

(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2007-519903

(P2007-519903A)

(43) 公表日 平成19年7月19日(2007.7.19)

| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|--------------------------------|-----------------------|-------------|
| GO 1 N 33/574 (2006.01) | GO 1 N 33/574 Z N A A | 4 B O 2 4 |
| GO 1 N 33/536 (2006.01) | GO 1 N 33/536 B | |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 A | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁)

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2006-549489 (P2006-549489) | (71) 出願人 | 596115687 |
| (86) (22) 出願日 | 平成17年1月10日 (2005.1.10) | | チルドレンズ メディカル センター コーポレーション |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成18年8月23日 (2006.8.23) | | アメリカ合衆国マサチューセッツ州02115, ボストン, シャタック・ストリート55 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2005/000714 | (74) 代理人 | 100102978 |
| (87) 国際公開番号 | W02005/071387 | | 弁理士 清水 初志 |
| (87) 国際公開日 | 平成17年8月4日 (2005.8.4) | (74) 代理人 | 100128048 |
| (31) 優先権主張番号 | 60/535,306 | | 弁理士 新見 浩一 |
| (32) 優先日 | 平成16年1月9日 (2004.1.9) | (72) 発明者 | モーゼス マーシャ エー. |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ブルックライン ディーン ロード 64 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 上皮起源の癌を診断および予後診断するための方法

(57) 【要約】

ADAM 12の発現および活性は、上皮起源の癌、例えば乳癌、結腸癌、前立腺癌、肝臓癌、膀胱癌、膵臓癌、卵巣癌、子宮頸癌、肺癌、および皮膚癌、ならびにその他を有する患者において上方制御されている：従って、本発明は、上皮起源の癌の予後評価および診断のための方法に向けられる。特に、生物学的試料中のADAM 12の存在は上皮起源の癌を示唆する。さらに、生物学的試料中、例えば尿中に検出されるADAM 12タンパク質量は、ADAM 12レベルを用いて癌の存在および転移能を予測可能なほど、疾患の状態に相関している。従って、生物学的試料(例えば、尿または血液)中のADAM 12レベルの測定は、患者において癌の診断および予後診断の両方に用いられ得る、迅速、容易、かつ安全なスクリーニングを提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の段階を含む、上皮起源の癌について患者の診断を容易にするための方法であって：

- a. 患者から生物学的試料を得る段階；および
 - b. 生物学的試料中のADAM 12の存在または非存在を検出する段階；
- ここで、ADAM 12の存在が上皮起源の癌の存在を示唆する、方法。

【請求項2】

生物学的試料が血液、組織、血清、尿、便、痰、髄液、乳頭吸引物、および細胞溶解物由来の上清からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

10

【請求項3】

生物学的試料が尿である、請求項1記載の方法。

【請求項4】

以下の段階を含む、患者において上皮起源の癌を診断するための方法であって：

- a. 患者から得られた試験試料中に存在するADAM 12レベルを測定する段階；
 - b. 対照試料中に存在するADAM 12レベルと試験試料中のADAM 12レベルを比較する段階；
- ここで、対照試料中のADAM 12レベルと比較して、試験試料中のより高いADAM 12レベルが、上皮起源の癌を示唆する、方法。

【請求項5】

試験試料および対照試料が血液、組織、血清、尿、便、痰、髄液、乳頭吸引物、および細胞溶解物由来の上清からなる群より選択される、請求項4記載の方法。

20

【請求項6】

試験および対照試料が尿である、請求項4記載の方法。

【請求項7】

以下の段階を含む、上皮起源の癌を有する疑いがあるか、または有する患者の予後評価のための方法であって：

- a. 患者から得られた試験試料中に存在するADAM 12レベルを測定する段階；
 - b. 段階(a)において決定されたレベルを対照試料中のADAM 12レベルと比較する段階；および
 - c. 段階(b)の比較に基づき、該患者の予後を評価する段階；
- ここで、対照試料中のADAM 12レベルより少なくとも3倍大きい試験試料中のADAM 12レベルが、癌の攻撃型および従って予後不良を示唆する、方法。

30

【請求項8】

試験試料が血液、組織、血清、尿、便、痰、髄液、乳頭吸引物、および細胞溶解物由来の上清からなる群より選択される、請求項7記載の方法。

【請求項9】

上皮起源の癌が乳癌、基底細胞癌、腺癌、消化管癌、口唇癌、口腔癌、食道癌、小腸癌、胃癌、結腸癌、肝臓癌、膀胱癌、膵臓癌、卵巣癌、子宮頸癌、肺癌、皮膚癌、前立腺癌、および腎細胞癌からなる群より選択される、請求項1、4、または7のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項10】

ADAM 12に特異的に結合する、抗体に基づく結合部分を用いてADAM 12の存在または非存在が検出される、請求項1記載の方法。

【請求項11】

ADAM 12タンパク質レベルを測定することによりADAM 12レベルが測定される、請求項4~7のいずれか一項記載の方法。

【請求項12】

以下の段階を含む方法によりADAM 12タンパク質レベルが測定される、請求項11記載の方法：

- a. 試験試料またはその調製物を、ADAM 12に特異的に結合する、抗体に基づく結合部分に

50

接触させ、抗体-ADAM 12複合体を形成させる段階；および

b. 複合体の存在を検出し、それにより存在するADAM 12レベルを測定する段階。

【請求項 13】

抗体に基づく結合部分が検出可能な標識を用いて標識される、請求項10または12記載の方法。

【請求項 14】

標識が放射性標識、ハプテン標識、蛍光標識、および酵素標識からなる群より選択される、請求項13記載の方法。

【請求項 15】

抗体に基づく結合部分が抗体である、請求項10または12記載の方法。

10

【請求項 16】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項15記載の方法。

【請求項 17】

尿試料を保持するための容器、およびADAM 12に特異的に結合する、少なくとも1つの抗体を含む、尿試料中のADAM 12を検出するためのキット。

【請求項 18】

1つの抗体が固相上に固定され、かつ1つの抗体が検出可能に標識された、ADAM 12に特異的に結合する2つの抗体を含む、請求項17記載のキット。

【請求項 19】

使用説明書をさらに含む、請求項17記載のキット。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、患者から得られた生物学的試料中のADAM 12レベルを評価することにより、上皮起源の癌を診断および予後診断するための方法に関する。

【0002】

相互参照

本出願は、2004年1月9日出願の米国仮出願第60/535,306号の35 U.S.C § 119(e)に基づく恩典を主張する。

30

【背景技術】

【0003】

発明の背景

癌からの生残において最も重要な因子の一つは初期段階における検出である。癌の初期事象を検出する臨床アッセイ法は、癌の進行に介入し、かつ防ぐ機会を提供する。遺伝子プロファイリングおよびプロテオミクスの発展と共に、特異的な癌を診断および予後診断するのに用いられ得る分子マーカーまたは「バイオマーカー」の同定において著しい進展があった。例えば、前立腺癌の場合、抗原PSA(prostate specific antibody)が血中に検出され得、かつ前立腺癌の存在を示唆する。従って、前立腺癌の危険性のある男性の血液を、PSAレベルの上昇について、迅速、容易、かつ安全にスクリーニングできる。

40

【0004】

たとえ癌検出の分野において著しい進展があったとしても、依然として、当技術分野において臨床応用において容易に用いられ得るさまざまな癌についての新規のバイオマーカーの同定の必要性が残る。例えば、現在まで、容易に検出可能なバイオマーカーを用いる乳癌の診断には、比較的少数の選択肢しか利用できない。特にエストロゲン受容体の下方制御と連動する、EFGRの過剰発現は、乳癌患者において予後不良のマーカーである。乳癌の他の公知のマーカーとしては、血中の高レベルのM2ピルビン酸キナーゼ(M2 PK)(米国特許第6,358,683号)、血中の高ZNF217タンパク質レベル(WO 98/02539)、および診断に有用な、乳癌において新規に同定されたタンパク質、PDEBCの差次的な発現(米国特許出願第20030124543号)が含まれる。これらのバイオマーカーは診断の代替方法を提供するものの、

50

広範には用いられていない。さらに、数多くの組織化学的、遺伝学的、および免疫学的マーカーの使用にもかかわらず、臨床医はどの腫瘍が他の臓器に転移するのか予測するのに依然として苦労している。

【0005】

細胞接着を媒介することが公知であり、シンデカンおよびインテグリン相互作用を通じて広がる、ADAM 12 (a disintegrin and metalloproteinase domain 12)は最近、肝臓癌において腫瘍の攻撃性および進行に対するマーカーとして示唆された(Pabic et al. Hepatology (2003) vol. 37(5):1056-1066)。しかしながら、この研究において、ADAM 12レベルの検出は生検を必要とし、かつ血清または尿中のADAM 12の検出に関しては開示がなかった。従って、Pabic et al.によって開示されるように、ADAM 12は容易に検出可能なバイオマーカーとしては役立たないように思われる。

10

【0006】

バイオマーカーの同定は、特に疾患の診断、予後診断、および処置の向上に関係する。そのため、当技術分野において、迅速、容易、かつ安全に検出され得る代替バイオマーカーを同定する必要がある。そのようなバイオマーカーを用いて、乳癌、特に疾患の浸潤期、潜在的な転移期を有する対象の進行または処置を、診断、病期決定、またはモニターし得る。

【発明の開示】

【0007】

発明の概要

20

本発明は、ADAM 12(活性および潜伏性の両方の)タンパク質が尿中に存在し、かつ上皮起源の癌、例えば乳癌、結腸癌、前立腺癌、肝臓癌、膀胱癌、膵臓癌、卵巣癌、子宮頸癌、肺癌、および皮膚癌、ならびにその他を有する患者において、ADAM 12の発現および活性が上方制御されるという驚くべき発見に基づく。従って、本発明は予後評価のための方法、上皮起源の癌の診断を容易にする方法、および治療効果のマーカーとしての方法に向けられる。具体的には、生物学的試料、例えば尿中に検出されるADAM 12タンパク質の量は、ADAM 12レベルを用いて癌の存在および転移能を予測可能な程、疾患の状態と関連する。このように、生物学的試料(例えば、尿または血液)中のADAM 12レベルの測定により、患者の上皮起源の癌、例えば乳癌の診断および予後診断の両方に用いられ得る、迅速、容易、かつ安全なスクリーニングが提供される。

30

【0008】

一つの態様において、患者の上皮起源の癌の診断を容易にするための方法が提供される。方法は、患者から生物学的試料を得る段階、および生物学的試料中のADAM 12(またはその断片)の存在または非存在を検出する段階を含み、ここで、ADAM 12の存在が上皮起源の癌の存在を示唆する。

【0009】

他の態様において、方法は、患者からの試験生物学的試料中に存在するADAM 12レベルを測定する段階、および観察されたADAM 12レベルを同タイプの対照試料中に存在するADAM 12レベルと比較する段階を含む。対照試料と比較して、より高いレベルの試験試料中のADAM 12が、癌を示唆する。好ましくは、本発明の方法は上皮起源の癌、特に乳癌の初期検出のために用いられる。例えば、患者は毎年、年1回の身体検査の間に医師によりスクリーニングされ得る。

40

【0010】

「対照試料」という用語は、癌を有しないと信じられる「正常な」または「健康な」個体(群)から得られた生物学的試料を指す。対照は当技術分野に周知である方法を用いて選択され得る。レベルが対照集団について十分確立されたならば、試験生物学的試料由来のレイ結果が公知のレベルと直接比較され得る。

【0011】

「試験試料」という用語は、上皮起源の癌について試験される患者から得られた生物学的試料を指す。

50

【0012】

生物学的試料は例えば、血液、組織(例えば、腫瘍または乳房)、血清、便、尿、痰、髄液、乳頭吸引物、および細胞溶解物由来の上清から得られ得る。好ましい生物学的試料の一つは尿である。

【0013】

一つの局面において、診断される上皮起源の癌は乳癌、基底細胞癌、腺癌、消化管癌、例えば口唇癌、口腔癌、食道癌、小腸癌、および胃癌など、結腸癌、肝臓癌、膀胱癌、膵臓癌、卵巣癌、子宮頸癌、肺癌、ならびに皮膚癌、例えば扁平上皮細胞および基底細胞癌、前立腺癌、腎細胞癌、ならびに、全身の上皮細胞を冒す他の公知の癌である。

【0014】

他の態様において、本発明は上皮起源の癌を有する疑いがあるか、または有する患者の予後評価のための方法を提供する。方法は、i)患者から得られた試験試料中に存在するADAM 12レベルを測定する段階、ii)試験試料中のADAM 12レベルを、癌を有しないと信じられる健康な患者から得られた同タイプの生物学的試料(対照試料)中に存在することが公知のADAM 12タンパク質レベルと比較する段階、およびiii)比較に基づき患者の予後を評価する段階を含み、ここで、対照試料中のレベルより少なくとも3倍大きい試験試料中のADAM 12レベルが、癌の攻撃型(例えば、転移性または浸潤性)、および従って予後不良を示唆する。

【0015】

本発明は、同じ患者から得られた複数の試験試料中に存在するADAM 12レベルを評価することも意図する。ここで、経時的なADAM 12量の進行性増加は癌腫瘍の攻撃性(例えば、転移能)の増強を示唆する。そのように、ADAM 12レベルは疾患の状態および病期の予測に役立つ。

【0016】

本発明は、上皮起源の癌を有する患者を処置するために設計された処置計画の治療効果をモニターするためにADAM 12レベルを評価することをさらに意図する。

【0017】

一つの好ましい態様において、生物学的試料は尿試料である。しかしながら、血液、組織、血清、便、痰、髄液、乳頭吸引物、および細胞溶解物由来の上清の生物学的試料も用いることができる。

【0018】

本発明の一つの局面において、試験生物学的試料中に存在するADAM 12レベルは、試験試料またはその調製物を、ADAM 12タンパク質またはその一部に特異的に結合する、抗体に基づく結合部分に接触させることにより測定される。抗体に基づく結合部分はADAM 12と検出可能な複合体を形成し、それによりADAM 12レベルを測定することが可能となる。

【0019】

抗体に基づく免疫学的アッセイ法はADAM 12タンパク質レベルを測定するための好ましい手段である。しかしながら、当業者に公知の任意の手段を用いてADAM 12レベルを評価し得る。例えば、いくつかの態様において、ADAM 12発現レベルはADAM 12 mRNA転写産物のレベルを測定することによりアッセイされる。または、ADAM 12レベルは、SELDI質量分析法を含む質量分析法により評価され得る。ADAM 12レベルは、基質ゲル電気泳動法を含むがこれに限定されない、生物学的活性アッセイ法によっても評価可能である。

【0020】

さらなる態様において、本発明は生物学的試料中のADAM 12を測定するための手段を含むキットを提供する。

【0021】

本発明の他の局面は下記に開示される。

【0022】

発明の詳細な説明

本発明者らは患者の生物学的試料中に存在するADAM 12レベルが、上皮起源の癌の存在

10

20

30

40

50

または非存在に相関することを発見した。さらに、高レベルのADAM 12が癌腫瘍の攻撃性および転移能に相関することが決定された。

【0023】

本明細書において用いられるように、「上皮起源の癌」とは、乳癌、基底細胞癌、腺癌、消化管癌、口唇癌、口腔癌、食道癌、小腸癌、および胃癌、結腸癌、肝臓癌、膀胱癌、膵臓癌、卵巣癌、子宮頸癌、肺癌、乳癌、および皮膚癌、例えば扁平上皮および基底細胞癌、前立腺癌、腎細胞癌、ならびに全身の上皮細胞を冒す他の公知の癌を含むがこれらに限定されない、上皮細胞から生じる癌を指す。

【0024】

癌に関して「攻撃性」または「浸潤性」という用語は、腫瘍がその境界を越えて隣接する組織に拡大する傾向を指す(Darnell, J. (1990), *Molecular Cell Biology*, Third Ed., W. H. Freeman, NY)。浸潤癌は、特定の臓器に限局する腫瘍である、臓器限局癌と対比され得る。腫瘍の浸潤特性には、腫瘍が被膜の境界を越えて拡大すること、およびその腫瘍が位置する特定の組織の境界を超えて拡大することを可能にするために、マトリックス材料および基底膜材料を分解する、コラゲナーゼなどのタンパク質分解酵素による加工が付随することが多い。

10

【0025】

本明細書において用いられるように、「転移」という用語は、患者において、起源の臓器から他の遠位部位に癌が広がる状態を指す。腫瘍転移のプロセスは、局所浸潤および細胞間マトリックスの破壊、血管、リンパ管、または他の輸送経路への侵入、循環中の生残、二次部位における管外への遊出、ならびに新規の位置における増殖を含む、多段階事象である(Fidler, et al., *Adv. Cancer Res.* 28, 149-250 (1978), Liotta, et al., *Cancer Treatment Res.* 40, 223-238 (1988), Nicolson, *Biochim. Biophys. Acta* 948, 175-224 (1988)およびZetter, *N. Eng. J. Med.* 322, 605-612 (1990))。悪性細胞の運動性の向上は、動物およびヒトの腫瘍の転移能の増強と関連していた(Hosaka, et al., *Gann* 69, 273-276 (1978)およびHaemmerlin, et al., *Int. J. Cancer* 27, 603-610 (1981))。

20

【0026】

本明細書において用いられるように、「生物学的試料」は患者、好ましくはヒト患者から得られた、組織、組織試料、細胞試料(例えば組織生検、例えば吸引生検、ブラシ生検、表面生検、針生検、パンチ生検、切除生検、直視下生検、切開生検、または内視鏡生検)、および腫瘍試料を含む、生物学的材料の試料を指す。生物学的試料は生物学的液体試料でもよい。一つの好ましい態様において、生物学的試料は尿である。しかしながら、血液、血清、唾液、髄液、乳頭吸引物、および細胞溶解物由来の上清も用いられ得る。

30

【0027】

本発明は、本発明の方法における生物学的試料の単離物の使用も包含する。本明細書において用いられるように、生物学的試料の「単離物」(例えば、組織または腫瘍試料の単離物)は、試料から分離、由来、摘出、精製、または単離され、かつ好ましくは、生物学的試料に関連する望ましくない組成物および/または不純物もしくは汚染物を実質的に含まない、材料または組成物(例えば、生物学的材料または組成物)を指す。

【0028】

好ましい態様において、生物学的試料はADAM 12タンパク質またはADAM 12 mRNAの分解を防ぐように処置される。分解を阻害するかまたは防ぐための方法には、プロテアーゼもしくはRNAアーゼ阻害剤を用いる生物学的試料の処置、生物学的試料の凍結、または氷上に生物学的試料への配置が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、分析の前に、生物学的試料または単離物は、ADAM 12タンパク質またはADAM 12 mRNAの分解を防ぐような条件下に常に保たれる。

40

【0029】

本発明において用いられるように、「組織試料」は対象、好ましくはヒト対象の無傷の組織から得られたかまたは除去された、組織の部分(portion)、切片、部分(part)、セグメント、または断片を指す。好ましい組織試料の一つは乳房組織である。

50

【0030】

本発明において用いられるように、「腫瘍試料」は腫瘍の部分(portion)、切片、部分(part)、セグメント、または断片、例えば対象、好ましくはヒト対象から得られたかまたは除去された(例えば、対象の組織から除去されたかまたは摘出された)腫瘍を指す。

【0031】

本明細書において用いられるように、「原発腫瘍」は対象内において第一の部位に生じた腫瘍であり、対象の体内において原発腫瘍から離れた部位に生じる「転移腫瘍」とは区別され得る。

【0032】

本明細書において用いられるように、「LCIS」は非浸潤性小葉癌を指す。LCISは小葉新生物とも呼ばれ、非浸潤性乳癌のタイプに分類されることもある。それは小葉壁を貫通しない。それは通常それ自身では浸潤癌にならないものの、この状態を有する女性は、同一または反対の乳房に浸潤性乳癌を発生する、より高いリスクを有する。

【0033】

本明細書において用いられるように、「DCIS」は非浸潤性乳管癌を指す。非浸潤性乳管癌は非浸潤性乳癌の最も一般的なタイプである。DCISにおいて、悪性細胞は管壁を通過して乳房の脂肪組織に転移しなかった。面皰癌は、他のタイプのDCISに比べ、乳腺腫瘍摘出術後に同じ領域に復帰する可能性が高く、かつ他の型のDCISより、最終的な浸潤性乳管癌の発生により密接に関係したタイプのDCISである。

【0034】

本明細書において用いられるように、「ADAM 12」はGenebankアクセス番号NM_003474(ホモサピエンス)(SEQ ID NO:1)(図5)のADAM 12タンパク質を指す。この用語は、種変種、ホモログ、対立形質型、変異体型、およびそれらの同等物も包含する。

【0035】

本発明は、患者において上皮起源の癌の診断を容易にするための方法に向けられる。一つの態様において、方法は、患者から生物学的試料を得る段階、および生物学的試料中のADAM 12(またはその断片)の存在または非存在を検出する段階を含み、ここで、ADAM 12の存在が上皮起源の癌の存在を示唆する。

【0036】

他の態様において、方法は、癌を有すると疑われる患者から得られた試験試料中のADAM 12レベルを測定する段階、および観察されたレベルを対照試料、例えば癌を有しないと信じられる個々の患者または個体集団から得られた試料中に見いだされたADAM 12レベルと比較する段階を含む。正常な対照中に観察されたレベルより高いADAM 12レベルは、癌の存在を示唆する。ADAM 12レベルは任意の単位により、例えば濃度計、照度計、またはEliisaプレートリーダーから得られた単位として表される。

【0037】

本明細書において用いられるように、「対照試料中のレベルと比較して、より高いレベルの試験試料中のADAM 12」は、対照試料中に存在するADAM 12量より多いADAM 12量を指す。「より高いレベル」という用語は、統計的に有意に、または有意に、対照試料中に見いだされたレベルより上のレベルを指す。好ましくは、「より高いレベル」は少なくとも2倍大きい。攻撃型の癌を示すADAM 12タンパク質レベルは、対照試料中に存在するADAM 12量より少なくとも3倍、好ましくは5倍から6倍大きいADAM 12量を指す。

【0038】

「統計的に有意に」または「有意に」という用語は統計的有意性を指し、通常規定濃度を上回るか、またはマーカー濃度より高い、2標準偏差(2SD)を意味する。

【0039】

比較のために、試験試料および対照試料は同タイプ、すなわち同じ生物学的供給源から得られたものである。対照試料は、健康な個体から得られた同タイプの生物学的試料中に正常に見いだされるのと同濃度のADAM 12を含む標準試料でもあり得る。例えば、尿、血液、脳脊髄液、または組織のような生物学的試料の中に正常に見いだされるADAM 12量に

10

20

30

40

50

ついで標準正常対照試料が存在し得る。

【0040】

一つの態様において、本明細書に記載される方法は、乳癌を検出するために用いられる。任意のタイプの乳癌が検出され得る。例えば、腺癌、非浸潤性乳管癌(DCIS)、浸潤性(または侵食)乳管癌(IDC)、浸潤性(または侵食)小葉癌(ILC)、非浸潤性の炎症性乳癌、非浸潤性小葉癌(LCIS)、髄様癌、粘液性癌腫、乳頭ページェット病、葉状腫瘍、および管状癌を検出できる。さらに、任意の進行段階の乳癌、例えば原発性、転移性、および再発乳癌が検出され得る。多数のタイプの乳癌についての情報は、例えば American Cancer Societyから、または例えば Wilson et al. (1991) Harrison's Principles of Internal Medicine, 12th Edition, McGraw-Hill, Incから見いだされ得る。

10

【0041】

本発明の一つの局面において、診断の第二段階を実施することができる。例えば、ADAM 12レベルが癌の存在を示すことが見いだされた場合、次いで、癌を検出する他の方法を実施して癌の存在を確認することができる。マンモグラフィ(乳癌)、超音波、PETスキャン、MRIもしくは他の撮像技術、生検、臨床検査、ダクトグラム(ductogram)、または他の方法のような任意のさまざまなさらなる診断段階が用いられ得る。

【0042】

本発明は、上皮起源の癌を有する疑いがあるか、または有する患者の予後評価のための方法をさらに提供する。方法は、患者から得られた試験生物学的試料中に存在するADAM 12レベルを測定する段階、および観察されたレベルを健康な個体の(同タイプの)生物学的試料中に通常見いだされるADAM 12レベルの範囲と比較する段階を含む。例えば、高いレベルはより高い転移活性を示唆し、かつ予後不良に相当するが、一方、より低いレベルは腫瘍の攻撃性がより低いことを示し、かつ予後がより良好であることに相当する。

20

【0043】

さらに、各患者においてADAM 12レベルを追跡することにより、疾患の進行を評価できる。例えば、経時的に患者におけるADAM 12発現レベルの変化を比較することにより、患者の状態の変化をモニターできる。ADAM 12レベルの進行性増加は腫瘍の浸潤能および転移能の増強を示唆する。

【0044】

本発明の予後診断法は、癌を有する患者に対する適切な処置方針の決定にも有用である。処置方針とは、癌の診断後または処置後の患者に対してとられる治療基準を指す。例えば、癌の再発、拡大、または患者の生残の可能性の決定により、より保存的もしくはより根治的なアプローチのいずれをとるべきか、または処置様式を組み合わせるべきかの決定が補助され得る。例えば、癌の再発が予期される場合、化学療法、放射線療法、免疫療法、生物学的修飾因子による治療、遺伝子治療、ワクチンなどを、外科的処置の前もしくは後に行うか、または患者を処置する期間を調整することが有利であり得る。

30

【0045】

ADAM 12レベルの測定

本明細書に記載される、ADAM 12レベルは当業者に公知の任意の手段により測定され得る。本発明において、生物学的試料中のADAM 12タンパク質レベルを検出するために、抗体または抗体同等物を用いることが通常好ましい。しかしながら、mRNA転写産物の分析によりADAM 12発現量を測定するなど、他のADAM 12発現検出方法も用いられ得る。例えば、生物学的試料が腫瘍または組織試料である場合、ADAM 12 mRNAを測定することが好ましい可能性がある。

40

【0046】

mRNAのレベルを評価するための方法は当業者に周知である。例えば、ノーザンブロット法によりRNA転写産物の検出が実現され得る。ここで、RNA調製物は変性アガロースゲル上で泳動され、適切な支持体、例えば活性化セルロース、ニトロセルロース、またはガラスもしくはナイロンメンブレンに転写される。次いで、標識された(例えば、放射性標識された)cDNAまたはRNAが、調製物にハイブリダイズされ、洗浄され、かつオートラジオグラ

50

フィーなどの方法により分析される。

【0047】

RNA転写産物の検出はさらに、公知の増幅法を用いて実現され得る。例えば、mRNAをcDNAに逆転写した後にポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を行うこと；または米国特許第5,322,770号に記載のように両方の段階に単一の酵素を用いること、もしくはR. L. Marshall, et al., PCR Methods and Applications 4: 80-84 (1994)により記載のように、mRNAをcDNAに逆転写した後に非対称性ギャブリガーゼ連鎖反応(RT-AGLCR)を行うことが本発明の範囲内である。ADAM 12 mRNA転写産物を検出するための適切な方法の一つは、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、参考文献Pabic et. al. Hepatology, 37(5): 1056-1066, 2003に記載される。

10

【0048】

本明細書において利用できる他の公知の増幅法には、PNAS USA 87: 1874-1878 (1990)記載、およびNature 350 (No. 6313): 91-92 (1991)にも記載のいわゆる「NASBA」または「3SR」技術；公開欧州特許出願(EPA)第4544610号記載のQ-増幅法；G. T. Walker et al., Clin. Chem. 42: 9-13 (1996)および欧州特許出願第684315号に記載の鎖置換増幅法；ならびにPCT公報WO 9322461記載の標的媒介増幅法が含まれるが、これらに限定されない。

【0049】

インサイチューハイブリダイゼーション可視化も用いられ得る。ここで、放射性標識されたアンチセンスRNAプローブは生検試料の薄片とハイブリダイズされ、洗浄され、RNAアーゼを用いて切断され、かつオートラジオグラフィーのために感光乳剤に暴露される。試料は試料の組織学的組成を示すためにヘマトキシリンを用いて染色されてもよく、適切な光フィルターを用いた暗視野像は現像された乳剤を示す。ジゴキシゲニンなどの非放射性標識も用いられ得る。

20

【0050】

または、mRNA発現をDNAアレイ、チップまたはマイクロアレイ上で検出することもできる。ADAM 12に相当するオリゴヌクレオチドをチップに固定し、次いでそれを患者から得られた試験試料の標識核酸とハイブリダイズする。ADAM 12転写産物を含む試料からは陽性のハイブリダイゼーションシグナルが得られる。DNAアレイの調製方法およびそれらの使用は当技術分野において周知である。(例えば、それらの全体が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第6,618,679；6,379,897；6,664,377；6,451,536；548,257号；米国特許第20030157485号、およびSchena et al. 1995 Science 20:467-470；Gerhold et al. 1999 Trends in Biochem. Sci. 24, 168-173；ならびにLennon et al. 2000 Drug discovery Today 5: 59-65を参照されたい)。連続的遺伝子発現分析法(Serial Analysis of Gene Expression, SAGE)も実施され得る(例えば、米国特許出願第20030215858号を参照されたい)。

30

【0051】

mRNAレベルをモニターするため、例えば、試験される生物学的試料からmRNAが抽出、逆転写され、かつ蛍光標識されたcDNAプローブが作成される。ADAM 12 cDNAにハイブリダイズ可能なマイクロアレイは次いで、標識されたcDNAプローブを用いて探索され、スライドはスキャンされ蛍光強度が測定される。この強度はハイブリダイゼーション強度および発現レベルと相関する。

40

【0052】

特に生物学的試料が液体試料、例えば血液または尿である場合、ADAM 12タンパク質レベル、またはADAM 12活性も測定可能である。一つの態様において、ADAM 12タンパク質レベルは、生物学的試料を、ADAM 12またはADAM 12の断片に特異的に結合する、抗体に基づく結合部分を接触させることにより測定される。次いで、抗体-ADAM 12複合体の形成が、ADAM12レベルの尺度として検出される。

【0053】

「抗体に基づく結合部分」または「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子および免

50

疫グロブリン分子の免疫学的に活性な決定群、例えばADAM 12に特異的に結合する(免疫反応する)抗原結合部位を含む分子を含む。「抗体に基づく結合部分」という用語は、例えば任意のアイソタイプ(IgG、IgA、IgM、IgEなど)の抗体全体を含むことが意図され、およびADAM 12タンパク質と特異的に反応性であるそれらの断片を含む。抗体は従来の技術を用いて断片化され得る。従って、この用語は特定のタンパク質と選択的に反応することが可能な、抗体分子のタンパク質分解的に切断されたセグメント、または組換えにより調製された部分(portion)を含む。そのようなタンパク質分解的および/または組換え断片の非限定的な例には、Fab、F(ab')₂、Fab'、Fv、dAb、ならびにペプチドリinkerにより連結されたVLおよびVHドメインを含む一本鎖抗体(scFv)が含まれる。scFv'は共有結合的にまたは非共有結合的に連結され、2つまたはそれ以上の結合部位を有する抗体を形成し得る。従って、「抗体に基づく結合部分」はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、または他の抗体精製調製物および組換え抗体を含む。「抗体に基づく結合部分」という用語は、ヒト化抗体、二重特異性抗体、および抗体分子由来の抗原結合決定群を少なくとも1つ有するキメラ分子を含むことがさらに意図される。好ましい態様において、抗体に基づく結合部分は検出可能に標識される。

10

【0054】

本明細書において用いられるように、「標識された抗体」は検出可能な手段により標識され、かつ酵素、放射性、蛍光、および化学発光標識された抗体を含むがこれらに限定されない抗体を含む。抗体は検出可能なタグ、例えばc-Myc、HA、VSV-G、HSV、FLAG、V5、またはHISを用いても標識され得る。

20

【0055】

ADAM 12の検出のために、抗体に基づく結合部分を用いる本発明の診断および予後診断法において、生物学的試料中に存在するADAM 12レベルは、検出可能に標識された抗体から発せられたシグナルの強度に相関する。

【0056】

一つの好ましい態様において、抗体に基づく結合部分は、抗体を酵素に連結することにより検出可能に標識される。次いで、酵素がその基質に暴露されると、例えば、分光光度法、蛍光定量法、または可視化手段により検出され得る化学的部分を産生するような様式で基質と反応する。本発明の抗体を検出可能に標識するのに用いることができる酵素には、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、 α -V-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、 α -グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-VI-リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、およびアセチルコリンエステラーゼが含まれるが、これらに限定されない。化学発光法は抗体に基づく結合部分を検出するために用いられ得る他の方法である。

30

【0057】

任意のさまざまな他の免疫アッセイ法を用いても、検出は実現され得る。例えば、抗体を放射性標識することにより、放射性免疫測定法の使用によって抗体を検出することが可能である。放射性同位体はガンマカウンターもしくはシンチレーションカウンターの使用のような手段、またはオートラジオグラフィーによって検出できる。本発明の目的のために特に有用な同位体は、³H、¹³¹I、³⁵S、¹⁴C、および好ましくは¹²⁵Iである。

40

【0058】

蛍光化合物を用いて抗体を標識することも可能である。蛍光標識された抗体が適切な波長の光線に暴露された場合、次いでその存在が蛍光のために検出され得る。最も一般的に使用される蛍光標識化合物には、CYE色素、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルアルデヒド、およびフルオレスカミンがある。

【0059】

¹⁵²Euのような蛍光発光金属、またはランタン系列の他のものを用いて、抗体を検出可

50

能に標識することも可能である。これらの金属は、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)またはエチレンジアミン四酢酸(EDTA)のような金属キレート化群を用いて抗体に接着され得る。

【0060】

抗体は、それを化学発光化合物と結合させることによっても検出可能に標識され得る。次いで、化学発光-抗体の存在が、化学反応進行中に生じる発光の存在を検出することにより決定される。特に有用な化学発光標識化合物の例にはルミノール、ルシフェリン、イソルミノール、テロマティック(theromatic)アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩、およびシュウ酸エステルがある。

【0061】

上記のように、ADAM 12タンパク質レベルは、それぞれ以下にさらに詳細に記載する、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、放射性免疫測定法(RIA)、免疫放射定量測定法(IRMA)、ウェスタンブロット、または免疫組織化学法などの免疫測定法により検出され得る。極めて迅速になり得るELISAまたはRIAなどの免疫測定法が一般的により好ましい。抗体アレイまたはタンパク質チップもまた用いられ得る。例えば、それらの全体が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許出願第20030013208A1；20020155493A1；20030017515号および米国特許第6,329,209；6,365,418号を参照されたい。

【0062】

免疫測定法

「放射性免疫測定法」は標識された(例えば、放射性標識された)型の抗原を用いて、抗原を検出し、かつ抗原の濃度を測定するための技術である。抗原に対する放射性標識の例には、 ^3H 、 ^{14}C 、および ^{125}I が含まれる。生物学的試料中のADAM 12抗原の濃度は、生物学的試料中の抗原を、抗原と抗体の結合について、標識された(例えば、放射性)抗原と競合させることにより測定される。標識抗原と非標識抗原の間で確実に競合的結合させるため、標識抗原は抗体の結合部位を飽和させるのに十分な濃度で存在する。試料中の抗原濃度が高いほど、抗体に結合する標識抗原の濃度が低下する。

【0063】

放射性免疫測定法において、抗体に結合した標識抗原の濃度を決定するためには、抗原-抗体複合体が遊離の抗原と分離されなくてはならない。遊離の抗原から抗原-抗体複合体を分離する一つの方法は、抗アイソタイプ抗血清を用いて抗原-抗体複合体を沈降させることによる。遊離の抗原から抗原-抗体複合体を分離する他の方法は、ホルマリリンにより殺された黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)を用いて抗原-抗体複合体を沈降させることによる。遊離の抗原から抗原-抗体複合体を分離するさらに他の方法は、「固相放射性免疫測定法」を実施することによる。ここで抗体はセファロースビーズ、ポリスチレンウェル、ポリ塩化ビニルウェル、またはマイクロタイタウェルに結合(例えば、共有結合)される。抗体に結合した標識抗原の濃度を、既知の濃度の抗原を有する試料に基づく標準曲線と比較することにより、生物学的試料中の抗原濃度が決定され得る。

【0064】

「免疫放射定量測定法」(IRMA)は、抗体試薬が放射性標識されている免疫測定法である。IRMAには、タンパク質、例えばウサギ血清アルブミン(RSA)との結合などの技術による多価抗原抱合体の産生が必要である。多価抗原抱合体は、一分子当たり少なくとも2つの抗原残基を必ず有し、かつ抗原残基は少なくとも2つの抗体によって抗原に結合できるように十分な距離離れている必要がある。例えば、IRMAにおいて、多価抗原抱合体はプラスチックの球体などの固体表面に結合されてもよい。非標識の「試料」抗原、および放射性標識された、抗原に対する抗体が、多価抗原抱合体コーティング球体を含む試験管に加えられる。試料中の抗原は、抗原抗体結合部位について多価抗原抱合体と競合する。適当なインキュベーション時間の後、結合していない反応物が洗浄により除かれ、固相上の放射能の量が測定される。結合した放射性抗体の量は、試料中の抗原濃度に逆比例する。

【0065】

最も一般的な酵素免疫測定法が「酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)」である。ELISAは、

10

20

30

40

50

標識(例えば、酵素結合)型の抗体を用いて、抗原を検出し、かつ抗原の濃度を測定する技術である。当業者に周知の異なる型のELISAが存在する。当技術分野において公知であるELISAの標準的な技術は、"Methods in Immunodiagnosis", 2nd Edition, Rose and Bigazzi, eds. John Wiley & Sons, 1980; Campbell et al., "Methods and Immunology", W. A. Benjamin, Inc., 1964; および Oellerich, M. 1984, J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 22:895-904に記載される。

【0066】

「サンドイッチELISA」において、抗体(例えば、抗ADAM 12)は固相(すなわち、マイクロタイタプレート)に結合され、かつ抗原(例えば、ADAM 12)を含む生物学的試料に暴露される。次いで、固相は洗浄され結合していない抗原が除かれる。次いで標識抗体(例えば、酵素結合)が結合した抗原(存在する場合)に結合され、抗体-抗原-抗体サンドイッチが形成される。抗体に結合され得る酵素の例には、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、ウレアーゼ、 α -ガラクトシダーゼがある。抗体に結合した酵素は基質と反応して、測定可能な着色反応産物を生成する。

10

【0067】

「競合ELISA」において、抗体は抗原(すなわち、ADAM 12)を含む試料と共にインキュベートされる。抗原-抗体混合物は次いで、抗原(すなわち、ADAM 12)を用いてコーティングされた固相(例えば、マイクロタイタプレート)と接触される。試料中に存在する抗原が多いほど、固相に結合可能な遊離の抗体は少ない。次いで、固相に結合した一次抗体の量を決定するために、標識(例えば、酵素結合)二次抗体が固相に添加される。

20

【0068】

「免疫組織化学アッセイ法」において、アッセイされるタンパク質に対して特異的な抗体に組織を暴露することにより、組織の一片が特異的なタンパク質について試験される。次いで、タンパク質の有無および存在するタンパク質の量を決定するための数多くの方法のうちの任意のものを用いて、抗体が可視化される。抗体を可視化するために用いられる方法の例は、例えば、抗体に結合した酵素(例えば、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、または α -ガラクトシダーゼ)、または化学的方法(例えば、DAB/基質クロマジェン(chromagen))を介する方法である。

【0069】

本開示に基づき、実践者の好みに従って、他の技術を用いてADAM 12を検出してよい。そのような技術の一つがウェスタンブロット(Towbin et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 76:4350 (1979))であり、ここで、適切に処理された試料がSDS-PAGEゲル上を泳動され、その後ニトロセルロースフィルターなどの固体支持体に転写される。次いで、検出可能な標識された抗ADAM 12抗体を用いてADAM 12レベルを評価でき、ここで検出可能な標識からのシグナルの強度は存在するADAM 12量に対応する。例えば濃度測定によりレベルを定量化することができる。

30

【0070】**質量分析法**

さらに、MALDI/TOF (time-to-flight)、SELDI/TOF、液体クロマトグラフィー質量分析法(LC-MS)、ガスクロマトグラフィー質量分析法(GC-MS)、高速液体クロマトグラフィー質量分析法(HPLC-MS)、キャピラリー電気泳動質量分析法、核磁気共鳴分析法、またはタンデム質量分析法(例えば、MS/MS、MS/MS/MS、ESI-MS/MSなど)のような質量分析法を用いてADAM 12を検出し得る。例えば、参照により本明細書に組み入れられる、米国特許出願第20030199001、20030134304、20030077616号を参照されたい。

40

【0071】

質量分析法は当技術分野において周知であり、かつタンパク質などの生体分子を定量および/または同定するのに用いられてきた(例えば、Li et al. (2000) Tibtech 18:151-160; Rowley et al. (2000) Methods 20: 383-397; および Kuster and Mann (1998) Curr. Opin. Structural Biol. 8: 393-400を参照されたい)。さらに、質量分析技術は、単離されたタンパク質の、少なくとも部分的な新規配列決定が可能となるまで進展している。Ch

50

ait et al., Science 262:89-92 (1993); Keough et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:7131-6 (1999); 総説が Bergman, EXS 88:133-44 (2000)に見られる。

【0072】

特定の態様において、気相イオン分光光度計が用いられる。他の態様において、試料を分析するためにレーザー脱離/イオン化質量分析法が用いられる。最近のレーザー脱離/イオン化質量分析法(「LDI-MS」)は、二種類の主要な方法で実践され得る:マトリックス支援レーザー脱離/イオン化(「MALDI」)質量分析法および表面増強レーザー脱離/イオン化(「SELDI」)質量分析法。MALDIにおいて、分析物はマトリックスを含む溶液と混合され、その液体の一滴が基質表面に配置される。次いでマトリックス溶液は、生体分子とともに共結晶化する。基質は質量分析計に挿入される。レーザーエネルギーが基質表面に向けられ、そこで生体分子を、それらを著しく断片化することなく、脱離かつイオン化する。しかしながら、MALDIには分析ツールとして限界がある。MALDIは試料を分画するための手段を提供せず、かつマトリックス材料が、特に低分子量の分析物について検出を妨げ得る。例えば、米国特許第5,118,937号(Hillenkamp et al.)および米国特許第5,045,694号(Beavis & Chait)を参照されたい。

10

【0073】

SELDIにおいて、基質表面は、それが脱離プロセスに能動的に関与するように改変される。一つの変法において、表面は、関心対象のタンパク質に選択的に結合する吸収剤および/または捕捉試薬を用いて誘導体化される。他の変法において、表面は、レーザーが照射されても脱離しないエネルギー吸収分子を用いて誘導体化される。他の変法において、表面は、関心対象のタンパク質と結合し、レーザーを適用すると切断される光分解結合を含む分子を用いて誘導体化される。これらの方法それぞれにおいて、誘導体化剤は通常、基質表面上の試料が置かれる特定の部位に局在化される。例えば、米国特許第5,719,060号およびWO 98/59361を参照されたい。例えば、分析物を捕捉するためにSELDIの親和性表面を用い、エネルギー吸収材料を提供するために捕捉された分析物にマトリックス含有液を添加することで、2つの方法を組み合わせ得る。

20

【0074】

質量分析計に関する追加情報については、例えば、Principles of Instrumental Analysis, 3rd edition., Skoog, Saunders College Publishing, Philadelphia, 1985; および Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 4.sup.th ed. Vol. 15 (John Wiley & Sons, New York 1995), pp. 1071-1094を参照されたい。

30

【0075】

マーカーまたは他の物質の存在の検出には、典型的にはシグナル強度の検出が含まれる。これは、基質に結合したポリペプチドの量および特徴を同様に反映し得る。例えば、特定の態様において、第一の試料と第二の試料のスペクトルからのピーク値のシグナル強度を比較し(例えば、視覚的に、コンピューター分析によってなど)、特定の生体分子の相対量を決定し得る。Biomarker Wizard program (CIPHERGEN Biosystems, Inc., Fremont, Calif)などのソフトウェアプログラムを用いて質量スペクトルの分析を補助し得る。質量分析計およびそれらの技術は当業者に周知である。

【0076】

当業者はいずれも、質量分析計の任意の構成要素(例えば、脱離源、質量分析器、検出部など)およびさまざまな試料調製物を、本明細書において記載される他の適切な構成要素もしくは調製物と、または当技術分野に公知のものに組み合わせ得ることを理解する。例えば、いくつかの態様において、対照試料は重原子(例えば、 ^{13}C)を含み得、それにより、同一回の質量分析において試験試料を既知の対照試料と混合可能にしている。

40

【0077】

一つの好ましい態様において、レーザー脱離飛行時間(TOF)質量分析計が用いられる。レーザー脱離質量分析法において、結合したマーカーを有する基質が注入系に導入される。マーカーは、イオン化源からのレーザーにより、気相に脱離かつイオン化される。生成されたイオンはイオン光学装置により回収され、次いで、飛行時間質量分析器において、

50

イオンは短い高電圧場を通して加速され、かつ高真空容器内に流入される。高真空容器の遠端で、加速されたイオンが異なる時間に高感度の検出器表面に衝突する。飛行時間はイオン質量の関数であることから、イオン形成とイオン検出器衝突の間の経過時間を用いて、特定の質量対電荷比を有する分子の存在または非存在を同定し得る。

【0078】

いくつかの態様において、部分的に、プログラム可能なデジタルコンピューターを用いてアルゴリズムを実行することにより、第一または第二の試料中に存在する1つまたは複数の生体分子の相対量が決定される。アルゴリズムは、第一の質量スペクトルおよび第二の質量スペクトル中に、少なくとも一つのピーク値を同定する。アルゴリズムは次いで、第一の質量スペクトルのピーク値のシグナル強度を、質量スペクトルの第二の質量スペクトルのピーク値のシグナル強度と比較する。相対的なシグナル強度が、第一および第二の試料中に存在する生体分子の量の指標である。既知の量の生体分子を含む標準物を第二の試料として分析し、第一の試料中に存在する生体分子の量のより良い定量を提供することが可能である。特定の態様において、第一および第二の試料中の生体分子のアイデンティティーも決定され得る。

10

【0079】

一つの好ましい態様において、ADAM 12レベルはMALDI-TOF質量分析法により測定される。

【0080】

他のアッセイ法

20

ADAM 12レベルは、例えば活性を測定し、酵素電気泳動法を含むがこれに限定されない、他の生物学的アッセイ法を用いることによっても測定され得る。酵素電気泳動法は当業者に周知のアッセイ法であり、それらの全体が参照により本明細書に組み入れられる、Heusen et al., *Anal. Biochem.*, (1980) 102:196-202; Wilson et al., *Journal of Urology*, (1993) 149:653-658; Hernon et al., *J. Biol. Chem.* (1986) 261: 2814-2828, Brauhut et al., *J. Biol. Chem.* (1994) 269: 13472-13479; および Moses et al., *Cancer Research* 58, 1395-1399, April 1, 1998に記載される。

【0081】

ADAM 12抗体

本発明において用いられる抗体は市販の供給源より得られ得る。または、抗体をADAM 12ポリペプチド、もしくはADAM 12ポリペプチドの一部に対して産生され得る。ADAM 12抗体の産生方法は、参照により本明細書に組み入れられるPCT公報W0 97/40072または米国特許出願第2002/0182702号に開示される。

30

【0082】

本発明において用いられる抗体は、抗体を産生する標準的な方法を用いて、例えばモノクローナル抗体産生(Campbell, A.M., *Monoclonal Antibodies Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, the Netherlands (1984); St. Groth et al., *J. Immunology*, (1990) 35: 1-21; および Kozbor et al., *Immunology Today* (1983) 4:72)により産生され得る。抗体は、当技術分野において周知の方法により、タンパク質の抗原性部分を用いてファージディスプレイライブラリーなどの抗体ライブラリーをスクリーニングすることによっても容易に得られ得る。例えば、米国特許第5,702,892号(U.S.A. Health & Human Services)およびW0 01/18058 (Novopharm Biotech Inc.)はバクテリオファージディスプレイライブラリーおよび抗体結合ドメイン断片を産生するための選択方法を開示する。

40

【0083】

ADAM 12検出キット

本発明は上皮起源の癌の検出および予後評価のための市販のキットにも向けられる。キットは当業者に周知の任意の形態をとり、かつ本明細書において記載されるADAM 12検出のための1つまたは複数の方法を実施するのに有用である。キットは、それらが、生物学的試料中のADAM 12の検出のためのアッセイ法を実施するために必須の試薬の全てではな

50

くとも、多くを供給する点において便利である。さらに、アッセイ法は好ましくは、試験の結果を定量化または確証化し得るように、キットに含まれる標準物または複数の標準物、例えば所定量のADAM 12タンパク質もしくは核酸と同時に実施される。

【0084】

キットにはADAM 12レベルを検出するための手段、例えばADAM 12タンパク質に選択的に結合する抗体もしくは抗体断片、またはそのタンパク質をコードするcDNAの合成を可能にするDNAオリゴヌクレオチドプライマー対、または、例えば、ADAM 12 mRNAの発現を検出するDNAプローブが含まれる。診断アッセイキットは優先的に標準的な二抗体結合方式で作製され、ここで1つのADAM 12特異的抗体が患者試料中のADAM 12を捕捉し、もう1つのADAM 12特異的抗体を用いて捕捉されたADAM 12を検出する。例えば、捕捉抗体は固相、例えばアッセイプレート、アッセイウェル、ニトロセルロースメンブレン、ビーズ、ディップスティック、または溶出カラムの構成要素上に固定される。第二の抗体、すなわち検出抗体は、典型的には比色剤または放射性同位元素などの検出可能な標識によりタグ化される。

10

【0085】

一つの好ましい態様において、キットは尿試料中のADAM 12レベルを検出するための手段を含む。特定の態様において、キットは、ADAM 12タンパク質に特異的に結合する抗ADAM 12抗体または断片がその上に固定された「ディップスティック」を含む。特異的に結合したADAM 12タンパク質は次いで、例えば比色剤または放射性同位元素を用いて検出可能に標識された第二の抗体を用いて、検出され得る。

【0086】

他の態様において、アッセイキットは(限定されないが)以下の技術を用い得る：競合および非競合アッセイ法、放射性免疫測定法(RIA)、生体発光および化学発光アッセイ法、蛍光アッセイ法、サンドイッチアッセイ法、免疫放射定量測定法、ドットプロット、ELISAを含む酵素結合アッセイ法、マイクロタイタプレート、ならびに免疫細胞化学。各キットについて、アッセイの範囲、感度、精度、信頼性、特異性、および再現性は、当業者に周知の手段により確立される。

20

【0087】

上記のアッセイキットは使用説明書をさらに提供する。

【0088】

前または後で引用された参考文献は全て参照により本明細書に組み入れられる。

30

【0089】

本発明は以下の実施例によりさらに説明される。

【0090】

これらの実施例は本発明の理解を助けるために提供され、その限定として解釈されない。

【0091】

実施例1 乳癌における尿中ADAM 12と疾患の状態および病期との相関

ADAM (a disintegrin and metalloprotease)は、ヘビ毒メタロプロテアーゼ(SVMP)およびマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)に関連する、内在性膜および分泌型糖タンパク質の最近発見されたファミリーである。このファミリーのメンバーは、正常な発生、ならびにアルツハイマー病、関節リウマチ、および癌などの病理的な状態の両方において、細胞表面再構築、外部ドメイン分断、成長因子可用性の調節、ならびに細胞間および細胞マトリックス相互作用の媒介においてさまざまな役割を示す。ヒトADAM 12は選択的にスプライシングされた2つの型、長い膜固定型(ADAM 12-L)、およびより短い分泌型(ADAM 12-S)として発現される。乳癌、結腸癌、肺癌、および肝細胞癌組織において、ADAM 12 mRNAおよびタンパク質レベルの上昇は以前に報告されている。本発明者らは以前、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)がさまざまな異なる癌を有する患者の尿中に検出され得、およびそれらの存在が疾患の状態の独立予測因子であることを報告した。しかしながら、MMP以外には、尿中の疾患マーカーとしての他のプロテアーゼの存在は、いまだ十分に探索されていない。本研究の目標は、癌患者の尿中に存在する他のプロテアーゼを同定し、そ

40

50

これらの存在が疾患の状態に関連し得るかどうか決定することである。本発明者らは、クロマトグラフィー段階およびMALDI-TOF質量分析法を組み合わせ用い、乳癌患者の尿中のADAM 12の検出を報告する。

【0092】

材料および方法

尿中ADAM 12の同定

ADAM 12の最初の同定は50mlの尿(総タンパク質量~5mg)を用いて行われた。尿をAmicon membrane XM-50(Millipore Corporation, Bedford, MA)を用いて限外ろ過により濃縮した。試料を2volの50mM Tris, pH 7.5(緩衝液A)を用いて希釈し、Qセファロースカラムに適用した。洗浄後、緩衝液A中の0~400mM NaCl勾配を添加した。ゼラチナーゼ活性を有する画分をプールし、NaCl濃度を200mMに調整し、Gelatin Sepharose (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)とともに、常時振盪しつつ4で16hインキュベートした。洗浄段階の後、200mM NaClを含む緩衝液A中にそれぞれ5、10、および20%DMSOの段階勾配を用いて溶出を実施した。溶出された画分を濃縮し、非還元性条件下でSDS-PAGEにより分離して、製造者の使用説明書に従ってSterling Rapid Silver Stain Kit (National Diagnostics, Atlanta, GA)を用いて染色した。~52、80、120、および140kDaのいくつかの別個のバンドが検出された。タンパク質のバンドをゲルから切除し、トリプシン消化に供し、タンパク質の分子量を決定するため、かつトリプシン消化物のペプチドマッピングのために、脱離のための波長337nmのレーザーおよび分析のリフレクトロンモードを用いて、MALDI飛行時間質量分析法(TOFMS)(Perceptive STR, Applied Biosystems, Framingham, MA)により分析した。生成されたペプチドマップを、MSFit (Baker, P.R. and Clauser, K.R.)検索プログラムを用いて、NCBIおよびSwiss-Protにより保有される非重複データベース中のタンパク質項目から構築された公有のタンパク質のFASTAデータベースに対して検索した。MSFitにより同定されたペプチド対応物は、それらのMOWSEスコア、一致した質量の割合、分子量、ならびにペプチドおよびタンパク質の数多くの観察に従って選別された。タンパク質の慎重な同定のためには、良好なスコアを伴い単一のタンパク質に一致する少なくとも2つのペプチドが必要とされる。

【0093】

ADAM 12-Sの発現および精製

全長のヒトADAM 12-Sをプラスミドにクローニングし(p1151)、以前記載されたように(5)Cos-7細胞(ATCC、CRL 1651)のトランスフェクトを実施した。馴化培地に分泌された、発現された組換えADAM 12-Sは、以前記載されたものに軽微な改変を加えて、精製した。簡単には、トランスフェクトされたCos-7細胞由来の馴化培地は、(6)に記載のように、連続的にSPセファロースおよびConAセファロースクロマトグラフィーの段階に供される。ConAセファロースカラム由来のADAM 12-Sを含む画分をプールし、緩衝液を交換した後、0.05% CHAPSを含む緩衝液Aを用いて前平衡化されたVivapure H Mini Q column (VivaScience, Carlsbad, CA)に添加した。純粋なADAM 12-Sが、SDS-PAGEおよび免疫プロット分析により決定されるように、フロースルー(flow-through)画分中に検出された。

【0094】

基質特異性研究

ADAM 12-Sのゼラチン、IV型コラーゲン、フィブロネクチン、およびカゼイン分解活性を、以前記載されたように(14)測定した。ADAM 12-S(1 μ M)を非還元性の試料緩衝液と混合し、0.1%ゼラチン、0.1%IV型コラーゲン、または0.02%フィブロネクチンのいずれかを含む10%ポリアクリルアミドゲル、および0.1%カゼインを含む12%ポリアクリルアミドゲル上で分離した。電気泳動後、2.5% Triton X-100を用いてゲルを30分間洗浄した。ゲルを5mM CaCl₂、1 μ M ZnCl₂、および0.02% Na₃を含む50mM Tris、pH 7.6中で18h、37でインキュベートすることにより基質消化を行った。ゲルは0.1%クーマシーを用いて染色され、酵素活性バンドは、均一な青色染色のバックグラウンド上の間隙帯として検出された。ADAM 12がI型コラーゲン分解活性を有するか否か決定するため、純粋な酵素(1 μ M)を、以前記載されたように(16)、放射測定コラゲナーゼアッセイ法を用いて分析した。阻害アッ

10

20

30

40

50

セイのために、ADAM 12(160nM)を30 μ gゼラチンとともにアッセイ緩衝液(50mM Tris、pH7.5)中で、さまざまな阻害剤、5mM 1, 10-フェナントロリン、5mM EDTA、1mM マリマスタット(Marimastat)、もしくは2種の異なる濃度(100および500nM)のTIMP-1、TIMP-2、TIMP-3、もしくはTIMP-4のいずれかの存在下または非存在下で、最終容量を30 μ lとし、18h、37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。反応は非還元性試料緩衝液の添加により停止され、試料はSDS-PAGE分析、その後のクーマシー染色により分離された。

【0095】

尿試料の回収および処理

尿の回収は、以前記載されたように(14)行われた。試料は無菌の容器に回収され、直ちに-20 $^{\circ}$ Cで凍結された。尿は、廃棄された臨床材料に関係する、施設の生命倫理ガイドラインに従って回収された。分析の前に、Multistix 9 Urinalysis Strips (Bayer, Elkhart, IN)を用いて、尿を血液および白血球の存在について試験し、血液または白血球を含む試料を除外した。尿のクレアチニン濃度を市販のキット(Sigma, St. Louis, MO)を用い、製造者のプロトコルに従って決定した。尿のタンパク質濃度は、ウシ血清アルブミンを標準として用いた、ブラッドフォード法により決定した。

10

【0096】

患者母集団

117の尿試料がADAM 12の存在について分析された。対照群は、認識される疾患を有さない46人の女性(年齢中央値 \sim 50歳)からなっていた。乳癌群は、異型乳管過形成(atypical ductal hyperplasia, ADH)、非浸潤性小葉癌(LCIS)、非浸潤性乳管癌(DCIS)、局所浸潤性乳癌(IBC)、および転移性疾患(図2参照)を含む乳癌のさまざまな病期と診断された71人の患者を含んでいた。

20

【0097】

ウェスタンブロット分析

等量のタンパク質(20 μ g)を還元条件下でSDS-PAGEにより分離した。分離されたタンパク質を電気泳動的にニトロセルロースメンブレン(Schleicher & Schuell, Keene, NH)に転写し、以前記載されたように(15)処置した。標識されたタンパク質は増強された化学発光(Pierce Chemical Company, Rockford, IL)を用いて可視化された。ヒトADAM 12に対するポリクローナル抗体、rb122 (4)、S-18 (sc-16526, Santa Cruz Biotechnology, CA)をそれぞれ1 μ g/mlおよび2 μ g/mlの濃度で用いた。バンド強度はUN-SCAN-IT(商標)(Silk Scientific, Orem, UT)ソフトウェアデジタルタイザー技術を用いて分析された。

30

【0098】

統計分析

感度、特異性、偽陽性率(FPR)、偽陰性率(FNR)、および尤度比(LR)を標準的な公式を用いて計算した。ADAM 12の存在を癌群(ADH/LCIS、DCIS、IBC、および転移性疾患)と対照の間で、ロジスティック回帰分析を用いて比較した。各群について、ADAM 12の存在は百分率として表され、正規近似に基づき95%信頼区間が計算された。ADAM 12レベルと乳癌の間の非線形関係は、ADAM 12の選択された区間に対する最尤推定により決定された確立を用いた、ロジスティック回帰分析を用いてモデル化された(17)。ADAM 12レベルの中央値は対照と癌患者の間で、マンホイットニーU検定に基づく対比較を用いたクラスカル・ワリスの検定を用いて比較され、一方、レベルの平均値は分散分析(ANOVA)により比較された。ADAM 12の診断正確性を評価するために、受信者動作特性(ROC)曲線分析を利用して、さまざまなADAM 12レベルについて、真陽性および偽陽性の全ての対をプロットした。ROC曲線は全ての乳癌患者と対照の間を識別するため、かつ別個に各癌群について作成された。(0,0)から急激に上昇し(0,1)近傍に至るROC曲線は、ほぼ完全に癌患者を対照から識別する試験であることを示し、一方、45度の対角線に近い曲線は低識別能を有する。95%信頼区間をともなう曲線下面積(AUC)は、疾患のバイオマーカーとしてのADAM 12の能力の指標として、ハンリー・マクニール(Hanley-McNeil)アルゴリズムを用いて決定された。さらに、AUCはランダムに選択された患者および対照の対が正確に分類される確率に等しい。癌患者と対照の実際の数、上に重ね合わせた理論上の確率曲線と共にヒストグラムで図

40

50

示し、より高いADAM 12レベルに対する乳癌の尤度の増加を説明する。5つの独立な群(病期に基づく4つの乳癌群および正常な対照群)間の多重比較を明らかにするため、 $P < 0.01$ (0.05割る5)の保存的両側基準を統計的に有意と見なした。全ての統計的分析はSAS statistical package (version 6.12, SAS Institute, Cary, NC)を用いて行われた。検出力分析から、各乳癌病期にある13人の患者の最小値が、ADAM 12レベルの差異の検出について80%の検出力を提供することが示唆された(version 5.0, nQuery Advisor, Statistical Solutions, Boston, MA)。

【 0 0 9 9 】

結果

ADAM 12の単離および同定

乳癌患者由来の尿は段階的なクロマトグラフィーに供され、かつプロテアーゼを単離する目的で、ゼラチンセファロースを用いてアフィニティークロマトグラフィー段階が行われた。ADAM 12がゼラチンセファロースビーズに結合したという事実は、この酵素がゼラチン分解能を有するという本発明者らのデータ(下記参照)を裏付けた。ゼラチンセファロースカラムに20%DMSOを添加した際に回収された画分は、~52、80、120、および140kDaのいくつかの別個のタンパク質のバンドを含んでいた(データは図示せず)。~120kDaのタンパク質バンドのMALDI-TOF分析により、それがディスインテグリンおよびメタロプロテアーゼドメイン12(ADAM 12)(アクセッション NP_003465)として同定された。ヒトADAM 12のアミノ酸配列にわたる4種の別個のペプチドが同定された。高いMOWSEスコア、一致した質量の割合、および同定されたペプチドの数により、分析されたタンパク質バンド中にADAM 12が存在することが高い信頼度で予測された。これらの結果を確認するために、乳癌患者および年齢が適合し性別が適合した対照由来の試料を含む、より大規模なコホートの尿がADAM 12について分析された。尿試料を濃縮し、タンパク質について正規化し(各分析につき総タンパク質量20 μ gを用いた)、ウェスタンブロット分析に供した。非還元尿試料において、ポリクローナルADAM 12特異的抗体、rb122は~120kDaのタンパク質バンドを認識し(データは図示せず)、一方、試料がメルカプトエタノールを用いて還元され、5分間煮沸された場合、~68kDaのバンドが検出された。他のADAM 12特異的抗体、ポリクローナル抗体S18、ならびにモノクローナル抗体8F8および6E6を用いた免疫ブロット分析も同様の結果を与えた(データは図示せず)。分子量に基づき、~68kDaのバンドが成熟型のADAM 12-S(5)として同定された。ADAM 12特異的抗体が癌患者の尿中に成熟型のタンパク質を検出した事実を鑑みると、質量分析法によるADAM 12のプロドメインに由来する2つのペプチドの同定は興味深い発見である。ADAM 12のプロドメインは、非還元条件下でのフェーリン切断(6)の後でさえも、プロテアーゼに会合したまま残ることが報告されている。このことは、この成熟ADAM 12会合プロペプチドのトリプシン切断(質量分析法に先立つ必須の段階)により、結果的にプロドメイン由来の2つのペプチドが検出されたことを示唆する。ADAM 12特異抗体を用いて免疫ブロット分析により検出されたタンパク質バンドのサイズは、成熟ADAM 12-Sのそれとほぼ一致するが、ポリクローナル抗体rb122は、-Lおよび-S型の両方で共有のされた相同領域である、ADAM 12のシステインに富む領域を認識する。従って、本発明者らは、検出されたバンドがADAM 12-Lの処理型である可能性を除外できない。全長のADAM 12-Lは報告された~120kDaの質量を有し、一方、成熟(プロペプチドを欠いた)膜結合型は~90kDaである(18)。質量分析法により分析された~120kDa種には全長のタンパク質が含まれていたが、免疫ブロット分析法から、尿中の主要な種は~68kDaの成熟型酵素であろうと示唆された。

【 0 1 0 0 】

ADAM 12の基質特異性

ADAM 12のECMタンパク質分解能を試験するため、組換えADAM 12-Sタンパク質がCos-7細胞中で発現され、以前記載されたように同質になるよう精製された。基質酵素電気泳動法によりアッセイされた場合、ADAM 12はゼラチンをタンパク質分解的に分解し得た。精製ヒトADAM 12-S試料は、ゼラチナーゼ活性バンドを示した、~68kDaの成熟型酵素からなっていた。ADAM 12はフィブロネクチンおよびIV型コラーゲンもまた分解したが、基質酵素

10

20

30

40

50

電気泳動法によりアッセイされた場合にカゼインを分解せず、放射測定コラゲナーゼアッセイ法において試験された場合にI型コラーゲンを分解しなかった(データは図示せず)。ADAM 12のゼラチン分解能を用いて、この酵素に対する異なるクラスのプロテアーゼ阻害剤の効果を評価した。純粋なADAM 12-Sをゼラチンと共に、さまざまな阻害剤の非存在下(図2C、レーン3~4)または存在下で、2または18hのいずれかの時間、37℃でインキュベートした。~140kDaのバンドの消失は、ADAM 12が時間依存的にゼラチンを切断したことを示した。亜鉛メタロプロテアーゼの古典的なキレート剤; EDTAおよび1, 10-フェナントロリンはADAM 12によるゼラチン分解を阻害したが、一方、1mMマリマスタットの添加は酵素活性の部分的な阻害をもたらした。内在性阻害剤のTIMP-1、TIMP-2、およびTIMP-4は、酵素より5倍高い濃度においてさえも、ADAM 12のゼラチナーゼ活性を阻害しなかったが、TIMP-3(500nM)はADAM 12活性の有効な阻害剤であった。

【0101】

疾患の進行中のADAM 12レベル

年齢が適合した健康な女性ボランティア由来の46検体、およびさまざまな病期の乳癌と診断されていた患者由来の71検体を含む、117の尿検体が分析された。癌患者由来の試料の大部分(図1、表I)はADAM 12について陽性であり、ADAM 12が著しく低い頻度で検出された正常な尿とは対照的であった。ADAM 12種の検出頻度は、対照群(15%)(46尿検体中7で陽性)と比較して、乳癌群(71尿検体中67で陽性)において高かった(94%)。乳癌患者および対照群由来の尿試料はADAM 12タンパク質レベルにおいても異なっていた。健康な個体および進行病期の乳癌を有する患者由来の代表的な尿試料の免疫プロット分析を図2に示す。ADAM 12バンドの濃度測定分析から、尿中ADAM 12レベルが疾患の進行病期に伴い上昇することが示された。対照において検出されたADAM 12は非常に低いかまたは無く、若干高いタンパク質レベルは乳癌の初期段階、例えばADH/LCISおよびDCISに付随し、一方、局所浸潤および転移性疾患を有する患者由来の尿中には、著しく高いレベルが観察された(図3)。

【0102】

統計解析

表IはADAM 12の陽性発現を有する患者の割合、および各群についてのレベル中央値を示す。対照群についての濃度測定スコアの平均値(12 DU)を閾値として、対照群と比較して、各癌群の陽性%が計算された。図6に示されるように、割合の比較に基づくと、対照と比較して、各乳癌群において、ADAM 12発現を有する個体の割合は著しく高かった(全て $P < 0.01$)。表IIは、全患者および各癌病期群についての二分試験(陽性または陰性の試験結果に基づく)としてのADAM 12の診断上の特性を示す。全癌患者については、任意のレベルの陽性発現に基づくADAM 12の感度は0.94(95%信頼区間: 0.86~0.98)であり、特異性は0.61(46対照中28)(95%信頼区間: 0.46~0.75)である。閾値12DUの設定により、全癌患者について、0.85(46対照中39)という著しく高い特異性がもたらされた。総体的な正確性は、症例または対照として正確に分類された117個体中の95個体に基づき、0.81であった(95%信頼区間: 0.73~0.88)。計算された尤度比(LR)は2.4であり、これは、陽性の試験結果について、尿中のADAM 12の存在が、その個体が乳癌を有する尤度が2.4倍高いことに関連づけられることを示す。71人の全癌患者および46人の対照についてのADAM 12レベルの中央値は、それぞれ37(四分位数間領域: 14~84)および0(四分位数間領域: 0~7)であった($P < 0.001$ 、マンホイットニー-U検定)。受信者動作特性(ROC)曲線は、実験的なADAM 12レベルに対するTPR(感度)およびFPR(1-特異性)間の関係を連続型変数として決定するため、全癌患者、ADH/LCIS、DCIS、IBC、および転移性疾患を有する患者を含むさまざまな群について作成された(データは図示せず)。全てのROC曲線は優れた識別性を示し、45度の対角線(すなわち、非識別性の線)から急激に上昇した。正常な対照とIBCを有する女性の区別に基づくROC曲線、および対照と転移性疾患を有する患者を比較するものが、0より大きいADAM 12レベルに対し、最も高いAUC(それぞれ、0.90および0.92)を有し、IBCおよび転移性疾患を有する患者を同定する感度は完全であった(すなわち、感度=1.00)。ロジスティック回帰分析を用いて、ADAM 12レベルに基づく乳癌の確率が導き出された(図7)。実験的なADAM 1

2レベルを、症例および対照について女性の割合を用いて、x軸に示されたADAM 12レベルを有するヒストグラムとして示した。46人の対照のうち、28人(61%)はADAM 12レベル0を有し、一方、71人の癌患者中4人(6%)のみがADAM 12レベル0を有した。さらに、6人の対照(13%)が20より高いADAM 12レベルを有したが、一方、71人の癌患者中46人(65%)が20より高いレベルを有した。ロジスティック回帰法により、ADAM 12レベルと癌の確率の間に、高度に有意な直接的関係が確認された(尤度比検定 = 34.62、 $P < 0.0001$)。図7において、理論的な非線形曲線により示されるように、ADAM 12レベル0を有する(すなわち、発現が無い)個体については乳癌の確率は32%であり、レベルが1と20の間である場合、ほぼ50%である。モデルから、21と40の間のADAM 12レベルに対して、乳癌の確率は67%であり、レベルが41と60の間の場合80%であり、61と80の間のレベルに対して90%、81~100のADAM 12レベルを有する個体について95%、およびレベルが100を超えた場合98%と予測される。

10

【0103】

(表I)乳癌患者および対照におけるADAM 12発現

| | | 対照 | ADH/LCIS | DCIS | IBC | 転移性 |
|---------------------|-------|------------|------------|------------|-------------|-------------|
| 患者数 | | 46 | 13 | 16 | 29 | 13 |
| 年齢、年 | | 41 ± 13 | 52 ± 6 | 57 ± 13 | 59 ± 12 | 55 ± 7 |
| ADAM 12の存在 | | 7 (15%) | 10 (78%) | 13 (82%) | 25 (86%) | 11 (85%) |
| ADAM 12 レベル (DU) | 平均±SE | 12.4 ± 4.2 | 23.0 ± 6.5 | 47.0 ± 9.8 | 68.4 ± 12.9 | 85.9 ± 17.8 |
| | 中央値 | 0 | 14 | 46 | 43 | 80 |
| | IQR | 0-7 | 12-31 | 15-67 | 20-92 | 42-106 |
| | 範囲 | 0-144 | 0-80 | 0-140 | 6-289 | 4-290 |

20

ADH = 異型乳管過形成、LCIS = 非浸潤性小葉癌、DCIS = 非浸潤性乳管癌、IBC = 局所浸潤性乳癌、DU = 濃度測定単位、IQR = 四分位数間領域

【0104】

(表II)乳癌患者および対照の区別におけるADAM 12の診断上の特性

| | 全患者 | ADH/LCIS | DCIS | IBC | 転移性 |
|-------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 感受性 | 0.94 (67/71) | 0.85 (11/13) | 0.88 (14/16) | 1.00 (29/29) | 1.00 (13/13) |
| FNR | 0.06 (4/71) | 0.15 (2/13) | 0.12 (2/16) | 0.00 (0/29) | 0.00 (0/13) |
| 特異性 | 0.61 (28/46) | 0.61 (28/46) | 0.61 (28/46) | 0.61 (28/46) | 0.61 (28/46) |
| FPR | 0.39 (18/46) | 0.39 (18/46) | 0.39 (18/46) | 0.39 (18/46) | 0.39 (18/46) |
| 精度 | 0.81 (95/117) | 0.66 (39/59) | 0.68 (42/62) | 0.76 (57/75) | 0.70 (41/59) |
| LR 陽性 試験 | 2.4 | 2.4 | 2.3 | 2.6 | 2.6 |

30

ADH = 異型乳管過形成、LCIS = 非浸潤性小葉癌、DCIS = 非浸潤性乳管癌、IBC = 局所浸潤性乳癌、FNR = 偽陰性率、FPR = 偽陽性率、LR = 尤度比

40

【0105】

以下におよび明細書を通じて引用される参考文献は、それらの全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0106】

参考文献

1. Buxbaum, J. D., Liu, K. N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., and Peschon, J. J. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 27765-27767
2. Chubinskaya, S., Mikhail, R., Deutsch, A., and Tindal, M. H. (2001) *J. Histochem. Cytochem.* 49, 1165-1176
3. Seals, D. F., and Courtneidge, S. A. (2003) *Genes Dev.* 17, 7-30
4. Gilpin, B. J., Loechel, F., Mattei, M. G., Engvall, E., Albrechtsen, R., and Wewer, U. M. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 157-166 10
5. Loechel, F., Gilpin, B. J., Engvall, E., Albrechtsen, R., and Wewer, U. M. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 16993-16997
6. Loechel, F., Fox, J. W., Murphy, G., Albrechtsen, R., and Wewer, U. M. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278, 511-515
7. Shi, Z., Xu, W., Loechel, F., Wewer, U. M., and Murphy, L. J. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 18574-18580
8. Asakura, M., Kitakaze, M., Takashima, S., Liao, Y., Ishikura, F., Yoshinaka, T., Ohmoto, H., Node, K., Yoshino, K., Ishiguro, H., Asanuma, H., Sanada, S., Matsumara, Y., Takeda, H., Beppu, S., Tada, M., Hori, M., and Higashiyama, S. (2002) *Nature Med.*, 8, 35-40 20
9. Iba, K., Albrechtsen, R., Gilpin, B. J., Loechel, F., and Wewer, U. M. (1999) *Amer. J. Pathol.* 154, 1489-1501
10. Iba, K., Albrechtsen, R., Gilpin, B., Frohlich, C., Loechel, F., Zolkiewska, A., Ishiguro, K., Kojima, T., Liu, W., Langford, J. K., Sanderson, R. D., Brakebusch, C., Fassler, R., and Wewer, U. M. (2000) *J. Cell Biol.* 149, 1143-1155 30
11. Le Pabic, H., Bonnier, D., Wewer, U. M., Coutand, A., Musso, O., Baffet, G., Clement, B., and Theret, N. (2003) *Hepatology* 37, 1056-1066
12. Lochter, A., Sternlicht, M. D., Werb, Z., and Bissell, M. J. (1998) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 857, 180-193
13. Kleiner, D. E., and Stetler-Stevenson, W. G. (1999) *Cancer Chemother. Pharmacol.* 43, S42-S51 40

14. Moses, M. A., Wiederschain, D., Loughlin, K. R., Zurakowski, D., Lamb, C. C., and Freeman, M. R. (1998) *Cancer Res.* 58, 1395-1399
15. Yan, L., Borregaard, N., Kjeldsen, L., and Moses, M. A. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 37258-37265
16. Moses, M. A., Sudhalter, J., and Langer, R. (1990) *Science* 248, 1408-1410
17. Breslow, N. E., and Day, N. E. (1980) in *Statistical methods in cancer research. Vol. 1-The analysis of case-control studies* pp. 192-224, Lyon, France: IARC 10
18. Cao, Y., Kang, Q., Zhao, Z. and Zolkiewska, A. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 26403-26411
19. Pieper, R., Gatlin, C. L., McGrath, A. M., Makusky, A. J., Mondal, M., Seonarain, M., Field, E., Schatz, C. R., Estock, M. A., Ahmed, N., Anderson, N. G., and Steiner, S. (2004) *Proteomics* 4, 1159-1174
20. Thongboonkerd, V., McLeish, K. R., Arthur, J. M., and Klein, J. B. (2002) *Kidney Inter.* 62, 1461-1469 20
21. Millichip, M. I., Dallas, D. J., Wu, E., Dale, S., and Mckie, N. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 245, 594-598
22. Martin, J., Eynstone, L. V., Davies, M., Williams, J. D. and Steadman, R. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 33683-33689
23. Shannon, J. D., Baramova, E. N., Bjarnason, J. B., and Fox, J. W. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 11575-11583
24. Alfandari, D., Cousin, H., Gaultier, A., Smith, K., White, J. M., Darribere, T., DeSimone, D. W. (2001) *Curr. Biol.* 11, 918-930 30
25. Amour, A., Knight, C. G., Webster, A., Slocombe, P. M., Stephens, P. E., Knauper, V., Docherty, A. J., and Murphy, G. (2000) *FEBS Lett.* 473, 275-279
26. Amour, A., Slocombe, P. M., Webster, A., Butler, M., Knight, C. G., Smith, B. J., Stephens, P. E., Shelley, C., Hutton, M., Knauper, V., Docherty, A. J., and Murphy, G. (1998) *FEBS Lett.* 435, 39-44
27. Zou, J., Zhu, F., Liu, J., Wang, W., Zhang, R., Garlisi, C. G., Liu, Y-H., Wang, S., Shah, H., Wan, Y., and Umland, S. P. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 9818-9830 40
28. Visse, R., and Nagase, H. (2003) *Cir. Res.* 92, 827-839
29. Fernández, C. A., Butterfield, C., Jackson, G., and Moses, M. A. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 40989-40995
30. Prestigiacomo, A. F., Lilja, H., Pettersson, K., Wolfert, R. L., and Stamey, T. A. (1996) *J. Urol.* 156, 350-354

31. Moertel, C. G., Fleming, T. R., Macdonald, J. S., Haller, D. G., Laurie, J. A., and Tangen, C. (1993) J. Am. Med. Assoc. 270, 943-947
32. Berek, J. S., and Bast, R. C., Jr. (1995) Cancer (Phila.) 76, 2092-2096

【図面の簡単な説明】

【0107】

本明細書に組み入れられ、かつ本明細書の一部をなす添付の図面は、本発明の態様を説明し、かつ、記載と共に、本発明の目的、利点、および原理を説明するのに役立つ。

【図1】乳癌を有する患者から得られた尿試料中のADAM 12の免疫プロット解析を、年齢および性別が適合した正常な対照；乳癌を有さない患者から得られた尿試料と比較して示す。

10

【図2】さまざまな病期の乳癌を有する患者から得られた尿試料中のADAM 12の免疫プロット解析を、正常な健康な個体から得られた尿試料中のADAM 12レベルと比較して示す。レーン11は92kDaの潜伏型および68kDaの成熟型のタンパク質を含む純粋な組換えADAM 12を表す。

【図3】全ての試料の免疫プロットの濃度測定のプロットを示す。プロットは乳癌の進行期に伴う尿中ADAM 12レベルの中央値の上昇を示す。誤差バーは標準誤差を示す(*、p、0.01、分散分析)。

【図4】ADAM 12の存在と乳癌の相関を図示するチャートを示す。癌患者由来の尿試料の94%がADAM 12について陽性であり、ADAM 12が著しく低い頻度(15%)で検出された正常な尿試料とは対照的であった。

20

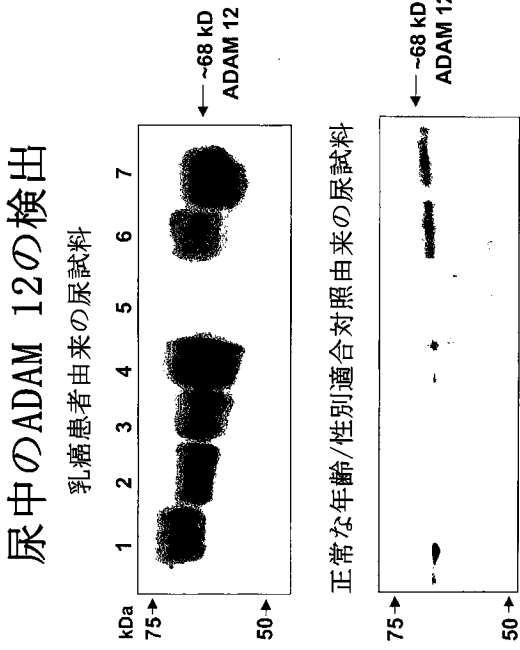
【図5】ADAM 12のアミノ酸配列(SEQ ID NO:1)を示す。

【図6】乳癌群および対照における尿中ADAM 12を有する患者の割合を示す。対照試料についての濃度測定スコアの平均値を閾値とし、対照群と比較して各癌群について陽性の割合を計算した。

【図7】ADAM 12レベルの上昇に基づき乳癌を有する(正常とは反対に)確率を図示する、ロジスティック回帰分析に基づく理論上の曲線を示す。確率曲線は、ADAM 12レベルの既定の区間について対照および乳癌患者の割合の上に重ね合わされている(p<0.00001)。x軸はADAM 12レベルの区間を表し、y軸は各区間における患者および対照の実際の割合に対応する。

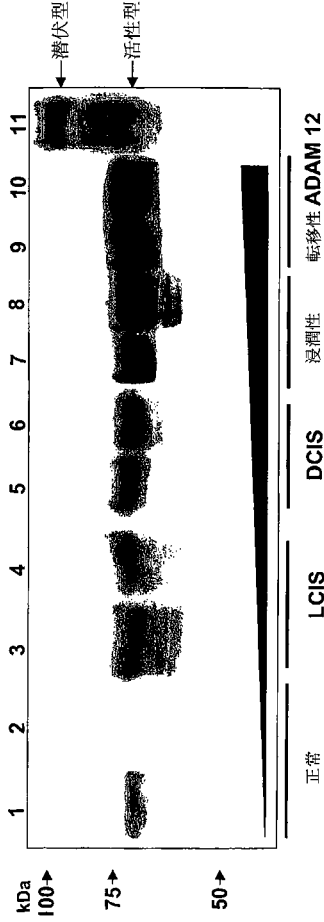
30

【 図 1 】



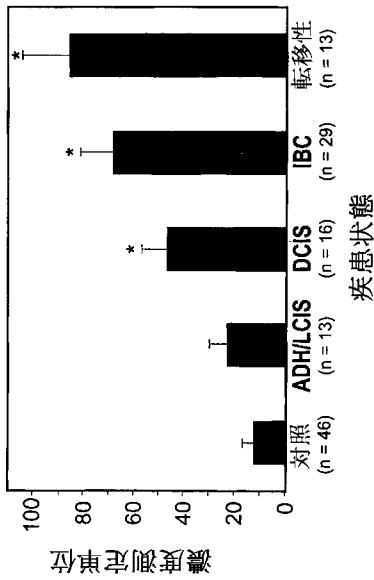
【 図 2 】

乳癌患者由来の尿試料のADAM 12
免疫ブロット分析



【 図 3 】

乳癌患者における尿中ADAM 12
レベルと疾患状態の相関



【 図 4 】

乳癌患者由来の尿試料のADAM 12免疫ブロット分析

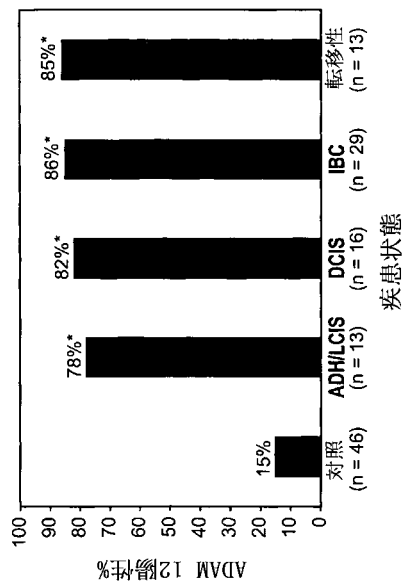
| | |
|----------------|----------|
| 分析された尿試料の総数 | 117 |
| 年齢適合、性別適合の正常対照 | 46 |
| ADAM 12 について陽性 | 7 (15%) |
| 乳癌 | 71 |
| ADAM 12 について陽性 | 67 (94%) |

【 図 5 】

MAARPLPVSPARALLLALAGALLAPCEARGVSLWNQGRADEVVS
 ASVRSGLDWIPVKSFDKSNHPEVLNIRLQRESKELIINLERNEGLIASSFTETHYLQD
 GTDVSRLARNYTVILGHCCYHGHVGRGYSDSAVSLSTCSGLRGLIVFENESYVLEPMKSA
 TNRYKLPFAKLLKSVRGSCGSHHTPNLAANKVFPSPSQTWARRHKRETLKATKYVEL
 VIVADNREFQRQCKDLEKVKQRLIEIANHVDKFYRPLNIRIVLVGVEVWMDMKCSVS
 QDPFTSLHEFLDWRKMKLLPRKSHDNAQLVSGVYFQGTIGMAPIMSMCTADQSGGIV
 MDHSDNPLGAAVTLAHELGHNFQMNHDTLDRGCSCQMAVEKGGCINMASTGYPPPMVF
 SSCSRKDLETSLKGMGVCLFNLPEVRESFGQKCGNRFVEEGECCDGEPEECMNRC
 CNATTCTLKPDAVCAHGLCCEDCQLKPAGTACRDSNSCDLPEFCTGASPHCPANVYL
 HDGHSCQDQVDGYCYNGICQTHEQQCVTLWGPAGAKPAPGICFERVNSAGDPYGNCGKVS
 KSSFAKCEMRDAKCGKIQCQGGASRPVIGTNAVSIETNIPLQQGGRILCRGTHVYVYLG
 DMPDPLGLVLAGTKCADGKICLNRCQONISVFGVHECAMQCHRGVGNRKNKCHCEAHW
 APPFCDKPFGGSDSGPIRQADNQGLTIGILVTLCLLAAGFVVYLKRRKTLIRLLFT
 NKKTTIEKLCVRRPSRPPRGFQPCQAHGLGKLMRKPDSYPPKDNPRLLQCCQV
 DISRPLNGLNVPQFQSTQVRLPPLHRAPRAPSVPARPLPAKPALRQAQGTCKPNPPQK
 PLPADPLARTTRLTHALARTPQGWETGLRLAPLRPAQYPHQVPRSTHTAYIK (SEQ ID NO:1)

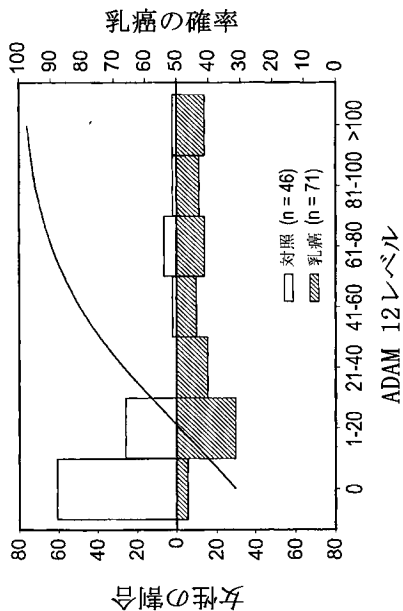
【 図 6 】

乳癌群および対照におけるADAM 12の陽性発現



【 図 7 】

ADAM 12レベルに基づく確率曲線



【手続補正書】

【提出日】平成18年9月12日(2006.9.12)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2007519903000001.app

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US05/00714 |
|--|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : 436/63, 64, 174; 530/350, 385, 386, 387.1, 387.7, 387.9, 388.1 US CL : GO1N 1/00, 33/48; C07K 1/00, 14/00, 17/00; A61K ; C07K 1/00, 14/00, 16/00, 17/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : GO1N 1/00, 33/48; C07K 1/00, 14/00, 17/00; A61K ; C07K 1/00, 14/00, 16/00, 17/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Medline | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| PX --- PY | ROY R. et al. ADAM 12 cleaves extracellular matrix proteins and correlates with cancer status and stage. The Journal of Biological Chemistry. December 3, 2004, Vol. 279, No. 49, pages 51323-51330. | 1-16 ----- 17-19 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: | | |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 10 May 2005 (10.05.2005) | | Date of mailing of the international search report 01 JUN 2005 |
| 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. (703) 305-3230 | | Authorized officer Alana M. Harris, Ph.D. <i>Alana Harris</i> Telephone No. 571-272-1600 |

フロントページの続き

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

(72) 発明者 ロイ ルーパリ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 アトルパロ オニール ブールバード 340 アパート
メント 7エー

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA14 BA80 CA02 DA02 HA11

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 上皮来源的癌症的诊断和预后的方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP2007519903A | 公开(公告)日 | 2007-07-19 |
| 申请号 | JP2006549489 | 申请日 | 2005-01-10 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 儿童医学中心公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 儿童医学中心公司 | | |
| [标]发明人 | モーゼスマーシャエー ロイルーパリ | | |
| 发明人 | モーゼス マーシャ エー. ロイ ルーパリ | | |
| IPC分类号 | G01N33/574 G01N33/536 C12N15/09 C07K1/00 C07K14/00 C07K16/00 C07K17/00 G01N1/00 G01N33/48 | | |
| CPC分类号 | G01N33/57492 G01N33/57415 G01N33/57484 G01N33/57488 G01N2333/96486 G01N2800/52 | | |
| FI分类号 | G01N33/574.ZNA.A G01N33/536.B C12N15/00.A | | |
| F-TERM分类号 | 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA14 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/DA02 4B024/HA11 | | |
| 代理人(译) | 清水初衷 | | |
| 优先权 | 60/535306 2004-01-09 US | | |
| 其他公开文献 | JP4847873B2 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

表达和ADAM 12的活性，上皮来源的，如乳腺癌，结肠癌，前列腺癌，肝癌，膀胱癌，胰腺癌，卵巢癌，子宫颈癌，肺癌，和皮肤癌，的以及在患者与其他的癌症上调：因此，本发明涉及用于预后评估和上皮起源的癌症诊断方法。特别地，ADAM 12在生物样品中的存在表明上皮来源的癌症。此外，在生物样品（例如尿液）中检测到的ADAM 12蛋白的量与疾病状态相关，达到ADAM 12水平用于预测癌症的存在和转移潜能的程度。因此，生物样本中的ADAM（例如，尿液或血液）12个级别的测量提供快速，简便和安全的筛查，可用于患者的癌症的诊断和预后。

(表 I I) 乳癌患者および対照の区別におけるADAM 12の診断上の特性

| | 全患者 | ADH/LCIS | DCIS | IBC | 転移性 |
|-------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 感受性 | 0.94 (67/71) | 0.85 (11/13) | 0.88 (14/16) | 1.00 (29/29) | 1.00 (13/13) |
| FNR | 0.06 (4/71) | 0.15 (2/13) | 0.12 (2/16) | 0.00 (0/29) | 0.00 (0/13) |
| 特異性 | 0.61 (28/46) | 0.61 (28/46) | 0.61 (28/46) | 0.61 (28/46) | 0.61 (28/46) |
| FPR | 0.39 (18/46) | 0.39 (18/46) | 0.39 (18/46) | 0.39 (18/46) | 0.39 (18/46) |
| 精度 | 0.81 (95/117) | 0.66 (39/59) | 0.68 (42/62) | 0.76 (57/75) | 0.70 (41/59) |
| LR 陽性 試験 | 2.4 | 2.4 | 2.3 | 2.6 | 2.6 |