

(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2013-511728

(P2013-511728A)

(43) 公表日 平成25年4月4日 (2013. 4. 4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/574 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/574 A	
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 O 1 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁)

(21) 出願番号 特願2012-540089 (P2012-540089)  
 (86) (22) 出願日 平成22年11月19日 (2010. 11. 19)  
 (85) 翻訳文提出日 平成24年7月18日 (2012. 7. 18)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/057427  
 (87) 国際公開番号 W02011/063232  
 (87) 国際公開日 平成23年5月26日 (2011. 5. 26)  
 (31) 優先権主張番号 61/263, 235  
 (32) 優先日 平成21年11月20日 (2009. 11. 20)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 512131243  
 ユニバーシティ オブ ルイスビル リサ  
 ーチ ファウンデーション, インコーポレイ  
 テッド  
 UNIVERSITY OF LOUIS  
 VILLE RESEARCH FOUN  
 DATION, INC.  
 アメリカ合衆国, 40202 ケンタッキ  
 ー州, ルイスビル, メッドセンター 3,  
 イースト ジェファーソン ストリート  
 201, スイート 215  
 MedCenter 3, 201 E. J  
 efferson Street, Sui  
 te 215, Louisville, K  
 entucky 40202, Unite  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌のバイオマーカー

## (57) 【要約】

限定された抗原 (例えば、特異的な細胞内局在化を伴う抗原) に対する自己抗体の、異なる I g G サブクラスの相対的免疫反応性に基づいて、卵巣癌を診断するおよび段階付ける方法が記載されている。

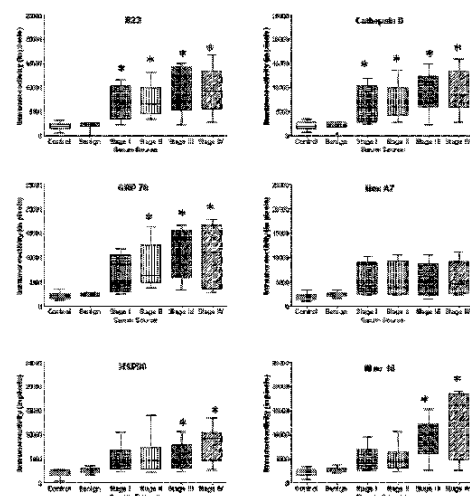


FIG. 8A

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

対象における癌を検出するまたは段階付ける方法であって：

上記対象から抗体を含んでいるサンプルを得ること

上記サンプルと 1 または 2 以上の腫瘍関連抗原とを、抗体 - 抗原複合体の形成に十分な条件下で接触させること；および

上記抗体 - 抗原複合体の形成を検出すること、を含んでおり、

複合体の存在は上記腫瘍関連抗原に対する自己抗体の存在を示し、かつ当該自己抗体の存在が上記対象における癌の存在または段階を示す、方法。

## 【請求項 2】

上記 1 または 2 以上の腫瘍関連抗原はそれぞれ、腫瘍細胞の核または細胞質において発現するものとして分類される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

上記核において発現する腫瘍関連抗原は、ヘテロ核リボヌクレオタンパク質 (HNRNP A2 / B1)、非転移性細胞 1 / 非転移性細胞 2 (NME1 / NME2)、zinc finger DHHC-type containing 7 アイソフォーム 2、サバイピン、p53、p73、ヌクレオホスミン (B23)、滑膜肉腫 X 切断点タンパク質 2 および 4 (SSX2、SSX4)、ならびに HoxA7 からなる群より選択される、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

上記細胞質において発現する腫瘍関連抗原は、ピリドキサルキナーゼ、ガレクチン - 1、熱ショックタンパク質 90、ペルオキシレドキシン、グルコース調節タンパク質 78、およびプロカテプシン D からなる群より選択される、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 5】

上記抗体は、IgG 型抗体である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

ピリドキサルキナーゼ、ガレクチン - 1、熱ショックタンパク質 90、zinc finger DHHC-type containing 7 アイソフォーム 2、サバイピン、p53、p73、ペルオキシレドキシン、ヌクレオホスミン (B23)、滑膜肉腫 X 切断点タンパク質 (SSX2、SSX4)、HoxA7、グルコース調節タンパク質 78、またはプロカテプシン D のうちの 1 もしくは 2 以上と特異的に結合する自己抗体の存在は、上記対象における癌の存在を示す、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

核におけるヘテロ核リボヌクレオタンパク質 (HNRNP A2 / B1) および非転移性細胞 1 / 非転移性細胞 2 (NME1 / NME2) のうちの 1 もしくは 2 以上と特異的に結合する自己抗体の存在、ならびに / またはサイトゾルにおけるピリドキサルキナーゼ、ガレクチン - 1 および熱ショックタンパク質 90 のうちの 1 または両方の存在は、上記対象がステージ I の卵巣癌を有していることを示す、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

核におけるzinc finger DHHC-type containing 7 アイソフォーム 2、サバイピン、p53、もしくはp73のうちの1もしくは2以上と特異的に結合する自己抗体の存在、および / またはサイトゾルにおけるペルオキシレドキシンの存在は、上記対象がステージ I I I または I V の卵巣癌を有していることを示す、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 9】

Muc16、p53、PLAP およびサバイピンのうちの 1 または 2 以上と特異的に結合する自己抗体の存在は、上記対象がステージ I I I または I V の卵巣癌を有していることを示す、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 10】

核におけるヌクレオホスミン (B23)、滑膜肉腫 X 切断点タンパク質 (SSX2、SSX4)、もしくはHoxA7のうちの1もしくは2以上と特異的に結合する自己抗体の存在、ならびに / または小胞体におけるグルコース調節タンパク質 78 の存在、ならびに

10

20

30

40

50

/またはリソソームにおけるプロカテプシンDの存在は、上記対象が癌を有していることを示す、請求項1に記載の方法。

【請求項11】

上記腫瘍関連抗原は、基体と結合している、請求項1に記載の方法。

【請求項12】

固体の上記基体は、固体表面またはビーズである、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

上記腫瘍関連抗原は、癌細胞であると知られている細胞の細胞質から単離されるか、または癌細胞であると知られている細胞の核から単離される、請求項1に記載の方法。

【請求項14】

上記癌は、膵臓癌、肺癌、乳癌、大腸癌、または卵巣癌である、請求項1～6および9～13の何れか1項に記載の方法。

【請求項15】

対象における卵巣癌を段階付ける方法であって：

上記対象からIgG型抗体を含んでいるサンプルを得ること；

上記サンプルと卵巣腫瘍に由来する抗原とを、抗体-抗原複合体の形成に十分な条件下で接触させること；

上記抗原と結合しているIgG型抗体のサブクラスを決定すること；および

上記サブクラスの相対的免疫反応性を決定すること、を含んでおり、

上記サブクラスの相対的免疫反応性は、上記対象が早期卵巣癌を有しているか、上記対象が中期卵巣癌を有しているか、または上記対象が進行卵巣癌を有しているかを示す、方法。

【請求項16】

上記サブクラスは、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4である、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

$IgG2 > IgG3 > IgG1 = IgG4$ である相対的免疫反応性の存在は早期卵巣癌の診断を示し； $IgG2 > IgG3 > IgG1 > IgG4$ の存在は中期卵巣癌の診断を示し、 $IgG2 = IgG3 = IgG4 > IgG1$ の存在は進行卵巣癌の診断を示す、請求項16に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本出願は、その全体の内容が参照によって本明細書に援用される、米国仮出願第61/263,235号（出願日：2009年11月20日）の利益を主張する。

【0002】

〔技術分野〕

本発明は、限定された抗原（defined antigen）（例えば、特異的な細胞内局在化を伴う抗原）に対する自己抗体の、異なるIgGサブクラスの相対的免疫反応性に基づいた、癌（例えば、膵臓癌、肺癌、乳癌、大腸癌、または卵巣癌）のバイオマーカーに関する。

【0003】

〔背景〕

卵巣癌は婦人科系の癌のわずか3分の1を占めるだけであるが、婦人科系の悪性腫瘍による死亡の55%、および女性における全ての癌による死亡の6%を招く（Memarzadeh S, Berek JS., J Reprod Medicine 2001, 46:621-629; Hoskins WJ. J Cell Biochem 1995; 23 (suppl):189-1）。長期の生存はこの30年間で顕著に変化することはなかった。それは、定着した癌のみを検出する不十分な診断手法が大きな原因である。卵巣癌のわずか19%のみが、ステージIにおいて診断される（Hoskins WJ., J Cell Biochem 1995, 23 (suppl):189-199）。一方、女性に関連する他の癌はステージIにおいて初期診断される（子宮体癌の77%、乳癌の55%、および子宮頸癌の83%）。ステージIの卵巣癌は9

10

20

30

40

50

0 % のケースにおいて治癒し得るが、進行した疾患（ステージⅢおよびⅣ）についての5年の生存率は21 % 未満である。そのため、生存期間の顕著な向上の見込みが疾患の早期診断において残されている。近年の診断手法は、種々の不備を示す（Clark-Pearson DL., N Engl J Med 2009, 361:170-177）。第一に、大抵のバイオマーカーは癌特異性を欠いている。第二に、大抵のバイオマーカーは早期疾患に対する陽性的中率を欠いている。第三に、大抵のバイオマーカーは末梢循環において不安定である。さらに、癌の早期検出の概念と、早期癌の特異的検出の概念とは、概して区別されない。症状に先立つ後期癌の同定は、結果に影響を与えないようである；しかしながら、早期における癌の検出は生存期間を大いに向上し得る。

#### 【0004】

血液循環しているCA125の評価は、疾患モニター（治療応答、疾患の再発および進行を明らかにすること）として意図されている（Nossov V, Amneus M, Su F, Lang J, Janco JMT, Reddy ST, Farias-Eisner R., Am J Obstet Gynecol 2008, 199: 215-223）一方、卵巣癌を診断するために用いられてきた（Bast RC, Badgwell D, Lu Z, Marquez R, Rosen D, Liu J, Baggerly KA, Atkinson EN, Skates S, Zhang Z, Lokshins A, Menon U, Jacobs I, Lu K., Int J Gynecol Cancer 2005, 15 (suppl 3): 274-281）。CA125は、ステージⅠの疾患を患っている女性の50 % 未満においてしか上昇しないため、新しい卵巣癌の検出に対して感受的でも特異的でもない。CA125は不十分な特異性を有しており、それは、良性および悪性の乳癌および大腸癌、腹膜刺激、ならびに良性の婦人科系疾患などにおける上昇によって示される（Bast RC, Badgwell D, Lu Z, Marquez R, Rosen D, Liu J, Baggerly KA, Atkinson EN, Skates S, Zhang Z, Lokshins A, Menon U, Jacobs I, Lu K., Int J Gynecol Cancer 2005, 15 (suppl 3): 274-281）。早期卵巣癌におけるCA125の限定的な発現、および非悪性の病変との関連に起因して、CA125はせいぜい57 % の陽性的中率を示す（Nossov V, Amneus M, Su F, Lang J, Janco JMT, Reddy ST, Farias-Eisner R., Am J Obstet Gynecol 2008, 199: 215-223）。

#### 【0005】

疾患の管理において、または最終的にはスクリーニング方法において、CA125を代替または補完し得る潜在的なマーカーを同定するために、多大な試みが展開されてきた（Jacobs IJ, Menon U., Mol Cell Proteomics, 3:355-366, 2004）。表面エンハンス型レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置（SELDI-TOF-MS）は、生物試料中のタンパク質の分析における使用に関して、大きな注目を受けてきた。SELDI-TOF-MSプロファイリングは、卵巣癌、乳癌、前立腺癌、および肝臓癌を、健康な対照から区別するために首尾よく用いられてきた（Zhang H, Kong B, Qu X, Jia L, Deng B, Yang Q., Gynecol Oncol, 102:61-66, 2006）。卵巣癌を患っている患者を、良性卵巣疾患を患っている患者および健康な対照から区別することにおいて、血清のSELDI-TOF-MSプロファイリングは、近年の標準的血清バイオマーカーCA125よりも顕著に優れていた（Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM., Lancet, 359:572-577, 2002）。これらのSELDI-TOF-MSプロファイリングにおける初期研究は前途有望であるが、この手法を慣例の診断試験に移行することは困難なままである。MS技術の欠点は、分光出力の解析におけるのと同様に、MSにおいて、重要ないくつかのタンパク質がより豊富なタンパク質によって隠され得ることである。近年のMS手法における最大の試みは、感度よりもむしろ動作範囲（dynamic range）である。優勢な（prevalent）タンパク質またはペプチドの排除は、特定のサンプルから得られる情報内容を非常に増大させ得るが、アルブミンなどの優勢なタンパク質は診断的意義のあるタンパク質のサブセットのキャリアとして機能し得る（Petricoin EF, Belluco C, Araujo RP, Liotta LA., Nature Rev Cancer 2006, 6:961-967）。

#### 【0006】

近年の診断方法における特異性の欠如を複雑にしているものは、末梢循環内における大抵のバイオマーカーの乏しい安定性である。抗原に基づいた分析（CA125のELISA、さらにはSELDI-TOF-MSなど）に関して、一度、標的抗原が腫瘍から放出

10

20

30

40

50

されると、それらは免疫学的な抗原処理能力を飽和させ、血管内侵入し、血液循環において検出可能な定常状態濃度に達しなければならない。その結果、血液循環しているバイオマーカーの濃度は、多様な変数（血液における、マーカーの血管内侵入、クリアランス速度およびタンパク質の半減期など）による影響を受ける。全てのバイオマーカーの安定性が調査されてきたわけではないが、循環している p 5 3 の研究は半減期が数時間であることを示し（Angelopoulou K, Yu H, Bharaj B, Giaï M, Diamandis EP., Clin Biochem 2000, 33: 53-62）、循環している S 1 0 0 B タンパク質（黒色腫における）の半減期はわずか 3 0 分であると見積もられている（Harpio R, Einarsson R., Clin Biochem 2004, 37: 512-518）。前立腺癌において、全 P S A および遊離 P S A は、それぞれ 4 . 2 7 時間および 2 . 1 4 時間の半減期を伴う急速な指数関数的分解相（rapid exponential degradation phase）を示す（Gregorakis AK, Stefanakis S, Malovrouvas D, Petraki K, Gourgiotis D, Scorilas A., Prostate 2008, 68:759-765）。胸部腫瘍を患っている患者において、C E A、S C C、T P A および C Y F R A の平均半減期は、それぞれ、3 6 時間、2 . 2 時間、2 . 5 時間および 1 . 5 時間であった（Yoshimasu T, Maebeys S, Suzuma T, Bessho T, Tanino H, Arimoto J, Sakurai T, Naito Y., Int J Biol Markers 1999, 14:99-105）。短い半減期に加え、卵巣癌のためのいくつかの血清バイオマーカーも、交絡因子（心理的ストレス、採血（blood draw）時間、およびサンプル操作における非管理の相違が挙げられる）に非常に敏感であることが実証されてきた（Thorpe JD, Duan X, Forrest R., PLoS ONE 2007, 2: e1281）。バイオマーカーの検出限界と実際の腫瘍量とを関連付ける数学的モデルに基づくと、陽性の試験結果を導く、算出された最小の腫瘍サイズは、C A 1 2 5 および卵巣癌を用いて 1 1 6 . 7 mm<sup>3</sup> であった（Lutz AM, Willmann JK, Cochran FV, Ray P, Gambhir SS., PLoS Medicine 2008, 5:1287-1297）。このモデルは、全ての腫瘍細胞によって均一に抗原産生され、分泌されたバイオマーカーの 1 0 %（インビトロ研究に基づく）が血液循環に到達し、かつ C A 1 2 5 は血液から浄化されないかまたは分解されないと想定したため、この算出された最小サイズは実際より非常に小さく見積もられ得る。

#### 【 0 0 0 7 】

それに対して、抗体は長い半減期を有し、簡単に測定され、かつ末梢循環において安定的であるため、抗体応答は臨床的なバイオマーカーになる見込みがある。癌関連タンパク質の異常発現は、自己抗体の誘発を招き得る（Draghici S, Chatterjee M, Tainsky MA., Expert Rev Mol Diagn 2005, 5: 735-743; Gagnon A, Kim JH, Schorge JO, Ye B, Liu B, Hasselblatt K, Welch WR, Bandera CA, Mok SC., Clin Cancer Res 2008, 14: 764-771; Gercel-Taylor C, Bazzett LB, Taylor DD., Gynecol Oncol 2001, 81:71-76）。実験動物モデルにおいて、最初の腫瘍発達の直後であって、かつ、触診可能な腫瘍または血液循環している腫瘍抗原に十分に先立って、血液循環している腫瘍反応性 I g G が実証され得る（Taylor DD, Gercel-Taylor C., Oncol Rep 1998 Nov-Dec, 5(6):1519-24; Nesterova M, Johnson N, Cheadle C, Cho-Chung YS., Biochim Biophys Acta 2006, 1762: 398-403）。結腸癌において、結腸ポリープを患っている患者と様々な段階および程度の結腸癌を患っている患者とを比較した場合、p 5 3 に対する自己抗体は、多段階の結腸癌発生における腫瘍進行に伴って生じるようである（Tang R, Ko MC, Wang JY, Changchien C R, Chen HH, Chen JS, Hsu KC, Chiang JM, Hsieh LL., Int J Cancer 2001, 94:859-863）。腫瘍反応性抗体は、血液循環している検出可能な腫瘍抗原よりも前に生成されるだけでなく、抗体は他の血清バイオマーカーと比べて、安定的であり、かつ交絡因子に影響されにくい（Nesterova M, Johnson N, Cheadle C, Cho-Chung YS., Biochim Biophys Acta 2006, 1762: 398-403）。

#### 【 0 0 0 8 】

##### 〔 要約 〕

本明細書に記載されるように、4つの I g G サブクラスについての反応性のパターンは、卵巣癌において異なっている。さらに、異なる細胞区画（膜、核またはサイトゾル）に由来する抗原成分も同様に異なっている。早期および後期の癌（例えば、卵巣癌）の認識

10

20

30

40

50

パターンを明らかにするために、共通する認識または段階に関連する認識を示す種々の腫瘍由来抗原を、MSによって同定した。

#### 【0009】

したがって、本明細書で提供されるものは、対象における癌（例えば、膵臓癌、肺癌、乳癌、大腸癌、または卵巣癌）を検出するまたは段階付ける（例えば、検出または段階付けにおける助けのために）方法（例えば、インビトロにおける方法）である。当該方法は、対象から抗体（例えば、IgG型抗体）を含んでいるサンプルを得ること；当該サンプルと1または2以上の腫瘍関連抗原とを、抗体-抗原複合体の形成に十分な条件下で接触させること；および当該抗体-抗原複合体の形成を検出することを含んでおり、複合体の存在は腫瘍関連抗原に対する自己抗体の存在を示し、かつ当該自己抗体の存在は当該対象における癌（例えば、膵臓癌、肺癌、乳癌、大腸癌、または卵巣癌）の存在または段階を示すものである。いくつかの実施形態において、当該癌は卵巣癌である。

10

#### 【0010】

いくつかの実施形態において、上記1または2以上の腫瘍関連抗原はそれぞれ、腫瘍細胞（例えば、膵臓、肺、乳房、大腸、または卵巣腫瘍細胞）の核または細胞質において発現するものとして分類される。いくつかの実施形態において、上記核において発現する腫瘍関連抗原は、ヘテロ核リボヌクレオタンパク質（HNRP A2/B1）、非転移性細胞1/非転移性細胞2（NME1/NME2）、zinc finger DHHC-type containing 7 アイソフォーム2、サバイピン、p53、p73、ヌクレオホスミン（B23）、滑膜肉腫X共通抗原または切断点タンパク質2および4（SSX2、SSX4）、ならびにホメオボックスA7（HoxA7）からなる群より選択される。いくつかの実施形態において、上記細胞質において発現する腫瘍関連抗原は、ピリドキサルキナーゼ、ガレクチン-1、熱ショックタンパク質90、ペルオキシレドキシン、グルコース調節タンパク質78、およびプロカテプシンDからなる群より選択される。

20

#### 【0011】

いくつかの実施形態において、ピリドキサルキナーゼ、ガレクチン-1、熱ショックタンパク質90、zinc finger DHHC-type containing 7 アイソフォーム2、サバイピン、p53、p73、グルコース調節タンパク質78（GRP78）ペルオキシレドキシン、ヌクレオホスミン（B23）、滑膜肉腫X切断点タンパク質（SSX2、SSX4）、HoxA7、ムチン16、細胞表面関連（cell surface associated）（Muc16）、NY-ESO-1（癌/精巣抗原1Bとしても知られている）、胎盤型アルカリホスファターゼ（PLAP）、SSX共通抗原、腫瘍関連糖タンパク質72（TAG-72）、グルコース調節タンパク質78（GRP78）、またはカテプシンDもしくはプロカテプシンDのうちの1もしくは2以上と特異的に結合する自己抗体の存在は、上記対象における癌（例えば、膵臓癌、肺癌、乳癌、大腸癌、または卵巣癌）の存在を示す。いくつかの実施形態において、PLAPと特異的に結合する自己抗体の存在は、上記対象における卵巣癌の存在を示す。いくつかの実施形態において、Muc16、p53、PLAPおよびサバイピンのうちの1または2以上と特異的に結合する自己抗体の存在は、上記対象がステージIIIまたはIVの卵巣癌を有していることを示す。いくつかの実施形態において、サバイピンに対する自己抗体の存在は、上記対象における肺癌または大腸癌の存在を示す。

30

40

#### 【0012】

いくつかの実施形態において、核におけるヘテロ核リボヌクレオタンパク質（HNRP A2/B1）および非転移性細胞1/非転移性細胞2（NME1/NME2）のうちの1もしくは2以上と特異的に結合する自己抗体の存在、ならびに/またはサイトゾルにおけるピリドキサルキナーゼ、ガレクチン-1および熱ショックタンパク質90のうちの1または両方の存在は、上記対象がステージIの卵巣癌を有していることを示す。

#### 【0013】

いくつかの実施形態において、核におけるzinc finger DHHC-type containing 7 アイソフォーム2、サバイピン、p53、もしくはp73のうちの1もしくは2以上と特異的

50

に結合する自己抗体の存在、および／またはサイトゾルにおけるペルオキシレドキシンの存在は、上記対象がステージⅠⅠⅠの卵巢癌を有していることを示す。

【0014】

いくつかの実施形態において、核におけるヌクレオホスミン（B23）、滑膜肉腫X切断点タンパク質（SSX2、SSX4）、もしくはHoxA7のうちの1もしくは2以上と特異的に結合する自己抗体の存在、ならびに／または小胞体におけるグルコース調節タンパク質78の存在、ならびに／またはリソソームにおけるプロカテプシンDの存在は、上記対象が癌（例えば、卵巢癌）を有していることを示す。

【0015】

いくつかの実施形態において、上記腫瘍関連抗原は、基体（例えば、固体表面またはビーズ）と結合している。

10

【0016】

いくつかの実施形態において、上記腫瘍関連抗原は、癌細胞であると知られている細胞（例えば、卵巢癌細胞）の細胞質から単離されるか、または癌細胞であると知られている細胞の核から単離される。

【0017】

いくつかの実施形態において、上記方法は、上記自己抗体の存在に関する情報を、医療供給者または上記対象へ伝えることをさらに含む。いくつかの実施形態において、上記方法は、上記対象に対する上記癌のための治療（当該技術分野において公知であるような）を施すことをさらに含む。

20

【0018】

別の局面において、本発明は、対象における卵巢癌を段階付ける（例えば、段階付けにおける助けのために）方法（例えば、インビトロにおける方法）を提供する。当該方法は、患者からIgG型抗体を含んでいるサンプルを得ること；当該サンプルと卵巢腫瘍に由来する抗原とを、抗体-抗原複合体の形成に十分な条件下で接触させること；当該抗原と結合しているIgG抗体のサブクラスを決定すること；および上記サブクラスの相対的免疫反応性を決定することを含んでおり、当該サブクラスの相対的免疫反応性は、当該対象が早期卵巢癌、中期卵巢癌、または進行卵巢癌を有しているか否かを示す。

【0019】

いくつかの実施形態において、上記サブクラスは、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4である。いくつかの実施形態において、 $IgG2 > IgG3 > IgG1 = IgG4$ である相対的免疫反応性の存在は早期卵巢癌の診断を示し； $IgG2 > IgG3 > IgG1 > IgG4$ の存在は中期卵巢癌の診断を示し、 $IgG2^3 IgG3 = IgG4 > IgG1$ の存在は進行卵巢癌を示す。

30

【0020】

本明細書に記載されている方法のいくつかの実施形態において、上記対象はヒト（例えば、卵巢癌を有していることがわかっているヒトまたは卵巢癌を有している疑いがあるヒト）である。

【0021】

いくつかの実施形態において、上記サンプルは、上記対象からの血清を含んでいる。

40

【0022】

別段の定めがない限り、本明細書において使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野における当業者によって一般的に理解される場合と同じ意味を有している。方法および材料が、本発明の利用のために、本明細書において記載されている；当該技術分野において公知の他の適当な方法および材料が同様に用いられ得る。材料、方法、および実施例は例証的なだけであり、限定される意図ではない。全ての公開、特許出願、特許、配列、データベース登録、および本明細書において言及されている他の参照は、その全体が参照によって援用される。矛盾する場合において、本明細書（定義を含む）が優先され得る。本発明の他の特徴および利点が、以下の詳細な説明および図面、ならびに特許請求の範囲から明白になるであろう。

50

## 【 0 0 2 3 】

## 〔 図面の説明 〕

図 1 の A ~ B は、卵巢腫瘍細胞の特定の細胞区画から単離されたタンパク質に対する、患者の免疫反応性の代表的なウエスタン免疫ブロットである：サイトゾル（C と称する）、膜（M と称する）および核（N と称する）。タンパク質の認識は 1 : 1 0 0 に希釈した患者の血清を用いた。代表的な血清は（1 A）正常な、同年齢の女性の対照、および（1 B）良性卵巢腫瘍（漿液性腺腫）を患っている患者から得た。

## 【 0 0 2 4 】

図 2 の A ~ C は、卵巢腫瘍細胞の特定の細胞区画から単離されたタンパク質に対する、患者の免疫反応性の代表的なウエスタン免疫ブロットを示している：サイトゾル（C と称する）、膜（M と称する）および核（N と称する）。タンパク質の認識は 1 : 1 0 0 に希釈した患者の血清を用いた。代表的な血清は（2 A）ステージ I の卵巢癌を患っている患者、（2 B）ステージ II の卵巢癌を患っている患者、および（2 C）ステージ III の卵巢癌を患っている患者から得た。各ステージについての Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3、および Ig G 4 を表す代表的な免疫ブロットは、同一の患者の血清を利用したものである。

## 【 0 0 2 5 】

図 3 は、特定の細胞区画（サイトゾル（C）、膜（M）および核（N））に由来する抗原に対する、正常な対照（n = 2 0）、良性疾患を患っている女性（n = 1 5）および様々なステージの卵巢癌を患っている患者（ステージ I, n = 1 5；ステージ II, n = 1 5；ステージ III, n = 1 5）に由来する血清の免疫反応性を表しているウエスタン免疫ブロットの定量化の結果を示す棒グラフである。棒は各群の患者についての全免疫反応性の平均を表す。黒棒は 4 0 k D より大きい抗原に対する平均の反応性を表し、白棒は 4 0 k D より小さい抗原に対する平均の反応性を表す。

## 【 0 0 2 6 】

図 4 の A ~ C は、ステージ I およびステージ III の卵巢癌患者によって認識されたタンパク質の 2 - D I G E の結果を示している。ステージ I の癌患者由来の Ig G を用いたアフィニティカラムを用いて免疫精製された細胞タンパク質を Cy 2（4 A）と称し、ステージ III の癌患者由来の Ig G を用いたアフィニティカラムを用いて免疫精製された細胞タンパク質を Cy 3（4 B）と称した。Typhoon イメージスキャナを用いてゲルをスキャンした。各スキャンは CyDye シグナルのうちの 1 つを呈した。単独の画像および重ね合わせの画像（4 C）を含む画像表示データを生成するために、ImageQuant ソフトウェアを用いた。重ね合わせの画像において、ステージ I の疾患と関連する抗原の例を中間の灰色（オリジナルにおいて緑色）で囲み、ステージ III と関連する成分の例を濃い灰色（オリジナルにおいて赤色）で囲み、共通する成分の例を薄い灰色（オリジナルにおいて黄色）で囲んだ。

## 【 0 0 2 7 】

図 5 は、模範的な卵巢癌の臨床的診断ツリーであり、バイオマーカーとしての腫瘍反応性 Ig G の利用に関してカギとなる箇所を示している。

## 【 0 0 2 8 】

図 6 は、卵巢癌を患っている患者によって認識された腫瘍由来抗原の 2 - D I G E イメージの画像である。スポット 1、1 7 ~ 2 1、2 8 ~ 3 2、および A ~ C（オリジナルにおいて緑色）は、ステージ I 疾患の卵巢癌患者に由来する Ig G によって認識された抗原タンパク質である。スポット 2 ~ 1 6 および 2 2 ~ 2 7（オリジナルにおいて赤色）は、ステージ III 疾患の卵巢癌患者に由来する Ig G によって認識された抗原タンパク質である。最も明るいスポット（画像の上部、中央の真左；オリジナルにおいて黄色）は、両方によって認識された抗原である。

## 【 0 0 2 9 】

図 7 は、ステージ I 疾患またはステージ III 疾患の卵巢癌患者に由来する血清を用いた免疫反応性スポットの代表的な比較を示している。上側のパネルは示された特定のスポ

10

20

30

40

50



ットについての 2 - D ゲルの結果を表す。下側のパネルはそれらスポットの定量化を表す。

#### 【 0 0 3 0 】

図 8 の A ~ B は、正常な対照 (  $n = 40$  )、良性疾患を患っている女性 (  $n = 40$  ) および様々なステージの卵巣癌を患っている患者 ( ステージ I ,  $n = 35$  ; ステージ II ,  $n = 25$  ; ステージ III ,  $n = 40$  ; ステージ IV ,  $n = 25$  ) に由来する血清の、ヌクレオホスミン、カテプシン D、グルコース調節タンパク質 78 ( GRP78 )、ホメオボックス A7 ( HoxA7 )、熱ショックタンパク質 90 kDa ( HSP90 )、ムチン 16、細胞表面関連 ( Muc16 )、NY - ESO - 1 ( 癌 / 精巣抗原 1B としても知られている )、p53、アルカリホスファターゼ、胎盤性 1 ( PLAP )、SSX 共通抗原、サバイピン、および腫瘍関連糖タンパク質 72 ( TAG-72 ) に対する免疫反応性を表すドット免疫スポットの定量化の結果を示す各 6 つの箱ひげ図である。\* は対照または良性の何れかより有意に差がある (  $p < 0.05$  ) ことを示す。

10

#### 【 0 0 3 1 】

図 9 は、正常な対照、ならびに膵臓癌 (  $n = 15$  )、肺癌 (  $n = 15$  )、乳癌 (  $n = 15$  )、大腸癌 (  $n = 15$  )、および卵巣癌 (  $n = 40$  ) を患っている女性に由来する血清の免疫反応性を表すドット免疫スポットの定量化の結果を示す 6 つの箱ひげ図のセットである。\* は対照より有意に差がある (  $p < 0.05$  ) ことを示す。

#### 【 0 0 3 2 】

〔 詳細な説明 〕

20

本明細書において記載されているように、卵巣癌患者由来の血清は、対照または良性疾患を患っている女性と比べて、顕著に大きい免疫反応性を示した。後期の患者はより強い強度において、より多いタンパク質を認識したが、段階特異的な異なる認識パターンが IgG サブクラスにおいてみられた ( 最大の認識が IgG 2 サブクラスにおいてみられた )。ステージ I および II の患者由来の IgG 2 および IgG 3 における免疫反応性は、 $> 40$  kD の核の抗原について最も強いようであるが、一方、ステージ III の患者において、さらなる免疫反応性が  $< 40$  kD の成分において存在した。また、ステージ III の患者は、 $< 40$  kD の膜の抗原との類似の反応を示した。段階に関連する 32 個の抗原の相違 ( 早期卵巣癌における 11 個および後期卵巣癌における 21 個 ) を 2D 電気泳動が明らかにした。このように、体液性応答のタイミングおよび安定性によって、特定の腫瘍抗原を認識する IgG サブクラスの定量化が、早期の癌の同定に対して優れたバイオマーカーを提供し、良性卵巣腫瘍と、悪性卵巣腫瘍ならびに早期癌および後期癌とを区別することができる。

30

#### 【 0 0 3 3 】

免疫監視の概念は、免疫細胞が突然変異に関して宿主細胞をスキャンし、検出された場合には、変異細胞は根絶されることを提案する。重要な文献は、免疫抑制状態に関連する癌に言及しているが、癌の発達に関連する、Th1 から Th2 へのシフトが存在することはより確実であり得る。Th2 細胞は T 細胞受容体によって、抗原に対する極度の感受性を有している。そのため、Th2 細胞の活性化は、免疫抑制の抗原特異的メカニズムである。一般に、腫瘍成分を認識する Th2 主導の抗体応答は、非防御的であり、Th1 細胞介在免疫応答を示すことによって腫瘍進行に寄与し得る ( Clerici M, Clerici E, Shearer GM, J Natl Cancer Inst 1996, 88(7):461-2 )。移植可能な腫瘍によって生成される「強力な」Th1 免疫応答と比較して、自然発生腫瘍は量的に軽い Th2 免疫応答を誘発する。このように、自然発生腫瘍は適切な免疫応答を刺激しないものであり得るが、腫瘍を根絶するために十分ではない非防御的な体液性免疫応答をむしろ誘発する。特に、「弱い」免疫応答は腫瘍の免疫的認識が起こる状態であるが、根絶は達成されない。

40

#### 【 0 0 3 4 】

卵巣癌における非防御的な体液性応答の誘発は、腫瘍を根絶することができないが、これら腫瘍反応性免疫グロブリンの出現 ( この Th2 シフトに関連する ) は、癌の特性であるようであり、それゆえ卵巣癌の発達に関連する事象のバイオマーカーとしての有用性を

50

有し得る。血液循環における特定のタンパク質の出現は癌を示すものであり得るが、それらと、癌ではない病状とのさらなる関連は、それらの特異性を減少させ、癌のスクリーニングにおけるそれらの使用を妨げる。腫瘍由来抗原の広範なアレイを用いて、評価された全ての癌患者において、特異的な免疫反応性が検出されている (Taylor DD, Homesley HD, Doellgast GJ., *Am J Reprod Immunol* 1984, 6:179-184; Marx D, Frey M, Zentgraf H, Adelssen G, Schauer A, Kuhn W, Meden H., *Cancer Detect & Prevent* 2001, 25:117-22); しかしながら、癌を有していないボランティアからの抗体によるこれらタンパク質の認識は、稀な (< 1%) 事象である (Pfreundschuh M., *Cancer Chemother Pharmacol* 2000, 46 (suppl):S3-S7)。このように、腫瘍由来タンパク質に対する体液性応答の誘発は、癌特異性を向上させるようである。我々のアッセイ系において、癌を有していない対照または良性卵巢疾患を患っている女性において、わずかなレベルの腫瘍反応性抗体が検出されただけである (図 1)。我々の以前の発表において、我々は、正常な卵巢から単離した抗原に対する患者由来の免疫グロブリンの反応性を述べた (Gercel-Taylor C, Bazzett LB, Taylor DD., *Gynecol Oncol* 2001, 81:71-76; Taylor DD, Gercel-Taylor C., *Oncol Rep* 1998 Nov-Dec, 5(6):1519-24; Taylor DD, Homesley HD, Doellgast GJ., *Am J Reprod Immunol* 1984, 6:179-184; Taylor DD, Gercel-Taylor C, Parker LP., *Gynecol Oncol* 2009, 115:112-120)。これらの研究は、正常な卵巢の抗原集団の範囲内における 1 から 2 本のバンドの認識を実証した。正常な対照においてみられるバックグラウンドの反応性が、抗体の Fc または Fab 部分を介する結合を表しているか否かを明らかにすることは、解析の設計に起因して不可能である。それとは関係なく、ほんのわずかな (2 ~ 4 つ) 成分が膜および核の抗原において弱く認識され、IgG サブクラス間において有意な差はみられなかった (図 1 の A および図 3)。さらなる膜および核の抗原が、良性卵巢疾患を患っている患者由来の IgG によって、IgG 3 サブクラスのうちで顕著に大きい反応性を伴って、弱く認識された (図 1 の B および図 3)。

10

20

30

40

50

#### 【0035】

我々のオリジナルの報告書において、卵巢癌患者における腫瘍反応性免疫グロブリンの存在を実証し、癌抗原の自己血清学的分類の基礎を確立したところ (Taylor DD, Doellgast GJ., *Analytical Biochem* 1979, 98:53-59)、優勢な抗体が IgG クラスに属することがわかった。IgG は体液性免疫応答の主要なエフェクター分子であり、血液循環中の全免疫グロブリンの約 75% を占め、二次抗体応答の間にそれらの反応性を発現する。ヒト IgG 区分は、4 つの異なるサブクラス (IgG 1、IgG 2、IgG 3 および IgG 4 と称される) からなり、それらの平均血清濃度は、IgG 1 が 6.89 mg/ml であり、IgG 2 が 3.80 mg/ml であり、IgG 3 が 0.51 mg/ml であり、IgG 4 が 0.56 mg/ml である。IgG の主な生物学的活性は、それらのエフェクター機能に関連しており、例えば、補体の活性化、および抗体依存性の細胞障害活性を介するために Fc 受容体に結合することが挙げられる。それらの重鎖は > 95% の配列相同性を示すが、IgG サブクラスは特有のエフェクター活性プロファイルを発現する (Ravetch JV, Bolland S. *IgG Fc receptors. Annual Rev Immunol* 2001; 19:275-290)。一般的に、タンパク質抗原は、IgG 1 および IgG 3 の応答を特徴的に誘発し、これらアイソタイプは全ての Fc 受容体および補体の C1 成分を活性化することが可能である。IgG 4 サブクラスの誘発は、慢性抗原刺激に特有であるようである (自己免疫疾患においてみられるなど); IgG 4 は限定的な Fc 受容体の活性化を示し、C1q を活性化しない。IgG 2 サブクラスはしばしば、炭水化物の抗原に対する応答において優勢であり、同様に、限定的な Fc 受容体および C1q の活性化を示す (Ravetch JV, Bolland S. *IgG Fc receptors. Annual Rev Immunol* 2001; 19:275-290)。例えば、急性リンパ球性白血病 (ALL) において、9-O-アセチル化シアル酸 (AcSA) 特異的 IgG 2 のレベルの上昇が誘発されたが、それは Fc 受容体、補体カスケードおよび細胞媒介性細胞障害の活性化を誘発できなかった (そのグリコトープ結合能力は影響を受けていなかったにもかかわらず) (Bandyopadhyay S, Bhattacharyya A, Mallick A, Sen AK, Tripathi G, Das T, Sa G, Bhattacharya DK, Mandal C., *Intl Immunol* 2005, 17:177-191)。抗 9-OA

c S A の、I g G 2 へのサブクラスの切り替えは、腫瘍細胞のグリコシル化プロファイルにおける変化に関連していた。毎日の低用量の I L - 2 に対して応答している、非血液性の腫瘍を患っている患者において、平均 I g G 2 レベルにおける顕著な増加がみられた；しかしながら、I g G 1、I g G 3、または I g G 4 レベルにおいて、顕著な変化はみられなかった (Soiffer RJ, Murray C, Ritz J, Phillips N, Jacobsohn D, Chartier S, Ambrosino DM., Blood 1995, 85:925-928)。

#### 【 0 0 3 6 】

我々の研究において、評価した全ての卵巢癌患者が、I g G 2 サブクラスにおいて、腫瘍由来抗原との最大の反応性を示している (図 2 および図 3)。ステージ I および I I 疾患の患者において、この I g G 2 応答が、40 k D より大きい核の抗原において最初に誘発された。ステージ I 疾患において、これら核の抗原は、I g G 1 および I g G 4 によって弱く認識されただけであった。我々の以前の研究は、他の研究と同様に、卵巢癌患者の「免疫抑制」状態が二相性であることを示した；早期癌において、抑制は抗原特異的であるようであり、一方、後期の疾患において、それは非特異的である (Taylor DD, Homesley HD, Doellgast GJ., Cancer Res 1980;40: 4064-4069)。我々の最近の結果はこの見解を支持した。ステージ I I I 疾患の患者が全ての I g G サブクラスにおいて、広範囲の、類似する認識パターンを示す (それでも I g G 2 が顕著に高いレベルの腫瘍反応性を示すが) からである。

#### 【 0 0 3 7 】

血清学的に定義されたバイオマーカーの解析は、一般に、患者の両極端 (進行癌と完全に正常なボランティア) に焦点が当てられてきた。多くのバイオマーカーは、これら両極端に基づいて、スクリーニングおよび診断における利用のために必要な特異性および感受性を示す。しかしながら、良性疾患、前癌性疾患、早期癌および炎症性病状が含まれる場合、大抵のバイオマーカーは、臨床的利用に十分な感受性および特異性を達成できない。Jacobs および Menon は、効果的なスクリーニングテストであるためには、アッセイは最低でも 99.6% の特異性を達成する必要があると算出した (Jacobs IJ, Menon U., Mol Cell Proteomics, 3:355-366, 2004)。近年、分析物として血清抗体を用いた包括的なエピトープ / 抗原プロファイリングが、診断マーカー (特に、リスクの高い集団における) として大規模に調べられた (Chatterjee M, Wojciechowski J, Tainsky MA., Mol Biol 2009, 520:21-38; Chatterjee M, Mohapatra S, Ionan A, Bawa G, Ali-Fehmi R, Wang X, Nowak J, Ye B, Nahhas FA, Lu K, Witkin SS, Fishman D, Munkarah A, Morris R, Levin NK, Shirley NN, Tromp G, Abrams J, Draghici S, Tainsky MA., Cancer Res 2006, 66:1181-1190)。ファージディスプレイシステムを用いた組み換え抗原の、ハイスループットのセレクションと、アレイに基づいた血清学的検出との、この組み合わせは、機能の観点を除いて無作為な方法において、エピトープまたは腫瘍抗原の大きなパネルを定義した (Chatterjee M, Wojciechowski J, Tainsky MA., Mol Biol 2009, 520:21-38)。Chatterjee ら (Chatterjee M, Mohapatra S, Ionan A, Bawa G, Ali-Fehmi R, Wang X, Nowak J, Ye B, Nahhas FA, Lu K, Witkin SS, Fishman D, Munkarah A, Morris R, Levin NK, Shirley NN, Tromp G, Abrams J, Draghici S, Tainsky MA., Cancer Res 2006, 66:1181-1190) は、65 個の異なる抗原を同定し、32 人の卵巢癌患者からの血清において反応性があること、ならびに健康な女性の対照、および良性疾患または他の悪性の婦人科系疾患の何れかを患っている 14 人の患者からの血清において反応性がないことを実証した。この技術のハイスループット能力にもかかわらず、種々の限定 (バクテリアまたはファージ成分との高い交差反応性、元の腫瘍の中に存在する正常組織 (リンパ系細胞が挙げられる) 由来の c D N A の共発現、および癌に関連する翻訳後修飾およびプロセシングの非存在が挙げられる) を有しているが、それはこれら「人工の」タンパク質の標的の免疫反応性の喪失を招き得る (Nishikawa H, Tanida K, Ikeda H, Sakakura M, Miyahara Y, Aota T, Mukai K, Watanabe M, Kuribayashi K, Old LJ, Shiku H., Proc Natl Acad Sci U S A 2001, 98:14571-14576)。それら 65 個の抗原のアレイを用いて、Chatterjee ら (Chatterjee M, Mohapatra S, Ionan A, Bawa G, Ali-Fehmi R, Wang X, Nowak J, Ye B, Nah

10

20

30

40

50

has FA, Lu K, Witkin SS, Fishman D, Munkarah A, Morris R, Levin NK, Shirley NN, Tromp G, Abrams J, Draghici S, Tainsky MA., Cancer Res 2006, 66:1181-1190) は、感受性および特異性がそれぞれ、わずか 55% および 98% であることを見出した。

#### 【0038】

近年の多くのバイオマーカー研究の決まった目的は、癌（段階に関係ない）の早期検出であった (Singh AP, Senapati S, Ponnusamy MP, Jain M, Lele SM, Davis JS, Remmeng a S, Batra SK., Lancet Oncol 2008, 9: 1076-1085)。卵巢癌のための「新しい」バイオマーカーの多くは、癌特異性を欠いているか、または進行疾患に関連しているかの何れかである (Kim K, Visintin I, Alvero AB, Mor G., Clin Lab Med 2009, 29:47-55)。癌の生存を向上させるカギは、早期癌の検出である。なぜなら、癌がステージ I において診断されれば、5 年の生存率が 93% まで顕著に向上するからである。不幸なことに、卵巢癌のケースの 19% のみが、このステージで診断される。外科手術および化学療法における進歩にもかかわらず、進行卵巢癌を患っている患者の大多数が、最前線の治療を終えた後、12 ~ 18 ヶ月の間に再発し得る。再発のリスクは種々の因子（例えば、診断時の段階が挙げられ、ステージ IV の患者の約 90 ~ 95% が再発する）に基づいて変化する。さらに、次善に (suboptimally) 減量術を施されたステージ III の患者の 80 ~ 85% が再発し得、同様に、最適に減量術を施されたステージ III の患者の 70 ~ 80% が再発し得、ステージ II の患者の 30% が再発し得る。それに対して、ステージ I の患者の 10% 未満が再発し得る。再発性卵巢癌は相変わらず致命的であり、再発性疾患の治療は一時的に軽くするものであり、一般に、疾患関連症状をコントロールすること、治療関連毒性を制限すること、生活の質を維持すること、および生存期間を延ばすことを目的として開始される (Herzog TJ., Clin Cancer Res 2004, 10:7439-7449)。それゆえ、臨床的有用性を有するために、バイオマーカーは 99.6% より高い特異性を伴って早期疾患を同定可能であることが不可欠である。卵巢癌の全てのステージについての、核および膜の抗原に対する IgG2 および IgG3 の免疫反応性は、対照および良性疾患を患っている患者にみられるものよりも大きかった (図 2 および図 3)。進行癌の患者においてみられる、より大きい反応性に加えて、認識された細胞性抗原の評価は、両方に共通する抗原および段階特異的な抗原を同定した (図 4 および表 1)。このように、患者由来の IgG2 による段階特異的タンパク質の認識は、卵巢癌の存在および段階の両方を明確にし得る。IgG2 サブクラスの範囲におけるエフェクター機能の非存在は、進行癌に関連する免疫抑制環境に対する重要な要因であり得る。IgG2 は特定の抗原の細胞認識を妨害し得、同様に、目標を定められる (targetable) 抗原を、細胞表面から除去し得る。婦人科系腫瘍専門医にとってカギとなる別の論点は、超音波診断によって同定された良性卵巢腫瘍と悪性卵巢腫瘍とを区別することである。図 1 および図 2 に示されるように、腫瘍由来の核の抗原に対する IgG2 の反応性の存在は、良性腺腫とステージ I の卵巢癌とを区別し得る。

#### 【0039】

これらの発見は、本明細書に記載されている診断方法の一実施形態を強調するが、それは二段階のアッセイからなり得る。以前に実証されたように、患者の体液性応答によって定義される抗原性タンパク質の多くは、癌の存在を明らかにするようであり、良性卵巢疾患由来のものと正常なものとを区別し得る (Taylor DD, Gercel-Taylor C, Parker LP., Gynecol Oncol 2009, 115:112-120) が、それはスクリーニングアッセイまたは卵巢腫瘍の性質を区別するためのアッセイの一段階目を構成し得る。二段階目として、サイトゾル、核および膜区画に由来する特定の抗原タンパク質が、段階特異性を示す (図 4 および表 1 参照)。認識が比較された最初の 12 個の抗原のうち、PLAP のみが、卵巢癌特異性を示した；しかしながら、我々の分析は他の卵巢特異的抗原の存在を示しており、最近これらは同定されている (Taylor DD, Gercel-Taylor C, Parker LP., Gynecol Oncol 2009, 115:112-120)。患者由来の IgG2 および IgG3 によるこれらタンパク質の認識パターンは、卵巢癌の段階を明らかにし得る。

#### 【0040】

さらに、腫瘍発達の間のそれらの早期出現および末梢循環における I g G の安定性によって、特定の腫瘍抗原を認識する I g G サブクラスの定量化は、早期癌の同定のための優れたバイオマーカーを提供し、良性卵巣腫瘍と悪性卵巣腫瘍との区別を可能にする。

#### 【 0 0 4 1 】

##### ( 使用方法 )

本明細書に包含されるものは、本明細書に記載されている腫瘍関連抗原に特異的な自己抗体の存在を検出することに基づいて、癌（例えば、膵臓癌、肺癌、乳癌、大腸癌、または卵巣癌）を診断するおよび段階付ける方法である。タンパク質の存在および / またはレベルは、当該技術分野において公知の方法を用いて（例えば、定量的な免疫アッセイ法を用いて）評価され得る。いくつかの実施形態において、タンパク質の存在および / またはレベルを検出するために、ハイスループットの方法（例えば、当該技術分野において公知であるようなタンパク質または遺伝子チップ（例えば、Ch. 12, Genomics, in Griffiths et al., Eds. Modern genetic Analysis, 1999; W. H. Freeman and Company, Ekins and Chu, Trends in Biotechnology, 1999, 17:217-218; MacBeath and Schreiber, Science 2000, 289(5485):1760-1763; Simpson, Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002; Hardiman, Microarrays Methods and Applications: Nuts & Bolts, DNA Press, 2003を参照））が用いられ得る。

10

#### 【 0 0 4 2 】

卵巣癌の模範的な臨床的診断ツリー（図 5）において、バイオマーカー（腫瘍反応性抗体など）を適用するための 3 つの潜在的な時点がある。第一に、可能性のあるバイオマーカーは、リスクの高い集団において、または全集団において、無症候の個人における癌の検出のためにそれらを適用することによるスクリーニングのために用いられ得る。第二に、可能性のあるバイオマーカーは、疑わしいもしくは明白な腫瘍、超音波診断によって同定された腫瘍または骨盤もしくは腹部の痛みの症状を有している個人の明確な診断のために用いられ得る。第三に、可能性のあるバイオマーカーは、残存の疾患および転移性の疾患の治療応答を評価するために、および再発の早期同定のために、卵巣癌に関して治療された（手術および最前線の化学療法によって）個人における、疾患のモニタリングまたはフォローアップのために用いられ得る。本明細書に記載されているバイオマーカーは、上記のうちの 1 もしくは 2 つ以上の時点において、または上記の 3 つ全ての時点において、または他の時点（例えば、医療供給者または保険業者によって決定される場合）において、用いられ得る。

20

30

#### 【 0 0 4 3 】

本明細書において卵巣癌は一例として用いられているが、本明細書に記載されている方法は同様に、他の癌（例えば、上皮起源の他の癌（例えば、癌腫（例えば、膵臓癌、肺癌、乳癌、または大腸癌）））のために用いられ得る。

#### 【 0 0 4 4 】

##### 〔 実施例 〕

本発明を以下の実施例においてさらに詳細に説明するが、特許請求の範囲に記載されている発明の範囲を限定するものではない。

#### 【 0 0 4 5 】

##### ( 実施例 1 . 腫瘍反応性 I g G による特定の抗原標的の認識 )

卵巣腫瘍細胞の特定の区画に由来する標的タンパク質を用いて、正常な女性の対照および良性卵巣疾患を患っている女性において、体液性応答の存在を評価した。

#### 【 0 0 4 6 】

Gynecologic Oncology Group Serum Bank（オハイオ州コロンバス）から入手した保存血清において実験を行った。血清は、ステージ I（n = 15）、ステージ II（n = 15）およびステージ III（n = 20）において診断された漿液性乳頭状腺癌を患っている患者、または良性卵巣疾患（漿液性腺腫、n = 15）を患っている患者、および同年齢の女性のボランティア（n = 20）からの試料を含んでいた。卵巣の患者および良性卵巣疾患の患者からの血清を外科手術前に入手した。対照群は、普通の婦人科系の検査を受けて

40

50

いる、同年齢の健康な女性（何かの癌の診断を受けていない、卵巣癌または乳癌に遺伝的にかかりやすすくない、かつ、サンプル収集後少なくとも6ヶ月間疾患にかかっていない）からなっていた。全ての血清は-70℃において保存されている。サンプル入手時における年齢、病理学的診断、および組織学的分析を、全ての群について入手した。腫瘍を有していない対照の平均年齢は57.0±4.1才であり、対して卵巣癌を患っている患者は58.1±5.2才、良性疾患を患っている患者は56.9±5.3才であり、年齢の相違は有意ではなかった。CA125は診断マーカーとして十分には働かないと報告されてきたが、外科手術前のCA125レベルを、患者記録から入手した。癌の徴候がない20人の対照の対象のうち、5人（25%）がCA125レベル>35 units/mlを示し、一方、良性卵巣腫瘍を有する15人の女性のうち7人（47%）が上昇したCA125（>35 units/ml）を示した。ステージIの疾患を患っている15人の患者のうち、9人がCA125レベル<35 units/ml（平均は26.74±16.22である）を示した。ステージIIIの卵巣癌を患っている20人の患者のうち、18人の女性が142.12±82.33 units/mlである、上昇したCA125の平均レベル（42~937に分布している）を示した。

10

20

30

40

50

#### 【0047】

体液性応答をウエスタン免疫ブロットによって評価した。ウエスタンブロット分析のために、腫瘍に由来する細胞タンパク質を以下のように調製した。全細胞タンパク質（細胞区画からのものが挙げられる）を、ステージIIIの卵巣嚢胞腺癌を患っている女性から我々の研究所において確立した、ヒト卵巣腫瘍細胞系統から単離した（UL-BおよびUL-Oと称する）。UL-O細胞は、乳癌/卵巣癌の家族歴がある48才の白人女性に由来した（医療記録は患者がBRCA1+であることを示していた）。一方、UL-Bは、癌の家族歴がない72才の白人女性に由来した（Taylor DD, Gercel-Taylor C., Gynecol Oncol 2008, 110:13-21）。これらの卵巣腫瘍細胞をRPMI 1640培地（10%の胎仔ウシ血清、0.1 mMの非必須アミノ酸、1 mMのピルビン酸ナトリウム、200 mMのL-グルタミン、100 mg/mlのストレプトマイシンおよび100 IU/mlのペニシリンによって補完した）中で、加湿された5% CO<sub>2</sub> 雰囲気において生育させる。細胞の生存率をトリパンブルー排除によって評価したところ、本研究に利用した全ての培養物は>95%生存していた。

#### 【0048】

タンパク質の細胞成分の分画を製造者の手順（BioVision, Mountain View, カリフォルニア州）に従って行った。20 mMのリン酸ナトリウム緩衝生理食塩水（PBS）を用いて、腫瘍細胞の単層を徹底的に洗浄し、次いで、擦り取ることによって単層から取り除き、サイトゾル、膜、および核に由来する画分へ分離した。各細胞画分のタンパク質濃度を、Bradfordマイクロアッセイ（Bio-Rad Laboratories, Hercules, カリフォルニア州）を用いて決定した。適切な分画を評価するために、膜画分のタンパク質マーカー（胎盤型アルカリホスファターゼおよびEpCAM）、核画分のタンパク質マーカー（ヒストンH3）および細胞質画分のタンパク質マーカー（GAPDH）を、ウエスタン免疫ブロット法によって評価する。抗体をSanta Cruz Biotechnologyから入手した。抗体は、抗PLAP（sc-47691）、抗EpCAM（sc-73491）、抗ヒストンH3（sc-10809）および抗GAPDH（sc-47724）であった。各細胞成分の画分は、それらの特異的マーカーに関してのみ、免疫ブロット上に検出可能なバンドを示した。

#### 【0049】

患者の自己抗体反応パターンを可視化するために、可溶化させたタンパク質（40 μg/レーン）を、10% SDS-PAGEゲルにかけ、電気泳動によって分離させ（Laemmli UK., Nature 1970, 227, 680-685）、ウエスタン免疫ブロット法によって解析した（Brown R, Clugston C, Burns P, Edlin A, Vasey P, Vojtesek B, Kaye SB., Int J Cancer 1993, 55, 678-684）。ニトロセルロース膜をSuperBlock（Pierce Chemical）を用いて3時間ブロッキングし、患者の血清（5%の脱脂粉乳をTween 20と共に含んでいるTBS中に1:100希釈した）を用いて4℃において一晩プローブさせ、続いてペルオ

キシダーゼと共役させた抗ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 (AbD Serotec, Raleigh, ノースカロライナ州) をプローブさせた。我々は、血清反応陽性の患者と血清反応陰性の対照とを区別するのに最適な希釈度を同定するための、患者および対照の血清の段階希釈を用いて、この試験のために当該 1 : 1 0 0 希釈を予め決定した (Taylor DD, Homesley HD, Doellgast GJ., Am J Reprod Immunol 1984, 6:179-184)。結合した免疫複合体を増強した化学発光 (ECL, Amersham Life Sciences, Arlington Heights, イリノイ州) によって可視化した。得られた X 線フィルムをスキャンし、デジタル化して、Un-scan-it ソフトウェア (Silk Scientific Corp., Orem, ユタ州) を用いて画素密度へ変換した。各細胞区画に由来する抗原 (4 0 k D より大きい、または小さい) に対する免疫反応性を、各ゲル上に含まれる対照の基準 (H R P - 抗マウス I g ) の画素値を用いて統一させた。免疫反応性のないレーンが 1 の値を示すように、統一させた画素値を、各ゲル上の陰性対照のレーンで割った。各患者について全く同じ (duplicate) ゲルを用い、これらのゲルから得られた比を平均した。各段階にある全ての患者の平均から、平均値および標準偏差を算出した。

10

20

30

40

50

#### 【 0 0 5 0 】

2 D D I G E ( 2 次元ディファレンスゲル電気泳動 ) タンパク質発現プロファイリングを以下のように行った。ステージ I の患者から溶出された、免疫アフィニティ単離した細胞タンパク質 ( 3 0 0  $\mu$  g ) を C y 2 と称する。ステージ I I I の患者由来の I g G によってカラムから溶出されたタンパク質 ( 3 0 0  $\mu$  g ) を C y 3 と称した。第一の次元において等電点電気泳動 ( I E F ) を用い、第二の次元において S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動 ( S D S - P A G E ) を用いて、2つのサンプルを単一の 2 D ゲル上で同時に分離させた。電気泳動の後、Typhoon イメージスキャナを用いてゲルをスキャンした。各スキャンは CyDye シグナル ( C y 2 および C y 3 ) のうち 1 つを呈した。単独の画像および重ね合わせの画像を含む画像表示データを生成するために、ImageQuant ソフトウェアを用いた。次いで、画像を DeCyder ソフトウェア解析 ( 多重のサンプルを自動的に探し出し、解析する ) にかけた。2 D ゲルスポットを移動させ、染色液および阻害化学物質を取り除くために洗浄し、最大量の消化バッファを吸収させるために乾燥した。乾燥した 2 D ゲルスポットをシーケンシンググレードの改質トリプシンを含んでいる消化バッファ ( 質量で 1 : 3 0 ) 中で再水和させ、タンパク質をゲル中で 3 7 において消化させた。トリフルオロ酢酸抽出バッファを用いて、消化されたペプチドをゲルから抽出し、消化されたトリプシンペプチドを C-18 Zip-tips ( Millipore ) を用いて脱塩した。脱塩したペプチドを C H C A マトリックス ( - シアノ - ヒドロキシケイ皮酸 ) と混合し、M A L D I プレートのウェル中へスポットした。各サンプル中のペプチドの質量スペクトル ( M S ) を、Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer を用いて得た。各サンプルについて最も豊富なペプチドのうち少なくとも 1 0 個をさらに、断片化およびタンデム型質量分析 ( M S / M S ) に供した。タンパク質の同定は、ペプチドフィンガープリント質量マッピングおよびペプチド断片化マッピング ( M S / M S スペクトルを用いた ) に基づいた。組み合わせた M S および M S / M S スペクトルを、一次配列データベースからタンパク質を同定するために、MASCOT 検索エンジンに装備された GPS Explorer ソフトウェアを用いて、データベース検索にかけた。

#### 【 0 0 5 1 】

各患者による特定のタンパク質スポットの認識を、特定の抗原それぞれに対する抗体反応の存在または非存在によって階層化した。癌を有していない対照からの特定の抗原の存在と、卵巣癌の各段階における患者からの特定の抗原の存在との比較を、クラスカル・ワリスの検定によって行った。  $p < 0 . 0 5$  を有する検定は、統計学的に有意であるとみなされる。

#### 【 0 0 5 2 】

結果を図 1 の A ~ B に示している。対照のサンプルは、I g G のサブクラスに関わらず、サイトゾル由来の抗原に対する反応性を何も示さなかった。対照は、全ての I g G サブクラスにおいて、膜区画に由来する抗原において、5 0 k D における単一バンドを認識し

た。また、これらの対照は、核画分において50 kDの抗原を認識し、同様に全てのIgGサブクラスにおいて52および60 kDにおける2本のバンドを認識した。また、IgG3サブクラスは、さらなる弱い反応性のバンドを示す。良性疾患を患っている患者において、50 kDのバンドが、全てのIgGサブクラスに関して、膜画分および核画分において認識される。さらなる34 kDのバンドが、全てのIgGサブクラスに関して、全ての画分において認識される。15 ~ 30 kDのバンド群が、IgG1、IgG3およびIgG4によって、膜画分において認識され、55 ~ 100 kDのさらなる群が全てのIgGサブクラスによって核画分において認識された。

#### 【0053】

次いで、腫瘍細胞系から単離したタンパク質を用いて、ステージI（図2のA）、ステージII（図2のB）およびステージIII（図2のC）の卵巢癌を患っている女性に由来する抗体を用いて、体液性免疫応答の存在を解析した。以前の研究では、癌患者の血清が正常な卵巢上皮において、わずかに数本の少数のバンドに対する反応性を示すことを実証した（aylor DD, Gercel-Taylor C, Parker LP., Gynecol Oncol 2009, 115:112-120）。卵巢腫瘍由来抗原に関して、抗原の認識における相違がみられた。50 kDのバンドの認識は全ての患者に共通しているようである。

#### 【0054】

ステージIの患者（図2のA）に関して、ウエスタン免疫ブロットは、20 ~ 140 kDの分子量に分布している複数のバンドを同定した。この免疫反応性は、IgG2 > IgG3 > IgG1 = IgG4であった（図3）。IgG2およびIgG3に関して、反応性は、核の抗原に関してより大きく、次いで膜の抗原が大きく、サイトゾルの抗原の認識が最小であった。対して、IgG1およびIgG4に関して、膜の抗原は最も大きい反応性を示し、次いでサイトゾルの抗原が大きく、核の抗原は反応性が最も小さかった。主な（primary）免疫反応性は、40 kDより大きい分子量を示す抗原においてみられた。

#### 【0055】

ステージIIの卵巢癌を患っている患者に関して、ウエスタン免疫ブロットは、10 ~ 140 kDの分子量に分布している複数のバンドを同定した（図2のB）。この免疫反応性は、IgG2 > IgG3 > IgG1 > IgG4であった（図3）。全てのIgGサブクラスに関して、反応性は核の抗原に関して、より大きく、次いで膜の抗原が大きく、サイトゾルの抗原の認識が最小であった。IgG1およびIgG4に関して、サイトゾル由来の抗原による有意な反応性はみられなかった。一方、IgG2およびIgG3に関して、より低い反応性（それぞれ、 $2.68 \pm 1.25$ および $1.85 \pm 0.81$ ）が、40 kD未満の抗原において主にみられた。全てのサブクラスにおいて類似する反応性によって、患者由来のIgGは、膜区画に由来する< 40 kDの抗原を主に認識した（IgG1 =  $2.59 \pm 0.69$ 、IgG2 =  $2.79 \pm 0.63$ 、IgG3 =  $2.61 \pm 0.71$ 、およびIgG4 =  $2.38 \pm 0.56$ ）。

#### 【0056】

ステージIIIの患者に関して、ウエスタン免疫ブロットは、10 ~ 140 kDの分子量に分布している複数のバンドを同定した（図2のC）。この免疫反応性は、IgG2 > IgG3 = IgG4 > IgG1であった（図3）。全てのIgGサブクラスに関して、強度以外、認識パターンは同一のようであった。IgG2およびIgG3に関して、反応性は核の抗原に関してわずかに大きく、次いで膜の抗原が大きく、サイトゾルの抗原の認識が最小であった。核の抗原に関して、反応性のレベルは、< 40 kDの抗原および> 40 kDの抗原について、IgG2（それぞれ、 $4.68 \pm 0.63$ 対 $4.71 \pm 0.72$ ）およびIgG3（それぞれ、 $3.42 \pm 0.58$ 対 $4.08 \pm 0.67$ ）に関して類似していた。膜の抗原に関して、主な反応性が40 kD未満の抗原についてみられた：IgG1は< 40 kDの抗原について2.08倍大きい（> 40 kDの抗原に対する）反応性を示し、IgG2は2.27倍大きい反応性を示し、IgG3は1.64倍大きい反応性を示し、IgG4は1.51倍大きい反応性を示した。サイトゾル区画に由来する抗原は、< 40 kDの抗原について類似するより大きい反応性を示した。

10

20

30

40

50



## 【 0 0 5 7 】

( 実施例 2 . 免疫反応性のある成分の同定 )

患者の I g G 認識を介在する抗原の正体を、2 - D I G E を用いて調べた ( 図 4 の A 、 B 、 C ) 。癌患者の反応性を解析する前に、良性卵巢疾患を患っている患者によって認識された抗原を、良性の患者由来の I g G を用いて構成されたアフィニティカラムを用いた免疫吸着法によって除去した。

## 【 0 0 5 8 】

免疫反応性タンパク質を単離するための、患者の血清による免疫アフィニティカラムを用意するために、0 . 5 m l の結合用バッファ ( 2 0 m M のリン酸ナトリウム , p H 7 . 0 ) を用いて患者の血清 ( 0 . 5 m l ) を希釈し、1 m l の HiTrap Protein G カラム ( GE Healthcare BioSciences, Piscataway, ニュージャージー州 ) にかけた。サンプルを室温において 1 時間カラムを再循環させ、次いで 1 0 m l の結合用バッファを用いて洗浄したか、またはサンプルを室温において、2 8 0 n m において吸収する物質が流出液中に出なくなるまで再循環させた。次いで、HiTrap カラムに結合している患者由来の I g G を、タンパク質 G と架橋させた。架橋するために、0 . 2 M のトリエタノールアミン , p H 8 . 0 を用いてカラムを平衡化し、2 5 m M の D M P ( ジメチルピメリデートジヒドロクロリド ) を含んでいる 1 m l の架橋バッファを加え、室温において 4 5 分間インキュベートした。次いで、1 m l のブロッキングバッファ ( 0 . 1 m M のエタノールアミン , p H 8 . 2 ) をカラムに加え、室温において 1 時間インキュベートした。免疫アフィニティカラムを結合用バッファを用いて 2 回洗浄し、続いて 1 m l の 0 . 1 M グリシン - H C l ( p H 2 . 5 ) を加え、D M P と架橋していない抗体を溶出させた。

## 【 0 0 5 9 】

段階に関連する免疫反応性タンパク質を分離するために、U L - B 細胞の単層を P B S を用いて徹底的に洗浄し、次いで擦り取ることによって取り除いた。細胞を氷冷 P B S 中に再懸濁し、4 0 0 x g において 1 0 分間遠心した。細胞ペレットを 1 % の N P - 4 0 、5 0 0 m M の N a C l 、5 0 m M の T r i s ( p H 7 . 5 ) 、1 m M の D T T 、ならびにプロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤の混合溶液 ( Sigma-Aldrich, St. Louis, ミズーリ州 ) に溶解させ、この懸濁液を 1 0 , 0 0 0 x g において 1 5 分間遠心した。上清を抗ヒト I g G 、A 、M - アガロースと共に 1 時間インキュベートすることによって清澄にした。これらの可溶化した細胞タンパク質を、プールした患者由来の I g G から構成した免疫アフィニティカラムにかけた。まず、卵巢疾患を患っている患者由来の I g G から構成したアフィニティカラムを用いて、細胞タンパク質を予め吸着させた。結合していないタンパク質をステージ I の患者由来の I g G またはステージ I I I の患者由来の I g G から構成したアフィニティカラムにかけた。これらのタンパク質を室温において 1 時間カラムを再循環させ、次いで 1 0 m l の結合用バッファ ( 2 0 m M のリン酸ナトリウム , p H 7 . 0 ) を用いて洗浄したか、またはこれらのタンパク質を、2 8 0 n m において吸収する物質が流出液中に出なくなるまで再循環させた。次いで、1 m l の 0 . 1 M グリシン - H C l ( p H 2 . 5 ) を加えることによって、結合した物質をカラムから溶出させ、2 8 0 n m における吸光度をモニタリングした。各免疫アフィニティカラムから溶出されたタンパク質のピークを回収し、トリス塩基の添加によって p H を中和した。溶出したタンパク質のタンパク質濃度を、Bradford マイクロアッセイによって決定した。

## 【 0 0 6 0 】

ステージ I の患者の I g G から溶出したタンパク質を C y 2 と称し、ステージ I I I から溶出したタンパク質を C y 3 と称した。2 - D 分離の後、共通するスポットおよび特有のスポットを明らかにするために、多様なサンプルの解析を行った ( 図 4 の C ) 。この解析は、段階に関連する抗原の相違を 3 2 個明らかにした。これらの特有のパターンのうち、1 1 個のタンパク質が、ステージ I の患者による認識の増大 ( 4 倍より大きい ) を示し、2 1 個のタンパク質が、ステージ I I I の患者による認識の増大を示した。これらのうち、ペプチドフィンガープリント質量マッピングおよびペプチド断片化マッピング ( M S / M S スペクトルを用いた ) を用いて、ステージ I および I I I のそれぞれについて、6

個の共通するタンパク質および 5 個の段階特異的なタンパク質の正体を決定した (表 1)。

【 0 0 6 1 】

【 表 1 】

表 1 : ステージ I の患者、ステージ I I I の患者、またはその両方によって認識される腫瘍由来抗原の、2-D I G E によるスポットの質量分析的な同定

共通する認識	
核	細胞質
ヌクレオホスミン (B23) SSX-2 SSX-4 HoxA7	グルコース調節タンパク質 (GRP) 78 (小胞体中) プロカテプシン D (リソソーム中)
早期の認識 (ステージ I)	
核	細胞質
HNRNP A2/B1 NME1/NME2	ピリドキサルキナーゼ ガレクチン-1 HSP90
後期の認識 (ステージ I I I)	
核	細胞質
Zinc finger DHHC-type containing 7, アイソフォーム 2 サバイピン p53 p73	ペルオキシレドキシン

10

20

【 0 0 6 2 】

表 1 に示されるように、ステージ I の患者によって選択的に (preferentially) 認識される抗原のうち、ヘテロ核リボヌクレオタンパク質 (HNRNP A2/B1) および非転移性細胞 1 / 非転移性細胞 2 (NME1/NME2) は核に局在化し、ピリドキサルキナーゼ、ガレクチン - 1、および熱ショックタンパク質 90 は一般的にサイトゾルにおいて発現する。ステージ I I I の患者によって選択的に (preferentially) 認識される抗原のうち、zinc finger DHHC-type containing 7 アイソフォーム 2、サバイピン、p53 および p73 は核に局在化し、ペルオキシレドキシンはサイトゾルに存在する。両方の患者群による認識を示しているタンパク質に関して、ヌクレオホスミン (B23)、滑膜肉腫 X 切断点タンパク質 (SSX2、SSX4)、および HoxA7 は一般的に核に局在化するタンパク質に相当し、グルコース調節タンパク質 78 は小胞体に局在化し、プロカテプシン D はリソソームに存在する。

30

【 0 0 6 3 】

( 実施例 3 . 腫瘍細胞由来の抗原の特異な認識 )

40

腫瘍細胞由来の抗原の特異な認識を明らかにするために、UL-6 由来の可溶化した細胞性抗原を、早期卵巣癌または後期卵巣癌を患っている患者由来の IgG によるそれらの特異的認識に基づいて単離した。これらの患者由来の IgG をタンパク質 G - Sepharose カラム上で単離し、DMP を用いて架橋した。また、同様の方法において、良性卵巣疾患を患っている女性由来の IgG を単離し、タンパク質 G と結合させた。まず、可溶化したタンパク質を、良性疾患に由来する免疫アフィニティカラムにかけた。これによって、これらの患者由来の IgG と反応するタンパク質を除去した。次いで、結合していないタンパク質を早期または後期に由来する IgG を用いて用意した免疫アフィニティカラムにかけた。カラムを徹底的に洗浄し、次いで溶出させた。溶出したタンパク質を 2-D I G E によって比較した。早期の患者から単離した反応性のあるスポットを、後期の患者と、デ

50

デジタル化画像を重ね合わせることによって比較した。次いで、反応性のあるスポットを定量化し、4倍の増加/減少を示しているスポットをMSシーケンシングによって明らかにした。

#### 【0064】

結果を図6および図7に示している。全部で32個の反応性のあるスポットが同定された。反応性のあるスポットとしては、ヌクレオホスミン、ヌクレオシドジホスフェートキナーゼ、NME1-NME2、核リボタンパク質A2/B1、Zn-DHHC-containing7、およびアルドースレダクターゼアイソフォームが挙げられる。

#### 【0065】

(実施例4. 卵巣ではない癌における反応性)

免疫吸着クロマトグラフィによって、培養細胞から特定の免疫反応性タンパク質を単離した。各タンパク質に対する市販の抗体を入手した：抗プロカテプシンD（ウサギモノクローナル、Calbiochem）、抗GRP78（ヤギポリクローナル、Santa Cruz Biotechnology [SCBT]）、抗p53（マウスモノクローナル、Abcam）、抗ヌクレオホスミン（マウスモノクローナル、Abcam）、抗胎盤型アルカリホスファターゼ（マウスモノクローナル、Abcam）、抗SSX共通エピトープ（ウサギポリクローナル、SCBT）、抗サバイピン（ウサギポリクローナル、Abcam）、抗NY-ESO-1（マウスモノクローナル、SCBT）、抗Muc16（マウスモノクローナル、SCBT）、抗HSP90（ラットモノクローナル、Abcam）、抗TAG72（マウスモノクローナル、Abcam）、および抗Hox7（マウスモノクローナル、SCBT）。卵巣腫瘍細胞系統に由来するタンパク質を、50mMのTris-HCl（pH7.5）（0.3%のSDS、2mMのオルトバナジン酸ナトリウム、200mMのDTT、1mMのフッ化ナトリウム、1mMのピロリン酸ナトリウム、1μg/mLのロイペプチン、1μg/mLのアプロチニン、1μg/mLのペプスタチン、および1mMのPMSEを含んでいる）に氷上で可溶化させた。可溶化したタンパク質を免疫吸着カラムにかけ、4において一晚インキュベートした。特異的に結合したタンパク質を0.1Mのグリシン-HCl, pH2.8（1MのTrisを用いて中和させた）を用いて溶出させた。

#### 【0066】

腫瘍の抗原と反応性のある免疫グロブリンに対するアレイアッセイを以下のように行った。精製したエキソソームタンパク質（20ng/mLタンパク質を含む250μL）を、バイオドット精密濾過装置（Bio-Rad Laboratories, Hercules, カリフォルニア州）を用いて、ニトロセルロース膜に付けた。対照として、段階希釈したヒトIgGを、プロットを統一させるための内部陽性対照として各膜上にスポットした。希釈したマウスIgおよびウサギIgを、陰性対照として各膜上にスポットした。ペルオキシダーゼと共役させたIgサンプルを試薬対照として、および配向のために、各膜上にスポットした。5%のBSAを用いて膜をブロッキングし、次いでTBS+0.1%Tween20を用いて3回洗浄し、TBSを用いて2回洗浄した。既知の癌患者および癌を患っていない対象からの血清（1:100に希釈した）を、4において一晚、膜と共にインキュベートし、ペルオキシダーゼと共役させた抗ヒトIgGと共にインキュベートし、ECLによって可視化した。得られたフィルムを画像化し、Kodak解析ソフトウェアを用いて解析した。全てのスポットについての画素値を取得し、内部陽性対照に基準を合わせた後、膜同士の比較を行った。最初の20個の対照サンプルの最大基準化画素値として、正の値に対するカットオフをセットした。

#### 【0067】

その結果は、卵巣癌と同様に、膵臓癌、肺癌、乳癌、および大腸癌を包含する癌について、いくつかの抗原の反応性を示す。反応性（正常な女性の対照に由来する血清、良性卵巣疾患を患っている女性に由来する血清、および卵巣癌患者に由来する血清）を明らかにするためにドットプロットアレイを用いて、各抗原の平均画素を決定し、プロットした（図8のA~B）。正常な対照および良性疾患の女性の両方についての免疫反応性は、試験した全ての抗原に対して陰性であると判断された。癌の全ての群についての平均は、対照

10

20

30

40

50

および良性の場合と統計学的に異なっていた。試験した抗原の大部分に関して、平均の反応性（画素値）は、早期の疾患（ステージⅠおよびⅡ）よりも、ステージⅢおよびⅣの疾患において大きかったが、その差は有意ではなかった。しかしながら、Muc 16、p53、PLAPおよびサバイピンに関して、反応性は早期の疾患よりも、進行した疾患において有意に大きかった。

#### 【0068】

進行した膵臓癌、肺癌、乳癌、および大腸癌を患っている女性に由来する血清についての研究を繰り返したところ、対照の女性と卵巢癌患者とを比較した場合、試験した全ての癌患者が、ヌクレオホスミン、カテプシンD、p53、およびSSX抗原を認識する抗体を生成することが示された（図9）。卵巢癌患者だけが、胎盤型アルカリホスファターゼ（PLAP）を認識するようである。肺癌および大腸癌の患者は、サバイピンをより強く認識するようである。

10

#### 【0069】

##### 〔他の実施形態〕

本発明はその詳細な説明と組み合わせて記載されているが、上述の説明は例示することが意図され、かつ本発明の範囲を限定しないことが意図されるものであり、本発明は付随の特許請求の範囲によって規定されることが理解されるであろう。他の局面、利益、および変更は、以下の特許請求の範囲の範囲内である。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0070】

20

【図1】卵巢腫瘍細胞の特定の細胞区画から単離されたタンパク質に対する、患者の免疫反応性の代表的なウエスタン免疫ブロットを示す図である。

【図2】卵巢腫瘍細胞の特定の細胞区画から単離されたタンパク質に対する、患者の免疫反応性の代表的なウエスタン免疫ブロットを示す図である。

【図3】特定の細胞区画（サイトゾル（C）、膜（M）および核（N））に由来する抗原に対する、正常な対照（n = 20）、良性疾患を患っている女性（n = 15）および様々なステージの卵巢癌を患っている患者（ステージⅠ，n = 15；ステージⅡ，n = 15；ステージⅢ，n = 15）に由来する血清の免疫反応性を表しているウエスタン免疫ブロットの定量化の結果を示す棒グラフを示す図である。

【図4】ステージⅠおよびステージⅢの卵巢癌患者によって認識されたタンパク質の2-DIGEの結果を示す図である。

30

【図5】模範的な卵巢癌の臨床的診断ツリーを示す図である。

【図6】卵巢癌を患っている患者によって認識された腫瘍由来抗原の2-DIGEイメージの画像を示す図である。

【図7】ステージⅠ疾患またはステージⅢ疾患の卵巢癌患者に由来する血清を用いた免疫反応性スポットの代表的な比較を示す図である。

【図8】正常な対照（n = 40）、良性疾患を患っている女性（n = 40）および様々なステージの卵巢癌を患っている患者（ステージⅠ，n = 35；ステージⅡ，n = 25；ステージⅢ，n = 40；ステージⅣ，n = 25）に由来する血清の、ヌクレオホスミン、カテプシンD、グルコース調節タンパク質78（GRP78）、ホメオボックスA7（HoxA7）、熱ショックタンパク質90kDa（HSP90）、ムチン16、細胞表面関連（Muc16）、NY-ESO-1（癌/精巢抗原1Bとしても知られている）、p53、アルカリホスファターゼ、胎盤性1（PLAP）、SSX共通抗原、サバイピン、および腫瘍関連糖タンパク質72（TAG-72）に対する免疫反応性を表すドット免疫スポットの定量化の結果を示す各6つの箱ひげ図を示す図である。

40

【図9】正常な対照、ならびに膵臓癌（n = 15）、肺癌（n = 15）、乳癌（n = 15）、大腸癌（n = 15）、および卵巢癌（n = 40）を患っている女性に由来する血清の免疫反応性を表すドット免疫スポットの定量化の結果を示す6つの箱ひげ図のセットを示す図である。





## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 10/57427

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C40B 30/04 (2010.01) USPC - 506/9 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC-506/9 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC-506/13;435/71,792 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB); Google Patents; Google Scholar cancer, tumor antigen, antibody, autoantibody, subclass, stage, ovarian cancer, IgG, nuclear, cytoplasmic, HNRNP A2/B1 OR NME1/NME2 OR survivin OR p53 OR p73 OR ssx2 OR ssx4 OR hoxa7, pyridoxal kinase or galectin-I or heat shock protein 90 or peroxi		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----- Y	US 2003/0119079 A1 (HANASH et al.) 26 June 2003 (26.06.2003) (para [0007]-[0011], [0084], [0116], [0119], [0124], [0246], )	1-3, 5, 6, 8, 9, and 11-14 ----- 4, 7, 10, and 15-17
Y	US 2007/0167405 A1 (HUFLEJT et al.) 19 July 2007 (19.07.2007) (para [0009]-[0016]) US 2003/0190602 A1 (PRESSMAN et al.) 09 October 2003 (09.10.2003) (para [1010])	4, 7 10
Y	(IMAI et al.) IgG subclasses in patients with membranoproliferative glomerulonephritis, membranous nephropathy, and lupus nephritis Kidney International, Vol. 51(1997), pp. 270 ?2 76 (pg 274-275 discussion; Figs 4-7 Tables 1, 2)	15-17
Y	US 2005/0158737 A1 (BANHAM et al.) 21 July 2005 (21.07.2005) (para [0001]; [0002], [0495], [0722(table)])	1-17
Y	(SOIFFER et al.) Recombinant interleukin-2 infusions and decreased IgG2 subclass concentrations BLOOD 1995 85: 925-928 (pg 925 col 1 para 1, 2; pg 927 Table 2).	15-17
Y	(HO et al.) Humoral Immune Response to Mesothelin in Mesothelioma and Ovarian Cancer Patients Clin Cancer Res 2005;11:3814-3820. Published online May 16, 2005. (pg 3815 col 1 para 1)	1-17
Y	(CHATTERJEE et al.) Diagnostic Markers of Ovarian Cancer by High-Throughput Antigen Cloning and Detection on Arrays Cancer Res 2006; 66: (2).pp1181-1190 January 15, 2006 (pg 1184 col 1 para 1, 2; pg 1188 col 2 para 2, Table 1)	1-17
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 application or patent 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 05 January 2011 (05.01.2011)		Date of mailing of the international search report <b>27 JAN 2011</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## フロントページの続き

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

(71)出願人 512131243

ユニバーシティ オブ ルイスビル リサーチ ファウンデーション, インコーポレイテッド  
UNIVERSITY OF LOUISVILLE RESEARCH FOUNDATION  
, INC.  
アメリカ合衆国, 40202 ケンタッキー州, ルイスビル, メッドセンター 3, イースト ジ  
ェファークソン ストリート 201, スイート 215  
MedCenter 3, 201 E. Jefferson Street, Suite 215  
, Louisville, Kentucky 40202, United States of  
America

(74)代理人 110000338

特許業務法人原謙三国際特許事務所

(72)発明者 タイラー, ダグラス, ディー.

アメリカ合衆国, 40241 ケンタッキー州, ルイスビル, トレイル リッジ ロード 320  
9

(72)発明者 ガーセル - タイラー, シセク

アメリカ合衆国, 40241 ケンタッキー州, ルイスビル, トレイル リッジ ロード 320  
9