらと密接に関連する指標値を直接的に取り扱い、典型的には装置を用いた客観的な測定結果に依拠する手法をいう。代表的には、蛍光ナノ粒子、すなわち、量子ドット(集積化していないもの)または蛍光体集積粒子(PID)のように、直径がナノサイズの粒子を用いて、目的タンパク質を標識し、定量する手法が用いられ、なかでも、蛍光体集積粒子を用いて行わ

50

れる定量方法（本明細書において「PID法」と称することがある。）が特に好適である。PID法の基本的な実施形態は特許文献1、特許文献2、またはその他の特許文献または非特許文献により公知である。本発明でも、例えば標本スライドを用いて病理診断を行う場合に準じた実施形態で、PID法を実施することができる。

【0038】

ADC構成抗体、抗体A、抗体B、抗体Cおよび抗体C'はいずれも、モノクローナル抗体が好ましい。抗体を産生する動物（免疫動物）の種類は特に限定されるものではなく、従来と同様、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ヒツジなどから選択すればよい。

【0039】

ADC構成抗体、抗体A、抗体B、抗体Cおよび抗体C'は、特定の目的物質（例えばADC構成抗体においては抗体薬物複合体の標的分子、抗体AであればADC構成薬剤）を特異的に認識して結合する能力を有するものであれば、天然の全長の抗体でなく、抗体断片または誘導体であってもよい。すなわち、本明細書における「抗体」という用語には、全長の抗体だけでなく、Fab、F(ab)'₂、Fv、scFvなどの抗体断片およびキメラ抗体（ヒト化抗体等）、多機能抗体などの誘導体が包含される。

【0040】

工程(a)および/または(b)により、検体内における抗体薬物複合体の局在を測定することができる。また、本発明の工程(c)によって抗体薬物複合体の標的細胞が標的分子をどの程度発現しているかを特定することができ、さらに抗体薬物複合体とその標的分子の距離を測定することにより、抗体薬物複合体とその標的分子との相互作用が実際にどの程度起きているかを評価することができる。例えば、後述するような画像処理において測定することのできる、ADC構成薬物および/またはADC構成抗体を標識したPID染色剤（PIDの輝点等）と、抗体薬物複合体の標的タンパク質を標識したPID染色剤の輝点との距離を、抗体薬物複合体および標的細胞間の距離とみなすことができる。この工程を実施する場合、同一の検体（組織切片等）に対して、前者の蛍光標識のための免疫染色処理および後者の蛍光標識のための免疫染色処理を行えばよく（多重免疫染色）、互いを区別するために異なる波長の蛍光を発する蛍光体集積粒子を有するPID染色剤を用いることが適切である。

【0041】

< 蛍光体集積粒子 >

本発明における用いられる蛍光体集積粒子（PID）は、有機物または無機物でできた粒子を母体とし、複数の蛍光体（たとえば蛍光色素）がその中に内包されているおよび/またはその表面に吸着している構造を有する、ナノサイズの粒子である。この場合、母体（たとえば樹脂）と蛍光物質は、互いに反対の電荷を有する置換基ないし部位を有しており、静電的相互作用が働くものであることが好適である。

【0042】

なお、本明細書における「蛍光体」は、所定の波長の電磁波（X線、紫外線または可視光線）が照射されてそのエネルギーを吸収することで電子が励起し、その励起状態から基底状態に戻る際に余剰のエネルギーを電磁波として放出する、つまり「蛍光」を発する物質であって、生体物質認識物質（生体物質を特異的に認識可能な物質、例；ビオチン、アビジン、抗体等）と直接的、あるいは間接的に結合させることのできる物質を指す。また、「蛍光」は広義的な意味を持ち、励起のための電磁波の照射を止めても発光が持続する発光寿命の長い燐光と、発光寿命が短い狭義の蛍光とを包含する。

【0043】

蛍光体集積粒子を形作る母体のうち、有機物としては、メラミン樹脂、尿素樹脂、アニリン樹脂、グアナミン樹脂、フェノール樹脂、キシレン樹脂、フラン樹脂など、一般的に熱硬化性樹脂に分類される樹脂；スチレン樹脂、アクリル樹脂、アクリロニトリル樹脂、AS樹脂（アクリロニトリル-スチレン共重合体）、ASA樹脂（アクリロニトリル-スチレン-アクリル酸メチル共重合体）など、一般的に熱可塑性樹脂に分類される樹脂；ポ

10

20

30

40

50

リ乳酸等のその他の樹脂；多糖を例示することができ、無機物としてはシリカ、ガラスなどを例示することができる。

【0044】

・半導体集積ナノ粒子

半導体集積ナノ粒子とは、蛍光体としての半導体ナノ粒子が、上記に記載した母体の中に内包されているおよび/またはその表面に吸着している構造を有する。半導体ナノ粒子を構成する素材は特に限定されるものではなく、たとえば、II-V族化合物、III-V族化合物、またはIV族元素を含有するもの、たとえば、CdSe、CdS、CdTe、ZnSe、ZnS、ZnTe、InP、InN、InAs、InGaP、GaP、GaAs、Si、Geなどが挙げられる。また、半導体が母体に内包されている場合、母体内部に分散されていればよく、母体自体と化学的に結合していても、していなくてもよい。

10

【0045】

・蛍光色素集積ナノ粒子

蛍光色素集積ナノ粒子とは、蛍光体としての蛍光色素が、上記に記載した母体の中に内包されている、および/またはその表面に吸着している構造を有する。蛍光色素は特に限定されるものではなく、たとえば、ローダミン系色素分子、スクアリリウム系色素分子、シアニン系色素分子、芳香環系色素分子、オキサジン系色素分子、カルボピロニン系色素分子、ピロメセン系色素分子などを例示することができる。あるいは、Alexa Fluor（登録商標、インビトロジェン社製）系色素分子、BODIPY（登録商標、インビトロジェン社製）系色素分子、Cy（登録商標、GEヘルスケア社製）系色素分子、DY（登録商標、DYOMICS社製）系色素分子、Hilyte（登録商標、アナスペック社製）系色素分子、DyLight（登録商標、サーモサイエンティフィック社製）系色素分子、ATTO（登録商標、ATTO-TEC社製）系色素分子、MFP（登録商標、Mobictec社製）系色素分子などを用いることができる。なお、このような色素分子の総称は、化合物中の主要な構造（骨格）または登録商標に基づき命名されており、それぞれに属する蛍光色素の範囲は当業者であれば過度の試行錯誤を要することなく適切に把握できるものである。また、蛍光色素が母体に内包されている場合、蛍光色素は母体内部に分散されていればよく、母体自体と化学的に結合していても、していなくてもよい。

20

【0046】

蛍光体集積粒子は、公知の方法（たとえば特開2013-57937号公報参照）に従って作製することができる。

30

【0047】

より具体的には、たとえば、シリカを母体とし、その中に蛍光物質が内包されている蛍光物質内包シリカ粒子は、無機半導体ナノ粒子、有機蛍光色素などの蛍光物質と、テトラエトキシシランのようなシリカ前駆体とが溶解している溶液を、エタノールおよびアンモニアが溶解している溶液に滴下し、シリカ前駆体を加水分解することにより作製することができる。

【0048】

一方、樹脂を母体とし、蛍光物質を樹脂粒子の表面に吸着させるか、樹脂粒子中に内包させた蛍光物質集積樹脂粒子は、それらの樹脂の溶液ないし微粒子の分散液を先に用意しておき、そこに無機半導体ナノ粒子、有機蛍光色素などの蛍光物質を添加して攪拌することにより作製することができる。あるいは、樹脂原料の溶液に蛍光色素を添加した後、重合反応を進行させることにより、蛍光物質を内包した樹脂粒子を作製することもできる。たとえば、母体となる樹脂としてメラミン樹脂のような熱硬化性樹脂を用いる場合、その樹脂の原料（モノマーまたはオリゴマーないしプレポリマー、たとえばメラミンとホルムアルデヒドの縮合物であるメチロールメラミン）と、有機蛍光色素と、好ましくはさらに界面活性剤および重合反応促進剤（酸など）とを含有する混合物を加熱し、乳化重合法によって重合反応を進行させることにより、有機蛍光色素内包樹脂粒子を作製することができる。また、母体となる樹脂としてスチレン系共重合体のような熱可塑性樹脂を用いる場

40

50

合、その樹脂の原料と、有機蛍光色素と（樹脂の原料モノマーとして、あらかじめ有機蛍光色素を共有結合などで結合させたモノマーを用いるようにしてもよい）、重合開始剤（過酸化ベンゾイル、アゾビスイソブチロニトリルなど）を含有する反応混合物を加熱し、ラジカル重合またはイオン重合によって重合反応を進行させることにより、有機蛍光色素内包樹脂粒子を作製することができる。

【0049】

蛍光体集積粒子に内包させる蛍光物質としては、上述したような半導体ナノ粒子、蛍光色素のほか、たとえば、 Y_2O_3 、 Zn_2SiO_4 等を母体とし、 Mn^{2+} 、 Eu^{3+} 等を賦活剤とする「長残光蛍光体」を挙げることができる。

【0050】

蛍光体集積粒子（特に上記のような製造方法によって得られる蛍光色素を内包した樹脂粒子）の平均粒径は、標本スライドの免疫染色に適した粒径であれば特に限定されないが、輝点としての検出のしやすさなどを考慮すると、通常は10～500nm、好ましくは50～200nmである。また、粒径のばらつきを示す変動係数は、通常は20%以下であり、好ましくは5～15%である。このような条件を満たす蛍光体集積粒子は、製造条件を調整することにより製造することができる。たとえば、乳化重合法により蛍光体集積粒子を作製する場合は、添加する界面活性剤の量によって粒径を調節することができ、一般的に、蛍光体集積粒子の母体原料の量に対する界面活性剤の量が相対的に多ければ粒径は小さくなり、その量が相対的に少なければ粒径は大きくなる傾向にある。

【0051】

なお、蛍光体集積粒子の粒径は、走査型電子顕微鏡（SEM）を用いて電子顕微鏡写真を撮影して蛍光体集積粒子の断面積を計測し、その断面形状を円と仮定したときに、その断面積に相当する円の直径として算出することができる。複数の蛍光体集積粒子からなる集団の平均粒径および変動係数は、十分な数（たとえば1000個）の蛍光物質集積ナノ粒子について上記のようにして粒径を算出した後、平均粒径はその算術平均として算出され、変動係数は式： $100 \times \text{粒径の標準偏差} / \text{平均粒径}$ 、により算出される。

【0052】

<PID染色剤の構成>

ADC構成薬物、ADC構成抗体、抗体薬物複合体の標的分子を蛍光標識するためのPID染色剤の一例として、[抗体]～[蛍光体集積粒子]が挙げられる。例えばADC構成薬物を染色するために用いるPID染色剤としては、[抗ADC構成薬物抗体]～[蛍光体集積粒子]が用いられる。ここで、“～”が示す結合の態様としては特に限定されず、例えば、共有結合、イオン結合、水素結合、配位結合、物理吸着または化学吸着等が挙げられ、必要に応じてリンカー分子を介していてもよい。

【0053】

[抗体]～[蛍光体集積粒子]は、あらかじめ所望の抗体に所望の蛍光体集積粒子が結合されている[抗体]～[蛍光体集積粒子]自体が市販されていれば、それを利用してよい。また、所望の抗体（タンパク質）に所望の蛍光色素を結合させることのできる公知の手法に基づいて、たとえば市販されている蛍光標識試薬（キット）を利用して作製することができる。

【0054】

例えば、無機物と有機物とを結合させるために広く用いられている化合物であるシランカップリング剤を用いることができる。このシランカップリング剤は、分子の一端に加水分解でシラノール基を与えるアルコキシシリル基を有し、他端に、カルボキシル基、アミノ基、エポキシ基、アルデヒド基などの官能基を有する化合物であり、上記シラノール基の酸素原子を介して無機物と結合する。具体的には、メルカプトプロピルトリエトキシシラン、グリシドキシプロピルトリエトキシシラン、アミノプロピルトリエトキシシラン、ポリエチレングリコール鎖を有するシランカップリング剤（例えば、Gelbst社製PEG-silane no. SIM6492.7）等が挙げられる。シランカップリング剤を用いる場合、2種以上を併用してもよい。

10

20

30

40

50

【0055】

蛍光体集積粒子とシランカップリング剤との反応手順は、公知の手法を用いることができる。例えば、得られた蛍光物質を内包したシリカナノ粒子を純水中に分散させ、アミノプロピルトリエトキシシランを添加し、室温で12時間反応させる。反応終了後、遠心分離またはろ過により表面がアミノプロピル基で修飾された蛍光物質を内包したシリカナノ粒子を得ることができる。続いてアミノ基と抗体中のカルボキシル基とを反応させることで、アミド結合を介して抗体を、蛍光物質を内包したシリカナノ粒子と結合させることができる。必要に応じて、EDC(1-Ethyl-3-[3-Dimethylaminopropyl]carbodiimide Hydrochloride; Pierce社製)のような縮合剤を用いることもできる。

10

【0056】

必要により有機分子修飾された蛍光物質を内包したシリカナノ粒子と直接結合しうる部位と、分子標的物質と結合し得る部位とを有するリンカー化合物を用いることができる。具体例として、アミノ基に選択的に反応する部位とメルカプト基に選択的に反応する部位との両方を有するsulfo-SMCC(Sulfosuccinimidyl-4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate; Pierce社製)を用いると、アミノプロピルトリエトキシシランで修飾した蛍光物質を内包したシリカナノ粒子のアミノ基と、抗体中のメルカプト基とを結合させることで、抗体が結合した蛍光物質を内包したシリカナノ粒子が得られる。

【0057】

蛍光物質を内包したポリスチレンナノ粒子に生体物質認識物質(生体物質を特異的に認識可能な物質、例; ビオチン、アビジン、抗体等)を結合させる場合、蛍光物質が蛍光色素の場合であっても、半導体ナノ粒子の場合であっても、同様の手順を適用することができる。すなわち、アミノ基など官能基を有するポリスチレンナノ粒子に半導体ナノ粒子または蛍光有機色素を含浸することにより、官能基を有する蛍光物質集積ポリスチレン粒子を得ることができ、以降EDCまたはsulfo-SMCCを用いることで、抗体が結合した蛍光体集積ポリスチレン粒子ができる。

20

【0058】

PID染色剤の他の一例として、[アビジン]-[蛍光体集積粒子](ここで、“-”は必要に応じてリンカー分子を介していてもよい共有結合により結合していることを表す。)が挙げられる。このようなPID染色剤を用いる場合はあらかじめ[目的物質に対する抗体(一次抗体)]-[ビオチン]と目的物質とを反応させておくか、または[目的物質に対する一次抗体(一次抗体)]と目的物質とを反応させた後にさらに[目的物質に対する一次抗体に対する抗体(二次抗体)]-[ビオチン]を反応させておく必要がある。

30

【0059】

例えば、染色後において目的物質と蛍光体集積粒子とは、[目的物質]...[目的生体物質に対する一次抗体]...[一次抗体に対する抗体(二次抗体)]-[ビオチン]/[アビジン]-[蛍光体集積粒子](ここで、“...”は抗原抗体反応により結合していることを表し、“-”は必要に応じてリンカー分子を介していてもよい共有結合により結合していることを表し、“/”はアビジン・ビオチン反応により結合していることを表す。)という様式によって間接的に連結される。

40

【0060】

抗体-ビオチン結合体(ビオチン修飾抗体)は、所望の抗体(タンパク質)にビオチンを結合させることのできる公知の手法に基づいて、たとえば市販されているビオチン標識試薬(キット)を利用して作製することができる。また、あらかじめ所望の抗体にビオチンが結合されているビオチン修飾抗体自体が市販されていれば、それを利用してよい。

【0061】

蛍光体集積粒子-アビジン結合体(アビジン修飾蛍光体集積粒子)も、蛍光体集積粒子にアビジンを結合させることのできる公知の手法に基づいて、たとえば市販されているアビジン標識試薬(キット)を利用して作製することができる。この場合のアビジンは、ビ

50

オチンとの間でアビジンよりも高い結合力が働く、ストレプトアビジンやニュートラアビジンなどの改良型であってもよい。

【0062】

蛍光体集積粒子 - アビジン結合体の作製方法の具体例を挙げれば次の通りである。蛍光体集積粒子が樹脂を母体とする蛍光体集積粒子である場合、その樹脂が有する官能基と、アビジン（タンパク質）が有する官能基とを、必要に応じて分子の両末端に官能基を有するPEG等のリンカー分子を介することにより、結合させることができる。たとえば、メラミン樹脂であればアミノ基等の官能基を利用することができるし、アクリル樹脂、スチレン樹脂等であれば、側鎖に官能基（たとえばエポキシ基）を有するモノマーを共重合させることにより、その官能基自体またはその官能基から変換された官能基（たとえばアンモニア水を反応させることにより生成するアミノ基）を利用することができるし、さらにはそれらの官能基を利用して別の官能基を導入することもできる。また、蛍光ナノ粒子がシリカを母体とする蛍光体集積粒子または無機半導体ナノ粒子である場合、シランカップリング剤で表面修飾することにより所望の官能基を導入することができ、たとえばアミノプロピルトリメトキシシランを用いればアミノ基を導入することができる。一方、アビジンに対しては、たとえばN - スクシンイミジルS - アセチルチオアセテート（SATA）をアビジンのアミノ基と反応させることにより、チオール基を導入することができる。そして、アミノ基との反応性を有するN - ヒドロキシスクシンイミド（NHS）エステルおよびチオール基との反応性を有するマレイミド基をポリエチレングリコール（PEG）鎖の両端に有するクロスリンカー試薬を利用することにより、アミノ基を有する蛍光体と、チオール基が導入されたアビジンとを連結することができる。

10

20

【0063】

また、本発明においては、上記PID染色剤を希釈液で希釈したPID染色液を用いて染色を行なう。希釈液の選択と希釈倍率については、目的物質と免疫染色剤とのアフィニティーに応じて最適化することができる。

【0064】

<免疫染色方法>

以下、本発明における実施例の1例として、腫瘍組織由来の検体、具体的には組織切片（標本スライド）を使用して、がん細胞における、蛍光体集積粒子を用いた免疫染色法の一例についてさらに詳細に説明する。

30

【0065】

本発明において用いられる免疫染色法の「目的物質」は、抗体 薬物複合体の構成成分である薬物（ADC構成薬物）、および抗体 薬物複合体の構成成分である抗体（ADC構成抗体）の少なくとも一方、好ましくは両方である。また、抗体 薬物複合体の標的分子も免疫染色法の「目的物質」とすることが好ましい。

【0066】

「腫瘍組織」は、ヒト（がん患者）の腫瘍由来であってもよいし、またヒト以外の動物の腫瘍由来であってもよい。

【0067】

「腫瘍組織由来の検体」とは、腫瘍組織から採取される病変部や、採取された病変部に含まれる腫瘍細胞を培養した細胞などであって、一般的には、免疫染色法により目的タンパク質の発現量を評価する場合などで慣用されているように、所定の手順に従って作製された標本スライドの形態をとる。本発明の検出方法は、そのような検体を用いて、ヒトまたはヒト以外の動物の生体外において実施される。

40

【0068】

組織切片（本明細書において、単に「切片」ともいい、例えば病理切片等の切片も包含する用語として用いる。）およびそれを載置した標本スライドの作製法は特に限定されず、公知の手順により作製されたものを用いることができる。

【0069】

（1．標本スライド前処理工程）

50

(1 - 1 . 脱パラフィン処理)

キシレンを入れた容器に、切片を浸漬させ、パラフィン除去する。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。浸漬時間は、3分以上30分以下であることが好ましい。また必要により浸漬途中でキシレンを交換してもよい。

【 0 0 7 0 】

次いでエタノールを入れた容器に切片を浸漬させ、キシレン除去する。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。浸漬時間は、3分以上30分以下であることが好ましい。また必要により浸漬途中でエタノールを交換してもよい。

【 0 0 7 1 】

水を入れた容器に、切片を浸漬させ、エタノール除去する。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。浸漬時間は、3分以上30分以下であることが好ましい。また必要により浸漬途中で水を交換してもよい。

(1 - 2 . 賦活化処理)

公知の方法に倣い、目的物質の賦活化処理を行う。賦活化条件に特に定めはないが、賦活液としては、0.01Mのクエン酸緩衝液(pH6.0)、1mMのEDTA溶液(pH8.0)、5%尿素、0.1Mのトリス塩酸緩衝液などを用いることができる。加熱機器はオートクレーブ、マイクロウェーブ、圧力鍋、ウォーターバスなどを用いることができる。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。温度は50~130、時間は5~30分で行うことができる。

【 0 0 7 2 】

次いでPBSを入れた容器に、賦活化処理後の切片を浸漬させ、洗浄を行う。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。浸漬時間は、3分以上30分以下であることが好ましい。また必要により浸漬途中でPBSを交換してもよい。

【 0 0 7 3 】

(2 . 免疫染色工程)

免疫染色工程では、抗体-薬物複合体およびその標的分子を染色するために、目的物質に直接的または間接的に結合しうる部位を有する染色剤を希釈液に分散させた免疫染色液を、組織切片に載せて、目的物質との反応を行う。免疫染色剤ないしそれを希釈するための希釈液およびその他の成分については前述した通りであり、この工程の前にあらかじめ調製しておけばよい。

【 0 0 7 4 】

たとえば、免疫染色剤として[アビジン]-[蛍光体集積粒子]を用い、さらに染色後において目的物質と標識物質とが、[目的物質]...[目的物質に対する一次抗体]...[一次抗体に対する抗体(二次抗体)]-[ビオチン]/[アビジン]-[蛍光体集積粒子](ここで“...”は抗原抗体反応により結合していることを表し、“-”は必要に応じてリンカー分子を介していてもよい共有結合により結合していることを表し、“/”はアビジン・ビオチン反応により結合していることを表す。)となる実施形態の場合、最初に一次抗体の溶液に標本スライドを浸漬する処理(1次反応処理)、次に二次抗体-ビオチン結合体の溶液に病理標本を浸漬する処理(2次反応処理)、最後にPID染色液に病理標本である組織切片を浸漬する処理(PID標識処理)を行えばよい。

【 0 0 7 5 】

免疫染色工程を行う上での条件、たとえば1次反応処理、2次反応処理および蛍光標識処理それぞれにおける、所定の溶液(試薬)に標本スライドを浸漬する際の温度および浸漬時間は、従来の免疫染色法に準じて、適切なシグナルが得られるよう適宜調整することができる。

【 0 0 7 6 】

温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。反応時間は、30分以上24時間以下であることが好ましい。

【 0 0 7 7 】

上述したような1次反応処理を行う前に、BSA含有PBSなど公知のブロッキング剤

10

20

30

40

50

や Tween 20 などの界面活性剤を滴下することが好ましい。

【0078】

(3. 標本後処理工程)

免疫染色工程を終えた標本スライドは、観察に適したものとなるよう、固定化・脱水、透徹、封入などの処理を行うことが好ましい。

【0079】

固定化・脱水処理は、標本スライドを固定処理液（ホルマリン、パラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、アセトン、エタノール、メタノール等の架橋剤）に浸漬すればよい。透徹は、固定化・脱水処理を終えた標本スライドを透徹液（キシレン等）に浸漬すればよい。封入処理は、透徹処理を終えた標本スライドを封入液に浸漬すればよい。これらの処理を行う上での条件、たとえば標本スライドを所定の処理液に浸漬する際の温度および浸漬時間は、従来の免疫染色法に準じて、適切なシグナルが得られるよう適宜調整することができる。

【0080】

(4. 任意工程)

本発明では、もしも必要であれば、明視野において細胞、組織、臓器等の形態を観察することができるようにするための、形態観察染色工程を含めることができる。形態観察染色工程は、常法に従って行うことができる。組織標本の形態観察に関しては、細胞質・間質・各種線維・赤血球・角化細胞が赤～濃赤色に染色される、エオジンを用いた染色が標準的に用いられている。また、細胞核・石灰部・軟骨組織・細菌・粘液が青藍色～淡青色に染色される、ヘマトキシリンを用いた染色も標準的に用いられている（これら2つの染色を同時に行う方法はヘマトキシリン・エオジン染色（HE染色）として知られている）。形態観察染色工程を含める場合は、免疫染色工程の後に行うようにしてもよいし、免疫染色工程の前に行うようにしてもよい。

【0081】

(5. 評価工程)

(5-1. 観察・撮影)

観察・撮影工程では、所望の倍率における顕微鏡の同一視野において、免疫染色工程に用いられた目的物質を蛍光標識している蛍光体集積粒子に対応した励起光に対応した励起光それぞれを標本サンプルに照射し、それらの蛍光体集積粒子から発せられた蛍光による免疫染色像それぞれを観察・撮影する。これらの励起光の照射は、たとえば、蛍光顕微鏡が備えるレーザー光源と、必要に応じて所定の波長を選択的に透過させる励起光用光学フィルターを用いることで照射することができる。互いに異なる蛍光体集積粒子を含む複数の免疫染色剤をもちいて免疫染色を行なったときは、それぞれの蛍光体集積粒子に対応した複数種類のフィルターセットを切り替えながら観察を行なう。免疫染色像の撮影は、たとえば、蛍光顕微鏡が備えるデジタルカメラによって行うことができる。免疫染色像の撮影の際には、必要に応じて所定の波長を選択的に透過させる蛍光用光学フィルターを用いることで、目的とする蛍光のみを含み、目的としない蛍光やノイズとなる励起光およびその他の光を排除した免疫染色像を撮影することができる。

(5-2. 画像処理・シグナル計測)

画像処理・計測工程では、目的物質に関して撮影された免疫染色像について、画像処理に基づき、目的物質に対応する蛍光標識シグナルに対応する蛍光標識シグナルを計測し、細胞膜の領域内にある前記目的生体物質に対応する蛍光標識シグナルを特定する。蛍光標識シグナルは、蛍光の輝点数として扱うことが好ましい。

【0082】

画像処理に用いることができるソフトウェアとしては、たとえば「ImageJ」（オープンソース）が挙げられる。このような画像処理ソフトウェアを利用することにより、免疫染色像から、所定の波長（色）の輝点を抽出してその輝度の総和を算出したり、所定の輝度以上の輝点の数を計測したりする処理、特に、上述した実施形態を行うための処理を半自動的に、迅速に行うことができる。

10

20

30

40

50

【0083】

また、輝点は蛍光ナノ粒子1個に由来するので、大きさが一定であり顕微鏡観察で認識できる。大きさが一定値(例;観測される蛍光ナノ粒子の平均値)より大きなシグナルは凝集輝点と判断する。この輝点と凝集輝点は、ソフトウェアを用いて半自動的に迅速に区別することができる。

<情報取得方法>

本発明の情報取得方法は、抗体薬物複合体を投与したヒトまたはヒト以外の動物から採取した検体を使用して、抗体薬物複合体やその標的分子、検体に含まれる細胞等に関する情報を特定する工程を含む。

【0084】

検体は、疾患のあるヒトまたはヒト以外の動物から採取した病変部や、採取された病変部に含まれる腫瘍細胞を培養した細胞などであって、一般的には、所定の手順に従って作製された標本スライドの形態をとる。

【0085】

「疾患」は特に限定されるものではないが、例えば、神経疾患、感染性疾患、遺伝性疾患、腫瘍(がん)であり、典型的には腫瘍(がん)である。腫瘍は、特に限定されるものではないが、例えば、細胞腫、黒色腫、肉腫、脳腫瘍、頭頸部がん、胃がん、肺がん、乳がん、肝がん、大腸がん、子宮頸がん、前立腺がん、膀胱がんなどの固形がん、白血病、リンパ腫、および多発性骨髄腫、などが挙げられる。

【0086】

「ヒト以外の動物」としては、例えば実験動物、典型的には担腫瘍動物、好ましくは担腫瘍マウスを用いることができる。

【0087】

担腫瘍マウスは、大きく自然誘発腫瘍マウス、培養がん細胞移植マウス、患者腫瘍組織移植マウスの3つに分類できる(下記表参照; Kohrt et al., Defining the optimal murine models to investigate immune checkpoint blockers and their combination with other immunotherapies. Annals of Oncology 00: 1-9, 2016)。

【0088】

【表1】

	がん細胞	免疫細胞	モデル
自然誘発腫瘍マウス	マウス	マウス	化合物を移植する古典的なモデル *Genetic-engineered mouse model *Human KI mice
培養がん細胞移植マウス	マウス	マウス	(3) Syngeneic murine model
	ヒト	マウス	(4) Cell-line derived xenograft (CDX)
患者腫瘍組織移植マウス	ヒト	マウス	(5) Patient derived xenograft (PDX) (6) Immuno-avatar mice (7) Hemato-lymphoid humanized mice (8) Immune-PDX

*遺伝子ノックインしたマウス

ヒト(がん患者)から採取した腫瘍(がん)組織または腫瘍細胞、あるいは培養細胞株として確立されたヒト由来の腫瘍細胞が移植された第0世代の実験動物、およびそのような第0世代に移植された腫瘍組織または腫瘍細胞を起源とする、第n-1世代の実験動物

10

20

30

40

50

の体内で生長した腫瘍組織または増殖した腫瘍細胞が移植された第n世代(n-1)の実験動物を包含する。このような実験動物は公知の手法を用いて作製することができる。例えばマウスであれば、CDX(Cell-line derived xenograft)モデルマウス、PDX(Patient derived xenograft)モデルマウスのほか、Immune-PDXモデルマウス、造血リンパ系ヒト化(Hemato-lymphoid humanized)モデルマウス、Immune-PDXモデルマウスなどの様々な担腫瘍マウスモデルを作製することが可能であり、作製済みの担腫瘍マウスモデルを購入できる環境も整っている。一方、患者から取り出した腫瘍細胞に由来する培養細胞を移植した担腫瘍マウスモデルは、より古典的であり作製が容易である。

10

【0089】

本発明における「診断または治療のための情報」の内容は特に限定されるものではなく、抗体-薬物複合体の投与によって標的分子の発現量がどう変化するか、例えば、その疾患の進行(疾患のステージ等)がどの程度変化するか、といった診断に関する情報や、抗体-薬物複合体がその疾患に対してどの程度有効であるか、といった治療に関する情報であればよい。

【0090】

本発明における疾患の診断または治療のための情報の取得方法(本明細書において、単に「本発明の情報取得方法」と称することがある。)においては、検体中における抗体-薬物複合体の局在、抗体-薬物複合体の標的分子の局在・発現量、抗体-薬物複合体とその標的分子の平均距離、標的分子を発現している細胞の種類・数・形態、組織・病変部内・細胞上における標的分子の単位面積あたりの発現量・発現部位・分布・専有面積、標的分子の細胞あたりの発現量とそれに対応する細胞数によって表されるヒストグラム・曲線、腫瘍等の病変部の大きさ、等から、少なくとも一つ、好ましくは二つ以上の情報を特定し、組み合わせて用いることができる。

20

【0091】

(i)抗体-薬物複合体の局在は、検体(標本スライド)を抗体-薬物複合体の構成成分である抗体および/または薬剤に対する免疫染色を行ない、蛍光体集積粒子に対応する所定の波長を有する励起光を照射しながら暗視野における観察および撮像を行なうことにより、染色剤に含まれる抗体-薬物複合体の構成成分である抗体および/または薬剤を標識した蛍光体集積粒子が輝点として表れている画像を取得することで、特定することができる。

30

【0092】

このとき、形態観察用染色剤(例えばエオジン)によって細胞の形状が特定できるような染色をあわせて行ってもよい。

【0093】

上記暗視野における画像の取得をおこなうとともに、明視野における観察および撮像により、細胞の形状を表すように染色されている画像を取得し、これらの2枚の画像を、画像処理により重ねあわせると、画像全体に含まれる、または画像中の特定の領域(例えば腫瘍組織のみ)に含まれる、個々の細胞と抗体-薬物複合体との位置関係を観察することができる。

40

【0094】

(ii)前記標的分子の全体量に対する、前記抗体-薬物複合体と結合している標的分子の比率を特定するには、まず、(i)と同様の手法で標的分子を標識した蛍光体集積粒子が輝点として表れている画像を取得して、この画像に含まれる、または画像中の特定の領域(例えば腫瘍組織のみ)に含まれる細胞に発現している標的分子を表す輝点数を計測する。さらに、この画像と、抗体-薬物複合体の構成成分である抗体および/または薬剤を標識した蛍光体集積粒子が輝点として表れている画像とを、画像処理により重ねあわせ、抗体-薬物複合体の構成成分である抗体および/または薬剤を標識した蛍光体集積粒子を示す輝点と、標的分子を標識した蛍光体集積粒子を示す輝点が一致した数を計測し、標

50

的分子を表す輝点数に対する割合を算出することで、標的分子の全体量に対する、前記抗体-薬物複合体と結合している標的分子の比率を特定することができる。

【0095】

(iii) また標的分子を標識した蛍光体集積粒子が輝点として表れている画像、抗体-薬物複合体の構成成分である抗体が輝点として表れている画像、および抗体-薬物複合体の構成成分である薬剤を標識した蛍光体集積粒子が輝点として表れている画像をそれぞれ取得して、重ねあわせることで、画像全体に含まれる、または画像中の特定の領域（例えば腫瘍組織のみ）に含まれる標的分子、抗体-薬物複合体の構成成分である抗体、および抗体-薬物複合体の構成成分である薬物間の距離をそれぞれ観察することもできる。

【0096】

(i) ~ (iii) の他にも、例えば、標的分子の蛍光免疫染色とあわせて形態観察染色を行なうことで、画像に含まれる全ての細胞について、標的分子の細胞当たりの平均発現量を定量することも可能である。この場合、(ii) と同様にして発現量を求めた後、画像中の特定の領域に含まれる細胞数で割るようによればよい。このとき、標的分子を標識した蛍光体集積粒子の輝点数を輝点標的分子の発現量の指標値として用いてもよいし、ある1つの輝点の明るさ（輝度、蛍光強度）を別途測定しておいた蛍光体集積粒子1つあたりの明るさで割ることにより、その輝点に含まれる蛍光体集積粒子の数を算出して得られた粒子数を標的分子の発現量の指標値として用いてもよい。さらに発現量と対応する細胞数によって表されるヒストグラムまたは曲線を作成する場合、横軸に細胞当たりの標的分子の発現量を所定の数ごとに、あるいは連続的に横軸にとり、それぞれの発現量に対応する細胞数（頻度）を計測して縦軸にとることにより、作成することができる。

【0097】

上記のヒストグラムおよび曲線からは、標的分子の分布（ヒストグラムまたは曲線の形状、ピークの数）がどのようになっているか、平均値または中央値、分散（CV）がどのような値か、また特にヒストグラムの場合、細胞当たりの輝点数または粒子数が最大の区切りがどの程度の細胞数（頻度）になっているか、などの情報を得ることができる。

【0098】

抗体-薬物複合体の投薬前後におけるそのような情報と、抗体-薬物複合体の薬効（例えば投与による病変部の大きさや状態の変化）やその局在、抗体-薬物複合体と標的分子との距離、などの試験結果と照らし合わせることにより、例えば、抗体-薬物複合体の薬効がどのような情報と最も関連しているか、換言すれば薬効などを予測する際にはどのような情報に基づくのが最も妥当か、といったことを分析し、把握することができる。

【実施例】

【0099】

（ビオチン修飾抗ウサギIgG抗体の作製）

50 mM Tris 溶液に、2次抗体として用いる抗ウサギIgG抗体50 μgを溶解した。この溶液に、最終濃度3 mMとなるようにDTT（ジチオトレイトール）溶液を添加、混合し、37 °Cで30分間反応させた。その後、反応溶液を脱塩カラム「Zeba Desalt Spin Columns」（サーモサイエンティフィック社、Cat. # 89882）に通して、DTTで還元化した2次抗体を精製した。精製した抗体全量のうち200 μLを50 mM Tris 溶液に溶解して抗体溶液を調製した。その一方で、リンカー試薬「Maleimide-PEG2-Biotin」（サーモサイエンティフィック社、製品番号21901）を、DMSOを用いて0.4 mMとなるように調整した。このリンカー試薬溶液8.5 μLを前記抗体溶液に添加、混合し、37 °Cで30分間反応させることにより、抗ウサギIgG抗体にPEG鎖を介してビオチンを結合させた。この反応溶液を脱塩カラムに通して精製した。脱塩した反応溶液について、波長300 nmにおける吸光度を分光高度計（日立製「F-7000」）を用いて測定することにより、反応溶液中のタンパク質（ビオチン修飾IgG抗体）の濃度を算出した。50 mM Tris 溶液を用いて、ビオチン修飾IgG抗体の濃度を250 μg/mLに調整した溶液を、ビオチン修飾2次抗体の溶液とした。

10

20

30

40

50

【0100】

[作製例1] 赤色PID染色剤作製工程

(テキサスレッド色素集積メラミン樹脂粒子の作製)

テキサスレッド色素分子「Sulforhodamine 101」(シグマアルドリッチ社) 2.5 mgを純水22.5 mLに溶解した後、ホットスターラーにより溶液の温度を70 に維持ながら20分間攪拌した。攪拌後の溶液に、メラミン樹脂「ニカラックMX-035」(日本カーバイド工業株式会社) 1.5 gを加え、さらに同一条件で5分間加熱攪拌した。攪拌後の溶液にギ酸100 µLを加え、溶液の温度を60 に維持しながら20分間攪拌した後、その溶液を放置して室温まで冷却した。冷却した後の溶液を複数の遠心用チューブに分注して、12,000 rpmで20分間遠心分離して、溶液に混合物として含まれるテキサスレッド色素内包メラミン樹脂粒子を沈殿させた。上澄みを除去し、沈殿した粒子をエタノールおよび水で洗浄した。得られた樹脂粒子の1000個についてSEM観察を行い、上述のように平均粒子径を測定したところ、平均粒子径152 nmであった。このようにして作製されたテキサスレッド色素内包メラミン樹脂粒子を次の手順で表面修飾した。

10

<ストレプトアビジン結合テキサスレッド色素内包メラミン樹脂粒子の作製>

得られた粒子0.1 mgをEtOH 1.5 mL中に分散し、アミノプロピルトリメトキシシランLS-3150(信越化学工業社製) 2 µLを加えて8時間反応させて表面アミノ化処理を行った。

【0101】

次いで、EDTA(エチレンジアミン四酢酸)を2 mM含有したPBS(リン酸緩衝液生理的食塩水)を用いて上記表面アミノ化処理を行った粒子を3 nMに調整し、この溶液に最終濃度10 mMとなるようSM(PEG)₁₂(サーモサイエンティフィック社製、succinimidyl-[N-maleimidopropionamido]-dodecaethyleneglycol)ester)を混合し、1時間反応させた。この混合液を10,000 Gで20分遠心分離を行い、上澄みを除去した後、EDTAを2 mM含有したPBSを加え、沈降物を分散させ、再度遠心分離を行った。同様の手順による洗浄を3回行うことで末端にマレイミド基が付いたテキサスレッド集積メラミン粒子を得た。

20

【0102】

一方、ストレプトアビジン(和光純薬社製)をN-succinimidyl S-acetylthioacetate(SATA)を用いてチオール基付加処理を行ったのち、ゲルろ過カラムによるろ過を行い、テキサスレッド集積メラミン粒子に結合可能なストレプトアビジン溶液を得た。

30

【0103】

上記のテキサスレッド集積メラミン粒子とストレプトアビジンとを、EDTAを2 mM含有したPBS中で混合し、室温で1時間反応させた。10 mMメルカプトエタノールを添加し、反応を停止させた。得られた溶液を遠心フィルターで濃縮後、精製用ゲルろ過カラムを用いて未反応ストレプトアビジン等を除去し、得られたストレプトアビジン結合テキサスレッド集積メラミン粒子を、参考例1および実施例1~4における赤色PID染色剤として使用した。

40

【0104】

[作製例2] 緑色PID染色剤作製工程

上記(ストレプトアビジン結合テキサスレッド集積メラミン樹脂粒子の作製)の手順に準じ、テキサスレッド色素分子「Sulforhodamine 101」(シグマアルドリッチ社)に代えてFITCを用い、平均粒子径159 nmのFITC色素集積メラミン樹脂粒子を作製した。得られた粒子の表面修飾は、上記の手順に従い、ストレプトアビジンに代えて抗ブレンツキシマブ抗体(精製したブレンツキシマブをウサギ脾臓に添加して抗体を作製した)を用いることで、抗体結合FITC色素内包メラミン樹脂粒子を作製し、実施例2~4における緑色PID染色剤として使用した。

50

【0105】

[作製例3] 青色PID染色剤作製工程

上記(ストレプトアビジン結合テキサスレッド色素内包メラミン樹脂ナノ粒子の作製)の手順に準じ、テキサスレッド色素分子「Sulforhodamine 101」(シグマアルドリッチ社)に代えてPhenylcoumarinを用い、平均粒子径132nmのPhenylcoumarin色素内包メラミン樹脂粒子を作製した。得られた粒子の表面修飾は、上記の手順に従い、ストレプトアビジンに代えて抗モノメチルアウリスタチンE(MMAE)マウスモノクローナル抗体(「clone 2E2」; Epitope Diagnostics社)を用いることで、抗体結合Phenylcoumarin色素内包メラミン樹脂粒子を作製し、実施例2~4における青色PIDとして使用した。

10

【0106】

[参考例1] CD30の発現量の評価

標本作製工程

悪性リンパ腫患者14名から採取した組織検体をSofiaBio社から購入し、獲得免疫不全マウスに移植することで、PDXモデルマウスを作製した。それぞれの患者に対応する2mm角の腫瘍組織を皮下へ移植し、1か月後に約300mm³まで腫瘍組織が成長した時にブレントキシマブベドチン(商品名; アドセトリス(登録商標))を100mg/kgを1日1回、計1回尾静脈内投与し、初回投与前および投与100日後の腫瘍体積を計測することにより薬の効果判定を行った。また、投与3日後腫瘍の一部を針生検により採取して、各マウスにつきFFPE(ホルマリン固定パラフィン包埋)組織スライドをそれぞれ数枚ずつ作成した。

20

【0107】

(標本の前処理)

作製したFFPE組織スライドを脱パラフィン処理した後、水に置換する洗浄を行った。洗浄した組織スライドを10mMクエン酸緩衝液中(pH6.0)中で121、15分間オートクレーブ処理することで、抗原の賦活化処理を行った。賦活化処理後の組織スライドをPBSにより洗浄し、得られた標本スライドに対してBSAを1%含有するPBSを用いて1時間ブロッキング処理を行った。

【0108】

(免疫染色の1次反応処理)

目的生体物質CD30に係る第1免疫染色用の1次反応処理は、BSAを1W/W%含有するPBSを用いて、抗CD30ウサギポリクローナル抗体(「GTX5557」; GeneTex社)を0.05nMの濃度で含有するよう1次反応処理液を調製して用いた。この1次反応処理液に標本前処理工程で作製した標本を浸漬し、4で1晩反応させた。

30

【0109】

(免疫染色の2次反応処理)

前記「ビオチン修飾抗ウサギIgG抗体の作製」の項で作製したビオチン修飾抗ウサギIgG抗体の溶液を、さらにBSAを1W/W%含有するPBSを用いて6μg/mLに希釈した2次反応処理液を調製した。1次反応処理を終えた標本をPBSで洗浄した後、この2次反応処理液に浸漬し、室温で30分間反応させた。

40

【0110】

(免疫染色の標識処理 - 1: DAB標識処理)

2次反応処理を終えた標本をPBSで洗浄した後、ストレプトアビジン-HRP(Termo-Fisher社、21130)を浸漬し、室温で60分間反応させた。その後標本をPBSで洗浄し、DAB(3,3'-Diaminobenzidine)溶液に1分浸漬した。

【0111】

(免疫染色の標識処理 - 2: PID標識処理)

前記「赤色PID染色剤作製工程」の項で作製したストレプトアビジン修飾テキサスレッド色素内包メラミン樹脂粒子を、カゼイン(組成 = - カゼイン(シグマ社c6780

50

) : 50 W / W %、 - カゼイン (シグマ社 c 6 9 0 5) : 50 W / W %) と B S A の含有率をそれぞれ 1 %、3 % に調整した蛍光ナノ粒子用希釈液を用いて、0 . 0 2 n M に希釈した蛍光標識反応処理液をそれぞれ調製した。2 次反応処理を終えた標本をこの蛍光標識処理液に浸漬し、室温で 3 時間反応させた。

【 0 1 1 2 】

なお、D A B 標識処理と P I D 標識処理は、別々の標本スライド (それぞれに積載されている組織切片は隣接切片であり、同一の標本サンプルと見做す) に対して行った。下記の D A B 染色陽性細胞率および蛍光輝点数の結果として表 2 に示したデータは、対応する同一の患者の組織についてのものである。

【 0 1 1 3 】

(形態観察用染色処理)

蛍光染色処理を行った標本スライドを、マイヤーヘマトキシリン液で 5 分間染色してヘマトキシリン染色を行った後、4 5 の流水で 3 分間洗浄した。

【 0 1 1 4 】

(標本の後処理)

免疫染色を終えた標本スライドに対して、純エタノールに 5 分間浸漬する操作を 4 回行う固定化・脱水処理を行った。続いて、キシレンに 5 分間浸漬する操作を 4 回行う透徹処理を行った。最後に、標本に封入剤「エンテランニュー」(メルク社)を載せて、カバーガラスを被せる封入処理を行い、観察に用いる標本とした。

【 0 1 1 5 】

評価工程

(蛍光輝点数)

蛍光の発光の観察には蛍光顕微鏡「B X - 5 3」(オリンパス株式会社)を用い、免疫染色像(400倍)の撮影には、当該蛍光顕微鏡に取り付けた顕微鏡用デジタルカメラ「D P 7 3」(オリンパス株式会社)を用いた。

【 0 1 1 6 】

まず、C D 3 0 の蛍光標識に用いたテキサスレッドに対応する励起光を標本に照射して蛍光を発光させ、その状態の免疫染色像を撮影した。この際、励起光の波長は、蛍光顕微鏡が備える励起光用光学フィルターを用いて 5 7 5 ~ 6 0 0 n m に設定し、観察する蛍光の波長は、蛍光用光学フィルターを用いて 6 1 2 ~ 6 9 2 n m に設定した。蛍光顕微鏡による観察および画像撮影時の励起光の強度は、視野中心部付近の照射エネルギーが 9 0 0 W / c m ²となるようにした。画像撮影時の露光時間は、画像の輝度が飽和しないような範囲で調節し、例えば 4 0 0 0 μ 秒に設定した。

【 0 1 1 7 】

このような免疫染色像の撮影は、同一視野において行った後、視野を変えて同じ操作を繰り返し、1 標本につき合計 5 視野ずつ行った(第 1 ~ 第 5 視野)。この工程における画像処理には、画像処理ソフトウェア「I m a g e J」(オープンソース)を用いた。

【 0 1 1 8 】

免疫染色像における C D 3 0 を蛍光標識したテキサスレッド集積メラミン粒子を表す輝点のうち輝度が所定の値以上のものの数を計測した。これをカウントすることで、C D 3 0 の発現量の評価指標とした。

【 0 1 1 9 】

次に、蛍光顕微鏡の明視野における観察および画像撮影により、D A B 染色による染色像を細胞の形態観察用のヘマトキシリン染色による染色像を撮影した。

【 0 1 2 0 】

このような免疫染色像および形態観察用染色像の撮影は、同一視野において行った後、視野を変えて同じ操作を繰り返し、1 つの標本スライドにつき 5 視野ずつ行った。

【 0 1 2 1 】

参考例 1 の結果を表 2 に示す。P I D による陽性率が高いほどアドセトリスの投与により腫瘍サイズが大きく減少し、アドセトリスの薬効(腫瘍サイズの減少効果)が大きくな

10

20

30

40

50

る傾向が確認された。一方従来のDAB標識によるCD30発現率による評価と、アドセトリスの薬効との間に相関は確認できなかった。

【0122】

【表2】

	DABによる評価 (DAB染色陽性細胞率)	PIDによる評価 (PID陽性細胞率)	薬の効果判定
検体A	0	0	PD
検体B	0	15	PR
検体C	0	60	PR
検体D	10	20	PD
検体E	10	80	SD
検体F	30	50	SD
検体G	40	60	PR
検体H	50	80	PR
検体I	60	100	CR
検体J	80	100	PR
検体K	80	100	SD
検体L	80	100	PD
検体M	100	100	PR
検体N	100	100	CR

CR (著効) : 全病変の消失が4週以上持続

PR (有効) : 30%以上と想定される縮小が4週以上持続

PD (進行) : 20%以上と想定される増大または新病変の出現

SD (不変) : PRにもPDにも該当しない変化

【実施例1】抗体 薬物複合体の定量評価

参考例1で準備した組織スライド数枚を用いて試験した。1次反応処理において抗CD30ウサギポリクローナル抗体の代わりに抗プレッツキシマブ抗体を用いる以外は参考例1と同様に、各マウスの投与前後の標本スライドに対しての染色および評価を行った。

【0123】

なお、DAB標識処理、CD30に対するPID蛍光標識処理およびアドセトリスに対するPID蛍光標識処理は、別々の標本スライドに対して行った。下記のDAB染色陽性細胞率および蛍光輝点数の結果として表2に示したデータは、対応する同一の患者の組織についてのものである。

【0124】

ここで、アドセトリスに対する蛍光標識処理を行ったスライドにおいて、細胞膜上の輝点が5以上カウントされた細胞をアドセトリス到達細胞と定義した。

【0125】

実施例1の結果を表3に示す。

【0126】

10

20

30

40

【表 3】

	投与前 PIDによる 評価 (PID陽性 細胞率)	投与後 PIDによる 評価 (PID 陽性細胞率)	投与後 アドセトリス 到達細胞率	薬の効果判定
検体A	0	0	0	PD
検体B	15	10	10	PR
検体C	60	20	40	PR
検体D	20	10	0	PD
検体E	80	0	40	SD
検体F	50	10	30	SD
検体G	60	20	30	PR
検体H	80	30	50	PR
検体I	100	0	100	CR
検体J	100	30	60	PR
検体K	100	60	20	SD
検体L	100	100	0	PD
検体M	100	40	60	PR
検体N	100	0	100	CR

10

20

< 考察 >

検体Aでは腫瘍においてアドセトリスの標的タンパク質であるCD30が発現しておらず、したがって薬物を投与しても薬物ががん細胞に到達せず、取り込まれないことが予測できる。このマウスにおいては腫瘍も進行しており、アドセトリスの薬効は見られない。検体B、CにおいてはCD30はDABでは検出出来ていないがPIDを用いると検出することが可能となり、発現していることがわかる。さらに薬も細胞に到達しており、腫瘍にアドセトリスが有効であることがわかる。検体DではCD30が低発現ではあるが検出されてはいるが、薬物ががん細胞に到達していない。また、検体EではCD30が広く分布しており、また薬が到達しているが、投与後にCD30を発現している細胞がなくなっている。したがって検体Eのマウスにはこれ以上アドセトリスを投与しても効果は得られないと考えられる。検体FではCD30を発現しており、薬も到達している。検体Fのマウスに関しては腫瘍を測定した投与100日目の時点においては腫瘍の大きさに効果は変化はみられないが、まだCD30発現細胞が残っているため、さらなる投与を続けることで薬効が現れることが期待できる。検体G～Jにおいてはそれぞれ細胞に薬が到達しており、アドセトリスが有効に作用していることがわかる。検体LではCD30は強発現しているが、がん細胞に薬が届いておらず、腫瘍の大きさにおいても薬の効果がみられない。検体M、NではCD30は強発現しており、薬も到達していることが確認でき、観察できた薬効も顕著である。

30

40

【0127】

以上の結果から、PID法により測定されたCD30の発現量、薬が到達している細胞の割合、そして薬効評価の間には相関性があることが示されていることがわかる。したがって、PID法を利用することにより、免疫細胞に発現している所定のタンパク質の発現量を高い精度で定量することができ、さらにその結果からがんの診断または治療のための投薬計画の構築に利用することのできる情報を取得できることが分かる。

【0128】

なお本実施例においては、細胞形態の観察情報を基に細胞膜領域に存在するアドセトリスの輝点を計測したが、さらに細胞内領域に存在するアドセトリスの輝点および細胞外に

50

存在するアドセトリスの輝点をそれぞれ計測し、それぞれの領域に位置する輝点の数や位置に関する情報を得てこれを解析する手法も可能である。

【0129】

[実施例2]

参考例1で作製した各スライドにそれぞれ実施例1と同じ手法で前処理を行った。参考例1と同じ手法で、1次反応工程、2次反応工程を行い、さらに作製例1で作製した赤色PID染色剤を1%BSA含有PBSで0.1nMに希釈した溶液を、標本スライドに載せて一晩放置した後、PBSを入れた容器に、染色後の組織標本を15分浸漬させた。赤色PIDで染色済みのスライドに、さらに作製例2で作製した緑色PID染色剤を1%BSA含有PBSで0.1nMに希釈したものを、標本スライドに載せて一晩放置した後、PBSを入れた容器に、染色後の組織標本を15分浸漬させた。さらにそのスライドに作製例3で作製した青色PID染色剤を1%BSA含有PBSで0.1nMに希釈した溶液を、標本スライドに載せて一晩放置した後、PBSを入れた容器に、染色後の組織標本を30分浸漬させた。

【0130】

なお、上記工程では2次反応工程を行った後、1%BSA含有PBSで最終濃度を0.1nMに調整した赤色PID染色剤、緑色PID染色剤、青色PID染色剤を同時に標本スライドに載せて一晩放置した後に、PBSを入れた容器に、染色後の組織標本を15分浸漬させる手法を用いてもよい。

【0131】

その後、参考例1と同様に標本の後処理を行い、免疫染色後の組織標本をステージに設置し、緑色用、赤色用、青色用の下記3種類のフィルターセット(Semrock社)を用いて各色の輝点の観察を行った。

【0132】

図1に、実施例2において行った三重染色の模式図を示し、図2にそのフローチャートを示す。

【0133】

【表4】

フィルターセット	フィルター波長の励起波長発行波長		
	赤色用 (テキサスレッド)	緑色用 (FITC)	青色用 (Phenylcoumarin)
励起フィルター	586nm (波長幅20nm)	470nm (波長幅30nm)	438nm (波長幅24nm)
蛍光フィルター	628nm (波長幅32nm)	525nm (波長幅50nm)	483nm (波長幅32nm)

各フィルターセットを切り替えるごとに、組織標本の蛍光像の蛍光輝点数を観察・撮影・画像処理を行った。3色の輝点がそれぞれ一致した細胞膜上に見られた場合をアドセトリス到達細胞と定義する。アドセトリス到達細胞と薬効評価には相関性があることが示された。すなわち、3種の輝点が一致する位置がCD30の存在する位置およびまだ分離していない(抗体-薬物複合体の状態の)アドセトリスの存在する位置を示しており、アドセトリスの非特異的検出や分離した後のアドセトリスの検出を除いた正確なアドセトリス到達細胞を規定することでより薬効判定に正確性が増すと考えられる。

【0134】

なお、ADC薬の抗薬物抗体を用いて得られた輝点の分布を観察すると、細胞内に輝点が10以上分布するケースではどの場合もCR(著効)に対応していた。

【0135】

さらに、CD30を発現するがん細胞とアドセトリスの距離も、輝点間距離として定量化できることも明らかとなった。したがって、PID法に基づき所定のタンパク質の発現

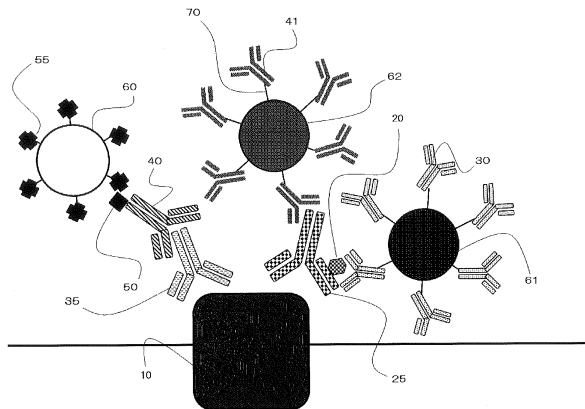
量を定量することにより、がん細胞上の標的分子の発現量を定量するとともに、標的分子と抗体 薬物複合体の距離も測定することができ、複合的な情報を取得できることが分かる。

【符号の説明】

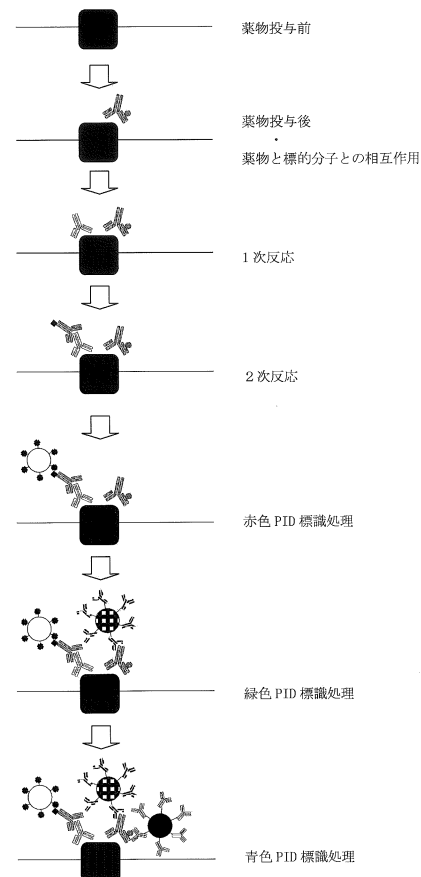
【 0 1 3 6 】

- 1 0 . . . C D 3 0
- 2 0 . . . アドセトリス構成薬物 (モノメチルアウリスタチン E)
- 2 5 . . . アドセトリス構成抗体 (プレンツキシマブ)
- 3 0 . . . 抗モノメチルアウリスタチン E 抗体
- 3 5 . . . 抗 C D 3 0 抗体
- 4 0 . . . 抗 I g G 抗体
- 4 1 . . . 抗プレんツキシマブ抗体
- 5 0 . . . ビオチン
- 5 5 . . . ストレプトアビジン
- 6 0 . . . テキサスレッド
- 6 1 . . . P h e n y l c o u m a r i n
- 6 2 . . . F I T C
- 7 0 . . . リンカー

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 G 0 1 N 33/574 A
 C 1 2 Q 1/04

審査官 磯田 真美

(56)参考文献 国際公開第2 0 1 2 / 1 3 3 0 4 7 (WO , A 1)

PONTE, J.F. et al. , Mirvetuximab Soratansine (IMGN853), a Folate Receptor Alpha-Targeting Antibody-Drug Conjugate, Potentiates the Activity of Standard of Care Therapeutics in Ovarian Cancer Models , NEOPLASIA , 2 0 1 6 年 1 2 月 , Vol. 18 , pp. 775-784

SMITH, L.M. et al. , Potent cytotoxicity of an auristatin-containing antibody-drug conjugate targeting melanoma cells expressing melanotransferrin/p97 , Molecular Cancer Therapeutics , 2 0 0 6 年 6 月 , Vol. 5, No. 6 , pp. 1474-1482

大塚由希子ほか , 乳癌におけるHER-2遺伝子異常のFISH解析 - 有用性と注意点 , 免疫組織化学との比較 , 臨床検査 , 2 0 0 6 年 , Vol. 50, No. 7 , pp. 753-760

GERBER, H.P. et al. , Combining antibody-drug conjugates and immune-mediated cancer therapy: What to expect? , Biochemical Pharmacology , 2 0 1 6 年 2 月 1 5 日 , Vol. 102 , pp. 1-6

RYAN, M.C. et al. , Therapeutic potential of SGN-CD19B, a PBD-based anti-CD19 drug conjugate, for treatment of B-cell malignancies , Blood , 2 0 1 7 年 1 1 月 , Vol. 130, No. 18 , pp. 2018-2026

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)

专利名称(译)	抗体-药物偶联物成分的检测方法		
公开(公告)号	JP6648842B2	公开(公告)日	2020-02-14
申请号	JP2018568978	申请日	2018-02-02
[标]申请(专利权)人(译)	柯尼卡株式会社		
申请(专利权)人(译)	柯尼卡美能达有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	柯尼卡美能达有限公司		
[标]发明人	高橋優 白石武嗣 小山昇		
发明人	高橋 優 白石 武嗣 小山 昇		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48 G01N33/574 C12Q1/04		
CPC分类号	G01N33/574 G01N33/582 G01N33/587		
FI分类号	G01N33/53.G G01N33/53.Y G01N33/48.P G01N33/53.D G01N33/574.D G01N33/574.A C12Q1/04		
优先权	2017036438 2017-02-28 JP		
其他公开文献	JPWO2018159212A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种检测抗体-药物缀合物的方法，并且涉及一种通过用于鉴定靶中靶分子的表达水平的定量技术以高精度确定抗体-药物缀合物的功效的方法。抗体-药物-缀合物的细胞及其之间的相互作用。根据该方法，通过用荧光体整合点进行免疫染色而使药物和抗体或抗体-药物-缀合物的成分可视化，能够检测抗体-药物-缀合物和成分。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6648842号 (P6648842)
(45) 発行日 令和2年2月14日(2020.2.14)		(24) 登録日 令和2年1月20日(2020.1.20)
(51) Int. Cl.	F I	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	G
G O 1 N 33/48 (2006.01)	G O 1 N 33/53	Y
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/48	P
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D
	G O 1 N 33/574	D
		請求項の数 19 (全 27 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号 特願2018-568978(P2018-568978)	(73) 特許権者 000001270 コニカミノルタ株式会社	
(86) (22) 出願日 平成30年2月2日(2018.2.2)	東京都千代田区丸の内二丁目7番2号	
(86) 国際出願番号 PCT/JP2018/003599	110001070	
(87) 国際公開番号 W02018/159212	特許業務法人 S S I N P A T	
(87) 国際公開日 平成30年9月7日(2018.9.7)		
審査請求日 平成30年12月28日(2018.12.28)	(72) 発明者 高橋 優 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コ ニカミノルタ株式会社内	
(31) 優先権主張番号 特願2017-36438(P2017-36438)	(72) 発明者 白石 武嗣 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コ ニカミノルタ株式会社内	
(32) 優先日 平成29年2月28日(2017.2.28)	(72) 発明者 小山 昇 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コ ニカミノルタ株式会社内	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP)		最終頁に続く
早期審査対象出願		

(54) 【発明の名称】 抗体-薬物複合体の構成成分の検出方法