

(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2004-536282

(P2004-536282A)

(43) 公表日 平成16年12月2日(2004.12.2)

(51) Int.Cl.⁷

GO 1 N 33/569

C 1 2 N 15/09

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/70

GO 1 N 33/48

F I

GO 1 N 33/569

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/70

GO 1 N 33/48

GO 1 N 33/50

L

A

Z N A

B

P

テーマコード (参考)

2 GO 4 5

4 BO 2 4

4 BO 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-561083 (P2002-561083)

(86) (22) 出願日 平成14年1月30日 (2002.1.30)

(85) 翻訳文提出日 平成15年7月31日 (2003.7.31)

(86) 国際出願番号 PCT/GB2002/000411

(87) 国際公開番号 W02002/061148

(87) 国際公開日 平成14年8月8日 (2002.8.8)

(31) 優先権主張番号 60/265,568

(32) 優先日 平成13年1月31日 (2001.1.31)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 503275990

ザ チャイニーズ ユニバーシティ オブ
ホンコンTHE CHINESE UNIVERS
ITY OF HONG KONG香港 ニュー テリトリーズ シャティン
ピ チウ ビルディング ルーム 2 2

6

(74) 代理人 100068755

弁理士 恩田 博宣

(74) 代理人 100105957

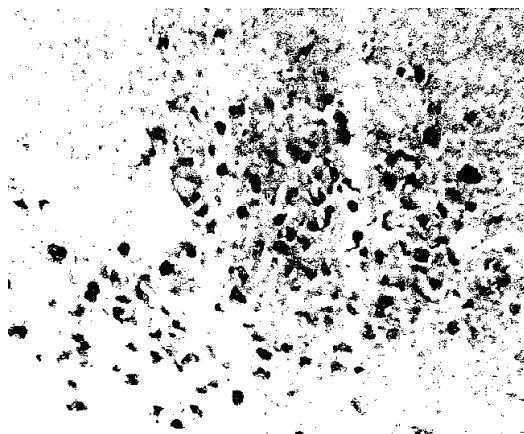
弁理士 恩田 誠

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 胃がん患者の血清中の、血中を循環するエプスタイン・バーウイルスDNA

(57) 【要約】

本発明は、患者の血清もしくは血漿中に存在するEBV DNAを検出または測定することにより、該患者の胃がん、頭部および頸部以外のリンパ系悪性腫瘍、および胃炎を診断し、検出し、モニターし、予後を判断する方法を特徴とする。本発明は、患者の血清または血漿中のEBV DNAを検出するのに適した試薬を備えた診断用キットをも特徴とする。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 胃炎を患っている患者から細胞を含まない血液由来の液体試料を採取すること、および

(b) 前記液体についてエプスタイン・バーウイルスが存在するか存在しないかをアッセイすることと、ウイルスの存在が、該患者が胃がんに行進しつつある可能性の増大の指標であることと、

により、胃炎を患っている患者が胃がんに行進しつつある可能性の増大を判断する方法。

【請求項 2】

(1) 患者から血液試料を採取するステップと、

(2) 前記血液試料から液体画分を採取するステップと、

(3) 前記液体画分から DNA を抽出するステップと、

(4) 前記液体画分中に存在する血中循環 EBV DNA の量を測定するステップと
からなる請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

(5) 前記液体画分中に存在する血中循環 EBV DNA の量を対照と比較するステップ
からさらになる請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

液体画分 1 ミリリットルあたり少なくとも約 500 コピーの EBV DNA が存在する請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

液体画分 1 ミリリットルあたり少なくとも 1 コピーの EBV DNA が存在する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

血液は血漿試料である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

アッセイは核酸プローブを用いた EBV ウイルス核酸のハイブリダイゼーションを含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

アッセイはポリメラーゼ連鎖反応に基づくアッセイである請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 9】

患者は慢性胃炎と診断されている請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

患者は胃がんであると診断可能であり、がん細胞は EBV 核酸を含まない請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

患者は胃がんであると診断可能であり、がん細胞が EBV 核酸を含んでいる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

患者の血清または血漿中に存在する EBV DNA を検出するステップからなる、患者における頭部および頸部以外の悪性腫瘍、もしくはリンパ系悪性腫瘍を診断し、検出し、モニターし、または予後を判断する方法。

40

【請求項 13】

(1) 患者から血液試料を採取するステップと、

(2) 前記血液試料から液体画分を採取するステップと、

(3) 前記液体画分から DNA を抽出するステップと、

(4) 前記液体画分中に存在する血中循環 EBV DNA の量を測定するステップと
からなる請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

(5) 前記液体画分中に存在する血中循環 EBV DNA の量を対照と比較するステップ

50

からさらになる請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

患者の血清または血漿中に存在する E B V D N A を検出するステップからなる、患者の胃炎を診断し、検出し、モニターし、または予後を判断する方法。

【請求項 16】

(1) 患者から血液試料を採取するステップと、
(2) 前記血液試料から液体画分を採取するステップと、
(3) 前記液体画分から D N A を抽出するステップと、
(4) 前記液体画分中に存在する血中循環 E B V D N A の量を測定するステップと
からなる請求項 15 に記載の方法。

10

【請求項 17】

(5) 前記血液試料中に存在する血中循環 E B V D N A の量を対照と比較するステップ
からさらになる請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

胃炎を患っている患者が胃がんに進捗しつつある可能性の増大を判断するためのキットであって、単一のキット製品中に

(a) 患っている患者の血液中のエプスタイン・バーウイルスを検出するための核酸、および

(b) エプスタイン・バーウイルスが存在するか存在しないかを判断するための核酸の使用に関する指示書、およびウイルスが血液中に存在する場合の患者が胃がんに進捗しつつある可能性の増大についての説明書を備えたキット。

20

【請求項 19】

血清または血漿中の E B V D N A を検出するのに適した試薬を備えた、患者の血清または血漿中の E B V D N A を検出するための診断用キット。

【請求項 20】

患者から血液試料を採取するためのデバイスを備えた請求項 19 に記載の診断用キット。

【請求項 21】

血液試料から E B V D N A を分離するための手段を備えた請求項 19 に記載の診断用キット。

30

【請求項 22】

血液試料中に存在する E B V D N A の量を定量するための手段を備えた請求項 19 に記載の診断用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、エプスタイン・バーウイルスが患者の血液由来の細胞を含まない液体に見出されることがあり、そのようなウイルスが見出されかつその患者が胃炎であるときは、その患者は胃炎から胃がんへと進行しやすい傾向を有する、という発見に関する。

【背景技術】

40

【0002】

がん由来の D N A が様々な腫瘍のがん細胞から放出されることが知られている (アンカーら (Anker et al.)、Cancer Metastasis Rev. 第 18 巻、65 - 73 ページ、1999 年)。例としては、すい臓がん由来のがん遺伝子突然変異体 (アンカーら (Anker et al.)、Gastroenterology、第 112 巻、4 - 1120 ページ、1997 年)、肺がんにおけるマイクロサテライトの変化 (チェンら (Chen et al.)、Nature Medicine、第 2 巻、3 - 1035 ページ、1996 年)、および肝臓がん由来のエピジェネティックな変化 (ウォンら (Wong et al.)、Cancer Res. 第 59 巻、3 ページ、1999 年) などがある。さらに、ウイルス感染と関連があるとして知られている多

50

くのがんの血液循環中にウイルスDNAが見出されている。例としては、上咽頭がん（マチラングラら（Mutirangura et al.）、Clin Cancer Res. 第4巻、665 - 9ページ、1998年；ローら（Lo et al.）、Cancer Res. 第59巻、1188 - 91ページ、1999年）およびある種のリンパ腫（レイら（Lei et al.）、Br J Haematol. 第111巻、239 - 46ページ、2000年；ガラガーら（Gallagher et al.）、Int J Cancer. 第84巻、442 - 8ページ、1999年；ドルーエら（Drouet et al.）、J Med Virol. 第57巻、383 - 9ページ、1999年）からのエプスタイン・バーウイルス（EBV）DNA、ならびに頭部および頸部がんからのヒトパピローマウイルスDNA（カポネら（Caponne et al.）、Clin Cancer Res. 第6巻、4171 - 5ページ、2000年）などがある。

10

【0003】

近年、がん患者の血漿および血清中のがん由来DNAの存在に非常に注目が集まっている（チェン、エックス キューら（Chen, X. Q. et al.）Nat. Med. 第2巻、1033 - 1035ページ、1996年；ノウロツ、エイチら（Nawroz, H. et al.）、Nat. Med. 第2巻、1035 - 1037ページ、1996年）。ウイルスに関連のあるがんについては、患者の血漿および血清中に細胞から離れた腫瘍関連ウイルスDNAが検出されている（マチラングラ、エーら（Mutirangura, A. et al.）、Cancer Res. 第4巻、665 - 669ページ、1998年；ロー、ワイ エム ディーら（Lo, Y. M. D. et al.）、Clin. Cancer Res. 第59巻、1188 - 1191ページ、1999年；カポネ、アール ビーら（Caponne, R. B. et al.）、Clin Cancer Res. 第6巻、4171 - 4175ページ、2000年）。多くのタイプの悪性腫瘍に関連付けられてきた1つの重要なウイルスはエプスタイン・バーウイルス（EBV）である（コーエン、ジェイ アイ（Cohen, J. I.）、N. Engl. J. Med. 第343巻、481 - 492ページ、2000年）。エプスタイン・バーウイルス（EBV）は、ヒト集団の大多数に感染するヒトヘルペスウイルスである。EBVは通常唾液を介して感染し、Bリンパ球に潜伏感染を成立させ、宿主の生存している間はそこに存続する。これについては、上咽頭がん（NPC）（マチラングラ、エーら（Mutirangura, A. et al.）、Cancer Res. 第4巻、665 - 669ページ、1998年；ロー、ワイ エム ディーら（Lo, Y. M. D. et al.）、Clin. Cancer Res. 第59巻、1188 - 1191ページ、1999年）およびある種のリンパ腫（レイ、ケイ アイら（Lei, K. I. et al.）、Br. J. Haematol. 第111巻、239 - 246ページ、2000年；ドルーエ、イーら（Drouet, E. et al.）、J. Med. Virol. 第57巻、383 - 389ページ、1999年；ガラガー、エーら（Gallagher, A. et al.）、Int. J. Cancer. 第84巻、442 - 8ページ、1999年）の患者の血漿および血清中に、血中を循環している（血中循環）EBV DNAが検出されている。

20

30

【0004】

EBV感染が胃がんの一部と関係があるという報告もされている（シバタ、ディーら（Shibata, D. et al.）、Am. J. Pathol. 第140巻、769 - 774ページ、1992年）。香港では、胃がん症例の約10%についてEBV感染との関連が見出されている（イェン、エス ティーら（Yuen, S. T. et al.）、Am. J. Surg. Pathol. 第18巻、1158 - 1163ページ、1994年）。

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、胃がん患者の血清中のEBV DNAを検出し、そのようにして検出されたE

50

B V D N A の量を臨床上の診断または予後の判断に関連付ける方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

第1の態様では、本発明は、患者の胃がんを診断し、検出し、モニターし、予後を判断する方法を特徴とする。該方法は胃がん患者の血清もしくは血漿中に存在するエプスタイン・バーウイルスDNA (E B V D N A) の量を検出または測定することを特徴とする。従って、本発明は臨床医学において広範な適用性を有する。

【0007】

本発明の方法を、乳がんをはじめとする、頭部および頸部以外のリンパ系悪性腫瘍を診断し、検出し、モニターし、予後を判断するために適用することも可能である。これらの新生物は、胃がん同様にE B V感染と関連付けられている。 10

【0008】

本発明の方法を、胃炎を診断し、検出し、モニターし、予後を判断するために適用することも可能である。E B V D N A は、胃炎をはじめとする、新生物ではない胃の疾患の患者の血漿および血清中に検出されうる。次には、胃炎は胃がんに関連付けられている。本発明は、胃がんの可能性があるかまたは胃がんと診断された患者、およびE B Vの核酸を含まないかまたはE B Vを含むがん細胞をさらに含む。

【0009】

本発明の方法は、通常(1)患者から血液試料を採取するステップと、(2)血液試料からDNAを抽出するステップと、(3)血液試料中に存在する血中循環E B V D N A の量を測定するステップと、(4)血液試料中に存在する血中循環E B V D N A の量を対照と比較するステップとからなる。当然のことであるが、本発明の方法を、患者から血液試料を採取するという作業ステップを伴わず、以前患者から採取された血液試料(またはそのような血液試料から得た液体画分もしくはDNA)について実施することも可能である。 20

【0010】

血液試料は、細胞を含まない液体試料であることが好ましい。細胞を含まないという語は、該試料が、凝血させて残りの液体から細胞を分離することにより細胞を取り出した血清、または凝血を阻害して液体画分を遠心分離することにより細胞を取り出したもの(血漿)のいずれかを意味する。E B V D N A は液体画分に関して測定される。E B V が細胞を含まない試料の液体中に見出される場合、該感染が活動性であり感染細胞がE B V を放出しているものと考えられる。 30

【0011】

第2の態様では、本発明は患者の血清または血漿中のE B V D N A を検出するのに適した試薬を備えた診断用キットを特徴とする。本発明のキットは、患者から血液試料を採取するための1つ以上のデバイスと、血液試料からE B V D N A を分離するための手段と、血液試料中に存在するE B V D N A の量を定量するための手段とをさらに備えても良い。そのようなキットは、胃がんおよび胃炎を診断し、検出し、モニターし、予後を判断するために使用可能である。

【発明を実施するための最良の形態】 40

【0012】

本発明は、患者の胃がんを診断し、検出し、モニターし、予後を判断する方法を特徴とする。該方法は胃がん患者の血清中に存在するE B V D N A の量を検出または測定することを特徴とする。本発明の方法は臨床医学において広範な適用性を有する。胃がんは、日本を含む多くの地理的地域において比較的高い罹患率で存在している。一部の胃がんはE B V 感染と関連があることが知られている(シバタら(S h i b a t a e t a l .)、Am J Pathol. 第140巻、769-74ページ、1992年)。本発明の非侵襲的血液検査は、臨床上の大きな進歩を示すものである。

【0013】

胃炎または消化不良は、胃粘膜の炎症である。胃炎とは、胃粘膜に炎症性の変化をもたら 50

すが、その臨床上的特徴、組織学的特性、および発症機構が異なる一群の関連する障害である。炎症は、慢性の場合、胃腺がんへの進行の指標として知られている。

【0014】

胃炎には急性も慢性もあり得る。過剰なアルコールを飲んだ後、食べ過ぎた後、香辛料の効いた食物を食べた後、または喫煙の後に胃炎を患う人々がいる。また別の人々は、非ステロイド系抗炎症薬（NSAIDs）の長期使用または大腸菌、サルモネラ菌、もしくはヘリコバクター・ピロリなどの細菌への感染の後に胃炎を発症する。時により、大手術、外傷、火傷、または重篤な感染の後に胃炎が発症することもある。悪性貧血、自己免疫不全、および慢性の胆汁逆流などのある種の疾患も同様に胃炎の原因となり得る。临床上、最も共通する症状は胃の不調または痛みである。おくび、腹部膨満、悪心、嘔吐、または胃部の満腹感もしくは灼熱感が患者により報告されている。胃の内面から出血している場合、血液は嘔吐物や大便中にも存在しうる。

10

【0015】

胃炎は、胃内視鏡、生検、貧血についての血液検査、および便潜血検査などの1つ以上の医学的検査によって診断される。便潜血検査は、胃炎の兆候である、便の中の血液の存在をチェックする。

【0016】

胃炎はEBV感染者に関連するとされているが、胃がんへの進行の増大とは関連付けられていない。胃がんに対する感受性が増大している胃炎患者を特定することが、本発明の目的である。本発明のアッセイは、医師が大きなリスクに直面している患者に注目することを可能にし、より積極的な抗胃炎治療とより高頻度の内視鏡的評価とを用いることにより、患者に利益をもたらすであろう。

20

【0017】

臨床的には、血中循環EBV DNAを、上咽頭がん（ロー、ワイ エム ディーら（Lo, Y. M. D. et al.）、Clin. Cancer Res. 第59巻、1188 - 1191ページ、1999年；ロー、ワイ エム ディーら（Lo, Y. M. D. et al.）、Cancer Res. 第59巻、5452 - 5455ページ、1999年）やある種のリンパ腫（レイ、ケイ アイら（Lei, K. I. et al.）、Br. J. Haematol. 第111巻、239 - 246ページ、2000年；ドルーエ、イーら（Drouet, E. et al.）、J. Med. Virol. 第57巻、383 - 389ページ、1999年；ガラガー、エーら（Gallagher, A. et al.）、Int. J. Cancer. 第84巻、442 - 448ページ、1999年）について実現されたのと同様に、EBER陽性の腫瘍を有する胃がん患者の診断およびモニタリングに適用する。最近示された、上咽頭がんにおける血中循環EBV DNAの予後上の重要性（ロー、ワイ エム ディーら（Lo, Y. M. D. et al.）、Cancer Res. 第60巻、6878 - 6881ページ）は、EBV DNAの測定が胃がんに関して予後上の重要性を有することを示唆するものである。

30

【0018】

本発明の方法は、いずれもEBVと関連のあるがんである、頭部および頸部以外のリンパ系悪性腫瘍を検出し、モニターし、予後を判断するために適用することも可能である。これらの新生物は、ある種の肝臓がん（スガワラら（Sugawara et al.）、Virology、第256巻、196 - 202ページ、1999年）と同様に、EBV感染とも関連付けられている（ボネットら（Bonnet et al.）、J. Natl. Cancer Inst. 第91巻、1376 - 81ページ、1999年）。

40

【0019】

本発明の方法は、胃炎を検出し、モニターし、予後を判断するために適用することも可能である。EBV DNAは、胃炎のような新生物でない胃疾患において検出されうる。あるタイプの胃炎はEBV感染と関連があることが知られている（ヤナイら（Yanai et al.）、J. Clin. Gastroenterol. 第29巻、39 - 43ページ、1999年）。あるタイプの胃炎は、患者が腸上皮化生になりやすく、ひいては胃

50

がんにかかりやすくなる素因である（ヨシムラら（Yoshimura et al.）、J Clin Pathol. 第53巻、532-6ページ、2000年）。

【0020】

日本国のヤナイ（Yanai）による20人の患者についての唯一の研究において、ある割合の胃炎患者およびその患者の胃上皮にEBVが存在することが見出されたが、その2つの間の関連は立証されていない。ドイツ国のフンゲルマン（Hungermann）による、242人を超える慢性胃炎（軽いものから重篤なものまで）の患者についての最近の研究から、これらの患者においてEBV感染は非常に低い罹患率であることが示され、胃上皮細胞のEBV感染は胃癌形成において重要ではないと結論付けられた。

【0021】

本発明は、胃上皮組織のEBV感染を簡単な血液検査によって特定するという発見を含むものである。以前は、リンパ系組織および他の非上皮組織へのEBV感染だけが同様の方法により検出可能であった。上皮細胞がEBV感染に抵抗性であることはよく知られているので、本発明は、第1にEBVに感染した胃炎患者を特定し、次いで第2にそれらの患者がその後胃癌に対する感受性を増すという可能性について研究するという全く新しい概念と機会とを示すものである。本発明のアッセイは、医師が大きなリスクに直面している患者に注目することを可能にし、より積極的な抗胃炎治療または抗ウイルス治療とより高頻度の内視鏡的評価とを用いることにより、患者に利益をもたらすであろう。

【0022】

本発明の別の目的は、がんの原因になりうるEBVに感染するリスクの高い患者に向けられている。そのような患者には、上咽頭がんの原因となるEBVに非常に感染しやすいことが証明されている、H2，BW46およびB17タイプのHLA抗原を有する患者が含まれる。ヒト免疫不全症ウイルス（HIV）のような疾患のため免疫不全の患者、または臓器移植後に免疫抑制剤を投与されている患者のような他の患者も感染リスクが高い。本発明は、腫瘍細胞内にEBV DNAを有する胃癌の症例を簡単に検出可能であることを示す。さらに、腫瘍細胞内にEBV DNAがない胃癌の場合でも、すぐ近くの上皮にEBVに感染したリンパ球または他の細胞がありさえすれば検出可能である。全体として、腫瘍のEBV DNAが陽性または陰性のいずれかの胃癌患者の約35%が本発明により検出された。この新しい概念は、EBV感染の直接または間接のいずれかの結果として別の種類のがんになるリスクの高い患者をモニターするときに大きな助けとなるであろう。本発明に基づき、リンパ腫のほかに胃癌を調査の必要な疾患のリストに加えることが可能である。

【0023】

固形組織をEBV DNAについて調べる場合、生検標本をパラフィンに包埋し5 μm厚の切片に切断する。DNAをQIAamp（登録商標）Tissue Kit（キアゲン（Qiagen））を用いて製造業者推奨のプロトコールにより抽出する。50 μlの最終溶出量をDNAの試験に使用する。

【0024】

従来のDNA増幅法またはシグナル増幅法のいずれもEBV DNAの検出に使用可能である。大抵の場合、標的配列を当技術分野でよく知られた数種の核酸増幅手順のうちのいずれかを用いて増幅することが望ましい。具体的には、核酸増幅は、増幅しようとする核酸配列に相補的な配列を含む核酸のアンプリコン（コピー）を酵素的に合成することである。当技術分野で用いられている核酸増幅手順の例には、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、鎖置換増幅（SDA）、リガーゼ連鎖反応（LCR）、および転写増幅（TAA）がある。核酸増幅は、試料中に存在する標的配列の量が非常に少ない場合に特に有用である。試料中の目的の生物またはウイルスの核酸をより確実に検出するためにアッセイ開始時に必要とされる標的配列がより少なくてすむので、標的配列を増幅し、合成されたアンプリコンを検出することによりアッセイの感度を大きく向上させることが可能である。

【0025】

核酸増幅法は文献に十分な記載がある。例えばPCR増幅は、米国特許第4,683,1

10

20

30

40

50

95号、第4,683,202号および第4,800,159号、ならびにMethods in Enzymology、第155巻、335-350ページ、1987年に、マリスら(Mullis et al.)により記載されている。SDAの例は、ウォーカー(Walker)、PCR Methods and Applications、第3巻、25-30ページ、1993年、ウォーカーら(Walker et al.)、Nucleic Acids Res.、第20巻、1691-1996ページ、1992年、およびProc. Natl. Acad. Sci.、第89巻、392-396ページ、1991年に見出すことができる。LCRは米国特許第5,427,930号および第5,686,272号に記載されている。そして種々のTAA方式は、バーグら(Burg et al.)の米国特許第5,437,990号；カシアンら(Kacian et al.)の米国特許第5,399,491号および第5,554,516号；ならびにGINGERASら(Gingeras et al.)の国際出願番号PCT/US87/01966および国際公開番号第88/01302号、国際出願番号PCT/US88/02108および国際公開番号第88/10315号などの刊行物に示されている。

【0026】

リアルタイム定量PCRはEBV DNAをモニターするのに好ましい手段であり、蛍光標識を用いるPCR反応の進行を継続的、光学的にモニターすることに基づいている(ハイデら(Heide et al.)、Genome Res.第6巻、986-694ページ、1996年およびローら(Lo et al.)、Am J. Hum. Genet.第62巻、768-775ページ、1998年)。このシステムでは、従来のPCRで用いる2種の増幅プライマーに加えて、二重に標識された蛍光ハイブリダイゼーションプローブも用いられる(リバークら(Livak, et al.)、PCR Methods Appl.、4357-362ページ、1995年)。一方の蛍光色素がレポーターの役割を果たし(FAM)、その発光スペクトルが第2の蛍光色素(TAMRA)により消光される。PCRの伸長段階の間は、Taq DNAポリメラーゼ(9)の5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性によりレポーターがプローブから離れ、よってレポーターが消光体から離れ、その結果518nmの蛍光発光が増大する。

【0027】

本発明の方法は、一般に(1)患者から血液試料を採取するステップと、(2)血液試料からDNAを抽出するステップと、(3)血液試料中に存在する血中循環EBV DNAの量を測定するステップと、(4)血液試料中に存在する血中循環EBV DNAの量を対照と比較するステップとからなる。血液試料を遠心分離にかけ、液体画分を採取し、液体画分についてEBV DNAを測定することが好ましい。

【0028】

当業者は、当技術分野で知られた多くの手段により血液試料からDNAを抽出しうることを理解するであろう。1つの好ましい手段は、QIAamp(登録商標)Blood Kitを用いることである。同様に、血中循環EBV DNAの量を多くの既知または新規なプロトコルのうちの1つを用いて測定することも可能である。リアルタイムPCR増幅システムを含むプロトコルが特に好ましい。そのようにして検出されたEBV DNAレベルを対照と比較するための標準的な手順は、得られた値の有意性を統計的に評価するべく容易に考案可能である。

【0029】

当業者は、臨床上的進行と試料中に存在する血中循環EBV DNA量との関係に基づく適切な診断基準を容易に作製することができる。しかしながら、胃癌患者においては一般に血清1mlあたり少なくとも約200コピー、より好ましくは少なくとも約500コピー、さらにより好ましくは少なくとも約1000コピーのEBV DNAが存在する。上記の血清1mlあたり500コピーのEBV DNAという境界点は、検査の時点である。がん細胞内部にEBV DNAを含むことが示されている場合にのみ適用する。EBV陽性リンパ球の浸潤のみを伴いがん細胞内部にはEBV DNAを含まない胃癌の患者については、コピー数のレベルはより低い。このように血清1mlあたりのEB

V DNAのコピー数がより低いレベルであることは、胃炎のみを有する患者の特性でもある。

【0030】

EBV DNAのコピー数を長期間測定し、疾患の進行または緩解に関連付けることも可能である。従って、本発明は胃がん、胃炎および他の特定のがんの診断とその後のモニタリングとを可能にする非侵襲的な方法を提供する。500コピーの境界点は検査の時点ですでにがんである場合にのみ適用されることに注意すべきである。上記のようなリンパ球の浸潤を伴う患者では、コピー数のレベルはより低い。

【0031】

第2の態様では、本発明は患者の血清または血漿中のEBV DNAを検出するのに適した試薬を備えた診断用キットを特徴とする。本発明のキットは、患者から血液試料を採取するための1つ以上のデバイスと、血液試料からEBV DNAを分離するための手段と、血液試料中に存在するEBV DNAの量を定量するための手段とをさらに備えても良い。そのようなキットは、胃がん、胃炎、および他のある種の頭部および頸部以外のリンパ系悪性腫瘍を診断し、検出し、モニターし、予後を判断するために使用可能である。

【0032】

本明細書中に記載の全ての刊行物及び特許出願は、各個別の刊行物または特許出願が引用により組み込まれるべく特に個別に表示されてはいても、引用により本願に組み込まれる。

【0033】

上述の発明は明確な理解のために図面および例示を用いてある程度詳細に記述されているが、請求項の趣旨または範囲を逸脱することなくある種の変更形態および修正形態を上記発明に加えることが可能であることは、本発明の教示に照らせば当業者には直ちに明白であろう。

(実施例)

以下の実施例は例示のためだけに提供するものであり、限定を目的とするものではない。当業者は、本質的に同様の結果をもたらすために変更または修正可能な、種々の重要性の低いパラメータを容易に認識するであろう。

(実施例1)

(材料と方法)

51人の胃がん患者を、香港所在のプリンス・オブ・ウェールズ病院からインフォームド Consentを実施して募集した。腫瘍の外科的切除の前に血液試料を採取した。手術後、腫瘍の切片をEBER (EBV遺伝子でコードされる小RNA) のin situハイブリダイゼーション分析に供した。胃炎で、がん腫の徴候のない30人の人、および健康そうな197人の対照被験者からも血液試料を採取した。

【0034】

(血漿試料からのDNA抽出) 各被験者から、血漿単離用のEDTAチューブ内へ末梢血(5ml)を採取することができる。血液試料を1600×gで遠心分離し、血漿をEDTA入りチューブから注意深く取り出して何も入っていないポリプロピレンチューブ内へ移す。次の処理までの間、試料を-20℃に保存する。血漿試料由来のDNAを、QIAamp (登録商標) Blood Kit (キアゲン (Qiagen)、ドイツ国ヒルデン所在)を用いて製造業者推奨の血液および体液用プロトコールにより抽出する(2)。血漿試料(130-800μl/カラム)をDNA抽出に使用する。正確な量を、標的DNAの濃度の算出用に記録する。抽出カラムから得た最終的な溶出量50μlを使用する。

【0035】

血中循環EBV DNAの濃度を、EBVゲノムのBamHI-W断片の領域についてのリアルタイム定量PCRシステム(ロー、ワイ エム ディーラ (Lo, Y. M. D. et al.)、Cancer Res. 第59巻、1188-1191ページ、1999年)を用いて測定した。リアルタイム定量PCRの原理および反応の準備手順については

10

20

30

40

50

すでに記載されている(ロー、ワイ エム ディーら(Lo, Y. M. D. et al.), Cancer Res. 第59巻、1188-1191ページ、1999年)。ABI Prism(登録商標)7700 Sequence Detectorを用いてデータを収集し、アプライドバイオシステムズ社(Applied Biosystems)により開発されたSequence Detection Systemソフトウェア(バージョン1.6.3)を用いて解析した。結果を血清1mlあたりのEBVゲノムのコピー数として表した。

【0036】

全ての血清DNA試料を同様にグロビン遺伝子についてのリアルタイム定量PCR分析(ロー、ワイ エム ディーら(Lo, Y. M. D. et al.), Cancer Res. 第59巻、1188-1191ページ、1999年)に供し、この分析により全ての被験試料について陽性のシグナルを得たが、これは抽出DNAの品質が良いことを示すものである。全ての分析について水を用いた多数の陰性ブランクを含めた。

【0037】

より具体的には、EBV DNA検出のために2種のリアルタイム定量PCRシステムを構築した:(a)一方はBamHI-W領域について;(b)他方はEBNA-I領域(ベアら(Baer et al.), Nature, 第310巻、207-211ページ、1984年)についてである。BamHI-Wシステムは、増幅プライマー(配列番号1)W-44F(5'-CCCCAACACTCCACCCACACC-3')および(配列番号2)W-119R(5'-TCTTAGGAGCTGTCCGAGGG-3')と、二重に標識された蛍光プローブ(配列番号3)W-67T(5'-(FAM)CACACACTACACACACCCACCCGTCCTC(TAMRA)-3')とから成る。EBNA-Iシステムは、増幅プライマー(配列番号4)EBNA-1162F(5'-TCATCATCATCCTCCGGGTCTCC-3')および(配列番号5)EBNA-1229R(5'-CCTACAGGGTGGAAAAATGGC-3')と、二重に標識された蛍光プローブ(配列番号6)EBNA-1186T[5'-(FAM)CGCAGGCCCCCTCCAGGTAGAA(TAMRA)-3']とから成る。蛍光プローブには、PCRの際にプローブが伸長するのを防ぐために3'側をブロックするリン酸基を含めた。プライマー/プローブの組合せは、Primer Expressソフトウェア(パーキンエルマー社(Perkin-Elmer Corp.), カリフォルニア州フォレスターシティ所在)を用いて設計した。EBVゲノムの配列データはGenBank配列データベースから入手した(アクセス番号V01555)。-グロビン遺伝子についてのリアルタイム定量PCRは、ローら(Lo, et al.), Am J. Hum Genet, 第62巻、768-775ページ、1998年)にすでに記載されているようなプライマーとプローブから成り、血漿DNAの増幅能についての対照として使用した。

【0038】

蛍光PCR反応を、TaqMan(登録商標)PCR Core Reagent Kit(パーキンエルマー社(Perkin-Elmer Corp.))中に提供されている構成要素(蛍光プローブと増幅プライマーを除く)を用いて反応容量50μl中に準備する。蛍光プローブはパーキンエルマーアプライドバイオシステムズ(Perkin-Elmer Applied Biosystems)によるカスタム合成である。PCRプライマーはライフテクノロジーズ社(Life Technologies, Inc. , メリーランド州ゲイサースバーグ(Gaithersburg)所在)により合成された。各反応には、5μlの10×緩衝液A; 300nMの各増幅プライマー; 25nM(EBVプローブ用)または100nM(-グロビンプローブ用)の対応する蛍光プローブ; 4mM MgCl₂; 各200μMのdATP、dCTP、およびdGTP; 400μMのdUTP; 1.25ユニットのAmpliTaq Gold(登録商標); ならびに0.5ユニットのAmpErase(登録商標)ウラシルN-グリコシラーゼを含めた。

10

20

30

40

50

【0039】

DNA増幅を、パーキンエルマーアプライドバイオシステムズ(Perkin-Elmer Applied Biosystems)の7700 Sequence Detectorにおいて96ウェル反应用プレート方式で実施する。各試料を2連で分析する。全ての分析について水を用いた多数の陰性ブランクを含めた。

【0040】

EBV陽性の細胞株Namalwa(American Type Culture Collection CRL-1432; クラインら(Klein et al.)、Int J. Cancer、第10巻、44-57ページ、1972年を参照のこと)から抽出したDNAを標準として使用し、検量線を並行して各分析につき2連で作製する。Namalwaは、細胞あたり2つ組み込まれたウイルスゲノムを含む二倍体細胞である。二倍体細胞あたり6.6 pg DNAの換算係数をコピー数算出に使用した(サイキら(Saiki et al.)、Science、第239巻、487-491ページ、1988年)。血中を循環している細胞外EBV DNAの濃度を、血漿1 mlあたりのEBVゲノムのコピー数として表した。

【0041】

EBV BamHI-WおよびEBNA-IのPCRシステムに同じ熱プロファイルを使用した。熱サイクリングは、ウラシルN-グリコシラーゼを作用させるために50 で2分間のインキュベーションを最初に実施し、次に95 で10分間の初期変性ステップとし、次いで95 で15秒間および56 で1分間の反応を40サイクル実施した。

【0042】

次に、7700 Sequence Detectorにより収集されマッキントッシュ(Macintosh)コンピュータ(アップルコンピュータ(Apple Computer)、カリフォルニア州クパチーノ(Cupertino)所在)に保存された増幅データを、パーキンエルマーアプライドバイオシステムズにより開発されたSequence Detection Systemソフトウェアを用いて解析する。各2連データの平均定量値を用いてさらに濃度を算出する。EBV DNAまたは -グロビン遺伝子の血漿中濃度(コピー/mlで表す)を次の式を用いて算出する。

$$C = Q \times (V_{DNA} / V_{PCR}) \times (1 / V_{ext})$$

式中、Cは血漿中の対象物の濃度(コピー/ml)を表し、QはPCRにおいてSequence Detectorにより測定された対象物の定量値(コピー数)を表し、 V_{DNA} は抽出後に得られたDNAの総容量(通常キアゲン(Qiagen)抽出1回あたり50 μ l)を表し、 V_{PCR} はPCRに使用されたDNAの容量(通常5 μ l)を表し、 V_{ext} は抽出された血漿/血清の容量(通常0.13-0.80 ml)を表す。

【0043】

腫瘍細胞中のEBVの存在を、すでに記載されているとおりに(ホイピーケーら(Hui, P. K. et al.)、Hum. Pathol.、第25巻、947-952ページ、1994年)、EBERに対するフルオレセイン結合オリゴヌクレオチドプローブ(ノボカストラ(Novocasttra)、英国所在)を用いたパラフィン包埋組織切片のin situハイブリダイゼーションにより評価した。

(結果)

総数51人の胃がん患者を募集した。この集団中、5例の胃がんはEBER陽性であった(図1A)。14例については、腫瘍細胞はEBER陰性であったが、部分的にEBER陽性の浸潤リンパ球が認められた(図1B)。これらの14例を「バックグラウンド」の陽性を示すものとして分類した。図2は、上記3つの患者群間の血中循環EBV DNAのレベルの差異を示す。血清中のEBV DNAはEBER陽性の症例のすべてにおいて検出された(血清中EBV DNA濃度の中央値: 1063 コピー/ml; 四分位範囲: 485 - 5141 コピー/ml)。陰性の32例のいずれにおいても血清中EBV DNAは検出されなかった(図2)。「バックグラウンド」のEBER陽性を示す14例のうち13例(93%)が検出可能な血清中EBV DNAを有していた。これらの症例の血

清中EBV DNA濃度の中間の中央値は50コピー/mL(四分位範囲:42-98コピー/mL)であった。これら3群の間の差異は統計的に有意である($p < 0.001$ 、クラスカル・ウォリス(Kruskal-Wallis)の検定)。多重比較(対比較)分析により、EBER陽性群とEBER陰性群との間の有意差($p < 0.05$ 、ダン(Dunn)の方法)およびEBERバックグラウンド群とEBER陰性群との間の有意差($p < 0.05$ 、ダン(Dunn)の方法)が示されている。

【0044】

EBV DNAは、胃炎の試料30例のうち7例(23%)および健康な対照197例のうち7例(3.6%)の血清中に検出可能であった。これら2群間の血清中EBV DNAが陽性である症例の割合は有意に異なっている(カイ二乗検定、 $p = 0.028$)。検出可能な血中循環EBV DNAを有する症例であっても、実際の血清中EBV DNAの濃度は一般にEBER陽性の胃がんの症例における濃度よりも低い。

10

【0045】

「バックグラウンド」のEBER陽性を示す胃がんの症例、胃炎の症例、および対照被験者における検出可能な血清中EBV DNAを症例間で比較した。これら3群の血清中EBV DNA濃度は図3にプロットされている。これら3群の間に血中循環EBV DNAレベルの統計的有意差はない(クラスカル・ウォリス(Kruskal-Wallis)の検定、 $p = 0.296$)。

(考察)

上記のデータは、細胞外のEBV DNAを一部の胃がん患者から採取した血清試料中に検出することができることを示す。さらに、上記データは血清中EBV DNAを検出可能であることと、腫瘍のEBERの状態との間の興味深い相関を示している。このように、EBER陽性の胃がん症例は高レベルな血清中EBV DNAと関連があり;「バックグラウンド」のEBER陽性を示す胃がん症例は中間レベルの血清中EBV DNAと関連があり;EBER陰性の症例には血清中EBV DNAは認められなかった。これらの知見は、血漿および血清ががんをモニターするための材料の非侵襲的供給源になることをさらに示している(アンカー ピーら(Anker, P. et al.)、Cancer Metastasis Rev. 第18巻、65-73ページ、1999年)。

20

【0046】

臨床的には、血中循環EBV DNAを、NPC(ロー、ワイ エム ディーら(Lo, Y. M. D. et al.)、Cancer Res. 第59巻、1188-1191ページ、1999年;ロー、ワイ エム ディーら(Lo, Y. M. D. et al.)、Cancer Res. 第59巻、5452-5455ページ、1999年)やある種のリンパ腫(レイ、ケイ アイら(Lei, K. I. et al.)、Br. J. Haematol. 第111巻、239-246ページ、2000年;ドルーエ、イーら(Drouet, E. et al.)、J. Med. Virol. 第57巻、383-389ページ、1999年;ガラガー、エーら(Gallagher, A. et al.)、Int. J. Cancer. 第84巻、442-448ページ、1999年)について実現されたのと同様にEBER陽性の腫瘍を有する一部の胃がん患者の診断およびモニタリングに適用可能である。最近、上咽頭がんの予後における血中循環EBV DNAの重要性が示された。このデータ(ロー、ワイ エム ディーら(Lo, Y. M. D. et al.)、Cancer Res. 第60巻、6878-6881ページ)は、EBV DNAの測定も胃がんの予後の判定に重要であることを示すものである。

30

40

【0047】

「バックグラウンド」のEBER陽性を示す胃がんにおける血中循環EBV DNAの検出は興味深い。腫瘍組織に浸潤しているEBER陽性のリンパ球が、これらの症例において検出可能な低いレベルの血清中EBV DNAの由来である可能性がある。仮にそれが正しいとすると、さらなる研究によりこれらのEBER陽性のリンパ球によるEBVの放出メカニズムが解明されるかもしれない。可能性のあるメカニズムには、DNAの積極的な放出(ロジャース ジェイ シーら(Rogers, J. C. et al.)、Pro

50

c . Natl . Acad . Sci . USA、第69巻、1685 - 1689、1972年)
)および上記細胞の一部における溶菌性のEBV感染の活性化が含まれる。

【0048】

血中循環EBV DNAとEBER陽性の浸潤リンパ球との間の関連は、低いレベルの血中循環EBV DNAが新生物を伴わない炎症状態においても認められることを示唆する。実際に、血中循環EBV DNAは胃炎患者にも存在する。対照としては、血清中EBV DNAは健康そうな対照の人々の3.6%にも検出された。健康そうな被験者において低いレベルの血中循環EBV DNAが存在するということは他の研究によって報告されている(ロー、ワイ エム ディーら(Lo, Y. M. D. et al.), Cancer Res. 第59巻、1188 - 1191ページ、1999年; ショーテラスク ケイら(Shotelersuk, K. et al.), Clin. Cancer Res. , 第6巻、1046 - 1051ページ、2000年)。検出可能な血清中EBV DNAを伴う胃炎の症例および健康な対照例において、ウイルスDNAの濃度は「バックグラウンド」のEBER陽性を示す胃がんの症例における濃度と非常に似通っている(図3)。この知見は、「バックグラウンドの」EBER陽性を示す胃がんについて上記に仮定したように、血中循環EBV DNAが胃炎および健康な対照例においてもEBER陽性リンパ球により放出されるということを示唆している。血中循環EBV DNAのレベルについては、検出可能な血清中EBV DNAを伴う上記27症例のうち26例が500コピー/ml未満であった。これに対して、EBER陽性の胃がん5例のうち4例(80%)、および、以前の研究(ロー、ワイ エム ディーら(Lo, Y. M. D. et al.), Cancer Res. 第59巻、1188 - 1191ページ、1999年)では上咽頭がん57例のうち48例(84%)が、500コピー/mlを上回る血中循環EBV DNAレベルを有していた。この解析から、血漿/血清のEBV DNA濃度500コピー/mlは特に明確にこれらのがん患者を特定するための実用的な診断上の境界点となりうることを示唆される。大規模な臨床研究により近々にこの境界値の精度がさらに高まることが期待される。

【0049】

健康そうな人々の血中に低いレベルの血中循環EBV DNAが存在することの長期的な意義は依然として不明である。何より、今後の研究は、これらの人々がEBV関連疾患を発症するリスクが大きいかもしれないという可能性について取り組むべきである。この問題は重大な公衆衛生上の問題かつ生物学的に重要な問題である。

【0050】

生物学的には、EBER陽性の胃がん患者における血中循環EBV DNAの検出は、血漿中の腫瘍由来DNAのクリアランス速度に関する重要な情報を提供する可能性がある。腫瘍由来DNAのクリアランスの速度論に関するこれまでの研究は放射線療法(ロー、ワイ エム ディーら(Lo, Y. M. D. et al.), Cancer Res. 第60巻、2351 - 2355ページ、2000年)および化学療法(レイ ケイ アイら(Lei, K. I. et al.), Br. J. Haematol. 第111巻、239 - 246ページ、2000年)を受けている患者について実施されているので、クリアランス速度は依然としてほとんど解明されていない問題となっている。上記のこれまでの研究から明らかにされた速度論的パラメータは、(a)治療法に起因する腫瘍細胞の死、および(b)血漿からの腫瘍由来DNAのクリアランスを合わせたものを指す。胃がんはほとんどが外科的切除により治療されるので、この新しいモデル系により、一時点すなわち手術時にがんを除去した後の腫瘍由来DNAのクリアランスに関する情報が提供されうる。そのような情報は、母親の血漿における胎児のDNAのクリアランスについてすでに為されているように(ロー、ワイ エム ディーら(Lo, Y. M. D. et al.), Am. J. Hum. Genet. , 第64巻、218 - 224ページ、1999年)、in vivoにおける血漿中DNAのクリアランスの解明を推進するであろう。

【0051】

本明細書中のデータは、血中循環EBV DNAが、EBVに関連のある他の多くのがん

のタイプにおいても有用であることも示唆している。そのようながんの例には、乳がん（ボネット エムら（Bonnet, M. et al.）、J. Natl. Cancer Inst. 第91巻、1376 - 1381ページ、1999年）および肝細胞がん（スガワラ ワイら（Sugawara, Y. et al.）、Virology、第256巻、196 - 202ページ、1999年）が含まれる。一部の腫瘍のタイプとEBVとの関連については議論のあるところであるので、そのような腫瘍を有する患者の血漿からEBV DNAを検出可能であるということは、上記の問題を解決するのに貢献する可能性がある。

【図面の簡単な説明】

【0052】

10

【図1A】EBV遺伝子でコードされる小RNA（EBER）陽性の腫瘍細胞を含む胃腺がんを示す図。EBERのin situハイブリダイゼーションで、×200拡大である。

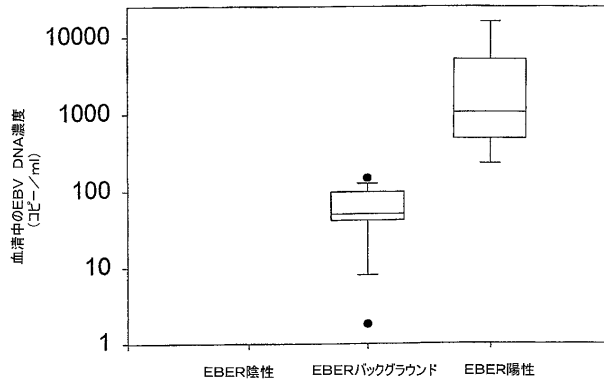
【図1B】部分的にEBER陽性の腫瘍浸潤リンパ球を含む胃腺がんを示す図。腫瘍細胞は陰性である。EBERのin situハイブリダイゼーションで、×400拡大である。

【図2】3つの患者群間の血中循環EBV DNAのレベルの差異を示す図。血清中のEBV DNAはEBER陽性の症例のすべてにおいて検出された（血清中EBV DNA濃度の中央値：1063コピー/mL；四分位範囲：485 - 5141コピー/mL）。陰性の32例のいずれにおいても血清中EBV DNAは検出されなかった。「バックグラウンド」のEBER陽性を示す14例のうち13例（93%）が検出可能な血清中EBV DNAを有していた。これらの症例の血清中EBV DNA濃度の中間の中央値は50コピー/mL（四分位範囲：42 - 98コピー/mL）であった。

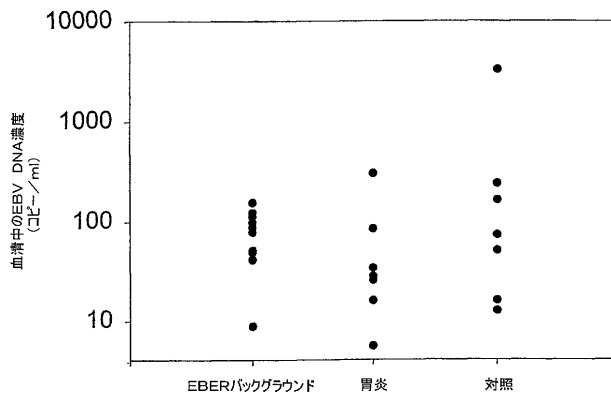
20

【図3】「バックグラウンド」のEBER陽性を示す胃がんの症例、胃炎の症例、および対照被験者における検出可能な血清中EBV DNAの症例間の比較を示す図。これら3群の血清中EBV DNAの濃度を示す。これら3群の間に血中循環EBV DNAレベルの統計的有意差はない（クラスカル・ウォリス（Kruskal-Wallis）の検定、 $p = 0.296$ ）。

【図 2】



【図 3】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
8 August 2002 (08.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/061148 A2(51) International Patent Classification⁷: C12Q 1/70

(21) International Application Number: PCT/GB02/00411

(22) International Filing Date: 30 January 2002 (30.01.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/265,568 31 January 2001 (31.01.2001) US

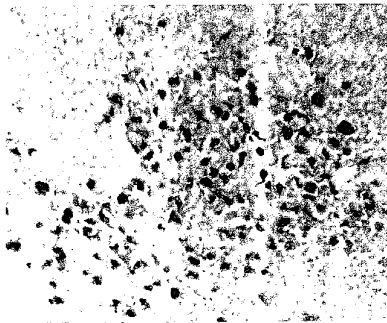
(71) Applicant (for all designated States except US): THE
CHINESE UNIVERSITY OF HONG KONG [CN/CN];
Room 226, Pi Chiu Building, Shatin, New Territories,
Hong Kong (CN).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): LO, Yuk, Ming,
Dennis [GB/CN]; 11at 15C, Arran Court, 2 Shek Ku Street,
Hornamatin, Kowloon, Hong Kong (CN). CHAN, Wing,
Yee [GB/CN]; 11B, Block 1, Grand Pacific Views, CastlePeak Road, Tuen Mun, Hong Kong (CN). NG, Kwok,
Wai [CN/CN]; Flat F, 3/F, Block 9, Castle Garden, Tai
Po, N.T., Hong Kong (CN).(74) Agents: DENISON, Christopher, M. et al.; Mewburn Ellis,
York House, 23 Kingsway, London, Greater London
WC2B 6LP (GB).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: CIRCULATING EPSTEIN-BARR VIRUS DNA IN THE SERUM OF PATIENTS WITH GASTRIC CARCINOMA



(57) Abstract: The present invention features methods for diagnosing, detecting, monitoring and determining the prognosis of gastric cancer, non-head and neck and lymphoid malignancies, and gastritis in a patient by detecting or measuring EBV DNA present in the serum or plasma of the patient. The present invention also features diagnostic kits comprising suitable reagents for detecting EBV DNA in the serum or plasma of a patient.

WO 02/061148 A2

WO 02/061148 A2**Published:**

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/061148

PCT/GB02/00411

**CIRCULATING EPSTEIN-BARR VIRUS DNA IN THE SERUM OF
PATIENTS WITH GASTRIC CARCINOMA**

FIELD OF THE INVENTION

5 [01] This invention relates to the discovery that Epstein Barr virus may be found in the cell free fluid of a patient's blood and when such virus is found and the patient suffers from gastritis, that patient has a predisposition to progress from gastritis to gastric cancer.

BACKGROUND OF THE INVENTION

10 [02] It is known that tumour-derived DNA can be released by cancer cells of a variety of tumours (Anker *et al.*, Cancer Metastasis Rev. 18: 65-73 (1999)). Examples include oncogene mutations from pancreatic carcinoma (Anker *et al.*, Gastroenterology. 112: 4-1120 (1997)), microsatellite alterations in lung cancer (Chen *et al.*, Nature Medicine. 2: 3-1035 (1996)) and epigenetic changes from liver cancer (Wong *et al.*, Cancer Res. 59: 3 (1999)). In addition, virus DNA has been found in the circulation of a number of cancers known to be associated with virus infection. Examples include Epstein-Barr virus (EBV) DNA from
15 nasopharyngeal cancer (Mutirangura *et al.*, Clin Cancer Res. 4: 665-9 (1998); Lo *et al.*, Cancer Res. 59: 1188-91 (1999)) and certain lymphomas (Lei *et al.*, Br J Haematol. 111:239-46 (2000); Gallagher *et al.*, Int J Cancer. 84: 442-8 (1999); Drouet *et al.*, J Med Virol. 57: 383-9 (1999)), and human papillomavirus DNA from head and neck cancer (Capone *et al.*,
20 Clin Cancer Res. 6: 4171-5 (2000)).

[03] Recently, much interest has been focused on the presence of tumor-derived DNA in the plasma and serum of cancer patients (Chen, X. Q. *et al.*, Nat. Med., 2:1033-1035 (1996); Nawroz, H. *et al.*, Nat. Med., 2:1035-1037 (1996)). For virally-associated cancers, cell-free tumor-associated viral DNA has been detected in the plasma and serum of patients
25 (Mutirangura, A. *et al.*, Cancer Res., 4:665-669 (1998); Lo, Y. M. D. *et al.*, Clin. Cancer Res., 59:1188-1191 (1999); Capone, R.B. Clin. Cancer Res., 6:4171-4175 (2000)). One important virus which has been associated with many types of malignancy is the Epstein-Barr virus (EBV) (Cohen, J. I. N. Engl. J. Med., 343:481-492 (2000)). Epstein-Barr virus (EBV) is a human herpesvirus that infects the majority of the human population. EBV is commonly
30 transmitted by saliva and establishes latent infection in B lymphocytes where it persists for

WO 02/061148

PCT/GB02/00411

the lifetime of the host. In this regard, circulating EBV DNA has been detected in the plasma and serum of patients with nasopharyngeal carcinoma (NPC) (Mutirangura, A. *et al.*, *Cancer Res.*, **4**:665-669 (1998); Lo, Y. M. D. *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, **5**:1188-1191 (1999)) and certain lymphoid malignancies (Lei, K. I. *et al.*, *Br. J. Haematol.*, **111**:239-246 (2000); Drouet, E. *et al.*, *J. Med. Virol.*, **57**:383-389 (1999); Gallagher, A. *et al.*, *Int. J. Cancer*, **84**:442-448 (1999)).

[04] EBV infection has also been reported to be associated with a proportion of gastric carcinomas (Shibata, D. *et al.*, *Am. J. Pathol.*, **140**:769-774 (1992)). In Hong Kong, approximately 10% of gastric carcinoma cases have been found to be associated with EBV infection (Yuen, S. T. *et al.*, *Am. J. Surg. Pathol.*, **18**:1158-1163 (1994)).

[05] The present invention provides methods for detecting EBV DNA in the sera of patients with gastric carcinoma and correlating the amount of EBV DNA so detected into clinical diagnosis or prognosis.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

[06] In a first aspect, the present invention features methods for diagnosing, detecting, monitoring and determining the prognosis of gastric cancer in a patient. The methods feature detecting or determining the amount of Epstein Barr Virus DNA (EBV DNA) present in the serum or plasma of gastric cancer patients. Accordingly, the present invention have broad applicability in clinical medicine.

[07] The methods according to the present invention are also applicable for diagnosing, detecting, monitoring and determining the prognosis of non-head and neck and lymphoid malignancies, such as breast cancer. These neoplasms have been associated with EBV infection as has gastric cancer.

[08] The methods according to the present invention are also applicable for diagnosing, detecting, monitoring and determining the prognosis of gastritis. EBV DNA can be detected in the plasma and serum of patients having non-neoplastic gastric diseases, such as gastritis. In turn, gastritis has been linked to gastric cancer. The invention further comprises patients that can be or have been diagnosed with gastric cancer and the cancer cells are free of EBV nucleic acid or contain EBV.

[09] The methods according to the present invention generally comprise the steps of (1) obtaining a blood sample from a patient, (2) extracting DNA from the blood sample, (3) measuring the amount of circulating EBV DNA present in the blood sample, and (4) comparing the amount of circulating EBV DNA present in the blood sample to a control.

WO 02/061148

PCT/GB02/00411

As will be appreciated, the methods of the present invention may also be carried out, without an active step of obtaining a blood sample from the patient, on a blood sample previously obtained from the patient (or on a fluid fraction or DNA obtained from such a blood sample).

WO 02/061148

PCT/GB02/00411

[10] Preferably, the blood sample is a non-cellular fluid sample. By non-cellular we mean that the sample is either blood sera where the cells are extracted by clotting and separation of the cells from the remaining fluid or by inhibiting clotting and centrifuging the fluid fraction (plasma). The EBV DNA is measured from the fluid fraction. When EBV is found in the fluid of a non-cellular sample, it is understood that the infection is active and infected cells releasing EBV.

[11] In a second aspect, the present invention features diagnostic kits comprising suitable reagents for detecting EBV DNA in the serum or plasma of patients. The kits according to the present invention may further comprise one or more of a device for obtaining a blood sample from a patient, a means to separate the EBV DNA from the blood sample and a means to quantify the amount of EBV DNA present in the blood sample. Such kits are useful for diagnosing, detecting, monitoring and determining the prognosis for gastric cancers and gastritis

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[12] Figure 1A depicts gastric adenocarcinoma with small EBV encoded RNA (EBER)-positive tumor cells. EBER in-situ hybridization, x200 magnification. Figure 1B depicts gastric adenocarcinoma with occasional EBER-positive tumor infiltrating lymphocytes. The tumor cells are negative. EBER in-situ hybridization, x400 magnification.

[13] Figure 2 illustrates the difference in the level of circulating EBV DNA amongst three patient groups. Serum EBV DNA was detected in every one of the EBER-positive cases (median serum EBV DNA concentration: 1063 copies/mL; interquartile range: 485 to 5141 copies/mL). No serum EBV DNA was detected in any of the 32 negative cases. Thirteen out of the 14 cases (93%) demonstrating 'background' EBER positivity had detectable serum EBV DNA. These cases had an intermediate median serum EBV DNA concentration of 50 copies/mL (interquartile range: 42 to 98 copies/mL).

[14] Figure 3 demonstrates a comparison between cases with detectable serum EBV DNA in the gastric carcinoma cases with 'background' EBER-positivity, gastritis cases and control subjects. The serum EBV DNA concentrations of these three groups are presented. There is no statistically significant difference in circulating EBV DNA levels amongst these three groups (Kruskal-Wallis test, $p=0.296$).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[15] The present invention features methods for diagnosing, detecting, monitoring and determining the prognosis of gastric cancer in a patient. The methods feature detecting or

WO 02/061148

PCT/GB02/00411

determining the amount of EBV DNA present in the serum of gastric cancer patients. The methods according to the present invention have broad applicability in clinical medicine. Gastric cancer is present in relatively high incidences in many geographical areas including Japan. It is known that a proportion of gastric carcinoma is associated with EBV infection (Shibata *et al.*, *Am J Pathol.* **140**: 769-74 (1992)). A non-invasive blood test according to the present invention represents a significant clinical advance.

[16] Gastritis, or dyspepsia is an inflammation of the gastric mucosa. Gastritis is a group of related disorders that induce inflammatory changes in the gastric mucosa but differ in their clinical features, histologic characteristics and causative mechanism. The inflammation, when chronic, is a known indicator of progression to gastric adenocarcinoma.

[17] Gastritis can be acute or chronic. Some people have gastritis after drinking too much alcohol, eating too much, eating spicy food, or smoking. Others develop gastritis after prolonged use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) or infection with bacteria such as *Escherichia coli*, *Salmonella*, or *Helicobacter pylori*. Sometimes gastritis develops after major surgery, traumatic injury, burns, or severe infections. Certain diseases, such as pernicious anemia, autoimmune disorders, and chronic bile reflux, can cause gastritis as well. Clinically, the most common symptoms are stomach upset or pain. Belching, abdominal bloating, nausea, vomiting or a feeling of fullness or burning in the stomach are reported by patients. Blood may also be present in vomit or stool if the stomach lining is bleeding.

[18] Gastritis is diagnosed through one or more medical tests including gastroscopy, biopsy, blood tests for anemia and, stool tests for blood. This test checks for the presence of blood in the stool, a sign of gastritis.

[19] Although gastritis has been associated with EBV infected persons it has never been associated with an increased progression towards gastric cancer. It is an object of this invention to identify gastritis patients with an increased susceptibility to having gastric cancer. The assays of this invention will benefit patients by allowing physicians to focus on those patients who are at greater risk and employing more aggressive anti-gastritis therapies and more frequent endoscopic evaluations.

[20] Clinically, circulating EBV DNA is applicable in diagnosing and monitoring gastric carcinoma patients who have EBER-positive tumors, similar to what has been achieved for nasopharyngeal cancers (Lo, Y. M. D. *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, **59**:1188-1191 (1999); Lo, Y. M. D. *et al.*, *Cancer Res.*, **59**:5452-5455 (1999)) and certain lymphomas (Lei, K. I. *et al.*, *Br. J. Haematol.*, **111**:239-246 (2000); Drouet, B. *et al.*, *J. Med. Virol.*, **57**:383-389 (1999); Gallagher, A. *et al.*, *Int. J. Cancer*, **84**:442-448 (1999)). The recent demonstration of the

WO 02/061148

PCT/GB02/00411

prognostic significance of circulating EBV DNA in nasopharyngeal cancers (Lo, Y. M. D. *et al.*, *Cancer Res.*, 60:6878-6881) suggests that EBV DNA measurement has prognostic importance for gastric carcinoma.

5 [21] The methods according to the present invention are also applicable for detecting, monitoring and determining the prognosis of non-head and neck and lymphoid malignancies where those cancers are both associated with EBV. These neoplasms have also been associated with EBV infection (Bonnet *et al.*, *J Natl Cancer Inst.* 91: 1376-81 (1999)) as have certain liver cancers (Sugawara *et al.*, *Virology*. 256: 196-202 (1999)).

10 [22] The methods according to the present invention are also applicable for detecting, monitoring and determining the prognosis of gastritis. EBV DNA can be detected in non-neoplastic gastric diseases, such as gastritis. It is known that certain types of gastritis are associated with EBV infection (Yanai *et al.*, *J Clin Gastroenterol.* 29: 39-43, 1999). Certain types of gastritis predispose patients to intestinal metaplasia which in turn predisposes to gastric carcinoma (Yoshimura *et al.*, *J Clin Pathol.* 53: 532-6, 2000).

15 [23] Although a percentage of gastritis patients and the gastric epithelium in these patients were found to show the presence of EBV in the only study of 20 patients by Yanai from Japan, the association between the two has never been established. A recent study of over 242 patients with mild to severe chronic gastritis by Hungermann in Germany indicated that EBV infection has a very low prevalence in these patients, and concluded that EBV infection of gastric epithelia cells is not an event in gastric carcinogenesis.

20 [24] This invention includes the discovery that infection of the gastric epithelial tissues by EBV can be identified by a simple blood test. Previously, only infection of lymphoid and other non-epithelial tissues by EBV was found possible to be detected by a similar method. Since epithelial cells are well known to be refractory to EBV infection, this invention demonstrates a totally new concept and opportunity to first identify those gastritis patients infected with EBV and then secondly, to study the possibility that these patients do have an increased susceptibility to having gastric cancer later on. The assays of this invention will benefit patients by allowing physicians to focus on those patients who are at greater risk and employing more aggressive anti-gastritis or anti-viral therapies and more frequent endoscopic evaluations.

30 Another objective of this invention is focused on patients that are at high risk of contracting EBV infection that may lead to cancer. Such patients include those that have HLA antigens of the types H2, BW46 and B17, proven to have a high tendency to contract EBV infection leading to nasopharyngeal carcinoma. Other patients that are immuno-compromised because

WO 02/061148

PCT/GB02/00411

of diseases such as the human immunodeficiency virus (HIV) or those receiving immuno-suppressant medications after organ transplantation are also at high risk. This invention shows that cases of gastric cancer that have EBV DNA inside the tumor cells can be easily detected. Moreover, even cases of gastric cancer that have *no EBV* DNA inside the tumor cells can also be detected, so long as there is the presence of EBV infected lymphocytes or other cells in the nearby epithelium. In total, about 35% of the gastric cancer cases that exhibit either tumoral EBV DNA positivity or negativity can be detected by this invention. This new concept will be of great help in the monitoring of patients that, as either a direct or indirect result of EBV infection, are at high risk of developing different forms of cancer.

Based on this invention, gastric cancer can be added to the list of diseases that need to be under surveillance, besides the lymphomas.

[01] In situations where solid tissue is evaluated for EBV DNA, biopsy specimens are embedded in paraffin and sectioned into 5- μ m thick sections. DNA is extracted with a QIAamp Tissue Kit (Qiagen) using a protocol recommended by the manufacturer. A final elution volume of 50 μ l is used for DNA studies.

[26] Any of the conventional DNA amplification or signal amplification methods may be used for detection of EBV DNA. In most instances, it is desirable to amplify the target sequence using any of several nucleic acid amplification procedures which are well known in the art. Specifically, nucleic acid amplification is the enzymatic synthesis of nucleic acid amplicons (copies) which contain a sequence that is complementary to a nucleic acid sequence being amplified. Examples of nucleic acid amplification procedures practiced in the art include the polymerase chain reaction (PCR), strand displacement amplification (SDA), ligase chain reaction (LCR), and transcription-associated amplification (TAA). Nucleic acid amplification is especially beneficial when the amount of target sequence present in a sample is very low. By amplifying the target sequences and detecting the amplicon synthesized, the sensitivity of an assay can be vastly improved, since fewer target sequences are needed at the beginning of the assay to better ensure detection of nucleic acid in the sample belonging to the organism or virus of interest.

[27] Methods of nucleic acid amplification are thoroughly described in the literature. PCR amplification, for instance, is described by Mullis et al. in U.S. Pat. Nos. 4,683,195 Methods of nucleic acid amplification are thoroughly described in the literature. PCR amplification, for instance, is described by Mullis et al. in U.S. Pat. Nos. 4,683,195, 4,683,202 and 4,800,159, and in *Methods in Enzymology*, 155:335-350 (1987). Examples of SDA can be found in Walker, *PCR Methods and Applications*, 3:25-30 (1993), Walker et al. in *Nucleic*

WO 02/061148

PCT/GB02/00411

Acids Res., 20:1691-1996 (1992) and *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89:392-396 (1991). LCR is described in U.S. Pat. Nos. 5,427,930 and 5,686,272. And different TAA formats are provided in publications such as Burg et al. in U.S. Pat. No. 5,437,990; Kacian et al. in U.S. Pat. Nos. 5,399,491 and 5,554,516; and Gingeras et al. in International Application No.

- 5 PCT/US87/01966 and International Publication No. WO 88/01302, and International Application No. PCT/US88/02108 and International Publication No. WO 88/10315.
- [28] Real-time quantitative PCR is a preferred means to monitor EBV DNA and is based on the continuous optical monitoring of the progress of a fluorogenic PCR reaction (Heide *et al. Genome Res.* 6:986-694,1996 and Lo *et al. Am J. Hum. Genet.* 62:768-775, 1998). In this
- 10 system, in addition to the two amplification primers used in conventional PCR, a dual-labeled fluorogenic hybridization probe is also included (Livak, *et al. PCR Methods Appl.*, 4357-362, 1995). One fluorescent dye serves as a reporter (FAM), and its emission spectrum is quenched by a second fluorescent dye (TAMRA). During the extension phase of PCR, the 5' to 3' exonuclease activity of the *Taq* DNA polymerase (9) cleaves the reporter from the
- 15 probe, thus releasing it from the quencher and resulting in an increase in fluorescence emission at 518 nm.

- [29] The methods according to the present invention generally comprise the steps of (1) obtaining a blood sample from a patient, (2) extracting DNA from the blood sample, (3) measuring the amount of circulating EBV DNA present in the blood sample, and
- 20 (4) comparing the amount of circulating EBV DNA present in the blood sample to a control. Preferably, the blood sample is centrifuged, a fluid fraction is obtained, and the EBV DNA is measured from the fluid fraction.

- [30] Those of skill in the art will understand that the DNA may be extracted from a blood sample by many means known in the art. One preferred means is using a QIAamp Blood Kit.
- 25 Also, the amount of circulating EBV DNA may be measured using one of many known or novel protocols. A protocol comprising a real time PCR amplification system is particularly preferred. Standard procedures for comparing the levels of EBV DNA so detected to a control may easily be devised so as to statistically assess the significance of the values obtained.

WO 02/061148

PCT/GB02/00411

[31] Those skilled in the art may readily prepare suitable diagnostic criteria based upon the correlation of clinical progression with the amount of circulating EBV DNA present in a sample. However, generally at least about 200 copies, more preferably at least about 500 copies, and still more preferably at least 1000 copies of EBV DNA /ml of serum are present in patients having gastric carcinoma. This cut-off point of 500 copies of EBV DNA per milliliter of serum only apply to those cases which are cancerous at the time of testing and are shown to contain EBV DNA inside the cancer cells. For patients that have gastric cancer with only EBV positive lymphocytic infiltration but without EBV DNA inside their cancer cells, the levels are lower. This lower level of EBV DNA copies per milliliter of serum is also the characteristics of those patients that only have gastritis.

[32] The number of copies of EBV DNA may be measured over time and correlated to disease progression or regression. Thereby, the present invention provides a non-invasive method that allows diagnosis and subsequent monitoring of gastric carcinoma, gastritis and certain other cancers. It should be noted that the cut-off of 500 copies only apply to cases which are already cancerous at the time of testing. For patients with such lymphocytic infiltration, the levels are lower.

[33] In a second aspect, the present invention features diagnostic kits comprising suitable reagents for detecting EBV DNA in the serum or plasma of patients. The kits according to the present invention may further comprise one or more of a device for obtaining a blood sample from a patient, a means to separate the EBV DNA from the blood sample and a means to quantify the amount of EBV DNA present in the blood sample. Such kits are useful for diagnosing, detecting, monitoring and determining the prognosis for gastric cancers, gastritis, and certain other non-head and neck and lymphoid malignancies.

[34] All publications and patent applications cited in this specification are herein incorporated by reference as if each individual publication or patent application were specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

[35] Although the foregoing invention has been described in some detail by way of illustration and example for purposes of clarity of understanding, it will be readily apparent to those of ordinary skill in the art in light of the teachings of this invention that certain changes and modifications may be made thereto without departing from the spirit or scope of the appended claims.

[36] EXAMPLES

WO 02/061148

PCT/GB02/00411

The following examples are provided by way of illustration only and not by way of limitation. Those of skill will readily recognize a variety of noncritical parameters which could be changed or modified to yield essentially similar results.

5

EXAMPLE 1**Materials and Methods**

- [37] Fifty-one patients with gastric carcinoma were recruited with informed consent from the Prince of Wales Hospital, Hong Kong. Blood samples were taken before surgical resection of the tumor. Following operation, sections of the tumor were taken for *in-situ* hybridization analysis for EBER (small EBV encoded RNA). Blood samples were also taken from 30 individuals with gastritis, without evidence of cancer carcinoma, and 197 apparently healthy control subjects.
- [38] **DNA Extraction from Plasma Samples.** Peripheral blood (5 ml) can be collected from each subject into an EDTA tube for the isolation of plasma. Blood samples are centrifuged at 1600 X g, and plasma carefully removed from the EDTA-containing tubes and transferred into plain polypropylene tubes. The samples are stored at -20°C until further processing. DNA from plasma samples are extracted using a QIAamp Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany) using the blood and body fluid protocol as recommended by the manufacturer (2). Plasma samples (130-800 µl/column) are used for DNA extraction. The exact amount is documented for the calculation of the target DNA concentration. A final elution volume of 50 µl is used from the extraction columns.
- [39] Circulating EBV DNA concentrations were measured using a real time quantitative PCR system towards the *Bam*HI-W fragment region of the EBV genome (Lo, Y. M. D. *et al.*, *Cancer Res.*, **59**:1188-1191 (1999)). The principles of real time quantitative PCR and reaction set-up procedures were as previously described (Lo, Y. M. D. *et al.*, *Cancer Res.*, **59**:1188-1191 (1999)). Data were collected using an ABI Prism 7700 Sequence Detector and were analyzed using the Sequence Detection System software (version 1.6.3) developed by Applied Biosystems. Results were expressed as copies of EBV genomes per milliliter of serum.
- [40] All serum DNA samples were also subjected to real time PCR analysis for the (beta-globin gene (Lo, Y. M. D. *et al.*, *Cancer Res.*, **59**:1188-1191 (1999))), which gave a positive signal on all tested samples, thus demonstrating the quality of the extracted DNA. Multiple negative water blanks were included in every analysis.

30

WO 02/061148

PCT/GB02/00411

- [01] More specifically, two real-time quantitative PCR systems have been developed for EBV DNA detection: (a) one toward the *Bam*HI-W region; and (b) the other toward the *EBNA-I* region (Baer, et al Nature, 310:207-211, 1984). The *Bam*HI-W system consisted of the amplification primers (SEQ ID NO: 1) W-44F (5'-CCCAACACTCCACCACACC-3') and (SEQ ID NO: 2) W-119R (5'-TCCTT AGGAGCTGTCCGAGGG-3') and the dual-labeled fluorescent probe (SEQ ID NO:3) W-67T (5'-FAM)CACACACTACACACACCCAC-CCGTCTC(TAMRA)-3']. The *EBNA-I* system consisted of the amplification primers (SEQ ID NO: 4) EBNA-1162F (5'-TCATCATCATCCGGTCTCC-3') and (SEQ ID NO: 5) EBNA-1229R (5'-CCTACAGGGT-GGAAAAATGGC-3') and the dual-labeled fluorescent probe (SEQ ID NO: 6) EBNA-1186T [5'-(FAM)CGCAGGCCCTCCAGGTA-GAA(TAMRA)-3']. The fluorescent probes contained a 3'-blocking phosphate group to prevent probe extension during PCR. Primer/probe combinations were designed using Primer Express software (Perkin-Elmer Corp., Foster City, CA). Sequence data for the EBV genome were obtained from the GenBank Sequence Database (accession number V01555).
- Real-time quantitative PCR for the *β -globin* gene consisted of primers and probe, as described previously in Lo, et al. *Am J. Hum Genet* 62:768-775, 1998, and was used as a control for the amplifiability of plasma DNA.
- [01] Fluorogenic PCR reactions are set up in a reaction volume of 50 μ l using components (except for the fluorescent probes and amplification primers) supplied in a TaqMan PCR Core Reagent Kit (Perkin-Elmer Corp.). Fluorescent probes are custom-synthesized by Perkin-Elmer Applied Biosystems. PCR primers were synthesized by Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD). Each reaction contained 5 μ l of 10x buffer A; 300 nM of each of the amplification primers; 25 nM (for the EBV probes) or 100 nM (for the *β -globin* probe) of the corresponding fluorescent probe; 4 mM MgCl₂; 200 μ M each of dATP, dCTP, and dGTP; 400 μ M dUTP; 1.25 units of AmpliTaq Gold; and 0.5 unit of AmpErase uracil N-glycosylase.
- [43] DNA amplifications are carried out in a 96-well reaction plate format in a Perkin-Elmer Applied Biosystems 7700 Sequence Detector. Each sample are analyzed in duplicate. Multiple negative water blanks were included in every analysis.
- [44] A calibration curve is run in parallel and in duplicate with each analysis, using DNA extracted from the EBV-positive cell line Namalwa (American Type Culture Collection CRL-1432; See Klein et al., *Int J. Cancer*, 10:44-57, 1972) as a standard. Namalwa is a diploid cell line that contains two integrated viral genomes/cell. A conversion factor of 6.6 pg of DNA/diploid cell was used for copy number calculation (Saiki et al., Science, 239:487-

WO 02/061148

PCT/GB02/00411

491, 1988). Concentrations of circulating cell-free EBV DNA were expressed as copies of EBV genome/ml plasma.

[45] An identical thermal profile was used for the EBV *Bam*HI-W and *EBNA-1* PCR systems. Thermal cycling was initiated with a 2-min incubation at 50°C for the uracil N-glycosylase to act, followed by an initial denaturation step of 10 min at 95°C, and then 40 cycles of 95°C for 15 s and 56°C for 1 min were carried out.

[01] Amplification data collected by the 7700 Sequence Detector and stored in a Macintosh computer (Apple Computer, Cupertino, CA) is then analyzed using the Sequence Detection System software developed by Perkin-Elmer Applied Biosystems. The mean quantity of each duplicate is used for further concentration calculation. The plasma concentration of EBV DNA or the *β-globin* gene (expressed in copies/ml) is calculated using the following equation:

$$[47] \quad C = Q \times \frac{V_{DNA}}{V_{PCR}} \times \frac{1}{V_{ext}}$$

[48] in which *C* represents the target concentration in plasma (copies/ml), *Q* represents the target quantity (copies) determined by a sequence detector in a PCR, *V_{DNA}* represents the total volume of DNA obtained after extraction (typically 50 μl/Qiagen extraction), *V_{PCR}* represents the volume of DNA solution used for PCR (typically 5 μl, and *V_{ext}* represents the volume of plasma/serum extracted (typically 0.13-0.80 ml)).

[49] The presence of EBV in tumor cells was assessed by in-situ hybridization on paraffin-embedded tissue sections using a fluorescein-conjugated oligonucleotide probe for EBER (Novocastra, U.K.) as previously described (Hui, P. K. *et al.*, *Hum. Pathol.*, **25**:947-952 (1994)).

Results

[50] A total of 51 gastric carcinoma patients were recruited. In this cohort, 5 gastric carcinomas were EBER-positive (Figure 1A). In 14 cases, the tumor cells were EBER-negative, but there were occasional infiltrating lymphocytes which were EBER-positive (Figure 1B). These 14 cases were classified as having 'background' positivity. Figure 2 illustrates the difference in the level of circulating EBV DNA amongst these three patient groups. Serum EBV DNA was detected in every one of the EBER-positive cases (median serum EBV DNA concentration: 1063 copies/mL; interquartile range: 485 to 5141 copies/mL). No serum EBV DNA was detected in any of the 32 negative cases (Figure 2). Thirteen out of the 14 cases (93%) demonstrating 'background' EBER positivity had

WO 02/061148

PCT/GB02/00411

detectable serum EBV DNA. These cases had an intermediate median serum EBV DNA concentration of 50 copies/mL (interquartile range: 42 to 98 copies/mL). The difference between these three groups is statistically significant ($p < 0.001$, Kruskal-Wallis test).

Pairwise multiple comparison analysis indicates significant difference between the EBER-positive and EBER-negative groups ($p < 0.05$, Dunn's method) and between the EBER-background and EBER-negative groups ($p < 0.05$, Dunn's method).

[51] EBV DNA was detectable in the serum of 7 of the 30 gastritis samples (23%) and 7 of the 197 healthy controls (3.6%). The proportions of serum EBV DNA positive cases between these groups are significantly different (chi-square test, $p = 0.028$). Even in the cases with detectable circulating EBV DNA, the actual serum EBV DNA concentrations were generally lower than those in the EBER-positive gastric carcinoma cases.

[52] A comparison was made for the cases with detectable serum EBV DNA in the gastric carcinoma cases with 'background' EBER-positivity, gastritis cases and control subjects. The serum EBV DNA concentrations of these three groups are plotted in Figure 3. There is no statistically significant difference in circulating EBV DNA levels amongst these three groups (Kruskal-Wallis test, $p = 0.296$).

Discussion

[53] These data demonstrate that cell-free EBV DNA can be detected in serum samples obtained from a proportion of gastric carcinoma patients. In addition, these data demonstrate an interesting correlation between the detectability of serum EBV DNA and tumoral EBER status. Thus, EBER-positive gastric carcinoma cases were associated with high levels of serum EBV DNA; gastric carcinoma cases with 'background' EBER-positivity were associated with intermediate levels; and no serum EBV DNA was seen in EBER-negative cases. This observation lends further demonstrate that plasma and serum represent noninvasive sources of materials for monitoring cancer (Anker, P. *et al.*, *Cancer Metastasis Rev.*, **18**:65-73 (1999)).

[54] Clinically, circulating EBV DNA may have application in the diagnosis and monitoring in the proportion of gastric carcinoma patients who have EBER-positive tumors, similar to what has been achieved for NPC (Lo, Y. M. D. *et al.*, *Cancer Res.*, **59**:1188-1191 (1999); Lo, Y. M. D. *et al.*, *Cancer Res.*, **59**:5452-5455 (1999)) and certain lymphomas (Lei, K. I. *et al.*, *Br. J. Haematol.*, **111**:239-246 (2000); Drouet, E. *et al.*, *J. Med. Virol.*, **57**:383-389 (1999); Gallagher, A. *et al.*, *Int. J. Cancer*, **84**:442-448 (1999)). Recently, the value of circulating EBV DNA in nasopharyngeal cancer prognosis has been demonstrated. The

WO 02/061148

PCT/GB02/00411

present data (Lo, Y. M. D. *et al.*, *Cancer Res.*, 60:6878-6881) indicate that EBV DNA measurement also has prognostic importance for gastric carcinoma.

[55] The detection of circulating EBV DNA in gastric carcinomas demonstrating 'background' EBER-positivity is interesting. The EBER-positive lymphocytes infiltrating the tumor tissues may be the origin of the low levels of serum EBV DNA that are detectable in these cases. If this is correct then further work may elucidate the mechanism of EBV liberation by these EBER-positive lymphocytes. Possible mechanisms include active release of DNA (Rogers, J. C. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 69:1685-1689 (1972)) and activation of lytic EBV infection in a proportion of these cells.

[56] The association between circulating EBV DNA and EBER-positive infiltrating lymphocytes suggests that low levels of circulating EBV DNA may also be seen in non-neoplastic inflammatory conditions. In fact, circulating EBV DNA is present in gastritis patients. As controls, serum EBV DNA was also detected in 3.6% of apparently healthy control individuals. The presence of low levels of circulating EBV DNA in apparently healthy subjects has previously been reported by other studies (Lo, Y. M. D. *et al.*, *Cancer Res.*, 59:1188-1191 (1999), Shotelersuk, K. *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 6:1046-1051 (2000)). In those gastritis and healthy control cases with detectable serum EBV DNA, the concentrations of viral DNA are very similar to those in the gastric carcinoma cases with 'background' EBER-positivity (Figure 3). This observation suggests that circulating EBV DNA may also be released by EBV-positive lymphocytes in the gastritis and healthy controls, as has been postulated above for EBER-background gastric carcinoma. With regard to the levels of circulating EBV DNA, amongst these 27 cases with detectable serum EBV DNA, 26 had levels below 500 copies/ml. In contrast, 4 of the 5 (80%) EBER-positive gastric carcinomas and, in a previous study (Lo, Y. M. D. *et al.*, *Cancer Res.*, 59:1188-1191 (1999)), 48 of 57 (84%) of nasopharyngeal carcinoma cases had circulating EBV DNA levels above 500 copies/ml. This analysis suggests that a plasma/serum EBV DNA concentration of 500 copies/ml may be a practical diagnostic cut-off for identifying patients with these carcinomas with high specificity. It is expected that farther refinement of this diagnostic cut-off value will be forthcoming with large-scale clinical studies.

[57] The long-term significance of the presence of low levels of circulating EBV DNA in the blood of apparently healthy individuals remains to be elucidated. Importantly, future studies should address the possibility that these individuals might be at increased risk of developing EBV-associated diseases. This issue would be of tremendous public health and biological importance.

WO 02/061148

PCT/GB02/00411

- [58] Biologically, the detection of circulating EBV DNA in patients with EBER-positive gastric carcinoma may provide important information regarding the clearance rate of tumor-derived DNA from the plasma. This remains a poorly understood issue because previous work on the kinetics of tumor-derived DNA clearance has been performed in patients undergoing radiation therapy (Lo, Y. M. D. *et al.*, *Cancer Res.*, **60**:2351-2355 (2000)) and chemotherapy (Lei, K. I. *et al.*, *Br. J. Haematol.*, **111**:239-246 (2000)). The kinetic parameters established from these previous studies represent a composite of (a) tumor cell death due to the treatment regime and (b) the clearance of tumor-derived DNA from the plasma. As gastric carcinoma is treated predominantly by surgical resection, this new model system may provide information regarding the clearance of tumor-derived DNA following cancer removal at a single time point, namely, at surgery. Such information would enhance the understanding of plasma DNA clearance in vivo, just as has already been done for fetal DNA clearance from maternal plasma (Lo, Y. M. D. *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.*, **64**:218-224 (1999)).
- [59] The present data also suggest that circulating EBV DNA may be useful in many other cancer types that are associated with EBV. Examples of such cancers include breast cancer (Bonnet, M. *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, **91**:1376-1381 (1999)) and hepatocellular carcinoma (Sugawara, Y. *et al.*, *Virology*, **256**:196-202 (1999)). As the association between some tumor types and EBV is still controversial, the possible detection of EBV DNA in the plasma of patients with such tumors may contribute towards resolving these issues.

WO 02/061148

PCT/GB02/00411

Sequence ID Listing

(SEQ ID NO: 1) W-44F (5'-CCCAACACTCCACCACACC-3')

(SEQ ID NO: 2) W-119R (5'-TCTT.AGGAGCTGTCCGAGGG-3')

(SEQ ID NO:3) W-67T (5'- FAM)CACACACTACACACCCCAC-

5 CCGTCTC(TAMRA)-3'].

(SEQ ID NO: 4) EBNA-1162F (5'-TCATCATCATCCGGGTCTCC-3')

(SEQ ID NO: 5) EBNA-1229R (5'-CCTACAGGGT-GGAAAAATGGC-3')

(SEQ ID NO: 6) EBNA-1186T [5'-(FAM)CGCAGGCCCTCCAGGTA-

GAA(TAMRA)-3'].

WO 02/061148

PCT/GB02/00411

WHAT IS CLAIMED IS:

- 1 1. A method of determining the increased probability of a patient suffering
2 from gastritis progressing to gastric cancer by:
3 (a) obtaining a sample of non-cellular blood-derived fluid from the patient suffering
4 from gastritis; and,
5 (b) assaying the fluid for the presence or absence of Epstein Barr virus where the
6 presence of the virus is an indication of increased probability of the patient progressing to
7 gastric cancer.
8
- 1 2. The method of claim 1 comprising the steps of:
2 (1) obtaining a blood sample from a patient;
3 (2) obtaining a fluid fraction from the blood sample;
4 (3) extracting DNA from the fluid fraction; and
5 (4) measuring the amount of circulating EBV DNA present in the fluid
6 fraction.
- 1 3. The method of claim 2 further comprising the step of:
2 (5) comparing the amount of circulating EBV DNA present in the fluid
3 fraction to a control.
- 1 4. The method of claim 1 wherein at least about 500 copies of EBV DNA
2 are present per milliliter of fluid fraction.
- 1 5. The method of claim 1 wherein at least 1 copy of EBV DNA is
2 present per milliliter of fluid fraction.
- 1 6. A method of claim 1 where the blood is a plasma sample.
- 1 7. A method of claim 1 wherein the assay involves hybridization of the
2 EBV virus nucleic acid with a nucleic acid probe.
- 1 8. A method of claim 1 wherein the assay is a polymerase chain reaction
2 based assay.
- 1 9. A method of claim 1 wherein the patient has been diagnosed with chronic
2 gastritis.
- 1 10. A method of claim 1 where the patient can be diagnosed with gastric
2 cancer and the cancer cells are free of EBV nucleic acid.

WO 02/061148

PCT/GB02/00411

- 1 11. A method of claim 1 where the patient can be diagnosed with gastric
2 cancer and the cancer cells contain EBV nucleic acid.
- 1 12. A method for diagnosing, detecting, monitoring or determining the
2 prognosis of a non-head and neck or lymphoid malignancy in a patient comprising the step of
3 detecting EBV DNA present in the serum or plasma of the patient.
- 1 13. The method of claim 12 comprising the steps of:
2 (1) obtaining a blood sample from a patient;
3 (2) obtaining a fluid fraction from the blood sample;
4 (3) extracting DNA from the fluid fraction; and
5 (4) measuring the amount of circulating EBV DNA present in the fluid
6 fraction.
- 1 14. The method of claim 13 further comprising the step of:
2 (5) comparing the amount of circulating EBV DNA present in the fluid
3 fraction to a control.
- 1 15. A method for diagnosing, detecting, monitoring or determining the
2 prognosis of gastritis in a patient comprising the step of detecting EBV DNA present in the
3 serum or plasma of the patient.
- 1 16. The method of claim 15 comprising the steps of:
2 (1) obtaining a blood sample from a patient;
3 (2) obtaining a fluid fraction from the blood sample;
4 (3) extracting DNA from the fluid fraction; and
5 (4) measuring the amount of circulating EBV DNA present in the fluid
6 fraction.
- 1 17. The method of claim 16 further comprising the step of:
2 (5) comparing the amount of circulating EBV DNA present in the blood
3 sample to a control.
- 1 18. A kit for determining the increased probability of a patient suffering
2 from gastritis progressing to gastric cancer comprising in a single kit product:

WO 02/061148

PCT/GB02/00411

3 (a) nucleic acid for detecting Epstein Barr virus in the blood of patients suffering from
4 ; and

5 (b) instructions for use of the nucleic acid to determine the the presence or absence of
6 Epstein Barr virus and an explanation of the increased probability of the patient progressing
7 to gastric cancer when the virus is present in the blood.

1 19. A diagnostic kit for detecting EBV DNA in the serum or plasma of a
2 patient comprising reagents suitable for detecting EBV DNA in the serum or plasma.

1 20. A diagnostic kit according to claim 19 comprising a device for
2 obtaining a blood sample from a patient.

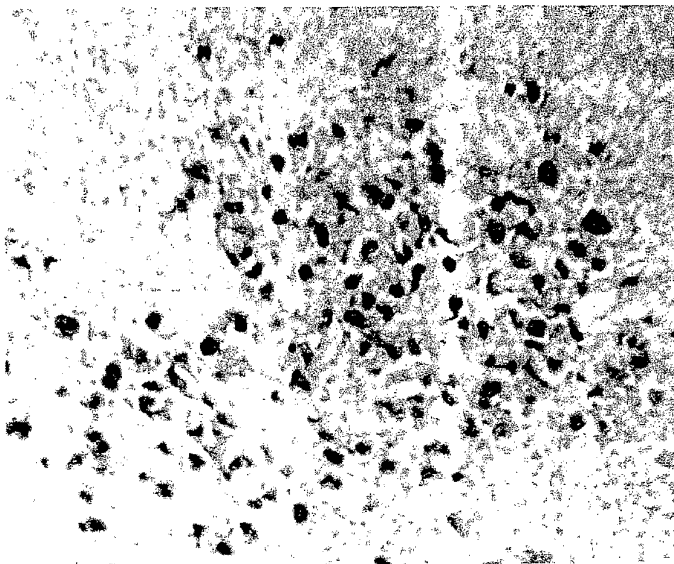
1 21. A diagnostic kit according to claim 19 comprising a means to separate
2 EBV DNA from a blood sample.

1 22. A diagnostic kit according to claim 19 comprising a means to quantify
2 the amount of EBV DNA present in the blood sample.

WO 02/061148

PCT/GB02/00411

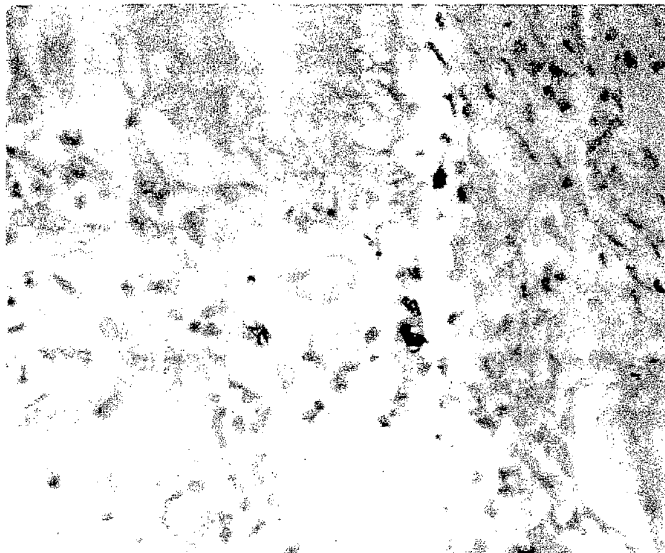
Figure 1A



WO 02/061148

PCT/GB02/00411

Figure 1B



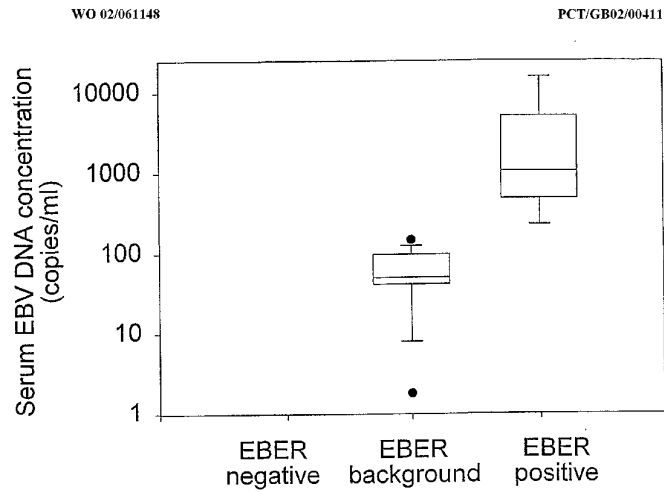
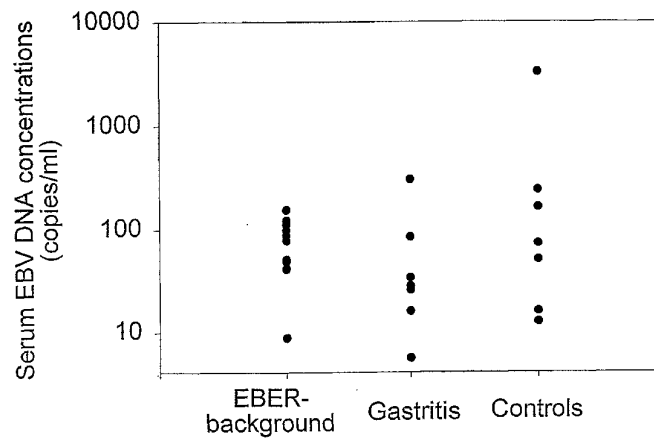


Figure 2

WO 02/061148

PCT/GB02/00411

Figure 3



【 国際公開パンフレット（コレクトバージョン） 】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
8 August 2002 (08.08.2002)

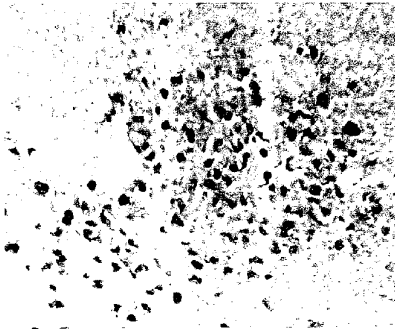
PCT

(10) International Publication Number
WO 02/061148 A3

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/70
(21) International Application Number: PCT/GH02/00411
(22) International Filing Date: 30 January 2002 (30.01.2002)
(25) Filing Language: English
(26) Publication Language: English
(30) Priority Data: 60/265,568 31 January 2001 (31.01.2001) US
(71) Applicant (for all designated States except US): THE CHINESE UNIVERSITY OF HONG KONG [CN/CN]; Room 226, Pi Chiu Building, Shatin, New Territories, Hong Kong (CN).
(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): LO, Yuk, Ming, Dennis [GB/CN]; Flat 15C, Arran Court, 2 Shek Ke Street, Homantin, Kowloon, Hong Kong (CN). CHAN, Wing, Yee [GB/CN]; 11B, Block 1, Grand Pacific Views, Castle Peak Road, Tuen Mun, Hong Kong (CN). NG, Kwok, Wai [CN/CN]; Flat B, 3/F, Block 9, Castle Garden, Tai Po, N.T., Hong Kong (CN).
(74) Agents: DENISON, Christopher, M. et al.; Mewburn Ellis, York House, 23 Kingsway, London, Greater London WC2B 6HP (GB).
(81) Designated States (national): AU, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KR, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BI, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: CIRCULATING EPSTEIN-BARR VIRUS DNA IN THE SERUM OF PATIENTS WITH GASTRIC CARCINOMA



(57) Abstract: The present invention features methods for diagnosing, detecting, monitoring and determining the prognosis of gastric cancer, non-head and neck and lymphoid malignancies, and gastritis in a patient by detecting or measuring EBV DNA present in the serum or plasma of the patient. The present invention also features diagnostic kits comprising suitable reagents for detecting EBV DNA in the serum or plasma of a patient.

WO 02/061148 A3

WO 02/061148 A3 **Published:**

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(88) Date of publication of the international search report:

15 May 2003

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 02/00411
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/70		
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) IPC 7 C12Q C07K		
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 practical, search terms used) BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ, EPO-internal, SEQUENCE SEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Y. LO ET AL.: "Circulating Epstein-Barr virus DNA in the serum of patients with gastric carcinoma." CLINICAL CHEMISTRY, vol. 47, no. 2, February 2000 (2000-02), page 366 XP001109439 Washington, DC, USA abstract 32 --- -/--	1-11, 15-22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 January 2003		Date of mailing of the international search report 11 03. 2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 5200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 51 051 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer N001J, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/GB 02/00411
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	H. YANAI ET AL.: "Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma and atrophic gastritis." JOURNAL OF CLINICAL GASTROENTEROLOGY, vol. 29, no. 1, July 1999 (1999-07), pages 39-43, XP008012247 New York, NY, USA cited in the application abstract page 39, right-hand column, line 17 - line 19 ---	1-11, 15-22
A	M. WU ET AL.: "Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas: Relation to H. pylori infection and genetic alterations." GASTROENTEROLOGY, vol. 118, no. 6, June 2000 (2000-06), pages 1031-1038, XP000982766 Philadelphia, PA, USA abstract page 1035, right-hand column ---	1-11, 15-22
A	P. LEVINE ET AL.: "Elevated antibody titers to Epstein-Barr virus prior to the diagnosis of Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma." INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 60, no. 5, 3 March 1995 (1995-03-03), pages 642-644, XP008012248 New York, NY, USA the whole document ---	1-11, 15-22
X	Y. LO ET AL.: "Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma." CANCER RESEARCH, vol. 59, no. 6, 15 March 1999 (1999-03-15), pages 1188-1191, XP000979273 Baltimore, MD, USA cited in the application the whole document ---	1-11, 15-22
A	K. LEI ET AL.: "Circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA levels in patients with EBV-associated lymphoid malignancies." CLINICAL CHEMISTRY, vol. 47, no. 2, February 2000 (2000-02), page 366 XP001109440 Washington, DC, USA abstract 31 -----	1-11, 15-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/GB 02/00411
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 1-17 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.	
2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:	
3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 8.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:	
see additional sheet	
1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. <input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-11, 15-18 (all completely), 19-22 (all partially)	
Remark on Protest	
<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/GB 02/00411

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-11, 15-18 (all completely), 19-22 (all partially)

A method and kit for diagnosing, detecting, monitoring or determining the prognosis of gastritis in a patient or for determining the increased probability of a patient suffering from gastritis progressing to gastric cancer comprising the step of detecting Epstein-Barr virus in non-cellular blood-derived fluid from said patient.

2. Claims: 12-14 (all completely), 19-22 (all partially)

A method and kit for diagnosing, detecting, monitoring or determining the prognosis of a non-head and neck or lymphoid malignancy in a patient comprising the step of detecting Epstein-Barr virus DNA in the serum or plasma of the patient.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 15/00	A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ロー、ユク ミン デニス

香港 クーロン ホマンティン 2 シェク ク ストリート アラン コート フラット 15
シー

(72)発明者 チャン、ウィン イー

香港 ツェン ムン キャッスル ピーク ロード グランド パシフィック ビューズ ブロッ
ク 1 11 ビー

(72)発明者 イン、クォク ワイ

香港 エヌ・ティ・ タイ ポ キャッスル ガーデン ブロック 9 フラット エフ 3 / エ
フ

F ターム(参考) 2G045 CA25 CB21 DA13 FB02

4B024 AA11 AA12 CA01 CA09 HA12

4B063 QA19 QQ10 QQ42 QR56 QR62 QS14 QS25 QS34 QX02