

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-504812

(P2017-504812A)

(43) 公表日 平成29年2月9日(2017.2.9)

(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	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 56 頁)

(21) 出願番号	特願2016-564354 (P2016-564354)	(71) 出願人	516214180 ミノミック インターナショナル リミテ ィド
(86) (22) 出願日	平成27年1月16日 (2015.1.16)		
(85) 翻訳文提出日	平成28年8月19日 (2016.8.19)		
(86) 国際出願番号	PCT/AU2015/000018		オーストラリア国, ニューサウスウェール ズ 2 1 1 3, マクアリー パーク, タラ ベラ ロード 7 5, グランド フロア, スイート 2
(87) 国際公開番号	W02015/106311		
(87) 国際公開日	平成27年7月23日 (2015.7.23)		
(31) 優先権主張番号	61/928, 776	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(32) 優先日	平成26年1月17日 (2014.1.17)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 診断用の細胞表面前立腺癌抗原

(57) 【要約】

本発明は、患者の体液または組織に前立腺癌を検出する組成物および方法を提供する。体液試料中のグリピカン - 1 のレベルを測定することにより前立腺癌を検出する。一実施形態では、体液試料と M I L - 3 8 などの抗グリピカン - 1 抗体とを接触させることにより前立腺癌を検出する。本発明は、抗グリピカン - 1 抗体とグリピカン - 1 標準品とを含む、体液試料に前立腺癌を検出するためのキットを含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者の前立腺癌を検出する方法であって、患者の体液試料中のグリピカン - 1 のレベルを測定することと、前記体液試料中のグリピカン - 1 のレベルに基づき、前記患者に前立腺癌があるか、前立腺癌が発生する可能性が高いことを確定することを含む、方法。

【請求項 2】

(a) 患者から体液試料を採取する段階と、
 (b) 前記体液試料と抗グリピカン - 1 抗体とを接触させる段階と、
 (c) 前記抗グリピカン - 1 抗体と前記体液試料との結合に基づき、前記患者に前立腺癌があるか、前立腺癌が発生する可能性が高いことを判定する段階と
 を含む、請求項 1 に記載の患者の前立腺癌を検出する方法。

10

【請求項 3】

前記抗グリピカン - 1 抗体が M I L - 3 8 である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記体液試料と抗体の集団とを接触させ、
 前記集団の抗体が、

(a) 重鎖可変領域であって、
 配列番号 1 0 の位置 5 0 ~ 5 4 によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域 1 (C D R 1) と、
 配列番号 1 0 の位置 6 9 ~ 8 5 によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域 2 (C D R 2) と、
 配列番号 1 0 の位置 1 1 8 ~ 1 2 6 によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域 3 (C D R 3) と

20

を含む、重鎖可変領域および

(b) 軽鎖可変領域であって、
 配列番号 1 1 の位置 4 4 ~ 5 4 によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域 1 (C D R 1) と、
 配列番号 1 1 の位置 7 0 ~ 7 6 によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域 2 (C D R 2) と、
 配列番号 1 1 の位置 1 0 9 ~ 1 1 7 によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域 3 (C D R 3) と

30

を含む、軽鎖可変領域

を含み、

前記集団の抗体が、

配列番号 1 2 の位置 4 8 ~ 5 8 によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域 1 (C D R 1) と、
 配列番号 1 2 の位置 7 4 ~ 8 0 によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域 2 (C D R 2) と、
 配列番号 1 2 の位置 1 1 3 ~ 1 2 1 によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域 3 (C D R 3) と

40

を含む軽鎖可変領域を含まない、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記抗体集団が、2014年8月22日、Cell Bank Australia (C B A) にアクセッション番号 C B A 2 0 1 4 0 0 2 6 の下で寄託されたハイブリドーマ細胞によって産生されるものであるか、同細胞によって生成される抗体集団と同一のものである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記抗グリピカン - 1 抗体が M I L - 3 8 ではない、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 7】

前記抗グリピカン - 1 抗体が、グリピカン - 1 と結合することが可能な抗体フラグメン

50

トまたは組換え抗体である、請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記抗グリピカン - 1 抗体を標識する、請求項 2 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記標識が、放射標識、蛍光標識、ビオチン - アビジン増幅系、化学発光系、マイクロスフェアおよびコロイド金からなる群より選択される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

免疫蛍光法、放射標識、イムノプロットティング、ウエスタンブロット法、酵素結合免疫測定法 (E L I S A)、フローサイトメトリー、免疫沈降、免疫組織化学法、生物膜試験、*affinity ring test*、抗体アレイ吸光度試験および化学発光からなる群より選択される技術により抗グリピカン - 1 抗体結合を検出する、請求項 2 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 11】

前記患者の体液試料中のグリピカン - 1 のレベルと、対照試料中のグリピカン - 1 のレベルとを比較し、前記体液試料の抗グリピカン - 1 抗体結合が前記対照試料よりも増大していれば、前立腺癌が存在するものとする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記体液試料のグリピカン - 1 のレベルが前記対照試料中のグリピカン - 1 のレベルよりも 50 % 以上増大していれば、前立腺癌があることを示す、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

抗グリピカン - 1 抗体と前記体液試料との結合を、対照試料の抗グリピカン - 1 抗体結合と比較し、前記体液試料の抗グリピカン - 1 抗体結合が前記対照試料よりも増大していれば、前立腺癌が存在するものとする、請求項 2 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 14】

前記抗グリピカン - 1 抗体と前記体液試料との結合が前記対照試料の抗グリピカン - 1 抗体結合のレベルよりも 50 % 以上増大していれば、前立腺癌があることを示す、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

抗グリピカン - 1 抗体と前記体液試料との結合を、抗グリピカン - 1 抗体と 1 つまたは複数のグリピカン - 1 標準品との結合と比較し、前記標準品の抗グリピカン - 1 抗体結合を用いて前記体液試料中のグリピカン - 1 の量を定量化する、請求項 2 ~ 10、13 または 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 16】

前記体液試料中のグリピカン - 1 含有量が約 10 ng / ml を上回れば、前立腺癌があることを示す、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

前記患者の体液試料中の前立腺特異抗原 (P S A) のレベルを測定することと、
(i) 前記体液試料で測定した P S A のレベルおよび (i i) 前記抗グリピカン - 1 抗体と前記体液試料との結合に基づき、前記患者に前立腺癌があるか、前立腺癌が発生する可能性が高いことを確定することと

40

をさらに含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

前記前立腺特異抗原 (P S A) のレベルを前記患者の血液試料で測定する、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

測定した前記体液試料中の前立腺特異抗原 (P S A) のレベルと、対照試料で測定した P S A のレベルとを比較し、前記体液試料中の P S A レベルが前記対照試料よりも増大していれば、前立腺癌が存在するものとする、請求項 17 または請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記体液が、血液、血清、血漿および尿からなる群より選択される、請求項 1 ~ 19 の

50

いずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 1】

前立腺癌を検出するキットであって、第一の抗グリピカン - 1 抗体と、薬学的に許容される担体と、グリピカン - 1 標準品とを含み、患者の体液中のグリピカン - 1 を検出することが可能である、キット。

【請求項 2 2】

前記抗グリピカン - 1 抗体が M I L - 3 8 ではない、請求項 2 1 に記載のキット。

【請求項 2 3】

前記抗グリピカン - 1 抗体が M I L - 3 8 である、請求項 2 1 に記載のキット。

【請求項 2 4】

前記抗グリピカン - 1 抗体が、請求項 4、5 または 7 のいずれか 1 項で言及されている抗体である、請求項 2 1 に記載のキット。

【請求項 2 5】

二次リガンドをさらに含む、請求項 2 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 2 6】

前記二次リガンドが、第二の抗グリピカン - 1 抗体またはグリピカン - 1 と結合することが可能なアプタマーであり、前記第二の抗グリピカン - 1 抗体が、前記第一の抗グリピカン - 1 抗体と同じものであり得る、請求項 2 5 に記載のキット。

【請求項 2 7】

前記二次リガンドを迅速に検出するため、前記リガンドが標識とコンジュゲートされている、請求項 2 5 または請求項 2 6 に記載のキット。

【請求項 2 8】

前記標識が、免疫蛍光法、放射標識、イムノプロットティング、ウエスタンブロット法、酵素結合免疫測定法 (E L I S A)、フローサイトメトリー、免疫沈降、免疫組織化学法、生物膜試験、a f f i n i t y r i n g t e s t、抗体アレイ吸光度試験および化学発光からなる群より選択される検出方法に使用するためのものである、請求項 2 7 に記載のキット。

【請求項 2 9】

E L I S A を実施するための構成要素を含む、請求項 2 2 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

技術分野

本発明は、全般的には前立腺癌診断の分野に関する。具体的には、本発明は、前立腺癌の検出に使用することができる生体試料中のバイオマーカーを特定することに関する。特定されたマーカーはほかに、前立腺癌患者の予後の判定および治療に対する応答のモニタリングに使用し得る。

【背景技術】

【0 0 0 2】

相互参照による組込み

本願は、2014年1月17日に出願された米国特許仮出願第61/928,776号の優先権を主張するものであり、上記出願の内容全体が相互参照により本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 3】

発明の背景

前立腺癌は、米国の男性に最も高頻度に診断が下される内臓癌であり、その死因の第2位を占めている。米国癌協会 (A m e r i c a n C a n c e r S o c i e t y) の推定では、2013年に新たに診断される前立腺癌の症例数は約238,590例にのぼり、29,720人の男性が前立腺癌で死亡するとみられている。全体で見ると、男性の6

10

20

30

40

50

人に1人が生涯の間に前立腺癌の診断が下されることになる。

【0004】

現在、前立腺癌は直腸指診(DRE)または患者の血中前立腺特異抗原(PSA)の測定のいずれかによって検出することが可能である。しかし、いずれの検査も完全に決定的なものになるわけではなく、偽陰性(実際には存在する癌が検出されずにいる)および偽陽性(癌が存在しなくても癌のシグナルが発生する)となることもある。例えば、推奨される4.0 ng/mlのカットオフレベルで実施される標準的なPSA検査は、癌患者に対する感度は86%であるが、特異性は33%であり、非癌患者のおよそ67%が偽陽性となる(Hoffmanら, 2002)。偽陽性であれば通常、続いて侵襲的で痛みを伴う生検が実施される。

10

【0005】

精度および/または感度が改善された前立腺癌の診断検査法が必要とされている。

【発明の概要】

【0006】

発明の概要

本発明は、前立腺癌患者の体液または組織にグリピカン-1ヘパラン硫酸プロテオグリカン(GPC-1)レベルの上昇がみられるという発見に一部基づくものである。本発明者らは、グリピカン-1が新たな前立腺癌のマーカーになることを発見した。したがって、本発明は、グリピカン-1を検出して患者に前立腺癌が存在することを確定する方法を提供する。

20

【0007】

一実施形態では、本発明は、患者の前立腺癌を検出する方法であって、患者から体液試料または組織試料を採取することと、前記試料と抗グリピカン-1抗体とを接触させることと、前記抗グリピカン-1抗体と前記体液試料または組織試料との結合に基づき、前記患者に前立腺癌があるか、前立腺癌が発生する可能性が高いことを確定することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、体液試料または組織試料中の1つまたは複数の追加の前立腺マーカーのレベルを測定し、患者に癌があること確定は、患者の体液試料または組織試料中のグリピカン-1のレベルおよび1つまたは複数の追加のマーカーのレベルに基づくものである。いくつかの実施形態では、癌は前立腺癌であり、追加のマーカーはPSAである。いくつかの実施形態では、抗グリピカン-1抗体はMIL-38である。他の実施形態では、抗グリピカン-1抗体はMIL-38ではない。いくつかの実施形態では、抗グリピカン-1抗体は、グリピカン-1と結合することが可能な抗体フラグメントまたは組換え抗体である。いくつかの実施形態では、検出を容易にするために抗グリピカン-1抗体を標識する。いくつかの実施形態では、抗体の標識は、特に蛍光標識、ビオチン-アビジン増幅系、化学発光系、マイクロスフェアまたはコロイド金であり得る。

30

【0008】

いくつかの実施形態では、患者から採取する体液試料は、血液試料、血清試料、血漿試料または尿試料である。

【0009】

一実施形態では、抗グリピカン-1抗体と患者の体液試料または組織試料との結合を、対照試料の抗グリピカン-1抗体結合のレベルと比較し; 体液試料または組織試料の抗グリピカン-1抗体結合が対照試料よりも増大していれば、前立腺癌が存在するものとする。いくつかの実施形態では、前記対照試料は、年齢が一致し前立腺癌がない患者の体液を含む。

40

【0010】

他の実施形態では、抗グリピカン-1抗体と患者の体液または組織との結合のレベルを、抗グリピカン-1抗体と比較標準品との結合のレベルと比較し、体液試料または組織試料の抗グリピカン-1抗体結合が比較標準品試料よりも増大していれば、前立腺癌が存在するものとする。いくつかの実施形態では、前記比較標準品は、グリピカン-1含有量が

50

既知の試料を含む。いくつかの実施形態では、抗グリピカン - 1 と体液または組織との結合の比較を、抗グリピカン - 1 とグリピカン - 1 標準品との結合と比較して、前記体液中のグリピカン - 1 の量を定量化する。

【0011】

いくつかの実施形態では、体液試料中のグリピカン - 1 含有量が約 0.1 ng/ml、0.5 ng/ml、1 ng/ml、5 ng/ml、10 ng/ml、15 ng/ml または 20 ng/ml を上回れば、前立腺癌があることを示す。

【0012】

本発明の診断方法は、患者に1つまたは複数の前立腺癌治療を実施することと、患者の回復または前立腺癌治療に対する応答をモニターする機序として体液または組織中のグリピカン - 1 レベルの変化を追跡することとをさらに含み得る。いくつかの実施形態では、免疫蛍光法、放射標識、イムノプロットティング、酵素結合免疫測定法、フローサイトメトリー、吸光度および化学発光などの技術により抗グリピカン - 1 抗体結合を検出する。

10

【0013】

本発明はこのほか、患者の体液または組織中のグリピカン - 1 を検出するキットを含む。一実施形態では、前立腺癌を検出するキットは、第一の抗グリピカン - 1 抗体と、薬学的に許容される担体と、グリピカン - 1 標準品とを含み；前記キットは、患者の体液または組織中のグリピカン - 1 を検出することが可能なものである。いくつかの実施形態では、キットは二次リガンドをさらに含む。いくつかの実施形態では、二次リガンドは第二の抗グリピカン - 1 抗体である。一実施形態では、第二の抗グリピカン - 1 抗体は第一の抗グリピカン - 1 抗体と同じものである。

20

【0014】

いくつかの実施形態では、前記リガンドを迅速に検出するため、二次リガンドが標識とコンジュゲートされている。

【0015】

したがって、本発明は、少なくとも以下の番号を付した一連の実施形態に関する：

実施形態 1：患者の前立腺癌を検出する方法であって、患者の体液試料中のグリピカン - 1 のレベルを測定することと、体液試料中のグリピカン - 1 のレベルに基づき、前記患者に前立腺癌があるか、前立腺癌が発生する可能性が高いことを確定することとを含む、方法。

30

【0016】

実施形態 2：

(a) 患者から体液試料を採取する段階と、
 (b) 前記体液試料と抗グリピカン - 1 抗体とを接触させる段階と、
 (c) 前記抗グリピカン - 1 抗体と前記体液試料との結合に基づき、前記患者に前立腺癌があるか、前立腺癌が発生する可能性が高いことを判定する段階と
 を含む、実施形態 1 に記載の患者の前立腺癌を検出する方法。

【0017】

実施形態 3：前記抗グリピカン - 1 抗体が M I L - 3 8 である、実施形態 2 に記載の方法。

40

【0018】

実施形態 4：前記体液試料と抗体の集団とを接触させ、
 集団の抗体が、

(a) 重鎖可変領域であって、
 配列番号 10 の位置 50 ~ 54 によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域 1 (CDR 1) と、
 配列番号 10 の位置 69 ~ 85 によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域 2 (CDR 2) と、
 配列番号 10 の位置 118 ~ 126 によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域 3 (CDR 3) と

50

を含む、重鎖可変領域および

(b) 軽鎖可変領域であって、

配列番号 11 の位置 44 ~ 54 によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域 1 (CDR1) と、

配列番号 11 の位置 70 ~ 76 によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域 2 (CDR2) と、

配列番号 11 の位置 109 ~ 117 によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域 3 (CDR3) と

を含む、軽鎖可変領域

を含み、

集団の抗体が、

配列番号 12 の位置 48 ~ 58 によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域 1 (CDR1) と、

配列番号 12 の位置 74 ~ 80 によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域 2 (CDR2) と、

配列番号 12 の位置 113 ~ 121 によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域 3 (CDR3) と

を含む軽鎖可変領域を含まない、実施形態 2 に記載の方法。

【0019】

実施形態 5 : 抗体集団が、2014年8月22日、Cell Bank Australia (CBA) にアクセッション番号 CBA20140026 の下で寄託されたハイブリドーマ細胞によって産生されるものであるか、同細胞によって生成される抗体集団と同一のものである、実施形態 4 に記載の方法。

【0020】

実施形態 6 : 前記抗グリピカン - 1 抗体が MIL - 38 ではない、実施形態 2 に記載の方法。

【0021】

実施形態 7 : 前記抗グリピカン - 1 抗体が、グリピカン - 1 と結合することが可能な抗体フラグメントまたは組換え抗体である、実施形態 2 ~ 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0022】

実施形態 8 : 前記抗グリピカン - 1 抗体を標識する、実施形態 2 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0023】

実施形態 9 : 前記標識が、放射標識、蛍光標識、ビオチン - アビジン増幅系、化学発光系、マイクロスフェアおよびコロイド金からなる群より選択される、実施形態 8 に記載の方法。

【0024】

実施形態 10 : 免疫蛍光法、放射標識、イムノプロットティング、ウエスタンブロット法、酵素結合免疫測定法 (ELISA)、フローサイトメトリー、免疫沈降、免疫組織化学法、生物膜試験、affinity ring test、抗体アレイ吸光度試験および化学発光からなる群より選択される技術により抗グリピカン - 1 抗体結合を検出する、実施形態 2 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0025】

実施形態 11 : 前記患者の体液試料中のグリピカン - 1 のレベルと、対照試料中のグリピカン - 1 のレベルとを比較し、体液試料の抗グリピカン - 1 抗体結合が対照試料よりも増大していれば、前立腺癌が存在するものとする、実施形態 1 に記載の方法。

【0026】

実施形態 12 : 前記体液試料のグリピカン - 1 のレベルが対照試料中のグリピカン - 1 のレベルよりも 50% 以上増大していれば、前立腺癌があることを示す、実施形態 11 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 7 】

実施形態 1 3 : 抗グリピカン - 1 抗体と前記体液試料との結合を、対照試料の抗グリピカン - 1 抗体結合と比較し、体液試料の抗グリピカン - 1 抗体結合が対照試料よりも増大していれば、前立腺癌が存在するものとする、実施形態 2 ~ 1 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 0 2 8 】

実施形態 1 4 : 抗グリピカン - 1 抗体と前記体液試料との結合が対照試料の抗グリピカン - 1 抗体結合のレベルよりも 5 0 % 以上増大していれば、前立腺癌があることを示す、実施形態 1 3 に記載の方法。

【 0 0 2 9 】

実施形態 1 5 : 抗グリピカン - 1 抗体と前記体液試料との結合を、抗グリピカン - 1 抗体と 1 つまたは複数のグリピカン - 1 標準品との結合と比較し、標準品の抗グリピカン - 1 抗体結合を用いて前記体液試料中のグリピカン - 1 の量を定量化する、実施形態 2 ~ 1 0、1 3 または 1 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 0 3 0 】

実施形態 1 6 : 体液試料中のグリピカン - 1 含有量が約 1 0 n g / m l を上回れば、前立腺癌があることを示す、実施形態 1 ~ 1 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 0 3 1 】

実施形態 1 7 :

患者の体液試料中の前立腺特異抗原 (P S A) のレベルを測定することと、
(i) 体液試料で測定した P S A のレベルおよび (i i) 前記抗グリピカン - 1 抗体と前記体液試料との結合に基づき、前記患者に前立腺癌があるか、前立腺癌が発生する可能性が高いことを確定することと

をさらに含む、実施形態 1 ~ 1 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 0 3 2 】

実施形態 1 8 : 前立腺特異抗原 (P S A) のレベルを患者の血液試料で測定する、実施形態 1 7 に記載の方法。

【 0 0 3 3 】

実施形態 1 9 : 測定した体液試料中の前立腺特異抗原 (P S A) のレベルと、対照試料で測定した P S A のレベルとを比較し、体液試料中の P S A レベルが対照試料よりも増大していれば、前立腺癌が存在するものとする、実施形態 1 7 または実施形態 1 8 に記載の方法。

【 0 0 3 4 】

実施形態 2 0 : 前記体液が、血液、血清、血漿および尿からなる群より選択される、実施形態 1 ~ 1 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 0 3 5 】

実施形態 2 1 : 前立腺癌を検出するキットであって、第一の抗グリピカン - 1 抗体と、薬学的に許容される担体と、グリピカン - 1 標準品とを含み、患者の体液中のグリピカン - 1 を検出することが可能である、キット。

【 0 0 3 6 】

実施形態 2 2 : 抗グリピカン - 1 抗体が M I L - 3 8 ではない、実施形態 2 1 に記載のキット。

【 0 0 3 7 】

実施形態 2 3 : 抗グリピカン - 1 抗体が M I L - 3 8 である、実施形態 2 1 に記載のキット。

【 0 0 3 8 】

実施形態 2 4 : 抗グリピカン - 1 抗体が、実施形態 4、5 または 7 のいずれか 1 つで言及されている抗体である、実施形態 2 1 に記載のキット。

【 0 0 3 9 】

実施形態 2 5 : 二次リガンドをさらに含む、実施形態 2 1 ~ 2 4 のいずれか 1 つに記載

10

20

30

40

50

のキット。

【0040】

実施形態26：前記二次リガンドが、第二の抗グリピカン-1抗体またはグリピカン-1と結合することが可能なアプタマーであり、前記第二の抗グリピカン-1抗体が、第一の抗グリピカン-1抗体と同じものであり得る、実施形態25に記載のキット。

【0041】

実施形態27：前記二次リガンドを迅速に検出するため、前記リガンドが標識とコンジュゲートされている、実施形態25または実施形態26に記載のキット。

【0042】

実施形態28：前記標識が、免疫蛍光法、放射標識、イムノプロットティング、ウエスタンブロット法、酵素結合免疫測定法(ELISA)、フローサイトメトリー、免疫沈降、免疫組織化学法、生物膜試験、affinity ring test、抗体アレイ吸光度試験および化学発光からなる群より選択される検出方法に使用するためのものである、実施形態27に記載のキット。

【0043】

実施形態29：ELISAを実施するための構成要素を含む、実施形態22~28のいずれか1つに記載のキット。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】細胞結合MIL-38グリピカン-1抗原の特徴付けを示す図である。DU-145前立腺癌細胞を膜タンパク質抽出キット(MPEK、Merck社)で処理し、磁気ビーズと結合させたMIL-38抗体とインキュベートした。次いで、抗原を免疫沈降させ、磁気ビーズ上で洗浄した後、抗原を溶出させ、前記抗原を質量分析に供した。グリピカン-1がMIL-38抗原と同定されたマススペック解析の結果を示す。グリピカン-1タンパク質の範囲にわたる18個の固有のペプチド配列には下線が施されている。

【図2】MIL-38の免疫沈降およびサイズ排除クロマトグラフィーを示す図である。MIL-38を用いてDU-145前立腺癌細胞の膜抽出物を免疫沈降させ、サイズ排除クロマトグラフィーカラムに通した。図は、MIL-38抗体または二次抗体対照のいずれかを用いた偶数のクロマトグラフィー画分のウエスタンブロット分析を示している。画

分A28およびA30の60Kdの位置にMIL-38抗原が見られる。

【図3】サイズ排除クロマトグラフィーで精製したMIL-38抗原の質量分析を示す図である。図2のサイズ排除クロマトグラフィーによる分離で得られた画分番号A29を質量分析により分析した。グリピカン-1がMIL-38抗原と同定されたマススペック解析の結果が、グリピカン-1タンパク質の範囲にわたる8個の固有のペプチド配列に下線を施して示されている。

【図4】MIL-38抗体と抗GPC-1抗体が二次元ゲルウエスタンブロット上で反応性の重複を示すことを示す図である。DU-145前立腺癌細胞の膜タンパク質抽出物を二次元ゲルで分離した(pI勾配が横方向、分子質量が縦方向である)。MIL-38抗体および市販のrGPC-1ウサギポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロットに60Kdタンパク質を示す反応性の重複が見られる(図の丸で囲った部分)。レーンDは、対照であるDU-145抽出物の一次元分離である。レーンMは、対照である分子量サイズのマーカーの一次元分離レーンである。

【図5】MIL-38がGPC-1抗体の免疫沈降物を検出することができ、逆も同様であることを示す図である。MIL-38抗体およびウサギ抗GPC-1抗体をそれぞれ用いて、DU-145前立腺癌細胞またはC3(MIL-38陰性)細胞の膜タンパク質抽出物からその抗原を免疫沈降させた。MIL-38抗体または抗GPC-1抗体のいずれかで検出された免疫沈降のウエスタンブロットが示されている。図5Aは、MIL-38免疫沈降物のGPC-1による検出(左)およびGPC-1免疫沈降物のMIL-38による検出(右)を示す。図5Bは、対照であるMIL-38免疫沈降物のMIL-38に

10

20

30

40

50

よる検出を示す。各レーンは、M a g i c M a r k - 対照である市販のタンパク質マーカー；D U 1 4 5 M P E K - 前立腺癌膜タンパク質抽出物（免疫沈降させていない）；D U 1 4 5 F T - 免疫沈降で得られた前立腺癌のフロースルー；D U 1 4 5 I P - 抗体を用いた免疫沈降物；C 3 M P E K - (M I L - 3 8 陰性) 対照膜タンパク質抽出物（免疫沈降させていない）；C 3 F T - 免疫沈降で得られた (M I L - 3 8 陰性) 細胞のフロースルー；C 3 I P 溶出物 - 抗体を用いた (M I L - 3 8 陰性) 細胞の免疫沈降物である。M I L - 3 8 は r G P C - 1 抗体の免疫沈降物を検出することができ、逆も同様である。M I L - 3 8 はほかにも、D U 1 4 5 M P E K を含めた全対照および M I L - 3 8 により実施した I P と結合することができる。

【図 6】M I L - 3 8 が組換えグリピカン - 1 を検出することを示す図である。N S 0 細胞で産生された組換えグリピカン - 1 の M I L - 3 8 抗体および抗 G P C - 1 抗体との反応性を試験した。ウエスタンブロットは、M I L - 3 8 抗体およびウサギポリクローナル抗 G P C - 1 抗体がともに組換えグリピカン - 1 との反応を有することを示している。各レーンは、M a g i c M a r k - 対照である市販のタンパク質マーカー；G P C - 1 - 組換えグリピカン - 1 タンパク質；G P C - 1 r e d - 還元剤を用いた組換えグリピカン - 1 タンパク質である。

【図 7】M I L - 3 8 が細胞培養上清中に分泌された抗原を検出することができることを示す図である。D U - 1 4 5 前立腺癌細胞を無血清培地で 3 6 時間インキュベートして無細胞馴化培地を得た。M I L - 3 8 抗体を用いて細胞を全く含まない馴化培地を免疫沈降させ、D U - 1 4 5 M P E K 膜タンパク質抽出物を用いた標準 I P と比較した。M I L - 3 8 抗体を用いた免疫沈降物のウエスタンブロットが示されている。M I L - 3 8 抗体は、馴化液体培地中の 4 0 k D および 5 5 k D の抗原を検出することができる。

【図 8 A】細胞培養上清中に検出された M I L - 3 8 抗原がグリピカン - 1 であることを示す図である。D U - 1 4 5 前立腺癌細胞を無血清培地で 3 6 時間インキュベートして無細胞馴化培地を得た。M I L - 3 8 抗体を用いて馴化培地を免疫沈降させ、免疫沈降物を質量分析法による分析に供した。図 8 A . 4 0 k D および 5 5 k D の M I L - 3 8 反応性抗原をともに含有する試料をマススペック解析に供した。グリピカン - 1 が馴化液体培地の M I L - 3 8 抗原であると同定されたマススペック解析の結果が、グリピカン - 1 タンパク質の N 末端の範囲にわたる 9 個の固有のペプチド配列に下線を施して示されている。図 8 B . 4 0 k D a の M I L - 3 8 反応性抗原を含有する試料をマススペック解析に供した。グリピカン - 1 が馴化液体培地の M I L - 3 8 抗原であると同定されたマススペック解析の結果が、グリピカン - 1 タンパク質の N 末端の範囲にわたる 1 0 個の固有のペプチド配列に下線を施して示されている。図 8 C . 5 5 k D a の M I L - 3 8 反応性抗原を含有する試料をマススペック解析に供した。グリピカン - 1 が馴化液体培地の M I L - 3 8 抗原であると同定されたマススペック解析の結果が、グリピカン - 1 タンパク質の N 末端の範囲にわたる 9 個の固有のペプチド配列に下線を施して示されている。

【図 8 B】細胞培養上清中に検出された M I L - 3 8 抗原がグリピカン - 1 であることを示す図である。D U - 1 4 5 前立腺癌細胞を無血清培地で 3 6 時間インキュベートして無細胞馴化培地を得た。M I L - 3 8 抗体を用いて馴化培地を免疫沈降させ、免疫沈降物を質量分析法による分析に供した。図 8 A . 4 0 k D および 5 5 k D の M I L - 3 8 反応性抗原をともに含有する試料をマススペック解析に供した。グリピカン - 1 が馴化液体培地の M I L - 3 8 抗原であると同定されたマススペック解析の結果が、グリピカン - 1 タンパク質の N 末端の範囲にわたる 9 個の固有のペプチド配列に下線を施して示されている。図 8 B . 4 0 k D a の M I L - 3 8 反応性抗原を含有する試料をマススペック解析に供した。グリピカン - 1 が馴化液体培地の M I L - 3 8 抗原であると同定されたマススペック解析の結果が、グリピカン - 1 タンパク質の N 末端の範囲にわたる 1 0 個の固有のペプチド配列に下線を施して示されている。図 8 C . 5 5 k D a の M I L - 3 8 反応性抗原を含有する試料をマススペック解析に供した。グリピカン - 1 が馴化液体培地の M I L - 3 8 抗原であると同定されたマススペック解析の結果が、グリピカン - 1 タンパク質の N 末端の範囲にわたる 9 個の固有のペプチド配列に下線を施して示されている。

10

20

30

40

50

【図 8 C】細胞培養上清中に検出された M I L - 3 8 抗原がグリピカン - 1 であることを示す図である。D U - 1 4 5 前立腺癌細胞を無血清培地で 3 6 時間インキュベートして無細胞馴化培地を得た。M I L - 3 8 抗体を用いて馴化培地を免疫沈降させ、免疫沈降物を質量分析法による分析に供した。図 8 A . 4 0 k D および 5 5 k D の M I L - 3 8 反応性抗原をとともに含有する試料をマススペック解析に供した。グリピカン - 1 が馴化液体培地の M I L - 3 8 抗原であると同定されたマススペック解析の結果が、グリピカン - 1 タンパク質の N 末端の範囲にわたる 9 個の固有のペプチド配列に下線を施して示されている。図 8 B . 4 0 k D a の M I L - 3 8 反応性抗原を含有する試料をマススペック解析に供した。グリピカン - 1 が馴化液体培地の M I L - 3 8 抗原であると同定されたマススペック解析の結果が、グリピカン - 1 タンパク質の N 末端の範囲にわたる 1 0 個の固有のペプチド配列に下線を施して示されている。図 8 C . 5 5 k D a の M I L - 3 8 反応性抗原を含有する試料をマススペック解析に供した。グリピカン - 1 が馴化液体培地の M I L - 3 8 抗原であると同定されたマススペック解析の結果が、グリピカン - 1 タンパク質の N 末端の範囲にわたる 9 個の固有のペプチド配列に下線を施して示されている。

【図 9】M I L - 3 8 抗体が前立腺癌患者の血漿および前立腺癌の膜抽出物中のグリピカン - 1 を検出することができることを示す図である。図 9 A . 正常対照患者 1 例および前立腺癌患者 1 例の血漿試料を M I L - 3 8 抗体で免疫沈降させた。M I L - 3 8 抗体および r G P C 1 抗体によるウエスタンブロットの両方が示されている。M I L - 3 8 では、対照患者の血漿よりも前立腺癌患者の血漿の方が免疫沈降したグリピカン - 1 タンパク質のレベルが高かった。各レーンは、0 4 6 I P N T - 前立腺癌血漿の I P ; 0 4 6 I P H e p I - ヘパリナーゼで処理した前立腺癌血漿の I P ; 0 4 2 I P N T - 正常対照血漿の I P ; 0 4 2 I P H e p I - ヘパリナーゼで処理した正常対照血漿の I P ; M a g i c M a r k - 対照である市販のタンパク質マーカーである。図 9 B . 正常前立腺 1 例および前立腺癌 1 例の膜タンパク質抽出物を N o v u s B i o 社から入手した。M I L - 3 8 抗体を用いて等量のタンパク質にウエスタンブロットを実施した。前立腺癌抽出物の方が M I L - 3 8 抗原の発現が高かった。

【図 1 0】M I L - 3 8 が前立腺癌患者の尿に癌を検出することができることを示す図である。年齢が一致した患者 1 2 5 例から尿試料を採取し、間接免疫蛍光アッセイに M I L - 3 8 抗体を用いて前立腺癌の存在を試験した。生検による確認 (B P H 、 C a P) または危険因子の分析 (健常対照) のいずれかに基づき、患者を健常対照、良性前立腺肥大 (B P H) または前立腺癌 (C a P) に分類した。図には、C a P 実験試料 ; D U 1 4 5 陽性対照試料 ; および C 3 陰性対照試料の例示的な画像が示されている。

【図 1 1】M I L - 3 8 が様々な E L I S A フォーマットで組換えグリピカン - 1 を検出することができることを示す図である。組換えヒト N S 0 産生グリピカン - 1 タンパク質 (r h G P C 1) 0 n g 、 0 . 1 n g 、 1 n g または 1 0 n g を分析物として用いてサンドイッチ E L I S A 法を実施した。図 1 1 A . M I L - 3 8 抗体による捕捉、ウサギポリクローナル抗 G P C 1 (a - G P C 1) による検出。図 1 1 B . 抗グリピカン - 1 抗体による捕捉、M I L - 3 8 による検出。図 1 1 C . M I L - 3 8 による捕捉、ピオチン化 M I L - 3 8 による検出。

【図 1 2 A】様々な M I L - 3 8 抗体調製物を捕捉抗体として用いて実施したサンドイッチ E L I S A 法による比較を示す図である。図 1 2 A . A M 3 および A M 4 を捕捉抗体として用いたサンドイッチ E L I S A 法による比較を示している。図 1 2 B . 混合調製物 (3 4 A) またはクローン集団 (A M 4 1 F 5) のいずれかを捕捉抗体として用いたサンドイッチ E L I S A 法による比較を示している。

【図 1 2 B】様々な M I L - 3 8 抗体調製物を捕捉抗体として用いて実施したサンドイッチ E L I S A 法による比較を示す図である。図 1 2 A . A M 3 および A M 4 を捕捉抗体として用いたサンドイッチ E L I S A 法による比較を示している。図 1 2 B . 混合調製物 (3 4 A) またはクローン集団 (A M 4 1 F 5) のいずれかを捕捉抗体として用いたサンドイッチ E L I S A 法による比較を示している。

【図 1 3】抗体スクリーニングの未処理データの箱ひげ図グラフである。A M 4 M I L

10

20

30

40

50

- 38抗体と各合成ペプチドとの結合をPEPSCANベースのELISAで試験した。箱の下端および上端はデータの25番目および75番目の百分位数である。箱中央付近の帯は50番目の百分位数(中央値)である。ひげは四分位範囲の1.5倍にあたり、データセット内の統計的外れ値を示している(McGillら, The American Statistician, 32:12-16, 1978)。

【図14】セット3の置換分析(実施例13)で探索したMIL38-AM4を文字プロットで表した図である。

【発明を実施するための形態】

【0045】

詳細な説明

本発明は、前立腺癌患者の体液または細胞にグリピカン-1ヘパラン硫酸プロテオグリカン(GPC-1)レベルの上昇がみられるという発見に一部基づくものである。本発明者らは、グリピカン-1が新たな前立腺癌のマーカーになることを発見した。したがって、本発明は、患者に前立腺癌の存在を検出する方法を提供する。

【0046】

正常なヒト細胞がテロメア短縮により生存不能になるまでに可能な細胞分裂の回数はわずか40~60回である。しかし、前立腺癌細胞は分裂のヘイフリック限界による制限を受けずにいつまでも分裂し続け、異常な増殖をもたらす。

【0047】

癌の発生で最もよくみられるのは、患者体内での腫瘍の形成である。本発明のいくつかの実施形態では、前立腺癌腫瘍は無痛性および無症候性であり得る。他の実施形態では、腫瘍は身体的不快感をはじめ、体液流の閉塞または出血などの局所的症状を引き起こし得る。いくつかの実施形態では、本発明の前立腺癌は、全身症状、例えば正常な身体機能の破壊によって引き起こされる全身症状などを引き起こし得る。他の実施形態では、本発明の前立腺癌の症状は、排便習慣または膀胱機能の変化を含み得る。

【0048】

良性前立腺腫瘍(非癌性)と悪性前立腺腫瘍(癌性)とを区別する因子のひとつに、転移する能力がある。転移とは、癌が他の身体部分に拡散する(転移する)能力のことである。患者の前立腺癌はさらに、疾患の進行に応じていくつかのステージに分類される。最もよく用いられるステージング法がTNM法であり、この方法では、原発性腫瘍の大きさおよび程度(T)、周辺リンパ節への癌の拡散(N)ならびに原発性腫瘍が他の身体部分に転移することにより形成された続発性腫瘍の存在(M)に基づいて癌を分類する(米国癌協会(American Cancer Society))。表1に癌の各ステージの定義の例を示す。

【0049】

10

20

30

【表 1】

表 1.

TNM法による癌ステージの定義（米国癌協会（American Cancer Society）のものを改変）。

ステージ	定義
ステージ0	in situの癌腫
ステージI、ステージIIおよびステージIII	数字が大きいほど疾患の程度が重い、つまり、腫瘍の大きさが大きく、かつ／または最初に癌が発生した臓器以外にも周辺リンパ節および／または原発性腫瘍の位置に近接する組織もしくは臓器まで拡散していることを示す。
ステージIV	癌が遠隔組織または遠隔臓器まで拡散している。

10

20

【0050】

いくつかの実施形態では、本発明により任意の1つまたは複数のステージの癌を検出することができる。

【0051】

いくつかの実施形態では、本発明のグリピカン - 1 は配列番号 1 によってコードされる。いくつかの実施形態では、グリピカン - 1 タンパク質は配列番号 2 の完全アミノ酸配列である。いくつかの実施形態では、グリピカン - 1 タンパク質は配列番号 3 のシグナルペプチドを含まない。いくつかの実施形態では、グリピカン - 1 タンパク質は配列番号 4 のプロペプチドを含まない。いくつかの実施形態では、本発明のグリピカン - 1 タンパク質は配列番号 5 である。いくつかの実施形態では、本発明のグリピカン - 1 は、グリピカン - 1 変異体、例えばアイソフォーム、スプライスパリアントおよびアロタイプなどを含む。本発明はこのほか、前立腺癌の患者の予後を判定する方法を提供する。一実施形態では、この方法は、患者から体液被験試料または組織被験試料を採取することと、前記体液または組織中のグリピカン - 1 のレベルを測定することと、前記レベルと固定された範囲の数値とを比較することとを含み、グリピカン - 1 レベルの方が高いほど、予後不良であるか、患者転帰が好ましくないものとする。

30

【0052】

本発明を用いて検出され得る前立腺癌の非限定的な例としては、前立腺上皮内新生物、腺癌、平滑筋肉腫および横紋筋肉腫が挙げられる。

40

【0053】

癌に対する最も強力なツールのひとつが早期検出である。癌のステージが早期であるほど治療が容易になる傾向があり、ほとんどの癌は、未だ局在化していれば予後が良好になるのが一般的である。癌の診断に役立ち得る検査は多数存在する。いくつかの実施形態では、本発明は、グリピカン - 1 を単独で用いて前立腺癌を検出するものである。他の実施形態では、GPC - 1 を別の抗原とともに使用し、両方の抗原が検出されることによって前立腺癌の存在が確定される。一実施形態では、別の抗原はPSAである。

【0054】

本発明は、前立腺癌を検出する方法を提供する。前立腺癌は、米国の男性に最も高頻度に診断が下される内臓癌であり、その死因の第2位を占めている。米国癌協会（Amer

50

ican Cancer Society)の推定では、2013年に新たに診断される前立腺癌の症例数は約238,590例にのぼり、29,720人の男性が前立腺癌で死亡するとみられている。全体でみると、男性の6人に1人が生涯の間に前立腺癌の診断が下されることになる。前立腺癌には、排尿困難、勃起不全および疼痛を含めた多数の症状がみられとされている。前立腺癌のほとんどは増殖速度が遅いが、転移して最終的に死に至る可能性のある進行性の前立腺癌の症例もある。

【0055】

現在、医療専門家によって用いられている主要な前立腺癌検出検査は、直腸指診(DRE)および患者血液中の前立腺特異抗原(PSA)の測定の2つである。だが、いずれの検査も完全に決定的なものになるわけではなく、偽陰性(実際には存在する癌が検出されずにいる)および偽陽性(癌が存在しなくても癌のシグナルが発生する)となることもある。例えば、推奨される4.0ng/mlのカットオフレベルで実施される標準的なPSA検査は、癌患者に対する感度は86%であるが、特異性は33%であり、非癌患者のおよそ67%が偽陽性となる(Hoffmanら, 2002)。本発明では、グリピカン-1測定とまた別の前立腺癌抗原、PSAとを組み合わせ、患者の体液または組織中のグリピカン-1のレベルおよびPSA検査の結果に基づき、前立腺癌の存在を確定する方法について記載する。

10

【0056】

B L C A - 3 8 (M I L - 3 8 と し て も 知 ら れ る) は、ヒト膀胱癌細胞系UCRU-BL-17CLに対してマウスに生じさせたIgG1マウス抗体である(Walkerら, 1989)。得られた抗体は、ほとんどのヒト膀胱癌系と結合することが明らかにされている(Russellら, 2004)。この抗体は、30Kdの細胞表面タンパク質と結合し、特定の種類の膀胱癌の検出に有用であるものとして記載されている(米国特許第5,622,836号)。

20

【0057】

本発明は、MIL-38抗原のアイデンティティについて初めて記載するものである。本発明者らは、のちの実施例1~8に記載する一連の免疫沈降、ウエスタンブロット分析、質量分析および二次元ゲルにより、この抗原を発見した。本発明に従えば、当業者に公知の任意の適切な薬剤および/または任意の適切な技術を用いて、所与の試料(例えば、体液試料)中のグリピカン-1のレベルを測定し、その測定値を用いて、試料を得た患者の前立腺癌の診断および/または予後予測を実施することができる。いくつかの実施形態では、薬剤は抗グリピカン-1抗体である。本発明のいくつかの実施形態では、MIL-38抗体を用いて、60kDグリピカン-1プロテオグリカンと結合させて検出する。いくつかの実施形態では、MIL-38抗体を用いて前立腺癌細胞表面のグリピカン-1抗原を検出する。他の実施形態では、MIL-38抗体を用いて前立腺癌患者の体液または組織中の可溶性グリピカン-1を検出する。いくつかの実施形態では、MIL-38抗体は、第一のセグメントKVNPQGPGE(配列番号6)またはKVNPQGGP(配列番号7)を含むグリピカン-1エピトープに対する結合特異性を有する。エピトープは、第二のセグメントTQNARA(配列番号8)またはTQNARAFRD(配列番号9)をさらに含み得る。本発明は、MIL-38が前立腺癌組織と結合する能力がグリピカン-1抗原の存在に基づくものであることを明らかにし、さらに、これ以外の抗グリピカン-1抗体を用いて癌性前立腺細胞が検出されることを示す。したがって、いくつかの実施形態では、抗グリピカン-1抗体はMIL-38ではない。本発明はさらに、患者の体液または組織中のグリピカン-1レベルを検出することによって前立腺癌を検出することが可能であることを示す。このようにして、本発明者らは、グリピカン-1が前立腺癌のマーカーであることを発見した。

30

40

【0058】

本発明に従えば、任意の適切な技術(例えば、任意のプロテオミクス技術)を用いて、体液または組織中のグリピカン-1レベルを検出することができる。いくつかの実施形態では、抗グリピカン-1抗体を用いてグリピカン-1レベルを検出することができる。例

50

えば、配列番号10の位置50～54によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域1(CDR1)；配列番号10の位置69～85によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域2(CDR2)；配列番号10の位置118～126によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域3(CDR3)を含む、重鎖可変領域を含み；配列番号11の位置44～54によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域1(CDR1)；配列番号11の位置70～76によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域2(CDR2)；配列番号11の位置109～117によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域3(CDR3)を含む、軽鎖可変領域を含む、抗グリピカン-1抗体を用いて、グリピカン-1レベルを検出することができる。グリピカン-1レベルの検出に用いる抗グリピカン-1抗体は、配列番号12の位置48～58によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域1(CDR1)；配列番号12の位置74～80によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域2(CDR2)；および配列番号12の位置113～121によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域3(CDR3)を含む、軽鎖可変領域を含まないものであり得る。抗グリピカン-1抗体は、2014年8月22日、Cell Bank Australia(CBA)にアクセッション番号CBA20140026の下で寄託されたハイブリドーマ細胞によって産生されるものであるか、同細胞によって生成される抗体と同一のものであり得る。

10

【0059】

20

本発明のいくつかの実施形態では、1つまたは複数の他の抗グリピカン-1抗体を用いて、患者の体液または組織中のグリピカン-1を検出し得る。いくつかの実施形態では、前記他の抗グリピカン-1抗体は、本願(表2)に挙げる抗体のいずれであってもよい。さらに別の実施形態では、患者の体液または組織中のグリピカン-1の検出に用いる抗体は、グリピカン-1と結合することが可能な任意の抗体であり得る。いくつかの実施形態では、本発明の抗体は抗体フラグメントまたは組換え抗体を含む。いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体およびキメラ抗体を含む。いくつかの実施形態では、本発明の抗体はコンジュゲート抗体である。本発明の抗体フラグメントの非限定的なリストとしては、抗原結合フラグメントであるFab、F(ab')₂、ScFv、Di-scFv sdAb、化学結合F(ab')₂、二重特異性抗体、三重特異性抗体Fab3、ビス-scFv、二価抗体のミニボディ、三価抗体のトリアボディ、二重特異性抗体のダイアボディ、四価抗体のテトラボディが挙げられる。HolligerおよびHudson 2005ならびに米国特許出願公開第2003/0077282号には、抗体フラグメントおよびドメインの組合せの概説が記載されている。

30

【0060】

【表 2 - 1】

表 2.

抗グリピカン-1抗体

会社	カタログ番号	反応性	用途	宿主	M/P	結合特異性	免疫原
R&D社	BAF4519	ヒト	WB、FC	ヤギ	ポリ	アミノ酸 24~530	マウスミエローマ細胞系NS0由来組換えヒトグリピカン-1、Asp24-Ser530 (アクセッション番号P35052)
Bioss社	bs-2426R-Biotin	ヒト、マウス、ラット、イヌ、ウシ、ウマ	WB、ELISA、IHC-P&F	ウサギ	ポリ		未知の免疫原。ビオチンコンジュゲート。
Bioss社	bs-2426-HRP	ヒト、マウス、ラット、イヌ、ウシ、ウマ	WB、ELISA、IHC-P&F	ウサギ	ポリ		未知の免疫原。HRPコンジュゲート。
antibodies-online社	ABIN740102	ヒト、マウス、ラット、イヌ、ウシ、ウマ	WB、ELISA、IHC-P&F	ウサギ	ポリ	C末端	ヒトグリピカン1のC末端由来の合成ペプチド。ビオチンコンジュゲート。
antibodies-online社	ABIN1174125	ヒト	IHC、WB、ELISA	ウサギ	ポリ		未知の免疫原。ビオチンコンジュゲート。
antibodies-online社	ABIN740109	ヒト、マウス、ラット、イヌ、ウシ、ウマ	WB、ELISA、IHC-P&F	ウサギ	ポリ	C末端	ヒトグリピカン1のC末端由来の合成ペプチド。配列情報については問い合わせのこと。HRPコンジュゲート。
antibodies-online社	ABIN653109	ヒト	WB、IHC、FACS、ELISA	ウサギ	ポリ	N末端	ヒトグリピカン-1のN末端領域のアミノ酸12~41にKLHをコンジュゲートした合成ペプチド
antibodies-online社	ABIN952553	ヒト	ELISA、IHC-p、WB、FACS	ウサギ	ポリ	N末端	ヒトグリピカン-1のN末端領域のアミノ酸12~41にKLHをコンジュゲートした合成ペプチド
antibodies-online社	ABIN797896	ヒト	IHC、WB	ウサギ	ポリ	N末端	ヒトGPC1のN末端ドメイン由来の合成ペプチド
antibodies-online社	ABIN347483	マウス、ラット、	IHC、WB	ウサギ	ポリ	N末端	ヒトGPC1のN末端ドメイン由

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

		ヒト					来の合成ペプチド
antibodies-online社	ABIN347484	ヒト	IHC WB ICC ELISA	ウサギ	ポリ	N末端	ヒト GPC1 の N 末端ドメイン由来の合成ペプチド
antibodies-online社	ABIN740100	ヒト、マウス、ラット、イヌ、ウシ、ウマ	WB ELISA IHC-P&F IF	ウサギ	ポリ	C末端	ヒトグリピカン1のC末端由来の合成ペプチド。配列情報については問い合わせのこと。
antibodies-online社	ABIN207433	ヒト	WB ELISA	ウサギ	ポリ	C末端	ヒト GPC1 前駆体のC末端残基に対応する合成ペプチド
antibodies-online社	ABIN964659	ヒト、マウス、ラット	WB ELISA	ウサギ	ポリ	内部領域	ヒト GPC-1 の内部領域に対応する合成ペプチド
antibodies-online社	ABIN349638	ヒト	WB ELISA	ウサギ	ポリ	内部領域	ヒト GPC1 に対応する合成ペプチド
antibodies-online社	ABIN1101824	ヒト	WB ELISA	ウサギ	ポリ	内部領域	ヒト GPC-1 の内部領域に対応する合成ペプチド
antibodies-online社	ABIN595376	ヒト	WB ELISA	ウサギ	ポリ	内部領域	ヒト GPC-1 の内部領域に対応する合成ペプチド
antibodies-online社	ABIN330371	ヒト	WB ELISA	ヤギ	ポリ	アミノ酸 24~530	NS0由来rhグリピカン1のアミノ酸24~530
antibodies-online社	ABIN1479675	ヒト	FACS IHC WB ELISA	ウサギ	ポリ	アミノ酸 12~41	ヒト GPC1 の N 末端領域に KLH をコンジュゲートした合成ペプチド

10

20

30

40

50

【 0 0 6 2 】

本発明のいくつかの態様では、グリピカン - 1 タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体から新たな抗グリピカン - 1 抗体を作製することができる。単なる非限定的な例を挙げれば、第一のセグメント K V N P Q G P G P E (配列番号 6) または K V N P Q G P G P (配列番号 7) を含むグリピカン - 1 エピトープに対して抗グリピカン - 1 抗体を生じさせることができる。エピトープは、第二のセグメント T Q N A R A (配列番号 8) または T Q N A R A F R D (配列番号 9) をさらに含み得る。当業者には、例えば Harlow ら, 1988 に記載されている方法など、抗体の作製に利用可能な方法を多数認識されよう。いくつかの実施形態では、抗グリピカン - 1 抗体の作製に用いるグリピカン - 1 免疫原は、天然のタンパク質の翻訳後修飾 (例えば、フォールディング) を含む。いくつかの実施形態では、グリピカン - 1 免疫原は、シグナルペプチド (配列番号 3) 配列も C 末端プロペプチド (配列番号 4) 配列も含まない。いくつかの実施形態では、グリピカン - 1 免疫原は、ヒト細胞をはじめとする哺乳動物細胞、例えば形質転換マウス NS0 細胞系、野生型 D U - 1 4 5 細胞系をはじめとするグリピカン - 1 発現細胞系などから得られるものである。いくつかの実施形態では、グリピカン - 1 抗原はグリピカン - 1 を発現する細胞であり得る。いくつかの実施形態では、グリピカン - 1 免疫原は、表面にグリ

ピカン - 1 タンパク質を有する細胞全体または細胞部分であり得る。当業者にはこのほか、B o r r e b a e c k ら , 1 9 9 5 ; および米国特許第 7 , 9 6 0 , 5 1 7 号に記載されている方法などの様々な周知の方法によって、遺伝情報から結合フラグメントまたは F a b フラグメントを調製し得ることが理解されよう。

【 0 0 6 3 】

本発明の別の実施形態では、前立腺癌を検出するために、グリピカン - 1 を標的とするポリクローナル抗体を作製し得る。同じく単なる非限定的な例を挙げれば、第一のセグメント K V N P Q G P G P E (配列番号 6) または K V N P Q G P G P (配列番号 7) を含むグリピカン - 1 エピトープを含めた一連のグリピカン - 1 エピトープに対して、グリピカン - 1 を標的とするポリクローナル抗体を生じさせることができる。エピトープは、第二のセグメント T Q N A R A (配列番号 8) または T Q N A R A F R D (配列番号 9) をさらに含み得る。グリピカン - 1 またはグリピカン - 1 のフラグメントに対するポリクローナル抗体の作製には、当該技術分野で公知の様々な方法を用い得る。本発明の一実施形態では、グリピカン - 1 タンパク質またはそのフラグメントを宿主動物に注射し得る。いくつかの実施形態では、宿主動物としては、特に限定されないが、ウサギ、マウス、ラットなどを挙げ得る。いくつかの実施形態では、得られた血清を精製し、ウエスタンブロットティング、E L I S A、免疫蛍光スクリーニング、フローサイトメトリー、蛍光標識細胞分取 (F A C S) などの当該技術分野で周知の技術によって、それがグリピカン - 1 と反応することができるかどうかを試験する。

10

【 0 0 6 4 】

別の実施形態では、前立腺癌を検出するために、グリピカン - 1 に対するモノクローナル抗体 (m A b) を作製し得る。同じく単なる非限定的な例を挙げれば、第一のセグメント K V N P Q G P G P E (配列番号 6) または K V N P Q G P G P (配列番号 7) を含むグリピカン - 1 エピトープに対して、グリピカン - 1 を標的とするモノクローナル抗体を生じさせることができる。エピトープは、第二のセグメント T Q N A R A (配列番号 8) または T Q N A R A F R D (配列番号 9) をさらに含み得る。一実施形態では、ハイブリドーマ技術 (K o h l e r および M i l s t e i n , 1 9 7 5) をはじめとする技術 (C o l e ら , 1 9 8 5 ; または米国特許第 6 , 1 1 6 , 0 1 3 号) により抗グリピカン - 1 抗体を作製する。抗体作製に関するさらなる詳細および例については、米国特許第 7 , 9 8 5 , 5 6 0 号を参照されたい。

20

30

【 0 0 6 5 】

本発明のいくつかの実施形態では、抗グリピカン - 1 抗体により患者の体液または組織中のグリピカン - 1 を検出する。いくつかの実施形態では、患者から採取する体液試料は、血液試料、血清試料、血漿試料または尿試料である。他の実施形態では、患者の組織試料中のグリピカン - 1 を検出する。いくつかの実施形態では、組織試料には、腫瘍生検をはじめとする患者の組織が含まれる。本発明のいくつかの態様では、抗体は、ウエスタンブロット分析、酵素結合免疫測定法 (E L I S A)、蛍光細胞分取もしくは F A C S、免疫蛍光法、放射標識、免疫沈降、免疫組織化学法、イムノブロットティング、化学発光および / または抗体もしくはその他のリガンド、例えばグリピカン - 1 と結合することが可能タンパク質などを用いてタンパク質を検出するその他の既知の技術によりグリピカン - 1 を検出する。いくつかの実施形態では、生物膜試験または米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 1 6 , 7 3 6 号に記載されている a f f i n i t y r i n g t e s t によりグリピカン - 1 を検出する。いくつかの実施形態では、透明な表面 (例えば、ポリカルボナート製スライド) にコートしたグリピカン - 1 結合剤によりグリピカン - 1 を検出する。グリピカン - 1 またはグリピカン - 1 を有する細胞の結合は、吸光度の変化によって検出することができる。いくつかの実施形態では、抗グリピカン - 1 抗体と前記体液試料または組織試料との結合を、抗グリピカン - 1 抗体と 1 つまたは複数のグリピカン - 1 較正標準品との結合と比較し、較正標準品の抗グリピカン - 1 抗体を用いて前記体液試料中のグリピカン - 1 の量を定量化する。一実施形態では、較正標準品は、グリピカン - 1 濃度が既知である 1 つまたは複数の試料を含む。

40

50

【0066】

いくつかの実施形態では、前記体液試料または組織試料とグリピカン - 1 リガンドとを接触させることによりグリピカン - 1 の測定を実施する。いくつかの実施形態では、リガンドは、グリピカン - 1 プロテオグリカンと結合することが可能な抗グリピカン - 1 抗体であり得る。

【0067】

いくつかの実施形態では、患者の組織または体液は、抗グリピカン - 1 リガンドによる検出の前に前処理を必要とし得る。いくつかの実施形態では、前記前処理は、特にヘパリーナーゼ P N G a s e F、N - グリコシダーゼ、アルカリホスファターゼまたはヘパリチナーゼなどの薬剤による処理を含み得る。他の実施形態では、前記前処理は、特に組織溶解、膜精製、血漿もしくは血清分画、細胞精製またはタンパク質精製を含み得る。

10

【0068】

いくつかの実施形態では、患者の体液または組織で測定したグリピカン - 1 のレベルを、癌を有さない患者の体液または組織の対照試料と比較する。他の実施形態では、患者の体液または組織で測定したグリピカン - 1 のレベルを、所定の参照値または参照値の範囲と比較する。他の実施形態では、患者の体液または組織中のグリピカン - 1 のレベルが前立腺腫瘍の大きさまたは進行度の指標となる。

【0069】

いくつかの実施形態では、体液試料または組織試料からのグリピカン - 1 の検出を酵素結合免疫測定法 (E L I S A) により実施する。E L I S A は、比色分析、化学発光および蛍光分析に基づくものを含む。E L I S A は、体組織または血液試料、血清試料および血漿試料などの体液中に少量含まれる薬物はじめとする抗原成分の測定への応用に成功を収めており、当該技術分野で周知のものである。本発明に有用な E L I S A は、抗体およびその誘導体、タンパク質リガンドなどを含めた任意の適切な捕捉試薬および検出可能試薬を用い得る。ある特定の実施形態では、E L I S A は細胞ベースのものである。他の実施形態では、E L I S A は無細胞抗原を検出するものである。いくつかの実施形態では、グリピカン - 1 を含有することが疑われる生体試料を捕捉 (またはコート) 抗体と接触させてインキュベートし、捕捉抗体はグリピカン - 1 を捕捉し、またはこれと結合する。検出段階では、前記グリピカン - 1 と結合し、その標識の検出に基づいてグリピカン - 1 の存在または量を検出するのに用いることができる、検出可能な抗体または検出可能なタンパク質リガンドを使用する。

20

30

【0070】

いくつかの実施形態では、生体試料を、グリピカン - 1 抗体であり得る固定化した捕捉 (またはコート) 試薬と接触させてインキュベートする。この抗体は任意の種のものであり得るが、いくつかの実施形態では、抗体はマウス抗体またはラット抗体である。他の実施形態では、抗体はマウス抗体である。他の実施形態では、抗体はハイブリドーマに由来する。いくつかの実施形態では、グリピカン - 1 抗体は組換え抗体または抗体フラグメントである。固定化は、アッセイ法の前に水不溶性のマトリックスまたは表面に吸着させる (米国特許第 3 , 7 2 0 , 7 6 0 号) か、非共有結合または共有結合 (例えば、米国特許第 3 , 6 4 5 , 8 5 2 号または R o t m a n s ら , 1 9 8 3 に記載されているように、事前に支持体を例えば硝酸および還元剤で活性化させるかどうかを問わず、グルタルアルデヒド架橋もしくはカルボジイミド架橋を用いて) させることによって、あるいは、アッセイ法の後に例えば免疫沈降によって、捕捉試薬を不溶化することにより従来通りに実施する。

40

【0071】

いくつかの実施形態では、固定化に用いる固相は、例えば表面、粒子、多孔性マトリックスなどの形態の支持体を含め、実質的に不水溶性であり免疫測定アッセイに有用な任意の不活性な支持体または担体であり得る。よく用いられる支持体の例としては、小型のシート、S e p h a d e x、ポリ塩化ビニル、プラスチック製ビーズのほか、96 ウェルマイクロタイタープレートを含めたポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレンなどから

50

製造されたアッセイ用のプレートまたは試験管ならびにフィルター紙、アガロース、架橋デキストランをはじめとする多糖類などの粒子性材料が挙げられる。あるいは、米国特許第3,969,287号；同第3,691,016号；同第4,195,128号；同第4,247,642号；同第4,229,537号；および同第4,330,440号に記載されている臭化シアン活性化炭水化物などの反応性不水溶性マトリックスおよび反応性基質が捕捉試薬の固定化に用いるのに適している。一実施形態では、固定化した捕捉試薬をマイクロタイタープレートにコートし、特に、用いる固相は、1回で複数の試料を分析するのに用いることができるマルチウェルマイクロタイタープレート、例えば、Nunc MaxisorbまたはImmulonなどとして販売されているマイクロテスト96ウェルELISAプレートである。ある特定の実施形態では、プレートは、NUNC MAXISORB（商標）またはIMMULON（商標）などとして販売されているMICROTEST（商標）またはMAXISORP（商標）96ウェルELISAプレートである。

10

【0072】

いくつかの実施形態では、所望の非共有結合的もしくは共有結合的相互作用または物理結合によって結合され得る上記の捕捉試薬で固相をコートする。結合させる技術としては、米国特許第4,376,110号およびそこに引用されている参考文献に記載されているものが挙げられる。共有結合的相互作用の場合、プレートをはじめとする固相を捕捉試薬とともに、室温で1時間などの当該技術分野で周知の条件下で架橋剤とインキュベートする。

20

【0073】

他の実施形態では、捕捉試薬を固相基質に結合させるのによく用いられる架橋剤としては、例えば、1,1-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシ-スクシンイミドエステル、例えば4-アジド-サリチル酸とのエステル、3,3'-ジチオビス-(スクシンイミジル-プロピオナート)などのジスクシンイミジルエステルを含めたホモ二官能性イミドエステルおよびビス-N-マレイミド-1,8-オクタンなどの二官能性マレイミドが挙げられる。メチル-3-[(p-アジドフェニル) -ジチオ] プロピオイミダートなどの誘導体化剤により、光の存在下で架橋を形成することが可能な光活性化中間体を得られる。

【0074】

いくつかの実施形態では、96ウェルプレートを用いる。いくつかの実施形態では、96ウェルプレートを捕捉試薬でコートする(通常、約8~12、約9~10または約9.6のpH、約4~20または約4~8の温度で少なくとも約10時間、より好ましくは一晩インキュベートすることにより、0.05M炭酸ナトリウムなどの緩衝液で希釈する)。さらに短時間のコーティングが望まれる場合、いくつかの実施形態では、プレートをコートする時間をさらに短く、例えば室温で2時間以下にすることができる。いくつかの実施形態では、アッセイそのものにかなり先立ってプレートを積み上げコートしてもよく、次いで、手動、半手動または自動で、例えばロボットの使用などにより、複数の試料で同時にアッセイを実施することができる。

30

【0075】

いくつかの実施形態では、コートしたプレートを結合部位と非特異的に結合し飽和するブロッキング剤で処理して、遊離リガンドがプレートのウェル上の過剰な部位と不必要に結合するのを防ぐことができる。この目的に適したブロッキング剤の非限定的な例としては、例えば、ゼラチン、ウシ血清アルブミン、卵アルブミン、カゼインおよび脱脂乳が挙げられる。いくつかの実施形態では、ブロッキング処理を周囲温度、約1~4時間の条件下で実施することができる。他の実施形態では、ブロッキングを1~3時間以下の時間にわたって実施することができる。他の実施形態では、ブロッキングを0~4で一晩実施することができる。

40

【0076】

いくつかの実施形態では、分析するグリピカン-1標準品(例えば、精製グリピカン-

50

1タンパク質)または生体試料を適宜希釈して固定化相に加える。いくつかの実施形態では、希釈率は約1~15体積%である。いくつかの実施形態では、グリピカン-1タンパク質標準品は、天然のタンパク質の翻訳後修飾を含む。いくつかの実施形態では、グリピカン-1タンパク質標準品は、ヒト細胞をはじめとする哺乳動物細胞、例えば形質転換NS0細胞系、野生型DU-145細胞系をはじめとするグリピカン-1発現細胞系などから得られるものである。他の実施形態では、グリピカン-1タンパク質は、体液または組織から精製されるものであり得る。いくつかの実施形態では、グリピカン-1標準品は、グリピカン-1検出抗体またはリガンドによって検出される部分的グリピカン-1ペプチドをはじめとするエピトープである。いくつかの実施形態では、標準品はグリピカン-1を発現する細胞であり得る。いくつかの実施形態では、希釈率は約10体積%である。この目的で希釈に使用し得る緩衝液の非限定的なグループとしては、(a)0.5%BSA、0.05%TWEEN20(商標)界面活性剤(P20)、0.05%PROCLIN(商標)300抗生物質、5mMEDTA、0.25%CHAPS界面活性剤、0.2%ウシ-グロブリンおよび0.35MNaClを含有するpH7.4のPBS;(b)0.5%ウシ血清アルブミン、0.05%ポリソルベート20、5mMEDTA、0.25%CHAPS、0.2%ウシ-グロブリンおよび0.35MNaClを含有するpH7.4のPBS(c)0.5%BSA、0.05%ポリソルベート20(P20)および0.05%PROCLIN(商標)300を含有するpH7のPBS;(d)0.5%BSA、0.05%P20、0.05%PROCLIN(商標)300、5mMEDTAおよび0.35MNaClを含有するpH6.35のPBS;(e)0.5%BSA、0.05%P20、0.05%PROCLIN(商標)300、5mMEDTA、0.2%ウシ-グロブリンおよび0.35MNaClを含有するpH7.4のPBS;ならびに(f)0.5%BSA、0.05%P20、0.05%PROCLIN(商標)300、5mMEDTA、0.25%CHAPSおよび0.35MNaClを含有するpH7.4のPBSが挙げられる。PROCLIN(商標)300は保存剤として作用し、TWEEN20(商標)は非特異的結合を排除する界面活性剤として作用する。

10

20

30

40

50

【0077】

捕捉試薬の濃度は一般に、生体試料を希釈する必要があるればそれを考慮に入れたうえで、目的とするグリピカン-1の濃度範囲によって決定されるが、捕捉試薬の最終濃度は通常、目的とする範囲にわたってアッセイの感度が最大になるよう実験的に決定される。

【0078】

試料と、固定化した捕捉試薬とのインキュベーションの条件は、アッセイの感度が最大になり、解離が最小限に抑えられるよう選択する。いくつかの実施形態では、約0~約40の範囲のかなり一定した温度でインキュベーションを実施する。他の実施形態では、約20~25でインキュベーションを実施する。インキュベーションの時間は主として温度によって決まり、一般には、感度の低いアッセイになるのを避けるため、約10時間以内である。いくつかの実施形態では、インキュベーション時間は約0.5~3時間である。他の実施形態では、インキュベーションは、遊離グリピカン-1と捕捉試薬との結合を最大にするため、室温で約1.5~3時間以内である。生体液中のプロテアーゼがグリピカン-1を分解するのを防ぐためにプロテアーゼ阻害剤を加える場合、インキュベーションの持続時間は長くなり得る。

【0079】

いくつかの実施形態では、検出方法は競合ELISA法である。いくつかの実施形態では、インキュベーション段階は、未結合で未標識の抗体の添加を含む。いくつかの実施形態では、既知の濃度の未標識抗体が遊離グリピカン-1抗原と結合し、同抗原がプレート上に固定化されるのを妨げる。いくつかの実施形態では、インキュベーション段階は、濃度既知の標識グリピカン-1タンパク質の添加を含む。いくつかの実施形態では、体液試料または組織試料中のグリピカン-1の量を、混合した標識グリピカン-1タンパク質の結合の減少として検出する。他の実施形態では、ELISAはサンドイッチELISA法である。

【0080】

この段階では、インキュベーション混合物のpHは通常、約4～9.5の範囲内にある。他の実施形態では、pHの範囲は約6～9である。さらに別の実施形態では、pHの範囲は約7～8である。別の実施形態では、アッセイ(ELISA)希釈液のpHはpH7.4である。インキュベーション緩衝液のpHは、捕捉試薬と、捕捉されるグリピカン-1との特異的結合が相当レベルに維持されるよう選択する。この段階で所望のpHを達成し維持するのに、ホウ酸塩、リン酸塩、炭酸塩、トリス-HClまたはトリスリン酸塩、酢酸塩、バルビタールなどを含めた様々な緩衝液を用い得る。特定の緩衝液を用いることが本発明に極めて重要であるというわけではないが、個々のアッセイで、ある緩衝液が別の緩衝液よりも好ましいものであり得る。

10

【0081】

いくつかの実施形態では、固定化した捕捉試薬から生体試料を(好ましくは洗浄によって)分離して、未捕捉分子を除去する。洗浄に使用する溶液は一般に、インキュベーション段階について上に記載した考慮事項および緩衝液を用いてpHを決定した緩衝液(「洗浄緩衝液」)である。一実施形態では、洗浄緩衝液のpHの範囲は約6～9である。洗浄は1回実施しても複数回実施してもよい。洗浄温度は一般に、冷蔵庫の温度から中程度の温度、通常約0～40であり、アッセイを実施する間は一定温度を維持する。他の実施形態では、洗浄温度は約4～30である。例えば、洗浄前に洗浄緩衝液を貯蔵所に4で水中に置くことができ、この段階にプレート洗浄機を用いることができる。ほかにも、捕捉されたグリピカン-1が次の段階である程度解離し得ることが懸念される場合、この段階で架橋剤をはじめとする適切な薬剤を添加して、新たに結合したグリピカン-1と捕捉試薬とを共有結合させ得る。

20

【0082】

いくつかの実施形態では、固定化した捕捉試薬と検出可能な抗体とを接触させる。いくつかの実施形態では、検出可能な抗体は抗グリピカン-1抗体である。いくつかの実施形態では、抗グリピカン-1抗体はMIL-38である。他の実施形態では、抗体は表2に記載されているものである。他の実施形態では、検出可能な抗体は、グリピカン-1を検出することが可能な任意の抗体である。検出可能な抗体は、固定化したグリピカン-1と約20～40の温度で接触させる。他の実施形態では、検出可能な抗体を約20～25で接触させ、接触させる正確な温度および時間はともに主として、用いる検出手段によって決まる。例えば、ストレパタビジン(streptavidin)-ペルオキシダーゼおよび3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンを検出手段として用いる場合、例えば、一実施形態では、シグナルを最大限が増幅されるよう接触を(例えば、約1時間以上)実施する。いくつかの実施形態では、プレート洗浄後、予想される遊離グリピカン-1の最大濃度に対してモル過剰の抗体またはリガンドをプレートに添加する。この抗体は直接的または間接的に検出可能なものである。検出可能な抗体はポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよく、例えば、ある特定の実施形態では、それはモノクローナル抗体であり、一実施形態ではマウス抗体であり、一実施形態ではMIL-38である。ほかにも、検出可能な抗体は直接的に検出可能なものであり得、一実施形態では比色分析標識を有し、別の実施形態では蛍光分析標識を有する。他の実施形態では、検出可能な抗体をビオチン化し、検出手段はアビジンまたはストレプトアビジン-ペルオキシダーゼおよび3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンである。いくつかの実施形態では、検出可能な抗体をビオチン-アビジン増幅系、化学発光系、マイクロスフェアまたはコロイド金で標識し得る。検出手段の読取りは、特に蛍光分析または比色分析であり得る。抗体の親和性は、少量の遊離グリピカン-1でも検出されるのに十分なものでなければならない。

30

40

【0083】

いくつかの実施形態では、検出可能な抗体を検出する手段を用いて、捕捉試薬と結合したグリピカン-1を測定する。体液試料または組織試料が患者由来のものであれば、測定段階は、上記段階の結果として起こる反応と標準曲線とを比較して、前記体液試料または

50

組織試料中のグリピカン - 1 のレベルを求めることを含む。他の実施形態では、上記段階の結果として起こる反応と、年齢が一致し癌がない個体の体液または組織などの対照体液試料または組織試料を用いた同様の反応とを比較する。

【0084】

他のグリピカン - 1 検出の実施形態では、患者の体液中のグリピカン - 1 をウエスタンブロット分析により検出する。いくつかの実施形態では、このアッセイは、電気泳動を用いて複雑な試料中のタンパク質を分離するものである。他の実施形態では、電気泳動をドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル (SDS - PAGE としてよく知られる) などのサイズ排除ゲルで実施する。一実施形態では、次いで、分離されたタンパク質を膜に転写する。当業者には、ウエスタンブロットに使用することができる材料には様々なものがあることが認識されよう。いくつかの実施形態では、膜はニトロセルロース製またはポリフッ化ビニリデン (PVDF) 製である。いくつかの実施形態では、膜でもゲルと同じタンパク質の分離パターンが保持されるように、タンパク質転写ボックス内で転写を実施する。いくつかの実施形態では、次いで、希釈したタンパク質溶液中、例えば脱脂粉乳またはウシ血清アルブミン (BSA) 溶液中で膜をインキュベートして、非特異的結合部位をブロックする。次いで、ブロックした膜をグリピカン - 1 標的タンパク質に特異的な一次抗体とインキュベートすることができる。いくつかの実施形態では、次いで膜を洗浄し、第一の抗体を標的とする二次抗体とインキュベートする。いくつかの実施形態では、第一または第二の抗体が容易に検出されるように、これを検出可能な標識とコンジュゲートする。いくつかの実施形態では、標識としては、蛍光標識、化学発光標識、放射標識または当該技術分野で周知の別の標識が挙げられる。いくつかの実施形態では、二次リガンドとコンジュゲートする前記標識は、放射標識、蛍光標識、ビオチン - アビジン増幅系、化学発光系、マイクロスフェアおよびコロイド金からなる群より選択される。

10

20

【0085】

任意選択で、本発明のいくつかの態様は、使用者が試料中に標的タンパク質が存在するかどうかを判定した後、膜から一次抗体および (任意選択の) 二次抗体を取り除くことができ、その膜を同じタンパク質または別のタンパク質に特異的な別の一次抗体とインキュベートすることができることを教示する。いくつかの実施形態では、第二のタンパク質を負荷対照として使用し得る。他の実施形態では、第二のタンパク質は、患者の健康状態の別のマーカーである。

30

【0086】

一実施形態では、グリピカン - 1 をフローサイトメトリーにより検出する。いくつかの実施形態では、患者の体液または組織中の細胞の表面にあるグリピカン - 1 を検出する。本発明のある特定の態様では、フローサイトメトリーによるグリピカン - 1 の検出を以下に概説する通りに実施し得る。いくつかの実施形態では、体液または組織由来の細胞を精製する。細胞の精製は中和段階を含み得る。いくつかの実施形態では、中和段階は、細胞を中和緩衝液中で保管することを含む。中和緩衝液は、 $0.2\text{ M NaH}_2\text{PO}_4$ 39 ml と $0.2\text{ M Na}_2\text{HPO}_4$ 61 ml とを混合し、水を加えて 200 ml にすることにより作製することができる。いくつかの実施形態では、細胞を遠心分離し、異なる溶液中で再懸濁させる。他の実施形態では、細胞を精製せずに保管する。いくつかの実施形態では、細胞を C y t o L y t 溶液中で再懸濁または洗浄する。他の実施形態では、細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で再懸濁または洗浄する。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液を塩化アンモニウムで処理して赤血球を溶解させる。いくつかの実施形態では、細胞をスライド上に固定する。他の実施形態では、細胞は遊離したままである。いくつかの実施形態では、細胞と、一次抗グリピカン - 1 抗体をはじめとするリガンドとを接触させる。いくつかの実施形態では、一次抗体は M I L - 38 である。いくつかの実施形態では、一次抗体は M I L - 38 ではない。他の実施形態では、一次抗体は他の任意の抗グリピカン - 1 抗体 (表 2) である。ある特定の実施形態では、さらに細胞と、検出標識とコンジュゲートした二次検出抗体とを接触させる。別の実施形態では、一次抗体が検出標識とコンジュゲートされている場合、抗原は一次抗体によって直接検出され得る。特定の場

40

50

合には、グリピカン - 1 抗体で標識することに加えて、細胞が識別可能なように、特に限定されないが、ある細胞型と別の細胞型とを識別する細胞表面マーカーに対する抗体を含めた他のプローブで標識し得る。いくつかの態様では、他のプローブを用いて、シグナルまたは総細胞計数值を正規化し得る。いくつかの実施形態では、他のプローブは細胞内抗原を標識するものである。他の実施形態では、他のプローブは細胞外抗原を標識するものである。標識した後、標識細胞を FACS フローサイトメトリーにより単離し得る。いくつかの実施形態では、FACS 機器により標識細胞を 1 個ずつ (すなわち、単一細胞として) 単離し得る。他の実施形態では、標識細胞を混合集団として単離し、次いで FACS 後に単一細胞に希釈し得る。いくつかの実施形態では、二次標識は色素であり得る。いくつかの実施形態では、色素標識は DAPI である。いくつかの実施形態では、DAPI 標識を用いて試料中の細胞数を定量化する。

10

【0087】

細胞を複数の異なる標識で標識する実施形態では、複数の異なる特性を用いて細胞を選別し得る。例えば、細胞を最初にあるプローブによって選別し、次いで別のプローブによって選別し得る。いくつかの実施形態では、細胞を最初に細胞型によって選別し、のちにグリピカン - 1 濃度によって選別することができる。これと同じようにして、プローブおよび FACS 機器による検出とともに計画した任意の順序で細胞を選別し得る。蛍光標識細胞分取の一般的原理については、単細胞懸濁液を作製することができる方法、例えば蛍光標識プローブを用いて細胞を標識することができる方法、細胞を互いに分離することができる方法のほか、フローセル、試薬およびコンピュータ制御システムを含めたフローサイトメトリーに用いることができるハードウェアを含め、公知であり、特に限定されないが：Orfaora, 1996; Johnsonら, 2007; Tungら, 2007; および Dainiakら, 2007 を含めた様々な刊行物で概説されている。

20

【0088】

本発明はほかに、患者の体液または組織中のグリピカン - 1 を検出するキットを含む。一実施形態では、癌を検出するキットは、本願に記載される検出アッセイのいずれかを実施するのに必要な材料を含む。いくつかの実施形態では、癌を検出するキットは、第一の抗グリピカン - 1 抗体をはじめとするリガンドと、薬学的に許容される担体と、グリピカン - 1 標準品とを含み；前記キットは患者の体液または組織中のグリピカン - 1 を検出することが可能である。第一の抗グリピカン - 1 抗体は、MIL - 38 であっても MIL - 38 でなくてもよい。第一の抗グリピカン - 1 抗体は、配列番号 10 の位置 50 ~ 54 によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域 1 (CDR1)；配列番号 10 の位置 69 ~ 85 によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域 2 (CDR2)；配列番号 10 の位置 118 ~ 126 によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域 3 (CDR3) を含む、重鎖可変領域を含み；配列番号 11 の位置 44 ~ 54 によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域 1 (CDR1)；配列番号 11 の位置 70 ~ 76 によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域 2 (CDR2)；配列番号 11 の位置 109 ~ 117 によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域 3 (CDR3) を含む、軽鎖可変領域を含むものであり得る。グリピカン - 1 レベルの検出に用いる抗グリピカン - 1 抗体は、配列番号 12 の位置 48 ~ 58 によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域 1 (CDR1)；配列番号 12 の位置 74 ~ 80 によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域 2 (CDR2)；および配列番号 12 の位置 113 ~ 121 によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域 3 (CDR3) を含む、軽鎖可変領域を含まないものであり得る。第一の抗グリピカン - 1 抗体は、2014 年 8 月 22 日、Cell Bank Australia (CBA) にアクセッション番号 CBA20140026 の下で寄託されたハイブリドーマ細胞によって産生されるものであるが、同細胞によって生成される抗体と同一のものであり得る。

30

40

【0089】

50

いくつかの実施形態では、キットは、ほかにも標準的な実験用のツールまたは機械の使用を必要とする。いくつかの実施形態では、必要なツールとしては、当業者に公知のピペット、細胞選別機、プレートリーダー、遠心分離機などが挙げられる。いくつかの実施形態では、キットの使用には、ほかにも当業者に周知のピペットチップ、膜、緩衝液または化学薬品物質などの標準的な実験試薬が必要とされ得る。いくつかの実施形態では、キットは二次リガンドをさらに含む。いくつかの実施形態では、二次リガンドは第二の抗グリピカン - 1 抗体である。一実施形態では、第二の抗グリピカン抗体は第一の抗グリピカン - 1 抗体と同じものである。いくつかの実施形態では、二次リガンドを迅速に検出するため、二次リガンドが標識とコンジュゲートされている。いくつかの実施形態では、キットの抗体は、本願に記載される抗体フラグメントまたは抗体の組合せであり得る。

10

【0090】

いくつかの実施形態では、患者の体液または組織中のグリピカン - 1 の検出が前立腺癌の存在を示す。いくつかの実施形態では、患者の体液中にグリピカン - 1 が 1 pg / ml、2 pg / ml、3 pg / ml、4 pg / ml、5 pg / ml、6 pg / ml、7 pg / ml、8 pg / ml、9 pg / ml、10 pg / ml、11 pg / ml、12 pg / ml、13 pg / ml、14 pg / ml、15 pg / ml、16 pg / ml、17 pg / ml、18 pg / ml、19 pg / ml、20 pg / ml、21 pg / ml、22 pg / ml、23 pg / ml、24 pg / ml、25 pg / ml、26 pg / ml、27 pg / ml、28 pg / ml、29 pg / ml、30 pg / ml、31 pg / ml、32 pg / ml、33 pg / ml、34 pg / ml、35 pg / ml、36 pg / ml、37 pg / ml、38 pg / ml、39 pg / ml、40 pg / ml、41 pg / ml、42 pg / ml、43 pg / ml、44 pg / ml、45 pg / ml、46 pg / ml、47 pg / ml、48 pg / ml、49 pg / ml、50 pg / ml、51 pg / ml、53 pg / ml、54 pg / ml、55 pg / ml、56 pg / ml、57 pg / ml、58 pg / ml、59 pg / ml、60 pg / ml、61 pg / ml、62 pg / ml、63 pg / ml、64 pg / ml、65 pg / ml、66 pg / ml、67 pg / ml、68 pg / ml、69 pg / ml、70 pg / ml、71 pg / ml、72 pg / ml、73 pg / ml、74 pg / ml、75 pg / ml、76 pg / ml、77 pg / ml、78 pg / ml、79 pg / ml、80 pg / ml、81 pg / ml、82 pg / ml、83 pg / ml、84 pg / ml、85 pg / ml、86 pg / ml、87 pg / ml、88 pg / ml、89 pg / ml、90 pg / ml、91 pg / ml、92 pg / ml、93 pg / ml、94 pg / ml、95 pg / ml、96 pg / ml、97 pg / ml、98 pg / ml、99 pg / ml、100 pg / ml、110 pg / ml、120 pg / ml、130 pg / ml、140 pg / ml、150 pg / ml、160 pg / ml、170 pg / ml、180 pg / ml、190 pg / ml、200 pg / ml、210 pg / ml、220 pg / ml、230 pg / ml、240 pg / ml、250 pg / ml、260 pg / ml、270 pg / ml、280 pg / ml、290 pg / ml、300 pg / ml、310 pg / ml、320 pg / ml、330 pg / ml、340 pg / ml、350 pg / ml、360 pg / ml、370 pg / ml、380 pg / ml、390 pg / ml、400 pg / ml、410 pg / ml、420 pg / ml、430 pg / ml、440 pg / ml、450 pg / ml、460 pg / ml、470 pg / ml、480 pg / ml、490 pg / ml、500 pg / ml、600 pg / ml、700 pg / ml、800 pg / ml、900 pg / ml、1000 pg / ml 存在すれば、前立腺癌があることを示す。

20

30

40

【0091】

いくつかの実施形態では、患者の体液または組織中のグリピカン - 1 の検出が前立腺癌の存在を示す。いくつかの実施形態では、患者の体液中にグリピカン - 1 が 1 ng / ml、2 ng / ml、3 ng / ml、4 ng / ml、5 ng / ml、6 ng / ml、7 ng / ml、8 ng / ml、9 ng / ml、10 ng / ml、11 ng / ml、12 ng / ml、13 ng / ml、14 ng / ml、15 ng / ml、16 ng / ml、17 ng / ml

50

、 18 ng / ml、 19 ng / ml、 20 ng / ml、 21 ng / ml、 22 ng / ml
 、 23 ng / ml、 24 ng / ml、 25 ng / ml、 26 ng / ml、 27 ng / ml
 、 28 ng / ml、 29 ng / ml、 30 ng / ml、 31 ng / ml、 32 ng / ml
 、 33 ng / ml、 34 ng / ml、 35 ng / ml、 36 ng / ml、 37 ng / ml
 、 38 ng / ml、 39 ng / ml、 40 ng / ml、 41 ng / ml、 42 ng / ml
 、 43 ng / ml、 44 ng / ml、 45 ng / ml、 46 ng / ml、 47 ng / ml
 、 48 ng / ml、 49 ng / ml、 50 ng / ml、 51 ng / ml、 53 ng / ml
 、 54 ng / ml、 55 ng / ml、 56 ng / ml、 57 ng / ml、 58 ng / ml
 、 59 ng / ml、 60 ng / ml、 61 ng / ml、 62 ng / ml、 63 ng / ml
 、 64 ng / ml、 65 ng / ml、 66 ng / ml、 67 ng / ml、 68 ng / ml
 、 69 ng / ml、 70 ng / ml、 71 ng / ml、 72 ng / ml、 73 ng / ml
 、 74 ng / ml、 75 ng / ml、 76 ng / ml、 77 ng / ml、 78 ng / ml
 、 79 ng / ml、 80 ng / ml、 81 ng / ml、 82 ng / ml、 83 ng / ml
 、 84 ng / ml、 85 ng / ml、 86 ng / ml、 87 ng / ml、 88 ng / ml
 、 89 ng / ml、 90 ng / ml、 91 ng / ml、 92 ng / ml、 93 ng / ml
 、 94 ng / ml、 95 ng / ml、 96 ng / ml、 97 ng / ml、 98 ng / ml
 、 99 ng / ml、 100 ng / ml、 110 ng / ml、 120 ng / ml、 130 ng / ml
 g / ml、 140 ng / ml、 150 ng / ml、 160 ng / ml、 170 ng / ml
 、 180 ng / ml、 190 ng / ml、 200 ng / ml、 210 ng / ml、 220
 ng / ml、 230 ng / ml、 240 ng / ml、 250 ng / ml、 260 ng / ml
 1、 270 ng / ml、 280 ng / ml、 290 ng / ml、 300 ng / ml、 31
 0 ng / ml、 320 ng / ml、 330 ng / ml、 340 ng / ml、 350 ng /
 ml、 360 ng / ml、 370 ng / ml、 380 ng / ml、 390 ng / ml、 4
 00 ng / ml、 410 ng / ml、 420 ng / ml、 430 ng / ml、 440 ng
 / ml、 450 ng / ml、 460 ng / ml、 470 ng / ml、 480 ng / ml、
 490 ng / ml、 500 ng / ml、 600 ng / ml、 700 ng / ml、 800 n
 g / ml、 900 ng / ml、 1000 ng / ml 存在すれば、前立腺癌があることを示
 す。

10

20

【0092】

いくつかの実施形態では、患者の体液または組織中のグリピカン - 1 の検出が前立腺癌
 の存在を示す。いくつかの実施形態では、患者の体液または組織中にグリピカン - 1 が 1
 μg / ml、 2 μg / ml、 3 μg / ml、 4 μg / ml、 5 μg / ml、 6 μg / ml
 、 7 μg / ml、 8 μg / ml、 9 μg / ml、 10 μg / ml、 11 μg / ml、 12
 μg / ml、 13 μg / ml、 14 μg / ml、 15 μg / ml、 16 μg / ml、 17
 μg / ml、 18 μg / ml、 19 μg / ml、 20 μg / ml、 21 μg / ml、 22
 μg / ml、 23 μg / ml、 24 μg / ml、 25 μg / ml、 26 μg / ml、 27
 μg / ml、 28 μg / ml、 29 μg / ml、 30 μg / ml、 31 μg / ml、 32
 μg / ml、 33 μg / ml、 34 μg / ml、 35 μg / ml、 36 μg / ml、 37
 μg / ml、 38 μg / ml、 39 μg / ml、 40 μg / ml、 41 μg / ml、 42
 μg / ml、 43 μg / ml、 44 μg / ml、 45 μg / ml、 46 μg / ml、 47
 μg / ml、 48 μg / ml、 49 μg / ml、 50 μg / ml 存在すれば、前立腺癌が
 あることを示す。

30

40

【0093】

いくつかの実施形態では、患者の体液または組織中のグリピカン - 1 のレベルまたはグ
 リピカン - 1 検出シグナルが上昇していれば、前立腺癌があることを示す。いくつかの場
 合には、癌患者のグリピカン - 1 レベルは、対照非癌性体液または組織のグリピカン - 1
 レベルまたはグリピカン - 1 検出シグナルよりも 1 %、 2 %、 3 %、 4 %、 5 %、 6 %、 7
 %、 8 %、 9 %、 10 %、 11 %、 12 %、 13 %、 14 %、 15 %、 16 %、 17 %、
 18 %、 19 %、 20 %、 21 %、 22 %、 23 %、 24 %、 25 %、 26 %、 27 %、
 28 %、 29 %、 30 %、 31 %、 32 %、 33 %、 34 %、 35 %、 36 %、 37 %、

50

38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、210%、220%、230%、240%、250%、260%、270%、280%、290%、300%、310%、320%、330%、340%、350%、360%、370%、380%、390%、400%、410%、420%、430%、440%、450%、460%、470%、480%、490%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%、5,000%、10,000%、15,000%超高い。いくつかの実施形態では、対照非癌性体液または組織は患者と年齢が一致するものである。

10

20

30

40

50

【0094】

実施例

実施例1．細胞と結合したMIL-38抗原の特徴付け。

MIL-38抗原は最初、30kDタンパク質として報告された(Russellら, 2004)が、本発明者らの研究では、MIL-38抗体が、様々な細胞抽出物中の主として60kDa抗原を検出することが示された。ウエスタンブロットでは、ゲル電気泳動の前に試料を還元剤とインキュベートすると、MIL-38の抗原との反応性が失われる。

【0095】

MIL-38抗体を免疫沈降実験に用いて、様々な細胞抽出物から60kDaタンパク質を特異的に単離することができた。生細胞の免疫沈降を用いて、細胞表面上の60kDa抗原の存在を検討した。この実験では、生細胞をMIL-38抗体を含有する無血清培地と氷上でインキュベートした。次いで細胞を洗浄し、可溶化液を調製し、タンパク質Gビーズとインキュベートして、細胞と結合したあらゆる抗体を単離した。免疫沈降物には60kDaバンドが認められ、培地中のMIL-38によって抗原が細胞表面上に認識されることが示された。

【0096】

実施例2．MIL-38抗原の免疫沈降および質量分析。

DU-145前立腺癌細胞を膜タンパク質抽出キット(MPEK)で処理した。磁気ビーズと架橋したMIL-38により膜抽出物を免疫沈降させた。免疫沈降物をゲルで泳動して切り取り、質量分析に供するか、ビーズから直接溶離させてから質量分析に供した。次いで、質量/電荷のデータに基づいてペプチドを同定することができる質量分析により、MIL-38抗体と結合した抗原を分析した。

【0097】

質量分析計により、ペプチドスコア4278および18の異なる配列を含む配列カバレッジ46%でグリピカン-1が同定された(図1)。

【0098】

実施例3．MIL-38抗原の免疫沈降、サイズ排除クロマトグラフィーおよび質量分析。DU-145前立腺癌細胞を膜タンパク質抽出キット(MPEK)で処理した。磁気ビーズと架橋したMIL-38により膜抽出物を免疫沈降させた。十分に洗浄した後、免疫沈降物を2%SDS含有TBS(トリス緩衝生理食塩水)中に溶出させた。溶出物をサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)に供し、1つ置き画分にアセトン沈殿を実施し、試料負荷緩衝液に再懸濁させ、MIL-38のウエスタンブロットに用いた。画分28および30に大量のMIL-38抗原が含まれている(図2)ことから、画分29にもMIL-38抗原が高濃度で含まれていることが示唆された。画分29をマスマス解析に供し、配列カバレッジ14%でグリピカン-1が同定された(図3)。これにより、

M I L - 3 8 抗体の抗原がグリピカン - 1 であることが重ねて確認された。

【 0 0 9 9 】

実施例 4 . M I L - 3 8 抗体と抗グリピカン - 1 (抗 G P C - 1) 抗体は二次元ウエスタンブロットで反応性の重複を示す。

ウサギ抗 G P C - 1 抗体を購入し、M I L - 3 8 により検出される分子量と同じ約 6 0 k D a の分子量のグリピカン - 1 コアタンパク質と反応することが明らかになった。M I L - 3 8 がグリピカン - 1 を認識したことを確認するため、前立腺癌 D U - 1 4 5 の M P E K 抽出物を二次元電気泳動およびウエスタンブロット法に供した。

【 0 1 0 0 】

図 4 に示されるように、M I L - 3 8 抗体と抗 G P C - 1 抗体は反応性の重複を示し、分子量が 6 0 k D a 、等電点の範囲が 5 ~ 7 のタンパク質を検出した。

10

【 0 1 0 1 】

実施例 5 . M I L - 3 8 は抗 G P C - 1 免疫沈降物中に検出され、逆も同様である。

M I L - 3 8 抗体またはウサギ抗 G P C - 1 抗体を用いて、その反応性抗原を D U - 1 4 5 または C 3 (M I L - 3 8 陰性) の M P E K 抽出物から免疫沈降させた。免疫沈降物 (I P) に M I L - 3 8 抗体または抗 G P C - 1 抗体のいずれかを用いてウエスタンブロットを実施した (図 5) 。

【 0 1 0 2 】

抗 G P C - 1 とブロットした M I L - 3 8 の I P には 6 0 k D a の G P C - 1 反応性のバンドが検出されたのに対し、M I L - 3 8 とブロットした抗 G P C - 1 の I P には 6 0 k D a の M I L - 3 8 反応性のバンドが検出された。二次抗体単独の対照では反応性は検出されなかった。さらに、M I L - 3 8 抗体で免疫沈降させたところ、M I L - 3 8 抗原および抗 G P C - 1 抗原はともにほぼ完全に枯渇し、M I L - 3 8 抗原がグリピカン - 1 であることが強く示唆された。

20

【 0 1 0 3 】

実施例 6 . M I L - 3 8 は組換え G P C - 1 を検出する。

精製組換えグリピカン - 1 の 2 つの入手源について、M I L - 3 8 抗体および抗 G P C - 1 抗体との反応性を試験した。第一の入手源はコムギ胚芽抽出物から作製された短縮型のものである (これにはしかるべき哺乳動物の翻訳後修飾が含まれていなかったことに留意されたい) 。第二の入手源はマウス N S 0 細胞により産生された完全長グリピカン - 1 である。コムギ胚芽発現グリピカン - 1 は M I L - 3 8 との反応性が全く認められなかったが、ウサギ抗 G P C - 1 抗体により検出することができた (データ不掲載) 。これに対し、N S 0 細胞で産生されたグリピカン - 1 には M I L - 3 8 抗体および抗 G P C - 1 抗体との極めて強い反応性が認められた (図 6) 。

30

【 0 1 0 4 】

実施例 7 . M I L - 3 8 は細胞培養上清中に分泌された抗原を検出することができる。

これまで、M I L - 3 8 抗原の分泌を示す実験的証拠は得られていない。このことを検討するため、D U - 1 4 5 細胞を無血清培地で洗浄した後、無血清培地で 3 6 時間インキュベートした。得られた馴化培地を M I L - 3 8 で免疫沈降させ、得られた試料を D U - 1 4 5 の M P E K 抽出物の標準 I P と比較した。馴化培地 I P には、D U - 1 4 5 抽出物から単離された 6 0 k D a バンドに対して、約 4 0 k D a バンドおよび 5 5 k D a バンドが認められた (図 7) 。

40

【 0 1 0 5 】

4 0 k D バンドおよび 5 5 k D バンドを含有する馴化培地 I P 試料をマスマス解析に供した。グリピカン - 1 (配列番号 2) が 1 6 % のペプチドカバレッジで同定された (図 8 a) 。4 0 k D バンドのみ (図 8 b) または 5 5 k D バンドのみ (図 8 c) を別々に分析したところ、ともにグリピカン - 1 ペプチド (配列番号 2) であると同定された。

【 0 1 0 6 】

以上の結果は、D U - 1 4 5 前立腺癌細胞系から M I L - 3 8 反応型のグリピカン - 1 が細胞培養上清中に放出され得ることを示唆している。

50

【0107】

実施例8．M I L - 3 8により前立腺癌患者の前立腺癌血漿試料中および膜抽出物中にG P C - 1を検出することができる。

これまで、正常患者でも前立腺癌患者でも血漿試料中にM I L - 3 8抗原の分泌を示す実験的証拠は得られていない。このことを検討するため、正常患者1例(042)および前立腺癌患者1例(046)の血漿試料をM I L - 3 8抗体で免疫沈降させ、I P試料にM I L - 3 8抗体および抗G P C - 1抗体を用いてウエスタンブロットを実施した(図9a)。

【0108】

両抗体とも、2種類の血漿試料に約70kDaの特異的バンドが検出された。M I L - 3 8抗体および抗G P C - 1抗体ともに、前立腺癌患者の血漿の方が正常患者の血漿よりもシグナルが著明に強く(バンドの色が濃く)、この可溶性のグリピカン-1は前立腺癌患者で上昇し得ることが示唆された。

10

【0109】

正常前立腺および前立腺癌の膜タンパク質抽出物にM I L - 3 8抗原が検出されるかどうかを明らかにするため、それぞれの試料を1例ずつNovus Bio社から入手した。等量のタンパク質にM I L - 3 8抗体を用いてウエスタンブロットを実施した(図9b)。前立腺癌抽出物の方が正常前立腺試料よりもM I L - 3 8抗原の発現量のはるかに多いことが示された。

【0110】

実施例9．患者尿中のM I L - 3 8抗原の検出。
M I L - 3 8は前立腺癌患者の尿中の細胞を検出することができる。この検出方法の感度および特異性を試験するため、年齢が一致した尿試料125例を入手した。尿から細胞を遠心沈殿させ、M I L - 3 8間接免疫蛍光アッセイにより分析した。合計で健常対照47例、良性前立腺肥大(BPH)37例および生検で確認された前立腺癌41例を分析した。陽性前立腺癌細胞、DU-145陽性対照およびC3陰性細胞の例を示す(図10)。

20

【0111】

M I L - 3 8免疫蛍光アッセイ(IFA)検査では、コホート内での前立腺癌の識別は感度が71%、特異性が73%であることが示された。この試験から、前立腺癌の識別はBPH患者に比して感度が71%、特異性が76%であることが明らかになった(表3)。

30

【0112】

【表3】

表3.

患者尿での前立腺癌検出の感度および特異性の計算値。

感度および特異性の計算値	
真陽性	偽陽性
29	12
偽陰性	真陰性
23	61
BPH単独の感度および特異性の計算値	
真陽性	偽陽性
29	12
偽陰性	真陰性
9	28

40

【0113】

50

実施例 10 . M I L - 3 8 抗原の検出と P S A レベルとの併用より前立腺癌の検出能が増大する。

M I L - 3 8 免疫蛍光アッセイ (I F A) 検査と P S A 検査とを併用すると、感度および特異性が増大する。このような増大は、P S A 検査に適用するカットオフ値に応じて異なる。陽性診断のカットオフが 2 n g / m L より大きい場合、特異性は I F A 単独検査時の 7 3 % から 2 つの検査併用時の 8 3 % まで増大する。陽性診断のカットオフが 4 n g / m L より大きい場合、特異性は I F A 単独検査時の 7 3 % から 2 つの検査併用時の 8 9 % まで増大する。

【 0 1 1 4 】

このことは、2 つの検査を併用した場合に O R および 9 5 % C I の増大を示すロジスティック回帰分析によってさらに説明される。

10

【 0 1 1 5 】

【表 4】

表 4 . M I L - 3 8 I F A 検査と P S A スコアとを併用した場合の感度および特異性の増大。

2 n g / m l で層別化

P S A < 2 n g / m l

		癌		
		1	0	
GPC-1	1	5	17	感度=100% 特異性=68%
IFA	0	0	36	

20

P S A ≥ 2 n g / m l

		癌		
		1	0	
GPC-1	1	24	4	感度=67% 特異性=83%
IFA	0	12	20	

30

4 n g / m l で層別化

P S A < 4 n g / m l

		癌		
		1	0	
GPC-1	1	10	20	感度=77% 特異性=71%
IFA	0	3	48	

P S A ≥ 4 n g / m l

		癌		
		1	0	
GPC-1	1	19	1	感度=68% 特異性=89%
IFA	0	9	8	

40

ロジスティック回帰

	OR	95%CI
GPC-1 IFA	6.4	2.8~14.9
GPC-1 IFA(PSA<4に調整)	10.2	3.2~32.8
GPC-1 IFA(PSA<2に調整)	13.4	4.0~44.7

50

【0116】

実施例11. MIL-38は様々なELISAフォーマットで組換えグリピカン-1を検出することができる。

図11に示されるように、3種類のELISAアッセイフォーマットを実施した。捕捉抗体としてMIL-38、検出抗体としてウサギ抗GPC-1を用いて、組換えグリピカン-1を0ng/ml、0.1ng/ml、1ng/mlおよび10ng/mlの濃度で試験した。同様の実験を、捕捉抗体としてウサギ抗GPC-1、検出抗体としてMIL-38を用いて実施した。ほかにも、捕捉抗体としてMIL-38抗体、検出抗体としてビオチン化MIL-38抗体を用いて、単一抗体ELISAを試験した。結果から、抗GPC-1抗体を様々なELISAフォーマットで用いることが可能であり、また、NS0 GPC-1が適切な陽性対照になり得ることがわかる。

10

【0117】

実施例12. AM4 MIL-38抗体を用いたグリピカン-1抗原の検出

本発明者らが実施した実験から、当時「BLCA-38ハイブリドーマ」と称された原寄託のMIL-38抗体のハイブリドーマ(ATCCアクセション番号HB11785:マウスハイブリドーマBLCA-38)は、ここで「AM3」および「AM4」と称される2つの異なる抗体集団を産生するハイブリドーマ細胞の混合集団であることが明らかになった。異なる抗体集団をそれぞれ産生するハイブリドーマ細胞を分離し、2014年8月22日、「AM4」ハイブリドーマ細胞をCell Bank Australia(CBA)にアクセション番号CBA20140026の下で寄託した。

20

【0118】

96ウェルプレートを、MIL-38を炭酸緩衝液(pH9.5)で調製したAM3またはAM4(1μg/ウェル)で一晩コートした。5%脱脂乳を含有するPBS-Tween(0.1%)でプレートを37℃にてブロックし、洗浄した。150mM NaClを加えた緩衝液II(20mM HEPES(pH7.5)、0.5mM EDTA、0.5% Triton X-100)で抗原(GPC-1 NS0)を希釈し、37℃で一晩インキュベートした。ビオチン化AM4抗体による検出を実施し、次いでアビジンHRP(1μg/mL)による検出を実施した。TMB(Sigma社、カタログ番号T0440)を加え、TMB停止液(Sigma社、S5814)で停止させた。450nmでの吸光度を読み取った。結果を図12Aに示す。

30

【0119】

2つ目の実験では、96ウェルプレートを、MIL-38をPBS(pH7.2)で調製した34A(AM3抗体とAM4抗体の混合物)またはAM4(2.5μg/ウェル)で1時間、室温でコートした。プレートを37℃で1時間、PBS-Tween(0.05%)に溶かしたBlocker Casein(Thermo社)でブロックした。洗浄後、50mMトリシンおよび150mM NaClを含有するTBS(pH7.2)で抗原(GPC-1 NS0)を希釈し、37℃で1時間インキュベートした。ビオチン化AM4クローン1F5による検出を実施し、次いでアビジンHRP(1μg/mL)による検出を実施した。TMB(Sigma社、カタログ番号T0440)を加え、TMB停止液(Sigma社、S5814)で停止させた。450nmでの吸光度を読み取った。結果を図12Bに示す。

40

【0120】

MIL-38を用いて上記の1つ目のELISAを実施して、NS0が産生したGPC-1(すなわち、MIL-38抗原)を捕捉した。この実験では、モノクローナルAM3 MIL-38とモノクローナルAM4 MIL-38の捕捉を比較した。サンドイッチELISAアッセイでは、AM3は捕捉剤として機能しなかったのに対し、AM4は捕捉剤として機能することが明らかになった(図12A)。

【0121】

上記の2つ目のELISAでは、MIL-38の混合集団(AM3およびAM4)と、モノクローナルAM4 1F5クローンから得られた混合集団とを比較した場合に得られ

50

た E L I S A シグナルを比較した。A M 4 1 F 5 を捕捉剤として用いた場合の方が、混合 3 4 A 抗体集団を用いた場合よりも強い E L I S A シグナルが得られた (図 1 2 B) 。

【 0 1 2 2 】

サンドイッチ E L I S A の結果は、捕捉試薬としてグリピカン - 1 抗原の検出に有用なのは A M 4 様形態のモノクローナル M I L - 3 8 抗体のみであり、モノクローナル集団を含む捕捉剤の方が混合集団からなる捕捉剤よりも優れた E L I S A シグナルが得られることを示している。

【 0 1 2 3 】

実施例 1 3 . A M 4 および A M 3 M I L - 3 8 抗体集団の配列解析

材料および方法

- 重鎖および軽鎖のシーケンシング (D N A)

別個のシーケンシングのランを 3 回実行した。1 回目のラン (コード 2 2 4 9 4 5) には、1 - 0 と称する混合 (A M 4 および A M 3) 調製物のニクローン性ハイブリドーマ細胞を用いた。2 回目のラン (コード 4 4 9 2 9 5 - 1) には、A M 4 の生成に用いたハイブリドーマストックである A l f i o の細胞を用いた。3 回目のラン (コード 4 4 9 2 9 5 - 5) には、A M 3 の生成に用いたハイブリドーマストックである A l f i o I I の細胞を用いた。

【 0 1 2 4 】

シーケンシングのラン 2 2 4 9 4 5 (1 - 0) および 4 4 9 2 9 5 - 1 (A l f i o I) では、凍結ハイブリドーマ細胞から全 R N A を抽出し、その R N A から c D N A を合成した。次いで、R T - P C R を実施して抗体の可変領域 (重鎖および軽鎖) および定常領域を増幅し、次いでこれを標準的なクローニングベクターに別個にクローニングし配列を決定した。

【 0 1 2 5 】

T R I z o l (登録商標) P l u s R N A P u r i f i c a t i o n S y s t e m の技術マニュアルに従って、ハイブリドーマ細胞から全 R N A を単離した。全 R N A をアガロースゲル電気泳動により分析した。S u p e r S c r i p t (商標) I I I F i r s t - S t r a n d S y n t h e s i s S y s t e m の技術マニュアルに従い、アイソタイプ特異的アンチセンスプライマーまたはユニバーサルプライマーを用いて全 R N を c D N A に逆転写させた。G e n S c r i p t 社の R A C E の標準操作手順書に従って、V_H、V_L、C_H および C_L の抗体フラグメントを増幅した。

【 0 1 2 6 】

標準的な分子クローニング法を用いて、増幅した抗体フラグメントを標準的なクローニングベクターにクローニングした。

【 0 1 2 7 】

コロニー P C R スクリーニングを実施して、正確な大きさのインサートを有するクローンを特定した。各抗体フラグメントについて、正確な大きさのインサートを有する単一コロニーを 5 つ以上、シーケンシングに供した。

【 0 1 2 8 】

V_H プラスミドおよび V_L プラスミドには、抗体の完全長可変領域および C_H 1 と C_L の一部分がコードされていた。C_H プラスミドには、C_H 1 の一部分および完全長の C_H 2 と C_H 3 がコードされていた。C_L プラスミドには C_L の一部分がコードされていた。完全長の定常領域または重鎖 / 軽鎖を得るため、V_H プラスミドおよび V_L プラスミドによってコードされる定常領域の部分ならびに C_H プラスミドおよび C_L プラスミドによってコードされる定常領域の部分を実験的に P C R で増幅し、次いで、オーバーラップ・エクステンション P C R を用いて完全長の D N A を得た。V_H、V_L、C_H および C_L のインサートの大きさが正確な 5 つの単一コロニーをシーケンシングに供した。

【 0 1 2 9 】

シーケンシングラン 4 4 9 2 9 5 - 5 (A l f i o I I) では、予測された I g G 1 重鎖配列に対応する配列を得るうえで困難に直面した。R N A の調製を 2 回実施した。1

10

20

30

40

50

つ目のバッチの細胞では、オリゴ-dTプライマーおよびCDS I I Iプライマーを逆転写(RT)に用いた。I g G 1およびI g に特異的なプライマーを用いたPCRによりV_H/C_HおよびV_L/C_Lを増幅し、陽性対照として部分的マウス - アクチン遺伝子を増幅した。ゲルには、通常の軽鎖バンドが容易に得られたのに対し、V_Hはわずかに観察されるにとどまった。V_LおよびC_Lのインサートの大きさが正確な5つの個々のコロニーをシーケンシングに供した。5つの異なるコロニーのV_L遺伝子およびC_L遺伝子はほぼ同一であることがわかった。A l f i o I Iハイブリドーマから得られたコンセンサス軽鎖配列を以下に挙げる。下に示されるように、無作為にシーケンシングに供した8個のV_H陽性クローンから非生産的な重鎖配列が1つ得られた。無作為にシーケンシングに供した10個のC_H陽性クローンから3種類の重鎖定常領域配列が得られた(I g G₁C_Hが1つ、I g G_{2a}C_Hが1つ、I g G_{2b}C_Hが8つ)。クラススイッチングの影響を受ける可能性を回避するため、I g M特異的プライマーを用いたC_Hを増幅を実施したが、目的PCR産物は得られなかった。また、重鎖FR1縮重プライマーを用いて完全長重鎖(V_H-C_H)を増幅しても、目的PCR産物は得られなかった。

10

【0130】

数回試みても生産的な重鎖は得られなかったため、2つ目のバイアルのA l f i o I I細胞から重鎖配列を単離することを試みた。2つ目のバイアルの細胞では、最初にオリゴ-dTプライマーを逆転写に用いた。I g G 1、I g G 2 b、I g M、I g Aに特異的なプライマーおよびI g G縮重プライマーをそれぞれ用いてV_Hを増幅し、I g 特異的プライマーを用いてV_Lを増幅した。前回の結果と同じく、生産的な軽鎖および非生産的な重鎖が得られた。ほかにランダム6量体プライマーを用いた逆転写を試みたが、成功しなかった。

20

【0131】

以上をまとめると、軽鎖配列および重鎖配列の単離を何度も試みた。2種類のバッチの細胞で別々に試みても一貫して、再配列された軽鎖配列が1つ得られた。しかし、V_Hの目的PCR産物がわずかに観察されるにとどまり、シーケンシングを実施しても一貫した重鎖配列は全く得られなかった。

【0132】

結果

- 配列のまとめの表

下の表5に、検討した抗体の重鎖および軽鎖の核酸配列およびタンパク質配列の概要を記載するとともに、様々な内部領域を示す。

30

【0133】

【表 5】

表 5 : AM4 抗体および AM3 抗体の配列および内部領域の概要

DNA 配列番号		リーダー	HFR1	HCDR1	HFR2	HCDR2	HFR3	HCDR3	HFR4	CH1-CH3	ヒンジ
13	AM4 重鎖	1~57	58~147	148~162	163~204	205~255	256~351	352~378	379~411	412~1383	703~741
		リーダー	LFR1	LCDR1	LFR2	LCDR2	LFR3	LCDR3	LFR4	CL	
14	AM4 軽鎖	1~60	61~129	130~162	163~207	208~228	229~324	325~351	352~381	382~702	
15	AM3 軽鎖	1~72	73~141	142~174	175~219	220~240	241~336	337~363	364~393	394~714	
アミノ酸配列番号		リーダー	HFR1	HCDR1	HFR2	HCDR2	HFR3	HCDR3	HFR4	CH	ヒンジ
10	AM4 重鎖	1~19	20~49	50~54	55~68	69~85	86~117	118~126	127~137	138~461	235~247
		リーダー	LFR1	LCDR1	LFR2	LCDR2	LFR43	LCDR3	LFR4	CL	
11	AM4 軽鎖	1~20	21~43	44~54	55~69	70~76	77~108	109~117	118~127	128~234	
12	AM3 軽鎖	1~24	25~47	48~58	59~73	74~80	81~112	113~121	122~131	132~238	

注 : HFR = 重鎖フレームワーク領域 ; HCDR = 重鎖相補性決定領域 ; CH = 重鎖定常領域

LFR = 軽鎖フレームワーク領域 ; LCDR = 軽鎖相補性決定領域 ; CL = 軽鎖定常領域
灰色で囲った部分は、縦 1 列目の配列番号によって定められる配列内での位置を示す。

【 0 1 3 4 】

- シーケンシング (DNA)

試料から単離した全 RNA を 1 . 5 % アガロース / Gel Red (商標) ゲル上で DNA マーカー (Marker III - T I A N G E N 社、カタログ番号 MD 1 0 3) と並べて泳動した。

【 0 1 3 5 】

各試料の PCR 産物 4 マイクロリットルを 1 . 5 % アガロース / Gel Red (商標) ゲル上で DNA マーカー (Marker III) と並べて泳動した。PCR 産物を精製し、のちに使用するまで - 2 0 で保管した。

【 0 1 3 6 】

5 つの異なるクローンの V_H 、 V_L 、 C_H および C_L 遺伝子はほぼ同一であった。以下に挙げるコンセンサス配列は、モノクローナルハイブリドーマ集団 (AM - 4) によって産生された抗体の配列であることが明らかになった。

【 0 1 3 7 】

10

20

30

40

【表6】

AM4 MIL-38マウスIgG₁重鎖DNAコンセンサス配列 (配列番号13)

```
                    10                    20                    30                    40                    50                    60                    70                    80                    90                    100                    110                    120                    130                    140                    150                    160                    170                    180                    190                    200                    210                    220                    230                    240                    250                    260                    270                    280                    290                    300                    310                    320                    330                    340                    350                    360                    370                    380                    390                    400                    410                    420                    430                    440                    450                    460                    470                    480                    490                    500                    510                    520                    530                    540                    550                    560                    570                    580                    590                    600                    610                    620                    630                    640                    650                    660                    670                    680                    690                    700                    710                    720                    730                    740                    750                    760                    770                    780                    790                    800                    810                    820                    830                    840                    850                    860                    870                    880                    890                    900                    910                    920                    930                    940                    950                    960                    970                    980                    990                    1000                    1010                    1020                    1030                    1040                    1050                    1060                    1070                    1080                    1090                    1100                    1110                    1120                    1130                    1140                    1150                    1160                    1170                    1180                    1190                    1200                    1210                    1220                    1230                    1240                    1250                    1260                    1270                    1280                    1290                    1300                    1310                    1320                    1330                    1340                    1350                    1360                    1370                    1380                    1390                    1400                    1410                    1420                    1430                    1440                    1450                    1460                    1470                    1480                    1490                    1500                    1510                    1520                    1530                    1540                    1550                    1560                    1570                    1580                    1590                    1600                    1610                    1620                    1630                    1640                    1650                    1660                    1670                    1680                    1690                    1700                    1710                    1720                    1730                    1740                    1750                    1760                    1770                    1780                    1790                    1800                    1810                    1820                    1830                    1840                    1850                    1860                    1870                    1880                    1890                    1900                    1910                    1920                    1930                    1940                    1950                    1960                    1970                    1980                    1990                    2000                    2010                    2020                    2030                    2040                    2050                    2060                    2070                    2080                    2090                    2100                    2110                    2120                    2130                    2140                    2150                    2160                    2170                    2180                    2190                    2200                    2210                    2220                    2230                    2240                    2250                    2260                    2270                    2280                    2290                    2300                    2310                    2320                    2330                    2340                    2350                    2360                    2370                    2380                    2390                    2400                    2410                    2420                    2430                    2440                    2450                    2460                    2470                    2480                    2490                    2500                    2510                    2520                    2530                    2540                    2550                    2560                    2570                    2580                    2590                    2600                    2610                    2620                    2630                    2640                    2650                    2660                    2670                    2680                    2690                    2700                    2710                    2720                    2730                    2740                    2750                    2760                    2770                    2780                    2790                    2800                    2810                    2820                    2830                    2840                    2850                    2860                    2870                    2880                    2890                    2900                    2910                    2920                    2930                    2940                    2950                    2960                    2970                    2980                    2990                    3000                    3010                    3020                    3030                    3040                    3050                    3060                    3070                    3080                    3090                    3100                    3110                    3120                    3130                    3140                    3150                    3160                    3170                    3180                    3190                    3200                    3210                    3220                    3230                    3240                    3250                    3260                    3270                    3280                    3290                    3300                    3310                    3320                    3330                    3340                    3350                    3360                    3370                    3380                    3390                    3400                    3410                    3420                    3430                    3440                    3450                    3460                    3470                    3480                    3490                    3500                    3510                    3520                    3530                    3540                    3550                    3560                    3570                    3580                    3590                    3600                    3610                    3620                    3630                    3640                    3650                    3660                    3670                    3680                    3690                    3700                    3710                    3720                    3730                    3740                    3750                    3760                    3770                    3780                    3790                    3800                    3810                    3820                    3830                    3840                    3850                    3860                    3870                    3880                    3890                    3900                    3910                    3920                    3930                    3940                    3950                    3960                    3970                    3980                    3990                    4000                    4010                    4020                    4030                    4040                    4050                    4060                    4070                    4080                    4090                    4100                    4110                    4120                    4130                    4140                    4150                    4160                    4170                    4180                    4190                    4200                    4210                    4220                    4230                    4240                    4250                    4260                    4270                    4280                    4290                    4300                    4310                    4320                    4330                    4340                    4350                    4360                    4370                    4380                    4390                    4400                    4410                    4420                    4430                    4440                    4450                    4460                    4470                    4480                    4490                    4500                    4510                    4520                    4530                    4540                    4550                    4560                    4570                    4580                    4590                    4600                    4610                    4620                    4630                    4640                    4650                    4660                    4670                    4680                    4690                    4700                    4710                    4720                    4730                    4740                    4750                    4760                    4770                    4780                    4790                    4800                    4810                    4820                    4830                    4840                    4850                    4860                    4870                    4880                    4890                    4900                    4910                    4920                    4930                    4940                    4950                    4960                    4970                    4980                    4990                    5000                    5010                    5020                    5030                    5040                    5050                    5060                    5070                    5080                    5090                    5100                    5110                    5120                    5130                    5140                    5150                    5160                    5170                    5180                    5190                    5200                    5210                    5220                    5230                    5240                    5250                    5260                    5270                    5280                    5290                    5300                    5310                    5320                    5330                    5340                    5350                    5360                    5370                    5380                    5390                    5400                    5410                    5420                    5430                    5440                    5450                    5460                    5470                    5480                    5490                    5500                    5510                    5520                    5530                    5540                    5550                    5560                    5570                    5580                    5590                    5600                    5610                    5620                    5630                    5640                    5650                    5660                    5670                    5680                    5690                    5700                    5710                    5720                    5730                    5740                    5750                    5760                    5770                    5780                    5790                    5800                    5810                    5820                    5830                    5840                    5850                    5860                    5870                    5880                    5890                    5900                    5910                    5920                    5930                    5940                    5950                    5960                    5970                    5980                    5990                    6000                    6010                    6020                    6030                    6040                    6050                    6060                    6070                    6080                    6090                    6100                    6110                    6120                    6130                    6140                    6150                    6160                    6170                    6180                    6190                    6200                    6210                    6220                    6230                    6240                    6250                    6260                    6270                    6280                    6290                    6300                    6310                    6320                    6330                    6340                    6350                    6360                    6370                    6380                    6390                    6400                    6410                    6420                    6430                    6440                    6450                    6460                    6470                    6480                    6490                    6500                    6510                    6520                    6530                    6540                    6550                    6560                    6570                    6580                    6590                    6600                    6610                    6620                    6630                    6640                    6650                    6660                    6670                    6680                    6690                    6700                    6710                    6720                    6730                    6740                    6750                    6760                    6770                    6780                    6790                    6800                    6810                    6820                    6830                    6840                    6850                    6860                    6870                    6880                    6890                    6900                    6910                    6920                    6930                    6940                    6950                    6960                    6970                    6980                    6990                    7000                    7010                    7020                    7030                    7040                    7050                    7060                    7070                    7080                    7090                    7100                    7110                    7120                    7130                    7140                    7150                    7160                    7170                    7180                    7190                    7200                    7210                    7220                    7230                    7240                    7250                    7260                    7270                    7280                    7290                    7300                    7310                    7320                    7330                    7340                    7350                    7360                    7370                    7380                    7390                    7400                    7410                    7420                    7430                    7440                    7450                    7460                    7470                    7480                    7490                    7500                    7510                    7520                    7530                    7540                    7550                    7560                    7570                    7580                    7590                    7600                    7610                    7620                    7630                    7640                    7650                    7660                    7670                    7680                    7690                    7700                    7710                    7720                    7730                    7740                    7750                    7760                    7770                    7780                    7790                    7800                    7810                    7820                    7830                    7840                    7850                    7860                    7870                    7880                    7890                    7900                    7910                    7920                    7930                    7940                    7950                    7960                    7970                    7980                    7990                    8000                    8010                    8020                    8030                    8040                    8050                    8060                    8070                    8080                    8090                    8100                    8110                    8120                    8130                    8140                    8150                    8160                    8170                    8180                    8190                    8200                    8210                    8220                    8230                    8240                    8250                    8260                    8270                    8280                    8290                    8300                    8310                    8320                    8330                    8340                    8350                    8360                    8370                    8380                    8390                    8400                    8410                    8420                    8430                    8440                    8450                    8460                    8470                    8480                    8490                    8500                    8510                    8520                    8530                    8540                    8550                    8560                    8570                    8580                    8590                    8600                    8610                    8620                    8630                    8640                    8650                    8660                    8670                    8680                    8690                    8700                    8710                    8720                    8730                    8740                    8750                    8760                    8770                    8780                    8790                    8800                    8810                    8820                    8830                    8840                    8850                    8860                    8870                    8880                    8890                    8900                    8910                    8920                    8930                    8940                    8950                    8960                    8970                    8980                    8990                    9000                    9010                    9020                    9030                    9040                    9050                    9060                    9070                    9080                    9090                    9100                    9110                    9120                    9130                    9140                    9150                    9160                    9170                    9180                    9190                    9200                    9210                    9220                    9230                    9240                    9250                    9260                    9270                    9280                    9290                    9300                    9310                    9320                    9330                    9340                    9350                    9360                    9370                    9380                    9390                    9400                    9410                    9420                    9430                    9440                    9450                    9460                    9470                    9480                    9490                    9500                    9510                    9520                    9530                    9540                    9550                    9560                    9570                    9580                    9590                    9600                    9610                    9620                    9630                    9640                    9650                    9660                    9670                    9680                    9690                    9700                    9710                    9720                    9730                    9740                    9750                    9760                    9770                    9780                    9790                    9800                    9810                    9820                    9830                    9840                    9850                    9860                    9870                    9880                    9890                    9900                    9910                    9920                    9930                    9940                    9950                    9960                    9970                    9980                    9990                    10000
```

10

20

30

マウス重鎖コード配列の個々の領域が網掛け文字／網掛けでない文字で交互に強調されている。位置：1～57＝リーダー配列；58～147＝フレームワーク領域（HFR1）；148～162＝相補性決定領域（HCDR1）；163～204＝HFR2；205～255＝HCDR2；256～351＝HFR3；352～378＝HCDR3；379～411＝HFR4；412～1383＝定常領域（CH1－CH3）；703～741＝ヒンジ領域（下線部）；1384～1386＝停止コドン。

【0138】

【表 7】

AM4 MIL-38 マウスカッパ軽鎖DNAコンセンサス配列 (配列番号14)

```

GACATCCAGATGACT
CAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAACTGTCCACCATCACATGT
TGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAACTCCTGGTCTAT
GGTGTGCCATCAAGGTTCCAGTGGCAGTGGATCAGGAACACAATATTTCTCTCAAGATCAATAGCCTGCGCCCT
GAAGATTTTGGGACTTATTACTGT
TTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAA
ATCAAA
TAG

```

10

マウス軽鎖コード配列の個々の領域が網掛け文字／網掛けでない文字で交互に強調されている。位置：1～60＝リーダー配列；61～129＝フレームワーク領域（LFR1）；130～162＝相補性決定領域（LCDR1）；163～207＝LFR2；208～228＝LCDR2；229～324＝LFR3；325～351＝LCDR3；352～381＝LFR4；382～702＝定常領域（CK）；703～705＝停止コドン。

20

【0139】

上記の重鎖および軽鎖のAM4 MIL-38コンセンサスDNA配列は以下の重鎖および軽鎖のアミノ酸配列に翻訳される：

【表 8】

AM4 MIL-38 マウスIgG1重鎖アミノ酸コンセンサス配列 (配列番号10)

```

MANVNTLLFLMLAAQSTIQAQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYAFTDYSMNVVKQAPGKGLRWMGWINTETG
EFTYTDDEKGRFAFSLETSASTAFLQINNLRNEDTATYFCARHYDYGGFPYWGQGLVTVSAAKTPPSVYELAF
GSAACTNSMVTLGCLVKGYFPEPEVTVTNNSGSLSSGVHTEPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPESETVICNVAPPA
SSTKYVDKIVPKDCGCKFCICIVFEVSSVFLPEKPKDVLITITLTPKVTQVVDISKDDPEVQFSNIVDDVEVHT
AQTOPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDNLNGKEFKCFNSAFAFPAPIEKTI SKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQMAKD
KVSILTCMITLFFPEDITVVEQWNGQFAENYKNTQFIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHH
TEKSLSHSPGK*

```

30

マウスIgG1重鎖配列の個々の領域が上のアミノ酸配列中に示されている。位置1～19＝リーダー配列；20～49＝フレームワーク領域（HFR1）；50～54＝相補性決定領域1（HCD1）；55～68＝HFR2；69～85＝HCDR2；86～117＝HFR3；118～126＝HCDR3；127～137＝HFR4（連結領域またはJ領域とも呼ばれる）；138～461＝IgG1鎖定常領域（CH1-CH3）および停止コドン（*）。上記配列中、ヒンジ領域には下線が施されている。

40

【0140】

【表 1 1】

AM3 MIL-38 軽鎖アミノ酸コンセンサス配列 (配列番号 1 2)

MGIIFNESQTQVTVYMLLRLSGVDEGDIVMTQSQKFMSTSIGDRVSVTCKAQQNVGSHVAVFQOKPGQSPKALITYSA
 SYRYSQVTVDRFTGSGSGTDFTLTINNVOSEDLAIEYFCQCYNSFFFTFGSGTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSSEQLT
 SEGASVVCFLNFPYKQINVKWIDGSEKQNGVLSWTDQDSKIDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCETHKTS
 TSPVVKSFNRNEC*

軽鎖アミノ酸配列の個々の領域が印を付けて示されている：位置 1～24＝リーダー配列；25～47＝フレームワーク領域 (LFR1)；48～58＝相補性決定領域 1 (LCDR1)；59～73＝LFR2；74～80＝LCDR2；81～112＝LFR3；113～121＝LCDR3；122～131＝LFR4；132～238＝カップ定常領域 (CK) および停止コドン (*)

10

【0 1 4 4】

実施例 1 4 . AM4 抗グリピカン - 1 抗体が結合するグリピカン - 1 エピトープの同定および特徴付け

材料および方法

本研究に使用した AM4 抗グリピカン - 1 抗体に関する情報を下の表 6 に記載する。

【0 1 4 5】

【表 1 2】

20

表 6：使用した AM4 抗体の説明

名称	起源	濃度	場所	状態
MIL38-AM4†	マウス	4.6mg/ml	-20℃/73	OK

† Cellbank Australia にアクセッション番号 CBA20140026 の下で寄託されたハイブリドーマ細胞によって産生されるもの

【0 1 4 6】

- ペプチド

30

本研究の土台となったヒトグリピカン - 1 (GPC-1) 配列は配列番号 1 6 で定められる。以下の残基配列を用いた：

GPC1__残基 番号 3 4 3 ~ 3 6 6 G N P K V N P Q G P G P E E K R R R G K L A P (配列番号 1 7)

GPC1__残基 番号 1 4 0 ~ 1 4 9 G E L Y T Q N A R A F R D L Y S E L R (配列番号 1 8)

【0 1 4 7】

- ペプチド合成

実施例 1 で言及した方法を用いてペプチド合成を実施した。以下に示す設計に従って、化学合成線状ペプチドおよび CLIPS ペプチドを合成した：

40

【0 1 4 8】

- Chemically Linked Peptides on Scaffolds (CLIPS) 技術

用いた CLIPS 技術の一般的原理の説明について以下で説明する。

【0 1 4 9】

CLIPS 技術は、ペプチドの構造を定められた三次元構造に固定化するものである。これにより、最も複雑な結合部位の機能さえ模倣される。CLIPS 技術は現在、ペプチドライブラリーを単一ループ構造、二重ループ構造または三重ループ構造のほか、シート様およびヘリックス様の折畳み構造に形づくるために日常的に用いられている。

【0 1 5 0】

50

C L I P S 足場のプロモ基とシステインのチオール側鎖との間でC L I P S 反応が起こる。この反応は、穏やかな条件下では迅速で特異的なものである。この化学反応を用いると、天然のタンパク質配列が単一T2ループ、T3二重ループ、コンジュゲートT2 + T3ループ、安定化ベータシートおよび安定化アルファヘリックスを含めた様々な構造を有するC L I P S 構築物に変換される (Timmermanら, J. Mol. Recognit. 2007; 20: 283 - 29)。

【0151】

C L I P S ライブラリースクリーニングではまず、コンビナトリアル基質設計を用いて、標的タンパク質を最大10,000個の重複するペプチド構築物からなるライブラリーに変換する。固体担体上で線状ペプチドの基質を合成し、次いで、これを空間的に定められたC L I P S 構築物に形づくる。正しい立体構造内の不連続エピトープの部分をともし示す構築物が抗体と高い親和性で結合し、これを検出し定量化する。不完全なエピトープを提示する構築物はこれよりも低い親和性で抗体と結合するのに対し、エピトープを含まない構築物は全く結合しない。親和性に関する情報を反復スクリーニングに用いて、エピトープの配列および立体構造の詳細を明らかにする。

10

【0152】

不連続な立体構造エピトープを含む標的タンパク質を基質ライブラリーに変換する。商標登録されているミニカード上でコンビナトリアルペプチドを合成し、空間的に定められたC L I P S 構築物に化学的に変換する。抗体の結合を定量化する。

20

【0153】

- ペプチド合成

標的分子の不連続エピトープを再構築するため、構造化されたペプチドのライブラリーを合成した。この合成はChemically Linked Peptides on Scaffolds (C L I P S) 技術を用いて実施した。C L I P S 技術により、単一ループ、二重ループ、三重ループ、シート様の折畳み、ヘリックス様の折畳みおよびその組合せに構造化されたペプチドを作製することができた。C L I P S 鑄型とシステイン残基とを結合させた。ペプチド内の多数のシステインの側鎖を1つまたは2つのC L I P S 鑄型と結合させた。例えば、T2 C L I P S 鑄型である1,3-ビス(プロモメチル)ベンゼンの0.5 mM 溶液を炭酸水素アンモニウム(20 mM, pH 7.9) / アセトニトリル(1:1 (v/v)) に溶かした。この溶液をペプチドアレイ上に加えた。固相中に存在する2つのシステインの側鎖と結合したC L I P S 鑄型がペプチドアレイ(3 μl ウェルを備えた455 ウェルプレート)のペプチドと結合した。ペプチドアレイを溶液中、溶液で完全に覆われた状態で30~60分間、穏やかに振盪した。最後に、ペプチドアレイを過剰のH₂Oで十分に洗浄し、PBS (pH 7.2) 中に1% SDS / 0.1% ベータ-メルカプトエタノールを含有する破壊緩衝液中、70℃で30分間、超音波処理した後、H₂O中でさらに45分間、超音波処理した。システインが3つであること以外は同じ方法で、T3 C L I P S を有するペプチドを作製した。

30

【0154】

以下の設計に従って線状ペプチドおよびC L I P S ペプチドを化学的に合成した：

セット1

模倣体の種類 不連続エピトープ模倣体

標識 MAT.A、MAT.B

説明 様々な長さの制約型ペプチド模倣体。2つの出発配列(配列番号17および配列番号18)からステップサイズ4の10~22量体ペプチドおよび10~18量体ペプチドをすべて作製し、これらに対にしたもの。末端および2つのペプチドの中間にシステインが位置している。これらはT3 C L I P S によって連結されている。

40

【0155】

セット2

模倣体の種類 線状ペプチド

標識 RN.PKVNPNQGPGEER (配列番号19)

50

説明 置換分析、ベース配列 P K V N P Q G P G P E E K R R (配列番号 20) から出発して、システインを除く個々のアミノ酸がすべて、天然に存在するアミノ酸に置き換わっている。

【0156】

セット3

模倣の種類 制約型ペプチド

標識 R N . P K V N P Q G P G P E E K R R _ _ L O O P (配列番号19)

R N . E L C T Q N C R A F R D L Y S _ _ h e l i 3 (配列番号21)

R N . E L C T Q N C R A F R D L Y S _ _ L O O P (配列番号21)

説明 置換分析、標識名に示されるベース配列から出発して、システインを除く個々のアミノ酸がすべて、天然に存在するアミノ酸に置き換わっている。

10

【0157】

- E L I S A スクリーニング

抗体と各合成ペプチドとの結合を P E P S C A N ベースの E L I S A で試験した。ペプチドアレイを一次抗体溶液とインキュベートした(4 で一晩)。洗浄後、ペプチドアレイを 1 / 1000 希釈の抗体ペルオキシダーゼコンジュゲート (S B A 社、カタログ番号 2010-05) と 25 で 1 時間インキュベートした。洗浄後、ペルオキシダーゼ基質の 2, 2'-アジノ-ジ-3-エチルベンゾチアゾリンスルホナート (A B T S) および 3% H₂O₂ 2 μl/ml を加えた。1 時間後、発色を測定した。電荷結合素子 (C C D) カメラおよび画像処理システムで発色を定量化した。

20

【0158】

- データ処理

C C D カメラで得られた値は 0 ~ 3000 m A U の範囲内にあり、標準的な 96 ウェルプレート E L I S A リーダーとほぼ同じである。結果を定量化し、P e p l a b データベースに保存した。ウェルに気泡が含まれているために偽陽性の値が出ることがあり、カードを手作業で検査し、気泡によって生じた値はいずれもスコアを 0 とする。

【0159】

- 合成の品質管理

合成ペプチドの品質を確認するため、別個のセットの陽性対照ペプチドおよび陰性対照ペプチドを同時に合成した。これらを抗体 57.9 でスクリーニングした (P o s t h u m u s ら, J . V i r o l o g y , 1990, 64: 3304-3309 を参照されたい)。

30

【0160】

- スクリーニングの詳細

表 7 に抗体結合条件をまとめる。P e p s c a n 緩衝液および前準備 (S Q) について、数値は競合タンパク質 (ウマ血清とオボアルブミンの組合せ) の相対量を示している。

【0161】

【表 13】

表 7 : スクリーニング条件

血清	希釈	試料緩衝液	前準備
MIL-38 AM4	10μg/ml	10%SQ	50%SQ

40

【0162】

結果

- 主要な実験結果およびシグナル/ノイズ比の決定

スクリーニングによって得られた未処理の E L I S A の結果の全データセットの概要を図 13 にグラフで示す。図中、箱ひげ図は各データセットを表し、各データセット内での

50

E L I S A シグナルの平均値、分布および外れ値を示している。実験条件（抗体量、プロッキング強度など）に応じて様々な E L I S A データの分布が得られる。

【 0 1 6 3 】

- 抗体 M I L 3 8 - A M 4

本発明者らが以前実施した分析では、M I L 3 8 - A M 4 が伸長₃₄₈V N P Q G P G P E E K₃₅₈（配列番号 2 2）上のグリピカンと結合するほか、伸長₁₃₅T Q N A R A₁₄₀（配列番号 8）/ ₁₃₅T Q N A R A F R D₁₄₃（配列番号 9）とも結合することが確認され、このことは不連続エピトープであることを示すと考えられた。

【 0 1 6 4 】

主要な伸長を含むループ型の構築物から、結合に最も重要な残基が正確に特定される。本研究の結果から、残基のうち V 3 4 8、Q 3 5 1、G 3 5 2 および P 3 5 3 は置換が許容されず、K 3 4 7、N 3 4 9 および P 3 5 0 は、G 3 5 4、P 3 5 5 および E 3 5 6 よりは程度が低いにせよ、必要度が相当高いことが示された（図 1 4）。

【 0 1 6 5 】

- 結論

抗体 M I L 3 8 - A M 4 の立体構造エピトープの特徴を明らかにした。M I L 3 8 - A M 4 に対する不連続エピトープを示唆する以前の分析で得られたリードを用いて、ループの長さが異なるマトリックスアレイを作製した。さらに、個々のリード配列の完全置換分析を実施した。いずれのアレイも M I L 3 8 - A M 4 抗体で探索した。

【 0 1 6 6 】

グリピカン - 1 の認識については、本研究で検討した M I L 3 8 - A M 4 抗体は、残基 3 4 7 と 3 5 8 との間の柔軟なループのみからなるか、主としてこれよりなるエピトープと結合する。

【 0 1 6 7 】

モノクローナル抗体 M I L 3 8 - A M 4 は主として残基 3 4 7 ~ 3 5 5 の間のループ上のグリピカン - 1 と結合するが、この抗体には、ペプチドに 1 3 5 ~ 1 4 0 または 1 3 5 ~ 1 4 3 の範囲の残基を付加することが有益である。

【 0 1 6 8 】

【表 1 4】

表 8 : M I L 3 8 - A M 4 抗体のエピトープ

抗体	エピトープ	最も重要な残基	立体構造感受性
MIL38-AM4	³⁴⁷ KVNPQGPGP ³⁵⁵ (配列番号7)	V348、Q351、G352、P353	Y

【 0 1 6 9 】

別途定義されない限り、本明細書の技術用語および科学用語はいずれも、本発明が属する技術分野の当業者が一般に理解するものと同じ意味を有する。本発明の実施または検証には、本明細書に記載されるものと類似するか、これと同等の任意の方法および材料を用いることができるが、好ましい方法および材料は本明細書に記載されるものである。引用されるあらゆる刊行物、特許および特許公開は、あらゆる目的においてその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 1 7 0 】

本明細書に記載される刊行物は、単に本願の出願日に先立って開示されたことを理由に記載されるものである。本明細書に記載されることはいずれも、本発明が、先行発明であるという理由でこのような先行刊行物に対する権利がないことを認めるものとして解釈されるべきではない。

【 0 1 7 1 】

ここまで本発明をその特定の実施形態に関連させて説明してきたが、本発明にはさらな

る改変を施すことが可能であり、本願は、本開示からの逸脱で、本発明が属する技術分野において既知のまたは慣例的な実施の範囲内に収まるもの、本明細書でここまでに記載した必須の特徴に当てはまり得るものおよび添付の「特許請求の範囲」の範囲内で導かれるものを含め、本発明の原理に全般的に従った本発明のあらゆる変形形態、用途または改変形態を包含することを意図するものであることが理解されよう。

【0172】

参考文献

- Aikawa T, Whipple C, Lopez M, Gunn J, Young A, Lander A, Korc M. 2008. "Glypican-1 modulates the angiogenic and metastatic potential of human and mouse cancer cells" *The Journal of Clinical Investigation* Vol 118:1
- Borrebaeck et al., 1995 *Antibody Engineering: A Practical Approach* (Borrebaeck, C, ed.), 1995, Oxford University Press, Oxford; *J. Immunol.* 149, 3914 - 3920 (1992)
- Cole et al., 1985, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77 - 96
- Dainak M, Kumar A, Galaev IY, Mattiasson B. 2007 "Methods in Cell Separations" Vol 106:1 - 18
- David G, Lories V, Decock B, Marynen P, Cassiman JJ, Van den Berghe H. 1990. "Molecular Cloning of a Phosphatidylinositol-anchored Membrane Heparan Sulfate Proteoglycan from Human Lung Fibroblasts" *The Journal of Cell Biology* Vol 111:6 - 2 3165 - 3176
- Filmus J, Capurro M, Rast J. "Glypicans" *Genome Biology* 2008, 9:224
- Filmus J, Selleck SB: Glypicans: proteoglycans with a surprise. *J Clin Invest* 2001, 108:497 - 501.
- Fujise M, Takeo S, Kamimura K, Matsuo T, Aigaki T, Izumi S, Nakato H. Dally regulates DPP morphogen gradient formation in the *Drosophila* wing. *Development* 2003, 130:1515 - 1522.
- Han C, Belenkaya TY, Wang B, Lin X. "Drosophila glypicans control the cell-to-cell movement of hedgehog by a dynamin-independent process". *Development* 2004, 131:601 - 611.
- Harlow et al 1988. *Antibodies, A Laboratory Manual*, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Cold Spring Harbor, N.Y.
- Harmon J Eyre, Robert A Smith, and Curtis J Mettlin, "Chapter 28 Cancer Screening a

- nd Early Detection" Holland - Frei Cancer Medicine 5th Edition. Bast RC Jr, Kufe DW, Pollock RE, editors Hamilton (ON): BC Decker; 2000.
- Hoffman R., Gililand F., Cameron M., Hunt W., and Key C. "Prostate-specific antigen testing accuracy in community practice" BMC Fam Pract. 2002, 3:19.
- Holliger P and Hudson P. 2005. "Engineered antibody fragments and the rise of single domains" Nature Biotech 23 1126 - 1136. 10
- Johnson KW, Dooner M, Queensberry PJ. 2007 "Fluorescence Activated Cell Sorting: A Window on the Stem Cell" Vol 8:133 - 9
- Kleef J, Ishiwata T, Kumbasar A, Friess H, Buchler M, Lander A. "The Cell-surface heparan sulfate proteoglycan glypican-1 regulated growth factor action in pancreatic carcinoma cells and is overexpressed in human pancreatic cancer" J Clin Invest. Vol 102 No 9 Nov 1998 20
- Kohler and Milstein 1975 Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity Nature 256:495 - 497
- Matsuda K, Maruyama H, Guo F, Kleef J, Matsu modto Y, Lander AD, Korc M. "Glypican-1 is overexpressed in human breast cancer and modulates the mitogenic effects of multiple heparin-binding growth factors in breast cancer cells." Cancer Res 2001 Jul 15, 61(14)5562 - 9. 30
- Orfao A, Ruiz-arguelles, Alejandro. 1996 "General concepts about cell sorting techniques" Clin. Biochem. Vol 29:1 5 - 9
- Qiao D, Meyer K, Mundhenke C, Friedl S, Friedl D. 2003 "Heparan Sulfate Proteoglycans as Regulators of Fibroblast Growth Factor-2 Signaling in Brain Endothelial Cells: SPECIFIC: ROLE FOR GLYPICAN-1 IN GLIOMA ANGIOGENESIS" J. Biol. Chem. 16045 - 16053. 40
- Rotmans et al. 1983 Cross-linking of Schistosoma mansoni antigens and their covalent binding on the surface of polystyrene microtitration trays for use in the ELISA J. Immunol. Methods 57:87 - 98 (1983)
- Russell PJ., Ow KT., Tam PN., Juarez EA., Qu CF., Li Y., Cozzi PJ., and Martiniello-Wilks. "Immunohistochemical characterization of the monoclonal antibody BLCA-38 for 50

- the detection of prostate cancer" *Cancer Immunol. Immunother* (2004) 53: 995 - 1004
- Spaltro, Andrea Doctoral Dissertation University of Bologna 2012
- Su G, Meyer, K, Nandini C, Qiao D, Salamat S, Friedl A. "Glypican-1 is frequently overexpressed in human gliomas and enhances FGFR-2 signaling in glioma cells" *Am J Pathol* 2006 June 168(6) 2014 - 2026.
- Suhovskih A, Mostovich L, Kunin I, Mekhrozhi d d i n B, Nepomnyashchikh G, Aidaulova S, Griorieva E. "Proteoglycan expression in normal human prostate tissue and prostate cancer" *Oncology Volume 2013 ID 680136*
- Tung JW, Heydari K, Tirouvanziam R, Sahaf B, Parks DR, Herzenberg LA. 2007 "Modern Flow Cytometry: A Practical Approach" Vol 27: 453 - 68
- Veugeliers M, De Cat B, Ceulemans H, Bruyste ns AM, Coomans C, Durr J, Vermeesch J, Maryn en P, David G. "Glypican-6, a new member of the glypican family of cell surface proteoglycans." *J Biol Chem* 1999 274: 26968 - 26977
- Walker KZ, Russell PJ, Kingsley EA, Phillips J, Raghavan D. "Detection of malignant cells in voided urine from patients with bladder cancer, a novel monoclonal assay." *J Urol* 142: 1578 1989.
- Whipple C, Yong A, RLATG, Korc M. 2012. "A KrasG12D-driven Genetic Mouse Model of Pancreatic Cancer Requires Glypican-1 for Efficient Proliferation and Angiogenesis" *Ocogene* May 17 31(20) 2535 - 2544.

【 図 1 】

図1

GPC1_ヒト 質量: 61641 スコア: 4276 マッチ: 166(134) 配列: 21(38) empAI: 5.50
 グリコカン-1 OS=ヒト GN=GPC1 FE=1 SV=2
 (Homo sapience)

配列カバレレッジ: 4.6%

マッチしたペプチドに下線が施されている

1 MELRARGNWL LCRALALVAC ARGDPASKR SCGEVYRQIYG AKGFSLSDYF
 51 QAEISSEHLR ICPQYTCCT SEMEENLNR SHRELETALR DSRVLIQAL
 101 ATQLRSFDDH FQHLNDSER TLAATPFGAF GELYTONARA FRDLXSELRL
 151 YVGRMILHL ETLAFWRLR LERLFLQIHP QLLLPDDYLD CLGKQAEALR
 201 PFGARPRER IRRATRFVA RSTYQGLGYA SDVYRKYAQV PUGFECSEAY
 251 MKLYVCAHCL GYPGARECPD YCRNVLKGL ANQADLDREW RNLIDSMVLI
 301 TDRFWTSQV ESVIGSVHTW LAEAINALQD NRDTLTARVI QCGNPKVNP
 351 QGPGFERER RSKLAPRRP RSGTLEKLV EKAQLRIVQ DFWISLPGTL
 401 CSEKMALSTA SDDRCNNGMA RGRILPEVMG DGLANQINNF EYEVDTIRPD
 451 MTRIQIMQL KIMTRLRSA YNGNDVDFQD ASDDGGSGS GDGCLDDLCS
 501 RYVRKSSSS RYPLTHALPG LSEQFGKTS RASCPQPTF LFLFLFLAL
 551 TVASRRWR (配列番号 2 3)

【 図 3 】

図3

サイズ排除HPLC画分番号2.9の質量分析

GPC1_ヒト 質量: 61641 スコア: 290 マッチ: 8(8) empAI: 0.52
 グリコカン-1 OS=ヒト GN=GPC1 FE=1 SV=2
 (Homo sapience)

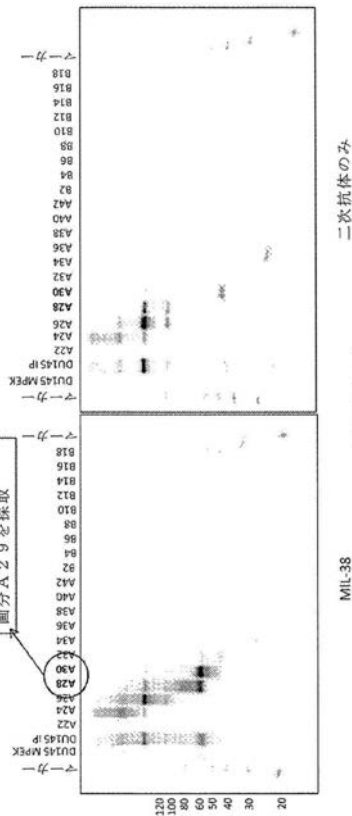
配列カバレレッジ: 1.4%

マッチしたペプチドに下線が施されている

1 MELRARGNWL LCRALALVAC ARGDPASKR SCGEVYRQIYG AKGFSLSDYF
 51 QAEISSEHLR ICPQYTCCT SEMEENLNR SHRELETALR DSRVLIQAL
 101 ATQLRSFDDH FQHLNDSER TLAATPFGAF GELYTONARA FRDLXSELRL
 151 YVGRMILHL ETLAFWRLR LERLFLQIHP QLLLPDDYLD CLGKQAEALR
 201 PFGARPRER IRRATRFVA RSTYQGLGYA SDVYRKYAQV PUGFECSEAY
 251 MKLYVCAHCL GYPGARECPD YCRNVLKGL ANQADLDREW RNLIDSMVLI
 301 TDRFWTSQV ESVIGSVHTW LAEAINALQD NRDTLTARVI QCGNPKVNP
 351 QGPGFERER RSKLAPRRP RSGTLEKLV EKAQLRIVQ DFWISLPGTL
 401 CSEKMALSTA SDDRCNNGMA RGRILPEVMG DGLANQINNF EYEVDTIRPD
 451 MTRIQIMQL KIMTRLRSA YNGNDVDFQD ASDDGGSGS GDGCLDDLCS
 501 RYVRKSSSS RYPLTHALPG LSEQFGKTS RASCPQPTF LFLFLFLAL
 551 TVASRRWR (配列番号 2 3)

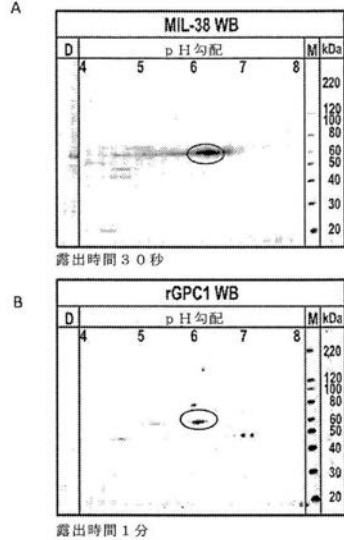
【 図 2 】

図2



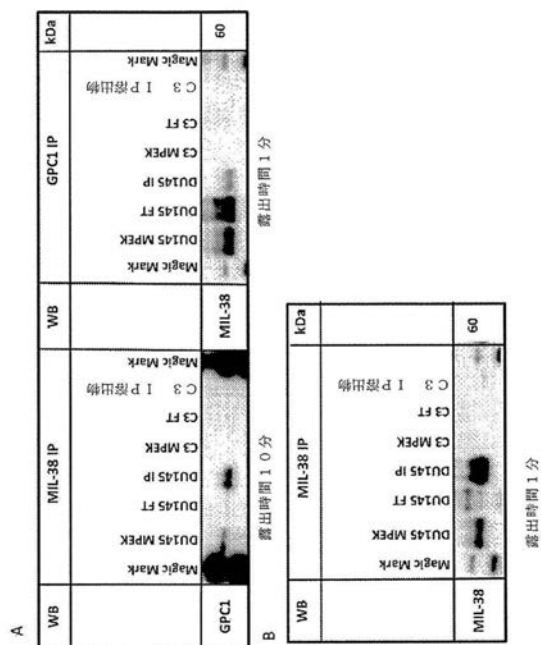
【 図 4 】

図4



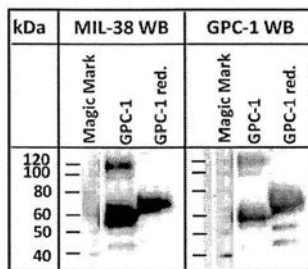
【 図 5 】

図5



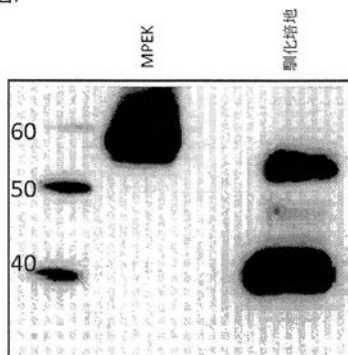
【 図 6 】

図6



【 図 7 】

図7



露出時間 5 分

【 図 8 A 】

図8A

A

GPC1 ヒト 質量: 61641 スコア: 852 マッチ: 30 (22) 配列: 11 (9) emPAT: 0.69
 グリヒカン-1 OS=ヒト gn=GPC1 PE=1 SV=2
 (Homo sapiens)
 配列カバレッジ: 16%

マッチしたペプチドに下線が施されている

1 MELRARGWL LCAAAALVAC ARGDPASKR SCGEVROIVG ARGFSLSQVP
 51 QAEISGEHR ICFQGYCCT SEMENLAR SHAELETAR DSSRYLOAM
 101 ALGDSFDH FOHLNDSK TLOATFFGA GELTQNARA FEDISEELR
 151 YRGNMHL ETLAEFARL LERLFGDLP GLLPDDYLD CLGKQALR
 201 FEGRELER IAAAEAVAA RSEVQGLVA SDVVRVAVY FGGECSTRY
 251 MKLVYCAEL GYGRARECD YCRVLRGCL ANQDIDAEV RNLADSNVLI
 301 IDKFWTSQV ESVGIVSHW LAEINALQD NRDLTAKVI QCCGNFVNP
 351 QGPFERRR RGLAPRRP FSGLEKLYS EAKAQRIVQ DEWLSLFTL
 401 CSEKALSTA SDRCRNGMA RGRYLFVMS DGLANQINP EVDYLDKED
 451 MTRQQIMQL KIMTRLRSA YNGNVDYFD ASDDSGSGS GDCGLDLC
 501 RYVSRSSSS RPLTHALRS LSEQEGKTS AASCQPTFF LRLPLALAL
 551 TVARPRWR (配列番号 2.3)

【 図 8 B 】

図8B

B

GPC1 ヒト 質量: 61641 スコア: 1591 マッチ: 48 (49) 配列: 11 (10) emPAT: 1.42
 グリヒカン-1 OS=ヒト gn=GPC1 PE=1 SV=2
 (Homo sapiens)
 配列カバレッジ: 18%

マッチしたペプチドに下線が施されている

1 MELRARGWL LCAAAALVAC ARGDPASKR SCGEVROIVG ARGFSLSQVP
 51 QAEISGEHR ICFQGYCCT SEMENLAR SHAELETAR DSSRYLOAM
 101 ATQLRSFDH FOHLNDSK TLOATFFGA GELTQNARA FEDISEELR
 151 YRGNMHL ETLAEFARL LERLFGDLP GLLPDDYLD CLGKQALR
 201 FEGRELER IAAAEAVAA RSEVQGLVA SDVVRVAVY FGGECSTRY
 251 MKLVYCAEL GYGRARECD YCRVLRGCL ANQDIDAEV RNLADSNVLI
 301 IDKFWTSQV ESVGIVSHW LAEINALQD NRDLTAKVI QCCGNFVNP
 351 QGPFERRR RGLAPRRP FSGLEKLYS EAKAQRIVQ DEWLSLFTL
 401 CSEKALSTA SDRCRNGMA RGRYLFVMS DGLANQINP EVDYLDKED
 451 MTRQQIMQL KIMTRLRSA YNGNVDYFD ASDDSGSGS GDCGLDLC
 501 RYVSRSSSS RPLTHALRS LSEQEGKTS AASCQPTFF LRLPLALAL
 551 TVARPRWR (配列番号 2.3)

【 8 C 】

図8C

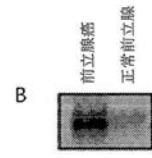
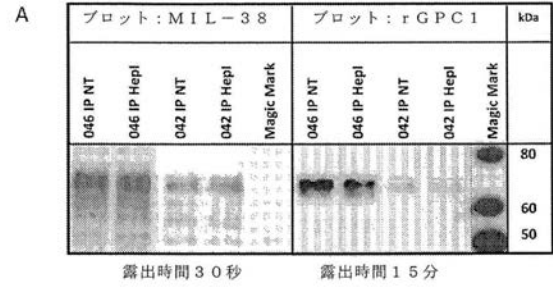
C
GPC1_ヒト 質量: 61641 スコア: 1364 マッチ: 59(95) 配列: 13(9) empAI: 1.13
グリピカン-1 OS=ヒト GN=GPC1 PE=1 SH=2
(Homo sapiens)
配列カバレッジ: 2.4%

マッチしたペプチドに下線が添されている

1 MEIDARQWL ICADALVAC ARGDRASKR SCGEVRLYG AKGFLSDYK
51 QETSGERLR ICFQGTCCF SEMENIANR SHLELEALR DSRVYLQAM
101 MQLSEFDH FHLINDSEK FLQATFGAF GELTQNSA FQDSEELK
151 YFNGANLHE ELRLFWARL LKRLFFQHF GLLFFDDLD CLGKQEAR
201 FEGAPSELR IAKRAFVA RSVYQLEVA SVYRVAVY PLGPECSRK
251 MEIYCAHCL GYFGARPCD YCAVLEKCL ANQADLAEW RNLDSVLL
301 IDKFWGTSV ESYIGSYHW LAENALQD NRDZLAKY QSCGNFVNF
351 QGRGPERR RGLAPRRP PSELEKLVK EAKQLRDVO DFWISLQGL
401 CSEKALSTA SDRGKMGMA RGRVLEFVW DGLANQINP EYEVLDKCS
451 MEIQGIMOL KMTVELPDA YKNDYDFQD ASDDSGSGS GDCCLDLC
501 RYVSRSSSS RPFZHALPS LSEQEGKTS MASCPQFFP LPLLLFLAL
551 TVARFRNR (配列番号 23)

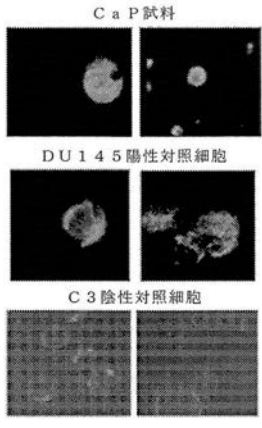
【 9 】

図9



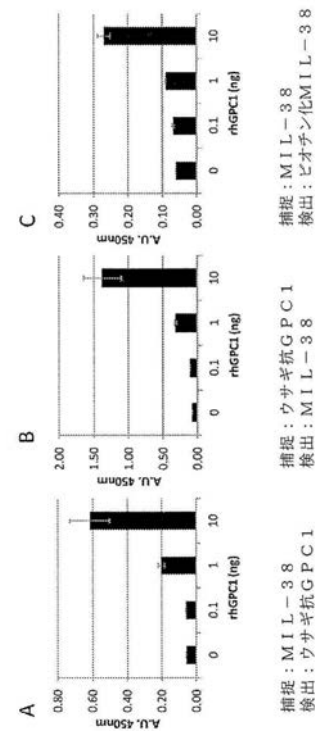
【 10 】

図10



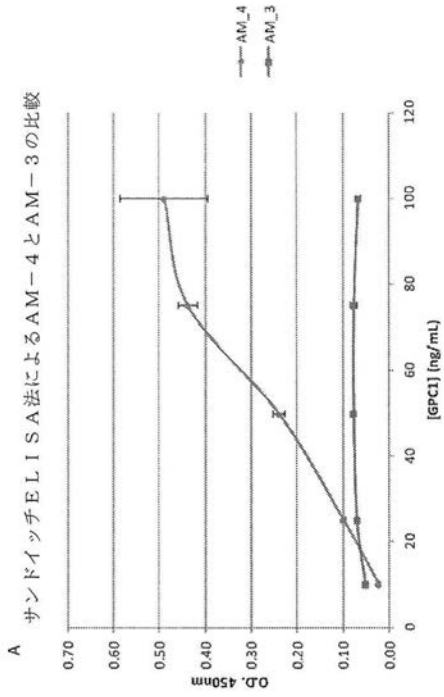
【 11 】

図11



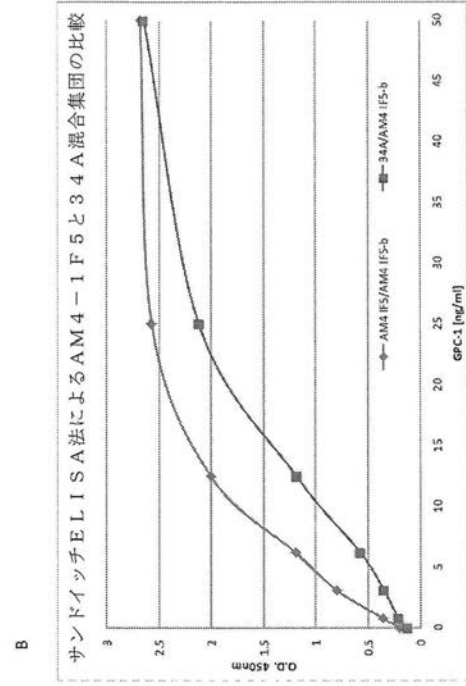
【 図 1 2 A 】

図12A



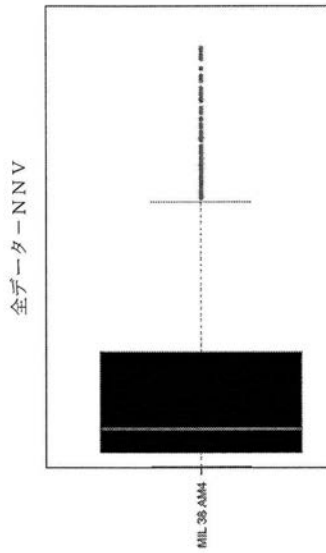
【 図 1 2 B 】

図12B



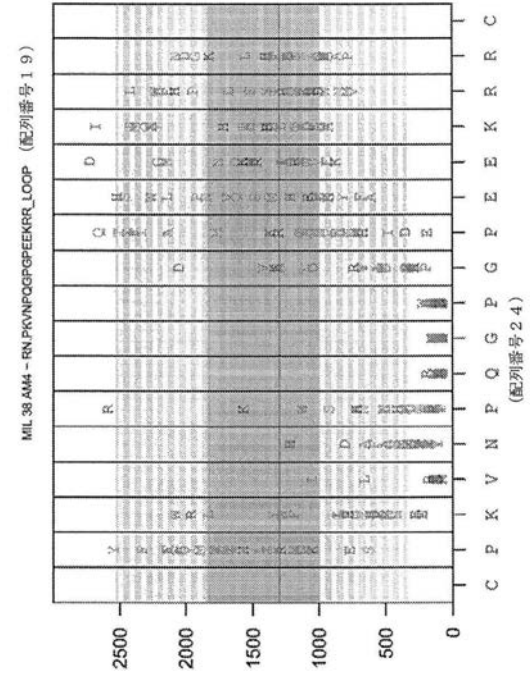
【 図 1 3 】

図13



【 図 1 4 】

図14



【配列表】

2017504812000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2015/000018
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
G01N 33/574 (2006.01) G01N 33/577 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01)		
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)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
Databases used: MEDLINE, BIOSIS, HCAPLUS, EMBASE, WPIAP, EPODOC, PUBMED, ESPACENET, GOOGLE, GOOGLE PATENTS, GOOGLE SCHOLAR, GENOMEQUEST, TXPEA, TXPEB, TXPEC, TXPEE, TXPEF, TXPEH, TXPEI, TXPEJ, TXPEK, TXPEL, TXPEM, TXPEN, TXPEO, TXPEP, TXPEQ, TXPER, TXPES, TXPEPEA, TXPUSE0A, TXPUSE1A, TXPUSEA, TXPUSEB, TXPW0EA		
Keywords used: GLYPICAN-1, GPC1, MIL-38, PROSTATE CANCER, PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN, PSA, KIT, TEST, SEQ ID NOS: 10-11 (MOTIF SEARCHES AND REGIONS), MISTATTM, BCLA-38, APPLICANT AND INVENTOR NAMES.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	
<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	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 13 March 2015	Date of mailing of the international search report 13 March 2015	
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaaustralia.gov.au	Authorised officer Alison Knight AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61 2 6283 2847	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/AU2015/000018

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - on paper
 - in electronic form
 - b. (time)
 - in the international application as filed
 - together with the international application in electronic form
 - subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

Searched SEQ ID NO: 10 positions 50-54 (DYSMN); positions 69-85 (WINTETGEPTYDDDFKG) and positions 118-126 (HYDYGGFPY). Also searched SEQ ID NO: 11 positions 44-54 (RASGNVHNYLA); positions 70-76 (AKTLAD) and positions 109-117 (QHFWSNPWT).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/AU2015/000018
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/119964 A2 (STEM CENTRX, INC.) 15 August 2013 claim 17; [0010]; [0018-0019]; [0022]; [00121]; [00146];[00154-00155]	1-29
X	SUHOVSKI, AV, et al. Proteoglycan Expression in Normal Human Prostate Tissue and Prostate Cancer. ISRN Oncology. 2013 vol. 2013, Article ID 680136, 9 pages. http://dx.doi.org/10.1155/2013/680136 p6, col 1; Fig. 4; Fig 3; p2-3; Table 1; Abstract	1-29
A	OBORT AS, et. al. Prostate-specific antigen: any successor in sight? Reviews in Urology. 2013, vol. 15, issue 3, pp 97-107.	17-19
X	RUSSELL PJ, et. al. Immunohistochemical characterisation of the monoclonal antibody BLCA-38 for the detection of prostate cancer. Cancer Immunology, Immunotherapy. 2004, vol. 53, issue 11, pp 995-1004. Abstract; Table 2;	21-29
X	DUAN L, et al. GPC-1 may serve as a predictor of perineural invasion and a prognosticator of survival in pancreatic cancer. Asian Journal of Surgery. 2013, vol. 36, issue 1 pp. 7-12. Abstract; p8;	21-29
X	MATSUDA K, et. al. Glypican-1 is overexpressed in human breast cancer and modulates the mitogenic effects of multiple heparin-binding growth factors in breast cancer cells. Cancer Research. 2001, vol. 61, issue 14, pp. 5562-9. Abstract; p5563	21-29
P,X	WISSMUELLER, S. et. al. Development of an antibody based test for the diagnosis of prostate cancer. BJU International. (March 2014) Vol. 113, Supp. 4, pp. 45. Abstract Number: 90. 67th Annual Scientific Meeting of the Urological Society of Australia and New Zealand. Brisbane, QLD, Australia. 16 Mar 2014-19 Mar 2014. whole document	21-29
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/AU2015/000018	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2013/119964 A2	15 August 2013	AR 084208 A1	02 May 2013
		AR 085281 A1	18 Sep 2013
		AU 2011293127 A1	14 Mar 2013
		AU 2011295715 A1	18 Apr 2013
		AU 2011295722 A1	02 May 2013
		AU 2011338425 A1	02 May 2013
		AU 2011360938 A1	02 May 2013
		AU 2012219313 A1	02 May 2013
		CA 2809369 A1	01 Mar 2012
		CA 2809864 A1	08 Mar 2012
		CA 2810016 A1	08 Mar 2012
		CA 2819861 A1	14 Jun 2012
		CA 2820885 A1	07 Sep 2012
		CA 2827637 A1	30 Aug 2012
		CN 103260646 A	21 Aug 2013
		CN 103313726 A	18 Sep 2013
		CN 103347538 A	09 Oct 2013
		CN 103476429 A	25 Dec 2013
		CN 103547597 A	29 Jan 2014
		CO 6700829 A2	28 Jun 2013
		CO 6791616 A2	14 Nov 2013
		CO 6821883 A2	31 Dec 2013
		EP 2608807 A1	03 Jul 2013
		EP 2611463 A2	10 Jul 2013
		EP 2611464 A2	10 Jul 2013
		EP 2648748 A1	16 Oct 2013
		EP 2648749 A2	16 Oct 2013
		EP 2675827 A1	25 Dec 2013
		EP 2689787 A1	29 Jan 2014
		JP 2013539468 A	24 Oct 2013
		JP 2013539966 A	31 Oct 2013
		JP 2013544493 A	19 Dec 2013
		JP 2014507117 A	27 Mar 2014
		JP 2014511179 A	15 May 2014
		KR 20140014064 A	05 Feb 2014
		KR 20140018837 A	13 Feb 2014

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.
Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/AU2015/000018	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
		KR 20140018905 A	13 Feb 2014
		KR 20140031175 A	12 Mar 2014
		MX 2013002255 A	03 Jul 2013
		MX 2013006569 A	31 Jan 2014
		MX 2013009541 A	30 Apr 2014
		PE 01902014 A1	10 Feb 2014
		PE 06732014 A1	14 Jun 2014
		PE 10282014 A1	30 Aug 2014
		SG 187965 A1	30 Apr 2013
		SG 188328 A1	30 Apr 2013
		SG 189212 A1	31 May 2013
		SG 190990 A1	31 Jul 2013
		SG 191081 A1	31 Jul 2013
		SG 192816 A1	30 Sep 2013
		TW 201305212 A	01 Feb 2013
		TW 201309729 A	01 Mar 2013
		US 2013058947 A1	07 Mar 2013
		US 2013061340 A1	07 Mar 2013
		US 2013061342 A1	07 Mar 2013
		US 2013224191 A1	29 Aug 2013
		US 2013260385 A1	03 Oct 2013
		US 2013302355 A1	14 Nov 2013
		US 2014093495 A1	03 Apr 2014
		US 2014105888 A1	17 Apr 2014
		US 2014302034 A1	09 Oct 2014
		US 2015030636 A1	29 Jan 2015
		WO 2012019061 A2	09 Feb 2012
		WO 2012027723 A1	01 Mar 2012
		WO 2012031273 A2	08 Mar 2012
		WO 2012031280 A2	08 Mar 2012
		WO 2012078813 A2	14 Jun 2012
		WO 2012112943 A1	23 Aug 2012
		WO 2012118547 A1	07 Sep 2012
		WO 2013119960 A2	15 Aug 2013

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.
Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/AU2015/000018	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
End of Annex			
<small>Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)</small>			

フロントページの続き

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

(74) 代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74) 代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74) 代理人 100134784

弁理士 中村 和美

(72) 発明者 ブラッドリー ウォルシュ

オーストラリア国, ニューサウスウェールズ 2074, トゥッラムツラ, マスグレイブ ストリート 5

(72) 発明者 ダグラス キャンベル

オーストラリア国, ニューサウスウェールズ 2060, ノース シドニー, キアラ クローズ 1, ユニット 26

(72) 発明者 イレネ ジャスティニアノ フェンマヨール

オーストラリア国, ニューサウスウェールズ 2075, セントアイブズ, モナ ベール ロード 212-216, ユニット 28

(72) 発明者 アライン ノコン

オーストラリア国, ニューサウスウェールズ 2040, ライカート, レウス ストリート 5

(72) 発明者 ジュリー スーン

オーストラリア国, ニューサウスウェールズ 2026, ノース ボンディ, プレア ストリート 58, ユニット 3

(72) 発明者 クアッチ トルオング

オーストラリア国, ニューサウスウェールズ 2040, ライカート, フラッド ストリート 115, ユニット 1

(72) 発明者 サンドラ ビスミュラー

オーストラリア国, ニューサウスウェールズ 2567, カーランズ ヒル, カーランズ ヒルドライブ 56

(72) 発明者 パメラ ラッセル

オーストラリア国, クイーンズランド 4217, サーファーズ パラダイス, エトナ ストリート 15