

(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2009-510395  
(P2009-510395A)

(43) 公表日 平成21年3月12日(2009.3.12)

(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 A	2 G O 4 1
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 M	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 2 4
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 27/62 V	4 B O 6 3
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-531352 (P2008-531352)  
 (86) (22) 出願日 平成18年9月14日 (2006. 9. 14)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年5月12日 (2008. 5. 12)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/036005  
 (87) 国際公開番号 W02007/033367  
 (87) 国際公開日 平成19年3月22日 (2007. 3. 22)  
 (31) 優先権主張番号 60/717, 154  
 (32) 優先日 平成17年9月14日 (2005. 9. 14)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

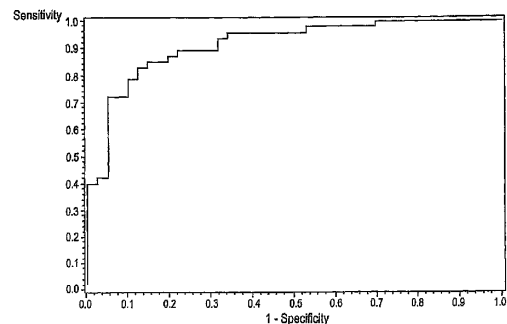
(71) 出願人 592130699  
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ  
 ティ オブ カリフォルニア  
 The Regents of The  
 University of Calif  
 ornia  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 946  
 07, オークランド, フランクリン スト  
 リート 1111, 12ティーエイチ フ  
 ロア  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100062409  
 弁理士 安村 高明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳がん検出のための唾液タンパク質およびRNA

(57) 【要約】

本発明は、乳癌において増加する唾液タンパク質およびRNA因子を初めて同定するものである。それゆえ、本発明は、唾液中の癌抗原(タンパク質およびRNA)を調べることによる、乳癌についての診断方法および予後判定を実施する方法を提供する。例えば、被験体における乳癌を診断する方法であって、該方法は、(a) VEGF、CEA、およびEGFの核酸、ならびにVEGF、CEA、およびEGFのポリペプチドからなる群から選択されたマーカーを特異的に検出するアッセイを用いて該被験体由来の唾液試料を分析する工程；ならびに(b) 該マーカーが該試料中で過剰発現されているか否かを判定する工程；を包含することにより乳癌の診断を与える、方法が提供される。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

被験体における乳癌を診断する方法であって、該方法は、

( a ) V E G F、C E A、および E G F の核酸、ならびに V E G F、C E A、および E G F のポリペプチドからなる群から選択されたマーカーを特異的に検出するアッセイを用いて該被験体由来の唾液試料を分析する工程；ならびに

( b ) 該マーカーが該試料中で過剰発現されているか否かを判定する工程；  
を包含することにより乳癌の診断を与える、方法。

**【請求項 2】**

前記アッセイがタンパク質を検出し、該アッセイが E L I S A、ウェスタンブロットティング、フローサイトメトリー、免疫蛍光、免疫組織化学または質量分析である、請求項 1 に記載の方法。

10

**【請求項 3】**

前記アッセイが核酸を検出し、該アッセイが質量分析、P C R、マイクロアレイハイブリダイゼーション、熱サイクル配列決定、キャピラリーアレイ配列決定または固相配列決定である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記アッセイが、タンパク質に結合する試薬を含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記試薬が抗体である、請求項 4 に記載の方法。

20

**【請求項 6】**

前記試薬がモノクローナル抗体である、請求項 5 に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記アッセイが、核酸に結合する試薬を含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記試薬は核酸である、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記試薬はオリゴヌクレオチドである、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記試薬は R T - P C R プライマーセットである、請求項 9 に記載の方法。

30

**【請求項 11】**

前記アッセイは、E L I S A、ウェスタンブロットティング、フローサイトメトリー、免疫蛍光、免疫組織化学、質量分析である、請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 12】**

V E G F および E G F を特異的に検出するアッセイを用いて、前記被験体由来の唾液試料を分析し、V E G F および E G F のタンパク質が該試料中で過剰発現されているか否かを判定する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記マーカーが V E G F のタンパク質または R N A である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記マーカーが E G F のタンパク質または R N A である、請求項 1 に記載の方法。

40

**【請求項 15】**

前記マーカーが C E A タンパク質または R N A である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 16】**

乳癌についての予後判定を与える方法であって、該方法は、

( a ) V E G F、C E A、および E G F の核酸、ならびに V E G F、C E A、および E G F のポリペプチドからなる群から選択されたマーカーを特異的に検出するアッセイを用いて該被験体由来の唾液試料を分析する工程；ならびに

( b ) 該マーカーが該試料中で過剰発現されているか否かを判定する工程；  
を包含することにより乳癌についての予後判定を与える、方法。

50

## 【請求項 17】

前記アッセイがタンパク質を検出し、該アッセイが E L I S A、ウェスタンブロッティング、フローサイトメトリー、免疫蛍光、免疫組織化学または質量分析である、請求項 16 に記載の方法。

## 【請求項 18】

前記アッセイが核酸を検出し、該アッセイが質量分析、PCR、マイクロアレイハイブリダイゼーション、熱サイクル配列決定、キャピラリーアレイ配列決定または固相配列決定である、請求項 16 に記載の方法。

## 【請求項 19】

前記アッセイが、タンパク質に結合する試薬を含む、請求項 16 に記載の方法。

10

## 【請求項 20】

前記試薬が抗体である、請求項 19 に記載の方法。

## 【請求項 21】

前記試薬がモノクローナル抗体である、請求項 20 に記載の方法。

## 【請求項 22】

前記試薬が核酸に結合する、請求項 16 に記載の方法。

## 【請求項 23】

前記試薬が核酸である、請求項 22 に記載の方法。

## 【請求項 24】

前記試薬はオリゴヌクレオチドである、請求項 23 に記載の方法。

20

## 【請求項 25】

前記試薬は RT - PCR プライマーセットである、請求項 24 に記載の方法。

## 【請求項 26】

VEGF、EGF または CEA のタンパク質が前記唾液試料中で発現されているか否かを、ELISA を用いて判定する、請求項 20 に記載の方法。

## 【請求項 27】

VEGF および EGF を特異的に検出するアッセイを用いて前記被験体由来の唾液試料を分析し、VEGF および EGF のタンパク質が該試料中で過剰発現されているか否かを判定する工程を包含する、請求項 16 に記載の方法。

## 【請求項 28】

前記マーカーが VEGF のタンパク質または RNA である、請求項 16 に記載の方法。

30

## 【請求項 29】

前記マーカーが EGF のタンパク質または RNA である、請求項 16 に記載の方法。

## 【請求項 30】

前記マーカーが CEA のタンパク質または RNA である、請求項 16 に記載の方法。

## 【請求項 31】

乳癌に対する治療の有効性をモニタリングする方法であって、

(a) VEGF、CEA、および EGF の核酸、ならびに VEGF、CEA、および EGF のポリペプチドからなる群から選択されたマーカーを特異的に検出する検定を用いて該被験体由来の唾液試料を分析する工程；ならびに

40

(b) 該マーカーが該試料中で過剰発現されているか否かを判定する工程、を包含することにより乳癌に対する治療の有効性をモニタリングする、方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

(関連出願の引用)

本願は、仮出願 US S N 60 / 7 1 7 , 1 5 4 ( 2 0 0 5 年 9 月 1 4 日出願 ) に対する優先権を主張する。仮出願 US S N 60 / 7 1 7 , 1 5 4 は、その全体が本明細書中に参考として援用される。

## 【0002】

50

(連邦政府による資金提供を受けた研究開発の下で行われた発明の権利に関する記載)  
この発明は、政府の支援によりNIH/NIDCR認可番号第UO1 DE 15018号および同第UO1 DE 16275号の下で行われた。政府は、この発明における一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

乳癌は、アメリカ人女性において最も一般的な形態の癌であり、癌死亡の2番目の死因である。2004年には、およそ215,990人の女性および1,500人の男性が浸潤性乳癌と診断され、40,580人がこの疾患によって亡くなったと見積もられた(非特許文献1)。早期検出が年齢調節乳癌死亡率を僅かに減少させると信じられている。しかしながら、身体検査および乳房X線像を含む、乳癌についての現在の標準的な診断/スクリーニング試験は完全ではないため、早期検出を改良する新規な方法の開発に関する研究が盛んに行われている。

10

【0004】

現在の臨床診療では、広範囲の疾患の評価または再発性乳癌の検出にCEA(癌胎児性抗原)およびCA15-3またはCA27-29等の血清腫瘍マーカーを用いているが、新たな乳癌の検出には用いられていない(非特許文献2)。多くの研究者は、プロテオミクスまたはDNA/RNAアレイ等の新たな技術を多数用いて、血液中に新規なマーカーを発見している(非特許文献3~4)。唾液は容易に入手可能な体液源であるが、唾液を研究しようとする試みが行われることはほとんどなかった。我々は、唾液中の血管新生および腫瘍マーカーのプロファイルが現在乳癌診断に用いられる方法を補うことができると仮定した。この研究では、我々は、特定の成長/腫瘍マーカーのレベルが乳癌と相関するか否かを判定しようと試みた。我々は、VEGF(血管内皮増殖因子)およびEGF(上皮増殖因子)を研究した。なぜなら、それらが強力な血管新生因子であるからであり、成功裏に標的化された治療剤は、FDAによって既に認可されているか(Avastin、Tarceva等)または臨床試験を行っている途中であるかのいずれかである(非特許文献5~6)。我々はまた、乳癌についてよく確立された血清腫瘍マーカーであるCEAについても測定を行った。我々は、乳癌患者においては、正常対照と比較して唾液中の上記タンパク質レベルが上昇していることを観察した。

20

30

【非特許文献1】Wood WC, Muss HB, Solin LJ, Olopade OI. Malignant tumors of the breast. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenbert SA, editors. Cancer: principles & practice of oncology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 1415-77.

【非特許文献2】Cheung KL, Graves CR, Robertson JF. Tumour marker measurements in the diagnosis and monitoring of breast cancer. Cancer Treat Rev 2000; 26: 91-102.

40

【非特許文献3】Posadas EM, Simpkins F, Liotta LA, MacDonald C, Kohn EC. Proteomic analysis for the early detection and rational treatment of cancer - realistic hope? Ann Oncol 2005; 16: 16-22.

【非特許文献4】Anker P, Mulcahy H, Stroun M. Circulating nucleic acids in plasma and serum as a noninvasive investigation for cancer: time for large-scale clinical studies? Int J Cancer 2003; 103: 149-52.

50

【非特許文献5】Kabbinavar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L, et al. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 2003; 21: 60-5.

【非特許文献6】Byrne BJ, Garst J. Epidermal growth factor receptor inhibitors and their role in non-small-cell lung cancer. Curr Oncol Rep 2005; 7: 241-7.

10

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0005】

(発明の簡単な要旨)

1つの局面では、本発明は、被験体における乳癌を診断する方法であって、(a) VEGF、CEA、およびEGFの核酸、ならびにVEGF、CEA、およびEGFのポリペプチドからなる群から選択されたマーカーに特異的に結合する試薬と、被験体由来の唾液試料を接触させる工程；ならびに(b)このマーカーが試料中で過剰発現されているか否かを判定する工程、を包含することにより乳癌の診断を与える、方法を提供する。

【0006】

20

別の局面では、本発明は、乳癌の予後判定を与える方法であって、(a) VEGF、CEA、およびEGFの核酸、ならびにVEGF、CEA、およびEGFのポリペプチドからなる群から選択されたマーカーに特異的に結合する試薬と、被験体由来の唾液試料を接触させる工程；ならびに(b)このマーカーが試料中で過剰発現されているか否かを判定する工程、を包含することにより乳癌の予後判定を与える、方法を提供する。

【0007】

別の局面では、本発明は、乳癌に対する治療の有効性をモニタリングする方法であって、(a) VEGF、CEA、およびEGFの核酸、ならびにVEGF、CEA、およびEGFのポリペプチドからなる群から選択されたマーカーを特異的に検出するアッセイを用いて被験体由来の唾液試料を分析する工程；ならびに(b)このマーカーが試料中で過剰発現されているか否かを判定する工程、を包含することにより乳癌に対する治療の有効性をモニタリングする、方法を提供する。

30

【0008】

1つの実施形態では、このアッセイは、タンパク質に結合する試薬を含む。別の実施形態では、このアッセイは抗体である試薬を含む。別の実施形態では、この試薬はモノクローナル抗体である。

【0009】

1つの実施形態では、この試薬は核酸に結合する。別の実施形態では、この試薬は核酸である。別の実施形態では、試薬はオリゴヌクレオチドである。別の実施形態では、試薬はRT-PCRプライマーセットである。

40

【0010】

1つの実施形態では、このアッセイはタンパク質を検出し、このアッセイはELISA、ウェスタンブロッティング、フローサイトメトリー、免疫蛍光、免疫組織化学または質量分析である。別の実施形態では、このアッセイは核酸を検出し、このアッセイは質量分析、PCR、マイクロアレイハイブリダイゼーション、熱サイクル配列決定、キャピラリーアレイ配列決定または固相配列決定である。

【0011】

1つの実施形態では、VEGFおよびEGFを特異的に検出するアッセイを用いて、被験体由来の唾液試料を分析し、VEGFおよびEGFタンパク質が試料中で過剰発現されているか否かを判定する工程を包含する。

50

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0012】

(発明の詳細な説明)

## 序論

我々は今や、ヒト乳癌に関して唾液試料中のVEGF、CEA、EGF、およびそれらの組み合わせ(VEGFとEGF、VEGFとCEA、CEAとEGF、およびVEGFとCEAとEGF等)の診断的/予後的な意義を実証した。タンパク質またはRNAのいずれもが唾液中で検出され得る。それゆえ、唾液中でのこれらおよび他の癌抗原の検出は、乳癌および他の癌の診断および予後判定に有用である。早期診断に関しては、ELISA、RT-PCRまたは質量分析等の技術を単独で、またはHER2/Neu、CA15-3、CA27-29等の他のマーカーと組み合わせて用いることにより、唾液中の癌抗原(タンパク質および当該タンパク質をコードするRNA)を調べることができる。抗体、受容体、リガンド、RT-PCR等の任意の特異的プローブを検出に用いることができる。質量分析もタンパク質の検出に用いることができる。このように、本発明を単独でまたは従来抗原分析を補うものとして用いて乳癌および他の癌の診断を強化することができる。

10

## 【0013】

本発明はまた、ヒト乳癌用血清試料におけるVEGF、CEA、EGF、およびそれらの組み合わせ(VEGFとEGF、VEGFとCEA、CEAとEGF、およびVEGFとCEAとEGF等)の診断的/予後的な意義も提供する。タンパク質またはRNAのいずれをも唾液中で検出し得る。それゆえ、唾液中でのこれらおよび他の癌抗原の検出は、乳癌および他の癌の診断および予後判定に有用である。早期診断に関しては、ELISA、RT-PCRまたは質量分析等の技術を単独で、またはHER2/Neu、CA15-3、CA27-29等の他のマーカーと組み合わせて用いることにより、唾液中の癌抗原(タンパク質および当該タンパク質をコードするRNA)を調べることができる。抗体、受容体、リガンド、RT-PCR等の任意の特異的プローブを検出に用いることができる。質量分析もタンパク質の検出に用いることができる。このように、本発明を単独でまたは従来抗原分析を補うものとして用いて乳癌および他の癌の診断を強化することができる。

20

## 【0014】

一般に、上記方法は、特に、乳癌および他の癌の診断または予後判定での用途が見出される。唾液は容易に入手可能な体液源であるが、その癌診断における価値を研究しようとする試みが行われることはほとんどなかった。我々は、特定のタンパク質およびRNAが乳癌患者の唾液中で増加すると仮定した。さらに、乳癌患者におけるタンパク質およびRNAの増加は、無病生存率、全生存率、および転移性癌を含めた予後不良と関連する。

30

## 【0015】

我々の研究には49人の健常人および49人の乳癌患者が参加した。唾液中における血管内皮増殖因子(VEGF)、上皮増殖因子(EGF)、および癌胎児性抗原(CEA)のレベルを、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)により測定した。ウィルコクソン検定および多重線形回帰モデルを用いて乳癌と唾液ペプチドとの関連性を評価し、受信者動作特性(ROC)曲線により予測力を分析した。

40

## 【0016】

唾液タンパク質のレベルは癌患者において次のように著しく上昇した: 1) VEGF: 癌において $3.7 \pm 1.6$ に対して、対照において $2.1 \pm 1.2$  ng/ml ( $p < 0.0001$ ); 2) EGF:  $3.7 \pm 1.7$ に対して $2.1 \pm 1.3$  ng/ml ( $p < 0.0001$ ); および 3) CEA:  $83 \pm 31$ に対して $66.1 \pm 27.1$  ng/ml ( $p = 0.0106$ )。ROC曲線下面積(AUC)は、それぞれ、80%、77%、および65%であった。本研究における最良予測は、感度83%、特異性74%、およびAUC84%で、唾液のVEGFとEGFの組み合わせで得られた。

## 【0017】

50

## 定義

「VEGF」、「CEA」、および「EGF」とは、以下である核酸（例えば、遺伝子、mRNA前駆体、mRNA）、ならびにポリペプチド、多型改変体、対立遺伝子、変異体、および種間ホモログをいう：（１）好ましくは、少なくとも約25、50、100、200、500、1000個またはそれより多くのアミノ酸からなる領域にわたって、参照核酸によってコードされたポリペプチドまたは本明細書中に記載のアミノ酸配列に対して約60%のアミノ酸配列同一性、65%、70%、75%、80%、85%、90%、好ましくは、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%、またはそれよりも大きなアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有する；（２）参照アミノ酸配列、その免疫原性フラグメント、およびその保存的に改変された改変体を含む免疫原に対して惹起された抗体（例えば、ポリクロナール抗体）に特異的に結合する；（３）ストリンジентなハイブリダイゼーション条件下で、参照アミノ酸配列をコードする核酸およびその保存的に改変された改変体と特異的にハイブリダイズする；（４）好ましくは、少なくとも約25、50、100、200、500、1000個またはそれより多くのヌクレオチドからなる領域にわたって、参照核酸配列に対して約95%よりも高い、好ましくは、約96%、97%、98%、99%またはそれよりも高いヌクレオチド配列同一性を有する核酸配列を有する。ポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列は、典型的には、霊長類（例えば、ヒト）；げっ歯類（例えば、ラット、マウス、ハムスター）；ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジまたは任意の哺乳類を含むがこれらに限定されない哺乳類に由来するものである。本発明の核酸およびタンパク質は、天然に存在する分子および組み換え分子の両方を包含する。VEGFのタンパク質配列は、例えば、アクセッション番号NP\_001020537号により提供され；EGFのタンパク質配列は、例えば、アクセッション番号NP\_958439号により提供される。CEAのタンパク質配列は、例えば、アクセッション番号CAA44076号により提供される。これらの抗原の切断型および選択的スプライス型は定義に含まれる。

### 【0018】

「癌」とは、固形癌およびリンパ癌、腎臓癌、乳癌、肺癌、腎臓癌、膀胱癌、結腸癌、卵巣癌、前立腺癌、膵臓癌、胃癌、脳癌、頭頸部癌、皮膚癌、子宮癌、精巣癌、食道癌、および肝臓癌（肝細胞癌、リンパ腫（非ホジキンリンパ腫（例えば、バーキットリンパ腫、小細胞リンパ腫、および大細胞リンパ腫）およびホジキンリンパ腫を含む）、白血病、および多発性骨髄腫を含む、ヒトの癌および癌腫、肉腫、腺癌、リンパ腫、白血病等をいう。

### 【0019】

「治療処置」および「癌療法」とは、化学療法、ホルモン療法、放射線療法、および免疫療法をいう。

### 【0020】

「過剰発現する」、「過剰発現」または「過剰発現された」という用語は、相互互換的に、正常細胞と比較して、（通常は癌細胞内で）検出可能により高いレベルで転写または翻訳されるタンパク質をいう。この用語は、正常細胞と比較したときの、転写、転写後プロセッシング、翻訳、翻訳後プロセッシング、細胞局在（例えば、細胞小器官、細胞質、細胞核、細胞表面）、ならびにRNAおよびタンパク質安定性による過剰発現を含む。過剰発現は、mRNAを検出するための従来技術（すなわち、RT-PCR、PCR、ハイブリダイゼーション）またはタンパク質を検出するための従来技術（すなわち、ELISA、免疫組織学化学的技術、質量分析）を用いて検出できる。過剰発現は、正常細胞と比較して、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれを超えるものであり得る。特定の場合には、過剰発現は、正常細胞と比較して、1倍、2倍、3倍、4倍またはそれよりも高いレベルの転写または翻訳である。

### 【0021】

「癌関連抗原」または「腫瘍特異性マーカー」もしくは「腫瘍マーカー」という用語は、正常細胞と比較して、細胞内で発現されるか、癌細胞の表面で発現されるか、または癌

10

20

30

40

50

細胞により分泌される、癌の診断、予後判定、および癌細胞に対する薬剤の優先的ターゲットに有用な分子（典型的には、タンパク質またはRNA等の核酸）を相互互換的にいう。しばしば、癌関連抗原は、正常細胞と比較して癌細胞内で過剰発現（例えば、正常細胞と比較して1倍過剰発現、2倍過剰発現、3倍過剰発現またはそれより高く過剰発現）される細胞表面分子である。しばしば、癌関連抗原は、癌細胞内で不適切に合成される細胞表面分子（例えば、正常細胞上で発現される分子と比較して欠失、付加または変異を含む分子）である。しばしば、癌関連抗原は、癌細胞の細胞表面上でもっぱら発現され、正常細胞の表面では合成も発現もされない。例示される細胞表面腫瘍マーカーとしては、乳癌についてのタンパク質c-erbB-2およびヒト上皮増殖因子受容体（HER）、前立腺癌についてのPSMA、ならびに乳癌、卵巣癌および結腸直腸癌を含む多くの癌における炭水化物ムチンが挙げられる。

10

**【0022】**

マーカーを単独で用いてもよく、または本明細書中に開示の用途（例えば、メラノーマ診断または予後判定）のいずれかについての他のマーカーと組み合わせて用いてもよいことが当業者によって理解される。

**【0023】**

「生物学的試料」は、生検試料および剖検試料等の組織の切片、ならびに組織学的目的のために採取された凍結切片を包含する。そのような試料としては、血液および血液分画または血液製剤（例えば、血清、血漿、血小板、赤血球等）、痰、組織、培養細胞（例えば、初代培養物、外植片、および形質転換細胞）、大便、尿等が挙げられる。生物学的試料は、典型的には、真核生物、最も好ましくは、哺乳類（例えば、霊長類（例えば、チンパンジーまたはヒト）；ウシ；イヌ；ネコ；げっ歯類（例えば、モルモット、ラット、マウス）；ウサギ）またはトリ；爬虫類；もしくは魚類から得られる。

20

**【0024】**

2つ以上の核酸配列またはポリペプチド配列に関する「同一の」または「同一性」パーセントという用語は、2つ以上の同じ配列もしくは部分配列をいうか、あるいは後述するデフォルトのパラメータでBLASTもしくはBLAST2.0配列比較アルゴリズムを用いるか、または手動によるアラインメントおよび目視検査（例えば、NCBIのウェブサイト<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>等を参照されたい）により測定したときに特定のパーセンテージ（すなわち、比較ウインドウ（comparison window）または指定領域にわたって最大対応になるように比較およびアラインメントした場合、特定の領域にわたって約60%同一性、好ましくは、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれより高い同一性）の同じアミノ酸残基またはヌクレオチドを有する2つ以上の配列もしくは部分配列をいう。そして、そのような配列を「実質的に同一」と呼ぶ。この定義はまた、テスト配列のコンプライメント（complement）をいうか、またはそれに適用され得る。この定義はまた、欠失および/または付加を有する配列、ならびに置換を有する配列も含む。後述するように、好適なアルゴリズムはギャップ等を計上し得る。好ましくは、同一性は、少なくともアミノ酸またはヌクレオチド約25個分の長さの領域、より好ましくは、アミノ酸またはヌクレオチド50~100個分の長さの領域にわたって存在する。

30

40

**【0025】**

配列比較については、典型的には、1つの配列が、テスト配列と比較される参照配列として作用する。配列比較アルゴリズムを用いる場合、テスト配列および参照配列をコンピュータに入力し、部分配列座標を必要に応じて指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。好ましくは、既定のプログラムパラメータを用いるか、または代替的なパラメータを指定することができる。次いで、配列比較アルゴリズムが、プログラムパラメータに基づいて、参照配列に対するテスト配列のパーセント配列同一性を算出する。

**【0026】**

本明細書中において用いる場合、「比較ウインドウ」は、20~600、一般的には、

50

約50～約200個、より一般的には、約100～約150個からなる群から選択された数連続する位置のいずれか1つのセグメントに対する参照であって、2つの配列を最適にアラインメントした後、1つの配列を同数の連続位置の基準配列に対して比較可能である参照を含む。比較のために配列アラインメントを行う方法は当該分野では周知である。比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)の局所的相同性アルゴリズムによって、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)の相同性アラインメントアルゴリズムによって、Pearson & Lipman, PROC. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988)の類似性検索法によって、これらのアルゴリズムのコンピュータインプリメンテーションによって(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIのGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA)、または手動によるアラインメントおよび目視検査によって(例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubelら編、1987-2005, Wiley Interscience)を参照されたい)行うことができる。

10

#### 【0027】

配列同一性パーセントおよび配列類似性パーセントの決定に適したアルゴリズムの好適な例は、BLASTおよびBLAST2.0アルゴリズムであり、これらは、それぞれ、Altschulら、Nuc. Acids Res. 25: 3389-3402 (1997)およびAltschulら、J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)に記載されている。BLASTおよびBLAST2.0は、本明細書中に記載のパラメータとともに、本発明の核酸およびタンパク質の配列同一性パーセントを決定するために用いられる。BLAST解析を行うためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)から公然と入手可能である。このアルゴリズムは、まず、問い合わせ配列内の長さがWの短いワードであって、データベース配列内の同じ長さのワードとアライメントした際に、ある正の値の閾値スコアTと一致するか、またはそれを満たすワードを特定することにより高スコア配列ペア(HSP)を同定することを含む。Tは、近傍ワードスコア閾値と呼ばれる(Altschulら、上記参照)。これら最初の近傍ワードヒットは、それらを含むより長いHSPを見つける検索を開始するためのシードとして作用する。このワードヒットは、累積アライメントスコアを増やすことができる限り、各配列に沿って両方向に伸ばされる。累積スコアは、ヌクレオチド配列については、パラメータM(一致残基に対する報酬スコア; 常に $> 0$ )およびN(不一致残基に対する罰則スコア; 常に $< 0$ )を用いて算出する。アミノ酸配列については、スコア行列を用いて累積スコアを算出する。累積アライメントスコアが最高到達値から数量Xだけ低下した場合; 負のスコアを有する残基アライメントが1つ以上累積したことにより累積スコアが0以下になった場合; またはいずれかの配列の最後に達した場合には、各方向におけるワードヒットの伸長が停止する。BLASTアルゴリズムパラメータW、T、およびXにより、アライメントの感度および速度が決定される。BLASTNプログラム(ヌクレオチド配列用)は、既定値として、ワード長(W)11、期待値(E)10、 $M = 5$ 、 $N = -4$ 、および両鎖の比較を用いる。アミノ酸配列については、BLASTPプログラムは、ワード長3および期待値(E)10を既定値として用い、BLOSUM62スコア行列(Henikoff & Henikoff, PROC. Nat'l. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989)を参照されたい)は、アライメント(B)50、期待値(E)10、 $M = 5$ 、 $N = -4$ 、および両鎖の比較を既定値として用いる。

20

30

40

#### 【0028】

「核酸」とは、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドおよびそれらの一本

50

鎖または二本鎖の形態のポリマー、ならびにそれらの相補体をいう。この用語は、合成、天然由来、および非天然由来のものであって、参照核酸と同様の結合特性を有し、参照ヌクレオチドと同様の方法で代謝される公知のヌクレオチド類似体または修飾骨格残基もしくは結合を有する核酸を含む。そのような類似体の例としては、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、ホスホン酸メチル、キラルホスホン酸メチル、2-O-メチルリボヌクレオチド、ペプチド核酸(PNA)が挙げられるがこれらに限定されない。

【0029】

特に明記しない限り、特定の核酸配列はまた、保存的に改変されたそれらの改変体(例えば、縮重コドン置換物)および相補配列を、明示した配列とともに、暗黙のうちに包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1つ以上の選択した(または全ての)コドンの第三位が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換された配列を生成することにより達成され得る(Batzerら、Nucleic Acid Res. 19:5081(1991); Ohtsukaら、J. Biol. Chem. 260:2605-2608(1985); Rossoliniら、Mol. Cell. Probes 8:91-98(1994))。核酸という用語は、遺伝子、cDNA、mRNA、オリゴヌクレオチド、およびポリヌクレオチドと相互互換的に用いられる。

10

【0030】

特定の核酸配列はまた、「スプライス改変体」、および癌抗原の切断型をコードする核酸配列を暗黙のうちに含む。同様に、核酸によりコードされた特定のタンパク質は、その核酸のスプライス変異または切断型によってコードされたあらゆるタンパク質を暗黙のうちに含む。「スプライス改変体」は、その名前が示唆するように、遺伝子の選択的スプライシングの産物である。異なる(代替の)核酸スプライス産物が異なるポリペプチドをコードするように、転写後に最初の核酸転写産物をスプライスしてもよい。スプライス改変体を産生する仕組みは異なるが、エキソンの選択的スプライシングを含む。読み越し転写により同じ核酸から派生した代替のポリペプチドもこの定義に含まれる。スプライス産物の組み換え型を含むスプライシング反応によるあらゆる産物がこの定義に含まれる。核酸は、5'末端または3'末端で切断され得る。ポリペプチドは、N末端側終端部またはC末端側終端部で切断され得る。切断されたバージョンの核酸配列またはポリペプチド配列は、天然に存在してもよく、または組み換えにより作製されてもよい。

20

【0031】

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーをいうように本明細書中において相互互換的に用いられる。これらの用語は、1つ以上のアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸の人工の化学的模倣物であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然由来のアミノ酸ポリマーおよび非天然由来のアミノ酸ポリマーに適用される。

30

【0032】

「アミノ酸」という用語は、天然に存在するアミノ酸および合成アミノ酸、ならびに天然に存在するアミノ酸と同様の様式で機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣物をいう。天然に存在するアミノ酸とは、遺伝暗号によりコードされるアミノ酸、ならびに後に修飾されるアミノ酸(例えば、ヒドロキシプロリン、 $\alpha$ -カルボキシグルタメート、およびO-ホスホセリン)である。アミノ酸類似体とは、天然に存在するアミノ酸と同じ基本的化学構造(すなわち、水素、カルボキシル基、アミノ基、およびR基と結合している炭素)を有する化合物(例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウム)をいう。そのような類似体は、修飾されたR基を有する(例えば、ノルロイシン)かまたは修飾されたペプチド骨格を有するが、天然に存在するアミノ酸と同じ基本的化学構造を保持する。アミノ酸模倣物とは、アミノ酸の一般的な化学構造と異なる構造を有するが天然に存在するアミノ酸と同様の様式で機能する化学化合物をいう。

40

【0033】

本明細書中において、アミノ酸は、一般に知られる3文字記号、またはIUPAC-I

50

UB Biochemical Nomenclature Commissionにより推奨される1文字記号のいずれかで言及され得る。同様に、ヌクレオチドは、一般に受け入れられた1文字コードで言及され得る。

#### 【0034】

「保存的に改変された改変体」は、アミノ酸配列および核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に関しては、保存的に改変された改変体とは、同一のまたは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸を意味し、核酸がアミノ酸配列をコードしない場合には、本質的に同一の配列をいう。遺伝暗号の縮重のため、多数の機能的に同一の核酸が任意の所定のタンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、CGCおよびGCUは全てアミノ酸アラニンをコードする。よって、アラニンがコドンによって指定される全ての位置で、このコドンを、コードしたポリペプチドを変更することなく記述された対応するコドンのいずれかへと変更し得る。そのような核酸バリエーションは、保存的に改変されたバリエーションの一種である「サイレントバリエーション(silent variation)」である。本明細書中のポリペプチドをコードするあらゆる核酸配列はまた、この核酸の可能なサイレントバリエーションのすべてを記述する。当業者は、核酸内の各コドン(通常はメチオニンに対する唯一のコドンであるAUG、および通常はトリプトファンに対する唯一のコドンであるTGGを除く)を改変することにより機能的に同一の分子を得ることができるとを認識する。従って、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレントバリエーションは、発現産物に対しては記載された各配列において暗示的であるが、実際のプローブ配列に対しては暗示的でない。

10

20

#### 【0035】

アミノ酸配列に関しては、当業者は、コードされる配列内の単一のアミノ酸または低い百分率のアミノ酸を変更、付加または欠失する核酸、ペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質配列に対する個々の置換、欠失、または付加が、変更によりあるアミノ酸と化学的に類似したアミノ酸とが置換された「保存的に改変された改変体」であることを認識する。機能的に類似したアミノ酸を提供する保存的な置換表は当該分野では周知である。そのような保存的に改変された改変体は、本発明の多型改変体、種間ホモログ、および対立遺伝子に加えてのものであり、それらを除外しない。

#### 【0036】

以下の8つのグループの各々は、相互に保存的に置換されるアミノ酸を含む：1) アラニン(A)、グリシン(G)；2) アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)；3) アスパラギン(N)、グルタミン(Q)；4) アルギニン(R)、リジン(K)；5) イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、バリン(V)；6) フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)；7) セリン(S)、トレオニン(T)；および8) システイン(C)、メチオニン(M)(例えば、Creighton, Proteins(1984)を参照されたい)。

30

#### 【0037】

「標識」または「検出可能部分」は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、化学的または他の物理的な手段によって検出可能な組成物である。例えば、有用な標識としては、<sup>32</sup>P、蛍光色素、電子密度が高い試薬、酵素(例えば、一般にELISAで用いられるようなもの)、ビオチン、ジゴキシゲニン、または、例えば、ペプチドに放射性標識を組み込むことにより検出可能にすることができるかもしくはペプチドと特異的に反応する抗体の検出に用いることができる、ハプテンおよびタンパク質が挙げられる。

40

#### 【0038】

「組み換え」という用語は、例えば、細胞または核酸、タンパク質またはベクターを参照して用いた場合、この細胞、核酸、タンパク質またはベクターが、異種核酸もしくはタンパク質の導入または天然の核酸もしくはタンパク質の変更により改変されているか、またはこの細胞がそのように改変された細胞に由来することを示す。よって、例えば、組み換え細胞は、その細胞の天然(非組み換え)型では見られない遺伝子を発現するか、そうでなければ異常に発現されるか、過少発現されるかもしくは全く発現されない天然の遺伝

50

子を発現する。

【0039】

「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」という語句は、典型的には、核酸の複雑な混合物中で、プローブがその標的部分配列とハイブリダイズするが他の配列とはハイブリダイズしない条件をいう。ストリンジェントな条件は配列依存的であり、異なる状況では異なったものである。配列が長いほど、より高い温度で特異的にハイブリダイズする。核酸のハイブリダイゼーションに関する広範な手引きが Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993)に見出される。一般に、ストリンジェントな条件は、既定のイオン強度の pH では、特定の配列についての熱融解点 ( $T_m$ ) よりも約 5 ~ 10 低くなるように選択される。 $T_m$  は、(既定のイオン強度、pH、および核酸 (nucleic) 濃度下で) 標的と相補的なプローブの 50% が平衡で標的配列とハイブリダイズする温度である (標的配列が過剰に存在するため、 $T_m$  では、プローブの 50% が平衡して占有される)。ストリンジェントな条件はまた、ホルムアミド等の不安定化剤を添加することにより達成され得る。選択的または特異的ハイブリダイゼーションについては、正のシグナルは、少なくともバックグラウンドの 2 倍、好ましくは、バックグラウンドハイブリダイゼーションの 10 倍である。例示的なストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は次のとおりであり得る：50%ホルムアミド、5 x SSC、および 1% SDS で 42 にてインキュベートするか、または 5 x SSC、1% SDS で 65 にてインキュベートして、65 にて 0.2 x SSC および 0.1% SDS で洗浄する。

10

20

30

40

50

【0040】

コードするポリペプチドが実質的に同一であれば、ストリンジェントな条件下で相互にハイブリダイズしない核酸であっても、それらは実質的に同一である。これは、例えば、遺伝暗号で許容される最大コドン縮重を用いて核酸のコピーが作製される場合に起こる。そのような場合、核酸は、典型的には、中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする。「中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」の例としては、37 にて 40%ホルムアミド、1Mの NaCl、1% SDS のバッファー中でのハイブリダイゼーション、および 45 にて 1 x SSC での洗浄が挙げられる。正のハイブリダイゼーションは、少なくともバックグラウンドの 2 倍である。当業者は、代替的なハイブリダイゼーションおよび洗浄条件を利用して同様のストリンジェンシーの条件を提供し得ることを容易に認識する。ハイブリダイゼーションパラメータを決定するためのさらなるガイドラインが多数の参考文献、例えば、Current Protocols in Molecular Biology, Ausubelら編 (上記参照) において提供される。

【0041】

PCR に関しては、低ストリンジェントな増幅には約 36 の温度が代表的であるが、アニーリング温度は、プライマーの長さに応じて約 32 ~ 48 の間で変化してもよい。高ストリンジェンシーの PCR 増幅に関しては、約 62 の温度が代表的であるが、高ストリンジェンシーのアニーリング温度は、プライマーの長さおよび特異性に応じて、約 50 ~ 約 65 の範囲であり得る。高ストリンジェンシー増幅および低ストリンジェンシー増幅の両方について典型的なサイクル条件としては、90 ~ 95 で 30 秒間 ~ 2 分間の変性相、30 秒間 ~ 2 分間続くアニーリング相、および約 72 で 1 ~ 2 分間の伸長相が挙げられる。低ストリンジェンシー増幅反応および高ストリンジェンシー増幅反応のプロトコルおよびガイドラインは、例えば、Innisら、(1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N.Y.) において提供される。

【0042】

「抗体」とは、抗原を特異的に結合して認識する、免疫グロブリン遺伝子またはそのフラグメント由来のフレームワーク領域を含むポリペプチドをいう。認識された免疫グロブリン遺伝子は、 $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、および $\alpha$ の定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子を含む。軽鎖は、 $\kappa$ または $\lambda$ のいずれかに分類される。重鎖は、免疫グロブリンのクラスI g G、I g M、I g A、I g DおよびI g Eをそれぞれ規定する、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ または $\alpha$ に分類される。典型的には、抗体の抗原結合領域は、結合の特異性および親和性に最も重要である。

#### 【0043】

例示的な免疫グロブリン（抗体）構造単位は、四量体を含む。各四量体は、2つの同一のポリペプチド鎖の対から構成され、各対は、1つの「軽」鎖（約25 kD）および1つの「重」鎖（約50～70 kD）を有する。各鎖のN末端は、主に抗原認識を担う約100～110個またはそれより多くのアミノ酸からなる可変領域を規定する。可変軽鎖（V<sub>L</sub>）および可変重鎖（V<sub>H</sub>）という用語は、それぞれ、これらの軽鎖および重鎖をいう。

10

#### 【0044】

抗体は、例えば、インタクトな免疫グロブリンとして、または種々のペプチダーゼによる消化によって産生された多数の十分に特徴付けられたフラグメントとして存在する。よって、例えば、ペプシンは、ヒンジ領域においてジスルフィド結合の下で抗体を消化して、それ自体がジスルフィド結合によりV<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1と連結した軽鎖であるFabの二量体であるF(ab)'<sub>2</sub>を産生する。F(ab)'<sub>2</sub>は、穏和な条件下で還元されてヒンジ領域内のジスルフィド結合を壊すことにより、F(ab)'<sub>2</sub>二量体をFab'単量体に変換する。Fab'単量体は、本質的に、ヒンジ領域の一部を有するFabである（Fundamental Immunology（Paul編、第3版、1993を参照されたい）。種々の抗体フラグメントはインタクトな抗体の消化に関して規定されるが、当業者は、そのようなフラグメントを、化学的にまたは組み換えDNA法を用いてデノボ合成してもよいことを理解する。よって、本明細書中において用いる場合、抗体という用語は、抗体全体の改変によって産生された抗体フラグメント、または組み換えDNA法を用いてデノボ合成された抗体フラグメント（例えば、単鎖Fv）またはファージディスプレイライブラリーを用いて同定された抗体フラグメントも包含する（例えば、McCaffertyら、Nature 348:552-554（1990）を参照されたい）。

20

#### 【0045】

例えば、組み換え抗体、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体等の抗体の調製には、当該分野で公知の多くの技術を用いることができる（例えば、Kohler & Milstein, Nature 256:495-497（1975）；Kozborら、Immunology Today 4:72（1983）；Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc.（1985）の77～96ページ；Coligan, Current Protocols in Immunology（1991）；Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual（1988）；およびGoding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice（第2版、1986）を参照されたい）。目的の抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子は、細胞からクローン化することができ、例えば、モノクローナル抗体をコードする遺伝子は、ハイブリドーマからクローン化し、組み換えモノクローナル抗体を産生するために用いられ得る。モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子ライブラリーは、ハイブリドーマまたは形質細胞からも作製され得る。重鎖および軽鎖の遺伝子産物を無作為に組み合わせることにより、異なる抗原特異性を有する大規模な抗体プールが作製される（例えば、Kuby, Immunology（第3版、1997）を参照されたい）。本発明のポリペプチドに対する抗体を産生するために、単鎖抗体または組み換え抗体の産生技術（米国特許第4,946,778号、米国特許第4,816,567号）を適合させることができる。また、トランスジェニックマウスまたは他の哺乳類等の他の生物体を用いてヒト化抗体またはヒト抗体を発現し

30

40

50

てもよい（例えば、米国特許第5,545,807号；同第5,545,806号；同第5,569,825号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,661,016号、Marksら、*Bio/Technology* 10:779-783(1992)；Lonbergら、*Nature* 368:856-859(1994)；Morrison, *Nature* 368:812-13(1994)；Fishwildら、*Nature Biotechnology* 14:845-51(1996)；Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826(1996)；およびLonberg & Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93(1995)を参照されたい)。あるいは、ファージディスプレイ技術を用いて、選択された抗原と特異的に結合する、抗体およびヘテロマーFabフラグメントを同定することができる（例えば、McCaffertyら、*Nature* 348:552-554(1990)；Marksら、*Biotechnology* 10:779-783(1992)を参照されたい)。抗体はまた、二重特異性、すなわち、2つの異なる抗原を認識可能にすることができる（例えば、WO93/08829、Traunekerら、*EMBO J.* 10:3655-3659(1991)；およびSureshら、*Methods in Enzymology* 121:210(1986)を参照されたい)。抗体はまた、ヘテロ結合体、例えば、共有結合により結合された2つの抗体、またはイムノトキシンとすることができる（例えば、米国特許第4,676,980号、WO91/00360；WO92/200373；およびEP03089を参照されたい）。

10

20

#### 【0046】

非ヒト抗体をヒト化または霊長類化する方法は当該分野で周知である。一般に、ヒト化抗体は、ヒト以外の供給源から導入された1つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば移入残基と呼ばれ、これは、典型的には、移入可変ドメインから取られる。ヒト化は、本質的に、Winterおよび共同研究者の方法に従って、対応するヒト抗体の配列をげっ歯類CDRまたはCDR配列で置換することにより行われ得る（例えば、Jonesら、*Nature* 321:522-525(1986)；Riechmannら、*Nature* 332:323-327(1988)；Verhoeyenら、*Science* 239:1534-1536(1988)およびPresta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596(1992)を参照されたい)。従って、そのようなヒト化抗体は、実質的に決してインタクトではないヒト可変ドメインが人以外の種に由来する対応配列により置換されたキメラ抗体である（米国特許第4,816,567号）。実用的には、ヒト化抗体は、典型的には、いくつかのCDR残基およびおそらくはいくつかのFR残基がげっ歯類抗体中の類似部位に由来する残基によって置換されたヒト抗体である。

30

#### 【0047】

「キメラ抗体」は、(a)定常領域またはその一部が変更、置換、または交換されてその結果、抗原結合部位(可変領域)が異なるかまたは変更されたクラス、エフェクター機能および/もしくは種の定常領域、またはキメラ抗体に新たな特性を与える完全に異なる分子(例えば、酵素、毒素、ホルモン、増殖因子、薬物等)と結合した抗体分子であるか；あるいは(b)可変領域またはその一部が変更されるか、異なるかまたは変更された抗原特異性を有する可変領域で置換または交換された抗体分子である。

40

#### 【0048】

1つの実施形態では、上記抗体は、「エフェクター」部分と接合される。エフェクター部分は、放射性標識もしくは蛍光標識等の標識部分を含む任意数の分子か、または治療部分であり得る。1つの局面では、上記抗体は、タンパク質の活性を調節する。

#### 【0049】

抗体に「特異的に(または選択的に)結合する」またはタンパク質もしくはペプチドについて言及する際に「特異的に(または選択的に)免疫反応性である」という語句は、しばしば、タンパク質および他の生体物質(biologics)の不均一集団においてタ

50

ンパク質の存在を決定する結合反応を意味する。よって、指定された免疫アッセイ条件下において、特定された抗体が、バックグラウンドの少なくとも2倍で、より典型的には、バックグラウンドの10~100倍で特定のタンパク質と結合する。そのような条件下での抗体との特異結合には、その特定のタンパク質に対する特異性について選択された抗体が必要である。例えば、ポリクロナール抗体を選択することにより、選択した抗原には特異的に免疫反応性であるが、他のタンパク質には免疫反応性ではないポリクロナール抗体のみを得ることができる。この選択を、他の分子と交差反応する抗体を除外することにより達成してもよい。種々の免疫アッセイフォーマットを用いて、特定のタンパク質と特異的に免疫反応を示す抗体を選択してもよい。例えば、固相ELISA免疫アッセイを慣用的に用いて、タンパク質に特異的に免疫反応を示す抗体を選択する（特異免疫学的反応性を判定するために使用可能な免疫アッセイフォーマットおよび条件の記載に関しては、例えば、Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988)を参照されたい)。

10

#### 【0050】

##### 診断法および予後判定法

本発明は、野生型、切断型または選択的スプライス型を含む、唾液試料中のVEGF、CEA、およびEGFまたはそれらの組み合わせ等の癌抗原（タンパク質、または当該タンパク質をコードするRNAのいずれか）を検査することにより癌を診断する方法を提供する。診断は、患者において本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドのレベルを決定して、そのレベルと基準線または範囲とを比較することを伴う。典型的には、基準線値は、癌を患っていない健常人における本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに典型的な値であって、唾液または血清もしくは血液等の他の生物学的試料を用いて測定された値である。本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドのレベルの基準線範囲からの変動（上方または下方のいずれか）は、その患者が癌を有するか、または癌を発症する危険性があることを示す。

20

#### 【0051】

本明細書中において用いる「予後判定を与える」という用語は、転移、無病生存率、全生存率等の予測を含め、乳癌等の癌の考え得る経過および結果の予測を与えることをいう。これらの方法を用いて、例えば、癌がまだ早期の病期にあるか否か、または積極的療法の効果がない病期まで癌が進行しているかどうかを示すことにより癌治療に適した療法を案出することにも用いることができる。

30

#### 【0052】

アッセイにおいて抗体試薬を用いて、当業者に公知の多数の免疫アッセイのいずれかを用いて患者試料におけるVEGF、CEA、およびEGFの発現レベルを検出することができる。免疫アッセイ技術およびプロトコルは、PriceおよびNewman, "Principles and Practice of Immunoassay", 2nd Edition, Grove's Dictionaries, 1997; およびGosling, "Immunoassays: A Practical Approach", Oxford University Press, 2000において一般に記載されている。競合的免疫アッセイおよび非競合的免疫アッセイを含む種々の免疫アッセイ技術を用いることができる。例えば、Selfら, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 7: 60-65 (1996)を参照されたい。免疫検定という用語は、酵素増幅免疫測定法(EMIT)、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、IgM抗体捕捉ELISA(MACELISA)、および微粒子酵素免疫アッセイ(MEIA)等の酵素免疫アッセイ(EIA); キャピラリー電気泳動免疫アッセイ(CEIA); ラジオイムノアッセイ(RIA); イムノラジオメトリックアッセイ(IRMA); 蛍光偏光免疫アッセイ(FPIA); および化学発光アッセイ(CL)を含むがこれらに限定されない技術を含む。所望であれば、そのような免疫アッセイを自動化することができる。免疫アッセイをレーザー誘起蛍光法とともに用いることもできる。例えば、Schmalzingerら, *Electrophoresis*, 18: 2184-93 (1997); Bao,

40

50

J. Chromatogr. B. Biomed. Sci., 699: 463 - 80 (1997) を参照されたい。フローインジェクションリポソーム免疫アッセイおよびリポソーム免疫センサー等のリポソーム免疫アッセイも本発明での使用に適している。例えば、Rongenら、J. Immunol. Methods, 204: 105 - 133 (1997) を参照されたい。さらに、タンパク質/抗体複合体の形成により光散乱が増加し、それがマーカー濃度の関数としてピーク速度シグナルに変換される比濁アッセイは、本発明の方法での使用に適している。比濁アッセイは、Beckman Coulter (Brea, CA; Kit # 449430) により市販されており、Behring Nephelometer Analyzer (Finkler, J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 27: 261 - 276 (1989)) を用いて行うことができる。

10

**【0053】**

核酸への抗体の特異的免疫結合は、直接または間接的に検出することができる。直接標識は、抗体に付着させた、蛍光または発光タグ、金属、色素、放射性核種などを含む。ヨウ素-125 ( $^{125}\text{I}$ ) で標識した抗体を用いることができる。核酸に特異的な化学発光抗体を用いる化学発光アッセイは、タンパク質レベルの高感度非放射性検出に適している。蛍光色素で標識した抗体も適している。蛍光色素の例としては、DAPI、フルオレセイン、Hoechst 33258、R-フィコシアニン、B-フィコエリトリン、R-フィコエリトリン、ローダミン、Texas red、およびリサミンが挙げられるがこれらに限定されない。間接標識は、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)、アルカリホスファターゼ (AP)、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ等、当該分野で周知の種々の酵素を含む。例えば、450 nm で検出可能な過酸化水素の存在下で可溶性生成物を生じる発色性基質テトラメチルベンジジン (TMB) とともに西洋ワサビペルオキシダーゼ検出系を用いることができる。例えば、405 nm で容易に検出可能な可溶性生成物を生じる発色性基質 p-ニトロフェニルリン酸塩とともにアルカリホスファターゼ検出系を用いることができる。同様に、410 nm で検出可能な可溶性生成物を生じる発色性基質 o-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド (ONPG) とともに  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ検出系を用いることができる。尿素-プロモクレゾールパープル (Sigma Immunochemicals; St. Louis, MO) 等の基質とともにウレアーゼ検出系を用いることができる。

20

**【0054】**

直接標識または間接標識からのシグナルは、例えば、分光光度計を用いた発色性基質からの色検出； $^{125}\text{I}$  検出用線測定器等の放射線測定器を用いた放射線検出；または蛍光計を用いた特定の波長の光の下での蛍光発光検出により分析できる。酵素結合抗体の検出には、EMAX Microplate Reader (Molecular Devices; Menlo Park, CA) 等の分光光度計を製造者の指示に従って用いることにより定量分析を行うことができる。所望であれば、本発明のアッセイを自動化またはロボット制御することができ、複数の試料からのシグナルを同時に検出することができる。

30

**【0055】**

上記抗体は、磁性またはクロマトグラフィーマトリックス粒子等の種々の固形支持体、アッセイプレート (例えば、マイクロタイターウェル) の表面、棒、スポンジ、紙、ウェル等の物理的形態のいくつかの固形基材材料または膜 (例えば、プラスチック、ナイロン、紙) の上に固定することができる。1つの抗体または複数の抗体を固形担体上にアレイ状にコーティングすることによりアッセイストリップを調製することができる。次いで、このストリップを試験試料に浸漬し、洗浄および検出工程を介して素早く処理して、着色した点等の測定可能なシグナルを生成することができる。

40

**【0056】**

あるいは、プローブ、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドアレイ、およびプライマー等の核酸結合分子をアッセイに用いて、患者試料中の VEGF、CEA、および EGF の差次的 RNA 発現を検出することができる (例えば、RT-PCR)。1つの実施形

50

態では、RT-PCRは、当該分野で公知の標準的な方法に従って用いられる。別の実施形態では、例えば、Applied Biosystemsから入手可能なTaqman（登録商標）アッセイ等のPCRアッセイを用いて核酸およびそれらの改変体を検出することができる。他の実施形態では、qPCRおよび核酸マイクロアレイを用いて核酸を検出することができる。選択された癌バイオマーカーと結合する試薬は、当業者に公知の方法または市販購入した方法に従って調製することができる。

【0057】

サザン解析、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）またはマーカーコード配列の一部に相補的な核酸配列とのハイブリダイゼーション（例えば、スロットプロットハイブリダイゼーション）に基づく任意の別の方法等の慣用技術を用いて核酸の分析を行うことができ、そしてこれはまた本発明の範囲内にある。適用可能なPCR増幅技術は、例えば、AusubelらおよびInnisら（上記）に記載されている。一般的な核酸ハイブリダイゼーション法は、Anderson, "Nucleic Acid Hybridization", BIOS Scientific Publishers, 1999に記載されている。複数の核酸配列（例えば、ゲノムDNA、mRNA、またはcDNA）の増幅またはハイブリダイゼーションは、マイクロアレイに配置されたmRNAまたはcDNA配列から行うこともできる。マイクロアレイ法は、Hardiman, "Microarrays Methods and Applications: Nuts & Bolts", DNA Press, 2003; およびBaldinら, "DNA Microarrays and Gene Expression: From Experiments to Data Analysis and Modeling", Cambridge University Press, 2002に一般に記載されている。

10

20

【0058】

マイクロアレイ、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）に基づく分析、配列分析、および電気泳動分析を含むがこれらに限定されない当該分野で公知の技術を用いて核酸マーカーおよびそれらの改変体の分析を行うことができる。PCRに基づく分析の非限定的な例としては、Applied Biosystemsから入手可能なTaqman（登録商標）対立遺伝子識別アッセイが挙げられる。配列分析の非限定的な例としては、Maxam-Gilbert配列決定、Sanger配列決定、キャピラリーアレイDNA配列決定、熱サイクル配列決定（Searsら、Biotechniques, 13: 626-633 (1992)）、固相配列決定（Zimmermanら、Methods Mol. Cell Biol., 3: 39-42 (1992)）、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析等の質量分析を用いた配列決定（MALDI-TOF/MS; Fuら、Nat. Biotechnol., 16: 381-384 (1998)）、およびハイブリダイゼーションによる配列決定が挙げられる。Cheeら、Science, 274: 610-614 (1996); Drmanacら、Science, 260: 1649-1652 (1993); Drmanacら、Nat. Biotechnol., 16: 54-58 (1998)。電気泳動解析の非限定的な例としては、アガロースゲル電気泳動またはポリアクリルアミドゲル電気泳動等のスラブゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動、および変性勾配ゲル電気泳動が挙げられる。他の核酸改変体検出方法としては、例えば、Third Wave Technologies, Inc.からのINVAADER（登録商標）アッセイ、制限断片長多型（RFLP）分析、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、ヘテロ二本鎖移動度アッセイ、一本鎖コンホメーション多型（SSCP）分析、一本鎖ヌクレオチドプライマー伸長（SNUPE）およびパイロシーケンシングが挙げられる。

30

40

【0059】

本明細書中に記載のアッセイにおいて検出可能部分を用いることができる。必要な感度、抗体との結合の容易さ、安定性要件、および利用可能な機器類および廃棄条件に応じて標識を選択して、多種多様な検出可能部分を用いることができる。適切な検出可能部分と

50

しては、放射性核種、蛍光色素（例えば、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、Oregon Green（登録商標）、ローダミン、Texas red、テトラロージミンイソチオシアネート（tetrarhodimine isothiocynate）（TRITC）、Cy3、Cy5等）、蛍光マーカー（例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP）、フィコエリトリン等）、腫瘍関連プロテアーゼにより活性化される自己消光蛍光化合物（autoquenched fluorescent compounds）、酵素（例えば、ルシフェラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等）、ナノ粒子、ビオチン、ジゴキシゲニン等が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0060】

有用な物理フォーマットは、複数の異なるマーカーの検出のために複数の個別のアドレス可能位置を有する表面を含む。そのようなフォーマットとしては、マイクロアレイおよび特定のキャピラリーデバイスが挙げられる。例えば、Ngら、J. Cell Mol. Med., 6: 329-340 (2002); 米国特許第6,019,944号を参照されたい。これらの実施形態では、個別の表面位置の各々は、1つ以上の検出用マーカーを各位置に固定する抗体を含んでもよい。表面は、表面の個別の位置に固定された1つ以上の個別の粒子（例えば、マイクロ粒子またはナノ粒子）を代替的に含んでもよく、ここで、マイクロ粒子は、1つ以上の検出用マーカーを固定する抗体を含む。他の有用な物理フォーマットとしては、棒、ウェル、スポンジ等が挙げられる。

#### 【0061】

分析は各種物理フォーマットで行うことができる。例えば、マイクロタイタープレートの使用または自動化を用いて、多数の試験試料の処理を容易にすることができる。あるいは、単一の試料フォーマットを開発することにより時宜よく診断または予後判定を容易にすることができる。

#### 【0062】

あるいは、本発明の抗体または核酸プローブを顕微鏡用スライド上に固定した患者試料に適用することができる。結果得られた抗体染色またはインサイチューハイブリダイゼーションパターンは、当該分野で公知の種々の光または蛍光顕微鏡法のいずれか1つを用いて可視化することができる。

#### 【0063】

タンパク質または核酸の分析は、例えば、高圧液体クロマトグラフィ（HPLC）単独により、またはこれを質量分析（例えば、MALDI/MS、MALDI-TOF/MS、タンデムMS等）と組み合わせることによっても達成することができる。

#### 【0064】

組成、キットおよび統合システム

本発明は、本発明のポリペプチドまたは当該ポリヌクレオチドの核酸に特異的な抗体を用いて本明細書中に記載のアッセイを実施するための組成、キットおよび統合システムを提供する。

#### 【0065】

本発明の診断アッセイを実施するためのキットは、典型的には、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに特異的に結合する抗体または核酸配列を含むプローブ、ならびにプローブの存在を検出するための標識を含む。このキットは、本発明のポリペプチドをコードするいくつかの抗体またはポリヌクレオチド配列（例えば、VEGFを認識する抗体、CEAを認識する抗体、およびEGFを認識する抗体の混合物）を含んでもよい。

#### 【実施例】

#### 【0066】

以下の実施例は、本願発明を例示するために提供され、限定するために提供されるのではない。

#### 【0067】

（実施例1：唾液タンパク質因子は乳癌患者において増加する）

10

20

30

40

50

## 患者および方法

## 被験体

被験体の募集および試料採取を、University of California Los Angeles Medical CenterのInstitutional Review Boardのガイドラインの範囲で行った。癌グループについての算入基準は次のとおりであった：1) インフォームドコンセントを行うことが可能であること；2) 妊娠も授乳もしていないこと；3) 活発な口腔/歯髄疾患がないこと；4) 非メラノーマ皮膚癌、子宮頸内癌腫または腺腫等の良性腫瘍を除いて、非乳房悪性腫瘍を以前(2年以内)に有したことがないかまたは同時に有していないこと；および5) 乳癌と診断されていること。これらの患者は、腫瘍を摘出する確定的な手術前に登録された。対照被験体は、UCLAのデンタルセンターおよび医療センターの両方から募集した健康なボランティアであった。

10

## 【0068】

## 唾液採取

無刺激全唾液試料を予め確立されたプロトコル(7~8)を用いて採取した。被験体には、採取の少なくとも30分前は飲食も喫煙も口腔衛生手順もしないように求めた。口紅を拭き取り、被験体は口を水で一度ゆすいだ。典型的には、患者は、およそ5~10mlの唾液を提供した。次いで、試料を、4にて2,600gで15分間遠心分離した。次いで、上清を使用時まで-80で保管した。なお、1ulのアプロチニン、10ulのPMSF(フェニルメタンスルホニルフルオリド)および3ulのオルトバナジン酸ナトリウム(全てSigma, St. Louis, MOから入手)を含有するプロテアーゼ阻害剤混合物を1ml唾液試料の各々に添加した。

20

## 【0069】

## ELISA解析

酵素結合免疫アッセイ(ELISA)による唾液タンパク質の測定を製造者の指示に従って行った。VEGFおよびEGF用のELISAをR&D(Minneapolis, MN)から購入し、CEAをBiomedica Corp.(Foster City, CA)から購入した。最低検出可能レベルは次のとおりであった：VEGFについて9pg/ml、EGFについて0.7pg/ml、CEAについて1.5ng/ml。付属の試料希釈液を使用した希釈は次のとおりであって：VEGFについて1:8、EGFについて1:25、CEAについて1:4。シグナルをBIOTEKマイクロプレートリーダー(Winooski, VT)で読み取った。

30

## 【0070】

## データ解析

ペプチド発現レベルと乳癌との関連性を評価するために、唾液因子の平均値および標準偏差を各被験体群ごとに別々に算出し、ウィルコクソン検定により単純な群比較解析を行った。年齢、民族性、癌/正常グループを独立変数として構築した3つのペプチドの各々に関する回帰モデル等の、年齢および民族性の潜在的影響(結果は示さず)を考慮するために複数の回帰分析も行った。

40

## 【0071】

各ペプチドの予測力を評価するために、ペプチド発現を独立変数とし、癌/対照グループを従属変数とした単純なロジスティックモデルで受信者動作特性(ROC)曲線解析を行った。ロジスティック回帰モデルにおいて各種タンパク質の組み合わせが含まれることをテストするステップワイズ選択法から選択した最良なモデルでROC曲線解析を繰り返して行った。次いで、ROC曲線の数値積分により曲線下面積(AUC)を計算した。最大AUCを有する因子またはそれらの組み合わせが乳癌検出の最大予測力を有すると特定した。唾液増殖因子のテストをまた、感度(疾患を有すると検出された人の割合)および特異性(疾患を有さず陰性に見なされた人の割合)等の尺度を用いて評価した。

## 【0072】

## 結果

50

### 被験体の特徴

全ての被験体は女性であった。表1は、49人の対照被験体および49人の乳癌患者の特徴を要約している。健常対照群と癌被験体との間には喫煙、糖尿病、肝炎、およびHIVの状態について有意な差はなかった。対照群の平均年齢は乳癌患者よりも低かった(41.4 ± 12.4歳対54.8 ± 11.2歳、 $p < 0.0001$ )。人種も有意な因子であった( $p = 0.0116$ )。癌グループでは、4人は0期(DCIS - 原位置での管癌)しか有さなかった。42の浸潤性癌の症例のうち、次に示すように3例以外の全てが最終的な病理学的病期を有していた: 局所再発が1例、1期が14例、2期が14例、3期が7例(そのうち1例は、新補助化学療法後の唾液採取時に残存DCISがあっただけである)、および4期が3例。

10

#### 【0073】

##### 唾液タンパク質レベル

乳癌および対照グループにおけるVEGF、EGFおよびCEAに関する唾液レベルを表2に示す。ウィルコクソン検定は、乳癌患者と対照グループとの間において、これら3つの唾液タンパク質の各々の発現レベルに有意差があることを示す。複数回帰分析も年齢および民族性の影響を調整した後、これら3つの唾液タンパク質各々と癌との間に有意に明らかな関連性が残るという一貫した結果を示している。

#### 【0074】

各唾液タンパク質個々およびそれらの組み合わせの予測力を判断するために、我々はまず、ステップワイズモデル選択法により最良なロジスティック回帰モデルを見つけた。この方法は、VEGFタンパク質およびEGFタンパク質をともに含むロジスティックモデルがそのデータに最も適合することを明らかにした。次いで、表3の最良な組み合わせで各タンパク質を用いてロジスティックモデルについて別々にROC解析を行った。VEGF、EGF、およびCEAのAUCは、それぞれ、80%、77%、65%であった。感度および特異性は次のとおりであった: VEGFについて74%および73%、EGFについて78%および68%、CEAについて70%および56%。最良な組み合わせは、感度83%、特異性74%、AUC 84%の、唾液VEGF + EGFであった。対応するROC曲線を図1に示す。

20

#### 【0075】

##### 考察

ここで、我々は、健常対照被験体と比較して、乳癌患者の唾液中でVEGFおよびCEAのレベルが有意に上昇したことを最初に報告する。最も強力な血管新生因子VEGFは、以前に健常個体の唾液中で検出されている(9~10)。また、我々は、EGFレベルの上昇も観察しており、これはスペインのNavarroグループの発表とも一貫している(11)。米国では、Streckfusグループが、対照被験体に対して癌被験体の唾液中でHer-2およびCA15-3のレベルが上昇することを報告している(12~13)。25人の乳癌患者に関する別の研究は、唾液Her-2が治療前の値と治療後の値とで有意差を示すことを示した(14)。

30

#### 【0076】

唾液中で血管新生因子が増加するという知見は、血管新生の過程、すなわち、新たな血管の形成が乳房腫瘍の成長および転移において重要な役割を果たすという事実と一貫している(15)。多くの血管新生因子が同定されて配列決定されて以来、我々は、それらの因子のうちのいずれかのレベルが体液中で検出可能であるか、およびそれらのレベルが癌の診断およびモニタリングと何らかの臨床的関連性を有するのかをいち早く問いかけてきた(16~17)。これら血管新生分子は、腫瘍細胞自体により放出されるか(18)、または細胞外マトリックスから動員されるか、および/または腫瘍内に補充されるマクロファージ等の宿主細胞により放出されるかのいずれかである。我々の研究室および他の施設による研究により、血管新生因子が乳癌患者の血清および尿中で有意に増加し得ることが示された。特定の血管新生因子のレベルが腫瘍の疾患の病期と相関することが示された(19)。

40

50

## 【0077】

我々の研究は、NCI Early Detection Research Network (EDRN) により規定されるガイドラインに沿ったフェーズII検証研究 (phase II validation study) を構成する(20)。次のステップは、多数の新たな乳癌の症例および対照被験体を用いたフェーズIII盲検検出試験 (phase III blinded detection trial) を実施して、VEGF、EGFおよびCEAが確固としたものであるかを判定することにより予測して、対照群からの唾液を乳癌患者からの唾液から識別することである。

## 【0078】

## 【表1】

表1: 被験体の特徴

人数	健常対照	癌被験体	p
	49	49	
年齢平均 ± SD (歳)	41.4 ± 12.4	54.8 ± 11.2	< 0.0001 <sup>a</sup>
人種			0.0116 <sup>b</sup>
白人(ヒスパニック系を含む)	25 (51%)	39 (80%)	
黒人	11 (22%)	4 (8%)	
アジア人	13 (27%)	6 (12%)	
喫煙			
糖尿病			
肝炎			
HIV			

<sup>a</sup>ウィルコクソン検定, <sup>b</sup>χ<sup>2</sup>二乗検定.

## 【0079】

## 【表2】

表2: 各唾液ペプチドについてのウィルコクソン検定(平均±SD)

	健常対照	癌被験体	p
VEGF	2.1 ± 1.2	3.7 ± 1.6	<.0001
EGF	2.1 ± 1.3	3.7 ± 1.7	<.0001
CEA	66.1 ± 27.1	83.0 ± 31.0	0.0106

## 【0080】

## 【表3】

表3: ROC 曲線解析

	AUC (%)	感度 (%)	特異性 (%)
VEGF	80	74	73
EGF	77	78	68
CEA	65	70	56
VEGF+EGF	84	83	74

10

20

30

40

50

【 0 0 8 1 】

【 表 4 - 1 】

参考文献

1) Wood WC, Muss HB, Solin LJ, Olopade OI. Malignant tumors of the breast. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenbert SA, editors. *Cancer: principles & practice of oncology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 1415-77.

2) Cheung KL, Graves CR, Robertson JF. Tumour marker measurements in the diagnosis and monitoring of breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2000; 26:91-102. 10

3) Posadas EM, Simpkins F, Liotta LA, MacDonald C, Kohn EC. Proteomic analysis for the early detection and rational treatment of cancer- realistic hope? *Ann Oncol* 2005;16:16-22.

4) Anker P, Mulcahy H, Stroun M. Circulating nucleic acids in plasma and serum as a noninvasive investigation for cancer: time for large-scale clinical studies? *Int J Cancer* 2003;103: 149-52. 20

5) Kabbinavar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L, et al. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:60-5.

6) Byrne BJ, Garst J. Epidermal growth factor receptor inhibitors and their role in non-small-cell lung cancer. *Curr Oncol Rep* 2005;7:241-7.

7) Li Y, St. John MAR, Zhou X, et al. Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection. *Clin Cancer Res* 2004;10:8442-50. 30

8) Navazesh M. Methods for collecting saliva. *Ann N Y Acad Sci* 1993;694:72-7.

9) Pammer J, Weninger W, Mildner M, Burian M, Wojta J, Tschachler E. Vascular endothelial growth factor is constitutively expressed in normal human salivary glands and is secreted in the saliva of healthy individuals. *J Path* 1998;186:186-91.

10) Taichman NS, Cruchley AT, Fletcher LM, et al. Vascular endothelial growth factor in normal human salivary glands and saliva: a possible role in the maintenance of mucosal homeostasis. *Lab Invest* 1998;78:869-75. 40

11) Navarro MA, Mesia R, Diez-Gilbert O, Rueda An, Ojeda B, Alonso MC. Epidermal growth factor in plasma and saliva of patients with active breast cancer and breast

【 0 0 8 2 】

## 【表 4 - 2】

cancer patients in follow-up compared with healthy women. *Breast Cancer Res Treatm* 1997;42:83-6.

12) Streckfus C, Bigler L, Tucci M, Thigpen JT. A preliminary study of CA15-3, c-erbB-2, epidermal growth factor receptor, cathepsin-D, and p53 in saliva among women with breast carcinoma. *Cancer Inv* 2000;18:101-9.

13) Streckfus C, Bigler L, Dellinger T, Dai X, Kingman A, Thigpen JT. The presence of soluble c-erbB-2 in saliva and serum among women with breast carcinoma: A preliminary study. *Clin Cancer Res* 2000;6:1363-70. 10

14) Bigler LR, Streckfus CF, Copeland L, et al. The potential use of saliva to detect recurrence of disease in women with breast carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2002;31:421-31.

15) Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002;29:15-8. 20

16) Nguyen M, Watanabe H, Budson A, Richie J, Hayes D, Folkman J. Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in the urine of patients with a wide spectrum of cancers. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:356-61.

17) Liu Y, Wang JL, Chang H, Barsky SH, Nguyen M. Breast cancer diagnosis with nipple fluid bFGF. *Lancet* 2000;356:567.

18) Soutter A, Nguyen M, Watanabe H, Folkman J. Basic fibroblast growth factor secreted by an animal tumor is detectable in urine. *Cancer Res* 1993;53:5297-9. 30

19) Nguyen M. Angiogenic factors as tumor markers. *Invest New Drug* 1997;15:29-37.

20) Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, et al. Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1054-61.

## 21) PCT/US2005/005263

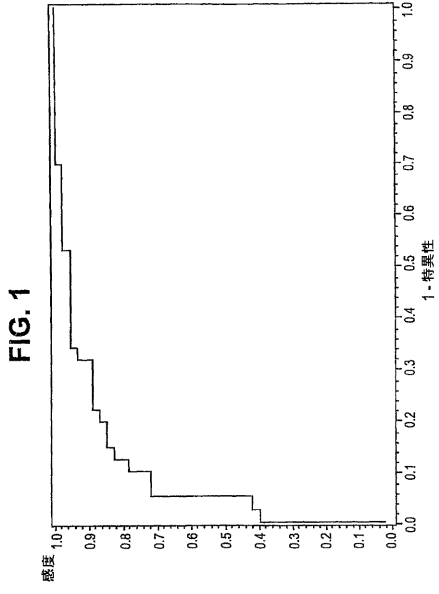
本明細書中に記載の実施例および実施形態は例示のみを目的とするものであり、それらに関する各種修正または変更は当業者には示唆されており、本願の精神および範囲ならびに添付の請求の範囲に含まれることが理解されるべきである。本明細書中に引用されるあらゆる刊行物、特許、および特許出願の全てを、あらゆる目的のために本明細書中において参考として援用する。 40

【図面の簡単な説明】

【0083】

【図1】対照被験体および乳癌患者由来の検体における唾液の V E G F 値および E G F 値の R O C 曲線。R O C 曲線下面積 8 4 %。

【 図 1 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US06/36005

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C12Q 1/68; G01N 33/574 (2007.01) USPC - 435/6; 435/7.23 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) 435/6 and 435/7.23  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched 436/64, 501, 813; 435/7.1, 7.92  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) USPTO (PGPUB, USPT, EPAB, JPAB), Google Scholar. Search Terms used: saliva, diagnosis, cancer, VEGF, CEA, and EGF.		
<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	US 20040241653 A1 (FEINSTEIN et al.) 2 December 2004 (02.12.2004), para [0007]-[0009], [0029], [0033], [0041], [0049], [0072], [0073], [0079], [0093], [0138], [0142], [0159], [0160], and [0188]-[0205].	1-31
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s), or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 March 2007 (19.03.2007)		Date of mailing of the international search report 29 MAY 2007
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

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

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	G 0 1 N 33/48	P
	G 0 1 N 33/53	Y
	C 1 2 N 15/00	A

(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, LV, 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, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72) 発明者 ワン, デイビッド. ティー. ダブリュー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 2 1 1, ビバリー ヒルズ, エス. クラーク ドライブ 1 2 0

(72) 発明者 ブルックス, マイ ゲエン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 3 6 2, ウエストレーク ピレッジ, ロイヤル ピスタコート 5 0 2 1

F ターム(参考) 2G041 CA01 DA04 FA12 GA06 LA07

2G045 CB07 DA13 DA36 FA11 FB02 FB03

4B024 AA12 CA11

4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ52 QR08 QR55 QR62 QS33 QS34

专利名称(译)	用于乳腺癌检测的唾液蛋白和RNA		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009510395A</a>	公开(公告)日	2009-03-12
申请号	JP2008531352	申请日	2006-09-14
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	加州大学董事会		
[标]发明人	ワンデイビッドティーダブリュー ブルックスマイグエン		
发明人	ワン, デイビッド. ティー. ダブリュー. ブルックス, マイグエン		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 C12Q1/68 G01N27/62 G01N33/48 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/57415 G01N33/57473 G01N33/57496 G01N2333/475 G01N2333/485 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/53.M C12Q1/68.A G01N27/62.V G01N33/53.D G01N33/48.P G01N33/53.Y C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/DA04 2G041/FA12 2G041/GA06 2G041/LA07 2G045/CB07 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA12 4B024/CA11 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS33 4B063/QS34		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/717154 2005-09-14 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明首次鉴定了唾液蛋白和RNA因子，其在乳腺癌中增加。因此，本发明提供了乳腺癌的诊断方法和通过检查唾液中的癌抗原（蛋白质和RNA）进行预后确定的方法。例如，在受试者中的乳腺癌诊断的方法，该方法包括，（a）中特定VEGF，CEA，和EGF的核酸，以及VEGF，CEA，和标记的EGF从选自的多肽的使用测定分析来自所述受试者的唾液样品以进行检测；并且（b）确定标记物是否在样品中过表达，从而提供乳腺癌的诊断。

