

(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2012-521552  
(P2012-521552A)

(43) 公表日 平成24年9月13日(2012.9.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53</b> (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	4 B O 6 3
<b>GO 1 N 33/574</b> (2006.01)	GO 1 N 33/574 A	
<b>C 1 2 Q 1/02</b> (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁)

(21) 出願番号	特願2012-501379 (P2012-501379)	(71) 出願人	511230624
(86) (22) 出願日	平成22年3月24日 (2010. 3. 24)		トータル サイエントフィック リミテ
(85) 翻訳文提出日	平成23年10月24日 (2011.10.24)		イド
(86) 国際出願番号	PCT/GB2010/000563		イギリス国, ケンブリッジ シービー2 2
(87) 国際公開番号	W02010/109196		3 エーティール, バブラハム リサーチ
(87) 国際公開日	平成22年9月30日 (2010. 9. 30)		キャンパス
(31) 優先権主張番号	0905076.6	(74) 代理人	100099759
(32) 優先日	平成21年3月24日 (2009. 3. 24)		弁理士 青木 篤
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100077517
			弁理士 石田 敬
		(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】 癌診断薬

(57) 【要約】

本発明は、癌の診断、予後及びモニタリングのためのキット、及び方法に関する。1つの局面では、哺乳動物が任意の癌に罹患しているか又はその危険にあるか否かを同定する方法であって、以下のステップ：(a) 哺乳動物由来の試料(例えば生物的試料)中の糖鎖含有抗原に結合する非-IgG免疫グロブリンによるシグナルを測定し；(b) ステップ(a)で測定したシグナルを、癌を有することが知られている1以上の哺乳動物由来の1以上の試料中の糖鎖含有抗原に結合する非-IgG免疫グロブリンによるシグナル、及び/又は1以上の健常な哺乳動物由来の1以上の試料中の糖鎖含有抗原に結合する非-IgG免疫グロブリンによるシグナルと比較すること、を含む方法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

哺乳動物が任意の癌に罹患しているか又はその危険にあるか否かを同定する方法であって、以下のステップ：

(a) 哺乳動物由来の試料（例えば生物的試料）中の糖鎖含有抗原に結合する非-IgG免疫グロブリンによるシグナルを測定し；

(b) ステップ (a) で測定したシグナルを、癌を有することが知られている1以上の哺乳動物由来の1以上の試料（例えば生物的試料）中の糖鎖含有抗原に結合する非-IgG免疫グロブリンによるシグナル、及び/又は1以上の健全な哺乳動物由来の1以上の試料（例えば生物的試料）中の糖鎖含有抗原に結合する非-IgG免疫グロブリンによるシグナルと比較すること、  
を含む、方法。

10

## 【請求項 2】

ステップ (a) がインビトロで行われる、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 3】

前記の糖鎖含有抗原に結合する非-IgG免疫グロブリンによるシグナルが、以下のステップ：

(i) 前記糖鎖含有抗原が好適な基板に結合されて、被覆された基板を形成し；

(ii) 前記被覆された基板が前記試料に曝露され；そして、

(iii) 前記被覆された基板に結合された非-IgG免疫グロブリンが検出されること、

で測定される、請求項 1 又は 2 記載の方法。

20

## 【請求項 4】

前記非-IgG免疫グロブリンが、IgA1、IgA2、総IgA、IgD、IgE及びIgMからなる群より選ばれる、請求項 1～3のいずれか1項記載の方法。

## 【請求項 5】

前記非-IgG免疫グロブリンが、IgA（例えば、IgA1又はIgA2）である、請求項 1～3のいずれか1項記載の方法。

## 【請求項 6】

前記糖鎖含有抗原が、腫瘍関連細胞表面抗原である、請求項 1～4のいずれか1項記載の方法。

30

## 【請求項 7】

前記糖鎖含有抗原が、-gal、ルイス-A、ルイス-X、シアリル-ルイス-X、Tn、シアリル-Tn又はTF抗原である、請求項 1～5のいずれか1項記載の方法。

## 【請求項 8】

前記糖鎖含有抗原が、-gal、TF抗原又はシアリル-ルイス-A、例えば-galである、請求項 1～6のいずれか1項記載の方法。

## 【請求項 9】

前記癌が乳癌である、請求項 8 記載の方法。

## 【請求項 10】

前記糖鎖含有抗原が、P1抗原、ルイス-X、血液型H、ルイス-B、血液型A三糖又はGal<sub>1-2</sub>Gal<sub>1-2</sub>である、請求項 1～6のいずれか1項記載の方法。

40

## 【請求項 11】

前記糖鎖含有抗原がルイス-Aである、請求項 10 記載の方法。

## 【請求項 12】

前記糖鎖含有抗原が、P1抗原、血液型A三糖、Gal<sub>1-2</sub>Gal<sub>1-2</sub>Gal<sub>1-3</sub>Gal<sub>1-3</sub>GlcNAc、Gal<sub>1-3</sub>Gal<sub>1-3</sub>Gal<sub>1-3</sub>GlcNAc<sub>1-3</sub>Gal<sub>1-4</sub>Glc<sub>1-4</sub>である、請求項 1～4及び6のいずれか1項記載の方法。

## 【請求項 13】

前記糖鎖含有抗原が、P1抗原である、請求項 12 記載の方法。

## 【請求項 14】

50

前記非-IgG免疫グロブリンがIgMである、請求項12又は13記載の方法。

【請求項15】

前記癌が、結腸癌である、請求項10～14のいずれか1項記載の方法。

【請求項16】

前記糖鎖含有抗原がタンパク質に結合されている、請求項1～15のいずれか1項記載の方法。

【請求項17】

前記タンパク質が血清アルブミンである、請求項16記載の方法。

【請求項18】

1超の糖鎖含有抗原が使用される、請求項1～17のいずれか1項記載の方法。

10

【請求項19】

非-IgG免疫グロブリンの異なった種類に特異的な1超の検出試薬が使用される、請求項1～18のいずれか1項記載の方法。

【請求項20】

前記試料が、血清、血漿又は全血である、請求項1～19のいずれか1項記載の方法。

【請求項21】

前記糖鎖含有抗原が -galであり、前記非-IgG免疫グロブリンがIgA（例えば、IgA1又はIgA2）である、請求項1～5のいずれか1項記載の方法。

【請求項22】

前記糖鎖含有抗原がルイス-Aであり、前記非-IgG免疫グロブリンがIgA（例えば、IgA1又はIgA2）である、請求項1～5のいずれか1項記載の方法。

20

【請求項23】

前記糖鎖含有抗原がP1であり、前記非-IgG免疫グロブリンがIgMである、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。

【請求項24】

前記癌が、乳癌、肝臓癌、胃癌、卵巣癌、脳腫瘍、膵臓癌、白血病及び骨腫瘍からなる群より選ばれる、請求項1～8、10～14及び16～23のいずれか1項記載の方法。

【請求項25】

前記癌が乳癌である、請求項24記載の方法。

【請求項26】

前記癌が、結腸癌である、請求項24記載の方法。

30

【請求項27】

前記哺乳動物がヒトである、請求項1～26のいずれか1項記載の方法。

【請求項28】

請求項1～27のいずれか1項記載の方法において使用するために好適なキットであって、以下：

(a) 1以上の糖鎖含有抗原；

(b) 1以上の非-IgG免疫グロブリンを特異的に認識することができる1以上の検出試薬を含む、キット。

【請求項29】

前記糖鎖含有抗原が、 -gal、ルイス-A、シアリル-ルイス-A、ルイス-X、シアリル-ルイス-X、Tn、シアリル-Tn、TF抗原、P1抗原、血液型H、ルイス-B、血液型A三糖、Gal<sub>1-2</sub>Gal、Gal<sub>1-3</sub>Gal<sub>1-3</sub>GlcNAc、Gal<sub>1-3</sub>Gal、及びGal<sub>1-3</sub>Gal<sub>1-4</sub>GlcNAc<sub>1-3</sub>Gal<sub>1-4</sub>Glcからなる群より選ばれるである、請求項28記載のキット。

40

【請求項30】

前記検出試薬が、IgA1、IgA2、総IgA、IgD、IgE又はIgMに特異的である、請求項28又は29記載の方法。

【請求項31】

前記糖鎖含有抗原が、 -gal、ルイス-A、ルイス-X、シアリル-ルイス-X、Tn、シアリル-Tn及びTF抗原からなる群より選ばれる、請求項28～30のいずれか1項記載の方法

50

。

## 【請求項 3 2】

前記糖鎖含有抗原が  $\alpha$ -gal であり、前記検出試薬が総 IgA (又は IgA1 又は IgA2) に特異的であり、そして前記癌が乳癌である、請求項 3 1 記載のキット。

## 【請求項 3 3】

前記糖鎖含有抗原が、P1 抗原、ルイス-X、血液型 H、ルイス-B、血液型 A 三糖又は Gal<sub>1-2</sub>Gal である、請求項 2 8 ~ 3 0 のいずれか 1 項記載のキット。

## 【請求項 3 4】

前記糖鎖含有抗原がルイス-A5 であり、前記検出試薬が総 IgA (又は IgA1 又は IgA2) に特異的であり、そして前記癌が結腸癌である、請求項 3 4 記載のキット。

10

## 【請求項 3 5】

前記糖鎖含有抗原が、P1 抗原、血液型 A 三糖、Gal<sub>1-2</sub>Gal、Gal<sub>a1-3</sub>Gal<sub>1-3</sub>GlcNAc、Gal<sub>1-3</sub>Gal、及び Gal<sub>1-3</sub>Gal<sub>1-4</sub>GlcNAc<sub>1-3</sub>Gal<sub>1-4</sub>Glc からなる群より選ばれる、請求項 2 8 ~ 3 0 のいずれか 1 項記載のキット。

## 【請求項 3 6】

前記糖鎖含有抗原が P1 抗原であり、前記検出試薬が IgM に特異的であり、そして前記癌が結腸癌である、請求項 3 3 記載のキット。

## 【請求項 3 7】

前記検出試薬が抗体である、請求項 2 8 ~ 3 6 のいずれか 1 項記載のキット。

## 【請求項 3 8】

前記検出試薬が定量化を助けるために標識される、請求項 2 8 ~ 3 7 のいずれか 1 項記載のキット。

20

## 【請求項 3 9】

請求項 2 8 ~ 3 8 のいずれか 1 項記載のキットであって、当該キットを使用して哺乳動物 (例えばヒト) 由来の 1 以上の試料に本発明の方法を適用することによって得られたデータに基づいて、癌の存在又は癌のリスクに関して、当該哺乳動物を分類するためのアルゴリズムを含む追加の成分を有する、キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、癌の診断、予後診断及びモニタリングのための、キット及び方法に関する。

30

## 【背景技術】

## 【0002】

癌は世界中で主要な死亡原因である (2007 年には 790 万人の死亡 ; 世界中のすべての死因の 13% ; WHO Factsheet #297 2008 年 7 月)。肺癌は最も一般的であり (140 万人の死亡)、次いで胃癌 (866,000 人の死亡) 及び結腸癌 (677,000 人の死亡) である。開発国での医療標準の顕著な改善にもかかわらず、癌に因る死亡数は、世界的に、2040 年までには 2 倍になると予測される。

## 【0003】

WHO によれば、癌負荷の約 3 分の 1 は、転移 (遠隔の解剖学的部位への腫瘍の浸潤) が起こる前に事例が検出され早期に治療されるならば除くことができる。多くの癌については、(しこり及び腫れ物の自己診断を助けるための) 教育が顕著な貢献をもたらす。しかしながら、他の癌、例えば結腸癌については、腫瘍が進行するまで何の症状も起こらないことが多く、最も初期の症状は通常非特異的である (例えば、体重減少及び疲労)。

40

## 【0004】

結果として、乳癌についてのマンモグラフィ、子宮頸癌についての細胞学 (「パブ塗抹」) 及び結腸癌についての結腸内視術を含む、最も一般的な癌のいくつかについては、スクリーニングプログラムが確立されている。これらのスクリーニングプログラムのすべてが、実施するには非常に労力がかかり、費用がかかるが、一方、結腸内視術は、対象に更に不快であり、極稀な事例では (特定の外科医によって 1000 中の 1 から 6000 中の 1 に見積も

50

られる)腸穿孔に因る重度の合併症のリスクをもたらす。

【0005】

したがって、これらの費用のかさむスクリーニングフレームワークをインビトロでの診断アッセイで置き換えるかなりの機会が存在する。例えば、結腸癌では、血中の癌胎児性抗原(CEA)のレベルを測定することは、切除後の疾患の再発を検出するために有用であるが、多くの偽陰性及び偽陽性を有するためにスクリーニングに有用でない。同様に、便潜血(FOB)試験は、約2~5%の偽陽性率を有し、S状結腸鏡検査法と組み合わせる時のスクリーニングに有用にすぎない。結果として、診断用結腸内視鏡術は、結腸癌についての最も標準的なスクリーニング方法と考えられ、50歳を超えるすべての個人は、米国臨床腫瘍学会によって発行されたガイドラインにおいて毎5~10年に一度スクリーニングが推奨される。同様に、成功的な治療後の毎年の結腸内視鏡術が現在推奨されているが(強力な調査が5年死亡率において37%~30%に減少していることと関連していたので)、血清CEA測定の例外はある。他の臨床的に有用な予後診断バイオマーカーは広く採用されていない。

10

【0006】

広範囲の種類の種類中の固形癌と関連する候補バイオマーカーを記載する広い文献にもかかわらず、前立腺癌のための前立腺特異的抗原(PSA)、甲状腺癌のためのサイログロブリン及び肝細胞癌のためのアルファ-フェトプロテインを除いて、他のいずれのバイオマーカーも固形癌の早期検出のための必要な感度及び特異性を記載してこなかった、という事実が依然としてある(Gara et al. (2008) Tunis Med. 86: 579-83)。

20

【0007】

最近の10年では、バイオマーカー発見のための「オーミクス」技術の使用における探究があり、それと共に、遺伝子発現プロファイリング、プロテオミクス及び代謝学のような方法によって発見された様々な組織中の腫瘍の検出用の候補バイオマーカーを記載する科学文献には、頻発する原稿が存在している。しかし、これまで、これらの新規マーカーは、あったとしても、ごく少数が大スケールの臨床試験で有効であると評価されてきた(そして、それらの大多数を有効であると評価しようとする事さえ不可能になっているほど速く、尤もらしい候補の数は増加している-すべての公知のタンパク質の10%程度は、文献のあるところでは癌の候補マーカーであると示唆されてきた)。癌の臨床的に有用なバイオマーカーの必要性は、そのため、相変わらず差し迫っている。

30

【0008】

研究の1つの有望な線は、腫瘍細胞の正常な前駆体と比べて腫瘍細胞によって区別的に発現される細胞表面抗原の研究である。該細胞表面の重要な成分は、細胞外被、該細胞表面上に提示されるオリゴ糖鎖のコロナ、及びプロテオグリカンである。この細胞外被の糖鎖組成物は、正常状態から癌性状態までの細胞転換の間に微妙な変換を経る。

【0009】

タンパク質グリコシル化パターンについての変化は、試験した本質的にすべての腫瘍細胞に見出された。この異常なグリコシル化は、一般的に、特異的なモノクローナル抗体の使用によってもともと同定されたいわゆる腫瘍関連糖鎖抗原(TACA)の発現をもたらす。ある癌での特定のTATCの発現は、80~100%(例えば、結腸癌のTn、STn)と高く、癌遺伝子、例えばp53又はp16の欠損又は不活性化に罹患した同一の癌の割合よりも高い。かかる抗原は、生検試料での腫瘍の診断及び評価のために有用であるが、それらは細胞関連抗原であるので、血清中では検出されず、固形癌の非侵襲的検出のために使用できない。

40

【0010】

その中で、最も一般的なグリコシル化変化は、以下の糖鎖構造の存在での変化である。

抗原: GalNAc[ 1]-Ser/Thr

シアリル-Tn抗原: Neu5Ac[ 2-6]GalNAc[ 1]-Ser/Thr

トムセン フリードリッヒ (TF) 又はT抗原: Gal[ 1-3]GalNAc[ 1]-Ser/Thr。

【0011】

GalNAcがN-アセチル-ガラクトサミンである場合に、Serはタンパク質鎖中のアミノ酸セ

50

リンでありThrは、タンパク質鎖中のアミノ酸スレオニンであり、Neu5 Acは、N-アセチル-ノイラミン酸（又はシアル酸）であり、Galはガラクトースである。糖結合は、グリコシド結合を介して連結される炭素を示すために慣用的な炭素番号を用いて角括弧で記載されている。及びは一般的な慣習に従ってグリコシド結合の立体化学を示している。

#### 【0012】

TF抗原は、結腸、乳房、膀胱、前立腺、肝臓、卵巣及び胃を含むすべてヒト癌の約90%に発現され、腫瘍の種類又は罹患した組織によらずに使用することができる「一般的な癌マーカー」である可能性を有する。

#### 【0013】

これらの3種の糖鎖抗原に加えて、シアリル-ルイスX (sLeX; Neu5Ac[ 2-3]Gal[ 1-4] {Fuc[ 1-3] }GlcNAc)、シアリル-ルイスA (sLeA; Neu5Ac[ 2-3]Gal[ 1-3] {Fuc[ 1-4] }GlcNAc)、並びにN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼV (GnT-V) の 1,6 GlcNAc分枝生成物、及び -ガラクトシルエピトープ ( -gal; Gal[ 1-3]Gal[ 1-4]GlcNAc) (ここで、Fucはフコースを、GlcNAcはN-アセチル-グルコサミンを示す) 他のTACAの範囲が同定されている。

#### 【0014】

(生検によって測定された) 腫瘍中のこれらの抗原の発現は、患者の生存と関連している。例えば、Tn抗原発現について乳癌陰性の患者は、Tn発現に陽性であった患者よりも顕著に良好な生存率を有することが分かった (Tsuchiya et al. (1999) Breast cancer 6: 175-80)。加えて、TF抗原発現は、膀胱癌での侵襲性と関連し (Langlilide et al. (1992) Cancer 69:219-27)、結腸癌での肝臓転移の高いリスクに関連していることが分かっている (Cao et al. (1995) Cancer 76: 1700-08)。

#### 【0015】

TACA自体は検出するのは困難であり(主に、細胞に関連して、腫瘍の生検が必要とされるためである)、そのため診断的スクリーニングのための尤もらしい標的をつくらないが(目的が知られていない位置での初期腫瘍を検出することである時には)、抗体がTACAに対して(実際に、それらは、多くの他の糖構造に対するように)見出されることは周知である (Bohn (1999) Immunol. Lett. 69: 317-20)。抗糖鎖抗体は「天然抗体」と記載され、その存在は偏在し、その特異性は一般的に比較的 low (いくつかの又は多くの低度に関連した糖鎖エピトープを認識する)、それらは一般的に親和性が低く、そのため低力価でのみ検出できる。

#### 【0016】

ヒト血液がTF抗原、Tn抗原及び -galを含むこれらのTACAの多くに対する自然抗体を含むことがすでによく知られている。これらの自然抗体のいくつかのレベルは、対照におけるよりも癌を有する患者において異なっていることが分かっている。例えば、TF、Tn及び特に -galに結合するIgGのレベルは、乳癌を有する患者において減少することがわかっており、そして、IgG対TG抗原のより高いレベルは、Kurtenkov他 (2005) Exp Oncol 27: 136-40による研究においてステージIIの乳癌患者のより長い生存期間と関連していた。Smorodin他 (2001, Exp. Oncology 23: 109-13) は、胃癌患者のIgG対TF及びTn抗原の減少したレベル、及び結腸癌患者のより低いIgG対TF抗原を報告した。それにもかかわらず、これらの心強い初期の報告にもかかわらず、TACAに対するIgGの測定は、臨床的に有用であることが見出されなかった。なぜならば、癌患者と対照との任意の差の程度は比較的小さく、個体間の可変性は高く、その結果、かかる試験の感受性及び特異性は診断的又はスクリーニング手段としての使用のためには十分でない。

#### 【0017】

しかしながら、現在の文献は、(これまで最も一般的に研究されたクラスである) IgGクラス免疫グロブリンの測定に限定されている。しかしながら、抗体は4つの他のクラスがあり、重鎖配列: IgG (重鎖を有する)に加えて、IgM ( $\mu$ 重鎖)、IgA ( $\alpha$ 重鎖)、IgE ( $\gamma$ 重鎖)及びIgD ( $\delta$ 重鎖)によって識別される。加えて、IgGは、IgG1、G2、G3及びG4と名付けられた、異なるが関連した重鎖を有する4つ(ヒトでは)のサブクラスに分類

10

20

30

40

50

されるが、IgAは、IgA1及びA2と名付けられた、異なるが関連した 重鎖を有する2つ（ヒトでは）のサブクラスに分類される。TACAに対する抗体の以前の研究は、特異性がほとんど特定されない検出試薬、あるいは存在するかもしれないIgGサブクラスのすべてを検出するために選択された他の検出試薬を使用してきた。

【0018】

しかしながら、我々 (Mosedale et al. (2006) J Immunol Methods 309: 182-91) 及び他 (Hamadeh et al. (1995) Clin Diagn Lab Immunol 2: 125-31) は、糖鎖に対する自然抗体がIgG以外のクラスに存在することを明らかにしている。健常対象の比較的大きな集団では、一般的な糖鎖抗原の範囲に対する抗体は、G2、A、D及びMクラスに限定された。結果として、先に公表された試験で検出されたTACAに対するIgGの大多数（すべてではない）が実際にIgG2であつたらしい。本開示の前に、他のクラス（ほとんど、IgA、IgD及びIgMの可能性が高い）のTACAに対する抗体（又は他の糖鎖抗原）が対照と比べた癌では異なっているだろうか、あるいは任意のかかる差は臨床的に有用であるだろうかはまったく知られていない。

10

【発明の概要】

【0019】

本発明の第1の局面によれば、哺乳動物が任意の癌に罹患しているか又はその危険にあるか否かを同定する方法であつて、以下のステップ：(a) 哺乳動物由来の試料（例えば生物的試料）中の糖鎖含有抗原に結合する非-IgG免疫グロブリンによるシグナルを測定し；(b) ステップ(a)で測定したシグナルを、癌を有することが知られている1以上の哺乳動物由来の1以上の試料（例えば生物的試料）中の糖鎖含有抗原に結合する非-IgG免疫グロブリンによるシグナル、及び/又は1以上の健常な哺乳動物由来の1以上の試料（例えば生物的試料）中の糖鎖含有抗原に結合する非-IgG免疫グロブリンによるシグナルと比較すること、を含む、方法を提供する。本発明の更なる局面及び特徴は、以下に詳述し、添付のクレームに記載する。

20

【0020】

ここで、我々は、糖鎖抗原に対する天然非-IgG免疫グロブリンが、対象由来の試料と健常対象から得られた試料由来の癌とを識別するために使用できることを開示する。したがって、糖鎖抗原に対する非-IgG免疫グロブリンの測定は、多くの異なった癌種の診断、スクリーニング、予後診断及びモニタリングに使用することができ、そのため、かかる測定をするためのキットが請求される。本発明の測定ステップは好ましくはインビトロで行われる。

30

【0021】

本発明は、乳癌、直腸癌、胃癌、肺癌、肝臓癌、卵巣癌、皮膚癌、睾丸癌、膵臓癌、白血病、頭頸部癌、脳腫瘍、又は悪性転換によって引き起こされることが知られている任意の他の組織を含む（但し、これらに限定されない）任意の癌形態に罹患している又は罹患の危険にある個体を同定するための方法を含む。前記方法は、個体から採取した好適な試料を1以上の糖鎖含有抗原と、試料中の抗体が該糖鎖抗原（複数）に結合するような方法で接触させ、次いで該抗原（複数）に結合された非-IgG免疫グロブリンを検出することを含む。該方法の独特な特徴は、糖鎖含有抗原の使用、及び癌を有する、有さない又は癌の危険にある個体を同定する目的での非-IgG免疫グロブリンの検出である。

40

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】図1は、ELISAとして実行された本発明の方法の鍵ステップを示す。

【発明を実施するための形態】

【0023】

抗体：抗原相互作用を測定する目的のための当該分野で周知の任意の技術的方法は、本発明の方法を実施する目的のために適用できる。例えば、酵素免疫吸着測定法（又はELISA）として知られている技術は、本発明の実施に容易に適用され得る。この実施態様では、糖鎖含有抗原又は抗原（複数）は、基板又は表面（典型的には商業的に入手できる高分

50

子の結合を増加させるための方法で処理されたプラスチック表面)上にコートされ、試料はコートされた基板に適用される。試料に存在する任意の抗体の結合に好適な期間後に、非結合物質は全体的に洗い流される。典型的には、検出用の好適な酵素で標識された抗体を用いて結合抗体が検出される。ヒト抗体の特定のクラスに特異的な抗体は当該分野で周知であり、好適な産物の範囲は商業的に入手できる。本発明の目的のために、検出のために使用される抗体又は抗体(複数)は、ヒト抗体の非-IgG免疫グロブリンクラス又はクラス(複数)に対する特異性について選択される。結合された酵素の量は、次いで、好適な基板、典型的には、該酵素への曝露において分光光度法で測定することができる着色した産物に変換される、基板を用いて定量化される。本発明の方法を実施するために好適な典型的なELISAの準備は図1に示される。

10

## 【0024】

幅広い糖鎖抗原に対する非-IgG免疫グロブリンは、健常な対象と比較して、癌を有する対象由来の試料では相違する。その結果として、任意の好適な糖鎖抗原は、本発明の方法に従って使用することができる、好適な糖鎖抗原は、当該抗原に結合する非-IgG抗体のレベルが、健常な対照個体由来の試料に比べて、癌を有する又は癌の危険にある個体由来の試料中では異なるものとして定義される。このことが類語の定義ではないことに注意することは重要である(例えば、有用な抗原を定義するための方法がそれらが有用であるかどうかを試験することである、ではない)。なぜならば、本発明を定義する鍵ステップは、有用な抗原のための研究スペースの、糖鎖成分を有する抗原への実質的な限定であり、ここでは結合抗体はIgGクラスでないからである。糖鎖成分を有する抗原は、すべての可能な抗原の非常に小さな分画(0.1%未満)のみを構成し、従って抗原が有用でありそうな限定を与える時に、その方法は有用かつ進歩性のある貢献をもたらす。

20

## 【0025】

好ましくは、糖鎖含有抗原又は抗原(複数)はTACAである。本発明の糖鎖含有抗原又は抗原(複数)の例は、以下の表から選択される。

## 【0026】

## 【表1】

名称	構造
$\alpha$ -gal三糖	Gal [ $\alpha$ 1-3] Gal [ $\beta$ 1-4] GlcNAc-
Tn	GalNAc-O-Ser/Thr
シアリル-Tn	NeuAc [ $\alpha$ 2-6] GalNAc-O-Ser/Thr
ルイス-A	Gal [ $\beta$ 1-3] {Fuc [ $\alpha$ 1-4]} GlcNAc-
ルイス-X	Gal [ $\beta$ 1-4] {Fuc [ $\alpha$ 1-3]} GlcNAc-
シアリル-ルイス-A	NeuAc [ $\alpha$ 2-3] Gal [ $\beta$ 1-3] {Fuc [ $\alpha$ 1-3]} GlcNAc-
シアリル-ルイス-X	NeuAc [ $\alpha$ 2-3] Gal [ $\beta$ 1-4] {Fuc [ $\alpha$ 1-3]} GlcNAc-
TF抗原	Gal [ $\beta$ 1-3] GlcNAc-

30

## 【0027】

本発明の他の好適な糖鎖含有抗原又は抗原(複数)は、P1抗原、血液型H、ルイス-B、血液型A三糖、Gal 1-2Gal、Gala1-3Galp1-3GlcNAc、Gal011-3Gal、又はGala1-3Galp1-4GlcNAcp1-3Galp1-4Glcを含む。

## 【0028】

本発明の目的のために有用な同様な結果は、様々な化合物、アナログ及び本明細書に挙げたコア抗原性オリゴ糖の誘導体を用いて得られる、ことは明らかである。例えば、-gal三糖を組み込む五糖Gal[ 1-3]Gal[ 1-4]GlcNAc[ 1-3]Gal[ 1-4]Glcが、より短い-galと比べて、本発明の方法に従って使用される場合に、ほとんど識別できない結果を与えるほどに、当該オリゴ糖の多くは、その抗原性に影響を与えることなく拡張することが

40

50

できる。同様に、抗原性オリゴ糖は、糖鎖抗原の提示又は物理的性質を制御する目的のためのタンパク質又はペプチドのような他の構造的要素と共に混合される。例えば、オリゴ糖は、血清アルブミン（抗体が一般的に存在せず、そのため、それに複合化されたオリゴ糖に対する抗体の決定に影響を与えない、タンパク質）に複合化して、ELISAアッセイにおける基板上の抗原の固定化を助けることができる。

#### 【0029】

糖鎖含有抗原に結合する天然抗体が、一般に比較的低度の特異性を有し、そのため、幅広い試料中に存在する非-IgG抗体のレベルを決定するために使用される時に、構造的関連したオリゴ糖の範囲が本質的に同一の結果を与え、その結果、本発明の方法に従って使用される時に互いに容易に置換することができる、ことに注目するのは重要である。本明細書の目的のために、「本質的に同一」とは、並んだ試料を含む同一の実験条件下で2つの関連したオリゴ糖を用いて得られたシグナルが、少なくとも0.8の相関係数で相関することを意味する。かかるオリゴ糖抗原は、本発明の方法に従って、本明細書に明確に開示されたオリゴ糖抗原と自由に置換してよい。

10

#### 【0030】

場合により、糖鎖含有抗原の多重度に対する非-IgG抗体の存在は、本発明の方法に従って決定することができる。同一試料中の数個の異なったオリゴ糖に対する非-IgG抗体のレベルは、慣用的な1回に1つの検体法（one-analyte-at-a-time methods）（例えば、各々は異なった抗原でコートされ、同一試料のアリコートを反復するために曝露されている、反復ウェルでELISAアッセイ）又は多重化法（例えば、各々は異なった抗原でコートされ、次いで同時に同一試料に曝露される、色素でコードされたビーズ又は単一の相補性決定領域（CDR））のいずれかを用いて、段階的に又は並行して決定することができる。得られるデータは、次いで、試料が癌を有するか又は癌の危険にあるものとしてあるいは健常であるとして採取された個体を識別するために、当該分野で周知の方法を用いて組み合わせることができる。例えば、データは、Principal Component Analysis (PCA), Projection to Latent Structures (PLS), genetic algorithms、及び大データセット内の多変量診断因子を同定するための同様な方法を含むが（これらに限定されない）多変量モデリング法を用いて分析することができる。あるいは、データは、臨床的に有用な分類指標を開発するために、ルールに基づいたパラダイムを用いて問われる。

20

#### 【0031】

あるいは、異なった糖鎖含有抗原の多重度に対する非-IgG抗体の存在は、同一のアッセイで同時に決定することができる。そこでは、（どの抗原にどの抗体が結合されるか決定する任意の方法なしに）複数の糖鎖含有抗原が混合され、同一の基板の上にコートされる。かかるアッセイからの単一のアウトプットは、次いで、試料が癌に罹患しているか又は癌の危険がある、あるいは健常のいずれかとして採取される個体を識別するために使用される。

30

#### 【0032】

糖鎖含有抗原の量は（抗原モチーフの複数の事例が単一分子内に存在する任意の場合、例えばいくつかの同一のオリゴ糖と接合されたアルブミンタンパク質分子の場合には、糖鎖抗原のモ濃度の点から）、潜在的に重要であり、必要とされた臨床的場面におけるアッセイの診断的能力を最適化するために最適コーティング濃度は、当該分野で周知の種類のパイロット実験を用いて測定しなければならない。天然抗体が二価（又は、IgM、五価の場合に）であるので、抗原のコーティング密度は重要であり、よって抗原コーティング密度が顕著に高い場合には抗原の1分子超を同時に結合することができる。したがって、抗原のコーティング密度が高くなればなるほど、試料内の比較的低親和性抗体の結合能は大きくなる。これに対して、低コーティング密度は、高親和性抗体の結合（単一の相補性決定領域（CDR）のみを介して結合する）を好むだろう。好ましくは、コーティング密度は、 $5 \text{ pmole/cm}^2 \sim 3.5 \text{ nmole/cm}^2$ の範囲にあることになる。

40

#### 【0033】

試料体積に対する抗原コート（モラーで）の絶対量は（基板の表面積に関係なく）ま

50

た、潜在的に重要であり、必要とされた臨床的場面におけるアッセイの診断的能力を最適化するための、最適なコーティング量は、当該分野で周知の種類のパイロット実験を用いて測定されなければならない。コーティング量は重要である。なぜならば、血清中に存在する抗原に結合することができる抗体の量は、アッセイに示される抗原量に依拠して得られたシグナルに影響を与えるだろう。特に、同一の抗原に対する異なったクラスの抗体が試料中に存在する場合には、結合のためのそのような抗体間の競争が存在することになる。この競争の結果は、抗体の様々なプールの相対的な親和性に依拠するが、その相対的な量にも依拠する。したがって、存在する多数の（例えば）IgG及びより少量のIgAがある状況では、当該アッセイにおいて少量の抗原はIgGの検出を好むだろうが、当該アッセイにおいて大量の抗原はそれほど多くない種（この例ではIgA）の検出を増加させるだろう。好ましくは、コーティング量は、使用した試料の50 µl当たり5 pmole ~ 3.5 nmoleの範囲にあることになる。

10

#### 【0034】

試料への抗原の曝露の前に、基板上の任意の非特異的結合部位をブロックする必要がある。典型的には、ブロッキングステップは、高コピー数、基板上の低親和性結合部位に結合し、ブロックする、高分子（例えば、タンパク質、DNA又は糖類）の高濃度に抗原コート基板を曝露することによって行われる。典型的には、基板は、ブロッキングの前に洗浄され（例えば、0.05% Tween-20を含むリン酸緩衝生理食塩水（PBS）での3回の簡単な洗浄で）、次いでブロッキング溶液に曝露される。好適なブロッキング溶液の例は、PBS中の0.1 ~ 5%のウシ胎児血清アルブミン（BSA）、好ましくはPBS中の0.5% BSA、又は1 ~ 10% Tween-20を含むPBS中の1 ~ 10%スクロース、好ましくは5% Tween-20を含むPBS中の5%スクロース、を含む。典型的には、基板は、15分 ~ 4時間、好ましくは約1時間、ブロッキング溶液に曝露される。その後、基板は、典型的には、試料への曝露の前にブロッキング溶液を除くために洗浄される。

20

#### 【0035】

次いで、糖鎖含有抗原は試料に曝露される。試料は、免疫グロブリンを含む個体由来の任意の生物液体でよく、血清、血漿、全血及び任意の他の血液処理誘導体（例えば精製された免疫グロブリン分画）を含む。試料は、公知の腫瘍由来の分泌物又は公知の腫瘍に罹患した組織のみを除く、唾液、涙、粘膜、水泡液及び任意の他の分泌物でよい。したがって、1つの局面における発明は、腫瘍細胞（例えば生検由来の）又はその細胞の産物の分析を明らかに除く。好ましくは、試料は血清である。本発明に従って使用するための血清は、血清を調製するために一般的に使用される方法（例えば、血清分離チューブの使用）のいずれかによって調製することができるが、選択された方法は、本発明の方法に従って分析されたすべての試料に一貫して適用されなければならない。

30

#### 【0036】

試料は、糖鎖含有抗原への曝露の前に希釈されてよい。必要とされる臨床的条件におけるアッセイの診断的能力を最適化するための最適な希釈は、当該分野で周知の種類のパイロット実験を用いて決定することができる。具体的には、同一の抗原に対する異なったクラスの抗体が試料中存在する場合には、結合のためのその抗体間の競争があるだろう。この競争の結果は、抗体の様々なプールの相対的な親和性、よって試料中のその絶対濃度に依拠することになる。したがって、多数の低親和性IgG（例えば）及びより少量の高親和性IgAが存在する環境では、試料の高い希釈はIgAの検出を助けるが、アッセイでの濃縮した試料はより低い親和性種（この試料中のIgG）の検出を増加させるだろう。好ましくは、試料の任意の希釈は、そのまま（すなわち希釈されない試料）から試料の1 : 100希釈までの範囲にある。当該分野でのELISAアッセイで典型的に使用されるものに比べて、比較的ほとんど希釈しないものが存在することに留意されたい、これは、糖鎖含有抗原に対する自然抗体の比較的低い親和性を反映している。試料が希釈される場合には、好適な希釈が選択されなければならない。当該分野で通常用いられる任意の希釈を選択してもよいが、当該分野で周知の好適な実験は、必要とされた臨床的条件におけるアッセイの最適な診断能力をもたらす希釈を選択するように行われるべきである。好適な希釈は、好ましくは

40

50

、プールされた正常のヒト血清、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、0.005%～1%の非イオン性界面活性剤、例えばTween-20を含むPBS、高純度水、最高500 mMの追加の塩、例えば塩化ナトリウム、を含む高張性PBS、最高1 M尿素を含むPBS、又は5.5～8.8単位にpH調整されたPBSからなる群より選択される。より好ましくは、希釈はPBSである。

#### 【0037】

試料（好適には希釈された）は、試料中の非-IgG免疫グロブリンの、糖鎖含有抗原への結合を許容する条件下で、糖鎖含有抗原に曝露される。温度、時間及び攪拌程度を含むこのインキュベーションの条件は、必要とされた臨床的条件におけるアッセイの診断的能力を最適化するために選択されるべきであり、当該分野で周知の種類のパイロット実験を用いて測定されなければならない。具体的には、同一抗原に対する異なったクラスの抗体が試料中に存在する場合には、結合のためのそれらの抗体間の競争が起こるだろう。この競争の結果は、各プールの結合の反応速度論及び温度感受性に依拠することになる。したがって、長時間のインキュベーションは、より遅い反応速度論との相互作用を助けるが、一方、より短時間のインキュベーションは、より速い（しかし、熱力学的にはほとんど支持されないらしい）相互作用を助ける。好ましくは、試料は、15分～4時間、より好ましくは約2時間、糖鎖含有抗原でインキュベートされる。好ましくは、インキュベーションは、4～37℃、より好ましくは約21℃で実施される。好ましくは、インキュベーションは、オービタルシェーカー（0～700 rpm）上で、より好ましくは約400 rpm攪拌しながら行われる。

10

#### 【0038】

試料曝露ステップの完了後に、結合されなかった物質を効率的に洗浄するべきである。温度、洗浄回数、洗浄体積及び洗浄溶液の性質を含むこの洗浄ステップの条件は、必要とされた臨床的条件においてアッセイの診断的能力を最適化するために選択されるべきであり、当該分野で周知の種類のパイロット実験を用いて測定することができる。結合されなかった物質を洗浄することに加えて、洗浄パuffaは、結合の緊縮性を増加させるように選択することができる（より弱く低い親和性相互作用を妨害し、一方、そのままのより強く高い親和性相互作用を残すことによって）。従って、界面活性剤を含む洗浄パuffa、又は高張の又は低張の浸透圧を有する変性剤は、異なった親和性を有する抗体の異なったプールの相対的な検出に効果がある。好適な洗浄溶液は、好ましくは、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、0.01%～1%の非イオン性界面活性剤、例えばTween-20を含むPBS、高純度水、最高500 mMの追加の塩、例えば塩化ナトリウム、を含む高張性PBS、最高1 M尿素を含むPBS、又は5.5～8.8単位にpH調整されたPBSからなる群より選択される。より好ましくは、洗浄溶液は、0.05%のTween-20を含むPBSである。典型的には、洗浄体積は、使用した試料体積よりも4～10倍多く、洗浄回数は、3～5である。試料が希釈される程度によって影響されることになる免疫グロブリン（選択された糖鎖含有抗原に対するものであってもそうでなくても）の濃度が高ければ高いほど、洗浄体積及び/又は洗浄回数が高くなる必要がある。場合により、選択された糖鎖含有抗原に特異的なある抗体について知られていない試料は、洗浄ステップの効率を見積もるために使用することができ（結合されていない免疫グロブリンが非効率な洗浄手段に因ってその手段によって維持されない場合には、そのような試料由来のシグナルは存在しないはずであるので）、したがって、好適な洗浄プロトコルを選択することができる。好ましくは、洗浄は、4～37℃で、より好ましくは約21℃で実施される。好ましくは、各洗浄の時間は、10秒～3分、より好ましくは約30秒である。

20

30

40

#### 【0039】

洗浄後に、任意の結合されない非-IgG抗体が検出される。検出は、任意の好適な試薬、典型的には抗抗体を用いて実施することができる。選択された検出試薬は、IgGへの結合に渡って非-IgG抗体の1以上のクラス（又はIgGの任意の特異的サブクラス）に特異的でなければならない。そこでは、特異性は、IgGへの結合に渡って非-IgG抗体の1以上のクラスについて、少なくとも100倍、より好ましくは少なくとも1000倍の高い親和性と定義される。典型的には、抗抗体は、当該分野で周知の方法によって定量することができる、酵素

50

又は他のタグ（例えば、蛍光色素）で標識される。例えば、結合されたタグ（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼ）は、好適な基板の、それ自体分光学的に定量することができる着色された生成物への変換によって定量化することができる。

#### 【0040】

検出ステップの条件は、選択された糖鎖含有抗原上で捕獲された試料由来の非-IgG抗体の検出を最適化するように選択されるべきである。一般的に、抗抗体の検出のより高濃度は、より高いシグナルをノイズ比に与えることになるが、（より高い検出抗体濃度は、非-IgG免疫グロブリンの標的クラスへの結合のようなより高い親和性相互作用を超えて、IgGへの結合のようなより低い親和性相互作用を助けるので）、IgGの検出が起こらないことを確実にするように注意を払わなければならない。

10

#### 【0041】

典型的には、IgGの意図しない検出をもたらさない抗抗体検出試薬の最も高い濃度が好ましい。典型的には、検出試薬は、洗浄溶液で希釈されるが、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、0.01%~1%の非イオン性界面活性剤、例えばTween-20を含むPBS、高純度水、最高500 mMの追加の塩、例えば塩化ナトリウム、を含む高張性PBS、最高1 M尿素を含むPBS、又は5.5~8.8単位にpH調整されたPBSを含む他の溶液は、非-IgG免疫グロブリンへの結合のための検出試薬の特異性を改善するために使用することができる。好ましくは、検出試薬は、15分~4時間、より好ましくは約1時間、インキュベートされる。好ましくは、インキュベーションは、4~37℃、より好ましくは約21℃で行われる。好ましくは、インキュベーションは、オービタルシェーカー（0~700 rpm）上で、より好ましくは約400 rpm撈拌しながら行われる。

20

#### 【0042】

検出試薬でのインキュベーション後に、任意の結合されていない検出試薬は洗浄しなければならない。典型的には、洗浄、すなわち糖鎖含有抗原への試料の曝露に続くステップについてはこの洗浄ステップのために同一条件が使用される。結合された標識量を定量する前に本質的にすべての結合されていない検出試薬が洗浄されることを確実にすることは重要である。

#### 【0043】

あるいは、非-IgG免疫グロブリンクラスの特異性及び次の定量は、2以上のステップに分けられる。例えば、酵素、放射活性、蛍光タグ又は他の定量可能なタグで標識された抗マウス検出試薬の後に、1以上の非-IgGクラスに対する特異的マウスモノクローナル抗抗体が使用できる。かかる設定は、多数の理由から選択される：高品質試薬の入手性、非-IgG免疫グロブリンの検出の特異性を改善すること、又は使用した抗体の2つの「層」の多価相互作用によって起こった特定のシグナルの増幅によるシグナル対ノイズ比を増加させること。しかし、使用した各々の抗抗体及びすべての抗抗体の特異性が確立される手段に抗抗体の余剰の「層」を導入する時に、それは重要である。例えば、標識された抗マウス免疫グロブリンは、任意のヒト免疫グロブリンに直接に結合しないはずであり、あるいは手段（より高度に又はより低度に）は、気付かずに、ヒトIgG及び非-IgG免疫グロブリンを測定することができる。

30

40

#### 【0044】

結合された標識は、次いで、好適な方法によって定量される。例えば、酵素結合検出抗体は、容易に検出できる生成物に変換される酵素標識の基質を含む溶液にウェルを曝露することによって検出される。典型的には、生成物は、（着色された生成物について）分光学的に検出され、又は（蛍光性の生成物について）蛍光分析で（fluorimetrically）検出される。あるいは、検出試薬が定量可能な標識、例えば蛍光色素を直接用いてタグ化される場合には、存在する色素の量は、例えば蛍光顕微鏡を用いて直接的に定量される。

#### 【0045】

この方法における変更は、同一の原理を考慮すると、本発明の方法を実施するために同等に採用することができる、と考えられる。例えば、（標識された検出抗抗体よりもむし

50

る) 標識された抗原を用いて、特定の糖鎖含有抗原に対する非-IgG免疫グロブリンのレベルを測定することができるだろう。この実施態様では、非-IgGクラスの総免疫グロブリンは、基板上で捕獲され(典型的には、非標識の抗抗体を用いて)、特定の抗原に特異的な当該抗体プールの量は、容易に定量することができる標識が付けられた抗原を用いて測定される(例えば、酵素、放射活性又は蛍光色素)。本発明のこの実施態様は、試料中に低絶対量で存在する非-IgG免疫グロブリンクラス(例えば、血清中のIgE)を用いて特に有用であるかもしれない。

【0046】

癌を有する又は癌の危険にある個体を分類する目的で、好適なステップ及び順序の選択は、選択された糖鎖含有抗原に対する非-IgG免疫グロブリンのレベルの測定を行うためにそれらが行われるが、それは本発明の局面ではない。当該分野で公知の任意の好適な方法を採用することができ、異なった方法は異なった適用について異なった利点を有する(異なった親和性の異なった抗体プールと異なった免疫グロブリンクラスとの競争のために、特定の抗原に結合する非-IgG免疫グロブリンのレベルを測定することを意図した異なった手段からのアウトプットは、選択された方法によってある程度異なるだろう)。結果として、使用されるべき正確な方法は、当該分野で周知の方法を採用して、実験によって特定の適用のために最適化される。

【0047】

本発明の一般性に妥協することなく、本発明の好ましい実施態様は、糖鎖含有抗原への非-IgG免疫グロブリン結合を測定するためのELISAアッセイである。そこでは、抗原は(次いで非特異的結合のためにブロックされる)好適な基板上に固定され、そして試料に曝露される。非結合物質を洗浄した後、結合された非-IgG免疫グロブリンは、酵素で標識された特異的抗抗体のような好適な検出試薬を用いて検出される。次いで結合された標識量は例えば酵素を好適な基板に曝露し、分光光度計によって着色された生成物の量を測定することによって定量化される。より好ましくは、このプロトコールは、糖鎖含有抗原としてのTACAを用いて行われる。より好ましくは、検出される非-IgG免疫グロブリンはIgAである。

【0048】

乳癌を有する又は乳癌の危険にある対象を分類するための本発明の好ましい実施態様は、以下のステップからなるプロトコールである：

1. 50  $\mu$ lの50 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、pH 9.6の、50~100 pmoleのヒト血清アルブミンに結合した-ゲルでマイクロタイタープレートウェルをコートする。
2. 0.05% Tween-20を含むPBSでウェルを3回洗浄する。
3. 5%スクロース及び5% Tween20を含むPBSでウェルをブロックする。
4. 0.05% Tween20を含むPBSで3回、及びPBSで1回、ウェルを洗浄する。
5. そのままか又はPBSで最大100倍に希釈した50  $\mu$ lの試料でウェルをインキュベートする。
6. 0.05% Tween20を含むPBSで5回、ウェルを洗浄する。
7. 200  $\mu$ lのマウス抗非IgG免疫グロブリン抗体(例えば、抗IgA免疫グロブリン抗体)でウェルをインキュベートする。
8. 0.05% Tween20を含むPBSで3回、ウェルを洗浄する。
9. 200  $\mu$ lの西洋ワサビ-ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体でウェルをインキュベートする。
10. 0.05% Tween-20を含むPBSでウェルを3回洗浄する。
11. 着色基質でウェルをインキュベートする。

【0049】

結腸癌を有する又はその危険のある対象を分類するために本発明の好ましい実施態様は、以下のステップからなるプロトコールである：

1. マイクロタイタープレートのウェルを、50  $\mu$ lの50 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、pH 9.6中のウシ又はヒト血清アルブミンに結合された50~100 pmolesのP1抗原及び/又はルイス-A抗原でコ

10

20

30

40

50

ートする。

2. 0.05% Tween-20を含むPBSで3回、ウェルを洗浄する。
3. 0.05% Tween-20及び0.5%ウシ血清アルブミンを含むPBSでウェルをブロックする。
4. 0.05% Tween20を含むPBSで3回、ウェルを洗浄する。
5. そのままか又はPBSで最大100倍に希釈した50  $\mu$ lの試料でウェルをインキュベートする。
6. 0.05% Tween20を含むPBSで5回、ウェルを洗浄する。
7. 0.05% Tween-20及び0.5%ウシ血清アルブミンを含むPBSで希釈された、200  $\mu$ lのマウス抗非IgG免疫グロブリン抗体（例えば、ルイスA抗原用抗IgA免疫グロブリン抗体、又はP1抗原用抗-IgM免疫グロブリン抗体）でウェルをインキュベートする。
8. 0.05% Tween20を含むPBSで3回、ウェルを洗浄する。
9. 0.05% Tween-20及び0.5%ウシ血清アルブミンを含むPBSで希釈された、200  $\mu$ lの西洋ワサビ-ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体でウェルをインキュベートする。
10. 0.05% Tween-20を含むPBSでウェルを3回洗浄する。
11. 着色基質でウェルをインキュベートする。

10

#### 【0050】

場合により、本発明の方法によって分析されるべき各試料について、基質が、任意の抗原でコートされていない（又は糖エpiteopを欠く抗原の担体部分のみでコートされている）以外は、非-IgG抗体の糖鎖含有抗原への結合を測定することを意図した試験アッセイについてすべての点で同一である反復アッセイが行われる。次いで、この反復ウェル（「コートなしの対照」）からのシグナルは、基質、担体、ブロッキング成分又は意図した糖鎖抗原以外のアッセイの任意の他の部分への、試料中の抗体の非特異的結合に因るシグナルの一部を除くために、試験アッセイでシグナルから差し引かれる。好ましくは、本発明の方法がELISA法を用いて実施される時に、かかるコートなしの対照アッセイが行われる。

20

#### 【0051】

最終ステップでは、得られたデータは、癌を有するもしくはその危険にある個体又は健常個体を分類するために使用される。その最も簡単な形態では、単一の糖鎖含有抗原に結合するクラスの単一の非-IgG免疫グロブリンのデータは、閾値に匹敵し、当該閾値の1つの側にある個体（例えば、閾値未満）は、癌を有する又はその危険にあると分類され、同時に残りの個体は健常と分類される。より複雑なシナリオでは、複数の閾値は、危険レベルを定義するために、単一の糖鎖含有抗原に結合するクラスの非-IgG免疫グロブリンのデータに適用される。例えば、10センチル未満の値は、癌を有する非常に高い危険にあると考えられ、90センチル超の値は、健常である可能性が高いと考えられる。10センチル～90センチルの間にある残りの個体はこの試験によっては分類されない。

30

#### 【0052】

あるいは、いくつかのアッセイ由来のデータ（並行ウェルで慣用的な方法によって又は多重化方法を利用することによって同時に実行されるか、あるいは順次にしかし同一試料の反復アリコートを使用して実行される）は、いくつかの異なった糖鎖含有抗原に結合することができる試料中の非-IgG免疫グロブリン集団を記載する多変量の「因子」を構築するために使用される。次いで、このサインは、試料が癌を有する危険性に従って採取されたその対象を分類するために、癌を有する個体及び健常個体からのサインと比較することができる。

40

#### 【0053】

試験が試料の完全な分類を提供することができない時さえ、試験は癌を有する危険についての臨床的に有用な情報を提供することができる、ことが明らかである。かかる適用のために、当該試験は、なされた陽性及び陰性の予測の数が偶然19/20事例で行われた場合に比べて他界場合には（その癌の状態が知られている試料の集団に適用される時に）診断力を有すると考えられる（言い換えれば、フィッシャー厳密試験を用いるクロス表での実際の状態に対して予測された状態の分布を比べるp値は0.05未満である）。かかる集団に

50

において試料の中で、試験されるべき抗原の選択において又は使用されるべき方法の最適化において従来使用されたものがない場合に、かかる試験は、同一の潜在的な集団から採取された未知の試料を分類する試験の能力の独立した検証である。

【0054】

本発明の方法による試験は、多数の異なった方法で使用することができる。例えば、試験は、ある形態の癌を有する又はその危険を有する個体を特定するための選別として、そうでなければ健常個体中での早期検出の目的のために、適用することができる。本願では、試験は、選別されるべき個体から採取された試料に適用され、そして、陽性の結果が得られた個体は、癌の存在について試験され、モニターされる。あるいは、本発明の方法に従う試験は、悪性腫瘍の診断を助けるために使用することもできる。固形癌の発症においては早期に、腫瘍そのものが非常に小さいために物理的（例えば、触診によって）に検出されないことがあり、疾患の症状は、比較的に非特異的であり得る（例えば、無気力、疲労感及び体重減少）。かかる状況において、試験は、このような症状を示す個体から採取された試料に適用され、陽性の結果が得られる個体は更に検査され、試験の結果が悪性腫瘍の診断に到達するために使用することができる。このような診断に従って、対象は癌の存在のために処置されることがあり、かかる新規な診断テストの利用性は、処置を最初の可能な危機の時点で、慣用的な診断が疾患の存在を確立することができなかつた時でさえ潜在的に、開始させることによって、患者の予後をおそらく改良するだろう。

10

【0055】

更に別の態様では、本発明に従う試験は、癌の将来的危険性を予測するために使用することができる。かかる状況では、当該試験は、評価されるべき個体から採取された試料に適用され、陽性試験が得られる個体は、陰性結果が得られる人よりも癌の発症のより高い危険にあると考えられる。より高い危険にある人はより緊密にモニターされ、いくらか後に発症する悪性腫瘍の危険性を減少させるために意図されたライフスタイルの変化を経験する。

20

【0056】

更に別の態様では、本発明に従う試験は、癌を治療又は予防するように設計された治療法への個体の反応をモニターすることができる。かかる状況では、当該試験は、当該治療が開始される前後に、当該治療を経験する個体に適用される。当該試験は、当該治療が始まる前に及び完了した後1回又は複数回適用することができる。各々の場合に、当該試験は、同一の方法によって、同一の試料から採取されたが異なった時間に採取された、異なった試料に適用される。当該試験（いくつかの閾値又は多変量の因子に比べて定性的、又は当該試験によるシグナルアウトプットの点から定量的のいずれかで）の結果における任意の変化は、個体の現在の疾患状態の重度、当該疾患を発症する危険性、又は当該疾患の再発の危険性、の変化の点から、解釈される。この情報は、次いで、対象の臨床的治療を導くために、対象のライフスタイルを変更するために、又は癌の治療もしくは予防のために設計された新規薬剤の臨床試験を補助するために、使用することができる。

30

【0057】

すべてのこのような適用は、転移の危険の決定を含んでよい（すなわち、二次的腫瘍を確立する、その原発部位から遠隔組織への癌の拡がりであり、患者のより低い予後及びより攻撃的な治療的介入に最も一般的に関連する挙動である）。

40

【0058】

TACAの分化的発現が本質的にすべての腫瘍種に起こることが知られているので、本発明の方法の適用は、癌の任意の特定の種類に限定されないが、本質的にすべての癌の種類をスクリーニングし、診断し及びモニターするために系を示す（非-IgG免疫グロブリンクラス及び糖鎖含有抗原のすべての組み合わせがすべての癌種に有用であるわけではないが、非-IgG免疫グロブリンクラス及び糖鎖含有抗原のある特定のペアリングは、特に、単一の、又は多数の密接に関連した癌種のみにも有用であるかもしれない）。

【0059】

先の一般性についての偏見なしに、以下の癌についての危険性の分類は本願の範囲内に

50

明らかに含まれる：

- 白血病（急性リンパ芽球性リンパ腫、急性骨髄性白血病、慢性リンパ芽球性リンパ腫、慢性骨髄性白血病、皮膚T細胞リンパ腫、ヘアリー細胞白血病、ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、非-ホジキンリンパ腫、ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症、多発性骨髄種、骨髄異形成症候群及びセザリー症候群を含む）；

- 内分泌系の癌（副腎皮質癌、島細胞癌、幼児多発性内分泌腺腫瘍症候群、膵臓癌、甲状腺癌、褐色細胞腫及び甲状腺癌（thyroid cancer）を含む）；

- AIDS-関連癌（AIDS-関連リンパ腫及びカポジ肉腫を含む）；

- 消化管の癌（肛門癌、結腸癌、盲腸癌、食道癌、胆嚢癌、胃（gastric）癌又は胃（stomach）癌、胃腸カルチノイド腫瘍、下咽頭癌、咽頭癌、口腔癌（口唇癌及び口腔癌を含む）、中咽頭癌、咽頭腫瘍、直腸癌、唾液腺癌、小腸癌及び咽頭癌を含む）；

- 中枢神経系の癌（星状細胞腫、脳幹グリオーマ、脳腫瘍、悪性グリオーマ、上衣細胞腫、髄芽細胞腫、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、視床下部グリオーマ、神経芽細胞腫、松果体腫瘍及び松果体胚腫を含む）；

- 乳癌及び乳房腫瘍（基底細胞癌、腎細胞癌及び他の腎臓癌、メルケル細胞腫瘍、ウィルムス腫瘍、移行細胞癌、胸腺癌及び胸腺腫を含む）；

- 尿生殖路の癌（膀胱癌、子宮頸癌、子宮内膜癌螺旋、性腺外胚細胞腫瘍、卵巣癌、上皮性卵巣腫瘍、卵巣胚細胞腫瘍、陰茎癌、前立腺癌、子宮肉腫、精巣癌、奇形腫、妊娠性絨毛腫（胞状奇胎）、尿道癌、陰癌及び外陰癌を含む）；

- 腺腫（カルチノイド腫瘍及び小児気管支腺腫瘍を含む）；

- 骨癌（骨肉腫及び悪性線維性組織球腫を含む）；

- 肉腫（ユーイング肉腫、カポジ肉腫及び横紋筋肉腫を含む）；

- 眼癌（網膜芽細胞腫及び眼内黒色腫を含む）；

- 肺癌（中皮腫及び悪性中皮腫、鼻腔癌及び副鼻腔癌、非小細胞肺癌、胸膜肺芽腫及び小細胞肺癌を含む）；

- 肝臓癌（肝外胆管癌及び肝細胞癌を含む）；

- 頭頸部癌；

- 感染源の癌（菌状息肉腫、ヒトパピローマウイルス誘発腫瘍、及び他のウイルス誘発腫瘍を含む）；並びに

- 皮膚癌（黒色腫、皮膚癌（skin carcinoma）及びメルケル）細胞癌を含む）。

#### 【0060】

本明細書では、生物試料、例えばヒト血清中の、糖鎖含有抗原に対する非-IgG免疫抗体を測定することによって癌を診断し、その危険性を予測又はモニターする目的のためのキットが提供される。かかるキットは、好適な基板、例えばマイクロタイタープレートウェル上に固定された、本発明の方法に従う1以上の糖鎖含有抗原を、当該プレートウェルに結合された非-IgG抗体を検出することができる検出試薬と共に含む。場合により、当該キットは、追加の試薬、例えば洗浄溶液、試料の希釈のための溶液、酵素基質、及びELISAキットに共通の補助試薬を含んでもよい。

#### 【0061】

本発明のキットは、1超の糖鎖含有抗原に結合する非-IgG抗体のレベルを測定するために必要とされる試薬を含んでもよい。複数の抗原は、単一の基板（例えば、マイクロタイタープレートの1つのウェル）上に混合物としてコートされて提供されてもよく、又は複数の基板（例えば、マイクロタイタープレートの複数のウェル）上に別個にコートされて提供されてもよい。あるいは、複数の抗原は、コード化された基板、例えば多重化系（例えば、色素でコードされたビーズ、バーコード化された微粒子又はアレイ上のスポット）で典型的に使用されるものの上に提供してもよい。

#### 【0062】

場合により、本発明のキットは、糖鎖含有抗原に結合する非-IgG抗体の1超のクラスのレベルを別々に測定するために必要とされる複数の検出試薬を含んでもよい。検出試薬はすべて、定量目的のために（例えば、酵素西洋ワサビペルオキシダーゼ）同一又は類似のタ

10

20

30

40

50

グを有してもよく、同一の糖鎖含有抗原でそれぞれコートされた複数の反復ウェル上で使用し、同一試料のアリコート反復するように曝露されることを意図し、あるいは非-IgG抗体の異なったクラスに特異的な検出試薬は、各々異なったかつ別個の定量できる標識（例えば、独特のスペクトル特性を有する蛍光色素）を有していてもよい。3-次元プロファイルをつくるためにコード化されたタグを有する多重化検出試薬と同時にコード化された基板上の多重化抗原を用いる可能性も考慮され、よって特許請求される。

【0063】

かかるキットの好ましい実施態様は、 $\alpha$ -gal、ルイス-X、ルイス-A、シアリル-ルイスX、シアリル-ルイスA、Tn、シアリルTn、TF抗原、P1抗原、血液型H、ルイス-B、血液型A三糖、Gal<sub>1-2</sub>Gal、Gal<sub>1-3</sub>Gal<sub>1-3</sub>GlcNAc、Gal<sub>1-3</sub>Gal、及びGal<sub>1-3</sub>Gal<sub>1-4</sub>GlcNAc<sub>1-3</sub>Gal<sub>1-4</sub>Glcからなる群より選ばれる1以上の糖鎖含有抗原でコートされたマイクロタイタープレートのウェルを含む。検出試薬は、IgA1、IgA2、総IgA、IgD、IgE又はIgMに特異的である。

10

【0064】

例えば、上記キットは、 $\alpha$ -gal、ルイス-A、シアリル-ルイス-A、ルイス-X、シアリル-ルイス-X、Tn5シアリル-Tn及びTF抗原からなる群より選ばれた糖鎖含有抗原を含んでよい。特に、当該キットでは、糖鎖含有抗原は $\alpha$ -galであり、検出試薬は総IgA（又はIgA1又はIgA2）に特異的であり、癌は乳癌であってよい。

【0065】

別の例では、当該キットは、P1抗原、ルイス-X、血液型H、ルイス-B、血液型A三糖及びGal<sub>1-2</sub>Galからなる群より選ばれる糖鎖含有抗原を含んでよい。特に、当該キットでは、糖鎖含有抗原は、ルイス-Aでよく、検出試薬は総IgA（又はIgA1又はIgA2）に特異的であり、癌は結腸癌であってよい。

20

【0066】

更なる例では、当該キットは、P1抗原、血液型A三糖、Gal<sub>1-2</sub>Gal、Gal<sub>1-3</sub>Gal<sub>1-3</sub>GlcNAc、Gal<sub>1-3</sub>Gal、及びGal<sub>1-3</sub>Gal<sub>1-4</sub>GlcNAc<sub>1-3</sub>Gal<sub>1-4</sub>Glcからなる選ばれる糖鎖含有抗原を含んでよい。特に、当該キットでは、糖鎖含有抗原はP1抗原でよく、検出試薬はIgMに特異的でよく、癌は結腸癌でよい。

【0067】

定義

用語「非-IgG免疫グロブリン」は、IgG以外の任意の免疫グロブリンを言う。IgG免疫グロブリンは重鎖（それぞれIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4を与える4つのバリエーション、1、2、3及び4の任意を含む）の存在によって定義される。従って、g鎖を欠く任意の免疫グロブリンは非-IgG免疫グロブリンである。IgA（重鎖の存在によって定義される）、IgD（重鎖の存在によって定義される）、IgM（ $\mu$ 重鎖の存在によって定義される）及びIgE（重鎖の存在によって定義される）は、非-IgG免疫グロブリンの定義に明らかに含まれる。

30

【0068】

用語「糖質」は、通常、5、6、7又は8員環からなる糖又は糖誘導体であって、炭素と当該環内の単一の酸素原子から主になり、当該環上に1以上のヒドロキシル置換基を有する糖又は糖誘導体を言うために使用される。典型的には、単一の糖はC<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>O<sub>n</sub>の化学式を有する。しかし、かかる糖は、アミノ基のヒドロキシル基による置換（例えば、グルコースに対するグルコサミンにおいて）によって、及びメチル化、アセチル化、硫酸化及び他の類似の誘導化反応によって修飾されてよく、かかる修飾された糖のすべては本発明に従う「糖」の定義内に含まれる。具体的には、タンパク質グリコシル化で一般的に使用される糖残基のすべては、ガラクトース、ガラクトサミン、N-アセチル-ガラクトサミン、グルコース、グルコサミン、N-アセチル-グルコサミン、シアリン酸、ノイラミン酸、N-アセチル-ノイラミン酸、マンノース、フコース、フコサミン、N-アセチルフコサミン及びキシロースを含む、本定義に明らかに含まれる。本明細書で使用される用語「糖」は、（グリコシド結合によって）オリゴ糖を形成するための糖部分の化合物の組合せを明らかに含

40

50

む。

【0069】

用語「糖鎖含有抗原」は、生物試料の大多数に存在する抗体によって任意の有意な程度に認識される部分のみが糖鎖部分からそのような部分である場合に、場合により他の非糖鎖部分を一緒に含む1以上の糖鎖部分を含む任意の化合物を言うために使用される。

【0070】

用語「約 (about)」、「約 (around)」又は「約 (approximately)」は、考慮された値の近くの間隔を言う。本願で使用される「約X」は、Xマイナス10%~Xプラス10%の間隔、好ましくはXマイナス5%~Xプラス5%の間隔を意味する。

【0071】

この説明において数値範囲の使用は、本発明の範囲内において、当該範囲内のすべての個々の整数及び所定の範囲の最も広い範囲内の上限及び下限の数値の組み合わせのすべてを明らかに含む意図である。

【0072】

本明細書で使用される用語「含むこと」は、「含むこと」及び「からなる」の両方の意味と読む。したがって、本発明がキットの1つの物品に関する場合には、この用語は、特定された1つの成分に加えて他の成分が存在する2つの物品及び定義された当該成分のうちの1つのみからなる物品をカバーする意図である。

【0073】

使用される場合には以下の省略は、単離されたオリゴ糖又はオリゴ糖の一部であるか、あるいは以下の文脈に従う他の化合物のいずれかの、以下の一般的に見出された糖部分を言う意図である。

【0074】

【表2】

略号	意味
Gal	ガラクトース
GalNAc	N-アセチル-ガラクトース
Glc	グルコース
GlcNAc	N-アセチル-グルコサミン
Neu5NAc	N-アセチル-ノイラミン酸、シアル酸
Fuc	フコース

【0075】

他の定義しない限り、本明細書で使用されるすべての技術的及び化学的用語は、本発明が帰属する分野の当業者によって一般的に理解されると同一の意味を有する。

【0076】

本発明の特定の非限定的な例は、以下の図面を参考に記述される。

【0077】

図1の実施態様において、糖鎖含有抗原(1)は基質又は表面上にコートされ、試料はコートされた基板に適用される。ヒト非-IgG免疫グロブリン(2)は、糖鎖含有抗原又は糖鎖含有抗原(複数)に結合することができ、次いで、結合されたヒト非-IgG免疫グロブリンは、酵素標識抗ヒト非-IgG免疫グロブリン(3)によって検出される。図1に示されたELISA法は、更に以下で詳細に考察される。

【実施例】

【0078】

実施例1: -galに対するIgA抗体のレベルによる乳癌の検出

糖鎖含有抗原のある範囲に対するIgA抗体のレベルは、乳癌を有する個体由来の血清試

10

20

30

40

50

料のパネルで測定し、健常対照由来の血清試料と比較した。比較のために、同一の抗原に対するIgGのレベルを測定した。

【0079】

方法：マイクロタイタープレート（Nunc Maxisorp（登録商標））は、75～250 pmoles/cm<sup>2</sup>（75～250 pmoles/ウェル）である範囲の糖鎖含有抗原でコートした。使用した抗原は、ルイスA、シアリル-ルイスX、血液型A抗原、血液型B抗原、 $\alpha$ -gal及びTF抗原であった（すべて、Dextra Laboratoriesから購入し、BSA又はHSAのいずれかに接合した）。抗原は50 mM炭酸ナトリウムバッファpH 9.6に200 nMに溶解し、50  $\mu$ l/ウェルを加えた。抗原は、21℃で18時間、放置して結合させた。2つの異なるシリーズは、使用した抗原の担体部分でコートした（「BSA」及び「HSA」ウェル）。

10

【0080】

コーティング後に、結合されていない抗原は洗浄し（PBS + 0.05% Tween-20; 375  $\mu$ l/ウェルで約30秒間の3回洗浄）、室温で攪拌しながら1時間、PBS中の5%スクロース、5% Tween-20で、基質をブロックした（オービタルシェーカー上で約400 rpm; 350  $\mu$ l/ウェル）。

【0081】

ブロッキング後に、先のようにして0.05% Tween-20を含むPBSでウェルを3回、次いでPBSのみで1回洗浄し、室温で攪拌しながら（オービタルシェーカー上で約400 rpm）、2時間、試料に曝露した（50  $\mu$ l/ウェル）。癌を有する個体由来の試料（乳癌のステージII非転移性癌）を、公知の癌を有さない個体及び健常であると考えられる個体由来の試料と比較した。血清を調製した。血清は、ベクトン・ディキンソン血清調製バキュタイナを用いて調製した。血清試料は、異なる凍結-融解サイクルなしに調製からアッセイまで凍結して保存した。試料は、プレート上にローディングする直前にPBSで1:100に希釈した。試料インキュベーション後に、ウェルを（5回の洗浄を行った以外は）先のように洗浄し、次いで第1検出試薬でインキュベートした。反復アッセイは、本発明のマウス抗ヒトIgA（M26013; Skybio Ltd, Wyboston, UKからのクローン2D7）を用いて、別個に比較のために抗-ヒトIgG2（M10015; SkybioからのクローンGOM1）を用いて行った。検出試薬は、PBS + 0.05% Tween-20で1:10,000希釈し、200  $\mu$ l/ウェルを分散した。プレートは、室温で攪拌しながら（オービタルシェーカー上で約400 rpm）、1時間、第1検出試薬でインキュベートした。

20

30

【0082】

第1の検出試薬後に、ウェルを先に記載のように3回洗浄し、次いで第2検出試薬でインキュベートした。第2検出試薬、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗-マウスIgGをPBS + 0.05% Tween-20で1:10,000に希釈し、200  $\mu$ l/ウェルを分配した。そのプレートは、室温で1時間、攪拌しながら、第2検出試薬でインキュベートした（オービタルシェーカー上で約400 rpm）。

【0083】

検出試薬でのインキュベーション後に、先のようにしてウェルを3回洗浄した。次いで、結合した標識の量を好適な基質（K-Blue（登録商標）; Skybio; 200  $\mu$ l/ウェル）の添加によって定量した。5分後、50  $\mu$ lの3M HClの添加によって反応を停止した。着色生成物の量は、450 nmで各ウェルの吸収を読むことによって測定した。「HSA」及び「BSA」ウェルからのデータは差し引かず、別箇に表す。

40

【0084】

結果：糖鎖含有エピトープの各々に結合する非-IgG免疫グロブリンの検出可能なレベルは、大多数の試料において見られた。 $\alpha$ -gal、TF抗原及びシアリル-ルイスXに対するIgA抗体のレベルは、健常な対照個体よりも癌を有する個体において実質的にかつ顕著に低かった。他の糖鎖含有エピトープに対するIgA抗体のレベルは、癌を有する個体間ではより低い傾向があるが、任意の差はこの実験では統計的に有意には至らなかった。

【0085】

比較すると、 $\alpha$ -galを含む同一抗原に対するIgG抗体のレベルは、癌を有する対象と健

50

常な対照個体とに有意に異ならなかった。

【 0 0 8 6 】

結論：糖鎖含有エピトープに結合する非-IgG免疫グロブリンの測定は、癌の検出に有用である、と我々は結論する。特に、 $\alpha$ -galエピトープ、TG抗原及びシアリル-ルイスXエピトープに対するIgA抗体の検出は、乳癌の存在についての個体の分類に有用である。

【 0 0 8 7 】

対照的に、糖鎖含有エピトープそれ自体が先行技術において、乳癌を含む癌細胞上に特異的に発現することが知られているとしても、これらのエピトープに対してIgGを測定することは（従来示唆されているように；Kurtenkov et al (2005) Exp Oncol 27: 136-40）、本発明の診断的有用性をもたらさない。

10

【 0 0 8 8 】

#### 実施例2: IgA、IgG2及びIgM抗体のレベルを用いる結腸癌の検出

本実施例では、結腸癌がIgG2抗体のみならず、様々な異なった糖鎖含有抗原に対するIgA及びIgM抗体を用いて検出することができることを示す。

方法：抗糖質抗体を多重にアッセイするためにアッセイ用基質として、UltraPlex（登録商標）の2ディジット微粒子を使用した。ビス1,2-(トリエトキシシリル)エタン（BTSE）

を用いて予備調子された微粒子は、37℃で、プロテクター上で、終夜、リン酸緩衝生理食塩水中の40 µg/mlの濃度の糖鎖含有抗原の範囲でコートした。コーティング後に、非結合抗原を洗浄し（0.1%ナトリウムアジドを含むPBS + 0.05% Tween-20; 洗浄バッファで約1分間の3回洗浄）、微粒子は、0.5%ウシ血清アルブミンを含む洗浄バッファ（ブロッキングバッファ）で、チューブプロテクター上で室温で1時間ブロックした。ブロックされた微粒子は、4℃で使用するまで保存した。各糖鎖抗原について1つのコードである異なったコード化された微粒子を用いて、16種のコーティング及びブロッキング手段を行った。16種の微粒子用コードのコーティング物質は以下のとおりである。

20

【 0 0 8 9 】

【表 3】

- 1) なし/ブランク
- 2) BSA
- 3) HSA
- 4) P1 抗原 (B1010)
- 5) ルイス X 抗原 (NGP0501)
- 6) ルイス A 抗原 (NGP0502)
- 7) 血液型 H (NGP0503)
- 8) ルイス B 抗原 (NGP0601)
- 9) N-アセチルラクトサミン (NGP1201)
- 10) 血液型 A 三糖 (NGP1305)
- 11) 血液型 B 三糖 (NGP1323)
- 12) Gal<sub>α1-2</sub>Gal (NGP2202)
- 13) Gal<sub>α1-3</sub>Gal<sub>β1-3</sub>GlcNAc (NGP2333)
- 14) Gal<sub>α1-3</sub>Gal (NGP3203)
- 15) α-Gal 線状 B 三糖 (NGP3334)
- 16) Gal<sub>α1-3</sub>Gal<sub>β1-4</sub>GlcNAc<sub>β1-3</sub>Gal<sub>β1-4</sub>Glc (ペンタ-gal)

30

40

【 0 0 9 0 】

50

これらの16種のコートされた微粒子を混合し、96-ウェルフィルタプレートのウェルにロードした。微粒子混合物は、次いで、洗浄バッファで3回洗浄し、次いで試料に攪拌しながら（オービタルシェーカー上で約900 rpm）室温で2時間曝露した（50  $\mu$ l/ウェル）。

【0091】

結腸癌（ステージII又はIIIの非転移性結腸癌）を有する個体由来の試料を、公知の癌を有さない個体及び健常であると考えられる個体由来の対照試料の2群と比較した。対照群1は、より広い人口統計学を示すために使用し、一方、対照群2は、血清試料が癌患者由来の試料と同一のプロトコールによって正確に調製されたので使用した。血清試料は、追加の凍結融解サイクルなしに、調製からアッセイまで凍結保存した。試料は希釈せずにアッセイした。

10

【0092】

試料インキュベーション後に、微粒子を含むウェルを先のように洗浄し（5回洗浄を行った以外）、次いで、第1検出試薬でインキュベートした。反復アッセイは、本発明の方法に従う、マウス抗-ヒトIgA (M26013; Skybio Ltd, Wyboston, UKからのクローン2D7) 又はマウス抗-ヒトIgM (M02013 ; Skybio Ltd, Wyboston, UKからのクローンAF6)、及び別個に抗-ヒトIgG2 (M10015; SkybioからのクローンGOM1) を比較に用いて行った。検出試薬は、ブロッキングバッファで33  $\mu$ g/ml（抗-ヒトIgA及び抗-ヒトIgG2について）又は0.4  $\mu$ g/ml（抗-ヒトIgMについて）希釈し、100  $\mu$ l/ウェルを分配した。プレートは、第1検出試薬で室温で1時間攪拌しながら（オービタルシェーカー上で約900 rpm）、インキュベートした。

20

【0093】

第1検出試薬後に、ウェルを先のように3回洗浄し、次いで第2検出試薬でインキュベートした。第2検出試薬、alexafuor 594標識ヤギ抗-マウスIgGは、ブロッキングバッファで5  $\mu$ g/mlに希釈し、100  $\mu$ l/ウェルを分配した。プレートは、第2検出試薬で室温で1時間攪拌しながら（オービタルシェーカー上で約900 rpm）、インキュベートした。

【0094】

検出試薬でのインキュベーション後に、ウェルを先のように3回洗浄した。次いで、結合した標識量は、蛍光顕微鏡を用いて微粒子を観察し、異なったコードの微粒子に結合する蛍光シグナルの平均レベルを測定することによって、定量した。

【0095】

上に加えて、3つの組み合わせ変数を計算した：(1) 総IgA、(2) 総IgG2、及び(3) 総IgM。これらは、それぞれIgA、IgG2及びIgM免疫グロブリンクラスが検出された16変数を合計することによって計算した。

30

【0096】

結果：以下の変数は、癌試料と対照群試料とで有意に異なることが見出されたが、この2つの対照試料群では見出されなかった。

【0097】

## 【表 4】

1. IgA 対 P1 抗原	
2. IgA 対 ルイス-X 抗原	
3. IgA 対 ルイス-A 抗原	
4. IgA 対 血液型 H	
5. IgA 対 ルイス-B 抗原	
6. IgA 対 血液型 A 三糖	10
7. IgA 対 Gal <sub>α1-2</sub> Gal	
8. IgG2 対 血液型 A 三糖	
9. IgG2 対 Gal <sub>α1-3</sub> Gal <sub>β1-3</sub> GlcNAc	
10. IgG2 対 α-Gal 線状 B 三糖	
11. IgM 対 P1 抗原	
12. IgM 対 血液型 A 三糖	
13. IgM 対 Gal <sub>α1-2</sub> Gal	
14. IgM 対 Gal <sub>α1-3</sub> Gal <sub>β1-3</sub> GlcNAc	
15. IgM 対 Gal <sub>α1-3</sub> Gal	20
16. IgM 対 Gal <sub>α1-3</sub> Gal <sub>β1-4</sub> GlcNAc <sub>β1-3</sub> Gal <sub>β1-4</sub> Glc	
17. 総 IgA	
18. 総 IgG2	
19. 総 IgM	

## 【0098】

加えて、見られた差の潜在的原因を調べ、患者と対照との差は、年齢、性別、BMI、喫煙、アルコール摂取、試料回収の年、他の合併症状又は試料群間の治療での差に起因しないと結論した。 30

## 【0099】

結腸癌パターンは、腺癌の位置に関係しない可能性もあるが（直腸対結腸）、より重度の疾患（ステージIII癌対ステージII）を有する患者においては、悪性度の高いパターンがあるかもしれない。

## 【0100】

結論：実施例2は、糖鎖含有エピトープに結合する非-IgG免疫グロブリンIgA及びIgMが結腸癌の検出に有用であることを示す点で、実施例1のデータを補足する。結腸癌及び乳癌は、その病因及び分子的生理学において顕著に異なる。特に、CEAのようなそれらの1つのために現在使用されているマーカーは、他の癌を検出するためには有用でない。結果として、糖鎖含有抗原に対する非-IgG免疫グロブリンがこれらの異なった癌腫のいずれか1つに罹患した患者において顕著に低いという証明は、糖鎖含有抗原に対する非-IgG免疫グロブリンの低レベルが、腫瘍の具体的な位置又は特定の腫瘍種の根底にある病理生理学よりも、癌そのものの危険又はその存在に関連しているとの強力な証拠を与えるものである。 40

## 【0101】

本発明は、好ましい又は具体的な実施態様を参考に記載してきたが、当業者は、本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく、本発明に対する様々な修飾及び変更ができ、かかる修飾は本明細書に明確に画されている、ことを理解するだろう。本明細書及び添付のクレームに記載に開示された特定の実施態様に関して限定がないことを意図しており、推察されるものではない。

【 0 1 0 2 】

本明細書に引用された文献は、その全体が参考として引用される。

【 図 1 】

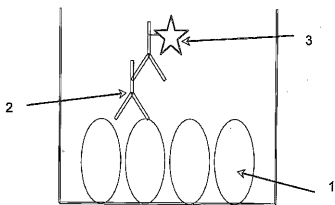


Fig. 1

【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2010/000563

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/574 G01N33/66		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SMORODIN EP AT AL: "[ELISA of IgM antibodies to Thomsen-Friedenreich (TF) hapten in cancer diagnostics: comparison of data obtained with four TF-glycoconjugates]" BIOORGANICHESKAYA KHIMIYA, vol. 23, no. 10, 1 October 1997 (1997-10-01), pages 795-799, XP008123207 abstract page 797, table ----- -/--	1-14, 16-25, 27-33, 35,37-39
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  15 June 2010		Date of mailing of the international search report  31/08/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Schmidt, Harald

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2010/000563

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HUFLEJT MARGARET E ET AL: "Printed glycan array identifies specific signatures of anti-glycan autoantibodies as biomarkers in sera of breast cancer patients: Diagnostic, prognostic and therapeutic opportunities" CANCER BIOMARKERS, IOS PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 2, no. 5, 1 January 2006 (2006-01-01), page 187, XP008123174 ISSN: 1574-0153 abstract	1-14, 16-25, 27-33, 35,37-39
X	US 2008/293161 A1 (DEUTSCHER SUSAN L [US] ET AL) 27 November 2008 (2008-11-27)  paragraph [0070] - paragraph [0073]; figures 2,4; examples 2-3 paragraph [0060] - paragraph [0061] paragraphs [0004], [0008] - [0010]	1-14, 16-25, 27-33, 35,37-39
X	JESCHKE UDO ET AL: "Expression of Sialyl Lewis X, Sialyl Lewis a, E-cadherin and cathepsin-D in human breast cancer: Immunohistochemical analysis in mammary carcinoma in situ, invasive carcinomas and their lymph node metastasis" ANTICANCER RESEARCH, INTERNATIONAL INSTITUTE OF ANTICANCER RESEARCH, GR, vol. 25, no. 3A, 1 May 2005 (2005-05-01), pages 1615-1622, XP008123199 ISSN: 0250-7005 abstract; table 1 page 1619	1-14, 16-25, 27-33, 35,37-39
A	WELINDER C ET AL: "Expression of Helix pomatia Lectin Binding Glycoproteins in Women with Breast Cancer in Relationship to Their Blood Group Phenotype" JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH, vol. 8, 11 November 2008 (2008-11-11), pages 782-786, XP002587147 page 784 - page 786 abstract	1-14, 16-25,27

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2010/000563

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>KURTENKOV O ET AL: "IgG Immune Response To Tumor-Associated Carbohydrate Antigens (TF, Tn, .alpha.Gal) In Patients With Breast Cancer: Impact Of Neoadjuvant Chemotherapy And Relation To The Survival" EXPERIMENTAL ONCOLOGY, vol. 27, 1 June 2005 (2005-06-01), pages 136-140, XP008123277 cited in the application the whole document</p>	<p>1-14, 16-25, 27-33, 35,37-39</p>
X,P	<p>PANDEY JP ET AL: "A genetic variant of immunoglobulin .gamma.2 is strongly associated with immunity to mucin 1 in patients with breast cancer" CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, vol. 58, 14 April 2009 (2009-04-14), pages 2025-2029, XP002587148 DOI: 10.1007/s00262-009-0709-4 the whole document</p>	<p>1-14, 16-25, 27-33, 35,37-39</p>

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.  
 PCT/GB2010/000563
**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
 9, 25, 32(completely); 1-8, 10-14, 16-24, 27-31, 33, 35, 37-39(partially)

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GB2010/000563

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 9, 25, 32(completely); 1-8, 10-14, 16-24, 27-31, 33, 35, 37-39(partially)

method of identifying whether or not a mammal is suffering from, or at risk from, breast cancer and kit suitable for use in the method

2. claims: 15, 26, 34, 36(completely); 1-8, 10-14, 16-24, 27-31, 33, 35, 37-39(partially)

method of identifying whether or not a mammal is suffering from, or at risk from, colon cancer and kit suitable for use in the method

3. claims: 1-8, 10-14, 16-24, 27-31, 33, 35, 37-39(all partially)

method of identifying whether or not a mammal is suffering from, or at risk from, liver cancer and kit suitable for use in the method

4. claims: 1-8, 10-14, 16-24, 27-31, 33, 35, 37-39(all partially)

method of identifying whether or not a mammal is suffering from, or at risk from, stomach cancer and kit suitable for use in the method

5. claims: 1-8, 10-14, 16-24, 27-31, 33, 35, 37-39(all partially)

method of identifying whether or not a mammal is suffering from, or at risk from, ovarian cancer and kit suitable for use in the method

6. claims: 1-8, 10-14, 16-24, 27-31, 33, 35, 37-39(all partially)

method of identifying whether or not a mammal is suffering from, or at risk from, brain cancer and kit suitable for use in the method

7. claims: 1-8, 10-14, 16-24, 27-31, 33, 35, 37-39(all partially)

method of identifying whether or not a mammal is suffering from, or at risk from, pancreatic cancer and kit suitable for use in the method

8. claims: 1-8, 10-14, 16-24, 27-31, 33, 35, 37-39(all partially)

International Application No. PCT/GB2010 /000563

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

method of identifying whether or not a mammal is suffering from, or at risk from, leukemia and kit suitable for use in the method

---

9. claims: 1-8, 10-14, 16-24, 27-31, 33, 35, 37-39(all partially)

method of identifying whether or not a mammal is suffering from, or at risk from, bone cancer and kit suitable for use in the method

---

10. claims: 1-8, 10-14, 16-24, 27-31, 33, 35, 37-39(all partially)

method of identifying whether or not a mammal is suffering from, or at risk from, any other cancer and kit suitable for use in the method

---

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/GB2010/000563

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2008293161 A1	27-11-2008	US 2006252097 A1	09-11-2006

## フロントページの続き

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

(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 100134784

弁理士 中村 和美

(72)発明者 デイビッド ジョン グレインジャー

イギリス国, ケンブリッジ シービー 2 2 4 アールエー, ダックスフォード, セント ジョンズ  
ストリート 9

(72)発明者 デイビッド モースデール

イギリス国, ノーフォーク ピーイー 3 3 0 エイチエイチ, キングス リン, ワトリントン, ミ  
ル ロード 6 1

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ08 QS33

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2012521552A5</a>	公开(公告)日	2013-05-09
申请号	JP2012501379	申请日	2010-03-24
[标]申请(专利权)人(译)	总科学有限公司三通德		
申请(专利权)人(译)	总科学Rimitido		
[标]发明人	デイビッドジョングレインジャー デイビッドモースデー		
发明人	デイビッド ジョン グレインジャー デイビッド モースデー		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/574 C12Q1/02		
CPC分类号	G01N33/66 G01N33/574 G01N33/57415 G01N33/57419 G01N33/6857		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/574.A C12Q1/02		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QS33		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 武井良太郎 喀米·金加缪拉		
优先权	2009005076 2009-03-24 GB		
其他公开文献	JP2012521552A JP5695023B2		

#### 摘要(译)

本发明涉及用于癌症的诊断，预后和监测的试剂盒和方法。在一个方面，提供了鉴定哺乳动物是否患有癌症或处于任何癌症风险中的方法，其包括以下步骤：(a) 将来自哺乳动物的样品(例如生物样品)通过非IgG免疫球蛋白结合含糖链抗原测量信号(b) 将步骤(a)中测量的信号与来自一种或多种已知患有癌症的哺乳动物的一种或多种样品中结合含糖水化合物抗原的非IgG免疫球蛋白的信号进行比较，用来自一种或多种健康哺乳动物的一种或多种样品中的来自非IgG免疫球蛋白的信号与含有碳水化合物抗原结合。提供。