

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6940505号
(P6940505)

(45) 発行日 令和3年9月29日(2021.9.29)

(24) 登録日 令和3年9月6日(2021.9.6)

(51) Int. Cl.	F I		
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	Z N A	
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574	A	
CO 7 K 16/30 (2006.01)	CO 7 K 16/30		
C 1 2 N 15/06 (2006.01)	C 1 2 N 15/06	1 0 0	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13		

請求項の数 13 (全 35 頁)

(21) 出願番号	特願2018-534840 (P2018-534840)	(73) 特許権者	518228851
(86) (22) 出願日	平成29年1月2日(2017.1.2)		シンセラズ、エス、アー エル、エル
(65) 公表番号	特表2019-505783 (P2019-505783A)		SYNCERUS S. A. R. L.
(43) 公表日	平成31年2月28日(2019.2.28)		ルクセンブルク国ルクセンブルク、コート
(86) 国際出願番号	PCT/EP2017/050034		、デイク、1 1
(87) 国際公開番号	W02017/114973	(74) 代理人	100107342
(87) 国際公開日	平成29年7月6日(2017.7.6)		弁理士 横田 修孝
審査請求日	令和1年12月16日(2019.12.16)	(74) 代理人	100155631
(31) 優先権主張番号	15307190.7		弁理士 榎 保孝
(32) 優先日	平成27年12月31日(2015.12.31)	(74) 代理人	100137497
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		弁理士 大森 未知子
(31) 優先権主張番号	16305133.7	(74) 代理人	100207907
(32) 優先日	平成28年2月5日(2016.2.5)		弁理士 赤羽 桃子
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組成物および癌の発生リスクの評価方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

従前に癌と診断されていないヒト対象における癌の発生リスクの評価方法であって、
a) 前記対象のサンプルにおけるプロガストリンのレベルを決定する工程(該工程は、
前記サンプルを少なくとも抗プロガストリンモノクローナル抗体と接触させること、および前記モノクローナル抗体のプロガストリンへの結合を測定してプロガストリンを検出することを含む)を含んでなり、

工程 a) におけるプロガストリンの検出が前記対象における癌の発症リスクの指標であり；かつ、

前記抗プロガストリンモノクローナル抗体が、2016年12月27日に参照番号 I - 5158 として CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes)、
パスツール研究所(25-28 rue du Docteur Roux、75724 Paris CEDEX 15、France) に寄託されたハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体 mAb 14 である、

前記方法。

【請求項 2】

工程 a) の決定が、前記サンプルを少なくとも1つの他のプロガストリン結合分子と接触させることを含み、前記プロガストリン結合分子は、mAb 14 が結合しないプロガストリンの部分へ結合する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記他のプロガストリン結合分子が、抗プロガストリン抗体、またはその抗原結合フラグメントである、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記他のプロガストリン結合分子が、プロガストリンのN末端に結合する抗プロガストリン抗体である、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記他のプロガストリン結合分子が、抗プロガストリンモノクローナル抗体またな抗プロガストリンポリクローナル抗体である、請求項3または4に記載の方法。

【請求項6】

前記他のプロガストリン結合分子が、

下記の3つのCDR、すなわち、それぞれ配列番号4、5および6のアミノ酸配列のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3を含んでなる重鎖と、下記の3つのCDR、すなわち、それぞれ配列番号7、8および9のアミノ酸配列のCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3を含んでなる軽鎖とを含んでなる、モノクローナル抗体mAB3

下記の3つのCDR、すなわち、それぞれ配列番号10、11および12のアミノ酸配列のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3を含んでなる重鎖と、下記の3つのCDR、すなわち、それぞれ配列番号13、14および15のアミノ酸配列のCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3を含んでなる軽鎖とを含んでなる、モノクローナル抗体mAB4、

下記の3つのCDR、すなわち、それぞれ配列番号16、17および18のアミノ酸配列のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3を含んでなる重鎖と、下記の3つのCDR、すなわち、それぞれ配列番号19、20および21のアミノ酸配列のCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3を含んでなる軽鎖とを含んでなる、モノクローナル抗体mAB16、ならびに

下記の3つのCDR、すなわち、それぞれ配列番号22、23および24のアミノ酸配列のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3を含んでなる重鎖と、下記の3つのCDR、すなわち、それぞれ配列番号25、26および27のアミノ酸配列のCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3を含んでなる軽鎖とを含んでなる、モノクローナル抗体mAB19

からなる群において選択される抗プロガストリンモノクローナル抗体である、請求項3～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記モノクローナル抗体mAB14が不溶性または部分的可溶性担体に結合され、かつ、前記他のプロガストリン結合分子が検出可能な部分で標識される抗プロガストリン抗体である、請求項3～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

プロガストリンのレベルが、工程a)においてELISAを用いて決定される、請求項3～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

前記サンプルが、血液、血清および血漿の中から選択される、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

癌の発症リスクを評価するためのキットであって、2016年12月27日に参照番号I-5158としてCNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes)、パスツール研究所(25-28 rue du Docteur Roux、75724 Paris CEDEX15、France)に寄託されたハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体mAb14を少なくともも含んでなる、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法において用いるための、キット。

【請求項11】

10

20

30

40

50

第1抗プロガストリン抗体(ここで、前記第1プロガストリン抗体が、前記2016年12月27日に参照番号I-5158としてCNM(Collection Nationale de Cultures de Microorganismes)、パスツール研究所(25-28 rue du Docteur Roux、75724 Paris CEDEX 15、France)に寄託されたハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体mAB14である); ならびに

第2抗プロガストリン抗体(ここで、前記第2プロガストリン抗体が、プロガストリンのN末端に結合するポリクローナル抗体、または

下記の3つのCDR、すなわち、それぞれ配列番号4、5および6のアミノ酸配列のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3を含んでなる重鎖と、下記の3つのCDR、すなわち、それぞれ配列番号7、8および9のアミノ酸配列のCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3を含んでなる軽鎖とを含んでなる、モノクローナル抗体mAB3

下記の3つのCDR、すなわち、それぞれ配列番号10、11および12のアミノ酸配列のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3を含んでなる重鎖と、下記の3つのCDR、すなわち、それぞれ配列番号13、14および15のアミノ酸配列のCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3を含んでなる軽鎖とを含んでなる、モノクローナル抗体mAB4、

下記の3つのCDR、すなわち、それぞれ配列番号16、17および18のアミノ酸配列のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3を含んでなる重鎖と、下記の3つのCDR、すなわち、それぞれ配列番号19、20および21のアミノ酸配列のCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3を含んでなる軽鎖とを含んでなる、モノクローナル抗体mAB16、ならびに

下記の3つのCDR、すなわち、それぞれ配列番号22、23および24のアミノ酸配列のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3を含んでなる重鎖と、下記の3つのCDR、すなわち、それぞれ配列番号25、26および27のアミノ酸配列のCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3を含んでなる軽鎖とを含んでなる、モノクローナル抗体mAB19

からなる群において選択されるモノクローナル抗体である)

を含んでなる、請求項10に記載のキット。

【請求項12】

請求項1~9のいずれか一項に記載の方法の実施形態に特徴的な一連の命令を含む、プログラム/コンピュータプログラム。

【請求項13】

演算装置と入力インターフェースを含む処理システムであって、前記システムが請求項1~9のいずれか一項に記載の方法の実施手段を含む、システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

癌は、細胞群が、制御されない増殖、隣接する組織に侵入し破壊する浸潤、および時には転移、すなわちリンパまたは血液を介した体内の他の部位への拡散を示す、多面的な疾患である。これらの3つの癌の悪性の特性により、浸潤または転移をしない良性腫瘍と癌とが区別される。

【0002】

各種類の癌の治療には、手術、放射線療法、化学療法および標的療法など、多数の方法が現在使用されている。癌治療の成功は、臨床的に明らかなものであるか顕微鏡的かを問わず、原発腫瘍およびいずれかの転移に向けられる。

【0003】

適切な治療の選択は、患者にとって非常に重要である。急速進行性の癌の拡大を防止するために、強力かつ侵襲的な治療プロトコールを迅速に使用する時機を知ることが不可欠である。一方、患者が有する腫瘍によって必要とされない場合に強力かつ侵襲的な治療を

10

20

30

40

50

実施することは、患者にとって不利益にもなる。実際に、強力かつ侵襲的な治療は、常に有害な毒性をもたらし、患者の生活の質に重大な影響を及ぼす恐れがある。例えば、その毒性の大部分は変異原性であるため、二次性腫瘍を誘発する傾向がある。加えて、このような強力かつ侵襲的な治療は通常非常に高価であるため、必要な場合にのみ実施すべきである。

【0004】

現在、固形腫瘍に対する治療の選択は腫瘍病期分類に基づいており、これは通常、米国癌合同委員会（AJCC）による腫瘍/結節/転移（TNM）検査を用いて実施される。TNMシステムは、3つのカテゴリーに基づいて番号を割り当てている。「T」は腫瘍の大きさを意味し、「N」はリンパ節の関与の程度を意味し、「M」は転移の程度を意味する。癌の広範な病期は通常、予後別でグループ化されたTNM値から引き出された数字I、II、III、IVとして引用される；数字が高い程、より進行した癌およびおそらく転帰がより不良であることを示す。

10

【0005】

この検査および病期分類システムは、患者において固形癌が診断されている病期に関する有用な情報をいくつかもたすが、それは不正確および不十分であることが一般に認識されている。特に、これは固形腫瘍に限定される。他方、液性腫瘍は、大部分が細胞遺伝学的変化の同定により特徴付けられる。

【0006】

最も重要なことに、TNM検査は、最も早期の病期の腫瘍進行を同定することができない。これらの早期の病期は、治療法にとって最も有望な期間をもたらすものである。癌発生のまさに最初に癌を検出できれば、効率的な標的療法が可能となり、副作用が低減される。よって、全集団のスクリーニングの一環として、できる限り早期の病期で患者を同定することが重要である。その結果、地域社会において癌を早期に同定でき、より早期の介入および管理が可能となり、死亡率および前記疾患による苦痛を低減することができる。患者の全生存率を改善するだけでなく、生活の質を改善し、実際に利益が得られる患者に対して侵襲的かつ高価な化学療法を継続するために、癌の発生に関する優れた予後検査が実際に必要である。特に、対象が癌を発症するリスクを評価する検査が必要である。

20

【発明の概要】

【0007】

本発明は、従前に癌と診断されていない対象において癌の発生を予測するための簡便かつ効率的な方法を提供する。本発明者らは、対象のサンプルにおけるプロガストリンの存在は、前記対象が癌を発症するかどうかの優れた信頼性の高い指標であることを示した。この関連性は、年齢または他のいずれのパラメーターとも独立している。よって、プロガストリンは、対象が癌を発症するリスクを決定するための簡便かつ効率的なツールを提供する。よって、プロガストリンは癌の最も早期の病期のマーカーである。

30

【0008】

プロガストリンレベルに基づいた予後検査は、従前に記載されている。しかしながら、このような検査は、過形成性ポリープを有する患者が前記過形成性ポリープの切除後に結腸新生物を発症するリスクを予測することに限定されている（WO 2012/164035; Do et al., Cancer Prev Res, 5(4): 675-684, 2012）。よって、このような検査は、すでに存在していることが判明している癌の予後に限定されるため、使用が限られている。このような検査は、癌のいずれの徴候も示さない対象がこの疾患を発症するリスクを評価するには使用することができない。

40

【0009】

第1の側面において、本発明は、従前に癌と診断されていない対象における癌の発生リスクの評価方法であって、

a) 前記対象のサンプルにおけるプロガストリンのレベルを決定すること；

b) 工程a)のレベルに基づいて前記対象が癌を発症するリスクを決定することを含んでなる方法に関する。

50

【 0 0 1 0 】

臨床データのROC（受信者動作特性）分析では、プロガストリンの存在は特異性が高くかつ高感度なマーカーであることを示している。プロガストリンは、癌を発症していない対象のサンプルにおいては基本的に検出不可能である。他方、癌と診断されたことのない対象は、プロガストリンがその対象のサンプルで検出可能である場合、将来癌を発症するリスクが無視できない。

【 0 0 1 1 】

本発明の方法は、従前に癌と診断されていない対象が癌を発症するリスクを容易かつ確実に評価することを可能とする。言い換えれば、この方法は、たとえ現在症状を呈していなくとも、将来癌を発症する対象を同定することも可能とする。このような患者は、たとえ癌の症状を認識していなくとも、すでに癌を有している。

10

【 0 0 1 2 】

「対象における癌の発生リスクの評価」という表現は、特定の対象が将来癌の症状を呈する相対的確率の決定を呼称する。本発明による方法は、臨床検査、生検、ならびに、例えば、CA125および/もしくはOVA1などの既知の癌のバイオマーカーのレベルの決定などの他の方法または指標と組合せた、前記リスクの評価におけるツールを表す。

【 0 0 1 3 】

本明細書に記載の方法に供し得る「対象」とは、ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ヤギ、ブタ(pig)、ブタ(swine)、ヒツジおよびサルを含むいずれかの哺乳動物であり得る。ヒトの対象は、「患者」として知られ得る。好ましくは、「対象」は、癌に罹患しておらず、癌に罹患している疑いがなく、癌と診断されていない哺乳動物である。本明細書で使用する場合、「癌に罹患している対象」とは、癌に罹患しておりその症状を示している、または癌と診断されている哺乳動物を指す。医療従事者により実施された医学的検査で癌の存在が明らかとなっている場合に、対象は「癌と診断」されているとされる。本明細書で使用する場合、「症状」とは、疾患、例えば癌のいずれかの主観的証拠である。「症状」とは、異常な状態、または疾患、例えば癌の存在を反映する、患者によって認識される正常な機能または感覚からの逸脱である。患者が前記疾患のキャリアであるが、症状を経験していない場合、疾患は無症候性とみなされる。例えば、プロガストリンレベルの測定など、医学的検査を患者が受けるまで、無症候性の状態は発見されない場合がある。

20

【 0 0 1 4 】

本方法は、対象が癌と診断されたことがない、および/またはそのいずれの症状も経験していない場合でも、対象において癌を同定することが可能であるため、特に有用でもある。プロガストリンは、特異性が高くかつ高感度な癌マーカーである。対象においてプロガストリンが検出されることは、前記対象が癌を発症する可能性が高いことを示す。よって、プロガストリンは、たとえまだいずれの症状も呈していなくとも、将来癌を発症する対象を同定するための特に重要なバイオマーカーである。本発明は、見たところ健常の、すなわち、癌と診断されたことのない、および/またはそのいずれの症状も経験していない対象集団のスクリーニングを可能とし、将来癌を発症する対象の同定を可能とするため、特に有利である。「スクリーニング」とは、本明細書では、集団内において、徴候または症状を呈していない個体にまだ診断されていない疾患が存在する可能性を同定するために用いられる方法を指す。これは、症状発現前または認識されていない症候性の疾患を有する個体を含み得る。このようなものとして、スクリーニング検査は、見たところ良好な健康状態にある者に対して実施されるという点で幾分独特であることは、当業者にとっては明らかであろう。癌スクリーニングの直接的な目的は、ある者が症状を発現する前、および処置が治癒をもたらす可能性が高い病状経過の時点で、早期の病期の癌または前癌病変を同定することである。

30

40

【 0 0 1 5 】

別の側面では、本発明は、従前に癌と診断されていない対象において癌を予測する方法であって、

- a) 前記対象のサンプルにおけるプロガストリンのレベルを決定すること；

50

b) 工程 a) のレベルに基づいて癌を予測することを含んでなる方法を提供する。

【0016】

「予後」は、本明細書で使用する場合、疾患から回復する可能性または疾患のあり得る発症もしくは転帰の予測を意味する。例えば、対象由来のサンプルが、プロガストリンの存在に対して陰性である場合は、その対象の「予後」は、サンプルがプロガストリンに対して陽性である場合よりも良好である。

【0017】

「プロガストリン」とは、本明細書では、哺乳動物のプロガストリンペプチドを指す。プロガストリンは、ガストリン遺伝子の一次翻訳産物である101個のアミノ酸のペプチド(アミノ酸配列参照: A A B 1 9 3 0 4 . 1) であるプレプロガストリン由来の最初の21個のアミノ酸(シグナルペプチド)の開裂によって形成される。プロガストリンの80個のアミノ酸鎖は、切断および修飾酵素によって、以下の数種類の生物学的に活性なガストリンホルモン形態へとさらに処理される: プロガストリンのアミノ酸38~71を含んでなるガストリン34(G34)およびグリシン伸長ガストリン34(G34-Gly)、プロガストリンのアミノ酸55~71を含んでなるガストリン17(G17)およびグリシン伸長ガストリン17(G17-Gly)。

【0018】

好ましい態様では、本発明のプロガストリンペプチドは、ヒトプロガストリンである。より好ましくは、「ヒトプロガストリン」という表現は、配列番号1の配列のヒトPGを指す。ヒトプロガストリンは、特に、前述の生物学的に活性なガストリンホルモン形態には存在しないN末端およびC末端ドメインを含んでなる。好ましくは、前記N末端ドメインの配列は、配列番号2で表される。別の好ましい態様では、前記C末端ドメインの配列は、配列番号3で表される。

【0019】

本発明は、サンプル、特に、生物学的液体および細胞、組織、生検サンプルおよび器官切片などの生体サンプルにおいてプロガストリンを検出するための方法を提供する。

【0020】

「生体サンプル」とは、本明細書では、対象から採取され得るいずれのサンプルも指す。このようなサンプルは、プロガストリンの発現レベルを決定できるものでなければならぬ。プロガストリンは、分泌タンパク質であることが知られる。よって、プロガストリンタンパク質のレベルを決定するための好ましい生体サンプルは、生物学的液体を含む。「生物学的液体」は、本明細書で使用する場合、生物学的起源の物質を含むいずれの液体も意味する。本発明において使用するための好ましい生物学的液体は、動物、例えば哺乳動物、好ましくはヒト対象の体液を含む。体液は、限定されるものではないが、血液、血漿、血清、リンパ液、脳脊髄液(CSF)、唾液、汗および尿を含むいずれの体液であってもよい。好ましくは、前記の好ましい液体生体サンプルは、血液サンプル、血漿サンプル、またはリンパサンプルなどのサンプルを含む。より好ましくは、生体サンプルは血液サンプルである。実際に、このような血液サンプルは、患者からの完全に無害な採血によって得られるため、対象が将来腫瘍を発症するリスクの非侵襲的評価が可能である。

【0021】

「生体サンプル」は、本明細書で使用する場合、癌が固形癌である場合、検査される患者の固形癌サンプルも含む。このような固形癌サンプルは、当業者が本発明のバイオマーカーのレベルのいずれかの種類の測定を実施することを可能とする。場合によっては、本発明による方法は、患者から固形癌サンプルを採取する予備工程をさらに含んでなってもよい。「固形癌サンプル」とは、腫瘍組織サンプルを指す。癌患者においても、腫瘍の部位である組織は、非腫瘍健常組織をさらに含んでなる。よって、「癌サンプル」は、患者から採取される腫瘍組織に限定されるべきである。前記「癌サンプル」は、生検サンプルまたは外科切除療法から採取されるサンプルであってもよい。

【0022】

10

20

30

40

50

一側面によれば、患者由来のサンプルは、癌細胞または癌組織である。

【0023】

このサンプルは、採取してもよいし、必要に応じて、当業者に既知の方法に従って調製してもよい。特に、サンプルは絶食中の対象から採取すべきであることは、当技術分野で周知である。

【0024】

本発明における癌細胞または癌組織は、特に限定されない。

【0025】

本明細書で使用する場合、用語「癌」は、制御されていない細胞増殖という特徴を一般に有する哺乳動物における生理学的状態を指すまたは記載する。用語「癌」および「癌の」は、本明細書で使用する場合、その疾患のあらゆる病期を包含することを意味する。「癌」は、本明細書で使用する場合、生物体における障害された細胞の望ましくない増殖、浸潤、および特定の条件下では転移の結果生じるいずれかの悪性新生物である。癌を引き起こす細胞は、遺伝学的に障害されており、通常、細胞分裂、細胞遊走の挙動、分化状態および/または細胞死の機構を制御する能力を失っている。大部分の癌は腫瘍を形成するが、白血病などの一部の造血癌は腫瘍を形成しない。

【0026】

よって、「癌」は、本明細書で使用する場合、良性および悪性両方の癌を含み得る。癌の例としては、限定されるものではないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病またはリンパ性悪性腫瘍が挙げられる。より具体的には、本発明に係る癌は、扁平上皮細胞癌（例えば、上皮扁平上皮細胞癌）、肺癌（小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌および肺扁平上皮癌を含む）、口咽頭癌、鼻咽頭癌、喉頭癌、腹膜癌、食道癌、肝細胞癌、胃癌(gastric or stomach cancer)（消化管癌および消化管間質癌を含む）、膵癌、膠芽腫、脳癌、神経系癌、子宮頸癌、卵巣癌、肝癌(liver cancer)、膀胱癌、尿路癌、肝細胞腫、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜または子宮癌、唾液腺癌、腎癌(kidney or renal cancer)、前立腺癌、膀胱癌、外陰癌、精巣癌、甲状腺癌、カボジ肉腫、肝癌(hepatic carcinoma)、肛門癌、陰茎癌、非黒色腫皮膚癌(non-melanoma skin cancer)、黒色腫、皮膚黒色腫、表在拡大型黒色腫、悪性黒子型黒色腫、肢端黒子型黒色腫、結節性黒色腫、多発性骨髄腫およびB細胞リンパ腫（ホジキンリンパ腫；非ホジキンリンパ腫、例えば、低悪性度/濾胞性非ホジキンリンパ腫(NHL)；小リンパ球型(SL)NHL；中悪性度/濾胞性NHL；中悪性度びまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ芽球性NHL；高悪性度小型非切れ込み核細胞性NHL；巨大病変NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS関連リンパ腫；およびワルデンストロームマクログロブリン血症を含む)；慢性リンパ球性白血病(CLL)；急性リンパ芽球性白血病(ALL)；有毛細胞白血病；慢性骨髄芽球性白血病(CML)；急性骨髄芽球性白血病(AML)；および移植後リンパ増殖性障害(PTLD)、ならびに母斑病に関連する異常な血管増殖、浮腫（例えば、脳腫瘍に関連するもの）、メイグス症候群、脳、ならびに口唇・口腔癌、および関連転移を含む頭頸部癌を含んでなる群から選択される。

【0027】

好ましい態様では、前記癌は、肺癌、口唇・口腔癌、口咽頭癌、鼻咽頭癌、喉頭癌、前立腺癌、食道癌、膀胱癌、肝癌(liver cancer)、肝細胞癌、胃癌(gastric or stomach cancer)（消化管癌および消化管間質癌を含む）、膵癌、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、白血病、多発性骨髄腫、カボジ肉腫、腎癌、膀胱癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、肝細胞腫、肝癌(hepatic carcinoma)、肛門癌、甲状腺癌、非黒色腫皮膚癌、皮膚黒色腫、脳癌、神経系癌、精巣癌、子宮頸癌、子宮癌、子宮内膜癌、卵巣癌、または乳癌である。

【0028】

より好ましい態様では、前記癌は、食道癌、肝癌(liver cancer)、肝細胞癌、胃癌(gastric or stomach cancer)（消化管癌および消化管間質癌を含む）、膵癌、ホジキンリンパ腫、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、肝細胞腫、肝癌、肛門癌、非黒色腫皮膚癌、皮膚

10

20

30

40

50

黒色腫、子宮頸癌、子宮癌、子宮内膜癌、卵巣癌、または乳癌である。

【0029】

好ましくは、前記対象が癌を発症するリスクは、工程 b) において工程 a) のレベルを参照レベルと比較することによって決定される。

【0030】

用語「参照レベル」は、本明細書で使用する場合、参照サンプルにおける検討中の癌マーカー、すなわち、プロガストリンの発現レベルを指す。「参照サンプル」とは、本明細書で使用する場合、その疾患が存在しないことが知られる、あるいはまた一般集団からの対象、好ましくは、2 個体以上の対象から得られるサンプルを意味する。癌マーカーの好適な参照発現レベルは、数個体の好適な対象において前記癌マーカーの発現レベルを測定することにより決定することができ、このような参照レベルは特定の対象集団に対して補正することができる。参照値または参照レベルは、絶対値；相対値；上限もしくは下限を有する値；値の範囲；平均値(average value)；中央値、平均値(mean value)、または特定の対照値もしくは基準値と比較した場合の値であり得る。参照値は、個々のサンプル値、例えば、処置される対象のサンプルから、より早期の時点で得られた値に基づき得る。参照値は、暦年齢適合群の対象の集団に由来するものなどの多数のサンプルに基づいてもよいし、または供試サンプルを含むもしくは含まないサンプルのプールに基づいてもよい。

10

【0031】

有利には、「参照レベル」は、癌に関して既知の特定の状態を有する対象由来の生体サンプルから得られた所定のプロガストリンレベルである。特定の態様では、工程 (b) において試験サンプルと比較するために使用される参照レベルは、健常対象由来の生体サンプルから、または癌に罹患している対象由来の生体サンプルから得られたものであってもよく、参照発現プロフィールもまた健常対象の生体サンプルのプールから、または癌を有する対象由来のサンプルのプールから取得できると理解される。本発明者らは、絶食中の健常対象におけるプロガストリンのレベルは 0 p Mであることを示した。好ましい態様では、参照レベルは 0 p Mである。

20

【0032】

プロガストリンのレベルは、当業者に知られたいずれの方法によって測定することもできる。

30

【0033】

好ましくは、サンプル中のプロガストリンのレベルの決定は、前記サンプルをプロガストリン結合分子と接触させること、および前記プロガストリン結合分子のプロガストリンへの結合を測定することを含む。

【0034】

発現レベルがタンパク質レベルで測定される場合、それは特に、例えば抗体などの特定のプロガストリン結合分子を用いて、特に、ビオチン化または他の等価な技術を用いた細胞膜染色とその後の特異的抗体による免疫沈降、ウエスタンブロット、ELISAまたはELISPO T、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、免疫組織化学(IHC)、免疫蛍光(IF)、抗体マイクロアレイ、または免疫組織化学と組合せた組織マイクロアレイなどの周知の技術を用いて実施され得る。他の好適な技術には、FRETまたはBRET、単一または複数の励起波長を用い、かつ、電気化学的方法(ボルタンメトリーおよびアンペロメトリー技術)、原子間力顕微鏡検査法、および高周波法、例えば、多極共鳴分光法、共焦点および非共焦点、蛍光、発光、化学発光、吸光度、反射率、透過率、および複屈折または屈折率の検出(例えば、表面プラズモン共鳴、偏光解析法、共振ミラー法、格子結合器導波管法または干渉法)、細胞ELISA、フローサイトメトリー、放射性同位体、磁気共鳴画像法、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)による分析；HPLC-質量分析；液体クロマトグラフィー/質量分析/質量分析(LC-MS/MS)などの適合した光学的方法を適用する、単細胞顕微鏡法または組織化学法が含まれる。これらの技術は総て当技術分野では周知のも

40

50

のであり、ここでさらに詳説する必要はない。これらの種々の技術がプロガストリンレベルを測定するために使用可能である。

【0035】

本発明のプロガストリン結合分子、特に、抗プロガストリン抗体は、イムノアッセイにおいて特に有用である。イムノアッセイは、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A)、ラジオイムノアッセイ (R I A)、免疫拡散アッセイ、または免疫検出アッセイ、例えば、表面プラズモン耐性アッセイ (例えば、B i a c o r e (登録商標)アッセイ)、E L I S P O T、スロットプロット、またはウエスタンプロットであり得る。このような技術に対する一般的な指針としては、例えば、Ausubel et al. (eds) (1987), "Current Protocols in Molecular Biology" John Wiley and Sons, New York, N.Y.を参照。

10

【0036】

抗体は、医学、獣医学およびその他の免疫検出分野で使用される多数のアッセイ技術において重要な試薬である。このような検査には、例えば、酵素結合E L I S A、R I A、I H C、およびI Fアッセイなどの多くの慣用イムノアッセイ技術が含まれる。プロガストリンのレベルは優先的には、前記タンパク質に対する抗体を用いて当業者に既知の任意の方法によってアッセイされる。好ましくは、プロガストリンのレベルは、好ましくはR I AおよびE L I S Aから選択される技術に基づく免疫酵素アッセイを、少なくとも1種類のプロガストリン結合分子とともに用いて決定される。最も好ましくは、前記レベルは、少なくとも1種類のプロガストリン結合分子を用いてE L I S Aにより決定される。より好ましくは、プロガストリンのレベルは、免疫酵素アッセイ、最も好ましくは、E L I S Aアッセイを使用し、1種類のプロガストリン結合分子を用いて測定される。

20

【0037】

特に有用な態様では、本発明に係る癌の発生のリスクを評価するための方法は、好ましくはR I AおよびE L I S Aから選択される技術に基づく免疫酵素アッセイをプロガストリン結合分子とともに用い、対象由来の生体サンプルにおけるプロガストリンのレベルを決定することを含んでなる。

【0038】

これらの技術は、当業者がプロガストリンの存在を簡単に再現性および信頼性がある試験によりアッセイすることを可能にするという点で特に有用である。従来技術の方法は半定量的試験、すなわち、ポリープ全体の上皮細胞のI H C染色に頼るものであった。このような方法は、いくらか信頼性を欠く。特に、アッセイに関連する主観性の程度のために、異なる病理医によって得られた結果を比較することが困難である。これに対し、本発明の方法は、完全に定量的、客観的、かつ、高感度である。

30

【0039】

別の特に有用な態様では、本発明による方法は、好ましくはR I AおよびE L I S Aから選択される技術に基づく免疫酵素アッセイをプロガストリン結合分子とともに用いて、対象由来の生体サンプルにおけるプロガストリンのレベルを決定することを含んでなる。

【0040】

よって、プロガストリンのレベルは、本方法の工程a)において、プロガストリン結合分子により、好ましくは、プロガストリンを認識する抗体が結合するプロガストリンの量を決定することによって決定される。

40

【0041】

「プロガストリン結合分子」とは、本明細書では、プロガストリンに結合するが、ガストリン - 17 (G 1 7)、ガストリン - 34 (G 3 4)、グリシン伸長ガストリン - 17 (G 1 7 - G l y)、またはグリシン伸長ガストリン - 34 (G 3 4 - G l y)には結合しないいずれの分子も称する。本発明のプロガストリン結合分子は、例えば、抗体分子または受容体分子などのいずれのプロガストリン結合分子であってもよい。好ましくは、プロガストリン結合分子は、抗プロガストリン抗体またはその抗原結合フラグメントである。

【0042】

50

「結合する」とは、本明細書では、抗体、またはその抗原結合フラグメントが抗原と、生理条件下で比較的安定な複合体を形成することを意味する。2つの分子が互いに結合するかどうかを決定するための方法は当技術分野で周知であり、例えば、平衡透析、表面プラズモン共鳴などが含まれる。特定の態様では、前記抗体、またはその抗原結合フラグメントは、BSAまたはカゼインなどの非特異的分子との結合に関する親和性の少なくとも2倍の親和性でプロガストリンに結合する。より詳しい態様では、前記抗体、またはその抗原結合フラグメントは、プロガストリンにのみ結合する。

【0043】

特定の態様では、対象由来の生体サンプルは、プロガストリンに結合する少なくとも1種類の分子と接触させ、プロガストリンに対する前記剤の親和性は、上記のものなどの方法で決定した場合、少なくとも100 nM、少なくとも90 nM、少なくとも80 nM、少なくとも70 nM、少なくとも60 nM、少なくとも50 nM、少なくとも40 nM、少なくとも30 nM、少なくとも20 nM、少なくとも10 nM、少なくとも5 nM、少なくとも1 nM、少なくとも100 pM、少なくとも10 pM、または少なくとも1 pMである。

10

【0044】

特定の態様では、本発明は、従前に癌と診断されていない対象における癌の発生リスクの評価方法であって、癌と診断されていない対象由来の生体サンプルにおけるプロガストリンの濃度の検出を含んでなり、前記生体サンプルが抗hPG抗体、またはその抗原結合フラグメントと接触される方法に関する。

20

【0045】

特定の態様では、本発明は、癌と診断されていない対象由来の生体サンプルにおけるプロガストリンの濃度の検出を含んでなり、前記生体サンプルが抗hPG抗体、またはその抗原結合フラグメントと接触される、癌の予後のための方法に関する。

【0046】

用語「抗体」は、本明細書で使用する場合、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体を含むものとする。抗体（または「免疫グロブリン」）は、ジスルフィド結合により相互に接続された少なくとも2本の重（H）鎖と2本の軽（L）鎖を含んでなる糖タンパク質からなる。各重鎖は、重鎖可変領域（またはドメイン）（本明細書ではHCVRまたはVHと略される）および重鎖定常領域を含んでなる。重鎖定常領域は、3つのドメインCH1、CH2およびCH3を含んでなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではLCVRまたはVLと略される）および軽鎖定常領域を含んでなる。軽鎖定常領域は、1つのドメインCLを含んでなる。VHおよびVL領域は、抗原のエピトープとの結合を主として担う「相補性決定領域」（CDR）または「超可変領域」と称される超可変性の領域と、フレームワーク領域（FR）と称されるより保存性の高い領域が散在する領域とにさらに細分できる。各VHおよびVLは、アミノ末端からカルボキシ末端へと次の順序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4で配置された3つのCDRと4つのFRから構成される。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫グロブリンと宿主組織、または免疫系の種々の細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的補体系の第1成分（C1q）を含む因子との結合を媒介し得る。抗体は、種々のアイソタイプ（すなわち、IgA、IgD、IgE、IgGまたはIgM）であり得る。

30

40

【0047】

より詳しい態様では、前記生体サンプルは、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体、ラクダ化抗体、IgA1抗体、IgA2抗体、IgD抗体、IgE抗体、IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体、IgG4抗体およびIgM抗体からなる群から選択される、プロガストリン結合抗体、またはその抗原結合フラグメントと接触される。

【0048】

加えて、抗体作製の分野の熟練者ならば、所与の抗原に対するポリクローナルおよび／

50

またはモノクローナル抗体を作製するための方法を容易に選択および実施することができる。また、当業者ならば、抗体の軽鎖および重鎖内のCDRを決定するための方法を知っている。

【0049】

「ポリクローナル抗体」は、1以上の他の同一でない抗体の中でまたは存在下で産生された抗体である。一般に、ポリクローナル抗体は、Bリンパ球から、同一でない抗体を産生するいくつかの他のBリンパ球の存在下で産生される。通常、ポリクローナル抗体は、免疫動物から直接得られる。

【0050】

用語「モノクローナル抗体」は、ほぼ均質な抗体集団から生じる抗体を表し、集団は、最小の割合で見られ得る少数の潜在的な自然発生突然変異を除き、同一の抗体を含んでなる。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマなどの単細胞クローンの増殖から生じ、ークラスおよびサブクラスの重鎖およびタイプの軽鎖を特徴とする。抗ヒトプロガストリン（抗hPG）モノクローナル抗体および診断または療法のためのそれらの使用は、すでに当技術分野で公知であり、例えば、結腸直腸癌についてはWO2011/083088、乳癌についてはWO2011/083090、膵癌についてはWO2011/083091、結腸直腸癌および消化管癌についてはWO2011/116954、ならびに肝臓病についてはWO2012/013609およびWO2011/083089を参照。

【0051】

抗体の「抗原結合フラグメント」という表現は、前記抗体の標的（一般には抗原とも称される）、一般には同じエピトープと結合する能力を保持し、かつ、抗体のアミノ酸配列の少なくとも5個の連続するアミノ酸残基、少なくとも10個の連続するアミノ酸残基、少なくとも15個の連続するアミノ酸残基、少なくとも20個の連続するアミノ酸残基、少なくとも25個の連続するアミノ酸残基、少なくとも40個の連続するアミノ酸残基、少なくとも50個の連続するアミノ酸残基、少なくとも60個の連続するアミノ酸残基、少なくとも70個の連続するアミノ酸残基、少なくとも80個の連続するアミノ酸残基、少なくとも90個の連続するアミノ酸残基、少なくとも100個の連続するアミノ酸残基、少なくとも125個の連続するアミノ酸残基、少なくとも150個の連続するアミノ酸残基、少なくとも175個の連続するアミノ酸残基、または少なくとも200個の連続するアミノ酸残基のアミノ酸配列を含んでなるいずれのペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質も示すものとする。

【0052】

特定の態様では、前記抗原結合フラグメントは、それが由来する抗体の少なくとも1つのCDRを含んでなる。いっそう好ましい態様では、前記抗原結合フラグメントは、それが由来する抗体の2、3、4または5つのCDR、より好ましくは、6つのCDRを含んでなる。

【0053】

「抗原結合フラグメント」は、限定されるものではないが、Fv、scFv（scは一本鎖を表す）、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv-Fcフラグメントまたはダイアボディ、またはXTEN（伸長組換えポリペプチド）もしくはPASモチーフなどの変性（disordered）ペプチドとの融合タンパク質、あるいはポリ（アルキレン）グリコール、例えば、ポリ（エチレン）グリコール（「ペグ化」）（Fv-PEG、scFv-PEG、Fab-PEG、F(ab')₂-PEGまたはFab'-PEGと称されるペグ化フラグメント）（「PEG」はポリ（エチレン）グリコールを表す）の付加などの化学修飾によるか、または本発明による抗体の特徴的なCDRのうち少なくとも1つを有する前記フラグメントをリポソームに組み込むことによって半減期が延長される任意のフラグメントからなる群において選択することができる。好ましくは、前記「抗原結合フラグメント」は、それらが由来する抗体の可変重鎖または可変軽鎖の部分配列から構成されるか、またはそれらを含んでなり、前記部分配列は、標的に対して、それが由来する抗体と同じ結合特異性と、十分な親和性、好ましくは、それらが由来する抗体の親和性と少な

10

20

30

40

50

くとも同等～1/100、より好ましい様式では少なくとも1/10の親和性を保持する。

【0054】

別の特定の態様では、対象由来の生体サンプルは、プロガストリンに結合する少なくとも1種類の抗体と接触され、前記抗体は、当業者に公知の免疫誘導法により、アミノ酸配列がプロガストリンのアミノ酸配列の全部または一部を含んでなるペプチドを免疫原として使用して得られたものである。前記抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルのいずれであってもよい。2以上（例えば、2つ）の抗体が使用される場合、本発明の方法は、同じタイプの抗体だけで（例えば、2つのモノクローナル抗体）または異なるタイプに属す抗体（例えば、1つのモノクローナル抗体と1つのポリクローナル抗体）で行うことができる。

10

【0055】

別の特定の態様では、前記生体サンプルは、このような抗体と接触される。より詳しくは、前記免疫原は、

- ・アミノ酸配列が全長プロガストリン、特に、配列番号1の全長ヒトプロガストリンのアミノ酸配列を含んでなる、またはからなるペプチド、
 - ・アミノ酸配列がプロガストリン、特に、配列番号1の全長ヒトプロガストリンのアミノ酸配列の一部に相当するペプチド、
 - ・アミノ酸配列がプロガストリンのN末端部分の一部または全アミノ酸配列に相当するペプチド、特に、アミノ酸配列：SWKPRSQQPDAPLG（配列番号2）を含んでなる、またはからなるペプチド、および
 - ・アミノ酸配列がプロガストリンのC末端部分の一部または全アミノ酸配列に相当するペプチド、特に、アミノ酸配列：QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN（配列番号3）を含んでなる、またはからなるペプチド、
 - ・アミノ酸配列がプロガストリンのC末端部分のアミノ酸配列の一部に相当するペプチド、特に、プロガストリンのアミノ酸71～80に相当するアミノ酸配列FGRRSAEDEN（配列番号40）を含んでなるペプチド
- の中から選択されるペプチドを含んでなる。

20

【0056】

当業者ならば、所望により、このような免疫誘導がポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれかを作製するために使用可能であることを理解するであろう。これらのタイプの抗体のそれぞれを取得するための方法は当技術分野で周知である。

30

【0057】

ヒトプロガストリンのアミノ酸配列1～14（N末端）に相当するアミノ酸配列「SWKPRSQQPDAPLG」を含んでなる免疫原を使用することにより作製されたモノクローナル抗体の例としては、限定されるものではないが、下記の表1～表4に記載されるように、mAb3、mAb4、mAb16およびmAb19およびmAb20と呼称されるモノクローナル抗体が挙げられる。他のモノクローナル抗体も記載されているが、これらの抗体が実際にプロガストリンに結合するかどうかは明らかでない（WO2006/032980）。エピトープマッピングの実験結果は、mAb3、mAb4、mAb16、およびmAb19およびmAb20が前記hPGN末端アミノ酸配列内のエピトープに特異的に結合することを示す。配列番号2で表されるプロガストリンのN末端内のエピトープを特異的に認識するポリクローナル抗体は、当技術分野で記載がある（例えば、WO2011/083088）。

40

【0058】

【表 1】

ハイブリドーマ寄託	mAb	アミノ酸配列		配列番号
6B5B11C10	mAb3	VH CDR 1	GYIFTSYW	配列番号 4
		VH CDR 2	FYPGNSDS	配列番号 5
		VH CDR 3	TRRDSPQY	配列番号 6
		VL CDR 1	QSIVHSNGNTY	配列番号 7
		VL CDR 2	KVS	配列番号 8
		VL CDR 3	FQGSHVPFT	配列番号 9

10

【 0 0 5 9 】

【表 2】

ハイブリドーマ寄託	mAb	アミノ酸配列		配列番号
20D2C3G2	mAb4	VH CDR 1	GYTFSSW	配列番号 10
		VH CDR 2	FLPGSGST	配列番号 11
		VH CDR 3	ATDGNYDWFAY	配列番号 12
		VL CDR 1	QSLVHSSGVTY	配列番号 13
		VL CDR 2	KVS	配列番号 14
		VL CDR 3	SQSTHVPPT	配列番号 15

20

【 0 0 6 0 】

【表 3】

ハイブリドーマ寄託	mAb	アミノ酸配列		配列番号
1E9D9B6	mAb16	VH CDR 1	GYTFTSYY	配列番号 16
		VH CDR 2	INPSNGGT	配列番号 17
		VH CDR 3	TRGGYYPFDY	配列番号 18
		VL CDR 1	QSLLDSDGKTY	配列番号 19
		VL CDR 2	LVS	配列番号 20
		VL CDR 3	WQGTTHSPYT	配列番号 21

30

40

【 0 0 6 1 】

【表 4】

ハイブリドーマ寄託	mAb	アミノ酸配列		配列番号
1B3B4F11	mAb19	VH CDR 1	GYSITSDYA	配列番号 22
		VH CDR 2	ISFSGYT	配列番号 23
		VH CDR 3	AREVNYGDSYHFDY	配列番号 24
		VL CDR 1	SQHRITYT	配列番号 25
		VL CDR 2	VKKDGS	配列番号 26
		VL CDR 3	GVGDAIKGQSVFV	配列番号 27

10

【 0 0 6 2 】

ヒトプロガストリンのアミノ酸配列 55 ~ 80 に相当するアミノ酸配列「QGPWLEEEEA YGWMD FGR RSA EDEN」(プロガストリンのC末端部分)を含んでなる免疫原を使用することにより作製可能なモノクローナル抗体の例としては、限定されるものではないが、下記の表 5 および 6 で mAb 8 および mAb 13 と呼称される抗体が挙げられる。エピトープマッピングの実験結果は、mAb 13 が前記 hPGC 末端アミノ酸配列内のエピトープに特異的結合することを示す。

20

【 0 0 6 3 】

【表 5】

ハイブリドーマ寄託	mAb	アミノ酸配列		配列番号
1C10D3B9	mAb8	VH CDR 1	GFTFTTYA	配列番号 28
		VH CDR 2	ISSGGTYT	配列番号 29
		VH CDR 3	ATQGNYSLDF	配列番号 30
		VL CDR 1	KSLRHTKGITF	配列番号 31
		VL CDR 2	QMS	配列番号 32
		VL CDR 3	AQNLELPLT	配列番号 33

30

【 0 0 6 4 】

【表 6】

ハイブリドーマ寄託	mAb	アミノ酸配列		配列番号
2C6C3C7	mAb13	VH CDR 1	GFIFSSYG	配列番号 34
		VH CDR 2	INTFGDRT	配列番号 35
		VH CDR 3	ARGTGTY	配列番号 36
		VL CDR 1	QSLLDSDGKTY	配列番号 37
		VL CDR 2	LVS	配列番号 38
		VL CDR 3	WQGTHFPQT	配列番号 39

40

【 0 0 6 5 】

他の例としては、配列番号 40 のアミノ酸配列を含んでなる免疫原を使用することによ

50

り作製された抗hPGモノクローナル抗体および/またはポリクローナル抗体が挙げられる。

【0066】

より詳しい態様では、本発明による方法では、前記生体サンプルは少なくとも1種類の抗hPG抗体またはその抗原結合フラグメント、好ましくは、1種類の抗hPG抗体またはその抗原結合フラグメントと接触され、前記抗hPG抗体は、N末端抗hPG抗体およびC末端抗hPG抗体の中から選択される。

【0067】

用語「N末端抗hPG抗体」および「C末端抗hPG抗体」とは、それぞれ、hPGのN末端部分に位置するアミノ酸を含んでなるエピトープまたはhPGのC末端部分に位置するアミノ酸を含んでなるエピトープと結合する抗体を表す。好ましくは、用語「N末端抗hPG抗体」は、配列が配列番号2で表されるプロガストリンのドメインに位置するエピトープと結合する抗体を指す。別の好ましい態様では、用語「C末端抗hPG抗体」は、配列が配列番号3で表されるプロガストリンのドメインに位置するエピトープに結合する抗体を指す。

【0068】

用語「エピトープ」は、抗体が結合する抗原の領域である。エピトープは、構造的または機能的として定義され得る。機能的エピトープは一般に構造的エピトープのサブセットであり、相互作用の親和性に直接寄与するアミノ酸を有する。エピトープはまた立体配座的であり得る。特定の態様では、エピトープは、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル基、またはスルホニル基などの化学的に活性な表面分子群である決定基を含み得、特定の態様では、特異的三次元構造特性、および/または特異的電荷特性を持ち得る。抗体が結合するエピトープの決定は、当業者に既知のいずれのエピトープマッピング技術によって行ってもよい。エピトープは、タンパク質のアミノ酸配列内に連続的に位置する異なるアミノ酸を含んでなり得る。エピトープはまた、タンパク質のアミノ酸配列内に連続的に位置しないアミノ酸も含んでなり得る。

【0069】

本発明の方法の特定の態様では、前記抗体は、

- ・それぞれ配列番号4、5および6のアミノ酸配列、またはそれぞれ配列番号4、5および6の配列と最適なアライメントの後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3のうち少なくとも1つ、優先的には少なくとも2つ、優先的には3つを含んでなる重鎖と、それぞれ配列番号7、8および9のアミノ酸配列、またはそれぞれ配列番号7、8および9の配列と最適なアライメントの後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3のうち少なくとも1つ、優先的には少なくとも2つ、優先的には3つを含んでなるモノクローナル抗体、

- ・それぞれ配列番号10、11および12のアミノ酸配列、またはそれぞれ配列番号10、11および12の配列と最適なアライメントの後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3のうち少なくとも1つ、優先的には少なくとも2つ、優先的には3つを含んでなる重鎖と、それぞれ配列番号13、14および15のアミノ酸配列、またはそれぞれ配列番号13、14および15の配列と最適なアライメントの後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3のうち少なくとも1つ、優先的には少なくとも2つ、優先的には3つを含んでなるモノクローナル抗体、

- ・それぞれ配列番号16、17および18のアミノ酸配列、またはそれぞれ配列番号16、17および18の配列と最適なアライメントの後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3のうち少なくとも1つ、優先的には少なくとも2つ、優先的には3つを

10

20

30

40

50

含んでなる重鎖と、それぞれ配列番号 19、20 および 21 のアミノ酸配列、またはそれぞれ配列番号 19、20 および 21 の配列と最適なアライメントの後に少なくとも 80 %、好ましくは 85 %、90 %、95 % および 98 % の同一性を有する配列の CDR - L1、CDR - L2 および CDR - L3 のうち少なくとも 1 つ、優先的には少なくとも 2 つ、優先的には 3 つを含んでなる軽鎖とを含んでなるモノクローナル抗体、

・それぞれ配列番号 22、23 および 24 のアミノ酸配列、またはそれぞれ配列番号 22、23 および 24 の配列と最適なアライメントの後に少なくとも 80 %、好ましくは 85 %、90 %、95 % および 98 % の同一性を有する配列の CDR - H1、CDR - H2 および CDR - H3 のうち少なくとも 1 つ、優先的には少なくとも 2 つ、優先的には 3 つを含んでなる重鎖と、それぞれ配列番号 25、26 および 27 のアミノ酸配列、またはそれぞれ配列番号 25、26 および 27 の配列と最適なアライメントの後に少なくとも 80 %、好ましくは 85 %、90 %、95 % および 98 % の同一性を有する配列の CDR - L1、CDR - L2 および CDR - L3 のうち少なくとも 1 つ、優先的には少なくとも 2 つ、優先的には 3 つを含んでなる軽鎖とを含んでなるモノクローナル抗体、

・それぞれ配列番号 28、29 および 30 のアミノ酸配列、またはそれぞれ配列番号 28、29 および 30 の配列と最適なアライメントの後に少なくとも 80 %、好ましくは 85 %、90 %、95 % および 98 % の同一性を有する配列の CDR - H1、CDR - H2 および CDR - H3 のうち少なくとも 1 つ、優先的には少なくとも 2 つ、優先的には少なくとも 3 つを含んでなる重鎖と、それぞれ配列番号 31、32 および 33 のアミノ酸配列、またはそれぞれ配列番号 31、32 および 33 の配列と最適なアライメントの後に少なくとも 80 %、好ましくは 85 %、90 %、95 % および 98 % の同一性を有する配列の CDR - L1、CDR - L2 および CDR - L3 のうち少なくとも 1 つ、優先的には少なくとも 2 つ、優先的には 3 つを含んでなる軽鎖とを含んでなるモノクローナル抗体、

・それぞれ配列番号 34、35 および 36 のアミノ酸配列、またはそれぞれ配列番号 34、35 および 36 の配列と最適なアライメントの後に少なくとも 80 %、好ましくは 85 %、90 %、95 % および 98 % の同一性を有する配列の CDR - H1、CDR - H2 および CDR - H3 のうち少なくとも 1 つ、優先的には少なくとも 2 つ、優先的には 3 つを含んでなる重鎖と、それぞれ配列番号 37、38 および 39 のアミノ酸配列、またはそれぞれ配列番号 37、38 および 39 の配列と最適なアライメントの後に少なくとも 80 %、好ましくは 85 %、90 %、95 % および 98 % の同一性を有する配列の CDR - L1、CDR - L2 および CDR - L3 のうち少なくとも 1 つ、優先的には少なくとも 2 つ、優先的には 3 つを含んでなる軽鎖とを含んでなるモノクローナル抗体、ならびに

・2016年12月27日に参照番号 I - 5158 として CNCM、パスツール研究所 (25 - 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris CEDEX 15, France) に寄託されたハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体

からなる群において選択されるモノクローナル抗体である。

【0070】

本明細書で使用する場合、核酸またはアミノ酸の 2 つの配列間の「同一性パーセント」または「同一性%」は、最適なアライメントの後に得られる、比較される 2 つの配列間で同一であるヌクレオチドまたはアミノ酸残基のパーセンテージを指し、このパーセンテージは純粋に統計学的であり、2 つの配列間の違いはその長さにわたってランダムに分布している。2 つの核酸またはアミノ酸配列の比較は、それらを最適にアラインメントした後に配列を比較することによって慣例的に実施されており、前記比較は、セグメントによってまたは「アラインメントウィンドウ」を使用することによって実施することができる。比較のための最適なアラインメントは、手動による比較に加えて、当業者に既知の方法によって実施することができる。

【0071】

参照アミノ酸配列と少なくとも 80 %、好ましくは 85 %、90 %、95 % および 98 % の同一性を示すアミノ酸配列に関して、好ましい例としては、参照配列、特定の修飾、

10

20

30

40

50

特に少なくとも1つのアミノ酸の欠失、付加もしくは置換、末端切断または伸長を含むものが挙げられる。1以上の連続または非連続アミノ酸の置換の場合は、置換されたアミノ酸が「等価な」アミノ酸によって置換される置換が好ましい。ここで、「等価なアミノ酸」という表現は、相当する抗体および以下で定義される特定例の生物活性を変更することなく構造アミノ酸の1つに関して置換される可能性のあるいずれのアミノ酸も示すものとする。

【0072】

等価なアミノ酸は、置換されるアミノ酸との構造的相同性、または生じる可能性のある種々の抗体間の生物活性の比較試験の結果に基づいて決定され得る。

【0073】

別の特定の態様では、本発明の方法に使用される抗体は、ヒト化抗体である。

【0074】

本明細書で使用する場合、「ヒト化抗体」は、非ヒト起源の抗体に由来するCDR領域を含有し、抗体分子の他の部分は1または複数のヒト抗体に由来している抗体を指す。加えて、骨格セグメント残基（フレームワークに関してはFRと呼称される）の一部は、必要に応じて、当業者に周知の技術（Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986）を用いて、結合親和性を保つために修飾することができる。ヒト化の目的は、抗体の完全な抗原結合親和性および特異性を維持しながらヒトに導入するために、マウス抗体などの異種抗体の免疫原性を低減することである。

【0075】

抗体は、CDRの移植（EP0239400；WO91/09967；米国特許第5,530,101号；および同第5,585,089号）、ベニヤリング(veneyring)またはリサーフェイシング(resurfacing)（EP0592106；EP0519596；Padlan E. A., 1991, Molecular Immunology 28(4/5): 489-498；Studnicka G. M. et al., 1994, Protein Engineering 7(6): 805-814；Roguska M.A. et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91:969-973）、およびチェーンシャッフリング（米国特許第5,565,332号）を含む種々の技術を用いてヒト化することができる。ヒト抗体は、ファージディスプレイ法を含む当技術分野で公知の種々の方法によって作製することができる。また、米国特許第4,444,887号、同第4,716,111号、同第5,545,806号、および同第5,814,318号；ならびに国際特許出願公開番号WO98/46645、WO98/50433、WO98/24893、WO98/16654、WO96/34096、WO96/33735、およびWO91/10741も参照。

【0076】

より詳しい態様では、本発明の方法で使用される抗体は、

- ・それぞれ配列番号4、5および6のアミノ酸配列、またはそれぞれ配列番号4、5および6の配列と最適なアライメントの後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3のうち少なくとも1つ、優先的には少なくとも2つ、優先的には3つを含んでなる重鎖と、それぞれ配列番号7、8および9のアミノ酸配列、またはそれぞれ配列番号7、8および9の配列と最適なアライメントの後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3のうち少なくとも1つ、優先的には少なくとも2つ、優先的には3つを含んでなる軽鎖とを含んでなるヒト化抗体、
- ・それぞれ配列番号10、11および12のアミノ酸配列、またはそれぞれ配列番号10、11および12の配列と最適なアライメントの後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3のうち少なくとも1つ、優先的には少なくとも2つ、優先的には3つを含んでなる重鎖と、それぞれ配列番号13、14および15のアミノ酸配列、またはそれぞれ配列番号13、14および15の配列と最適なアライメントの後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR-L1

10

20

30

40

50

、CDR-L2およびCDR-L3のうち少なくとも1つ、優先的には少なくとも2つ、優先的には3つを含んでなる軽鎖とを含んでなるヒト化抗体、

・それぞれ配列番号16、17および18のアミノ酸配列、またはそれぞれ配列番号16、17および18の配列と最適なアライメントの後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3のうち少なくとも1つ、優先的には少なくとも2つ、優先的には3つを含んでなる重鎖と、それぞれ配列番号19、20および21のアミノ酸配列、またはそれぞれ配列番号19、20および21の配列と最適なアライメントの後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3のうち少なくとも1つ、優先的には少なくとも2つ、優先的には3つを含んでなる軽鎖とを含んでなるヒト化抗体、

10

・それぞれ配列番号22、23および24のアミノ酸配列、またはそれぞれ配列番号22、23および24の配列と最適なアライメントの後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3のうち少なくとも1つ、優先的には少なくとも2つ、優先的には3つを含んでなる重鎖と、それぞれ配列番号25、26および27のアミノ酸配列、またはそれぞれ配列番号25、26および27の配列と最適なアライメントの後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3のうち少なくとも1つ、優先的には少なくとも2つ、優先的には3つを含んでなる軽鎖とを含んでなるヒト化抗体、

20

・それぞれ配列番号28、29および30のアミノ酸配列、またはそれぞれ配列番号28、29および30の配列と最適なアライメントの後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3のうち少なくとも1つ、優先的には少なくとも2つ、優先的には3つを含んでなる重鎖と、それぞれ配列番号31、32および33のアミノ酸配列、またはそれぞれ配列番号31、32および33の配列と最適なアライメントの後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3のうち少なくとも1つ、優先的には少なくとも2つ、優先的には3つを含んでなる軽鎖とを含んでなるヒト化抗体、ならびに

・それぞれ配列番号34、35および36のアミノ酸配列、またはそれぞれ配列番号34、35および36の配列と最適なアライメントの後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3のうち少なくとも1つ、優先的には少なくとも2つ、優先的には3つを含んでなる重鎖と、それぞれ配列番号37、38および39のアミノ酸配列、またはそれぞれ配列番号37、38および39の配列と最適なアライメントの後に少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3のうち少なくとも1つ、優先的には少なくとも2つ、優先的には3つを含んでなる軽鎖とを含んでなるヒト化抗体

30

からなる群において選択されるヒト化抗体であり、前記抗体はまた、ヒト抗体に由来する軽鎖および重鎖の定常領域も含んでなる。

40

【0077】

第1の態様では、本発明による方法は、生体サンプルを、hPGのエピトープに結合する少なくとも1種類の抗hPG抗体、好ましくは、hPGのエピトープに結合する1種類の抗hPG抗体と接触させることを含んでなり、前記エピトープは、hPGのC末端部分内に位置する。あるいは、本発明による方法は、生体サンプルを、hPGのエピトープに結合する少なくとも1種類の抗hPG抗体、好ましくは、hPGのエピトープに結合する1種類の抗hPG抗体と接触させることを含んでなり、前記エピトープは、hPGのN末端部分内に位置する。

【0078】

より具体的な態様では、本発明による方法は、生体サンプルを、hPGのエピトープに

50

結合する少なくとも1種類の抗hPG抗体、好ましくは、hPGのエピトープに結合する1種類の抗hPG抗体と接触させることを含んでなり、前記エピトープは、hPGのアミノ酸10～14、hPGのアミノ酸9～14、hPGのアミノ酸4～10、hPGのアミノ酸2～10およびhPGのアミノ酸2～14（なお、このhPGのアミノ酸配列は配列番号1である）に相当するアミノ酸配列の中から選択されるプロガストリンのN末端部分のアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を含む。

【0079】

より具体的な態様では、本発明による方法は、生体サンプルを、hPGのエピトープに結合する少なくとも1種類の抗hPG抗体、好ましくは、hPGのエピトープに結合する1種類の抗hPG抗体に接触させることを含んでなり、前記エピトープは、hPGのアミノ酸71～74、hPGのアミノ酸69～73、hPGのアミノ酸71～80（配列番号40）、hPGのアミノ酸76～80、およびhPGのアミノ酸67～74（なお、このhPGのアミノ酸配列は配列番号1である）に相当するアミノ酸配列の中から選択されるプロガストリンのC末端部分のアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を含む。

10

【0080】

本発明の方法の特定の態様では、前記方法は、対象由来の生体サンプルを、プロガストリンの第1の部分と結合する第1剤およびプロガストリンの第2の部分と結合する第2剤と接触させる工程を含んでなる。前記プロガストリン結合分子が抗体であるより詳しい態様では、対象由来の生体サンプルは、プロガストリンの第1のエピトープと結合する抗体およびプロガストリンの第2のエピトープと結合する第2の抗体と接触される。

20

【0081】

好ましい態様によれば、前記第1の抗体は、不溶性または部分的可溶性担体に結合される。前記第1の抗体によるプロガストリンの結合は、前記生体サンプルからのプロガストリンの捕捉をもたらす。好ましくは、前記第1の抗体は、hPGのエピトープに結合する抗体であり、前記エピトープは、上記のように、プロガストリンのC末端部分のアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を含む。より好ましくは、前記第1の抗体は、WO2011/083088に記載のハイブリドーマ2H9F4B7により産生されるモノクローナル抗体Mab14である。ハイブリドーマ2H9F4B7は、ブダペスト条約の下、2016年12月27日に参照番号I-5158としてCNCM、パスツール研究所（25-28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris CEDEX 15, France）に寄託されたものである。

30

【0082】

別の好ましい態様によれば、前記第2の抗体は、下記のように、検出可能な部分で標識される。第2の抗体によるプロガストリンの結合は、生体サンプル中に存在していたプロガストリン分子の検出を可能とする。さらに、第2の抗体によるプロガストリンの結合は、生体サンプル中に存在していたプロガストリン分子の定量を可能とする。好ましくは、前記第2の抗体は、hPGのエピトープに結合する抗体であり、前記エピトープは、上記のように、プロガストリンのN末端部分のアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を含む。より好ましくは、前記N末端抗体は、上記のようにポリクローナル抗体である。あるいは、プロガストリンのN末端内のエピトープに結合するモノクローナル抗体、例えば、上記のN末端モノクローナル抗体、特に、それぞれ配列番号16、17および18のアミノ酸配列のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3を含んでなる重鎖と、配列番号19、20および21のアミノ酸配列のCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3を含んでなる軽鎖とを含んでなるモノクローナル抗体を使用することも可能である。

40

【0083】

特に好ましい態様では、第1の抗体は不溶性または部分的可溶性担体に結合され、第2の抗体は検出可能な部分で標識される。

【0084】

特定の態様では、本発明の方法は、従前に癌と診断されたことのないヒト対象由来の生体サンプルにおいてプロガストリンの濃度を決定することを含んでなる。

50

【 0 0 8 5 】

別の特定の態様では、本発明の方法は、従前に癌と診断されたことのないヒト対象由来の生体サンプルにおいてプロガストリンの濃度を決定することを含んでなり、前記生体サンプルは血液、血清および血漿から選択される。

【 0 0 8 6 】

より詳しい態様では、本発明の方法は、前記対象由来の血漿サンプルを少なくとも1種類の抗hPG抗体、特に、1種類の抗hPG抗体と接触させること、および前記サンプル中のプロガストリンの濃度を決定することを含んでなり、プロガストリンの濃度が前記血漿中10pMを上回れば、前記対象における癌発症リスクの指標となる。言い換えれば、前記血漿中10pMを上回るプロガストリンの濃度は、前記対象における不良の予後の指標となる。

10

【 0 0 8 7 】

いっそうより好ましくは、本発明の方法は、前記対象由来の血漿サンプルを少なくとも1種類の抗hPG抗体、特に、1種類の抗hPG抗体と接触させること、および前記サンプルにおいてプロガストリンの濃度を決定することを含んでなり、前記血漿サンプル中10pM、好ましくは20pM、より好ましくは30pM、いっそうより好ましくは40pM、さらにより好ましくは50pMを上回るプロガストリンの濃度が前記対象における癌発症リスクの指標となる。

【 0 0 8 8 】

別の側面では、本発明は、癌と診断されたことのない患者において癌を治療する方法であって、

20

a) 上記のいずれかの方法によって、前記患者が癌を発症するリスクを評価すること；および

b) a) に従って、リスクが存在する場合に前記癌を治療することを含んでなる方法に関する。

【 0 0 8 9 】

本発明の方法は、癌を非常に早期の病期で同定できるため、特に有利である。癌の同定が早期である程、寛解の可能性が高いことは、当技術分野で公知である。加えて、侵襲的過ぎない抗癌薬で患者を治療できるため、治療効果を維持しながら副作用の可能性を低減できる。

30

【 0 0 9 0 】

特定の態様では、本発明による方法は、患者から得た生体サンプルにおけるプロガストリンの濃度を、サンプルにおけるプロガストリンの濃度の所定の値と比較することを含んでなり、より詳しい態様では、前記所定の値は、癌を有さない集団における値、すなわち、患者が癌を有さないことが判明した場合に得られるプロガストリン濃度値の平均値(mean)、または平均値(average)の決定に基づいたサンプル値の平均値(mean)、または平均値(average)の中から選択される。

【 0 0 9 1 】

さらに別の側面では、本発明はまた、上記の方法において使用するための組成物を提供する。本発明のこの側面によれば、組成物は、従前に癌と診断されていない対象において癌の発生のリスクを評価するためのものであり、前記組成物は、少なくとも1つのプロガストリン結合抗体、またはその抗原結合フラグメントを含んでなる。

40

【 0 0 9 2 】

第1の態様では、本発明による組成物は、プロガストリンのアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を含むエピトープを認識する抗体を含んでなる。

【 0 0 9 3 】

より具体的な態様では、本発明による組成物は、プロガストリンのエピトープを認識する抗体を含んでなり、前記エピトープは、プロガストリンのN末端部分のアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を含み、前記アミノ酸配列は、hPGの残基10~14、hPGの残基9~14、hPGの残基4~10、hPGの残基2~10またはhPGの残基2~1

50

4 (なお、このh P Gのアミノ酸配列は配列番号1である) を含み得る。

【0094】

より具体的な態様では、本発明による組成物は、プロガストリンのエピトープを認識する抗体を含んでなり、前記エピトープは、プロガストリンのC末端部分のアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を含み、前記アミノ酸配列は、h P Gの残基71~74、h P Gの残基69~73、h P Gの残基71~80(配列番号40)、h P Gの残基76~80、またはh P Gの残基67~74(なお、このh P Gのアミノ酸配列は配列番号1である) を含み得る。

【0095】

さらに別の側面では、本発明は、上記の方法にとって有用なキットであって、本発明のいずれかの抗体を含んでなるキットを提供する。上記の方法を実施するための説明を備えた、所定の量の試薬の組合せを含んでなる包装された材料、例えばキットもまた、本発明の範囲内である。好ましくは、前記キットは、本発明の抗体を少なくとも1つ、より好ましくは2つ含んでなる。

【0096】

例えば、第1の態様では、前記キットは、不溶性または部分的可溶性の担体に結合された第1の抗体を含んでなる。好ましくは、前記第1の抗体は、h P Gのエピトープに結合する抗体であり、前記エピトープは、上記のように、プロガストリンのC末端部分内のアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を含む。より好ましくは、前記第1の抗体は、WO 2011/083088に記載のハイブリドーマ2H9F4B7により産生されるモノクローナル抗体Mab14である。ハイブリドーマ2H9F4B7は、ブダペスト条約の下、2016年12月27日に参照番号I-5158としてCNCM、パスツール研究所(25-28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris CEDEX 15, France)に寄託されたものである。別の態様では、本明細書で詳説するポリクローナルもしくはモノクローナル抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体は、上記の抗原を有する細胞を分泌またはプロガストリン受容体への結合の前に同定するために、例えばキットとして包装および使用できるように、検出可能な部分で標識された状態で提供される。このような標識の限定されない例としては、フルオレセインイソチオシアネートなどの蛍光団；発色団、放射性核種、ビオチンまたは酵素が挙げられる。このような標識抗体または結合フラグメントは、抗原の組織学的局在、ELISA、細胞選別、ならびに、例えば、プロガストリン、およびこの抗原を有する細胞を検出または定量するための他の免疫学的技術に使用し得る。好ましくは、前記標識抗体は、h P Gのエピトープに結合する抗体であり、前記エピトープは、上記のように、プロガストリンのN末端部分内のアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を含む。より好ましくは、前記N末端抗体は、上記のように、ポリクローナル抗体である。あるいは、例えば、上記のN末端モノクローナル抗体、特に、それぞれ配列番号16、17および18のアミノ酸配列のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3を含んでなる重鎖と、配列番号19、20および21のアミノ酸配列のCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3を含んでなる軽鎖とを含んでなるモノクローナル抗体など、プロガストリンのN末端内のエピトープに結合するモノクローナル抗体を使用することも可能である。

【0097】

よって、最も好ましい態様では、本発明のキットは、

2016年12月27日に参照番号I-5158としてCNCM、パスツール研究所(25-28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris CEDEX 15, France)に寄託されたハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体である、第1の抗プロガストリン抗体；ならびに

プロガストリンのN末端内のエピトープに結合するポリクローナル抗体または下記の3つのCDR、すなわち、それぞれ配列番号16、17および18のアミノ酸配列のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3を含んでなる重鎖と、下記の3つのCDR、すなわち、それぞれ配列番号19、20および21のアミノ酸配列のCDR-L1、CDR

10

20

30

40

50

- L2およびCDR-L3を含んでなる軽鎖とを含んでなるモノクローナル抗体である、第2の抗プロガストリン抗体を含んでなる。

【0098】

本発明は、抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体が標識されているキットを含む。

【0099】

試薬は、溶解時に適当な濃度を有する試薬溶液を提供する賦形剤を含む、通常凍結乾燥された乾燥粉末として提供され得る。

【0100】

キットは、例えば、ELISAまたはウエスタンブロットにおいてイン・ビトロ (*in vitro*) でプロガストリンを検出および定量するための抗体を含む。本発明の抗体は、例えば、ELISAまたはウエスタンブロットにおいてイン・ビトロでプロガストリンを検出および定量するためのキット内に提供され得る。抗体が酵素で標識されている場合、キットは、その酵素が必要とする基質および補因子 (例えば、検出可能な発色団または蛍光団を提供する基質前駆体) を含む。加えて、安定剤、バッファー (例えば、ブロッキングバッファーまたは溶解バッファー) などの他の添加剤が含まれてもよい。このようなキットは、バイアル、チューブなどの1以上の容器を受容するように区画化されている受け口を含んでなってもよく、このような容器は本発明の別々の要素を保持する。例えば、1つの容器は、不溶性または部分的可溶性の担体に結合された第1の抗体を含んでもよい。第2の容器は、可溶性の検出できるように標識された第2の抗体を、凍結乾燥形態でまたは溶液として含んでもよい。受け口はまた、検出できるように標識された第3の抗体を凍結乾燥形態でまたは溶液として保持する第3の容器を含んでもよい。この性質のキットは、本発明のサンドイッチアッセイにおいて使用し得る。ラベル表示または添付文書は、組成物の説明、ならびに意図されるイン・ビトロまたは診断上の使用に関する指示を提供し得る。

【0101】

キットはまた、細胞からのプロガストリンの精製または免疫沈降用の陽性対照として使用するために提供される。プロガストリンの単離および精製のために、キットは、ビーズ (例えば、セファロースビーズ) と結合した、本明細書に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体を含み得る。例えば、ELISAまたはウエスタンブロットにおいてイン・ビトロまたはエクス・ビボ (*ex vivo*) でプロガストリンを検出および定量するための抗体を含むキットが提供され得る。キットは、容器と、その容器上のまたはその容器に添付されたラベル表示または添付文書を含んでなる。容器は、本発明の少なくとも1つの抗体、またはその結合フラグメントもしくは誘導体を含んでなる組成物を保持する。例えば、希釈剤およびバッファー、対照抗体を含む追加の容器が含まれてもよい。ラベル表示または添付文書は、組成物の説明、ならびに意図されるイン・ビトロまたは診断上の使用に関する指示を提供し得る。

【0102】

本発明はまた、本発明の方法の実施形態に特徴的な一連の命令を含むプロダクト/コンピュータプログラムに関する。

【0103】

本発明はまた、演算装置と入力インターフェースを含み、本明細書に開示されているように、癌を発症するリスクを決定するための方法を実施するための手段を含むことを特徴とする処理システムに関する。

【0104】

図13に関して、本発明の特定の態様による装置(1)は、コンピューターの命令に従うことおよびデータを処理することが可能な演算装置(10)を含む。1つのこのような演算装置は、優先的にはマイクロプロセッサ(110)を含み、これは現況技術に既知のいずれの種類であってもよい。演算装置(10)はまた、方法の実施形態に特徴的な一

10

20

30

40

50

連の命令を含むコンピュータープログラムの受信が可能で、データの保存が可能な記憶装置(100)も有する。

【0105】

装置(1)はまた、装置(1)のオペレーター(0)に処理されるデータの入力を可能とする、演算装置(10)に接続された入力インターフェース(12)も含む。1つのこのような入力インターフェース(12)は、ポインティングデバイス要素と関連していてもよいキーボード要素などの演算装置(10)用のこのようなデータの入力が可能ないずれかの要素を含む。

【0106】

優先的には、演算装置は、一方で、入力されたデータの完全性をユーザーが検証することを可能とし、他方で、演算装置(10)がオペレーター(0)と対話できるようにすることを可能とする画面などの出力インターフェース(14)をさらに含む。

10

【0107】

装置(1)は、コンピューター、スマートフォンまたは本発明の方法の実施形態を可能とする現況技術に既知のいずれかの他のシステムなどの単一のシステムに統合し得る。オペレーター(0)は、いずれの熟練レベルでもあり得、よって、医療資格を保有していてもしていなくてもよい。

【0108】

本発明の特定の態様によれば、オペレーター(0)により入力されたデータは、本発明の方法を実施することができ、よってサーバーにより受信されたデータを処理することができる演算装置を含んでなるリモートサーバーに、優先的には安全な方法で、ネットワーク(例えばインターネット)を介して送られることが、特に想定される。所望により、前記処理の後、サーバーは、同じネットワークまたは別のネットワークを介して分析結果をユーザーに戻す。所望により、サーバーは、データおよび/または分析結果を記録の手段で記録する。明らかに、ドナーおよびレシピエントの生理学的/臨床的特徴の匿名性を保証する手段が想定され得る。

20

【0109】

よって、1つのこのような装置(1)は、本発明の方法の実施形態を可能とする。すなわち、

入力インターフェース(12)を用いて、演算装置(10)に生理学的/臨床的特徴を入力する工程(工程22)(前記特徴は、サンプル(10)におけるプロガストリンのレベルを含む(工程23))、

30

所望により、演算装置(10)によるデータ処理を介して前記プロガストリンレベルを正規化する工程(工程24)、および

癌の発生リスクを決定するために、前記リスクスコアを分析する工程(工程25)の実施形態を可能とする。

【0110】

よって、本発明の方法は、臨床職員または病院職員によるだけでなく、臨床研究に関与する全職員(医薬品業界、科学者、医師など)または一般大衆によっても実施可能である。

40

【0111】

以下に示す実施例は、本発明の範囲および本開示の内容を単に例証したものである。当業者ならば、本発明の範囲から逸脱することなく、以下に示す実施例に対する多数の修正を考案および構築することができる。

【図面の簡単な説明】

【0112】

【図1】図1：結腸直腸癌に関する受信者動作特性(ROC)曲線(上のパネル)とROC曲線下面積および統計分析(下のパネル)。

【図2】図2：N末端ポリクローナル抗体とC末端ポリクローナル抗体の組合せを用いた、結腸直腸癌患者(n=148)および対照患者(n=103)におけるプロガストリン

50

の血漿中濃度の中央値 - マン・ホイットニー検定 (両側)、* * * $p < 0.0001$ 。

【図3】図3：肝細胞癌に関する受信者動作特性 (ROC) 曲線 (上のパネル) と ROC 曲線下面積および統計分析 (下のパネル)。

【図4】図4：N末端ポリクローナル抗体とC末端ポリクローナル抗体の組合せを用いた、肝細胞癌患者 ($n = 47$) および対照患者 ($n = 103$) におけるプロガストリンの血漿中濃度の中央値 - マン・ホイットニー検定 (両側)、* * * $p < 0.0001$ 。

【図5】図5：食道癌に関する受信者動作特性 (ROC) 曲線 (上のパネル) と ROC 曲線下面積および統計分析 (下のパネル)。

【図6】図6：N末端ポリクローナル抗体とC末端ポリクローナル抗体の組合せを用いた、食道癌患者 ($n = 12$) および対照患者 ($n = 103$) におけるプロガストリンの血漿中濃度の中央値 - マン・ホイットニー検定 (両側)、* * * $p < 0.0001$ 。

【図7】図7：胃癌 (gastric cancer) に関する受信者動作特性 (ROC) 曲線 (上のパネル) と ROC 曲線下面積および統計分析 (下のパネル)。

【図8】図8：N末端ポリクローナル抗体とC末端ポリクローナル抗体の組合せを用いた、胃癌 (gastric cancer) 患者 ($n = 15$) および対照患者 ($n = 103$) におけるプロガストリンの血漿中濃度の中央値 - マン・ホイットニー検定 (両側)、* * $p < 0.001$ 。

【図9】図9：膵癌に関する受信者動作特性 (ROC) 曲線 (上のパネル) と ROC 曲線下面積および統計分析 (下のパネル)。

【図10】図10：N末端ポリクローナル抗体とC末端ポリクローナル抗体の組合せを用いた、膵癌患者 ($n = 44$) および対照患者 ($n = 103$) におけるプロガストリンの血漿中濃度の中央値 - マン・ホイットニー検定 (両側)、* * * $p < 0.0001$ 。

【図11】図11：卵巣癌に関する受信者動作特性 (ROC) 曲線 (上のパネル) と ROC 曲線下面積および統計分析 (下のパネル)。

【図12】図12：N末端ポリクローナル抗体とC末端ポリクローナル抗体の組合せを用いた、卵巣癌患者 ($n = 8$) および対照患者 ($n = 103$) におけるプロガストリンの血漿中濃度の中央値。

【図13】図13：本発明の特定の態様による処理システムの概略図。

【図14】図14：本発明の特定の態様による方法を表した機能グラフ。

【図15】図15：ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の組合せを用いた、種々の癌型の患者 ($n = 231$) および対照患者 ($n = 322$) におけるプロガストリンの血漿中濃度の中央値。

【図16】図16：ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体 (mAb - pAb) の組合せまたはモノクローナル抗体 (mAb - mAb) の組合せを用いた、種々の癌型の患者 ($n = 10$) におけるプロガストリンの血漿中濃度の中央値 - マン・ホイットニー検定 (両側)、NS $p > 0.05$ 。

【実施例】

【0113】

実施例1：ポリクローナル抗体を用いた血漿中プロガストリン濃度の検出

2種類の特異的抗プロガストリン抗体を用いて、ELISAにより血漿中プロガストリンレベルを定量した：捕捉抗体をプレートのウェルにコーティングし、一方、可視化抗体を用いてプロガストリンを検出し、シグナルの可視化を媒介する。

【0114】

本実施例では、定量は、反応が光を発する基質を使用することにより、捕捉抗体が保持する抗原に結合された抗体の発光量に比例する値を割り当てることが可能なELISA法に基づいている。

【0115】

材料

試薬および機器を表7に示す：

【0116】

10

20

30

40

50

【表 7】

名称	供給業者	参照
プレート MaxiSORP ホワイトヌク、96 ウェル	Dutscher	# 055221
炭酸ナトリウム/重炭酸	Sigma	# 21851
DPBS 1 倍	Lonza	# P04-36500
ツイーン 20	Biosolve	# 20452335
BSA	Euromedex	# 04-100-810-C
ストレプトアビジン-HRP	Pierce (Thermo)	# 21130
スーパーシグナル ELISA フェムト最大感度基質	Pierce (Thermo)	# 37074
抗プロガストリンポリクローナル抗体	Eurogentec	/

10

【 0 1 1 7 】

ポリクローナル抗体は、標準プロトコールに従い、N末端プロガストリン（配列番号 2）、またはhPGのアミノ酸71～80に相当し、配列FGRRSAEDEN（配列番号 40）を有するC末端プロガストリンでウサギを免疫することによって得た。

20

【 0 1 1 8 】

本アッセイに用いたプロガストリンに対するポリクローナル抗体の結合の特徴は、以下の通りである：G34-Gly、G34、G17-Gly、G17に結合せず、全長プロガストリンに結合する。

【 0 1 1 9 】

1つのカプセル剤の内容物を100mLのミリQ水に溶解して、50mM、pH9.6の炭酸-重炭酸ナトリウムの溶液を調製することにより、96ウェルプレートをコーティングする。プロガストリンFGRRSAEDEN（配列番号40）のC末端を用いて得られるポリクローナル抗体に相当する捕捉抗体溶液（3μg/mL）を、炭酸バッファー中で調製する。100マイクロリットルの抗体溶液を各ウェルに添加し、4で16時間インキュベートする（一晩）。次に、抗体溶液を除去してプレートをブロッキングし、300μLの1倍PBS/0.1%ツイーン20で3回洗浄した後、ウェルあたり200μLのブロッキングバッファー（1倍PBS/0.1%ツイーン20/0.1%BSA）を添加し、22で2時間インキュベートする。次に、ブロッキングバッファーを除去し、ウェルを300μLの1倍PBS/0.1%ツイーン20で3回洗浄する。

30

【 0 1 2 0 】

血漿の希釈は、以下のように実施する：血漿は純品として使用し、1/2、1/5および1/10に希釈する。1倍PBS/0.1%ツイーン20/0.1%BSA中に純粋血漿から希釈溶液を調製する。

40

【 0 1 2 1 】

対照試験、すなわち、既知濃度のプロガストリンの存在下でのELISAに関しては、プロガストリン希釈溶液を以下のように調製する：ストック組換えPG（パスツール研究所、パリ、フランスから得た、大腸菌で産生され、グルタチオンアガロース/標識除去（TeV）/IMACカウンター精製/透析でアフィニティー精製された全長ヒトプロガストリン）を、0.45mg/mL（45マイクロモル）の濃度にて3反復で調製する。プロガストリン濃度の範囲は、以下のように調製した：

- ・溶液A：前希釈1/10、2μLのストック+18μLのバッファー
- ・溶液B：前希釈1/100、10μLのA+90μLのバッファー
- ・溶液C：前希釈1/1000、10μLのB+90μLのバッファー

50

- ・溶液D：500 pM、5,55 μ LのC + 494.5 μ Lの希釈剤
- ・溶液E：250 pM、250 μ LのD + 250 μ Lの希釈剤
- ・溶液F：100 pM、200 μ LのE + 300 μ Lの希釈剤
- ・溶液G：50 pM、250 μ LのF + 250 μ Lの希釈剤
- ・溶液H：25 pM、200 μ LのG + 200 μ Lの希釈剤
- ・溶液I：10 pM、100 μ LのH + 150 μ Lの希釈剤

【0122】

組換えPGの範囲は線形であるため、使用する抗体に応じて多少広範囲とすることができる。

【0123】

試験サンプルの調製のために、およそ500 μ Lの各サンプルを取っておき、結果の分析（および必要な場合は確認）まで保存する。範囲の各点の100 μ Lおよび/または血漿を純品としてアッセイし、1/2、1/5および1/10に希釈し、プレート上で22で2時間インキュベートする。

【0124】

試験の可視化のために、プレートを300 μ Lの1倍PBS/0.1%ツイーン20で3回洗浄する。ビオチンと結合して0.5 μ g/mLとなった、免疫原としてプロガストリンのN末端部分を用いて得られたポリクローナルウサギ抗プロガストリン抗体の溶液を、1倍PBS/0.1%ツイーン20/0.1%BSAでの希釈により調製する。この溶液100 μ Lを各ウェルに添加する。22で1時間インキュベートする。検出抗体を除去することにより、ストレプトアビジン-HRPによる可視化を実施し、300 μ Lの1倍PBS/0.1%ツイーン20で3回洗浄した後、1倍PBS/0.1%ツイーン20/0.1%BSAで希釈された20 ng/mLのストレプトアビジン-HRP溶液を調製し、ここで、この溶液100 μ Lを各ウェルに添加した後、22で1時間インキュベートする。

【0125】

検出は、ストレプトアビジン-HRPを除去し、300 μ Lの1倍PBS/0.1%ツイーン20で3回洗浄した後、ウェルあたり100 μ Lの化学発光基質溶液を添加することから構成される。基質溶液は、使用する30分前に、スーパーシグナルELISAフェムトキットの2種類の溶液を等容量（20 mL + 20 mL）混合することにより調製し、暗所に室温で保存する。暗所において室温で5分間インキュベートした後、発光を読み取る。

【0126】

各条件につき、試験を3反復で実施し、範囲の結果は、プロガストリン濃度に依存した発光の変化を示すグラフとして示す。各血漿希釈溶液に関して、相当する範囲（1/10に希釈したサンプルについては範囲1/10）の線形回帰直線の式を用いて、プロガストリンの濃度を決定する。

【0127】

方法および結果

後に癌を発症したことが判明した対象由来の血漿サンプルにおいて、プロガストリンレベルを決定した。プロガストリンは、C末端に対して特異的なポリクローナル抗体で捕捉した。検出は、N末端に対して特異的な標識ポリクローナル抗体を用いて実施した。

【0128】

重要なことに、サンプル採取の時点で、これらの対象は癌と診断されたことがなく、癌に関連するいずれの症状も示していなかった。対照は、一般集団由来の血漿サンプルから構成された。

【0129】

結果を図1～12に示す。プロガストリンの血漿中濃度の中央値は、後に結腸直腸癌を発症した患者（n = 148）において17 pM、肝細胞癌を発症した患者（n = 47）において100 pM、食道癌を発症した患者（n = 12）において42.3 pM、胃癌を発

10

20

30

40

50

症した患者 (n = 15) において 17.90 pM、膵癌を発症した患者 (n = 44) において 16.6 pM、卵巣癌を発症した患者 (n = 8) において 8.45 であった。比較として、対照対象 (n = 103) におけるプロガストリンの血漿中濃度の中央値は、0 pM である。

【0130】

これらのデータは、癌を将来発症する患者は、血漿中に検出可能なレベルのプロガストリンを有するが、健常対照個体は有しないことを示している。プロガストリンは、いずれかの癌が診断され得る前ですら検出することができるため、プロガストリンは癌発症の有用なバイオマーカーとなる。ROC分析では、上記の癌のそれぞれについて、プロガストリンの予測的性質が確認された。

10

【0131】

これらのデータは、癌を発症するリスクを有する患者は、健常対照個体と比較して、血漿中プロガストリン濃度が高いことを示している。

【0132】

実施例 2：ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の組合せを用いた血漿中プロガストリン濃度の検出

本実施例では、96 ウェルプレートにプレコーティングされたヒトプロガストリン (hPG) に対して特異的な抗体を使用して、ELISAにより血漿中プロガストリンレベルを定量した。標準物質およびサンプルをウェルに添加し、hPGが存在すれば固定化捕捉抗体に結合する。ウェルを洗浄し、抗hPG検出抗体セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) コンジュゲートを添加し、抗体-抗原-抗体の「サンドイッチ」を作製する。2回目の洗浄後、TMB基質溶液を添加すると、最初のサンプル中に存在するhPGの量と正比例して青色が生じる。停止液で色を青色から黄色に変化させ、マイクロプレートリーダーを用いて450 nmでウェルを読み取る。

20

【0133】

ポリクローナル抗体は、標準プロトコールに従い、N末端プロガストリン (配列番号 2)、またはhPGのアミノ酸71~80に相当し、配列FGRRSAEDEN (配列番号 40) を有するC末端プロガストリンでウサギを免疫することによって得た。

【0134】

モノクローナル抗体は、標準プロトコールに従い、N末端プロガストリン (配列番号 2)、またはhPGのアミノ酸71~80に相当し、配列FGRRSAEDEN (配列番号 40) を有するC末端プロガストリンに対する抗体を産生するハイブリドーマを用いて得た。

30

【0135】

本アッセイに用いたプロガストリンに対するポリクローナルおよびモノクローナル抗体の結合の特徴は、以下の通りである：G34 - Gly、G34、G17 - Gly、G17に結合せず、全長プロガストリンに結合する。

【0136】

対照試験、すなわち、既知濃度のプロガストリンの存在下でのELISAに関しては、プロガストリン希釈溶液を以下のように調製する：ストック組換えPG (パスツール研究所、パリ、フランスから得た、大腸菌で産生され、グルタチオンアガロース/標識除去 (Tev) / IMACカウンター精製/透析で精製された全長ヒトプロガストリン) を、0.45 mg/mL (45 マイクロモル) の濃度にて3反復で調製する。プロガストリン濃度の範囲は、以下のように調製した：

40

- ・溶液 A：前希釈 1 / 10、2 μ L のストック + 18 μ L のバッファー
- ・溶液 B：前希釈 1 / 100、10 μ L の A + 90 μ L のバッファー
- ・溶液 C：前希釈 1 / 1000、10 μ L の B + 90 μ L のバッファー
- ・溶液 D：500 pM、5,55 μ L の C + 494.5 μ L の希釈剤
- ・溶液 E：250 pM、250 μ L の D + 250 μ L の希釈剤
- ・溶液 F：100 pM、200 μ L の E + 300 μ L の希釈剤

50

- ・溶液 G : 50 pM、250 μ L の F + 250 μ L の希釈剤
- ・溶液 H : 25 pM、200 μ L の G + 200 μ L の希釈剤
- ・溶液 I : 10 pM、100 μ L の H + 150 μ L の希釈剤

組換え PG の範囲は線形であるため、使用する抗体に応じて多少広範囲とすることができる。

【0137】

方法および結果

後に癌を発症したことが判明した対象由来の血漿サンプルにおいて、プロガストリンレベルを決定した。プロガストリンは、WO 2011/083088 に記載のハイブリドーマ 2H9F4B7 により産生される C 末端モノクローナル抗体 mAb 14 で捕捉した (ハイブリドーマ 2H9F4B7 は、ブダペスト条約の下、2016 年 12 月 27 日に参照番号 I-5158 として CNCM、パスツール研究所 (25-28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris CEDEX 15, France) に寄託されたものである)。検出は、N 末端に対して特異的な標識ポリクローナル抗体を用いて実施した。

10

【0138】

重要なことに、サンプル採取の時点で、これらの対象は癌と診断されたことがなく、癌に関連するいずれの症状も示していなかった。対照は、一般集団由来の血漿サンプルから構成された。

【0139】

結果を図 15 に示す。プロガストリンの血漿中濃度の中央値は、癌の種類に応じた患者 (n = 231) において 2.750 ~ 21.5 pM であった。比較として、対照対象 (n = 322) におけるプロガストリンの血漿中濃度の中央値は、0 pM である。

20

【0140】

これらのデータは、癌を将来発症する患者は、血漿中に検出可能なレベルのプロガストリンを有するが、健常対照個体は有しないことを示している。プロガストリンは、いずれかの癌が診断される前ですら検出することができるため、プロガストリンは癌発症の有用なバイオマーカーとなる。

【0141】

これらのデータは、癌を発症するリスクを有する患者は、健常対照個体と比較して、血漿中プロガストリン濃度が高いことを示している。

30

【0142】

実施例 3 : モノクローナル抗体の組合せを用いた血漿中プロガストリン濃度の検出

本実施例では、96 ウェルプレートにプレコーティングされたヒトプロガストリン (hPG) に対して特異的な抗体を使用して、ELISA により血漿中プロガストリンレベルを定量した。標準物質およびサンプルをウェルに添加し、存在するいずれかの hPG が固定化捕捉抗体に結合する。ウェルを洗浄し、抗 hPG 検出抗体セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) コンジュゲートを添加し、抗体 - 抗原 - 抗体の「サンドイッチ」を作製する。2 回目の洗浄後、TMB 基質溶液を添加すると、最初のサンプル中に存在する hPG の量と正比例して青色が生じる。停止液で色を青色から黄色に変化させ、マイクロプレートリーダーを用いて 450 nm でウェルを読み取る。

40

【0143】

ポリクローナル抗体は、標準プロトコールに従い、N 末端プロガストリン (配列番号 2)、または hPG のアミノ酸 71 ~ 80 に相当し、配列 FGRRSAEDEN (配列番号 40) を有する C 末端プロガストリンでウサギを免疫することによって得た。

【0144】

モノクローナル抗体は、標準プロトコールに従い、N 末端プロガストリン (配列番号 2)、または hPG のアミノ酸 71 ~ 80 に相当し、配列 FGRRSAEDEN (配列番号 40) を有する C 末端プロガストリンに対する抗体を産生するハイブリドーマを用いて得た。

50

【 0 1 4 5 】

本アッセイに用いたプロガストリンに対するポリクローナルおよびモノクローナル抗体の結合の特徴は、以下の通りである：G 3 4 - G l y、G 3 4、G 1 7 - G l y、G 1 7 に結合せず、全長プロガストリンに結合する。

【 0 1 4 6 】

対照試験、すなわち、既知濃度のプロガストリンの存在下での E L I S A に関しては、プロガストリン希釈溶液を以下のように調製する：ストック組換え P G (パスツール研究所、パリ、フランスから得た、大腸菌で産生され、グルタチオンアガロース / 標識除去 (T e v) / I M A C カウンター精製 / 透析でアフィニティー精製された全長ヒトプロガストリン) を、0 . 4 5 m g / m L (4 5 マイクロモル) の濃度にて 3 反復で調製する。プロガストリン濃度の範囲は、以下のように調製した：

- ・溶液 A : 前希釈 1 / 1 0、2 μ L のストック + 1 8 μ L のバッファー
- ・溶液 B : 前希釈 1 / 1 0 0、1 0 μ L の A + 9 0 μ L のバッファー
- ・溶液 C : 前希釈 1 / 1 0 0 0、1 0 μ L の B + 9 0 μ L のバッファー
- ・溶液 D : 5 0 0 p M、5 , 5 5 μ L の C + 4 9 4 . 5 μ L の希釈剤
- ・溶液 E : 2 5 0 p M、2 5 0 μ L の D + 2 5 0 μ L の希釈剤
- ・溶液 F : 1 0 0 p M、2 0 0 μ L の E + 3 0 0 μ L の希釈剤
- ・溶液 G : 5 0 p M、2 5 0 μ L の F + 2 5 0 μ L の希釈剤
- ・溶液 H : 2 5 p M、2 0 0 μ L の G + 2 0 0 μ L の希釈剤
- ・溶液 I : 1 0 p M、1 0 0 μ L の H + 1 5 0 μ L の希釈剤

組換え P G の範囲は線形であるため、使用する抗体に応じて多少広範囲とすることができる。

【 0 1 4 7 】

方法および結果

後に癌を発症したことが判明した対象由来の血漿サンプルにおいて、プロガストリンレベルを決定した。プロガストリンは、W O 2 0 1 1 / 0 8 3 0 8 8 に記載のハイブリドーマ 2 H 9 F 4 B 7 により産生される C 末端モノクローナル抗体 m A b 1 4 で捕捉した (ハイブリドーマ 2 H 9 F 4 B 7 は、ブダペスト条約の下、2 0 1 6 年 1 2 月 2 7 日に参照番号 I - 5 1 5 8 として C N C M、パスツール研究所 (2 5 - 2 8 r u e d u D o c t e u r R o u x , 7 5 7 2 4 P a r i s C E D E X 1 5 , F r a n c e) に寄託されたものである)。検出は、N 末端に対して特異的な、W O 2 0 1 1 / 0 8 3 0 8 8 に記載の標識モノクローナル抗体 m A b 1 6 を用いて実施した。

【 0 1 4 8 】

重要なことに、サンプル採取の時点で、これらの対象は癌と診断されたことがなく、癌に関連するいずれの症状も示していなかった。対照は、一般集団由来の血漿サンプルから構成された。

【 0 1 4 9 】

結果を図 1 6 に示す。m A b - p A b および m A b - m A b を用いたプロガストリンの血漿中濃度の中央値は、中央値 (それぞれ 8 . 2 対 6 . 6 p M) および平均値 (それぞれ 1 8 . 9 9 対 1 6 . 7 9 p M) において同程度であった (n = 1 0)。

【 0 1 5 0 】

これらのデータは、m A b - p A b および m A b - m A b E L I S A サンドイッチ試験は、双方とも患者の血漿中のプロガストリンを検出することを示している。重要なことに、両試験間の有意差は同定することができなかった。特に、m A b - p A b と m A b - m A b サンドイッチの感度は非常に類似していた。従って、m A b - m A b E L I S A サンドイッチは、いずれかの癌が診断される前ですら患者の血漿中のプロガストリンの検出に信頼して用いることができるため、プロガストリンは癌発症の有用なバイオマーカーとなる。

【 0 1 5 1 】

これらのデータは、癌を発症するリスクを有する患者は、健常対照個体と比較して、血

10

20

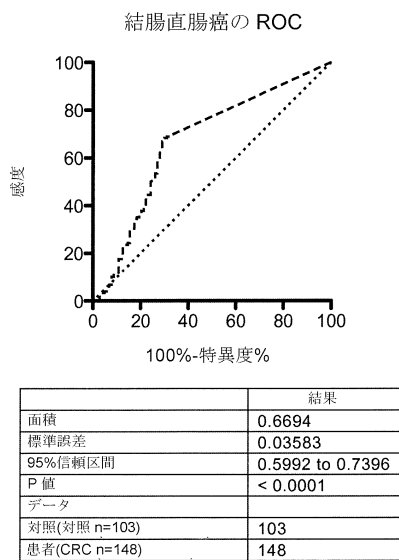
30

40

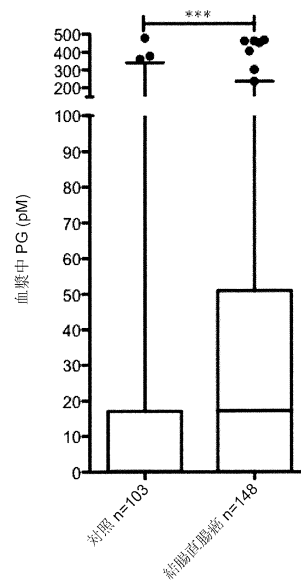
50

漿中プロガストリン濃度が高いことを示している。

【 図 1 】

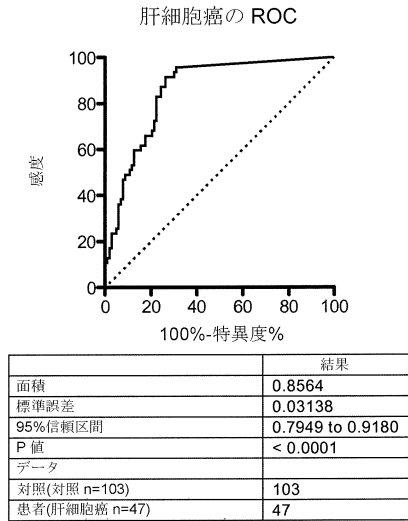


【 図 2 】

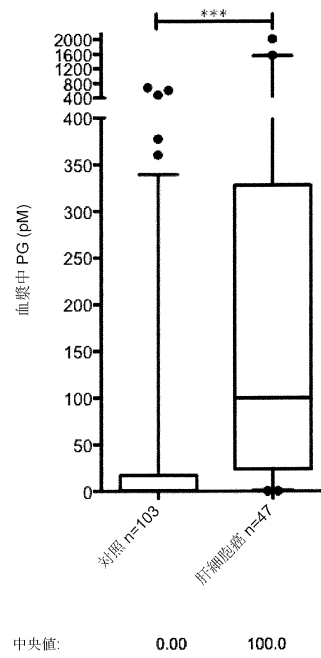


中央値: 0.00 17

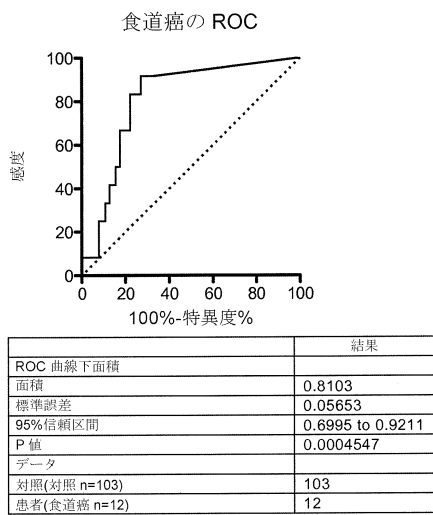
【 図 3 】



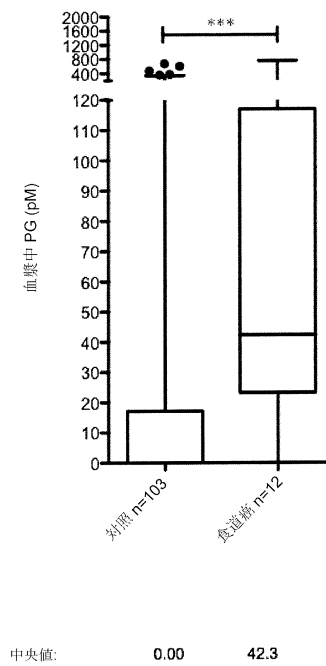
【 図 4 】



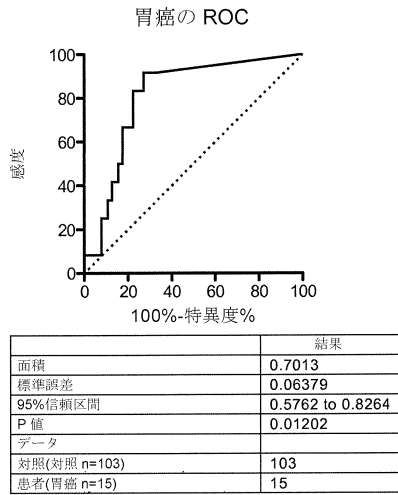
【 図 5 】



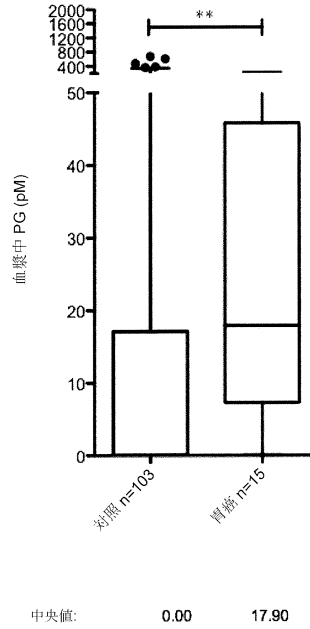
【 図 6 】



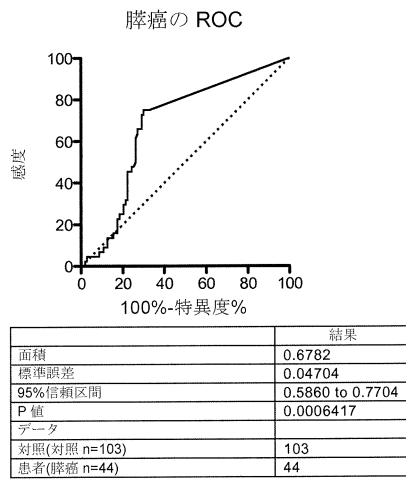
【図7】



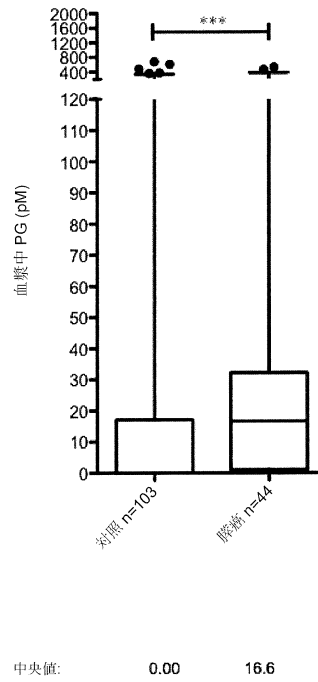
【図8】



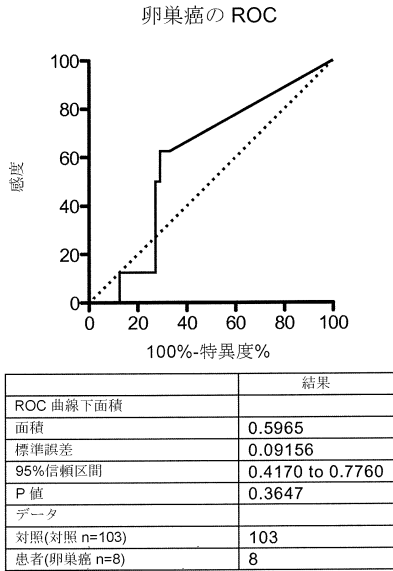
【図9】



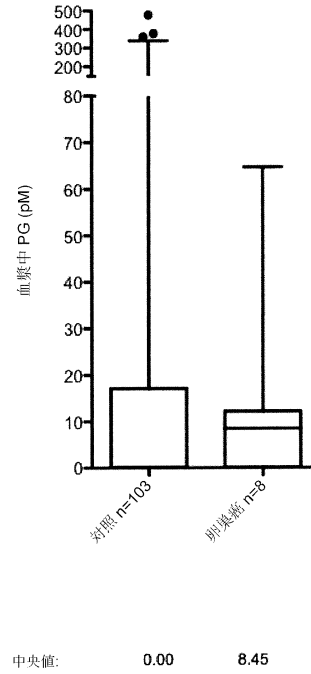
【図10】



【 図 1 1 】

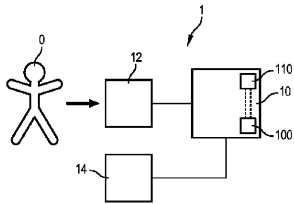


【 図 1 2 】



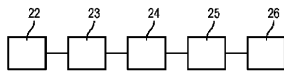
【 図 1 3 】

Figure 13

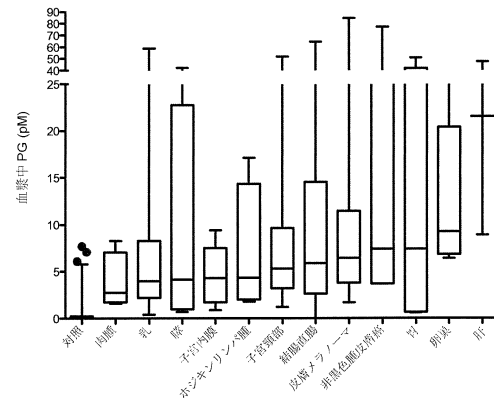


【 図 1 4 】

Figure 14

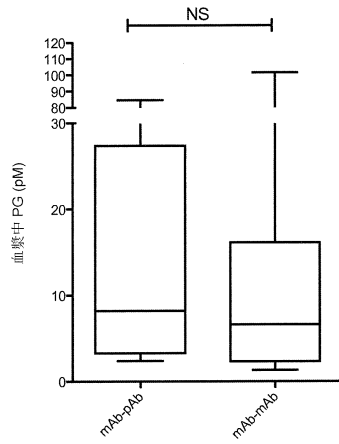


【 図 1 5 】



	サンプル数	中央値
対照	322	0.000
肉腫	4	2.750
乳	65	4.000
肺	6	4.150
子宮内腫	5	4.300
ホジキンリンパ腫	4	4.350
子宮頸部	25	5.300
結腸直腸	52	5.900
皮膚メラノーマ	46	6.450
NMSC	9	7.400
胃	4	7.400
卵巣	8	9.250
肝	3	21.50

【 図 16 】



	mAb-pAb	mAb-mAb
サンプル数	10	10
中央値	8,200	6,600
平均値	18,99	16,79

【 配列表 】

0006940505000001.app

フロントページの続き

微生物の受託番号 CNCM I-5158

(72)発明者 ジャン、フランソワ、フロック
フランス国ガルラン、シャトー、ボア、デ、ラ、ロッシュ

審査官 大瀧 真理

(56)参考文献 国際公開第2012/164035(WO, A1)
特表2013-516437(JP, A)
特表2013-516617(JP, A)
特表2013-507138(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48 - 33/98
C07K 16/30
C12N 15/06
C12N 15/13