

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6691060号
(P6691060)

(45) 発行日 令和2年4月28日 (2020.4.28)

(24) 登録日 令和2年4月13日 (2020.4.13)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A
C 1 2 N 15/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A

請求項の数 29 (全 50 頁)

(21) 出願番号	特願2016-564354 (P2016-564354)	(73) 特許権者	519455933
(86) (22) 出願日	平成27年1月16日 (2015.1.16)		グリセリックス リミティド
(65) 公表番号	特表2017-504812 (P2017-504812A)		オーストラリア国、ニューサウスウェールズ 2113, マクアリー パーク, タラベラ ロード 75, グランド フロア, スイート 2
(43) 公表日	平成29年2月9日 (2017.2.9)		
(86) 国際出願番号	PCT/AU2015/000018	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開番号	W02015/106311		弁理士 青木 篤
(87) 国際公開日	平成27年7月23日 (2015.7.23)	(74) 代理人	100123582
審査請求日	平成29年12月25日 (2017.12.25)		弁理士 三橋 真二
(31) 優先権主張番号	61/928, 776	(74) 代理人	100092624
(32) 優先日	平成26年1月17日 (2014.1.17)		弁理士 鶴田 準一
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100114018
微生物の受託番号	CBA 20141126		弁理士 南山 知広
前置審査			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 診断用の細胞表面前立腺癌抗原

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者の前立腺癌を検出する方法であって、

患者の体液試料中の可溶性グリピカン-1 のレベルを測定すること、

癌に罹患していない患者の体液試料中の可溶性グリピカン-1 のレベルを対照試料中のグリピカン-1 のレベルとして、前記体液試料中の可溶性グリピカン-1 のレベルを、当該対照試料中のグリピカン-1 のレベルと比較し、当該対照試料中のグリピカン-1 のレベルと比べた前記体液試料中の可溶性グリピカン-1 のレベルの変化を検出すること、を含み、

当該変化の存在は、前記患者に前立腺癌があるか、前立腺癌が発生する可能性が高いことを示す、方法。

【請求項 2】

患者由来の体液試料と抗グリピカン-1 抗体とを接触させること、抗グリピカン-1 抗体と前記体液試料との結合を、対照試料中の抗グリピカン-1 抗体結合と比較し、前記対照試料中の抗グリピカン-1 抗体結合と比べた前記体液試料の抗グリピカン-1 抗体結合の変化を検出することを含み、

当該変化の存在は、前記患者に前立腺癌があるか、前立腺癌が発生する可能性が高いことを示す、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

10

20

前記抗グリピカン-1抗体が2014年8月22日、Cell Bank Australia (CBA) にアクセッション番号CBA20140026の下で寄託されたハイブリドーマ細胞によって産生された抗体と同一である、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記体液試料と抗体の集団とを接触させ、
前記集団の抗体が、

(a) 重鎖可変領域であって、

配列番号10の位置50～54によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域1 (CDR1) と、

配列番号10の位置69～85によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域2 (CDR2) と、

配列番号10の位置118～126によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域3 (CDR3) と

を含む、重鎖可変領域および

(b) 軽鎖可変領域であって、

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

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

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

を含む、軽鎖可変領域

を含み、

前記集団の抗体が、

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

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

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

を含む軽鎖可変領域を含まない、請求項2に記載の方法。

【請求項5】

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

【請求項6】

前記抗グリピカン-1抗体が2014年8月22日、Cell Bank Australia (CBA) にアクセッション番号CBA20140026の下で寄託されたハイブリドーマ細胞によって産生された抗体と同一ではない、請求項2に記載の方法。

【請求項7】

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

【請求項8】

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

【請求項9】

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

【請求項10】

免疫蛍光法、放射標識、イムノブロットイング、ウエスタンブロット法、酵素結合免疫

10

20

30

40

50

測定法（E L I S A）、フローサイトメトリー、免疫沈降、免疫組織化学法、生物膜試験、a f f i n i t y r i n g t e s t、抗体アレイ吸光度試験および化学発光からなる群より選択される技術により抗グリピカン－1抗体結合を検出する、請求項2～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

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

【請求項12】

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

10

【請求項13】

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

【請求項14】

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

【請求項15】

20

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

【請求項16】

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

【請求項17】

前記患者の体液試料中の前立腺特異抗原（P S A）のレベルを測定すること、
 （i）前記体液試料で測定したP S Aのレベルおよび（i i）前記抗グリピカン－1抗体と前記体液試料との結合に基づき、測定した前記体液試料中の前立腺特異抗原（P S A）のレベルと、対照試料で測定したP S Aのレベルとを比較し、前記対照試料と比べた前記体液試料中のP S Aレベルの変化を検出し、及び、抗グリピカン－1抗体と前記体液試料との結合を、対照試料中の抗グリピカン－1抗体結合と比較し、前記体液試料との結合と比べた前記体液試料中の抗グリピカン－1抗体結合の変化を検出すること、
をさらに含み、

30

これらの変化の存在は、前記患者に前立腺癌が存在するか、前立腺癌が発生する可能性が高いことを示す、請求項1～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】

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

40

【請求項19】

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

【請求項20】

前記体液が、血液、血清、血漿および尿からなる群より選択される、請求項1～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

患者由来の体液中の前立腺癌を検出するためのキットの使用であって、当該キットが、

50

第一の抗グリピカン-1抗体と、グリピカン-1標準品とを含み、第一の抗グリピカン-1抗体が患者の体液中の可溶性グリピカン-1を検出するために使用される、キットの使用。

【請求項22】

前記抗グリピカン-1抗体が2014年8月22日、Cell Bank Australia (CBA) にアクセッション番号CBA20140026の下で寄託されたハイブリドーマ細胞によって産生された抗体と同一ではない、請求項21に記載のキットの使用。

【請求項23】

前記抗グリピカン-1抗体が2014年8月22日、Cell Bank Australia (CBA) にアクセッション番号CBA20140026の下で寄託されたハイブリドーマ細胞によって産生された抗体と同一である、請求項21に記載のキットの使用。

【請求項24】

前記抗グリピカン-1抗体が、請求項4、5および7のいずれか1項で定義されている抗体である、請求項21に記載のキットの使用。

【請求項25】

二次リガンドをさらに含む、請求項21～24のいずれか1項に記載のキットの使用。

【請求項26】

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

【請求項27】

前記二次リガンドを迅速に検出するため、前記リガンドが標識とコンジュゲートされている、請求項25または請求項26に記載のキットの使用。

【請求項28】

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

【請求項29】

ELISAを実施するための構成要素を含む、請求項22～28のいずれか1項に記載のキットの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

技術分野

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

【背景技術】

【0002】

相互参照による組込み

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

【0003】

発明の背景

前立腺癌は、米国の男性に最も高頻度に診断が下される内臓癌であり、その死因の第2

10

20

30

40

50

位を占めている。米国癌協会（American Cancer Society）の推定では、2013年に新たに診断される前立腺癌の症例数は約238,590例にのぼり、29,720人の男性が前立腺癌で死亡するとみられている。全体でみると、男性の6人に1人が生涯の間に前立腺癌の診断が下されることになる。

【0004】

現在、前立腺癌は直腸指診（DRE）または患者の血中前立腺特異抗原（PSA）の測定 of the いずれかによって検出することが可能である。しかし、いずれの検査も完全に決定的なものになるわけではなく、偽陰性（実際には存在する癌が検出されずにいる）および偽陽性（癌が存在しなくても癌のシグナルが発生する）となることもある。例えば、推奨される4.0 ng/mlのカットオフレベルで実施される標準的なPSA検査は、癌患者に 10 対する感度は86%であるが、特異性は33%であり、非癌患者のおよそ67%が偽陽性となる（Hoffmanら、2002）。偽陽性であれば通常、続いて侵襲的で痛みを伴う生検が実施される。

【0005】

精度および／または感度が改善された前立腺癌の診断検査法が必要とされている。

【発明の概要】

【0006】

発明の概要

本発明は、前立腺癌患者の体液または組織にグリピカン-1ヘパラン硫酸プロテオグリカン（GPC-1）レベルの上昇がみられるという発見に一部基づくものである。本発明 20 者らは、グリピカン-1が新たな前立腺癌のマーカーになることを発見した。したがって、本発明は、グリピカン-1を検出して患者に前立腺癌が存在することを確定する方法を提供する。

【0007】

一実施形態では、本発明は、患者の前立腺癌を検出する方法であって、患者から体液試料または組織試料を採取することと、前記試料と抗グリピカン-1抗体とを接触させることと、前記抗グリピカン-1抗体と前記体液試料または組織試料との結合に基づき、前記患者に前立腺癌があるか、前立腺癌が発生する可能性が高いことを確定することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、体液試料または組織試料中の1つまたは複数の追加の前立腺マーカーのレベルを測定し、患者に癌があること確定は、患者の体液試料 30 または組織試料中のグリピカン-1のレベルおよび1つまたは複数の追加のマーカーのレベルに基づくものである。いくつかの実施形態では、癌は前立腺癌であり、追加のマーカーはPSAである。いくつかの実施形態では、抗グリピカン-1抗体はMIL-38である。他の実施形態では、抗グリピカン-1抗体はMIL-38ではない。いくつかの実施形態では、抗グリピカン-1抗体は、グリピカン-1と結合することが可能な抗体フラグメントまたは組換え抗体である。いくつかの実施形態では、検出を容易にするために抗グリピカン-1抗体を標識する。いくつかの実施形態では、抗体の標識は、特に蛍光標識、ビオチン-アビジン増幅系、化学発光系、マイクロスフェアまたはコロイド金であり得る。

【0008】

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

【0009】

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

【0010】

他の実施形態では、抗グリピカン-1抗体と患者の体液または組織との結合のレベルを 50

、抗グリピカン-1抗体と比較標準品との結合のレベルと比較し、体液試料または組織試料の抗グリピカン-1抗体結合が比較標準品試料よりも増大していれば、前立腺癌が存在するものとする。いくつかの実施形態では、前記比較標準品は、グリピカン-1含有量が既知の試料を含む。いくつかの実施形態では、抗グリピカン-1と体液または組織との結合の比較を、抗グリピカン-1とグリピカン-1標準品との結合と比較して、前記体液中のグリピカン-1の量を定量化する。

【0011】

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

10

【0012】

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

【0013】

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

20

【0014】

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

【0015】

したがって、本発明は、少なくとも以下の番号を付した一連の実施形態に関する：

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

30

【0016】

実施形態2：

(a) 患者から体液試料を採取する段階と、

(b) 前記体液試料と抗グリピカン-1抗体とを接触させる段階と、

(c) 前記抗グリピカン-1抗体と前記体液試料との結合に基づき、前記患者に前立腺癌があるか、前立腺癌が発生する可能性が高いことを判定する段階と

を含む、実施形態1に記載の患者の前立腺癌を検出する方法。

40

【0017】

実施形態3：前記抗グリピカン-1抗体がMIL-38である、実施形態2に記載の方法。

【0018】

実施形態4：前記体液試料と抗体の集団とを接触させ、
集団の抗体が、

(a) 重鎖可変領域であって、

配列番号10の位置50～54によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域1(CDR1)と、

配列番号10の位置69～85によって定められるアミノ酸配列を含むか、これより

50

なる相補性決定領域 2 (CDR2) と、

配列番号 10 の位置 118 ~ 126 によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよりなる相補性決定領域 3 (CDR3) と

を含む、重鎖可変領域および

(b) 軽鎖可変領域であって、

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

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

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

を含む、軽鎖可変領域

を含み、

集団の抗体が、

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

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

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

を含む軽鎖可変領域を含まない、実施形態 2 に記載の方法。

【0019】

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

【0020】

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

【0021】

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

【0022】

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

【0023】

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

【0024】

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

【0025】

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

【0026】

10

20

30

40

50

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

【0027】

実施形態 13：抗グリピカン-1 抗体と前記体液試料との結合を、対照試料の抗グリピカン-1 抗体結合と比較し、体液試料の抗グリピカン-1 抗体結合が対照試料よりも増大していれば、前立腺癌が存在するものとする、実施形態 2～10 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0028】

実施形態 14：抗グリピカン-1 抗体と前記体液試料との結合が対照試料の抗グリピカン-1 抗体結合のレベルよりも 50 % 以上増大していれば、前立腺癌があることを示す、実施形態 13 に記載の方法。

10

【0029】

実施形態 15：抗グリピカン-1 抗体と前記体液試料との結合を、抗グリピカン-1 抗体と 1 つまたは複数のグリピカン-1 標準品との結合と比較し、標準品の抗グリピカン-1 抗体結合を用いて前記体液試料中のグリピカン-1 の量を定量化する、実施形態 2～10、13 または 14 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0030】

実施形態 16：体液試料中のグリピカン-1 含有量が約 10 ng/ml を上回れば、前立腺癌があることを示す、実施形態 1～15 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【0031】

実施形態 17：

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

をさらに含む、実施形態 1～16 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0032】

実施形態 18：前立腺特異抗原 (PSA) のレベルを患者の血液試料で測定する、実施形態 17 に記載の方法。

30

【0033】

実施形態 19：測定した体液試料中の前立腺特異抗原 (PSA) のレベルと、対照試料で測定した PSA のレベルとを比較し、体液試料中の PSA レベルが対照試料よりも増大していれば、前立腺癌が存在するものとする、実施形態 17 または実施形態 18 に記載の方法。

【0034】

実施形態 20：前記体液が、血液、血清、血漿および尿からなる群より選択される、実施形態 1～19 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0035】

実施形態 21：前立腺癌を検出するキットであって、第一の抗グリピカン-1 抗体と、薬学的に許容される担体と、グリピカン-1 標準品とを含み、患者の体液中のグリピカン-1 を検出することが可能である、キット。

40

【0036】

実施形態 22：抗グリピカン-1 抗体が MIL-38 ではない、実施形態 21 に記載のキット。

【0037】

実施形態 23：抗グリピカン-1 抗体が MIL-38 である、実施形態 21 に記載のキット。

【0038】

実施形態 24：抗グリピカン-1 抗体が、実施形態 4、5 または 7 のいずれか 1 つで言

50

及されている抗体である、実施形態 2 1 に記載のキット。

【0039】

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

【0040】

実施形態 2 6：前記二次リガンドが、第二の抗グリピカン-1 抗体またはグリピカン-1 と結合することが可能なアプタマーであり、前記第二の抗グリピカン-1 抗体が、第一の抗グリピカン-1 抗体と同じものであり得る、実施形態 2 5 に記載のキット。

【0041】

実施形態 2 7：前記二次リガンドを迅速に検出するため、前記リガンドが標識とコンジュゲートされている、実施形態 2 5 または実施形態 2 6 に記載のキット。

【0042】

実施形態 2 8：前記標識が、免疫蛍光法、放射標識、イムノブロットィング、ウェスタンブロット法、酵素結合免疫測定法（ELISA）、フローサイトメトリー、免疫沈降、免疫組織化学法、生物膜試験、affinity ring test、抗体アレイ吸光度試験および化学発光からなる群より選択される検出方法に使用するためのものである、実施形態 2 7 に記載のキット。

【0043】

実施形態 2 9：ELISA を実施するための構成要素を含む、実施形態 2 2～2 8 のいずれか 1 つに記載のキット。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図 1】細胞結合 M I L-3 8 グリピカン-1 抗原の特徴付けを示す図である。D U-1 4 5 前立腺癌細胞を膜タンパク質抽出キット（M P E K、M e r c k 社）で処理し、磁気ビーズと結合させた M I L-3 8 抗体とインキュベートした。次いで、抗原を免疫沈降させ、磁気ビーズ上で洗浄した後、抗原を溶出させ、前記抗原を質量分析に供した。グリピカン-1 が M I L-3 8 抗原であると同定されたマスペック解析の結果を示す。グリピカン-1 タンパク質の範囲にわたる 1 8 個の固有のペプチド配列には下線が施されている。

【図 2】M I L-3 8 の免疫沈降およびサイズ排除クロマトグラフィーを示す図である。M I L-3 8 を用いて D U-1 4 5 前立腺癌細胞の膜抽出物を免疫沈降させ、サイズ排除クロマトグラフィーカラムに通した。図は、M I L-3 8 抗体または二次抗体対照のいずれかを用いた偶数のクロマトグラフィー画分のウェスタンブロット分析を示している。画分 A 2 8 および A 3 0 の 6 0 K d の位置に M I L-3 8 抗原が見られる。

【図 3】サイズ排除クロマトグラフィーで精製した M I L-3 8 抗原の質量分析を示す図である。図 2 のサイズ排除クロマトグラフィーによる分離で得られた画分番号 A 2 9 を質量分析により分析した。グリピカン-1 が M I L-3 8 抗原であると同定されたマスペック解析の結果が、グリピカン-1 タンパク質の範囲にわたる 8 個の固有のペプチド配列に下線を施して示されている。

【図 4】M I L-3 8 抗体と抗 G P C-1 抗体が二次元ゲルウェスタンブロット上で反応性の重複を示すことを示す図である。D U-1 4 5 前立腺癌細胞の膜タンパク質抽出物を二次元ゲルで分離した（p I 勾配が横方向、分子質量が縦方向である）。M I L-3 8 抗体および市販の r G P C-1 ウサギポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロットに 6 0 K d タンパク質を示す反応性の重複が見られる（図の丸で囲った部分）。レーン D は、対照である D U-1 4 5 抽出物の一次元分離である。レーン M は、対照である分子量サイズのマーカーの一次元分離レーンである。

【図 5】M I L-3 8 が G P C-1 抗体の免疫沈降物を検出することができ、逆も同様であることを示す図である。M I L-3 8 抗体およびウサギ抗 G P C-1 抗体をそれぞれ用いて、D U-1 4 5 前立腺癌細胞または C 3（M I L-3 8 陰性）細胞の膜タンパク質抽出物からその抗原を免疫沈降させた。M I L-3 8 抗体または抗 G P C-1 抗体のいずれ

10

20

30

40

50

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

10

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

【図7】M I L - 3 8 が細胞培養上清中に分泌された抗原を検出することができることを示す図である。D U - 1 4 5 前立腺癌細胞を無血清培地で36時間インキュベートして無細胞馴化培地を得た。M I L - 3 8 抗体を用いて細胞を全く含まない馴化培地を免疫沈降させ、D U - 1 4 5 M P E K 膜タンパク質抽出物を用いた標準I P と比較した。M I L - 3 8 抗体を用いた免疫沈降物のウェスタンブロットが示されている。M I L - 3 8 抗体は、馴化液体培地中の40kDおよび55kDの抗原を検出することができる。

20

【図8A】細胞培養上清中に検出されたM I L - 3 8 抗原がグリピカン-1であることを示す図である。D U - 1 4 5 前立腺癌細胞を無血清培地で36時間インキュベートして無細胞馴化培地を得た。M I L - 3 8 抗体を用いて馴化培地を免疫沈降させ、免疫沈降物を質量分析法による分析に供した。図8A. 40kDおよび55kDのM I L - 3 8 反応性抗原をとともに含有する試料をマススペック解析に供した。グリピカン-1が馴化液体培地のM I L - 3 8 抗原であると同定されたマススペック解析の結果が、グリピカン-1タンパク質のN末端の範囲にわたる9個の固有のペプチド配列に下線を施して示されている。図8B. 40kDaのM I L - 3 8 反応性抗原を含有する試料をマススペック解析に供した。グリピカン-1が馴化液体培地のM I L - 3 8 抗原であると同定されたマススペック解析の結果が、グリピカン-1タンパク質のN末端の範囲にわたる10個の固有のペプチド配列に下線を施して示されている。図8C. 55kDaのM I L - 3 8 反応性抗原を含有する試料をマススペック解析に供した。グリピカン-1が馴化液体培地のM I L - 3 8 抗原であると同定されたマススペック解析の結果が、グリピカン-1タンパク質のN末端の範囲にわたる9個の固有のペプチド配列に下線を施して示されている。

30

【図8B】細胞培養上清中に検出されたM I L - 3 8 抗原がグリピカン-1であることを示す図である。D U - 1 4 5 前立腺癌細胞を無血清培地で36時間インキュベートして無細胞馴化培地を得た。M I L - 3 8 抗体を用いて馴化培地を免疫沈降させ、免疫沈降物を質量分析法による分析に供した。図8A. 40kDおよび55kDのM I L - 3 8 反応性抗原をとともに含有する試料をマススペック解析に供した。グリピカン-1が馴化液体培地のM I L - 3 8 抗原であると同定されたマススペック解析の結果が、グリピカン-1タンパク質のN末端の範囲にわたる9個の固有のペプチド配列に下線を施して示されている。図8B. 40kDaのM I L - 3 8 反応性抗原を含有する試料をマススペック解析に供した。グリピカン-1が馴化液体培地のM I L - 3 8 抗原であると同定されたマススペック解析の結果が、グリピカン-1タンパク質のN末端の範囲にわたる10個の固有のペプチド配列に下線を施して示されている。図8C. 55kDaのM I L - 3 8 反応性抗原を

40

50

含有する試料をマスマススペック解析に供した。グリピカン-1が馴化液体培地のM I L-38抗原であると同定されたマスマススペック解析の結果が、グリピカン-1タンパク質のN末端の範囲にわたる9個の固有のペプチド配列に下線を施して示されている。

【図8C】細胞培養上清中に検出されたM I L-38抗原がグリピカン-1であることを示す図である。D U-145前立腺癌細胞を無血清培地で36時間インキュベートして無細胞馴化培地を得た。M I L-38抗体を用いて馴化培地を免疫沈降させ、免疫沈降物を質量分析法による分析に供した。図8A. 40 k Dおよび55 k DのM I L-38反応性抗原をとともに含有する試料をマスマススペック解析に供した。グリピカン-1が馴化液体培地のM I L-38抗原であると同定されたマスマススペック解析の結果が、グリピカン-1タンパク質のN末端の範囲にわたる9個の固有のペプチド配列に下線を施して示されている。図8B. 40 k D aのM I L-38反応性抗原を含有する試料をマスマススペック解析に供した。グリピカン-1が馴化液体培地のM I L-38抗原であると同定されたマスマススペック解析の結果が、グリピカン-1タンパク質のN末端の範囲にわたる10個の固有のペプチド配列に下線を施して示されている。図8C. 55 k D aのM I L-38反応性抗原を含有する試料をマスマススペック解析に供した。グリピカン-1が馴化液体培地のM I L-38抗原であると同定されたマスマススペック解析の結果が、グリピカン-1タンパク質のN末端の範囲にわたる9個の固有のペプチド配列に下線を施して示されている。

10

【図9】M I L-38抗体が前立腺癌患者の血漿および前立腺癌の膜抽出物中のグリピカン-1を検出することができることを示す図である。図9A. 正常対照患者1例および前立腺癌患者1例の血漿試料をM I L-38抗体で免疫沈降させた。M I L-38抗体およびr G P C 1抗体によるウエスタンブロットの両方が示されている。M I L-38では、対照患者の血漿よりも前立腺癌患者の血漿の方が免疫沈降したグリピカン-1タンパク質のレベルが高かった。各レーンは、046 I P N T-前立腺癌血漿のI P ; 046 I P H e p I-ヘパリナーゼで処理した前立腺癌血漿のI P ; 042 I P N T-正常対照血漿のI P ; 042 I P H e p I-ヘパリナーゼで処理した正常対照血漿のI P ; M a g i c M a r k-対照である市販のタンパク質マーカーである。図9B. 正常前立腺1例および前立腺癌1例の膜タンパク質抽出物をN o v u s B i o社から入手した。M I L-38抗体を用いて等量のタンパク質にウエスタンブロットを実施した。前立腺癌抽出物の方がM I L-38抗原の発現が高かった。

20

【図10】M I L-38が前立腺癌患者の尿に癌を検出することができることを示す図である。年齢が一致した患者125例から尿試料を採取し、間接免疫蛍光アッセイにM I L-38抗体を用いて前立腺癌の存在を試験した。生検による確認(B P H、C a P)または危険因子の分析(健常対照)のいずれかに基づき、患者を健常対照、良性前立腺肥大(B P H)または前立腺癌(C a P)に分類した。図には、C a P実験試料; D U 145陽性対照試料; およびC 3陰性対照試料の例示的な画像が示されている。

30

【図11】M I L-38が様々なE L I S Aフォーマットで組換えグリピカン-1を検出することができることを示す図である。組換えヒトN S 0産生グリピカン-1タンパク質(r h G P C 1) 0 n g、0. 1 n g、1 n gまたは10 n gを分析物として用いてサンドイッチE L I S A法を実施した。図11A. M I L-38抗体による捕捉、ウサギポリクローナル抗G P C 1(a-G P C 1)による検出。図11B. 抗グリピカン-1抗体による捕捉、M I L-38による検出。図11C. M I L-38による捕捉、ビオチン化M I L-38による検出。

40

【図12A】様々なM I L-38抗体調製物を捕捉抗体として用いて実施したサンドイッチE L I S A法による比較を示す図である。図12A. A M 3およびA M 4を捕捉抗体として用いたサンドイッチE L I S A法による比較を示している。図12B. 混合調製物(34A)またはクローン集団(A M 4 1 F 5)のいずれかを捕捉抗体として用いたサンドイッチE L I S A法による比較を示している。

【図12B】様々なM I L-38抗体調製物を捕捉抗体として用いて実施したサンドイッチE L I S A法による比較を示す図である。図12A. A M 3およびA M 4を捕捉抗体として用いたサンドイッチE L I S A法による比較を示している。図12B. 混合調製物(

50

34A) またはクローン集団 (AM4-1F5) のいずれかを捕捉抗体として用いたサンドイッチ ELISA 法による比較を示している。

【図13】抗体スクリーニングの未処理データの箱ひげ図グラフである。AM4-MIL-38 抗体と各合成ペプチドとの結合を PEPSCAN ベースの ELISA で試験した。箱の下端および上端はデータの 25 番目および 75 番目の百分位数である。箱中央付近の帯は 50 番目の百分位数 (中央値) である。ひげは四分位範囲の 1.5 倍にあたり、データセット内の統計的外れ値を示している (Mcgill ら, The American Statistician, 32:12-16, 1978)。

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

10

【発明を実施するための形態】

【0045】

詳細な説明

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

【0046】

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

20

【0047】

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

【0048】

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

30

【0049】

【表 1】

表 1.

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

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

10

20

【0050】

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

【0051】

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

30

【0052】

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

【0053】

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

40

【0054】

本発明は、前立腺癌を検出する方法を提供する。前立腺癌は、米国の男性に最も高頻度に診断が下される内臓癌であり、その死因の第2位を占めている。米国癌協会（American Cancer Society）の推定では、2013年に新たに診断される

50

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

【0055】

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

【0056】

B L C A-38（M I L-38 としても知られる）は、ヒト膀胱癌細胞系 U C R U-B L-17 C L に対してマウスに生じさせた I g G1 マウス抗体である（Walker ら, 1989）。得られた抗体は、ほとんどのヒト膀胱癌系と結合することが明らかにされている（Russell ら, 2004）。この抗体は、30 Kd の細胞表面タンパク質と結合し、特定の種類の膀胱癌の検出に有用であるものとして記載されている（米国特許第 5, 622, 836 号）。

【0057】

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

【0058】

本発明に従えば、任意の適切な技術（例えば、任意のプロテオミクス技術）を用いて、体液または組織中のグリピカン-1 レベルを検出することができる。いくつかの実施形態では、抗グリピカン-1 抗体を用いてグリピカン-1 レベルを検出することができる。例えば、配列番号 10 の位置 50～54 によって定められるアミノ酸配列を含むか、これよ

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

10

【0059】

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

20

30

【0060】

【表 2 - 1】

表 2.

抗グリピカン-1 抗体

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

【表 2 - 2】

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

【0062】

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

ピカン-1タンパク質を有する細胞全体または細胞部分であり得る。当業者にはこのほか、Borrebaeckら、1995；および米国特許第7,960,517号に記載されている方法などの様々な周知の方法によって、遺伝情報から結合フラグメントまたはFabフラグメントを調製し得ることが理解されよう。

【0063】

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

【0064】

別の実施形態では、前立腺癌を検出するために、グリピカン-1に対するモノクローナル抗体（mAb）を作製し得る。同じく単なる非限定的な例を挙げれば、第一のセグメントKVNPQGPGPE（配列番号6）またはKVNPQGPGP（配列番号7）を含むグリピカン-1エピトープに対して、グリピカン-1を標的とするモノクローナル抗体を生じさせることができる。エピトープは、第二のセグメントTQNARA（配列番号8）またはTQNARAFRD（配列番号9）をさらに含み得る。一実施形態では、ハイブリドーマ技術（KohlerおよびMilstein, 1975）をはじめとする技術（Coleら, 1985；または米国特許第6,116,013号）により抗グリピカン-1抗体を作製する。抗体作製に関するさらなる詳細および例については、米国特許第7,985,560号を参照されたい。

【0065】

本発明のいくつかの実施形態では、抗グリピカン-1抗体により患者の体液または組織中のグリピカン-1を検出する。いくつかの実施形態では、患者から採取する体液試料は、血液試料、血清試料、血漿試料または尿試料である。他の実施形態では、患者の組織試料中のグリピカン-1を検出する。いくつかの実施形態では、組織試料には、腫瘍生検をはじめとする患者の組織が含まれる。本発明のいくつかの態様では、抗体は、ウエスタンブロット分析、酵素結合免疫測定法（ELISA）、蛍光細胞分取もしくはFACS、免疫蛍光法、放射標識、免疫沈降、免疫組織化学法、イムノブロッティング、化学発光および／または抗体もしくはその他のリガンド、例えばグリピカン-1と結合することが可能タンパク質などを用いてタンパク質を検出するその他の既知の技術によりグリピカン-1を検出する。いくつかの実施形態では、生物膜試験または米国特許出願公開第2013/016,736号に記載されているaffinity ring testによりグリピカン-1を検出する。いくつかの実施形態では、透明な表面（例えば、ポリカルボナート製スライド）にコートしたグリピカン-1結合剤によりグリピカン-1を検出する。グリピカン-1またはグリピカン-1を有する細胞の結合は、吸光度の変化によって検出することができる。いくつかの実施形態では、抗グリピカン-1抗体と前記体液試料または組織試料との結合を、抗グリピカン-1抗体と1つまたは複数のグリピカン-1校正標準品との結合と比較し、校正標準品の抗グリピカン-1抗体を用いて前記体液試料中のグリピカン-1の量を定量化する。一実施形態では、校正標準品は、グリピカン-1濃度が既知である1つまたは複数の試料を含む。

【0066】

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

【0067】

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

10

【0068】

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

【0069】

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

20

30

【0070】

いくつかの実施形態では、生体試料を、グリピカン-1抗体であり得る固定化した捕捉(またはコート)試薬と接触させてインキュベートする。この抗体は任意の種のものであり得るが、いくつかの実施形態では、抗体はマウス抗体またはラット抗体である。他の実施形態では、抗体はマウス抗体である。他の実施形態では、抗体はハイブリドーマに由来する。いくつかの実施形態では、グリピカン-1抗体は組換え抗体または抗体フラグメントである。固定化は、アッセイ法の前に水不溶性のマトリックスまたは表面に吸着させる(米国特許第3,720,760号)か、非共有結合または共有結合(例えば、米国特許第3,645,852号またはRotmansら,1983に記載されているように、事前に支持体を例えば硝酸および還元剤で活性化させるかどうかを問わず、グルタルアルデヒド架橋もしくはカルボジイミド架橋を用いて)させることによって、あるいは、アッセイ法の後に例えば免疫沈降によって、捕捉試薬を不溶化することにより従来通りに実施する。

40

【0071】

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

50

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

10

【0072】

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

20

【0073】

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

【0074】

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

30

【0075】

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

40

【0076】

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

50

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

【0077】

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

【0078】

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

【0079】

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

【0080】

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

10

【0081】

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

20

【0082】

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

30

40

【0083】

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

50

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

【0084】

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

【0085】

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

【0086】

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

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

10

【0087】

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

20

【0088】

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

30

40

【0089】

50

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

10

【0090】

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

20

30

40

【0091】

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

50

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

【0092】

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

【0093】

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

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

【0094】

実施例

実施例1. 細胞と結合したMIL-38抗原の特徴付け。

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

【0095】

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

【0096】

実施例2. MIL-38抗原の免疫沈降および質量分析。

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

【0097】

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

【0098】

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

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

【 0 0 9 9 】

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

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

【 0 1 0 0 】

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

10

【 0 1 0 1 】

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

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

【 0 1 0 2 】

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

20

【 0 1 0 3 】

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

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

30

【 0 1 0 4 】

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

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

40

【 0 1 0 5 】

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

【 0 1 0 6 】

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

50

【0107】

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

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

【0108】

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

【0109】

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

【0110】

実施例9. 患者尿中の M I L - 3 8 抗原の検出。

M I L - 3 8 は前立腺癌患者の尿中の細胞を検出することができる。この検出方法の感度および特異性を試験するため、年齢が一致した尿試料125例を入手した。尿から細胞を遠心沈殿させ、M I L - 3 8 間接免疫蛍光アッセイにより分析した。合計で健常対照47例、良性前立腺肥大（BPH）37例および生検で確認された前立腺癌41例を分析した。陽性前立腺癌細胞、D U - 1 4 5 陽性対照およびC3陰性細胞の例を示す（図10）。

【0111】

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

【0112】

【表3】

表3.

患者尿での前立腺癌検出の感度および特異性の計算値。

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

【0113】

実施例10. MIL-38抗原の検出とPSAレベルとの併用より前立腺癌の検出能が増大する。

MIL-38免疫蛍光アッセイ (IFA) 検査とPSA検査とを併用すると、感度および特異性が増大する。このような増大は、PSA検査に適用するカットオフ値に応じて異なる。陽性診断のカットオフが2 ng/mLより大きい場合、特異性はIFA単独検査時の73%から2つの検査併用時の83%まで増大する。陽性診断のカットオフが4 ng/mLより大きい場合、特異性はIFA単独検査時の73%から2つの検査併用時の89%まで増大する。

【0114】

このことは、2つの検査を併用した場合にORおよび95%CIの増大を示すロジスティック回帰分析によってさらに説明される。

【0115】

【表4】

表4. MIL-38 IFA検査とPSAスコアとを併用した場合の感度および特異性の増大。

2 ng/mLで層別化

PSA < 2 ng/mL

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

PSA ≥ 2 ng/mL

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

4 ng/mLで層別化

PSA < 4 ng/mL

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

PSA ≥ 4 ng/mL

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

ロジスティック回帰

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

【0116】

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

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

10

【0117】

実施例 12. A M 4 M I L - 38 抗体を用いたグリピカン-1 抗原の検出

本発明者らが実施した実験から、当時「B L C A - 38 ハイブリドーマ」と称された原寄託の M I L - 38 抗体のハイブリドーマ (A T C C アクセション番号 H B 11785: マウスハイブリドーマ B L C A - 38) は、ここで「A M 3」および「A M 4」と称される 2 つの異なる抗体集団を産生するハイブリドーマ細胞の混合集団であることが明らかになった。異なる抗体集団をそれぞれ産生するハイブリドーマ細胞を分離し、2014 年 8 月 22 日、「A M 4」ハイブリドーマ細胞を C e l l B a n k A u s t r a l i a (C B A) にアクセション番号 C B A 20140026 の下で寄託した。

20

【0118】

96 ウェルプレートに、M I L - 38 を炭酸緩衝液 (pH 9.5) で調製した A M 3 または A M 4 (1 μ g / ウェル) で一晩コートした。5% 脱脂乳を含有する P B S - T w e e n (0.1%) でプレートを 37°C にてブロックし、洗浄した。150 mM N a C l を加えた緩衝液 I I (20 mM H E P E S (pH 7.5)、0.5 mM E D T A、0.5% T r i t o n X - 100) で抗原 (G P C - 1 N S O) を希釈し、37°C で一晩インキュベートした。ビオチン化 A M 4 抗体による検出を実施し、次いでアビジン H R P (1 μ g / m l) による検出を実施した。T M B (S i g m a 社、カタログ番号 T 0440) を加え、T M B 停止液 (S i g m a 社、S 5814) で停止させた。450 nm での吸光度を読み取った。結果を図 12 A に示す。

30

【0119】

2 つ目の実験では、96 ウェルプレートに、M I L - 38 を P B S (pH 7.2) で調製した 34 A (A M 3 抗体と A M 4 抗体の混合物) または A M 4 (2.5 μ g / ウェル) で 1 時間、室温でコートした。プレートを 37°C で 1 時間、P B S - T w e e n (0.05%) に溶かした B l o c k e r C a s e i n (T h e r m o 社) でブロックした。洗浄後、50 mM トリシンおよび 150 mM N a C l を含有する T B S (pH 7.2) で抗原 (G P C - 1 N S O) を希釈し、37°C で 1 時間インキュベートした。ビオチン化 A M 4 クローン 1 F 5 による検出を実施し、次いでアビジン H R P (1 μ g / m l) による検出を実施した。T M B (S i g m a 社、カタログ番号 T 0440) を加え、T M B 停止液 (S i g m a 社、S 5814) で停止させた。450 nm での吸光度を読み取った。結果を図 12 B に示す。

40

【0120】

M I L - 38 を用いて上記の 1 つ目の E L I S A を実施して、N S O が産生した G P C - 1 (すなわち、M I L - 38 抗原) を捕捉した。この実験では、モノクローナル A M 3

M I L - 38 とモノクローナル A M 4 M I L - 38 の捕捉を比較した。サンドイッチ E L I S A アッセイでは、A M 3 は捕捉剤として機能しなかったのに対し、A M 4 は捕捉剤として機能することが明らかになった (図 12 A)。

【0121】

上記の 2 つ目の E L I S A では、M I L - 38 の混合集団 (A M 3 および A M 4) と、モノクローナル A M 4 1 F 5 クローンから得られた混合集団とを比較した場合に得られた E L I S A シグナルを比較した。A M 4 1 F 5 を捕捉剤として用いた場合の方が、混

50

合 3 4 A 抗体集団を用いた場合よりも強い E L I S A シグナルが得られた (図 1 2 B)。

【 0 1 2 2 】

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

【 0 1 2 3 】

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

材料および方法

一重鎖および軽鎖のシーケンシング (D N A)

10

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

【 0 1 2 4 】

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

20

【 0 1 2 5 】

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

30

【 0 1 2 6 】

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

【 0 1 2 7 】

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

【 0 1 2 8 】

V_H プラスミドおよび V_L プラスミドには、抗体の完全長可変領域および C_H1 と C_L の一部分がコードされていた。 C_H プラスミドには、 C_H1 の一部分および完全長の C_H2 と C_H3 がコードされていた。 C_L プラスミドには C_L の一部分がコードされていた。完全長の定常領域または重鎖／軽鎖を得るため、 V_H プラスミドおよび V_L プラスミドによってコードされる定常領域の部分ならびに C_H プラスミドおよび C_L プラスミドによってコードされる定常領域の部分を別個に P C R で増幅し、次いで、オーバーラップ・エクステンション P C R を用いて完全長の D N A を得た。 V_H、 V_L、 C_H および C_L のインサートの大きさが正確な 5 つの単一コロニーをシーケンシングに供した。

40

【 0 1 2 9 】

シーケンシングラン 4 4 9 2 9 5 - 5 (A l f i o I I) では、予測された I g G 1 重鎖配列に対応する配列を得るうえで困難に直面した。 R N A の調製を 2 回実施した。1 つ目のバッチの細胞では、オリゴ d T プライマーおよび C D S I I I プライマーを逆

50

転写 (RT) に用いた。IgG1 および IgK に特異的なプライマーを用いた PCR により VH/CH および VK/CK を増幅し、陽性対照として部分的マウス β -アクチン遺伝子を増幅した。ゲルには、通常の軽鎖バンドが容易に得られたのに対し、VH はわずかに観察されるにとどまった。VK および CK のインサートの大きさが正確な 5 つの個々のコロニーをシーケンシングに供した。5 つの異なるコロニーの VK 遺伝子および CK 遺伝子はほぼ同一であることがわかった。Alfio II ハイブリドーマから得られたコンセンサス軽鎖配列を以下に挙げる。下に示されるように、無作為にシーケンシングに供した 8 個の VH 陽性クローンから非生産的な重鎖配列が 1 つ得られた。無作為にシーケンシングに供した 10 個の CH 陽性クローンから 3 種類の重鎖定常領域配列が得られた (IgG₁CH が 1 つ、IgG_{2a}CH が 1 つ、IgG_{2b}CH が 8 つ)。クラススイッチングの影響を受ける可能性を回避するため、IgM 特異的プライマーを用いた C_H の増幅を実施したが、目的 PCR 産物は得られなかった。また、重鎖 FR1 縮重プライマーを用いて完全長重鎖 (V_H-C_H) を増幅しても、目的 PCR 産物は得られなかった。

10

【0130】

数回試みても生産的な重鎖は得られなかったため、2 つ目のバイアルの Alfio II 細胞から重鎖配列を単離することを試みた。2 つ目のバイアルの細胞では、最初にオリゴ dT プライマーを逆転写に用いた。IgG1、IgG2b、IgM、IgA に特異的なプライマーおよび IgG 縮重プライマーをそれぞれ用いて V_H を増幅し、IgK 特異的プライマーを用いて VK を増幅した。前回の結果と同じく、生産的な軽鎖および非生産的な重鎖が得られた。ほかにもランダム 6 量体プライマーを用いた逆転写を試みたが、成功

20

【0131】

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

【0132】

結果

一配列のまとめの表

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

30

【0133】

【表 5】

表 5 : AM 4 抗体および AM 3 抗体の配列および内部領域の概要

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

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

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

【0134】

ーシーケンシング（DNA）

試料から単離した全 RNA を 1.5% アガロース／Gel Red（商標）ゲル上で DNA マーカー（Marker III-TIANGEN 社、カタログ番号 MD103）と並べて泳動した。

【0135】

各試料の PCR 産物 4 マイクロリットルを 1.5% アガロース／Gel Red（商標）ゲル上で DNA マーカー（Marker III）と並べて泳動した。PCR 産物を精製し、のちに使用するまで -20℃ で保管した。

【0136】

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

【0137】

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

20

30

【 0 1 3 8 】

【表 7】

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

GACATCCAGATCACT
 CAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACATGT
 TGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAACTCCTGGTCTAT
 GGTGTGCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGAACACAATATTCTCTCAAGATCAATAGCCTGCAGCCT
 GAAGATTTTGGGACTTATTACTGT
 ATCAAA
 TAG

マウス軽鎖コード配列の個々の領域が網掛け文字／網掛けでない文字で交互に強調されて
 いる。位置：1～60＝リーダー配列；61～129＝フレームワーク領域（LFR1）；
 130～162＝相補性決定領域（LCDR1）；163～207＝LFR2；208～2
 28＝LCDR2；229～324＝LFR3；325～351＝LCDR3；352～
 381＝LFR4；382～702＝定常領域（CK）；703～705＝停止コドン。

【0139】

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

【表 8】

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

MAWVWTLFLMAAQSIAQIQVLVQSGPELKKPGETVKISKASGYAFTDYSMNWVKQAPGKGLRWGWINTEG
 EPTYTDDFKGRFAFSLETSASTAFLQINNLRNEDTATYFCARHYDYGGEPIWGQGLVTVSAAKTIPPSVYPLAF
 GSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTNSSGLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSSETVICNVAPPA
 SSTKVDKKIVPRECGCKPCICTVPEVSSVFIPEPKPKGVLTITLTPRVTCVVVDISKDDPEVQFSWVDQVEVHT
 AQTOPREEQFNSTFRSVSELPIMHQONLNGKEFKCRVNSAFAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPEPKQMAKD
 KVSILTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLNHH
 TEKSLSHSPGK*

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

【0140】

10

20

30

40

AM4 コンセンサスMIL-38 軽鎖アミノ酸コンセンサス配列 (配列番号 11)

軽鎖アミノ酸配列の個々の領域が印を付けて示されている：位置 1～20＝リーダー配列；フレームワーク領域（LFR1）；21～43＝相補性決定領域 1（LCDR1）；44～54＝LFR2；55～69＝LCDR2；70～76＝LFR3；77～108＝LCDR3；109～117＝LFR4；118～234＝カップ定常領域（CK）および停止コドン（*）

10

AM3 コンセンサス配列

AM3 様 A l f i o I I 細胞からは一貫した重鎖配列は得られなかった。シーケンシングラン 449295-5 (A l f i o I I) から得られた軽鎖配列は一貫して得られたものであり、他の 2 回のシーケンシングランの配列と比較して、フレームワーク領域および相補性決定領域の両方に明らかな差がみられた。

20

AM3 MIL-38 カッパ軽鎖DNA コンセンサス配列 (配列番号15)

30

*軽鎖コード配列の個々の領域が網掛け文字／網掛けでない文字で交互に強調されている。
位置：1～72＝リーダー配列；73～141＝フレームワーク領域（LFR1）；142～174＝相補性決定領域（LCDR1）；175～219＝LFR2；220～240＝LCDR2；241～336＝LFR3；337～363＝LCDR3；364～393＝LFR4；394～714＝定常領域（CK）；715～717＝停止コドン

40

【表 1 1】

AM3 MIL-38 軽鎖アミノ酸コンセンサス配列 (配列番号 1 2)

MCIMNESQTCVTVYMLLNLSGVDSGDIVMTQSQKFMSTSIGDRVSVTCKASQNVGSHVAFQKPGQSPKALITYSA
 SYRYSQVTDTRFTGSGSGTDFTLTINNVSQEDLAIEYFCQYNSFFFTFGSGTKLEIKRADAAFTVSIFPPSSEOLT
 SGGASVVCFLNNFYFKDINVKWKIDGSEKQNGVLNSWTDQSDKSTYSMSSTLTLTKEVERHNSYTCEATHKTS
 TSPIVKSFNNEC*

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

10

【0 1 4 4】

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

材料および方法

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

【0 1 4 5】

【表 1 2】

20

表 6：使用した AM4 抗体の説明

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

†Cell bank Australia にアクセス番号 CBA20140026 の下で寄託されたハイブリドーマ細胞によって産生されるもの

【0 1 4 6】

－ペプチド

30

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

GPC1__残基 番号 343～366 GNPKVNPQGPGPEEKRRRGKLAP (配列番号 1 7)

GPC1__残基 番号 140～149 GELYTQNARAFRDLYSELR (配列番号 1 8)

【0 1 4 7】

－ペプチド合成

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

40

【0 1 4 8】

－Chemically Linked Peptides on Scaffolds (CLIPS) 技術

用いた CLIPS 技術の一般的原理の説明について以下で説明する。

【0 1 4 9】

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

【0 1 5 0】

50

C L I P S 足場のブロモ基とシステインのチオール側鎖との間でC L I P S 反応が起こる。この反応は、穏やかな条件下では迅速で特異的なものである。この化学反応を用いると、天然のタンパク質配列が単一T 2 ループ、T 3 二重ループ、コンジュゲートT 2 + T 3 ループ、安定化ベータシートおよび安定化アルファヘリックスを含めた様々な構造を有するC L I P S 構築物に変換される (Timmermanら, J. Mol. Recognit. 2007; 20: 283-29)。

【0151】

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

10

【0152】

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

20

【0153】

ーペプチド合成

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

30

【0154】

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

セット1

40

模倣体の種類 不連続エピトープ模倣体

標識 MAT. A、MAT. B

説明 様々な長さの制約型ペプチド模倣体。2つの出発配列(配列番号17および配列番号18)からステップサイズ4の10~22量体ペプチドおよび10~18量体ペプチドをすべて作製し、これらを対にしたもの。末端および2つのペプチドの中間にシステインが位置している。これらはT 3 C L I P S によって連結されている。

【0155】

セット2

模倣体の種類 線状ペプチド

標識 RN. PKVNPQGPGPEEKRR (配列番号19)

50

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

【0156】

セット3

模倣の種類 制約型ペプチド

標識 RN. PKVNPQGPGPEEKRR__LOOP（配列番号19）

RN. ELCTQNCRAFRDLYS__heli3（配列番号21）

RN. ELCTQNCRAFRDLYS__LOOP（配列番号21）

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

10

【0157】

－ELISAスクリーニング

抗体と各合成ペプチドとの結合をPEPSCANベースのELISAで試験した。ペプチドアレイを一次抗体溶液とインキュベートした（4℃で一晩）。洗浄後、ペプチドアレイを1/1000希釈の抗体ペルオキシダーゼコンジュゲート（SBA社、カタログ番号2010-05）と25℃で1時間インキュベートした。洗浄後、ペルオキシダーゼ基質の2, 2'-アジノージー3-エチルベンゾチアゾリンスルホナート（ABTS）および3% H₂O₂ 2 μl/mlを加えた。1時間後、発色を測定した。電荷結合素子（CCD）カメラおよび画像処理システムで発色を定量化した。

20

【0158】

－データ処理

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

【0159】

－合成の品質管理

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

30

【0160】

－スクリーニングの詳細

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

【0161】

【表13】

表7：スクリーニング条件

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

40

【0162】

結果

－主要な実験結果およびシグナル／ノイズ比の決定

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

50

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

【0163】

－抗体 M I L 3 8－A M 4

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

【0164】

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

【0165】

－結論

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

【0166】

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

【0167】

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

【0168】

【表 1 4】

表 8：M I L 3 8－A M 4 抗体のエピトープ

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

【0169】

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

【0170】

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

【0171】

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

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

【0172】

参考文献

- Aikawa T, Whipple C, Lopez M, Gunn J, Young A, Lander A, Korc M. 2008. "Glypican-1 modulates the angiogenic and metastatic potential of human and mouse cancer cells" *The Journal of Clinical Investigation* Vol 118:1 10
- Borrebaeck et al., 1995 *Antibody Engineering: A Practical Approach* (Borrebaeck, C, ed.), 1995, Oxford University Press, Oxford; J. Immunol. 149, 3914-3920 (1992)
- Cole et al., 1985, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 20
- Dainak M, Kumar A, Galaev IY, Mattiasson B. 2007 "Methods in Cell Separations" Vol 106:1-18
- David G, Lories V, Decock B, Marynen P, Cassiman JJ, Van den Berghe H. 1990. "Molecular Cloning of a Phosphatidylinositol-anchored Membrane Heparan Sulfate Proteoglycan from Human Lung Fibroblasts" *The Journal of Cell Biology* Vol 111:6-2 3165-3176
- Filmus J, Capurro M, Rast J. "Glypicans" *Genome Biology* 2008, 9:224 30
- Filmus J, Selleck SB: Glypicans: proteoglycans with a surprise. *J Clin Invest* 2001, 108:497-501.
- Fujise M, Takeo S, Kamimura K, Matsuo T, Aigaki T, Izumi S, Nakato H. Dally regulates DPP morphogen gradient formation in the *Drosophila* wing. *Development* 2003, 130:1515-1522.
- Han C, Belenkaya TY, Wang B, Lin X. "Drosophila glypicans control the cell-to-cell movement of hedgehog by a dynamin-independent process". *Development* 2004, 131:601-611. 40
- Harlow et al 1988. *Antibodies, A Laboratory Manual*, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Cold Spring Harbor, N. Y.
- Harmon J Eyre, Robert A Smith, and Curtis J Mettlin, "Chapter 28 Cancer Screening a 50

nd Early Detection" Holland-Frei Cancer Medicine 5th Edition. Bast RC Jr, Kufe DW, Pollock RE, editors Hamilton (ON) : BC Decker ; 2000.

Hoffman R. , Gililand F. , Cameron M. , Hunt W. , and Key C. "Prostate-specific antigen testing accuracy in community practice" BM C Fam Pract. 2002, 3:19.

Holliger P and Hudson P. 2005. "Engineered antibody fragments and the rise of single domains" Nature Biotech 23 1126-1136.

10

Johnson KW, Dooner M, Queensberry PJ. 2007 "Fluorescence Activated Cell Sorting: A Window on the Stem Cell" Vol 8:133-9

Kleef J, Ishiwata T, Kumbasar A, Friess H, Buchler M, Lander A. "The Cell-surface heparan sulfate proteoglycan glypican-1 regulated growth factor action in pancreatic carcinoma cells and is overexpressed in human pancreatic cancer" J Clin Invest. Vol 102 No 9 Nov 1998

20

Kohler and Milstein 1975 Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity Nature 256:495-497

Matsuda K, Maruyama H, Guo F, Kleef J, Matsu modto Y, Lander AD, Korc M. "Glypican-1 is overexpressed in human breast cancer and modulates the mitogenic effects of multiple heparin-binding growth factors in breast cancer cells." Cancer Res 2001 Jul 15, 61(14) 5562-9.

30

Orfao A, Ruiz-arguelles, Alejandro. 1996 "General concepts about cell sorting techniques" Clin. Biochem. Vol 29:1 5-9

Qiao D, Meyer K, Mundhenke C, Friedl S, Friedl D. 2003 "Heparan Sulfate Proteoglycans as Regulators of Fibroblast Growth Factor-2 Signaling in Brain Endothelial Cells : SPECIFIC:ROLE FOR GLYPICAN-1 IN GLIOMA ANGIOGENESIS" J. Biol. Chem. 16045-16053.

40

Rotmans et al. 1983 Cross-linking of Schistosoma mansoni antigens and their covalent binding on the surface of polystyrene microtitration trays for use in the ELISA J. Immunol. Methods 57:87-98 (1983)

Russell PJ. , Ow KT. , Tam PN. , Juarez EA. , Qu CF. , Li Y. , Cozzi PJ. , and Martiniello-Wilks. "Immunohistochemical characterization of the monoclonal antibody BLCA-38 for

50

the detection of prostate cancer" Cancer Immunol. Immunother (2004) 53:995–1004

Spaltro, Andrea Doctoral Dissertation University of Bologna 2012

Su G, Meyer, K, Nandini C, Qiao D, Salamat S, Friedl A. "Glypican-1 is frequently overexpressed in human gliomas and enhances FGF-2 signaling in glioma cells" Am J Pathol 2006 June 168 (6) 2014–2026.

Suhovskih A, Mostovich L, Kunin I, Mekhrozhi 10
ddin B, Nepomnyashchikh G, Aidaulova S, Griorieva E. "Proteoglycan expression in normal human prostate tissue and prostate cancer" Oncology Volume 2013 ID 680136

Tung JW, Heydari K, Tirouvanziam R, Sahaf B, Parks DR, Herzenberg LA. 2007 "Modern Flow Cytometry: A Practical Approach" Vol 27:453–68

Veugeliers M, De Cat B, Ceulemans H, Bruystens AM, Coomans C, Durr J, Vermeesch J, Maryn 20
en P, David G. "Glypican-6, a new member of the glypican family of cell surface proteoglycans." J Biol Chem 1999 274:26968–26977

Walker KZ, Russell PJ, Kingsley EA, Phillips J, Raghavan D. "Detection of malignant cells in voided urine from patients with bladder cancer, a novel monoclonal assay. J Urol 142:1578 1989.

Whipple C, Yong A, RLATG, Korc M. 2012. "A KrasG12D-driven Genetic Mouse Model of Pancreatic Cancer Requires Glypican-1 for Efficient Proliferation and Angiogenesis" Oncogene May 17 31 (20) 2535–2544. 30

【図 1】

図1

GPC1—ヒト 質量: 61641 スコア: 4276 マッチ: 166(134) 配列: 21(18) embAI: 5.50
グリピカン-1 OS=ヒト GN=GPC1 EF=1 SV=2
(Homo sapiens)

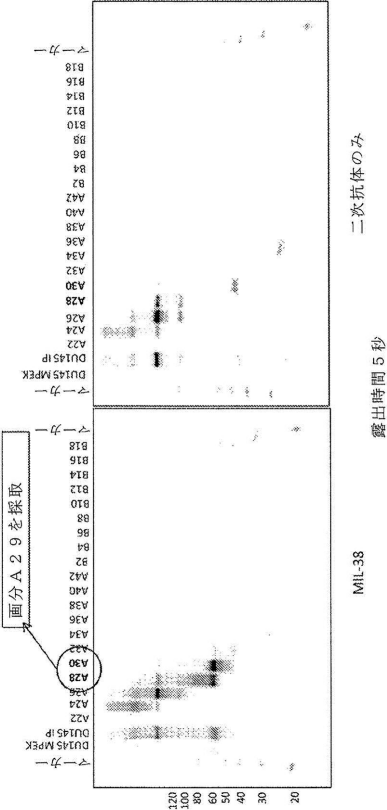
配列カバレッジ: 46%

マッチしたペプチドに下線が施されている

1 MEIRARGMWLCRAALVACARGDPASKR SCGEYRQIYGKGFSLSDVP
51 QAEISGEHLR ICPQGYTCTT SEMENLAR SHALETALR DSSRLQAML
101 ATQLSEFDH FQHLNDSER TLQATFGAF GELYTONARA ENLISEALR
151 YRGANLHLE ETLAEFWARL LERLTKQLHP QLLPFDYLD CIGKQEARL
201 PFGAPRELR LRATRAFWAA RSTVQGLVA SVVRKVAQV PIGPECRRV
251 MKLYVCACHL GVGARPCPD YCRNVLKGL ANQADLDAN RNLDLMVLI
301 TDNWTGSSV ESVGSVHTN LAELINALQD NRDTLTARVI QCCGNPKNP
351 QGPGFEKRR RGLAPRRP PGTLEKLVG EKAQIRIVQ DFWISLFTL
401 CSEKALSTA SDDRNRGMA RGYLPEVMG DGIANQINP EYVDITRPD
451 MTIRQQIMOL KIMINRLSA YNGNDVDFQD ASDDGGSGS GDCGLDLC
501 RYVRKSSSS NPTLHALPE LSEQEGOKTS AASCQPTTF LPLALLAL
551 TVARERWR (配列番号 2 3)

【図 2】

図2



【図 3】

図3

サイズ排除HPLC画分番号29の質量分析

GPC1—ヒト 質量: 61641 スコア: 290 マッチ: 8(8) 配列: 8(8) embAI: 0.52
グリピカン-1 OS=ヒト GN=GPC1 EF=1 SV=2
(Homo sapiens)

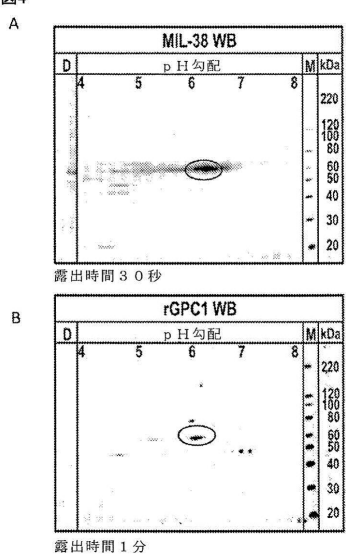
配列カバレッジ: 14%

マッチしたペプチドに下線が施されている

1 MEIRARGMWLCRAALVACARGDPASKR SCGEYRQIYGKGFSLSDVP
51 QAEISGEHLR ICPQGYTCTT SEMENLAR SHALETALR DSSRLQAML
101 ATQLSEFDH FQHLNDSER TLQATFGAF GELYTONARA ENLISEALR
151 YRGANLHLE ETLAEFWARL LERLTKQLHP QLLPFDYLD CIGKQEARL
201 PFGAPRELR LRATRAFWAA RSTVQGLVA SVVRKVAQV PIGPECRRV
251 MKLYVCACHL GVGARPCPD YCRNVLKGL ANQADLDAN RNLDLMVLI
301 TDNWTGSSV ESVGSVHTN LAELINALQD NRDTLTARVI QCCGNPKNP
351 QGPGFEKRR RGLAPRRP PGTLEKLVG EKAQIRIVQ DFWISLFTL
401 CSEKALSTA SDDRNRGMA RGYLPEVMG DGIANQINP EYVDITRPD
451 MTIRQQIMOL KIMINRLSA YNGNDVDFQD ASDDGGSGS GDCGLDLC
501 RYVRKSSSS NPTLHALPE LSEQEGOKTS AASCQPTTF LPLALLAL
551 TVARERWR (配列番号 2 3)

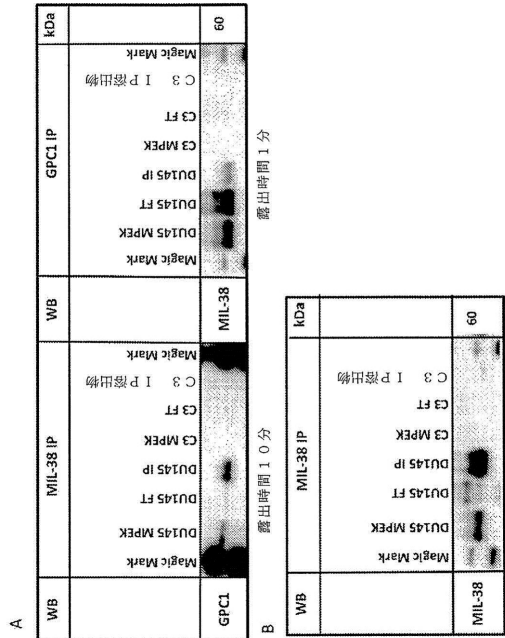
【図 4】

図4



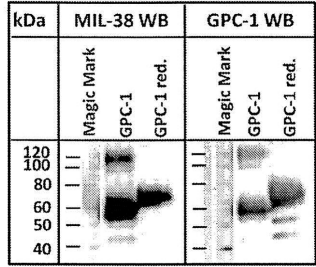
【図 5】

図5



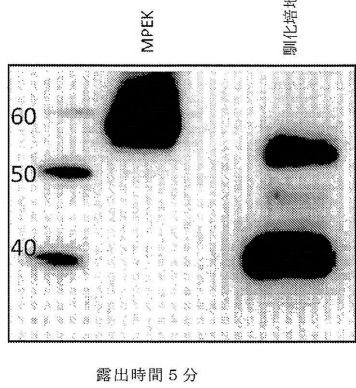
【図 6】

図6



【図 7】

図7



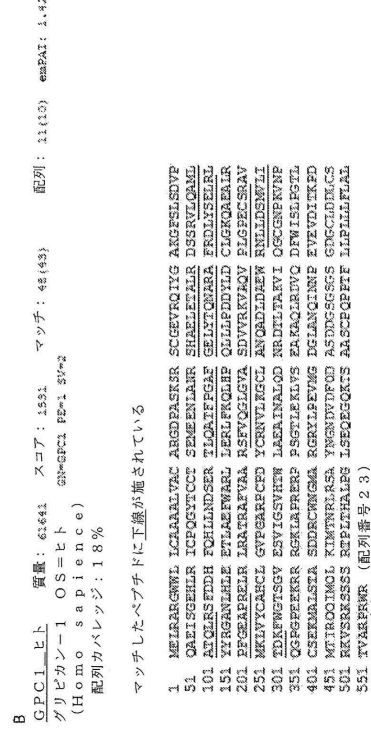
【図 8 A】

図8A



【図 8 B】

図8B



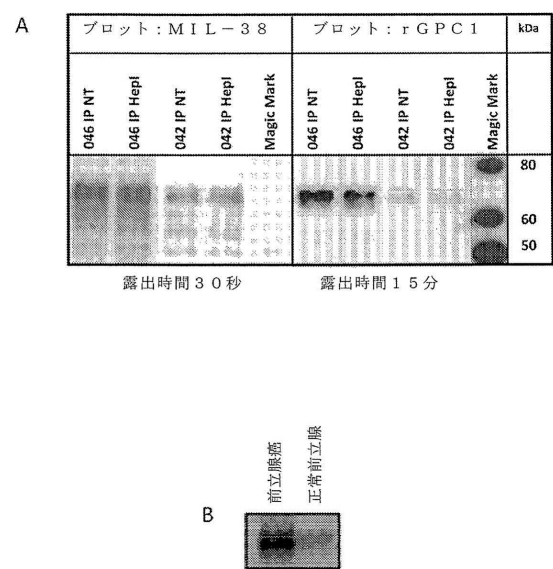
【図 8 C】

図8C



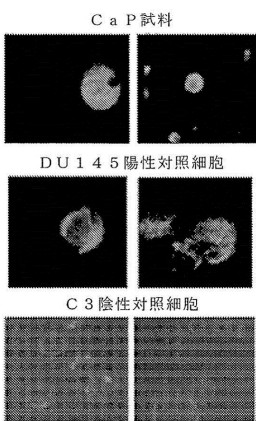
【図 9】

図9



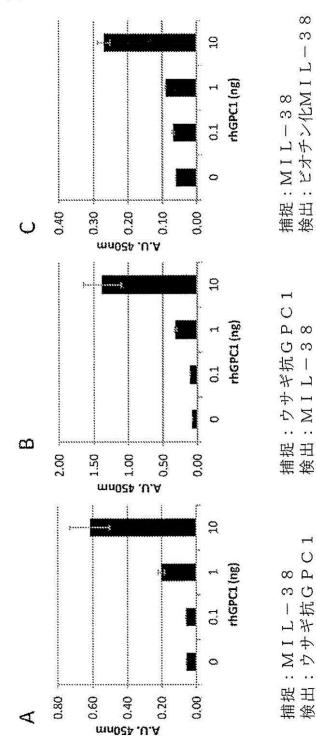
【図 10】

図10



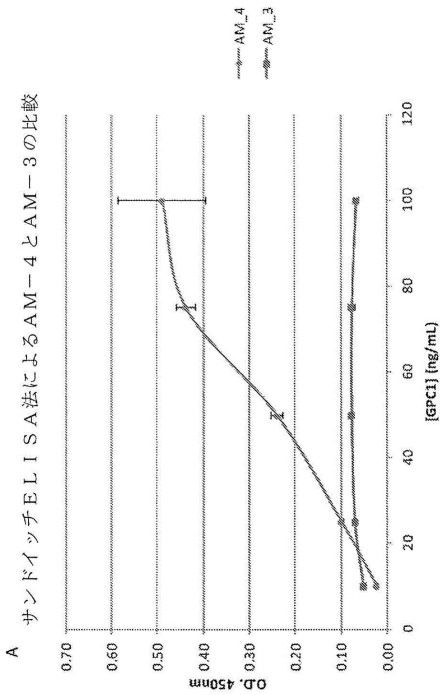
【図 11】

図11



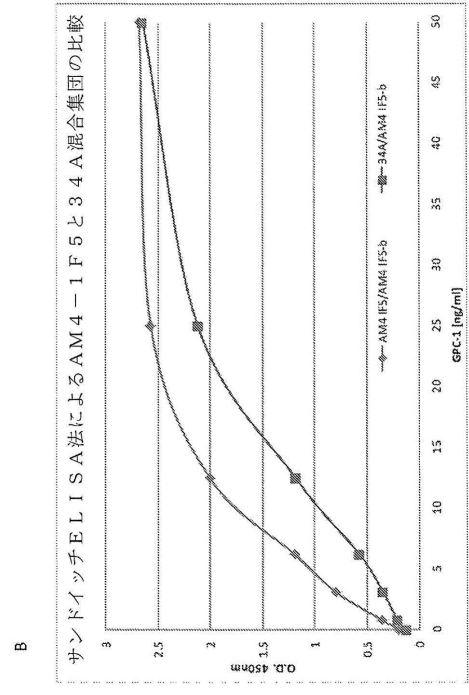
【図 1 2 A】

図12A



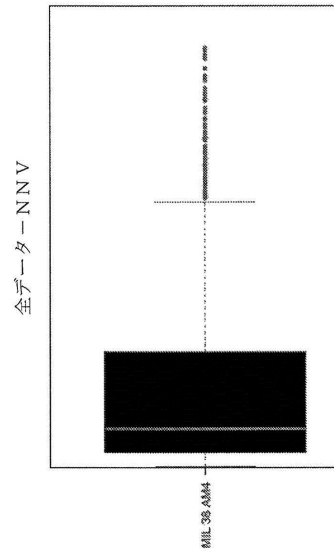
【図 1 2 B】

図12B



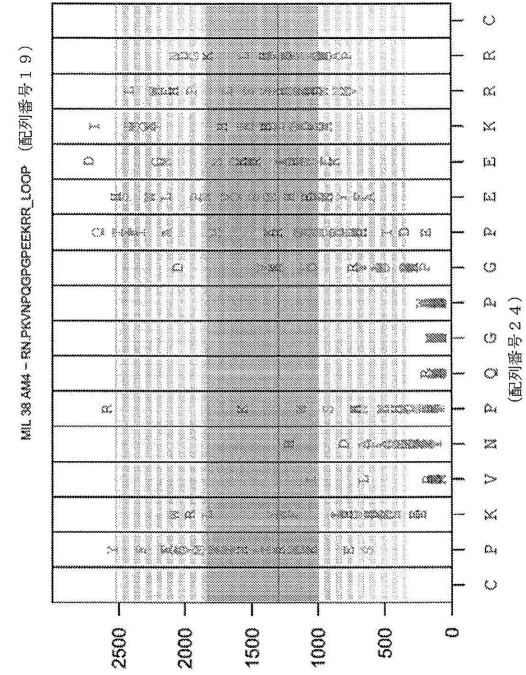
【図 1 3】

図13



【図 1 4】

図14



【配列表】

0006691060000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
- (74)代理人 100173107
弁理士 胡田 尚則
- (72)発明者 ブラッドリー ウォルシュ
オーストラリア国, ニューサウスウェールズ 2074, トウッラムツラ, マスグレイブ ストリート 5
- (72)発明者 ダグラス キャンベル
オーストラリア国, ニューサウスウェールズ 2060, ノース シドニー, キアラ クローズ 1, ユニット 26
- (72)発明者 イレネ ジャスティニアノ フェンマヨール
オーストラリア国, ニューサウスウェールズ 2075, セントアイブズ, モナ ベール ロード 212-216, ユニット 28
- (72)発明者 アライン ノコン
オーストラリア国, ニューサウスウェールズ 2040, ライカート, レウス ストリート 5
- (72)発明者 ジュリー スーン
オーストラリア国, ニューサウスウェールズ 2026, ノース ボンディ, プレア ストリート 58, ユニット 3
- (72)発明者 クアッチ トルオング
オーストラリア国, ニューサウスウェールズ 2040, ライカート, フラッド ストリート 115, ユニット 1
- (72)発明者 サンドラ ビスミューラー
オーストラリア国, ニューサウスウェールズ 2567, カーランズ ヒル, カーランズ ヒルドライブ 56
- (72)発明者 パメラ ラッセル
オーストラリア国, クイーンズランド 4217, サーファーズ パラダイス, エトナ ストリート 15

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2003/0103980 (US, A1)
特表2010-526766 (JP, A)
国際公開第2012/151609 (WO, A1)
Anastasia V. Suhovskih, Lyudmila A. Mostovich, et al., Proteoglycan expression in normal human prostate tissue and prostate cancer, ISRN Oncology, 米国, 2013年, vol. 2013 1-9
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48-33/98
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)