

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6392762号  
(P6392762)

(45) 発行日 平成30年9月19日(2018.9.19)

(24) 登録日 平成30年8月31日(2018.8.31)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/68	(2006.01)	GO 1 N 33/68	
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	D
CO 7 K 14/665	(2006.01)	CO 7 K 14/665	Z NA

請求項の数 19 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2015-534992 (P2015-534992)	(73) 特許権者	514122524
(86) (22) 出願日	平成25年10月1日 (2013.10.1)		シュピーングテック ゲゼルシャフト ミ
(65) 公表番号	特表2015-532423 (P2015-532423A)		ット ベシュレンクテル ハフツング
(43) 公表日	平成27年11月9日 (2015.11.9)		ドイツ連邦共和国, 16761 ヘニッヒ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/070471		スドルフ, ノイエンドルフシュトラーセ
(87) 国際公開番号	W02014/053502		15アー
(87) 国際公開日	平成26年4月10日 (2014.4.10)	(74) 代理人	100099759
審査請求日	平成28年8月17日 (2016.8.17)		弁理士 青木 篤
(31) 優先権主張番号	12187050.5	(74) 代理人	100077517
(32) 優先日	平成24年10月2日 (2012.10.2)		弁理士 石田 敬
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 女性対象において癌になるリスクの予測を補助するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

癌に罹患していない女性対象において癌になるリスクの予測を補助するための方法であって、以下のステップ：

前記女性対象から得られた体液中のプロ エンケファリン (PENK) 又はその断片のレベルを決定し；そして

前記プロ エンケファリン又はその断片のレベルと癌になるリスクとを相関させ、ここで低減したレベルは、増大した癌になるリスクを示す、

ことを含み、ここで前記プロ エンケファリン又はその断片が、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10 及び配列番号 11 を含む群から選択され、

ここで、前記癌が、乳癌又は肺癌である、方法。

【請求項 2】

前記女性対象から体液サンプルが採取された時点で、前記女性対象が、癌の診断の履歴を有したことがない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記女性対象が、癌の診断の履歴を有し、そして前記女性対象から体液サンプルが採取された時点で、治癒しており、そして乳癌を再発するリスクが、決定され又は癌の再発が示される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記女性対象から体液サンプルが採取された時点で、前記女性対象が、心血管疾患又は糖尿病を有すると診断されている、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

年齢、糖尿病の存在、現在の喫煙を含む群から選択される、少なくとも 1 つの臨床パラメーターがさらに決定される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記プロ エンケファリンのレベルが、イムノアッセイで測定される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記方法が、女性対象において乳癌になるリスクを監視するために、又は治療経過を監視するために、2 回以上行われる、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 8】

前記監視が、採用される予防及び/又は治療手段に対する前記女性対象の応答を評価するために行われる、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記女性対象をリスク群に層別化するための請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

以下のステップ：

前記女性対象から採取した体液中のプロ ニューロテンシン 1 1 1 7 (配列番号 1 7 ) のレベルを決定し；そして

20

前記プロ エンケファリン又はその断片及びニューロテンシン 1 1 1 7 (配列番号 1 7 ) のレベルと癌になるリスクとを相関させ、ここで、低減したプロ エンケファリンのレベルは、癌になる増大したリスクを示し、そしてここで、プロ ニューロテンシンの増加したレベルは、癌になる増大したリスクを示す、ことを含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記プロ エンケファリン又はその断片の低減したレベルが、閾値未満のレベルであり、ここで前記閾値が、1 0 0 p m o l / l 未満である、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 12】

前記プロ ニューロテンシン又はその断片の増加したレベルが、閾値超のレベルであり、ここで前記閾値が、7 8 p m o l / l 超である、請求項 1 0 又は 1 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記体液が、血液、血漿、又は血清である、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

MR プロ エンケファリン (配列番号 6 ) 及び/又はプロ ニューロテンシン 1 1 1 7 (配列番号 1 7 ) のレベルが決定される、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 15】

サンプル中の前記プロ エンケファリン及び前記プロ エンケファリン断片を決定するためのキットであって、アミノ酸 1 3 3 1 4 0 ( L K E L L E T G、配列番号 2 2 ) 及びアミノ酸 1 5 2 1 5 9 ( S D N E E E V S、配列番号 2 3 ) である前記プロ エンケファリンの領域内の 2 つの異なる領域に結合する 2 つの結合剤を含み、ここで、前記領域のそれぞれが、少なくとも 4 つ又は 5 つのアミノ酸を含む、キット。

【請求項 16】

前記キットが、健康な対象のプロ エンケファリン又はプロ エンケファリン断片を定量するために十分な感度であり、そして、1 5 p m o l / l 未満の分析アッセイ感度を有する、請求項 1 5 に記載のキット。

50

## 【請求項 17】

癌に罹患していない女性対象において癌になるリスクを予測し、及び/又は前記女性対象をリスク群に層別化するための、請求項 15 又は 16 に記載のキットの使用であって、ここで、前記癌が、乳癌又は肺癌である、使用。

## 【請求項 18】

癌に罹患していない女性対象において癌になるリスクを予測し、及び/又は前記女性対象を、オピオイド成長因子 (OGF) 治療を受けるべき群に層別化するための、請求項 15 又は 16 に記載のキットの使用であって、ここで、前記癌が、乳癌又は肺癌である、使用。

## 【請求項 19】

前記プロ エンケファリン及びプロ エンケファリン断片のレベルが、癌に罹患していない女性対象において癌になるリスクを予測するために使用される、請求項 15 又は 16 に記載のキットであって、ここで、前記癌が、乳癌又は肺癌である、キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本願発明の主題は、癌に罹患していない女性対象において癌になるリスクを予測し、又は女性対象において癌を診断するための方法であって、以下のステップ：

前記女性対象から得られた体液中のプロ エンケファリン (PENK) 又は少なくとも 5 つのアミノ酸の Leu エンケファリン及び Met エンケファリンを含む、その断片のレベルを決定し；そして

前記プロ エンケファリン又はその断片のレベルと癌になるリスクとを相関させ、ここで低減したレベルは、増大した癌になるリスクを予測し、又は癌を診断する、ここで低減したレベルは、癌の診断と相関関係があることを含む、方法である。

## 【背景技術】

## 【0002】

Met エンケファリンは、エンケファリン前駆体 (プレプロエンケファリン) 由来の 5 つのアミノ酸ペプチドであり、また「オピオイド成長因子 (OGF)」とも呼ばれ、プロエンケファリン断片と共に放出される。成熟したペプチドは、さまざまなオピオイド受容体に結合する (Koneru ら、2009)。エンケファリン (OGF) が、多くの生理的機能を有することを見出した。CNS において、それは、サブスタンス P 関連疼痛シグナル伝達を下方制御し、サイトカインとしての役割を果たす (Plotnikoff ら、1997)。プロエンケファリンは、抗菌作用を示すペプチドと関連する (Goumon ら、1998)。プロエンケファリン及びエンケファリンは、抗腫瘍作用を示し、そしてプロアポトーシス剤として作用する (Tavish ら、2007、Donahue ら、2011、Zagon ら、2009)。

## 【0003】

男性における癌のリスクの予測のための血管作動性ペプチドの使用は、Belting ら、Cancer, Epidemiology, Biomarkers & Prevention によって報告されている。MR pro ANP、MR pro ADM 及びコペプチンは、Malmo Diet and Cancer Study の 1991 ~ 1994 におけるベースライン試験の前に癌に罹患していない参加者 (1768 人の男性及び 2293 人の女性) 由来の空腹時血漿において測定された。著者は、女性間では、バイオマーカーと癌発生率の間には関連性がなかったことを述べている。

## 【発明の概要】

## 【課題を解決するための手段】

## 【0004】

本願発明の主題は、癌発生率の予測及び癌の再発のリスクの予測のための PENK の予後予測及び診断能力を研究することであった。この問題に対処するために、空腹時血漿中

10

20

30

40

50

のプロ エンケファリンの適切な断片 (Ernstら、2006) が、前記スウェーデンの前向きコホート研究 (Malmö Diet and Cancer Study) において測定し、そして追跡の15年の間の乳癌発生率に対するこのバイオマーカーのベースラインレベルを関連付けた。

【0005】

驚くべきことに、プロ エンケファリンが、癌に罹患していない女性対象において、癌になるリスクを予測し、又は女性対象において癌を診断するための女性のための有力なそして非常に重要なバイオマーカーであることが示された。

【0006】

従って、本願発明の主題は、癌に罹患していない女性対象において、癌になるリスクを予測し、又は女性対象において癌を診断するための方法であり、以下のステップ：

前記女性対象から得られた体液中のプロ エンケファリン又は少なくとも5つのアミノ酸のその断片のレベルを決定し；そして

前記プロ エンケファリン又はその断片と癌になるリスクとを相関させ、ここで低減したレベルは、増大した癌になるリスクを予測し、又は癌を診断する、ここで低減したレベルは、癌の診断と相関関係がある

ことを含む、方法である。

【0007】

癌の例は、乳癌、肺癌、膵臓癌及び結腸癌からなる群から選択されてもよい。本願明細書全体を通じて、用語「プロ エンケファリンの断片 (fragment of Pro Enkephalin)」は、また、Leu エンケファリン及びMet エンケファリンを含むことが理解されるべきである。

【0008】

本願発明の特定の実施態様では、前記癌は、乳癌である。本願発明の他の特定の実施態様では、前記癌は、肺癌である。従って、本願発明の主題は、癌、例えば、乳癌、肺癌などに罹る女性の感受性の決定である。

【0009】

本研究で得られたデータは、また、男性対象において癌になるリスクと前記男性対象から得た体液中のプロ エンケファリン又は少なくとも5つのアミノ酸のその断片のレベルとの間の相関を明らかにしたが、この相関関係は、男性においてまた、PENKの低減したレベルで、増大した癌のリスクについての明確な傾向があったが、しかしながら、本データセットについて、統計的に有意ではなかった。従って、男性対象のためにも、本願発明の方法の価値はあるが、本研究において、観察された効果は、男性対象について、女性対象と比較して同程度に強いものではなかった。これは、男性集団における癌事象が少ないことが、主な原因であるかもしれない。

【0010】

さらに、本研究で得られたデータは、女性対象において癌になるリスクと前記女性対象から得た体液中のプロ エンケファリン又は少なくとも5つのアミノ酸のその断片との間の相関関係を、ここで、前記癌は、肺癌又は乳癌ではなかったが、また明らかにした。この特定の集団における少数の事象のために、この相関関係は、しかしながら、本データセットについて統計的に有意ではなかった。有意ではないが、明確な傾向があった。本データは、エンケファリン、PENKの断片の公知のプロアポトーシス作用により、他の癌においても、そのような相関関係を示唆することが、さらに信頼できる。先行技術を発端として、プロ エンケファリン又はその断片が、癌を予測し得ることは驚くべきことである。乳癌及び肺癌について統計的に非常に関連性のある本データを根幹として、同様に他の種類の癌について予後予測し得ることが期待され、そして信頼できる。

【0011】

本願明細書中で使用される場合、用語「対象 (subject)」は、生きているヒト又はヒト以外の生物を意味する。本明細書中で好ましくは、対象は、ヒト対象である。

【0012】

10

20

30

40

50

用語「低減したレベル ( r e d u c e d l e v e l ) 」は、特定の閾値レベル未満のレベルを意味する。

【 0 0 1 3 】

体液は、血液、血清、血漿、尿、脳脊髄液 ( c s f ) 及び唾液を含む群から選択されてもよい。

【 0 0 1 4 】

本願発明の 1 つの実施態様では、前記女性対象は、体液のサンプルが前記女性対象から採取された時点で、診断された癌を有したことがない。

【 0 0 1 5 】

他の実施態様では、前記女性対象は、癌に罹患していると以前に診断されており、そして、体液のサンプルが前記女性対象から採取された時点で、治癒しており、そして癌の再発のリスクが決定され、又は癌の再発が予測される。

10

【 0 0 1 6 】

プロ エンケファリンは、以下の配列を有する。

【 0 0 1 7 】

配列番号 1 ( プロ エンケファリン ( 1 2 4 3 ) )

【 化 1 】

ECSQDCATCSYRLVRLPADINFLACVMECEGKLPSTLKIWETCKELLQLSKPELPQDGTSTL  
RENSKPEESHLLAKRYGGFMKRYGGFMKKMDELYPMEPEEEANGSEILAKRYGGFMK  
KDAEEDDSLANSDDLKELLETGDNRRERSHHQDSDNEEEVSKRYGGFMRGLKRSPQL  
EDEAKELQKRYGGFMRRVGRPEWWMDYQKRYGGFLKRFAEALPSDEEGESYSKEVPE  
MEKRYGGF MRF

20

【 0 0 1 8 】

体液中で測定し得るプロ エンケファリンの断片は、例えば、以下の断片の群から選択される。

配列番号 2 ( シンエンケファリン ( S y n e n k e p h a l i n ) 、プロ エンケファリン 1 7 3 )

30

【 化 2 】

ECSQDCATCSYRLVRLPADINFLACVMECEGKLPSTLKIWETCKELLQLSKPELPQDGTSTL

RENSKPEESHLLA

【 0 0 1 9 】

配列番号 3 ( M e t エンケファリン )

40

【 化 3 】

YGGFM

【 0 0 2 0 】

配列番号 4 ( L e u エンケファリン )

【化4】

YGGFL

【0021】

配列番号5 (プロ エンケファリン90 109)

【化5】

MDELYPMEPEEEEANGSEILA

10

【0022】

配列番号6 (プロ エンケファリン119 159、中領域 (Mid regional) プロ エンケファリン、MRPENK)

【化6】

DAEEDDSLANSDDLKELLETDGDNRRERSHHQDGSNNEEEVS

20

【0023】

配列番号7 (Met エンケファリン Arg Gly Leu)

【化7】

YGGFMRGL

【0024】

配列番号8 (プロ エンケファリン172 183)

【化8】

30

SPQLEDEAKELQ

【0025】

配列番号9 (プロ エンケファリン193 203)

【化9】

VGRPEWWMDYQ

40

【0026】

配列番号10 (プロ エンケファリン213 234)

【化10】

FAEALPSDEEGESYSKEVPEME

【0027】

配列番号11 (プロ エンケファリン213 241)

50

【化11】

FAEALPSDEEGESYSKEVPMEKRYGGFM

【0028】

配列番号12 (Met エンケファリン Arg Phe)

【化12】

YGGFMRF

10

【0029】

Leu エンケファリン及びMet エンケファリンを含むプロ エンケファリン又はその断片のレベルを決定は、プロ エンケファリン又はLeu エンケファリン及びMet エンケファリンを含む、その断片に向けての免疫反応性が決定されることを意味し得る。結合の領域に依存する、Leu エンケファリン及びMet エンケファリンを含むプロ エンケファリン又はその断片の決定のために使用される結合剤は、上に示した分子の1つ以上に結合してもよい。これは、当業者に明らかである。

【0030】

従って、本願発明によれば、任意の上記ペプチド及びペプチド断片のアミノ酸配列（すなわち、プロ エンケファリン (PENK) 及び任意の配列番号1～12による断片）内の領域に結合する少なくとも1つの結合剤を使用することによる免疫反応性分析物のレベルは、前記対象から得た体液において決定し；そして、臨床的関連の特定の実施態様と関連させる。

20

【0031】

本願発明による方法のより具体的な実施態様では、MRPENKのレベルが決定される（配列番号6：プロ エンケファリン119 159、中領域プロ エンケファリン断片、MRPENK、DAEEDDSLANSDDLKELLETDGDNRRERSHHQD GSDNEEVS）。より具体的な実施態様では、MR PENKに結合する少なくとも

30

【0032】

プロ エンケファリン又はLeu エンケファリン及びMet エンケファリン又はこれらの断片を含むその断片のレベルの決定は、プロ エンケファリン又はLeu エンケファリン及びMet エンケファリンを含む、その断片に向けての免疫反応性が決定されることを意味し得る。結合の領域に依存する、Leu エンケファリン及びMet エンケファリンを含むプロ エンケファリン又はその断片の決定のために使用される結合剤は、上に示した分子の1つ以上に結合してもよい。これは、当業者に明らかである。本願発明の他の実施態様では、断片は、Leu エンケファリン又はMet エンケファリンでなく、本願発明の他の実施態様では、プロ エンケファリン又はLeu エンケファリン及びMet エンケファリンを含まない、その断片に向けての免疫反応性が決定される。

40

【0033】

あるいは、任意の上の分析物のレベルが、他の分析方法、例えば、質量分析法によって、決定されてもよい。

【0034】

特定の実施態様では、プロ エンケファリン又はその断片のレベルは、プロ エンケファリン又はその断片に結合する抗体又は抗体の断片を使用するイムノアッセイで測定される。プロ エンケファリン又は少なくとも5つのアミノ酸のその断片を決定するために有用であり得るイムノアッセイは、実施例2で概説されるステップを含んでもよい。すべて

50

の閾値及び値は、実施例2に従って使用される試験及びキャリブレーションに対する相関について理解されなければならない。当業者は、閾値の絶対値が、使用されるキャリブレーションによって影響されるかもしれないことを理解しているであろう。これは、本願明細書中で与えられたすべての値及び閾値が、本願明細書中で使用されるキャリブレーション（実施例2）の文脈において理解されるべきであることを意味する。本願発明によれば、プロ エンケファリンに対する診断結合剤は、抗体、例えば、IgG、標準的な全長免疫グロブリン、又は、少なくとも重及び/又は軽鎖のF 可変領域を有する抗体断片、例えば、化学結合した抗体（Fab）、限定されないが、Fabミニボディを含むFab断片、単鎖Fab抗体、エピトープタグを有する一価のFab抗体、例えば、CH3領域で二量体化されたFab V5Sx2；二価Fab（ミニ抗体）；二価Fab又は多価Fab、例えば、異種ドメインを用いて多量体化を介して形成される、例えば、dHLXドメインの二量体化を介して、例えば、Fab dHLX FSx2；F(ab')、scFx断片、多量体化多価又は/及び多重特異性scFv断片、二価及び/又は二重特異性ダイアボディ、BITE（登録商標）（二重特異性T細胞誘導（bispecific T・cell engager））、三機能性（trifunctional）抗体、多価抗体、例えば、Gとは異なるクラス由来の；シングルドメイン抗体、例えば、ラクダ科の動物又はフィッシュ免疫グロブリン由来のナノボディからなる群から選択される。

【0035】

特定の実施態様では、プロ エンケファリン又はその断片のレベルは、以下で詳細に記載されるような、プロ エンケファリン又はその断片に結合する、アダプター、非 Ig スキャフォールドを含む群から選択される結合剤を使用するアッセイで測定される。

【0036】

プロ エンケファリン又はその断片のレベルを決定するために使用され得る結合剤は、少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、好ましくは、 $10^8 M^{-1}$ のプロ エンケファリンに対する親和定数、好ましい親和定数は、 $10^9 M^{-1}$ 超、最も好ましくは、 $10^{10} M^{-1}$ 超を示す。当業者は、化合物のより高い用量を適用することによってより低い親和性を補うと考えられ得、そしてこの測定が、本願発明の範囲外につながることを理解する。結合親和性は、分析サービス、例えば、Biaffin Kassel Germany (<http://www.biaffin.com/de/>)として提供されるBiacoreを使用して決定されてもよい。

【0037】

ヒトプロ エンケファリン対照サンプルは、ICI Diagnostics, Berlin, Germany <http://www.ici-diagnostics.com/>から入手し得る。アッセイは、また、合成（本願発明者等の実験では、本願発明者等は、合成MRPENK、配列番号6を使用）又は組み換えプロ エンケファリン又はその断片によってキャリブレーションしてもよい。

【0038】

本願発明の方法に従って、女性対象において乳癌になるリスクを決定し、又は女性対象における乳癌を診断するための閾値は、 $100 pmol/l$  PENK未満、 $50 pmol/l$ 未満、より好ましくは、 $40.4 pmol/l$ 未満である。特定の実施態様では、前記閾値は、約 $40.4 pmol/l$ である。これらの閾値は、上記のキャリブレーション法に関連する。前記閾値未満のPENK値は、対象が、癌にかかる増大したリスクを有し、又はすでに癌に罹患していることを意味する。

【0039】

本願発明の1つの実施態様では、前記方法は、女性対象において乳癌になるリスクを監視するために、又は処置の経過を監視するために、2回以上行われる。1つの特定の実施態様では、前記監視は、採用される予防及び/又は治療手段に対する前記女性対象の応答を評価するために行われる。

【0040】

本願発明の1つの実施態様では、方法は、前記女性対象をリスク群に層別化するために

10

20

30

40

50

使用される。

【0041】

本願発明の主題は、また、女性において癌になるリスクを予測し、又は任意の従前の実施態様に従って、癌になる増大したリスクを有する女性対象を識別するための方法であり、ここで、前記女性対象から得た体液中のプロ エンケファリン又は少なくとも5つのアミノ酸のその断片のレベルが、単独で又は他の予後予測に有用な実験室的又は臨床的パラメーターと組み合わせてのいずれかで、以下の選択肢：

「健康な」又は「見かけ上健康な」対象の集団において予め決定されたサンプルのアンサンプル中の前記女性対象から得た体液中のプロ エンケファリン又は少なくとも5つのアミノ酸のこの断片のレベルの中央値との比較、

10

「健康な」又は「見かけ上健康な」対象の集団において予め決定されたサンプルのアンサンプル中の前記女性対象から得た体液中のプロ エンケファリン又は少なくとも5つのアミノ酸のこの断片のレベルの変位値との比較、

C o x 比例ハザード分析に基づく、又はリスク指標計算、例えば、N R I (純再分類指標 (Net Re classification Index)) 又は I D I (統合判別指標 (Integrated Discrimination Index)) を使用することによる計算

から選択されてもよい方法による有害事象を得る対象のリスクの予測のために使用される。

【0042】

20

本願発明の主題の1つの実施態様は、また、女性において癌になるリスクを予測し、又は任意の従前の実施態様に従って、癌になる増大したリスクを有する女性対象を識別するための方法であり、ここで、前記女性対象から得た体液中のプロ エンケファリン又は少なくとも5つのアミノ酸のその断片のレベルが、単独で又は他の予後予測に有用なバイオマーカーと組み合わせて使用される。

【0043】

本願発明による方法のより具体的な実施態様では、プロ ニューロテンシン 1 1 1 7 のレベルが、プロ エンケファリン又はその断片の決定に加えて決定されてもよい。

【0044】

従って、本願発明の主題は、また、癌に罹患していない女性対象において癌になるリスクを予測し、又は女性対象において癌を診断するための方法であって、以下のステップ：

30

前記女性対象から得た体液中のプロ エンケファリン又は L e u エンケファリン及び M e t エンケファリンの少なくとも5つのアミノ酸を含む、その断片のレベルを決定し；

前記女性対象から得た体液中のプロ ニューロテンシン又は少なくとも5つのアミノ酸のその断片のレベルを決定し；そして

前記プロ エンケファリン又はその断片及びプロ ニューロテンシン又は少なくとも5つのアミノ酸のその断片と癌になるリスクとを関連させ、ここで、プロ エンケファリンの低減したレベルが、癌になる増大したリスクのための予測であり、又は癌を診断し、ここで、低減したレベルが癌の診断と相関関係があり、そしてここで、プロ ニューロテンシンの増加したレベルが、癌になる増大したリスクのための予測であり、又は癌を診断する、ここで、増加したレベルが、癌の診断と相関関係があることを含む、方法である。

40

【0045】

配列番号 1 3 (プロ ニューロテンシン 1 1 4 7 )

【化13】

SDSEEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNPAE  
ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ  
EDILDTGNDK NGKEEVIKRRK IPYILKRQLY ENKPRRPYIL KRDSYYY

【0046】

配列番号14 (プロ ニューロテンシン1 125 (ラージニューロメジン (large neuromedin) N) 10

【化14】

SDSEEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNPAE  
ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ  
EDILDTGNDK NGKEEVI KR KIPYIL

【0047】

配列番号15 (ニューロメジンN)

20

【化15】

KIPYIL

【0048】

配列番号16 (ニューロテンシン)

【化16】

30

pyroQLYENKPRRP YIL

【0049】

配列番号17 (プロ ニューロテンシン1 117)

【化17】

SDSEEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNPAE  
ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ  
EDILDTGNDK NGKEEVI

40

【0050】

配列番号18 (プロ ニューロテンシン1 132)

【化18】

SDSEEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNPAE  
 ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ  
 EDILDTGNDK NGKEEVIKRK IPYILKRQLY EN

【0051】

配列番号19 (プロ ニューロテンシン120 140)

10

【化19】

KIPYILKRQL YENKPRRPYIL

【0052】

配列番号20 (プロ ニューロテンシン120 147)

【化20】

20

KIPYILKRQL YENKPRRPYIL KRDSYYY

【0053】

配列番号21 (プロ ニューロテンシン128 147)

【化21】

QLYENKPRRP YILKRDSYYY

【0054】

特定の実施態様では、プロ ニューロテンシンのレベルは、イムノアッセイで測定される。より具体的には、イムノアッセイは、Ernstら (Peptides (2006) , (27) 1787-1793) に記載されたように使用されてもよい。プロ ニューロテンシン又は少なくとも5つのアミノ酸のその断片のレベルを決定するために有用であり得るイムノアッセイは、実施例2に概説されるようなステップを含んでもよい。すべての閾値及び値は、実施例2に従って使用される試験及びキャリブレーションに対する相関について理解されなければならない。当業者は、閾値の絶対値が、使用されるキャリブレーションによって影響されるかもしれないことを理解しているであろう。これは、本願明細書中で与えられたすべての値及び閾値が、本願明細書中で使用されるキャリブレーション (実施例2) の文脈において理解されるべきであることを意味する。ヒトプロ ニューロ

30

40

【0055】

プロ ニューロテンシン又はその断片のレベルを決定するために使用されてもよい結合剤は、少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、好ましくは、 $10^8 M^{-1}$ のプロ ニューロテンシンに対する親和定数を示し、好ましい親和定数は $10^9 M^{-1}$ 超であり、最も好ましくは、 $10^{10} M^{-1}$ である。当業者は、化合物のより高い用量を適用することによってより低い親和性を補うと考えられ得、そしてこの測定が、本願発明の範囲外につながらないことを理解する。結

50

合親和性は、分析サービス、例えば、Biaffin Kassel Germany (<http://www.biaffin.com/de/>)として提供されるBiacoreを使用して決定されてもよい。本願発明の方法による、女性対象において乳癌になるリスクを決定するための、又は女性対象において乳癌を診断するための閾値は、78 pmol/l PNT超、好ましくは、100 pmol/l PNT超、より好ましくは、150 pmol/l PNT超である。特定の実施態様では、前記閾値は、約100 pmol/l PNT超である。これらの閾値は、上記キャリブレーション法に関連する。上記閾値超のPNT値は、対象が癌になる増大したリスクを有し、又は既に癌に罹患していることを意味する。

【0056】

10

本願発明の1つの実施態様では、前記方法は、女性対象において乳癌になるリスクを監視するために、又は処置の経過を監視するために、2回以上行われる。1つの特定の実施態様では、前記監視は、採用される予防及び/又は治療手段に対する前記女性対象の応答を評価するために行われる。

【0057】

本願発明の1つの実施態様では、方法は、前記女性対象をリスク群に層別化するために使用される。

【0058】

本願発明の1つの実施態様では、癌は、乳癌及び肺癌を含む群から選択される。

【0059】

20

本願発明の主題は、アミノ酸113 140 (L K E L L E T G、配列番号22)及びアミノ酸152 159 (S D N E E E V S、配列番号23)であるプロエンケファリンの領域内の2つの異なる領域に結合する2つの結合剤を含む、サンプル中のプロエンケファリン及びプロエンケファリン断片を決定するためのさらなるアッセイであり、ここで、それぞれの前記領域は、少なくとも4又は5つのアミノ酸を含む。

【0060】

本願発明によるサンプル中のプロエンケファリン又はプロエンケファリン断片を決定するためのアッセイの1つの実施態様では、前記アッセイの分析感度は、健康な対象のプロエンケファリン又はプロエンケファリン断片を定量することができ、そして、< 15 pmol/l、好ましくは、< 10 pmol/l、そして最も好ましくは、< 6 pmol/lである。

30

【0061】

本願発明によるサンプル中のプロエンケファリン又はプロエンケファリン断片を決定するためのアッセイの1つの実施態様では、前記結合剤は、少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、好ましくは、 $10^8 M^{-1}$ のその結合パートナーに対する結合親和性を示し、好ましい親和定数は $10^9 M^{-1}$ 未満であり、最も好ましくは、 $10^{10} M^{-1}$ 未満である。当業者は、化合物のより高い用量を適用することによってより低い親和性を補うと考えられ得、そしてこの測定が、結合親和性が上記のように決定されてもよい、本願発明の範囲外につながらないことを理解する。

【0062】

40

本願発明によるサンプル中のプロエンケファリン又はプロエンケファリン断片を決定するためのアッセイの1つの実施態様では、そのようなアッセイは、サンドイッチアッセイ、好ましくは、完全に自動化されたアッセイである。ELISAは完全に自動化又は手動であってもよい。いわゆる、POC試験(臨床現場即時(point of care)試験)であってもよい。自動又は完全に自動化されたアッセイの例は、以下のアッセイ: Roche Elecsys(登録商標)、Abbott Architect(登録商標)、Siemens Centaur(登録商標)、Brahms Kryptor(登録商標)、Biomerieux Vidas(登録商標)、Alerie Triage(登録商標)の1つに使用されてもよいアッセイを含む。

【0063】

50

本願発明によるサンプル中のプロ エンケファリン又はプロ エンケファリン断片を決定するためのアッセイの1つの実施態様では、前記2つの結合剤の少なくとも1つが、検出されるために、標識される。標識の種類は、上で提供される。

【0064】

本願発明によるサンプル中のプロ エンケファリン又はプロ エンケファリン断片を決定するためのアッセイの1つの実施態様では、前記2つの結合剤の少なくとも1つが、固相に結合される。固相の例は、上で提供される。

【0065】

本願発明によるサンプル中のプロ エンケファリン又はプロ エンケファリン断片を決定するためのアッセイの1つの実施態様では、前記標識は、化学発光標識、酵素標識、蛍光標識、放射性ヨード標識を含む群から選択される。

10

【0066】

本願発明のさらなる主題は、本願発明に従ったアッセイを含むキットであり、ここで、前記キットの構成要素は、1つ以上の容器中に含まれてもよい。

【図面の簡単な説明】

【0067】

【図1】図1は、典型的なプロ エンケファリン用量/シグナル曲線を示す。プロ エンケファリンの標準曲線である。

【図2】図2は、女性集団におけるプロ エンケファリンの度数分布を示す。

【図3】図3は、女性の累積癌診断の四分位数(Q)1(40.4 pmol/l未満)、四分位数2(40.4~47.1 pmol/l)、四分位数3(47.2~54.1 pmol/l)、四分位数4(54.1 pmol/l超)を示す、 Kaplan-Meier グラフである。低減したPENKは、乳癌発症の長期の増加したリスクを示す。ベースラインの日時点での癌病歴を有する任意の女性(血液サンプリング)を排除したので、プロ エンケファリンは、将来の乳癌発症について、非常に予測する。全体にわたって、Q1の女性は、Q4の女性よりも、乳癌発症の3.6倍高いリスクを有する。

20

【図4】図4は、乳癌予測のためのプロ エンケファリンの複合解析の図例を示す。

【実施例】

【0068】

実施例1

抗体の開発

ペプチド

ペプチドを合成した(JPT Technologies, Berlin, Germany)。

ペプチド/免疫コンジュゲート

免疫のためのペプチドを、ウシ血清アルブミン(BSA)に対するペプチドのコンジュゲートのための追加のN末端システイン残基で合成した。ペプチドを、SulfoSMCC(Perbio science, Bonn, Germany)を使用することによってBSAと共有結合させた。共有結合の方法を、Perbioの取扱説明書に従って、行った。

30

40

【0069】

## 【表1】

表1:

免疫のためのペプチド	プロ-エンケファリン配列
(C)DAEEDD	119-125
(C)EEDDSLANSDDLK	121-134
(C)LKELLETTG	133-140
(C)TGDNRERSHHQDGSNE	139-155
(C)SDNEEEVS	152-159

10

## 【0070】

抗体を、以下の方法に従って生成した。

BALB/cマウスを、0日及び14日で、100µgペプチド BSA コンジュゲート(100µl完全フロイントアジュバントにおいて乳化)、21日及び28日で、50µg(100µl不完全フロイントアジュバントにおいて)で免疫した。融合実験を行った3日前に、動物は、1つは腹腔内注射及び1つは静脈内注射として与えられる、100µl生理食塩水中に溶解した50µgのコンジュゲートを受けた。

20

## 【0071】

免疫したマウス由来の脾細胞及び骨髓腫細胞株SP2/0の細胞を、1mlの50%ポリエチレングリコールで、37℃で30秒間、融合した。洗浄後、細胞を96ウェル細胞培養プレートに播種した。ハイブリッドクローンを、HAT培地で生育することによって選択した(20%ウシ胎児血清及びHATサプリメントを補充したRPMI1640培地)。2週間後、HAT培地を、3回継代のために、HT培地で置換し、続いて、通常の細胞培養培地に戻した。

## 【0072】

細胞培養物上清を、融合後3週間、抗原特異的IgG抗体について、一次スクリーニングした。試験陽性マイクロ培養を、増殖のために、24ウェル中に移した。再試験後、選択された培養物を、限界希釈技術を使用して、クローン化しそして再クローン化し、そしてアイソタイプを決定した。

30

## 【0073】

(Lana, R. D. "A short duration polyethylene glycol fusion technique for increasing production of monoclonal antibody secreting hybridomas," J. Immunol. Meth. 81:223-228; (1985)、Ziegler, B.ら、"Glutamate decarboxylase (GAD) is not detectable on the surface of rat islet cells examined by cytofluorometry and complement dependent antibody mediated cytotoxicity of monoclonal GAD antibodies," Horm. Metab. Res. 28:11-15, (1996))。

40

## 【0074】

モノクローナル抗体生成

抗体を、標準の抗体生成法(Marxら、Monoclonal Antibody Production(1997), ATLA 25, 121)を介して生成し、そしてProtein A chromatographyを介して精製した。抗体の精製率は、SDSゲル電気泳動分析に基づいて、>95%であった。

## 【0075】

50

### 抗体の標識及びコーティング

すべての抗体を、以下の方法に従って、アクリジニウムエステルで標識した。

標識化合物(トレーサー) : 100 µg (100 µl) 抗体 (PBSにおいて、1 mg/ml、pH 7.4) を、10 µl アクリジニウム NHS エステル (アセトニトリルにおいて、1 mg/ml、InVent GmbH, Germany) (欧州特許第 0353971号) と混合し、そして室温で、20 分間、インキュベートした。標識抗体を、Bio Sil SEC 400 5 でのゲルろ過 HPLC (Bio Rad Laboratories, Inc., USA) によって精製した。精製した標識抗体を、(300 mmol/l リン酸カリウム、100 mmol/l NaCl、10 mmol/l Na EDTA、5 g/l ウシ血清アルブミン、pH 7.0) において、希釈した。最終濃度は、標識化合物 (200 µl あたり) で、約 800.000 相対発光量 (RLU) であった。アクリジニウムエステル化学発光を、AutoLumat LB 953 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG) を使用することにより、測定した。

10

#### 【0076】

固相抗体 (コーティングされた抗体)

固相 : ポリスチレンチューブ (Greiner Bio One International AG, Austria) を、抗体 (1.5 µg 抗体 / 0.3 ml、100 mmol/l NaCl、50 mmol/l Tris/HCl、pH 7.8) で、コーティングした (室温で 18 時間)。5% ウシ血清アルブミンでブロッキングした後、チューブを PBS (pH 7.4) で洗浄し、そして真空乾燥した。

20

#### 【0077】

抗体特異性

さまざまな抗体の交差反応性を、表 2 に示す。

#### 【0078】

#### 【表 2】

表 2 :

免疫のためのペプチド	プレプロ- エンケファリン配列	抗体名
(C)DAEEDD	119-125	NT-MRPENK
(C)EEDDSLANSDDLK	121-134	NM-MRPENK
(C)LKELLETG	133-140	MR-MRPENK
(C)TGDNRERSHHQDGSNE	139-155	MC-MRPENK
(C)SDNEEEVS	152-159	CT-MRPENK

30

#### 【0079】

抗体交差反応性を、以下のように決定した。

300 µl PBS 中の 1 µg ペプチド (pH 7.4) を、ポリスチレンチューブに分注し、そして室温で、1 時間、インキュベートした。インキュベーション後、チューブを、PBS (pH 7.4) 中の 5% BSA を使用して、5 回 (それぞれ 1 ml) 洗浄した。標識抗体のそれぞれを添加し (PBS (pH 7.4) 中の 300 µl、800.000 RLU / 300 µl)、室温で 2 時間、インキュベートした。5 回洗浄した後 (それぞれ 1 ml の洗浄溶液 (20 mmol/l PBS、pH 7.4、0.1% Triton X 100)、残存発光 (標識抗体) を、AutoLumat LB 953 を使用して定量した。MRPENK ペプチドを、参照物質として使用した (100%)。

40

50

【 0 0 8 0 】

【 表 3 】

表 3 :

抗体 ペプチド	DAEEDD	EEDDSLANS SSDLLK	LKELLE TG	TGDN RERSH HQDGS DNE	SDNE EEVVS	MRPEN K (配列 番号 6)
NT- MRPEN K	121	10	<1	<1	<1	100
NM- MRPEN K	<1	98	<1	<1	<1	100
MR- MRPEN K	<1	<1	105	<1	<1	100
MC- MRPEN K	<1	<1	<1	115	<1	100
CT- MRPEN K	<1	<1	<1	<1	95	100

10

20

【 0 0 8 1 】

すべての抗体は、免疫のために使用したペプチドに相当する、MRPENKペプチドを結合した。NT MRPENK抗体(EEDDSLANSDDLKと10%交差反応)以外の抗体は、抗体の免疫のために使用されないMRPENKペプチドと交差反応を示さなかった。

【 0 0 8 2 】

プロ エンケファリンイムノアッセイ

50  $\mu$ lのサンプル(又はキャリブレーター)を、コーティングされたチューブに分注し、標識抗体(200  $\mu$ l)を添加した後、チューブを、18~25 で2時間、インキュベートした。結合しなかったトレーサーを、洗浄液(20 mmol/l PBS、pH 7.4、0.1% Triton X 100)で、5回洗浄することによって(それぞれ1 ml)、除去した。チューブ結合標識抗体を、Luminometer LB 953及び1000 pmol/l MRPENKの固定された濃度を使用して、測定した。異なる抗体の組み合わせのノイズ(MRPENKなしのRLU)比に対するシグナル(1000 pmol MRPENK/lでのRLU)を、表4に示す。すべての抗体は、任意の他の抗体とのサンドイッチ複合体を生成することができた。驚くべきことに、ノイズ比に対する最も強いシグナル(最も良い感受性)を、MR MRPENKとCT MRPENK抗体とを組み合わせることで生成した。その後、本願発明者等は、この抗体の組み合わせを使用して、さらなる研究のためのMRPENK イムノアッセイを行った。MR MRPENK抗体を、コーティングされたチューブ抗体として使用し、そしてCT MRPENK抗体を標識抗体として使用した。

30

40

【 0 0 8 3 】

## 【表4】

表4：

	固相抗体	NT-MRPENK	NM-MRPENK	MR-MRPENK	MC-MRPENK	CT-MRPENK
標識抗体						
NT-MRPENK		/	27	212	232	<1
NM-MRPENK		36	/	451	487	<1
MR-MRPENK		175	306	/	536	1050
MC-MRPENK		329	577	542	/	<1
CT-MRPENK		<1	615	1117	516	/

10

20

## 【0084】

## キャリブレーション

アッセイを、20 mM  $K_2PO_4$ 、6 mM EDTA、0.5% BAS、50  $\mu$ M アマスタチン、100  $\mu$ M ロイペプチン、pH 8.0で希釈された、合成MRPENKの希釈液を使用して、キャリブレーションを行った。プロ エンケファリン対照血漿は、ICI diagnostics, Berlin, Germanyから入手し得る。図1は、典型的なプロ エンケファリン用量/シグナル曲線を示す。標準曲線プロ エンケファリンである。アッセイの感受性は、0 キャリブレーター（MRPENKの添加）+ 2SD)の20決定、5.5 pmol/Lであった。

30

## 【0085】

## 集団研究

## 方法

本願発明者等は、1991~1994のMalmo Diet and Cancer Studyベースライン試験（年齢58 ± 6歳及び59%の女性）に基づく集団の2559人の女性参加者から空腹時血漿中のプロ エンケファリンを測定した。本願発明者等は、多変量補正（すべての従来の心血管リスク因子、糖尿病リスク因子及び癌についてのまた癌の遺伝の分析における）コックス比例ハザードモデルを使用して、ベースラインPENK（それぞれの対数変換PENKの標準偏差増加あたりのハザード比）を12年超の追跡期間の中央値の間のそれぞれの研究されたエンドポイントの最初の事象の時と関連付けた。エンドポイントを、スウェーデン国立病院の退院登録、スウェーデンの心筋梗塞登録、Malmo登録における脳卒中及びスウェーデンの癌登録を介して、検索した。これらの登録を介してのエンドポイントの検索は、正確であることが検証されそして理解されている（Beltingら、Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 10.2012 AACRをまた参照）。

40

## 【0086】

## 研究における女性の臨床特性

50

【表5】

表5：

記述統計			
	N	平均	標準偏差
MDCSスクリーニング時の年齢	2559	57.554	5.9403
収縮期血圧 (mmHg)	2559	140.50	19.311
拡張期血圧 (mmHg)	2559	85.65	9.117
ボディマスインデックス (体重/kg×kg)	2559	25.5196	4.19083
ウエスト (cm)	2559	76.99	10.245
グルコース (mmol/l)	2559	5.0418	1.21798
中性脂肪 (mmol/l)	2559	1.2245	.58404
高密度リポタンパク質 (mmol/l)	2559	1.5123	.36949
低密度リポタンパク質 (mmol/l)	2559	4.2016	1.04762
P-インスリン	2512	7.223	5.4223

10

## 【0087】

図2は、女性集団におけるプロエンケファリンの度数分布を示す。

平均値は、 $47.2 \text{ pmol/l}$ 、標準偏差 =  $1.2 \text{ pmol/l}$ であった。X軸は、PENK濃度の自然対数(LN)である。すべての結果は、アッセイの測定範囲内であり、最も低いPENK濃度は、 $9 \text{ pmol/l}$ であった。これらの結果は、使用したアッセイの適合性を示す(アッセイの感度  $5.5 \text{ pmol/l}$ )。

20

## 【0088】

乳癌のPENK及び予測

プロエンケファリンと乳癌との関連性を評価した(表6)。女性において、プロエンケファリンと乳癌との間に強い関連性があった。完全補正モデルにおいて、プロエンケファリンのそれぞれのSD増加は、将来の乳癌の28.6%のリスク低減と関連し、又はプロエンケファリンのSDの低減(revPENK)は、将来の乳癌の40%増加したリスクと関連し(表5)、そしてプロエンケファリンの四分位数の最上位対最下位は、乳癌のリスクにおいて、3倍超の差を確認した(表7及び図3を参照)。

30

## 【0089】

## 【表6】

表6：

方程式における変数<sup>0</sup>

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	Exp(B)についての95.0%CI	
							Lower	Upper
年齢	,007	,016	,228	1	,633	1,007	,977	1,039
性別				0 <sup>a</sup>				
BMI_B	,026	,025	1,139	1	,286	1,027	,978	1,077
DM_B	-,242	,407	,352	1	,553	,785	,354	1,744
HDL_B	,044	,252	,031	1	,860	1,045	,638	1,714
LDL_B	-,081	,090	,000	1	,988	,999	,837	1,191
現在の喫煙者	,330	,195	2,886	1	,089	1,392	,950	2,037
HER_CANCER_0	,034	,176	,038	1	,846	1,035	,733	1,461
LNINS	-,288	,197	2,127	1	,145	,750	,509	1,104
ZscoreLNPENK_females_noCa	-,337	,082	16,858	1	,000	,714	,608	,839

40

50

【 0 0 9 0 】

【 表 7 】

表 7 :

乳癌							
	HR per 1 SD	値	四分位数 4	四分位数 3	四分位数 2	四分位数 1	P for trend
女性 (2140/ 135)	1.40 (13-1.6)	<0.001	1.0 (ref)	1.50 (0.81-2.1)	2.7(1.7-3.4)	3.6 (2.7-4.9)	<0.001

10

ベースラインプロエンケファリン対乳癌の発生率についての多変量 Cox 比例ハザードモデル

【 0 0 9 1 】

図 3 は、女性の累積癌診断の四分位数 (Q) 1 (40.4 pmol/l 未満)、四分位数 2 (40.4 ~ 47.1 pmol/l)、四分位数 3 (47.2 ~ 54.1 pmol/l)、四分位数 4 (54.1 pmol/l 超) を示す、 Kaplan-Meier グラフである。低減した PENK は、乳癌発生の長期の増加したリスクを示す。ベースラインの日時点での癌病歴を有する任意の女性 (血液サンプリング) を排除したので、プロエンケファリンは、将来の乳癌発生について、非常に予測する。全体にわたって、Q1 の女性は、Q4 の女性よりも、乳癌発症の 3.6 倍高いリスクを有する。

20

【 0 0 9 2 】

プロエンケファリンとプロニューロテンシンとの組み合わせ

最近、増加するプロニューロテンシンが、乳癌について、非常に予測することを示したので、本願発明者等は、乳癌予測のための両バイオマーカーを組み合わせた。

【 0 0 9 3 】

実施例

プロニューロテンシンアッセイ

抗体を上記のように生成した。標識した抗体 (LA) を、PNT119 (H C S D S E E M K A L E A D F L T N M H (配列番号 24)) に対して生成し、そして固相抗体 (SPA) を、ペプチド PNT4462 (C N L N S P A E E T G E V H E E E L V A (配列番号 25)) に対して、生成した。

30

【 0 0 9 4 】

ヒトプロニューロテンシンの定量のためのイムノアッセイ

使用した技術は、アクリジニウムエステル標識に基づく、サンドイッチコーティングされたチューブ発光イムノアッセイであった。

【 0 0 9 5 】

標識化合物 (トレーサー) : 100 μg (100 μl) LA (PBS 中の 1 mg/ml、pH 7.4) を、10 μl アクリジニウム NHS エステル (アセトニトリル中の 1 mg/ml、InVent GmbH, Germany) (欧州特許第 0353971 号) と混合し、そして室温で 20 分間、インキュベートした。標識 LA を、BioSil SEC 400 5 グルを過 HPLC (Bio Rad Laboratories, Inc., USA) で精製した。精製した LA を、希釈した (300 mmol/l リン酸カリウム、100 mmol/l NaCl、100 mmol/l Na EDTA、5 g/l ウシ血清アルブミン、pH 7.0 で)。最終濃度は、標識化合物 200 μl あたり (約 20 ng 標識抗体)、約 800.000 相対発光量 (RLU) であった。アクリジニウムエステル化学発光を、AutoLumat L 953 (Berthold Technolo

40

50

gies GmbH & Co. KG) を使用することで測定した。

【0096】

固相：ポリスチレンチューブ (Greiner Bio One International AG, Austria) を、SPA (1.5 μg SPA / 0.3 ml 100 mmol/l NaCl、50 mmol/l Tris/HCl、pH 7.8) で、コーティングした (室温で18時間)。5%ウシ血清アルブミンでブロッキングした後、チューブをPBS (pH 7.4) で洗浄し、そして真空乾燥した。

【0097】

キャリブレーション

アッセイを、プロニューロテンシンコーティングヒト血清の希釈液を使用して、キャリブレーションした。高いプロニューロテンシン免疫反応性を有するヒト血清のプールを (InVent Diagnostika, Hennigsdorf, Germany)、ウマ血清で希釈した (Biochrom AG, Deutschland) (アッセイスタンダード)。

10

【0098】

スタンダードを、ヒトプロニューロテンシンキャリブレーター (ICI Diagnostics, Berlin, Germany) の使用により、キャリブレーションした。あるいは、アッセイを、合成又は組み換えPNT 117又はその断片によってキャリブレーションしてもよい (Ernstら、2006をまた参照)。

【0099】

プロNTイムノアッセイ

50 μlのサンプル (又はキャリブレーター) を、SPAコーティングチューブ中に分注し、標識LA (200 μl) を添加後、チューブを、18~25 で16~22時間、インキュベートした。結合しなかったトレーサーを、洗浄溶液 (20 mmol/l PBS、pH 7.4、0.1% Triton X 100) で、5回 (それぞれ1 ml) 洗浄により除去した。チューブ結合LAを、Luminometer LB 953を使用して測定した。結果を、キャリブレーション曲線から計算した。

20

【0100】

女性集団におけるプロエンケファリン及びPNTの複合解析

プロエンケファリンとプロニューロテンシンとの間に、有意な相関はなかった ( $p = 0.56$ )。両バイオマーカーを使用する複合モデルにおいて、本願発明者等は、乳癌予測において、それらが両方とも独立していることが分かった。

30

【0101】

完全に補正されたモデルにおいて、PNTのそれぞれのSD増加は、将来の乳癌の49.9%リスク増加と関連していた。驚くべきことに、方程式にPNTを追加した後、PENKは、PNTなしよりもはるかに強く、そしてプロエンケファリンのそれぞれのSD増加について、30.8%リスク低減を示し、又はプロエンケファリンのそれぞれのSD低減は、将来の乳癌の44.5%増加したリスクと関連していた (表8)。

【0102】

表8：乳癌予測のためのPNT及びPENKの複合アッセイ

40

【表 8】

方程式における変数

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	Exp(B) についての 95.0%CI	
							Lower	Upper
年齢	-.003	.019	.020	1	.888	.997	.960	1,036
現在の喫煙者 0	.434	.204	4,505	1	.034	1,543	1,034	2,304
BMI_B	.001	.027	.001	1	.979	1,001	.948	1,056
GFR_CG_BSACorr	-.005	.008	.357	1	.550	.995	.979	1,011
hrl_curt	.730	.201	13,146	1	.000	2,075	1,399	3,079
PNT	.405	.091	19,731	1	.000	1,499	1,254	1,793
PENK	-.368	.088	17,416	1	.000	.692	.582	.823

表 8 :

【 0 1 0 3 】

最上位対最下位の四分位 PNT は、乳癌発症について、2.56 倍のリスクを示し、そして PNT 最下位対最上位四分位数の上のプロ エンケファリン ( rev = 反転四分位数 Q1 = Q4、Q2 = Q3、Q3 = Q2、Q4 = Q1 ) は、独立した 3.6 倍のリスクを示す (表 9)。

【 0 1 0 4 】

10

20

30

40

50

PNTの最上位の四分位数と最下位のプロ エンケファリンの四分位数対最下位のPNT及び最高位のプロ エンケファリンの四分位数の組み合わせは、6.17の複合リスクを示す(図3参照)。

【0105】

表9：乳癌予測のためのPNT及びPENKの複合解析

【表9】

表9：

方程式における変数

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95.0% CI
							Lower
年齢	-.022	.018	1,468	1	.226	.978	.943
現在の喫煙者0	.391	.200	3,808	1	.051	1,478	.998
hrt_curr	.652	.195	11,145	1	.001	1,920	1,309
BMI_B	.012	.025	.247	1	.619	1,012	.964
GFR.CG_BSAcorr	-.012	.008	2,279	1	.131	.988	.972
NLN_PNT			13,898	3	.003		
NLN_PNT(1)	.353	.301	1,378	1	.241	1,424	.789
NLN_PNT(2)	.604	.286	4,452	1	.035	1,830	1,044
NLN_PNT(3)	.942	.269	12,260	1	.000	2,566	1,514
Q_PENK_rev			23,361	3	.000		
Q_PENK_rev(1)	.410	.331	1,534	1	.215	1,507	.787
Q_PENK_rev(2)	.979	.305	10,299	1	.001	2,663	1,464
Q_PENK_rev(3)	1,284	.300	18,315	1	.000	3,610	2,005

【0106】

図4は、乳癌予測のためのプロ エンケファリンの複合解析の図例を示す。

本願発明者等は、最下位プロ エンケファリン(1<sup>st</sup>)四分位数及び最高位(4<sup>th</sup>)プロ ニューロテンシン四分位数を有する女性を組み合わせた(群3)。その高リスク群内で、約19.02%の女性が、15年後以内に、乳癌を発症した。

【0107】

群2は、プロ ニューロテンシンの3<sup>rd</sup>四分位数及びプロ エンケファリンの2<sup>nd</sup>四分位数+プロ ニューロテンシンの2<sup>nd</sup>四分位数及びプロ エンケファリンの3<sup>th</sup>四分位数を有する女性の組み合わせである。その中リスク群内で、約7.48%の女性が、15年後以内に、乳癌を発症した。

【0108】

群1は、プロ ニューロテンシンの1<sup>st</sup>四分位数及びプロ エンケファリンの4<sup>th</sup>四分位数を有する女性の組み合わせである。その低リスク群内で、3.08%の女性が、15年後以内に、乳癌を発症した。群1及び群3の間のハザードリスクは、約6.17である。

【0109】

肺癌

女性において、プロ エンケファリンはまた、肺癌を予測する。

40人の女性が、観察期間中に肺癌を発症した。プロ エンケファリンは、喫煙及び非喫煙女性で異なる(p=0.44)。予想されるように、喫煙は、肺癌のための強いリスク予測マーカーである(P<0.0001)。驚くべきことに、喫煙は、方程式の一部であるが、低いプロ エンケファリンは、肺癌を発症する3.2倍のリスクを示した(表10a及び10b)。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 1 0 】

表 1 0 a 及び 1 0 b は、女性における肺癌の予測での P E N K を示す。女性を、三分位に群分けし (表 1 0 a)、そしてその後、肺癌発症について解析した (表 1 0 b を参照)。rev = 最高位三分位 (三分位 3)、rev ( 1 ) = 三分位 2、及び rev ( 2 ) = 最下位三分位 (三分位 1) である。

## 【 0 1 1 1 】

## 【表 1 0】

表 10 a :

## PENK [pmol/L]

PENKpmol/L のパーセンタイルグループ	中央値	最小	最大
1	37,80000	9,000	42,800
2	47,20000	42,900	51,300
3	58,30000	51,400	518,100
合計	47,25000	9,000	518,100

10

20

## 【 0 1 1 2 】

## 【表 1 1】

表 10 b :

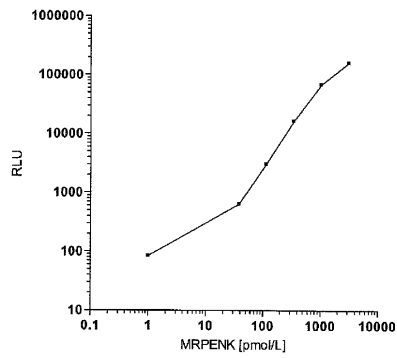
## 方程式における変数

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)
年齢	,045	,040	1,251	1	,263	1,046
現在の喫煙者 0	1,897	,427	19,761	1	,000	6,667
BMI_B	-,034	,063	,287	1	,592	,967
GFR_CG_BSAcorr	-,024	,019	1,592	1	,207	,976
T_PENK_females_rev			6,698	2	,035	
T_PENK_females_rev(1)	,208	,580	,128	1	,721	1,231
T_PENK_females_rev(2)	1,168	,511	5,220	1	,022	3,214

30

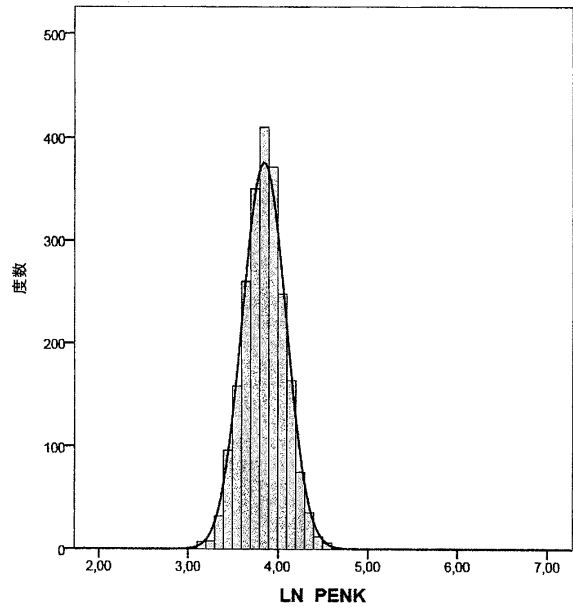
【 図 1 】

Fig. 1:



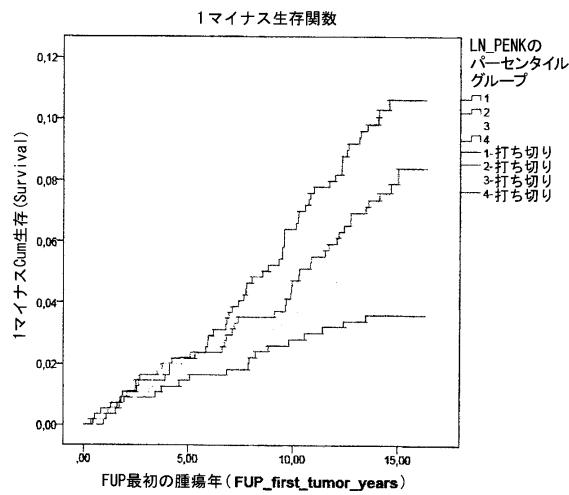
【 図 2 】

Fig. 2:



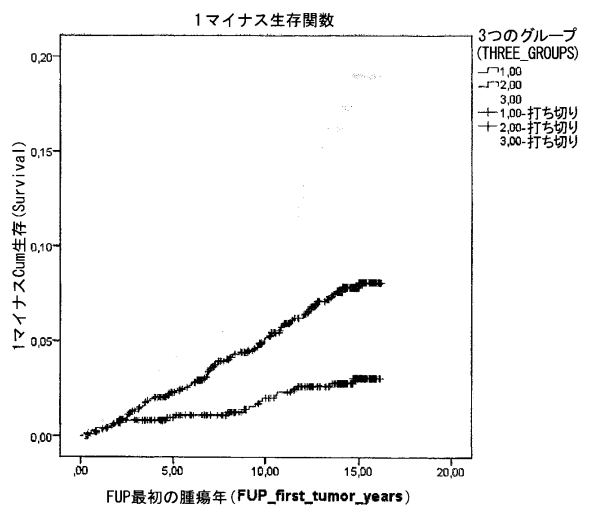
【 図 3 】

Fig. 3:



【 図 4 】

Fig. 4:



【配列表】

0006392762000001.app

## フロントページの続き

- (74)代理人 100117019  
弁理士 渡辺 陽一
- (74)代理人 100150810  
弁理士 武居 良太郎
- (74)代理人 100179039  
弁理士 伊藤 洋介
- (72)発明者 アンドレアス ベルクマン  
ドイツ連邦共和国, 13465 ベルリン, アム ローゼンアンガー 78
- (72)発明者 オレ メランデル  
スウェーデン国, エス - 20502 マルメー, ビルディング 91, エントランス 72, フロア 12, セーノウ スコーネ ユニバーシティ ホスピタル クリニカル リサーチ センター

審査官 海野 佳子

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2008/0160557(US, A1)  
国際公開第2009/044561(WO, A1)  
特表2007-537430(JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 33/48 - 33/98  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	有助于预测女性受试者患癌症风险的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP6392762B2</a>	公开(公告)日	2018-09-19
申请号	JP2015534992	申请日	2013-10-01
[标]申请(专利权)人(译)	思芬构技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	格哈德·戈尔抛丸科技GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	格哈德·戈尔抛丸科技GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	アンドレアスベルクマン オレメランデル		
发明人	アンドレアスベルクマン オレメランデル		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 C07K14/665		
CPC分类号	G01N33/57415 G01N33/57423 G01N2333/665 G01N2800/50 G01N33/574		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D C07K14/665.ZNA		
代理人(译)	青木 篤 石田 敬 渡边洋一 武井良太郎 伊藤洋介		
优先权	2012187050 2012-10-02 EP		
其他公开文献	JP2015532423A5 JP2015532423A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种用于预测未患癌症或用于诊断女性受试者中的癌症的女性受试者患癌症的风险的方法，包括以下步骤：确定包含至少5个氨基酸的亮氨酸脑啡肽和甲硫氨酸脑啡肽的脑啡肽素或其片段的水平；并且将脑啡肽素或其片段的水平与患癌症的风险相关联，其中该水平预测发生癌症增加或诊断癌症的风险，其中降低的水平与癌症的诊断相关。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6392762号 (P6392762)
(45) 発行日 平成30年9月19日(2018.9.19)	(24) 登録日 平成30年8月31日(2018.8.31)	
(51) Int. Cl.	F I	
G O 1 N 33/68 (2006.01)	G O 1 N 33/68	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D
C O 7 K 14/665 (2006.01)	C O 7 K 14/665	Z N A
請求項の数 19 (全 26 頁)		
(21) 出願番号 特願2015-534992 (P2015-534992)	(73) 特許権者 514122524	
(86) (22) 出願日 平成25年10月1日(2013.10.1)	シュベーンゴテック ゲゼルシャフト ミ	
(65) 公表番号 特表2015-532423 (P2015-532423A)	ット ベシュレンクテル ハフツング	
(43) 公表日 平成27年11月9日(2015.11.9)	ドイツ連邦共和国, 1 6 7 6 1 ベニヒ	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2013/070471	ストルフ, ノイエンドルフシュトゥー	
(87) 国際公開番号 W02014/053502	1 5アー	
(87) 国際公開日 平成26年4月10日(2014.4.10)	(74) 代理人 10009759	
審査請求日 平成28年8月17日(2016.8.17)	弁理士 青木 篤	
(31) 優先権主張番号 12187050.5	(74) 代理人 100077517	
(32) 優先日 平成24年10月2日(2012.10.2)	弁理士 石田 敬	
(33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)	(74) 代理人 100087871	
	弁理士 福本 慎	
	(74) 代理人 100087413	
	弁理士 古賀 哲次	
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 女性対象において癌になるリスクの予測を補助するための方法		