

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4722834号
(P4722834)

(45) 発行日 平成23年7月13日(2011.7.13)

(24) 登録日 平成23年4月15日(2011.4.15)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 Z N A A
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 S
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 1 B
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5
CO 7 K 14/47 (2006.01)	GO 1 N 21/78 C

請求項の数 82 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-507164 (P2006-507164)
 (86) (22) 出願日 平成16年3月15日(2004.3.15)
 (65) 公表番号 特表2007-525643 (P2007-525643A)
 (43) 公表日 平成19年9月6日(2007.9.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/007765
 (87) 国際公開番号 W02004/083449
 (87) 国際公開日 平成16年9月30日(2004.9.30)
 審査請求日 平成19年3月2日(2007.3.2)
 (31) 優先権主張番号 10/388,930
 (32) 優先日 平成15年3月13日(2003.3.13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 505345037
 フジレビオ アメリカ インク
 アメリカ合衆国 デラウェア州 1980
 8 ウィルミントン スイート 3206
 センターヴィレ ロード 2751
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (72) 発明者 オウシャネッスィー ダニエル ジュー
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 19
 468 リメリック ヒッコリー グロー
 ブ ドライブ 912

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 卵巣癌査定のための尿のメソセリン／巨核球可能化因子関連ペプチド (mesothelin/megakaryocytopoietin family peptide)

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

女性における卵巣癌の存在をスクリーニングする方法であって、該女性の尿試料を得ること；メソセリン／巨核球可能化因子族 (MMPFF) の状態を測定し、尿試料からMMPFF状態データを収集することを含み、さらに、該MMPFF状態の測定は、該女性から得られた尿試料中のMMPFFペプチドの存在を査定することを含み、尿試料中のMMPFFペプチドの存在を示している状態が、該女性が卵巣癌にかかっていることの指標となる、方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であって、前記卵巣癌は上皮卵巣癌であることを特徴とする方法。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の方法であって、前記卵巣癌は間質卵巣癌であることを特徴とする方法。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の方法であって、前記卵巣癌は幹細胞卵巣癌であることを特徴とする方法。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の方法であって、尿中におけるMMPFFペプチドの存在は特異的にMMPFFペプチドと結合する第1抗体と尿を接触させ、MMPFFペプチドが前記第1抗体と結合したかどうかを査定することによって査定することを特徴とする方法。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の方法であって、尿を第 1 抗体と接触させる前に尿を遠心分離機にかけて沈殿物があればそれをそこから殆ど取り除くことを特徴とする方法。

【請求項 7】

請求項 5 に記載の方法であって、第 1 抗体は担体と結合していることを特徴とする方法。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の方法であって、前記担体はプラスチック容器であることを特徴とする方法。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の方法であって、前記容器はマルチウエルプレートであることを特徴とする方法。

10

【請求項 10】

請求項 9 に記載の方法であって、前記プレートはロボット装置による自動分析に適合するようになっているものであることを特徴とする方法。

【請求項 11】

請求項 5 に記載の方法であって、MMPFFペプチドと第 1 抗体との結合は、尿と前記第 1 抗体の接触の後、特異的にMMPFFペプチドと結合する第 2 抗体と第 1 抗体を接触させ、第 1 と第 2 の抗体が一緒に局在しているかを査定することによって査定することを特徴とする方法。

20

【請求項 12】

請求項 11 に記載の方法であって、前記尿は、第 1 抗体と第 2 抗体の接触前少なくとも 10 分間第 1 抗体と接触していることを特徴とする方法。

【請求項 13】

請求項 11 に記載の方法であって、前記尿は、第 1 抗体と第 2 抗体の接触前少なくとも 60 分間第 1 抗体と接触していることを特徴とする方法。

【請求項 14】

請求項 11 に記載の方法であって、第 2 抗体は検出可能に標識してあることを特徴とする方法。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の方法であって、前記第 2 抗体は酵素、放射性核種、発蛍光団、及び発色団を構成する群から選択された化合物と接続していることを特徴とする方法。

30

【請求項 16】

請求項 11 に記載の方法であって、第 2 抗体はリガンドに接続しており、第 1 及び第 2 抗体の共局在が、第 2 抗体と、(i) リガンドと結合する受容体および(ii) 検出可能な標識を含んでなる化合物との接触によって査定されることを特徴とする方法。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の方法であって、前記標識は酵素、放射性核種、発蛍光団、及び発色団を構成する群から選択されていることを特徴とする方法。

【請求項 18】

請求項 16 に記載の方法であって、前記リガンドはビオチンであり前記受容体はアビジンであることを特徴とする方法。

40

【請求項 19】

請求項 18 に記載の方法であって、前記アビジンはストレプトアビジン(streptavidin)であることを特徴とする方法。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の方法であって、前記標識は酵素であることを特徴とする方法。

【請求項 21】

請求項 20 に記載の方法であって、前記酵素は西洋わさびペルオキシダーゼ(horseradish peroxidase)であることを特徴とする方法。

50

【請求項 2 2】

請求項 2 1 に記載の方法であって、第 1 及び第 2 抗体の共局在が 3、3'、5、5' - テトラメチルベンジジンの存在下で査定されることを特徴とする方法。

【請求項 2 3】

請求項 5 に記載の方法であって、第 1 抗体と尿を接触させた後に、第 1 抗体と第 1 抗体の標識したリガンドとを接触させ、尿と接触させた第 1 抗体と結合する標識したリガンドの量と、尿と接触させなかった等量の第 1 抗体と結合する標識したリガンドの量を比較することを特徴とする方法。

【請求項 2 4】

請求項 2 3 に記載の方法であって、標識したリガンドは MMPFF ペプチドと同じアミノ酸配列を有していることを特徴とする方法。

10

【請求項 2 5】

請求項 2 4 に記載の方法であって、標識したリガンドのグリコシル化状態は MMPFF ペプチドのグリコシル化状態と同じであることを特徴とする方法。

【請求項 2 6】

請求項 1 に記載の方法であって、MMPFF ペプチドはグリコシル化されていることを特徴とする方法。

【請求項 2 7】

請求項 1 に記載の方法であって、MMPFF ペプチドのアミノ酸配列は、配列 ID 番号 1 から 5 よりなる群から選択された 1 つの配列の少なくとも 10 の連続する残基から構成されていることを特徴とする方法。

20

【請求項 2 8】

請求項 2 7 に記載の方法であって、MMPFF ペプチドのアミノ酸配列は、配列 ID 番号 1 から 5 よりなる群から選択された 1 つの配列の少なくとも 20 の連続する残基から構成されていることを特徴とする方法。

【請求項 2 9】

請求項 2 7 に記載の方法であって、MMPFF ペプチドのアミノ酸配列は、配列 ID 番号 1 から 5 よりなる群から選択された 1 つの配列の少なくとも 50 の連続する残基から構成されていることを特徴とする方法。

【請求項 3 0】

請求項 2 7 に記載の方法であって、MMPFF ペプチドのアミノ酸配列は、配列 ID 番号 1 から 5 よりなる群から選択された 1 つの配列の少なくとも 200 の連続する残基から構成されていることを特徴とする方法。

30

【請求項 3 1】

請求項 2 7 に記載の方法であって、MMPFF ペプチドのアミノ酸配列は、配列 ID 番号 1 から 5 よりなる群から選択された 1 つの配列から構成されていることを特徴とする方法。

【請求項 3 2】

請求項 2 7 に記載の方法であって、MMPFF ペプチドのアミノ酸配列は、配列 ID 番号 4 の少なくとも 10 の連続的残基から構成されていることを特徴とする方法。

40

【請求項 3 3】

請求項 2 7 に記載の方法であって、MMPFF ペプチドのアミノ酸配列は、配列 ID 番号 5 の少なくとも 10 の連続的残基から構成されていることを特徴とする方法。

【請求項 3 4】

請求項 1 に記載の方法であって、MMPFF ペプチドは、少なくとも 20 の連続アミノ酸残基の部分からなり、その部分のアミノ酸配列は配列 ID 番号 1 から 5 よりなる群から選択された 1 つの配列の 20 の連続残基に対し少なくとも 90 % 同じであることを特徴とする方法。

【請求項 3 5】

請求項 3 4 に記載の方法であって、MMPFF ペプチドは、少なくとも 20 の連続アミ

50

ノ酸残基の部分からなり、その部分のアミノ酸配列は配列 I D 番号 4 と 5 よりなる群から選択された 1 つの配列の 20 の連続残基に対し少なくとも 90% 同じであることを特徴とする方法。

【請求項 36】

請求項 1 に記載の方法であって、更に、女性の尿中の第 2 卵巣癌マーカーの存在の査定を含んで構成され、尿中の前記第 2 マーカーの存在もまた女性が卵巣癌にかかっていることの示唆であることを特徴とする方法。

【請求項 37】

請求項 36 に記載の方法であって、前記第 2 の卵巣癌マーカーは尿ゴナドトロピンペプチド (urinary gonadotropin peptide)、システインプロテイナーゼ (cysteine proteinase)、ネオプテリン (neopterin)、及び腫瘍関連トリプシン抑制剤 (tumor-associated trypsin inhibitor) よりなる群から選択されたものであることを特徴とする方法。

10

【請求項 38】

請求項 1 に記載の方法であって、更に、女性の血清中の第 2 卵巣癌マーカーの存在の査定を含んで構成され、血清中の前記第 2 マーカーの存在もまた女性が卵巣癌にかかっていることの示唆であることを特徴とする方法。

【請求項 39】

請求項 38 に記載の方法であって、前記第 2 卵巣癌マーカーは C A 1 2 5、癌性胎児抗原 (carcinoembryonic antigen)、血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor)、腫瘍関連トリプシン抑制剤 (tumor-associated trypsin inhibitor)、C D 4 4 スプライス変形体 (splice variants)、抗マリグニン抗体 (anti-malignin antibody)、乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase)、アルファーヒドロキシ酪酸脱水素酵素 (alpha-hydroxybutyrate dehydrogenase)、C A 1 9 - 9、組織ポリペプチド抗原 (tissue polypeptide antigen)、及びシアリル T N よりなる群から選択されたものであることを特徴とする方法。

20

【請求項 40】

請求項 38 に記載の方法であって、前記第 2 の卵巣癌マーカーは C A 1 2 5 であることを特徴とする方法。

【請求項 41】

請求項 1 に記載の方法はさらに女性の血清中の M M P F F ペプチドの存在の査定を含んで構成され、血清中の前記 M M P F F ペプチドの存在もまた女性が卵巣癌にかかっていることの示唆であることを特徴とする方法。

30

【請求項 42】

女性から採取した尿中のメソセリン/巨核球可能因子族 (M M P F F) ペプチド (mesothelin/megakaryocyte potentiating factor family peptide) の存在を査定するキットであって、そのキットは配列 I D 番号 3 から 5 よりなる群から選定された一つの配列の少なくとも 10 の連続する残基を含んで構成される M M P F F ペプチドと結合するための第 1 薬剤と、尿を浄化する装置と、浄化した尿と前記第 1 薬剤を接触することを記述する使用説明書から構成されていることを特徴とするキット。

【請求項 43】

請求項 42 に記載のキットであって、前記第 1 薬剤は抗体であることを特徴とするキット。

40

【請求項 44】

請求項 43 に記載のキットであって、前記抗体は薄い金属フィルムに結合されていることを特徴とするキット。

【請求項 45】

請求項 44 に記載のキットであって、前記フィルムは表面プラズモン共鳴装置内の分析に用いられることを特徴とするキット。

【請求項 46】

請求項 42 に記載のキットであって、更に、M M P F F ペプチドが前記第 1 薬剤との結

50

合を査定するための第2薬剤を含んで構成されていることを特徴とするキット。

【請求項47】

請求項46に記載のキットであって、前記第2薬剤は前記第1薬剤の検出可能に標識をつけたリガンドであることを特徴とするキット。

【請求項48】

請求項47に記載のキットであって、前記第1薬剤は抗体で前記リガンドはMMPFFペプチドであることを特徴とするキット。

【請求項49】

請求項47に記載のキットであって、前記リガンドは酵素、放射性核種、発蛍光団、及び発色団よりなる群から選択された化合物で標識されていることを特徴とするキット。 10

【請求項50】

請求項46に記載のキットであって、前記第2薬剤は検出可能に標識した抗体であることを特徴とするキット。

【請求項51】

請求項50に記載のキットであって、前記抗体はビオチン化した抗体であることを特徴とするキット。

【請求項52】

請求項50に記載のキットであって、前記抗体は酵素、放射性核種、発蛍光団、及び発色団よりなる群から選択された化合物で標識されていることを特徴とするキット。

【請求項53】

請求項50に記載のキットであって、前記第1薬剤は検出可能に標識されている抗体と結合するエピトープとは異なるMMPFFのエピトープと結合する抗体であることを特徴とするキット。 20

【請求項54】

請求項42に記載のキットであって、前記装置は女性から採取した尿サンプルを遠心分離する装置であることを特徴とするキット。

【請求項55】

請求項42に記載のキットであって、前記第1薬剤は担体に結合されていることを特徴とするキット。

【請求項56】

請求項55に記載のキットであって、前記担体はプラスチックの容器であることを特徴とするキット。 30

【請求項57】

請求項56に記載のキットであって、前記容器はマルチウエルプレートであることを特徴とするキット。

【請求項58】

請求項57に記載のキットであって、前記プレートはロボット装置による自動分析に適合するように作製されたものであることを特徴とするキット。

【請求項59】

請求項56に記載のキットであって、前記第1薬剤は抗体であることを特徴とするキット。 40

【請求項60】

請求項59に記載のキットであって、更に、MMPFFペプチドが前記第1薬剤との結合を査定するための第2薬剤を含んで構成され、前記第2薬剤は第2抗体であることを特徴とするキット。

【請求項61】

請求項60に記載のキットであって、前記第2抗体はリガンドに接続されていることを特

徴とするキット。

【請求項62】

請求項 6 1 に記載のキットであって、(i) 前記リガンドと結合する受容体と (ii) 検出可能な標識とを含んでなる化合物を更に含むことを特徴とするキット。

【請求項 6 3】

請求項 6 2 に記載のキットであって、標識は酵素、放射性核種、発蛍光団、及び発色団よりなる群から選択された化合物で標識されていることを特徴とするキット。

【請求項 6 4】

請求項 6 3 に記載のキットであって、前記リガンドはビオチンであり、前記受容体はアビジンであることを特徴とするキット。

【請求項 6 5】

請求項 6 4 に記載のキットであって、前記アビジンはストレプトアビジン(streptavidin)であることを特徴とするキット。

10

【請求項 6 6】

請求項 6 5 に記載のキットであって、前記標識は酵素であることを特徴とするキット。

【請求項 6 7】

請求項 6 6 に記載のキットであって、前記酵素は西洋わさびペルオキシダーゼ(horseradish peroxidase)であることを特徴とするキット。

【請求項 6 8】

請求項 6 7 に記載のキットであって、更に、3、3'、5、5' - テトラメチルベンジジンを含んで構成されていることを特徴とするキット。

【請求項 6 9】

20

請求項 4 2 に記載のキットであって、更に、対照例としての MMPFF ペプチドを含んで構成され、対照例ペプチドのアミノ酸配列は配列 ID 番号 3 から 5 よりなる群から選ばれたひとつの配列の少なくとも 10 の連続する残基を含んで構成されていることを特徴とするキット。

【請求項 7 0】

請求項 6 9 に記載のキットであって、対照例ペプチドのアミノ酸配列は配列 ID 番号 3 から 5 よりなる群から選ばれたひとつの配列の少なくとも 20 の連続する残基を含んで構成されていることを特徴とするキット。

【請求項 7 1】

請求項 6 9 に記載のキットであって、対照例ペプチドのアミノ酸配列は配列 ID 番号 3 から 5 よりなる群から選ばれたひとつの配列の少なくとも 50 の連続する残基を含んで構成されていることを特徴とするキット。

30

【請求項 7 2】

請求項 6 9 に記載のキットであって、対照例ペプチドのアミノ酸配列は配列 ID 番号 3 から 5 よりなる群から選ばれたひとつの配列の少なくとも 200 の連続する残基を含んで構成されていることを特徴とするキット。

【請求項 7 3】

請求項 6 9 に記載のキットであって、対照例ペプチドのアミノ酸配列は配列 ID 番号 3 から 5 よりなる群から選ばれたひとつの配列を含んで構成されていることを特徴とするキット。

40

【請求項 7 4】

請求項 6 9 に記載のキットであって、対照例ペプチドのアミノ酸配列は配列 ID 番号 4 の少なくとも 10 の連続する残基を含んで構成されていることを特徴とするキット。

【請求項 7 5】

請求項 6 9 に記載のキットであって、対照例ペプチドのアミノ酸配列は配列 ID 番号 5 の少なくとも 10 の連続する残基を含んで構成されていることを特徴とするキット。

【請求項 7 6】

請求項 4 2 に記載のキットであって、更に、少なくとも 20 の連続するアミノ酸残基の部分を含んで構成される対照例ペプチドを含み、その部分のアミノ酸配列は配列 ID 番号 3 から 5 よりなる群から選択された配列の 20 の連続する残基と少なくとも 90 % 同一で

50

あることを特徴とするキット。

【請求項 77】

請求項 76 に記載のキットであって、前記対照例ペプチドは少なくとも 20 の連続するアミノ酸残基の部分を含んで構成され、その部分のアミノ酸配列は配列 I D 番号 4 と 5 よりなる群から選択された配列の 20 の連続する残基と少なくとも 90 % 同一であることを特徴とするキット。

【請求項 78】

請求項 42 に記載のキットであって、更に、女性の尿中の第 2 卵巣癌マーカーの存在を査定する試薬を含んで構成されることを特徴とするキット。

【請求項 79】

請求項 78 に記載のキットであって、前記第 2 の卵巣癌マーカーは尿ゴナドトロピンペプチド (urinary gonadotropin peptide)、システインプロテイナーゼ (cysteine proteinase)、ネオプテリン (neopterin)、腫瘍関連トリプシン抑制剤 (tumor-associated trypsin inhibitor) よりなる群から選択されたものであることを特徴とするキット。

【請求項 80】

請求項 42 に記載のキットであって、更に、女性の血清中の第 2 卵巣癌マーカーの存在を査定する試薬を含んで構成されることを特徴とするキット。

【請求項 81】

請求項 80 に記載のキットであって、前記第 2 卵巣癌マーカーは C A 1 2 5、癌性胎児抗原 (carcinoembryonic antigen)、血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor)、腫瘍関連トリプシン抑制剤 (tumor-associated trypsin inhibitor)、C D 4 4 スプライス変形体 (splice variants)、抗マリグニン抗体 (anti-malignin antibody)、乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase)、アルファーヒドロキシ酪酸脱水素酵素 (alpha-hydroxybutyrate dehydrogenase)、C A 1 9 - 9、組織ポリペプチド抗原 (tissue polypeptide antigen)、及びシアリル T N よりなる群から選択されたものであることを特徴とするキット。

【請求項 82】

請求項 81 に記載のキットであって、前記第 2 の卵巣癌マーカーは C A 1 2 5 であることを特徴とするキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

卵巣癌査定のための尿のメソセリン / 巨核球可能化因子関連ペプチド (mesothelin/megakaryocyte potentiating factor family peptide) の検出。

【背景技術】

【0002】

本発明は、一般的に女性の卵巣癌の診断に関するものである。

【0003】

卵巣癌は米国における女性の癌死亡の主要な原因のひとつである。卵巣癌患者の間で死亡率が比較的高い理由のひとつは、この疾病が進行した状態になるまでしばしばそうと診断されないことにある。

【0004】

卵巣腫瘍は腫瘍が発生した細胞のタイプ、腫瘍細胞の形態学、および腫瘍の進行段階によって分類できる。

【0005】

卵巣腫瘍は次の 3 つの卵巣細胞のタイプのいずれからでも - 上皮細胞、生殖細胞、間質細胞のいずれからでも起こりうる。上皮卵巣腫瘍 (E O T s) は全卵巣腫瘍の 85 % 以上を占める卵巣腫瘍の最も一般的なタイプである。E O T s は卵巣の外側表面を覆う上皮細胞から発生する。ある種の E O T s は良性で医学的損傷は比較的に殆どない。併し悪性の E O T s は無制御に成長し近くの細胞を侵し又は離れた身体部分に転移する。生殖細胞卵巣

10

20

30

40

50

腫瘍は卵子生産細胞から発生し、やはり良性のものと悪性のものがある。間質卵巢腫瘍は卵巢結合組織細胞から発生するが比較的まれである。

【 0 0 0 6 】

E O T s は上皮卵巢腫瘍を構成する細胞の種類によってさらに特徴づけられている。確認されている細胞の種類としては血清、粘液嚢胞、子宮内膜、および明細胞がある。ある種の E O T s はこれらの細胞種のなかで明確に区別できないものがあり、これらの区別できない E O T s が明確に区別できる E O T s の種類よりもより早く成長し蔓延する傾向がある。

【 0 0 0 7 】

E O T s はまた等級と段階によっても分類される。腫瘍の等級はその肉眼で見える外観を著すものである。等級 1 腫瘍は、通常の卵巢組織に近似する傾向を有し、比較的良好的な予後診断がなされる傾向を有している。等級 3 腫瘍は異常な外観を有する傾向があり、普通、悪い予後診断がなされる。等級 2 の腫瘍は等級 1 と等級 3 の中間である。腫瘍の段階とは腫瘍がその元の状態から広がった度合い又は範囲を示すものである。段階 1 の卵巢腫瘍は 1 つ又は両方の卵巢に限られる。段階 1 の中での等級づけとしては、1 つの卵巢内部に限られる腫瘍 (段階 1 A) , 両卵巢内部にかざられる腫瘍 (段階 1 B) , 1 つ又は両卵巢の表面に現れ、破裂したカプセルを有する 1 つまたはそれ以上の卵巢の状態、或いは腹水に存在する腫瘍細胞又は腹膜洗浄で検出された腫瘍細胞と関連する腫瘍 (段階 1 C) であらわされる。段階 2 卵巢腫瘍は卵巢をこえて骨盤内に広がったものである。段階 2 内の等級づけとしては、子宮や卵管の 1 つ又は両方に広がった腫瘍を段階 2 A とあらし、他の骨盤臓器に広がるか、腹水に存在するか腹膜洗浄で検出された腫瘍細胞と関連した腫瘍を段階 2 B としてあらし。段階 3 卵巢腫瘍は骨盤をこえてリンパ節にひろがるか骨盤、リンパ節両方にひろがったものである。段階 4 卵巢腫瘍は腹膜腔をこえた臓器に広がったものである。

【 0 0 0 8 】

卵巢腫瘍の早期診断は腫瘍の効果的治療のためにも患者の生存を伸ばすためにも重要である。卵巢癌の早期診断はこの疾病が進んだ状況に進行するまで目に見える兆候が殆どないという事実から判りにくいものである。卵巢腫瘍のための現存する診断テストには、効果的治療を与えるのに十分なほど早期な段階の卵巢癌を検出するのにあまねく成功しているといえるものはない。現存するテストが十分早期の卵巢癌を検出しない理由は完全には判っていない。例えば、いくつかのテストは腫瘍細胞から放出されるマーカーに依存しているが、その放出レベルは腫瘍の大きさが比較的大きく成長するまでは検出したと信頼するにはあまりにも低いレベルなのである。

【 0 0 0 9 】

人々によって卵巢癌診断に用いられたマーカーには C A 1 2 5 (ハリラほか、1987、Br. J. キャンサー、56(2):153-156 (Halila et al., Br. J. Cancer 56(2):153-156))、癌性胎児抗原 (carcinoembryonic antigen) (C E A ; ジュエイほか、1997、ジネコルオンコル 67(3):259-271 (CEA; Juweid et al., 1997 Gynecol. Oncol. 67(3):259-271))、血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor) (V E G F ; キャンディド レイスほか、2002、ジネコルオプステット インベスト 54(3):132-136 (VEGF; Candido Dos Reis et al., Gynecol. Obstet. Invest. 54(3):132-136)、尿ゴナドトロピンペプチド (urinary gonadotropin) (U G P ; シュッターほか、アンチキャンサー レス 19(6C):5551-5557 (UGP; Schutter et al., 1999, Anticancer Res. 19(6C):5551-5557))、ネオプテリン (neopterin), ザルカほか、1988、アクタチアヒュング 29(4):359-364 (Szarka et al., 1988, Acta Chir. Hung. 29(4):359-364))、C D 4 4 スプライスヴァリアント (splice variants) (ウールスタイドほか、1995、オンコロジー 52(5):400-406 (Uhl-Steidl et al., 1995, Oncology 52(5):400-406))、尿システインプロテナーゼ (urinary cysteine proteinase) (U C P ; ガオほか、1996、ヒュアキイケダク エケバオ 27(3):291-294 (UCP; Gao et al., 1996, Hua Xi Yi Ke Da Xue

10

20

30

40

50

Xue Bao 27(3):291-294)), 抗マリグニン抗体(anti-malignin antibody) (ボゴッホほか 1991、ランセット337:927) (Bogoch et al., Lancet 337:927)), 腫瘍関連トリプシン抑制剤(tumor-associated trypsin inhibitor) (TATI; メドルほか、1995、Br. J. キャンサー、71(5):1051-1054 (TATI; Medl et al., 1995, Br. J. Cancer 71(5):1051-1054)); ハリラほか、1988、Br. J. キャンサー、57(3):304-307 (Halia et al., 1988, Br. J. Cancer 57(3)304-307)). クドーほか(1999、ジネコルオプステットインベスト47(1):52-57 (Kudoh et al., Gynecol. Obstet. Invest 47(1);52-57))は、乳酸脱水素酵素(lactate dehydrogenase) (LDH)、アルファ-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素(alpha-hydroxybutyrate dehydrogenase) (AHBDH)、CA19-9, 組織ポリペプチド抗原(tissue polypeptide antigen) (TPA), シアリルTN (STN) を含むいくつかの他のEOTs用血清マーカーの有用性を比較した。この段落にあげられたマーカーはどれも卵巣癌患者それぞれに異常量で存在しているわけではない。

【0010】

メソセリンは少なくとも中皮細胞、中皮腫、いくつかの扁平上皮癌、及び卵巣癌の表面に発現されたタンパク質である(チャングほか、1996、プロック・ナショナル・アカデミ・サイエンス・USA 93:136-140 (Chang et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:136-140))。メソセリンは文献に記載されている(例えば、米国特許第6,083,502号)。メソセリンと結合する抗体についても記載されている。例えば、K1と称される単クローン性の抗体が米国特許第5,320,956に記載されており、受入番号HB10570としてアメリカ基準培養物収集展示場(American Type Culture Collection) (ATCC; 10801大学通り; マナサス、バージニア20110-2209; USA)に他の人によって預託されたハイブリドーマによって分泌される。抗体K1は卵巣癌や他の細胞の表面に見出される約40キロダルトンのタンパク質と結合することが判明されている(チャングほか、1996、プロック・ナショナル・アカデミ・サイエンス・USA 93:136-140 (Chung et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(1):136-140))。メソセリンと呼ばれるそのタンパク質はより大きな(約69キロダルトン)前駆タンパク質から得られ、その配列は図1に示されている。ショラーら(1999、プロック・ナショナル・アカデミ・サイエンス・USA 96(20):11531-11536 (Scholler et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96(20):11531-11536))は、メソセリン(methothelin)や巨核球可能化因子(megakaryocyte potentiating factor) (MPF)のアミノ末端配列に高度に類似するアミノ酸配列を有する抗原が卵巣癌にかかった多くの患者の血清中に発生することを確認した。ショラーは、この抗原が卵巣癌の診断のための有用な血清マーカーたりうると提案している。

【0011】

有用な診断テストというものは患者のなかの卵巣癌の存在を検出できることだけであってはならず、それがまた安価、非侵襲的で使いやすいものであることが望ましい。テスト用基質として血液や血清を用いる診断テストは審査される患者から血液を抜き取らねばならず、時として抜き取った血液サンプルは更に分離、精製、または他の処理を必要とする。血液の抜き取りは訓練されたヘルスケア従事者によってなされねばならず、患者にとっては苦痛の多い侵襲的なもので、血液サンプルの貯蔵と輸送のための専門設備と試薬が必要で血液からの病原体の伝染の危険を有している。それに較べ、尿サンプルは殆ど又は全く専門的な設備を要せずに収集でき、ヘルスケア従事者によるしっかりした監視を必要とせず、患者の通常の生理上のプロセスの一部としてつくることができ、一般に伝染病の重要な原因とはならない。これらの理由から、テスト用基質として尿サンプルを用いた診断テストは血液サンプルで行われる同等のテストより好ましい。

【0012】

本発明は、尿サンプルを使って実行でき、疾病進行の早期段階での卵巣癌検出に用い得る卵巣癌診断テストを提供する。

【発明の開示】

10

20

30

40

50

【 0 0 1 3 】

本発明は女性における卵巣癌（即ち、上皮、間質、生殖細胞卵巣癌の1つ又はそれ以上）の診断方法に関する。その方法は女性から採取した尿素中のメソセリン及び/又は巨核球可能化因子族（MMPFF）ペプチド(mesothelin/megakaryocyte potentiating factor family peptide)の発生を査定することを含んで構成されていることを特徴とする。尿中のMMPFFペプチドの発生はその女性が卵巣癌にかかっていることを示している。

【 0 0 1 4 】

1つの実施形態においては特異的にMMPFFペプチドと結合する第1抗体と尿（又は遠心分離した尿）を接触させることによって女性の尿のなかのMMPFFペプチドを査定する。MMPFFペプチドがこの第1抗体と結合したかを査定することによって女性の尿のなかのMMPFFペプチドの存在を査定することが出来る。例えば、ロボット装置で自動分析するのに適した型のプラスチックのマルチウエルプレートのような基板に第1抗体を結合させることが出来る。MMPFFペプチドと第1抗体の結合は、例えば第1抗体と、特異的にMMPFFペプチドと結合する第2抗体を接触させ、第1と第2の抗体が共局在しているかを査定することによって評価できる。第2抗体は酵素、放射性核種、発蛍光団、及び発色団からなる群から選定された化合物などで検出可能に標識することが出来る。

10

【 0 0 1 5 】

例として、この方法は結合している抗MMPFFペプチド捕獲抗体を有するプレートと女性から採取した尿とを接触させることを含む。尿は10分又は1時間などの時間プレートで任意でインキュベートすることが出来る。そのプレートは次いで、捕獲抗体が結合するよりも強くMMPFFペプチドのエピトープと結合するビオチン化した第2抗体と接触することができる。ストレプトアビジン(streptavidin)結合酵素はビオチン化した抗体と結合して発色性基質（例えば西洋わさびペルオキシダーゼ(horseradish peroxidase)の発色性基質である3、3'、5、5'-テトラメチルベンジジン）の存在のもとに該抗体の検出を可能にする。勿論、第2抗体はそれに代えて蛍光標識、放射標識、または他の方法で検出できるように標識することが出来る。

20

【 0 0 1 6 】

卵巣癌を診断するための方法についての他の実施形態において、第1の抗体と尿を接触させた後に、第1の抗体とその標識リガンドとを接触させる。尿と接触した第1抗体と結合する標識リガンドの量と、尿と接触しなかった第1抗体の相当量と結合する標識リガンドの量を比較することによって尿からどのくらいの量のMMPFFが第1抗体と結合したかを査定することが出来る。

30

【 0 0 1 7 】

ここに記載されるキットと方法が自然に発生するMMPFFペプチド（即ちメソセリンと卵巣癌患者の体から自然に造りだされるようなタンパク質の部分のような両全長タンパク質）と合成的に造られたMMPFFペプチドを含む種々のMMPFFペプチドを検出するのに用いることができる。MMPFFペプチドのアミノ酸配列は、配列ID番号1から5よりなる群から選択された1つの配列の少なくとも10（20、50、又は200）の連続する残基から構成されていることを特徴としている。その代わりに、MMPFFペプチドは少なくとも20の連続アミノ酸残基の部分から構成され、その部分のアミノ酸配列は、配列ID番号1から5よりなる群から選択された1つの配列の20の連続する残基と少なくとも90%（又は95%）同じであることを特徴としている。

40

【 0 0 1 8 】

ここに開示されたキットと方法は、他の卵巣癌マーカーの発生（尿または血清中での）の査定のための既知またはこれから開発されるキットや方法とともに用いることが出来る。例をあげれば、尿に発生することが知られている卵巣癌のマーカーは尿ゴナドトロピンペプチド(urinary gonadotropin peptide)、システインプロテイナーゼ(cysteine proteinase)、ネオプテリン(neopterin)、腫瘍関連トリプシン抑制剤(tumor-associated trypsin inhibitor)である。既知の血清卵巣癌マーカーにはCA125、癌性胎児抗原、血管内

50

皮成長因子 (vascular endothelial growth factor)、腫瘍関連トリプシン抑制剤 (tumor-associated trypsin inhibitor)、C D 4 4 スプライス変形体 (splice variants)、抗マリグニン抗体 (anti-malignin antibody)、乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase)、アルファ-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素 (alpha-hydroxybutyrate dehydrogenase)、C A 1 9 - 9、組織ポリペプチド抗原 (tissue polypeptide antigen)、及びシアリル T N があげられる。C A 1 2 5 は卵巣癌の発生、進行のための代理マーカーとして知られている。女性の尿中の M M P F F ペプチドの発生の査定は女性の血清中の M M P F F ペプチドの査定と関連して同様に行うことが出来る。

【 0 0 1 9 】

殆ど同じキットと方法が女性の卵巣癌にかかっている可能性を査定するのに用いられる。即ち、採取された尿の中に M M P F F ペプチドが発生している女性は、他の点では同じで且つ尿の中に M M P F F がいない女性よりも卵巣癌にかかっている可能性が高いということを示すものである。

10

【 0 0 2 0 】

殆ど同じキットや方法が女性の卵巣癌の治療の効能を査定するのに用いられる。治療後の女性から採取した尿中の M M P F F ペプチドの量は治療前のその女性の M M P F F の量と比較される。治療後の尿中の M M P F F ペプチドの量が少ないことはその治療の効果があったことを示している。同様に、治療後の尿中の M M P F F ペプチドの量が多いことはその治療の効き目がなかったことを示している。そのようなキットや方法は種々の治療薬や養生法の効能の比較に用いることが出来る。

20

【 0 0 2 1 】

別の観点において、本発明は女性から採取した尿中の M M P F F ペプチドの発生を査定するキットに関するものである。そのキットは M M P F F ペプチドと結合するための第 1 薬剤 (例えば抗体) と、尿と第 1 薬剤との接触を記述する使用説明書とから構成されている。キットの構成は決定的なものではなく E L I S A、ラテックスビーズ凝集体、表面プラズモン共鳴形式のような多くの標準形式を使うことが出来る。そのキットには積極的なコントロールとして用いるための M M P F F ペプチドを含めることが出来る。勿論、そのキットに卵巣癌の他の既知のマーカーを評価するための試薬を含めることが出来る。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 2 】

アミノ酸配列を含んでいるすべての図において、標準単一文字アミノ酸コードはアミノ酸残基を代表するのに用いられる。

30

【 0 0 2 3 】

図 1 はメソセリン前駆タンパク質のアミノ酸配列 (配列 I D 番号 : 1) である。この配列はゲンバンク (登録商標) (GENBANK (登録商標)) 受入番号 2 2 0 7 3 8 6 A にリストされているものと同じで、チャングほか、1 9 9 6、ブロック・ナショナル・アカデミ・サイエンス・U S A 9 3 (1) : 1 3 6 - 1 4 0 (Chung et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(1):136-140) に報告されている。

【 0 0 2 4 】

図 2 は巨核球可能化因子 (megakaryocyte potentiating factor) (M P F) 前駆タンパク質のアミノ酸配列 (配列 I D 番号 : 2) である。この配列はゲンバンク (登録商標) (GENBANK (登録商標)) 受入番号 N P 0 0 5 8 1 4 と同じで、ヤマグチほか、1 9 9 4、J . ビオル . ケミ . 2 6 9 (2) : 8 0 5 - 8 0 8 (Yamaguchi et al, 1994, J. Biol. Chem. 269(2):805-808) に報告されている。

40

【 0 0 2 5 】

図 3 は M P F 前駆タンパク質の可溶性変形型で部分アミノ酸配列 (配列 I D 番号 : 3) でゲンバンク (登録商標) (GENBANK (登録商標)) 受入番号 A F 1 8 0 9 5 1 にリストされショラーら 1 9 9 9、ブロック・ナショナル・アカデミ・サイエンス・U S A 9 6 (2 0) : 1 1 5 3 1 - 1 1 5 3 6 (Scholler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96(20):11531-11536) に報告されている。

50

【 0 0 2 6 】

図 4 A および 4 B からなる図 4 は配列 I D 番号 1 の残基 2 9 4 - 6 2 8 と配列 I D 番号 2 のほぼ同じ部分との比較である。残基の数が右の余白に表記されている。「M S T」はメソセリンを意味する。「M P F」は巨核球可能化因子(megakaryocyte potentiating factor)を意味する。この配列において、同じアミノ酸残基は垂直線で示され、同類アミノ酸置換はクロス(+)で示され、ダッシュ(-)は配列を合わせるために配列 I D 番号 2 に挿入した隙間を意味している。

【 0 0 2 7 】

図 5 A および 5 B からなる図 5 は配列 I D 番号 1 から 3 の同じ部分の比較である。残基の数は右の余白にあげられている。「M S T」はメソセリンを意味する。「M P F」は巨核球可能化因子(megakaryocyte potentiating factor)を意味する。「S M R」は M P F の可溶性変形型でその配列は図 3 にあげられている。この配列で、3 つの配列で同じになっている残基は大文字の単一文字コードによって示され、3 つの配列すべてにおいて同一でない残基は小文字の単一文字コードによって示され、配列を合わせるために挿入した隙間はダッシュ(-)で表されている。

【 0 0 2 8 】

図 6 は、図 6 A および 6 B からなる。図 6 A は、アミノ酸配列(配列 I D 番号 4)でここに記載される抗体の発生に好ましいエピトープを含んでいる。図 6 B は、アミノ酸配列(配列 I D 番号 5)でここに記載される抗体の発生に好ましいエピトープを含んでいる。配列 I D 番号 4 及び 5 のそれぞれにおいて、下線を引いた太字の X は何らかのアミノ酸残基を示し、アスパラギン酸塩またはアスパラギンのいずれかであることが好ましい。図 6 A においてその他の下線を引いた太字の残基は図 6 B に示される配列には存在しない残基を示している。

【 0 0 2 9 】

図 7 は、C A 1 2 5 I I 抗体の血清レベル(左から右に斜め下に伸びる線条のある棒)と M M P F F ペプチドの尿レベル(左から右に斜め上に伸びる線条のある棒)を示す棒グラフで、ここに開示されたように査定されたものである。査定は 1 から 4 として示されている 4 人の患者について卵巣癌診断時(a)と手術着手から約 1 ヶ月後(b)の両方で行われた。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 3 0 】

本発明はメソセリン(mesothelin)、巨核球可能化因子(megakaryocyte potentiating factor)(M P F)、及び M P F の可溶性変形物を含むタンパク質族と類似な重要なアミノ酸配列を有する 1 つ又はそれ以上のポリペプチドが卵巣癌にかかっている女性の尿の中に存在しているという発見に関係している。これらの尿ポリペプチドはその族のタンパク質に対して産生される抗体と特異的に結合する。患者の尿中にこれらのポリペプチドが存在しているということはその患者が卵巣癌にかかっているという診断である。ポリペプチドの量は卵巣癌の効果的な治療によって減少する。このように、尿ポリペプチドは抗卵巣癌治療の効果を査定するのにも用いられる。

【 0 0 3 1 】

定義

【 0 0 3 2 】

ここに用いられるように、次の用語の各々はこの章内でそれと関連する意味を有している。

【 0 0 3 3 】

メソセリン/巨核球可能化因子族ペプチド(mesothelin/megakaryocyte potentiating factor family peptide)(M M P F F ペプチド)は(i)配列 I D 番号 1 から 5 よりなる群から選択された 1 つの配列の少なくとも 1 0 の連続的な残基からなるか、(ii)少なくとも 2 0 の連続アミノ酸残基の一部からなり、その部分のアミノ酸配列は配列 I D 番号 1 から 5 よりなる群から選択された 1 つの配列の 2 0 の連続残基と少なくとも 9 0 % (好ましく

10

20

30

40

50

は少なくとも95%又は100%)同一であるかのいずれかのアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

【0034】

「抗体」というのは集合的にまた個別に免疫性グロブリン分子、免疫性グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、即ち特異的にMMPFFペプチドと結合する抗原結合部位を含む分子に対して集合的及び個別に当てはまるものである。特異的にMMPFFペプチドと結合する分子はそのペプチドと結合するが、そのポリペプチドを天然に含んでいる試料(例えば尿サンプル)のなかの他の分子とは殆ど結合しない分子である。免疫性グロブリン分子の免疫学的活性部分の例には、抗体がそれぞれパイン又はペプシンのような酵素で処理されることによって発生できるF(ab)とF(ab')2フラグメントが含まれている。ポリクローナルおよびモノクローナルの一方又は両方の抗体がここに記載される方法とキットに用いられる。

10

【0035】

「モノクローナル抗体」という語は特定のエピトープと免疫学的に反応することのできる抗原結合部位の一種のみを含む抗体分子の集団をいう。

【0036】

「標識した」という語は抗体またはペプチドに関するもので、検出可能物質をペプチド又は抗体にカップリング(即ち物理的に結合する)することによって直接ペプチド又は抗体を標識することと、ペプチド又は抗体を直接標識されている他の試薬とカップリングすることによってペプチド又は抗体を間接的に標識することを含んでいる。間接標識の例には蛍光標識した二次抗体を用いて、および蛍光標識したストレプトアビジン(streptavidin)で検出できるようペプチドをビオチンで末端標識して、一次抗体を検出することを含んでいる。

20

【0037】

「使用説明書」というのは刊行物、記録、図表、又はここに記載されているキットをどのように使うかを伝達するのに用いることが出来るその他の表現媒体と、卵巣癌に関するものとして尿中のMMPFFの発生を解釈するための情報、またはその両者である。本発明のキットについての使用説明書は例えば本発明のキットを含む容器に添付されるか、キットをいれた容器と一緒に出荷することができる。代わりに、使用説明書は容器と別に出荷することが出来るが意図としては使用説明書とキットを受取人が一緒に使うようにいうことである。

30

【0038】

詳細な記載

【0039】

タンパク質族とかなりのアミノ酸配列類似性を有する1つまたはそれ以上のポリペプチド(メソセリン/巨核球可能化因子族(mesothelin/megakaryocyte potentiating factor family peptide); MMPFF)が卵巣癌にかかった女性の尿に発生する。これらの尿ペプチドは、例えばMMPFFのタンパク質に対抗する抗体で検出される。患者の尿にこのようなペプチドが発生することは、患者が卵巣癌にかかっていることを示すものである。卵巣癌の多様性、個々のなかでの遺伝子的多様性や他の要因により、MMPFFペプチドは卵巣癌にかかった全患者の尿中には現れにくく、殆ど同じ型の卵巣癌にかかった個々に対して異なった量で現れやすいのである。これらの変化を考慮にいれても、女性の尿中のMMPFFペプチドの1つ又はそれ以上の発生があれば、その女性は卵巣癌にかかっていることを示している。

40

【0040】

都合のよいことには、卵巣癌にかかった女性の尿にMMPFFペプチドが発生することは卵巣癌だと判る段階に依存しないようである。そのため、MMPFFペプチドの尿での発生は早期段階での卵巣癌の診断に用いることが出来て、治療が無駄となるか、無駄に近い病状段階に達する前に癌の効果的な治療が可能となるのである。

【0041】

50

ここに開示されたキットと方法の他の利点は卵巣癌患者の尿中のMMPFFペプチドの量と濃度が腫瘍の状態を示すものであることである。そのため、尿MMPFFペプチド発生の査定は卵巣癌の治療のための養生法の効果を査定するのに用いることが出来る。養生で腫瘍の収縮、後退がおこる分だけMMPFFペプチドの尿中濃度が減少することが期待される。同様に、卵巣癌治療の間に尿中のMMPFFペプチドが徐々にスムーズに増加していることは、治療のための養生が腫瘍の成長を抑制していないことを示している。

【0042】

ここに記載されているキットや方法は種々の卵巣癌型の発生、進行を査定するのに用いることが出来る。ひとつの重要な実施形態では、キットと方法が最も普通の卵巣癌のなかの上皮卵巣癌の発生または進行を査定するのに用いられる。その他の実施形態では、このキットや方法は間質卵巣腫瘍や生殖細胞卵巣腫瘍の発生や進行を査定するのに用いられる。

10

【0043】

診断方法

【0044】

本発明は女性の卵巣癌の診断方法を含むものである。その方法は女性から採取した尿のなかのメソセリン/巨核球可能化因子族(mesothelin/megakaryocyte potentiating factor family peptide) (MMPFF) ペプチドの発生を査定することを含んで構成されることを特徴としている。尿中のMMPFFペプチドの発生は女性が卵巣癌にかかったことを示唆するものである。種々の型の卵巣癌(例えば上皮卵巣癌)、程度、段階がこの方法を用いて診断される。この方法はまた種々の細胞の型(例えば血清細胞、粘液細胞、子宮細胞、明細胞、及び区別できない卵巣腫瘍)によって特徴づけられる卵巣癌の診断に用いることが出来る。

20

【0045】

女性の尿中のMMPFFペプチドの発生を査定するのに用いられるこの方法は決定的なものではない。どんな方法でもペプチドの有無を査定するのに用いられればその方法でよいのである。尿中のMMPFFペプチドの量(例えば濃度)を査定できる方法がいくつかの実施形態では好ましく、特に、比較のために時間の経過とともになされる査定の場合に好ましい(例えば、抗癌治療の養生効果の査定の場合)。

【0046】

ひとつの実施形態において、患者の尿中でのMMPFFペプチドの存在が、特異的にMMPFFペプチドと結合する抗体と尿の接触により、そしてMMPFFペプチドが第1抗体と結合したかを査定することによって査定される。

30

【0047】

この分野では多くのMMPFF結合抗体が知られている。例えば米国特許第5,320,956に記載され、受入番号HB10570としてATCCに預託されたハイブリドーマによって分泌される抗体を使うことが出来る。その抗体はチャングほか(1996、ブロック・ナショナル・アカデミ・サイエンス・USA93:136-140(Chung et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(1):136-140)に記載のように、特異的にメソセリンタンパク質の約40キログルトン部と結合する。他の好適な抗体についてはショラーほか(1999、ブロック・ナショナル・アカデミ・サイエンス・USA96(20):11531-11536(Scholler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96(20):11531-11536)及びPCT公報WO00/50900に記載され、そのような抗体はOV569, 4H3, 3G3, 及び1A6と呼ばれている。

40

【0048】

2つの抗MMPFFペプチド抗体を用いる診断用キットと方法において、2つの抗体は同じエピトープとの結合を競合しないことが好ましい。例を挙げれば、ショラーほかによってOV569と呼ばれる抗体は4H3, 3G3, 及び1A6と呼ばれる抗体に結合されたエピトープと異なるエピトープの所で結合する。このように、例えばOV569を基質と結合させて患者の尿中に存在するMMPFFペプチドと適当な抗体結合条件のもとで結合する捕獲抗体として用いることが出来、抗体4H3, 3G3, 及び1A6のひとつを検出

50

可能に標識して、捕獲抗体と患者の尿の接触後、捕獲抗体と接触させることができる。検出可能に標識された抗体と捕獲抗体との結合はMMPFFペプチドが患者の尿に存在していたことを示している。捕獲抗体と共存している検出可能な標識の量の分析から存在していたペプチドの量を示すことができる。

【0049】

ここに記載されているように、MMPFFペプチドの幾つかの部分は重要なアミノ酸配列相同を共有している。図1から3は少なくとも3つのMMPFFタンパク質のアミノ酸配列の少なくともある部分を示している。図4と5はこれらの配列の直線性を示し、これらのタンパク質のなかの最大配列相同の領域を示している。これらの図から、図6Aおよび6B(それぞれ配列ID番号4と5)に示される配列がMMPFFペプチドの有用な部分をあらわしている。これらの配列のいずれかの全部分又は一部分(例えば、10、20、50、又は200の連続残基)に対抗する抗体は特に卵巣癌患者の尿中に発生するものを含むMMPFFペプチドの広い範囲と結合することが期待される。

10

【0050】

MMPFF(例えばここに記載されたもの又は従来技術の中に記載されているもの)又はその一部が多クローン及び単クローン抗体作製のための標準技術を用いて抗体を発生させるための免疫抗原として用いることができる。全長MMPFFの断片は免疫抗原として用いられる場合には配列ID番号1から5までのいずれかのアミノ酸配列か他のMMPFFメンバーのアミノ酸配列の少なくとも10のアミノ酸残基(好ましくは12、15、20、50、100か200またはそれ以上)からなることが望ましい。

20

【0051】

ここに記載されたキットと方法に有用な抗体の発生に適切なMMPFFペプチドは、配列ID番号1から5よりなる群から選択された1つの配列の20の連続する残基と少なくとも90%(好ましくは少なくとも95%或いは100%)は同一である少なくとも20の連続したアミノ酸残基の部分から構成されているものである。

【0052】

抗体発生方法は既知でありここに簡単に要約のみを記載する。一般に免疫抗原はウサギ、ヤギ、ねずみ、その他の哺乳動物又は脊椎動物のような適当な対象(即ち免疫担当)を免疫化することによって抗体を作製するのに用いられる。好適な免疫抗原作製には例えば遺伝子組み換えと表現された、又は化学的に合成されたポリペプチドを含めることができる。その作製は更にフロインドの完全又は不完全補助薬又は同じ免疫活性化試薬のような補助薬を含めることができる。

30

【0053】

多クローン抗体は免疫抗原として本発明のポリペプチドを用いて適当な対象を免疫化することによって上述のように作製することができる。免疫化した対象中の抗体タイターは固定したポリペプチドを用いた酵素結合免疫吸着剤査定法(ELISA)のような標準技法によって時間の経過とともに監視することが出来る。望むなら、抗体分子はその対象から収穫され又は分離され(例えば、対象の血液、血清から)、タンパク質Aクロマトグラフィーのような既知の技法によって精製されIgG留分を得ることができる。

【0054】

免疫化後適切なきに、例えば、特定の抗体タイターが最高のとき、抗体生産細胞を対象から収穫し、元来はコーラーとミルスタイン(1975)ネイチャー256:495-497(Kohler and Milstein (1975) Nature 256:495-497)に記載されたハイブリドーマ技法、人のB細胞ハイブリドーマ技法(コツボーほか(1983)イムノル・トゥデイ4:72(Kozbor et al., (1983) Immunol. Today 4:72)、EBVハイブリドーマ技法(コールほか(1985)モノクロナル アンチボディ アンド キャンサーセラピー、アランR.リス、インクpp77-96(Cole et al., 81985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96)又はトリオーマ技法のような標準技法によって単クローン抗体を作製するのに用いることができる。ハイブリドーマを生産する技術はよく知られている(カレント プロトコル イン イムノロジー(1994)コ

40

50

リガンほか (Eds.) ジョン ウイリー & サン、インク .、ニューヨーク、NY (Current Protocols in Immunology (1994) Coligan et al., (Eds.) John Wiley & Sons, Inc., New York, NY). 本発明の単クローン抗体を生産するハイブリドーマ細胞は、問題のポリペプチドと結合する抗体用ハイブリドーマ培養菌の上澄みを、例えば標準 E L I S A 査定を用いて、スクリーニングすることによって検出される。

【 0 0 5 5 】

単クローン抗体分泌ハイブリドーマの作製の代わりに、本発明のポリペプチドに対抗する単クローン抗体は組み換え組み合わせ免疫性グロブリンライブラリー (例えば抗体ファージ展示ライブラリー) を問題のポリペプチドでスクリーニングすることで同定され分離される。ファージ展示ライブラリーを発生させスクリーニングするためのキットは市販で入手可能である。(例えば、ファーマシア リコンビナント ファージ アンチボディ システムのカタログ番号 27-9400-01 (Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, Catalog No. 27-9400-01); とストラータジーン S U R F Z A P ^{T M} ファージディスプレイキット カタログ番号 240612 (Stratagene SURFZAPTM Phage Display Kit, Catalog No. 240612)。また、特に、抗体展示ライブラリーを発生、スクリーニングする用途に適用できる方法や試薬の例は、例えば、米国特許番号 5, 223, 409、PCT 公報番号 WO 92/18619, PCT 公報番号 WO 91/17271, PCT 公報番号 WO 92/20791, PCT 公報番号 WO 92/15679, PCT 公報番号 WO 93/01288, PCT 公報番号 WO 92/01047, PCT 公報番号 WO 92/09690, PCT 公報番号 WO 90/02809, フックスほか、(1991) バイオ/テクノロジ 9:1370-1372 (Fucks et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372); ヘイほかフム . アンチボド . ハイブリドマス 3:81-85 (Hay et al. (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85); フュースほか (1989) サイエンス 246:1275-1281 (Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281); グリフィスほか (1993) E M B O J . 12:725-734 (Griffiths et al. (1993) EMBO J. 12:725-734)。

【 0 0 5 6 】

人間的な部分と非人間的な部分の両方からなる標準的な組み換え DNA 技法を用いた空想的且つ人間的単クローン抗体組み換え抗体は本発明の範囲内にあるものである。そのような空想的且つ人間的単クローン抗体はこの分野で既知の組み換え DNA 技法によって造られるが、PCT 公報番号 WO 87/02671; ヨーロッパ特許番号 184, 187; ヨーロッパ特許番号 171, 496; ヨーロッパ特許番号 173, 494; PCT 公報番号 WO 86/01533; 米国特許番号 4, 816, 567; ヨーロッパ特許番号 125, 023; ベターほか . (1988) サイエンス 240; 1041-1043 (Better et al. (1988) Science 240:1041-1043); リューほか . (1987) プロック . ナット . アカド . サイエンス . U S A 84:3439-3443 (Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443); リューほか . (1987) J . イムノル . 39:3521-3526 (Liu et al. (1987) J. Immunol. 139:3521-3526); サンほか . (1987) プロック . ナット . アカド . サイエンス . U S A 84:214-218 (Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218); ニシムラほか . (1987) キャンサーレス . 47:999-1005 (Nishimura et al. (1987) Cancer Res. 47:999-1005); ウッドほか . (1985) ネイチャー 314:446-449 (Wood et al. (1985) Nature 314:446-449); ショウほか . (1988) J . ナット . キャンサーインスト . 80:1553-1559 (Shaw et al. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559); モリソン (1985) サイエンス 229:1202-1207 (Morrison (1985) Science 229:1202-1207); オーイほか . (1986) バイオ/テクニク 4:214 (Oi et al. (1986) Bio/Techniques 4:214); 米国特許番号 5, 225, 539; ジョンほか . (1986) ネイチャー 321:552-525 (Jones et al. (1986) Nature 321:552-525); パーホーヤン (1988) サイエンス 239:1534 (Verhoeyan et al. (1988) Science 239:1534); バイドラほか . (1988) J . イムノル . 141:4053-4060 (Beidler et al. (1988) J. Immunol. 141:4053-4060)。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 7 】

抗MMPFFペプチド抗体を患者から採取した尿と接触させる実施形態において、尿はその自然に分泌された状態で用いられるか使用前に部分的に精製するか浄化することが出来る。例えば、尿は標準の方法を用いて遠心分離され、その尿を抗体と接触させる前に沈殿物を実質上除いてもよい。代わりに、尿はその量を減らすか大きな不純物を除くために濾過または限外濾過してもよい。尿中に存在するMMPFFペプチドは10,000から100,000ダルトンの範囲の分子量をもつポリペプチドであると思われるので、MMPFFペプチドが検出前に除かれてしまうのを防ぐために適切な濾過又は限外濾過の選定が必要である。例をあげれば、比較的大きな孔のフィルター（例えば、250,000から百万ダルトンの分子量を有する球状粒子の通過を許す様なもの）が尿から粒状物質を除くのに用いることが出来て、約5000ダルトンよりも大きな分子量をもつタンパク質の通過を除外するような膜を装備した限外濾過装置が濾液を濃縮するのに用いることが出来る。この実施例では、限外濾過装置のなかの残留物のなかのMMPFFの存在を査定できる。

10

【 0 0 5 8 】

MMPFFペプチドは卵巣癌患者の尿中に比較的多量に存在することが多く、ここに記載された多くの方法（例えば免疫学的方法）は比較的感受性がよいので、通常卵巣癌患者の尿中のMMPFFペプチドの発生を検出するのに尿の濃縮は必要としない。尿の浄化が必要とされる場合、遠心分離が好ましい。何故なら、限外濾過を使えば尿中に存在するMMPFFペプチドが濾過媒体と結合したり絡まったりする可能性がないからである。

20

【 0 0 5 9 】

女性の尿中のMMPFFペプチドの存在を査定する1つの好ましい方法は通常[サンドイッチELISA]アッセイとして知られる処理法である（ELISAは酵素免疫測定法の略称である）。この方法では、抗体はガラスビーズやプラスチックのマルチウエルアッセイプレートの底面のような基質に結合される。この抗体は「捕獲」抗体と呼ばれる。尿中に存在するいかなるMMPFFペプチドも特異的に捕獲抗体と結合するように、女性からの未処理の、或いは浄化したり精製した尿を、種々の条件のもと（例えば、塩および洗浄剤の濃度が低くタンパク質変性でない条件）で基質と接触させる。基質は任意にはMMPFFペプチドを含まない液体で洗浄して残りの尿及び結合していないMMPFFを除く。次いで基質は捕獲抗体が結合しているエピトープの所と異なるエピトープの所でMMPFFペプチドと特異的に結合する第2抗体と接触させる。第2抗体はリガンド又はリガンドの受容体のいずれかと検出可能に標識されるか結合する。どちらにせよ、基質を第2抗体を含まない液体で洗浄した後に第2抗体の結合が検出され（かつ任意で定量され）る。第2抗体の検出はMMPFFペプチドの尿中での存在を示している。第2抗体の量が定量されれば、次いで尿中のMMPFFペプチドの量が定量できる。例えば、既知量のMMPFFを含む対照試料を用いて行った測定で検出した第2抗体の量を比較することによって定量できる。

30

【 0 0 6 0 】

抗体検出は抗体を検出可能物質とカップリングすることによって容易にすることができる。検出可能な物質の例には種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、及び放射性物質がある。好適な酵素の例には西洋わさびペルオキシダーゼ（horseradish peroxidase）、アルカリホスファターゼ（alkaline phosphatase）、ベータガラクトシダーゼ（beta-galactosidase）、又はアセチルコリンエステラーゼ（acetylcholinesterase）を含み、好適な補欠分子族複合体の例はストレプトアビジン/ビオチン（streptavidin/biotin）とアビジン/ビオチン（avidin/biotin）を含み、好適な蛍光物質の例はウンベリフェロン（umbelliferone）、フルオレセイン（fluorescein）、フルオレセインイソチオシアネート（fluorescein isothiocyanate）、ローダミン（rhodamine）、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセン（dichlorotriazinylamine fluorescein）、塩化ダンシル（dansyl chloride）又はフィコエリトリン（phycoerythrin）を含み、発光物質の例はルミノール（luminol）を含み、生体発光性物質の例はルシフェラーゼ（luciferase）、ルシフェリン（luciferin）、及

40

50

びエクオリン(aequorin)で、好適な放射性物質の例は ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、又は ^3H を含む。

【0061】

標準化したアッセイ装置を使用することでここに記載された方法の自動化ができるようになる。例えば、24、48、96、384のウェルのあるプラスチックプレートのような多くの異なった標準化したアッセイ用容器が知られている。これらの容器をロボット装置に収容されるように適合させた場合、試料の自動分析が達成でき、比較的短い時間で多くの試料を高処理量でスクリーニングできる。コンピュータ制御アッセイに使用するように適合した自動アッセイ装置と容器はこの分野で既知でありここに記載されたキットや方法に容易に適合されている。

10

【0062】

女性から採取された尿中のMMPFFペプチドの存在を査定するのに用いることの出来る免疫学的アッセイについての他のタイプは普通「競合」アッセイと呼ばれる。このアッセイでは、特異的にMMPFFペプチドと結合する抗体が基質に固定される。尿中に存在するいかなるMMPFFペプチドも抗体と結合するように、未処理の尿、浄化又は精製された尿を（好ましくは数分又は数時間の間）基質に接触させる。特異的に抗体と結合する標識リガンド（例えば、同じMMPFFペプチド又は別のMMPFFペプチドの標識されたもの）が次いで基質と接触される（好ましくは数分又は数時間の間）。標識または標識リガンドを含まない液体で基質を洗浄した後、基質と結合した標識リガンドの量が査定される。基質と結合した標識の量が、患者の尿とは接触していないが他の点では同様に処理された基質に結合した標識の量と比較される。結合した標識のこの2つの量の差が基質に結合したMMPFFペプチドの量を示すものであり、基質に適用された尿サンプル中に存在したMMPFFペプチドの量を示唆するものである。

20

【0063】

免疫学的競合アッセイが用いられると、基質と結合した抗体の標識リガンドは患者の尿中に存在していると判っているか又は存在していると思われるMMPFFペプチドと出来るだけ同じでなければならない。例えば、そのリガンドとそのMMPFFペプチドは同じアミノ酸配列を有するか含んでいなければならない。同様に患者の尿中に存在するMMPFFペプチドがグリコシル化されたものと思われる場合、リガンドも同様に同じ位置で同じ程度にグリコシル化されていなければならない。このように、リガンドに対する抗体とMMPFFペプチドに対する抗体の親和性の差は最小にする事が出来て競合アッセイの精度を改善することが出来る。

30

【0064】

ここに記載されるキットや方法は人間の患者の尿のなかにあるMMPFFペプチドの発生の査定のみ用いることが出来るもので、そのような発生が女性が卵巣癌にかかっていることを示すものである。併し、もし卵巣癌の1つ以上のマーカーの発生が女性のなかで査定されれば、多くの卵巣癌が検出できて卵巣癌の診断における大きな確信が得られるのである。その他の卵巣癌マーカーも普通尿のなかで発見されるマーカーでありうるし、通常血液のなかで発見されるマーカーでありうるし、又は尿及び血液の両方で発見されるマーカーでありうる。例をあげれば、MMPFFペプチドは卵巣癌にかかった患者の血清のなかで見つかる（ショラーほか、1999、ブロック・ナショナル・アカデミ・サイエンス・USA 96(20):11531-11536 (Scholler et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96(20):11531-11536))。このように、尿中のMMPFFペプチドの発生の査定用にここに記載されたキットや方法は、血清中の同じ又は別のMMPFFペプチドの検出のためのキットや方法と関連付けて用いることが出来る。

40

【0065】

尿中に発生することが知られている他の卵巣癌マーカーには尿グナドトロピンペプチド(urinary gonadotropin peptide(UGP; シュッターほか、1999、アンチキャンサーレス19(6C):5551-5557 (UGP; Schutter et al., 1999, Anticancer Res. 19(6C):5551-5557)), システインプロテイナーゼ(cysteine proteinase)(UCP; ガオ

50

ほか、1996、ヒュアキイイケダクエクエバオ27(3):291-294(UCP; Gao et al., 1996, Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao 27(3):291-294), ネオプテリン(neopterin)(ザルカほか、1998、アクタチアヒュング29(4):359-364(Szarka et al., 1988, Acta Chir. Hung. 29(4):359-364))及び腫瘍関連トリプシン抑制剤(tumor-associated trypsin inhibitor)(TATI; メドルほか、1995、Br. J. キャンサー、71(5):1051-1054(TATI; Medl et al., 1995, Br. J. Cancer 71(5):1051-1054; ハリラほか、1988、Br. J. キャンサー、57(3):304-307(Halia et al., 1988, Br. J. Cancer 57(3)304-307))がある。

【0066】

血清中に発生することが知られている他の卵巣癌マーカーにはCA125(ハリラほか、1987、Br. J. キャンサー、56(2):153-156(Halila et al., Br. J. Cancer 56(2):153-156)), 癌性胎児抗原(carcinoembryonic antigen)(CEA; ジュエイほか、1997、ジネコルオンコル67(3):259-271(Gynecol. Oncol 67(3):259-271)), 血管内皮成長因子(vascular endothelial growth)(VEGF; キャンディド ドス レイスほか、2002、ジネコルオブステットインベスト54(3):132-136(VEGF; Candido Dos Reis et al., Gynecol. Obstet. Invest. 54(3)132-136)、腫瘍関連トリプシン抑制剤(tumor-associated trypsin inhibitor)(TATI; メドルほか、1995、Br. J. キャンサー、71(5):1051-1054(TATI; Medl et al., 1995, Br. J. Cancer 71(5):1051-1054; ハリラほか、1988、Br. J. キャンサー、57(3):304-307(Halia et al., 1988, Br. J. Cancer 57(3)304-307)), CD44 スプライス変形体(CD44 splice variants)(ウールスタイドほか、1995、オンコロジー52(5):400-406(Uhl-Steidl et al., 1995, Oncology 52(5):400-406)), 抗マリグニン抗体(anti-malignin antibody)(ボゴッホほか1991、ランセット337:927(Bogoch et al., Lancet 337:927)), 乳酸脱水素酵素(lactate dehydrogenase)(LDH)、アルファーヒドロキシ酪酸脱水素酵素(alpha-hydroxybutyrate dehydrogenase)(aHBDH)、CA19-9、組織ポリペプチド抗原(tissue polypeptide antigen)(TPA)、シアリルTN(SiTN; クドーほか(1999、ジネコルオブステットインベスト47(1):52-57(Kudoh et al., 1999, Gynecol. Obstet. Invest 47(1):52-57))がある。血液及び又は尿中のこれら既知のマーカーの組み合わせのいずれかを査定するためのキットや方法は、それが少なくとも尿中のMMPFFペプチドの発生を査定するキットや方法であるかぎり本発明に含むものである。

【0067】

女性から採取した尿中のMMPFFペプチドの発生を査定するためのここに記載したキットや方法は、女性が卵巣癌にかかる可能性を査定するのに使うことが出来る。女性の尿中のMMPFFペプチドの発生の検出は他の点では同じであるがその尿のなかにMMPFFが発生していない女性にくらべて一層卵巣癌にかかっているらしいことを示している。卵巣腫瘍、腫瘍成長の早期段階、腫瘍形成の初期、及び卵巣腫瘍形成の可能性の増大、との間の差が殆ど区別できないということは認められていることである。それでもなお、これらの進行各々の結果は女性の健康が傷ついてしまう卵巣腫瘍の展開発展なのである。この理由から、ここに開示されているキットや方法を用いたこれらの段階のいずれかを査定することが有用なのである。

【0068】

抗MMPFFペプチド抗体は臨床テストの手順の一部として、例えば、行った卵巣癌治療の養生の効果を測定するために尿中のMMPFFのレベルを診断的に又は予後診断的に監視するのに用いることが出来る。

【0069】

ここに記載されたキットや方法はひとつの薬剤(例えばアゴニスト、アンタゴニスト、ペプチドミメティック、タンパク質、ペプチド、核酸、小さい分子、または他の薬物候補品)は卵巣癌を緩和、抑制、後退、又は予防するために患者に与えることが出来るかどうか

10

20

30

40

50

を決定するために用いることが出来る。例えば、そのような方法は、卵巣癌患者が特定の薬剤、または特定の種類の薬剤を用いれば効果的に治療されるかどうかを決定するのに用いられる。

【0070】

尿MMPFFペプチド発生の査定のためのキット

【0071】

本発明は哺乳類（例えば女性）から採取された尿サンプル中のMMPFFの存在を検出するためのキットも含んでいる。そのキットはMMPFFペプチドと結合する第1の薬剤、そのMMPFFペプチドとその薬剤との結合を査定するための第2の薬剤、尿と第1の薬剤を接触させることを記載した使用説明書を含む。これらのキットは患者が卵巣癌に罹患しているか発症の危険が高まっているかを決定するために用いることが出来る。例えば、キットは尿サンプル中のMMPFFペプチドを検出可能な標識化合物又は薬剤を含むことが出来る。そのキットは又、或いはその代わりに、サンプル中のMMPFFペプチドの量を決定する手段を含むことができる。キットはMMPFFペプチドの量が正常レベル（例えば、実施例1の方法を用いて450ナノメータでの吸光度測定値が少なくとも0.2）の上か下であるとき検査した患者が卵巣癌にかかっているか発症のリスクを負っているかを査定するための説明書を含むものである。

【0072】

抗体をベースにしたキットに関し、そのキットは、例えば、（1）特異的にMMPFFペプチドと結合する第1抗体（例えば、固形支持体に付けられた）とオプションとして、（2）特異的にMMPFFペプチド（例えば、第1抗体が結合しているところのエピトープと別のエピトープのところ）か第1抗体のどちらかと結合し検出可能な薬剤と結合している第2の別の抗体を含むことができる。代わりに、そのキットは第1抗体とその第1抗体の標識リガンドを含むことが出来る。その第1抗体と女性の尿サンプルを接触させた後、標識リガンドと第1抗体の結合がここで記載されたような競合型アッセイで査定することが出来る。

【0073】

そのキットは更に試薬、及び又は、女性の尿又は血清中に女性の卵巣癌の発生を示唆する他のマーカーの発生を査定するための指導書を含んで構成できる。

【0074】

実施例

【0075】

本発明は次の実施例をもとにここに記載される。これらの実施例は説明の目的のためのみ提供するものであって、本発明はこれらの実施例に限定されるものではなく、ここに提供された教示の結果として明らかなすべての変形を含むものである。

【0076】

実施例1

【0077】

試料中のMMPFFを査定するためのサンドウィッチELISA査定

【0078】

尿中のMMPFFを検出するために用いられる代表的査定についてここに記載する。査定は、予め単クローン抗体4H3（シヨラーら1999、プロック・ナショナル・アカデミ・サイエンス・USA96（20）：11531-11536（Scholler et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96(20):11531-11536）とPCT公報WO00/50900に記載されたような）が塗布してある、96のウエルのある、すっきりしたマイクロ滴低定プレートのなかで行われる。ウエルの底には、炭酸塩-重炭酸塩バッファー（pH9.6）1ミリリッター当たり3マイクログラムの抗体からなる懸濁液50マイクロリッターが個々のウエルに加えられることによって、抗体が塗られる。そのプレートがまわされて、ウエルの底面が塗布され次いで4で一夜乾燥される。個々のウエルをウシ血清アルブミン（BSA）の3%（w/v）懸濁液で満たし、2時間室温に保ち、その後BSA懸濁液を

10

20

30

40

50

その個々のウエルから取り除く。

【0079】

人間のIg配列をエンコードしたベクトルを用いてイムノグロブリン(Ig)定常領域に溶解したMPFアミノ酸配列(即ち、44kDaメンブラン結合領域)の部分からなる溶解タンパク質(ショラーら1999、ブロック・ナショナル・アカデミ・サイエンス・USA96(20):11531-11536(Scholler et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96(20):11531-11536)に記載されたように)を用いて標準カーブがつけられる(PCR公報番号W000/50900及びホーレンバウほか、1995、J.イムノル・メス・188:1-7(Hollenbaugh et al., 1995, J. Immunol. Meth. 188:1-7に記載のように)。この溶解たんぱく質はhIgGと呼ばれる。標準カーブについて、溶解タンパク質がミリリッター当たり1.0マイクログラム、ミリリッター当たり0.1マイクログラム、及びその4連続5倍希釈液(即ち、1:5、1:25、1:125、1:625)の濃度で査定される。用いられた希釈剤はBSAの7%(w/v)懸濁液であった。

【0080】

アッセイを行うために、hIgG融合タンパク質希釈液、対照、又は尿サンプル、又は希釈尿サンプルの50マイクロリッターが個々のウエルに加えられた。そのプレートを1時間常温でインキュベートし、ウエルは0.05%(v/v)トウイーン(登録商標)20界面活性剤を含むトリス緩衝した食塩水(pH7.8から8)で洗浄した。ビオチン化モノクローナル抗体OV569(ショラーら1999、ブロック・ナショナル・アカデミ・サイエンス・USA96(20):11531-11536(Scholler et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96(20):11531-11536)及びPCR公報番号W000/50900に記載)のリッター当たり200ナノグラム懸濁液50マイクロリッターが個々のウエルに加えられた。常温で1時間プレートをインキュベートし、その後0.05%(v/v)トウイーン(登録商標)20界面活性剤を含むトリス緩衝した食塩水(pH7.8から8)で各ウエルを洗浄した後、ストレプトアビジン-西洋わさびペルオキシダーゼ(streptavidin-horseradish peroxidase)(アラバマ州バーミンガムのサウザンバイオテクノロジーアソシエートインクのカタログ番号7100-05から得た(Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, Al. catalog no. 7100-05))の1:5000希釈液50マイクロリッターを個々のウエルに加え、そのプレートを常温で1時間インキュベートした。50マイクロリッターの3、3'、5、5'-テトラメチルベンジジン(TMB; 西洋わさびペルオキシダーゼ(horseradish peroxidase)用発色基質; メリーランド、ガイサースブルグ、キルクガード&ペリーラボラトリー、インク(Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD)から得られる)を個々のウエルに加えて信号を発生する。そのプレートを常温で15分インキュベートし50マイクロリッターのTMBストップ液(0.1規定硫酸; メリーランド、ガイサースブルグ、キルクガード&ペリーラボラトリー、インク(Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD)から得られる)を加えてペルオキシダーゼ反応を停止した。ペルオキシダーゼのTMBへの反応により出来た青色をモレキュラーディバイセススペクトラマックス(登録商標)プラス384(Molecular Devices SpectraMax Plus 384)分光光度プレートリーダー(モデル番号02523)を用いて450ナノメータでの吸光度を測定した。

【0081】

実施例2

【0082】

卵巣癌患者から得られた尿サンプル中のMMPFの検出

【0083】

卵巣癌にかかった25人の患者から尿サンプルを得た。個々の尿サンプルを15分13000rpm(約15,700(g))で遠心分離し沈殿を除去した。尿サンプル上澄みの各々50マイクロリッターの部分標本を実施例1で述べた査定法を用いてテストした。

【0084】

テストした25サンプルのうち、22サンプルが450ナノメータで0.2より大きい吸

10

20

30

40

50

光度を示した。これらのデータは、尿中のMMPFF検出のための発色体サンドウィッチELISA型査定法が多くの患者の卵巣癌の発生を検出するのに信頼できる方法であることを示している。

【0085】

実施例3

【0086】

卵巣癌患者から得られた尿サンプル中のMMPFF信号の確認

【0087】

実施例2に記載された尿サンプル中のMMPFF発生に相当する擬似信号を有する非特定結合を除外するために、実施例2で比較的高い吸光度値が得られた尿サンプルが選ばれた。抗体4H3が塗布されていないことを除き実施例1に記載されたものと同じ査定用プレートが調整された。個々の尿サンプルが準備され実施例2に記載したプレートに加えられた。

10

【0088】

この実施例でテストされたサンプルはいずれも背景強度を超える信号は検出されなかった。

【0089】

別の実験では、実施例2に記載された尿サンプルが実施例1で述べられたように調整されたプレートを用いてテストされた。しかしこの実験で用いられた569単クローン抗体はビオチン化されていないものであった。それ以外には、査定法は実施例1に記載の通りであった。テストされたサンプルのいずれについても背景強度を超える信号はなかった。

20

【0090】

他の別の実験では、ビオチン化した単クローン抗体569の代わりに前述のMMPFFと無関係のビオチン化した抗体が用いられたこと以外には実施例1に記載された方法で査定が行われた。この方法による実施例2記載の尿サンプルの査定では、この方法でテストされたときの背景を超える信号は出なかった。

【0091】

卵巣癌の患者から得られた尿を使用した450ナノメータでのサンドウィッチELISA査定の吸光信号が増加していることが、これらのデータは患者の尿中のMMPFFペプチドの存在を示唆する真の応答であることを示している。

30

【0092】

実施例4

【0093】

膀胱癌と診断された31患者から得られた尿サンプル、良性の婦人病にかかった3人の女性からの尿サンプル、正常な健康成人から得られた22の尿サンプルが実施例1に記載された査定法を用いてテストされた。

【0094】

データは正常な健康な患者から得られた尿はMMPFFペプチドが非常に低いレベルであることを示している。実施例2に記載のように、25の卵巣癌患者のうちの22(88%)の尿は著しく高いMMPFFペプチドレベルを示した。膀胱癌(即ち他の泌尿生殖系疾病)患者から得られた尿サンプルは31サンプルのうち8サンプルにのみ高レベルのMMPFFペプチドが示された。良性の婦人病にかかっている女性から得られた3つの尿サンプル中には高いMMPFFペプチドレベルは検出されなかった。総合すると、56の非卵巣癌患者のうち8の尿サンプルのみしか高いMMPFFペプチドレベルを示さず、一方卵巣癌患者からの25の尿サンプルのうち22が高いMMPFFペプチドを示した。これらのデータは卵巣癌のこの査定法は正診86%であることを示している。

40

【0095】

実施例5

【0096】

尿MMPFFペプチドレベルと卵巣癌の段階との相関

50

【 0 0 9 7 】

実施例 2 において尿サンプルが分析された 25 人の卵巣癌患者の各々について、その癌の段階についての情報が集められた。4 つの段階の各々についての卵巣癌を有する患者が代表とされた。患者の癌の段階と患者の尿中に検出された MMPFF ペプチドの量には明らかな相関はなかった。ここに記載された尿 MMPFF ペプチド測定法は早期段階卵巣癌の発生の査定に後期段階卵巣癌と同じように効果的に使用することが出来ることがこの観察から言える。

【 0 0 9 8 】

実施例 6

【 0 0 9 9 】

尿 MMPFF ペプチドレベルに対する卵巣癌治療の効果

10

【 0 1 0 0 】

実施例 2 に記載の 25 人の卵巣癌患者のうち 4 患者に対する卵巣癌治療の MMPFF ペプチドレベルについての効果が査定され、CA125 と呼ばれる卵巣癌腫瘍マーカーの血清レベルと比較した。4 患者のそれぞれから得られた血清サンプルにおける CA125 が治療前、治療後で CA125 IITM (ペンシルバニア、マルヴァーン フジレバイオ ダイアグノスティックス、インク。(Fujirebio Diagnostics, Inc., Malvern, PA) 査定と本質的に同じ免疫性査定法を用いて査定された。尿 MMPFF ペプチドレベルは実施例 1 及び 2 に記載の方法を用いて 4 患者の各々について治療前後で査定された。

【 0 1 0 1 】

尿 MMPFF ペプチドレベルの治療前後での変化は図 7 に説明されているように 4 人の患者のそれぞれにおいて血清 CA125 レベルの変化にほぼ比例していた。何故なら CA125 は卵巣癌進行の代理マーカーとしてこの分野では受け入れられており、これらのデータは尿の MMPFF ペプチドレベルと疾病進行とは相関関係があることを示している。これらのデータはこのテストの臨床的価値と卵巣癌治療効果を監視する非侵襲性方法として使える可能性を立証している。

20

【 0 1 0 2 】

実施例 7

【 0 1 0 3 】

MMPFF ペプチドの尿レベルと血清レベルの相関

30

【 0 1 0 4 】

実施例 2 で査定された尿サンプルを提供した 25 人の患者の各々から血液を採取した。実施例 1 に記載の作業標準を用いてこれらの血液サンプルの血清 MMPFF ペプチドレベルを測定した。血清と尿サンプルは個々の患者から同じ日に集められたものである。

【 0 1 0 5 】

MMPFF ペプチドが、いくつかの例では非常に低いレベルであったとはいえ、すべての患者から尿と血清の両方のサンプルに検出されている。尿サンプルのテストに 0.2 吸光度単位 (450 ナノメータで) をカットオフ値として用いた場合、テストした 25 サンプルのうち 22 (88%) は MMPFF は陽のテスト結果であった。血清サンプルのテストに 0.1 吸光度単位 (450 ナノメータで) をカットオフ値として用いた場合、テストした 25 サンプルのうち 16 のみ (64%) が MMPFF は陽のテスト結果であった。これらのデータから、MMPFF ペプチドレベルは卵巣癌患者の血清と尿の両方において上昇することを示している。併し、尿中の MMPFF ペプチドの検出はより感度が高いようで、それだけ大きい診断的価値を有しているといえよう。

40

【 0 1 0 6 】

実施例 8

【 0 1 0 7 】

尿 CA125 レベルの査定

【 0 1 0 8 】

CA125 レベルが実施例 2 に記載された 25 の尿サンプルの各々について CA125 II

50

T M テストキットを用いて査定された。上記査定の背景強度を超える結果は尿サンプルからは全くでなかった。これらの結果からCA125はこれらの患者の尿には存在していないことを示している。これらのデータは、CA125のような血清腫瘍マーカーは、血清の中には発生していてもその患者の尿中には必ずしも存在しないことを立証している。

【0109】

ここに記載された個々の特許、特許申請書、公報で開示されたものはすべて参考文献としてここに組み込まれる。

【0110】

本発明は特定の実施形態を参照に開示されたが本発明の他の実施形態や変形が当業者によって本発明の真の精神と範囲から逸脱することなく案出しうることは明らかである。添付の請求の範囲はそのような実施形態や相当する変形の全てを含むものである。

【 図 1 】

MAJQRLDPCW SCDDRPGSLL FLLFLSLGVH PARTLAGETG TESAPLGGVL TTPHNISSL 60
 PROLLGFPCA EYVSGLSTERY RELAVALAOK NYKLSLTEQLR CIAHRLSEPP EDDLDALDLD 120
 LHLFLNPDAPS GQACTRFFS RITKANVDLL EGNAPKQRL LEAALACNGV RGSLLSEADY 180
 RALGGLACLDL PGRFVAESAE VLLPRLVSCP GFLDQDQEA AFAALQGGP FYGPFESTWV 240
 STMDALRGLL PVLGQPIRS IFQGIWAAR ORSSRDPFWR QPRTILRPR FRREVEKTAC 300
 PSKSKAREID ESLIFPKWE LEACYDAALL ATQWDRVNAI PFTYEQLDVL KHKLDLDFQ 360
 GYPSVIOHL GYLFLKMSPE DIEKNVITSL ETLKALREVD KGHMSRQAP RRLPFOVATL 420
 IDRFYKGRQ LQKDTLETL AFYKYLCSL SEBELSSVEP SSIWAVRPOD LPTCDPROLD 480
 VLLFKARLAF QMMGSEYFV KIOSFLGAP TEBDKALSQ NYSDMLATEM KLRTYAVLPL 540
 TVAEVQKLLG FHVGEKRAEE RHRPVRDWIL RQRQDDLDLIL GUGLQGGIEN GHVLDLDSVQ 600
 ETLSGTPECLL GPGPVLTVIA LLLASTLIA 628

Fig. 1

【 図 2 】

MALEFARPLL GSCPTPALGS LLEFLFLSLGW YQSPFTLAGE TQCEAAPLDG VLAMPPISS 60
 LSPRQLLGGFP CAEYVSGLSTE RVEELAVALA QKNVKLSTEQ LFCLAHRLSE PEEDDLDEL 120
 DLELFLNPD A FSGFQACTRF FSRITKANVD LPRGAPERQ RLEFAALACW GVRSSLSEAE 180
 DVWALGGLAC DLPRFVAES AEVLLPRLVSCP GFLDQDQ EAARALQGG GPFYGPSTW 240
 SVTMDALRG LPLVGOPII RSIPOGIVAA WRORSRDP S WEQPERTILR PRFRREVEKT 300
 ACPSSKARE IDESLIFYKK WELEACYDAA LIAIOWDRVN AIPFTYEBOLD VLKHLDELY 360
 PGYPSVIOHL GYLFLKMS PEDEKKNVT SLFTLAKALLE VNKGHMSRQ VATLIDRFVK 420
 GRGGLDKDTL DFLFTFYEGY LCSLSPEELS SVPPSSIMAV RQQLDTCBP ROLDLYPKA 480
 RLAFQMMGS EYFYKIOSFL GQAPTEBLKA LSQONVSMDL ATEFKLRTDA VLPFTYAVQ 540
 KLLGFHVEGL KAENRHRPVR DWILRQRQDD LPTLHUGLQG GIPNGYIVLD LSVQEAUSGT 600
 FCLLGGPVL TVIALLAST IA 628

Fig. 2

VEKTAQPSK KAREIDBSLI FYKWELEAC VDAALLATOM DRVNAIEFTY EQLDVLRHKL 60
 DELXPOEYFE SVIQHLGYLF LKMSPELRK WNVTSLETLK ALLEVNGHE MSPQVATLID 120
 RFVYGRQLD KDITLITLAF YFVYGLCSLP BELSSVPSW INAVRPODLD TCDPQDLVL 180
 YPKALAFON MNGSEYFYKI QSFVLGAPTE DLKALQONV SMDLATEMKL RTDVLVITVY 240
 AEVOKLLGPH VEGLEKABERH RPYVDWILRQ RODDLITLGL GLOGGIPNGY LVLDLSVGG 300
 RGOBARAGR AGGVVEGALS HPSLCHGPLG DALPRTWTC SHRPCTAPSL HPGLEARLPC 360
 WPCQWCSFP QOQOAVILFV PPQENRSRVN GNMPPADT 398

Fig. 3

【 4 A 】
 MST EVEKTAC 300
 |||||
 MFV EVEKTAC 302
 MST PSKPKAREID ESLIFYKKWE LEACVDAALL ATQMDRVNAI PFTYEQLDVY KHKLDLYPQ 360
 |||||
 MFV PSKPKAREID ESLIFYKKWE LEACVDAALL ATQMDRVNAI PFTYEQLDVY KHKLDLYPQ 362
 MST GYFESVIOHL GYLFLKMSPE DIRKKNVTSL ETLKALLEVD KGHMSFQAP RRPLFOVATL 420
 |||||+
 MFV GYFESVIOHL GYLFLKMSPE DIRKKNVTSL ETLKALLEVN KGHMSFQ-- ----VAITL 414
 MST IDRFVKGRQ LDMDTLDITL AFYVGLGSL SPEELSSVFP SSIWAVRPOD LDTCRQDLD 480
 |||||
 MFV IDRFVKGRQ LDMDTLDITL AFYVGLGSL SPEELSSVFP SSIWAVRPOD LDTCRQDLD 474
 MST VLYPKARLAF QNNNGSEYFV KIQSFLGGAP TEDLKALSOQ NVSMDLATEFM KLRTDAVILPL 540
 |||||
 MFV VLYPKARLAF QNNNGSEYFV KIQSFLGGAP TEDLKALSOQ NVSMDLATEFM KLRTDAVILPL 534

Fig. 4A

【 4 B 】
 MST TVAEVQKLLG PHVEGLKABE RHRPVRDWIL RQRQDLDLTL GLGLQGGIPN GYLVLDLSVQ 600
 |||||
 MFV TVAEVQKLLG PHVEGLKABE RHRPVRDWIL RQRQDLDLTL GLGLQGGIPN GYLVLDLSVQ 594
 628
 MST ETLSGTFCIL GFGPVLVILA LLLASTLA
 |||||
 MFV ETLSGTFCIL GFGPVLVILA LLLASTLA 622

Fig. 4B

【 5 A 】
 MST eVEKT 298
 MFV eVEKT 300
 SMR -VEKT 4
 MST ACPSGKKARE IDESLIFYKK WELEACVDAA LLATQMDRVN AIPFTYEQLD VLKHKLDLY 358
 MFV ACPSGKKARE IDESLIFYKK WELEACVDAA LLATQMDRVN AIPFTYEQLD VLKHKLDLY 360
 SMR ACPSGKKARE IDESLIFYKK WELEACVDAA LLATQMDRVN AIPFTYEQLD VLKHKLDLY 64
 MST PQGPESVIQ HLGYLEFKMS PEDIRKNVVT SLETLKALLE VnKGHEMSFQ APRPLFOVA 418
 MFV PQGPESVIQ HLGYLEFKMS PEDIRKNVVT SLETLKALLE VnKGHEMSFQ -----VA 412
 SMR PQGPESVIQ HLGYLEFKMS PEDIRKNVVT SLETLKALLE VnKGHEMSFQ -----VA 116
 MST TLIDRFVKGR QLDKDTLDT LFAFYGYIC SLSPPELSSV PPSIIWAVRP QDLDTCDPRQ 478
 MFV TLIDRFVKGR QLDKDTLDT LFAFYGYIC SLSPPELSSV PPSIIWAVRP QDLDTCDPRQ 472
 SMR TLIDRFVKGR QLDKDTLDT LFAFYGYIC SLSPPELSSV PPSIIWAVRP QDLDTCDPRQ 176
 MST LDVLYPKARL AFONNGSEY FVKIQSFLGG APTEDLKALS QONVSMDLAT FMKLRTDVIL 538
 MFV LDVLYPKARL AFONNGSEY FVKIQSFLGG APTEDLKALS QONVSMDLAT FMKLRTDVIL 532
 SMR LDVLYPKARL AFONNGSEY FVKIQSFLGG APTEDLKALS QONVSMDLAT FMKLRTDVIL 236
 MST PLTVAEVQKL LGPHVEGLKA EERHRPVRDW ILRQRQDLDL TLGLGLQGGI PNGYLVLDLS 598
 MFV PLTVAEVQKL LGPHVEGLKA EERHRPVRDW ILRQRQDLDL TLGLGLQGGI PNGYLVLDLS 592
 SMR PLTVAEVQKL LGPHVEGLKA EERHRPVRDW ILRQRQDLDL TLGLGLQGGI PNGYLVLDLS 296

Fig. 5A

【 5 B 】

```

MST VQetlsgtpc llgpgpvlv lalllastla ----- 628
MPF VQealsgtpc llgpgpvlv lalllastla ----- 622
SMR VQggrggqar eggraggvev galspslcr gplgdalppr twtcshrpgt apslhpglra 356

MST -----
MPF -----
SMR plpcwbpqew gspggedqar vipvpqensr svngmmpa dt 398

```

Fig. 5B

【 6 B 】

```

EVEKTCPSG KKAREIDESL IFYKKWELEA CVDAALAIATQ MDRVNAIPFT YEQLDLVKHK IDELYFOGYF
ESVIQHLYL FLKMSPEDIR KMWVTSLETL KALLEVXKGH EMSPOAVATLI DRFYKRGGL DKDTLDLITA
FYFGLCSLS PEELSSVPPS SIWAHPDLD DTCDPRQLDV LYFKARIAFO NMGSEFYK IQSFLGGAPT
EDLKALSOON VSMDLATFMK LRTDAVLEPLT VAEVQKLLGP HVEGLKAEER HRPVREDWILR QRQDLDLTLG
LGLGGIPNG YLVLDLSVQ

```

Fig. 6B

【 6 A 】

```

EVEKTCPSG KKAREIDESL IFYKKWELEA CVDAALAIATQ MDRVNAIPFT YEQLDLVKHK IDELYFOGYF
ESVIQHLYL FLKMSPEDIR KMWVTSLETL KALLEVXKGH EMSPOAVATLI DRFYKRGGLDK
DTLDLITAFY FGLCSLSPE ELSSVPPSSI WAHPDLDLT CDPRQLDVLY FKARLAFOM NGSEVFKIQ
SFLGGAPTEP LKALSOONVS MDLAFMKLR TDVAVLPTVA EYQKLLGPHV EGLKAEERH FVRDWLKRQ
QDLDLTLGLG LQGGIPNGYL VLDLSVQ

```

Fig. 6A

【 7 】

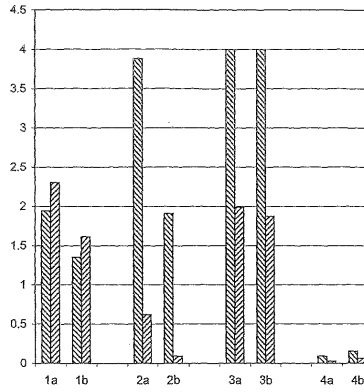


Fig. 7

【配列表】

0004722834000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

G 0 1 N 33/553

G 0 1 N 33/543 5 9 5

C 0 7 K 14/47

(72)発明者 サルデサイ ニランジャン ワイ

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 4 5 4 ノース ウェールズ セイボリー レーン 1
0 2

(72)発明者 ボーンズ ジェニファー

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 3 8 2 ウェスト チェスター サウス ブラッドフォ
ード アベニュー 7 1 9

審査官 海野 佳子

(56)参考文献 特表2002-538434(JP,A)

国際公開第02/071928(WO,A1)

SCHOLLER N. et al., Soluble member(s) of mesothelin/megakaryocyte potentiating factor family are detectable in sera from patients with ovarian carcinoma, Proc.Natl. Acad. sci. USA, 1999年, Vol.96, P.11531-11536

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

CAPlus(STN)

(54)【発明の名称】 卵巣癌査定のための尿のメソセリン/巨核球可能化因子関連ペプチド(mesothelin/megakaryocytepotentiatingfactorfamilypeptide)の検出

专利名称(译)	用于卵巢癌评估的尿间皮素/巨核细胞活化因子相关肽 (间皮素/巨核细胞增强因子胞嘧啶肽) 的检测		
公开(公告)号	JP4722834B2	公开(公告)日	2011-07-13
申请号	JP2006507164	申请日	2004-03-15
申请(专利权)人(译)	FUJIREBIO美国公司		
当前申请(专利权)人(译)	FUJIREBIO美国公司		
[标]发明人	オウシャネッスイーダニエルジェー サルデサイニランジャンワイ ポーンズジェニファー		
发明人	オウシャネッスイーダニエルジェー サルデサイニランジャンワイ ポーンズジェニファー		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/543 G01N21/78 G01N33/553 C07K14/47 C07K16/00 C12Q C12Q1/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/57449 G01N2333/4703 G01N2800/50 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/574.ZNA.A G01N33/543.545.S G01N33/543.541.B G01N33/543.575 G01N21/78.C G01N33/553 G01N33/543.595 C07K14/47		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	10/388930 2003-03-13 US		
其他公开文献	JP2007525643A JP2007525643A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及与间皮素相关的氨基酸序列，巨核细胞增强因子，序列和与卵巢癌患者血清中发育相关的其它肽，以及用于评估妇女泌尿发育的方法和试剂盒。该方法和试剂盒可用于诊断女性卵巢癌，并预测无症状女性卵巢癌的发展，并评估卵巢癌治疗方案的效果。

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
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000